

# CAC3 基因转运肽序列和 *accD* 基因融合 植物表达载体的构建

张煜星<sup>1,2</sup>, 崔 燕<sup>2</sup>, 武寒雪<sup>2</sup>, 祝建波<sup>2</sup>, 周 鹏<sup>1</sup>,

(1. 中国热带农业科学院 热带生物技术研究所国家重点实验室, 海南 海口 571101;

2. 石河子大学 生命科学院 农业生物技术重点实验室, 新疆 石河子 832003)

**摘要:** 采用 PCR 方法分别从陆地棉和拟南芥基因组中扩增出 *Accase* 羧基转移酶  $\beta$ -CT 亚基编码基因 *accD*, *Accase* 羧基转移酶  $\alpha$ -CT 亚基编码基因 *CAC3* 的定位于叶绿体的转运肽序列。分析结果与 NCBI 公布的氨基酸同源性分别为 100%, 99%。将 *CAC3* 基因转运肽序列与 *accD* 基因进行体外重组, 构建了融合植物表达载体 *pBI-CAC3tp-accD*, 为下一步作物的遗传转化打下了基础。

**关键词:** 陆地棉; 拟南芥; *accD* 基因; *CAC3* 基因; 转运肽

中图分类号: Q786 文献标识码: A 文章编号: 1000- 7091(2008)05- 0026- 04

## Construction of Plant Expression Vector on Fusion Transit Peptide of *CAC3* Gene and *accD* Gene

ZHANG Yu-xing<sup>1,2</sup>, CUI Yan<sup>2</sup>, WU Han-xue<sup>2</sup>, ZHU Jian-bo<sup>2</sup>, ZHOU Peng<sup>1</sup>

(1. Institute of Tropical Bioscience and Biotechnology, Chinese Academy of Tropical Agricultural

Sciences, Haikou 571101, China; 2. Laboratory of Agricultural Biotechnology, College of Life

Science, Shihezi University, Shihezi 832003, China)

**Abstract:** The acetyl-CoA carboxylase (ACCase) is the rate-limiting enzyme of fatty acids synthesis. The *accD* gene and transit peptide of *CAC3* gene was amplified from *Gossypium hirsutum* genome and *Arabidopsis thaliana* genome, DNA sequence analysis indicated that the cloned DNA fragmes have the highest homology compared with the NCBI published date, showing 100% and 99%. Plant expression vector of fusion transit peptide of *CAC3* gene and *accD* gene was constructed. The vector of *pBI-CAC3tp-accD* will be usefull for further natural genetic transformation.

**Key words:** *Gossypium hirsutum*; *Arabidopsis thaliana*; *accD* gene; *CAC3* gene; Transit peptide

植物油含有丰富的还原态碳链, 是同体积淀粉所含能量的 8 倍多, 是一种密集的可更新能源。植物油不仅可作为食品, 而且可作为低成本生产汽油的化学原料<sup>[1-3]</sup>。还原态碳链的大规模生产是植物必需的, 这一过程主要受质体 ACCase 的控制。存在于质体中的异质型 ACCase 包含 4 个亚基, 即生物素羧化酶 (Biotin carboxylase, BC)、生物素羧基载体蛋白 (Biotin carboxyl carrier protein, BCCP) 以及羧基转移酶 (Carboxyltransferase, CT) 的 2 个亚基  $\alpha$ -CT 和  $\beta$ -CT。其中亚基 BC (*accC* 编码)、BCCP (*accB* 编码) 和  $\alpha$ -CT (*accA* 编码) 是由核基因组编码的, 第 4 个亚基  $\beta$ -CT

(*accD* 编码) 由叶绿体基因组编码<sup>[4-9]</sup>。由核基因组编码的 3 个亚基其编码基因先在胞质溶胶中转录、翻译成大的前体蛋白, 然后被分别转运到叶绿体中除去转运肽, 与叶绿体本身编码的  $\beta$ -CT 亚基一起加工组装成高分子量的 ACCase 复合体<sup>[7-9]</sup>。已有研究表明, 通过叶绿体转化系统过量表达异质型 ACCase 的方法, 实现了脂肪酸合成的数量调控<sup>[9]</sup>。Yukiko Sasaki 等<sup>[10,11]</sup> 认为质体中 *accD* 的表达可能制约质体 ACCase 总体水平, *accD* 的超量表达可能会提高 ACCase 水平。根据 NCBI 公布的陆地棉 ACCase 羧基转移酶  $\beta$  亚基基因序列采用 PCR 方法克

收稿日期: 2008- 06- 10

项目基金: 国家“863”子项目 (2007AA021401); 兵团博士基金 (2006JC07)

