

香蕉果实成熟相关基因 *ACO1* 启动子区的克隆及其功能初探

王新力 彭学贤*

(中国科学院微生物研究所植物生物技术实验室,北京 100080)

摘 要 根据已报道的香蕉果实表达 ACC 氧化酶基因(*ACO1*)的序列,用改进的接头连接 PCR 法从香蕉基因组中扩增并克隆了此基因 5' 旁侧区 1526bp 的片段。其中包含一个推测的 TATA 盒序列;与已公布的两个香蕉 ACC 氧化酶基因启动子序列(分别为 934bp 和 1451bp)的相似性各为 97.3%(López-Gómez 等)和 88.8%(May 和 Kipp)。将 4 个含有不同大小启动子区的克隆片段与 GUS 基因编码区连接构建成嵌合基因,通过基因枪轰击转入香蕉叶、根和果实的细胞后。瞬时表达结果表明不同大小的 *ACO1* 启动子区段都只在果实细胞中指导 GUS 基因表达,证明该启动子具有指导基因在果实中表达的功能,并推测负责果实特异性的顺式元件可能位于启动子近端 0.7kb 区段之内,在 468 至 822 的 355bp 区段内可能存在与正控制有关的顺式元件。

关键词 香蕉, ACC 氧化酶基因启动子, 果实相关性, 瞬时表达

中图分类号 Q789 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3061(2001)04-0428-05

ACC(1-aminocyclopropane-1-carboxylate)氧化酶是高等植物乙烯生物合成途径中的关键酶之一,催化由 1-氨基环丙烷-1-羧酸生成乙烯这一过程^[1]。在植物基因组中 ACC 氧化酶是由多基因编码的,已经鉴定出在番茄、矮牵牛和绿豆基因组中分别含有 3 个、4 个和 2 个 ACC 氧化酶基因成员^[2,3,4]。ACC 氧化酶基因的表达是以时空或诱导的方式调控的,其往往在果实成熟和叶片凋落过程,及组织受伤时大量表达;有些 ACC 氧化酶基因是以器官特异性方式表达的。ACC 氧化酶基因家族成员间的 5' 非编码区差别较大,编码区同源性较高;另外其产物的酶活性不稳定,周转较快。因此对于 ACC 氧化酶活性的调控主要是在基因表达水平上进行的。

López-Gómez 等分离到一个香蕉 ACC 氧化酶基因 *ACO1*,其包含 5' 旁侧区 0.9kb 的序列。用 Northern 杂交法证明 *ACO1* 在香蕉果实中和受伤的香蕉叶中表达^[5];May 和 Kipp 公布了一个关于香蕉 ACC 氧化酶基因启动子的专利^[6]。他们都没有进行启动子功能的鉴定。我们根据所发表的 *ACO1* 核苷酸序列设计引物,用接头连接 PCR 法从香蕉基因组 DNA 中扩增并克隆了其 5' 旁侧区序列;用瞬时表达的方法首次证实了该 5' 旁侧区序列具有果实相关启动

子功能。

1 材料与方法

1.1 材料

香蕉(*Musa acuminata*)叶和根取自香蕉组培苗移栽 6 个月的幼株;香蕉果实为贮存于 10℃ 的成熟青果实。

1.2 方法

1.2.1 基因组 DNA 的提取 参照植物 RNA 的提取方法^[7]从香蕉叶中提取基因组 DNA。

1.2.2 PCR 扩增 参照 Siebert 等改进的接头连接 PCR 方法^[8],用产生平末端的限制酶将基因组 DNA 酶切,酶切产物与合成的接头连接,建立一系列接头连接 DNA 库;以其为模板,用接头引物(AP-1 和 AP-2)和基因特异引物进行 PCR 扩增。其中基因特异性引物为 ACOP3(5'-GGATCTCCATGGCTGCT-3')和 ACOP4(5'-CATGACACGCTCTTTCTTC-3');扩增片段均克隆在 pBluescript II SK⁺ 载体中,重组质粒转化大肠杆菌 DH5 α 菌株。

