

## ACS 和 ACO 基因克隆及植物转化

王金发 申煌煊

(中山大学生命科学学院, 广州 510275)

**摘要** 根据已知序列设计 PCR 引物, 分别扩增氨基环丙烷羧酸合酶 (ACS) 和氨基环丙烷羧酸氧化酶 (ACO) 基因并克隆到中间载体, 经限制性内切酶酶切图谱分析、部分序列分析以及 Southern 印迹鉴定后, 将两个基因单个或相互串联后反向亚克隆至植物表达载体 pBI121。经农杆菌 LBA4404 转化番茄子叶, 在抗性培养基上得到 8 株 ACS 基因反义转化的生根小苗以 ACS 基因的酶切小片段作为探针, 经 Southern 印迹分析, 证明获得了两株阳性转化株。

**关键词** 番茄; 1-氨基环丙烷-1-羧酸合酶 (ACS) 基因; 1-氨基环丙烷-1-羧酸氧化酶 (ACO) 基因; 反义技术; 转基因植物

分类号 Q943

## ACS AND ACO GENE CLONING AND PLANT TRANSFORMATION

Wang Jinfa Shen Huangxuan

(School of Life Sciences, Zhongshan University, Guangzhou 510275)

**Abstract** According to the published sequences, PCR primers of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACS) and 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase (ACO) gene of tomato amplification were designed. Fragments of ACS and ACO gene were generated. The products of PCR fragments and T-vector ligation were transformed into *E. coli* (DH 5 $\alpha$ ). The recombinants were selected by blue-white colony screening and restriction analysis. After partial sequencing and Southern hybridization, the fragments and stringed products of two genes were subcloned into plant gene expression vector pBI121 in antisense orientation. The antisense vectors were transformed into *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 by freeze-thaw method. Fourteen-day-old cotyledon pieces were infected with *Agrobacterium*, and transformants were selected with 75  $\mu\text{g ml}^{-1}$  kanamycin. Southern blotting with 0.9kb fragments of ACS gene as probe provided that two positively transgenic plantlets were obtained.

**Key words** Tomato; 1-Aminocyclopropane-1-carboxylate synthase (ACS) gene; ACC oxidase (ACO) gene; Antisense technique; Transgenic plant

乙烯是一种植物气体激素,它对植物种子萌发、生长、发育、衰老和果实成熟等都有明显的影响,此外,乙烯还参与植物细胞的程序性死亡、促进花的凋谢和DNA片段化<sup>[1]</sup>。高等植物体内,乙烯的生物合成途径为:Met → SAM → ACC → C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>+HCN+CO<sub>2</sub><sup>[2]</sup>。催化SAM向ACC转化的酶叫ACC合酶(ACS),催化ACC向乙烯转化的酶称为ACC氧化酶(ACO)。在乙烯生物合成途径中,限速反应是SAM向ACC的转化<sup>[3]</sup>。因此,ACS和ACO是植物乙烯生物合成途径中的两个关键酶。另外,近几年来利用系列突变体对乙烯信号传递途径的研究也取得了较大进展<sup>[4,5]</sup>。

在控制乙烯生物合成的基因工程研究中,主要是通过反义技术,抑制植物体内ACS和ACO基因的表达。利用反义技术降低乙烯产生,单个基因已成功<sup>[6,7]</sup>。由于这两种酶是乙烯代谢途径中的两个关键酶,相互之间可能具有一定的制约作用,如果通过反义技术,将两个基因串联在一起进行植物转化,可能会在更大程度上控制乙烯的合成。将两个基因串联在一起的反义研究目前尚未见报道。本研究主要目的是分别将ACS和ACO两个基因的不同区段克隆出来,反向串联连至植物基因工程的表达载体,转化植物,研究对乙烯合成的影响,并探讨两个基因反义作用的分子模式。本文报道前期实验结果。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

提取DNA用的番茄种子F93-6购自广州市农业科学研究所,转化用的番茄品系“丽春”由广州市蔬菜科学研究所提供。PCR试剂盒购自上海生工公司,PCR引物由上海生工公司合成。

