

青花菜雄性不育相关基因 *BoDHAR* 的克隆与表达分析 Gene Cloning and Expression Analysis of a Male Sterility Related Gene *BoDHAR* from Broccoli

张国裕^{1,2}, 康俊根¹, 张延国¹, 程智慧², 王晓武^{1*}

ZHANG Guo-Yu^{1,2}, KANG Jun-Gen¹, ZHANG Yan-Guo¹, CHENG Zhi-Hui² and WANG Xiao-Wu^{1*}

1 中国农业科学院蔬菜花卉研究所, 北京 100081

2 西北农林科技大学园艺学院, 杨凌 712100

1 Institute of Vegetables and Flowers, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China

2 College of Horticulture, North-West Sci-Tech University of Agricultural and Forestry, Yangling 712100, China

摘 要 以一个与甘蓝显性核不育相关的差异表达片段的序列为信息探针, 通过在 NCBI 与 TAIR 网站数据库中进行同源 EST 序列搜索, 经人工拼接、RT-PCR、PCR 克隆与序列分析, 获得了青花菜脱氢抗坏血酸还原酶 DHAR dehydroascorbate reductase 基因的 cDNA 与 DNA 全长序列, 命名为 *BoDHAR*。并利用双链接头介导 PCR 的染色体步行技术(genome walking)克隆了其上游 644bp 的 5'端序列。所获的 *BoDHAR* 基因全长 1486bp, 存在两个内含子, DNA 编码区序列 633bp, 编码 210 个氨基酸; 序列分析表明: *BoDHAR* 与同源基因 *AT1G19570.1* cDNA 序列有 82.3% 的一致性, 推导的氨基酸序列有 79.6% 的一致性, 编码的水溶性蛋白存在多个磷酸化位点, 5'端上游区存在明显的转录调控序列。半定量 RT-PCR 结果表明: *BoDHAR* 在可育系花蕾中的表达量明显高于不育系花蕾, 在花药中的表达明显高于其它部位。

关键词 青花菜 (*Brassica oleracea* L. var. *italica*), DHAR (dehydroascorbate reductase), 基因克隆, RT-PCR

中图分类号 Q786 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2006)05-0751-06

Abstract A differentially expressed cDNA fragment obtained from a cDNA-AFLP analysis, which performed on floral buds of male sterile and fertile lines of cabbage, was used as a querying probe to blast the Genbank and *Arabidopsis* databases. Based on the assembled homologous cDNA sequences, a full-length cDNA of 633 bp for *BoDHAR* was cloned by RT-PCR. Furthermore, we have experimentally cloned and sequenced the 5' flanking sequence of gene *BoDHAR* by genomic walking method based on ligation-mediated PCR. The full length DNA sequence with 1486bp, containing two introns, was achieved. Homologous analysis shows that gene has 82.3% identity at nucleotide level, and 79.6% identity at amino acid level with *Arabidopsis* dehydroascorbate reductase (DHAR) gene *AT1G19570.1*. Structurally, *BoDHAR* encodes a polypeptide of 210 amino acids, which contains a GST-c-DHAR domain highly conserved among other members of the DHAR superfamily and has multiple phosphorylation sites. Promoter predictions software indicated that the 5' upstream region contained putative transcription signals and conserved sequences, one CAAT-box, one G-box and four TGAC-like motifs. To advance our understanding of gene *BoDHAR*, tissue expression pattern were analyzed by semi-quantitative RT-PCR. The results indicate that expression level of

Received: February 13, 2006; Accepted: April 5, 2006.

This work was supported by the grants from the National Natural Science Foundation Projects (No.30370981, 30471188, 30400298) and the Key Laboratory of Vegetable Genetics and Physiology, Ministry of Agriculture.

* Corresponding author. E-mail: wangxw@mail.caas.net.cn

国家自然科学基金资助项目(No.30370981, 30471188, 30400298)和农业部蔬菜遗传与生理重点开放实验室资助。

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

gene *BoDHAR* is higher in fertile buds than that in sterile buds, and expressed intensively in the anther.

