

学校编码: 10384

分类号_____密级_____

学号:

UDC _____

厦 门 大 学

_____博士_____学 位 论 文

集胞藻 PCC 6803 *ACCase* 基因克隆、载体构建和脂肪合成的研究

Clone、 construction and expression of *Synechocystis* sp.PCC 6803 Acetyl- CoA carboxylase gene for fat production

周赞虎

指导教师姓名：郑天凌 教授

章 军 副教授

专 业 名 称：微生物学

论文提交日期：2015 年 11 月

论文答辩时间：2016 年 05 月

答辩委员会主席： 方柏山

评 阅 人： _____

2016 年 5 月 15 日

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下，独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果，均在文中以适当方式明确标明，并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范（试行）》。

另外，该学位论文为（ ）课题（组）的研究成果，获得（ ）课题（组）经费或实验室的资助，在（ ）实验室完成。（请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称，未有此项声明内容的，可以不作特别声明。）

声明人（签名）：

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

（ ） 1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，于 2019 年 12 月 30 日解密，解密后适用上述授权。

（ ） 2. 不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月 日

目 录

目 录.....	IV
摘要.....	X
Abstract.....	XII
第一章 前言.....	1
1.1 生物柴油研究概述.....	1
1.1.1 生物能源概述.....	1
1.1.2 世界生物柴油发展概况.....	1
1.1.3 中国生物柴油发展概况.....	2
1.2 乙酰辅酶 A 羧化酶简介.....	3
1.2.1 <i>ACC</i> ase 的类型、结构、功能.....	3
1.2.2 <i>ACC</i> ase 在脂类合成的研究及应用.....	5
1.3 大肠杆菌生产生物柴油研究简介.....	5
1.3.1 大肠杆菌脂类代谢概况.....	5
1.3.2 大肠杆菌在生物柴油生产的研究应用.....	7
1.4 本研究的目的是和意义.....	9
第二章 蓝藻浓度测定及蓝藻 DNA 提取.....	10
2.1 前言.....	10
2.2 材料和方法.....	11
2.2.1 蓝藻藻细胞浓度测定.....	11
2.2.2 蓝藻 DNA 提取.....	11
2.3 结果与讨论.....	14
2.3.1 不同波长对蓝藻藻细胞浓度测定的影响.....	14
2.3.2 不同 DNA 提取方法对蓝藻 DNA 得率影响.....	17
2.4 小结.....	19
第三章 <i>ACC</i>ase 基因克隆与分析.....	20
3.1 前言.....	20
3.2 材料和方法.....	23
3.2.1 <i>accA</i> 亚基基因克隆.....	23
3.2.2 <i>accB</i> 亚基基因克隆.....	24
3.2.3 <i>accC</i> 亚基基因克隆.....	25
3.2.4 <i>accD</i> 亚基基因克隆.....	25
3.2.5 TA 克隆.....	26
3.3 结果与讨论.....	27

3.3.1 <i>ACC</i> ase A 亚基克隆鉴定及分析	27
3.3.2 <i>ACC</i> ase B 亚基克隆鉴定及分析	27
3.3.3 <i>ACC</i> ase C 亚基克隆鉴定及分析	28
3.3.4 <i>ACC</i> ase D 亚基克隆鉴定及分析	34
3.4 小结	35
第四章 <i>ACC</i>ase 克隆载体、表达载体的构建与鉴定	37
4.1 前言	37
4.2 材料和方法	37
4.2.1 pUCEBCAD 克隆载体的构建	37
4.2.2 pET32a(+)-BCAD 表达载体的构建	41
4.3 结果与讨论	42
4.3.1 pUCEBCAD 克隆载体构建的电泳图谱及测序图谱	43
4.3.2 pET32a(+)-BCAD 表达载体构建	49
4.4 小结	50
第五章 转基因菌在核酸、蛋白和表达产物上鉴定	52
5.1 前言	52
5.2 材料和方法	53
5.2.1 <i>ACC</i> ase 基因转化与转基因菌的培养	53
5.2.2 <i>ACC</i> ase 各亚基 LAMP 鉴定	53
5.2.3 蛋白提取及鉴定	54
5.2.4 粗脂肪提取测定	55
5.2.5 转基因菌的氨苄青霉素 (Amp) 抗性测试	56
5.3 结果与讨论	57
5.3.1 环介导等温扩增技术对 <i>ACC</i> ase 各亚基检测结果	57
5.3.2 SDS-PAGE 电泳结果及分析	58
5.3.3 转基因和非转基因菌在粗脂肪产量的对比	60
5.3.4 转基因菌生长曲线及氨苄青霉素抗性测试结果	60
5.4 小结	61
第六章 BL21BCAD 转基因菌 C16:0 脂肪酸合成情况	63
6.1 前言	63
6.2 材料和方法	63
6.2.1 样品准备和前处理	63
6.2.2 气相色谱质谱联用仪 (GC-MS) 测定脂肪酸 (C16:0 脂肪酸)	63
6.2.3 脂肪酸合成条件的优化	64
6.3 结果与讨论	64
6.3.1 上清液脂肪酸测定结果	64

