

朱金鑫,孙金鑫,原晓龙,等. 滇牡丹 3-酮酯酰-CoA 合酶基因克隆与功能分析[J]. 江苏农业科学,2018,46(2):20-23.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2018.02.005

滇牡丹 3-酮酯酰-CoA 合酶基因克隆与功能分析

朱金鑫^{1,3}, 孙金鑫^{1,3}, 原晓龙^{2,3}, 王 娟^{2,3}, 杨宇明^{2,3}, 王 毅^{2,3}

(1. 西南林业大学林学院, 云南昆明 650224; 2. 云南省林业科学院, 云南昆明 650201;

3. 国家林业局重点开放性实验室/云南珍稀濒危森林植物保护和繁育实验室/云南省森林植物培育与开发利用重点实验室, 云南昆明 650201)

摘要:3-酮酯酰-CoA 合酶(3-ketoacyl-CoA synthase, 简称 KCS) 是超长链单不饱和脂肪酸生物合成途径的关键酶。依据转录组数据设计特异性引物, 使用 RT-PCR 方法从滇牡丹(*Paeonia delavayi*) 中克隆得到 1 个 KCS 基因的 cDNA 全长序列, 命名为 *PdKCS* (GenBank 登录号 KX524949)。生物信息学分析结果表明, *PdKCS* 基因片段序列全长 1 527 bp, 包含完整的 cDNA 开放阅读框(ORF), 编码含有 502 个氨基酸残基的蛋白质; Blast 比对结果显示, 该蛋白质属于 KCS 蛋白家族; 系统进化分析结果显示, 该蛋白质属于跨膜、亲水性蛋白; RT-PCR 结果显示, 其在种子中的表达随着种子的成熟出现双峰型的表达量变化。研究结果可为进一步研究该蛋白的调控机制提供理论依据及获得含高不饱和脂肪酸转基因滇牡丹品种奠定理论基础。

关键词:滇牡丹; 3-酮酯酰-CoA 合酶; 基因克隆; 基因功能分析; RT-PCR

中图分类号:S685.110.1 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2018)02-0020-04

牡丹属芍药属牡丹组, 具有很高的观赏和药用价值^[1-2], 牡丹籽油作为中药丹皮(牡丹根皮)生产中的副产品, 其食用药用价值逐渐被人们发现, 并不断加强重视。研究人员发现,

收稿日期:2016-07-27

基金项目:国家林业公益性行业科研专项(编号:201204110); 云南省科技计划(编号:2015A005); 云南省应用基础研究重点项目(编号:2013FA054)。

作者简介:朱金鑫(1993—), 男, 河南周口人, 硕士研究生, 主要从事植物学研究。E-mail:1639807959@qq.com。

通信作者:王 毅, 博士, 助理研究员, 主要从事植物分子生物学研究。E-mail:228285818@qq.com。

牡丹籽油中含有丰富的不饱和脂肪酸, 具有重要的研究价值和应用潜力^[3]。滇牡丹(*Paeonia delavayi*) 主要分布在云南省中部至西北部、西藏自治区东南部和四川省西南部海拔 1 900~3 600 m 的部分区域, 是中国西南地区特有的珍稀种质资源, 1992 年中国植物红皮书将滇牡丹列为渐危种, 1996 年中国野生植物保护条例将滇牡丹定为国家二级保护植物^[4-7]。滇牡丹虽然自然分布狭窄, 但其栽培范围广^[4], 因此具有极大的引种驯化和育种空间, 应用价值高。

超长链单不饱和脂肪酸(very long chain monounsaturated fatty acid, 简称 VLCMFA) 是指主链上碳原子数 ≥ 18 , 有且仅有 1 个双键的脂肪酸^[8]。VLCMFA 在生物体内参与生物膜

[14] Valdez - Alarcon J J, Ferrando M, Salerno G, et al. Characterization of a rice sucrose - phosphate synthase - encoding gene[J]. Gene, 1996, 170(2):217-222.

[15] Sugiharto B, Sakakibara H, Saumadi, et al. Differential expression of two genes for sucrose - phosphate synthase in sugarcane; molecular cloning of the cDNAs and comparative analysis of gene expression [J]. Plant & Cell Physiology, 1997, 38(8):961-965.

[16] Tobias D J, Hirose T, Ishimaru K, et al. Elevated sucrose - phosphate synthase activity in source leaves of potato [*Solanum tuberosum*] plants transformed with the maize [*Zea mays*] SPS gene [J]. Plant Production Science, 2008, 2(2):92-99.

