

DOI: 10.3724/SP.J.1006.2011.00424

甘蓝型油菜烯脂酰-CoA 还原酶基因 *BnECR* 的克隆及功能分析

倪 郁 张飞萃 王亚超 蒲 飞 王 瑞 柴友荣 李加纳

西南大学农学与生物科技学院, 重庆 400715

摘 要: 反式烯脂酰-CoA 还原酶(trans-2,3-enoyl-CoA reductase, ECR)是催化超长链脂肪酸(VLCFAs)合成的脂肪酰-CoA 延长酶之一。根据已报道拟南芥 ECR 基因设计引物, 采用 RACE (rapid amplification of cDNA ends)方法从甘蓝型油菜中克隆 ECR 的全长 cDNA 序列和对应的基因组序列, 命名为 *BnECR* (GenBank 登录号分别为 FJ899705 和 FJ899706)。序列分析结果显示, *BnECR* 的全长 cDNA 序列为 1 328 bp, 对应的基因组序列为 2 093 bp, 由 4 个外显子组成, 在 ORF 的上、下游分别有一个 163 bp 的 5'UTR 和一个 232 bp 的 3'UTR。根据编码区预测 *BnECR* 前体蛋白为一个 310 个氨基酸残基的多肽链, 包含 ECR 蛋白的重要功能位点 K₁₄₄、R₁₄₅ 及一个 NAD(P)H 结合基序 G₂₂₅SGGYQIPR/HG₂₃₄。NCBI Blastn、氨基酸序列多重比对及保守域分析表明, 该基因与拟南芥 *AtECR* 基因的同源性最高, 是对应拟南芥 *AtECR* 的垂直同源基因。RT-PCR 分析表明, *BnECR* 基因在甘蓝型油菜根、茎、叶、花及角果中均有表达, 其中在茎中的表达量最高。*BnECR* 在高芥酸材料种子发育中后期的表达量显著高于低芥酸种子, 表明 *BnECR* 可能参与甘蓝型油菜芥酸的合成。将 *BnECR* 克隆到酿酒酵母的穿梭表达载体中, 分别转化野生型酵母 By4743 和突变体菌株 YDL015c, 添加半乳糖诱导表达。气相色谱分析表明, *BnECR* 在酿酒酵母中有效表达, 转化菌株中的芥酸(C22:1)占总脂肪酸含量的 1.34%, 比对照增加 52%; 对突变体的转化结果表明芥酸含量恢复到野生型水平。

关键词: 甘蓝型油菜; 烯脂酰 CoA 还原酶; 克隆; 芥酸; 酿酒酵母

Cloning and Functional Analysis of Enoyl-CoA Reductase Gene *BnECR* from Oilseed Rape (*Brassica napus* L.)

NI Yu, ZHANG Fei-Cui, WANG Ya-Chao, PU Fei, WANG Rui, CHAI You-Rong, and LI Jia-Na

College of Agronomy and Biotechnology, Southwest University, Chongqing 400715, China

Abstract: Very-long-chain fatty acids (VLCFAs) are critical components found in cuticular waxes, sphingolipids and triacylglycerols in higher plants. Biosynthesis of VLCFAs is catalyzed by the fatty acyl-CoA elongase, a membrane-bound enzymatic complex containing 3-ketoacyl-CoA synthase (KCS), 3-ketoacyl-CoA reductase (KCR), 3-hydroxyacyl-CoA dehydratase (HCD), and trans-2,3-enoyl-CoA reductase (ECR). In this research, primers were designed based on multiple alignments of trans-2,3-enoyl-CoA reductase (ECR) gene sequences from *Arabidopsis thaliana*, and the full-length cDNA, here designated *BnECR*, and the corresponding genomic sequences were isolated from *Brassica napus* by using rapid amplification of cDNA ends (RACE) method (GenBank accession No. FJ899705 and No. FJ899706). The sequence of *BnECR* cDNA was 1 328 bp (excluding the poly dA tail), and the corresponding genomic sequence was 2 093 bp. *BnECR* was composed of four exons and contained a 163 bp 5' untranslated region (5' UTR) and a 233 bp 3' UTR. The deduced *BnECR* protein was 310 amino acid in length, with a MW of 735.78 kD and a pI of 9.52. The critical functional sites K₁₄₄ and R₁₄₅ in *AtECR* were unchanged in *BnECR*. The G₂₂₅SGGYQIPR/HG₂₃₄ which presented a non-classical NADPH-binding motif was found in C-terminal of *BnECR*. NCBI Blastn, multiple alignments and conserved domain search showed that *BnECR* had the highest homology to *A. thaliana AtECR*. RT-PCR analysis showed that *BnECR* was ubiquitously expressed in *B. napus* and preferentially expressed in stem. The transcript level of *BnECR* at middle and late stages of seed development in low erucic acid rapeseed cultivar was obviously lower than that in high erucic acid rapeseed cultivar, suggesting that *BnECR* was involved in biosynthesis of erucic acid. The 933 bp *BnECR* ORF was

本研究由国家自然科学基金项目(31000122), 重庆市自然科学基金项目(CSTC2008BB1002), 中国博士后科学基金项目(20090460718)和西南大学博士启动基金项目(SWUB2008010)资助。

第一作者联系方式: E-mail: nmniyu@126.com

Received(收稿日期): 2010-09-08; Accepted(接受日期): 2010-11-26.

subcloned into the yeast-*E. coli* shuttle vector pYES2.0. And then the recombinant plasmid was transformed into *Saccharomyces cerevisiae* wild type strain BY4743 and mutant strain YDL015c, respectively. With galactose as inducer, the transformant was cultured to induce the expression of *BnECR*. The GC result indicated that *BnECR* was overexpressed effectively in *S. cerevisiae*, and the content of erucic acid reached to 1.34% of the total fatty acid in the recombinant strain, an increase of 52% over the control. Functional complementation of *BnECR* in a *ECR*-deficient mutant yeast demonstrated that with *BnECR* mediated the biosynthesis of VLCFAs. Our results suggest that *BnECR* should be functional orthologue of *AtECR*.

