

甜瓜品种河套蜜瓜 ACC 氧化酶基因 1(*ACO1*) 全长 cDNA 的克隆及序列分析

郝金凤,高峰,博彦泰,李凤,哈斯阿古拉

(内蒙古大学 生命科学院生物工程中心,内蒙古自治区牧草与特色作物生物技术重点实验室,内蒙古 呼和浩特 010021)

摘要: 根据 GenBank 上登录的甜瓜 ACC 氧化酶基因 1 (*Cm-ACO1*) 序列,设计特异性引物,应用 RT-PCR 从甜瓜品种河套蜜瓜成熟果实中克隆得到了 *ACO1* 的全长 cDNA,共 1 035 bp,并对其进行了序列分析,结果表明,所克隆的 cDNA 与已报道的甜瓜品种 Cantaloup charentais 的 *ACO1* cDNA 序列完全一致。该基因的克隆为进一步研究 ACC 氧化酶基因在甜瓜中的表达特性以及功能奠定了基础。

关键词: 甜瓜; ACC 氧化酶基因 1; cDNA

中图分类号: Q78; S652.1 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2010)04-0061-03

Cloning and Sequence Analysis of ACC Oxidase Gene 1 cDNA from Melon Cultivar Hetao(*Cucumis melo* L. cv Hetao)

HAO Jin-feng, GAO Feng, BO Yan-tai, LI Feng, Hasi Agula

(Biotechnology Center, College of Life Sciences, Inner Mongolia University, Inner Mongolia Key Laboratory of
Herbage & Endemic Crop Biotechnology, Huhhot 010021, China)

Abstract: A pair of specific primer was designed based on melon ACC oxidase gene *Cm-ACO1* in Genbank. The full-length cDNA of *ACO1* was cloned by RT-PCR from ripening fruit of melon (*Cucumis melo* L. cv. Hetao). The length of cDNA was 1 035 bp. Sequence analysis indicated that the cDNA sequence was consistent with that of reported melon *ACO1* cDNA. This work may contribute to study the expression pattern and function of *ACO1* in melon.

Key words: Melon; ACC oxidase gene1; cDNA

乙烯是调节植物生长发育的内源激素^[1],它调节着植物生长发育等许多生理过程,如种子萌发、根毛发育、开花、果实成熟、器官衰老及植物对生物和逆境胁迫的反应等^[2-6]。植物乙烯合成途径^[7]是:甲硫氨酸→S-腺苷甲硫氨酸(SAM)→1-氨基环丙烷-1-羧酸(ACC)→乙烯。ACC 氧化酶(ACO)是乙烯生物合成途径中的最后一个步骤的酶,催化 ACC 向乙烯转化,是乙烯生物合成的关键酶之一。许多研究表明,ACC 氧化酶基因是一个基因家族,如已发现甜瓜的 ACC 氧化酶基因家族是由 *ACO1*、*ACO2* 和 *ACO3* 3 个基因组成,这些基因的编码区核苷酸同源性很高^[8],其表达也存在器官表达特异性和时空表达特异性,如 *CM-ACO1* 在成熟果实及受乙烯或伤诱导的叶片中表达量最高,在未成熟的果实

中检测不到其表达量;*CM-ACO2* 只在白化的胚轴中可检测到其转录物;而 *CM-ACO3* 主要在花器官中表达,在白化的胚轴中表达量次之,在果实中不表达^[8]。为进一步研究 *ACO1* 在甜瓜果实生长、发育和成熟过程中的特异性功能,本研究克隆了甜瓜 *ACO1* 全长 cDNA。

1 材料和方法

1.1 植物材料和试剂

植物材料为甜瓜品种河套蜜瓜原种,由本实验室保存。在大田种植,采摘九成熟的果实,取中果皮组织,于液氮速冻,-80℃保存备用。

大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DH5α 由本实验室保存。反转录试剂盒购自 Invitrogen 公司;克隆载

收稿日期:2010-10-06

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30660111);国家基础科学人才培养基金资助项目(J0730648)

作者简介:郝金凤(1977-),女,内蒙古呼和浩特人,讲师,主要从事植物分子生物学及基因工程研究。

通讯作者:哈斯阿古拉(1961-),男,内蒙古科左后旗人,教授,博士,主要从事植物分子生物学及基因工程研究。

体 pMD19-T、限制性内切酶、PrimeSTAR™ HS DNA 聚合酶、dNTPs、氨苄青霉素、DNA marker 等购自大连宝生物公司; PCR 产物纯化试剂盒购自上海生物工程技术有限公司; 其余试剂为进口或国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 甜瓜果实总 RNA 提取 采用异硫氰酸胍法结合 KAc 沉淀多糖法提取甜瓜果实中果皮组织总 RNA^[9]。

1.2.2 引物设计与合成 根据 Genbank 上登录的甜瓜品种 Cantaloup charentais 的 *ACO1* cDNA 序列 (登录号: X95551), 设计特异性引物。上游引物 P1 序列为: 5'-GGCGGATCCAAACCAAATCTTGATC-TAC-3', 5'-端设计限制性酶 *Bam*H I 酶切位点, 下游引物 P2 序列为: 5'-TCAGGTACCAAGCCCTCTAATATTCCT-3', 5'-端设计限制性酶 *Kpn*I 酶切位点。引物由上海生物工程技术有限公司合成。

