

# 苹果酰基辅酶 A 结合蛋白 2 编码基因 *MdACBP2* 的克隆和表达分析

柏素花<sup>1,2,3</sup>, 祝 军<sup>2</sup>, 戴洪义<sup>2,\*</sup>

(<sup>1</sup> 湖南农业大学园艺园林学院, 长沙 410128; <sup>2</sup> 青岛农业大学园林园艺学院, 山东青岛 266109; <sup>3</sup> 青岛农业大学生命科学学院, 山东省高校植物生物技术重点实验室, 山东青岛 266109)

**摘 要:** 酰基辅酶 A 结合蛋白 (ACBP) 是一个保守的蛋白家族, 在酰基酯辅酶 A 的转运过程中发挥重要作用。在水稻和拟南芥中鉴定的 ACBP 除了参与长链酰基辅酶 A 的转运以外, 还参与了植物对生物和非生物胁迫的反应。为了探讨在苹果树中是否也存在参与植物对逆境反应的 ACBP, 并可用于改良苹果品种, 以提高抗逆能力, 从苹果品种‘鸡冠’中克隆、鉴定了一个 ACBP 基因, 命名为 *MdACBP2*。*MdACBP2* 包含一个 378 bp 的开放阅读框, 编码包含 125 个氨基酸残基的蛋白质; 推定的氨基酸序列中包含有一个 ACB 结构域, 无信号肽序列。序列和结构特征表明该基因是 ACBP 家族 Class I 亚族的成员。利用荧光定量 PCR 技术检测 *MdACBP2* 的表达, 发现在苹果的根、叶、花、幼果、枝皮、芽等组织中均有表达, 在叶中的表达量最高, 在幼果中的表达量最低, 这一表达模式暗示 *MdACBP2* 可能参与多种生理途径。不同胁迫处理的时序表达分析表明, *MdACBP2* 的表达能被轮纹病病原菌 *Botryosphaeria dothidea* 侵染和 10% PEG 渗透胁迫所抑制, 低温胁迫则能诱导 *MdACBP2* 的表达, 1 mmol · L<sup>-1</sup> Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> 处理对 *MdACBP2* 的表达没有显著影响。推测 *MdACBP2* 可能参与了苹果对低温胁迫的防御反应。

**关键词:** 苹果; 酰基辅酶 A 结合蛋白; 轮纹病菌; 低温胁迫; 渗透胁迫

**中图分类号:** S 661.1

**文献标志码:** A

**文章编号:** 0513-353X (2012) 10-1893-10

## Cloning and Expression Analysis of a New Acyl-CoA-binding Protein 2 (*MdACBP2*) Identified from *Malus domestica*

BAI Su-hua<sup>1,2,3</sup>, ZHU Jun<sup>2</sup>, and DAI Hong-yi<sup>2,\*</sup>

(<sup>1</sup> College of Horticulture and Landscaping, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China; <sup>2</sup> College of Landscaping and Horticulture, Qingdao Agricultural University, Qingdao, Shandong 266109, China; <sup>3</sup> Key Lab of Plant Biotechnology of Shandong Province, College of Life Sciences, Qingdao Agricultural University, Qingdao, Shandong 266109, China)

**Abstract:** To investigate the function of acyl-CoA-binding protein in *Malus domestica*, we isolated a new ACBP gene (designated as *MdACBP2*) from leaf cDNA using RACE technique. The full-length cDNA has an open reading frame (ORF) of 378 bp encoding a protein of 125 amino acids. The putative amino acid sequence contains an ACB domain consisting of 85 amino acid residues as predicted with

收稿日期: 2012-05-04; 修回日期: 2012-09-29

基金项目: 国家苹果产业技术体系项目 (CARS-28-01-07); 山东省良种产业化工程项目 (620902); 青岛市科技计划基础研究项目 [12-1-4-5-(1)-jch]

\* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: hydai@qau.edu.cn)

SMART program. Sequence analysis and structural feature indicated that *MdACBP2* belongs to Class I of ACBP family. Quantitative real-time PCR experiment revealed that *MdACBP2* is expressed in root, leaf, flower, young fruit, bark and bud. The highest mRNA expression was found in leaf, and the lowest in young fruit. The responses of *MdACBP2* expression to biotic or abiotic stress were also investigated using quantitative real-time PCR. The results showed that *MdACBP2* expression was inhibited by osmotic stress and *Botryosphaeria dothidea* infection, but was enhanced by cold stress. There was no significant changes among the apple seedlings treated with  $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ Pb}(\text{NO}_3)_2$ . It was speculated that *MdACBP2* gene might be involved in the defense of apple seedling against cold stress.

**Key words:** *Malus domestica*; acyl-CoA-binding protein; *Botryosphaeria dothidea*; cold stress; osmotic stress

苹果树在生长过程中经常遭受环境中各种生物或非生物胁迫导致生长衰弱或减产。其中生物胁迫包括真菌、细菌等病原的侵染和害虫的危害 (Tang et al., 2012), 而非生物胁迫包括干旱、低温、重金属污染、农药残留等。挖掘抗逆境基因进行遗传改良, 对于提高果树的抗逆性和增强适应性具有重要的意义。

最近, 研究人员从拟南芥和水稻中鉴定了一个参与植物逆境反应的蛋白家族 (Xiao et al., 2009, 2011a; Meng et al., 2011) ——酰基辅酶 A 结合蛋白 (ACBP)。该家族的蛋白结构保守, 具有一个酰基辅酶 A 结合结构域 (ACB), 能与长链的酰基辅酶 A 结合 (Burton et al., 2005)。ACBP 最初从小鼠的脑中分离出来, 作为苯二氮受体的内源配体, 抑制安定剂与脑神经元突触膜结合 (Guidotti et al., 1983; Shoyab et al., 1986)。大多数 ACBP 都由约 90 个氨基酸组成, 分子量为 10 kD 左右, 在不同物种中高度保守, 这表明 ACBP 可能具有保守的生理功能。结合研究表明, ACBP 与游离脂肪酸或辅酶 A 本身没有亲和性, 但是对 8 个碳原子以上的长链酰基辅酶 A 酯具有高度的亲和性 (Mikkelsen et al., 1987)。ACBP 通过与酰基辅酶 A 酯结合, 在酰基辅酶 A 代谢中发挥作用。它能介导膜间酰基辅酶 A 转运, 将酰基辅酶 A 转运到线粒体或微体中, 分别参与  $\beta$ -氧化或甘油酯生物合成 (Rasmussen et al., 1994)。

