

# 苹果 *apetala2* 同源基因的克隆和转化研究

周盛梅<sup>1</sup> 宿红艳<sup>2</sup> 王磊<sup>2</sup> 张宪省<sup>3</sup> 束怀瑞<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup> 山东农业大学园艺科学与工程学院, 泰安 271018; <sup>2</sup> 烟台师范学院生命科学学院, 烟台 264025; <sup>3</sup> 山东农业大学生命科学学院, 泰安 271018)

**摘要:** 利用同源克隆的方法从苹果的花芽中分离出 *apetala2* 的同源基因 *MAP2*。 *MAP2* 全长 2 212 bp, 编码 549 个氨基酸。分析表明, *MAP2* 具有 *AP2* 家族典型的结构域, 是苹果的 *AP2* 同源基因。 Southern 杂交结果表明, *MAP2* 在基因组中以低拷贝形式存在。采用 RT-PCR 的方法分析 *MAP2* 在不同组织中的表达, 结果显示, *MAP2* 在苹果营养组织、花芽以及不同花器官中均有表达, 与拟南芥的 *AP2*、矮牵牛的 *PhAP2A* 的表达模式一致。为确定 *MAP2* 在苹果中的生物学功能, 构建了 35S *MAP2* 正义表达载体, 并对 ‘皇家嘎啦’ 苹果进行了农杆菌介导的遗传转化。

**关键词:** 苹果; *apetala2*; 基因克隆; 表达分析; 转基因

**中图分类号:** S 661.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 0513-353X (2006) 02-0239-05

## Cloning and Transformation of *apetala2* Homologues Genes from Apple

Zhou Shengmei<sup>1</sup>, Su Hongyan<sup>2</sup>, Wang Lei<sup>2</sup>, Zhang Xiansheng<sup>3</sup>, and Shu Huairui<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup> Institute of Horticulture Science and Engineering, Shandong Agricultural University, Taian 271018, China; <sup>2</sup> College of Life Sciences, Yantai Normal University, Yantai 264025, China; <sup>3</sup> College of Life Sciences, Shandong Agricultural University, Taian 271018, China)

**Abstract:** *MAP2*, with homology to *Arabidopsis AP2*, was isolated from the flower buds of apple (*Malus domestica* Borkh). *MAP2* cDNA is 2 212 bp long and encodes a 549 amino acid protein. Like other *AP2* genes, *MAP2* encodes a protein containing two distinct *AP2* domain, a transcription-activating domain and a putative nuclear location signal. This indicates that *MAP2* is a homologue of *AP2* in apple. Although the homology among the three proteins in the putative nuclear location signal is 100%, *MAP2* shares only 45.1% and 55.2% similarity with *AP2* and *PhAP2A*, respectively. This reflects the diversity in the function of *AP2* gene family except for acting in the nuclear. RT-PCR analysis showed that *MAP2* is expressed in floral buds, all floral organs and vegetative organs, which is similar to the expression pattern of *AP2* and *PhAP2A*. To study the function of *MAP2* in apple, we introduced the sense *MAP2* under the control of 35S promoter of *Cauliflower mosaic virus* into Royal Gala plants.

**Key words:** Apple; *apetala2*; Gene cloning; Expression; Transgenic

通过对模式植物拟南芥突变体的研究, 人们分离到一系列调节花发育的重要基因, *apetala2* 基因是其中之一, 参与花分生组织建立和花器官形成过程中基因表达的调控<sup>[1, 2]</sup>。已经从玉米、矮牵牛、风信子等植物中相继克隆到了 *AP2* 的同源基因<sup>[3-5]</sup>。这些基因内部均含有高度保守的 *AP2* 结构域, 并且在表达模式上具有一定的相似性<sup>[6]</sup>。但是迄今为止对于 *AP2* 及 *AP2* 结构域的结构和功能尚未完全确定。

虽然果树不是研究成花机制的理想材料, 但是如果将在模式植物中获得的理论和运用的实验技术应用于果树学研究, 将有助于在植物花发育研究领域获得新的进展。本研究对苹果的 *AP2* 同源基因 *MAP2* 进行克隆和表达模式分析。为了确定 *MAP2* 在苹果中的生物学功能, 我们构建 35S *MAP2* 正义表达载体, 并对 ‘皇家嘎啦’ 苹果进行农杆菌介导的遗传转化。这将对进一步研究 *MAP2* 的功能具有重要意义。