Keywords: *Brassica napus* L; Enoyl-CoA reductase; Cloning; Erucic acid; *Saccharomyces cerevisiae*

超长链脂肪酸 (very long chain fatty acid, VLCFAs) 是指碳链长度为 20 碳或更长的脂肪酸。常见的有花生酸(C20:0)及其饱和同系物、芥酸(C22:1)及其衍生物山萾酸、蜡质(前体)等。这类脂肪酸参与生物膜脂、鞘脂、木栓质及角质层蜡质的合成, 在植物体中具有广泛的生理功能^[1-3]。植物 VLCFA 的合成是在内质网上脂酰-CoA 延长酶的作用下进行的。脂酰-CoA 延长酶属于膜结合的多酶复合体, 包括 β -酮脂酰-CoA 合酶(3-ketoacyl-CoA synthase, KCS)、 β -酮脂酰-CoA 还原酶(3-ketoacyl-CoA reductase, KCR)、 β -羟脂酰-CoA 脱水酶(3-hydroxyacyl-CoA dehydratase, HCD)和反式烯脂酰-CoA 还原酶(trans-2,3-enoyl-CoA reductase, ECR), 分别催化缩合、还原、脱水 and 再还原 4 步反应^[4-5]。拟南芥延长酶中这 4 个酶基因已被陆续分离^[6-9]。催化最后一步延长反应的 ECR 被认为是所有微粒体脂肪酸延长酶所共有的, 没有底物特异性^[10]。Kohlwein 等^[11]从一个温度敏感、缺乏鞘脂合成的酵母突变体 *tsc13* 中分离了编码 ECR 的基因 *TSC13*, 并指出 *TSC13* 蛋白主要分布于内质网核泡分界处。拟南芥 *AtECR* 功能互补于酵母突变体 *tsc13*, 编码的 ECR 蛋白为脂肪酸延长酶活性所必需, 在拟南芥植株中普遍表达^[9]; 其 T-DNA 插入突变体导致鞘脂、角质层蜡与种子 VLCFA 合成受阻, 抑制细胞扩增, 植株变形^[12]。烟草 *NbECR* 基因沉默导致烟草膜结构紊乱、皮层细胞消融^[13]。棉纤维发育中 *GhECR* 基因参与了 VLCFA 的合成^[14]。

芥酸是十字花科植物种子中特异积累的长链脂肪酸, 改良芥酸的含量是油菜品质育种的重要目标之一, 菜油中芥酸含量的水平直接影响菜籽油的食用营养价值和工业应用价值^[15]。因此, 对以芥酸为代表的长链脂肪酸的研究具有重要的理论和现实意义。对油菜脂酰-CoA 延长酶的研究, 主要集中于 KCS 的研究。油菜中编码 KCS 的同工酶基因 *Bn-FAE1.1* 和 *Bn-FAE1.2* 特异性催化发育种子中芥酸等的合成。但 *Bn-FAE1.1* 起主要作用, 并主要存在于高芥酸品种油菜中^[16]。编码 KCR 的基因

Bn-KCR1 和 *Bn-KCR2* 近期也从高芥酸品种油菜中被分离, 二者在高芥酸与低芥酸品种的发育种子中表达差异显著^[17]。甘蓝型油菜中编码 HCD 和 ECR 的基因还未见报道。本研究从甘蓝型油菜中分离克隆了编码反式烯脂酰-CoA 还原酶的 *BnECR* 基因, 并对该基因的功能进行分析, 研究结果有助于进一步理解油菜 VLCFA 合成、代谢机制, 为充分利用改造脂酰-CoA 延长酶基因来调控油菜 VLCFA 合成奠定基础。

1 材料与方法

1.1 植物材料和菌种

选用甘蓝型油菜 5B、高芥酸油菜 83501R(芥酸含量 50%)和低芥酸油菜 2821R(芥酸含量为 0%), 种子由重庆市油菜工程技术研究中心(西南大学油菜技术研究中心)提供, 于田间常规种植。分别采集 5B 材料的根、茎、叶、花、角果及高、低芥酸材料的开花后 10、25、40 和 55 d 的种子, 立即放入液氮并于 -80°C 冰箱保存, 直到抽提 DNA 与 RNA。大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH5 α 由重庆市作物品质改良重点实验室保存。酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)野生型菌株 BY4743 和突变体 YDL015c (BY4743, Mata, his3 Δ 1, leu2 Δ 0, lys2 Δ 0, ura3 Δ 0, YDL015c::KanMX4/YDL015C)购自德国 EUROSCARF Library。

1.2 实验试剂与培养基

T4 DNA 连接酶, 限制酶 *Sac* I 和 *Xba* I 购自宝生物工程(大连)有限公司; 胶回收试剂盒、质粒抽提试剂盒和 DNA Marker 均购自 Transgen 公司, TRNzol RNA 提取试剂盒、T-vector 试剂盒和反转录试剂盒购自大连 TaKaRa 公司; 表达载体 pYES2.0 购自 Invitrogen 公司。引物合成和序列测定均由上海英骏生物技术有限公司完成。其他常规试剂均为国产分析纯。酵母营养缺陷型 SC-Ura 培养基和诱导表达培养基的配制按 Invitrogen 公司操作说明进行。

1.3 DNA 与总 RNA 的提取

基因组 DNA 采用 CTAB 法提取。总 RNA 采用 TRNzol RNA 提取试剂盒(TaKaRa)提取。

1.4 *BnECR* 3'末端与 5'末端的扩增

参照 Invitrogen 生物技术公司的 GeneRacer Kit 操作说明, 从甘蓝型油菜 5B 提取 RNA 反转录合成 cDNA 作为 PCR 模板。根据已报道的拟南芥反式烯脂酰-CoA 还原酶基因 *AtECR*(NM_115394) 序列设计基因特异引物。使用 GeneRacer 3'端引物 3'-P 和正向特异引物 FECR3-1 进行 3'-RACE 一扩。使用 GeneRacer 3'端巢式引物 3'-NP 和正向特异引物 FECR3-2 进行 3'-RACE 巢式扩增。使用 GeneRacer 5'端引物 5'-P 和反向特异引物 RECR5-1 进行 5'-RACE 一扩, 5'-NP 与反向巢式引物 RECR5-2 进行 5'-RACE 巢式扩增(引物序列见表 1)。PCR 扩增程序为 94°C 2 min, 然后 94°C 30 s, 53°C 30 s, 72°C 1.5 min, 30 个循环。对扩增产物进行筛选、鉴定和测序。

1.5 *BnECR* 全长 cDNA 及对应的基因组序列的分离

根据测序结果, 设计引物 FECR 和 RECR(表 1), 以甘蓝型油菜基因组和总 cDNA 分别为模板进行 *BnECR* 全长序列的扩增。PCR 程序为: 94°C 预变性

2~4 min; 94°C 1 min, 58°C 1 min, 72°C 2 min, 共 30 个循环; 72°C 10 min 结束反应。将扩增产物全部电泳, 回收目的条带并进行亚克隆、测序。

