

光皮桦 ACC 氧化酶基因 *BLACO* 的克隆和表达分析

周厚君, 黄华宏, 林二培, 程龙军, 彭沙沙, 童再康*

浙江农林大学林业与生物技术学院, 浙江临安 311300

摘要: ACC (1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid)氧化酶(ACO)是植物乙烯合成过程中的关键限速酶, 对乙烯的合成具有重要的调控作用。以光皮桦茎叶组织提取的 RNA 为模板, 据已报道的 ACO 同源序列设计简并引物, 通过 RT-PCR 扩增获得部分基因片段, 结合 5', 3' RACE 方法从光皮桦中扩增出 1 个 ACO 的全长 cDNA 序列。该基因 cDNA 全长 1 262 bp, 具有一个 957 bp 的完整开放阅读框架, 编码含 318 个氨基酸的蛋白。与其他植物中的 ACO 基因进行同源性比对的结果显示, *BLACO* 蛋白与欧洲白桦的同源性最高, 达到 97%。该基因在光皮桦的雄花和雌花中表达量较高, 而在茎中的表达量较低。

关键词: 光皮桦; ACO; 基因克隆; 表达

Cloning and Expression Analysis of ACC Oxidase Gene *BLACO* in *Betula luminifera* H. Winkl.

ZHOU Hou-Jun, HUANG Hua-Hong, LIN Er-Pei, CHENG Long-Jun, PENG Sha-Sha, TONG Zai-Kang*

School of Forestry and Biotechnology, Zhejiang Agricultural & Forestry College, Lin'an, Zhejiang 311300, China

Abstract: 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid oxidase (ACO) is an important rate-limiting enzyme and plays a critical role in regulation of the ethylene biosynthesis. The *BLACO* gene was cloned by RT-PCR and 5', 3' RACE methods, using mRNA template from stem and leaf of *Betula luminifera*, and the designed primers according to the homologous sequences of ACO from other species. Sequence analysis showed that *BLACO* cDNA was 1 262 bp length and contained a single open reading frame encoding a protein of 318 amino acids. The results of homology comparison showed that *BLACO* protein shared a 97% homology with *Betula pendula*. The expression of *BLACO* gene was higher in male flower and female flower of *Betula luminifera*, and lower in stem.

Key words: *Betula luminifera*; ACO; gene clone; expression

众所周知, 植物气体激素乙烯(ethylene)与果实成熟密切相关。研究表明, 乙烯在植物整个生命周期中起着重要作用, 不仅对植物的种子萌发、叶片和花器官发育与衰老、果实成熟等有影响; 同时与逆境胁迫, 如渍水、病原菌入侵等方面有关; 而且还参与植物细胞的程序性死亡、促进花凋谢和 DNA 降解等。

高等植物中乙烯生物合成途径十分清楚 (Bleecker 和 Kende 2000)。前体物质蛋氨酸(2-amino-4-methylmercaptobutyric acid, Met)在腺苷蛋氨酸合成酶的作用下合成 S-腺苷蛋氨酸(S-adenosyl methionine, SAM), 经 ACC 合成酶(ACC synthase, ACS)催化, SAM 转化成 1-氨基环丙烷-1-羧酸(1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid, ACC), 最后在 ACC 氧化酶(ACC oxidase, ACO)的作用下, ACC 转

化为乙烯(Kende 1993)。ACS 和 ACO 是乙烯生物合成过程中 2 个关键的酶(Mathooko 1996)。

ACO 是乙烯生物合成的关键限速酶, 该基因的表达是非组成型的, 其转录水平上的调控可能控制着乙烯的合成速率(Balagué 等 1993)。现已从很多种植物中克隆得到其全长序列(陈银华等 2005; 刘鲜艳等 2008; 张亚丽等 2008; 周琳和董丽 2008; Callahan 等 1992; McGarvey 和 Christoffersen 1992; Lasserre 等 1996), 对 ACO 基因的研究也取得了一定的进展。而且在番茄中又发现了 3 个与受伤、花器发育、叶片和花朵衰老以及果实成熟相关的

收稿 2010-04-12 修定 2010-07-07

资助 浙江省重大科技专项(2008C02004-1)和浙江省林业科技重点项目(2006SY01)。

* 通讯作者(E-mail: zktong@zjfc.edu.cn; Tel: 0571-63732746)。

*ACO*基因(Holdsworth等1987; Barry等1996; Blume等1997; Nakatsuka等1998; Llop-Tous等2000)。

