

DOI: 10.11931/guihaia.gxzw201405026

武玉永,谭秀华,马立新. 油菜叶绿体乙酰辅酶 A 羧化酶单交换表达载体的构建[J]. 广西植物,2015,35(4):609-617

Wu YY, Tan XH, Ma LX. Construction of single-cross expression vector for chloroplast acetyl coenzyme A carboxylase in *Brassica napus*[J]. *Guihaia*, 2015,35(4):609-617

油菜叶绿体乙酰辅酶 A 羧化酶单交换表达载体的构建

武玉永¹, 谭秀华¹, 马立新^{2*}

(1. 滨州医学院 医学遗传学教研室, 山东 烟台 264003; 2. 湖北大学 生命科学学院 分子微生物学与基因工程实验室, 武汉 430062)

摘要: 根据已知序列设计引物,通过 PCR 扩增获得质体定位的乙酰辅酶 A 羧化酶的 4 个亚基的基因序列。先将该酶 4 个亚基的基因进行拼接,然后将这 4 个拼接好的片段,克隆到 pMD18-T 载体上,得到质粒 pH-BM714。再以质粒 pHBM714 DNA 为模板,用分别带有 *Cpo* I 和 *Asc* I 酶切位点的引物进行 PCR 扩增,PCR 产物在 dTTP 的保护下经 T4 DNA 聚合酶处理,与将质粒 pHBM720 DNA 纯化后经 *Cpo* I 和 *Asc* I 双酶切后得到的大片段连接,连接产物转化大肠杆菌 Xl₁₀-gold,得到正确的重组子命名为 pHBM726。此质粒 pH-BM726,即为带有壮观霉素抗性基因(*aadA*)筛选标记的质体定位的乙酰辅酶 A 羧化酶基因油菜叶绿体单交换表达载体;在此载体中壮观霉素抗性基因(*aadA*)、乙酰辅酶 A 羧化酶的 4 个亚基的基因(*ACC*)和绿色荧光蛋白基因(*gfp*)共 6 个基因串联在一起,共用一个启动子序列,一起来进行表达;通过酶切检测、PCR 验证和测序验证,均表明该表达载体构建成功。最后此载体在大肠杆菌中表达时,发现重组菌能够在含壮观霉素的培养基上生长,且在可见光下,能看到绿色荧光,表明壮观霉素抗性基因和绿色荧光蛋白基因均在大肠杆菌中成功表达;表达产物通过 Western 印迹验证表明组成乙酰辅酶 A 羧化酶的 4 个亚基的基因在大肠杆菌中成功表达。以上结果表明,该表达载体中串联排列的这 6 个基因均在大肠杆菌中成功表达。该研究结果可为质体定位的乙酰辅酶 A 羧化酶转叶绿体的研究奠定基础,为油菜油脂代谢研究提供参考。

关键词: 油菜; 叶绿体; 乙酰辅酶 A 羧化酶; 单交换; 表达载体; 构建

中图分类号: Q943.2; S565.4 文献标识码: A 文章编号: 1000-3142(2015)04-0609-09

Costruction of single-cross expression vector for chloroplast acetyl coenzyme A carboxylase in *Brassica napus*

WU Yu-Yong¹, TAN Xiu-Hua¹, MA Li-Xin^{2*}

(1. Department of Medical Genetics, Binzhou Medical University, Yantai 264003, China; 2. College of Life Sciences, Hubei University, Molecular Microbiology and Genetic Engineering Laboratory, Wuhan 430062, China)

Abstract: This study aimed to construct *Brassica napus* chloroplast acetyl coenzyme A carboxylase single cross-over expression vector, to lay the foundation for chloroplast transformation research of *B. napus* acetyl coenzyme A carboxylase, at the same time, to provide a good reference for the research of oilrape lipid metabolism. According to the known sequences from GenBank, the corresponding primers were designed, the gene sequences of four subunits for plastid acetyl coenzyme A carboxylase were amplified by Polymerase chain reaction. The form of acetyl coenzyme A carboxylase of *Escherichia coli* and the form of acetyl coenzyme A carboxylase of plastid were similar, therefore the gene sequences of four subunits of plastid acetyl coenzyme A carboxylase were spliced according to the form of acetyl

收稿日期: 2014-09-30 修回日期: 2014-12-15

基金项目: 国家“973”重大科学研究计划项目(2013CB910801); 山东省自然科学基金(ZR2010HQ054); 烟台市科技发展计划项目(2013ZH097)。

作者简介: 武玉永(1975-), 男, 山东沂水人, 硕士, 讲师, 主要从事分子微生物学及植物分子生物学研究, (E-mail) wuyuyong_820@126.com。

*通讯作者: 马立新, 教授, 主要从事合成生物学与工业生物技术的研究, (E-mail) malixin@hubu.edu.cn。

coenzyme A carboxylase of *Escherichia coli*. And the plasmid pHBM714 was obtained by cloned the gene fragments of chloroplast acetyl coenzyme A carboxylase into pMD18-T vector. Then the DNA sequence of plasmid pHBM714 was taken as the template, and the front of primers were added to the gene sequence of restriction enzyme sites of *Cpo* I and the gene sequence of restriction enzyme sites of *Asc* I respectively. At last, the sequence of chloroplast acetyl coenzyme A carboxylase was amplified by Polymerase chain reaction. These products of Polymerase chain reaction were processed by T4 DNA polymerase in the protection of dTTP, and which was jointed with the largest fragment that was got by the plasmid of pHBM720 DNA digested by restriction enzyme of *Cpo* I and restriction enzyme of *Asc* I. The ligation products was transformed into *Escherichia coli* XL₁₀-gold. The recombinant that was verified by amplification of Polymerase chain reaction and restriction enzymes digested correctly was named the plasmid of pHBM726. The recombinant plasmid of pHBM726 was the single cross-over expression vector for chloroplast acetyl coenzyme A carboxylase in *Brassica napus* which was obtained with selection marker of spectinomycin resistance gene (*aadA*) (-*Prrn*-*SD*-*aadA*-*ACC*-*gfp*-*psbA3'*-*RbcL*-*Amp^r* + *Ori* -*ACCD*-). And it consisted of spectinomycin resistance gene (*aadA*), biotin carboxylase gene (*BC*), biotin carboxyl carrier protein gene (*BP4*), carboxyltransferase beta subunit gene (β -*CT*), carboxyl transferase alpha subunit gene (α -*CT*) and green fluorescent protein gene (*gfp*), furthermore, the six genes that were connected in series, and these genes which were expressed together with a common promoter sequence in *Escherichia coli*. The plasmid of pHBM726 was constructed successfully that were verified by restriction enzyme digestion, Polymerase chain reaction and sequencing. Finally, the recombinant plasmid of pHBM726 was expressed in *Escherichia coli*, with the recombinant plasmid pHBM726 of *Escherichia coli* could grow well on the medium plate containing spectinomycin, and the single colony was able to emit green fluorescence under visible light excitation, which indicated that spectinomycin resistance gene and green fluorescent protein gene were expressed successfully in *Escherichia coli*; the expression products of four subunits of plastid targeted acetyl coenzyme A carboxylase gene were all detected by Western blotting, it showed that four subunits of plastid targeted acetyl coenzyme A carboxylase gene were expressed successfully in *Escherichia coli*. All the results showed that four subunits of plastid targeted acetyl coenzyme A carboxylase gene, spectinomycin resistance gene and green fluorescent protein gene which were successfully expressed in *Escherichia coli*. This study constructed single cross-over expression vector for *Brassica napus* chloroplast acetyl coenzyme A carboxylase, and will lay the solid foundation for the chloroplast transformation research of *Brassica napus*.

