

沙田柚 *RNase-like* 基因的克隆及序列分析

刘玉洁, 郭丹妮, 张 渝, 覃信梅, 李惠敏, 秦新民

(广西师范大学 生命科学学院, 珍稀濒危动植物生态与环境保护省部共建教育部重点实验室, 广西 桂林 541004)

摘 要:以沙田柚自交和异交花柱为试材, 采用高通量测序技术对其进行转录组测序。通过差异分析得到 *RNase-like* 贮藏蛋白的基因序列, 并研究了其理化性质。结果表明: 该基因全长 1 048 bp (GenBank 登录号为 KR363153), 开放阅读框 (ORF) 全长为 693 bp, 共编码 230 个氨基酸, 编码的蛋白质的分子量为 25.82 kDa, 理论等电点为 5.30, 含有核苷酸结合的保守区域, 属于 *RNase-T2* 超家族成员。该蛋白为疏水性蛋白, 可能的磷酸化位点共有 15 个。氨基酸序列同源性分析表明, 该基因编码的氨基酸与甜橙和克莱门柚的同源性均为 99%。系统进化树显示沙田柚 *RNase-like* 贮藏蛋白基因与甜橙、克莱门柚的亲缘关系较近, 属于同一进化分支。

关键词:沙田柚; *RNase-like* 基因; 序列分析

中图分类号:S 666.303.6 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2015)24-0070-05

植物的自交不亲和性 (self-incompatibility, SI) 是指植物能够产生正常功能的雌雄配子, 但是雌蕊的柱头或花柱能够特异性地识别自体或相同基因型的异体花粉, 并抑制其萌发或生长的一种现象。这种现象广泛存在于被子植物中, 对于被子植物有性繁殖过程中的遗传改良及保持杂种优势有极其重要的作用。因此, 阐明自交不亲和的分子机理对于植物生殖学和培育无籽品种方面具有重要的理论和应用价值^[1]。

近年来, 植物自交不亲和的研究取得了较大进展^[2-3], 如调节花粉的特异性的识别, 花粉管的定向生长等的蛋白表现了多样化^[4]。在茄科、蔷薇科、车前草科, 自交不亲和物种利用细胞外的 S-RNase 阻止花粉管的生长^[5]。此外, CARUSO 等^[6]还发现了 F-box 蛋白、Ca²⁺ 调节蛋白等与自交不亲和有关联的蛋白质。

沙田柚属于配子体高度自交不亲和果树。目前, 沙田柚自交不亲和在蛋白质化学、细胞学和形态学方面有了一些进展, 确定了沙田柚的自交不亲和类型为配子体

自交不亲和^[7], 自交花粉管在花柱中生长的受阻位置在 1/2 处^[8], 沙田柚自交花柱特异蛋白的分子量、等电点和 N-末端氨基酸序列的测定^[9-10]。秦新民等^[11]还对沙田柚花粉管特异蛋白进行了分离和鉴定。同时, 花柱通道细胞中的特异蛋白^[12]和花粉管中的特异蛋白的产生部位及分布也得到确定^[13-14]。

为了研究沙田柚自交不亲和的机理, 课题组对沙田柚自交和异交花柱进行了转录组测序, 通过自交和异交花柱差异基因的比对, 获得了沙田柚 *RNase-like* 贮藏蛋白基因, 并对该基因编码的蛋白质进行了生物化学特征分析, 旨在为深入研究沙田柚自交不亲和分子机理提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试沙田柚取自广西灵川县潮田乡大山口村果园 10 年生结果树。取盛花期人工自交 (沙田柚 × 沙田柚) 授粉和异交授粉 (酸柚 × 沙田柚) 后 1~3 d 的花柱, 及当天开花的未授粉的花柱为试材, 立即于液氮中速冻, 并保存在 -80℃ 超低温冰箱。

1.2 试验方法

1.2.1 RNA 的提取 建库及测序 RNA 的提取按改良 Trizol 法^[15]进行, RNA 检测合格后交由深圳华大基因科技服务有限公司建库测序, 每样品产生 8 Gb clean data (资料另文发表)。首先用带有 Oligo (dT) 的磁珠富集 mRNA, 然后将 mRNA 随机打断成片段, 以这些 RNA

第一作者简介:刘玉洁 (1990-), 女, 硕士研究生, 研究方向为植物生殖生理。E-mail: 2510965486@qq.com.

