

甘薯质体中的乙酰辅酶A羧化酶亚基基因 *accD* 的克隆与序列分析

王玉华*, 郝建国, 贾敬芬

西北大学生命科学学院, 陕西省生物技术重点实验室, 西部资源生物与现代生物技术教育部重点实验室, 西安 710069

摘要: 依据烟草质体全基因组序列设计引物, 以甘薯质体基因组DNA为模板, PCR扩增包含质体 *accD* 基因完整编码区在内的一段序列(GenBank登录号为GQ395771)。序列分析表明: 该片段全长为2209 bp, 包括1548 bp的 *accD* 基因编码序列, 推测编码515个氨基酸的蛋白质, 该蛋白序列具有异质型 β -CT中保守的锌指结构和C末端5个基元。同时绘制了该DNA片段的限制性酶切图谱。相似性比较显示, 甘薯 *accD* 基因与大豆、马铃薯、拟南芥、人参、莴苣、葡萄、海岛棉、甘蓝、辣椒、菠菜、番茄和烟草的 *accD* 基因核苷酸相似性为72%~87%, 氨基酸相似性为58%~83%。

关键词: 甘薯; 乙酰辅酶A羧化酶(ACCCase); *accD* 基因; 克隆

Cloning and Sequence Analyses of Plastid-Encoded Acetyl-CoA Carboxylase Subunit Gene *accD* of Sweet Potato [*Ipomoea batatas* (L.) Lam.]

WANG Yu-Hua*, HAO Jian-Guo, JIA Jing-Fen

College of Life Sciences, Northwest University, Shaanxi Provincial Key Laboratory of Biotechnology, Key Laboratory of Resource Biology and Biotechnology in Western China, Ministry of Education, Xi'an 710069, China

Abstract: The fragment containing plastid *accD* gene (GenBank accession number: GQ395771) encoding the carboxyltransferase β subunit of acetyl-CoA carboxylase (ACCCase) was cloned from plastid genome DNA in sweet potato (*Ipomoea batatas*). Sequencing analysis indicated that sweet potato *accD* is 2209 bp with an 1548 bp open reading frame (ORF), encoding a 515-amino-acid polypeptide which contained the zinc finger structure and the C-terminal regions with five motifs. The restriction map of this cloned fragment was also established. The BLAST results showed that the homologies of this gene with soybean, potato, tobacco, *Arabidopsis thaliana*, ginseng, lettuce, grape, sea-island cotton, cabbage, pepper, spinach, tomato and tobacco were from 72% to 87%, and the similarities of the amino acid sequences were from 58% to 83%.

Key words: sweet potato (*Ipomoea batatas*); acetyl-CoA carboxylase (ACCCase); *accD* gene; cloning

作为脂肪酸生物合成关键酶的乙酰辅酶A羧化酶(acetyl-CoA carboxylase, ACCCase)是碳流进入脂肪酸合成途径的调控点(Slabas和Fawcett 1992; Ramli等2002; 王伏林等2006; 崔燕等2008)。在植物体内有位于质体的异质型和位于胞质溶胶中的同质型两种类型的ACCCase, 异质型ACCCase (ACCCase II)因与大肠杆菌ACCCase属于同一类型, 也称原核型ACCCase。它是一个由4个亚基组成的多酶复合体, 其中生物素羧化酶(biotin carboxylase, BC)亚基、生物素羧基载体蛋白(biotin carboxyl carrier protein, BCCP)亚基以及羧基转移酶(carboxyltransferase, CT)的 α 亚基(α -CT)分别由核基因 *accC*、*accB* 和 *accA* 编码, 而 β -CT亚基由质体基因组中的 *accD* 基因编码(Sasaki等1995; Ke等2000; Lee等2004)。3个细胞核编码亚基基因在细胞质中转录、翻译成大的前体蛋白, 之后转运到质体中