光皮桦是一种材质优良的珍贵用材树种,在我国南方广泛分布。*ACO*基因作为乙烯生物合成中重要的酶基因,而且又与逆境胁迫和花器官发育相关,克隆*ACO*基因对于研究其在光皮桦生长过程中的作用打下基础,同时对研究光皮桦逆境条件下的基因表达和调控,以及花器官发育等都具有重要意义。

材料与amp;方法

光皮桦(*Betula luminifera* H. Winkl.)材料取自于浙江农林大学光皮桦良种繁育中心苗圃,取茎叶组织作为mRNA提取材料。

克隆用大肠杆菌*Escherichia coli* 5 α 为本实验室保存; T4 DNA连接酶、Taq DNA聚合酶、克隆载体pGEM-T Easy Vector为Promega公司产品; RT-PCR试剂盒为Invitrogen公司产品; 引物由南京金斯瑞生物工程技术服务有限公司合成; RACE试剂盒为ClonTech产品。

光皮桦茎叶组织mRNA提取采用改进的CTAB法(侯夫云等2008)。称取150 mg样品,在液氮中研成粉末转入到65℃水浴的700 μ L CTAB (2%)提取液中,充分混匀。65℃水浴20 min后冷却至室温。加等体积(700 μ L)氯仿:异戊醇(24:1),混匀,4℃下以10 000 \times g离心10 min。小心吸取上清液,重复上述步骤,直至中间层无白色絮状沉淀。吸取上清液,加1/4体积的LiCl (10 mol \cdot L⁻¹),混匀后于4℃沉淀过夜,然后10 000 \times g离心20 min。弃上清,加入500 μ L SSTE (1 mol \cdot L⁻¹ NaCl; 0.5% SDS; 1 mmol \cdot L⁻¹ EDTA, pH 8.0; 10 mmol \cdot L⁻¹ Tris-HCl, pH 8.0)溶解沉淀,加入等体积的氯仿:异戊醇(24:1),混匀,4℃下10 000 \times g离心10 min; 取上清,加入2倍体积无水乙醇-70℃沉淀至少30 min,或-20℃沉淀2 h。4℃下12 000 \times g离心20 min。弃上清,75%的乙醇洗涤2次,吹干沉淀,30 μ L DEPC处理的水溶解沉淀,得到RNA样品。

本实验对从GenBank数据库获得的*ACO*基因的编码序列通过Vector NTI 9.0软件模块AlignX (Informax, Invitrogen)做多序列比对,根据序列保守性,设计基因保守区的RT-PCR引物ACO-U和ACO-L,序列分别为ACO-U: 5' TGGTGAAYCATGG-GATWTCTC 3'和ACO-L: 5' TTKRCCATCCTT-AGAAGCTG 3'。比对的*ACO*基因编码序列: 欧洲白桦(*Betula pendula*)登录号Y10749; 棉花(*Gossypium hirsutum*)登录号DQ116442; 桃(*Prunus persica*)登录号AF129074。

cDNA的合成及PCR扩增均参照试剂盒说明书步骤进行。获得的片段以T载体法克隆PCR产物,阳性克隆送南京金斯瑞生物工程技术服务有限公司测序。测序结果经BLAST检索序列数据库,确定所克隆序列为光皮桦*ACO*基因编码序列。

根据RT-PCR片段的序列测定结果,合成*ACO*特异引物GSP1和GSP2,分别用于克隆cDNA的5'和3'端序列。引物序列分别为ACO-GSP1: 5' CT-TGCCACCATGTCCTTGAAC 3'和ACO-GSP2: 5' CTACCCTCCTTGCCCCAAACC 3'。

5' RACE和3' RACE具体步骤均按SMARTTM RACE cDNA Amplification Kit (ClonTech)的说明书进行,PCR产物回收后经T载体克隆、测序,并与已克隆的*ACO*基因编码区拼接,从而获得全长cDNA序列。以拼接得到的*ACO*全长cDNA设计引物,再经PCR扩增,凝胶电泳分析、测序,验证所获基因全长的准确性。据*ACO*全长cDNA设计的引物序列为: ACO-U': 5' TAGTGAGAGTAAG-AGAGGTAG 3'和ACO-L': 5' CTCACTCAAC-AAAGAAACAGC 3'。

