

单引物方法克隆盐角草 *orf25* 基因

李金耀 张富春* 马纪 单文娟 王宾

(新疆大学生命科学与技术学院分子生物学重点实验室,新疆生物资源基因工程重点实验室 乌鲁木齐 830046)

摘 要 采用单引物 RT-PCR 扩增的方法,从新疆野生植物盐角草(*Salicornia europaea*)中克隆获得了 1.7kb 的 cDNA 片段,经过测序和序列分析,发现基因片段包含了 *orf25* 基因完整的读码框架。采用序列同源性分析方法,结果显示新疆盐角草 *orf25* 基因与甜菜线粒体同源性高达 98%,与烟草线粒体同源性达到 95%,与小麦同源性为 92%,与玉米同源性为 88%,表明 *orf25* 基因在植物中是高度保守的一种基因,同时说明野生植物盐角草中也存在与农作物相似的雄性不育相关基因,*orf25* 基因编码的功能性蛋白可能在影响植物雄性不育改良作物品种方面具有重要的意义。

关键词 盐角草, *orf25* 基因片段, 单引物 RT-PCR, 植物雄性不育

中图分类号 Q785 **文献标识码** A **文章编号** 1000-306X(2003)01-0120-04

植株雄性不育是一种植物在有性繁殖过程中不能产生正常的花药、花粉或雄配子的遗传现象,它广泛存在于开花植物中。植物雄性不育是作物杂种优势利用的重要途径,已成为许多农作物育种的主要方向和目标,并且在生产上取得了很大的成功,如我国杂交水稻种植面积占水稻总面积的 46%~55%,其产量较常规品种增产 20%~30%。植物雄性不育性状的分类和遗传机制是杂种优势利用的基础,在这方面已取得许多研究进展,尤其是在不良性状遗传上,已建立了较为科学的理论体系,并用于指导雄性不育系的选育和农作物的改良。

自上世纪 90 年代初 Mariani(1990,1992)^[1,2]等开始利用基因工程创造植物雄性不育以来,至今已初步建立了几种创造雄性不育的体系。De Block(1997)^[3]和傅荣昭(1997)^[4]也相继将雄性不育体系用于小麦的研究,但均沿用了 Mariani 等人开创的花药特异性启动子驱动 Barnase 基因来构建雄性不育基因的体系。李艳红(1999)^[5]以克隆的肌动蛋白基因为基础构建了新的雄性不育嵌合基因导入普通小麦取得了可喜的结果。Eric Ducos(2001)^[6]对甜菜进行了研究,发现了 G 型细胞质雄性不育与线粒体有关。Marianne B. Smit(2002)^[7]利用显微镜技术直接从形态学方面对细胞质雄性不育进行了研究,使人们对雄性不育有了更直观的了解。

盐角草(*Salicornia europaea*)为藜科(Chenopodiaceae)盐角草属(*Salicornia*)植物。一年生草本,高 10~40cm,生于新疆南北疆平原地区盐湖边、盐化沼泽边、潮湿盐土及重盐土上,

为一种耐盐碱的植物,其对于利用野生耐盐碱植物来改良作物性状,培育作物新品种,改良盐碱土壤和退沙还耕均有重要的意义。因此本文运用 RT-PCR 技术从盐角草 mRNA 中扩增出 *orf25* 基因片段,发现 *orf25* 基因是一类与雄性不育密切相关的基因,试想从转录阶段来探讨植物雄性不育的遗传机制,以期作为作物优良品种的培育提供科学的理论指导。

1 材料和方法

1.1 材料和试剂

盐角草采自新疆五家渠干旱盐碱地区, pMD18-T 测序载体购自 TaKaRa 公司,大肠杆菌 DH5 α 菌株为本实验室保藏菌种。RNA 提取试剂盒、PCR 产物回收试剂盒、DNA marker、Kpn I 和 Sph I 限制酶、exTaq 酶以及 RT-PCR 和 PCR 引物均购自 TakaRa 公司,测序试剂盒购自美国 PE 公司,其它试剂均为分析纯。

