

油茶脂酰辅酶A硫酯酶基因的克隆与表达分析

谭晓风^{1*}, 王建勇¹, 龙洪旭¹, 曾艳玲¹, 梅芳芳², 刘凯³, 陈鸿鹏⁴

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华中师范大学生命科学学院, 武汉430079; ³广西林业科学研究院, 南宁530001; ⁴国家林业局桉树研究开发中心, 广东湛江524022

摘要: 脂酰辅酶A硫酯酶是催化脂酰CoA水解成自由脂肪酸(FFA)和辅酶A (CoASH)的一类酶, 它通过维持胞内脂酰CoA、FFA和CoASH等的水平来参与生命体内的生理过程。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, 分离和克隆到一个油茶脂酰CoA硫酯酶基因的全长cDNA序列, 命名为*CoACOT* (GenBank登录号KJ910339)。该基因cDNA全长为1 588 bp, 含有1 164 bp 的开放读码框, 编码387个氨基酸; 基因编码的蛋白CoACOT具有cNMP结合域保守序列“VVREGGAGDGVYFIWDG”和C端的保守三联肽“SKL”, 属于过氧化物酶体蛋白。成功构建了表达载体, 其中, 原核表达载体在宿主细胞BL21 (DE3)上成功诱导表达, 获得分子量约为44 kDa的目的蛋白。荧光定量PCR分析表明, *CoACOT*基因在种子不同的发育期均有表达, 种子膨大期最低, 经油脂合成期上调表达之后, *CoACOT*基因的相对表达量维持在一个相对稳定的较高水平。结果显示*CoACOT*基因可能调控着油茶种子的油脂合成。

关键词: 油茶; 脂酰辅酶A硫酯酶; 克隆; 表达分析; 载体构建

Cloning and Expression Analysis of a Acyl-CoA Thioesterase Gene from *Camellia oleifera*

TAN Xiao-Feng^{1*}, WANG Jian-Yong¹, LONG Hong-Xu¹, ZENG Yan-Ling¹, MEI Fang-Fang², LIU Kai³, CHEN Hong-Peng⁴

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; ²Hubei Key Laboratory of Integrative Biology, College of Life Sciences, Central China Normal University, Wuhan 430079, China; ³Guangxi Academy of Forestry, Nanning 530001, China; ⁴China Eucalypt Research Centre, Zhanjiang, Guangdong 524022, China

Abstract: Acyl-CoA thioesterases are a group of enzymes that catalyze the hydrolysis of acyl-CoAs to the free fatty acid (FFA) and coenzyme A (CoASH), providing the potential to regulate intracellular levels of acyl-CoAs, FFAs and CoASH. In this paper, state trial oil-tea variety ‘Huashuo’ as material, a full-length cDNA of acyl-CoA thioesterase genes from *Camellia oleifera* was isolated and cloned by RACE technology and reverse transcription PCR (RT-PCR). This gene was named *CoACOT* (GenBank accession number KJ910339) and the full-length cDNA was found to be 1 588 bp. *CoACOT* had an open reading frame of 1 164 bp, encoding 387 amino acids. *CoACOT* contained a conserved sequences of “VVREGGAGDGVYFIWDG” in cNMP binding domain and a highly conserved triple peptides of “SKL” in the C-terminal, belonging to a peroxysome protein. The expression vectors of *CoACOT* were constructed successfully, and the recombinant vector of pET30a-*CoACOT* was induced to expressed the about 44 kDa target product in the BL21 (DE3) bacteria. The real-time quantitative PCR showed the expression level of *CoACOT* was the lowest in seed expanding stage, and then remained almost a relatively stable higher level after up-regulation in the lipid synthesis. The results showed *CoACOT*, as a auxiliary gene, may regulate and maintain the physiological balance in lipid synthesis of *C. oleifera* seeds.

Key words: *Camellia oleifera*; acyl-CoA thioesterase; clone; expression analysis; vector construction

收稿 2014-09-05 修定 2014-11-04

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)。

生物体内通过 β 氧化产生的短链产物需要及时清除,脂酰辅酶A硫酯酶(acyl-CoA thioesterase, ACOT)就是生物体内的这样一类酶,它属于 β 氧化系统的辅助酶之一(Poirier等2006),催化脂酰CoA水解成自由脂肪酸(free fatty acid, FFA)和辅酶A (coenzyme A, CoASH)的一类酶,通过维持胞内脂酰CoA、FFA和CoASH的适当水平来参与生物体内的必不可少的的生理过程(Hunt和Alexson 2002, 2008; Kirkby等2010)。ACOT在原核和真核生物广泛的表达(Spencer等1978; Naggert等1991; Jones等1999; Kal等2000; Hunt等2002; Tilton等2004),以组织依靠的方式几乎表达与定位在细胞质、内质网、线粒体、过氧化物酶体和溶酶体等所有的组织细胞中,表明了它在生物体中具有的重要功能。自Gergely等(1952)发现第一个ACOT酶以来,其后几个不同的ACOT家族陆续被发现,目前有15个ACOT基因家族被鉴定和命名(Hunt等2005; Kirkby等2010; Zhuravleva等2012)。依赖结构和功能数据库,ACOT被分类成 α/β 水解酶超家族(Nardini和Dijkstra1999; Huhtinen等2002)和hotdog-fold超蛋白家族(Dillon和Bateman 2004; Forwood等2007),具有短链、中链或长链酰基CoA活性(Alexson等1989; Wilcke和Alexson1994)。通过序列分析,ACOT具有Asp、Gln和Thr的催化活性位点(Li等2000),具有线粒体信号序列或过氧化物酶体信号序列,其中,过氧化物酶体信号序列(PTS 1)定位在蛋白C端(Jones等1999; Hunt等2002),具有保守的三联肽,如SKL、PKL、AKL、SKV和SKI,而线粒体信号序列则定位在N端(Holroyd和Erdmann 2001; Hunt和Alexson 2002; Ishizuka等2004; Westin等2004, 2007; Hunt等2006; Buch等2009)。

尽管ACOT广泛的分布于原核和真核生物组织中,可对ACOT的生理功能并不是十分清楚,目前,通过对ACOT的克隆和它的更深一步的特征分析,促进了对该酶功能了解,明确了它作为一种辅助酶能调控与终止线粒体或过氧化物酶体的 β 氧化。ACOT受过氧化物酶体增殖物活化受体(PPARs)和其他的营养因子等的强烈调控和诱导(Berge等1981; Miyazawa等1981),它能终止FA的合成(Libertini和Smith 1978),它的催化底物与产物可能在脂肪酸代谢、离子通道的开启、胞内膜的出

