

甘蔗 ACC 氧化酶基因的克隆与植物表达载体构建

董伟清¹, 王爱勤^{1,2*}, 韦波³, 何龙飞¹, 杨丽涛¹, 李杨瑞² (1. 广西大学农学院植物科学系, 广西南宁 530005; 2. 广西农业科学院作物改良与生物技术重点开放实验室, 广西南宁 530007; 3. 广西壮族自治区药用植物园, 广西南宁 530023)

摘要 [目的]为甘蔗的基因工程育种提供理论基础和技术储备。[方法]从甘蔗嫩叶中提取总 RNA, 根据 GenBank 中甘蔗 ACC 氧化酶 cDNA 序列设计 2 对引物, 利用 RT-PCR 技术扩增甘蔗 ACO cDNA 序列。构建甘蔗 ACO cDNA 正义植物表达载体和反义植物表达载体, 并利用含 ACC 氧化酶基因的植物重组表达载体转化根癌农杆菌感受态细胞。[结果]从甘蔗嫩叶中提取总 RNA 的 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 为 1.90, 说明提取 RNA 完整性好、纯度高, 完全可满足 cDNA 逆转录的要求。所获得的甘蔗 ACC 氧化酶 cDNA 序列全长为 969 bp, 与 GenBank 中甘蔗 ACO cDNA 的核苷酸序列同源性为 98.6%, 氨基酸序列同源性为 97.5%。成功构建了正义植物表达载体 pBIaco 和反义植物表达载体 pBlantiaco, 并将其导入根癌农杆菌 EHA105 中。[结论]该研究为研究该基因的功能和培育甘蔗转基因新种质资源奠定了基础。

关键词 甘蔗; ACC 氧化酶; 基因克隆; 植物表达载体

中图分类号 S188 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2008)17-07147-03

Cloning of ACC Oxidase Gene in Sugarcane and the Construction of Its Plant Expression Vector

DONG Wei-qing et al (Department of Plant Science of Agronomy College, Guangxi University, Nanning, Guangxi 530005)

Abstract [Objective] The research aimed to provide the theoretical basis and the technical reserve for the genetic engineering breeding of sugarcane. [Method] Total RNA was extracted from tender leaves of sugarcane. Two pairs of primers were designed according to cDNA sequence of ACC oxidase (ACO) on GenBank website to amplify ACO cDNA sequence in sugarcane. The sense and antisense plant expression vectors of ACO cDNA in sugarcane were constructed. And the recombinant plant expression vectors containing ACO gene was used to transfer the competent cells of *Agrobacterium tumefaciens*. [Result] The OD₂₆₀/OD₂₈₀ value of total RNA extracted from tender leaves of sugarcane was 1.90, which indicated that the extracted RNA had good integrity and high purity and it could completely met the demands of cDNA reverse transcription. The whole length of ACO cDNA obtained from sugarcane was 969 bp, with the nucleotide sequence homology with ACO cDNA in sugarcane of 98.6% and the amino acid sequence homology of 97.5%. The sense plant expression vector pBIaco and the antisense plant expression vector pBlantiaco were successfully constructed and they were introduced into *A. tumefaciens* EHA105. [Conclusion] This research laid the foundation for studying the functions of the gene and breeding new transgenic germplasm resources of sugarcane.

Key words Sugarcane; ACC oxidase; Gene cloning; Plant expression vector

乙烯作为一种气态植物激素, 参与了种子萌发至成熟的一系列生命活动的调节, 与植物花、果的成熟和衰老有着密切的关系^[1], 是目前植物生长发育调控机制的研究热点之一。乙烯在植物中的生物合成途径为: 甲硫氨酸→S-腺苷甲硫氨酸 (SAM)→1-氨基环丙烷-1-羧酸 (ACC)→乙烯^[2]。其中, ACC 氧化酶 (ACO) 催化 ACC 氧化成乙烯, 是植物内源乙烯生物合成途径的关键酶之一^[3]。

