

# 大肠杆菌乙酰辅酶 A 羧化酶 *accD* 亚基表达载体的构建及遗传转化研究

王伏林<sup>1,2</sup> 郎春秀<sup>2</sup> 刘仁虎<sup>2</sup> 吴关庭<sup>2</sup> 冯都华<sup>2,3</sup> 陈锦清<sup>2</sup> 石春海<sup>1</sup>

(1. 浙江大学农学系,浙江 杭州 310029;2. 浙江省农业科学院病毒学与生物技术研究所,浙江 杭州 310021;  
3. 浙江师范大学化学与生命科学学院,浙江 金华 321004)

**摘要:**为探索大肠杆菌异质型乙酰辅酶 A 羧化酶 (ACCase) 的  $\beta$ -CT 亚基 *accD* 基因对油料作物含油量的影响,将目的基因 *E. coli accD* (*eaccD*) 与拟南芥 Rubisco 小亚基 (*rbcS*) 转运肽基因融合,构建以油菜 *Napin* 启动子驱动的种子特异表达载体。本试验应用农杆菌介导法,将该表达载体转入油菜,通过 PCR 检测获得了 7 个阳性转基因株系,RT-PCR 检测其中 3 株,证明 *eaccD* 基因在转基因株系的种子中转录,在转基因植株叶片中不转录,说明该表达载体转入油菜中能引起植株种子 *eaccD* 基因的特异表达。同时分析还表明转基因株系的含油量与对照植株相比提高约 9%。

**关键词:**油菜;ACCase;*eaccD*;超量表达;含油量

## *Escherichia coli* ACETYL-CoA CARBOXYLASE (ACCase) *accD* SUBUNIT GENE EXPRESSION VECTOR CONSTRUCTION AND GENETIC TRANSFORMATION

WANG Fu-lin<sup>1,2</sup> LANG Chun-xiu<sup>2</sup> LIU Ren-hu<sup>2</sup> WU Guan-ting<sup>2</sup>  
FENG Du-hua<sup>2,3</sup> CHEN Jin-qing<sup>2</sup> SHI Chun-hai<sup>1</sup>

(1. Department of Agronomy, Zhejiang University, Hangzhou, Zhejiang 310029;  
2. Institute of Virology and Biotechnology, Zhejiang Academy of Agricultural Sciences, Hangzhou, Zhejiang 310021;  
3. College of Chemistry and Sciences, Zhejiang Normal University, Jinhua, Zhejiang 321004)

**Abstract:** To investigate the influence of *Escherichia coli accD* (*eaccD*) gene on *Brassica* fatty acid content, an expression vector was constructed by fusing the *Arabidopsis rubisco* small subunit (*rbcS*) transit peptide and the *Brassica* seed specific promoter *Napin* to *eaccD* gene. The expression vector was transformed into *Brassica napus* via *Agrobacterium*-mediated transformation and seven transgenic plants were obtained. The *eaccD* transcript was confirmed by RT-PCR analysis. The data showed that *eaccD* was transcribed in seeds but not in leaves. This demonstrated that the expression vector can result in the specific over expression of *eaccD* in immature seeds of *Brassica*. Seed oil contents were detected by Soxhlet extraction. The total oil content of transgenic seeds was approximately 9% higher than that of the wild plant. Therefore, expression of *eaccD* in *Brassica* could significantly increase the fatty acid content.

**Key words:** *Brassica napus*; Acetyl-CoA carboxylase; *eaccD*; overexpression; fatty acid content

油菜是世界主要的油料作物之一。长期以来,我国油菜生产中存在的主要问题之一是菜籽含油量整体

收稿日期:2011-02-10 接受日期:2011-09-13

基金项目:国家自然科学基金项目(No. 30430450 和 No. 30370910),浙江省自然科学基金项目(No. Y305251)

