

桃果实中 ACC 合酶基因克隆及基因沉默载体构建

王 廿¹, 张红星¹, 朱本忠², 罗云波², 韩 涛¹

(¹北京农学院, 北京 102206; ²中国农业大学食品科学与营养工程学院, 北京 100083)

摘要:植物中乙烯是一种具有促进果实成熟和衰老的内源激素。ACC 合酶是植物乙烯生物合成途径中一个重要的限速酶, 沉默 ACC 合酶基因的表达能减少植物性内源性乙烯的产生。以中华寿桃为研究材料, 采用 RT-PCR 技术, 克隆获得 ACC 合酶基因。将该基因酶切回收后连接到 pTRV-RNA2 载体上, 转化 DH5 α , 筛选阳性克隆, 进行酶切鉴定。测序后与已知序列进行同源性比较, 其同源性达到 99%, 表明将 ACC 合酶基因成功连接到 pTRV-RNA2 基因沉默载体上。

关键词:桃; ACC 合酶基因; 克隆; 载体构建; 基因沉默

中图分类号: S3 文献标识码: A

Cloning of ACC Synthase Gene and Vector Construction of Gene Silencing from Peach

Wang Nian¹, Zhang Hongxing¹, Zhu Benzong², Luo Yunbo², Han Tao¹

(*Beijing University of Agriculture, Beijing 102206;*

²College of Food Science and Nutritional Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083)

Abstract: Ethylene, an internal source hormone, affects ripening and senescence in most of fruits. ACC Synthase is one of the rate-limiting enzymes in ethylene biosynthesis. The silencing of ACC Synthase gene results in the decreased production of endogeny ethylene. In this study, ACC Synthase gene was cloned with RT-PCR from peach, digested and inserted into the pTRV-RNA2 vector, and transformed into the E. coli component DH5 α . The recombination plasmid was selected and identified by restriction enzyme analysis. Sequence analysis showed that nucleotide of the ACC Synthase gene was 99% identical to the published sequence. The results showed that ACC Synthase gene was rightly cloned into the gene silencing vector pTRV-RNA2.

Key words: peach, ACC Synthase gene, clone, vector construction, gene silencing

0 引言

桃属于呼吸跃变性果实, 植物内源性乙烯具有触发呼吸跃变和促进果实成熟及衰老的作用。ACC 合酶 (1-Aminocyclopropane-1-Carboxylate synthase, ACS) 是植物体内乙烯合成途径其中一个关键性限速酶, S-腺苷-L-蛋氨酸在 ACC 合酶作用下合成乙烯前体 1-氨基-1-羧基环丙烷 (ACC)^[1-2]。RNA 干扰技术已被应用于沉默 ACC 合酶基因表达的研究。唐霞等构建

了柿果 ACC 合成酶基因 RNA 干扰植物表达载体^[3]。Yuri Trusov 等研究发现, 凤梨中 RNA 干扰抑制 ACC 合成酶基因 *ACACS2* 使得其开花的时间延后^[4]。

病毒诱导基因沉默 (virus-induced gene silencing, VIGS) 是一种用于植物基因功能研究的新兴技术。VIGS 可引起内源 mRNA 序列特异性降解, 是一种转录后的基因沉默^[5]。抑制乙烯生物合成途径中 ACC 合酶基因的表达, 拟达到降低植物内源性乙烯的生成,

基金项目:“十一五”国家科技支撑项目“农产品产后品质劣变的调控技术”(2006BAD22B01); 北京市属市管高校人才强教计划资助项目(0014-05-1671); 中青年骨干教师培养计划资助项目(PXM2007_014207_044539); 北京市教育委员会果蔬生物与物理保鲜技术创新平台。

第一作者简介:王廿, 女, 1985 年出生, 贵州普安人, 硕士研究生, 研究方向为果品采后生理与保鲜技术。通信地址: 102206 北京市昌平区北京农学院 0602 信箱, E-mail: jessiewang323@163.com。

通讯作者:韩涛, 男, 1963 年出生, 北京人, 教授, 研究生导师, 研究方向为果品采后生理与保鲜技术。通信地址: 102206 北京昌平区回龙观镇北农路北京农学院食品系, Tel: 010-80794186, Fax: 010-80799170, E-mail: taolhan@yahoo.com.cn。

收稿日期:2009-03-12, **修回日期:**2009-04-20。

是 VIGS 运用于研究延缓桃果实成熟和衰老的基础。笔者克隆了中华寿桃 ACC 合成酶基因片段, 并成功构建 pTRV-RNA2-ACS 载体, 为下一步研究奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验材料 采用的桃 (*Prunus persica* L.) 品种为中华寿桃果实, 取自北京平谷区麻子峪果园。

