

矮牵牛 *ACS2* 基因的克隆及反义重复表达载体的构建黄凤兰^{1,2}, 薛贵彬³, 孟凡娟¹, 阎秀峰¹

(1. 东北林业大学 生命科学院 黑龙江 哈尔滨 150000; 2. 内蒙古民族大学 生命科学院 内蒙古 通辽 028000; 3. 哈尔滨师范大学 生命与环境学院 黑龙江 哈尔滨 150080)

摘要: 利用降落 PCR 的方法, 从矮牵牛 DNA 中扩增出 *ACS2* 基因片段, 在 GenBank 中获得基因序列号为 DQ090003; 利用一步法将 *ACS2* 基因的反义重复与 pBI-121 质粒连接, 构建含该基因的反义重复表达载体。

关键词: 矮牵牛; ACC 合成酶; 反义重复表达载体; 降落 PCR; 一步法

中图分类号: S 681.6; Q 943.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2009)07-0029-05

花卉衰老过程中伴随乙烯的生物合成, 乙烯是促使花卉衰老的重要因素^[1]。ACC 合成酶(1-amino-cyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) synthase, 简称 ACS)是乙烯生物合成过程中催化 SAM 向 ACC 转化的限速酶^[2,3]。*ACS* 基因是乙烯生物合成过程中的重要基因, 是一个多基因家族^[4], 各个成员间序列同源性差异很大^[5], 其中的 *ACS2* 基因是这个家族中的重要成员^[6]。在花卉中克隆 *ACS* 基因的研究比在果实中起步晚, 只局限于少数几种植物。

转基因沉默理论认为, 转基因与内源基因有较高同源性, 以及重复基因的导入均可加强内源基因的沉默^[7]。Angel S M^[8] 和 Hamilton A J^[9] 等的研究也表明, 重复 DNA 片段能够引起内源基因近 100% 的转录后沉默。并且反向抑制比正向抑制效果好, 重复抑制比单基因抑制效果好^[10]。这为转基因沉默内源基因提供了更加高效的方法。

矮牵牛 (*Petunia hybrida*) 作为最受欢迎的花卉之一^[11], 被认为是模式花卉^[12], 在花色方面的研究报道很多, 有关花期方面的研究很少。在国外, 1998 年 Lindstrom J T 等^[13] 从矮牵牛中克隆出了 *ACS* 基因, 序列号为 AF049711; 在国内, 目前还没有这方面的报道。

该试验的目的就是克隆矮牵牛 ACC 合成酶基因 2 (*ACS2*), 并构建含该基因的反义重复表达载体, 从而为以模式花卉矮牵牛为对象, 利用共抑制技术延长花期的

研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 植物材料、菌种、质粒 植物材料为矮牵牛 (*Petunia hybrida*) 幼嫩叶片, 采自东北农业大学花圃; 克隆载体 pGEM-T Easy Vector 购自 Promega 公司, 表达载体质粒 pBI-121, 由实验室保存; 大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DH5 α , 由实验室保存。

1.1.2 试剂 LA Taq DNA 聚合酶, Marker, 各种限制性内切酶, 引物, T₄ 连接酶, 氨苄青霉素、卡那霉素、IPTG 和 X-gal 等抗生素, 胶回收试剂盒, 质粒提取试剂盒等购于 Takara 公司; 其他试剂均为国产的分析纯。

