

文章编号: 1001-1498(2002)03-0256-05

香石竹 ACC 氧化酶基因的克隆 与植物表达载体构建

余义勋¹, 张俊卫¹, 孙振元², 包满珠¹

(1. 华中农业大学林学系, 武汉 430070; 2. 中国林业科学研究院花卉中心, 北京 100093)

摘要: 根据已发表的 ACC 核苷酸序列, 设计一对引物, 以香石竹品种 'American' 基因组 DNA 为模板, 扩增出香石竹 ACC 氧化酶基因, 将其连接到 pMD18 加 T 质粒载体上, 通过中间载体 pBluescript SK, 构建了 ACC 基因正向和反向插入的植物表达载体, 并将其导入了农杆菌。酶切检测表明该片段已插入表达载体, 序列测定结果显示所克隆基因片段含 3 个外显子, 2 个内含子, 其中 3 个外显子序列与已发表的 ACC 基因 cDNA 序列完全一致。

关键词: 香石竹; ACC 氧化酶; 基因克隆; 测序; 重组载体构建

中图分类号: S722.3

文献标识码: A

香石竹 (*Dianthus caryophyllus* L.) 是世界四大切花之一, 在花卉市场中占有重要地位。就商业观点而言, 瓶插寿命是切花植物品质优劣的主要因素之一。乙烯是高等植物中促进器官衰老和果实成熟的激素。香石竹是典型的乙烯致衰植物, 也是研究乙烯代谢的花卉之一。ACC 氧化酶, 又称乙烯合成酶 (EFE), 是植物乙烯合成途径中的关键酶, 催化乙烯合成的最后一步 (即催化 ACC 生成乙烯)。应用 ACC 氧化酶基因的反义 RNA 技术, 可望有效抑制乙烯生物合成, 从而延长切花植物的瓶插寿命^[1]。目前国外已从番茄 (*Lycopersicon esculentum* Mill.)^[2]、苹果 (*Malus pumila* Mill.)^[3]、豌豆 (*Pisum sativum* Linn.)^[4]、桃 (*Amygdalus persica* L.)^[5]、矮牵牛 (*Petunia hybrida* Vilm.)^[6]、香石竹^[7]、猕猴桃 (*Actinidia* sp.)^[8] 等植物中克隆到 ACC 氧化酶基因 cDNA, 1995 年澳大利亚花卉基因有限公司将香石竹 ACC 氧化酶基因 cDNA 导入香石竹后, 使香石竹花瓣衰老明显延迟^[1], 而在国内利用基因工程获得抗衰老香石竹品种的研究尚未见报道。本研究以香石竹品种 'American' 基因组为模板, 成功地克隆了 ACC 氧化酶基因, 并构建起其正义和反义基因的植物表达载体。

1 材料和方法

1.1 材料

香石竹品种 'American' 组培苗由云南省农科院提供, 大肠杆菌 (*Escherichia coli* (Migula) Castellani and Chalmers) DH5、根癌农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens* (Smith et Townsend) Conn) LBA4404 菌株为本实验室保存, 中间载体 pBluescript SK(+), 二元载体 pMOGMON 为荷兰自由

收稿日期: 2001-12-25

基金项目: 国家自然科学基金 (39970532), 948 项目 (96-04-06) 资助

作者简介: 余义勋 (1973-), 男, 河南新县人, 华中农业大学博士生。

大学馈赠,其余分子生物学试剂均购自华美生物工程公司。

1.2 植物 DNA 的提取和纯化

植物总 DNA 的提取参照张俊卫等^[9]的微量提取法,取 0.2 g 植物叶片,放入 1.5 mL 的离心管中,置液氮中片刻,捣碎组织至粉末状;加入 600 μL 提取缓冲液,65 ℃ 水浴 20 min,中间颠倒 1 次,12 000 r·min⁻¹离心 5 min,上清液转入另一离心管,加等体积氯仿:异戊醇(24:1)抽提,重复抽提 3 次;上清液转入另一离心管,加 0.6 倍体积异丙醇(-20 ℃)放置 30 min,沉淀 DNA;12 000 r·min⁻¹离心 2 min 弃上清,沉淀用 70%酒精漂洗;干燥 DNA,加 100 μL TE 溶解 DNA,并保存于 4 ℃。

