

甜瓜果实酸性转化酶基因 cDNA 片段的克隆

于喜艳¹ 赵双宜² 何启伟³ 孔庆国⁴

(¹ 山东农业大学园艺学院, 泰安 271018; ² 山东大学生命科学学院, 济南 250100; ³ 山东省农业科学院蔬菜研究所, 济南 250100; ⁴ 山东滨州职业学院, 滨州 256624)

摘要: 根据在 GenBank 中登录的番茄、胡萝卜和柑桔等酸性转化酶基因的保守序列设计引物, 采用 RT-PCR 方法, 从甜瓜果实总 RNA 中扩增出目标 cDNA 片段, 克隆到 pMD18-T 载体中。序列分析表明, 它与其它植物的酸性转化酶基因的同源性很高, 与番茄氨基酸序列同源性为 99%, 说明已经成功克隆到甜瓜果实酸性转化酶基因 cDNA 片段, 在 GenBank 中登记号 AF490425。

关键词: 甜瓜; 果实; RT-PCR; 酸性转化酶基因

中图分类号: S 652 **文献标识码:** A **文章编号:** 0513-353X (2003) 03-0346-03

1 目的、材料与方法

甜瓜果肉中主要的可溶性糖是蔗糖、葡萄糖和果糖。对于不同含糖量的品种来说葡萄糖、果糖的含量基本上没有太大差别, 甜度差别主要取决于蔗糖含量的不同^[1]。而甜瓜果实蔗糖代谢主要受酸性转化酶和蔗糖磷酸合成酶的调控, 而且酸性转化酶活性的降低是甜瓜果实蔗糖积累的必要前提^[2]。改善甜瓜品质, 提高含糖量和适当提早蔗糖积累的主要突破口就是适时降低果实发育中酸性转化酶的活性。因此, 有必要对甜瓜果实酸性转化酶基因进行克隆和测序。

将‘伊丽莎白’甜瓜 (*Cucumis melo* L.) 播种于山东省农科院蔬菜所日光温室, 以开花后 5 d 果实为材料, 提取总 RNA。RNA PCR (AMV) Ver 2.1 Kit, pMD 18-T Vector 和 T₄ DNA 连接酶购自大连宝生物有限公司; DNA Extraction Kit 购自 MBI 公司; 大肠杆菌 DH10B 由山东大学生命科学院遗传实验室提供。RNA 的提取参照文献 [3]。根据在 GenBank 中登录的番茄、胡萝卜和柑橘等作物的酸性转化酶基因的保守序列, 设计 5' 端引物为 5'-GACCCGACTACTGCTTGG-3' (引物 A) 和 3' 端引物为 5'-TAT-GACTGTCTTCTCCT-3' (引物 B)。按 RNA PCR Kit (AMV) Ver 2.1 试剂盒说明书, 逆转录: 取 1 μ L (约 1 μ g) 甜瓜果实总 RNA 于 8.5 μ L 无 RNA 酶的双蒸水中, 72℃ 水浴 10 min, 立即置冰上 2 min 后, 加入 25 mmol/L MgCl₂ 4 μ L, 10 \times RNA PCR Buffer 2 μ L, 10 mmol/L 的 dNTP 2 μ L, Rnase Inhibitor 0.5 μ L, Reverse Transcriptase 1 μ L (5 U/L) 和 Oligo (dT) -Adaptor primer 1 μ L。置 PCR 仪中, 反应条件为 42℃ 30 min, 99℃ 5 min, 5℃ 5 min。逆转录完成后, 向反应体系中加入下列成分: 25 mmol/L MgCl₂ 6 μ L, 10 \times RNA PCR buffer 8 μ L, D.D.W 57.5 μ L, 引物 A 4 μ L (20 pmol/ μ L), 引物 B 4 μ L (20 pmol/ μ L), Taq 酶 0.5 μ L (5 U/ μ L) 总体积 100 μ L。PCR 反应参数为 94℃ 预变性 5 min, 随后 94℃ 1 min, 50℃ 1 min, 72℃ 3 min, 30 个循环后, 72℃ 再延伸 10 min。