1.1.2 菌株和质粒 大肠杆菌 DH5 α 购自 Tiangen 公司; 含有 TRV-RNA1 载体的农杆菌 GV3101、含有 TRV-RNA2 载体的农杆菌 GV3101、含有 TRV-RNA3 载体的农杆菌 GV3101 由中国农业大学食品科学与营养工程食品生物技术实验室保存。

1.1.3 酶和试剂 限制性内切酶、 T_4 DNA 连接酶、反转录试剂盒 (Reverse transcription system) 购自美国 Promege 公司; PCR 反应所用 DNA 聚合酶、植物 RNA 提取试剂盒、质粒小量提取试剂盒、琼脂糖凝胶 DNA

回收试剂盒等购自 Tiangen 公司, Ex TaqTM DNA 聚合酶、DNA Marker DL 2000 购自大连宝生物公司; dNTP 购自赛百盛公司; 其他常规化学试剂均为国产分析纯。PCR 引物由上海生工生物技术有限公司合成。

1.2 方法

1.2.1 中华寿桃总 RNA 的提取 按照 Tiangen 公司植物 RNA 提取试剂盒的操作说明书提取总 RNA。参照 Promega 公司反转录试剂盒 (Reverse transcription system) 合成 cDNA。cDNA 于 -20 °C 保存备用。

1.2.2 基因克隆 为了保证定向克隆和阅读框正确, 根据桃中的 ACC 合成酶基因 (GenBank 访问号: AY077626) 序列设计一对引物, 在上游引物和下游引物的 5' 端分别引入 *Bam*HI 和 *Xba*II 酶切位点, 引物由上海生工生物技术有限公司合成, 引物序列分别如下:

ACS 上游引物: 5'-CG GGA TCC TCC ACC GCT CAT CAC AAC-3'
*Bam*HI

ACS 下游引物: 5'-GC TCT AGA GGG TTA TTC AGA TGG GTC-3'
*Xba*II

以合成单链 cDNA 为模板, 使用设计引物进行 PCR 扩增, 反应条件如下: 25 μ l 反应体系, 94 °C 5 min; 94 °C 1 min, 58 °C 1 min, 72 °C 1 min, 30 次循环; 72 °C 10 min。PCR 产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳分离后, 按照 Tiangen 公司琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒的操作方法将 PCR 产物纯化回收。

1.2.3 重组载体的构建 质粒 DNA 提取、酶切、连接及转化均参照文献^[6]。通过培养含有 TRV-RNA2 载体的农杆菌 GV3101, 提取质粒 pTRV-RNA2。分别将 pTRV-RNA2 沉默载体与回收的 PCR 产物用 *Bam*HI 和 *Xba*II 酶切成粘性末端, 通过 1% 非变性琼脂糖凝胶电泳分离出目的片段, 并用 Tiangen 公司的琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒分别回收目的片段。将回收纯化的 PCR 酶切产物与酶切好的 pTRV-RNA2 载体连接, 20 μ l 的连接反应体系如下: 10 \times T_4 DNA 连接酶缓冲液 2 μ l, pTRV-RNA2 载体与 PCR 回收产物的末端摩尔数比 3:1, T_4 DNA 连接酶 1 μ l, 离心混匀收集于管底, 4 °C 连接过夜。将 1 μ l 连接产物转化 100 μ l 大肠杆菌感受态 DH5 α 细胞, 接种到含有 50 mg/L 卡那抗性的 LB 平板上, 在 37 °C 培养 14 h 左右, 挑单菌落于含有卡那抗性的 LB 液体培养基中, 37 °C 150 r/min 摇床上培养过夜。集菌提质粒后通过双酶切鉴定 pTRV-RNA2-ACS 重组质粒。

1.2.4 ACC 合酶基因的测序和生物学分析 ACC 合酶基因的测序工作由上海生工生物技术有限公司测序完成。生物学分析采用 Primer 5 和 DNAMAN 软件。

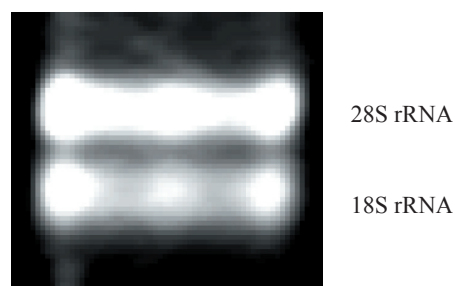


图 1 桃果实总 RNA 琼脂糖凝胶电泳

2 结果与分析

2.1 桃果实总 RNA 提取的效果

采用试剂盒提取中华寿桃总 RNA。通过 1.5% 非变性琼脂糖凝胶电泳检测提取的总 RNA 质量。由图 1 所示, 28S rRNA 的亮度约为 18S rRNA 的两倍且没有降解, 提取 RNA 的完整性较好, 可作为反转录模板。

