

拟南芥 *AtLACS9* 基因的克隆及其植物表达载体构建

赵欢欢, 吴兴, 张锋, 李宏伟, 王茅雁

(内蒙古农业大学 生命科学学院, 内蒙古 呼和浩特 010018)

摘要: 将大豆种子凝集素基因的启动子(lec)从 pBI-*lec* 载体上酶切下来, 连接到植物表达载体 pCambia3301 (p3301)的多克隆位点上, 然后运用 RT-PCR 方法扩增了拟南芥 *AtLACS9* 基因的编码区 cDNA, 并将其克隆到改造后的 p3301 载体的 *lec* 启动子之后, 为进一步转化大豆、获得油份含量提高的转基因大豆做准备。结果表明: p3301 载体改造成功, 命名为 p3301-*lec*; *AtLACS9* 基因的编码区 cDNA 由 2076 bp 组成, 编码含 691 个氨基酸残基的蛋白, 其种子特异性表达载体 p3301-*lec*-*AtLACS9* 构建成功, 可进行后续研究。

关键词: 长链脂酰辅酶 A 合成酶; 基因克隆; 载体构建

中图分类号: S565.1

文献标识码: A

文章编号: 1000-9841(2011)02-0190-04

Cloning and Plant Expression Vector Construction of *AtLACS9* Gene from *Arabidopsis Thaliana*

ZHAO Huan-huan, WU Xing, ZHANG Feng, LI Hong-wei, WANG Mao-yan

(College of Life Sciences, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot 010018, Inner Mongolia, China)

Abstract: Triacylglycerol (TAG) is the major form of storage lipid in oilseeds, and acyl-coenzyme A (CoA) and glycerol-3-phosphate are precursors for the synthesis of TAG. The long-chain acyl-CoA synthetases (LACSs) catalyze the synthesis of acyl-CoA molecules and therefore influence TAG content in oilseeds. In this paper, the soybean seed-specific lectin promoter (*lec*), which was digested with restriction enzymes from vector pBI-*lec*, was inserted into the multiple cloning site of the plant expression vector pCambia 3301 (p3301), and then the complete coding region cDNA of *Arabidopsis thaliana LACS9* (*AtLACS9*) gene was amplified by reverse transcription PCR (RT-PCR) and subcloned into the reconstructed vector p3301 downstream of the *lec* promoter. This work aimed at laying a foundation for future transformation of soybean with the gene and then obtaining transgenic soybean with enhanced oil content. The results showed that the vector p3301 was successfully reconstructed by inserting the *lec* promoter and was named p3301-*lec*; *AtLACS9* had an open reading frame of 2076 bp and the corresponding protein consists of 691 amino acids; the seed-specific expression vector of *AtLACS9*, namely p3301-*lec*-*AtLACS9*, was constructed successfully and could be used in the next experiments.

Key words: Long-chain acyl-CoA synthetases (LACSs); Gene cloning; Vector construction

植物油的化学成分主要是 TAG, 脂酰辅酶 A 和甘油-3-磷酸是合成 TAG 的前体。因此, 增加二者的含量可提高种子的含油量。脂酰辅酶 A 合成酶 (Acyl-CoA synthetases, ACS) 催化脂酰辅酶 A 的合成。在发育的种子中, ACS 定位于质体外膜, 在质体中合成的脂肪酸必须被 ACS 激活, 转化成脂酰辅酶 A 后才能进入细胞质, 然后在酰基转移酶的催化下将其中的脂肪酸链转移到甘油-3-磷酸的甘油骨架上, 形成 TAG^[1-3]。

已在多种生物体和植物细胞的油体、过氧化物酶体、线粒体、叶绿体、质体和微体中检测到 ACS 的活性^[3-4]。体外研究表明, ACS 的抑制剂可以阻断

细胞中 TAG 的合成^[5]。在动物肝脏细胞中过量表达 ACS 基因可使其中脂酰辅酶 A 和 TAG 的含量显著提高^[6]。这些结果表明, ACS 的活性是决定脂酰辅酶 A 含量的关键因素, 进而在 TAG 的合成中起重要作用。

在模式植物拟南芥的种子中 TAG 的含量高达 30%~40%^[7], 目前对其 ACS 基因的研究报道较多。在其基因组中共有 9 个 *LACS* 基因, 其中 *AtLACS9* 在幼嫩的角果和发育的种子中高表达^[3,8]; *AtLACS9* 的酶活性占叶绿体/质体中 *AtACS* 总酶活的绝大部分, 是其中主要的 ACS^[3]。由此推测, *AtLACS9* 与脂酰辅酶 A 合成和 TAG 积累关系密切。

