研究论文

狗头枣 ACC I 氧化酶基因的克隆及其序列分析

陈国梁， 齐向英， 涂容福， 陈治利， 王文静， 陈宗礼

（延安大学 生命科学学院，陕西省红枣重点实验室，陕西省区域生物资源保育与利用工程技术研究中心，陕西 延安 716000）

摘要：为利用 RNAi 技术开展调控乙烯合成延迟狗头枣果实成熟等研究，以狗头枣试管苗叶片的总 DNA 为模板，根据冬枣 ACC I 氧化酶基因的序列设计引物，通过 PCR 方法获得一长 1 294 bp 片段，序列分析结果表明，该片段具有 4 个外显子和 3 个内含，依次在 106~201、430~541 bp 与 877~1 002 bp 碱基处。此序列与冬枣 ACC I 氧化酶基因(EU216549.1)的核苷酸和氨基酸序列同源性均为 99.69 %，表明成功地克隆了狗头枣 ACC I 氧化酶基因。

关键词：狗头枣；ACC I 氧化酶；基因克隆

中图分类号：S 641.2　**文献标志码**：A　**文章编号**：1673—1689(2014)06—0647—05

Cloning and Sequence Analysis of ACC I Oxidase Gene from *Zizyphus jujube*（Goutouzao）

CHEN Guoliang, *QI Xiangying*, *TU Rongfu*, *CHEN Zhili*, *WANG Wenjing*, *CHEN Zongli*

（College of Life Science Yan'an University, Shaanxi Engineering & Technological Research Center for Conversation & Utilization of Regional Biological Resources, Yan'an 716000, China）

Abstract: In order to carry out researching of delaying Goutou jujube fruit ripening by regulation of ethylene synthesis with RNAi technology, a pair of specific primers were designed according to ACC I oxidase gene sequence of *Zizyphus jujube* (Dongzao) recorded in GenBank. Using test-tube plantlet total DNA from "Goutou jujube" as template, a fragment of ACC I oxidase gene including an ORF (1 294 bp) was amplified. The results showed that the fragment has four exons and three introns, turn in at 106~201, 430~541 and 877~1 002 bp base. Compared with nucleotide sequence and amino acid sequence homology of ACC I oxidase gene (EU216549.1) landed were 99.69%, which showed the successful cloning of the Goutou jujube ACC I oxidase gene.

Keywords: Goutou jujube, ACC I Oxidase, gene cloning

乙烯作为植物体中 5 大内源激素之一，对植物生长发育过程具有广泛影响，特别对果实成熟和衰老调节起到重要的作用[1-4]。在果实的成熟过程中，乙烯的大量生成启动了果实内部一系列与衰老有

收稿日期：2013-07-19

基金项目：地方高校国家级大学生创新训练计划项目(201210719017)；陕西省教育厅省级重点实验室重点科研计划项目(2010JS065)；延安市科技发展计划项目(2011kn-09)；延安大学专项科研基金项目(YDZ2012-12)。

作者简介：陈国梁(1974-)，男，陕西定边人，理学硕士，副教授，硕士研究生导师，主要从事植物生物技术研究。E-mail：glc9359@163.com

关的酶的活性，从而导致采后旺盛的新陈代谢，使果品迅速衰老变质。目前，已有越来越多的资料显示，乙烯是公认的成熟激素，可诱导和促进果实的成熟。高等植物中乙烯生物合成途径为：Met(蛋氨酸)→ SAM(S-腺苷蛋氨酸)→ACC(1-氨基环丙烷-1-羧酸)→乙烯，其中 ACC 氧化酶(1-aminocyclopropane-l-carboxylic acid oxidase，ACO) 为乙烯生物合成的两个关键酶之一，可直接催化 ACC 转变为乙烯[5]。

