

甘蔗乙烯合成酶基因家族三个成员的克隆与序列分析

王爱勤¹, 杨丽涛¹, 王自章², 韦宇拓³, 何龙飞¹, 李杨瑞^{1,4*}

(1. 广西大学农学院, 南宁 530005; 2. 中国科学院植物研究所, 北京 100093;

3. 广西大学生命科学与技术学院, 南宁 530005; 4. 广西农业科学院, 南宁 530007)

摘要: ACC (1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid)合成酶是高等植物乙烯生物合成途径中的限速酶。根据已克隆的植物 ACS (1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase)基因同源序列, 设计简并引物, 以甘蔗叶片总 DNA 为模板, 通过 PCR 扩增, 得到 3 条特异性强的扩增片段: *Sc-ACS1* 为 1 041 bp、*Sc-ACS2* 为 1 345 bp 和 *Sc-ACS3* 为 1 707 bp。将序列在 GenBank 核酸数据库进行同源性搜索, 结果表明, 3 个片段均为 ACS 基因, 推导编码的蛋白质序列分别包含 326、242 和 310 个氨基酸。其中, *Sc-ACS1* 和 *Sc-ACS3* 同源性最高, 核苷酸序列和蛋白质氨基酸序列分别有 98% 和 96% 同源, 与禾本科植物玉米 *Zm ACS6*、水稻 *OS-ACS2*、毛竹等 ACS 基因家族也有很高的同源性, 核苷酸序列同源性为 88%–98%, 蛋白质氨基酸序列同源性为 73%–81%。甘蔗 *Sc-ACS2* 与水稻 *OS-ACS5* 在核苷酸和氨基酸序列上分别有 91% 和 79% 同源性, 但与甘蔗 *Sc-ACS1* 和 *Sc-ACS3* 基因成员之间, 氨基酸同源性分别只有 45% 和 49%。系统进化分析表明, *Sc-ACS1* 和 *Sc-ACS3* 基因与玉米 *Zm ACS6* 基因亲缘关系最近, 而 *Sc-ACS2* 基因与水稻 *OS-ACS5* 基因亲缘关系最近。Southern 杂交表明三基因在基因组中确实存在而且是多拷贝基因。三个片段已在 GenBank 数据库中注册, 注册号分别为 AY620985、AY620986 和 AY788919。

关键词: 甘蔗; ACC 合成酶; 基因家族; 克隆

中图分类号: Q781

文献标识码: A

文章编号: 1005-3395(2005)06-0485-08

Cloning and Sequence Analysis of Three Members of ACC Synthase Gene Family in Sugarcane

WANG Ai-qin¹, YANG Li-tao¹, WANG Zi-zhang², WEI Yu-tuo³, HE Long-fei¹, LI Yang-rui^{1,4*}

(1. Agricultural College, Guangxi University, Nanning 530005, China; 2. Institutes of Botany, the Chinese Academy of Sciences,

Beijing 100093, China; 3. Biotechnology Research Center, Guangxi University, Nanning 530005, China;

4. Guangxi Academy of Agriculture Sciences, Nanning 530007, China)

Abstract: ACC (1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid) synthase (ACS) is one of the key rate-limiting enzymes for ethylene biosynthesis in higher plants. In this paper, two degenerate oligonucleotide primers were designed, coding for conservative amino acid regions in ACC synthase protein family. PCR amplification was performed on sugarcane DNA template, and produced three fragments, 1 041 bp (*Sc-ACS1*), 1 345 bp (*Sc-ACS2*) and 1 707 bp (*Sc-ACS3*). By using the program of BLAST on NCBI GenBank database, three sequences were all ACC synthase genes, coded 326, 242 and 310 amino acids, respectively. The identity of *Sc-ACS1* and *Sc-ACS3* was 98% in DNA sequence and 96% at amino acid level, and that of ACS genes from other grass plant species *Zea mays* (*Zm ACS6*), *Oryza sativa* (*OS-ACS2*) and *Phyllostachys edulis* (*BA-ACS*) reached to 88%–98% in DNA sequence and 73%–81% in amino acid sequence. The identity of *Sc-ACS2*, compared to *OS-ACS5* from *Oryza*

收稿日期: 2005-04-26 接受日期: 2005-08-24

基金项目: 国家自然科学基金项目 (39860039) 资助

* 通讯作者 Corresponding author

stativa, was 91% in DNA sequence and 79% at amino acid level, which was higher than that for *Sc-A CS1* (45%) and *Sc-A CS3* (49%) from sugarcane. Phylogenetic analysis showed that the genes of *Sc-A CS1* and *Sc-A CS3* in sugarcane were closely related to *Zm ACS6* in maize, while *Sc-A CS2* was closely related to *OS-ACS5* in rice. Southern blotting analysis showed that these genes were presented in the genomic DNA with multiple copies. The three sequences have been registered in GenBank with the accession numbers AY620985, AY620986 and AY788919.

