

决明巴豆酰辅酶 A 羧化酶基因的克隆、序列分析以及组织差异表达

刘祖碧, 李娟娟, 朱乾坤, 宋 涛, 周嘉裕, 廖 海

(西南交通大学 生命科学与工程学院, 四川 成都 610031)

摘 要:通过 RACE 克隆得到了决明 MCCase 的 cDNA, 利用生物信息学进行系统分析, 并利用荧光定量 PCR 对决明 MCCase 进行了差异表达分析。结果表明:决明 MCCase 全长 1 269 bp, 编码 423 个氨基酸的蛋白质, 为偏酸性不稳定蛋白质, 定位于线粒体或细胞质中。决明 MCCase 与拟南芥的 MCCase 同源性最高。MCCase 上有一个保守的功能结构域, 与乙酰 CoA 羧化酶显示出较高的相似性, 并在该结构域内发现了 4 个高度保守的氨基酸基序, 可能在催化过程中发挥关键作用。MCCase 在不同组织中存在差异表达, 在根与胚轴中显示出高表达, 在其它组织中表达量低, 这可能与光和糖类抑制 MCCase 的表达有关。

关键词:巴豆酰辅酶 A 羧化酶; 决明; 基因克隆; 生物信息学; 基因表达

中图分类号:S 567.9 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2015)03-0099-06

甲基巴豆酰-CoA 羧化酶 (Methylcrotonyl-CoA carboxylase, MCCase) 是一种催化 ATP 依赖性的羧化反应, 催化 3-甲基巴豆酰-CoA (3-Methylcrotonyl-CoA, MC-CoA) 生成 3-甲基戊二酰-CoA (3-methylglutonyl-CoA, MG-CoA)^[1], 反应机制如图 1 所示。在动物、细菌和真菌中, MCCase 在一些代谢途径中是必需的, 包括参与亮

氨酸的分解代谢, 甲基戊酸分支和类异戊二烯分解代谢^[2]。植物中 MCCase 被研究的很少, 研究发现, 植物有 2 个不同的分解亮氨酸的代谢途径, 一个是不需要 MCCase 与线粒体的过氧化酶通路, 另一条通路则与动物、细菌和真菌中一样, 后一条代谢通路提供了证据证明 MCCase 在植物代谢中发挥功能^[1]。

决明子属豆科一年生植物决明 (*Cassia obtusifolia* L.) 或小决明 (*Cassia tora* L.) 的干燥成熟种子^[4], 决明子中含有多种有效成分, 具有降血压、降血脂、保肝及抑菌等生理活性^[5]。决明中还含有多种营养成分, 富含脂类、蛋白质以及糖类, 其中必需氨基酸中以亮氨酸和赖氨酸的含量最高, 是极具营养价值的保健食品, 是国家

第一作者简介:刘祖碧 (1989-), 女, 硕士研究生, 研究方向为植物分子生物学。

责任作者:廖海 (1974-), 男, 博士, 副教授, 研究方向为植物分子生物学。E-mail: hliao2012@163.com.

基金项目:国家自然科学基金资助项目 (31371232)。

收稿日期:2014-09-17

Screening Factors That Impact Pollen Growth of *Prunus armeniaca* L. cv 'Katy' in vitro

HAN Xue-ping, XUE Xiao-min, WANG Jin-zheng, NIE Pei-xian, CHEN Ru
(Shandong Institute of Pomology, Tai'an, Shandong 271000)

Abstract: Taking *Prunus armeniaca* L. cv 'Katy' as material, the pollen germination rate and the pollen tube length that different types of mediums and different concentrations of sucrose and boric acid were determined. The effect of different types of mediums and different concentrations of sucrose and boric acid for pollen germination and pollen tube elongation were studied. The results showed that, most suitable medium for *Prunus armeniaca* L. cv 'Katy' was 10% sucrose + 0.10% boric acid + 0.5% agar. It was more than 90% pollen germination rate and the length of pollen tube growth 13 510.30 μm in vitro.

