

## 山核桃 APETALA1 同源基因的克隆与序列分析

王正加, 黄有军, 夏国华, 郑炳松, 金松恒, 黄坚钦

(浙江林学院 浙江省现代森林培育技术重点实验室, 浙江 临安 311300)

摘要: 根据植物花分生组织及花器官形成过程中起重要作用的 APETALA1(AP1) 基因的高度保守区序列, 设计合成一对长度为 23 bp 的聚合酶链式反应(PCR)引物, 以山核桃 *Carya cathayensis* 基因组 DNA 为模板, 采用 PCR 方法扩增出长为 486 bp 的 DNA 片段, 克隆到 pMD18-T 载体。测序和序列分析结果表明, 获得了山核桃 AP1 同源基因中的 1 个片段, 该片段序列包含 2 个内含子, 长度分别为 86 bp 和 291 bp, 编码区共编码 36 个氨基酸。其序列已在 GenBank 中注册(注册号为 EU155118), 在 GenBank 中进行同源性检索结果表明, 其氨基酸序列与其他植物 AP1 同源基因的氨基酸序列同源性高达 69%~88%, 推测它们在功能上也是相似的。图 3 表 1 参 11

关键词: 林木育种学; 山核桃; APETALA1(AP1) 基因; 克隆; 序列分析

中图分类号: S722.3 文献标志码: A 文章编号: 1000-5692(2008)04-0427-04

## Cloning and analysis of the APETALA1(AP1) homolog gene from *Carya cathayensis*

WANG Zheng-jia, HUANG You-jun, XIA Guo-hua, ZHENG Bing-song,  
JIN Song-heng, HUANG Jian-qin

(The Key Laboratory for Modern Silvicultural Technology of Zhejiang Province, School of Forestry and Biotechnology, Zhejiang Forestry College, Lin'an 311300, Zhejiang, China)

Abstract: From *Carya cathayensis*, 23 base pair (bp) primers designed according to a conserved sequence of the APETALA1 (AP1) gene, which has an important function in floral development, were used to amplify a 486 bp fragment by polymerase chain reaction(PCR). The fragment was cloned into a pMD18-T vector and then sequenced. Next, the deduced amino acid sequence of the fragment was blasted with AP1 homologous genes of other 17 plants. Results of the 486 bp fragment cloned into a pMD18-T vector produced a fragment of the AP1 homologous gene: the CcAP1 gene. Also, the sequence analysis indicated two introns of 86 bp and 291 bp in the fragment with the exons encoding 36 amino acids. Afterward, when the CcAP1 gene was blasted with AP1 homologous genes, homology reached 69% - 88%. This result suggested that the CcAP1 gene, registered in GenBank with the accession number EU155118, might have the same function of floral development as other AP1 homologous genes. [Ch, 3 fig. 1 tab. 11 ref.]

Key words: forest tree breeding; *Carya cathayensis*; APETALA1 gene; cloning; sequence analysis

山核桃 *Carya cathayensis* 属胡桃科 Juglandaceae 山核桃属 *Carya* 植物, 是我国特有的优质干果和木本油料树种<sup>[1]</sup>, 主要分布于浙皖交界的天目山区。山核桃从种子播种到结果需 7~8 a 的时间, 这就抑制了山核桃产业发展。如何缩短童期, 加快育种进程, 是山核桃研究者有待解决的难题, 也是山区农民发展致富的迫切需要。对拟南芥 *Arabidopsis thaliana* 等模式植物开花的研究发现, AP1 基因是一个影响花分生组织特征的因子, 在特化花分生组织特征上具有重要作用, 不仅在时空上调控花分生组

收稿日期: 2007-09-28; 修回日期: 2007-11-22

基金项目: 浙江省自然科学基金资助项目(Y305331); 浙江省现代森林培育技术重点实验室开放基金资助项目(200520)

作者简介: 王正加, 副教授, 博士, 从事植物生物技术研究。E-mail: wzj21@163.com。通信作者: 黄坚钦, 教授, 博士, 从事植物发育生物学研究。E-mail: huangjq@zjfc.edu.cn

织形成与花器官的发生,同时,它也是萼片和花瓣等花器官正常发育的必需因子<sup>[2-4]</sup>。Mandel等<sup>[2]</sup>利用CaMV35S启动子使AP1基因在拟南芥中组成型表达,大多数转基因植物的开花时间都早于野生型。安利忻等<sup>[5]</sup>将CaMV35S-AP1基因导入矮牵牛*Petunia hybrida*,在R<sub>0</sub>代即表现出生根后15d在培养基中持续不断地开花,并与对照存在明显差异。文章以山核桃的幼叶为试验材料,提取其基因组DNA,用聚合酶链式反应(PCR)扩增的方法进行了AP1同源基因的分子克隆研究,期望能为从分子水平上认识山核桃成花机理等研究积累资料。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

