

苹果山梨醇转运子 cDNA 的克隆及其序列分析

龚晏, 梁东 (西北农林科技大学园艺学院, 陕西杨凌 712100)

摘要 [目的]为进一步研究糖运输蛋白的功能、作用机理奠定基础。[方法]以嘎啦苹果叶片总 RNA 为模板, 根据报道的山梨醇转运子的保守区设计引物, 对山梨醇转运子 cDNA 片段的 PCR 扩增, PCR 产物的克隆和测序和序列分析。[结果]经 RT-PCR 获得一条长度为 581bp 的片段, 回收并进行测序, 该片断编码 181 个氨基酸。应用 Blastn 和 Blastx 软件, 通过与 GenBank 蛋白数据库比对分析发现其蛋白序列与 MdSOT4、MdSOT6、MDSOT1 3 种苹果 (*Malus domestica*) 同源性分别为 95%、92%、92%; 酸樱桃 (*Prunus cerasus*) 78%; 大豆 (*Glycine max*) 77%; 应用 SMART 软件分析, 含有 4 个 AgrB 结构域, 为一种跨膜蛋白结构。[结论]克隆得到的片段确定为苹果山梨醇转运子基因。

关键词 苹果; 山梨醇转运子; 克隆

中图分类号 S188 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2008)23-09918-03

Cloning and Sequence Analysis of cDNA of Sorbitol Transporters from Apple Leaf

GONG Yan et al (College of horticulture, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100)

Abstract [Objective] The study was to lay the base for the further investigation on the function and acting mechanism of sugar transporters. [Method] With the total RNA of *Malus pumila* Mill cv. Royal Gala Leaf as templet, and the primer was designed according to the conserved region of sorbitol transporters that had been reported, then the cDNA fragments of sorbitol transporters were amplified by PCR, and then PCR productions was cloned, sequenced and its sequence was analyzed. [Result] Through RT-PCR, a fragment with length of 581bp was obtained, retrieved and sequenced and it encoded 181 amino acids. When Blastn and Blastx softwares were used to the comparative analysis with GeneBank protein database, it was found that the homologies of its protein sequence with 3 apples (*Malus x domestica*) such as MdSOT4, MdSOT6, MDSOT1 were 95%, 92% and 92% resp., that with amarelle (*Prunus cerasus*) was 78% and that with soybean (*Glycine max*) was 77%. Analysis with SMART software showed that the fragment was a structure of transmembrane protein with 4 AgrB domains. [Conclusion] The fragment obtained by clone was indeed the gene of sorbitol transporters of apple.

Key words Apple; Sorbitol transporters; Clone

山梨醇 (Sorbitol) 是一种糖醇, 是山梨糖 (Sorbse) 的还原产物。经过广泛研究发现, 它普遍存在于蔷薇科的许多植物中。多年的研究表明, 山梨醇是蔷薇科植物主要的光合产物、运输糖和贮藏物质, 它在碳水化合物代谢中的作用是蔷薇科植物所特有的, 占有重要地位, 起着其他植物中蔗糖的作用, 并且与提高植物抗逆性、改善果实风味等许多方面有密切关系^[1-4]。山梨醇转运子 (Sorbitol transporters) 对山梨醇从韧皮部卸载及运入果实贮藏薄壁细胞起着重要的作用。到目前为止, 山梨醇转运子基因已从苹果 (*Malus domestica*)^[5]、樱桃^[6]等植物中得到克隆和鉴定。该试验根据其他植物上已报道的山梨醇转运子基因序列的保守区域设计引物, 提取苹果叶片 RNA, 通过 RT-PCR 方法从苹果叶片中克隆山梨醇转运子基因 cDNA 片段, 旨在为进一步研究糖运输蛋白的功能、作用机理奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料 材料为苹果 (*Malus pumila* Mill) 品种皇家嘎啦 (Royal Gala) 成熟叶片, 取自西北农林科技大学园艺学院试验场, 用液氮速冻后放入 -70 °C 冰箱待用。