目的 DNA 片段的回收采用购自 MBI 公司的 DNA Extraction 试剂盒。PCR 产物纯化后直接与 pMD18-T (大连宝生物 T 载体试剂) 载体连接, 采用热激法转化大肠杆菌 DH10B 感受态细胞, 感受态细胞的制备采用 CaCl₂ 法^[4]。取 100 μ L 菌液涂布于含 X-gal 和 IPTG 的筛选培养基 (含氨苄青霉素) 平板, 37℃ 培养 16 h 后随机挑取 4 个白色菌落分别接种于加有 Amp 50 mg/L 的 LB 液体培养基中, 37℃ 过夜培养。按碱裂解法少量提取质粒。以质粒 DNA 为模板进行 PCR 鉴定, 委托大连宝生物工程有限公司测定 DNA 序列。

2 结果与分析

2.1 RNA 提取和酸性转化酶基因 RT-PCR 扩增

通常情况下,甜瓜果实花后 10~15 d 左右酸性转化酶活性最高,但编码蛋白的 mRNA 的高峰期应早于酶的活性期,再考虑到‘伊丽莎白’为早熟品种,故取花后 5 d 的果实作为材料提取 RNA。本试验从 10 g ‘伊丽莎白’甜瓜果实组织中提取到 336 μ g RNA,完整性很好,OD₂₆₀/OD₂₈₀=2.03,达到了 RT-PCR 对 RNA 的要求。RT-PCR 产物经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检查,在约 1 kb 处有一条带,片段大小与预期的一致(图 1)。

2.2 RT-PCR 产物的克隆

RT-PCR 产物纯化后与 pMD18-T 载体连接,转化大肠杆菌 DH10B,蓝白斑筛选获得 285 个白斑菌落,未见蓝斑。随机挑取 4 个克隆提取质粒。PCR 检测结果均为阳性(图 2),这表明 RT-PCR 产物已克隆到载体上。

2.3 甜瓜果实酸性转化酶 cDNA 片段的序列分析

将所得克隆的重组质粒纯化后进行序列测定,结果如图 3。双向测序结果表明克隆的 cDNA 片段长 1038 bp,推导的氨基酸序列长 346 个氨基酸。与 GenBank 中的同源序列比较,本研究所分离的

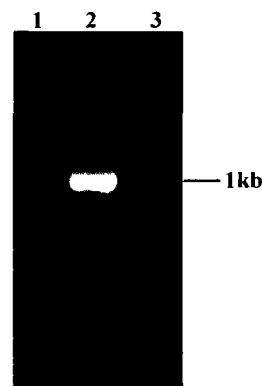


图 1 甜瓜果实酸性转化酶基因 RT-PCR 产物

1. 空白对照; 2. 果实总 RNA 的 RT-PCR 产物; 3. DNA 分子量标记
Fig. 1 RT-PCR product of acid invertase gene in melon fruit
1. Negative control; 2. RT-PCR product amplified from melon fruit;
3. Marker DNA DL. 2,000 + 15,000

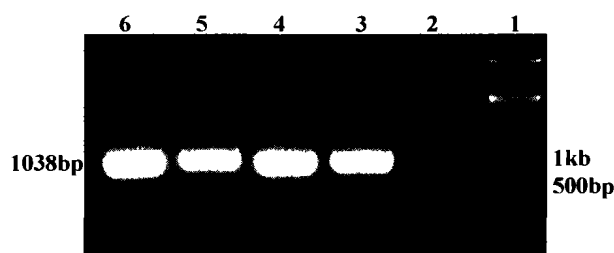


图 2 重组质粒的 PCR 鉴定

1. DNA 分子量标记; 2. PMD 18-T 质粒; 3~6. 重组子的 PCR 产物
Fig. 2 PCR products of the recombinant plasmids
1. Marker DNA DL. 2,000 + 15,000; 2. pMD18-T plamid;
3~6. PCR products of recombinant plasmids