作者简介: 张煜星 (1967- ), 男, 新疆吐鲁番人, 副教授, 在读博士, 主要从事植物基因工程研究。

通讯作者: 周 鹏 (1962- ), 男, 安徽绩溪人, 研究员, 博士生导师, 主要从事植物基因工程研究。

克隆了 *accD* 基因, 使该基因与拟南芥羧基转移酶  $\alpha$  亚基编码基因 *CAC3* 中定位于叶绿体的转运肽相连, 构建植物表达载体 pBI-*CAC3tp-accD*, 为实现转基因植物脂肪酸代谢调控奠定了基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

1.1.1 植物材料 陆地棉、拟南芥(本实验室提供)。

1.1.2 菌株和质粒 *E. coli* DH5 $\alpha$  菌株, 农杆菌 GV3101, pBI121 质粒由本实验室保存。

1.1.3 试剂 限制性内切酶, T4-DNA Ligase, pGM-T Vector 等均为大连宝生物公司产品。Taq 酶购自北京天为时代。PCR 引物北京三博远志公司合成。

### 1.2 方法

1.2.1 模板制备 分别取陆地棉、拟南芥叶片做材料, 用 SDS 法提取总 DNA。

1.2.2 引物的设计 根据 NCBI 公布的陆地棉 AG-Case 羧基转移酶  $\beta$  亚基基因(*accD*) 的序列, 设计了一对引物 P1: 5'-ATCGATATGGAAATAGAGGCAAGAAAGG-3'; P2: 5'-GAGCTCACAAAGTCAAAGCCCATTACGG-3'; 在其上游引物 5' 引入 *Cla* I 位点, 在其下游引物 5' 引入 *Sac* I 位点。根据 NCBI 公布的拟南芥棉 ACCase 正羧基转移酶  $\alpha$  亚基基因(*CAC3*) 的序列设计一对扩增转运肽(*CAC3tp*) 引物 P3: 5'-TCTAGAGAACTCAACGCAAAAATGGG-3'; P4: 5'-ATCGATTACATCAACAATCTTCTTCTCCAAT-3'; 在其上游引物 5' 引入 *Xba* I 位点, 在其下游引物 5' 引入 *Cla* I 位点。

1.2.3 PCR 扩增 在 PCR 反应管中, 加入 10 $\times$  Reaction Buffer (不含 Mg<sup>2+</sup>) 2  $\mu$ L, 2.50 mmol/L dNTP 1  $\mu$ L, 10 pmol/ $\mu$ L 引物各 1  $\mu$ L, 模板 DNA 3  $\mu$ L, 25 mmol/L MgCl<sub>2</sub> 1  $\mu$ L, Taq DNA Polymerase (0.5  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 11.5  $\mu$ L), 反应总体积 20  $\mu$ L。95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min 后, 95 $^{\circ}$ C 30 s, 58 $^{\circ}$ C 1 min, 72 $^{\circ}$ C 90 s, 共 30 个循环, 72 $^{\circ}$ C 7 min 结束反应。扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳和溴化乙锭染色后, 观察记录结果并回收目标片段。

1.2.4 PCR 产物的回收和克隆 PCR 产物回收采用回收试剂盒, 按说明书回收。扩增产物克隆采用 T-载体克隆法<sup>[16]</sup>, PCR 产物与载体在 T4 DNA 连接酶的作用下 16 $^{\circ}$ C 孵育 2 h, 然后 4 $^{\circ}$ C 14 h, 取连接产物 5  $\mu$ L 转化感受态大肠杆菌 DH5 $\alpha$  菌株 (CaCl<sub>2</sub> 法制备), 涂布于含氨苄霉素 50  $\mu$ g/mL 的 LB 培养皿中, 于 37 $^{\circ}$ C 培养过夜。

1.2.5 PGM-T 载体克隆的鉴定 从转化平皿上挑

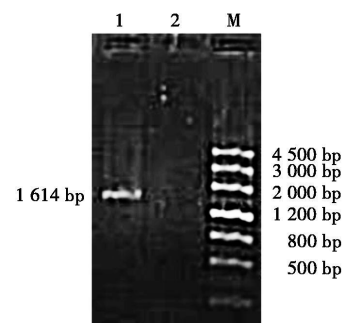
取白色单菌落, 37 $^{\circ}$ C 摇菌培养, 抽提质粒, 进行 PCR 鉴定。*accD* 以 *Cla* I、*Sac* I; *CAC3tp* 以 *Xba* I、*Cla* I, 进行双酶切鉴定。

