

十字花科植物 *FAEI* 基因的克隆与功能验证

庞慧, 李莹, 李密密, 严琴琴, 杭悦宇^①, 孙小芹^①

[江苏省·中国科学院植物研究所(南京中山植物园)江苏省植物迁地保护重点实验室, 江苏 南京 210014]

摘要: 对十字花科(Brassicaceae)植物非洲芥菜(*Brassica tournefortii* Gouan)、埃塞俄比亚芥(*B. carinata* A. Braun)、短喙芥(*B. elongata* Ehrhart)、芝麻菜[*Eruca vesicaria* subsp. *sativa* (Miller) Thellung]、野萝卜(*Raphanus raphanistrum* Linn.)、*Crambe filiformis* Jacq.、苜蓿(*Thlaspi arvense* Linn.)、臭芥[*Coronopus didymus* (Linn.) Smith]、芥[*Capsella bursa-pastoris* (Linn.) Medikus]和小花碎米芥(*Cardamine parviflora* Linn.)的 *FAEI* 基因进行了克隆、序列比对及功能验证。结果显示:上述前6种1亚种的 *FAEI* 基因长度均为1 521 bp,臭芥的 *FAEI* 基因长度为1 517 bp,芥和小花碎米芥的 *FAEI* 基因长度为1 518 bp,GenBank 登录号为JX898749—JX898758;它们的序列相似性较高,相似度达89%;对位排列矩阵长度1 521 bp,其中包含保守位点1 051个(69.1%)、变异位点470个(30.9%)和简约信息位点232个(15.3%);臭芥、芥和小花碎米芥的 *FAEI* 序列在第132位分别缺失3个碱基,臭芥的 *FAEI* 基因在第515位缺失1个碱基。虽然芥和小花碎米芥的 *FAEI* 基因编码505个氨基酸、臭芥的 *FAEI* 基因仅编码186个氨基酸、其他种类的 *FAEI* 基因均编码506个氨基酸,但它们的氨基酸序列相似度高达88.9%;各种类的氨基酸序列存在151个变异位点,其中有6个变异位点与种子芥酸含量相关。Western blot 及气相色谱分析结果表明:各种类的 *FAEI* 基因在酵母中均能表达出预期的蛋白产物;在臭芥和小花碎米芥 *FAEI* 基因的转化酵母细胞中无芥酸积累,而在其他种类 *FAEI* 基因的转化酵母细胞中均有芥酸积累;此外,除芥外的其他8种1亚种植物的种子芥酸含量与转化酵母细胞中的芥酸含量正相关。

关键词: 十字花科; *FAEI* 基因; 克隆; 功能验证; 芥酸含量

中图分类号: Q785; Q943.2 文献标志码: A 文章编号: 1674-7895(2013)01-0008-06

DOI: 10.3969/j.issn.1674-7895.2013.01.02

Cloning and function verification of *FAEI* gene in some species of Brassicaceae PANG Hui, LI Ying, LI Mimi, YAN Qinqin, HANG Yueyu^①, SUN Xiaoqin^① (Jiangsu Province Key Laboratory for Plant *Ex-situ* Conservation, Institute of Botany, Jiangsu Province and the Chinese Academy of Sciences, Nanjing 210014, China), *J. Plant Resour. & Environ.* 2013, 22(1): 8-13

Abstract: Cloning, sequence alignment and function verification of *FAEI* gene from Brassicaceae species including *Brassica tournefortii* Gouan, *B. carinata* A. Braun, *B. elongata* Ehrhart, *Eruca vesicaria* subsp. *sativa* (Miller) Thellung, *Raphanus raphanistrum* Linn., *Crambe filiformis* Jacq., *Thlaspi arvense* Linn., *Coronopus didymus* (Linn.) Smith, *Capsella bursa-pastoris* (Linn.) Medikus and *Cardamine parviflora* Linn. were carried out. The results show that the length of *FAEI* gene from the front six species and one subspecies about mentioned all is 1 521 bp, that from *Coronopus didymus* is 1 517 bp, and that from *Capsella bursa-pastoris* and *Cardamine parviflora* is 1 518 bp, their GenBank accession number is from JX898749 to JX898758. Their sequences have higher similarity with a degree of 89% similarity. In the 1 521 bp alignment matrix, there are 1 051 conserved sites (69.1%), 470 variable sites (30.9%) and 232 parsimony informative sites (15.3%). Sequence of *FAEI* gene from *Coronopus didymus*, *Capsella bursa-pastoris* and *Cardamine parviflora* deletes three bases in the 132nd position, respectively and that from *Coronopus didymus* also deletes one base in the 515th position. Although, *FAEI* gene from *Capsella bursa-pastoris* and *Cardamine parviflora* encodes 505 amino acids, that from *Coronopus didymus*