外源乙烯对甘蔗生长也有着广泛的调节效应, 在生长前期使用可促进萌发、分蘖和生长, 提高产量; 在生长后期使用可促进甘蔗早熟、提高蔗糖含量^[4-5]。研究表明, 甘蔗 ACO 基因与甘蔗叶片对逆境胁迫的应答有关, 并参与植物激素对甘蔗生长的调节^[6]。因此, 从分子水平上阐明甘蔗 ACO 的特性, 进而从体外控制或通过基因工程的手段来调控乙烯的生物合成, 从而调控甘蔗的成熟与衰老, 对提高甘蔗品质和培育新品种具有重要的现实意义。王爱勤等^[7]通过 RACE-PCR 技术获得了甘蔗 ACC 氧化酶的 cDNA 全长序列, 但关于甘蔗 ACC 氧化酶基因的功能鉴定和转基因结果尚无报道。鉴于此, 笔者首先采用 RT-PCR (Reverse transcription polymerase chain reaction) 技术克隆了甘蔗 ACC 氧化酶的 cDNA 读码框, 并将其分别以正向和反向插入载体 pBI121 的 CaMV 35s 启动子与 NOS 终止子之间, 构建了正义植物表达载体和反义植物表达载体, 准备用于转化模式植物烟草,

鉴定甘蔗 ACO 基因的功能, 进而遗传转化甘蔗, 进一步研究甘蔗 ACO 基因调控乙烯生物合成的机制, 以期获得甘蔗新品种, 为甘蔗的基因工程育种提供理论基础和技术储备。

1 材料与与方法

1.1 材料 甘蔗 (*Saccharum officinarum* L.) 品种为 ROC22; 质粒载体 pBI121、大肠杆菌 DH5 α 均由广西作物遗传改良生物技术重点开放实验室保存; 根癌农杆菌菌株 EHA105 由中国热带农业科学院热带作物生物技术国家重点实验室张树珍教授惠赠; RNA 抽提试剂 Trizol 购自 Promega 公司; 反转录试剂盒 First Strand cDNA Synthesis Kit 购自 MBI Fermentas 公司; 克隆载体 pMD18-T vector 及其他分子生物学试剂为宝生物工程 (大连) 有限公司产品; 引物由上海生工生物工程公司合成。

1.2 方法

1.2.1 甘蔗总 RNA 的提取及电泳分析。参照王爱勤等^[8]的方法, 取 2 g 嫩叶采用 Trizol 一步法提取甘蔗总 RNA, 进行非变性琼脂糖凝胶电泳检测, -80℃ 保存备用。

1.2.2 PCR 引物的设计。为了确定方向和后续操作的方便, 根据 GenBank (AY521566) 中甘蔗 ACC 氧化酶的 cDNA 序列设计了 2 对引物: ACO-01 和 ACO-02。ACO-01 的上游引物 P1: 5'CGGATCCATGGCGCCTGCATTGTC3', 下游引物 P2: 5'TGAGCTCTTACGCGATGGCTATGCAGTTG 3'; ACO-02 的上游引物 P3: 5'CGAGCTCATGGCGCCTGCATTGTC 3', 下游引物 P4: 5'TGGATCCTTACGCGATGGCTATGCAGTTG 3' (下划线为酶切位点)。其中, P1 引物 BamHI 位点, P2 引物 SacI 位点, 其 RT-PCR 产物用于构建正义表达载体。P3 引物 SacI 位点, P4 引物 BamHI 位点, 其 RT-PCR 产物用于构建反义

