

小桐子 *JcACBP* 基因克隆和序列分析

文锦芬¹, 龚 明², 陈 凯³, 段小凡¹, 齐亚峰¹, 王欣欣¹, 辛 艳¹, 邓明华^{4*}

(1 昆明理工大学 现代农业工程学院, 昆明 650500; 2 云南师范大学 生命科学院, 昆明 650500; 3 保山学院 资源与环境学院, 云南保山 678000; 4 云南农业大学 园林园艺学院, 昆明 650201)

摘 要:以小桐子(*Jatropha curcas*) cDNA 为模板, 克隆了酰基辅酶 A 结合蛋白(Acyl-CoA-binding Protein) 基因(*JcACBP*)的 CDS 序列, 对其序列进行了生物信息学分析, 并采用实时荧光定量 PCR 方法, 研究了 *JcACBP* 基因在小桐子不同器官和果实生长发育阶段的表达模式。结果显示: *JcACBP* 基因完全阅读框(coding sequence, CDS) 全长 279 bp, 编码 92 个氨基酸。预测其编码蛋白质的分子量为 10.30 kD, 具有 ACBP 家族典型的结构域。*JcACBP* 基因推测氨基酸与油桐(*Vernicia fordii*, AFZ62125)的亲缘关系最近(96%)。*JcACBP* 基因在小桐子根、茎、叶、花、发育中的胚及果实等组织中都有表达, 其中在花后 40 d 的种子中表达最高, 其次是果皮, 而在根中表达较少; 在果实发育过程中的表达与果实油脂积累的变化趋势基本一致。

关键词:酰基辅酶 A 结合蛋白; 基因克隆; 小桐子; 表达分析

中图分类号: Q785; Q786

文献标志码: A

Cloning and Expression Analysis of a New Acyl-CoA-binding Protein(*JcACBP*) Identified from *Jatropha curcas* L.

WEN Jinfen¹, GONG Ming², CHEN Kai³, DUAN Xiaofan¹, QI Yafeng¹,
WANG Xinxin¹, XIN Yan¹, DENG Minghua^{4*}

(1 Faculty of Modern Agricultural Engineering, Kunming University of Science and Technology, Kunming 650500, China; 2 College of Life Science, Yunnan Normal University, Kunming 650500, China; 3 College of Resources and Environment, Baoshan University, Baoshan, Yunnan 678000; 4 College of Horticulture and Landscape, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China)

Abstract: Acyl-CoA-binding protein(ACBP) has been proposed to play a pivotal role in the intracellular trafficking and the utilization of long-chain fatty acyl-CoA esters. The objective of this study is to demonstrate the structure and function of the *JcACBP*. A complete CDS sequence of Acyl-CoA-binding protein gene(*JcACBP*) was cloned from the *Jatropha curcas* L. We analyzed the sequence and structure characteristics of its encoded protein, and its expression patterns in the different organism and the development of fruit by quantity RT-PCR. The complete CDS sequence is 279 bp, and encoded 92 amino acid residues with a putative molecular mass of 10.30 kD. *JcACBP* contained one conserved domain-ACBP superfamily. Evolutionary relationships analysis revealed a closer genetic relationship between the *J. curcas* L. *JcACBP* gene and that of *Vernicia fordii*(96%). *JcACBP* expression significantly in different organism and had the highest transcript profile in the fruit; the expression level of *JcACBP* had the same trends with the lipid accumulation in the fruit.

