

- [25] Kieliszewski MJ and Lamport DTA, 1994, *Plant J*, **15**: 157 - 172.
- [26] Guttman DS and Charlesworth D, 1998, *Nature*, **393**: 263 - 266.
- [27] Scutt CP et al., 1997, *Genome*, **40**: 705 - 715.
- [28] Donnison IS et al., 1996, *Genetics*, **144**: 1893 - 1901.
- [29] Zhang YH, et al., 1998, *Genome*, **41**: 141 - 147.
- [30] Delichere C et al., 1999, *EMBO J*, **18**(15): 4169 - 4179.

AGPase 及其基因表达研究

姚新灵

(宁夏大学生物工程系 银川 750021)

在高等植物淀粉生物合成过程中,二磷酸腺苷葡萄糖焦磷酸化酶-AGPase(ADP-glucose pyrophosphorylase)将一磷酸葡萄糖焦磷酸化,形成二磷酸腺苷葡萄糖(ADP-葡萄糖)。其产物 ADP-葡萄糖是合成直链和支链淀粉的底物。在含淀粉组织内,ADP-葡萄糖是淀粉合成酶、与淀粉粒结合的淀粉合成酶以及分支酶等的底物,用于直链淀粉和支链淀粉的合成。该底物的浓度直接影响淀粉的合成速度和效率。

一、植物功能 AGPase 由四个亚基构成

植物中 AGPase 由四个亚基组成,其中两两在组成和结构方面相同,构成了两种大小明显不同的多肽^[1],其中较大的称为大亚基,其分子量因种不同而变化于 54kD 到 60kD 之间,较小的为小亚基,分子量在 51kD 到 55kD 间。编码两亚基的基因已从几种植物中被克隆,大亚基之间和小亚基之间的 DNA 序列及推测的氨基酸顺序表现同源性,并与大肠杆菌中该酶表现相似的氨基酸顺序^[2,3]。

较早从分子水平证实 AGPase 由四个亚基构成的试验是在玉米的胚乳中,玉米 bt2 突变是发生于其胚乳 AGPase 小亚基的突变^[4],sh2 是发生于其大亚基的突变^[5],对两者的分析表明:为了表现 AGPase 完全活性,大小两亚基缺一不可,两种突变分别减少胚乳中 AGPase 活性 90% - 95%,减少胚乳淀粉含量 75%^[6,7]。皱粒豌豆是编码 AGPase 大亚基的基因突变(叫做 rb 基因)所致,rb 突变体子叶中 AGPase 活性比正常型下降 90%,淀粉含量下降 50%^[8,9],在大肠杆菌中表达两种马铃薯 AGPase 亚基表明,AGPase 单个亚基的活性低,而将两者合并表达其活性高于单个亚基 10 - 70 倍;试验证明植物中正常 AGPase 由两个大亚基和两个小亚基构成的四合体行使其完全功能^[10]。

二、AGPase 编码基因分化表达

淀粉的合成出现于植物体的不同组织器官,储

藏器官内 AGPase 基因的表达与其他组织及器官中 AGPase 基因表达之间的关系怎样是实现 AGPase 基因表达水平调控必须回答的问题。在已研究的植物种类中,包括拟南芥^[11]、马铃薯^[12,13]、大麦^[14]、水稻^[15]和小麦^[16]等,它们的 AGPase 的大亚基同属多基因编码,这些基因的表达具有高度专一性。例如在大麦和小麦中,这些基因的表达仅限于叶片或根和胚乳中。另外,它们的表达在特定条件的诱导下发生,如在马铃薯中增加蔗糖诱发该基因的表达,遗传分析也证实了大亚基的等位形式随器官及组织分化而出现。玉米 sh2 突变出现在胚乳中,这必然有另外的基因在胚和叶中编码 AGPase 大亚基^[17]。事实上玉米胚中另一个编码大亚基的转录子也在胚乳中被发现,但其量极低^[18]。大豆中 AGPase 小亚基的两个 cDNA 克隆已被识别,它们表现组织表达专一性,一个仅表达于叶中;另一个则表达于叶和子叶内^[19]。玉米中被识别的两个小亚基的 cDNA 也表现明显不同的组织专一性^[20]。