DNA测序用美国Biochemical公司的测序试剂盒;探针标记采用Promega公司的缺口平移试剂盒。PCR扩增采用上海医用恒温设备厂的三孔三温水浴槽;PCR产物克隆采用Permegea公司的pGEM-T Vector system I和本实验室自制的T-载体;[ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]-dATP购自北京亚辉生物医学工程公司。

### 1.2 方 法

**ACS和ACO基因的克隆及鉴定** 从番茄F93-6无菌苗中提取总DNA<sup>[8]</sup>,ACS和ACO基因的PCR扩增参照Innis<sup>[9]</sup>的方法略加修改,扩增ACS的条件为94℃ 1 min,72℃ 3 min,55℃ 2 min;扩增ACO的条件为:94℃ 1 min,72℃ 3 min,61℃ 2 min,共进行25个循环,反应体积为100  $\mu$ l,扩增产物于0.8%的琼脂糖凝胶电泳检查,经回收纯化后,连至pBluscript T-载体。对候选克隆经限制性内切酶切割、电泳鉴定后,用双脱氧法进行DNA序列分析,进一步确定克隆基因的正确性。

**ACS和ACO基因的反向亚克隆** 用限制性内切酶将ACS和ACO基因的PCR扩增片段从T-载体上切出后分别反向亚克隆至表达载体pBI121,同时将ACS和ACO基因的两个片段反向串联并亚克隆至表达载体pBI121。筛选鉴定后,感受态法转化农杆菌LBA4404<sup>[10]</sup>,碱法提取农杆菌质粒,Southern分析串联体的插入。

**番茄的转化及再生** 取经种子萌发13-15 d的番茄子叶,用培养过夜的农杆菌液进行感

染转化, 将感染后的子叶洗净吸干并放在含有卡那霉素 ( $75 \mu\text{g ml}^{-1}$ ) 的 MS 培养基上进行培养, 选择转化体及再生植株<sup>[11]</sup>。取再生植株叶片, 进行 Southern 分析鉴定。

## 2 结果和讨论

### 2.1 ACS 基因的 PCR 扩增、克隆和鉴定

根据 Rottmann 等<sup>[12]</sup>所发表的序列, 设计扩增 ACS 的引物, 5' 端链引物的碱基为: 5'ATGGGATTGGAGATTGCAAA 3'; 3' 端链引物的碱基组成为: 5'TAACGAACTAATGG-TGAGGG 3'。所扩增 ACS 基因的全长为 2521 个碱基, 起始于 ACS 基因 3053 位的起始密码子 ATG, 终止于 ACS 基因 5573 位的终止密码子 TAA, 由四个外显子和三个内含子所组成。PCR 产物与 T-载体连接克隆后, 用限制性内切酶 *SacI*、*HindIII* 进行酶切分析, 根据文献<sup>[9]</sup>, *SacI* 在 ACS 基因中有两个切点, *HindIII* 在 ACS 基因中有三个切点, 酶切结果表明: 克隆基因的酶切位点及酶切片段大小都同文献报道的相同 (图 1)。另外, 经部分序列分析 (准确识读 112 个碱基), 检测到的碱基组成与文献完全一致。

### 2.2 ACO 基因的 PCR 扩增、克隆和鉴定

根据报道序列<sup>[13]</sup>设计 PCR 扩增的引物。5' 端链引物的碱基组成为 5'TTGGATCCAACCTAG-TGTGGAATAC 3', 在引物的 5' 端加入限制性内切酶 *BamHI* 的酶切位点 GGATCC (划线部分); 3' 端链引物的碱基组成为 5'TCAAGCTTACCACACATGTAGTAGG 3', 引物的 5' 端同样加入限制性内切酶 *HindIII* 的酶切位点 AAGCTT (划线部分)。ACO 基因全长为 2870 个碱基, 起始于 ACO 基因 226 位的起始密码子 ATG, 终止于 ACO 基因的 2732 位的终止密码子 TAG, 整个片段包括 ACO 基因的所有编码区, 一段前导序列和一段下游序列, 由四个外显子和三个内含子组成。PCR 产物与 T-载体相连。重组体的酶切图谱与文献完全一致 (图 2)。部分序列分析 (准确识读 134 个碱基) 表明: 检测到的碱基组成与文献报道的完全一致。

