

# 荔枝败育胚 S-腺苷甲硫氨酸合成酶基因的全长扩增和序列分析

张以顺<sup>1</sup> 向旭<sup>2</sup> 傅家瑞<sup>1</sup> 黄上志<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup> 中山大学生命科学学院, 广州 510275; <sup>2</sup> 广东省农业科学院果树研究所, 广州 510640)

**摘要:** 从荔枝‘桂味’的败育胚中提取总 RNA, 利用 GeneRacer™ Kit 将 RNA 经去磷酸化反应、去 mRNA 的帽子结构及 RNA Oligo 连接, 反转录合成 cDNA, 以 cDNA 为模板, 分别用 SSH 分离得到的胚败育相关差异表达 S-腺苷甲硫氨酸合成酶基因的部分 cDNA 序列 (599 bp) 设计出 3' 和 5' 端基因特异引物, 进行 PCR 末端扩增。荔枝败育胚的 S-腺苷甲硫氨酸合成酶基因序列全长为 1515 bp, 编码 393 个氨基酸, 与其它物种的 S-腺苷甲硫氨酸合成酶基因的核苷酸序列同源性在 79% ~ 82% 之间, 氨基酸序列同源性在 88% ~ 91% 之间。结果表明所获得的基因为与荔枝胚败育相关的 S-腺苷甲硫氨酸合成酶基因。

**关键词:** 荔枝; 败育胚; S-腺苷甲硫氨酸合成酶基因

**中图分类号:** S 667.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 0513-353X (2004) 02-0160-05

## Full-length Amplifying and Sequencing of S-adenosylmethionine Synthetase Gene in Litchi Aborted-embryo of ‘Guiwei’

Zhang Yishun<sup>1</sup>, Xiang Xu<sup>2</sup>, Fu Jiarui<sup>1</sup>, and Huang Shangzhi<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup> Life Science School, Zhongshan University, Guangzhou 510275, China; <sup>2</sup> Pomology Institute, Guangdong Academy of Agricultural Science, Guangzhou 510640, China)

**Abstract:** Total RNA was extracted from aborted-embryo of litchi ‘Guiwei’. Dephosphorylating RNA, removing the mRNA cap structure and ligating the RNA Oligo to decapped mRNA with GeneRacer™ Kit and then the first strand of cDNA was synthesized by reverse transcription. The 3' and 5' gene specific primers from differential expressing cDNA fragments (*SAM* gene), isolated from aborted-embryo of litchi varieties of Guiwei by SSH, was designed with Gene Tools. The full-length 3' and 5' ends of cDNA was amplified with the first cDNA as template and two gene specific primers or nested primers by PCR. Complete *SAM* gene sequence was obtained by BLAST comparison of the three fragments and splicing according to the overlapping regions. The sequence of the *SAM* synthetase gene is 1515 bp in length with an opening reading frame (ORF) encoding 393 amino acids. The nucleotide sequence exhibits about 79% – 82% overall similarity to the corresponding gene of other organisms, and the amino acids is about 88% – 91%. It was suggested that the obtained cDNA was a *SAM* gene in aborted-embryo of litchi varieties of Guiwei.

**Key words:** Litchi; Aborted-embryo; S-adenosylmethionine synthetase gene (*SAM* gene)

S-腺苷甲硫氨酸合成酶基因编码 S-腺苷甲硫氨酸合成酶 (E. C. 2.5.1.6), 该酶催化甲硫氨酸和 ATP 反应生成 S-腺苷甲硫氨酸 (SAM)。在生物学上, SAM 不仅是植物体内转甲基反应的甲基供体, 还是植物生长调节物质多胺和乙烯合成的前体<sup>[1,2]</sup>。近年来, 有学者在水稻、茶树等多种植物中成功克隆了 SAM 合成酶基因<sup>[3,4]</sup>, 但荔枝 SAM 合成酶基因尚无研究报道。

我们在利用抑制消减杂交 (Suppressive subtraction hybridization, SSH) 技术克隆分离荔枝‘桂味’胚胎败育相关基因时, 成功地克隆出 SAM 合成酶基因等几个差异表达基因 cDNA 片段, 并对与

收稿日期: 2003-05-22; 修回日期: 2003-08-11

基金项目: 广东省自然科学基金资助项目 (010118)

