

甘蓝型油菜 γ -生育酚甲基转移酶基因的克隆和功能验证

钱文成, 陈德富, 王绘砖, 王永芹, 陈喜文*

南开大学生命科学学院, 天津 300071

提要: 采用 RACE 技术, 从甘蓝型油菜中克隆出一含 1 044 个碱基的开放阅读框架的 γ -生育酚甲基转移酶(γ -TMT)基因全长 cDNA。将其成熟蛋白编码区克隆进 pET21b(+)多克隆位点, 在大肠杆菌 BL21 (DE3)CodonPlus 中表达出一个分子量为 36 kDa 的融合蛋白。酶学分析显示, 重组酶具有 γ -TMT 活性。

关键词: 生育酚; γ -生育酚甲基转移酶(γ -TMT); 功能验证; 甘蓝型油菜

Gene Cloning and Function Confirmation of γ -Tocopherol Methyltransferase from *Brassica napus* L.

QIAN Wen-Cheng, CHEN De-Fu, WANG Hui-Zhuan, WANG Yong-Qin, CHEN Xi-Wen*

College of Life Sciences, Nankai University, Tianjin 300071, China

Abstract: The full-length cDNA of γ -tocopherol methyltransferase (γ -TMT) which contained a 1 044 bp open reading frame was cloned from *Brassica napus* by rapid amplification of cDNA end (RACE) method. The mature encoding region was then cloned into multiple cloning sites of pET21b(+) and a 36 kDa recombinant protein was expressed in *Escherichia coli* BL21 (DE3) CodonPlus. Enzymatic analysis indicated that the recombinant protein had γ -TMT activity.

Key words: tocopherol; γ -tocopherol methyltransferase; function confirmation; *Brassica napus*

维生素 E 是 8 种生育酚类化合物的总称, 由一个芳香杂环和类异戊二烯基侧链组成。它是一种脂溶性抗氧化剂, 是维持人体正常生理功能所必需的(Fryer 1992)。临床医学证明, 日吸收 100~400 IU 的维生素 E, 可提高人体免疫功能, 防止或延缓许多慢性病的发生, 降低患心血管疾病和某些癌症的危险。同时, 维生素 E 还可作为治疗老年性痴呆病、高血压、冠心病、心肌梗塞、动脉硬化、血栓等的辅助药物(Stampfer 等 1993; Rimm 等 1993; Buring 和 Hennekens 1997)。在 8 种维生素 E 中, α -生育酚活性最高, β 、 γ 、 δ -生育酚的活性分别是 α -生育酚的 50%、10% 和 3% (Traber 和 Sies 1996)。

维生素 E 仅由植物和某些光合细菌合成。但在维生素 E 含量最为丰富的油料作物如大豆、油菜、花生中, α -生育酚的含量较低, 仅占总生育酚的 7%~10%, 而 γ -生育酚含量则高达 60%~70%, 以致生育酚总活性很低(黄筱声 2001; Grusak 和 DellaPenna 1999)。 γ -生育酚甲基转移酶(γ -tocopherol methyltransferase, γ -TMT)

是维生素 E 生物合成途径中的限速酶, 催化 γ -生育酚向 α -生育酚的转化。尽管多种藻类及植物中 γ -TMT 基因已得到克隆(Cho 等 2005; Tavva 等 2007), 但作为油料作物的甘蓝型油菜中的 γ -TMT 基因克隆尚未见报道。本文从甘蓝型油菜中克隆出 γ -TMT 全长 cDNA, 并将其成熟蛋白编码区克隆进 pET21b(+)进行表达, 表达的重组酶能有效地将 γ -生育酚转变为 α -生育酚。现报道如下。

材料与amp;方法

甘蓝型油菜(*Brassica napus* L.)的品系 '垦 C1' (陕西省农垦研究中心李殿荣先生馈赠), 播种于 25 °C、15 h 光照/9 h 黑暗(光强约为 420 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$)的人工气候室中, 20 d 后取其叶片用于总 RNA 的提取。大肠杆菌菌株 DH5 α -FT、BL21

