

香蕉 ACC 氧化酶基因 (MAO3) 的克隆及其表达特性分析

黄俊生¹ 王 华² 张世清²

(¹ 中国热带农业科学院环境与植物保护研究所, 儋州 571737; ² 中国热带农业科学院热带生物技术研究所热带作物生物技术国家重点实验室, 海口 571101)

摘 要: 根据同源扩增得到香蕉 (*Musa acuminata*) ACC 氧化酶基因 (MAO3) 的核心部分, 再通过 3' 和 5' RACE 扩增上、下游序列以及 Genome-Walker 的方法得到启动子部分, 共获得 3 718 bp 长度的序列。将所得结果进行聚类分析, 发现香蕉中 ACC 氧化酶的氨基酸序列非常保守, 各序列间的同一性高达 99%, 与单子叶植物和双子叶植物中 ACC 氧化酶的氨基酸序列的同源性在 66.7% ~ 71.8% 之间。组织原位杂交试验表明 MAO3 基因的表达具有组织特异性, 初步认为是在韧皮部筛管组织中特异表达。运用实时荧光定量 PCR 技术, 实时监测到了 MAO3 基因和香蕉乙烯受体基因 ERS2 受机械伤诱导的定量变化。

关键词: 香蕉; MAO3 基因; 克隆; 同源性分析; 组织特异表达; 机械伤诱导

中图分类号: S 668.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 0513-353X (2005) 05-0807-05

Cloning and Expression Analysis of Banana ACC Oxidase Gene (MAO3)

Huang Junsheng¹, Wang Hua², and Zhang Shiqing²

(¹ Environment and Plant Protection Institute, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Danzhou 571737, China;

² State Key Laboratory of Tropical Crop Biotechnology, Institute of Tropical Bioscience and Biotechnology, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Haikou 571101, China)

Abstract: We obtained core sequence of MAO3 of banana according to homo-cloning, and then cloned 5' up stream and 3' down stream sequences by RACE PCR technology and the promoter sequence by Genome-Walker technology. Phylogenetic analysis showed that this gene was highly conserved in the same species and had comparatively high homology compared with both monocots and dicots. In situ hybridization experiment showed that the expression of MAO3 gene was tissue specific. Meanwhile, according to fluorescence real-time quantification PCR, we found that MAO3 and ERS2 (one of banana ethylene receptor genes) genes were also induced by wounding.

Key words: Banana; MAO3 gene; Cloning; Homology analysis; Tissue specific expression analysis; Wounding induce

香蕉作为典型的呼吸跃变型果实, 控制其乙烯合成以延长其货架寿命具有重要的经济价值。Hamilton⁽¹⁾等通过从番茄中克隆到的 ACC 氧化酶基因构建反义 pTOM13 导入番茄, 这种转基因番茄在成熟过程中的乙烯释放被抑制了 97%, 在伤害处理的叶片中, ACC 氧化酶活性被抑制了 93%, 这是世界上首例采用反义 RNA 控制乙烯生成的试验。随后, 研究者们相继从多种植物中分离克隆了 ACO 基因全长或片段。目前, GeneBank 中已登录的香蕉 ACC 氧化酶氨基酸序列共有 7 个, 但关于该基因表达特性的研究还较少。作者在得到基因全长序列的基础上研究该基因的组织特异表达和机械伤诱导表达, 旨在为后续的应用研究提供理论基础, 如通过反义 RNA 技术提高香蕉的货架寿命等。

1 材料与方法

收稿日期: 2004 - 12 - 01; 修回日期: 2005 - 02 - 02

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (39560056)

1.1 材料与香蕉 ACC氧化酶基因 (MAO3) 全长序列的克隆

供试材料为海口当地巴西种香蕉,七八成熟。由于香蕉属于单子叶植物,所以根据目前已得到的兰花和水稻两种单子叶植物的 ACC氧化酶基因序列的同源性,以及对 ACO 基因序列分析得出的保守区序列,共设计两个引物 (CP1f和 CP2r) 用以扩增该基因的核心区域: CP1f, 5' TGGAAAACGCCGACTCAGAAATC3'; CP2r, 5' CGTCGCTCCCGGGTTGTAGAAG 3'。然后根据得到的核心序列,分别设计和合成如下 4个引物进行 RACE PCR, 扩增其上游区 (RP5f和 RP3r) 和下游区 (RP6f和 RP4r) 序列。RP3r, 5' TCATCAAGATCGGGGATCTCAGA 3'; RP4r, 5' CGGGTTGCATAGACATAGA 3'; RP5f, 5' CAA GTGCAATCAGGGAAGAAAGAG 3'; RP6f, 5' ATCACCAATGGCAAGTACAAGAGC 3'。

