

DOI: 10.13332/j.1000-1522.20160121

毛果杨中链酰基辅酶 A 合成酶的克隆及酶学分析

曹山 蒋璐瑶 李丽红 要笑云 张强 撒静宜 王莹 李慧 陆海

(北京林业大学生物科学与技术学院)

摘要:中链酰基辅酶 A 合成酶(MACS)属于腺苷酸合成酶超基因家族,催化中链脂肪酸与辅酶 A 结合形成相应的中链酰基辅酶 A。本研究通过同源检索毛果杨基因组数据库中的 4CL 基因,克隆得到毛果杨 *PtMACS1* 的基因序列(基因编号:estExt_fgenesh4_pg. c_640066)。通过序列分析可知,Box I 和 Box II 两个在 4CL 中保守的结构域在该蛋白中并不保守。将 *PtMACS1* 与原核表达载体 pET-30a(+) 构建融合表达载体 *PtMACS1*-pET-30a(+),转化大肠杆菌 BL21(DE3)后诱导重组蛋白进行表达。镍柱纯化重组蛋白后进行酶学活性分析,研究结果表明该蛋白对中链脂肪酸己酸、壬酸、癸酸显示出明显活性;*K_{cat}* 分别为(130 ± 2.65)、(193 ± 3.46)、(201 ± 5.51) μmol/(min·mg),以该蛋白的最适底物癸酸测得该蛋白的最适反应温度为 37 °C,最适反应 pH 为 7.0。该结果表明,*PtMACS1* 属于毛果杨中链酰基辅酶 A 合成酶家族一员,为后续毛果杨腺苷酸合成酶超基因家族的鉴定及分类分析提供资料。

关键词:毛果杨; MACS; 克隆; 原核表达; 酶学分析

中图分类号:S718.43 **文献标志码:**A **文章编号:**1000-1522(2016)07-0009-07

CAO Shan; JIANG Lu-yao; LI Li-hong; YAO Xiao-yun; ZHANG Qiang; HAN Jing-yi; WANG Ying; LI Hui; LU Hai. **Cloning and enzymatic analysis of medium-chain acyl coenzyme A synthetase in *Populus trichocarpa*.** *Journal of Beijing Forestry University*(2016)**38**(7) 9-15 [Ch,26 ref.] College of Biological Sciences and Biotechnology, Beijing Forestry University, Beijing, 100083, P. R. China.

Medium-chain acyl coenzyme A synthetase (MACS) family is a subfamily of adenylate-forming enzymes superfamily, catalyzing the medium-chain fatty acids with CoA to produce medium-chain-acyl-CoA. *PtMACS1* (gene model:estExt_fgenesh4_pg. c_640066) was cloned via blast in the database JGI of *Populus trichocarpa*. Sequence analysis showed that the conserved domains BoxI and BoxII in 4CL were not conserved in the proteins. Expression vector *PtMACS1*-pET-30a(+) was constructed and transformed into *E. coli* BL21 (DE3) to express the recombinant protein. The recombinant protein was purified by Ni-NTA affinity chromatography, enzymatic analysis showed that the recombinant protein had remarkable catalytic activity to the medium-chain fatty acids, such as hexanoic acid, nonanoic acid and decylic acid, and the *K_{cat}* were 130, 193 and 201 μmol/L/(min·mg) respectively. When decylic acid was used as the substrate, the optimum temperature was 37 °C and pH was 7.0. The results demonstrate that *PtMACS1* is one of the MACS family members, and supplies research data in identifying and classifying members from adenylate-forming enzymes superfamily in *Populus trichocarpa*.

Key words *Populus trichocarpa*; MACS; gene clone; prokaryotic expression; enzymatic analysis

羧酸的激活是生物体内众多新陈代谢进行的前提,如脂肪酸、氨基酸以及一些次级代谢物的生物合成及分解。研究表明腺苷酸合成酶超基因家族能够

通过依赖 ATP 进行的 1 个两步反应来实现生物体内羧酸的激活。该反应第 1 步是形成酰基-AMP 中间体,同时释放出焦磷酸盐。第 2 步反应则将酰基

收稿日期:2016-04-08 修回日期:2016-05-30

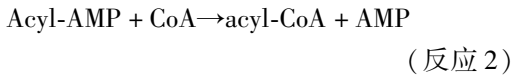
基金项目:国家自然科学基金项目(31570582,30671697,J1103516)。

第一作者:曹山,博士生。主要研究方向:树木分子生物学。Email:lles0909@163.com 地址:100083 北京市海淀区清华东路 35 号北京林业大学生物科学与技术学院。

