

## 编码缺刻缘绿藻乙酰辅酶 A 羧化酶 BCCP 亚基的基因克隆与表达分析

李燕, 周志刚

(上海海洋大学水产与生命学院, 上海 201306)

**摘要:** 为了探讨在氮饥饿对缺刻缘绿藻花生四烯酸(ArA)合成与积累的影响,通过 cDNA 末端快速扩增(RACE)和设计简并引物进行反转录(RT)-PCR 扩增,克隆了编码该藻异质型乙酰辅酶 A 羧化酶(ACCCase)的 2 个生物素羧基载体蛋白(BCCP)的基因序列。其中 *MiBCCP1* 基因的 cDNA 序列长 1 267 bp, 包含的 5'-非翻译区(UTR)长 44 bp, 3'-UTR 长 524 bp, 开放阅读框(ORF)长 699 bp, 编码 232 个氨基酸并含有 45 个氨基酸序列的叶绿体定位信号肽;预测成熟蛋白分子量约为 20 ku。*MiBCCP2* 基因的 ORF 长 789 bp, 编码 263 个氨基酸并含有 49 个氨基酸的叶绿体定位信号肽, 推测成熟蛋白分子量约为 22 ku, 但其羧基端缺乏生物素酰基化位点。邻接法(NJ)构建的聚类图显示它们分属于 2 个不同的分支(靴带值为 100)。采用半定量反转录(RT)-PCR 技术分析这 2 个基因的表达量, 结果显示, 在氮饥饿光照培养条件下, 它们的相对转录量都先短暂升高然后持续下调, 从而表明缺刻缘绿藻脂肪酸的从头合成能力有下降的趋势。结合该藻的 ArA 含量在该培养条件下明显增加的结果, 推测胞质中同质型 ACCCase 对缺刻缘绿藻 ArA 合成与积累起着更重要的作用。

**关键词:** 缺刻缘绿藻; 乙酰辅酶 A 羧化酶; 生物素羧基载体蛋白(BCCP); 氮饥饿; 半定量反转录 PCR

中图分类号: Q 785; S 917.3

文献标志码: A

乙酰辅酶 A 羧化酶(acetyl-CoA carboxylase, ACCCase, EC6.4.1.2)是一种生物素结合酶, 它催化乙酰 CoA 和 CO<sub>2</sub> 生成丙二酸单酰 CoA, 为脂肪酸的从头合成及长链脂肪酸的延长提供二碳单位<sup>[1]</sup>。因此, ACCCase 催化的羧化反应不仅是脂肪酸从头合成途径的第一步反应, 也是脂肪酸合成途径的关键与限速步骤<sup>[2]</sup>, 同时也是控制碳流进入脂肪酸生物合成的重要调控位点<sup>[3]</sup>。ACCCase 分为异质型(heteromeric)和同质型(homomeric)两类。异质型 ACCCase 由生物素羧化酶(biotin carboxylase, BC)、生物素羧基载体蛋白(biotin carboxyl carrier protein, BCCP)、 $\alpha$ -和  $\beta$ -羧基转移酶(carboxyltransferase, CT)等 4 个亚基

组成的多酶复合体, 其中, BCCP 蛋白是连接该多酶复合体其他 3 个亚基的桥梁, 细菌及植物体中的 ACCCase 即是这种类型。同质型 ACCCase 是一条多肽链, 包含着 BC、BCCP 以及  $\alpha$ -CT 和  $\beta$ -CT 4 个功能域, 大多数植物胞质溶胶中的 ACCCase 属于这一类型<sup>[4-5]</sup>。

研究表明, ACCCase 活性的增加在 *Cyclotella cryptica* 中是由硅不足所引起<sup>[6]</sup>。在利用葡萄糖异氧培养 *Chlorella zofingienensis* 时, Liu 等<sup>[7]</sup>发现总脂肪酸及油酸含量的增加与编码 BC 蛋白基因转录量的上调呈正相关。在 *Chlorella sorokiniana* 混合营养培养的稳定期中, 其编码  $\beta$ -CT 蛋白基因 *accD* 的转录量也与油脂含量同步增加<sup>[8]</sup>。对

收稿日期: 2014-02-05 修回日期: 2014-04-08

资助项目: 国家自然科学基金(31172389); 国家海洋局可再生能源专项(SHME2011SW02); 上海高校海洋科学一流学科建设项目

通信作者: 周志刚, E-mail: zgzhou@shou.edu.cn

菠菜 (*Spinacia oleracea*)、豌豆 (*Pisum sativum*) 等高等植物叶绿体中酰基 CoA 研究表明, ACCase 活性对脂肪酸的合成有重要影响<sup>[9]</sup>。因此, ACCase 的基因转录量、酶活性及酶含量被认为是衡量藻类等植物油脂合成能力的重要指标<sup>[2]</sup>。

