

油桐*VfFATB1*基因的克隆及其功能的初步分析

刘美兰, 龙洪旭, 谭晓风*

中南林业科技大学, 经济林培育与保护省部共建教育部重点实验室, 长沙410004

摘要: 以油桐转录组数据中*FATB1*基因的cDNA片段为模板, 通过RACE技术克隆获得该基因的CDS, 命名为*VfFATB1*, 并进行了生物信息学分析, 同时通过Real-time PCR和亚细胞定位对该基因的表达模式和表达部位进行了研究分析。结果表明*VfFATB1*是一个由8个 α -螺旋和10个 β -折叠组成“hot-dog”折叠结构的二聚体, 与*JcFATB1*相似度高达92%; 该基因有FAT重要催化作用的半胱氨酸活性位点Cys320和3个保守的组氨酸位点His140/285/345; 该基因在油脂合成后期种仁中的表达量最高, 是幼根的30倍左右, 且在油脂合成过程中一直是上调状态; 该基因定位于叶绿体中。综上所述, *VfFATB1*是一个位于叶绿体中且含有多个催化功能结构的蛋白, 表达模式与油脂积累相同, 因此它可能与油脂合成有着密切的关系, 这为油桐的遗传改良提供了潜在的基因资源。

关键词: 油桐; 脂肪酸生物合成; *FATB1*; 生物信息学; 表达模式; 亚细胞定位

油桐(*Vernicia fordii*)是我国四大木本油料树种(油桐、油茶、核桃、乌桕)之一, 其种子榨出的桐油是一种优良的干性植物油, 具有干燥快、比重轻、有光泽、防湿等特性, 是高级油漆、涂料工业的重要原料, 又可供制生物柴油、人造橡胶、医药等(谭晓风2006)。桐酸是桐油中的主要脂肪酸, 含量高达80%左右(W/W), 桐酸含量的高低决定了桐油的品质及其在工业上的用途(何方2005)。植物种子脂肪酸的生物合成在质体中进行, 首先乙酰辅酶A在乙酰辅酶A羧化酶(acetyl coenzyme A carboxylase, ACCase)的催化下生成丙二酸单酰辅酶A, 随后丙二酸单酰辅酶A在脂肪酸合成酶复合体系(fatty acid synthetase, FAS)的作用下进行连续的聚合反应, 每次循环使碳链延长2个碳原子, 最后由脂肪酸-酰基载体蛋白硫酯酶(fatty acyl-ACP thioesterase, FAT)将脂肪酸链从酰基载体蛋白中释放出自由的脂肪酸(Harwood 2005)。因此, FAT决定存贮油脂中脂肪酸碳链的长度和脂肪酸的种类。

植物FAT是一种核编码蛋白, 由N端的转运肽定向于质体中的功能二聚体(Voelker等1992; McKeon和Stumpf 1982; Hellyer等1992)。根据它们的氨基酸序列可分为两种类型: FATA和FATB (Jones等1995; Mekhedov等2000), FATA主要负责18:1-ACP等长链脂肪酸的释放(Knutzon等1992; Hawkins和Kridl 1998; Serrano-Vega等2005), 而FATB主要负责碳链长为8~18饱和脂肪酸的释放(Voelker等1997; Salas和Ohlroggt 2002)。拟南芥基因组数据中发现2个FATA和1个FATB (Beisson等2003), 很多植物的*FATB*基因已被克隆出来, 它们的底物特性

也在细菌体内得到了验证。值得注意的是16:0-ACP硫酯酶基因作为持家基因存在于所有植物组织中, 其在花中的表达量最高(Dlrmann等2000), 而特异性催化生成中链脂肪酸的*FATB*基因只在处于发育阶段的胚中表达(Dehesh等1996b)。在加利福尼亚月桂树中找到了能使月桂酸含量增加的12:0-ACP硫酯酶, 并证明了12:0-ACP硫酯酶具有决定从头合成的脂肪酸链长的特性(Bonaventure等2003)。从萼距花种子中获得的16:0-ACP硫酯酶可以使油菜富含C16:0脂肪酸, 而山竹果的18:0-ACP硫酯酶则可使油菜籽中C18:0从原来的1%增加到20% (Facciotti等1999)。从麻疯树上获得的*Jc-FATB1*表达于所有的组织中, 且在种子发育后期表达量最高, 经转基因植株发现该基因主要催化C16:0脂肪酸的释放(Wu等2009)。从产麻黄油的植物中获得的*FATB*基因在大肠杆菌中表达后, 可明显增加C16:0在培养基上清液中的含量(Jha等2006)。对毛白杨*PtFATB*进行的研究发现该基因对毛白杨的抗旱性有着重要作用(Zhou等2007)。

油桐种子中含有大量的桐油, 因此以油桐为材料研究*FATB1*基因在桐油合成过程中的作用不仅能阐述木本植物的油脂合成代谢机理, 同时有望在此基础上通过生物技术的手段对油桐进行遗传改良, 提高桐油的产量, 改善桐油的品质, 这对于开发我国生物质能源, 提高我国能源自给能力

收稿 2016-03-09 修定 2016-05-13

资助 国家林业公益性行业科研专项重点项目(201204403)。

* 通讯作者(E-mail: tanxiaofengcn@126.com)。

具有重要的战略意义。然而,相对于麻风树、蓖麻等研究较早的油料树种而言,目前对油桐的研究主要集中于生产栽培和常规育种,相关分子生物学研究相对较少且不够深入。造成这一现象的主要原因是缺少相关的参考信息而无法进行深入研究,新一代转录组测序(RNA-seq)技术的发展则为解决这一难题提供了必要的技术手段。本研究对通过RNA-seq技术获得的油桐种子转录组数据库进行分析,发现*VjFATB1*基因在油桐种子发育期大量表达,随后在此基础上克隆了*VjFATB1*基因,并对其表达变化规律和特征进行了详细的探讨。这一研究结果将为油桐乃至木本植物油脂合成代谢机理的阐述提供理论参考。此外,本研究结果也为油桐的遗传改良提供了潜在的基因资源。

