

富有柿果 ACC 氧化酶 cDNA 的克隆及其序列分析

张 丽¹, 唐 霞¹, 马俊莲¹, 刘月英²

(1. 河北农业大学 食品科技学院, 河北 保定 071001; 2. 河北经贸大学 生物工程系, 河北 石家庄 050061)

摘要:以富有柿果为材料, 用 RNA 提取试剂盒提取总 RNA, 根据已报道的柿果 ACC 氧化酶(β -aminocyclopropane- β -carboxylic acid oxidase, ACO)基因的序列设计并合成 1 对引物, 通过 RT-PCR 方法获得 1 条约 1.2 kb 特异片段, 将该片段连接到 pGEM[®]-T easy vector 上进行测序, 其全长共 1 237 bp, 编码区 697 bp, 共编码 231 个氨基酸残基。序列分析结果表明, 该序列与 DK-ACO1 的 cDNA 序列同源性达 99%, 氨基酸的同源性达 98%。

关键词: 柿果; ACC 氧化酶; RT-PCR; 序列分析

中图分类号: S665.2 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2007)01-0069-04

Cloning and Sequence Analysis of a cDNA Encoding ACC Oxidase from Fuyu Persimmon

ZHANG Li¹, TANG Xia¹, MA Jun-lian¹, LIU Yue-ying²

(1. College of Food Science and Technology, Agricultural University of Hebei, Baoding 071001, China;

2. Biological Science and Engineering College, Hebei University of Economic and Business, Shijiazhuang 050061, China)

Abstract: Total RNA was extracted from Fuyu persimmon fruits and reverse transcribed to first strand of cDNA. A pair of primers were designed and synthesized based on the sequence reported. The specific PCR product of β -aminocyclopropane β -carboxylic acid oxidase was obtained using the first strand of cDNA as template. The product was ligated to pGEM[®]-T easy vector and sequenced. The sequencing data showed that the PCR product was 1 237 bp with 697 bp of coding region, encoding 231 predicted amino acid residues. Comparison with the cDNA sequence from DK-ACO1 indicated the homology was 99%, and amino acid identities were 98%.

Key words: Persimmon fruit; Fuyu; ACC oxidase; RT-PCR; Sequence analysis

柿(*Diospyros kaki*) 在成熟过程中有呼吸高峰出现, 属跃变型果实^[1]。乙烯对跃变型果实的成熟过程有重要的调节作用, 未熟果实可以通过内源或外源乙烯的作用而加速成熟进程^[2]。ACC 氧化酶催化乙烯生物合成的最后一步是将 ACC(β -氨基环丙烷 β -羧酸) 转化为乙烯。ACC 氧化酶可能也是乙烯生物合成途径中的一个限速酶, 并且 ACC 氧化酶基因的表达是非组成型的, 其转录水平上的调控可能控制着乙烯的生成速率^[3,4]。因此, 采用反义 RNA 或 RNA 干扰技术将 ACC 氧化酶基因反向导入柿果品种中, 可在一定程度上抑制其内源 ACC 氧化酶的表达, 而抑制乙烯的生物合成, 进而延缓柿果的软

化, 使其贮藏期得以延长。为此, 本研究采用 RT-PCR 技术分离、克隆了柿果 ACC 氧化酶的 cDNA 并进行了序列分析, 该序列与 GenBank 中登陆的柿 ACC 氧化酶基因的 cDNA 序列, 已被证实与柿果实的成熟软化有关^[5], 推断该克隆基因也与果实的成熟软化有关。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 植物材料 完熟期的富有柿果采自河北省石家庄市井陉矿区天户峪村果园。

1.1.2 质粒载体和细菌菌株 质粒载体 pGEM[®]-T

收稿日期: 2006-12-08

基金项目: 河北省国际科技合作攻关项目(04395501D-3)

作者简介: 张 丽(1981-), 女, 山西太原人, 在读硕士, 主要从事基因构建和转基因的研究工作

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工作。

easy vector 为 Promega 公司产品, 大肠杆菌 DH5 α 购自道普生物科技(北京)有限公司。

1.1.3 试剂盒、工具酶及生化试剂 RNA 提取试剂盒、反转录试剂盒为 Qiagen 公司产品; 胶回收试剂盒、Taq DNA 聚合酶及 PCR 相关试剂购自天为时代生物公司; Oligo(dT)₁₂₋₁₈ 为 GIBCO/ BRL 公司产品; 各种限制性内切酶均为大连宝生物公司产品。

