

牡丹 ACC 氧化酶基因的克隆与反义载体的构建

杨英军¹, 刘保国¹, 卢军刚¹, 柳叶²

(1. 河南科技大学 林学院, 河南 洛阳 471003; 2. 河南新安县磁涧镇政府, 河南 洛阳 471822)

摘要: 根据报道的牡丹 ACC 氧化酶基因(DQ337251)cDNA 序列, 设计一对特异引物, 以牡丹品种“洛阳红”基因组 DNA 为模板, 用 PCR 扩增方法克隆出牡丹 ACC 氧化酶基因的部分片段, 并将其连接到 pMD18-T 载体上进行测序。结果表明, 克隆的序列全长为 467 bp, 其中包括一个长度为 157 bp 的序列, 推测它可能是一个内含子, 其它序列与已报道序列同源性为 98.2%; 用 SacI 和 XbaI 对重组质粒和载体 pBI 121 酶切、连接, 构建牡丹 ACC 氧化酶基因的反义表达载体。

关键词: 牡丹; ACC 氧化酶基因; 克隆; 反义载体

中图分类号: S 685.11 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2008)05-0187-04

牡丹(*Paeonia suffruticosa*)属毛茛科芍药属(*Paeonia*)牡丹组(*sect. Montan*)植物, 是中国的特产名花, 曾被评为我国十大传统名花之首, 享有“国色天香”、“花群之王”的美誉, 是吉祥、幸福、富贵、和平、友谊和繁荣昌盛的象征, 是国花的唯一候选花卉, 深受人们喜爱。

我国对牡丹的深入研究主要集中于资源的收集、整理、评价^[1-2]、栽培技术的探讨^[3]、组织培养及快速繁殖^[4-7]和对花期的调控方面等。其中对花期的调控研究

最为重要, 因为在自然条件下, 牡丹花期一般7~10 d 且比较集中, 不利于观赏和经济发展, 如果能人为地调控花期, 将对旅游业的发展有重大的意义。在这方面已有许多学者进行了调控花期研究和抑制栽培研究^[8-9], 已经实现了牡丹花期周年开放、周年供应, 基本满足了人们对鲜花的要求^[10-13]。

乙烯是高等植物中促进器官衰老和果实成熟的激素, 牡丹是典型的乙烯致衰植物。ACC 氧化酶, 又称乙烯合成酶(EFE), 是乙烯合成途径中的关键酶, 它催化乙烯合成的最后一步(即催化 ACC 生成乙烯)。应用 ACC 氧化酶基因的反义 RNA 技术, 可望有效抑制乙烯生物合成, 从而延长鲜切花植物寿命。目前国外已从番茄、苹果、豌豆、桃、矮牵牛、香石竹、猕猴桃等植物中克隆到 ACC 氧化酶基因 cDNA^[14-17], 澳大利亚将香石竹 ACC 氧化酶基因 cDNA 导入香石竹后, 使香石竹花瓣衰老明显

第一作者简介: 杨英军(1968-), 男, 河南孟津人, 副教授, 从事园艺植物分子生物学研究工作。
基金项目: 河南省自然科学基金资助项目(0611030700); 河南省科技攻关资助项目(072102140015); 河南科技大学人才科学研究基金资助项目(05018)。
收稿日期: 2007-12-30

[6] 贾守宁, 杨卉. 蕨麻抗缺氧作用的试验研究[J]. 中国民族医药杂志, 1999(1): 37.

[7] 黄学林, 李筱菊. 高等植物组织离体培养的形态建成及其调控[M]. 北京: 科学出版社, 1995.

[8] 曹孜义, 刘国民. 实用植物组织培养技术教程[M]. 兰州: 甘肃科学技术出版社, 1996: 14-18.

[9] 王冬梅, 黄学林, 黄上志. 细胞分裂素类物质在植物组织培养中的作用机制[J]. 植物生理学通讯, 1996, 32(5): 373-377.

