

研究简报

甘蓝型油菜羧基转移酶 α 亚基全长 cDNA 的克隆及在大肠杆菌中表达*

武玉永 马立新** 蒋思婧

(湖北大学生命科学学院, 分子微生物学与基因工程研究室, 武汉 430062)

摘要 通过分析拟南芥与大豆的羧基转移酶 α 亚基的 cDNA 序列, 运用 RT-PCR、RACE 和基因组步行 (Genome walking) 三种技术进行组合克隆, 首次从油菜开花后 20 ~ 29 天的幼胚中, 克隆到质体定位的羧基转移酶 α 亚基的全长 cDNA. 同源性分析表明, 其开放阅读框 (ORF) 编码的氨基酸序列与拟南芥、大豆的羧基转移酶 α 亚基的同源性分别为 85%、59%. 将此 cDNA 去除叶绿体转运肽编码序列的成熟肽编码序列, 克隆到表达载体 pHBM625 上, 蛋白质印迹分析, 它在大肠杆菌中成功表达.

关键词 甘蓝型油菜, 羧基转移酶 α 亚基, 组合克隆, 基因表达

学科分类号 Q78

羧基转移酶 α 亚基 (carboxyltransferase alpha subunit, α -CT) 是组成大多数植物质体定位的乙酰辅酶 A 羧化酶 (acetyl-CoA carboxylase, ACCase, EC 6.4.1.2) 4 个亚基中的 1 个亚基, 其余 3 个亚基是: 生物素羧基载体蛋白亚基、生物素羧化酶亚基和羧基转移酶 β 亚基. 这 4 个亚基中, 除羧基转移酶 β 亚基为叶绿体基因编码外, 其余 3 个亚基均由核基因编码^[1,2]. 在乙酰辅酶 A 羧化酶活性状态下, 羧基转移酶 α 亚基与羧基转移酶 β 亚基紧密结合成异源二聚体, 构成羧基转移酶催化羧基转移的功能域, 将羧化的生物素上的羧基转移到乙酰辅酶 A 上形成丙二酰辅酶 A. 乙酰辅酶 A 羧化酶在生物体内催化形成丙二酰辅酶 A, 丙二酰辅酶 A 是脂肪酸合成和脂链延伸系统等重要代谢反应的底物, 被认为是生物体内基本的代谢底物和特定蛋白质活性的调控代谢物. 尤其是在脂肪酸合成途径中, 乙酰辅酶 A 羧化酶催化的这步反应不仅是第一个关键步骤, 同时也是限速步骤^[1~3], 由此可见, 羧基转移酶 α 亚基在这步反应中的重要性.

近几年来, 人们对植物乙酰辅酶 A 羧化酶的研究逐渐升温, 主要集中在降低该酶对除草剂的敏感性^[2~6]和提高种子含油量^[2,7~10]两方面. 在油菜中, 存在两种类型的乙酰辅酶 A 羧化酶: 一种是多功能单亚基的乙酰辅酶 A 羧化酶, 定位于胞质中; 另一种是多亚基的乙酰辅酶 A 羧化酶, 定位

于质体中. Roesler 等^[10] (1997 年) 将拟南芥的多功能单亚基的乙酰辅酶 A 羧化酶转入油菜, 结果使其总含油量提高了 5%. 油菜多功能单亚基的乙酰辅酶 A 羧化酶基因已被克隆, 未见转质体的报道^[11,12]. 对组成油菜质体定位的乙酰辅酶 A 羧化酶的生物素羧基载体蛋白亚基、生物素羧化酶亚基和羧基转移酶 β 亚基也进行过研究^[13~15], 但由于其中的羧基转移酶 α 亚基的基因尚未克隆, 从而限制了对质体定位的乙酰辅酶 A 羧化酶进一步的研究, 将该酶 4 个亚基的基因串联起来转质体干预油脂代谢的研究, 迄今未见报道. 我国是油菜种植大国, 油菜是重要的油料作物, 开展多亚基的乙酰辅酶 A 羧化酶质体工程的研究, 进行油脂代谢系统的基础研究以及提高油菜种子的含油量, 缓解食用油与工业用油的矛盾, 具有重要的理论意义和现实意义. 因此, 克隆质体定位的羧基转移酶 α 亚基的基因是十分必要的.

本文运用 RT-PCR、cDNA 末端快速扩增法 (RACE) 和基因组步行 (Genome walking) 三种技术进行组合克隆, 首次从油菜开花后 20 ~ 29 天的

* 湖北省自然科学基金 (2003ABA118) 和国家高技术“863”计划资助项目 (2002AA227011).

** 通讯联系人.

Tel: 027-88666349, E-mail: malixin9@hotmail.com

收稿日期: 2004-03-11, 接受日期: 2004-04-29

幼胚^[14,15]中克隆到质体定位的羧基转移酶 α 亚基的全长 cDNA, 将其去除叶绿体转运肽编码序列的成熟肽编码序列克隆到表达载体 pHBM625 上, 在大肠杆菌中成功表达.

