

莲雾乙烯受体基因保守序列的克隆及分析

韩继成¹, 冯志红², 方宣钧³

(1. 河北省农林科学院昌黎果树研究所, 河北 昌黎 066600; 2. 河北职业技术师范学院,
河北 昌黎 066600; 3. 海南省热带作物资源研究利用开发研究所, 海南 三亚 572025)

摘要: 用莲雾的叶片提取基因组 DNA 作为模板, 根据乙烯受体基因的保守序列设计引物, 进行 PCR 扩增, 得到长度约 1.5 kb 的目的片段, 将其克隆到 pGEM T-easy 载体转化大肠杆菌, 提取质粒, 进行限制性内切酶图谱分析及序列测定。结果表明, 该目的片段全长为 1400 bp, 与栽培稻(*Oryza sativa*) 的 osers 基因组 DNA 可比对序列的一致性为 98.68%。在所应用的 12 个内切酶中, 该片段内部没有切点, 根据序列特征和与其他乙烯受体基因序列比较, 推测该片段有 2 个内含子和 3 个外显子片段组成, 外显子总长为 972 bp, 编码 324 个氨基酸, 其中第 197~324 氨基酸残基与组氨酸蛋白激酶的磷酸基团接受域有同源性。

关键词: 莲雾; 乙烯受体基因; 序列分析

中图分类号: S68.01 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2003)院庆专辑-0056-03

The Cloning and Analysis of the Conserved Sequence of Ethylene Receptor Gene in Wax Apple

HAN Ji-cheng¹, FENG Zhi-hong², FANG Xuan-jun³

(1. Changli Institute of Pomology, Hebei Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Changli 066600, China; 2. Hebei Vocation-Technical Teachers College, Changli 066600, China; 3. Hainan Provincial Institute of Tropical Agricultural Resource, Sanya 572025, China)

Abstract: A ethylene receptor protein gene fragment of about 1.5 kb was obtained by PCR amplifying from the genomic DNA of wax apple (*Syzygium samarangense*) leaves using a pair of primers designed according to the conserved sequence of ethylene receptor protein gene. This fragment was linked into the pGEM T-easy vector, then transformed the *E. coli* DH5 α . This fragment was analyzed by restriction enzyme mapping and sequenced. The result revealed that the length of this fragment was 1400 bp contained two introns and three exons. The whole length of exon was 974 bp, coding 324 amino acids. Sequence compared analysis suggested that this fragment was most similar to the sequence of rice (*Oryza sativa*) ethylene receptor gene (osers), the identity was 98.68%.

Key words: Wax apple; Ethylene receptor gene; Sequence analysis

莲雾 (*Syzygium samarangense*) 属桃金娘科 (*Myrtaceae*) 赤楠属的热带常绿果树。果实呈倒圆锥形, 果面有腊质光泽, 呈深红、淡红、粉红、青绿和乳白等色, 成熟期从 11 月至翌年 4 月。莲雾果实作为一种特色、优质水果在海南岛已成为较常见的热带水果。

乙烯不仅调节植物叶片、果实和花卉的成熟、衰老或脱落, 而且在植物对环境刺激, 尤其是病害防卫方面亦有重要作用。植物感觉乙烯以及乙烯信号转导的初始物质是乙烯受体^[1-3]。国外已进行了大量研究, 但莲雾的乙烯受体基因的克隆及分析国内外尚无这方面的报道。因此我们根据乙烯受体基因的

收稿日期: 2003-07-08

作者简介: 韩继成(1969-), 男, 河北昌黎人, 助理研究员, 理学硕士, 主要从事果树分子标记、功能基因克隆和遗传转化的研究工作。

保守区段设计了一对引物从莲雾的基因组 DNA 中克隆了乙烯受体基因的保守片断, 以期进行莲雾果实发育及采后保鲜储藏等方面的研究。

1 材料和方法

1.1 植物材料

莲雾的叶片取自海南省热带作物资源开发与利用研究所。

1.2 方法

1.2.1 基因组 DNA 提取 应用棉花基因组 DNA 提取方法^[3]进行, 首先在液氮中磨碎样品, 按 1:5 加入 DNA 提取缓冲液抽提细胞, 离心倒掉上清后, 去除可溶性杂质, 再加细胞核裂解缓冲液, 提取基因组 DNA。

1.2.2 目的片段的获得 根据 GenBank 已登录的乙烯受体基因(ousers)的保守区段设计一对引物。正向引物为: 5'-ACT CAT GAA ATC AGA AGC AC-3'; 反向引物为: 5'-AAC TTA ACA GCA TTG CCA G-3'。在 25 μ L 反应体系中, 加入 10 \times PCR 反应缓冲液 2.5 μ L, dNTP 0.2 μ L (各 25 mmol/L), Taq DNA 聚合酶 0.2 μ L (5 U/ μ L), 两端引物各 1 μ L, 模版 1 μ L, 加水至 25 μ L。反应条件为首先 92 $^{\circ}$ C 变性 5 min, 然后 92 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 60 $^{\circ}$ C 退火 90 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 120 s, 循环 30 次, 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 120 s。