去除导肽, 最后与质体基因编码的 β -CT亚基组装成ACCCase复合体(Reverdatto等1999; Ke等2000)。

有研究表明, 质体基因组编码 β -CT亚基是ACCCase活性发挥的限制因子, 质体 *accD* 基因的超量表达可能会提高ACCCase的总体水平(Sasaki和Nagano 2004)。近年来, 对 β -CT亚基的研究不断深入, 已从豌豆(Sasaki等1989)、油菜(Elborough等1996)、马铃薯(Lee等2004)、拟南芥(Ke等2000)、棉花(张煜星等2008)、油棕(Nakkaew等2008)、甘蓝型油菜及其近缘种(王伏林等2008)等多种植物中克隆到 β -CT亚基的编码基因 *accD*。本

收稿 2009-07-31 修定 2009-09-30

资助 陕西省教育厅专项(09JK777)、国家自然科学基金(30900914和30671082)、西北大学西部资源生物与生物技术重点实验室开放基金。

* 通讯作者(E-mail: wangyh@nwu.edu.cn; Tel: 029-88303484)。

文以甘薯为材料,根据烟草质体全基因组序列设计引物,采用PCR方法克隆了包含质体 *accD* 基因完整编码区在内的一段甘薯质体DNA片段,为将来利用质体转化系统在植物质体内过量表达该基因以提高油料作物种子含油量研究提供基础材料,同时也为在甘薯中开展质体基因工程研究提供质体基因组序列信息。

材料与方法

材料为甘薯 [*Ipomoea Batatas* (L.) Lam.] ‘京3’ 无菌苗,由北京市农林科学院小麦中心提供。在不含植物生长调节剂的MS固体培养基中继代培养。取继代培养30 d左右的叶片用于质体基因组DNA的提取。

取继代培养4周左右的组培苗叶片30 g, 4 °C 黑暗饥饿过夜,之后用高盐低pH法(龚晓松和阎隆飞 1991)提取质体基因组DNA (chloroplast DNA, cpDNA)。各取2 μL cpDNA, 分别用 *Bam*HI 和 *Pst*I 消化,之后进行琼脂糖凝胶电泳检测 cpDNA 的质量。纯化的质体DNA稀释到一定浓度后用于PCR扩增。

根据烟草质体全基因组全序列资料,用软件Oligo 6设计一对引物。上游引物为 *accD*-U: 5' TTAGTATTAGACGAGATTTTAC 3'; 下游引物为 *accD*-L: 5' GGGAAATTAATCAAATTTTCGAC 3'。引物委托上海生工生物工程技术有限公司合成。

取2 μL 稀释后的甘薯质体基因组DNA (约50 ng)为模板,采用50 μL 的反应体系: 10×PCR 缓冲液5 μL、dNTPs (2.5 mmol·L⁻¹) 4 μL、上下游引物(10 μmol·L⁻¹)各2 μL、Tag DNA 聚合酶(2 U·L⁻¹) 0.5 μL, 其余用双蒸水补齐。PCR反应在PTC-100 Peltier 基因扩增仪上进行,反应程序为: 94 °C 起始变性5 min; 然后进行30个循环的扩增反应,每个循环包括94 °C 变性1 min、56 °C 退火1 min 以及72 °C 退火1.5 min; 最后于72 °C 下延伸7 min。

PCR产物以琼脂糖凝胶电泳分离,目的产物用锋利的刀片割下,用胶回收试剂盒回收纯化,之后克隆进pGEM-T载体,转化大肠杆菌DH5α菌株,选取阳性克隆提取质粒DNA,酶切鉴定后送上海生工生物工程技术有限公司测序,对测序结果用软件进行序列分析,绘制限制性酶切图谱,并与其他近缘种的核苷酸序列、氨基酸序列进行比较分析。

