

# 樱桃 ACC 氧化酶基因的克隆和序列分析

王俊英<sup>1</sup>, 张开春<sup>2</sup>, 王俊平<sup>3</sup>, 张军科<sup>4</sup>

(1. 北京林业大学 生物学院, 北京 100083; 2. 北京市农林科学院林果所, 北京 100093;  
3. 中国农业大学 作物学院, 北京 100094; 4. 西北农林科技大学 园艺系, 陕西 杨凌 712100)

**摘要:** 以樱桃基因组 DNA 为模板定向克隆其 ACC 氧化酶基因。对 PCR 扩增的目的片段用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测后, 进行回收、连续转化, 通过蓝白筛选挑取白色菌落提取质粒 DNA 进行酶切鉴定, 确定重组子后采用双脱氧终止法测定 DNA 全序列。DNA 测序结果显示, 樱桃的 ACC 氧化酶基因序列全长为 1 310 bp, 由 2 个外显子和 3 个内含子构成, 外显子总长为 1 000 bp。同源性分析可知, 樱桃与桃的 ACC 氧化酶基因 DNA 序列同源性达 97.8%。

**关键词:** 樱桃; ACC 氧化酶; 基因克隆; DNA 测序

中图分类号: S662.5 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2002)01-0011-05

乙烯是调控果实成熟的关键因子, ACC 氧化酶是乙烯生物合成途径的关键酶, 它直接催化 ACC (1-氨基环丙烷-1-羧酸) 转变为乙烯。ACC 氧化酶基因最早是从番茄 cDNA 文库中克隆出来<sup>[1]</sup>的, 之后, 相继从苹果<sup>[2]</sup>、矮牵牛<sup>[3]</sup>、康乃馨<sup>[4]</sup>等植物中克隆到了 ACC 氧化酶基因 cDNA。将该基因以反义形式转入番茄, 所获得的转基因植株的果实, 乙烯生物合成受到抑制, 保鲜期延长<sup>[5]</sup>。通过 ACC 氧化酶的反义 RNA 技术, 可望有效抑制乙烯生成, 从而延长果实贮运期和销售期。

樱桃 (*Prunus pseudocerasus* L.) 是我国北方的主要栽培果树, 在我国已有百余年的栽培历史。樱桃是北方成熟最早的落叶果树, 果实营养丰富, 味道鲜美, 深受人们的喜爱。但是由于樱桃果实属于呼吸跃变型果实, 不耐储藏, 严重影响樱桃的保鲜和储运, 给种植者造成很大的经济损失。近年来, 通过控制乙烯的生物合成过程来控制果实成熟的基因工程研究已取得较大进展, 在番茄等作物上已经得到成功应用, 但到目前为止, 关于樱桃果实成熟的基因工程研究方面还未见报道。

本文以早丹樱桃的基因组 DNA 为模板, 用人工合成的寡聚核苷酸引物扩增克隆出了樱桃的 ACC 氧化酶基因, 为进一步开展转基因育种奠定了基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

早丹樱桃的叶片、果实取自北京市林业果树研究所, 自制大肠杆菌 DH5 $\alpha$ , P<sup>UCm-T</sup>、限制性内切酶购自 Promega 公司, DNA 快速纯化试剂盒购自博大科技公司。

由上海博亚公司采用双脱氧终止法进行了 DNA 序列的测定。

## 1.2 方法

1.2.1 樱桃基因组 DNA 的提取 用改良 CTAB 法提取。改良 CTAB 提取缓冲液: Tris-HCl  $100 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  (pH 8.0), NaCl  $1.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , EDTA (pH 8.0)  $20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ , CTAB 2%, PVP 2%, 巯基乙醇  $25 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

1.2.2 ACC 氧化酶基因扩增 以樱桃基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增。根据已发表玉露桃<sup>[6]</sup>、猕猴桃<sup>[7]</sup>的 mRNA 序列, 设计出樱桃 ACC 氧化酶基因定向克隆的正、反向引物。

正向引物: 5' AGA TGG AGA ACT TCC CAA TCA TCA ACT TGG 3'

反向引物: 5' GCA AAC AAC CTT TCC AGC TTA GTA AAG C 3'

