

梁文杰. 梨  $S_{22}$ -RNase 基因全长 cDNA 克隆及序列分析[J]. 江苏农业科学, 2013, 41(12): 34-37.

# 梨 $S_{22}$ -RNase 基因全长 cDNA 克隆及序列分析

梁文杰<sup>1,2</sup>

(1. 中南林业科技大学经济林育种与栽培国家林业局重点实验室, 湖南长沙 410004; 2. 温州科技职业学院, 浙江温州 325006)

**摘要:**以砂梨品种“宝珠”雌蕊为材料提取 RNA, 通过采用 RACE 技术, 获得了 1 个 840 bp 梨  $S$  基因的 cDNA 目的片段, 经克隆后测序, 证实该片段是梨  $S_{22}$ -RNase 的全长 cDNA 序列; 分析表明, 该基因的编码框由 681 个碱基组成, 共编码 227 个氨基酸, 与已克隆的梨  $S$ -RNase 基因的 cDNA 序列的相似性为 60% ~ 90%。

**关键词:**砂梨; 自交不亲和性;  $S$  基因; 克隆; 序列分析

**中图分类号:** S661.201 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2013)12-0034-03

自交不亲和性是植物实现异花受精、防止近亲繁殖和物种退化的一种重要而精密的遗传机制<sup>[1-2]</sup>。梨 (*Pyrus*) 自交不亲和是由单个基因位点 ( $S$  基因位点) 的复等位基因 ( $S$ -RNase 基因, 简称  $S$  基因) 所控制<sup>[3-4]</sup>。对于全长 cDNA 序列的获得可以更好地研究梨自交不亲和和  $S$  基因在 RNA 水平上的差异, 更好地获得其编码序列的真实情况, 验证基因组水平上获得的  $S$  基因外显子的可靠性和内含子插入区域的准确性。日本学者于 1995 和 1998 年从日本的 5 个梨品种中分离克隆到了 7 个  $S$  基因的全长 cDNA<sup>[5-6]</sup>, 2002 年又克隆了  $S_8$  的全长 cDNA<sup>[7]</sup>, 2004 年克隆到了  $S_9$  的全长 cDNA<sup>[8]</sup>。国内新发现了 30 多个新的梨  $S$  基因, 但绝大多数都为基因片段。笔者提取砂梨品种“宝珠” (*Pyrus pyrifolia* ‘Baozhu’) 雌蕊的总 RNA, 并用 RT-PCR 和 RACE 技术获得了  $S_{22}$ -RNase 的全长 cDNA 序列, 并对序列进行了相关分析。

## 1 材料与与方法

### 1.1 材料

宝珠雌蕊采自中国农业科学院郑州果树研究所, 置于液氮中带回实验室于  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  保存待用。ExTaq、pMD18-T 载体和 3'-Full Race Core Set 试剂盒购自 TaKaRa 公司, RNA 抽提试剂盒购自 Invitrogen 公司, 回收试剂盒购自安比奥生物技术公司, 其他药品购自上海生工生物工程技术服务公司。

### 1.2 方法

**1.2.1 总 RNA 提取** 参照 RNA 抽提试剂盒说明书, 所用试剂用 0.05% DEPC 处理过的无菌水配制。操作过程尽量避免 RNase 污染, 耐高温器皿  $240\text{ }^{\circ}\text{C}$  烘烤 4 h 以上, 其他器皿用 0.05% DEPC 浸泡过夜, 然后高温灭菌处理, 烘干备用。

**1.2.2 引物设计及 cDNA 全长获得** 参考 GenBank 上苹果、梨的 mRNA 序列, 利用 Primer Premier 5.0 设计 5'端特异引物 PF<sub>2</sub>: 5'-TGCCTCGCTCTTGAACAAA-3' 和 PF<sub>1</sub>: 5'-TTTACG-CAGCAATATCAG-3', PF<sub>1</sub> 位于 PF<sub>2</sub> 下游 120 bp 左右处。反转录反应体系为:  $10\times\text{RNA PCR Buffer}$  1  $\mu\text{L}$ , 25 mmol/L MgCl<sub>2</sub>

