

甘蔗 ACC 氧化酶全长 cDNA 的克隆及序列分析

王爱勤¹, 杨丽涛¹, 王自章², 韦宇拓³,

何龙飞¹, 李杨瑞^{1,4}

(1. 广西大学 农学院, 广西 南宁 530005; 2. 中国科学院 植物研究所, 北京 100093; 3. 广西大学 生命科学与技术学院, 广西 南宁 530005; 4. 广西农业科学院, 广西 南宁 530007)

摘要: ACC 氧化酶是高等植物乙烯生物合成途径中的限速酶。根据报道的植物 ACC 氧化酶基因序列设计特异引物, 从甘蔗 cDNA 文库中克隆到一 ACC 氧化酶基因片段, 命名为 GZ-ACO, 该基因长 792 bp, 与甘蔗基因组文库中克隆的 ACO 基因片段仅 18 个碱基之差。根据该 cDNA 片段序列, 设计两对末端扩增的特异引物, 利用 RACE-PCR 技术, 获得 GZ-ACO 片段的 5'端和 3'端序列。用 Vector NTI 7.0 软件对三个序列进行拼接和分析, 结果得到全长的甘蔗 GZ-ACO 氧化酶基因。GZ-ACO cDNA 核苷酸序列长 1 307 bp, 具有一个 972 bp 完整的读码框, 启动子 ATG 位于 126 bp, 终止子 TAA 位于 1 097 bp, 推导编码 323 个氨基酸。系统进化分析表明, GZ-ACO 基因氨基酸序列与其它植物已报道的 ACC 氧化酶基因具有 65%~86% 的同源率, 且与单子叶禾本科植物首先聚类, 其次与单子叶芭蕉科、兰科植物聚类, 最后与双子叶植物聚类, 与植物形态的系统进化结果一致。该基因已在 DDBJ/EMBL/GenBank 基因数据库注册, 注册号为 AY521566。

关键词: ACC 氧化酶; cDNA 克隆; 甘蔗; 基因

中图分类号: Q943.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2006)02-0194-06

Cloning and sequencing of full-length cDNA encoding ACC oxidase in sugarcane

WANG Ai-qin¹, YANG Li-tao¹, WANG Zi-zhang^{1,2},

WEI Yu-tuo³, HE Long-fei¹, LI Yang-rui^{1,4}

(1. *Agricultural College, Guangxi University, Nanning 530005, China*; 2. *Institutes of Botany, the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100093, China*; 3. *College of Life Sciences and Technology, Guangxi University, Nanning 530005, China*; 4. *Guangxi Academy of Agricultural Sciences, Nanning 530007, China*)

Abstract: 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid oxidase is one of the key rate-limiting enzymes for ethylene biosynthesis in higher plants. In the present study, a cDNA fragment of 792 bp, designated GZ-ACO, was obtained from sugarcane cDNA library. According to the GZ-ACO cDNA fragment sequence, full length of GZ-ACO cDNA was generated by 5'RACE and 3'RACE methods. GZ-ACO cDNA was 1 307 bp in length. Within the full-length cDNA, a clear open reading frame(ORF) was 972 nucleotides, coding 323 amino acids. The 5' end included a putative translation start codon(ATG) at position 126 bp; the 3' end included an end codon(TAA) at position 1 097 bp and had a poly(A) tail. The identity of the other polypeptides to each other varied between 65%~86%. The results of phylogenetic analysis showed that ACC oxidase from sugarcane and from Gramineae clustered together firstly, and then came those from Musaceae and Orchidaceae, dicotyledon came subsequently. The clustering results of ACC oxidase molecules accorded with morphological classification sys-

收稿日期: 2005-01-26 修回日期: 2005-07-26

基金项目: 国家自然科学基金(39860039); 广西自然科学基金(桂科青 9912014)资助[Supported by the National Natural Science Foundation of China(39860039); Natural Science Foundation of Guangxi(9912014)].

作者简介: 王爱勤(1966-), 女, 广西上思人, 博士生, 副教授, 从事植物学教学和科研工作, E-mail: <lfhe@gxu.edu.cn.com>.

tem. The sequence of GZ-ACO had been submitted to the DDBJ/EMBL/GenBank database, the accession number was AY521566.