Key words Broccoli (*Brassica oleracea* L. var. *italica*), DHAR (Dehydroascorbate Reductase), gene cloning, RT-PCR

雄性不育是高等植物中广泛存在的一种现象, 用其育成的雄性不育系是作物杂种优势利用的重要途径, 具有重要的理论和应用研究价值, 因而一直是作物育种工作研究的重点^[1-2]。甘蓝类蔬菜在农业生产中占有重要地位, 自 1979 年获得甘蓝显性核不育株以来, 已在一代杂种生产中发挥了巨大作用^[1]。

但对其遗传规律的认识还停留在形态和细胞学的研究水平上, 产生雄性不育的分子基础还不清楚。雄性不育相关基因的克隆和其作用机制的研究是揭示雄性不育发生的分子机理及人工创造雄性不育系的重要基础。

脱氢抗坏血酸还原酶(DHAR)是抗坏血酸(Ascorbic Acid, AsA)氧化还原循环途径中的重要酶, 其功能是将氧化态的脱氢抗坏血酸还原成抗坏血酸(AsA)。AsA 是高等植物中普遍存在的小分子物质, 具有清除超氧自由基和过氧化氢等活性氧的功能, 在植物细胞对氧化胁迫的抵抗以及细胞的分裂和伸长中发挥着重要作用。AsA 的重要生理功能依赖于和其再生和转运相关的酶类活性的变化^[3]。但脱氢抗坏血酸还原酶基因在花药发育过程中的作用尚未见报道。

本实验室采用 cDNA-AFLP 技术得到一个与甘蓝显性核不育相关的差异表达片段 TDF (Transcript Derived Fragments)^[2]。本研究以此 TDF 序列为信息探针, 采用电子克隆(in silicon cloning)的策略^[4]与双链接头介导 PCR 的染色体步行技术, 获得了青花菜 DHAR 基因 cDNA 及基因全长序列, 并对该 cDNA 序列、推导的蛋白质序列及其表达进行了分析, 为进一步研究其在甘蓝显性核不育小孢子发育过程中的作用奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

克隆载体 pMD 18-T Vector 和胶回收纯化试剂盒为 TaKaRa 公司产品; T4 DNA 连接酶为 ToYoBo 公司产品; 宿主菌 *E. coli* TOP10、Taq DNA 聚合酶和 DNA Marker 购自北京天为时代科技有限公司; 反转录试剂盒和 TRIzol 试剂为 Invitrogen 产品。试验所用青花菜为自交系 B10-144。

1.2 方法

1.2.1 总 RNA 的提取及反转录合成单链 cDNA RNA 的提取采用 TRIzol 试剂盒^[2]进行, 取 0.1g 青花

菜组织, 液氮迅速研磨后加入 1mL Trizol 充分摇匀, RNA 最后溶于 20 μ L DEPC 水中。cDNA 的合成按反转录试剂盒说明书进行。

1.2.2 引物的设计合成与 PCR 扩增 根据电子克隆所得的完整 cDNA 序列, 设计合成特异引物(由上海生工生物工程公司合成): *BoDHAR*-F, 5'-TAAAAATGGCTCTCGAAGTCTG-3'; *BoDHAR*-R, 5'-TTACTACTGGACCTTGGGAGCC-3'。 β -actin 基因正向引物: 5'-CCACCAATCTTGTACACATCC-3'; 反向引物: 5'-AGACCACCAAGTACTACTGCAC-3'。PCR 反应体系: cDNA 模板 0.5 μ L, 10 \times PCR 缓冲溶液 2 μ L, 特异引物(5pmol/ μ L) 0.4 μ L, 10mmol/L dNTPs 1.6 μ L, Taq 酶(2.5u/ μ L) 0.4 μ L, 加水到总体积 20 μ L。程序为 94 $^{\circ}$ C 预变性 3min, 94 $^{\circ}$ C 变性 30s, 56 $^{\circ}$ C 复性 45s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 50s, 共 35 个循环, 72 $^{\circ}$ C 延伸 10min。进行基因表达水平的半定量 RT-PCR 分析时扩增循环数降低为 23 个循环。反应完毕后取 6 μ L 于 1.0% 的琼脂糖凝胶上进行电泳分析, 通过凝胶分析软件 Gel capture 中的 area density tool 工具分析单位面积凝胶亮度值作为基因表达的相对量, 三次重复。