Key words: *Brassica napus*; chloroplast; acetyl coenzyme A carboxylase; single-cross; expression vector; construction

高等植物的叶绿体基因工程始于1990年(Svab *et al.*, 1990),与细胞核基因工程相比,它尽管起步较晚,但与常规细胞核基因工程相比它具有以下优点(Maliga, 2004):叶绿体基因组较小,而且其不与组蛋白结合,结构相对简单,易于操作;基因转化是通过同源重组来实现的,所以叶绿体基因转化为定点整合,而且不存在位置效应,这样就使得外源基因的表达相对比较稳定;叶绿体基因转化为母系遗传,外源基因不会通过花粉来传播,不会产生外源基因的漂移,所以就不存在生物安全问题。

油菜作为重要的油料作物,提高菜籽油的品质和种子的含油量一直是科学研究者所不断追求的两大问题,特别是提高油菜籽的含油量对于我国来说,有着重要和特殊的意义。近年来,尽管油菜叶绿体基因工程取得了一些可喜的进展(张中林等, 2000; 侯丙凯等, 2001, 2002),但在叶绿体表达载体的运用

方面,大都用的是叶绿体同源片段的双交换载体(侯丙凯等, 2001, 2002, 2000; 张中林等, 2001; 武玉永等, 2013),虽然也有叶绿体同源片段的单交换载体,但对于油菜叶绿体乙酰辅酶A羧化酶单交换表达载体的构建,迄今未见有报道。目前国内外对于油菜质体定位的乙酰辅酶A羧化酶基因的研究,大多是其组成亚基的调控及进化情况的研究(Andre *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2011),对于通过叶绿体工程来调控油脂代谢的研究也未见报道。本研究对于组成甘蓝型油菜乙酰辅酶A羧化酶基因的4个亚基的基因均已克隆(武玉永等, 2004),同时构建了油菜多顺反子单交换表达载体,为油菜叶绿体乙酰辅酶A羧化酶单交换表达载体的构建创造了基本条件。本文构建了甘蓝型油菜叶绿体乙酰辅酶A羧化酶单交换表达载体,并在大肠杆菌中通过平板定性分析和Western印迹的方法对所构建载体上的表达盒

进行功能鉴定,为质体定位的乙酰辅酶 A 羧化酶转叶绿体的研究奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 材料

1.1.1 酶和试剂 T4 DNA 聚合酶、T4 DNA 连接酶、限制性内切酶、*Ex-Taq* DNA 聚合酶、碱性磷酸酶(CIAP)和 dNTP 购自宝生物(大连)工程有限公司,DAB 试剂盒、ELISA 试剂盒和羊抗兔 IgG-HRP 等免疫学试剂和 DNA 片段回收试剂盒购自生工生物工程(上海)股份有限公司,魔芋精粉购自湖北天源协力魔芋生物科技有限公司,其它常规试剂采用进口分装或国产分析纯。

1.1.2 培养基 LB、MD、BMGY、BMMY 等培养基配制见 Invitrogen 公司毕赤酵母操作手册。

1.1.3 质粒和菌株 大肠杆菌 *Xl₁₀-gold* 购于 Stratagene 公司,克隆载体 pMD18-T 购于宝生物(大连)工程有限公司,酵母工程菌 *Pichia pastoris* GS115 (man)、质粒 pHBM702、pHBM703、pHBM705、pHBM706 和 pHBM720 为湖北大学生命科学学院分子微生物学与基因工程实验室构建。

1.2 方法

1.2.1 引物合成 根据已知序列设计引物,并加上相应的接头 P1: 5'-GTCATTGTAGGGAGGGATT-TAT GGTGGCTAACAGAGGTGAAATC-3'; P2: 5'-GGCCACTAAGCAGCTGCGTTTGTCAAATC-3'; P3: 5'-GGCCATTGTAGGGAGGGATTTATGGCCG-CCGAGCTCTC-3'; P4: 5'-GCGATCAAGGCACGATGGTAAACAGAG-3'; P5: 5'-CGCATTGTAGGGAGGGATTTATGGAAAAATCGTGGTTCAATTTG-3'; P6: 5'-GGCCATTATTTGATTTCAATTTTGTTCAAA GG-3'; P7: 5'-GGCCATTGTAGGGAGGGATTTATG GCATCCACCAAAGAAACAACC-3'; P8: 5'-CGCGA TCAAGCGAAGTGGGGGTTAATG-3'。以上所有引物合成与 DNA 测序工作均由生工生物工程(上海)股份有限公司完成。

1.2.2 生物素羧化酶基因(BC)的扩增 根据质体定位的生物素羧化酶的 cDNA 序列(AY034410.1)设计 1 对引物(P1 和 P2),在引物 P1 的 5'端加上 Shine-Dalgarno(SD)序列(AGGGAGGG)与 GTCA 接头,在引物 P2 的 5'端加上 GGCCA 接头,然后以质粒 pHBM702 DNA 为模板,以 P1 和 P2 为引物,

进行 PCR 扩增,从而获得质体定位的生物素羧化酶基因序列。扩增条件为 94 °C 5 min;94 °C 30 s,53 °C 1 min,72 °C 1.5 min,30 个循环;72 °C 7 min。PCR 扩增经琼脂糖凝胶电泳验证,验证正确后,回收并置于 4 °C 冰箱中保存。

