

柑橘类植物 GPAT 基因片段 克隆和 SNP 分析

吴波¹ 刘勇^{2*}

(1. 江西中医学院 江西省中药种质资源工程技术研究中心, 江西 南昌 330004; 2. 江西农业大学 农学院, 江西 南昌 330045)

摘要:甘油-3-磷酸酰基转移酶基因是与植物抗冷性强弱密切相关的基因。根据已报道的各种植物 GPAT 基因的氨基酸序列上前两个保守区设计 1 对简并引物,采用 RT-PCR 技术,分别从琯溪蜜柚、马家柚、莽山野橘等 8 种柑橘类植物中克隆得到 315 bp 的 GPAT 基因片段。使用 DNASTar5.0 软件对 8 个片段序列进行同源比较,8 个片段的核苷酸同源性高达 97.8%,与其它植物 GPAT 基因核苷酸序列的同源性都在 72.5% 以上;经过氨基酸序列推导,每个 GPAT 基因片段分别编码 105 个氨基酸,8 个片段的氨基酸同源性为 95.2%,与其它植物 GPAT 基因的氨基酸序列同源性在 68.9% 以上。试验克隆所得 8 种柑橘类植物 GPAT 基因片段序列存在明显的单核苷酸变异,在 14 个核苷酸位点存在 SNPs(single nucleotide polymorphisms),导致 6 个氨基酸位点发生变异,多态性频率为 1SNP/22.5 bp,核苷酸变异度为 4.45%,氨基酸变异度为 5.71%。采用 NJ 聚类法对克隆片段的核苷酸序列进行了遗传多样性分析。

关键词:柑橘类植物;GPAT;基因克隆;SNP;序列分析

中图分类号:Q785 文献标识码:A 文章编号:1000-2286(2010)01-0051-06

Cloning of Partial Sequence of GPAT Gene in *Citrus* and Its SNP Analysis

WU Bo¹ LIU Yong^{2*}

(1. Research Center of Traditional Chinese Medicine Germplasm Resource, JXTCMI, Nanchang 330004, China; 2. College of Agronomy, JAU, Nanchang 330045, China)

Abstract: GPAT gene is an important gene with cold resistance of plants. A pair of degenerate primers were designed according to the conserve regions of GPAT gene of many kinds of plants reported in Genbank. Eight cDNA documents of GPAT gene in *Citrus maxima* cv. Guanximiyou, *Citrus maxima* cv. Majiayou, *Citrus mangshanensis*, *Citrus limon*, *Citrus sinensis*, Xingguotiancheng, *Citrus maxima* cv. Xinmuyou, *Poncirus trifoliata* and *Citrus maxima* cv. Lingnanshatianyou were cloned by using RT-PCR technology. The biology program of DNASTar5.0 was used to analyze the eight document sequences. The best nucleotide similarity was 97.8% among the eight gene documents and the similarity was above 72.5% with other plants' GPAT gene. Every nucleotide sequence encoded 105 amino acids according to derivation. The best amino acid similarity was 95.2% among the eight gene documents and the similarity was above 68.9% with other plants' GPAT gene. Fourteen variational sites of single nucleotides were discovered in the eight gene documents. Six amino acid sites transformed

收稿日期:2009-10-14 修回日期:2009-11-08

基金项目:江西省自然科学基金资助项目(2009GZN0024)、产学研结合培养高素质复合型中药人才模式创新研究与实践项目(教高函[2007]29号)和江西农业大学博士启动基金项目(1791)

作者简介:吴波(1980-)男,硕士,主要从事药用植物生物技术研究,E-mail:wubojxtemi@sina.com;* 通讯作者:刘勇,教授。

because of the variation of fourteen single nucleotides. According to the calculation result, the polymorphism frequency was 1SNP/22.5 bp, the nucleotide and amino acid degree of the variation of nucleotide and amino acids were 4.45% and 5.71%. The genetic diversity of cloning documents was analyzed by using the clustering procedure of NJ (Neighbor - Joining).