2.2 ACC 合酶基因的 RT-PCR 扩增

以中华寿桃果实总 RNA 为模板, 按照 Promega 公司反转录试剂盒 (Reverse transcription system) 操作说明书反转录成 cDNA。以 cDNA 为模板进行 PCR 扩增, 得到了长度约为 250 bp 左右的片段, 与预期目的片段大小相符 (图 2)。

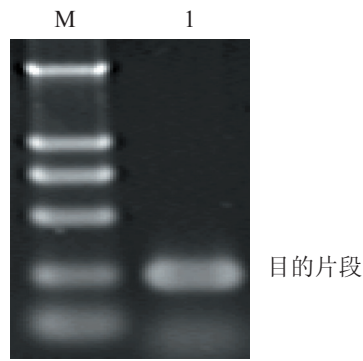


图2 RT-PCR产物的凝胶电泳结果
注: M: 2000bp DNA maker; 1为扩增结果。

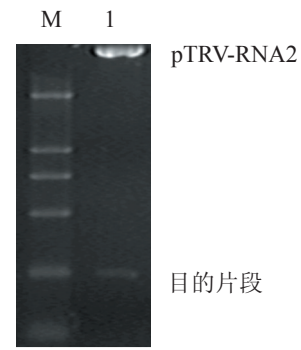


图3 重组质粒pTRV-RNA2-ACS双酶切鉴定电泳图
注: M: 2000 bp DNA maker; 1: BamHI和XbaII双酶切重组质粒的酶切产物。

