

油茶3羟酰CoA脱水酶基因的克隆与表达分析

王建勇¹, 谭晓风^{1,*}, 曾艳玲¹, 龙洪旭¹, 陈鸿鹏², 刘凯³

¹中南林业科技大学, 经济林培育与保护教育部重点实验室, 经济林育种与栽培国家林业局重点实验室, 长沙410004; ²国家林业局桉树研究开发中心, 广东湛江524022; ³广西林业科学研究院, 南宁530001

摘要: 3羟酰CoA脱水酶是一类催化3羟酰CoA脱水转化成为烯酰CoA形式的酶。本研究以国审油茶品种‘华硕’种子为材料, 在已构建的转录组和表达谱数据库的基础之上, 采用RACE技术, 克隆到一个油茶3羟酰CoA脱水酶基因的cDNA全长, 命名为*CoHCD* (GenBank登录号KJ910336)。该基因cDNA全长为1 145 bp, 含有666 bp的开放读码框, 编码221个氨基酸, 分子量为25.2 kDa, 理论等电点pI为9.4, 疏水残基占整个氨基酸残基的48.9%, 是亲水性蛋白, 具有4个比较明显的跨膜区和蛋白质酪氨酸磷酸酶基序“HGXXGXXRS”。在基因cDNA全长序列的基础上, 分别成功地构建了原核表达载体、超表达载体和RNA干扰载体, 其中, 原核表达载体在宿主细胞BL21(DE3)上成功诱导表达, 获得表观分子量约为25 kDa的相应目的蛋白。实时荧光定量PCR分析表明, 在5个不同发育时期的油茶种子中*CoHCD*高效表达主要集中在8~10月, 转录最高峰发生在9月, 其表达量在种子发育过程中呈增加趋势。

关键词: 油茶; 3羟酰CoA脱水酶; 克隆; 表达分析

Cloning and Expression Analysis of a 3-Hydroxyacyl-CoA Dehydratase Gene from *Camellia oleifera*

WANG Jian-Yong¹, TAN Xiao-Feng^{1,*}, ZENG Yan-Ling¹, LONG Hong-Xu¹, CHEN Hong-Peng², LIU Kai³

¹Key Laboratory of Cultivation and Protection for Non-Wood Forest Trees, Key Lab of Non-Wood Forest Product of State Forestry Administration, Central South University of Forestry and Technology, Changsha 410004, China; ²China Eucalypt Research Centre, Zhanjiang, Guangdong 524022, China; ³Guangxi Academy of Forestry, Nanning 530001, China

Abstract: 3-Hydroxyacyl-CoA dehydratase (HCD) is a kind of protein that is the dehydrateion of the 3-hydroxyacyl-CoA to an enoyl-CoA. In this paper, a full-length cDNA of 3-hydroxyacyl-CoA dehydratase in *Camellia oleifera* ‘Huashuo’ seeds was cloned using reverse transcription PCR (RT-PCR), RACE technique, and basing’ transcriptome and expression profiling database of *C. oleifera* seed. The full length cDNA was 1 145 bp, and the gene was named *CoHCD* (GenBank No. KJ910336). The sequence had an open reading frame of 666 bp, encoding 221 amino acids rich in hydrophobic residues (48.9%), showing a hydrophilic protein. Sequence analysis showed that molecular mass of the *CoHCD* protein was 25.2 kDa with a theoretical pI of 9.4. *CoHCD* had four transmembrane domains and contained a protein tyrosine phosphatase motif “HGXXGXXRS” that was common to the *PTPLA* gene families. The expression vectors of *CoHCD* were constructed successfully, and the BL21(DE3) bacteria harboring the pET30a-*CoHCD* was induced to express the about 25 kDa target protein. The relative expression abundance of *CoHCD* at 5 different developmental stages of seed were analyzed using RT-PCR. The *CoHCD* gene expression was up-regulated during the seed developmental stages (with the highest point occurring in middle September and high-efficiency expression in August to October), which was consistent with the accumulation of the lipid synthesis of *C. oleifera* seeds.

Key words: *Camellia oleifera*; 3-hydroxyacyl-CoA dehydratase; clone; expression analysis

3羟酰CoA脱水酶(3-hydroxyacyl-CoA dehydratase, HCD)是一类催化3羟酰CoA脱水转化成为烯酰CoA形式的酶, 主要参与了脂肪酸的 β 氧化和非常长链脂肪酸(very long chain fatty acids, VLC-FAs)合成的两个生理过程。在脂肪酸 β 氧化中, 它以一种D-3羟酰CoA脱水酶结构的形式存在, 是异

收稿 2014-06-13 修订 2014-08-22

资助 国家自然科学基金(31070603)、湖南省自然科学基金(14JJ2104)和中南林业科技大学青年基金重点项目(QJ2011008A)。

* 通讯作者(E-mail: tanxiaofengcn@126.com; Tel: 0731-85623416)。

构化作用上的关键酶之一(Hiltunen等1989), 参与了催化3羟酰CoA硫酯的差向异构化作用的半反应, 与烯酰CoA水合酶共同催化来完成3羟酰CoA的异构化作用。硫酯差向异构化作用是次要代谢途径中多不饱和脂肪酸完全降解的必不可少的反应, 参与了过氧化物酶体中亚油酸2%的 β 氧化(Yang等1986)。研究表明, 非线粒体 β 氧化系统通过依靠异构酶通路来降解多不饱和脂肪酸是有限的(Yang等1986), D-3羟酰CoA脱水酶在过氧化物酶体的 β 氧化中是个必需的酶, 它在脂肪酸的 β 氧化中可能替代了拥有D-羟基的奇数碳原子, 而D-3羟酰CoA脱水酶是否能降解D-羟酰脂肪酸需要进一步的研究。在VLCFAs的合成中, HCD作为脂肪酸延长酶(FAE)复合体组成酶之一参与VLCFAs合成循环途径中的第三步脱水反应(Bach等2008; Ikeda等2008; Konishi等2010)。VLCFAs的合成是由脂酰CoA通过内质网或叶绿体上的多蛋白延长酶复合体的催化下完成的, 它不仅是种子储存中三酰甘油、表皮蜡和鞘磷脂等合成必不可少的组成部分, 还对维持生物体生长过程的内稳态稳定是必需的(如植物与环境之间的保护屏障和防水屏障等), 在生物体细胞中作为信号分子控制着细胞增殖、压力应激反应和细胞程序性死亡等生命过程(Worrall等2003; Bach等2008; Pollard等2008; Kunst和Samuels 2009; Franke等2012)。

在植物中, HCD的酶活性最早是在银扇草和韭葱中而得到证实的(Domergue等2000), 研究表明HCD对R构型的催化底物羟脂酰-CoA具有更强的亲和性(Xu等2002); 在表面活性剂TritonX-100的作用下, HCD酶活性显著增强(Costaglioli等2005)。研究发现, HCD基因突变会在早期终止VLCFAs的延伸, 引起了VLCFAs的总体特征的下降和累积3羟酰CoA底物(Bach等2008)。在植物形态特征上, HCD基因突变使植物表现出异常生长迟缓形态(Panikashvili等2008)而导致机体表现出各种缺陷, 如真叶融合、子叶下轴膨胀及拥有更多的皮层细胞等(Nobusawa等2013)。在植物生理条件下, HCD基因突变能提高细胞分裂素水平, 导致愈伤组织结构的形成(Faure等1998; Bellec等2002)而使细胞组织增生(Nobusawa等2013); 促进胚胎后期的融合(Siebera等2000; Chen等2003); 引起植物与病原体