1.2.3 瞬时表达载体的构建 pUGS 的构建见文献[9],将含有 PCR 扩增片段的重组质粒用 *Bam*HI 和 *Sal*I 进行双酶切,分离切出的插入片段,与 *Bam*HI

和 *SalI* 双酶切的 pUGS 载体片段连接 ,转化大肠杆菌 DH5 α 菌株 ,筛选正确的重组质粒。

1.2.4 瞬时表达检测 :见文献 [9]

2 结果与讨论

2.1 香蕉果实成熟相关 *ACO1* 基因启动子区的克隆

根据 López-Gómez 等发表的香蕉果实成熟相关 *ACO1* 基因序列 ,我们在其翻译起始密码子附近设计、合成了两段引物。经过接头连接 PCR 扩增 ,分别由 *SnaBI*、*HincII*、*ScaI* 和 *SspI* 酶切产生的“ 接头连接 DNA 库 ”中得到了约 1.1kb、1.5kb、0.7kb 和 1.0kb 的 DNA 扩增片段。对这 4 个片段进行序列分析证明它们均属于 *ACO1* 基因的启动子区序列 (GenBank 登记号 AF221107) ;它们的 5' 端区长度不同 ,但 3' 端一致。将含有这 4 种扩增片段的重组质粒分别命名为 pACOP1、pACOP4、pACOP7 和 pACOP19。从最长的片段 1526bp 序列上看 ,pACOP4 质粒包含 1 至 1526 的 1526bp 片段 ,pACOP1 质粒包含 396 至 1526 的 1131bp 区段 ,pACOP19 质粒中包含 468 至 1526 的 1059bp 的区段 ,pACOP7 质粒中包含 822 至 1526 的 705bp 的区段 (图 1)。1524 至 1526 为翻译起始密码子 ,1443 至 1450 为 TATA 盒 ,未找到 CCAAT 盒序列。序列分析表明该启动子序列有一处拟南芥同源异形盒蛋白 1 结合位点的类似序列 (以 Athp-1 表示)^[10] ,两处与玉米激活因子 P 结合位点的序列类似 (以 P 表示)^[11] ,有一段与玉米 Opaque 2 蛋白质结合位点的序列相似 (以 O₂ 表示)^[12] ,还有两处序列类似于禽骨髓细胞瘤病毒 (AMV) ν -Myb 蛋白质的结合位点序列 (以 ν -Myb 表示)^[11] 。在 82 至 136 和 176 至 235 之间有一段 55bp 的正向重复序列 (图 2)。

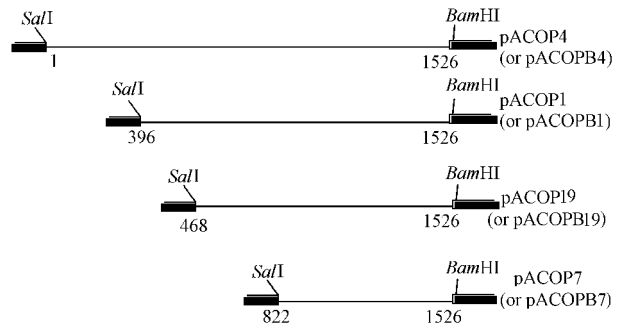


图 1 pACOPs 和 pACOPBs 中所含 *ACO1* 基因 5' 旁侧区区段
Fig.1 5' flanking regions of *ACO1* in pACOP or pACOPB plasmids

与已公布、发表的数据相比较 ,López-Gómez 等报道的 *ACO1* 基因启动子区序列比我们的短 592bp ,

相同区段序列相似性较高 ,达 97.3% ;与 May 和 Kipp 所公布的启动子序列相似性为 88.8% ,其序列比我们的短 75bp。这 3 个序列在 3' 部分基本相同 ,只是在 5' 端区存在差异。