\* 通讯作者, E-mail: Lsshsz@zsu.edu.cn

SAM 合成酶基因等对应的克隆进行了 Virtual Northern 检测<sup>[5]</sup>, 这一结果显示 SAM 合成酶基因可能与桂味的胚胎败育有某种联系。本文报告利用 cDNA 末端扩增技术获得荔枝败育胚中的 SAM 合成酶基因全长及序列分析结果, 力求为今后荔枝胚胎败育机制的分子水平研究奠定一定基础。

## 1 材料与方法

供试荔枝品种‘桂味’取自广东省农业科学院果树研究所大丰基地荔枝园 7~9 年生正常挂果树。在盛花期选择花量较大、花穗健壮的单株挂牌记录各花穗的雌花开放期, 取谢花后 20 d 的一批幼果, 置冰壶中带回实验室, 于 -20℃ 低温冰箱保存备用。

GeneRacer™ Kit 购自 Invitrogen 公司; TOPO TA cloning® Kit 购自 Invitrogen 公司; ExTaq DNA 聚合酶 (5 U/μL) 购自 Takara 公司; QIAquick Gel Extraction Kit 购自 Qiagen 公司。DNTTP 及 3 S Total RNA Miniprep Super Kit 购自上海博彩生物科技有限公司。

荔枝胚总 RNA 的提取: 剥取败育胚, 用 3 S Total RNA Miniprep Super Kit 提取总 RNA, 具体操作参照说明进行。提取完成后, 样品 RNA 用紫外分光光度计及甲醛变性凝胶检测, -70℃ 下保存备用。

特异基因引物的设计: 以通过抑制消减杂交获得的阳性差异表达克隆的插入 cDNA 片段 (599 bp) 为已知序列, 利用 Gene Tools 进行引物设计。3' 基因特异引物: 5'TTGGGTGCTCGGTTGACTGA 3', 3' 巢式引物: 5'CCGGACGGCAAAACACAAGTGA3'; 5' 基因特异引物: 5'CGGACGTGAAACCAATGGACC-TGCAAG3'; 5' 巢式引物: 5'TGCCCCCTCGTTCCTGACTCTG3'。

模板 cDNA 的合成: 取 5 μg 败育胚总 RNA, 加入 RNaseOut™ (40 U/μL) 和 CIP (10 U/μL), 50℃ 温浴 1 h, 去磷酸化; 吸取去磷酸化 RNA (7 μL), 加入 RNaseOut™ (40 U/μL) 及 TAP (0.5 U/μL), 37℃ 温浴 1 h, 去除 mRNA 的帽子结构; 然后加入 0.25 μg lyophilized GeneRacer™ RNA Oligo, 65℃ 温浴 5 min, 再加入 ATP (10 mmol/L) 和 T4RNA 连接酶 (5 U/μL), 37℃ 温浴 1 h, 完成 RNA Oligo 的连接; 最后加入 GeneRacer™ Oligo dT Primer 和 SuperScript™ II RT (200 U/μL), 42℃ 温浴 50 min, 70℃ 继续温浴 15 min 以终止反转录反应, 加入 1 μL RNase H (2U), 37℃ 温浴 20 min, 降解未反转录的 RNA。具体操作参照 GeneRacer™ Kit 说明书进行。

cDNA 末端扩增及 PCR 产物克隆: 3' 及 5' cDNA 末端扩增具体参照 GeneRacer™ Kit 说明书进行, 只是退火温度和延伸温度需作适当调整: 3' 特异基因引物的最佳退火温度为 57℃, 延伸温度为 66℃; 5' 特异基因引物的最佳退火温度为 59℃, 延伸温度为 68℃。3' 及 5' cDNA 巢式 PCR 扩增采用触减 PCR 扩增方式进行, 扩增参数为: 94℃ 预变性 2 min; 94℃ 变性 30 s, 63℃ 复性 30 s, 68℃ 延伸 2 min, 12 个循环; 94℃ 变性 30 s, 58℃ 复性 30 s, 63℃ 延伸 2 min, 13 个循环; 68℃ 延伸 10 min。割胶纯化、PCR 产物与 TOPO® 载体的连接和转化参照 QIAquick Gel Extraction Kit 和 TOPO TA Cloning® Kit 说明书进行。

克隆分析及序列测定: 任意挑选 3' 及 5' 的克隆各 20 个, 进行 LB 液体培养基 (100 μg/mL 氨苄青霉素) 摇菌培养, 同时用灭菌牙签蘸少许对应的克隆菌液放入 PCR 扩增体系中进行 PCR 扩增。各取 10 μL PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳分析, 最后挑选与插入片段相符的 3' 及 5' 的克隆各 10 个, 送上海生物工程服务有限公司进行序列测定。