1.3 PCR 扩增及其产品的回收

参照 Wang 等^[7]报道的香石竹 ACC 氧化酶基因 cDNA 序列,设计一对引物(由上海博亚生物技术工程公司合成),反应体系和反应条件参照林荣呈等^[10]的做法。PCR 产品用上海生工 DNA 回收试剂盒进行回收。

1.4 目的片段的克隆、酶切分析

将回收的目的 DNA 条带与 pMD18-T 载体连接,转化大肠杆菌 DH5 感受态细胞,在 x-gal/IPTG 培养基上挑取白色菌落,用碱法小批量抽提质粒,并作电泳鉴定和限制性内切酶分析。

1.5 含 ACC 氧化酶基因的中间载体的构建、序列测定和植物重组表达载体构建和鉴定

将含有 ACC 氧化酶基因的 pMD18-T 载体用 Pst I 和 BamH I 双酶切,回收小片段克隆到经 Pst I 和 BamH I 双酶切的 pBluescript SK(+)载体上,并对该重组载体进行测序。将含有 ACC 氧化酶基因的 pBluescript SK(+)载体用 EcoR I 和 BamH I 双酶切,回收小片段克隆到经 EcoR I 和 BamH I 双酶切的 pMOGMON 载体(含 35S 启动子的二元表达载体)上,构建成正义植物表达载体。将含有 ACC 氧化酶基因的 pBluescript SK(+)载体用 EcoR I 和 Xba I 酶切回收小片段克隆到经 EcoR I 和 Xba I 双酶切的 pMOGMON 载体上,构建反义植物表达载体,如图 1。

1.6 含 ACC 氧化酶基因的植物重组表达载体转化根癌农杆菌

用碱法大量制备质粒 DNA,经 RNase 消化 RNA,然后用氯仿:异戊醇(24:1)抽提 3 次,上清液转入另一离心管,加 0.6 倍体积异丙醇(-20 ℃)放置 30 min,沉淀 DNA;12 000 r·min⁻¹离心 2 min 弃上清,沉淀用 70%酒精漂洗;干燥 DNA,加 50 μL TE 溶解 DNA,用冻融法导入根癌农杆菌。

