

ACC 氧化酶 cDNA 克隆及其对美洲黑杨体内乙烯产生的反义抑制*

李明亮¹⁾ 韩一凡¹⁾ 李玲¹⁾ 田颖川²⁾ 李凝³⁾ 王世绩¹⁾

(1) 中国林业科学研究院林业研究所, 100091, 北京; 2) 中国科学院微生物研究所, 100080, 北京;
3) 香港科技大学生物学系, 香港; 第一作者 41 岁, 男, 副教授)

摘要 利用 RT-PCR 技术克隆了番茄 ACC 氧化酶基因 LEETHYBR 编码区 0.9 kb 的 cDNA 片段, 经酶切图谱分析和序列分析鉴定后, 反向插入到植物表达载体 pBin438 中, 构建了表达 ACC 氧化酶反义 RNA 的二元载体。用农杆菌侵染美洲黑杨叶片, 在含卡那霉素的 MS 培养基上选择转化子和植株再生, 通过 PCR 检测筛选到 16 株转基因杨树植株, Southern blot 分析初步确证了外源基因是以单拷贝插入到杨树基因组中; 对杨树幼苗乙烯释放量的测定结果表明转基因杨树的乙烯释放量为对照植株的 28%。

关键词 ACC(1-aminocyclopropane-1-carboxylate) 氧化酶; 基因; 反义 RNA; 美洲黑杨
分类号 S718.43

乙烯是 5 大类植物激素之一, 在植物的成熟、衰老和器官脱落过程中起着十分重要的调节作用^[1~5]。80 年代初 Yang 等^[6]阐明了乙烯生物合成途径, 认为催化 SAM(S-腺苷-L-蛋氨酸) 向 ACC 转化的 ACC 合成酶和催化 ACC 氧化生成乙烯的 ACC 氧化酶是植物体内乙烯合成的 2 个关键酶。至今已经有许多学者从不同植物中克隆得到了 ACC 氧化酶 cDNA^[7~10]。由于乙烯对植物的成熟、衰老和器官的脱落有重要的调节作用, 因而通过控制乙烯合成或其信号传递途径来延缓植物衰老、果实成熟和器官脱落, 这一直是植物生理学家的研究课题之一。近年来发展起来的反义 RNA 技术给这项研究带来了希望。耐贮藏转反义基因番茄植株的培育成功^[11], 标志着利用反义 RNA 技术控制乙烯的生物合成是一条切实可行而且快速有效的育种途径。在国内, 也有将 ACC 合酶反义基因导入番茄获得了转基因植株并成功地抑制了番茄果实成熟的报道^[12]。但迄今为止, 尚未见到转 ACC 氧化酶反义基因木本植物以及对其生长发育影响的报道。杨树是我国的主要造林树种之一, 具有早期速生、实用性强、分布广、容易改良遗传性和容易进行无性繁殖, 适用于集约栽培, 并且基因组较小, 是研究树木生理和利用基因工程方法进行遗传性状改良的理想木本模式植物^[13, 14]。作者根据 Holdsworth 等^[15]报道的 ACC 氧化酶基因序列, 利用 RT-PCR 技术克隆了 1 个番茄 ACC 氧化酶基因, 并通过农杆菌途径转化美洲黑杨外植体获得了表达 ACC 氧化酶反义 RNA 的转基因植株, 进而获得了抑制乙

* 本文为国家自然科学基金项目(1996~1998 年)“反义 ACC 合成酶和 ACC 氧化酶基因对杨树生长发育的影响”(编号 39500119)的部分成果。王贵禧副研究员在乙烯释放量测定过程中提供了实验条件和热情的指导, 特致谢意。
1998-08-18 收稿。

