

无花果 ACC 合成酶基因克隆及序列分析

张 帅,张 明,寇天舒,马俊莲,唐 霞,张子德

(河北农业大学 食品科技学院 河北 保定 071001)

摘要:为进一步利用基因工程手段调控无花果乙烯的合成,以无花果果肉为材料提取基因组 DNA,根据已报道的无花果 ACC 合成酶基因序列设计引物,采用 PCR 技术扩增得到一条约 600 bp 的特异片段,将该片段克隆到 pGM-T easy vector 上经 PCR、酶切和测序鉴定。序列分析结果表明,基因全长 590 bp,编码 196 个氨基酸,该序列与 GenBank 上已登陆的 Masui Dauphine-*ACS* 的 cDNA 序列同源性达 99%,氨基酸同源性达 98%。结果表明,成功克隆到了无花果 *ACS* 基因片段。

关键词:无花果;ACC 合成酶;基因克隆;序列分析

中图分类号:Q78 文献标识码:A 文章编号:1000-7091(2012)06-0034-04

Cloning and Sequence Analysis of a DNA Encoding ACC Synthase Gene from *Ficus carica*

ZHANG Shuai, ZHANG Ming, KOU Tian-shu, MA Jun-lian, TANG Xia, ZHANG Zi-de

(College of Food Science and Technology, Agricultural University of Hebei, Baoding 071001, China)

Abstract: Specific primers were designed based on the the reported ACC synthase(*ACS*) gene sequences of *Ficus carica* in the GenBank. Using genome DNA extracted from *Ficus carica* fruits as template the specific PCR product of *ACS* was obtained, then the product was ligased to pGM-T easy vector with PCR restriction enzyme digestion and sequencing. The sequencing data showed that the PCR product was 590 bp encoding 196 predicted amino acid residues. Comparison with nucleotide sequence and amino acid sequence homology of ACC oxidase gene (DQ269492) landed were 99% and 98%, which showed the successful cloning of the *ACS* synthase gene.

Key words: *Ficus carica*; ACC synthase; Gene clone; Sequence analysis

无花果果实味美,营养丰富,还具有明显的医疗保健作用,应用前景广阔^[1]。但其采收后极易软化伤烂,给贮藏、加工、运输等带来重大困难,这严重影响了无花果的食用和经济价值。无花果属跃变型果实,其采后成熟软化速度与其本身的乙烯释放水平密切相关^[2]。1979 年,Adams 等^[3]研究表明,ACC(1-氨基环丙烷-羧酸)是乙烯合成的直接前体,在乙烯的合成途径中,催化 SAM 向 ACC 转化的 ACC 合成酶是植物体内乙烯合成的限速酶。降低 ACC 合成酶基因的表达,减少乙烯生成量,可以有效延长贮藏期^[4-5]。因此,利用反义及 RNA 干扰技术抑制其靶基因的表达,降低 ACC 合成酶基因的活性,减少乙烯的生成,进而达到延缓果实衰老的效果。本研

究主要采用 PCR 技术克隆出无花果 ACC 合成酶基因片段并进行了序列分析,为今后的转基因工作奠定基础。

1 材料和方法

1.1 试验材料

1.1.1 供试材料 以绿果无花果为试材,采自山东威海市郊果园。

1.1.2 质粒载体和菌株 pGM-T 克隆试剂盒为北京天根生化科技有限公司产品,大肠杆菌 DH5 α 由河北农业大学食品科技学院生物技术实验室保存。

1.1.3 试剂及试剂盒 DNA DNA 提取试剂盒、DNA 回收试剂盒、*Taq* DNA Polymerase 及 PCR 相关

收稿日期:2012-08-25

作者简介:张 帅(1988-),女,河北保定人,在读硕士,主要从事果蔬生物技术研究。

通讯作者:马俊莲(1964-),女,山西太原人,教授,博士生导师,主要从事果蔬贮藏和生物技术的教学和研究。

试剂均为北京 TIANGEN 公司产品; 各种限制性内切酶均为大连宝生物公司产品; 引物由北京三博志远生物技术有限公司合成。

1.2 试验方法

1.2.1 无花果基因组 DNA 的提取 利用 TIANGEN 公司的 DNA 提取试剂盒提取无花果叶片基因组 DNA, 方法按产品使用说明进行, -20°C 保存备用。

1.2.2 引物设计 根据 GenBank 中登录的无花果 ACC 合成酶基因保守序列, 设计合成一对特异引物, 上游引物 P1: 5'-GAGAAGGCTCAAGAGGAGAACAATAAGA-3', 下游引物 P2: 5'-CATAGAGCCATCTCTGCATCAAGTGT-3'。

