

黄河蜜甜瓜 1-氨基环丙烷 1-羧酸合成酶 基因片段的克隆和反义载体的构建^{*}

张永红^{1,2}, 张力群², 杨之为¹, 唐文华²

(1 西北农林科技大学 植保学院, 陕西 杨凌 712100; 2 中国农业大学 植物病理系, 北京 100094)

[摘 要] 从伤诱导的黄河蜜甜瓜(*Cucumis melo* cv. Huanghemi)成熟果实的中果皮组织中分离总 RNA, 经反转录和 PCR 扩增得到 974 bp 的 cDNA 片段, 克隆到质粒载体 pGEM-3zf, 经测序与 Genbank 中甜瓜 1-氨基环丙烷 1-羧酸合成酶(1-amino-cyclopropane-1-carboxylic acid synthase, ACS)基因同源性为 99%。克隆片段经双酶切消化, 反向插入到植物表达载体 pBI121 的 35S 启动子和 NOS 终止子之间, 构建 ACS 基因的反义表达载体。

[关键词] 黄河蜜甜瓜; ACS 基因; 反义载体

[中图分类号] S652.303.6

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2004)02-0044-05

乙烯在高等植物的生长、发育、成熟、衰老过程中起着重要作用^[1,2], 乙烯的产生与果实的软化、腐烂有密切关系^[3]。1979 年, Adnan 和 Yang^[3]阐述了乙烯的生物合成途径为: 甲硫氨酸(MET)→S-腺苷甲硫氨酸(SAM)→1-氨基环丙烷 1-羧酸(ACC)→乙烯。在这个合成途径中, SAM 向 ACC 的转化由 1-氨基环丙烷 1-羧酸合成酶(ACS)催化形成, 此步骤是乙烯生物合成的限速步骤^[2,4]。Sato 和 Theologis^[5]首次报道从南瓜(*Cucumis zucchini*)果实切片中分离到编码 ACS 的 cDNA 序列。此后相继报道从多种植物中克隆到 ACS 的 cDNA 和染色体 DNA, 如番茄^[6,7], 甜瓜^[8]等。反义 RNA 技术是转录后基因沉默(PTGS)的一种, 其可能的作用机制是同时转录的正义和反义 RNA 形成互补的双链 RNA(dsRNA), dsRNA 被核酸酶切割成 21~25 nt 的干扰性小 RNA(siRNA), 由 siRNA 介导识别并靶向切割同源性靶 mRNA 分子而实现基因沉默^[9]。利用反义 ACS 基因调控乙烯的合成, 从而延迟果实成熟的成功例子很多^[10,11]。黄河蜜甜瓜是甘肃特产的厚皮甜瓜, 果实甘甜、营养丰富、风味独特, 但采后病害严重, 不耐储藏, 严重影响了甜瓜的生产及储运。控制果实成熟过程中乙烯的产量是减少产后病害损失的有效方法之一, 但是应用传统方法解决这个问题一直没有得到理想结果。本研究拟通过反义

RNA 技术获得转反义 ACS 基因的黄河蜜甜瓜植株, 以期获得耐贮藏的甜瓜品种, 改善黄河蜜甜瓜的保鲜问题。作为前期工作, 本研究介绍黄河蜜甜瓜 ACS 基因编码区 cDNA 的克隆和表达其反义 ACS 二元载体的构建。

1 材料与方法

1.1 材料

植物材料 黄河蜜甜瓜果肉购自当地市场。

质粒载体和细菌菌株 质粒载体 pGEM-3zf 购自 Promega 公司; 二元载体 pBI121, 根癌农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)菌株 LBA 4404 (Str^r)和大肠杆菌(*Escherichia coli*)菌株 DH5 α 由中国农业大学植保生防室保存。

工具酶及生化试剂 反转录酶 M-MLV, RNA 酶抑制剂和 DNA 回收试剂盒购自鼎国生物公司, Taq 酶及 PCR 相关试剂购自欣经科生物公司, DNA 连接酶及其他限制性内切酶购自华美公司, DNA 测序由上海申友生物公司完成。

1.2 方法

1.2.1 大肠杆菌 DH5 α 的培养 挑取单菌落接种于液体 LB 培养基中, 37℃ 振荡培养至 OD₆₀₀ = 0.5, 收集细胞用于连接物转化。电击转化后均匀涂于附加有氨苄青霉素(Amp)(100 μ g/mL), X-gal