缺刻缘绿藻 (*Myrmecia incisa* Reising) 属于绿藻门 (Chlorophyta)、共球藻纲 (Trebouxiophyceae), 是一种淡水单细胞藻类。该藻富含长链多不饱和脂肪酸花生四烯酸 (arachidonic acid, ArA), 尤其在氮饥饿条件下, ArA 含量可达藻体干重的 7%, 是非缺氮培养条件下的 3.7 倍<sup>[10]</sup>。那么缺刻缘绿藻的脂肪酸合成与氮饥饿信号是如何建立联系的? 来自拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 的研究报告<sup>[11]</sup>指出, 其细胞中的氮调控蛋白 PII 通过与质体 ACCase 的 BCCP 亚基结合, 从而实现对脂肪酸合成的调控。那么, 缺刻缘绿藻中是否存在这种调控机制? 显然, 缺刻缘绿藻 BCCP 基因的克隆及其特征是进行该机制分析的第一步。为此, 在缺刻缘绿藻氮饥饿<sup>[12]</sup>和氮恢复<sup>[13]</sup>培养条件下通过高通量转录组测序获得 2 条编码 BCCP 亚基的 contig 序列基础上, 首先利用 cDNA 末端快速克隆技术 (rapid amplification of cDNA ends, RACE) 克隆并比较这 2 个 BCCP 基因的序列, 推测缺刻缘绿藻的叶绿体存在 2 个 BCCP 亚基; 然后通过半定量 PCR 分析在氮饥饿等培养条件下, 缺刻缘绿藻中这 2 个基因转录量的变化情况。为进一步探讨氮饥饿如何对缺刻缘绿藻 ArA 合成产生影响的分子机理研究奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 藻种及培养

缺刻缘绿藻来自布拉格查理斯大学藻类培养中心 (Culture collection of algae of Charles University of Prague, CAUP), 由暨南大学张成武教授馈赠。

将藻接种于 BG-11 液体培养基<sup>[14]</sup>, 在 25 °C 和 115  $\mu\text{mol quanta}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$  的光照培养箱中培养, 光周期为光照 14 h: 黑暗 10 h, 每天不定期地摇晃。待长至指数生长期, 4 °C 下 5 500 r/min 离心 10 min, 收集藻细胞, 用灭菌去离子水洗涤两次并离心收集, 立即提取 RNA 或用液氮速冻,

-80 °C 保存备用。

### 1.2 总 RNA 提取与反转录合成

参照 TRIzol 试剂盒 (Invitrogen) 参考说明书抽提缺刻缘绿藻的总 RNA。按照 SMART RACE cDNA 扩增反应试剂盒 (Clontech) 使用说明, 分别反转录合成 5' 和 3'-RACE 技术所需的 cDNA 第一链。其中, 5'-RACE 所需的 cDNA 第一链此步骤合成: 总 RNA (300 ng/ $\mu\text{L}$ ) 3  $\mu\text{L}$ , 5'-CDS primer A 1  $\mu\text{L}$ , SMARTII A Oligo 1  $\mu\text{L}$ , 加入 200  $\mu\text{L}$  EP 管; 离心收集反应液后 70 °C 孵育 2 min, 置于冰中 2 min; 在该反应液中再加入 5  $\times$  First-Strand Buffer 2  $\mu\text{L}$ 、DTT (20 mmol/L) 1  $\mu\text{L}$ 、dNTP Mix (10 mmol/L) 1  $\mu\text{L}$  及 MMLV Reverse Transcriptase 1  $\mu\text{L}$ , 离心收集后 42 °C 孵育 1.5 h 后, 加入 100  $\mu\text{L}$  Tricine-EDTA 稀释, 72 °C 孵育 7 min 以终止反应。3'-RACE 所需的 cDNA 第一链合成的反应体系及反应条件基本同 5'-RACE, 仅将引物改为 3'-CDS primer A。

### 1.3 BCCP 基因的 cDNA 全长序列克隆

自本实验室获得的缺刻缘绿藻转录组<sup>[12-13]</sup>数据中, 经序列比对筛选到 2 条可能是编码 BCCP 亚基的基因序列 (contig22797 和 contig10579)。其中根据 contig22797 序列使用 Primer 5.0 软件设计 5'-RACE 引物 BCCP1-5 和 3'-RACE 引物 BCCP1-3 及 BCCP1-3N 巢氏扩增引物 (表 1)。根据 contig10579 序列, 设计 BCCP2 正向扩增引物 BCCP2-F (表 1); 参考莱茵衣藻 (*Chlamydomonas reinhardtii*)、团藻 (*Volvox carterii* f. *nagariensis*) 及多变小球藻 (*Chlorella variabilis*) 预测的 BCCP 氨基酸序列 (GenBank 登录号分别为 EDP09857. 1、EFJ45055. 1 及 EFN53301. 1), 并根据缺刻缘绿藻的密码子使用偏好性<sup>[15]</sup>, 设计反向扩增简并引物 BCCP2-R (表 1), 以扩增 BCCP2 基因的编码序列。