除此而外, ACBP 还能保护长链酰基辅酶 A 酯不被酰基辅酶 A 水解酶水解 (Rasmussen et al., 1993)。

在植物中除了小分子量的 ACBP 以外, 还有分子量大于 10 kD 的大分子量 ACBP。这些大分子量的 ACBP 不但含有高度保守的 ACB 结构域, 还包含有一些其他的功能域, 如 ankyrin 重复序列、kelch 基序, 以及跨膜域等 (Xiao et al., 2009)。对拟南芥 ACBP 研究表明, 大分子量的 ACBP 对酰基辅酶 A 酯具有不同的亲和性, 这种亲和性的差别暗示它们参与了多种生理功能。除了像小分子 ACBP 那样参与磷脂代谢外, 大分子 ACBP 还能影响植物发育, 包括早期的胚胎形成和叶片老化, 并参与植物抗生物胁迫和非生物胁迫的反应, 比如耐受重金属, 冷冻胁迫或抗氧化胁迫以及病原侵染等 (Xiao et al., 2011a)。

目前在植物中, 只有油菜、水稻和拟南芥中分离鉴定了 ACBP (Xiao et al., 2009)。而在其他植物, 特别是蔷薇科木本植物中尚未见有关 ACBP 的报道。为了探讨 ACBP 家族的成员能否被用于改良苹果品种以提高其抗逆性, 本研究中克隆、鉴定了一个苹果 ACBP 的编码基因, 并对其在逆境条件下的表达进行了分析。

## 1 材料与方法

### 1.1 植物材料及其处理

轮纹病接种试验用嫁接于八棱海棠砧木上的 2 年生‘鸡冠’苹果树进行。轮纹病病原菌 (*Botryosphaeria dothidea*) 菌株 040301 由青岛农业大学李保华教授惠赠。

苹果树盆栽培养于青岛农业大学胶州实验农场的温室中, 病原菌接种于 2010 年 7 月进行。病原菌培养及产孢方法参考冷伟峰等 (2009) 的方法, 用‘富士’苹果的幼果繁殖分生孢子。接种方法参考张高雷等 (2011) 的方法稍做改动。选择当年生枝条中部 15 cm 左右的区域, 通过喷雾的方法接种 5 mL 病原菌分生孢子悬浮液 (分生孢子  $1 \times 10^6$  个  $\cdot$  mL<sup>-1</sup>), 接种部位用塑料袋包裹保湿 24 h。每株接种 5 个枝条, 共接 20 株。分别于接种后 0、5、10、15、20、25、30、32、34、36、38、40 d 取样, 每次取 5 株, 每个植株取 1 个枝条。剥下接种部位 10 cm 范围内的幼皮, 液氮研磨后提取 RNA, 检测基因表达量, 设 5 次重复。用无菌双蒸水代替分生孢子液, 以同样程序进行模拟接种作为对照。

环境胁迫处理选用通过茎尖培养获得的‘嘎啦’组培苗进行。所用培养基为 MS + 1.0 mg  $\cdot$  L<sup>-1</sup> 6-BA + 0.1 mg  $\cdot$  L<sup>-1</sup> NAA + 30 g  $\cdot$  L<sup>-1</sup> 蔗糖 + 8 g  $\cdot$  L<sup>-1</sup> 琼脂, pH 5.8, 每月继代 1 次。继代培养 1 周的组培苗, 转入生根培养基 (1/2 MS + 3 mg  $\cdot$  L<sup>-1</sup> IBA + 20 g  $\cdot$  L<sup>-1</sup> 蔗糖 + 8 g  $\cdot$  L<sup>-1</sup> 琼脂, pH 5.8) 暗培养 1 周, 光下培养 3 周, 以诱导生根。培养室温度维持在 25  $^{\circ}$ C, 光照强度 2 000 lx, 光周期为光照 16 h, 黑暗 8 h。

胁迫处理按下述方法进行。(1) 渗透胁迫: 参照李天红等 (2005) 的试验方法稍做修改, 用 10% PEG-6000 诱导渗透胁迫, 先将生根后的组培苗移入 1/2 Hoagland 营养液适应培养 3 d, 再转入 Hoagland 全培养液培养 3 d, 然后转入含 10% PEG-6000 的 Hoagland 培养液, 并以未处理的组培苗为对照, 于处理后 0、3、6、12、24、36、48 h 取叶片提取 RNA, 分析基因表达, 设 3 次重复, 每次重复 1 株。(2) 冷胁迫: 将生根后的组培苗置于人工气候箱中在 4  $^{\circ}$ C 条件下处理 48 h, 以未处理的组培苗作为对照, 分别在处理后 0、3、6、12、24、36、48 h 取叶片提取 RNA, 分析基因表达, 设 3 次重复, 每次重复 1 株。(3) 重金属胁迫: 参考 Xiao 等 (2008) 的方法稍做修改, 将生根后的组培苗转移至含 1 mmol  $\cdot$  L<sup>-1</sup> Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> 的 Hoagland 培养液中培养, 以未处理的组培苗作为对照, 分别在处理后 0、3、6、12、24、36、48 h 取叶片提取 RNA, 分析基因表达, 设 3 次重复, 每次重复 1 株。