Muller Rober 等 1994 年从马铃薯中分离 3.2kb 的 AGPase 大亚基启动子序列,并将不同长度的序列与葡萄糖醛酸酶编码基因连接形成嵌合基因结构,转化于烟草和马铃薯;结果发现该结构在含淀粉的块茎薄壁细胞,茎和叶柄鞘细胞,保卫细胞中表达,在前两者中行使功能的启动子区域是位于 3.2kb 大亚基启动子-500 - -1200 的序列;启动子 5' 端的 0.3kb 片段负责该结构在保卫细胞内的表达^[13]。该结果表明马铃薯 AGPase 大亚基基因启动子序列本身具备了调节其所驱动的基因在不同器官表达的功能,这在一定程度上类似于大肠杆菌乳糖操纵子中所谓的调节基因的功能;当然,在近年的研究中关于启动子调节基因表达及表达效率的进展非常迅速;但在 AGPase 基因启动子调节其表达的研究尚未见很多报道。过去人们认为 AGPase 活性表现于

叶绿体和淀粉组织的淀粉体内;还有研究认为在正在发育的玉米胚乳内95%的AGPase活性表现于细胞质体外,但免疫染色和电镜观察却支持AGPase在淀粉体内表现活性的观点。K. Denyer在玉米胚乳内用碱性磷酸化酶和淀粉合成酶作为细胞质体内标记酶,乙醇脱氢酶、乙醇磷酸化酶和6-磷酸果糖转移酶作为细胞质体外标记酶研究AGPase活性在细胞内的分布,比较标记酶的分布后发现95%的AGPase活性出现于玉米胚乳细胞质体外,用抗体识别的两个bt2小亚基中较大的主要存在于胚乳细胞质体外,较小的则存在于细胞质体内;发生于小亚基较大者中的bt2突变专一性地导致质体外AGPase活性的丧失^[21]。这意味着玉米胚乳细胞内外存在明显不同组成形式的AGPase。Jack Shannon等的研究表明在玉米胚乳线性淀粉积累阶段,90%以上的AGPase活性是在细胞质体外表现的;同时,玉米Bt1蛋白质包含KTGGL氨基酸序列,该氨基酸序列与淀粉合成酶及细菌糖元合成酶中的ADP-葡萄糖结合位点相同;在AGPase中该序列是腺苷转运体,负责转运ADP-葡萄糖进入淀粉体^[22]。Sang-Bong从紫苏子叶中分离了三个AGPase cDNA克隆,其中两者与其他植物AGPase小亚基同源,另一者与其他植物大亚基同源;在观察小亚基转录子在光合和非光合组织出现与否时发现两者在茎内呈现最高表达水平,而大亚基则在茎和子叶内表达,进一步研究发现大亚基与两种小亚基之一表达于细胞质体内,且子叶内存在多个AGPase大亚基^[23]。Diane比较大麦正在发育胚乳细胞内AGPase分布发现AGPase主要表达于细胞质体外;另外用AGPase/UGPase的比率作为AGPase与UGPase代谢反应的指示指标,研究发现胚乳中ADP-葡萄糖和AGPase/UPGase比率高于其他组织^[24]。储藏组织AGPase表现高活性是源于不同的大小亚基组合,还是由于同一组合在不同组织的不同结构或/和调控方式尚属未知。

三、AGPase 基因表达的调控

Inglesias等发现在马铃薯中AGPase可分别与3-磷酸甘油酸(3-PGA)和无机磷(Pi)结合,实现对AGPase的活性的调控,3-PGA是该酶激活因子,后者是抑制因子^[24]。在进一步的研究中,Milagros从大麦叶中分离纯化了完整AGPase,发现AGPase代谢反应的最适宜底物为AMP-葡萄糖,Pi,3-PGA,ATP,ADP,NADP和AMP是AGPase代谢反应的