1.1.3 细菌培养基 LB、YEB、蓝白斑筛选(含 X-gal 和 IPTG) 培养基。

1.2 试验方法

1.2.1 矮牵牛 *ACS2* 基因的克隆 矮牵牛基因组 DNA 的提取: 采用 SDS 法。*ACS2* 基因的引物设计: 根据基因的序列同源性、基因内部限制性酶切位点, 以及克隆载体 pGEM-T Easy Vector 和表达载体 pBI-121 质粒上的多克隆位点, 在欲克隆的反义 *ACS2* 第一段基因(简称反 1, antisense 1)上游引物 5' 端引入 2 个保护碱基(GG)和 1 个 KpnI 的酶切位点, 下游引物 5' 端引入 2 个保护碱基(GG)和 XbaI 的酶切位点; 在欲克隆的反义 *ACS2* 第二段基因(简称反 2, antisense 2)上游引物 5' 端引入 2 个保护碱基(GG)和 1 个 SmaI 的酶切位点, 下游引物 5' 端引入 2 个保护碱基(GG)和 KpnI 的酶切位点; 最终提交给公司合成的引物序列如下:

反 1 { 上游: 5'-GGGGTACCACGAGAAGAAGCCATAAG-3'
下游: 5'-GGTCTAGAATAATCGGAAACCCAC-3';
反 2 { 上游: 5'-GGCCCGGACGAGAAGAAGCCATAAG-3'
下游: 5'-GGGGTACCATAATCGGAAACCCAC-3'。

第一作者简介: 黄凤兰(1973-), 女, 副教授, 在站博士后, 研究方向为植物基因工程。E-mail: huangfenglan2008@yahoo.com.cn.

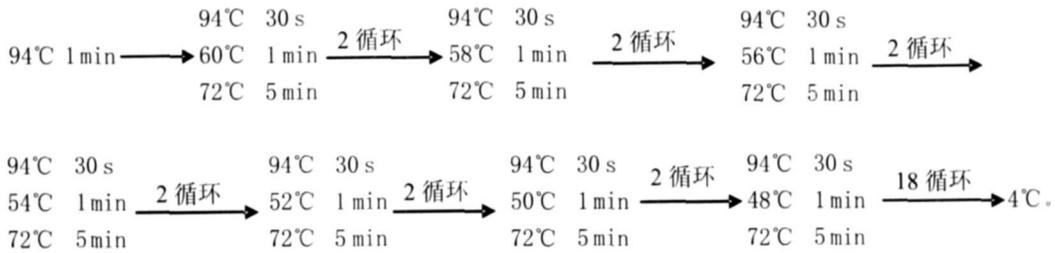
通讯作者: 阎秀峰(1965-), 男, 黑龙江肇东人, 博士, 教授, 现从事细胞生物学方向研究工作。E-mail: xyfan@mai.hl.cn.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30760123); 内蒙古民族大学博士启动基金资助项目(225)。

收稿日期: 2009-02-10

目的基因的 PCR 扩增和目的片段的纯化回收: 反应体系为: 10× LA PCR Buffer II 5 μL, dNTP (各 5 mM) 8 μL, MgCl₂ (25 mM) 5 μL, 上游引物 (10 pmol) 1 μL, 下游引物

(10 pmol) 1 μL, 模板 DNA 1 μL, LA Taq (5 U/μL) 0.5 μL, ddH₂O 28.5 μL; Total 50 μL。采用降落 PCR 的方法, 反应条件如下:



扩增完毕进行琼脂糖凝胶电泳检测: 目的片段的纯化回收按上海华舜小量胶回收试剂盒说明书进行。目的片段与 pGEM-T Easy Vector 载体连接: 反应体系如下: 2× Rapid Ligation Buffer 5 μL, pGEM-T or pGEM-T Easy Vector (50ng) 1 μL, PCR product 3 μL, T₄ DNA Ligase (3 Weiss units/μL) 1 μL; Total 10 μL。反应条件: 4°C 过夜。大肠杆菌感受态的制备和连接产物转化感受态细胞: 采用 CaCl₂ 法^[4] 制备大肠杆菌 DH5α 感受态细胞。连接产物转化感受态细胞的过程按 T₄ DNA Ligase 使用说明进行。筛选培养基含氨苄抗性。重组质粒的筛选和鉴定: 重组质粒的鉴定包括 PCR 鉴定和酶切鉴定。PCR 鉴定时设空白对照, 以正常程序和体系进行 PCR 反应。质粒提取方法参见采用上海华舜生物工程有限公司的质粒提取试剂盒。用 XbaI 和 KpnI 双酶切, 反应体系如下: XbaI 0.8 μL, KpnI 0.8 μL, 重组质粒 4.0 μL, M Buffer 2.0 μL, ddH₂O 12.4 μL; Total 20 μL。酶切反应条件: 37°C 3 h。克隆序列的测定: 序列测定采