芽与融合、信号转导、基因转录和酶的调节上扮演着重要的作用(Hunt和Alexson 2002)。针对目前的研究结果,ACOT和它的催化底物与产物的功能主要体现在以下几个方面:(1) ACOT是控制脂酰CoA流向的途径之一。脂酰CoA是调节脂肪酸(fatty acid, FA)的降解和合成的重要中间物,是代谢能量的主要来源,它在调节中间代谢物、基因表达、FA的降解与合成及复合酯的形成中具有重要功能(Forman等1997; Kliewer等1997)。比如脂酰CoA可以作为脂肪酸合成和一些核激素受体的强烈反馈抑制剂(Hunt等1999),可以作为一些核因子(HNF-4a)的配体(Hertz等1998),也可能参与了胞内运输、囊泡出芽和内吞作用等过程(Hunt和Alexson 2002); (2) ACOT也能控制信号转导蛋白的酰化状态及它们的胞内定位,调节膜蛋白和它的活化联系(Faergeman和Knudsen 1997); (3) CoASH是柠檬酸循环、氧化和其它代谢通路的关键中间物(Wanders等1994; Hunt和Alexson 2002)。研究表明,ACOT的活性可能阻止CoASH隐藏在中间体上而维持体内有效的自由CoASH的最佳水平,进而提高了FA的氧化,为那些依靠CoASH的代谢通路提供了CoASH原料(Lee和Schulz 1979; Jones等1999; Hunt和Alexson 2002); (4) 长链脂酰CoA酯不仅作为FA合成和降解的重要中间物,在调节中间代谢途径和基因表达中具有重要功能,也影响着众多的细胞系统和功能,如对离子通道、离子泵、转运蛋白、膜融合和蛋白质酰化的调节(Faergeman和Knudsen 1997); (5) ACOT在促进短链羧酸的排出中起重要作用(Hunt和Alexson 2002)。

油茶是我国重要的木本食用油料树种,茶油中主要由油酸、亚油酸等不饱和脂肪酸组成,其含量一般在90%以上,是一种优质食用油(廖书娟等2005)。但是,油茶种仁含油率较低且易遭逆境环境等的影响,这些都严重影响和制约了油茶产业的快速发展。随着新兴的生物技术的广泛应用,应用现代分子生物学技术和方法,给油茶的利用与发展开创一个崭新的局面。因此,对油茶优质基因的分离、克隆及功能的研究对于油茶育种和优质基因的利用具有重要意义。鉴于ACOT具有的重要作用,展开该基因在油茶上的研究将具有重大的研究价值,我们在已构建的转录组和表达

谱数据库的基础之上,首次在油茶中发现了*ACOT*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分析,这不仅丰富了油茶基因库中*ACOT*基因的相关知识,也为今后进一步深入研究*ACOT*基因的生理功能奠定了基础。

材料与方法

1 材料与试剂

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,取材时间分别为种子膨大期(5月5日、6月5日和7月4日)和油脂合成期(8月4日、8月15日、8月25日、9月5日、9月12日、9月19日、9月26日、10月3日、10月10日和10月17日),摘取材料后用锡箔纸包裹好,迅速存于液氮并 -80°C 超低温冰箱保存。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、pET30a、pEGAD、pDONR201和pJawoh18-RNAi为本实验室保藏。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、RNA提取和3' RACE反转录试剂盒购自Invit-

rogen公司, pMD18-T质粒载体购自TaKaRa公司, BL21 (DE3)、2 \times Easy Taq Mix、pEASY-Simple-Blunt Cloning Kit和Trans StartTM Fast Pfu DNA Polymerase购自北京全式金公司,质粒提取试剂盒和DNA凝胶回收试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司,5' RACE反转录试剂盒购自Clontech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Amerosco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。引物与测序分别由华大和博尚公司完成。

2 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。

3 *CoACOT*基因的克隆与生物信息学分析

BLAST比对后,根据初步确定的*CoACOT*转录组序列和同源序列,设计特异和简并引物(表1),采用RACE技术,克隆*CoACOT*基因。

表1 *CoACOT*基因引物序列及各引物作用

Table 1 Primers for *CoACOT* gene and their applications

引物名称	引物序列(5'→3')	$T_m/^{\circ}\text{C}$	用途
F0	CTATCAGTCTAGATCATGCGATGTGGTTT	59.6	转录组
R0	CAACAAGCTCTCCTTTCCGGTTAAACATT	59.6	扩增引物
3' GSP-F	CGGAAAGGAGAGCTTGTTCATCAT	60.6	3' RACE扩增
AUAP	GGCCACGCGTCGACTAGTAC		3'末端序列
F1	CGTGATGGGAAVAGCTTTGTCYAC	60.5	简并片段
R1	ACCCAGTCATCGGCTCTAAGTG	60.0	扩增引物
5' GSP-R	ACCGTTCGGGTAGCAAGCTCTT	60.0	5' RACE扩增
UPM Long	CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT		5'末端序列
UPM Short	CTAATACGACTCACTATAGGGC		
CDS-F	ACATTTTACTTTGCGAGTGGTTCC	57.0	全长cDNA
CDS-R	TCATCGCCGTATATAAGCAT	51.3	扩增

扩增转录组序列和RACE的PCR反应体系(25 μL): 2 \times Easy Taq 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' \times Trans Start Fast Pfu Buffer (Mg²⁺ plus) 10.0 μL 、2.5 mmol $\cdot\text{L}^{-1}$ 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(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($1 \text{ kb} \cdot \text{min}^{-1}$ 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、InterProScan和SOPMA等, 预测分析基因的理化性质、结构与功能。

4 *CoACOT*基因的载体构建

本研究以获得基因的全长克隆质粒pEASY-CoACOT为模板, 采用常规载体构建方法构建了的原核表达载体和真核超表达载体, 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[原核表达上游引物F: 5' CGGGATCCGTGGTTCCTCCAAGAACTCCAAATT 3' (下划线部分为*Bam*HI酶切位点), 下游引物R: 5' CGAGCTCTTAAAGCTTTGATGGGAGAGCAG 3' (下划线部分为*Sac*I酶切位点); 真核表达上游引物F: 5' TCCCCGGGGTGGTTCCTCCAAGAACTCCAATT 3' (下划线部分为*Sma*I酶切位点), 下游引物R: 5' CGGGATCCTTAAAGCTTTGATGGGAGAGCAG 3' (下划线部分为*Bam*HI酶切位点)], 两者的扩增长度均为1 188 bp。根据同源序列的保守区段, 设计用于扩增干扰片段所需的特异引物attB1-F: 5' ggggacaagttgtacaaaaagcaggcttcTGCTGATGTGATTGCATTGTCC 3'; attB2-R: 5' ggggacactttgtacaagaaagctgggtgGGGCTCACAAAATCTTATCTCT 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493 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。

5 *CoACOT*基因的原核表达

成功转化入BL21 (DE3)感受态细胞的重组质

粒pET30a-CoACOT (图1), 37 °C培养至 OD_{600} 值为0.5~0.8后, 在28 °C和IPTG终浓度为 $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的条件下诱导表达, 诱导总时间为12 h, 每隔2 h取菌液进行12% SDS-PAGE分析。

