

# 大豆细胞质 COX II 基因的分离及序列分析

吴丽丽<sup>1,2</sup> 唐月异<sup>1,3</sup> 赵洪锟<sup>1</sup>, 董英山<sup>1</sup>, 李启云<sup>1</sup>, 赵丽梅<sup>1</sup>, 王庆胜<sup>2</sup>

(<sup>1</sup> 吉林省农业科学院, 吉林 长春 130033; <sup>2</sup> 黑龙江省农业科学院佳木斯分院, 黑龙江 佳木斯 154007; <sup>3</sup> 山东省花生研究所, 山东 青岛 266000)

**摘要:** 目前关于细胞质雄性不育的机理研究主要集中在植物线粒体上, 通过参考大豆线粒体细胞色素氧化酶亚基 II (COX II) 基因序列, 合成保守基因引物, 从供试材料中克隆到了 COX II 基因, 对基因序列分析表明: 该基因编码了一个有 280 个氨基酸组成的蛋白, 推测其可能与大豆细胞质不育有关。

**关键词:** 大豆; 细胞质雄性不育; COX II 基因

**中图分类号:** S565.1      **文献标识码:** A      **文章编号:** 1000-9841(2008)06-0933-03

## Isolation and Sequence Analysis of COX II Gene in Soybean Cytoplasm

WU Li-li<sup>1,2</sup>, TANG Yue-yi<sup>1,3</sup>, ZHAO Hong-kun<sup>1</sup>, DONG Ying-shan<sup>1</sup>, LI Qi-yun<sup>1</sup>, ZHAO Li-mei<sup>2</sup>, WANG Qing-sheng<sup>2</sup>

(<sup>1</sup> Jilin Academy of Agricultural Sciences, Changchun 130033, Jilin; <sup>2</sup> Jiamusi Branch of Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Jiamusi 154007, Heilongjiang; <sup>3</sup> Shandong Peanut Research Institute, Qingdao 266000, Shandong, China)

**Abstract:** At present, the research about the mechanism of CMS are all focusing on mitochondrial genome analysis, A pair of primers was designed according to the soybean Mitochondrial cytochrome oxidase subunit II sequence which published in GenBank. The gene was isolated and analysed from the CMS soybean. This gene codes a protein which consisting 280 amino acids, and maybe associated with CMS.

**Key words:** Soybean; Cytoplasmic male sterility (CMS); COX II gene

植物细胞质雄性不育 (cytoplasmic male sterility, CMS) 是植物在有性繁殖过程中不能产生正常可育的雄配子的遗传现象<sup>[1]</sup>。它是一种母性传递的遗传性状, 其遗传方式不符合孟德尔规律。这种现象广泛的存在于开花作物中。目前已在近 200 种植物中发现细胞质雄性不育现象<sup>[2]</sup>。

现有的研究表明, 大多数植物的 CMS 主要与线粒体 DNA (mtDNA) 有关<sup>[3-5]</sup>, 线粒体细胞色素氧化酶亚基 II 基因 (COX II) 是植物呼吸作用中还原氧到水分子的重要的酶系统成员之一。目前, 已经发现玉米、矮牵牛、水稻、小麦、高粱、油菜等细胞质雄性不育系中的 COX I、COX II、COX III、atp6、atp9、atpA 等与线粒体能量代谢相关的基因在基因编码区域、基因组织结构或拷贝数等方面与正常可育保持系有明显差异, 因此推测这些基因可能与细胞质雄性不育有关<sup>[6-8]</sup>。研究旨在推断出 COX II 基因与 CMS 的关系。

### 1 材料与方法

#### 1.1 材料

大豆不育系和保持系是严格的同核异质材料, 分别为 JLCMS1-1A、JLCMS1-1B、JLCMS1-2A、JLCMS1-2B。

菌种: 大肠杆菌 (Escherichia coli) DH5α。

#### 1.2 方法

1.2.1 引物设计 通过参考大豆线粒体细胞色素氧化酶亚基 II 基因 (accession no: X04825) 序列, 合成如下保守基因引物:

