

## 番茄 ACC 合成酶 cDNA 克隆及其对果实成熟的反义抑制

刘传银<sup>1</sup> 田颖川<sup>2</sup> 沈全光<sup>1</sup> 蒋浩<sup>2</sup> 鞠戎<sup>1</sup>  
阎田<sup>1</sup> 刘存德<sup>1</sup> 莽克强<sup>2</sup>

(中国科学院植物研究所 北京 100093)<sup>1</sup>

(中国科学院微生物研究所 北京 100080)<sup>2</sup>

**摘 要** 利用 RT-PCR 技术克隆了 ACC 合成酶多基因家族成员之一 LE-ACC2 编码区约 1.7kb 的 cDNA, 经酶切图谱和序列分析鉴定无误后, 反向插入到植物表达载体 pBin437 中, 构建了表达 ACC 合成酶反义 RNA 的二元载体。经农杆菌途径转化番茄“丽春”品种后, 通过 PCR 检测从抗卡那霉素再生植株中筛选到 6 株转基因植株, Southern 杂交确证了外源基因是以单拷贝插入到番茄染色体中; 对果实乙烯释放的测定结果表明转基因番茄果实的乙烯释放量仅为对照的 30% 左右, 在室温下转基因番茄果实采后保存 60 d 以上仍然没有变红、软化。以上结果表明其反义 RNA 在转基因番茄中的表达能有效地抑制乙烯的生物合成从而延缓果实成熟, 表现出良好的耐储保鲜特性。对转基因植株子一代(T<sub>1</sub>)的分析结果进一步表明反义 ACC 合成酶基因以典型的单基因方式传到子代。通过对子二代的分析已初步筛选到一个耐储藏的转基因番茄纯合品系。

**关键词** ACC (1-aminocyclopropane-1-carboxylate) 合成酶, 反义 RNA, 转基因番茄

学科分类号 Q784

番茄果实成熟是果实器官发育的最后阶段, 在此期间内部发生一系列生理生化变化, 包括色泽、风味和质地的改变。越来越多的实验<sup>[1~4]</sup>证明这些生理生化变化和衰老的发生是有关成熟基因时空表达的结果, 而乙烯在跃变型果实成熟过程中作为一种调节器持续地通过复杂的信号传递途径与相关因子共同作用, 诱导相关 mRNA 和蛋白质的快速转换, 从而启动成熟过程<sup>[5]</sup>。80 年代初 Yang 等已阐明了乙烯生物合成途径<sup>[6]</sup>, 其中催化 SAM 向 ACC 转化的 ACC 合成酶是植物体内乙烯生物合成的限速酶。目前已知在番茄中此酶至少有 9 个编码基因<sup>[5]</sup>, 其中两个为果实成熟诱导的, 称果实成熟诱导型(Ripening fruit-inducible gene, R-type)。近几年来对 ACC 合成酶的分子生物学研究取得了重大进展, 至今已有多家实验室从番茄中克隆得到了 ACC 合成酶 cDNA 和相应基因组序列<sup>[7~10]</sup>。

由于乙烯对果实衰老成熟有重要的作用, 因而通过控制乙烯合成或其信号传递途径从而达到控制或延缓果实成熟一直是植物生理学家的研究课题之一。近几年发展起来的反义基因技术使保鲜技术产生巨大飞跃, 耐储藏转基因番茄植株的培育已在美国获得成功<sup>[11]</sup>, 表明用反义 RNA 技术控制 ACC 合成酶基因的表达从而抑制乙烯生物合成是一条

本项研究系国家“八五”科技攻关资助项目, 同时得到国际科学与文化中心(ICSC)的世界实验室的部分资助。

收稿日期: 1997-06-28, 修回日期: 1997-11-20。

确实可行而且快速培育耐储藏番茄的有效途径。在国内,罗云波等<sup>[12]</sup>已将 ACC 反义基因转入番茄获得了转基因植株,但对转基因植株及其子代的分子生物学及遗传学分析尚未见报道。

我们根据已知的 ACC 基因序列<sup>[13,14]</sup>,利用 RT-PCR 技术克隆了一个 ACC 合成酶 cDNA,并通过农杆菌途径转化番茄外植体获得了表达 ACC 反义 RNA 的转基因番茄植株,进而获得了耐储藏转基因番茄纯合体系。本文报道该项研究的一些主要结果。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