在浙江林学院苗圃采集山核桃幼嫩叶,用改良的十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)法<sup>[6]</sup>提取并纯化DNA作为模板。在比较其他物种上已克隆的AP1序列的保守区后设计1对长度均为23bp的特异引物,并递交上海生物工程技术有限公司合成,上游引物为LAP1:5'-GCAGCAGCTTGATACTACTCT-TA-3',下游引物为RAP1:5'-GTTTTGCTCCTGTATTGCCTTCT-3'。10×PCR缓冲液,Marker,Taq plus DNA聚合酶,dNTP均购自上海生工,内切酶Hind<sup>Ⅲ</sup>和EcoR<sup>Ⅰ</sup>购自Takala公司,其他试剂均为国产分析纯。

### 1.2 PCR扩增

PCR反应体系(50μL)为:10×PCR buffer 5μL,10mmol·L<sup>-1</sup>dNTP 1.0μL,LAP1引物(10μmol·L<sup>-1</sup>)1.5μL,RAP1引物(10μmol·L<sup>-1</sup>)1.5μL,Taq plus DNA聚合酶(8.34×10<sup>-5</sup>kat·L<sup>-1</sup>)0.5μL,模板DNA 1.0μL(150ng),ddH<sub>2</sub>O 39.5μL。采用“热启动PCR”,反应程序为:94℃预变300s,94℃变性30s,55℃退火45s,72℃延伸120s,30个循环后,72℃延伸600s,4℃保温。

### 1.3 目的片段的回收和重组

把PCR扩增得到的目的片段切胶后利用QIAGEN公司的离心柱型琼脂糖凝胶DNA回收试剂盒从琼脂糖凝胶上回收,连接到pMD18-T载体(大连宝生物公司),16℃放置4h以上,连接产物转化感受态细胞(天为时代Top10),铺平板于含Amp/X-gal/IPTG的LB选择培养基上,于37℃培养14h左右,挑取白色菌落,用LB液体培养基培养,37℃培养12h左右,用EZ-10 Spin Column Plasmid Mini-Perps Kit试剂盒提取质粒,用Hind<sup>Ⅲ</sup>/EcoR<sup>Ⅰ</sup>双酶切鉴定。

### 1.4 目的片段的测序及分析

把含有目的片段的重组质粒菌液给上海生物工程技术有限公司进行测序。测定的序列用DNA-MAN和BLAST软件搜索GenBank/NCBI/RGP中的同源序列进行比较分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 PCR产物的扩增和克隆

以山核桃基因组DNA为模板,通过设计的上下游引物进行了PCR扩增,得到长度为500bp左右的条带(图1),经胶回收、纯化后连接到pMD18-T载体并转化Top10感受态细胞,通过质粒提取与酶切鉴定(图2),目的片段送交上海生工进行正反向测序后获得长为486bp的序列(图3)。

### 2.2 基因序列与同源性分析

利用GenBank/NCBI中的BLAST(局部性相似基本查询工具)进行比较分析,结果显示获得了AP1同源基因的1个片段,该片段全长486bp,含2个内含子,长度分别是86bp和291bp,剪切点位置均符合GT-AG规律;其外显子区共109bp,推测共编码36个氨基酸(图2),序列命名为CcAP1,并在GenBank中注册(注册号EU155118)。用Blast工具软件在GenBank中进行氨基酸序列同源搜索,结果如表1所示。从表中可以看出,所克隆出片段与其他植物的AP1同源基因的同源性达到69%~88%。同源性最高的为虎耳草科Saxifragaceae植物北美珊瑚草*Heuchera americana*,达88%;最低为柳叶菜科Ongraceae的送春花*Clarkia concinna*,但也有69%的同源性,说明所克隆的基因片段确实为AP1同源基因片段。

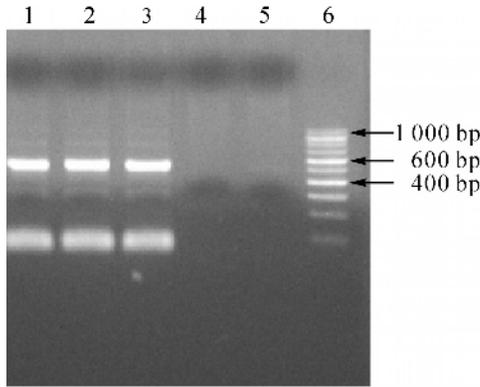


图 1 PCR 扩增结果 (1 ~3: PCR 扩增产物; 4 ~5: 单引物 PCR 扩增; 6: Marker)