1.2.3 PCR 扩增产物的克隆 PCR 反应体系的扩增产物在 0.8% 琼脂糖胶上进行电泳, 100 V 电泳 2 h 后将胶转入 EB 中浸泡 30 min, 然后在紫外灯下观察并用 QIAGEN 试剂盒回收。回收的 PCR 产物与 pTEM T-easy vector 连接。连接片段的转化及筛选参照《分子克隆实验指南(第二版)》^[1]。

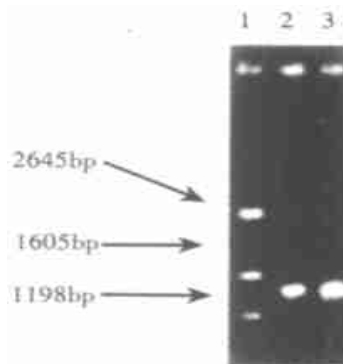
本试验采用的载体系统为蓝-白斑筛选系统。来自基因组 DNA 的克隆系统中随机挑取共约 6 个形状饱满的白色克隆作为初选对象。质粒的提取按《分子克隆实验指南(第二版)》的质粒小量制备的碱裂解法^[4]进行。用 EcoRI 酶切确认克隆是否含有目的片段。选取带目的片段的克隆由上海生工生物有限公司进行测序, 测序以 SP6/T7 为引物。所用测序仪器为 ABI PRISM 377-96, 测序试剂为 BigDye terminator V2.0。

2 结果与分析

2.1 目的片段的获得

利用棉花基因组 DNA 提取方法, 获得了高质量的基因组 DNA, 以此为模版利用设计的一对引物

进行 PCR 扩增, 经 0.8% 琼脂糖电泳得到一条约 1.5 kb 扩增片段(图 1)。



1. PGEM marker; 2, 3 为扩增片段

图 1 莲雾基因组 DNA 乙烯受体基因扩增结果

2.2 目的片段的克隆和重组子筛选

PCR 产物经 0.8% 琼脂糖电泳后在紫外灯下切取带有目的片段的琼脂糖条, 回收、连接克隆到 pGEM T-easy 载体上, 转化大肠杆菌, 随机挑取 6 个白色菌落, 对其中的一个克隆进行酶切鉴定。考虑到已克隆的乙烯受体基因内部有一个 EcoRI 酶切位点, 进行酶切鉴定时, 分别用 EcoRI 和 PstI 进行切割, 因为该载体的目的片段连接两端有两个 EcoRI 和 PstI 切点, 用这两个内切酶进行切割时, 可得到目的片段和载体两个片段。根据酶切图谱, 从所挑取的白色菌落中提取的质粒内含有相应的目的片段, 并且所获片段内部没有这两个酶的切点。

2.3 目的片段的限制性内切酶酶切分析

用 Ball, BamHI, DraI, EcoRI, EcoRV, HindIII, NcoI, NotI, PstI, SalI, SmaI 和 XhoI 等 12 个限制性内切酶直接对重组质粒进行酶切分析, 经分析所获得的目的片段内部没有这些酶的切点。

2.4 目的片段的全序列测定

对经过酶切和 PCR 鉴定的克隆进行全序列测定, 结果表明该片段全长为 1 400 bp, 如图 2 所示。根据序列特征和与其他乙烯受体基因序列比较, 推测该片段由两个内含子和 3 个外显子片段组成, 外显子总长为 972 bp, 编码 324 个氨基酸, 其中第 197~324 氨基酸残基与组氨酸蛋白激酶的磷酸基团接受域有同源性(图 3)。经同源性分析, 与两个栽培稻的 ERS 基因 mRNA 相应序列同源性分别达到 98.68% 和 71.05%。初步确定所获目的片段为乙烯受体基因。