用<http://srs.ebi.ac.uk/srsbin/cgi-bin/wgetz?page+applSelect>中Nucleic Tools分析推测*ACO*基因编码蛋白质的氨基酸组成。用ProtParam tool (<http://www.expasy.org/tools/protparam.html>)工具推测其分子量和等电点(pI)。利用蛋白质保守结构域推测工具SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de>)分析*ACO*的结构域,并用SignalP (<http://www.cbs>

dtu.dk/services/SignalP)软件对其N端进行分析。同时用ExPASy的HNN (http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_nn.html)预测其二级结构进行,用MODWEB (<https://modbase.compbio.ucsf.edu/scgi/modweb.cgi>)预测其三级结构。

分析光皮桦ACO与其他植物中同源蛋白序列的同源性时,在NCBI上用其BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>)分别将光皮桦的ACO蛋白质序列与其他植物的ACO蛋白质序列进行同源性比对。同时用AlignX软件对不同植物的ACO蛋白质序列与光皮桦ACO蛋白质序列进行多重序列比对,并用MEGA3 (Kumar等2004)软件构建不同植物的ACO基因进化树,分析进化关系。

对光皮桦ACO基因进行不同组织的表达分析时,分别用上述方法提取光皮桦雄花、雌花、叶、芽、茎组织中的RNA,反转录成cDNA。以ACO的cDNA为模板设计半定量引物,对该基因的组织表达特异性进行分析。半定量PCR扩增产物用1%的琼脂糖凝胶进行电泳分析。半定量RT引物序列分别为Actin-RT-U: 5' GCTCAACCATG-TTCCCTGGTATTG 3', Actin-RT-L: 5' GATAATG-CAACCCGAGGAAGGACT 3', ACO-RT-U: 5' TGGA-GAAAGAAGCTGAGAAAGGC 3'和ACO-RT-L: 5' CAAAGCACAGCTAAACCACAAGC 3'。

结果与讨论

1 光皮桦ACO基因的克隆与分析

以ACO的序列保守区域设计简并引物ACO-U和ACO-L,经过RT-PCR扩增,获得一个约500 bp的产物,连接到T载体且转化DH5 α 后,挑取阳性克隆测序。测序结果用NCBI的BLAST程序检索数据库,显示该序列与欧洲白桦、棉花、桃的同源性都达到90%以上,尤其与欧洲白桦的序列同源性最高,达到96%。确定该片段为光皮桦的ACO基因片段。用该序列设计5' RACE特异引物ACO-GSP1和3' RACE特异引物ACO-GSP2,分别用于基因5'端和3'端序列的扩增。5'和3' RACE克隆产

物测序结果表明,5'和3'端序列与获得的光皮桦ACO基因编码序列有重叠,为ACO基因mRNA的5'和3'端序列。经拼接,得到光皮桦ACO基因完整的cDNA序列,共1262 bp,GenBank登录号为HM357150。该基因全长扩增(图1)和测序结果验证了该基因的准确性。

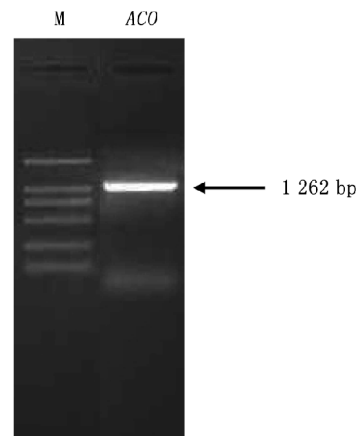


图1 光皮桦ACO全长cDNA RT-PCR产物的琼脂糖电泳图谱

Fig.1 Agrose gel electropherogram of RT-PCR product of ACO full-length cDNA in *B. lumifera*

M: DL2000, 条带由大到小分别为2000, 1000, 750, 500, 250和100 bp。

2 光皮桦ACO基因编码蛋白质的分析

光皮桦ACO基因全长cDNA序列含有1个957 bp的完整开放阅读框,编码318个氨基酸(图2),预测其分子量为35.8379 kDa,等电点pI为5.03。保守结构域分析结果显示,该蛋白含有一个2OG-FeII_Oxy结构域。SignalP软件分析该蛋白为非分泌蛋白,不具有信号肽结构。其二级结构(图3)存在12个螺旋区(helix)和13个折叠区域(sheet),其余部位均为无规则卷曲(coil)。预测的三级结构(图4)通过Swiss-pdbViewer 4.0.1软件显示。