PM6F: 5'-gtggaatctccgaacgaac-3'

PM6R: 5'-gcttatgcactcgctgtc-3'

1.2.2 PCR 反应体系及反应程序 大豆线粒体提取方法参照 Douce 等的方法<sup>[9]</sup>, 稍做改动。PCR 反应体系以 Williams 基本反应体系为基础, 采用 25μL 反应体系, 反应在 MyCycler PCR 扩增仪 (BIO-RAD)

上进行。

PCR 反应程序为 94℃ 4 min;94℃ 45 s;57℃ 1 min;72℃ 1.5 min;30 个循环;72℃ 10 min。PCR 扩增产物用 1.2% 的琼脂糖凝胶(含 0.5 μg·mL<sup>-1</sup> 溴化乙锭)电泳分离,并通过 BIO- RAD 公司的 Gel-Doc1000 紫外凝胶成像分析系统照像并记录。

1.2.3 PCR 扩增产物的回收及回收产物的克隆  
采用 SangonUNIQ-10 柱式 DNA 胶回收试剂盒,回收扩增出来的特异 DNA 片段。采用 pMD18-T Vector 载体试剂盒(宝生物公司)并按其操作规程进行。采用热激转化法进行转化,并采用快速碱法提取重组质粒。

1.2.4 重组质粒酶切及 PCR 鉴定 在设计合成引物时,引物的 5' 端加上了 EcoR I 酶切位点,并且在 pMD18-T Vector 的插入位点的两侧各有一个 EcoR I 酶切位点,用 EcoR I 限制性内切酶进行酶切,检测是否插入正确的 DNA 片段。酶切体系为 10 μL: ddH<sub>2</sub>O 7.7 μL;质粒 DNA(40 ng·μL<sup>-1</sup>) 为 1 μL; EcoRI Buffer 为 1 μL; EcoRI (20 U·μL<sup>-1</sup>) 为 0.3 μL。37℃ 酶切 3 h。同时利用扩增所用 PCR 引物,将阳性质粒 DNA 稀释 100 倍进行 PCR 鉴定,PCR 反应体系为 25 μL: 10 × PCR (MgCl<sub>2</sub> 25 mmol·L<sup>-1</sup>) Buffer 为 2.5 μL; dNTPs(2.5 mmol·L<sup>-1</sup>) 为 0.4 μL; PM6 引物 (10 ng·μL<sup>-1</sup>) 为 0.5 μL (each); 质粒 DNA(10 ng·μL<sup>-1</sup>) 为 2 μL; TaqDNA 聚合酶(2U·μL<sup>-1</sup>) 为 0.4 μL; 灭菌超纯水为 19.7 μL。然后经 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测酶切及 PCR 结果。

1.2.5 测序 由上海捷瑞公司进行测序。

## 2 结果与分析

### 2.1 PCR 扩增及电泳检测

以提取的不育系 (JLCMS1-1A、JLCMS1-2A) 和保持系 (JLCMS1-1B、JLCMS1-2B) 线粒体基因组 DNA 为模板,用 PM6F 和 PM6R 引物进行 PCR 扩增,电泳检测如图 1 所示,PCR 扩增在保持系上获得特异的与预期片段大小(1.9 kb 左右)相符的产物。

### 2.2 T-A 克隆、酶切及 PCR 鉴定

将 PCR 回收产物分别与 T-A 克隆载体 pMD18-T 连接、转化,各挑选单菌落 3 个接种培养,提取质粒并电泳检测(1#-6#)(图 2),电泳检测结果显示 1 #,2#,3#,5#,6#可能有目的基因片段插入,为可能的阳性克隆。