实验结果

1 *accD* 基因的克隆与序列分析

按材料与方法所示,提取甘薯cpDNA,以稀释后的甘薯cpDNA作模板,以 *accD*-U 和 *accD*-L 为引物,在TaKaRa的PrimeSTAR HS DNA聚合酶作用下,PCR扩增获得大小为2.0 kb左右的片段(图1),与预期的目的片段大小一致。将扩增得到的片段回收纯化后与pMD18-T载体连接,得到重组质粒pMD18-*accD*,经 *Xba*I 和 *Pst*I 双酶切验证正确,之后送上海生工生物工程技术有限公司测序,测序结果已经登录GenBank,登录号为GQ395771。序列分析表明,重组质粒中插入片段全长2209 bp,其中包含一个1548 bp的 *accD* 基因开放阅读框(open reading frame, ORF),推测编码515个氨基酸。用DNAMAN软件对克隆到的甘薯 *accD* 基因片段进行限制性酶切分析,绘制限制性酶切图谱(图2),结果显示,在筛选的24个常见的限制性内切酶中,有9个酶切位点位于该片段中。

2 *accD* 基因序列的相似性比较和进化分析

比较甘薯 *accD* 基因与其他植物的 *accD* 基因相似性的结果(表1)显示,该基因编码区与大豆、马铃薯、拟南芥、人参、莴苣、葡萄、海岛棉、甘蓝、辣椒、菠菜、番茄和烟草的 *accD* 基因核苷酸相似性为72%~87%,氨基酸相似性为58%~83%。无论是核苷酸序列还是氨基酸序列,都表现为甘薯与烟草的相似性最高,而与甘蓝的相似性最低。

以 *accD* 基因的核苷酸序列为考核指标,用

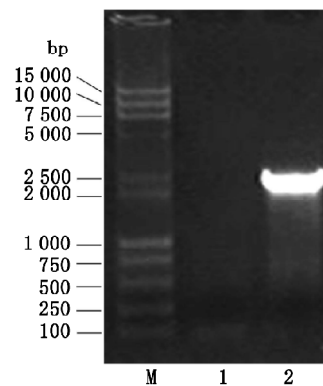
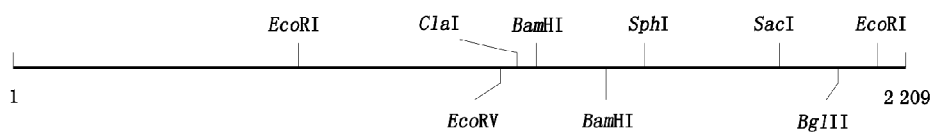


图1 甘薯 *accD* 基因片段的扩增

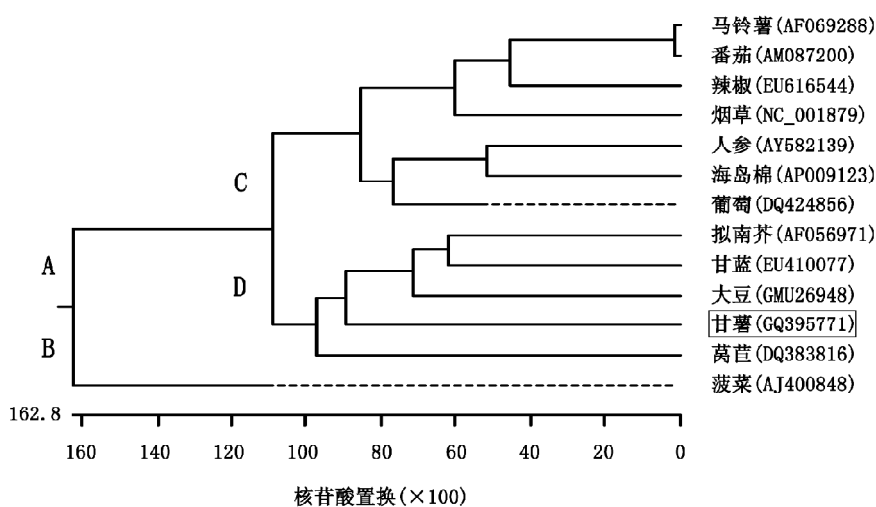
Fig.1 Amplification of sweet potato *accD* gene fragment
M: DL2000+DL15000 标记; 1: H₂O 作负对照; 2: 甘薯 *accD* gene 片段。