1.2 方法

1.2.1 总 RNA 的制备。 采用改良 SDS 热酚法提取总 RNA^[7-8]。取 0.2 g 苹果叶片, 在液氮中充分研碎成粉末, 加入到 700 μ l Tris-酚试剂 (80 °C) 中, 而后迅速加入 20 μ l β -巯基乙醇, 900 μ l Buffer 混匀, 4 °C 12 000 r/min 离心 20 min。上清液移至另一 EP 管中, 加入等体积酚: 氯仿: 异戊醇 = 25:24:1 混合液, 上下颠倒振荡混匀, 4 °C 12 000 r/min 离心 20

min。将上清液转移至新 EP 管中, 加入等体积氯仿: 异戊醇 = 24:1 混合液, 混匀, 4 °C 12 000 r/min 离心 20 min。吸取上清液, 加入 2.5 倍体积无水乙醇和 0.1 倍体积的醋酸钠, 放置 3 h 并过夜。而后 4 °C 10 000 r/min 离心 20 min, 弃上清液, 加入 1 ml 浓度 75% 乙醇清洗沉淀 2 次, 干燥沉淀后, 溶于 30 ~ 50 μ l DEPC 水中, -20 °C 保存备用。取 RNA 1 μ l 进行 1.0% 琼脂糖凝胶电泳。取 10 μ l 稀释至 2 800 μ l, 测波长在 260 nm 和 280 nm 处的吸光值, 即 A_{260} 和 A_{280} 。

1.2.2 引物设计及 RT 反应。 根据已克隆的山梨醇转运子基因保守区序列设计简并引物, 引物 1: 5'-CCT AAR AGR AAY AAG TWT GCT TTT GCT TGT GCT-3'; 引物 2: 5'-CCC TCC RAA CAA AAA GAA KGC ACC ACC3'; 引物 3: 5'-AAC RAG CCA MCG YGG KGA CTC WGG CAT-3'。引物由捷瑞生物工程公司合成。

25.0 μ l 反转录反应体系包括: 1 μ g 总 RNA, 加入 10 mmol/L 引物 1.0 μ l, 70 °C 反应 5 min。冰上冷却加入 10 mmol/L dNTPs 1.25 μ l, M-MLV 5 \times Reaction 缓冲液 5.0 μ l, 200 U/ μ l M-MLV RT(H-) 1.0 μ l, 加 DEPC 水至 25.0 μ l, 轻轻摇匀, 短暂离心。37 °C 孵育 60 min, 然后 70 °C 孵育 5 min, -20 °C 保存待用。

1.2.3 山梨醇转运子 cDNA 片段的 PCR 扩增。

(1) 一次 PCR。以苹果叶片总 RNA 的反转录产物为模板进行 PCR 扩增。反应体积为 25.0 μ l, 包括 10 \times Buffer 2.5 μ l, MgCl₂ 25 mmol/L 2.2 μ l, dNTPs 2.5 mmol/L 2 μ l, 10 mmol/L 引物 12.0 μ l, 10 mmol/L 引物 22.0 μ l, 5 U/ μ l Taq DNA 聚合酶 0.3 μ l, 模板 cDNA 3.0 μ l, 灭菌双蒸水补齐至 25.0 μ l。反应条件为: 94 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 50 s, 50 °C 50 s, 72 °C 延伸 2 min, 35 个循环; 然后 72 °C 延伸 10 min。

(2) 二次 PCR。以一次 PCR 产物为模板进行的 PCR 扩

基金项目 西北农林科技大学资助项目。

作者简介 龚晏 (1983 -), 女, 湖南岳阳人, 硕士研究生, 研究方向: 果树育种与生物技术。

收稿日期 2008-06-02

增。反应体积为 25.0 μl,包括 10 × Buffer 2.5 μl, MgCl₂ 25 mmol/L 2.2 μl, dNTPs 2.5 mmol/L 2.0 μl, 10 mmol/L 引物 1 2 μl, 10 mmol/L 引物 3 2.0 μl, 5 U/μl TaqDNA 聚合酶 0.3 μl, 模板 2 μl, 灭菌双蒸水补齐至 25.0 μl。反应条件为:94 °C 预变性 5 min;94 °C 变性 50 s, 50 °C 50 s, 72 °C 延伸 2 min, 35 个循环;然后 72 °C 延伸 10 min。PCR 产物经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测后,切下目的条带,用 PCR 产物纯化试剂盒回收 DNA。

1.2.4 PCR 产物的克隆和测序。回收的 PCR 产物与 pMD 18-T Vector 连接,转化 *E. coli* DH5α, 菌斑在含有 X-gal 和 IPTG 的平板上进行蓝白斑筛选,挑取若干白斑于 10 ml LB 培养 10 ~ 12 h,提取质粒后,酶切鉴定和 PCR 鉴定,经鉴定得到的正确克隆用于测序,测序工作由捷瑞公司完成。

1.2.5 序列分析。

(1)利用 NCBI 网址中的 ORF finder, Blastn 和 Blastx 软件对山梨醇转运蛋白基因进行序列分析和同源性比较分析,并利用 DNA MAN 软件对该蛋白序列进行多重对齐分析和进化关系的分析。