Figure 1 Result of PCR(1 - 3: PCR product; 4 - 5: simple primer PCR results; 6:100 bp Marker)

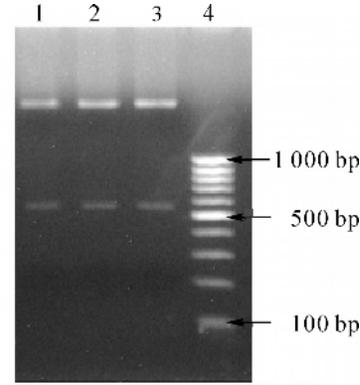


图 2 重组质粒酶切鉴定(1 ~3: EcoR 和 Hind 重组质粒酶切; 4: Marker)

Figure 2 Restriction endonucleases identification of recombination plasmid (1 - 3: Restriction endonucleases of recombination plasmid with EcoRI and Hind ; 4: 100 bp Marker)

```

1  gCAGCAGCCTTGATACTACICTTAAAACACATCAGGTCGAGAAAGgtaaaaaatcatgatag
   Q Q L D T T L K H I R S R K
61  cattagatataaatacagactggta caggatgcagtttgatccattaatatttggtaatt
121 cacttgcagAACCAAGTTATGCACGAATCCATTTCCGGATCTTCAGAAAAAGgtaagcccc
   N Q V M H E S I S D L Q K K
181 tacttctcccatatataatgtatgaagt agagaatccatataatcattgacagtaactaacta
241 caaatcttaatgccatttgtggaaaatggtaattttacattctattctaaccagcataaa
301 catgca tggcttateccaaagtcctaatggtttttaagtga tgccttgcctgatgttcttta
361 ataacgaatggaaatctccatataaaaattacgcttataaagagcaacaatgacatttta
421 tat tgc ttaatggatgggtcctctaacagcttttcatgacagGAGAAGCAATACAGGAG
   E K A I Q E
481 CAAAAC
   Q N
    
```

图 3 CcAP1 核苷酸序列及推测的氨基酸序列(划线部分为引物序列, 大写字母表示的区域是编码区)

Figure 3 Nucleotide and predicted amino acid sequence of CcAP1 (the underline are digonucleotide primer; the open reading frame is shown by black capital letters)

### 3 讨论

成花过程是植物生长发育过程中的重要转折时期, 是一个高度复杂的生理生化 and 形态发生过程, 受许多基因的调控。AP1 基因不仅在时空上调控花分生组织的形成与花器官的发生, 还是两轮花器官(花萼和花瓣)的决定基因。AP1 在花分生组织形成中的作用只有在 LEAFY(LFY)作用不存在时才得以显露, 此时 AP1 单独可以将花序分生组织转化为花分生组织<sup>[7-10]</sup>。这说明 AP1 可能作为 LFY 的下游基因导致分生组织特异性的形成, LFY 的作用之一可能是激活 AP1, 而 AP1 对 LFY 基因的表达具有反馈促进作用。AP1 表达有位置特异性, 花原基开始在花序分生组织区发生时, AP1 RNA 就开始表达, 但在花序分生组织中央却没有发现 AP1 RNA。当花器官特异性基因开始表达时, AP1 在内二轮花器官细胞中的表达开始减少。此外, AP1 含有 MADS 区域, 说明 AP1 蛋白以序列特异方式与 DNA 结合, 具有转录调节因子功能<sup>[11]</sup>。本研究是在克隆了山核桃 LFY 同源基因(CcLFY, GenBank 注册号: DQ989225)的基础上, 以山核桃基因组 DNA 为模板克隆出的又一与成花相关的 AP1 同源基因的 1 个片段, 序列分析表明它与其他植物的 AP1 同源基因有极高的同源性, 这种结构上的相似性使笔者有理由推测它们在功能上的相似性。在以拟南芥等为模式植物的研究中, 发现 AP1 在控制花分生组织特性和花器形成中起着至关重要的作用, 与 LFY 和 MADS-box 基因构成高度复杂的网络结构, 因