收稿日期: 2005 - 03 - 04; 修回日期: 2005 - 06 - 02

\*通讯作者 Author for correspondence (E-mail: hrshu@sdau.edu.cn)

# 1 材料与方法

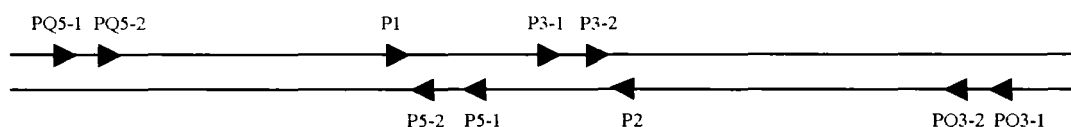
## 1.1 植物材料

苹果 (*Malus domestica* Borkh.) 栽培品种 ‘红玫瑰’ 取材于山东农业大学农场自然条件下生长的植株。在花芽分化期剥取花芽, 用液氮速冻, 保存于  $-80^{\circ}\text{C}$ 。

## 1.2 总 RNA 的提取和 cDNA 的克隆

总 RNA 的提取采用 CTAB 方法<sup>[7]</sup>。取  $2\mu\text{g}$  处于分化期的花芽的总 RNA, 用 B26 为引物进行反转录。引物 B26 由中国科学院遗传与发育所薛勇彪博士惠赠, 序列为 5'-GACTCGAGTCGACATCGATTTTTTTTTTTTTTTTTT-3'。

根据 AP2 及其同源基因的 AP2 结构域内高度保守的 WESHW 和 HKCGHWE 序列, 设计了简并引物 P1 [5'-TGGGA (A/G) TC (G/C/T) CA (C/T) AT (C/T) TGGGA-3'] 和 P2 [5'-TCCCA (A/G/C) (C/T) (G/T) (A/G) CC (A/G) CA (C/T) TT (A/G) TG-3'], 进行 RT-PCR 扩增。反应条件为 94 预变性 3 min; 94 变性 45 s, 56 退火 45 s, 72 延伸 60 s, 35 个循环; 最后 72 延伸 10 min。将扩增出的约 280 bp 的片段连接到 pGEM-T easy 载体上 (Promega), 并进行序列测定。3' 末端扩增: 根据已知序列, 设计特异引物 P3-1 (5'-TGAAGAA GACTTGAAGCA GATGAG-3') 和 P3-2 (5'-TTTGTGCA TGTACTTCGCCG-3'), 经过巢式 PCR (nested-PCR) 得到约 1 200 bp 的 cDNA 片段, 克隆到 pGEM-T easy 载体进行序列测定。5' 末端扩增: 方法同上, 设计特异引物 P5-1 (5'-AAATTTATG TCCGCCACTCCC-3') 和 P5-2 (5'-CAAA TCCACCAAGATAAAC-3') 进行 5'RACE PCR, 扩增出约 800 bp 的片段, 并测序。全长 cDNA 的扩增: 根据得到的 cDNA 5' 端和 3' 端非编码区序列, 设计两组特异引物 PQ5-1 (5'-TTCCTGTTC AAGTTGA TGCC-3'), PQ5-2 (5'-TTGCCACGCTGA ATTCTGA GT-3'), PQ3-1 (5'-GTTAGTTGACAAAA TGACC-3') 和 PQ3-2 (5'-AACACCAAA GAGCA TGCA-3')。以 PQ5-1 和 PQ3-1 为引物进行第 1 次 PCR 反应, 再以 PQ5-2 和 PQ3-2 为引物进行第 2 次 PCR 反应得到 1 条约 2 kb 的 DNA 片段。从两个方向进行测序后命名为 MAP2。引物在基因中的位置如下:



## 1.3 MAP2 在不同组织中的表达

提取叶片、花芽、萼片、花瓣、雄蕊、子房和幼果中的总 RNA, 经 DNase (RNase-free) 消化后, 取  $2\mu\text{g}$  用 Access RT-PCR System 试剂盒 (Promega 公司) 进行反转录, 合成第 1 条 cDNA。以 PQ5-2 和 PQ3-2 为引物进行 PCR 反应。反应程序如下: 94 预变性 3 min; 94 变性 1 min, 56 退火 1 min, 72 延伸 90 s, 35 个循环。取  $5\mu\text{L}$  的 PCR 产物, 用 1% 琼脂糖凝胶电泳分离后在  $1\mu\text{g/mL}$  溴化乙锭 (EB) 溶液中染色。

