

# 不同超长链脂肪酸延长酶基因 *FAE1* 芥酸合成功能的比较

韩凤英<sup>1</sup>, 王 津<sup>1</sup>, 胡馨月<sup>1</sup>, 徐劲松<sup>2,3</sup>, 许本波<sup>1,3</sup>, 张学昆<sup>2,3</sup>, 赵福永<sup>1,3</sup>

(<sup>1</sup>长江大学生命科学学院, 湖北荆州 434025; <sup>2</sup>长江大学农学院, 湖北荆州 434025;

<sup>3</sup>长江大学湿地生态与农业利用教育部工程研究中心, 湖北荆州 434025)

**摘要:** 植物芥酸是在以 *FAE1* (*Fatty acid elongase 1*) 编码的  $\beta$ -酮脂酰-CoA 合酶为关键限速酶的多酶复合体的催化下合成的, 主要以 TAG 形式储存于种子中, 是一种重要的油脂化工原料。不同植物来源的 *FAE1* 基因序列差异是导致其芥酸合成能力差异的根本原因。为分离和鉴定芥酸高合成能力的 *FAE1*, 本研究采用同源克隆法从油菜、海甘蓝、早金莲和荷包蛋花等 4 种植物中克隆获得了 12 条正常编码的 *FAE1* 基因序列, 并分别构建表达载体在酵母中进行诱导表达和芥酸含量比较分析。结果表明, 源于不同植物的 12 条 *FAE1* 基因 cDNA 序列一致性介于 52.1%~99.9%, 氨基酸序列一致性介于 49.9%~99.8%, *FAE1* 基因具有明显的种属特性。酵母表达及 GC-MS 分析结果表明, 源于绵油 328、海甘蓝和荷包蛋花的 8 个 *FAE1* 基因具有超长链脂肪酸合成能力, 其中 *CaFAE1-3* 合成芥酸能力最强 (4.82%), 其次为 *GjFAE1-1* (4.53%), *LdFAE1* 合成芥酸能力最弱 (0.29%); *CaFAE1-3* 对 C20:1 转化率可达 95.39%, 在高芥酸育种领域具有极大的应用潜力。另外 4 个源自阳光 80 和早金莲的 *FAE1* 基因均不具有芥酸合成功能, 因为 *GyFAE1-2*、*TmFAE1-1* 和 *TmFAE1-2* 在保守的半胱氨酸或(和)组氨酸位点存在突变, 而 *GyFAE1-1* 存在 1 个 R395K 突变, 导致酶活丧失。本研究增进了对 *FAE1* 基因结构与功能之间关系的认识, 为油菜和海甘蓝的高芥酸育种及芥酸性状基因工程改良提供了科学依据。

**关键词:** *FAE1*; 超长链脂肪酸; 芥酸; 生物合成; 酵母表达

## Comparison of Erucic Acid Biosynthesis of the *FAE1* Genes Encoding the Very-Long-Chain Fatty Acid Elongase from Different Plant Species

HAN Feng-ying<sup>1</sup>, WANG Jin<sup>1</sup>, HU Xin-yue<sup>1</sup>, XU Jin-song<sup>2,3</sup>, XU Ben-bo<sup>1,3</sup>,

ZHANG Xue-kun<sup>2,3</sup>, ZHAO Fu-yong<sup>1,3</sup>

(<sup>1</sup>College of Life Science, Yangtze University, Hubei Jingzhou 434025; <sup>2</sup>College of Agriculture, Yangtze University, Hubei Jingzhou 434025; <sup>3</sup>Engineering Research Center of Ecology and Agricultural Use of Wetland, Ministry of Education, Hubei Jingzhou 434025)

**Abstract:** In plants, erucic acid is synthesized by the catalysis of a multienzyme complex, in which the  $\beta$ -Ketoacyl-CoA synthase encoded by *FAE1* (*fatty acid elongase 1*) is a key rate limiting factor. Erucic acid is mainly stored in seeds in the form of TAG and is an important oleochemical feedstocks. The *FAE1* genes in plants are variable on DNA sequence, thus resulting in differences on capability of erucic acid synthesis. To identify and isolate *FAE1* genes with the highest capability on erucic acid synthesis, four plant species including *Brassica napus*, *Crambe abyssinica*, *Tropaeolum majus* and *Limnanthes douglasii* were used and twelve encoded *FAE1*

收稿日期: 2022-09-13 修回日期: 2022-10-21 网络出版日期: 2022-11-04

URL: <https://doi.org/10.13430/j.cnki.jpgr.20220913001>

第一作者研究方向为油菜脂肪酸遗传改良, E-mail: hanfengying176@163.com

通信作者: 赵福永, 研究方向为油菜分子生物学与遗传育种, E-mail: fyzhao@yangtzeu.edu.cn

基金项目: 国家公益性行业(农业)科研专项(201303008); 国家重点研发计划(2017YFD0101700)

**Foundation projects:** The Special Fund for Agro-scientific Research in the Public Interest (201303008); The National Key Research and Development Program of China (2017YFD0101700)

sequences were obtained from their genomes by homologous cloning method. Each *FAEI* gene was sub-cloned into the yeast expression vector, followed by the analysis of erucic acid content in each recombinant yeast under induction culture conditions. The results showed that the twelve *FAEI* genes shared 52.1-99.9% and 49.9-99.8% identity on cDNA and amino acid sequence, respectively, showing species-specific characteristics. By GC-MS analysis of all recombinant yeasts, eight *FAEI* genes derived from Mianyou328, *Crambe abyssinica* and *Limnanthes douglasii* have been demonstrated with the capability to synthesize very-long-chain fatty acids. *CaFAEI-3* had the strongest capability to synthesize erucic acid (4.82%), followed by *GjFAEI-1* (4.53%), and *LdFAEI* that was the weakest one (0.29%). In addition, 95.39% of the C20:1 fatty acids were converted by *CaFAEI-3*, implying great application potential in high erucic acid breeding. The remaining four genes derived from Yangguang80 and *Tropaeolum majus* were not detected with the capability on erucic acid synthesis. This is possible because of *GyFAEI-2*, *TmFAEI-1* and *TmFAEI-2* that contain mutations in the conserved cysteine or (and) histidine sites, and *GyFAEI-1* that contains a R395K mutation resulting in loss of enzyme activity. Collectively, this study represented better understanding of the relationship between the structure and function of *FAEI* gene, which has implication in higher erucic acid breeding and genetic engineering improvement on erucic acid trait in rapeseed and *Crambe abyssinica*.

**Key words:** *fatty acid elongase 1*; very-long-chain fatty acid; erucic acid; biosynthesis; yeast expression

超长链脂肪酸(VLCFAs, very-long-chain fatty acids)是指主链碳原子数超过18个的脂肪酸,在生物体内主要以三酰甘油(TAG, triacylglycerol)、蜡质前体、甘油磷脂及鞘磷脂等4种形式存在,参与多种生命活动进程<sup>[1]</sup>。植物能合成多种形式的VLCFAs,不同的VLCFAs有着不同的生理功能,如种子中以TAG形式贮存的VLCFAs是重要的能量储备物质,为种子萌发和幼苗生长供能;鞘脂和磷脂是细胞膜的重要结构组分和信号分子;基于VLCFAs合成的植物表皮角质层蜡质对于避免水分散失、防止病原菌入侵以及适应环境胁迫方面有着重要作用<sup>[2]</sup>。

芥酸(Erucic acid, C22:1)是一种超长链单不饱和脂肪酸,主要由十字花科(Cruciferae)和金莲花科(Tropaeolaceae)等植物合成并以TAG形式贮存于种子中<sup>[3-4]</sup>。芥酸因其具有疏水性强、润滑性能优异以及氧化-聚合速度较短碳链脂肪酸慢等特性,是一种重要的油脂化工原料,在冶金、机械、橡胶、化工、油漆、纺织和医药等领域具有广泛用途<sup>[5]</sup>。芥酸的生物合成通路及其分子调控网络现已研究得较为清楚<sup>[1-2]</sup>。芥酸等单不饱和超长链脂肪酸是在细胞内质网中以油酰-CoA(C18:1-CoA)为底物,在脂肪酸碳链延长酶复合体的催化下,以丙二酰-CoA为碳源并经过多次相继的缩合反应合成的,其中由*FAEI*(*Fatty acid elongase 1*)编码的 $\beta$ -酮脂酰-CoA合酶(KCS,  $\beta$ -ketoacyl-CoA synthase)是关键的限速酶<sup>[1-2]</sup>。James等<sup>[6]</sup>首次从拟南芥中克隆了*FAEI*基

因,并证明其是种子中超长链脂肪酸合成的必需基因。此后,*FAEI*在希蒙得木<sup>[7]</sup>(*Simmondsia chinensis*)、油菜<sup>[8-12]</sup>(*Brassica napus*, *Brassica rapa*, *Brassica juncea*)、甘蓝<sup>[11-12]</sup>(*Brassica Oleracea*)、芜菁<sup>[11-12]</sup>(*Brassica campestris*)、旱金莲<sup>[13]</sup>(*Tropaeolum majus*)、海甘蓝<sup>[14]</sup>(*Crambe abyssinica*)、荷包蛋花<sup>[15]</sup>(*Limnanthes douglasii*)、银扇草<sup>[16]</sup>(*Lunaria annua*)、碎米荠<sup>[17]</sup>(*Cardamine graeca*)等多种植物中被克隆。不同植物种子芥酸含量差异极大,旱金莲是迄今报道的自然界中种子芥酸含量最高的植物,达80%,其次为海甘蓝,为55%~60%<sup>[13-14]</sup>。遗传因素、环境因子和栽培措施(播期、氮肥施用量、栽培密度等)等均会影响种子芥酸含量,其中遗传因素是决定因素<sup>[18-19]</sup>。*FAEI*编码产物的功能正常与否、活性高低、表达水平等直接决定芥酸的合成量。

Ghanevati等<sup>[20]</sup>研究发现,功能型*FAEI*具有高度保守的半胱氨酸残基(C85、C223、C270、C312、C389、C460)和组氨酸残基(H302、H387、H391、H420),其中C223是活性位点,可能参与酰基链转移。Han等<sup>[8]</sup>和Katavic等<sup>[12]</sup>发现,*BnFAEI*第282位丝氨酸残基(S)对其芥酸合成能力至关重要,若突变为苯丙氨酸(F),则芥酸合成能力丧失。Katavic等<sup>[21]</sup>进一步对该位点进行点突变后发现,*FAEI*的活性高低主要与该位点氨基酸残基的大小和电子密度有关,若为甘氨酸(G)或半胱氨酸(C)等较小的氨基酸则其活性更高。*FAEI*的S282对芥酸合成能力的重要性后续也得到了证实<sup>[22-24]</sup>。*AtFAEI*和*BnFAEI*嵌