Preliminary Study on Tissue Culture of *Potentilla anserina*

SHEN Ning-dong¹, WEI Mei-qin¹, MA Guo-ling¹, LI Ning¹, TANG Qing-chuan¹, Li Jun-qiao²

(1. Agriculture and Animal Husbandry College of Qinghai University, Xining, Qinghai 810016 China; 2. Qinghai Nationalities College, Xining, Qinghai 810007, China)

Abstract: Bud regeneration on different explants period the tissue culture of *P. anserina* was investigated. The results showed: the rate of the bud regeneration on stem apex of *P. anserina* was best, it was 75.3%, tuberous was 56.5%, creeping stem was 11.1% and leaf was the worst, it was 0%. On tissue culture, the optimum combination was NAA 0.5 mg/L and 6-BA 1.0 mg/L for stem apex and NAA 0.5 mg/L and KT 0.5 mg/L for tuberous.

Key word: *Potentilla anseriue* L.; Explant; Tissue culture; Bud regeneration

延迟。以牡丹品种“洛阳红”基因组为模板,在克隆了ACC氧化酶基因部分序列后,构建其反义植物表达载体,为牡丹花期的调控研究和进一步牡丹转基因研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 植物材料 取完整、无病虫害的牡丹品种“洛阳红”幼嫩叶片为试材,并于-20℃保存备用。

1.1.2 试剂与菌种 限制性内切酶、RNase、dNTP、pMD18-T Vector、Taq DNA 聚合酶、UNIQ-10 柱式DNA 胶回收试剂盒分别购于宝生物公司、华美公司和生工公司;其他为分析纯进口或国产试剂。植物表达载体 pBI 121 和大肠杆菌菌株 (*Escherichia coli*)DH5α 由河南科技大学实验室保存。

1.2 方法

1.2.1 牡丹 DNA 提取及引物设计与合成 参照朱红霞等^[4]的方法从牡丹叶片中提取基因组 DNA。根据 GenBank 公布的牡丹 ACC 氧化酶基因(DQ337251)部分序列,设计一对引物 P1 和 P2。为了便于克隆,分别在 P1 和 P2 中插入了 Sac I 和 Xba I 两个酶切位点(加下划线部分): P1: 5'-AC GAGCTC GACAGAAATCAAT-GATATGGATTGG -3'(33 bp); P2: 5'-CA TCTAGA CCCTTAATCAAGTCTGGTTTGGGGC -3'(33 bp)。

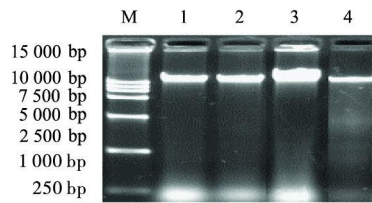


图1 牡丹 DNA 提取

注: M. DNA Marker DL15 000;