^{*} [收稿日期] 2003-02-19

[基金项目] 澳大利亚国际农业中心项目(PHT/1998/140)

[作者简介] 张永红(1972-), 女, 河南遂平人, 在读硕士, 主要从事分子植物病理研究。E-mail: gipsygirlzhyh@163.net

[通讯作者] 张力群(1969-), 男, 山东济南人, 副教授, 博士, 主要从事细菌分子生物学和植物病害生物防治研究。E-mail: zhanglq@cau.edu.cn

(40 $\mu\text{g}/\text{mL}$), IPTG (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 的 LB 平板上, 37 $^{\circ}\text{C}$ 温箱中培养过夜。

1.2.2 农杆菌 LBA 4404 (Str^r) 的培养 挑取单菌落接种于含有硫酸链霉素 (Str) (125 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 的液体 LB 培养基中, 28 $^{\circ}\text{C}$ 振荡培养至 $\text{OD}_{600} = 0.3 \sim 0.4$, 收集细胞用于转化。转化液均匀涂于附加有硫酸链霉素 (Str) (125 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 和卡那霉素 (Kan) (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 的 LB 平板上, 28 $^{\circ}\text{C}$ 温箱中培养 36~48 h。

1.2.3 总 RNA 的分离 从市场购回的黄河蜜甜瓜果实在 25 $^{\circ}\text{C}$ 温箱中保湿 5 h 后取出, 一切两半, 以伤诱导 ACS 基因的表达^[12]。分别间隔 0, 1, 2, 3, 4, 5 h 取中果皮组织约 5 g, 切成 1 mm 厚的薄片, 立即放入液氮中研磨, 用 LCL 沉淀法从多糖材料黄河蜜甜瓜果中中提取总 RNA^[13]。

1.2.4 RT-PCR 和 ACS 基因 cDNA 的克隆 分别以伤诱导 0, 1, 2, 3, 4, 5 h 的甜瓜中果皮组织中提取的总 RNA 为模板, 以 Oligo (dT)₁₅ 为引物, 按照 M-MLV 反转录方法反转录成 cDNA 第一链, 再以 cDNA 第一链为模板进行 PCR

扩增, 引物以 Genbank 中葫芦科 ACS 基因 cDNA 的保守序列设计。P₁: 5' acacg agcac aaata attcc ag, P₂: 5' gccag gagaa cattg agctt。反应条件为: 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 4 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 55 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 共 35 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 终延伸 10 min。反应体积 50 μL 。扩增完毕后电泳检查, 用酚/氯仿抽提和乙醇沉淀法从反应混合物中纯化扩增到的 cDNA 片段。纯化的片段克隆到经限制性内切酶 *Sma* I 消化的质粒载体 pGEM-3zf。

1.2.5 反义载体的构建 重组质粒经限制性内切酶 *Sac* I 和 *Xba* I 消化后, 从胶中回收小片段, 与经 *Xba* I 和 *Sac* I 消化的质粒载体 pBI121 大片段连接, 连接产物转化感受态大肠杆菌 *E. coli* DH5 α , 在含有卡那霉素 (Kan) (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 的 LB 平板上筛选阳性菌落, 碱法提取质粒并酶切鉴定。重组质粒用反复冻融法转化根癌农杆菌 LBA 4404 (Str^r), 在含有卡那霉素 (Kan) (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 和硫酸链霉素 (Str) (125 mg/L) 的 LB 平板上筛选阳性克隆并提取质粒酶切鉴定。反义载体的构建过程见图 1。