收稿 2007-05-16 修定 2007-06-18

资助 天津市自然科学基金重点基金(07JCZDJC03800)。

* 通讯作者(E-mail: xiwenchen@nankai.edu.cn; Tel: 022-23500133)。

(DE3)、BL21 (DE3) CodonPlus 和表达载体 pET21b (+) 由我室保存。克隆载体 pMD18-T、Ex-Taq DNA 聚合酶、DNA 连接酶、限制性内切酶、IPTG、PCR 引物等试剂均购自宝生物工程(大连)有限公司。 α -生育酚和 γ -生育酚购自于 Sigma 公司。腺苷甲硫氨酸(SAM)购自纽英伦生物技术(北京)有限公司。色谱级甲醇及异丙醇购自天津大学科威公司。

甘蓝型油菜叶片总 RNA 提取、poly (A)⁺ mRNA 分离、全长 cDNA 合成等参照 Chen 等(2003) 文中的方法。根据 GenBank 注册的 γ -TMT 序列, 设计一对兼并引物 TMT-1 [5' ATGAAAGCRACTCT-MGCASCAC 3' (R=A 或 G, M=A 或 C, S=C 或 G)] 和 TMT-2 [5' TTAGAGWGGCTTCTGGCAAGY 3' (W=A 或 T, Y=C 或 T)], 扩增甘蓝型油菜 γ -TMT 中间序列。扩增产物经琼脂糖凝胶电泳回收后克隆到 pMD18-T 上, 再转化进 DH5 α -FT, 采用菌落 PCR 和酶切等方法筛选阳性转化子后, 由北京三博远志生物有限责任公司测序。

根据所得 γ -TMT 中间序列, 设计 3'-RACE 引物 R3 (5' TATGCCTGACAAGGCCAAG 3') 和 5'-RACE 引物 R5 (5' AACCTGGCCTTGTCAGGCATA 3')。以 R3 和 Oligo(dT)-Gan [5' CGCAGAGTC(T)₃₀ 3'] 为引物扩增出 γ -TMT 的 3' 端。为了扩增出 γ -TMT 的 5' 端, 先用 Smart-5-end (5' GGTAT-CAACGCAGAGTACGCGGG 3') 和 TMT-2 为引物进行第一轮扩增, 再以 Smart-5-end 与 R5 为引物进行巢式扩增。3' 端和 5' 端序列获得后, 与中间序列拼接成甘蓝型油菜 γ -TMT 全长 cDNA, 命名为 *BnTMT*, 随后送 GenBank 注册, 作 BLAST 比对分析。

根据所得的 γ -TMT 全长序列, 设计引物 E1 (5' CGGATCCAAGCGTAGCTGTGACGGCT 3', 下划线为 *Bam*HI 酶切位点) 和 E2 (5' CAAGCTT-GAGAGGTTTCTGGCAAGTGATG 3', 下划线为 *Hind*III 酶切位点), 以全长 cDNA 为模板扩增 γ -TMT 成熟蛋白编码区。扩增产物纯化后先重组到 pMD18-T 上, 再提取阳性转化子中的重组质粒进行 *Bam*HI 和 *Hind*III 酶切。回收酶切的 γ -TMT 成熟蛋白编码区片段, 与经同样限制性内切酶消化的 pET21b (+) 载体进行连接。连接子转化入

DH5 α -FT, 测序鉴定的阳性重组子再转化入 BL21 (DE3) 或 BL21 (DE3) CodonPlus。阳性表达株于 37 ℃ 下振荡培养至 $A_{600}=0.6$ 后, 加入终浓度为 1 mmol·L⁻¹ 的 IPTG, 于 22 ℃ 条件下诱导 *BnTMT* 表达。过夜表达的菌液经离心后收集菌体沉淀, 再悬浮于 100 mmol·L⁻¹ 磷酸缓冲液 (pH 7.4) 中, 于 -80 ℃ 下作冻融处理和超声波破碎, 再以 17 400×g 转速下于 4 ℃ 离心 15 min, 上清液即为酶粗提液。粗提液以 12.5% SDS-PAGE 检测, 并用 Bradford (1976) 法测定其蛋白含量。