Key words: *Citrus*; GPAT; gene cloning; SNP; sequence analysis

甘油-3-磷酸酰基转移酶 (glycerol-3-phosphate acyltransferase, GPAT, EC2.3.1.15) 是植物生物膜中磷脂酰甘油 (PG) 生物合成过程中的第一个酰基酯化酶, 它催化脂肪酰基转移到甘油-3-磷酸的 sn-1 位上, 合成 1-酰基甘油-3-磷酸, 对 PG 分子中的饱和度起着关键性作用, 与植物抗冷性关系密切^[1]。目前, 国内外已经先后从兵豆^[2]、甜椒^[3]、拟南芥^[4]、红花^[5]等植物中获得了该基因的 cDNA 片段或全长序列。在有关柑橘类植物 GPAT 基因的研究报道还很少, 仅克隆获得了温州蜜柑 GPAT 基因全长序列^[6]和新干特早柚 GPAT 基因 5' 序列^[7], 国内外还未见其它柑橘类植物中克隆 GPAT 基因的报道。

本实验克隆了 8 种柑橘类植物 GPAT 基因片段, 并对所得序列进行了 SNP 分析, 发掘了其中的核苷酸变异位点和相应编码的氨基酸变异位点, 揭示了该基因在柑橘类植物中的遗传多态性。为克隆柑橘类植物 GPAT 基因全长序列; 丰富构建柑橘类植物基因图谱标记和抗冷性状的遗传标记; 对柑橘类及其近缘种植物进行精确遗传多样性分析研究; 并用于柑橘类植物抗冷性分子育种奠定基础。

1 材料和方法

1.1 供试材料

于春季从江西省农业科学院园艺研究所柑橘种质资源圃采摘 8 种柑橘类植物幼嫩叶片 (表 1) 用液氮速冻后, 放入 -80 °C 的超低温冰箱中备用。受体大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 菌株为 DH5 α , 由本实验室保存; 克隆载体 pMD18-T、限制性内切酶、Taq 聚合酶等购自大连宝生物公司, PCR 产物纯化试剂盒购自 Promge 公司, dNTPs、氨苄青霉素、DNA marker 等购自上海生工生物工程有限公司, 其余试剂为进口或国产分析纯。

表 1 供试材料名称和来源

Tab.1 The name of germplasm and their source

序号 No.	名称 Germplasm name	来源 Source
1	琯溪蜜柚 <i>Citrus maxima</i> cv. Guanximiyou	福建 Fujian, China
2	马家柚 <i>Citrus maxima</i> cv. Majiayou	江西 Jiangxi, China
3	莽山野桔 <i>Citrus mangshanensis</i>	湖南 Hunan, China
4	柠檬 <i>Citrus lemon</i>	江西 Jiangxi, China
5	兴国甜橙 <i>Citrus sinensis</i> . Xingguotiancheng	江西 Jiangxi, China
6	信木柚 <i>Citrus maxima</i> cv. Xinmuyou	广西 Guangxi, China
7	飞龙枳 <i>Poncirus trifoliata</i>	湖北 Hubei, China
8	岭南沙田柚 <i>Citrus maxima</i> cv. Lingnanshatianyou	江西 Jiangxi, China

1.2 方法

1.2.1 叶片总 RNA 提取 采用改进的异硫氰酸胍法^[8]提取幼嫩叶片总 RNA, 用紫外分光光度法检测 OD_{260}/OD_{280} 和 OD_{260}/OD_{230} 值, 并进行电泳检测。

1.2.2 引物设计与合成 根据 GenBank 所报道的拟南芥、南瓜、菜豆、油菜的 GPAT 基因氨基酸的保守序列, 设计 1 对简并引物。上游引物 P1 序列为: 5' - GA [AG] CC [ATCG] TT [CT] GA [CT] TA [CT] TA [CT] - 3', 下游引物 P2 序列为: 5' - CAT [AG] TG [CT] TT [CT] TT [CG] [AT] [AG] TAIAC [AG] [AG] CAIAT - 3'。引物由上海生工生物工程技术有限责任公司合成。

