

甘蓝型油菜生物素羧基载体蛋白基因的克隆与结构分析

戴晓峰, 卢长明, 吴刚, 武玉花, 肖玲

(中国农业科学院油料作物研究所, 武汉 430062)

摘要: 【目的】生物素羧基载体蛋白负责将羧基从生物素羧化酶转移到羧基转移酶上, 对于长链脂肪酸的从头合成与种子含油量的形成具有十分重要的作用。本研究的目的是从甘蓝型油菜品种基因组 DNA 中分离生物素羧基载体蛋白 (BCCP) 基因的全长编码区序列, 通过生物信息学分析揭示该基因的结构特征 (包括内含子的数量、长度与分布, 蛋白质保守区疏水性特征等) 和功能关系。【方法】基因克隆采取同源序列法进行。【结果】分离得到的 bccp 基因全长均为 1 600 bp 左右, 根据其结构特点可以分成 3 种类型, 它们均包含 5 个内含子。bccp1 基因编码的蛋白质具备完整的生物素化功能结构域, 是唯一功能完整的基因序列; bccp2 和 bccp3 由于移码突变造成蛋白合成提前终止, 翻译的蛋白质均缺少生物素化结构域。【结论】本研究首次从中国冬油菜品种中克隆获得 bccp 基因的全长序列并揭示了其序列特征, 为进一步利用该基因开展含油量的基因调控研究提供了科学依据。

关键词: 脂肪酸合成; 生物素羧基载体蛋白 (BCCP); 基因克隆; 基因结构分析; 甘蓝型油菜

Gene Cloning and Structural Analysis of Biotin Carboxyl Carrier Protein Encoding Gene in *Brassica napus*

DAI Xiao-feng, LU Chang-ming, WU Gang, WU Yu-hua, XIAO Ling

(Oil Crops Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Wuhan 430062)

Abstract: 【Objective】Acetyl-CoA Carboxylase (ACCCase) catalyzes the first step in *de novo* biosynthesis of fatty acids. Biotin carboxyl carrier protein (BCCP), as one of the subunits of plastidial ACCCase, controls the transfer of carboxyl from acetyl-CoA carboxylase to carboxyltransferase. This study is designated to isolate bccp genes from genomic DNA of *Brassica napus* and reveal the structural aspects and functional relevance of these genes, including gene length, intron distribution, conserved hydrophobic regions etc. 【Method】Homologous sequence amplification method was used in gene isolation. 【Result】Three isoforms of bccp genes in full length were obtained. Only one isoform bccp1 encodes a protein which is full in length and contains the domain for biotinylation, while the other two isoforms bccp2 and bccp3 encode proteins that are incomplete and lack of the domain for biotinylation. 【Conclusion】Full length bccp genes were first isolated and characterized from the large scale commercialized varieties of China's winter type rapeseed, providing a scientific basis for further utilization of these genes in genetic modification of oil content.

Key words: De Novo fatty acid biosynthesis; Biotin carboxyl carrier protein (BCCP); Gene cloning; Gene structure analysis; *Brassica napus*

0 引言

【研究意义】植物乙酰辅酶 A 羧化酶 (ACCCase) 是植物脂肪酸合成的关键酶^[1]。在 ATP 存在的条件

下, 它催化乙酰辅酶 A 生成丙二酸单酰辅酶 A, 该步骤作为长链脂肪酸合成的第一步, 是种子脂肪酸合成与含油量形成的关键调控步骤^[2,3]。ACCCase 酶的活性决定了脂肪酸的合成速度, 因而成为植物种子含油量

收稿日期: 2006-05-31; 接受日期: 2006-08-15

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30471099), 国家“973”项目 (2006CB101600), 国家“863”项目 (2006AA10A113)

作者简介: 戴晓峰 (1980-), 女, 河南郑州人, 研究方向为油菜分子生物学。通讯作者卢长明 (1959-), 男, 江西鄱阳人, 研究员, 博士, 研究方向为基因工程与转基因安全。Tel: 027-86728186; E-mail: cmlu@oilcrops.cn

