

香蕉果实特异性 ACC 合酶的 cDNA 克隆及序列分析

王新力 彭学贤* 李 宏**

(中国科学院微生物研究所 北京 100080)

摘 要 根据 ACC 合酶高度保守区氨基酸序列设计两种兼并引物。通过 RT-PCR,克隆了香蕉果肉 ACC 合酶 1693bp 的 cDNA 片段。再根据其序列测定结果进行 5'RACE(Rapid amplification of cDNA ends)。最终确定香蕉果肉中 ACC 合酶的 mRNA 全长为 1752 个核苷酸。其中 5'非翻译区 74 个核苷酸,编码区 1461 个核苷酸,3'非翻译区 217 个核苷酸,编码产物为 486 个氨基酸。通过 Northern 杂交分析,证明此 ACC 合酶基因的表达具有果实特异性。

关键词 香蕉果实特异性,ACC 合酶,cDNA

中图分类号 Q78 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3061(2000)02-0134-03

ACC 合酶(EC4.4.1.14)是植物进行乙烯生物合成的关键酶之一。乙烯作为一种气态植物激素参与对植物生长、发育和凋谢等过程的调控,以及对损伤,施用植物生长素及外界胁迫作出反应^[1]。ACC 合酶成为众多课题的研究对象已经在其基因结构、蛋白质结构与功能、催化活性位点和表达调控等方面进行了较深入的研究。

为了研究香蕉果实特异性基因启动子的结构和功能,ACC 合酶在果实中的表达调控,以及探索该启动子在生物反应器中的可利用性,本研究首先克隆了香蕉果实 ACC 合酶的 cDNA,完成了全长 cDNA 序列的测定;通过 RNA 杂交分析,证实其基因的表达具有果实特异性,为进一步克隆其启动子奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 材 料

香蕉(*Musa acuminata*)叶和根取自已经结蕉的香蕉植株;果肉和果皮取自市售香蕉。

1.2 香蕉不同器官总 RNA 的提取

参见文献[2]。

1.3 ACC 合酶 cDNA 的克隆及序列测定

使用 CapFinderTM PCR cDNA 文库构建试剂盒(Clontech 公司产品)中的 MMLV 反转录酶,CDS/3'PCR 引物和 CapSwitchTM寡聚核苷酸,以香蕉果

肉的总 RNA 为模板,合成 cDNA 的第一条链。以单链 cDNA 为模板,分别对 cDNA 的 5'端和 3'端进行 PCR 扩增,即使用 5'CapFinderTM引物和基因特异的 3'引物,或 CDS/3'引物和基因特异的 5'引物进行 PCR 扩增。回收扩增片段。将两种回收片段混合再用 5'CapFinderTM引物和 CDS/3'引物进行扩增。将此次扩增产物与 pGEM-T 载体连接,转化 DH5 α ,获得含 ACC 合酶 cDNA 的克隆 pMACS。用 *Pst*I 和 *Sph*I 双酶切检查插入片段的大小。构建四个亚克隆进行测序。

1.4 ACC 合酶 cDNA 5'端区的克隆和测序

根据测序结果设计并合成基因特异引物 GSP₁和 GSP₂。利用 5'RACE 试剂盒(GibcoBRL 公司产品)按照其说明以香蕉果肉总 RNA 为模板进行扩增。扩增产物与 pBluescript II SK⁺连接,转化 DH5 α 。选出 6 个含有插入片段的克隆进行测序。

1.5 Northern 杂交分析

取香蕉根、叶、果肉和果皮中总 RNA 各 10 μ g 进行 1%琼脂糖凝胶的乙二醛、二甲亚砷变性电泳。用 Hybaid 公司的真空转膜装置将变性 RNA 转到 Zeta-Probe 膜上。然后与³²P 标记的 ACC 合酶的 cDNA 探针(用随机引物法标记)于 65 $^{\circ}$ C 条件下进行杂交。-70 $^{\circ}$ C 放射自显影。最后以标记的 18S rDNA 与已转印到膜上的香蕉总 RNA 进行杂交,以作为检测杂交可靠性的对照。

收稿日期:1999-04-16,修回日期:1999-10-10。

基金项目:中国科学院“九五”重大项目资助课题。

* 联系人。 ** 为北京师范大学硕士研究生。

本文涉及的核苷酸序列已提交 GenBank/EMBL/DBJ 数据库,accession number 为 AF109927。

2 结果与讨论

2.1 香蕉果实表达 ACC 合酶的 cDNA 克隆

根据 ACC 合酶中的两段高度保守区氨基酸序列 FRVCFANM 和 MGLAENQ^[2] 设计合成了用于扩增 ACC 合酶 cDNA 5' 区段和 3' 区段,并反向重叠的两个 PCR 兼并引物。命名为 3' 引物和 5' 引物。

3' 引物:5'-CAT(A/G)TTIGC(A/G)AA(A/G)CAIACIC(G/T)(A/G)AA-3'