与 GenBank 中其它的植物果实相关基因启动子以及香蕉果实特异性 ACC 合酶基因启动子序列相比较 ,相似性很低 ,为 19.9% ~ 22.3%。其中与苹果果实中表达 ACC 氧化酶基因启动子的相似性为 20.0% ,苹果果实 ACC 氧化酶启动子中有一段 64bp 的正向重复序列 ,但与香蕉 *ACO1* 启动子的 55bp 正向重复序列并无相似性 ,说明不同植物中功能相似的基因 ,其启动子间可能存在着很大的不同。对香蕉果实中表达的 ACC 合酶基因和 *ACO1* 基因的启动子进行序列比较 ,相似性只有 19.9% ;但在 8 ~ 10bp 序列范围内有近百个区段的 *ACO1* 基因启动子序列与 ACC 合酶基因启动子的正向或反向序列相同。可能这些短序列当中有些是在基因转录调控中起着重要的作用 ,决定着基因表达的特性以及协调功能相关基因的转录。

2.2 所克隆的香蕉果实成熟相关 *ACO1* 基因启动子区的功能鉴定

重组质粒 pACOP4、pACOP1、pACOP19 和 pACOP7 中的 *ACO1* 启动子插入片段在 pBluescript II SK⁺ 载体中的取向一致 ,并都包含启动子区、5' 非翻译区和 ATG 翻译起始密码子 ,在翻译起始密码子外侧的载体多酶切位点区有一个 *BamHI* 位点 ,与 pUGS 中的 *BamHI* 位点连接后 ,这个翻译起始密码子至 GUS 基因的编码区阅读框架正好相匹配。利用插入片段两端载体上的 *BamHI* 及 *SalI* 位点将插入片段切下来 ,连接到 *BamHI* 和 *SalI* 双酶切的 pUGS 载体上构建了四个 *ACO1* 启动子 5' 端不同的瞬时表达载体 pACOPB4、pACOPB1、pACOPB19 和 pACOPB7 (图 1)。

在瞬时表达试验中 ,以不含有启动子片段的 GUS 基因载体质粒 (pUGS) 为阴性对照转化香蕉材料 ,在基因枪轰击后的香蕉果实、叶和根中都未观察到出现蓝色斑点。以含有水稻 *Actin* 基因启动子与 GUS 融合基因的 pMG9 表达载体为阳性对照 ,在香蕉的果实、叶和根中均能观察到蓝色斑点^[9]。将含有不同大小 *ACO1* 启动子区的 4 种表达载体转化香蕉的叶、根和果实的细胞后 ,结果只在香蕉果实细胞中观察到 GUS 基因的表达 (彩版 Plate III)。虽然 4 种表达载体在组织化学上有差异 ,而且有启动子越短 GUS 显色越浅的趋势 ,但由于瞬时表达的结果不