2 结果

2.1 PCR 产物的克隆、酶切分析和序列测定

ACC 氧化酶基因已在番茄^[2]、桃^[5]、苹果^[3]、矮牵牛^[6]、香石竹^[7]等植物上有报道,不同植物 ACC 氧化酶基因氨基酸同源性在 70%

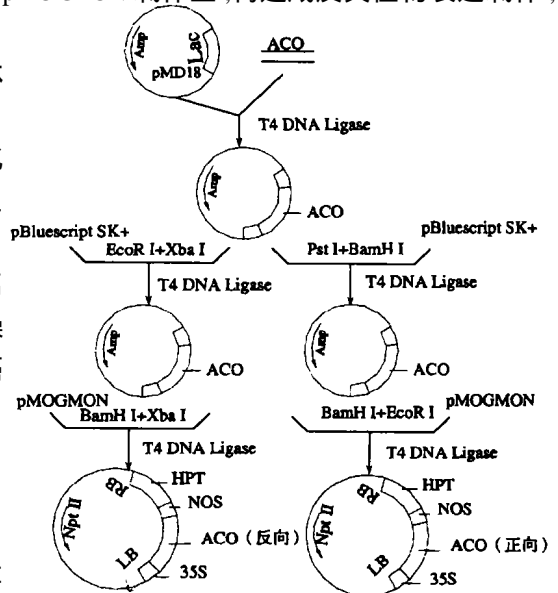


图 1 含 ACO 基因的植物重组表达载体的构建

左右。根据 Wang 等^[7]报道的 'White' 香石竹品种 ACC 氧化酶基因 cDNA 序列,设计一对特异引物,5' > GCAAACATTGTCAACTTCCC < 3' 和 5' > TCAAAGCA GTTGAATGGGAC < 3',以 'American' 香石竹品种基因组 DNA 为模板进行 PCR,扩增出一长度约为 1.2 kb 的片段,将该片段克隆到 pMD18-T 载体上,初步筛选到 5 个插入片段在 1.2 kb 左右的克隆,对其中一个克隆 pMD4 进行酶切鉴定、PCR 分析。pMD4 经 Pst 和 BamH 双酶切后与用 Pst 和 BamH 双酶切的 pBluescrip SK(+) 载体,定名为 pBS-ACO1。对 pBS-ACO1 的酶切和 PCR 分析表明:PCR 片段已插入 pBluescrip SK(+) 载体中。

```

CTACAAATCTACAAATACATGAAATTTGTTAAATTAACGAAACAATGGCAAACATTGTCAAACCTCCCTATCA
                                     GCAAACATTGTCAAACCTCCCTATCA
TTGACATGGAGAAGCTCAATAATTATAATGGTGTGGAGGAGTCTTGTGTTGGACCAAATTAAGGATGC
TTGACATGGAGAAGCTCAATAATTATAATGGTGTGGAGGAGTCTTGTGTTGGACCAAATTAAGGATGC
TTGTCACAACTGGGGATTCCTCCAGGT
TTGTCACAACTGGGGATTCCTCCAGGTAATCATCATCATCATCATCATCATCATCGTCGTAATAAT

AGTAACAATACCAAGTAATCTATATAATATATGACGAAATGTATGTATGATATATATGATGGATTAT
GGTGAACCATAGTTTGTACACATGAACTGATGGACAAAGTGGAGAGGATGACA
TGGACATGCATGCAGGTGGTGAACCATAGTTTGTACACATGAACTGATGGACAAAGTGGAGAGGATGACA
AAAGAGCATTACAAGAAAATTCAGGGAGCAAAAAGTTCAAAGACATGGTTCAGACCAAAGGTTTAGTGTCTG
AAAGAGCATTACAAGAAAATTCAGGGAGCAAAAAGTTCAAAGACATGGTTCAGACCAAAGGTTTAGTGTCTG
CTGAGTCTCAAGTCAATGACATTTGATTTGGGAGAGCACCTTCTACCTTCGTCATCTCCCACCTCCAACAT
CTGAGTCTCAAGTCAATGACATTTGATTTGGGAGAGCACCTTCTACCTTCGTCATCTCCCACCTCCAACAT
CTCCGAGGTCCCTGATCTCGACGACCAATACAGGAAGTTGATGAAGGAGTTTCAGCCAGATTGAGAGG
CTCCGAGGTCCCTGATCTCGACGACCAATACAGGAAGTTGATGAAGGAGTTTCAGCCAGATTGAGAGG
TTATCNCGAGCAACTGTTGGACTTGTATGTGAGAACCTTGGCCTTGAGAAAGGCTACCTTAAGAATGCC
TTATCNCGAGCAACTGTTGGACTTGTATGTGAGAACCTTGGCCTTGAGAAAGGCTACCTTAAGAATGCC
TTCTATGGTGCCAATGGCCCCACTTTTGGTACCAAGGTCAGCAACTACCCGCCTTGCCCCAACCCCGACC
TTCTATGGTGCCAATGGCCCCACTTTTGGTACCAAGGTCAGCAACTACCCGCCTTGCCCCAACCCCGACC
TTATCAAAGGACTTAGGGCCACACCGAGCCTGGTGGCATCTCTCTGTTCCAGGACGACAAAGGTCAG
TTATCAAAGGACTTAGGGCCACACCGAGCCTGGTGGCATCTCTCTGTTCCAGGACGACAAAGGTCAG
CGCCCTCCAGCTCCTCAAGGATGGTCAATGGGTTGATGTTCTCCATGAAACATCCATTGTTGTGTTAAC
CGCCCTCCAGCTCCTCAAGGATGGTCAATGGGTTGATGTTCTCCATGAAACATCCATTGTTGTGTTAAC
TTGGGGGACCAACTTG
TTGGGGGACCAACTTGAGGTATGACATGAATACAGAAATAGGTTACTCCGAAATTAGAAGCCGCCTCCGA
                                     AGGTTATTA
CTAATATGAATGATATGAATCATAATATATGACGCATTTATTTATTTTACGTGTTTAGGTTATTA
CAAATGGCAAGTACAAGAGTGTGATGCACCGCGTGATAGCGCAGACAGATGGTAACAGGATGTCGATAGC
CAAATGGCAAGTACAAGAGTGTGATGCACCGCGTGATAGCGCAGACAGATGGTAACAGGATGTCGATAGC
ATCATTTCAACCCCGGAAGTGTGATGCCGTGATTTACCCGCGCCAAACATTTGGTGGAAAAAGAAGAGGAG
ATCATTTCAACCCCGGAAGTGTGATGCCGTGATTTACCCGCGCCAAACATTTGGTGGAAAAAGAAGAGGAG
AAATGCAGAGCATACCCAAAATTTGTGTTTCGAGGATTAATGAATCTCTACTTAAAGCTCAAGTTCCAAG
AAATGCAGAGCATACCCAAAATTTGTGTTTCGAGGATTAATGAATCTCTACTTAAAGCTCAAGTTCCAAG
AGAAGGAGCCAGGTTTGAAGCAATGAAGGCCATGGAAACCACGGGTCCCATTTCCAACCTGCTTGA
AGAAGGAGCCAGGTTTGAAGCAATGAAGGCCATGGAAACCACGGGTCCCATTTCCAACCTGCTTGAATAA
TGATTTGATAATAAGCAATGCTTCTCATCAACCAATTTAAGTATTTCTAABATACGCCACTCTCATCTCATAT
ATTATATTTATATTTAGTGTGTTATGAAATAAGAGCTTCCCTTTAAGTATGATTTGTTAATGTAATGTTCCATGTC
TATGGATTTGATGGTCTACATAAATACGGAGTATTCATTCAAATTACAATAATTTATCCCTTAAAAA