Keywords: *Prunus armeniaca* L. cv 'Katy'; pollen germination; sucrose; boric acid

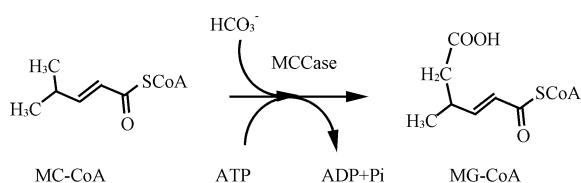


图1 MCCase 催化 3-甲基巴豆酰-CoA (MC-CoA)羧化生成 3-甲基戊二酰-CoA (MG-CoA)^[3]

Fig.1 MCCase catalyzes carboxylating 3-Methylcrotonyl-CoA (MC-CoA) to form 3-methylglutonyl-CoA (MG-CoA)^[3]

卫生部公布的 69 种药食同源的作物之一^[6]。MCCase 是参与植物亮氨酸代谢途径的必需酶,对维持决明子氨基酸营养价值起到重要作用^[3]。该研究从决明种子转录组中筛选 MCCase 基因进行全长克隆、序列分析以及组织差异表达,以期解析决明子氨基酸代谢途径和提高决明子的营养价值奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

决明各组织由西南交通大学生命科学与工程学院实验室种植收集并保存于-70℃冰箱备用。宿主菌 DH5α 由该实验室保存。植物 RNA 提取试剂 Plant RNA Kit 购置于 Omega 公司, Taq DNA 聚合酶、M-MLV reverse transcriptase、SYBR® Premix Ex Taq™ II、pMD19-T、Dnase I、末端转移酶均购置于 Takara 公司, DNA 纯化回收试剂盒购置于天根公司,引物合成与序列测序由上海生工完成。

1.2 试验方法

1.2.1 决明各组织 RNA 的提取 决明各组织包括根、茎、叶、花蕾、花、种子、果夹、子叶、胚轴、愈伤的 RNA 的提取方法参照 Omega 公司 Plant RNA Kit 试剂盒的方法进行。0.1%的琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 提取效果以用于 mRNA 反转录及第一链 cDNA 的合成。

1.2.2 决明 MCCase 的 3'RACE 根据决明种子转录组提供的 MCCase 序列片段设计 2 条正向 3'RACE 引物(外侧引物 MCC 3RW、内侧引物 MCC 3RN,表 1),用 Oligo(dT) 18 为反转录引物反转录得到 cDNA 作为 3'RACE 模板。3'RACE 巢式 PCR 采用 50 μL 的反应体系:10× Buffer (with Mg²⁺) 5 μL、dNTP (10 mmol) 4 μL、MCC 3RW 和 3RP 引物(10 μmol)各 2 μL、exTaq 聚合酶(5 U/μL) 0.25 μL、模板 2 μL、超纯水 34.75 μL,第 1 轮 PCR 程序采用 5 min、94℃ 预变性,30 s、94℃ 变性,30 s、58℃ 退火,2 min、72℃ 延伸,变性、退火、延伸进行 35 个循环,最后 7 min、72℃ 延伸完全,4℃ 保存。以第 1 轮 PCR 产物为模板进行第 2 轮 PCR,引物为 MCC 3RN 和 3RNP,将退火温度改变至 57℃,PCR 体系和其它条件不变。0.1%琼脂糖凝胶电泳检测第 2 轮 PCR 产物,回收目的条带,连接到克隆载体 pMD19-T 上,然后

转化到 DH5α 大肠杆菌感受态细胞中。37℃ 过夜培养之后挑取单菌落,进行菌落 PCR 检测,将阳性结果送至上海生工公司测序。

表 1 研究用到的引物

Table 1 The primers used in the study

Primer	Sequence(5'→3')
Oligo(dT)18	GCTGTCAACGATACGCTACGTAACGG CATGACAGTGTTTTTTTTTTTTTTTTTT
3RP	GTCAACGATACGCTACGTAACG
3RNP	TACGTAACGCGCATGACAGTG
MCC 3RW	AAGAAGCATCTAAGGGCAGAG
MCC 3RN	TCTTGTGAAGGCTGCAACTGG
oligo (dT)11	AGGACTCACTATAGGGCTTTTTTTTTTTVN
T7	GTAATACGACTCACTATAGGGC
MCC 5RW	GGAGTTCGGAAATCAAGTCGG
MCC 5RN	GGAAAGCACTCCACTATCAACTA
MCC CDSF	ACGAAGTGATGCTACGCTTATTG
MCC CDSR	CAGAACATCACTGGATTCATGGT
MCC qF	ATGGGOGACTTTGTATGTTTGTG
MCC qR	TTGGAAGGAAAGCACCTCCACT
18S qF	CAGTGGGGGCATTCGTATTT
18S qR	CAGCCTTGCGACCATACTCC

1.2.3 决明 MCCase 的 5'RACE 用 MCCase 的 3'RACE 正确测序结果设计 2 条 5'RACE 反向引物(外侧引物 MCC 5RW、内侧引物 MCC 5RN,表 1),用 MCC5RW 为反转录引物进行反转录得到第 1 条 cDNA,纯化并用末端转移酶进行加尾反应得到 5'RACE 模板。5'RACE 巢式 PCR 体系与 3'RACE 巢式 PCR 体系基本相同,第 1 轮 PCR 引物为 MCC 5RW 和 oligo (dT)11,退火温度采用 55℃;以第 1 轮产物为模板进行第 2 轮 PCR,引物为 MCC 5RN 和 T7,退火温度为 57℃,PCR 完全后 4℃ 保存。PCR 产物的克隆和测序同上。