作者简介:王伏林(1974-),女,湖北荆州人,硕士研究生,在职博士生,研究方向为植物生物技术。E-mail: hzwdy74@163.com

通讯作者:石春海(1956-),男,浙江新昌人,博士,教授,研究方向为水稻遗传育种。E-mail: chhshi@zju.edu.cn

陈锦清(1953-),男,浙江瑞安人,博士,研究员,研究方向为植物代谢基因工程。E-mail: j. q. chen28@163.com

不高,与国外进口菜籽相比有较大差距。虽然近几年油菜育种取得了较大进展,已有一些含油量较高的新品种在生产上推广应用,但提高种子含油量依然是我国油菜育种的重要目标。目前许多科学家通过正向遗传学手段调控油菜籽脂肪酸合成途径中的关键酶乙酰辅酶 A 羧化酶 (ACCCase) 基因来提高脂肪酸含量。在生物体中 ACCCase 有两种类型,一种是异质型 (heteromeric),也称多亚基或原核型 ACCCase,存在于细菌及双子叶植物和非禾本科单子叶植物的质体中<sup>[1, 2]</sup>。异质型 ACCCase 包含 4 个亚基,即生物素羧化酶 (biotin carboxylase, BC)、生物素羧基载体蛋白 (biotin carboxyl carrier protein, BCCP) 以及羧基转移酶 (carboxyltransferase, CT) 的 2 个亚基  $\alpha$ -CT 和  $\beta$ -CT。另一类 ACCCase 称为同质型 (homomeric),亦称多功能或真核型,存在于动物<sup>[3]</sup>、酵母<sup>[4, 5]</sup>、藻类<sup>[6]</sup> 及植物<sup>[7, 8]</sup> 的胞质溶胶中,它的一条多肽链包含着原核型 ACCCase 所有的 4 个亚基 (BC、BCCP、CT $\alpha$  和 CT $\beta$ ),形成了 3 个功能域 (CT $\alpha$  和 CT $\beta$  为一个功能域)。在生物体中,质体和胞质溶胶中的 ACCCase 催化乙酰辅酶 A 产生丙二酰辅酶 A 的反应,但它们在植物体中的功能并不完全相同。质体 ACCCase 催化产生的丙二酰辅酶 A 用于脂肪酸的从头生物合成,而胞质溶胶中 ACCCase 催化产生的丙二酰辅酶 A 则用于脂肪酸链的延伸及类黄酮等次生代谢产物的合成。

ACCCase 为脂肪酸生物合成限速酶,在基因工程提高油料作物油脂含量研究中具有重要地位。但迄今为止在这方面的研究成效并不大,主要原因是由于异质型 ACCCase 由 4 个亚基组成,这些亚基分别由 3 个核基因和 1 个叶绿体基因编码。通过基因工程使这些基因在目标生物中同时表达、定位于质体并组装成一种有活性的结构具有很大的难度。同质型 ACCCase 属于单亚基酶,虽然遗传操纵相对简单,但可能存在的反馈抑制作用会限制油脂含量的提高。本试验将大肠杆菌异质型 ACCCase 亚基基因 *eaccD* 定位于油菜种子胞质质体中,目的是增加脂肪酸的从头生物合成能力,以研究该亚基基因在提高油菜籽含油量中的作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 供试植物材料、菌株和载体 用于遗传转化的受体材料为本实验室育成的甘蓝型油菜 (*Brassica napus* L.) “超油 2 号”。大肠杆菌 DH5 $\alpha$ 、农杆菌 EHA105 及植物表达载体 pFGC-5941 由浙江省农业科

学院病毒学与生物技术研究所保存,克隆载体 pMD18-T 购自 TaKaRa 公司。

1.1.2 酶和化学试剂 限制性内切酶、T<sub>4</sub> DNA 连接酶、ExTaq、dNTP、Marker 等均购自 TaKaRa 公司,逆转录试剂盒购自 Promega 公司;琼脂糖凝胶电泳回收试剂盒购自上海生工生物工程公司。其他试剂均为国产分析纯。

### 1.2 方法

1.2.1 引物设计 用于载体构建的引物根据 *E. coli* ACCCase 的  $\beta$ -CT 亚基基因 *eaccD* 基因 (登录号 M68934) 全长序列设计,以 *E. coli* DH5 $\alpha$  的基因组 DNA 为模板扩增 *eaccD* 基因全长,扩增 *eaccD* 的条件为:94 $^{\circ}$ C 5min;94 $^{\circ}$ C 1min,55 $^{\circ}$ C 1min,72 $^{\circ}$ C 2min,30 个循环;72 $^{\circ}$ C 10min。本试验所用的启动子为种子特异表达启动子 Napin,以油菜叶片总 DNA 为模板,扩增条件为 94 $^{\circ}$ C 5min;94 $^{\circ}$ C 1min,50 $^{\circ}$ C 1min,72 $^{\circ}$ C 2min,30 个循环;72 $^{\circ}$ C 10min。以已发表的拟南芥 *Rbcs* 小亚基 (登录号 AY065101) 序列设计引物 Rbestp-F/ Rbestp-R,拟南芥叶片 RNA 的提取采用 Trizol 试剂盒的方法进行,取 0.1g 幼嫩的植物叶片,液氮迅速研磨后加入 1ml Trizol 试剂充分摇匀,最后溶于 50 $\mu$ l DEPC 处理水中。取 2 $\mu$ g 总 RNA,以 oligo (dT)<sub>18</sub> 和 6 碱基随机引物为引物合成 cDNA 第一链。随后采用两步 PCR 法扩增 *Rbcs* 转运肽,扩增条件:94 $^{\circ}$ C 5min;94 $^{\circ}$ C 1min,72 $^{\circ}$ C 1.5min,30 个循环;72 $^{\circ}$ C 10min (表 1)。