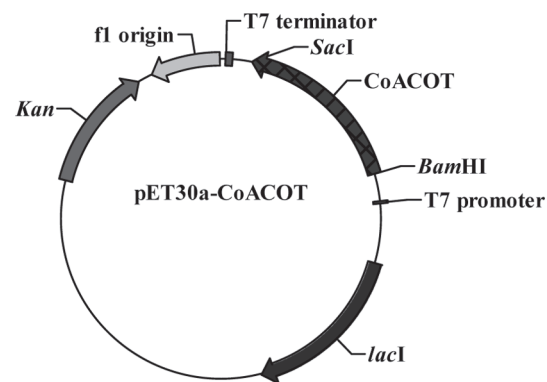


图1 重组载体pET30a-CoACOT的构建

Fig.1 Constructed recombinant pET30a-CoACOT plasmid

6 *CoACOT*基因的实时荧光定量

对收集的13个不同时期的‘华硕’果实种子提取总RNA, 逆转录cDNA后, 采用实时荧光定量PCR (qRT-PCR)技术确定*CoACOT*基因在不同时期的相对表达含量, 每组做3个平行重复反应。设计引物分别为qF: 5' TGGAGGACAGTTTATCGG-GC 3'和qR: 5' GTGAATACAACATTGCCTTT 3', 扩增长度为203 bp, 选取最优内参基因*GAPDH* (王保明2012)作为本实验的内参基因, ddH₂O模板为阴性对照。qRT-PCR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, 58 °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2), 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。

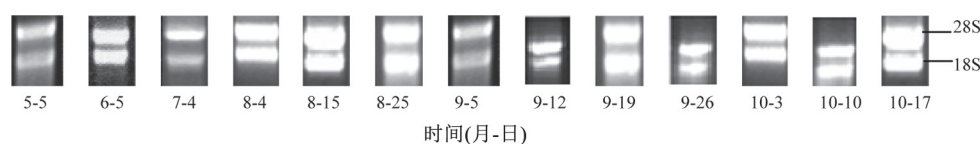


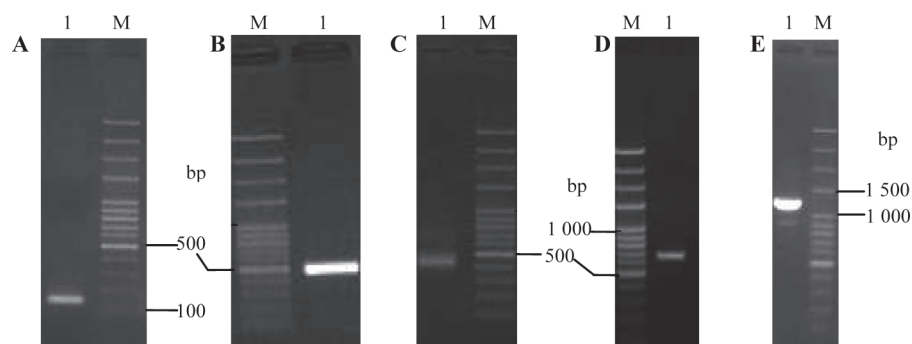
图2 不同时期油茶种子总RNA的提取

Fig.2 Total RNA extracted from *C. oleifera* seeds at different developmental stages

2 *CoACOT*基因cDNA全长的克隆与序列分析

通过RACE技术, 获得全长为1 588 bp的目的片段(转录组序列173 bp, 简并序列506 bp, 3' RACE 474 bp, 5' RACE 581 bp) (图3), 起始密码子为ATG, 终止密码子为TGA, 5' UTR和3' UTR分别为40和384 bp, 终止密码子后有加尾信号AATAA和Poly (A) 尾巴(图4), 开放阅读框为1 164 bp (41~1 204), 编码

387个氨基酸, 分子量为43.5 kDa, pI理论值为7.14, 即生理条件下该蛋白偏向为中性。带负电荷残基(Asp+Glu)数为47, 带正电荷残基(Arg+Lys)数为47, 分子式为 $C_{1955}H_{3054}N_{540}O_{563}S_{13}$, 不稳定指数(II)为30.1, 属于稳定蛋白。整个蛋白的疏水指数从-2.778到2.488, 是亲水性蛋白(图5-A), 不具跨膜区(评分超过500) (图5-B)。

图3 *CoACOT*基因cDNA的克隆Fig.3 Molecular cloning of *CoACOT* cDNA

A: 转录组序列扩增; B: 简并序列扩增; C: 3' RACE扩增; D: 5' RACE扩增; E: CDS扩增; M: 100 bp plus DNA ladder.

氨基酸同源比对发现, *CoACOT*具有一个cNMP结合域保守序列和C端保守三联肽“SKL” (图6)。根据氨基酸保守性分析可知, 该蛋白具有环核苷酸结合域(cAMP结合域、cNMP结合域及类似于RmlC-like jelly roll fold结合域), 属于hotdog-fold超蛋白家族(图7)。系统进化分析结果表明, *CoACOT*与番茄(*Solanum lycopersicum*)和马铃薯(*Solanum tuberosum*)的ACOT同源蛋白亲缘关系最近, 在一个进化分支上(图8)。蛋白质的高级结构预测显示, α 螺旋和不规则卷曲是油茶ACOT的主要结构元件(图9-A), α 螺旋结构为30.23%、 β 折叠为17.57%、 β 转角为6.20%和无规则卷曲为45.99%; 图9-B为预测的*CoACOT*三维空间模型。

3 *CoACOT*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[原

核表达载体、真核表达载体和干扰载体宿主菌分别为BL21 (DE3)、GV3101和LBA4404], 制备工程菌。由图10-A~F均可以看到1条明显约1 200 bp的条带, 这跟预期的结果一致, 说明我们成功地构建了pET30a-*CoACOT*原核表达载体和pEGAD-*CoACOT*超表达载体, 且均已成功转入了宿主感受态细胞中。由图10-G~I均可以看到1条明显约500 bp的条带, 这跟预期的结果一致, 说明我们成功地构建了pJawohl18-*CoACOT*干扰载体, 且已成功转入了宿主农杆菌LBA4404中。

4 *CoACOT*基因的原核表达

在不同诱导时间下, 蛋白表达情况(图11)显示, 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44 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ACOT

1 ACATTTTACTTTTGGGAGTGGTTCCTCCAAGAACTCCAATT

41 ATGAACACAGACGAAGTGCAGTTTTTAGGTTGCGTTCCTCTTCTACAGAGACTCCCGAGCTTGTCTCTCCGAAAAATCGCCGAAGTC
M N T D E V I E F L G C V P L L Q R L P S L S L R K I A E V

131 GTCAGTGTAAACGCTACGATCGCGGGACTATGTTGTCCTGAAGGCGAGGCTGGGGATGGAGTTACTTTCATTGGGATGGGGAGGCT
V T V K R Y D R G D Y V V R E G E A G D G V Y F I W D G E A

221 GAAGTATGCGACTCGGTCCATGCCGATGACGAAAAATCGTCTGAATTCAGTTGAATCGTTATGATTATTTGGTCATGGTACTGCTACA
E V C D S V H A D D E N R P E F Q L N R Y D Y F G H G T A T