合基因表达结果证实, *FAE1* 第 92 位氨基酸(K92R) 是决定底物特异性的关键位点<sup>[25]</sup>。Sun 等<sup>[26]</sup>依据 DNA 序列将十字花科 *FAE1* 归为 5 个进化分支, 并鉴定了 16 个影响种子芥酸含量的候选活性位点。 *FAE1* 关键位点氨基酸的突变会导致生物学活性丧失, 是产生低芥酸材料的重要途径<sup>[27]</sup>。

酵母自身仅能合成微量的 VLCFAs, 且不能合成 C22:1 等超长链单不饱和脂肪酸, 但在其体内重组表达功能型 *FAE1* 则能合成 C22:1<sup>[8,12]</sup>。因此, 酵母表达系统非常适宜用于 *FAE1* 芥酸合成功能分析, 并已有多个报道<sup>[8,10,14,16-17,20-21,24,28-30]</sup>。该系统的优点在于, 不仅能鉴定 *FAE1* 有无芥酸等超长链脂肪酸合成能力, 而且还能平行比较不同 *FAE1* 的芥酸合成能力, 因为相同条件下不同 *FAE1* 的芥酸合成量与其活性紧密相关。因此, 为分离和鉴定芥酸高合成能力的 *FAE1*, 本研究选取了高芥酸油菜绵油 328、高油酸油菜阳光 80、荷包蛋花<sup>[15]</sup>、早金莲<sup>[31]</sup>和海甘蓝<sup>[32]</sup>等 5 种种子芥酸含量不同的植物材料, 采用同源克隆法拟获取其基因组中全部 *FAE1* 拷贝并分别构建重组表达载体, 然后通过气质联用色谱仪检测各酵母重组菌诱导表达后的脂肪酸组分, 筛选具有芥酸高合成能力的 *FAE1*, 以期增进对 *FAE1* 基因结构与功能关系的认识, 为采用现代生物技术创制超高芥酸材料和高芥酸遗传育种提供科学依据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 试验材料

高芥酸油菜绵油 328(芥酸含量 51.3%)、高油酸油菜阳光 80(芥酸含量 <2.0%) 种子由长江大学油菜课题组提供; 海甘蓝种子由中国农业科学院油料作物研究所陆光远副研究员馈赠; 早金莲和荷包蛋花种子由长江大学生命科学学院何勇副教授馈赠。油菜与海甘蓝均播种于长江大学农业科技产业园试验地, 常规田间管理。早金莲和荷包蛋花, 用营养土种植于植物生长培养室中(25±2 °C, 16 h/8 h(光照/黑暗))。

### 1.2 菌株、质粒及主要试剂

大肠杆菌(DH5 $\alpha$ )和酵母菌株(INVSc1)感受态细胞均购自上海维地生物技术有限公司, 酵母表达质粒 pYES2/NT A 由长江大学油菜遗传育种实验室保存。植物基因组 DNA 提取试剂盒(*EasyPure Plant Genomic DNA Kit*)、平末端连接试剂盒(*pEASY-Blunt Cloning Kit*)、质粒提取试剂盒(*Plasmid*

*MiniPrep Kit*)及高保真 DNA 聚合酶(*FastPfu DNA polymerase*)、T4 DNA 连接酶等均购自北京全式金生物技术有限公司; 琼脂糖凝胶回收试剂盒(*FastPure Gel DNA Extraction Mini Kit*)购自南京诺唯赞生物技术有限公司; 限制性内切酶 *EcoRI*、*BamHI* 等购自 Fermentas 公司; 酵母氮源基础(YNB)、DO Supplement-Ura 购自北京酷莱博科技有限公司; 棉子糖、半乳糖购自上海麦克林生化科技有限公司; 脂肪酸甲酯化试剂甲醇、正庚烷、石油醚均为色谱纯, 其他试剂均为分子试剂级或分析纯。

### 1.3 *FAE1* 的克隆与测序

已报道的绝大多数 *FAE1* 是无内含子蛋白编码基因<sup>[6,11-13,28,33]</sup>。因此, 本研究以各种植物基因组 DNA 为扩增模板进行 *FAE1* 克隆。分别剪取各植物幼嫩叶片组织 100 mg, 按照植物基因组 DNA 提取试剂盒说明书操作步骤提取高质量基因组 DNA。依据甘蓝型油菜(*BnaA08g11130D*)、海甘蓝(*AGG87083*)、早金莲(*DQ417593.1*)、荷包蛋花(*AF247134.1*) *FAE1* 基因序列, 应用 NCBI 网站 Primer-BLAST 程序设计 PCR 特异扩增引物, 送北京擎科生物技术有限公司合成(表 1)。PCR 扩增体系(50  $\mu$ L)为: 10 $\times$ Buffer (Mg<sup>2+</sup>) 5  $\mu$ L; Primer-F (10  $\mu$ mol/L) 2  $\mu$ L; Primer-R (10  $\mu$ mol/L) 2  $\mu$ L; dNTPs (2.5 mmol/L) 5  $\mu$ L; gDNA 模板 (100 ng) 2  $\mu$ L; *Pfu* DNA 聚合酶 2  $\mu$ L; ddH<sub>2</sub>O 32  $\mu$ L; 扩增程序为: 95 °C 3 min; 95 °C 45 s, 60 °C 45 s, 72 °C 1 min 30 s, 36 个循环; 72 °C 7 min。PCR 扩增产物经 2.0% 琼脂糖凝胶电泳后, 切取目的条带用琼脂糖凝胶回收试剂盒回收。按平末端连接试剂盒说明书构建连接反应体系, 连接产物转化大肠杆菌感受态细胞, 转化产物涂布于含 50 mg/L 卡那霉素的 LB 固体平板。37 °C、过夜培养, 挑取抗性单菌落进行菌落 PCR 检测, 各挑取 10 个左右阳性菌落送北京擎科生物技术有限公司进行测序。

### 1.4 *FAE1* 序列生物信息学分析

对测序后的 *FAE1* 基因序列采用 BioEdit 7.0 (<http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>)、序列处理在线工具包 (<http://www.bio-soft.net/sms/>)、MOTIF Search (<https://www.genome.jp/tools/motif/>)、TMHMM 2.0 (<https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?TMHMM-2.0>)、MEGA-X (<https://www.megasoftware.net/>) 等进行基因结构、DNA 及推导氨基酸序列比对、限制性酶切位点、结构域预测以及系统进化树构建等分析。

表1 基因克隆与重组表达载体构建引物信息

Table 1 Information of primers for gene cloning and recombinant expression vector

引物名称 Primer name	引物序列(5'-3') Sequence (5'-3')	引物名称 Primer name	引物序列(5'-3') Sequence (5'-3')
<i>BnFAE1-F</i>	CCG <b><i>GAATTC</i></b> ATGACGTCCGTTAACGTAAAGC	<i>BnFAE1-R</i>	CG <b><i>GGATCC</i></b> TTAGGACCGACCGTTTTGGAC
<i>CaFAE1-F</i>	CCG <b><i>GAATTC</i></b> ATGACGTCCATTAACGTAAAGCTC	<i>CaFAE1-R</i>	CG <b><i>GGATCC</i></b> TTAGGACCGACCGTTTTGGG
<i>TmFAE1-F</i>	CCG <b><i>GAATTC</i></b> ATGTCAGGAACAAAAGCAACATCAG	<i>TmFAE1-R</i>	CG <b><i>GGATCC</i></b> TTAATTTAATGGAACCTCAACCGGAA
<i>LdFAE1-F</i>	CCG <b><i>GAATTC</i></b> ATGTCGGAGACAAAACCTGAGA	<i>LdFAE1-R</i>	CG <b><i>GGATCC</i></b> TTAGACAACAGCAACCGGAAAC
<i>LdFAE1-Ex2-F</i>	GGAGAAGACAAAGGTGAATCCGAAG	<i>LdFAE1-Ex1-R</i>	CTTCGGATTACCTTTGTCTTCTCC
<i>Linker-F</i>	AGCTTGGGCCG <b><i>GAATTC</i></b> CG <b><i>GGATCC</i></b> CGGCT	<i>Linker-R</i>	CTAGAGCCG <b><i>GGATCC</i></b> CG <b><i>GAATTC</i></b> CGGCCCA
<i>pYES2-sq-F</i>	AATATACCTCTATACTTTAACGTC	<i>pYES2-sq-R</i>	GCGTGAATGTAAGCGTGAC

引物序列中斜体加粗字母表示限制性内切酶识别序列

Italic and bold letters in primer sequences indicate the restriction enzyme recognition site

### 1.5 酵母表达质粒 pYES2/NT A 的改造与 FAE1 重组表达质粒的构建

为避免表达载体 N 端标签序列(6×His、Xpress™ epitope、Enterokinase (EK) recognition site) 影响 FAE1 蛋白的正确折叠和生物学功能发挥,遂对表达载体进行了改造。依据载体序列酶切位点构成及所有 FAE1 基因序列酶切位点分析结果(均不含 EcoRI 和 BamHI 识别序列),本研究设计了含 4 个限制性酶切位点(HindIII+EcoRI+BamHI+XbaI)的连接头(表 1)。载体改造流程如下:(1)pYES2.0/NT A 质粒 DNA 用 HindIII 和 XbaI 进行双酶切,回收大片段备用;(2)取 Linker-F 和 Linker-R 各 10 μL 混合于离心管,95℃水浴 5 min,自然冷却备用;(3)用 T4 DNA 连接酶构建回收载体大片段与接头退火产物的连接体系(10 μL),16℃连接过夜;(4)连接产物转化大肠杆菌,筛选重组子并鉴定,改造后的质粒命名为 pYES2/HEBX。

提取 pYES2/HEBX 质粒 DNA,用 EcoRI 和 BamHI 进行双酶切,回收大片段;然后与经相同双酶切处理的各 FAE1 扩增产物进行连接、转化和重组子鉴定。对于各 FAE1 重组表达质粒菌,经测序引物组合(pYES2-sq-F/pYES2-sq-R)初筛后,各挑取 2~3 个单菌落送北京擎科生物技术有限公司进行测序验证。对于序列无误的单菌落,摇菌后用质粒提取试剂盒抽提质粒 DNA,用于酵母转化。