收稿日期: 2012-10-18

基金项目: 江苏省自然科学基金资助项目(BK2010476); 江苏省植物迁地保护重点实验室开放基金项目(迁201202)

作者简介: 庞慧(1987—),女,吉林吉林人,硕士研究生,主要从事植物功能基因克隆与进化研究。

^①通信作者 E-mail: hangyueyu@yahoo.com.cn; sunxiaoqin.njbio@gmail.com

encodes only 186 amino acids, and that from other species all encodes 506 amino acids, but the similarity of these amino acid sequences is up to 88.9%. There are 151 variable sites among amino acid sequences, in which, 6 variable sites are related with erucic acid content in seed. Analysis results of Western blot and gas chromatography show that *FAEI* gene from each species can express the expected protein product in transformed yeast cell. And there is no erucic acid accumulation in transformed yeast cell of *FAEI* gene from *Coronopus didymus* and *Cardamine parviflora*, but there is erucic acid accumulation in all transformed yeast cells of *FAEI* gene from the other species. In addition, except *Capsella bursa-pastoris*, there is a positive correlation in erucic acid content between seed and transformed yeast cell of *FAEI* gene from other eight species and one subspecies.

Key words: Brassicaceae; *FAEI* gene; cloning; function verification; erucic acid content

FAEI 基因是第1个被发现的调控芥酸等超长链脂肪酸合成的关键基因^[1],该基因主要通过编码 β -酮酯酰 CoA 合酶(KCS)控制芥酸合成^[1-2],同时也在蜡质及鞘脂类等超长链脂肪酸的合成中起重要作用^[3]。*FAEI* 基因最初克隆自拟南芥 [*Arabidopsis thaliana* (Linn.) Hey.]^[4],其后主要克隆自十字花科 (Brassicaceae) 植物,如从甘蓝型油菜 (*Brassica napus* Linn.)、白菜型油菜 (*B. campestris* Linn.)、芥菜型油菜 (*B. juncea* Linn.)、黑芥 (*B. nigra* Linn.)、白芥 (*Sinapis alba* Linn.) 和 中欧芥 [*Teesdalia nudicaulis* (Linn.) R. Br.] 等种类中均获得 *FAEI* 基因^[5-10]。虽然不同种类的 *FAEI* 基因在长度与序列上存在差异,但均无内含子。目前,*FAEI* 基因的克隆方法主要有转座子标签法、探针法及 EcoTILLING 法 (ecotype targeting induced local lesions in genomes) 等^[4,7,11],其中最常见的方法为同源序列扩增法^[8,10]。

FAEI 基因的功能验证主要包括酵母与植物转基因验证,这些研究大多也在十字花科植物中进行。酵母中脂肪酸延长酶活性很低,只能合成微量的超长链脂肪酸,是研究 *FAEI* 编码蛋白活性的常用体系^[12-13]。Millar 等^[14]将拟南芥的 *FAEI* 基因转化到酵母中,发现随着 *FAEI* 基因的表达长链脂肪酸在酵母中累积;而将诸葛菜 [*Orychophragmus violaceus* (Linn.) O. E. Schulz] 和芥 [*Capsella bursa-pastoris* (Linn.) Medikus] 2 种零芥酸种类的 *FAEI* 基因转化到酵母中,虽然都能表达出预期的蛋白产物,但却无长链脂肪酸的累积^[9,15];中欧芥及海甘蓝 (*Crambe abyssinica* Hochst. ex R. E. Fr.) 的栽培品种 ‘Prophet’ 的 *FAEI* 基因功能除了在酵母中得到验证,还被转化至拟南芥中,同样发现该基因能显著促进长链脂肪酸的累积^[16-17]。此外,将拟南芥的 *FAEI* 基因转化到烟草 (*Nicotiana tabacum* Linn.) 中,随 *FAEI* 基因的表达

长链脂肪酸在烟草中累积;在拟南芥中过量表达 *FAEI* 基因,其长链脂肪酸含量也明显提高^[14]。由此可见,虽然十字花科种类很多,但 *FAEI* 基因的克隆与功能验证研究主要集中于芸薹属 (*Brassica* Linn.) 植物及拟南芥,而在其他十字花科植物中 *FAEI* 基因的特性尚未见研究报道。

