

DOI: 10.11931/guihaia.gxzw201401009

秦新民, 万珊, 李惠敏, 等. 沙田柚无机焦磷酸酶基因的 cDNA 克隆及序列分析[J]. 广西植物, 2015, 35(6):842—847

Qin XM, Wan S, Li HM, et al. Cloning and sequence analysis of inorganic pyrophosphatase gene from *Citrus grandis* var. *shatianyu* [J]. Guihaia, 2015, 35(6):842—847

沙田柚无机焦磷酸酶基因的 cDNA 克隆及序列分析

秦新民¹, 万珊², 李惠敏¹, 覃屏生¹, 张渝¹

(1. 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; 2. 洛阳理工学院 环境工程与化学系, 河南 洛阳 471023)

摘要: 植物自交不亲和性是植物生殖过程中普遍存在的一种现象, 是植物特异性识别并拒绝自身花粉或亲缘关系很相近的花粉的一种遗传机制。无机焦磷酸酶(inorganic pyrophosphatase, IPPase)在植物生长发育方面起重要作用。该研究根据沙田柚花柱消减文库中 EST 序列(无机焦磷酸酶基因内部片段), 设计了 2 对特异引物 5'-GSP1, 5'-nGSP1, 3'-GSP2 and 3'-nGSP2, 通过 SMART-RACE PCR 技术从所构建的沙田柚花柱抑制性消减文库中克隆了沙田柚无机焦磷酸酶基因的 cDNA 全长序列, 利用 Blastn、DNAMAN 和 ExPasy 软件对所克隆的基因进行同源性分析, 以及基因编码的氨基酸的分子量、等电点、疏水性等理化性质分析。结果表明: IPPase 基因 cDNA 全长为 1 136 bp (GenBank 登录号为 KF990474), 开放阅读框(ORF)全长为 654 bp, 共编码 217 个氨基酸, 包括 170 bp 5'UTR 和 312 bp 的 3'UTR; 编码的蛋白质的分子量为 24.4 kDa, 等电点为 5.96; 蛋白结构域分析显示沙田柚 IPPase 与焦磷酸酶具有相同的保守结构域; 对沙田柚 IPPase 蛋白质序列进行疏水性分析, 结果表明沙田柚 IPPase 基因编码的肽链中疏水性最大值约为 3.21, 最小值约为 -2.98, 属于亲水性蛋白, 无跨膜区域; Blastn 搜索的结果显示, 沙田柚 IPPase 基因序列与多种植物的 IPP 基因高度同源; 序列分析表明, 沙田柚 IPPase 基因核苷酸的同源性为 87%, 氨基酸序列与克莱门柚(*Citrus clementina*)无机焦磷酸酶完全一致。该研究结果可为深入研究无机焦磷酸酶在沙田柚自交不亲和中的作用机理提供基础。

关键词: 沙田柚; 无机焦磷酸酶; 全长 cDNA; 基因克隆; 序列分析

中图分类号: Q943.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2015)06-0842-06

Cloning and sequence analysis of inorganic pyrophosphatase gene from *Citrus grandis* var. *shatianyu*

QIN Xin-Min¹, WAN Shan², LI Hui-Min¹, QIN Ping-Sheng¹, ZHANG Yu¹

(1. College of Life Sciences, Key Laboratory of Ecology of Rare and Endangered Species and Environmental Protection,

Guangxi Normal University, Guilin 541004, China; 2. Department of Environmental Engineering and

Chemistry, Luoyang Institute of Science and Technology, Luoyang 471023, China)

Abstract: Self-incompatibility (SI) is the prevalence of phenomenon in the process of plant reproduction, it is an intraspecific reproductive barrier adopted by angiosperms that allows the pistil to distinguish between self (genetically related) and non-self (genetically unrelated) pollen. Inorganic pyrophosphatase (IPPase) play important roles in regulating the growth and development in plants. In order to better understand the mechanism of IPP gene in the self-incompatibility of *Citrus grandis* var. *shatianyu*, the inorganic pyrophosphatase gene of *C. grandis* var. *shatianyu* was cloned and physicochemical properties of pyrophosphatase were analyzed. The total RNA was isolated from style of