收稿日期: 2014-06-05; 修改稿收到日期: 2014-09-09

基金项目: 国家自然科学基金(31260064, 31460355, 31460059); 云南省应用基础研究项目(KKSA201123093)

作者简介: 文锦芬(1973—), 女, 博士, 副教授, 主要从事植物次生代谢产物方面的研究。E-mail: wenjf888@163.com

* 通信作者: 邓明华, 博士, 副教授, 主要从事分子生物学方面的研究。E-mail: dengminghua2013@163.com

Key words: Acyl-CoA-binding protein; gene clone; *Jatropha curcas* L.; expression analysis

小桐子(*Jatropha curcas* L.)又名麻疯树、膏桐、黑皂树等,为大戟科落叶灌木或小乔木,主产于美洲,非洲和亚洲等热带及亚热带地区,中国主要分布于云南、广东、广西、贵州、四川、海南和台湾等省区^[1-2]。小桐子生长迅速,3年可挂果,5年进入盛果期。果实采摘期长达50年,种仁的含油率为60%~70%^[1],经改性后的小桐子油可适用于各种柴油发动机,并在闪点、凝固点、硫含量、一氧化碳排放量、颗粒值等关键技术均优于国内零号柴油,达到欧洲二号排放标准,被称为生物柴油树,是世界公认的,未来最有可能替代化石能源并具有巨大开发潜力的能源植物树种^[1-5]。在生物柴油生产中,原料成本占生物柴油总成本的60%~75%^[6]。近年来小桐子油脂生物合成与调控机理的研究受到研究人员的广泛关注,并取得了一定进展,分离了与小桐子油脂生物合成有关的 *KASIII* 基因、*JcFATB1* 基因、B型酰基 ACP 硫酯酶基因、*JcGPAT* 基因和 *KASII* 基因的全序列,并进行了相关分析^[7-11]。

植物油脂的生物合成是受一系列生物酶催化的链式反应,酰基辅酶 A 结合蛋白(ACBP)在其中发挥重要作用^[12]。ACBP 普遍存在于真核细胞中,是高度保守的蛋白^[13]。ACBP 的氨基酸组成在物种内和物种间一致性都在50%以上,具有一个酰基辅酶 A 结合结构域(ACB),能与长链的酰基辅酶 A 结合^[14],N端都含有一个疏水性的跨膜区^[15]。在植物的角果、根系、茎秆、花、叶和发育的胚胎中都有高浓度 ACBP 基因的 mRNA 表达。植物体内的 ACBP 主要分布于角果之中,与种子中油脂的形成有关^[16]。

作为酰基辅酶 A 的载体,ACBP 与长链脂酰基辅酶 A 具有高度亲和力^[17]。ACBP 对脂酰基辅酶 A 的胞内贮存和转运,参与糖脂的生物合成及氧化起重要作用^[18]。在植物中除了小分子量的 ACBP 以外,还有分子量大于10 kD的大分子量 ACBP。对拟南芥 ACBP 研究表明,大分子量的 ACBP 对酰基辅酶 A 酯具有不同的亲和性,这种亲和性的差别暗示它们参与了多种生理功能^[19]。除了像小分子 ACBP 参与脂类代谢,大分子 ACBP 还影响植物的发育,如在植物胚胎早期发育和叶片衰老时起调控作用,此外,还参与逆境胁迫响应,如重金属胁迫,氧化胁迫,冻害和抗病性等^[19-20]。

目前在植物中,已经从蓖麻、油菜、水稻、拟南芥

和苹果等物种中分离鉴定了 ACBP^[17,21]。而在能源植物小桐子中尚未见有关 ACBP 的报道。鉴于 ACBP 在脂类代谢中的重要作用,本研究利用电子克隆的方法,从小桐子中克隆了 *JcACBP* 基因,并进行了初步的生物信息学分析,通过 qRT-PCR 技术调查其在不同组织以及果实发育过程中的表达规律,以期为进一步探讨小桐子种子含油量累积的分子机理及抗逆性提供基础资料。

1 材料和方法

1.1 实验材料

实验材料为种植于昆明理工大学现代农业工程学院实验基地的4年生小桐子。在盛花期取根、茎、叶、花、果皮和花后40 d的种子,液氮速冻后保存在-80℃的环境中备用;同时取授粉后不同发育阶段(10、20、30、40、50和60 d)小桐子果实,液氮速冻后保存在-80℃的环境中备用。