1 材料与方法

1.1 材料

甘蓝型油菜 (*Brassica napus* L.) 中双 4 号, 种子萌发后 2 周的叶片, 及开花后 20 ~ 29 天的幼胚^[14,15], 以上实验材料均由湖北大学遗传学研究室黄邦全博士提供. 大肠杆菌 XL₁₀-gold 购自 Stratagene 公司, 大肠杆菌表达载体 pHBM625 为本室构建. 克隆载体 pMD18-T、限制性内切酶、T4 DNA 聚合酶、T4 DNA 连接酶、Ex-Taq DNA 聚合酶、RT-PCR 试剂盒和 4 种 dNTP 均购自 TaKaRa 公司, SMARTTM RACE cDNA amplification kit 和 Universal GenomeWalkerTM kit 均购自 Clontech 公司, TRIzol 试剂和 Superscript II 逆转录酶购自 Invitrogen 公司, DNA PCR pure Kit 和 DNA gel extraction kit 购自 Vitagene 公司, 谷胱甘肽转移酶 (GST) 单抗购自 Oncogene 公司, 辣根过氧化物酶标记山羊抗小鼠 IgG (H + L) 购自北京中杉金桥生物技术有限公司, 其他常规试剂采用进口分装或国产分析纯.

1.2 方法

1.2.1 总 RNA 及总 DNA 酶切后片段的制备: 取

甘蓝型油菜开花期 20 ~ 29 天的幼胚^[14,15], 提取总 RNA (TRIzol 法). 以油菜种子萌发后 2 周的叶片为材料, 提取总 DNA^[16], 将此总 DNA, 分别用 *Pvu* II、*Sma* I 及 *Eco*R V 3 种酶, 完全酶切后, 用 2 倍体积的无水乙醇和 1/10 体积的 3 mol/L 乙酸钠 (pH 5.2) 沉淀, 70% 乙醇洗 2 次, 分别溶于 TE 缓冲液中.

1.2.2 RT-PCR、3'-RACE 和 Genome walking: RT-PCR 参照 TaKaRa 公司 one step RNA PCR kit (AMV) 操作指南进行; 3'-RACE 参照 Clontech 公司 SMARTTMRACE cDNA amplification kit 操作指南进行; Genome walking 参照 Clontech 公司 Universal GenomeWalkerTM kit 操作指南进行.

1.2.3 引物合成: P1, 5' AAAGCCTGTCACCTTGGATTT 3'; P2, 5' GCTGCACATGCCTCTGGACT 3'; P3, 5' CCGGGCGGGGTATGATGATCCAGCCAT 3'; P4, 5' CAGCGTTTTCAAGCATCAGCATTTTATTAG 3'; P5, 5' GGCATCCCAAAGTTACGCATTATATTCTCT 3'; P6, 5' CTTCCACACAATACCCACGGCCTC 3'; P7, 5' TGAACGACAAAAGTACTGTCTAATGAAAC 3'; P8, 5' GTCATGCATCCACCAAAAGAAACAACC 3'; P9, 5' GGCCAAGGGCTTCAAGATCAAACAATGTC 3'; 3'-RACE CDS PrimerA (3'-CDS), 5' AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTAC (T)₃₀N₁N 3' (N = A, C, G, or T; N₁ = A, G, or C); Genome walking 引物 (图 1).

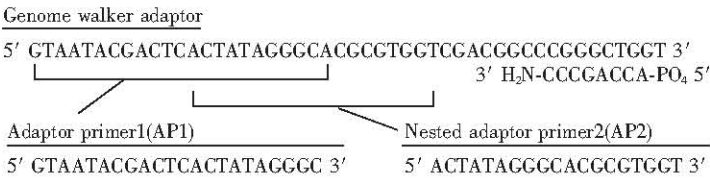


Fig. 1 Structure of the GenomeWalker adaptor and adaptor primers

The adaptor has been ligated to both ends of the genomic DNA fragments to create GenomeWalker libraries. The amine group on the lower strand of the adaptor blocks extension of the 3' end of the adaptor-ligated genomic fragments, and thus prevents formation of an AP1 binding site on the general population of fragments.

以上所有引物合成与 DNA 测序工作均由上海博亚生物技术有限公司完成.

1.2.4 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE): 参照 BIO-RAD 实验手册进行.

1.2.5 蛋白质印迹: 参照蛋白质印迹分析

(Western blotting analysis)^[17]进行.

