实验技术

苹果液泡酸性转化酶基因片段的克隆及序列分析

安新民　张志毅*　　陶　俊
（北京林业大学林木花卉遗传育种教育部重点开放实验室　北京　100083）（扬州大学农学院园艺系　扬州　225014）
何承忠
（西南林学院　昆明　650224）

摘　要　在分析植物可溶性转化酶基因的保守区序列基础上，设计了一对 PCR 引物，以苹果（辽伏）基因组 DNA 为模板，采用 PCR 方法扩增出长约 743bp 的 DNA 片段，克隆入 pUCm-T 载体，测序结果表明，所获得的片段推测为苹果酸性转化酶基因的片段，该基因片段长度为 743bp，是开放阅读框的一部分，无内含子。其序列已在 GenBank 中登记（登记号为 AF433644）。在 GenBank 中进行同源性检索，结果表明该成员编码的氨基酸与植物可溶性酸性转化酶的氨基酸同源性较高，与温州蜜柑（GenBank AF014925）、胡萝卜（X67163）、甜菜（GenBank X81796）和绿豆（GenBank D10265）液泡酸性转化酶基因编码蛋白质的氨基酸分别具有 80%、80%、78% 和 77% 的同源性。而与定位于细胞壁的酸性转化酶（不溶性）同源性较低，由此可推测出研究获得的苹果转化酶基因可能定于液泡。该基因片段的获得对于深入研究苹果蔗糖代谢以及果实发育和品质形成具有重要的意义。

关键词：苹果　　液泡酸性转化酶基因　　克隆

除山梨醇之外，蔗糖是苹果果实中碳水化合物卸载的一种重要形式，在果实发育和品质形成的相关代谢中起着重要的作用[1,2]。转化酶（蔗糖酶）催化蔗糖水解生成葡萄糖与果糖，在蔗糖代谢中起着重要作用。转化酶分为酸性、中性或碱性三类。酸性转化酶存在于细胞壁（不溶性的）和液泡（可溶性的）中，中性或碱性转化酶存在于细胞质中。对酸性转化酶基因转化植株的研究表明，改变转化酶的活性可以影响光合能力、光合产物的运转分配、乃至植株生长、果实的大小、品质、产量和育性[3-8]。

目前已从胡萝卜、甜菜、马铃薯、拟南芥、烟草、玉米、番茄以及绿豆等植物中分离到编码酸性转化酶的基因。但就果树而言，现仅从葡萄[9]和草莓（GenBank 登记号 AF000521）中分离到该基因，我们已获得柑桔转化酶基因家族的 3 个成员[10,11]，在苹果上则未见报道。而该基因的获得对于探讨苹果果实发育过程中蔗糖的运输、积累和分解机理以及对研究转化酶基因的表达与果实发育的内在联系具有重要意义。

材料和方法

1. 植物材料

以辽伏苹果（*Malus pumila*）幼叶（采自浙江大学华家池校区园艺系果园）为提取基因组 DNA 的材料。

2. 引物

根据 GenBanK 登记的其他植物酸性转化酶基因序列的保守区设计 PCR 引物如下：上游引物：5' TATCATCT(G/A/T/C)TTTTA(T/C)CA(A/G)TACAA(T/C)CC3'；下游引物：5'(A/G)TCGAAGAA (G/A/T/C)GTTTTGGATGC(A/G)TA 3'

3. 基因组 DNA 提取

本文 2003 年 4 月 14 日收到，7 月 28 日接受。
*通讯作者。E-mail：zhiyizhang@bjfu.edu.cn

采用CTAB法。

4. PCR反应

(在HYBAID PCR EXPRESS中进行) 50μL PCR反应体系包括50ng苹果(辽伏)因组DNA,各0.2μmol/L上游引物和下游引物,1×PCR反应缓冲液,2mmol/L $MgCl_2$,200μmol/L dNTPs和2单位Taq DNA聚合酶。PCR循环条件为94℃预变性3min,最后72℃延伸10min,94℃变性40s,52℃退火40s,72℃延伸90s,共进行30轮循环。