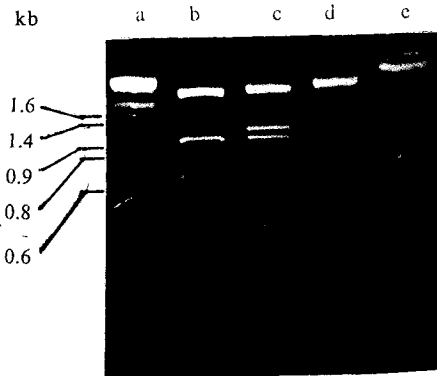


图 1 ACS 基因克隆的酶切分析

Fig. 1 Restriction analysis of cloned ACS DNA  
a:  $\lambda$ DNA + *HindIII* + *EcoRI*; b: Cloned ACS DNA + *SacI* + *HindIII*; c: Cloned ACS DNA + *HindIII*; d: Cloned ACS DNA + *SacI*; e: Cloned ACS DNA (none digestion)  
1.5% agarose.

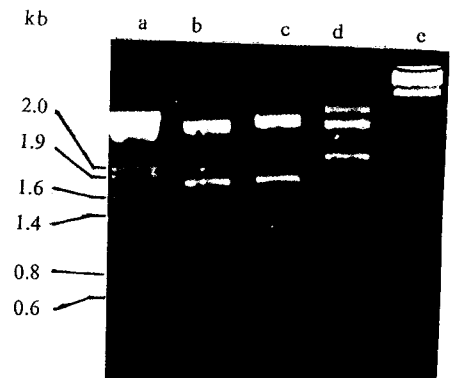


图 2 ACO 基因克隆的酶切分析

Fig. 2 Restriction analysis of cloned ACO DNA  
a:  $\lambda$ DNA + *HindIII* + *EcoRI*; b: Cloned ACO DNA + *XbaI* + *EcoRI*; c: Cloned ACO DNA + *XbaI*; d: Cloned ACO DNA + *EcoRI*; e: Cloned ACO DNA (none digestion).  
1.0% agarose.

### 2.3 ACS 和 ACO 基因反向插入植物表达载体

分别用限制性内切酶 *Bam*HI 和 *Sac*I、*Bam*HI 和 *Xba*I 从 T 载体上切下 ACS(S) 和 ACO(S) 片段，单独反向或反向串联亚克隆至植物表达载体 pBI121。

含有串联体的质粒直接转化农杆菌 LBA4404，提取转化菌的质粒。用限制性内切酶 *Sac*I 和 *Bam*HI 切割 ACS 获得 0.9kb 小片段，以它为探针，对反向亚克隆的 DNA 进行 Southern 印迹分析(图 3)。结果表明，所构建反义重组体是正确的。

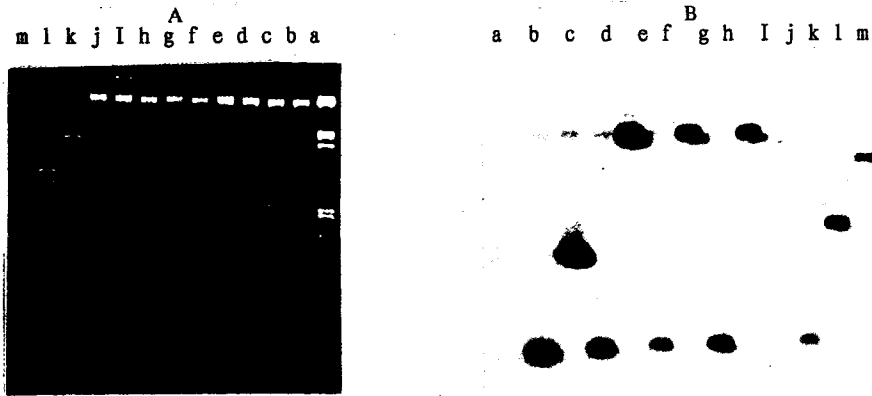


图 3 几种反向克隆的 Southern 印迹

Fig. 3 Southern blotting of reversed clones

A: 酶切电泳 Electrophoresis of digested DNA; B: 印迹杂交 Southern blotting,  $^{32}$ P labeled ACS fragments DNA (0.9kb) as probe.