(2)利用简单模块构架搜索工具(Simple Modular Architecture Research Tool, SMART)对山梨醇转运蛋白基因所编码的蛋白一级序列进行功能结构域分析,网址为 <http://smart.embl-heidelberg.de/>。

2 结果与分析

2.1 RNA 的提取结果 试验结果表明,利用改良的 SDS 热酚法提取的 RNA,其 28S 和 18S 条带清晰,宽度和亮度均为 2:1 的关系,表明纯度较高,没有蛋白污染,可用于后续的反转录。

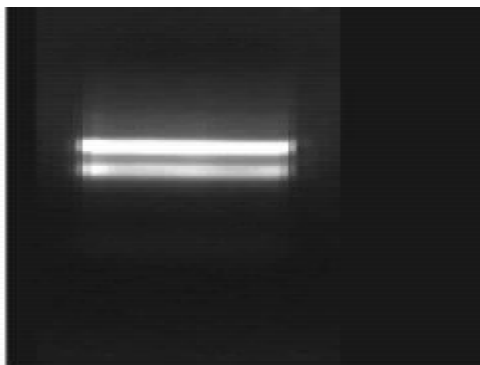


图 1 苹果叶片的总 RNA

Fig.1 Total RNA of apple leaves

2.2 苹果山梨醇转运子基因片段的 RT-PCR、重组质粒的鉴定结果 通过 RT-PCR,从苹果叶片中得到一条大小为 581 bp 的片段(图 2)。

2.3 测序结果及其序列分析结果

2.3.1 测序结果。测序后发现从苹果叶片中扩增得到的片段长 581 bp,暂定名为 ST1,通过 ORF 分析,发现该基因编码 181 个氨基酸,其碱基序列及推导的氨基酸序列见图 3。

2.3.2 Blastn 和 Blastx 分析结果。Blastn 结果显示,ST1 基因与 MdsOT4、MdsOT1、MdsOT6、MdsOT3、SOT[*Glycine max*] 基因同源性分别为 558/580 (96%)、539/576 (93%)、536/576 (93%)、444/581 (76%)、443/584 (75%)。Blastx 结果显示,嘎拉苹果 ST1 基因编码的氨基酸序列与 MdsOT4、MdsOT6、

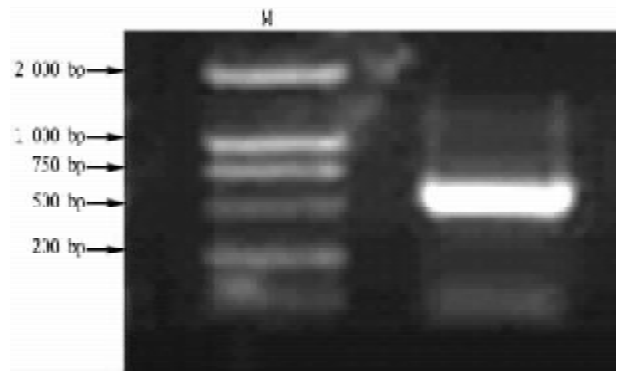


图 2 RT-PCR 扩增

Fig.2 Amplification of RT-PCR

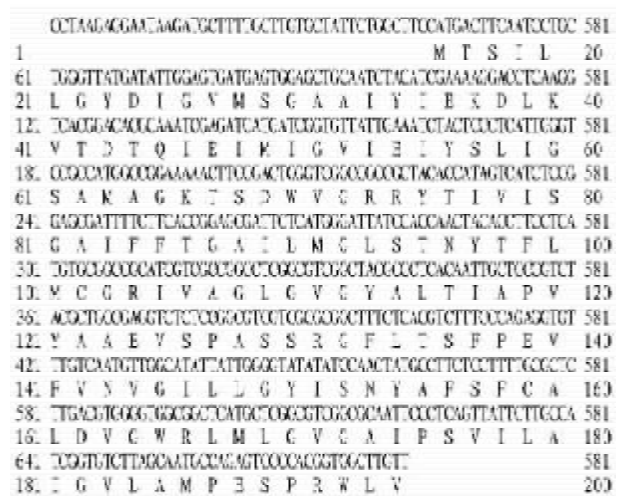


图 3 山梨醇转运子核苷酸序列及其推测的氨基酸序列

Fig.3 Nucleotide sequence of sorbitol transporter cDNA and deduced amino acid sequence

