

苹果叶片抗坏血酸过氧化物酶基因 cDNA 的克隆

栗霞,张军科,马锋旺

(西北农林科技大学 园艺学院, 陕西 杨凌 712100)

[摘要] 根据 Genbank 上已报道的烟草、辣椒、龙眼和杨树 4 种植物的抗坏血酸过氧化物酶基因的保守区域设计兼并引物,利用 RT-PCR 和 RACE 法对皇家嘎拉苹果叶片 APX 基因进行克隆、分析。结果表明,皇家嘎拉苹果叶片 APX 基因片段长度为 694 bp,与 GenBank 中已登陆的富士苹果果实、皇家嘎拉苹果花芽、草莓及 Rosa hybrid cultivar 等的 APX cDNA 的同源性分别为 97%,97%,84%和 84%。

[关键词] 苹果叶片;APX 基因;过氧化物酶

[中图分类号] S661.103.2

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2007)10-0077-04

Cloning of ascorbate peroxidase cDNA from apple

SU Xia,ZHANG Jun-ke,MA Feng-wang

(College of Horticulture, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: With degenerated primers designed according to conservative region of ascorbate peroxidase gene sequence of *Nicotiana tabacum*, *Capsicum annuum*, *Dimocarpus longan*, and *Populus curamERICANA* on Genbank, the fragment of APX gene was cloned from Royal Gala apple by RT-PCR method and the 3' end by rapid amplification of cDNA end (RACE) strategy. The analysis showed that the spliced fragment contained 694 base pairs, which were 97%, 97%, 84% and 84% homology to that of Fuji fruit, Royal Gala young shoot, strawberry and Rosa hybrid cultivar in APX cDNA of Genbank, respectively.

Key words: apple leaf; APX gene; POX

植物在生长发育过程中经常受到环境因素的胁迫,这种胁迫严重影响植物的正常生长和发育过程。当植物遇到高温、干旱等一些逆境时,其体内就会产生大量的活性氧(ROS),如过氧化氢(H_2O_2),若不及时清除就会导致植物死亡。而抗坏血酸过氧化物酶(Ascorbate peroxidase, APX)是分解 H_2O_2 的关键酶^[1],其对保护叶绿体和其他细胞组分免受 H_2O_2 及其所产生的羟基自由基的破坏是必不可少的^[2]。植物体内积累的活性氧,能快速诱导 APX 表达,APX 催化抗坏血酸(ASA)与 H_2O_2 反应而使 H_2O_2 被分解^[3]。迄今,已有大量报道指出,植物在

遇到高温、干旱、强光等逆境时,植物体内 APX 的活性均有所增强^[4-5],APX 是植物和藻类特有的清除 H_2O_2 的重要酶类^[6]。因此,克隆植物 APX 基因,并通过转基因的方法来增强该基因的表达,提高 APX 酶活性,对于增加作物的抗性、提高其产量和品质具有重要的现实意义。

苹果作为多年生木本植物,环境胁迫不仅影响其生长和发育,而且影响其产量和品质。为了增强苹果对逆境的抵抗能力,减弱环境胁迫对苹果造成的影响,本研究以嘎拉苹果叶片为材料,运用 RT-PCR 技术对苹果 APX 基因片段进行了克隆、鉴定,

[收稿日期] 2006-09-15

[基金项目] 陕西省重大科技专项计划项目(2006kz05-G4);西北农林科技大学“拔尖人才支持计划”项目

[作者简介] 栗霞(1981-),女,陕西西安人,在读硕士,主要从事果树生物技术研究。

[通讯作者] 张军科(1969-),男,甘肃灵台人,副教授,博士,主要从事果树抗性生理与生物技术改良研究。

E-mail: zhangjk@nwsuaf.edu.cn

以期为进一步获得该基因全序列,并进行遗传转化培育抗性品种奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