基因调控的关键靶标^[4]。【前人研究进展】根据结构和来源,该酶可划分为两种类型, I 类 ACCase 是一条由 3 个融合在一起的结构域组成的多肽,分子量至少为 200 kDa,这 3 个结构域分别是生物素羧化酶(BC),生物素羧化酶转运蛋白(BCCP)和羧基转移酶(CT); II 类 ACCase 是一个由 BC, BCCP, α -CT 和 β -CT 等 4 个亚基组成的多肽复合物,分子量约 700 kDa^[5-7]。其中生物素羧化酶亚基(BC)在 ATP 存在下将生物素部分催化转移到生物素羧基载体蛋白(BCCP)上, α 和 β 羧基转移酶亚基(α -CT 和 β -CT)再将活化的羧基从 BCCP 转移到乙酰辅酶 A 上形成丙二酸单酰辅酶 A^[8]。在双子叶植物中, I 类 ACCase 属于泛组织表达类型,主要通过碳链延长负责蜡脂和类黄酮等物质的合成^[4,9,10],而 II 类 ACCase 具有组织特异性,存在于质体基质中^[4],在发育种子中表达量上调^[4,11,12],是催化植物种子油脂从头合成的关键酶^[4]。II 类 ACCase 的各个亚基分别由不同的基因编码^[12]。目前发现在拟南芥中 II 类 ACCase 的 BCCP 亚基由 2 个核基因编码^[10],在甘蓝型油菜中至少由 6 个核基因编码^[12]。Elborough 等^[12]根据这 6 个基因的 3'UTR 和 ORF 特征,将这 6 个 bccp 基因分成 2 个亚类,即 pBP1 和 pBP2 属于亚类 I, pBP3、pBP4、pBP6、pBP7 属于亚类 II,其中 pBP4 与 pBP6 编码完整的 BCCP 蛋白。对于 bccp 基因的结构、物种间变异规律、调控机制等目前还缺乏深入的研究。迄今为止,中国还没有从油菜基因组 DNA 中克隆获得 bccp 基因和进行深入结构分析的报道。【本研究切入点】由于 bccp 基因类型复杂,该基因的序列特征在一定程度上决定了该基因的功能。开展脂肪酸的基因调控研究时,必须对该基因的结构特征进行深入分析,以便了解它们与基因功能的关系。【拟解决的关键问题】鉴于 bccp 基因在油料作物含油量基因调控方面可能具有重要利用价值,笔者从中国大面积推广种植的冬油菜品种基因组中克隆获得 bccp 基因,对它们的内含子分布和功能结构域特征进行了深入的结构分析。

1 材料与方 法

1.1 材 料

基因分离采用 3 个甘蓝型油菜品种进行,它们分别是高芥酸品种中油 821 低芥酸品种中双 9 号和中双 6 号。

1.2 方 法

1.2.1 DNA 提取 取 2 到 3 片油菜小叶片,用 1%

的 CTAB 裂解液 600 μ l 研磨,然后于 65 $^{\circ}$ C 温浴 30 min,其间不时轻摇。将裂解混合物取出后于 12 000 r/min 离心 10 min,取上清,加入等量酚抽提一次,离心后再用氯仿/异戊醇抽提一次,然后用两倍体积的无水乙醇于 -20 $^{\circ}$ C 沉淀 DNA 1 h 以上。接着于 4 $^{\circ}$ C 在 12 000 r/min 离心 10 min 收集沉淀,用 70% 预冷乙醇洗涤 DNA 两遍,干燥后加入适量 RNA 酶,37 $^{\circ}$ C 放置 1 h,最后加 40 μ l 去离子水于 4 $^{\circ}$ C 过夜溶解。

1.2.2 扩增 bccp 全长基因 根据 GenBank 公布的油菜(Accession No. AY034410, AY538674, AY538675, Z50868, X90727, X90728, X90729, X90730, X90731, X90732)和拟南芥 bccp 基因(Accession No. AB005242, AF223948, AF236873, ATF18021, ATT20K14, AY054617, AY072460, AY086528, AY087857, NM_104145, NM_112439, NM_115471, NM_121557, NM_121644, NM_180260, NM_202717, NM_203060)全长 mRNA 编码区两端比对所得的保守区(包括起始密码子 ATG 和终止密码子 TGA)设计全长扩增引物,结果将正向引物与反向引物分别设计为 TCATCCTATCTCAACAATGGCGTCA 与 CAGC TTCTTCATTTCAAGGAGCGA。

PCR 扩增体系(50 μ l)含有:1 \times KDO Plus Buffer, MgSO₄ 1 mmol \cdot L⁻¹, 每种 dNTP 0.2 mmol \cdot L⁻¹, 正反向引物各 2.5 μ mol \cdot L⁻¹, 油菜基因组 DNA 50 ng, 高保真 DNA 聚合酶 KDO Plus 1 U。扩增程序(Touch-down)为:94 $^{\circ}$ C 5 min 1 个循环;94 $^{\circ}$ C 30 sec, 60 $^{\circ}$ C 30 sec(每循环降低 0.5 $^{\circ}$ C), 68 $^{\circ}$ C 2 min, 进行 8 个循环;94 $^{\circ}$ C 30 sec, 56 $^{\circ}$ C 30 sec, 68 $^{\circ}$ C 2 min, 进行 30 个循环;68 $^{\circ}$ C 2 min 1 个循环;4 $^{\circ}$ C 停止。94 $^{\circ}$ C 热启动。取 5 μ l 产物在 1% 的琼脂糖凝胶上进行电泳检测。

