

文章编号: 1001-411X(2001)03-0043-04

毛叶枣 APETALA1 同源基因的克隆

胡桂兵^{1,2}, 徐昌杰¹, 陈大成², 郑启发², 安新民¹, 张上隆¹

(1 浙江大学园艺系, 浙江 杭州 310029; 2 华南农业大学园艺系, 广东 广州 510642)

摘要: 分析在植物花分生组织及花器官形成过程中起重要作用的 APETALA1 (AP1) 基因的保守区序列, 设计 1 对长度为 23 bp 的 PCR 引物, 以毛叶枣基因组 DNA 为模板, 采用 PCR 方法扩增出长为 648 bp 的 DNA 片段, 克隆入 pUCm-T 载体, 测序和序列分析结果表明获得了毛叶枣 AP1 同源基因中部的 1 个片段, 该片段有 2 个内含子, 长度分别为 152 bp 和 386 bp, 编码区共编码 36 个氨基酸, 其序列已在 GenBank 中登记(登记号为 AF356541)。在 GenBank 中进行同源性检索, 结果表明其氨基酸序列与其他植物 AP1 同源基因的氨基酸序列同源性高达 66%~88%, 推测它们在功能上也是相似的。

关键词: 毛叶枣; AP1 基因; PCR; 分子克隆

中图分类号: Q943; S665

文献标识码: A

毛叶枣 (*Zizyphus mauritianan* lam.), 亦称印度枣、台湾青枣, 为鼠李科枣属的常绿木本果树^[1]。毛叶枣童期特别短, 无论是实生苗还是嫁接苗, 均可在种植的当年开花、结果^[2], 这一特性在众多木本果树中是罕见的, 因此是研究童期形成机理理想的材料。木本植物童期的研究, 长期以来基本上集中在形态学、生理生化基础、环境因子和栽培技术措施对实生苗开花的影响等方面, 虽积累了大量有用的资料^[3], 但目前对木本植物童期形成的内部机理还不是很清楚。80 年代末以来, 对拟南芥等模式植物开花的分子机制及其遗传控制研究取得了巨大的突破, 为果树学科中类似的研究提供了许多可以借鉴的信息和手段。在拟南芥等模式植物上的研究发现, APETALA1 (AP1) 基因是一个影响花分生组织特征的因子, 在特化花分生组织特征上具有重要作用, 同时, 它也是萼片和花瓣等花器官正常发育的必需因子^[4~9]。有鉴于此, 笔者以毛叶枣栽培品种“高朗 1 号”的幼叶为试验材料, 提取其基因组 DNA, 用 PCR 扩增的方法进行了 AP1 同源基因的分子克隆研究, 期望能从分子水平上揭示木本果树的童期本质。本文报道的是笔者在初步研究^[7]基础上, 进一步研究取得的结果。

1 材料与方法

1.1 材料

在华南农业大学园艺系果树育种分场毛叶枣品种园采取台湾青枣‘高朗 1 号’幼嫩的叶片, 用改良的 CTAB 法^[8]提取并纯化其 DNA 作为模板。在比较

其他物种上已克隆的 APETALA1 (AP1) 序列的保守区后设计 1 对长度均为 23 bp 的特异引物并委托上海生工公司合成, 上游引物 A: 5'-GCAGCAGCTTGAT-ACTACTCTTA-3'; 下游引物: 5'-GTTTGTCTCCTG-TATTGCCTTCT-3'。10×PCR 缓冲液、DL2000 DNA 分子标准、Taq 酶、dNTP 均购自 TaKaRa 公司, 其他试剂均为分析纯试剂。

1.2 PCR 扩增方法

反应体系为: 10×PCR 缓冲液(不含 Mg²⁺) 5.0 μL, MgCl₂ (25 mmol/L) 4.0 μL, dNTP 混合物(各自 2.5 mmol/L) 4.0 μL, 上游引物(10 μmol/L) 1.0 μL, 下游引物(10 μmol/L) 1.0 μL, 模板 DNA 1.0 μL, Taq 酶(5 个活性单位/μL) 0.5 μL, 加灭菌双蒸水至总体积 50 μL。扩增参数为: 94℃变性 5 min 后, 按 94℃, 40 s; 51℃, 60 s; 71.5℃, 90 s 进行 30 个循环。

1.3 DNA 片段重组入质粒载体

回收凝胶中的 PCR 产物, 纯化后与 pUCm-T 载体连接, 连接产物转化大肠杆菌 TG1 菌株感受态细胞, 通过蓝白斑筛选、质粒长度和酶切鉴定获得重组质粒^[9]。