材料与方 法

1 供试材料和实验试剂

油桐[*Vernicia fordii* (Hemsl.) Airy-shawy]品种‘葡萄桐’(来源于中南林业科技大学油桐试验基地——国家油桐种质资源保存库);大肠杆菌Trans-T1、2×EasyTaq PCR SuperMix、pEASY-Blunt Simple Cloning Kit均购自全式金公司;Pure-Link™ RNA Mini Kit、SMARTer™ RACE cDNA Amplification Kit、Gateway重组酶购自Invitrogen公司;PrimeSTAR HS DNA Polymerase高保真DNA聚合酶、*LA Taq*酶、定量PCR试剂2×SYBR Green qPCR Mix、PrimeScript® TR reagent Kit购自TaKa-

Ra公司;RvertAid First Stand cDNA Synthesis Kit购自Fermentas公司;Plant Genomic DNA Kit购自TIANGEN公司;PCR回收试剂盒为安比奥生物技术有限公司的Gel Extraction Kit;引物合成及测序结果由华大基因完成,其他试剂均为分析纯。

2 方 法

2.1 油桐总RNA和DNA的提取及cDNA的合成

油桐种子总RNA采用RNA提取试剂盒和CTAB裂解法抽提,DNA采用DNA提取试剂盒抽提,利用1.0%和1.5%琼脂糖凝胶电泳分别检测总RNA和基因组DNA的完整性,用紫外可见分光光度计(Lambda35, Perkin Elmer, USA)检测核酸的纯度,按照Fermentas公司的逆转录试剂盒说明书合成油桐cDNA的第一条链。

2.2 *VjFATB1*基因CDS和基因组DNA的克隆

根据油桐种子转录组数据分析得到长度为854 bp的*FATB1*基因片段,以此为模板,利用Primer Premier 5软件设计5' RACE和3' RACE引物,具体方法按照Invitrogen公司的SMARTer™ RACE cDNA Amplification Kit的操作手册进行。根据RACE得到的序列信息,拼接后设计全长引物扩增全长CDS和基因组DNA序列,回收全长CDS和基因组DNA扩增片段,分别与pEASY-Blunt Simple Cloning Vector连接,然后转化大肠杆菌Trans-T1感受态细胞,平板培养基培养后挑菌用载体通用引物M13F/R和片段特异引物进行PCR鉴定,并将鉴定的阳性克隆样品测序。各引物序列见表1,PCR扩增程序见说明书。

表1 *VjFATB1*引物序列

Table 1 Primer sequence of *VjFATB1*

引物名称	序列(5'→3')	用途	PCR扩增温度/°C
FATB1-F	GCTGCTATTACAACATATATT	<i>VjFATB1</i> 的中间片段扩增	56
FATB1-R	TGGCACTCAATTCACCCGC		
FATB1-GSP1	AGTCCAGCAGTCTAACATGAT	5'RACE扩增	55
FATB1-GSP2	TAACCTCTAGATGGAGTGAT	3'RACE扩增	50
CDS_FATB1-F	CTGGCTGCTGTAAGAAGTCTGCTC	<i>VjFATB1</i> 的CDS和基因组扩增	56
CDS_FATB1-R	AATCTCCTTAGTCACAATGCCTG		
Q-FATB1-F	AAAGGAGAAATAGAGCC	<i>VjFATB1</i> 实时定量RT-PCR	55
Q-FATB1-R	GACAACACTGCGGACTA		
EF1 α -F	GCCTGGTATGGTTGTGACCT	EF1 α 实时定量RT-PCR	55
EF1 α -R	GGATCATCCTTGGAGTTGGA		
YFATB1-F	GGGGACAACCTTTGTACAAAAAAGTTG		
	GAATGGTTGCTACTGCTGCTACTTCCT	VjFATB1亚细胞定位载体构建	64
YFATB1-R	GGCGCCGCACAACCTTTGTACAAGAAAGT		
	TGGGTAAGCACTTCAGCTGGAATCTGACC		

2.3 生物信息学分析

在NCBI BLAST网站上对序列结果进行检索, 利用本地软件Vector NTI 10.3.0和GENDOC对序列进行比对分析和翻译, 用MEGA 5.1对多个树种的蛋白质序列进行比对并构建系统树。利用在线软件ProtParam、PredicProtein、TMpred Server和Mobyly portal分别分析目的序列理化性质和预测目的蛋白的保守结构域和跨膜结构; 利用在线SOPMA软件预测分析蛋白质二级结构, 并用在线SWISS-MODEL和EsyPred3Dwebserver 1.0预测蛋白质三级结构, 并用本地软件UCSF Chimera 1.8rc对三级结构进行模拟。

2.4 实时荧光定量PCR

油桐12个组织和9个时期种子总RNA采用RNA提取试剂盒和CTAB裂解法抽提, 利用1.0%的琼脂糖凝胶电泳检测总RNA的完整性, 用紫外可见分光光度计检测核酸的纯度, 按照TaKaRa公司的荧光定量逆转录试剂盒说明书合成各组织和各时期种子cDNA的第一条链。以油桐不同组织和不同时期种子的cDNA为模板, 油桐的持家基因 $EF1\alpha$ 为内参, 引物序列 $EF1\alpha$ -F和 $EF1\alpha$ -R见表1, ddH₂O为阴性对照, 根据*VfFATB1*基因序列设计检测*VfFATB1*基因表达量的引物Q-FATB-F和Q-FATB-R (表1), 其扩增长度为95 bp, 且琼脂糖凝胶电泳检测结果表明, Q-FATB1-F和Q-FATB1-R只扩增出预期大小的片段, 没有引物二聚体。实时荧光定量PCR的具体反应体系和反应程序见TaKaRa说明书, 每个反应重复3次。使用BIO-RAD公司Mini option定量PCR仪, 96孔板完成PCR反应。

2.5 *VfFATB1*亚细胞定位

用Gateway克隆系统方法将*VfFATB1*目的基因插入pEarleyGate 104 (N-YFP)载体中, 并转化至农杆菌Gv3101细胞中。采用农杆菌侵染法将带有*VfFATB1*基因的农杆菌注射至野生型八叶期红化烟草叶片下表皮细胞里, 暗培养10 h后光照培养48 h取叶片进行观察分析。取干净的载玻片, 在中央滴1滴纯净水, 从烟草叶片上取边长为0.5 cm正方形大小叶置于载玻片上, 平铺于载玻片中央(尽量避免气泡产生), 倒置于激光共聚焦显微镜(LSM 510)下进行观察。荧光成像参数: YFP激发光477 nm, 接收滤镜503~530 nm; 叶绿体激发光543 nm, 接收滤镜585 nm。