1.2.3 转入克隆载体、测序 用 EcoRV 酶切克隆载体 pZero²(kan^r): 酶切体系(50 μ l 体系)含有载体 3 μ l(约 150 ng), 1 \times Buffer 3, 1 \times BSA, EcoRV 30 U, 37 $^{\circ}$ C 酶切 3 h。纯化:将电泳检测后剩余的 45 μ l PCR 产物与 50 μ l 酶切产物混合纯化,最后浓缩到 22 μ l 水中,所用纯化试剂盒为 V-Gene Biotechnology Limited(250)。连接(25 μ l 体系):体系中含有 22 μ l 纯化产物,1 \times 连接酶 Buffer, T₄连接酶 200 U。转化:将连接产物转化入大肠杆菌菌株 Top10 感受态细胞中,筛选平板为含 50 mg \cdot L⁻¹ Kan 的 LB 平板。克隆筛选:PCR 筛选体系(25 μ l)含有 1 \times Taq 酶 Buffer(含(NH₄)₂SO₄), MgCl₂ 2 mmol \cdot L⁻¹, 每种 dNTP 0.2

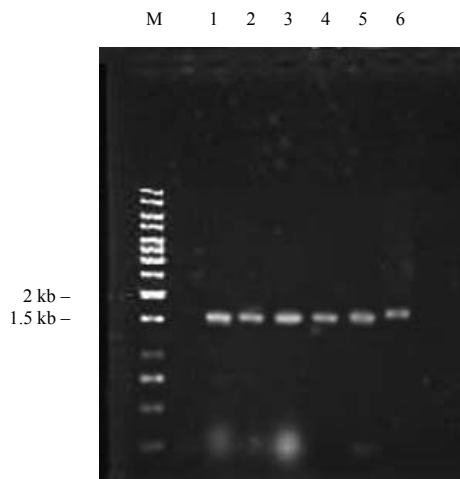
mmol·L⁻¹, M13 正反向引物(不用分离 *bccp* 基因时设计的特异引物, 以免误分离出大肠杆菌中的该基因)各 2.5 pmol·L⁻¹, Taq 酶 1 U, 底物菌体 2.5 μl (OD=0.8)。电泳检测 PCR 产物, 1.8 kb 左右的带为阳性带, 选取阳性克隆适量扩培进行测序。测序工作由北京三博远志公司完成。

1.3 数据处理

序列拼接用到 ContigExpress 软件进行; 基因及蛋白序列比对分析用 BlastN, ClustalW, 和 AlignX 进行; ORF 及内含子查找用到软件 Vector NTI 和 AlignX 进行; 蛋白质翻译、保守区查找及特性分析用 DNASTar 和 DNASIS 软件进行。

2 结果与分析

利用正向引物 TCATCCTATCTCAACAATG GCGTCA 和反向引物 CAGCTTCTTCATTTCAAGG AGCGA 对 3 个品种的基因组 DNA 进行扩增, 扩增产物经电泳分离后, 获得长度 1 500~1 700 bp 扩增产物(图 1)。



每个品种选取 2 份 DNA 进行扩增; M: 分子量标记; 1: 中油 821(1); 2: 中油 821 (2); 3: 中双 6 号 (1); 4: 中双 6 号 (2); 5: 中双 9 号 (1); 6: 中双 9 号 (2)
DNA of two samples for each cultivar was amplified separately; M: marker; 1: 821(1); 2: 821(2); 3: ZS6(1); 4: ZS6(2); 5: ZS9(1); 6: ZS9(2)

图 1 *bccp* 基因扩增产物电泳图

Fig. 1 PCR amplification of *bccp* gene

测序结果表明, 不同品种来源的 *bccp* 扩增产物表现出明显的多样性。根据序列长度和特征, 扩增产物分为 3 种类型, 分别命名为 *bccp1*, *bccp2*, *bccp3* (表