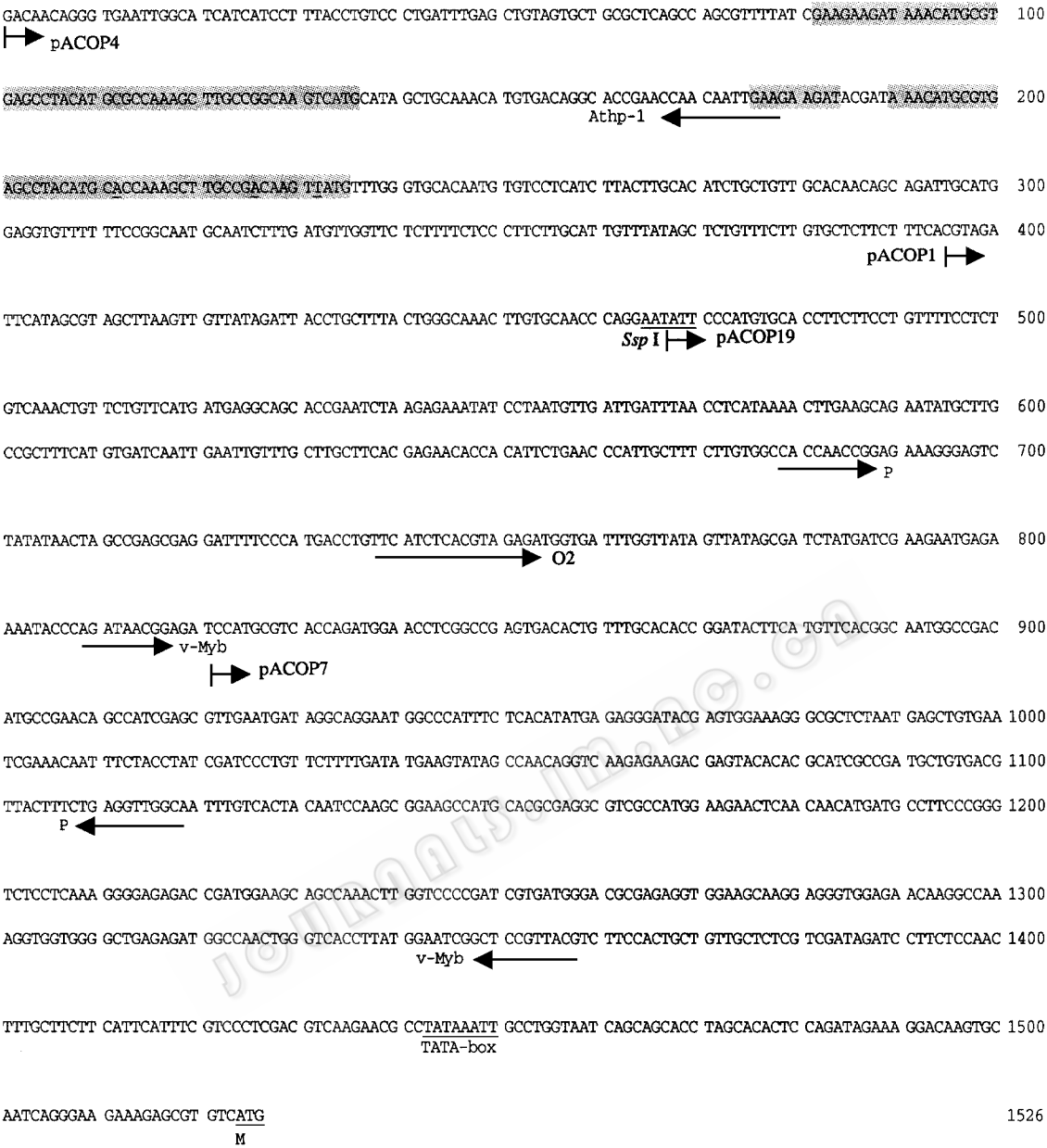


图 2 *ACO1* 基因 5' 旁侧区序列
Fig.2 5' flanking region sequence of *ACO1*

能准确定量 我们还不能确定启动子不同区段的作用,但瞬时表达的结果表明几种克隆的香蕉 *ACO1* 基因 5' 旁侧区都具有果实相关启动子的功能。

0.7kb 的 *ACO1* 启动子区段(pACOPB7)就可以指导报告基因于果实中表达,表明负责果实特异性转录的顺式元件位于启动子 3' 端区 0.7kb 的范围内,但其表达强度稍弱于其它 3 种表达载体(pACOPB4、pACOPB1 和 pACOPB19),可能在 467 至 822 的 356bp 区段内有与正控制相关的顺式元件,这一区段的缺失导致基因表达程度的下降。

目前对于植物果实中基因表达调控的研究还主要集中于双子叶植物当中,对于单子叶植物果实中表达基因调控的研究还未见报道。我们将在本文工作的基础上对香蕉 *ACO1* 启动子的结构以及与之结合的核蛋白质进行研究,并与有关的双子叶植物材料相比较,从中了解单、双子叶植物果实相关启动子的共同特征以及单子叶植物的相关基因表达调控的机制。