责任作者:秦新民 (1956-), 男, 博士, 教授, 现主要从事植物分子生物学等研究工作。E-mail: xmain@mailbox.gxnu.edu.cn.

基金项目:国家自然科学基金资助项目 (31360477); 广西教育厅资助项目 (2013YB036)。

收稿日期:2015-08-04

片段为模板,用随机引物合成第 1 条 cDNA 链,然后加入缓冲液、dNTPs、RNase H 和 DNA polymerase I 合成第 2 条 cDNA 链。cDNA 经过试剂盒纯化并加 EB 缓冲液洗脱之后做末端修复、加 poly(A)并连接测序接头,然后用琼脂糖凝胶电泳检测文库插入片段大小,最后进行 PCR 扩增,制备好的文库用 Illumina HiSeq™ 2000 进行测序。

1.2.2 序列分析和系统树构建 使用 DNAMAN、SWISS-MODEL、NetPhos 2.0、TMPRED、Finder 等软件对测序所得序列进行序列及蛋白质理化性质分析。基于氨基酸

序列 *RNase-like* 贮藏蛋白基因的系统进化树用 DNAMAN 软件进行构树。

2 结果与分析

2.1 基因的生物信息学分析

沙田柚 *RNase-like* 贮藏蛋白(Unigene2441_All)的全长序列 1 048 bp(GenBank 登录号为 KR363153),使用 NCBI 网站的 NCBI ORF Finder 和生物信息学软件 DNAMAN 进行分析,该序列包含 1 个 693 bp 的开放阅读框(ORF),编码 230 个氨基酸(图 1)。

```

GGAAACTCTTACAAGGCTTCTTCTATACATAGATACATTCAAAACCATTGTCGATCTCCC
TCCCAAAAAATTAATATTGATTTTACTATTGGCACTTTGAGAATTATGGAGTGCAAGCGCC
                                     M E C K R
AGTTTTCAATAATCTTGATCAAACTTTTCTTCATTGATATCTATCAGTTCTTTGTGCTG
Q F S I I L I K L F F I Q Y L S V L C A
CCCGGAACCTTCGATTTCTTCTACTTTGCTGCGAGTGCCAGGATCATACTGTGATACAG
A R N F D F F Y F V L Q W P G S Y C D T
CGAAGAGTTGCTGCTATCCAACGACTGGAAAGCCAGCAGCAGATTTCGGGATTTCATGGAC
A K S C C Y P T T G K P A A D F G I H G
TCTGGCCTAATTACAACGACGGCTCCTATCCATCCAACCTGTGACCCCAATGCCCTTTTCG
L W P N Y N D G S Y P S N C D P N A P F
ATCAATCCCAGATATCAGACCTGCGAAGCAGCATGCTAAAGAACTGGCCAACACTGGCTT
D Q S Q I S D L R S S M L K N W P T L A
GCCCCAAGCGGGAATGGCATAACATTTTGGTCCCATGAATGGGAGAAACACGGCACTTGCT
C P S G N G I T F W S H E W E K H G T C
CTGAGTCTGTGCTTAACCAACATCAGTACTTTCAAAACAGCTCTTAACCTGAAAAATCAAA
S E S V L N Q H Q Y F Q T A L N L K N Q
TCAATCTCCTCAAGCTCTCAGAACCGCAGGAATAGTGCCTGACGGGAGTTCGTACAGCT
I N L L Q A L R T A G I V P D G S S Y S
TGGAAGCATCAAGGATGCGATCAAAGAAGCAAGTGGGTTGAGTCCATGGATAGAGTGCA
L E S I K D A I K E A S G F S P W I E C
ATGTTGATGAATCAGGCAACAGCCAGCTTTATCAGATTTACTTGTGTGTCGACACTTCTG
N V D E S G N S Q L Y Q I Y L C V D T S
CCTCTAAGTTCATCAACTGCCCGTCTTTCCCAACGGCAAAAAATGTGGATCCCAGATTG
A S N F I N C P V F P N G K K C G S Q I
AGTTTCCTCCGTTTTAGTGATCAAGGATCAATAATCAACGTGTGTGATTAATTTCTTCA
E F P P F *
CCATGTTAAGCTGATTCAATTTCACTTTTTTATTATTATCATCAATCTCATATTGTTCTA
CCAACTAGTTGCTCAAGTAATTATTTCTAGCCAGTAGCCGTTAAGGTGGTAATGGCTT
CTTTTATTTGATGTTCAAATTGAATTGCTTGCAAGTTATTGTCTTCTCAAACCTAGATAT
AAAGTTTATGGATGGTCCTACGCTCCA