## 1.4 基因组 DNA 的提取及 Southern 杂交分析

采集 ‘玫瑰红’ 苹果春季新发幼叶, 提取基因组 DNA<sup>[8]</sup>。用限制性内切酶 *EcoR* 和 *Nco* (Takara 公司) 分别将 DNA 完全酶解。取  $10\mu\text{g}$  酶切产物, 电泳分离后将 DNA 转移到尼龙膜上, 65 预杂交过夜。以 MAP2 的 3' 端非保守区为模板, 采用随机引物法合成  $^{32}\text{P}$  标记的探针 (Primer a gene labeling system, Promega), 65 杂交 24 h。用洗膜液依次洗膜后, 将 X 光片置于膜上, 于  $-70^{\circ}\text{C}$  进行放射自显影。

## 1.5 MAP2 正义表达载体的构建

在 MAP 基因 3' 端非编码区设计特异引物 PQS3-2 (5'-CCACTAGTAACACCAAA GAGCA TGCA-3') (下划线示 *Spe* 酶切位点), 以 1.2 中的反转录产物为模板, 以 PQS3-2 和 PQ5-2 为引物进行 PCR 扩增。反应程序是: 94 预变性 3 min; 然后进行以下循环: 94 变性 45 s, 60 退火 45 s, 72 延伸

1 min, 共进行 30 个循环; 最后 72 延伸 10 min, 扩增出约 2 kb 的特异条带。将 PCR 产物与 pMD18-T 载体连接, 并测序鉴定。将筛选到的重组子用 *Xba* 和 *Spe* (Takara) 双酶切后电泳回收 2 kb 片段。同时, 用 *Xba* 和 *Spe* 双酶切表达载体 pB II21, 电泳回收载体片段。取 5  $\mu$ g pB II21 载体片段和 1  $\mu$ g MAP2 片段混合, 用 DNA 连接试剂盒 (Takara 公司) 将 MAP2 正向插入 pB II21 的 35S 启动子下游。将连接产物转化 DH5 并进行双酶切鉴定。

### 1.6 ‘皇家嘎啦’苹果的遗传转化

参照文献 [9] 的方法进行遗传转化。将构建的表达载体 pB II21-MAP2 转入农杆菌 LBA4404。切割好的外植体于农杆菌液中浸蘸, 取出后转移到与悬浮农杆菌相同的液体培养基中, 黑暗条件 (25 ) 下培养 2~3 d。将外植体用灭菌水充分清洗后, 用无菌滤纸吸去多余液体, 转移到预筛选培养基 (MS 附加 6-苄基嘌呤 4.0 mg/L、吲哚乙酸 0.4 mg/L、羧苄青霉素 250 mg/L) 中, 黑暗条件下培养 3~4 d。然后移入筛选培养基 (MS 附加 6-苄基嘌呤 4.0 mg/L、吲哚乙酸 0.4 mg/L、羧苄青霉素 250 mg/L、卡那霉素 20 mg/L) 中, 在黑暗条件下培养 3~4 d 后转光照条件下 (25 , 16 h 光照和 8 h 黑暗) 培养 6 周。期间每 2 周更换 1 次新鲜选择培养基。选取抗卡那霉素的新梢, 在附加 20 mg/L 卡那霉素的增殖培养基上扩繁。在 1/2 MS 附加吲哚乙酸 0.1 mg/L 的生根培养基上诱导生根。

## 2 结果与分析

### 2.1 MAP2 的克隆及序列分析

为研究 AP2 同源基因在苹果花发育过程的作用, 利用同源克隆的方法从苹果早期花芽中分离出全长约 2.2 kb 的 cDNA 片段。该 cDNA 全长为 2 212 bp, 编码 549 个氨基酸。序列分析结果显示 (图 1), 其氨基酸序列具有 AP2 家族成员的典型特征, 具体表现为: 内部含有两个高度保守的重复序列即 AP2 结构域, 该结构域可以识别 DNA 顺式作用元件并与之结合<sup>[10]</sup>。此外, 在其 N 端第 16~60 氨基酸之间有一富含丝氨酸的转录激活区域<sup>[11]</sup>, 在第 170~180 氨基酸之间还含有 1 个碱性区域, 内含