1)。从中油 821 和中双 9 号中发现两种序列类型, 从中双 6 号中发现一种(表 1)。*bccp1* 仅从高芥酸中油 821 中分离得到, *bccp2* 在所研究的 3 个品种中均分离得到, *bccp3* 仅从新型低芥酸品种中双 9 号中分离得到。它们的长度分别为 1 464, 1 465 和 1 660 bp。将这些序列与网上公布的甘蓝型油菜中 *bccp* 基因的 mRNA 进行比对、利用 Vector NTI 软件寻找 ORF, 并将翻译出的蛋白与已知甘蓝型油菜 BCCP 蛋白比对后, 证实了扩增产物确实是甘蓝型油菜 BCCP 蛋白的编码基因, 并且包含了该基因的完整编码区。

2.1 *bccp* 基因的核苷酸序列特征分析

序列比对后发现, 分离出的 3 个基因均含有 5 个明显的内含子, 其中 *bccp1*、*bccp2* 的内含子长度与序列完全相同, 而 *bccp3* 比较特殊, 其除内含子 3 的长度与 *bccp1*、*bccp2* 相同外, 其余内含子的长度及序列均有不同程度的差异(表 1)。*bccp1* 与 *bccp2* 的内含子起止位置基本相同, 只是从内含子 4 开始 *bccp2* 的内含子位置较 *bccp1* 整体向后推了一位, 也即 *bccp2* 在内含子 3 与内含子 4 之间的编码区内比 *bccp1* 多出了一个碱基。内含子的具体长度及位置如表 1 所示。

表 1 所分离 *bccp* 基因的核苷酸序列特征比较

Table 1 Characterization of 3 *bccp* isoforms isolated from genomic DNA of *Brassica napus*

比较内容 Content	<i>bccp1</i>	<i>bccp2</i>	<i>bccp3</i>
全长 Full length	1464 bp	1465 bp	1660 bp
ORF 长度 ORF length	831 bp	579 bp	582 bp
内含子 1 Intron1	256 bp	256 bp	258 bp
内含子 2 Intron2	127-382	127-382	130-387
内含子 3 Intron3	87 bp	87 bp	225 bp
内含子 4 Intron4	425-511	425-511	430-654
内含子 5 Intron5	84 bp	84 bp	84 bp
来源品种 Source cultivar	637-720	637-720	780-863
	109 bp	109 bp	90 bp
	1025-1133	1026-1134	1169-1258
	94 bp	94 bp	126 bp
	1206-1299	1207-1300	1331-1456
	中油 821	中油 821、中双 9 号、中双 9 号	
	ZY821	中双 6 号	ZS9
		ZY821, ZS9, ZS6	

进一步比对 *bccp1*、*bccp2* 与 *bccp3*, 发现 *bccp2* 与 *bccp1* 的序列基本相同, 只是 *bccp2* 在第 498 位比 *bccp1* 多一个腺嘌呤 A, 其它序列完全相同。*bccp3* 则

与 *bccp1* 和 *bccp2* 的差异较大, 并且在 *bccp2* 第 498 位的相应位点同样多出一个碱基 A。将分离得到的 *bccp* 基因进行 BlastN 比对, 发现与已公布的甘蓝型油菜 pBP6 (Accession No. X90731.1) 具有非常高的同源性, HIT SCORE 得分分别达到 559、545、537, E 值分别为 $9e-156$ 、 $1e-151$ 、 $4e-149$ 。基因数据库中发表的 6 条序列在 *bccp2* 第 498 位的相应位点上均没有多出的腺嘌呤 A。

2.2 *bccp* 基因编码蛋白的氨基酸序列特征分析

对 *bccp* 基因的开放阅读框及相应的编码蛋白结构进行分析表明, BCCP1 蛋白含有 277 个氨基酸, BCCP2 和 BCCP3 则分别只有 193 和 194 个氨基酸。从图 2 可以看出, BCCP1 蛋白比 BCCP2 和 BCCP3 蛋白长出许多, 而 BCCP3 蛋白仅比 BCCP2 蛋白多 1 个氨基酸。BCCP1 从第 167 位开始与另外两种蛋白出

现不同, 而 BCCP2 与 BCCP3 从该位开始直至结束氨基酸序列完全相同。进一步分析发现, BCCP3 在第 6 位比 BCCP1 和 BCCP2 多出 1 个异亮氨酸, 在第 16 位、20 位、29 位、30 位、48 位、52 位发生了 6 处氨基酸替换, 分别为将天冬酰胺 (N) 替换成丝氨酸 (S), 将谷氨酸 (E) 替换成甘氨酸 (G), 将脯氨酸 (P) 替换成亮氨酸 (L), 将谷氨酰胺 (Q) 替换成赖氨酸 (K), 将异亮氨酸 (I) 替换成缬氨酸 (V), 将精氨酸 (R) 替换成组氨酸 (H), 而 BCCP1 和 BCCP2 除肽链长度有所不同外, 其余氨基酸序列完全相同。