收稿日期: 2010-12-02

基金项目: 转基因生物新品种培育科技重大专项资助项目 (2009ZX08004-009B)。

第一作者简介: 赵欢欢 (1983-), 女, 在读硕士, 主要从事大豆转基因工作。E-mail: 1234567_zhh@sina.com。

通讯作者: 王茅雁 (1961-), 女, 教授, 博士生导师, 研究方向为植物分子生物学。E-mail: wangmaoyan@163.com。

大豆是重要的油料作物之一,但其 TAG 的含量通常只占种子干重的 18%~21%^[9],通过基因工程来提高其含油量是重要的育种目标。该文克隆了拟南芥 *AtLACS9* 基因的编码区 cDNA,并将其构建到经改造的植物表达载体 p3301-lec 上,为进一步将其转入大豆、获得油分含量提高的转基因大豆奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 植物材料

野生型拟南芥(Ecotype Columbia 0)。

1.2 酶与试剂

限制性内切酶购自 TaRaKa 公司; rTaq DNA polymerase 购自博日公司;质粒小提试剂盒和胶回收试剂盒购自天根公司; M-MLV、T-easy 载体、T4 DNA 连接酶和热敏感碱性磷酸酶(TSAP)均购自 Promega 公司; Ligation high 试剂盒购自 TOYOBO 公司;抗生素购自 Sigma 公司;其它试剂和药品购自国内相关厂家和公司。表达载体 p3301 和 pBI-lec 分别由中国农科院王国英教授和中国科学院植物所许亦农研究员惠赠。PCR 引物合成和测序在北京华大基因中心进行。

1.3 植物表达载体的改造

用质粒小提试剂盒提取 pBI-lec 和 p3301 质粒 DNA,然后用 *Hind* III 和 *Eco*R I 分别进行双酶切,用胶回收试剂盒回收 lec 小片段与 p3301 载体大片段,再用 T4 DNA 连接酶将二者在 16℃ 连接 12 h。将连接产物转化大肠杆菌 *DH5α* 感受态细胞,挑取单克隆用 *Hind* III/*Eco*R I 和 *Sma* I 进行质粒酶切鉴定,获得重组质粒 p3301-lec。

1.4 总 RNA 提取及逆转录

取生长 10~15 d 的拟南芥莲座叶,在液氮中速冻后转移至 -76℃ 冻存,用于提取 RNA。

总 RNA 提取采用热酚法,用 M-MLV 逆转录合成 cDNA。

1.5 基因克隆

根据文献报道的 *AtLACS9* 基因登录号(AF503759),从基因数据库中(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)获取全长 cDNA 序列,在其编码区两侧 UTR 区设计正向引物 AA9S:5' ATCCCCGGTTTGGGGGTTTAGTGAA 3'(加 *Sma* I 切点),反向引物 AA9SR:5' AAGTTATATGCCTAAATTTTCCCGGGCC 3'(加 *Sma* I 切点),用上述 cDNA 做模板进行 PCR 扩增。25 μL 扩增体系含 10 × PCR buffer 2.5 μL; 10 mmol · L⁻¹ dNTP mix 0.5 μL; 10 μmol · L⁻¹ 正、反向引物各 0.5 μL; cDNA 2.5 μL; rTaq DNA polymerase(5 U · μL⁻¹) 0.25 μL; ddH₂O 18.25 μL。扩增程序为:94℃ 3 min; 94℃ 30 s; 60℃ 30 s; 72℃ 30 s; 72℃ 10 min; 4℃ 保温,33 个循环。将 PCR 产物进行电泳,回收目的片段并与 T-easy 载体连接,然后转化大肠杆菌 *DH5α*,经菌液 PCR 鉴定送阳性克隆测序。

1.6 植物表达载体的构建

用质粒提取试剂盒提取 T-easy-*AtLACS9* 和 p3301-lec 质粒 DNA,然后用 *Sma* I 进行酶切,用胶回收试剂盒回收 *AtLACS9* 基因和 p3301-lec 载体片段。再用 TSAP 将后者去磷酸化,然后用 Ligation high 试剂盒将其与 *AtLACS9* 基因片段连接。将连接产物转化大肠杆菌 *DH5α* 感受态细胞,挑取单菌落进行菌液 PCR 鉴定,阳性克隆再分别用 *Sma* I、*Xba* I 和 *Eco*R I 进行酶切鉴定,以确定 *AtLACS9* 基因片段是否插入及其在 lec 启动子中的插入方向。