311 TCTGCTCAAAATGCTGATGTGATTGCATTGTCCAAGGTGAACATTTTCCGGGGGATTACCTTGCCGGATGCTCCAAGGTTTGGGGAGGTC
S A P N A D V I A L S K V N I F R G I T L P D A P R F G E V

401 TTTGGAGGACAGTTTATCGGGCAGGCACTGGCTGCAGCATCGAAAACTGTTGATTGTCTTAAGGTAGTTCATAGTCTGCATTGCTACTTC
F G G Q F I G Q A L A A A S K T V D C L K V V H S L H C Y F

491 CTTCTTGTGGGGATCTTGACCTGCCAATCATGTATGAAGTTCACCGTGTACGTGATGGAAAAAGTTTGTACCCGAACGGTAGATGCA
L L V G D L D L P I M Y E V H R V R D G K S F A T R T V D A

581 ATACAAAAGGCAATGTGTATTACATTGCTTCTGTTTCAGAAAGAAGAAGGGTTTGATCACCAGGTACCAGTGCCTCT
I Q K G N V V F T L L A S F Q K E E E G F D H Q V P V M P S

671 GTGCCTGATCCAGAAACGCTTTTGTCAATGGAAGAGGTGAGAGAGACGTCTCACTGATCCCGTCTCCAGAACTTACCGGAACAAG
V P D P E T L L S M E E V R E R R L T D P R L P R T Y R N K

761 GTGGCCACTGCAAAAGTTGTACCATGGCCCATAGAGATAAGATTTTGTGAGCCAGTACTGCTACCAATCAAATAAACTCTCTCAAGT
V A T A K F V P W P I E I R F C E P S T A T N Q T K S P P S

851 TTGAGGTATTGGTTTAGAGCTAAAGGAAAACTTTCAGATGACCAGGCTTTGCATAGATGTGTAGCGGCATATACTTCAGATCTGATATT
L R Y W F R A K G K L S D D Q A L H R C V A A Y T S D L I F

941 CTTCTGTAAAGTCTGAATCCTCACCGGAAGAAGAAATTTAAAAACAACCTTCTATCAGTCTAGATCATGCGATGTGGTTTCACAGGCCACTT
L S V S L N P H R K K N L K T T S I S L D H A M W F H R P L

1031 AGAGCCGATGACTGGGTGTTGTTTGTGATTACAAGTCTGCTGCGTATAATGCACGTGGCTTTTGTCTGGCCAAATGTTTAAACCGGAAA
R A D D W V L F V I T S P A A Y N A R G F C S G Q M F N R K

1121 GGAGAGCTTGTTCATCATTGATTCAAGAGGGCTTAATAAGGCAGGTGAAACCGCCAAATCTGCTCTCCCATCAAAGCTTTAA
G E L V A S L I Q E G L I R Q V K P P N S A L P S K L *

1205 TGCTTATATACGGCGATGATTATCATACTATTGGGGTGAACCTTTTGGAGATTTTCTGGGCGATGATTATCATATTATGGGGCAAACCTTTTCTAC
CCTGGTCTTCATTTTACTCATTATTAIGCTCAATAAATTAAGCAGTTTGTATTGCAAATCTAATCAATAAAGTAGAGTTTAGATGCCATGACATTT
GTGCTGAAATTTAAGTTGCAAAAACACAGTTGACCTAATTGTGATTACTATCATTGTTAAGGTAATAATTGGTCGATTAGTTTGTCTTATTGTTGTTG
AGAGTTAAAAGGAACACCTTTCTTGGATAATTTAGATTGAGAAGCTTTTACAGGGGTTCCAGCAAAAAAAAAAAAAAAAAA

图4 *CoACOT*基因的全长cDNA序列及氨基酸序列Fig.4 Full length *CoACOT* 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,方框表示加尾信号。

的分子量相一致,说明油茶pET30a-*CoACOT*重组质粒在原核细胞BL21 (DE3)中得到了表达。

5 不同种子发育时期*CoACOT*基因的表达分析

实时定量和半定量PCR表明,油茶‘华硕’种子在不同发育阶段中*CoACOT*基因均有表达(图12)。在5~7月相对表达量比较低;经过8月份的上调表达之后,*CoACOT*相对表达量基本维持在一个稳定的较高水平。这与油茶种子油脂合成规律基本相

一致(曾艳玲等2014),即5~7月为油茶种子膨大期,这个时期是种子油脂合成缓慢形成期;7月底~8月底为油茶种子油脂合成迅速累积期;9月初~10月为油茶种子油脂合成累积完成期。推测*CoACOT*基因可能调控着油茶种子的油脂合成。