香蕉果皮总 RNA的分离提取及 cDNA第 1链的合成: 将香蕉果皮在液氮中研磨成粉状,总 RNA的提取采用异硫氰酸胍 (GTC) —酸性酚 —氯仿抽提法^[2], 然后用 $10 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 LiCl沉淀 RNA。反转录试剂产品均购自 Promega公司。以总 RNA为模板, Oligo (dT)₁₅为引物,在 AMV反转录酶作用下合成。合成 cDNA第 1链后直接进行 PCR扩增。

香蕉 MAO3基因核心区域的扩增条件: 预变性 95 °C 5 min; 然后经过 94 °C 变性 40 s, 55 °C 退火 90 s, 72 °C 延伸 90 s, 共进行 35个循环; 最后 72 °C 延伸保温 10 min, 4 °C 保存。核心序列 5'区 (即上游区) 的扩增条件: 预变性 95 °C 5 min; 然后经过 94 °C 变性 40 s, 62 °C 退火 90 s, 72 °C 延伸 90 s, 共进行 32个循环; 最后 72 °C 延伸保温 10 min, 4 °C 保存。核心序列 3'区 (即下游区) 的扩增条件: 预变性 95 °C 5 min; 然后经过 94 °C 变性 40 s, 58 °C 退火 90 s, 72 °C 延伸 90 s, 共进行 30个循环; 最后 72 °C 延伸保温 10 min, 4 °C 保存。

PCR扩增产物的切胶回收采用 Pharmacia公司的 GTC试剂盒, 然后按 Promega公司 pGEM-T载体的操作说明连接并转化至 XL1-Blue菌株 (该菌株由本实验室保存)。重组质粒采用 Roche公司试剂盒进行提取纯化,在 PE公司的 ABI377 DNA测序仪上测序, DNA序列分析试剂盒为 PE-ABI公司产品。

克隆启动子采用的是 CLONTECH公司的 GenomeWalker试剂盒。

DNA的序列分析、同源性比较等采用 DNA STAR公司的软件包。地高辛标记 RNA探针试剂盒及杂交液 (DIG easy Hyb) 均购自 Roche生物公司。

1.2 实时荧光定量 PCR技术检测伤害诱导下 MAO3基因及 ERS2基因的表达

实时荧光定量 PCR采用 QIAGEN公司的试剂盒,染料为 SYBR Green I,在该公司 Rotor-Gene 3000定量 PCR仪上进行。选用 NCBI上已登录的香蕉 18S rRNA为归一化 (standardization) 内标^[3]。cDNA第一链的获得如前所述。所用引物如下 (扩增 18S rRNA及 ERS2的引物设计依据 NCBI上已登录的相关序列的保守区信息,扩增 MAO3基因的引物则是根据本试验测序得到的结果来设计的。引物设计时尽可能使两条引物跨越一个或多个内含子,以避免 gDNA的污染,但 PCR产物的长度维持在 150~200 bp之间)。18S rRNAf, 5'TCA TCA GCT CGC GTT GAC TA 3'; 18S rRNAr, 5'GTT CAG TGG ACT TCT CGC GA 3'; ACOf, 5'GAG GCA TCA TCT TGC TCT TC 3'; ACOr, 5'CAC GCT CTT GTA CTT GCC AT 3'; ERS2f, 5'TCA AGG ATA CTG GCT GTG GA 3'; ERS2r, 5'TGC AAC CCT TTC CAA TGC CT 3'。

机械伤处理: 用灭菌的不锈钢刀片将香蕉果皮切成 1 cm^2 的薄片,置于无菌三角瓶中于室温放置,而后分别在不同时间 (0、2、4、8、12、24 h) 将处理样品置于液氮中保存,以便最终一起提取总 RNA。实时荧光定量 PCR的程序如下: 95 °C 预变性 15 min; 94 °C 变性 30 s, 55 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 30 s, 80 °C 获取荧光信号 15 s, 循环 45次。分析软件为 4.6版本。