```

图 1 *RNase-like* 贮藏蛋白基因序列和推测的氨基酸序列

Fig. 1 Nucleotide sequence of *RNase-like* storage protein gene and the deduced amino acid sequence

2.2 编码蛋白质的分析和疏水性预测

在线软件(<http://web.expasy.org/protparam/>)分析表明,该基因编码的蛋白质分子量(MW)为 25.82 kDa,等电点 pI 为 5.30。该蛋白质带负电荷的氨基酸(Asp+Glu)总数为 20,带正电荷的氨基酸(Arg+Lys)总数为 15;分子式为 $C_{1164}H_{1726}N_{296}O_{344}S_{14}$;不稳定系数为 43.40,属于不稳定性的蛋白质。

蛋白质序列的疏水性用 DNAMAN 软件分析,从图 2 可以看出,所编码的肽链中疏水性最大值约为 3.13,最小值约为 -2.89,平均值是 0.12,属于疏水性蛋白。

2.3 功能结构域分析

将编码的氨基酸序列用 NCBI 的 Conserved Domain Architecture Retrieval Tool 分析,发现该蛋白质具有 1

个与核酶 T2 (RNase T2)蛋白相同的保守 CAS 结构域(图 3)。

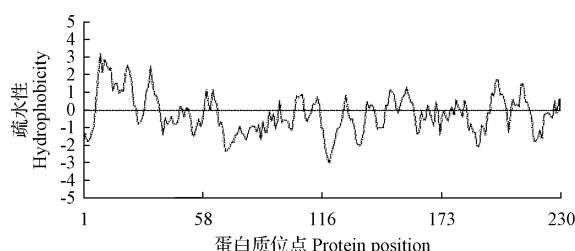
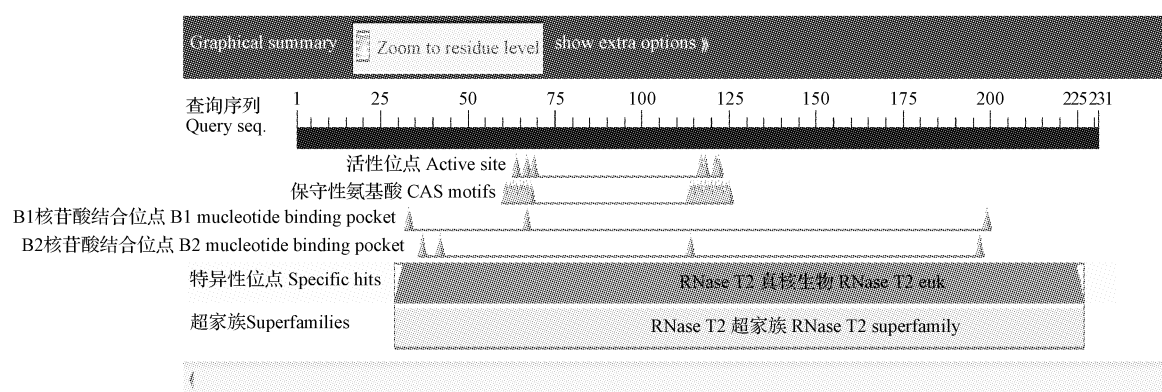