1.2.4 决明 MCCase 的 CDS 全长克隆 将经过 Blast 比对验证测序正确的 3'RACE 与 5'RACE 测序结果通过 DNAMAN^[7] 拼接,拼接结果由 BioXM^[8] 软件找到编码 CDS 序列,设计包括 CDS 序列的 1 对全长引物(MCC CDSF、MCC CDSR,表 1)。以 cDNA 为模板进行 CDS 的 PCR 扩增,PCR 体系及条件与 3'RACE 相同,延伸时间为 2 min,退火温度为 59℃,PCR 完全后 4℃ 保存。PCR 产物的克隆和测序同上。

1.2.5 决明 MCCase 的生物信息学分析 用 BioXM 分析 MCCase 的 ORF 并翻译成蛋白质序列。MCCase 的同源蛋白通过 Blast 搜索 NCBI 蛋白质数据库获取。氨基酸序列理化性质分析使用 ProtParam^[9] 完成;氨基酸序列亲疏水性分析使用 ProtScale^[10] 完成;信号肽分析使用 SignalP 3.0^[11] 完成;亚细胞定位使用 PSORT^[12] 完成;跨膜结构域的分析用 TMHMM 2.0^[13] 完成;功能结构域利用 CDD 检索分析。氨基酸序列比对使用 Clustal X^[14] 软件完成;系统发生树使用 MEGA^[15] 构建。以来自 PDB 数据库的最高同源蛋白为模板用 SWISS-MODEL^[16] 进行同源建模建立 MCCase 的三维结构模型。建立的结构通过 PEOCHECK^[17] 和 VERIFY 3D^[18] 进行评估。

1.2.6 决明 *MCCase* 的组织差异表达分析 用核酸定量仪测定提取的决明各组织的 RNA 的浓度,使每个组织反转录体系中 RNA 的总量相同,反转录模板采用随机引物,反转录总体积为 40 μL 。荧光定量 PCR 采用决明 18S rRNA 为内参基因(表 1),使用的仪器是 LightCycler[®] 96 system (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany)。反应体系为 10 μL : 5 μL SYBR[®] Premix Ex Taq[™] II, 1 μL cDNA, 4 μL ddH₂O, PCR 反应条件为 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 1 min, 然后 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 10 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 退火 10 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 20 s 反应 40 个循环。18S rRNA 和 *MCCase* 引物溶解曲线显示单峰,引物扩增效率分别为 1.963 和 1.972, R^2 分别为 0.993 和 0.998。试验重复 3 次。

1.3 数据分析

试验数据分析采用 LightCycler[®] 96 软件提供的 $\Delta\Delta C_T$ -法完成。

2 结果与分析

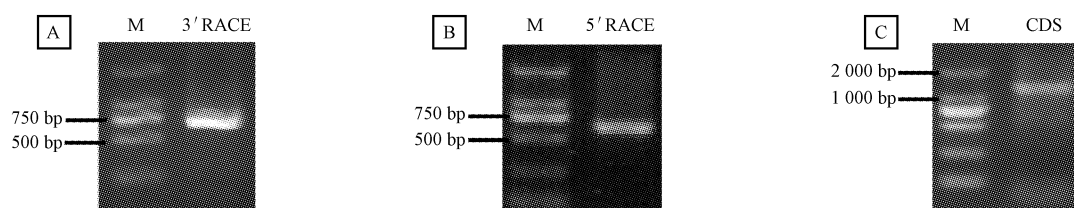
2.1 决明 *MCCase* cDNA 的克隆

决明 *MCCase* 3'RACE PCR 产物电泳图如图 2A 所

示,所得 PCR 产物的长度在 600 bp 左右,与估计的产物长度基本吻合。经测序分析,测序结果有 ploy (A) 结构,能找到内侧引物并且经过 Blast 比对分析为 *MCCase* 基因,因此初步认定克隆出决明 *MCCase* 3'端序列。

决明 *MCCase* 5'RACE PCR 产物电泳图如图 2B 所示,所得 PCR 产物的长度在 600 bp 左右,与估计的产物长度基本吻合。经测序分析,测序结果有 ploy(T) 结构,能找到内侧引物并且经过 Blast 比对分析为 *MCCase* 基因。因此初步认定克隆出决明 *MCCase* 5'端序列。3'RACE 与 5'RACE 测序结果通过 DNAMAN 拼接,拼接结果含有完整的 CDS 序列。

MCCase 基因的 CDS PCR 产物电泳图如图 2C 所示,所得 PCR 产物的长度在 1 200 bp 左右,与估计的产物长度基本吻合。经过 BioXM 软件分析能找到 CDS 编码序列且全长为 1 269 bp,编码 423 个氨基酸,与上述拼接结果一致(图 3)。经过 Blast 比对分析为 *MCCase* 基因。因此,初步认定克隆出决明 *MCCase* 基因的 CDS 序列。



注:M;DL 2 000 DNA Marker.