枣(*Zizyphus jujube* Mill)原产中国，枣树是中国最具特色和优势的果树之一，近年来以冬枣为代表的鲜食品种的快速发展，以及人们对鲜枣营养价值的重新认识，带动了国内外市场对鲜枣的需求。然而，鲜枣采收后不易保鲜、不耐贮藏，大大缩短了鲜枣市场的货架期。为了深入探究乙烯在枣成熟过程的分子机理，作者克隆了狗头枣的 ACO I 基因，并对其序列进行了有关信息学的分析，为进一步揭示 ACO I 与枣果实成熟、衰老的关系，以及利用 RNAi 技术开展抑制乙烯合成、延迟果实成熟等研究奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 材料

狗头枣试管苗，由陕西省红枣重点实验室提供；pGM-Tvector、标准 DNA-Marker、PCR 产物回收试剂盒，购于天根生化科技(北京)有限公司；实验所用的各种限制性内切酶、T_4 DNA 连接酶和 Taq 聚合酶，均购自宝生物(大连)工程有限公司；大肠杆菌菌株 $DH_{5\alpha}$ 感受态细胞，采用 $CaCl_2$ 法制备；其他试剂均为国产或进口分析纯。

1.2 引物设计与合成

以冬枣 ACO I 基因 (登录号：EU216549.1)的 cDNA 全序列为依据，采用 Oligo6.0 软件设计引物。ACCI-U：5'-ATGGAGAATTTCCCAGTTATCA-3'；ACCI-L：5'-TTAAGCTGTAGCA ATTGGACC-3'；送由上海生工生物技术公司合成。

1.3 总 DNA 的提取

以狗头枣试管苗新鲜叶片组织为材料，采用 CTAB 法[6]提取总 DNA。

1.4 ACO I 基因的扩增

以所提取的总 DNA 为模板，ACCI-U、ACCI-L 为引物，在 25 μL 的反应体系 (含 Taq 酶缓冲液、dNTP、Taq 酶) 中，95 ℃ 5 min、95 ℃ 40 s、59 ℃ 50 s、72 ℃ 60 s 扩增 30 个循环，72 ℃保温 10 min。取 5.0 μL PCR 扩增产物进行电泳检测并回收。

1.5 PCR 产物与 T 载体的连接及鉴定

取 PCR 回收产物与 T 载体连接，转化大肠杆菌 $DH_{5\alpha}$ 并进行蓝白斑和抗性筛选，采用 PCR 及酶切进行鉴定，所得阳性重组子命名为 pGEM-TACC I 并测序。

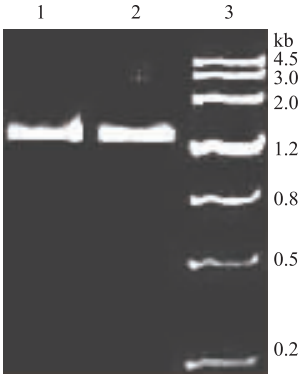
1.6 序列比对及生物信息学分析

利用 NCBI 的 ORF (http://www.ncbi nlm.nih.gov/gorf/gor.fhtml)软件寻找 ACO I 基因的开放阅读框；通过 NCBI 的 Blast 功能 (http://www.ncbi nlm.nih.gov/BLAST) 及 DNAMAN 软件分析其核苷酸和氨基酸序列同源性，并进行进化系统树分析及亲水性和疏水性分析；用 ProtParam(http://au.expasy. org/tools/prot-param.html)软件计算相对分子质量、等电点和不稳定系数等；用 Signal 4.0 Server(http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/)检测信号肽序列；以在线软件 Predict- protein (http://www.predictprotein.org/)中 Submission 功能预测蛋白质二级结构。