烯生物合成的转反义基因杨树。

1 材料与方法

1.1 材料

美洲黑杨(*Populus deltoides* Bartr.) 组培苗来自中国林业科学研究院林业研究所分子遗传实验室。T-载体 pGEM^R-T 为 Promega 公司产品。pBin438 由中国科学院微生物研究所田颖川研究员提供。限制性内切酶及各种修饰酶为 Parkin Elma、Promega、Boehringer Mannheim 公司的产品。cDNA 合成试剂盒、随机引物 DNA、标记试剂盒购自 Boehringer Mannheim 公司。T7 DNA Sequencing Kit 购自 Pharmacia 公司。Taq DNA 聚合酶购自上海生物工程公司。同位素 α -³⁵S-dATP、 α -³²P-dCTP 为美国 NET 公司的产品。Zeta-probe 杂交膜购自 Bio-Rad 公司。无 RNase 的 DNase 购自 Promega 公司。所用引物系根据 Holdsworth 等^[15]已报道的 ACC 氧化酶基因序列在基因的 5 和 3 区分别设计 2 个特异引物, 它们分别是:

正链引物 ACO₁(P₁): 5—TACTCTAGAATGGATATCTTCCCAATTATCAACTTGG;

负链引物 ACO₂(P₂): 5—ACTGGATCCAGCACTTGCAATTTGATCAACTAATTC。

1.2 实验方法

1.2.1 ACC 氧化酶 cDNA 的克隆 用伤害和外源乙烯(王贵禧副研究员提供)处理番茄(*Lycopersicon esculentum* L.)果实, 参照 Sambrook 等方法^[16]从番茄果实心皮组织中提取总 RNA, 根据 cDNA 合成试剂盒推荐的条件在 20 μ L 反应体系中合成 cDNA 第 1 条链, 从中取 2 μ L 加到 50 μ L PCR 反应体系中以 P₁ 和 P₂ 为引物进行扩增, 反应条件为: (1) 94 $^{\circ}$ C 预变性 3 min; (2) 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 60 $^{\circ}$ C 退火 1 min, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 共进行 30 个循环; (3) 72 $^{\circ}$ C 补平 5 min。PCR 产物经 0.8% 琼脂糖凝胶电泳、回收片段后, 直接连到 T-载体 pGEM^R-T 上获得 pGACO, 然后对 pGACO 进行酶谱分析, 再用双脱氧法测定所克隆的 DNA 序列。

1.2.2 表达 ACC 氧化酶反义 RNA 的二元载体的构建 将 pGACO 用 BamH1 和 XbaI 完全酶切, 电泳后回收 0.9 kb 的片段, 然后与用 BamH1 和 XbaI 酶切的 pBin438 连接, 获得反向插入质粒 pBin438 的 pBACO 后转化大肠杆菌(*Escherichia coli* (Migula) Castellani and Chalmers) DH5 α 得到 pBACO 克隆。转化土壤农杆菌(*Agrobacterium* sp.) LBA4404 获得了 pBACO 的农杆菌转化子 pBACO/LBA 4404。

1.2.3 美洲黑杨的转化和植株的再生 采用叶盘法将 pBACO/LBA 4404 转化美洲黑杨叶片, 在含卡那霉素的 MS 培养基上选择转化子并培养再生植株^[17]。

1.2.4 转反义基因杨树植株的 PCR 检测及 Southern blot 分析 PCR 检测: 用 CTAB 法^[18]提取再生美洲黑杨植株叶片 DNA, 并以此为模板(100 ng DNA)在 20 μ L 反应体系中进行 PCR 反应; Southern blot 分析: 10 μ g 美洲黑杨叶片 DNA 经酶切后在 0.8% 琼脂糖凝胶上电泳分离, 用 Hybaid 公司的真空转膜装置将 DNA 转到 Zeta-probe 膜上, 然后与 α -³²P 标记的 ACO 基因探针(0.9 kb)65 杂交过夜。

1.2.5 ACC 氧化酶反义 RNA 表达的检测 用化钽密度梯度离心法提取转基因美洲黑杨植株叶片总 RNA, 经无 RNase 的 DNase 处理除去 DNA, 按 Gibco BRL 公司 SuperScript TM cDNA 合成试剂盒推荐的条件以 P₁ 为引物, 在 20 μ L 反应体系中合成 cDNA 第 1 条链, 经 RNase H 处理取 2 μ L 在 50 μ L 反应体系中以 P₁ 和 P₂ 为引物进行 PCR 扩增, 反应条件同