实验结果

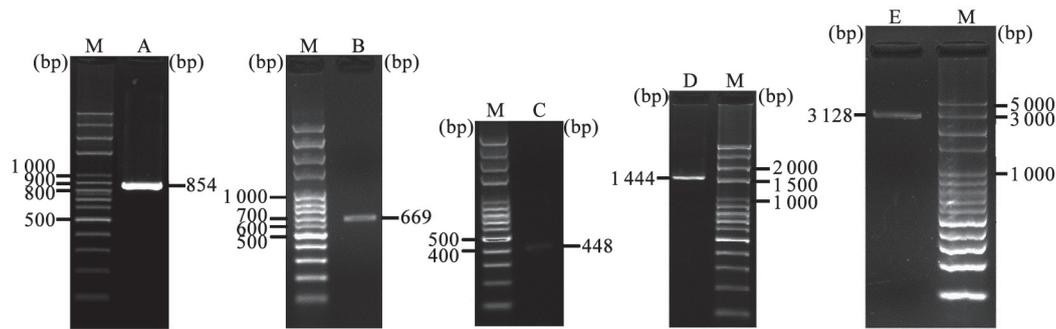
1 *VfFATB1*基因克隆

将转录组数据中获得的*FATB1*基因854 bp的cDNA片段(图1-A)与通过RACE技术克隆的5'端(图1-B)和3'端(图1-C)序列进行拼接, 得到了*FATB1*基因的全长cDNA序列。随后在拼接序列的5'端和3'端设计引物, 以总cDNA为模板对其进行PCR扩增, 扩增产物进行测序后获得了一条长为1 444 bp的序列(图1-D), 它与拼接序列完全一致。*FATB1*基因的CDS编码区为1 257 bp, 编码418个氨基酸, 含量最高的氨基酸是色氨酸和亮氨酸, 它们各占8.9%, 含量最少的是半胱氨酸, 仅占0.5%, 该蛋白分子量为46 kDa; 等电点为6.07; 理论推导半衰期为30 h; 编码蛋白的原子组成分别为C₂₀₄₄H₃₂₅₄N₅₆₈O₆₂₄S₁₆; 不稳定系数为40.96 (说明这个蛋白是不稳定性蛋白); 脂肪系数为83.73, 总平均亲水性分别为-0.337 (说明这个蛋白是亲水性蛋白), 该基因序列信息已提交至GenBank, 登录号为KF891943。在此基础上, 通过PCR获得了一条长为3 128 bp的基因组序列(图1-E), 在线软件分析表明该序列有9个内含子。以上序列的克隆为后续深入研究*VfFATB1*基因的功能奠定了基础。