2  $\mu\text{L}$ , dNTP Mixture (各 10 mmol/L) 1  $\mu\text{L}$ , 5 U/ $\mu\text{L}$  AMV Reverse Transcriptase XL 0.5  $\mu\text{L}$ , 40 U/ $\mu\text{L}$  RNase Inhibitor 0.25  $\mu\text{L}$ , 2.5  $\mu\text{mol/L}$  Oligo dt-3sites Adaptor Primer 0.5  $\mu\text{L}$ ,  $2\times 10^5$  copies/ $\mu\text{L}$  Positive Control RNA 0.5  $\mu\text{L}$ , RNase Free dH<sub>2</sub>O 4.25  $\mu\text{L}$ 。循环条件如下:  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$  10 min,  $50\text{ }^{\circ}\text{C}$  30 min,  $95\text{ }^{\circ}\text{C}$  5 min,  $5\text{ }^{\circ}\text{C}$  5 min, 1 个循环。反应结束后, 进行下一反应:  $10\times\text{PCR Buffer (Mg}^{2+}\text{ Free)}$  4  $\mu\text{L}$ , 25 mmol/L MgCl<sub>2</sub> 3  $\mu\text{L}$ , 5 U/ $\mu\text{L}$  Taq 0.25  $\mu\text{L}$ , 10  $\mu\text{mol/L}$  PF<sub>2</sub> 1  $\mu\text{L}$ , 20  $\mu\text{mol/L}$  3 sites Adaptor Primer 0.5  $\mu\text{L}$ , 上步反应液 10  $\mu\text{L}$ , 灭菌水 33.75  $\mu\text{L}$ ; 循环条件:  $94\text{ }^{\circ}\text{C}$  30 s,  $55\text{ }^{\circ}\text{C}$  30 s,  $72\text{ }^{\circ}\text{C}$  2 min, 38 个循环。

**1.2.3 目的片段回收、克隆** PCR 产物回收按照 Ambion Gen Life Tech Ltd 的 Puprep Gel Extraction Kit 操作, 回收产物与 pMD18-T Vector (TaKaRa) 过夜连接, 连接产物转化至感受态大肠杆菌 DH5 $\alpha$ , 涂布于含有 IPTG、X-gal、Amp 的 LB 固体培养基上  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  过夜。挑取白色单克隆于 5 mL 含 Amp 的 LB 液体培养基中,  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  摇菌过夜, 抽提质粒 DNA, 送上海生工测序。

## 2 结果与分析

### 2.1 雌蕊总 RNA 的检测

提取雌蕊总 RNA, 用 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测 (图 1), 结果显示: 28S 和 18S 核糖体 RNA 特征谱带清晰, 无拖尾, 亮度接近 2:1, 这说明 RNA 是完整的。用紫外分光光度计测定  $D_{260}/D_{280}$ , 接近 2.0, 可以满足试验的需要。

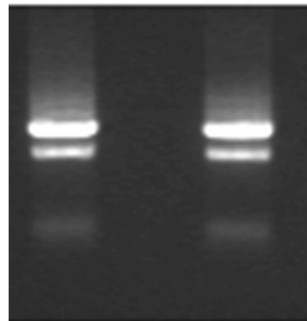


图 1 雌蕊总 RNA 电泳图

### 2.2 RACE 扩增与序列分析

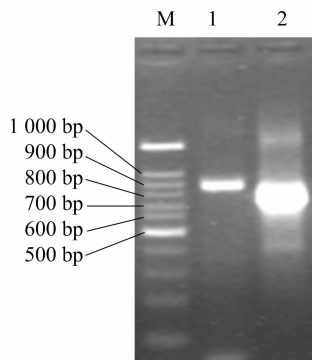
为获得基因的全长, 反转录后, 在 5'-UTR 区域设计特异引物 PF<sub>2</sub>, 并在其下游 120 bp 左右设计特异引物 PF<sub>1</sub> 作为