25  $\mu\text{L}$  BCCP1 5'-RACE 的 PCR 反应体系: PCR 级水 17  $\mu\text{L}$ , 10  $\times$  Advantage 2 PCR 缓冲液 2.5  $\mu\text{L}$ , dNTPs (10 mmol/L) 0.5  $\mu\text{L}$ , BCCP1-5 引物 (10  $\mu\text{mol/L}$ ) 0.5  $\mu\text{L}$ , 10  $\times$  UPM 2.5  $\mu\text{L}$ , 5'-RACE cDNA 1.5  $\mu\text{L}$ , 50  $\times$  Advantage 2 聚合酶混合液 0.5  $\mu\text{L}$ 。反应程序: 94 °C 变性 5 min; 94 °C 变性 30 s, 64 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 1 min, 35 个循环; 72 °C 延伸 5 min。

表 1 本研究所使用的 PCR 引物及其序列  
Tab. 1 Sequences of the primers employed in the present research

引物 primer name	序列 primer sequence	用途 usage
BCCP1-F	5'-ATGCAGCCCCACCTCGCT-3'	BCCP1 ORF 扩增 amplification
BCCP1-R	5'-TCAGGGCTTGATGATCAT-3'	BCCP1 ORF 扩增 amplification
BCCP1-5	5'-GTCAACTCTCAAAGTCCAACGGGT-3'	BCCP1 5'-RACE 引物 primer
BCCP1-3	5'-CGGGAGAGGGCAACGGTGTAC-3'	BCCP1 3'-RACE 引物 primer
BCCP1-3N	5'-CCTCCGCAGCAGTATGCAACAAGCCC-3'	BCCP1 3'-RACE 巢式引物 nested primer
BCCP2-F	5'-ATGGTCGCTTTGCAAGCG-3'	BCCP2 编码序列扩增 amplification
BCCP2-R	5'-GCGTACTTGCTRTCSCCGAT-3'	BCCP2 编码序列扩增 amplification
BCCP1-QF	5'-CGGGAGAGGGCAACGGTG-3'	BCCP1 半定量引物 semiquantitative
BCCP1-QR	5'-GGTGCAGTGGGAGCCGCT-3'	BCCP1 半定量引物 semiquantitative
BCCP2-QF	5'-GCCTTCCTGGTCTATCCG-3'	BCCP2 半定量引物 semiquantitative
BCCP2-QR	5'-CGCAAGATGCCGACCTTG-3'	BCCP2 半定量引物 semiquantitative
GAPDH-F	5'-CACAGCAGACGCCACAACGA-3'	半定量内参引物 semiquantitative reference
GAPDH-R	5'-TCAGCACAGACTTCCAGCACG-3'	半定量内参引物 semiquantitative reference

25  $\mu\text{L}$  BCCP1 3'-RACE 反应体系基本上同 5'-RACE, 仅将引物及模板分别改成 BCCP1-3 (表 1) 及 3'-RACE cDNA。反应程序也基本上同 5'-RACE, 但由于 3'-RACE 扩增使用巢式 PCR, 第一轮循环数改为 20 个。以上述 PCR 反应产物 1  $\mu\text{L}$  为模板, NUP 和 BCCP1-3N (10  $\mu\text{mol/L}$ ) 为引物进行第二轮扩增, 94  $^{\circ}\text{C}$  变性 30 s, 63.7  $^{\circ}\text{C}$  退火 45 s, 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 2 min, 25 个循环; 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 5 min。根据 BCCP1 基因 RACE 扩增并拼接后得到的 cDNA 全长, 分别设计上下游引物 BCCP1-F 和 BCCP1-R (表 1) 进行 ORF 序列验证。

使用 Taq PCR Mastermix 试剂盒 (北京天根生化科技有限公司) 并利用 BCCP2-F、BCCP2-R 这对兼并引物 (表 1) 扩增得到 BCCP2 基因的编码序列。25  $\mu\text{L}$  的反应体系: 10  $\times$  PCR 缓冲液 12.5  $\mu\text{L}$ 、上下游引物 (10  $\mu\text{mol/L}$ ) 各 1.0  $\mu\text{L}$ 、反转录 cDNA 1.0  $\mu\text{L}$  及无菌水 9.5  $\mu\text{L}$ 。PCR 反应程序: 94  $^{\circ}\text{C}$  预变性 5 min; 94  $^{\circ}\text{C}$  变性 30 s, 56  $^{\circ}\text{C}$  退火 30 s, 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 1 min, 35 个循环; 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 5 min。

目的片段经胶回收纯化与 pMD19-T 载体连接后转入大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DH5 $\alpha$  感受态细胞 (北京天根生化科技有限公司), 筛选阳性克隆送生工生物工程 (上海) 有限公司测序。