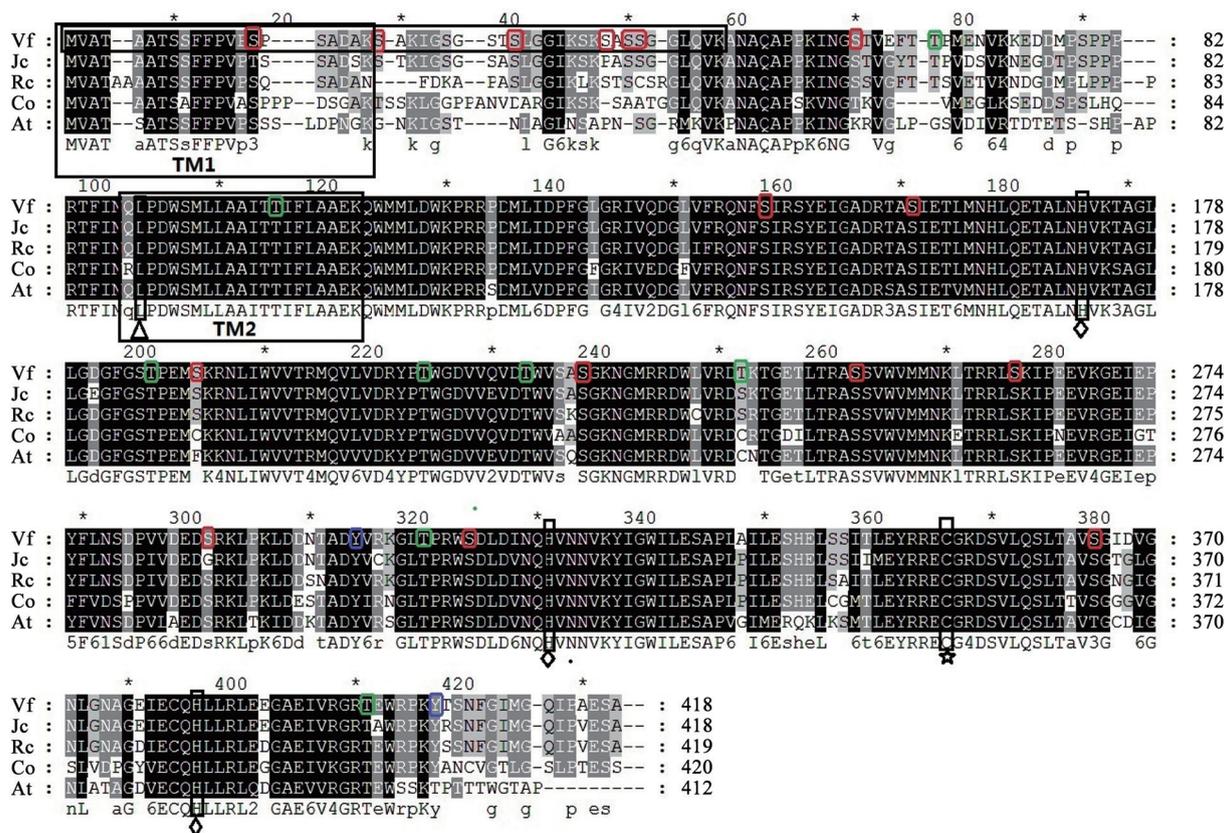
2 *VfFATB1*基因的生物信息学分析

跨膜拓扑结构预测发现VfFATB1蛋白具有2个跨膜域, 分别位于1~21 aa和88~108 aa区域。磷酸化位点预测分析表明VfFATB1蛋白有16个丝氨酸、6个苏氨酸和2个酪氨酸磷酸化位点。转运肽预测分析发现VfFATB1蛋白N端43 aa为叶绿体转运肽。保守结构域预测分析表明VfFATB1蛋白除了具有3个酶活性位点和3个蛋白结合位点外, 还具有1个acyl-thio_N高度同源区域、1个hot_dog结构域和2个4HBT保守结构域, 属于hot-dog超基因家族的成员。经序列比对和分析在VfFATB1蛋白中发现了植物FAT中非常重要且保守的半胱氨酸活性位点Cys320和3个保守的组氨酸位点His140/285/345, 以及一个裂解位点Leu89 (图2)。

根据在线SOPMA软件的预测, VfFATB1蛋白的二级结构包含34.45%的 α -螺旋(Hh)、13.40%的 β -折叠(Ee)、4.55%的 β -转角(Tt)和47.61%的随机卷曲(Cc)。利用在线SWISS-MODEL和EsyPred3Dwebserver 1.0对VfFATB1蛋白的三级结构进行预测, 并

图1 油桐 *VfFATB1* PCR扩增产物Fig.1 PCR amplification product of *FATB1* gene from *V. fordii*

A: 中间片段扩增产物; B: 5'RACE扩增产物; C: 3'RACE扩增产物; D: *VfFATB1*的cDNA全长扩增片段; E: *VfFATB1*基因组扩增片段。M: 分子量标准。

图2 *VfFATB1*与其他植物FATB1的氨基酸序列比对Fig.2 Alignment of deduced amino acids of *VfFATB1* and other plant *FATB1*-like genes

红色、绿色和蓝色小框为磷酸化位点, ◇: 保守组氨酸位点; ☆: 半胱氨酸位点; △: 裂解位点; TM1/2: 跨膜结构域; Vf: 油桐; Jc: 麻疯树; Rc: 蓖麻; Co: 油菜; At: 拟南芥。

用本地软件UCSF Chimera 1.8rc对三级结构进行模拟后发现, *VfFATB1*有8个 α -螺旋和10个 β -折叠(图3-A), 多个重复的 α -螺旋和 β -折叠结构组成一个hot-dog的折叠结构(图3-B)。

利用软件Vector NTI 10.3.0和GENDOC进行*VfFATB1*同源性比对发现, *VfFATB1*与其他植物的FATB1之间具有较高的相似度, 其中与麻疯树(*Jatropha curcas*)的序列相似度高达92% (图4), 与

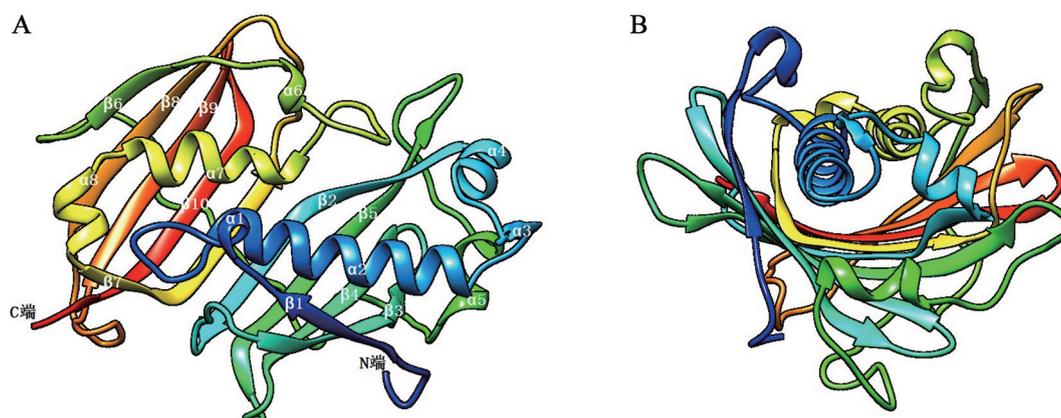


图3 VfFATB1三级结构模型预测

Fig.3 Tertiary structure of VfFATB1

A为彩带立体图; B为Hot-dog折叠结构。

蓖麻(*Ricinus communis*)的相似度达89%, 此外该蛋白序列的C端序列非常保守, N端特异性非常强(图2)。用软件MEGA 5.1中的Neighbor-joining方法进

行系统演化分析发现, VfFATB1与JcFATB1的亲缘关系最近, 同时可发现VfFATB1与其他物种具有相同的祖先和相似的功能特征(图4)。

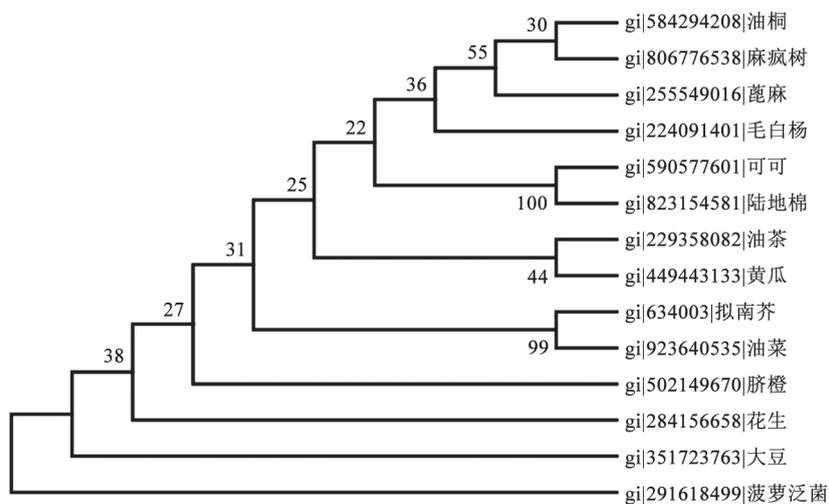


图4 VfFATB1蛋白和其他植物FATB1蛋白的进化关系分析

Fig.4 Phylogenetic tree of the predict VfFATB1 and other homologous proteins from different species