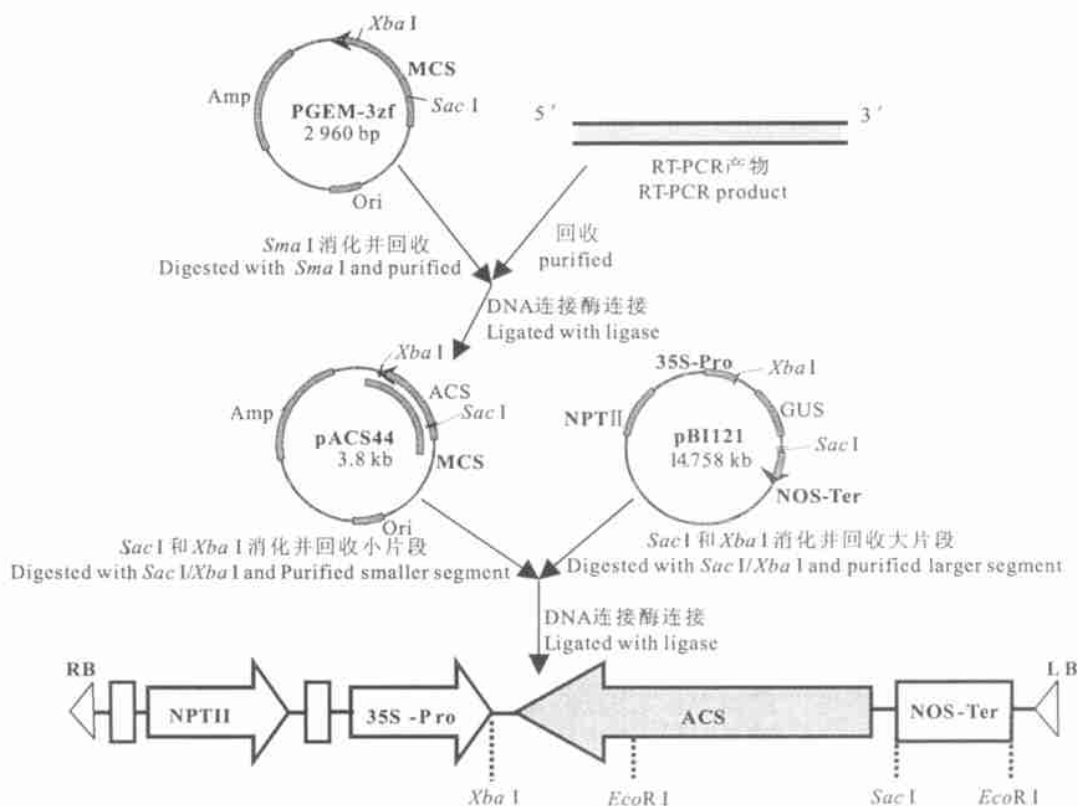


图 1 ACS 反义表达载体 pBACS 的构建过程

Fig 1 Construction of antisense expressing vector pBACS

2 结果与分析

2.1 cDNA 的合成和 ACS 基因 cDNA 克隆

以总 RNA 为模板, Oligo (dT)₁₅ 为引物, 反转录成 cDNA 第一链, 再以 cDNA 第一链为模板, 以 P₁ 和 P₂ 为引物进行 PCR 扩增。PCR 产物经电泳检查, 只有诱导 2 0, 3 0, 4 4 h 的样品有 PCR 产物, 扩增的 ACS cDNA 片段约为 1 kb, 与预期大小一致 (图 1, 泳道 6)。有文献报道^[14], 甜瓜 ACS RNA 以伤诱导 4~5 h 的产量最高, 本研究选取诱导 4 4 h 的 PCR 产物做后续工作。扩增后的 cDNA 片段以平端插入 pGEM-3zf 的 *Sma* I 位点。重组质粒命名为 pACS44, 并经限制性内切酶消化和电泳分析验证 (图 2)。

测序结果显示该片段长 974 bp, 其核苷酸序列与 Genbank 中报道的日本甜瓜品种“*Andes ME-ACS1*”、黄瓜 ACS 和番茄 ACS 的同源性分别为 99%, 95% 和 84%, 推导的氨基酸序列与甜瓜、黄

瓜、番茄的氨基酸序列同源性分别为 98%, 96%, 70% (Genbank database) (图 3)。

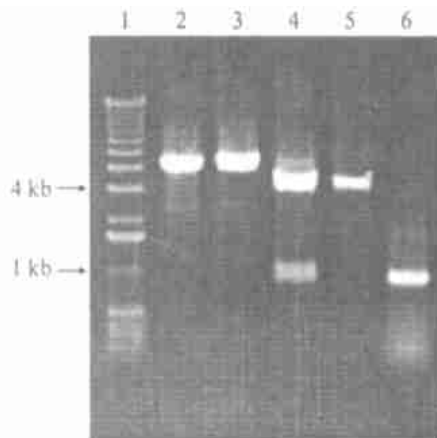


图 2 pACS44 的限制酶分析

1. 1 kb ladder; 2. *Kpn* I 消化; 3. *Sal* I 消化; 4. *Xba* I + *Sac* I 消化; 5. *EcoR* I 消化的 pGEM-3zf; 6. PCR 产物