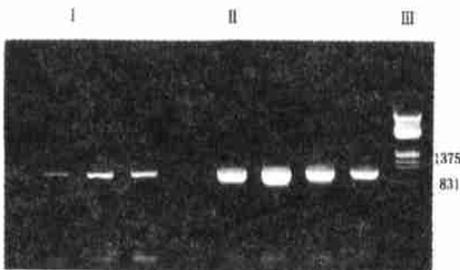
在 20  $\mu\text{L}$  体系中加入模板 DNA (200 ng) 4  $\mu\text{L}$ ,  $10 \times$  buffer 2  $\mu\text{L}$ , 正向引物 ( $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 2  $\mu\text{L}$ , 反向引物 ( $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 2  $\mu\text{L}$ , dNTP ( $20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 2  $\mu\text{L}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  ( $15 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 2.7  $\mu\text{L}$ , Tag 酶 ( $5 \text{ u}/\mu\text{L}$ ) 0.3  $\mu\text{L}$ 。PCR 反应条件为:  $94 \text{ }^\circ\text{C}$  2 min、 $94 \text{ }^\circ\text{C}$  1 min、 $53 \text{ }^\circ\text{C}$  2 min、 $72 \text{ }^\circ\text{C}$  2 min, 循环 40 次,  $72 \text{ }^\circ\text{C}$  延伸 10 min、 $0 \text{ }^\circ\text{C}$  保温。用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, glassmilk 法回收目的片段。

1.2.3 ACC 氧化酶基因克隆 将回收的 DNA 片段直接进行平末端连接, 转化大肠杆菌 DH<sub>5</sub> $\alpha$  感受态细胞。通过 X-gal/IPTG 蓝白筛选挑取白色菌落, 用碱裂解法提取质粒 DNA。对重组质粒进行 BamHI、XhoI 单酶切, BamHI、SacI 双酶切鉴定, 并对该基因片段进行测序。

## 2 结果与分析

### 2.1 PCR 扩增

利用 PCGENE 软件人工预测樱桃的 ACC 氧化酶基因的片段大小为 1 300 bp 左右。PCR 扩增目的片段的凝胶电泳检测结果表明: ACC 氧化酶基因片段的大小位于 947~1 375 bp 标准带之间, 并且靠近 1 375 bp 标准带 (图 1)。说明外源片段的大小在 1 300 bp 左右, 可以确定 PCR 克隆成功。



I 樱桃 ACC 氧化酶基因 II 桃 ACC 氧化酶基因  
III  $\lambda$ -DNA/EcoRI + HindIII 分子量 marker

图 1 樱桃 ACC 氧化酶的 DNA 克隆凝胶电泳



I BamHI 单酶切 II BamHI 和 SacI 双酶切  
III XhoI 单酶切 IV 外源片段 V 重组质粒  
VI  $\lambda$ -DNA/EcoRI + HindIII 分子量 marker

图 2 ACC 氧化酶的 DNA 酶切鉴定图

### 2.2 重组质粒的筛选与酶切鉴定

选用半乳糖苷酶的蓝/白筛选系统初步筛选出白色菌落, 提取质粒 DNA 后进一步进行

酶切鉴定。根据杏的 ACC 氧化酶基因序列可以确定在其序列所含的酶切位点中没有 BamHI 和 SacI 这两个酶切位点, 其第 340 个碱基有一个 XhoI 酶切位点。通过分析 P<sup>UCm+T</sup> 克隆载体的多克隆酶切位点序列得出, 在外源目的片段的左端有一个 SacI 的酶切位点, 右端有一个 BamHI 和一个 XhoI 的酶切位点。用 BamHI 单酶切后应产生一个滞后质粒; BamHI 和 SacI 双酶切后应产生一个约 2 700 bp 左右的质粒片段和一个 1 300 bp 左右的外源目的片段。为进一步确定插入外源片的方向性, 选用外源片段和质粒载体上都有酶切位点的 XhoI 单酶切。如果是正向插入, 应产生一个约 960 bp 大小的片段; 如果是反向插入, 应产生一个约 340 bp 大小的片段。酶切结果经琼脂糖凝胶电泳检测与理论相符(图 2), 证明外源目的片段克隆成功, 并为正向插入质粒载体。

### 2.3 测序结果

对樱桃的 ACC 氧化酶基因进行全序列测定, 结果表明该基因序列全长 1 310 bp。通过同源性和 ORF 分析发现, 该基因由 2 个外显子和 3 个内含子构成, 外显子总长为 1 000 bp, 与桃的 ACC 氧化酶基因 DNA 序列同源性达到 97.8%。