用 Sanger 双脱氧链终止法, 由上海生物工程公司完成。
 1.2.2 ACS2 基因反义重复表达载体的构建 pBI-121 质粒的酶切鉴定: PstI 在 pBI-121 上有 3 个酶切位点, 分别在 3 019、4 966、12 854 处, 所以能将 pBI-121 切成 3 段, 大小分别将近 2.5、8 kb。酶切验证反应体系如下: PstI 0.8 μL, H Buffer 2.0 μL, pBI-121 质粒 4.0 μL, ddH₂O 13.2 μL; Total 20 μL。反应条件: 37°C, 3 h。
 ACS2 基因反义重复表达载体的构建: 用 XbaI、KpnI 将反 1 从 T 载体上切下, 回收; 用 KpnI、SmaI 将反 2 从 T 载体上切下, 回收; pBI-121 质粒用 XbaI、SmaI 酶切, 回收目的片段; 回收的反 1、反 2 和 pBI-121 质粒片段用一步法进行连接。转化大肠杆菌感受态细胞、单斑筛选 (培养基含卡那抗性)、摇菌、PCR 检测和酶切检测。构建过程见图 1。一步法连接反 1、反 2 和 pBI-121 质粒片段的反应体系如下: Buffer 1 μL, pBI-121 2.4 μL, 反 1 2.5 μL, 反 2 2.5 μL, T₄ DNA Ligase 1.3 μL; Total 10 μL。反应条件: 4°C 过夜。其他过程同 1.2.1。

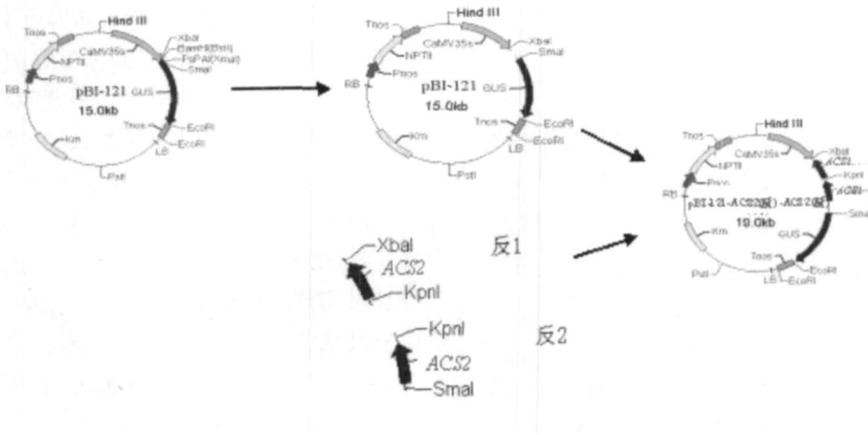


图 1 ACS2 基因反义重复表达载体构建过程

Fig. 1 The Construction of Antisense Repetition Expression Vectors of ACS2 gene

2 结果与分析

2.1 矮牵牛 ACS2 基因的克隆

2.1.1 矮牵牛基因组 DNA 的提取 提取的矮牵牛基因组 DNA 电泳结果见图 2。从图 2 可以看出: 所提取的

DNA 完整, 没有降解, 质量较好, 可以满足 PCR 克隆基因的要求。

2.1.2 目的基因的 PCR 扩增 以矮牵牛基因组 DNA 为模板, 以 ddH₂O 为空白对照, 采用降落 PCR 技术进行 PCR 扩增。PCR 反应结束后, 取 5 μL 进行电泳检测。从图 3 可以看出, 所获得片段和目的片段大小接近, 约为 2 kb。

