

# 柿果实 ACC 氧化酶 cDNA 的克隆及其序列分析

饶景萍<sup>1</sup>, 杨书珍<sup>1</sup>, 中野隆平<sup>2</sup>, 稻叶昭次<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>西北农林科技大学园艺学院, 杨凌 712100; <sup>2</sup>日本冈山大学农学部, 日本冈山 700-8530)

摘要: 以柿 (*Diospyros kaki* Thunb.) 果实为材料, 根据其它植物 ACC 氧化酶 (1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid oxidase, ACO) 氨基酸保守区, 设计 1 组简并引物, 通过 RT-PCR 法扩增出 2 个约 800 bp 大小的 cDNA 片段。将其克隆至 pGEM-T 载体上, 对这 2 个重组克隆进行序列测定, DK-ACO1 由 834 个碱基组成, 编码 259 个氨基酸; DK-ACO2 为 836 个碱基, 编码 260 个氨基酸。它们均具有其它植物 ACC 氧化酶中存在的保守区, 且在多肽水平上的同源性很高, 与番茄 LE-ACO1 的同源性 DK-ACO1 是 86.2%, DK-ACO2 是 82.5%; 与甜瓜 CM-ACO1 的同源性 DK-ACO1 是 82.6%, DK-ACO2 为 81.1%。

关键词: 柿; ACC 氧化酶基因; 克隆; 序列分析

## Cloning and Sequence Analysis of cDNA Encoding ACC Oxidase from Persimmon Fruit

RAO Jing ping<sup>1</sup>, YANG Shu-zhen<sup>1</sup>, Nakano Ryohei<sup>2</sup>, Inaba Akitsugu<sup>2</sup>

(<sup>1</sup> College of Horticulture, Northwest Science and Technology University of Agriculture and Forestry, Yangling 712100; <sup>2</sup> Faculty of Agriculture, Okayama University, Okayama 700-8530, Japan)

Abstract: The cDNA encoding ACC oxidase in persimmon (*Diospyros kaki* Thunb.) fruit was cloned and its sequence was analyzed. According to the conserved acid sequence for ACC oxidase in other plant, we designed a group of oligonucleotide primers. Using RT-PCR method, two cDNA fragments about 800 base pair were amplified and then cloned into pGEM-T vector. The sequence determination was performed on the two fragments, the result suggested that DK-ACO1 was composed of 834 base pair and encoded 259 amino acid. DK-ACO2 was composed of 836 base pair encoding 260 amino acid. Each of the cloned cDNA fragment in persimmon fruit had the same conserved amino acid sequences for ACC oxidase as that in other plants, and they had highly homology at polypeptide level. Their homology percentage of DK-ACO1, DK-ACO2 were 86.2%, 82.5% respectively comparing with LE-ACO1 from tomato fruit. While comparing with CM-ACO1 from melon, their homology percentage of DK-ACO1, DK-ACO2 were 82.6%, 81% respectively.

Key words: Persimmon; ACC oxidase; Cloning; Sequence analysis

柿在成熟过程中有呼吸高峰的出现, 其采后软化速度与其乙烯释放水平有着密切的关系<sup>[1,2]</sup>。有呼吸高峰的果实成熟是乙烯依赖型的<sup>[3]</sup>, 乙烯对呼吸跃变型果实的成熟过程起着重要的调节作用, 未熟果实可以通过内源或外源乙烯的作用而加速成熟进程<sup>[4]</sup>。在高等植物中, 乙烯由 Met(蛋氨酸) → SAM(腺苷蛋氨酸) → ACC(1-氨基酸丙烷-1-羧酸)

→ 乙烯途径合成。在此生物合成途径中, 主要通过 ACC 合成酶(ACS) 基因和 ACC 氧化酶(ACO) 基因表达, 在转录水平上进行调节, 最终由 ACO 催化 ACC 转化为乙烯<sup>[5,6]</sup>。据 Balague 等研究报道, ACO 可能也是乙烯生物合成途径中的一个限速酶, 它在转录水平上调控着乙烯的生成速率<sup>[7]</sup>。迄今已从多种植物器官中获得 ACC 氧化酶基因的 cDNA 克