参照 Shintani 和 DellaPenna (1998) 的方法测定 γ -TMT 活性。250 μ L 反应体系中含 50 mmol·L⁻¹ Tris-HCl (pH 8.2)、1 mmol·L⁻¹ DTT、0.24 mmol·L⁻¹ 山梨醇、1.94 mmol·L⁻¹ γ -生育酚、1.28 mmol·L⁻¹ SAM 和 198 μ L 酶粗提液, 于 25 ℃ 下温育 1.5 h 后用氯仿/甲醇 (2:1, V/V) 终止反应。反应液于 4 ℃ 下以 27 300×g 离心 10 min, 收集氯仿层, 充氮气干燥, 溶于 40 μ L 无水乙醇中。生育酚含量分析参照 Sattler 等(2003) 文中的方法, HPLC 系统为 Agilent 1100 高效液相色谱系统 (美国安捷伦科技有限公司), 层析条件为: 反相 C18 分析柱 (进口填料为 NYQG-C18, 粒径为 5 μ m, 长 250 mm×直径 4.6 mm), 流动相为甲醇/异丙醇 (95:5, V/V), 流速固定在 1.2 mL·min⁻¹, 检测激发波长为 290 nm, 发射波长为 325 nm。 γ -TMT 活力单位 (U) 定义为每小时生成 1 nmol α -生育酚所对应的酶量。酶活性取 3 次平均值。

实验结果

1 甘蓝型油菜 γ -TMT 基因的克隆和序列分析

根据 GenBank 注册的高等植物 γ -TMT 保守区序列, 设计一对兼并引物, 从甘蓝型油菜总 cDNA 中扩增出一长为 1 044 bp 的片段。序列分析表明, 该片段与 GenBank 注册的 γ -TMT 有很高的同源性, 初步认定其为甘蓝型油菜 γ -TMT 基因片段。再用 RACE 技术, 获得该基因片段的两侧序列。经序列拼接, 获得甘蓝型油菜 γ -TMT 基因全长 cDNA 序列, 命名为 *BnTMT*, GenBank 注册号为 DQ508019。图 1 显示, *BnTMT* 全长 1 254 bp, (G+C) % = 49.14%, 5' 端起始密码子 ATG 前有一长为 41 bp 的非编码区, 3' 端终止密码子 TAA