## 2 结果与分析

### 2.1 3' 及 5' 特异基因巢式引物 PCR 扩增

通常情况下在最佳的退火温度及延伸温度得到的 3' 及 5' 基因特异引物的 PCR 扩增产物很可能就是我们希望的序列, 但有时也可能是假象 (其它扩增产物)。因此进行 3' 及 5' 基因特异巢式引物 PCR 扩增, 以验证真伪。结果表明 (图 1), 3' 及 5' 基因特异巢式引物均能从各自对应的初始 PCR 产物进行巢式引物 PCR 扩增, 巢式引物 PCR 扩增的产物的琼脂糖凝胶电泳结果基本上与预计结果相

符,可以肯定 3' 及 5' 基因特异引物的 PCR 扩增产物是目标基因全长的片段序列。

## 2.2 克隆的初步鉴定

挑选转化的白色菌株(单个克隆)进行 PCR 扩增,结果表明,3' 及 5' 的各转化菌株的插入片段一致,片段大小基本上与 3' 及 5' 特异基因引物的 PCR 扩增产物相对应(图 2),说明试验取得了预期的结果,所得克隆是目标基因的部分片段。

## 2.3 克隆序列测定结果

挑选 3' 及 5' 白色克隆各 10 个进行序列测定,结果显示,3' 端的克隆插入片段为 951 bp,5' 端的克隆插入片段为 310 bp,两片段经 GeneBank BLAST

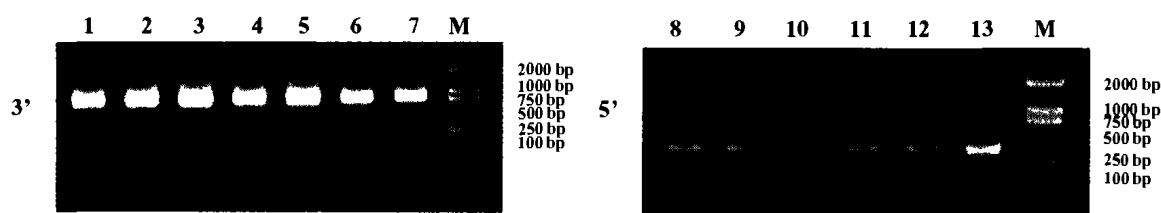


图 2 3' 及 5' 的部分转化菌株 PCR 产物电泳结果

1~7. 3' 部分转化菌株 PCR 产物; 8~13. 5' 部分转化菌株 PCR 产物; M. DNA marker.

Fig. 2 Electrophoresis result of portion 3' and 5' transformed TOPO 10 PCR products

Lane 1~7. 3' transformed TOPO 10 PCR products; Lane 8~13. 5' transformed TOPO 10 PCR products; M. DNA marker.

进行搜索比对,均与原差异表达克隆序列所对应的 S-腺苷甲 BLAST 进行搜索比对,均与原差异表达克隆序列所对应硫氨酸合成酶基因的部分序列有较高的同源性,最后将 3 个片段的重叠区域进行拼接,整个目标基因全长序列为 1515 bp (图 3)。

## 2.4 全长基因序列分析

S-腺苷甲硫氨酸合成酶基因的完全序列和推断的 S-腺苷甲硫氨酸合成酶基因编码的 S-腺苷甲硫氨酸合成酶氨基酸序列表明,该基因编码 393 个氨基酸,开放读码框从 ATG 密码子(70~72 碱基)开始,在 TGA 密码子(1246~1248 碱基)结束,推断的 poly(A<sup>+</sup>) 信号序列 AATAAA 发生在 1375~1380 碱基之间(图 3)。该基因全长序列经 GeneBank BLAST 进行搜索比对的结果表明,荔枝败育胚的 S-腺苷甲硫氨酸合成酶基因的核苷酸序列与其它物种的 S-腺苷甲硫氨酸合成酶基因的核苷酸序列同源性在 79%~82% 之间;氨基酸序列与长春花、牛奶子、芥菜、棉豆、番茄、矮牵牛和番木瓜的 SAM 氨基酸的同源性分别为 90%、91%、91%、91%、90%、90% 和