3 不同物种间ACO基因的同源性分析

BLAST显示,在核苷酸水平上,光皮桦ACO基因与桦木科的欧洲白桦(Y10749)、桃(AF129074)、棉花(DQ116442)的相似性高达96%、85%和

CTGTCCCTGAAGACCCTAGTGAGAGTAAGAGAGGTAGAAGAAAGAAAAGAGAGAATGGCA
 M A
 ACTTTCCCAGTTATTGACATGGAGAAGCTTAATGGTGAAGAGAGAGGAGAAACCATGGAA
 T F P V I D M E K L N G E E R G E T M E
 TTGATAGAAGATGCCTGTGAGAAGCTGGGGCTTCTTTGAGCTGGTGAATCATGGGATTTCT
 L I E D A C E N W G F F E L V N H G I S
 CATGATTTGTTGGACACAGTGGAGAAGCTGAATAAGGAGCATTACAGGAAGTGTATGGAG
 H D L L D T V E K L N K E H Y R K C M E
 GAAAGGTTCAAGGACATGGTGGCAAGTAAGGGTCTAGAGGCTGCTCAGTCCGAAGTCACT
 E R F K D M V A S K G L E A A Q S E V S
 GACATGGACTGGGAAAGCACCTTCTTCTGCGCCACCTCCGGCCTCCAACATTTCTGAA
 D M D W E S T F F L R H L P A S N I S E
 ATCCCTGATCTTGATGAAGATTATAGGAAGGCAATGAAGGAATTTGCAGAGGATTTAGAG
 I P D L D E D Y R K A M K E F A E D L E
 AAACTGGCTGAGCAACTATTGGACCTGCTGTGAGAATCTTGGGCTGGAGAAAGGATAC
 K L A E Q L L D L L C E N L G L E K G Y
 CTGAAGAAGTCCTTTTATGGGTCCAAAGGTCCAAATTTTGGCACCAAGGTCAGCAGCTAC
 L K K S F Y G S K G P N F G T K V S S Y
CCTCCTTGCCCCAAACCAGAGCTCATCCAGGGCCTCCGCGCCACACCCGACGCCGGCGGC
 P P C P K P E L I Q G L R A H T D A G G
CTCATCCTTCTCTTCCAAGATGACAAGTCAAGTGGACTCCAGCTTCTCAAGGATGGCAAA
 L I L L F Q D D K V S G L Q L L K D G K
TGGGTTGATGTTCCCCCAATGCGCCACTCCATGTGCATCAACCTTGGTGACCAACTTGAG
 W V D V P P M R H S I V I N L G D Q L E
GTCATTACCAATGGCAAGTACAAGAGTGTGCTGCACCGTGTGCTTGCTCAACCAGACGGT
 V I T N G K Y K S V L H R V L A Q P D G
AACAGAATGTCCTTAGCATCATTCTACAACCCCGGCAGTGTGATGCCGTTATCTATCCGGCA
 N R M S L A S F Y N P G S D A V I Y P A
 CCAGCATTGGTGGAGAAAGAAGCTGAGAAAGGCCAAGTGTACCCGAAGTTTGTTCGAA
 P A L V E K E A E K G Q V Y P K F V F E
 GACTATATGAAGCTCTACGCCGGCCTGAAGTCCAGGCCAAGGAGCCAAGGTTTGAAGCC
 D Y M K L Y A G L K F Q A K E P R F E A
 ATGAAGGCCACGGAGTCTACCGTTAAGTTGGGTCCATTTGCCACTGCCTGAGTCACCACC
 M K A T E S T V K L G P I A T A *
 TCTCATGCATGACACAGAGGAAATGGATTTTATGTCAGTGTCTGTGTATAATCATAGT
 CCTAGCTATTTGAGTCTTGCTGTTTCTTTGTTGAGTGAGTTTTAAGCTTGTGGTTTAGCT
 GTGCTTTGGCTATACGCTTCTTCAATAGTTCCTGTGGTGTATGTATTTGCTGCTGCTGT
 TTATCAGATGTACTGTTAGAAATGACTTGTCCCTTTTGGAGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
 AA