方法 1.2.1 节所述。RT-PCR 产物经琼脂糖电泳、染色后观察结果。

1.2.6 转反义基因美洲黑杨乙烯释放量的测定 各取 5 g 美洲黑杨幼苗地上部放入三角烧瓶中,以橡皮塞密封瓶口,置于 25 ℃ 下培育 2 d 后用注射器从瓶内取 1 mL 气体注入 103 型气相色谱仪(上海分析仪器厂),检测乙烯含量并与标准乙烯对比计算其幼苗的乙烯释放量,以 $\mu\text{L} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ 表示。

2 结果与分析

2.1 ACC 氧化酶 cDNA 的鉴定

按方法 1.2.1 节中所述合成了番茄的 cDNA,以此 cDNA 为模板用上述 ACC 氧化酶基因特异引物(P₁ 和 P₂) 通过 PCR 扩增得到了 0.9 kb 左右的 DNA 片段,将此片段插入 T-载体 pGEM^R-T 获得了重组质粒 pGACO(图 1)。经 DNA 序列分析读出的该 DNA 片段全序列与 Holdsworth 等^[15]发表的序列相应部分完全一致(资料略)。

2.2 pBACO 植物表达载体的鉴定

用 BamH1 和 Xba1 完全酶切 pGACO 分离到 0.9 kb 的 ACO 片段后与经 BamH1 和 Xba1 完全酶切的二元载体 pBin438 连接,即得到表达 ACC 氧化酶反义 RNA 的二元载体 pBACO,用 HindIII 和 BamH1 酶切 pBACO 质粒,得到了预期的片段,证明 ACC 氧化酶基因已插入到二元载体 pBin438 中,并且与 35S 启动子的方向是相反的。将 pBACO 质粒转化农杆菌 LBA4404 获得了 pBACO 的农杆菌转化子 pBACO/LBA4404,再提取 pBACO 质粒经酶切后在琼脂糖凝胶上电泳,确证该质粒正确无误。

2.3 ACC 氧化酶反义基因转基因杨树植株的鉴定

通过农杆菌介导转化美洲黑杨叶片获得再生植株后,利用 PCR 快速检测获得 16 株有外源 ACC 氧化酶反义基因插入的转基因植株。而对照植株未扩增出任何片段(图 2)。初步证明这些植株中有外源 ACC 氧化酶反义基因插入;为了最终证实 ACC 氧化酶反义基因在杨树基因组 DNA 中的整合,对植株的基因组 DNA 进行了 Southern blot 分析,结果(图 3)表明转基因植株 DNA 的 HindIII 酶切产物与 ACC 氧化酶基因探针可产生 4.5 kb 和 5.5 kb 的 2

条杂交带,而非转基因植株只有 1 条 5.5 kb 的杂交带出现。说明 4.5 kb 这条杂交带为插入的外源 ACC 氧化酶反义基因片段。这一结果不但说明外源 ACC 氧化酶反义基因已整合到杨树基因组 DNA 中,而且初步表明只有 1 个拷贝的插入。