基金项目 广西省科学基金 (桂科青 0640003); 广西省农科院博士后基金 (桂财教函 [2005] 205 号)。

作者简介 董伟清 (1981-), 女, 广西贺州人, 硕士研究生, 研究方向: 植物分子生物学。* 通讯作者。

收稿日期 2008-03-26

表达载体。

1.2.3 RT-PCR 扩增甘蔗 ACOcDNA。取甘蔗幼叶总 RNA 5 μ l, Oligod(T)₁₈ primer 1 μ l, Rnase-free H₂O 7 μ l, 混匀于 70 °C 水浴 5 min; 再加入 5 \times First strand buffer 4 μ l, Rnase inhibitor 1 μ l, dNTP (10 mmol/L) 1 μ l, 混匀, 37 °C 水浴 5 min 后加入 M-Mulv Reverse transcriptase 1 μ l, 混匀后 42 °C 反应 60 min, 再于 70 °C 反应 10 min, 合成 ACOcDNA 第一链。然后以合成的 cDNA 第一链为模板, 采用 LA Taq DNA polymerase 进行扩增, 反应体系为: cDNA 第一链反应液 20 μ l, 2 \times GC buffer I 25 μ l, dNTP (10 mmol/L) 2 μ l, P1 10 pmol, P2 10 pmol/P3 10 pmol, P4 10 pmol; LA Taq DNA polymerase 1 μ l, 定量补足 ddH₂O 至 50 μ l。RT-PCR 反应条件为: 预变性 94 °C, 2 min; 94 °C 30 s, 64 °C 30 s, 72 °C 2 min, 35 cycles; 最后 72 °C 再延伸 10 min。PCR 产物经 0.8% 琼脂糖凝胶电泳后, 切下目的带, 用 PCR 产物纯化试剂盒回收。

1.2.4 PCR 产物的序列测定。将回收的目的片段与 pMD18-T 载体连接, 转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞, 在 X-gal/

IPTG 培养基上挑取白色菌落, 用碱法小量抽提质粒, 并进行电泳鉴定和限制性内切酶分析。挑出能切出约 1.0 kb 片段的阳性克隆菌株, 委托上海捷瑞生物工程有限公司进行测序。引物 P1、P2 PCR 产物得到的克隆命名为 pMD 18 acc; P3、P4 PCR 产物得到的克隆命名为 pMD18antiaco。

1.2.5 甘蔗 ACC 氧化酶 cDNA 正、反义植物表达载体的构建。在载体 pBI121 中有一个 GUS 基因, GUS 基因两侧 35 S 启动子和 NOS 终止子构成一个完整的表达框架。笔者试图用 ACO 基因取代 GUS, 从而可利用 GUS 基因两侧的表达框控制 ACO 基因在植物中的表达。将含有甘蔗 ACOcDNA 的克隆 pMD18acc 和 pMD18antiaco 用 BamHI 和 SacI 双酶切, 分别回收小片段定向连接到也经 BamHI 和 SacI 进行双酶切的载体 pBI121 上, 连接产物转化 E.coli DH5 α 感受态细胞、碱法提取质粒, 取电泳谱带滞后的质粒 DNA 作 BamHI + SacI 酶切图谱分析。正义载体命名为 pBIaco, 反义载体命名为 pBIantiaco, 其构建策略见图 1。

1.2.6 含 ACC 氧化酶基因的植物重组表达载体转化根癌

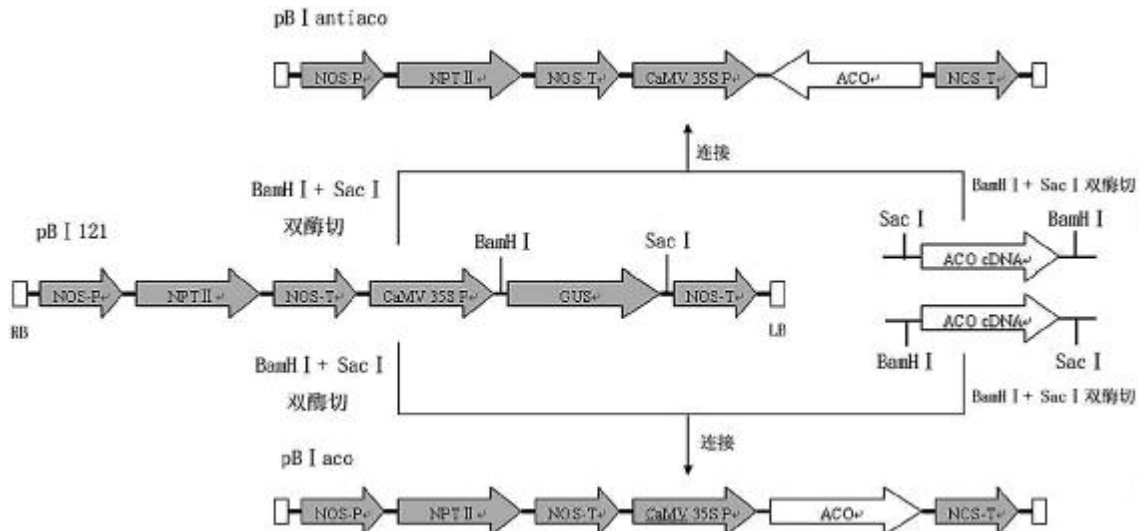


图 1 ACC 氧化酶 cDNA 的正义植物表达载体 pBIaco 和反义植物表达载体 pBIantiaco 的构建

Fig. 1 Construction of sense plant expression vector pBIaco and antisense plant expression vector pBIantiaco of the ACC oxidase cDNA