1.2.3 染色体步行(genome walking)接头、引物制备及 PCR 扩增 根据 Clontech 公司 Universal Genome WalkerTM Kit 进行操作。接头 1: 5'-GTAATACGACT CACTATAGGGCAGCGCTGCTCGACGGCCCGGCTGCT-3'; 接头 2: 5'-PO₄-ACCAGCCC-NH₂-3'; 根据 *BoDHAR* 基因的 5'-端序列反向设计两个巢式引物: GSP1: 5'-AAGTTACAGTCGCCGAGAGCATC-3'; GSP2: 5'-GGCGGCTTTCACGCAGAC-3'。根据接头序列设计接头引物 AP1: 5'-GTAATACGACTC ACTATAGGGC-3'; AP2: 5'-ACTATAGGG CACGCGTGGT-3'。

1.2.4 重组、克隆和 DNA 序列分析 琼脂糖凝胶电泳回收 PCR 产物, 克隆到 pMD 18-T 载体上, 按说明书进行操作, 通过蓝白菌落挑选阳性克隆, 委托北京三博远志生物技术有限责任公司进行 DNA 序列测定。利用 DNASTAR、MatInspector2.2 软件进行序列分析。

2 结果与分析

2.1 青花菜 *BoDHAR* 的 cDNA 与 DNA 序列的克隆与分析

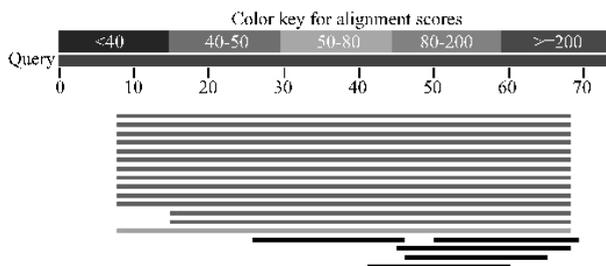


图1 TDF MS1615170 数据库搜索比对结果

Fig.1 The BLASTN results of TDF MS1615170 in database

ncbi.nlm.nih.gov/BLAST 与 <http://www.arabidopsis.org/BLAST> 的数据库中进行同源序列检索,得到与之同源性较高的基因序列或 EST 片段共 20 条(图 1)。将检出的同源性较高或部分重叠的 EST 序列拼接为重叠群(contig),再以此重叠群序列重复以上 BLAST 检索过程,重叠群不再继续延伸^[4],得到受信息探针支持的青花菜 *BoDHAR* 基因 638bp 的可靠 cDNA 序列。以此序列为模版设计特异引物进行目的片段的 RT-PCR 扩增,1.0% 琼脂糖凝胶电泳分析的结果显示,得到与预计大小相符的约 638bp 的特异条带(图 2)。经克隆测序,序列受信息探针完全支持(图 4)。经 DNAsar 软件进行可读框(ORF)的搜索以及与相似性较高的拟南芥基因 *At1G19570.1* 比对分析,确定了长度为 633bp 的开放阅读框,编码 210 个氨基酸。ATG 上游-3 位核苷酸为 A,+4 位为 G,为典型的 Kozak 结构,这一结构对于蛋白质合成的 40S 起始复合物正确识别起始密码子具有重要的作用,并且同一读码框起始位点上游存在终止子序列,有明显的转录翻译起始序列的特点,因此推定得到了青花菜 *BoDHAR* cDNA 完整序列。

以青花菜 DNA(50 ng)为模板,利用特异引物

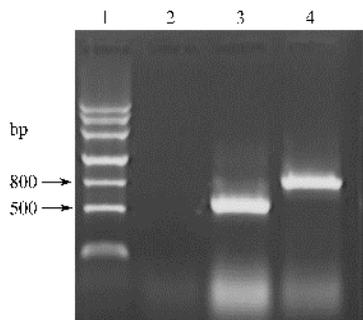


图2 青花菜 *BoDHAR* RT-PCR 与基因组 PCR 产物琼脂糖电泳分析

Fig.2 Identification of the RT-PCR and PCR product by agrose gel electrophoresis

1: DNA molecular mass marker; 2: H₂O (CK); 3: RT-PCR product; 4: genomic PCR product.

