

# 上西早生柿 *ETR5* 基因片段的克隆与植物表达载体的构建

陈 佳, 马俊莲, 张子德, 唐 霞

(河北农业大学 食品科技学院, 河北 保定 071001)

**摘要:** 从上西早生(Uenishiwase)柿叶片中, 提取了基因组 DNA。以基因组 DNA 为模板, 经 PCR 扩增, 克隆到一个 549 bp 的 *ETR5* 的 DNA 片段。序列分析表明, 上西早生柿基因与洋梨 *ETR5* 的核苷酸同源性和氨基酸同源性为 81.0%; 并且含有其他植物 *ETR5* 的保守氨基酸区和不变氨基酸残基, 表明克隆到的序列是上西早生柿 *ETR5* 的基因片段。设计了 2 对带限制性内切酶位点的特异性引物, 以测序质粒为模板, PCR 扩增到 2 个 *ETR5*-Uenishiwase 片段。2 个片段经单酶切消化后连接成反向互补的大片断。连接片断经双酶切消化后, 连接到植物表达载体 pBI221 上, 构建成功 Uenishiwase-*ETR5* 基因的植物表达载体。

**关键词:** 柿; 上西早生; 乙烯受体; *ETR5*; 植物表达载体

中图分类号: S665.203 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2007)04-0025-04

## Cloning of *ETR5* from Uenishiwase Persimmon Fruits and Its Plant Expression Vector Construction

CHEN Jia, MA Jun-lian, ZHANG Zi-de, TANG Xia

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

**Abstract:** One fragment of *ETR5* was cloned from Uenishiwase persimmon by PCR. Sequence analysis indicated that nucleotide identities of Uenishiwase with *Pyrus communis* was 79%, and amino acid identities were 81%. Uenishiwase has the conserved amino acid regions and invariant amino acid residues of *ETR5* existing in other plants, the cloned production was Uenishiwase persimmon *ETR5* gene sequence confirmly. Two pairs of primers containing restriction enzyme site were designed and were used to amplify sequenced plasmid. Two PCR products were digested by the corresponding restricted enzymes respectively, then connect them to be a long segment that is reverse complemented. Finally inserted it into the expression vector pBI221 after digesting.

**Key words:** Persimmon fruit; Uenishiwase; Ethylene receptor; *ETR5*; Plant expression vector

柿(*Diospyros kaki*)是跃变型果实, 进入完熟阶段后, 乙烯的生物合成量急速增加, 果实快速软化<sup>[1]</sup>。在基因水平上调控果实成熟的主要途径有 2 条: 一是抑制乙烯的生物合成, 二是调节乙烯受体的敏感性<sup>[2-6]</sup>。近年来, 通过转基因可以降低或抑制乙烯的表达, 但果实在采收贮藏和运输环境中, 也会有乙烯积累, 即使少量的乙烯也会加速果实成熟衰老。植物体内有乙烯受体, 乙烯只有与乙烯受体结合, 才会诱导植物体内的信号转导过程, 通过转基因的方法减少乙烯受体的数量, 可以降低乙烯的敏感性<sup>[4]</sup>。

上西早生是生产上广泛栽植的甜柿的优良品种, 本研究利用 PCR 的方法克隆了上西早生柿 *ETR5* 的 DNA 片段, 构建了柿果的 *ETR5* 正反义基因的连接片段, 并构建了植物表达载体。为通过转基因技术控制柿果的采后软化、简化柿果的贮藏方法、延长柿果贮藏期奠定基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

1.1.1 植物材料 从上西早生柿组培苗叶片中, 提

收稿日期: 2007-04-18

基金项目: 河北省自然科学基金项目(C2006000465)

作者简介: 陈 佳(1982-), 女, 山东聊城人, 在读硕士, 主要从事果蔬生物技术研究工作

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。

取基因组 DNA。

1.1.2 质粒载体和细菌菌株 质粒载体 pGE<sup>®</sup>-T easy vector 为 Promega 公司产品, 双元表达载体 pBI121 为中国农业大学王国英教授实验室保存, 大肠杆菌 DH5 $\alpha$  购自道谱生物技术公司。