苹果 (*Malus domestica* Botkh.) 品种“皇家嘎拉”的叶片,采自西北农林科技大学园艺场。大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 宿主菌为 DH5a,由西北农林科技大学园艺学院实验室保存。*Taq* DNA 聚合酶购自华美生物公司,dNTPs、MLV 反转录酶、pMD18-T 载体和限制性内切酶等购自大连 TaKaRa 生物公司,Agarose Gel DNA Extraction Kit 和 Plasmid mini kit 购自安徽优晶生物工程公司,十二烷基磺酸钠(SDS)为 Sigma 公司产品,其他试剂均为国产分析纯。

1.2 引物的设计与合成

根据 Genbank 上已登陆的烟草 (GenBank 登录号:U15933)、辣椒 (GenBank 登录号:DQ002888)、龙眼 (GenBank 登录号:A Y831398) 和杨树 (GenBank 登录号:AJ698922) APX 基因的保守区,设计引物 APX-1、APX-2 和 APX-3。另外,设计锚定引物 APX-4 和反转录引物 APX-5:

APX-1:5' GTT GTT GCT GT (G/T) GAA (A/G) TT ACT GG 3';

APX-2:5' AGG AGC GTT C (T/A) G G (A/C/G/T) T T (T/C) G AGG 3';

APX-3:5' CAT C (C/T) G CAG CAT A (T/C) T T (C/T) T CAA G 3';

APX-4:5' CTG ATC TAG AGG TAC CGG ATC G 3';

APX-5:5' CTG ATC TAG AGG TAC CGG ATC CTT TTT TTT TTT TTT TT (A/C/G) 3';

引物由上海生物工程公司合成。

1.3 苹果叶片总 RNA 的提取

采用改良的 SDS/酚法^[7-8] 提取苹果叶片总 RNA,-70℃ 保存备用。将 RNA 溶解于 30 μL DEPC 处理的无菌水中,电泳检测完整性,并用紫外分光光度计检测 RNA 的浓度和纯度。

1.4 苹果叶片 APX 基因的 RT-PCR 及 3' 末端扩增 (3' RACE)

1.4.1 反转录 以提取的总 RNA 为模板,在引物 APX-5 引导下,反转录合成 cDNA 第一条链。在 20 μL 反应体系中加入 4 μL 5 × MLV buffer,1.6 μL 25 mmol/L MgCl₂,2 μL 10 mmol/L dNTP,20 U

RNasin,2.5 μL 引物 APX-5,1 U MLV 反转录酶,1 μg RNA 模板,室温放置 10 min,42℃ 反应 15 min,95℃ 反应 5 min,4℃ 反应 5 min。

1.4.2 RT-PCR 取 2 μL 反转录产物作为模板,在 0.2 mL PCR 管中依次加入 2.5 μL 10 × Taq Buffer,0.5 μL dNTP (10 mmol/L),2 μL Mg²⁺ (25 mmol/L),2 μL APX-1 (10 μmol/L),2 μL APX-4 (10 μmol/L),0.2 μL Taq (5 U/μL),加灭菌双蒸水至 25 μL,进行第 1 次 PCR 扩增。PCR 扩增程序为:94℃ 预变性 5 min;94℃ 变性 1 min,52℃ 退火 1 min,72℃ 延伸 2 min,循环 35 次;最后 72℃ 延伸 10 min;4℃ 存放。

以第 1 次 PCR 扩增产物作为模板,APX-1 和 APX-3 为引物进行第 2 次 PCR 扩增,反应体系和程序同上。

1.4.3 3' RACE 以 1.4.2 中第 1 次 PCR 扩增产物作为模板,APX-2 和 APX-4 为引物扩增 3' 末端,反应体系和程序同 1.4.2。

1.5 苹果叶片 APX 基因 PCR 产物的克隆、鉴定与测序

1.5.1 PCR 产物的克隆 PCR 产物用 Agarose Gel DNA Extraction Kit 回收后,与 pMD18-T 载体连接。连接产物利用热激法转化至 DH5a 感受态细胞中,然后将其涂于含 100 mg/L Amp 的 LB 固体培养基上,37℃ 反向放置培养 12~16 h。待长出大小合适的菌斑时筛选白斑,少量提取质粒。