Key words: 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid oxidase; cDNA cloning; *Saccharum officinarum* L. Hybrid; gene

乙烯对植物生长和发育过程具有广泛的调节作用,如调控种子萌发、生根、茎叶的生长、花芽分化、果实的成熟、衰老和脱落、对环境胁迫的应答等。生理生化研究表明,乙烯利对甘蔗的增产、增糖具有重要的调节作用。Singh 等(1998)和 Solomon 等(2001)报道,甘蔗收获前 7~10 d,用乙烯利处理甘蔗,有效地提高甘蔗的品质、地下潜伏芽色氨酸和锌的含量,维持细胞膜的稳定,从而提高冬季甘蔗的发芽率。Li 等(2003)报道在甘蔗分蘖初期用 200~400 mg/L 的乙烯利进行叶面喷施,对甘蔗生长有明显的抑制作用,80~100 mg/L 浓度的乙烯利则促进叶面积、株高、有效茎数增加;甘蔗生长后期,高浓度的乙烯利则可提高甘蔗糖分、蔗汁锤度、蔗汁糖分、蔗汁重力纯度,降低蔗汁还原糖含量,抑制甘蔗开花抽穗。关于乙烯利调节甘蔗增产、增糖的机理,目前有两种不同的观点,一是外源乙烯利诱导甘蔗体内乙烯的形成(Yang 等,1984);二是外源乙烯利不影响 ACC 和 ACC 合成的水平,与体内乙烯的形成无关(Foster 等,1992)。ACC 合成酶(ACS)和 ACC 氧化酶(ACO)是高等植物乙烯生物合成的两个关键酶,已经从多种植物中分离和克隆它们的基因,但在甘蔗中,除王自章等(2003)从基因组文库中分离到一段 ACO 基因片段外,未见有其它报道。为阐明乙烯调控甘蔗增产和增糖的分子机理,进行 ACS 和 ACO 基因的克隆与表达研究,对全面了解甘蔗生长与环境胁迫关系、乙烯诱导甘蔗增产、增糖及开花机理,进而利用基因工程手段实现品种改良具有重要的理论和实践意义。作为第一步工作,我们从 cDNA 文库分离了甘蔗 ACO 基因全长,并提交 DDBJ/EMBL/GenBank 基因数据库,登录号为 AY521566,同时利用基因数据库资料对该基因序列进行比较分析。

1 材料和方法

1.1 供试材料、菌株和试剂

甘蔗(*Saccharum officinarum* L. Hybrid ROC20)由广西大学农学院教学科研基地提供。以

一芽一节种植于温室大棚中(30℃±2)。每天定时喷雾淋水。选取 4~5 叶期甘蔗健壮幼苗为材料,用 0.5mM IAA+0.05mM BA+75mM LiCl 喷淋甘蔗幼叶至叶面完全湿透。5 h 后,剥取甘蔗幼嫩心叶,迅速加液氮,置-80℃冰箱保存。受体大肠杆菌菌株 JM109 由广西大学生物科学与技术学院微生物发酵中心保存。Taq DNA 聚合酶、限制性内切酶、IPTG、X-Gal、dNTP、AMV-RNase、PMD18-T Vector、DL2000、胶回收试剂盒、质粒小量抽提试剂盒等分子生物学试剂购自大连宝生物工程公司。

1.2 甘蔗总 RNA 的提取和 cDNA 第一链的合成

甘蔗幼嫩心叶加液氮研匀,移入预冷的 50 mL 离心管中,迅速加入 Trizol 提取液。室温下剧烈振荡 5 min。加入酚:氯仿:异戊醇(125:24:1),室温下剧烈振荡 10 min,离心 10 min。取上清液于一干净 RNA-free 的预冷的 50 mL 离心管中。加入无水乙醇后分别转入 UVIQ-10 柱,放置 5 min。离心弃去废液,加入洗液离心 1 min。取出 UVIQ-10 柱,放在一干净 RNA-free 的离心管上,加入 0.5 mL 的 TE 洗脱液于柱中央。室温下放置 5 min,离心 1 min,所得溶液即为总 RNA。

cDNA 第一链的合成:5 μg 甘蔗总 RNA,0.5 ng Oligo(dT)₃₆,5×RT buffer 4 μL,RNase inhibitor 20U,40mM dNTP 2 μL,AMV Reverse transcriptase 5U 反转录合成 cDNA 第一链。