[17] Clements H F, Ghotb A. The numbering of leaves and internodes for sugarcane nutrition studies[J]. Proc Intl Soc Sugar Cane Technol, 1968, 13:569-584.

[18] Iskandar H M, Simpson R S, Casu R E, et al. Comparison of reference genes for quantitative real - time polymerase chain reaction analysis of gene expression in sugarcane [J]. Plant Molecular Biology Reporter, 2004, 22(4):325-337.

[19] 杨翠芳, 黄诚梅, 潘有强, 等. 甘蔗蔗糖磷酸合成酶 SPS III 基因表达的初步研究[J]. 南方农业学报, 2012, 43(6):723-726.

[20] 潘有强, 罗海玲, 李杨瑞. 甘蔗节间蔗糖含量与蔗糖代谢相关的 4 种酶活性之间的关系剖析[J]. 植物生理学通讯, 2007, 243(5):861-864.

[21] Reimholz R, Geiger M, Haake V, et al. Potato plants contain multiple forms of sucrose phosphate synthase, which differ in their tissue distributions, their levels during development, and their responses to low temperature[J]. Plant Cell & Environment, 1997, 20(3):291-305.

[22] Cpl G, Cte S, Perroux J M, et al. The five families of sucrose - phosphate synthase genes in *Saccharum* spp. are differentially expressed in leaves and stem. [J]. Functional Plant Biology, 2006, 33(6):605-610.

[23] 叶冰莹, 邱 思, 周 平, 等. 甘蔗蔗糖磷酸合成酶 SPS II cDNA 片段克隆与表达分析[J]. 应用与环境生物学报, 2011, 17(5):673-677.

[24] Verma A K, Upadhyay S K, Verma P C, et al. Functional analysis of sucrose phosphate synthase (SPS) and sucrose synthase (SS) in sugarcane (*Saccharum*) cultivars [J]. Plant Biology, 2011, 13(2):325.

[25] 王 英, 高和琼, 庄南生, 等. 崖城割手密 11 号与拔地拉核型比较分析[J]. 中国农学通报, 2008, 24(3):52-57.

脂、鞘脂的合成,是角质层蜡质生物合成的前体物质^[9], VLCMFA 不仅在生物体内具有广泛的重要作用,而且具有独特的医疗保健、化工用途,高单不饱和脂肪酸食用油具有降血脂、保护心脑血管、促进婴幼儿大脑发育等优点^[10-11],在工业上可以制备人造纤维、表面树脂、油漆干性剂等重要化工原料^[12-13]。VLCMFA 在生物体内主要以油酸等单不饱和脂肪酸为底物,在脂肪酰 - CoA 延长酶复合体的催化下合成,其中脂肪酰 - CoA 延长酶复合体包括 4 个酶:3 - 酮酯酰 - CoA 合酶(3 - ketoacyl - CoA synthase,简称 KCS)、3 - 酮酯酰 - CoA 还原酶(3 - ketoacyl - CoA reductase,简称 KCR)、3 - 羟酯酰 - CoA 脱水酶(3 - hydroxyacyl - CoA dehydrase,简称 HCD)、羟酯酰 - CoA 还原酶(enoyl - CoA reductase,简称 ECR)^[14-15],其中 KCS 催化步骤是其中的关键步骤^[16],因此被认为是 VLCMFA 生物合成途径中的限速酶而得到广泛研究。目前 KCS 已经在油菜^[17-18]、大豆^[19-20]、油桐^[21]、油茶^[22]等传统油料作物中被广泛研究,2011 年中华人民共和国卫生部将牡丹籽油列入新资源食品后^[23],油用牡丹迅速成为研究热点。本研究从滇牡丹中克隆得到 KCS 基因并进行生物信息学分析,为进一步研究其调控机制及获得含高 VLCMFA 油用品种奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料与试剂

滇牡丹种子于 2014 年 6—9 月采集于云南省昆明市林业科学院树木园苗圃,样本经液氮速冻后于 -80 ℃ 冰箱内保存待用。总 RNA 小量提取试剂盒购自美国 Qiagen 公司,pESY - T₃ 克隆试剂盒与感受态细胞购自北京金式金生物技术有限公司,LA - Taq 酶、反转录酶 M - MLV 购自大连宝生物工程有