6.3.2 细胞破碎物脂肪酸测定结果.....	67
6.3.3 不同表达条件下 C16:0 脂肪酸测定结果.....	69
6.4 小结	71
第七章 结论与展望	73
7.1 总结	73
7.2 本论文的特色和创新点	74
7.3 不足及展望	75
参考文献	76
附录	85
攻读学位期间科研成果	93
致 谢	93

Catalogue

Abstract(Chinese version)	X
Abstract(English version)	XII
Chapter 1 Preface	1
1.1 Introduction of biodiesel	1
1.1.1 Introduction of bioenergy	1
1.1.2 Introduction of world biodiesel.....	1
1.1.3 Introduction of china biodiesel	2
1.2. Introduction of ACCase	3
1.2.1 Type, structure and function of ACCase	3
1.2.2 Application of ACCase in lipid synthesis	4
1.3. Escherichia coli used in genetic engineering of biodiesel	5
1.3.1 Lipid Metabolism of Escherichia coli.....	5
1.3.2 Application and engineering of biodiesel biosynthesis in Escherichia coli.....	7
1.4. Aims and significances of this research	9
Chapter 2 Determination of the concentration of cyanobacteria and it's DNA extraction	11
2.1 Preface	11
2.2Materials and methods	12
2.2.1 Determination of the concentration of cyanobacteria.....	12
2.2.2 DNA extraction of cyanobacteria.....	12
2.3 Results and analysis	15
2.3.1 Effect of the determination of the concentration of cyanobacteria by different wavelength	15
2.3.2 Effect of the yield of the cyanobacteria DNA by different DNA extraction method.....	18
2.3 Summary	19
Chapter 3 ACCase gene clone and analysis	21
3.1 Preface	21
3.2 Materials and methods	24

3.2.1 Clone of A subunit of <i>ACC</i> ase gene	24
3.2.2 Clone of B subunit of <i>ACC</i> ase gene	25
3.2.3 Clone of C subunit of <i>ACC</i> ase gene	26
3.2.4 Clone of D subunit of <i>ACC</i> ase gene	26
3.2.5 Clone of TA.....	27
3.3 Results and analysis	28
3.3.1 Agarose gel electrophoresis mapping and sequencing results of <i>ACC</i> ase gene subunit A.....	28
3.3.2 Agarose gel electrophoresis mapping and sequencing results of <i>ACC</i> ase gene subunit B.....	28
3.3.3 Agarose gel electrophoresis mapping and sequencing results of <i>ACC</i> ase gene subunit C.....	29
3.3.4 Agarose gel electrophoresis mapping and sequencing results of <i>ACC</i> ase gene subunit D	35
3.4 Summary.....	36
Chapter 4 Construction and identification of <i>ACC</i>ase Vector	38
4.1 Preface.....	38
4.2 Materials and methods	39
4.2.1 Construction of pUCEBCAD cloning vectors.....	38
4.2.2 Construction of pET32a(+)-BCAD Expression vector.....	42
4.3 Results and analysis	43
4.3.1 Agarose gel electrophoresis mapping and sequencing results of Construction vectors	44
4.3.2 Restriction enzyme identification of pET32a(+)-BCAD Expression vector.....	50
4.4 Summary.....	51
Chapter 5 Transformation and expression of <i>ACC</i>ase gene in <i>Escherichia coli</i>	53
5.1 Preface.....	53
5.2 Materials and methods	54
5.2.1 Transformation of <i>ACC</i> ase gene and cultivation of transgenic bacteria	54
5.2.2 Identification of <i>ACC</i> ase gene subunits by LAMP.....	54