之间的相互作用的改变(Reina-Pinto和Yephremov 2009); 造成机体中的角质层蜡质和鞘磷脂等在形态学上功能的缺失, 使机体出现一系列的异位表达、异位细胞分裂、细胞分化及激素应答等生理反应, 从而导致机体发育缺陷或致死(Faure等1998; Bellec等2002; Haberer等2002; Harrar等2003; Baud等2004; Smyczynski等2006; Bach等2008; Roudiera等2010)。也有研究表明, 过量表达HCD基因不仅能在植物和种子组织中提高VLCFA的水平(Bach等2008), 也能延迟了细胞周期进程, 尤其在有丝分裂过程(Da Costa等2006; Yu等2006)。还发现HCD与内质网(ER)联系在一起与烯酰CoA还原酶(CER10)产生生理相互作用(Bach等2008)等。以上研究表明, HCD在促进VLCFAs的合成上对细胞的增殖和组织形式是重要的, 对机体的生长和发育是必需的, 也是VLCFA合成的限速酶(Abe等2013)。

尽管通过突变体、体内重组蛋白活性和蛋白脂质体中延长酶复合体重构等研究(Denic和Weissman 2007), 完成了HCD一些生物化学的分析, 最终将HCD作为一个延伸酶的功能而被确定了下来。但到目前为止, 对植物脂肪酸代谢系统中编码HCD蛋白的基因研究较少, 在本油料作物上更是鲜有报道。我们在已构建的转录组和表达谱数据库的基础之上, 首次在本油料作物油茶中发现了HCD基因并克隆获得基因的全长cDNA序列, 在此基础上进行了序列特征分析、生物信息学分析、载体构建及表达特征的分析, 这不仅丰富了油茶基因库中HCD基因的相关知识, 也为今后进一步深入研究油茶HCD基因的生理功能奠定了基础。

材料与方法

1 材料、质粒与菌体

以株洲马家河油茶基地国审油茶(*Camellia oleifera* Abel.)品种‘华硕’(谭晓风等2011)果实为实验材料, 取材时间分别为6月5日、7月4日、8月15日、9月12日和10月10日, 摘取后用锡箔纸包裹好, 迅速置于液氮并 -80°C 超低温冰箱保存。BL21(DE3)购自北京全式金公司, 农杆菌菌株GV3101由中南林业科技大学生物学院生物能源与材料研究中心赠送, 大肠杆菌DH5 α 、农杆菌菌株

LBA4404、pET-30a、pEGAD、pDONR201和pJawoh18-RNAi为本实验室保藏。

2 工具酶与试剂

各种限制性内切酶和T4 DNA连接酶及单链cDNA合成试剂盒购自Fermentas公司。重组酶购自Invitrogen公司。2 x Easy Taq Mix、pEASY-Simple-Blunt Cloning Kit、Trans1-T1 Phage Resistant Chemically、Trans Start™ Fast Pfu DNA Polymerase、100 bp DNA Plus Ladder和蛋白质相对分子质量标准、pMD18-T质粒载体、Total RNA Purification System和3' RACE试剂盒、5' RACE试剂盒、Puprep Gel Extraction Kit、TIANprep Mini Plasmid Kit等分别购自北京全式金、TaKaRa、Invitrogen、Clontech、Ambiogen和天根等公司。蛋白胨、氨苄青霉素、卡那霉素、IPTG、EDTA、

Tris-base和SDS等购自上海生工。DTT、EB、丙烯酰胺、甲叉双丙烯酰胺和过硫酸胺购自Amersco公司。考马斯亮兰R-250购自Sigma公司。琼脂糖Biowest Agarose购自Genetech。酵母提取物购自Merck。其它生化试剂和常规试剂均为超纯或分析纯。引物和测序分别由华大和博尚公司完成。

3 油茶种子总RNA的提取及单链cDNA合成

油茶种子总RNA的提取参见Invitrogen RNA提取试剂盒操作手册,检测总RNA的纯度与浓度,并以此为模板反转录合成单链cDNA,方法详见3' RACE、5' RACE与Fermentas试剂盒说明书。

4 *CoHCD*基因的克隆与生物信息学分析

BLAST比对后,根据确定的油茶*HCD*转录组序列和同源序列,设计特异引物(表1),采用RACE技术,克隆*CoHCD*基因。

表1 *CoHCD*基因引物序列及各引物作用

Table 1 Primer sequence and function of *CoHCD* genes

引物名称	引物序列(5'→3')	T _m /°C	用途
F0	GTCACAGCGACTGCGCACAATAA	59.6	转录组序列
R0	GTCACAGCGACTGCGCACAATAA	61.1	扩增引物
3' GSP-F	ATTACTTCTATGCTGCAATTCTGTGCTCT	58.3	3' RACE扩增
AUAP	GGCCACGCGCTCGACTAGTAC		3'末端序列
5' GSP-R	GGCAATATAAATTAGACCAACTTCACT	56.3	5' RACE扩增
UPM Long	CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAG-TGGTATCAACGCAGAGT		5'末端序列
UPM Short	CTAATACGACTCACTATAGGGC		
CDS-F	TCTCTACTTATTCAAATCCCCA	52.5	全长
CDS-R	AGATGTCGGACTGATACTTAG	53.9	cDNA扩增

扩增转录组序列和RACE的PCR反应体系(25 μL): 2×EasyTaq PCR SuperMix 12.5 μL、F (或UPM) 1.0 μL、R (或AUAP) 1.0 μL、单链cDNA 0.5 μL、ddH₂O 10.0 μL。扩增基因全长PCR反应体系(50 μL): 5'×Trans Start Fast Pfu Buffer (Mg²⁺ plus) 10.0 μL、2.5 mmol·L⁻¹ dNTPs 5.0 μL、Trans Start Fast Pfu DNA Polymerase 1.0 μL、F 1.0 μL、R 1.0 μL、单链cDNA 1.0 μL、ddH₂O 31.0 μL。

Touch Down PCR循环扩增条件: 95 °C预变性5 min; 95 °C变性30 s, 退火30 s。退火温度从高于(T_m+4) °C开始, 每5个循环降低退火温度2 °C直至(T_m-2) °C, 72 °C延伸时间取决于目的DNA片段长度(1 kb·min⁻¹计算), 最后以(T_m-4) °C作为最终退火

温度, 进行15个循环; 72 °C延伸10 min; 4 °C保存。若2条引物T_m值不同, 参考较低的T_m作为退火温度。

PCR产物回收, 克隆, 转化, 鉴定重组子并测序。利用本地软件和在线软件Vector NTI 10.3、MEGA 4.1、GENDOC、ProtParam、Signal P 4.1、TargetP 1.1 Server、ProtScale、Mobyly portal、InterProScan、SOPMA和Predictprotein Serve等, 预测分析基因的理化性质、结构与功能。