1 ACTCATGAAATCAGAAGCACTCTTGATAGACATACGATTTTGAAGACTACACTTGTTGAG
61 CTAGGAGGGACCTTGGGCTGGAAGAATGTGCCCTATGGATGCCATCAAGAAGTGGTTCA
121 A GTCTTCAGCTTTCTCATACTCTCCGCCACCAGATTACTGTTGGGTCAACTGTATCAATT
181 A ATCTTCCTGTTGTCAATCAAGTGTTCAGTAGCAACAGAGCAATTATAATACCCACACA
241 T CTCCTTTGGCACGGATCCGACCTCTTGCGAGGAGATATGTTCCACCAGAAGTGGCTGCA
301 G TCGAGATTCTCTTCTACATCTTTCAAACCTTTCAAATAAATGATTGGCCAGAGCTTTCA
361 GCAAAGAGCTATGCAATCATGGTTCTGATGCTTCCATCTGATAGCGCAAGAAAATGGCAT
421 GTGCATGAGTTGGAGCTTGTGAGGTCGTGGCTGATCAGGTTAGTGCTGTTTCTTTTGCT
481 A TGGTTACTTATAACATGGGTATTTATAGGAGAGAGAGCGTGATATTTAATATGTTTCAA
541 A AGCTGTGTGCTCATGATCTTTCAATCAATAGACAACAGTCACCAATTAACCTAAAACAA
601 CACATATTCCAACTATGATCTGTTGATCAATGATTCATGGAAAATTTCAAATATCATT
661 TATTATTCCAAGAGTTTCCCTTTTTTTTTTTTGA AAAACAAGGATACTGAGAAGCAGCAA
721 G CAAGCTAAAAGTGCCCTCTTTACTTTTTTATACCTTAGTTTATATTCATAAATATGAAT
781 GAGGCAGTATTGTAAGCAAGTTTTTTTTAATCATCTTCTCTTTTATTTTCGGGTTGCAGTT
841 G CACTTTCTCATGCAGCTATTCTTGAAGAGTCCATGCGTGCGCTGATCTGCTAATGGAG
901 CAAAATGTTGCTCTGGATTTAGCTCGACGTGAGGCTGAAATGGCTATCCGTGCTCGTAAT
961 GATTTCTGGCTGTTATGAATCATGAAATGAGAACACCAATGAATGCAATAATAGCCCTT
1021 T CGTCCTTACTTTTTGGAACCGAAGCTTACTCCTGAGCAGCGCTTGATGGTGGAACAGTC
1081 T TGAAAAGCAGCAATCTTTTAGCAACACTCATCAATGATGTGTTAGATCTTTCCAACTT
1141 GAGGATGGTAGCCTTGAATTGGAGATTAAAGCATTCAATCTTCATGCTGTTTTCAAGGAG
1201 GTCTGAAGCTCTGAACTTCATCATTTGTGGTTGTTAATGACTAAATATGCAAATTGCAC
1261 T TGCTGAAATTTTACTTCGTCTTACTCTTACAGGTAATGAGTTTCATCAAGCCAATCGC
1321 A GCCATCAAGAGACTGTCTGTGCCAGTTATGTTGGCACCAGACTTGCCATTATGTGCCAT
1381 CGGTGATGAAAAGAGGCTAATGCAAATATTTTGAATATCTCTGGCAATGCTGTTAAGTT

图 2 莲雾基因组 DNA 乙烯受体基因序列

Query:196 NDFLAVMNHEMRTPMNAIALSSLLLETEL TPEQRLMVETVLKSSNLLATLINDVLDLSK 255
Sbjct: 3 REFLANLSHELRTPLTAIRGYLELLDTELSEEQREYLETILREAERLLRLINDLLDSR 62
Query:256 LEDG 259
Sbjct: 63 IEAG 66

图 3 推定的莲雾乙烯受体基因氨基酸序列的保守性分析

3 讨论

大量的试验结果表明,激素的生理作用不仅决定于它在一定组织、器官中存在的浓度,而且更可能决定于某个植物组织对激素的敏感性。这种不同的敏感性来源于激素的作用机制:激素在植物体内必须首先与细胞膜上或细胞质内的受体结合,将受体蛋白激活,激活了的受体将引起某些特定的生化反应,最终导致激素诱导的基因表达。由于受体数目、受体与激素的亲及植物反应能力的不同就导致了敏感性的不同^[5]。

乙烯受体广泛存在于各类农作物中,在结构、特别是功能上有很大的保守性。我们根据乙烯受体基因的保守区段设计的一对引物从莲雾基因组 DNA 中扩增出一部分序列,与栽培稻^[9]可比对序列的相似性为 98.68%。

由于目前所获得的目的片段不是全长基因,尚不能进行功能分析,仅根据其同源性初步确定是乙烯受体基因的同源片段。为进一步确定该片段是乙烯受体基因,需要通过 5' RACE 及 RT-PCR 途径获得该基因的全部序列,然后进行结构和功能分析和进行莲雾果实发育及采后保鲜储藏等方面的研究。

参考文献:

- [1] Hajime Sakai, Jian Hua, Qianhong G, *et al.* ET R2 is an ETR1-like gene involved in ethylene signaling in Arabidopsis[J]. Plant Biology, 1998, 95: 5812-5817.
- [2] Jian Hua, Hajime Sakai, Nourizadeh, *et al.* EIN4 and ERS2 are members of the putative ethylene receptor gene family in Arabidopsis[J]. The Plant Cell, 1998, 10: 1321-1332.
- [3] Paterson A H, Brubaker C L, Wendel J F. A rapid method for extraction of cotton(*Gossypium spp.*) genomic DNA suitable for RFLP or PCR analysis[J]. Plant Molecular Biology Reporter, 1993, 11(2): 122-127.
- [4] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T, Molecular Cloning: A Laboratory Manual[M]. 北京: 科学出版社, 1999. 19-56.
- [5] 季 兰, 杨仁崔. 水稻茎伸长生长与植物激素[J]. 植物学通报, 2002, 19(1): 109-115.
- [6] Yau C P, Yip W K. Nucleotide sequence of a full-length cDNA encoding an ethylene receptor from rice[J]. Plant Physiol, 1997, 115: 315.