#### 1.4 BCCP 基因序列的生物信息学分析

利用 NCBI 中的 BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 对获得的 BCCP 基因全

长序列进行核酸、蛋白质序列同源性分析。利用 ProtParam (<http://www.expasy.org/tool/protparam.html>) 在线分析蛋白质氨基酸组成和分子量。参考 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/cdd.shtml> 对 BCCP 一级结构进行分析。利用 BioEdit V 7.0<sup>[16]</sup> 及 Clustal X<sup>[17]</sup> 对氨基酸序列进行比对。并利用信号肽预测软件 ChloroP 1.1 Server (<http://genome.cbs.dtu.dk/services/ChloroP/>) 对 BCCP 的定位进行在线预测<sup>[18]</sup>。利用 MEGA 4.0 软件<sup>[19]</sup> 构建邻接法 (Neighbor-Joining, NJ) 系统演化树。

#### 1.5 半定量反转录 PCR (RT-PCR)

为了研究氮饥饿胁迫对基因表达的影响, 在完全培养基和缺氮培养条件下于光照 1、3、5、8、12 h 等时间点, 分别取 3 个培养的藻样品, 调节反转录 RNA 总起始量为 1  $\mu\text{g}$ , 根据反转录试剂盒 Prime Scrip<sup>TM</sup> II 1st Strand cDNA Synthesis Kit (TaKaRa) 使用说明, 合成 RT-PCR 反应 cDNA 第一链。BCCP1 的半定量引物为 BCCP1-QF、BCCP1-QR (表 1), BCCP2 的半定量引物为 BCCP2-QF、BCCP2-QR (表 1)。以转录组数据库中的 GAPDH 基因 (contig16588 及 contig13212) 作为半定量内参, 设计上下游引物 GAPDH-F 和 GAPDH-R (表 1)。半定量 RT-PCR 反应体系为 10  $\times$  PCR 缓冲液 12.5  $\mu\text{L}$ 、上下游引物 (10  $\mu\text{mol/L}$ ) 各 1.0  $\mu\text{L}$ 、反转录 cDNA 1.0  $\mu\text{L}$  及无菌水 9.5  $\mu\text{L}$ 。反应程序为 94  $^{\circ}\text{C}$  变性 30 s, BCCP1、BCCP2

及 *GAPDH* 基因分别在 56、60 及 62 °C 退火 45 s, 72 °C 延伸 1 min, 30 个循环; 最后 72 °C 延伸 5 min。

## 2 结果与分析

### 2.1 缺刻缘绿藻 *BCCP1*、*BCCP2* 基因 cDNA 全长序列的克隆

根据缺刻缘绿藻高通量转录组数据库中的 KO 注释, 搜索到 contig22797 和 contig10579 等 2 条序列。BLAST 对比显示它们的部分序列与莱茵衣藻的 *BCCP1* 和 *BCCP2* 分别具有 75% 和 74% 的核苷酸序列相似性。根据 contig22797 序列设计引物(表 1), 通过 RACE 技术得到缺刻缘绿藻 *BCCP1* 基因长 308 bp 的 5'-RACE 和长 991 bp 的 3'-RACE 扩增产物(图 1 泳道 1 和泳道 2)。序列经拼接并重新设计引物进行 PCR 验证后获得编码该藻 *BCCP1* 基因 1 267 bp 的 cDNA 全长序列, 命名为 *MiBCCP1*。它包含 44 bp 长的 5'-非翻译区(5'-UTR); 3'-UTR 长 524 bp, 具有明显的 Poly(A) 尾巴; ORF 长 699 bp, 编码 232 个氨基酸。将该氨基酸序列经 BLAST 搜索, 结果显示它与莱茵衣藻及拟南芥的 *BCCP1* 氨基酸序列(GenBank 登录号分别为 EDO98131.1 及 AED92173.1) 同源性分别为 60% 及 52%。

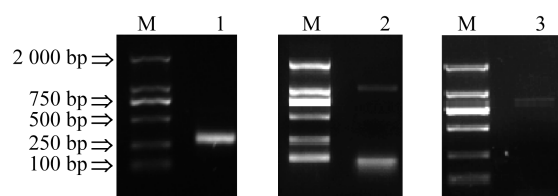


图 1 *MiBCCP1* 基因的 5'-RACE 与 3'-RACE 及 *MiBCCP2* 基因的编码序列克隆电泳图

M. 2 000 bp DNA 分子量标准; 1 泳道. *MiBCCP1* 的 5'-RACE 结果; 2 泳道. *MiBCCP1* 的 3'-RACE 结果; 泳道 3. *MiBCCP2* 的编码序列

Fig. 1 Electrophoresis patterns of amplified products of *MiBCCP1* 5'- and 3'-RACE and *MiBCCP2* coding sequence

M. 2 000 bp marker; Lane 1. amplified product of *MiBCCP1* 5'-RACE; Lane 2. amplified product of *MiBCCP1* 3'-RACE; Lane 3. product of *MiBCCP2* coding sequence

根据 contig10579 序列及参考莱茵衣藻、团藻与小球藻 *BCCP2* 基因序列所设计的兼并引物 *BCCP2*-F 和 *BCCP2*-R(表 1), 克隆并重新设计引

