

苹果 - 法尼烯合酶基因组结构和序列的多态性分析

苑克俊*, 刘庆忠, 李 勃, 张力思

(山东省果树研究所, 山东泰安 271000)

摘 要: 通过设计引物进行 PCR 扩增、测序、拼接序列, 以及与 GenBank 中的 cDNA 序列 (登录号 AY182241) 进行比对, 获得 - 法尼烯合酶基因 (*AFS*) 的基因组序列和内含子/外显子结构。获得的 *AFS* 基因序列已在 GenBank 注册 (登录号 DQ901739), 它有 6 个内含子和 7 个外显子, 编码一个大小为 576 个氨基酸的蛋白质。间隔外显子的 6 个内含子相位分别是 0、1、2、2、0、0, 其大小分别是 108、113、> 1 000、125、220 和 88 bp, 7 个外显子的推导氨基酸序列大小分别是 57、89、127、73、48、83 和 99。编码的蛋白质中有 3 个序列模式 (motif), RR (X8) W 模式的编码基因序列在基因 5 端的外显子 1 上, RxR 模式和 DDxxD 模式的编码基因序列在外显子 4 上。将获得的 *AFS* 基因序列与 GenBank 中的 cDNA 序列 (登录号 AY523409) 进行比对, 结果发现两序列间有 6 个单核苷酸多态性, 其中 4 个引起氨基酸突变。有意义的是, 1 个氨基酸突变 (291R → G) 发生在 RxR 模式上, 此氨基酸突变以及其它突变是否与苹果 - 法尼烯合成能力和虎皮病发生能力有关, 值得进一步探讨。

关键词: 苹果; - 法尼烯合酶; 基因组 DNA; 多态性; 虎皮病

中图分类号: S 661.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 0513-353X (2007) 04-1003-04

Genomic Organization and Sequence Polymorphism of E, E- α Farnesene Synthase Gene in Apples (*Malus domestica* Borkh.)

YUAN Ke-jun*, LIU Qing-zhong, LI Bo, and ZHANG Li-si

(Shandong Institute of Pomology, Taian, Shandong 271000, China)

Abstract: Primer pairs were designed to amplify the genomic DNA of α -farnesene synthase gene (*AFS*) by PCR, the PCR products were sequenced, the sequences were spliced and compared to cDNA (accession No. AY182241) in the GenBank, then the genomic sequence and intron-exon organization of *AFS* gene were obtained. The *AFS* genomic sequence has been registered in GenBank (accession No. DQ901739), it had 6 introns and 7 exons, encoded a protein with 576 amino acids. The sizes of 6 introns were 108 bp, 113 bp, >1 000 bp, 125 bp, 220 bp and 88 bp, and their phase were 0, 1, 2, 2, 0, 0, respectively. The sizes of deduced amino acids of 7 exons were 57, 89, 127, 73, 48, 83 and 99, respectively. The *AFS* protein contained three motifs, the RR (X8) W motif was encoded by a sequence in exon 1, the RxR motif and DDxxD motif were encoded by two sequences in exon 4. The *AFS* genomic sequence (accession No. DQ901739) was compared to cDNA (accession No. AY523409) in the GenBank, it was found that there were 6 single-nucleotide polymorphisms between the two sequences, four of which caused mutations at the amino acid level. Interestingly, one amino acid mutation (291R → G) was found in RxR motif, it deserves further investigation whether the α -farnesene synthesis ability and superficial scald susceptibility of apples were influenced by this amino acid mutation and other mutations.

Key words: Apple; α -farnesene synthase; Genomic DNA; Polymorphism; Superficial scald

收稿日期: 2007 - 01 - 31; 修回日期: 2007 - 05 - 28

基金项目: 教育部留学回国人员科研启动基金资助项目 [2004 (527)]; 山东省人事厅留学回国人员科技活动择优资助项目 [2003 (10) 14]

* E-mail: yuankj@vip.sina.com

苹果 β -法尼烯与虎皮病的发生有密切关系 (胡小松 等, 2002), 其合成涉及 HMG-CoA 还原酶 (HMGR)、FPP合酶 (FPPS) 和 β -法尼烯合酶 (AFS) 等酶基因 (Rupasinghe et al, 1998)。采用 HMG-CoA 还原酶的竞争性抑制剂洛伐他汀 (Lovastatin) 处理果实, 几乎完全抑制 β -法尼烯和虎皮病发生 (Ju & Curry, 2000)。这说明, 控制 β -法尼烯合成的相关酶基因是有可能控制虎皮病的。