5.2.3 Extraction and identification of the interest protein	55
5.2.4 Extraction and identification of the Crude fat.....	56
5.2.5 The test of transgenic bacteria ampicillin resistance	57
5.3 Results and analysis	58
5.3.1 The result of identification of ACCase gene subunits by LAMP	58
5.3.2 SDS-PAGE results and analysis.....	59
5.3.3 Comparison of transgenic and non-transgenic bacteria strains in the production of Crude fat.....	61
5.3.4 The result of transgenic bacteria ampicillin resistance test.....	61
5.4 Summary.....	62
Chapter 6 Expression of palmitic acid in transgene ACCase gene Escherichia coli	64
6.1 Preface.....	64
6.2 Materials and methods	64
6.2.1 Sample preparation and pre-treatment.....	64
6.2.2 The determination of fatty acid by gas chromatography mass spectrometry.....	64
6.2.3 Optimization of fatty acids expression conditions.....	65
6.3 Results and analysis	65
6.3.1 The test result of palmitic acid in supernatant	65
6.3.2 The test result of palmitic acid in Cell detritus	68
6.3.3 The test result of palmitic acid in different conditions	70
6.4 Summary.....	72
Chapter 7 Conclusions and prospects.....	74
7.1 Summary.....	74
7.2 Creativity	76
7.3 Prospect.....	76
References.....	78
Appdendix.....	85
Papers and awards.....	93
Acknowledgement.....	95

摘要

在化石燃料日益枯竭、环境污染逐渐威胁人类生存的今天,生物柴油在提供可再生能源的同时还可以减少温室气体,从而受到世界各国的广泛重视。蓝藻为光合自养微生物,是大气碳循环主要贡献者,其生物柴油产量是油料作物的8~24倍。乙酰辅酶A 羧化酶(acetyl-coenzyme A carboxylase, *ACC*Case)是生物体内脂肪生物合成的关键酶,研究发现,过量表达*ACC*Case能够促进生物体脂肪的合成。相对于蓝藻,大肠杆菌具有遗传背景清楚、生长速度快等特点,利用基因工程构建的大肠杆菌表达系统是目前最常用的外源基因表达系统,在转基因生产中占据着主导地位。

本文以集胞藻 *Synechocystis* sp.PCC6803 为研究对象,采用 PCR 技术分别克隆出其 *ACC*Case 的 4 个亚基基因,通过酶切酶连和 cloneEZ 无缝克隆等技术构建了 pUCEBCAD 克隆载体和 pET32a(+)-BCAD 细菌表达载体,并转化入大肠杆菌 BL21 (DE3) 中,采用环介导等温扩增技术验证了转基因菌中的外源基因,通过 SDS-PAGE 验证转基因菌的蛋白表达情况,最后采用 GC-MS 对转基因菌的 C16:0 进行测定。本文的主要研究成果如下:

1. 研究了集胞藻 *Synechocystis* sp.PCC6803 浓度测定技术和 DNA 提取方法,实验表明: 750nm 吸光值最能反映集胞藻 *Synechocystis* sp.PCC6803 细胞真实浓度的变化; 3 种藻类提取方法中,罗氏试剂盒提取效率最高,但 CTAB 法和 SDS 法也能够提取到相应的 DNA。

2. 克隆了集胞藻 *Synechocystis* sp.PCC6803 乙酰辅酶 A 羧化酶的 4 个亚基基因,并对其进行了分析,发现实验用的集胞藻 *Synechocystis* sp.PCC6803 乙酰辅酶 A 羧化酶与以往文献报道有所不同,进一步分析显示实验用的集胞藻 *Synechocystis* sp.PCC6803 可能是一个新亚种。

