

# 油菜ACO1基因家族成员及其蛋白质高级结构比较

祝晨琳

浙江师范大学生命科学学院, 浙江 金华

收稿日期: 2024年2月28日; 录用日期: 2024年4月22日; 发布日期: 2024年4月30日

## 摘要

乙烯对植物的生长发育具有重要的调节作用,尤其在植物抵抗逆境胁迫过程中扮演着重要角色。ACO1 (1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase 1)是乙烯合成过程中的一个限速酶,对乙烯的生物合成具有调控作用。菜籽油是我国居民的主要植物食用油之一,提高油菜抗逆性和产品品质是保证我国植物油持续供应的重要育种环节。本文利用生物信息学的方法,对油菜ACO1基因家族进行全基因组鉴定,并从基因的基本信息、蛋白质的亚细胞定位、保守结构域、蛋白质高级结构以及进化关系等方面对油菜ACO1基因家族进行了分析研究。结果显示,在油菜基因组中,ACO1基因家族包含7个基因位点,其中1个为不编码假基因,其余6个基因位点各编码1个蛋白质,这些基因在A基因组和C基因组上都存在,编码的蛋白质均定位于细胞质中。油菜ACO1蛋白质序列长度均为310AA,其氨基酸组成差异较小,均属于PLN02403超家族,行使氨基环丙烷羧酸氧化酶的功能。在油菜ACO1蛋白质的二级结构中, $\alpha$ -螺旋和 $\beta$ -折叠都较多, $\alpha$ -螺旋数量在11~13个之间, $\beta$ -折叠的数量在13~14个之间,蛋白质序列中间段的二级结构差异极其微小,为保守区,而N端和C端的二级结构差异较中间段的大,或许在功能上有一定的差异。同源建模法所得到的空间结构中N端和中间部分的空间结构差异微小,较保守,而C末端序列的空间结构差异较明显,为可变区,可能是活性位点,与酶的催化活性有关。

## 关键词

油菜, ACO1基因, 基因家族, 高级结构

## Comparison of ACO1 Gene Family Members and Their Protein Higher Structure in *Brassica napus* L.

Chenlin Zhu

College of Life Sciences, Zhejiang Normal University, Jinhua Zhejiang

Received: Feb. 28<sup>th</sup>, 2024; accepted: Apr. 22<sup>nd</sup>, 2024; published: Apr. 30<sup>th</sup>, 2024

## Abstract

Ethylene plays an important role in regulating the growth and development of plants, especially in the process of plant resistance to adversity stress. ACO1 (1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase 1) is a rate-limiting enzyme in the process of ethylene synthesis and has a regulatory effect on ethylene biosynthesis. Rapeseed oil is one of the main vegetable edible oils for Chinese residents, and improving the stress-resistance and product quality of rapeseed is an important breeding step to ensure the continuous supply of vegetable oil in our country. This article uses bioinformatics methods to identify the ACO1 gene family members in *Brassica napus* L., and analyzes them from the basic information of genes, protein subcellular location, conserved domains, protein structure, and evolutionary relationships. The results showed that the ACO1 gene family in *Brassica napus* L. contains 7 genetic locus, one of which is a non-coding pseudogene, and the remaining 6 gene loci each encode a protein. These genes exist on both the A genome and the C genome. The encoded proteins are all located in the cytoplasm. The length of ACO1 protein sequence is all 310 amino acid (AA), and the difference of their amino acid composition is small, all belong to the PLN02403 superfamily, and perform the function of aminocyclopropane carboxylic acid oxidase. In the secondary structure of rape ACO1 proteins, there are more  $\alpha$ -helices and  $\beta$ -sheets. The number of  $\alpha$ -helices is between 11 to 13, and the number of  $\beta$ -sheets is between 13 to 14. The secondary structure difference in the middle segment of the sequence is extremely small, which is a conserved region, while the secondary structure difference between the N-terminal and C-terminal is larger than that of the middle segment, and there may be a certain difference in function. The spatial structure difference between the N-terminal and the middle part of the spatial structure obtained by the homology modeling method is small and conservative, while the spatial structure of the C-terminal sequence is more obvious. It is a variable region, which may be the active site, related to the catalytic activity of the enzyme.

## Keywords

*Brassica napus* L., ACO1 Gene, Gene Family, Advanced Structure

Copyright © 2024 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

## 1. 引言

乙烯是一种挥发性植物激素，它能够调节植物的种子萌发、花和叶的衰老、果实的成熟等生长发育过程，并能够对逆境做出胁迫反应。乙烯还可以作为信号分子，在植物生命周期的某些阶段诱导基因表达的特定变化，因此，植物能否在时间和空间上精确控制乙烯的生产水平是至关重要的。在乙烯合成过程中，ACC合成酶(ACS)首先催化S-腺苷甲硫氨酸(SAM)形成1-氨基环丙烷-1-羧酸(ACC)，ACC氧化酶(ACO)再催化ACC生成乙烯[1]。

ACO作为一种只参与乙烯合成途径的酶，已从许多植物中获得，如番茄[2]、苹果[3]和陆地棉[4]等。ACO具有2-羟戊二酸结合域R<sub>x</sub>S和亚铁结合位点H<sub>x</sub>D<sub>x</sub>nH，活性部位为C端附近的一个宽裂口，ACC的氧化反应需要反应物O<sub>2</sub>和Fe<sup>2+</sup>作为辅助因子，抗坏血酸作为共底物，需要CO<sub>2</sub>、Fe<sup>2+</sup>和抗坏血酸来维持其酶活性。