收稿日期: 2013-05-09

基金项目: 国家林业局重点项目 (编号: 2006-12)。

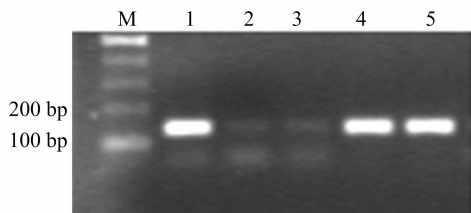
作者简介: 梁文杰 (1981—), 男, 硕士, 讲师, 研究方向为林业生物技术和林业碳汇。E-mail: lwj60000@126.com。

巢式引物,与 TaKaRa 的 3'-Full Race Core Set 试剂盒通用引物 3 sites Adaptor Primer 配对进行扩增。引物 PF<sub>2</sub> 和 3 sites Adaptor Primer 的 PCR 产物在 840 bp 左右有 1 条亮带,引物 PF<sub>1</sub> 和 3 sites Adaptor Primer 的 PCR 产物在 720 bp 左右有 1 条亮带(图 2)。将 PCR 产物回收并与 PMD18-T 载体连接后转化,分别选取大量阳性克隆,用特异引物 PF<sub>1</sub> 和 P22R (5'-GAGGATTCCTTATCTTGC-3') 扩增,检测到 140 bp 左右有条带(图 3)。对原来的阳性克隆测序,插入片段大小分别为 840、717 bp。



M—DNA marker(DL 1500); 1—3' Race<sub>2</sub>产物; 2—巢式PCR产物

图2 3' Race 及巢式 PCR 产物电泳图



M—DNA marker(DL 1500); 1~5—引物PF1和P22R扩增产物

图3 特异引物检测电泳图

### 2.3 S<sub>22</sub>-RNase 全长 cDNA 序列分析

通过对测序基因片段序列进行拼接,获得 1 个 cDNA 全长为 840 bp 的基因。对序列进行分析,结果显示,该基因的编码框由 681 个碱基组成,基因序列从第 28 bp 开始至 714 bp,含有 1 个开放阅读框(ORF)和 1 个终止密码子,编码 227 个氨基酸(图 4)。由图 4 可见,S<sub>22</sub>-RNase 氨基酸序列包含信号肽(putative signal peptide)+C1+C2+HV+C3+RC4+C5,其中,信号肽由 27 个氨基酸组成,C1 区由 11 个氨基酸组成,C2 区也由 11 个氨基酸组成,C3 区由 6 个氨基酸组成,RC4 是蔷薇科特有保守区,由 8 个氨基酸组成,C5 区由 7 个氨基酸组成。另外,有 8 个高度保守的半胱氨酸残基,位置分别为 Cys<sup>42</sup>、Cys<sup>49</sup>、Cys<sup>75</sup>、Cys<sup>118</sup>、Cys<sup>182</sup>、Cys<sup>197</sup>、Cys<sup>208</sup> 和 Cys<sup>220</sup>,这 8 个高度保守的半胱氨酸残基扮演了一个很重要的角色,说明 S 等位基因可能存在 4 个二硫键。在 C2 和 C3 区各含有 1 个保守的组氨酸残基,分别位于 His<sup>60</sup> 和 His<sup>105</sup>,这 2 个组氨酸残基在决定 S-RNase 酶活性方面起着重要的作用。

### 2.4 和已有梨 S 基因的比较分析

将已分离克隆的梨 S 基因用 MEGA 4.0 软件进行转换和颠换分析,结果由表 1 可见:序列变异位点基本上是转换少于颠换;除了 S<sub>3</sub> 和 S<sub>5</sub> 的转换和颠换较少外,其余的平均转换为 55 个,颠换为 69 个,二者之比约为 0.8,转换和颠换占总序列