2 结果与分析

2.1 植物表达载体 p3301 的改造

为了获得在种子中特异表达且以除草剂为选择标记的转基因大豆,首先用限制酶 *Eco*R I 和 *Hind* III 将表达载体 pBI-lec 上的大豆种子凝集素基因启动子 lec 酶切下来,定向连接到植物表达载体 p3301 的多克隆位点上(图 1),经质粒酶切鉴定获得预期大小的片段(图 2),证明载体改造成功,命名为 p3301-lec。

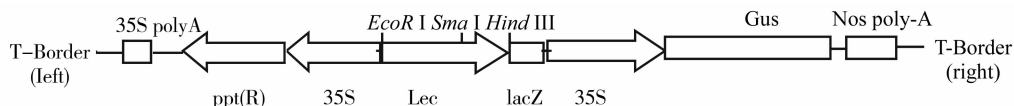


图 1 p3301-lec 载体图

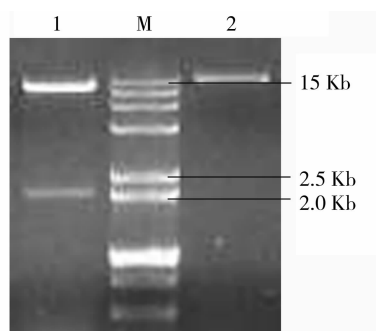
Fig. 1 Map of vector p3301-lec

2.2 *AtLACS9* 基因的克隆

用热酚法提取到质量较好的拟南芥幼苗叶片总 RNA(图 3),然后将其逆转录合成 cDNA 做模板,

用 *AtLACS9* 基因编码区特异性引物进行 PCR 扩增,获得预期 2130 bp 的目的片段(图 4)。将该片段回收后克隆到 T-easy 载体进行测序验证。共测定了 5

个独立的单克隆,获得由 2 076 bp 组成且序列正确的 *AtLACS9* 编码区 cDNA。其推测的编码蛋白由 691 个氨基酸残基组成,一级结构中含有 *LACS* 家族所特有的结构域,分子质量为 76.07 KDa,等电点为 6.97。



M: DNA 分子量标准 (D15000 + 2000); 1: *Hind* III / *Eco* R I 双酶切 (11256 bp/2120 bp); 2: *Sma* I 单酶切 (13376 bp)

M: DNA marker (D15000 + 2000); 1: *Hind* III / *Eco* R I double-enzyme digestion (11256 bp/2120 bp); 2: *Sma* I digestion (13376 bp)

图 2 p3301-lec 载体酶切鉴定图谱

Fig. 2 Enzyme digestion patterns of vector p3301-lec

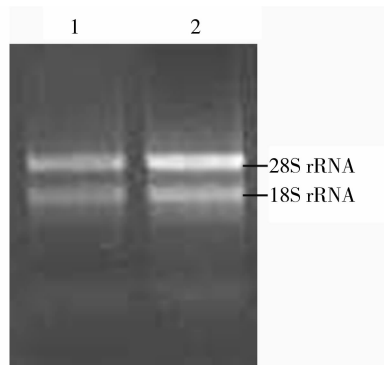
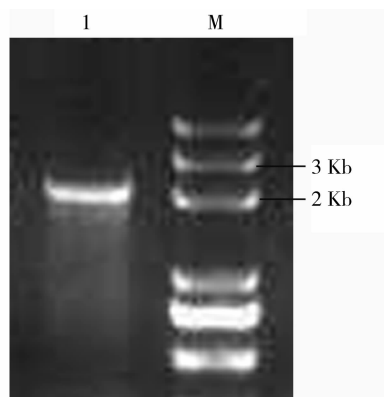


图 3 总 RNA 电泳图谱

Fig. 3 Electrophoresis patterns of total RNA



M: DNA 分子量标准 (Trans 2k); 1: RT-PCR 产物

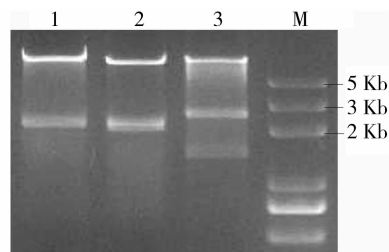
M: DNA marker (Trans 2k); 1: RT-PCR product

图 4 *AtLACS9* RT-PCR 产物电泳图谱

Fig. 4 Electrophoresis patterns of *AtLACS9* RT-PCR product

2.3 *AtLACS9* 植物表达载体的构建

将 *AtLACS9* 编码区 cDNA 用限制酶 *Sma* I 从 T-easy 载体上酶切下来,连接到经同样酶切的 p3301-lec 的 lec 启动子之后,然后转化大肠杆菌并进行菌液 PCR 检测 (图略) 和质粒酶切鉴定 (图 5 泳道 1),证明获得阳性重组克隆。由于是平末端连接,故用不同的限制酶 *Xba* I 和 *Eco* R I 对重组克隆中 *AtLACS9* 的插入方向进行了酶切鉴定,证明获得了正向插入的重组克隆 (图 5 泳道 2、3),植物表达载体构建成功,命名为 p3301-lec-*AtLACS9*。