### 1.2 基因克隆和序列分析

总 RNA 用天根生化科技公司的 RNAprep pure Plant Kit 从‘鸡冠’苹果树幼叶提取。第一链 cDNA 用 TaKaRa 公司的 PrimeScript II 1st Strand cDNA Synthesis Kit 合成。

利用拟南芥 AtACBP6 蛋白的氨基酸序列作为探针, 搜索苹果基因组数据库, 对所获得的基因组序列用 FGENGSH 软件预测其编码区, 并根据编码区序列设计引物 5'-ATGGGGTTTATATCCCAA-3'和 5'-AGTAGAAGCTCCGGCTTCTC-3', 从苹果叶片 cDNA 中获得目标基因的部分编码区片段。测序后, 根据 cDNA 片段的序列设计引物, 利用 RACE 技术扩增目标基因的 3'和 5'cDNA 末端。进行 3'RACE 反应时, 为方便扩增用带有 Adaptor 序列的 OligodT 引物 GGCCACGCGGACT AGTACT<sub>17</sub> 合成 cDNA, 作为 3'RACE 反应的模板, 用 5'-ATGCTGAGAAAGCCAAGA-3'和 5'-GACTCTACAAGCAAGCCACT-3'分别作为正向引物, 以接头序列 GGCCACGCGTCTGACTAGTAC 作反向引物进行巢式扩增获得 3'末端片段。5'RACE 反应的模板按下列方法制备: cDNA 合成后经 DNA 片段

纯化试剂盒 (TaKaRa) 纯化 (参照说明书进行), 再用末端脱氧核苷酰转移酶 (Terminal deoxynucleotidyl transferase, TdT) 在 cDNA 3'端加上 polyC 尾巴, 加尾方法按 TdT 说明书进行。以加尾后的 cDNA 为模板, 以 5'-CTCCCTTCAACAGCCTTC-3'和 5'-GGTGCTCACTGCTCCAAC-3'为反向引物, 以 GGCCACGCGTCGACTAGTACG<sub>13</sub> 为正向引物进行巢式扩增获得 5'末端片段。将获得的 cDNA 片段的序列用 AlignX 软件进行拼接获得 cDNA 全长。

蛋白质的序列相似性分析用 BLAST 算法进行 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>), 多重序列比对用 ClustalX 程序进行。蛋白质的结构特征分析用蛋白质专家分析系统 ExPASy (<http://www.expasy.org/>) 及 SMART 程序 (<http://www.smart.emblheidelberg.de/>) 进行。

### 1.3 系统进化树的构建

用 ClustalX 2.0 (Larkin et al., 2007) 软件对推定的 MdACBP2 氨基酸序列及选定的各物种的 ACBP 蛋白进行多重比对, 并在此基础上利用 MEGA4.0 软件按邻接法构建系统进化树。构建系统进化树所利用的蛋白序列全部从数据库 NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)、PLAZA (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/plaza/>) 和 Phytozome (<http://www.phytozome.net/>) 中获得。

### 1.4 基因表达定量

用实时荧光定量 PCR 进行基因表达定量分析。取‘鸡冠’苹果树 1 年生侧根、叶、花、幼果、枝皮、芽等, 提取 RNA 并反转录成 cDNA。每种组织从 12 株苹果树上取样, 来源于 3 株树上的组织混合作为 1 个组织样品, 4 次重复。

荧光定量 PCR 应用 LightCycler 480 SYBR Green I Master 试剂盒, 根据生产商推荐的方法, 在罗氏 LightCycler 480 系统上进行。

所用 *MdACBP2* 的引物为 5'-GACTCTACAAGCAAGCCACT-3'和 5'-GGATCTCCCTTCAACAGC-3', 内参基因 *β-actin* (GQ339778.1) 的引物为 5'-CTGAACCCAAAGGCTAATCG-3'和 5'-ACTGGCGTAGAGGGAAAGAA-3'。

数据分析根据 Livak 等 (2001) 报道的  $2^{-\Delta\Delta CT}$  法进行。在组织表达分析中用表达量最低的组织作为校正子, 在胁迫处理的时序表达分析中用未处理的样品作校正子。所有的数据都以相对 mRNA 表达量表示, 并经过单因素方差分析和 Duncan's 检验。

## 2 结果与分析

### 2.1 *MdACBP2* 的克隆与鉴定

为了克隆酰基辅酶 A 结合蛋白的编码基因, 以 AtACBP6 蛋白的氨基酸序列作为探针搜索苹果基因组数据库, 并通过 FGENESH 程序预测, 获得了一个 ACBP 基因的编码区序列。根据此序列设计引物, 通过 PCR 扩增, 获得了一个 375 bp 的 cDNA 片段。在此片段的基础上进行 3'和 5'RACE 反应, 获得 263 bp 的 3'端序列和 278 bp 的 5'端序列。将获得的 cDNA 片段拼接组装, 去除 3'端 179 bp 与 5'端的 234 bp 重叠序列, 获得了一个全长 503 bp 的 cDNA 序列, 并命名为 *MdACBP2*。此序列包括 44 bp 的 5'端非编码区, 81 bp 的 3'端非编码区以及一个 378 bp 的开放阅读框。在 3'端有一个加尾信号序列 AATAAA 以及一个多聚腺苷酸尾巴 PolyA。开放阅读框编码 125 个氨基酸, 预测的蛋白分子量为 14.0 kD, 等电点为 5.74, 该蛋白的氨基酸序列包含一个保守的 ACB 结构域。基因的核苷酸及氨基酸序列如图 1 所示。

```

1                               M G F A Y P K L L E E A E Q V L
1   GTGTTGCATTAGCATGTCTATGACTTTCAAATTATCGTAATGAATGGGTTTGCATATCCCAATTGCTTGAGGAAGCCGACGAAGTTT
17   V S N V G T F D F G T L L R L E S K E A R Y M E E F D E H A
91   TAGTGTCAAATGTAGGCACCTTCGACTTTGGAACACTCTTAAGGCTAGAGATAAGAAGCTCGGTATATGAGGAGTTTGTATGAACATG
47   E K A K T L P K S T T N E N K L N L Y G L Y K Q A T V G A V
181  CTGAGAAAGCCAGACCCCTTCCAAAGTCAACAACCAATGAGAACCAAGCTCAATCTCTATGGACTCTACAAGCAAGCCACTGTTGGAGCAG
77   S T S R P G M F N M K D R V K W D A W K A V E G R S K E E A
271  TGAGCACCAGCCGCCCGGAATGTTCAATATGAAGACAGAGTAATGTGGATGCATGAAGGCTGTTGAAGGAGATCCAAGGAGGAAG
107  M G D Y I T K V K H L L G E A G A S T *
361  CTATGGGCGACTACATCAAGAGGTGAAGCACTGCTTGGAGAAGCCGAGCTTCTACTTGATGCTTTTGTATAGTGGTGTGTAATCAA
451  AATAAACATTGTACTCTTTCGTACTGCTCTCTTAAAAA