每种组织从10株小桐子树上取样,来源于3株树上的组织混合作为1个组织样品,4次重复。

1.2 方法

1.2.1 基因克隆 各材料的 RNA 用 Trizol 提取, cDNA 合成用 High Fidelity PrimeScrip® RT-PCR Kit 试剂盒,操作过程参考使用说明。

小桐子 ACBP 基因特异引物根据蓖麻 ACBP 基因保守区及与之高度一致的小桐子 EST 设计,引物为 *JcACBP*-F(5'-CCCGGATACGTTCTATAA-ATC-3')和 *JcACBP*-R(5'-CCCACACGCAAGAG-AAGACACTA-3')。PCR 产物连接到 pMD18-T 并双向测序,每个基因至少测5个克隆。

1.2.2 生物信息学及系统进化分析 测序结果使用 DNASTAR(DNASTar Inc., Madison, Wisc.) 软件初步编辑、比对,人工校对。利用 GenScan software(<http://genes.mit.edu/GENSCAN.html>) 进行 DNA 序列预测,利用 The Conserved Domain Architecture Retrieval Tool of BLAST at the National Center for Biotechnology Information (NCBI) server (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) 进行蛋白质保守结构域的预测和分析,利用 The Compute pI/Mw Tool (http://www.expasy.org/tools/pi_tool.html) 对预测的蛋白质的等电点和分子量进行预测,利用 SOPMA (<http://npsa-pbil.ibcp.fr/>) 对所推导的蛋白质序列的二级

结构进行预测。SignalP 3.0 server(<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)分析信号肽,PSort II (<http://psort.hgc.jp/>)分析亚细胞定位,TM-HMM-2.0 server(<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>)预测跨膜区域。利用 ClustalX, Mega 4.0 和 DnaMan software 进行氨基酸比对和系统发育树的构建。

1.2.3 基因表达分析 用实时荧光定量 PCR 进行基因表达定量分析。各材料 RNA 用 Trizol 提取, cDNA 合成用 PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser (Perfect Real Time) 试剂盒, 操作过程参考使用说明。

荧光定量 PCR 应用 SYBR® Premix Ex Taq™ II (Tli RNaseH Plus) 试剂盒, 根据生产商推荐的方法, 在罗氏 LightCycler 480 系统上进行。

所用 *JcACBP* 的引物为 *JcACBP*-qF (5'-AAGATCAGTCTAGGAAATCCTTC-3') 和 *JcACBP*-qR (5'-GCATAAATTAGGAAATTTTAGAGTGT-3'), 内参基因 β -actin 的引物为 β -actin-F (5'-CTGAACCCAAAGGCTAATCG-3') 和 β -actin-R (5'-ACTGGCGTAGAGGGAAAGAA-3')。

基因表达的数据分析根据 Livak 等^[22]报道的 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法进行。在组织表达分析中用表达量最低的组织作为校正子, 在果实发育过程中的时序表达分析中用第一发育阶段(10 d)的样品作校正子。

2 结果与分析

2.1 *JcACBP* 的克隆与鉴定

克隆获得的 cDNA 序列全长 510 bp (图 1), 整个 CDS 为 279 bp, 可以翻译成含有 92 个氨基酸残基的蛋白质 (图 2), 分子量为 10.30 kD, 其理论等电点为 5.53。负电荷残基 (Asp + Glu) 总数为 15 个, 正电荷残基 (Arg + Lys) 总数为 14 个, 不稳定系数为 35.39, 属于稳定蛋白。蛋白质保守域预测表明所获得的 *JcACBP* 序列包含一个 ACBP 超家族。