1.2 方法

1.2.1 RNA 的提取 采用 Qiagen 公司的总 RNA 提取试剂盒(RNeasy Plant Mini Kit) 分离完熟富有柿果中的总 RNA, 方法按产品使用说明进行。

1.2.2 cDNA 第一链的合成 利用反转录试剂盒(Omniscript RT Kit), 以完熟富有柿果的总 RNA 为模板, Oligo(dT)₁₂₋₁₈ 为引物, 按试剂盒的使用说明进行反转录, 合成 cDNA 第一链。

1.2.3 PCR 扩增 PCR 扩增所用引物是根据 GenBank 中登陆的 ACC 氧化酶基因的保守区设计的, 上游引物为: 5'-TCAACGATGCCTGTGAGAACTGG-3'; 下游引物为: 5'-(AT)GC(AG)TC(AG)(CT)TGCC(AC)GGGTTGTAGAAA-3'; 由北京赛百盛基因技术有限公司 Tag 合成。以合成的 cDNA 第一链为模板, 采用 Taq DNA polymerase 进行 PCR 扩增。反应条件为: 热启动, 94℃ 3 min, 94℃ 1 min, 62℃ 1 min, 72℃ 1.5 min, 35 个循环; 最后一轮 72℃ 延伸 15 min。PCR 产物经 1% 的琼脂糖凝胶电泳后, 切下目的条带, 用胶回收试剂盒回收。

1.2.4 目的片段的克隆与 cDNA 序列的测定 纯化的目的 PCR 片段与 pGEM^{hl}-T easy vector 连接, 转化到大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞中, 在 x-gal/ IPTG 培养基上挑取白色菌落, 碱法小批量抽提质粒, 用 EcoRI 酶切质粒后, 电泳鉴定并选择插入片段大小正确的质粒, 菌液送北京三博远志生物技术有限公司进行测序。

1.2.5 序列同源性分析 对测序结果进行 Blast 同源性比较, 用 Omiga 软件进行序列分析。

2 结果与分析

2.1 RNA 的完整性

取 6 μ L 完熟期的富有柿果总 RNA 样品混合液, 加入 94 μ L RNA-free 水, 混匀, 在紫外可见分光光度计上测定波长 260 与 280 nm 下的吸光值, 其 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 比值为 2.097 9。取 4 μ L 该 RNA 样品用琼脂糖电泳检测 RNA 的质量, 图谱中呈现 2 条清晰完整的条带, 且目测 28 S rRNA 条带亮度是 18 S rRNA 条带亮度的 2 倍, 无拖尾现象(图 1), 说明所提

取的 RNA 样品不仅纯度高而且完整。可满足反转录 cDNA 的要求。

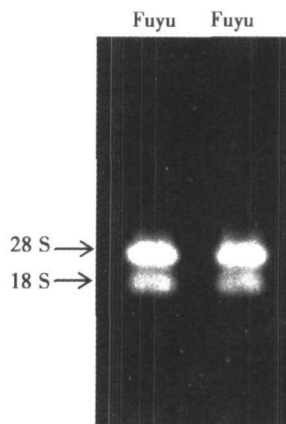
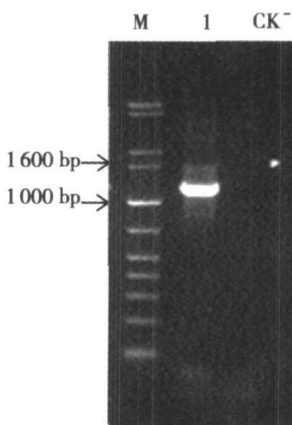


图 1 富有柿果 RNA 电泳图谱

Fig 1 RNA electrophoresis of fuyu persimmon fruit



M. 1 kb plus DNA ladder marker; 1. PCR 产物; CK⁻. 阴性对照
M. 1 kb plus DNA ladder marker; 1. PCR products; CK⁻. Negative comparison of PCR products

