

强雌性系西瓜 ACC 合成酶基因的克隆及其序列分析

胡宝刚¹, 刘 莉¹, 焦定量²

(1. 天津大学 农业与生物工程学院, 天津 300072; 2. 天津科润蔬菜研究所, 天津 300384)

摘要: 为了解 ACC 合成酶基因对西瓜花性型分化的作用机理, 根据已报道的西瓜 ACC 合成酶(ACS) 基因序列, 设计特异性引物, 以强雌性西瓜总 RNA 为模板, 通过 RT-PCR 扩增得到 4 条特异性片段: *Cit-ACS1* 为 1 690 bp、*Cit-ACS2* 为 402 bp、*Cit-ACS3* 为 598 bp 和 *Cit-ACS4* 为 499 bp。序列同源性比对表明, 该 4 个片段与已报道的西瓜 ACC 合成酶基因序列的同源性 99.8% ~ 100%。构建了西瓜 ACC 合成酶基因系统进化树, 显示 *Cit-ACS1* 与甜瓜 *CMe-ACS2* 和黄瓜 *CS-ACS2* 亲缘关系最近; 并对 *Cit-ACS1* 基因编码的蛋白进行了二级结构和三级结构分析。

关键词: 西瓜; 强雌性系; ACC 合成酶; RT-PCR

中图分类号: S651; Q78 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2011)01-0067-05

Cloning and Sequence Analysis of ACC Synthase Gene in Subgynoecious Watermelon

HU Bao-gang¹, LIU Li¹, JIAO Ding-liang²

(1. College of Agriculture and Bioengineering, Tianjin University, Tianjin 300072, China;

2. Tianjin Kernel Vegetable Research Institute, Tianjin 300384, China)

Abstract: According to the reported ACC synthase(ACS) gene sequences of watermelon, specific primers to amplify ACS genes from subgynoecious watermelon by RT-PCR were designed in order to understand the mechanism of ACC synthase gene on flower sexual differentiation. PCR amplification produced four fragments with size 1 690 bp (*Cit-ACS1*), 402 bp (*Cit-ACS2*), 598 bp (*Cit-ACS3*) and 499 bp (*Cit-ACS4*). Sequence homology analysis indicated that the identity between the four fragments and the reported watermelon ACS gene sequences were 99.8% - 100%. A phylogenetic tree of ACS genes was constructed by software MEGA 4 and the similarity between *Cit-ACS1* and *CMe-ACS2*, *CS-ACS2* was the highest. Secondary and tertiary structure of the protein encoded by *Cit-ACS1* gene were analyzed by bioinformatic databases.

Key words: Watermelon; Subgynoecious; ACC synthase; RT-PCR

乙烯对植物生长、发育过程具有广泛的调节作用, 如生根、茎叶生长、花芽分化、性别分化和对环境胁迫的应答等^[1]。在高等植物中, 乙烯的生物合成主要通过 ACC (1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid) 合成酶(ACS) 基因和 ACC 氧化酶(ACO) 基因的表达在转录水平上进行调节, 其中 ACC 合成酶是乙烯生物合成途径中的关键酶^[2-3]。

目前, 众多学者较一致的观点是黄瓜的雌性系与 ACC 合成酶基因有着非常密切的关系。Galun、Kubicki、Wall 等^[4-6]先后对黄瓜性别表达和性别决定基因做了大量而细致的研究工作。而在西瓜(*Citrullus*

lanatus Thunb.) 上关于花性型分化和 ACC 合成酶基因的报道甚少, 其研究主要参考黄瓜上的研究成果。Trebitsh 等^[7]分离并鉴定了黄瓜一个编码 ACC 合成酶的基因 *CS-ACS1G*, 分析表明, *CS-ACS1G* 与雌性表现位点 F 具有 100% 相关性, 在黄瓜花性型分化机制中起了重要作用。Kamachi 等^[8]从黄瓜茎尖中分离出了 *CS-ACS2* 基因, 它的转录时期和水平与乙烯诱导雌花作用的时期一致, 由此认为, 黄瓜的雌花产生很可能由 *CS-ACS2* 转录的 mRNA 所调控。Mibus 等^[9]通过对黄瓜基因组 DNA 的 Southern 杂交和 SCAR 标记分析, 发现 *CS-ACS1G* 基因为雌性系和强雌性系特