PP-ACS1 mRNA	ATGGCCCTCCCTCATCAGCAACTTCGAACCCGTTCGTACTCT	40	Consensus	atctatgacagctacagtttcagctccccgactttcacat	
ACS	0	PP-ACS1 mRNA	CCATCICCCAGGTCATACAAACATGPAATTGCAACCCCAA	800
Consensus	atgggctcctcatcagcaacttcgaaccggttgttactct		ACS	
PP-ACS1 mRNA	CAACATTCCACCACGCGAGCCCATCGTCAGAACCCACC	80	Consensus	gcatctccgaggtcatataaaacatgaattgcaaccctcaa	840
ACS	0	PP-ACS1 mRNA	TTTAAATCCACTTCTCTATAGTTTGTCCAGCACATCGGG	840
Consensus	ccaagattcaaccagcagggccatgctgagaaccacc		ACS	
PP-ACS1 mRNA	CTACTTCGATCGCTGCAAGCCGTACCCATAGAAACCATTTC	120	Consensus	tttaatccacatgctctatagttgttccaaggacatgggg	880
ACS	0	PP-ACS1 mRNA	CTCCCGGCTTGAGGCTCCGCAAGTTTACTCATACAAATG	880
Consensus	ctaactcgatgggtgaaaggcgtacgatacaaacatttc		ACS	
PP-ACS1 mRNA	CACCACCAAAAACCCCGACGGCGTTATTCAGATGCGCTC	160	Consensus	ctcccggccttgaggctcggcatagtttactcatacaaatg	920
ACS	0	PP-ACS1 mRNA	ATCATCTGCTCAACATCGCCCCACATCTCAACTTTCCG	920
Consensus	cacccaacgaaaaacccccaggcgttattcagatggggtc		ACS	
PP-ACS1 mRNA	TTCAGAAACACAGCTTTCCTTCGACTGATCGAAGACTG	200	Consensus	atgatgtggtaacaatcgccgcaagatgtcaagtttcgg	960
ACS	20	PP-ACS1 mRNA	CTTGGTTTCCTCCCAACTCAACACATGCTCCCTCGATG	960
Consensus	ttgcagaaaacagctttccttcgactgactcgaagactg		ACS	
PP-ACS1 mRNA	CATTAAAGAAAACCCCAAGCCCTCCATCTGCACCTCCCG	240	Consensus	gctggtttctcccaactcaacacatgctcgcgtcgatg	1000
ACS	60	PP-ACS1 mRNA	CTCTTGGATCAACAGTTTCTGGCAAGCTTCTCGACACAA	1000
Consensus	gat taaga.aaaccccaaggctcctcatctgcactccgag		ACS	
PP-ACS1 mRNA	CGACTTCAGCAGCTTCAACAAACCGCCATCTTTCAAGACT	280	Consensus	ctcttgatgaaagattgtggcaagttctctggagacaa	1040
ACS	100	PP-ACS1 mRNA	CTTCCAAAGACCTCGCCAACCCCATCGCTTTTTCACAA	1040
Consensus	ggaattgaaggactcaagcaagcgtccatctttcaagact		ACS	
PP-ACS1 mRNA	ATCATGCCCTTTCGCACTTCAGAAACCCCTCTGCTATCTT	320	Consensus	gctccaagagcctcgcgaagcggcatgggttttccaaa	1080
ACS	140	PP-ACS1 mRNA	CGCGCTAGACCAACTCGGAATCAACTCTTGAAGACAAAT	1080
Consensus	atcatggctttccgacttcagaaaggctgtgctatggt		ACS	
PP-ACS1 mRNA	CATCTCGAACCACAGCTGCTACACTCATTTCATCCG	360	Consensus	ggcgctagagcaactcgggaatcaactcgttagaagcaat	1120
ACS	180	PP-ACS1 mRNA	CCCAGCTTTTTCCTCGATGCACTTAACGACCTCTGTCA	1120
Consensus	catgtcgaaggcgaagcgtggttagactcaactttcatccg		ACS	
PP-ACS1 mRNA	PACCCCTTCTCATCACCCGTCACCCACCCGACCCGAPCG	400	Consensus	gcccgccttttctctggatggacttaagcagcctgttga	205
ACS	205	PP-ACS1 mRNA	AACATCAAACATTTGGTGGTACCTGCTCTTGGCTGT	1160
Consensus	aaccgggttgtgatgagcgggtggaccaccggagcgaacg		ACS	
PP-ACS1 mRNA	AGCTCTCATCTTCTCTCTGCGCCACCCCGCGACGCTT	440	Consensus	aagatcaaacatttgtatggatgagatgctgtttggcgtgt	1200
ACS	480	PP-ACS1 mRNA	CATGTGCAATCAACTCGGCTCAATCTCTCCAGGCTCT	1200
Consensus	agctggatcatgttctgtctggccgaccccgcgagcctt		ACS	
PP-ACS1 mRNA	CTTCCICCCCTCTCTTACTATCACCATTTTTACCGACAC	480	Consensus	gattgtgaaatcaactcgggctcaatgcttcccagggtct	1240
ACS	520	PP-ACS1 mRNA	TCTTTTAACTCCCTGAGCCTCGTTCTTACGCTTTTGT	1240
Consensus	cctcgtcccctctcttactatccagcattttaccgagac		ACS	
PP-ACS1 mRNA	TGGCGTGGCAGAACCTCTCCAAATCTCCCGCTTCTAAT	560	Consensus	tcttttaagtccgtgagcctcgttggctttagggtttggt	1280
ACS	600	PP-ACS1 mRNA	TTCCAAACATGGATGGAGACTCTCCAACCTTCACACTCA	1280
Consensus	ttgggatggagaactggtgtccaaatcgtccgggtgatt		ACS	
PP-ACS1 mRNA	CGATACCTTCCAAATTTCCAAATPACCAAGCAGCACT	560	Consensus	ttccaacatggatgacgagactcgtgaagctgactcaa	1320
ACS	640	PP-ACS1 mRNA	AACGATCAGAACTTCTTACGCCACCGAAGAAAGCTCAA	1320
Consensus	cgcgatgctccaacaatttccaataaaccaaggaagcact		ACS	
PP-ACS1 mRNA	TCCACCCGCTTATGAAAPAGCCCAAPACAPACCTTCAAC	600	Consensus	aaagatcagaacatttgtacgccaagcgaagaaagctcaa	1360
ACS	680	PP-ACS1 mRNA	CATCAACCACACTAACCTTAAACCCCTAACCTTGGAAAA	1360
Consensus	tgcagcgcctatgaaaaagcccaaaagaacaacatcaac		ACS	
PP-ACS1 mRNA	CTGACCGCTTCTATCAATACAAACCCATCAACCCACTTCG	640	Consensus	gatcaagcgtacaactaaaagcctaagcgttggaaa	1400
ACS	720	PP-ACS1 mRNA	CCAACTTGAGCCTTACCTTTTCTATCTATCAACAGAG	1400
Consensus	gtgaagggcttgatcatacaaacccatcaaacctattgg		ACS	
PP-ACS1 mRNA	CAACCACTTTCAGACAGACACACTCGAAGCCTTGTGCA	680	Consensus	gcaatctgagccttagcttttcatcatcaacacagaag	1440
ACS	760	PP-ACS1 mRNA	ATTGATCAGACAGTCTTAACTTTTGTGACCCACACTG	1440
Consensus	gcaccaccttggacagagacacactcgaagccttgggga		ACS	
PP-ACS1 mRNA	ATTCTACAACCAACAAATCCACTTGGCTGTGTCACGAA	720	Consensus	at ttgatcaacagtggttaagt tttgtcaccacacatg	1478
ACS	760	PP-ACS1 mRNA	ATCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCT	1478
Consensus	attcatcaaccaaaagaacatccacttgggtgtgacgaa		ACS	
PP-ACS1 mRNA	ATCTATGCACTTACACTTCCACTCCCGACTTTCACAT		Consensus	atgtctcctcactctcctcctcgttcgagccaagactta	
ACS				