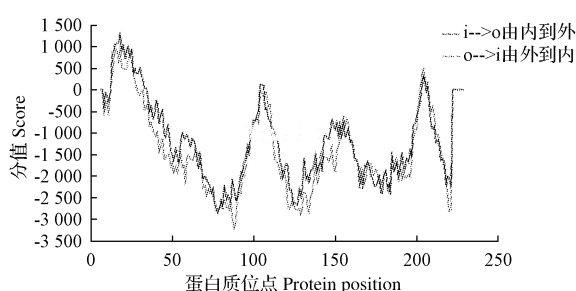
图 2 沙田柚 *RNase-like* 贮藏蛋白疏水性分析

Fig. 2 Hydrophobicity analysing of *RNase-like* storage protein in *Citrus grandis* var. *Shatinyu*

图3 *RNase-like* 贮藏蛋白保守结构域Fig. 3 Conserved domains of *RNase-like* storage protein

2.4 跨膜预测

运用跨膜蛋白数据库 TMbase (http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED_form.html) 预测该蛋白的跨膜区域。从图4可知,此蛋白共有5个跨膜区,其中9~27、97~116、197~213位氨基酸的跨膜方向为由内向外,分值分别为1 323、141、323。而11~27、195~215位氨基酸的跨膜方向为由外到内,分值分别为1 003和531。

图4 沙田柚 *RNase-like* 贮藏蛋白的跨膜区预测Fig. 4 Result of TMpred prediction on *RNase-like* storage protein of *Citrus grandis* var. *Shatinyu*

2.5 蛋白质磷酸化预测

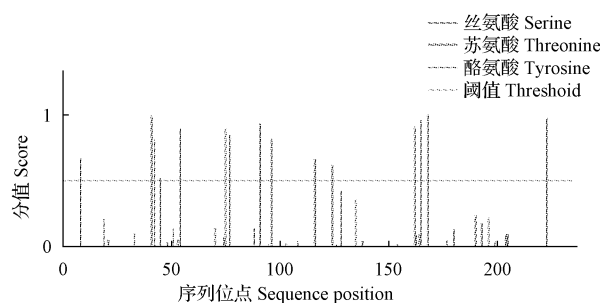
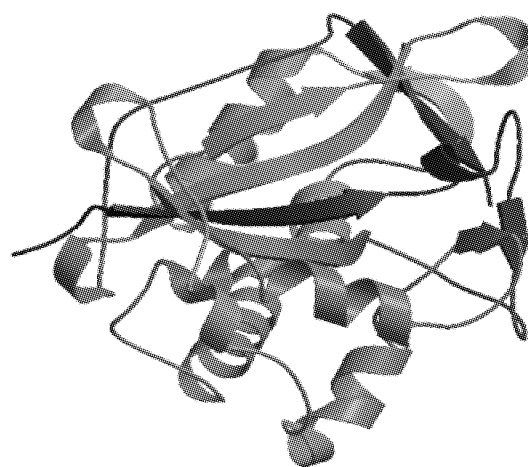
通过在线蛋白磷酸化位点预测分析软件 Net Phos 2.0 Server,对 *RNase-like* 贮藏蛋白基因所编译的蛋白进行预测。从图5可以看出,该多肽链分值在0.5以上的可能磷酸化位点共有15个。其中丝氨酸(Ser)可能的磷酸化位点共有10个,分别位于肽链的8、41、77、91、96、116、162、165、168、223位;苏氨酸(Thr)可能的磷酸化位点有3个,分别位于45、54、124位;酪氨酸的磷酸化位点有2个,位于42、75位。

2.6 蛋白质二级结构及三级结构预测

通过在线分析软件 Predict Protein (<http://www.predictprotein.org/>)对 *RNase-like* 贮藏蛋白二级结构进行预测, α -螺旋、 β -折叠和无规则卷曲, α -螺旋所占比例为27.83%, β -折叠所占比例为10.87%,无规则卷曲所占比