1	GACCCGACTACTGCTTGGACCGGACCACAAAATGGGCAATGGCTGTTAAACAATCGGGCTCTAAGATTGGTAAACG
1	D P T T A W T G P Q N G Q W L L T I G S K I G K T
76	GGTGTGCACTTGTATGAACTTCAACTTCACAAGCTTTAAGCTATTGGATGGAGTGCTGCATGCGGTTCCG
26	G V A L V Y E T S N F T S F K L L D G V L H A V P
151	GGTACGGGTATGTGGAGTGTGTGGACTTTTACCGGTATCTACTAAAAAACAACGGGTGGACACATCATAT
51	G T G M W E C V D F Y P V S T K K T N G L D T S Y
226	AACGGGCCGGGTGTAAGCATGTGTTAAAGCAAGTTAGATGACAATAAGCAAGATCATTATGCTATTGGTACG
76	N G P G V K H V L K A S L D D N K Q D H Y A I G T
301	TATGACTTGGGAAGAACAATGGACACCGGATAACCGGAATTGGATTGTGGAATTGGGTGAGACTAGACTAT
101	Y D L G K N K W T P D N P E L D C G I G L R L D Y
376	GGGAAATATTATGCATCAAAGACTTTTATGACCGAAGAAAGAACGAGAGTACTGTGGGATGGATTGGGAA
126	G K Y Y A S K T F Y D P K K E R R V L W G W I G E
451	ACTGACAGTGAATCTGCTGACCTGCAGAGGATGGGCATCTGTACAGAGTATCCAAGGACAGTGCTTTACGAC
151	T D S E S A D L Q K G W A S V Q S I P R T V L Y D
526	AAGAAGACAGGACACATCTACTTCAGTGGCAGTGAGGAAATTGAAAGCTTAAGAGTGGTGATCCTACTGTT
176	K K T G T H L L Q W P V E E I E S L R V G D P T V
601	AAGCAATCGATCTTCAATCAGGCTCAATTGAGCTACTCCGTGCTGACTCAGCTGCAGAGTTGGATATAGAAGCC
201	K Q V D L Q S G S I E L L R A D S A A E L D Z E A
676	TCATTTGAAGTGGACAAAGTCGCGCTTCAGGGAATAATTGAAGCAGATCATGTAGGTTTCAGTTGCTCTACTAGT
226	S F E V D K V A L Q G I I E A D H V G F S C S T S
751	GGAGGTGCTAGCAGAGGCATTTTGGGACCATTTGGTGTATAGTAATTGCTGAT AAACGCTATCTGAGCTA
251	G G A A S R G Z L G P F G V I V I A D Q T L S E L
826	ACGCCAGTTACTTTTACATTTCTAAAGGAGCTGATGGTCATGCAGAGACTCACTTCTGTGCTGATCAAACATA
276	T P V Y F Y I S K G A D G H A E T H F C A D Q T R
901	TCCTCTGAGGCTCCGGAGTTGGTAAACAAGTTTATGGTAGTTCACTACCTGTGTTGGACGGTGAAAAACATTCA
301	S S E A P G V G K Q V Y G S S V P V L D G E K H S
976	ATGAGATTATTGGTGGATCACTCAATTGTGGAGGCTTTGCTCAAGGAGGAAGACAGTCATA
326	M R L L V D X S I V E S F A Q G G R T V I

图 3 甜瓜果实酸性转化酶基因 cDNA 片段序列及其推导的氨基酸序列

上行为 cDNA 序列,下行为推导的氨基酸序列。

Fig. 3 Sequences of cDNA fragment and its deduced amino acid of acid invertase gene in melon fruit

The above line showed cDNA sequence, under which were the sequence of deduced amino acid.

