

# 甘蓝和油菜中类硫氧还蛋白 *THL2* 基因的克隆与序列分析

王茂广<sup>1</sup> 吴俊岩<sup>1</sup> 吴能表<sup>2</sup> 朱利泉<sup>1\*</sup> 王小佳<sup>2\*</sup>

(<sup>1</sup> 西南农业大学农学与生命科学学院生化实验室, 重庆 400716; <sup>2</sup> 西南农业大学园艺园林学院, 重庆市蔬菜学重点实验室, 重庆 400716)

**摘要:** 采用 PCR 和 RT-PCR 方法, 对甘蓝和油菜的基因组 DNA 和柱头总 RNA 进行扩增, 获得了类硫氧还蛋白 *THL2* 的 DNA 和 cDNA。序列分析首次表明 *THL2* 基因有两个内含子, 并且在油菜和甘蓝中的大小不同。进一步分析表明, 油菜和甘蓝中 *THL2* DNA 序列的同源性为 96%。

**关键词:** 自交不亲和性; *THL2* 基因; 克隆; 序列分析

中图分类号: S 635 文献标识码: A 文章编号: 0513-353X (2004) 03-0381-03

## Cloning and Sequence Analysis of Thioredoxin-h-like *THL2* Gene in *Brassica napus* L. and *Brassica oleracea* L.

Wang Maoguang<sup>1</sup>, Wu Junyan<sup>1</sup>, Wu Nengbiao<sup>2</sup>, Zhu Liquan<sup>1\*</sup>, and Wang Xiaojia<sup>2\*</sup>

(<sup>1</sup> Laboratory of Biochemistry, College of Agronomy and Life Sciences, Southwest Agricultural University, Chongqing 400716, China; <sup>2</sup> Chongqing Key Laboratory of Olericulture, College of Horticulture and Gardens, Southwest Agricultural University, Chongqing 400716, China)

**Abstract:** Thioredoxin-h-like protein *THL2* DNA and cDNA were amplified from genomic DNA and stigma total RNA in *Brassica napus* L. and *B. oleracea* L. by PCR and RT-PCR method respectively. Sequence analysis first indicated that *THL2* gene contained two introns, which were different in size between *B. napus* L. and *B. oleracea* L. Homologous analysis demonstrated that there was 96% identity of *THL2* DNA from *B. napus* L. and *B. oleracea* L.

**Key words:** Self-incompatibility; *THL2* gene; Cloning; Sequence analysis

### 1 目的、材料与方法

自交不亲和性 (self-incompatibility, SI) 在遗传上受 S-位点 (S-locus) 控制。在孢子体型自交不亲和的芸薹属中, S 位点受体激酶 (S-locus receptor kinase, SRK) 是柱头 S 基因编码的一种跨膜的蛋白质激酶<sup>[1,2]</sup>; S 位点富含半胱氨酸蛋白 (S-locus cysteine rich protein, SCR) 是花粉 S 基因编码的一种配体蛋白<sup>[3]</sup>, 当自花花粉落到柱头上时, SCR 特异地结合在 SRK 的受体结构域上, 启动一个信号传递过程, 最终导致 SI 反应。而类硫氧还蛋白 *THL2* (Thioredoxin-h-like 2) 能与 SRK 的胞内激酶结构域特异结合, 抑制 SRK 的自磷酸化作用<sup>[4,5]</sup>, 从而阻止 SI 反应信号的传递。但是目前对 *THL2* 抑制 SRK 活性的分子机理还知之甚少。在油菜中已经克隆了它的 cDNA<sup>[6]</sup>, 但对其与基因组 DNA 的比较分析尚未见报道。本试验以西南农业大学提供的‘西园四号’甘蓝和‘2001817’油菜为试材, 分别克隆甘蓝和油菜中 *THL2* DNA 和 cDNA, 对其序列进行比较分析, 以期为进一步弄清 *THL2* 编码基因的结构与遗传变异提供新内容。

用本实验室改良的 CTAB 法提取甘蓝和油菜基因组 DNA, 根据 *THL2* 的 cDNA 序列, 设计合成了

收稿日期: 2003-07-15; 修回日期: 2003-10-14

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30170646); 重庆市应用基础项目 (6870)

\* 通讯作者 Corresponding author; zhu\_lq2002@yahoo.com.cn; xj@swau.cq.cn

1 对寡核苷酸引物:  $P_1$  (5'-TGCAGAAGAGGGACAAGT-3') 和  $P_2$  (5'-AGGCAATGGTCTTATGATG-3')。为了符合引物设计的合理性, 5'引物设计时从起始密码子之后的碱基开始, 引物合成由上海生工公司完成。用 PCR 反应试剂盒 (上海生工) 扩增 *THL2* DNA。用 UNIQ-10 Trizol Total RNA Preparation Kit 抽提甘蓝和油菜柱头总 RNA。以总 RNA 为模板, 用 cDNA First Strand Synthesis Kit 和特异性引物  $P_2$  进行反转录合成 cDNA 第一链, 再以 cDNA 第一链为模板, 用引物  $P_1$  和  $P_2$  进行 PCR 扩增 *THL2* cDNA。PCR 和 RT-PCR 产物经 1% 的琼脂糖凝胶电泳, 目的带经回收纯化后, 与 pUCm-T 载体 (上海生工) 连结, 然后转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$  感受态细胞进行蓝白筛选, 通过菌液 PCR 和酶切分析筛选阳性克隆, 然后送上海生工测序, 得到甘蓝和油菜 *THL2* 的 DNA 与 cDNA 序列。