90% (表 1),说明所获得的基因序列的确是荔枝败育胚的 S-腺苷甲硫氨酸合成酶基因。

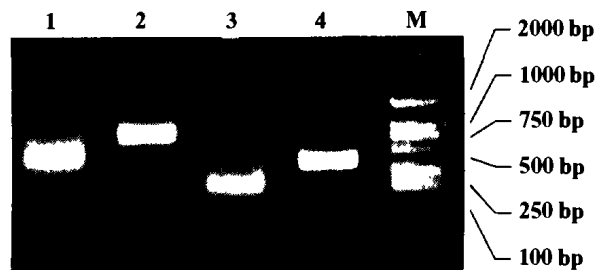


图 1 3' 及 5' 特异基因巢式引物 PCR 扩增

1. 3' 基因特异性巢式引物; 2. 3' 基因特异性引物; 3. 5' 基因特异性巢式引物; 4. 5' 基因特异性引物; M. DNA marker.

Fig. 1 PCR amplification of 3' and 5' nested primer

1. 3' specific gene nested primer; 2. 3' specific gene primer; 3. 5' specific gene nested primer; 4. 5' specific gene primer; M. DNA marker.

表 1 荔枝败育胚的 SAM 合成酶基因与其它物种 SAM 合成酶基因的同源性

Table 1 The nucleotide sequence of SAM synthetase gene in aborted embryo of litchi overall similarity to the corresponding gene of other organisms

基因登录号 Accession No.	物种 Organism	碱基同源性 Identity (%)	同源碱基数 No. bp overlap
M73430	<i>Populus x generosa</i>	82	1166
AJ277206	茶树 <i>Camellia sinensis</i>	81	1170
AF531479	番木瓜 <i>Carica papaya</i>	81	1167
Z24742	番茄 <i>Lycopersicon esculentum</i>	81	1173
AF170798	矮牵牛 <i>Petunia hybrida</i>	80	1148
AF321001	海滨稔蓬 <i>Suaeda maritima</i> subsp	80	1177
AF346306	牛奶子 <i>Elaeagnus umbella</i>	80	1166
U17241	猕猴桃 <i>Actinidia chinensis</i>	80	1052
AB062358	棉豆 <i>Phaseolus lunatus</i>	82	670
Z26867	水稻 <i>Oryza sativa</i>	81	797
AY092955	拟南芥 <i>Arabidopsis thaliana</i>	79	1170
M61882	康乃馨 <i>Dianthus caryophyllus</i>	79	1037
AF004317	香蕉 <i>Musa acuminata</i>	79	998
AF271220	芥菜 <i>Brassica juncea</i>	81	1099
Z71271	长春花 <i>Catharanthus roseus</i>	79	1168
U38186	短叶松 <i>Pinus banksiana</i>	79	1163
L36680	豌豆 <i>Pisum sativum</i>	81	1041

```

1   GAAAGCCCATCACCAACCTACCCCTCCTAAACAATTATTTCTTCTGAGATTGTAAACAG
61  AGAGAGGAAATGGAGACTTTTCTATTACATCAGAGTCAGTGAACGAGGGGCACCCAGAC
      M E T F L F T S E S V N E G H P D
121 AAGCTCTGTGACCAAGTCTCTGACGCTGTCCGACGCGTGTCTCGCTCAGGATCCTGAC
      K L C D Q V S D A V L D A C L A Q D P D
181 AGCAAGGTTGCTGTGAAACATGCACCAGGACAAACATGGTCATGGTTTTCGGAGAAATC
      S K V A C E T C T R T N M V M V F G E I
241 ACCACTAAAGCCAACGTGGACTATGAGCAGATCGTCCGTGACACTTGCAGGTCCATTGGT
      T T K A N V D Y E Q I V R D T C R S I G
301 TTCACGTCCGACGATGTTGGTCTCGACGCGGACAACTGCAAGGTCTCGTCAACATCGAG