1.4 DNA 序列测定及分析

采用双脱氧终止法用 PE 公司 377 型自动测序仪测定重组质粒 DNA 序列, 按 ABI PRISM™染料终止循环试剂盒提供的测序操作手册进行。所得的序列通过 GeneBank 上同源基因序列的比较分析后, 把编码区翻译成氨基酸序列, 用 BLAST 软件进行氨基酸序列同源性比较。

收稿日期: 2001-03-12

作者简介: 胡桂兵(1969-), 男, 讲师, 浙江大学 2001 级春季在职博士生。

基金项目: 华南农业大学陈励文基金资助项目(5300-k99047)

2 结果与分析

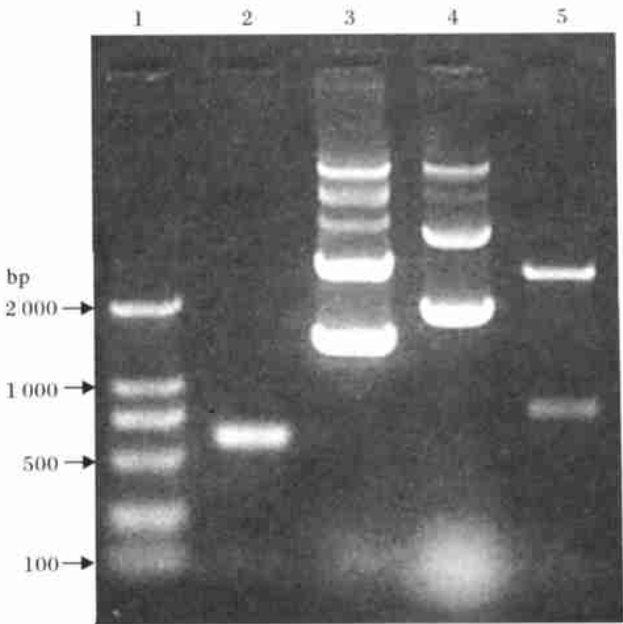
2.1 PCR 产物的扩增和克隆

以毛叶枣基因组 DNA 为模板, 所设计的 1 对引物进行 PCR 反应, 得到长度为 648 bp 的条带。将经回收、纯化后的 PCR 产物与 pUCm-T 载体连接, 连接产物转化大肠杆菌 TG1 菌株感受态细胞, 在含氨苄青霉素、X-gal 及 IPTG 的 LB 平板上涂布获得白色菌落, 挑取这些菌落培养、提取质粒, 经长度和酶切 (*EcoR* I 和 *Hind* III) 鉴定获得重组质粒 (图 1)。

2.2 基因序列与同源性分析

测定重组质粒的序列, 并在 GenBank 中进行同源性搜索, 结果表明获得了 AP1 同源基因中部的 1 个片段, 称之为 ZM-AP1。ZM-AP1 片段长 648 bp, 编码 36 个氨基酸, 有 2 个内含子, 1 个为 152 bp, 另 1 个为 386 bp (图 2), 其序列已在 GenBank 中登记 (登记号 AF356541)。ZM-AP1 片段拼接位点的位置与其他植物 AP1 同源基因完全一致, 但内含子长度相互间差异很大。

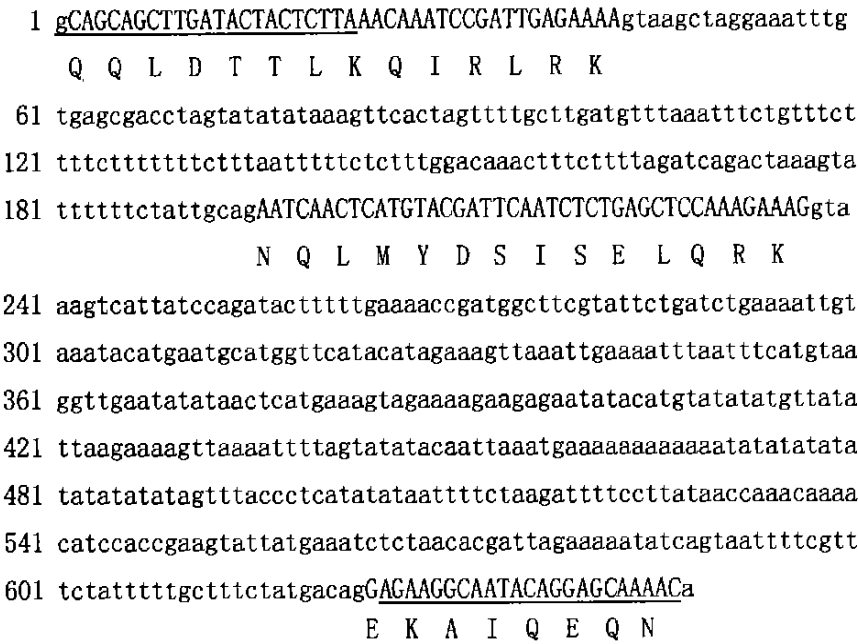
用 Blast 工具软件在 GenBank 中进行氨基酸序列同源搜索, 结果如表 1 所示。从表中可以看出, 所克隆出的片段与其他植物的 AP1 同源基因的同源性达到 66%~88%, 同源性最高的为白芥 (*Sinapis alba*) 及芸薹属的花椰菜 (*Brassica oleracea* var. *botrytis*)、卷心菜 (*Brassica oleracea* var. *capitata*)、球茎甘蓝 (*Brassica oleracea* var. *gongylodes*)、青花菜 (*Brassica oleracea*