农杆菌。用碱法大量制备质粒 pBIaco 和 pBIantiaco, 经 RNase 消化 RNA, 然后用 PEG 进行纯化, 将纯化后的质粒 DNA 通过冻融法^[9]导入根癌农杆菌感受态细胞。提取重组质粒, 以 ACO-01 和 ACO-02 为引物分别对两者进行 PCR 检测。

2 结果与分析

2.1 RNA 的完整性 取部分从甘蔗幼叶中提取的总 RNA 进行 1% 非变性琼脂糖凝胶电泳检测, 结果见图 2。产生 3 条清晰条带, 采用紫外吸收法测定其浓度和纯度, OD₂₆₀/OD₂₈₀ 为 1.90, 说明所提取的 RNA 完整性较好、纯度高, 完全可满足逆转录 cDNA 的要求。

2.2 PCR 产物的鉴定和序列测定 将 PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳分析, 2 对引物 ACO-01 和 ACO-02 均扩增出约 1.0 kb 的 DNA 片段(图 3), 与预期的结果相符。将此片段回收后与 pMD18-T vector 相连, 获得重组质粒 pMD18acc 和 pMD18antiaco。pMD18acc 和 pMD18antiaco 经 BamHI 和 SacI 酶切消化, 均得到 2 条带, 一条为约 3.0 kb pMD18-T, 另一条为约 1.0 kb 甘蔗 ACOcDNA, 说明目的片段已经插入 pMD18-T vector 中(图 4)。

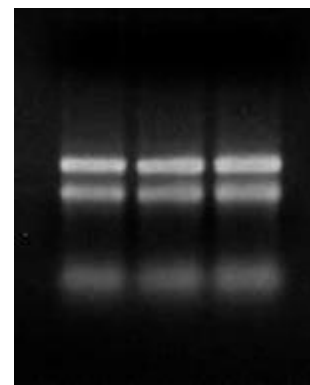
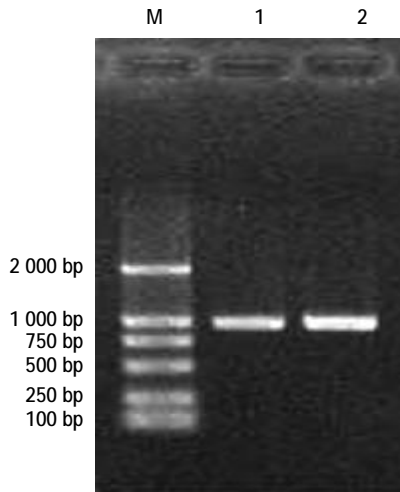


图 2 甘蔗嫩叶 RNA 1% 琼脂糖凝胶电泳图谱
Fig. 2 1% agarose gelelectrophoresis for RNA of sugarcane leaves

经序列测定可知, 该试验所获得的甘蔗 ACC 氧化酶 cDNA 序列全长 969 bp。经比较, 其与 GenBank 公布的甘蔗 ACO cDNA 的核苷酸序列 (AY521566) 同源性为 98.6%, 氨基酸序列同源性为 97.5%, 说明该试验得到的甘蔗 ACC 氧化酶的 cDNA 是正确的。

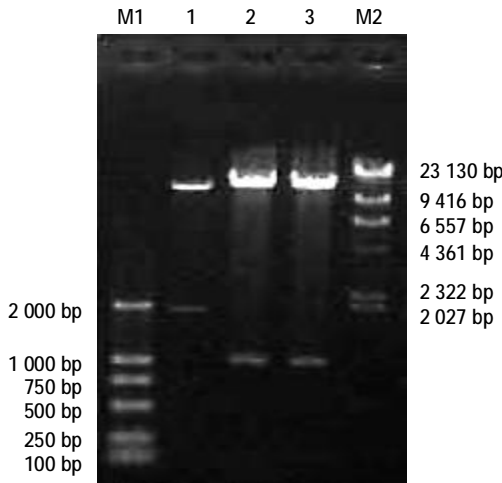


注: M 为 DNA Marker DL-2000; 1 为甘蔗 ACO cDNA 经引物 ACO-01 扩增的 RT-PCR 产物; 2 为经引物 ACO-02 扩增甘蔗 ACO-02 的 RT-PCR 产物。
Note: M. DNA Marker DL-2000; 1. RT-PCR products with ACO-01 primers of sugarcane ACO cDNA; 2. RT-PCR products with ACO-02 primers of sugarcane ACO cDNA.