番茄“佳粉二号”(L. esculentum cv. Jiafen 2)果实购自北京四季青乡,转化用番茄品种“丽春”(Lycopersicon esculentum cv. Lichun)种子购自中国农科院。

质粒 pSP71 购自 Promega 公司;pBin437 为中科院植物生物技术开放实验室构建<sup>[15]</sup>,限制酶及各种 DNA 修饰酶为 Boehringer Mannheim 或 Promega 公司产品。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 聚合酶购自中科院遗传所。同位素  $\alpha$ -<sup>35</sup>S-dATP,  $\alpha$ -<sup>32</sup>P-dCTP 为美国 NEN 公司产品。Zeta-probe 杂交膜购自 Bio-Rad 公司。无 RNase 的 DNase 购自 Promega 公司。PCR 引物由中科院微生物所技术室及上海 Sangon 生物工程公司合成。

### 1.2 ACC 合成酶 cDNA 的克隆及鉴定

按 Straeton 等<sup>[14]</sup>用 LiCl 诱导番茄果实 ACC 合成酶,并参照 Vries 等的方法<sup>[6]</sup>从红熟的“佳粉二号”番茄果实心皮组织中提取总 RNA,将总 RNA 过 Oligo(dT)纤维素柱获得 mRNA<sup>[17]</sup>,根据 cDNA 合成试剂盒推荐的条件在 20  $\mu$ l 合成体系中合成 cDNA 第一条链,从中取 2  $\mu$ l 加到 50  $\mu$ l PCR 反应体系中进行扩增,反应条件为:94℃ 1min, 56℃ 1min, 72℃ 2min,共进行 30 个循环。PCR 产物经 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检查后,平头插入到 pBlue-script SK 的 EcoRV 位点,经转化获得 ACC 合成酶 cDNA 克隆 pTACC。对 pTACC 进行酶谱分析无误后再用双脱氧法测定克隆两端的序列。将 pTACC 用 Sma I / Cla I 完全酶解,回收 1.7kb ACC 合成酶基因片段,与 Pvu II / Cla I 完全酶解的质粒 pSP71 连接后转化 DH5 $\alpha$  即得到 pSPACC 克隆。

### 1.3 表达 ACC 合成酶反义 RNA 的二元载体的构建

用 Bgl II 和 Xho I 将 pSPACC 完全酶切,电泳后回收 1.7kb 片段,与 BamH I 和 Sal I 完全酶解的 pBin437 连接转化后得到表达载体 pBACC。参考 An 等<sup>[18]</sup>方法获得含 pBACC 的农杆菌转化子。

### 1.4 番茄的转化和植株的再生

用 pBACC/LBA4404 转化 7~8d 番茄幼苗子叶,在含卡那霉素的 MS 培养基上选择转化子及再生植株<sup>[19]</sup>。

### 1.5 转基因植株的 PCR 检测及 Southern blot 杂交

**1.5.1 PCR 检测:**用 CTAB 法<sup>[20]</sup>提取再生植株叶片 DNA,并以此为模板(约 100ng DNA)在 20  $\mu$ l 反应体系中进行 PCR 反应。

**1.5.2 Southern blot 分析:** 10 $\mu$ g 番茄叶 DNA 经酶解后,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<sup>32</sup>P 标记的 ACC 基因探针(1.7kb XhoI-Bgl II 双酶切的 pSPACC 片段)65℃ 杂交过夜。

## 1.6 ACC 合成酶反义 RNA 表达的检测

用热酚法<sup>[16]</sup>提取转基因植株叶片总 RNA,经 RNase 的 DNase 处理除去 DNA,按 Gibco BRL 公司 SuperScript™ cDNA 合成试剂盒推荐的以 ACC1 为引物,在 20 $\mu$ l 反应体系中合成 cDNA 第一条链,经 RNase H 处理后取 2 $\mu$ l 在 50 $\mu$ l 反应体系中以 ACC1、ACC2 为引物进行 PCR 扩增,反应条件为:94℃ 1min, 55℃ 1min, 72℃ 1min, 共 30 个循环。RT-PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳分离,然后按本文 1.5.2 所述方法与 ACC 基因探针进行杂交。