收稿日期: 2014-08-07 修回日期: 2014-10-27

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

作者简介: 秦新民(1956-), 男, 广西灵川人, 教授, 主要从事植物分子生物学等教学与研究, (E-mail) xmqin@mailbox.gxnu.edu.cn。

C. grandis var. *shatianyu* used the total RNA Purification System(Invitrogen) and following the manufacture's protocols. According to the EST sequence(internal fragment of inorganic pyrophosphatase gene) in suppression subtractive hybridization libraries of *C. grandis* var. *shatianyu* style, 4 specific primers 5'-GSP1, 5'-nGSP1, 3'-GSP2 and 3'-nGSP2 were designed for amplifying 3-RACE and 5-RACE of the gene. The full-length sequences of cDNA of inorganic pyrophosphatase gene were obtained from suppression subtractive hybridization libraries of *C. grandis* var. *shatianyu* style by the SMART-RACE PCR method. A comparison of the similarity of the full-length cDNA sequence of the inorganic pyrophosphatase gene was performed in the GenBank database used the BLAST program. DNAMAN software was used for amino acid sequence and homology analysis. Prediction of molecular weight, isoelectric point(pI) and hydrophobicity were performed by using on line software ExpASY and DNAMAN. A 150 bp band in 3-RACE, and a 900 bp band in 5-RACE were cloned by nested and non nested PCR method. For the full-length cDNA sequences, the middle sequence, 3-RACE and 5-RACE sequence of the inorganic pyrophosphatase gene were spliced and formed the full-length cDNA sequences. As a result, the cDNA of inorganic pyrophosphatase was 1 136 bp in length containing an 654 bp open reading frame(ORF), which encoded a protein of 217 amino acids with a 170 bp 5 untranslated region(5' UTR) and a 321 bp 3' UTR. The sequence of the cloned cDNA of the inorganic pyrophosphatase from *C. grandis* var. *shatianyu* was registered in GenBank under the accession No. KF990474. In addition, through the DNAMAN software analysis, the deduced molecular weight of encoded protein of the full-length cDNA sequence was 24.4 kDa and theoretical pI value of 5.96. Protein domain analysis showed that IPPase of *C. grandis* var. *shatianyu* and pyrophosphatase have the same conserved domain. Bioinformatics analysis showed that the IPPase gene was a hydrophilic protein without any signal peptide, has no winded helix structure and transmembrane domain. The full length inorganic pyrophosphatase cDNA from *C. grandis* var. *shatianyu* was cloned and characterized. Blastn search results showed that the sequence of IPP gene of *C. grandis* var. *shatianyu* was highly homologous with IPP gene of variety plants. The homology analysis indicated that *C. grandis* var. *Shatianyu* IPPase gene shared 87% nucleotide sequence homology with *Populus trichocarpa* and *Hevea brasiliensis* IPPase, and 100% amino acid sequence homology with *Citrus clementina* IPPase. The research results would provide the basis for further exploration of the function of inorganic pyrophosphatase in self-incompatibility of *C. grandis* var. *shatianyu*.

Key words: *Citrus grandis* var. *shatianyu*; inorganic pyrophosphatase; full-length cDNA; gene cloning; sequence analysis

自交不亲和性(self-incompatibility, SI)广泛存在于被子植物中。所谓自交不亲和性是植物雌蕊的柱头或花柱可以识别自体或异体花粉,并抑制自体花粉萌发或生长的一种特性,在被子植物的有性生殖过程中自交不亲和性对于避免近亲繁殖有很重要的作用(Takayama *et al.*, 2005)。因此,对自交不亲和性的研究在植物生殖学和杂交优势利用等方面具有重要的理论和应用价值。

沙田柚为广西特产水果之一,属配子体高度自交不亲和果树。目前,关于沙田柚自交不亲和的形态学、细胞学、蛋白质化学等方面的研究取得一定进展,确定了沙田柚自交不亲和性类型、花粉管在花柱中生长的受阻部位为花柱的 1/2 部位(薛妙男等, 1995),用 IEF/SDS-PAGE 双向电泳鉴定出沙田柚花柱特异蛋白,并测定该蛋白的分子量、等电点和 N-末端氨基酸序列(杨继华等, 2001)。秦新民等(2004)对沙田柚花粉管特异蛋白进行了分离和鉴