责任作者:陆海,教授,博士生导师。主要研究方向:树木发育与木材形成。Email:luhai1974@bjfu.edu.cn 地址:同上。

本刊网址: <http://j.bjfu.edu.cn>; <http://journal.bjfu.edu.cn>

转移到最终受体上,在多数情况下,AMP 会释放出来^[1]。



腺苷酸合成酶超基因家族按所催化底物的不同分为酰基辅酶 A 合成酶家族 (ACS, EC6. 2. 1. 1)、4-香豆酸辅酶 A 连接酶家族 (4CL, EC6. 2. 1. 12)、非核糖体肽合成酶家族、氯苯甲酸辅酶 A 连接酶家族以及荧光素酶家族 (EC1. 13. 12. 7)^[2]。其中酰基辅酶 A 合成酶家族又根据催化底物碳原子数的不同分为短链酰基辅酶 A 家族 ($C_2 \sim C_4$)、中链酰基辅酶 A 家族 ($C_6 \sim C_{12}$) 及长链酰基辅酶 A 家族 (大于 C_{14})^[3]。腺苷酸合成酶基因在植物中数量众多、家族庞大而且功能各异,因此有关该基因家族的研究一直是近年来研究的热点之一。在模式植物拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 的研究中,已有 44 个腺苷酸合成酶超基因家族成员被发现,其中 1 个为乙酰辅酶 A 合成酶基因,4 个为香豆酸辅酶 A 连接酶家族,9 个属于长链酰基辅酶 A 合成酶家族成员,剩余的基因功能尚未明确^[4-11]。在木本植物的研究中,随着毛果杨 (*Populus trichocarpa*) 全基因组测序的完成,已有 18 个 4CL 的同源基因被发现^[12],其中 2 个为乙酰辅酶 A 合成酶基因,5 个研究确定为 4CL 基因,剩余的基因功能并未完全确定。

中链酰基辅酶 A 合成酶 (MACS) 属于腺苷酸合成酶超基因家族的一员,催化中链脂肪酸与辅酶 A 结合形成相应的中链酰基辅酶 A。目前有关 MACS 的报道主要集中于动物及真菌方面,例如人^[13]、老鼠^[14] 以及真菌甲烷八叠球菌 (*Methanosarcina barkeri*)^[15] 等,而在植物方面却鲜见报道。本实验通过同源检索毛果杨基因组数据库中的 4CL 基因,利用 PCR 技术克隆获得了毛果杨基因 *PtMACS1* 的序列,酶活性测定结果表明该基因并非是真的 4CL 基因,而是毛果杨的中链酰基辅酶 A 合成酶基因。

1 材料与实验方法

1.1 材料

1.1.1 数据库与分析软件

毛果杨全基因组数据库: [http://genome.jgi.](http://genome.jgi.doe.gov/Popt1_1/Popt1_1.info.html)

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>; GenBank: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>; 拟南芥全基因组数据库: <http://arabidopsis.org/>。基因序列分析软件: DNAMAN, BioEdit, BlastP。系统进化分析软件: MEGA6.0。

1.1.2 材料与试剂

毛果杨 (*Populus trichocarpa*) 组培苗由北京林业大学生物化学与分子生物学研究室继代与扩繁。大肠杆菌 (*Escherichia coli*) JM109、BL21 (DE3) 及表达载体 pET-30a (+) 由本实验室保存。克隆载体 pMD-18T, Ex Taq 酶购自 TaKaRa 公司。植物总 RNA 提取试剂盒,反转录试剂盒,琼脂糖凝胶回收试剂盒与普通质粒小提试剂盒购自北京天根生物公司。T4-DNA 连接酶,限制性内切酶 Sac I 和 Sal I 购自 promega 公司。咪唑、中性羟胺盐酸盐、香豆酸、咖啡酸、阿魏酸、芥子酸、5-羟基阿魏酸、荧光素、荧光素酶、二硫赤藓糖醇 (DTE)、异丙基硫代半乳糖苷 (IPTG)、三氯乙酸 (TCA) 均购自 Sigma 公司。己酸、壬酸、癸酸、油酸购自北京国药有限公司。Ni-NTA 亲和层析柱购自 QIAGEN 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 *PtMACS1* 基因序列的克隆

通过同源检索毛果杨基因组数据库中的 4CL 基因,获得名为 *Pt4CL5* 的预测序列,根据该序列设计上下游引物 (表 1)。按照总 RNA 提取试剂盒的操作流程以毛果杨组培苗的叶片为材料提取毛果杨的总 RNA;根据反转录试剂盒的操作步骤,以 Oligo (dT)₁₈ 为引物进行反转录得到毛果杨的 cDNA 序列,以 cDNA 为模板进行 PCR 扩增获得目的基因序列,将目的基因连接到 pMD-18T 后送北京六合华大公司进行测序获得正确的目的基因序列。