图2 光皮桦 *ACO* 基因的 cDNA 序列及其推测的氨基酸序列

Fig.2 cDNA sequence of *ACO* gene and its deduced protein in *B. luminifera*

用 * 号标出的为终止密码子, 下划线处碱基编码 2OG-FeII_Oxy 结构域。

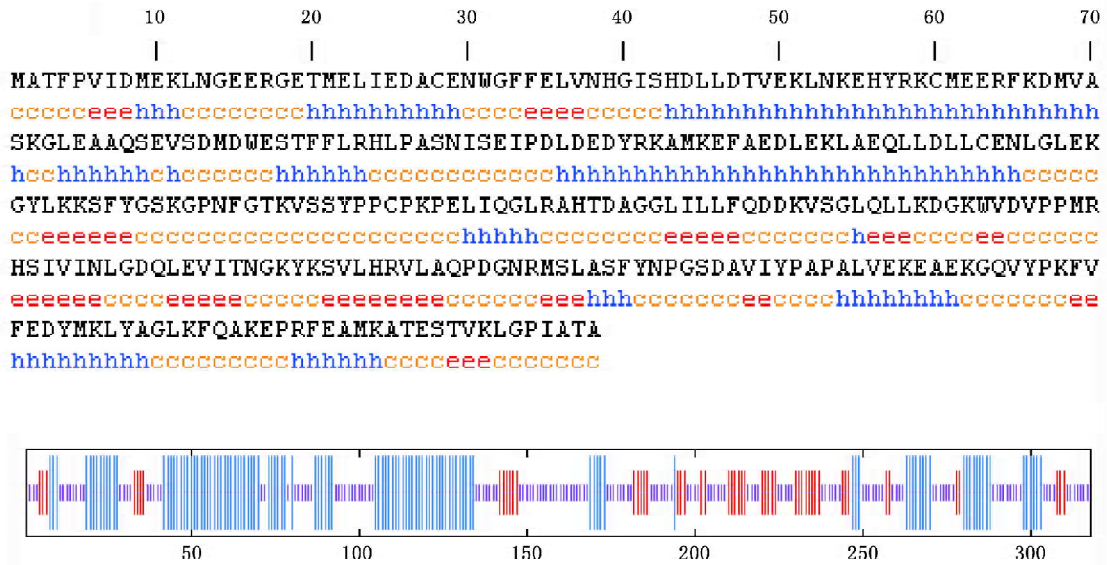


图3 光皮桦 ACO 蛋白二级结构
Fig.3 Secondary structure of ACO protein in *B. luminifera*

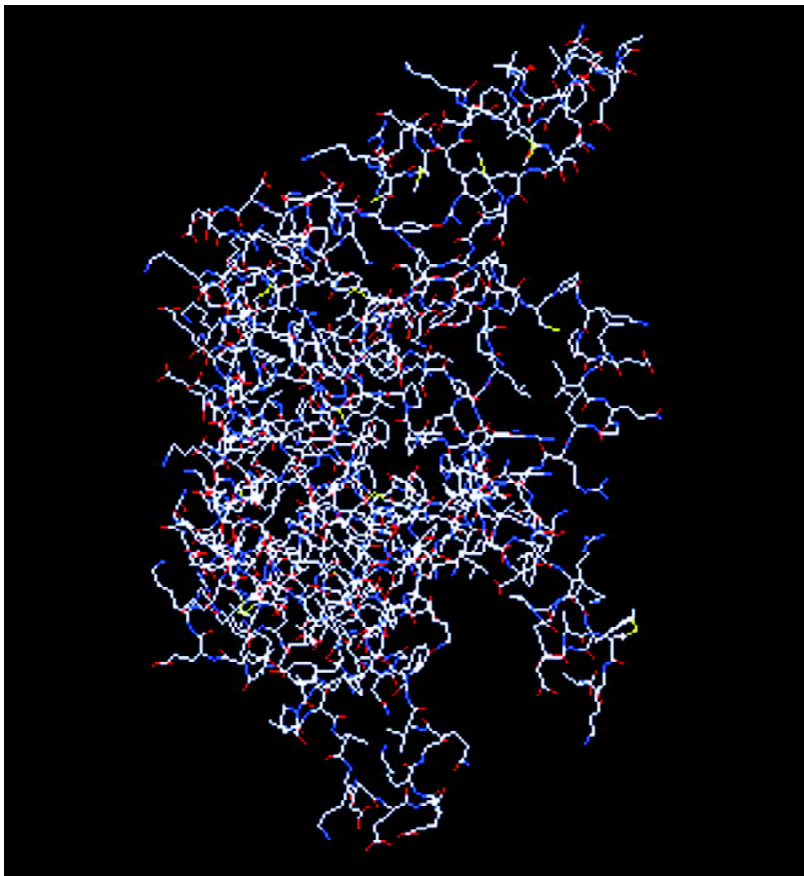


图4 光皮桦 ACO 蛋白三级结构
Fig.4 Tertiary structure of ACO protein in *B. luminifera*

81%。对不同植物中已克隆到的ACO蛋白进行多序列比对,其氨基酸序列的同源性也是与欧洲白桦(CAA71738)的最高,为97%,棉花(AAZ83342)为85%,番木瓜(*Carica papaya*, AAC98808)为84%(图5)。