## 1.7 转基因番茄果实乙烯释放量测定及其储藏情况观察

用打孔器取番茄成熟果实外心皮组织圆片 3g 放入三角瓶,以橡皮塞封闭瓶口,置于 25℃ 下保温 1h 后用注射器从瓶内取 1ml 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乙烯释放量,以  $\mu$ l/g·h 表示。

转基因番茄植株及其子代植株在温室或网室种植后记录其开花、结果及转熟时间,观察植株及果实形态,在一定时间采收后与同期采收的对照果实进行储藏性的观察比较。

# 2 结果与讨论

## 2.1 ACC 合成酶 cDNA 的克隆和鉴定

根据已报道的基因序列<sup>[13,14]</sup>,在 LE-ACC2 基因的 5'非编码区和 3'非编码区分别设计了两个特异性引物,它们分别是:

Primer ACC1 (P1): 5'-TAAAGCACTTGTGAGTTGTG-3'

Primer ACC2 (P2): 5'-CCAGTTGTCAATACATACGCT-3'

按材料与方法 1.2 中所述合成了番茄“佳粉 2 号”果实的 cDNA,以此 cDNA 为模板用上述 ACC 基因特异性引物通过 PCR 扩增得到了 1.7kb 左右 DNA 片段。将此片段平头插入 pBluescript SK 的 EcoRV 位点获得了重组质粒 pTACC(见图 1)。DNA 测序读出该克隆两端共 400bp 的序列,与 Vander Straeten 等<sup>[14]</sup>发表的 LE-ACC2 序列的相应部分完全一致。限制性酶谱分析也证实我们所克隆的基因是正确的(资料略)。由于少数碱基的差异不可能对反义 RNA 的抑制作用产生重大影响,所以我们未对该 cDNA 进行全部核苷酸序列的测定。为了便于将 ACC 合成酶 cDNA 反向插入到植物表达载体中,又将其亚克隆到 pSP71 中构建成质粒 pSPACC(见图 1)。

## 2.2 pBACC 植物转化二元载体的构建

从 pSPACC 中分离到 1.7kb 的片段后与 BamHI 和 SalI 完全酶解的二元载体 pBin437 连接即得到表达 ACC 合成酶反义 RNA 的二元载体 pBACC(图 1)。

将 pBACC 质粒直接转化农杆菌 LBA4404,以 EcoRI 和 Hind III 酶切转化子中的 pBACC 质粒,得到了预期的 6 个片段(资料略),证明 ACC 合成酶基因已插入到二元载体 pBin437 中,并且与 35S 启动子的方向是相反的。