### 1.6 酵母重组菌的诱导表达及脂肪酸分析

各 FAE1 重组表达质粒及空载体 pYES2/HEBX 质粒的酵母转化,参照酵母菌 INVSc1 感受态细胞产品说明书进行。转化菌液涂布于 SD-U 平板筛选后,挑取单菌落用载体测序引物组合进行菌落 PCR 鉴定,阳性菌落用于后续诱导表达分析。为得到理想的 FAE1 蛋白表达量,诱导表达前,以酵母转化菌(pYES2/HEBX、pYES2/HEBX-TmFAE1-1、pYES2/

HEBX-GyFAE1-1)绘制生长曲线,获得的最佳诱导表达条件为:30℃,250 r/min,振荡培养 16 h。

取诱导表达后的各重组菌菌液于 4℃,4000 r/min 离心 6 min 收集酵母菌体。无菌水重复清洗 3 次后,菌体置-80℃冰箱中冷冻 8 h,然后放入真空冷冻干燥机中干燥。称取酵母干燥菌体 65 mg 或种子样品 100 mg 按照武玉花等<sup>[24]</sup>方法进行脂肪酸甲酯化处理。以空载体酵母转化菌为阴性对照,取甲酯化后的样品用气相色谱质谱联用仪(Thermo Scientific Trace 1300-ISQ)进行脂肪酸组分分析,2 次生物学重复。色谱及质谱条件: TG-FAME (50 m×0.25 mm×0.20 μm) 色谱柱;载气为氦气;流速为 0.63 mL/min;进样量为 1.0 μL;分流比为 30:1;进样口温度 270℃;升温程序为 80℃(保持 1 min),以 20℃/min 速率升高到 160℃(保持 1.5 min),再以 3℃/min 的速率升高到 250℃(保持 3 min)。离子化方式为电子轰击(EI, electron impact);离子化能量 70 eV;传输线温度 260℃;离子源温度 280℃;扫描范围 50~350 amu (atomic mass unit)。

酵母菌株 INVSc1 仅能合成微量的 VLCFAs,对研究结果影响极小,故计算各脂肪酸含量及脂肪酸转化率时均未加以考虑。因 FAE1 延长酶仅以 C18:0 或 C18:1 为初始底物进行碳链延长,并不涉及不饱和和键数的改变,因此每一分子超长链脂肪酸均可对应一分子 C18:0 或 C18:1,故其脂肪酸转化率可以按照公式:转化率=[1-C<sub>n</sub>/(C<sub>n</sub>+C<sub>(n+2)</sub>+C<sub>(n+4)</sub>+C<sub>(n+6)</sub>)]×100% 计算(n=18~22),饱和脂肪酸和单不饱和脂肪酸分类计算。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同植物来源的 FAE1 的序列分析

测序结果分析表明,不同植物基因组中的 FAE1 基因拷贝数不同,且功能基因间存在 SNP 位点,编

码氨基酸序列存在差异(图1)。绵油328中至少存在3个 *FAE1* 拷贝,分别命名为 *GjFAE1-1*、*GjFAE1-2* 和 *GjFAE1-3*,均为单外显子基因,长度分别为1521 bp、1521 bp和1517 bp。*GjFAE1-1*和 *GjFAE1-2*均编码长度为506个氨基酸的 *FAE1* 蛋白。相对于 *GjFAE1-1*和 *GjFAE1-2*, *GjFAE1-3* 在第1366~1369位有4 bp 碱基(TCAG)缺失,导致其编码区发生移码突变,不能翻译出正常功能蛋白。阳光80中则至少存在4个 *FAE1* 拷贝,分别命名为 *GyFAE1-1*、*GyFAE1-2*、*GyFAE1-3* 和 *GyFAE1-4*,均为单外显子基因,长度分别为1521 bp、1521 bp、1519 bp和1519 bp。其中 *GyFAE1-1*和 *GyFAE1-2*均编码长度为506个氨基酸的 *FAE1* 蛋白,但 *GyFAE1-3*和 *GyFAE1-4* 相对于 *GyFAE1-1*和 *GyFAE1-2*,在第1422~1423位存在2 bp 碱基(GA)缺失,导致其编码区发生移码突变,不能翻译出正常功能蛋白。海甘蓝中至少存在5个 *FAE1* 拷贝,分别命名为 *CaFAE1-1*、*CaFAE1-2*、*CaFAE1-3*、*CaFAE1-4*和 *CaFAE1-5*,均为单外显子基因,长度也均为1521 bp,均能编码506个氨基酸的 *FAE1* 蛋白。早金莲中至少存在2个 *FAE1* 拷贝,分别命名为 *TmFAE1-1*和 *TmFAE1-2*,均为单外显子基因,长度均为1512 bp,编码503个氨基酸的 *FAE1* 蛋白。*TmFAE1-1*和 *TmFAE1-2* 编码区仅存在1个 SNP (T698G)位点,但导致了氨基酸序列出现了F233C 差异。荷包蛋花中仅鉴定到1个 *FAE1* 拷贝,命名为 *LdFAE1*。不同于上述物种中的 *FAE1* 基因,*LdFAE1* 含有1个长度为80 bp的内含子,其cDNA 编码区全长1518 bp,编码505个氨基酸的 *FAE1* 蛋白。因此,在构建表达载体的过程中,特异设计了 *LdFAE1-Ex1-R*和 *LdFAE1-Ex2-F* 引物,以实现2个外显子的拼接而获得其编码区全长序列。上述12个能正常编码蛋白的 *FAE1* 基因之间cDNA 序列一致性介于52.1%~99.9%之间,推导氨基酸序列一致性介于49.9%~99.8%之间,其系统进化关系如图2所示, *FAE1* 表现出明显的种属特性。

*FAE1* 是一种膜结合蛋白<sup>[25]</sup>。跨膜结构域的数量、位置及其氨基酸残基组成均会影响其膜结合稳定性,进而影响其生物学功能。对各 *FAE1* 基因推导氨基酸序列采用 TMHMM 2.0 程序分析发现,不同物种来源的 *FAE1* 其跨膜结构域的数量和位置均不同,而同一物种的不同 *FAE1* 拷贝则相同(图1)。油菜、海甘蓝和早金莲3个物种的 *FAE1* 均含有3个跨膜结构域(I、II、III),其中I、II位于N端,而油菜和海甘蓝 *FAE1* 的跨膜结构域III位于C端,早金莲的

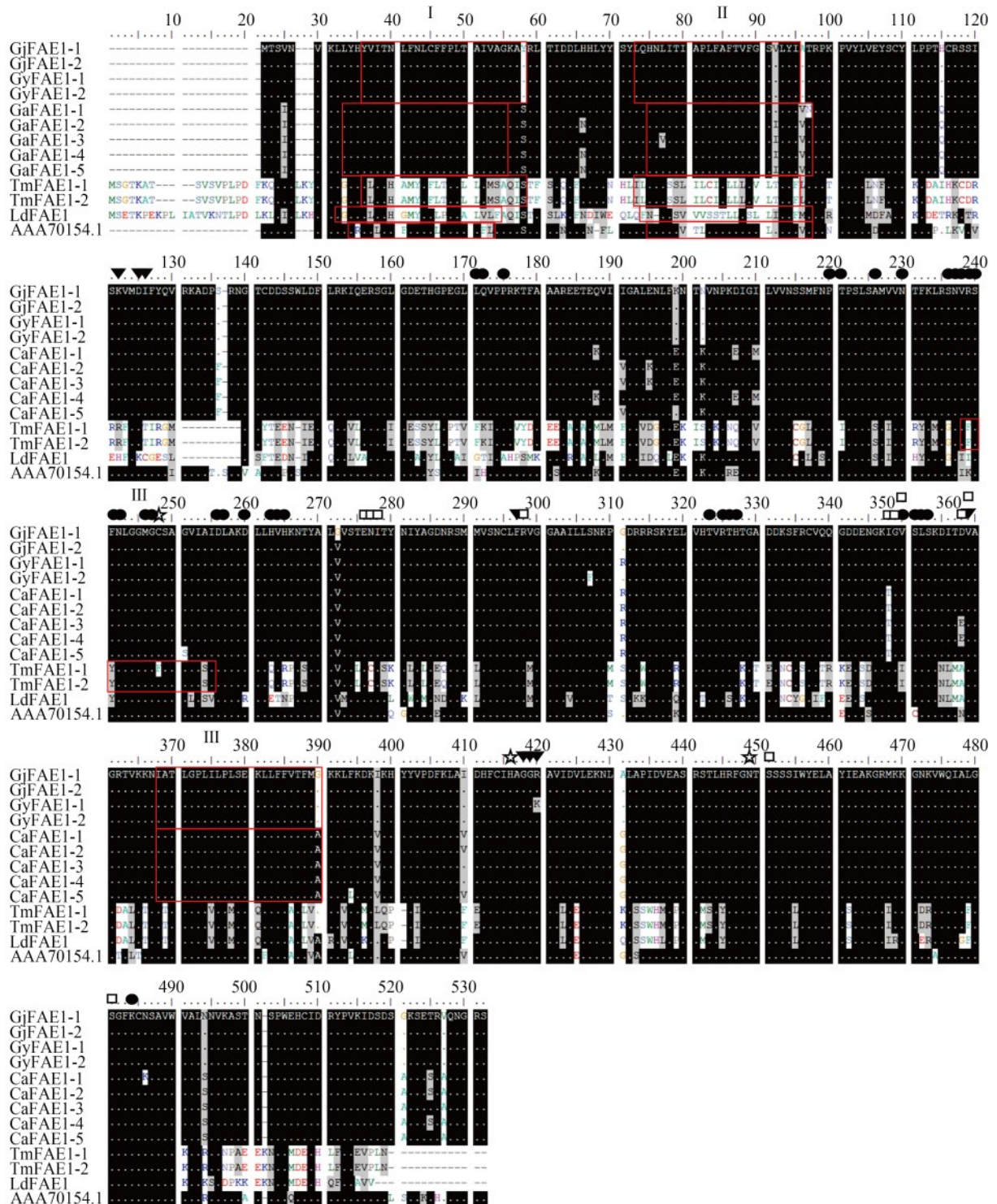
跨膜结构域III则位于中部;荷包蛋花和拟南芥 *FAE1* 只有两个跨膜结构域(I、II),且均位于N端。进一步对各跨膜结构域分析发现,亲缘关系越近的物种间其 *FAE1* 相同位置跨膜结构域氨基酸序列保守性越高,亲缘关系越远的物种间相同位置跨膜结构域氨基酸序列差异越大,各结构域包含18~23个氨基酸残基不等;同属十字花科的油菜和海甘蓝的 *FAE1* 其3个跨膜结构域(I、II、III)的氨基酸残基数均为23个,但其序列组成存在差异;而拟南芥 *FAE1* 的2个跨膜结构域的氨基酸残基数分别为20个(I)和23个(II),序列组成与前二者之间差异更大。早金莲 *FAE1* 的跨膜结构域I和II的氨基酸残基数均为23个,而跨膜结构域III为18个。荷包蛋花的 *FAE1* 的跨膜结构域I和II的氨基酸残基数均为23个(图1)。