β -法尼烯合酶是直接参与 β -法尼烯合成的酶。目前人们已获得苹果 β -法尼烯合酶 cDNA 克隆, 研究了该基因表达与果皮中 β -法尼烯含量的关系 (Pechous et al, 2004, 2005; 李萌 等, 2006)。在玉米和动物上的研究结果表明, 玉米品种间倍半萜烯的差异是由于两个萜烯酶基因 (*TPS4*、*TPS5*) 的单核苷酸差异引起 (Kollner et al, 2004), 内含子序列差异与性状间存在相关性 (Kuhnlein et al, 1997)。这说明有必要从基因组 DNA 及其序列差异方面研究 *AFS* 基因, 探讨其与虎皮病发生的关系, 为采用基因工程方法控制虎皮病提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 基因组 DNA 提取

以 ‘国光’ 苹果嫩叶为试材提取 DNA (陈昆松 等, 2004; 苑克俊, 2005)。将盛叶片的试管置于冰块上用研磨棒研磨, 研磨后立即加入预热至 65 的 0.6 mL 2% CTAB 提取缓冲液 [2% CTAB, 100 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0), 20 mmol/L EDTA, 1.4 mol/L NaCl, 2% PVP-40, 2% β -巯基乙醇], 此后提取过程同已报道方法 (苑克俊, 2005)。将样品 65 水浴提取 30 min, 期间轻轻倒置样品试管 3 次。加入 0.6 mL 氯仿 异戊醇 (24 1), 混匀, 离心后将上清液 (约 420 μ L) 转入新试管, 加入等体积经 -20 预冷的异丙醇, 轻轻摇匀, 离心后将上清液移去。所得 DNA 球用 500 μ L 经 -20 预冷的 70% 乙醇漂洗 2 次, 置于室温下晾干, 加入 30~50 μ L 灭菌无离子水或 0.2 \times 的 TE, 加入不含 DNAse 的 RNAse 在 37 下处理 10 min 除去 RNA, 在 4 冰箱中保存备用, 或冷冻保存。

1.2 引物设计、PCR 扩增和基因组 DNA 测序

利用 GenBank 中长度最大的 *AFS* 基因 cDNA 序列 (登录号 AY182241) 设计引物 P1、P2R、P3、P4R、P5 和 P6R (18~22 bp) 进行 PCR 扩增 (表 1)。表 1 中的 P3f、P4fR 和 P4gR 是第一轮 PCR 扩增测序后为完成序列拼接设计的引物。PCR 反应液 (50 μ L) 含有 1 μ L (50 ng) 基因组 DNA 和 49 μ L 反应混合物。一份反应混合物由 1 μ L dNTPs (10 mmol/L)、5 μ L *Taq* 缓冲液、1.5 μ L 正向引物 (10 μ mol/L)、1.5 μ L 反向引物 (10 μ mol/L)、0.5 μ L (1 U) 的 *Taq* DNA 聚合酶和 39.5 μ L 水组成。PCR 反应 35 个循环, 每一循环 94 变性 30 s, 55 退火 1 min 和 72 延伸 2 min。将 2 μ L PCR 产物、8 μ L 水和 2 μ L Loading dye 混合, 溴化乙锭染色, 在 80 V 电压、1.5% 琼脂胶上电泳检查 PCR 产物质量 (苑克俊, 2005)。委托生物技术公司进行纯化和测序。

表 1 PCR 产物及相关引物

Table 1 PCR products and related primers

PCR 产物 PCR product	正向引物 Forward primer	反向引物 Reverse primer
P1 - 2R	P1: TATCCCAAAACATCTCgAgC	P2R: TAGCgTCAAggAAgCTTTC
P3 - 4R	P3: CCTCAAACCTgggTTTCg	P4R: ATTCCTCTCCTCAATTTCACg
P5 - 6R	P5: TgAgCAgCTTCCA gAgTgTATg	P6R: TTCAATACTTTggCAACAACg
P3f - 4fR	P3f: gggCACATTAgA gAACAC	P4fR: CgAA TgCTACTCCACAg
P3 - 4gR	P3: CCTCAAACCTgggTTTCg	P4gR: CATTA TgAgggTCgTTgg
P3 - 4fR	P3: CCTCAAACCTgggTTTCg	P4fR: CgAA TgCTACTCCACAg

1.3 基因组 DNA 分析

将测出的 DNA 序列进行拼接获得 *AFS* 基因的基因组序列, 利用 Blastn 将其与 GenBank 中 *AFS1*

的 cDNA 序列 (登录号 AY182241) 进行比对, 找出 *AFS* 基因组序列中的内含子/外显子接合位点; 将其与 GenBank 中抗虎皮病品种 ‘艾达红’ 苹果 *AFS* 基因的 cDNA 序列 (登录号 AY523409) 进行比对, 找出两序列间的单核苷酸多态性位点。利用 Sequin 软件编制 *AFS* 基因组序列的 GenBank 注册文件, 找出两个苹果品种的氨基酸序列差异位点。

