

# 富有柿果实 ACC 合成酶 3' 末端的 cDNA 克隆

马俊莲<sup>1</sup>, 唐霞<sup>1</sup>, 张子德<sup>1</sup>, 王国英<sup>2</sup>

(1 河北农业大学 食品科技学院, 河北 保定 071001; 2 中国农业大学国家生物技术重点实验室, 北京 100094)

**摘要:** 利用 3' RACE 的方法对柿果实 ACC 合成酶基因的 3' 末端进行扩增, 扩增产物克隆到 pMD18-T Vector 载体上, 转化到大肠杆菌感受态细胞 DH5 $\alpha$ , 蓝白斑筛选重组质粒, 并对插入片段进行序列测定。结果表明, 3' RACE 产物长 912 bp, 开放阅读框内核苷酸序列编码 251 个氨基酸, 此氨基酸序列含有 ACC 合成酶中 3 个高度保守区, GenBank 中登录的 DK-ACS1 (登录号 AB073005) 序列只有一个的氨基酸不同。终止子后面的 3' 非编码区的长度为 155 bp, 其中只有一个核苷酸与 DK-ACS1 的 3' 序列非编码区不同。序列分析结果显示, 克隆的片段含有 5' 端 GSP Inner Primer 和 3' 端为 RACE Inner Primer 的引物。

**关键词:** 柿果; 富有; ACC 合成酶; 3' RACE

中图分类号: S665.2 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2005)04-0004-04

## Cloning of a Full 3' End cDNA Sequence of ACC Synthase from Fuyu Persimmon

MA Jun-lian<sup>1</sup>, TANG Xia<sup>1</sup>, ZHANG Zi-de<sup>1</sup>, WANG Guo-ying<sup>2</sup>

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

2. National Agricultural Biotechnology Key Lab, China Agricultural University, Beijing 100094, China)

**Abstract:** Gene cloning is the bases to research gene function and expressing characterization. The popular used method is to partial clone gene coding sequence first by the gene specific prime desired from the gene conserve amino acid, then to get 5' and 3' end sequence which is much difficult than coding region cloning. A cDNA fragment with a 3' end sequence of ACC synthase was cloned from Fuyu persimmon fruit by 3' RACE PCR. The PCR product was linked into the pMD18-T Vector and recombinant plasmid was transformed to *E. coli* DH5 $\alpha$ , which was selected with  $\times$ -gal/IPTG. Sequence analysis showed the PCR product was 912 bp, which encoded 251 amino acids with three highly conserved regions of ACC synthase. There was only one amino acid different from the sequence DK-ACS1 which entered in GenBank (AB073005). There was a 155 bp non-encoding sequence in 3' end, in which only one nucleotide was different from DK-ACS1. The sequence included 5GSP inner primer and 3RACE inner primer, which indicated to get a full 3' end sequence of Fuyu persimmon fruit.

**Key words:** Persimmon; Fuyu; ACC synthase; 3' RACE

近年来,随着分子生物学的发展,用基因工程的方法克隆与果实成熟保鲜性能相关的目的基因,对相关基因的表达进行有目的调控,进而改变果实的成熟性能,获得耐贮运的优良品种,从根本上克服果实采后软化,已成为调节果实等产品贮运保鲜的重要手段之一。为此,许多学者在这方面做了大量的

工作,并把重点放在如何阻断果实中乙烯的生物合成上。乙烯在植物体内的合成过程已被阐明,ACC 合成酶是乙烯生物合成过程中的限速酶<sup>[1]</sup>。当 ACC 合成酶基因的表达受抑制时,果实成熟受阻,贮藏期得以延长<sup>[2]</sup>。

跃变型果实的成熟过程是由乙烯引发的<sup>[3]</sup>。柿

收稿日期: 2005-01-08

基金项目: 国家留学基金委回国人员启动基金项目

作者简介: 马俊莲(1964-),女,山西太原人,教授,博士,主要从事果蔬贮运和生物技术的教学和研究工作。

果属于典型的跃变型果实,从柿果实中克隆 ACC 合成酶基因,利用转基因技术抑制柿果 ACC 合成酶的表达,降低或抑制柿果完熟期间乙烯的生物合成,是获得耐贮藏柿果重要方法。本文在克隆富有柿果实<sup>[4]</sup>的部分编码序列的基础上,利用 RACE 技术对该基因 3' 末端的序列进行了克隆,为进一步研究该基因的结构和功能特性奠定基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