2.1.3 重组质粒的鉴定 PCR 鉴定结果: 从图 4 可以看出, 反 1 的 1st 菌落、反 2 的 1st 菌落和 2nd 菌落为阳性克隆, 反 1 的 2nd 菌落为假阳性; 酶切鉴定结果见图 5, 可以看出, 反 1 的 1st、反 2 的 1st、2nd 菌落为阳性克隆, 反 1 的 2nd 菌落为假阳性。PCR 鉴定结果和酶切鉴定结果表明, 反 1 的 1st、反 2 的 1st 和 2nd 菌落为阳性, 可将该阳性菌液用于测序。

2.1.4 克隆序列的测定与分析 经测定, 所克隆的 ACS2 基因反 1 和反 2 的片段长度均为 1 962 bp, 与 gen-

bank 中序列号为 AF049711 的矮牵牛 ACS2 基因的同源性达到 85.79%。所克隆的序列已经申请登录 genbank, 序列号为。

2.2 ACS2 基因反义重复表达载体 (pBI-121-ACS2(反)-ACS2(反))的构建

2.2.1 pBI-121 质粒的酶切鉴定 PstI 对 pBI-121 酶切鉴定结果见图 6。从图 6 可知, 该质粒为 pBI-121。

2.2.2 XbaI、SmaI 对 pBI-121 质粒的双酶切 酶切结果见图 7。酶切后回收目的的大片段。由于 pBI-121 载体多克隆位点在 XbaI、SmaI 之间的片段很短, 所以酶切后电泳时只能看到一条和载体大小相近的带。

2.2.3 pBI-121-ACS2(反)-ACS2(反)的鉴定 pBI-121-ACS2(反)-ACS2(反)的菌落 PCR 鉴定结果见图 8, 酶切鉴定结果见图 9。PCR 鉴定和酶切鉴定结果表明, 所构建的 ACS2 基因反义重复表达载体 pBI-121-ACS2(反)-ACS2(反)的结构是正确的, 可用于后续试验。

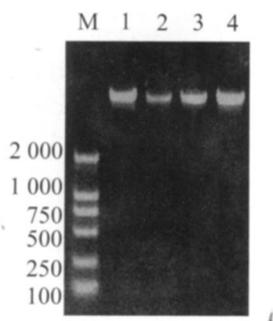


图 2 矮牵牛基因组 DNA 提取电泳图

Fig. 2 The extraction of genome DNA of *petunia*

Note: M; DL2 000 Marker; 1, 2, 3, 4; Genome DNA of *Petunia*.

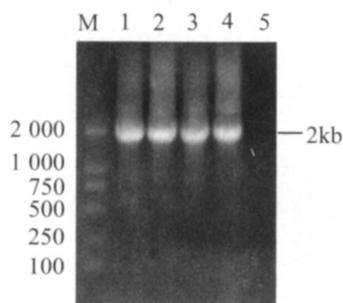


图 3 ACS2 基因的 PCR 扩增

Fig. 3 The PCR amplification of ACS2 Gene

Note: M; DL2 000 Marker; 1, 2; PCR result of antisense 1; 3, 4; PCR result of antisense 2; 5; CK.

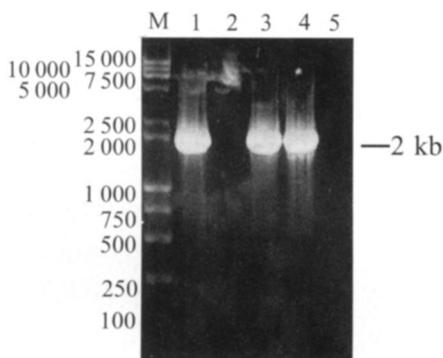


图 4 ACS2 基因的 PCR 鉴定

Fig. 4 The PCR Identification of ACS2 Gene

Note: M; Wide Range DNA Ladder Marker; 1, 2; The 1st and 2nd Bacterial Colony PCR of the Antisense 1; 3, 4; The 1st and 2nd Bacterial Colony PCR of the Antisense 2; 5; CK.