1、2: SDS 法所提的 DNA; 3、4 CTAB 法所提的 DNA。

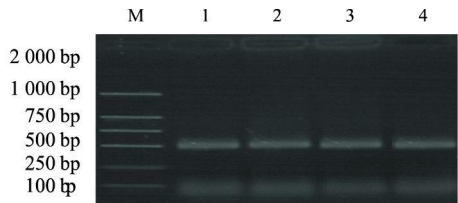


图2 ACC 氧化酶基因 PCR 扩增

注: M. DNA Marker DL 2 000; 1~4: 4 次

PCR 扩增重复。

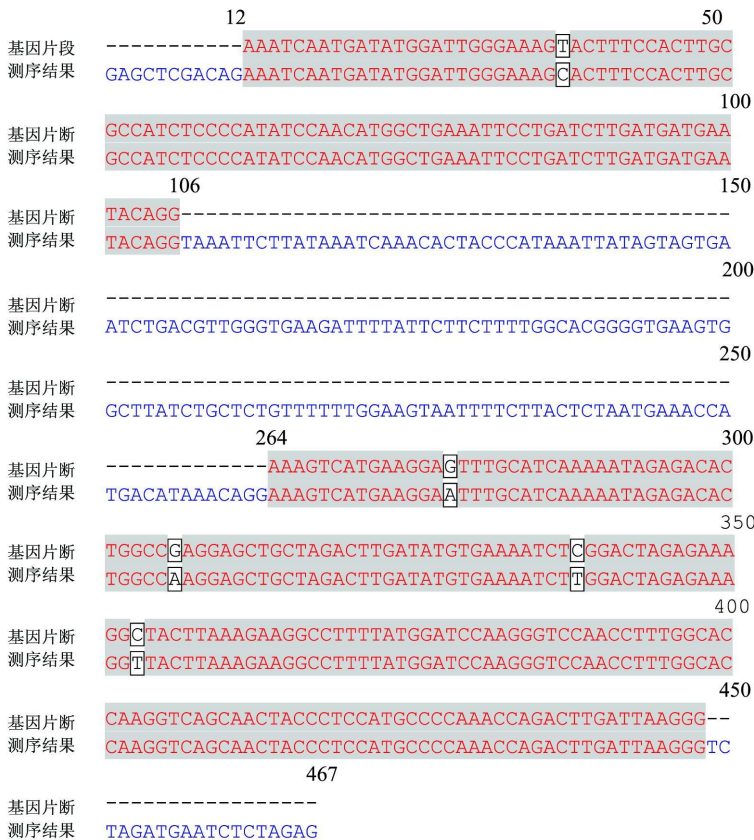


图3 克隆到的牡丹 ACC 氧化酶基因部分序列与已知序列的比较

1.2.2 牡丹 ACC 氧化酶基因片段的扩增 采用 50 μ L 反应体系 包括 10 mmol/L Tris-HCl (pH 值 8.3), 50 mmol/L KCl, 1.5 mmol/L MgCl₂, 0.01 mg/mL 明胶, 0.2 mmol/L dNTPs(每种)、7.5 ng 引物, 0.8 U Taq 酶, 10 ng 模板。PCR 反应在 Gradient Thermoblock PCR 仪上进行。扩增程序为 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s; 60 $^{\circ}$ C 退火 1 min; 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 8 min; 4 $^{\circ}$ C 保存。反应结束后, PCR 产物在 1.4% 琼脂糖凝胶上电泳分离, 用 DL 2000 为分子量标准, 电泳缓冲液为 1 \times TAE, 电压 3 ~ 4 V/cm, 约电泳 1 h 后, 经溴化乙锭染色放紫外灯下观察照相。

1.2.3 基因片段的回收、连接与测序 回收 PCR 产物后与 pMD18-T 连接, 转化大肠杆菌 DH 5 α 感受态细胞 通过蓝白菌落筛选重组载体。质粒的提取采用碱裂解法, 鉴定的阳性克隆进行测序, 并用 Vector 7.0 软件分析。

1.2.4 反义表达载体的构建 用 Sac I、Xba I 对阳性质粒和 pBI 121 双酶切, 分别回收后再连接, 转化大肠杆菌, 并酶切筛选。

2 结果与分析

2.1 牡丹基因组 DNA 提取

使用 CTAB 和 SDS 两种方法提取牡丹基因组 DNA, 将所提 DNA 电泳检测(图 1), 可以看出两种提取方法都能提出高质量的 DNA, 分子量大, 没有拖尾现象, 能满足研究对模板的要求。

2.2 牡丹 ACC 氧化酶基因片段的克隆

用设计的一对引物 P1 和 P2 对牡丹基因组 DNA 进行 PCR 扩增, 在 94 $^{\circ}$ C 变性、60 $^{\circ}$ C 退火、72 $^{\circ}$ C 延伸条件下, 循环 35 次, 之后进行电泳观察扩增结果。发现在分子量约 500 bp 处有一亮带(图 2), 与设计大小为 300 bp 左右的牡丹 ACC 氧化酶基因片段相差约 200 bp。

用柱式 DNA 回收试剂盒对 PCR 扩增产物回收, 并与克隆载体 pMD18-T 连接 热激法将连接产物转化到大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞中, 经 37 $^{\circ}$ C 培养后, 挑阳性单菌落摇菌并提取质粒鉴定。PCR 鉴定发现在约 500 bp 的位置有明显的亮带, 说明所挑取的菌斑是呈阳性的。

2.3 测序结果及分析

将进一步酶切鉴定后的阳性克隆寄送宝生物公司测序, 测序结果用软件 Vector 7.0 分析(图 3)。

在设计牡丹 ACC 氧化酶引物时, 拟通过 PCR 扩增获得牡丹 ACC 氧化酶基因序列(DQ 337251)中 130 ~ 435 bp 之间的约 300 bp 片段, 但是通过测序分析发现, 克隆到的基因片段全长为 467 bp, 其中约 300 bp 的序列与已知基因片段的 cDNA 序列基本相符, 只有 5 个碱基不一致 两者同源性达 98.2%, 表明所得到的片段是牡丹