2 结 果

2.1 羧基转移酶 α 亚基全长 cDNA 克隆及序列测定

2.1.1 羧基转移酶 α 亚基部分 cDNA 克隆: 根据拟

南芥、大豆的羧基转移酶 α 亚基 cDNA 序列^[13,18] 的保守区段, 设计一对引物 (P1 与 P2), 以从油菜开花后 20 ~ 29 天的幼胚^[14,15] 中提取的总 RNA 为模板, 进行 RT-PCR 扩增. RT-PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳检测, 发现扩增出一条大约 700 bp 的 cDNA 带, 与预计的大小相符 (图 2), 将此片段连接到 pMD18-T 载体上测序. 此片段长度为 693 bp, 同源性序列分析表明, 由它推导的氨基酸序列与拟南芥和大豆羧基转移酶 α 亚基相应的氨基酸序列同源性分别为 97% 和 88% (图 3). 表明此段序列应为甘蓝型油菜 (中双 4 号) 质体定位的羧基转移酶 α 亚基的部分 cDNA 序列.

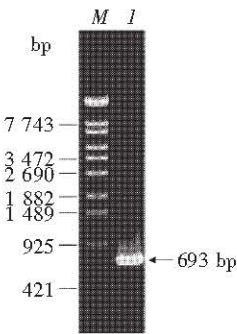


Fig. 2 Amplification of partial cDNA fragment by RT-PCR

M: DNA standard marker (λ -EcoT14 I digest).
I: product of RT-PCR.

<i>Brassica napus</i>	KPVTLDFEKPLVELEKKIVDVRKMAAETGLDFTDQIITLETKYRQALKDLYTHLTPIQRV	60
<i>Arabidopsis thaliana</i>	KPVTLDFEKPLVELEKKIVDVRKMANETGLDFTQIITLENKYRQALKDLYTHLTPIQRV	153
<i>Brassica napus</i>	NIARHPNRPTFLDHIHNITDKFMELHGDRAGYDDPAIVTGITIDGKRYMFIGHQKGRNT	120
<i>Arabidopsis thaliana</i>	NIARHPNRPTFLDHIHNITDKFMELHGDRAGYDDPAIVTGITIDGKRYMFIGHQKGRNT	213
<i>Brassica napus</i>	KENIMRNFQMPTPHGYRKALRMYYADHHGFFIVTFIDTPGAYADLKSEEGQGGEAIANN	180
<i>Arabidopsis thaliana</i>	KENIMRNFQMPTPHGYRKALRMYYADHHGFFIVTFIDTPGAYADLKSEELQGGEAIANN	273
<i>Brassica napus</i>	LRTMFGLEVPILSIVIGEGSGGALAIGCANKMLMLLENVFFVYASPEACA	230
<i>Arabidopsis thaliana</i>	LRTMFGKVPILSIVIGEGSGGALAIGCANKMLMLLENVFFVYASPEACA	323

Fig. 3 Comparison of amino acid sequences deduced from partial cDNA of α -CT from *Brassica napus* with that of *Arabidopsis thaliana*

2.1.2 羧基转移酶 α 亚基 3'端 cDNA 的克隆: 根据以上获得的 cDNA 序列, 设计一条基因特异性引物 (P3), 结合引物 3'-CDS, 用 3'-RACE 的方法克隆羧基转移酶 α 亚基的 3'端 cDNA. PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳检测, 发现扩增出一条大约 2.1 kb 的 cDNA 带, 与预计的大小相符 (图 4). 将此片段连接到 pMD18-T 载体上测序. 此片段长度为 2 004 bp, 同源性序列分析表明, 它与拟南芥和大豆羧基转移酶 α 亚基的 cDNA 的同源性分别是 87% 和 83% (图 5), 而且它的 3'端序列带有 polyA 的尾巴. 由

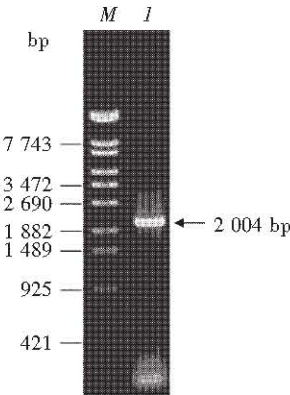


Fig. 4 Amplification of 3'-CT by RACE

M: DNA standard marker (λ -EcoT14 I digest). I: product of PCR by 3'-RACE.

此表明此段序列应为甘蓝型油菜 (中双 4 号) 质体定位的羧基转移酶 α 亚基完整的 3'端 cDNA 序列.