定。花柱通道细胞中特异蛋白(薛妙男等, 2001)和花粉管中特异蛋白产生的部位及分布(秦新民等, 2009)得到确定。但有关沙田柚配子体自交不亲和的相关基因克隆的研究尚未见报道。为获取沙田柚配子体自交不亲和相关基因,本文在构建沙田柚自交和异交花柱消减文库并获得大量 EST 序列的基础上(秦新民等, 2008),采用 SMART-RACE 技术克隆沙田柚花柱无机焦磷酸酶基因全长 cDNA,并进行生物信息学分析,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 材料

沙田柚采自桂林市雁山文家村果园 10 年生结果树。在盛花期对其样树进行人工自交授粉, 3 d 后收集自交授粉花柱,截取花柱 1/2 部位上下 3

mm 部分立即放入液氮中, -70°C 保存备用。

1.2 引物设计

依据本实验室所构建的沙田柚自交不亲和花柱抑制性消减文库的一条 EST 序列(317 bp), 设计下列引物: 5'-GSP1: 5'-ATACCATCATCCAGTTTCACGGGC-3'; 5'-nGSP1: 5'-GATCAAACGACTACCGCTCAAGC-3'; 3'-GSP2: 5'-ACCTGAGTGATAGATTCGGTTCGTGTG-3'; 3'-nGSP2: 5'-ACGC-CCGTGAAACTGGATGATGGT-3'。

1.3 方法

1.3.1 总 RNA 的提取和 cDNA 第一链的合成 总 RNA 的提取采用 TRIzol 试剂盒(Invitrogen 公司)并参照其操作手册进行。

1.3.2 无机焦磷酸酶基因的 PCR 扩增 按照 SMARTTM RACE cDNA Amplification Kit 说明书中的操作步骤先分别合成 3' 和 5' 端的第一链 cDNA, 作为后续反应的模板; 再分别进行 3' 和 5' 端非嵌套 PCR 和嵌套 PCR, PCR 反应体系及反应程序如下: 非嵌套 PCR(25 μL 体系): 10 $\times$ Bufer 5 μL , 3' 或 5' 端的第一链 cDNA 1 μL , 3' 或 5' 端引物 1 μL , UPM 引物 2.5 μL , dNTP Mix(10 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 0.5 μL , Ex Taq 酶(5 $\text{U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$) 0.2 μL , ddH₂O 15.3 μL , 共计 25 μL 。反应程序为 94 $^{\circ}\text{C}$, 30 s; 72 $^{\circ}\text{C}$, 3 min, 5 个循环; 94 $^{\circ}\text{C}$, 30 s; 70 $^{\circ}\text{C}$, 30 s; 72 $^{\circ}\text{C}$, 3 min, 5 个循环; 94 $^{\circ}\text{C}$, 30 s; 68 $^{\circ}\text{C}$, 30 s; 72 $^{\circ}\text{C}$, 3 min, 27 个循环。

将非嵌套 PCR 产物稀释 50 倍后作为嵌套 PCR 反应的模板。反应体系及程序如下: 嵌套 PCR(25 μL 体系)为 10 $\times$ Bufer 2.5 μL , 50 倍稀释后的非嵌套 PCR 产物 1 μL , 3' 或 5' 端巢式引物 0.5 μL , NUP 引物 0.5 μL , dNTPmix(10 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ each) 0.5 μL , Ex Taq 酶(5 $\text{U}/\mu\text{L}$) 0.2 μL , ddH₂O 19.8 μL , 共计 25 μL 。反应程序为 94 $^{\circ}\text{C}$, 4 min; (94 $^{\circ}\text{C}$, 30 s; 65 $^{\circ}\text{C}$, 30 s; 72 $^{\circ}\text{C}$, 1 min), 25 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$, 10 min。取 3 μL 嵌套 PCR 产物 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测, 其余 PCR 产物按 QIAquick PCR Purification Kit 凝胶回收试剂盒说明书进行。DNA 回收纯化将 ADC 的 3'、5' 端 PCR 产物回收纯化后连接到 pMD19-T Vector 中, 涂板(LB+Amp)过夜培养后进行菌落 PCR, 挑选阳性克隆送上海生工测序。