讨 论

在植物中,尽管早已在叶绿体(Joyard和

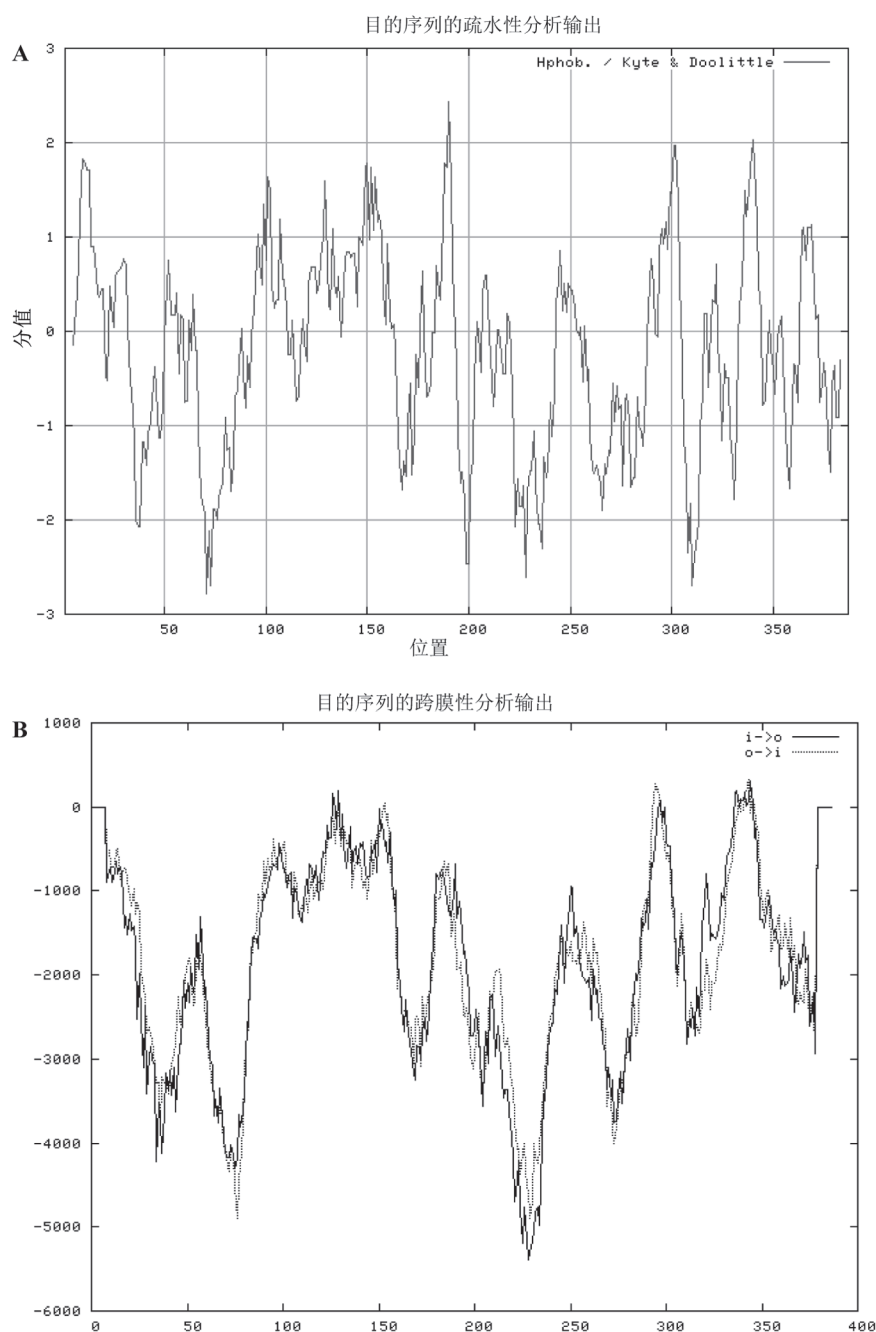


图5 CoACOT蛋白质疏水性和跨膜区预测

Fig.5 Hydrophobicity and transmembrane domain prediction of CoACOT

A: 疏水性预测; B: 跨膜区预测。

Stumpf 1980; Andrews和Keegstra 1983)和内质网(Murphy等1984)上证明了ACOT基因活性的存在,但对植物ACOT的生理功能的研究相对较少。从拟南芥中克隆到的ACH2基因是首次克隆到的植物ACOT基因(Tilton等2004),对拟南芥不同组织ACH2的生化活性和表达模式分析可知,尽管

ACH2具有ACOT的生理特征共性(具有过氧化物酶体信号序列-SKL_{COOH}和具有3个保守的催化残基等),但它并不像目前已知的真核生物ACOT一样参与脂肪酸的氧化,说明植物中的ACOT具有自己独特的生理功能。同源比对发现,ACH2的N端的129个氨基酸完全特异于ACOT的TesB家族,但在

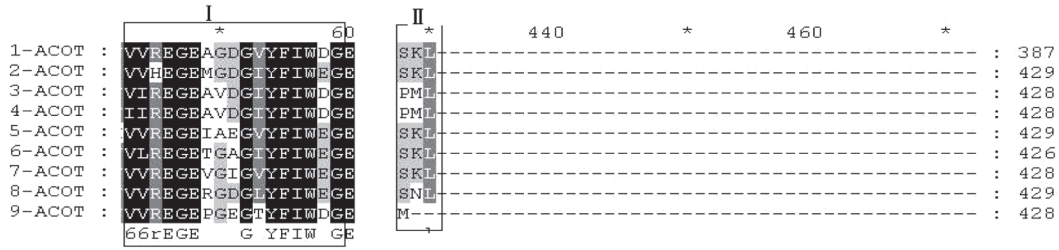


图6 CoACOT与其他植物ACOT蛋白质序列的多重比较

Fig.6 Multiple comparisons between CoACOT and other plant ACOTs

1-ACOT: 油茶(*Camellia oleifera*, CoACOT), KJ910339; 2-ACOT: 葡萄(*Vitis vinifera*, VvACOT), XP_002273474.1; 3-ACOT: 番茄(*Solanum lycopersicum*, SlACOT), XP_004229899.1; 4-ACOT: 马铃薯(*Solanum tuberosum*, StACOT), XP_006339561.1; 5-ACOT: 蓖麻(*Ricinus communis*, RcACOT), XP_002511851.1; 6-ACOT: 黄瓜(*Cucumis sativus*, CsACOT), XP_004133866.1; 7-ACOT: 草莓(*Fragaria vesca* subsp. *vesca*, FvACOT), XP_004306789.1; 8-ACOT: 大豆(*Glycine max*, GmACOT), XP_003521006.1; 9-ACOT: 鹰嘴豆(*Cicer arietinum*, CaACOT), XP_004510792.1; I: cNMP结合域保守序列; II: 保守三联肽。

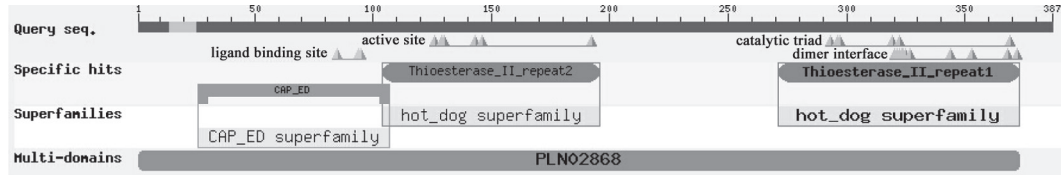


图7 CoACOT的氨基酸保守区

Fig.7 The conserved domain of CoACOT

CAP_ED superfamily: CAP转录因子超家族; PLNO2868: 脂酰CoA 硫酯酶家族蛋白。

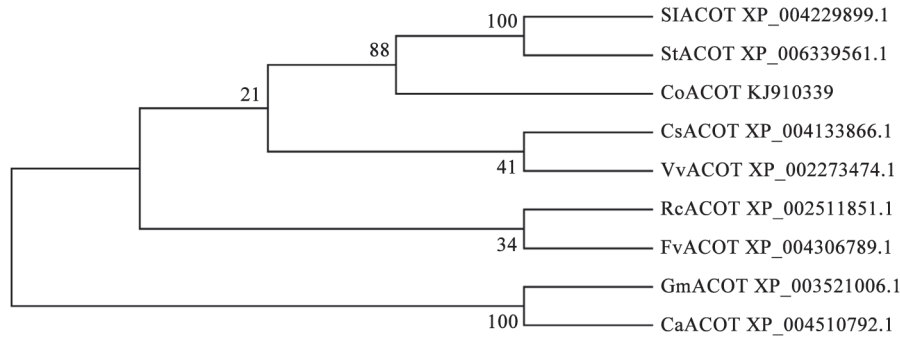


图8 CoACOT与其他植物ACOTs的聚类分析

Fig.8 Phylogenetic analysis of CoACOT and other plant ACOTs

SIACOT: 番茄; StACOT: 马铃薯; CoACOT: 油茶; CsACOT: 黄瓜; VvACOT: 葡萄; RcACOT: 蓖麻; FvACOT: 草莓; GmACOT: 大豆; CaACOT: 鹰嘴豆。