Key words: *Saccharum officinarum* L.; 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase; Gene family; DNA cloning

乙烯对植物生长具有广泛的调节作用, 不仅与果实的成熟、衰老和脱落有关, 还调控植物的发育过程, 如种子萌发、生根、茎叶的生长、花芽分化、性别分化 and 对环境胁迫的应答等^[1]。生理生化研究表明, 乙烯利对甘蔗的增产、增糖具有重要的调节作用^[2-4]。甘蔗分蘖初期用低浓度的乙烯利处理, 对甘蔗生长有明显的促进作用, 叶面积、株高、有效茎数都比对照增加^[2-3]; 在甘蔗生长后期, 高浓度的乙烯利可抑制甘蔗开花、提高甘蔗糖分和纯度^[4, 5]。乙烯利调节甘蔗增产、增糖的机理, 目前有两种不同的观点, 一是外源乙烯利诱导甘蔗体内乙烯的形成^[6, 7]。另一种观点认为外源乙烯利不能影响 ACC 和 ACC 合成的水平, 因此与体内乙烯的形成无关^[8]。越来越多研究证据支持第一种观点。姚瑞亮等发现乙烯利处理后乙烯释放有一共同特点, 即在乙烯释放下降过程中有一个小的回升过程, 出现一个次高峰, 认为可能是乙烯利诱发甘蔗内源乙烯释放的结果, 而乙烯利对甘蔗生长和催熟的调控效应, 是通过影响茎尖的激素平衡, 降低茎尖中生长素、细胞分裂素和赤霉素含量, 提高乙烯和脱落酸含量, 从而抑制生长而促进成熟^[9]。然而, 缺乏分子水平的证据。

高等植物乙烯的生物合成途径已经确定, ACC 合成酶和 ACC 氧化酶是该合成途径的两个关键酶, 内源乙烯的生物合成和释放量与这两个酶的活性、酶基因的表达有关。为了更好地研究乙烯调控甘蔗增产和增糖的分子机理, 我们在已经克隆甘蔗乙烯氧化酶基因 cDNA 全长(AF521566)的基础上, 克隆了甘蔗 ACC 合成酶基因及其基因家族成员, 并利用基因数据库资料对该基因序列进行了比较分析, 为利用基因工程进行品种改良提供参考资料。

1 材料和方法

1.1 供试材料、菌株和试剂

甘蔗(*Saccharum officinarum* L. Hybrid ROC 20)

由广西大学农学院教学科研基地提供。以一芽一节种植于温室大棚中(30±2℃)。每天定时喷雾淋水。选取 4-5 叶期甘蔗健壮幼苗为材料, 剥取幼嫩心叶, 迅速加液氮研匀, 置 -80℃冰箱保存。受体大肠杆菌菌株 JM109 由广西大学生物科学与技术学院微生物发酵中心提供。Taq DNA 聚合酶、限制性内切酶、IPTG、X-Gal、dNTP、AMV-RNase、PMD18-T Vector、DL2000、胶回收试剂盒、质粒小量抽提试剂盒等分子生物学试剂购自 TaKaRa 公司。

1.2 甘蔗 DNA 的提取和纯化

按王自章等^[10]方法进行。

1.3 引物设计

根据 GenBank 核酸数据库中检索水稻、玉米、毛竹、小麦、香蕉等单子叶植物的 ACS 基因家族成员 DNA 或 cDNA 序列, 设计简并引物, P1f: 5-TAGAGCTCATCCAGATGGGCCTCGCCGA-3; P2r: 5-TATCTAGAACGCGGAACCA[GC]CCGGGCTC-3, 由上海生工合成。

1.4 甘蔗 ACS 基因 DNA 片段的克隆和测序

以甘蔗总 DNA 为模板进行 PCR 扩增。反应体积为 50 μl, 内含 2 × GC Buffer I 反应缓冲液 25 μl, 2.5 mmol/L dNTP Mix 4 μl, P1f 和 P2r 各 10 μmol/L, LA Taq 酶 2.5 U, 模板 DNA 0.1 μg。反应条件为: 94℃预变性 5 min, 94℃变性 30 s, 60℃退火 45 s, 72℃延伸 2 min, 35 次循环, 然后 72℃延伸 10 min。PCR 扩增产物经 1%的琼脂糖凝胶电泳后, 切下含目的片段的胶块, 用上海华舜生工胶回收纯化试剂盒回收。将目的 DNA 片段与载体 pGEM-T Easy Vector 连接, 转化大肠杆菌 JM109, 菌落在含有 IPTG 和 X-gal 的平板上进行蓝白斑筛选, 挑选白色转化菌落进行质粒酶切鉴定。克隆的 PCR 产物由上海生工测序。序列用 NCBI-Blast 等软件和 Vector NTI 7.0 软件对核酸数据库及推导的蛋白质

序列进行同源性分析。

1.5 Southern 杂交

用 NCBI-Blast 软件和 Vector NTI 7.0 软件分析目的基因序列的酶切位点,选择基因序列中不含酶切位点的内切酶 *Bam*H I、*Eco*R I、*Hind*III 进行基因组 DNA 消化过夜。DNA 的印迹转移按《植物分子生物学实验手册》^[11]的方法。DNA 探针用 ³²P 同位素标记,根据 Promega 公司提供的 Random labeling systems 反应盒进行 DNA 标记,标记反应在 50 μ l 的体积进行。DNA 杂交液用北京博大泰克高效液相杂交液,杂交温度为 65 $^{\circ}$ C 过夜。用 2 \times SSC、0.1% SDS 的洗膜液在 65 $^{\circ}$ C 下洗膜 2 次,每次 20 min,然后再用 0.1 \times SSC、0.1% SDS 的洗膜液在 65 $^{\circ}$ C 下洗膜 2 次,每次 20 min。

2 结果和分析

2.1 甘蔗 ACS 基因 DNA 片段的扩增与回收

扩增结果可见三条带,以 2.0 kb 的带特异性最强,1.4 kb 次之,1.0 kb 最弱(图 1A)。1.0 kb 的带符合我们预计的片段,而 2.0 kb 和 1.4 kb 的带与我们预计的片段大小差别太大,但特异性很强,鉴于 ACS 基因是多基因家族,我们认为可能是不同的基因家族成员,因此将这三个片段(从大到小分别记为 *Sc-A*CS3, *Sc-A*CS2, *Sc-A*CS1)一并回收。将回收的 PCR 产物(图 1B)插入载体 pGEM-T Easy