鉴于此,作者对十字花科 8 属 9 种 1 亚种的 *FAEI* 基因进行了克隆、比对及功能验证,以期对十字花科植物中 *FAEI* 基因存在的普遍性及功能的相似性进行探讨。

1 材料和方法

1.1 材料

供试的十字花科 8 属 9 种 1 亚种包括芸薹属的非洲芥菜 (*B. tournefortii* Gouan, 原产地印度)、埃塞俄比亚芥 (*B. carinata* A. Braun, 原产地加拿大) 和短喙芥 (*B. elongata* Ehrhart, 原产地伊朗); 芝麻菜属 (*Eruca* Miller) 的芝麻菜 [*E. vesicaria* subsp. *sativa* (Miller) Thellung, 原产地波兰]; 萝卜属 (*Raphanus* Linn.) 的野萝卜 (*R. raphanistrum* Linn., 原产地印度); 两节芥属 (*Crambe* Linn.) 的 *C. filiformis* Jacq. (原产地加拿大); 菥蓂属 (*Thlaspi* Linn.) 的菥蓂 (*T. arvense* Linn. 原产地波兰); 臭芥属 (*Coronopus* Zinn) 的臭芥 [*C. didymus* (Linn.) Smith, 原产地中国江苏]; 芥属 (*Capsella* Medikus) 的芥 [*C. bursa-pastoris* (Linn.) Medikus, 原产地中国江苏]; 碎米芥属 (*Cardamine* Linn.) 的小花碎米芥 (*C. parviflora* Linn., 原产地中国江苏)。其中,非洲芥菜、埃塞俄比亚芥和 *C. filiformis* 种子由加拿大植物种质资源库 (Plant Gene Resources of Canada, PGRC) 提供,短喙芥、芝麻菜、野萝卜和菥蓂种子由美国种质资源库 (Germplasm Resources

Information Network, GRIN) 提供;臭芥、芥和小花碎米芥种子均采自南京中山植物园。种子萌发后栽培于本所种质圃,幼苗长出后采集新鲜幼嫩叶片备用。

1.2 方法

1.2.1 *FAEI* 基因的克隆与序列分析

按改良的 CTAB 法^[18]从叶片中提取基因组 DNA。在引物 TF/TR^[16]两侧分别加上 *Kpn*I 与 *Bam*HI 酶切位点,合成 TFK 引物(序列为 5'-CGGGGTACCGCAATGACGTCCGTTAAC-3')和 TRB 引物(序列为 5'-CGCGGATCCGGACCGACCGTTTTGGAC-3')。使用 TFK 和 TRB 引物对各种类的 *FAEI* 基因进行扩增。

用 PE-9700 型 PCR 仪(Perkin Elmer 公司生产)进行 PCR 反应。扩增体系总体积 20 μ L,包含 2.0 μ L 10 \times PCR buffer、0.2 mmol \cdot L⁻¹ dNTPs、2.0 mmol \cdot L⁻¹ Mg²⁺、0.2 μ mol \cdot L⁻¹ 引物、0.4 U *Taq* DNA 聚合酶和 20 ng 模板 DNA,以灭菌双蒸水补足至 20 μ L。PCR 反应程序为:95 $^{\circ}$ C 预变性 3 min;95 $^{\circ}$ C 变性 30 s,53 $^{\circ}$ C 退火 40 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min,共 35 个循环;最后于 72 $^{\circ}$ C 保温 7 min,4 $^{\circ}$ C 保存。PCR 产物用质量体积分数 0.8% 的琼脂糖凝胶(含 0.5 μ g \cdot mL⁻¹ 1 \times EB)电泳约 1 h,用 WV-BP330 凝胶扫描分析系统(江苏捷达科技发展有限公司生产)进行观察和拍照。按 AxyPrep DNA 凝胶回收试剂盒方法将扩增产物进行割胶纯化,按 pMD19-T 载体试剂盒方法将纯化产物连接到 pMD19-T 载体[购自宝生物工程(大连)有限公司]上,通过 PCR 筛选的阳性克隆交上海华大基因有限公司进行测序。

用 Sequencher 软件对测序峰图进行编辑和拼接,采用 Clustal W 软件进行序列比对分析,用 MEGA5.1 软件对 DNA 和蛋白质序列的同源性进行比较。