5 *CoHCD*基因的载体构建

本研究以获得的*CoHCD*基因的全长克隆质粒为模板, 采用常规载体构建方法构建了原核表达载体和真核表达载体, 采用Gateway技术构建干扰

载体。在基因编码区的3'和5'两端分别设计带酶切位点的引物[上游引物F: 5' CCGGAATTCATGGC-GAGTTTTCTATCACTTGT 3' (下划线部分为 *EcoRI*酶切位点), 下游引物R: 5' CCCAAGCTTC-TACTCCCTCTTTGATTTGAG 3' (下划线部分为 *Hind III*酶切位点), 真核表达上下游引物与原核表达上下游引物相同], 扩增长度为666 bp。根据同源序列保守区域, 设计构建干扰载体所需的特异引物attB1-F: 5' ggggacaagtgttacaaaaagcaggcttcAGCCTCTTCTCCTCGCTCAATC 3'; attB2-R: 5' ggggaccactttgtacaagaaagctgggtgAACTTCACTG-GTGATGCCGCTA 3', 小写部分是Gateway的接头序列, 依次采用BP反应构建入门载体和LR反应构建干扰载体(详见Invitrogen Gateway试剂盒说明书), 扩增长度为320 bp。PCR、回收、克隆、抽提质粒与纯化及转化, 采用菌液PCR和测序两种方法鉴定阳性克隆。

6 *CoHCD*基因的原核表达

成功转化入重组质粒pET30a-*CoHCD*的BL21(DE3)感受态细胞, 37 °C培养至OD₆₀₀值约为0.5~0.8后, 在28 °C和IPTG终浓度为1 mmol·L⁻¹的条件下诱导表达, 每隔2 h取样一次, 培养至12 h, 经15% SDS-PAGE电泳进行分析。

7 *CoHCD*基因的实时荧光定量PCR

对收集5个不同时期的‘华硕’果实的种子提取总RNA, 用紫外分光光度计测定浓度。将不同时期种子RNA量调整成相同浓度, 逆转录cDNA, 采用实时荧光定量PCR (qPCR)技术确定*CoHCD*基因的相对表达含量, 每组做3个平行重复反应。设计引物分别为qF: 5' GCCGCCGTTTTGGAGATACT 3'和qR: 5' CAAGTATGTGAGTCCGAGTC 3', 扩增长度为141 bp, 选取最优内参基因*GAPDH* (王保明2012)作为本实验的内参基因, 无菌水模板为阴性对照。qPCR反应体系参见TaKaRa试剂说明书, 热循环程序为95 °C预变性30 s, 95 °C变性5 s, 55 °C退火30 s, 共39循环, 采用Bio-Rad CFX Manager软件进行实验数据的分析。同时, 采取半定量多重RT-PCR, 将内参基因和特异基因的引物浓度以1:1的比例在同一个管中进行扩增, 反应体系和热循环程序同上, 产物均经2%的琼脂糖凝胶电泳检测来反映目的基因的表达水平变化。

实验结果

1 不同时期油茶种子提取的总RNA质量

油茶种子总RNA 28S和18S两条带清晰可见(图1), 进行检测结果表明 A_{260}/A_{280} 的比率为1.8~2.0, 说明RNA完整度较高, mRNA几乎没有降解, RNA的质量基本满足符合后续RT-PCR实验的要求。

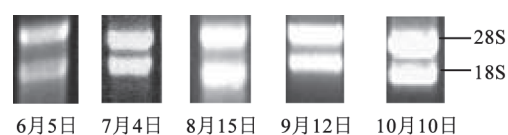


图1 不同时期油茶种子总RNA的提取

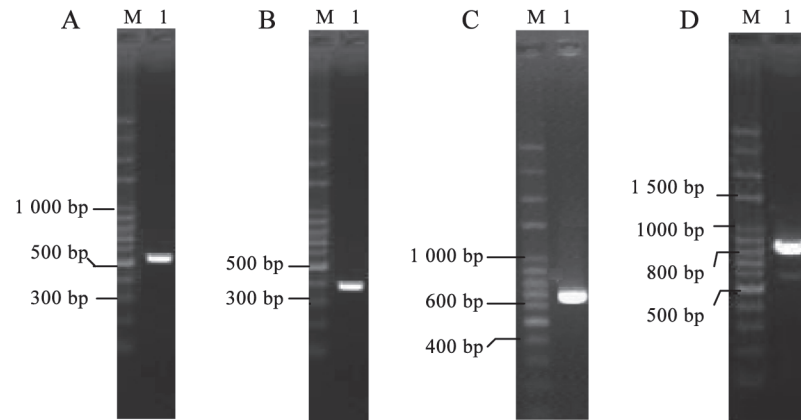
Fig.1 Total RNA extracted from *C. oleifera* seeds at different developmental stages

2 *CoHCD*基因全长cDNA的克隆与生物信息学分析

通过RACE技术, 获得全长为1 145 bp的目的片段(转录组序列 531 bp, 3' RACE 388 bp, 5' RACE 690 bp) (图2), 起始密码子为ATG, 终止密码子为TAG, 5' UTR和3' UTR分别为207和272 bp, 终止密码子后有PolyA尾巴(图3)。开放阅读框为666 bp (208~873), 编码221个氨基酸, 分子量为25.2 kDa, pI理论值为9.4, 即生理条件下该蛋白偏向为碱性。带负电荷残基(Asp+Glu)数为13, 带正电荷残基(Arg+Lys)数20, 分子式为C₁₁₈₁H₁₈₁₃N₂₈₅O₃₀₉S₈, 不稳定指数(II)为50.9, 属于典型的不稳定蛋白, 整个蛋白的疏水指数从-1.789到2.789, 其中疏水残基占整个氨基酸残基的48.9%, 是亲水性蛋白(图4-A), 具有4个比较明显的跨膜区(评分超过500), 分别是由外向内的13~31和134~162位氨基酸的跨膜区, 及由内向外的102~122和179~200位氨基酸跨膜区(图4-B)。氨基酸同源比对发现, 在氨基酸序列120位左右存在有类似于蛋白质酪氨酸磷酸酶基序(图5)。系统进化分析结果表明, *CoHCD*与葡萄(*Vitis vinifera*)和毛果杨(*Populus trichocarpa*)的HCD同源蛋白亲缘关系最近, 在一个进化分支上(图6)。蛋白质的高级结构预测(图7)显示, α 螺旋是油茶HCD的主要结构元件, α 螺旋结构为58.82%, β 折叠为14.93%, β 转角为4.52%和无规则卷曲为21.72%。