```

第 1 行为已发表的香石竹 ACO cDNA 序列,第 2 行为测序结果。划横线部分为引物序列,划波纹线部分为内含子。

图 2 测序结果与已发表的香石竹 ACO 基因 cDNA 序列比较

对重组载体 pBS-ACO1 中插入片段的序列测定(图 2)表明:所克隆片段全长 1 205 bp(含引物)含 3 个外显子,2 个内含子,外显子全长 953 bp 内含子全长 242 bp,外显子部分与 Wang 等^[7]所报道的 cDNA 序列完全一致。

2.2 植物重组表达载体构建和鉴定

pBS-ACO1 经 EcoR 和 BamH 双酶切后的较小片段回收插入经 EcoR 和 BamH 双酶切的 pMOGMON 载体上,为正义植物表达载体,定名为 pMACO1。pBS-ACO1 经 EcoR 和 Xba 双酶切后的较小片段回收插入经 EcoR 和 Xba 双酶切的 pMOGMON 载体上,为反义植物表达载体,定名为 pMACO2。两重组表达载体都经酶切鉴定、PCR 分析。

2.3 根癌农杆菌的转化与鉴定

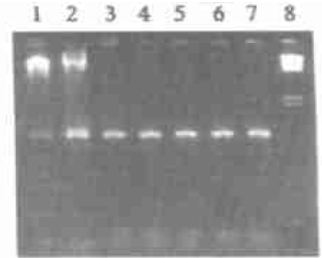
用冻融法将正义和反义重组表达载体转化到根癌农杆菌中,分别得到 10 多个转化子。以根癌农杆菌中纯化的质粒为模板,用 ACC 氧化酶基因的特异引物进行 PCR,结果表明:大多数转化子的 DNA 中均能扩增出与 ACC 氧化酶基因片段大小相同的片段,而阴性对照未能扩增出相应条带,如图 3。

3 讨论

乙烯在高等植物中的合成途径为:MET(蛋氨酸)-SAM(腺苷蛋氨酸)-ACC-乙烯,ACC 氧化酶催化 ACC 生成乙烯。最新研究表明,IAA 能够促进乙烯产量的增加是通过乙烯自身诱导了 ACC 氧化酶基因的转录,ACC 氧化酶可能也是乙烯合成的一个限速酶^[11],利用 ACC 氧化酶基因反义 RNA 技术抑制乙烯合成已先后在番茄^[2]和香石竹^[1]上获得成功。另外,根据同源依赖性基因沉默(HDCS)原理,导入正义基因和反义基因均可实现内源基因沉默^[12]。最近,Angel^[13]和 Hamilton^[14]等的研究表明,重复 DNA 片段能够引起内源基因 100% 的转录后沉默(Posttranscriptional silence)频率,为转基因沉默内源基因提供了更加高效的方法。目前,正义和反义基因转化香石竹以及重复基因的载体构建工作正在进行之中。

参考文献:

