

7 种植物花瓣 ACO 基因的克隆与分析

吴田^a, 蓝增全^{b*}

(西南林业大学 a.园林学院; b.环境科学与工程学院, 云南 昆明 650224)

摘 要: 为获得通用的适用于植物花瓣 ACO 基因克隆与检测的引物, 根据 Genbank 中收录的双子叶木本植物的 ACO 基因序列, 设计 1 对简并引物, 并用其对随机选择的 7 种植物(紫罗兰、多头菊、冬樱、迎春、云南杜鹃、垂丝海棠、山茶)的花瓣的 RNA 进行 PCR 扩增。结果发现: 从 7 种植物花瓣中都能扩增出约 800 bp 的特异片段, 登录 Genbank 发现均未被注册, 将序列提交 Genbank 数据库, 获得 7 种植物花瓣 ACO 基因的登录号(JX503067、JX503068、JX503069、JX503070、KC112390、KC112392、KC112393); 在 NCBI 上进行 blast 比对, 发现所克隆的 7 个 ACO 基因均与其他植物的 ACO 基因有一定的序列相似性, 其中冬樱 ACO 基因与千叶桃花 ACO 基因同源性最高, 为 98%, 迎春 ACO 基因与中华猕猴桃 ACO6 基因的同源性最低, 为 88%, 将 7 个 ACO 基因的片段进行多序列比较分析, 发现两两之间序列平均相似性为 77%。

关 键 词: 植物; 花瓣; ACO 基因; 简并引物; 基因克隆

中图分类号: Q781

文献标志码: A

文章编号: 1007-1032(2013)02-0155-05

Cloning and analysis of ACO gene from petals in seven plants

WU Tian^a, LAN Zeng-quan^{b*}

(a.Landscape Architecture College; b.Environment Science and Engineering College, Southwest Forestry University, Kunming 650224, China)

Abstract: To obtain general primers for detection and cloning of ACO gene of plant petal, a pair of degenerate primers was designed based on the published sequences of ACO genes of dicotyledonous woody plants in Genbank, which were used to clone ACO genes from petals in 7 plants, namely, *Matthiola incana*, *Dendranthema morifolium*, *Prunus majestica* Koehhe., *Jasminum nudiflorum*, *Rhododendron yunnanense* Franch., *Malus halliana*, *Camellia japonica*. The results indicated that specific fragments of about 800 bp could be amplified from all of the 7 plants and the sequences have not been registered on Genbank database. The sequences were submitted to Genbank database and the accessing numbers were JX503067, JX503068, JX503069, JX503070, KC112390, KC112392 and KC112393. The 7 sequences show high sequence identities with ACO genes of other plants through NCBI blast analysis, the highest homology of nucleotide sequence existed between *Prunus majestica* Koehhe. ACO gene and *Prunus persica* Batsch. ACO gene, which is 98%, and the lowest homology of nucleotide sequence existed between *Jasminum nudiflorum* ACO gene and *Actinidia chinensis* ACO6, which is 88%. It was found that the average sequence identity through comparison between any two samples was 77% by multiple sequence alignments.

Key words: plant; petal; ACO gene; degenerate primer; gene cloning

ACC 氧化酶(ACC oxidase, ACO)是乙烯合成途径中的最后一个酶, 是乙烯合成过程中重要的限速

收稿日期: 2012-11-02

基金项目: 云南省自然科学基金项目(2010ZC268); 国家林业局“948 项目”(2011-4-45); 西南林业大学大型仪器设备共享基金; 园林植物与观赏园艺省高校重点实验室基金

作者简介: 吴田(1980—), 女, 山东青岛人, 博士, 副教授, 主要从事植物分子生物学研究, 461257271@qq.com; *通信作者, 2351417655@qq.com

