

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
53(8):809–816; 4 August 2013
ISSN 0001–6209; CN 11–1995/Q
<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>

嗜碱单胞菌的新型羧基转移酶 α 亚基基因 *Aa-accA* 及其抗盐碱性能

姜明杰^{1,2}, 翟磊¹, 仲乃琴¹, 马祎玮³, 薛燕芬^{1*}, 马延和^{1*}

¹中国科学院微生物研究所, 北京 100101

²中国科学院大学, 北京 100049

³四川大学生命科学学院, 成都 610065

摘要:【目的】探讨解淀粉嗜碱单胞菌 (*Alkalimonas amylolytica*) N10 来源的羧基转移酶 α 亚基 (Acetyl-coenzyme A carboxylase subunit alpha, AccA) 基因 *Aa-accA* 对细菌及植物细胞耐盐碱性的作用。【方法】通过 PCR 方法从嗜碱菌 N10 基因组中扩增基因 *Aa-accA*, 并在大肠杆菌 (*Escherichia coli*) K12 中表达, 通过测定工程菌及对照菌在不同盐浓度 [0%, 2%, 4%, 6% (W/V) NaCl] 及不同碱性 pH (8.0, 8.5, 9.0, 9.5) 的 LB 中生长 12 h 后的 OD_{600} 值, 以及二者在分别含 6% (W/V) NaCl 及 pH 9 的 LB 中的生长曲线, 评价 *Aa-accA* 对大肠杆菌耐盐碱性的影响。同时以 pPZP111 为载体, 构建了植物细胞重组表达载体, 通过农杆菌介导方法将该基因转入烟草 BY-2 悬浮细胞表达, 利用 FDA 染色方法测定经盐碱溶液处理后残存的活细胞数量评价该基因对植物细胞耐盐碱性的影响。【结果】PCR 扩增得到基因 *Aa-accA*, 其 ORF 含 957 bp, 编码 318 个氨基酸的多肽, BLAST 比对显示该基因为羧基转移酶 α 亚基 (AccA) 家族中的成员, 其氨基酸序列与 *E. coli* 的 AccA 具有 76% 同源性; 含有 *Aa-accA* 的 *E. coli* K12 相较于对照组在不同 NaCl 浓度及不同碱性 pH 的 LB 中表现出了明显的生长优势, 特别是在 6% (W/V) NaCl 及 pH 9 的 LB 中培养 12 h 后, 终 OD_{600} 分别是对照菌的 2.6 倍和 3.5 倍; 缺失体实验结果显示基因缺失的突变体 *E. coli* K12 $\Delta accA$ 在 6% (W/V) NaCl 及 pH 9 的 LB 中不能正常生长, 而含有 *Aa-accA* 基因的重组质粒使得 *E. coli* K12 $\Delta accA$ 在同样条件下 OD_{600} 值达到 0.5 和 0.2; 转入此基因的烟草 BY-2 细胞, 经盐碱溶液处理后, 其存活细胞比例高于野生型。【结论】本研究首次发现了 *Aa-accA* 基因与盐碱性的相关性, 可提高大肠杆菌及烟草 BY-2 细胞的耐盐碱能力。

关键词:嗜碱菌, *Aa-accA* 基因, 大肠杆菌 (*Escherichia coli*) K12, 烟草 BY-2 细胞, 耐盐碱

中图分类号:X172 **文献标识码:**A **文章编号:**0001-6209 (2013)08-0809-08

基因 *accA* 编码的是乙酰辅酶 A 羧化酶 (ACC) 中羧基转移酶 (CT) 的 α 亚基^[1]。ACC 在脂肪酸合成过程中有着重要作用, 该酶催化乙酰辅酶 A 生成丙二酸单酰 CoA 这一限速步骤。在细菌, 如大肠杆

菌中, 该酶属于异质性酶, 即多亚基酶^[2]。除了 *accA* 基因编码的亚基, 其它 3 种亚基为生物素羧化酶 (Biotin carboxylase, BC), 生物素羧基载体蛋白 (Biotin carboxyl Carrier Protein, BCCP), 羧基转移酶

基金项目:国家“973 项目”——国家重点基础研究发展计划 (2013CB733900); 农业部民口科技重大专项 (2009ZX08009-096B)

* 通信作者。Tel: +86-10-64807618; E-mail: xueyf@im.ac.cn, mayanhe@im.ac.cn

作者简介:姜明杰 (1987–), 女, 河北保定人, 硕士研究生, 研究方向为极端微生物。

收稿日期:2012-11-09; **修回日期:**2013-03-05

(carboxyl transferase domain, CT)的 β 亚基,分别由 *accB*, *accC* 和 *accD* 编码^[3-4]。之前的研究已经从大肠杆菌、拟南芥和大豆^[5]中发现了全部4个亚基的基因。最近,Gu等又克隆得到了麻风树 ACC 全部亚基的基因^[6]。此外,研究者们从深海古菌中克隆得到了该酶部分亚基的基因, *accA*^[7]。

由于 ACC 在脂肪酸合成中的重要作用,研究者们利用基因工程技术对提高目标菌脂肪酸合成量或增强油料作物含油量进行了深入研究。对于细菌来源,特别是大肠杆菌来源的基因,将包含 *accA* 在内的4个亚基基因共表达已见报道,而鲜有对 *accA* 的单独克隆表达。且目前尚未有对嗜碱菌 ACC 基因克隆的报道,更无对该基因除脂肪酸合成以外的耐盐碱性方面的相关研究。