3. 把集胞藻 *Synechocystis* sp.PCC6803 乙酰辅酶 A 羧化酶的 4 个亚基基因按 BCAD 顺序串联在一起,构建成 pUCEBCAD 克隆载体,最后用 CloneEZ 无缝克隆技术把目的基因整合到 pET32a(+)-BCAD 细菌表达载体上,并在大肠杆菌 BL21 (DE3) 中获得表达。

4. 探讨了转基因菌表达情况, SDS-PAGE 实验结果显示: 转化菌在 35k Da 附近有大量蛋白表达,可能是 *ACC*Case 酶的 α -CT 亚基和或 β -CT 亚基; 在 66 k

Da (17k Da+49k Da) 附近也有较多的蛋白表达, 可能是包含生物素羧化酶转运蛋白的生物素羧化酶。粗脂肪测定结果显示: 转入集胞藻 *Synechocystis* sp.PCC6803 乙酰辅酶 A 羧化酶基因后的大肠杆菌 BL21 (DE3) 细胞油脂含量提高了 65.54%, 经 IPTG 诱导 4h 后, 油脂含量再度提高 19.59%, 比野生菌提高 97.97%。证明转入乙酰辅酶 A 羧化酶基因确实提高了转基因菌株的油脂产量; 用气相色谱质谱联用仪精确测定大肠杆菌中具有代表意义的 C16:0 脂肪酸, 实验表明: 转基因菌体比野生菌体 C16:0 脂肪酸含量增加 29.7%, 显著差异。

5. 探讨了 BL21BCAD 转基因菌的生长情况, 细菌生长实验结果显示: 在 37 °C 200rpm 条件下培养 3h, BL21BCAD 转基因菌 OD₆₀₀ 值为 0.61, 而野生大肠杆菌 BL21 (DE3) OD₆₀₀ 值为 0.66, 生长实验结果证明, 转入 *ACC*ase 基因, 对菌体影响不大。Amp 抗性研究表明: 转基因菌 BL21BCAD 能够在氨苄青霉素 100 μg/mL 生长。培养条件研究表明: 在 37°C, 200rpm, IPTG 浓度为 0.75mmol/L, Amp 浓度 25 μg/mL, 培养时间 3h, C16:0 脂肪酸合成情况最好。

关键词: 集胞藻; *ACC*ase 基因克隆; 载体构建; 基因表达; 脂肪合成

Abstract

With the increasingly severe problems of energy crisis and environmental pollution, biodiesel has been attracting more and more attention worldwide by providing renewable energy and reducing greenhouse emissions. As photoautotrophic microorganisms, Cyanobacteria are major contributors to atmospheric carbon cycle, the biodiesel productivity of which is 8 to 24 times of that observed in oilseeds. Acetyl coenzyme A carboxylase (ACCase) is the key enzyme controlling fatty acid biosynthesis *in vivo*, and researchers found that the overexpression of ACCase *in vivo* can enhance the lipid synthesis. Apart from Cyanobacteria, *Escherichia coli* presents well-known genetic background, fast growing speed and other excellent features. Genetically engineered *E. coli* expression system is currently the most popular exogenous gene expression system, securing a dominant position in transgenic production.

In this study, *Synechocystis* sp.PCC6803 was set as the main research object and the four subunit genes of its ACCase had been cloned respectively by PCR technology. The pUCEBCAD cloning vector and pET32a(+)-BCAD bacterial expression vector were constructed by genetic engineering techniques, such as endonuclease digestion and CloneEZ cloning technology, and expressed in *E. coli* BL21 (DE3). Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) was applied in exogenous gene conformation in transgenic strains, SDS-PAGE analysis was used to verify protein molecular weight and C16: 0 fatty acids in *E. coli* were finally accurately determined by Gas chromatography–mass spectrometry (GC-MS). The main findings of this dissertation are as follows:

1. Cell density determination strategies of *Synechocystis* sp.PCC6803 had been studied. The results demonstrated that the change of cell density could be best observed in the absorbance at 750 nm. Three DNA extraction methods of *Synechocystis* sp.PCC6803 were also analysed, demonstrating the method based on Roche kit was optimal compared with CTAB and SDS extraction methods.