1.3 甘蔗 ACC 氧化酶基因 cDNA 片段的克隆和测序

据 GenBank 核酸数据库中报道的甘蔗 ACO 部分序列,设计一对引物 P3f: 5-GCATTCTGAAC-CACGGCATCTC-3, P4r: 5-TAGGCCTCGAAC-CTTGTGCCG-3。由上海生物工程公司合成。合成的 cDNA 第一链产物稀释 10 倍后作为模板,用 TaKaRa 公司的 EX Taq 酶,以 P3f 和 P4r 为引物,对目的片段进行 PCR 扩增。反应条件:94℃预变性 2 min,94℃变性 30 S、57℃退火 30 S、72℃延伸 2 min,35 次循环,然后 72℃延伸 10 min。PCR 扩增产物经 1% 的琼脂糖凝胶电泳后,切下含目的片段,用上海华舜生物工程有限公司胶回收纯化试剂盒回收目的片段。目的 DNA 片段与载体 pGEM-T

Easy Vector 连接,转化大肠杆菌 JM109,菌落在含有 IPTG 和 X-gal 的平板上进行蓝白斑筛选,挑选出白色的转化菌落质粒 DNA 进行质粒酶切鉴定。克隆的 PCR 产物由上海生物工程公司测序。序列用 NCBI-Blast 等软件和 Vector NTI7.0 软件对核酸数据库及推导的蛋白质序列进行同源性分析。

1.4 甘蔗 ACC 氧化酶基因 cDNA 片段末端扩增引物的设计

利用 Vector NTI7.0 软件对报道的甘蔗 ACO (AF442821)部分序列和前面克隆的 cDNA 片段序列进行对比并修正后,通过 NCBI-Blast 的 GeneFisher 网站对 ACO 基因 cDNA 片段的 5'末端和 3'末端区域设计若干条引物,分析后选择以下引物交由上海生物工程公司合成。

Prt(5'末端磷酸标记引物):5-CGCTCTTGTA CCTGCCGTTG-3, Pfl:5-TCACCAACGGCAGGT ACAAGAGC-3, Pfl2:5-GGCTGCTGGACCTTCT GTGC-3, Pr1:5-GGTATCTCGGCGATGTTGGA-3, Pr2:5-AGCGTCTTGCTGGCGAACT-3, Oligo(dT)₁₀+3'末端锚定引物:5-TTTTTTTTTTCTG ATCTAGAGGTACCGGATCC-3, 3-末端锚定引物:5-CTGATCTAGAGGTACCGGATCC-3, Pr11:5-GGCGGACGAAGAAAGTGC-3, Pr22:5-CGTC CTTGAGCGTCTTGC-3。

1.5 甘蔗 ACC 氧化酶基因 cDNA 片段 5'端和 3'端的扩增

3'末端 PCR 扩增按照大连宝生物工程公司的 3-full RACE Core Set Kit 试剂盒说明书进行。以 Oligo(dT)₁₀+3'末端锚定引物为引物,反转录合成 cDNA 第一链,将合成的锚定 cDNA 第一链的产物作为模板,合成的特异引物 Pfl 和 Pfl2 分别与 3'末端锚定引物进行 3'末端 PCR 扩增。

5'末端 PCR 扩增按照大连宝生物工程公司 3-full RACE Core Set Kit 试剂盒说明书进行。以 5'末端磷酸标记引物(Prt)为引物,反转录合成磷酸标记的 cDNA 第一链;将环化的单链 cDNA 连接产物稀释 10 倍后作为模板,以特异引物 Pfl2 和 Pr1、Pfl2 和 Pr11 分别作为引物对,对目的片段进行第一次 PCR 扩增;将 cDNA 片段 5'末端第一次 PCR 扩增产物稀释 10 倍后作为模板,以特异引物 Pfl 和 Pr2、Pfl 和 Pr11、Pfl 和 Pr22 分别作为引物对,对目的片段进行第二次 PCR 扩增。扩增产物的克隆和测序同上 1.3。

1.6 甘蔗 ACC 氧化酶基因 cDNA 全长的获得及其推导的氨基酸序列同源性分析

用 Vector NTI7.0 软件对已克隆的三段 cDNA 核苷酸序列进行分析和拼接,拼接所得的序列再用 NCBI-Blast 等软件和 Vector NTI7.0 软件对核酸数据库及推导的蛋白质序列进行同源性比较和分析。

1.7 甘蔗 ACO 基因全长 DNA PCR 扩增

根据已获得的全长序列,用 Vector NTI7.0 软件中的引物设计功能在编码框外设计一对引物,即 P33:5-ATGGCGCCTGCATTGTCATT-3 和 P44:5-AAACCAGAGCTAGGCGCAGG-3,以甘蔗基因组 DNA 为模板,进行 PCR 扩增。扩增产物的克隆和测序同上 1.3。