5' GAGCCACATTTGTTGTTTCTCCAACCAACCTCTCATTATAA	ATG AAA GCG ACT CTC GCA CCA CCC TCC	68
	M K A T L A P P S	
TCT CTC ATA AGC CTC CCA AGG CAC AAA GTA TCT	TCT CTC CGT TCA CCG TCG CTT CTC CTT	128
S L I S L P R H K V S S L R S P S L L L		
CAG TCC CAA CGG CCA TCC TCA GCC TTA ATG ACA	ACG ACG GCA TCA CGT GGA AGC GTA GCT	188
Q S Q R P S S A L M T T T A S R G S	V A	
GTG ACG GCT GCT GCT ACC TCC TCC GCT GAG	GCG CTG CGA GAA GGA ATA GCG GAA TTC TAC	248
V T A A A T S S A E A L R E G I A E F Y		
AAC GAG ACG TCG GGA TTA TGG GAG GAG ATT	TGG GGA GAT CAT ATG CAT CAC GGC TTC TAC	308
N E T S G L W E E I W G D H M H H G F Y		
GAT CCC GAT TCC TCT GTT CAA CTT TCA GAT	TCC GGT CAC CGG GAA GCT CAG ATC CGG ATG	368
D P D S S V Q L S D S G H R E A Q I R M		
ATT GAA GAG TCT CTA CGT TTC GCC GGC GTT	ACT GAA GAG GAG AAA AAG ATA AAG AGA GTG	428
I E E S L R F A G V T E E K K I K R	V	
GTG GAT GTT GGG TGT GGG ATC GGA GGA	AGC TCA AGG TAT ATT GCC TCT AAA TTT GGT GCC	488
V D V G C G I G	G S S R Y I A S K F G A	
GAA TGC ATT GGC ATC ACA CTC AGT CCC	GTT CAA GCC AAG AGA GCC AAT GAT CTC GCC GCC	548
E C I G I T L S P V Q A K R A N D L A A		
GCT CAA TCA CTC TCT CAT AAG GTT TCC	TTC CAA GTT GCA GAT GCA TTG GAC CAA CCA TTT	608
A Q S L S H K V S F Q V A D A L D Q P F		
GAA GAT GGT ATT TTC GAT CTT GTT TGG	TCA ATG GAA AGC GGT GAG CAT ATG CCT GAC AAG	668
E D G I F D L V W S M E S G E H M P D K		
GCC AAG TTC GTG AAG GAA TTG GTA CGT	GTG ACG GCT CCA GGA GGA AGG ATA ATA ATA GTG	728
A K F V K E L V R	V T A P G G R I I I	V
ACA TGG TGC CAC AGA AAT CTA TCT CAA	GGG GAA GAA TCT TTG CAG CCA TGG GAG CAG GAC	788
T W C H R N L S Q G E E S L Q P W E Q D		
CTC TTG GAC AGA ATC TGC AAA ACA TTT	TAT CTC CCG GCC TGG TGC TCC ACC GAT TAT	848
L L D R I C K T F Y L P A W C S T T D Y		
GTC GAG TTG CTT CAA TCC CTC TCG CTC	CAG GAT ATT AAG TAT GCA GAT TGG TCA GAG AAC	908
V E L L Q S L S L Q D I K Y A D W S E N		
GTA GCT CCT TTC TGG CCG GCG GTT ATA	CGA ACC GCA TTA ACG TGG AAG GGC CTT GTG TCT	968
V A P F W P A V I R T A L T W K G L V S		
CTG CTT CGT AGT GGT ATG AAG AGT ATA	AAA GGA GCA TTG ACA ATT CCA TTG ATG ATT GAA	1028
L L R S G M K S I K G A L T I P L M I E		
GGG TAC AAG AAA GGT GTC ATT AAG TTT	GGC ATC ATC ACT TGC CAG AAA CCT CTC TAA GTT	1088
G Y K K G V I K F G I I T C Q K P L *		
TAATCTAAACAATAAAATTGTCGTTAAGTACTTTTTCAGCGAATTGATTCCTATCTATGATATAGGAGATGAATAAG		1167
AGTCACGTGAGAAATGTGGATGCAGAAATCCCTTGACGTCATTAATGTTTCGTTTCATGGCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA		1216
AAAAAAAA 3'		1254