用MEGA3软件的邻接法(neighbor-joining, NJ)构建不同植物ACO蛋白的系统发育树。从构建的发育树中可以看出,同属桦木科的欧洲白桦和光皮桦亲缘关系最近,烟草与柿树的亲缘关系比较近,而毛果杨与棉花的亲缘关系较近(图6)。

4 光皮桦不同器官中ACO基因的表达分析

半定量RT-PCR分析结果表明,光皮桦ACO基因在雄花、雌花、叶、芽、茎中均有表达,以雄花和雌花中表达量较高,茎中表达量较低(图7)。雄花和雌花作为内轮花器官,可能是导致ACO基因在其中表达量相对较高的重要原因。另一方面,雄花形成于头年7月份,而采集的雄花材料已处于休眠末期,相对于幼嫩的雌花和幼嫩的叶、芽、茎组织而言,其表达量也会表现相对较高。

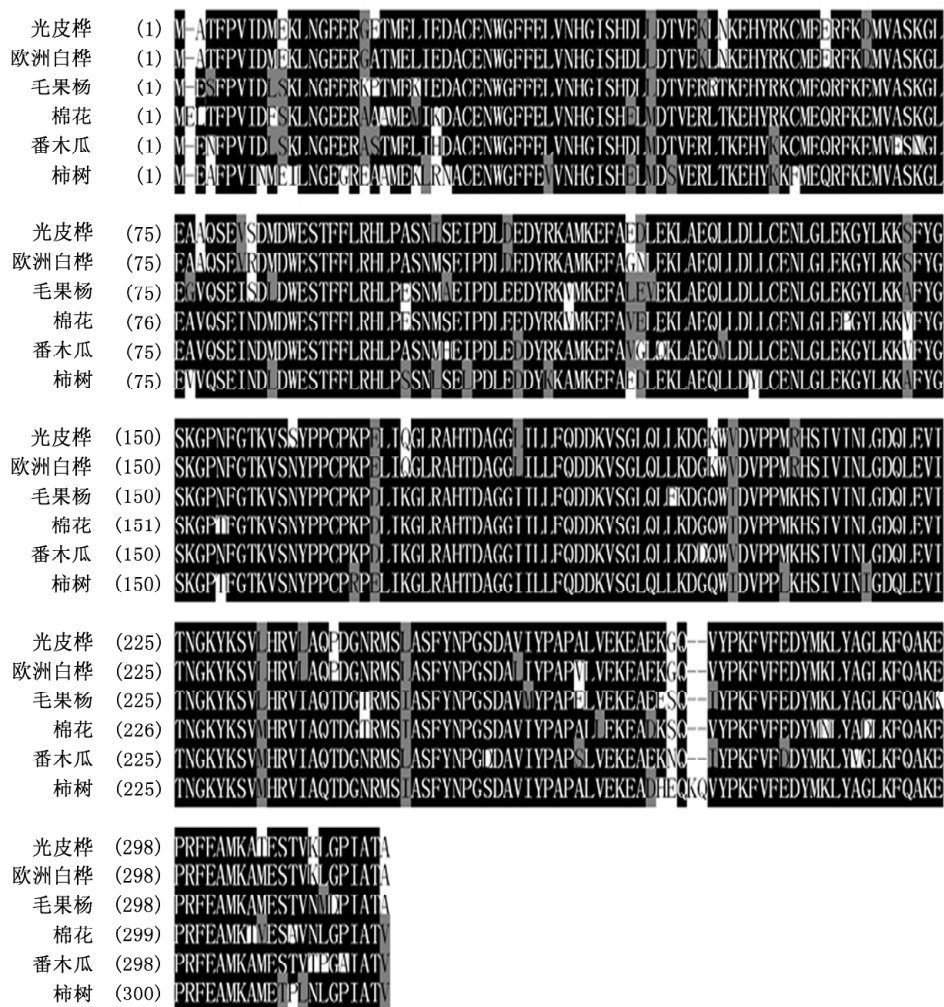


图5 光皮桦 ACO 蛋白序列及其他植物同源蛋白序列的比对

Fig.5 Comparison of ACO in *B. luminifera* and its homologous proteins from other plants