解淀粉嗜碱单胞菌 (*Alkalimonas amylolytica*) N10 是由本实验室分离自内蒙古察罕诺尔盐碱湖的一株革兰氏阴性的专性嗜碱菌,生长所需 NaCl 为 0-7% (W/V), pH 为 8-11。根据 Wang 等对该菌的差异蛋白质组学研究^[8],我们发现 *accA* 对应的蛋白是其中非常显著的一个既与 pH 又与 Na^+ 相关的差异点。因而本研究克隆了该菌的 *accA*, 将其分别在大肠杆菌和烟草 BY-2 细胞中表达,结果提高了重组大肠菌和烟草阳性转化系细胞的耐盐碱性。本研究首次揭示了 *accA* 在促进细菌和植物细胞耐盐碱性方面的作用。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒: *Alkalimonas amylolytica* N10 (AS 1.3430), *E. coli* K12, K12 $\Delta accA$, 烟草 BY-2 悬浮细胞, 农杆菌 EHA-105, pUC18, pPZP111。

1.1.2 培养基: (1) 大肠杆菌的培养基: 培养与转化使用普通 LB 培养基, 转化子的筛选培养基使用加有 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 氨苄青霉素的 LB; 转化子的耐盐功能验证培养基使用加有 NaCl 为相应值 [0%, 2%, 4%, 6% (W/V)] 的 LB 培养基 (pH 中性); 耐碱功能验证培养基在 LB 中加入 50 mM 的 CAPS、CHES 和 TRICINE 做为缓冲剂, 灭菌后用 NaOH 调节 pH 至相应值。(2) 烟草 BY-2 悬浮细胞培养基: 野生型细胞培养使用普通 NT 培养基, 阳性转化系细胞的培养用加入 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 卡那霉素的 NT 培养基, 阳性

转化系细胞的筛选使用加入 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 卡那霉素和 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 头孢霉素的 NT 培养基。

1.1.3 主要试剂和仪器: 快速克隆试剂盒 (Fast clone kit) 购自 PUEx 公司, 质粒提取试剂盒 (Plasmid-mini kit) 和 DNA 产物纯化回收试剂盒 (Cycle-Pure kit) 购自 Omega 公司, 有机缓冲剂 CAPS、CHES 和 TRICINE 购自 Ameresco 公司; DU800 紫外分光光度计购自美国 Beckman Coulter 公司; PCR 仪购自德国 Eppendorf 公司。

1.2 重组载体的构建

采用 Fast PCR Clone Kit (快速克隆构建试剂盒) 克隆基因, 根据序列解构后, 单链置换形成新的序列重组的原理, 在引物序列的 5' 端加入一段 (至少 15 bp) 与载体 pUC18 互补的序列: 上游引物为 5'-TATGACCATGATTACCATGATGTTAAATTAT-3', 下游引物为 5'-CAGGTCGACTCTAGACTAGCAATAACCAA-3'。以 N10 基因组为模板, PCR 扩增后的产物回收纯化后, 与经 *EcoRI* 和 *BamHI* 双酶切的载体 pUC18 连接, 连接产物转化大肠杆菌 K12 感受态细胞, 然后在含有 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的氨苄霉素的 LB 培养平板上采用菌落 PCR 的方法挑选阳性克隆, 阳性克隆子进行测序验证。

1.3 基因 *Aa-accA* 提高大肠杆菌 K12 盐碱耐受性的测定

将野生型 *E. coli* K12 及带有空载体 pUC18 的 K12/pUC18 和外源基因 *accA* 的 K12/pUC18-*Aa-accA* 接入到 LB 液体培养基, 制成种子液, 37 $^{\circ}\text{C}$ 振荡培养后测定种子液 OD_{600} , 以 $OD_{600} = 1.000$, 接种量为 1% 的标准, 接种到 4 mL 不同 pH (8.0, 8.5, 9.0, 9.5)、不同盐浓度 [0%, 2%, 4%, 6% (W/V) NaCl] 的 LB 培养基中。37 $^{\circ}\text{C}$ 培养, 12 h 后测定 OD_{600} , 表示菌株的生长状况。本论文中除特别说明, 每组实验均为 3 个平行。

1.4 生长曲线测定

37 $^{\circ}\text{C}$ 培养的各种子液——K12/pUC18、K12/pUC18-*Aa-accA* 测定 OD_{600} , 统一其接种量: 以 $OD_{600} = 1.000$, 接种量为 1% 的标准, 接种至 50 mL 含 NaCl 为 6% (W/V) 和 pH 为 9.0 的 2 种 LB 液体培养基中, 37 $^{\circ}\text{C}$, 200 r/min 振荡培养, 每隔 2 h 测定 OD_{600} 。

1.5 基因 *Aa-accA* 提高大肠杆菌 K12 $\Delta accA$ 缺陷体盐碱耐受性测定

将野生型 *E. coli* K12、*accA* 缺失的大肠杆菌

K12 $\Delta accA$ 和重组菌株 K12 $\Delta accA$ /pUC18、K12 $\Delta accA$ /pUC18- *Aa-accA* 接入到 LB 液体培养基,制成种子液,37℃ 振荡培养后测定种子液 OD_{600} ,以 $OD_{600} = 1.000$,接种量为 1% 的标准,接种到 4 mL pH 9.0 和盐浓度为 6% (W/V) NaCl 的两种 LB 培养基中,37℃ 培养,12 h 后测定 OD_{600} 。