MDSOT1、SOT[*Prunus cerasus*]、SOT[*Malus domestica*]、SOT2 [*Prunus cerasus*]、SOT[*Glycine max*]、SOT[*Oryza sativa Japonica Group*]、MDSOT3 基因编码的蛋白氨基酸序列一致性分别为 171/179 (95%)、165/179 (92%)、165/179 (92%)、148/188 (78%)、148/188 (78%)、147/188 (78%)、146/188 (77%)、135/188 (71%)、131/188 (69%)。二者分析得出同样的结果,ST1 与从苹果中克隆得到的山梨醇转运子有很高的同源性,最高可达 96% (核苷酸序列)和 95% (氨基酸序列),与大豆、水稻等也有很高的同源性,说明不同种属植物中山梨醇转运蛋白差异不是很大。利用 DNA MAN 软件对该蛋白序列进行多重对齐分析和进化关系的分析,进一步发现 ST1 与蔷薇科植物的山梨醇转运蛋白归为一类,而大豆、水稻归为一类。说明虽然植物中山梨醇转运蛋白具有较高的同源性,但是不同种属的山梨醇转运蛋白还是有一定的差异。

2.3.3 功能结构域分析结果。利用简单模块构架搜索工具对山梨醇转运蛋白基因所编码的蛋白一级序列进行功能结构域分析,发现 ST1 具有 AgrB 结构域,含 agr 系统,即附属基因调节因子,由其自身编码的肽诱导激活,对许多附属的胞外蛋白和胞质蛋白基因具有重要的调控作用。AgrB 是一个多次跨膜蛋白,含有 4 个疏水的跨膜区段以及 2 个富含正电荷氨基酸残基的亲水性跨膜区段。AgrB 一方面作为蛋白酶参与对 AgrD 的加工,使其成熟为自诱导肽(AIP)。另一方面

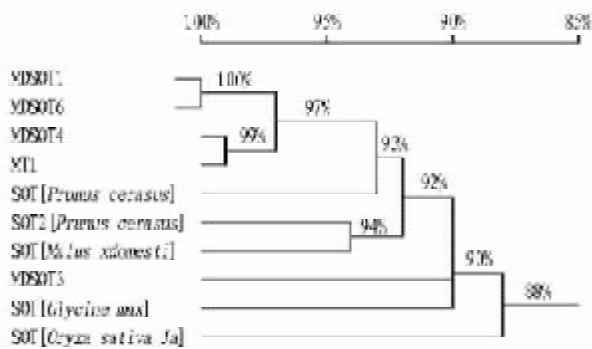


图4 苹果山梨醇转运子 cDNA 同源性聚类分析结果

Fig. 4 Clustering analysis result of sorbitol transporter cDNA homology in apple

AgrB 作为一个寡肽的运输者,帮助成熟的 AIP 分泌至胞外。AgrB 具有跨膜转运的功能,通过对其他已经克隆出的山梨醇转运蛋白分析,基本上都具有 AgrB 结构。说明 AgrB 是山梨醇转运蛋白中不可或缺的结构域,在山梨醇的转运过程中起着重要作用。

3 讨论

3.1 取样及总 RNA 的提取 由于 mRNA 的表达具有时空性,取样对于目的基因的克隆非常重要。不同时期的叶片,山梨醇转运子基因表达量具有很大的差异,成熟叶片山梨醇的合成运输处于旺盛时期,山梨醇转运蛋白基因表达量相对较高。有研究表明,不同类型的山梨醇转运蛋白基因在源叶中都有表达,选取成熟叶片对于克隆到目的片段的可能性较大。获得高质量且完整的 RNA,可以反转录出尽可能长且完整的基因 cDNA 模板链,特别是一些低丰度表达的基因尤为重要。笔者利用改良的 SDS 热酚法,65 °C 水浴浸提得到 RNA,浸提后蛋白质变性,Tris-酚、氯仿有效地抑制 RNase 活性,防

止了 RNA 的降解,同时各步操作均须在冰上操作。按该方法提取的 RNA,没有蛋白污染, OD_{260}/OD_{280} 均在 1.8~2.0,说明纯度非常高,同时条带清晰,边缘整齐,28S/18S 比例为 2:1,说明条带完整,RNA 无降解。

3.2 山梨醇转运子基因与光合作用同化产物的关系 研究表明^[9-10],糖运输蛋白对光合作用同化的碳水化合物的运输非常重要。由于糖运输蛋白存在于源端和库端细胞的质膜和液泡膜上,因此这些运输蛋白在同化物分配及其调节中可能起着不可缺少的作用。笔者运用 RT-PCR 方法结合分子生物学分析方法,克隆到了苹果山梨醇转运蛋白基因,为苹果韧皮部山梨醇的转运研究奠定了基础。