5' 引物:5'-ATGGGICTIGCIGA(A/G)AA(T/C)CA-3'

按图 1 所示过程进行 PCR 扩增和 cDNA 克隆。首先以香蕉果肉总 RNA 为模板反转录合成单链 cDNA,再以单链 cDNA 为模板进行两套 PCR 反应。利用 5'CapFinderTM引物与基因特异引物 3' 引物扩增出 ACC 合酶 5' 端区约 1.25kb 的 cDNA 片段;用基因特异引物 5' 引物与 CDS/3' 引物扩增出 3' 端区约 1.5kb 的 cDNA 片段。根据设计 1.25kb 片段与 1.5kb 片段之间应有一段重叠区。因此将这两种片段混合,变性,退火后,将产生不同来源的单链 DNA 3' 端区互补的复性双链 DNA。这种杂合双链 DNA 5' 端突出,通过 Taq DNA 聚合酶将其补齐后则应产生全长 cDNA 片段。再利用 5'CapFinderTM引物和 CDS/3' 引物进一步进行 PCR 扩增,得到一约 1.7kb 的扩增产物。将其克隆到 pGEM-T 载体上,获得了 pMACS 重组质粒。对于 pMACS₃ 用 *Pst*I 和 *Sph*I 双酶切,可切出一约 1.7kb 的片段,见图 2。进一步的测序结果表明:pMACS 中的 cDNA 插入片段长 1693bp。

根据其开放阅读框所推测的氨基酸序列与其它植物 ACC 合酶的比较,相似性变化范围为 45.3% 至 99.0%。Dong 等通过比较来自番茄、苹果和笋瓜果

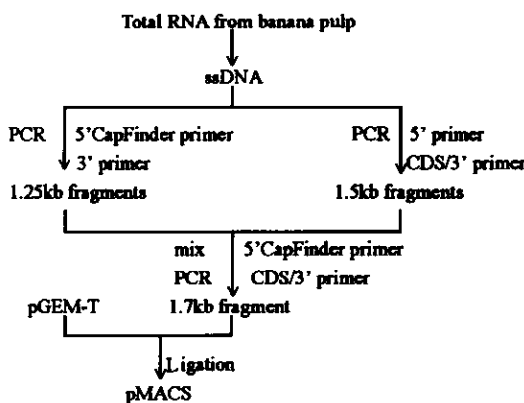


图 1 香蕉果肉 ACC 合酶的 cDNA 克隆

Fig. 1 Cloning of cDNA encoding ACC synthase from banana pulp

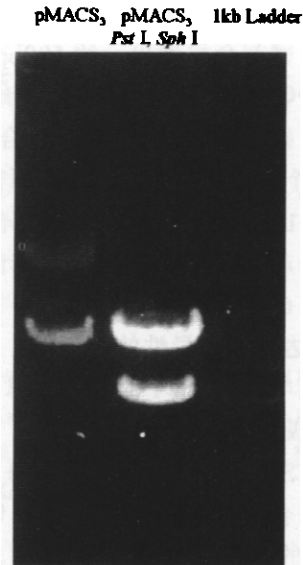


图 2 重组质粒 pMACS₃ 的 *Pst*I-*Sph*I 双酶切结果
Fig. 2 Digestion of the recombinant plasmid pMACS₃ with *Pst*I and *Sph*I

实的 ACC 合酶氨基酸序列认为 ACC 合酶普遍具有 7 个高度保守区^[3]。其中第 5 区被认为是其活性位点区^[4]。但最近分析显示高度保守的只有第 1、2、4、5 和 6 区,而以前所认为的第 3 和 7 区并不十分保守^[5]。根据我们所获得的 ACC 合酶 cDNA 序列所推测的氨基酸序列,同样包含这 7 个高度保守区,但第 3 区 8 个氨基酸中有 2 个与文献[3]报道的不同。这与文献[5]的结论相符。通常认为 ACC 合酶中有 11 个不连续的氨基酸是不变的,在我们获得的 ACC 合酶的推测氨基酸序列中可以找到其中 10 个,但其第 243 位的 Phe 通常为 Tyr,但康乃馨衰老花瓣中 ACC 合酶的相应位置也为 Phe^[6]。综上所述我们认为我们所得到的 cDNA 确实是编码 ACC 合酶的。

以上结果也提出了一个简便、有效地克隆序列未知的某一特定 cDNA 的方法。不需要建立 cDNA 文库,合成基因特异探针,以及杂交筛选等复杂步骤。只要根据特定蛋白质的两个高度保守区氨基酸序列设计兼并引物;扩增出基因特异并相互重叠的两种片段;再利用 3'、5' 端通用引物进行 PCR 扩增就可以从某种生物材料的 cDNA 中获得该蛋白质的 cDNA 克隆。这一方法在克隆特定 cDNA 方面可能具有较普遍的适用性。

2.2 ACC 合酶 cDNA 5' 端区的克隆与测序

为了确定所获得的 ACC 合酶 cDNA 是否为全长,根据上面已测出的 cDNA 序列合成了两个引物: GSP₁:5'-TCATCACGATGCGGTCTG-3'