1.2.3 PCR 扩增 以无花果基因组 DNA 为模板, P1、P2 为引物对, 进行 PCR 扩增, 反应体系为: ddH₂O 34.5 μL , 10 \times Buffer 5.0 μL , dNTP (各 2.5 mmol/L) 4.0 μL , P1、P2 各 2.0 μL , DNA 模板 2.0 μL , Taq DNA 聚合酶 (5 U/ μL) 0.5 μL 。反应条件为: 热启动, 94°C 预变性 5 min; 94°C 变性 1 min, 62.5°C 退火 30 s, 72°C 延伸 1 min, 共 35 个循环; 最后一轮 72°C 延伸 10 min; 同时以无菌水为模板作阴性对照。取 10 μL 扩增产物于 1% 的琼脂糖凝胶上电泳检测。

1.2.4 目的片段的克隆与 cDNA 序列的测定 用凝胶回收试剂盒回收目的片段 将回收产物与 pGM-T 载体连接, 转化到大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞中, 在含有 IPTG 和 X-gal 的平板上进行蓝白斑筛选, 挑取白色菌落, 经菌液 PCR 鉴定, *EcoR* I 双位点酶切鉴定, 将符合要求的质粒送北京三博志远生物技术有限公司进行测序。

1.2.5 序列同源性分析 将测序结果在 NCBI 上进行 Blast 同源性比较, 用 DNAMAN 软件进行序列分析。

2 结果与分析

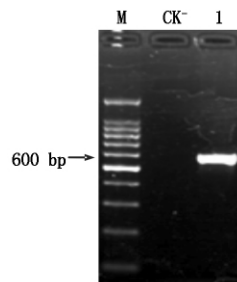
2.1 电泳检测 PCR 产物

以无花果基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增, 扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 其扩增片段大小在 600 bp 左右 (图 1), 条带清晰且与预期的目的片段大小一致, 可以进行下一步目的条带的切胶纯化。

2.2 阳性克隆的鉴定

将扩增片段与 pGEM-T 载体连接转化后, 进行蓝白斑筛选, 在含有 IPTG 和 X-gal 的平板上随机挑取 4 个白色单菌落, 通过菌液 PCR 扩增检测重组质粒, 若含有插入片段则应克隆出 1 条 600 bp 左右的

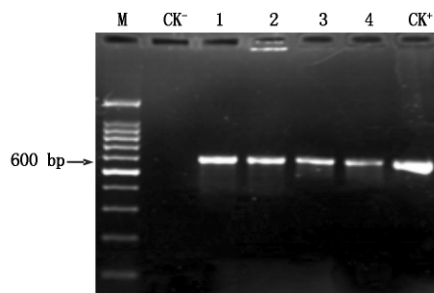
条带, 电泳检测 PCR 产物, 如图 2 所示。



M. 100 bp ladder Marker; CK⁻. 阴性对照; 1. PCR 产物。
M. 100 bp ladder Marker; CK⁻. Negative comparison; 1. PCR products.

图 1 PCR 产物电泳检测

Fig. 1 Agrose gel electrophoretogram of PCR products

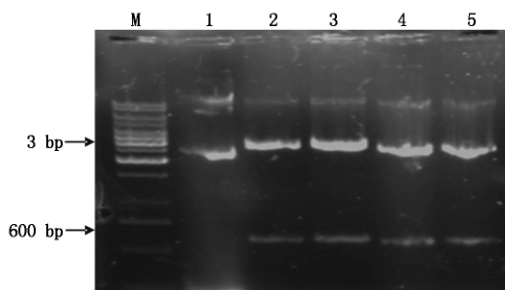


M. 100 bp ladder Marker; CK⁺. 阳性对照;
1~4. 菌液 PCR 产物; CK⁻. 阴性对照。
M. 100 bp ladder Marker; CK⁺. Positive control of PCR;
1~4. PCR products; CK⁻. Negative comparison.

图 2 阳性克隆的菌液 PCR 产物电泳图谱

Fig. 2 Agrose gel electrophoretogram of positive bacterium liquid PCR products

对检测正确的菌液采用碱裂解法少量提取质粒 DNA, 采用 *EcoR* I 酶切重组质粒, 若重组质粒中含有插入片段, 则酶切后应得到 1 条 3.0 kb pGM-T 载体片段及 1 条 600 bp 左右的插入片段。电泳检测酶切产物 (图 3), 得到 2 条亮带, 片段大小与预期一致, 初步断定成功地克隆出绿果 *ACS1* 基因片段。



M. 1 kb ladder Marker; 1. 重组质粒; 2~5. 重组质粒 *EcoR* I 酶切产物。
M. 1 kb ladder Marker; 1. Recombinant plasmid;
2~5. Recombinant plasmid digested by *EcoR* I.