a,  $\lambda$ DNA + *Hind*III + *Eco*RI; b, Recombinant plasmids pBI121::ACO(S)::ACS(S)  $\Delta$  GUS DNA (from *A. tumefaciens*) + *Sac*I + *Xba*I + *Bam*HI; c, Recombinant plasmids pBI121::ACO(S)::ACS(S)  $\Delta$  GUS DNA (from *A. tumefaciens*) + *Sac*I + *Xba*I; d, Recombinant plasmids pBI121::ACO(S)::ACS(S)  $\Delta$  GUS DNA (from *A. tumefaciens*) + *Sac*I + *Bam*HI; e, Recombinant plasmids pBI121::ACO(S)::ACS(S)  $\Delta$  GUS DNA (from *A. tumefaciens*) + *Sac*I; f, Recombinant plasmids pBI121::ACS(S)  $\Delta$  GUS DNA (from *A. tumefaciens*) + *Sac*I + *Bam*HI; g, Recombinant plasmids pBI121::ACS(S)  $\Delta$  GUS DNA (from *A. tumefaciens*) + *Bam*HI; h, Recombinant plasmids pBI121::ACS(S)  $\Delta$  GUS DNA (from *E. coli*) + *Sac*I + *Bam*HI; i, Recombinant plasmids pBI121::ACS(S)  $\Delta$  GUS DNA (from *E. coli*) + *Bam*HI; j, Plasmids pBI121 DNA + *Bam*HI; k, Recombinant plasmids pBluescript::ACS DNA + *Sac*I + *Bam*HI; l, Recombinant plasmids pBluescript::ACS DNA + *Kpn*I + *Bam*HI; m, Recombinant plasmids pBluescript::ACS DNA + *Bam*HI.

### 2.4 番茄的转化及转基因植株的鉴定

含有 ACS 片段的农杆菌转化番茄，获得 8 株卡那霉素 ( $75 \mu\text{g ml}^{-1}$ ) 抗性的再生植株。提取再生植株叶片的总 DNA，以 ACS 的 *Sac*I 和 *Bam*HI 酶切产生的 0.9kb 小片段作为探针，对抗性植株 DNA 进行 Southern 印迹分析，结果如图 4 所示。

番茄中本来就存在 ACS 基因，因此无论是亲本番茄还是受体番茄，无论是脱分化所产生的番茄还是转化所产生的番茄，在杂交中至少都应出现一条带，图 4 所显示的结果表明，所有的被