1.1.3 试剂盒、工具酶及生化试剂 回收电泳谱带的试剂盒 QIAEX<sup>®</sup> II Gel Extraction Kit 为 QIAGEN 产品。pGEM-T Easy Vector System I 载体是 Promega 的产品。Oligo(dT) 12-18 是 Invitrogen 的产品。Taq 酶和各种限制性内切酶均为大连宝生物公司产品; DNA 序列由联合基因上海联众基因研究院完成。感受态菌 DH5 $\alpha$  购自北京鼎国公司。

## 1.2 方法

1.2.1 引物的设计和 PCR 扩增 根据植物 ETR 的核苷酸保守序列, 设计了一个 5' 端引物和一个 3' 端引物。5' 端引物的序列为 5'-CATGGGTGTCTC-CATTTCATGATTCA-3'; 3' 端引物的序列为 5'-CA-GAATTGTGCGTTTGGATGCG-3'。引物由 SBS 公司合成。

本研究以反转录的 DNA 为模板进行 PCR, 扩增条件为: 94℃ 热启动 5 min; 94℃ 变性 1 min 30 s, 58℃ 退火 2 min, 72℃ 延伸 1 min, 5 轮循环; 94℃ 变性 30 s, 58℃ 退火 1 min, 72℃ 延伸 1 min 30 s, 15 轮循环; 94℃ 变性 30 s, 58℃ 退火 1 min, 72℃ 延伸 2 min, 20 轮循环; 最后 72℃ 延伸 7 min; 4℃ 保存。1% 的琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物。

1.2.2 PCR 产物的回收、克隆和测序<sup>[7]</sup> 从琼脂糖电泳胶上回收预期大小的 PCR 谱带, 连接到 pGEM-T Easy TA 载体上, 转化到感受态菌 DH5 $\alpha$  中, 在含 Amp、IPTG 和 X-gal 的 LB 平板上培养, 选择白色菌落提取质粒。用 EcoRI 酶切质粒, 电泳鉴定并选择插入片段大小正确的质粒, 送北京三博远志进行测序。

1.2.3 序列分析 对测序结果进行 Blast 同源性检索, 用 Omiga 和 DNASTar 软件进行序列分析。

1.2.4 上西早生柿 ACC 合成酶 cDNA 植物表达载体的构建

1.2.4.1 表达载体引物设计 根据 Uenishiwase-ETR5 核苷酸序列和载体上的酶切位点, 设计了 2 对引物, 用于 Uenishiwase-ETR5 正义和反义序列的扩增。正义扩增的引物序列中含有 Xba I 和 Sac I 酶切位点; 反义扩增的引物中含 Sma I 和 Sac I 酶切位点。正义序列扩增的上游引物为: 5'-GAGATCTCGATGCCGAATGAAAAG-3', 下游引物为: 5'-TGAGCTCGGATTCTTCAAGAAG-3'; 反义序列扩增

的上游引物为: 5'-TCCCGGGTGAAGAGAACA GA-3', 下游引物为: 5'-GCCGAGCTCGCCATCATAGCAT-3', 引物由赛百盛生物公司合成。

1.2.4.2 PCR 扩增目的片段 以稀释 5 000 倍的测序质粒为模板, 采用 Taq DNA polymerase 进行 PCR 扩增。扩增正义片段反应条件为: 94℃ 5 min, 94℃ 30 s, 56.3℃ 30 s, 72℃ 1 min, 30 个循环, 最后一轮 72℃ 延伸 5 min。扩增反义片段反应条件为: 94℃ 5 min, 94℃ 30 s, 54.7℃ 30 s, 72℃ 1 min, 30 个循环, 最后一轮 72℃ 延伸 5 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。

1.2.4.3 正反义片断的连接 正反义 PCR 产物分别用限制性内切酶 Sac I 消化后, 进行回收。用 T4 DNA Ligase 进行连接, 反应条件为 16℃ 过夜。连接产物转化到感受态大肠杆菌 *E. coli* DH5 $\alpha$  中, 在含 Amp、IPTG 和 X-gal 的 LB 平板上培养, 选择白色菌落提取质粒。用 EcoRI 酶切质粒, 电泳鉴定判断插入的正反义连接片段的正确性。