有研究表明，水杨酸[5]、乙酰水杨酸[6]可以通过抑制ACO的活性从而抑制乙烯的合成，RNA干扰ACO1和ACO2基因的表达可以延长木瓜果实[7]的货架期。ACO基因在拟南芥中过表达提高了其耐淹水

能力[8]。黄瓜 ACO2 基因的突变产生了只结雄花的突变体[9]。

由 ACO 相关理论指导的生物技术在植物中的应用很广泛,其中之一是在果实成熟和采后贮藏时减少乙烯的产生。反义 RNA 技术下调 ACO 的表达,从而降低乙烯产量,进而控制果实的成熟和采后的贮藏,而这一成果已被广泛应用于延缓果实成熟、延长果实的货架期以及蔬菜营养组织的保质期。用转基因的方法沉默 ACO 的表达在石斛兰、石竹、康乃馨等花卉栽培中也有很大的应用[10]。例如, Houben M 等研究[11]表明, ACO 基因在矮牵牛、香石竹中下调表达可引起花期延长。ACO 活性的降低可影响部分花瓣和萼片的形状,延缓花蕾的败育,延缓开放花朵的衰老和脱落。Sornchai P 研究[12]表明,转入反义 ACO 基因的石斛兰表现出花期延长,花蕾脱落延迟,但花粉活力和花粉管生长未受到显著影响。

油菜是我国的四大油料作物之一,油菜籽的含油量较高,并且具有丰富的营养价值,是我国的主要油料作物之一。除此之外,油菜在化工、医药、纺织和造纸业等方面也有很大的用途。虽然我国是油菜籽生产大国,但是近年来国内植物油的生产量还是不能满足消费所需的量,还有很大一部分需要从国外进口。因此,如何在低成本条件下,通过提高油菜的抗逆性保证其单产水平提高,进而提高油菜生产总量至关重要[13]。

植物 ACO 基因家族包含多个亚家族,如番茄 ACO 基因家族包含 ACO1、ACO2 和 ACO3 亚家族[14],这三个基因的表达具有特异性,主要表现为器官、时空、转录水平和翻译水平等的表达差异。ACO1 基因家族也包含多个基因,不同基因的表达或许也有特异性。

本研究用生物信息学的技术和方法,对油菜 ACO1 基因家族进行全基因组鉴定,并从基因的基本信息、蛋白质的亚细胞定位、保守结构域、蛋白质高级结构以及进化关系等方面对油菜 ACO1 基因家族进行研究,希望对油菜的育种提供参考。

## 2. 材料与方法

### 2.1. 基本信息获取

在 NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)的 Gene 数据库中搜索油菜 ACO1 (1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase 1)基因,共获得 7 个成员,点击每一条 Gene ID 以获得各个成员的基本信息,如基因定位、外显子数目、所编码的蛋白质长度等,并下载相应的蛋白质序列。

### 2.2. 亚细胞定位

分别利用 Plant-mPLOC、Psort、TargetP-2.0、CELLO v.2.5 和 Euk-mPLOC 2.0 server 共同分析 ACO1 蛋白质家族各成员的亚细胞定位,采用统计学原则获得一致性结论。

### 2.3. 油菜 ACO1 蛋白质序列特性与进化关系分析

打开 DNAMAN 软件,点击 Multiple Sequence Alignment,在默认参数下对油菜 ACO1 蛋白质家族成员进行多序列比对;进一步生成距离进化树状图并显示为有根树(Rooted Tree)。

### 2.4. 不同物种 ACO1 蛋白的进化分析

在 NCBI 中搜寻并下载十字花科的甘蓝、白菜、芥菜、萝卜、花菜,茄科的番茄、烟草,蔷薇科的苹果的 ACO1 氨基酸序列,把这些同源蛋白氨基酸序列进行比对并构建进化树。

### 2.5. 保守结构域

进入 NCBI 中的保守结构域分析页面,点击 Batch CD-Search,复制各条蛋白质序列于粘贴框内,提交数据获得预测结果并绘图。

## 2.6. 高级结构建模和结构可靠性分析

利用 PRABI ([https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa\\_automat.pl?page=npsa\\_sopma.html](https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_sopma.html))中的 SOPMA 工具预测油菜 ACO1 蛋白质家族成员的二级结构。通过同源建模法进行蛋白质的三级结构预测, 所用软件为 SWISS-MODEL (<https://swissmodel.expasy.org/interactive>), 并对所建模的结构进行可靠性评价。

## 3. 结果与分析

### 3.1. 油菜 ACO1 基因家族成员基本信息分析

通过搜索 NCBI 基因数据库, 共获得了 7 个 ACO1 基因家族成员, 分析可知(见表 1), 其中有 1 个为假基因(LOC106363716), 不编码蛋白质, 定位于 C1 染色体上; 另外 6 个基因分别编码 6 条油菜 ACO1 蛋白质序列, 其中 LOC106436068 定位于 A9 染色体上、LOC106365298 定位于 C8 染色体上, 然而 LOC106400855、LOC106376208、LOC106374519 和 LOC111210370 这 4 个基因的染色体定位尚不清楚。所有 6 个编码基因均有 3 个外显子。由这些基因编码得到的 6 个蛋白质中, 2 个为 ACO1, 4 个为 ACO1 类似物, 但这 6 个蛋白质的序列长度(Length)均为 310AA, 长度一致。