的多克隆位点后,获得的重组质粒分别命名为 pTSc-A CS1、pTSc-A CS2 和 pTSc-A CS3。重组质粒经 *Eco*R I 酶切后电泳显示的片段大小与 PCR 扩增结果相同(图 1C)。

2.2 PCR 产物测序结果

*Sc-A*CS1 全长 1041 bp,在 7-162 bp、217-1040 bp 处有编码框,编码 326 个氨基酸序列,占推测全长氨基酸残基总数的 67%。163-216 bp 之间的序列为内含子,除了没有保守区 1 和 2 外,该片段的 DNA 序列包含了已有报道的 7 个保守区中的 5 个(图 2)。

*Sc-A*CS2 全长 1345 bp,在 1-132 bp、685-1287 bp 处有编码框,编码 245 个氨基酸序列,占推测全长氨基酸残基总数的 50%。173-556 bp 之间的序列为内含子,除了没有保守区 3 和 7 外,该片段的 DNA 序列也包含了已有报道的 7 个保守区中的 5 个(图 3)。

*Sc-A*CS3 全长 1707 bp,在 596-741 bp、925-1707 bp 处有编码框,编码 310 个氨基酸序列,占推测全长氨基酸残基总数的 64.6%。1-595 bp、742-924 bp 之间的序列为内含子;除了没有保守区 1 和 2 外,该片段的 DNA 序列也包含了已有报道的 7 个保守区中的 5 个(图 4)。

用 NCBI-Blast 和 Vector NTI 7.0 软件对经过反复双向测序所得到的结果进行核酸数据库及推导的蛋白质序列同源性比较分析,结果发现,所克隆的三个 DNA 片段, *Sc-A*CS3 和 *Sc-A*CS1 相应区段

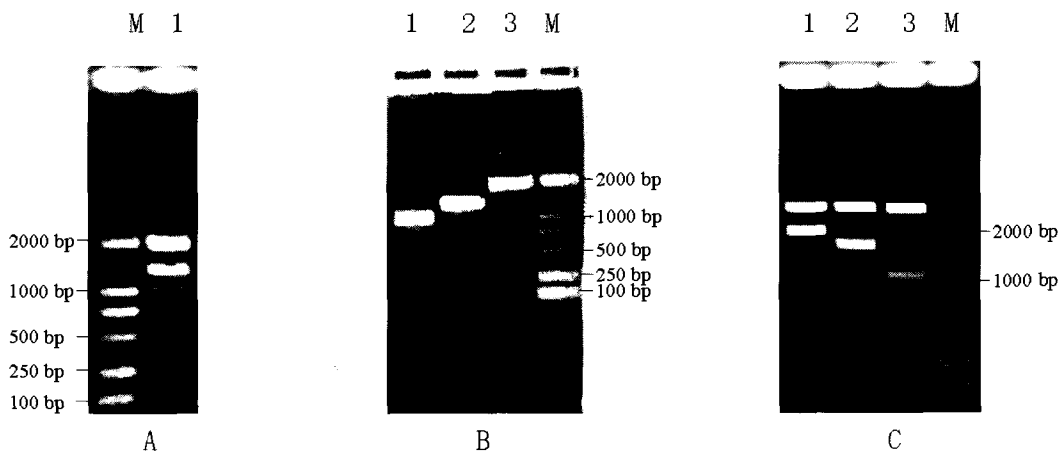


图 1 甘蔗 ACS 基因的 PCR 扩增及重组质粒的 *Eco*R I 酶切结果

Fig. 1 PCR amplification and cloning of ACS genes in sugarcane and recombinant plasmid digested by *Eco*R I
 A: ACS 基因的 PCR 扩增结果 PCR amplification of the ACS gene (M. DL2000 Marker, 1. ACS 基因 ACS gene);
 B: 胶回收的 PCR 产物 Purified PCR products (1. *Sc-A*CS1; 2. *Sc-A*CS2; 3. *Sc-A*CS3; M. DL2000 Marker);
 C: 重组质粒 pTSc-A CS1、pTSc-A CS2 和 pTSc-A CS3 的 *Eco*R I 酶切结果 Recombinant plasmid digested by *Eco*R I
 (1. pTSc-A CS3; 2. pTSc-A CS2; 3. pTSc-A CS1; M. DL2000 Marker)

```

1  atccagatgggctcgcgaccacggagacgttttctcataccaccgacatactaccagggtatgtttgctgtgtgta
   M G L A D H G I D A F L I P T P Y Y P G Y V C V C V
82  cgttgctttttaaagtgcgtgcaagtggcggcggcggtgattggcggcgcgatgcacgttactgtactagctat
   R C F F N S R C K W R P A A D W R R A M H V T A T Y
159 taagtactcctagctaggccacatgatggcatgacgacggatgggacggctgctgactgggcttgcgcgcttgc
   * L G L L A L V
238 gtctacaggttcgaccgtgacctcaagtggcgcaccggcggcggagatcgtccccgtgacctgcacgagcggcaacggc
   V Y R F D R D L K W R T G A E I V P V H C T S G N G
316 ttccgggtgacgcgcccgctggagcagcgtaccgccggccagaagcagcggctgctgctgcaaggcggctgctc
   F R V T R A A L D D A Y R R A Q K Q R L R V K G V L
394 ataccaacccttccaaccggctgggaccacgtccccggcggcggacctggagatgctggtgacttctgtggcggc
   I T N P S N P L G I T S P R A D L E M L V D F V A A
472 aaggcctaccctggtgagcagagatatactccggcaccgcttccggagcggcttctgagcgtcctcgag
   K G I H L V S D E I Y S G T A F A E P G F V S V L E
550 gtggtggcgcgctgtgacccgccacggcggcggctgctgctggagcgcgtcacgtggtgtacacgctg
   V V A A R V N A A T D A D G L L S E R V H V V Y S L
628 tccaaggacctggcctccctggtttccgctggcggcggccttactcctccaaccggcggctgctcgcgcgccacc
   S K D L G L P G F R V G A I Y S S N A G V V S A A T
706 aagatgctgagcttccgctggtgctcctccagacgacacccctcctggcgtgctgctggcgacaggacttccac
   K M S S F G L V S S Q T Q H L L A S L L G D R D F T
784 cggcgtagctcgcgagacacgcggcggatcaaggggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggc
   R R Y V A E N T R R I K G R R D Q L A E G L A A I R
862 ggcatgagtgctggagagcaacggcggcgtcttctgctgggtcaacatcgggggcgtgatggcggcggcggcggc
   G I E C L E S N A G L F C W V N M R G L M R T P S
938 ttcgagcggcagatggagctgtggaagaagtggtgttcgaggctgggctcaacatcctccccggctcctcctgc
   F E G E M E L W K K V V F E V G L N I S P G S S C
1013 cactgccggcggcggcggctggttccgctt
   H C R E P G W F R V