1.2 试验方法

1.2.1 *PdKCS* 基因的克隆 通过转录组分析获得 1 个只含有部分滇牡丹 KCS 基因的序列片段,根据该基因片段序列设计特异性引物 5' - RACE 引物(本试验所用引物见表 1)对 5' - 基因片段进行克隆。按照总 RNA 小量提取试剂盒操作步骤提取总 RNA,检测总 RNA 浓度及完整性后反转录合成 cDNA 第 1 链。按照试剂盒操作步骤扩增获得 *PdKCS* 基因 5' 端序列片段,利用 ATGC 序列拼接软件将 5' - RACE 获得的基因片段和转录组数据分析获得的基因片段进行拼接后获得 *PdKCS* 全长基因序列。以 *PdKCS* 基因全长序列为模板,设计含有起始密码子和终止密码子的特异性引物 *PdKCSF*、*PdKCSR*,以滇牡丹种子 cDNA 为模板,*PdKCSF* 和 *PdKCSR* 为引物扩增 *PdKCS* 基因 cDNA 开放阅读框全长序列,PCR 反应体系参考 PrimeScript™ Kit。扩增程序为:94 ℃ 5 min;94 ℃ 30 s,58 ℃ 45 s,72 ℃ 90 s,30 个循环;72 ℃ 延伸 7 min。将 PCR 产物转入 pESY - T₃ 载体中送测序公司检测并验证。

1.2.2 生物信息学分析 应用 ProtParam (<http://web.expasy.org/protparam>)在线工具分析蛋白质理化性质;应用 ProtScale (<http://web.expasy.org/protscale/>)在线工具进行蛋白质亲疏水性预测分析;应用 Tmpred (http://www.ch.embnet.org/soft-ware/TMPRED_form.html)在线工具分析蛋白质序列跨膜结构域;应用 Cell - PLoc ([表 1 引物序列](http://www.csbio.</p></div><div data-bbox=)

引物名称	序列 5'→3'	用途
KCSF1	CAACCTGGGAGGATGG	5'RACE
KCSF2	GCTCCGATGATCACGA	
<i>PdKCSF</i>	ATGAGCACTGCCGCCGGTGT	cDNA ORF 克隆
<i>PdKCSR</i>	TTAGGAAACTGTCTCCACTG	
<i>PdKCSFt</i>	AGAAGAACCCTTGATTG	荧光定量 PCR 检测
<i>PdKCSRt</i>	ACATACAGTGCTCATACG	
F1	TCGGATGATGATGACCTTCTCTGTG	内参基因
R1	CATACACTCGTCTGCGTTCTCCA	

sjtu.edu.cn/bioinf/Cell - PLoc/)进行亚细胞定位;应用 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) Blast 和 DNAMAN 生物学软件进行氨基酸多序列比对分析;利用软件 MEGA 5.0 以邻位连接法构建氨基酸序列的系统进化树;数据使用 GraphPad Prism v5.0 进行分析制图。

1.2.3 荧光定量 PCR 检测 *PdKCS* 组织表达分析 以获得的 *PdKCS* 基因序列为模板设计特异性引物 *PdKCSFt* 和 *PdKCSRt*;分别采集滇牡丹授粉后 30、50、70、90 d 的种子,采集后立即放入液氮中。用 RNA 小量提取试剂盒提取滇牡丹不同发育时期的种子总 RNA,电泳检测后 -80 ℃ 保存;参照反转录酶 M - MLV 试剂盒合成 cDNA,保存于 -20 ℃;RT - PCR 反应用荧光染料 SYBR Green I, *GAPDH* 为内参基因。PCR 反应体系 20 μL,反应程序为:94 ℃ 4 min;95 ℃ 15 s,57 ℃ 15 s,72 ℃ 25 s,35 个循环;72 ℃ 单点检测信号。反应结束后,60 ℃ 连续检测信号产生溶解曲线。用 Opticon monitor 3.1 软件进行数据的记录和分析。每个样品 3 次重复,灭菌水为空白对照。

