

胡萝卜 *Daucus carota* var. *sativus* Hoffm Deutschl 抗冻蛋白基因的克隆及测序

尹明安¹ 崔鸿文¹ 樊代明² 郭立¹

(¹西北农林科技大学, 杨凌 712100; ²第四军医大学, 西安 710032)

摘要: 以宁夏吴忠胡萝卜、陕西华县胡萝卜和陕西汉中胡萝卜 3 个地方品种为材料, 用 PCR (polymerase chain reaction) 的方法克隆了中国胡萝卜的抗冻蛋白基因 (*qfp*), 测定了其核苷酸序列, 并和英国胡萝卜的 *qfp* 序列进行了对比。在所测 1004 个核苷酸中, 两变种碱基不同者有 36 个, 占 3.6%, 其中无义突变 21 个, 有义突变 15 个。按有义突变计, 同源性为 98.5%。

关键词: 胡萝卜; 抗冻蛋白; 分子生物学

中图分类号: Q 785; S 631.2 文献标识码: A 文章编号: 0513-353X (2001) 02-0173-02

1 目的、材料与方法

1998 年 10 月 Dawn Worrall 等^[1]发表了胡萝卜抗冻蛋白 (AFP) 及其基因的论文, 标志着第 1 个植物抗冻蛋白基因 *qfp* 的发现。Worrall 等所用胡萝卜材料为 *Daucus carota* var. *autumn* King (Smallwood M., 个人通讯), 与我国栽培的胡萝卜 *Daucus carota* var. *sativus* Hoffm Deutschl 属于同一种内的不同变种^[2]。两变种处于长期隔离的不同生态环境中。为了解我国胡萝卜 *qfp* 的基本结构和对其进行开发利用, 很有必要对我国胡萝卜的 *qfp* 进行克隆和测序。以宁夏吴忠、陕西华县和陕西汉中 3 个地方品种为材料, 根据 var. *autumn* King 的 AFP cDNA 已知序列, 设计合成一对引物, 以胡萝卜基因组 DNA 为模板进行 PCR。对 PCR 产物做琼脂糖凝胶电泳, 纯化回收目的片段。根据已知序列的酶切位点, 选择 *Bam* H I 和 *Pst* I 对目的片段进行酶切分析。构建克隆载体所用的载体为上海生工的 pUCmT Vector, 宿主菌为大肠杆菌 DH 5 α , 感受态的制备及转化过程参照文献^[3]进行。按碱裂解法少量提取质粒^[3]。以质粒 DNA 为底物用 *Bam* H I 进行酶切鉴定; 以质粒 DNA 为模板进行 PCR 鉴定。由上海博亚生物技术有限公司用 Sanger 双脱氧链终止法进行目的基因的序列测定。

2 结果与分析

2.1 PCR 及目的片段的酶切鉴定 试验所用的 3 个品种均扩增出特异目的片段 (约 1 000 bp)。对经过纯化回收的目的片段分别用 *Bam* H I 和 *Pst* I 进行酶切分析, *Bam* H I 产生约 600 bp 和 400 bp 的预期片段。*Pst* I 产生约 900 bp 和 100 bp 的预期片段。据此可初步认为该目的片段即为胡萝卜 AFP 的基因片段。

2.2 克隆载体的构建及重组质粒的鉴定 选择宁夏吴忠胡萝卜的 *qfp* 片段构建克隆载体。转化细菌后, 直径 9 cm 的培养皿上生成菌落约 800 个, 其中白色菌落约占 60%。对白色菌落的质粒 DNA 进行 *Bam* H I 酶切鉴定, 1 个克隆 (TV 1) 产生约 600 bp 的预期片段。以

收稿日期: 2000-08-01; 修回日期: 2000-10-16

基金项目: 陕西省攻关项目 (98K12-G19 (11))