物验证后得到编码缺刻缘绿藻 *BCCP2* 基因 789 bp 长的编码序列(图 1 泳道 3), 命名为 *MiBCCP2*。它编码 263 个氨基酸。经 BLAST 搜索, *MiBCCP2* 与莱茵衣藻 *BCCP2* (GenBank 登录号为 EDP09857.1) 的氨基酸序列同源性为 53%。

经 BLAST 搜索比对, 发现 *MiBCCP1* 与 *MiBCCP2* 基因的核苷酸序列无相似性, 而根据其核苷酸序列所推测氨基酸序列的同源性仅为 41%。该结果表明缺刻缘绿藻存在 2 个编码 *BCCP* 不同的基因。

### 2.2 缺刻缘绿藻 *BCCP1*、*BCCP2* 基因序列的特征及聚类分析

利用 ChloroP 1.1 Server 对 *MiBCCP1* 及 *MiBCCP2* 氨基酸序列进行定位信息预测, 其结果显示缺刻缘绿藻 *MiBCCP1* 存在叶绿体转运肽(chloroplast transit peptide, cTP) (预测分值为 0.539), 其酶切位点位于 Val45 和 Ala46 之间(图 2)。因而 *MiBCCP1* 的转运肽由 45 个氨基酸组成, 而成熟的 *MiBCCP1* 蛋白分子量约 20 ku。*MiBCCP2* 与 *MiBCCP1* 一样也存在 cTP(预测分值为 0.533), 但其大小及酶切位点不同。*MiBCCP2* 在 Thr49 和 Ala50 之间存在转运肽酶切位点(图 2), 该转运肽由 49 个氨基酸组成, 成熟 *MiBCCP2* 蛋白的分子量约 22 ku。

*MiBCCP1* 几乎不含有带电荷的氨基酸; *MiBCCP2* 中的羟基类氨基酸含量占总氨基酸的 14.3%, 且前 10 个氨基酸残基中仅有 2 个甘氨酸, 没有脯氨酸。这些信息与 cTP 所具有的共同特征<sup>[20]</sup> 基本一致。*MiBCCP1* 及 *MiBCCP2* 均只具有一个预测的 cTP, 表明这 2 个 *BCCP* 都只能在缺刻缘绿藻叶绿体的基质而不是类囊体中起作用, 但它们在藻细胞中的具体定位有待实验证实。

将 *MiBCCP1* 和 *MiBCCP2* 基因推测编码的氨基酸序列与其他一些已知基因序列进行对比, 结果如图 2 所示。除信号肽区域外, *BCCP* 亚基有 3 个保守区域。其中, 区域 I 可能参与 *BCCP* 蛋白结构的形成及亚基间的相互作用<sup>[21]</sup>; 区域 II 富含含有丙氨酸-脯氨酸的 APAA 序列, 一般认为这部分序列与作为柔性臂有助于羧基在各亚基活性位点间移动有关<sup>[5]</sup>; 区域 III 是保守的生物素酰基化序列(biotinylation motif), 该基序主要存在于含生物素的酶中, 参与羧化、脱羧及羧基的转移反应, 并且含有一个保守的生物素共价结合位



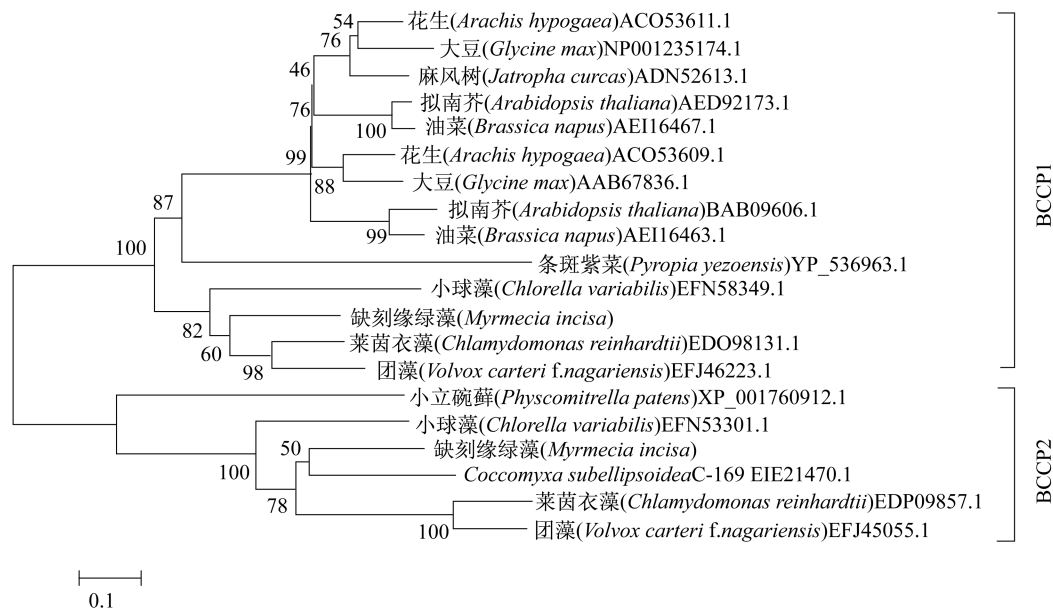


图 3 基于 BCCP 氨基酸序列构建的邻接法进化树

Fig. 3 Phylogenetic tree analysis of the *MiBCCP* with other algae and plant BCCP