模型为松柏修正, Bootstrap的值大于500。

3 VfFATB1基因的表达模式分析

3.1 VfFATB1基因在不同组织中的表达模式分析

采用实时荧光定量PCR对油桐幼根、茎、叶、叶柄、雄蕊、萼片、柱头、花瓣、子房、种仁、种皮和种柄12个组织中 *VfFATB1* 基因的表达量进行分析, 以油桐持家基因 *EF1a* 作为内参基因, 以幼根为参照, 其表达水平设置为1, 相对表达量结果显示 *Vf*-

FATB1 基因在12个组织中均有表达, 但存在差异, 其中在种仁的表达量是幼根的30倍, 其次在花的各组织中雄蕊、萼片、柱头、花瓣和子房分别是幼根的14、6、5、2和2倍, 而种皮、种柄、茎、叶和叶柄分别是幼根的2、2、3、3和4倍, *VfFATB1* 在所有组织中的表达量从大到小依次为: 种仁>雄蕊>萼片>柱头>叶柄>叶>茎>种柄>种皮>花瓣>子房>幼根(图5-A)。

3.2 *VjFATB1*基因在种子不同发育时期的表达模式分析

采用实时荧光定量PCR对处于9个不同发育时期的油桐种仁中*VjFATB1*基因的表达量进行分析,以油桐持家基因*EF1 α* 作为内参基因,以6月1日为校正器,其表达水平设置为1,结果表明,种仁中*VjFATB1*基因随着种仁的不断发育成熟表达量逐进升高,6月15日是6月1日的1倍,7月1日和15日分别是6月1日的2倍和3倍;8月1日和15日分别是6月1日的4倍和8倍;9月1日和15日分别是6月1日的8

倍和9倍;10月1日是6月1日的11倍(图5-B)。

4 *VjFATB1*基因的亚细胞定位分析

将重组质粒pEarleyGate 104-*VjFATB1*转入农杆菌Gv3101,采用农杆菌侵染法侵染八叶期烟草叶片,暗培养10 h后光照培养48 h取叶片利用激光共聚焦显微镜进行观察,发现该融合蛋白的荧光集中在叶绿体中(图6-A),通过和叶片叶绿体自发荧光(图6-B)、白光(图6-C)进行共定位发现,它们完全一致(图6-D),这一结果与生物信息学预测结果相同,因此*VjFATB1*定位于叶绿体中。

