

阴沟肠杆菌 ACC 脱氨酶基因的克隆和载体构建*

Cloning and Vector Construction of ACC Deaminase Gene from *Enterobacter cloacae*

黄海泉¹, 刘飞虎^{1**}, 刘齐元¹, 黄美娟²

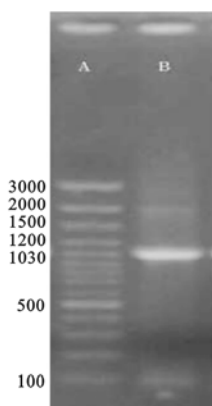
(1. 云南大学生命科学学院, 云南 昆明 650091; 2. 西南林学院园林学院, 云南 昆明 650224)

中图分类号: Q-33 文献标识码: A 文章编号: 1004-390X(2005)04-0603-02

乙烯作为植物体内5大内源激素之一,其对植物的生长发育和果实成熟等生理过程起着重要的调节作用,特别是对一些跃变型果实(如香蕉、番茄、苹果等)和花卉(如矮牵牛、金鱼草、兰科植物等),其在叶、花的衰败和果实成熟过程中起着关键性的作用。因此,减少乙烯的生成可以延长植物果实和花朵的保鲜期。利用基因工程保鲜技术抑制乙烯的生物合成,既可达到良好的保鲜效果,又无化学药品污染环境的问题,因而具有广阔的应用前景。ACC脱氨酶是乙烯代谢过程中的重要酶,它分解乙烯的直接前体ACC,从而能减少乙烯生成、达到延衰保鲜效果。人们从微生物(如细菌、

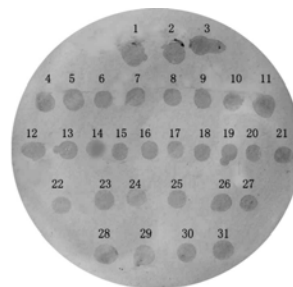
真菌和酵母)中克隆了ACC脱氨酶基因,但在植物中尚未发现。通过导入外源ACC脱氨酶基因,延长番茄保鲜期和增强植物抗逆性已有报道^[1-6]。

以阴沟肠杆菌(*Enterobacter cloacae*) CAL2株的DNA为模板,根据GENBANK中报道的ACC脱氨酶基因序列设计特异引物进行PCR扩增,将扩增回收后的目的片段连接至pGEM-T载体上转化大肠杆菌DH5 α ,并采用碱法提取质粒进行酶切和



A: GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder Plus Marker
B: 目的基因编码区片段(全长1 017 bp)

图1 源自阴沟肠杆菌CAL菌株中ACC脱氨酶基因的克隆
Fig. 1 Cloning of ACC deaminase gene from *Enterobacter cloacae* CAL2 strain



1-3: 含CaMV35S启动子的ACC脱氨酶基因植物表达载体的农杆菌菌落
4-11: 含SAG12启动子的ACC脱氨酶基因植物表达载体的农杆菌菌落
12-21: 含chsA启动子的ACC脱氨酶基因植物表达载体的农杆菌菌落
22-27: 含chsA启动子的ACC脱氨酶基因及反义ACC氧化酶基因的双基因植物表达载体的农杆菌菌落
28-31: 含CaMV35S启动子的ACC脱氨酶基因及反义ACC氧化酶基因的双基因植物表达载体的农杆菌菌落

图2 经“三亲交配”后PCR检测呈阳性的农杆菌菌落的原位杂交(深色斑为阳性)

Fig. 2 In situ hybridization of positive agrobacterium tumefaciens colonies of PCR detection after triparental mating

收稿日期: 2005-04-15

* 基金项目: 云南省自然科学基金(2002C0003M)