图2 甘薯 *accD* 基因片段的限制性酶切图谱Fig.2 The restriction map of sweet potato gene *accD* fragment表1 不同物种 *accD* 基因相似性比较Table 1 Comparison of nucleotide and amino acid sequences of *accD* gene of *I. batatas* with other plants

种名	<i>accD</i> 基因核苷酸序列相似性/%	<i>accD</i> 基因氨基酸序列相似性/%
甘薯(<i>Ipomoea batatas</i>)	100	100
马铃薯(<i>Solanum tuberosum</i>)	80	82
番茄(<i>Solanum lycopersicum</i>)	79	82
辣椒(<i>Capsicum annuum</i>)	80	74
烟草(<i>Nicotiana tabacum</i>)	87	83
人参(<i>Panax ginseng</i>)	83	77
海岛棉(<i>Gossypium barbadense</i>)	73	71
葡萄(<i>Vitis vinifera</i>)	77	68
拟南芥(<i>Arabidopsis thaliana</i>)	73	64
甘蓝(<i>Brassica oleracea</i>)	72	58
大豆(<i>Glycine max</i>)	73	64
莴苣(<i>Lactuca sativa</i>)	78	71
菠菜(<i>Spinacia oleracea</i>)	77	74

DNASTAR软件分析了甘薯与表1所列物种之间的亲缘关系,并建立进化树(图3)。结果显示:参与分析的13个物种在进化树上呈现两大分支,A支包括除菠菜之外的12个物种,B支仅含蓼科的菠菜。

A支里面又划分成两个子分支C和D,甘薯和十字花科的拟南芥、甘蓝,菊科的莴苣以及豆科的大豆属于同一个子分支,该系统进化树显示的分类结果与植物学分类的结果一致。

图3 基于 *accD* 基因编码区构建的进化树Fig.3 The dendrogram of sweet potato based on *accD* ORF

3 *accD* 基因编码蛋白质结构分析

有研究表明锌指结构单元 $CX_2CX_{13-15}CX_2C$ 在所有的异质型 β -CT 中是保守的(Nakkaew 等 2008; 王伏林等 2008)。在甘薯 *accD* 基因编码的蛋白质中, 保守的锌指结构单元序列为 CEKCYGLNYKK-

FLKSKMHICEQC。此外, 表 2 显示, 在甘薯和其他植物的 *accD* 基因编码产物中, C 末端均有 5 个高度保守的基元, 其中基元 I 为乙酰辅酶 A 的催化中心结合位点, 基元 II 为乙酰辅酶 A 的催化中心位点 (Lee 等 2004)。

表 2 *accD* 基因编码产物 C 末端 5 个高度保守的氨基酸序列基元

Table 2 Five highly conserved amino acid sequence motifs on C-terminal region of protein encoded by *accD* genes