图 3 RT-PCR 产物电泳谱带

Fig. 3 Electrophoretic band of RT-PCR products

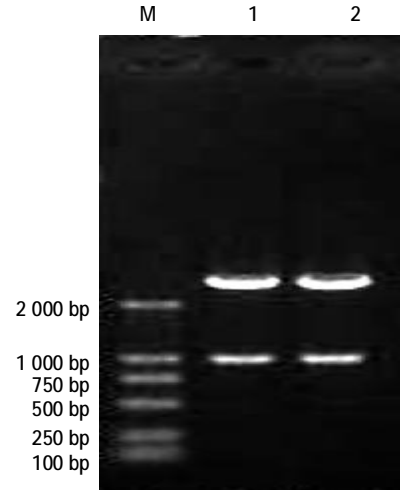
2.3 甘蔗 ACC 氧化酶 cDNA 植物表达载体的鉴定和分析 将正义表达载体 pBIaco 和反义表达载体 pBIantiaco 进行 BamHI 和 SacI 双酶切鉴定, 如图 5 所示。研究表明, 它们在 11 kb 和约 1.0 kb 各出现一条带, 而对照 pBI121 的双酶切结果为 11 kb 和约 2.0 kb (GUS 基因), 说明甘蔗 ACC 氧化酶正义基因和反义基因均已经插入植物表达载体 pBI121 的 BamHI+SacI 位点, 取代了原载体中的 GUS 基因, 从而可利用 GUS 基因两侧的 35S 启动子和 NOS 终止子构成一个完整的表达盒, 实现 ACO 基因在植物中的表达。在载体中还有一个 NPT II 基因(卡那霉素抗性基因), 因此可以在转基因过程中利用卡那霉素选择转基因阳性苗。



注: M1 为 DNA Marker DL-2000; M2 为 A DNA/Hind III; 1 为 pBI121/BamHI 和 SacI; 2 为 pBIaco/BamHI 和 SacI; 3 为 pBIantiaco/BamHI 和 SacI。
Note: M1. DNA Marker DL-2000; M2. A DNA/Hind III; 1. pBI121/BamHI and SacI; 2. pBIaco/BamHI and SacI; 3. pBIantiaco/BamHI and SacI.

图 5 正义植物表达载体 pBIaco 和反义植物表达载体 pBIantiaco 的酶切验证
Fig. 5 Verification of pBIaco and pBIantiaco by restriction enzyme

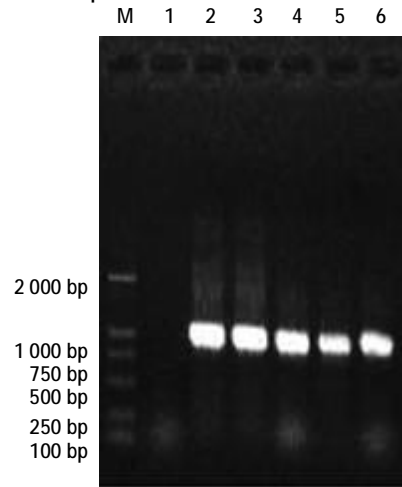
2.4 根癌农杆菌的转化与鉴定 利用冻融法将正向和反



注: M 为 DNA Marker DL-2000; 1 为 pMD18aco/BamHI 和 SacI; 2 为 pMD18antiaco/BamHI 和 SacI。
Note: M. DNA Marker DL-2000; 1. pMD18aco/BamHI and SacI; 2. pMD18antiaco/BamHI and SacI.

