

草莓中贝壳杉烯氧化酶基因 (STGA3) 中两个不同编码序列的克隆

石琰¹ 孙仲序² 束怀瑞^{2*}

(¹ 青岛科技大学化工学院, 青岛 266042; ² 山东农业大学园艺科学与工程学院, 泰安 271018)

摘要: 以保守氨基酸序列设计了简并性引物的方法, 克隆 ‘丰香’ 草莓 (*Fragaria grandiflora* ‘Fengxiang’) 贝壳杉烯氧化酶基因部分序列, 发现叶片和花蕾中合成赤霉素的贝壳杉烯氧化酶的序列不同, Southern杂交方法检测在草莓基因组中存在 3 个拷贝的目标基因, 表明在草莓中至少有两个不同基因共同编码贝壳杉烯氧化酶, 以响应不同发育信号的调控。

关键词: 草莓; 赤霉素; GA3 基因; 贝壳杉烯氧化酶; 生物合成

中图分类号: S 668.4; Q 785 文献标识码: A 文章编号: 0513-353X (2006) 01-0128-02

Cloning of Two Different ent-kaurene oxidase (STGA3) Sequence in Strawberry

Shi Yanjing¹, Sun Zhongxu², and Shu Huairui^{2*}

(¹ Chemistry Engineering College, Qingdao University of Science and Technology, Qingdao 266042, China; ² Institute of Horticulture Science and Engineering, Shandong Agriculture University, Tai'an 271018, China)

Abstract: A pair of degenerate primers were designed according to the conservative amino acid sequences to clone the ent-kaurene oxidase from strawberry, and obtained two different RT-PCR products from the strawberry leaves and flowers respectively. These two segments have different nucleotide sequences, and Southern blot detected 3 copies of target gene in the strawberry genome. So there are at least two different genes coding ent-kaurene oxidase to respond different development signals.

Key words: Strawberry; Gibberellins; GA3 gene; Ent-kaurene oxidase; Biosynthesis

1 目的、材料与方法

贝壳杉烯氧化酶是赤霉素生物合成途径中的关键酶, 位于早期未分支的合成步骤上, 催化 3 步氧化反应, 即由贝壳杉烯氧化成贝壳杉烯醇, 继而形成贝壳杉烯醛, 再被氧化成贝壳杉烯酸, 这是一系列的单加氧过程, 此酶属于细胞色素 P450 酶的单加氧酶系^[1]。本试验克隆了草莓贝壳杉烯氧化酶的同源基因 STGA3 (strawberry GA3), 以期探讨赤霉素在合成的上游部分调控草莓生长发育的机制。

采集 ‘丰香’ 草莓 (*Fragaria grandiflora* ‘Fengxiang’) 刚刚展开叶片和花蕾, 提取 RNA 并反转录^[2,3]。在 NCB 查询 GA3 基因已在拟南芥^[4]、南瓜^[5]、烟草^[6] 3 种植物中得到, 经过同源性比较, 找出保守氨基酸序列合成简并引物 GA3A [5'-GA (T/C) TGG (A/C) G (A/T/C/G) A (T/C) TT (T/C) TT (T/C) CC-3'] 和 GA3B [5'-C (G/T) (A/T) AG (A/G/C/T) GT (C/T) TC (G/C) TG (A/G) AA (A/G/T/C) AC-3'], 以此对简并引物分别扩增草莓幼叶和花蕾的 RNA 的反转录产物, RT-PCR 的产物用 2% 琼脂糖电泳分离, 片段经凝胶回收纯化后分别连入 pGEM-T easy 载体中, 转化大肠杆菌 DH5, 分别挑取阳性克隆, 并测序。测序重复 3 次。

GA3A 和 GA3B 扩增基因组 DNA, 并分析序列, 发现内部没有 *EcoR*、*Pst* 的酶切位点, 采用随机引物法制备探针, 探针为叶片与花蕾的简并引物的 RT-PCR 混合产物。分别以 *EcoR*、*Pst* 完

收稿日期: 2005 - 04 - 11; 修回日期: 2005 - 07 - 29

* 通讯作者 Author for correspondence

全酶解 15 μ g 总 DNA, 并于 0.8% 琼脂糖凝胶上电泳充分分离。电泳后的转膜、预杂交和杂交依照 Sambrook 等的方法^[7], -70 进行放射自显影 3 d。

2 结果与分析

分别以叶片和花蕾反转录产物为模板的 RT-PCR 的产物用 2% 琼脂糖电泳分析, 紫外光透射分析观察分别获得 1 条大约 410 bp 的带, 经克隆测序后, 发现叶片和花蕾中获得了两个不同的序列, 分别命名为 pSTGA3L (叶片) 和 pSTGA3F (花蕾)。比较二者的碱基序列发现同源性 84.83%, 氨基酸同源性 88.2%。pSTGA3L 在 NCB 注册号码为 AY462247, pSTGA3F 的注册号码为 AF495729。

在 Southern blot 检测发现, 在基因组中有 3 个拷贝 (图 1)。分析其原因, 一是因为草莓是天然的多倍体, 因此基因组中存在多个拷贝, 另一个原因就是赤霉素在植物体内有多种功能, 而且还影响相互矛盾的两个方面——营养生长和生殖生长。在本试验中, 我们获得了两个编码 STGA3 的片段, 分别负责叶片和花中的目标基因的编码, 以响应营养生长和生殖生长的不同发育信号。

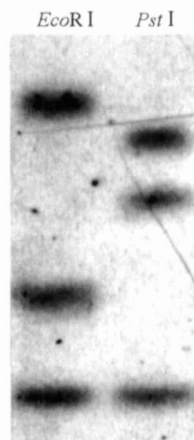


图 1 草莓基因组 DNA 杂交

草莓 DNA 的 *EcoR* , *Pst* 完全酶切产物与 ³²P 标记的探针各得到 3 条杂交带。

Fig 1 DNA blot analysis of strawberry genome

EcoR and *Pst* digested strawberry DNA were hybridized with ³²P labeled probe, each got 3 bands

参考文献:

- 1 Helliwell C A, Poole A, Peacock W J, Dennis E S. *Arabidopsis* ent-kaurene oxidase catalyzes three steps of gibberellin biosynthesis. *Plant Physiology*, 1999, 119: 507 ~ 510
- 2 Chang S J, Puryear J, Caimey J. A simple and efficient method for isolating RNA from pinetrees. *Plant Molecular Biology Reporter*, 1993 (11): 113 ~ 116
- 3 Zhang X S, Li Q Z, Li X G, Bai S N, Lu W L. Molecular cloning and expression analysis of *HAG 1* in the floral organs of *Hyacinthus orientalis* L. *Science in China (Series C)*, 2000, 43 (4): 395 ~ 401
- 4 Helliwell C A, Sheldon C C. Cloning of the *Arabidopsis* ent-kaurene oxidase gene *GA3*. *Proceedings of National Academic Science of United States of America*, 1998, 95 (15): 9019 ~ 9024
- 5 Helliwell C A, Olive M R, Gebbie L, Forster R, Peacock W J, Dennis E S. Isolation of an ent-kaurene oxidase cDNA from *Cucurbita maxima*. *Plant Physiology*, 2000, 27: 1141 ~ 1149
- 6 Fukazawa J, Sakai T, Ishida S, Yamaguchi I, Kamiya Y, Takahashi Y. Repression of shoot growth, a bZIP transcriptional activator regulates cell elongation by controlling the level of gibberellins. *Plant Cell*, 2000, 12 (6): 901 ~ 915
- 7 Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular cloning: a laboratory manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001. 538 ~ 572