2 结果与分析

2.1 基因组序列和结构

目前获得的 ‘国光’ 苹果的 *AFS* 基因组序列长度为 3 009 bp, 中间尚有一缺口未测序。通过比较其基因组 DNA 和 GenBank 中 *AFS1* 的 cDNA 确定了其基因组结构。*AFS* 基因有 6 个内含子和 7 个外显子, 编码一个大小为 576 个氨基酸的蛋白质。7 个外显子的推导氨基酸序列大小分别是 57、89、127、73、48、83 和 99, 间隔外显子的 6 个内含子皆符合 “GT - - - AG” 规则, 其相位分别是 0、1、2、2、0、0, 其大小分别是 108、113、>1 000、125、220 和 88 bp (图 1)。另外, 在起始密码子上游有 5 bp, 在终止密码子下游有 69 bp, 未测序缺口位于内含子 3。内含子 3 特别大, 目前仅测出 550 bp, 根据电泳图谱上 PCR 扩增产物条带的大小推算还有大约 519 bp 的序列未测出。测出的苹果 - 法尼烯合酶的基因组序列已在 GenBank 注册, 登录号 DQ901739。

对推导氨基酸序列的分析结果表明, 编码的蛋白质中有 3 个模式, RR (X8) W 模式的编码序列在基因 5 端的外显子 1 上, R_xR 模式和 DD_xxD 模式的编码序列在外显子 4 上。

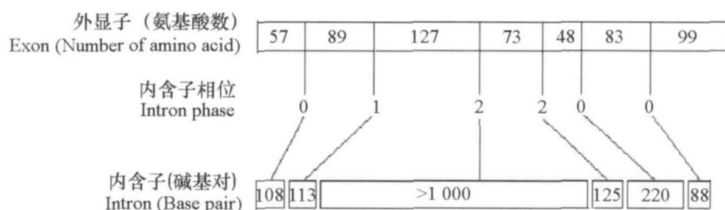


图 1 苹果 - 法尼烯合酶基因的基因组结构

Fig. 1 Genomic organization of apple alpha-farnesene synthase gene

2.2 序列多态性

将获得的 *AFS* 基因序列与 GenBank 中抗虎皮病品种 ‘艾达红’ 苹果 *AFS* 基因的 cDNA 序列 (登录号 AY523409) 进行比对。发现有 6 个单核苷酸变异 (图 2, 数字代表 ‘国光’ 苹果 *AFS* 基因序列中相应核苷酸的位置), 其中 426 G → A, 501 A → G, 1 747 A → G 和 2 573 G → A, 这 4 个单核苷酸变异引起氨基酸突变, 另外 2 个单核苷酸变异 1 875 T → C 和 2 625 C → T 是同义突变, 无论是否变异皆编码 333G (甘氨酸) 和 468R (精氨酸)。有意义的是, 1 个氨基酸突变 (291 R → G) 发生在 R_xR 模式上。

从图 2 还可看出, 426 G → A 和 501 A → G 单核苷酸变异在外显子 2 上, 1 747 A → G 和 1 875 T → C 单核苷酸变异在外显子 4 上, 2 573 G → A 和 2 625 C → T 单核苷酸变异在外显子 6 上。

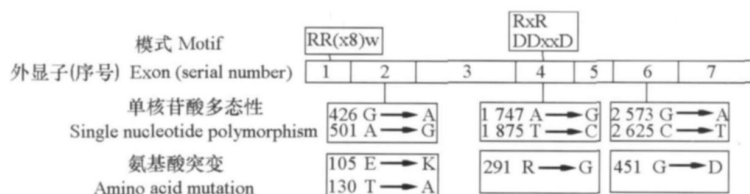


图 2 *AFS* 基因序列和推导氨基酸序列的突变位点

Fig. 2 The mutations in the sequences of *AFS* gene and deduced amino acid

3 讨论

有研究表明, 易发虎皮病品种 ‘Law Rome’ *AFS* 基因的转录表达水平、 α -法尼烯和共轭三烯醇含量分别比抗病品种 ‘艾达红’ 高 2.5 倍、4 倍和 33 倍 (Pechous et al., 2005), 但尚未见造成二者差异的原因报道。我们从 *AFS* 基因序列差异着手进行了探讨, 通过测定易发虎皮病品种 ‘国光’ 的 *AFS* 基因序列, 并与 GenBank 中抗病品种 ‘艾达红’ 的 cDNA 序列进行比对, 发现两序列间有 6 个单核苷酸多态性, 其中 4 个引起氨基酸突变。有意义的是, 1 个氨基酸突变 (291R → G) 发生在 R_xR 模式上, 抗虎皮病品种 ‘艾达红’ 在此处的氨基酸残基是 G, 易发病品种 ‘Law Rome’ 和 ‘国光’ 在此处的氨基酸残基都是 R。鉴于 R_xR 模式和 DD_xD 模式的氨基酸残基在萜烯形成过程中起作用一起负责引导二磷酸根离子离开碳阳离子中间产物 (Davis & Croteau, 2000), 前面提到的 ‘艾达红’ α -法尼烯含量低 (Pechous et al., 2005), 很可能是 R_xR 模式氨基酸突变 (291R → G) 引起。当然, 是氨基酸突变 (291R → G) 还是其它突变引起 ‘艾达红’ *AFS* 基因的转录表达水平和 α -法尼烯含量低, 需通过进一步试验进行探讨。