**Table 1.** General information of ACO1 family members in *Brassica napus* L.

**表 1.** 油菜 ACO1 基因家族成员基本信息

基因号	蛋白序列	染色体定位	外显子	长度	蛋白质描述
LOC106436068	XP_013732481.1	A9NC_027774.2 (39021231..39023906)	3	310 aa	ACO1
LOC106365298	XP_013660201.1	C8NC_027765.1 (42110823..42113479)	3	310 aa	ACO1
LOC106400855	XP_013696699.1	UnNW_019168613.1 (81934..83382)	3	310 aa	ACO1-like
LOC106376208	XP_013671730.2	UnNW_019169472.1 (1723..3258)	3	310 aa	ACO1-like
LOC106374519	XP_013669979.1	UnNW_019168571.1 (355287..356788)	3	310 aa	ACO1-like
LOC111210370	XP_022566418.1	UnNW_019168571.1 (364398..365937)	3	310 aa	ACO1-like
LOC106363716	假基因	C1	-	-	-

注: Un (Unplaced Scaffold): 表示基因序列的染色体定位还不清楚; ACO1: 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase 1

### 3.2. 油菜 ACO1 蛋白质亚细胞定位分析

**Table 2.** Subcellular localization of ACO1 protein family members in *Brassica napus* L.

**表 2.** 油菜 ACO1 蛋白质家族成员的亚细胞定位

蛋白质序列	Psort	TargetP-2.0	CELLO v.2.5	Euk-mPLoc 2.0 server	Plant-mPLoc	结论
XP_013732481.1	cyto: 8, nucl: 3, chlo: 1, cysk: 1, golg: 1	Other:2	Cyto:3.501	Cyto	Cyto	Cyto
XP_013660201.1	cyto: 8, nucl: 4, chlo: 1, cysk: 1	Other:2	Cyto:2.336, Nucl:2.108	Cyto	Cyto	Cyto
XP_013696699.1	cysk:12, nucl: 2	Other:2	Cyto:2.891	Cyto	Cyto	Cyto
XP_013671730.2	cysk:12, nucl: 2	Other:2	Cyto:2.941	Cyto	Cyto	Cyto
XP_013669979.1	cysk:12, nucl: 2	Other:2	Cyto:3.014	Cyto	Cyto	Cyto
XP_022566418.1	cysk:12, nucl: 2	Other:2	Cyto:3.029	Cyto	Cyto	Cyto

注: Cyto: 细胞质; Nucl: 细胞核; Chlo: 叶绿体; Cysk: 细胞骨架; Golg: 高尔基体; Other: 其他部位(除叶绿体、线粒体、分泌蛋白外); TargetP-2.0、CELLO v.2.5 的数值: 可靠性级别



综合 5 个在线分析软件得出的 ACO1 蛋白质家族各个成员的亚细胞定位结果(表 2), Psort 分析结果为 XP\_013732481.1 和 XP\_013660201.1 这两种蛋白质定位于细胞质中, 其他的四个蛋白质定位于细胞骨架上; 而利用 TargetP-2.0 预测出所有蛋白质均定位于除叶绿体、线粒体、分泌蛋白外的其他部位, 该软件是基于蛋白质序列的 N 端信号, 利用神经网络的方法来预测的; CELLO v.2.5、Euk-mPloc 2.0 serve 和 Plant-mPloc 这三个软件分析结果表明, 6 条蛋白质序列均定位于细胞质中, 这与 TargetP-2.0 预测的结果相符合。按照统计学中少数服从多数原则, 油菜 ACO1 蛋白质家族各成员大概率定位在细胞质内。

### 3.3. 油菜 ACO1 蛋白质序列特性及进化分析

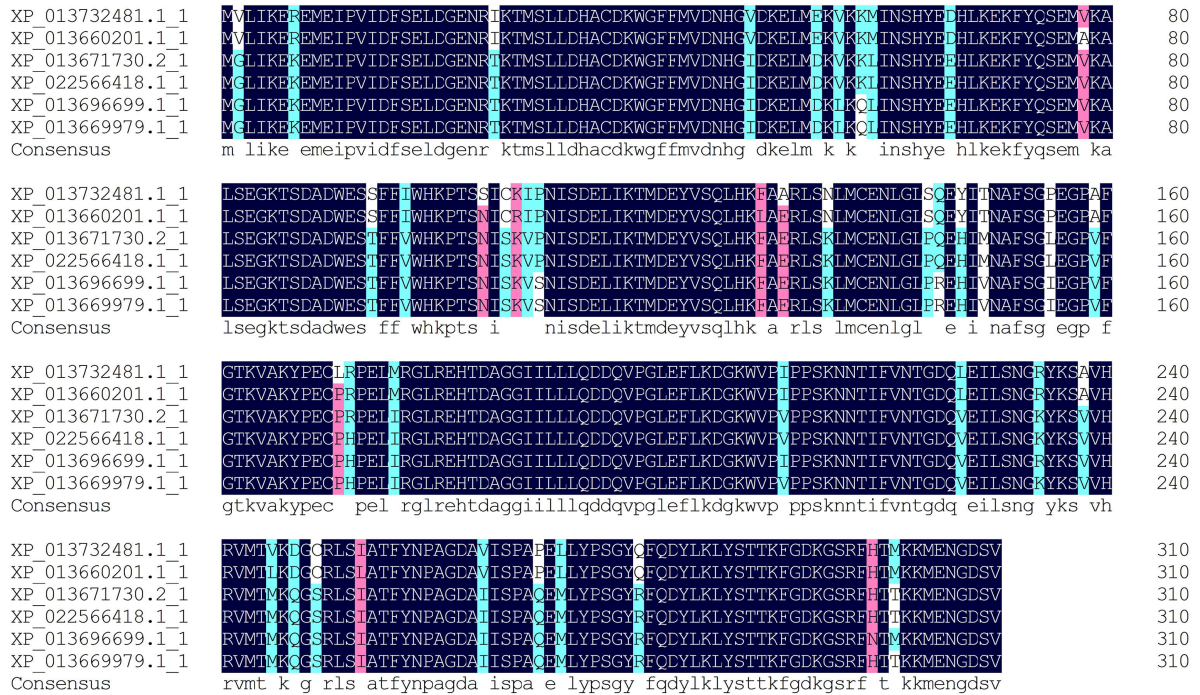


Figure 1. Multiple sequence alignment of the ACO1 protein family in *Brassica napus* L.  
图 1. 油菜 ACO1 蛋白质家族的多序列比对