依据早金莲 *FAE1* 蛋白序列(ABD77097)的功能注释,对本研究克隆所获得的12条 *FAE1* 蛋白序列及拟南芥 *FAE1* 蛋白序列(AAA70154)分析发现,参与丙二酰辅酶A结合的氨基酸位点F272、V334、GRA(394~396)均极其保守,位点R98、DT(101~102)可塑性较大。十字花科的 *FAE1* 在98、101~102均分别为K、DI,而与早金莲(R、DT)和荷包蛋花(H、KC)的差异较大;参与二聚体组装的位点在十字花科内较保守,与早金莲和荷包蛋花的差异较大;3个催化活性位点(C223、H391、N424)极其保守,除 *TmFAE1-1* 为F223外,其余 *FAE1* 的3个活性位点氨基酸完全相同;参与短链脂酰CoA结合的位点也较为保守,E251、I253、R273、G344、V339、S426和S456在所有 *FAE1* 中完全相同。上述有些关键氨基酸位点还同时参与多种作用,如V325既参与二聚体组装也参与短链脂酰CoA的结合,V334既参与丙二酰辅酶A结合也参与短链脂酰CoA的结合(图1)。

从上述序列分析结果可以看出,不同植物来源的 *FAE1* 一级结构存在广泛的氨基酸差异,这些差异位点的协同作用可能是导致芥酸等超长链脂肪酸合成能力差异的根本原因。

## 2.2 *FAE1* 的酵母表达分析

武玉花等<sup>[24]</sup>研究证明,源于十字花科不同物种的6个 *FAE1* 基因,不论是否具有生物学活性,酵母中蛋白表达量均无明显差异。本研究采用的表达系统和策略与武玉花等<sup>[24]</sup>相似,故借鉴其研究结果粗略认为,本研究中各 *FAE1* 基因在相同诱导表达条件下的蛋白表达量基本一致。



GjFAE1、GyFAE1、CaFAE1、TmFAE1 和 LdFAE1 分别表示克隆自高芥酸油菜绵油 328、高油酸油菜阳光 80、海甘蓝、旱金莲和荷包蛋花的 *FAE1* 基因的氨基酸推导序列;AAA70154.1 为拟南芥 *FAE1* 氨基酸序列;下同。▼表示丙二酰辅酶 A 结合位点;●表示二聚体组装作用位点;

★表示催化活性位点;□表示短链酯酰 CoA 结合位点;红色矩形内序列表示跨膜结构域(I、II、III)

GjFAE1, GyFAE1, CaFAE1, TmFAE1, and LdFAE1 represent the deduced amino acid sequences of *FAE1* isolated from high erucic acid rapeseed Mianyou 328, high oleic acid rapeseed Yangguang 80, *Crambe abyssinica*, *Tropaeolum majus*, and *Limnanthes douglasii*, respectively.

AAA70154.1 represents the arabidopsis *FAE1* protein; The same as below. ▼ symbol indicates key sites for malonyl-CoA binding; ● symbol indicates key sites for dimer interface; ★ symbol indicates key sites for active; □ symbol indicates key sites for product binding site; Sequences in

red rectangle represent transmembrane domain I, II and III

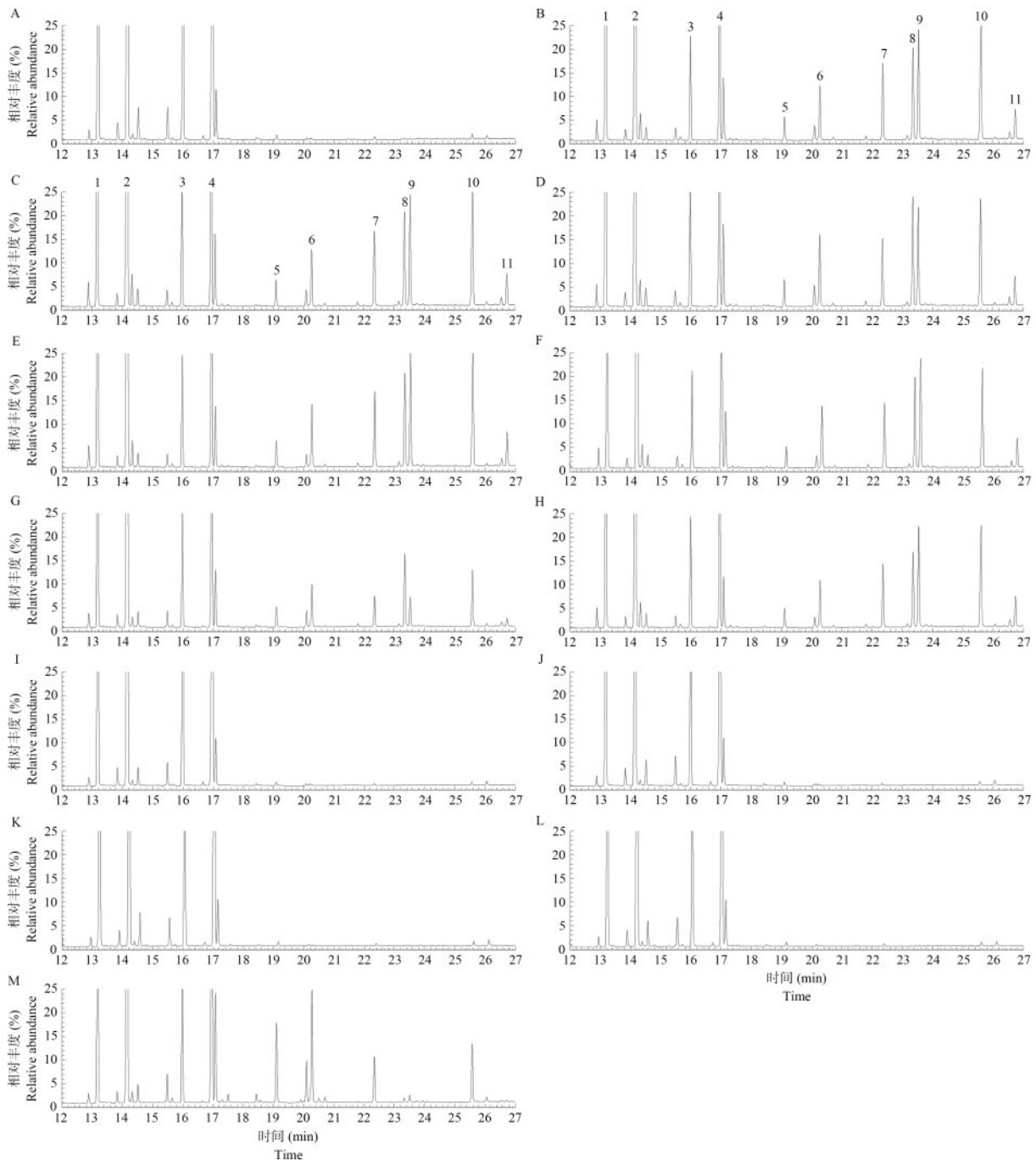
图1 不同植物来源 *FAE1* 氨基酸序列功能结构域及关键氨基酸位点分析

Fig.1 Key amino acid site and functional domain analyses of *FAE1* originated from different plant species