1. DL2000 marker 2. PCR 产物 3. pUC19 质粒
4. 重组质粒 5. 重组质粒 *EcoR* I 和 *Hind* III 双酶切产物
1. DL2000 marker 2. PCR product 3. pUC19 4. Recombinant plasmid
5. Recombinant plasmid digested with *EcoR* I and *Hind* III

图 1 PCR 扩增片段重组入 pUCm-T
Fig. 1 Cloning of amplified fragment into pUCm-T

var. *italica*)、羽衣甘蓝 (*Brassica oleracea* var. *acephala*) 等植物, 达 88%; 最低为大麦 (*Hordeum vulgare*)、普通小麦 (*Triticum aestivum*) 等禾本科的植物, 但也有 66% 的同源性。说明所克隆的基因片段确实为 AP1 同源基因片段。



(大写黑体字母表示的区域是编码区, 划线部分为引物序列 The open reading frame is shown by black capital letters and sequences homologous to the oligonucleotide primers used for PCR amplification are underlined)

图 2 ZM-AP1 核苷酸序列及推导的氨基酸序列

Fig. 2 Nucleotide and deduced amino acid sequence of ZM-AP1

表 1 一些植物 AP1 同源基因氨基酸序列同源性比较

Tab. 1 Alignment of amino acid sequences of AP1 from some plants

基因 gene	GeneBank 登记号 accession number	同源性 alignment/ %	植物种类 species
ZM-AP1	AF356541		毛叶枣(<i>Zizyphus mauritiana</i>)
MADS C-2 protein	AF109403	88	白芥(<i>Sinapis alba</i>)
Floral homeotic protein	AF126723	88	花椰菜(<i>Brassica oleracea</i> var. <i>botrytis</i>)
Floral homeotic protein	AF126724	88	卷心菜(<i>Brassica oleracea</i> var. <i>capitata</i>)
Floral homeotic protein	AF126725	88	球茎甘蓝(<i>Brassica oleracea</i> var. <i>gongylodes</i>)
Floral homeotic protein	AF126726	88	青花菜(<i>Brassica oleracea</i> var. <i>italica</i>)
Floral homeotic protein	AF126734	88	羽衣甘蓝(<i>Brassica oleracea</i> var. <i>acephala</i>)
Homeotic protein boiAP1	U67451	86	甘蓝(<i>Brassica oleracea</i>)
SQUA	X63701	86	金鱼草(<i>Antirrhinum majus</i>)
BOAP1	Z37968	86	甘蓝(<i>Brassica oleracea</i>)
Saap1	X81480	86	白芥(<i>Sinapis alba</i>)
AP1	Z16421	83	拟南芥(<i>Arabidopsis thaliana</i>)
APETALA1 gene	AC008262	83	拟南芥(<i>Arabidopsis thaliana</i>)
MADS3 protein	X99653	80	欧洲白桦(<i>Betula pendula</i>)
MADS5 protein	X99655	80	欧洲白桦(<i>Betula pendula</i>)
Floral binding protein	AF176783	77	碧冬茄(<i>Petunia hybrida</i>)
MADS-box protein MADS5	AF068724	77	烟草(<i>Nicotiana tabacum</i>)
NAP1-2	AF009127	77	烟草(<i>Nicotiana tabacum</i>)
MADS box protein	AF130118	75	辣椒(<i>Capsicum annuum</i>)
transcription factor NTSQUA15	U63162	75	烟草(<i>Nicotiana tabacum</i>)
MADS box transcription factor	AF176782	72	碧冬茄(<i>Petunia hybrida</i>)
NAP1-1	AF009126	71	烟草(<i>Nicotiana tabacum</i>)
SLM4	X80491	69	蝇子草(<i>Silene latifolia</i>)
MADS-box protein 5	AJ249144	66	大麦(<i>Hordeum vulgare</i>)
MADS-box protein 3	AJ249143	66	大麦(<i>Hordeum vulgare</i>)
MADS box transcription factor	AB007504	66	小麦(<i>Triticum aestivum</i>)

3 讨论

本研究中, 笔者从毛叶枣基因组 DNA 中分离出了 AP1 同源基因中部的 1 个片段, 序列分析表明它与其他植物的 AP1 同源基因有极高的同源性, 这种结构上的相似性使笔者有理由推测它们在功能上的相似性. 在以拟南芥等为模式植物的研究中, 发现 AP1 在控制花分生组织特性和花器官形成中起着至关重要的作用^[4-6]. 因此, ZM-AP1 基因的分离对于探索毛叶枣花芽分化过程控制机制, 进而揭示其极短童期形成的分子机理具有重要意义.