1.6 *Aa-accA* 基因转化烟草 BY-2 悬浮细胞

将外源基因连接在植物重组二元载体 pPZP111 上,此步骤由上海生工生物技术有限公司完成,重组质粒用电转化的方式转入农杆菌 EHA105 感受态细胞中,重组后的农杆菌转化烟草 BY-2 细胞,操作方法按 An 所述进行^[9]。

在含有 50 $\mu\text{g/mL}$ 卡那霉素的 NT 培养平板上培养细胞,提取其基因组,用 *Aa-accA* 基因引物筛选验证阳性转化系,PCR 产物进行测序验证。

1.7 烟草 BY-2 悬浮细胞阳性转化系的耐盐碱测定

收集验证后的含外源质粒的 BY-2 细胞,用 NT 液体培养基稀释约一倍。取 1 mL BY-2 细胞悬浊液加入 10 mL 500 mmol/L NaCl 溶液或 pH 为 9.5 的碳酸钠-碳酸氢钠缓冲液中进行处理;黑暗中放置 2 h 后,用 FDA 染色后荧光显微镜下观察结果。野生型 BY-2 细胞作为对照。

2 结果和分析

2.1 基因 *Aa-accA* 的克隆与重组载体的构建

以嗜碱单胞菌 N10 基因组为模板,PCR 扩增该菌羧基转移酶 α 亚基基因,得到特异性条带,结果如电泳图 1 所示。PCR 产物测序表明为大小 987 bp 的片段,含有 957 bp 的目的基因和上下游引物序列

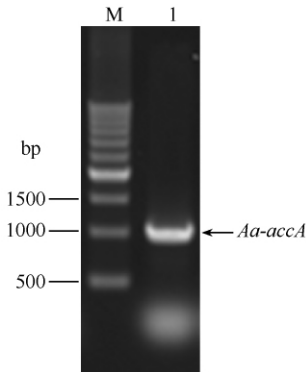


图 1. *accA* 基因 PCR 产物电泳图

Figure 1. Electrophoresis of gene *accA*. M, 500 bp DNA marker; lane 1, the gene of *Aa-accA*.

共 30 bp。PCR 产物回收纯化后与经 *Bam*HI、*Eco*RI 双酶切的载体 pUC18 用 Fast PCR Clone Kit 连接,获得重组载体 pUC18-*Aa-accA*,转化大肠杆菌 K12 感受态细胞后挑取克隆,经菌落 PCR 和质粒酶切验证,阳性克隆子进行测序验证,最终获得转有目的基因 *Aa-accA* 的工程菌。序列提交 NCBI,通过 BLAST 工具在 GenBank 数据库中进行同源性比对,证实该基因为羧基转移酶 α 亚基 (AccA) 家族中的成员,其氨基酸序列与 *E. coli* 的 AccA 具有 76% 同源性。

2.2 基因 *Aa-accA* 提高大肠杆菌 K12 盐碱耐受性实验

2.2.1 工程菌在不同 NaCl 浓度的培养基中的生长情况:工程菌 K12/pUC18- *Aa-accA* 与对照组 K12/pUC18 在 NaCl 浓度为 0% ,2% ,4% ,6% (W/V) 的 LB 中分别培养 12 h 后测定 OD_{600} 值,结果如图 2-A 所示,在不同盐浓度的 LB 培养基中,菌株 K12/pUC18- *Aa-accA* 和 K12/pUC18 的生长随盐浓度变化而改变的趋势相似,其中在 2% (W/V) NaCl 浓

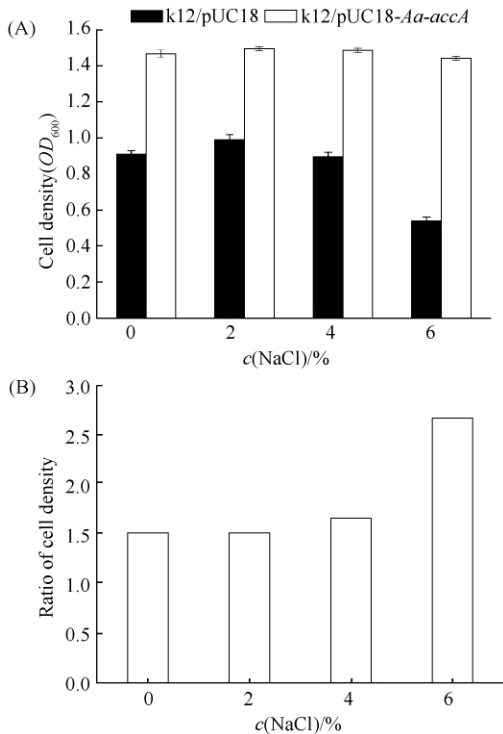


图 2. 不同 NaCl 浓度下菌株的生长状况

Figure 2. The growth of K12/pUC18 and K12/pUC18-*Aa-accA* under different salt concentrations. A: the final OD_{600} of K12/pUC18 and K12/pUC18-*Aa-accA* after 12h incubation under different NaCl concentrations; B: the ratio of the final OD_{600} of K12/pUC18-*Aa-accA* to the one of K12/pUC18 under different NaCl concentrations.