Fig 2 Analysis of pACS44 with restriction enzyme

1. 1 kb ladder; 2. *Kpn* I digestion; 3. *Sal* I digestion; 4. *Xba* I + *Sac* I digestion; 5. Plasmid pGEM-3zf digested with *EcoR* I; 6. PCR product

I	NSSSVPNFQDYHGLPEFRNAIASFMGKAGGGRVKFDPSPRIVMGGGATGASETVIFCLADPGDAFLIPSPYYAAFDRLQWRTRAQIIPV
II	NFKDIA*****R*****A*****V*****P*****N*****R*****GV*****L*****I
III	NFKDIA*****R*****A*****V*****P*****N*****R*****GV*****L*****I
IV	---AIA*****K*****E*TR*****R*****E*****V*****A*****N*****I*****V*****P*****N*****R*****GV*****L*****I
I	HCNSSNNFQITREALEVAYKKAESNIKVGLIITNPSNPLGTIYDRDTLKSIVNFVNDNNIHLICDEIYSATVFKSPSFTSIAEII--
II	*****E*****K*****SK*****VKE*****EN*****QK*****L*****TL*****K*****VLS*****T*****QH*****V*****A*****DT*****Q*****V*****LDE
III	*****E*****K*****SK*****VKE*****EN*****QK*****L*****TL*****K*****VLS*****T*****QH*****V*****A*****DT*****Q*****V*****LDE
IV	*****E*****K*****SK*****VKE*****EN*****QK*****L*****TL*****K*****VLS*****T*****QH*****V*****A*****DT*****Q*****V*****LDE
I	EEMDHCKKELIHLSSLSKDMGLPGFRVGLISYNDTVVSIARKMSSFGVLSSQTQHLLAAMLSDKEFVDNPLVENSRLAKRHRARFTE
II	*****E*****K*****SK*****VKE*****EN*****QK*****L*****TL*****K*****VLS*****T*****QH*****V*****A*****DT*****Q*****V*****LDE
III	*****E*****K*****SK*****VKE*****EN*****QK*****L*****TL*****K*****VLS*****T*****QH*****V*****A*****DT*****Q*****V*****LDE
IV	*****E*****K*****SK*****VKE*****EN*****QK*****L*****TL*****K*****VLS*****T*****QH*****V*****A*****DT*****Q*****V*****LDE
I	Q*TY*N*D*V*VY*****I*F*D*NC*****T*VF*****EK*****R*SAM*G*KH*N
II	*****E*****K*****SK*****VKE*****EN*****QK*****L*****TL*****K*****VLS*****T*****QH*****V*****A*****DT*****Q*****V*****LDE
III	*****E*****K*****SK*****VKE*****EN*****QK*****L*****TL*****K*****VLS*****T*****QH*****V*****A*****DT*****Q*****V*****LDE
IV	*****E*****K*****SK*****VKE*****EN*****QK*****L*****TL*****K*****VLS*****T*****QH*****V*****A*****DT*****Q*****V*****LDE
I	ELEKMGITCLNSNAGLFVWMDLRKLLKQSFSEMELEWRVINEVKLVNSP
II	*****E*****K*****SK*****VKE*****EN*****QK*****L*****TL*****K*****VLS*****T*****QH*****V*****A*****DT*****Q*****V*****LDE
III	*****E*****K*****SK*****VKE*****EN*****QK*****L*****TL*****K*****VLS*****T*****QH*****V*****A*****DT*****Q*****V*****LDE
IV	*****E*****K*****SK*****VKE*****EN*****QK*****L*****TL*****K*****VLS*****T*****QH*****V*****A*****DT*****Q*****V*****LDE

图 3 黄河蜜甜瓜 ACS 推导的氨基酸序列及其与其他作物 ACS 氨基酸序列的比较

* 表示相同的氨基酸; I. 黄河蜜瓜; II. 甜瓜; III. 黄瓜; IV. 番茄

Fig 3 Comparison of derived AA sequence and other crop species' AA sequence of ACC synthase

* presents the same AA; I. *Cucumis melon* cv. Huanghe; II. *Cucumis melon*; III. *Cucumis sativus*; IV. *Lycopersicon esculentum*

2.2 反义表达载体的构建

ACS cDNA 片段可由 pACS44 上经 *Xba* I 和 *Sac* I 双酶切切下, 所得到的 ACS 基因片段表达方向为 *Sac* I → *Xba* I。该片段连接上 *Xba* I 和 *Sac* I 双酶切的真核表达载体 pB1121 后, 构建成新的载体 pBACS, 其由 35S 启动子带动的转录方向为 *Xba* I → *Sac* I, 形成 ACS 的反义 mRNA (图 3)。克隆的 cDNA 片段第 24 和 638 位有 2 个 *EcoR* I 位点, 用