1.2.3 cDNA 克隆及序列分析 取 3 μ L 模板总 RNA, 加 1 μ L Oligo(dT)₁₈ 引物, 加 DEPC 处理过的水

8.5 μL , 70 $^{\circ}\text{C}$ 变性 5 min, 迅速放在冰上 5 min; 然后依次加入 5 \times Reaction Buffer 4 μL , 10 mmol/L dNTP 2 μL , 反转录酶 M-MLV 1 μL , RNase-inhibitor 0.5 μL , 简单离心, 42 $^{\circ}\text{C}$, 1 h; 95 $^{\circ}\text{C}$, 5 min。以该 cDNA 为模板和所设计的简并引物作 RT-PCR 扩增。PCR 反应体系为 50 μL , 其中 10 \times Reaction buffer 5 μL , Mg^{2+} 3 μL , dNTPs (2.5 mmol/L) 1 μL , P1 (10 pmol/ μL) 3 μL , P2 (10 pmol/ μL) 3 μL , cDNA 3 μL , Taq Ex DNA polymerase (5 U/ μL) 1 μL , ddH₂O 31 μL 。PCR 反应程序为: 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min, 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 40 s, 50 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 90 s, 扩增 40 个循环后, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 7 min。RT-PCR 产物经 15 g/L 的琼脂糖电泳后, 切下目的片段, 经回收纯化后与 pMD18-T 载体连接, 转化 DH5 α 大肠杆菌中, 在 LB/Amp/IPTG/X-gal 平板上筛选阳性克隆, 然后随机挑选经 *EcoR* I 和 *Pst* I 酶切确认的重组质粒, 送上海生工生物技术工程服务有限公司测序。将所测的序列结果在 NCBI 网站上通过 Blast n 和 Blast p 进行序列的相似性分析, 用 DNASTar5.0 软件进行序列的比较分析。

2 结果和分析

2.1 基因片段克隆产物分析

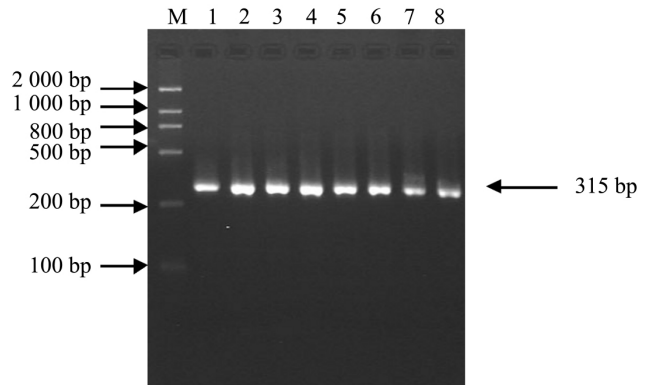
以反转录合成的 8 种柑橘类植物 cDNA 为模板, 经 RT-PCR 扩增后分别得到约 315 bp 的特异性条带 (图 1), 经分析初步认为可能为所要克隆的目的基因片段, 从左至右依次命名为 1、2、3、4、5、6、7、8, 再经过 *EcoR* I 和 *Pst* I 双酶切鉴定后, 证实了 8 个片段为所要克隆的柑橘类植物 GPAT 基因片段 (图 2)。

2.2 克隆片段序列分析

测序结果及其序列分析结果表明: 本研究中所克隆到的 8 种柑橘类植物 GPAT 基因片段的 cDNA 序列长度均为 315 bp, 编码 105 个氨基酸, 克隆所得序列均已成功提交 GenBank, 登录号依次为: DQ193956 (琯溪蜜柚)、DQ193957 (马家柚)、DQ193958 (莽山野橘)、DQ193959 (柠檬)、DQ193960 (兴国甜橙)、DQ193961 (信木柚)、DQ193962 (飞龙枳)、DQ193963 (岭南沙田柚)。