植物材料同文献[4]。

### 1.2 果实总 RNA 提取

按文献[4]的方法。

### 1.3 cDNA 第一链合成

向置于冰上的 0.2 mL 的 PCR 管中依次加入 total RNA 1  $\mu$ g, dNTPs (2.5 mmol/ $\mu$ L) 4  $\mu$ L, 3' RACE Adapter(接头引物) 2  $\mu$ L, 10 $\times$  RT Buffer 2  $\mu$ L, RNase Inhibitor 1  $\mu$ L, M-MLV Reverse Transcriptase 1  $\mu$ L, 加 Nuclease-free water 至终体积 20  $\mu$ L。将管中组份轻轻混匀,离心,置于 42  $^{\circ}$ C 水浴 1 h。取出后置于 -20  $^{\circ}$ C 保存备用或继续进行实验。以上用于 cDNA 合成的酶及试剂均为 Ambion 公司的产品,所用 PCR 管及枪头均经过 DEPC 处理灭菌。

### 1.4 PCR 扩增

根据已发表的富有柿果实 ACC 合成酶的 cDNA 序列,设计了 2 条该酶的特异性引物,用作 5' 端上游引物。5' 端的上游引物分别为 GSP Outer Primer(基因特异性的外侧上游引物)为 5' TCACCAACCCATCAAACCCTCT 3', GSP Inner Primer(基因特异性内游引物) 5' CACCGAAAAGGGCATTTCATCT 3', 2 个引物的间隔距离约为 60 bp。RACE 试剂盒提供了 3' RACE Outer Primer(3' 外侧引物)和 3' RACE Inner Primer(3' 内侧引物)。引物由北京三博志远生物技术有限公司合成。

1.4.1 第一轮 PCR 0.2  $\mu$ L 灭菌的 PCR 管中依次加入 cDNA 1  $\mu$ L, 3' RACE Outer Primer 2  $\mu$ L, GSP Outer primer 2  $\mu$ L, dNTPs (10 mmol/ $\mu$ L) 1  $\mu$ L, 10 $\times$  PCR Buffer 5  $\mu$ L, Ex-Taq 酶 0.25  $\mu$ L,加水至终体积 50  $\mu$ L。

热启动 PCR 扩增目的片段,按以下条件进行 PCR: 94  $^{\circ}$ C 预变性 3 min, 94  $^{\circ}$ C 变性 30 s, 63  $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72  $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 35 个循环,最后一轮 72  $^{\circ}$ C 延伸 10 min。

1.4.2 第二轮 PCR 将第一轮 PCR 产物用灭菌的 ddH<sub>2</sub>O 稀释 20 倍,取 1  $\mu$ L 作为模板,进行第二次

PCR。反应液中所用 PCR 引物,5 端为 GSP Inner Primer,3 端为 RACE Inner Primer。其他组份均与第一次 PCR 相同,反应条件同上。扩增产物在 1% 的琼脂糖凝胶上电泳检测。

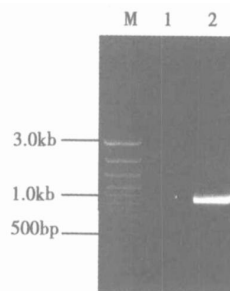
### 1.5 PCR 产物的克隆及 DNA 序列的测定

从琼脂糖凝胶上回收 PCR 产物,采用天为时代的胶回收试剂盒。回收的 PCR 产物与 pMD18-T Vector(TaKaRa 公司产品)载体连接,转化到大肠杆菌 DH5 $\alpha$  感受态细胞中,在 x-gal/IPTG 培养基上挑取白色菌落,菌液 PCR 及碱法小量提质粒酶切鉴定,菌液送三博志远进行测序。

## 2 结果与讨论

### 2.1 3' RACE 产物的凝胶电泳

对两次 PCR 产物在 1% 的琼脂糖凝胶进行了电泳检测。第一轮用 GSP Outer Primer 和 3' RACE Outer primer 这对引物扩增后,电泳检测 PCR 产物没有谱带。但用第一轮 PCR 产物为模板, GSP Inner Primer 和 3' RACE Inner Primer 进行第二轮 PCR 时,扩增到一条明亮的、约为 950 bp 电泳谱带(图 1),经测序证明是 ACC 合成酶的序列。说明第一轮 PCR 所用的引物专一性较低,扩增到的 ACC 合成酶 cDNA 丰度低,没有达到电泳检测的量值。



