

• 遗传快报 •

番茄 1—氨基环丙烷羧酸(ACC)合成酶基因的反义 RNA—核酶嵌合 DNA 序列的构建^①

仇润祥^② 扈廷茂^③ 王永胜 张晓海 刘中大

(内蒙古大学生物系, 呼和浩特 010021)

摘要 根据番茄 ACC 合成酶基因(LE-ACC2)DNA 序列, 以番茄(*Lycopersicon esculentum* Mill)果实的总 DNA 为模板, 利用 PCR 技术扩增得到预期大小的该基因编码区内部分 DNA 序列, 插入到质粒载体 pGEM-3zf(+)的 *Bam*HI 和 *Hind*III 位点之间后转化 *E. coli* DH-5 α , 可选出重组子 pRE, 经酶切, PCR 及 DNA 序列分析证明克隆成功; 将 pRE 上的目的 DNA 序列以反义方式构建到我室已合成并克隆的含核酶 DNA 序列的重组质粒 pRI 的 *Bam*HI 和 *Hind*III 之间, 构成含有反义 RNA—核酶嵌合 DNA 序列的重组质粒 pREI, 经酶切及序列分析, 结果与预期一致。

关键词 番茄, ACC 合成酶, 反义 RNA—核酶嵌合基因

中图分类号 Q78, Q943

The Construction of Antisense RNA—Ribozyme Chimeric DNA Sequence of Tomato ACC Synthase Gene

QIU Run—Xiang HU Ting—Mao WNAG Yong—Sheng

ZHANG Xiao—Hai LIU Zhong—Da

(Department of Biology, Inner Mongolia University, Huhhot 010021)

Abstract According DNA sequence of Tomato ACC synthase gene(LE-ACC2), and using total DNA of fruit of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill) as template, the expected partial DNA Sequence in coding region of gene was obtained by PCR amplification and inserted into pGEM-3zf(+) digested with *Bam*HI and *Hind*III, then we transformed the system into DH5- α and selected the positive recombinant (pRE). The digestion of enzyme, PCR amplification and sequence of DNA analysis demonstrated that the cloning was successful; By the antisense way, the DNA sequence from pRE was combined to pRI between *Bam*HI and *Hind*III to construct pREI containing antisense RNA—Ribozyme chimeric DNA sequence (pRI was constructed in our Lab and contains Ribozyme DNA sequence). The restriction map of recombinants and sequence analysis were identical to the expected results.

Key words Tomato, ACC synthase, Antisense RNA—ribozyme chimeric DNA

番茄是一种重要的经济作物, 同时又是植物基因工程的模式植物^{〔1〕}。过去几年对其果实的成熟机制及应用

①国家自然科学基金(39460032)和内蒙基金资助项目。

②仇润祥, 男, 26岁, 硕士研究生, 专业方向为分子遗传学。

③通讯联系人。

反义基因延熟方面的研究比较深入。乙烯是植物内源性成熟激素, 具有明显的果实催熟作用。1979年, Adams 和 杨祥发 阐明了乙烯的生物合成途径⁽²⁾。乙烯的直接前体 ACC 的合成是由 ACC 合成酶这个限速酶来催化的。1991年, Rottman 等⁽³⁾ 从成熟的番茄果实里克隆了 5 个 ACC 合成酶基因, 其中 LE-ACC2 与 Straeten 1989 年报道的 pCVV4A 完全一样, 与番茄的成熟直接相关。因此, 基于 ACC 合成酶在乙烯生物合成方面的重要性, 在基因水平上控制 ACC 合成酶的表达成为植物果实延熟及抗衰老的一个研究热点。

1991年, Oeller 将 ACC 合成酶的反义基因导入番茄植株中去⁽⁴⁾, 在所培育成功的转基因番茄果实中, 乙烯的合成被抑制了 99.5%。国内外应用反义技术在抗病毒感染和果实保鲜等方面开展了不少工作, 但效果不等。甚至有将番茄 ACC 合成酶基因及其反义基因导入其它植物(如西瓜)也取得了一定的效果⁽⁵⁾。目前应用基因工程进行果实保鲜和延熟几乎都集中于反义技术, 但其在体内作用的效率及稳定性有待提高。