致谢 感谢本实验室莽克强先生和中山大学黄学林教授给予本工作的大力帮助。

REFERENCES(参考文献)

[1] Zarembinski T I ,Theologis A. Ethylene biosynthesis and action :a case of conservation . *Plant Mol Biol* ,1994 **26** :1579 ~ 1597

[2] 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

[3] Tang X ,Wang H ,Brandt A S *et al* . Organization and structure of the 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase gene family from *Petunia hybrida* . *Plant Mol Biol* ,1993 **23** :1151 ~ 1164

[4] Kim W T ,Yang S F. Structure and expression of cDNA encoding 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase homologs isolated from excised mung bean hypocotyls . *Planta* ,1994 **194** :223 ~ 229

[5] López-Gómez R ,Campbell A ,Dong J-G *et al* . Ethylene biosynthesis in banana fruit :isolation of a genomic clone to ACC oxidase and expression studies . *Plant Sci* ,1997 **123** :123 ~ 131

[6] May G D ,Kipp P B. International Patent . WO9738106 ,1997-10-16

[7] Chang S ,Puryear J ,Cairney J. A simple and efficient method for isolating RNA from pine tree . *Plant Mol Biol Rept* ,1993 **11** :113 ~ 116

[8] Siebert P D ,Chenchik A ,Kellogg D E *et al* . An improved PCR method for walking in uncloned genomic DNA . *Nucl Acids Res* ,1995 **23** :1087 ~ 1088

[9] WANG X L (王新力) ,PENG X X (彭学贤) . Cloning of promoter of banana fruit-specific ACC synthase gene and primary study on its function . *Chinese Journal of Biotechnology* (生物工程学报) 2001 **17** (3) :293 ~ 296

[10] Sessa G ,Morelli G ,Ruberti I. The Athb-1 and -2 HD-Zip domains homodimerize forming complexes of different DNA binding specificities . *EMBO J* ,1993 **12** :3507 ~ 3517

[11] Grotewold E ,Drummond B J ,Bowen B *et al* . The myb-homologous P gene controls phlobaphene pigmentation in maize floral organs by directly activating a flavonoid biosynthetic gene subsetRL . *Cell* ,1994 **76** :543 ~ 553

[12] Schmidt R J ,Ketudat M ,Aukerman M J *et al* . Opaque-2 is a transcriptional activator that recognizes a specific target site in 22-kD zein genes . *Plant Cell* ,1992 **4** :689 ~ 700

Cloning of Promoter of Banana Fruit Ripening-related *ACO1* and Primary Study on Its Function

WANG Xin-Li PENG Xue-Xian

(Laboratory of Plant Biotechnology ,Institute of Microbiology , Chinese Academy of Sciences ,Beijing 100080 ,China)

Abstract According to the published sequence of ACC oxidase gene(*ACO1*)which was shown to express in banana fruits ,we cloned its 5'-flanking region by improved adaptor ligation PCR. The 1526 bp fragment contained a putative TATA-box. Sequence alignment of our promoter with two published (934bp and 1451bp)revealed 97.3%(López-Gómez *et al* .)and 88.8%(May and Kipp)similarity in nucleotide sequence ,respectively. The 5'-flanking fragments in different length were fused to the coding sequence of GUS gene. These constructs were delivered to leaf ,root and fruit cells of banana via particle bombardment. The results of transient gene expression assay showed that the cloned *ACO1* promoter was able to direct fruit-specific gene expression ,and that the regulatory region for fruit-specificity was probably located in the 0.7 kb 5'-flanking sequence of the gene and some positive regulatory elements may exist within the region of 355 bp from 468 to 822 .

Key words banana , ACC oxidase , fruit ripening-related , promoter , transient expression

Received :October 23 ,2000

This work was supported by grant from the Key Project of the Chinese Academy of Sciences(KY 951-A1-302-12-09)

* Corresponding author .Tel 86-01-62522107 ;Fax 86-010-62560912 ;E-mail pengxx@sun .im .ac .cn

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals .im .ac .cn>