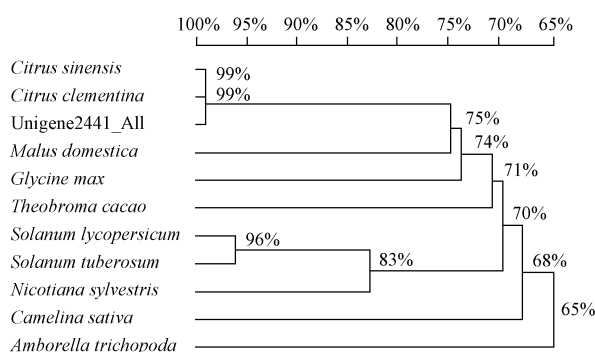
例为61.30%。

利用 SWISS-MODEL 工具对该蛋白三级结构进行在线预测。图6表明,该蛋白的三级结构含有5个 α -螺旋,6个 β -折叠,其间由无规则卷曲连接。

图5 *RNase-like* 贮藏蛋白氨基酸序列翻译后的磷酸化修饰预测图6 *RNase-like* 贮藏蛋白的三级结构Fig. 6 The tertiary structure of *RNase-like* storage protein

2.7 同源性分析

从 GenBank 数据库中下载其它植物的 *RNase-like* 贮藏蛋白基因编码的氨基酸进行同源性分析,沙田柚 *RNase-like* 贮藏蛋白基因编码的氨基酸序列与甜橙 (*Citrus sinensis*, XP_006469367) 和 克 莱 门 柚 (*Citrus clementina*, XP_006438697) 的同源性均为 99%。在此基础上,下载了 10 种植物的 *RNase-like* 贮藏蛋白序列构建了系统树,结果表明沙田柚 *RNase-like* 贮藏蛋白基因编码蛋白与芸香科的甜橙 (*Citrus sinensis*, XP_006469367) 和 克 莱 门 柚 (*Citrus clementina*, XP_006438697) 的亲缘关系很近,属于同一进化分支(图 7)。



注: *Citrus sinensis* (甜橙, XP_006469367); *Citrus clementina* (克莱门柚, XP_006438697); Unigene2441_All (沙田柚, KR363153); *Malus domestica* (苹果, XP_008389461); *Glycine max* (大豆, XP_003518732); *Theobroma cacao* (可可, XP_007046081); *Solanum lycopersicum* (番茄, NP_001234195); *Solanum tuberosum* (马铃薯, XP_006355102); *Nicotiana sylvestris* (烟草, XP_009793100); *Camelina sativa* (亚麻, XP_010425075); *Amborella trichopoda* (无油樟, XP_006827258)。

图 7 基于氨基酸序列的 *RNase-like* 贮藏蛋白系统发育树

Fig. 7 Phylogenetic tree based on amino acid sequences of *RNase-like* storage protein

3 讨论

氨基酸序列同源性分析表明,该试验所克隆的沙田柚基因(Unigene2441_All)与甜橙和克莱门柚的 *RNase-like* 贮藏蛋白的同源性均为 99%,表明 Unigene2441_All 是 *RNase-like* 贮藏蛋白基因。通过对该基因编码蛋白的功能结构域分析,发现该蛋白具有 1 个与核酸酶 T2 蛋白相同的保守 CAS 结构域。核酸酶 T2 通常具有保守的活性位点(CAS)区域 CASI 和 CASII,表现一致性的氨基酸序列特征:F/WTL/IHGLWP 和 FWXHEWXXKHGTC。将 *RNase-like* 贮藏蛋白基因与 T2 核酸酶保守的活性位点进行比对,CASI 区一位保守的氨基酸残基苯丙氨酸(F),二位的色氨酸(W),三位的苏氨酸(T)分别被替换为了酪氨酸(Y)、苯丙氨酸(F)、缬氨酸(V);而 CASII 区的保守活性位点完全一致。