```

图 2 *Sc-ACS1* 的核苷酸序列及其推导氨基酸序列

Fig. 2 The nucleotide sequence of *Sc-ACS1* and its deduced amino acid sequence
方框为保守区氨基酸序列 Conserved sequences are denoted by boxes.

```

1  atccagatgggctcgcgaccacggagacgttttctcataccaccgacatactaccagggtatgtttgctgtgtgta
   I Q M G L A E N Q V S F D L L E G Y L R D H P E A A D W
83  gggcggtgcccggctccggcgttccagcttccaggacaacgcgtgttccaggactaccacggcctcaaggcctca
   G G A A G S G V A S F R D N A L F Q D Y
184 ggaaggtgagcgaacgcggcaaaaaagtgctctcccctgctgctctctgactgctgctgctgctgctgctgctgctg
244 aaatgcaacgtactgacctgaccgctgctcatttgcctgacggcggatggcggcggcggcggcggcggcggcggcggc
324 aggtttgaccccaccgcatgctgctaccgccggcgggtaacagagctgctcacgttccctgccaaccccggag
404 acgctgctgctgctcctccttactaccctgggtaagctaacacatcaagcaagctgcatgcatgcaaccgacagtg
484 tatgctactgttacatacactgccaagtgctctctgctgacatggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggc
564 cagagacctgaggtgaggaccgggtggaacatcgtgcccgtgcaatgacgacagcgaacgggttccaggctcaggtcg
644 ccgctcaccaggcggctacgaggaggccgaggcggcggggtatgctgctcgcggcggcggcggcggcggcggcggcggc
   M R V R A V L L I T N P S N
724 ccgctcggcaccaccgtggaagcggctgctcctgaggacgtgctgactcgtggttcgcccacaacatccacatcctc
   P L G I T V K R S V L E D V L D F V V R H N I H L I S
804 cgacgagatctactccggctcggctctcgcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggc
   D E I Y S G S V F A A P D L V S V A E L V E S R A R R
884 gggcgacgactccggcgtcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggc
   G D D S G V A E R V H I V Y S L S K D P G L P G F R
964 gtcggcgtggtgactcgtacaacgatccgctgctcaccacggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggc
   V G V V Y S Y N D A V V T T A R R M S S F T L V S S Q
1044 gacgcagaagacgctcgtcgcctgctcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggc
   T Q K T L V A M L S D A D F A D A Y I R T N R E R L
1123 cggcgcgccgacgatcacatcgtcgcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggc
   R A R H D H I V A G L A R A G V P C L R G N V G L F R
1202 gtgtggatggacatgaggcggctgctcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggc
   V D G H E A A A R R G D R R R R A Q A V G P D A A G
1281 aggttaagctcaacatcgcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggc
   G

```

图 3 *Sc-ACS2* 的核苷酸序列及其推导氨基酸序列

Fig. 3 The nucleotide sequence of *Sc-ACS2* and its deduced amino acid sequence
方框为保守区氨基酸序列 Conserved sequences are denoted by boxes.