1.2.2 *FAEI* 基因的酵母转化和表达分析

酵母转化及培养参照文献[12]进行。用 *Bam*HI/*Kpn*I 双酶切 pMD19-T 重组载体,将目的片段连接到酵母表达载体 pYES2/NT C(Invitrogen 出品)上,位于载体半乳糖诱导表达启动子的下游,通过表达产生 N 末端融合了(His)6Gly 标签的融合蛋白;以空载体 pYES2/NT C 作为阴性对照,转化到酵母菌株 InvSc1 中,并在含质量体积分数 2% 葡萄糖但不含尿嘧啶的培养基上(SC-ura)进行暗培养并筛选。转化的酵母细胞接种到含质量体积分数 2% 葡萄糖的 SC-ura 液体培养基中,于 28 $^{\circ}$ C 条件下振荡暗培养过夜;用含质量体积分数 2% 半乳糖的 SC-ura 液体培养基将其稀释到

$OD_{600}=0.02$,并继续振荡暗培养至 $OD_{600}=1.4$;将酵母培养物分为等量的 2 份,分别用于 Western blot 分析及气相色谱分析。

1.2.3 Western blot 分析

用酵母蛋白提取试剂盒(南京凯基公司,Cat No. KGP650)提取酵母细胞总蛋白,然后用 HisBind resin 纯化蛋白。参照文献[12]进行 Western blot 分析,采用 10% SDS-PAGE 凝胶电泳,蛋白质分子量标准为 PageRuler Prestained Protein Ladder (Fermentas 公司出品)。将分离的蛋白转移到硝酸纤维素膜上进行 Western blot 分析,然后用一抗 HisG 抗体和碱性磷酸酶标记的二抗羊抗兔 IgG 检测,最后显色。

1.2.4 气相色谱分析

酵母细胞的脂肪酸分析参照文献[12]进行。酵母细胞用超纯水洗涤 2 次;然后用质量体积分数 10% KOH-体积分数 95% 甲醇的混合溶液于 80 $^{\circ}$ C 皂化反应 2 h,反应结束后置于冰上冷冻,再用正己烷洗涤以去除未皂化物;剩余水相用 6 mol \cdot L⁻¹ HCl 酸化。用正己烷萃取游离脂肪酸,减压浓缩以去除多余溶剂;游离脂肪酸用含 1% H₂SO₄ 的甲醇溶液 2 mL 于 60 $^{\circ}$ C 条件下甲基化 1 h;然后用正己烷萃取脂肪酸甲酯,减压去除溶剂,剩余物用于气相色谱分析,脂肪酸含量采用峰面积归一法计算。

2 结果和分析

2.1 *FAEI* 基因的克隆和序列分析

用引物 TFK/TRB 对供试的 9 种 1 变种的 *FAEI* 基因进行扩增,均得到 Rf 值相等的单一条带,其中,芝麻菜、*Crambe filiformis*、野萝卜、蒜薹、非洲芥菜、埃塞俄比亚芥和短喙芥的 *FAEI* 序列长度均为 1 521 bp,臭芥的 *FAEI* 序列长度为 1 517 bp,芥和小花碎米芥的 *FAEI* 序列长度为 1 518 bp。所有种类的 *FAEI* 基因序列已在 GenBank 上登录,非洲芥菜、埃塞俄比亚芥、短喙芥、芝麻菜、野萝卜、*Crambe filiformis*、蒜薹、臭芥、芥和小花碎米芥的登录号分别为 JX898749、JX898750、JX898751、JX898752、JX898753、JX898754、JX898755、JX898756、JX898757 和 JX898758。

供试的 9 种 1 亚种的 *FAEI* 序列相似性较高,相似度达 89%。比对分析结果表明:对位排列矩阵长度为 1 521 bp,其中,保守位点 1 051 个,占序列总长度的 69.1%;变异位点 470 个,占总长度的 30.9%;简约信息位点 232 个,占总长度的 15.3%。臭芥、芥和

小花碎米荠的 *FAEI* 序列在第 132 位均缺失 3 个碱基, 臭芥的 *FAEI* 序列在第 515 位缺失 1 个碱基。

基于拟南芥的 *FAEI* 序列 (GenBank 登录号 NM_119617.2), 将供试种类的 *FAEI* 基因序列翻译成氨基酸序列, 获得的氨基酸序列长度存在差异, 但绝大部分编码完整。芝麻菜、*Crambe filiformis*、野萝卜、菥蓂、非洲芥菜、埃塞俄比亚芥和短喙芥的 *FAEI* 基因编码 506 个氨基酸, 芥与小花碎米荠的编码 505 个氨基酸; 而臭芥由于在 515 bp 处缺失 1 个碱基, 导致其 *FAEI* 基因编码的氨基酸序列提前终止, 仅编码 186 个氨基酸。比对分析结果显示: 供试 9 种 1 亚种的 *FAEI* 基因编码的氨基酸序列也高度相似, 相似度达 88.9% ;