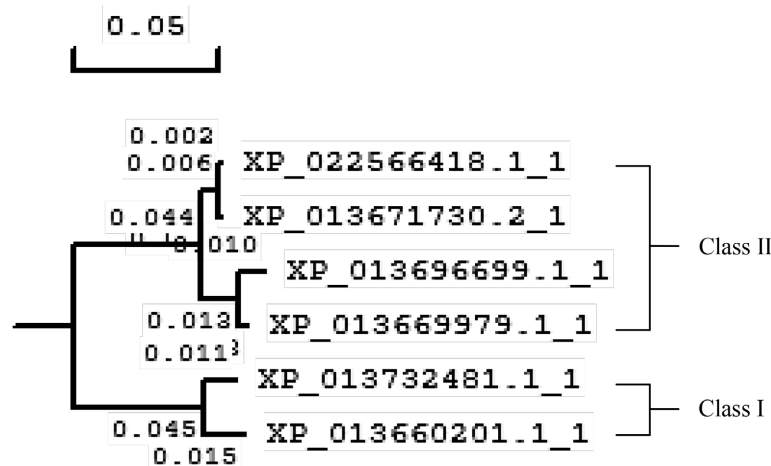


Figure 2. Phylogenetic tree of ACO1 protein family in *Brassica napus* L.  
图 2. 油菜 ACO1 蛋白质家族进化树

利用 DNAMAN 对油菜 ACO1 蛋白质家族的所有蛋白质进行多序列对比, 从对比结果(图 1)来看, 这 6 个蛋白质序列的平均相似性为 95.38%, 序列分化较小, 总体相似性极高, 表明它们执行的功能都非常相似。然后根据它们的同缘关系的远近生成有根进化树(图 2), 通过分析所得的有根进化树, 将 6 个蛋白质分为两个大分支, 分别为 CLASSI 和 CLASSII, CLASSI 包含 XP\_013732481.1 和 XP\_013660201.1 两个蛋白质, CLASSII 包含 XP\_013696699.1、XP\_013671730.2、XP\_013669979.1、XP\_022566418.1 这 4 个蛋白质。在进化树的每一个大分支里, 都既包含 A 基因组表达的蛋白质序列, 又包含 C 基因组表达的蛋白质序列, 而甘蓝型油菜是由白菜(AA, n = 10)与甘蓝(CC, n = 9)通过自然种间杂交后双二倍化进化而来的一种复合种, 表明油菜 ACO1 所包含的基因在最早期就已经出现了分化。

### 3.4. ACO1 蛋白垂直同源序列的比较和进化树构建

以 XP\_013660201.1 序列对非冗余蛋白质数据库进行搜索, 下载十字花科中甘蓝、白菜、拟南芥、萝卜、花菜、芥菜, 茄科的番茄、烟草, 蔷薇科的苹果的 ACO1 氨基酸序列, 把这些同源蛋白氨基酸序列进行比对, 结果显示, 这些序列的相似性达到 72.44%, 将这些序列构建进化树, 结果(图 3)表明, 甘蓝型油菜与甘蓝、白菜和萝卜的进化距离最近, 首先聚为一类, 其次与拟南芥为一类, 均为十字花科植物, 分为一大类 Class I; 与十字花科的芥菜、花菜, 蔷薇科的苹果, 茄科的番茄、烟草的进化距离较远, 分为另一大类 Class II。