图4 ACS基因和已发表序列的核苷酸序列比较

2.3 重组质粒构建与鉴定

将 RT-PCR 扩增的片段和克隆载体 pTRV-RNA2 均用限制性内切酶 *Bam*H I 和 *Xba*II 切成双粘性末端, 纯化后用 *T*₄ 连接酶进行定向连接。重组质粒用限制性内切酶 *Bam*HI 和 *Xba*II 进行酶切鉴定, 分别得到大于 2000 bp 和 250 bp 左右两个片断, 目的基因片断大小与预期结果相符, 初步确定克隆片断的正确性(图3)。

2.4 ACC 氧化酶基因测序及序列分析结果

如图4所示, 通过与 Gene bank 序列 AY077626 的比较, 克隆得到的基因(称为 ACS)与已发表基因的同源性达 99%。结果能达到病毒诱导基因沉默技术的要求, 与预期目标符合。

3 讨论

由于脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒的效率是一定的, 为了成功连接回收纯化的 PCR 酶切产物与酶切好的 pTRV-RNA2 载体, 此实验将含有 TRV-RNA2 载体的农杆菌 GV3101 提取质粒后转化入 DH5 α 内。大量培养转化的 DH5 α 有利于提取到高浓度的质粒 TRV-RNA2, 再将质粒双酶切。实验通过 RT-PCR 从中华寿桃果实 cDNA 中克隆了 ACC 合酶基因, 并将此基因与载体 pTRV-RNA2 连接, 转化到农杆菌 GV3013 中。为下一步带有重组质粒的农杆菌侵染桃果实做好了充分的准备。

植物基因功能研究中病毒诱导的基因沉默

(virus-induced gene silencing, VIGS) 与传统的转基因技术相比, 具有以下优点: 操作简单, 只需经过简单的农杆菌侵染程序; 操作简便, 无需复杂的遗传转化; 病毒载体来源广泛, 双子叶和单子叶植物都能应用^[5]。研究成功构建了 pTRV-RNA2-ACS 基因沉默载体, 为下一步抑制 ACC 合酶的表达减少内源性乙烯产生的实验打下了基础。

参考文献

- [1] Johnson P R, Ecker J R. The ethylene gas signal transduction pathway: A molecular perspective. Annual review of genetics, 1998, 32:227-254.
- [2] Yang S F, Hoffman N E. Ethylene biosynthesis and its regulation in higher plants. Annual Review of Plant Physiology, 1998, 35: 155-189.
- [3] 唐霞, 周志平, 赵丛枝, 等. 富有柿果 ACC 合成酶基因 RNA 干扰植物表达载体的构建. 华北农学报, 2007, 22(1): 73-77.
- [4] Yuri Trusov, Jose' Ramo' n Botella. Silencing of the ACC synthase gene ACACS2 causes delayed flowering in pineapple (*Ananas comosus* (L.) Merr.). Journal of Experimental Botany, 2006, 57: 3953-3960.
- [5] 傅达奇, 朱本忠, 赵晓丹, 等. 植物中病毒诱导基因沉默的研究进展. 中国生物工程杂志, 2005, 25(B04): 62-66.
- [6] 萨姆布鲁克 J. 分子克隆试验指南拉塞尔. 黄培堂. 译. 北京: 科学出版社, 2002.