ACC 氧化酶基因部分序列。其中无法匹配的 157 bp 序列, 极有可能是在转录过程中被剪切掉的一个内含子序列。

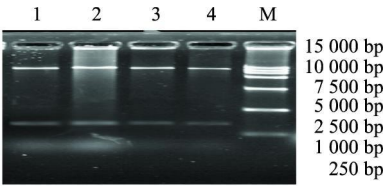


图 4 反义载体双酶切鉴定

注: M. DNA Marker DL 15 00Q 1~4: 重组质粒双酶切结果

2.4 反义载体构建

将提取的重组质粒和植物表达载体 pBI 121 质粒分别用 Sac I 和 Xba I 双酶切。重组质粒和 pBI 121 的质粒分别被切出了一个约 500 bp 和 1 800 bp 的小片段, 回收重组质粒被切出的约 500 bp 的小片段和 pBI 121 被切剩余的约 13 000 bp 的大片段。将连接产物转化到大肠杆菌感受态细胞中, 培养后挑单菌落提取质粒, 用 Sac I 和 Xba I 双酶切(图 4), 在 25 bp 和 1 000 bp 之间有亮带产生(约 500 bp), 与预计的含有 ACC 氧化酶基因片段大小相符, 表明牡丹 ACC 氧化酶基因反义载体构建成功。

3 结论与讨论

3.1 结论

根据已公布的牡丹 ACC 氧化酶基因序列设计引物 P1 和 P2 通过 PCR 扩增获得约 500 bp 的片段, 经测序、分析后发现该片段与已知序列同源性为 98.2%, 表明牡丹 ACC 氧化酶基因部分序列克隆成功。

分析发现, 克隆出的片段比已知序列多一个 157 bp 的片段, 初步推断该片段可能是一个内含子。

将牡丹 ACC 氧化酶基因部分片段反向连接到 pBI 121gus A 基因处, 构建牡丹 ACC 氧化酶基因的反义载体。

3.2 讨论

乙烯是启动和促进植物成熟和衰老的激素, 在成熟过程中由自我抑制转向自我催化, 因而与乙烯生成有关的酶及基因的分离是人们研究的热点。在乙烯合成途径中, ACC 氧化酶催化 ACC 生成乙烯。目前国内外学者已经从番茄、苹果、豌豆、桃、樱桃、香石竹¹⁶⁻¹⁸ 等植物中克隆到 ACC 氧化酶基因 cDNA。目前利用反义基因技术, 抑制乙烯合成已经在番茄上获得成功。

关于牡丹的 ACC 氧化酶基因克隆及反义载体构建方面的研究, 迄今未见报道。该试验通过对牡丹“洛阳红”基因组 DNA 的 PCR 扩增, 得到了特异性片段, 经测序表明, 所扩增片段与已经公布的牡丹 ACC 氧化酶基因 cDNA 序列基本一致, 同源性高达 98.2%, 说明成功

克隆了 ACC 氧化酶基因的部分序列。进一步将克隆到的牡丹 ACC 氧化酶片段与植物表达载体 pBI 121 反向连接,并转化到大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞中,成功构建了牡丹 ACC 氧化酶基因的反义表达载体,为进一步通过反义技术获得抗衰牡丹资源奠定了基础。

大多数真核生物的 DNA 分为编码区和非编码区,而编码区又分为外显子(exon)和内含子,试验将克隆的 ACC 氧化酶基因部分序列与 GenBank 中相应部分序列比较,发现多出一个长达 157 bp 的片段,初步断定它可能是在转录中被剪切的一个内含子序列,其生物学意义还有待进一步研究。