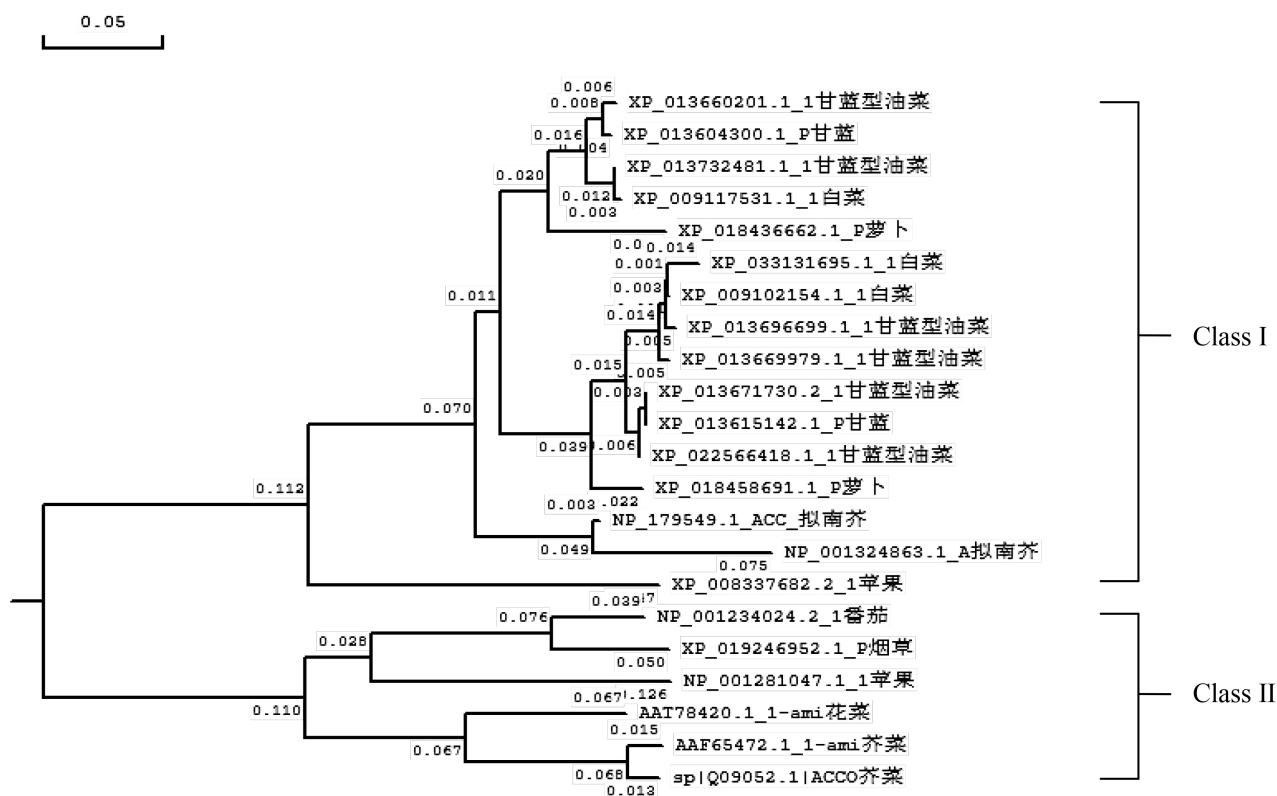


Figure 3. Phylogenetic tree of amino acid sequences of ACO1 proteins from different species

图 3. 不同物种 ACO1 蛋白的氨基酸序列的进化树

### 3.5. 油菜 ACO1 基因家族成员的蛋白质结构域分析

通过分析油菜 ACO1 家族 6 个蛋白质序列的结构域所对应的超家族(superfamily), 结果表明(表 3、图

4), 这 6 条蛋白质序列的保守结构域在氨基酸序列上的位置都为 9~309, 都属于 PLN02403 超家族, 行使相似的功能。PLN02403 超家族结构域内还含有两个结构域, 分别为 2OG-FeII\_Oxy 和 PcbC。

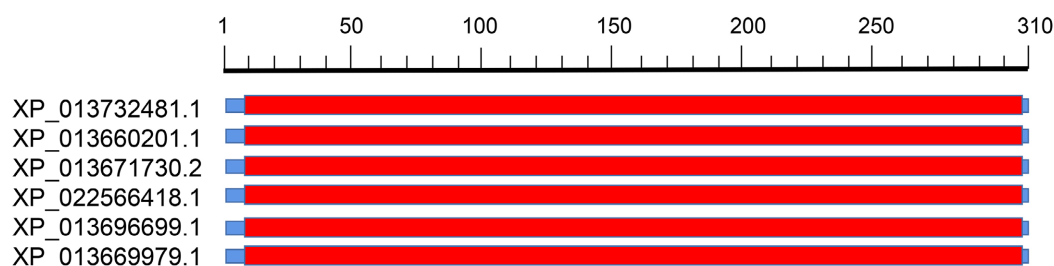
2OG-FeII\_Oxy 即 2OG-Fe (II)加氧酶超家族, 包含 2-氧戊二酸酯和 Fe<sup>2+</sup>依赖性加氧酶超家族的成员 [15]。该结构域的位置保守, 均为 167~259。

PcbC 即异青霉素 N 合酶和相关的双加氧酶超家族 [15]。该结构域的氨基酸长度不一, 在 XP\_013732481.1 和 XP\_013660201.1 的蛋白质序列上的位置为 9~271, 其余的都为 9~267。

**Table 3.** Conservative structural domains of ACO1 protein family in *Brassica napus* L.

**表 3.** 油菜 ACO1 蛋白质家族的保守结构域

Query	From	To	E-Value	Bitscore	Accession	Short name	Super family
XP_013660201.1	9	309	0	596.453	PLN02403	PLN02403	cl31875
XP_013669979.1	9	309	0	576.037	PLN02403	PLN02403	cl31875
XP_013671730.2	9	309	0	581.815	PLN02403	PLN02403	cl31875
XP_013696699.1	9	309	0	581.045	PLN02403	PLN02403	cl31875
XP_013732481.1	9	309	0	589.904	PLN02403	PLN02403	cl31875
XP_022566418.1	9	309	0	581.430	PLN02403	PLN02403	cl31875