Xba I 和 *Sac* I 消化后只留下 638 位的 *EcoR* I 位点, 质粒 pB1121 的 NOS 终止子下游有 1 个 *EcoR* I 位点, 若携带有部分克隆载体 pGEM-3zf 序列的 cDNA 片段以反方向插入 35S 启动子和 NOS 终止子之间, 则用限制性内切酶 *EcoR* I 消化会切下一个 904 bp 的片段。 *EcoR* I 消化和电泳分析结果 (图 4) 说明, ACS 基因片段的反义表达载体已经成功构建。

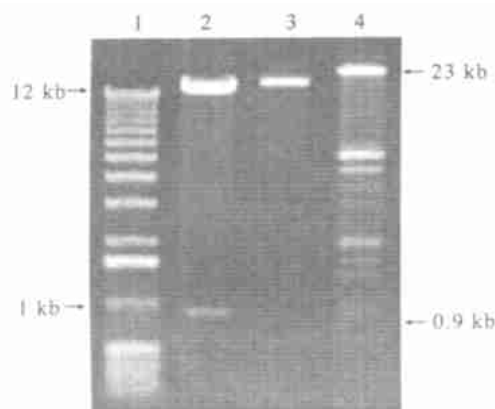


图4 反义表达载体的限制酶分析

1 1 kb ladder; 2 *EcoR* I 消化; 3 *EcoR* I 消化
的质粒 pBI121; 4 *NDNA/EcoR* I + *Hind*III marker

Fig 4 A analysis of antisense expression vector
digested with restriction enzyme

1 1 kb ladder; 2 *EcoR* I digestion; 3 Plasmid pBI 121
digested with *EcoR* I; 4 *NDNA/EcoR* I + *Hind*III marker

3 讨论

ACC 合成酶参与植物生长发育的调控以及对环境压力作出各种反应。ACC 合成酶基因由多基因家族编码, 其表达有组织特异性^[15, 16], 因此不同的甜瓜品种其 ACS 基因的同源性也有一定的差异。Miki 等^[14]从甜瓜成熟果实中克隆出 2 个 ACS 基因 *M e-A CS 1* 和 *M e-A CS 2*, *M e-A CS 1* 的表达不仅受成

熟诱导还受伤口诱导, 而且在果实成熟过程中优先表达, 这说明 *M e-A CS 1* 对甜瓜果实成熟过程中乙烯的大量产生起着主要作用。*M e-A CS 1* 的表达与番茄中 ACC 合成酶 *LE-ACC2* 在成熟过程中的表达方式相似。本研究从伤诱导的黄河蜜甜瓜成熟果实的中果皮组织中克隆了 ACC 合酶 cDNA 片段。克隆的 cDNA 片段长 974 bp, 与已经报道的甜瓜 *M e-A CS 1* 的核苷酸同源性为 99%, 因此可以推断所克隆的 cDNA 片段与成熟过程中乙烯的产生相关。

20 世纪 80 年代以来, 反义 RNA 技术已经成为调控植物基因表达的有力工具。通过反义 RNA 途径抑制乙烯合成途径中限速酶的表达, 可延迟果实的成熟^[11]。反义 RNA 可能的作用机制是转录后有义链和反义链互补形成的复合物干扰了靶基因的表达^[17]。尽管目前还不完全清楚由反义 RNA 介导的转录后基因沉默 (PTGS) 的机制, 但是其潜在的应用价值在过去的 20 年中已经得到证明^[18~20]。本研究构建了黄河蜜瓜 ACC 合酶 cDNA 片段的反义表达载体, 并以根癌农杆菌介导建立了适合黄河蜜甜瓜的高效遗传转化体系, 将甜瓜 ACC 合成酶反义基因导入黄河蜜甜瓜, 并通过组织培养筛选出了黄河蜜甜瓜再生培养基中适宜的激素浓度, 目前已经获得抗性无根苗, 无根苗的生根及转基因再生植株的鉴定工作正在进行中。

[参考文献]