通过 DNA 测序结果分析表明, 樱桃的 ACC 氧化酶基因与已知的木本植物桃 DNA 序列同源性很高, 可以初步确定所克隆的基因是樱桃的 ACC 氧化酶基因。

樱桃氧化酶基因的 DNA 序列如下:

3	9	15	21	27	33	39	45

1 AGA TGG AGA ACT TCC CAA TCA TCA ACT TGG AGA GCC TCA ATG GAG  
46 AGG GAA GAA AAG CAA CAA TGG AAA AAA TCA AAG ATG CCT GTG AGA  
91 ACT GGG GTT TCT TTG AGG TAA TTA TAT CCT AAG ATA TAT ATA TAT  
136 ATA TAT GCT TAG CTT CTT CAT TCC TTT TCT CTG TTC ATC TTT TAT  
181 GTT CAT CAA AAT TCA CCT TAT ATA TGA TGA GTT TGG GTT CAC AAA  
226 TAT TGC AGC TTG TGA GTC ATG GGA TAC CAA CTG AGT TTT TGG ACA  
271 CAG TGG AGA GGT TGA CCA AAG AAC ACT ACA GGC AGT GCT TGG AGC  
316 AGA GGT TCA AGG AGC TGG TGG CCA GCA AGG GCC TTG AGG CTG TTA  
361 AGA CAG AGG TCA ATG ATA TGG ACT GGG AAA GCA CCT TCT ACT TGC  
406 GCC ATC TTC CAA AAT CCA ACA TAT CTG AAG TTC CAG ATC TTG AGG  
451 ATC AGT ACA GGT AAA ACC AAT CAC ACA CTA CTT TTA AAT TTC TCT  
496 GTA CGT AAT GCT AGC TAG CTA GCT GGT GCT TGT TCT TTA GAG AAA  
541 TTA ATT TAC ATG AAA TAT GCA GGA ATG TGA TGA AGG AAT TTG CAT  
586 TGA AGT TGG AGA AAT TAG CAG AGC AGC TCC TAG ACT TGC TCT GTG  
631 AGA ATC TTG GAC TTG AAC AAG GGT ACC TCA AGA AGG CCT TCT ATG  
676 GCA CAA ATG GAC CAA CTT TTG GCA CCA AGG TTA GCA ACT ACC CTC  
721 CTT GTC CCA ACC CTG AGC TGA TCA AGG GTC TCC GGG CTC ACA CCG  
766 ATG CCG GTG GCC TCA TCC TGC TCT TCC AGG ATG ACA AGG TCA GTG  
811 GTC TGC AGC TCC TTA AAG ATG GCC AAT GGA TTG ACG TGC CCC CCA  
856 TGC GCC ACT CCA TTG TTA TCA ACC TTG GTG ACC AAA TTG AGG TAA

901 CCC AAT ATT CCG AAT GAA TGT TAC TTC ATG CCC AAT TAA TAT TAA  
 946 ATT TAC TTA CAT ATA TAT ATA ATA AAC ATA TAG GTG ATC ACT AAT  
 991 GGG AAG TAC AAG AGT GTG GAG CAC AGA GTG ATT GCC CAA ACT GAT  
 1036 GGC ACC AGA ATG TCA ATA GCT TCC TTC TAC AAC CCT GGC AGT GAT  
 1081 GCT GTC ATC TAC CCT GCA CCA ACA CTG GTG GAG AAG GAA GCA GAG  
 1126 GAG AAG AAT CAA GTG TAC CCA AAA TTC GTG TTC GAA GAC TAC ATG  
 1171 AAG CTC TAT GCT GGC GTC AAG TTC CAG CCC AAG GAG CCA AGA TTT  
 1216 GAA GCC ATG AAA GCA GTG GAA ACC AAT ATC AGT TTG GGT CCA ATT  
 1261 GCA ACA GCT TAA GAG AAA CTA AGC TTT ACT AAG CTG GAA AGG TTG  
 1306 TTT GC