注: 红色条带为 PLN02403 superfamily

**Figure 4.** Conservative structural domains of ACO1 protein family in *Brassica napus* L.

**图 4.** 油菜 ACO1 蛋白质家族的保守结构域

### 3.6. 高级结构及结构评估

#### 3.6.1. 油菜 ACO1 蛋白二级结构

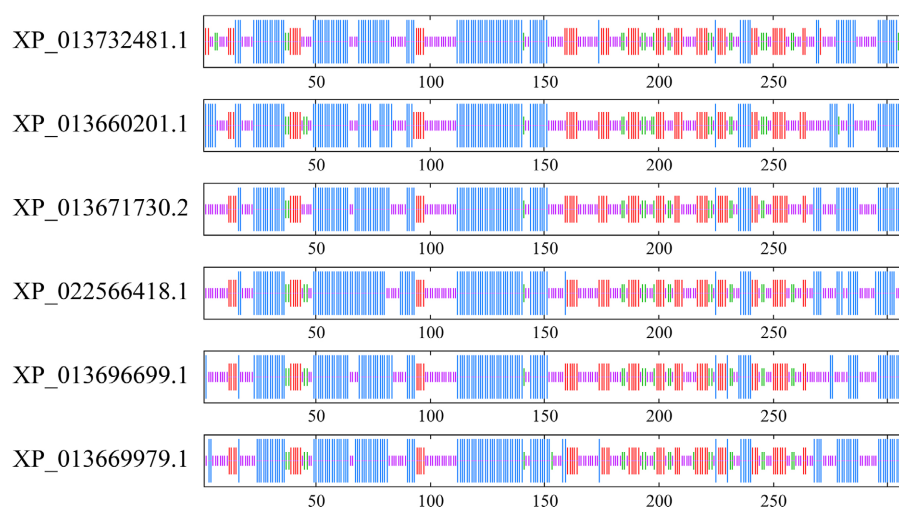
**Table 4.** Secondary structure prediction of the ACO1 protein family in *Brassica napus* L.

**表 4.** 油菜 ACO1 蛋白质家族的二级结构预测

Protein sequence 蛋白序列	Alpha helix $\alpha$ 螺旋	Extended strand 延伸链	Beta turn $\beta$ -转角	Random coil 随机卷曲
XP_013732481.1	115 : 37.10%	60 : 19.35%	23 : 7.42%	112 : 36.13%
XP_013660201.1	114 : 36.77%	61 : 19.68%	19 : 6.13%	116 : 37.42%
XP_013671730.2	120 : 38.71%	57 : 18.39%	17 : 5.48%	116 : 37.42%
XP_022566418.1	120 : 38.71%	58 : 18.71%	20 : 6.45%	112 : 36.13%
XP_013696699.1	115 : 37.10%	58 : 18.71%	20 : 6.45%	117 : 37.74%
XP_013669979.1	124 : 40.00%	55 : 17.74%	25 : 8.06%	106 : 34.19%

注: “:” 前表示氨基酸数, “:” 后表示这些氨基酸占总氨基酸数的百分比。

利用 PRABI 中的 SOPMA 工具对油菜 ACO1 蛋白质家族成员进行二级结构分析, 结果表明(表 4、图 5), ACO1 蛋白质家族的二级结构中  $\alpha$ -螺旋和  $\beta$ -折叠较多, 为  $\alpha + \beta$  蛋白, 各个蛋白质二级结构组成上相似性较高,  $\alpha$ -螺旋的个数在 11~13 个之间, 其中 XP\_013732481.1、XP\_013696699.1、XP\_013671730.2 和 XP\_022566418.1 这 4 个蛋白质含 11 个, XP\_013669979.1 含 12 个, XP\_013660201.1 含 13 个。 $\beta$ -折叠的个数在 13~14 个之间, 其中 XP\_013732481.1、XP\_013660201.1 和 XP\_022566418.1 含 14 个, 其余的都含有 13 个。每个  $\beta$ -转角的氨基酸数都不超过 4 个, 因此都不会形成环(Loop)结构。对比各蛋白质的二级结构预测图可以发现蛋白质序列中间段的二级结构差异极其微小, 保守性高, 为保守区, 而 N 端和 C 端的二级结构差异较中间段的大, 或许功能上有一定的差异。



注: 蓝色:  $\alpha$ -螺旋; 红色:  $\beta$ -折叠; 绿色:  $\beta$ -转角; 紫色: 随机卷曲。

Figure 5. Secondary structure prediction of the ACO1 protein family in *Brassica napus* L.

图 5. 油菜 ACO1 蛋白质家族的二级结构预测图

### 3.6.2. 油菜 ACO1 蛋白质家族的三级结构预测及建模结构的评估

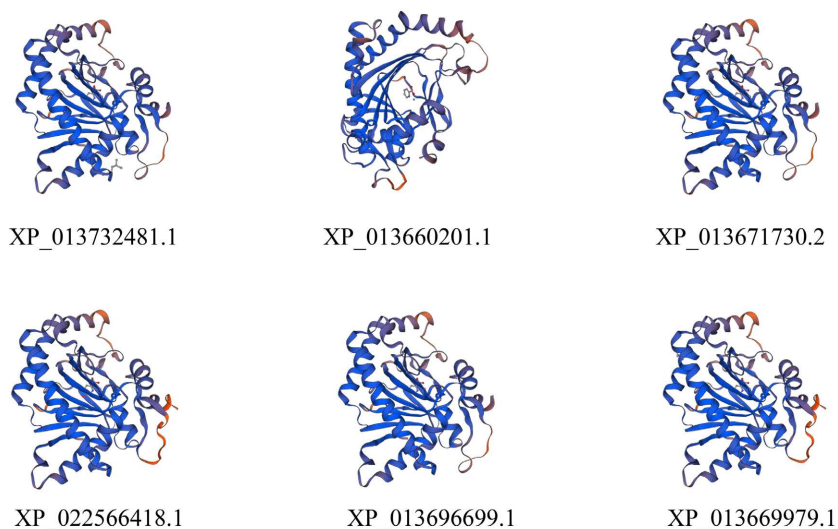


Figure 6. Tertiary structure of ACO1 protein family in *Brassica napus* L.