5. 片段重组入质粒载体

PCR产物经纯化后与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重组质粒[12]。

6. DNA序列测定

采用双脱氧终止法,PE公司377型自动测序仪测定重组质粒DNA序列。

7. 序列分析

采用Seqaid II、Clustalx和Bioedit等软件进行翻译和序列比较分析。

结 果

1. PCR产物的扩增和克隆

以苹果基因组DNA为模板,用所设计的引物进行PCR反应,得到与预计长度一致的大约为740 bp的条带,将经纯化的PCR产物与pUCm-T载体连接,用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。挑取白色单菌落培养,提取质粒,经长度和酶切(*Pst* I)鉴定获得预期的重组质粒(图1)。

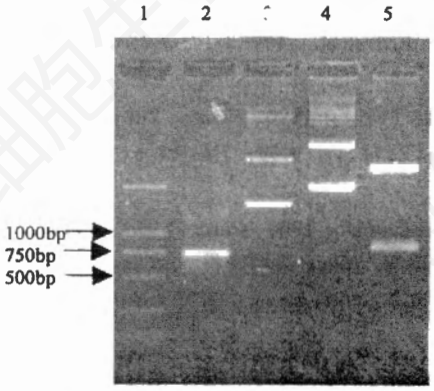

图1 基因片段重组入pUCm-T

1. DL-2000 Marker; 2. PCR产物; 3. pUC19; 4. 重组质粒; 5. 重组质粒用*Pst* I酶切的产物[释放出与插入片段(PCR产物)长度基本一致的条带]。

2. 基因序列与同源性分析

测定重组质粒中插入片段的序列,表明所克隆的基因片段长743bp,其序列如图2所示。在GenBank中进行Blast检索结果表明,该片段与植物液泡转化酶基因的相应片段具有较高的同源性,推测其为苹果液泡酸性转化酶基因(MP-VI-1)开放阅读框的一部分,不含内含子,序列内包含*Sca* I和*Hind* III两个常用酶切位点。运用Seqaid II软件分析推导该基因片段编码247个氨基酸(图2)。

```
                                                    TA        2
TCATCTTTTTTATCAGTACAACCCCAACAAAGCAGTATGGGAGACATAGTTTGGGGACAT   62
S  S  F  L  S  V  Q  P  Q  Q  S  S  M  G  D  I  V  W  G  H     20
GCTGTGTCCAAGGACTTGATCCATTGGCTTCACCTTCCTCTGGCCATGGTGGCTGATCAG  122
A  V  S  K  D  L  I  H  W  L  H  L  P  L  A  M  V  A  D  Q     40
TGGTATGACATCAATGGCGTTTGGACTGGCTCAGCCACCATTCTCCCTGATGGTAAAATT  182
W  Y  D  I  N  G  V  W  T  G  S  A  T  I  L  P  D  G  K  I     60
GTCATGCTCTACACTGGTTCAACCAATGAGTCTGTCCAGGTCCAAAACCTTGCATATCCT  242
V  M  L  Y  T  G  S  T  N  E  S  V  Q  V  Q  N  L  A  Y  P     80
                                 Sca I
GCTGACCACTCTGACCCTCTTCTCCTCAACTGGGTCAAGTACTCAGGCAACCCGGTCTTA  302
A  D  H  S  D  P  L  L  L  N  W  V  K  Y  S  G  N  P  V  L    100
GTCCCGCCCCCGGGCATCGGGTACAAGGACTTCCGGGACCCTACCACGGCGTGGTTCACG  362
V  P  P  P  G  I  G  Y  K  D  F  R  D  P  T  T  A  W  F  T    120
                                 Hind III
TCAGAGGGCAAATGGCGGATCACCATTGGGTCCAAGCTTAACAAAACTGGGATGTCTTTG  422
S  E  G  K  W  R  I  T  I  G  S  K  L  N  K  T  G  M  S  L    140
GTTTATGACACCAAGGACTTCAAAACCTATGAGCTTCTGAATGGGGTGCTTCATGCTGTC  482
V  Y  D  T  K  D  F  K  T  Y  E  L  L  N  G  V  L  H  A  V    160
CCTGGGACTGGAATGTGGGAGTGTGTGGATTTTTATCCGGTGTCGAAAACCAGTGACAAG  542
P  G  T  G  M  W  E  C  V  D  F  Y  P  V  S  K  T  S  D  K    180
GGATTGGATACTTCTGTGAACGGGCCTGATGTGAAGCATGTGGTAAAGGCTAGCCTTGAT  602
G  L  D  T  S  V  N  G  P  D  V  K  H  V  V  K  A  S  L  D    200
GATGACAGGAATGATTACTATGCGTTCGGGACTTATGATGAGAAGACTGGCAAATGGGTT  662
D  D  R  N  D  Y  Y  A  F  G  T  Y  D  E  K  T  G  K  W  V    220
CCTGATAACGAAAAGATTGATGTTGGTATTGGAATTAGGTATGATTATGGCAAATTCTAC  722
P  D  N  E  K  I  D  V  G  I  G  I  R  Y  D  Y  G  K  F  Y    240
GCATCCAAAACCTTCTTCGAC                                         743
A  S  K  T  F  F  D                                           247
```