1.2.2 植物表达载体的构建 将克隆到的启动子 *Napin*、转运肽 *Rbcs* 小亚基基因、*eaccD* 分别克隆到载体 pMD18-T 中,将 pMD-*Napin* 用 *Mlu* I / *Xba* I 酶切,与相同双酶切的 pMD-*Rbcs* 连接,组成中间载体 pMD-*Napin-Rbcs*,中间载体用 *Apa* I / *Xba* I 酶切,与相同酶切的 pMD-*eaccD* 链接,形成 pMD-*Napin-Rbcs-eaccD*,命名为 pMD-NTD。由于 *Mun* I 与 *Eco*R I 是同尾酶,所以将 pMD-NTD 用 *Mun* I / *Xba* I 双酶切回收小片段,将 pFGC-5941 用 *Eco*R I / *Xba* I 酶切链接,构建成 pFGC-*Napin-Rbcs-accD*,命名为 pFGC-NTD。将该重组质粒转化根癌农杆菌 EHA105 菌株,于 -70 $^{\circ}$ C 下保存用于油菜的转化。其表达载体的结构图和相关酶切位点如图 1 所示。

1.2.3 农杆菌介导的遗传转化 用牙签挑取农杆菌新鲜菌落在含 Km 50mg / L 及 Rif 50mg / L 的 YEB 液体培养基中 28 $^{\circ}$ C 振荡培养,至对数分裂中期 (OD<sub>600</sub> = 0.3)。取菌液于 12 000r / min 离心 1min,用 MS 培养基离心洗涤一次后稀释 10 倍。将培养好的油菜下胚轴剪成约 1cm 浸入上述菌液 1min,灭菌滤纸吸干后平

铺于 MS 培养基上暗培养 2d,待下胚轴切口处被农杆菌感染后取出,在 MS 液体培养基中洗净后培养在含羧苄青霉素 (Cb)500mg/L 的 MS 培养基上。1 周后转入含 Cb 500mg/L 及 Basta 5mg/L 的 MS 分化培养基

上,每 2 周重复 1 次,直到抗性愈伤出现并且芽分化,计算转化频率。待芽长至 2~3cm 高时,转入含相同抗生素的生根培养基诱导生根,2 周后出根长成完整小植株,即可移入土中进行常规管理。

表 1 扩增各片段所用引物序列

Table 1 Primer sequence

引物名称 primer name	引物序列(5'-3') primer sequence (5'-3')	酶切位点 enzyme site	GenBank 登录号 GenBank accession number
Rbestp-F	ACGCGTACACAAAGACTAAAGAAG	<i>Mlu</i> I	AY065101
Rbestp-R	GGGCCCGGAATCGCTAAGGTCAGG	<i>Apa</i> I	
EaccD-F	GGGCCCATGAGCTGGATTGAACGAATT	<i>Apa</i> I	M68934
EaccD-R	CTCGAGTCAGGCTCAGGTTCTGATCCGG	<i>Xho</i> I	
Napin-F	CAATTGAAGCTTTCTTCATCGGTGATT	<i>Mun</i> I	J02798
Napin-R	ACGCGTGGATCCTGTATGTTTTTAATC	<i>Mlu</i> I	