度时两菌长势最旺盛,6% (W/V) NaCl 浓度下两菌长势最差,但工程菌在各个浓度下都表现出了明显的生长优势,特别是在6% (W/V) NaCl 浓度,工程菌 OD_{600} 值下降幅度不明显,其生长状态 (OD_{600} 值为 1.44) 远远优于对照菌 (OD_{600} 值为 0.55)。图 2-B 显示在不同 NaCl 浓度下工程菌与对照组 OD_{600} 的比值,可以看出随着 NaCl 浓度的增加工程菌的生长优势更加明显,在 6% (W/V) NaCl 浓度下,工程菌是对照菌的 2.6 倍。

2.2.2 工程菌在不同 pH 的培养基中的生长情况:

测定了工程菌 K12/pUC18- *Aa-accA* 与对照组 K12/pUC18 在 pH 为 8.0,8.5,9.0,9.5 下培养 12 h 后的 OD_{600} 值,结果如图 3-A 所示,在不同 pH 值的 LB 培养基中,菌株 K12/pUC18- *Aa-accA* 和 K12/pUC18 的生长随 pH 变化而改变的趋势相似,在 pH 为 8.0 和 8.5 时长势都很好,相差不大,而在 pH 为 9.0 时,两菌生长状态开始有明显区分,对照菌的 OD_{600} 值从

pH 8.5 时的 1.12 下降到 0.26,而工程菌生长状态依然良好, OD_{600} 值与 pH8.5 时相比,只下降到 0.89,当 pH 到达 9.5 时,对照菌基本不生长,而工程菌的 OD_{600} 值仍然有 0.37。图 3-B 显示在不同 pH 条件下工程菌与对照组 OD_{600} 的比值,可以看出随着 pH 的增加工程菌的生长优势更加明显,在 pH9.0,工程菌 OD_{600} 值是对照菌的 3.5 倍,在 pH9.5,工程菌 OD_{600} 值是对照菌的 5.9 倍。

2.3 生长曲线测定

为了更细致的对比含 *Aa-accA* 基因的 *E. coli* K12 工程菌和转入空质粒的野生菌在盐碱环境下的生长情况,我们测定了两者在 14 h 内的生长变化。

如图 4 所示,在 NaCl 浓度为 6% (W/V) 的 LB 中,与含空 pUC18 质粒的 *E. coli* K12 对照菌相比,含有 *Aa-accA* 的 *E. coli* K12/pUC18- *Aa-accA* 在 14 h 内的生长周期中表现出了明显的优势,终 OD_{600} 达到了 1.38,而对照组只有 0.38。特别是第 4 - 6 小时这一时间段,两组都进入到了对数生长期,工程菌在两小时内 OD_{600} 迅速从 0.26 增长到 0.92,远远超过了对照组。第 10 - 14 小时内,对照菌已经处于稳定期,而工程菌 K12/pUC18- *Aa-accA* 还有缓慢生长。

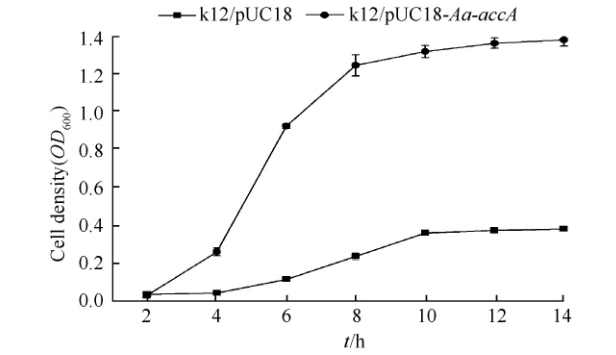


图 4. K12/pUC18 和 K12/pUC18-*Aa-accA* 菌株在含有 6% (W/V) NaCl 的 LB 中的生长曲线

Figure 4. Growth curves of K12/pUC18 and K12/pUC18-*Aa-accA* in LB containing 6% (W/V) NaCl.

在碱性培养基中的生长曲线如图 5 所示,在 pH 为 9 的 LB 中,与含空 pUC18 质粒的 *E. coli* K12 对照菌相比,含有 *Aa-accA* 的 *E. coli* K12/pUC18- *Aa-accA* 在 14 h 内的生长周期内表现出了明显的优势,终 OD_{600} 达到了 1.20,而对照组只有 0.26。在前 4 h 内,生长速率相差不大,从第 4 h 开始,工程菌的生长优势开始显现,12 h 后趋于稳定。