抑制因子,AGPase不仅可出现于大麦胚乳的细胞质体外,也可发现于细胞质体内;在储藏组织中随淀粉的积累AGPase活性明显下降,并与淀粉合成酶呈现竞争底物的趋势^[26]。表现皱粒豌豆的AGPase大亚基突变体rb使AGPase活性和淀粉含量下降的同时,使AGPase对3-PGA和Pi调节更敏感^[27];1992年Li和Preiss报道了拟南芥的AGPase大亚基突变导致AGPase对3-PGA和Pi的不同反应^[28]。在进一步的研究中,Preiss等用磷酸吡哆醛识别3-PGA的结合位点,研究结果表明拟南芥AGPase小亚基C端的赖氨酸和大亚基相应位置的赖氨酸结合于3-PGA及其类似物。菠菜叶中AGPase大亚基的第二个赖氨酸可结合于磷酸吡哆醛;赖氨酸也与无机磷(Pi)的调节相关^[25]。然而,该第二个赖氨酸并不存在于所有来源的AGPase大亚基;值得注意的是小麦和大麦胚乳中表达的大亚基中该赖氨酸被蛋氨酸取代,而在小麦叶片内表达的AGPase大亚基中,该氨基酸仍为赖氨酸。这意味着3-PGA和Pi调节程度随大亚基等位形式表达于不同的组织器官而变化。另一方面3-PGA/Pi也调节大小亚基的结合,当分别比较从谷类叶中和胚乳中分离出的AGPase时,这种随分化而出现的不同结合方式则显而易见^[29,30]。同时,豌豆叶和子叶中该酶也表现出此区别^[27]。Thomas Greene用点突变创造并识别马铃薯AGPase大亚基的突变体P521,该突变体对3-PGA调节不敏感,为了识别AGPase大亚基中另外与3-PGA结合的氨基酸,并识别P521在大肠杆菌内恢复糖元合成功能的回复突变点的研究发现:AGPase中大亚基四个不同位置氨基酸的变化形成的三个回复突变体与3-PGA的亲合力高于P521突变体10-49倍,其原因是在野生型AGPase大亚基氨基酸序列内加入了E38K或G101N两位点所至^[31]。这种回复突变酶的形成将为高等植物AGPase的调节及为确定淀粉合成内源酶调控途径提供有用的信息。

四、AGPase 编码基因与淀粉合成

AGPase催化产生ADP-葡萄糖进行淀粉合成时,该酶表达水平的高低在决定淀粉积累方面起着至关重要的作用;对拟南芥叶片专一表达的AGPase基因的突变体研究表明,编码AGPase两亚基之一的基因的突变体减少叶内该酶活性的7%,且叶内淀粉合成减少为正常水平的26%^[32]。该拟南芥突变已被用于估计AGPase的流量控制系数,此系数

可用所合成淀粉量和 AGPase 在正常型和突变型中活性的关系来计算。据作者的研究,在较低的光强条件下,AGPase 在叶内淀粉合成中发挥着最重要的控制功能;在高光强条件下,虽然 AGPase 的流量控制系数增加,但其他酶的流量控制系数也增加,这表明其他酶反应也发挥着控制作用。这些其他的控制点与光合碳固定中产生磷酸己糖的酶相关,该方面的测定尚未进行过^[33]。Denny 等表达来自大麦 AGPase 的大小亚基编码基因于昆虫细胞内表明:小亚基可在 3-磷酸甘油酸存在的条件下表现活性,并被无机磷抑制;为了弄清大小亚基的作用,时空二维表达系统用于四个 AGPase 亚基转录子形成的研究,其结果表明编码大小亚基的转录子产生稳定蛋白质水平的高低与淀粉的积累呈正相关;而将这些转录子表达于大麦体内则产生蛋白质的最低^[34]。