参考文献

- [1] 周志钦,潘开玉,洪德元.牡丹组野生种间亲缘关系和栽培牡丹起源研究进展[J].园艺学报,2003,30(6):751-757.
- [2] 侯小改,尹伟伦,李嘉珏,等.部分牡丹品种遗传多样性的 AFLP 分析[J].中国农业科学,2006,39(8):1709-1715.
- [3] 梁臣,徐睿,孙建周,等.洛阳红牡丹抑制裁培技术研究[J].中国林副特产,2003,67(4):32-33.
- [4] 孔祥生,张妙霞.牡丹的快繁研究[J].北方园艺,1998,121(3):87-89.
- [5] Bouza L. Requirements for in vitro rooting of *P. suffruticosa* Andr. cv. 'Mmevatry'[J].Scientia Horticulturae, 1994,58(3):223-233.
- [6] Bouza L, Jacques M, Miginiac E. In vitro propagation of *P. suffruticosa* Andr. cv. 'Mmevatry': developmental effects of exogenous hormones during the multiplication phase[J]. Plant Science, 1994,57(3):241-251.

- [7] Bouza L, Jacques M, Sotta B et al. The differential effect of N6 benzyl adeninead N6(Δ 6 isopentenyladenine) on in vitro propagation of *P. suffruticosa* is correlated with different hormone contents[J]. Plant Cell Reports, 1993,12(10):593-596.
- [8] 郑建敏,王创.菏泽牡丹在合肥地区的春节催花促控技术[J].安徽农业科学,2004,32(3):604-605.
- [9] 高志民,王莲英.牡丹催花后复壮栽培根系生长及光合特性研究[J].林业科学研究,2004,17(4):479-483.
- [10] 弓德强,郑鹏,任小林,等.几种植物生长调节剂对牡丹花期的影响[J].陕西农业科学,2003(1):9-10.
- [11] Boyle T H. BA influences flowering and dry matter partitioning in shoots of *Crimson Giant Easter Cactus*[J]. Hort Science, 1995,30(2):289-291.
- [12] Serek M, Andersen S. AOA and BA influence on floral development and longevity of potted *victory parade miniature rose*[J]. Hort Science, 1993,28(10):1039-1040.
- [13] 郭香凤,史国安.牡丹花水提液对氧自由基的清除作用[J].植物生理学通讯,2004,40(1):37-38.
- [14] 朱红霞,袁涛.一种简便的牡丹、芍药 DNA 的提取方法[J].山东林业科技,2005(4):53-54.
- [15] 王俊英,张开春,王俊平,等.樱桃 ACC 氧化酶基因的克隆和序列分析[J].华北农学报,2002,16(1):11-15.
- [16] 刘会超,李永春,巨关升,等.香石竹 ACC 氧化酶基因的克隆及其反义表达载体构建[J].核农学报,2005,19(6):461-464.
- [17] 张树珍,汤火龙,杨本鹏,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.

Cloning of ACC Oxidase Gene and Construction of Antisense Vector on Peony

YANG Ying-jun¹, LIU Guo-bao¹, LU Jun-gang¹, LIU-Ye²

(1. Forestry College, Henan University of Science & Technology, Luoyang Henan 471003, China; 2. Chijian Town, Xinan County of Henan Province, Luoyang Henan 471822, China)

Abstract: As a respiration climacteric flower, the peony fresh (cut) flower release some endogenous ethylene which can impact aging strongly with the flower senescence. The ACC (1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid) oxidase was one of the key rate-limiting enzymes for ethylene biosynthesis in higher plants. The studies on the expression and regulation-control of ACC oxidase have some important roles in prolonging the florescence. A pair of specific primers, P1 and P2, were designed and synthesized according to the reported cDNA sequence of the ACC oxidase gene of peony (the sequence number in the GenBank was DQ337251) in this experiment. A DNA fragment was obtained from "luoyanghong" genomic DNA by PCR at first, and linked it to pMD18-T which was a cloning vector. Then sequencing the cloned fragment. The result shows that the whole length of the fragment was 467bp. A sequence, 157bp among them, might be an intron. The homologous rate of the remaining sequence was 98.2% compared with the reported sequence. The recombinant plasmid and the plant expression vector pBI 121 were digested with the Sac I and Xba I. The fragment of ACC oxidase gene from peony and pBI 121 were reclaimed and ligated, an antisense expression vector was constructed in the end.

Key word: Peony; ACC oxidase; Cloning; Antisense vector