

柑桔 MADS 盒 *APETALA1* 同源 DNA 片段克隆

林伯年 刘春铃 徐昌杰 陈大明

(浙江大学园艺系, 杭州 310029)

摘要: 用 PCR 扩增法, 从柑桔基因组分离出了 *AP1* 同源基因中的一个片段。序列分析表明, 它与其它植物的 MADS 盒基因同源性较高, 氨基酸序列同源 45%~73%, 但是否与发育有关, 还需做功能性检测。

关键词: 柑桔; MADS 盒基因; PCR

中图分类号: S 666; Q 785 文献标识码: A 文章编号: 0513-353X (2001) 02-0167-03

1 目的、材料与方法

拟南芥中的 MADS 基因家族中 *APETALA1* 基因在花分生组织和花器官的形成过程中起着至关重要的作用^[1,2]。作者以大三岛脐橙基因组 DNA 为材料, 用 PCR 扩增法克隆柑桔 *APETALA1* 同源 DNA 片段, 为克隆全长基因和通过转基因手段缩短柑桔童期奠定基础。

DNA 的提取参考文献 [3], 根据在 GenBank 中登录的一些 MADS 盒基因序列设计引物, 5' 端引物 Primer1: 5' GCAGCAGCTTGATACTACTCTA 3', 3' 端引物 Primer2: 5' GTTTTGCTCCTGTATTGCCTTCT 3'。Primer1 与 Primer2 由上海生工生物工程有限公司合成。PCR 反应体系为 10×PCR 反应缓冲液 5 μL, 25 mmol/L MgCl₂ 4 μL, 25 mmol/L dNTP 4 μL, Primer1 (10 pmol/μL) 1 μL, Primer2 (10 pmol/μL) 1 μL, Taq DNA 聚合酶 (4.5 u/μL) 0.5 μL, 加 ddH₂O 至 49 μL, 模板 DNA (柑桔基因组 DNA 10 ng/μL) 1 μL。PCR 反应的参数设置为 94℃预变性 5 min, 变性 40 s, 51℃退火 60 s, 71.5℃延伸 90 s, 30 轮循环。

目的 DNA 片段的回收采用 Glassmilk 法。PCR 产物纯化后直接与 pMD18-T 载体连接, 连接反应体系为 PCR 纯化产物 3 μL, 10×T4 ligase buffer 0.5 μL, pMD18-T vector 0.5 μL, T4 DNA ligase 0.5 μL, ddH₂O 0.5 μL, 12℃连接过夜。采用 CaCl₂ 法制备大肠杆菌感受态细胞 (TG1), 连接产物 3 μL 转化大肠杆菌感受态细胞, 取 100 μL 菌液涂布于含 X-gal 和 IPTG 的筛选培养基 (含氨苄青霉素) 平板 (直径 7 cm), 37℃培养 24 h 后挑取几个白色菌落分别接种于加有 Amp 50 μg/mL 的 LB 液体培养基中, 37℃培养至对数生长期。

重组质粒进一步采用 PCR 法筛选, 反应体系同前。将筛选到的克隆接种于 3 mL 的 LB 培养基 (含 Amp 50 μg/mL) 中, 37℃培养至对数生长期, 用碱法提取质粒 DNA, 重组质粒再通过与质粒 PUC19 电泳比较及 PCR 反应进行鉴定。用 Pharmacia biotech Gy5TM Autorcycle Sequencing Kit 做测序反应, 在 Pharmacia ALF express 全自动测序仪上测定序列。

2 结果与分析

2.1 扩增结果 以柑桔基因组 DNA 为模板, 按设计的反应条件进行 PCR 扩增, 扩增产物经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检查, 在约 300 bp 处有一条带, 其大小与预期值相符 (图 1)。

2.2 扩增产物的连接转化和重组质粒分析 PCR 扩增产物纯化后与 pMD18T Vector 连接,

转化 TG1 后在含 Amp (100 μ g/mL) 的含 X-gal 和 IPTG 的筛选培养基中随机筛选 9 个白色阳性菌落, 将可能含有插入片断的白色菌落的裂解上清液作为模板进行 PCR 反应, 筛选出两个含有插入片段的重组菌落。取其中一个重组菌落, 用碱法提取质粒, 以 PUC19 质粒 DNA 作为对照, 在 1.0% 的琼脂糖凝胶中电泳进行鉴定, 证明质粒中插入了外源 DNA 片段 (图 2), 将此质粒命名为 *csAP1*。