1.2 盐角草总 RNA 的提取

依据操作试剂盒进行。

1.3 RT-PCR 反应

根据已发表的 *Beta vulgaris* 线粒体 *orf25* 基因序列(AB020062),设计 PCR 引物序列为:5'-TCATAGATCGTTC-CTGAAAACG-3',依照 TaKaRa RNA PCR Kit 操作指南进行,反转录用 Oligo(dT)作下游引物,反应条件:42℃ 30min,99℃ 5min,5℃ 5min。PCR 反应用 *orf25* 基因序列设计特异性引物,扩增参数 94℃ 5min,94℃ 30s,51℃ 30s,72℃ 3min 40 个循环;72℃ 10min,反应产物进行琼脂糖凝胶电泳检测。

收稿日期 2002-08-26,修回日期 2002-10-25。

基金项目 国家科技攻关项目资助(No. 2001BA901A32)。

* 通讯作者。Tel 86-991-8582557; Fax 86-991-8583259; E-mail: zfc@xin.edu.cn

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

1.4 *orf25* gene cDNA 的克隆

按 TaKaRa 公司 PCR Fragment Recovery Kit 说明书进行 PCR 产物的回收。回收的 *orf25* cDNA 片段与 pMD 18-T 载体在 T4 DNA 连接酶的作用下 16℃ 过夜,使 *orf25* cDNA 连接到 pMD 18-T 的载体上。连接产物转化感受态细胞,感受态的制备及转化按参考文献 [8]。

1.5 重组质粒的鉴定

按相关的参考文献 [8] 进行质粒 DNA 的小量提取,提取后的质粒用 *Kpn*I 和 *Sph*I 双酶切进行重组质粒的鉴定,酶切反应结束后进行琼脂糖凝胶电泳鉴定,正确的克隆进行质粒的大量提取。

1.6 盐角草 *orf25* cDNA 的序列测定及序列分析

为鉴定克隆的 cDNA 序列,对 pMD18-T/*orf25* 重组质粒进行纯化,并用 BcaBEST primer RV-M 和 BcaBEST primer M13-47 对盐角草 *orf25* cDNA 在 PE377 全自动测序仪进行双向 DNA 序列测定,所得序列用 PE 公司 SeqEd v1.0.3 软件进行分析。

2 结果

2.1 RT-PCR 产物鉴定

利用提取的总 RNA,以 Oligo(dT) 为引物进行反转录得到单链 cDNA,再以设计的 PCR 单引物进行扩增得到 *orf25* 基因片段。RT-PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定(见图 1),可见一条约 1700bp 的条带,与我们预计的 1700bp 一致。

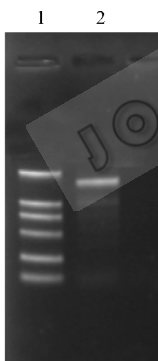


图 1 盐角草 *orf25* 基因 RT-PCR 结果

Fig. 1 RT-PCR of *orf25* cDNA from *Salicornia europaea*

1. DL2000 marker ;

2. *orf25* cDNA from *Salicornia europaea*

2.2 测序载体的构建及其鉴定

RT-PCR 产物与克隆载体 pMD18-T 连接,构建了重组质粒 pMD18-T/*orf25*。重组质粒用 *Kpn*I 和 *Sph*I 酶切,切出约 1700bp 的 DNA 片段(图 2),与预计的连接片段大小相同。

2.3 盐角草 *orf25* cDNA 序列测定及序列分析

对 pMD18-T/*orf25* 重组质粒用 BcaBEST primer RV-M 和 BcaBEST primer M13-47 进行双向测序,部分测序结果如图 3。