2 结果分析

2.1 目的片段的扩增结果

以狗头枣总 DNA 为模板扩增所得产物，经质量分数 1%琼脂糖凝胶电泳检测，得到单一、整齐、明亮、大小约为 1 300 bp 的 DNA 条带，见图 1。



1、2 PCR扩增产物　3 Marker III

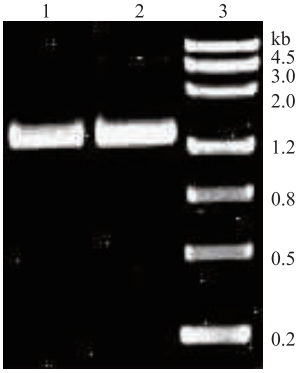
图 1　目的片段 PCR 产物电泳图

Fig. 1　PCR amplification electrophoresis

2.2 ACO I 基因的克隆

目的片段与 T 载体连接转化后，经筛选、PCR 及 *Eco*R Ⅰ和 *Hind*Ⅲ双酶切鉴定(图 2，3)，表明扩增

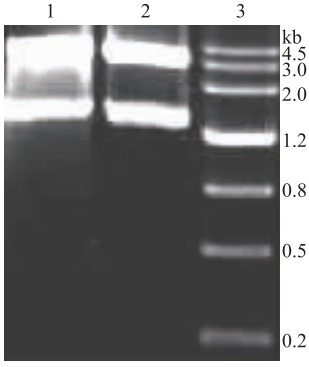
所得片段大小约为 1 300 bp,与目的片段大小相符合,说明外源 DNA 片段已经连接到 T 载体上。



1、2 PCR扩增产物　3 Marker III

图 2　重组质粒 PCR 检测电泳图

Fig. 2　Electrophoresis of recombinant plasmid PCR amplification electrophoresis



1、2 酶切产物　3 Marker III

图 3　重组质粒酶切鉴定电泳图

Fig. 3　Electrophoresis of recombinant plasmid digestion electrophoresis

2.3　ACO I 基因核苷酸序列分析

将连接到 T 载体上的 DNA 片段测序,结果表明,该片段大小为 1 294 bp。经 ORF 在线搜索软件分析,发现含有 4 个外显子和 3 个内含子(在 106~201、430~541 bp 与 877~1 002 bp 碱基处),见图 4。经 Blast 核苷酸序列同源性分析,表明此序列与 GenBank 中冬枣 ACO I 基因(EU216 549.1)核苷酸序列和氨基酸序列的同源性均为 99.69%,表明成功地克隆了狗头枣 ACO I 基因。

将该基因核苷酸序列提交 GenBank 并注册(GenBank nucleotide 登录号为:JF812966.1)。将该基因的核苷酸序列进行同源性分析,通过 NCBI 网站进行 Blast 比对,发现了与其同源性较高的 10 个物种,结果见表 1。

表 1　狗头枣 ACO I 基因与其它植物 ACO I 基因核苷酸序列同源性比对

Table 1　Nucleotide sequence of Goutou jujuber ACO I gene similarity to the ACO I gene of other plant species