      F T S D D V G L D A D N C K V L V N I E
361 CAGCAGAGCCCTGATATCGCTCAGGGTGTCATGGTACCTGACCAAAAAGCCTGAAGAG
      Q Q S P D I A Q G V H G H L T K K P E E
421 ATTGGTGACGGTGACCAGGGTCACATGTTGGATATGCCACTGATGAGACCCAGAGTTG
      I G A G D Q G H M F G Y A T D E T P E L
481 ATGCCTCTCAGCCACGTTCTGGCTACCAAGTTGGGTGCTCGGTTGACTGAGGTGAGAAA
      M P L S H V L A T K L G A R L T E V R K
541 AATGGAACCTGTGCATGGTTGAGACCGGACGGCAAAACACAAGTGACTGTTGAGTACTAC
      N G T C A W L R P D G K T Q V T V E Y Y
601 AATGGTAATGGCGCTATGGTTCTGTGTCGTCACACTGTCTCATATCTACACAGCAT
      N G N G A M V P V R V H T V L I S T Q H
661 GATGAGACCGTGACTAATGACGAGATTGCTGCTGACCTCAAGCAGCATGTGATCAAGCCC
      D E T V T N D E I A A D L K Q H V I K P
721 GTGATTCTGAAAAGTACTTGGACGAGAAGACTATTTTCCATCTCAACCCGTCTGGTCGT
      V I P E K Y L D E K T I F H L N P S G R
781 TTTGTGATTGGCGGTCCACATGGGGATGCTGGACTCACTGGCAGGAAGATCATTATTGAC
      F V I G G P H G D A G L T G R K I I I D
841 ACCTATGGTGGGTGGGGGGCCACGGCGGTGGGGCGTTTTCAGGCAAGGATCCTACTAAG
      T Y G G W G A H G G G A F S G K D P T K
901 GTGGACAGGAGTGGTGCTTATATTGTTAGACAGGCTGCTAAGAGCATTTGTCGAAGTGGG
      V D R S G A Y I V R Q A A K S I V A S G
961 TTGGCAAGGAGGTGCATTGTTCAAGTTTCTTATGCTATTGGAGTTCCTGAGCCTTTGTCA
      L A R R C I V Q V S Y A I G V P E P L S
1021 GTTTTGTGGACAGTTATGGCACTGGAAAGATTCCTGACAGGGAGATTTTGAAGATTGTT
      V F V D S Y G T G K I P D R E I L K I V
1081 AAGGAGAATTTTGATTTTCAGGCCCGGAATGATTTCAAGTCAATCTTGATTGGAAGAGGGT
      K E N F D F R P G M I S V N L D L K R G
1141 GGCAATGGCAGGTTTTTGAAGACTGCTGCTTATGGACATTTTGGTAGGGAAGATCCTGAC
      G N G R F L K T A A Y G H F G R E D P D
1201 TTCACATGGGAGGTGGTCAAGCCACTCAAGTGGGACAAGGTCCAAGCTTGATCAATCAGG
      F T W E V V K P L K W D K V Q A *
1261 GCTTGATTGAGTTTTCATGGTACACATACATGTCTTATGGGGATATGATTTTACCTTT
1321 TTTTGGCTGTGATCTTCAATTTGGGGATTTTGCTCGTGGTTGCTAGACAAAGTTTATT
1381 TTTTTCGTTTGTGTTTCATCTCTAA TGAGAGGTGGATAGATATTGTATTGAAATGGCTA
1441 TTGTTGCCTGAATAATACTATTAATTTGAGAATCCGCGGATAATTGGGCTCGAAAAAAA
1501 AAAAAAAAAAAAAA