细胞定位预测显示, *JcACBP* 编码的蛋白位于

细胞质中。对 *JcACBP* 编码的蛋白进行跨膜分析表明该蛋白为膜外蛋白。信号肽预测表明该蛋白不含信号肽。

2.2 *JcACBP* 基因编码氨基酸序列一致性及系统演化分析

用 NCBI BlastX 对 *JcACBP* 基因编码氨基酸序列进行同源搜索, 发现小桐子 *JcACBP* 基因编码的氨基酸序列与其他植物 ACBP 氨基酸序列 (油桐 AFZ62125、人参 BAB85987、毛果杨 XP 0023034、蓖麻 O04066、葡萄 XP002263421、狭叶洋地黄 CAB-56693) 高度一致, 其中与大戟科油桐 (*Vernicia fordii*) 的一致性为 96%, 与杨柳科毛果杨 (*Populus trichocarpa*) 的一致性为 93%, 与五加科人参 (*Panax ginseng*) 和大戟科的蓖麻 (*Ricinus communis*) 的一致性均为 92%, 与葡萄科葡萄 (*Vitis vinifera*) 的一致性为 91%, 与玄参科狭叶洋地黄 (*Digitalis lanata*) 的一致性为 90%。氨基酸多序列比对显示植物 ACBP 具有较高的保守性 (图 3)。利用 MEGA 4.0 软件构建 7 种植物 ACBP 进化树 (图 4), 结果表明, 小桐子 *JcACBP* 基因编码的氨基酸序列和同科的油桐 ACBP 聚类, 五加科人参和杨柳科的毛果杨聚类, 反映了同源 ACBP 基因系统发生上的密切关系。

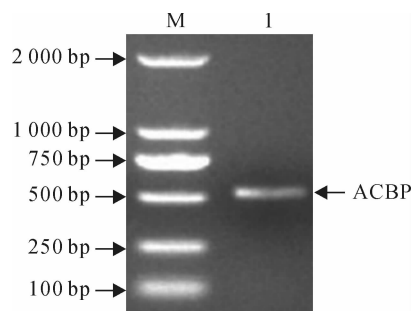


图 1 小桐子 ACBP 基因电泳检测图

M, DNA marker; 1, ACBP 的 PCR 产物

Fig. 1 PCR product of *JcACBP*

gene in *J. curcas*

M, DNA marker; 1, PCR product of ACBP

```

ATGGGTTTGAAGGAGGAATTTGAGGAGTATGCTGAGAAAGCTAAGACCCCTCCGGAAAAACACAACAATGAGAAC
M G L K E E F E E Y A E K A K T L P E N T T N E N
AAACTTATTTTGTATGGGCTTTTAAACAAGCCACTGTTGGACCTGTGAACACCAGCCGCTCTGGAATGTTCAAC
K L I L Y G L F K Q A T V G P V N T S R P G M F N
ATGAGGGACAGAGCAAAAGTGGGATGCATGGAAGGCTGTTGAAGGCAAACTAAGGAAGAAGCAATGAGTGACTAT
M R D R A K W D A W K A V E G K S K E E A M S D Y
ATCACGAAGGTTAACTGTTGCTGGAAGAAGCTGCAGCAGCGGCTTCGCTTAG
I T K V K L L L E E A A A A A S A .