1.2.3 生物素羧基载体蛋白基因(BP4)的扩增 根据质体定位的生物素羧基载体蛋白亚基的 cDNA 序列(AY538674.1)设计 1 对引物(P3 和 P4),在引物 P3 的 5'端加上 Shine-Dalgarno (SD)序列(AGG-GAGGG)与 GGCCA 接头,在引物 P4 的 5'端加上 GCGA 接头;以质粒 pHBM703 DNA 为模板,以 P3 和 P4 为引物,进行 PCR 扩增来获得质体定位的生物素羧基载体蛋白基因序列。扩增条件为 94 °C 5 min;94 °C 30 s,52 °C 1 min,72 °C 1 min,30 个循环;72 °C 7 min。PCR 扩增经琼脂糖凝胶电泳验证,验证正确后,回收并置于 4 °C 冰箱中保存。

1.2.4 羧基转移酶 β 亚基基因(β -CT)的扩增 根据羧基转移酶 β 亚基的 DNA 序列(Z50868.1)设计 1 对引物(P5 和 P6),在引物 P5 的 5'端加上 Shine-Dalgarno(SD)序列(AGGGAGGG)与 CGCA 接头,在引物 P6 的 5'端加上 GGCCA 接头。以质粒 pHBM705 DNA 为模板,以 P5 和 P6 这对引物为引物进行 PCR 扩增,从而获得质体定位的羧基转移酶 β 亚基基因序列。扩增条件为 94 °C 5 min;94 °C 30 s,53 °C 1 min,72 °C 2 min,30 个循环;72 °C 10 min。PCR 扩增经琼脂糖凝胶电泳验证,验证正确后,回收并置于 4 °C 冰箱中保存。

1.2.5 羧基转移酶 α 亚基基因(α -CT)的扩增 根据质体定位的羧基转移酶 α 亚基的 cDNA 序列(AY538675.1)设计一对引物(P7 和 P8),在引物 P7 的 5'端加上 Shine-Dalgarno (SD)序列(AGG-GAGGG)与 GGCCA 接头,在引物 P8 的 5'端加上 CGCGA 接头,以质粒 pHBM706 DNA 为模板,通过 PCR 扩增获得质体定位的羧基转移酶 α 亚基基因序列。扩增条件为 94 °C 5 min;94 °C 30 s,56 °C 1 min,72 °C 3 min,30 个循环;72 °C 10 min。PCR 扩增经琼脂糖凝胶电泳验证,验证正确后,回收并置于 4 °C 冰箱中保存。

1.2.6 质体定位的乙酰辅酶 A 羧化酶的 4 个亚基的基因元件的拼接 由于质体定位的乙酰辅酶 A 羧化酶的组成形式与大肠杆菌中乙酰辅酶 A 羧化酶的相似,所以按照大肠杆菌中乙酰辅酶 A 羧化酶基因(ACC)的组成形式将组成甘蓝型油菜质体定位

的乙酰辅酶 A 羧化酶 4 个亚基的基因进行拼接。

将上面得到的乙酰辅酶 A 羧化酶 4 个亚基的基因片段,在 16 °C 下,用 Solution I 酶,先将 BC 和 BP4 这两个基因片段连接,再将 β -CT 和 α -CT 这两个基因片段连接。分别以这两个连接产物为模板,以 P1 和 P4、P5 和 P8 为相对应的引物,进行 PCR 扩增。最后 PCR 产物经 0.7% 的琼脂糖凝胶电泳检测,先将 PCR 产物回收纯化,再用 PCR 方法与酶切方法进行验证,验证正确后,置于 4 °C 冰箱中保存。以此获得 BC 和 BP4 两个基因连接片段和 β -CT 和 α -CT 两个基因连接片段。分别在 dTTP 的保护下先经 T4 DNA 聚合酶处理,再用 T4 多聚核苷酸激酶磷酸化,将溶液回收纯化,最后分别溶解于 elution 缓冲液中,置于 4 °C 冰箱中保存。

将经 T4 DNA 聚合酶处理后的两个片段的连接产物,在 16 °C 下,用 Solution I 酶连接,以此连接产物为模板,用 P1 和 P8 这对引物进行 PCR 扩增。PCR 产物经 0.7% 的琼脂糖凝胶电泳检测后,将此片段回收纯化,得到质体定位的乙酰辅酶 A 羧化酶 4 个亚基的基因的拼接片段,再将此拼接片段克隆到 pMD18-T 载体上,转化大肠杆菌 Xl₁₀-gold,将得到的重组子用 PCR 法与酶切法进行验证。

1.2.7 质体定位的乙酰辅酶 A 羧化酶基因叶绿体单交换表达载体的构建 质粒 pHBM720 纯化后,用 Cpo I 和 Asc I 双酶切后,其酶切产物经 0.7% 的琼脂糖凝胶电泳检测,出现了大小两条 DNA 带,验证正确后,再将大片段回收,溶解于 elution 缓冲液中,置于 4 °C 冰箱中保存。

以质粒 pHBM714 DNA 为模板,用 P1 和 P8 这对引物 PCR 进行扩增。首先,PCR 产物经 0.7% 的琼脂糖凝胶电泳检测,将得到的 DNA 带回收纯化后,再用 PCR 的方法与酶切的方法验证,验证正确后,即获得质体定位的乙酰辅酶 A 羧化酶基因拼接片段;然后在 dTTP 的保护下,经 T4 DNA 聚合酶处理,溶液回收纯化,溶解于 elution 缓冲液中;最后,将此片段与 pHBM720 经 Cpo I 和 Asc I 双酶切后得到的大片段连接,连接产物转化大肠杆菌 Xl₁₀-gold,涂布 LA 加魔芋及曲利本蓝平板,分别挑选没有产生水解圈的菌落,点到 LA 平板上培养,紫外光下挑选产生绿色荧光的菌落,培养后提取其质粒,分别用 PCR 的方法验证这些质粒。

1.2.8 质体定位的乙酰辅酶 A 羧化酶 4 个亚基抗血清的制备 分别将组成质体定位的乙酰辅酶 A 羧

化酶的 4 个亚基的基因在大肠杆菌中的表达产物经 SDA-PAGE 凝胶电泳后,将凝胶用预冷的 0.25 mol · L⁻¹ KCl, 1 mmol · L⁻¹ DTT 溶液浸泡 5 min,重蒸水冲洗,在置于预冷的重蒸水(含 1 mmol · L⁻¹ DTT)中 1 h,用洁净的手术刀片切下融合蛋白条带所在的凝胶,按 1 : 1 比例(W/V)加入 PBS 缓冲液(0.14 mol · L⁻¹ NaCl, 2.7 mmol · L⁻¹ KCl, 1.5 mmol · L⁻¹ KH₂PO₄, 8.1 mmol · L⁻¹ Na₂HPO₄)于冰浴中研磨。用 PBS 缓冲液适当稀释后,加入等体积的福氏不完全佐料(1.5 g 羊毛脂和 8 mL 石蜡油)进行乳化。然后去免疫雌性大白兔,第 1 次在兔的大淋巴结和背部多点免疫,两周后在兔的背部注射进行加强免疫。1 周后,ELISA 试剂盒检测抗血清的效价。