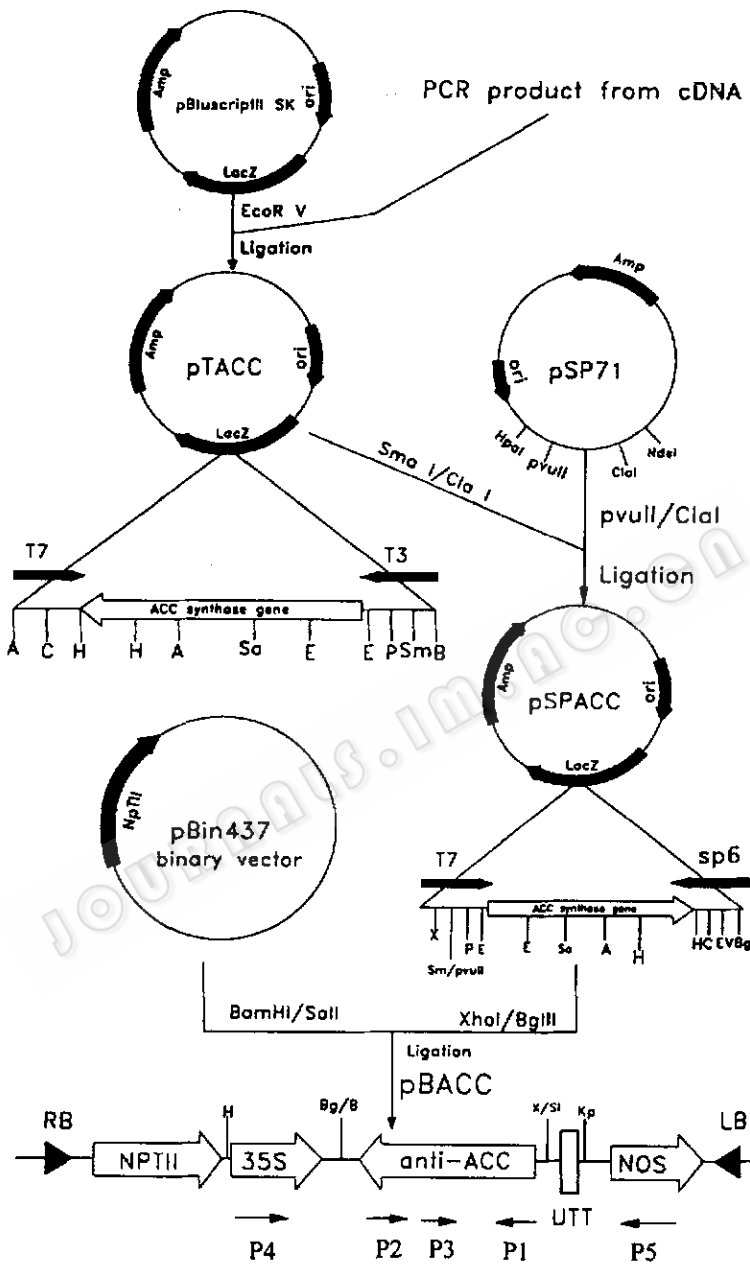


图 1 ACC 合成酶基因的克隆及植物表达载体 pBACC 的构建

Fig. 1 Cloning of ACC synthase gene and the construction of its antisense binary vector pBACC

The abbreviations used for restriction endonucleases were:

A, Acc I; B, BamHI; C, ClaI; E, EcoRI; EV, EcoRV; H, Hind III; P, PstI; Sa, SacI; SI, SalI; Sm, SmaI. The numbers of 1~5 with arrows indicate 5 primers and their direction in the vector: ACC1, ACC2, ACC3, 35S and Nos 3' sequence respectively.

2.3 番茄的转化和转基因植物的鉴定

通过农杆菌介导转化番茄子叶,获得再生植株后,利用 PCR 快速检测获得数株有外源 ACC 合成酶基因插入的转基因植株。由于 ACC 合成酶为多基因家族,各成员之间同源性很高,结构复杂,所以实验过程中我们利用 Primer ACC1, Primer ACC2 或 35S 和 Nos Primer 均未扩增出单一的特异 PCR 产物,出现非特异性扩增产物。经对该基因家族进行详细分析后,合成第三个引物 ACC3: 5'-TCTAACTCTTCCTC-CTCTTG-3',以 ACC3 和 Nos Primer 为引物进行 PCR 反应的结果表明(Fig. 2)

以转化植株 DNA 为模板和以 pBACC 为模板均特异地扩增出 600bp 的片段,而非转基因植株对照未扩增出任何片段,初步表明这些植株中(3# ~ 18#)有外源 ACC 基因插入。

为了最终证实反义 ACC 合成酶基因在番茄染色体中的整合,对植株的染色体 DNA 进行了 Southern 杂交,结果(见图 3)表明转基因植株 DNA 的 EcoRI 酶解产物与 ACC 合成酶基因探针可产生 0.4kb, 3.5kb 及大于 12kb 的三个杂交带,而非转基因对照

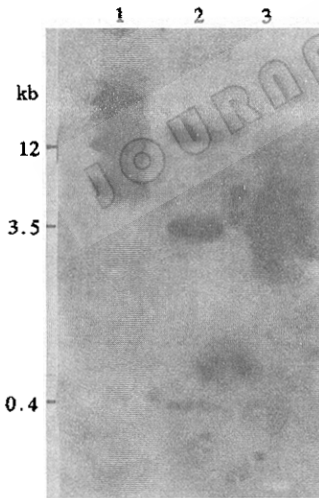


图 3 转 ACC 合成酶反义基因植株 DNA 的 Southern blot 杂交

Fig.3 Southern blot analysis of genomic DNA from tomato plant transformed with antisense ACC synthase gene

Lane 1. DNA from transgenic plant A1-1-15(T2 progeny) digested with XbaI and hybridized with <sup>32</sup>P labeled ACC synthase gene probe as described in the text.

Lane 2. As in lane1 but digested with EcoRI;

Lane 3. DNA from control plant digested with EcoRI.