2.1.3 羧基转移酶 α 亚基 5'端部分结构基因的克隆: 根据以上获得的 cDNA 序列, 设计 2 条用于 Genome walking 的基因特异性引物 (P4 与 P5), 将叶片的总 DNA 分别用 *Pvu* II、*Sma* I 及 *Eco* R V 3 种酶完全酶切后, 在这些 DNA 片段末端均加上 Genome walking 接头, 以这 3 组 DNA 片段为模板, 用 AP1 与 P4 这对引物进行第一轮 PCR, 再分别以回收纯化后的 PCR 产物为模板, 用 AP2 与 P5 这对引物进行第二轮 PCR, 两轮 PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳检测 (图 6), 将其中以 *Pvu* II 酶切后的 DNA 片段为模板, 经过两轮 PCR 获得的片段连接到 pMD18-T 载体上测序. 此片段长度为 1 725 bp, 序列分析表明, 它与拟南芥羧基转移酶 α 亚基的结构基因同源性是 78.5% (图 7), 从而确定此段序列为羧基转移酶 α 亚基基因的 5'端部分结构基因的序列. 这段序列与拟南芥羧基转移酶 α 亚基 cDNA 的序列分析表明, 它已经包括了拟南芥羧基转移酶 α 亚基全长 cDNA 序列的 5'端, 由此可推测, 它也包括甘蓝型油菜质体定位的羧基转移酶 α 亚基全长 cDNA 序列的 5'端.

[illegible]

Fig. 5 Comparison of the sequence of 3'- α -CT from *Brassica napus* with that of *Arabidopsis thaliana*

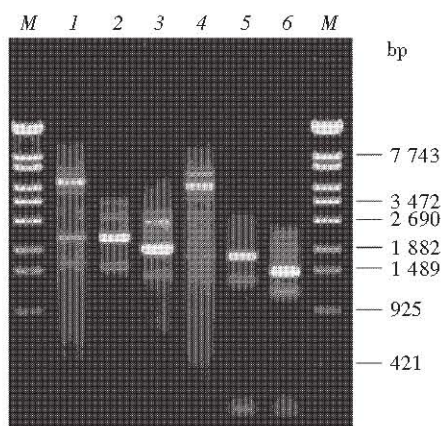


Fig. 6 Amplification of 5'-structure gene of α -CT by Genome walking

M: DNA standard marker (λ -EcoT14 I digest). 1: product of the first PCR using template of total DNA digested by *EcoRV*; 2: product of the first PCR using template of total DNA digested by *PvuII*; 3: product of the first PCR using template of total DNA digested by *SmaI*; 4: product of the secondary PCR using template of DNA fragment from 1; 5: product of the secondary PCR using template of DNA fragment from 2; 6: product of the secondary PCR using template of DNA fragment from 3.

2.1.1.4 羧基转移酶 α 亚基全长 cDNA 的克隆: 根据 Genome walking 与 3'-RACE 获得 cDNA 序列, 设计一对基因特异性引物 (P6 与 P7), 以从油菜开花后 20 ~ 29 天的幼胚^[14,15]中提取的总 RNA 为模板, RT-PCR 扩增得到甘蓝型油菜质体定位的羧基转移酶 α 亚基的全长 cDNA (图 8), 经测序验证, 它的长度是 2 717 bp. 同源性分析表明, 其开放阅读框编码的氨基酸序列与拟南芥及大豆的羧基转移酶 α 亚基的同源性分别为 85% 和 59% (图 9). 此基因已被 GenBank 接受, 接受号为: AY538675.

2.2 表达载体 pHBM701 的构建

利用 ChloroP 1.1 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/ChloroP/>) 推测羧基转移酶 α 亚基全长 cDNA 开放阅读框编码的氨基酸序列中叶绿体转运肽序列, 其结果见表 1, 设计一对引物 P8 和 P9, 分别在这 2 条引物的 5' 端加上 GTCA, GGCCA 接头, PCR 扩增质体定位的羧基转移酶 α

Fig. 7 Comparison of structure gene sequences of α -CT from *Brassica napus* with that of *Arabidopsis thaliana*

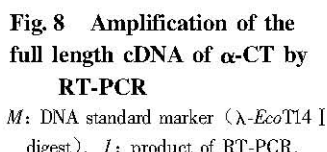


Fig. 8 Amplification of the full length cDNA of α -CT by RT-PCR
M: DNA standard marker (λ -EcoT14 I digest). *L*: product of RT-PCR.

亚基全长 cDNA 去除叶绿体转运肽编码序列的成熟肽编码序列。将 PCR 扩增产物凝胶回收纯化后,在 dTTP 的保护下经 T4 DNA 聚合酶处理,溶液回收纯化后,与经 *Cpo* I 与 *Not* I 双酶切去掉卡那霉素抗性基因序列 (*Kan*) 的大肠杆菌表达载体 pHB625 连接,转化大肠杆菌 XL10-gold,验证转化子,得到重组质粒 pHB701 (图 10)。