```

图 1 *MdACBP2* 的核苷酸序列及推定的氨基酸序列

具有灰色背景的字母表示 ACB 结构域, 带方框的字母表示多聚腺苷酸的加尾信号。

Fig. 1 Nucleotide and deduced amino acid sequences of *MdACBP2* gene from *Malus domestica*

Letters with gray background represent ACB domain and the boxed letters represent polyadenylation signal sequence.

## 2.2 *MdACBP2* 同源性及系统演化分析

通过 Blast 分析发现, *MdACBP2* 与葡萄 ACBP (XP\_002263421.1) 的氨基酸序列一致性为 78%, 与拟南芥 *AtACBP6* (NP\_174462) 为 69%, 与水稻 *OsACBP3* (Os03g37960) 和 *OsACBP1* (Os06g02490) 分别为 74% 和 76%, 与玉米 ACBP (ACG46576) 为 76%。除了与植物的 ACBP 序列同源以外还与脊椎动物的 ACBP 蛋白具有一定的序列相似性, 如与鲤鱼的 endozepine 蛋白 (AAT00460.1)、非洲爪蟾的安定剂结合抑制剂 (NP\_001085947.1) 和家鸡 ACBP (NP\_989907.1) 的氨基酸序列一致性分别为 49%、48% 和 47%。这些与 *MdACBP2* 表现为序列同源的植物或动物蛋白都具有 ACB 结构域, 而且 ACB 结构域的氨基酸序列在不同物种之间高度保守。多重序列比对结果表明, 在 ACB 结构域内与酰基辅酶 A 相互作用的 4 个保守的氨基酸 (Tyr-65、Lys-69、Lys-91 和 Tyr-110) 同样存在于 *MdACBP2* 中 (图 2)。

```

AtACBP6      LKEEFEEHAEKVNTILTELPSEDLIIYGLYKQAKFEPVDTSRPGFYSMKERAKWDAMKAVEGKSSSEAMNEYITKVKQLLEVA
CcEndozepine SEAEFCQAEEVKQLKAKPTDAEMLEIYSLYKQATVGVNTARPGILDFTGKAKWDAMEKKKMSKDDAMKAYIAKVELKKEY
OsACBP3      LQEDFEYAEKVKTLPESTSNEDKIIYGLYKQATVGVNTARPGIEAQRDRKWDAMKAVEGKSKBAMSYITKVKQLCEEA
OsACBP2      .....TLPDTISNEDKIIYGLYKQATVGVNTARPGIENLKDVKWDAMKAVEGKSKBAMSYITKVKQLLEEA
OsACBP1      LQEDFEYAEKAKTLPESTSNENKIIYGLYKQATVGVNTARPGIEAQRDRKWDAMKAVEGKSKBAMSYITKVKQLLEEA
MdACBP2      YMEEFDEHAEKAKTLPKSTTNENKIIYGLYKQATVGVNTARPGIFNFKDRKWDAMKAVEGKSKBAMSYITKVKHLLEEA
DrACBD7      LKAEEFCYAEKVKTKRPTDQELDIYGLYKQATVGVNTARPGIDLKGKAKWDAMSRKMSSEAMKAYITLAKQAIKEY
VvACBP       .....TLPENTTNENKIIYGLYKQATVGVNTARPGIENLRERAKWDAMKAVEGKSSSEAMNEYITKVKQLLEEA
Consensus    l y lykqa g pg kwdaw g s am yi

```

图 2 *MdACBP2* 与其它 ACBP 家族蛋白的 ACB 结构域的多重比对

黑色背景的白色字母表示一致的氨基酸, 红色背景字母表示一致性高于 75% 的氨基酸, 蓝色背景字母表示一致性高于 50% 的氨基酸,

星号表示酰基辅酶 A 结合位点的保守氨基酸残基。蛋白名称、来源物种及序列号如下: VvACBP (葡萄, XP\_002263421),

CcEndozepine (鲤鱼, AAT00460), DrACBD7 (斑马鱼, NP\_001122240), OsACBP1 (水稻, NP\_001061062),

OsACBP2 (水稻, NP\_001050536), OsACBP3 (水稻, NP\_001056611), AtACBP6 (拟南芥, AEE31396)。

Fig. 2 Amino acid sequence alignment of *MdACBP2* and other proteins containing ACB domain

Identical amino acids are in white letters with black background. Red background indicates amino acid with  $\geq 75\%$  identity and blue background indicates amino acid with  $\geq 50\%$  identity. The Asterisks (\*) indicates conserved amino acid residues corresponding acyl-coA binding site. The

accession numbers of the proteins used in alignment are listed as following: VvACBP (*Vitis vinifera*, XP\_002263421), CcEndozepine (*Cyprinus carpio*, AAT00460), DrACBD7 (*Danio rerio*, NP\_001122240), OsACBP1 (*Oryza sativa* NP\_001061062), OsACBP2