GeneBank 登录号	物种	长度/bp	比对盖度	同源性
EU216549.1	枣	1 757	100%	99%
AB031027.1	乌梅	870	100%	83%
DQ785807.1	桑	815	90%	83%
AM743171.1	巴西三叶胶	797	99%	82%
XM_002320451.1	毛果杨	750	99%	81%
AF115263.2	白三叶草	662	94%	80%
XM_002273394.1	葡萄	658	99%	79%
AY077461.1	番木瓜	658	95%	79%
AK339461.1	莲	616	86%	80%
AB434925.1	花生	588	96%	78%

```
1     ATGGAGAATT TCCCAGTTAT CAACTTGGAG AATCTCAATG GTGAAGGAAG GAAGGCTACA
61    ATGGAACAGA TTAGAGATGC TTGTGAGAAC TGGGGTTTCT TTGAGGTAAA AATGCTAGCT
121   ATTTTTTTAA TGTTATAGCA CATTATTTTC TTTTGGCACG GTGATTATGG TGCTTATCTT
181   AACAAAAACA AAAATTGGCA GCTTGTGAAT CATGGTATAG CCCCTGAGTT TATGGACAAA
241   ATAGAGAGGA TGACAAAAGA GCATTACAGG AAGTGCATGG AGCAGAGGTT CAAAGAGCTT
301   GTTGCAAGCA AAGGTTTGGA AGCTGTTCAG ACAGAGGTCA GTGACATGGA TTGGGAAAGC
361   ACTTTCTTCT TGCGCCACCT TCCTGTTTCT AACATATCAG AGATTCCAGA TCTCCATGAT
421   GATTACAGGT ATTATTTTCC AAAAAAAAAA AAAAAAAAAT TCCCAGATAT CTAAAATGTT
481   GATAAATCAT ACACAATGCA GAGTTCTAAA AAAGAAATCC AAAAAATTAA TTTTCTACAG
541   GAAAGCGATG AAGGAATTTG CTTTGAAATT GGAGACACTA GCTGAGGAAC TACTAGACCT
601   GTTATGTGAG AATCTTGGAC TTGAAAAAGG GTATCTGAAA AAGGCCTTCT ATGGATCAAA
661   AGGTCCAACT TTTGGAACCA AGGTGAGCAA TTATCCACCA TGCCCAAAAC CGGAGTTGAT
721   CAAAGGTCTC CGAGCCCACA CAGATGCAGG TGGCATCATC TTGCTGTTCC AGGATGACAA
781   AGTCAGCGGC CTCCAGCTAC TTAAGGATGG TCAATGGATT GATGTCCCTC CTATGCGCCA
841   CTCCATTGTA GTCAACCTTG GCGATCAACT TGAGGTAAGC CCTCCATGTT TTAATAAACA
901   AATCCAACTC CAAATTAAAA TTTGTCTTTT TATTTTTTTT AATACCCCAA AAAACAAAG
961   ATAGTGAAAA TCTGAACTAT GAAAAATATG TTTTTTACAG GTTATAACAA ATGGGAAATA
1021  CAAGAGTGTA GAACACAGAG TGATTGCACA AACAAATGGT ACCAGAATGC CCATAGCTTC
1081  ATTCTACAAC CCCGGTAGTG ATGCTGTTAT TTACCCTGCA CCAGTCCTTG TCGAGAAAGA
1141  AGCAGAGGAG AAGAAGCAAG TTTACCCAAA ATTTGTTTTT GAAGATTATA TGAAGCTTTA
1201  TACTGCGTTG AAATTCGAGC CCAAAGAGCC AAGGTTCAAA GCCATGAAAG CAGTGGAAAC
1261  TAATGTTGGT TTGGGTCCAA TTGCTACAGC TTAA
```

下划线核苷酸为 PCR 引物;阴影处为内含子序列

图 4　狗头枣 ACO I 基因的核苷酸序列

Fig. 4　Nuclear acid sequence of Goutou jujuber ACO I

2.4 ACO I 基因氨基酸序列同源性分析及分子进化分析

用 DNAMAN 软件将狗头枣 ACO I 基因的核苷酸序列翻译成氨基酸，可得到 319 个编码的氨基酸。把这 319 个氨基酸的序列提交到 GenBank 中进行 Blast 比对，结果表明狗头枣 ACO I 氨基酸序列与冬枣、李属、桃、乌梅、苹果、沙梨、山茶、山毛榉、巴西三叶胶、木薯及杨等 11 种植物的同源性均在 84%以上，同源性较高。