2.4 对所测序列进行同源性分析

用 DNAMAN 对盐角草 *orf25* 基因与甜菜、烟草、小麦、玉米 *orf25* 基因进行同源性分析,其同源性分别为 98%、95%、

92% 和 88%(见图 4),表明所克隆的 cDNA 为 *orf25* cDNA,测定序列区间包含了 5' 端的 *orf25* 的部分读码框架。

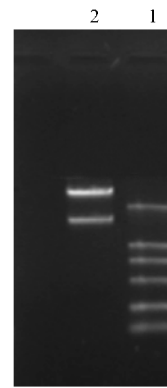


图 2 pMD18-T/*orf25* 酶切分析

Fig. 2 Identification of the pMD18-T/*orf25*

1. DL2000 marker ;

2. Digestion of pMD18-T/*orf25* with *Kpn*I and *Sph*I

```
ATGACCATGATTACGAATTCGAGCTCGGTACCCGGGGATCCTCTAGAGAT
TTCATAGATCGTTCCTGAAAACGGGTGCGACGGGAAGAAGTGGCATTGG
AAGTGTGCTGACTTAACATTTAGGTTTCGACATAACAAGCTTGCACTG
CCTTTTCGCACCTTAGGCGCGCAGCGTGCCATTGGTAATGATTCTACTACG
GTTCACAAAATTCGCAAGCTGACCCTAAGTAATCGTTGTTTCATTGGA
TTCCGGGGAACTACTCTCGTTAGGATTGGGAATTGCTGCGATTCTTCCT
GAATAGCCTGGATTCTCTCGTCGAGAGTCACTTTGAAAGTATTACCTAAA
CTCTTTTCGGCTGAATATGATAAAGCCTATAAAAACAACGAGCTACTATCAT
TTCTTCATTATAGATTGAGATCTTCTCGAACTTGATGCACAAATAGATA
GAATAGCAGCAAATAGCATCTTCTAGCCTGCATCTTCGTGGAACCTCTTT
CTCATTTAGAAAAGCTTATCTTTATCTTTCAGCAACTGAACGGGAAGTTTC
TTAGGAAAAGTTCGAATCGGATCGCTCGCCCGCGGAGAAAAGGCCCTGATC
CTGCCAATCAAGTAAAAAGAAAGAAGAGAACGAAACAA
```

图 3 盐角草 *orf25* 基因 5' 端的 cDNA 序列测定结果

Fig. 3 The sequence of *orf25* 5' cDNA in *Salicornia europaea*

3 讨论

本研究通过单引物 RT-PCR 技术扩增盐角草 *orf25* 基因,根据甜菜(*Beta vulgaris*)的线粒体 *orf25* 基因序列设计一条引物,通过引物与基因序列的同源性分析,发现该引物既能作为上游引物,又能作为下游引物,以合适的 PCR 条件即可扩增出目的基因片段。对于单引物 PCR 条件进行的探索表明,单引物 PCR 退火温度比普通 PCR 退火温度要稍高一些,一般比引物 T_m 值低 3℃ 左右,其余条件与普通 PCR 相同。从盐角草总 RNA 中扩增出的目的片段与甜菜线粒体 *orf25* 基因同源性达到了 98%,与烟草线粒体 *orf25* 基因同源性达到了 95%,与小麦的 *orf25* 基因同源性为 92%,与玉米同源性为 88%,说明 *orf25* 基因在植物中是高度保守的,*orf25* 基因可能编码了一个保守的蛋白产物^[9]。并且 *orf25* 基因位于线粒体基因组,其功能可能与细胞质雄性不育有关。

Tang 等发现了高粱的细胞质雄性不育品系 IS1112C,该产品含有一个全新的开放读框,其中包含了 *orf25* 基因序列,被

称为 *urf20^d*^[1]。Ogihara 小组发现光周期敏感型细胞质雄性不育小麦品系(Alloplasmic line)的 *orf25* 基因转录产物比正常小麦品系(Euplasmic line)的 *orf25* 基因转录产物多大约 300 个核苷酸,说明 *orf25* 的转录模式与光周期敏感的细胞质雄