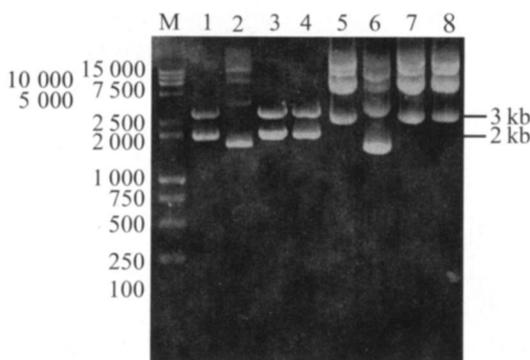


图 5 ACS2 基因的质粒酶切鉴定

Fig. 5 The digestion identification of plasmid of ACS2 Gene

Note: M; Wide Range DNA Ladder Marker; 1, 2; The 1st and 2nd bacterial colony digestion identification of plasmid of the antisense 1; 3, 4; The 1st and 2nd bacterial colony digestion identification of plasmid of the antisense 2; 5, 6; The 1st and 2nd bacterial colony plasmid of the antisense 1; 7, 8; The 1st and 2nd bacterial colony plasmid of the antisense 2.

3 结论

3.1 获得了矮牵牛 ACS2 基因片段

利用降落 PCR 的方法, 克隆了矮牵牛 ACS2 基因片段并申请登录 genbank, 序列号为。该基因的克隆, 为以矮牵牛为对象, 研究花卉的衰老问题奠定基础。

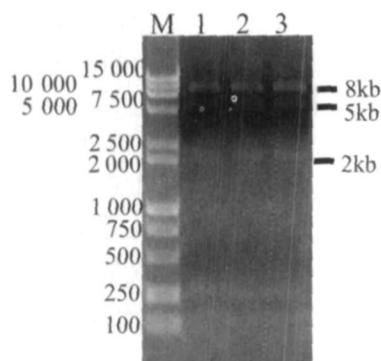


图 6 PstI 对 pBI-121 质粒的酶切

Fig. 6. The Identification of pBI-121 Plasmid by PstI Digestion

Note; M; Wide Range DNA Ladder Marker; 1, 2, 3; Digestion Identification.

3.2 构建了矮牵牛 ACS2 基因的反义重复表达载体

用一步法将 ACS2 基因的 2 个反义片段与 pBI-121 质粒连接起来, 构建了 pBI-121-ACS2(反)-ACS2(反)重复表达载体。该载体的构建, 为利用共抑制技术延长矮牵牛花期的研究奠定基础。

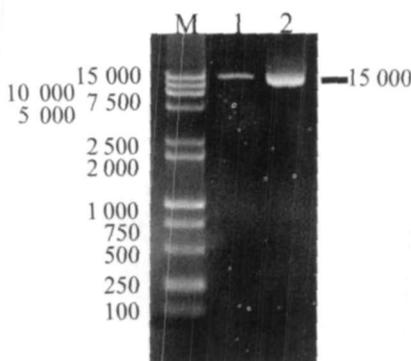


图 7 XbaI、SmaI 对 pBI-121 质粒的双酶切

Fig. 7. The Identification of pBI-121 Plasmid by XbaI and SmaI Digestion

Note; M; Wide Range DNA Ladder Marker; 1; Identification of pBI-121 Plasmid by XbaI and SmaI Digestion; 2; pBI-121 Plasmid.