的失活是保守的组氨酸突变(H420Y)的结果, TmFAE1-1是保守的半胱氨酸(C223F)和保守的组氨酸(H420Y)双重突变的结果。然而, LdFAE1在

对应的第420位也为酪氨酸Y,但它仍具备较弱的超长链脂肪酸合成能力,说明不同的FAE1活性丧失分子机制存在差异。

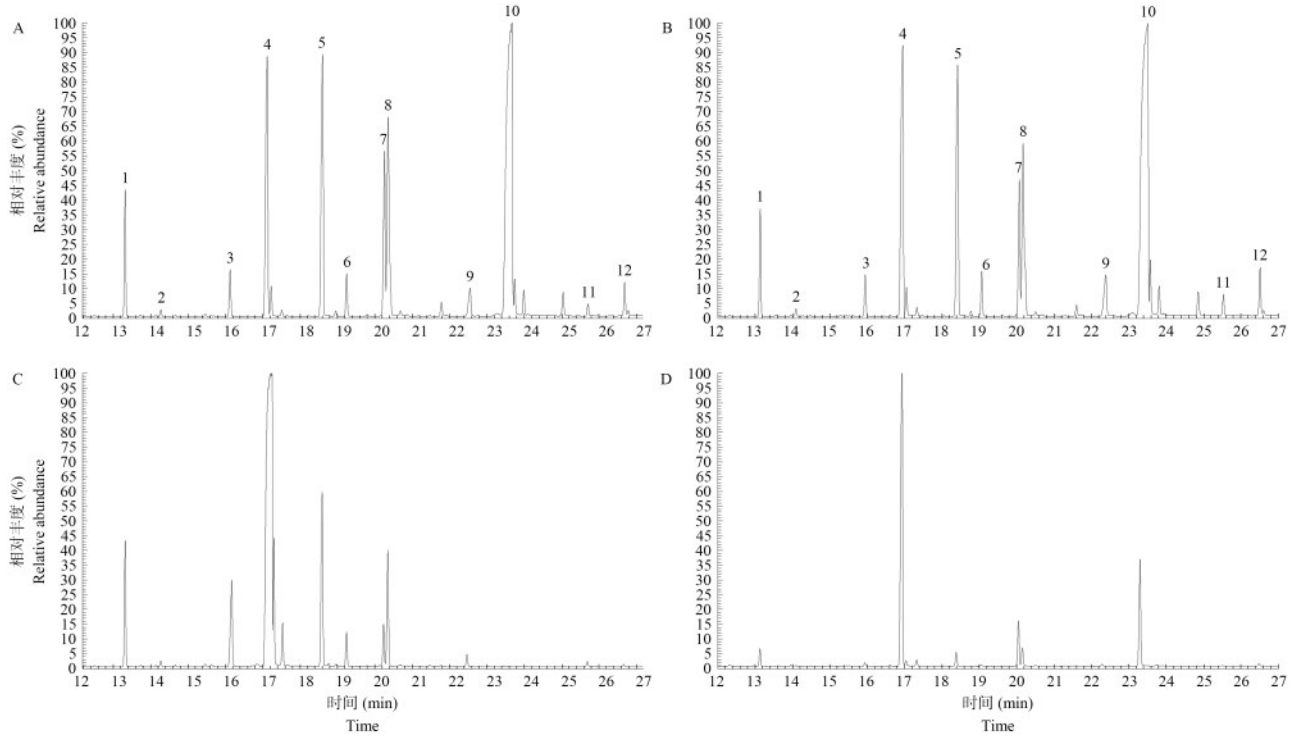


A: 空载质粒 *Pyes2/HEBX*; B, C: *GjFAE1-1*, *GjFAE1-2*; D-H: *CaFAE1-1*~*CaFAE1-5*; I, J: *GyFAE1-1*, *GyFAE1-2*; K, L: *TmFAE1-1*, *TmFAE1-2*; M: *LdFAE1*. 色谱峰1至峰11代表的脂肪酸分别为棕榈酸(C16:0)、棕榈油酸(C16:1)、硬脂酸(C18:0)、油酸(C18:1)、花生酸(C20:0)、花生烯酸(C20:1)、山嵛酸(C22:0)、二十二碳烯酸(C22:1, *cis*-11)、芥酸(C22:1, *cis*-13)、木蜡酸(C24:0)、神经酸(C24:1)  
A: Negative plasmid *Pyes2/HEBX*; B, C: *GjFAE1-1*, *GjFAE1-2*; D-H: *CaFAE1-1*~*CaFAE1-5*; I, J: *GyFAE1-1*, *GyFAE1-2*; K, L: *TmFAE1-1*, *TmFAE1-2*; M: *LdFAE1*. Chromatographic peak 1 to peak 11 represents palmitic acid (C16:0), palmitoleic acid (C16:1), stearic acid (C18:0), oleic acid (C18:1), arachidic acid (C20:0), eicosenoic acid (C20:1), behenic acid (C22:0), docosenoic acid (C22:1, *cis*-11), erucic acid (C22:1, *cis*-13), lignoceric acid (C24:0), and nervonic acid (C24:1), respectively

图3 不同FAE1基因转化酵母脂肪酸组分的气相色谱分析

Fig.3 GC-MS analysis of fatty acid components in yeast transformed with different FAE1 genes





A: 绵油328; B: 海甘蓝; C: 阳光80; D: 早金莲; 色谱峰1至峰12代表的脂肪酸分别为棕榈酸(C16:0)、棕榈油酸(C16:1)、硬脂酸(C18:0)、油酸(C18:1)、亚油酸(C18:2)、花生酸(C20:0)、花生烯酸(C20:1)、亚麻酸(C18:3)、山嵛酸(C22:0)、芥酸(C22:1)、木蜡酸(C24:0)、神经酸(C24:1)

A: Mianyou328; B: *Crambe abyssinica*; C: Yangguang80; D: *Tropaeolum majus*; Chromatographic peak 1 to peak 12 represent palmitic acid (C16:0), palmitoleic acid (C16:1), stearic acid (C18:0), oleic acid (C18:1), linoleic acid (C18:2), arachidic acid (C20:0), eicosenoic acid (C20:1), linolenic acid (C18:3), behenic acid (C22:0), erucic acid (C22:1), lignoceric acid (C24:0), and nervonic acid (C24:1), respectively

图4 种子中脂肪酸组分的气质色谱分析

Fig.4 GC-MS analysis of fatty acid components in seeds

表2 不同 *FAEI* 转化酵母菌脂肪酸组份气相色谱质谱分析

Table 2 GC-MS analyses of fatty acid components in yeast transformed with different *FAEI* genes

峰号 Peak number	脂肪酸种类 Fatty acid type	转化基因及平均脂肪酸相对含量 Target gene and average relative abundance of fatty acid												
		<i>GjFA</i> <i>EI-1</i>	<i>GjFA</i> <i>EI-2</i>	<i>CaFA</i> <i>EI-1</i>	<i>CaFA</i> <i>EI-2</i>	<i>CaFA</i> <i>EI-3</i>	<i>CaFA</i> <i>EI-4</i>	<i>CaFA</i> <i>EI-5</i>	<i>LdF</i> <i>AEI</i>	<i>GyFA</i> <i>EI-1</i>	<i>GyFA</i> <i>EI-2</i>	<i>TmFA</i> <i>EI-1</i>	<i>TmFA</i> <i>EI-2</i>	<i>pYES2/</i> <i>HEBX</i>
1	棕榈酸 (C16:0)	14.76	14.97	15.02	14.79	14.58	16.94	15.39	14.77	21.27	21.22	21.31	20.95	21.15
2	棕榈油酸 (C16:1)	25.10	24.03	24.41	24.15	25.72	28.83	25.15	25.28	29.55	29.35	28.18	29.58	28.24
3	硬脂酸 (C18:0)	3.90	4.30	4.38	4.04	3.78	5.11	4.39	5.68	10.71	10.30	11.03	10.09	10.66
4	油酸 (C18:1)	8.65	9.38	9.46	8.84	9.48	13.81	9.70	17.84	24.65	24.51	24.48	25.25	24.71
5	花生酸 (C20:0)	0.88	0.90	0.92	0.93	0.84	0.89	0.78	3.30	0.15	0.15	0.17	0.17	0.19
6	花生烯酸 (C20:1)	2.15	2.03	2.62	2.42	0.48	1.99	1.97	4.92	0.07	0.06	0.04	0.03	0.06
7	山嵛酸 (C22:0)	3.11	2.74	2.46	2.97	2.77	1.42	2.69	1.88	0.08	0.08	0.10	0.10	0.11

表2(续)

峰号 Peak number	脂肪酸种类 Fatty acid type	转化基因及平均脂肪酸相对含量 Target gene and average relative abundance of fatty acid												
		<i>GjFA</i> <i>E1-1</i>	<i>GjFA</i> <i>E1-2</i>	<i>CaFA</i> <i>E1-1</i>	<i>CaFA</i> <i>E1-2</i>	<i>CaFA</i> <i>E1-3</i>	<i>CaFA</i> <i>E1-4</i>	<i>CaFA</i> <i>E1-5</i>	<i>LdF</i> <i>AE1</i>	<i>GyFA</i> <i>E1-1</i>	<i>GyFA</i> <i>E1-2</i>	<i>TmFA</i> <i>E1-1</i>	<i>TmFA</i> <i>E1-2</i>	<i>pYES2/</i> <i>HEBX</i>
8	二十二 碳烯酸 (C22:1 ( <i>cis</i> -11))	3.87	3.49	4.17	3.73	3.88	3.41	3.22	0.17					
9	芥酸(C22:1 ( <i>cis</i> -13))	4.53	4.05	3.68	3.73	4.82	1.31	4.42	0.29					
10	木蜡酸 (C24:0)	5.27	4.82	4.20	5.12	4.60	2.68	4.64	2.50	0.13	0.15	0.17	0.16	0.21
11	神经酸 (C24:1)	1.18	1.13	1.02	1.28	1.23	0.36	1.27	0.06					

脂肪酸相对含量值取自两次独立生物重复测定的平均值;表中空格表示未检测到相应脂肪酸

The value of relative abundance of fatty acid is taken from the average of two independent biological repeated determinations; The space in the table indicates that the corresponding fatty acid is undetectable

### 3 讨论

#### 3.1 植物芥酸性状的遗传与利用

虽然自然界中早金莲种子的芥酸含量最高,但其种子含油量极低(6%~10%),且具有匍匐性生长习性、种子成熟期不一致、易脱落等不利性状,致使其无法大规模推广和应用<sup>[34]</sup>。目前,国内外芥酸工业制备的主要原料是高芥酸菜籽油和海甘蓝籽油,国内企业则主要使用高芥酸菜籽油。

甘蓝型油菜<sup>[34]</sup>(AACC,  $2n=4x=38$ )和海甘蓝<sup>[35]</sup>( $2n=6x=90$ )均为十字花科多倍体物种,但对于种子芥酸性状遗传的认识多来源于甘蓝型油菜。甘蓝型油菜种子芥酸含量受2对具有加性作用的胚基因控制,同时还受遗传因素和环境因素互作影响<sup>[36-37]</sup>,后发展为2对主基因+多基因控制的遗传模式,2对主基因分别位于A、C不同染色体组,基因效应不等,同时存在多基因的修饰作用<sup>[38]</sup>。Fourmann等<sup>[39]</sup>发现,甘蓝型油菜基因组中的2个FAEI基因(*BnFAEI.1*和*BnFAEI.2*)与控制芥酸含量的2个基因座位(*E1*和*E2*)存在共分离关系。Barret等<sup>[40]</sup>进一步证实,其中一个FAEI(*CE7*)即为*E1*候选基因,推测另一个FAEI可能为*E2*候选基因,*E1*和*E2*分别决定芥酸含量水平总变异的56.4%和28.6%,二者可共解释芥酸含量变异的90.6%。Qiu等<sup>[41]</sup>利用TNDH群体检测到2个调控种子芥酸含量的主效QTL,分别位于A8和C3连锁群。在此基础上,Wang等<sup>[42]</sup>证实,这2个QTL的候选基因均为FAEI基因(*Bn.FAEI-A8*、*Bn.FAEI-C3*)。十字花科FAEI

基因的序列变异与其种子芥酸含量密切相关,两者之间存在因果关系<sup>[26]</sup>。虽然少有海甘蓝种子芥酸性状遗传的文献报道,但其种子中的芥酸含量同样是受FAEI调控<sup>[14,43]</sup>。

因此,生产上高、低芥酸品种的选育主要是FAEI的选择。选择功能失活型FAEI培育低芥酸或高油酸品种用于食用油生产,如阳光80、中双系列、华杂系列等品种<sup>[27,44-45]</sup>;选择功能型FAEI培育高芥酸品种用于工业用油生产,如绵油系列<sup>[18-19]</sup>、高芥1号<sup>[46]</sup>等油菜品种以及Carmen、Hochst、Prophet等海甘蓝品种<sup>[16,35,43]</sup>。针对两种类型的FAEI基因序列特征,已开发出了SNP、RAPD、CAPS、SCAR、InDel等<sup>[9,23,39,45,47-49]</sup>多种分子标记可供使用,大大提高了育种效率,加速了育种进程。

#### 3.2 FAEI基因与芥酸合成能力

肖玲等<sup>[22]</sup>发现,油菜FAEI基因在其编码区DNA序列水平存在广泛的单核苷酸多态性(SNP)。在本研究中,不同物种的FAEI基因其编码蛋白同样存在广泛的一级结构差异,是导致其芥酸合成能力差异的根本原因。来自绵油328和海甘蓝的功能型FAEI均具有3个跨膜结构域、6个保守的半胱氨酸残基、4个保守的组氨酸残基以及S282、R395等特征,而来自阳光80和早金莲的失活型FAEI在上述某一或多个关键氨基酸位点均存在突变,但LdFAEI虽存在H420Y关键位点突变却仍具有弱活性,说明FAEI的分子失活机制存在多样性。