激活子 3-PGA 和抑制子 Pi 可调解 AGPase 活性,使淀粉合成速度改变,所以在所研究过的种类器官中,控制淀粉合成的重点都放在了通过 3-PGA 和 Pi 对 AGPase 的调节^[35-37],而叶内 3-PGA 和 Pi 水平依据光合作用中碳的固定水平而改变,在^[35-37]叶中当对碳的吸收高于对碳的需求,淀粉合成则较快,当碳吸收较低时,淀粉合成则减慢,于是,尽管淀粉生物合成的调控因不同种类及组织而有差异,但 3-PGA/Pi 仍然成为了 AGPase 活性调解的重要模式^[38]。有研究表明 AGPase 在贮藏器官内的调控不像在叶内那样明显,且不存在明显的以代谢为媒的短期调控^[39]。因此,该调节模式就储藏组织而言仍处于探索阶段。孟山都(Monsanto)公司的 Stark 等将对调控不敏感的大肠杆菌 AGPase 基因转化于烟草和马铃薯中,其结果为培养基中的烟草细胞淀粉合成提高了 300%,马铃薯细胞中则提高 60%^[40]。正常大肠杆菌 AGPase 基因表达对 1,6-二磷酸果糖的调节非常敏感^[41],该调节不能在转基因植物组织增加淀粉合成。这表明用大肠杆菌 AGPase 基因替代对调控极为敏感的植物 AGPase 编码基因提高淀粉生物合成效率存在潜力。对调控不敏感的外源 AGPase 基因导入淀粉植物将会成为研究 AGPase 基因表达调控模式和提高淀粉含量的可选择途径。

除了影响所产生淀粉的数量外,AGPase 也影响淀粉的组成。在豌豆中影响 AGPase 大亚基的 rb 突变,在减少了其所合成淀粉的数量的同时,也增加了支链淀粉的比例^[42],据作者在 GBSSI 基因表达研究的结果(待发表)这是由于降低的 ADP-葡萄糖浓

度造成淀粉粒与其结合困难,这种困难尤其以淀粉粒内部更为严重,因 ADP-葡萄糖扩散到淀粉粒晶体内部才可与 GBSSI 结合实现直链淀粉中 $\alpha(1-4)$ 键的形成,低浓度的 ADP-葡萄糖不利于其向淀粉粒内部扩散,从而影响了其与 GBSSI 的结合,从而减少直链淀粉的合成。

五、可能的研究选择

正像 1,5 二磷酸核酮糖羧化酶有不同的亚基构成,其调节因素众多,而使人们对它的研究变的困难一样,AGPase 也将是内源表达调控复杂不易人为操纵的酶之一。AGPase 的大小亚基的形成有多个等位基因编码,其表达受不同发育阶段、组织、细胞内外及上下游相关产物等因素的影响,这些因素的某些构成了其表达的传导信号作用于启动子;每一个亚基与其他亚基结合也可能受到两类多肽的可利用程度间的不平衡的影响,使得所产生的酶具有了可变性,从而最终影响其活性。在该方面需进一步研究的问题是:1)某一植物中,表达于不同组织及细胞质体内外的 AGPase 大小亚基各有几个等位基因控制?它们的相似性,一致性如何?2)不同大小亚基的组合在不同组织及细胞内表达的调控机理是什么?3)AGPase 大小亚基转录因子是什么?Muller Rober 的 AGPase 启动子在驱动 AGPase 表达中怎样调控其表达?4)AGPase 所合成的 ADP-葡萄糖是否是叶绿体内临时储藏淀粉合成的底物?

转化对内源调节不敏感的外源 AGPase 基因,用于植物淀粉生物合成产量的提高,在目前是唯一且可行的途径,具有应用价值。

诱发并识别对各类调控不敏感 AGPase 大小亚基的突变或改变大小亚基氨基酸组成,掌握 3-PGA 和 Pi 与 AGPase 结合的结构区别,增加益于 3-PGA 结合的位点,以寻求提高 AGP 活性的方法。

继续从分子水平分别识别细胞质体内外 AGPase 大小亚基、它们间结合的结合域及其他的相互作用,这将是探索 AGPase 等位基因在组织及细胞内的分化表达必不可少的。

目前研究这些基因特征的方法之一是从生化提取物中识别其所形成的酶和其所决定的基因。然而,不是所有的不同等位基因在某发育阶段均有各自的产物,这增加了从表型方面研究的困难。但基因结构和功能的分析大大促进了对不同等位基因作用的理解,使控制淀粉合成基因的表达成为可能,并借助代谢途径的调控也可以了解到淀粉生物合成模

