

香石竹 ACC 氧化酶基因的克隆及其正义反义表达载体的构建

李 涵¹, 张 婷¹, 张 颢¹, 李树发¹, 姚有林², 于丽霞², 鄢 波¹

(1. 云南省农业科学院 花卉研究所, 云南 昆明, 650205; 2. 西南林学院 植物保护学院, 云南 昆明 650205)

摘 要: 利用在 Genbank 上已报道的香石竹 ACC 氧化酶(ACO)基因的 cDNA 序列设计特异引物,以香石竹品种‘MASTER’的 cDNA 为模板进行 PCR 扩增,克隆香石竹 ACC 氧化酶(ACO)基因。测序结果显示,克隆基因的序列与报道序列完全一致。将克隆的 ACC 氧化酶(ACO)基因分别连接到植物表达载体 PBI121 启动子 CaMV 35S 的上游及下游,构建香石竹 ACC 氧化酶(ACO)基因的正义表达载体 PBI121-ACO 及反义表达载体 PBI121-anti ACO。经 PCR 鉴定,基因已成功构建到表达载体上。为香石竹抗衰老基因工程育种奠定了基础。

关键词: 香石竹;ACC 氧化酶基因;正义反义表达载体

中图分类号: S 681.5; Q 943.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001—0009(2007)11—0177—03

香石竹(*Dianthus caryophyllus* L.)是世界四大鲜切花之一。其切花在瓶插过程中自身释放的乙烯促进了花瓣衰老,并呈加速老化趋势,故香石竹切花的保鲜在鲜切花产业中显得尤为重要^[1]。基因工程技术的发展,为乙烯敏感型花卉瓶插寿命改良提供了一个新的可能途径。

1 材料与方法

1.1 材料

香石竹品种‘MASTER’采自云南省农业科学院花卉所;质粒载体 pMD18-T Vector、Taq DNA polymerase、dNTPs、限制性内切酶等连接试剂盒购自 TaKaRa

公司;总 RNA 提取试剂盒(RNArose LS Reagent)购自上海华舜生物工程有限公司;M-MLV (RNase H⁻)RTase (逆转录酶)购自 TOYOBO 公司;PCR 产物回收纯化试剂盒、B 型质粒小样快速提取试剂盒等购自 BioDev-Tech 公司;常用的化学试剂均为国产分析纯试剂;PBI121、E.coli DH5 α 由云南省农业科学院生物技术与种质资源研究所保存。

1.2 方法

1.2.1 香石竹花瓣总 RNA 的提取及电泳分析 RNA 的提取采用上海华舜生物工程有限公司的 RNArose LS Reagent 总 RNA 提取试剂盒,步骤按产品使用说明进行。RNA 电泳采用甲醛凝胶电泳。

1.2.2 cDNA 第一链的合成 采用 20 μ L 反应体系。0.5 mL Eppendof 管加入 9 μ L RNA (约 1 μ g)、RNase-free DEPC H₂O 3.5 μ L、oligo(dT)₁₀ (2 μ g/ μ L)0.5 μ L、5 \times first strand buffer 4 μ L、RNase Inhibitor (30 u/ μ L) 1 μ L、M-MLV RTase (30 u/ μ L) 1 μ L、dNTPs(2.5 mM) 1 μ L。42 $^{\circ}$ C 反应 60 min,置于一 20 $^{\circ}$ C 备用。

第一作者简介: 李涵(1979-),女,在职博士,主要研究方向为花卉生物技术研究。

通讯作者: 鄢波,博士,主要从事分子生物学研究。E-mail: boyan-dr@yahoo.com.cn.

基金项目: 云南省农业科技攻关计划资助项目(2006NG34)。

收稿日期: 2007—06—08

Study on Browning Control in Tissue Culture of *Actinidia arguta* Planch.

LIU Yan-ji¹, REN Fei-rong^{1,2}

(1. College of Agronomy, Shengyang Agricultural University, Shenyang, Liaoning 11016 China;
2. Bio-technical College Shenyang Agricultural University, Shenyang, Liaoning 110116 China)

Abstract: Experiment was aimed at studying the problem of browning control during the stem segment with buds culture of *Actinidia arguta* Planch.. Results showed that the best way for the browning control of explanted tissue is that the explants of *Actinidia arguta* Planch. were cultured in MS, added with 6-BA (0.1 mg \cdot L⁻¹), NAA (0.02%) and PVP (3%). And the subculture plantlets were transplanted on the same medium at intervals of 10-15 d.