1.2.4.4 表达载体的构建 提取正反义连接产物的质粒, 用限制性内切酶 Sma I + Xba I 消化, 从胶中回收目的片段; pBI221 质粒也用 Sma I + Xba I 酶切, 电泳回收大片段, 回收的目的片段进行定向连接。连接产物转化到感受态大肠杆菌 *E. coli* DH5 $\alpha$  中, 在含有 Amp 的 LB 平板上筛选阳性菌落, 碱法提取质粒。采用 Sma I + Xba I、Sma I + Sac I 和 Xba I + Sac I 酶切的方法, 判断插入的正反义连接片段的正确性。

## 2 结果与分析

### 2.1 上西早生柿 ETR 基因片段的扩增和克隆

从上西早生柿组培苗叶片中分离到了完整的基因组 DNA, 以其为模板进行 PCR 扩增, 从上西早生柿叶片中扩增到 1 条与预期大小相近的电泳谱带(图 1), 谱带约为 550 bp。重组质粒经 EcoRI 酶切后, 上西早生柿得到约 549 bp 大小的 1 条谱带(图 2), 说明在上西早生序列中不存在 EcoRI 的酶切位点。

### 2.2 克隆片段的序列分析

从上西早生柿叶片中克隆到 549 bp 的 DNA 片段。同源性分析表明, 上西早生柿 ETR5 基因与洋梨中 ETR5 的核苷酸同源性为 79.0% (图 3), 氨基酸同源性 81.0% (图 4)。上西早生柿中的氨基酸序列中, 具有植物 ETR5 的保守氨基酸区和不变氨基酸残基, 表明上西早生 ETR 的核苷酸序列为 ETR5 的片段。由于柿的 ETR5 基因迄今为止并未见报道, 通过上西早生柿 ETR5 基因与洋梨的 ETR5 核苷酸

序列和氨基酸序列同源性的比较, 可以肯定所得到的基因片断为上西早生柿 *ETR5* 的基因序列。

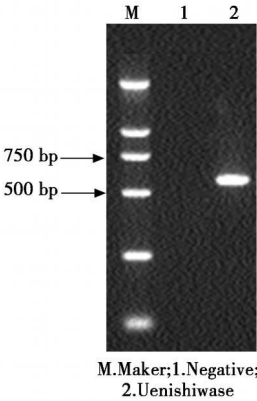


图 1 上西早生柿 PCR 产物电泳图

Fig. 1 PCR production electrophoresis of Uenishiwase persimmon

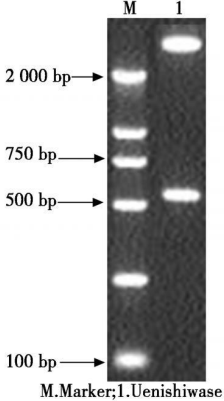


图 2 重组质粒经 *EcoRI* 酶切后的电泳图谱

Fig. 2 Electrophoresis partten of recombinant plasmid digested by *EcoRI*

Uenishiwase	1	CAGAATTGTCGGCTTTGGATGCCGAATGAAAAGAGAACAGAAATGCACTTGACTCATCAG	60
Pyrus communis	607		666
Uenishiwase	61	TTGAAAAGGAGTTCTTCAA-ACAGTTATGGCCAATTTCTTCCAATTAATGACCGCGATGT	119
Pyrus communis	667		725
Uenishiwase	120	GTTAGATATAAGAAACAAGAAGGGAGTGAGCATTTTGAGGCCAGATTGCTGACTGGGTC	179
Pyrus communis	726		785
Uenishiwase	180	TGGCAGCACTGCTGCGTCTTCTGACTTTGCTGCTGCGCAGCAATTAGCATGCCAATGCT	239
Pyrus communis	786		845
Uenishiwase	240	TTGCTTTTGAATTTTAAGGGAGCAACTCCAGAGTTTCTTGAGACTTCTTATGCCATATT	299
Pyrus communis	846		905
Uenishiwase	300	GCTTTTGGCTTCTTCCAAATGCAAAATGCTGAGACTGCGCTATAATGAGATGGAGATACT	359
Pyrus communis	906		965
Uenishiwase	360	GGAAGTAGTTGCTGACCAAGTGGCTCTGGCTCTTCCCATGCTGCGCTTCTGAAGAATC	419
Pyrus communis	966		1025
Uenishiwase	420	CCAACTAATGAGGAAAAAACTGGAAGAGCAGAATCCGATGCTACAGCAGGCTAAGCAGAA	479
Pyrus communis	1026		1085
Uenishiwase	480	TGCTATCATGCCAAGCCAGCAAGG	504
Pyrus communis	1086		1110