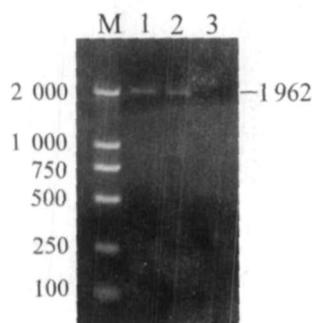


图 8 pBI-121-ACS2(反)-ACS2(反)的菌落 PCR 鉴定

Fig. 8 The PCR Identification of Colony on pBI-121- ACS2 (Antisense)-ACS2(Antisense) Vector

Note; M; DL2000 Marker; 1, 2; The 1st and 2nd Bacterial Colony PCR of the pBI-121- ACS2(Antisense)-ACS2(Antisense); 3; CK.

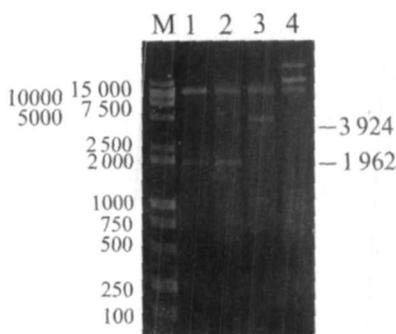


图 9 pBI-121-ACS2(反)-ACS2(反)的质粒酶切鉴定

Fig. 9 The Digestion Identification of Plasmid on pBI-121-ACS2 (Antisense)-ACS2(Antisense)

Note; M; Wide Range DNA Ladder Marker; 1; The Digestion Identification of Plasmid by XbaI and KpnI; 2; The Digestion Identification of Plasmid by KpnI and SmaI; 3; The Digestion Identification of Plasmid by XbaI and SmaI; 4; Plasmid.

4 讨论

降落 PCR 是一种设计多循环以使相连循环, 的退火温度越来越低, 从而达到最佳扩增条件的方法。省却了常规 PCR 中摸索最适退火温度的过程。经过改良以后程序简单, 且产物的特异性及效率有较大提高^[15-16]。该试验就是采用了改良后的降落 PCR 技术, 一次就得到了目的产物, 并且产物的特异性强, 产量高, 表现在 PCR 产物在电泳时条带宽、亮, 从而验证了降落 PCR 确实比一般 PCR 方法工作效率高。

在构建表达载体时, 一般采用一个中间载体最后将

目的片段与表达载体连接^[11]。该试验采用一步法将 2 个目的片段和 1 个载体片段直接放在一起连接, 比利用中间载体顺次连接减少工作量。

参考文献

- [1] Woodson W R, Park K Y, Drory A, et al. Expression of ethylene biosynthetic pathway transcripts in senescence camation flower[J]. Plant Physiology, 1992, 99: 526-532.
- [2] 金志强, 李瑞珍, 徐碧玉, 等. 香蕉果实特异性 ACC 合成酶基因的克隆及反义载体的构建[J]. 农业生物技术学报, 2002, 10(3): 305-306.
- [3] 王爱勤, 王自章, 杨丽涛, 等. 乙烯生物合成途径中的两个关键酶基因的研究进展[J]. 广西农业生物科学, 2004, 23(2): 164-169.
- [4] Kende H. Enzymes biosynthesis. Annu. Rev. Plant Physiol[J]. Plant

Mol. Biol. 1993, 44: 283-307.

[5] Rottmann W H. 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthetase in tomato is encoded by a multifamily whose transcription is induced during fruit floral senescence[J]. J. Molecular Biology, 1991, 222: 37-961.

[6] Jones M L, Woodson W R. Differential expression of three members of 1-aminocyclopropane synthase gene family in carnation[J]. Plant Physiol, 1999, 119: 755-764.

[7] Meins F. RNA degradation and models for post-transcriptional gene silencing[J]. Plant molecular Biology, 2000, 43: 261-273.

[8] Angel S M. Consist gene silencing in transgenic plants expressing a replicating potato virus X RNA[J]. EMBOJ, 1997, 16: 3675-3684.

[9] Hamilton A J, Brown S, Yuanhai H, et al. A transgene with repeated DNA causes high frequency, post-transcriptional suppression of ACC oxidase gene expression in tomato[J]. Plant J, 1998, 15(6): 737-746.