(*Oryza sativa* NP\_001050536), OsACBP3 (*Oryza sativa* NP\_001056611), AtACBP6 (*Arabidopsis thaliana* AEE31396)。

为进一步确证 MdACBP2 蛋白与其它植物 ACBP 之间的相互关系,将来源于拟南芥、水稻、大豆的 ACBP 蛋白的氨基酸序列与 MdACBP2 一起用邻接法聚类。ACBP 家族的蛋白可明显分为 4 个亚群,即是 Class I、Class II、Class III、Class IV。MdACBP2 与拟南芥的 AtACBP6、水稻的 OsACBP1、OsACBP2、OsACBP3,以及来源于大豆的 GmACBP6 共同聚类在同一个亚群,同属于植物 ACBP 蛋白家族的 Class I 亚族(图 3)。

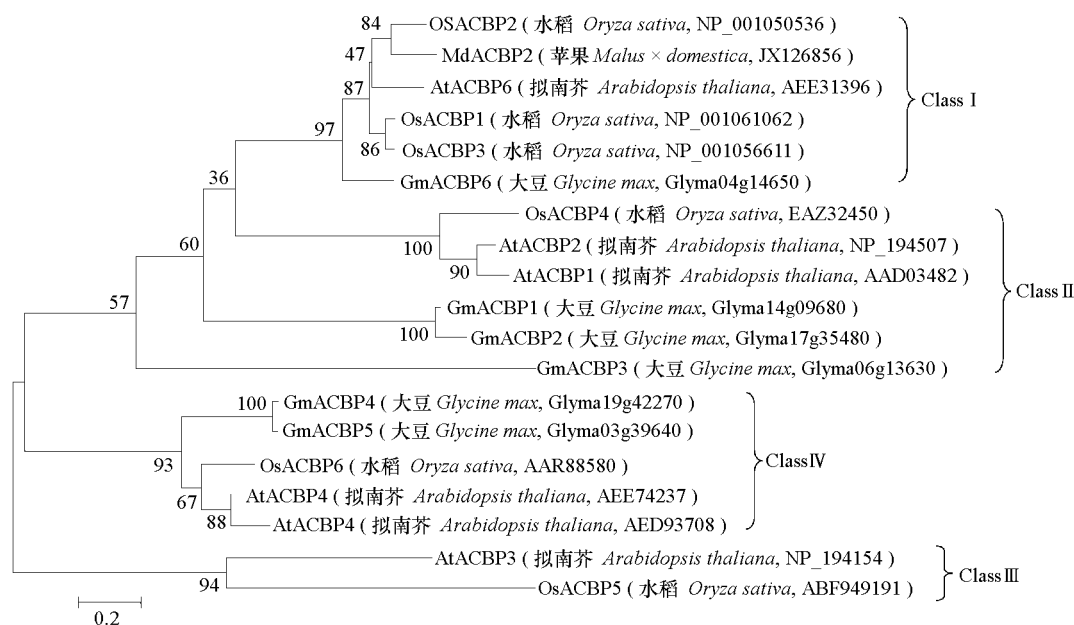


图 3 MdACBP2 与不同来源的 ACBP 蛋白的系统进化树

图中数字代表 Bootstrap 值。

Fig. 3 Phylogenetic tree constructed by the neighbor-joining method in MEGA software based on the ACB domain of ACBPs

The numbers on the tree indicate bootstrap values.

## 2.3 MdACBP2 的组织表达分析

用荧光定量 PCR 技术检测出 MdACBP2 在‘鸡冠’苹果的幼叶、花、幼果、枝皮、一年生侧根、芽等不同组织中均有表达,在幼叶中的表达量最高,在幼果中表达量最低(图 4)。

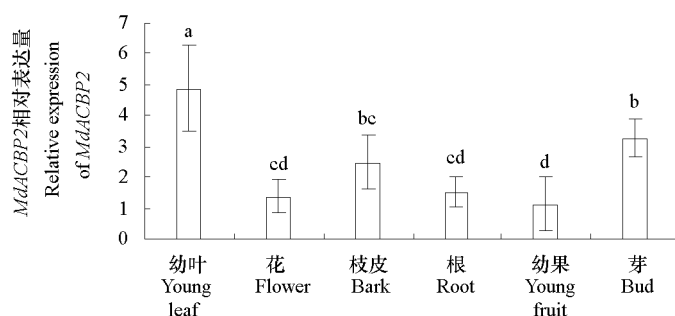
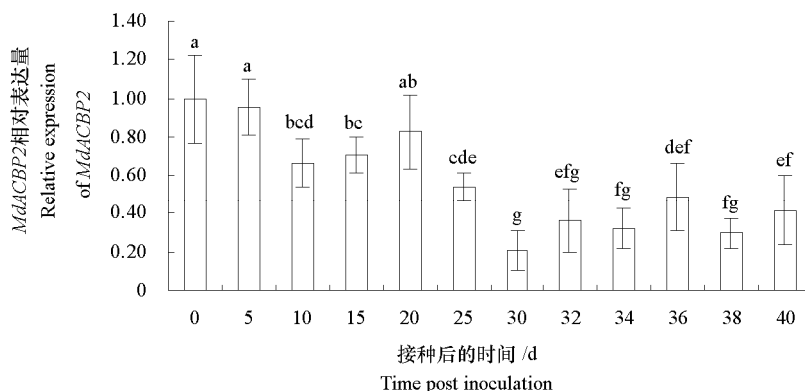