3 *CoHCD*基因的载体构建

构建成功的载体分别转化感受态宿主细胞,

图2 *CoHCD*基因cDNA的克隆Fig.2 Cloning of cDNA in *CoHCD*

M: 100 bp plus DNA ladder; A: 转录组序列扩增; B: 3' RACE扩增; C: 5' RACE扩增; D: 全长扩增。

```

1 ACATGGGGTTGGAAGTTGAGACAATAATGAGAGAGTTGGGAGAGAGAAGCAAGTAAGCAAAACGGGAAGTGGTTGATCGGCTCACCTACATCAATT
TATTATTTATGGCTCCCATTTGATTTTCTCTACTTAATCAAATCCCAATCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCAACTCTGAAACTCACTCAGATCA
GGTCTCTCTA

208 ATGGCGAGTTTTCTATCACTTGTAAGACGTACCTACCTACCAATCTACAATGGACCGTCTTCGTCGGCTGGTTCCAAGTGTCTTATCTT
M A S F L S L V R R T Y L T I Y N W T V F V G W F Q V L Y L

298 GCTTTGAAAACTCTCATGGAGTCGGGCCATGAACATGTCTACGACGCTGTTGAAAAGCCTCTTCTCTCGCTCAATCCGCCCGCTTTTG
A L K T L M E S G H E H V Y D A V E K P L L L A Q S A A V L

388 GAGATACTTCATGGTCTAGTAGGTTTGGTAAGATCTCCAGTCACAGCGACACTGCCACAATAAGTCAAGGTTGTATGTAACCTGGGGC
E I L H G L V G L V R S P V T A T L P Q I S S R L Y V T W G

478 ATCTTGTGGAGTTTTCTGAGACTCGGACTCACATACTTGTAGCTCAITGGTCATAAGCTGGTCTATCACAGAGATTATCGTTATCTT
I L W S F P E T R T H I L V S S L V I S W S I T E I I R Y S

568 TTCTTTGGCACAAAGGAAGCTCTTGGCTCTGCACCGTCCGGGCTCATGTGGCTCAGGTATAGCACCTTTTACTGCTGTATCTAGCGGC
F F G T K E A L G S A P S G L M W L R Y S T F L L L Y P S G

658 ATCACCAAGTGAAGTTGGTCTAATTTATATTGCCATGCCTTACATCAAGGAATCAGAGAAATATTGTGTACGGAATGCCTAACAATGGAAT
I T S E V G L I Y I A M P Y I K E S E K Y C V R M P N K W N

748 CTCTCAITTTGATTAATCTATGCTGCAATCTTGTCTTGGAACTATGTCACAGGAGCCCTCACATGTACACATACATGCTTGGACAA
L S F D Y F Y A A I L V L G I Y V P G S P H M Y T Y M L G Q

838 AGGAAGAAAGCTCTCTCAAAATCAAAGAGGGAGTAG
R K K A L S K S K R E *

874 AATGGGCATTTTAAAGAAGTTTAAACCCATTGTTTATCAGATTTTTGATTTTGTAGCTAAGTATCAGTCCGACATCTCTGGTTCCTTTTATTAAAGTT
TTTATTGGTTAAACATAITATTGTGCTTGTAGTATATATAAAAACTTTTTGGGTGTGCCAAAAAATCAAGGCGAAGTTGATCAAAATAGG
GGGGAAAAATGACGACTAAATGCACAAGCGTTCGACAAGCCTTTAAGGTTGGGTCAAAAAAAAAAAAAAAAAA

```

图3 *CoHCD*基因的全长cDNA序列及氨基酸序列Fig.3 Full length of *CoHCD* cDNA sequence and its deduced amino acid sequence

cDNA 双下划线分别表示起始密码子和终止密码子, 波浪线表示Poly A尾, 单下划线表示CDS, *表示翻译终止。

原核表达载体、真核表达载体和干扰载体宿主菌为BL21(DE3), 宿主菌为GV3101, 宿主菌为LBA4404, 制备工程菌。由图8-A~F可知, 均可以看到1条明显的约700 bp条带, 这跟预期的结果一致, 说明我们成功地构建了pET30a-*CoHCD*原核表达载体和

pEGAD-*CoHCD*超表达载体, 且均已成功地转化入了宿主感受态细胞中。由图8-G~I可知, 均可以看到1条明显的约320 bp条带, 这跟预期的结果一致, 说明我们成功地构建了pJawoh18-*CoHCD*干扰载体且成功地转化入了宿主农杆菌LBA4404中。

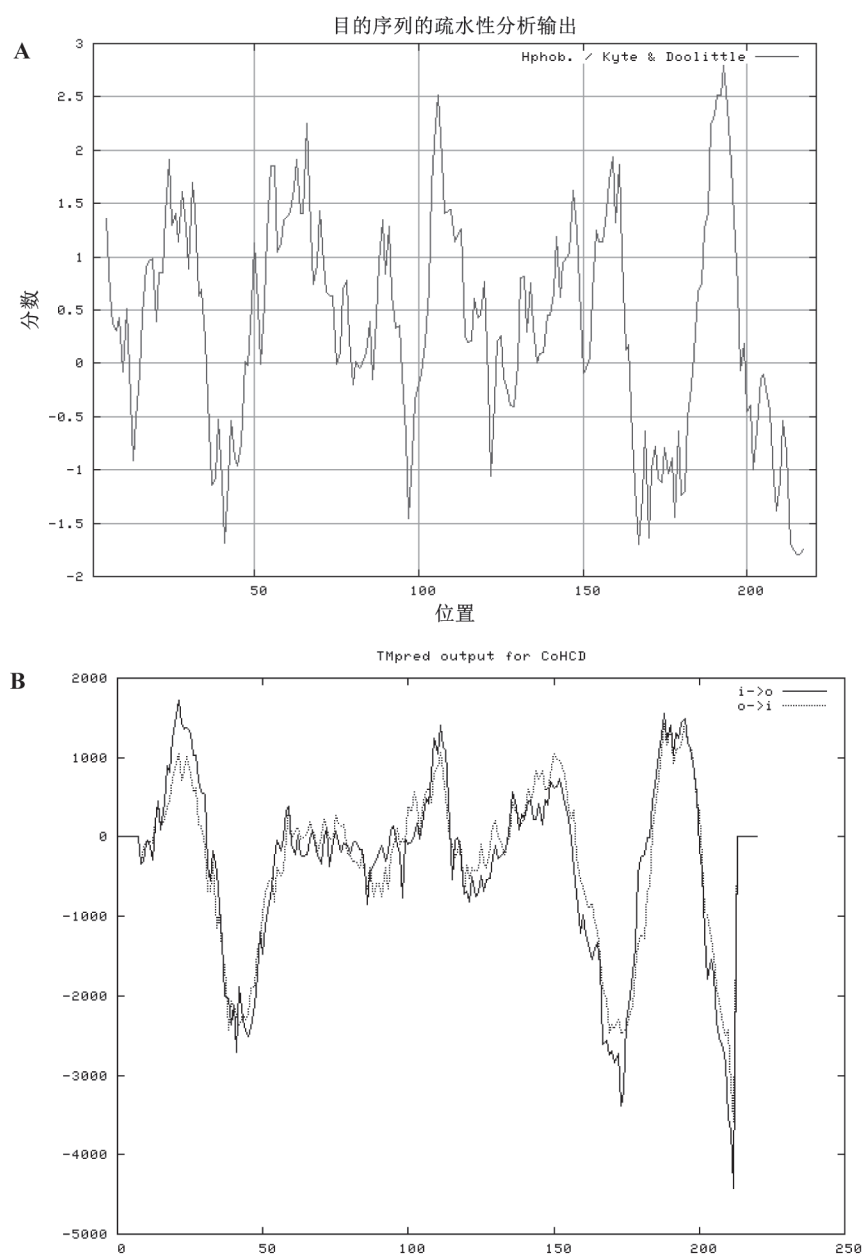


图4 油茶HCD蛋白质疏水性和跨膜区预测结果

Fig.4 Hydrophobicity and transmembrane domain prediction of HCD in *C. oleifera*

A: 疏水性预测; B: 跨膜区预测。

4 *CoHCD*基因的原核表达

在不同诱导时间下, 蛋白表达情况(图9)表明, 相比于未加诱导剂的菌株, 诱导的宿主菌株有一条清晰的、分子量约为25 kDa的条带, 且随着时间延长, 目的条带颜色加深, 这与预测的油茶HCD的分子量相一致, 说明油茶pET30a-CoHCD重组质粒在大肠杆菌中得到了表达。