欧洲白桦(*Betula pendula*, CAA71738)、毛果杨(*Populus trichocarpa*, XP_002316589)、棉花(*Gossypium hirsutum*, AAZ83342)、番木瓜(*Carica papaya*, AAC98808)、柿树(*Diospyros kaki*, BAB89352)。

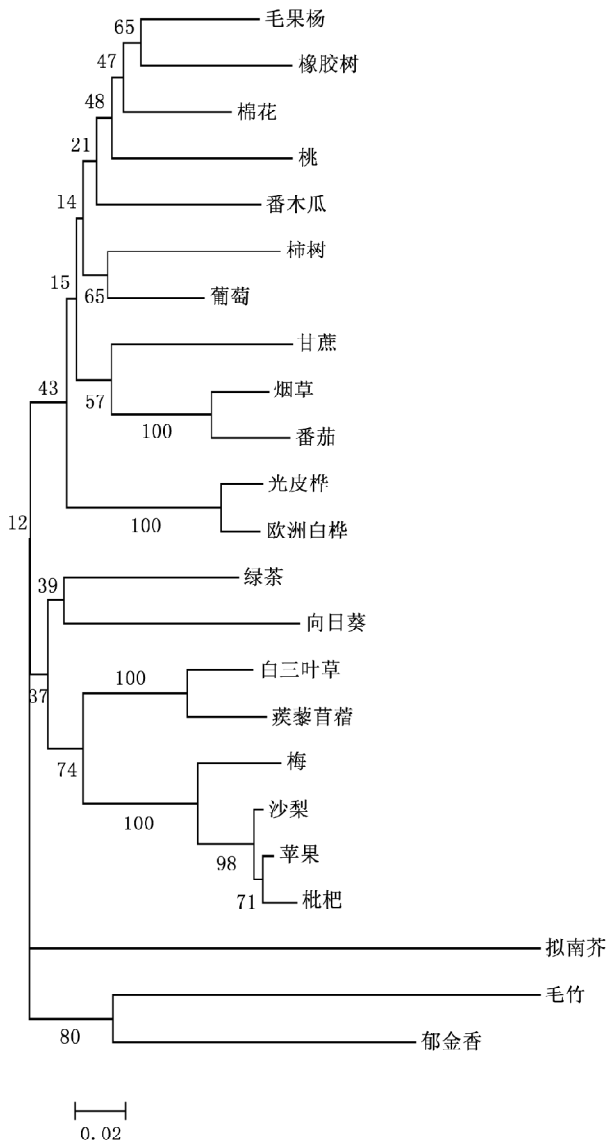


图6 植物ACO蛋白的系统发育树

Fig.6 Phylogenetic tree of ACO protein in different plants

欧洲白桦(*Betula pendula*, CAA71738)、毛果杨(*Populus trichocarpa*, XP_002316589)、棉花(*Gossypium hirsutum*, AAZ83342)、番木瓜(*Carica papaya*, AAC98808)、柿树(*Diospyros kaki*, BAB89352)、烟草(*Nicotiana tabacum*, CAA58232)、拟南芥(*Arabidopsis thaliana*, NP_172665)、葡萄(*Vitis vinifera*, XP_002273430)、桃(*Prunus persica*, AAF36484)、番茄(*Solanum lycopersicum*, ABP68407)、苹果(*Malus x domestica*, BAC53656)、白三叶草(*Trifolium repens*, AAD28197)、沙梨(*Pyrus pyrifolia*, BAD61000)、枇杷(*Eriobotrya japonica*, ACU82854)、蒺藜苜蓿(*Medicago truncatula*, AAL35971)、梅(*Prunus mume*, BAA90550)、甘蔗(*Ipomoea nil*, ABL67954)、毛竹(*Phyllostachys pubescens*, BAB32502)、绿茶(*Camellia sinensis*, ABI33224)、向日葵(*Helianthus annuus*, AAB71421)、郁金香(*Tulipa gesneriana*, BAE20195)、橡胶树(*Hevea brasiliensis*, CAN85569)。