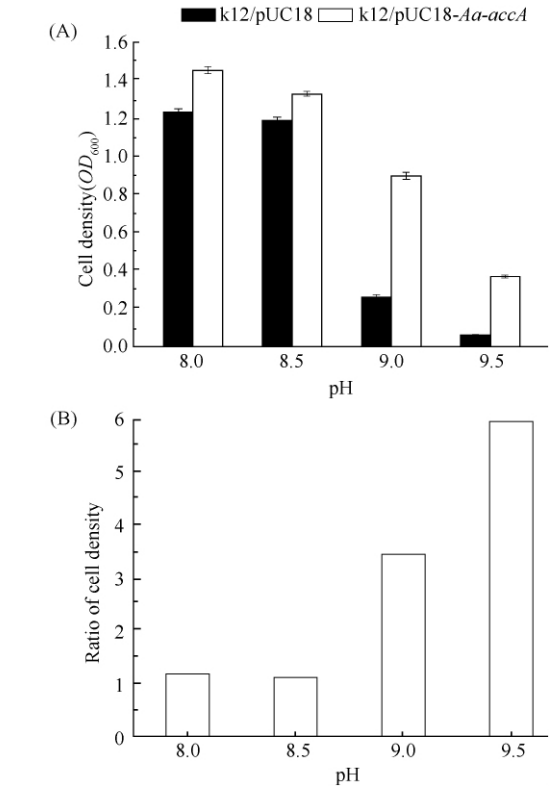


图 3. 不同 pH 值条件下菌株的生长

Figure 3. The growth of K12/pUC18 and K12/pUC18-*Aa-accA* under different pH values. A: the final OD_{600} of K12/pUC18 and K12/pUC18-*Aa-accA* after 12h incubation under different pH; B: ratio of the final OD_{600} of K12/pUC18-*Aa-accA* to the one of K12/pUC18 under different pH.

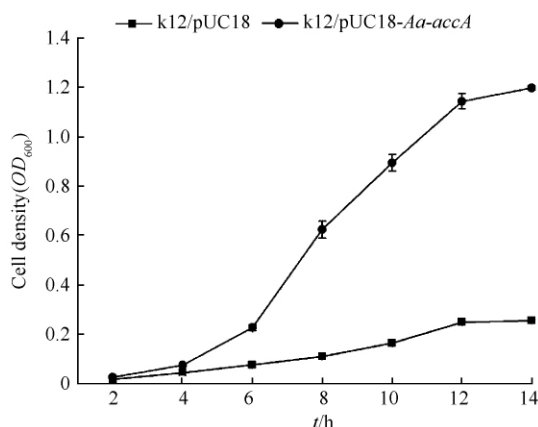


图 5. K12/pUC18 和 K12/pUC18-Aa-accA 菌株在 pH9 的 LB 中的生长曲线

Figure 5. Growth curves of K12/pUC18 and K12/pUC18-Aa-accA in LB whose pH value is 9.

2.4 基因 *Aa-accA* 提高大肠杆菌 K12 $\Delta accA$ 缺陷株的耐盐碱性实验

为了进一步考察 *Aa-accA* 基因的耐盐碱性功能,我们将该基因转化 *E. coli* K12 $\Delta accA$ 缺失体,并测定了相应的工程菌在盐碱环境下的生长情况。

图 6 所示是野生菌 *E. coli* K12、缺陷体 K12 $\Delta accA$ 、对照菌 K12 $\Delta accA$ /pUC18 及工程菌 K12 $\Delta accA$ /pUC18-Aa-accA 在含 6% (W/V) NaCl 的 LB 中培养 12h 后的 OD_{600} 值。在 6% (W/V) NaCl 的盐环境中,与野生菌相比,缺陷体菌株不能够正常生长,而含有 *Aa-accA* 基因的 K12 $\Delta accA$ 工程菌与对照组相比,耐盐能力有大幅度提高, OD_{600} 值达到了 0.50,与 *E. coli* K12 野生型菌株相差不大。

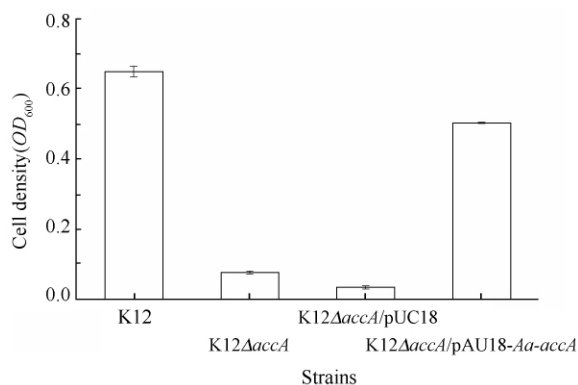


图 6. 各菌株在 6% (W/V) NaCl 的 LB 中的生长情况

Figure 6. The growth of different strains in LB containing 6% (W/V) NaCl.

$\Delta accA$ 、对照菌 K12 $\Delta accA$ /pUC18 及工程菌 K12 $\Delta accA$ /pUC18-Aa-accA 在 pH9 的 LB 中培养 12 h 后的 OD_{600} 值。在 pH 为 9 的碱环境中,与野生菌相比,缺陷体菌株不能够正常生长,而含有 *Aa-accA* 基因的 K12 $\Delta accA$ 菌株与对照组相比,耐碱能力有所恢复, OD_{600} 值增长到 0.2。

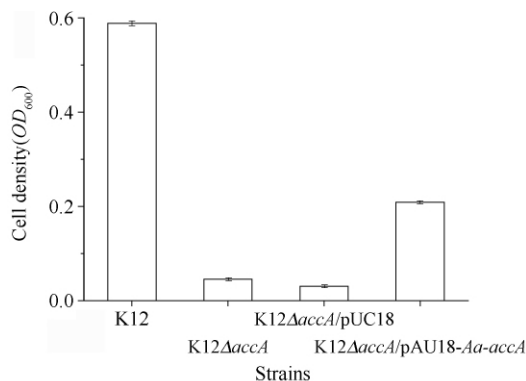


图 7. 各菌株在 pH 为 9 的 LB 中的生长情况

Figure 7. The growth of different strains in LB with pH9.