种名	I	II	III	IV	V
甘薯	GSMGSVVG	PLIIVCASGGARMQE	QMAKISSAL	PTTGGVTASFGMLGDIIIIVEP	FAGKRVIEQTL
马铃薯	GSMGSVVG	PLIIVCASGGARMQE	QMAKISSAL	PTTGGVTASFGMLGDIIIIEAP	FAGKRVIEQTL
番茄	GSMGSVVG	PLIIVCASGGARMQE	QMAKISSAL	PTTGGVTASFGMLGDIIIIEAP	FAGKRVIEQTL
辣椒	GSMGSVVG	PLIIVCASGGARMQE	QMAKISSAL	PTTGGVTASFGMLGDIIIIEAP	FAGKRVIEQTL
烟草	GSMGSVVG	PLIIVCASGGARMQE	QMAKISSAL	PTTGGVTASFGMLGDIIIIEAP	FAGKRVIEQTL
人参	GSMGSVVG	PLIIVCASGGARMQE	QMAKISSAL	PTTGGVTASFGMLGDIIIIEAP	FAGKRVIEQTL
海岛棉	GSMGSVVG	PLIIVCASGGARMQE	QMAKISSAL	PTTGGVTASFGMLGDIIIIEAP	FAGKRVIEQTL
葡萄	GSMGSVVG	PLIIVCASGGARMQE	QMAKISSAL	PTTGGVTASFGMLGDIIIIEAP	FAGKRVIEQTL
拟南芥	GSMGSVVG	PLIIVCASGGARMQE	QMAKISSAL	PTTGGVTASFGMLGDIIIIEAP	FAGKRVIEQTL
甘蓝	GSMGSVVG	PLIIVCASGGARMQE	QMAKISSAL	PTTGGVTASFGMLGDIIIIEAP	FAGKRVIEQTL
大豆	GSMGSVVG	PLIIVCASGGARMQE	QMAKISSAL	PTTGGVTASFGMLGDIIIIEAP	FAGKRVIEQTL
莴苣	GSMGSVVG	PLIIVCASGGARMQE	QMAKISSAL	PTTGGVTASFGMLGDIIIIEAP	FAGKRVIEQTL
菠菜	GSMGSVVG	PLIIVCASGGARMQE	QMAKISSAL	PTTGGVTASFGMLGDIIIIEAP	FAGKRVIEQTL

方框内为不保守的氨基酸。

讨 论

ACCase 在生物体内催化乙酰辅酶 A 羧化形成丙二酰辅酶 A, 为脂肪酸和许多次生代谢产物的合成提供底物(Konishi 等 1996), 是脂肪酸生物合成途径的限速酶, 因常被用作通过基因工程手段提高油料作物含油量的研究目标而备受关注。但迄今为止, 这方面的研究进展并不大, 原因是异质型的 ACCase 是四亚基复合物, 且 4 个亚基分别由 3 个核基因和 1 个质体基因编码, 要使 4 个基因同时在质体中表达并组装成有活性的蛋白难度较大。有研究认为, 由质体编码的 *accD* 基因是该复合酶活性的限制因子(Sasaki 和 Nagano 2004), 也就是说, 用在质体中过量表达异质型 ACCase 基因 *accD*, 有望实现脂肪酸合成的数量控制。例如, Madoka 等(2002)研究发现过量表达 *accD* 基因的烟草质体 ACCase 活性水平大幅提高, 脂肪酸含量也相应增加, 这说明质体 *accD* 基因的过量表达对提高作物的含油量有作用。ACCase 不仅是脂肪酸合成的关键酶和限速酶, 且对大多数生物来说也是一个必须酶, 例如, Kode 等(2005)用同源重组的方法剔除烟草 *accD* 基

因, 发现烟草植株叶片出现白绿色斑点或叶片减少, 该研究证明质体 *accD* 基因对植物叶片生长起作用。与此相反的是, Madoka 等(2002)在烟草质体中过量表达 *accD* 后, 烟草叶片长度增加。

鉴于质体 ACCase 的重要性, 迄今已有多个物种的 β -CT 亚基基因 *accD* 已得到, 而关于甘薯 *accD* 基因的克隆还未见报道。本文从甘薯中克隆到包含质体 *accD* 基因完整编码区在内的一段 2 209 bp 的质体片段, 编码含 515 个氨基酸残基的蛋白质, 通过与烟草、马铃薯等其他植物比较的结果表明, 与大多数植物中的 β -CT 亚基一样, 甘薯 β -CT 亚基在 C 端含有 5 个高度保守的基元, 这种保守性说明 *accD* 基因在进化过程中有很强的惰性。甘薯 *accD* 基因的克隆为将来采用质体转化系统在植物体内过量表达此基因, 提高油料作物种子含油量的研究积累了基础材料, 同时也为在甘薯中开展质体转化技术提供了质体基因组序列的信息。

参考文献

- 崔燕, 祝建波, 张煜星(2008). 植物乙酰辅酶 A 羧化酶 β 亚基 *accD* 基因研究进展. 安徽农业科学, 36 (13): 5255~5256, 5463