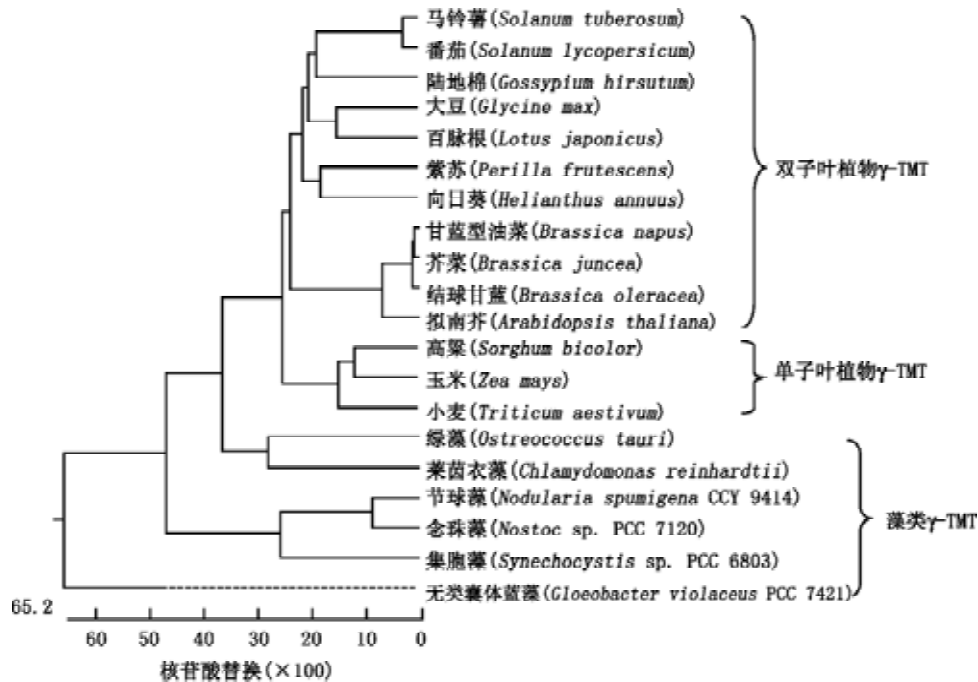
图1 *BnTMT* 全长 DNA 序列及其推导的氨基酸编码序列Fig.1 Full-length DNA sequence of *BnTMT* and its deduced amino acid sequence

推导氨基酸序列在核苷酸序列下方, 箭头所示位置为推测的叶绿体导肽切割位点, 方框为 SAM 结合结构区域, 星号所示核苷酸为终止密码子, 下划线核苷酸为聚腺苷酸化信号。

后有一长为 169 bp 的非编码区, 开放阅读框架长 1044 bp。根据 *BnTMT* 编码序列, 推导该多肽长为 347 个氨基酸, 分子量为 38.2 kDa, $pI=6.76$, 在 N 端有一由 47 个氨基酸组成的叶绿体导肽。在多肽的第 129~137 和第 219~228 位置上各有一保守的 SAM 结合结构域。整个序列与报道的其他物种 γ -TMT 有较高的同源性, 据此认定该 cDNA 是完整的, 其编码的蛋白质是依赖 SAM 提供甲基的 γ -TMT。

图 2 是 *BnTMT* 与其他 19 种 γ -TMT 氨基酸序列比对结果, 反映了 γ -TMT 在进化中的相对保守

性——从藻类到高等植物, 均依赖 SAM 提供的甲基催化 γ -生育酚生成 α -生育酚。图 2 还显示, 尽管单子叶植物与双子叶植物来源的 γ -TMT 分成两大类, 但都与藻类 γ -TMT 相差甚远, 反映 γ -TMT 的进化与其物种进化高度一致。从同源数值来看, *BnTMT* 与其他 γ -TMT 的同源性介于 42.8%~99.1% 之间, 差异主要集中于 N 端, 尤其是导肽切割位点前。*BnTMT* 与十字花科的芥菜、结球甘蓝和拟南芥的 γ -TMT 亲缘关系最近, 其中与芥菜 γ -TMT 仅差 0.9%; 与藻类 γ -TMT 亲缘关系最远, 差异高达 57.2%。

图2 不同物种 γ -TMT的MegAlign图Fig.2 MegAlign profile of γ -TMTs from different species

MegAlign用DNASar-Lasergene(Ver 6.1)中的Clustal W方法。聚类分析用的20种 γ -TMT分别来源于马铃薯(DQ456877)、番茄(DQ456876)、陆地棉(DQ456880)、大豆(AY960126)、百脉根(DQ013360)、紫苏(AF213481)、向日葵(DQ229831)、甘蓝型油菜(DQ508019, 本文所得序列)、芥菜(DQ864978)、结球甘蓝(AF381248)、拟南芥(AF104220)、高粱(AF527809)、玉米(DQ456879)、小麦(DQ139266)、绿藻(CR954216)、莱茵衣藻(AJ884948)、节球藻(NZ_AAVW01000001)、念珠藻(NC_003272)、集胞藻(NC_000911)和无类囊体蓝藻(NC_005125)。