Note:M;DL 2 000 DNA Marker.

图 2 决明 *MCCase* cDNA 的克隆

Fig. 2 The cloning of *C. obtusifolia* *MCCase* cDNA

```

1  acgaagtgtgctacgttattgagtttgggaagaagagcccatggaagctcatggagaggaagcacccttgaggtttttactagaagg
Forward Primer M L R L L S L G R R A H G S S W R G S T L E V F T R R G
91  gcttttgcctggaggtcttcccgatggctgcacgcaatccggagccttttctagcaactctaatccatggccgacttgattccg
   F C L G V F P D G V D R N S E A F S S N S N S M A D L I S E
181  aactccaatctcacgtaaacaggtacttgcgggtgggtggagctgagggaggaacaggagtaggaataaacttctaccagag
   L Q S H V N K V L A G G G A E A V R R N R S R N K L L P R E
271  aaagaattgatgcctccttgatcccggtgcttcattccttgagctttcacagcttgcaggacatgaattatatgaagaaccttgcctt
   R I D R L L D P G A S F L E L S Q L A G H E L Y E E P L P S
361  ctgctgggattattactggaataggtccagtgcatggcgacatttgtatgtttgtggcaaatgacccaactgttaaggaggagacttatt
   A G I I T G I G P V H G R L C M F V A N D P T V K G G T Y Y
451  accccattactgttaagaagcatctaaggacacaggagattgtctcaatgcaaatgccctgcatttatctagttgatgtggaggtg
   P I T V K K H L R A Q E I A A Q C K L P C I Y L V D S G G A
541  ctttcttccaaagcaggtgatgtcttccctgacaaagagaactttggcagaatattctataatcaggcattaatgtcttccgaaggaa
   F L P K Q A D V F P D K E N F G R I F Y N Q A L M S S E G I
631  ttccgcaaatgcactggttttaggttcttgcactgctggtggtgcttatatacctgctatggctgatgaaagtgtgatgtgtaaggaa
   P Q I A L V L G S C T A G G A Y I P A M A D E S V M V K G N
721  atggaaacctatftttggcagggcctcctcttcttgaaggtgcaactgggaagaggtctctgcagaggatttgggggtgcttctgttc
   G T I F L A G P P L V K A A T G E E V S A E D L G G A S V H
811  actgcaagacatcagggttttcagattatttgcacagatgaactgcatggacttgcacttgggaggaacatcattaagaacttgcata
   C K T S G V S D Y F A Q D E L H G L A L G R N I I K N L H M
901  tggtctgggaagatgtcttgggaatgattacaaatgtaaaatgaatataaagaccactatatgatgccaatgaacttctgttcta
   A G K D V L G N G L Q N V K Y E Y K E P L Y D A N E L R S I
991  ttgctccaactgatcttaagcagcaatttgatattcgatcagttatttcccgattgtagatggaagtgaatttgatgaattcaagaaat
   A P T D L K Q Q F D I R S V I A R I V D G S E F D E F K K L
1081  tatatgggactactcttgaacaggttttgcataatattggacagcctgttgaattattggaacaatggaattctatttcaatgaat
   Y G T T L V T G F A R I Y G Q P V G I I G N N G I L F N E S
1171  ctgctctaaagggctcatttcattgaaatatgtactcagagaaatattcctttgttcttccagattttgtatcccatcttgcctc
   A L K G A H F I E I C T Q R N I R L V F L Q I L L S H L P Q
1261 agattttgatccaacacatgacacagtgatgttctg
      I L I Q P * Reverse Primer

```

注:下划线表示克隆 CDS 用的上下游引物。线框表示起始密码子和终止密码子。

Note: Underline shows the primers used for cloning *MCCase* CDS. Wire frame shows the initiation codon and termination codon.