通过 AlignX 软件将 BCCP1、BCCP2 和 BCCP3 蛋白序列与 Elborough 等公布的被认为结构与功能完整的 pBP4 及 pBP6 序列进行比对^[12], 发现仅 BCCP1 蛋白具有完整的 N 端和 C 端核心区, 另外两种蛋白虽然 N 端都很完整, 但 C 端都提前终止。



图 2 所分离 BCCP 蛋白的氨基酸序列比对图

Fig. 2 Alignment of the encoded proteins of *bccp* genes isolated

2.3 *bccp* 基因编码蛋白的保守区分析

将 BCCP1 与文献^[12]中 pBP4、pBP6 蛋白的序列进行了多重比对分析。表 2 显示了连续相同氨基酸个数在 10 个以上的保守区的氨基酸及肽链性质, 一共有 4 处, 分别位于 BCCP1 蛋白的第 1 至 18 位、44 至 75 位、92 至 121 位、184 至 245 位。从表 2 可以看出

第 1 保守区的碱性最强, 特别是精氨酸 (R), 3 个碱性氨基酸中占据 2 个, 不含酸性氨基酸, pH=7 时的电荷为 2.91; 具有 7 个高度疏水的氨基酸, 分别是 3 个丙氨酸 (A)、2 个缬氨酸 (V)、1 个亮氨酸 (L) 和 1 个异亮氨酸 (I); 羟基氨基酸含量高, 其中丝氨酸 (S) 占 3 个; 长度为 18 个氨基酸, 符合导肽的一

般规律^[13], 推测参与构成 BCCP 蛋白的导肽部分。第 2 保守区包含 32 个氨基酸, 极性氨基酸含量最高, 由于有文献记载 BCCP 蛋白的 N 端代表蛋白质与蛋白质的作用位点^[14], 因此推测这一区域参与了蛋白质间的相互作用。第 3 保守区的疏水氨基酸含量最多, 由 30 个氨基酸组成, 推测参与构成疏水核心区维持并稳定蛋白的三级结构, 其中 Cys115 是该核心区唯一的半胱氨酸, 与 Fall 等的生化分析结果^[15]和 Athappilly 等采用多重波长异常绕射法测定的结果^[16]相符。第 4 保守区酸性最强, 由 62 个氨基酸组成, 富含脯氨酸、甘氨酸, 参与构成将羧基基团在各亚基活性位点之间转移的臂膀, 属于 BCCP 蛋白的核心区域^[11]。

将不同亚类所有已知的 6 种 BCCP 蛋白与 BCCP1 比对后发现, 第 4 保守区内有 6 处在亚类间保守的基序, 从 N 端起分别位于 BCCP1 的第 193 到 197 位, 第 199 到 209 位, 第 211 到 212 位, 第 214 到 223 位, 第 240 到 242 位以及第 244 到 245 位, 保守基序序列依次为 GEPPF、KVGDKVQKGQV、CI、EAMKLMNEIE、PVS、DT, 其中第 2 个基序中的 Gly201、Gly207 与

第 6 个基序中的 Asp244 是完整 BCCP 蛋白锤头结构中 β 转角处高度保守的氨基酸^[16], 第 4 个保守基序中的 AMKLMN 是生物素化部分^[11], Met219 是与生物素相连的残基^[11]。

将突变蛋白 BCCP2、BCCP3 与完整蛋白 BCCP1 比对后发现, BCCP2 含有除第 4 个保守区外的全部保守区, BCCP3 第 1 个保守区在第 6 位多一个异亮氨酸 (I), 16 位的天冬酰胺 (N) 被替换为丝氨酸 (S), 第 2 个保守区 48 位的异亮氨酸 (I) 被替换为缬氨酸 (V), 52 位的精氨酸 (R) 被替换为组氨酸 (H), 第 3 个保守区没有变化, 无第 4 个保守区。分析 BCCP3 蛋白保守区中这些氨基酸的替换规律, 发现它们均为同类替换, 如表 3 所示这些替换并未带来保守区极性及其带电情况的改变, 因此 BCCP3 与 BCCP2 一样也具有亚类 II 基因编码蛋白的前 3 个保守区。然而突变蛋白 BCCP2 与 BCCP3 都没有第 4 保守区, 而第 4 保守区含有负责生物素化的重要基序, 同时生物素化又是 BCCP 蛋白的主要功能, 因此推测这两个突变蛋白 BCCP2 和 BCCP3 不具有生物素化的功能。