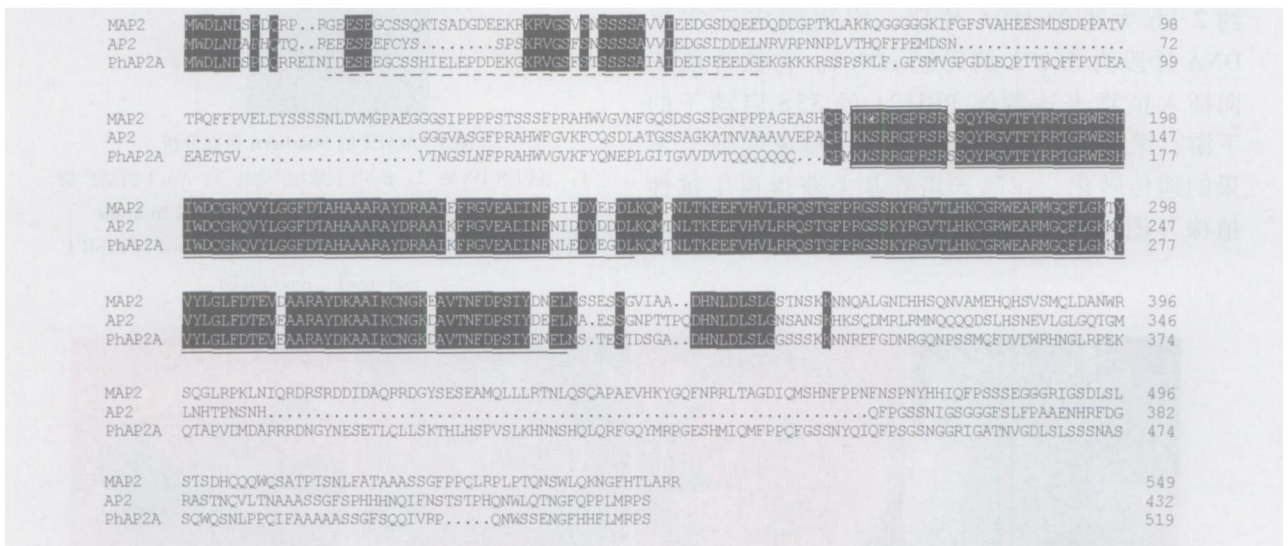


图 1 MAP2 与 AP2、PhAP2A 的氨基酸序列的同源性比较

阴影部分表示序列的同源性 100%。下划线表示两个保守的重复区域 AP2 domain, 下划线表示转录激活区域。

核定位信号 (KKSR) 序列用方框标出。

**Fig 1 Alignment of the deduced amino acid sequences of MAP2 with AP2 (Arabidopsis) and PhAP2A (petunia)**  
Dark shading with white letters reflects 100% sequence conservation. The underlined amino acid indicate the two conserved AP2 domain, and the nuclear location sequence (KKSR) and transcription-activating domain are indicated by a box and dashes, respectively.

核定位信号 KKS<sup>R</sup><sup>[12]</sup>。以上这些结果表明, 我们已经从苹果中分离出 *AP2* 的同源基因, 该基因被命名为 *MAP2* (for *Malus AP2*)。通过 *MAP2* 与拟南芥的 *AP2*、矮牵牛的 *PhAP2A* 的氨基酸序列比较发现, 尽管 3 个蛋白的核定位信号序列、两个 *AP2* 结构域及其连接部分均具有较高的同源性, 但 *MAP2* 与 *AP2* 和 *PhAP2A* 的同源性仅分别为 45.1% 和 55.2%, 其它区域氨基酸序列的显著差异预示了它们在功能上可能存在很大不同。

## 2.2 *MAP2* 在不同组织中的表达

采用 RT-PCR 的方法分析 *MAP2* 在不同组织中的表达情况。结果显示, 在叶片、花芽、萼片、花瓣、雄蕊和子房中均扩增出长约 2 kb 的条带, 只有在幼果中未检测到相应的条带 (图 2), 说明 *MAP2* 在营养组织、花芽以及不同花器官中均有表达, 与拟南芥的 *AP2*、矮牵牛的 *PhAP2A* 的表达模式一致。

## 2.3 *MAP2* 基因的 Southern 杂交分析

如图 3 所示, 用两种限制性内切酶分别酶切的 DNA 均有多个杂交信号条带, 但是信号强弱有所不同, 说明 *MAP2* 在苹果基因组中是以低拷贝形式存在的。

## 2.4 转基因植株的获得

为确定 *MAP2* 基因的功能, 根据 *MAP2* 基因的核苷酸序列, 在起始密码子上游和终止密码子下游分别设计特异引物 PQ5-2 和 PQS3-2, 以花芽总 RNA 的反转录产物为模板, 扩增出约 2 kb 大小的 DNA 片段, 序列测定证实该 DNA 片段为 *MAP2* 编码区 cDNA。将该片段正向插入植物表达载体 PB II 21 的 35S 启动子的下游, 采用农杆菌介导法进行 ‘皇家嘎啦’ 苹果的遗传转化, 在筛选培养基上获得再生抗性植株 (图 4)。