2 结果与分析

2.1 甘蔗 ACC 氧化酶基因 cDNA 片段的克隆与序列分析

以 cDNA 第一链为模板,P3 和 P4 为引物,PCR 扩出预期 750bp 左右的特异性带(图 1:1)。测序分析结果表明,该片段核苷酸序列长度为 792bp,与基因组中克隆的片段(AF442821)同源性高达 97%,仅有 18 个碱基的差异。推导编码 264 个氨基酸序列与甘蔗基因组中克隆的片段(AF442821)同源性高达 95%。

2.2 甘蔗 ACC 氧化酶基因 cDNA 片段 3'端和 5'端的克隆与序列分析

引物和反应条件优化的结果,以 Pr11 和 Pfl2 为第一次 PCR 扩增引物的 PCR 产物为模板,Pr22 和 Pfl 为二次扩增引物,退火温度为 60℃,进行 5'端的扩增,可扩出约 400bp 左右特异性带,记为 5R(图 1:2)。测序结果表明,5R 核苷酸序列大小为 382bp。该序列两端引物完整,与 cDNA 片段的序列进行拼接分析,发现它们有 118bp 的一段是相重叠,而且相重叠的序列几乎完全相同,仅有一个碱基的差异。证明所克隆的 5'末端的核苷酸序列是 cDNA 片段序列未知的上游序列。

以 53℃退火温度、引物 Pfl 进行 3'末端的扩增,可扩出特异性强的 600bp 左右条带,记为 3R(图 1:3)。测序结果表明,3R 核苷酸序列大小为 516bp。该序列具有完整的两端引物序列和 10 个 Poly(A)尾。与 cDNA 片段的序列进行拼接分析,发现它们有 217bp 的一段是相重叠,而且相重叠的

序列几乎完全相同(仅有 2 个碱基的差异)。证明所克隆的 3'末端的核苷酸序列是 cDNA 片段序列的延伸,是该基因的下游未知序列。

2.3 甘蔗 ACO 基因全长 DNA PCR 扩增

以 P33 和 P44 为特异引物,60℃退火温度扩出 1 200bp 左右的特异带(图 1:4)。测序分析所得的结果与已获得的全长序列完全相同,进一步验证了

所拼接的序列的正确。

2.4 甘蔗 ACC 氧化酶基因 cDNA 全长的获得及其推导的氨基酸序列

根据以上的克隆工作,我们将所克隆到的三个 cDNA 片段通过 Vector NTI 7.0 和 NCBI-Blast 软件进行拼接分析,获得了甘蔗 ACO 基因全长 cDNA 序列(图 2)。该序列核苷酸序列大小为 1 307 bp,读

表 1 甘蔗 ACO 基因推导的氨基酸序列与已知其它植物的 ACO 氨基酸序列同源性比较图

Table 1 Alignment of AY521566 and some plant ACO amino acid sequences in GenBank

	水稻 <i>Oryza sativa</i>	毛竹 <i>Phyllostachys edulis</i>	甘蔗 <i>Saccharum officinarum</i>	香蕉 <i>Musa acuminata</i>	蝴蝶兰 <i>Doritaep-sis sp.</i>	玉米 <i>Zea mays</i>	马铃薯 <i>Solanum tuberosum</i>	白三叶 <i>Trifolium repens</i>
基因库中的注册号 Ac- cession No. in GenBank	Q40634	AB044747	AF442821	U55770	P31238	AY359576	AF384821	AF115261
同源率 Homology(%)	86	85	82	72	71	67	66	65