1.2.9 质体定位的乙酰辅酶 A 羧化酶基因在大肠杆菌中的表达 将制备的组成质体定位的乙酰辅酶 A 羧化酶的 4 个亚基的抗血清去交叉反应。再将质粒 pHBM726 转化大肠杆菌 Xl₁₀-gold,得到的转化子在 37 °C 下,在 LA 液体培养基中过夜培养后,收集菌体,将菌体经 SDS-PAGE 检测和 Western 印迹。

1.2.10 遗传工程的方法 以上 PCR 的反应均在 PE2400 型扩增仪中进行。高等植物叶绿体 DNA 的提取参照文献(龚小松等,1991)。质粒 DNA 的提取、DNA 片段连接、DNA 的酶切、磷酸化和转化均参照分子克隆(Sambrook *et al.*, 2001)进行;DNA 片断用生工生物工程(上海)股份有限公司的 SanPrep Spin Column DNA Gel Extraction Kit 回收。Western 检测参照基因工程实验技术方法(彭秀玲等,1997)进行。

2 结果与分析

2.1 组成质体定位的乙酰辅酶 A 羧化酶的 4 个亚基的基因的克隆

分别以质粒 pHBM702、pHBM703、pHBM705 和 pHBM706 DNA 为模板,以 P1 和 P2、P3 和 P4、P5 和 P6、P7 和 P8 为相对应的引物为引物,进行 PCR 扩增。PCR 产物经 0.7% 的琼脂糖凝胶电泳检测,分别得到 4 条 DNA 带,分别为 1.4 kb、500 bp、1.5 kb 和 2.2 kb 的 DNA 带(图 1),与预计的大小基本一致,将此片段回收纯化后,得到组成质体定位的乙酰辅酶 A 羧化酶的 4 个亚基的基因序列。

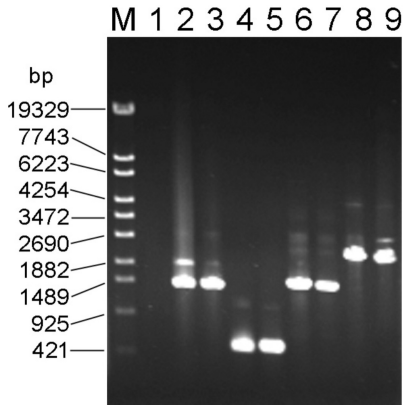


图 1 质体定位的乙酰辅酶 A 羧化酶基因 4 个亚基的基因扩增 M. 用 λ -EcoT14 I 降解得到的标准 DNA 标记, 下同; 1. 以质粒 pHBM625 为模板扩增基因 BC 的 PCR 产物; 2-3. 以质粒 pHBM702 为模板扩增基因 BC 的 PCR 产物; 4-5. 以质粒 pHBM703 为模板扩增基因 BC 的 PCR 产物; 6-7. 以质粒 pHBM705 为模板扩增基因 BC 的 PCR 产物; 8-9. 以质粒 pHBM706 为模板扩增基因 BC 的 PCR 产物。

Fig. 1 Amplification of the four subunits of plastid AC-Case M. DNA standard marker (λ -EcoT14 I digest), the same below. 1. PCR product/template pHBM625; 2-3. PCR product of BC/template pHBM702; 4-5. PCR product of BP4/template pHBM703; 6-7. PCR product of β -CT/template pHBM705; 8-9. PCR product of α -CT/template pHBM706.

2.2 组成质体定位的乙酰辅酶 A 羧化酶的 4 个亚基的基因元件的组装 (图 2)

PCR 扩增 BC 和 BP4 这两个基因的连接片段和 β -CT 和 α -CT 这两个基因的连接片段。PCR 产物经 0.7% 的琼脂糖凝胶电泳检测, 得到 2 条 DNA 带, 一条约 2.0 kb 的 DNA 带, 另一条约 3.7 kb 的 DNA 带, 与预计的大小一致, 将这两个连接片段胶回收纯化后, 经 PCR 验证与酶切验证正确后, 以此获得了 BC 和 BP4 这两个基因的连接片段和 β -CT 和 α -CT 这两个基因的连接片段 (图 3)。

PCR 扩增经 T4 DNA 聚合酶处理后的两个片段的连接产物, PCR 产物经 0.7% 的琼脂糖凝胶电泳检测, 得到一条大约 5.7 kb 的 DNA 带 (图 4), 与预计的大小一致, 将此片段胶回收纯化后, 从而将乙酰辅酶 A 羧化酶 4 个亚基的基因片段连接起来, 再将此 DNA 片段克隆到 pMD18-T 载体上, 将转化大肠杆菌 Xl₁₀-gold 得到的重组子经 PCR 验证与酶切验证 (图 4) 正确后, 将此重组子命名为质粒 pHBM714 (图 5), 将带有此质粒的大肠杆菌穿刺培养后, 送上海桑尼生物科技有限公司对构建的乙酰辅酶 A 羧化酶 4 个亚基的基因的拼接片段测序, 测序结果表明 4 个基因片段拼接正确。

2.3 质体定位的乙酰辅酶 A 羧化酶基因叶绿体单交换表达载体的构建

用 PCR 扩增获得质体定位的乙酰辅酶 A 羧化酶基因拼接片段, 再通过 T4 DNA 聚合酶处理后与 pHBM720 DNA 经 *Cpo* I 和 *Asc* I 双酶切后得到的大片段 (7.7 kb) (图 6) 连接, 连接产物转化大肠杆菌 Xl₁₀-gold, 涂布 LA 加魔芋及曲利本蓝平板, 分别挑选没有产生水解圈的菌落, 点到 LA 平板上培养, 紫外光下挑选产生绿色荧光的菌落, 培养后提取其质粒, 这些质粒分别用 PCR 验证 (图 7), 得到正确的重组子。将得到的其命名为 pHBM726 (图 8)。

质粒 pHBM726 即带有 *aadA* 筛选标记的质体定位的乙酰辅酶 A 羧化酶基因油菜叶绿体单交换表达载体 (-*Prrn*-SD-*aadA*-ACC-*gfp-psbA3'*-*RbcL-Ampr*+*Ori-ACCD*)。