底物特异性是FAEI最重要的特性之一,与其一级结构紧密相关。不同的FAEI对不同碳链长度

和饱和度的脂酰-CoA 亲和力存在差异,并最终决定了合成的 VLCFAs 的碳链长度。AtFAE1 仅以 C18:1-CoA 和 C20:1-CoA 为底物<sup>[28]</sup>,LdFAE1 倾向于以饱和脂肪酸 C18:0-CoA 和 C20:0-CoA 为底物<sup>[14]</sup>,而 SdFAE1<sup>[6]</sup>、BnFAE1<sup>[15]</sup>、TmFAE1<sup>[12]</sup> 以及 CaFAE1<sup>[13]</sup> 对 C18 和 C20 饱和及单不饱和脂肪酸-CoA 均具有亲和力,且对 C20 的亲和力更高。本研究也有相似发现,2 个生物学活性较高的 GjFAE1-1 和 CaFAE1-3 对 C20 的底物特异性均要高于 C18,两者对 C18:0-CoA 的转化率分别为 70.36% 和 68.47%,对 C20:0-CoA 的转化率均为 90% 左右;两者对 C18:1-CoA 的转化率分别为 57.56% 和 52.34%,但对 C20:1-CoA 的转化率 CaFAE1-3(95.39%)要远远高于 GjFAE1-1(81.67%)。因此,高芥酸育种上 *CaFAE1-3* 更具应用潜力。

Blacklock 等<sup>[25]</sup>认为,FAE1 的底物特异性是由其 N 端和 C 端氨基酸序列共同决定的。目前,FAE1 对底物脂酰-CoA 碳链长度和不饱和度选择的分子机制还不太清楚<sup>[50-51]</sup>。但对于合成产物碳链长度的分子机制,Denic 等<sup>[51]</sup>通过蛋白脂质体重构实验提出了分子卡尺(Molecular caliper)机制,认为活性位点与 Elop 延长酶跨膜螺旋管腔端附近的赖氨酸之间的距离是决定因子。Paul 等<sup>[30]</sup>发现,酵母中单一一种超长链碳链延长酶 Elop 能将不同碳链长度底物合成到同一长度产物,同时不同 Elop 又能将同一碳链长度底物合成为不同碳链长度产物。

### 3.2 *FAEI* 基因与芥酸含量

*FAEI* 基因剂量与芥酸含量。转基因研究表明,种子中芥酸含量与其转入 *FAEI* 拷贝数成正相关,功能拷贝数越多芥酸含量越高,且含油量也越高<sup>[4]</sup>;反之,*FAEI* 基因突变失活后,其种子芥酸含量显著降低,同时含油量也降低<sup>[10,42,52-53]</sup>。本研究发现,海甘蓝基因组中至少存在 5 个 *FAEI* 基因拷贝,且均具备芥酸合成能力,是否是其种子芥酸含量高的直接原因值得进一步研究。

*FAEI* 芥酸合成能力与芥酸含量。Puyaubert 等<sup>[54]</sup>发现,源自于高、低芥酸油菜品种的 *FAEI* 基因在转录水平具有相似的表达趋势,但仅高芥酸来源的 *FAEI* 能在种子中合成芥酸,说明这种芥酸合成能力差异是发生在翻译后,即蛋白质序列水平。芥酸高合成能力的 *FAEI* 基因其编码产物往往具有特定的序列组成和关键氨基酸位点。Wang 等<sup>[23]</sup>采用 EcoTILLING 技术对 110 余份芸薹属材料的 *FAEI* 基因序列分析发现,*Bn.FAEI-A8* 第 845 bp 的碱基 C 或

T 对种子芥酸含量影响显著,此处为 C 的单倍型其平均芥酸含量为 45.36%,为 T 的单倍型仅含 2.04%;对应的编码氨基酸分别为 282 位丝氨酸(S)或苯丙氨酸(F)。*Bn.FAEI-C3* 则存在第 1366~1369 bp 或(和)第 1422~1423 bp 碱基缺失的 3 种单倍型,无缺失单倍型的芥酸平均含量为 44.73%,1366~1369 bp 缺失单倍型芥酸平均含量为 2.78%,1422~1423 bp 缺失单倍型芥酸平均含量为 0.67%,双位点缺失单倍型芥酸平均含量为 0.55%,显著低于单位点缺失的含量。本研究从高芥酸油菜品种绵油 328 和高油酸品种阳光 80 中克隆的 *FAEI* 序列特征与 Wang 等<sup>[23]</sup>分析结果极其相似,只是 *FAEI* 缺失型突变缺失的碱基组成存在差异,缺失的碱基数目和位置均相同。此外,FAE1 蛋白氨基酸序列也是正确空间构象形成、二聚体组装效率、膜结合稳定性、底物结合偏好性等决定因素。*FAEI* 突变导致其编码产物失活是目前低芥酸油菜的主要基因资源。Wu 等<sup>[44]</sup>鉴定到 *FAEI* 发生 4 bp 缺失导致零芥酸油菜。Wang 等<sup>[42]</sup>采用 TILLING 技术获得的 3 个低芥酸材料(L080-1, N004-1, L297-1),可以作为一种新的遗传资源用于 LEA 油菜育种,而不会产生间接近亲繁殖效应和遗传侵蚀。

*FAEI* 基因表达调控与芥酸含量。*FAEI* 启动子具有极强的种子表达特异性,且活性要高于同类启动子 *napin*,由其驱动的 *FAEI* 的转录高峰期与油脂积累进程几乎同步<sup>[55]</sup>。Yan 等<sup>[45]</sup>对我国 1981 份白菜型油菜地方品种分析发现,不同于甘蓝型油菜,白菜型油菜低芥酸性状并不是 *FAEI* 编码序列变异导致,而可能是其起始密码子上游 1300 bp 处的 28 bp 碱基(富含 AT)缺失导致了 *FAEI* 表达水平下降所致。该基因型表现出在分离群体中与低芥酸性状共分离。此外,转录因子 MYB96 可以结合到 *FAEI* 基因启动子区促进其在种子中的表达进而促进芥酸合成<sup>[56]</sup>。

### 3.3 超高芥酸分子设计育种的几点思考

芥酸是一种重要的化工原料,具有广泛的应用领域和巨大的市场需求,培育超高芥酸含量的作物品种,经济价值可观,社会效益明显<sup>[5,34]</sup>。用植物种子生产芥酸具有可再生性,是工业芥酸原料获取的理想途径。提高种子油中的芥酸含量能有效降低其工业制备成本,Li 等<sup>[43]</sup>估算,若种子油中芥酸含量增加 10%,其制备成本可降低一半;若含量达到 90% 则可直接用于芥酸酰胺生产而无需纯化。在高芥酸及超高芥酸材料创制方面,已有大量的

研究和报道,方法和手段也多样,如种内杂交<sup>[57]</sup>、种间杂交<sup>[58]</sup>、体细胞杂交<sup>[32,59]</sup>、RNA干扰<sup>[60-61]</sup>、转基因<sup>[4,10,43,62-65]</sup>等,其中Li等<sup>[43]</sup>报道的一个海甘蓝转基因株系(*BnFAE1* + *LdLPAAT* + *CaFAD2-RNAi*)种子芥酸含量达76.9%,是迄今芥酸含量最高的遗传工程材料。那么,植物种子中的芥酸含量是否还有提升空间,又如何实现?

基于对种子中脂肪酸生物合成通路、转运储存机制及分布规律<sup>[66]</sup>等的认识和理解,以及按照作物生产上的“源-流-库”理论,从以下几个方面着手对脂肪酸合成关键结构基因和调控基因进行设计和优化,并综合应用于育种实践,获得芥酸含量达到80%~90%的材料是完全有可能的。

(1)育种手段的选择。油菜和海甘蓝基因组中均不具有将芥酸导入到TAG的 $sn-2$ 位功能的溶血性磷脂酰基转移酶(LPAAT),因此常规育种方法无法突破66.7%的理论极限含量,采用转基因、基因编辑等生物技术手段是必然选择。遗传修饰材料再辅以分子标记辅助选择、小孢子培养、人工杂交等技术可以快速实现目标基因的聚合和纯合,从而大大加速育种进程。

(2)遗传转化受体材料的选择。众多研究表明,*FAE1*对种子芥酸含量具有加性和显性效应,单个*FAE1*转基因贡献的芥酸含量在1%~30%之间。含油量高及基础芥酸含量高的受体材料,往往具有对芥酸合成有利的基因型(主基因+修饰基因),加上转入的*FAE1*作用,可以大大提升对“源”(C18:1)的转化效率。目前,以油菜和海甘蓝为受体材料的遗传转化技术体系已相当成熟,因此高芥酸油菜和海甘蓝是理想的遗传转化受体材料,但应注意特殊基因型受体材料的遗传转化体系的优化。

(3)靶标基因的选择与载体构建策略。已有研究表明,种子中芥酸含量主要取决于*FAE1*、*FAD2*和*LPAAT*3个基因的协同作用,它们涉及芥酸合成与储存的“源”、“流”和“库”三个环节,因此,这3个基因是芥酸基因工程的主要靶标。针对这3个基因,理想的高芥酸材料基因型应该是*FAE1 FAE1/fad2 fad2/LPAAT LPAAT*。芥酸高合成能力的*FAE1*可实现油酸“源”的高效转化;*FAD2*的失活(*fad2*)可以阻断油酸“源”向多不饱和方向转化,增加其向碳链延伸方向转化的底物量,再结合高活性、多拷贝*FAE1*可实现“引流”和“扩流”效果;外源*LPAAT*负责芥酸入“库”,将游离芥酰-CoA导入到TAG的 $sn-2$ 位。表达载体启动子应均为种子特异启动子,*FAE1*启动子

要优于*napiin*和*CaMV 35SP*。3个基因可以构建在一个表达载体中,也可以分开构建、转化然后再通过杂交而聚合,但后者后期筛选、鉴定工作量较大。以*fad2fad2*基因型高含油量高芥酸材料为受体,再构建*FAE1+LPAAT*共表达载体进行转化较为可行。