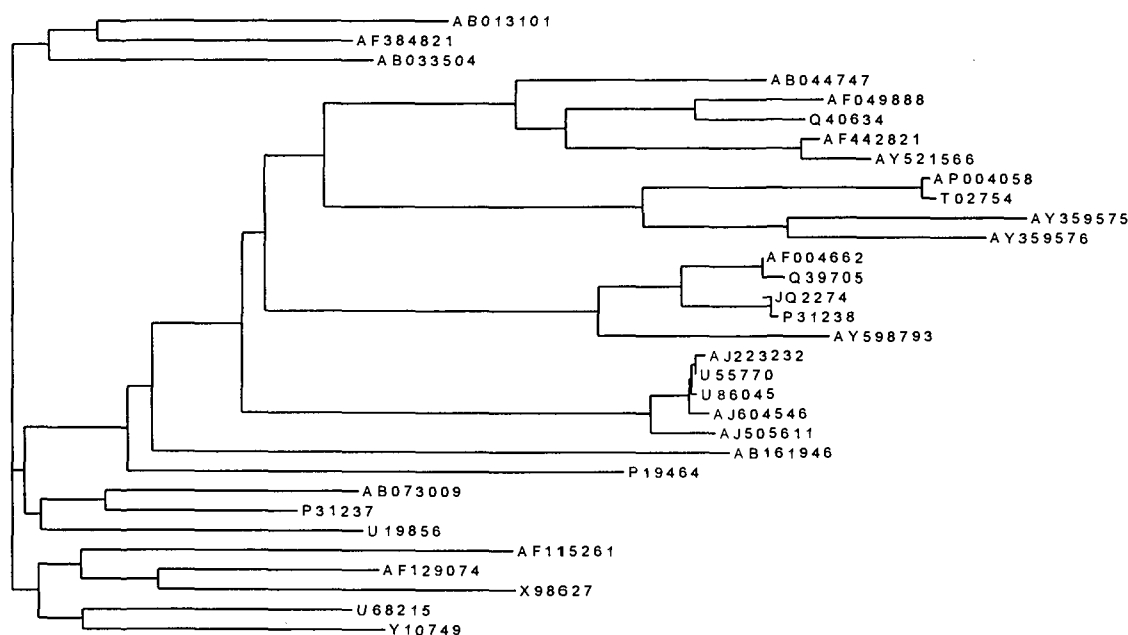


图 3 Vector NTI 7 软件分析不同来源的 ACC 氧化酶基因推导的氨基酸序列聚类分析结果

Fig. 3 Phylogenetic analysis of amino acid sequences of ACC oxidases from sugarcane and other plants in GenBank database

注册号为 AY521566 和 AF442821 是甘蔗; AF049888、Q40634、AP004058 和 T02754 是水稻; AB044747 毛竹; AY359575 和 AY359576 玉米; AJ223232、U55770、U88045、AJ604546 和 AJ505611 是香蕉; AF004662、Q39705、JQ2274、P31238 和 AY598793 兰科植物; AB161946 郁金香; P19464 油梨; AB073009 柿子; P31237 中华猕猴桃; U19856 天竺葵; AB033504 胡杨; AB013101 番茄; AF384821 马铃薯; AF115261 白三叶; AF129074 桃; X98627 苹果; U68215 番木瓜; Y10749 垂枝桦等的 ACC 氧化酶基因及其基因家族。

Among the entries, AY521566 and AF442821 are from sugarcane; AF049888, Q40634, AP004058 and T02754 are from rice; AB044747 is from Bamboo; AY359575 and AY359576 are from *Zea mays*; AJ223232, U55770, U88045, AJ604546 and AJ505611 are from *Musa acuminata*; AF004662, Q39705, JQ2274, P31238 and AY598793 are from *Phalaenopsis sp.*; AB161946 is from *Tulipa gesneriana*; P19464 is from *Persea americana*; AB073009 is from *Diospyros kaki*; P31237 is from *Actinidia chinensis*; U19856 is from *Pelargonium × hortorum*; AB033504 is from *Populus euramericana*; AB013101 is from tomato; AF384821 is from potato; AF115261 is from white clover; AF129074 is from peach; X98627 is from apple; U68215 is from *Carica papaya*; and Y10749 is from *Betula pendula*.

码框为 126~1 097 bp, 其中, 起始密码子 ATG(即启动子)位于 126 bp, 终止密码子 TAA(即终止子)

位于 1 097 bp, 推导 323 个氨基酸(图 2)。该基因已在 DDBJ/EMBL/GenBank 基因数据库注册, 注册

号为 AY521566。

从甘蔗 ACO 基因推导的氨基酸序列与已知其它植物的 ACO 序列有 65%~86% 同源性,其中与水稻 ACO 基因同源性最高为 86%,其次是毛竹、香蕉、兰花、玉米等单子叶植物,与双子叶植物如马铃薯、白三叶等同源性在 65%~68% 之间(表 1)。

2.5 甘蔗 ACC 氧化酶基因推导的氨基酸序列系统进化分析

对 GenBank 同源性搜索获得的其它植物 ACO 基因氨基酸序列进行系统进化分析,发现甘蔗 (AY521566 和 AF442821) 最先与水稻 (AF049888, Q40634) 聚类合并,接着与毛竹 (AB044747)、水稻 (AP004058 和 T02754)、玉米 (AY359575 和 AY359576) 聚类合并,然后与兰科植物 (AF004662, Q39705, JQ2274, P31238 和 AY598793)、芭蕉科植物 (AJ223232, U55770, U88045, AJ604546 和 AJ505611) 聚类,最后与双子叶植物聚类合并(图 3)。系统进化分析结果符合按照形态特征进行判断的系统进化关系。