2 甘蓝型油菜 γ -TMT成熟蛋白编码区在大肠杆菌中的表达

BnTMT的N端具有叶绿体导肽,前体BnTMT在导肽的牵引下进入叶绿体。对于大肠杆菌表达系统而言,导肽的存在可能影响重组酶功能,因此在构建表达载体时应将其去除。为此,本文在BnTMT全长序列基础上又设计了一对引物E1和E2,以扩增BnTMT成熟蛋白编码区。阳性转化子序列分析显示,去除导肽序列的903 bp编码序列已成功地被克隆进pET21b(+)*Bam*HI与*Hind*III位点之间,其转录受T7启动子控制。转录的mRNA在理论上可表达出328个氨基酸残基组成的分子量为36.3 kDa的融合蛋白。

遗传密码分析显示,BnTMT上有较多大肠杆菌稀有密码子,因此本文比较了其在BL21(DE3)和BL21(DE3)CodonPlus中的表达效果,其中BL21(DE3)CodonPlus携有编码稀有密码子tRNA基因。SDS-PAGE检测发现,在BL21(DE3)的上

清液和沉淀中即使优化表达条件(温度、IPTG浓度、IPTG诱导时的菌体初始浓度及诱导时间),也不能发现分子量为36 kDa的特异条带;在BL21(DE3)CodonPlus上清液中虽然没有明显的特异条带,但在其沉淀中可清楚地看见一条36 kDa大小的特异条带(图3),显示BnTMT在BL21(DE3)

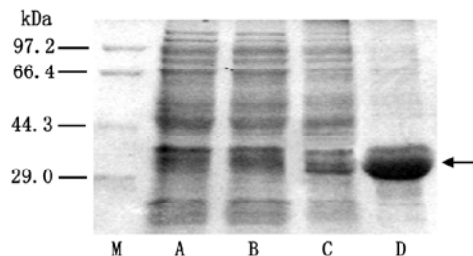


图3 BnTMT在BL21(DE3)CodonPlus中的表达

Fig.3 The expression of BnTMT in BL21(DE3)CodonPlus

M: 蛋白分子量标准物(kDa); A: pET21b(+)*BnTMT*菌液上清液; B: pET21b(+)-*BnTMT*菌液上清液; C: pET21b(+)*BnTMT*菌液沉淀; D: pET21b(+)-*BnTMT*菌液沉淀。箭头所示为BnTMT融合蛋白。

CodonPlus 中主要以包涵体形式表达。

3 甘蓝型油菜 γ -TMT重组酶的活性分析

尽管对 *BnTMT* 在 BL21 (DE3) CodonPlus 中的表达条件进行了多方面优化, 但从 SDS-PAGE 图谱来看, 包涵体问题仍未得到有效解决, 为此我们以大肠杆菌破碎液的上清液(即酶粗提液)进行 *BnTMT* 酶活性分析。在粗提液中加入 γ -生育酚和 SAM, 25 °C 下温育 1.5 h 后, 用 HPLC 法测定生育酚的变化, 结果在反应产物中出现了新的对称峰(图 4), 其峰形和保留时间(11 min)与 α -生育酚

标准品一致, 同时, 其底物 γ -生育酚的峰面积也相应减少。说明酶粗提液中存在活性 γ -TMT, 此酶以 SAM 为甲基供体将 γ -生育酚转变为 α -生育酚。按照峰形面积, 计算出酶比活力约为 24.7 U·mg⁻¹ (蛋白), 比 Shintani 和 DellaPenna (1998) 报道的另一大肠杆菌菌株中表达的拟南芥和集胞藻 (*Synechocystis* sp. PCC 6803) γ -TMT 比活性高。显示 *BnTMT* 在 BL21 (DE3) CodonPlus 中有较高的 γ -TMT 活性。而在含 pET21b (+)-*BnTMT* 的 BL21 (DE3) 上清液中则未见到明显的峰形变化。