M. 100 bp ladder marker; 1. 第一轮 PCR 产物; 2. 第二轮 PCR 产物

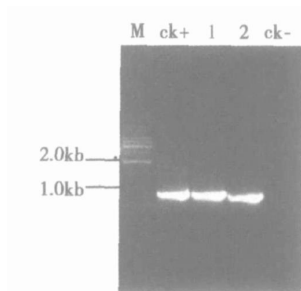
M. 100bp marker; 1. products of the first PCR; 2. products of the second PCR

图 1 3' RACE 产物的电泳图谱

Fig. 1 Agarose electrophoresis of 3' RACE product

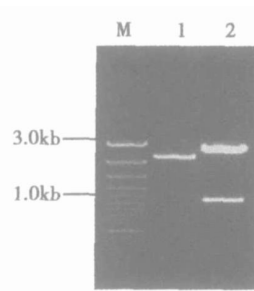
### 2.2 重组质粒的鉴定

将回收的 PCR 产物连接到 pMD18-T Vector (2 692 bp) 上,并转化到大肠杆菌 DH5 $\alpha$  感受态细胞中,挑取 x-gal/IPTG 培养基上白色菌落,进行菌液 PCR,扩增出一条大约为 950 bp 条带(图 2),与第 2 轮 RACE 扩增到的片段大小一致。选择第 3 泳道“1”(图 2)中对应的菌液提取质粒,根据载体上的酶切位点,选择限制性内切酶 Hind III 和 Xba I 对质粒进行消化,琼脂糖凝胶电泳检测,重组质粒中插入的



M. 1kb ladder marker ; ck+ . 第二轮 PCR 产物;  
1, 2 均为菌液 PCR 产物; ck- . 阴性对照(水为模板)  
M. 1kb ladder marker; ck+ . products of the second PCR;  
1, 2. the products of positive bacterium liquid PCR products;  
ck- . negative comparison( water for the template)

图 2 阳性克隆的菌液 PCR 产物电泳图谱  
Fig. 2 Agarose electrophoresis of the positive  
bacterium liquid PCR products



M. 100bp ladder marker ; 1. 对照质粒(未酶切质粒);  
2. 双酶切质粒  
M. 100bp ladder marker ; 1. The ck plasmid( the plasmid undigested );  
2. The plasmid digested by two enzyme

图 3 重组质粒经 *Xba* I 和 *Hind* III 双酶切后的电泳图谱  
Fig. 3 Electrophoresis pattern of recombinant  
plasmid digested by *Xba* I and *Hind* III