3 讨论

从 cDNA 文库中分离植物基因比从基因组文库中克隆要难得多,主要是 DNA 提取条件比较简单,不容易降解,而 RNA 在提取过程中,非常容易降解。因此基因克隆成功的关键是 RNA 提纯的质量。利用上海生物工程公司生产的 Trizol UNIQ10 柱式 RNA 抽提试剂盒,可以在较短的时间获得植物总 RNA,减少 RNA 降解的机会。基因全长的克隆方法很多,用核酸探针杂交分离,通过建立 DNA 或 cDNA 文库等克隆目的基因是较常用的方法,但

工作量和难度都很大,对一个已知部分 DNA 片段的基因而言,采用 PCR 和 RACE PCR 方法从 cDNA 文库中克隆基因全长是目前最简便而快速有效的方法。根据拼接结果,在全长编码区两端设计引物,从 DNA 文库中扩增到甘蔗 ACO 基因全长(图 3),推导的氨基酸序列与报道的其它植物 ACO 基因有较高的同源率,以及氨基酸序列系统进化分析结果都证实所克隆的 GZ-ACO 基因确实是 ACC 氧化酶基因。该基因的获得,为进一步了解乙烯与甘蔗生长、糖分积累的关系,构建反义或正义基因,通过遗传转化培育出具有反义或正义基因的基因工程甘蔗,优化蔗糖积累代谢打下了基础。目前该基因的结构与功能鉴定工作正在进行中。

参考文献:

- Foster KR, Reid DM, Pharis RP. 1992. Ethylene biosynthesis and ethephon metabolism and transport in barley [J]. *Crop Science*, **32**:1 345—1 352.
- Li YR, Solomon S. 2003. Ethephon: a versatile growth regulator for sugar cane industry [J]. *Sugar Tech*, **5**(4):213—223.
- Singh I, Solomon S, Rai RK, et al. 1998. Effect of 2-chloroethyl phosphonic acid on stubble bud sprouting in winter initiated sugarcane ratoon [J]. National Seminar on 'Sugarcane Ratoon Management' held at II SR, Lucknow. Aug. 8—10.
- Solomon S, Shahi HN, Dutta-Majumder SK, et al. 2001. Effect of ethephon on sugarcane grown under sub-tropical climate [J]. *Proc Int Soc Sugar Cane Technol*, **24**:174—176.
- Wang ZZ(王自章), Li YR(李杨瑞), Zhang SZ(张树珍), et al. 2003. Cloning and sequencing of ACC oxidase gene from sugarcane(甘蔗 ACC 氧化酶基因片段的克隆与序列分析) [J]. *Acta Genet Sin*(遗传学报), **30**(1):62—69.
- Yang SF, Hofman NE. 1984. Ethylene biosynthesis and its regulation in higher plants [J]. *Ann Rev Plant Physiol*, **35**:155—189.

(上接第 151 页 Continue from page 151)

参考文献:

- 丁宝章,王遂义,高增义. 1988. 河南植物志(1)[M]. 郑州:河南科学技术出版社.
- 丁宝章,王遂义. 1990,1997,1999. 河南植物志(2、3、4)[M]. 郑州:河南科学技术出版社.
- 朱长山,杨好伟. 1994. 河南种子植物检索表[M]. 兰州:兰州大学出版社.
- 吴征镒,王荷生. 1983. 中国自然地理(植物地理. 上册)[M]. 北京:科学出版社.
- Ronald Good. 1974. The geography of the flowering plants,

- 4th ed. [M]. London: Longman Group Ltd.
- Wu ZY(吴征镒). 1991. The areal-types of Chinese genera of seed plants(中国种子植物属的分布区类型)[J]. *Acta Bot Yunnan*(云南植物研究), 增刊 IV:1—139.
- Wu ZY(吴征镒), Zhou ZK(周浙昆), Li DZ(李德铎), et al. 2003. The areal-types of the world families of seed plants(世界种子植物科的分布区类型系统)[J]. *Acta Bot Yunnan*(云南植物研究), **25**(3):245—257.
- Zang GB(张桂宾). 2004. Floristic study of spermatophyte of Henan Province(河南种子植物区系地理研究)[J]. *Guihaiia*(广西植物), **24**(3):199—206.