性不育现象相关。同时也表明 *orf25* 基因编码的异常蛋白产物可能导致线粒体机能不良,从而影响了花的形态形成途径,尤其是决定器官特性的过程^[11]。

<i>orf25</i> res	AAGAGTTCACGAAGATCGAGGCTAGAAAGATGCTATTG	179
Beta vulgaris mitoc	AAGAGTTCACGAAGATCGAGGCTAGAAAGATGCTATTG	585
Maize (V3) mitochon	tttAGTggaAtGgAtAtGaAGaaaAGAAaATGCTATTG	170
Nicotiana tabacum m	ttGAGTTCACGAATATCGAGGCTAGAAAGATGCTATTG	146
Wheat mitochondrial	tttcttTtCtACGgAtAtGaAGsAtAGAAATATGCTATTG	289
Consensus	t a g a atg ag agaaa atgctattg	
<i>orf25</i> res	CTGCTATTCTATCTATTGTGTCATCAAGTTCGAAGAAGAT	219
Beta vulgaris mitoc	CTGCTATTCTATCTATTGTGTCATCAAGTTCGAAGAAGAT	625
Maize (V3) mitochon	CTGCTATTCTATCTATTGTGTCATCAAGTTCGAAGAAGAT	210
Nicotiana tabacum m	CTGCTATTCTATCTATTGTGTCATCAAGTTCGAAGAAGAT	186
Wheat mitochondrial	CTGCTATTCTATCTATTGTGTCATCAAGTTCGAAGAAGAT	329
Consensus	ctgctattc atctatttctgctcaagtc cgaagaagat	
<i>orf25</i> res	CTCAACTATAATGAAGAAATGATAGTAGCTCGTGTGTTTT	259
Beta vulgaris mitoc	CTCAACTATAATGAAGAAATGATAGTAGCTCGTGTGTTTT	665
Maize (V3) mitochon	CTCAACTATAATGAAGAAATGATAGTAGCTCGTGTGTTTT	250
Nicotiana tabacum m	CTCAACTATAATGAAGAAATGATAGTAGCTCGTGTGTTTT	226
Wheat mitochondrial	CTCAACTATAATGAAGAAATGATAGTAGCTCGTGTGTTTT	369
Consensus	ctcaat tataatgaagaagaatgatagtagctc tgtttt	
<i>orf25</i> res	ATAGGCTTTATCATATTTCAGCCGAAAGACTTTAGGTAATA	299
Beta vulgaris mitoc	ATAGGCTTTATCATATTTCAGCCGAAAGACTTTAGGTAATA	705
Maize (V3) mitochon	ATAGGCTTTATCATATTTCAGCCGAAAGACTTTAGGTAATA	290
Nicotiana tabacum m	ATAGGCTTTATCATATTTCAGCCGAAAGACTTTAGGTAATA	266
Wheat mitochondrial	ATAGGCTTTATCATATTTCAGCCGAAAGACTTTAGGTAATA	409
Consensus	ataggcttt tcatatt ag cg aagagttaggttaa a	
<i>orf25</i> res	CTTTCAAAGTACTCTCCGACGAGAGAAATCCAGGCTATTCA	339
Beta vulgaris mitoc	CTTTCAAAGTACTCTCCGACGAGAGAAATCCAGGCTATTCA	745
Maize (V3) mitochon	CTTTCAAAGaaACTCTCCGACGgGAGAAATCgAGtCTATTCA	330
Nicotiana tabacum m	CTTTCAAAGTACTCTCCGACGgGAGAAATCCAGGCTATTCA	306
Wheat mitochondrial	CTTTCAAAGaaACTCTCCGACGgGAGAAATCgAGtCTATTCA	449
Consensus	ctttcaaaag actctccgacg gagaatc ag ctattca	