1.5.2 PCR 产物的鉴定与测序 分别用单引物 (APX-1、APX-3) 及双引物 (APX-1 和 APX-3) 对 RT-PCR 质粒进行 PCR 扩增,并进行 *Xba* 和 *Sal* 双酶切鉴定,将 PCR 扩增和双酶切鉴定均为阳性的克隆测序。同样,分别用单引物 (APX-2、APX-4) 及双引物 (APX-2 和 APX-4) 对 3' 末端质粒进行 PCR 扩增,并进行 *Sal* 和 *EcoR* 双酶切鉴定,将 PCR 扩增和双酶切鉴定均为阳性克隆测序。测序在西北农林科技大学生物技术中心完成,结果用 BLAST 软件进行序列分析。

2 结果与分析

2.1 苹果叶片 APX 基因的 RT-PCR 及 3' RACE 扩增

以苹果叶片总 RNA 为模板,APX-1 和 APX-3 为引物,经 RT-PCR 得到长度为 379 bp 的片段 (图 1),与预期结果相符;以 APX-2 和 APX-4 为引物,进行 3' RACE,产物长度为 500 bp 左右 (图 2)。

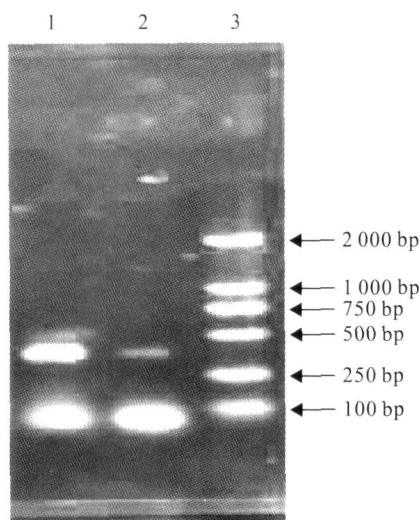


图 1 苹果叶片 APX 基因 RT-PCR 扩增结果

1, 2. RT-PCR 产物; 3. DNA 分子量标准

Fig. 1 RT-PCR products of apple leaves

1, 2. RT-PCR products; 3. DL2000 Marker

2.2 苹果叶片扩增产物的克隆鉴定与序列分析

将扩增产物分别与 pMD18-T 载体进行连接, 转化 DH5a, 筛选阳性克隆进行鉴定, 结果显示 RT-PCR 产物长度为 379 bp (图 3), 3' RACE 产物长度

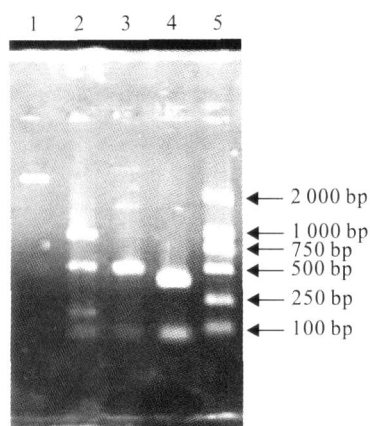


图 3 苹果叶片 APX 基因 RT-PCR 产物

重组质粒的鉴定结果

1. 酶切产物; 2, 3. 单引物 PCR 产物; 4. 双引物 PCR 产物; 5. DNA 分子量标准

Fig. 3 Test of RT-PCR recombined plasmid in apple leaves

1. Digest fragment; 2, 3 Single primer products;

4. PCR products; 5. DL2000 Marker

将所得的苹果叶片 APX 基因 cDNA 序列与 Genbank 中已登录的其他物种 APX 基因进行比对, 结果发现, 其均具有很高的同源性。其中, 与富士苹果果实 (GenBank 登录号: DW248924)、皇家嘎拉苹果花芽 (GenBank 登录号: CN943921)、草莓