表 2 BCCP 蛋白保守区序列特征与生化特性

Table 2 Sequence characterization and biochemical traits of the conservative domains in BCCP

保守序列 Conservative sequence	位点 Site (bp)	疏水氨基酸 Hydrophobic amino acids		极性氨基酸 Polar amino acids		强酸性氨基酸 Strong acidic amino acids		强碱性氨基酸 Strong alkaline amino acid		等电点 Isoelectric point	pH=7 时的电荷 Charge at PH7
		个数	百分比	个数	百分比	个数	百分比	个数	百分比		
		Number	(%)	Number	(%)	Number	(%)	Number	(%)		
MASLSVPYAKISAPNRRV	1~18	7	39	5	28	0	0	3	17	11.08	2.91
QSTIWRLRATTNEVVSNST PVTNGGCLNGNVK	44~75	9	28	15	47	1	3	3	9	9.32	1.88
KVSGLLKLVDSDRIVELEL KQLDCEIVIRK	92~121	13	43	4	13	6	20	6	20	6.43	-0.12
GTFYRSPGPGPEPPVKVGD KVQKGQVVCIEAMKLMN EIEAEKSGTITELLAEDGKP VSVDT	184~245	19	31	12	19	10	16	7	11	4.63	-3.11

3 讨论

ACCase 酶的活性决定了脂肪酸的合成速度, 上调 ACCase 酶的活性可以使种子含油量提高 3%~5%^[11,17]。BCCP 蛋白作为 ACCase 酶的重要组成部分, 是连接 ACCase 酶另外 3 个亚基的纽带和桥梁, 在植物种子脂肪酸的合成过程中扮演着十分重要的作用^[18,19]。有研究表明, 拟南芥和油菜种子在发育过程中 BCCP 蛋白表达量上调, 与 ACCase 酶的比活性以

及种子油脂含量的变化呈正相关^[18]。反向抑制拟南芥种子 *bccp* 基因的表达, 使 BCCP2 含量减少 38%, 脂肪酸含量降低 9%, 对植株发育和种子活力等性状没有显著影响^[18]。令人感觉意外的是, *bccp* 基因在拟南芥中的过量表达不但没有增加 ACCase 酶的活性, 反而导致种子中 ACCase 酶活性降低 65%, 含油量减少 23%, 结实率下降, 抽苔数增加, 千粒重提高^[19]。有人认为, *bccp* 基因可以编码两种 BCCP 蛋白, 一种可以生物素化, 一种不可以生物素化, 这两种 BCCP

蛋白通过竞争性结合 ACCase 酶的另外两个亚基来调节 ACCase 酶的活性, 从而实现了对脂肪酸合成过程的调控^[19]。本试验的结果为以上假设提供了实验证据。

ACCcase 酶种类复杂, 不同物种以及相同物种的不同组织和不同的细胞器在 ACCcase 酶基因的类型和拷贝数方面均有显著不同^[20-23]。在种子脂肪酸的合成

过程中, 脂肪酸从 2C 到 16C 的延长, 丙二酸单酰 CoA 主要由位于叶绿体的 II 型 ACCcase 酶合成, 而从 18C 到 22C 的延伸, 丙二酸单酰 CoA 主要是由位于细胞液中的 I 型 ACCcase 酶催化合成^[24-26]。因此, 本研究克隆的 *bccp* 基因主要参与脂肪酸的从头合成过程(从 2C 到 16C)。

表 3 *bccp* 基因编码蛋白序列的氨基酸替换对比表

Table 3 Comparison of amino acid substitution in proteins encoded by *bccp* genes

氨基酸位点 Site of amino acid	比较内容 Content	BCCP1	BCCP2	BCCP3
第 16 位 The 16th	氨基酸 Amino acid	N	N	S
	R 基分类	不带电极性 R 基	不带电极性 R 基	不带电极性 R 基
	Type of R-group	Not polarized	Not polarized	Not polarized
第 20 位 The 20th	氨基酸 Amino acid	E	E	G
	R 基分类	带负电 R 基	带负电 R 基	不带电极性 R 基
	Type of R-group	Negatively charged	Negatively charged	Not polarized
第 29 位 The 29th	氨基酸 Amino acid	P	P	L
	R 基分类	非极性 R 基	非极性 R 基	非极性 R 基
	Type of R-group	Not polarized	Not polarized	Not polarized
第 30 位 The 30th	氨基酸 Amino acid	Q	Q	K
	R 基分类	不带电极性 R 基	不带电极性 R 基	带正电 R 基
	Type of R-group	Not polarized	Not polarized	Positively charged
第 48 位 The 48th	氨基酸 Amino acid	I	I	V
	R 基分类	非极性 R 基	非极性 R 基	非极性 R 基
	Type of R-group	Not polarized	Not polarized	Not polarized
第 52 位 The 52nd	氨基酸 Amino acid	R	R	H
	R 基分类	带正电 R 基	带正电 R 基	带正电 R 基
	Type of R-group	Positively charged	Positively charged	Positively charged