2 结果与分析

2.1 香蕉 MAO3基因全长序列的克隆

本试验获得的序列长度为 3 718 bp, GeneBank 登录号为 AY804252, 氨基酸序列的登录号为

AAV66542。其中 - 1 807 bp 为启动子部分, +1 至 +1 202 bp 为编码区, 共有 3 个内含子和 4 个外显子, cDNA 全长 957 bp, 共编码 318 个氨基酸, - 709 bp 为该基因的 3' 非编码区。启动子部分包含两个 39 bp 的正向重复序列 (- 1 444 bp 处和 - 1 345 bp 处), 一个 CAAT BOX (- 405 bp 处) 和一个 TATA BOX (- 81 bp 处)。

2.2 聚类分析

图 1 为本研究结果 MAO3 与 GeneBank 中已有的香蕉 ACC 氧化酶氨基酸序列的聚类分析。从图中可以看出, MAO3 与登录号为 AAR00930 的序列完全相同, 与另外几个序列的同一性 (identity) 也相当高, 软件分析表明各序列之间的同一性均大于 99%。

由图 2 的聚类分析可知, 本试验所得的香蕉 ACO 氨基酸序列与几种典型植物的 ACO 氨基酸序列同源性都比较高: 与油梨的同源性为 71.5%, 与苹果的同源性为 66.7%, 与兰花的同源性为 71.8%, 与水稻的同源性为 71.5%, 可以看出, 单子叶植物 (如香蕉、水稻、兰花) 与双子叶植物 (如油梨、苹果) 的 ACO 氨基酸序列有明显差异。

2.3 香蕉 ACC 氧化酶基因的组织表达

以 DIG 标记的香蕉 MAO3 反义 RNA 作为探针进行原位分子杂交, 杂交结果显示香蕉 MAO3 基因不是在香蕉果实的所有组织细胞里转录表达, 而是在特定的细胞类型中表达, 初步认为是韧皮部筛管组织 (图 3)。