2. The four subunit genes of *Synechocystis* sp.PCC6803's acetyl-coenzyme A carboxylase were cloned and comparative analysis was performed. It was shown that the *Synechocystis* sp.PCC6803's acetyl-coenzyme A carboxylase used in this study was different from those in previously reported references, further analysis showed *Synechocystis* *Synechocystis* sp.PCC6803 in this study could be a new subspecies.

3. The four subunit genes of *Synechocystis* sp.PCC6803's acetyl-coenzyme A carboxylase were combined together in the sequence of BCAD to construct pUCEBCAD cloning vector. Then the target gene was integrated into pET32a (+) - BCAD bacterial expression vector by CloneEZ cloning technology and expressed in *E. coli* BL21 (DE3).

4. The expression of transgenic strains was discussed. The results of SDS-PAGE analysis showed that, the protein with an approximate molecular mass of 35k Da was abundantly expressed, which may be α -CT and β -CT subunits of ACCase. The protein with molecular mass of around 66k Da was also significantly expressed, presenting possibly Biotin carboxylase (BC, 17k Da) combined with Biotin carboxyl carrier protein (BCCP, 49k Da). The results of crude lipid determination showed: The lipid content in the cells of transgenic strains increased by 65.54%, and a further increase of 19.59% was achieved after being induced by IPTG for 4 hours, totally 97.97% higher than non-transgenic strains. All the results indicated that the lipid yield could be eventually improved after the strains were engineered with genes coding for acetyl coenzyme A carboxylase. Gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) was used to accurately determine typical C16:0 fatty acids in *E. coli* and it was demonstrated that the content of C16:0 fatty acid in the cells of engineered strains increased by 29.7%, which is a significant difference compared with wild strains.

5. The growth of transgenic strains BL21BCAD was assessed. The results showed the OD₆₀₀ value of BL21BCAD was measured as 0.61 after being cultured for 3 hours at 37 °C 200rpm while the OD₆₀₀ value of wild strains BL21(DE3) was 0.66 with same culturing conditions, which indicated that no significant impact on bacterial cell growth was present after the *ACCase* gene being transferred. Research on Ampicillin resistance demonstrated that transgenic strains BL21BCAD could also grow when the concentration of ampicillin reached 100 μ g/mL. In summary, research results showed that the optimal culture conditions for the expression of C16:0 fatty acids were IPTG concentration 0.75mmol/L, Amp density 25 μ g/mL, shaking speed 200rpm, temperature 37 °C and culture time 3h.

Keywords: *Synechocystis*; *ACCase* gene cloning; vector construction ; Gene expression; fat production

第一章 前言

1.1 生物柴油研究概述

1.1.1 生物能源概述

在化石燃料日益枯竭、环境污染逐渐威胁人类生存的今天，可再生能源的开发成为各国研究的方向。可再生能源是指人们可利用的、生生不息的大自然资源。它包括包括生物能源、太阳能、光能、沼气等，其中生物能源是目前各国研究的重点。

生物能源：利用生物质（包括植物、动物及其排泄物、垃圾及有机废水等几大类）生产的能源。主要包含以下 3 大类：

1) 燃料乙醇：现世界 3 大燃料乙醇生产国：巴西、美国和中国，我国现有燃料乙醇生产能力已达 102 万吨/年。燃料乙醇生产的原料主要有甘蔗、玉米和陈化粮。

2) 沼气能源：利用农业秸秆资源等为原料生产的沼气能源。

3) 生物柴油^[1]：生物柴油是以生物体油脂为原料，通过分解、酯化而得到的长链脂。一般是由 14-24 个碳原子的脂肪酸单酯组成，和石化柴油组分类似，但在经济、环保、燃烧、对人体的危害性等方面具有石化柴油所无法比拟的优越性，被誉为是“液体太阳能燃料”。根据美国生物柴油协会 NBB(National Biodiesel Board)的定义，生物柴油的定义有两种，即技术定义和广泛定义。技术定义是指由动植物油脂和醇（例如甲醇和乙醇）经酯交换反应制得的脂肪酸单烷基酯，最典型的为脂肪酸甲酯，以 BD100 表示。广义定义是指从天然油脂制备的柴油，可以是单烷基酯，也可以是其他柴油，如油脂加氢制备的柴油。1991 年，奥地利颁发了第一个生物柴油燃油标准 ONC1190；1993 年，法国、意大利，1994 年捷克共和国，1996 年瑞士、美国都相续颁发了生物柴油的生产标准；随后，德国也颁发了该国是生物柴油燃油标准。在我国需要符合《柴油机燃料调和用生物柴油（BD100）（GB/T 20828-2007）国家标准。