```

图 2 小桐子 *JcACBP* 核酸和氨基酸序列

Fig. 2 Nucleotide and amino acid sequences of *JcACBP* in *J. curcas*

KC875844 MGLKDEFEFFHPKAKTLPENTTNENKLILYGLFKQATVGFVNISRPGFMNMRDRAKWDANKAVEGKSKEEAMSDYITKVKLLLEEEAAAAS 91
AFZ62125 MGLKDEFEFFHPKAKTLPENTTNENKLILYGLYKQATVGFVNISRPGIFNQRDRAKWDANKAVEGKSKEEAMSDYITKVKQLLEEEAAAAS 91
BAB85987 MGLKDEFEFFHPKAKTLPESTTNENKLILYGLYKQATVGFVNISRPGIFNMRDRAKWDANKAVEGKSKEEAMSDYITKVKQLLEEEAA---- 87
XP0023034 MGLKDEFEFFHPKAKTLPENTTNENKLILYGLFKQATVGLVNISRPGIFNMRDRAKWDANKAVEGKSKEEAMSDYITKVKQLLEEEAAAAS 90
O04066 MGLKDEFEFFHPKAKTLPENTTNENKLILYGLYKQATVGFVNISRPGFMNMRDRAKWDANKAVEGKSKEEAMSDYITKVKQLLEEEAAAAS 90
XP002263421 MGLKDEFEFFHPKAKTLPENTTNENKLILYGLYKQATVGVNISRPGIFNLRERAKWDANKAVEGKSKEEAMNDYITKVKQLLEEEAAAAS 91
CAB56693 MGLKDEFEFFHPKAKTLPENTTNANKLILYGLYKQATVGVNISRPGVFNMRDRAKWDANKAVEGKSKEEAMADYITKVKQLLEEEAAAAS 91

图 3 小桐子与其他物种 ACBP 基因推导氨基酸序列比对

KC875844. 小桐子;AFZ62125. 油桐;BAB85987. 人参;XP 0023034. 果杨;O04066. 蓖麻;XP 002263421. 葡萄;CAB56693. 狭叶洋地黄

Fig. 3 Alignment of deduced amino acid sequences of ACBP from *J. curcas* L. and other plants

KC875844. *Jatropha curcas*; AFZ62125. *Vernicia fordii*; BAB85987. *Panax ginseng*; XP 0023034. *Populus trichocarpa*; O04066. *Ricinus communis*; XP 002263421. *Vitis vinifera*; CAB56693. *Digitalis lanata*



图 4 小桐子与其他物种 ACBP 基因
推导氨基酸序列进化树

标尺代表遗传距离;数值代表从 1 000 次重复
计算得到的 Bootstrap 百分比值

Fig. 4 The evolutionary tree of amino acid sequences
of ACBP from *J. curcas* and other plants

The scale bar represents genetic distance; Numbers
represent the Bootstrap percentage values
calculated from 1 000 replicates

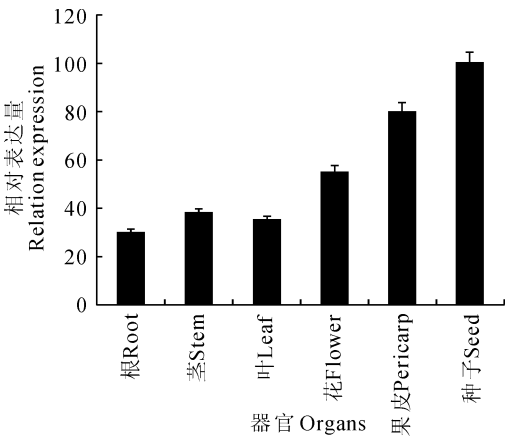


图 5 小桐子 *JcACBP* 基因在不同器官中的表达

Fig. 5 Expression levels of *JcACBP* gene
in different organs of *J. curcas*

2.3 *JcACBP* 基因表达分析

以 β -actin 作为内参,对小桐子 *JcACBP* 在不同组织和果实不同发育阶段的表达情况进行 qRT-PCR 分析,分析结果(图 5)表明,小桐子 *JcACBP* 在根、茎、叶、花、发育中的果皮和种子等组织中都有

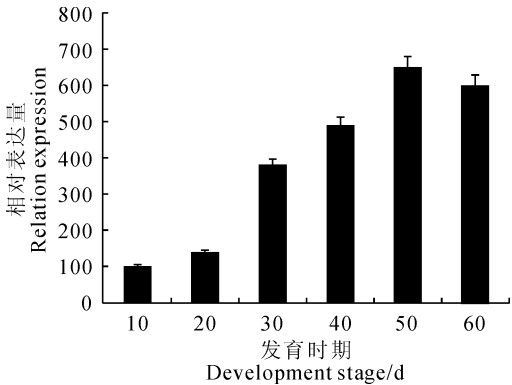


图 6 小桐子 *JcACBP* 基因在果实不同发育阶段中的表达

Fig. 6 Expression levels of *JcACBP* gene in fruits
at different development stages of *J. curcas*