1.2.3 cDNA 克隆及序列分析 取 5 μg 总 RNA 做模板, 加 50 μmol/L Oligo (dT)₂₀ 引物 1 μL, 加 10 mmol/L dNTP 2 μL, 灭菌无 RNase 水 5 μL, 65℃ 变性 5 min, 迅速放在冰上 5 min; 然后依次加入 5 × cDNA Synthesis Buffer 4 μL、0.1 mol/L dTT 1 μL、15 U/μL Thermo Script™ RT 1 μL、40 U/μL RNase-out 1 μL, 反应条件: 50℃, 50 min; 60℃, 10 min; 70℃, 10 min; 85℃, 5 min; 4℃, 5 min。反应结束后, 加 RNaseH 1 μL 于 37℃ 反应 30 min, -20℃ 保存备用。

以合成的 cDNA 第一链为模板, 采用 PrimeSTAR™ HS DNA 聚合酶进行 PCR 扩增。PCR 反应条件为: 94℃ 预变性 30 s, 94℃ 变性 30 s, 60℃ 退火 40 s, 72℃ 延伸 90 s, 30 个循环后; 72℃ 延伸 10 min。PCR 产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测。

PCR 产物经 PCR 产物纯化试剂盒纯化后与 pMD19-T 载体连接, 转化 DH5α 大肠杆菌, 在 LB / Amp / IPTG / X-gal 平板上筛选阳性克隆, 然后随机挑选经 *Bam*H I 和 *Kpn*I 酶切确认的重组质粒 3 个独立克隆, 进行序列分析。将所测的序列结果进行 BLAST 序列相似性分析, 用 DNAMAN6.0 软件进行序列比较分析。

2 结果与分析

2.1 RNA 的分析

用紫外分光光度法测定 RNA 的 OD 值, 结果表明 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 为 1.94, OD₂₆₀/OD₂₃₀ 为 2.06。从图 1 电泳图片可以看出: 28 S rRNA 的亮度约为 18 S rRNA 的 2 倍, 说明提取的总 RNA 纯度高而且完整性好。

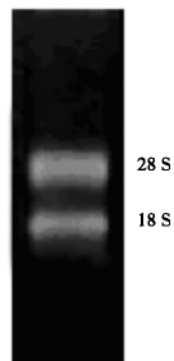
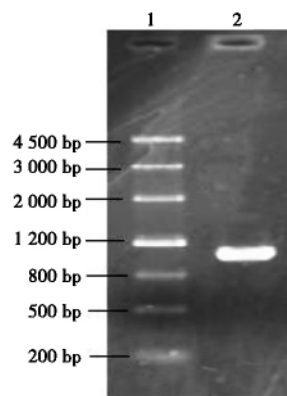


图 1 甜瓜果实总 RNA 的电泳结果

Fig.1 Agarose gel electrophoresis of melon fruit total RNA

2.2 RT-PCR 产物的分析

RT-PCR 扩增后得到约 1 kb 的特异性条带 (图 2), 与预期相符。



1. DNA Marker III; 2. RT-PCR 产物。

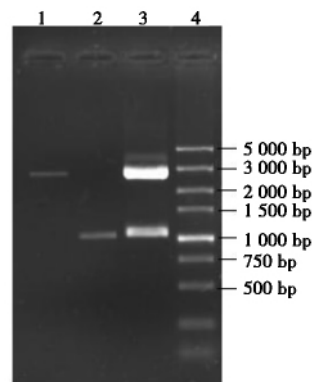
1. DNA Marker III; 2. Product of RT-PCR.

图 2 甜瓜 *ACO1* 基因的 cDNA 扩增

Fig.2 The cDNA amplification of *ACO1* gene from melon

2.3 cDNA 克隆及序列分析

将得到的特异性条带进行克隆和酶切鉴定 (图 3), 结果表明已经得到预期正确的克隆。



1. 阴性对照质粒 pUC19; 2. RT-PCR 产物; 3. *Bam*H I 和 *Kpn*I 酶切的重组质粒; 4. DNA Marker DL5000。

1. pUC19; 2. Product of RT-PCR; 3. Recombinant plasmid digested by *Bam*H I and *Kpn*I; 4. DL5000 Marker.