图 3 克隆的决明 *MCCase* 基因的 CDS 序列和编码的氨基酸序列

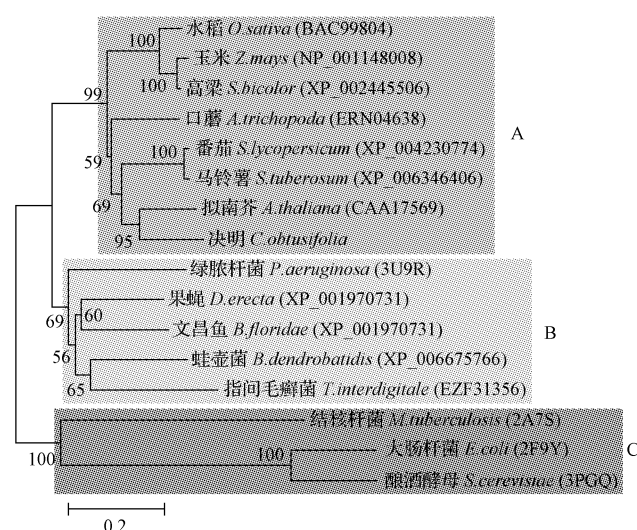
Fig. 3 The cloned *C. obtusifolia* *MCCase* gene CDS sequence and the coding amino acid sequence

2.2 决明 MCCase 氨基酸序列分析

决明 MCCase 基因编码 423 个氨基酸(Amino acid, AA)的蛋白质,通过 ProtParam 计算,分子量为 45.87 kDa,等电点 pI=6.80,含量最丰富的氨基酸为 Leu (11.3%)、Gly (10.4%)、Ala (8.3%),不含有 Pyl 和 Sec,稳定指数为 42.62,说明 MCCase 是一个偏酸性不稳定蛋白质。ProtScale 分析表明 50.25%的氨基酸表现出亲水性,49.75%的氨基酸表现出疏水性,总分值为-22.729,决明的 MCCase 基因总体表现为亲水性蛋白质。用 SignalP 分析发现,决明 MCCase 基因整体表现为较弱的疏水性,未发现信号肽。用 PSORT 分析发现 MCCase 定位于线粒体或细胞质中。TMHMM 2.0 分析 MCCase 无跨膜区,为非跨膜蛋白。

2.3 系统发育分析

通过 Blast 搜索 NCBI 蛋白质数据库获取了绿脓杆菌(*P. aeruginosa*)、拟南芥(*A. thaliana*)、水稻(*O. sativa*)、果蝇(*D. erecta*)、文昌鱼(*B. floridae*)、结核杆菌(*M. tuberculosis*)、大肠杆菌(*E. coli*)、酿酒酵母(*S. cerevisiae*)、口蘑(*A. trichopoda*)、马铃薯(*S. tuberosum*)、番茄(*S. lycopersicum*)、玉米(*Z. mays*)、高粱(*S. bicolor*)、蛙壶菌(*B. dendrobatidis*)和指间毛癣菌(*T. interdigitale*)的 MCCase 氨基酸序列并通过 MEGA 和决明 MCCase 一起进行系统发育分析。如图 4 所示,MCCase 共分为三大分支(A、B、C)。分支 A 主要由植物组成,包括决明、水稻、玉米、高粱、口蘑、番茄、马铃薯和拟南芥的 MCCase,其中决明的 MCCase 与拟南芥的 MCCase 亲缘关系最近。另外,果蝇、文昌鱼、绿脓杆菌、蛙壶菌、指间毛癣菌的 MCCase 聚为分支 B,而分支 C 则由大肠杆菌、结核杆菌和酿酒酵母的 MCCase 组成。



注:括号中为 GenBank 登录号。

Note: The sequence accession number was shown in bracket.

图 4 不同物种 MCCase 的系统发育树

Fig. 4 The phylogenetic tree of MCCase from different species

2.4 序列比对分析

将决明和拟南芥、水稻、绿脓杆菌、果蝇的 MCCase 进行多序列比对分析。由图 5 可以看出,MCCase 的 N-端显示出较大的差异性,可能与物种特异性相关。MCCase 上有一个保守的功能结构域(56AA-336AA),该保守结构域与乙酰 CoA 羧化酶显示出较高的相似性。另外还在该结构域内发现了 4 个高度保守的氨基酸基序(如图 5 箭头所示,kkh...raq, lpc...gga, gsc...gay, tif...lvk),这些保守基序在 FAD 结合蛋白的进化过程中保留下来,可能在催化过程中发挥关键作用。绿脓杆菌 MCCase(PDB 登录号:3U9R)的晶体结构已经通过 X 射线晶体衍射方法解析出来,而且决明 MCCase 与 3U9R 一致性为 59%,高于 30%,提供了一个决明 MCCase 分子建模的合适模板。