2.5 *Aa-accA* 基因提高烟草 BY-2 悬浮细胞耐盐碱功能验证

野生型及阳性转化系细胞经盐碱处理后,结果如图 8 所示,用盐碱处理后的野生型 BY-2 细胞,能被 FDA 染色的极少,而含有 *Aa-accA* 基因的阳性转化系细胞,经同样的盐碱溶液处理后,其存活细胞比例高于野生型。这一结果表明,*Aa-accA* 基因不但具有提高细菌耐盐碱的功能,在植物细胞中同样有该功能。

3 讨论

乙酰辅酶 A 是催化脂肪酸合成的限速酶,存在于细菌、双子叶植物和非禾本科单子叶植物中的该酶是多亚基异质型酶。*accA* 基因是编码其中羧基转移酶(CT) α 亚基的基因,编码 CT 另一 β 亚基的是 *accD* 基因。在植物中,*accD* 是质基因,存在于叶绿体中^[10]。

对于细菌来源的基因,研究者们多采用将 *accA* 和其它基因共表达的方式来提高其脂肪酸合成量。如 Davis 等将该酶 4 个亚基的编码基因克隆到以 T7 为启动子的同一载体上,诱导条件下进行过表达,结果显示,蛋白亚基的过量表达大大增加了 ACC 的活性,并伴随着胞内丙二酸单酰 CoA 水平的上升;同

图 7 所示是野生菌 *E. coli* K12、缺陷体 K12

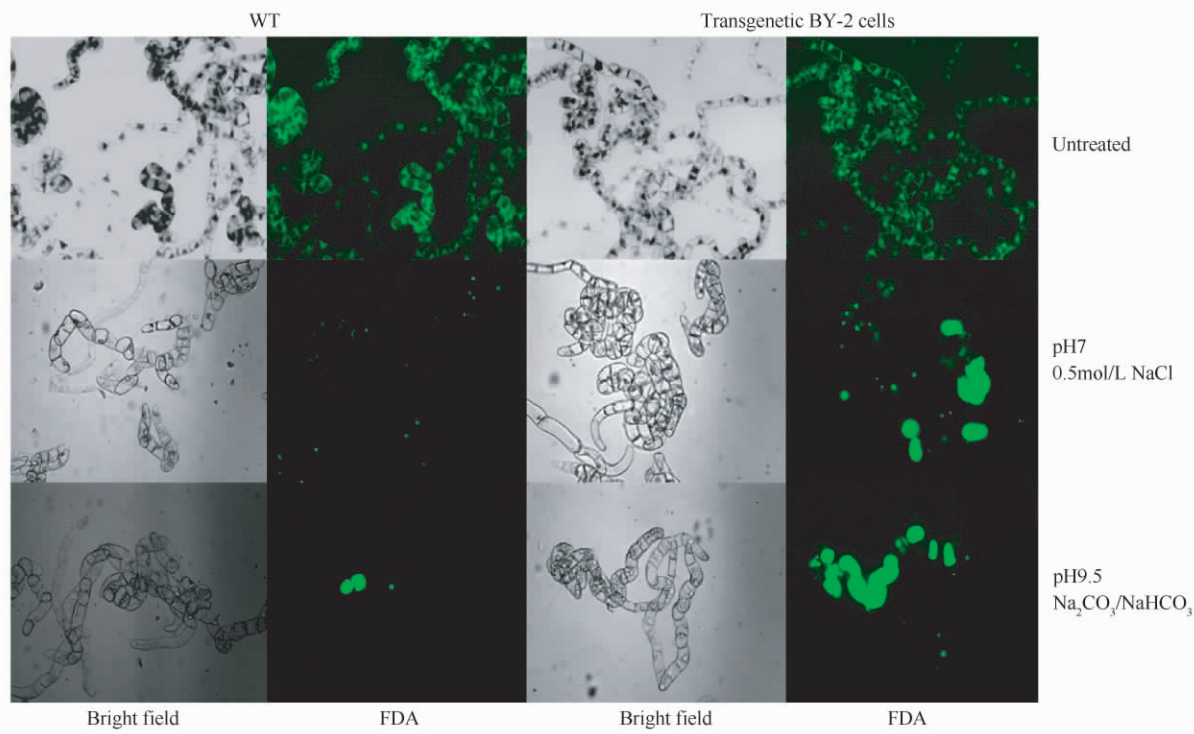


图 8. 含 *Aa-accA* 基因的 BY-2 细胞和野生型 BY-2 细胞经盐碱溶液处理后 FDA 染色结果

Figure 8. Viability test of BY-2 cells using a FDA fluorescence probe. Wild-type and transgenic cells were either untreated or treated with 500 mmol/L NaCl at pH 7.0 or 50 mmol/L pH 9.5 Na_2CO_3 - NaHCO_3 buffer for 2 h and then stained with FDA prior to examination under a fluorescence microscope.