1.6 RT-PCR 分析

参照 Transgene 生物技术公司的操作说明, 分别用甘蓝型油菜 5B 的根、茎、叶、花、角果以及高、低芥酸油菜花后 10、25、40 和 55 d 的种子提取 RNA 反转录合成 cDNA。基因特异引物 FECR 和 RECR5-2 用于扩增 *BnECR* cDNA 5'端的 606 bp 片段(表 1)。同时设计合成内参基因引物 F26S 和 R26S 来扩增相应于 *A. thaliana* 26S rRNA 基因的 534 bp 基因片段^[18]。取 1.0 μL cDNA 第一链产物做模板, 参照 50 μL 标准 PCR 体系, 同时扩增目的基因与内参基因。扩增程序为: 94°C 预变性 2 min; 94°C 变性 1 min, 58°C 退火 1 min, 72°C 延伸 50 s, 共 27 个循环; 72°C 延伸 10 min。将扩增产物全部电泳, 在紫外灯下观察电泳结果, 以凝胶成像系统拍照分析。

1.7 表达载体的构建与转化

设计引物 FECRO 和 RECRO(表 1)扩增甘蓝型

表 1 *BnECR* 基因克隆与表达分析所用引物
Table 1 Sequences of primers for *BnECR* isolation and expression

引物 Primer	序列 Sequence (5'→3')	用途 Application
3'-P	GCTGTCAACGATACGCTACGTAACG	3'-RACE 第一轮扩增通用引物 Kit primer for 3'-RACE primary amplification
3'-NP	CGCTACGTAACGGCATGACAGTG	3'-RACE 巢扩通用引物 Kit primer for 3'-RACE nested amplification
FECR3-1	CCTTCAGATGAAGATTGGTTTCGGG	3'-RACE 第一轮扩增特异引物 Gene-specific primer for 3'-RACE primary amplification
FECR3-2	TGGCTAGGATTCAACATCGCTACTCAGAC	3'-RACE 巢扩特异引物 Gene-specific primer for 3'-RACE nested amplification
5'-P	CGACTGGAGCACGAGGACACTGA	5'-RACE 第一轮扩增通用引物 Kit primer for 5'-RACE primary amplification
5'-NP	GGACACTGACATGGACTGAAGGAGTA	5'-RACE 巢扩通用引物 Kit primer for 5'-RACE nested amplification
RECR5-1	CAAACCAAACCAAACCCGAAACC	5'-RACE 第一轮扩增特异引物 Gene-specific primer for 5'-RACE primary amplification
RECR5-2	ATCCGTTTGAAGTAGTGAAGCACCAGTAG	5'-RACE 巢扩特异引物 Gene-specific primer for 5'-RACE nested amplification
FECR	AGTTAGTTAGTTGTCTACTCCCACTACACAAC	目标基因全长序列扩增特异引物 Upstream gene-specific primer for amplifying full-length cDNA of <i>BnECR</i> gene
RECR	GGCAAAATGTTTTGAGTTTGACTTACCA	目标基因全长序列扩增特异引物 Downstream gene-specific primer for amplifying full-length cDNA of <i>BnECR</i> gene
F26S	CACAATGATAGGAAGAGCCGAC	RT-PCR 内参基因扩增引物 Upstream primer for amplifying 26S rRNA gene
R26S	CAAGGGAACGGGCTTGGCAGAATC	RT-PCR 内参基因扩增引物 Downstream primer for amplifying 26S rRNA gene
FECRO	AGAGCTCATGAAAGTCACCGTCGTCTCCCGC	<i>BnECR</i> 基因编码区扩增引物 Upstream primer for amplifying <i>BnECR</i> ORF
RECRO	ATCTAGACTACAGGAATGGAGGTAAGATCACCC	<i>BnECR</i> 基因编码区扩增引物 Downstream primer for amplifying <i>BnECR</i> ORF

油菜 ECR 基因的编码区, 并且参考酿酒酵母表达载体 pYES2.0 的多克隆位点, 分别在引物的 5'端引入 *Sac* I 和 *Xba* I 的酶切位点。PCR 扩增体系除延伸时间为 1 min 外, 其余条件同上。分别用 *Sac* I 和 *Xba* I 酶切 PCR 产物和表达载体 pYES2.0, 回收之后连接, 并转化到大肠杆菌 DH5 α 中, 筛选转化子, 经过 PCR 和酶切检测, 得到重组质粒 pYBnECR。将空质粒 pYES2.0 和重组质粒 pYBnECR 转化到营养缺陷型酿酒酵母 BY4743 和突变体菌株 YDL015c 中, 在 SC-Ura 培养基上筛选得到转化子, 分别作为对照菌种和工程菌株 YBnECR。大肠杆菌感受态准备、转化方法及酵母感受态制备和转化方法分别参见文献[19-20]。

1.8 *BnECR* 的诱导表达

将对照菌株和工程菌株 YBnECR 接种到 15 mL SC-Ura 的液体培养基中, 每个处理接种 3 瓶, 在 30℃ 和 120 r min⁻¹ 条件下振荡过夜培养, 将培养物接种到含有 2% 半乳糖的 100 mL SC-Ura 培养基中, 30℃、120 r min⁻¹ 条件下诱导培养 72 h, 使 OD₆₀₀ 达到 2, 收获菌体。

1.9 气相色谱(GC)分析

将收获的菌体用去离子水洗涤 3 次, 50℃ 烘干 10 h, 磨碎, 乙醚/石油醚(1:1)浸提过夜。加入 KOH/CH₃OH(1:1)溶液, 超声波振荡 20 min, 合成脂肪酸甲酯, 备用待测。气相色谱分析中采用弹性石英毛细管柱, 载气为 N₂, 线速 10 cm s⁻¹。分流比 100:1, 气化温度 250℃, 柱温 180℃, 尾吹 50 mL min⁻¹, 采用氢火焰离子化检测器, 上样量 2 μ L。重复 3 次测定。

1.10 生物信息学分析

利用 Vector NTI Advance v.9.0 进行核苷酸及氨基酸序列分析, 在 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)网站上进行 GenBank Blast 和蛋白序列的 CDD 搜索, 在 <http://bip.weizmann.ac.il/> 和 <http://www.expasy.org/> 等网站提供链接的各生物信息学软件网站上进行蛋白质结构分析。

网站上进行 GenBank Blast 和蛋白序列的 CDD 搜索, 在 <http://bip.weizmann.ac.il/> 和 <http://www.expasy.org/> 等网站提供链接的各生物信息学软件网站上进行蛋白质结构分析。