```

图3 SAM 基因全序列及 SAM 基因编码的 SAM 合成酶氨基酸序列

Fig. 3 Complete sequence of SAM gene and amino acid sequence of SAM synthetase by SAM gene

### 3 讨论

近年来,各国学者通过对模式植物拟南芥和其它植物胚胎发育过程中的胚胎突变体基因表达调控的研究,已分离克隆出 *AGL11*、*KN1*、*SIN* 等多个与植物胚胎发育相关的基因<sup>[6~8]</sup>,在植物胚胎发育过程中如果这些基因发生突变或缺失会直接导致胚胎败育,但对某一个基因在植物胚胎发育过程大量表达而引发胚胎败育的研究则未见有报道。

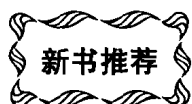
SAM 是生物体内重要的中间代谢物,不仅是植物体内转甲基反应的甲基供体,还是植物生长调节物质多胺和乙烯合成的前体<sup>[1,2]</sup>。有关 SAM 合成酶基因调控与植物胚胎发育之间的直接证据,目前还未见有报告,只是在动物果蝇胚的发育过程中,发现 SAM 合成酶突变体的幼体由于多胺生物合成受到梗阻,导致果蝇体胚或幼体致死<sup>[9]</sup>。

一般认为,在植物体细胞胚胎发育过程中,高水平内源乙烯抑制体胚发生,高水平多胺促进体胚

发生,二者相互制约<sup>[10]</sup>。张风路等在对玉米籽粒发育及败育的研究中发现,玉米籽粒败育型品种在受粉后8 h 乙烯释放量明显高于正常类型,且在以后的1~2 d 内维持较高水平,说明乙烯在玉米籽粒的败育中起着重要作用<sup>[11]</sup>。陈伟和吕柳新的研究表明,在荔枝胚胎发育的各个时期,败育胚珠中多胺含量均比正常发育的胚珠中的低<sup>[12]</sup>,揭示多胺不仅与荔枝胚胎发育有关,而且很可能是导致荔枝胚胎败育的一个重要原因。SAM 作为植物生长调节物质多胺和乙烯合成的前体,说明 SAM 合成酶基因对植物胚胎发育是必需的,但 SAM 合成酶基因荔枝败育胚中的大量表达,可能在某种程度上促进了乙烯的生物合成,使败育胚中乙烯含量增加,最终导致了荔枝胚败育。

### 参考文献:

- 1 Yang S F, Hoffman N E. Ethylene biosynthesis and its regulation in higher plants. *Plant Physiol.*, 1984, 35: 155~189
- 2 Slocum R D, Kaur-Sawhney R, Galston A W. The physiology and biochemistry of polyamines in plants. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1984, 235: 283~303
- 3 Frank V B, Rudy D, Jan G, et al. Characterization of a S-Adenosylmethionine synthetase gene in rice. *Plant Physiol.*, 1994, 105: 1163~1164
- 4 冯艳飞,梁月荣. 茶树 S-腺苷甲硫氨酸合成酶基因的克隆和序列分析. *茶树科学*, 2001, 21 (1): 21~25
- 5 张以顺,何旭,傅家瑞,等. 荔枝胚败育差异表达基因 cDNA 片段的克隆及序列分析. *园艺学报*, 2004, 31 (1): 25~28
- 6 Rounseley S D, Ditta G S, Yanofsky M F. Diverse roles for MADS box genes in *Abrabidopsis* development. *Plant Cell*, 1995, 7: 1259~1269
- 7 Elster R, Bommert P, Sheridan W F, et al. Analysis of four embryo-specific mutants in *Zea mays* reveals that incomplete radial organization of the proembryo interferes with subsequent development. *Development Genes and Evolution*, 2000, 210: 300~310
- 8 Ray S, Goleen T, Ray A. Maternal effects of short integuments mutation on embryo development in *Abrabidopsis*. *Dev. Biol.*, 1996, 180: 3365~3369
- 9 Larsson J, Rasmuson-Lestander A. Somatic and germline clone analysis in mutants of the S-adenosylmethionine synthetase encoding gene in *Drosophila melanogaster*. *FEBS Letter*, 1998, 427: 119~123
- 10 黄学林,李筱菊. 乙烯和多胺的生物合成与植物体细胞胚胎发生. *植物生理学通讯*, 1995, 31 (2): 81~85
- 11 张风路,赵明,王志敏,等. 乙烯在玉米籽粒发育及败育中调节作用的研究. *河北农业大学学报*, 1996, 19 (4): 1~5
- 12 陈伟,吕柳新. 荔枝胚珠中多胺含量变化与胚胎发育的关系. *热带亚热带植物学报*, 2000, 8 (3): 229~234



### 《英汉生物学词汇》(第二版)

本书是《英汉生物学词汇》1983年版的增修订本,是一部综合生物学各分支学科词汇的大型工具书。收有动物学、植物学、人体解剖学、组织胚胎学、微生物学、遗传学、细胞学、生物化学、生物物理学、时间生物学、生物工程、分子生物学、生态学等学科以及医学、农学的词汇,共约130 000条。定价:99元(含邮费)。

### 《汉英生物学词汇》

本书是一部汉英对照的大型工具书。收有动物学、植物学、人体解剖学、组织胚胎学、微生物学、遗传学、细胞学、生物化学、生物物理学、时间生物学、生物工程、分子生物学、生态学等学科以及医学、农学的名词,共约14万条。定价:106元(含邮费)。

### 《英汉园艺学词典》 章文才主编

该词典共收集专业词汇约两万条,按照全、新、准、精的收词原则,收录了园艺科学的基本词汇和与园艺科学有密切联系的基础科学和边缘科学词汇,其中从现代外文书刊中摘录的拼合新词约100多条。为了便于检索,本词典将主要的果树、蔬菜、花卉种名,按植物属分类汇编。可供我国园艺界的教学、科研、生产方面的专业人员和广大园艺工作者参考使用。定价:23元(含邮费)。

购书者请通过邮局汇款至北京中关村南大街12号中国农科院蔬菜花卉所《园艺学报》编辑部,邮编100081。