(4)*FAE1*基因的选择。实现超高芥酸的3个目标基因当中,*FAE1*的选择可塑性最大。目前并不清楚决定*FAE1*芥酸合成能力的最佳一级结构,这也是本研究的出发点和初衷,筛选自然界中存在的芥酸高合成能力的*FAE1*。本研究克隆的12个正常编码的*FAE1*当中,Ca*FAE1-3*对C20:1的转化率可达95.39%,若再配合一个对C18:1高转化率的*FAE1*,则可显著提高芥酸的合成量。此外,还可以利用点突变、基因改组(Gene shuffling)等技术人为促进*FAE1*的进化,筛选获得芥酸合成能力进一步提高的*FAE1*用于遗传转化。因此,要实现超高芥酸就应选择具有高合成能力的*FAE1*基因。

#### 参考文献

- [1] Bach L, Faure J D. Role of very-long-chain fatty acids in plant development, when chain length does matter. *Comptes Rendus Biologies*, 2010, 333 (4): 361-370
- [2] Batsale M, Bahammou D, Fouillen L, Mongrand S, Joubès J, Domergue F. Biosynthesis and functions of very-long-chain fatty acids in the responses of plants to abiotic and biotic stresses. *Cells*, 2021, 10 (6): 1284
- [3] 孟继红. 芥酸合成基因表达的量化分析及芥酸种质资源的TRAP分子鉴定. 乌鲁木齐: 新疆农业大学, 2007  
Meng J H. Quantitative analysis gene expression of erucic acid synthesis and TRAP molecular identification of erucic acid germplasm. Urumqi: Xinjiang Agricultural University, 2007
- [4] 淮东欣. 调控超长链脂肪酸合成关键基因对植物种子中脂肪酸组成的影响. 武汉: 华中农业大学, 2015  
Huai D X. Effects of regulating the key genes in very long chain fatty acid biosynthesis pathway on fatty acid composition in plant seeds. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2015
- [5] 吴关庭, 郎春秀, 陈锦清. 芥酸的生产及其衍生产物开发. *中国油脂*, 2007, 32 (6): 27-31  
Wu G T, Lang C X, Chen J Q. Production of erucic acid and development of its derivative product. *China Oils and Fats*, 2007, 32 (6): 27-31
- [6] James D W J, 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] Lassner M W, Lardizabal K, Metz J G. A *jojoba*  $\beta$ -Ketoacyl-CoA synthase cDNA complements the canola fatty acid elongation mutation in transgenic plants. *Plant Cell*, 1996, 8 (2): 281-292

- [8] Han J X, Lühs W, Sonntag K, Zähringer U, Borchardt D S, Wolter F P, Heinz E, Frentzen M. Functional characterization of  $\beta$ -ketoacyl-CoA synthase genes from *Brassica napus* L. *Plant Molecular Biology*, 2001, 46 (2): 229-239
- [9] Gupta V, Mukhopadhyay A, Arumugam N, Sodhi Y S, Pental D, Pradhan A K. Molecular tagging of erucic acid trait in oilseed mustard (*Brassica juncea*) by QTL mapping and single nucleotide polymorphisms in *FAEI* gene. *Theoretical and Applied Genetics*, 2004, 108 (4): 743-749
- [10] Kanrar S, Venkateswari J, Dureja P, Kirti P B, Chopra V L. Modification of erucic acid content in Indian mustard (*Brassica juncea*) by up-regulation and down-regulation of the *Brassica juncea* *FATTY ACID ELONGATION 1* (*BjFAEI*) gene. *Plant Cell Reports*, 2006, 25 (2): 148-155
- [11] Das S, Roscoe T J, Delseny M, Srivastava P S, Lakshmikumaran M. 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*. *Plant Science*, 2002, 162: 245-250
- [12] Katavic V, Mietkiewska E, Barton D L, Giblin E M, Reed D W, Taylor D C. Restoring enzyme activity in nonfunctional low erucic acid *Brassica napus* fatty acid elongase 1 by a single amino acid substitution. *European Journal of Biochemistry*, 2002, 269 (22): 5625-5631
- [13] Mietkiewska E, Giblin E M, Wang S, Barton D L, Dirpaul J, Brost J M, Katavic V, Taylor D C. Seed-specific heterologous expression of a nasturtium *FAE* gene in *Arabidopsis* results in a dramatic increase in the proportion of erucic acid. *Plant Physiology*, 2004, 136 (1): 2665-2675
- [14] Mietkiewska E, Brost J M, Giblin E M, Barton D L, Taylor D C. Cloning and functional characterization of the *fatty acid elongase 1* (*FAEI*) gene from high erucic *Crambe abyssinica* cv. Prophet. *Plant Biotechnology Journal*, 2007, 5 (5): 636-645
- [15] Cahoon E B, Marillia E F, Stecca K L, Hall S E, Taylor D C, Kinney A J. Production of fatty acid components of meadowfoam oil in somatic soybean embryos. *Plant Physiology*, 2000, 124 (1): 243-251
- [16] Guo Y, Mietkiewska E, Francis T, Katavic V, Brost J M, Giblin M, Barton D L, Taylor D C. Increase in nervonic acid content in transformed yeast and transgenic plants by introduction of a *Lunaria annua* L. *3-ketoacyl-CoA synthase* (*KCS*) gene. *Plant Molecular Biology*, 2009, 69 (5): 565-575
- [17] Taylor D C, Francis T, Guo Y, Brost J M, Katavic V, Mietkiewska E, Michael Giblin E, Lozinsky S, Hoffman T. Molecular cloning and characterization of a *KCS* gene from *Cardamine graeca* and its heterologous expression in *Brassica* oilseeds to engineer high nervonic acid oils for potential medical and industrial use. *Plant Biotechnology Journal*, 2009, 7: 925-938
- [18] 刘念, 范其新, 汤天泽, 蒙大庆, 罗华友, 李红. 种植密度和施氮量对特高芥酸绵油 309 产量和品质的影响及相关性分析. *湖北农业科学*, 2014, 53 (23): 5673-5676
- [19] Liu N, Fan Q X, Tang T Z, Meng D Q, Luo H Y, Li H. Effects of densities, nitrogen rates on yield, quality of rapeseed Mianyou 309 with high erucic acid and correlation analysis. *Hubei Agricultural Sciences*, 2014, 53 (23): 5673-5676
- [19] 刘念, 汤天泽, 范其新, 蒙大庆, 李芝凡, 陈军. 不同地点、播期和氮肥施用量对特高芥酸油菜经济和品质性状的影响. *甘肃农业大学学报*, 2015, 50 (3): 68-72
- [20] Liu N, Tang T Z, Fan Q X, Meng D Q, Li Z F, Chen J. Effects of site, sowing date and nitrogen application amount on economical characters, quality traits of high erucic acid rapeseed. *Journal of Gansu Agricultural University*, 2015, 50 (3): 68-72
- [20] Ghanevati M, Jaworski J G. Active-site residues of a plant membrane-bound fatty acid elongase beta-ketoacyl-CoA synthase, *FAEI* KCS. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2001, 1530 (1): 77-85
- [21] Katavic V, Barton D L, Giblin E M, Reed D W, Kumar A, Taylor D C. Gaining insight into the role of serine 282 in *B. napus* *FAEI* condensing enzyme. *FEBS Letters*, 2004, 562 (1-3): 118-124
- [22] 肖玲, 卢长明. 油菜脂肪酸延长酶基因 *fae1* 片段的克隆与 SNP 分析. *中国农业科学*, 2005, 38(5): 891-896
- [22] Xiao L, Lu C M. Cloning of *fae1* gene partial sequence and SNP analysis in *Brassica* species. *Scientia Agricultura Sinica*, 2005, 38(5): 891-896
- [23] Wang N, Shi L, Tian F, Ning H C, Wu X M, Long Y, Meng J L. Assessment of *FAEI* polymorphisms in three *Brassica* species using EcoTILLING and their association with differences in seed erucic acid contents. *BMC Plant Biology*, 2010, 10: 137
- [24] 武玉花, 吴刚, 肖玲, 曹应龙, 卢长明. 十字花科植物中低芥酸野生种的发掘和 *FAEI* 基因功能的验证. *中国农业科学*, 2009, 42 (11): 3819-3827
- [24] Wu Y H, Wu G, Xiao L, Cao Y L, Lu C M. Discovery of low erucic acid wild species and functional characterization of *FAEI* genes in crucifer species. *Scientia Agricultura Sinica*, 2009, 42 (11): 3819-3827
- [25] Blacklock B J, Jaworski J G. Studies into factors contributing to substrate specificity of membrane-bound 3-ketoacyl-CoA synthases. *European Journal of Biochemistry*, 2002, 269 (19): 4789-4798
- [26] Sun X Q, Pang H, Li M M, Peng B, Guo H S, Yan Q Q, Hang Y Y. Evolutionary pattern of the *FAEI* gene in brassicaceae and its correlation with the erucic acid trait. *PLoS ONE*, 2013, 8 (12): e83535
- [27] Roscoe T J, Lessire R, Puyaubert J, Renard M, Delseny M. Mutations in the *fatty acid elongation 1* gene are associated with a loss of beta-ketoacyl-CoA synthase activity in low erucic acid rapeseed. *FEBS Letters*, 2001, 492 (1-2): 107-111
- [28] Blacklock B J, Jaworski J G. Substrate specificity of *Arabidopsis* 3-ketoacyl-CoA synthases. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2006, 346 (2): 583-590
- [29] Stenback K E, Flyckt K S, Hoang T, Campbell A A, Nikolau