核酶是由 Cech 和 Altman 发现的一类具有催化功能的 RNA 分子⁽⁶⁾, 其切割具有顺序专一性。从核酶发现以来, 对其结构和机理有较多的研究⁽⁷⁾, 并确定为金属酶类⁽⁸⁾。目前应用研究中较受重视的核酶有锤头结构(Hammerhead)、发夹结构(Hairpin)和斧头结构(Axehead),^(8~10) 其中锤头结构被研究的较多, 其结构特点也最早被阐明, 加上其设计简单和类型多样, 从而为从全新角度设计合成特异性的人造核酶, 专一性抑制某一 RNA 的活性提供了条件。在核酶应用方面, 大部分集中在抗病毒方面, 尤其是严重威胁人类健康的获得性免疫缺陷病毒(HIV)的复制上^(6, 12, 13), 然而其体内稳定性、切割效率有待提高。有关反义 RNA—核酶嵌合基因在抗病毒方面, 国外有少量报道^(14, 15), 而在国内外尚未见到以此嵌合基因抑制番茄 ACC 合成酶 mRNA 表达的报道。

本文成功地克隆了反义 RNA—核酶嵌合 DNA 序列, 希望利用此嵌合基因弥补反义 RNA 和核酶分别作用的不足, 从而为进一步探讨利用该嵌合基因提高抗果实软化的可能性创造必要条件。

1 材 料

1.1 植物材料

表面顶部略显红色的番茄果实。

1.2 菌种及载体质粒

DH-5 α 为本实验室保存菌种; pGEM-3zf(+)载体质粒购自北京华美生物工程公司。

1.3 酶、试剂及用品

限制性内切酶; 标准 DNA 分子量 Marker; PCR 试剂盒; T₄-DNA 连接酶均购自华美生物工程公司。X-gal; IPTG 为 Promega 公司产品。其它常规试剂均为国内分析纯或化学纯产品。

1.4 引物

据 Rottman 报道的番茄 ACC 合成酶 LE-ACC2 基因正链序列⁽³⁾, 先在第四个外显子 1 928~2 421 区段处设计合成一对引物, 跨越 ACC 合成酶基因 494bp(该区段转录形成 LE-ACC2mRNA 中的 649~1 086 区段)。

Re-1: 5' GGGGATCCACCTTGTTTGTGACGA-24mer(5 端引物);

Re-2: 5' CGTTAAGCTTAACATCGTTT-20mer(3 端引物)。

以上引物由中国科学院微生物研究所自动 DNA 合成仪合成。

2 实 验 方 法

2.1 ACC 合成酶基因(LE-ACC2)部分编码序列的克隆和检测

2.1.1 番茄总 DNA 的提取 参考辽宁省农业科学院石太渊等快速提取高粱 DNA 的改良方法⁽¹⁶⁾。

2.1.2 目的基因的 PCR 的扩增 100 μ l 的反应体系中包括: 10 \times buffer[500mmol/L KCl; 100mmol/L Tris-HCl(pH9.0, 25 $^{\circ}$ C); 15mmol/L MgCl₂; 0.1%明胶(w/v); 1% Triton X-100] 10 μ l; 4 \times dNTP(2.0mmol/L/每种) 10 μ l; 引物 Re-1 和 Re-2 分别为 50pmol; 模板 500ng。循环参数为: 95 $^{\circ}$ C 1 分钟、50 $^{\circ}$ C 1 分钟、72 $^{\circ}$ C 3 分钟、35 个循环。

2.1.3 连接及转化 用 *Bam*HI 和 *Hind*III 双切提取好的质粒载体 pGEM-3zf(+)及 PCR 产物, 用电洗脱透析带法分别回收 PCR 产物及载体大片段按常规方法进行连接⁽¹⁷⁾, 连接产物转化感受态细胞(DH-5 α), 转化产物涂布在含 X-gal、IPTG 的培养基上进行蓝白斑落的初步筛选⁽¹⁸⁾。