2.4 质体定位的乙酰辅酶 A 羧化酶基因在大肠杆菌中的表达及鉴定

将质粒 pHBM726 转化大肠杆菌 Xl₁₀-gold, 得到的转化子在 37 °C 下, 在 LA 液体培养基中过夜培养后收集的菌体经 SDS-PAGE 检测和 Western 印迹 (图 9) 检测均有阳性信号, 虽然产生了一点杂信号, 但与对照相比, 均检测到目的阳性信号的产生, 其中生物素羧化酶亚基与生物素羧基载体蛋白亚基产生的阳性信号最强, 而羧基转移酶 β 亚基产生的阳性信号较弱, 表明这 4 个亚基的基因均在大肠杆菌中成功表达。

3 讨论

3.1 基因元件组装过程中四片段连接方法的改进

在质体定位的乙酰辅酶 A 羧化酶基因的拼接时, 采用连接产物再进行 PCR 扩增的方法。先分别将其中两个亚基基因片段进行连接, 再将连接产物进行 PCR 扩增, 然后将这两次 PCR 产物进行连接, 再将连接产物进行 PCR 扩增, 之后将连接产物克隆到载体上, 最后转化大肠杆菌。传统的方法在进行四片段连接时, 先分别进行两片段连接, 将连接产物克隆到载体上转化大肠杆菌, 然后分别从载体上得到两个片段连在一起的片段, 再将这两个片段连接, 将连接产物克隆到载体上转化大肠杆菌。本文采用这种连接方式减少了一次在大肠杆菌中的操作, 从而节约了时间。另外, PCR 产物利用 T4 DNA 聚合酶的 3' 到 5' 的外切活性, 切出匹配末端进行连接,

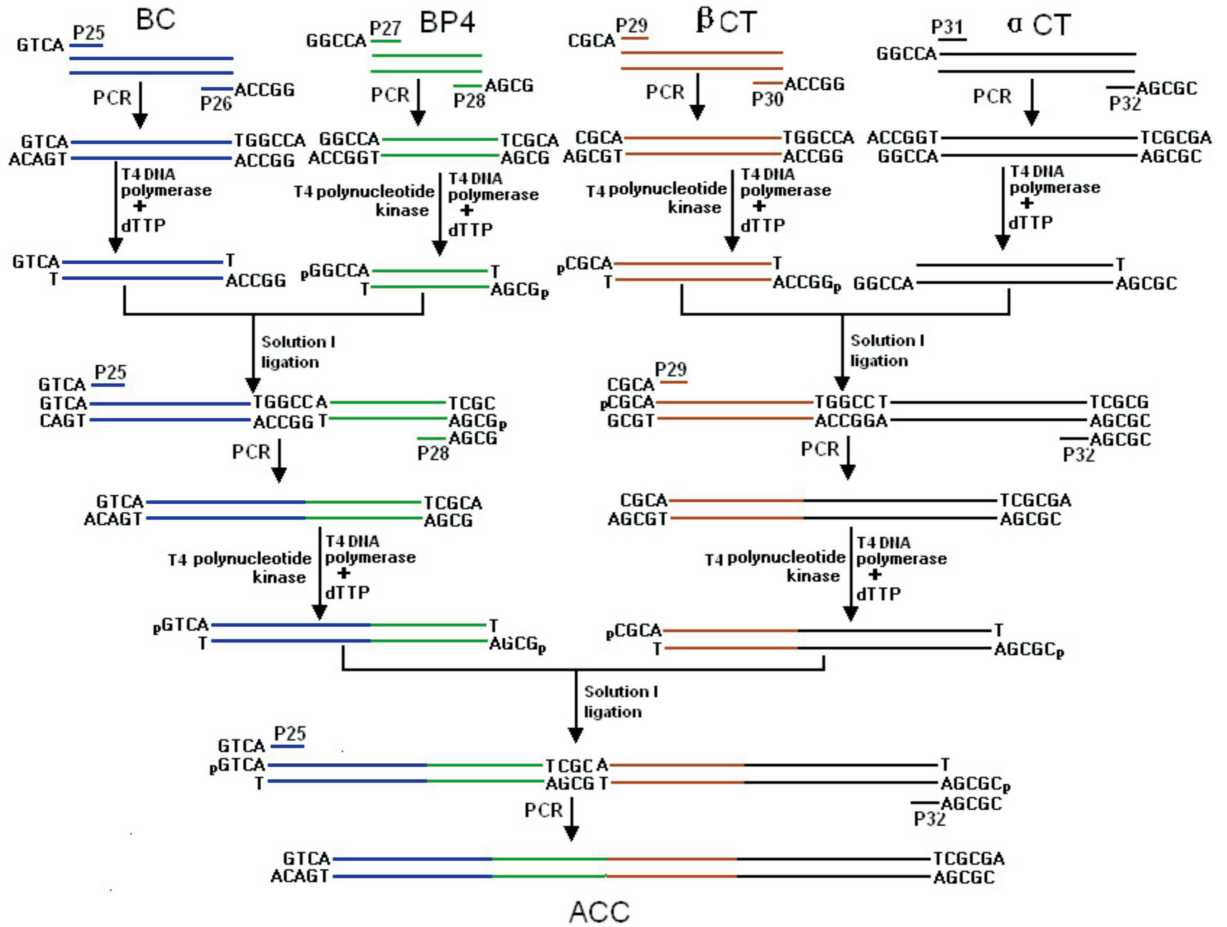


图 2 组成质体定位的乙酰辅酶 A 羧化酶的 4 个亚基的基因元件的组装

Fig. 2 Assembling genes encoding the four known components that plastid ACCase

从而巧妙地避免了为寻找合适的限制性酶切位点所带来麻烦。此方法同样也存在缺点,花费较大,而且多轮 PCR 发生突变的几率升高,但在时间要求较紧张的情况下,此方法更具优势。

3.2 表达载体的优势

本文构建的油菜乙酰辅酶 A 羧化酶叶绿体单交换表达载体比其他实验室构建的油菜叶绿体表达载体更具优势。因为本实验室构建的油菜叶绿体单交换表达载体在引入外源基因的位置引入了 *Cpo I* 与 *Asc I* 两个酶切位点,这样在将乙酰辅酶 A 羧化酶基因连接到载体上时,可通过设计 PCR 引物时,在其 5' 端分别引进 GTCA 与 CGCGA 接头,而不必考虑乙酰辅酶 A 羧化酶基因内部的酶切位点,从而高通量的将其克隆到载体中。另外,在油菜叶绿体单交换表达载体的 *Cpo I* 与 *Asc I* 两个酶切位点之间引入了一个甘露聚糖酶基因,这样在构建乙酰辅酶 A 羧化酶叶绿体表达载体时,只要用 *Cpo I* 与