ACC	GAA	AAG	GGC	ATT	CAT	CTC	ATC	AGC	GAC	GAG	ATT	TAT	TCC	GGC	ACA	GTT	TTT
T	E	K	G	I	H	L	I	S	D	E	I	Y	S	G	T	V	F
AGC	TCC	CCA	GGC	TTT	CTA	AGC	GTC	ATG	GAG	ATT	CTA	ATG	GAC	AAG	AAG	TAC	TCC
S	S	P	G	F	L	S	V	M	E	I	L	M	D	K	K	Y	S
ATG	AAT	ACT	GAA	GTC	TGG	AAG	CGA	GTT	CAC	ATC	GTG	TAT	AGC	CTT	TCC	AAA	GAT
M	N	T	E	V	W	K	R	V	H	I	V	Y	S	L	S	K	D
CTG	GGT	CTT	CCT	GGT	TTT	CGA	GTT	GGT	GCC	ATA	TAT	TCC	AAC	GAC	GAT	GTG	GTC
L	G	L	P	G	F	R	V	G	A	I	Y	S	N	D	D	V	V
GTA	GAG	GCT	GCC	ACT	AAA	ATG	TCG	AGT	TTT	GGG	CTG	GTT	TCT	TCA	CAG	ACC	CAG
V	E	A	A	T	K	M	S	S	F	G	L	V	S	S	Q	T	Q
TAT	CTT	CTC	TCG	GCA	ATG	CTC	TCC	GAC	AAG	AAG	TTC	AGG	AAA	AAC	TAC	ATT	TCC
Y	L	L	S	A	M	L	S	D	K	K	F	R	K	N	Y	I	S
GAG	AAT	CAG	AAG	AGG	CTC	CGG	CAT	CGG	CAA	GAG	ATG	CTG	ATA	TCT	GGC	CTT	GAA
E	N	Q	K	R	L	R	H	R	Q	E	M	L	I	S	G	L	E
AGC	GCC	GGA	ATT	AGA	TGC	CTT	AAG	AGC	AAT	GCC	GGT	TTG	TTC	TGT	TGG	GTA	GAT
S	A	G	I	R	C	L	K	S	N	A	G	L	F	C	W	V	D
ATG	AGA	CAC	CTC	TTG	AGC	TCC	GAA	ACT	TTC	GAC	GCG	GAG	ATG	GAG	CTC	TGG	AAG
M	R	H	L	L	S	S	E	T	F	D	A	E	M	E	L	W	K
AAG	ATT	GTT	TAC	GAT	GTC	GGC	TTG	AAC	ATA	TCG	CCT	GGC	TCG	TCT	TGC	CAC	TGC
K	I	V	Y	D	V	G	L	N	I	S	P	G	S	S	C	H	C
GAC	GAA	CCG	GGT	TGG	TTC	CGG	GTT	TGC	TTC	GCG	AAC	ATG	TCC	GCG	GCG	ACT	CTG
D	E	P	G	W	F	R	V	C	F	A	N	M	S	A	A	T	L
AAT	CTC	GCA	ATA	CAA	AGG	ATA	AAA	CTT	TTT	GTT	CAG	TCC	ACC	GCC	GCC	GGC	GAC
N	L	A	I	Q	R	I	K	L	F	V	Q	S	T	A	A	G	D
AAA	CAA	AAC	CAA	AGC	TAT	CAC	CAA	TCA	CTC	AAC	AAC	TCG	AGA	AGA	AAA	TCA	CTC
K	Q	N	Q	S	Y	H	Q	S	L	N	N	S	R	R	K	S	L
ACC	AAG	TGG	GTT	TTT	CGA	TTA	TCG	TTC	GAT	GCG	GAG	CCT	GAC	GAA	CGA	TAA	
T	K	W	V	F	R	L	S	F	D	G	R	E	P	D	E	R	*
TCC	AGT	GTG	AAC	ATA	TTA	TCG	ATA	CGG	ATC	TTT	CTT	TCT	TTC	TTT	TTT	CTC	AAT
ATT	GAA	ATG	TTG	AGT	TCG	TCT	TCT	TTC	TTC	TTT	TTG	GAT	CAA	AAA	ATT	TAA	TTA
ATC	AAA	AAA	AAA	AAA	CCT	ATA	GTG	AGT	CGT	ATT	AAT	TCG	GAT	CCG	CG		

横线所示核苷酸序列为引物序列, 阴影中氨基酸序列为高度保守区的氨基酸序列, 方框中的核苷酸为不同的碱基  
Underlined sequences were the 3' RACE Inner Primer and RACE Inner Primer; Shadowed sequences were the conserved  
amino regions; Nucleotide in square box meant the nucleotide different from DK-ACSI.

图 4 3' RACE 产物的核苷酸序列及所推导的氨基酸序列  
Fig. 4 Nucleotide and presumed amino sequences of 3' RACE product

片段大小约为 950 bp(图 3)。图 3 中第 2 泳道“1”中是酶切前的环状重组质粒, 环状质粒往往以超螺旋态存在, 在琼脂糖电泳时迁移速度明显快于线状质粒, 在电泳图上的位置先于酶切后质粒载体。

菌液 PCR 扩增到了约 950 bp 的电泳谱带, 重组质粒酶切后也得到了约 950 bp 片段, 可以初步确定获得的产物可能是柿果 ACC 合成酶的 3' 端序列。

### 2.3 PCR 产物的序列测定

经序列测定知 PCR 产物全长 912 bp, 含有 3' 扩增中所用的引物序列。将此序列进行 BLAST 分析, 表明与 GenBank 中登录的 DK-ACS1 (登录号 AB073005) 编码区只有两个核苷酸不同, 导致所编码的氨基酸不同(图 4), 非编码区除引物外只有一个核苷酸不同, 重复测序结果一致。由此序列推导出的氨基酸序列包含 ACC 合成酶的 3 个高度保守区,

3' 末端有 110 bp 的不翻译片段。

### 参考文献:

[1] Yang S F, Hoffman N E. Ethylene biosynthesis and its regulation in higher plants[J]. Annual Rev Plant Physiol, 1984, 35: 155.

[2] Oller P W, Lu M W, Taylor L P, *et al.* Reversible inhibition of tomato fruit senescence by antisense RNA [J]. Science, 1991, 254: 437- 439.

[3] Adman 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, 1979, 76: 170- 174.

[4] 马俊莲, 唐 霞, 刘月英. 磨盘和富有柿果实 ACS 基因片段的克隆[J]. 河北农业大学学报, 2004, 27(4), 40-44.