图 4 MdACBP2 在苹果各组织和器官中的表达

Fig.4 The expression of *MdACBP2* in different tissues and organs of apple

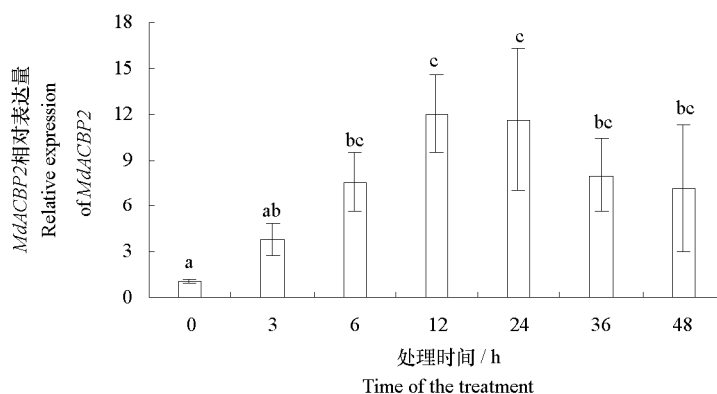
## 2.4 轮纹病病原菌侵染抑制 *MdACBP2* 表达

‘鸡冠’苹果树一年生枝条中, *MdACBP2* 的表达在接种轮纹病病原菌后 0~40 d 检测范围内出现两次下调。第 1 次出现在接种后 10~15 d, *MdACBP2* 的表达显著下调至对照的 66% ( $P < 0.05$ ), 20 d 时恢复到对照水平。第 2 次下调从 25 d 时开始, 表达显著降低, 在 30 d 时降低至对照的 21%, 达到最低点, 此后维持在较低水平 (图 5)。

图 5 轮纹病病原菌侵染后 *MdACBP2* 在苹果枝条皮中的表达Fig.5 The expression of *MdACBP2* in bark of apple after inoculation with *Botryosphaeria dothidea*

## 2.5 低温胁迫诱导 *MdACBP2* 的表达

以荧光定量 PCR 技术检测 4 °C 低温处理 0~48 h 的‘嘎啦’苹果组培苗叶片中 *MdACBP2* 的表达, 显示低温能显著提高 *MdACBP2* 的表达。在低温处理 3 h, *MdACBP2* 表达量开始显著升高, 到 12~24 h 达到最高点, 与对照相比提高了 11.5 倍 ( $P < 0.01$ )。36 和 48 h 时, 有所降低, 但维持在一个相对较高的水平 (图 6)。

图 6 低温处理后 *MdACBP2* 在苹果叶中的表达Fig.6 The expression of *MdACBP2* in leaves of apple after treatment with low temperature

## 2.6 渗透胁迫抑制 *MdACBP2* 表达

用 10% PEG 对‘嘎啦’苹果组培苗进行渗透胁迫, 然后用荧光定量 PCR 技术分析 *MdACBP2*

的时序表达。胁迫处理 6 h 后, *MdACBP2* 在叶中的表达显著降低至对照的 25% ( $P < 0.01$ ), 在 24 h 后开始上升 (图 7)。36 和 48 h 时, 基本回复到对照水平。

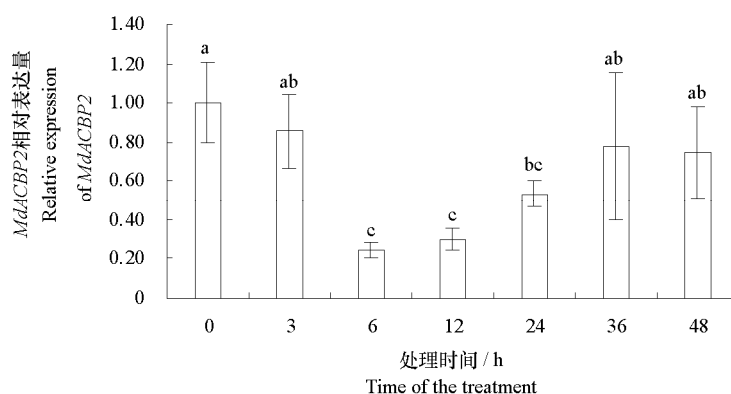


图 7 渗透胁迫后 *MdACBP2* 在苹果叶中的表达

Fig. 7 The expression of *MdACBP2* in leaves of apple after treatment with water stress

## 2.7 $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ 处理不影响 *MdACBP2* 表达

用  $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  处理‘嘎啦’苹果组培苗, *MdACBP2* 在叶片中的表达在整个试验过程中没有发生显著变化 ( $P > 0.05$ ) (图 8)。

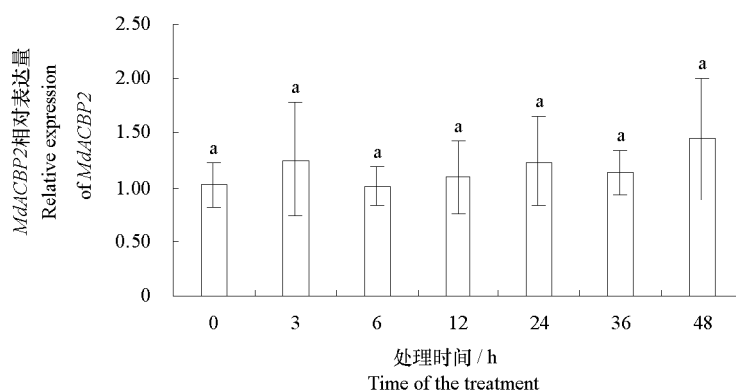


图 8  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  处理后 *MdACBP2* 在苹果叶中的表达

Fig. 8 The expression of *MdACBP2* in leaves of apple after treatment with  $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{Pb}(\text{NO}_3)_2$