5 不同种子发育时期*CoHCD*基因的表达特征分析

半定量和实时定量PCR表明, 油茶‘华硕’种子在不同发育阶段中*CoHCD*基因均有表达(图10), 并且*CoHCD*的相对表达量呈增加趋势, 在6、7月份表达量较低, 而在8、9、10月份的种子中表达量相对较高, 这与油茶种子油脂合成规律研究基本相一致(曾艳玲等2014), 即6、7月份为油茶种子油

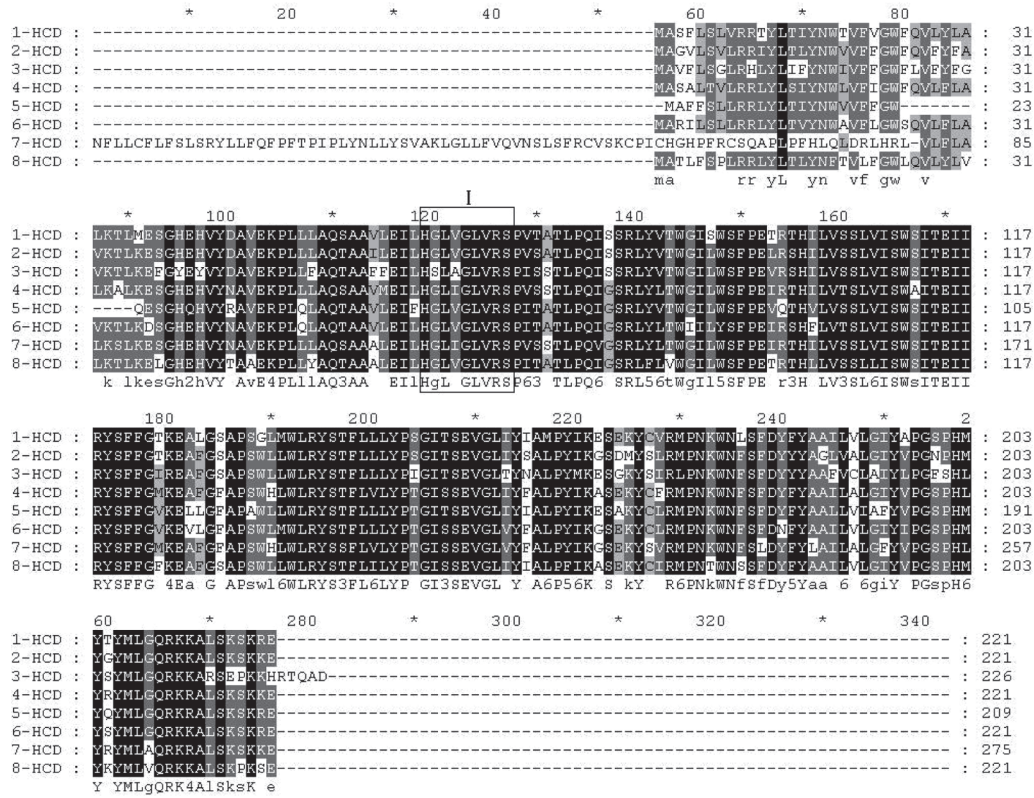


图5 CoHCD与其他植物HCD蛋白质序列的多重比较

Fig.5 Multiple comparisons between CoHCD and other plant HCDs

1: 油茶(*Camellia oleifera*) CoHCD KJ910336; 2: 番茄(*Solanum lycopersicum*) SIHCD XP_004236696.1; 3: 马铃薯(*Solanum tuberosum*) StHCD XP_006346750.1; 4: 陆地棉(*Gossypium hirsutum*) GhHCD AHA62438.1; 5: 葡萄(*Vitis vinifera*) VvHCD XP_002269096.1; 6: 毛果杨(*Populus trichocarpa*) PtHCD XP_002310869.1; 7: 可可(*Theobroma cacao*) TcHCD XP_007047795.1; 8: 鹰嘴豆(*Cicer arietinum*) CaHCD XP_004509689.1; I: 蛋白质酪氨酸磷酸酶基序(protein tyrosine phosphatase motif)。图6同此。