无论是核苷酸序列及氨基酸序列比较,同源性都最高,核苷酸序列 98%同源,氨基酸序列 96%同源。两者推导的氨基酸序列与数据库中搜索到的玉米、毛

竹、水稻、芦笋、香蕉、苹果、马铃薯、番茄等植物 *ACS* 基因有 57%–81%的同源性,而且与禾本科植物玉米 *ZM ACS6*、毛竹 *ACS*、水稻 *OS-ACS2*、芦笋 *ACS*

```

1 atggcctcgcgagaaaccgactatcctcgcactgctggaggcgtgctggaggccaaccggagcgcctcggcctccgc
83 gggaggcgcctcgcctcctccgagcctcgcctcctccaggactaccacggcagcggggctcaagaatgtagtgct
164 gctgtctgctagtttacatcattcattgattgctccaggcacaggcagccattctgtgctcgtcggcgtcgaagc
244 ggcggccgggagcagcaaatcaacgagactgctcctttagttcgtcctaaattcctaaattttacattttctt
324 atcacattgaatttagatgtatgcaatggagcaactaaataggtaaaagagataactaattatacagtttgctgtaa
404 cttacgagacgaatcctttgagcctaattaatattgattggacactgattatgattggacactgtaccacaataaa
484 accaaatacaaacgaaagtgtactagtagaaaaaaaactcaaaaaaacctacgactcaaacgaggccgactgactga
564 atgctgatttccgaggcattggcaggttcatgtcagagcaactgggtacagggtagcttgcacccagcaactc
M S E Q R G Y R V T F D P S N I
644 gtgctaccgcccggcaccctcggccaacgaggcctcatgttctgctcggcaccagggagacgcttttctcatccc
V L T A G A T S A N E A L M F C L A D H G D A F L I P
724 caccgatactaccagggtatgtttgctgtgtgtatgctcgtttttaaagctgctgcaagtgccgagcggcgtg
T P Y Y P G Y V C V G V C R F F N S R C K W R P A A D
804 attgccgcgcgagtgacgcttactgctactaagtagctcctagctaggccacatgatggcatgacgacggatg
W R R A M H V T A T Y *
883 gacggctgctgaactggcgttgcctcgccttgcctcaggttgcacgctgacctcaagtgccgaccggcggcagat
L G L L A L V V C R F D R D L K W R T G A E I
964 cgtcccgctgcactgcagagcggcaacggcttccgggtgacgcgcggcgttgagcagcgtaccgcccggcagc
Q R L R V K G V L I T N P S N P L G T T S P R A D L
1044 agcagcggcgtcgcgctcaaggcgtgctcaccacccctccaaccgctggggcaccagctccccgcgcccagct
R L L R V K G V L I T N P S N P L G T T S P R A D L
1123 ggagatgctgtagtggactctggtggcccaaggcctccactggtgagcagcagatatactcggcaccggccttgcg
E M L V D F V A A K G I H L V S D E I Y S G T A F A
1202 gagccggcttctgtagcgtcctcagggtggggcgcgctgtaacgcccagggcgtgctgtagcagcgtgacac
E P G F V S V L E V V A A R V N A D G L L S E R V H
1281 gtggtatcacgcttccaaggacgtggcctcctggtttccgctggggcaccatctactcctcaacgcccggcgtc
V V Y S L S K D L G L P G F R V G A I Y S S N A G V
1360 gctcgcggcccaacagatgtgagcttccgctggctgctcctccagagcagcaccctctggcgtcgtcgtgggc
V S A A T K M S S F G L V S S I Q T Q H L L A S L L G
1439 gataggacttcccccgggtacatagccgagaacacgcccggatcaaggcgcgcccggaccagctggcggaggc
D R D F A R R Y I A E N T R R I K A R R D Q L A E G
1518 ctggcggcagatccggcctcagtgcttggggagcaacgcccggcctcttctgctgggtcaacatgcccggcgtgat
L A A I R G I E C L G S N A G L F C W V N M R G L M
1597 cggaccctcgttgcaggcagatggagctgtggaagaagggtgctcagggcggcctcaacatctccccggc
R T P S F E G E M E L W K K V V F E V G L N I S P G
1676 tctcctgcccactgcccggcggcggcggctggttccgcta
S S C H C R E P G W F R V
    
```

图 4 *Sc-ACS3* 的核苷酸序列及其推导氨基酸序列

Fig. 4 The nucleotide sequence of *Sc-ACS3* and its deduced amino acid sequence
方框为保守区氨基酸序列 Conserved sequences are denoted by boxes.

等同源性较高, 达 73%–81% (表 1)。 *Sc-ACS2* 与水稻 *OS-ACS5* 同源率很高, 核苷酸序列和氨基酸序列分别为 91% 和 79% 同源; 但 *Sc-ACS2* 氨基酸序列与数据库中搜索到的玉米、毛竹、水稻、芦笋、香蕉、苹果、马铃薯、番茄等植物 *ACS* 家族成员之间仅有

22%–54% 同源率, 与甘蔗 *Sc-ACS3*、*Sc-ACS1* 同源性较低, 分别为 49% 和 45% (表 1)。

2.3 氨基酸序列系统进化分析

应用 Vector NTI 7.0 软件对 *Sc-ACS1*、*Sc-ACS2*

表 1 *Sc-ACS* 基因家族与一些植物 *ACS* 氨基酸序列的同源性 (%)

Table 1 Homology percentage of *Sc-ACS* gene family and some plant amino acid sequences recorded in GenBank

植物和基因名称 Plant and genes	GenBank 登陆号 GenBank accession No.	同源率 Homology (%)			
		<i>Sc-ACS1</i>	<i>Sc-ACS3</i>	<i>Sc-ACS2</i>	
玉米 <i>Zea mays</i>	<i>ZM ACS6</i>	AAR25560	80	81	27
毛竹 <i>Phyllostachys edulis</i>	<i>BA-ACS</i>	BAC56949	75	76	22
水稻 <i>Oryza sativa</i>	<i>OS-ACS2</i>	Q07215	73	75	26
水稻 <i>Oryza sativa</i>	<i>OS-ACS5</i>	CAA65776	28	30	79
芦笋 <i>Asparagus officinalis</i>	<i>PAS-ACS</i>	BAC98504	74	75	53
香蕉 <i>Musa acuminata</i>	<i>bacs2</i>	X96947	59	61	26
苹果 <i>Malus sylvestris</i>	<i>Ms-ACS1</i>	1808332A	57	58	48
马铃薯 <i>Solanum tuberosum</i>	<i>ACS1b</i>	S56176	58	59	54
番茄 <i>Lycopersicon esculentum</i>	<i>LA-ACS3</i>	Q42881	58	59	32
甘蔗 <i>Saccharum officinarum</i>	<i>Sc-ACS2</i>	AY620986	45	49	100
甘蔗 <i>Saccharum officinarum</i>	<i>Sc-ACS3</i>	AY788919	96	100	49