式。另外,大多数淀粉生物合成酶是用可溶性的提取物测得的,不能反映淀粉粒内的真实条件;除非用诱发突变和植物转化,否则,几乎无法评价这些酶的非代谢特征。同时,每一生物合成酶的不同形式都有着其非代谢特征。代表了多样化的代谢途径,最终产生了多聚物和组织的复杂性和不同种类的可变性,这使了解其一般非代谢特征变得更为困难。除诱发突变和植物转化途径外,近年被广泛用于研究蛋白质间、蛋白质-DNA 相互作用的酵母杂交系统可用于 AGPase 代谢反应的研究,结合 Muller 分离的启动子,用单杂交系统识别 AGPase 大小亚基的转录因子,像所有已发现的转录因子一样,该转录因子必将与 ADP-葡萄糖合成上下游产物相关或可能就是 AGPase 已合成大小亚基的某一个。另外,在考虑大小亚基间相互作用时,酵母双杂交系统将是目前为止最理想的途径,如在知道了 AGPase 基因与转录因子的结合域序列的情况下,大小亚基间相互作用机理的研究将变得简单。

摘 要

ADP-葡萄糖焦磷酸化酶(AGPase)是淀粉生物合成的限速酶,本文讨论了到目前为止对不同植物 AGPase 基因及其表达的研究结果。其中包括 AGPase 大小亚基编码基因表达的分布及调控。其结论为:完整 AGPase 两个大亚基和两个小亚基对合成正常含量的淀粉缺一不可;有多个等位基因编码植物 AGPase 大小亚基,它们表现发育阶段、组织器官、细胞质体内外及诱导条件的分化表达;尽管各亚基表达于含淀粉的组织,但它们在储藏组织内的表达量远高于其他组织;对调控不敏感的外源 AGPase 基因导入淀粉植物将会成为提高淀粉含量的重要途径。提出了进一步研究中存在的问题及可能的解决途径。

参 考 文 献

- [1] Copeland L and Preiss J. 1981, *Plant Physiol.*, **68**: 996 - 1001.
- [2] Inglesias A. A., Kakefuda G. and Preiss J. 1991, *Plant physiol.*, **97**: 1187 - 1195.
- [3] Smith-White B. J and Preiss J. 1992, *J. Mol. Evol.*, **34**: 449 - 464.
- [4] Bae, J M, Giroux M. and Hannah, L. 1990, *Maydica* **35**: 317 - 319.
- [5] Bhavé, M R, Lawrence. S; Barton, C and Hannah, L. C., 1990, *Plant Cell* **25**: 581 - 583.
- [6] Tsai C. Y. and Nelson, O. E. 1966, *Science*. **151**: 341 - 343.