核酸酶 T2 高度保守^[16],存在于几乎所有的生物中,包括植物、动物、真菌、细菌、及病毒等^[17-19]。植物核

酸酶 T2 在叶片衰老过程中表达,也会在受伤或病毒入侵时应激表达^[20]。*RNase* T2 包含多种种类的 *RNase*^[21],其中 S-*RNase* 基因就参与植物的自交不亲和反应,能够作为植物自花花粉的选择性细胞毒素,防止自花授粉^[22]。沙田柚为配子体自交不亲和果树,该试验获得的 *RNase-like* 贮藏蛋白基因在沙田柚自交不亲和反应中的功能有待进一步证实。

参考文献

- [1] 黄绍西,彭宏祥,朱建华,等. 沙田柚雌蕊自交不亲和基因之间的调控机理研究[J]. 中国园艺文摘,2013,29(11):5-6.
- [2] 胡彬,蒋建雄,易自力. 植物配子体自交不亲和机制研究进展[J]. 中国农学通报,2012,28(18):168-173.
- [3] 张雪梅,李保国,齐国辉. 植物雌蕊与花粉自交不亲和的研究进展[J]. 北方园艺,2011(10):185-187.
- [4] DISTEFANO G, CARUSO M, LA MALFA S, et al. Histological and molecular analysis of pollen-pistil interaction in clementine[J]. Plant Cell Reports, 2009, 28(9):1439-1451.
- [5] KUBO K, ENTANI T, TAKARA A, et al. Collaborative non-self recognition system in S-*RNase*-based self-incompatibility[J]. Science, 2010, 330(6005):796-799.
- [6] CARUSO M, MERELLO P, DISTEFANO G, et al. Comparative transcriptome analysis of stylar canal cells identifies novel candidate genes implicated in the self-incompatibility response of *Citrus clementina* [J]. BMC Plant Biology, 2012, 12(1):1491-1509.
- [7] 阳晶. 沙田柚花柱自交不亲和和相关基因的克隆与鉴定[D]. 桂林:广西师范大学,2008.
- [8] 薛妙男,陈腾土. 沙田柚自交和异交亲和性观察[J]. 园艺学报,1995, 22(2):127-132.
- [9] 杨继华,李红艳,薛妙男. 沙田柚花柱 S-糖蛋白分离及鉴定[J]. 广西师范大学学报,2000,18(4):66-70.
- [10] 杨继华,尧桂荣,薛妙男. 沙田柚花柱 S-糖蛋白的纯化和 N-端序列测定[J]. 广西师范大学学报,2001,19(1):72-79.
- [11] 秦新民,李惠敏,薛妙男,等. 沙田柚自交,异交花粉管蛋白的双向电泳分析[J]. 广西植物,2004,24(6):566-569.
- [12] 薛妙男,李义平,张杏辉,等. 沙田柚自交花柱中识别蛋白的免疫金定位[J]. 园艺学报,2001,28(1):59-61.
- [13] 秦新民,莫花浓,万珊,等. 沙田柚花粉管特异蛋白的免疫细胞化学研究[J]. 广西师范大学学报,2008,26(4):113-115.
- [14] 秦新民,莫花浓,石菁萍,等. 沙田柚花粉管 S1-*RNase* 免疫胶体金定位研究[J]. 广西农业科学,2009,40(5):483-485.
- [15] SIMMS D, CIZDZIEL P E, CHOMCZYNSKI P. Trizol: A new reagent for optimal single-step isolation of RNA[J]. Focus, 1993, 15(4):532-535.
- [16] 曾祥然,魏健,贾霖,等. 水稻核糖核酸酶 T2 蛋白质在叶片生长和胁迫过程中的表达研究[J]. 核农学报,2013,27(6):743-749.
- [17] LUHTALA N, PARKER R. T2 Family ribonucleases: ancient enzymes with diverse roles[J]. Trends in Biochemical Sciences, 2010, 35(5):253-259.
- [18] IRIE M. Structure-function relationships of acid ribonucleases: lysosomal, vacuolar, and periplasmic enzymes[J]. Pharmacology and Therapeutics, 1999, 81(2):77-89.
- [19] HILLWIG M S, RIZHSKY L, WANG Y, et al. Zebrafish *RNase* T2 genes and the evolution of secretory ribonucleases in animals[J]. BMC Evolutionary Biology, 2009, 9(1):170-284.
- [20] BURT C, HOLLINS T W, NICHOLSON P. Identification of a QTL

conferring seedling and adult plant resistance to eyespot on chromosome 5A of Cappelle-Desprez[J]. Theoretical and Applied Genetics, 2011, 122(1): 119-128.