图 2 RT-PCR 产物电泳检测

Fig 2 Agrose gel electrophoretogram of PCR products

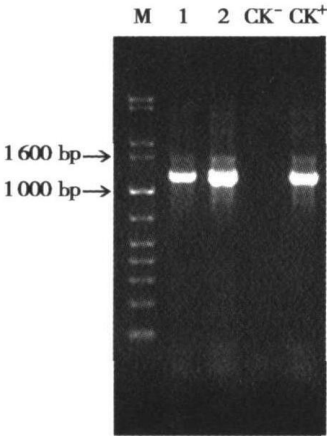
2.2 电泳检测 RT-PCR 产物

完熟柿果的总 RNA 经 RT-PCR 扩增, 根据引物在 ACC 氧化酶基因上的位点, 可以推断扩增产物应在 700 kb 左右。PCR 扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳分析后可以看出, 其扩增片段的大小约为 1.2 kb 左右, 可能有内含子, 凝胶成像系统观察电泳图谱, 如图 2 所示。

2.3 阳性克隆的鉴定

将扩增的片段纯化后与 pGEM^{hl}-T easy 载体连接, 转化大肠杆菌感受态 DH5 α , 蓝白斑筛选含有插入片段的重组质粒。挑取 X-gal/ IPTG 培养基上白色菌落, 进行菌液 PCR 扩增。若含有插入片段则应扩增出 1 条大约为 1.2 kb 条带, 电泳检测 PCR 产物(图 3)。

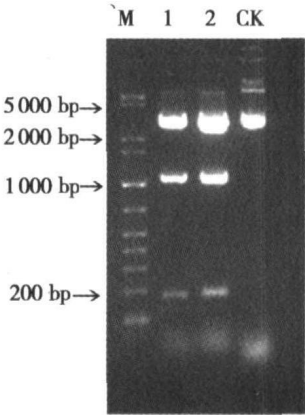
选择第 1, 2 泳道的菌液采用碱裂解法小量提取质粒 DNA, 根据载体上多克隆位点两端的酶切位点, 选择 EcoRI 酶切重组质粒。若重组质粒含有插



M. 1 kb plus DNA ladder marker; CK⁺. PCR 产物;
1, 2. 均为菌液 PCR 产物; CK⁻. 阴性对照
M. 1kb plus DNA ladder marker; 1, 2 Products of
positive bacterium liquid PCR products;
CK⁻. Negative comparison; CK⁺. PCR products

图 3 阳性克隆的菌液 PCR 产物电泳图谱

Fig 3 Agarose electrophoresis of the positive
bacterium liquid PCR products



M. 1 kb plus DNA ladder marker;
1, 2. 重组质粒酶切; CK. 重组质粒
M. 1kb plus DNA ladder marker; 1, 2. Recombinant plasmid
digested by *EcoRI* ; CK. recombinant plasmid