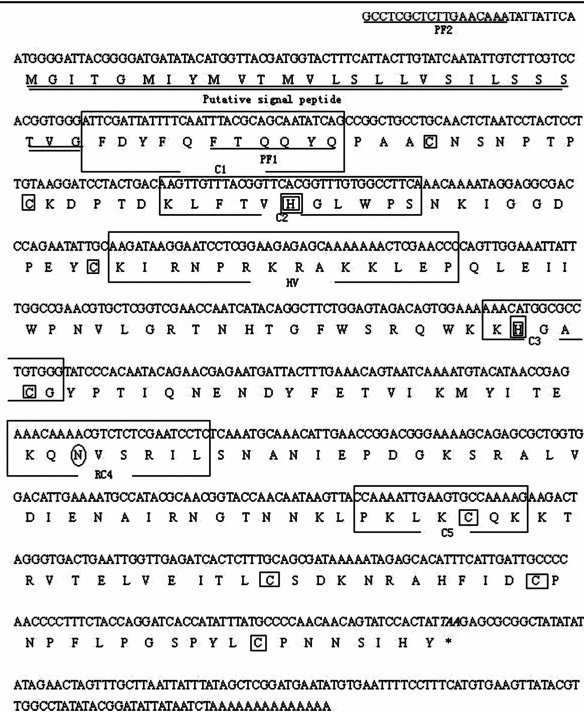


图4 S<sub>22</sub>-RNase 核苷酸序列及推导的氨基酸序列

的 18.37%。但是,可能存在一些基因间转换大于颠换,这和 S 基因的分化时期早于梨 S 基因的分化有关。

为进一步研究和分析 S<sub>22</sub>-RNase 序列,将其与 GenBank 已登录的东方梨 S-RNase 基因进行比对,结果(图 5)发现:梨 S-RNase 基因有其特有的组成:信号肽+C1+C2+HV+C3+RC4+C5;信号肽部分有 22~28 个氨基酸,C1 区比较保守,仅存在氨基酸 Y 和 F 的替代,C2 区高度保守,未出现任何替代,C3 保守区也有个别的氨基酸替代现象,作为蔷薇科 S 基因所特有的保守区,RC4 存在 1 处氨基酸的替代,C5 区也存在 1 处氨基酸替代的现象,作为鉴别 S 基因的重要部分,HV 区氨基酸种类和长度都有很大差异。在已获得的全长 cDNA 序列中,S<sub>22</sub>-RNase 的氨基酸序列和 S<sub>21</sub>-RNase 的相似性最高,达 90%,和 S<sub>9</sub>-RNase 的相似性最低,为 60%。

### 3 小结与讨论

以砂梨品种宝珠为材料,用 3' RACE 技术,获得了梨 S<sub>22</sub>-RNase 的全长 cDNA 序列,S<sub>22</sub>-RNase 和梨 S<sub>21</sub>-RNase 的相似性最高,达 90%,且和已克隆梨 S-RNase 基因间的转换/颠换的平均比率为 0.92,接近于 1.00,这可能与蔷薇科 S 基因的进化早于苹果亚科的分化有关<sup>[9-10]</sup>。

2002 年 Castillo 等为获得日本梨 S<sub>8</sub>-RNase 的全长序列,设计了 5' 端延伸引物“TGCCTCGCTCTTGAACAAA”<sup>[7]</sup>,此引物在日本梨中仅不能扩增出 S<sub>1</sub>,用于中国梨品种中,目前除 S<sub>12</sub> 外,均可以扩增。S<sub>22</sub>-RNase 也可以采用此引物扩增。

S-RNase 编码的糖蛋白存在于雌蕊输导组织的胞外空间,其 5 个保守区(C1 至 C5)中,C1、C4、C5 是疏水区,C2、C3 是亲水区<sup>[11-12]</sup>。HV 区是糖蛋白中含亲水基团最多的部分。从已克隆的梨 S 基因 cDNA 全长来看,只有 C2 区严格保守,其余的 4 个保守区都有变化,HV 区的变化最为活跃,因此,

表 1 梨 S 基因间的转换(右上角)和颠换(左下角)