本试验分离得到的 3 个基因均含有 5 个内含子, 序列特征非常相似, 显然具有共同的来源, 可能属于复等位基因或相同基因的不同拷贝。*bccp1* 和 *bccp2* 的内含子在长度、分布和序列特征上完全相同, 可能来自相同基因位点。*bccp3* 除内含子 3 的长度与 *bccp1*、*bccp2* 相同外, 其余内含子的长度及序列均有不同程度的差异(表 1)。将分离得到的 3 个 *bccp* 基因与已公布 6 个基因的核苷酸序列及氨基酸序列分别进行比对^[11], 发现只有 *bccp1* 的编码蛋白完整, *bccp2*、*bccp3* 由于腺嘌呤的插入, 导致编码蛋白提前终止。从 3 个 DNA 供体品种中均分离到 1 465 bp 的序列 *bccp2*, 它们都是在第 498 位比 *bccp1* 多一个腺嘌呤 A, 编码的蛋白质缺少生物素化结构域, 说明该基因很可能是一个丧失功能的基因。目前基因数据库中发表的类似基因序列都没有发现第 498 位的腺嘌呤 A。*bccp2* 是否在冬油菜品种中普遍存在需要更多的研究数据, 但本研究的结果至少说明在中国推广的冬油菜品种中存在丧失生物素化功能的 *bccp* 基因。由它们编码的 BCCP 蛋白与 ACC 酶的其它亚基竞争性结合,

可能成为降低 ACC 酶活性的因素, 最终影响油菜种子含油量的提高。

4 结论

本试验第一次从中国冬油菜品种基因组中分离得到 *bccp* 基因全长编码区。通过对基因的结构进行分析, 揭示了该基因的序列特征。分离出的 *bccp* 基因至少有 3 种类型, *bccp1* 可以编码完整的功能蛋白, *bccp2* 和 *bccp3* 由于一个腺嘌呤的插入导致移码突变从而使蛋白合成提前终止, 产生丧失生物素化功能的 BCCP 蛋白。*bccp3* 除上述的腺嘌呤(A)插入外其它部位的碱基替换和三联体密码子的整体插入都没有改变编码蛋白的性质和功能。

References

- [1] Slabas A R, Fawcett T. The biochemistry and molecular biology of plant lipid biosynthesis. *Plant Molecular Biology*, 1992, 19: 169-191.
- [2] Post B D, Roughan G, Ohlrogge J B. Regulation of plant fatty acid biosynthesis. Analysis of Acyl-Coenzyme A and Acyl-Acyl carrier