如图 5 所示。

```
1    ATGGAGAATTTCCCAGTTATCAACTTGGAGAATCTCAATGGTGAAGGAAGGAAGGCTACA
1     M  E  N  F  P  V  I  N  L  E  N  L  N  G  E  G  R  K  A  T
61   ATGGAACAGATTAGAGATGCTTGTGAGAACTGGGGTTTCTTTGAGCTTGTGAATCATGGT
21    M  E  Q  I  R  D  A  C  E  N  W  G  F  F  E  L  V  N  H  G
121  ATAGCCCCTGAGTTTATGGACAAAATAGAGAGGATGACAAAAGAGCATTACAGGAAGTGC
41    I  A  P  E  F  M  D  K  I  E  R  M  T  K  E  H  Y  R  K  C
181  ATGGAGCAGAGGTTCAAAGAGCTTGTTGCAAGCAAAGGTTTGGAAGCTGTTCAGACAGAG
61    M  E  Q  R  F  K  E  L  V  A  S  K  G  L  E  A  V  Q  T  E
241  GTCAGTGACATGGATTGGGAAAGCACTTTCTTCTTGCGCCACCTTCCTGTTTCTAACATA
81    V  S  D  M  D  W  E  S  T  F  F  L  R  H  L  P  V  S  N  I
301  TCAGAGATTCCAGATCTCCATGATGATTACAGGAAAGCGATGAAGGAATTTGCTTTGAAA
101   S  E  I  P  D  L  H  D  D  Y  R  K  A  M  K  E  F  A  L  K
361  TTGGAGACACTAGCTGAGGAACTACTAGACCTGTTATGTGAGAATCTTGGACTTGAAAAA
121   L  E  T  L  A  E  E  L  L  D  L  L  C  E  N  L  G  L  E  K
421  GGGTATCTGAAAAAGGCCTTCTATGGATCAAAAGGTCCAACTTTTGGAACCAAGGTGAGC
141   G  Y  L  K  K  A  F  Y  G  S  K  G  P  T  F  G  T  K  V  S
481  AATTATCCACCATGCCCAAAACCGGAGTTGATCAAAGGTCTCCGAGCCCACACAGATGCA
161   N  Y  P  P  C  P  K  P  E  L  I  K  G  L  R  A  H  T  D  A
541  GGTGGCATCATCTTGCTGTTCCAGGATGACAAAGTCAGCGGCCTCCAGCTACTTAAGGAT
181   G  G  I  I  L  L  F  Q  D  D  K  V  S  G  L  Q  L  L  K  D
601  GGTCAATGGATTGATGTCCCTCCTATGCGCCACTCCATTGTAGTCAACCTTGGCGATCAA
201   G  Q  W  I  D  V  P  P  M  R  H  S  I  V  V  N  L  G  D  Q
661  CTTGAGGTTATAACAAATGGGAAATACAAGAGTGTAGAACACAGAGTGATTGCACAAACA
221   L  E  V  I  T  N  G  K  Y  K  S  V  E  H  R  V  I  A  Q  T
721  AATGGTACCAGAATGCCCATAGCTTCATTCTACAACCCCGGTAGTGATGCTGTTATTTAC
241   N  G  T  R  M  P  I  A  S  F  Y  N  P  G  S  D  A  V  I  Y
781  CCTGCACCAGTCCTTGTCGAGAAAGAAGCAGAGGAGAAGAAGCAAGTTTACCCAAAATTT
261   P  A  P  V  L  V  E  K  E  A  E  E  K  K  Q  V  Y  P  K  F
841  GTTTTTGAAGATTATATGAAGCTTTATACTGCGTTGAAATTCGAGCCCAAAGAGCCAAGG
281   V  F  E  D  Y  M  K  L  Y  T  A  L  K  F  E  P  K  E  P  R
901  TTCAAAGCCATGAAAGCAGTGGAAACTAATGTTGGTTTGGGTCCAATTGCTACAGCTTAA
301   F  K  A  M  K  A  V  E  T  N  V  G  L  G  P  I  A  T  A  *
```

图 5　狗头枣 ACO I 基因的核苷酸序列及其所推导的氨基酸序列

Fig. 5　Nucleotide sequences and deduced amino acid sequences of Goutou jujuber ACO I

利用 DNAMAN 软件将狗头枣 ACO I 与上述 11 种植物的 ACO I 氨基酸序列进行系统进化分析，由图 6 可知：狗头枣最先与冬枣聚类合并，其次与其他蔷薇科植物(李属、桃、乌梅、苹果、沙梨)聚类，然后分别与山茶、山毛榉、巴西三叶胶、木薯及杨等聚类。表明狗头枣与蔷薇科的亲缘关系最近，与杨的亲缘关系最远。