水稻 *OsP-73* 基因的启动子序列驱动基因表达时, 需要基因内含子的参与 (陈俊和王宗阳, 2004)。本研究发现苹果 *AFS* 基因有一个特别大的内含子 3, 因没有 ‘艾达红’ 苹果试材, 未能研究其内含子是否存在序列差异以及是否与基因的表达调控有关, 值得今后进一步探讨。

References

- Chen Jun, Wang Zong-yang. 2004. Expression of *OsP-73* gene requires involvement of its intron in rice. *Journal of Plant Physiology and Molecular Biology*, 30 (1): 81 - 86. (in Chinese)
- 陈 俊, 王宗阳. 2004. 水稻 *OsP-73* 基因表达需要其内含子参与. *植物生理与分子生物学学报*, 30 (1): 81 - 86.
- Chen Kun-song, Li Fang, Xu Chang-jie, Zhang Shang-long, Fu Cheng-xin. 2004. An efficient macro-method of genomic DNA isolation from *Actinidia chinensis* leaves. *Hereditas*, 26 (4): 529 - 531. (in Chinese)
- 陈昆松, 李 方, 徐昌杰, 张上隆, 傅承新. 2004. 改良 CTAB 法用于多年生植物组织基因组 DNA 的大量提取. *遗传*, 26 (4): 529 - 531.
- Davis EM, Croteau R. 2000. Cyclization enzymes in the biosynthesis of monoterpenes, sesquiterpenes, and diterpenes. *Topics in Current Chemistry*, 209: 53 - 95.
- Hu Xiao-song, Xiao Ha-zhi, Wang Xiao-xia. 2002. Contents of α -farnesene and conjugated trienes in apples and their relation with storage temperature. *Acta Horticulturae Sinica*, 31 (2): 169 - 172. (in Chinese)
- 胡小松, 肖华志, 王晓霞. 2002. 苹果 α -法尼烯和共轭三烯含量变化与贮藏温度的关系. *园艺学报*, 31 (2): 169 - 172.
- Ju Z G, Curry E A. 2000. Lovastatin inhibits α -farnesene synthesis without affecting ethylene production during fruit ripening in ‘Golden Supreme’ apples. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 125 (1): 105 - 110.
- Kollner T G, Schnee C, Gershenzon J, Degenhardt J. 2004. The variability of sesquiterpenes emitted from two *Zea mays* cultivars is controlled by allelic variation of two terpene synthase genes encoding stereoselective multiple product enzymes. *The Plant Cell*, 16: 1115 - 1131.
- Kuhnlein U, Ni L, Weigend S, Gavora J S, Fairfall W, Zadworny D. 1997. DNA polymorphisms in the chicken growth hormone gene: Response to selection for disease resistance and association with egg production. *Animal Genetics*, 28: 116 - 123.
- Li Meng, Sui Na, Zhang Yuan-hu, Meng Qing-wei. 2006. Cloning and prokaryotic expression of apple *AFS* gene. *Acta Horticulturae Sinica*, 33 (1): 122 - 124. (in Chinese)
- 李 萌, 隋 娜, 张元湖, 孟庆伟. 2006. 苹果 *AFS* 基因的克隆与原核表达. *园艺学报*, 33 (1): 122 - 124.
- Pechous SW, Watkins C B, Whitaker B D. 2005. Expression of α -farnesene synthase gene *AFS1* in relation to levels of α -farnesene and conjugated trienols in peel tissue of scald-susceptible ‘Law Rome’ and scald-resistant ‘Idared’ apple fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 35: 125 - 132.
- Pechous SW, Whitaker B D. 2004. Cloning and bacterial expression of an (E, E)- α -farnesene synthase cDNA from peel tissue of apple fruit. *Planta*, 219: 84 - 94.
- Rupasinghe H P V, Paliyath G, Murr D P. 1998. Biosynthesis of α -farnesene and its relation to superficial scald development in Delicious apples. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 123 (5): 882 - 886.
- Yuan Ke-jun. 2005. An improved method for development of CAPS markers in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 13 (5): 580 - 586. (in Chinese)
- 苑克俊. 2005. 改进的拟南芥 CAPS 标记方法. *农业生物技术学报*, 13 (5): 580 - 586.