植物中是保守的, 这预示研究植物中ACOT的N端域的功能可能是了解植物过氧化物酶体ACOT生理功能的重要一步。也有研究表明, ACOT可能通过调节胞内酰基CoA和FA的浓度参与了其他的代谢途径, 包括植物激素茉莉酸的合成(Mcconn和Browse 1996; Turner等2002)和植烷酸的氧化(Jones和Gould 2000)等。本实验在木本油料作物油茶上

首次克隆到CoACOT基因, 并成功地构建表达载体且进行了表达特征的初步分析。初步预测获得的油茶CoACOT蛋白属于hotdog-fold超蛋白家族中的ACOT 8蛋白家族, 具有该蛋白家族的基本特征, 如具有环核苷酸结合域(cAMP结合域、cNMP结合域及类似于RmlC-like jelly roll fold结合域等)(Dillon和Bateman 2004; Forwood等2007); C端具有

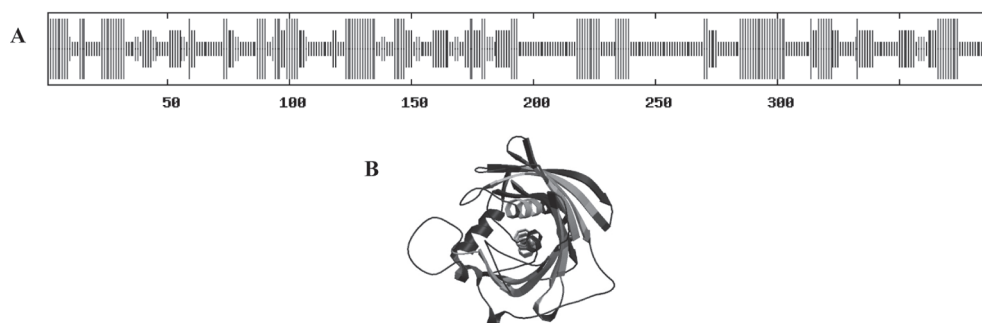


图9 CoACOT蛋白质的结构预测
Fig.9 Structure predictions of CoMCAT
A: 二级结构; B: 三级结构。

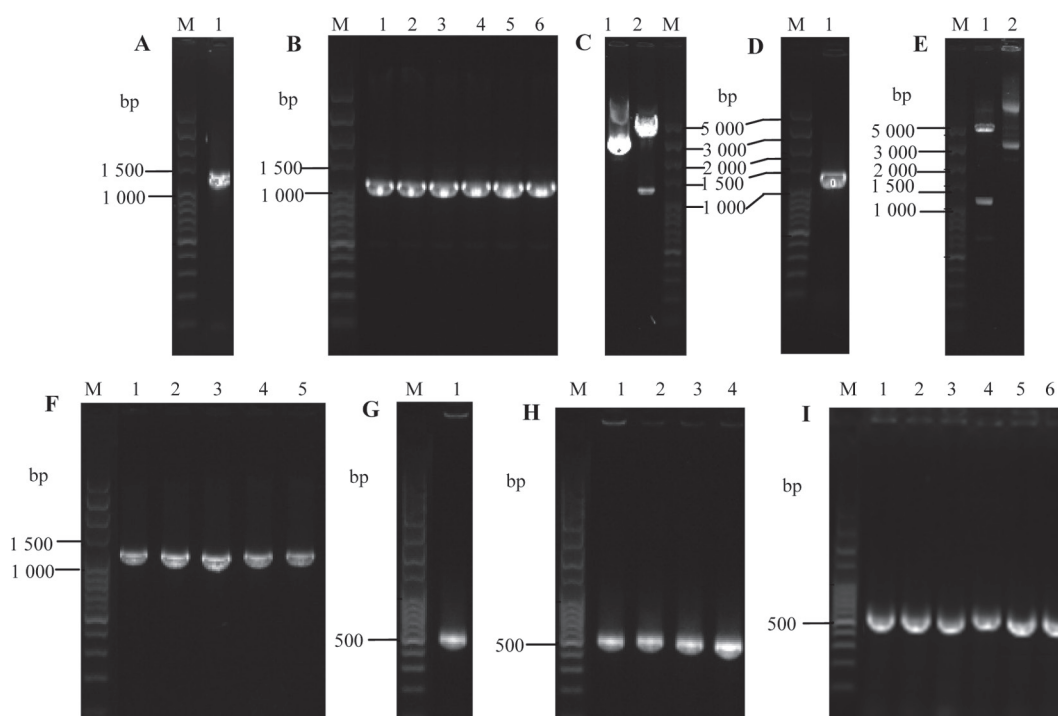


图10 *CoACOT*基因载体构建电泳图

Fig.10 Agarose gel electrophoresis results of constructed vectors of *CoACOT*

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

保守的三联肽“SKL”, 属于过氧化物酶体功能蛋白 (Jones等1999; Hunt等2002, 2006; Hunt和Alexson 2002; Westin等2007; Buch等2009)。荧光定量分析表明, 该基因在油茶种子的油脂合成期(8月份)上调表达, 上调表达之后*CoACOT*基因的相对表达量维持在相对较高的水平, 这不仅与油茶种子油脂

合成规律基本相一致(曾艳玲等2014), 还可能说明了*CoACOT*作为一种脂肪酸代谢过程中的辅助酶, 在油茶种子的油脂合成过程中是管家基因, 通过维持胞内脂酰CoA、FFA和CoASH等的水平为生物体的油脂合成提供基本原料, 从而调控油茶种子油脂合成过程(Hunt和Alexson 2002, 2008; Poirier等