收稿日期: 2001-04-03

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30170662)

作者简介: 饶景萍(1957-), 女, 陕西城固人, 教授, 主要从事园艺产品贮藏保鲜的研究和教学工作。Tel: 029-7032577; Fax: 029-7082810; E-mail: dqf0723@public.xa.sn.cn

隆,ACO由多基因家族编码<sup>[81]</sup>。目前,在柿上还未见有对ACO基因的克隆及其在果实成熟中的表达调控等方面的研究报道。本研究成功地克隆了柿果实中ACO基因家庭中的2个成员:DK-ACO1和DK-ACO2,并进行了序列分析,旨在从分子水平阐明柿果成熟软化机制,以便为采后果实后熟软化的控制提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

供试材料为日本涩柿代表品种‘平核无(Hinatanenashi)’果实,采自日本冈山大学试验农场。于果实发育第I期(7月25日)采收。

质粒载体 pGEM<sup>®</sup>-T Easy Vectors System 为 Promega 公司产品;Oligo(dT)<sub>30</sub>、LIFE SCIENCES First strand cDNA Synthesis Kit 及其余分子生物学试剂为日本 TAKARA 生物制剂公司提供;大肠杆菌菌株 JM109 为冈山大学农产物利用研究室保存;其他化学常规试剂为日本高塚药品株式会社提供。

### 1.2 RNA提取和分离

切取果实薄片投入-80℃的液氮中保存备用。将冻好的组织加液氮研磨成粉状,按照Wan等<sup>[91]</sup>的方法提取总RNA。用Oligo(dT)<sub>30</sub>(按使用说明)分离出Poly(A)<sup>+</sup>RNA。

### 1.3 引物设计与合成

参照Kende<sup>[10]</sup>等发表的其它果实ACO基因的保守氨基酸序列,设计1对简并引物,上游引物为5'-CGCGGATCCGC(ACGT)TG(CT)(GC)A(AG)AA(ACGT)TGGGG(ACGT)TT-3',下游引物是5'-AAACTGCAG(ACGT)GG(CT)TC(CT)TT(ACGT)GC(CT)TG(AG)AA(CT)TT-3',由日本Amersham pharmacia biotech公司合成。

### 1.4 cDNA单链合成和RT-PCR扩增

取分离得到的Poly(A)<sup>+</sup>RNA 2 μg,使用LIFE SCIENCES First strand cDNA Synthesis Kit,37℃60 min反转录合成cDNA第1链。以此产物为模板,进行PCR扩增。反应总体积50 μl,其中Taq DNA Polymerase(5 U/μl)0.25 μl,dNTP Mixture(2.5 mmol/L)4 μl。反应条件:热启动,95℃3 min;变性,95℃1 min,退火,50℃2 min,延伸,72℃3 min,35轮循环;最后一轮延伸10 min。

### 1.5 扩增产物克隆与cDNA序列测定

用低熔点琼脂糖法回收PCR产物,与pGEM-T载体连接,连接产物转化大肠杆菌JM109感受态细

胞。在加有X-gal/IPTG的培养基上挑取白菌落,用碱变性法小批量抽提质粒,并用EcoRI双位点酶切后进行电泳鉴定。采用双脱氧终止法,岛津DSQ1000-L自动DNA序列分析仪测序,用Genetex Mac软件系统,计算机自动收集和处理信号,打印出碱基序列和氨基酸序列。将其与从基因组数据库中获得的序列进行相似性比较,断定所克隆的cDNA是否ACC氧化酶基因片段。

## 2 结果与分析

### 2.1 RNA检测

由柿果实中提取的总RNA样品,经紫外分光光度计测定,紫外吸收值OD<sub>260/280</sub>=1.87,OD<sub>260/230</sub>>2.0,说明提取的RNA纯度较高;用RNA琼脂糖甲醛变性电泳检测结果见图1。图中可见有28S和18S两条较完整的条带,并无拖尾。28S rRNA条带的亮度接近18S rRNA条带亮度的2倍,表明RNA样品比较完整。