- B J. Modifying the yeast very long chain fatty acid biosynthetic machinery by the expression of plant 3-ketoacyl CoA synthase isozymes. *Scientific Reports*, 2022, 12 (1): 13235
- [30] Paul S, Gable K, Beaudoin F, Cahoon E, Jaworski J, Napier J A, Dunn T M. Members of the *Arabidopsis* FAE1-like 3-ketoacyl-CoA synthase gene family substitute for the Elop proteins of *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of Biological Chemistry*, 2006, 281 (14): 9018-9029
- [31] Taylor D C, Francis T, Lozinsky S, Hoffman T, Giblin M, Marillia E F. Cloning and characterization of a constitutive lysophosphatidic acid acyltransferase 2 (*LPAT2*) gene from *Tropaeolum majus* L. *The Open Plant Science Journal*, 2010, 4: 7-17
- [32] Wang Y P, Sonntag K, Rudloff E. Development of rapeseed with high erucic acid content by asymmetric somatic hybridization between *Brassica napus* and *Crambe abyssinica*. *Theoretical and Applied Genetics*, 2003, 106 (7): 1147-1155
- [33] 徐爱遐, 黄镇, 马朝芝, 肖恩时, 张修森, 涂金星, 傅廷栋. 芥菜型油菜 *FAE1* 基因序列特征及其与芥酸含量关系的初步分析. *作物学报*, 2010, 36 (5): 794-800  
Xu A X, Huang Z, Ma C Z, Xiao E S, Zhang X S, Tu J X, Fu T D. *FAE1* sequence characteristics and its relationship with erucic acid content in *Brassica juncea*. *Acta Agronomica Sinica*, 2010, 36 (5): 794-800
- [34] Wang P D, Xiong X J, Zhang X B, Wu G, Liu F. A review of erucic acid production in *Brassicaceae* oilseeds: Progress and prospects for the genetic engineering of high and low-erucic acid rapeseeds (*Brassica napus*). *Frontiers in Plant Science*, 2022, 13: 899076
- [35] Cheng J H, Salentijn E M J, Huang B Q, Krens F A, Dechesne A C, Visser R G F, van Loo E N. Isolation and characterization of the omega-6 fatty acid desaturase (*FAD2*) gene family in the allohexaploid oil seed crop *Crambe abyssinica* Hochst. *Molecular Breeding*, 2013, 32: 517-531
- [36] Siebel J, Pauls K P. Inheritance patterns of erucic acid content in populations of *Brassica napus* microspore-derived spontaneous diploids. *Theoretical and Applied Genetics*, 1989, 77: 489-494
- [37] 吴江生. 甘蓝型油菜芥酸含量的遗传研究. *湖北农业科学*, 1989 (7): 16-17, 32  
Wu J S. Genetic study on erucic acid content in *Brassica napus*. *Hubei Agricultural Sciences*, 1989 (7): 16-17, 32
- [38] 戚存扣, 盖钧镒, 章元明. 甘蓝型油菜芥酸含量的主基因+多基因遗传. *遗传学报*, 2001, 28 (2): 182-187  
Qi C K, Gai J Y, Zhang Y M. Major gene plus poly-gene inheritance of erucic acid content in *Brassica napus* L.. *Acta Genetica Sinica*, 2001, 28 (2): 182-187
- [39] Fourmann M, Barret P, Renard M, Pelletier G, Delourme R, Brunel D. The two genes homologous to *Arabidopsis* *FAE1* cosegregate with the two loci governing erucic acid content in *Brassica napus*. *Theoretical and Applied Genetics*, 1998, 96: 852-858
- [40] Barret P, Delourme R, Renard M, Domergue F, Lessire R, Delseny M, Roscoe T J. A rapeseed *FAE1* gene is linked to the E1 locus associated with variation in the content of erucic acid. *Theoretical and Applied Genetics*, 1998, 96 (2): 177-186
- [41] Qiu D, Morgan C, Shi J, Long Y, Liu J, Li R, Zhuang X, Wang Y, Tan X, Dietrich E, Weihmann T, Everett C, Vanstraelen S, Beckett P, Fraser F, Trick M, Barnes S, Wilmer J, Schmidt R, Li J, Li D, Meng J, Bancroft I. A comparative linkage map of oilseed rape and its use for QTL analysis of seed oil and erucic acid content. *Theoretical and Applied Genetics*, 2006, 114 (1): 67-80
- [42] Wang N, Wang Y, Tian F, King G J, Zhang C, Long Y, Shi L, Meng J L. A functional genomics resource for *Brassica napus*: Development of an EMS mutagenized population and discovery of *FAE1* point mutations by TILLING. *The New Phytologist*, 2008, 180 (4): 751-765
- [43] Li X Y, van Loo E N, Gruber J, Fan J, Guan R, Frentzen M, Stymne S, Zhu L H. Development of ultra-high erucic acid oil in the industrial oil crop *Crambe abyssinica*. *Plant Biotechnology Journal*, 2012, 10 (7): 862-870
- [44] Wu G, Wu Y H, Xiao L, Li X D, Lu C M. Zero erucic acid trait of rapeseed (*Brassica napus* L.) results from a deletion of four base pairs in the *fatty acid elongase 1* gene. *Theoretical and Applied Genetics*, 2008, 116 (4): 491-499
- [45] Yan G X, Li D, Cai M X, Gao G Z, Chen B Y, Xu K, Li J, Li F, Wang N, Qiao J W, Li H, Zhang T Y, Wu X M. Characterization of *FAE1* in the zero erucic acid germplasm of *Brassica rapa* L.. *Breeding Science*, 2015, 65 (3): 257-264
- [46] 傅寿仲, 张洁夫, 戚存扣, 浦惠明, 高建芹, 陈新军. 工业专用型高芥酸油菜新品种选育. *作物学报*, 2004, 30 (5): 409-412  
Fu S Z, Zhang J F, Qi C K, Pu H M, Gao J Q, Chen X J. Breeding of high erucic acid rapeseed (*B. napus*) for industrial use. *Acta Agronomica Sinica*, 2004, 30 (5): 409-412
- [47] Saini N, Singh N, Kumar A, Vihan N, Yadav S, Vasudev S, Yadava D K. Development and validation of functional CAPS markers for the *FAE* genes in *Brassica juncea* and their use in marker-assisted selection. *Breeding Science*, 2016, 66 (5): 831-837
- [48] Wu Y, Xiao L, Wu G, Lu C. Cloning of fatty acid elongase1 gene and molecular identification of A and C genome in *Brassica* species. *Science in China Series C: Life Sciences* 2007, 50 (3): 343-349
- [49] Jourden C, Barret P, Horvais R, Foisset N, Delourme R, Renard M. Identification of RAPD markers linked to the loci controlling erucic acid level in rapeseed. *Molecular Breeding*, 1996, 2: 61-71
- [50] Joubès J, Raffaele S, Bourdenx B, Garcia C, Laroche-Traineau J, Moreau P, Domergue F, Lessire R. The VLCEFA elongase gene family in *Arabidopsis thaliana*: Phylogenetic analysis, 3D modelling and expression profiling. *Plant Molecular Biology*, 2008, 67 (5): 547-566
- [51] Denic V, Weissman J S. A molecular caliper mechanism for

- determining very long-chain fatty acid length. *Cell*, 2007, 130 (4): 663-677
- [52] Cao Z Y, Tian F, Wang N, Jiang C C, Lin B, Xia W, Shi J Q, Long Y, Zhang C Y, Meng J L. Analysis of QTLs for erucic acid and oil content in seeds on A8 chromosome and the linkage drag between the alleles for the two traits in *Brassica napus*. *Journal of Genetics and Genomics*, 2010, 37 (4): 231-240
- [53] Liu Y H, Du Z L, Lin S L, Li H M, Lu S P, Guo L, Tang S. CRISPR/Cas9-targeted mutagenesis of *BnaFAE1* genes confers low-erucic acid in *Brassica napus*. *Frontiers in Plant Science*, 2022, 13: 848723
- [54] Puyaubert J, Garbay B, Costaglioli P, Dieryck W, Roscoe T J, Renard M, Cassagne C, Lessire R. Acyl-CoA elongase expression during seed development in *Brassica napus*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2001, 1533 (2): 141-152
- [55] Rossak M, Smith M, Kunst L. Expression of the *FAE1* gene and *FAE1* promoter activity in developing seeds of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Molecular Biology*, 2001, 46 (6): 717-725
- [56] Lee H G, Park B Y, Kim H U, Seo P J. MYB96 stimulates C18 fatty acid elongation in *Arabidopsis* seeds. *Plant Biotechnology Report*, 2015, 9: 161-166
- [57] Sasongko N D, Möllers C. Toward increasing erucic acid content in oilseed rape (*Brassica napus* L.) through the combination with genes for high oleic acid. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 2005, 82 (6): 445-449
- [58] Roslinsky V, Falk K C, Gaebelein R, Mason A S, Eynck C. Development of *B. carinata* with super-high erucic acid content through interspecific hybridization. *Theoretical and Applied Genetics*, 2021, 134 (10): 3167-3181
- [59] Heath D W, Earle E D. Synthesis of high erucic acid rapeseed (*Brassica napus* L.) somatic hybrids with improved agronomic characters. *Theoretical and Applied Genetics*, 1995, 91: 1129-1136
- [60] 王志伟, 张自阳, 林丽婷, 张金文, 刘明久, 乔岩. Artificial miRNA 调控甘蓝型油菜芥酸的研究. *核农学报*, 2019, 33 (1): 24-30
- Wang Z W, Zhang Z Y, Lin L T, Zhang J W, Liu M J, Qiao Y. Study of artificial miRNA regulate erucic acid in *Brassica napus*. *Journal of Nuclear Agricultural Sciences*, 2019, 33 (1): 24-30
- [61] Jadhav A, Katavic V, Marillia E F, Michael Giblin E, Barton D L, Kumar A, Sonntag C, Babic V, Keller W A, Taylor D C. Increased levels of erucic acid in *Brassica carinata* by co-suppression and antisense repression of the endogenous *FAD2* gene. *Metabolic Engineering*, 2005, 7 (3): 215-220
- [62] Nath U K, Wilmer J A, Wallington E J, Becker H C, Möllers C. Increasing erucic acid content through combination of endogenous low polyunsaturated fatty acids alleles with *Ld-LPAAT* + *Bn-fae1* transgenes in rapeseed (*Brassica napus* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, 2009, 118 (4): 765-773
- [63] Lassner M W, Levering C K, Davies H M, Knutzon D S. Lysophosphatidic acid acyltransferase from meadowfoam mediates insertion of erucic acid at the *sn*-2 position of triacylglycerol in transgenic rapeseed oil. *Plant Physiology*, 1995, 109: 1389-1394
- [64] 陈柳, 毛善婧, 陆莉, 储成才, SONNTAG Karin, 王幼平. 导入 *LPAAT* 和 *KCS* 基因对油菜种子芥酸含量的影响. *作物学报*, 2006, 32 (8): 1174-1178
- Chen L, Mao S J, Lu L, Chu C C, Karin S, Wang Y P. Influence of introducing *LPAAT* and *KCS* genes into rape on erucic acid content of seed. *Acta Agronomica Sinica*, 2006, 32 (8): 1174-1178
- [65] 石江华, 郎春秀, 王伏林, 吴学龙, 陈锦清, 吴关庭. 工业用高油高芥酸转基因油菜株系的获得. *分子植物育种*, 2016, 4 (3): 586-592
- Shi J H, Lang C X, Wang F L, Wu X L, Chen J Q, Wu G T. Development of high oil and high erucic acid transgenic rapeseed lines for industrial use. *Molecular Plant Breeding*, 2016, 4 (3): 586-592
- [66] Lu S P, Aziz M, Sturtevant D, Chapman K D, Guo L. Heterogeneous distribution of erucic acid in *Brassica napus* seeds. *Frontiers in Plant Science*, 2020, 10: 1744