- [7] Dickinson D. B. and Preiss J. 1969, *Plant Physiol.* **44**: 1058 - 1062.
- [8] Hylton C. and Smith A. M. 1992, *Plant Physiol.*, **99**: 1626 - 1634.
- [9] Burton R. A., Bewleg J. D. Smith A. M., Bhattacharyya M. K., Taage H., Ring S., Bull V., Hamilton W. D. P. and Martin C. 1995, *J. Plant* **7**: 3 - 15.
- [10] Inglesias A. A., Barry G. F., Meyer C., Blocksberg L., Nakata P. A., Green T., Laughlin M. J., Okita T. W., Kishore G. M. and Preiss J. 1993, *J. Biol. Chem.*, **268**: 1081 - 1086.
- [11] Villand P., Olsen O. A., and Kleczkowski L. A., 1993, *Plant Mol. Biol.* **23**: 1279 - 1281.
- [12] Muller-Rober, B., Sonnewald, U. and Willmitzer, L. 1992, *EMBO J.* **11**: 1229 - 1232.
- [13] Muller-Rober, B., La Cognata, U. and Sonnewald, U. 1994, **14**. Villand, P., Olsen, O. A., Kilian A., and Kleczkowski L. A. 1992, *Plant Physiol.* **100**: 1617 - 1619.
- [15] Krishnan. H. B, Reeves, C. D. and Okita T. W. 1986, *Plant physiol.* **81**: 642 - 645.
- [16] Shannon J. C. and Garwood D. L. 1984, *Genetics and physiology of starch development*. Orlando FL: Academic Press. PP. 25 - 86.
- [17] Olive M. R., Ellis R. J. and Schuch W. W., 1989, *Plant Mol. Boil.* **12**: 525 - 528.
- [18] Giroux, M. J and Hannah L. C. 1994, *Mol. Gen. Genet.* **243**: 400 - 404.
- [19] Weber H., Heim. U. Borisjuk L. and Wobus U. 1995, *Planta* **195**: 352 - 361.
- [20] Prioul, J. L., Emmanuelle J., Reyss. A., Gregory N., Giroux, M., Hannah, L. C and Causse M. 1994, *Plant Physiol.* **104**: 1287 - 1290.
- [21] K Denyer, F Dunlap, T Thorbjornsen, P Keeling A, M Smith. 1996, *Plant Physiology*, **112**: 779 - 785.
- [22] Jack C. Shannon, Fang-Mei Pie, Heping Gao, Kang-Chien Liu. 1998, *Plant Physiology*. **117**: 1235 - 1252.
- [23] Sang-Bong Choi, Kyung-Hwan Kim, Ibrahim Halil Kavakli, Seong-Kon, Thoma Okita. 2001, *Plant and Cell physiology*. **42**: 146 - 153.
- [24] Diane M. Beckles, Alison M. Smith, Tom ap Rees. 2001, *Plant Physiology*. **125**: 818 - 827.
- [25] Preiss J. 1993, *Biosynthesis of starch*, *Denpan Kogako* **40**: 117 - 131.
- [26] Milagros Rodriguez-Lopez, Eduarne Baroja-Fernandez, Aitor Zandueta-Criado, Javier Pozueta-Romero. 2000, *Proceedings of the National Academy of Sciences*; **97**: 8705 - 8710.
- [27] Smith A. M., Betty M. and Bedford I. D., 1989, *Plant Physiol.* **89**: 1279 - 1284.
- [28] Li L. and Preiss J. 1992, *Cabohydr. Res.* **92**: 227 - 239.
- [29] Duffus C. M. 1993, *Starch synthesis and deposition in developing cereal endosperms*. Oxford University Press; pp. 191 - 219.
- [30] Kleczkowski L. A., Villand P., Luthi E., Olsen O. A. and Preiss J. 1993, *Plant physiol.* **101**: 179 - 186.
- [31] Thomas W. Greene, Ibrahim Halil Kavakli, Michael L. Kahn, Thoma W. Okita. 1998, *Proceedings of the national academy of sciences*, **95**: 10322 - 10327.
- [32] Lin T. P., Caspar, T., Somerville C. and Preiss J. 1988, *Plant Physiol.* **781**: 849 - 852.
- [33] Neuhaus H. E., and Stitt M. 1990, *Planta*. **182**: 445 -

- 454.
- [34] Danny N. P. Doan, Heidi Rudi, Odd-Arne Olsen. 1999, *Plant Physiology*; **121**:965 - 975.
- [35] Plaxton W. C. and Preiss J. 1987, *Plant Physiol.* **83**:105 - 112.
- [36] Preiss J. 1991, In *Oxford Surveys of plant molecular and cell biology*. Vol. 7, B. J. Mifflin ed. (Oxford: Oxford University Press). pp. 59 - 114.
- [37] Okita T. W. 1992, *Plant Physiol.* **100**:560 - 564.
- [38] Preiss J., Ball K., Smith-White B., Inglesias A., Kakefuda G. and Li L. 1991, *Biochem. Soc. Trans.* **19**:539 - 547.
- [39] Hylton C. and Smith A. M. 1992, *Plant Physiol.* **99**:1626 - 1634.
- [40] Stark D. M., Tmmerman K. P., Barry G. L., Preiss J. and Kishore G. M. 1992, *Science*. **258**:287 - 292.
- [41] Preiss J. and Romero T. 1989, *Adv. Microbiol. Phys.* **30**:183 - 238.
- [42] Kooistra E. 1962, *Euphytica*. **11**:357 - 373.