2.5 三级结构预测

基于上述分析,选定绿脓杆菌 MCCase(3U9R)为模板,用 Swiss-Model 进行同源建模建立了 MCCase 的三维结构模型(图 6)。通过 PEOCHECK 和 VERIFY 3D 对建立的模型进行评估。PEOCHECK 得到的拉式图显示 98.6%的氨基酸的结构处于合理区,仅有 1.4%的氨基酸位于合理区外。通过 VERIFY 3D 评价,超过 80%的氨基酸评分大于 0.2。建立的模型和模板进行结构重叠,RMSD 值为 0.137 nm,显示出较高的相似性,证明建立的结构合理准确。得到的 MCCas 三维结构包括 30 个 α 螺旋区、27 个 β 折叠区,其余为无规则卷曲。从结构上分为两大结构域(A、B),结构域 A 主要由多变的 N-端氨基酸残基组成,结构域 B 则主要由保守的 C-端氨基酸残基组成,保守的功能结构域(56AA-336AA)位于结构域 B。

2.6 组织差异表达分析

组织差异表达可以为研究基因的功能和调控机制提供依据,课题组选择了决明的根、果荚、花、花蕾、茎、胚轴、叶、愈伤、种子和子叶 10 个组织对 MCCase 进行了组织差异表达模式分析。由图 7 可知,MCCase 在不同组织中的表达水平为:根>胚轴>花蕾>愈伤>果荚>叶>花>茎>种子>子叶,其中在根与胚轴中显示出高度表达,而在其它组织中表达量较低。有研究显示,MCCase 高度表达于非光合作用器官内,光照可抑制 MCCase 表达^[3],决明的根属于非见光部分,刚萌发的胚轴不具有光合作用,也属于非光合作用器官,其高表达与前人研究相符。其它组织属于见光部分,MCCase 可能由于受到光照的影响而呈现出低表达。研究显示,糖类能够抑制 MCCase 的表达^[3],决明子叶和种子富含糖类物质,而且决明种子中的亮氨酸含量很高^[6],MCCase 在亮氨酸分解代谢途径中发挥重要作用,这也解释了 MCCase 在子叶和种子中的表达量最低。