各种类的氨基酸序列间存在 151 个变异位点, 其中有 6 个位点与种子芥酸相对含量有关 (表 1)。

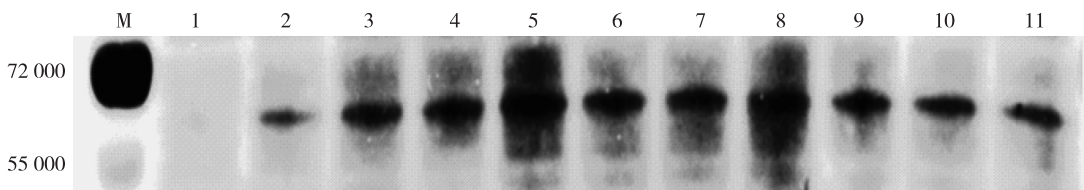
2.2 *FAEI* 基因功能的验证

2.2.1 Western blot 分析结果 将供试 9 种 1 亚种的 *FAEI* 基因所构建的表达载体转化至酵母中, 经 Western blot 分析, 发现它们的 *FAEI* 基因在酵母中均表达出预期的蛋白产物, 且编码蛋白的分子量相似, 相对分子质量均为 60 000 左右。其中臭芥的 *FAEI* 基因由于移码突变只编码包含 186 个氨基酸的蛋白质, 但实际上转化至酵母中仍可表达出分子量正常的蛋白产物; 而从含有 pYES2/NT C 空载体的酵母菌株 (对照) 中则未检测出目标蛋白 (图 1)。

表 1 十字花科植物 *FAEI* 基因编码的氨基酸序列变异位点与其种子芥酸相对含量的对应分析
Table 1 Corresponding analysis of variable site of amino acid sequence encoded by *FAEI* gene from Brassicaceae species to relative content of erucic acid in seed

种类 Species	种子芥酸相对含量/% ¹⁾ Relative content of erucic acid in seed ¹⁾	氨基酸序列变异位点 ²⁾ Variable site of amino acid sequence ²⁾							
		14	22	45	56	106	122	188	286
非洲芥菜 <i>Brassica tournefortii</i>	48.08	I	F	Y	I	V	W	V	R
埃塞俄比亚芥 <i>Brassica carinata</i>	42.53	I	F	Y	I	V	W	V	R
短喙芥 <i>Brassica elongata</i>	46.41	I	F	Y	I	V	W	V	R
芝麻菜 <i>Eruca vesicaria</i> subsp. <i>sativa</i>	37.79	I	F	Y	I	V	W	V	R
野萝卜 <i>Raphanus raphanistrum</i>	32.75	I	F	H	I	V	W	V	R
<i>Crambe filiformis</i>	32.75	I	F	Y	I	V	W	V	R
菥蓂 <i>Thlaspi arvense</i>	55.82	I	F	Y	I	V	W	V	R
臭芥 <i>Coronopus didymus</i>	1.30	L	L	-	V	I	S	*	
芥 <i>Capsella bursa-pastoris</i>	0.61	L	L	-	V	I	S	V	G
小花碎米荠 <i>Cardamine parviflora</i>	0.00	L	L	-	V	I	S	V	G

¹⁾ 种子芥酸相对含量数据来源于文献 [15] Data of relative content of erucic acid in seed is from Reference [15].
²⁾ -: 表示氨基酸缺失 Representing deletion of amino acids; *: 显示编码区提前终止 Representing the pre-stop codon in coding region; I: 异亮氨酸 Isoleucine; L: 亮氨酸 Leucine; F: 苯丙氨酸 Phenylalanine; Y: 酪氨酸 Tyrosine; H: 组氨酸 Histidine; V: 缬氨酸 Valine; W: 色氨酸 Tryptophan; S: 丝氨酸 Serine; R: 精氨酸 Arginine; G: 甘氨酸 Glycine.