<i>orf25</i> res	GGAAGAATCGCAGCAATTCGCCAATCCCTAACGGAAGTAGTT	379
Beta vulgaris mitoc	GGAAGAATCGCAGCAATTCGCCAATCCCTAACGGAAGTAGTT	785
Maize (V3) mitochon	GGAATcAtTGCAGCAATTCgCAATCCCTAACGGAAGTcaATT	370
Nicotiana tabacum m	GGAAGAATCGCAGCAATTCGCCAATCCCTAACGGAAGTAGTT	346
Wheat mitochondrial	GGAAGAATCGCAGCAATTCGCCAATCCCTAACGGAAGTAGTT	489
Consensus	ggaa at gc gcaattc caatcctaacaagaat tt	
<i>orf25</i> res	CCCCGGAAATCCAATGAACAACAACGATTACTTAG....	414
Beta vulgaris mitoc	CCCCGGAAATCCAATGAACAACAACGATTACTTAG....	420
Maize (V3) mitochon	Cttgaggaatccaatgaacaacaacagattacttiaatcttac	810
Nicotiana tabacum m	Cctccggaatccaatgaacaacaacagattacttag....	381
Wheat mitochondrial	Ccggaagaaatccaatgaacaacaacagattacttag....	524
Consensus	c ggaatccaatgaacaacaacagattacttag	
<i>orf25</i> res	.GGTCAGCTTGCGAATTTGTGGAACC.....GTAGTAGA	447
Beta vulgaris mitoc	.GGTCAGCTTGCGAATTTGTGGAACC.....GTAGTAGA	853
Maize (V3) mitochon	aGATCAGCTTGCGAATTTGcaGcACcGtaaaGATGATAGA	450
Nicotiana tabacum m	.GATCAGCTTGCGAATTTGTGGAACC.....GTAGTAGA	414
Wheat mitochondrial	.GATCAGCTTGCGAATTTGTGGAACC.....GTAGTAGA	557
Consensus	g tcagcttgcgaatttg g acc gtagtaga	
<i>orf25</i> res	ATCATTACCAATGGCAGCGTGGCGCCTAAGTGGCAAAAG	487
Beta vulgaris mitoc	ATCATTACCAATGGCAGCGTGGCGCCTAAGTGGCAAAAG	893
Maize (V3) mitochon	ATCATTACCAATGGCAGCGTGGCGCCTAAGTGGCAAAAG	487
Nicotiana tabacum m	ATCATTACCAATGGCAGCGTGGCGCCTAAGTGGCAAAAG	454
Wheat mitochondrial	ATCATTACCAATGGCAGCGTGGCGCCTAAGTGGCAAAAG	497
Consensus	atcattacca ggca gc gcgccctaagtgcaaaa	
<i>orf25</i> res	CGAGTGCAGCTTTGTTATGTGCAAAACCTAAATGTTAAGT	527
Beta vulgaris mitoc	aCAGTGCAGCTTTGTTATGTGCAAAACCTAAATGTTAAGT	933
Maize (V3) mitochon	aCAGTGCAGCTTTGTTATGTGCAAAACCTAAATGTTAAGT	500
Nicotiana tabacum m	aCAGTGCAGCTTTGTTATGTGCAAAACCTAAATGTTAAGT	494
Wheat mitochondrial	aCAGTGCAGCTTTGTTATGTGCAAAACCTAAATGTTAAGT	637
Consensus	cagtgcagctt	

图 4 盐角草 *orf25* gene 与甜菜、玉米、烟草和小麦 *orf25* gene 同源性比较

Fig.4 Homology analysis of the *orf25* cDNA of *Salicornia europaea* with *Beta vulgaris*, *Maize*, *Nicotiana* and *Wheat*

orf25 基因在玉米中以单拷贝形式存在,并且在 4 种主要的玉米细胞质(N, T, C and S)和烟草中进行转录。预计 ORF25 多肽在玉米中分子量为 24.374kD,在烟草中为 22.439kD。在 4 种玉米细胞质和烟草中 *orf25* 基因有几个核苷酸和预测的氨基酸发生了变化。不同种之间 *orf25* 序列在保守性和转录方面的性质说明了 *orf25* 基因是一个具有功能的线粒体基因。对细胞质雄性不育品系 T 恢复系和未恢复系的 *orf25* 基因序列进行比较没有发现差异,因此 *orf25* 基因的核酸序列与可育性的恢复无直接关系^[12]。

上述研究结果表明 *orf25* 基因在植物中是非常保守的,而且在植物细胞质雄性不育中起着重要的作用。这为进一步研究盐角草 *orf25* 基因的功能,以及利用该基因改良农作物品种方面奠定了理论基础。

REFERENCES(参考文献)