<i>Brassica napus</i>	MASMSHSSIALCGASASASADHLRSSINGVS	LKTLGRAMVASTKRNLYVTARLKK	57
<i>Arabidopsis thaliana</i>	MASISHSSIALCGAS	SASASDYLRSSSNGVNGVPLKTLGRAVFTTIRRKDLAVTSRLKK	59
<i>Brassica napus</i>	GKKFEDHPWASNPDPNVKGGLSYLSTFKPLGDTQKPVTLDFEKLPLVEKKIVDYRKMAA		117
<i>Arabidopsis thaliana</i>	GKKFEHPWPNPDPNVKGGLSYLAEFKPLGDTQKPVTLDFEKLPLVEKKIVDYRKMAN		119
<i>Brassica napus</i>	ETGLDFTDQIIITLCTKYRQALKDLYTDLTPIQRVNIARHFNPTFLDHIHNITDKFMELH		177
<i>Arabidopsis thaliana</i>	ETGLDFTDQIIITLENKYRQALKDLYTHLTPIQRVNIARHFNPTFLDHIHNITDKFMELH		179
<i>Brassica napus</i>	GDRAGYDDPAIVTGIGTIDGKRYMFICHQKGRNTEKINIRNFGMPTPHGYRKALRMYYA		237
<i>Arabidopsis thaliana</i>	GDRAGYDDPAIVTGIGTIDGKRYMFICHQKGRNTEKINIRNFGMPTPHGYRKALRMYYA		239
<i>Brassica napus</i>	DHHGFPITVFIDTPGAYADLKSEELGQGEAIANNLRMTFGLKVPILSVIGEGGSGGALA		297
<i>Arabidopsis thaliana</i>	DHHGFPITVFIDTPGAYADLKSEELGQGEAIANNLRMTFGLKVPILSVIGEGGSGGALA		299
<i>Brassica napus</i>	IGCANKMLLENVAVFYVASPEACAA ILWNSSKAAPEAAEKLRTSRELVLKNVADGITPE		357
<i>Arabidopsis thaliana</i>	IGCANKMLLENVAVFYVASPEACAA ILWKTSKAAPEAAEKLRTSRELVLKNVADGITPE		359
<i>Brassica napus</i>	PLGGAHADPSWTSQQIKIAINENMNEFGKMSGEELLKHRMAKYRKIGVFIENTAPVEPEIK		417
<i>Arabidopsis thaliana</i>	PLGGAHADPSWTSQQIKIAINENMNEFGKMSGEELLKHRMAKYRKIGVFIENTAPVEPEIK		419
<i>Brassica napus</i>	VNMKRRDAVVSNSRKLGEVEKLEKEQLKAKETSSSEDQPSSEVLNEMIKKLKSEIDDEY		477
<i>Arabidopsis thaliana</i>	VNMKREAVFSDSRKLQGEVDKLEKEQLKAKET STEAEFSSSEVLNEMIKKLKSEIDDEY		478
<i>Brassica napus</i>	TEAARTMGLLEERLTAMRGEFSKASEEEHLVHPILIEKLEKKEEFNTRLSEAPNYESLKS		537
<i>Arabidopsis thaliana</i>	TEAA IAVGLEERLTAMREEFSKASEEEHLVHPVILIEKLEKKEEFNTRLTDAPNYESLKS		538
<i>Brassica napus</i>	KLDMRLDFSRKAAEAASVKNEINKRFQEAVDREPREKVEAIKAEVASSGASSFEELS		597
<i>Arabidopsis thaliana</i>	KLNMLRDFSRKAAASEATSLKKEINKRFQEAVDREPREKVEAIKAEVASSGASSFDELP		598
<i>Brassica napus</i>	DELKEKVLKTRGEVEAEMAGVLKSMGLEDAVKQNKDTAEQIYAANENLQEKLEKLNQE		654
<i>Arabidopsis thaliana</i>	DELKEKVLKTRGEVEAEMAGVLKSMGLEDAVKQNKDTAEQIYAANENLQEKLEKLNQE		658
<i>Brassica napus</i>	ISEKIEEVVRAPEIKSMVELLKVENAKASQTPGDTKYSQKLETLEQQIKQKIAADALMSG		714
<i>Arabidopsis thaliana</i>	ITSKIEEVVRTPEIKSMVELLKVETAKASRTPGVTEAYQKIEALEQQIKQKIAEALNTSG		718
<i>Brassica napus</i>	LQEKQEELEKELAVAREVAAYKSEESLKEDDDDDGSESE KPELINPHEA		764
<i>Arabidopsis thaliana</i>	LQEKQDELEKELAAARELAABESDGSVKEDDDDDGSESESGKSEMVNPSPA		769

Fig. 9 Comparison of the predicted protein sequence of α-CT from *Brassica napus* with that of *Arabidopsis thaliana*

Table 1 Chlorop v1.1 prediction results					
Name	Length	Score	cTP	CS-score	cTP-length
Sequence	764	0.572	Y	8.032	41