时还在硫酯酶存在条件下测定了胞内脂肪酸的合成速率,该条件下脂肪酸的合成速率增加了 6 倍^[11]。Meng 等将乙酸钙不动杆菌 (*Acinetobacter calcoaceticus*) 中 ACC 的 4 个亚基编码基因克隆到大肠杆菌中共表达,重组菌株的脂肪酸含量比野生型提高了 5.6 倍^[12]。Lee 等将铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) 的 *accA* 和 *fabD* 及化脓链球菌 (*Streptococcus pyogenes*) 的硫酯酶基因连接,在 *P. aeruginosa* 和 *E. coli* 中共表达,重组菌长链脂肪酸 (C16 - C18) 合成量比野生型增长了 1.3 - 1.7 倍^[13]。

而对于植物来源的基因,由于其分布在核、叶绿体不同部位,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。Madoka 等过量表达 *accD* 后发现,烟草质体 ACCase 的水平及植株叶子中脂肪酸的含量提高。说明该基因编码的亚基是限制因子,且对作物的含油量有重要作用^[14]。因此研究者多异源表达对植物质体 ACC 活性和种子含油量中有重要作用的 *accD* 基因以增强脂肪酸合成^[15-16]。

目前,在细菌中尚未发现 *accA* 基因有同植物 *accD* 基因类似的关键作用,所以鲜有对该基因的单克隆表达,特别是嗜碱菌来源的 *accA* 基因,更无对 *accA* 基因除脂肪酸合成以外的耐盐碱性方面的相关研究。Wang 等对该基因的来源菌进行了蛋白质组学分析,得到了大量 pH 依赖性 or Na^+ 依赖性差异蛋白,*accA* 基因编码的蛋白就是其中一个既与 pH 又与 Na^+ 相关的显著差异点^[10]。

在此基础上,我们推测该基因可能与耐盐碱功能相关。由此,我们构建了 *accA* 基因的重组载体,将其转入大肠杆菌中表达,在不同的盐碱环境中测定其生长,结果显示含有 *Aa-accA* 重组质粒的 *E. coli* K12 相较于野生型在不同盐浓度及不同碱性 pH 的 LB 中表现出了明显的生长优势,特别是在 6% (W/V) NaCl 及 pH 9.5 的 LB 中培养 12h 后,终 OD_{600} 分别是野生型菌的 2.6 倍和 5.9 倍。利用互补实验我们进一步验证了 *Aa-accA* 基因耐盐碱的功能,结果显示基因缺失的突变体 K12 $\Delta accA$ 在 6% (W/V) NaCl 及 pH 9 的 LB 中生长极其微弱,而含有 *Aa-accA* 基因的重组质粒可以使得 K12 $\Delta accA$ 在同样条

件下的生长状态恢复。

为了验证该基因是否在高等植物中也有同样功能,我们利用烟草 BY-2 悬浮细胞系进行研究。BY-2 悬浮细胞具有易于培养、抗干扰能力强、胁迫处理均匀、转化方法成熟等特点,是研究转化基因的良好试材。我们的阳性转化系细胞,经同样的盐碱溶液处理后,其存活细胞比例高于野生型。这一结果表明,*Aa-accA* 不但在细菌中有耐盐碱的功能,在高等植物细胞中同样有该功能。

综上,我们研究发现了 *Aa-accA* 除了与脂肪酸合成外相关的其它功能,首次发现 *accA* 可提高大肠杆菌及烟草 BY-2 细胞的耐盐碱能力。*accA* 提高盐碱性的作用机制尚不清楚,我们推测仍与其脂肪酸合成有关,具体细节有待进一步研究。

参考文献

- [1] Cronan JE, Waldrop GL. Multi-subunit acetyl-CoA carboxylases. *Progress in Lipid Research*, 2002, 41(5): 407-435.
- [2] 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1991, 88(21): 9730-9733.
- [3] Li SJ, Cronan JE. The gene encoding the biotin carboxylase subunit of *Escherichia coli* acetyl-CoA carboxylase. *The Journal of Biological Chemistry*, 1992, 267: 855-863.
- [4] Choi-Rhee E, Cronan JE. The biotin carboxylase-biotin carboxyl carrier protein complex of *Escherichia coli* acetyl-CoA carboxylase. *The Journal of Biological Chemistry*, 2003, 278(33): 30806-30812.
- [5] Li J, Zheng S, Yu Z, Zhang J. Acetyl-coenzyme A carboxylase: A key metabolic enzyme of fatty acid and progress of its gene clone. *Chinese Journal of Applied and Environmental Biology*, 2011, 17(5): 753-758. (in Chinese)
李洁琼,郑世学,喻子牛,张吉斌.乙酰辅酶 A 羧化酶:脂肪酸代谢的关键酶及其基因克隆研究进展.应用与环境生物学报,2011,17(5): 753-758.
- [6] Gu KY, Chiam HH, Tian DS, Yin ZC. Molecular cloning and expression of heteromeric ACCase subunit genes from *Jatropha curcas*. *Plant Science*, 2011, 180(4): 642-649.
- [7] Yakimov MM, Cono VL, Denaro R. A first insight into the occurrence and expression of functional *amoA* and *accA* genes of autotrophic and ammonia-oxidizing bathypelagic *Crenarchaeota* of Tyrrhenian Sea. *Deep-Sea Research II*, 2009, 56(11-12): 748-754.
- [8] Wang QH, Han HM, Xue YF, Qian Z, Meng B, Peng FL, Wang ZW, Tong W, Zhou CQ, Wang Q, Guo YH, Li G, Liu SQ, Ma YH. Exploring membrane and cytoplasm proteomic responses of *Alkalimonas amylolytica* N10 to different external pHs with combination strategy of *de novo* peptide sequencing. *Proteomics*, 2009, 9(5): 1254-1273.
- [9] An G. High efficiency transformation of cultured tobacco cells. *Plant Physiology*, 1985, 79(2): 568-570.
- [10] Wang F, Lang C, Liu R, Wu G, Feng D, Chen J, Shi C. *Escherichia coli* Acetyl-CoA carboxylase (ACCase) *accD* subunit gene expression vector construction and genetic transformation. *Journal of Nuclear Agricultural Sciences*, 2011, 25(6): 1129-1134. (in Chinese)
王伏林,郎春秀,刘仁虎,吴关庭,冯都华,陈锦清,石春海.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.核农学报,2011,25(6): 1129-1134.
- [11] Davis MS, Solbiati J, Cronan JE. Overproduction of acetyl-CoA carboxylase activity increases the rate of fatty acid biosynthesis in *Escherichia coli*. *The Journal of Biological Chemistry*, 2000, 275(37): 28593-28598.
- [12] Meng X, Yang JM, Cao YJ, Li LZ, Jiang XL, Xu X, Liu Wei, Xian M, Zhang YW. Increasing fatty acid production in *E. coli* by simulating the lipid accumulation of oleaginous microorganisms. *Journal of Industry Microbiology & Biotechnology*, 2011, 38: 919-925.
- [13] Lee S, Jeon E, Jung Y, Lee J. Heterologous co-expression of *accA*, *fabD*, and thioesterase genes for improving long-chain fatty acid production in *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2012, 167: 24-38.
- [14] 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. *Plant and Cell Physiology*, 2002, 43(12): 1518-1525.
- [15] Kode V, Mudd EA, Iamtham S, Day A. The tobacco plastid *accD* gene is essential and is required for leaf development. *The Plant Journal*, 2005, 44(2): 237-