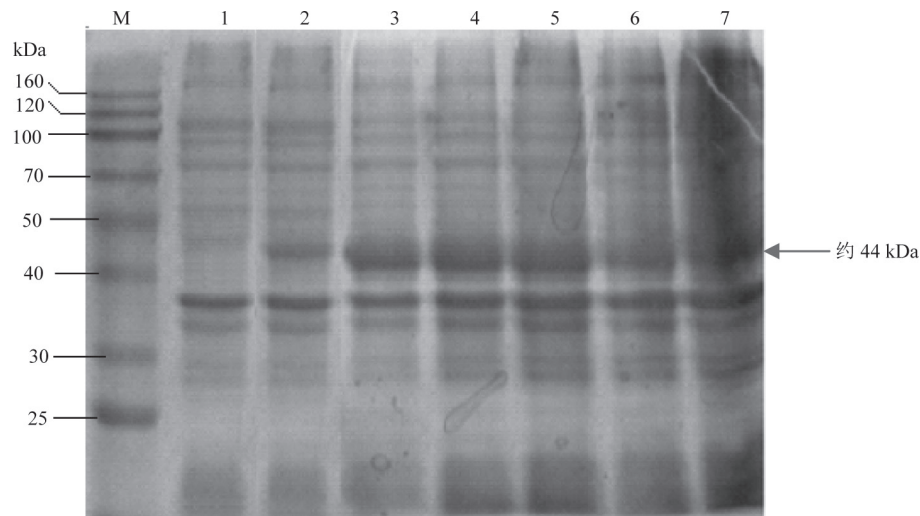
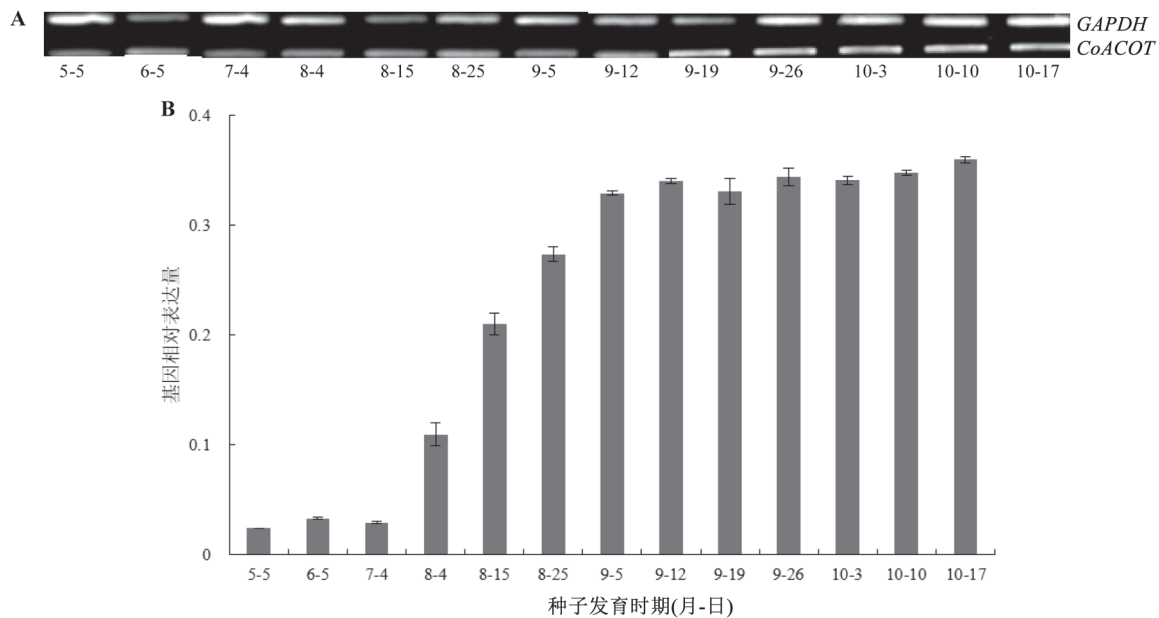


图11 pET30a-CoACOT表达蛋白的SDS-PAGE分析

Fig.11 SDS-PAGE analysis of expression proteins of pET30a-CoACOT

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12 *CoACOT*在不同种子发育时期的转录水平Fig.12 Transcription levels of *CoACOT* in different stages of seed

A: 半定量多重RT-PCR; B: 实时荧光定量PCR。

2006; Kirkby等2010); 通过原核表达系统获得表观分子量约为44 kDa的表达产物, 这同已获得的基因家族的表达产物相一致(Hunt和Alexson 2008)。这些研究为今后展开*CoACOT*基因在调控油脂的合成机理, 以及通过分子遗传育种手段提高油茶含油率奠定分子生物学的理论基础。

本文获得的ACOT正是调节油脂特征的这样

一类酶, 未来通过展开该基因的启动子研究、报告基因研究以及它的催化活性与其催化底物与产物[如各种类型脂酰CoA (直链CoA、支链CoA和羟酰CoA)和油酸代谢中间物CoA酯等]的靶向研究、对*ACOT*突变体研究及其酶活性的生化研究, 也将会促进*ACOT*基因在调节油脂代谢途径上的功能了解。植物ACOT的研究重点主要集中在同