1.3.3 拼接 cDNA 序列的全长序列的生物信息学分析 根据得到的 5' 和 3' 片段以及已知的 EST 序列, 拼接出无机焦磷酸酶基因全长 cDNA 序列, 登陆

NCBI 网站(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)将得到的全长序列用 BLAST 软件搜索, 进行同源性分析。运用 NCBI ORF Finder 来查找序列的开放性阅读框(ORF)。运用软件 DNAMAN 和 ExPasy 对序列分析并对氨基酸序列进行结构的预测。

2 结果与分析

2.1 总 RNA 的提取

紫外分光光度计检测总 RNA 在波长 260 nm、280 nm 处的吸光值, 得出 A_{260}/A_{280} 的比值在 1.9~2.0 之间, 说明所提取的总 RNA 纯度较高。1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测, 总 RNA 的 28S rRNA、18S rRNA 两条带清晰锐利, 前者较后者的亮度比为 2:1(图 1), 表明总 RNA 未出现降解, 完整性较好。

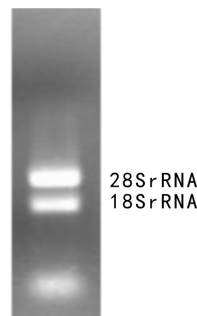


图 1 沙田柚自交花柱总 RNA 电泳图
Fig. 1 Electrophoretogram of total RNA of self-pollinated style in *Citrus grandis* var. *shatianyu*

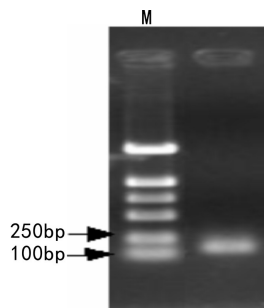


图 2 IPP 基因 3'RACE 扩增结果
M. DNA 分子量标记(DL-2000), 下同。
Fig. 2 Result of IPP 3'RACE amplification
M. DNA Marker DL-2000, the same below.

2.2 无机焦磷酸酶基因的 3'RACE 和 5'RACE 结果

按照 1.3.2 所述的非嵌套和嵌套 PCR 方法, 获得了酶 3' 和 5' 的 RACE 嵌套产物, 并用 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测(图 2, 图 3)。从图 2 和图 3 可以看

出,无机焦磷酸酶基因的 3'和 5'RACE 嵌套产物的序列长度约 150 bp 和 900 bp。

2.3 拼接和全长基因的生物信息学分析

2.3.1 全长 cDNA 分析 将测序得到的 5'RACE 和 3'RACE 的片段与已知 EST 序列拼接到了无机焦磷酸酶基因全长 cDNA 序列,使用 NCBI 网站上的 NCBI ORF Finder 和生物信息学软件 DNAMAN 进行分析,该序列全长 1 136 bp (GenBank 登录号为 KF990474),包含 1 个 654 bp 的开放阅读框 (ORF),编码 217 个氨基酸,同时包括 170 bp 5'UTR

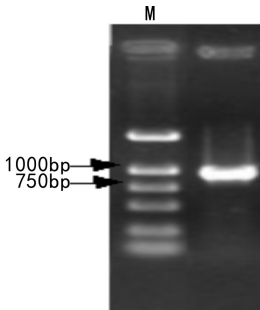


图 3 IPP 基因 5'RACE 扩增结果
Fig. 3 Result of IPP 5'RACE amplification



图 4 IPP 基因 cDNA 序列和推测的氨基酸序列 起始密码(ATG)和终止密码(TAG)用下划线表示。
Fig. 4 Nucleotide sequence of IPP cDNA and the deduced amino acid sequence
The start codon(ATG) and the stop codon(TAG) were single-underlined.