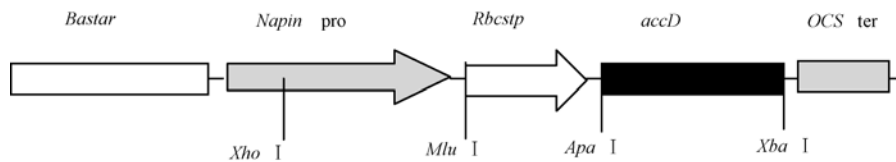


图 1 重组质粒 pFGC-NTD 结构图

Fig. 1 Recombinant vector of pFGC-NTD

1.2.4 转基因油菜的 PCR 和 RT-PCR 检测 利用 *eaccD*-F 左端引物和载体上终止子 OCS-R 右端引物对待测转基因油菜植株进行 PCR 扩增验证,扩增引物为 *eaccD*-F: GGGCCCATGAGCTGGATTGAA CGAATT, OCS-R:GTGGCGCTCTATCATAGATG。对 PCR 检测阳性株系使用 Trizol Reagent (Invitrogen) 分别提取油菜叶片和 18d 幼嫩荚果 RNA,为进一步明确目标基因在转基因植株中的表达,对转基因株系进行验证,目标基因 *eaccD* 扩增引物为 *eaccD*-F: ATGAGCTGGATTGAACGAATT, *eaccD*-R: TCAGGCC TCAGGTTCTGATCCGG。内标基因为油菜 *Actin*, *Actin* 引物为 *Actin*-F: ATGGCCGATGGTGAGGACAT, *Actin*-R: TTAGAAGCATTTCCTGTGGA。为验证外源基因对油菜内源 *accD* 基因是否产生影响,故对油菜内源 *accD* 基因进行 RT-PCR 验证。油菜内源 *accD* 基因引物为 *BnaccD*-F: ATGAGCTGGATTGAACGAATT, *BnaccD*-R: TCAGGCCTCAGGTTCTGATCCGG。

1.2.5 转基因油菜含油量测定 采用索氏抽提法测定转基因油菜种子含油量,约 2g 种子在 80℃ 烘烤后磨样,装入预先烘好的滤纸包中,105℃ 烘烤 3h 称量纸包重 (M1),准确称取约 2g 种子,放入 80℃ 烘箱 30min 后拿出研磨、包好,并置于 105℃ 烘烤 3h,称重 (M2),然后置于石油醚中浸泡过夜,后置于索氏提取器中

50℃ 回流约 1d。油脂完全浸出后,干燥残渣、105℃ 烘烤 3h 并称量 (M3)。按下式计算种子油脂含量:种子含油量 = (M2-M3) / (M2-M1) × 100%。每个样品测定 3 次,求其平均值。

## 2 结果与分析

### 2.1 启动子、拟南芥 *Rbcs* 转运肽、大肠杆菌 *eaccD* 的克隆

根据所设计的引物 *EaccD*-F/ *EaccD*-R 扩增 *E. coli* 基因组 DNA,获得 *E. coli* ACCase 基因 *eaccD* 长度为 915bp,用 *Napin*-F/*Napin*-R 引物从油菜叶片基因组中扩增得到种子特异表达启动子 *Napin*,长度为 1147bp;提取拟南芥幼嫩叶片的 RNA,逆转录后以 cDNA 为模板,利用 *Rbestp*-F/ *Rbestp*-R 引物进行 RT-PCR 扩增,获得 *Rbcs* 长度为 234bp。分析测序结果表明扩增片段与 GenBank 中对应序列同源率 100%。获得质粒载体 pMD-*eaccD*、pMD-*Napin* 和 pMD-*Rbestp*。

### 2.2 植物表达载体 pFGC-*accD* 的构建

*Mlu* I / *Xba* I 分别对载体 pMD-*Napin* 及 pMD-*Rbestp* 进行双酶切,回收 3845bp 的大片段与长度为 246bp 的 *Rbcs* 片段连接,获得中间载体 pMD-*Napin*-*rbestp*。再将中间载体用 *Apa* I / *Xba* I 双酶切,回收大

片段 4085bp, 与相同双酶切的 pMD-*eaccD* 回收的 *eaccD* 片段(长度为 927bp)连接, 得到载体 pMD-NTD; 由于目标基因 *eaccD* 中有 *EcoR* I 酶切位点, 因 *Mun* I 和 *EcoR* I 是同尾酶, 所以将 *Napin* 前带上 *Mun* I 酶切位点, 将 pMD-NTD 用 *Mun* I/*Xba* I 酶切, 与 *EcoR* I/*Xba* I 双酶切的 pFGC-5941 相连接, 获得 pFGC-NTD。由于 *Napin* 片段在 467bp 的位置有 *Xho* I 酶切位点, 而在转运肽 *Rbcstp* 和 *accD* 中没有该酶切位点, 所以本试验选用 *Xho* I/*Xba* I 双酶切对 pMD-NTD 和 pFGC-NTD 两种质粒分别进行酶切鉴定验证, 可以出现 1841bp 大小的片段, 与预期结果相符。