图 3 重组质粒经 *EcoR* I 酶切后电泳图谱

Fig. 3 Electrophoresis pattern of recombinant plasmid digested by *EcoR* I

2.3 阳性克隆的测序及同源性分析

将经 PCR、酶切检测正确的重组质粒送北京三博志远生物技术有限公司进行测序。测序结果显

绿果无花果	<u>GAGAAGGCTCAAGAGGAGAACATAAGAGTGAAAGGTTTGCTGATCACCAA</u>	50
Masui Dauphine	GAGAAGGCTCAAGAGGAGAACATAAGAGTGAAAGGTTTGCTGATCACCAA	471
绿果无花果	TCCATCAAGCCCCTTAGGCACCATCTAGACAGAGAGACACTAAGGATGA	100
Masui Dauphine	TCCATCAAACCCCTTGGGCACCATCTAGACAGAGAGACACTAAGGATGA	521
绿果无花果	TAGTGC GGTTCAATCAACGAGAAGAGCATCCACCTAGTCTGCGACGAAATC	150
Masui Dauphine	TAGTGC GGTTCAATCAACGAGAAGAGCATCCACCTAGTCTGCGACGAAATC	571
绿果无花果	TATGCTGCCACGGTCTTCAACCAGCCGCCATTCTGAGCATCTCGGAGAT	200
Masui Dauphine	TATGCTGCCACGGTCTTCAACCAGCCGCCATTCTGAGCATCTCGGAGAT	621
绿果无花果	CATAGCAGAGGATGCAGACATCGAGTGCAACACAGACCTCATCCACATTG	250
Masui Dauphine	CATAGCAGAGGATGCAGACATCGAGTGCCACACAGACCTCATCCACATTG	671
绿果无花果	TCTACAGCCTCTCAAAGGACATGGGATTCCCTGGCTTCAGAGTCGGCGTT	300
Masui Dauphine	TCTACAGCCTCTCAGAGGACATGGGATTCCCTGGCTTCAGAGTCGGCGTT	721
绿果无花果	GTCTACTCTACAACGACGCGGTGGTGAATTGCGCGCAAAGATGTCAAG	350
Masui Dauphine	GTCTACTCTACAACGACGCGGTGGTGAATTGCGCGCAAAGATGTCAAG	771
绿果无花果	CTTCGGATTAGTCTCGTCTCAAACACAACACCTGATTGCAGCCATGTTGT	400
Masui Dauphine	CTTCGGATTAGTCTCGTCTCAAACACAACACCTGATTGCAGCCATGTTGT	821
绿果无花果	CGGATGATGTGTTTGTGACGAGTTTTTGGCCGAGAGCGCTAGAAGATTG	450
Masui Dauphine	CGGATGATGTGTTTGTGACGAGTTTTTGGCCGAGAGCGCTAGAAGATTG	871
绿果无花果	GAAAGAAGGCACACCGGCTTACCCGAGGACTCGCCAGGTTAGAATTAC	500
Masui Dauphine	GAAAGAAGGCACACCGGCTTACCCGAGGACTCGCTCAGGTTAGAATTAC	921
绿果无花果	CTGCTTGGAGAGCAATGCAGGCCTGTTTTGTGGATGGATTGCACAGGC	550
Masui Dauphine	CTGCTTGGAGAGCAATGCAGGCCTGTTTTGTGGATGGATTGCACAGGC	971
绿果无花果	CTTCTCAAAGAAAGACACTTGATGCAGAGATGGCTCTATG	591
Masui Dauphine	CTTCTCAAAGAGCAGACACTTGATGCAGAGATGGCTCTATG	1012

横线处所标核苷酸序列为引物序列; 方框中的核苷酸为与 Masui Dauphine-*ACSI* 不同的核苷酸。

Underlined sequences were the primer sequences; Nucleotide in square box meant the nucleotide different from Masui Dauphine-*ACSI*.

图 4 绿果无花果 *ACSI* 核苷酸序列

Fig. 4 The nucleotide sequence of Green Figs Fruit-*ACSI*

绿果无花果	EKAQEENIRV	KGLLITNPSS	PLGTILDRET	LRMIVRFINE	40
Masui Dauphine	EKAQEENIRV	KGLLITNPSN	PLGTILDRET	LRMIVRFINE	40
绿果无花果	KSIHLVCDEI	YAATVFNQPP	FVSISEIIAE	DADIECNTDL	80
Masui Dauphine	KSIHLVCDEI	YAATVFNQPP	FVSISEIIAE	DTDIECHTDL	80
绿果无花果	IHIVYSLSKD	MGFPGFRVGV	VYSYNDAVVN	CARKMSSFGL	120
Masui Dauphine	IHIVYSLSED	MGFPGFRVGV	VYSYNDAVVN	CARKMSSFGL	120
绿果无花果	VSSQTQHLIA	AMLSDDVFVT	RFLAESARRL	ERRHNGFTRG	160
Masui Dauphine	VSSQTQHLIA	AMLSDDVFVT	RFLAESARRL	ERRHNGFTRG	160
绿果无花果	LAQVRITCLE	SNAGLFLWMD	LHRLLEQTL	DAEMAL	196
Masui Dauphine	LAQVRITCLE	SNAGLFLWMD	LHRLLEQTL	DAEMAL	196

框中的氨基酸为两者不同氨基酸。

The amino acid in square box meant the amino acid different from Masui Dauphine-*ACSI*.