使用 DNASTar5.0 将本试验所得到的序列与其它植物的 GPAT 基因序列进行比较 (表 2)。结果表明, 柑橘类植物 GPAT 基因的核苷酸序列与其它植物 GPAT 基因的核苷酸序列的同源性较高, 与蚕豆、非洲油棕榈、辣椒、番茄、红花、黄瓜、豌豆、菜豆、南瓜的同源性分别为 80.0%、80.3%、79.7%、77.8%、81.3%、72.5%、76.4%、75.6% 和 73.2%, 与温州蜜柑的同源性高达 98.4%。

本试验所得的 8 个基因片段的氨基酸

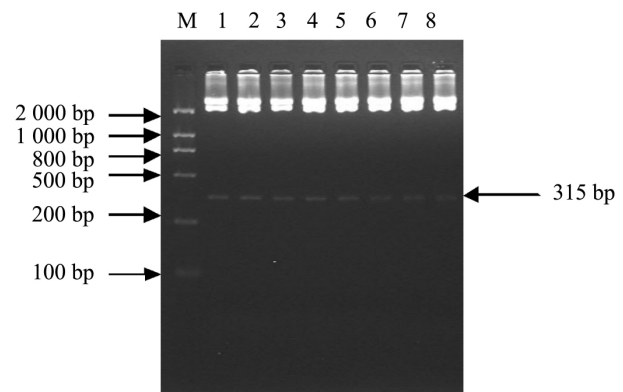


M: marker; 1. 琯溪蜜柚; 2. 马家柚; 3. 莽山野橘; 4. 柠檬; 5. 兴国甜橙; 6. 信木柚; 7. 飞龙枳; 8. 岭南沙田柚。

M: marker; 1. *Citrus maxima* cv. Guanximiyou; 2. *Citrus maxima* cv. Majiayou; 3. *Citrus mangshanensis*; 4. *Citrus lemon*; 5. *Citrus sinensis*. Xingguotiancheng; 6. *Citrus maxima* cv. Xinmuyou; 7. *Poncirus trifoliata*; 8. *Citrus maxima* cv. Lingnanshatianyou.

图 1 GPAT 基因片段的 PCR 产物电泳结果 (Marker 为 2000 bp Marker)

Fig. 1 PCR product of GPAT gene documents



M: marker; 1. 琯溪蜜柚; 2. 马家柚; 3. 莽山野橘; 4. 柠檬; 5. 兴国甜橙; 6. 信木柚; 7. 飞龙枳; 8. 岭南沙田柚。

M: marker; 1. *Citrus maxima* cv. Guanximiyou; 2. *Citrus maxima* cv. Majiayou; 3. *Citrus mangshanensis*; 4. *Citrus lemon*; 5. *Citrus sinensis*; Xingguotiancheng; 6. *Citrus maxima* cv. Xinmuyou; 7. *Poncirus trifoliata*; 8. *Citrus maxima* cv. Lingnanshatianyou.

图 2 重组质粒的酶切电泳检测结果 (Marker 为 2000 bp Marker)

Fig. 2 Detection by *EcoR*I and *Pst*I digestion for recombinant plasmid

序列之间的同源性高达 95.2% ~ 100% ,说明柑橘类植物间 GPAT 基因在氨基酸水平上的同源性相当高。与温州蜜柑、芥菜、辣椒、红花、豌豆、菠菜的同源性分别为 97.2% ,68.9% ,80.2% ,79.25% ,80.2% ,78.3% 。