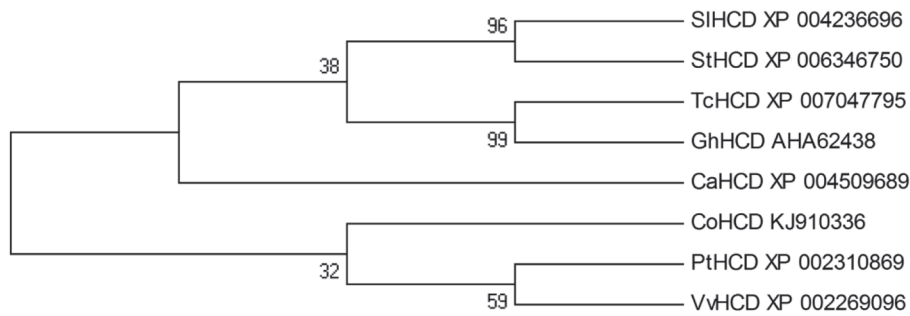


图6 CoHCD与其他植物HCDs的聚类分析

Fig.6 Phylogenetic analysis of CoHCD and other plant HCDs

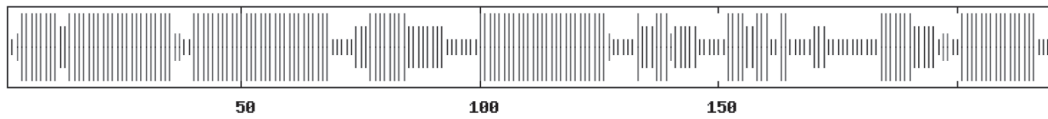


图7 CoHCD蛋白质的二级结构

Fig.7 The secondary structure of CoHCD

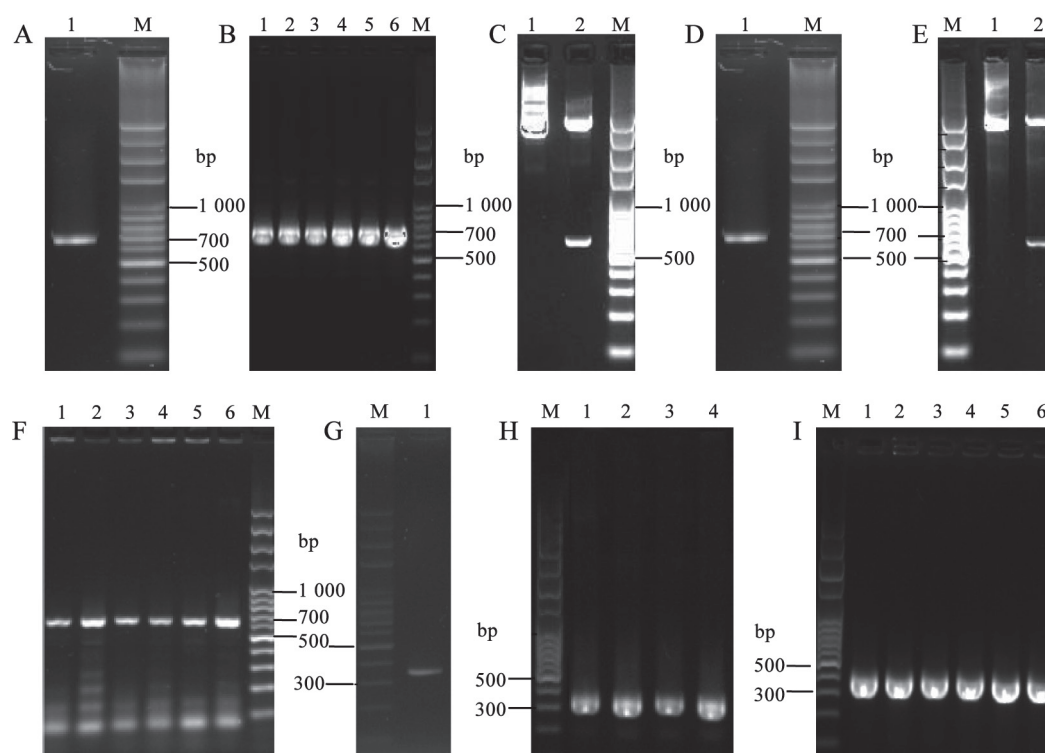


图8 *CoHCD*基因载体构建电泳图

Fig.8 The electrophoresis results of constructed vector of *CoHCD*

A: 带酶切位点的原核表达基因表达片段; B: 重组质粒pET30a-*CoHCD*的菌液PCR检测; C: pET30a-*CoHCD*的双酶切鉴定结果, 1: pET30a-*CoHCD*质粒, 2: 双酶切后的pET30a-*CoHCD*质粒; D: 带酶切位点的真核表达基因片段; E: 重组质粒pEGAD-*CoHCD*的双酶切, 1: pEGAD-*CoHCD*质粒, 2: 双酶切后的pEGAD-*CoHCD*质粒; F: 农杆菌中的重组质粒pEGAD-*CoHCD*的菌液PCR; G: 带attB位点的干扰基因片段; H: RNA干扰入门载体pDONR201-*CoHCD*菌液PCR; I: 农杆菌中的RNA干扰载体pJawoh18-*CoHCD*菌液PCR。

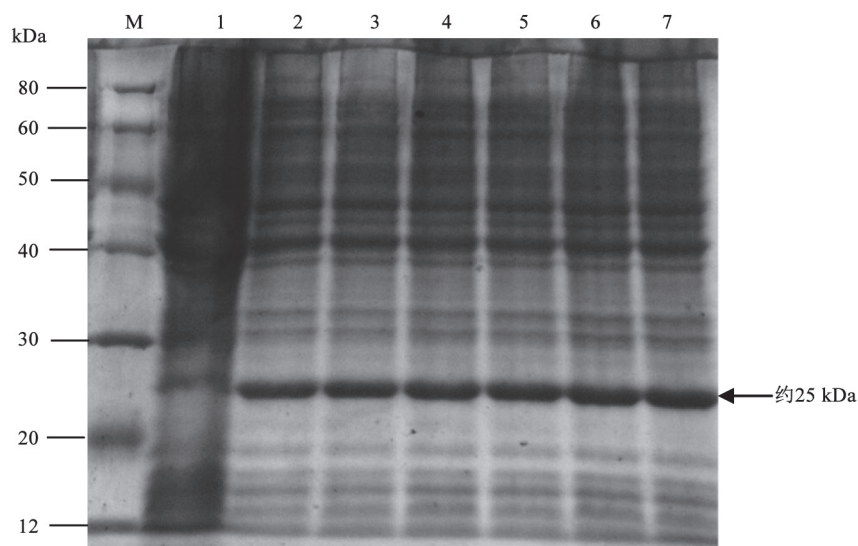
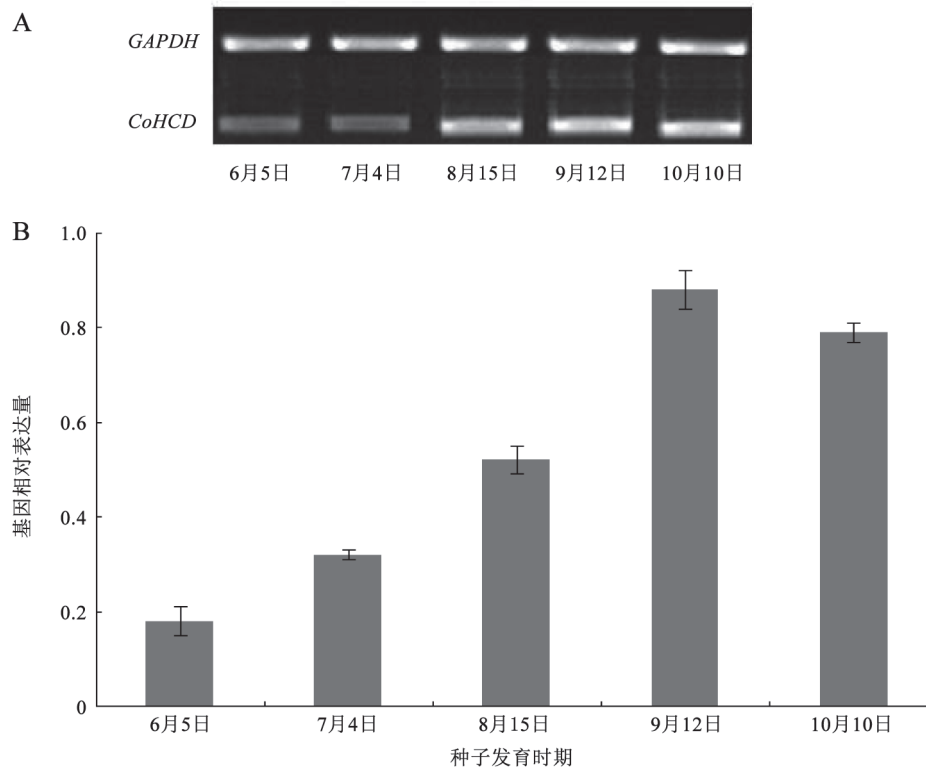