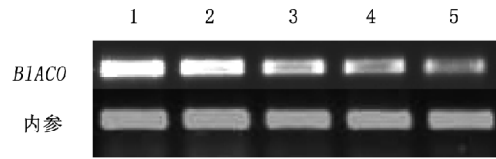


图7 光皮桦 ACO 基因在雄花、雌花、叶、芽、茎中的表达分析

Fig.7 Analysis of ACO gene expression in male flower, female flower, leaf, bud and stem in *B. luminifera*

1: 雄花; 2: 雌花; 3: 叶; 4: 芽; 5: 茎。

参考文献

- 陈银华, 张俊红, 欧阳波, 李汉霞, 叶志彪(2005). 花椰菜 ACC 氧化酶基因的克隆及其 RNAi 对内源基因表达的抑制作用. 遗传学报, 32: 764~769
- 侯夫云, 赵兵, 赵宝杰, 王庆美, 李爱贤, 张海燕, 董顺旭, 张立明 (2008). 利用改良的 CTAB-LiCl 法提取甘薯块根 RNA. 山东农业科学, 9: 90~92
- 刘鲜艳, 刘雅莉, 王跃进, 张宗勤(2008). 百合 ACC 氧化酶基因全长 cDNA 的克隆及序列分析. 西北植物学报, 28: 651~656
- 张亚丽, 乔小燕, 陈亮(2008). 茶树 ACC 氧化酶基因全长 cDNA 的克隆与表达分析. 茶叶科学, 28: 459~467
- 周琳, 董丽(2008). 牡丹 ACC 氧化酶基因 cDNA 克隆及全序列分析. 园艺学报, 35: 891~894
- Balagué C, Watson CF, Turner AJ, Rouge P, Picton S, Pech JC, Grierson D (1993). Isolation of a ripening and wound-induced cDNA from *Cucumis melo* L. encoding a protein with homology to the ethylene-forming enzyme. Eur J Biochem, 212: 27~34
- Barry CS, Blume B, Bouzayen M, Cooper W, Hamilton AJ, Grierson D (1996). Differential expression of the 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase gene family of tomato. Plant J, 9: 525~535
- Bleecker AB, Kende H (2000). Ethylene: a gaseous signal molecule in plants. Annu Rev Cell Dev Biol, 16: 1~18
- Blume B, Barry CS, Hamilton AJ, Bouzayen M, Grierson D (1997). Identification of transposon-like elements in non-coding regions of tomato ACC oxidase genes. Mol Gen Genet, 254: 297~303
- Callahan AM, Morgens PH, Wright P, Nichols KE Jr (1992). Comparison of Pch313 (pTOM13 homolog) RNA accumulation during fruit softening and wounding of two phenotypically different peach cultivars. Plant Physiol, 100: 482~488
- Holdsworth MJ, Bird CR, Ray J, Schuch W, Grierson D (1987). Structure and expression of an ethylene-related mRNA from tomato. Nucleic Acids Res, 15: 731~739
- Kende H (1993). Ethylene biosynthesis. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol, 44: 283~307

- Kumar S, Tamura K, Nei M (2004). MEGA3: integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. *Brief Bioinform*, 5: 150~163
- Lasserre E, Bouquin T, Hernandez JA, Bull J, Pech JC, Balagué C (1996). Structure and expression of three genes encoding ACC oxidase homologs from melon (*Cucumis melo* L.). *Mol Gen Genet*, 251: 81~90
- Llop-Tous I, Barry CS, Grierson D (2000). Regulation of ethylene biosynthesis in response to pollination in tomato flowers. *Plant Physiol*, 123: 971~978
- Mathooko FM (1996). Regulation of ethylene biosynthesis in higher plants by carbon dioxide. *Postharvest Biol Tec*, 7: 1~26
- McGarvey DJ, Christoffersen RE (1992). Characterization and kinetic parameters of ethylene-forming enzyme from avocado fruit. *J Biol Chem*, 267: 5964~5967
- Nakatsuka A, Murachi S, Okunishi H, Shiomi S, Nakano R, Kubo Y, Inaba A (1998). 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. *Plant Physiol*, 118: 1295~1305