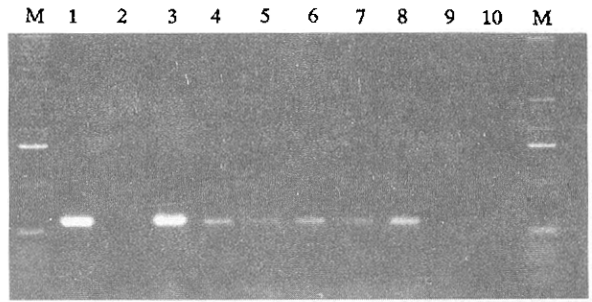


图 2 部分转化再生番茄植株 PCR 检测电泳图谱

Fig.2 Electrophoresis of PCR products of regenerated tomato plants

M: 1kb DNA ladder, Lanes 3~10: PCR products from 8 different transformed plants; Lane 1: From pBACC as a positive control; Lane 2: From non-transformed plant

则只产生一条 3.5kb 带,说明 3.5kb 这一杂交带为植物内源 ACC 合成酶基因与探针杂交产生的,而 0.4kb 与大于 12kb 带则分别应是 ACC 基因 5' 端的 0.4kb EcoRI 片段及其余部分 ACC 基因, NPT II 基因及部分植物染色体 DNA 形成的片段。转基因植株 DNA 经 XbaI 酶解后与 ACC 基因探针产生三个杂交带(图 3, 泳道 1), 最大分子量带可能是未完全酶解的染色体 DNA, 而另两条带应分别为内源 ACC 基因和插入的外源 ACC 基因片段。这一结果不但说明外源反义 ACC 合成酶基因已整合到番茄染色体上,而且表明只有一个拷贝的插入。

2.4 ACC 合成酶反义 RNA 在转基因番茄中的表达

为了证实反义 ACC 合成酶基因在转基因番茄中的转录,对转基因植株的

RNA 进行了 RT-PCR 及其产物的 Southern blot 杂交。引物 ACC1 为 ACC 合成酶基因的 5'端正链引物,所以番茄内源 ACC mRNA 不会与之结合,也就不会经反转录产生其 cDNA;而对转基因番茄而言 ACC1 既是内源 ACC 合成酶基因的 5'端正链引物,又是外源反义 ACC 合成酶基因的 3'端负链引物,只有反义 ACC 合成酶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 RNA 的 cDNA。由此可以排除内源 ACC 合成酶 RNA 对 RT-PCR 的干扰,确证其反义 RNA 在转基因番茄中的表达。RT-PCR 结果(见图)证实了这一点,即只有转基因番茄 RNA 才能经 RT-PCR 扩增出预期的 1.7kb 基因片段(图 4 左 A),对照植株则不能(图 4 左 B)。

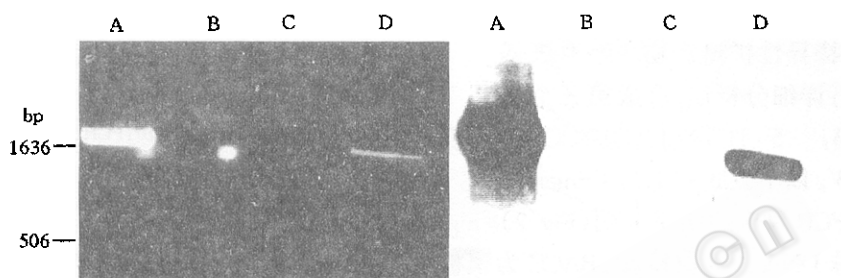


图 4 转基因番茄叶片总 RNA 的 RT-PCR 分析

Fig. 4 RT-PCR analysis of RNAs from transgenic tomato leaves

Left part of the picture is the electrophoresis pattern of the RT-PCR products, while the right part is the Southern blot analysis result pattern of the RT-PCR products on the left.