cDNA 片段的氨基酸序列与其它物种酸性转化酶的氨基酸序列同源性介于 55% ~ 99%。其中与茄科作物的同源性最高,与番茄同源性为 99%,与马铃薯为 96%,与辣椒为 93%;其次与甘薯、胡萝卜、水稻的同源性都在 80% 以上;与甘蓝、菜豆和葡萄等的同源性在 70% ~ 79%。据此认为,该 cDNA 片段属于甜瓜果实酸性转化酶基因 cDNA 片段,在 GenBank 中登记号 AF490425。

本试验为今后从甜瓜果实 cDNA 文库中筛选全长基因和利用反义基因技术,促进甜瓜果实蔗糖积累,从分子水平进行甜瓜品质改良奠定了基础。

参考文献:

- 1 Lingem S E, Dunlap J R. Sucrose metabolism in nested muskmelon fruit during development. *Plant Physiol.*, 1987, 84: 386 ~ 389
- 2 Mc Collum T G, Hubert D J. Soluble sugar accumulation and activity of related enzymes during muskmelon fruit development. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 1988, 113 (3): 399 ~ 403
- 3 赵双宜, 吴耀荣. 介绍一种新的 RNA 的提取方法. *遗传*, 2002, 24: (3) 337 ~ 338
- 4 J 萨姆布鲁克, E F 弗里奇, T 曼尼阿蒂斯. 分子克隆实验指南. 金科雁, 黎孟枫译. 北京: 科学出版社, 1992. 55 ~ 56

Cloning of a cDNA Fragment of Acid Invertase Gene from *Cucumis melo* L. Fruit

Yu Xian¹, Zhao Shuangyi², He Qiwei³, and Kong Qingguo⁴

(¹ School of Horticulture, Shandong Agricultural University, Tai'an 271018, China; ² School of Life Sciences, Shandong University, Ji'nan 250100, China; ³ Vegetable Institute, Shandong Academy of Agricultural Sciences, Ji'nan 250100, China; ⁴ Binzhou Vocational College of Shandong Province, Binzhou 256624, China)

Abstract: PCR primers were designed based on the consensus domain of some acid invertase genes in GenBank. The aimed cDNA fragment was amplified from the total RNA isolated from melon fruit via RT-PCR and cloned into pMD18-T vector. The amino acid sequence determined by this fragment shows 99% homology to that of the corresponding region of acid invertase of tomato. This confirms that we have cloned a cDNA fragment from melon fruit successfully, the access number of this gene in GenBank is AF490425.

Key words: Melon; Fruit; RT-PCR; Acid invertase gene



信息

中国园艺学会十字花科蔬菜分会成立

经中国园艺学会第九届第 5 次常务理事扩大会议讨论批准,中国园艺学会十字花科蔬菜分会成立,并于 2003 年 3 月 27 日在郑州召开成立大会,30 余名从事十字花科蔬菜科研、教学、生产、管理方面的代表参加了会议。代表们听取了筹备小组的筹备工作报告,讨论并通过了分会章程,选举了分会领导机构的主要组成人员。会长:方智远;副会长:何启伟、徐家炳、王均邦;秘书长:孙日飞;副秘书长:侯喜林、刘玉梅。会议决定 2003 年 10 月上旬在山东莱州市召开十字花科蔬菜学术交流会。

关于召开十字花科蔬菜学术交流会议的预备通知

中国园艺学会十字花科蔬菜分会决定,2003 年 10 月上旬在山东省莱州市召开十字花科蔬菜学术交流会,会期预计 3 天。会议主要内容有:1. 召开中国园艺学会十字花科蔬菜分会理事会;2. 交流十字花科蔬菜生物技术及雄性不育方面的研究进展;3. 展示十字花科蔬菜的新品种。欢迎从事十字花科蔬菜科研、教学、生产、管理方面的单位和个人参加会议。申请参加会议的代表请于 2003 年 8 月 30 日前与中国园艺学会办公室张彦同志联系,拟在会上进行论文交流的,请将论文全文寄到中国园艺学会办公室。会议费及差旅费自理。会议具体日期及提供展示新品种的要求将另行通知。

中国园艺学会十字花科蔬菜分会

2003 年 6 月 8 日