酶,具有重要的调控作用^[1-2]。用生物化学方法很难分离出细胞提取液中的 ACO,采用分子克隆方法可以克服直接从植物组织中提取 ACO 的困难^[3]。目前已在一些植物(番茄^[4]、青花菜^[5]、柿^[6])中克隆到 ACO 基因。ACO 基因的表达与植物器官的成熟、果品保鲜有密切的关系^[7]。抑制 ACO,从而抑制乙烯的生成,可以延缓蝴蝶兰^[9]、康乃馨^[10]、牡丹^[11]等植物花朵的衰老和凋谢^[8],因此,克隆植物的 ACO 基因,有助于调控植物的开花时期,阐明开花植物乙烯合成的分子机理。

简并 PCR 是 20 世纪 90 年代初建立的扩增 DNA 的技术,现已广泛应用于新基因的克隆^[12]。用简并引物已经在水稻^[13]、风信子^[14]、黑莓^[15]、树莓^[15]等中成功克隆了一系列的基因。笔者根据已知的 ACO 基因序列,设计简并引物,用于克隆植物 ACO 基因,旨在发掘克隆花卉植物 ACO 基因的通用引物,为进一步分析植物 ACO 基因的序列特征及分离全长 cDNA 提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试植物

本研究所用的紫罗兰(*Matthiola incana*)品种为阿贝拉,多头菊(*Dendranthema morifolium*)品种为白丹,均由云南省农业科学院惠赠。冬樱(*Prunus majestica* Koehhe.)、迎春(*Jasminum nudiflorum*)、云南杜鹃(*Rhododendron yunnanense* Franch.)、垂丝海棠(*Malus halliana*)、山茶(*Camellia japonica*)等植物均采摘于西南林业大学树木园。研究材料为以上植物盛开花朵的花瓣。

1.1.2 试剂与仪器

RN09 试剂盒购于北京艾莱克生物有限公司;TranZol UP 试剂盒购于北京全式金生物技术有限公司;Quant cDNA 第一链合成试剂盒购于北京天根生化科技有限公司;DNA 聚合酶、dNTPs、回收试剂盒、克隆载体 pMD18-T 等分子生物学常规试剂均购于上海 TaKaRa 生物公司。超微量分光光度计购自英国 NanoVue 公司。

1.2 方法

1.2.1 不同植物的 RNA 提取

用 RN09 试剂盒提取山茶花瓣的 RNA,其他植物花瓣的 RNA 用 TranZol UP 试剂盒分别提取。提取方法均按照相应的说明书进行。RNA 提取后用 DEPC 处理过的 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 完整性,并用超微量分光光度计测定 RNA 的浓度,稀释成 500 ng/ μ L,用于后续的反转录试验。

1.2.2 简并引物设计

用多序列比较软件^[16]分析已在 Genbank 中注册的双子叶木本植物,如龙眼、苹果、茶树等 20 多种植物的 ACO 基因序列,找出相对比较保守的序列区段,结合 Primer Permier 5 引物设计软件,以尽量降低简并度为原则,设计 ACO 基因简并引物 ACO-JBF(5'-ATGCBTGTGMRAACTGGGGHTTY TT-3')和 ACO-JBR(5'-AAYCTVGGCTCTTTBGCY TGRAAYT-3')。预期扩增片段长度约为 800 bp。

1.2.3 基因片段的克隆及测序

反转录使用 Quant cDNA 第一链合成试剂盒,操作步骤按照说明书进行,得到克隆基因所需要的 cDNA 模板。分别以上述合成的 cDNA 为模板,用 ACO-JBF 和 ACO-JBR 简并引物进行 PCR 扩增,其程序为 95℃ 预变性 3 min;94℃ 变性 45 s,53℃ 退火 45 s,72℃ 延伸 60 s,32 个循环;72℃ 充分延伸 10 min,4℃ 暂存。将 PCR 产物在 1.5% 琼脂糖凝胶上进行电泳,回收目的条带,克隆到 pMD18-T 载体上,并送北京华大中生科技发展有限公司测序。