- protein substrate pools in spinach and pea chloroplasts. *Plant Physiology*, 1992, 100: 923-930.
- [3] Thelen J J, Ohlrogge J B. Metabolic engineering of fatty acid biosynthesis in plants. *Metabolic Engineering*, 2002, 4: 12-21.
- [4] Thelen J J, Mekhedov S, Ohlrogge J B. Brassicaceae express multiple isoforms of biotin carboxyl carrier protein in a tissue-specific manner. *Plant Physiology*, 2001, 125: 2016-2028.
- [5] Guchhait R B, Polakis S E, Dimroth P, Stoll E, Moss J, Lane M D. Acetyl coenzyme A carboxylase system of *Escherichia coli*. Studies on the mechanisms of the biotin carboxylase and carboxyltransferase-catalyzed reactions. *Journal of Biological Chemistry*, 1974, 249: 6633-6645.
- [6] Li S J, Cronan J E. The genes encoding the two carboxyltransferase subunits of *Escherichia coli* acetyl-CoA carboxylase. *Journal of Biological Chemistry*, 1992, 267: 16841-16847.
- [7] Li S J, Cronan J E. The gene encoding the biotin carboxylase subunit of *Escherichia coli* acetyl-CoA carboxylase. *Journal of Biological Chemistry*, 1992, 267: 855-863.
- [8] Thelen J J, Ohlrogge J B. The multisubunit acetyl-CoA carboxylase is strongly associated with the chloroplast envelope through non-ionic interactions to the carboxyltransferase subunits. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2002, 400: 245-257.
- [9] Ebel J, Hahlbrock K. Enzymes of flavone and flavonol-glycoside biosynthesis. Coordinated and selective induction in cell-suspension cultures of *Petroselinum hortense*. *European Journal of Biochemistry*, 1977, 75: 201-209.
- [10] Shorosh B S, Dixon R A, Ohlrogge J B. Molecular cloning, characterization, and elicitation of acetyl-CoA carboxylase from alfalfa. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 1994, 91(10): 4323-4327.
- [11] Thelen J J, Mekhedov S, Ohlrogge J B. Biotin carboxyl carrier protein isoforms in Brassicaceae oilseeds. *Biochemical Society Transactions*, 2000, 28(6): 595-598.
- [12] Elborough K M, Winz R, Deka R K, Markham J E, White A J, Rawsthorne S, Slabas A R. Biotin carboxyl carrier protein and carboxyltransferase subunits of the multi-subunit form of acetyl-CoA carboxylase from *Brassica napus*: cloning and analysis of expression during oilseed rape embryogenesis. *Biochemical Journal*, 1996, 315: 103-112.
- [13] 翟中和, 王喜忠, 丁明孝. 细胞生物学. 北京: 高等教育出版社, 2000: 237.
- Zhai Z H, Wang X Z, Ding M X. *Cell Biology*. Beijing: Higher Education Press, 2000: 237. (in Chinese)
- [14] Fall R R, Vagelos P R. Acetyl-coenzyme A carboxylase. Proteolytic modification of biotin carboxyl carrier protein. *Journal of Biological Chemistry*, 1973, 248: 2078-2088.
- [15] Fall R R, Vagelos P R. Acetyl coenzyme A carboxylase. Molecular forms and subunit composition of biotin carboxyl carrier protein. *Journal of Biological Chemistry*, 1972, 247: 8005-8015.
- [16] Athappilly F K, Hendrickson W A. Structure of the biotinyl domain of acetyl-coenzyme A carboxylase determined by MAD phasing. *Structure*, 1995, 3:1407-1419.
- [17] Roesler K, Shintani D, Savage L, Boddupalli S, Ohlrogge J. Targeting of the Arabidopsis homomeric acetyl-coenzyme A carboxylase to plastids of Rapeseeds. *Plant Physiology*, 1997, 113: 75-81.
- [18] Focks N, Benning C. *Winkled1*: A novel mutant of Arabidopsis with a deficiency in the seed-specific regulation of carbohydrate metabolism. *Plant Physiology*, 1998, 118: 91-101.
- [19] Thelen J J, Ohlrogge J B. Both Antisense and Sense Expression of biotin carboxyl carrier protein isoform 2 inactivates the plastid acetyl-coenzyme A carboxylase in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal*, 2002, 32(4): 419-431.
- [20] Choi J K, Yu F, Wurtele E S, Nikolau B J. Molecular cloning and characterization of the cDNA coding for the biotin-containing subunit of the chloroplastic acetyl-coenzyme A carboxylase. *Plant Physiology*, 1995, 109(2): 619-625.
- [21] Athavankar S, Peterson B R. Control of Gene Expression with small molecules: biotin-mediated acylation of targeted lysine residues in recombinant yeast. *Chemistry and Biology*, 2003, 10: 1245-1253.
- [22] Lindqvist Y, Schneider G. Protein-biotin interactions. *Current Opinion in Structural Biology*, 1996, 6: 798-803.
- [23] Mekhedov S, Martinez de Ibarra O, Ohlrogge J. Toward a functional catalog of the plant genome. A survey of genes for lipid biosynthesis. *Plant Physiology*, 2000, 122: 389-401.
- [24] Kozaki A, Sasaki Y. Light-dependent changes in redox status of the plastidic acetyl-CoA carboxylase and its regulatory component. *Biochemical Journal*, 1999, 339: 541-546.
- [25] Reverdatto S, Beilinson V, Nielsen N C. A multisubunit acetyl coenzyme a carboxylase from soybean. *Plant Physiology*, 1999, 119: 961-978.
- [26] Ke J, Choi J K, Smith M, Horner H T, Nikolau B J, Wurtele E S. Structure of the *CAC1* gene and in situ characterization of its expression. (The *Arabidopsis thaliana* gene coding for the biotin-containing subunit of the plastidic acetyl-coenzyme A carboxylase). *Plant Physiology*, 1997, 113(2): 357-365.