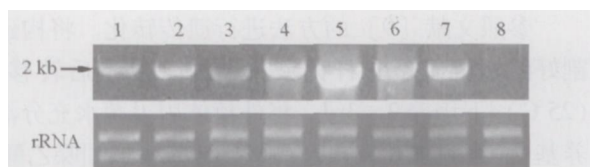


图 2 不同组织 *MAP2* 表达的 RT-PCR 分析

1: 叶片; 2: 花芽; 3: 萼片; 4: 花瓣; 5: 雄蕊; 6: 雌蕊;  
7: 子房; 8: 幼果。

Fig. 2 RT-PCR analysis of *MAP2* expression in various tissues

1: Leaf; 2: Floral bud; 3: Sepal; 4: Petal; 5: Stamen; 6: Pistil;  
7: Ovary; 8: Young fruit

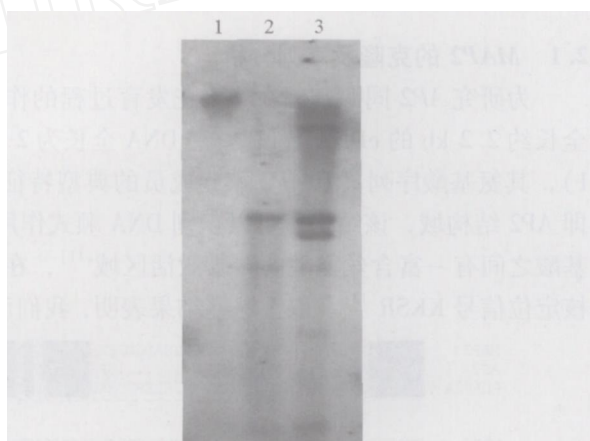


图 3 *MAP2* 的 Southern 杂交分析

1: 基因组 DNA; 2: *EcoR* 酶切产物; 3: *Nco* 酶切产物。

Fig. 3 Southern blot analysis of *MAP2* in apple

1: Genomic DNA; 2, 3: Genomic DNA digested by *EcoR* and *Nco*, respectively

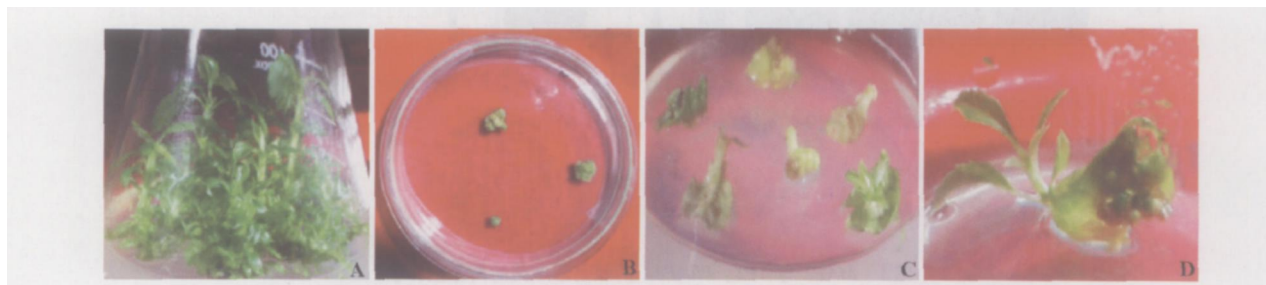


图 4 转基因 ‘皇家嘎啦’ 苹果植株的获得

A: 在增殖培养基上生长的 ‘皇家嘎啦’ 植株; B: 从转化的叶片上再生的绿色愈伤; C 和 D: 在筛选培养基上生长的再生抗性植株。

Fig. 4 Transgenic procedure of ‘Royal Gala’

A: ‘Royal Gala’ plants in regeneration medium; B: Green callus regenerated from transformed leaves;  
C and D: Transgenic plants in selective medium.