### 3 讨论

乙烯是发动和促进果实成熟的激素，在成熟过程中由自我抑制转向自我催化，因而与乙烯生成有关的酶及基因的分离克隆是人们致力研究的热点。ACC 氧化酶是乙烯生物合成途径中最后一个酶，催化 ACC 转化为乙烯。ACC 氧化酶是植物中一个固有酶系，是催化乙烯生物合成过程的两个关键酶之一。虽然该酶不构成对乙烯途径中的限速步骤，但是该酶在基因工程方面有重要意义。1990 年，Hamilton 等(1990) 将 ACC 氧化酶的反义基因<sub>p</sub>TOM13 转入番茄，带有两个拷贝 ACC 氧化酶反义基因的转基因番茄在果实成熟时其乙烯的合成降低 97%，且果实成熟的启动不延迟，但成熟过程变慢。经外源乙烯处理采摘的果实，成熟过程可部分逆转，而且乙烯处理过的果实不易皱缩，ACC 氧化酶基因在果实成熟基因工程的意义由此可见。目前人们已先后从甜瓜<sup>[8]</sup>、苹果<sup>[9]</sup>、鳄梨<sup>[10]</sup> 中分离得到 ACC 氧化酶，并鉴定了活性。近来，还成功地进行了苹果中 ACC 氧化酶的纯化、鉴定及特性分析。

关于樱桃的 ACC 氧化酶基因克隆方面的研究，迄今为止未见报道。我们研究了桃的定向克隆引物和其 PCR 扩增体系，并且成功克隆了樱桃的 ACC 氧化酶基因，且与桃的 ACC 氧化酶基因同源性达到 97.8%。樱桃氧化酶基因的克隆完成了樱桃成熟基因工程的上游工作，但是到培育出耐储运的转基因品种尚有很多的工作要做。

### 参考文献:

- [1] 宋艳茹, 谢安勇. 乙烯生物合成与果实成熟的调节 [J]. 植物学报, 1991, 36 (增刊): 1-13.
- [2] 李正国. 果实成熟的基因调控 [J]. 生物工程进展, 2000, 20 (3): 30-34.
- [3] 刘存德. 果实成熟及其基因调控 [J]. 生物学通报, 1999, 34 (1): 4-6.
- [4] 罗云波. 果蔬采后生物技术研究进展 [J]. 园艺学年评, 1995, 1: 39-56.
- [5] 金勇丰, 张上隆, 陈昆松. 果实成熟的分子生物学 [J]. 植物生理学通讯, 1996, 32 (5): 390-396.
- [6] 金勇丰, 张耀洲, 张上隆. 中国“玉露”桃 ACC 氧化酶基因组 DNA 的序列测定及其结构分析 [J]. 浙江农业大学学报, 1998, 24 (1): 63-65.
- [7] 任小林, 金志强, 彭世清. 猕猴桃 ACC 氧化酶 cDNA 克隆及全序列测定 [J]. 园艺学报, 1997, 24

(4): 333– 337.

- [ 8 ] Smith J J, Vereridis P, John P. Characterization of the ethylene forming enzyme partially purified from melon [ J ] . *Phytochemistry*, 1992, 31: 1485– 1496.
- [ 9 ] Fernandez Maculet J C, Yang S F. Isolation and partial characterization of the ethylene-forming enzyme from apple fruit [ J ] . *Plant Physiol*, 1992, 99: 751– 754.
- [ 10 ] McGarvey D J, Christofferson R E. Characterization and kinetic parameters of ethylene-forming enzyme from Avocado fruit [ J ] . *J Biol Chem*, 1992, 267: 5964– 5967.

## Cloning and Sequencing of ACC Oxidase Genes in Cherry Fruit and Leaf

WANG Jun-ying<sup>1</sup>, ZHANG Kai-chun<sup>2</sup>, WANG Jun-ping<sup>3</sup>, ZHANG Jun-ke<sup>4</sup>

(1. Beijing Forestry University, Beijing 100083, China; 2. Beijing Agriculture and Forestry Institute, Beijing 100093, China; 3. China Agricultural University, Beijing 100094, China;  
4. Northwestern University of Agricultural and Forestry Science and  
Technology, Yangling 712100, China)

**Abstract:** The ACC oxidase gene was cloned from genomic DNA of *Prunus pseudocerasus* L. Destination segments amplified by PCR were reclaimed, connected and transformed after examination by 1% agarose gel electrophoresis. By blue-white screening, the plasmid DNA extracted from white colony was identified using restriction enzyme analysis and the DNA sequence was determined following reconfirmation. The results of DNA sequencing revealed that the ACC oxidase gene sequence of *Prunus pseudocerasus* L was 1 310 bp and consisted of 2 exons and 3 introns and the full length of the exons was 1 000 bp. Homogenous analysis indicated that homologue of DNA sequence of the ACC oxidase gene in *Prunus pseudocerasus* L and *Prunus persica* Batsch reached 97.8%.

**Key words:** Cherry; ACC oxidase; Gene cloning; DNA sequencing