图 4 重组质粒 pMD18aco 和 pMD18antiaco 的酶切验证
Fig. 4 Verification of recombinant plasmid PMD18aco and PMD18antiaco by restriction enzyme

向重组表达载体转化到根癌农杆菌中, 分别获得 20 余个转化子。正向载体采用引物 ACO-01, 反向载体采用引物 ACO-02, 以农杆菌中纯化的质粒为模板进行 PCR, 结果如图 6。挑取的菌株均能扩增出一条长约 1.0 kb 的特异性条带, 而阴性对照未能扩增出相应条带, 说明这些菌落为阳性转化子, 质粒 pBIaco 和 pBIantiaco 已转入农杆菌中。



注: M 为 DNA Marker DL-2000; 1 为对照; 2、3 为 PBIaco/EHA105 的 PCR 产物; 4、5、6 为 pBIantiaco/EHA105 的 PCR 产物。
Note: M. DNA Marker DL-2000; 1. CK; 2 and 3. PCR products from PBIaco/EHA105; 4-6. PCR products from pBIantiaco/EHA105.

图 6 PCR 检测质粒 pBIaco 和 pBIantiaco 转化农杆菌电泳图谱
Fig. 6 Electrophoretogram of plasmids pBIaco and pBIantiaco in agrobacterium-mediated transformation by PCR detection

3 讨论

利用乙烯利促进甘蔗增产增糖, 在甘蔗生产中已被广泛推广与应用, 其调控的生理生化效应和形态结构方面已有深入研究。但是, 有关揭示基因表达调控生理基础和分子机理的报道很少。近年来, 已有许多学者从不同植物中克隆了 ACC 氧化酶 cDNA, 并通过鉴定其功能性表达实现了基因的性质和功能鉴定, 如番茄^[10]、甜瓜^[11]、康乃馨^[12-13]等。为此, 笔者采用 RT-PCR 技术克隆了甘蔗 ACO 的 cDNA, 并分

(下转第 7171 页)

表 5 供试不育系柱头外露率
Table 5 Stigma exertion rate of the 4 PTGMS lines

光温敏核不育系 PTGMS line	总颖花数 Total florets//朵	柱头外露数 Stigma exertion florets//朵	单外露率 One stigma exertion rate//%	双外露率 Double stigma exertion rate//%	总外露率 Total stigma exertion rate//%
香 125 S Xiang125 S	518	428	40.9	31.7	72.6
安湘 S AnxiangS	572	495	51.2	35.3	86.5
培矮 64 S Peiai64 S	697	608	50.7	36.5	87.2
贺 S HeS	676	543	45.6	34.7	80.3

表 6 供试不育系张颖时间、颖尖距离和开颖角度
Table 6 Glume opening time, glume top distance and glume opening angle of the 4 PTGMS lines

光温敏核不育系 PTGMS line	张颖时间 Glume opening time//h	颖尖距离 Glume top distance//cm	张颖角度 Glume opening angl.//°
香 125 S Xiang125 S	1.68	0.39	30.8
安湘 S AnxiangS	2.12	0.37	32.5
培矮 64 S Peiai64 S	1.85	0.45	33.0
贺 S HeS	1.78	0.43	29.6

表 7 供试不育系柱头生命力测定结果
Table 7 The test results of stigma vitality for the 4 PTGMS lines

光温敏核不育系 PTGMS line	第 1 天 1 st day	第 2 天 2 nd day	第 3 天 3 rd day	第 4 天 4 th day	第 5 天 5 th day	第 6 天 6 th day	第 7 天 7 th day	%
香 125 S Xiang125 S	48.8	36.6	23.7	15.8	1.6	0	0	
安湘 S AnxiangS	56.2	49.5	36.4	28.7	19.6	8.9	2.8	
培矮 64 S Peiai64 S	53.2	44.2	35.4	12.2	5.7	2.5	0	
贺 S HeS	54.2	42.8	32.2	21.0	8.8	1.4	0	

类型。

(3)4 个光温敏核不育系的育性表现均比较好,不育花粉以典败为主,并且不育株率和花粉不育率均符合实用光温敏核不育系标准。

(4)4 个光温敏核不育系开花时间比较长,开花分散,花时高峰基本上集中在 10:00~11:00,午前开花百分率高;除了香 125 S 以外,柱头外露率均达到 80%以上;同时张颖时间比较长,颖尖距大,张颖角度也比较大;柱头生命力除了香 125 S 只能保持 5 d 以外,其他 3 个光温敏核不育系均