1.2.4 序列分析

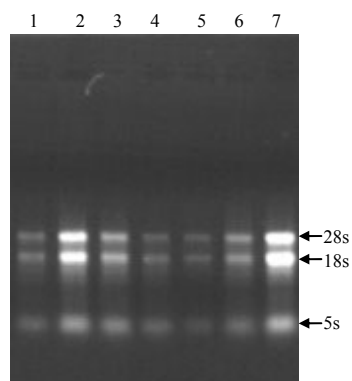
将克隆得到的基因片段在 NCBI 上进行 blast (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>)比对。然后用多序列比较软件^[16]将所得到的序列进行多序列比对分析。

2 结果与分析

2.1 RNA 的电泳分析和纯度检测

对从紫罗兰、多头菊、冬樱、迎春、云南杜鹃、垂丝海棠、山茶等 7 种花瓣中提取的总 RNA 分别进行电泳检测,可见 28S、18S 和 5S 等 3 条清晰的

电泳条带(图 1)。用紫外分光光度计测其纯度, $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ 为 1.9~2.0, 表明总 RNA 质量较高。



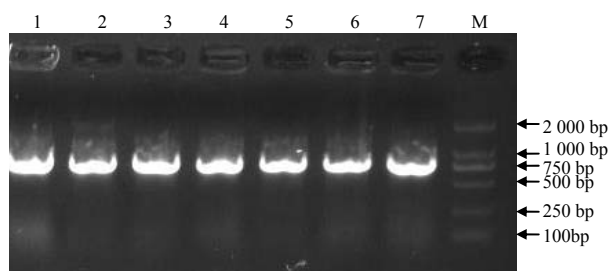
1~7 分别示紫罗兰、多头菊、冬樱、迎春、云南杜鹃、垂丝海棠、山茶的总 RNA 电泳条带。

图 1 7 种花瓣中提取的总 RNA 电泳图

Fig.1 Electrophoresis profiles of total RNA in 7 plants

2.2 7 种植物花瓣 ACO 基因片段的克隆

紫罗兰、多头菊、冬樱、迎春、云南杜鹃、垂丝海棠、山茶等 7 种植物的反转录产物 cDNA 为 PCR 模板, 进行 PCR 扩增, 结果发现均能得到约 800 bp 的扩增产物(图 2)。经测序, 发现它们的长度分别为 831、828、825、820、822、822、826 bp, 表明本研究所设计的 ACO 简并引物适用于本试验所选的 7 种植物。登录 Genbank 发现这几个序列均为首次克隆的基因片段, 将它们分别提交 Genbank, 获得基因序列登录号, 分别为 JX503067、JX503068、JX503069、JX503070、KC112390、KC112392、KC112393。



1~7 分别示紫罗兰、多头菊、冬樱、迎春、云南杜鹃、垂丝海棠、山茶的 PCR 扩增条带; M 为 marker 2000。

图 2 用简并引物分别克隆 7 种植物的 ACO 基因片段

Fig.2 Amplification of ACO gene in 7 plants with degenerate primer

测序结果表明, ACO-JBF 引物的第 1 个简并

碱基(B), 在杜鹃和多头菊对应为 C, 在其他植物对应为 T; 第 2 个简并碱基(M), 在多头菊对应为 C, 在其他植物对应为 A; 第 3 个简并碱基(R), 在紫罗兰、山茶、冬樱对应为 G, 在其他植物对应为 A; 第 4 个简并碱基(H), 在多头菊和山茶对应为 C, 在迎春对应为 T, 在其他植物对应为 A; 第 5 个简并碱基(Y), 在山茶和垂丝海棠对应为 C, 在其他植物对应为 T。ACO-JBR 引物的第 1 个简并碱基(Y), 在多头菊和迎春对应为 C, 在其他植物为 T; 第 2 个简并碱基(V), 在山茶对应为 G, 在其他植物对应为 C; 第 3 个简并碱基(B), 在山茶对应为 G, 在垂丝海棠对应为 T, 在其他植物对应为 C; 第 4 个简并碱基(Y), 在山茶对应为 C, 在其他植物对应为 T; 第 5 个简并碱基(R), 在多头菊、迎春、垂丝海棠对应为 A, 在其他植物对应为 G; 第 6 个简并碱基(Y), 在多头菊、垂丝海棠、山茶对应为 C, 在其他植物对应为 T, 其中, 紫罗兰和冬樱序列能与 ACO-JBF 引物完全匹配, 而杜鹃和冬樱的序列能与 ACO-JBR 引物完全匹配。