M: Marker; 1: pYES2/NT C (CK); 2: 小花碎米荠 *Cardamine parviflora* Linn.; 3: 芥 *Capsella bursa-pastoris* (Linn.) Medikus; 4: 臭芥 *Coronopus didymus* (Linn.) Smith; 5: 短喙芥 *Brassica elongata* Ehrhart; 6: 埃塞俄比亚芥 *B. carinata* A. Braun; 7: 非洲芥菜 *B. tournefortii* Gouan; 8: 菥蓂 *Thlaspi arvense* Linn.; 9: 野萝卜 *Raphanus raphanistrum* Linn.; 10: *Crambe filiformis* Jacq.; 11: 芝麻菜 *Eruca vesicaria* subsp. *sativa* (Miller) Thellung.

图 1 十字花科植物 *FAEI* 基因的转化酵母细胞中表达产物的 Western blot 分析结果
Fig. 1 Analysis result of Western blot of expression product in transformed yeast cell of *FAEI* gene from Brassicaceae species

2.2.2 气相色谱分析结果 用气相色谱法分析各种类 *FAEI* 基因转化酵母中的芥酸含量, 结果见表 2。由表 2 可见: 在作为对照的含 pYES2/NT C 空载体的

酵母细胞中没有检测出芥酸, 而在非洲芥菜、埃塞俄比亚芥、短喙芥、菥蓂、芝麻菜、野萝卜、*C. filiformis* 和芥 *FAEI* 基因的转化酵母细胞中均有芥酸积累, 其中

在芥 *FAEI* 基因的转化酵母细胞中芥酸相对含量最高,达 4.63%;而在臭芥和小花碎米芥 *FAEI* 基因的转化酵母细胞中芥酸相对含量均为 0.00%。

表2 十字花科植物 *FAEI* 基因转化酵母细胞中芥酸相对含量的比较
Table 2 Comparison of relative content of erucic acid in transformed yeast cell of *FAEI* gene from Brassicaceae species

<i>FAEI</i> 基因来源种类 Source species of <i>FAEI</i> gene	芥酸相对含量/% Relative content of erucic acid
非洲芥菜 <i>Brassica tournefortii</i>	2.33±0.38
埃塞俄比亚芥 <i>Brassica carinata</i>	0.27±0.24
短喙芥 <i>Brassica elongata</i>	1.52±0.13
芝麻菜 <i>Eruca vesicaria</i> subsp. <i>sativa</i>	0.43±0.15
野萝卜 <i>Raphanus raphanistrum</i>	2.50±0.06
<i>Crambe filiformis</i>	0.75±0.17
菥蓂 <i>Thlaspi arvense</i>	0.76±0.14
臭芥 <i>Coronopus didymus</i>	0.00±0.00
芥 <i>Capsella bursa-pastoris</i>	4.63±0.49
小花碎米芥 <i>Cardamine parviflora</i>	0.00±0.00
pYES2/NT C(CK)	0.00±0.00

3 讨论和结论

3.1 *FAEI* 基因编码的氨基酸序列与转化酵母细胞中芥酸含量的关系

前人对拟南芥及油菜突变体的研究结果^[19]显示:在 *FAEI* 基因编码的氨基酸序列中有 11 个位点的任何一个发生突变,会导致高芥酸种类(通常种子中芥酸含量大于 30% 的为高芥酸种类,芥酸含量小于 10% 的为低芥酸种类^[12])的 *FAEI* 基因转化酵母细胞中芥酸含量为 0,这 11 个位点是 6 个半胱氨酸位点(Cys84、Cys223、Cys270、Cys312、Cys389 和 Cys460)、4 个组氨酸位点(His302、His387、His391 和 His420)及丝氨酸/苯丙氨酸位点(Ser/Phe282)。但武玉花等^[9]的研究结果显示:这 11 个位点未发生任何变异,推测其他氨基酸位点的变异也与 *FAEI* 基因转化酵母的芥酸含量相关。本研究结果与武玉花等的结果基本一致,在本研究涉及的高、低芥酸种类中这 11 个位点也并未有任何变异,说明这 11 个位点的进化十分保守。而前人有关脂肪酸延长酶活性位点的研究是在遗传背景一致的材料间(如同种的不同品种间)进行的,因而在不同的物种间这些变异并不稳定。在本研究中,由 *FAEI* 编码的氨基酸序列的 151 个变异位点中有 6 个氨基酸变异位点与转化酵母的芥酸含量相关,如第 14 位氨基酸残基在转化酵母有芥酸积累的埃塞俄比

亚芥等 7 种植物中为异亮氨酸,而在转化酵母无芥酸积累的臭芥和小花碎米芥中为亮氨酸,同样的情形还可见于第 22 位的苯丙氨酸/亮氨酸、第 56 位的异亮氨酸/缬氨酸、第 106 位的缬氨酸/异亮氨酸、第 122 位的色氨酸/丝氨酸、第 286 位的精氨酸/甘氨酸,因此,这 6 个氨基酸位点的变异可能是导致转化酵母无芥酸积累的原因之一,当然,这一结论还有待于采用定点突变实验加以验证。