Key words: Tissue culture; Explants; Browning control; Antioxidant; Induction

1.2.3 PCR 根据香石竹 ACC 氧化酶基因的 cDNA 序列(GenBank L35152), 并依据 PCR 引物设计原则设计特异引物, 委托北京奥科生物技术有限责任公司合成, 引物序列为: 上游引物 P1: 5'-GCTCTAGATTTTGT-TATGTTTATGT-3'; 下游引物 P2: 5'-GGGAGCTCACTTAAAAGGAAGCTCT-3'。以合成的 cDNA 第一链为模板, 采用 Taq DNA polymerase 进行 PCR 扩增。采用 50 μ L 反应体系: 10 \times Taq DNA polymerase、buffer 5.0 μ L、MgCl₂(2 μ M) 4.0 μ L、dNTPs(2.5 mM) 4.0 μ L、P1 (12.5 pm/ μ L) 2.0 μ L、P2(12.5 pm/ μ L) 2.0 μ L、cDNA 第一链反应液 2 μ L、Taq DNA polymerase (5 u/ μ L) 1.0

μ L、dd H₂O 28 μ L。反应条件为预变性 94 $^{\circ}$ C, 2 min; 循环参数为 94 $^{\circ}$ C, 30 s; 60 $^{\circ}$ C, 30 s; 72 $^{\circ}$ C, 90 s; 37cycles; 72 $^{\circ}$ C 延伸 7 min; 4 $^{\circ}$ C 保存。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳, 切下目的条带, 采用 PCR 产物回收纯化试剂盒进行胶回收。

1.2.4 PCR 产物的序列测定 PCR 胶回收的目的片段产物, 与 pMD18-T Vector 载体相连接, 转化到 E. coli DH5 α 中, 采用 B 型质粒小样快速提取试剂盒进行质粒提取, 经 PCR 及 KpnI 酶切鉴定, 选取片段长度适合, 正向、反向插入的质粒各 2 送 invitrogen 公司进行测序, 得中间载体 PMD-ACO。