### 2.3 根癌农杆菌介导的油莱转化及抗除草剂再生苗的获得

按照 1.5 方法, 油菜种子萌发 5~6d 后, 剪取离生长点约 1cm 的无菌苗下胚轴作为转化逐级体进行预培养, 本试验中, 共接种外植体约 500 个, 出芽数约为 100 个, 出芽率为 20%。当绿色抗性芽长至 2cm 左右时, 将其切下转入生根培养基中进行生根, 共接种再生芽 60 个, 生根频率为 100%。待转化苗根系发育完备后, 打开组培瓶盖炼苗 2d, 然后移栽于温室中进行常规管理(图 2)。

### 2.4 转基因油菜检测

对经过 Basta 筛选获得的抗性植株利用 *eaccD*-F 左端引物和 OCS-R 右端引物进行 PCR 检测, 共检测出 7 株  $T_0$  油菜具有特异扩增带(图 3)。初步表明目的基因 *accD* 已转入到油菜基因组中。为检测 PCR 阳性株目的基因转录水平的表达情况, 分别以“超油 2 号”和转基因株系的叶片和 18d 未成熟种子进行 RT-PCR 分析。当以对照和转基因株系的幼嫩种子 cDNA 为模板时, 利用大肠杆菌 *eaccD* 基因引物 *EaccD*-F/*EaccD*-R, 对照未扩增出带, 而 3 个转基因株系都出现了目标带, 利用油菜内源的 *BnaccD* 基因片段引物, 对照和转基因株系都出现了内源目标带(图 4); 而以对照和转基因株系的叶片 cDNA 为模板时, 利用大肠杆菌 *eaccD* 基因引物, 在 3 个转基因株系和对照的叶片中都未扩增出目标带, 说明转基因 *eaccD* 基因在油菜叶片中不转录, 而在转基因株系种子中转录表达, 而内源油菜 *BnaccD* 既可在油菜种子中表达, 又能在叶片中表达(图 4)。该结果表明本试验所构建的载体转入油菜中可实现 *eaccD* 基因在籽粒中的特异表达。

### 2.5 转基因油菜的含油量测定

利用索氏提取法测定转基因植株和对照植株的

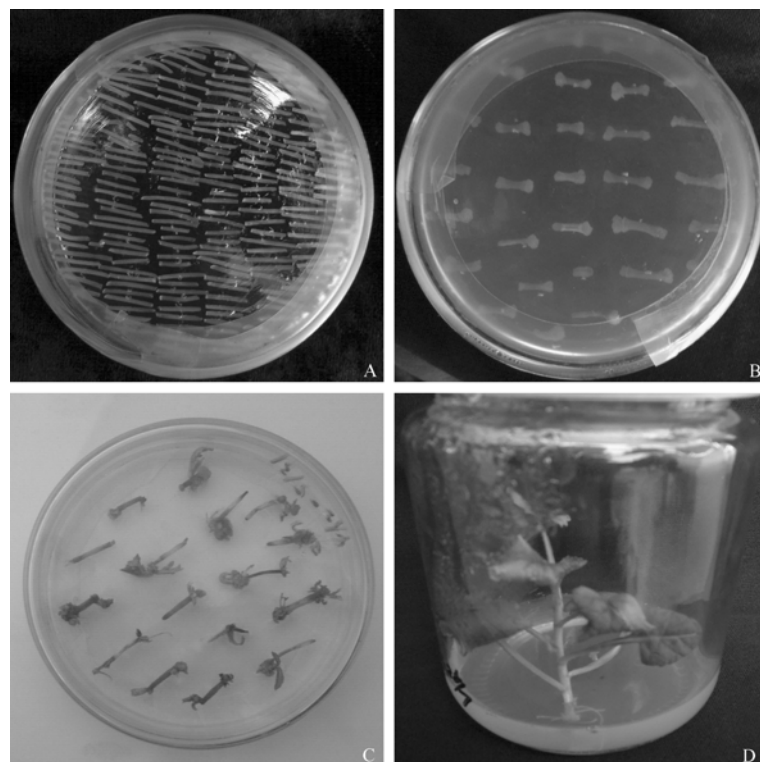


图 2 根癌农杆菌介导的油莱遗传转化

Fig. 2 *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation of oilseed rape