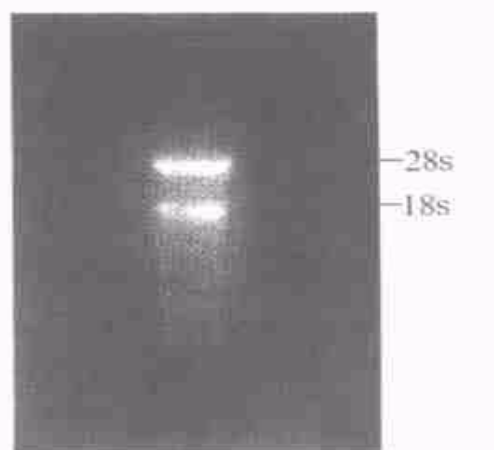


图1 柿果实RNA电泳图

Fig.1 Electrophore togram of RNA from persimmon fruit

### 2.2 PCR产物扩增和克隆

ACC氧化酶基因的克隆已在番茄<sup>[8]</sup>、甜瓜<sup>[7]</sup>、黄瓜<sup>[11]</sup>等多种植物上报道。它们一般都有7~8个氨基酸保守区。我们根据保守区设计的1组简并引物,从柿果实中扩增出ACC氧化酶的cDNA片段。将这些片段纯化,克隆至载体pGEM-T,通过限制性内切酶EcoRI双位点酶切鉴定,初步筛选出插入的片段为800 bp左右的重组克隆(图2中的1,2,3,4,6,7,8,11)。

### 2.3 cDNA序列测定和同源性比较

对重组克隆的DK-ACO进行核苷酸序列测定表明,DK-ACO片段有2个不同的碱基序列,1个片



1~11:重组质粒酶切, pDK-ACO + EcoRI ; 12: Markers

图2 重组质粒用 EcoRI 双位点酶切后的电泳图谱

Fig.2 Electro phoretogram of restriction pattern of recombination plasmid

段为 834 个碱基,编码 259 个氨基酸(将其定为 DK-ACO1,图 3),另 1 个片段由 836 个碱基组成,编码 260 个氨基酸(将其定为 DK-ACO2,图 4)。通过与其它植物的 ACC 氧化酶基因氨基酸的同源性比较,与番茄的 LE-ACO1 的同源性 DK-ACO1 为 86.2%,DK-ACO2 为 82.5%。与甜瓜 CM-ACO1 的同源性,DK-ACO1 为 82.6%,DK-ACO2 是 81.1%(图 5)。柿的 2 个 ACC 氧化酶多肽均包含有 7 个氨基酸高度保守区和不同酶中所共有的 7 个不变氨基酸残基。二者在多肽水平上有 84.0%的相似性。

### 3 讨论

过去的研究认为,ACC 合成酶是乙烯生物合成途径中唯一的限速酶<sup>[5]</sup>。但近年来的研究结果表

```

CGCGGATCCGCTTGTGAGAAGTGGGGTTTCTTTGAGTTGGTGAACCTGGAATTCCTCCGGAGCTAATGGACACAGTAGAGAGA 84
R G S A C E K W G F F E L V N H G I P P E L M D T V E R
TTGACAAAAGAGCACTACAAGAAGTGCATGGAGCAGAGGTTCAAGGAGCTGGTGGCAAGCCAGGCTCTAGAGGGGGTCCAAGCT 168
L T K E H Y K K C M E Q R F K E L V A S Q A L E G V Q A
GAGGTTACAGACATGGATTGGGAAAGCACCTACTTCTTGGCCATCTCCCCAGTCCAACATCTCAGAACTACCCGATCTCGAC 252
E V T D M D W E S T Y F L R H L P Q S N I S E L P D L D
GAGGAATACAGGAGGATCATGAAGGATTTTGTCTGAAAGGTTAGAGAAGCTAGCAGAGTATCTCCTGGACTTGCTATGCGAAAAC 336
E E Y R R I M K D F A E R L E K L A E Y L L D L L C E N
CTTGGACTAGAAAAGGATACCTAAGAAGGCCTTCTATGGAACAAAGGGTCTAATTTGGCACCAAGGTTGCCAACTACCCG 420
L G L E K G Y L K K A F Y G T K G P N F G T K V A N Y P
CCGTGCTCTAAGGCAGACCTGATCAAGGGGCTGAGAGCTCACACTGATGCTGGTGGCATCATCTCCTCTTCCAGGATGACAAG 504
P C P K A D L I K G L R A H T D A G G I I L L F Q D D K
GTCAGTGGTCTCCAGCTCCTCAGGACGACCAAGTGGATCGATGTCCTCCCAATGAAACATTCATCGTCATCAACCTTGGCGAC 588
V S G L Q L L K D D Q W I D V P P M K H S I V I N L G D
CAGCTTGAAGTGATAACCAATGGCAAGTACAAGAGCGTCTTACCCTGTGGTGGCACAACAGATGGCACCCCGGATGCAATA 672
Q L E V I T N G K Y K S V L H R V V A Q T D G T R M S I
GCTTCTTCTACAACCCGGCAATGATGCTGTTATCTATCCAGCAGCAGCACTGGTTGAGAAAGAAGTACAGGAGAAGGAAGTT 756
A S F Y N P G N D A V I Y P A A A L V E K E V Q E K E V
TACCCGAGATTCGTGTTGATGACTACATGAAGCTGTATGCTGGCCTGAAATTTCAAGCCAAGGAACCACTGCAGTTT 834
Y P R F V F D D Y M K L Y A G L K F Q A K E P L Q F