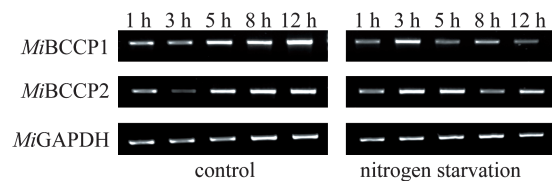


图 4 不同培养条件下, *MiBCCP1* 和 *MiBCCP2* 基因的半定量 RT-PCR 电泳图

Fig. 4 Relative transcription of *MiBCCP1* and *MiBCCP2* genes during the normal culture and nitrogen starvation

### 3 讨论

在高通量转录组测序获得缺刻缘绿藻 2 条与编码 ACCase BCCP 亚基有关的 contig 序列基础上,本研究克隆了它们的全长序列(图 1 与图 2),通过序列的生物信息学分析可知,缺刻缘绿藻与拟南芥<sup>[23]</sup>、欧洲油菜 (*Brassica napus*)<sup>[24]</sup>、花生<sup>[25]</sup>、大豆 (*Glycine max*)<sup>[26]</sup> 等高等植物一样,至少具有 2 个 BCCP 基因。在藻类中,通过 NCBI 网站搜索,发现多变小球藻、莱茵衣藻、团藻等也具有 2 个编码 BCCP 亚基的基因(具体 GenBank 登录号见图 3)。通过对拟南芥不同组织或发育阶段 BCCP 的功能分析及插入突变, Li 等<sup>[23]</sup> 发现 *BCCP1* 基因起主要的作用,可以补偿 *BCCP2* 基因的突变缺失;但 *BCCP1* 基因的缺失不能维持正常生长。在缺刻缘绿藻这 2 个编码 BCCP 亚基的

基因中, *MiBCCP2* 缺乏生物素化区域(图 2),可能通过竞争性结合 ACCase 酶的 BC 及  $\alpha$ -与  $\beta$ -CT 亚基来调节 ACCase 的酶活性,从而实现对脂肪酸从头合成的调控<sup>[27]</sup>。显然,有关不同 BCCP 亚基是如何调控藻细胞叶绿体的脂肪酸从头合成还需要直接的实验证据。

对 2 个 BCCP 亚基基因的半定量 RT-PCR 结果显示,它们在氮饥饿的光照培养条件下,其基因转录量在短暂的上升后持续降低(图 4),表明缺刻缘绿藻在氮饥饿持续条件下,脂肪酸的从头合成能力有下降的趋势。众所周知,藻类和植物细胞的脂肪酸大多以磷脂、糖脂等组成的极性脂或三酰甘油等中性脂的形式存在。缺刻缘绿藻三酰甘油中的长链多不饱和脂肪酸只能在藻细胞的胞质中经过多个去饱和酶<sup>[12]</sup>及延长酶<sup>[28]</sup>的作用过程才能合成。该合成过程需要丙二酸单酰 CoA 提供的二碳单位,脂肪酸才能在胞质中延长。胞质中的丙二酸单酰 CoA 只能由胞质的同质型 ACCase 来合成,这是由于叶绿体中异质型 ACCase 合成的丙二酸单酰 CoA 不能跨过叶绿体膜进入胞质<sup>[29]</sup>。本研究发现 *MiBCCP1* 和 *MiBCCP2* 基因转录量随氮饥饿下调,而延长酶基因的上调<sup>[28]</sup>, ArA 含量增加<sup>[10,30]</sup>,同时缺刻缘绿藻叶绿体体积随氮饥饿变小,胞质油体的出现<sup>[15]</sup>,这些都表明缺刻缘绿藻胞质中的同质型 ACCase 在氮饥饿条件下对 ArA 合成与积累所起

的作用可能比异质型 ACCase 中的 BCCP 等亚基更显著。目前,我们在缺刻缘绿藻高通量转录组数据库<sup>[12-13]</sup>中已找到 3 个编码该同质型 ACCase 的 contig。因此,本研究为缺刻缘绿藻等藻类 ACCase 如何从头合成并影响多不饱和脂肪酸以及多不饱和脂肪酸在氮饥饿培养条件下累积的分子机理等研究指明了方向。