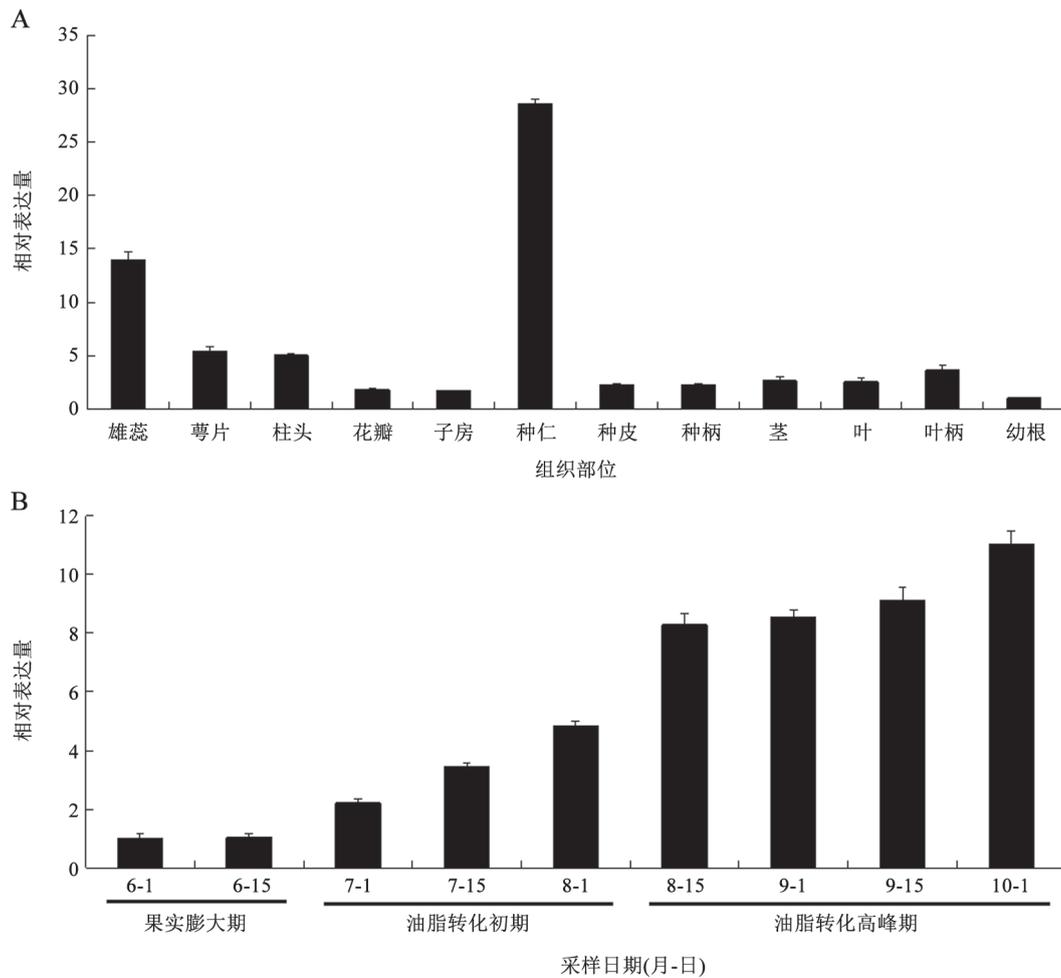


图5 *VjFATB1*基因特异表达模式分析

Fig.5 The expression pattern analysis of *VjFATB1*

A为不同组织中的表达模式分析; B为种子不同发育时期的表达模式分析。

讨 论

植物FAT是直接决定脂肪酸从头合成不同脂

肪酸酰基链长度的关键酶(Voelker等1992),它可通过影响游离脂肪酸的数目和种类,从而进一步影响超长链脂肪酸的合成,这对植物的遗传改良和

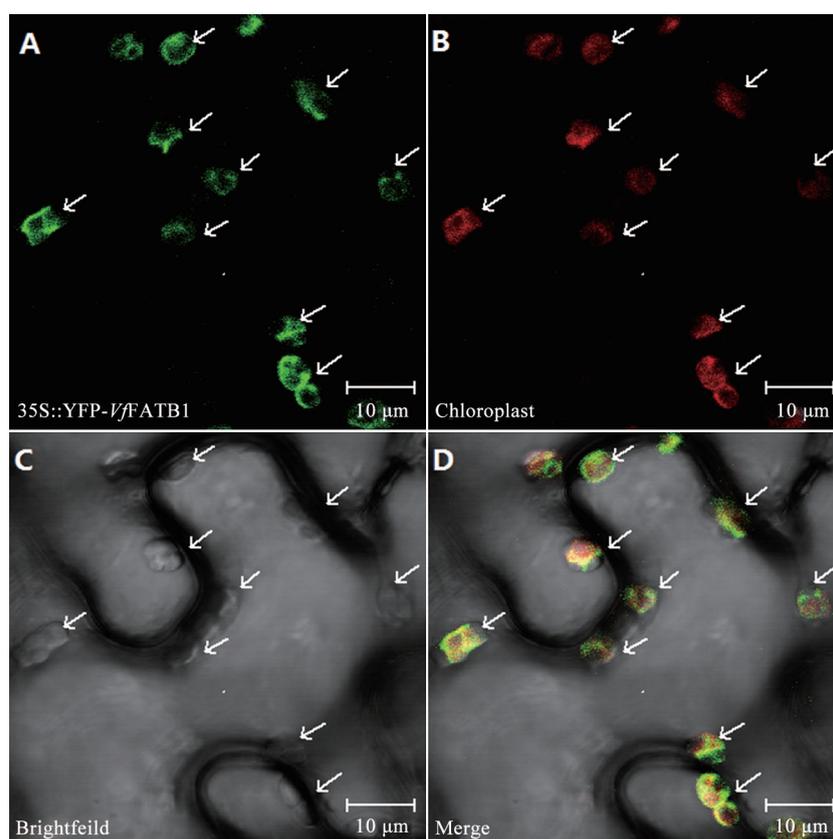


图6 VfFATB1蛋白的亚细胞定位

Fig.6 Subcellular of VfFATB1 localization

A-D分别是VfFATB1蛋白的荧光蛋白、叶绿体自发荧光、白光、共定位图,箭头是定位点。

植物油脂品质的改善具有重要意义(Raffaele等2008)。很多FATB基因已被特征分析,比如一些植物的中长链脂肪如加利福尼亚月桂树中的12:0-ACP硫酯酶和萼距花中的8:0-ACP硫酯酶都被发现并验证(Dehesh等1996)。此外,少量的FATB结构和底物特异性也被分析探讨出来了(Doermann等1995; Mayer和Shamklin 2005, 2007)。但是更多植物的FATB需要分析它潜在功能,特别是在调控植物油脂中脂肪酸成分的组成上。

本研究在对3个不同发育时期的油桐转录组数据进行分析的基础上,利用RT-PCR和RACE技术克隆了*VfFATB1*基因,生物信息学分析该蛋白发现它存在FAT重要的结构域,同源比对分析发现VfFATB1与麻疯树JcFATB1相似度高达92%,且该蛋白序列的N端存在叶绿体转运肽,这与向日葵种子中脂肪酸生物合成途径中的 β -羟酰-酰基载体蛋白脱氢酶(β -hydroxyacyl-[acyl-ACP]-dehydratase,

HAD)和烯脂酰-酰基载体蛋白还原酶(Enoyl-[ACP]-reductase, ENR)相同(González-Thuillier等2015a, b)。此外在油桐FATB蛋白序列上发现了FAT特异催化位点,与麻疯树和油樟(*Cinnamomum longepaniculatum*)中的FATB1预测结果相一致(Wu等2009; Lin等2013)。根据系统进化树分析表明VfFATB1与JcFATB1亲缘关系最近,这可能与油桐和麻疯树都是大戟科的木本油料树种有关,从而导致它们之间的亲缘关系较近,同时可发现VfFATB1与其他物种具有相同的祖先,它们可能进化出了相似的脂肪酸生物合成机制,这也暗示了它们的FATB1功能具有相似性。根据JcFATB1和ClFATB1功能特点和综合上述生物信息学结果可推测VfFATB1的特异底物可能为C16:0-ACP硫酯酶(Wu等2009; Lin等2013)。

在含有75%辛酸C8:0和癸酸C10:0的萼距花种子中有2个FATBs,分别是ChFATB1(以C16:0为底

物)和ChFATB2 (以C8:0和C10:0为底物), ChFATB1在不同组织中都有表达(Jones等1995), 而ChFATB2只在种子中有表达(Dehesh等1996)。而拟南芥、油菜和棉花中只有一个FATB, 但表达于各种组织中。麻疯树和油棕中的FATB1也表达于所有组织中, 且在种子发育后期表达量最高(Wu等2009; Dehesh等1996a)。VfFATB1基因在各组织也均有表达, 但是各组织中的表达量存在显著差异, 其中发育后期种仁的表达量是幼根的30倍左右, 这可能与油桐种子内脂肪酸积累含量高有关, 其次在花的前身且细胞分裂旺盛, 细胞分裂需要大量的膜脂, 因此其表达量也相对较高, 在根、茎、叶等组织中由于只需要少量的膜脂, 表达量较低, 在植物中只有16:0-ACP硫酯酶基因存在于所有植物组织中, 且主要表达于种子中, 其次在花中的表达量相对较高, 而特异性催化生成中链脂肪酸的FATB基因只在处于发育阶段的胚中表达, 因此进一步证明VfFATB1的特异底物很有可能是C16:0-ACP硫酯酶(Dlrmann等2000; Dehesh等1996b); 另外, 根据油桐种仁FATB1基因的时空表达模式表明, 其在6月至7月, 即果实膨大期和油脂转化初期的表达量较低, 而在8月至10月, 即油脂转化高峰期具有较高的表达量, 在整个油脂合成过程中, 该基因是一直处于上调状态的, 这与油桐种仁内油脂积累相一致(李捷宇等2015), 由此推断VfFATB1基因在脂肪酸生物合成过程中发挥着重要作用, 并主要在油脂转化高峰期起着关键性作用, 这为进一步研究VfFATB1基因的功能提供了线索, 也为探讨油桐脂肪酸生物合成的分子机理提供了理论依据。