2.5 ACO I 蛋白质一级结构特征及理化性质分析

用 ProtParam 软件对狗头枣 ACO I 基因的 319 个氨基酸预测，表明该蛋白质的分子式为 $C_{1635}H_{2560}N_{424}O_{476}S_{15}$，相对分子质量为 36 253.7 Da，理论等电点为 5.65；带负电荷的氨基酸残基数(Asp+Glu)为 48，带正电荷的氨基酸残基数(Arg+Lys)为 41；不稳定系数为 28.25，此蛋白质为稳定蛋白质；氨基酸组成中氨基酸 Glu(10.0%)，Leu(9.7%)，Lys(9.1%)，Ala、Gly、Val(均为 6.6%)质量分数均较高，不含 Pyl 和 Sec；亲水性平均数为-0. 382，表明该蛋白质为亲水性蛋白质，可能与含有较多的 Glu、Leu 和 Lys 有关。用在线的 ProtScale 程序(http://www.expasy.org /cgi-bin/protscale.pl)进行疏水性分析(见图 7)，同样得出该蛋白质为亲水性蛋白质。

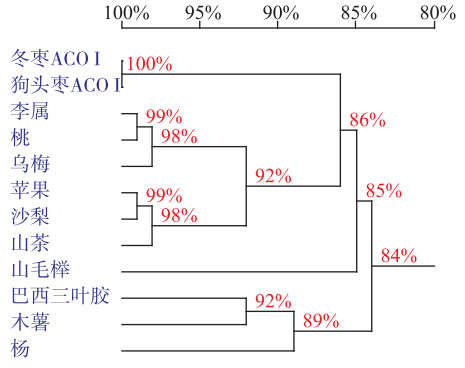


图 6　狗头枣 ACO 氨基酸序列与其他物种氨基酸序列的同源树

Fig. 6　Homology tree of a sequence of ACC oxidase gene of Goutou jujuber with others specie

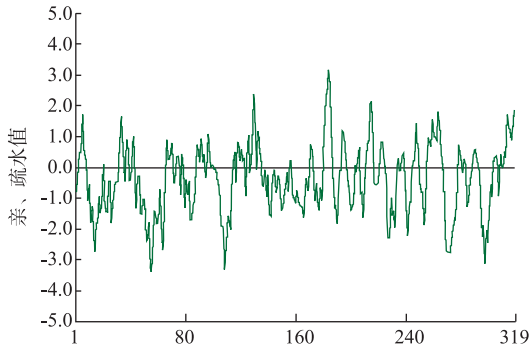


图 7　ACO I 蛋白质疏水性分析

Fig.7　Hydrophobicity profile of ACO I protein

2.6　ACO I 蛋白质二级结构预测

通过在线蛋白质分析软件 Predictprotein 进行 ACO I 蛋白质的二级结构预测，结构比率为：α-螺旋占 32.29%、β-折叠占 15.36%、无规卷曲占 52.35%。Signal 4.0 Server 软件检测发现，该序列中没有信号肽序列，这说明狗头枣中的 ACOI 蛋白质可能为非分泌性蛋白质。

3 讨　论

ACO 基因已从桃、矮牵牛、柿子、草莓、梨、番茄、冬枣等众多植物中被分离克隆，并证明其是由多基因家族成员所编码，该基因表达也具有一定的组织及时空特异性[7-9]。如冬枣的 Zj ACO1 与 Zj ACO2 在叶片中基本不表达，ZjACO1 在绿果期具有较高表达水平，到发白期果实中表达水平达到最高，而在成熟期则又下降，红色期几乎不表达；而 ZjACO2 仅在大绿果期和发白期果实中具有较高的表达水平，在果实发育的其他时期基本不表达[5]。由此推断枣中可能还存在其他的 ACO 基因成员。