[1] Mariani C, De Beuckeleer M, Truettner J *et al.* Introduction of male sterility in plants by a chimaeric ribonuclease gene. *Nature*, 1990, **347**: 737 - 741

[2] Mariani C, Gossele V, De Beuckeleer M. A chimaeric ribonuclease inhibitor gene restores fertility to male sterile plants. *Nature*, 1992, **357**: 384 - 387

[3] De Block M, Debrouwer D *et al.* The development of a nuclear male sterility system in wheat, Expression of the barnase gene under the control of tapetum specific promoters. *Theor Appl Genet*, 1997, **95**: 125 - 131

[4] FU R Z(傅荣昭), CAO G C(曹光诚) *et al.* The primary report of

the study on transducing male-sterile gene into wheat. *Acta Genetica Sinica*(遗传学报), 1997, **24**: 358 - 361

[5] LI Y H(李艳红), XIAO X G(肖兴国), ZAO G R(赵广荣) *et al.* Preliminary study of transferring new engineered male sterile gene into cultivated wheat. *J Agri Biotech.*(农业生物技术学报) 1999, **7**(3): 255 - 258

[6] Eric Ducos, Pascal Touzet1, and Marc Boutry. The male sterile G cytoplasm of wild beet displays modified mitochondrial respiratory complexes. *The Plant Journal*, 2001, **26**(2): 171 - 180

[7] Marianne B. Smith, Reld G. Palmer, and Harry T. Horner. Microscopy of a cytoplasmic male - sterile soybean from an interspecific cross between *Glycine max* and *G. soja* (leguminosae). *American Journal of Botany*. 2002, **89**(3): 417 - 426

[8] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning: A laboratory Manual*, 2nd ed, New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989

[9] Liu AW, Narayanan KK, Andre CP *et al.* Co-transcription of *orf25* and *coxIII* in rice mitochondria. *Curr. Genet.* 1992, **21**: 507 - 513

[10] Tang H V, Pring D R, Muza F R *et al.* Sorghum mitochondrial *orf25* and a related chimeric configuration of a male-sterile Cytoplasm. *Curr Genet*, 1996, **29**: 265 - 274

[11] Ogihara Y, Futami K, Tsuji K, Murai K. Alloplasmic wheats with *Aegilops crassa* cytoplasm which express photoperiod-sensitive homeotic transformations of anthers, show alterations in mitochondrial DNA structure and transcription. *Mol Gen Genet*, 1997, **255**: 45 - 53

[12] Stamper SE, Dewey RE, Bland MM *et al.* Characterization of the gene *urf13-T* and an unidentified reading frame, ORF 25, in maize

Using Single Primer PCR to Amplify the *orf25* Gene Fragment Related to Plant Male-sterility in *Salicornia europaea*

LI Jin-Yao ZHANG Fu-Chun* MA Ji SHAN Wen-Juan WANG Bin
(College of Life science and Techonolgy , Xinjiang University , Urumuqi 830046 ,China)

Abstract The gene *orf25* encodes functional protein that may play an important role in plant fertility control in nature. To clone the *orf25* from *Salicornia europaea* Xinjiang into a T-vector , a single designed primer was used to amplify 1.7kb cDNA fragment with RT-PCR. Sequence analysis reveals that the cloned fragment contains entire *orf25* coding region with 98% , 95% , 92% and 88% identity to that of *orf25* from *Beta vulgaris* , *Nicotiana* , wheat and maize mitochondrion , respectively. This analysis suggests that *orf25* gene is highly conserved in terms of evolution in plant ; and it also suggests that wild plant *Salicornia europaea* contain a male-sterility gene similar to crops that is of great importance in improvement of the breed of crop.

Key words *Salicornia europaea* , *orf25* gene fragment , plant male-sterility , single primer PCR

Received : 08-26-2002

This work was supported by grant from the State Key Technologies R&D Programme of China(No.2001BA901A32).

* Corresponding author. Tel : 86-991-8582557 ; Fax : 86-991-8583259 ; E-mail : zfc@xju.edu.cn