Asc I 双酶切切去甘露聚糖酶基因即可,减少了载体的自连背景,同时在筛选重组子时,可以在甘露聚糖酶底物平板上筛选没有水解圈的菌落,从而更有效地寻找重组子。

3.3 六顺反子共表达

叶绿体表达的特点之一:原核表达方式,可以进行多顺反子表达,而且不受密码子偏爱性的影响。本文构建的质体定位的乙酰辅酶 A 羧化酶叶绿体表达载体中,其中组成质体定位的乙酰辅酶 A 羧化酶的 4 个亚基的基因与两个筛选标记 *aadA* 与 *gfp* 一起构成六顺反子结构,所用启动子为叶绿体的 16SrRNA 基因启动子 *Prrn*,终止子为叶绿体 *psbA* 基因的终止子。这六个顺反子在大肠杆菌中均实现表达。在大肠杆菌中构建多顺反子表达载体表达外源基因,并成功表达已有报道, Watanabe *et al.* (2003) 将用于 ansamycin polydetide precursor 生物合成的 9 个基因串联在一起构成多顺反子结构在

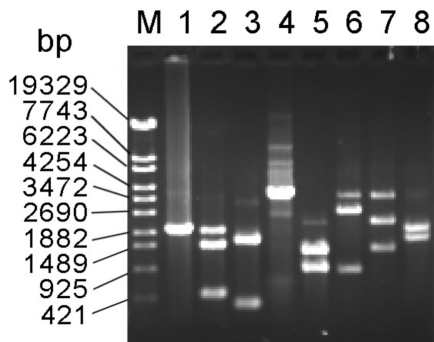


图 3 两片断连接产物($BC+BP4 \beta-CT+\alpha-CT$)酶切鉴定 1. 扩增 BC 和 $bp4$ 两个基因连接片段的 PCR 产物; 2. 用降解 Kpn I 酶 BC 和 $bp4$ 两个基因连接片段; 3. 用降解 Stu I 酶 BC 和 $bp4$ 两个基因连接片段; 4. 扩增 $\beta-CT$ 和 $\alpha-CT$ 两个基因连接片段的 PCR 产物; 5. 用降解 Bst X I 酶 $\beta-CT$ 和 $\alpha-CT$ 两个基因连接片段; 6. 用降解 Cla I 酶 $\beta-CT$ 和 $\alpha-CT$ 两个基因连接片段; 7. 用降解 Sna B I 酶 $\beta-CT$ 和 $\alpha-CT$ 两个基因连接片段; 8. 用降解 Xho I 酶 $\beta-CT$ 和 $\alpha-CT$ 两个基因连接片段。

Fig. 3 Identification of the ligation products between two DNA fragments ($BC+BP4 \beta-CT+\alpha-CT$) by digestion 1. product of $BC+BP4$ by PCR; 2. $BC+BP4$ digested by Kpn I; 3. $BC+BP4$ digested by Stu I; 4. product of $\beta-CT+\alpha-CT$ by PCR; 5. $\beta-CT+\alpha-CT$ digested by Bst X I; 6. $\beta-CT+\alpha-CT$ digested by Cla I; 7. $\beta-CT+\alpha-CT$ digested by Sna B I; 8. $\beta-CT+\alpha-CT$ digested by Xho I.

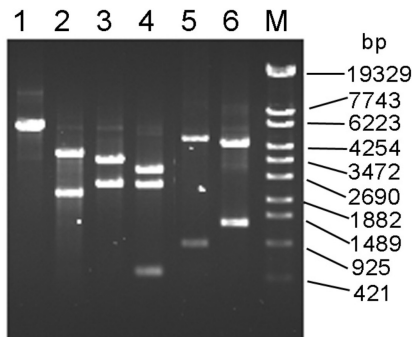


图 4 两片断连接产物($BC+BP4+\beta-CT+\alpha-CT$, 即 ACC)酶切验证图 1. 扩增基因 ACC 的 PCR 产物; 2. 用 Xho I 酶降解 ACC 的 PCR 产物; 3. 用 Sna B I 酶降解 ACC 的 PCR 产物; 4. 用 Kpn I 酶降解 ACC 的 PCR 产物; 5. 用 Cla I 酶降解 ACC 的 PCR 产物; 6. 用 Bst X I 酶降解 ACC 的 PCR 产物。

Fig. 4 Identification of the ligation products between two DNA fragments ($BC+BP4+\beta-CT+\alpha-CT$) by digestion 1. product of ACC by PCR; 2. ACC digested by Xho I; 3. ACC digested by Sna B I; 4. ACC digested by Kpn I; 5. ACC digested by Cla I; 6. ACC digested by Bst X I.

T7 启动子的控制下在大肠杆菌中成功表达。在大肠杆菌中用叶绿体的 16SrRNA 基因启动子 $Prrn$ 与叶绿体 $psbA$ 基因的终止子构建六顺反子结构, 并成功表达未见报道。关于叶绿体多基因转化, 而

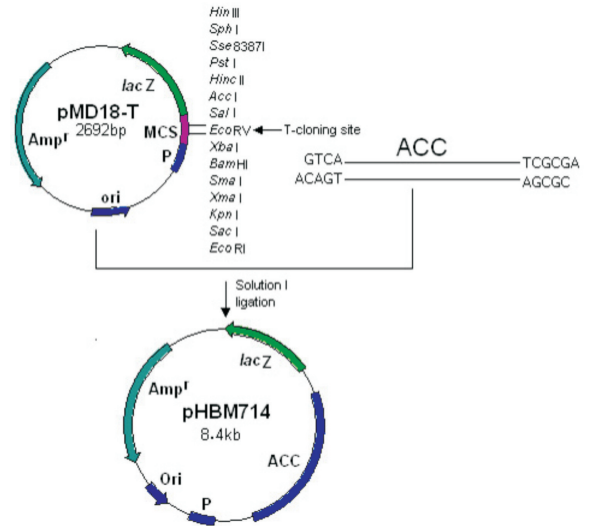


图 5 质粒 $pHBM714$ 的构建

Fig. 5 Construction for the plasmid of $pHBM714$

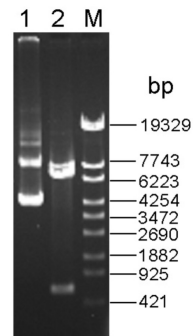


图 6 质粒 $pHBM720$ 经 Cpo I 和 Asc I 双酶切 1. 质粒 $pHBM720$ DNA; 2. Cpo I 和 Asc I 双酶降解质粒 $pHBM720$ DNA。
Fig. 6 Plasmid of $pHBM720$ was digested by restriction endonuclease of Cpo I and Asc I 1. recombinant $pHBM720$; 2. $pHBM720/Cpo$ I+ Asc I.