GSP₂:5'-TGGGTCAAATCTGGCTCG-3'

使用 5'RACE 试剂盒扩增出一约 500bp 的产物。将其克隆测序。与上面的 cDNA 序列相比,5'端长出 59bp。因此可推断香蕉果肉中 ACC 合酶的 mRNA 全长为 1752 个核苷酸,其中 5'非翻译区为 74 个核苷酸,编码区 1461 个核苷酸,3'非翻译区 217 个核苷酸。其编码产物为 486 个氨基酸,计算分子量为 55kD,pI 值为 6.95。

2.3 基因表达器官特异性的鉴定

提取香蕉叶、根、果肉和果皮的总 RNA。变性电泳后,真空吸印于 Zeta-Probe 膜上。以 *Pst*I-*Sph*I 双酶切 pMACS₃ 质粒,分离 ACC 合酶 cDNA 片段,用随机引物法合成标记探针。与已转印 RNA 的膜杂交。图 3A 的放射自显影结果表明,只有香蕉果肉、果皮的 RNA 形成杂交阳性条带,而结蕉植株的根和叶的 RNA 杂交结果均呈阴性。说明该 ACC 合酶基因的表达具有器官特异性,它只在香蕉果实中表达,而在香蕉根和叶中均未有其可检测到的转录物。图 3B 作为对照,证实了上述结果的可靠性。

与 GenBank 中公布的香蕉 ACC 合酶 cDNA 及基因相比较,香蕉果皮 ACC 合酶的 cDNA 序列(Accession number 为 AF080258)与我们所获得的果肉 ACC 合酶 cDNA 全长序列的相似性为 96.3%。其 5'端非编码区比我们的少 32bp,但 3'端非编码区要

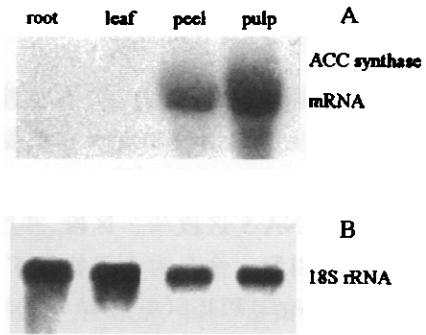


图 3 Northern 杂交放射自显影

Fig. 3 Autoradiogram of Northern hybridization

长 89bp。其编码的氨基酸序列与我们的相似性为 99.0%。另一个香蕉果皮 ACC 合酶的 cDNA 序列(Accession number 为 Y15739)^[7]与我们的相比,相似性为 98.7%。其 5'端非编码区比我们的短 59bp,3'端与我们的一致。其编码的氨基酸序列与我们的相似性为 98.4%。GenBank 中公布的另两个香蕉 ACC 合酶基因(Accession number 为 X96946 和 X96947)的推测氨基酸序列与我们的香蕉果实特异性 ACC 合酶的相比较,其相似性分别为 56.6% 和 57.4%。其中 ACC 合酶基因(X96946)是在香蕉叶和青果皮中表达(私人通信)。这说明香蕉的 ACC 合酶基因也像其它植物一样,是以多基因家族方式^[8]存在的,并且各个基因的表达方式是不同的。

参 考 文 献

- [1] Yang S F, Hoffman N E. *Annu Rev Plant Physiol*, 1984, 35:155~189
- [2] 李宏,王新力等. 植物生理学通讯, 1999, 35(15):384~388
- [3] Dong J G, Kim W T *et al.* *Planta*, 1991, 185:38~45
- [4] Yip W K, Dong J G *et al.* *Proc Nalt Acad Sci USA*, 1990, 87:7930~7934
- [5] Fluhr R, Mattoo A K. *Critical Rev in Plant Sci*, 1996, 15:479~523
- [6] Park K Y, Drory A *et al.* *Plant Mol Bio*, 1992, 18:377~386
- [7] Huang S. *Plant Physiol*, 1998, 116:1192
- [8] Liang X, Abel S *et al.* *Proc Nalt Acad Sci USA*, 1992, 89:11046~11050

Cloning and Sequence of cDNA Encoding ACC Synthase Specifically Expressed in Banana Fruit

WANG Xin-Li PENG Xue-Xian LI Hong

(Institute of Microbiology, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080)

Abstract A cDNA encoding ACC synthase in banana pulp was amplified by RT-PCR and cloned in *E. coli*. The 5' terminal region of the ACC synthase transcript was determined by using 5' RACE procedure. The results showed that the ACC synthase cDNA in banana pulp is 1752 bp in length including 74bp of 5' untranslated region, 1461 bp of coding region which encodes a polypeptide of 486 amino acids and 217 bp of 3' untranslated region. The Northern blot analysis indicates that the ACC synthase mRNA is specifically transcribed in banana fruits.

Key words Banana fruit-specific, ACC synthase, cDNA