2.3 序列分析

将本试验所克隆的基因片段在 NCBI 上进行比对, 发现冬樱 ACO 基因与千叶桃花 ACO 基因(登录号: AAF36483)同源性高达 98%; 垂丝海棠 ACO 基因与沙梨 ACO 基因(登录号: BAD61004)同源性高达 97%; 迎春 ACO 基因和云南杜鹃 ACO 基因与中华猕猴桃 ACO6 基因的同源性分别高达 88% 和 93%; 与紫罗兰 ACO 基因、多头菊 ACO 基因和山茶 ACO 基因相似性最高的分别为玉山阿拉伯芥 ACO 基因、向日葵 ACO 基因、智利猕猴桃 ACO5 基因, 同源性分别为 95%、91%、90%。由此可以推断, 所克隆的 7 个基因均为相应植物 ACO 基因的片段, 且具有较高的同源性。此外, 通过序列比对还发现, 7 个 ACO 基因的片段中均包含 1 个 20G-Fe(II) 加氧酶超家族结构域和 1 个 N 端加双氧酶超级家族结构域(图 3)。

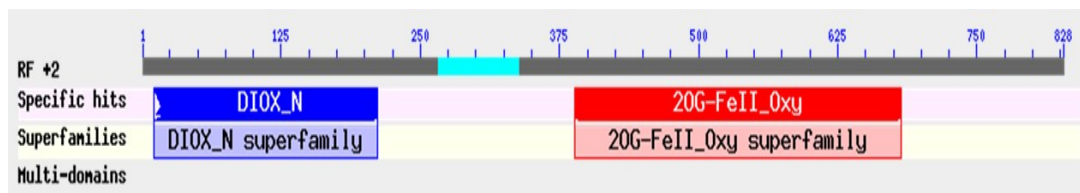
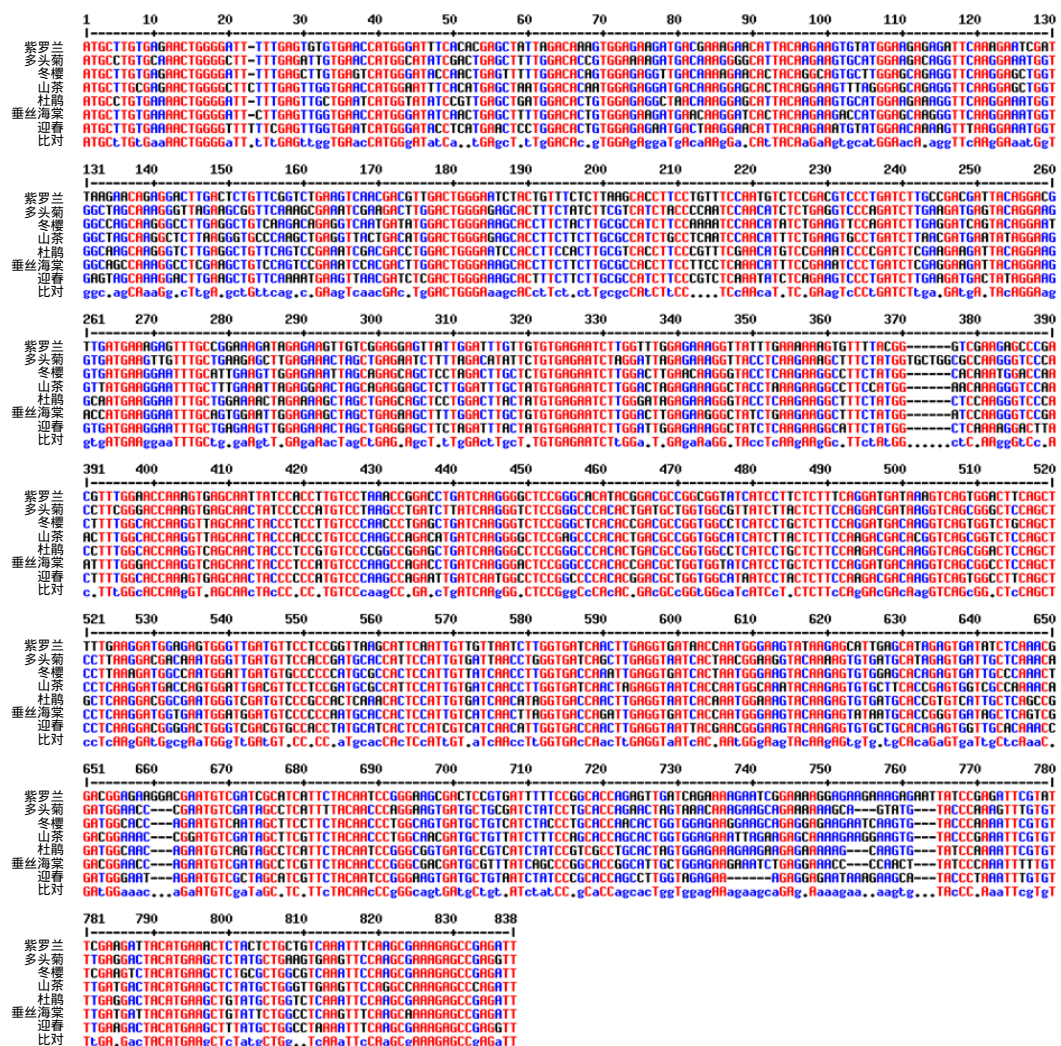