2 结果与分析

2.1 *BnECR* 基因的克隆与核苷酸序列分析

利用引物组合 FE_{CR}3-1/3'-P、FE_{CR}3-2/3'-NP 和 FE_{CR}5-1/5'-P、FE_{CR}5-2/5'-NP 分别进行 3'cDNA 和 5'cDNA 末端的一扩与巢扩, 获得与预期大小相符的电泳条带。测序结果与 GenBank 中的序列进行同源比对表明, 获得的 cDNA 3'末端序列和 5'末端序列与拟南芥 ECR 基因 *AtECR* (NM_115394) 同源性最高。根据测序结果设计了一对扩增全长 cDNA 的引物 FE_{CR}/RE_{CR}, 从甘蓝型油菜总 cDNA 和 gDNA 中扩增得到了预期大小的片段。该基因的 cDNA 序列全长为 1 328 bp (不包括 polyA 尾), 对应的基因组序列长度为 2 093 bp, 被命名为 *BnECR* (GenBank 登录号分别为 FJ899705 和 FJ899706)。如图 1 所示, 933 bp 长的 ORF 被 3 个内含子隔开, 与已报道的拟南芥 *AtECR* 结构相同。在 ORF 上游有一个 163 bp 的 5'UTR, 在 ORF 下游有一个 232 bp 的 3'UTR, 随后是 polyA 尾。NCBI Blastn 同源分析表明, *BnECR* cDNA 序列与 *AtECR* 同源性最高, 为 86%; 其次是与棉花 *GhECR2* (EU001743), 同源性为 77%, 与 *GhECR1* (EU001742)、烟草 *NbECR* (DQ000300) 的同源性为 74%。ORF 水平上 *BnECR* 与 *AtECR* 的同源性达到 89%, 即使与酵母 ECR 基因 *ScTSC1 3* (NC_001136) 也有 46.5% 的同源性。从核苷酸水平的同源性分析来看, *BnECR* 是拟南芥 *AtECR* 的垂直对应基因。

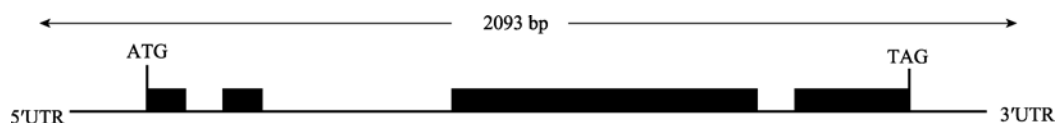


图 1 *BnECR* 的基因结构图

Fig. 1 Schematic structure of *BnECR*

黑色框代表外显子; 黑色框之间的黑线代表内含子; UTR: 非翻译区。

The black boxes indicate the exons. The black lines between the black boxes indicate the introns. UTR: untranslated region.

2.2 预测 *BnECR* 蛋白的分析

在 Vector NTI Suite 8.0 上对 *BnECR* 的 ORF 进行了翻译, 根据核苷酸预测的 *BnECR* 前体蛋白由 310 氨基酸组成, 分子量为 35.78 kD, 等电点为 9.52。通过 NCBI Blastp 对 *BnECR* 蛋白进行分析表

明, 它与拟南芥 *AtECR* (NP_191096) 最同源, 一致性/相似性为 97.1%/98.7%、其次是与棉花 *GhECR2* (ABV60089) 为 85.0%/92.0%, 与 *GhECR1* (ABV60088) 为 82.6%/90.3%, 与烟草 *NbECR* (AAY17262) 为 82.6%/90.6%。在 Vector NTI Suite 8.0 上进行多重序

列比对(图 2)及系统学分析表明(图 3), BnECR 和 AtECR 最相似, 聚在一个亚组里。虽然 BnECR 与 GhECR、NbECR 也有很高的同源性, 但在许多氨基酸残基位点上 BnECR 更趋向于与 AtECR 同源。例如图 2 所示(加下画线表示)的 V₁₃、L₁₄、A₁₆、P₁₇、D₁₉、F₃₃、A₃₇、D₅₇、K₅₈、S₆₄、S₇₈、A₈₈、L₁₀₅、I₁₀₆、L₁₁₉、I₁₆₂、G₁₆₃、D₂₂₂、A₂₆₉、L₂₇₃、S₂₈₄、I₂₈₉、K₂₉₆。根据 NCBI 保守域^[21]预测结果, 在 BnECR 蛋白(M₁~L₃₁₀)中存在烯脂酰-CoA 还原酶保守性结构域(PLN02560, E-value: 6.08E-169)。图 2 显示 BnECR 的所有高保守氨基酸残基都与 AtECR 以及其他植

物的 ECR 相同, 特别是 ECR 的重要功能位点在这个蛋白中都没有变化。例如, 拟南芥 ECR 蛋白的 K₁₄₄、R₁₄₅^[22]和酵母 ECR 蛋白的 Q₈₁^[11]。TMpred 预测 BnECR 蛋白有 4 个跨膜螺旋结构, 分别位于 L₉₅~V₁₁₅、V₁₆₅~N₁₈₄、I₁₉₈~L₂₁₆、Q₂₆₀~G₂₈₁^[23]。而根据拟南芥、酵母 ECR 蛋白的拓扑学分析表明, ECR 蛋白含有 6 个跨膜结构域, 定位于内质网^[22]。综合序列比对结果分析, BnECR 蛋白可能在 G₁₂₂~T₁₅₉、K₂₁₈~A₂₅₈ 之间还含有两个跨膜结构域。脂肪酸合成和延长反应中的两步还原反应需要利用 NAD(P)H^[7,24-25]。棉花 ECR 中鉴定出一个 NAD(P)H 结合基序 G(5X)