1.2.2 *PtMACS1* 基因的序列分析以及系统进化树的构建

利用 BioEdit、DNAMAN 等软件分析 *PtMACS1* 基因序列及氨基酸序列,获得分析结果。利用 NCBI 网站上的 BLASTx 程序进行同源序列比对分析,通过 MEGA6.0 软件进行系统进化树的构建。

1.2.3 融合表达载体 *PtMACS1*-pET-30a (+) 的构建

利用 Sac I 和 Sal I 双酶切重组测序质粒 pMD-18T-*PtMACS1* 和原核表达载体 pET-30a (+),回收目的片段后经 T4-DNA 连接酶连接后转化 *E. coli*

表 1 *PtMACS1* 克隆所用 PCR 引物

Tab. 1 Primers used for *PtMACS1* cloning

引物名称 Primer	上游引物 (5'-3') Upstream primer	下游引物 (5'-3') Downstream primer
<i>PtMACS1</i>	CGAGCTCATGGACCAACAAGCCAACCTCTCC	GCCTCGACTTACATTTTCGATGAAGGGAAC

JM109 感受态细胞,在硫酸卡那霉素抗性的 LB 平板上挑取重组菌落,并对重组质粒 *PtMACS1*-pET-30a(+)进行双酶切鉴定和测序验证。

1.2.4 融合表达载体 *PtMACS1*-pET-30a(+)的原核表达及蛋白纯化

将构建好的重组质粒 *PtMACS1*-pET-30a(+)转化入大肠杆菌 BL21(DE3)中。在含卡那霉素(100 mg/L)的 LB 固体培养基上划线后于 37 °C 过夜培养到单菌落长出,挑取单菌落于 20 mL 的含卡那霉素(100 mg/L)的液体 LB 培养基中过夜培养,取 5 mL 过夜培养的菌液按 1:100 的比例扩大培养到 500 mL 的含卡那霉素(100 mg/L)的液体 LB 培养基中培养 3 h 左右到 OD_{600} 为 0.6 左右,加入抽滤灭菌的 IPTG(终浓度为 0.3 mmol/L)溶液,于 28 °C、140 r/min 的摇床中诱导培养 3 h。4 000 r/min 离心收集菌体,以未加 IPTG 诱导的转化菌株作为空白对照,以 12% 的 SDS-PAGE 电泳检测目的蛋白的表达结果。根据 QIAGEN 公司的蛋白纯化手册的步骤对表达的目的蛋白进行纯化,以 12% 的 SDS-PAGE 电泳检测目的蛋白的纯化结果。

1.2.5 重组蛋白的活性测定

参照 Allina 等^[16]的方法测定 4CL 底物(香豆酸、咖啡酸、阿魏酸、芥子酸、5-羟基阿魏酸)的活性。参照 Fernandez-Valverde 等^[18]的方法测定底物乙酸钠的活性。测定脂肪酸底物(己酸、壬酸、癸酸、油酸)的活性是通过荧光素酶偶联反应测定反应过程中的 ATP 的变化量来确定该酶的活性。该活性测定分为 2 个反应^[17],第 1 步反应 200 μ L 反应体系

包含:2 μ g 纯化的目的蛋白、200 μ mol/L 脂肪酸底物、50 μ mol/L ATP、250 μ mol/L $MgCl_2$ 、100 μ mol/L CoA、1 mmol/L DTE 和 0.1 mol/L Tris-HCl (pH 7.5),脂肪酸底物用 2% 的 Triton X-100 溶解,反应测定液中 Triton X-100 的终浓度为 0.1%。第 2 步反应 200 μ L 体系包含:2 μ L 第 1 步反应液、1 μ g 荧光素酶、4.6 μ g 荧光素和 0.1 mol/L Tris-HCl (pH 7.5)。通过日立荧光分光光度计(F-4500)测定第 2 步反应的光强度,通过光强度的变化来确定反应过程中 ATP 的变化量以确定反应底物的变化量。根据上述测定方法以癸酸为底物测定该重组蛋白在 pH 分别为 5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5、9.0 条件下的反应活性,温度分别为 4、25、30、35、37、40、50、55 °C 条件下的反应活性,确定该重组蛋白的最适反应 pH 以及最适反应温度。

2 结果与分析

2.1 *PtMACS1* 基因序列的克隆

以毛果杨的总 RNA 反转录的 cDNA 为模板,通过 PCR 扩增得到大小约为 1.7 kb 的片段,如图 1 所示。图 1 中的数字 1~5 均为 PCR 扩增得到的 *PtMACS1* 基因的目的片段,其大小与杨树基因组数据库中预测的基因序列大小基本一致,将该片段回收后与 pMD-18T 载体连接转化大肠杆菌 JM109,提取质粒进行初步的 PCR 鉴定,将得到的阳性菌液送去测序。将测序结果与杨树基因组数据库中的序列进行比对,得到正确的目的基因序列。