图9 pET30a-*CoHCD*表达蛋白的SDS-PAGE分析

Fig.9 SDS-PAGE analysis of expression proteins of pET30a-*CoHCD*

1: 未经IPTG诱导的重组菌总蛋白; 2~7: $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ IPTG分别诱导2、4、6、8、10和12 h重组菌总蛋白; 箭头所指为目的蛋白。

图10 *CoHCD*在不同种子发育阶段中的表达情况Fig.10 Expression pattern of *CoHCD* in different developmental stage of seeds

A: 半定量多重RT-PCR; B: 实时荧光定量PCR。

脂合成缓慢形成期,7月底至8月底为油茶种子油脂合成迅速累积期,9月初至10月中旬为油茶种子油脂合成累积完成期,说明该基因可能与油茶油脂合成调控有着密切的关系。

讨 论

HCD是个抗磷酸化酶,与磷酸化细胞周期酪氨酸蛋白依赖性激酶A (CDKA)相互作用而阻止了细胞周期蛋白的去磷酸化和活化,从而引起细胞过早地进入细胞分裂时期(Da Costa等2006)。研究证实,HCD具有类似于CDKA的功能(Dissmeyer等2009),它也具有辅助分子伴侣的功能(Smith等1990; Tanioka等2000)。位于内质网中的该酶除了C端的保守信号外,还具有丰富疏水残基和跨膜结构(Kihara等2008),它的“Tyr-xxx-Glu”等残基对该酶的催化活性、结构维持和底物特异性等功能具有重要作用且被认为构成了它的活性位点(Kihara等2008),HCD的可能的催化机制类似于细菌中的3羟酰ACP脱水酶FabA (Leesong等1996; White等

2005),但它的真正功能仍然是不清楚的。本研究获得的CoHCD的疏水残基占整个氨基酸残基的48.9%和具有4个比较明显的跨膜区,这符合HCD具有丰富疏水残基和跨膜结构的特征。该基因在油茶种子发育时期上调表达,说明它可能在脂肪酸的合成中具有重要作用(曾艳玲等2014)。氨基酸同源比对发现,HCD均具有类似于蛋白质酪氨酸磷酸酶基序(PTP基序)“HGXXGXXRS”,预测该基因可能类似于PTPLA超基因家族,表明CoHCD可能参与了与磷酸化作用相关的过程,这和已报道的结果相一致(Kihara等2008; Wang等2004)。功能互补试验表明,拟南芥中的3羟脂酰-CoA脱水酶[PASTICCINO2 (PAS2)]同酵母中的3羟脂酰-CoA脱水酶(PHS1)非常相似(Bellec等2002; Bach等2008)。通过Phs1p的结构和功能分析(Kihara等2008),类似于PTP的结构基序是作为催化残基来参与脱水过程,这预示着HCD并不属于PTP基因家族。尽管如此,我们并不能排除HCD是从PTP进化而来的这种可能性。一些迹象表明,HCD蛋白可

能仍然参与了磷酸化作用过程(如存在高度保守的PTP基序、哺乳类动物类似基因PTPLA突变引起与磷酸酶作用相关的疾病和酵母PHS1具有与磷酸酶相关的上位互作用等)(Kihara等2008; Pele等2005; Schuldiner等2005)。值得注意的是,在植物中同样发现了参与VLCFA代谢且与CDKA磷酸化作用相关的酶,这为今后展开植物HCD蛋白的研究提供了一个统一的模型。

目前我们对HCD调节VLCFA的代谢通路来参与调控细胞分裂和分化的生命机制仍然是不清楚的。未来为进一步的研究CoHCD基因的功能:在原核表达的基础上,分别展开目的蛋白表达条件的优化与纯化、酶活性的测定、Western、酵母双杂交和蛋白晶体结构研究等,为揭示该蛋白的动力学及其作用机制、结构和功能等奠定基础;在构建好的真核表达载体的基础上,采用RNAi失活和超表达来进行转基因的研究。这些研究,将会为揭示CoHCD基因的功能研究奠定分子生物学基础。

参考文献

- 谭晓风,袁德义,袁军,邹锋,谢鹏,苏勇,杨定桃,彭建桃(2011). 大果油茶良种‘华硕’. 林业科学, 47 (12): 184
- 王保明(2012). 油茶ACCase基因的克隆及功能研究[学位论文]. 长沙: 中南林业科技大学
- 曾艳玲,谭晓风,张党权,陈鸿鹏,曾晓峰,朱勇,许淑娟,陈力(2014). 油茶脂肪酸代谢途径中关键酶基因调控油脂合成的规律研究. 中国粮油学报, 29 (2): 26~29
- Abe K, Ohno Y, Sassa T, Taguchi R, Çalışkan M, Ober C, Kihara A (2013). Mutation for nonsyndromic mental retardation in the trans-2-enoyl-CoA reductase TER gene involved in fatty acid elongation impairs the enzyme activity and stability, leading to change in sphingolipid profile. J Biol Chem, 288: 36741~36749
- Bach L, Michaelson LV, Haslam R, Bellec Y, Gissot L, Marion J, Da Costa M, Boutin JP, Miquel M, Tellier F et al (2008). The very long-chain hydroxyl fatty acyl-CoA dehydratase PASTICCINO2 is essential and limiting for plant development. Proc Natl Acad Sci USA, 105 (38): 14727~14731
- Baud S, Bellec Y, Miquel M, Bellini C, Caboche M, Lepiniec L, Faure JD, Rochat C (2004). *gurke* and *pasticcino3* mutants affected in embryo development are impaired in acetyl-CoA carboxylase. EMBO Rep, 5: 515~520
- Bellec Y, Harrar Y, Butaeye C, Darnet S, Bellini C, Faure JD (2002). *Pasticcino2* is a protein tyrosine phosphatase-like involved in cell proliferation and differentiation in *Arabidopsis*. Plant J, 32: 713~722
- Chen X, Goodwin SM, Boroff VL, Liu X, Jenks MA (2003). Cloning and characterization of the WAX2 gene of *Arabidopsis* involved in cuticle membrane and wax production. Plant Cell, 15: 1170~1185
- Costaglioli P, Joubès J, Garcia C, Stef M, Arveiler B, Lessire R, Garbay B (2005). Profiling candidate gene involved in wax biosynthesis in *Arabidopsis thaliana* by microarray analysis. Biochim Biophys Acta, 1734 (3): 247~258
- Da Costa M, Bach L, Landrieu I, Bellec Y, Catrice O, Brown S, De Veylder L, Lippens G, Inzé D, Faure JD (2006). *Arabidopsis* PASTICCINO2 is an antiphosphatase involved in regulation of cyclin-dependent kinase A. Plant Cell, 18: 1426~1437
- Denic V, Weissman JS (2007). A molecular caliper mechanism for determining very long-chain fatty acid length. Cell, 130: 663~677
- Dissmeyer N, Weimer AK, Pusch S, De Schutter K, Kamei CLA, Nowack MK, Novak B, Duan GL, Zhu YG, Veylder LD et al (2009). Control of cell proliferation, organ growth, and DNA damage response operate independently of dephosphorylation of the *Arabidopsis* Cdk1 homolog CDKA;1. Plant Cell, 21: 3641~3654
- Domergue F, Chevalier S, Créach A, Cassagne C, Lessire R (2000). Purification of the acyl-CoA elongase complex from developing rapeseed and characterization of the 3-ketoacyl-CoA synthase and the 3-hydroxyacyl-CoA dehydratase. Lipids, 35 (5): 487~494
- Faure JD, Vittorioso P, Santoni V, Fraissier V, Prinsen E, Barlier I, Van Onckelen H, Caboche M, Bellini C (1998). The PASTICCINO genes of *Arabidopsis thaliana* are involved in the control of cell division and differentiation. Development, 125: 909~918
- Franke RB, Dombink I, Schreiber L (2012). Suberin goes genomics: use of a short living plant to investigate a long lasting polymer. Front Plant Sci, 3: 4
- Haberer G, Erschadi S, Torres-Ruiz RA (2002). The *Arabidopsis* gene PEPINO/PASTICCINO2 is required for proliferation control of meristematic and nonmeristematic cells and encodes a putative anti-phosphatase. Dev Genes Evol, 212: 542~550
- Harrar Y, Bellec Y, Bellini C, Faure JD (2003). Hormonal control of cell proliferation requires PASTICCINO genes. Plant Physiol, 132: 1217~1227
- Hiltunen JK, Palosaari PM, Kunau WH (1989). Epimerization of 3-hydroxyacyl-CoA esters in rat liver. Involvement of two 2-enoyl-CoA hydratases. J Biol Chem, 264: 13536~13540
- Ikeda M, Kanao Y, Yamanaka M, Sakuraba H, Mizutani Y, Igarashi Y, Kihara A (2008). Characterization of four mammalian 3-hydroxyacyl-CoA dehydratases involved in very long-chain fatty acid synthesis. FEBS Lett, 582: 2435~2440
- Kihara A, Sakuraba H, Ikeda M, Denpoh A, Igarashi Y (2008). Membrane topology and essential amino acid residues of Phs1, a 3-hydroxyacyl-CoA dehydratase involved in very long chain fatty acid elongation. J Biol Chem, 283: 11199~11209
- Konishi H, Okuda A, Ohno Y, Kihara A (2010). Characterization of HACD1 K64Q mutant found in arrhythmogenic right ventricular dysplasia patients. J Biochem, 148: 617~622
- Kunst L, Samuels L (2009). Plant cuticles shine: advances in wax biosynthesis and export. Curr Opin Plant Biol, 12: 721~727
- Leesong M, Henderson BS, Gillig JR, Schwab JM, Smith JL (1996). Structure of a dehydratase-isomerase from the bacterial pathway