且是多顺反子转化成功的报道, 仅见 2 篇报道 (De Cosa *et al.*, 2001; Ruiz *et al.*, 2003)。

3.4 质体定位的乙酰辅酶 A 羧化酶叶绿体表达载体可能存在的问题

在油菜叶绿体转化载体中, 叶绿体同源重组片段采用的是 $RbcL$ 与 $ACCD$ ($\beta-CT$)。在这两个基因的间隔区插入 $aadA$ 表达盒。对载体本身而言, 载体不存在设计问题, 但用它构建的质体定位的乙酰辅酶 A 羧化酶叶绿体表达载体, 由于 $ACCD$ 基因是组成质体定位的乙酰辅酶 A 羧化酶基因的一个亚基的基因, 所以转化叶绿体时, 此表达载体导入叶绿体中, 此载体中的叶绿体同源重组片段 ($RbcL$ 与 $ACCD$ 基因片段) 与油菜叶绿体基因组中的 $RbcL$

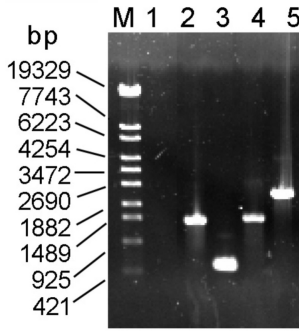


图 7 PCR 验证重组子 pHBM726 1. 以质粒 pHBM720 DNA 为模板扩增得到的 PCR 产物; 2. 以质粒 pHBM726 DNA 为模板扩增基因 BC 得到的 PCR 产物; 3. 以质粒 pHBM726 DNA 为模板扩增基因 BP4 得到的 PCR 产物; 4. 以质粒 pHBM726 DNA 为模板扩增基因 β -CT 得到的 PCR 产物; 5. 以质粒 pHBM726 DNA 为模板扩增基因 α -CT 得到的 PCR 产物。

Fig. 7 Identification of these recombinants pHBM726 by PCR 1. Amplification by PCR/template:pHBM720; 2. Amplification of BC by PCR/template:pHBM726; 3. Amplification of BP4 by PCR/template:pHBM726; 4. Amplification β -CT by PCR/template: pHBM726; 5. Amplification of α -CT by PCR/template: pHBM726.

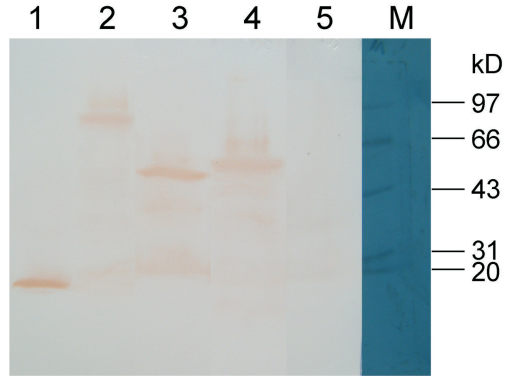


图 9 Western 印迹检测质体定位的乙酰辅酶 A 羧化酶基因在大肠杆菌中的表达产物 M. 标准蛋白质分子标记; 1. Western 印迹检测基因 BP4 的表达产物; 2. Western 印迹检测基因 α -CT 的表达产物; 3. Western 印迹检测基因 BC 的表达产物; 4. Western 印迹检测基因 β -CT 的表达产物; 5. Western 印迹检测空载体的表达产物。

Fig. 9 Testing of expression products of these genes encoding plastid acetyl-CoA carboxylase in *E. coli* by Western blotting M. protein molecular weight standard marker; 1. Gene BP4 in expression product was identified by Western blotting; 2. Gene α -CT in expression product was identified by Western blotting; 3. Gene BC in expression product was identified by Western blotting; 4. Gene β -CT in expression product was identified by Western blotting; 5. Expression product of vectors that have not contained ACC was identified by Western blotting.

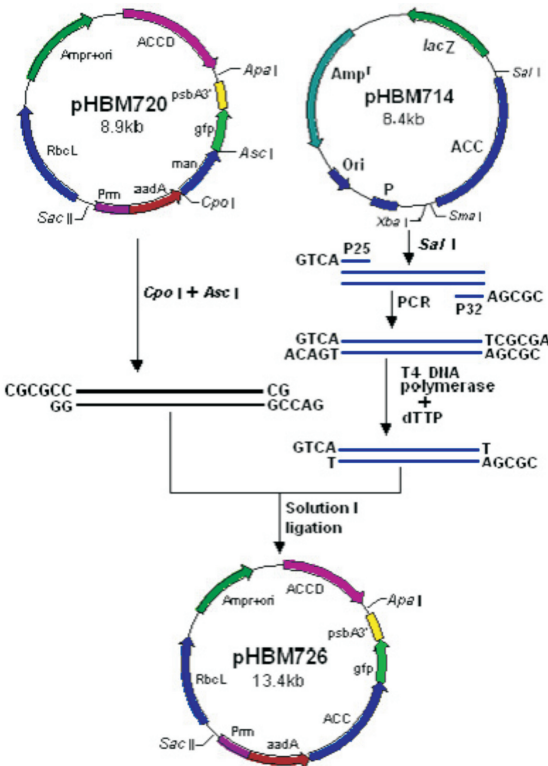


图 8 油菜质体定位的乙酰辅酶 A 羧化酶叶绿体单交换表达载体 pHBM726 的构建图

Fig. 8 Construction of *Brassica napus* plastid single-cross expression vector of pHBM726

与 ACCD 发生同源重组时,可能会发生叶绿体基因组中的 ACCD 基因除了与作为同源交换的 ACCD 基因发生交换外,还有可能与组成质体定位的乙酰辅酶 A 羧化酶中的羧基转移酶 β 亚基基因 (ACCD) 发生同源重组,从而可能会造成转化效率降低,这一点需在叶绿体转化中进一步去验证。

3.5 抗血清的制备

在制备组成质体定位的乙酰辅酶 A 羧化酶的 4 个亚基的抗血清时,融合蛋白的纯化是采用的聚丙烯酰胺凝胶纯化的方法,在蛋白纯化过程中很难做到没有杂蛋白,而且是免疫的兔子,致使制备的抗血清中含有杂蛋白的抗体,是多克隆抗体。当用此种抗体来做 Western 印迹,检测质体定位的乙酰辅酶 A 羧化酶基因在大肠杆菌中是否表达时,导致发生交叉反应,给表达产物的鉴定带来困难。因此,用同一种表达系统来表达的目的蛋白作为抗原制备抗血清,再用此抗血清来检测此目的蛋白时,较易发生交叉反应。另外,将质体定位的乙酰辅酶 A 羧化酶基因克隆到昆虫表达系统中,用此抗血清,在昆虫细胞 Sf9 中,通过 Western 印迹检测表达的目的蛋白时,