工酶特征上, 这将为了解ACOT如何促进脂酰辅酶A的代谢途径奠定基础, 也将会进一步揭示ACOT在生物体上的功能。

参考文献

- 廖书娟, 吉当玲, 童荣华(2005). 茶油脂脂肪酸组成及其营养保健功能. *粮食与油脂*, (6): 7~9
- 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
- Alexson SEH, Osmundsen H, Berge RK (1989). The presence of acyl-CoA hydrolase in rat brown-adipose-tissue peroxisomes. *Biochem J*, 262: 41~46
- Andrews J, Keegstra K (1983). Acyl-CoA synthetase is located in the outer membrane and acyl-CoA thioesterase in the inner membrane of pea chloroplast envelopes. *Plant Physiol*, 72: 735~740
- Berge RK, Skrede S, Farstad M (1981). Effects of clofibrate on the intracellular localization of palmitoyl-CoA hydrolase and palmitoyl-L-carnitine hydrolase in rat liver. *FEBS Lett*, 124: 43~47
- Buch C, Hunt MC, Alexson SEH, Hallberg E (2009). Localization of peroxisomal matrix proteins by photobleaching. *Biochem Biophys Res Commun*, 388: 355~359
- Dillon SC, Bateman A (2004). The Hotdog fold, wrapping up a superfamily of thioesterases and dehydratases. *BMC Bioinformatics*, 5: 109
- Faergeman NJ, Knudsen J (1997). Role of long-chain fatty acyl-CoA esters in the regulation of metabolism and cell signaling. *Biochem J*, 323: 1~12
- Forman BM, Chen J, Evans RM (1997). Hypolipidemic drugs, polyunsaturated fatty acids, and eicosanoids are ligands for peroxisome proliferator-activated receptors α and β . *Proc Natl Acad Sci USA*, 94: 4312~4317
- Forwood JK, Thakur AS, Guncar G, Marfori M, Mouradov D, Meng W, Robinson J, Huber T, Kellie S, Martin JL et al (2007). Structural basis for recruitment of tandem hotdog domains in acyl-CoA thioesterase 7 and its role in inflammation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 104: 10382~10387
- Gergely J, Hele P, Ramakrishnan CV (1952). Succinyl and acetyl coenzyme A deacylases. *J Biol Chem*, 3: 23~35
- Hertz R, Magenheimer J, Berman I, Bar-Tana J (1998). Fatty acyl-CoA thioesters are ligands of hepatic nuclear factor-4 α . *Nature*, 392: 512~516
- Holroyd C, Erdmann R (2001). Protein translocation machineries of peroxisomes. *FEBS Lett*, 501: 6~10
- Huhtinen K, O'Byrne J, Lindquist PJG, Contreras JA, Alexson SHE (2002). The peroxisome proliferator-induced cytosolic type I acyl-CoA thioesterase (CTE-I) is a Serine-Histidine-Aspartic acid α/β hydrolase. *J Biol Chem*, 277: 3424~3432
- Hunt MC, Alexson SHE (2002). The role acyl-CoA thioesterases play in mediating intracellular lipid metabolism. *Prog Lipid Res*, 41: 99~130
- Hunt MC, Alexson SHE (2008). Novel functions of acyl-CoA thioesterases and acyltransferases as auxiliary enzymes in peroxisomal lipid metabolism. *Prog Lipid Res*, 47: 405~421
- Hunt MC, Nousiainen SEB, Huttunen MK, Orii KE, Svensson LT, Alexson SHE (1999). Peroxisome proliferator-induced long chain acyl-CoA thioesterases comprise a highly conserved novel multi-gene family involved in lipid metabolism. *J Biol Chem*, 48 (276): 34317~34326
- Hunt MC, Rautanen A, Westin MAK, Svensson LT, Alexson SHE (2006). Analysis of the mouse and human acyl-CoA thioesterase (ACOT) gene clusters shows that convergent, functional evolution results in a reduced number of human peroxisomal ACOTs. *FASEB J*, 20 (11): 1855~1864
- Hunt MC, Solaas K, Kase BF, Alexson SHE (2002). Characterization of an acyl-CoA thioesterase that functions as a major regulator of peroxisomal lipid metabolism. *J Biol Chem*, 277: 1128~1138
- Hunt MC, Yamada J, Maltais LJ, Wright MW, Podesta EJ, Alexson SHE (2005). A revised nomenclature for mammalian acyl-CoA thioesterases/hydrolases. *J Lipid Res*, 46: 2029~2032
- Ishizuka M, Toyama Y, Watanabe H, Fujiki Y, Takeuchi A, Yamasaki S, Yuasa S, Miyazaki M, Nakajima N, Taki S et al (2004). Overexpression of human acyl-CoA thioesterase upregulates peroxisome biogenesis. *Exp Cell Res*, 297 (1): 127~141
- Jones JM, Gould SJ (2000). Identification of PTE2, a human peroxisomal long-chain acyl-CoA thioesterase. *Biochem Biophys Res Commun*, 275: 33~240
- Jones JM, Nau K, Geraghty MT, Erdmann R, Gould SJ (1999). Identification of peroxisomal acyl-CoA thioesterases in yeast and humans. *J Biol Chem*, 274: 9216~9223
- Joyard J, Stumpf PK (1980). Characterization of an acyl-coenzyme A thioesterase associated with the envelope of spinach chloroplasts. *Plant Physiol*, 65: 1039~1043
- Kal AJ, Hetteema EH, van den BM, Groot KM, van Ijlst L, Distel B, Tabak HF (2000). *In silico* search for genes encoding peroxisomal proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell Biochem Biophys*, 32: 1~8
- Kirkby B, Roman N, Kobe B, Kellie S, Forwood JK (2010). Functional and structural properties of mammalian acyl-coenzyme A thioesterases. *Prog Lipid Res*, 49: 366~377
- Kliwer SA, Sundseth SS, Jones SA, Brown PJ, Wisely GB, Koble CS, Devchand P, Wahli W, Willson TM, Lenhard JM et al (1997). Fatty acids and eicosanoids regulate gene expression through direct interactions with peroxisome proliferator-activated receptors α and β . *Proc Natl Acad Sci USA*, 94: 4318~4323
- Lee KY, Schulz H (1979). Isolation, properties, and regulation of a mitochondrial acyl coenzyme A thioesterase from pig heart. *J Biol Chem*, 254: 4516~4523
- Li J, Derewenda U, Dauter Z, Smith S, Derewenda ZS (2000). Crystal structure of the *Escherichia coli* thioesterase II, a homolog of the human Nef binding enzyme. *Nat Struct Biol*, 7: 555~559
- Libertini LJ, Smith S (1978). Purification and properties of a thioesterase from lactating rat mammary gland which modifies the

- product specificity of fatty acid synthetase. *J Biol Chem*, 253: 1393~1401
- Mcconn M, Browse J (1996). The critical requirement for linolenic acid is pollen development, not photosynthesis, in an *Arabidopsis* mutant. *Plant Cell*, 8: 403~416
- Miyazawa S, Furuta S, Hashimoto T (1981). Induction of a novel long-chain acyl-CoA hydrolase in rat liver by administration of peroxisome proliferators. *Eur J Biochem*, 117: 425~430
- Murphy DJ, Mukherjee KD, Latzko E, Woodrow IE (1984). Solubilization, purification and kinetic properties of three membrane-bound long-chain acyl-coenzyme-A thioesterases from microsomes of photosynthetic tissue. *Eur J Biochem*, 142: 43~48
- Naggert J, Narasimhan ML, DeVeaux L, Cho H, Randhawa ZI, Cronan JE, Green BN, Smith S (1991). Cloning, sequencing, and characterization of *Escherichia coli* thioesterase II. *J Biol Chem*, 266: 11044~11050
- Nardini M, Dijkstra BW (1999). α/β hydrolase fold enzymes, the family keeps growing. *Curr Opin Struct Biol*, 9: 732~737
- Poirier Y, Antonenkov VD, Glumoff T, Hiltunen JK (2006). Peroxisomal β -oxidation-A metabolic pathway with multiple functions. *BBA-Mol Cell Res*, 1763: 1413~1426
- Spencer AK, Greenspan AD, Cronan JE (1978). Thioesterases I and II of *Escherichia coli*. Hydrolysis of native acyl-acyl carrier protein thioesters. *J Biol Chem*, 253: 5922~5926
- Turner JG, Ellis C, Devoto A (2002). The jasmonate signal pathway. *Plant Cell*, 14: 153~164
- Tilton GB, Schockey JM, Browse J (2004). Biochemical and molecular characterization of ACH2, an acyl-CoA thioesterase from *Arabidopsis thaliana*. *J Biol Chem*, 279: 7487~7494
- Wanders RJK, Vreken P, Den Boer FAW, Van Gennip AH, Ijlst L (1994). Disorders of mitochondrial fatty acyl-CoA β -oxidation. *J Inher Metab Dis*, 22: 442~487
- Westin MAK, Alexson SEH, Hunt MC (2004). Molecular cloning and characterization of two mouse peroxisome proliferator-activated receptor α (PPAR α)-regulated peroxisomal Acyl-CoA thioesterases. *J Biol Chem*, 279 (21): 21841~21858
- Westin MAK, Hunt MC, Alexson SHE (2007). Peroxisomes contain a specific phytanoyl-CoA/pristanoyl-CoA thioesterase acting as a novel auxiliary enzyme in α - and β -oxidation of methyl-branched fatty acids in mouse. *J Biol Chem*, 282 (37): 26707~26716
- Wilcke M, Alexson SHE (1994). Characterization of acyl-CoA thioesterase activity in isolated rat liver peroxisomes. *Euro J Biochem*, 222 (3): 803~811
- Zhuravleva E, Gut H, hynx D, Marcellin D, Bleck CKE, Genoud C, Cron P, Keusch JJ, Dummler B, Esposti MD et al (2012). Acyl-CoA thioesterase Them5/Acot15 is involved in cardioliipin remodeling and fatty liver development. *Mol Cell Biol*, 32: 2685~2697