收稿日期: 2010-10-02

基金项目: 天津市应用基础研究计划项目(07JCZDJC04200)

作者简介: 胡宝刚(1985-), 男, 河北保定人, 硕士研究生, 主要从事分子植物育种研究。

通讯作者: 刘 莉(1963-), 女, 重庆人, 副教授, 主要从事蔬菜、瓜类种质资源与遗传育种研究。

有。2008 年 Salman-Minkov 等^[10]首次在西瓜上分离克隆了 ACC 合成酶基因家族 4 个基因 *CitACS1-4* ,并对其进行表达分析。

西瓜强雌性系是在田间育种材料中发现的一株突变体,经多代自交纯化,其雌花节率稳定在 80% 以上。通过克隆强雌性西瓜 ACC 合成酶基因家族的 4 个基因,并对其进行了生物信息学分析,为进一步认识该基因与西瓜强雌性状的联系以及在花性型分化方面的作用机理研究奠定了基础,并为利用基因工程进行品种改良提供参考资料。

1 材料和方法

1.1 试验材料

以强雌性系西瓜为试材,植株长至 4~5 叶期,取其茎尖,用液氮速冻后于 -80℃ 冰箱保存备用。*Taq* DNA 聚合酶、限制性内切酶、dNTP、RNA PCR

Kit(AMV) Ver. 3.0 等分子生物学试剂购自 TaKaRa 公司。植物 RNAout 试剂盒(CAT#: 71203-50) 购于天泽基因有限公司; DL2000 Marker、DNA 凝胶回收试剂盒和 pBS-T 载体购自天根公司; 大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 菌株 DH5 α 感受态细胞采用 CaCl₂ 法制备。IPTG、X-Gal 购自 Amresco 公司,其他常规试剂均为国产分析纯。

1.2 引物的设计和茎尖 RNA 提取

根据 GenBank 中已发表西瓜 ACC 合成酶基因序列(EF154455、EF154456、EF154457、EF154458) 利用 Primer Premier5 软件设计特异引物(表 1),由上海生物工程技术有限公司合成。采用天泽柱式植物 RNAout 试剂盒提取强雌性系西瓜茎尖 RNA,用无 RNase 的 DNaseI 处理去除 RNA 提取液中的基因组 DNA,1% 琼脂糖凝胶上样 3 μ L 电泳检测。

表 1 西瓜 ACC 合成酶基因引物序列

Tab.1 Watermelon ACC synthase gene primer sequences

	上游引物(F-primer 5'-3')	下游引物(R-primer 5'-3')
<i>Cit-ACS1</i>	GCCGCCAAATACATTCCAT	ACCCTAACAGTGTTCATAGC
<i>Cit-ACS2</i>	GGCATTGGTTGAATTTATGG	TTCCTCGTCTTCGCTACTC
<i>Cit-ACS3</i>	TATTCAGATGGGTTTAGCAG	TTTGAAGACAGTGGCAGAG
<i>Cit-ACS4</i>	TTAACTGCTGGTGCCACTG	AACCTCTGCGACGCTGTGA

1.3 ACC 合成酶基因片段的克隆和测序

以西瓜总 RNA 为模板进行 RT-PCR 扩增。反转录反应参照试剂盒 TaKaRa RNA PCR Kit(AMV) Ver. 3.0 使用说明配置反转录反应液: MgCl₂ 2 μ L, 10 \times RT Buffer 1 μ L, dNTP Mixture(各 10 mmol/L) 1 μ L, RNase Inhibitor 0.25 μ L, AMV Reverse Transcriptase 0.5 μ L, Oligo dT-Adaptor Primer 0.5 μ L, RNA 1 μ L,后加入 RNase Free H₂O 3.75 μ L 至总体积为 10 μ L。反应程序为: 30℃ 10 min, 42℃ 30 min, 99℃ 5 min, 5℃ 5 min, 1 个循环。