2.1.4 重组子的筛选和鉴定 养皿随机挑取 8 个大而透亮的菌落, 提质粒后, 首先用 *Pst*I 单酶切。没有切开的阳性克隆用 *Bam*HI 和 *Hind*III 双切及 PCR 检测, 以进一步确定重组质粒。

2.2 嵌合 DNA 序列的构建及检测⁽¹⁷⁾

2.2.1 构建及克隆 以反碱法提质粒 pRE 及 pRI, 用 *Bam*HI 和 *Hind*III 分别双酶切 pRE 和 pRI, 并用电洗脱透析带法回收 pRE DNA 小片段北京义方式和以同样方法回收的 pRI 大片段进行连接。用 DH-5 α 制备感受态细胞并进行连接物的转化, 转化产物用 Amp 初步筛选。随机挑取 8 个阳性克隆, 用 *Xba*I 单切, 然后挑取未切开的重组质粒, 用 *Kpn*I 和 *Hind*III 及 *Bam*HI 和 *Hind*III 两种双酶切以进一步检测 pREI 是否构建成功。

2.2.2 序列分析 将 pREI 交由 赛百盛(美国)生物工程公司 DNA 自动荧光测序仪进行序列分析。

嵌合基因克隆质粒构建图(图 1)。

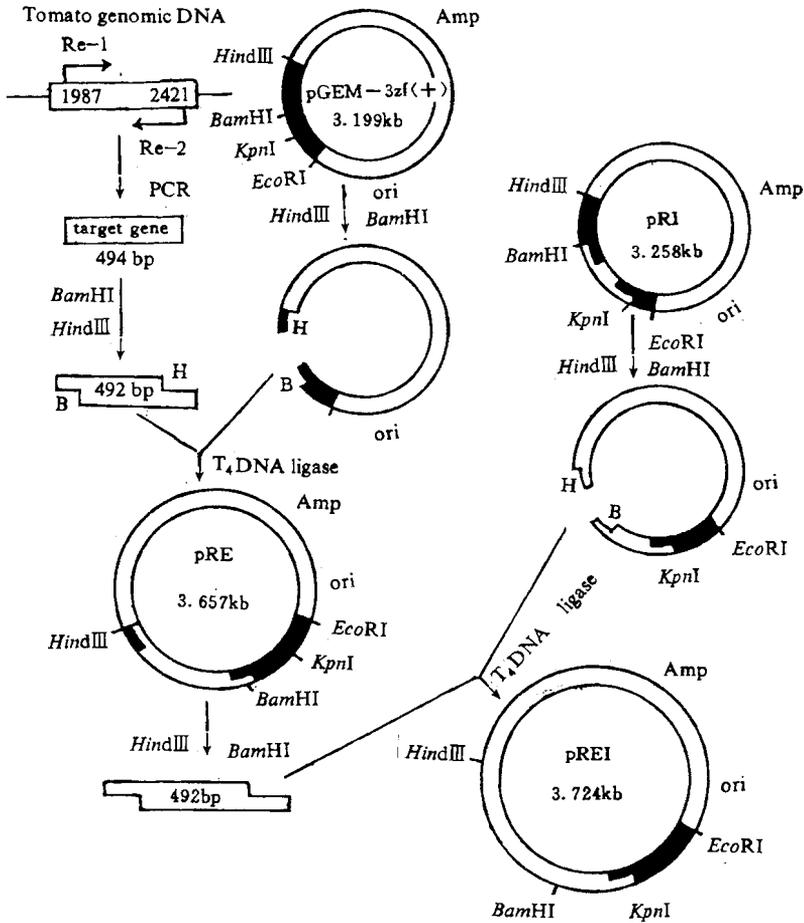


图 1 反义 RNA-核酶嵌合序列重组载体的构建图

3 结 果

3.1 ACC 合成酶基因(LE-ACC2)部分编码序列的克隆分析

用 *Pst*I 单切 8 个白色菌落的质粒 DNA, 有 5 个质粒不存在 *Pst*I 切点。将此 5 个克隆进行酶切及 PCR 检测, 证明确有预期大小的插入片段。