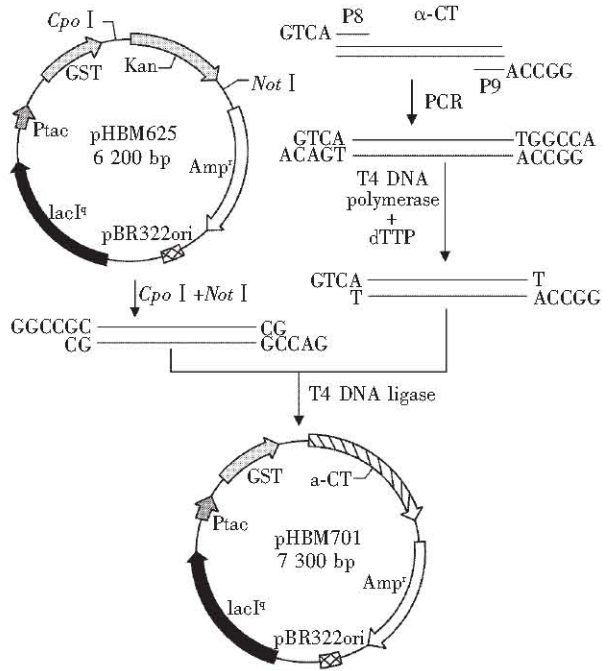


Fig. 10 Construction of expression vector pHBM701

2.3 表达产物的分析

将重组质粒 pHBM701 转入大肠杆菌 XL10-gold, 经 25℃ 温育、IPTG 诱导后, 表达产物经

SDS-PAGE 分析, 与对照相比, 出现了一条蛋白质条带, 与理论上预计的大小一致, 约 106 ku, 用 GST 单抗, 蛋白质印迹检测 (图 11), 表明它成功表达, 而且此融合蛋白约占总菌体蛋白的 8% (图 11), pHBM625 带有 GST 融合纯化标签, 去除 Kan 基因后, 可在表达出 26 ku 大小的 GST 蛋白, pBluescript II SK (+) 中不带 GST 融合纯化标签.

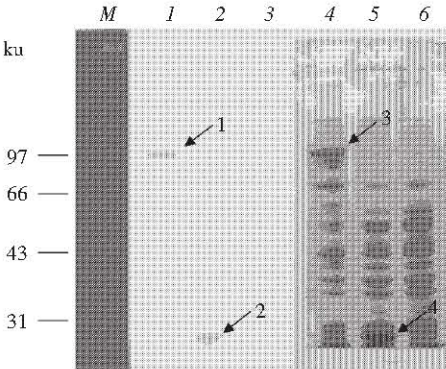


Fig. 11 SDS-PAGE and Western blotting analysis of fusion expression of α-CT with 12% polyacrilamide under denature conditions

M: Protein molecular mass standard marker. 1: Total protein from induced pHBM701; 2: Total protein from induced pHBM625 (no containing Kan^r gene); 3: Total protein from induced pBluescript II SK (+); 4: Total protein from induced pHBM701/Western blotting; 5: Total protein from induced pHBM625 (no containing Kan^r gene) / Western blotting; 6: Total protein from induced pBluescript II SK (+) / Western blotting. Arrow1 and arrow3 indicates the band of target protein, arrow2 and arrow4 indicates the band of GST (26 ku) protein.

3 讨 论

本文根据拟南芥、大豆的羧基转移酶 α 亚基 cDNA 序列^[13,18] 的保守区段, 设计一对引物, 通过 RT-PCR 扩增油菜质体定位的羧基转移酶 α 亚基的一段 cDNA. 根据这段 cDNA 序列, 设计引物利用 3'-RACE 获得了它的 3' 端的 cDNA 序列. 根据以上得到的序列, 先后设计了 7 条基因特异性引物, 用 5'-RACE 克隆其 5' 端的 cDNA 序列均未成功. 尽管得到了一些 DNA 片段, 测序之后, 序列分析表明, 这些序列与拟南芥、大豆的羧基转移酶 α 亚基的基因序列都没有同源性, 可能由于非特异性扩增造成的. 在这种情况下, 我们尝试用 Genome walking 克隆它的结构基因 5' 端序列, 将此序列与拟南芥的羧基转移酶 α 亚基的基因序列进行同源性比较, 以此获得用于设计其 5' 端的引物, 通过 RT-PCR 获得其全长 cDNA. 这种克隆方法有别于传统的用 RT-PCR 获得中间一段 cDNA 序列后, 再根据此段序列设计引物, 用 5'-RACE 和 3'-RACE 获得扩增全长 cDNA 的引物序列, 最后经 RT-PCR 获得其全长 cDNA 方法. 由于逆转录酶不能通过 5' 端特殊的“帽子”结构和 mRNA 可能形成的二级结构, 传统方法在克隆全长 cDNA 的 5' 端时, 较不容易获得其完整的 5' 端的 cDNA 序列. 而我们采用 Genome walking 的方法, 先克隆它的结构基因 5' 端序列, 再根据同源比较及分析其外显子的方法拼接得到完整的 5' 端 cDNA 序列, 从而巧妙地克服了上述缺点, 可以比较容易地获得全长 cDNA. 用此种克隆 cDNA 5' 端的方法, 通过分析大型真菌中漆酶基因序列, 本研究室还克隆了 4 个大型真菌漆酶的全长 cDNA, 同源性序列分析表明, 它们均与 GenBank 收录的漆酶基因的同源性较低. 由此可见, 克隆不同种的基因全长 cDNA, 对其同源性较低且结构基因长度小于 10 kb (Genome walking 的局限性) 时, 运用 RT-PCR、RACE 和 Genome walking 3 种技术进行组合克隆的方法不失为一种新的有效方法.