1.2.6 序列分析 选取 *accD* 和 *CAC3tp* 经 PCR 及双酶切鉴定为阳性的克隆, 送北京三博远志生物技术有限公司测序, 用 DNAMAN 软件分析测序结果。

## 2 结果和分析

### 2.1 PCR 扩增结果

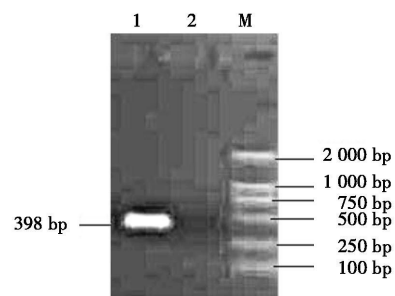
分别以陆地棉、拟南芥总 DNA 为模板, 用引物进行扩增产物经 1% 的琼脂糖凝胶电泳, 分别得到 1 614 和 398 bp 的片段, 与预先设计的目的片段大小一致(图 1, 2)。



Lane M. DNA Marker III; Lane 1. Amplification of *accD*; Lane 2. Negative control.

图 1 *accD* 的克隆

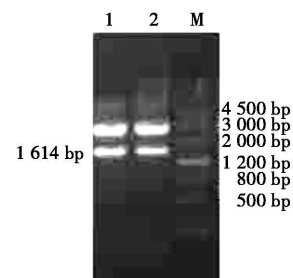
Fig. 1 Amplification of *accD*



Lane M. DNA Marker DL2000; Lane 1. Amplification of *CAC3tp*; Lane 2. Negative control.

图 2 *CAC3tp* 的克隆

Fig. 2 Amplification of *CAC3tp*



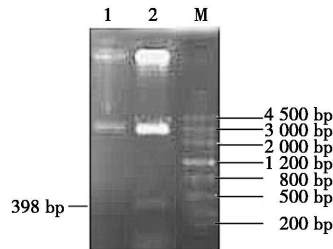
Lane M. DNA Marker III; Lane 1, 2. *T-accD* *Cla* I/ *Sac* I

图 3 *T-accD* 的 *Cla* I/ *Sac* I 酶切鉴定

Fig. 3 Restriction enzyme digestion identification of *T-accD*

## 2.2 *T-accD*、*T-CAC3tp* 克隆的酶切鉴定

由转化了重组质粒的大肠杆菌 DH5 $\alpha$  菌株抽提质粒, *accD* 的重组质粒以 *Cla* I 和 *Sac* I 双酶切 *CAC3tp* 的重组质粒以 *Xba* I 和 *Cla* I 双酶切后, 经 0.10% 琼脂糖凝胶电泳。重组子 *T-accD* 经 *Cla* I 和 *Sac* II 双酶切后得到一约 1 614 bp 的条带(图 3), *T-CAC3tp* 的重组质粒以 *Xba* I 和 *Cla* I 双酶切后得到 398 bp 的片段(图 4), 与 PCR 的结果相一致。



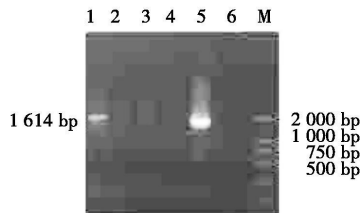
Lane M. DNA Marker III; Lane 1, 2. *Xba* I/ *Cla* I digestion of *T-CAC3tp*.

图 4 *T-CAC3tp* 酶切鉴定

Fig. 4 Restriction enzyme digestion identification of *T-CAC3tp*

## 2.3 扩增产物的测序分析

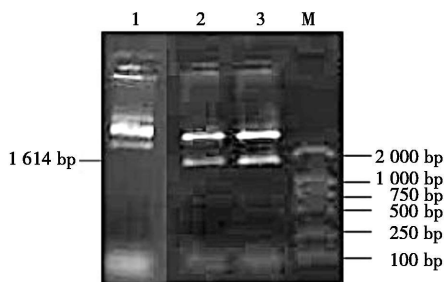
将 *accD*、*CAC3tp* 扩增产物经 T 载体克隆、酶切鉴定阳性结果, 所获得的序列与 NCBI 登录的 *accD*、*CAC3tp* 序列进行核苷酸和氨基酸同源性比较。*accD* 核苷酸同源性为 100%; 氨基酸同源性 100%。*CAC3tp* 氨基酸同源性 99%。*CAC3tp-accD* 基因序列分析证明所获得的序列完全符合预期的设计结果。



Lane M. DNA Marker DL2000; Lane 1, 5. *T-CAC3tp-accD accD*-PCR; Lane 6. Negative control.