2 结果与分析

2.1 *PdKCS* 基因的克隆与序列分析

通过分析滇牡丹种子转录组获得的 KCS 基因片段,依据获得的基因片段设计 5' - RACE 基因扩增特异性引物,以 cDNA 为模板进行 PCR 扩增 5' - RACE 获得基因片段,利用 ATGC 序列拼接软件,最终获得全长 cDNA 序列 1 527 bp,命名为 *PdKCS*,序列提交 GenBank(登录号 KX524949)。利用 NCBI ORF Finder 软件对拼接数据结果进行序列分析,结果显示 *PdKCS* 基因片段包含完整的 cDNA 开放阅读框,编码 502 个氨基酸残基的蛋白质,起始密码子为 ATG,终止密码子 TAA,并根据获得的 *PdKCS* 基因全长设计含有起始密码子和终止密码子的特异性引物,以 cDNA 为模板扩增获得 *PdKCS* 基因开放阅读框,并将扩增产物连接到克隆载体中,进行永久保存。

2.2 *PdKCS* 蛋白理化性质预测

蛋白理化性质分析结果显示,*PdKCS* 分子式为 C_{2 534} H_{4 008} N₆₈₈ O₇₀₉ S₂₃,相对分子质量为 56 193.2,理论等电点为 9.36,脂肪酸系数为 96.1,亲水性平均系数为 -0.026,不稳定指数为 40.61,该蛋白为碱性亲水不稳定蛋白(图 1)。

PdKCS 蛋白跨膜结构预测如图 2 所示,亚细胞定位结果显示 *PdKCS* 定位于质体膜。

2.3 *PdKCS* 氨基酸序列比对分析

将克隆出来的 *PdKCS* 基因编码的氨基酸蛋白序列与已

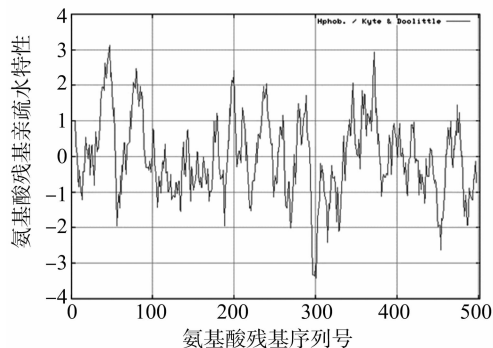


图1 PdKCS 蛋白亲水性分析

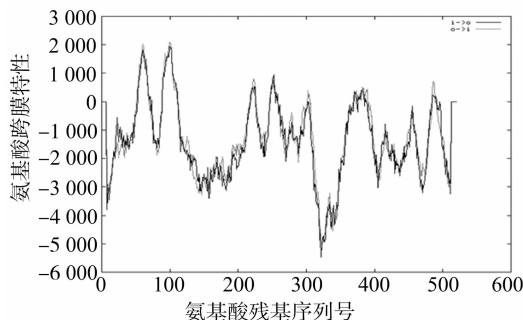


图2 PdKCS 蛋白跨膜结构预测

[illegible]

阴影部分分别表示高度保守区“PTPSLSAM”“FGNTSSSS”“GSGFKCNSAVW”，
加框部分表示催化区域“GMGCSA”

图3 PdKCS 与其他物种3-酮酯酰-CoA 合酶氨基酸序列比对分析

为双峰型,在授粉后 30 d 时 *PdKCS* 的表达量达到第 1 个高峰,此后表达水平降低,在 50 d 后表达水平再次升高,在授粉后 70 d *PdKCS* 表达水平最高,而在种子发育后期,即授粉后 70~90 d 内,*PdKCS* 表达水平降低,不饱和脂肪酸合成量降低,以积累饱和脂肪酸等物质以备萌发所需。

报道的 KCS 的氨基酸序列进行多重序列比对。结果显示,该蛋白与已报道的 PdKCS 含有 KCS 家族的高度保守区“PTPSLSAM”“FGNTSSSS”“GSGFKCNSAVW”和催化区域“GMGCSA”(图 3),表明该蛋白属于 KCS 家族蛋白。PdKCS 的氨基酸序列与花生 (*Arachis hypogaea*) 氨基酸序列(登录号: ACZ51240.1)相似性达 65.45%,与油茶 (*Camellia oleifera*) 氨基酸序列(登录号: ACQ41892.1)相似性达 84.46%,与可可 (*Theobroma cacao*) 氨基酸序列(登录号: XP_007042184.1)相似性达 85.46%,与树棉 (*Gossypium arboreum*) 氨基酸序列(登录号: ALJ55536.1)相似性达 81.3%。