A: pre-cultivation; B: co-cultivation; C: regeneration; D: rooting

A: pre-cultivation; B: co-cultivation; C: regeneration; D: rooting

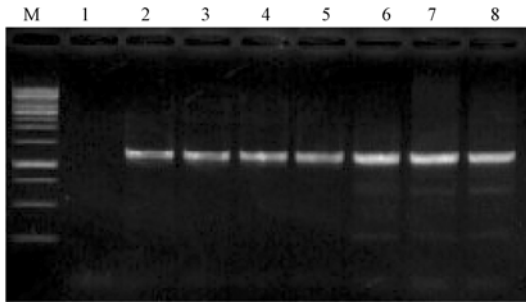
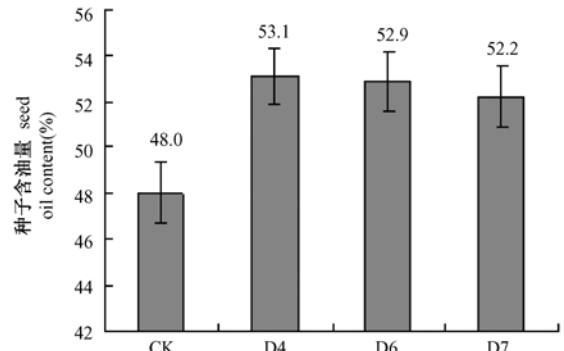


图3 转基因株系的 PCR 检测

Fig. 3 PCR detection of transgenic lines

M: 1kb Marker; 1: 对照株系; 2~7: 转基因株系

M: 1kb Marker; 1: negative control line; 2~7: transgenic lines

图5 转基因  $T_1$  代植株种子含油量测定结果Fig. 5 Seed oil content of  $T_1$  transgenic oilseed rape

CK: “超油 2 号”; D4、D6、D7: 转基因植株

CK: “chaoyou 2” control; D4, D6, D7: transgenic plants

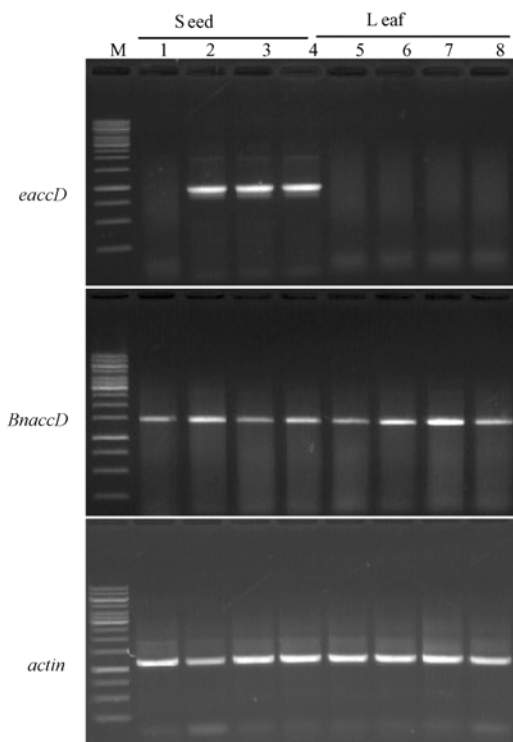


图4 转基因植株的 RT-PCR 检测

Fig. 4 Transgenic plants identification based on RT-PCR

M: 1kb marker; 1: “超油 2 号”对照材料幼嫩种子;

2~4: 转基因株系幼嫩种子; 5: “超油 2 号”

对照材料叶片; 6~8: 转基因株系叶片

M: 1kb Marker; 1: “chaoyou 2” control immature seeds;

2~4: transgenic lines' immature seeds; 5: “chaoyou 2”

control leaves; 6~8: transgenic lines, leaves

$T_1$  代种子含油量, 结果表明, 3 个转基因株系种子含油量都显著 ( $P < 0.05$ ) 高于对照植株, 说明通过超量表达 *E. coli eaccD* 基因能够提高转基因植株种子的含油量, 3 个转基因株系的平均含油量 (以干基计) 比对照高约 9% (图 5)。