参考文献

- [1] 周睿,束怀瑞. 高等植物中的山梨醇及其代谢[J]. 植物生理学通讯, 1993, 29(5): 384-390.
- [2] 李嘉瑞,马锋旺. 蔷薇科果树山梨醇的研究[J]. 果树科学, 1991, 8(2): 111-115.
- [3] 马锋旺,李嘉瑞. 蔷薇科果树中山梨醇代谢的酶[J]. 西北农业大学学报, 1993, 21(3): 88-93.
- [4] 梁东,马锋旺,管清美,等. 蔷薇科植物中山梨醇代谢酶的研究进展[J]. 西北植物学报, 2004, 24(7): 1362-1366.
- [5] JUNYA WARARI, YOSHIHIRO KOBAE. Identification of sorbitol transporters expressed in the phloem of apple source leaves[J]. Plant Cell Physiol, 2004, 45(8): 1032-1041.
- [6] GAO Z F, LAURENCE. Cloning, expression, and characterization of sorbitol transporters from developing sour cherry fruit and leaf sink tissues[J]. Plant Physiology, 2003, 131: 1566-1575.
- [7] 侯义龙,张开春,吴禄平,等. 果树组织中总 RNA 提取的新方法[J]. 沈阳农业大学学报, 2002, 33(2): 122-125.
- [8] 张今今,王跃进,王西平,等. 葡萄总 RNA 提取方法的研究[J]. 果树学报, 2003, 20(3): 178-181.
- [9] CHEN J W, ZHANG S L, ZHANG L C, et al. Characteristics of photosynthate ansloncation and partitioning and sugar accumulation in developing satsuma mandarin (*Citrus unshiu* Marc.) fruit[J]. Acta Phytophysiol Sin, 2001, 27: 186-192.
- [10] LEMOINE R. Sucrose transporters in plants: update on function and structure[J]. Biochim Biophys Acta, 2000, 1465: 246-262.

(上接第 9913 页)

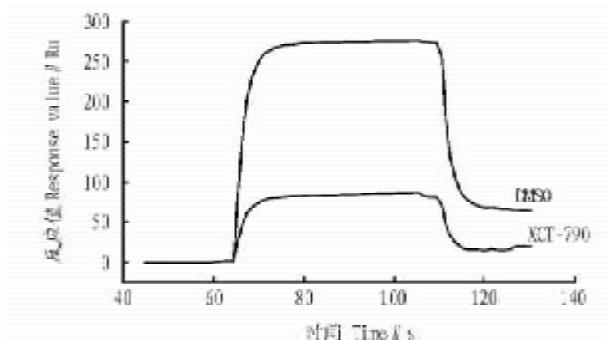


图4 Biacore 鉴定纯化的 ERR α -LBD 融合蛋白的活性

Fig. 4 Analysis of ERR α -LBD fusion protein activity by Biacore system

3 讨论

EER α 是雌激素相关受体家族的一个重要成员。在多种代谢疾病(如糖尿病)以及肿瘤细胞(如乳腺癌细胞、前列腺癌细胞等)中,都发现 EER α 的表达异常或者功能紊乱^[2]。EER α 已成为核受体家族中新的研究热点。核受体一般具有

6 个功能区,其中与配体发生相互作用的是 E/F 区,核受体家族的配体结合域(LBD)便由此区域编码。当配体与 LBD 区结合后,往往改变 LBD 区构象,募集相关的转录辅助因子,调节下游基因的表达,行使相应功能^[5]。虽然目前还没有发现体内 EER α 的天然配体,但很多人工合成的小分子都可以通过与配体结合域的结合来调节 EER α 活性。

参考文献

- [1] GIGUERE V. Orphan nuclear receptors: From gene to function[J]. Endocrine Reviews, 1999, 20(5): 689-725.
- [2] ARIAZI E A, JORDAN V C. Estrogen-related receptors as emerging targets in cancer and metabolic disorders[J]. Curr Top Med Chem, 2006, 6(3): 203-215.
- [3] 钱云霞,钱凯先. 雌激素相关受体 ERR 的功能及其调控[J]. 生物化学与生物物理进展, 2006, 32(6): 495-500.
- [4] KALLEN J, LATTMANN R, BEERLI R, et al. Crystal structure of human estrogen-related receptor alpha in complex with a synthetic inverse agonist reveals its novel molecular mechanism[J]. J Biol Chem, 2007, 282(32): 23231-23239.
- [5] ARANDA A, PASCUAL A. Nuclear hormone receptors and gene expression[J]. Physiol Rev, 2001, 81(3): 1269-1304.