```

划线部分为引物 The prortion of underline means primer

图3 柿果 ACC 氧化酶 cDNA DK-ACO1 核苷酸序列和由此推导的氨基酸序列

Fig.3 The nudeotide and deduced amino acid sequence of DK-ACO1

明,ACC 氧化酶对乙烯的生物合成也具有重要的调控作用,它可能是又一乙烯生物合成限速酶<sup>[7]</sup>。跃变型果实在呼吸高峰前期,ACO 活性可因外源乙烯的影响而增加<sup>[12]</sup>。在康乃馨、牵牛花的花瓣老化时,ACO 活性增大的同时,ACO 基因的表达量也随之增加,这种现象在跃变型果实成熟始期,兰花受粉之后,番茄和花椰菜营养组织老化过程中都有发生<sup>[13]</sup>。ACC 氧化酶基因是由多基因家族编码,这在许多植物体中都已发现,番茄和甜瓜均有 3 个 ACO 基因<sup>[7,14]</sup>。一般不同物种的 ACC 氧化酶氨基酸的同源性都比较高,大多为 80%左右。我们从柿

中克隆的 2 个 ACC 氧化酶的同源物,经序列分析和同源性分析表明,它们与番茄等植物的同源性很高,超过了 80%,并且也具有其它植物类似的高度保守氨基酸序列,2 个基因编码不同的 ACC 氧化酶多肽,这些结果都说明柿的 ACC 氧化酶同样是由多基因家族编码的。多基因家族中各基因的表达受发育时期、环境条件、激素等因素的影响,在不同的条件下具有不同的表达特征。柿的 2 个 ACO 基因与其果实成熟衰老的关系,以及在成熟软化过程中表达调控的特异性方面的研究,尚在进行之中。

```

GGATCCGCGTGCAGAACTGGGGTTCTTTGAGGTGGTGAACCACGGCATCTCCCACGAGCTGATGGACTCAGTGGAGAGGCTC 84
G S A C Q N W G F F E V V N H G I S H E L M D S V E R L
ACAAAGGAGCACTACAAGAAGTTCATGGAGCAAAGTTCAAGGAAATGGTGGCAAGCAAAGCCTTGGAGTTGTTCACTGCTGAG 168
T K E H Y K K F M E Q R F K E M V A S K G L E V V Q S E
ATCAACGACTTGGACTGGGAGAGCACCTTCTTCTGCGCCATCTTCTTCTTCCAACCTCTCAGAACTCCCCGATCTTGAAGAT 252
I N D L D W E S T F F L R H L P S S N L S E L P D L E D
GATTACAAGAAGCAATGAAGGAGTTTCTGAGGACCTGGAGAAGCTGGCGGAgcAGCTGCTGGACTACTTGTGTGAAAACCTA 336
D Y K K A M K E F A E D L E K L A E Q L L D Y L C E N L
GGGCTGGAGAAAGGTACTGAAGAAGGCTTCTATGGCTCCAAGTCCGACTTTTGGACCAAGGTGAGCAACTATCCACCA 420
G L E K G Y L K K A F Y G S K G P T F G T K V S N Y P P
TGTCGAAGACCGAGCTGATAAAGGGGTGAGAGCCACACAGATGCCGGTGCATCATCTTGTCTTCCAAGATGACAAGGTC 504
C P R P E L I K G L R A H T D A G C I I L L F Q D D K V
AGTGGCTCCAGCTCCTCAAGGATGGCCAGTGGATCGATGTCCCACCATTGAAGCACTCCATTGTCATCAACATTGGCGACCAA 588
S G L Q L L K D G Q W I D V P P L K H S I V I N I G D Q
CTTGAGGTAATCACCAATGGCAAATACAAGCGTGTGACCCAGTGTGCGCAAACAGATGGCAACAGAATGTCCATAGCC 672
L E V I T N G K Y K S V M H R V I A Q T D G N R M S I A
TCTTTCTACAACCGGGCAGCGACGAGTATTTATCCAGCGCCACTTGGGTGGAGAAAGAAGCTGATCATGAGCAGAAGCAA 756
S F Y N P G S D A V I Y P A P P W V E K E A D H E Q K Q
GTTTACCCAAATTTGCTTTCGAAGACTACATGAAGCTCTATGCTGGCCTGAAATCCAGGCCAAAGAGCCCTGCACTT 836
V Y P K F V F E D Y M K L Y A G L K F Q A K E P L Q