- [1] Savin KL, Baidotte S C, Graham M W, et al. Antisense ACC oxidase RNA delays carnation petal senescence [J]. Hortscience, 1995, 30(5): 970-972
- [2] Hamilton A J, Lyett G W, Grierson D, et al. Antisense gene that inhibit synthesis of hormone ethylene in transgenic plants [J]. Nature, 1990, 346(6281): 284-287
- [3] Dong J G, Olaon D, Silverstone A. Sequence of a cDNA coding for a 1-aminocyclopropae-1-carboxylate oxidase homolog from apple fruit [J]. Plant Physiol, 1992, 98(4): 1530
- [4] Perk S C, Olson D C, Kende H. A cDNA sequence encoding 1-aminocyclopropae-1-carboxylate oxidase from pea[J]. Plant Physiol, 1993, 101(2): 689-690



1. EcoR + BamH 酶切 pMACO1; 2. EcoR + Xba 酶切 pMACO2; 3. 以 pMACO1 为模板 PCR 扩增; 4. 以 pMACO2 为模板 PCR 扩增; 5、6. 以根癌农杆菌转化子为模板 PCR 扩增; 7. 以香石竹基因组为模板 PCR 扩增; 8. DNA/ Hind III 分子量标记。

图 3 pMACO1 和 pMACO2 的酶切和 PCR 鉴定

- [5] Callahan A M, Morgens P H, Wright P, et al. Comparison of pch313(pTOM13homolog) RNA accumulation during fruit softening and wounding of two phenotypically different peach cultivars[J]. *Plant Physiol*, 1992, 100(1): 482-488
- [6] Tang X Y, Wang H, Brandt A S, et al. Organization and structure of the ACC oxidase gene family from *petunia hybrida* [J]. *Plant Mol Biol*, 1993, 23(6): 1151-1164
- [7] Wang H, William R W. A flower senescence-related mRNA from carnation shares sequence similarity with fruit-related mRNA involved in ethylene biosynthesis [J]. *Plant Physiol*, 1991, 96(3): 1000-1001
- [8] Colin W B, Macdiarmid, Richard C. A cDNA sequence from kiwifruit homologous to 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid oxidase[J]. *Plant Physiol*, 1993, 101(3): 691-692
- [9] 张俊卫. 梅栽培品种及梅近源种的 RAPD 初步分析[D]. 武汉: 华中农业大学, 1998
- [10] 林荣呈. 根癌农杆菌介导的香石竹遗传转化研究 [D]. 武汉: 华中农业大学, 1999
- [11] Balague C, Watson C F, Turner A J. Isolation of a ripening and wound-induced cDNA from *Cucumis melo* L. Encoding a protein with homology to the ethylene-forming enzyme[J]. *Eur J Biochem*, 1993, 212(2): 27-34
- [12] Gallie D R. Controlling gene expression in transgenics [J]. *Current Opinon in Plant Biology*, 1998, 1(2): 166-172
- [13] Angel S M, Baulcombe D C. Consistent gene silencing in transgenic plants expressing a replicating potato virus X RNA[J]. *EMBO J*, 1997, 16(12): 3675-3684
- [14] Hamilton A J, Brown S, Yuanhai H, et al. A transgene with repeated DNA causes high frequency, post-transcriptional suppression of ACC-oxidase gene expression in tomato [J]. *Plant J*, 1998, 15(6): 737-746

Cloning of ACC Oxidase Gene of Carnation and Construction of Its Plant Expression Vectors

YU Yi-xun¹, ZHANG Jun-wei¹, SUN Zhen-yuan², BAO Man-zhu¹

(1. Central China Agricultural University, Wuhan 430070, Hubei, China; 2. Flower Center, CAF, Beijing 100091, China)

Abstract: A pair of primers were designed according to the 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) oxidase gene of carnation and the primers were used to amplify the genomic DNA fragment of about 1.2 kb by polymerase chain reaction (PCR) by taking genome DNA from 'American' carnation leaves as template. The PCR product was cloned into T-tailing pMD18 vector. Sequencing indicated that the ACC oxidase gene included three exons interrupted by 2 introns with identical positions as they are in tomato. ACC oxidase gene were respectively cloned into plant expression vector pMOGMON in sense and antisense orientation. Recombinant expression vectors were identified by restriction enzyme and PCR analysis. PCR indicated plant expression vectors were transferred into *A. tumefaciens*.

Key words: carnation (*Dianthus caryophyllus* L.); ACC oxidase gene; cloning; sequencing; construction of plant expression vector