图 3 上西早生柿 *ETR5* 与洋梨 *ETR5* 核苷酸序列比对结果

Fig. 3 Alignment of nuclear acid sequence between Uenishiwase-*ETR5* and *Pyrus communis-ETR5*

Uenishiwase	1	QNCAVWMPNEKRTEMHL THQLKRSSSNYSYQFLPINDPDVLDIRNKKGVRLRPDSSLGS	60
Pyrus communis	200	QNCAVWMPNEKRGEMLN THELKTSSSRQYRRSIP INDPDVLEIRESERVMLRPDSALGS	259
Uenishiwase	61	ASSGGSSEFGAVAAIRMPML CVSNEFKGCTPEFVETSYAILVLVLPNGNGGDWSYNEMEIV	120
Pyrus communis	260	ASSGESSESGAVAAIRMPMLRVSNFKGCTPQLVDTHYAILVLVLPVADSGGWSHHELEIV	319
Uenishiwase	121	EVVADQVAVALSHAAVLEESQLMREKLEEQNRMLQQAQKQAMMASQARNTFQKVMNHEMR	180
Pyrus communis	320	EVVADQVAVALSHAAVLEESQLMREKLAEQNRALQQAKNAMMASQARHSFQKAMSHGMR	379
Uenishiwase	181	TPM	183
Pyrus communis	380	RPM	382

图 4 由上西早生柿 *ETR5* 与洋梨 *ETR5* 核苷酸序列所推导出的氨基酸序列比较

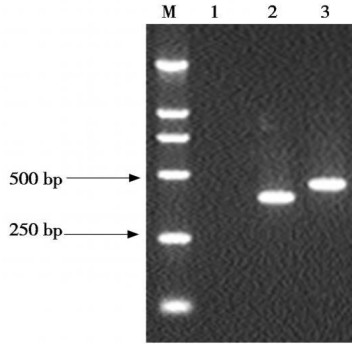
Fig. 4 Alignment of amino acid sequences deducted sequences from Uenishiwase-*ETR5* and *Pyrus communis-ETR5*

2.3 柿 ACC 合成酶 cDNA 植物表达载体的构建

以稀释 5 000 倍的 Uenishiwase-ETR5 测序质粒为模板, 用正义序列的扩增引物 PCR 扩增到 1 条约 420 bp 的片段, 用反义序列的扩增引物也扩增到 1

条约 480 bp 的片段, 与设计结果相符(图 5)。正反义 PCR 产物分别用限制性内切酶 *SacI* 消化后, 进行回收连接, 连接产物转化到感受态大肠杆菌 *E. coli* DH5α 中, 提取质粒。用 *EcoRI* 酶切质粒, 电泳