[10] 余义勋, 包满珠. 不同结构的外源 ACC 基因导入香石竹对瓶插寿命的影响[J]. 生物工程学报, 2004, 20(5): 704-707.

[11] 代色平, 包满珠. 矮牵牛育种研究进展[J]. 植物学通报, 2004, 21(4): 385-391.

[12] Robert C S, Michel A H, David G C. Regulation of volatile benzenoid biosynthesis in petunia flowers[J]. TRENDS in Plant Science, 2006, 11(1): 20-25.

[13] Lindstrom J T, Lei C H, Jones M L, et al. Accumulation of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid in petunia pollen is associated with expression of a pollen-specific ACC synthase late in development[J]. Horticulture Building, 1998(2): 1165.

[14] Sambrook J, David W. Russell. Molecular Cloning: A Laboratory Manual[M]. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001: 97-98.

[15] 王天云, 张贵星, 薛乐勋. 一种简便高效的改良降落 PCR[J]. 中国生物工程杂志, 2003, 23(11): 80-82.

[16] 田路明, 黄丛林, 张秀海. 降落 PCR 法快速检测高羊茅转基因植株[J]. 生物技术通报, 2006(3): 85-87.

The Clone of *ACS2* Gene of *Petunia hybrida* and the Construction of Its² Antisense Repetition Expression Vectors

HUANG Feng-lan^{1,2}, XUE Gui-bin³, MENG Fan-juan¹, YAN Xiu-feng¹

(1. College of Life Science, Northeast Forestry University, Harbin, Heilongjiang 150030, China; 2. College of Life Science, Inner Mongolia University for the Nationalities, Tongliao, Inner Mongolia 028000, China; 3. College of Life and Environmental Sciences, Harbin Normal University, Harbin, Heilongjiang 150080, China)

Abstract: Used the method of touch down PCR, the *ACS2* gene was cloned from DNA of *Petunia hybrida*. At the same time, its gene sequence DQ090003 was obtained in GenBank, the antisense repetition of *ACS2* linked the plasmid pBI-121 by use of one step. In the result, the expression vector having antisense repetition gene was constructed.

Key words: *Petunia hybrida*; ACC synthase; Antisense repetition expression vectors; Touch down PCR; One step

不同水果适合不同职业

据研究不同的水果含有的营养成分不同,适合不同职业的人食用。

香蕉缓和紧张情绪。柿子消除体力疲劳。大多数人根据自己的喜好选择水果的种类。但很多人不知道,不同的水果含有的营养成分不同,适合不同职业的人食用。

俄罗斯《共青团真理报》就撰文介绍了一些水果的独特功能。疲惫不堪的体力劳动者多吃些大柿子很有益处。因为疲劳在多数情况下是因为缺血造成的,而柿子里含有很多铁元素,可以刺激血

红蛋白的生成。成熟的大柿子应该是深红色(有些棕色),而且非常软,看样子好像熟过头了一样。橙子可以帮助经常吸入废气的司机排除体内的毒素。

菠萝很适合运动员。它有消炎和消肿的作用,能改善血液循环,促进肌腱炎症和外伤的康复。

香蕉可以使服务员对消费者的态度更好一些——它能缓和紧张的情绪,提高工作效率,降低疲劳。

经常坐在电脑前的白领应该多吃油梨,因为它含丰富的维生素 A、E 和 B₂,对

眼睛有益。

老人和孩子可以多吃一些猕猴桃,因为其维生素 C 的含量是橙子的两倍,可以更好地提高抵抗力,避免感染疾病。

此外,葡萄有祛痰作用,咳嗽的时候可以吃点,但糖尿病患者不宜食用。

芒果含有丰富的胡萝卜素 β 和独一无二的酶,可以令皮肤富有弹性,并且延缓皱纹生成,最适合爱美的女性。

(本刊编辑)