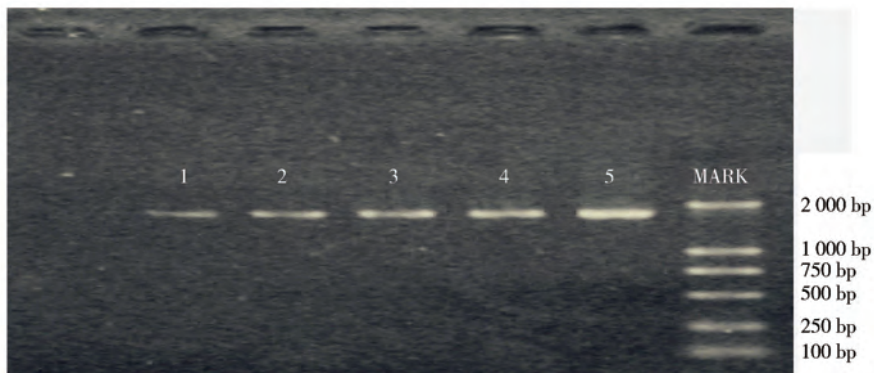


图 1 *PtMACS1* 的克隆电泳结果

Fig. 1 Electrophoresis results of *PtMACS1* cloning

2.2 *PtMACS1* 基因序列分析及进化树分析

对克隆获得的 *PtMACS1* 基因序列进行分析可知,该基因全长为 4 621 bp,含有 6 个外显子和 5 个内含子,其 CDS 序列全长为 1 659 bp,编码 553 个氨基酸,该序列不含信号肽大小约为 60 kD。通过其

与毛果杨中的 4CL 基因的氨基酸序列比对分析(图 2)可知,该序列含有 ATP 结合的保守结构域 Motif I 和 Motif II,因此推测该基因应该属于腺苷酸合成酶基因家族。但 4CL 中的两个保守结构域 Box I 中亮氨酸(L)-脯氨酸(P)组合在 *PtMACS1* 蛋白中变成

了赖氨酸(K)-缬氨酸(V)组合,保守结构域 Box II 中的异亮氨酸(I)-半胱氨酸(C)-异亮氨酸(I)组合变成了亮氨酸(L)-色氨酸(W)-缬氨酸(V)组

合,在4CL基因中 Box I 相对保守但 Box II 的结构域却是绝对的保守^[20-21],因此该保守结构域的改变很有可能导致 PtMACS1 不具有4CL的活性。

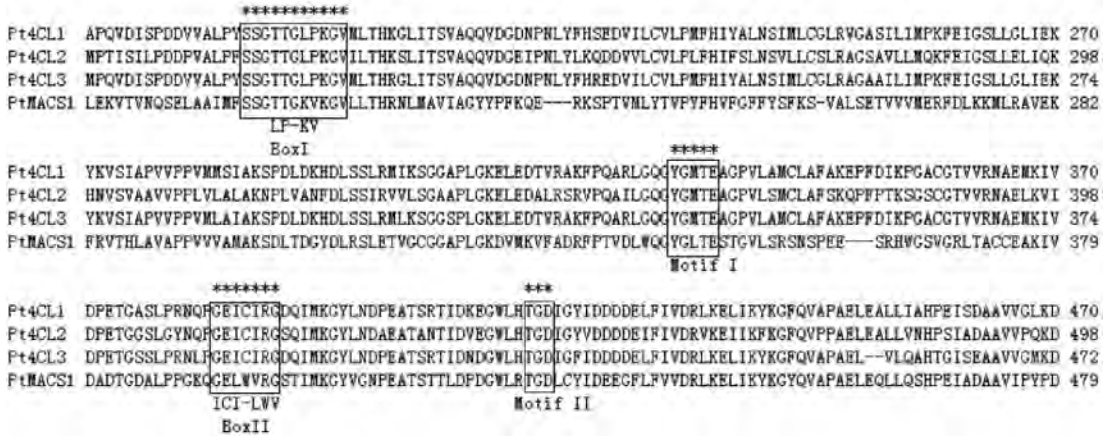


图2 毛果杨 PtMACS1 与 4CL 基因序列比对分析

Fig. 2 Sequence alignment analysis of PtMACS1 and 4CL

利用软件 MEGA6.0 对毛果杨 (*Populus trichocarpa*)、拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*)、菜豆 (*Phaseolus vulgaris*)、水曲柳 (*Fraxinus mandshurica*) 以及金银花 (*Lonicera japonica*) 的腺苷酸合成酶家族基因构建进化树进行进化分析 (如图 3)。从进化树结果可以看出 PtMACS1 与毛果杨中研究确定的 4CL 的进化关系相对较远,与金银花的 4CL 以及拟南芥中的 4CL-like9 的同源性较高。而 Schneider K 等^[17]人研究发现拟南芥中的 4CL-like9 并非真正的 4CL 基因而属于酰基辅酶 A 合成酶基因,其蛋白可以催化多种脂肪酸底物的反应。通过进化树可以看出 PtMACS1 与拟南芥中的 4CL-like9 同源性较高,因此可以初步推测 PtMACS1 很可能属于毛果杨中