图2 苹果液泡酸性转化酶基因部分序列

(划线部分为引物序列)

在GenBank进行Blast检索并采用Clustalx和Bioedit等软件分析,结果表明本研究克隆的苹果液泡酸性转化酶基因(MP-VI-1)片段分别与绿豆(D10265)、温州蜜柑(AF014925)、酸橙(AF048579)等定位于液泡的酸性转化酶基因的相应片段具有81%、79%和79%的核苷酸同源性,其编码的氨基酸与温州蜜柑(AF014925)、胡萝卜(X67163)、甜菜(X81796)和绿豆(D10265)液泡酸性转化酶基因编码的氨基酸分别具有80%、80%、78%和77%的同源性(图3)。而与定位与细胞壁的转化酶基因具有较低的核苷酸和氨基酸同源性。该序列中的基序"MWECVD"(图3)是植物液泡转化酶非常保守的半胱氨酸的催化位点,可能在转化酶的构造和催化活性上具有重要的功能[13]。根据上述分析,推测获得的基因片段MP-VI-1定位于液泡。

图 3 几种植物液泡转化酶基因编码的氨基酸同源性比较

AF433644——苹果液泡酸性转化酶基因；AF014925——温州蜜柑液泡酸性转化酶基因；X81796——甜菜可溶性转化酶基因；D10265——绿豆可溶性转化酶基因；X67163——胡萝卜可溶性转化酶基因。

讨 论

转化酶在植物的蔗糖代谢中具有重要的作用。许多研究表明，编码转化酶的基因组成一个大的基因家族，每一种类型转化酶基因又包括几个不同的成员，因此仅从酶活性测定无法阐明转化酶作用的内在本质，只有获得基因，进而进行表达研究方可阐明每个成员在蔗糖代谢与积累及其生理功能的分子机理。

本研究获得的苹果可溶性酸性转化酶基因片段(MP-VI-1，GenBank 号为 AF433644)，为研究该基因成员在不同组织和发育阶段的表达情况，探讨其在苹果果实发育期间蔗糖的积累和分解中所起的作用，进而为理解果实发育以及含糖量这一品质性状形成机制打下基础。

植物液泡和细胞壁中存在的酸性转化酶又各有几种同工酶，苹果的酸性转化酶也包括液泡和细胞壁转化酶，苹果的液泡转化酶也可能由若干个不同的基因成员来编码，本研究首次获得该基因家族一个成员的片段，苹果中其他的转化酶基因成员仍有待克隆并进行进一步深入研究。

参 考 文 献

[1] Beurter J. 1985, *J Plant Physiol.*, **121**:331－341.
[2] Beruter J et al., 1997, *J Plant Physiol.*, **151**:269－276.
[3] Ohyama A et al., 1995, *Plant Cell Physiol.*, **36** (2): 369－376.
[4] Ohyama A et al., 1999, *Plant Biotechnology*. **16**(2):147－151.
[5] Kang W et al., 1996, *Plant Physiol.*, **111**(2,s): 167, A786.
[6] Klann EM et al., 1996, *Plant Physiol.*, **112**: 1231－1330.
[7] Scholes J et al., 1996, *Planta*, **200**: 265－272.
[8] Tang GQ et al., 1999, *The Plant Cell.*, **11**(2):177－189.
[9] Davies C et al., 1996, *Plant Physiol.*, **111**:275－283.
[10] 安新民等，2001，果树学报，**18**(4):189－192.
[11] 安新民等，2003，上海交通大学学报(农业科学版)，**21**(1): 1－4.
[12] Sambrook J et al., 1995，分子克隆实验指南. 第二版. 金冬雁，黎孟枫等译，侯云德等校. 北京：科学出版社，P1062.
[13] Kim JY et al., 2000, *Gene*. **245**:89－102.