## 3 讨论

ACBP 蛋白是一个保守的蛋白家族, Meng 等 (2011) 根据其保守的 ACB 结构域将来源不同植物的 ACBP 蛋白进行系统进化分析, 将其分为 4 个亚族, 其中 Class I 亚族是结构最简单的亚族, 除 ACB 结构域外, 无信号肽和其他结构域, 是存在于细胞质中的蛋白。同时, Class I 也被认为是最原始的亚群, 是其他较复杂亚群 Class II, III 和 IV 发生的基础 (Meng et al., 2011), 不同亚群适应不同功能而发生序列歧化。本文中报道的苹果酰基辅酶 A 结合蛋白的编码基因 (*MdACBP2*) 编码区全长 378 bp, 编码 125 个氨基酸残基。氨基酸序列中包含有一个 ACB 结构域。序列分析和结构特征表明 *MdACBP2* 蛋白属于 ACBP 家族 Class I 亚族, 与同亚族的其他蛋白一样, 推定的 *MdACBP2* 蛋白序列中包含 ACB 结构域, 无跨膜区和信号肽, 暗示 *MdACBP2* 是细胞质中的蛋白。



在 *MdACBP2* 的 ACB 结构域中,存在着与酰基酯结合的 4 个保守的氨基酸(Tyr-136、Lys-140、Lys-162 和 Tyr-181) (Kragelund et al., 1993),表明 *MdACBP2* 像其他 ACBP 蛋白一样可能参与酰基酯 CoA 的运输。

Blast 分析表明,*MdACBP2* 蛋白与已知功能的拟南芥 *AtACBP6* 和水稻的 *OsACBP1*、*OsACBP2*、*OsACBP3* 及脊椎动物鲤鱼,非洲爪蟾和斑马鱼等 ACBP 蛋白具有较高的序列相似性。鲤鱼、非洲爪蟾和斑马鱼等 ACBP 蛋白在动物体内作为安定剂结合抑制剂存在,并在酰基酯代谢中发挥作用 (Guidotti et al., 1983; Chang et al., 1996; Klein et al., 2002)。拟南芥 *AtACBP6* (Chen et al., 2008) 和水稻的 *OsACBP1*、*OsACBP2*、*OsACBP3* 都属于 Class I (Meng et al., 2011),参与植物的脂类代谢,同时也参与对逆境反应。尽管这些蛋白同属一个亚群,但是它们对环境胁迫的反应有很大的差异。以前的研究表明 *AtACBP6* 能响应低温诱导提高表达,而且过量表达 *AtACBP6* 能够提高拟南芥的抗冷性 (Chen et al., 2008),但水稻 *OsACBP1*、*OsACBP2*、*OsACBP3* 的表达则受低温胁迫的抑制 (Meng et al., 2011)。在本研究中,低温条件下 *MdACBP2* 表达提高,暗示其可能参与了苹果幼苗对冷胁迫的抗性。这种响应冷胁迫的表达模式与 *AtACBP6* 在冷冻胁迫下的反应相似,暗示 *MdACBP2* 可能以与 *AtACBP6* 相似的方式参与抗冷性反应。*AtACBP6* 参与抗冻胁迫,伴随着磷脂酶基因 *PLD $\delta$*  表达的提高,同时卵磷脂含量降低、磷脂酸含量提高,暗示 *AtACBP6* 提高拟南芥的抗冻性是经过 *PLD $\delta$*  介导的途径 (Chen et al., 2008),是否 *MdACBP2* 通过同样的方式参与植物的抗冷反应还需要进一步的研究。

在 ACBP 家族中,*AtACBP3* 和 *OsACBP5* 能够被真菌病原侵染诱导 (Meng et al., 2011, Xiao et al., 2011b, Zheng et al., 2012),*AtACBP3* 和 *AtACBP2* 能够被重金属胁迫诱导 (Xiao et al., 2008),而 *OsACBP4* 响应干旱胁迫表达提高。尽管同为 ACBP 家族,但 *MdACBP2* 的表达并没有响应这几种胁迫而提高,这可能是由于 *MdACBP2* 与这几种基因具有不同的生理功能。*MdACBP2* 蛋白和 *AtACBP3*、*OsACBP5*、*AtACBP3*、*AtACBP2*、*OsACBP4* 蛋白分属于不同的亚群,除了 ACB 结构域以外,在蛋白质结构的其他部分,*MdACBP2* 与这几种蛋白存在着较大的差异。比如,*AtACBP3* 和 *OsACBP5* 都具有跨膜域,*AtACBP1*、*AtACBP2* 和 *OsACBP4* 都具有 ANK 基序和信号肽 (Meng et al., 2011)。这些结构上的不同,使它们参与不同的生理功能,在遭受胁迫时具有不同的反应,出现不同的表达变化。*MdACBP2* 的表达也缺乏像 *AtACBP1*、*AtACBP2* 那样对  $Pb^{2+}$  胁迫的响应,这同样可能是由于其不参与对  $Pb^{2+}$  胁迫的响应,缺乏相应生理功能的原因。Andersen 等 (1993) 的研究表明,ACBP 与重金属的结合与氨基酸序列所形成的蛋白结构中微环境有关,包括电荷数,氧原子数等。*MdACBP2* 蛋白与 *AtACBP1*、*AtACBP2* 蛋白所带的电荷数和氧原子数均存在着差异,*MdACBP2* 蛋白的微环境可能会导致其不适于与  $Pb^{2+}$  相互结合。

总之,本研究中克隆和鉴定了一个新的苹果酰基辅酶 A 结合蛋白的编码基因,该基因属于 ACBP 家族的 Class I 亚群,能够响应冷胁迫而提高表达,推测与植物对冷胁迫的响应有关。

## References

- Andersen K V, Poulsen F M. 1993. The three-dimensional structure of acyl-coenzyme A binding protein from bovine liver: Structural refinement using heteronuclear multidimensional NMR spectroscopy. *Journal of Biomolecular NMR*, 3: 271 - 284.
- Burton M, Rose T M, Faergeman N J, Knudsen J. 2005. Evolution of the acyl-CoA binding protein (ACBP). *Biochemistry Journal*, 392: 299 - 307.
- Chang J L, Tsai H J. 1996. Carp cDNA sequence encoding a putative diazepam-binding inhibitor/endozepine/acyl-CoA-binding protein. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1298: 9 - 11.
- Chen Q F, Xiao S, Chye M L. 2008. Overexpression of the *Arabidopsis* 10-kilodalton acyl-coenzyme A-binding protein ACBP6 enhances freezing