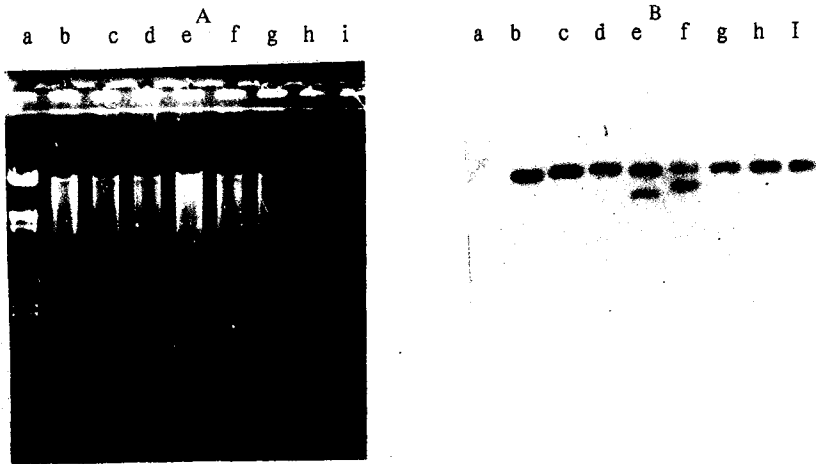


图 4 转基因番茄 DNA 的 Southern 印迹分析

Fig. 4 Southern blotting of transgenic plantlet DNA

A: 番茄总 DNA 经 *Xba*I 切割后的电泳分析; B: 印迹杂交, 探针为  $^{32}$ P 标记的 ACS 基因的 0.9kb 小片段。

A: Electrophoresis analysis of digested DNA with *Xba*I; B: Southern blotting,  $^{32}$ P labeled ACS fragments DNA (0.9kb) as probe.

a,  $\lambda$ DNA + *Eco*RI + *Hind*III; b, Tomato (F93-6) total DNA; c, Tomato (cv. 'Lichun') total DNA; d, Regenerated tomato (cv. 'Lichun') total DNA (none transformation); e, f, g, Transgenic tomato (cv. 'Lichun') DNA; h, Regenerated tomato (cv. 'Lichun') total DNA, which was co-cultivated with *A. tumefaciens* (no plasmid); i, Regenerated tomato (cv. 'Lichun') total DNA, which was co-cultivated with *A. tumefaciens* (containing vector DNA).

测植株都有一共同的带, 这同预期的一致。在被检测的三株候选转基因番茄中, 两株存在另一条杂交带, 表明被转化的 ACS(S)DNA 已在另一位点插入到番茄的基因组中, 另一株没有第二条带出现, 不能证明是真正的转基因株。

至于 ACS 和 ACO 基因的反向串联克隆的转化和筛选鉴定工作目前正在进行中。

#### 参考文献

- 1 Orzaez D, Granell A. DNA fragmentation is regulated by ethylene during carpel senescence in *Pisum sativum*. The Plant Journal, 1997, 11:137-144
- 2 Adams D O, Yang S F. Ethylene biosynthesis: identification of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid as an intermediate in the conversion of methionine to ethylene. Proc Natl Acad Sci, USA, 1979, 76:170-174
- 3 Cameron A C, Febton C A L, Yu Y B et al. Increased production of ethylene by plant tissues treated with 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid. Hort Science, 1979, 14:178-180
- 4 Ecker J R. The ethylene signal transduction pathway in plants. Science, 1995, 268:667-675
- 5 Bleeker A B, Schaller G E. The mechanism of ethylene perception. Plant Physiol, 1996, 111:653-660
- 6 Oeller P W, Lu M W, Taylor L P. Reversible inhibition of tomato fruit senescence by antisense RNA. Science,

- 1991, 254:437-439
- 7 Hamilton A J, Lycett G W, Grierson D. Antisense gene that inhibits synthase of the hormone ethylene in transgenic plants. *Nature*, 1990, 346:284-287
  - 8 Murray M G, Thompson W F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucl Acids Res*, 1980, 8:4321-4375
  - 9 Innis M A, Gelfand D H. Optimization of PCRs. In: Innis M A, Gelfand D H, Sainky J J eds. *PCR Protocols*. Academic press, INC, 1990, 3-12
  - 10 Höfgen R, Willmitzer L. Storage of competent cells for *Agrobacterium* transformation, *Nucl Acids Res*, 1988, 16:9877
  - 11 Moloney M M, Walker J M, Sharma K K. High efficiency transformation of *Brassica napus* using *Agrobacterium* vectors. *Plant Cell Reports*, 1989, 8:238-242
  - 12 Rottmann W H, Peter G F, Oeller P W et al. 1-Aminocyclopropane-1-carboxylate synthase in tomato is encoded by a multigene family whose transcription is induced during fruit and floral senescence. *J Mol Biol*, 1991, 222: 937-961
  - 13 Holdsworth M J, Schuch W, Grierson D. Nucleotide sequence of an ethylene-related gene from tomato. *Nucl Acids Res*, 1987, 15:10600