表 2 试验所得序列与其他植物 GPAT 基因的同源性

Tab. 2 Nucleotide sequences of cloning similarity to other species GPAT gene

基因登录号 Accession No.	物种 Species	碱基同源性/% Identity	E 值 E - Value
L33841	红花 <i>Carthamus tinctorius</i>	81.3	2E - 36
Y00771	南瓜 <i>Cucurbita moschata</i>	73.2	4E - 09
AF251795	非洲油棕榈 <i>Elaeis guineensis</i>	80.3	9E - 29
AY318749	辣椒 <i>Capsicum annum</i>	79.7	6E - 27
AF090734	蚕豆 <i>Vicia faba</i>	80.0	6E - 27
X59041	豌豆 <i>Pisum sativum</i>	76.4	9E - 26
X79722	菜豆 <i>Phaseolus vulgaris</i>	75.6	5E - 21
AY360170	番茄 <i>Lycopersicon esculentum</i>	77.8	5E - 15
M80571	黄瓜 <i>Cucumis sativus</i>	72.5	2E - 14
AB076608	温州蜜柑 <i>Citrus unshiu</i>	98.4	3E - 164

2.3 GPAT 基因片段 SNP 分析

运用 DAMBE 软件 对所克隆的序列进行 SNP 分析 ,分别找出了不同位点之间的碱基和所翻译的氨基酸序列间的差异 结果显示:在每个品种长度为 315 bp 的序列中有 14 个单核苷酸位点发生变异 ,导致了 6 个氨基酸位点产生变异 ,多态性频率为 1SNP/22.5 bp ,如表 3、表 4 所示。其中 ,第 46、第 49、第

表 3 GPAT 基因片段单核苷酸变异

Tab. 3 Variation of single nucleotides in the segment of GPAT gene

样品名称 Sample name	单核苷酸变异位点 Variational site of single nucleotides													
	3	12	45	46	49	112	168	169	257	300	301	302	306	309
岭南沙田柚 <i>Citrus maxima</i> cv. Lingnanshatianyou	G	C	T	T	G	A	T	A	T	C	T	C	A	G
飞龙枳 <i>Poncirus trifoliata</i>	G	C	T	T	G	A	T	A	T	C	T	C	A	G
马家柚 <i>Citrus maxima</i> cv. Majiayou	A	T	T	T	G	A	T	A	T	C	A	C	A	A
信木柚 <i>Citrus maxima</i> cv. Xinmuyou	G	C	T	T	G	A	T	A	T	T	T	G	A	A
琯溪蜜柚 <i>Citrus maxima</i> cv. Guanximiyou	G	C	T	T	G	G	T	A	T	C	A	C	G	G
莽山野桔 <i>Citrus mangshanensis</i>	G	C	C	T	G	A	G	G	T	C	T	C	A	A
柠檬 <i>Citrus lemon</i>	G	C	T	G	A	A	T	A	C	C	T	C	A	G
兴国甜橙 <i>Citrus sinensis</i> Xingguotiancheng	G	T	T	T	G	A	T	A	T	C	T	C	A	A

112、第 169、第 257、第 302 个位点的单核苷酸变异引起了 6 个氨基酸位点的不同,分别是第 16 位点:L 亮氨酸、V 缬氨酸;第 17 位点:V 缬氨酸、I 异亮氨酸;第 38 位点:D 天冬氨酸、N 天冬酰胺;第 57 位点:I 异亮氨酸、V 缬氨酸;第 86 位点:P 脯氨酸、L 亮氨酸;第 101 位点:S 丝氨酸、C 半胱氨酸、T 苏氨酸。