M: DNA 分子量标准 (Trans 2k); 1: *Sma* I 酶切 (13376 bp, 2130 bp); 2: *Xba* I 酶切 (11286 bp, 2173 bp, 2047 bp); 3: *Eco* R I 酶切 (11658 bp, 1410 bp, 2438 bp)

M: DNA marker (Trans 2k); 1: *Sma* I digestion (13376 bp, 2130 bp); 2: *Xba* I digestion (11286 bp, 2173 bp, 2047 bp); 3: *Eco* R I digestion (11658 bp, 1410 bp, 2438 bp)

图 5 *AtLACS9* 正向插入 p3301-lec 酶切鉴定图谱

Fig. 5 Enzyme digestion patterns for the positive-orientation insertion of *AtLACS9* fragment into vector p3301-lec

3 讨论

近年来,包括大豆在内的植物脂类的合成途径及其相关酶类的基因功能已基本阐明,大豆的遗传转化效率有了显著提高 (最高可达 7%),这为大豆的基因工程改良提供了前所未有的契机。该研究旨在通过在大豆种子中过量表达高油分植物拟南芥的 *AtLACS* 基因,获得油分含量提高的转基因大豆,同时要求以除草剂作为转基因材料的筛选剂。为此,该文首先将常用的植物表达载体 p3301 进行了改造。该载体虽然以除草剂草丁膦 (Phosphinothricin, PPT) 作为植物选择标记,但它所含的启动子是花椰菜花叶病毒 35S 启动子 (CaMV35S),其转录驱动活性虽然较强,但属于组成型表达,不仅会引起基因的多效性,还可能对转基因植物的生长发育产生不利影响,因此需引入种子特异性启动子。大豆凝集素 (Lectin) 是一种在大豆种子中特异表达的蛋白质^[10],其基因在种胚发育的中晚期大量表达,将该基因的启动子 lec 分离出来再转入大豆和烟草,可以持续、有效地驱动外源基因在种子中表达^[11-13]。该试验将 lec 启动子从表达载体 pBI-lec (以卡那霉素为筛选剂) 上酶切下来,成功连接到

p3301 载体的多克隆位点上,完成了表达载体构建的第一步。在拟南芥基因组中有 9 个 *AtLACS* 基因,目前认为以 *AtLACS9* 与 TAG 的积累关系最为密切^[3,8],该文克隆了 *AtLACS9* 基因的编码区 cDNA,并将其连接到经改造的表达载体 p3301-lec 的 lec 启动子之后,成功构建了其种子特异性表达载体。目前,课题组已通过农杆菌介导的子叶节法将该基因转化大豆,获得了抗除草剂的再生绿苗,进一步的试验正在进行之中。