A. 5 $\mu$ l of RT-PCR products of transgenic plant RNA; B. 5 $\mu$ l of RT-PCR products of non-transgenic control plant RNA; C. As in A, but without reverse transcriptase; D. 1 $\mu$ l of RT-PCR products of transgenic plant RNA

RNA 样品均经无 RNase 的 DNase 处理除去了可能存在的 DNA 污染;未加反转录酶的 RT-PCR 结果(图 4 左 C)证明 RNA 样品中没有 DNA 污染。对 RT-PCR 产物进行 Southern 杂交(图 4 右),结果表明对照植株不存在这种反义 RNA。因此反义 ACC 合成酶基因在转录水平上的表达应是转基因番茄果实完熟过程延期、耐储藏的根本原因。

## 2.5 转基因番茄的乙烯生成及果实成熟

用成熟的番茄果实进行的乙烯释放测定结果表明转基因果实乙烯产生量仅为非转基因对照果实的 27%。经 1000ppm 乙烯利处理 10d 后转基因果实的乙烯释放量也仅分别为非转基因和转空载体转基因植株的 45% 和 39% (见图 5)。绿熟果实采收后存放于室温(25~30℃)条件下,非转基因果实在 7~10d 内转红并开始变软,而转基因果实存放 40d 以上仍未转红变软。当用 1000ppm 乙烯利处理(浸泡)转基因果实 10d 后则开始变为红色,但可能由于处理的时间或其它条件(如温度,光线等)不够适宜,所以转基因果实仍未能变为对照那样的深红色。在不用乙烯利处理的条件下转基因果实可在室温下存放更长的时间,我们的转基因番茄一般可达 60d,多数存放 60d 左右的果实内部结构仍然完好,水分,品味与收后 10d 左右的绿熟的果实无明显差异(资料略)。这些结果表明转基因番茄果实中乙烯的产生受到合成酶 ACC 反义基因转录物的明显抑制,从而导致转基因果实成熟过程受阻,果实在常温下的存放时间延长。

经对子一代植株番茄果实成熟情况的调查发现,凡 PCR 反应为阳性的植株其果实都

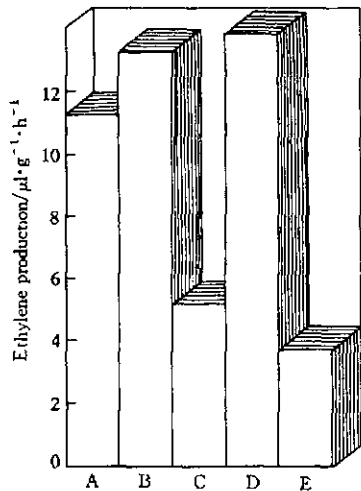


图 5 转反义 ACC 合成酶基因番茄果实中乙烯的释放水平

Fig. 5 Ethylene production in fruits of transgenic tomato

A, B and C represent the ethylene production of fruits from non-transformed, transformed, with empty vector and transgenic tomato plants 10 days post ethylene treatment respectively. D and E represent the ethylene production of fruits from non-transformed and transgenic plants respectively, without ethylene treatment.

有延长成熟、抗软化的效果。这部分植株占总调查株数的 73 % (表 1), 这一结果与 Southern blot 分析及 PCR 检测结果一致, 进一步证明 ACC 反义基因为单拷贝插入。

表 1 转基因番茄植株子一代的遗传分析

Table 1 Genetic analysis of T1 progenies from a transgenic tomato plant

| Line No. | Number of PCR positive/<br>total plant numbers | $\chi^2$<br>(3:1) | P(1) | Plants with fruits stored for more<br>than 60 days/total plant number | $\chi^2$<br>(3:1) | P(1) |
|----------|--|-------------------|------|---|-------------------|------|
| A-1-1    | 74/105   | 1.15              | 0.25 | 33/45   | 0.067             | 0.75 |
| CK       | 0/5  | -                 | -    | 0/12  | -                 | -    |

对 5 个子一代株系的子代(T2)植株进行 PCR 分析和果实耐储藏性状的观察结果表明有一个株系可能为转基因的纯合系(资料略)。有关转基因纯合系的果实品质、植株性状、栽培特点及在生产中的适用性等方面的研究结果将另文发表。