表达,其中在花后 40 d 的种子中表达量最高,其次是果皮,而在根中表达量较少。

JcACBP 基因在果实发育过程中的定量分析表明:该基因在果实生长发育的前期,随着果实的生长发育,其表达水平不断增加,在种子生长发育的后期(50 d)达到最高峰,然后略有下降(图 6)。

3 讨 论

本研究以近缘物种的同源基因序列为基础,结合 GenBank 中大量 EST 序列,搜寻与该基因高度一致的 EST 拼接,再利用电子克隆此物种该基因的完整 CDS 序列,该方法对于从全基因组背景缺乏的物种中克隆特定基因,具有快速、经济和简便的优势^[23]。利用该方法克隆了小桐子的 *JcACBP* 基因,亲缘关系分析表明与多种植物的 ACBP 基因高度同源。

酰基辅酶 A 结合蛋白(ACBP)家族的蛋白结构保守,具有一个能与长链的酰基辅酶 A 结合的酰基辅酶 A 结合结构域(ACB)^[14]。目前已经测定的 ACBP 大多数都由约 90 个氨基酸组成,分子量约为 10 kD,其序列在不同物种中高度保守,这些现象表

明 ACBP 蛋白可能具有保守的生理功能^[24]。本文克隆了小桐子的 *JcACBP* 基因,亲缘关系分析表明,小桐子的 *JcACBP* 基因编码氨基酸与油桐(AFZ62125)的亲缘关系最近,与人参(BAB85987)、葡萄(XP 002263421)、狭叶洋地黄 CAB56693)等高度一致,氨基酸多序列比对显示植物 ACBP 具有较高的保守性。进一步的研究表明,ACBP 本身与游离脂肪酸或辅酶 A 不具有亲和性,但对 8 碳以上的长链酰基辅酶 A 酯具有高度的亲和性^[25]。通过与酰基辅酶 A 酯结合,ACBP 在酰基辅酶 A 代谢中发挥重要作用。ACBP 能介导膜间酰基辅酶 A 转运,将酰基辅酶 A 转运到线粒体或微体中,分别参与 β -氧化或甘油酯生物合成^[26]。除此而外,ACBP 还能保护长链酰基辅酶 A 酯不被酰基辅酶 A 水解酶水解^[27]。本文中报道的小桐子 ACBP 基因编码区全长为 279 bp,编码 92 个氨基酸残基。氨基酸序列中含有多个 CoA 结合位点。序列分析和结构特征表明 *JcACBP* 蛋白属于 ACBP 超家族,推定的 *JcACBP* 蛋白无跨膜区和信号肽,暗示 *JcACBP* 蛋

白是细胞质中的蛋白。在 *JcACBP* 蛋白中存在与多个 acyl-CoA binding pocket,表明 *JcACBP* 蛋白像其他 ACBP 蛋白一样参与酰基酯 CoA 的运输而参与脂肪酸的合成。

以前的研究表明 ACBP 基因的表达存在组织特异性^[21,28]。在本研究中,小桐子 *JcACBP* 在根、茎、叶、花、果皮和发育中种子等组织中都有表达,其中在花后 40 d 的种子中表达量最高,其次是果皮,而在根中表达量较少。这与前人在部分其他物种的研究结果有一定的差异^[21,28],这可能与小桐子果实中油脂含量多有关。