COLONING AND ANALYSIS OF THE VACUOLAR ACID INVERTASE GENE FRAGMENT FROM MALUS PUMILA

AN Xin Min ZHANG Zhi Yi*
(*Key Laboratory for genetics and Breeding of Forest Trees and Ornamental Plants, MOE, Beijing Forestry University, Beijing* 100083 *China*)
TAO Jun
(*Department of Horticulture, Yang Zhou University, YangZhou* 225014 *China*)
HE Cheng Zhong
(*Xinan Farestry College, Kuenming* 650224 *China*)

ABSTRACT A pair of primers was designed according to the conserved sequences of plant soluble acid invertase genes, and a 743bp fragment was amplified by polymerase chain reaction (PCR) using the genomic DNA of *Malus pumila* (Liao Fu) as a template. The fragment was cloned into pUCm-T, and then sequenced. The results suggest that this fragment is a part of open reading frame (ORF), and there is no intron in this fragment. The sequence has been registered on GenBank (AF433644), and shows much more homology to soluble than to insoluble invertases of plants by Blast in GenBank. The deduced amino acid sequence of the invertase gene fragment is 80%、80%、78%、77% identical to that of the proteins from Citrus unshiu (AF014925), *Daucus carota* (X67163), *Beta vulgaris* (X81796) and *Mung bean* (D10265), respectively. The gene is putatively recognised as a soluble acid invertase (vacuolar acid invertase) gene. Our results are important for study on transportation and metabolism of sucrose, development and quality of apple fruit.

Key words: ***Malus pumila*** **Vacuolar Acid Invertase Gene** **Cloning**

* Corresponding author. E-mail: zhiyizhang@bjfu.edu.cn

《细胞生物学杂志》2003年(25卷)总目录

专论与综述

成年神经干细胞研究现况 …… 刘 璇等Ⅰ:(1)
第Ⅵ类中间丝蛋白——Nestin …… 李雪玲Ⅰ:(5)
端粒(酶)的结构功能及其与衰老和癌症的关系 …… 梁铮铮 胡 剑Ⅰ:(8)
前列腺特异性抗原在前列腺癌诊断中的应用研究 …… 胡玲美等Ⅰ:(14)
线粒体融合机制研究进展 …… 耿 红 孟紫强Ⅰ:(17)
胸腺素α原研究进展 …… 曹俊霞等Ⅰ:(21)
FasL-Fas:免疫豁免还是炎症? …… 刘照平Ⅰ:(25)
葫芦科作物转基因研究进展 …… 于天祥 张明方Ⅰ:(29)
肥大细胞活化及生存 …… 康丽娜等Ⅱ:(65)
gp130介导的信号转导通路在哺乳动物着床中的作用 …… 刁红录等Ⅱ:(69)
泛素-蛋白水解酶复合体通路在卵母细胞减数分裂和受精中的作用 …… 霍立军等Ⅱ:(73)
微管动力学相关蛋白的研究 …… 李爱群 周建伟Ⅱ:(78)
NKT细胞亚群 …… 张 勇 王福庆Ⅱ:(81)
B淋巴细胞刺激因子 …… 孙 剑Ⅱ:(85)
B7分子家族及其配体 …… 陶 箭Ⅱ:(87)
赤霉素信号转导研究进展 …… 袁高峰 汪俏梅Ⅱ:(90)
γ-氨基丁酸(GABA)转运蛋白的结构、功能和调控 …… 胡佳华等Ⅲ:(129)
成体干细胞及其可塑性的研究进展 …… 郭 虹 赵春华Ⅲ:(133)
真核生物细胞中无终止密码mRNA的降解 …… 甘 强 王逸云Ⅲ:(139)
SMAD/DPC4基因与TGF-β超家族信号传导 …… 石松林 李祺福Ⅲ:(141)
尿激酶受体研究进展 …… 孙自勇Ⅲ:(145)