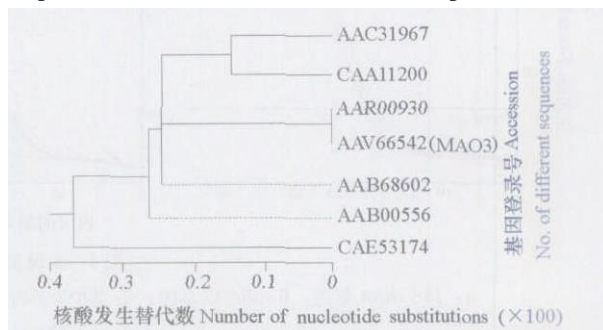


图 1 MAO3 与 GeneBank 中已有的香蕉 ACO 氨基酸序列的聚类分析

Fig 1 Alignment analysis of banana ACO amino acid sequence among MAO3 and others

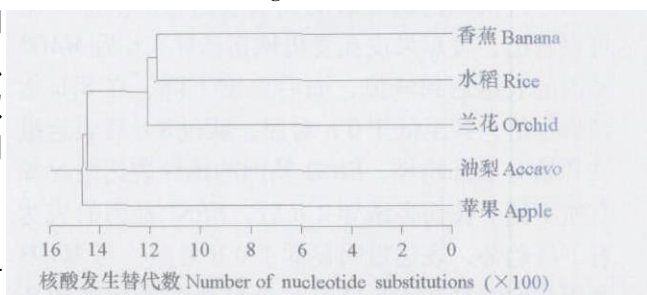


图 2 几种植物 ACO 氨基酸序列同源性分析

Fig 2 Alignment analysis of ACO amino acid sequences of several plants

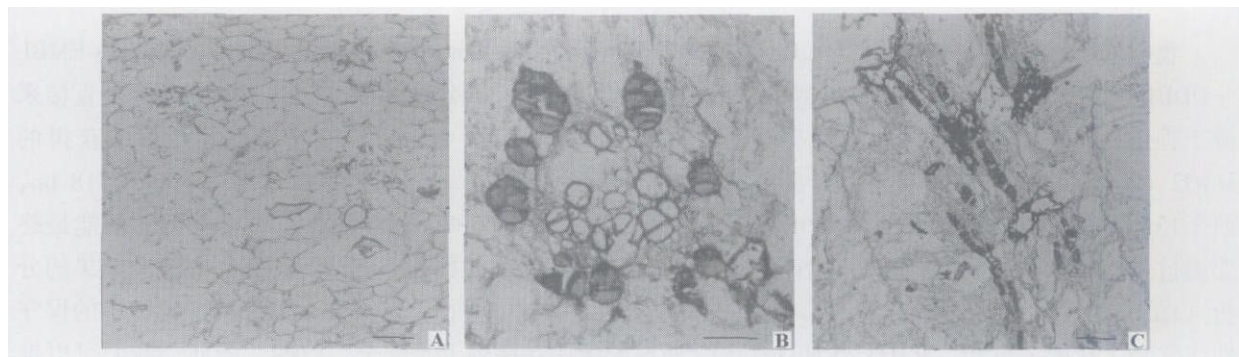


图 3 香蕉维管束组织中 MAO3 基因的表达

A: 早期维管束组织横切面; B: 成熟维管束组织横切面; C: 成熟维管束组织纵切面。标尺 = 100 μm。

Fig 3 MAO3 gene in banana vascular bundle

A: Transverse section of vascular bundle in early mature; B: Transverse section of vascular bundle in later mature; C: Vertical section of vascular bundle in later mature. Scale bar = 100 μm.

2.4 实时荧光定量 PCR 技术检测机械伤诱导下香蕉 MAO3 基因及乙烯受体 ERS2 基因的表达

提取不同处理时间的香蕉果皮总 RNA, 反转录得到 cDNA 第一链后进行荧光实时定量 PCR, 所得结果如图 4。其中, 制作标准曲线的标准样是以 cDNA 第一链为模板的 PCR 产物回收后经蒸馏水稀释得到的浓度梯度系列。

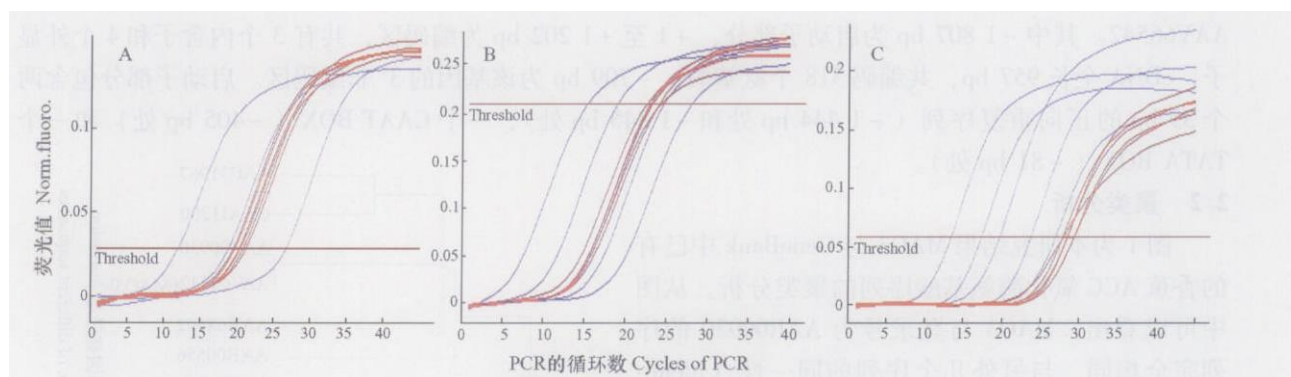


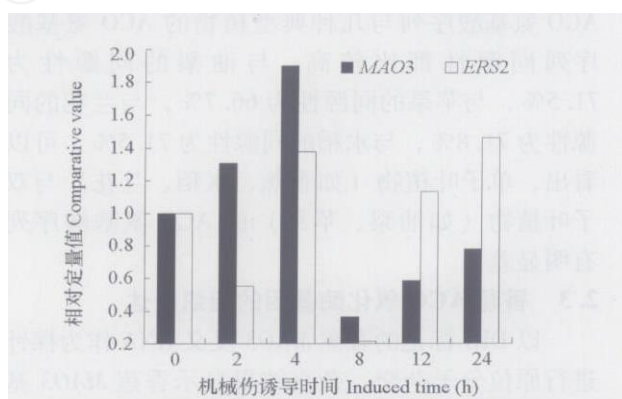
图 4 实时荧光定量 PCR 结果

A: 18S *rRNA* 基因; B: *MAO3* 基因; C: *ERS2* 基因。图中蓝色线条代表标准曲线, 红色线条代表样品曲线。

Fig. 4 The result of real-time PCR

A: 18S *rRNA* gene; B: *MAO3* gene; C: *ERS2* gene. Blue lines represent standard curve and red lines represent sample curve.