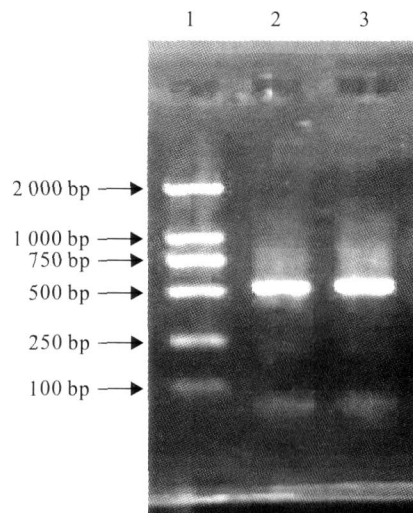


图 2 苹果叶片 APX 基因 3' RACE 的扩增结果

1. DNA 分子量标准; 2, 3. 3' RACE 产物

Fig. 2 3' RACE products of apple leaves

1. DL2000 Marker; 2, 3. 3' RACE products

为 489 bp (图 4)。对 APX 基因 RT-PCR 产物和 3' RACE 产物测序后进行拼接, 结果 (图 5) 显示, 苹果叶片 APX 基因 cDNA 长度为 694 bp。

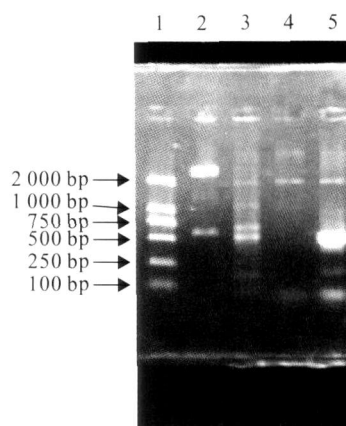


图 4 苹果叶片 APX 基因 3' RACE 产物

重组质粒的鉴定结果

1. DNA 分子量标准; 2. 酶切产物; 3, 4. 单引物 PCR 产物; 5. 双引物 PCR 产物

Fig. 4 Test of 3' RACE recombined plasmid in apple leaves

1. DL2000 Marker; 2. Digest fragment;

3, 4. Single primer products; 5. PCR products

(GenBank 登录号: CX025276) 和 Rosa hybrid cultivar (GenBank 登录号: AY937208) APX cDNA 的同源性分别为 97%, 97%, 84% 和 84%。另外, 将其所编码的氨基酸序列与几种植物的抗坏血酸过氧化物酶氨基酸序列比较, 也具有较高的同源性, 从而可

以确定克隆片断为皇家嘎拉苹果叶片 APX 基因的部分序列。

```

1  GTTGTGCTG  TGGAAGTTAC  TGGTGGGCCT  GATGTCCCAT  TCCACCCAGG  AAGGACGGAT
61  GCCCCGTGC  CACCACCAGA  GGGCCGTCTT  CCTGATGCTA  CCAAGGGTTG  TGATCATTTG
121  AGGGATGTCT  TCTGCAAGAC  CATGGGCCTC  AGCGACAAGG  ATATTGTTAC  TCTCTCCGGT
181  GGTCACACCC  TGGGAAGGTG  CCACAAGGAG  CGTTCTGGAT  TTGAGGGACC  TTGGAATCCC
241  AACCCCTTA  TCTTCGACAA  CTCCTACTTC  ACGGTGCTTC  TTGGTGGAGA  CCAGGAAGGT
301  CTTCTAATGC  TTCCAAGTGA  CAAGGCTCTT  CTGGATGACC  CTGTCTTCCG  CCCTCTTGTG
361  GAAAAATACG  CTGCGGATGA  AGATGCTTTC  TTTGCTGACT  ATGCTGAATC  TCACATGAAG
421  CTCTCCGAGC  TTGGGTTTGC  TGAGGCCTAA  GCAGAGCTGG  AGAACTACAA  GGGATGAAGC
481  CAATGCCTGT  GCGCCTTTCT  TTTGTATTTT  TGGATGCCTC  TTGGTTGTGA  GGTTGTAGGC
541  AGTTGGTGCT  TTTCTTTTTT  ATCTTATCAG  GTTTTAGGAA  GTGGGACTTC  TAGTTCGATT
601  TGAAGAACGA  ATGTTTTTAA  ATTGGATGGA  ATGCTGGTAA  TCATCCTCGT  TGATTAAATA
661  ATACTGTAAT  TTTACCCGAA  AAAAAAAAAA  AAAA