已经下降为 1.6%。

3 结论与讨论

(1)4 个光温敏核不育系按照生育期由短到长排列依次为:香 125S、安湘 S、培矮 64S、贺 S,因此在生产过程中,应该根据各自的生育期安排适宜的播种期。

(2)4 个光温敏核不育系农艺性状差异较大,因此在生产利用时应根据育种目标要求选择适宜的光温敏核不育系

能保持 6 d,安湘 S 甚至可以保持长达 8 d。因此,在利用其作为母本进行制种时,应该根据光温敏核不育系各自开花习性的优缺点,以及所选父本的开花习性,采取趋利避害的技术措施,以最大限度地提高制种产量。

参考文献

- [1] 陈飞,蒋远球,申亿如.水稻光温敏核不育系香 125S 的开花习性观察[J].杂交水稻,1996(1):16-17.
- [2] 郭武强.水稻两用核不育系安湘 S 的开花习性初步观察[J].杂交水稻,2004,19(3):38-39.
- [3] 白德朗,罗孝和.两系杂交水稻新组合两优培特的配套研究与开发应用[J].湖南农业科学,1995(6):6-8.
- [6] WANG A Q,YANG L T,WANG Z Z,et al.Expression of ACC oxidase gene from sugarcane induced by hormones and environmental force [J].Agricultural Sciences in China,2005,4(8):609-613.
- [7] 王爱勤,杨丽涛,王自章,等.甘蔗 ACC 氧化酶全长 cDNA 的克隆及序列分析.广西植物,2006,26(2):194-199.
- [8] 王爱勤,范业庚,赵晓艳,等.甘蔗茎 RNA 提取方法的比较.广西农业生物科学,2007,26(2):175-178.
- [9] 王关林,方宏筠.植物基因工程[M].2 版.北京:科学出版社:2002,776-777.
- [10] NAKATSUKA A,MURACHI S,OKUNISHI H,et al. Differential expression and internal feedback regulation of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase,1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase,an ethylene receptor genes in tomato fruit during development and ripening[J].Plant Physiol,1998,118(4):1295-1305.
- [11] LASSERRE E,BOUQUIN T,HEMANDEZ J A,et al.Structure and expression of three genes encoding ACC oxidase homologs from melon (Cucumis melo L.)[J].Mol Gen Genet,1996,251(1):81-90.
- [12] WOODSON W R,PARK K Y,DRORY A,et al.Expression of ethylene biosynthetic pathway transcripts in senescing carnation flowers[J].Plant Physiol. 1992,99:526-732.
- [13] 张树珍,汤火龙,杨本鹏,等.康乃馨 ACC 氧化酶反义基因遗传转化康乃馨的研究[J].园艺学报,2003,30(6):699-702.

(上接第 7149 页)

别以正向和反向插入载体 pBI121 的 CaMV 35 s 启动子和 NOS 终止子之间,取代原 GUS 基因,构建植物表达载体。经 PCR 鉴定,已获得了含有表达载体的农杆菌 EHA105,并用于转基因模式植物烟草的遗传转化,以期获得转甘蔗 ACO 正义与反义基因烟草,通过真核系统研究鉴定甘蔗 ACO 基因的功能,阐释 ACO 控制乙烯生物合成的分子机制,进一步转化甘蔗,为获得一批高产高糖的转基因甘蔗种质新资源奠定良好基础。

参考文献

- [1] ABELES F B.Ethylene in plant biology [M].New York, London: Academic Press,1973.
- [2] YANGS F,HOFFMAN N E.Ethylene biosynthesis and its regulation in higher plants[J].Ann Rev Plant Physiol,1984,35:155-189.
- [3] 陈明,陈金印.调控果实成熟的基因工程研究进展[J].中国农学通报,2004,20(2):15-19.
- [4] 李永健,杨丽涛,李杨瑞,等.不同时期喷施乙烯利对甘蔗生长、主要农艺性状及抗旱性的影响[J].甘蔗,2002,9(1):12-18.
- [5] L Y R,SOLOMON S. Ethephon:A versatile growth regulator for sugarcane industry[J].Sugar Tech,2003,5(4):213-223.