发现仍有部分交叉反应,但比检测大肠杆菌中表达的目的蛋白发生交叉反应明显少了。

由此可见,用 Western 印迹检测目的蛋白是否在一种表达系统中表达,最好用另一种与亲源关系较远的表达系统表达的目的蛋白作为抗原来制备抗血清。

3.6 油脂代谢的研究

随着植物基因工程的发展,对许多代谢途径的基因研究已有很多重大突破。油脂代谢工程的研究就是植物代谢工程中的重要一项,虽然大多工作主要集中在对影响油脂代谢的单个基因的表达进行修饰,但仍然取得了一些可喜成果。近年来,叶绿体基因工程的兴起,已成为植物基因工程新的增长点。由于叶绿体转化系统的优点,从而可以进行多基因的转化,且无基因沉默现象,使人们对其倍加关注并对其前景充满信心。在油脂合成中,其中脂肪酸的合成是必需的,质体定位的乙酰辅酶 A 羧化酶是脂肪酸从头合成中的第一个关键酶、限速酶。它在生物体内催化形成丙二酰辅酶 A,丙二酰辅酶 A 是脂肪酸合成和脂酰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。本研究成功克隆组成质体定位的乙酰辅酶 A 羧化酶这个多酶复合体的 4 个亚基的基因,构建了油菜叶绿体表达载体,并在大肠杆菌中成功表达,为下一步转化叶绿体以及研究质体定位的乙酰辅酶 A 羧化酶对油脂代谢的影响奠定了基础。

参考文献:

Andre C, Haslam RP, Shanklin J. 2012. Feedback regulation of plastidic acetyl-CoA carboxylase by 18:1-acyl carrier protein in *Brassica napus*[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, **109**(25): 10 107-10 112

De Cosa B, Moar W, Lee SB, et al. 2001. Overexpression of the Bt cry2Aa2 operon in chloroplasts leads to formation of insecticidal crystals[J]. *Nat Biotechnol*, **19**(1): 71-74

Gong XS(龚小松), Yan LF(阎隆飞). 1991. Improved method for purification of higher plant chloroplast DNA(高等植物叶绿体 DNA 提纯方法的改进)[J]. *Chin Sci Bull*(科学通报), **36**(6):467-469

Hou BK(侯丙凯), Chen ZH(陈正华). 2001. Cloning of insecticidal protein gene from *Bacillus thuringiensis* and chloroplast genetic transformation in *Brassica napus* L. (苏云金芽孢杆菌杀虫蛋白基因克隆及油菜叶绿体遗传转化研究)[J]. *Hereditas*(遗传), **23**(1):39-40

Hou BK(侯丙凯), Hu ZM(胡赞民), Dang BY(党本元), et

al. 2002. Site-specific integration of insect-resistant gene into chloroplast genome of oilseed rape and acquisition of transgenic plants(定点整合抗虫基因到油菜叶绿体基因组并获得转基因植株)[J]. *J Plant Physiol Mol Biol*(植物生理与分子生物学学报), **28**(3):187-192

Hou BK(侯丙凯), Zhang ZL(张中林), Zhou YH(周奕华), et al. 2000. Construction of vector for oilseed rape chloroplast transformation and its insecticidal toxicity(油菜叶绿体定点转化载体的构建及其杀虫性)[J]. *High Technol Lett*(高技术通讯), **10**(7):5-11

Li ZG, Yin WB, Song LY, et al. 2011. Genes encoding the biotin carboxylase subunit of acetyl-CoA carboxylase from *Brassica napus* and parental species: cloning, expression patterns, and evolution[J]. *Genome*, **54**(3):202-211

Maliga P. 2004. Plastid transformation in higher plants[J]. *Ann Rev Plant Biol*, **55**:289-313

Peng XL(彭秀玲), Yuan HY(袁汉英), Xie Y(谢毅), et al. 1997. The Experimental Technique of Gene Engineering(基因工程实验技术)[M]. Changsha(长沙): Hunan Science and Technology Press(湖南科学技术出版社):252-261

Ruiz ON, Hussein HS, Terry N, et al. 2003. Phytoremediation of organomercurial compounds via chloroplast genetic engineering [J]. *Plant Physiol*, **132**(3): 1 344-1 352

Sambrook J, David W. 2001. Russell. Molecular Cloning: A Laboratory Manual[M]. 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory

Svab Z, Hajdukiewicz P, Maliga P. 1990. Stable transformation of plastids in higher plants[J]. *Proc Natl Acad Sci*, **87**(21): 8 526-8 530

Watanabe K, Rude MA, Walsh CT, et al. 2003. Engineered biosynthesis of an ansamycin polyketide precursor in *Escherichia coli* [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, **100**(17): 9 774-9 778

Wu YY(武玉永), Ma LX(马立新), Jiang SJ(蒋思婧). 2004. Cloning of the full length cDNA of carboxyltransferase alpha subunit from *Brassica napus* and its expression in *Escherichia coli* (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)[J]. *Progr Biochem Biophys*(生物化学与生物物理进展), **31**(9):847-854

Wu YY(武玉永), Yao QS(姚庆收), Ma LX(马立新). 2013. Construction of double cross-over expression vector for chloroplast multicistron in *Brassica napus* L. (油菜叶绿体多顺反子双交换表达载体的构建)[J]. *Agric Sci & Technol*(农业科学与技术), **14**(3):402-406

Zhang ZL(张中林), Qian KX(钱凯先), Shen GF(沈桂芳). 2000. Transplastomic plants homoplasmic for foreign transgenes(同质化叶绿体转基因植株的获得)[J]. *ABBS*(生物化学与生物物理学报), **32**(6):620-626

Zhang ZL(张中林), Zhang JY(张景昱), Li YN(李轶女), et al. 2001. Cloning of homologous targeting sequences containing chloroplast genes, *rbcL* and *atpB*, of *Brassica napus* and the construction of plastid transformation vectors harboring key enzyme genes responsible for PHB biosynthesis(油菜叶绿体基因组同源重组片段的克隆及 *phb* 基因定点整合载体的构建)[J]. *Acta Phytophysiol Sin*(植物生理学报), **27**(3):135-242