的酰基辅酶 A 合成酶家族。

2.3 PtMACS1 的原核表达及重组蛋白的纯化

将克隆得到的 PtMACS1 基因与表达载体 pET-30a(+) 经双酶切后连接,构建融合表达载体 PtMACS1-pET-30a(+),将构建好的融合表达载体转入大肠杆菌 BL21 (DE3) 后经 IPTG 诱导表达。12% SDS-PAGE 电泳 (如图 4A) 显示,与未诱导的转化重组质粒相比,经诱导的样品在 60 kD 左右出现了一条明显的表达条带,利用 Ni-NTA 亲和层析对表达蛋白进行纯化,获得纯化后的目的蛋白 (如图 4B)。

2.4 PtMACS1 的酶学活性测定

以纯化蛋白进行 4-香豆酸辅酶 A 连接酶(4CL)

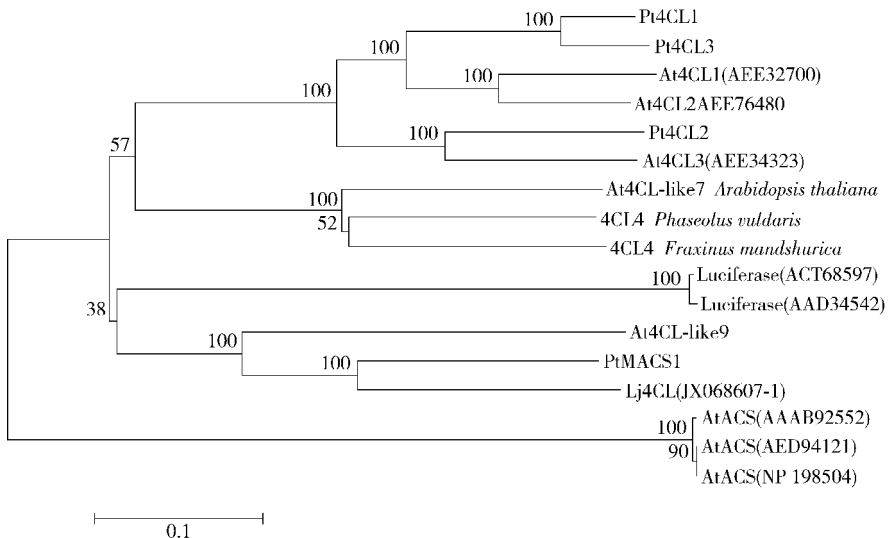


图3 PtMACS1 蛋白与其他植物腺苷酸合成酶超基因家族蛋白进化树分析

Fig. 3 Phylogenetic tree showing relationships between the PtMACS1 protein and other adenylate-forming enzymes superfamily members