```

划线部分为引物 The portion of underline means primer

图 4 柿果 ACC 氧化酶 cDNA<sup>Δ</sup>ACO<sub>2</sub> 核苷酸序列和由此推导的氨基酸序列Fig.4 The nucleotide and deduced amino acids sequence of DK-ACO<sub>2</sub>

```

LE-AC01 FELVNGIPHEVMDTVEKMTKGHYKCKMEQRFKELVASKGLEAVQAEVTDLDWESTFFLRHLPTSNSISQV 70
CM-AC01 FELVNGIPHEFLDMVEKMRDRHYKCKMEERFKETVLSKGLEAAQAEVNDMDWESTFFLRHLPESNISQM 70
DK-AC01 FELVNGIPPELMDTVERLTKEHYKCKMEQRFKELVASQALEGVQAEVTDMDWESTYFLRHLPPQSNISEL 70
DK-AC02 FEVNVNGISHELMDSVERLTKEHYKCKFMEQRFKEMVASKGLEVVQSEINDLDWESTFFLRHLPSSNLSSEL 70
** ***** * * * * * ***** * * * * * ***** ***** * * *
LE-AC01 PDLDEEYREVMRDFAKRLEKLAEEILDLLCENLGLHKGYLKNAFYGSKGPNFGTKVSNYPCCPKPDLING 140
CM-AC01 SDLDEEYKIMKQFAKKLENLAEEILDLLCENLGLHKGYLKKAIFYGSKGPTFGTKVSNYPCCPKPDLING 140
DK-AC01 PDLDEEYRRIMKDFAEERLEKLAEYILDLLCENLGLHKGYLKKAIFYGSKGPNFGTKVANYPCCPKADLING 140
DK-AC02 PDLEDDYKAMKEFAEDLEKLAEQILDYLCENLGLHKGYLKKAIFYGSKGPTFGTKVSNYPCCPRPELING 140
** * * * * * ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** *****
LE-AC01 LRAITAGGIILLFQDDKVSGLQLLKDEQWIDVPPMRHSIVVNLQDQLEVITNGKYKSVLRVIAQTDGT 210
CM-AC01 LRAITAGGIILLFQDDKVSGLQLLDGNWIDVPPMRHAIIVVNLQDQLEVITNGRYKYSVLRVLTQTSGT 210
DK-AC01 LRAITAGGIILLFQDDKVSGLQLLKDDQWIDVPPMKHSIVINLQDQLEVITNGKYKSVLRVVAQTDGT 210
DJ-AC02 LRAITAGCIILLFQDDKVSGLQLLDGQWIDVPPPKHSIVINLQDQLEVITNGKYKYSVLRVIAQTDGN 210
***** ***** ***** ***** * * * ***** ***** ***** * * *
LE-AC01 RM IASFYNFGSDAVIYPAKTLVEKEAES-TQVYPKFVFDYMKLYAGL 259
CM-AC01 RM IASFYNFGSDAVIYPALVEKDQDEEKKEVYPKFVFDYMKLYLGV 258
DK-AC01 RM IASFYNFGSDAVIYPAAALVEKEVQE--KEVYPRFVFDYMKLYAGL 259
DK-AC02 RM IASFYNFGSDAVIYPAPPVVEKEADHEQKQVYPKFVFDYMKLYAGL 260
***** ***** * * * ***** ***** *****