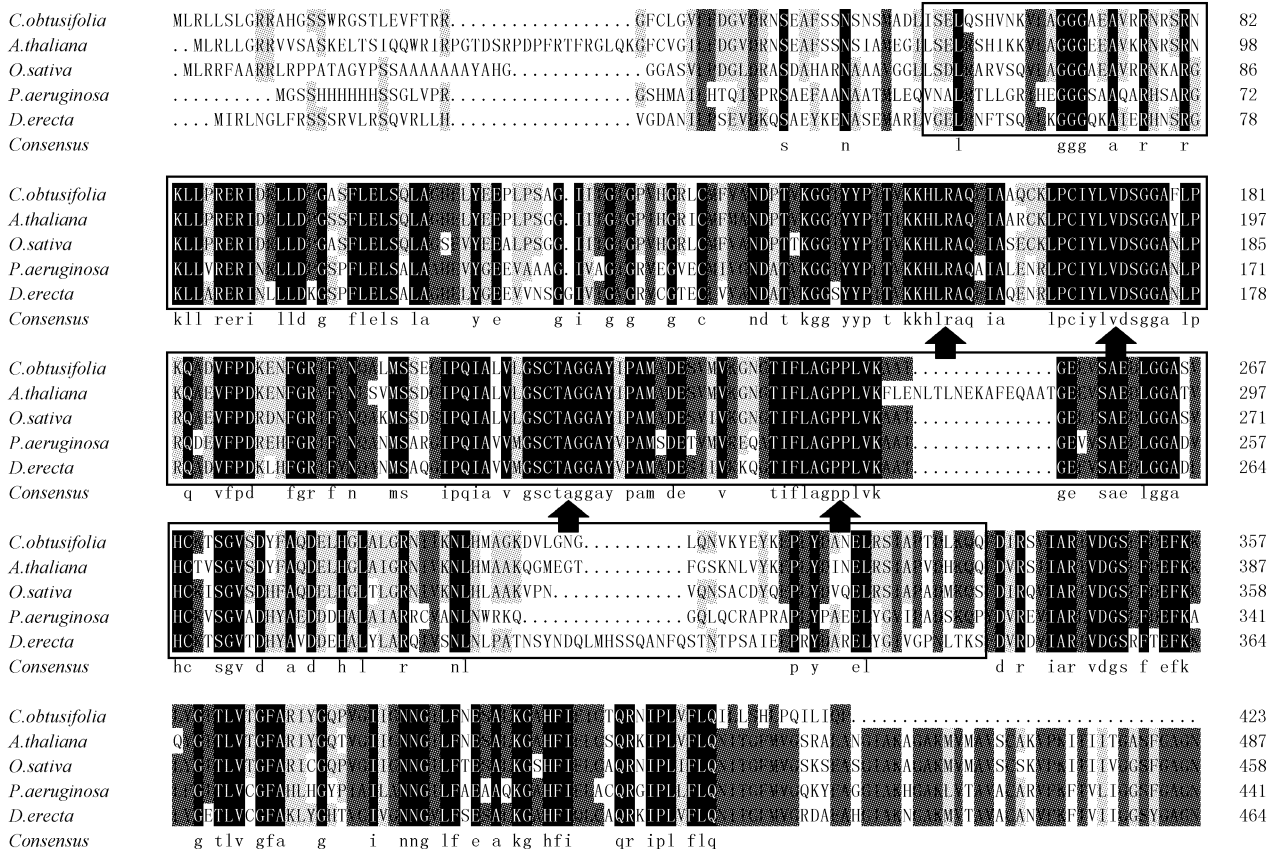


图 5 决明 MCCase 和其它 MCCase 多序列比对

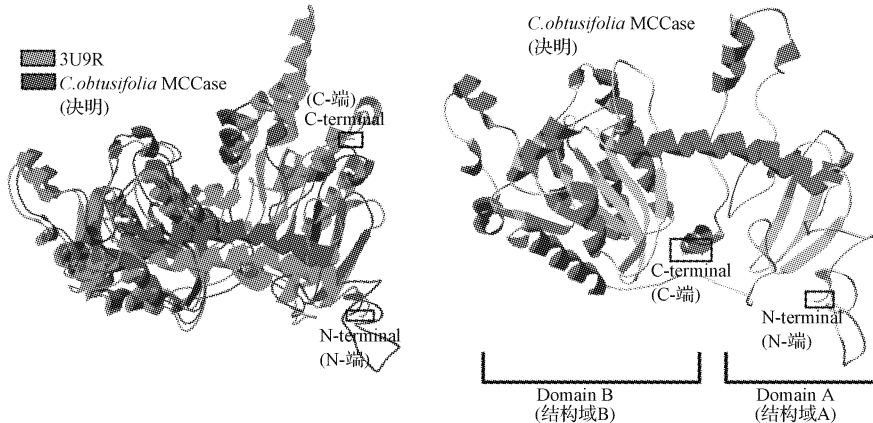
Fig. 5 The multiple sequence alignments of *C. obtusifolia* MCCase and other MCCases

图 6 决明 MCCase 的同源建模

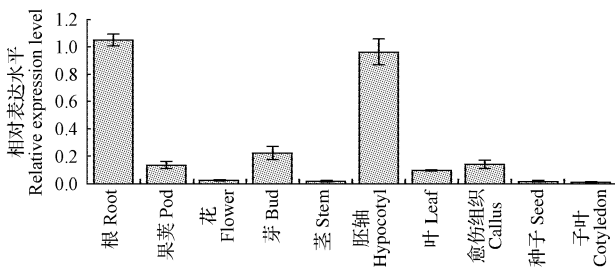
Fig. 6 Homology modeling of *C. obtusifolia* MCCase

图 7 决明 MCCase 组织差异表达模式

Fig. 7 The tissue-specific expression profile of *C. obtusifolia* MCCase

3 结论

决明子作为一种药食同源的植物,提高其营养价值受到愈加关注,MCCase 参与植物中亮氨酸代谢途径,研究 MCCase 为了解氨基酸代谢途径和提高决明子的营养价值提供依据。该研究提取了决明 10 个不同组织的 RNA,利用 RACE 技术得到了决明 MCCase 的全长,利用生物信息学对全长序列进行了系统分析,并以决明 18S rRNA 为内参利用荧光定量 PCR 技术对决明 MCCase 进行了差异表达分析。决明 MCCase 全长 1 269 bp,编

码 423 个氨基酸(Amino acid, AA), 为偏酸性不稳定蛋白质, 无信号肽, 定位于线粒体或细胞质中, 为非跨膜蛋白。决明 *MCCase* 与水稻、玉米、高粱、口蘑、番茄、马铃薯和拟南芥的 *MCCase* 表现出较高的同源关系, 其中与拟南芥同源性最高。*MCCase* 上有一个保守的功能结构域 *B*, 与乙酰 *CoA* 羧化酶显示出较高的相似性, 并在该结构域内发现了 4 个高度保守的氨基酸基, 可能在催化过程中发挥关键作用。*MCCase* 在不同组织中存在差异表达, 在根与胚轴中显示出高表达, 在其它组织中表达量低, 这与光和糖类抑制 *MCCase* 的表达有关。该研究可为研究 *MCCase* 的功能和调控机制提供依据。