S 基因	S <sub>1</sub>	S <sub>2</sub>	S <sub>3</sub>	S <sub>4</sub>	S <sub>5</sub>	S <sub>6</sub>	S <sub>7</sub>	S <sub>8</sub>	S <sub>9</sub>	S <sub>12</sub>	S <sub>13</sub>	S <sub>16</sub>	S <sub>21</sub>	S <sub>22</sub>	S <sub>34</sub>	S <sub>39</sub>
S <sub>1</sub>		48	57	20	64	50	53	56	76	45	59	51	70	60	54	57
S <sub>2</sub>	75		55	49	58	53	45	43	68	37	54	45	53	51	52	54
S <sub>3</sub>	67	72		54	8	67	65	69	74	49	62	58	50	47	65	71
S <sub>4</sub>	20	76	71		56	41	42	44	64	37	51	41	54	50	44	47
S <sub>5</sub>	70	73	9	75		68	65	71	77	54	63	58	54	51	68	73
S <sub>6</sub>	65	78	82	71	76		51	56	68	53	53	37	67	67	48	56
S <sub>7</sub>	52	78	64	53	65	72		53	70	42	62	52	52	53	53	60
S <sub>8</sub>	64	72	79	68	74	78	49		69	47	66	52	62	64	64	60
S <sub>9</sub>	61	70	78	65	79	57	64	67		55	71	66	80	81	67	80
S <sub>12</sub>	67	61	80	67	77	70	63	56	65		55	44	54	50	45	46
S <sub>13</sub>	69	83	82	73	78	67	67	72	77	75		52	60	59	56	61
S <sub>16</sub>	65	84	80	71	82	51	62	74	62	74	71		63	55	49	59
S <sub>21</sub>	65	61	57	64	54	67	65	70	72	60	73	72		20	69	72
S <sub>22</sub>	63	63	55	66	52	67	66	67	73	60	73	67	18		62	68
S <sub>34</sub>	60	78	75	64	79	65	53	50	67	63	70	67	73	63		58
S <sub>39</sub>	68	80	76	76	74	72	66	76	68	77	69	72	62	60	73	