从序列上看,由于移码突变,臭芥的 *FAEI* 基因只编码 186 个氨基酸,但在转化酵母中仍可表达出分子量正常的蛋白产物,这也许是由于基因本身的终止密码子比突变出现的终止密码子更有竞争优势,因而使基因仍可通读;但其转化酵母中的芥酸相对含量为 0.00%,表明该编码蛋白并无酶活性,在酵母细胞中不能催化长链脂肪酸的合成。

3.2 *FAEI* 基因转化酵母的芥酸含量与其种子芥酸含量的关系

前人的研究结果表明:十字花科植物的种子芥酸含量高,其 *FAEI* 基因转化至酵母中也使酵母细胞中的芥酸含量相应提高,反之亦然;如高芥酸植物油菜(*Brassica napus* Linn.)、甘蓝(*B. oleracea* Linn.)和芜菁(*B. rapa* Linn.)的一些栽培品种,其 *FAEI* 基因转化酵母中芥酸含量可达 1.94%~2.19%;而低芥酸栽培植物 *B. napus* ‘Westar’ 的 *FAEI* 基因转化酵母中芥酸含量为 0%^[12-13];同样的情形也存在于高芥酸甘蓝型油菜‘中油 821’、新疆白芥、新疆野芥(*Sinapis arvensis* Linn.)、菘蓝(*Isatis indigotica* Fort.)及低芥酸植物诸葛菜和芥中^[9]。

本课题组前期对十字花科 94 种野生植物种子芥酸含量的分析结果表明^[15]:非洲芥菜等 6 种 1 亚种的种子芥酸含量均高于 30%,为高芥酸种类;臭芥与小花碎米芥种子芥酸含量为 0.00%~1.30%,为低芥酸种类。本研究结果显示:在非洲芥菜等 6 种 1 亚种 *FAEI* 基因的转化酵母细胞中芥酸相对含量为 0.27%~2.50%,而在臭芥和小花碎米芥 *FAEI* 基因的转化酵母中芥酸相对含量为 0.00%,证实了前期的研究结果;同时,除芥外的 8 种 1 亚种的种子芥酸相对含量与转化酵母细胞中的芥酸含量呈正相关($r=0.493$),更明确了植物种子芥酸含量与该物种 *FAEI* 基因转化酵母细胞中芥酸含量的正相关关系。

3.3 芥的 *FAEI* 基因克隆与功能验证

前期的测定结果显示芥的种子中芥酸相对含量

为0.61%,为低芥酸种类^[15],其 *FAEI* 基因转化酵母细胞中芥酸相对含量却远高于其他高芥酸种类,表明其编码的脂肪酸延长酶具有很高活性,这种特例之前未见报道。推测其原因可能是在芥体内受到各式元件调控而导致 *FAEI* 基因功能不正常,但在酵母表达系统中其基因编码区脱离了各式调控元件的作用,从而恢复正常功能;也可能是由于 *FAEI* 基因在植物体内可能受到包括甲基化在内的基因修饰和调节作用,关闭了该基因的活性,而在酵母中去甲基化后基因又重新活化表达^[20]。在本实验过程中芥的 *FAEI* 基因扩增十分困难^[9],作者也是尝试多次后才获得成功,这一现象也可能是该基因发生甲基化作用的佐证。

致谢: 美国种质资源库与加拿大植物种质资源库馈赠部分种类的种子,中国农业科学院油料作物研究所卢长明研究员与武玉花助理研究员馈赠酵母菌株与质粒,江苏省农业科学院油料作物研究所高建芹副研究员完成脂肪酸的气相色谱分析,在此一并致谢!