前人研究表明 ACBP 基因与脂肪酸的合成有关,而且其表达量与组织脂肪酸合成量呈正相关^[14]。本研究表明 *JcACBP* 基因在小桐子果实生长发育阶段的表达呈“先升高再降低”的单峰曲线,且与小桐子种仁的油脂含量的变化趋势基本一致。结合 ACBP 基因在组织表达中表现为在果实中表达最高,可以推断 ACBP 基因在小桐子果实油脂生物合成中具有重要作用。

参考文献:

- [1] WANG X(王 曦),LONG CH L(龙春林). Investigation and evaluation of *Jatropha curcas* (Euphorbiaceae) resource in Yunnan Province [J]. *Acta Botanica Yunnanica* (云南植物研究),2009,**31**(5):455—460(in Chinese).
- [2] WANG H Y(王海燕),WEN M F(文明富),LIU SH SH(刘石生),*et al.* A review on the research progress in biology and utilization of *Jatropha curcas* L. [J]. *Chinese Journal of Tropical Crops* (热带作物学报),2010,**31**(4):670—675(in Chinese).
- [3] JOHNSON T S,ESWARAN N,SUJATHA M. Molecular approaches to improvement of *Jatropha curcas* Linn. as a sustainable energy crop[J]. *Plant Cell Reports*,2011,**30**(9):1 573—1 591.
- [4] MAKKAR H P S,BECKER K. *Jatropha curcas*, a promising crop for the generation of biodiesel and value-added coproducts[J]. *European Journal of Lipid Science and Technology*,2009,**111**(8):773—787.
- [5] CUI M K(崔明昆),LIN J(林 锦),LI H CH(李红朝),*et al.* Studies on energy plant resources in Yunnan[J]. *Journal of Yunnan Normal University* (云南师范大学学报),2009,**29**(6):39—46(in Chinese).
- [6] YANG J G(杨继国),LIN W T(林伟铁),WU J L(吴军林). Advances in enzymatic synthesis of biodiesel[J]. *Environmental Protection and Chemical Industry* (化工环保),2004,**24**(2):116—120(in Chinese).
- [7] LI J,LI M R,WU P Z,*et al.* Molecular cloning and expression analysis of a gene encoding a putative β -ketoacyl-acyl carrier protein(ACP) synthase III (KAS III) from *Jatropha curcas* [J]. *Tree Physiology*,2008,**28**(6):921—927.
- [8] WU P Z,LI J,WEI Q,*et al.* Cloning and functional characterization of an acyl-acyl carrier protein thioesterase(*JcFATB1*) from *Jatropha curcas* [J]. *Tree Physiology*,2009,**29**(10):1 299—1 305.
- [9] DANI K G,HATTI K S,RAVIKUMAR P,*et al.* Structural and functional analyses of a saturated acyl ACP thioesterase,type B from immature seed tissue of *Jatropha curcas* [J]. *Plant Biology*,2011,**13**(3):453—461.
- [10] ZHANG N(张 楠),XU R H(徐荣华),LIU X ZH(刘小烛),*et al.* Cloning and sequence analysis of *sn*-glycerol-3-phosphate acyltransferase gene(*JcGPAT*) from *Jatropha curcas* L. [J]. *Plant Physiology Journal* (植物生理学报),2011,**47**(2):181—188(in Chinese).
- [11] WEI Q,LI J,ZHANG L,*et al.* Cloning and characterization of a β -ketoacyl-acyl carrier protein synthase II from *Jatropha curcas* [J].