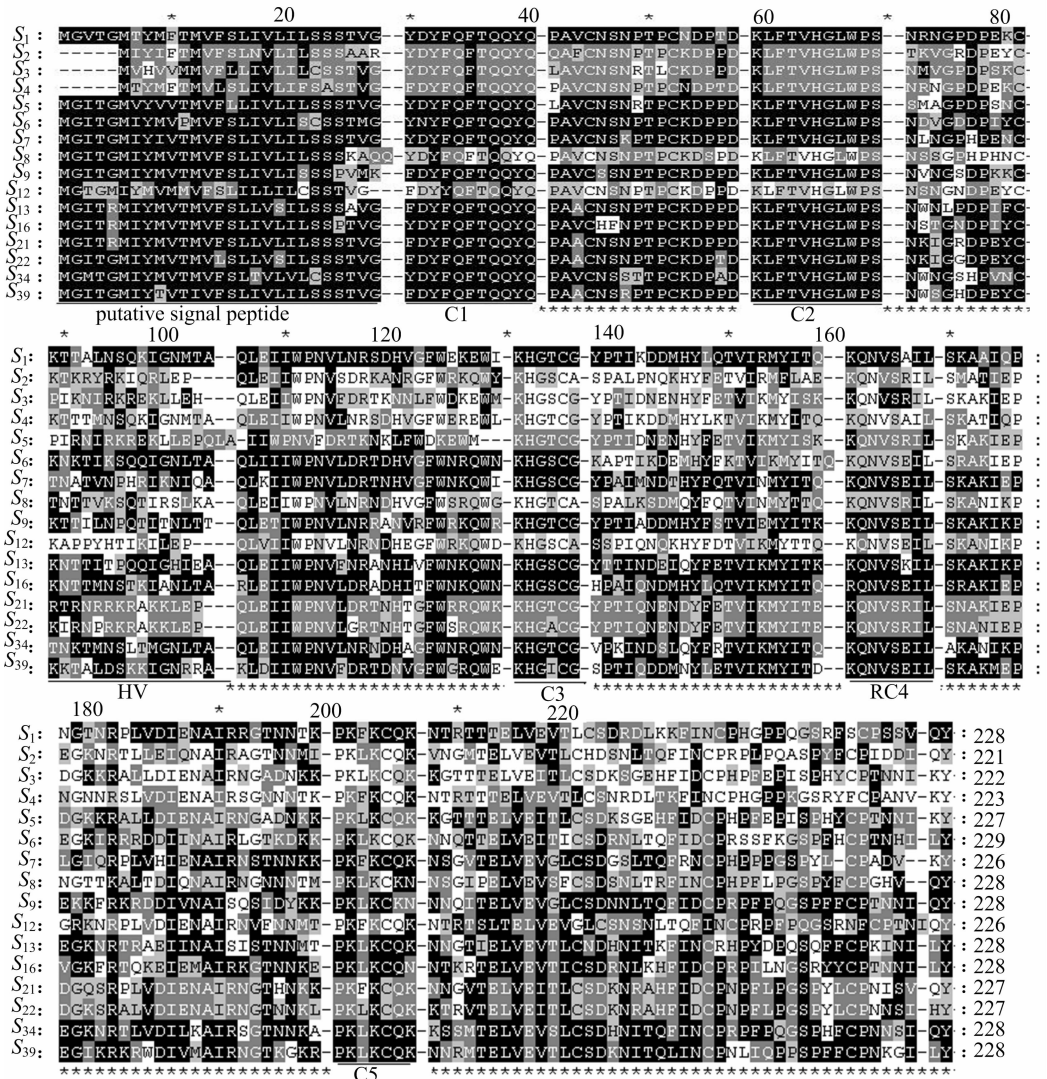


图5 S<sub>22</sub>-RNase 推导的氨基酸序列与已知其他梨 S 基因编码的氨基酸序列比较

HV 区也被认为是雌蕊与花粉间特异识别的关键部位。梨的雄蕊和雌蕊分别受不同的 S 基因控制,即花粉 S 基因和雌蕊

S 基因,但由于一直未分离到花粉 S 基因的产物,所以梨自交不亲和的机制还未完全搞清。分离和鉴定花粉 S 基因是未来

王立博,张 婷,王敬力,等. 油茶内生真菌 DNA 提取及 SRAP 反应体系的建立[J]. 江苏农业科学,2013,41(12):37-40.

# 油茶内生真菌 DNA 提取及 SRAP 反应体系的建立

王立博,张 婷,王敬力,易庆平

(荆楚理工学院生物工程学院,湖北荆门 448000)

**摘要:**采用改良的 CTAB 法提取油茶内生真菌基因组 DNA,并以油茶内生真菌基因组 DNA 为材料,对影响 SRAP 反应条件的因素进行探索。结果表明,在 30  $\mu\text{L}$  反应体系中,5 种成分的适宜量分别是  $\text{Mg}^{2+}$  1.8 mmol/L、dNTPs 145  $\mu\text{mol/L}$ 、引物 0.22  $\mu\text{mol/L}$ 、模板 DNA 65 ng、*Taq* DNA 聚合酶 2.0 U。建立的 SRAP-PCR 反应体系为 SRAP 分子标记在油茶内生真菌遗传多样性研究中的应用提供了基础。

**关键词:**内生真菌;油茶;SRAP;PCR 反应体系

**中图分类号:** Q939.9 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2013)12-0037-04

内生真菌(endophytic fungi)是指生活史中的一部分或全部阶段生活于健康植物的各种组织部位及器官内部的真菌微生物,一般不引起植物体病害,可通过组织学方法等证明其为内生,常见于植物的茎、叶以及芽等组织<sup>[1-2]</sup>。目前对植物内生真菌研究较多的是药用植物和农作物等方面,如红豆杉、匙叶翼首草、虎杖、麻黄、水稻等<sup>[3-10]</sup>。