图 4 重组质粒经 *EcoRI* 酶切后电泳图谱

Fig 4 Electrophoresis pattern of recombinant
plasmid digested by *EcoRI*

TCAACGATGC	CTGTGAGAAC	TGGGGCTTCT	TTGAGGTATA	CAAAAAGCAT	50
ACATTCAAGC	TTTCATTATG	TTTCAAACAT	CTCCATTTT	GCAGTCCAAA	100
TAGCTGGTAA	TATTTCTACT	AAGAGCTCAT	TGATCTTTGT	GTTGTGTTTG	150
TGTAGTTGGT	GAACCACGGA	ATTCCTCCGG	AGCTAATGGA	CACAGTGGAG	200
AGAGTGACAA	AAGAGCACTA	CAAGAAGTGT	ATGGAGCAGA	GGTTCAAGGA	250
GCTGGTGGCA	AGCAAGGCTC	TAGAGGGGAT	CCAAGCTGAG	GTTACTGACA	300
TGGATTGGGA	AAGTACCTAC	TTCTTGCGCC	ATCTCCCCCA	GTCCAACATC	350
TCAGAAGTAC	CCGACCTCGA	CGAGGAATAC	AGGTACTGAA	TTGTTTGATC	400
TCTACTCCGA	TCACACATGA	TTAAAGAGAA	TGGTATTAC	TAGTTGAATA	450
TTGAGCTGTT	TCCACCAAAC	GTGGCAGCCA	GTGAAGAGGC	GGAAGGTGAT	500
GGCTTAACAG	GGTCATAACC	TTTTGTGATT	AGACACCATT	AATGGAGACA	550
CAGAATGATT	GGAGAAAATA	TAAAGACACC	CGCATGGAAA	ATTTTCTTAT	600
TTTCTTTCTA	ATTCTTTCAA	AAACAGAATC	ACACAATCAG	ACTTGTTATA	650
GCCCTTTTCAT	GATCTTCCCA	TTGATCAATC	TTCTCCAATT	CTATCTCTGA	700
ATGAGCAGGA	GGGTCATGAA	GGATTTTGCT	GAAAGGTTAG	AGAAGCTAGC	750
AGAGTATCTC	CTGGACTTGC	TATGCGAAAA	CCTTGACTA	GAGAAAGGAT	800
ACCTAAAGAA	GGCCTTCTGT	GGAACAAAGG	GTCCTAATTT	TGGCACCAAG	850
GTTGCCAACT	ACCCGCCGTG	TCCTAAGGCA	GACCTGATCA	AGGGGCAGAG	900
AGCTCACACT	GATGCTGGTG	GCATCATCCT	CCTCTTCCAG	GATGACAAGG	950
TCAGTGGTCT	CCAGCTCCTC	AAGGACGACC	AGTGGATCGA	TGTCCCCCA	1000
ATGAAACATT	CCATGTCAT	CAACTTGGC	GACCAGCTTG	AGGTAAAAATC	1050
ATAGCTTCCA	TCTAGTTGCA	TTAGCTCAAC	CAACACCAAA	CTTTATTTAG	1100
GAAAAAATTC	TAAAGGACCT	TATCAATTTC	AGGTGATAAC	CAATGGCAAG	1150
TACAAGAGTG	TGCTTCACCG	TGTGGCGGCA	CAAACAGATG	GCACCCGGAT	1200
GTCAATAGCT	TCTTTCTACA	ACCCTGGCAA	TGACGCCT		1250

下划线核苷酸为 PCR 引物; 阴影处为内含子序列; 方框处为与 DK-ACO1 的不同核苷酸序列
The portion of underline means primer, shade means intron sequences, the nucleotide in square
box means the nucleotide different from DK-ACO1

图 5 Fuyu-ACO 的核苷酸序列

Fig 5 Nucleur acid sequence of Fuyu-ACO

入片段, 则酶切后除应得到 1 条 3.0 kb 的 pGEM^{HL}-T easy 载体片段外, 还应有 1 条 1.2 kb 左右的插入片段。琼脂糖凝胶电泳检测酶切产物, 结果表明有 2 条 DNA 片段, 大小分别为 1.0 kb 和 200 bp 左右。2 条片段的总和与预期大小一致, 可能为我们所要的

目的片段, 推测在 DNA 片断中存在 *EcoRI* 酶切位点, 酶切电泳如图 4。

2.4 阳性克隆的测序及同源性分析

将经检测正确的阳性克隆送北京三博远志生物技术有限公司进行测序。测序结果表明, PCR 扩增

产物长 1 237 bp, 含有扩增时所用的引物序列, 而且还含有 3 段内含子序列(有明显的内含子末端标记 GTAG), 图 5 所示。内含子序列的存在可能有以下 2 个原因: mRNA 的不完全剪切或是在提取