- Journal of Plant Physiology*, 2012, **169**(8): 816—824.
- [12] SLOCOMBE S P, CORNAH J, PINFIELD-WELLS H, *et al.* Oil accumulation in leaves directed by modification of fatty acid breakdown and lipid synthesis pathways[J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2009, **7**(7): 694—703.
- [13] KIRUTHIKA J, RAJESH S, PONNIAH A G, *et al.* Molecular cloning and characterization of acyl-CoA binding protein(ACBP) gene from shrimp *Penaeus monodon* exposed to salinity stress[J]. *Developmental and Comparative Immunology*, 2013, **40**(1): 78—82.
- [14] BURTON M, ROSE T M, FAERGEMAN N J, *et al.* Evolution of the acyl-CoA binding protein(ACBP)[J]. *Biochemical Journal*, 2005, **392**(2): 299—307.
- [15] WHITNEY H M, MICHAELSON L V, SAYANOVA O, *et al.* Functional characterization of two cytochrome b5 fusion desaturases from *Anemone leveillei*; the unexpected identification of a fatty acid Delta6 desaturase[J]. *Planta*, 2003, **217**(6): 983—992.
- [16] HIGHTTOWER R, BADEN C, PENZES E Expression of antifreeze proteins in transgenic plant[J]. *Plant Molecular Biology*, 1991, **17**(5): 21—34.
- [17] XIAO S, CHYE M L. New roles for acyl-CoA-binding proteins(ACBPs) in plant development, stress responses and lipid metabolism[J]. *Progress in Lipid Research*, 2011, **50**(2): 141—151.
- [18] SHINOZAKI K, YAMAGNCHI-SHINOZAKI K. Molecular responses dehydration and low temperature; differences and cross-talk between two stress signaling pathways[J]. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 2000, **3**(3): 217—223.
- [19] TAKATO A H, SHIMIDZUB M, ASHIZAWA Y, *et al.* An acyl-CoA-binding protein from grape that is induced through ER stress confers morphological changes and disease resistance in *Arabidopsis*[J]. *Journal of Plant Physiology*, 2013, **170**(6): 591—600.
- [20] YURCHENKO O P, WESELAKE R J. Involvement of low molecular mass soluble acyl-CoA-binding protein in seed oil biosynthesis[J]. *New Biotechnology*, 2011, **28**(2): 97—110.
- [21] BAI S H (柏素花), ZHU J (祝 军), DAI H Y (戴洪义). Cloning and expression analysis of a new acyl-CoA-binding protein 2 (MdACBP2) identified from *Malus domestica*[J]. *Acta Horticulturae Sinica* (园艺学报), 2012, **39**(10): 1 893—1 902 (in Chinese).
- [22] MENG W, SU Y C F, SAUNDERS R M K, *et al.* The rice acyl-CoA-binding protein gene family: Phylogeny, expression and functional analysis[J]. *New Phytologist*, 2011, **189**(4): 1 170—1 184.
- [23] HARDISON R C. Comparative genomics[J]. *PloS Biology*, 2003, **1**: 58.
- [24] KRAGELUND B B, KNUDSEN J, POULSEN F M. Acyl-coenzyme A binding protein(ACBP)[J]. *Biochimica et Biophysica Acta-Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1999, **1 441**(2): 150—161.
- [25] MIKKELSEN J, HOJRUP P, NIELSEN P F, *et al.* Amino acid sequence of acyl-CoA-binding sequence from cow liver[J]. *Biochemical Journal*, 1987, **245**: 857—861.
- [26] RASMUSSEN J T, FAERGEMAN N J, KRISTIANSEN K, *et al.* Acyl-CoA binding protein(ACBP) can mediate intermembrane acyl-CoA transport and donate acyl-CoA for beta-oxidation and glycerolipid synthesis[J]. *Biochemical Journal*, 1994, **299**: 165—170.
- [27] RASMUSSEN J T, ROSENDAL J, KNUDSEN J. Interaction of acyl-CoA binding protein(ACBP) on processes for which acyl-CoA is a substrate, product or inhibitor[J]. *Biochemical Journal*, 1993, **292**: 907—913.
- [28] HILLS M J, DANN R, LYDIATE D, *et al.* Molecular cloning of a cDNA from *Brassica napus* L. for a homologue of acyl-CoA-binding protein[J]. *Plant Molecular Biology*, 1994, **25**(5): 917—920.