## 2 结果分析与讨论

### 2.1 PCR 和 RT-PCR 扩增产物电泳分析

PCR 和 RT-PCR 产物经 1% 的琼脂糖凝胶电泳显示, 分别获得了 880 bp 左右和 520 bp 左右的扩增条带 (图 1), 谱带显示扩增的 DNA 和 cDNA 在油菜与甘蓝中的大小基本相同。

### 2.2 测序结果及序列分析

扩增产物经回收纯化、克隆和验证后, 进行两端测序。测序结果 (图 2) 表明克隆的油菜中 *THL2* DNA 长为 888 bp, cDNA 长为 524 bp; 甘蓝中 *THL2* DNA 长为 879 bp, cDNA 长为 516 bp。比较 *THL2* DNA 与 cDNA 序列发现, 油菜 *THL2* DNA 在 86~348 位和 475~575 位序列不编码任何氨基酸, 是非编码区, 推测这两部分序列为内含子, 大小为 263 bp 和 101 bp; 甘蓝中 *THL2* DNA 与 cDNA 序列比较相似, 两个内含子起止位点分别在 86~354 位和 481~574 位, 大小为 269 bp 和 94 bp。这两个内含子的剪切位点都符合典型的 GT-AG 法则。

将甘蓝与油菜的 *THL2* DNA 序列比较发现, 在编码区仅有四处碱基不同 (GAG→GCG, ATT→AAT, ACA→ACC, AAT→AGT), 其中 ACA→ACC 未造成氨基酸的变化, 属于同义突变; 其余 3 个碱基都是在第 2 位密码子的位置上发生突变, 造成了氨基酸的变化, 属于错义突变。这表明 *THL2* 基因在不同作物中存在进化上的差异。用 MegAlign 程序 (DNASTar 公司) 分析表明油菜与甘蓝中 *THL2* DNA 序列的同源性为 96%。进一步将 *THL2* DNA 的编码区与非编码区序列比较发现, 编码区序列高度保守, 而两个内含子序列和 3' 的非翻译区 (UTR) 保守程度较低, 反映了这些序列比编码区累积突变的程度更高。

根据 cDNA 推导了 *THL2* 的氨基酸序列, 克隆的 *THL2* 基因含有编码 117 个氨基酸的开放阅读框, 由 3 个外显子组成, 在第 2 个外显子中有 1 个与 SRK 的 Cys<sup>465</sup> 特异结合的反应活性位点 CPPC<sup>[5]</sup>, 这两个 Cys 在与 SRK 的结合中起关键作用<sup>[4]</sup>。油菜中 *THL2* 编码的氨基酸与文献报道<sup>[6]</sup> 的一致, 从而肯定了所克隆基因的正确性; 甘蓝中 *THL2* 编码的氨基酸与文献报道<sup>[6]</sup> 的有 3 处差异 (图 2), 由于我们采用的 PCR 扩增错误率小于万分之一, 而扩增的 cDNA 大小仅为 516 bp, 认为该差异是甘蓝中 *THL2* 基因本身造成突变的可能性较大。这种变异是否会影响 *THL2* 蛋白的空间构象及其在孢子体型自交不亲和性信号转导过程中与 SRK 的结合情况, 还需要进行深入研究。

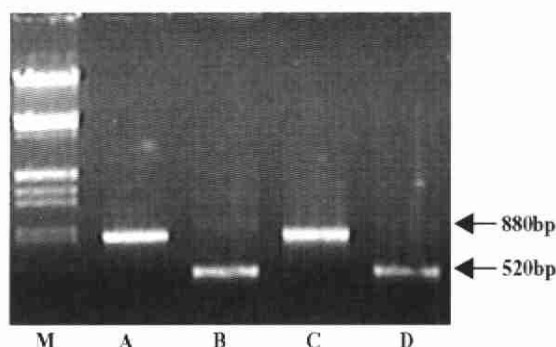


图 1 PCR 和 RT-PCR 产物电泳

M: Marker  $\lambda$ DNA/ Hind III + EcoRI; A: 油菜 PCR 产物; B: 油菜 RT-PCR 产物; C: 甘蓝 PCR 产物; D: 甘蓝 RT-PCR 产物

Fig. 1 PCR and RT-PCR products

M: Marker  $\lambda$ DNA/ Hind III + EcoRI; A: PCR product of *Brassica napus* L.; B: RT-PCR product of *B. napus* L.; C: PCR product of *B. oleracea* L.; D: RT-PCR product of *B. oleracea* L.

- 1 Takasaki T, Hatakeyama K, Suzuki G, et al. The S receptor kinase determines self-incompatibility in *Brassica stigma*. *Nature*, 2000, 403: 913 ~ 916
- 2 吕俊, 朱利泉, 王小佳. 利用蛋白激酶抑制剂和激活剂调控甘蓝自交不亲和性. *园艺学报*, 2001, 28 (3): 235 ~ 239
- 3 Schopfer C R, Nasrallah M E, Nasrallah J B. The male determinant of self-incompatibility in *Brassica*. *Science*, 1999, 286: 1697 ~ 1700
- 4 Mazzurco M, Sulaman W, Elina H, et al. Further analysis of the interactions between the *Brassica* S-receptor kinase and three interacting proteins (ARCL, *THL1* and *THL2*) in the yeast two-hybrid system. *Plant Molecular Biology*, 2001, 45: 365 ~ 376
- 5 刘东, 朱利泉, 王小佳. 甘蓝自交不亲和信号转导中 SRK 结合蛋白基因 *THL1* 的克隆与序列分析. *园艺学报*, 2003, 30 (1): 56 ~ 58
- 6 Bower M S, Matias D D, Fernandes-Carvalho E, et al. Two members of the thioredoxin-h family interact with the kinase domain of a *Brassica* S-locus receptor kinase. *The Plant Cell*, 1996, 8: 1641 ~ 1650