244.

[16] Bryant N, Lloyd J, Sweeney C, Myouga F, Meinke D.

Identification of nuclear genes encoding chloroplast-

localized proteins required for embryo development in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 2011, 155 (4): 1678-1689.

A novel gene (*Aa-accA*) encoding acetyl-CoA carboxyltransferase α -subunit of *Alkalimonas amylolytica* N10 enhances salt and alkali tolerance of *Escherichia coli* and tobacco BY-2 cells

Mingjie Xian^{1,2}, Lei Zhai¹, Naiqin Zhong¹, Yiwei Ma³, Yanfen Xue^{1*}, Yanhe Ma^{1*}

¹Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

²University of Chinese Academy Sciences, Beijing 100049, China

³School of Life Sciences, University of Sichuan, Chengdu 610065, China

Abstract: [**Objective**] Acetyl-CoA carboxylase (ACC) catalyzes the first step of fatty acid synthesis. In most bacteria, ACC is composed of four subunits encoded by *accA*, *accB*, *accC*, and *accD*. Of them, *accA* encodes acetyl-CoA carboxyltransferase α -subunit. Our prior work on proteomics of *Alkalimonas amylolytica* N10 showed that the expression of the *Aa-accA* has a remarkable response to salt and alkali stress. This research aimed to find out the *Aa-accA* gene contributing to salt and alkali tolerance. [**Methods**] The *Aa-accA* was amplified by PCR from *A. amylolytica* N10 and expressed in *E. coli* K12 host. The effects of *Aa-accA* expression on the growth of transgenic strains were examined under different NaCl concentration and pH conditions. Transgenic tobacco BY-2 cells harboring *Aa-accA* were also generated via *Agrobacterium-mediated* transformation. The viability of BY-2 cells was determined with FDA staining method after salt and alkali shock. [**Results**] The *Aa-accA* gene product has 318 amino acids and is homologous to the carboxyl transferase domain of acyl-CoA carboxylases. It showed 76% identity with AccA (acetyl-CoA carboxylase carboxyltransferase subunit alpha) from *E. coli*. Compared to the wild-type strains, transgenic *E. coli* K12 strain containing *Aa-accA* showed remarkable growth superiority when grown in increased NaCl concentrations and pH levels. The final cell density of the transgenic strains was 2.6 and 3.5 times higher than that of the control type when they were cultivated in LB medium containing 6% (W/V) NaCl and at pH 9, respectively. Complementary expression of *Aa-accA* in an *accA-depletion E. coli* can recover the tolerance of K12 $\Delta accA$ to salt and alkali stresses to some extent. Similar to the transgenic *E. coli*, transgenic tobacco BY-2 cells showed higher percentages of viability compared to the wild BY-2 cells under the salt or alkali stress condition. [**Conclusion**] We found that *Aa-accA* from *A. amylolytica* N10 overexpression enhances the tolerance of both transgenic *E. coli* and tobacco BY-2 cells to NaCl and alkali stresses.

Keywords: alkaliphiles, *Alkalimonas amylolytica* N10, *Aa-accA* gene, salt/alkali stress

(本文责编:王晋芳)

Supported by the Key Project of China National Programs for Fundamental Research and Development (2013CB733900) and by the Ministry of Agriculture of China (2009ZX08009-096B)

* Corresponding authors. Tel: +86-10-64807618; E-mail: xueyf@im.ac.cn, mayanhe@im.ac.cn

Received: 9 November 2012/Revised: 5 March 2013