4 结　语

将本研究所得 ACO I 基因用生物信息学软件进行多序列比对分析，表明该基因与其他植物已分离的 ACO I 基因无论是核苷酸水平还是在氨基酸水平，都有很高的同源性，这为借鉴其他植物相关研究进行狗头枣 ACO I 基因研究奠定了理论基础，也消除了所得狗头枣 ACO I 基因用于其他红枣品种间进行转基因的潜在危险性。对于所获得的 ACO I 基因是否对红枣果实成熟起调控作用，研究组正在构建该基因 RNAi 表达载体并用于红枣遗传转化研究中。此外，还需要对枣果实中其他的 ACO 基因家族成员进行深入研究。

参考文献：

[1] 张竞秋，武泰存，王景安. 果实保鲜的基因工程[J]. 植物生理学通讯，2006，42(4)：790-794.
ZHANG Jingqiu，WU Taicun，WANG Jingan. Gene engineering of fruits fresh keeping [J]. **Plant Physiology Communications**，2006，42(4)：790-794. (in Chinese)

[2] Czarny J C，Grichk V P，Glick B R. Genetic modulation of ethylene biosynthesis and signaling in plants [J]. **Bio-technology Advances**，2006，24：410-419.

[3] 陈明，陈金印. 调控果实成熟的基因工程研究进展[J]. 中国农学通报，2004，20(4)：15-19.
CHEN Ming，CHEN Jinyin. Advances in research on genetic engineering regulated ripening of fruit [J]. **Chinese Agricultural Science Bulletin**，2004，20(4)：15-19. (in Chinese)

[4] Cornelius S Barry，James J Giovannoni. Ethylene and fruit ripening[J]. **Jorunal Plant Growth Regul**，2007，26：143-159.

[5] 魏绍冲，陈汝，赵相娟，等. 冬枣两个 ACC 氧化酶基因的 cDNA 克隆及其表达模式[J]. 园艺学报，2008，35(5)：643-648.
WEI Shaochong，CHEN Ru，ZHAO Xiangjuan，et al. Cloning and expression patterns of two cDNAs encoding ACC oxidase in 'Dongzao' jujube[J]. **Acta Horticulturae Sinica**，2008，35(5)：643-648. (in Chinese)

[6] 萨姆布鲁克 J，弗里奇 E F，曼尼阿蒂斯 T，等. 分子克隆实验指南[M]//第 2 版. 金冬雁，黎孟枫，译. 北京：科学出版社，1992.

[7] 张丽，唐霞，马俊莲，等. 富有柿果 ACC 氧化酶 cDNA 的克隆及其序列分析[J]. 华北农学报，2007，22(1)：69-72.
ZHANG Li，TANG Xia，MA Junlian，et al. Cloning and sequence analysis of a cDNA encoding ACC oxidase from fuyu persimmon[J]. **Acta Agricultural Boreali-Sinica**，2007，22(1)：69-72. (in Chinese)

[8] 郝金凤，高峰，博彦泰，等. 甜瓜品种河套蜜瓜 ACC 氧化酶基因 1(ACO1)全长 cDNA 的克隆及序列分析[J]. 华北农学报，2010，25(4)：61-63.
HAO Jinfeng，GAO Feng，BO Yantai，et al. Cloning and sequence analysis of ACC oxidase gene 1 cDNA from melon cultivar hetao(Cucumis melo L.cv hetao)[J]. **Acta Agricultural Boreali-Sinica**，2010，25(4)：61-63. (in Chinese)

[9] 石海燕，张玉星. 高等植物 ACC 氧化酶基因的克隆 _ 表达及其调控[J]. 安徽农业科学，2012，40(1)：39-40.
SHI Haiyan，ZHANG Yuxing. Cloning，expression and regulation of ACC oxidase gene in higher plants [J]. **Journal of Anhui Agricultural Sciences**，2012，40(1)：39-40. (in Chinese)