EcoR I 酶切检测,克隆载体为 pMD18-T Vector

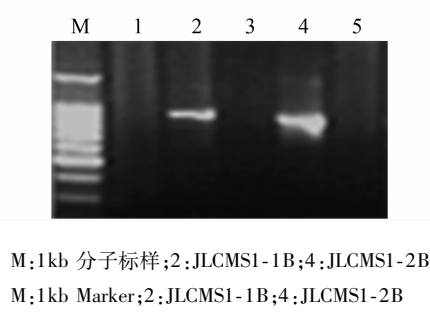


Fig. 1 Electrophoresis analysis of PCR amplification products

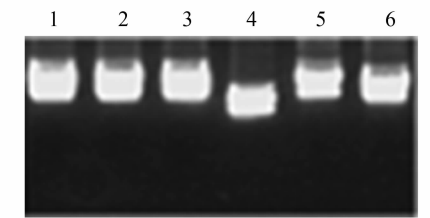


Fig. 2 Electrophoresis analysis of recombination plasmids

的大小为 2 692 bp,插入片段大约为 1 900 bp,单酶切切开的环形质粒大小约为 4 600 bp,如图 3,所得结果与预期一致。PCR 鉴定结果如图 4 所示,所挑选的 5 个克隆都有目的基因片段的插入。

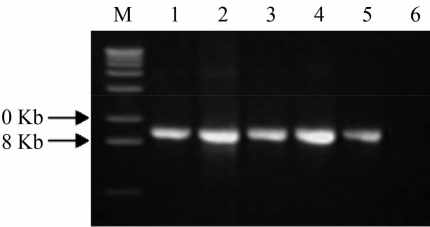


Fig. 3 Digestion analysis of positive clones

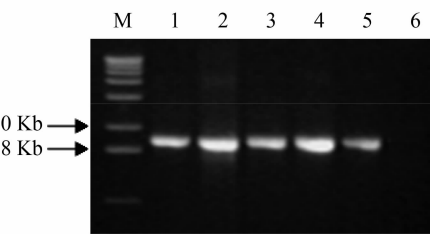


Fig. 4 PCR analysis of positive clones

### 2.3 测序及序列分析

选取 2 号线粒体 DNA 克隆进一步序列测定和

分析,在这里被命名为 MIGMCOII-2。根据测序结果,先用 BlastP 软件从网络公共资源中调出相关同源蛋白序列,采用 ClustalX 软件将同源序列进行多序列匹配排列,通过 Gene Doc 对多序列匹配结果进行校正。结果表明,从供试材料中扩增得到的 *COX*