### 3 讨论

基于对 *ap2* 突变体的分析, 人们发现 *AP2* 基因不仅在花瓣和萼片的形成过程中起重要作用, 而且与 *AP1*、*LFY* 及 *CAL* 等花的分生组织决定基因相互作用, 参与花的分生组织的早期建立<sup>[1, 2]</sup>。但是 Maes 等<sup>[4]</sup> 获得的矮牵牛 *AP2* 同源基因 *PhAP2A* 的突变体没有表现出任何花发育相关的突变特征。本研究从苹果花芽中分离出 *AP2* 的同源基因 *MAP2*, *MAP2* 与 *AP2*、*PhAP2A* 的氨基酸序列比较结果 (图 1) 显示, *MAP2* 与 *AP2* 和 *PhAP2A* 的同源性仅分别为 45.1% 和 55.2%, 除核定位信号序列和 *AP2* 结构域之外, 这 3 个基因的氨基酸序列差异很大, 暗示在不同物种间, 尤其在具有不同开花特性的物种间 *AP2* 同源基因的功能可能存在一定的差异。

尽管序列同源性分析和基因表达模式常常作为推测基因功能的重要标准, 但是功能分析才能最终说明它在植物发育过程中的作用。为确定 *MAP2* 在苹果中的功能, 我们构建 35S *MAP2* 正义表达载体, 并对 ‘皇家嘎啦’ 苹果进行农杆菌介导的遗传转化, 期望获得的转基因植株能够在花发育等方面表现出某些特征, 以验证 *MAP2* 基因的功能。虽然在果树上进行遗传转化还存在许多障碍, 如生长缓慢, 童期较长, 但我们希望通过更多的尝试能够在果树上得到更直接的结果。

### 参考文献:

- 1 Kunst L, Klenz J E, Martinez-Zapater J, Haughn G W. *AP2* gene determines the identity of perianth organs in flowers of *A. thaliana*. *Plant Cell*, 1989, 1: 1195 ~ 1208
- 2 Shannon S, Meeks-Wagner D R. Genetic interactions that regulate inflorescence development in *A. thaliana*. *Plant Cell*, 1993, 5: 639 ~ 655
- 3 Chuck G, Meeley R B, Hake S. The control of maize spikelet meristem fate by the *APETALA2*-like gene *indeterminate spikelet 1*. *Genes Dev*, 1998, 12: 1145 ~ 1154
- 4 Maes T, Van de Steene N, Zethof J, Karimi M, D'Hauw M, Mares G, Van Montagu M, Gerats T. *Petunia AP2*-like genes and their role in flower and seed development. *Plant Cell*, 2001, 13: 229 ~ 244
- 5 Li Q Z, Li X G, Bai S N, Lu W L, Zhang X S. Isolation and expression of *HA2*, a homolog of *AP2* in *Hyacinthus orientalis* L. *Developmental and Reproductive Biology*, 2001, 10 (1): 69 ~ 75
- 6 Jofuku K D, den Boer B G W, Van Montagu M, Okamoto J K. Control of *A. thaliana* flower and seed development by the homeotic gene *APETALA2*. *Plant Cell*, 1994, 6: 1211 ~ 1225
- 7 Chang S, Puryear J, Caimey J. A simple and sufficient method for isolating RNA from pine trees. *Plant Mol Biol Rpt*, 1993, 11: 113 ~ 116
- 8 Murray G C, Thompson W F. Rapid isolation of high molecular weight DNA. *Nucl Acid Res*, 1980, 8: 4321 ~ 4325
- 9 刘庆忠, 赵红军, 刘 鹏, Mong Rengong, Freddi A Hammerschlag. 抗菌肽 *MB<sub>39</sub>* 基因导入 ‘皇家嘎啦’ 苹果及其四倍体植株的培育. *园艺学报*, 2001, 28 (5): 392 ~ 398
- 10 Liu Q Z, Zhao H J, Liu P, Mong Rengong, Freddi A Hammerschlag. Regeneration of tetraploid plants with cecropin *MB<sub>39</sub>* gene from ‘Royal Gala’ apple. *Acta Horticulturae Sinica*, 2001, 28 (5): 392 ~ 398 (in Chinese)
- 11 Ohme-Takagi M, Shinshi H. Ethylene-inducible DNA binding proteins that interact with an ethylene-responsive element. *Plant Cell*, 1995, 7: 172 ~ 182
- 12 Mitchell P J, Tjian R. Transcriptional regulation in mammalian cells by sequence-specific DNA binding proteins. *Science*, 1989, 245: 371 ~ 378
- 13 Chelsky D, Ralph R, Jonak G. Sequence requirements for synthetic peptide-mediated translocation to the nucleus. *Mol Cell Biol*, 1989, 9: 2487 ~ 2492