图 5 *T-CAC3tp-accD accD* PCR 鉴定

Fig. 5 *accD* PCR identification of PGM- *CAC3tp-accD*



Lane M. DNA Marker DL2000; Lane 1. The plasmid of *T-CAC3tp-accD*; Lane 2, 3. *T-CAC3tp-accD Cla* I/ *Sac* I.

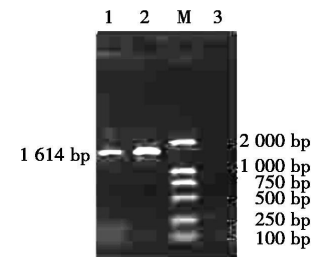
图 6 *T-CAC3tp-accD* 的 *Xba* I/ *Cla* I 酶切鉴定

Fig. 6 Restriction enzyme digestion identification of *T-CAC3tp-accD*

## 2.4 植物表达载体构建及鉴定分析

2.4.1 *T-CAC3tp-accD* 表达载体的构建 将 *T-CAC3tp* 用 *Cla* I/ *Sac* I 双酶切, 回收大片段。*T-accD* 用 *Cla* I/ *Sac* I 双酶切回收小片段。将回收产物用 T4DNAIigase 作载体与目标片段的连接, 命名为 *T-CAC3tp-accD*。用 *accD* 上下游引物进行 PCR 鉴定, 用 *Cla* I/ *Sac* I 双酶切鉴定(图 5, 6)

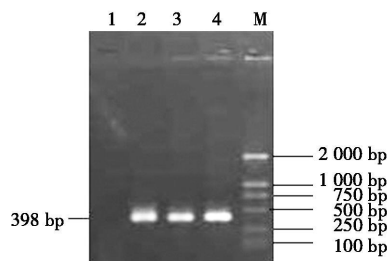
2.4.2 *pBI-CAC3tp-accD* 表达载体的构建 将 *T-CAC3tp-accD* 用 *Xba* I/ *Sac* I 双酶切, 回收小片段。*pBI121* 表达载体, 用 *Xba* I/ *Sac* I 双酶切, 回收大片段。将回收产物用 T4DNAIigase 作载体与目标片段的连接, 命名为 *pBI- CAC3tp-accD*。用 *CAC3tp* 上游引物和 *accD* 上下游引物进行 PCR 鉴定, 用 *Xba* I/ *Sac* I 双酶切鉴定(图 7, 8, 9)



Lane M. DNA Marker DL2000; Lane 1, 2. *pBI- CAC3tp-accD accD*-PCR; Lane 3. Negative control.

图 7 *pBI-CAC3tp-accD accD* PCR 鉴定

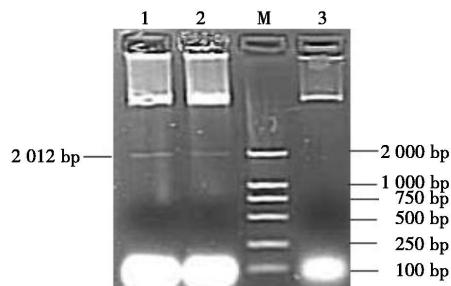
Fig. 7 *accD* PCR identification of *pBI- CAC3tp-accD*



Lane M. DNA Marker DL2000; Lane 2-4. *pBI- CAC3tp-accD CAC3tp*-PCR; Lane 1. Negative control.

图 8 *pBI- CAC3tp-accD CAC3tp* PCR 鉴定

Fig. 8 *CAC3tp* PCR identification of *pBI- CAC3tp-accD*



Lane M. DNA Marker DL2000; Lane 1, 2. *pBI- CAC3tp-accD Xba* I/ *Sac* I; Lane 3. The plasmid of *pBI- CAC3tp-accD*.

图 9 *pBI- CAC3tp-accD* 的 *Xba* I/ *Sac* I 酶切鉴定

Fig. 9 Restriction enzyme digestion identification of *pBI- CAC3tp-accD*

### 3 讨论

由叶绿体基因组编码的 *Accase* 羧基转移酶  $\beta$  亚基(*accD* 编码)在质体 *Accase* 的合成中起到了重要作用,*accD* 的表达可能制约质体 *ACCcase* 总体水平。陆地棉 *accD* 基因完整的读码框为 1 493 bp。本试验扩增了 1 614 bp,同时测序保证该基因读码框编码氨基酸序列不发生变化。Jinshan Ke 等<sup>[4]</sup>提出的 *CAC3* 转运肽序列 339 bp,本试验扩增了 398 bp。测序结果与已知序列相比,在第 34 个碱基处由 A 变为 G。