根据图 4 中所得数据计算得到 *MAO3* 和 *ERS2* 基因经过机械伤诱导后的相对表达量。从图 5 中可以看出, 香蕉果皮在受机械伤诱导 4 h 后 *MAO3* 基因的表达达到峰值, 而后急剧下降, 在 8 h 达到最小值, 甚至低于 0 h 对照, 跃过 8 h 后表达量又开始有上升趋势。*ERS2* 基因的诱导表达情况却有所不同。在伤害诱导 2 h 后, *ERS2* 基因的表达有下降趋势, 表达量明显低于 0 h 对照, 与 *MAO3* 基因相同的是在 4 h 处有一个显著的诱导表达高峰, 8 h 处又回落较低, 而后也有上升趋势, 但在 24 h 处表达量比 4 h 处还要高。

图 5 不同时间机械伤诱导的 *MAO3* 和 *ERS2* 基因的表达Fig. 5 Comparative quantitative value of *MAO3* gene and *ERS2* gene induced by wounding

3 讨论

我们将所获得的全部序列 3 718 bp 在 NCB 服务器上用 Blastn 进行检索, 结果在 GenBank + EMBL + DDBJ + PDB 数据库中得到 280 个结果, 这些基因都是 *ACO* 或 *ACO-LIKE* 序列, 其中有 16 个直接来源于香蕉, 同源性都非常高, 达到 95% 以上。值得一提的是, Huang^[4] 等人从香蕉叶片中获得的 *MAO2* (Accession No. 为 U86045, 氨基酸序列的 Accession No. 为 AAR00930) 基因也有 3 718 bp, 前 3 131 bp 的序列与本试验结果有 99% 的同源性, 余下部分有 88% 的同源性。了解基因的功能最终要通过蛋白质, 于是我们将软件分析得到的蛋白质序列在蛋白质数据库中进行检索。对检索结果的分析 (图 1, 图 2) 有力地说明了 ACC 氧化酶虽然在不同物种中存在一定差异, 但在同一物种中的保守性非常高。从图 1 可知, *MAO3* 与 Huang 等^[4] 获得的蛋白在序列上是完全一致的, 因此, 我们可以推测两蛋白的功能很有可能相似。

Huang 等^[4] 研究了 ACC 氧化酶基因在成熟各阶段的表达和受外源乙烯诱导表达的情况, 本文作者则着重研究 *MAO3* 的组织特异表达和机械伤诱导表达。乙烯在产生部位即发挥作用, 很长一段时间以来, 人们都认为乙烯可在植物的各个组织部位形成, 本研究结果则改变了这种认识。在应用领域, 组织特异表达的发现也有着重要的经济价值。如为延长果实的货架寿命而采用的反义 RNA 技术中, 通过组织特异的启动子将反义基因定位, 可能会起到更好的抑制效果。

机械伤处理能诱导植物乙烯的产生和 ACC 氧化酶基因的表达, 但在不同品种和种类以及不同器官中表达模式存在差异。一般情况下, ACC 氧化酶基因受伤害诱导的表达是短暂的: 金勇峰等^[5] 在

溶质水蜜桃中的 Southern杂交结果显示,桃果实中 ACC氧化酶基因在机械伤诱导处理 4 h左右开始检测到,16 h后信号有所减弱,而叶片中伤害诱导仅 1 h就可检测到信号,4 h出现高峰,16 h表达已明显减弱。本试验中,香蕉果皮 MAO3 基因的表达模式为:机械伤害诱导 2 h,基因的表达已有明显上升趋势,4 h达到最高峰,表达量相当于 0 h 对照的 1.902 倍,8 h 表达量显著下降,仅为对照的 0.369 倍,此后直到 24 h,表达量稍有回升趋势,但仍低于 0 h 对照(也就是 Southern杂交中的检测不到信号)。