用此种克隆方法, 根据拟南芥与大豆羧基转移酶 α 亚基的 cDNA 序列^[13,18], 首次获得油菜质体定位的羧基转移酶 α 亚基的全长 cDNA 序列, 其开放阅读框编码的氨基酸序列与拟南芥及大豆的羧基转移酶 α 亚基的同源性分别为 85% 和 59%. 将此 cDNA 去除叶绿体转运肽编码序列的成熟肽编码序列, 克隆到表达载体 pHB625 上, 通过蛋白质印迹检测, 表达的融合蛋白大约为 106 ku, 正是该酶

未融合时的大小 (约 80 ku) 与 GST 蛋白 (约 26 ku) 融合后的大小总和, 表明在大肠杆菌中成功表达, 而且所表达的融合蛋白约占总菌体蛋白的 8%, 从而为制备该亚基的抗血清创造了条件. 但由于该酶是组成多酶复合体——乙酰辅酶 A 羧化酶 4 个亚基中的一个亚基, 该酶本身没有活性, 在体外没有酶活性, 而且无法检测其酶活性, 在体内该酶与羧基转移酶 β 亚基一起形成异源二聚体, 即羧基转移酶, 羧基转移酶与生物素羧化酶和生物素羧基载体蛋白一起构成乙酰辅酶 A 羧化酶这个多酶复合体, 才能发挥该酶的作用.

油菜是重要的油料作物, 提高油菜种子的含油量及植物油的品质一直是人们所追求的, 特别是提高油菜种子的含油量对于我国来说有着特殊的意义. 最近几年来, 随着植物质体工程的兴起及对乙酰辅酶 A 羧化酶参与油脂代谢的关注, 人们已经克隆了许多与油脂代谢相关的基因, 其中组成油菜脂肪酸合成中第一个限速酶——多亚基的乙酰辅酶 A 羧化酶的 4 个亚基基因中, 除了羧基转移酶 α 亚基的基因尚未克隆外, 其他 3 个亚基的基因序列均已被发表^[14]. 而我们不仅克隆了这个亚基的全长 cDNA, 还克隆了两条甘蓝型油菜叶绿体基因的序列及组成质体定位的乙酰辅酶 A 羧化酶的另外 3 个亚基: 生物素羧化酶、生物素羧基载体蛋白和羧基转移酶 β 亚基的基因序列, 从而获得了组成质体定位的乙酰辅酶 A 羧化酶这个多酶复合体 4 个亚基的基因, 为多亚基的乙酰辅酶 A 羧化酶转油菜质体及干预油脂代谢系统的研究创造了条件. 本研究室对于多亚基的乙酰辅酶 A 羧化酶质体工程的研究正在进行中.

致谢 在此衷心地感谢黄邦全博士对本文提供的指导和帮助.

参 考 文 献

- 1 Cronan Jr J E, Waldrop G L. Multi-subunit acetyl-CoA carboxylases. *Prog Lipid Res*, 2002, **41** (5): 407~435
- 2 赵虎基, 王国英. 植物乙酰辅酶 A 羧化酶的分子生物学与基因工程. *中国生物工程杂志*, 2003, **23** (2): 12~16
- 3 Zhao H J, Wang G Y. *J Chin Biotech*, 2003, **23** (2): 12~16
- 4 Herbert D, Walker K A, Price L J, *et al.* Acetyl-CoA carboxylase A graminicide target site. *Pestic Sci*, 1997, **50**: 67~71
- 5 靳 莉, 任天瑞, 向文胜, 等. 乙酰辅酶 A 羧化酶抑制剂的研究进展. *农药学报*, 2002, **4** (1): 10~16
- 6 Jin L, Ren T R, Xiang W S, *et al.* *Chin J Pestic Sci*, 2002, **4** (1): 10~16
- 7 Boldt L D, Barrett M. Effects of diclofop and haloxyfop on lipid