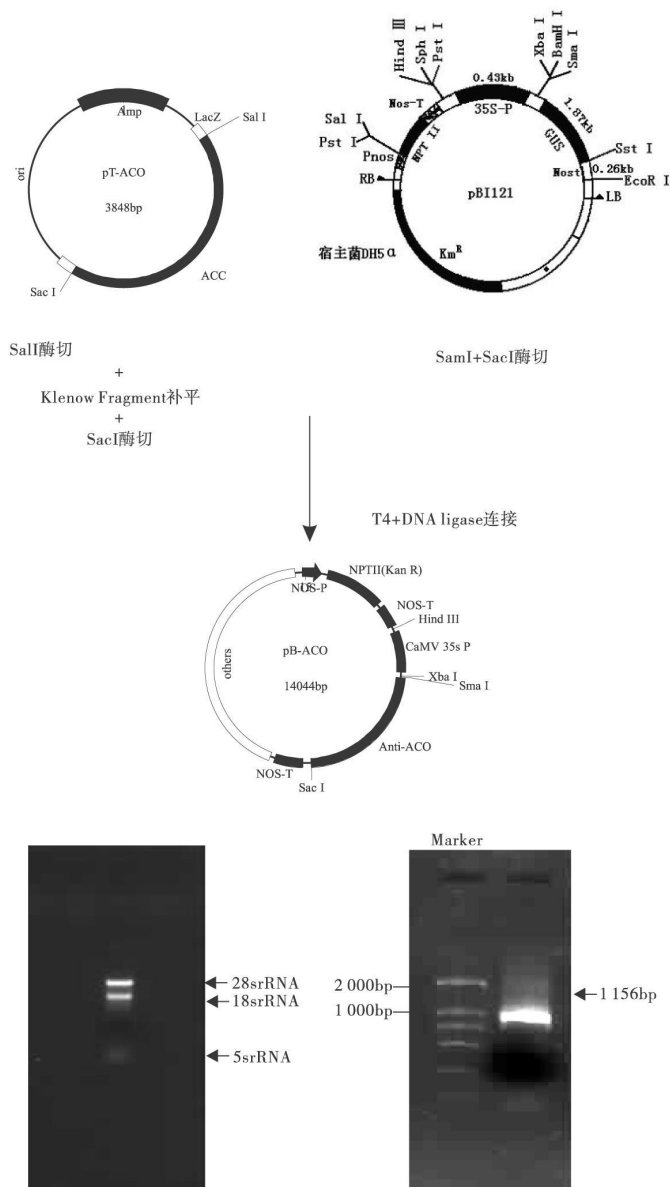


图1 香石竹花瓣总 RNA 电泳结果 图2 ACC 氧化酶 cDNA PCR 产物电泳检测结果

1.2.5 香石竹 ACC 氧化酶基因表达载体的构建 PMD-ACO 中的目的片段(ACO)取代 pBI121 中的 GUS

基因(图1)。把重组克隆质粒 PMD-ACO 用 SalI 完全酶切后用无水乙醇沉淀, 吹干沉淀(含目的片段)后用 dd H₂O 溶解后, Klenow Fragment 补平, 补平后无水乙醇沉淀(含目的片段), dd H₂O 溶解后再用 SacI 酶切, -20 $^{\circ}$ C 保存待用; pBI121 用 SmaI/SacI 酶切, 电泳回收大片段; 回收的两片段利用 T₄ 连接酶进行定向连接反应, 连接产物转化 E. coli DH5 α 感受态细胞, 培养使其扩增繁殖, 提取质粒, 并对质粒进行特异引物 PCR 检测。

2 结果与分析

2.1 总 RNA 的完整性

利用 RNase LS Reagent 总 RNA 提取试剂盒对香石竹总 RNA 进行提取, 经甲醛变性的琼脂糖凝胶电泳检测, 所得 5S、18S、28S 条带清楚, 说明所提 RNA 保证了其完整性, 符合逆转录的要求(图1)。

2.2 香石竹 ACC 氧化酶基因的 PCR 扩增

经特异引物扩增得到约 1 200 bp 的条带, 与目的基因长度相符。回收的目的条带与 pMD18-T Vector 载体相连接, 转化到 E. coli DH5 α 中, 提取的质粒经 PCR 及酶切检测, 符合设计结果(图2)。

2.3 序列测定结果与分析

本实验室克隆的 ACC 氧化酶基因测序报告显示, 该基因片段全长 1 156 bp, 编码 304 个氨基酸, 与 GenBank L35152 报道的序列完全一致。在与 PMD18-T Vector 连接过程中存在正向连接和反向连接两种方式。

2.4 香石竹 ACC 氧化酶 cDNA 植物表达载体的构建

香石竹 ACC 氧化酶 cDNA 插入植物表达载体 pBI121 的 SmaI/SacI 位点(取代了 pBI121 中 GUS 基因位点), 转化 E. coli DH5 α 后, 筛选重组转化子, 经特