```

图 5 苹果叶片 APX 基因 cDNA 的测序结果

Fig. 5 Results of APX gene cDNA sequencing in apple leaves

3 讨 论

在高等植物中,抗坏血酸(Ascorbic acid, ASA)-谷胱甘肽(Glutathione, GSH)循环对于清除活性氧具有极其重要的作用。而 APX 作为 ASA-GSH 循环中分解 H_2O_2 的关键酶,与植物的生长和抵抗逆境胁迫有密切关系,同时其也是分解维生素 C 的酶之一。在高等植物中,APX 存在多种同工酶,分别定位在细胞的不同部位^[9-11]。目前,不少研究者已在多种植物上进行了 APX 各种同工酶基因的分子克隆,但多集中在草本植物上,木本植物由于遗传背景较复杂,至今得到 APX 基因全长的研究相对较少。尽管在 Genbank 上已有富士果实及皇家嘎拉花芽 APX 基因的片断,但尚无皇家嘎拉叶片 APX 基因全长的报道。为了能成功克隆皇家嘎拉叶片 APX 基因,本试验在设计引物时参考木本和草本植物 APX 基因序列共有的保守区,而没有局限在苹果 APX 基因序列。本研究对皇家嘎拉叶片 APX 基因片断进行了成功克隆,结果为苹果抗性新品种的培育及 APX 基因功能的深入研究奠定了基础。

[参考文献]

[1] Asada K. Ascorbate peroxidase—a hydrogen peroxide scavenging enzyme in plants[J]. Plant physiol, 1992, 85: 235-241.

[2] 王伟青. 番茄叶绿体抗氧化酶基因的克隆与遗传转化的研究[D]. 山东: 山东农业大学, 2003: 69.

[3] Foyer C H, Hailiwell B. The presence of glutathione and glutathione reductase in chloroplasts: proposed role in ascorbic acid metabolism[J]. Planta, 1976, 133: 21-25.

[4] Cakmak I, Marschner H. Magnesium deficiency and high light intensity enhance activities of superoxide dismutase, ascorbate peroxidase and glutathione reductase in bean leaves[J]. Plant physiol, 1992, 98: 1222.

[5] Tanaka K, Masuda R, Sugimoto T, et al. Water deficiency induced changes in the contents of defensive substances against active oxygen in spinach leaves[J]. Agric Bwl Chem, 1990, 54: 2629.

[6] 沈文飏, 黄丽琴, 徐朗莱. 植物抗坏血酸过氧化物酶[J]. 生命的化学, 1997, 5(17): 24-26.

[7] 候义龙. 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] 郑晓飞. RNA 实验技术手册[M]. 北京: 科学出版社, 2004.

[9] Chen G X, Asada K. Ascorbate peroxidase in tea leaves: occurrence of two isozymes and the differences in their enzymatic and molecular properties[J]. Plant and Cell Physiology, 1989, 30: 987-998.

[10] Bunkelmann J R, Trelease R N. Ascorbate peroxidase: a prominent membrane protein in oilseed glyoxysomes[J]. Plant Physiology, 1996, 110: 589-598.

[11] Shigeru S, Takahiro I, Masahiro T, et al. Regulation and function of ascorbate peroxidase isoenzymes[J]. Journal of Experimental Botany, 2002, 5: 1305-1319.