表1 部分植物 AP1 同源基因氨基酸序列同源性比较

Table 1 Alignment of amino acid sequences of AP1 from some plant species

基 因	GeneBank 登记号	同源性/%	植物种类
euAP1APETALA1-likeMADS-box	AAP83372.1	88	北美珊瑚草 <i>Heuchera americana</i>
MADS box transcription factor	CAC81068.1	86	胡萝卜 <i>Daucus carota</i> var. <i>sativus</i>
NAP1-2	AAD01422.1	86	烟草 <i>Nicotiana tabacum</i>
MADS-box protein MADS5	AAD39035.1	86	烟草 <i>Nicotiana tabacum</i>
MADS-box protein MADS2	AAD39037.1	86	美花烟草 <i>Nicotiana sylvestris</i>
MADS-box protein	ABM67697.1	83	脐橙 <i>Citrus sinensis</i>
squamosa protein	CAJ44135.1	83	线叶小金鱼草 <i>Misopates orontium</i>
AP1	CAA78909.1	83	拟南芥 <i>Arabidopsis thaliana</i>
MADS3 protein	CAA67967.1	83	欧洲白桦 <i>Betula pendula</i>
ASAPETALA1	AAD51190.1	83	黏菊 <i>Madia nutans</i>
floral binding protein	AAF19164.1	83	矮牵牛 <i>Petunia × hybrida</i>
MdMads 2.1 protein	ABB22023.1	83	苹果 <i>Malus × domestica</i>
MADS5 protein	CAA67969.1	83	欧洲白桦 <i>Betula pendula</i>
AP1-like protein	AAT07447.1	83	葡萄 <i>Vitis vinifera</i>
MADS-box transcription factor	AAV30857.1	80	扁桃 <i>Prunus dulcis</i>
MADS4 protein	CAA67968.1	80	欧洲白桦 <i>Betula pendula</i>
homeotic protein boi1AP1	AAB08875.1	77	油菜 <i>Brassica deracea</i>
SQUA	CAA45228.1	75	金鱼草 <i>Antirrhinum majus</i>
FRUITFULL-like MADS-box	AAP83401.1	72	罂粟 <i>Papaver somniferum</i>
FRUITFULL-like MADS-box	AAP83367.1	69	送春花 <i>Clarkia concinna</i>

此, CcAP1 和 CcLFY 基因的分离对探索山核桃花芽分化过程调控机制, 揭示木本植物童期形成分子机制具有重要的意义, 同时也为 AP1 同源基因全长序列克隆、其及功能研究打下良好基础。

#### 参考文献:

- [1] 张若蕙, 路安民. 中国山核桃属研究[J]. 植物分类学报, 1979, 17 (2): 40 - 44.
- [2] MANDEL M A, YANOFKY M F. A gene triggering flower formation in Arabidopsis[J]. Nature, 1995, 377: 522 - 524.
- [3] MANDEL M A, GUSTAFSON B C, SAVIDGE B, et al. Molecular characterization of the Arabidopsis floral homeotic gene APETALA1[J]. Nature, 1992, 360: 273 - 277.
- [4] IRISH V F, SUSSEX I M. Function of APLTELA1 gene during Arabidopsis floral development [J]. Plant Cell, 1990, 2: 743 - 753.
- [5] 安利忻, 刘荣维, 陈章良, 等. 花生组织决定基因 AP1 转化矮牵牛的研究[J]. 植物学报, 2001, 43 (1): 63 - 66.
- [6] 王正加, 黄坚钦, 郭传友, 等. 山核桃基因组 DNA 提取及 RAPD 引物筛选[J]. 安徽农业大学学报, 2005, 32 (1): 72 - 76.
- [7] WEIGEL D, MEYEROWITZ E M. The ABCs of floral homeotic genes[J]. Cell, 1994, 78: 203 - 209.
- [8] WEIGEL D, ALVAREZ J, SMYTH D R, et al. LEAFY controls floral meristem identity in Arabidopsis[J]. Cell, 1992, 69: 843 - 859.
- [9] NG M, YANOFKY M F. Activation of the Arabidopsis B class homeotic genes by APETALA1[J]. Plant Cell, 2001, 13: 739 - 754.
- [10] FERRANDIZ C, GU Q, MARTIENSSEN R, et al. Redundant regulation of meristem identity and plant architecture by FRUITFULL, APETALA1 and CAULIFLOWER [J]. Development, 2000, 127: 725 - 734.
- [11] SUÁREZ-LÓPEZ P, WHEATLEY K, ROBSON F, et al. CONSTANS mediates between the circadian clock and the control of flowering in Arabidopsis [J]. Nature, 2001, 410: 1116 - 1120.