** 通讯作者

作者简介: 黄海泉(1974-),男,博士研究生,主要从事植物基因工程研究。

序列分析,其结果与报道的基因序列一致(图 1)。目前,已经分别完成组成型启动子 CaMV35S,花特异表达启动子 chsA 及衰老特异启动子 SAG12 的 ACC 脱氨酶基因植物表达载体的构建及农杆菌转化工作。另外,还分别采用 CaMV35S 和 chsA 为启动子成功地构建了反义 ACC 氧化酶基因及 ACC 脱氨酶基因的双基因植物表达载体。对转化后的农杆菌进行了原位杂交试验,证明上述植物表达载体均已成功地转入根癌农杆菌(图 2)。笔者正在利用转化好的根癌农杆菌采用多种技术方案,以康乃馨、矮牵牛等为受体进行转基因工作。该基因的获得、特别是双基因串联并转化植物后,预期能对跃变型水果、花卉、蔬菜等作物的延衰保鲜起到更强的作用,从而实现增产增效目标,同时为研究利用基因工程技术培育耐贮运的园艺产品奠定较好的基础。

[参考文献]

[1] 宋俊岐,邱并生,王荣,等.通过表达 ACC 脱氨酶基因控制番茄果实的成熟[J].生物工程学报,1998,14:33-38.

[2] GRICHKO V P, GLICK B R. Flooding tolerance of transgenic tomato plants expressing the bacterial enzyme ACC deaminase controlled by the 35S, rolD or PRB-1b promoter [J]. Plant Physiol Biochem, 2001, 39: 19 - 25.

[3] KLEE H J, HAYFORD M B, KRETZMER K A, et al. . Control of ethylene synthesis by expression of a bacterial enzyme in transgenic tomato plants[J]. Plant Cell, 1991, (3): 1187 - 1193.

[4] MARY M R, SALEHUZZAMAN S, BHAJU T, et al. . Reduced symptoms of Verticillium wilt in transgenic tomato expressing a bacterial ACC deaminase[J]. Molecular Plant Pathology, 2001, 2 (3): 135 - 145. [5] REED A J, MAGIN K M, ANDERSON J S et al. . Delayed ripening tomato plants expressing the enzyme 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid deaminase: 1. Molecular characterization, enzyme expression, and fruit ripening traits[J]. J Agric Food Chem, 1995, 43: 1954 - 1962.

[6] VARVARA P G, BERNARD R G. Amelioration of flooding stress by ACC deaminase-containing plant growth-promoting bacteria[J]. Plant Physiol Biochem, 2001, 39: 11 - 17.

(上第接 588 页)

[参考文献]

[1] 张宜洛. 西泮一级公路沥青路面施工质量控制[J]. 公路交通技术,2004,21(2):25-77.

[2] 熊辉,史其信,潘先榜. 路面管理理论与方法的研究进展及趋势[J]. 土木工程学报,2004,37(1):65-73.

[3] 李兵. 浅谈高速公路沥青路面质量控制[J]. 甘肃科技,2004,20(11):149-150.

[4] JTJ032-94. 公路沥青混凝土路面施工技术规范[S]. 32~94.

[5] 闻丽娟,文艳. 浅谈高速公路材料质量控制[J]. 黑龙江交通科技,2003,26(6):54-56.

[6] 余清河. 对我国沥青路面设计的几点改进建议[J]. 重庆交通学院学报,2004,23(2):40-42.

[7] 陈全文. 热拌沥青混凝土路面的施工控制[J]. 科技情报开发与经济,2004,14(1):230-231.

[8] 李晓华. 沥青混合料配合比设计方法及施工技术[J]. 中国西部科技,2004,(6):51-53.

[9] 陈启宗. 间歇式与连续式沥青混凝土搅拌设备的级配控制[J]. 筑路机械与施工机械化,2003,20(6):22-24.

[10] 严二虎,沈金安,李福普. 沥青路面级配碎石基层的设计与施工工艺[J]. 公路交通科技,2004,21(3):9-13.

[11] 刘玉琴. 浅谈沥青混合料在拌和过程中的质量控制及沥青混凝土路面的施工工艺[J]. 辽宁交通科技,2004,(4):4-13.

[12] 陈璋立,张学明,李心平. 沥青路面施工质量管理的一点体会[J]. 中南公路工程,1992,(4):13-16.

[13] 刘弈辉,刘金辉. 沥青混凝土路面下面层的施工工艺及质量控制[J]. 公路,2004,(11):170-173.

[14] 孙剑. 沥青路面摊铺接缝处理[J]. 筑路机械与施工机械化,2004,(9):26-27.

[15] 李彦伟,耿淑泽. 高速公路沥青路面摊铺碾压工艺控制技术[J]. 筑路机械与施工机械化,2004,(7):22-25.