3.2 反义 RNA—核酶嵌合 DNA 序列的构建及检测

3.2.1 嵌合 DNA 序列连接物 转化得到 23 个转化子, 随机挑取 8 个大而透亮的转化子, 提质粒 DNA, 经相应酶切检测, 其中 5 个克隆含有预期大小的嵌合片段, 从而说明 pREI 构建成功。

3.2.2 反义 RNA—核酶嵌合 DNA 序列的分析 经反义 RNA—核酶嵌合 DNA 序列的分析, 与原序列(包括 *Bam*HI 位点之前的原设计的核酶 DNA 序列)和 *Bam*HI 位点之后的原 LE-ACC2 编码区内部分 DNA 序列比较见图 2。



图 2 反义 RNA—核酶嵌合 DNA 与设计的核酶 DNA 及 LE-ACC2(1 928~2 381)的核苷酸顺序比较
a. 嵌合 DNA 核苷酸顺序; b. 设计核酶 DNA 及 LE-ACC2(1 928~2 381)的核苷酸顺序。

我们只比较前 521 个碱基序列, 第 521~561 位点间序列由于测序太长的原因, 在测序图上未标出。1~6 位是 *Kpn*I 酶切位点, 69~74 是 *Bam*HI 酶切位点, a 表示原序列, b 表示嵌合 DNA 的序列(与 a 序列相同的碱基用横线代替)分析结果。通过比较发现: b 序列相对于 a 序列的第 62 位缺失了一个 C, a 序列第 143 位的 A 在 b 序列中以 G 替换。如不考虑未标出的序列, 嵌合 DNA 序列与原序列比较, 同源率为 99.80%。

3.3 核酶—反义 RNA 嵌合 DNA 序列的转录产物在 mRNA 上的作用位点及区段

针对番茄 ACC 合成酶基因 LE-ACC2 第四个外显子处设计的核酶—反义 RNA 嵌合 DNA 序列的转录产物

在 mRNA 上的作用位点及区段见图 3。

嵌合 DNA 序列的转录产物在 mRNA 上的作用位点及区段的说明:

- (1) *KpnI* 和 *BamHI* 识别序列对应区段与 mRNA 不完全互补, 是出于构建的需要。
- (2) 以 *BamHI* 识别序列对应区段与 mRNA 不互补的 CC 为分界点, 左为核酶(62nt), 右为反义 mRNA(492nt)。反义 RNA-Ribozyme 由 pGEM-3zf(+)₂的 SP6→T7 方向转录而成, 即 *HindIII*→*KpnI* 方向。
- (3) 箭头(竖向)所指为核酶在 mRNA 上的剪切点。