- tolerance. *Plant Physiology*, 148: 304 – 315.
- Guidotti A, Forchetti C M, Corda M G, Konkel D, Bennett C D, Costa E. 1983. Isolation, characterization and purification to homogeneity of an endogenous polypeptide with agonistic action on benzodiazepine receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 80: 3531 – 3535.
- Klein S L, Strausberg R L, Wagner L, Pontius J, Clifton S W, Richardson P. 2002. Genetic and genomic tools for *Xenopus* research: The NIH *Xenopus* initiative. *Developmental Dynamics*, 225: 384 – 391.
- Kragelund B B, Andersen K V, Madsen J C, Knudsen J, Poulsen F M. 1993. Three-dimensional structure of the complex between acyl-coenzyme A binding protein and palmitoyl-coenzyme A. *Journal of Molecular Biology*, 230: 1260 – 1277.
- Larkin M A, Blackshields G, Brown N P, Chenna R, McGettigan P A, McWilliam H, Valentin F, Wallace I M, Wilm A, Lopez R, Thompson J D, Gibson T J, Higgins D G. 2007. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*, 23: 2947 – 2948.
- Leng Wei-feng, Li Bao-hua, Guo Li-yun, Dong Juan-hua, Wang Cai-xia, Li Gui-fang, Dong Xiang-li. 2009. Method to promote sporulation of *Botryosphaeria berengeriana* f. sp. *Piricola*. *Acta Phytopathologica Sinica*, 39 (5): 536 – 539. (in Chinese)
- 冷伟峰, 李保华, 国立耘, 董娟华, 王彩霞, 李桂舫, 董向丽. 2009. 苹果轮纹病菌诱导产孢方法. *植物病理学报*, 39 (5): 536 – 539.
- Li Tian-hong, Li Shao-hua, Wang Jing. 2005. Effects of water deficiency stress on transport and distribution of  $^{14}\text{C}$ -assimilates in micropropagated apple plants. *Journal of China Agricultural University*, 10 (5): 44 – 48. (in Chinese)
- 李天红, 李绍华, 王 晶. 2005. 水分胁迫对苹果组培苗  $^{14}\text{C}$  - 光合产物运输和分配的影响. *中国农业大学学报*, 10 (5): 44 – 48.
- Livak K J, Schmittgen T D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$  method. *Methods*, 25: 402 – 408.
- Meng W, Su Y C F, Saunders R M K, Chye M L. 2011. The rice acyl-CoA-binding protein gene family: Phylogeny, expression and functional analysis. *New Phytologist*, 189: 1170 – 1184.
- Mikkelsen J, Hojrup P, Nielsen P F, Roepstorff P, Knudsen J. 1987. Amino acid sequence of acyl-CoA-binding sequence from cow liver. *Biochemistry Journal*, 245: 857 – 861.
- Rasmussen J T, Faergeman N J, Kristiansen K, Knudsen J. 1994. Acyl-CoA binding protein (ACBP) can mediate intermembrane acyl-CoA transport and donate acyl-CoA for beta-oxidation and glycerolipid synthesis. *Biochemistry Journal*, 299: 165 – 170.
- Rasmussen J T, Rosendal J, Knudsen J. 1993. Interaction of acyl-CoA binding protein (ACBP) on processes for which acyl-CoA is a substrate, product or inhibitor. *Biochemistry Journal*, 292: 907 – 913.
- Shoyab M, Gentry L E, Marquardt H, Todaro G J. 1986. Isolation and characterization of a putative endogenous benzodiazepineoid (endozepine) from bovine and human brain. *Journal Biological Chemistry*, 261: 11968 – 11973.
- Tang W, Ding Z, Zhou Z, Wang Y, Guo L. 2012. Phylogenetic and pathogenic analyses show that the causal agent of apple ring rot in China is *Botryosphaeria dothidea*. *Plant Disease*, 96: 486 – 496.
- Xiao S, Chye M L. 2009. An *Arabidopsis* family of six acyl-CoA-binding proteins has three cytosolic members. *Plant Physiology and Biochemistry*, 47: 479 – 484.
- Xiao S, Chye M L. 2011a. New roles for acyl-CoA-binding proteins (ACBPs) in plant development, stress responses and lipid metabolism. *Progress in Lipid Research*, 50: 141 – 151.
- Xiao S, Chye M L. 2011b. Overexpression of *Arabidopsis* ACBP3 enhances NPR1-dependent plant resistance to *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000. *Plant Physiology*, 156: 2069 – 2081.
- Xiao S, Gao W, Chen Q F, Ramalingam S, Chye M L. 2008. Overexpression of membrane-associated acyl-CoA-binding protein ACBP1 enhances lead tolerance in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, 54: 141 – 151.
- Zheng S X, Xiao S, Chye M L. 2012. The gene encoding *Arabidopsis* acyl-CoA-binding protein 3 is pathogen inducible and subject to circadian regulation. *Journal of Experimental Botany*, doi: 10.1093/jxb/ers009.
- Zhang Gao-lei, Li Bao-hua, Dong Xiang-li, Wang Cai-xia, Li Gui-fang, Guo Li-yun. 2011. Microanatomy conformation of apple branch tumors caused by *Botryosphaeria dothidea*. *Acta Phytopathologica Sinica*, 41 (1): 98 – 101. (in Chinese)
- 张高雷, 李保华, 董向丽, 王彩霞, 李桂舫, 国立耘. 2011. 苹果轮纹病瘤组织形态研究. *植物病理学报*, 41 (1): 98 – 101.