- synthesis in corn (*Zea mays*) and bean (*Phaseolus vulgaris*). Weed science, 1991, **39** (2): 143 ~ 148
- 6 Zagnitko O, Jelenska J, Tevzadze G, *et al.* An iso-leucine/leucine residue in the carboxyltransferase domain of acetyl-CoA carboxylase is critical for interaction with aryloxyphenoxy-propionate and cyclohexanedioneinhibitors. Proc Natl Acad Sci USA, 2001, **98** (12): 6617 ~ 6622
 - 7 Gengenbach B G, Somers D A, Wyse D L, *et al.* Transgenic plants expressing maize acetyl CoA carboxylase gene and method of altering oil content. United States Patent, 6 222 099, 2001.4-24
 - 8 Ohlrogge J B, Roesler K R, Shorrosh B S. Methods of increasing oil content of seeds. United States Patent, 5 925 805. 1999.7-20
 - 9 Sellwood C, Slabas A R, Rawsthorne S. Effects of manipulating expression of acetyl-CoA I in *Brassica napus* L. embryos. Biochemical Society, 2000, **28** (6): 598 ~ 600
 - 10 Roesler K, Shintani D, Saevage L, *et al.* Targeting of the *Arabidopsis* homomeric acetyl-coenzyme A carboxylase to plastids of rapeseeds. Plant Physiol, 1997, **113** (1): 75 ~ 81
 - 11 Elborough K M, Swinhoe R, Winz R, *et al.* Isolation of cDNAs *Brassica napus* encoding the biotin-binding and transcarboxylase domains of acetyl-CoA carboxylase: assignment of the domain structure in a full-length *Arabidopsis thaliana* genomic clone. Biochem J, 1994, **301** (Pt2): 599 ~ 605
 - 12 Schulte W, Topfer R, Stracke R, *et al.* Multi-functional acetyl-CoA carboxylase from *Brassica napus* is encoded by a multi-gene family: indication for plastidic localization of at least one isoform. Proc Natl Acad Sci USA, 1997, **94** (7): 3465 ~ 3470
 - 13 Elborough K M, Winz R, Deka R K, *et al.* 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, 1996, **315** (pt1): 103 ~ 112
 - 14 O'Hara P, Slabas A R, Fawcett T. Fatty acid and lipid biosynthetic genes are expressed at constant molar ratios but different absolute levels during embryogenesis. Plant Physiol, 2002, **129** (1): 310 ~ 320
 - 15 O'Hara P, Slabas A R, Fawcett T. Expression of fatty acid and lipid biosynthetic genes. Biochem Soc Trans, 2000, **28** (6): 617 ~ 619
 - 16 王景雪, 孙毅, 高武军. 一种简便实用的植物总 DNA 提取方法. 山西大学学报 (自然科学版). 2000, **23** (3): 271 ~ 272
Wang J X, Sun Y, Gao W J. J Shanxi University (Natural Science Edition), 2000, **23** (3): 271 ~ 272
 - 17 彭秀玲, 袁汉英, 谢毅, 等. 基因工程实验技术. 长沙: 湖南科学技术出版社, 1997. 256 ~ 261
Peng X L, Yuan H Y, Xie Y, *et al.* Experimental Technology of Gene Engineering. Changsha: Hunan Science & Technology Press, 1997. 256 ~ 261
 - 18 Reverdatto S, Beilinson V, Nielsen N C. A multisubunit acetyl coenzyme A carboxylase from soybean. Plant Physiol, 1999, **119** (3): 961 ~ 978

Cloning of The Full Length cDNA of Carboxyltransferase Alpha Subunit From *Brassica napus* and Its Expression in *Escherichia coli**

WU Yu-Yong, MA Li-Xin**, JIANG Si-Jing

(Laboratory of Molecular Microbiology & Gene Engineering, College of Life Science, Hubei University, Wuhan 430062, China)

Abstract By analyzing the cDNA sequences of carboxyltransferase alpha subunits (α -CTs) from *Arabidopsis thaliana* and *Glycine max*, and combination RT-PCR, 3'-rapid amplification of cDNA ends (3'-RACE) and Genome walking techniques, the full length cDNA of plastid α -CT from embryos of *Brassica napus* between 20 and 29 days after flowering was cloned. Homologous analysis showed that the amino acid sequence deduced from it shares 85% and 59% homology with those of α -CT in *Arabidopsis thaliana* and *Glycine max*, respectively. The sequence encoding mature peptide that was absent from chloroplast transit peptide has been inserted into expression vector pHBM625 and expressed successfully in *Escherichia coli* by Western blotting analysis.

Key words *Brassica napus*, carboxyltransferase alpha subunit, combinatorial cloning, gene expression

* This work was supported by grants from The National Natural Sciences Foundation of Hubei Province (2003ABA118) and State 863 High Technology R&D Project of China (2002AA227011).

** Corresponding author. Tel: 86-27-88666349, E-mail: malixin9@hotmail.com