1.1.2 世界生物柴油发展概况

生物柴油应用最多的是欧洲，生产原料主要是菜籽油和麻疯树种子等。欧洲议会免除生物柴油 90%的税收，欧洲国家对替代燃料的立法支持，差别税收以及油籽生产的补贴，共同促进了生物柴油产业的快速发展。1993 年欧盟生物柴油

刚刚起步, 2000 年刚刚突破 0.5 万吨, 2010 年欧盟生物柴油产量为 957 万吨^[2] 全球 2014 年生物柴油产量料达到 2980 万吨^[3]; GlobalData 公司^[4] 研究显示, 21 世纪第一个十年以来, 全球生物柴油市场累计年均增长率达到 41.9%, 预计在第二个十年内将以 10% 的速度增长。2009 年欧洲的生物柴油市场占有率为 49.8%, 美国 32.8%, 亚太地区 4.4%。世界各国生物柴油的年产量比较^[5] 见图 1-1。

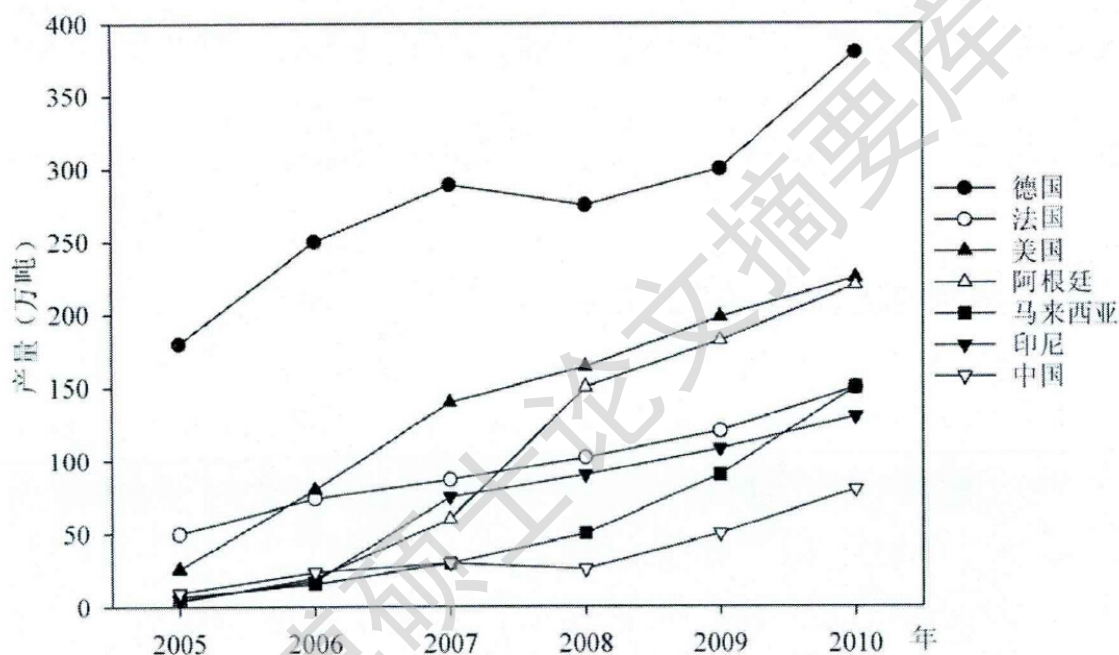


图 1-1: 世界各国生物柴油年产量 单位: 万吨^[5]

Fig.1-1: The world annual production of bio-diesel Unit: million tons^[5]