按下列组成配制 PCR 反应液: 5 \times PCR Buffer 10 μ L, TaKaRa Ex Taq[®] HS 0.25 μ L, F-Primer 1 μ L, R-Primer 1 μ L, RT 产物 10 μ L,后加入灭菌 ddH₂O 27.75 μ L 至总体积为 50 μ L。PCR 程序为: 94℃ 预变性 2 min; 94℃ 变性 30 s, 55℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 1 min, 35 个循环,最后 72℃ 延伸 10 min。PCR 扩增产物经 1% 的琼脂糖凝胶电泳后,回收纯化目的片段。目的 DNA 片段与 pBS-T 载体过夜连接,转化 DH-5 α 感受态细胞,在含有 IPTG 和 X-gal 的平板上进行蓝白斑筛选,挑选白色菌落进行菌液 PCR 鉴定。取阳性克隆测序。

1.4 序列拼接与分析

DNA 序列测序结果用 Contig Express 序列拼接软件进行全长序列拼接,利用 DNAMAN 软件、

MEGA4 软件和相关生物信息学数据库等对序列进行分析。

2 结果与分析

2.1 总 RNA 提取及 ACC 合成酶基因 cDNA 片段的扩增结果

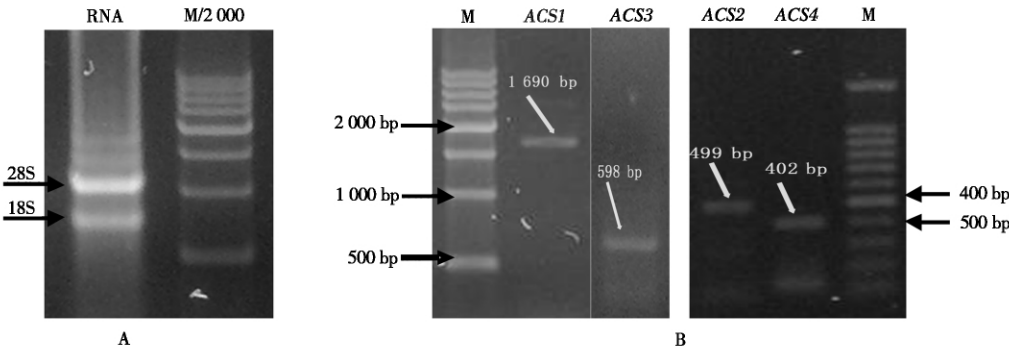
RNA 琼脂糖凝胶电泳分析结果(图 1-A) 显示, 28 S rRNA 和 18 S rRNA 2 条主带明显,且 28 S rRNA 条带亮度约为 18 S rRNA 条带亮度的 2 倍。紫外检测总 RNA 浓度为 0.54 μ g/ μ L, OD₂₆₀/OD₂₈₀ = 1.96,其浓度和质量达到了反转录的要求。由 ACC 合成酶基因的 RT-PCR 扩增结果(图 1-B) 可以看出,得到的扩增片段 *Cit-ACS1* 长度为 1 690 bp, *Cit-ACS2* 为 499 bp, *Cit-ACS3* 为 598 bp, *Cit-ACS4* 为 402 bp,条带清晰且大小符合预计,可以进行下一步目的条带的切胶纯化。

2.2 全长序列的获得及分析

将测序所得 *Cit-ACS1* 序列进行拼接得到 *Cit-ACS1* 基因全长 cDNA 序列,确定 CDS 序列长 1 461 bp,编码 486 个氨基酸,预测分子质量约为 54 379 kDa,其中,编码酸性氨基酸 58 个,碱性氨基酸 54 个。用 SignalP 软件^[11] 对该蛋白的 N 端进行分析,没有发现信号肽,运用 PBIL LYON-GERLAND 信息库^[12] 对 *Cit-ACS1* 编码的蛋白序列进行二级结构预