和 312 bp 的 3'UTR(图 4)。

2.3.2 同源性分析 Blastn 的结果显示,沙田柚 IPP 基因与多种植物的无机焦磷酸酶基因 (inorganic pyrophosphatase) 的核苷酸序列高度同源,包括毛果杨(*Populus trichocarpa*)87%,橡胶树 (*Hevea brasiliensis*) 87%,葡萄 (*Vitis vinifera*)

86%。Blastx 结果显示,与克莱门柚 (*Citrus clementina*)推测为无机焦磷酸酶的氨基酸序列完全一致,与橡胶树预测是无机焦磷酸酶的氨基酸序列同源性为 93%、与毛果杨 91%、蓖麻 (*Ricinus communis*)91%、葡萄 88%。由此推测该基因为沙田柚无机焦磷酸酶(图 5)。将编码的氨基酸序列在

C. shatinyu	-----MMAPP IETSSKTPVSQPPAHPPLNERILSSMSRRSVA AHPWHDLE	50
C. clementina	-----MMAPP IETSSKTPVSQPPAHPPLNERILSSMSRRSVA AHPWHDLE	
H. brasiliensis	-----MVPP IETPDKTHVSKQSSHPPLNERILSSMTRRSVA AHPWHDLE	
R. communis	MLEVADMVQPIETPNKAPVTKQSSHPPLNERI ISSMSRRTVA AHPWHDLE	
P. trichocarpa	-----MAPPIETPSKLPISRHSSHPPLNERILSSMNRRSVA AHPWHDLE	
V. vinifera	-----MAPPIETPNKALNSHQSHHPPLNERILSSMTRRAVA AHPWHDLE	
	*. ***,. * : : *****; **, **: *****	
C. shatinyu	IGPGAPKIFNCVIEIGKGSKVKYELDKKSG LIMVDRVLYSSVVYPHNYGF	100
C. clementina	IGPGAPKIFNCVIEIGKGSKVKYELDKKSG LIMVDRVLYSSVVYPHNYGF	
H. brasiliensis	IGPGAPKIFNCVIEIGKGSKVKYELDKKTG LIKVDRLVLYSSVVYPHNYGF	
R. communis	IGPGAPKIFNCVVEIGKGSKVKYELDKKSG LIKVDRLVLYSSVVYPHNYGF	
P. trichocarpa	IGPEAPKIFNCVVEIGKGGKVKYELDKKTG LIKVDRLVLYSSVVYPHNYGF	
V. vinifera	IGPGAPTIFNCVVEIGKGSKVKYELDKKTG LIKVDRLVLYSSVVYPHNYGF	
	*** **, *****; *****, *****; *** *****	
C. shatinyu	IPRTL CEDNDPLDVLII MQEPVLP GCFLRAKAIGLMP MIDQGEKDDKIIA	150
C. clementina	IPRTL CEDNDPLDVLII MQEPVLP GCFLRAKAIGLMP MIDQGEKDDKIIA	
H. brasiliensis	IPRTL CEDNDPLDVLII MQEPVLP GCFLRAKAIGVMP MIDQGEKDDKIIA	
R. communis	IPRTL CEDSDPLDVLII MQEPVLP GCFLRAKAIGLMP MIDQGEKDDKIIA	
P. trichocarpa	IPRTL CEDNDPMDVLII MQEPVLSGCFLRAKAIGLMP MIDQGEKDDKIIA	
V. vinifera	IPRTL CEDNDPMDVLVIMQEPVLP GCFLRAKAIGLMP MIDQGEKDDKIIA	
	*****; **, **; *****; *****; *****; *****	
C. shatinyu	VCADDPEYRHYNDIKELPPHRLAEIRRFEDYKKNENKEVAVNDFLPASD	200
C. clementina	VCADDPEYRHYNDIKELPPHRLAEIRRFEDYKKNENKEVAVNDFLPASD	
H. brasiliensis	VCADDPEYRHYNDIKELPPHRLAEIRRFEDYKKNENEEVAVNDFLPASD	
R. communis	VCADDPEYRDFDDIKELPPHRLAEIRRFEDYKKNENKEVAVNDFLPASD	
P. trichocarpa	VCADDPEYRHYNDIKELPPHRLAEIRRFEDYKKNENKEVAVNDFLPASD	
V. vinifera	VCADDPEYRHYTDINELPPHRLAEIRRFEDYKKNENKEVAVNDFLPSSS	
	*****. : **: *****; *****; *****; *	
C. shatinyu	AYNSVQQSMNLYADYIVESLRR	222
C. clementina	AYNSVQQSMNLYADYIVESLRR	
H. brasiliensis	AYKAVQHSMNLYADYIVESLRR	
R. communis	AYNAVQHSMNLYADYIVESLRR	
P. trichocarpa	AYEAIQHSMNLYADYIVESLRR	
V. vinifera	AYEAIQHSMNLYADYIVESLRR	
	** : : *: *****	