在构建植物表达载体时,将目的基因和定位于叶绿体的转运肽编码序列相连,然后可以用细胞核转化技术把外源基因导入植物细胞。这样目的基因编码的蛋白质就有可能在转运肽的引导下输送到叶绿体颗粒中去,从而克服叶绿体 DNA 多拷贝的问题,并且在很大程度上还可缓解转化体的分离。采用转运肽介导目的基因的叶绿体间接转化方法虽然没有整合到叶绿体基因组,但可以使目的基因的产物蛋白定位到叶绿体。由于细胞核转基因技术已经相当成熟,因此,这种间接的采用转运肽介导叶绿体转化的方法也是一种较为便捷的途径。

*ACCcase* 作为脂肪酸生物合成限速酶,在利用基因工程提高棉花等油料作物油脂含量研究中具有重要地位<sup>[13-15]</sup>。但迄今为止,这方面的研究进展并不很大,主要原因是异质型 *ACCcase* 由 4 个亚基组成,这些亚基分别由 3 个核基因和 1 个叶绿体基因编码,采用基因工程使这些基因在目标生物中同时表达、定位于质体并组装成一种有活性的结构有很大的难度。而 Yukiko Sasaki 等<sup>[12]</sup>提出的质体中 *accD* 的表达可能制约质体 *ACCcase* 总体水平,为脂肪酸代谢调控中 *ACCcase* 的研究提供新方法。通过转运肽,利用细胞核转化方法将 *accD* 基因定位于叶绿体,以实现其成功表达,为转基因棉花等油料作物脂肪酸代谢研究奠定了基础。

#### 参考文献:

[1] 石东乔,周奕华,陈正华. 植物脂肪酸调控基因工程研究[J]. 生命科学, 2002, 14(5): 291-295.

- [2] 王幼平,曾宇,罗鹏. 植物脂肪酸代谢工程研究进展[J]. 中国油料作物学报, 1998, 20(4): 88-92.
- [3] 张羽航,林炜铁,姚汝华. 植物油脂基因工程[J]. 中国油脂, 1999, 24(5): 56-58.
- [4] Jinshan Ke, Tuan-Nan Wen. Coordinate regulation of the nuclear and plastidic genes coding for the subunits of the heteromeric acetyl coenzyme A carboxylase1[J]. Plant Physiology, 2000, 122: 1057-1071.
- [5] Sang Sook Lee, Won Joong Jeong. Characterization of the plastid-encoded carboxyltransferase subunit(*accD*) gene of potato[J]. Mol Cell, 117, 3: 422-429.
- [6] Norihiro Hirata, Daizou Yonekura. Possible involvement of the 5'-flanking region and the 5' UTR of plastid *accD* gene in NEP-dependent transcription[J]. Plant Cell Physiol, 2004, 45(2): 176-186.
- [7] 王伏林. 植物中的乙酰辅酶 A 羧化酶[J]. 植物生理学通讯, 2006, 42(1): 10-14.
- [8] 赵虎基. 植物乙酰辅酶 A 羧化酶的分子生物学与基因工程[J]. 中国生物工程杂志, 2003, 23(2): 12-16.
- [9] 谢禄山,谭晓风. 乙酰辅酶 A 羧化酶基因研究综述[J]. 中南林学院学报, 2005, 25(4): 89-95.
- [10] Yukiko Sasaki, Yukio Nagano. Plant Acetyl-CoA carboxylase: structure, biosynthesis, regulation, and gene manipulation for plant breeding Biosci[J]. Biotechnol Biochem, 2004, 68(6): 1175-1184.
- [11] Yukiko Sasaki, Kazuhiko Hakamada. Chloroplast-encoded protein as a subunit of acetyl-CoA carboxylase in pea plant[J]. Biological Chemistry, 1993, 268(25): 25118-25123.
- [12] Yuka Madoka, Ken-ichi Tomizawa. Chloroplast transformation with modified *accD* operon increases acetyl-CoA carboxylase and causes extension of leaf longevity and increase in seed yield in tobacco[J]. Plant Cell Physiol, 2002, 43(12): 1518-1525.
- [13] 马三梅,王永飞. 高等植物叶绿体基因组的转化[J]. 植物生理学通讯, 2004, 40(3): 385-389.
- [14] 卢善发. 植物脂肪酸的生物合成与基因工程[J]. 植物学通报, 2000, 17(6): 481-491.
- [15] Dorte Klaus, John B. Ohlrogge. Increased fatty acid production in potato by engineering of acetyl-CoA carboxylase[J]. Planta, 2004, 219: 389-396.
- [16] 萨姆布鲁克. 分子克隆实验指南[M]. 黄培堂译. 北京: 科学出版社, 2002.