*II* 基因与以往发表的大豆线粒体胞色素氧化酶亚基 *II* 基因 *MIGMCO II* 的同源性为 99.9%。

根据其基因结构推测,该基因编码了一个由 280 个氨基酸组成的蛋白,在 N-端有一段由 20 个氨基酸组成信号肽序列,21-280Aa 为成熟肽区段(图 5)。

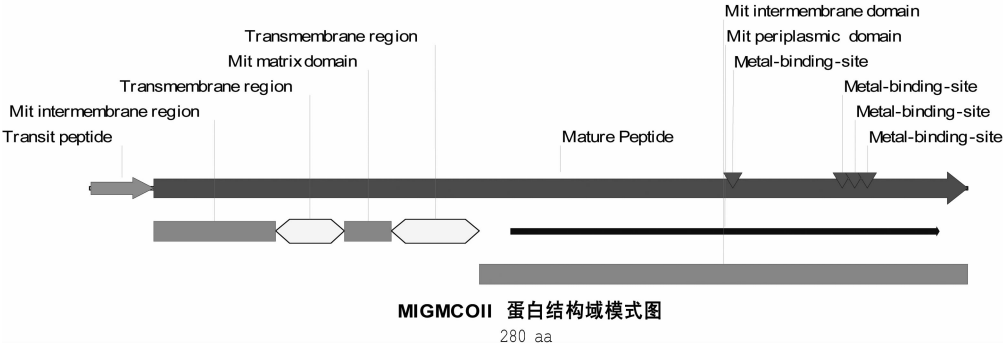


图 5 大豆线粒体胞色素氧化酶亚基 *II* 基因 *MIGMCOII-2* 编码蛋白功能结构域模式图

Fig.5 Functional motif prediction of *MIGMCOII-2*

3 结论与讨论

根据 GenBank 中登陆的 *COXII* 序列,从供试材料中克隆到了 *COXII* 基因序列,通过软件分析,该基因与以往发表的大豆 *COXII* 基因 *MIGMCOII* 的同源性为 99.9%。根据其基因结构推测,该基因编码了一个由 280 个氨基酸组成的蛋白。

由于 *MIGMCOII-2* 基因序列只存在保持系中,这表明该基因可能与大豆细胞质雄性不育有关系,这与在油菜、拟南芥、水稻等细胞质雄性不育基因的报道相一致<sup>[10-11]</sup>,由于细胞质雄性不育在不同物种中并不是非常保守,具体的分子机制非常复杂,有关大豆细胞质雄性不育的分子机理还有待于进一步的线粒体功能基因组学来揭示。

参考文献

[1] 张海艳,于元杰,周玉亮. 植物细胞质雄性不育的生物学研究进展[J]. 山东农业大学学报(自然科学版),2004,35(1):137-141. (Zhang H Y,Yu Y J,Zhou Y L. Studies on biological mechanism of cytoplasmic male sterility in plants[J]. Journal of Shandong Agricultural University ( Nature Science ), 2004, 35 ( 1 ): 137-141. )

[2] Hanson M R. Plant mitochondrial mutation and male sterility[J]. Annual Reviews in Genetics,1991,25:461-486.

[3] 刘良式. 植物分子遗传学(第二版)[M]. 北京:科学出版社,2003:105-117. (Liu L S. Plant molecular genetics [M]. Beijing: Science Press,2003:105-117. )

[4] Lonsdale D M. CytoPlasmie male sterility: a molecular perspective [J]. Plant Physiology and Biochemistry,1987,25(1):265-271.

[5] Kofer W,Glimelius K,Bonnett H T. Modifications of mitoeochondrial DNA cause changes in floral development in homeotic-like mutants oft obacco[J]. Plant Cell,1991,3:759-769.

[6] Dewey R E,Siedow J N,Timothy D H,Levings C S III. A13- kilodalton maize mitochondrial protein in E. coli confer- sensitivity to Bipolarismay distoxin[J]. Science,1988,239:293-295.

[7] Dewey R E,Timothy D H,Levings C S III. Chimeric mitochondrial genes expressed in the C made-sterile cytoplasm of maize[J]. Current Genetics,1991,20(6):475-582.

[8] 孔祥海. 植物细胞质雄性不育分子生物学研究进展[J]. 中国生态农业学报,2004,12(3):35-39. ( Kong X H. Research advance in the molecular biology of cytoplasmic male sterility in plants[J]. Chinese Journal of Eco- Agriculture, 2004, 12 ( 3 ): 35-39. )

[9] Douce R,Christensen E L,Bonner W D. Preparation of intaintact plant mitochondria [J]. Biochim Biophys Acta,1972,275(2):148-160.

[10] 杨剑波,汪秀峰,赵成松,等. 水稻线粒体 DNA 中与雄性不育有关的克隆及序列分析[J]. 遗传学报,2002,29(9):808-813. ( Yang J B,Wang X F,Zhao C S et al. Cloning and sequencing of fragments associated with cytoplasm male sterility of rice[J]. Acta Genetica Sinica,2002,29(9):808-813. )

[11] 贺学勤. 甜菜胞质雄性不育系及其保持系的某些生理特性差异[D]. 内蒙古农业大学,2001. ( He X Q. Some differences of physiological characteristics of cyto plasmic male sterile lines and their maintainer lines in sugarbeet[D]. Inner Mongolia Agtucultural University,2001. )