### 3 讨论

本试验在构建 *eaccD* 表达载体过程中, 利用油菜种子特异表达启动子 *Napin*, 并且利用拟南芥 *Rubisco* 小亚基 *Rbcs* 转运肽片段与目标基因 *eaccD* 融合, 以期将目标基因蛋白进一步定位到油菜籽粒的质体中, 从而提高油菜含油量。通过 RT-PCR, 证明目标基因 *eaccD* 在转基因株系未成熟种子中表达, 而在转基因植株和对照植株的叶片中都不表达, 说明 *Napin* 启动子是种子特异表达启动子。 *Napin* 是芸薹属植物种子主要贮藏蛋白之一, 其编码基因有在种子中特异表达的特性。熊新华等<sup>[9]</sup>应用 *Napin* 启动子反向调控 *Fad2* 基因, 获得了高油酸含量转基因油菜。Roesler 等<sup>[10]</sup>利用 *Napin* 启动子构建拟南芥同质型 ACCase 基因的超量表达载体转化油菜, 油菜含油量增加了约 5%。本试验根据 Li 等<sup>[11]</sup>、Zhong 等<sup>[12]</sup>方法, 采用 *Rbcs* 小亚基的转运肽外加该成熟蛋白的前 24 个氨基酸作为转运肽与目标基因融合, 将目标基因蛋白转运到转基因植株种子质体中, 起到了很好的效果, 证明所用转运肽对 *eaccD* 功能的发挥有促进作用。

利用基因工程手段提高种子含油量已成为国际上植物基因工程研究的热点。由于 ACCase 是脂肪酸生物合成的限速酶, 人们期望通过超量表达 ACCase 基因, 提高其活性来调节种子含油量, 并将这一设想在油菜、大豆、芝麻、向日葵等油料作物上运用。Roesler 等<sup>[10]</sup>将油菜种子贮藏蛋白 *Napin* 特异表达启动子与拟南芥同质型 ACCase 基因 *ACC1* 融合, 在大豆 *Rubisco* SSU 转移肽的转运下, 成功实现了胞质溶胶 ACCase 在油菜叶绿体上的亚细胞定位, 获得的转基因

油菜 T<sub>1</sub> 代成熟种子中 ACCase 活性比对照提高 10 ~ 20 倍, 含油量增加 5% 并改变了脂肪酸组成。Davis 等<sup>[13]</sup> 将噬菌体 T<sub>7</sub> 强启动子与异质型大肠杆菌 ACCase 4 亚基编码基因连接 (*accB*、*accC*、*accD* 和 *accA* 依次排列), 构建成一个细菌多顺反子, 用其转化大肠杆菌后, 脂肪酸含量增加了 6 倍。Klaus 等<sup>[14]</sup> 通过超量表达拟南芥同质型 *ACC1*, 转化马铃薯后含油量比对照增加了 5 倍。由于 ACCase 是四亚基复合酶, 且分别由细胞核和叶绿体基因编码, 结构与 1,5-二磷酸核酮糖羧化酶/加氧酶 (Rubisco) 类似, 采用基因工程方法使这些基因在目标生物中同时表达并组装成一种有活性的结构存在很大的难度。科学家们在研究 ACCase 的各亚基中发现叶绿体编码的 *accD* 亚基基因是该复合酶的限制因子。Madoka 等<sup>[15]</sup> 在烟草质体中超量表达 *accD* 基因提高了质体中 ACCase 水平及转基因植株叶子中脂肪酸的含量, 该结果表明 *accD* 基因编码的 β-CT 亚基是 ACCase 基因的限制因子, 且 *accD* 亚基对作物的含油量起着重要调节作用。Kode 等<sup>[16]</sup> 利用同源重组的方法剔除烟草 *accD*, 发现剔除 *accD* 基因的植株叶片出现白绿色斑点或叶片减少, 证明质体 *accD* 基因也对植物叶片生长起重要作用。Bryant 等<sup>[17]</sup> 研究发现拟南芥叶绿体 *accD* 缺失或突变导致胚致死, 而油菜或玉米中由于核内重复基因的补偿作用, 叶绿体 *accD* 缺失并不会导致胚致死。本实验室构建了 *E. coli* 的 ACCase 的各亚基基因的超量表达载体分别进行油菜转化, 发现 *eaccD* 基因对转基因油菜含油量的贡献最大。