引物 PCR 鉴定(图 3, 4), 所扩增的片段与预期片段相符为阳性重组质粒, 说明载体构建成功, 正义表达载体

命名为 pB-ACO1, 反义表达载体命名为 pB-ACO2。

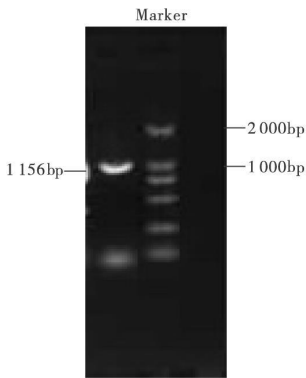


图 3 基因表达载体 pB-ACO1
特异 PCR 检测

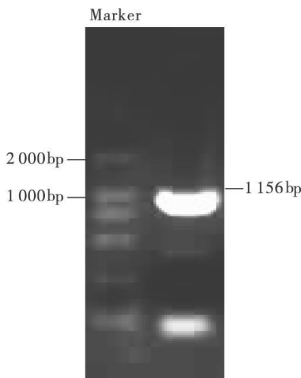


图 4 基因表达载体 pB-ACO2
特异 PCR 检测

3 讨论

香石竹是乙烯敏感(ethylene sensitivity)的花卉, 其瓶插过程中衰老主要是因为内源衰老激素乙烯的作用^[2]。香石竹 ACC 氧化酶基因在自然衰老过程中是在花器官中被诱导表达的^[4]。但 ACC 氧化酶基因也可被外源乙烯所诱导。利用反义基因技术抑制其自身乙烯的生物合成从而延长鲜切花的观赏寿命, 在理论上讲是可行的^[5]。国外(Savin K W 等, 1995; Kiss E 等, 2000)^[6, 7] 已将康乃馨 ACC 合成酶基因反向导入康乃馨中, 获得了衰老延缓的康乃馨新品种。国内也有报道(张树珍等, 2003)^[3] 将 ACC 氧化酶反义基因导入康乃馨获得转基因植株。现拟利用反义基因技术把香石竹 ACC 氧化酶 cDNA 反向插入植物表达载体为今后导入香石竹中, 以获得能延长其瓶插寿命的香石竹品种建立一定基础。首先采用 RT-PCR 技术分离、克隆了香石竹 ACC 氧化酶的 cDNA, 并进行了序列分析, 该序列与 GenBank (L35152)中报道的康乃馨 ACC 氧化酶基因的

cDNA 序列相符(编码序列同源性达 100%)。

以组成型的 CaMV35s 为启动子, 利用 pBI121 质粒, 构建了 ACC 氧化酶反义基因植物表达载体 pB-ACO。预期采用该组成型启动子驱动香石竹 ACC 氧化酶的反义基因在转化的香石竹中表达, 并对其进一步研究。考虑到该反义基因在转化后可能会在香石竹发育的任意时期及植株的任意部位表达, 它的表达可能会造成植株内部资源的浪费, 因此有待于在后期的转化植株中进一步的检测、对比及分析。目前遗传转化香石竹栽培品种的工作正在准备进行中。

参考文献

[1] 陈春玲, 赖钟雄. 切花采后生理与保鲜的研究进展[J]. 世界农业, 1999, 10(246): 38-41.
[2] 高俊平, 张晓红, 黄绵佳, 等. 月季切花开花和衰老进程中乙烯变化类型初探[J]. 园艺学报, 1997, 24(3): 274-278.
[3] 张树珍, 汤火龙, 杨木鹏, 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.
[4] 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, and ethylene receptor genes in tomato fruit during development and ripening[J]. Plant Physiol, 1998, 118(4): 1295-1305.
[5] Wang H, William R W. A flower senescence-related mRNA from Carnation shares sequence similarity with fruit-related mRNA involved in ethylene biosynthesis[J]. Plant Physiol, 1991; 1000-1001.
[6] Savin K W, Baudinette S G, Graham M W, et al. Antisense ACC oxidase RNA delays carnation petal senescence[J]. HortScience, 1995 30(5): 970-972.
[7] Kiss E, Veres A, Gall I, et al. Production of transgenic Carnation with antisense ACS gene[J]. International Journal Horticultural Science, 2000 6 (4): 103-107.

ACC Oxidase Gene Cloning in Carnation and the Construction of Its' Plant Expression Vectors and Antisense Expression Vectors

LI Han¹, ZHANG Ting¹, ZHANG Hao¹, LI Shu-fa¹, YAO You-lin², YU Li-xia², YAN Bo¹

(1. Flower Research Insitute of Yunnan Academy of Agriculture Science, Kunming, 650205, China;

2. Plant Protection College, West-south Forestry University, Yunnan, kunming, 650205, China)

Abstract: Basing on the cDNA sequence of ACC Oxidase Gene from carnation in Genebank, we designed a pair of special primers, according to PCR, amplified ACC Oxidase Gene of carnation using the cDNA of MASTER as template. The sequence analysis showed that the cloned sequence was accord with the reported totally, PCR product was cloned into the up-stream and downstream of CaMV 35S promoter in plant expression vector-PBI121 plasmid separately, established expression vectors(PBI121-ACO) and antisense expression vectors(PBI121-antiACO). PCR identification showed gene had been cloned into expression vector successfully which can be used for old resistant breeding of gene engineering.

Key words: Carnation; ACC Oxidase Gene; Expression and antisense expression vector