测 主要用 Hopfield 神经网络(HNN) 预测 ,结果如图 2 ,二级结构中无规则卷曲(Random coil-c) 占 41. 36% α -螺旋(Alpha helix-h) 占 38. 89% ,伸展链(Extended strand-e) 占 19. 75% 。利用 Expsy 中的

AWISS-MODEL 工具预测 *Cit-ACS1* 编码蛋白的三维结构^[13-15] ,预测所得到的三级结构模型的序列和目的蛋白序列相似性为 69. 529%(图 3) 。



A. 强雌性系西瓜茎尖总 RNA 提取结果(M 为 DL200 Marker) ;
B. ACC 合成酶基因 cDNA 片段的扩增结果(左 M 为 500 bp ladder Marker; 右 M 为 100 bp ladder Marker) 。
A. Total RNA extraction of subgynocious watermelon stem apex; B. Amplification of cDAN segment of ACC synthase gene.

图 1 西瓜总 RNA 及 RT-PCR 扩增产物电泳图

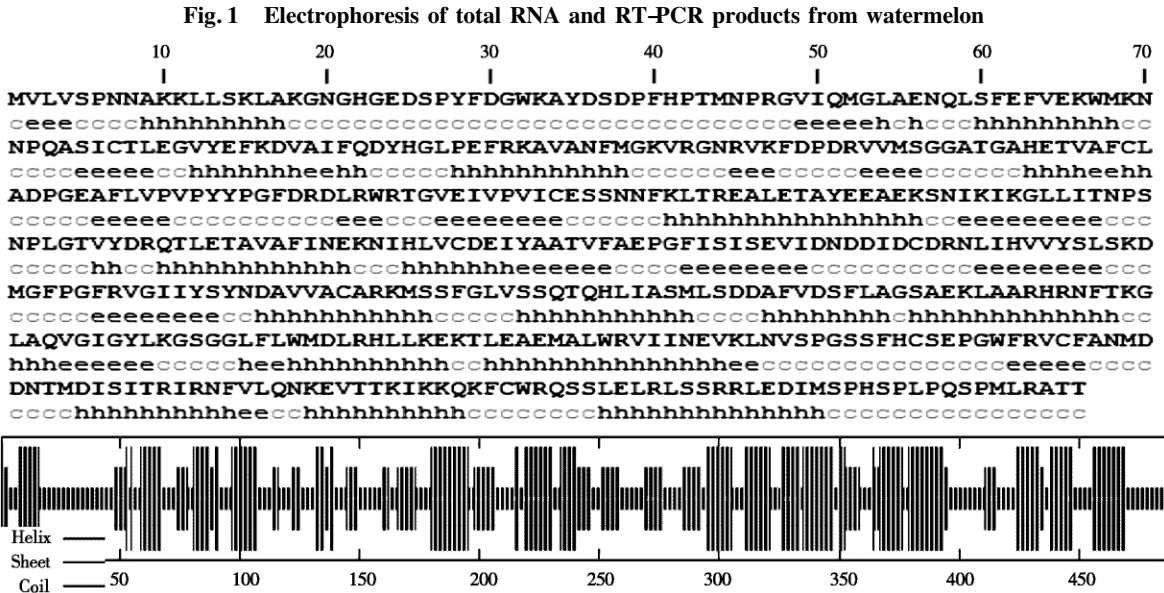


图 2 *Cit-ACS1* 编码蛋白二级结构分析

Fig. 2 Secondary structure analysis of protein encoded by *Cit-ACS1*

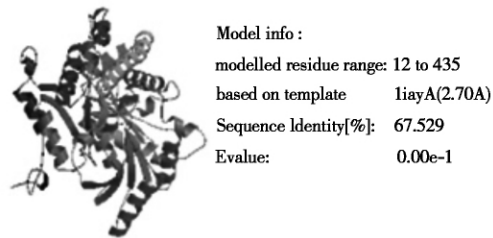


图 3 *Cit-ACS1* 的三级结构预测模型及相关信息

Fig. 3 Tertiary structure prediction model and related information of protein encoded by *Cit-ACS1*