参 考 文 献

1 Brady C, McGlasson B, Speirss J. Tomato Biotechnology, ed by Nevins, D J, Richard A J Published by INFO, NY 1987  
2 Christoffersen R E, Warm E, Laties G G. *et al.* Planta. 1982, 155: 52~57  
3 Lincoln J E, Cordes S, Read E. *et al.* Proc Natl Acad Sci USA, 1987, 84: 2793~2797  
4 Smith C J S, Watson C F, Ray J. *et al.* Nature, 1988, 334: 724~726  
5 Zarembinski T I, Theologis A. Plant Mol Biol. 1994, 26: 1579~1597  
6 Yang S F, Hoffman N E. Annu Rev Plant Physiol. 1984, 35: 155~189  
7 Lincoln J E, Campell A D, Oetiker J. *et al.* LE-ACS4. J Biol Chem, 1993, 268: 19422~19430  
8 Olson D C, White J A, Edelman L. *et al.* Proc Natl Acad Sci USA. 1991, 88: 5340~5344

- 9 Rottmann W H, Peter G F, Oeller P W, *et al.* J Mol Biol, 1991, **222**:937~961
- 10 Yip W K, Moore T, Yang S F. Proc Natl Acad Sci USA, 1992, **89**:2475~2479
- 11 Oeller P W, Lu M W, Taylor L P, *et al.* Reversible Inhibition of Tomatofruit Senescence by Antisense RNA. Science, 1991, **254**:437~439
- 12 罗云波, 生吉萍, 申 琳, 农业生物技术学报, 1995, **3**:38~44
- 13 Sato T, Theologis A. Proc Natl Acad Sci USA, 1989, **86**:6621~6625
- 14 Van der Straeten D, Wiemeersch L V, Goodman H M, *et al.* Proc Natl Acad Sci USA, 1990, **87**:4859~4863
- 15 田颖川, 秦晓峰, 许丙寅等, 生物工程学报, 1991, **7**:1~10
- 16 Vries S D, Hoge H, Bisseling T, *et al.* Plant Mol Biol Manual, 1991, **B6**:1~5
- 17 Sambrook J, *et al.* Mol Cloning-A Laboratory Manual (2nd edition), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, 1989, NY.
- 18 An G, *et al.* Methods In Enzymology, 1987, **153**:292
- 19 鞠 戎, 田颖川, 沈全光等, 生物工程学报, 1994, **10**:96~102
- 20 Rogers S O, Bendich A J. Plant Mol Biol Manual, 1988, **A6**:1~10

## Cloning of ACC Synthase cDNA and Its Inhibition of Fruit Ripening by Its Antisense RNA in Transgenic Tomato Plants

Liu Chuangyin<sup>1</sup> Tian Yingchuan<sup>2</sup> Shen Quanguang<sup>1</sup> Jiang Hao<sup>2</sup>  
Ju Rong<sup>1</sup> Yan Tian<sup>1</sup> Liu Cunde<sup>1</sup> Mang Keqiang<sup>2</sup>

(Institute of Botany, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100093)<sup>1</sup>

(Institute of Microbiology, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080)<sup>2</sup>

**Abstract** A 1.7kb fragment of ACC synthase cDNA, one of the ACC synthase multigene family, was amplified from total tomato cDNA through Polymerase Chain Reaction (PCR) and cloned. The cloned ACC synthase gene was then inserted into a binary vector, pBin437, in an inverted orientation between the CaMV 35S promoter and the Nos 3' termination sequence, to construct an expressing vector. Transgenic tomato plants were obtained by Agrobacterium-mediated transformation of cotyledons. PCR detection and Southern blot analysis confirmed the integration of the antisense ACC gene in transformed tomato genome. The results from RT-PCR of RNAs isolated from transgenic tomato leaves confirmed that antisense ACC RNA was synthesized in these transgenic plants. The amount of ethylene released from transgenic tomato fruits was reduced significantly to about 30% of that released by non-transformed controls. The inhibition effect of antisense ACC RNA on fruit ripening was observed in the transgenic plants and their progenies (T<sub>1</sub>). The shelflife of transgenic tomato fruits was at least 60 days at room temperature without significant change in hardness and color. Upon 15~20days treatment of the transgenic fruits with ethylene, most of them could reach the ripe stage, turning red as that of the controls. The antisense ACC synthase gene was inherited as a single gene in the T<sub>1</sub> progeny as determined by T<sub>1</sub> progeny analysis, consistent with the results of Southern blot analysis. Transgenic homozygotes showing prolonged shelflife have been selected by genetic analysis of T<sub>2</sub> progenies.

**Key words** ACC (1-aminocyclopropane-1-carboxylate) synthase, gene, antisense RNA, transgenic tomato plants