```

\* \* 表示完全保守;线框中是保守区;黑影处为不变氨基酸残基

“ \* ” means completely conserved, shade means unchangeable amino acid residues, the portion in black frame means conserved regions

图 5 柿 ACO 基因(DK-AC01,DK-AC02)与番茄 LE-AC01 和甜瓜 CM-AC01 基因所推导的氨基酸序列比较

Fig.5 Comparison of the deduced amino acid sequence between ACO gene (DK-AC01, DK-AC02) from persimmon and LE-AC01 from tomato, CM-AC01 from melon

## References

- [ 1 ] Tian J W, He P C, Xu M X. The relationship between hormones and ripening of persimmon. *Acta Horticulturae Sinica*. 1994,21(3):217-221. (in Chinese)  
田建文,贺普超,许明宪.植物激素与柿子后熟的关系.园艺学报,1994,21(3):217-221.
- [ 2 ] Takada. The changes of respiration, ethylene production of persimmon fruits at different stages during fruit development. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.*,1983,52(1):78-84. (in Japan)  
高田峰雄.種々の发育段階で採取したカキ果実の呼吸、エチレン生成及び成熟.园艺学会雑誌,1983,52(1):78-84.
- [ 3 ] Alonso J M, Chamarro J, Granell A. Evidence for the involvement of ethylene in the expression of specific RNAs during maturation of the orange, a nonclimacteric fruit. *Plant Mol. Biol.* 1995,29:385-390.
- [ 4 ] Lelievre J M, Latche A, Jones B, et al. Ethylene and fruit ripening. *Physiol Plant*, 1997,101:727-739.
- [ 5 ] Yang S F, Hoffman N E. Ethylene biosynthesis and its regulation in higher plants. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 1984,35:155-189.
- [ 6 ] Abeles F B, Morgan P W, Saltveit M E. Ethylene in Plant Biology. Academic Press. San Diego. 1992, P:26-55.
- [ 7 ] Balague C, Watson C F, Turner A J, et al. Isolation of a ripening and wound-induced cDNA from *Cucumis melo* L. Encoding a protein with homology to the ethylene-forming enzyme. *Eur. J. Biochem.* 1993,212:27-34.
- [ 8 ] Barry C S, Blume B, Bouzayen M, et al. Differential expression of the 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase gene family of tomato. *Plant J.* 1996,9:525-535.
- [ 9 ] Wan C Y, Wilking T A. A modified hot borate method significantly enhance the yield of high-quality RNA from cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Anal. Biochem.* 1994,223:7-12.
- [ 10 ] Kende H. Ethylene biosynthesis. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 1993,44:283-307.
- [ 11 ] Shiomi S, Yamamoto M, Ono T, et al. cDNA cloning of ACC synthase and ACC oxidase genes in cucumber fruit and their differential expression by wounding and auxin. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* 1998,67(5):685-692.
- [ 12 ] Liu Y, Hoffman N E, Yang S F. Promotion by ethylene of the capability to convert 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid to ethylene in preclimacteric tomato and cantaloupe fruits. *Plant Physiol.* 1985,77:407-411.
- [ 13 ] Ó Neil S D, Nadeau J A, Zhang X S, et al. Interorgan regulation of ethylene biosynthesis genes by pollination. *Plant Cell*, 1993,5:419-432.
- [ 14 ] Lasserre E, Bouquin T, Hernandez J A, et al. Structure and expression of three genes encoding ACC oxidase homologs from melon (*Cucumis melo* L.). *Mol. Gen. Genet.* 1996,251:81-90.