2.4 ACC 氧化酶反义 RNA 在转基因杨树植株中的表达

为了证实 ACC 氧化酶反义基因在转基因杨树中的转录,对转基因植株的 RNA 进行了

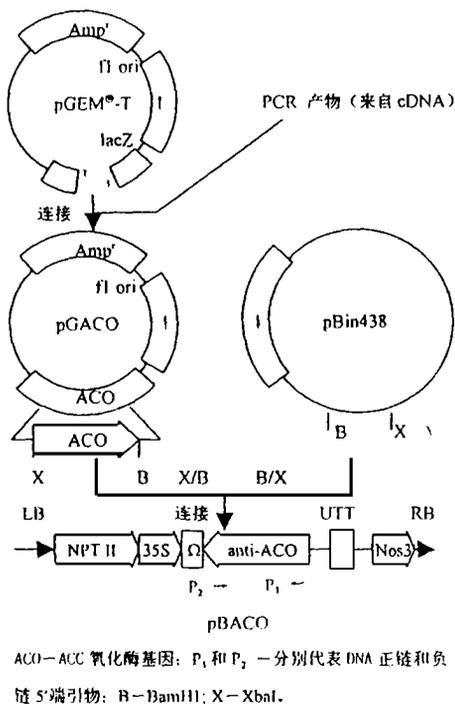


图 1 ACC 氧化酶基因的克隆及其反义基因植物表达载体 pBACO 的构建

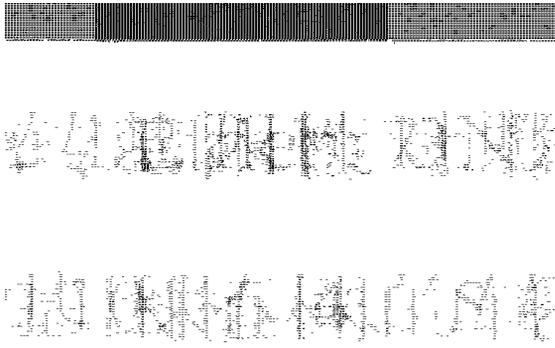


图2 部分转化再生杨树植株 PCR 检测电泳图谱

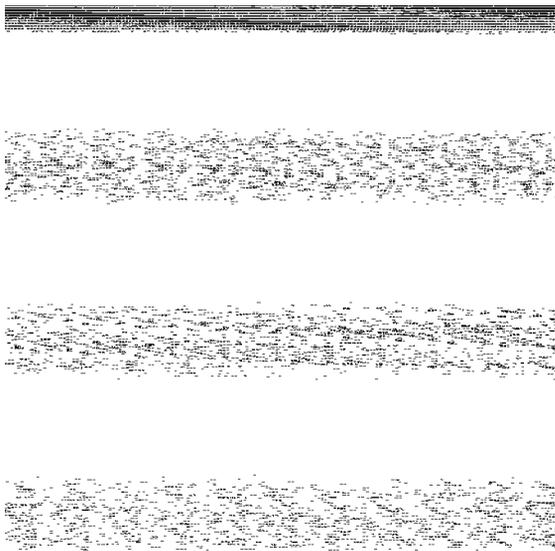


图4 转基因杨树叶片总 RNA 的 RT-PCR 分析

的 RT-PCR 的分析结果(图 4), 证明 RNA 样品中没有 DNA 污染。

2.5 ACC 氧化酶反义基因对美洲黑杨体内乙烯产生的抑制作用

对美洲黑杨地上部进行的乙烯测定结果表明, 转基因植株乙烯生产量仅为非转基因植株的 28%。经 $500 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 乙烯利和伤害处理 2 d 后转基因植株的乙烯释放量也仅为非转基因植株的 30% (图 5)。这些结果表明转基因杨树体内乙烯的产生受到 ACC 氧化酶反义基因转录物的明显抑制。

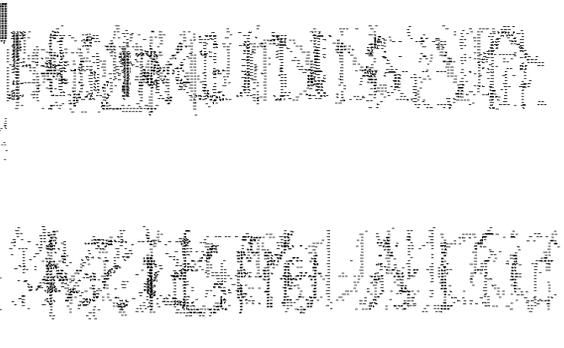
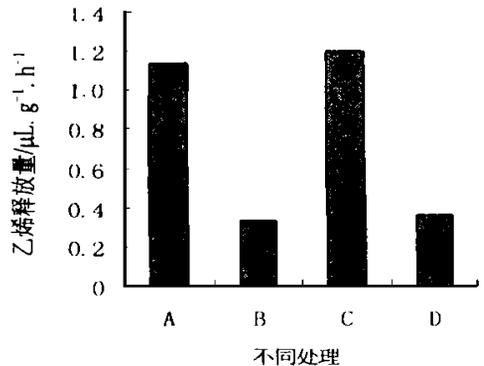