2.3 西瓜四种 ACC 合成酶基因编码的蛋白序列比较分析

应用 DNAMAN 软件将克隆所得的强雌性系西瓜 4 个 ACS 基因编码的氨基酸序列进行多序列对比。结果表明: 4 个 ACS 基因编码氨基酸序列间同

源性为 25. 51% ,存在多个高度保守区域 ,其中 *Cit-ACS1* 与 *Cit-ACS3* 基因编码氨基酸序列同源性最高 ,为 67%(图 4) 。

2.4 基因进化树构建

将克隆所得的强雌性系西瓜 *Cit-ACS1* 基因 cDNA 编码的氨基酸序列与 NCB I 上已登录的其他瓜类作物的 ACS 基因编码的氨基酸进行多序列对比 ,采用 MEGA4. 0 软件的邻接法(Neighbor Joining NJ) 构建强雌性系西瓜与黄瓜、甜瓜等植物的 16 种 ACS 同源氨基酸序列的基因进化树。该进化树显示 ,*Cit-ACS1* 与甜瓜 *CMe-ACS2*、黄瓜 *CS-ACS2* 亲缘关系最近 ,*Cit-ACS2* 和甜瓜 *CMe-ACS3* 亲缘关系最近 ,*Cit-ACS3* 和甜瓜 *CMe-ACS1*、*Cit-ACS4* 与拟南芥 *At-ACS4*

亲缘关系相近,而与苦瓜、西洋南瓜等较远(图5)。

Cit-acs2_protein	...LVEFMAEIRGNKVTFEA	17
Cit-acs4_protein	0
Cit-acs1_protein	RKRVNFMGKVRGNRVKFD	120
Cit-acs3_protein	RNIASFMGKARGGRVKFD	71
consensus	r a a fmgk rgnrvkf	
Cit-acs2_protein	NNIVLTAGATSANETLMFCL	37
Cit-acs4_protein	...LIAGATAANELLTFIL	16
Cit-acs1_protein	DRVVMSCGATGAHETVAFCL	140
Cit-acs3_protein	SRIVMGGGATGASEIVIFCL	91
consensus	rivltagatganetl fcl	
Cit-acs2_protein	AEAGDAFLLPYPYPGFDRD	57
Cit-acs4_protein	ANPGDALLVPTYPYPGFDRD	36
Cit-acs1_protein	ADPGDAFLVPYPYPGFDRD	160
Cit-acs3_protein	ADPGDAFLVPSYPYAFDRD	111
consensus	adpgdaflvptpyypgfd	
Cit-acs2_protein	LRWRTGVEIVPIHCSSNCF	77
Cit-acs4_protein	LRWRTGVKIVPIHCSSNCF	56
Cit-acs1_protein	LRWRTGVEIVPIHCSSNCF	180
Cit-acs3_protein	LCWRTRACIIPVHCSSNCF	131
consensus	lrwrtgveivpihc ssn	
Cit-acs2_protein	QVTKSALEAYKEAQTNRNR	97
Cit-acs4_protein	QITKALEEAYNTAMAMKIK	76
Cit-acs1_protein	KLTRALEAYEAEKSNIK	200
Cit-acs3_protein	QIRKEALEAYKRAEANIK	151
consensus	qitkeale aykeaq nik	
Cit-acs2_protein	VKGVLITNPSNPLGTTMTRH	117
Cit-acs4_protein	VKGVLITNPSNPLGATIQR	96
Cit-acs1_protein	IKGLLITNPSNPLGTVYDRQ	220
Cit-acs3_protein	VKGVLITNPSNPLGTTYDRD	171
consensus	vkgvlitnpsnplgttydr	
Cit-acs2_protein	ELDLVDFDITSGIHLISDE	137
Cit-acs4_protein	TIEEILDFVTRKNIHLVSDE	116
Cit-acs1_protein	TLETAVAFINEKNIHLVCDE	240
Cit-acs3_protein	TLKSLVNFVNDNNIHLICDE	191
consensus	tle vdfin knihlicde	
Cit-acs2_protein	IYSGTVFSPGFSAMEVLR	157
Cit-acs4_protein	IYSGSVFSSAEFTSVAEV..	134
Cit-acs1_protein	IYAATVFAEPGFISISEVID	260
Cit-acs3_protein	IYSATVFK.....	199
consensus	lysatv f spgfs ev	