参考文献:

- [1] LESSIRE R, COSTAGLIOLI P, GARCIA C, et al. Acyl-CoA elongase: genomic studies[J]. *Plant Molecular Biology*, 2004, 21(2): 237-242.
- [2] KUNST L, TAYLOR D C, UNDERHILL E W. Fatty acid elongation in developing seeds of *Arabidopsis thaliana*[J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 1992, 30: 425-434.
- [3] JEROME J, RAFFAELE S, BOURDENX B, et al. The VLCFA elongase gene family in *Arabidopsis thaliana*: phylogenetic analysis, 3D modelling and expression profiling[J]. *Plant Molecular Biology*, 2008, 67: 547-566.
- [4] JAMES D W Jr, LIM E, KELLER J, et al. Directed tagging of the *Arabidopsis* fatty acid elongation 1 (*FAEI*) gene with the maize transposon activator[J]. *The Plant Cell*, 1995, 7(3): 309-319.
- [5] CLEMENS S, KUNST L. Isolation of a *Brassica napus* cDNA (accession no. AF009563) encoding β -ketoacyl-CoA synthase, a condensing enzyme involved in the biosynthesis of very long chain fatty acids in seeds (PGR97-125)[J]. *Plant Physiology*, 1997, 115: 313-314.
- [6] FOURMANN M, BARRET P, RENARD M, et al. The two genes homologous to *Arabidopsis FAEI* cosegregate with the two loci governing erucic acid content in *Brassica napus*[J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 1998, 96: 852-858.
- [7] BARRET P, DELOURME R, RENARD M, et al. A rapeseed *FAEI* gene is linked to the E1 locus associated with variation in the content of erucic acid[J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 1998, 96: 177-186.
- [8] DAS S, ROSCOE T J, DELSENY M, et al. Cloning and molecular characterization of the fatty acid elongase 1 *FAEI* gene from high and

low erucic acid lines of *Brassica campestris* and *Brassica oleracea*[J]. *Plant Science*, 2002, 162: 245-250.

- [9] 武玉花, 吴刚, 肖玲, 等. 十字花科植物中低芥酸野生种的发掘和 *FAEI* 基因的功能验证[J]. *中国农业科学*, 2009, 42(11): 3819-3827.
- [10] ERIKSSON D, MERKER A. Cloning and functional characterization of genes involved in fatty acid biosynthesis in the novel oilseed crop *Lepidium campestre* L.[J]. *Plant Breeding*, 2011, 130: 407-409.
- [11] WANG N, SHI L, TIAN F, et al. Assessment of *FAEI* polymorphisms in three *Brassica* species using EcoTILLING and their association with differences in seed erucic acid contents[J]. *BMC Plant Biology*, 2010, 10: 137.
- [12] KATAVIC V, MIETKIEWSKA E, BARTON D L, et al. Restoring enzyme activity in nonfunctional low erucic acid *Brassica napus* fatty acid elongase 1 by a single amino acid substitution[J]. *European Journal of Biochemistry*, 2002, 269(22): 5625-5631.
- [13] KATAVIC V, BARTON D L, GIBLIN E M, et al. Gaining insight into the role of serine 282 in *B. napus FAEI* condensing enzyme[J]. *FEBS Letters*, 2004, 562(1/3): 118-124.
- [14] MILLAR A A, KUNST L. Very-long-chain fatty acid biosynthesis is controlled through the expression and specificity of the condensing enzyme[J]. *The Plant Journal*, 1997, 12(1): 121-131.
- [15] 孙小芹, 庞慧, 郭建林, 等. 十字花科 58 属 94 种野生植物种子脂肪酸组分分析[J]. *林产化学与工业*, 2011, 31(6): 46-54.
- [16] MIETKIEWSKA E, BROST J M, GIBLIN E M, et al. A *Teesdalia nudicaulis FAEI* complements the *FAEI* mutation in transgenic *Arabidopsis thaliana* plants and shows a preference for elongating oleic acid to eicosenoic acid[J]. *Plant Science*, 2007, 173: 198-205.
- [17] MIETKIEWSKA E, BROST J M, GIBLIN E M, et al. Cloning and functional characterization of the fatty acid elongase 1 (*FAEI*) gene from high erucic *Crambe abyssinica* cv. Prophet [J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2007, 5(5): 636-645.
- [18] PATERSON A H, BRUBAKER C L, WENDEL J F. A rapid method for extraction of cotton (*Gossypium* spp.) genomic DNA suitable for RFLP or PCR analysis [J]. *Plant Molecular Biology Reporter*, 1993, 11(2): 122-127.
- [19] GHANEVATI M, JAWORSKI J G. Active-site residues of a plant membrane-bound fatty acid elongase β -ketoacyl-CoA synthase, *FAEI* KCS[J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2001, 1530(1): 77-85.
- [20] VAN H H, INGELBRECHT I, VAN M M, et al. Post-transcriptional silencing of a neomycin phosphotransferase II transgene correlates with the accumulation of unproductive RNAs and with increased cytosine methylation of 3' flanking regions[J]. *The Plant Journal*, 1997, 12(2): 379-392.