图 3 在 NCBI blast 检索的结构域保守区段示意图

Fig.3 Diagram of conserved domain by NCBI blast

将 7 个 *ACO* 基因的片段在多序列比较分析软件上进行比对, 结果发现两两之间的序列相似性为 71%~82%, 平均为 77%, 其中, 杜鹃 *ACO* 基因和垂丝海棠 *ACO* 基因、冬樱 *ACO* 基因和山茶 *ACO*

基因的序列差异最小, 序列相似性均为 82%; 紫罗兰 *ACO* 基因和山茶 *ACO* 基因的序列差异最大, 序列相似性为 71%(图 4)。

图 4 7 个 *ACO* 基因片段的序列比较分析结果Fig.4 Multiple sequence alignments of 7 *ACO* genes

3 讨论

笔者在提取 RNA 时, 最开始使用常规的 RNA 提取法^[17-18], 虽然几经改进, 但 RNA 要么根本无

法提取, 要么降解严重, 即使没有降解也是产量很低, 不适于后续的反转录试验。而使用试剂盒后也并非所有材料的 RNA 可以用同种试剂盒提取, 如

山茶的花瓣 RNA 用北京全式金公司的 TranZol UP 试剂盒就无法提取。提取高质量的 RNA 是进行基因克隆的第一步,笔者通过提取不同植物材料、不同组织器官的 RNA 后,摸索出在进行基因克隆时,可以首选 RNA 试剂盒,且要考虑该试剂盒是否是针对植物中多糖、多酚等问题进行设计的。

本研究所设计的简并引物从随机选择的 7 种植物(紫罗兰、多头菊、冬樱、迎春、云南杜鹃、垂丝海棠、山茶)花瓣中均克隆到了 ACO 基因,这 7 种植物归属于十字花科、菊科、蔷薇科、木犀科、杜鹃花科、山茶科等 6 种不同的科。此外,用该对简并引物克隆得到了诺丽、高盆樱、玉兰等植物中的 ACO 基因(数据未在本文公布);因此,推论该对简并引物有较高的通用性,可以尝试在其他科(属)的植物中进行 ACO 基因的克隆,以便快速得到更多的 ACO 基因,并进一步分析序列的保守性。然而,用该对引物在茶梅、梅花、桂花等植物中进行克隆,并未得到相应的基因。在后续的工作中,需对更多植物进行 ACO 基因的克隆,获得更多的 ACO 基因序列,以调整引物的简并度,获得通用性更高的 ACO 简并引物。