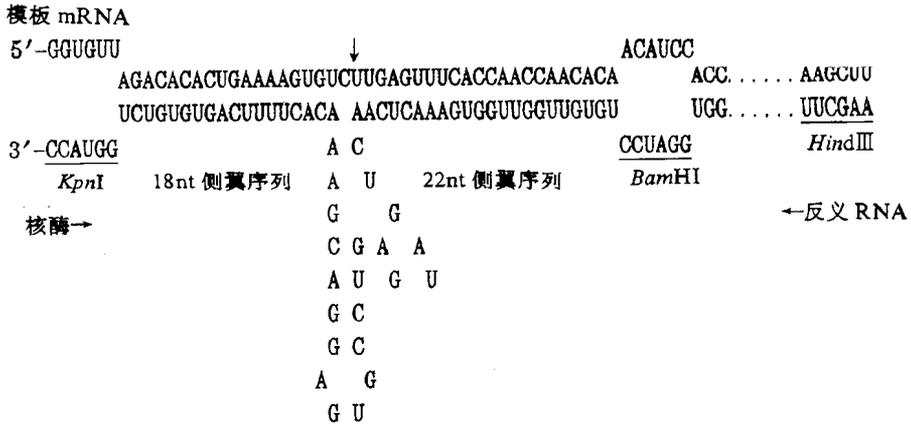


图 3 反义 RNA-核酶嵌合 DNA 序列转录物阻断 LE-ACC2 mRNA 表达的序列和位点

4 讨 论

1991 年, Rottman 从成熟的番茄果实里克隆了 5 个 ACC 合成酶基因^[3] 其中与番茄果实成熟直接相关的两种是 LE-ACC2 和 LE-ACC4。LE-ACC2 被乙烯诱导的速度快于 LE-ACC4, 所以应用基因工程技术对番茄果实延熟保鲜最理想的方法就是阻断 LE-ACC2 的表达, 本文正是针对此基因设计并合成了反义 RNA-核酶嵌合 DNA 序列。通过测序并与原序列进行比较, 发现测出的 LE-ACC2 基因编码区内部分 DNA 序列与原序列相比只有一个碱基差异(第 143 位以 A 替代了 G)。测出的核酶 DNA 序列与原设计序列相比在第 6 位和第 62 位分别缺失了一个 C, 根据测序图的波峰判断, 第 6 位上的 C 属未标出, 实际并未缺失, 而第 62 位的 C 将来位于核酶的右臂上, 对于核酶行使其功能无有影响。所以预计此嵌合体序列可以较圆满地实现其功能。

设计 Ribozyme 和反义 RNA 时, 正确选择靶位点是很关键的。我们比较了 ACC 合成酶多基因家族成员, 发现 LE-ACC2 的第四个外显子在多基因家族中相对保守。尤其是 LE-ACC2 和 LE-ACC4 在我们所设计的嵌合基因区内, 核苷酸序列几乎是吻合的(LE-ACC2 比 LE-ACC4 后移几位)。LE-ACC2 第四个外显子从 2 180 位点开始有 36 个碱基在 ACC 合成酶多基因家族及各种转氨酶基因中几乎是保守的, 而这 36 个碱基序列表达形成 ACC 合成酶的 Dodecapeptide motif, 是 ACC 合成酶的部分活性中心, 也是辅酶磷酸吡哆醛的结合位点。

基于以上分析, 我们针对 LE-ACC2 第四个外显子 1 928~2 421 区段间设计了反义 DNA 序列, 在 1 897~1 934 区段间, 针对 1 903 位点开始处的 GTC 设计了核酶 DNA 序列, 二者重合的 6 个位点是 *BamHI* 的识别位点。借助与此位点构建的嵌合基因序列可望能阻断 LE-ACC2 的表达, 同时阻断 LE-ACC4 及其它多基因家族成员, 从而能够有效控制乙烯的形成, 达到高效延熟及保鲜的目的。

在设计 Ribozyme 靶位点时, 我们考虑到周围的二级结构比较简单, 有利于核酶接近靶位点, 其保守性也较好, 符合核酶切割位点的一般性原则^[20]。在核酶两臂互补序列长度方面, 一般认为两侧互补区为 16 个碱基较为合适^[20]。但考虑到嵌合基因构建的需要及真核生物 mRNA 较长而导致其二级结构的复杂性, 我们选择了左臂 18 个碱基, 右臂 22 个碱基, 使得核酶与 mRNA 容易结合, 易于发挥作用。

核酶两侧需要与靶 RNA 配对, 从这个意义上说, 核酶是具有催化活性的反义 RNA 分子^[22], 也就是说具有反义 RNA 和剪切作用的双重功能。但由于真核生物 mRNA 较长, 可能导致其二级结构复杂化, 加上有关核酶对真核生物 mRNA 剪切的报道极少, 所以如果核酶的作用位点被埋藏在高级结构中, 反义 RNA 牢固的结合作用可以拆开二级结构, 从而促进核酶发生作用。反过来, 核酶的结合及剪切也可增加破坏 mRNA 的二级结构, 促进自身和反义 RNA 的作用。反义 RNA 和核酶有协同作用^[14], 尤其是可望能提高核酶的稳定性和剪切效率。核酶和反义 RNA 的联合应用将是真核生物体内阻断 mRNA 表达的有效办法。

从另一个角度说, 嵌合基因序列的转录物相当于臂延伸了的核酶, 核酶两侧的无关序列虽可提高核酶的稳定性, 但如果与核酶形成二级结构, 会导致剪切活性的降低^[23]。我们还难以肯定没有这种可能性, 另外还有报道^[20]: 核酶两侧的靶序列延长, 与 mRNA 作用加强, 剪切效率高, 但最适温度也升高, 这对体内作用显然是不利因素。基于这种认识, 我们可利用本文所克隆的反义 DNA 序列和核酶碱基序列不经嵌合就检测其作用, 作为对照, 以检测这种可能性是否成立。