本研究所克隆的 ZM-AP1 基因片段可用于 Northern 杂交, 以了解 ZM-AP1 基因在毛叶枣植株生长发育中的表达情况. 另外, 笔者也正在建立毛叶枣基因组文库, 准备用文库筛选的方法^[9]进行全长基因的克隆工作.

参考文献:

[1] 刘成明, 胡桂兵, 陈大成. 毛叶枣引种及实生选种初报[J]. 中国南方果树, 1997, (6): 48.

[2] 刘成明, 胡桂兵, 王惠聪. 毛叶枣(印度枣)的驯化引种及选种优株产量品质的研究[J]. 西南农业大学学报, 1997, 19(3): 240—243.

[3] 沈德绪, 林伯年. 果树童期与提早结果[M]. 上海: 上海科技出版社, 1989. 1—15.

[4] MANDEL M A, YANOFSKY M F. A gene triggering flower formation in *Arabidopsis*[J]. Nature, 1995, 377: 522—524.

[5] MANDEL M A, GUSTAFSON B C, SAVIDGE B et al. Molecular characterization of the *Arabidopsis* floral homeotic gene APETALA1[J]. Nature, 1992, 360: 273—277.

[6] IRISH V F, SUSSEX I M. Function of APETALA1 gene during *Arabidopsis* floral development[J]. Plant Cell, 1990, 2: 743—753.

[7] 胡桂兵, 郑启发, 陈大成, 等. 毛叶枣 APETALA1 基因分

子克隆初报[J]. 华南农业大学学报, 2000, 21 (4): 93. [9] SAMBROOK J, FRITSCH E F, MANIATIS T. 分子克隆实验指南[M]. 第 2 版. 金冬雁, 黎孟枫等译, 侯云德等校. 北京: 科学出版社, 1995. 34—75.

[8] 王关林, 方宏筠. 植物基因工程原理与技术[M]. 北京: 科学出版社, 1998. 600—601.

Molecular Cloning of APETALA1 Gene from *Zizyphus mauritianan* Lam.

HU Gui-bing^{1,2}, XU Chang-jie¹, CHEN Da-cheng², ZHENG Qi-fa², An Xin-ming¹, ZHANG Shang-long¹
(1 Dept. of Horticulture, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China ;
2 Dept. of Horticulture, South China Agric. Univ., Guangzhou 510642, China)

Abstract: A pair of 23 bp primers, designed according to a conserved sequence of the APETALA1 (AP1) gene which has an important function in floral development, were used to amplify a 648 bp fragment by polymerase chain reaction (PCR). The fragment was cloned into pUCm-T vector, and then sequenced. A fragment in the middle of AP1 homologous gene named ZM-AP1 gene was obtained. The result of sequence analysis indicated that there were two introns of 152 bp and 386 bp in the fragment, and the exons encoded 36 amino acids. The ZM-AP1 gene has been registered in GenBank with the accession number AF356541. After the deduced amino acid sequence of the fragment was submitted to GenBank and blast with AP1 homologous gene of other plants, it was found that the homology reached 66%—88%. This result suggested that ZM-AP1 gene might have the same function as other AP1 homologous gene.

Key words: *Zizyphus mauritianan* lam. ; APETALA1 gene; PCR; molecular cloning

【责任编辑 柴 焰】

(上接第 42 页)

The Anatomy of Stem and Histochemistry of Phenol Distribution in
Difficult- and Easy-to-Root *Eucalyptus* Species

ZHANG Shao-hong¹, QIU Xing-qiu¹, HUANG Zhuo-lie¹, TAN Shao-man²

(1 College of Biotechnology, South China Agric. Univ., Guangzhou 510642, China;
2 College of Forestry, South China Agric. Univ., Guangzhou 510642, China)

Abstract: The rooting abilities in different species of *Eucalyptus* are quite different. The stem anatomy and histochemistry of *Eucalyptus* species, i.e. *Eucalyptus* ABL No. 12 W5 clone, *E. urophylla* M1A clone, *E. exserta* and *E. citriodora*, were studied. It was indicated that those stem cuttings of *Eucalyptus* species, which had relatively developed and relatively lignified rays, relatively high content and relatively extensive distribution of phenol substances, were easy to form root primordia and then easy to root.

Key words: *Eucalyptus*; rooting of cuttings; rays; phenol substances

【责任编辑 周志红】