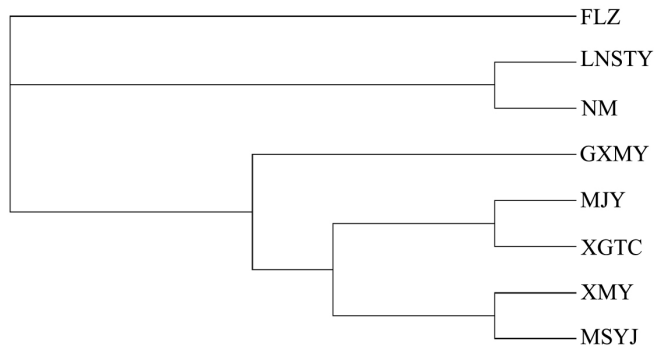
表 4 GPAT 基因片段氨基酸变异

Tab.4 Variation of amino acids in the segment of GPAT gene

样品名称 Sample name	氨基酸变异位点 Variational site of amino acids					
	16	17	38	57	86	101
岭南沙田柚 <i>Citrus maxima</i> cv. Lingnanshatianyou	L	V	N	I	L	S
飞龙枳 <i>Poncirus trifoliata</i>	L	V	N	I	L	S
马家柚 <i>Citrus maxima</i> cv. Majiayou	L	V	N	I	L	T
信木柚 <i>Citrus maxima</i> cv. Ximmuyou	L	V	N	I	L	C
琯溪蜜柚 <i>Citrus maxima</i> cv. Guanximiyou	L	V	D	I	L	T
莽山野桔 <i>Citrus mangshanensis</i>	L	V	N	V	L	S
柠檬 <i>Citrus lemon</i>	V	I	N	I	P	S
兴国甜橙 <i>Citrus sinensis</i> Xingguotiancheng	L	V	N	I	L	S

2.4 克隆基因片段的遗传多样性分析

使用 DAMBE 生物统计软件,以莽山野橘为外类群,对克隆所得的 8 个 GPAT 基因片段序列采用 NJ 聚类法进行聚类分析,结果显示:莽山野橘单独为一类;岭南沙田柚和柠檬归为一类;琯溪蜜柚、马家柚、兴国甜橙、信木柚归为一大类。



From top to bottom there are *Poncirus trifoliata*, *Citrus maxima* cv. Lingnanshatianyou, *Citrus lemon*, *Citrus maxima* cv. Guanximiyou, *Citrus maxima* cv. Majiayou, *Citrus sinensis*, Xingguotiancheng, *Citrus maxima* cv. Ximmuyou, *Citrus mangshanensis*.

图 3 NJ - 聚类分析图

Fig. 3 NJ - cluster and analysis

从上到下依次为:飞龙枳、岭南沙田柚、柠檬、琯溪蜜柚、马家柚、兴国甜橙、信木柚、莽山野桔。

3 讨 论

(1)从 GPAT 基因同源性分析比较的结果来看,该基因具有种属特异性。不同科植物的 GPAT 基因变异程度较大;同科属植物间高度保守,如,柑橘类植物中温州蜜柑与克隆所得 8 个序列的核苷酸同源性高达 98.9%。

(2)8 种柑橘类植物 GPAT 基因核心片段的 SNP 变异位点和所对应的氨基酸变异位点,揭示了该基因在柑橘类植物间的多态性。14 个核苷酸变异位点共导致了 6 个氨基酸变异位点,都是由于三联体密码的第 3 个密码子发生变异,导致相应编码的氨基酸发生变异,表明了第 3 个密码子承受着比前两个密码子更大的选择压力,与众多学者的研

究^[9-10]结果相符。

(3) SNP 是目前最为精确的分子标记技术^[11],其分辨率可达到单碱基,具有位点丰富、遗传稳定性高、结果客观化等优点,可以对亲缘关系较近的近缘种,甚至不同基因型的品种实行精确的遗传多样性研究。刘勇等^[12-13]采用 AFLP 和 SSR 分子标记技术对 110 份柚类和 12 份近缘种进行遗传多样性研究,岭南沙田柚、琯溪蜜柚、马家柚和信木柚归为一类,没有分开,而实际上,上述品种的基因核苷酸序列是有细微差别的。Germano 等^[14]通过分析云杉种间 SNP,鉴定出 3 个近缘种间的多态性;Kota 等^[15]对大麦 7 个基因型 180 个 EST 位点进行 SNP 研究,发现了 72 个 SNP 位点,并把它们用于大麦亲缘关系研究。此外,SNP 存在于整个基因组中,在任何重要基因座或邻近区,比其它类型分子标记能提供更多的特殊性标记,可以更直接、快捷地用于分子育种^[16]。