BoDHAR-F/BoDHAR-R 进行基因组 *BoDHAR* 序列的扩增,得到 842bp 的 DNA 序列(图 2 A)经分析确定此基因包含两个内含子,分别位于 +59bp ~ +164bp 和 +256bp ~ +358bp(将翻译起始密码 ATG 中的 A 定义为 +1 位)符合 GT-AG 法则,基因的结构与同源性较高的拟南芥 *At1G19570.1* 基因相似。

对 *BoDHAR* 核酸序列的同源性分析表明:*BoDHAR* 与其他高等植物中得到的抗坏血酸还原酶的一致性均大于 50%,与同科植物拟南芥 *At1g19570.1* 核酸序列有 82.3% 的一致性;与大白菜 *DHAR* 基因 *AAQ01573* 有 78.8% 的一致性;其它高等植物 *DHAR* 基因间的核酸序列一致性也较高,说明该基因的核酸序列比较保守。

2.2 *BoDHAR* 基因 5' 端上游序列的克隆与分析

利用双链接头介导 PCR 的染色体步行技术从 *Sma* I 与 *Eco* R V 酶切的总 DNA 中分别扩增出一条约 4.5kb 和 900bp 的专一条带,选择较长的片段(4.5 kb)进行克隆测序,结果表明该片段的 3'-端与已获得的 *BoDHAR* DNA 5'-端碱基完全相同,说明克隆到了 *BoDHAR* 翻译起始密码子 ATG 的上游序列。与相似性很高的 *At1G19570.1* 基因上游启动子区的序列比对分析后确定了 *BoDHAR* 基因 5'端 644bp 的上游序列(图 3)。在翻译起始密码子上游存在一个 CAAT-box,其中央序列为 -424 ~ -428 位的 CCAAT;此区中还有一个 G-box 序列(-174 ~ -179bp, cACGTg);4 个 TGAC 序列(-498 ~ -508bp, acaaTGACcccc; -460 ~ -471bp, tgtgTGACatgg; -355 ~ -366bp, tctcTGACccat; -228 ~ -239bp, tgagTGACaacc)。G-box 序列和 TGAC 序列是广泛存在于植物基因启动子区的一类顺式调控元件,是

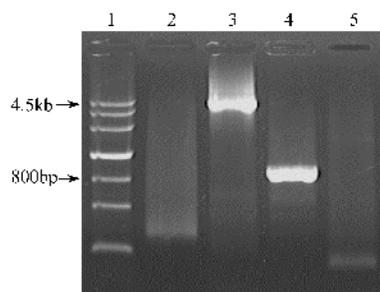


图3 青花菜 *BoDHAR* 5'端上游序列的 genome walking 巢式 PCR 结果电泳分析

Fig.3 Identification of the secondary (nested) PCR product by agrose gel electrophoresis in the genome walking

1: DNA size markers; 2: *Hae* III library; 3: *Sma* I library; 4: *Eco* R V library; 5: *Pvu* II library