图 6. 油菜 ACO1 蛋白质家族的三级结构



利用 SWISS-MODEL 软件对 6 条编码蛋白质进行三级结构建模,本次建模所选的模板序列为 5gja.1.A, 是拟南芥的一条 ACO2 蛋白质序列,与每条蛋白质序列的相似性在 47%~51%之间,具有可靠的同源性关系,以此为参考模板建模获得各个蛋白的三级结构(图 6)并下载为 PDB 格式,用视图软件 RasMol 打开,通过观察比对发现各个蛋白的三级结构的 N 端和中间部分的空间结构均非常相似,C 末端部分(275A 之后)的空间结构有所不同,XP\_013732481.1、XP\_013671730.2 和 XP\_013696699.1 的三级结构的重叠性极高,非常相似,XP\_022566418.1 和 XP\_013669979.1 的空间结构也极其相似,XP\_013660201.1 的三级结构与其他蛋白的都略有不同,因此,ACO1 的 C 端部分为可变区,或许指导各蛋白质行使不同的功能。

利用 VERIFY3D 和 Procheck 两个在线分析软件对建模的结果进行质量评估,根据 VERIFY3D 评价所得的结果(表 5)表明,每个蛋白质中平均 3D-1D 得分  $\geq 0.2$  的氨基酸残基占建模氨基酸总数的百分比都大于 80%,多数高达 90%以上,说明此次建模所得的空间结构较为稳定,可靠性高。根据 Procheck 程序对建模结果的拉氏散点图检测结果(表 6)可知,每个蛋白质中位于最支持区域的氨基酸都占总氨基酸数的 92.5%以上,没有氨基酸位于不允许区,表明此模型结构符合立体化学规则,建模结果较理想。

**Table 5.** Modeling quality evaluation results of the program VERIFY3D

**表 5.** VERIFY3D 程序的建模质量评估结果

蛋白质序列	VERIFY3D
XP_013732481.1	93.52%
XP_013660201.1	95.22%
XP_013696699.1	89.38%
XP_013671730.2	91.10%
XP_013669979.1	91.50%
XP_022566418.1	92.52%

注:百分比数代表平均 3D-1D 得分  $\geq 0.2$  的氨基酸残基占氨基酸总数的百分比。

**Table 6.** Modeling quality evaluation results of the program Procheck

**表 6.** Procheck 程序的建模质量评估结果

残基分布区	XP_013732481.1	XP_013660201.1	XP_013696699.1	XP_013671730.2	XP_013669979.1	XP_022566418.1
最支持区域 (A, B, L)	92.6%	92.5%	92.6%	92.5%	94.2%	94.2%
额外允许区 (a, b, l, p)	7.4%	7.5%	7.0%	7.1%	5.0%	5.1%
勉强允许区 (-a, -b, -l, -p)	0.0%	0.0%	0.4%	0.4%	0.8%	0.8%

注:该表中的各个区域指建模评估中拉氏散点图上的不同区域,百分比数指每个区域的氨基酸数占全部氨基酸的百分比。

## 4. 讨论

本研究用生物信息学的方法对甘蓝型油菜 ACO1 基因家族进行了挖掘并对蛋白质高级结构、保守结构域、亚细胞定位、进化关系等方面进行了对比分析,结果发现,油菜 ACO1 基因家族成员存在于多条染色体上,在 A 基因组和 C 基因组中都有,共挖掘出 7 条基因,其中有 1 条为假基因,另外 6 条分别编码 6 个蛋白质,氨基酸序列长度均为 310AA。ACO1 的亚细胞定位一直存在争议[16],用五个不同的软件对这些 ACO1 进行亚细胞定位预测,发现均定位于细胞质中,由此推出 ACO1 在细胞质中将 ACC 氧



化形成乙烯。在进化关系上,甘蓝型油菜与同为十字花科的甘蓝、白菜和萝卜的距离最近,与拟南芥的距离相对较近,而与十字花科的芥菜和花菜、蔷薇科的苹果、茄科的烟草和番茄距离较远。对蛋白质的保守结构域在氨基酸序列上的位置都为9~309A,都属于PLN02403超家族,为氨基环丙烷羧酸氧化酶超家族,行使相似的功能。该结构域中含2OG-Fe(II)加氧酶的结构域,均定位于氨基酸序列的167~259A上,比较各蛋白质的二、三级结构预测图可知该结构域极其保守,由1个 $\alpha$ -螺旋和9个 $\beta$ -折叠组成,各 $\beta$ -折叠条带反向平行排列于蛋白质三级结构的中间位置。有实验表明苹果ACO1的催化活性位点位于蛋白质C末端[17],而油菜ACO1蛋白质家族成员的C端约50个氨基酸的空间结构差异也较大,为可变区,由此推测该区域可能也是催化活性位点,接收不同的信号而使蛋白质在表达上有所差异。有研究表明,在红花中,过表达ACO1可以刺激类黄酮生物合成途径[18],类黄酮可以作为抗氧化剂帮助身体抵消和稳定自由基,抑制其对健康细胞和组织的损伤,这或许在提高油菜抗逆性中有重要的指导作用。在杨树中,ACO1的过表达刺激形成层细胞分裂,进而导致木质部发育的增加和伸长生长的抑制,这是木材工业的理想性状[19]。并且,对于乙烯相关信号转导途径对水稻的抗倒伏作用机理已得到了初步揭示[20],因此将这些运用到油菜的育种当中去或许可以提高油菜的抗倒伏能力。进一步研究ACO1的催化活性位点,弄清其与蛋白质功能表达之间的关系,将其运用到油菜育种中去,可以为提高菜籽的产量和油菜抗逆性提供参考。