AtTSC13	(1)	MKVTVVRSRSREVLKAFLLDLPDSATVADLQEAFFHKRAKKFYPSRORLTLPVTPGSKDKPV
BnECR	(1)	MKVTVVRSRSREVLKAFLLDLPDSATVADLQEAFFHKRAKKFYPSRORLTLPVTPGSKDKPV
GhECR1	(1)	MKVTLVRSRSREFINGGLELDPDSATVADLQEAIFYKRTKKFYPSRORLTLVPVPEGSKERP
GhECR2	(1)	MKVTLVRSRSREFIKGGLDLPDSATVADLQEAIFHKRTKKFYPSRORLTLPVTPGSKERP
NbTSC13	(1)	MKVTVVRSRSKELIKGGLDLPDSATVADLQEAIFHKRTKKFYPSRORLTLVPVPEGSKERP
ScTSC13	(1)	MPITIKRSRS-KGLRDEIDLKSKFTLDDVLKKISANNHNISKYRIRLTYKKE--SKQVPV
Consensus	(1)	MKVTVVRSRSRELIKGGDLDPDSATVADLQEAIFHKRTKKFYPSRORLTLPV PGSKERP
AtTSC13	(61)	VLNSKKSLSKEYCDGNNSLTVVFKDLGQVSYRTIFFEYLGPELLIYPVFYFF----VY
BnECR	(61)	VLNSKKSLSKEYCDGNTDLSLTVVFKDLGQVSYRTIFFEYLGPELLIYPVFYFF----VY
GhECR1	(61)	VLNYKKSLSKEYCDGNNSLTVVFKDLGQVSYRTIFFEYLGPELLIYPVFYFF----VY
GhECR2	(61)	ILNYKKSLSKEYCDGNNSLTVVFKDLGQVSYRTIFFEYLGPELLIYPVFYFF----VY
NbTSC13	(61)	VLHYKKSLSKEYCDGNNSLTVVFKDLGQVSYRTIFFEYLGPELLIYPVFYFF----VY
ScTSC13	(58)	IS--ES---FFQEEADDSMEFFIKDLGQISWRLVFFCEYLGPELLVHSLFYLLSTIPTIV
Consensus	(61)	VLNYKKSLSKEYCDGN NSLTVVFKDLGQVSYRTIFFEYLGPELLIYPVFYFF VY
AtTSC13	(117)	KELGYGEDCVIHPVQTYAMYWCFFHYKRILETFFVHRFSATSPIGNVFNCAIYWSFG
BnECR	(117)	KYLYGYGEDRVIHPVQTYAMYWCFFHYKRIMETFFVHRFSATSPIGNVFNCAIYWSFG
GhECR1	(117)	KFFGYGEDRVIHPVQTYAVYWCFFHYKRILETFFVHRFSATSPIGNVFNCAIYWSFG
GhECR2	(117)	KYFGYEEKRVIHPVQTYALYWCFFHYKRIMETFFVHRFSATSPIGNVFNCAIYWSFG
NbTSC13	(117)	KFFGYKEERVIHPVQTYAMYWCFFHYKRIMETFFVHRFSATSPIGNVFNCAIYWSFG
ScTSC13	(113)	DRWHSASSDYNPFLNRVAYFLILGHYKRILETFFVHRFSATSPIGNVFNCAIYWSFG
Consensus	(121)	KFFGYGEDRVIHPVQTYAMYWCFFHYKRIMETFFVHRFSATSPIGNVFNCAIYWSFG
AtTSC13	(117)	AYIAYYVN-----HPIYTPVSDLOMKIGFGFGLVCOVAFYCHILKLNLRDPSG
BnECR	(117)	AYIAYYVN-----HPIYTPVSDLOMKIGFGFGLVCOVAFYCHILKLNLRDPSG
GhECR1	(117)	SMIAYYVN-----HPIYTPVSDLOMKIGFGFGLVCOVAFYCHILKLNLRDPSG
GhECR2	(117)	SMIAYYVN-----HPIYTPVSDLOMKIGFGFGLVCOVAFYCHILKLNLRDPSG
NbTSC13	(117)	SMIAYYVN-----HPIYTPVSDLOMKIGFGFGLVCOVAFYCHILKLNLRDPSG
ScTSC13	(173)	GIISFGYFGYGFPPFGNAKLFKYSYLKLDLSTLILGLFVLSLWAFYCHILKLNLRDPSG
Consensus	(181)	AYIAYYVN-----HPIYTPVSDLOMKIGFGFGLVCOVAFYCHILKLNLRDPSG
AtTSC13	(226)	AGC---YQIPRGFLFNIVTCANYYTEIYQWLGFNIAQTQ--IAGYVFLVAVALIMTNWAL
BnECR	(226)	SGG---YQIPRGFLFNIVTCANYYTEIYQWLGFNIAQTQ--VAGYVFLVAVALIMTNWAL
GhECR1	(226)	SGC---YQIPRGFLFNIVTCANYYTEIYQWLGFNIAQTQ--VAGYVFLVAVALIMTNWAL
GhECR2	(226)	SGC---YQIPRGFLFNIVTCANYYTEIYQWLGFNIAQTQ--VAGYVFLVAVALIMTNWAL
NbTSC13	(226)	NGC---YQIPRGFLFNIVTCANYYTEIYQWLGFNIAQTQ--VAGYVFLVAVALIMTNWAL
ScTSC13	(233)	KHCNAKIRVPLNQGIFNLFVAFNYTEIYQWLGFNIAQTQ--VAGYVFLVAVALIMTNWAL
Consensus	(241)	SGG---YQIPRGFLFNIVTCANYYTEIYQWLGFNIAQTQ--VAGYVFLVAVALIMTNWAL
AtTSC13	(281)	EKHSRLRKIFDGKDGKFKYPRRWVILPEF--
BnECR	(281)	EKHSRLRKIFDGKDGKFKYPRRWVILPEF--
GhECR1	(281)	TKHRRLLKLFVDGNGREKYPKPRRWVILPEF--
GhECR2	(281)	EKHSRLRKIFDGKDGKFKYPRRWVILPEF--
NbTSC13	(281)	EKHSRLRKIFDGKDGKFKYPRRWVILPEF--
ScTSC13	(293)	KKNK-----KYHTRRAEFLPEF--
Consensus	(301)	EKHSRLRKIFDGKDGKFKYPRRWVILPEF--

图 2 BnECR 与其他物种的 ECR 蛋白的氨基酸序列比对

Fig. 2 Deduced amino acid sequence of BnECR compared with sequences of related proteins

参加比对的物种有甘蓝型油菜 BnECR (GenBank 登录号为 ACR56737)、拟南芥 AtECR (NP_191096)、棉花 GhECR1 (ABV60088)、GhECR2 (ABV60089)、烟草 NbECR (AAY17262) 和酵母 ScTSC13 (NP_010269)。序列比对图中, 完全相同、基本相同与不相同的氨基酸残基分别用黑色、灰色与白色背景表示; BnECR 中趋向于与 AtECR 同源的氨基酸残基用下画线表示。一致序列行中用 * 表示 ECR 重要功能位点, 下画线表示 NAD(P)H 结合基序。

Amino acid sequence of BnECR (GenBank accession No. ACR56737) was aligned with orthologues AtECR from *A. thaliana* (NP_191096), GhECR1 and GhECR2 from *Gossypium hirsutum* (ABV60088 and ABV60089), NbECR from *Nicotiana benthamiana* (AAY17262) and ScTSC13 from *Saccharomyces cerevisiae* (NP_010269). Identical, conservative, and non-similar residues are denoted by black shading, grey shading, and white background respectively. Residues in BnECR preferentially similar to AtECR are underlined. In the consensus line, the critical functional sites are marked by the asterisks and the NADPH-binding region is underlined.

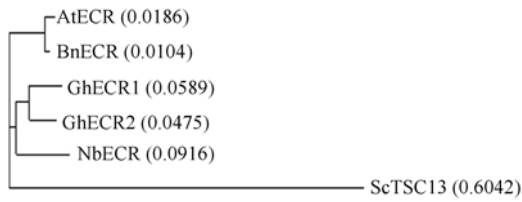


图 3 *BnECR* 与其他物种的 ECR 蛋白的系统发生树
Fig. 3 Phylogenetic tree of *BnECR* protein and ECR proteins from other species established by Bootstrap neighbor-joining

系统发生树括号中数字表示相对进化距离。
Calculated relative distance values are shown in parentheses following molecule names.