2.4 *PdKCS* 基因系统进化树分析

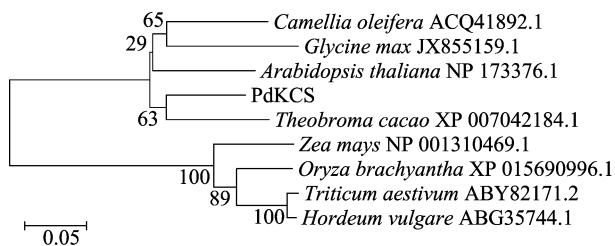
利用 MEGA 5.0 软件构建基于 PdKCS 氨基酸的系统进化树(图 4),结果表明,PdKCS 与可可 KCS(XP_007042184.1)聚为一类,亲缘关系最近,与双子叶植物聚为同一分支,与单子叶植物聚为不同分支,亲缘关系最远。由基因系统进化树可知,双子叶植物的 KCS 已经形成与单子叶植物亲缘关系较远的、相对独立的家族,这与目前的研究结果相吻合。

2.5 荧光定量 PCR 检测 *PdKCS*

利用 RT-PCR 方法和 *PdKCS* 的基因特异性引物检测其在授粉后 30、50、70、90 d 后种子中的表达情况(图 5)。使用 GraphPad Prism v5.0 进行数据分析, 结果显示 *PdKCS* 的表达

3 结论与讨论

KCS 是植物体内催化以油酸等单不饱和脂肪酸延长碳链产生超长链单不饱和脂肪酸生物合成途径的关键。本研究将转录组数据分析后克隆得到的滇牡丹 *KCS* 基因序列, 命



Camellia oleifera—油茶; *Glycine max*—大豆; *Arabidopsis thaliana*—拟南芥; *Zea mays*—玉米; *Oryza brachyantha*—短花药野生稻; *Triticum aestivum*—小麦; *Hordeum vulgare*—大麦; *Theobroma cacao*—可可

图4 PdKCS 与其他植物 KCS 系统进化树

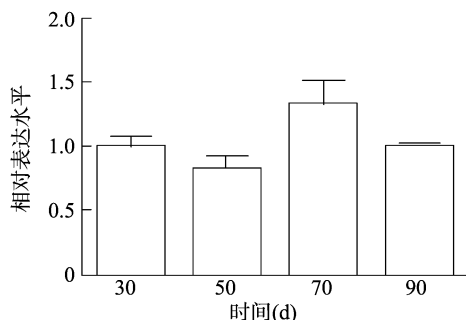


图5 滇牡丹种子不同时期 KCS 相对表达水平

名为 *PdKCS*, GenBank 登录号为 KX524949, 包含完整的 cDNA 开放阅读框, 其开放阅读框全长 1 527 bp, 起始密码子为 ATG, 终止密码子为 TAA, 编码含 502 个氨基酸残基的蛋白质。生物信息学分析结果显示, *PdKCS* 含有 KCS 蛋白家族的保守结构域, 且与已报道的 KCS 具有高度一致性, 表明该蛋白属于 KCS 家族蛋白。蛋白理化性质分析结果显示, *PdKCS* 分子式为 $C_{2534}H_{4008}N_{688}O_{709}S_{23}$, 相对分子质量为 56 193.2, 理论等电点为 9.36, 脂肪酸系数 96.1, 亲水性平均系数为 -0.026, 不稳定指数为 40.61, 该蛋白为碱性亲水不稳定蛋白, 蛋白跨膜结构预测显示该蛋白为跨膜蛋白, 亚细胞定位结果显示 *PdKCS* 定位于质体膜。

滇牡丹具有生态适应性强、栽培范围广等优点, 因此滇牡丹具有极大的引种驯化和育种空间, 牡丹籽油中含有丰富的不饱和脂肪酸, 具有重要的研究价值和应用潜力, 因此选育出高单不饱和脂肪酸含量的油用滇牡丹品种并推广种植, 有利于促进地区林业的可持续发展。VLCMFA 在生物体内主要以油酸等单不饱和脂肪酸为底物, 在脂肪酰 - CoA 延长酶复合体的催化下合成, 而脂肪酰 - CoA 延长酶复合体中的 KCS 被认为是 VLCMFA 生物合成途径中的限速酶, 对其深入研究有助于进一步了解 VLCMFA 的合成过程及调控机制。因此, *PdKCS* 基因可作为未来滇牡丹油脂高产型新品种培育的调控研究重点。本研究从滇牡丹中克隆得到 *KCS* 基因并进行生物信息学分析, 为进一步研究它的调控机制及获得种子单不饱和脂肪酸含量高的油用滇牡丹品种, 促进地区林业的可持续发展, 创造巨大的经济价值奠定理论基础。

参考文献:

- [1] 潘开玉. 芍药科分布格局及其形成的分析[J]. 植物分类学报, 1995, 33(4): 340-349.
- [2] 王莲英. 中国牡丹品种图志[M]. 北京: 中国林业出版社, 1997:

2-7.