参考文献

- [1] Pollard M, Ohlrogge J. Testing models of fatty acid transfer and lipid synthesis in spinach leaf using *in vivo* oxygen-18 labeling [J]. *Plant Physiology*, 1999, 121: 1217-1226.
 - [2] Somerville C, Browse J. Plant lipids: metabolism, mutants, and membranes[J]. *Science*, 1991, 252: 80-87.
 - [3] Schnurr J A, Shockey J M, Boer Gert-Jan de, et al. Fatty acid export from the chloroplast. Molecular characterization of a major plastidial acyl-coenzyme a synthetase from *Arabidopsis* [J]. *Plant Physiology*, 2002, 129:1700-1709.
 - [4] Black P N, DiRusso C C. Yeast acyl-CoA synthetases at the crossroads of fatty acid metabolism and regulation[J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2007, 1771(3):286-298.
 - [5] Muio D M, Lewin T M, Wiedmer P, et al. Acyl-CoAs are functionally channeled in liver: potential role of acyl-CoA synthetase [J]. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 2000, 279: E1366-1373.
 - [6] Parkes H A, Preston E, Wilks D, et al. Overexpression of acyl-CoA synthetase-1 increases lipid deposition in hepatic (HepG2) cells and rodent liver *in vivo* [J]. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 2006, 291: E737-744.
 - [7] White J A, Todd J, Newman T, et al. A new set of Arabidopsis expressed sequence tags from developing seeds. The metabolic pathway from carbohydrates to seed oil [J]. *Plant Physiology*, 2000, 12:1582-1594.
 - [8] Shockey J M., Fulda M S, Browse J A. *Arabidopsis* contains nine long-chain acyl-coenzyme a synthetase genes that participate in fatty acid and glycerolipid metabolism[J]. *Plant Physiology*, 2002, 129:1710-1722.
 - [9] Hajduch M, Ganapathy A, Stein A J W, et al. Systematic proteomic study of seed filling in soybean. Establishment of high-resolution two-dimensional reference maps, expression profiles, and an interactive proteome database [J]. *Plant Physiology*, 2005, 137:1397-1419.
 - [10] Vodkin L O, Raikhel N V. Soybean lectin and related proteins in seeds and roots of Le⁺ and Le⁻ soybean varieties[J]. *Plant Physiology*, 1986, 81:558-565.
 - [11] Cho M J, Widholm J M, Vodkin L O. Cassettes for seed-specific expression tested in transformed embryogenic cultures of soybean [J]. *Plant Molecular Biology Reporter*, 1995, 13:255-269.
 - [12] Buenrostro-Nava M T, Ling P P, Finer J J. Comparative analysis of 35S and lectin promoters in transgenic soybean tissue using an automated image acquisition system and image analysis[J]. *Plant Cell Reporter*, 2006, 25: 920-926.
 - [13] Ma Q H, Wang X, Wang Z M. Expression of isopentenyl transferase gene controlled by seed-specific lectin promoter in transgenic tobacco influences seed development [J]. *Plant Growth Regulation*, 2008, 27:68-76.
-
- (上接第 189 页)
- [7] 贾晓艳, 张彩英. 河北省大豆推广品种遗传多样性分析[J]. *植物遗传资源学报*, 2006, 7(3): 310-315. (Jia X Y, Zhang C Y. A study on genetic diversity of soybean cultivars in Hebei[J]. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2006, 7(3): 310-315.)
 - [8] 吴晓雷, 贺超英, 陈受宜, 等. 用 SSR 分子标记研究大豆属种间亲缘进化关系[J]. *遗传学报*, 2001, 28(4): 359-366. (Wu X L, He C Y, Chen S Y, et al. Phylogenetic Analysis of interspecies in Genus *Glycine* through SSR marker[J]. *Acta Genetica Sinica*, 2001, 28(4): 359-366.)
 - [9] 张博, 邱丽娟, 常汝镇. 中国大豆部分获奖品种与其祖先亲本间 SSR 标记的多态性比较和遗传关系分析[J]. *农业生物技术学报*, 2003, 11(4): 351-358. (Zhang B, Qiu L J, Chang R Z. Diversity comparison and genetic relationship analysis between awarded soybean cultivars and their ancestors in China[J]. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2003, 11(4): 351-358.)
 - [10] 周晓馥, 庄炳昌, 王玉民, 等. 利用 RAPD 与 SSR 技术进行野生大豆种群内分化的研究[J]. *中国生态农业学报*, 2002, 10(4): 6-9. (Zhou X F, Zhuang B C, Wang Y M, et al. Population differentiation of wild soybean based on the RAPD and SSR analysis[J]. *Chinese Journal of Eco-Agriculture*, 2002, 10(4): 6-9.)
 - [11] Barnham K D, Fencis D M, Dorrance A E, et al. Genetic diversity patterns among phytophthora resistant soybean plant introductions based on SSR markers [J]. *Crop Science*, 2002, 42(2): 338-343.
 - [12] Silva D C G, Yamanaka N, Brogin R L, et al. Molecular mapping of two loci that confer resistance to Asian rust in soybean[J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 2008, 117:57-63.
 - [13] Rogers S O, Bendich A J. Extraction of DNA from plant, fungal and algal tissues[M]//Gelvin S B, Schilperoort R A. *Plant Molecular Biology Manual*. Boston, MA: Kluwer Academic Publishers, 1994, D1: 1-8.
 - [14] 刘峰, 东方阳, 邹继军, 等. 应用微卫星标记进行大豆种质多样性和遗传变异性分析[J]. *遗传学报*, 2000, 27(7): 628-633. (Liu F, Dong F Y, Zou J J, et al. Soybean germplasm diversity and genetic variance detected by microsatellite markers [J]. *Acta Genetica Sinica*, 2000, 27(7): 628-633.)
 - [15] Rongwen J, Akkaya M S, Lavi U, et al. The use of microsatellite DNA markers for soybean genotype identification [J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 1995, 19:43-48.
 - [16] Narvel J M, Chu W C, Fehr W R, et al. Development of multiplex sets of SSR markers covering the soybean genome [J]. *Journal of Molecular Breeding*, 2000, 6:175-183.