IPXG ($G_{225}SGGYQIPR/HG_{234}$)^[14], 而这个基序同样也存在于 *BnECR* 中(图 2)。综上所述,从核苷酸和氨基酸 2 个水平的同源性及保守域分析来看,获得的 *BnECR* 是对应于拟南芥 *AtECR* 的垂直同源基因。

2.3 *BnECR* 的表达分析

AtECR 参与拟南芥所有 VLCFAs 的合成^[9]。为了解 *BnECR* 的表达模式,本研究采用甘蓝型油菜 5B 的根、茎、叶、花、角果的 RNA 样品进行半定量 RT-PCR 分析。结果表明, *BnECR* 在所检测的组织中普遍表达,但同时存在组织器官特异性。*BnECR* 在茎中的表达量最高,在叶、花中中等表达,在根和角果中的表达量最低(图 4)。同时也研究了 *BnECR* 在油菜高芥酸材料 83501R 和低芥酸材料 2821R 种子不同发育阶段的表达。总体来讲, *BnECR* 在高芥酸材料中的表达丰度高于低芥酸材料(图 5)。种子发育初期, *BnECR* 在高芥酸材料中的表达略高于低芥酸材料,在花后 40 d 的种子中高芥酸材料表达量达到最高。低芥酸材料种子中的表达随发育进程逐渐减弱。这表明 *BnECR* 参与了甘蓝型油菜芥酸的合成。

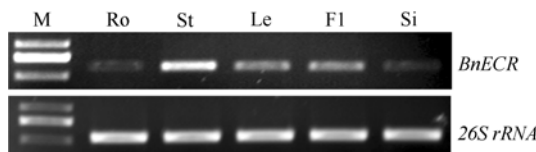


图 4 *BnECR* 的组织器官表达模式

Fig. 4 Expression pattern of *BnECR* in different rapeseed organs

M: DL2000 DNA marker; Ro: 根; St: 茎; Le: 叶; Fl: 花; Si: 角果(花后 30 d); 26S *rRNA*: 内参。

M: DL2000 DNA marker; Ro: roots; St: stems; Le: leaves; Fl: flowers; Si: siliques of 30 days after flowering; Simultaneous detection of 26S *rRNA* gene expression was used as internal control.

2.4 *BnECR* 基因在酿酒酵母中的功能分析

利用带有酶切位点的引物 FECRO/RECRO 以甘蓝型油菜 cDNA 为模板进行 PCR 扩增,经亚克隆、

测序验证后的阳性克隆,抽提质粒。对质粒和表达载体 pYES2.0 分别进行 *Sac* I 和 *Xba* I 双酶切,回收目的条带和载体骨架,连接后转化大肠杆菌 DH5 α ,从含有 Amp 的 LB 平板上挑选转化子,培养阳性克隆子,抽提质粒。经过 PCR 和酶切鉴定正确,得到构建成功的重组质粒 pYBnECR。将空载体 pYES2.0 和重组质粒 pYBnECR 转化到酿酒酵母野生型 BY4743 和突变体 YDL015c 中,在 SC-Ura 平板上筛选到对照菌株和转化菌株 YBnECR,以转化空载体的受体菌为对照,诱导表达外源基因。经过 GC 分析,如图 6 所示,对照菌株和工程菌株都显示了典型的酵母脂肪酸组成,并以 C16 和 C18 的饱和、不饱和脂肪酸为主。在本试验条件下,长于 18 个碳的脂肪酸只检测到芥酸(C22:1)。对 BY4743 的转化结果表明,转化菌株中的芥酸(C22:1)占总脂肪酸含量的 1.34%,是对照的 1.52 倍,差异显著($P < 0.05$)。说明 *BnECR* 蛋白促进了芥酸的合成。YDL015c 的转化结果表明,转化菌株中的芥酸(C22:1)占总脂肪酸含量的 0.96%,是对照的 4.17 倍,与对照差异显著($P < 0.05$)。表明突变体恢复了芥酸的合成能力。酵母超表达和酵母突变体的功能互补分析分别证明 *BnECR* 蛋白能够介导芥酸的合成。

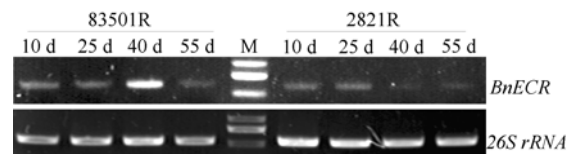


图 5 *BnECR* 在高、低芥酸材料不同发育阶段种子中的表达
Fig. 5 Expression of *BnECR* during high erucic acid rapeseed cultivar and low erucic acid rapeseed cultivar seed development

M: DL2000 DNA marker; 10, 25, 40 and 55 d: seeds of 10, 25, 40, and 55 d after flowering, respectively. 83501R: high erucic acid rapeseed; 2821R: low erucic acid rapeseed. Simultaneous detection of 26S *rRNA* gene expression was used as internal control.

3 讨论

VLCFA 参与种子甘油酯、生物膜膜脂及鞘脂的合成,并为角质层蜡质的生物合成提供前体物质,在植物体中具有广泛的生理功能^[1-3]。内质网中由 KCS、KCR、HCD、ECR 组成的脂肪酸延长酶共同负责催化 VLCFA 的合成,其中 ECR 催化延长反应的最后一步还原反应。植物中 ECR 活性降低将会减少 VLCFA 的合成,细胞扩增受抑制,植株变形乃

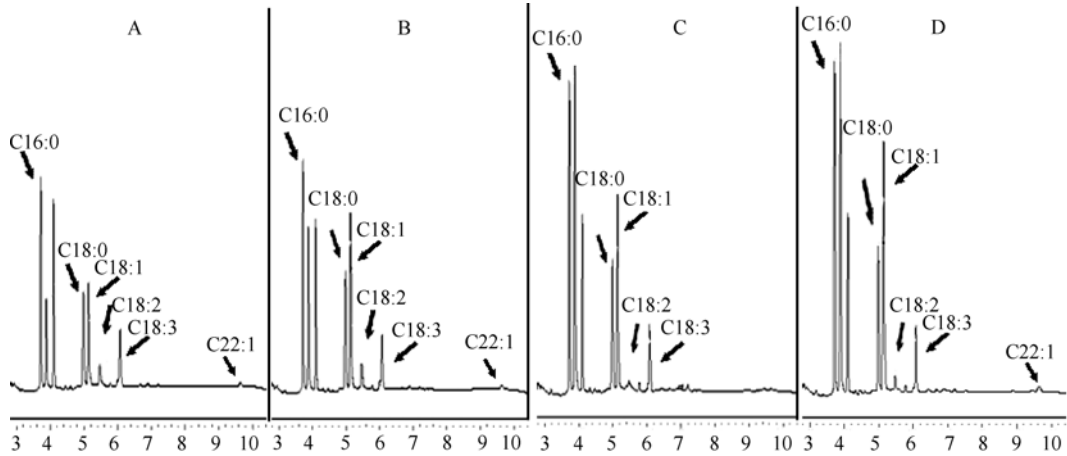


图 6 转基因酿酒酵母总脂肪酸气相色谱分析图

Fig. 6 Gas chromatographic analyses of fatty acid methyl esters prepared from transgenic yeast cells compared with cells containing empty vector as the control