参考文献

- [1] Che P, Wurtele E S, Nikolau B J. Metabolic and environmental regulation of 3-methylcrotonyl-coenzyme A carboxylase expression in *Arabidopsis* [J]. *Plant Physiology*, 2002, 129(2): 625-637.
- [2] Nikolau B J, Ohlrogge J B, Wurtele E S. Plant biotin-containing carboxylases [J]. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2003, 414(2): 211-222.
- [3] Anderson M D, Che P, Song J, et al. 3-Methylcrotonyl-coenzyme A carboxylase is a component of the mitochondrial leucine catabolic pathway in plants [J]. *Plant Physiology*, 1998, 118(4): 1127-1138.
- [4] 张加雄, 兰志琼, 王凌, 等. 决明子的生药学研究[J]. *时珍国医国药*, 2008, 19(8): 1876-1877.
- [5] 何菊英, 刘松青. 决明子的药理作用及其临床应用[J]. *药学实践杂志*, 2001, 19(2): 111-113.
- [6] 杨怀礼, 张帮启, 张明. 决明子中氨基酸类成分的含量分析[J]. *西北药学杂志*, 2002, 17(4): 157-157.
- [7] Antoniou M, Economou I, Wang X, et al. Fourteen-year seroepidemiological study of zoonoses in a Greek village [J]. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 2002, 66(1): 80-85.
- [8] Huang J, Zhang H S. Development of nucleotide sequence analysis software based on Windows [J]. *China Journal of Bioinformatics*, 2004, 2(1): 13-17.
- [9] Marques M A M, Espinosa B J, Xavier da Silveira E K, et al. Continued proteomic analysis of *Mycobacterium leprae* subcellular fractions [J]. *Proteomics*, 2004, 4(10): 2942-2953.
- [10] Jones D. ProtScale Tool: Amino acid scale; Refractivity [J]. *J Theor Biol*, 1975, 50: 167-184.
- [11] Dyrlov Bendtsen J, Nielsen H, von Heijne G, et al. Improved prediction of signal peptides; SignalP 3.0 [J]. *Journal of Molecular Biology*, 2004, 340(4): 783-795.
- [12] Horton P, Park K J, Obayashi T, et al. WoLF PSORT: protein localization predictor [J]. *Nucleic Acids Res*, 2007, 35(suppl 2): W585-W587.
- [13] Wu C C, MacCoss M J, Howell K E, et al. A method for the comprehensive proteomic analysis of membrane proteins [J]. *Nature Biotechnology*, 2003, 21(5): 532-538.
- [14] Larkin M A, Blackshields G, Brown N, et al. Clustal W and Clustal X version 2.0 [J]. *Bioinformatics*, 2007, 23(21): 2947-2948.
- [15] 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.
- [16] Guex N, Peitsch M C. SWISS-MODEL and the Swiss-Pdb Viewer: an environment for comparative protein modeling [J]. *Electrophoresis*, 1997, 18(15): 2714-2723.
- [17] Laskowski R A, MacArthur M W, Moss D S, et al. PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures [J]. *Journal of Applied Crystallography*, 1993, 26(2): 283-291.
- [18] Eisenberg D, Lüthy R, Bowie J U. VERIFY3D: Assessment of protein models with three-dimensional profiles [J]. *Methods in Enzymology*, 1997, 277: 396-404.

Cloning, Sequence Analysis and Tissue-specific Expression of Methylcrotonyl-CoA Carboxylase from *Cassia obtusifolia*

LIU Zu-bi, LI Juan-juan, ZHU Qian-kun, SONG Tao, ZHOU Jia-yu, LIAO Hai

(School of Life Science and Engineering, Southwest Jiaotong University, Chengdu, Sichuan 610031)

Abstract: The cDNA sequence of *Cassia obtusifolia MCCase* was obtained by RACE and analyzed by bioinformatics. The tissue-specific expression of *MCCase* was analyzed by quantitation RT-PCR. The results showed *MCCase* sequence had length of 1 269 bp and coded a protein consisting of 423 amine acids, which was an acid, hydrophilic, unstable protein and was located to mitochondria or cytoplasm. *Cassia MCCase* had the highest homology with *Arabidopsis MCCase*. There was a conserved functional domain in *MCCase*, which was similar to that of acetyl *CoA* carboxylase. Four highly conserved motifs were found in the conserved domain and might play important role in catalysis. *MCCase* expressed differently in various tissues. It showed high expression level in root/hypocotyl and low expression level in other tissues. This might be related to the expressional inhibition of *MCCase* caused by carbohydrate and light.

Keywords: Methylcrotonyl-CoA carboxylase; *Cassia obtusifolia*; gene cloning; bioinformatics; gene expression