图4 西瓜 ACS 基因编码的氨基酸序列多序列比对

Fig.4 The alignment of amino acid sequences of watermelon ACS gene

3 讨论

在高等植物体内,乙烯由 Met(蛋氨酸)→SAM(腺苷蛋氨酸)→ACC(1-氨基丙烷-1-羧酸)→乙烯途径合成,在瓜类作物花芽分化和性型转变中发挥着重要作用。在乙烯生物合成过程中,每一步反应都是在特定的酶催化下完成的,了解和研究这些酶,特别是 ACC 合成酶基因及其表达的特异性,对明确乙烯的生物合成调控途径及其在植物花性型分化上的作用机理都有很大促进作用。

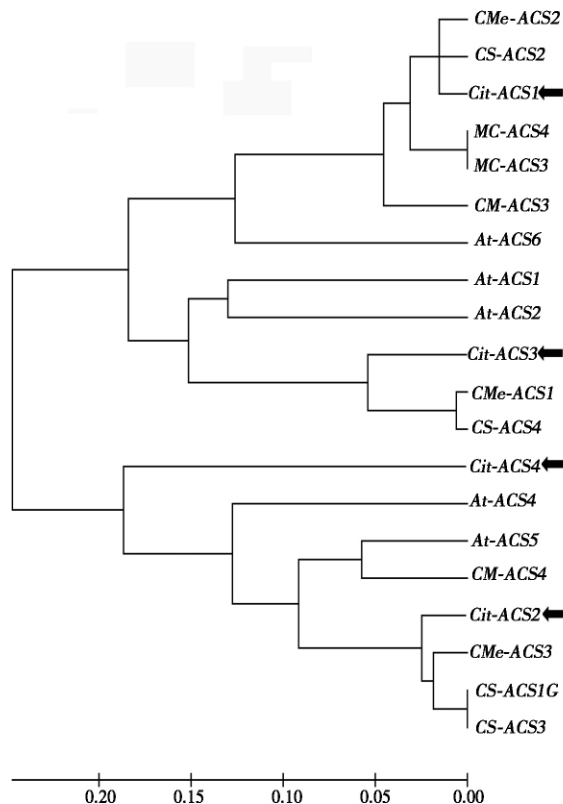


图5 西瓜 ACC 合成酶基因系统进化分析

Fig.5 Phylogenetic tree based on *Cit-ACS* sequences of watermelon

本研究采用 RT-PCR 技术,在强雌性系西瓜中获得了 *Cit-ACS1* 基因的全长序列和 *Cit-ACS2-4* 基因的片段,对所得序列分析发现,该基因家族保守性很好,与已报道的西瓜 ACS 基因同源性 99.8%~100%,系统进化分析表明,其与甜瓜和黄瓜的 ACS 基因亲缘关系很近。由于西瓜上关于 ACC 合成酶的研究还很少,笔者基于 ACS 基因在黄瓜上的研究成果,利用特殊的西瓜强雌性系材料通过分析 ACS 基因的时空表达,并联系西瓜的花性型分化和乙烯信号传导途径,可以进一步明确 ACS 基因与西瓜花性型分化过程中的作用机制。另一方面,对西瓜 ACS 基因的克隆和生物信息学分析可以为利用基因工程进行品种改良提供重要的参考资料。