图 5 由 Green Figs Fruit-*ACSI* 推导出的氨基酸序列及与 Masui Dauphine-*ACSI* 氨基酸序列同源性比较

Fig. 5 The amino acid sequence deduced from Green Figs Fruit-*ACSI* and homologous comparison with Masui Dauphine-*ACSI*

示 PCR 扩增产物长为 590 bp, 含有扩增时所用的引物序列, 不含内含子序列, 如图 4 所示。对克隆到的核苷酸序列进行同源性分析, 通过 NCBI 网站上进行 Blastn 比较, 在 GenBank + EMBL + DDBJ + PDB 数据库中显示出各种植物 ACC 合成酶基因核苷酸序列, 它与 Masui Dauphine-*ACSI* mRNA 的编码序列(登陆号为 DQ269492) 同源性高达 99%, 除引物序列外只有 7 核苷酸与其不同(图 4)。克隆的核苷酸序列编码了 196 个氨基酸, 在氨基酸水平上它与 Masui Dauphine-*ACSI* 氨基酸有 99% 同源性, 有 4 个氨基酸不同(图 5)。由此可以确定重组质粒插入的 DNA 片段为无花果 *ACSI* 基因片段, 表明成功克隆了绿果无花果 *ACSI* 基因片段。

3 讨论

ACC 合成酶作为植物乙烯生物合成途径中的限速酶, 对内源乙烯合成起着重要的调控作用, 利用基因工程技术抑制 *ACS* 基因的表达, 从而抑制乙烯的合成成为近年来人们研究的热点问题。目前, 通过 ACC 合成酶反义 RNA 技术抑制果实乙烯生成, 从而延缓果实软化, 已在番茄上获得成功^[6], 现已大量投入商业生产。无花果 ACC 合成酶基因由多基因家族编码, Owino 等^[7] 从无花果成熟果实中分离出 3 个 ACC 合成酶基因, 即 *Fc-ACSI*, *Fc-ACS2* 和 *Fc-ACS3*, 已证实 *Fc-ACSI* 基因在果实成熟过程中大量表达。利用反义 RNA 及 RNAi 干扰技术抑制无花果 *ACSI* 基因的表达, 抑制果实中的乙烯生成, 预期可以有效地延缓果实的成熟、软化。

本研究成功克隆了绿果无花果 *ACSI* 基因, 与

Masui Dauphine-*ACSI* 的 cDNA 序列具有 99% 同源性, 初步预计该基因与绿果无花果的成熟、软化有关。本试验拟通过 RNA 干扰技术来调控该基因的表达, 从而抑制无花果的成熟与软化, 为培育出具有抗软化、耐贮运特性的无花果品种奠定基础。该基因的植物表达载体正在构建过程中。

参考文献:

- [1] 朱海舰, 张胜男, 何保华, 等. 无花果的营养与医疗作用[J]. 国土绿化, 2004(4): 43.
- [2] Lelievre J M, Latche A, Jones B *et al.* Ethylene and fruit ripening[J]. *Physiol Plant*, 1997, 101: 727 - 739.
- [3] Adams D O, Yang S F. Ethylene biosynthesis: Identification of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid as an intermediate in the conversion of methionine to ethylene[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1979, 76(1): 170 - 174.
- [4] 王关林, 方宏筠. 植物基因工程原理与技术[M]. 北京: 科学出版社, 1998.
- [5] 罗云波, 生吉平, 申琳. 番茄中反义 ACC 合成酶基因的导入与乙烯生物合成的控制[J]. 农业生物技术学报, 1995(3): 38 - 39.
- [6] Oeller P W, Wong L M, Taylor L P *et al.* Reversible inhibition of tomato fruit senescence by antisense 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthetase[J]. *Science*, 1991, 254: 437 - 439.
- [7] Owino W O, Manabe Y, Mathooko F M *et al.* Regulatory mechanisms of ethylene biosynthesis in response to various stimuli during maturation and ripening in fig fruit(*Ficus carica* L.) [J]. *Plant Physiol Biochem* 2006, 44(5-6): 335 - 342.