研究工作

银杏雌雄基因组 DNA 间的差异性分析

王晓梅* 宋文芹 李秀兰 陈瑞阳
(南开大学生物系 天津 300071)

在高等的显花植物中绝大多数为两性花 (hermaphrodite) 物种, 仅有极少数的物种为严格的雌雄单性异株 (dioecious) 或雌雄单性同株 (monoecious) 植物^[1]。在这些雌雄单性异株植物中又仅有少数的物种具有异型性染色体^[2], 并且异型性染色体控制了植物的性别表型。在被子植物中如白麦瓶草 (*Silene latifolia*) 和酸模 (*Rumex acetosa*) 的性别及其决定机制在细胞和分子水平都得到了广泛和较为深入的研究。由于植物雌雄个体的营养器官具有一致的表型, 它们的性别差异主要表现在花器官上, 而裸子植物通常要经历许多年才能开花, 分辨雌雄, 得到性别确定的个体, 所以在雌雄异体的裸子植物中, 其性别的细胞学特别是分子生物学方面少有研究。虽然几十年前就开始在细胞水平研究了银杏 (*Ginkgo biloba* L.) 的性染色体^[3-7], 但关于其染色体的性别决定类型至今仍是一个悬而未决的问题。同时由于银杏的性别不同应用价值不同, 且银杏需要二十多年才能开花分辨雌雄, 因此人们一直关注银杏的早期性别鉴定, 因而有必要从分子水平探讨银杏两性基因组间的差异性, 它不仅具有潜在的应用价值, 而且对探讨其性别分化也具有一定的理论意义。

自从 1990 年 Williams 和 Welsh 创立 RAPD 技术以来, 已广泛用于基因组研究的各个方面。该技术是迄今研究遗传变异、多态性等最简单最快速的方法, 这是 RFLP 和 AFLP 技术难以达到的, 因此利用 RAPD 技术检测雌雄异株银杏基因组间的多态性, 寻找性别差异有其特有的优势。该技术已成功用于啤酒花 (*Humulus lupulus*)^[8] 和白麦瓶草 (*Silene latifolia*)^[9] 的研究中。本研究利用 RAPD

技术, 检测了雌雄银杏基因组间的多态性, 这一分子水平的研究将有助于寻找与银杏性别相关的分子标记或性别特异性的探针, 最终有望为银杏性别的鉴定提供理论依据。

材料与方 法

1. 植物材料

取自辽宁省兴城市中国农科院果树研究所。已知性别的成年银杏雌雄各 10 株, 将其幼叶液氮速冻后, -70℃ 保存。

2. DNA 的提取

取 0.2g 银杏幼叶于液氮中研成粉末, 加 2ml DNA 提取缓冲液 (1% CTAB, 5% PVP, 1.4mol/L NaCl, 80mmol/L Tris-HCl pH8.0, 20mmol/L EDTA pH8.0), 56℃ 保温 30min, 酚、氯仿抽提, 异丙醇沉淀, TE (10mmol/L Tris-HCl pH8.0, 1mmol/L EDTA pH8.0) 溶解后, RNase (终浓度 200mg/L) 37℃ 处理 2 小时, 酚、氯仿抽提, 乙醇沉淀, TE 溶解, 4℃ 保存备用。

3. 雌雄基因组 DNA 间多态性检测及与性别相关的 RAPD 标记的筛选

取等量的个体基因组 DNA 组成雌雄两个 DNA 池, 首先用于 RAPD 引物的筛选, 检测雌雄基因组 DNA 间的多态性, 之后对有差异的引物再随机选取雌雄各五株做个体分析。

RAPD 反应采用热启动 PCR。反应体系为 25μl, 其中含有 10mmol/L Tris-HCl, pH8.3, 50mmol/L KCl, 2.5mmol/L MgCl₂, 0.5μmol/L 引物 (购自上海生物工程公司及香港大学动物学系孙梅博士惠赠) 和 250μmol/L dNTP (上海生物工程公司), 10-40ng 基因组 DNA, 1.5U Taq DNA 聚合酶 (北京高登沃德生物制品有限公司)。每个反应为 40 个循环, 前 8

本文 2000 年 11 月 27 日收到, 2001 年 6 月 11 日接受。

* 天津农学院定向培养博士研究生。