将筛选得到的重组子 *csAP1* 用 Hind III 和 EcoR I 进行双酶切, 酶切产物同时在 1.0% 的琼脂糖凝胶中电泳, 结果在 300 bp 左右出现条带, 长度与 PCR 产物相近, 这与预期结果完全符合 (图 3)。

2.3 *csAP1* 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的结果如图 4。

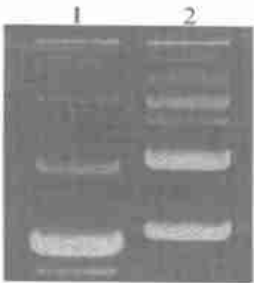


图 2 重组质粒和 PUC19 质粒的琼脂糖凝胶电泳
Fig. 2 Comparison of plasmid PUC19 with the recombinant plasmid by agarose gel electrophoresis
1. plasmid PUC19, 2. The recombinant plasmid

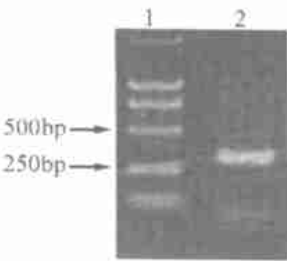


图 1 柑桔 *AP1* 同源基因片段的 PCR 扩增
Fig. 1 PCR amplification of a fragment of the *AP1* homologue in citrus
1. PCR product amplified from citrus genomic DNA,
2. DL 2 000 Marker

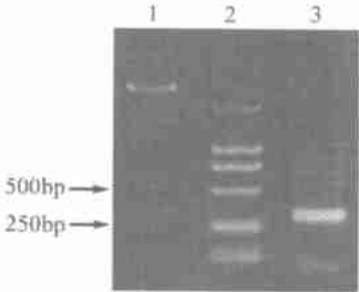


图 3 重组克隆的限制性酶切分析及 PCR 鉴定
Fig. 3 Restriction pattern and PCR product of the recombinant plasmid
1. The recombinant plasmid digested with HindIII, and EcoRI together, 2. DL 2 000 marker,
3. PCR product of the recombinant plasmid

```
gCAGCAGCTTGATACTACTCTTAAGCGCCTTCGAAATAGAAAGgtgaagatt 52
Q Q L D T T L K R L R N R K
caatgcaatgctcttcaacatttttatgtcttctgtattgtgttggacataca 104
ccataatattgacattatctttctgggtacaatatatttatataatgcagaacc 156
↓                                     ↓
aACTGACACATGAATCAATTTCCGATCTACAAAAAAGGGTAAGctcattgta 208
L T H E S I S D N Q L Q K R
gctcccttggtgttttactacaataaacaatacaatctctgatagtatcctgt 260
↓
acaacaatgaacataataacaataaagtttggttacagGAGAAGGCAATACA 312
B K A I Q
GGAGCAAAAC
E Q N
322
```

图 4 *csAP1* 克隆的核苷酸及其推导的氨基酸序列 (箭头所指为拼接位点)
Fig. 4 Nucleic acid sequence and deduced amino acid sequence of *csAP1* clone
(The arrow heads above the sequence indicate the splice donor and acceptor sites)

该 DNA 片段已在 GenBank 中登记, 登记号为 AF2639911。 *csAP1* 基因片段编码的氨基酸序列与一些 MADS 盒基因的氨基酸序列的比较如表 1 所示。

所克隆的 DNA 片段与其它植物的 MADS 盒基因氨基酸序列同源 45% ~ 73%, 同源性较高, 但是否与发育有关, 尚需做功能性检测。

表 1 *csAP1* 片段与一些 MADS 盒基因编码的氨基酸序列比较

Table 1 Compare of amino acid sequence in a fragment of *csAP1* with MADS box genes in other plants