和 *Sc-ACS3* 的氨基酸序列及从 GenBank 中获取的其它植物的 ACS 基因序列进行系统进化分析(图 5), 发现 *Sc-ACS1* 和 *Sc-ACS3* 最先与玉米 *ZmACS6* 聚类, 然后再与毛竹、芦笋、水稻 *OS-ACS1* 和 *OS-ACS2* 聚类合并。而 *Sc-ACS2* 则与水稻 *OS-ACS5* 最先聚类合并, 再与双子叶植物如梨、苹果、马铃薯、绿豆、拟南芥等聚类, 然后与玉米 *ZmACS2* 和 *ZmACS7* 聚类。这一结果与 GenBank 核酸数据库中进行的同源性搜索结果相吻合, 说明 *Sc-ACS1* 和 *Sc-ACS3* 系统进化分析符合按照形态特征进行判定

的单子叶和双子叶植物的系统进化关系, *Sc-ACS2* 进化关系较远, 该酶可能是由基因家族中为适应不同环境条件而演化的较远的基因编码的^[10]。

2.4 甘蔗 ACS 基因片段的 Southern 杂交分析

用甘蔗 ACS 基因 *Sc-ACS1*、*Sc-ACS2*、*Sc-ACS3* 分别作为探针进行 Southern 杂交, 结果见图 6-8。由图 6 可知, 以 *Sc-ACS1* 为探针, 用 *Bam*H I (B) 酶切得到 4 条带 (21 kb、10 kb、9.0 kb、2.4 kb 左右), 用 *Eco*R I (E) 酶切得到 3 条带 (6.5 kb、5.0 kb、

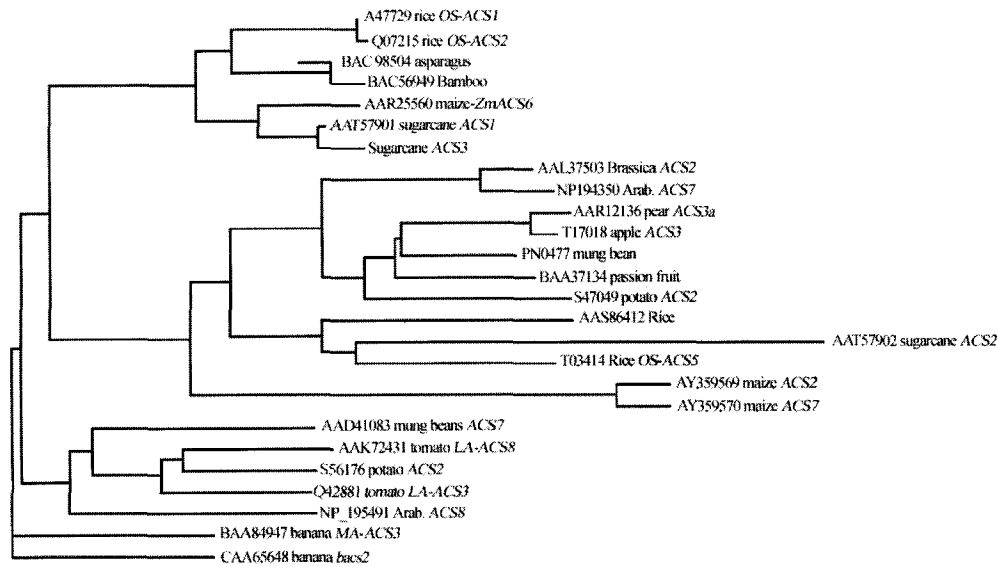


图 5 甘蔗与其它植物 ACS 基因的氨基酸序列聚类分析图

Fig. 5 Dendrogram of ACS gene sequences from sugarcane and other plants by Vector NTI7.0 program

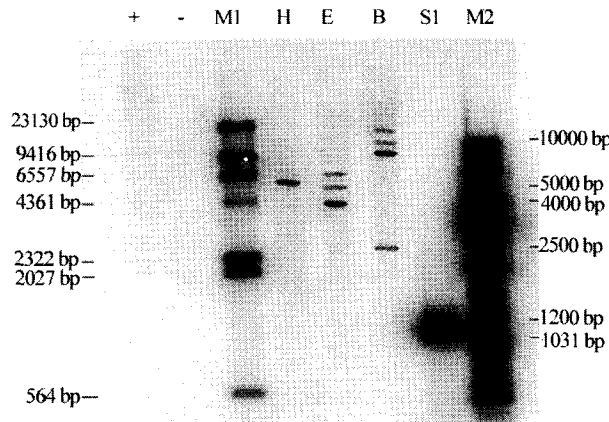


图 6 以 *Sc-ACS1* 作为探针进行 Southern 杂交

Fig. 6 Southern blot analysis of the gene *Sc-ACS1* by using the DNA isolated from young leaves of sugarcane

B、E、H 分别为基因组 DNA 用内切酶 *Bam*H I、*Eco*R I、*Hind* III 消化; +: 基因组 DNA 不经酶切; -: 以水作阴性空白对照; M1: λDNA/ *Hind* III Marker; S1: *Sc-ACS1* 探针阳性对照; M2: SM0333 Marker。下同。+: The genomic DNA without digestion as the positive control; -: Water without digestion as the negative control; M1: λDNA/ *Hind* III Marker; S1: The positive control of *Sc-ACS1* probe; M2: SMO333 Marker. B, E and H: The results of Southern blotting analysis, which 60 μg DNA was digested with *Bam*H I, *Eco*R I and *Hind* III, respectively. The labels in the figure are the same for the following figures.