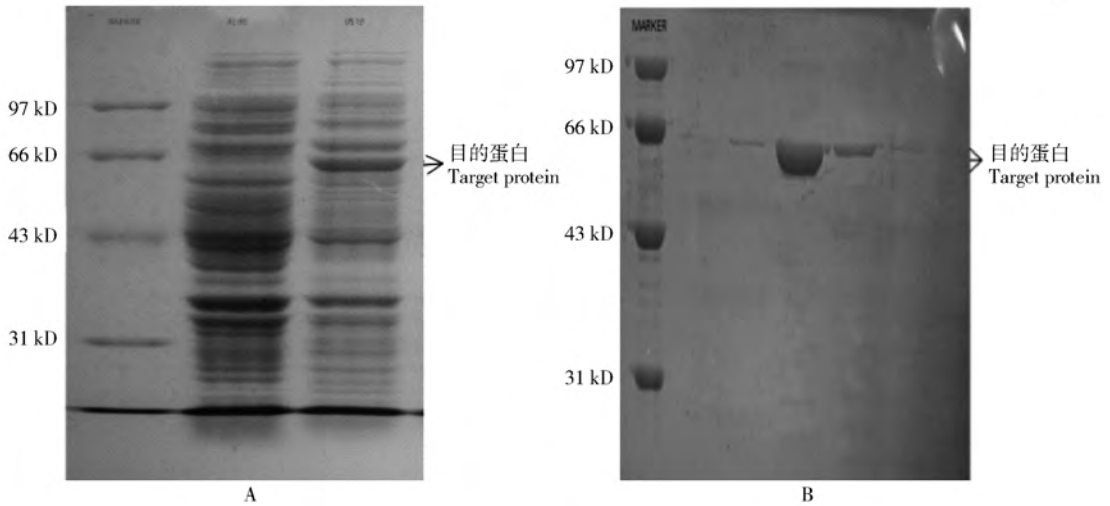


图 4 PtMACS1 的表达及重组蛋白的纯化

Fig. 4 Expression and purification of recombinant PtMACS1

的活性测定,结果显示纯化蛋白酶液对 4CL 的 5 种底物(香豆酸、咖啡酸、阿魏酸、芥子酸、5-羟基阿魏酸)均没有催化活性。以乙酰辅酶 A 连接的底物乙酸钠进行活性测定,结果纯化蛋白亦不能催化其反应进行。该结果表明该基因不是 4CL 或者乙酰辅酶 A 合成酶基因。以中链脂肪酸己酸、壬酸、癸酸以及长链脂肪酸油酸为底物的活性测定中,纯化蛋白对己酸、壬酸、癸酸显示出明显活性,并测得纯化蛋白对这三种底物的转化数(如表 2),而对长链脂肪酸油酸并未检测到催化活性,此结果表明 PtMACS1 基因属于酰基辅酶 A 合成酶家族中的中链酰基辅酶 A 合成酶家族的基因。

以最适底物癸酸对纯化蛋白进行最适反应 pH 以及最适反应温度的测定,由最适温度曲线(如图 5A)可以得出, PtMACS1 的最适反应温度为 37 °C, 低于 37 °C 反应随温度的升高蛋白的活力逐渐增加, 高于 37 °C 后随温度的升高蛋白的活力逐渐降低。从最适反应 pH(如图 5B)可以得出该蛋白的最适反应 pH 为 7.0, 该曲线的变化趋势与温度的变化趋势一致都属于典型的钟型曲线。

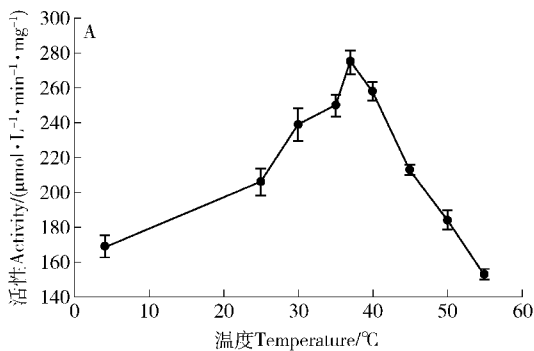


表 2 PtMACS1 对各种底物的转化数

Tab. 2 The Kcat of PtMACS1 to different substrates

底物 Substrate	转化数 Turnover number Kcat/ (μmol · L ⁻¹ · min ⁻¹ · mg ⁻¹)
香豆酸 Coumaric acid	0
咖啡酸 Caffeic acid	0
阿魏酸 Ferulic acid	0
芥子酸 Sinapic acid	0
5-羟基阿魏酸 5-Hydroxyferulic acid	0
乙酸钠 Sodium acetate	0
己酸 Hexanoic acid	130 ± 2. 65
壬酸 Nonanoic acid	193 ± 3. 46
癸酸 Decanoic acid	201 ± 5. 51
油酸 Oleic acid	0

3 结论与讨论

植物要利用脂肪酸必须首先将脂肪酸催化合成脂酰 CoA, 这是脂肪酸参与植物新陈代谢的第 1 步反应, 酰基辅酶 A 合成酶 (acyl-CoA synthetase, ACS) 广泛存在于真核以及原核生物中, 在脂肪酸代谢过程中发挥重要作用。ACS 根据其催化底物碳