本文是有关克隆反义 RNA-核酶嵌合基因序列, 以用于阻断番茄 ACC 合成酶表达的首次报道, 对于探讨番茄延熟保鲜的机制及嵌合基因的作用, 有十分重要的理论价值和实际意义。同时也为今后进一步与其它高效率启动区联合克隆, 构建高效表达载体, 以获得高效表达的和稳定的转基因植株创造了条件。

参 考 文 献

- 1 王永胜等. 特异切割番茄 1-氨基环丙烷羧酸 mRNA 的核酶基因序列的合成与克隆. 遗传, 1998, 20(1): 28~32
- 2 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: 170~174
- 3 Rottman W H *et al* 1-Aminocyclopropane-1-carboxylate synthase in tomato is encoded by a Multigene Family whose Transcription is induced during Fruit and Senescence. J. Mol. Biol., 1991, 222: 937~961
- 4 Oeller P W, Lu M W, Taylor L P *et al*. Reversible Inhibition of Tomato Fruit Senescence by antisense RNA. Science, 1991, 254: 437~439
- 5 王春霞等. ACC 合成酶基因及其反义基因对西瓜的遗传转化. 植物学报, 1997, 39(5): 445~450
- 6 Sarver N, Cantin E M, Chang P S *et al*. Ribozyme as potential anti-HIV-1-therapeutic agents. Science, 1990, 247: 1222~1225
- 7 Cech T R, Uhlenbeck O C. Hammerhead nailed down. Nature, 1994, 372: 39~40
- 8 Pyle A M. Ribozyme: A distinct class of metalloenzyme. Science, 1993, 261: 709~714
- 9 Ding Shouwei *et al*. The tymbobox, a sequence shared by most tymovirus: Its use in molecular studies of tymoviruses. Nucleic acids Reserach, 1990, 1181~1187
- 10 Lamb J W, Hay R T. Ribozymes that cleave potato leafroll virus RNA within the coat protein. Journal of General Virology, 1990, 71: 2257~2264
- 11 Ausubel F M. Current Protocols in Molecular Biology. Wiley Fnter science, 1989
- 12 Sczakiel G, Micheal P. Inhibition of Human immunodeficiency virus type I replication in human T cell stably expressing antisense RNA. Jvirol, 1991, 65: 468~472
- 13 Sczakiel G, Micheal P, Andreas K. Specific inhibition of human immunodeficiency virus type I replication by RNA transcribed in sense and antisense orientation from the 5'-leader/gag region. Biophysics Res. Commun, 1991, 169: 643~651
- 14 Cantor G H *et al*. Proc Natl Acad Sci USA., 1993, 90(23): 10932~61
- 15 Homan M *et al*. Nucleic Acids Rec., 1993, 21(12): 2809~14
- 16 石太渊等. 快速提取高粱 DNA 的改良方法. 生物学杂志, 1992, (1): 25~27
- 17 萨姆布鲁克等著(金冬雁等译). 分子克隆实验指南. 第二版, 北京: 科学出版社, 1993, 19~21
- 18 盛小禹等. CaCl₂ 法转化大肠杆菌. 基因过程实验技术讲义, 1986, 9: 53
- 19 彭秀玲, 袁汉英编著. 基因工程实验技术. 1987, 146
- 20 汤 华等. 核酶的抗病毒作用研究. 国外医学-微生物学分册, 1994, 17(1): 1~4
- 21 Heidenreich O *et al*. J. Biol. Chem., 1992, 261(3): 1904~1909
- 22 许政凯等. 核酶的体外合成及其对烟草花叶病毒靶 RNA 的作用. 中国科学(B), 1992, 1: 47~53
- 23 陆长德等. 核酶对靶 RNA 的体外切割反应的计算机分析. 生物化学与生物物理学报, 1996, 5: 279~285