[21] BARIOLA P A, HOWARD C J, TAYLOR C B, et al. The Arabidopsis-ribonuclease gene RNS1 is tightly controlled in response to phosphate limita-

tion[J]. The Plant Journal, 1994, 6(5): 673-685.

[22] SASSA H, NISHIO T, KOWYAMA Y, et al. Self-incompatibility (S) alleles of the Rosaceae encode members of a distinct class of the T2/S ribonuclease superfamily[J]. Molecular and General Genetics MGG, 1996, 250(5): 547-557.

Cloning and Sequence Analysis of *RNase-like* Gene From *Citrus grandis* var. *Shatinyu* Hort

LIU Yujie, GUO Danni, ZHANG Yu, QIN Xinmei, LI Huimin, QIN Xinmin

(College of Life Science, Guangxi Normal University/Key Laboratory of Ecology of Rare and Endangered Species and Environmental Protection, Guilin, Guangxi 541004)

Abstract: The self-pollinated and cross-pollinated style of *Citrus grandis* var. *Shatinyu* Hort were used as test materials and transcriptome sequenced by high-throughput sequencing technology. The sequence of *RNase-like* storage protein was obtained by differential analysis, what's more, the physical and chemical properties of this protein were studied. The result showed that, the length of this gene (GenBank accession number: KP172529) was 1 048 bp with an open reading frame (ORF) of 693 bp, encoding 290 amino acids with deduced molecular weight of 25.82 kDa, and the theoretical pI value was 5.30. And it belonged to the RNase-T2 superfamily with a conserved region binding the nucleotide. This protein was a hydrophobic protein, and there were 15 phosphorylation sites within the polypeptide chain. The homology analysis of amino acid sequence indicated that the *RNase-like* storage protein shared high homology with *Citrus sinensis* (99%) and *Citrus clementina* (99%). The phylogenetic tree revealed that *RNase-like* gene storage protein showed closer kinship with *Citrus sinensis* and *Citrus clementina*, indicating that they belonged to the same evolutionary branch.

Keywords: *Citrus grandis* var. *Shatinyu* Hort; *RNase-like* gene; sequence analysis

立足黑龙江 辐射全中国 聚焦大农业 促进快发展

2016年《黑龙江农业科学》征订启事

《黑龙江农业科学》是黑龙江省农业科学院主办的综合性科技期刊。是全国优秀期刊、黑龙江省优秀期刊。现已被中国核心期刊(遴选)数据库、中国学术期刊综合评价数据库等多家权威数据库收录。

本刊内容丰富,栏目新颖,信息全面,可读性强。月刊,每月10日出版,国内外公开发行。国内邮发代号14-61,每期定价12.00元,全年144.00元;国外发行代号M8321,每期定价12.00美元,全年144.00美元。

热忱欢迎广大农业科研工作者、农业院校师生、国营农场及农业技术推广人员、管理干部和广大农民群众踊跃订阅。全国各地邮局均可订阅,漏订者可汇款至本刊编辑部补订。汇款写明订购份数、收件人姓名、详细邮寄地址及邮编。

另有合订本珍藏版欢迎订购。2007年合订本每册定价80.00元,2008—2009年合订本每册定价90.00元,2010—2014年合订本150.00元,邮费各10.00元,售完为止。

欢迎投稿

欢迎订阅

欢迎刊登广告

地址:哈尔滨市南岗区学府路368号《黑龙江农业科学》编辑部
电话:0451-86668373

邮编:150086
投稿网址:www.haasep.cn