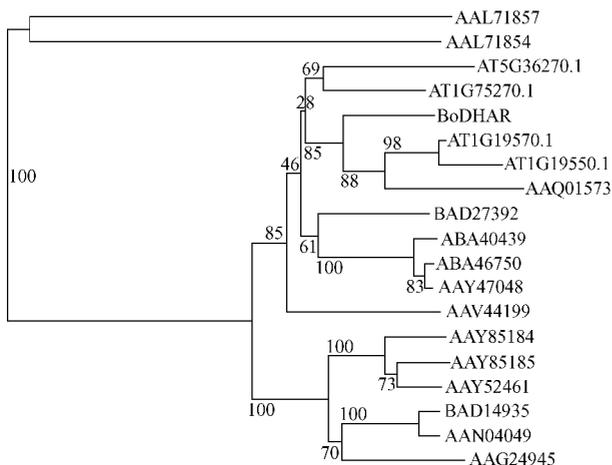


图5 青花菜 *BoDHAR* 基因氨基酸序列与其它植物氨基酸序列系统进化树
数值表示 100 次自展分析值

Fig.5 Phylogenetic tree of aa sequence of broccoli

BoDHAR gene with other reported genes

百脉根 (*Lotus japonicus*, AAY52461); 苜蓿 (*barrel medic*, AAY85185); 大豆 (*soybean*, AAY85184); 菠菜 (*spinach*, AAG24945); 甘蓝 (*cabbage*, BAD14935); 芥菜 (*Brassica juncea*, AAN04049) 水稻 (*rice*, AAV44199) 小麦 (*Wheat*, AAL71854) 马铃薯 (*potato*, ABA46750, ABA40439) 番茄 (*tomato*, AAY47048) 烟草 (*tabacco*, AAL71857) 百日菊 (*zinnia elegans*, BAD27392); 大白菜 (*pekinensis cabbage*, AAQ01573); 拟南芥 (*Arabidopsis*, AT1G19550.1, AT1G19570.1, AT5G36270.1, AT1G75270.1); 青花菜 (*BoDHAR*).

BoDHAR 在可育植株与雄性不育植株花蕾中表达的差异, 提取花蕾总 RNA, 以 β -actin 为内参照基因进行半定量 RT-PCR 分析, 结果表明 (图 6): *BoDHAR* 的表达量在可育与不育植株花蕾中存在明显的差异, 在显性细胞核雄性不育植株的花蕾中表达微弱, 与 cDNA-AFLP 结果相同。提取青花菜不同器官 (根、茎、叶、花、幼荚) 与花不同组织 (花柄、花萼、花瓣、花

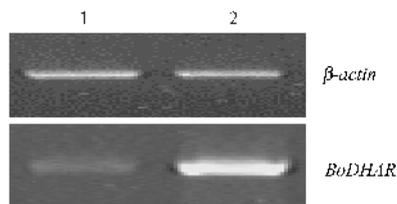


图6 基因 *BoDHAR* 在可育系与显性细胞核雄性不育系花蕾中的表达分析

Fig.6 RT-PCR analysis of the expression of *BoDHAR* in the flower buds of fertile line and dominant male sterile line.

1 : sterile line ; 2 : fertile line.

柱、花丝、花药) 的 RNA 进行半定量 RT-PCR 分析, 结果见图 7。 *BoDHAR* 在根以外的其它器官中均有表达, 但花器官中表达量最高, 为茎与叶中表达量的 2~3 倍。在花各组织中, 花药中的表达量明显高于其它组织。这些结果说明 *BoDHAR* 可能与花药的发育密切相关。

3 讨论

在有目的探针的基础上, 利用电子克隆技术获得新的基因是目前被广泛应用的一种新的、快捷且成本低的基因克隆手段, 随着 EST 数据库的不断扩充, 克隆效率会更高。我们克隆了与花药发育相关的基因 *BoDHAR*, 受信息探针的完全支持, 经比对发现与拟南芥的抗坏血酸还原酶基因 AT1G19570.1 序列一致性较高, 基因结构相似。

很多研究中表明抗坏血酸 (*AsA*) 在植物体内具有清除有害活性氧的重要作用, 它能调节 *AsA/DHA* 氧化还原状态的抗坏血酸氧化酶 (*AO*), 还直接或间接参与细胞的增殖与伸长过程, 特别是 *AsA* 与其氧化产物可以通过多种途径影响细胞的伸展与细

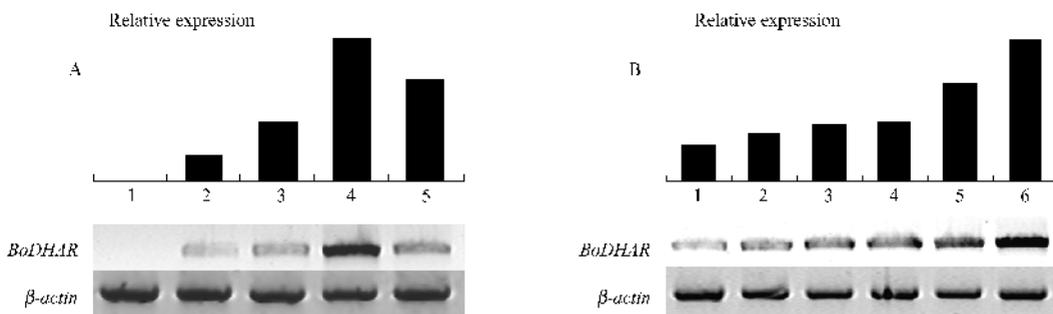


图7 基因 *BoDHAR* 在根、茎、叶、花、幼荚 (A) 及花柄、花萼、花瓣、花柱、花丝和花药 (B) 中的表达分析

Fig.7 RT-PCR analysis of the expression of *BoDHAR* in different organs and flower tissues