#### 参考文献:

- [ 1 ] Kondo H, Shiratsuchi K, Yoshimoto T, Masuda T, Kitazono A, Tsuru D, Anai M, Sekiguchi M, Tanabe T. Acetyl-CoA carboxylase from *Escherichia coli*: gene organization and nucleotide sequence of the biotin carboxylase subunit [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1991, 88: 9730 - 9733
- [ 2 ] Li S J, Cronan J E. The gene encoding the biotin carboxylase subunit of *Escherichia coli* acetyl-CoA carboxylase [J]. J Biol Chem, 1992, 267: 855 - 863
- [ 3 ] Takai T, Yokoyama C, Wada K, Tanabe T. Primary structure of chicken liver acetyl-CoA carboxylase deduced from cDNA sequence [J]. J Biol Chem, 1998, 263: 2651 - 2657
- [ 4 ] Walid A F, Chirala S S, Wakil S J. Cloning of the yeast *FAS3* gene and primary structure of yeast acetyl-CoA carboxylase [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1992, 89: 4534 - 4538
- [ 5 ] Hasslacher M, Ivessa A S, Paltauf F, Kohlwein S D. Acetyl-CoA carboxylase from yeast is an essential enzyme and is regulated by factors that control phospholipid metabolism [J]. J Biol Chem, 1993, 268: 10946 - 10952
- [ 6 ] Roessler P, Ohlrogge J B. Cloning and characterization of the gene that encodes acetyl-coenzyme A carboxylase in the Alga *Cyclotella cryptica* [J]. J Biol Chem, 1993, 268: 19254 - 19259
- [ 7 ] Shorosh B S, Dixon R A, Ohlrogge J B. Molecular cloning, characterization, and elicitation of acetyl-CoA carboxylase from alfalfa [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1994, 91: 4323 - 4327
- [ 8 ] Yanai Y, Kawasaki T, Shimada H, Wurtele E S, Nikolau B J, Ichikawa N. Genomic organization of 251 kDa acetyl-CoA carboxylase genes in *Arabidopsis*: tandem gene duplication has made two differentially expressed isozymes [J]. Plant Cell Physiol, 1995, 36: 779 - 787
- [ 9 ] 熊兴华, 官春云, 王学军, 周小云, 李家洋. 甘蓝型油菜 *Fad2* 基因片段的克隆和反义表达载体的构建 [J]. 中国油料作物学报, 2002, 24(2): 1-4
- [ 10 ] Roesler K, Shintani D, Savage L, Boddupalli S, Ohlrogge J. Targeting of the *Arabidopsis* homomeric acetyl-coenzyme A carboxylase to plastids of rapeseeds [J]. Plant Physiol, 1997, 113: 75 - 81
- [ 11 ] Lee K H, Kim D H, Lee S W, Kim Z H, Hwang I. In vivo import experiments in protoplasts reveal the importance of the overall context but not specific amino acid residues of the transit peptide during import into chloroplasts [J]. Molecules and Cells, 2002, 14 (3): 388 - 397
- [ 12 ] Zhong H, Teymouri F, Chapman B, Maqbool SH, Sabzikar R, El-Maghraby Y, Dale B, Sticklen M B. The pea (*Pisum sativum* L.) *rbcS* transit peptide directs the Alcaligenes eutrophus polyhydroxybutyrate enzymes into the maize (*Zea mays* L.) chloroplasts [J]. Plant Science, 2003, 165: 455 - 462
- [ 13 ] Davis M S, Solbiati J, Cronan J E. Overproduction of Acetyl-CoA carboxylase activity increases the rate of fatty acid biosynthesis in *Escherichia coli* [J]. The Journal of Biological Chemistry, 2000, 275, 37: 28593 - 28598
- [ 14 ] Klaus D, Ohlrogge J B, Neuhaus H E, Dormann P. Increased fatty acid production in potato by engineering of acetyl-CoA carboxylase [J]. Planta, 2004, 219: 389 - 396
- [ 15 ] Madoka Y, Tomizawa K, Mizoi J, Nishida I, Nagano Y, Sasaki Y. Chloroplast transformation with modified *accD* operon increases acetyl-CoA carboxylase and causes extension of leaf longevity and increase in seed yield in tobacco [J]. Plant Cell Physiol, 2002, 43 (12): 1518 - 1525
- [ 16 ] Kode V, Mudd E A, Iamtham S, Day A. The tobacco plastid *accD* gene is essential and is required for leaf development [J]. The Plant Journal, 2005, 44: 237 - 244
- [ 17 ] Bryant N, Lloyd J, Sweeney C, Myoung F, Meinke D. Identification of nuclear genes encoding chloroplast-localized proteins required for embryo development in *Arabidopsis* [J]. Plant Physiol, 2011, 155: 1678 - 1689

(责任编辑 王媛媛)