4.0 kb 左右),用 *Hind* III (H) 酶切得到 1 条 5.5 kb 左右的带。由图 7 可知,以 *Sc-ACS2* 为探针,用 *Bam*H I (B) 酶切产物得到 3 条 21 kb、9.8 kb、5.1 kb 左右的带,用 *Eco*R I (E) 酶切得到 1 条 20 kb 左右的带,用 *Hind* III (H) 酶切得到 3 条 10.5 kb、8.0 kb、5.5 kb 左右的带。由图 8 可知,以 *Sc-ACS3* 为探针,用 *Bam*H I (B) 酶切得到 4 条带(21 kb、9.4 kb、6.5 kb、2.8 kb 左右),用 *Eco*R I (E) 酶切得到 4 条带(7.8 kb、5.5 kb、4.2 kb、2.8 kb 左右的),用 *Hind* III (H) 酶切得到 2 条带(9.0 kb、5.5 kb 左右的)。从图 6-8 可以看出,无论是以 *Sc-ACS1*、*Sc-ACS2* 或 *Sc-ACS3* 作为探针进行 Southern 杂交,结果都相

似,即酶切产物得到多条带,探针作为阳性对照均有一条特异杂交带,与探针大小相同,而不经酶切的基因组 DNA 直接杂交均未见杂交带。对甘蔗 *ACS* 基因家族成员序列进行酶切位点分析表明,该基因家族成员内部均不含 *Bam*H I、*Eco*R I、*Hind* III 酶切位点,表明甘蔗 *ACS* 基因家族成员在基因组中确实存在而且是多拷贝基因。

3 讨论

植物 *ACS* 基因是一个大的基因家族,它与 *ACO* 基因的不同之处是所报道的植物 *ACO* 基因彼此之间的核苷酸序列和氨基酸序列的同源性较高(氨基酸序列在 80% 以上),而且同源的区域集中在多肽的中部;而所报道的不同植物的 *ACS* 基因、甚至同一植物不同的基因家族成员彼此之间的核苷酸序列和氨基酸序列的同源性相差很大,已知的植物都有一个以上的 *ACS* 基因,且它们的编码区内 DNA 序列都有约 60% 的同源性,氨基酸序列一致变幅为 48%–97%,蛋白质同源性为 50%–95%,mRNA 的分子量大小为 2.8–2.2 kb 左右^[12]。根据已报道的植物 ACC 合成酶基因序列及所推导的氨基酸序列来设计 PCR 引物扩增目的基因片段,进而扩增基因全长,在许多植物的 *ACS* 和 *ACO* 基因的克隆中都获得了成功^[13-17]。但同种植物 *ACS* 基因家族不同的成员之间同源性差异较大,如水稻基因家族中 *OS-ACS5* 与番茄 *LE-ACS3* 在氨基酸上有 69% 同源率,但与水稻其它的 *ACS* 基因成员之间的同源率只有 44%–50%^[18];玉米 *ZmACS6* 与 *ZmACS2*、*ZmACS7* 的氨基酸序列的同源率分别为 54% 和 53%,但它与拟南芥 *ACS4* 基因有 68% 同源,而 *ZmACS2* 和 *ZmACS7* 的氨基酸序列的同源率高达 95%^[19]。这给我们的克隆工作增加了许多困难。对甘蔗 *ACS* 基因,我们不知道它的任何序列,已知的是其它植物同一基因的序列。甘蔗是遗传背景十分复杂的异源多倍体或非整倍体的植物^[20],克隆的难度相对别的植物更大。鉴于此,我们采用同源序列克隆方法,利用 PCR 方法从基因组 DNA 中首先克隆到 *ACS* 基因片段,再从 cDNA 文库克隆全长的克隆策略。

甘蔗 *ACS* 基因家族三个不同成员的获得,为我们继续跟踪这些基因在甘蔗生长发育过程中,特别是在生长后期的糖分积累和甘蔗开花过程中的表达,进一步明确 *ACS* 和 *ACO* 基因与甘蔗生长发育和增产增糖的关系将具有重要的学术价值和实践意义。

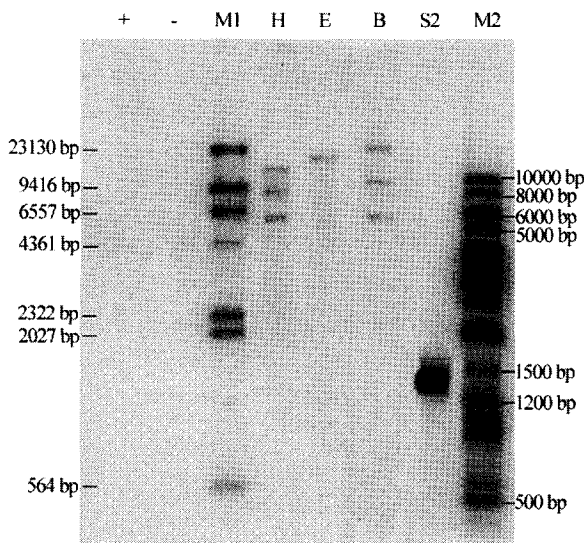


图 7 以 *Sc-ACS2* 作为探针进行 Southern 杂交

Fig. 7 Southern blotting analysis of the gene *Sc-ACS2* by using the DNA isolated from young leaves of sugarcane