鉴定判断, 得到一条约 900 bp 的片段, 表明正反义片段连接成功(图 6)。

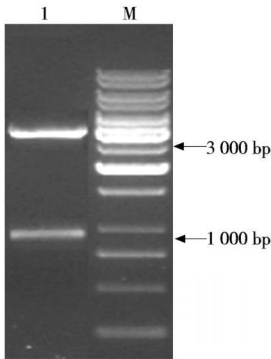


M. DL2000 marker; 1. 阴性对照; 2. 正义 PCR 产物; 3. 反义 PCR 产物

M. DL2000 marker; 1. Negative comparison of PCR; 2. PCR productions of sense; 3. PCR productions of antisense

图 5 PCR 产物电泳图

Fig. 5 Agarose electrophoresis of PCR productions

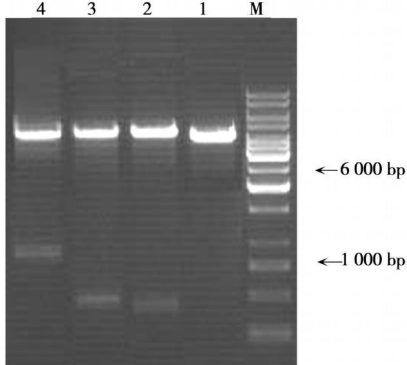


M. DL2000 marker; 1. 重组质粒

M. DL2000 marker; 1. Recombinant plasmid

图 6 重组质粒经 *EcoRI* 酶切后的电泳图谱

Fig. 6 Electrophoresis pattern of recombinant plasmid digested by *EcoRI*



M. 1 kb ladder marker; 1. 对照质粒; 2. pBI221-RNAi; / *Xba* I + *Sac* I; 3. pBI221-RNAi/ *Sma* I + *Sac* I; 4. pBI221-RNAi/ *Sma* I + *Xba* I

M. 1 kb ladder marker; 1. Control plasmid;

2. pBI221-RNAi; / *Xba* I + *Sac* I; 3. pBI221-RNAi/ *Sma* I + *Sac* I;

4. pBI221-RNAi/ *Sma* I + *Xba* I

图 7 RNAi 表达载体酶切鉴定图谱

Fig. 7 Detection of the expression vector by enzymatic digestion

将 pBI221 质粒和正反义连接产物的质粒分别

用限制性内切酶 *Sma* I + *Xba* I 消化, 凝胶回收并进行定向连接。连接产物转化到感受态大肠杆菌 *E. coli* DH5 $\alpha$  中, 提取质粒。用 *Sma* I + *Xba* I、*Sma* I + *Sac* I 和 *Xba* I + *Sac* I 分别酶切, 电泳鉴定判断, 分别得到约 900, 480 和 420 bp 的片段, 表明上西早生柿 ACC 合成酶 cDNA 植物表达载体构建的正确性(图 7)。

### 3 讨论

从上西早生柿中克隆了柿 *ETR5* 的部分基因序列, 克隆的序列中包含有 *ETR5* 的保守氨基酸区和不变氨基酸残基, 与洋梨 *ETR5* 的核苷酸和氨基酸序列有很高同源性。*ETR5* 基因在植物的花和果实中表达, 有较高的表达丰度<sup>[8,9]</sup>。本研究以柿的 *ETR5* 的核苷酸序列, 构建植物表达载体 RNAi, 进而获得抗软化转基因柿果, 为柿果的采后软化、简化柿果的贮藏方法、延长柿果贮藏期奠定基础。目前, 构建好的正反义质粒已转入农杆菌 LBA4404 中, 转基因试验正在进行中。

### 参考文献:

- [1] 田建文, 贺普超, 许明宪. 植物激素与柿子后熟的关系[J]. 园艺学报, 1994, 21(3): 217-221.
- [2] 刘莉, 柿原文香, 加藤正弘. 甜瓜果实中乙烯生产量及相关性状的遗传分析[J]. 华北农学报, 2005, 20(3): 25-29.
- [3] El-Sharkawy I, Jones B, Li Z G, et al. Isolation and characterization of four ethylene perception elements and their expression during ripening in pears (*Pyrus communis* L.) with/without cold requirement[J]. J Exp Bot, 2003, 54(387): 1615-25.
- [4] Klee H J. Control of ethylene-mediated processes in tomato at level of receptors[J]. J Exp Bot, 2002, 53: 2057-2063.
- [5] Denise M T, Harry J K. Differential expression of two novel members of the tomato ethylene-receptor family[J]. Plant Physiology, 1999, 120: 165-172.
- [6] Ma N, Tan H, Liu X, et al. Transcriptional regulation of ethylene receptor and CTR genes involved in ethylene-induced flower opening in cut rose (*Rosa hybrida* cv. Samantha)[J]. J Exp Bot, 2006, 57(11): 2763-2773.
- [7] 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.
- [8] 王中风, 应铁进. 植物乙烯信号转导研究进展[J]. 植物生理与分子生物学报, 2004, 30(6): 601-608.
- [9] 魏绍冲, 陈昆松, 罗云波. 乙烯受体与果实成熟调控[J]. 园艺学报, 2004, 31(4): 543-548.