图 5 6 种植物无机焦磷酸酶氨基酸序列比对 1. 沙田柚; 2. 克莱门柚; 3. 橡胶树; 4. 蓖麻; 5. 毛果杨; 6. 葡萄。
Fig. 5 Alignment of amino acid sequences of IPPase from six species of plants 1. *Citrus grandis* var. *shatianyu*;
2. *C. Clementina*; 3. *Hevea brasiliensis*; 4. *Ricinus communis*; 5. *Populus trichocarpa*; 6. *Vitis vinifera*.

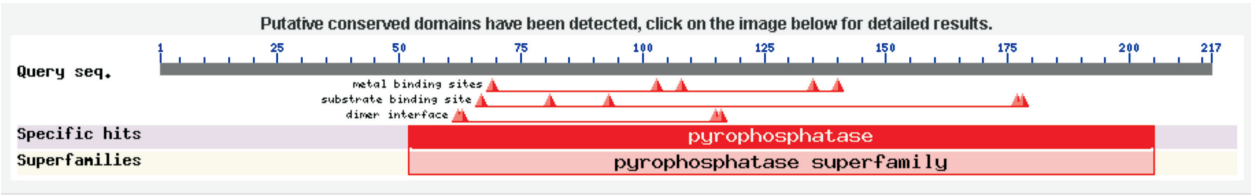


图 6 IPP 基因的保守结构域示意图
Fig. 6 Conserved domains of IPP gene

Blastp 里搜索,发现与焦磷酸酶(Pyrophosphatase, PPase)具有相同保守序列(图 6)。

2.3.3 编码蛋白质的分析和预测 运用 DNAMAN 可 得出,该基因编码的蛋白质分子量(MW)为 24.4 kD,等电点 pI 为 5.96。通过 DNAMAN 对蛋白质序列进行疏水性分析(图 7)。从图 7 可以看出,所编码的肽链

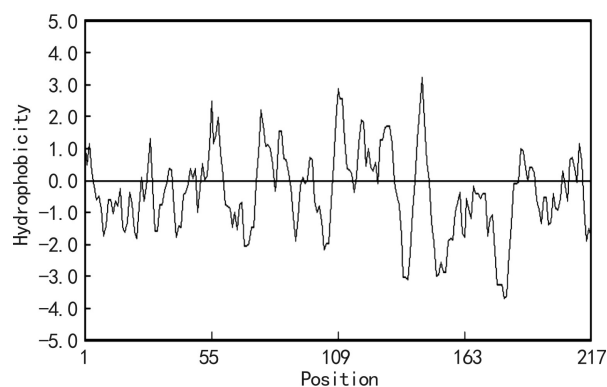


图 7 沙田柚 PPase 蛋白质疏水性分析 横坐标为编码的氨基酸顺序;纵坐标为亲/疏水值;“-”表示亲水性;“+”表示疏水性。

Fig. 7 Hydrophobicity analysing of PPase in *Citrus grandis* var. *shatianyu* Abscissa is the amino acid sequence of the encoded protein; ordinate is the pro-hydrophobic value; “-” represents hydrophilic; “+” refers to hydrophobic.