- for biosynthesis of unsaturated fatty acids: two catalytic activities in one active site. *Structure*, 4: 253~264
- Nobusawa T, Okushima Y, Nagata N, Kojima M, Sakakibara H, Umeda M (2013). Synthesis of very-long-chain fatty acids in the epidermis controls plant organ growth by restricting cell proliferation. *Plos Biol*, 11 (4): e1001531
- Panikashvili D, Savaldi-Goldstein S, Mandel T, Yifhar T, Franke RB, Höfer R, Schreiber L, Chory J, Aharoni A (2007). The *Arabidopsis* DESPERADO/AtWBC11 transporter is required for cutin and wax secretion. *Plant Physiol*, 145: 1345~1360
- Pele M, Tiret L, Kessler JL, Blot S, Panthier JJ (2005). SINE exonic insertion in the PTPLA gene leads to multiple splicing defects and segregates with the autosomal recessive centronuclear myopathy in dogs. *Hum Mol Genet*, 14: 1417~1427
- Pollard M, Beisson F, Li Y, Ohlrogge JB (2008). Building lipid barriers: biosynthesis of cutin and suberin. *Trends Plant Sci*, 13: 236~246
- Reina-Pinto JJ, Yephremov A (2009). Surface lipids and plant defenses. *Plant Physiol Biochem*, 47: 540~549
- Roudiera F, Gissota L, Beaudoin F, Haslamb R, Michaelson L, Mariona J, Molino D, Lima A, Bacha L, Morinc H et al (2010). Very long-chain fatty acids are involved in polar auxin transport and developmental patterning in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 22: 364~375
- Schuldiner M, Collins SR, Thompson NJ, Denic V, Bhamidipati A, Punna T, Ihmels J, Andrews B (2005). Exploration of the function and organization of the yeast early secretory pathway through an epistatic miniarray profile. *Cell*, 123: 507~519
- Siebera P, Schordereta M, Rysera U, Buchalaa A, Kolattukudy P, Métraux J P, Nawrath C (2000). Transgenic *Arabidopsis* plants expressing a fungal cutinase show alterations in the structure and properties of the cuticle and postgenital organ fusions. *Plant Cell*, 12: 721~738
- Smith DF, Faber LE, Toft DO (1990). Purification of unactivated progesterone receptor and identification of novel receptor-associated proteins. *J Biol Chem*, 265: 3996~4003
- Smyczynski C, Roudier F, Gissot L, Vaillant E, Grandjean O, Morin H, Masson T, Bellec Y, Geelen D, Faure J D (2006). The C terminus of the immunophilin PASTICCINO1 is required for plant development and for interaction with a NAC-like transcription factor. *J Biol*, 281: 25475~25484
- Tanioka T, Nakatani Y, Semmyo N, Murakami M, Kudo I (2000). Molecular identification of cytosolic prostaglandin E2 synthase that is functionally coupled with cyclooxygenase-1 in immediate prostaglandin E2 biosynthesis. *J Biol Chem*, 275: 32775~32782
- Wang B, Pelletier J, Massaad MJ, Herscovics A, Shore GC (2004). The yeast split-ubiquitin membrane protein twohybrid screen identifies BAP31 as a regulator of the turnover of endoplasmic reticulum-associated protein tyrosine phosphatase like B. *Mol Cell Biol*, 24: 2767~2778
- White SW, Zheng J, Zhang YM, Rock CO (2005). The structural biology of type II fatty acid biosynthesis. *Annu Rev Biochem*, 74: 791~831
- Worrall D, Ng CKY, Hetherington AM (2003). Sphingolipids, new players in plant signaling. *Trends Plant Sci*, 8: 317~320
- Xu XJ, Dietrich CR, Lessire R, Nikolau BJ, Schnable PS (2002). The endoplasmic reticulum-associated maize GL8 protein is a component of the acyl-coenzyme A elongase involved in the production of cuticular waxes. *Plant Physiol*, 128 (3): 924~934
- Yang SY, Cuebas D, Schulz H (1986). 3-Hydroxyacyl-CoA epimerases of rat liver peroxisomes and *Escherichia coli* function as auxiliary enzymes in the beta-oxidation of polyunsaturated fatty acids. *J Biol Chem*, 261: 12238~12243
- Yu L, Castillo LP, Mnaimneh S, Hughes TR, Brown GW (2006). A survey of essential gene function in the yeast cell division cycle. *Mol Biol Cell*, 17: 4736~4747