基因 Gene	基因银行登记号 Number in genbank	氨基酸序列 Acino acid sequence	同源性 Homologous (%)	
			A*	B*
<i>csAP1</i>		<u>QQLDTTLKRLRNRNQQLTHE SISDLQKREKA</u>		
<i>NAP1-2</i>	AF009127	<u>QQLDTSKLIRSRKNQLMHESISMLQKKEKA</u>	77	73
<i>ASAP1-A</i>	AF147210	<u>QQLDTGLKHIRTRKNQLLHESISELQKKGKA</u>	77	73
<i>ASAP1-B</i>	AF147221	<u>QQLDTGLKHIRTRKNQLLHESISELQKKGKA</u>	77	73
<i>GSQUA1</i>	AJ009727	<u>QQLDTALKRIHSKKNQLLHQ SISELQKKEKA</u>	75	60
<i>NTSQUA</i>	U63162	<u>QQLDTSKLIRSRKNQLMHESISMLQKKEKA</u>	75	73
<i>AP1</i>	Z16421	<u>QQLDTALKHIRTRKNQLMYESINELQKKEKA</u>	75	63
<i>BOAP1</i>	Z37968	<u>QQLDTALKHIRSRKNQLMYESINELQKKEKA</u>	72	55
<i>Snap1</i>	X81480	<u>QQLDTALKRIHSKKNQLLHQ SISELQKKEKA</u>	72	57
<i>SQUA</i>	X63701	<u>QQLDTALKNIRTRKNQLLYDSISELQKKEKA</u>	72	55
<i>ALAP1</i>	AF143379	<u>QQLDTALKNIRTRKNQLMYESINELQKKEKA</u>	72	55
<i>FBP26</i>	AF176783	<u>QQLDSALKQIRSRKNQLMHESISELQKKDKA</u>	72	70
<i>MADSBP</i>	AF130118	<u>QQLDSALKHIRSRKNQLMHESISELQKKDKA</u>	72	73
<i>MADS1</i>	AF068725	<u>QQLDSALKHIRSRKNQLMHESISELQKKDKA</u>	71	73
<i>boi2AP1</i>	U67452	<u>QQLDTALKHIRSRKNQLMYDSINELQKKEKA</u>	69	50
<i>NAP1-1</i>	AF009126	<u>QQLDSALKHIRSRKNQLMHESISELQKKDEA</u>	68	73
<i>TDR4</i>	X60757	<u>QQLDSALKHIRSRKNQLMHESISVLQKKDRA</u>	68	73
<i>TF</i>	U23758	<u>QQLDSALKHIRSRKNQLMHESISVLQKDRA</u>	68	73
<i>boi1AP1</i>	U67451	<u>QQLDTALKHIRSRKNQLMYDSVNELQKKEKA</u>	66	45
<i>MADS5</i>	X99655	<u>QQLDSALKHIRSRKNQLMYESISELQKKDKA</u>	66	63
<i>MADSBP2</i>	U78948	<u>QQLDSALKHIRSRKNQVMYESISELQKKDKA</u>	66	63
<i>MADSBF</i>	AB007504	<u>QQLESSLKHIRSRKNQLMHESISELQKKERS</u>	63	73
<i>MADSBP1</i>	AF035378	<u>QQLESSLKHIRSRKSQLMHESISELQKKERS</u>	61	68

* : 同源性 A 包括引物, 同源性 B 不包括引物。
* A, including primer, B not including primer.

参考文献:

1 Mandel M A. Molecular characterization of the *Arabidopsis* floral homeotic gene *APETALA1*. Nature, 1992, 360: 273~ 277
2 Weigel D, Nilsson O. A development swith sufficient for flower initiation, in diverse plants. Nature, 1995, 377: 495~ 500
3 张立平, 林伯年, 沈德绪. 葡萄属植物染色体 DNA 的提取纯化及 RFLP 鉴定. 果树科学, 1996, 13 (2): 71~ 73

Cloning DNA Fragment of *APETALA1* Homologue of the Citrus MADS box

Lin Bonian, Liu Chunling, Xu Changjie, and Chen Daming
(Horticultrud Department, Zhejiang University, Hangzhou 310029)

Abstract: Through PCR method, a fragment of *AP1* homologue is separated from citrus gene library of DNA. This fragment is conserved with MADS box genes in other plants. The amino acid sequence deduced from the exons is 45% – 73% homologous to that of the corresponding regions of MADS box genes in other plants. This fragment is appeared at GenBank. Serial number is AF 2639911.

Key words: Citrus; MADS box genes; PCR