中疏水性最大值约为 3.21,最小值约为-2.98。用 ExPASy 在线分析软件,预测该蛋白是亲水性蛋白,没有跨膜区域。

3 讨论与结论

无机焦磷酸酶 (inorganic pyrophosphatase, PPase, EC3.6.1.1) 是以焦磷酸 (PPi) 为底物的水解酶,该酶广泛分布于自然界,参与多种代谢途径中所形成的 PPi 的水解,释放能量,为各种生理机制提供能源,调节生物的生长和发育 (Pace *et al.*, 2011; May *et al.*, 2011; Gomez-Garcia *et al.*, 2007)。无机焦磷酸酶参与了植物自交不亲和的作用, Cabrillac *et al.* (2001) 在罂粟属中发现蛋白质磷酸化参与了自交不亲和性反应。在 Ca^{2+} 调解的细胞内信号途径中,有两个花粉蛋白的磷酸化水平增加,一个是 26 kD,一个是 68 kD,命名为 p26、p68。这种磷酸化是 SI 特异性发生,因为它不受亲和 S-蛋白和热变性 S-蛋白的刺激 (Rudd *et al.*, 2003; Ohi *et al.*, 2003)。Rudd *et al.* (1996) 发现自交不亲和反应中, p26 的磷酸化迅速发生,最初在 90 s 内就可观察到,且会伴随自交不亲和作用持续 400 s,导致花粉管尖端生长受到抑制。通过对 p26 磷酸化蛋白基因的克隆和产物特性鉴定显示,它是一个可溶性的无机焦磷酸酶, p26 蛋白与可溶性的无机焦磷酸酶具有高达 80% 的序列同一性,而无机焦磷酸酶是细胞膜和细胞壁合成所需的一个重要的酶,也就是说在自

交不亲和反应中 p26 的磷酸化可能使其焦磷酸酶活性降低或钝化,导致花粉管不能合成生长过程中细胞膜和细胞壁所需要的成分,因此花粉管停止生长 (Sassa *et al.*, 1997)。与 p26 相比, p68 在自交不亲和反应中的磷酸化比较晚,而且不依靠 Ca^{2+} 。但目前对其研究还不是很清楚, p68 的磷酸化可能参与了 SI 信号途径的后期阶段 (Rudd *et al.*, 2003)。Barend *et al.* (2006) 研究结果也证明,抑制罂粟花粉中 sPPase 活性后,花粉管生长也受到严重抑制。

目前,茄科 (Solanaceae)、蔷薇科 (Rosaceae)、罂粟科 (Papaveraceae) 植物的配子体自交不亲和研究取得了较大进展,提出了与 S-核酸酶 (S-RNase) 相关的 GSI 信号转导和与花粉管胞质自由钙离子相关的 GSI 信号转导 2 种假说 (胡彬等, 2012)。沙田柚属芸香科植物,其配子体自交不亲和的分子机制尚未见报道。

无机焦磷酸酶分为两类:一类是存在于细胞浆和细胞器基质中的可溶性酶类,另一类是与膜结合的不可溶性酶类,即膜结合焦磷酸酶。通过对所克隆的沙田柚无机焦磷酸酶蛋白质分析,该蛋白属于亲水性蛋白,没有跨膜区域,与 Cabrillac *et al.* (2001) 在罂粟属植物中发现的 p26 蛋白一样为可溶性无机焦磷酸酶,参与细胞膜和细胞壁合成。推测在沙田柚自交不亲和反应中无机焦磷酸酶磷酸化可能使其焦磷酸酶活性降低或钝化,导致细胞生长过程中细胞膜和细胞壁所需要成分的合成受到影响,从而参与沙田柚自交不亲和性反应。其机理有待今后深入研究。

参考文献:

- Barend HJD, Rudd JJ, Wheeler MJ, *et al.* 2006. Self-incompatibility in *Papaver* targets soluble inorganic pyrophosphatases in pollen [J]. *Nature*, **444** (7 180): 490—493
- Cabrillac D, Cock JM, Dumas C, *et al.* 2001. The S-locus receptor kinase is inhibited by thioredoxins and activated by pollen coat proteins [J]. *Nature*, **410** (6 825): 220—223
- Gómez-García MR, Losada M, Serrano A. 2007. Comparative biochemical and functional studies of family I soluble inorganic pyrophosphatases from photosynthetic bacteria [J]. *FEBS J*, **274** (15): 3 948—3 959
- Gram BH, Rudd JJ, Wheeler MJ. 2006. Self-incompatibility in *Papaver* targets soluble inorganic pyrophosphatases in pollen [J]. *Nature*, **444** (7118): 490—493
- Hu B (胡彬), Jiang JX (蒋建雄), Yi ZL (易自力). 2012. Advances on mechanisms of gametophytic self-incompatibility in plant (植物配子体自交不亲和和机制研究进展) [J]. *Chin Agric Sci Bull* (中国农学通报), **28** (18): 168—173
- May A, Berger S, Hertel T, *et al.* 2011. The *Arabidopsis thaliana* phosphate starvation responsive gene *AtPPase I* encodes a
- (下转第 867 页 Continue on page 867)