A 和 B: 空载体 pYES2.0 和重组质粒 pYBnECR 分别转化酿酒酵母野生型 BY4743; C 和 D: 空载体 pYES2.0 和重组质粒 pYBnECR 分别转化酿酒酵母突变体 YDL015c。

A and B: *S. cerevisiae* wild type strain BY4743 yeast cells transformed with the empty vector pYES2.0 and the construct pYBnECR, respectively; C and D: *S. cerevisiae* mutant strain YDL015c yeast cells transformed with the pYES2.0 and the construct pYBnECR, respectively.

至死亡^[12-13]。本研究从甘蓝型油菜中克隆了编码 ECR 的基因 *BnECR*, 从核苷酸、氨基酸水平的同源性及保守域分析来看, 获得的序列与拟南芥 *AtECR* 同源性最高, 在核苷酸水平上达到 86% 的同源性, 氨基酸水平上达到 97.1%/98.7% 的一致性/相似性, 存在烯脂酰-CoA 还原酶保守性结构域(PLN02560)。根据拟南芥 ECR 蛋白拓扑学研究结果预测 *BnECR* 蛋白有 6 个跨膜结构域, 定位于内质网^[22]。经过比对发现, *BnECR* 蛋白在 G₂₂₅ 和 G₂₃₄ 之间有一个植物 ECR 基因家族的 NAD(P)H 结合基序 G(5X)IPXG。前人鉴定的 ECR 酶活性的重要功能位点, 如 Q₈₁(对应 *BnECR* 的 Q₈₉)^[11]、K₁₄₄R₁₄₅ 等在 *BnECR* 中保守存在^[22]。综合上述分析, *BnECR* 是对应于拟南芥 *AtECR* 的垂直同源基因。

拟南芥中编码 KCS 的基因可能有 21 个^[26], 编码 KCR、HCD、ECR 的基因各有 1 条^[7-9]。油菜是异源四倍体, 基因组大小大约是拟南芥基因组的 6 倍^[27-28]。到目前为止, 油菜中编码 KCS 和 KCR 的基因各有 2 条, 分别为 *Bn-FAE1.1*、*Bn-FAE1.2*^[16] 和 *Bn-KCR1*、*Bn-KCR2*^[17]。本研究中采用 RACE 方法只分离克隆到 1 条 *BnECR* 基因, 具有转录活性和酶催化活性, 可能是主要的 ECR 功能成员。由于 RACE 方法对分离表达丰度低的基因有局限, 因此不排除在甘蓝型油菜中还存在其他 *BnECR* 基因成员。

与拟南芥 *AtECR* 的表达模式一致, *BnECR* 在甘蓝型油菜组织器官中普遍表达, 这与前人研究结果

符合, 延长反应中的 KCS 存在组织、器官特异性表达和底物特异性, 而 KCR、HCD 与 ECR 被认为是所有微粒体脂肪酸延长酶所共有的, 没有底物特异性^[10]。*BnECR* 同时存在组织器官特异性表达, 在茎中表达最高, 在叶、花中中等表达(图 4)。这可能与 VLCFAs 不同程度地参与这些器官的生物膜脂、角质层蜡质的合成有关。在种子发育中后期, 高芥酸材料的 *BnECR* 表达量高于低芥酸材料(图 5), 表明 *BnECR* 参与种子中芥酸的合成。

Rossak 等^[29]认为 *FAE1* 编码的 KCS 是长链脂肪酸合成的限速酶。拟南芥的 *FAE1* 发生突变, 种子中长链脂肪酸含量大幅度降低, 推测 *FAE1* 是芥酸生物合成的关键基因^[30-31]。油菜中 *Bn-FAE1.1* 起主要催化芥酸合成的作用^[16]。油菜 *BnKCR2* 转化酵母功能互补分析表明, VLCFA 含量增加为野生型的 2 倍^[17]。本研究中, *BnECR* 基因导入酿酒酵母超表达, 芥酸含量增加为对照的 1.52 倍; 转化突变体基本恢复为野生型水平, 表明 *BnECR* 是具有催化芥酸合成的功能基因。这些数据为油菜中超表达 *BnKCR*、*BnECR* 增加 VLCFA 含量提供了证据支持。

随着人们对植物 VLCFA 代谢研究的深入, 基因工程为其生物合成调控开辟了广阔前景。目前的转化研究主要是单基因导入, 伴随着油菜脂肪酸延长酶基因的陆续分离, 油菜 VLCFA 合成代谢的信息得到进一步补充。这也为通过遗传转化、导入多个延长酶基因调控油菜 VLCFA 合成提供了途径。

4 结论

从甘蓝型油菜中分离克隆了反式烯脂酰-CoA 还原酶基因 *BnECR*, 同源比对及相关生物信息学分析表明 *BnECR* 是对应于拟南芥 *AtECR* 的垂直同源基因; 其表达具有普遍性和器官特异性, 种子发育中后期, mRNA 在高芥酸种子中的表达显著增强, 暗示 *BnECR* 参与了油菜种子芥酸的合成; 转基因酵母超表达和功能互补分析表明 *BnECR* 蛋白具有催化芥酸合成的功能。