通过观察烟草叶片中有绿色荧光的亚细胞结构来确定VfFATB1在细胞中的表达部位, 结果定位在烟草叶片细胞的叶绿体中, 这与VfFATB1蛋白亚细胞的预测结果相一致。同时, 前面VfFATB1蛋白的生物信息学分析发现该蛋白存在叶绿体转运肽, 因此综合实验结果与分析可知VfFATB1定位于叶绿体中, 但由于油桐种仁中没有叶绿体结构, 但有与叶绿体结构相似的有色体, 而烟草叶片中只有叶绿体, 因此油桐种子VfFATB1可能在烟草叶片中选择了与有色体结构相似的叶绿体中表达, 这与人研究植物脂肪酸的生物合成主要是在质体中

完成相一致(Voelker等1992; McKeon等1982; Hellyer等1992)。质体是植物细胞中特有的结构, 根据质体内所含色素的不同, 可将质体分为白色体、有色体和叶绿体, 三种质体不但来源相同, 且结构相似, 具有相对的独立性, 能够进行自我复制, 三种质体在一定的条件下, 还可以发生相互转化。因此可推测VfFATB1基因是在质体中参与油桐脂肪酸生物合成代谢的基因。

众所周知, 桐油具有极高的经济利用价值, 是一种优质的干性油。目前对油桐的研究主要集中于常规育种, 但这对提高桐油的产量来说具有一定的局限性。分子生物学和基因工程技术的发展以及对植物脂肪酸合成代谢途径关键酶基因功能越来越深入的了解, 使得利用基因工程的手段调控植物种子脂肪酸代谢途径、改变脂肪酸的组成成为可能, 这有望提高桐油的产量, 改善桐油的品质。因此, 对VfFATB1基因进行全面而深入的研究, 将为油桐的遗传改良提供潜在的基因资源, 从而获得更为高产优质的油桐品种, 这对于开发我国生物质能源, 提高我国能源自给能力具有重要的战略意义。下一步将通过转基因植株或菌株等方法直接证明VfFATB1的功能特点。

参考文献

- Beisson F, Koo AJ, Ruuska S, Schwender J, Pollard M, Thelen JJ, Paddock T, Salas JJ, Savage L, Milcamps A, et al (2003). *Arabidopsis* genes involved in acyl lipid metabolism. A 2003 census of the candidates, a study of the distribution of expressed sequence tags in organs, and a web-based database. *Plant Physiol*, 132 (2): 681–697
- Bonaventure G, Salas JJ, Pollard MR, Ohlrogge JB (2003). Disruption of the *FATB* gene in *Arabidopsis* demonstrates an essential role of saturated fatty acids in plant growth. *Plant Cell*, 15 (4): 1020–1033
- Dehesh K, Edwards P, Hayes T, Cranmer AM, Fillatti J (1996a). Two novel thioesterases are key determinants of the bimodal distribution of acyl chain length of *Cuphea palustris* seed oil. *Plant Physiol*, 110 (1): 203–210
- Dehesh K, Jones A, Knutzon DS, Voelker TA (1996b). Production of high levels of 8:0 and 10:0 fatty acids in transgenic canola by overexpression of *Ch FatB2*, a thioesterase cDNA from *Cuphea hookeriana*. *Plant J*, 9: 167–172
- Dlrmann P, Voelker T A, Ohlrogge JB (2000). Accumulation of palmitate in *Arabidopsis* mediated by the acyl-acyl carrier protein thioesterase FATB1. *Plant Physiol*, 123: 637–643
- Doermann P, Voelker TA, Ohlrogge JB (1995). Cloning and expression in *Escherichia coli* of a novel thioesterase from *Arabidopsis*