#### 参考文献:

- [ 1 ] Ohlrogge J, Browse J. Lipid biosynthesis [ J ]. *Plant Cell*, 1995, 7(7) : 957 - 970.
- [ 2 ] Sasaki Y, Nagano Y. Plant acetyl-CoA carboxylase: Structure, biosynthesis, regulation, and gene manipulation for plant breeding [ J ]. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 2004, 68 ( 6 ) : 1175 - 1184.
- [ 3 ] Slabas A R, Fawcett T. The biochemistry and molecular biology of plant lipid biosynthesis [ J ]. *Plant Molecular Biology*, 1992, 19(1) : 169 - 191.
- [ 4 ] Kozaki A, Mayumi K, Sasaki Y. Thiol-disulfide exchange between nuclear encode and chloroplast-encode subunits of pea acetyl-CoA carboxylase [ J ]. *Journal of Biological Chemistry*, 2001, 276 ( 43 ) : 39919 - 3992.
- [ 5 ] Cronan Jr, J E, Waldrop G L. Multi-subunit acetyl-CoA carboxylases [ J ]. *Progress in Lipid Research*, 2002, 41(5) : 407 - 435.
- [ 6 ] Roessler P G. Changes in the activities of various lipid and carbohydrate biosynthetic enzymes in the diatom *Cyclotella cryptica* in response to silicon deficiency [ J ]. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 1988, 267(2) : 521 - 528.
- [ 7 ] Liu J, Huan J C, Fan K W, *et al.* Production potential of *Chlorella zofingiensis* as a feedstock for biodiesel [ J ]. *Bioresource Technology*, 2010, 101 ( 22 ) : 8658 - 8663.
- [ 8 ] Wan M, Liu P, Xia J, *et al.* The effect of mixotrophy on microalgal growth, lipid content, and expression levels of three pathway genes in *Chlorella sorokiniana* [ J ]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2011, 91(3) : 835 - 844.
- [ 9 ] 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 [ J ]. *Plant Physiology*, 1992, 100(2) : 923 - 930.
- [ 10 ] Ouyang L L, Li H, Liu F, *et al.* Accumulation of arachidonic acid in a green microalga, green microalga, *Myrmecea incisa* H4301, enhanced by nitrogen starvation and its molecular regulation mechanisms [ M ] // Dumancas G G, Murdianti B S, Lucas E A ( eds ). *Arachidonic Acid: Dietary Sources and General Functions*. New York: Nova Science Publishers, 2013: 1 - 20.
- [ 11 ] Ana B F B, Benoit V, Alain G, *et al.* Chloroplast acetyl-CoA carboxylase activity is 2-oxoglutarate-regulated by interaction of PII with the biotin carboxyl carrier subunit [ J ]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2010, 107(1) : 502 - 507.
- [ 12 ] Ouyang L L, Chen S H, Li Y, *et al.* Transcriptome analysis reveals unique C4-like photosynthesis and oil body formation in an arachidonic acid-rich microalga *Myrmecea incisa* Reisigl H4301 [ J ]. *BMC Genomics*, 2013, 14(6) : 396.
- [ 13 ] Chen S H, Zhou Z G. The transcriptome pyrosequencing and gene function annotation of the green microalga *Myrmecea incise* [ J ]. *Journal of Shanghai Ocean University*, 2012, 21(5) : 662 - 670. [ 陈思弘, 周志刚. 缺刻缘绿藻转录组测序及脂质代谢相关基因注释. *上海海洋大学学报*, 2012, 21(5) : 662 - 670. ]
- [ 14 ] Stanier R Y, Kunisawa M M, Cohen-Bazir G. Purification and properties of unicellular blue-green algae ( Order Chlorococcales ) [ J ]. *Bacteriological Review*, 1971, 35(2) : 171 - 201.
- [ 15 ] Ouyang L L, Du D H, Yu S Y, *et al.* Expressed sequence tags analysis revealing the taxonomic position and fatty acid biosynthesis in an oleaginous green microalga, *Myrmecea incisa* Reisigl ( Trebouxiophyceae, Chlorophyta ) [ J ]. *Chinese Science Bulletin*, 2012, 57(25) : 3342 - 3352.
- [ 16 ] Hall T A. BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT [ J ]. *Nucleic Acids Symposium Series*, 1999, 41 : 95 - 98.
- [ 17 ] Thompson J D, Gibson T J, Plewniak F, *et al.* The CLUSTAL\_X windows interface: Flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools [ J ]. *Nucleic Acids Research*, 1997, 25(24) : 4876 - 4882.
- [ 18 ] Emanuelsson O, Brunak S, von Heijne G, *et al.* Locating proteins in the cell using TargetP, SignalP and related tools [ J ]. *Nature Protocols*, 2007, 2(4) : 953 - 971.