References

- [1] Kunst L, Samuels A L. Biosynthesis and secretion of plant cuticular wax. *Prog Lipid Res*, 2003, 42: 51–80
- [2] Leonard A E, Pereira S L, Sprecher H, Huang Y S. Elongation of long-chain fatty acids. *Prog Lipid Res*, 2004, 43: 36–54
- [3] Sperling P, Heinz E. Plant sphingolipids: structural diversity, biosynthesis, first genes and functions. *Biochim Biophys Acta*, 2003, 1632: 1–15
- [4] Fehling E, Mukherjee K D. Acyl-CoA elongase from a higher plant (*Lunaria annua*): metabolic intermediates of very-long chain acyl-CoA products and substrate specificity. *Biochim Biophys Acta*, 1991, 1082: 239–246
- [5] von Wettstein-Knowles P M. Elongase and epicuticular wax biosynthesis. *Physiol Veg*, 1982, 20: 797–809
- [6] James D W Jr, Lim E, Keller J, Plooy I, Ralston E, Dooner H K. Directed tagging of the *Arabidopsis FATTY ACID ELONGATION1 (FAE1)* gene with the maize transposon activator. *Plant Cell*, 1995, 7: 309–319
- [7] Beaudoin F, Gable K, Sayanova O, Dunn T, Napier J A. A *Saccharomyces cerevisiae* gene required for heterologous fatty acid elongase activity encodes a microsomal beta-keto-reductase. *J Biol Chem*, 2002, 277: 11481–11488
- [8] Garcia C, Joubes J, Chevalier S, Laroche-Traineau J, Bourdenx B, Dieryck W, Lessire R. *AtHCD1* encodes a 3-hydroxyacyl-CoA dehydratase involved in wax biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. In: Benning C, Ohlrogge J, eds. Proceedings of 17th International Symposium on Plant Lipids. Salt Lake City: Aardvark Global Publishing Company, 2007. pp 203–206
- [9] Gable K, Garton S, Napier J A, Dunn T M. Functional characterization of the *Arabidopsis thaliana* orthologue of Tsc13p, the enoyl reductase of the yeast microsomal fatty acid elongating system. *J Exp Bot*, 2004, 55: 543–545
- [10] Dittrich F, Zajonc D, Huhne K. Fatty acid elongation in yeast-biochemical characteristics of the enzyme system and isolation of elongation-defective mutants. *Eur J Biochem*, 1998, 252: 477–485
- [11] Kohlwein S D, Eder S, Oh C S, Martin C E, Gable K, Bacikova D, Dunn T. Tsc13p is required for fatty acid elongation and localizes to a novel structure at the nuclear-vacuolar interface in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*, 2001, 21: 109–125
- [12] Zheng H, Rowland O, Kunst L. Disruptions of the *Arabidopsis* enoyl-coA reductase gene reveal an essential role for very-long-chain fatty acid synthesis in cell expansion during plant morphogenesis. *Plant Cell*, 2005, 17: 1467–1481
- [13] Parka J A, Kimb T W, Kimb S K, Kima W T, Paic H S. Silencing of *NbECR* encoding a putative enoyl-CoA reductase results in disorganized membrane structures and epidermal cell ablation in *Nicotiana benthamiana*. *FEBS Lett*, 2005, 579: 4459–4464
- [14] Song W Q, Qin Y M, Saito M, Shirai T, Pujol F M, Kastaniotis A J, Hiltunen J K, Zhu Y X. Characterization of two cotton cDNAs encoding trans-2-enoyl-CoA reductase reveals a putative novel NADPH-binding motif. *J Exp Bot*, 2009, 60: 1839–1848
- [15] Food Standards Australia New Zealand. Erucic acid in food: a toxicological review and risk assessment. Technical Report Series, 2003, 21: 17–23
- [16] Fourmann M, Barret P, Renard M, Pelletier G, Delourme R, Brunel D. The two genes homologous to *Arabidopsis FAE1* co-segregate with the two loci governing erucic acid content in *Brassica napus*. *Theor Appl Genet*, 1998, 96: 852–858
- [17] Puyaubert J, Dieryck W, Costaglioli P, Chevalier S, Breton A, Lessire R. Temporal gene expression of 3-ketoacyl-CoA reductase is different in high and in low erucic acid *Brassica napus* cultivars during seed development. *Biochim Biophys Acta*, 2005, 1687: 152–163
- [18] Singh K, Raizada J, Bhardwaj P, Ghawana S, Rani A, Singh H, Kaul K, Kumar S. 26S rRNA-based internal control gene primer pair for reverse transcription-polymerase chain reaction-based quantitative expression studies in diverse plant species. *Anal Biochem*, 2004, 335: 330–333
- [19] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular Cloning, 3rd edn. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 2002
- [20] Dohmen R J, Strasser A W, Höner C B, Hollenberg C P. An efficient transformation procedure enabling long-term storage of competent cells of various yeast genera. *Yeast*, 1991, 7: 691–692
- [21] Marchler-Bauer A, Anderson J B, Chitsaz F, Derbyshire M K, DeWeese-Scott C, Fong J H, Geer L Y, Geer R C, Gonzales N R, Gwadz M, He S, Hurwitz D I, Jackson J D, Ke Z, Lanczycki C J, Liebert C A, Liu C, Lu F, Lu S, Marchler G H, Mullokandov M, Song J S, Tasneem A, Thanki N, Yamashita R A, Zhang D, Zhang N, Bryant S H. CDD: specific functional annotation with the conserved domain database. *Nucl Acids Res*, 2009, 37: 205–210
- [22] Paul S, Gable K, Dunn T M. A six-membrane-spanning topology

- for yeast and *Arabidopsis* Tsc13p, the enoyl reductases of the microsomal fatty acid elongating system. *J Biol Chem*, 2007, 282: 19237–19246
- [23] Hofmann K, Stoffel W. TMbase—a database of membrane spanning proteins segments. *Biol Chem Hoppe-Seyler*, 1993, 374: 166–167
- [24] Harlan W R Jr, Wakil S J. Synthesis of fatty acids in animal tissues: I. Incorporation of C14-acetyl coenzyme A into a variety of long chain fatty acids by subcellular particles. *J Biol Chem*, 1963, 238: 3216–3223
- [25] Qin Y, Ma Pujol F, Shi Y H, Feng J X, Liu Y M, Kastaniotis A J, Hiltunen J K, Zhu Y X. Cloning and functional characterization of two cDNAs encoding NADPH-dependent 3-ketoacyl-CoA reductase from developing cotton fibers. *Cell Res*, 2005, 15: 465–473
- [26] Costaglioli P, Joubes J, Garcia C, Stef M, Arveiler B, Lessire R, Garbay B. Profiling candidate genes involved in wax biosynthesis in *Arabidopsis thaliana* by microarray analysis. *Biochim Biophys Acta*, 2005, 1734: 247–258
- [27] Schmidt R, Acarkan A, Boivin K. Comparative structural genomics in the *Brassicaceae* family. *Plant Physiol Biochem*, 2001, 39: 253–262
- [28] Johnston J S, Pepper A E, Hall A E, Chen Z J, Hodnett G, Drabek J, Lopez R, Price H J. Evolution of genome size in *Brassicaceae*. *Ann Bot*, 2005, 95: 229–235
- [29] Rossak M, Smith M, Kunst L. Expression of the *FAEI* gene and *FAEI* promoter activity in developing seeds of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol Biol*, 2001, 46: 717–725
- [30] Lemieux B, Miquel M, Somerville C, Browse J. Mutants of *Arabidopsis* with alterations in seed lipid fatty acid composition. *Theor Appl Genet*, 1990, 80: 234–240
- [31] Kunst L, Tayl D C, Underhill E W. Fatty acid elongation in developing seeds of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol Biochem*, 1992, 30: 425–434