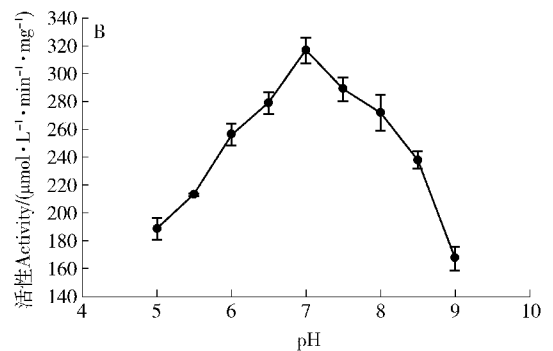


图 5 温度与 pH 对 PtMACS1 活性影响曲线

Fig. 5 Effect of temperature and pH on the activity of recombinant PtMACS1

链长度的不同分为短链 ACS (SACS)、中链 ACS (MACS)、长链 ACS (LACS) 三类^[21-22]。越来越多的研究表明,ACS 基因参与脂肪酸 β -氧化降解、脂肪酸碳链延长以及三脂酰甘油合成等过程^[21,23]。目前有关高等植物 ACS 家族基因的研究主要集中在 LACS 方面,其中模式植物拟南芥中已研究发现 9 个 LACS 编码基因。其中 *AtLACS1* 和 *AtLACS2* 参与蜡质层和角质层合成;*AtLACS6* 和 *AtLACS7* 在过氧化物酶体中的 β -氧化代谢中发挥作用;*AtLACS4* 和 *AtLACS9* 则与油脂的合成相关^[11,24-26],而有关 MACS 的报道目前主要集中于动物及真菌方面,植物这方面的研究鲜见报道。

本研究从模式木本植物毛果杨中克隆得到了毛果杨中链酰基辅酶 A 合成酶 *PtMACS1* 基因,通过原核表达成功获得 *PtMACS1* 的蛋白并进行了酶学活性的研究。该研究结果显示,*PtMACS1* 利用己酸、壬酸、癸酸等中链脂肪酸作为底物,对 4-香豆酸辅酶 A 连接酶、乙酰辅酶 A 连接酶以及长链酰基辅酶 A 合成酶底物没有催化活性,据此推测 *PtMACS1* 基因可能参与了毛果杨的中链脂肪酸的代谢调控,而进一步研究其在植物体内的调控作用是该基因后续的研究方向。本研究结果表明 *PtMACS1* 基因为毛果杨中链酰基辅酶 A 合成酶 (MACS) 家族的成员,为后续毛果杨腺苷酸合成酶超基因家族的鉴定及分类分析提供一定的研究资料。

参 考 文 献

- [1] STUIBLE H, BUTTNER D, EHLTING J, et al. Mutational analysis of 4-coumarate:CoA ligase identifies functionally important amino acids and verifies its close relationship to other adenylate-forming enzymes [J]. FEBS Letters, 2000, 67(1):117-122.
- [2] SCHMELZ S, NAISMITH J H. Adenylate-forming enzymes [J]. Current Opinion in Structural Biology, 2009, 19(6): 666-671.
- [3] BABBITT P C, KENYON G L, MARTIN B M, et al. Ancestry of the 4-chlorobenzoate dehalogenase: analysis of amino acid sequence identities among families of acyl:adenyl ligases, enoyl-CoA hydratases/isomerases, and acyl-CoA thioesterases [J]. Biochemistry, 1992, 31(24): 5594-5604.
- [4] SHOCKEY J M, FULDA M S, BROWSE J. *Arabidopsis* contains a large superfamily of acyl-activating enzymes: phylogenetic and biochemical analysis reveals a new class of acyl-coenzyme A synthetases [J]. Plant Physiology, 2003, 132(2):1065-1076.
- [5] EHLTING J, BÜTTNER D, WANG Q, et al. Three 4-coumarate: coenzyme A ligases in *Arabidopsis thaliana* represent two evolutionarily divergent classes in angiosperms [J]. The Plant Journal, 1999, 19(1):9-20.
- [6] SHOCKEY J M, FULDA M S, BROWSE J A. *Arabidopsis* contains nine long-chain acyl-coenzyme A synthetase genes that participate in fatty acid and glycerolipid metabolism [J]. Plant Physiology, 2002, 129(4):1710-1722.
- [7] KE J, BEHAL R H, BACK S L, et al. The role of pyruvate dehydrogenase and acetyl-coenzyme A synthetase in fatty acid synthesis in developing *Arabidopsis* seeds [J]. Plant Physiology, 2000, 123(2):497-508.
- [8] HAMBERGER B, HAHLBROCK K. The 4-coumarate:CoA ligase gene family in *Arabidopsis thaliana* comprises one rare, sinapate-activating and three commonly occurring isoenzymes [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 2004, 101(7):2209-2214.
- [9] SCHNURR J A, SHOCKEY J M, DE BOER G J, et al. Fatty acid export from the chloroplast. Molecular characterization of a major plastidial acyl-coenzyme A synthetase from *Arabidopsis* [J]. Plant Physiology, 2002, 129(4):1700-1709.
- [10] SCHNURR J, SHOCKEY J, BROWSE J. The acyl-CoA synthetase encoded by LACS2 is essential for normal cuticle development in *Arabidopsis* [J]. Plant Cell, 2004, 16(3):629-642.
- [11] FULDA M, SCHNURR J, ABBADI A, et al. Peroxisomal acyl-CoA synthetase activity is essential for seedling development in *Arabidopsis thaliana* [J]. Plant Cell, 2004, 16(2):394-405.
- [12] 饶国栋, 陆海. 毛白杨 4CL 基因家族的克隆与进化分析 [J]. 广东农业科学, 2012(8): 141-144.
RAO G D, LU H. Cloning and phylogenetic analysis of 4CL gene family from *Populus tomentosa* Carr [J]. Guangdong Agricultural Sciences, 2012(8): 141-144.
- [13] LINDNER I, RUBIN D, HELWIG U, et al. The L513S polymorphism in medium-chain acyl-CoA synthetase 2 (MACS2) is associated with risk factors of the metabolic syndrome in a Caucasian study population [J]. Molecular Nutrition & Food Research, 2006, 50:270-274.
- [14] KASUYA F, KAZUMI M, TATSUKI T, et al. Effect of salicylic acid and diclofenac on the medium-chain and long-chain acyl-CoA formation in the liver and brain of mouse [J]. Applied Toxicology, 2009, 29(5):435-445.
- [15] YU M, INGRAM-SMITH C, COOPER L L, et al. Characterization of an archaeal medium-chain acyl coenzyme A synthetase from *Methanosarcina acetivorans* [J]. Journal of Bacteriology, 2010, 192(22):5982-5990.
- [16] ALLINA S M, PRI-HADASH A, THEILMANN D A, et al. 4-coumarate:coenzyme A ligase in hybrid poplar. Properties of native enzymes, cDNA cloning, and analysis of recombinant enzymes [J]. Plant Physiology, 1998, 116(2):743-754.
- [17] FERNÁNDEZ-VALVERDE M, REGLERO A, MARTINEZ-BLANCO H, et al. Purification of *Pseudomonas putida* acyl coenzyme A ligase active with a range of aliphatic and aromatic substrates [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1993, 59(4):1149-1154.
- [18] SCHNEIDER K, KIENOW L, SCHMELZER E, et al. A new type of peroxisomal acyl-coenzyme A synthetase from *Arabidopsis thaliana* has the catalytic capacity to activate biosynthetic precursors of jasmonic acid [J]. The Journal of Biological Chemistry, 2005, 80(14), 13962-13972.
- [19] EHLTING J, MATTHEUS N, AESCHLIMAN D S, et al. Global transcript profiling of primary stems from *Arabidopsis thaliana*