- 龚晓松, 阎隆飞(1991). 高等植物叶绿体 DNA 提纯方法改进. 科学通报, 36 (6): 467~469
- 王伏林, 吴关庭, 郎春秀, 陈锦清(2006). 植物中的乙酰辅酶 A 羧化酶(ACCCase). 植物生理学通讯, 42 (1): 10~14
- 王伏林, 吴关庭, 郎春秀, 刘仁虎, 陈锦清(2008). 甘蓝型油菜及近缘种中异质型 ACCCase 亚基 *accD* 编码基因的克隆及序列分析. 农业生物技术报, 16 (4): 622~627
- 张煜星, 崔燕, 武寒雪, 祝建波, 周鹏(2008). *CAC3* 基因转运肽序列和 *accD* 基因融合植物表达载体的构建. 华北农学报, 23 (5): 26~29
- Elborough KM, Winz R, Deka RK, Markham JE, White AJ, Rawsthorne S, Slabas AR (1996). Biotin carboxyl carrier protein and carboxyltransferase subunits of the multi-subunit form of acetyl-CoA carboxylase from *Brassica napus*: cloning and analysis of expression during oilseed rape embryogenesis. *Biochem J*, 315 (1): 103~112
- Ke J, Wen TN, Nikolau BJ, Wurtele ES (2000). Coordinate regulation of the nuclear and plastidic genes coding for the subunits of the heteromeric acetyl-coenzyme A carboxylase. *Plant Physiol*, 122 (4): 1057~1072
- Kode V, Mudd EA, Iamtham S, Day A (2005). The tobacco plastid *accD* gene is essential and is required for leaf development. *Plant J*, 44 (2): 237~244
- Konishi T, Shinohara K, Yamada K, Sasaki Y (1996). Acetyl-CoA carboxylase in higher plants: most plants other than gramineae have both the prokaryotic and the eukaryotic forms of this enzyme. *Plant Cell Physiol*, 37 (2): 117~122
- Lee SS, Jeong WJ, Bae JM, Bang JW, Liu JR (2004). Characterization of the plastid-encoded carboxyltransferase subunit (*accD*) gene of potato. *Mol Cells*, 17 (3): 422~429
- Madoka Y, Tomizawa KI, Mizoi J, Nishida I, Nagano Y, Sasaki Y (2002). Chloroplast transformation with modified *accD* operon increases acetyl-CoA carboxylase and causes extension of leaf longevity and increase in seed yield in tobacco. *Plant Cell Physiol*, 43 (12): 1518~1525
- Nakkaew A, Chotigeat W, Eksomtramage T, Phongdara A (2008). Cloning and expression of a plastid-encoded subunit, β -carboxyltransferase gene (*accD*) and a nuclear-encoded subunit, biotin carboxylase of acetyl-CoA carboxylase from oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). *Plant Sci*, 175 (4): 497~504
- Ramli US, Baker DS, Quant PA, Harwood JL (2002). Regulation of fatty acid synthesis. *Biochem Soc Trans*, 30 (6): 1043~1046
- Reverdatto S, Beilinson V, Nielsen NC (1999). A multisubunit acetyl coenzyme A carboxylase from soybean. *Plant Physiol*, 119 (3): 961~978
- Sasaki Y, Konishi T, Nagano Y (1995). The compartmentation of acetyl-coenzyme A carboxylase in plants. *Plant Physiol*, 108 (2): 445~449
- Sasaki Y, Nagano Y (2004). Plant acetyl-CoA carboxylase: structure, biosynthesis, regulation, and gene manipulation for plant breeding. *Biosci Biotechnol Biochem*, 68 (6): 1175~1184
- Sasaki Y, Nagano Y, Morioka S, Ishikawa H, Matsuno R (1989). A chloroplast gene encoding a protein with one zinc finger. *Nucleic Acids Res*, 17 (15): 6217~6227
- Slabas AR, Fawcett T (1992). The biochemistry and molecular biology of plant lipid biosynthesis. *Plant Mol Biol*, 19 (1): 169~191