1.1.3 中国生物柴油发展概况

中国生物柴油发展现状^[6], 2005年12月, 国家发改委办公厅组织实施生物质工程高技术产业化专项中明确指出要支持以棉籽、油菜籽、废弃油及其他用木本植物原料生产生物柴油产业化, 2006年1月1日开始《中华人民共和国可再生能源法》正式实施, 2011年, 生物柴油免征消费税政策出台。到2014年全球生物柴油产量近3000万吨, 已建和在建生物柴油装置年产能接近5000万吨, 生物柴油迅猛发展, 成为21世纪正在崛起的新兴产业。我国目前生物柴油产量只有100多万吨。与发达国家相比, 我国生物柴油产业起步较晚, 发展进程较为缓慢, 生产的生物柴油一般仅可用于农业或发电机械。

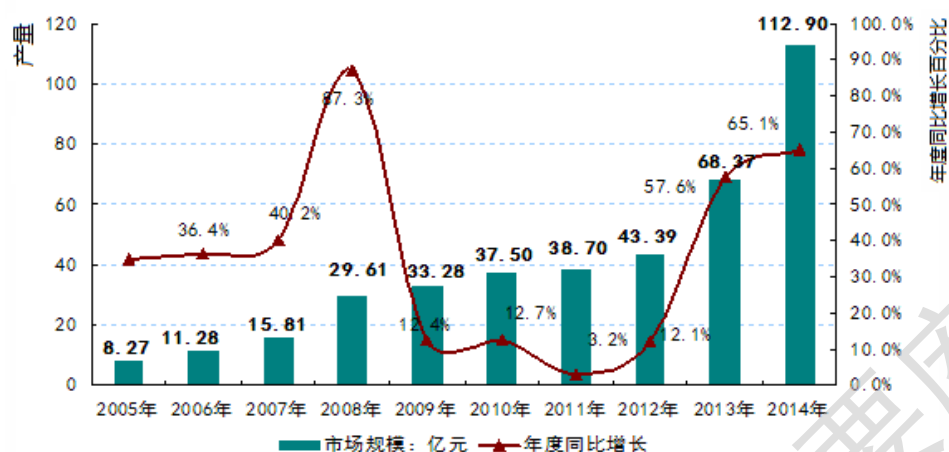


图 1-2: 中国生物柴油年产量 单位: 万吨^[7]

Fig.1-2: China annual production of bio-diesel Unit: million tons^[7]

1.2 乙酰辅酶 A 羧化酶简介

乙酰辅酶 A 羧化酶 (Acetyl-CoA carboxylase, *ACC*) 在 ATP 供能、 Mg^{2+} 存在下, 以 HCO_3^- 为羧基供体, 将乙酰辅酶 A 羧化生成丙二酰单酰辅酶 A。丙二酰辅酶 A 是脂肪酸从头合成途径的直接底物, 因此这个酶促反应是脂肪酸合成和氧化过程中限制速率的关键调节步骤, *ACC* 是脂肪酸生物合成途径的关键限速酶, 是整个脂肪酸合成的总开关, 对脂肪酸合成起着至关重要的作用。

1.2.1 *ACC* 的类型、结构、功能

生物界中有两类 *ACC*, 第一大类为异质型 *ACC*, 即多亚基型^[8], 由 4 个亚基组成, 即生物素羧化酶 (Biotin carboxylase, BC)、生物素羧基载体蛋白 (Biotin carboxyl carrier protein, BCCP) 以及羧基转移酶 (Carboxyltransferase, CT) 的 2 个亚基 α -CT 和 β -CT。这些亚基结合在一起形成 *ACC* 全酶, 可能以 $(BC)_2(BCCP)_4(CT\alpha, CT\beta)_2$ 形式存在, 但全酶很不稳定, 易解离成各种不同的形式^[9]。异质型 *ACC*^[10-12] 存在于细菌、双子叶植物和非禾本科单子叶植物的质体中大肠杆菌的 *ACC* 是异质型 *ACC* 的代表。

大肠杆菌 *ACC* 在结构上有 3 个功能域, 分别是生物素羧化酶 (biotin carboxylase, BC)、生物素羧基载体蛋白 (biotin carboxyl carrier protein, BCCP)、羧基转移酶 (Carboxyltransferase, CT)。生物素以共价键连接在 BCCP 亚基上, 在 *ACC* 羧化乙酰 CoA 的过程中作为羧基的中间载体。BC 和 CT 各催化 2 个独立的半

Degree papers are in the “[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)”.

Fulltexts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.