- thaliana* specific for long-chain acyl-acyl carrier proteins. Arch Biochem Biophys, 316: 612–618
- Facciotti MT, Bertain PB, Yuan L (1999). Improved stearate phenotype in transgenic canola expressing amodified acyl-acyl carrier protein thioesterase. Nat Biotechnol, 17: 593–597
- González-Thuillier I, Venegas-Calderón M, Garces R, von Wettstein-Knowles P, Martínez-Force E (2015a). Sunflower (*Helianthus annuus*) fatty acid synthase complex: enoyl-[acyl carrier protein]-reductase genes. Planta, 241 (1): 43–56
- González-Thuillier I, Venegas-Calderón M, Sánchez R, Garces R, von Wettstein-Knowles P, Martínez-Force E (2015b). Sunflower (*Helianthus annuus*) fatty acid synthase complex: β -hydroxyacyl-[acyl carrier protein] dehydratase genes. Planta, 243 (2): 397–410
- Harwood J (2005). Fatty acid biosynthesis. In: Murphy DJ (ed). Plant Lipids: Biology, Utilisation and Manipulation. Oxford: Blackwell Publishing, 27–66
- Hawkins DJ, Kridl JC (1998). Characterization of acyl-ACP thioesterases of mangosteen (*Garcinia mangostana*) seed and high levels of stearate production in transgenic canola. Plant J, 13: 743–752
- He F, He B, Wang CN, Huang ZQ, Wang GZ (2005). Interpretation of tung oil quality grade standard. Nonwood Forest Res, 23 (4): 118–122 (in Chinese with English abstract) [何方, 何柏, 王承南, 黄正秋, 王桂芝(2005). 油桐产品质量等级标准制订说明. 经济林研究, 23 (4): 118–122]
- Hellyer A, Leadlay PF, Slabas AR (1992). Induction purification and characterization of acyl-ACP thioesterase from developing seeds of oil seed rape (*Brassica napus*). Plant Mol Biol, 20: 763–780
- Jha JK, Maiti MK, Bhattacharjee A, Basu A, Sen PC, Sen SK (2006). Cloning and functional expression of an acyl-ACP thioesterase *FATB* type from *Diploknema (Madhuca) butyracea* seeds in *Escherichia coli*. Plant Physiol Biochem, 44 (11-12): 645–655
- Jones A, Davies HM, Voelker TA (1995). Palmitoyl-acyl carrier protein (ACP) thioesterase and the evolutionary origin of plant acyl-ACP thioesterase. Plant Cell, 7: 359–371
- Knutzon DS, Bleibaum JL, Elsen JN, Kridl JC, Thompson GA (1992). Isolation and characterization of two oleoyl-acyl carrier protein thioesterase cDNA clones. Plant Physiol, 100: 1751–1758
- Li JY, Long HX, Zhang L, Wang Z, Li Z, Tan XF (2015). Isolation and expression analysis of *LACS4* and *LACS8* from *Vernicia fordii*. Plant Physiol J, 51 (11): 1982–1990 (in Chinese with English abstract) [李捷宇, 龙洪旭, 张琳, 王哲, 李泽, 谭晓风(2015). 油桐 *LACS4* 和 *LACS8* 基因克隆及其表达分析. 植物生理学报, 11: 1982–1990]
- Lin N, Ai TB, Gao JH, Fan LH, Wang SH, Chen F (2013). Identification of novel acyl-ACP thioesterase gene *CIFATB1* from *Cinamomum longepaniculatum*. Biochemistry (Moscow), 78 (11): 1298–1303
- Mayer K, Shanklin J (2005). A structural model of the plant acyl-acyl carrier protein thioesterase FatB comprises two helix/4-stranded sheet domains, the N-terminal domain containing residues that affect specificity and the C-terminal domain containing catalytic residues. J Biol Chem, 280: 3621–3627
- Mayer KM, Shanklin J (2007). Identification of amino acid residues involved in substrate specificity of plant acyl-ACP thioesterases using a bioinformatics-guided approach. BMC Plant Biol, 7: 1
- McKeon TA, Stumpf PK (1982). Purification and characterization of the stearyl-acyl carrier protein desaturase and the acyl-acyl carrier protein thioesterase from maturing seeds of safflower. J Biol Chem, 257: 12141–12147
- Mekhedov S, de Ilarduya OM, Ohlrogge J (2000). Toward a functional catalog of the plant genome. A survey of genes for lipid biosynthesis. Plant Physiol, 122: 389–402
- Raffaele S, Vaillau F, Léger A, Joubès J, Miersch O, Huard C, Blée E, Mongrand S, Domergue F, Roby D (2008). AMYB transcription factor regulates very-long-chain fatty acid biosynthesis for activation of the hypersensitive cell death response in *Arabidopsis*. Plant Cell, 20 (3): 752–767
- Salas JJ, Ohlrogge JB (2002). Characterization of substrate specificity of plant FatA and FatB acyl-ACP thioesterases. Arch Biochem Biophys, 403: 25–34
- Serrano-Vega MJ, Garceés R, Martínez-Force E (2005). Cloning, characterization and structural model of a FatA-type thioesterase from sunflower seeds (*Helianthus annuus* L.). Planta, 221: 868–880
- Tan XF (2006). Status and suggestion on development of *Vernicia fordii*. Nonwood Forest Res, 24 (3): 62–64 (in Chinese with English abstract) [谭晓风(2006). 油桐的生产现状及其发展建议. 经济林研究, 24 (3): 62–64]
- Voelker TA, Jones A, Cranmer AM, Davies HM, Knutzon DS (1997). Broad-range and binary-range acyl-acyl-carrier protein thioesterases suggest an alternative mechanism for medium-chain production in seeds. Plant Physiol, 114: 669–677
- Voelker TA, Worrell AC, Anderson L, Bleibaum J, Fan C, Hawkins DJ, Radke SE, Davies HM (1992). Fatty acid biosynthesis redirected to medium chains in transgenic oilseed plants. Science, 257: 72–74
- Wu PZ, Li J, Wei Q, Zeng L, Chen YP, Li MR, Jiang HW, Wu GJ (2009). Cloning and functional characterization of an acyl-acyl carrier protein thioesterase (*JcFATB1*) from *Jatropha curcas*. Tree Physiol, 29: 1299–1305
- Zhou Z, Zhang DQ, Lu MZ (2007). Cloning and expression analysis of *PtFATB* gene encoding the acyl-acyl carrier protein thioesterase in *Populus tomentosa* Carr. J Genet Genomics, 34 (3): 267–274

Cloning and preliminary functional analysis of *VfFATB1* in tung tree

LIU Mei-Lan, LONG Hong-Xu, TAN Xiao-Feng*

Key Laboratory of Cultivation and Protection for Non-Wood Forest Trees, Ministry of Education, Central South University of Forestry and Technology, Changsha 410004, China

Abstract: In this research, we report the cloning and functional analysis of *VfFATB1* in tung tree (*Vernicia fordii*) that shares high similarity with *Jatropha curcasto FATB1* (fatty acyl-ACP thioesterase B1) gene, up to 92%. The encoded protein contains a typical domain of “hot dog” folds composed 8 α -helixes and 10 β -sheets. It also has one essential Cys320 residue and three conserved His140/285/345 of FAT catalytic sites. At the same time, it has highest expression in the seed kernel, about 30 times than radicle, and was significantly increased during fatty acid synthesis of tung seed. Furthermore, *VfFATB1* is located in the chloroplast. Taken together, *VfFATB1* has many functional catalytic sites and locates in the chloroplast which implies that *VfFATB1* has a close relationship with fatty acid synthesis.

Key word: tung tree (*Vernicia fordii*); fatty acid biosynthesis; *FATB1*; bioinformatics; expression patterns; sub-cellular localization

Received 2016-03-09 Accepted 2016-05-13

This work was supported by National Forestry Public Welfare Industry Research Project of China (Grant No. 201204403).

*Corresponding author (E-mail: tanxiaofengcn@126.com).