图3 转 ACC 氧化酶反义基因杨树植株的 Southern blot 分析

RT-PCR 分析。引物 P₁ 是外源 ACC 氧化酶反义基因的负链引物, 只有 ACC 氧化酶反义基因转录产生的负链 RNA 才可以与之结合, 经反转录产生负链 cDNA。由此可以排除内源和外源 ACC 氧化酶 mRNA 的干扰, 确证其反义 RNA 在转基因杨树中的表达。RT-PCR 结果(图 4)证实了这一点, 即只有转基因杨树的反义 RNA 才能经 RT-PCR 扩增出预期的 0.9 kb 基因片段, 对照植株则不能, 说明对照植株中不存在这种反义 RNA。

RNA 样品均经无 RNase 的 DNase 处理除去了可能存在的 DNA 污染; 未加反转录酶



A 和 B 分别代表非转基因植株和转基因植株的乙烯释放量; C 和 D: 分别代表用乙烯利处理 2d 后的非转基因植株和转基因植株的乙烯释放量。

图5 转 ACC 氧化酶反义基因杨树乙烯的释放水平

3 结论与讨论

本研究利用 RT-PCR 克隆了番茄 ACC 氧化酶基因 0.9 kb 的 DNA 片段, 构建了 ACC 氧化酶反义基因植物表达载体, 首次将该反义基因转化美洲黑杨获得了转基因植株。对转反义基因杨树植株进行 Southern blot 分析初步证明该基因是以单拷贝插入杨树基因组中。对反义 RNA 和内源乙烯释放量的分析结果表明: ACC 氧化酶反义基因不仅在美洲黑杨中能够表达相应的反义 RNA, 而且能够抑制美洲黑杨内源乙烯的释放。用外源乙烯处理植株也不能解除这种反义抑制作用。这些实验结果与 John 等^[19]在番茄中的实验结果完全一致。这可能是由于 ACC 氧化酶反义 RNA 的表达抑制了 ACC 氧化酶 mRNA 的正常转录, 进而抑制了其蛋白质的合成。由于 ACC 氧化酶是乙烯生物合成过程中的 2 个关键酶之一, 其蛋白质的合成受到抑制, 因此转反义基因杨树植株的乙烯释放量降低。关于 ACC 氧化酶反义 RNA 抑制 ACC 氧化酶 mRNA 正常转录的详细机理尚待进一步研究。