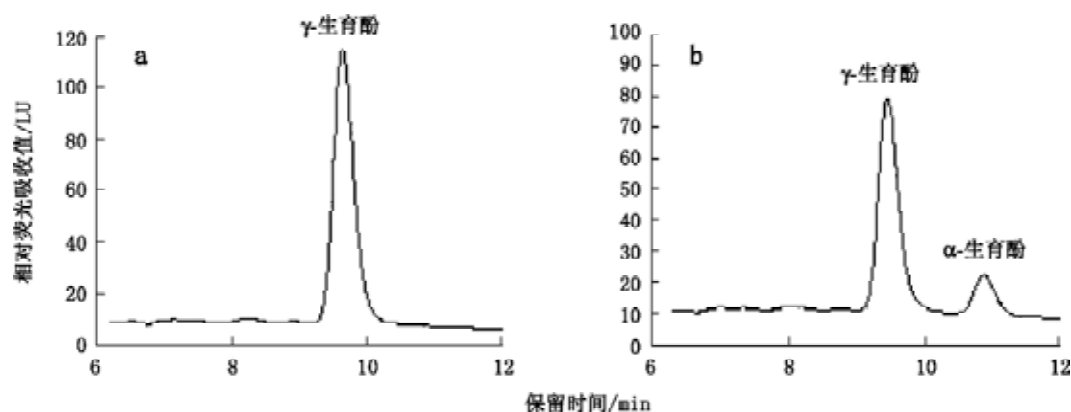


图4 BL21 (DE3) CodonPlus 表达的 *BnTMT* 的 γ -TMT 活性

Fig.4 γ -TMT activity of *BnTMT* produced in BL21 (DE3) CodonPlus

a : pET21b (+) 菌上清液; b : pET21b (+)-*BnTMT* 菌上清液。

讨 论

本文从甘蓝型油菜中克隆出 γ -TMT 基因全长 cDNA 序列, 将其成熟蛋白编码区克隆入表达载体, 可在大肠杆菌 BL21 (DE3) CodonPlus 中高效表达, 表达出的重组蛋白具有明显的 γ -TMT 活性。从而证实 *BnTMT* 克隆是真实的, 其编码的蛋白质是 γ -TMT 家族的一员。同源性分析显示, 甘蓝型油菜的 γ -TMT 与目前注册的 γ -TMT 有较高的同源性。2 个 SAM 结合结构域及其附近氨基酸序列的同源性很高, 尤其是第一个 SAM 结合结构域内的后 7 个氨基酸(DVGCGIG)在目前已注册的 20 多种序列中几乎完全同源, 其余氨基酸变化也多限于生理功能相似氨基酸间, 如 V 与 I、L 等。 γ -TMT 的这种保守性证实 SAM 结合结构域及其附近氨基酸序列在长期进化过程中承受着较大的功能选择压力。

γ -TMT 的 N 端有一段叶绿体导肽, 负责引导未成熟 γ -TMT 进入叶绿体。不同 γ -TMT 的导肽差异较大。如十字花科的芥菜、结球甘蓝和拟南芥的导肽均为 47 个氨基酸(欧阳青等 2003), 同源性介于 52.1%~100% 之间, 但与由 25 个氨基酸组成的集胞藻导肽几乎没有同源性。根据芥菜、结球甘蓝、拟南芥 γ -TMT 的导肽特征, 我们推导甘蓝型油菜导肽长也是 47 个氨基酸, 后续功能实验证实, 这种预测是对的。

本文之所以采用 BL21 (DE3) 和 BL21 (DE3) CodonPlus 两种大肠杆菌菌株表达 *BnTMT*, 是考虑到基因序列上存在较多的大肠杆菌稀有密码子, 其中有 8 个 Arg、7 个 Ile、2 个 Pro、2 个 Leu, 占整个编码区的 6.3%。由于 BL21 (DE3) CodonPlus 携带稀有密码子 tRNA 基因, 能在一定程度上解决稀有密码子问题, 本文结果也证实了这一点。有关选择菌株方法解决稀有密码子的类似报道还有许