TV1 的微量质粒 DNA 为模板, 非常特异地扩增出了约 1 000 bp 的目的片段。

2.3 目的基因的序列测定 目的基因的测序结果和 var. *autumn King* 的 *gfp* 序列进行对比。开放阅读框从 ATG 开始到 TAG 结束, 共 999 个核苷酸, 编码 332 个氨基酸。在所测 1004 个核苷酸中, 两变种碱基不同者有 36 个, 约占 3.6%, 其中无义突变 21 个, 占 2.1%, 有义突变 15 个, 占 1.5%。按有义突变计, 两变种的同源性为 98.5%。332 个氨基酸中, 两变种有 14 个氨基酸不同 (其中 1 个氨基酸的三联体密码有两个突变位点), 它们分别位于 AFP 的第 15、55、56、63、71、83、109、179、181、216、217、240、245 和 262 位。var. *autumn King* 在这些位点的氨基酸依次为: I、P、G、N、N、Q、H、Q、Q、S、S、N、T、G; var. *sativus* Hoffm Deutschl 相应为: M、S、D、D、S、E、N、R、E、R、A、K、M、E。它们对 AFP 的结构与功能有何影响, 还不清楚, 但至少说明它们所在区域乃非保守区。

3 讨论

本试验以地方胡萝卜品种为材料, 是考虑到地方品种比较保守, 基因流动少, 基本保持着变种的原貌。中国胡萝卜 var. *sativus* Hoffm Deutschl 与英国胡萝卜 var. *autumn King* 长期以来处于不同的生态环境中, 其 *gfp* 保持了很高的种内同源性 (98.5%), 但又有一定的变种间异质性 (1.5%), 体现了生物的多样性, 符合分类学和遗传学规律。至于 15 个核苷酸变异造成的 14 个氨基酸的差异会不会导致 AFP 结构与功能的不同, 主要取决于发生变异的氨基酸在决定 AFP 结构与功能中所起作用的重要性。由于目前胡萝卜 AFP 结构与功能的研究还不够深入, 故对某一位点的氨基酸, 很难判断其对 AFP 的结构与功能究竟有什么影响。在这种情况下, 只有通过严格的表达比较才能确定。这里, 两变种有差异的 *gfp* 则为 AFP 的结构与功能研究提供了很好的实验材料。

参考文献:

- 1 Worrall D, Elias L, Ashford D, et al. A carrot leucine rich repeat protein that inhibits ice recrystallization. *Science*, 1998, 282: 115~117
- 2 中国科学院西北植物研究所编著. 秦岭植物志第一卷种子植物 (第三册). 北京: 科学出版社, 1981. 432
- 3 萨姆布鲁克 J, 弗里奇 E F, 曼尼阿蒂斯 T. 分子克隆实验指南 (第二版). 金冬雁, 黎孟枫译. 北京: 科学出版社, 1992. 19~22, 55~56

Cloning and Sequencing of Antifreeze Protein Gene in *Daucus carota* var. *sativus* Hoffm Deutschl

Yin Ming'an¹, Cui Hongwen¹, Fan Daiming², and Guo Li¹

(¹Northwest Sci-Tech University of Agricultural and Forestry, Yangling 712100; ²The Fourth University of Military Medicine, Xi'an 710032)

Abstract: Three carrot cultivar Wuzhong Ningxia, Huaxian Shaanxi and Hanzhong Shaanxi were used as test material and antifreeze protein gene (*gfp*) of Chinese carrot (*Daucus carota* var. *sativus* Hoffm Deutschl) was cloned and sequenced by PCR (polymerase chain reaction). Obtained sequence was compared with that of British carrot (*Daucus carota* var. *autumn King*). There were 36 different bases in 1004 nucleotides (3.6%) between the two varieties. Among the different bases there were 21 nonsense mutations and 15 sense mutations. According to sense mutations, homology was 98.5%.

Key words: Carrot (*Daucus carota* var. *sativus* Hoffm Deutschl); Antifreeze protein; Molecular biology