参考文献:

- [1] Yang S F, Hoffman N E. Ethylene biosynthesis and its regulation in higher plant [J]. Ann Rev Plant Physiol, 1984, 35: 155-189.
- [2] 陈银华,黄伟,王海. ACC 氧化酶基因研究进展[J]. 海南大学学报:自然科学版, 2006, 24(2): 194-200.
- [3] Yu B Y, Adas D O, Yang S F. 1-aminocyclobutane-1-carboxylate synthase, a key enzyme in ethylene bio-synthesis [J]. Arch Biochem Biophys, 1979, 198(1): 280-286.
- [4] Barry C S, Blume B, Bouzayen M, et al. Differential expression of the 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase gene family of tomato [J]. Plant J, 1996, 9: 525-535.
- [5] 张宪省,钟海文,吕程. 授粉诱导蝴蝶兰雌蕊中乙烯合成和 ACC 氧化酶基因表达[J]. 植物学报, 1996, 3(5): 375-378.
- [6] 饶景萍,杨书珍,中野隆平,等. 柿果实 ACC 氧化酶 cDNA 的克隆及其序列分析[J]. 中国农业科学, 2002, 35(6): 695-699.
- [7] Hamilton A J, Lyett G W, Grierson D. Antisense gene that inhibit synthesis of hormone ethylene in transgenic plants [J]. Nature, 1990, 346: 284-287.
- [8] Savin K W, Baudinette S C, Graham M W, et al. Antisense ACC oxidase RNA delays carnation petal senescence [J]. Hort Science, 1995, 30(5): 970-972.
- [9] 徐晓峰,黄学林,黄霞. ACC 氧化酶反义基因转化青花菜的研究[J]. 中山大学学报:自然科学版, 2003, 42(4): 64-68.
- [10] 张树珍,汤火龙,杨本鹏,等. 康乃馨 ACC 氧化酶 cDNA 的克隆及其反义植物表达载体的构建[J]. 云南植物研究, 2002, 24(6): 775-780.
- [11] 周琳,董丽. 牡丹 ACC 氧化酶基因 cDNA 克隆及全序列分析[J]. 园艺学报, 2008, 35(6): 891-894.
- [12] Telenius H, Carter N P, Bebb C E, et al. Degenerate oligonucleotide-primed PCR: General amplification of target DNA by a single degenerate primer [J]. Genomics, 1992, 13: 718-725.
- [13] 李子银,陈受宜. 水稻抗病基因同源序列的克隆、定位及其表达[J]. 科学通报, 1999, 44(7): 727-733.
- [14] 张宪省,李全梓,李兴国,等. 风信子 HAG 基因的克隆与表达[J]. 中国科学:C 辑, 2000, 30(4): 376-381.
- [15] 张春红,王小敏,王鲁北,等. 利用简并引物克隆黑莓、树莓肌动蛋白基因片段及表达分析[J]. 生物技术通报, 2011(8): 123-128.
- [16] Corpet F. Multiple sequence alignment with hierarchical clustering [J]. Nucl Acids Res, 1988, 16(22): 10881-10890.
- [17] 张宇,唐志鹏,邓海燕,等. 富含多糖多酚芒果果肉组织总 RNA 的提取[J]. 湖南农业大学学报:自然科学版, 2009, 35(6): 637-639.
- [18] 李立志,邓子牛,熊兴耀,等. 番茄组织总 RNA 提取方法研究[J]. 湖南农业大学学报:自然科学版, 2007, 33(5): 572-575.

责任编辑: 罗 维

英文编辑: 罗 维