RNA 时污染了该品种的基因组 DNA。此外, 在序列的 170 bp 处存在 *EcoR* I 酶切位点, 与酶切电泳图谱一致。

Fuyu-ACO	-----NDACENWGFELVN■GIPPELMDTVERVTKEHYKKC	36
DK-ACO1	MESFPVINMEKMNGEERAATMGLINDACENWGFELVN■GIPPELMDTVERVTKAHYKKC	60
Fuyu-ACO	MEQRFKELVASKALEG IQAEVTDMDWESTYFRLHLPQSNISEVPDLDEEYRRVMKDFAER	96
DK-ACO1	MEQRFKELVASKALEG IQAEVTDMDWESTYFRLHLPQSNISEVPDLDEEYRRVMKDFAER	120
Fuyu-ACO	LEKLAEYL■DL■CEN■LGLEKGYLKAFTG■TKGPN■FCTKVANYPPCFKADLIK■Q■RA■IT■A■	156
DK-ACO1	LEKLAEYL■DL■CEN■LGLEKGYLKAFTG■TKGPN■FCTKVANYPPCFKADLIK■GLRA■IT■A■	180
Fuyu-ACO	GCHLLFQDDKY■SGLQLLKDDQWIDVPPMKHS■VINL■DQLEVITNGKYKSVL■RV■AQT	216
DK-ACO1	GCHLLFQDDKY■SGLQLLKDDQWIDVPPMKHS■VINL■DQLEVITNGKYKSVL■RV■AQT	240
Fuyu-ACO	DGTRMSIASFYNPNCN-----	231
DK-ACO1	DGTRMSIASFYNPNCNDIAVYPAPALVEKEVEKEVYPKFVFDYMKLYAALKFQAKEPRF	300
Fuyu-ACO	-----	
DK-ACO1	EAMKAVEANVNLCPIATV	318

阴影处为保守区; 黑影处为不变氨基酸残基; 方框处为与 DK-ACO1 的不同氨基酸残基
Shade means conserved regions, bold means unchangeable amino acid residues, the amino acid in square box means the amino acid different from DK-ACO1

图 6 Fuyu-ACO 和 DK-ACO1 的核苷酸所推导出的氨基酸序列比较

Fig 6 Alignment of amino acid Sequences deduced from Fuyu-ACO and DK-ACO1 Sequences

对克隆的核苷酸序列进行同源性分析, 通过 NCBI 网站进行 Blast 比较, 在 GenBank+ EMBL+ DDBJ+ PDB 数据库中显示出各种植物 ACC 氧化酶基因核苷酸序列, 它与 DK-ACO1 的 mRNA 编码序列(登陆号为 AB073008) 同源性高达 99%, 除外引物序列只有 6 个碱基与其不同(图 5 中所示)。将克隆的核苷酸序列去除 3 段内含子后, 编码 231 个氨基酸, 包含有 ACC 氧化酶的 7 个氨基酸高度保守区和不变氨基酸残基, 在氨基酸水平上, 它与 DK-ACO1 的氨基酸序列(登陆号为 BAB89351) 有 98% 的同源性, 有 4 个氨基酸不同(图 6 所示)。因此可确定所克隆到的序列为 ACC 氧化酶基因, 即 Fuyu-ACO。

3 讨论

ACC 合成酶和 ACC 氧化酶都是乙烯生物合成途径的关键酶, 利用转基因技术从乙烯生物合成途径的上游抑制 ACO 的表达, 从而抑制乙烯的合成。Fuyu-ACO 与 DK-ACO1 无论是核苷酸水平还是在氨基酸水平, 都有很高的同源性^[6], 可以认为两者在功能上也有很高的相似性。DK-ACO1 基因已被证实与柿果成熟直接相关, 若将克隆的富有柿果 ACC 氧化酶序列构建到植物表达载体, 以反义及 RNA 干扰

技术抑制该基因的表达, 预期可能有效延缓柿果的成熟、软化。Fuyu-ACO 的核苷酸序列已用于载体构建, 转基因试验正在进行中。

参考文献:

[1] 张子德, 马俊莲, 甄增立. 柿果采后生理研究[J]. 河北农业大学学报, 1995, 18(2): 105- 107.

[2] Lelievre J M, Latche A, Jones B, et al. Ethylene and fruit ripening[J]. PhysiolPlant, 1997, 101: 727- 739.

[3] Arjen T H, Ernst J W. Ethylene biosynthetic genes are differentially expressed during camation(*Dianthus caryophyllus* L.) flower senescence[J]. Plant Molecular Biology, 1997, 34: 89- 97.

[4] 马俊莲, 唐 霞, 张子德, 等. 富有柿果实 ACC 合成酶 3' 末端的 cDNA 克隆[J]. 华北农学报, 2005, 20(4): 4- 7.

[5] Nakano R, Ogura E, Kubo Y, et al. Ethylene biosynthesis in detached young persimmon fruit is initiated in calyx and modulated by water loss from the fruit[J]. Plant Physiology, 2003, 131(1): 276- 286 .

[6] 饶景萍, 杨书珍, 中野隆平, 等. 柿果实 ACC 氧化酶 cDNA 的克隆及其序列分析[J]. 中国农业科学, 2002, 35(6): 695- 699.