参考文献:

- [1] Frentzen M, Neuberger M, Joyard J, et al. Intraorganelle localization and substrate specificities of the mitochondrial acyl-CoA:sn-glycerol-3-phosphate O-acetyl-transferase and acyl-CoA:1-acyl-sn-glycerol-3-phosphate O-acetyl-transferase from potato tubers and pea leaves [J]. *Eur J Biochem*, 1990, 69(1): 395-402.
- [2] 唐慧, 陈善娜, 鄢波, 等. 兵豆甘油-3-磷酸酰基转移酶基因克隆和序列分析及蛋白质二级结构的预测 [J]. *云南植物研究* 2004, 26(5): 559-562.
- [3] 陈娜, 郭尚敬, 颜坤, 等. 甜椒甘油-3-磷酸酰基转移酶基因的克隆与表达分析 [J]. *园艺学报* 2005, 32(5): 823-827.
- [4] Nishida I, Murata N. Chilling sensitivity in plants and cyanobacteria: The crucial contribution of membrane lipids [J]. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 1996, 47(5): 541-568.
- [5] Bhilla R S, Mackenzie S L. Nucleotide sequence of a cDNA from *Carthamus tinctorius* encoding a glycer-3-phosphate acyl-transferase [J]. *Plant Physiol*, 1994, 106(12): 1713-1714.
- [6] Ataka M, Katoh E, Wakayama N I. Magnetic orientation as a tool to study the initial stage of Crystallization of Lysozyme [J]. *Crystal Growth*, 1997, 173(8): 592-596.
- [7] 吴波, 刘勇. 新干特早柚 GPAT 基因 5' 端克隆及序列分析 [J]. *江西农业大学学报* 2009, 31(5): 915-918.
- [8] 曹庆芹, 谌谋华, 伊华林, 等. 柑橘及近缘属总 RNA 的有效提取 [J]. *果树学报* 2005, 22(4): 426-427.
- [9] Grocock, Russell J, Sharp, et al. Synonymous codon usage in *Pseudomonas aeruginosa* PA01 [J]. *Gene* 2002, 289: 131-139.
- [10] Thomas P D, Kejariwal A. Coding single-nucleotide polymorphisms associated with complex vs. mendelian disease: evolutionary evidence for differences in molecular effects [J]. *PANS* 2004, 101: 15398-15403.
- [11] 杜春芳, 刘惠民, 李润植, 等. 单核苷酸多态性在作物遗传及改良中的应用 [J]. *遗传* 2003, 25(6): 735-739.
- [12] 刘勇, 孙中海, 刘德春, 等. 柚类种质资源 AFLP 和 SSR 遗传多样性分析 [J]. *中国农业科学* 2005, 38(11): 2308-2315.
- [13] 刘勇, 吴波, 刘德春, 等. 江西柑橘地方品种资源及野生近缘种 SSR 分子标记 [J]. *江西农业大学学报* 2005, 27(4): 486-490.
- [14] Germano J, Klein A S. Species specific nuclear and chloroplast single nucleotide polymorphism to distinguish *Picea glauca*, *P. mariana* and *P. rubens* [J]. *Theor Appl Genet*, 1999, 99: 37-49.
- [15] Kota R, Varsheny R K, Thiel T, et al. Generation and comparison of EST-derived SSRs and SNPs in barley (*Hordeum vulgare* L.) [J]. *Hereditas* 2001, 135: 145-151.
- [16] Khlestkina E K, Salina E A. SNP markers: methods of analysis, ways of development and comparison on an example of common wheat [J]. *Russian Journal of Genetics* 2006, 42(6): 585-594.