- identifies candidate genes for missing links in lignin biosynthesis and transcriptional regulators of fiber differentiation [J]. *The Plant Journal*, 2005, 42(5):618-640.
- [20] COSTA M A, BEDGAR D L, MOINUDDIN S G, et al. Characterization in vitro and in vivo of the putative multigene 4-coumarate: CoA ligase network in *Arabidopsis*; syringyl lignin and sinapate/sinapyl alcohol derivative formation [J]. *Phytochemistry*, 2005, 66(17): 2072-2091.
- [21] STEINBERG S J, MORGENTHALER J, HEINZER A K, et al. Very long-chain acyl-CoA synthetases: human "bubblegum" represents a new family of proteins capable of activating very long-chain fatty acids [J]. *Biological Chemistry*, 2000, 275(45): 35162-35169.
- [22] FULDA M, SHOCKEY J, WERBER M, et al. Two long-chain acyl-CoA synthetases from *Arabidopsis thaliana* involved in peroxisomal fatty acid β -oxidation [J]. *The Plant Journal*, 2002, 32(1): 93-103.
- [23] ZHAO L, KATAVIC V, LI F, et al. Insertional mutant analysis reveals that long-chain acyl-CoA synthetase 1 (LACS1), but not LACS8, functionally overlaps with LACS9 in *Arabidopsis* seed oil biosynthesis [J]. *The Plant Journal*, 2010, 64:1048-1058.
- [24] SCHNURR J, HOCKEY J, BROWSE J. The acyl-CoA synthetase encoded by LACS2 is essential for normal cuticle development in *Arabidopsis* [J]. *Plant Cell*, 2004, 16(3):629-642.
- [25] LU S, SONG T, KOSMA D K, et al. *Arabidopsis* CER8 encodes long-chain acyl-coA synthetase1 (LACS1) that has overlapping functions with LACS2 in plant wax and cutin synthesis [J]. *The Plant Journal*, 2009, 59(4):553-564.
- [26] JESSEN D, ROTH C, WIERMER M, et al. Two activities of long-chain acyl-coenzyme A synthetase are involved in lipid trafficking between the endoplasmic reticulum and the plastid in *Arabidopsis* [J]. *Plant Physiology*, 2015, 167: 351-366.

(责任编辑 赵勃
责任编辑委 蒋湘宁)