植物花性型的分化是一个高度复杂的、在一定遗传背景控制下的生理生化及形态发生过程,普遍认为是在特殊信号诱导下基因的选择性表达的结果,瓜类作物上不同花性型的研究一直以来都是育种研究的重点。大量研究报道表明,ACC 合成酶与瓜类作物花性型分化存在着密切联系,ACC 合成酶基因在西瓜强雌性系及其近等位基因系上的深入研究,能够进一步探明该基因的表达调控对西瓜花性型分化的影响方式和分子机理。

参考文献:

- [1] Abeles F B. Ethylene in Plant Biology [M]. New York and London: Academic Press ,1973: 1 – 302.
- [2] Yang S F ,Hoffman N E. Ethylene biosynthesis and its regulation in higher plants [J]. Annu Rev Plant Physiol , 1984 ,35: 155 – 189.
- [3] Abeles F B ,Morgan P W ,Saltvelt M E. Ethylene in plant biology [M]. San Diego: Academic Press ,1992.
- [4] Galun E. Study of the inheritance of sex expression in the cucumber: The interaction of major genes with modifying genetic and non-genetic factors [J]. Genetica ,1962(32) : 134 – 163.
- [5] Kubicki B. Investigations of sex determination in cucumber(*Cucumis sativus* L.) . V. Genes controlling intensity of femaleness [J]. Genetica Polonica ,1969(10) : 69 – 86.
- [6] Wall J R. Correlated inheritance of sex expression and fruit shape in Cucumis [J]. Euphytica ,1967(16) : 199 – 208.
- [7] Trebitsh T ,Staub J E ,Neil S D. Identification of a amino-cyclopropane-l-carboxylic acid synthase gene linked to the Female locus that enhance female sex expression in cucumber [J]. Plant Physiology ,1997 ,113(3) : 987 – 995.
- [8] Kamachi S ,Sekimoto H ,Kondo N *et al.* Cloning of a cDNA for a l-aminocyclopropane-l-carboxylate synthase that is expressed during development of female flowers at the apices of *Cucumis sativus* L [J]. Plant and Cell Physiology ,1997 ,38(11) : 1197 – 1206.
- [9] Mibus H ,Tatlioglu T. Molecular characterization and isolation of the F/f gene for femaleness in cucumber(*Cucumis sativus* L.) [J]. Theor Appl Genet ,2004 ,109(8) : 1669 – 1676.
- [10] Salman-Minkov A ,Levi A ,Wolf S *et al.* ACC synthase genes are polymorphic in watermelon(*Citrullus* spp.) and differentially expressed in flowers and in response to Auxin and Gibberellin [J]. Plant Cell Physiol ,2008 ,49(5) : 740 – 750.
- [11] Jannick D B ,Henrik N ,Gunnar H *et al.* Improved prediction of signal peptides: Signal P 3. 0 [J]. J Mol Biol , 2004 ,340(4) : 783 – 795.
- [12] Combet C ,Blanchet C ,Geourjon C *et al.* NPS@ : network protein sequence analysis [J]. Trends Biochem Sci 2000 ,25(3) : 147 – 150.
- [13] Arnold K ,Bordoli L ,Kopp J *et al.* The SWISS-MODEL Workspace: A web-based environment for protein structure homology modelling [J]. Bioinformatics ,2006 ,22: 195 – 201.
- [14] Schwede T ,Kopp J ,Guex N *et al.* SWISS-MODEL: An automated protein homology-modeling server [J]. Nucleic Acids Research 2003 ,31: 3381 – 3385.
- [15] Guex N ,Peitsch M C. SWISS-MODEL and the Swiss-Pdb Viewer: An environment for comparative protein modelling [J]. Electrophoresis ,1997 ,18: 2714 – 2723.