多(Kane 1995; Ivanov 等 1997; 王涛等 2000; Kim 和 Lee 2006)。尽管在 SDS-PAGE 中难以检测到可溶状态的重组酶, 但体外酶活性测定结果证明, 上清液中仍表达出具有很好生物学活性的重组酶, 这为今后继续采用该基因进行代谢工程研究提供了基础。

参考文献

- 黄筱声(2001). 天然维生素 E 与人体健康. 粮食与油脂, 9: 35~36
- 欧阳青, 樊春涛, 孙卉, 张玉满, 白双义, 蔡文启(2003). 结球甘蓝 γ -生育酚甲基转移酶 cDNA 的克隆、分析及其异源表达酶蛋白的功能研究. 自然科学进展, 13 (7): 709~715
- 王涛, 周先碗, 胡美浩(2000). 人尿激酶原在大肠杆菌中表达的研究. 北京大学学报, 36 (6): 802~807
- Bradford MM (1976). A rapid sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem, 72: 248~254
- Buring JE, Hennekens CH (1997). Antioxidant vitamins and cardiovascular disease. Nutr Rev, 55: S53~S60
- Chen D, Kawarasaki Y, Nakano H, Yamane T (2003). Cloning and *in vitro* and *in vivo* expression of plant glutathione S-transferase zeta class genes. J Biosci Bioeng, 95: 594~600
- Cho EA, Lee CA, Kim YS, Baek SH, de los Reyes BG, Yun SJ (2005). Expression of gamma-tocopherol methyltransferase transgene improves tocopherol composition in lettuce (*Lactuca sativa* L.). Mol Cells, 19: 16~22
- Fryer MJ (1992). The antioxidant effects of thylakoid vitamin E (α -tocopherol). Plant Cell Environ, 15: 381~392
- Grusak MA, DellaPenna D (1999). Improving the nutrient composition of plants to enhance human nutrition and health. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol, 50: 133~161
- Ivanov IG, Saraffova AA, Abouhaidar MG (1997). Unusual effect of clusters of rare arginine (AGG) codons on the expression of human interferon α 1 gene in *Escherichia coli*. Int J Biochem Cell Biol, 29 (4): 659~666
- Kane JF (1995). Effects of rare codon clusters on high-level expression of heterologous proteins in *Escherichia coli*. Curr Opin Biotechnol, 6 (5): 494~500
- Kim S, Lee SB (2006). Rare codon clusters at 5'-end influence heterologous expression of archaeal gene in *Escherichia coli*. Protein Expr Purif, 50 (1): 49~57
- Rimm EB, Stampfer MJ, Ascherio A, Giovannucci E, Colditz GA, Willett WC (1993). Vitamin E consumption and the risk of coronary heart disease in men. New Engl J Med, 328: 1450~1456
- Sattler SE, Cahoon EB, Coughlan SJ, DellaPenna D (2003). Characterization of tocopherol cyclases from higher plants and cyanobacteria. Evolutionary implications for tocopherol synthesis and function. Plant Physiol, 132: 2184~2195
- Shintani D, DellaPenna D (1998). Elevating the vitamin E content of plants through metabolic engineering. Science, 282 (5396): 2098~2100
- Stampfer MJ, Hennekens CH, Manson JE, Colditz GA, Rosner B, Willett WC (1993). Vitamin E consumption and the risk of coronary disease in women. New Engl J Med, 328: 1444~1449
- Tavva VS, Kim YH, Kagan IA, Dinkins RD, Kim KH, Collins GB (2007). Increased alpha-tocopherol content in soybean seed overexpressing the *Perilla frutescens* gamma-tocopherol methyltransferase gene. Plant Cell Rep, 26 (1): 61~70
- Traber MG, Sies H (1996). Vitamin E in humans: demand and delivery. Annu Rev Nutr, 16: 321~347