- [1] Abeles F B, Morgan P W, Saltveit M J. Ethylene in plant biology[M]. Ed2. San Diego. CA: Academic Press, 1992
- [2] Yang S F. Biosynthesis and action of ethylene[J]. Hortscience, 1985, 20: 41- 45
- [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] Yang S F, Hoffman N E. Ethylene biosynthesis and its regulation in higher plants[J]. Annu Rev Plant Physiol, 1984, 35: 155- 189
- [5] Sato T, Thellogis A. Cloning the mRNA encoding 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase, the key enzyme for ethylene biosynthesis in plants[J]. Proc Natl Acad Sci, 1989, 86: 6621- 6625
- [6] 曹晓风, 鲁治滨, 朱玉贤, 等. 番茄乙烯合成酶基因的 cDNA 克隆及全序列测定[J]. 科学通报, 1993, 38: 1907- 1910
- [7] 李小娟, 邵寒霜, 郑学勤. 番茄 1-氨基环丙烷羧酸 ACC 合成酶基因的克隆及其反义基因表达载体的构建[J]. 热带作物学报, 1999, 20: 34- 37
- [8] 尹俊, 哈斯阿古拉, 方天祺. 河套蜜瓜 ACC 合成酶 cDNA 片段的克隆和序列分析[J]. 生物技术, 1997, 7: 10- 13
- [9] 陈忠斌, 于乐成, 王升启. RNA 干扰作用 (RNA i) 研究进展[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2002, 18: 525- 528
- [10] Oeller 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
- [11] 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- 43

- [12] Nakajima N, Mori H, Yamazaki H, et al Molecular cloning and sequence of a complementary DNA encoding 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase induced by tissue wounding[J]. *Plant Cell Physiol*, 1990, 31: 1021- 1029
- [13] Ikoma Y, Yano M, Ogawa K, et al Isolation and evaluation of RNA from polysaccharide-rich tissues in fruit for quality by cDNA library construction and RT-PCR[J]. *J Japan Soc Hort Sci*, 1996, 64: 809- 814
- [14] Miki T, Yamamoto M, Nakagawa H, et al Nucleotide sequence of a cDNA for 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase from melon fruits[J]. *Plant Physiol*, 1995, 107: 297- 298
- [15] Williams H. ACC synthase in tomato is encoded by a multigene family whose transcription is induced during fruit and floral senescence[J]. *J Mol Biol*, 1991, 222: 937- 961
- [16] Kende H. Ethylene biosynthesis[J]. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 1993, 44: 283- 307
- [17] Waterhouse PM, Graham MW, Wang MB. Virus resistance and gene silencing in plants can be induced by simultaneous expression of sense and antisense RNA[J]. *Proc Natl Acad Sci*, 1998, 95: 13959- 13964
- [18] Smith CJ, Watson CF, Morris PC, et al Inheritance and effect on ripening of antisense polygalacturonase genes in transgenic tomatoes[J]. *Plant Mol Biol*, 1990, 14: 369- 379
- [19] Amor MB, Guis M, Latche A, et al Expression of an antisense 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase gene stimulates shoot regeneration in *Cucumis melo*[J]. *Plant Cell Reports*, 1998, 17: 586- 589
- [20] 张晓海, 扈廷茂, 海燕, 等. 番茄 ACC 合成酶基因的反义 RNA-核酶嵌合基因植物表达载体的构建及对番茄的转化[J]. *内蒙古大学学报(自然科学版)*, 2001, 32: 74- 78

Molecular cloning of a muskmelon cDNA fragment encoding an aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) synthase and construction of antisense expression vector

ZHANG Yong-hong^{1,2}, ZHANG Li-qun², YANG Zhi-wei¹, TANG Wen-hua²

(1 College of Plant Protection, Northwest Science and Technology University of Agriculture and Forestry, Yangling, Shaanxi 712100, China;

2 Department of Plant Pathology, China Agriculture University, Beijing 100094, China)

Abstract: A cDNA fragment of an aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) synthase was amplified by Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) from wounded mesocarp tissue of mature muskmelon (*Cucumis melo* cv. Huangheni) and cloned into a vector pGEM-3zf. DNA sequencing showed that the cloned fragment shared highly homogeneity to the cDNAs of ACC synthases from other Cucurbitae plants. The cloned cDNA of ACC synthase was further introduced into a binary vector pBI121 in a reverse orientation with its upstream promoter (CaMV 35S), giving an expressing plasmid containing the antisense ACC synthase gene.

Key words: muskmelon; ACC synthase gene; antisense expression vector