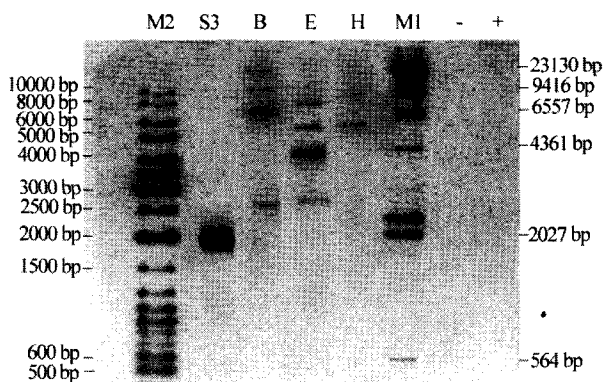


图 8 以 *Sc-ACS3* 作为探针进行 Southern 杂交

Fig. 8 Southern blotting analysis of the gene *Sc-ACS3* by using the DNA isolated from young leaves of sugarcane

参考文献

- [1] Abeles F B. Ethylene in Plant Biology [M]. New York and London: Academic Press, 1973. 1-302.
- [2] Singh I. Stubble bud sprouting in winter initiated sugarcane ratoon [J]. Indian J Plant Physiol, 1998, 3(4):253-255.
- [3] Solomon S, Shahi H N, Dutta M S K, et al. Effect of ethephon on sugarcane grown under sub-tropical climate [J]. Proc Int Soc Sugar Cane Techn, 2001, 24:174-176.
- [4] Li Y R, Solomon S. Ethephon: a versatile growth regulator for sugarcane industry [J]. Sugar Techn, 2003, 5(4):213-223.
- [5] Moore P H, Osgood R V, Ou S Y (欧仕益译). Spraying ethephon inhibits sugarcane flowering and improve yield [J]. Foreign Agri-Sugarcane(国外农学 - 甘蔗), 1990, 35(2):31-33.(in Chinese)
- [6] Yang S F, Hoffman N E. Ethylene biosynthesis and its regulation in higher plants [J]. Ann Rev Plant Physiol, 1984, 35:155-189.
- [7] Woltering E J, Somhorst D, Van der Veer P. The role of ethylene in interorgan signaling during flower senescence [J]. Plant Physiol, 1995, 109:1219-1225.
- [8] Foster K R, Reid D M, Pharis R P. Ethylene biosynthesis and ethephon metabolism and transport in barley [J]. Crop Sci, 1992, 32:1345-1352.
- [9] Yao R L(姚瑞亮). The physiological bases of hormones and enzymes for ethephon regulation of growth and sugar accumulation in sugarcane [D]. Fujian: Fujian Agricultural University, 2001.(in Chinese)
- [10] Wang Z Z(王自章), Li Y R(李杨瑞), Zhang S Z(张树珍), et al. Cloning and sequencing of ACC oxidase gene from sugarcane [J]. Acta Gen Sin(遗传学报), 2003, 30(1):62-69.(in Chinese)
- [11] Clark M S. Plant Molecular Biology - A Laboratory Manual [M]. Beijing: China Higher Education Press, Heidelberg: Springer-Verlag Berlin, 1996. 13-31(in Chinese).
- [12] Yu S W(余叔文), Tang Z C(汤章城). Plant Physiology and Molecular Biology [M]. Beijing: China Science Press, 1998. 493-511.(in Chinese)
- [13] Jin Z Q(金志强), Peng S Q(彭世清), Shao H S(邵寒霜), et al. Amplification and sequencing of a cDNA encoding ACC synthase in banana [J]. Chin J Trop Crops(热带作物学报), 1998, 19(1): 48-51.(in Chinese)
- [14] Trebitsh T, Staub J E, O'Neil S D. Identification of a 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase gene linked to the female locus that enhances female sex expression in cucumber [J]. Plant Physiol, 1997, 113:987-995.
- [15] Lasserre E, Bouquin T, Hernandez J A, et al. Isolation of a ripening and wound-induced cDNA from *Cucumis melo* L. encoding a protein with homology to the ethylene-forming enzyme [J]. Eur J Biochem, 1993, 212:27-34.
- [16] MacDiarmi C W, Gardner R C. A cDNA sequence from kiwifruit homologous to 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid oxidase [J]. Plant Physiol, 1993, 101:691-692.
- [17] Wang X L(王新力), Peng X X(彭学贤), Li H(李宏). Cloning and sequence of cDNA encoding ACC synthase specifically expressed in banana fruit [J]. Chin J Biotechn(生物工程学报), 2000, 16(2):134-136.(in Chinese)
- [18] Dominique V D S, Zhongyi Z, Eis P, et al. A comparative molecular-physiological study of submergence response in lowland and deepwater rice [J]. Plant Physiol, 2001, 125:955-968.
- [19] Gallie D R, Yang T E. The ethylene biosynthetic and perception machinery is differentially expressed during endosperm and embryo development in maize [J]. Mol Gen Genom, 2004, 271: 267-281.
- [20] Chen R K(陈如凯). Theories and Practices for Modern Sugarcane Breeding [M]. Beijing: China Agriculture Press, 2003. 3.(in Chinese)