## 参考文献

- [1] Yang, S.F. and Hoffman, N.E. (1984) Ethylene Biosynthesis and Its Regulation in Higher Plants. *Annual Review of Plant Physiology*, **35**, 155-189. <https://doi.org/10.1146/annurev.pp.35.060184.001103>
- [2] Lycett, G.W., Roberts, J.A. and Jackson, M.B. (1996) Increased 1-Aminocyclopropane-1-Carboxylic Acid Oxidase Activity in Shoots of Flooded Tomato Plants Raises Ethylene Production to Physiologically Active Levels. *Plant Physiology*, **109**, 1435-1440. <https://doi.org/10.1104/pp.109.4.1435>
- [3] Binnie, J.E. and Mcmanus, M.T. (2009) Characterization of the 1-Aminocyclopropane-1-Carboxylic Acid (ACC) Oxidase Multigene Family of *Malus domestica* Borkh. *Phytochemistry*, **70**, 348-360. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2009.01.002>
- [4] Shi, Y.H., Zhu, S.W., Mao, X.Z., et al. (2006) Transcriptome Profiling, Molecular Biological, and Physiological Studies Reveal a Major Role for Ethylene in Cotton Fiber Cell Elongation. *The Plant Cell*, **18**, 651-664. <https://doi.org/10.1105/tpc.105.040303>
- [5] Li, Y., He, H., Hou, Y., et al. (2022) Salicylic Acid Treatment Delays Apricot (*Prunus armeniaca* L.) Fruit Softening by Inhibiting Ethylene Biosynthesis and Cell Wall Degradation. *Scientia Horticulturae*, **300**, Article 111061. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2022.111061>
- [6] Fan, X.T., Mattheis, J.P. and Fellman, J.K. (1996) Inhibition of Apple Fruit 1-Aminocyclopropane-1-Carboxylic Acid Oxidase Activity and Respiration by Acetylsalicylic Acid. *Plant Physiology*, **149**, 469-471. [https://doi.org/10.1016/S0176-1617\(96\)80151-9](https://doi.org/10.1016/S0176-1617(96)80151-9)
- [7] Sekeli, R., Abdullah, J., Namasivayam, P., et al. (2014) RNA Interference of 1-Aminocyclopropane-1-Carboxylic Acid Oxidase (ACO1 and ACO2) Genes Expression Prolongs the Shelf Life of Eksotika (*Carica papaya* L.) Papaya Fruit. *Molecules*, **19**, 8350-8362. <https://doi.org/10.3390/molecules19068350>
- [8] Ramadoss, N., Gupta, D., Brajesh, N., et al. (2018) Functional Characterization of 1-Aminocyclopropane-1-Carboxylic Acid Oxidase Gene in *Arabidopsis thaliana* and Its Potential in Providing Flood Tolerance. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **503**, 365-370. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.06.036>
- [9] 刘畅宇, 陈勋, 龙雨青, 等. 乙烯生物合成及信号转导途径中介导花衰老相关基因的研究进展[J]. *生物技术通报*, 2019, 35(3): 171-182.
- [10] Chen, H., Sun, J., Li, S., et al. (2016) An ACC Oxidase Gene Essential Forcucumber Carpel Development. *Molecular Plant*, **9**, 1315-1327. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2016.06.018>
- [11] Houben, M. and Poel, B. (2019) 1-Aminocyclopropane-1-Carboxylic Acid Oxidase (ACO): The Enzyme That Makes the Plant Hormone Ethylene. *Frontiers in Plant Science*, **10**, Article 695. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00695>
- [12] Sornchai, P., Van Doorn, W.G., Imsabai, W., et al. (2020) *Dendrobium* Orchids Carrying Antisense ACC Oxidase: Small Changes in Flower Morphology and a Delay of Bud Abortion, Flower Senescence, and Abscission of Flowers.

- 
- Transgenic Research, **29**, 429-442. <https://doi.org/10.1007/s11248-020-00209-8>
- [13] 阮先乐, 王俊生, 刘红占, 等. 油菜 GRF 基因家族的鉴定和基本特征分析[J]. 分子植物育种, 2018, 16(8): 2420-2428.
- [14] 陈银华, 黄伟, 王海. ACC 氧化酶基因研究进展[J]. 海南大学学报(自然科学版), 2006, 24(2): 194-200.
- [15] 黄旭, 田苗苗, 肖妃垚, 等. 柑橘香橙素生成途径关键酶黄烷酮-3-羟化酶特性分析及原核表达[J]. 食品科学技术学报, 2021, 39(2): 65-72.
- [16] 姚雪, 侯和胜. 高等植物 ACO 基因研究进展[J]. 安徽农学通报, 2013(1): 16-17.
- [17] Seo, Y.S., Yoo, A., Jung, J., *et al.* (2004) The Active Site and Substrate-Binding Mode of 1-Aminocyclopropane-1-Carboxylate Oxidase Determined by Site-Directed Mutagenesis and Comparative Modelling Studies. *Biochemical Journal*, **380**, 339-346. <https://doi.org/10.1042/bj20031762>
- [18] Tu, Y., He, B., Gao, S., *et al.* (2019) CtACO1 Overexpression Resulted in the Alteration of the Flavonoids Profile of Safflower. *Molecules*, **24**, Article 1128. <https://doi.org/10.3390/molecules24061128>
- [19] Love, J., Bioerklund, S., Vahala, J., *et al.* (2009) Ethylene Is an Endogenous Stimulator of Cell Division in the Cambial Meristem of Populus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **106**, 5984-5989. <https://doi.org/10.1073/pnas.0811660106>
- [20] 白羿雄, 赵小红, 姚晓华, 等. 作物抗倒伏相关性状及其信号转导调控机理的研究进展[J]. 植物科学学报, 2021, 39(1): 102-109.