(A) 1 : root ; 2 : young stem ; 3 : young leaf ; 4 : flower bud ; 5 : young silique ; (B) 1 : flower stalk ; 2 : sepal ; 3 : petal ; 4 : style ; 5 : filament ; 6 : anther.

胞壁物质的形成^[5,6]。甘蓝显性核不育细胞学的观察结果是不育花药小孢子在四分体时期粘连不分离最终导致败育^[2]。这一现象与 AsA 的浓度降低导致的活性氧清除能力的减弱或对细胞壁合成的影响是否有关还需探讨。

本实验还通过双链接头介导的 PCR 染色体步行技术克隆了青花菜 *BoDHAR* 基因的 5' 端上游序列。其关键是有有效利用了接头的防自身延伸扩增设计以及两步 PCR 的高退火温度, 减少了接头自身扩增产生的非特异条带。克隆得到的序列经与同源基因 ATIG19570.1 启动子区比对分析, 确定该区包含了同源性很高的核心序列, 存在 CAAT-box、G-box 等转录调控序列。需通过启动子活性及缺失试验以进一步确定其核心的转录调控序列^[7]。

对 *BoDHAR* 基因的克隆为进一步通过反义 RNA 或 RNAi 技术来研究其具体的功能^[8], 通过启动子序列融合 GFP 或 GUS 基因确定其表达的部位与时期^[9]及阐明其在雄性不育小孢子发育中的作用奠定了基础。

REFERENCES (参考文献)

- [1] Fang ZY, Sun PT *et al.* A male sterile line with dominant gene (Ms) in cabbage and its utilization for hybrid seed production. *Ephytica*, 1997, **97**: 256 - 268
- [2] Lou P(娄平), Wang XW(王晓武) *et al.* Gene expression association with dominant male sterility in cabbage is revealed by cDNA-Amplified fragment length polymorphism analysis. *Acta Horticulturae Sinica*(园艺学报), 2003, **30**(6): 668 - 672
- [3] Horeman SN, Foyer CH *et al.* Ascorbate function and associated transport systems in plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2000, **38**: 531 - 540
- [4] Xiao JN(肖洁凝), Huang XI(黄学林) *et al.* Identification of an auxin response factor-like protein cDNA from mango cotyledon section. *Chinese Journal of Biotechnology*(生物工程学报), 2004, **20**: 59 - 62
- [5] Daveym W, Monta GV *et al.* Plant L-ascorbic acid: chemistry, function, metabolism, bioavailability and effects of processing. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2000, **80**: 825 - 860
- [6] Takahama U. Regulation of peroxidase-dependent oxidation of phenolics by ascorbic acid: Different effects of ascorbic acid on the oxidation of coniferylalcohol by the apoplastic soluble and cell wall-bound peroxidases from epicotyls of *Vigna angularis*. *Plant and Cell Physiology*, 1994, **34**: 809 - 817
- [7] Keller B, Heierli D. Vascular expression of the GRP1.8 promoter is controlled by three specific regulatory elements and one unspecific activation sequence. *Plant Molecular Biology*, 1994, **26**(2): 747 - 756
- [8] Park SU, Yu M, Facchini PJ. Antisense RNA-mediated suppression of benzophenanthridine alkaloid biosynthesis in transgenic cell cultures of California poppy. *Plant Physiology*, 2002, **128**: 696 - 706
- [9] Kim HU, Park BS, Jin YM. Promoter sequences of two homologous pectin esterase genes from Chinese cabbage (*Brassica campestris* L. ssp. *pekinensis*) and pollen specific expression of the GUS gene driven by a promoter in tobacco plants. *Molecular Cell*, 1997, **7**(1): 21 - 27