序列相关扩增多态性(sequence related amplified polymorphism,SRAP)是一种新型的基于 PCR 的标记技术,它不需要

知道任何基因的序列信息即可进行 PCR 扩增,克服了 RAPD、SSR、AFLP 等标记技术重复性差、成本高的缺点,具有操作简便、标记位点分布均匀、标记稳定性好、重复性好等优点<sup>[11-13]</sup>,有学者用 SRAP 分子标记技术对喜树内生真菌进行了研究<sup>[14]</sup>,但至今未见 SRAP 分子标记技术应用于油茶内生真菌研究中的报道。因此,本研究以油茶内生真菌为材料,提取基因组 DNA,建立适合于油茶内生真菌的 SRAP 反应体系,以期 SRAP 标记技术应用于油茶内生真菌遗传多样性及基因标记的研究奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料及试剂

1.1.1 材料 试验材料为周希等筛选的油茶内生真菌<sup>[15]</sup>。随机选取 15 种,在液体培养基内培养 4 d 获得油茶内生真菌菌丝体。

收稿日期:2013-05-15

基金项目:湖北省教育厅项目(编号:Q20134301);荆楚理工学院校级科研项目(编号:ZR201001)。

作者简介:王立博(1988—),男,河南洛阳人,主要从事食品科学与工程研究。E-mail:volley\_ball@163.com。

通信作者:张 婷,硕士,讲师,主要从事生化与分子生物学研究。E-mail:ztxianyun@126.com。

的热点,也是彻底解决自交不亲和的机制的关键所在。

## 参考文献:

- [1] Stone J L. Molecular mechanisms underlying the break down of gametophytic self-incompatibility[J]. Rev Biol, 2002, 77(1): 17-32.
- [2] Sophia L S, Daphne R G. The molecular biology of self-incompatibility systems in flowering plants[J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 2001, 67(2): 93-114.
- [3] Javier S, María H. Identification of self-incompatibility alleles in pear cultivars(*Pyrus communis* L.)[J]. Euphytica, 2004, 128(3): 325-331.
- [4] Silvia Z, Paola T, Wim B, et al. S-Allele characterization in self-incompatible pear(*Pyrus communis* L.)[J]. Sex Plant Reprod, 2002, 15(3): 153-158.
- [5] Norioka N, Ohnishi Y, Norioka S, et al. Nucleotide sequences of cDNAs encoding  $S_2$ - and  $S_4$ -RNases (D49527 and D49528 for EM-BL) from Japanese pear(*Pyrus pyrifolia* Nakai) (PGR95-020)[J]. Plant Physiol, 1995, 108: 1343.
- [6] Ishimizu T, Shinkawa T, Sakiyama F, et al. Primary structural features of rosaceous S-RNases associated with gametophytic self-incom-

patibility[J]. Plant Molecular Biology, 1998, 37(6): 931-941.

- [7] Castillo C, Takasaki T, Saito T, et al. Cloning of the  $S_8$ -RNase ( $S_8$ -allele) of Japanese Pear(*Pyrus pyrifolia* Nakai)[J]. Plant Biotechnology, 2002, 19(1): 1-6.
- [8] Takasaki T, Okada K, Castillo C, et al. Sequence of the  $S_9$ -RNase cDNA and PCR-RFLP system for discriminating  $S_1$ - to  $S_9$ -allele in Japanese pear[J]. Euphytica, 2004, 135(2): 157-167.
- [9] Hoy-Taek K, Yutaka H, Hyun-jung K, et al. The presence of a new S-RNase allele( $S_{10}$ ) in Asian pear(*Pyrus pyrifolia* (Burm; Nakai))[J]. Genetic Resources and Crop Evolution, 2006, 53(7): 1375-1383.
- [10] Raspe O, Kohn J R. Population structure at the S-locus of *Sorbus aucuparia* L. (Rosaceae: Maloideae)[J]. Molecular Ecology, 2007, 16(6): 1315-1325.
- [11] Cornish E C, Pettitt J M, Boning I, et al. Developmentally controlled expression of a gene associated with self-incompatibility in *Nicotiana glauca* L. Nature, 1987, 326: 99-102.
- [12] Sassa H, Nishio T, Kowiyama Y, et al. Self-incompatibility (S) alleles of the rosaceae encode members of a distinct class of the T2/S ribonuclease superfamily[J]. Molecular & General Genetics, 1996, 250(5): 547-557.