图 3 重组质粒的酶切鉴定

Fig.3 Detection of recombinant plasmid

将 3 个独立克隆进行测序分析,结果表明,克隆的该基因 cDNA 核苷酸序列长度为 1 035 bp,编码区共 957 bp,与已报道的 *Cm-ACO1* mRNA 序列完全

一致(图 4),编码 318 个氨基酸组成的蛋白,分子量约为 35.1 kDa。此序列已经在 GenBank 数据库中提交,登录号为 GU017416。

```

GGCGGATCCA AACC AATCT TGTATCTACA AAAAGAAATG GCTGTCTTTC CTATCATCAA CTTGGAAAAC ATCAATGATG 80
ATGGTAGAGC TAAGATATTG GAGCAAATTG AAGATGCCTG CCAAAATTGG GGTTTCTTTG AGTTGGTGAA CCATGGGATC 160
CCACATGAGT TTTTAGACAT GGTGGAGAAG ATGACAAGAG ATCATTACAA GAAATGTATG GAAGAGAGGT TTAAGGAGAC 240
TGTGCTTAGC AAAGGCTTAG AGGCTGCACA AGCTGAAGTT AATGATATGG ATTGGGAAAG CACCTTTTTT TTACGCCATC 320
TTCCTGAATC AAACATCTCC CAGATGTCTG ATCTCGACGA GGAATATAAG AAAATTATGA AGGAATTTGC GAAGAAATTG 400
GAGAACTCTG CTGAGGAGTT GTTGGACCTG CTATGTGAGA ATCTTGGGTT GGAGAAGGGT TATCTCAAAA AGGCTTTCTA 480
TGGTTCAAAA GGTCTCTACAT TTGGAACAAA GGTGAGCAAT TATCCGCCGT GTCCCAAGCC GGACCTCATC AAGGGTCTTC 560
GAGCCACAC CGACGCCGGT GGCATCATCC TCCTCTTCCA GATGACAAG GTAAGTGGCC TGCAACTCCT GAAAGATGGC 640
AACTGGATCG ACGTGCCCCC AATGCGCCAC GCCATTGTCTG TCAACCTCGG GGACCAACTT GAGGTGATCA CAAATGGAAG 720
ATACAAAAGT GTGATGCATA GAGTGTTAAC TCAAACGAGT GGAACCTGGC GAATGTCTGAT AGCTTCATTG TACAATCCCG 800
GGAGCGACGC GGTGATCTAC CCGCGCCGG CGCTAGTGA GAAAGATCAG GATGAGGAGA AGAAGGAAGT GTACCCCAAG 880
TTTGTGTTTG AAGATTACAT GAAGCTGTAT CTAGGAGTGA AGTTTCAGGC GAAGGAGCCA AGATTGGAAG CCATGAAAGC 960
CAATGCTAAT TTGGGTCCAA TgGCAACAGC ATAATTAATA CACCACATT TTCATTAATA GTAATAAGGA ATATTAGAGG 1040
GCTTGAGCTC TGA 1053

```

下划线核苷酸为 PCR 引物。

The portion of underline means PCR primer.

图 4 甜瓜品种河套蜜瓜 *ACO1* 基因 cDNA 核苷酸序列

Fig. 4 Nucleotide sequence of *ACO1* gene cDNA from melon cultivar Hetao

3 讨 论

多数甜瓜品种果实糖分含量特别高,其中多糖是干扰甜瓜总 RNA 提取的重要因素。本研究采用异硫氰酸胍法结合 KAc 沉淀多糖的方法成功地从甜瓜品种河套蜜瓜中提取出了高质量的 RNA,为该基因的克隆提供了基础。

序列比较发现,本研究克隆的甜瓜品种河套蜜瓜的 ACC 氧化酶基因 *ACO1* cDNA 与 Lasserre 等^[8]所报道的甜瓜品种 Cantaloup charentais 的 *ACO1* cDNA 序列完全相同,表明 ACC 氧化酶基因 *ACO1* 在这两个甜瓜品种中相当保守。该基因的克隆为进一步研究 ACC 氧化酶基因在甜瓜中的表达特性以及特异性功能方面奠定了基础。

参考文献:

- [1] Gane R. Production of ethylene by some ripening fruits [J]. Nature, 1934, 134: 1008 - 1008.
- [2] Bleecker A B, Kende H. Ethylene: a gaseous signal molecule in plants [J]. Annu Rev Cell Dev Biol, 2000, 16: 1 - 18.

- [3] Achard P, Vriezen W H, Van Der Straeten D, et al. Ethylene regulates Arabidopsis development via the modulation of DELLA protein growth repressor function [J]. Plant Cell, 2003, 15: 2816 - 2825.
- [4] Chen Y F, Etheridge N, Schaller G E. Ethylene signal transduction [J]. Ann Bot (Lond), 2005, 95: 901 - 915.
- [5] Van Loon L C, Geraats B P, Linthorst H J. Ethylene as a modulator of disease resistance in plants [J]. Trends Plant Sci, 2006, 11: 184 - 191.
- [6] Li H, Guo H. Molecular basis of the ethylene signaling and response pathway in Arabidopsis [J]. J Plant Growth Regul, 2007, 26: 106 - 117.
- [7] Yang S F, Hoffman N E. Ethylene biosynthesis and its regulation in higher plants [J]. Ann Rev Plant Physiol, 1984, 35(1): 155 - 189.
- [8] Lasserre E, Bouquin T, Hernandez J A, et al. Structure and expression of three genes encoding ACC oxidase homologs from melon (*Cucumis melo* L.) [J]. Mol Genet, 1996, 251(1): 81 - 90.
- [9] 郑晓飞. RNA 实验技术手册 [M]. 北京: 科学出版社, 2004: 44 - 46.