ACC氧化酶将 ACC氧化成乙烯后,将信号传递给乙烯受体分子,它们是一个具有完整跨膜结构的受体家族。该家族的第一个成员是 Chang等^[6]在拟南芥中克隆到的 ETR1 基因,另外,人们又从拟南芥中获得 4 个 ETR1 相关基因,这 5 个成员根据结构的相似性可分为两个亚族,ETR1 (包括 ETR1 和 ERS1) 样亚族和 ETR2 (包括 ETR2、EN4 和 ERS2) 样亚族,它们虽然序列同源,但很可能被不同的环境因子所调控,与 MAO3 基因一样,可能具有不同的表达模式。比如,曹宛虹等^[7]在水稻中克隆到了一个乙烯受体类似物 OSPK2 基因,该基因受机械伤诱导后,茎叶和根的表达情况都有所不同。本试验研究的乙烯受体分子是从香蕉中分离克隆的 ERS2 基因,该基因受机械伤诱导表达的情况又有所不同。由此看来,ACC氧化酶和乙烯受体基因的表达模式都具有多样性,对其基本理论的理解还需要更深入的研究。

参考文献:

- 1 Hamilton A J, Bouzayen M, Grierson D. Identification of tomato gene for ethylene-forming enzyme by expression in Yeast Proc. Nalt Acad Sci, 1991, 88: 7434 ~ 7437
- 2 萨母布鲁尔 J, 拉塞尔 D W. 分子克隆实验指南. 第 3 版. 黄培堂译. 北京: 科学出版社, 2002. 518 ~ 522
Sambrook J, Russell D W. Molecular Cloning: A Laboratory Manual 3rd ed. Translated by Huang P T. Beijing: Science Press, 2002. 518 ~ 522 (in Chinese)
- 3 Kim B R, Nam H Y, Kim S U, Kim S I, Chang Y J. Normalization of reverse transcription quantitative-PCR with housekeeping genes in rice Biotechnol Lett, 2003, 25 (21): 1869 ~ 1872
- 4 Huang P L, Do Y Y, Huang F C, Thay T S, Chang T W. Characterization and expression analysis of a banana gene encoding 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase Biochemistry and Molecular Biology International, 1997, 41 (5): 941 ~ 950
- 5 金勇峰, 张耀洲, 张上隆. 伤处理和乙烯对桃 ACC氧化酶基因表达的影响. 植物学报, 1999, 41 (2): 222 ~ 225
Jin Y F, Zhang Y Z, Zhang S L. Effect of ripening, wounding and ethylene treatment on expression of ACC oxidase gene of peach tissue. Acta Botanica Sinica, 1999, 41 (2): 222 ~ 225 (in Chinese)
- 6 Chang C, Kwok S F, Bleeker A B, Meyerowitz E M. Arabidopsis ethylene-response gene ETR1: similarity of product to two component regulators Science, 1993, 262: 539 ~ 544
- 7 曹宛虹, 董 亿, 张劲松, 陈受宜. 水稻乙烯受体类似物基因的克隆及其表达特性. 中国科学 (C 辑), 2003, 33 (2): 125 ~ 132
Cao W H, Dong Y, Zhang J S, Chen S Y. Cloning and expression analysis of rice ethylene receptor-like Science in China (series C), 2003, 33 (2): 125 ~ 132 (in Chinese)

新书推荐

《中国花卉病虫原色图鉴》 吕佩珂等主编

该图鉴共有彩版 208 页, 彩色生态照片 1 664 幅, 病原墨线和电镜扫描图片 171 幅, 文字 137 万, 含花卉病虫害 1608 种, 其中病害 1321 种, 虫害 287 种, 分上下两册。上册包括草本花卉、木本花卉、仙人掌与多浆类花卉病害 903 种, 彩色照片 896 幅, 彩版 112 页, 文字 68 万。下册重点介绍 115 种鲜切花和草坪草病害 418 种, 花木害虫 287 种, 文字 69 万, 含彩色生态照片 768 幅。该图鉴图文并茂、内容新颖、实用性强, 是我国第一部花卉病虫害识别与防治大全, 是观赏植物植保重要工具书。定价: 158 元 (上、下册, 含邮资)。

购书者请汇款至北京中关村南大街 12 号中国农科院蔬菜花卉所《园艺学报》编辑部, 邮编 100081。