- [19] Tamura K, Dudley J, Nei M, *et al.* MEGA4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0 [J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2007, 24(8): 1596 – 1599.
- [20] von Heijne G, Steppuhn J, Herrmann R G. Domain structure of mitochondrial and chloroplast targeting peptides [J]. *European Journal of Biochemistry*, 1989, 180(3): 535 – 545.
- [21] Fall R R, Vagelos P R. Acetyl-coenzyme A carboxylase: Proteolytic modification of biotin carboxyl carrier protein [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1973, 248(6): 2078 – 2088.
- [22] Broussard T C, Kobe M J, Pakhomova S, *et al.* The three-dimensional structure of the biotin carboxylase-biotin carboxyl carrier protein complex of *E. coli* acetyl-CoA carboxylase. *Structure*, 2013, 21(4): 650 – 657.
- [23] Li X, Ilarslan H, Brachova L, *et al.* Reverse-genetic analysis of the two biotin-containing subunit genes of the heteromeric acetyl-coenzyme A carboxylase in *Arabidopsis* indicates a unidirectional functional redundancy [J]. *Plant Physiology*, 2011, 155(1): 293 – 314.
- [24] Elborough K M, Winz R, Deka R K, *et al.* 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 [J]. *Biochemical Journal*, 1996, 315(1): 103 – 112.
- [25] Li M J, Xia H, Wang X J, *et al.* Cloning and structural analysis of biotin carboxyl carrier protein genes in wild relatives of *Arachis hypogaea* [J]. *Acta Agriculturae Boreali-Sinica*, 2009, 24(6): 6 – 10. [李孟军, 夏晗, 王兴军, 等. 花生野生近缘种生物素羧基载体蛋白基因的克隆与结构分析. 华北农学报, 2009, 24(6): 6 – 10.]
- [26] Reverdatto S, Beilinson V, Nielsen N C. A multisubunit acetyl coenzyme A carboxylase from soybean [J]. *Plant Physiology*, 1999, 119(3): 961 – 978.
- [27] 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* [J]. *Plant Journal*, 2002, 32(4): 419 – 431.
- [28] Yu S Y, Li H, Tong M, *et al.* Identification of a  $\Delta 6$  fatty acid elongase gene for arachidonic acid biosynthesis localized to the endoplasmic reticulum in the green microalga *Myrmecea incisa* Reising [J]. *Gene*, 2012, 493(2): 219 – 227.
- [29] Thelen J J, Mekhedov S, Ohlrogge J B. Brassicaceae express multiple isoforms of biotin carboxyl carrier protein in a tissue-specific manner [J]. *Plant Physiology*, 2001, 125(4): 2016 – 2028.
- [30] Tong M, Yu S Y, Ouyang L L, *et al.* Comparison of increased arachidonic acid content in *Myrmecea incisa* cultured during the course of nitrogen or phosphorus starvation [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2011, 35(5): 763 – 773. [童牧, 于水燕, 欧阳珑玲, 等. 氮饥饿与磷饥饿促使缺刻缘绿藻花生四烯酸含量增加的比较. 水产学报, 2011, 35(5): 763 – 773.]



## Cloning and transcription analysis of genes coding for BCCP subunit of acetyl-CoA carboxylase in *Myrmecia incisa*

LI Yan, ZHOU Zhigang

(College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

**Abstract:** Acetyl-CoA carboxylase (ACCase) catalyzes the biotin-dependent carboxylation of acetyl-CoA to produce malonyl-CoA, which is a key and rate-limited step in the biosynthesis of fatty acids. In order to investigate its effect on the arachidonic acid (ArA) in *Myrmecia incisa* grown under nitrogen starvation, two genes coding for biotin carboxyl carrier protein (BCCP) which was one subunit of the heteromeric ACCase complex, were cloned by using Rapid Amplification Complementary DNA ends (RACE) method and reverse transcription (RT)-PCR with designed degenerated primers. The full-length cDNA sequence of *MiBCCP1* was composed of 1 267 bp, comprising a 44-bp 5'-untranslated region (UTR) and a 524-bp 3'-UTR with a typical poly A tail. The open reading frame (ORF) was 699 bp in length encoding a 232-amino-acid protein. After restriction of a 45-amino-acid chloroplast signal peptide, the putative molecular weight of mature *MiBCCP1* was about 20 ku. The coding sequence of *MiBCCP2* gene was also cloned and it was 789 bp in length encoding a 263-amino-acid protein with a 49-amino-acid chloroplast signal peptide, too. The putative molecular weight of mature *MiBCCP2* was approximately 22 ku but it lacked a characteristic biotinylation domain at the C-terminus. Neighbor-joining (NJ) dendrogram showed that these two cloned genes belonged to BCCP1 and BCCP2 clades, which was supported by the bootstrap value of 100. Semi-quantitative reverse transcription (RT)-PCR result showed that during the stress course of nitrogen starvation, the relative transcription of both *MiBCCP1* and *MiBCCP2* genes increased temporally possibly due to shock, and subsequently declined to the end of this experiment, suggesting that *M. incisa* had a trend to a declined ability of fatty acid biosynthesis *de novo*. Taking the significantly increased ArA level in this microalga during this culture course together, it was supposed that the homomeric ACCase in the cytosol played a more important role than the heteromeric one in modulating biosynthesis and accumulation of ArA in *M. incisa* under the nitrogen starvation stress.

**Key words:** *Myrmecia incisa*; acetyl-CoA carboxylase; biotin carboxyl carrier protein subunit; nitrogen starvation; semi-quantitative RT-PCR

**Corresponding author:** ZHOU Zhigang. E-mail: zgzhou@shou.edu.cn