参 考 文 献

- 1 Brady C, McGlsson B, Speirss J. Tomato Biotechnology. ed. Nevins D J, Richard A J. NY:INFO, 1987.
- 2 Lincoln J E, Cordes S, Read E, et al. Regulation of gene expression by ethylene during *Lycopersicon esculentum* (tomato) fruit development. Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 1987, 84(8): 2793 ~ 2797.
- 3 Inaba A, Nakamura R. Effect of exogenous ethylene concentration and fruit temperature on the minimum treatment time necessary to induce ripening in banana fruit. J. Japan. Soc. Hort. Sci., 1986, 55: 348 ~ 354.
- 4 Liu Y, Hoffman N E, Yang S F. Production by ethylene of the capability to convert 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid to ethylene in preclimacteric tomato and cantaloupe fruits. Plant Physiol., 1985, 77(2): 407 ~ 411.
- 5 van Wouster G D, Anthony D. Abscission of flowers and floral parts. J. Exp. Bot., 1997, 48: 821 ~ 837.
- 6 Yang S F, Hoffman N E. Ethylene biosynthesis and its regulation in higher plants. Annu. Rev. Plant Physiol., 1984, 35: 155 ~ 189.
- 7 Adams D O, Yang S F. Ethylene biosynthesis: identification of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid as an intermediate in the conversion of methionine to ethylene. Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 1979, 76(1): 170 ~ 174.
- 8 Boller T, Herner R C, Kende H. Assay for and enzymatic formation of an ethylene precursor, 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid. Planta, 1979, 145(3): 293 ~ 303.
- 9 Yu Y, Adams A D, Yang S F. 1-aminocyclopropane carboxylate synthase, a key enzyme in ethylene biosynthesis. Arch. Biochem. Biophys., 1979, 198(1): 280 ~ 286.
- 10 Barry C S, Blume B, Bouzayen M, et al. Differential expression of the 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase gene family of tomato. Plant J., 1996, 9: 525 ~ 535.
- 11 Oeller P W, Taylor L P. Reversible inhibition of tomato fruit senescence by antisense RNA. Science, 1991, 254: 437 ~ 439.
- 12 刘传银, 田颖川, 沈全光, 等. 番茄 ACC 合成酶 cDNA 克隆及其对果实成熟的反义抑制, 生物工程学报, 1998, 14(2): 139 ~ 146.
- 13 Dayton H W, Richard B M, Scott A M. Expression of foreign genes in transgenic yellow-poplar plants. Plant Physiol., 1992, 98(1): 114 ~ 120.
- 14 Jehan H, Brown S, Marie D, et al. Ontogenesis and ploidy level of plantlets regenerated from *Populus trichocarpa* × *P. deltoides* cv. Hunnegem root, leaf and stem explants. J. Plant Physiol., 1994, 114: 576 ~ 585.
- 15 Holdsworth M J, Bird C R, Ray J, et al. Structure and expression of an ethylene-related mRNA from tomato. Nucleic Acids Res., 1987, 15(2): 731 ~ 739.

- 16 Sambrook J. Mol. Cloning-A Laboratory Manual 2nd ed., NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- 17 陈颖, 韩一凡, 李玲, 等. 苏云金杆菌杀虫晶体蛋白基因转化美洲黑杨的研究. 林业科学, 1995, 31(2): 97 ~ 103.
- 18 Rogers S O, Bendich A J. Extraction of DNA from milligram amounts of fresh, herbarium and mummified plant tissues. Plant Mol. Belgium: Biol. Kluwer Academic Publishers, 1988. A6: 1 ~ 10.
- 19 John I, Drake R, Farrell A, et al. Delayed leaf senescence in ethylene-deficient ACC-oxidase antisense tomato plants: molecular and physiological analysis. Plant Journal, 1995, 7(3): 483 ~ 490.

Cloning of ACC Oxidase cDNA and Its Inhibition of Ethylene Synthesis by Its Antisense RNA in Transgenic *Populus deltoides*

Li Mingliang¹⁾ Han Yifan¹⁾ Li Ling¹⁾
Tian Yingchuan²⁾ Li Ning³⁾ Wang Shiji¹⁾

(1) The Research Institute of Forestry, CAF, 100091, Beijing, China; 2) The Institute of Microbiology, The Chinese Academy of Sciences, 100080, Beijing, China; 3) The Department of Biology, Hong Kong University of Science and Technology, Hong Kong, China)

Abstract A 0.9 kb fragment of ACC oxidase cDNA fragment prepared from total tomato RNA was amplified by polymerase chain reaction (PCR) and cloned into pGEM^R-T vector. The cloned ACC oxidase gene was further inserted into a binary vector, pBin438, in an inverted orientation between the CaMV 35S promoter and Nos 3 termination sequence (pBACO). Transgenic poplar plants were obtained by regeneration of agrobacterium-mediated transformed leaves. PCR and Southern blot analyses confirmed the integration of a single antisense ACC oxidase gene in transformed poplar genome. The results from RT-PCR of RNAs isolated from transgenic poplar leaves confirmed that the antisense RNA of ACC oxidase presented in these transgenic plants. The amount of ethylene released from transgenic poplars was reduced significantly to about 28% of that released from non-transformed controls.

Key words ACC (1-amino cyclopropane-1-carboxylate) oxidase; gene; antisense RNA; *Populus deltoides*