- [3] 周海梅, 马锦琦, 苗春雨, 等. 牡丹籽油的理化指标和脂肪酸成分分析[J]. 中国油脂, 2009, 34(7): 72-74.
- [4] 李奎. 滇牡丹保护生物学与遗传多样性研究[D]. 北京: 中国林业科学研究院, 2013: 1.
- [5] 龚洵, 潘跃芝, 杨志云. 滇牡丹的多样性和现状评估[J]. 西北植物学报, 2003, 23(2): 218-223.
- [6] 中华人民共和国野生植物保护条例[J]. 河南省人民政府公报, 1996(12): 14-16.
- [7] 于永福. 中国野生植物保护工作的里程碑——《国家重点保护野生植物名录(第一批)》出台[J]. 植物杂志, 1999(5): 3-11.
- [8] Murphy D J, Mukherjee K D. Biosynthesis of triacylglycerols containing very long chain acyl moieties in seeds [M]// Biological Role of Plant Lipids, 1989: 143-146.
- [9] 倪郁, 郭彦军. 植物超长链脂肪酸及角质层蜡质生物合成相关酶基因研究现状[J]. 遗传, 2008, 30(5): 561-567.
- [10] Okamoto T, Chimi K, Maruyama T, et al. Nutritional studies of hardened fish oil. I: comparisons of the effects of hardened fish oil on fatty acid profiles of tissue lipids with those of soybean oil and hardened soybean oil in rats [J]. Journal of Japan Oil Chemists Society, 1988, 37: 177-184.
- [11] 王性炎, 王姝清. 神经酸研究现状及应用前景[J]. 中国油脂, 2010, 35(3): 1-5.
- [12] 田德雨, 王士安, 王立昊, 等. 超长链单不饱和脂肪酸的生物合成和代谢工程[J]. 生物技术通报, 2015, 31(12): 42-49.
- [13] 周万平, 郎春秀, 熊鲜艳, 等. 油菜籽芥酸含量遗传调控研究进展[J]. 核农学报, 2010, 24(3): 537-541.
- [14] Kunst L, Clemens S. Plant long chain fatty acid biosynthetic enzyme: US, US 6815579 B1 [P]. 2004(9): 12-26.
- [15] 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[D]. 武汉: 华中农业大学, 2015: 7-12.
- [16] Qi Q, Rose P A, Abrams G D, et al. (+) - Absciscic acid metabolism, 3 - ketoacyl - coenzyme A synthase gene expression, and very - long - chain monounsaturated fatty acid biosynthesis in brassica napus embryos [J]. Plant Physiology, 1998, 117(3): 979-987.
- [17] Guo Y, Mietkiewska E, Francis T, et al. Increase in nervonic acid content in transformed yeast and transgenic plants by introduction of a *Lunaria annua* L. 3 - ketoacyl - CoA synthase (*KCS*) gene [J]. Plant Molecular Biology, 2009, 69(5): 565-575.
- [18] 王会, 刘佳, 付丽, 等. 基因工程技术在油菜油脂中的研究进展[J]. 中国农学通报, 2013(24): 131-137.
- [19] Cahoon E B, Marillia E F, Stecca K L, et al. Production of fatty acid components of meadowfoam oil in somatic soybean embryos [J]. Plant Physiology, 2000, 124(1): 243-51.
- [20] 赵艳, 翟莹, 邱增成, 等. 大豆 *KCS* 基因的克隆及结构预测[J]. 分子植物育种, 2013, 11(1): 72-76.
- [21] 周俊琴, 谭晓风, 刘美兰, 等. 油桐 β - 酮脂酰 - CoA 合成酶 (*KCS*) 基因的克隆与序列分析[J]. 经济林研究, 2013, 31(4): 52-57.
- [22] 李魏. 油茶 β - 酮脂酰 - CoA 合酶基因的全长 cDNA 克隆 [D]. 北京: 中南林业科技大学, 2009: 1-12.
- [23] 中华人民共和国卫生部公告 2011 年第 9 号 [J]. 中华人民共和国卫生部公报, 2011(2): 264.