

油茶长链脂肪酰基 CoA 合成酶基因 1 (*CoLACS1*) 分子特征与表达分析

江南^{1,2,3}, 谭晓风^{1,3}, 张琳^{1,3}, 李泽¹, 蒋瑶^{1,3}, 黄丽媛¹

(¹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/经济林育种与栽培国家
林业局重点实验室, 长沙 410004; ²湖南工业大学包装与材料工程学院, 株洲 412007;

³中南林业科技大学/湖南工业大学经济林培育与利用湖南省 2011 协同创新中心, 长沙 410004)

摘要:长链脂肪酰基 CoA 合成酶(LACS)在脂肪酸的合成与分解代谢中起着重要作用。本研究以油茶(*Camellia oleifera* Abel)国家审定品种华硕(*Camellia oleifera* Huashuo)种仁转录组数据为基础,根据 LACS 基因 Unigene 序列设计引物,分离克隆了油茶 LACS1 基因全长 cDNA 序列,命名为 *CoLACS1* (GeneBank 登录号:KJ960228),全长 2114 bp,开放阅读框 2088 bp,编码 695 个氨基酸;生物信息学分析显示 *CoLACS1* 具有 3 个 Block,从分子特征可判断 *CoLACS1* 属于 LACS 家族;氨基酸同源比对显示与其他物种的 LACS 氨基酸序列具有较高的相似性,其中与拟南芥 LACS7 相似性为 78%,与麻风树、大豆、毛果杨等物种 LACS6 (peroxisomal)相似性可达 80% 以上;对 *CoLACS1* 进行原核表达分析,构建的 pET30a-*CoLACS1* 载体成功转化至 BL21 (DE3) 中经 1 mmol/L IPTG 诱导表达,菌液检测获得预测的目的蛋白(分子量约为 76 kD);分析转录组数据中 *CoLACS1* 的 Unigene 序列 RTKM 值并对 *CoLACS1* 进行实时荧光定量 PCR 分析,结果表明 *CoLACS1* 在油茶华硕种子发育各时期平稳表达,表达丰度变化不大,荧光定量结果变化规律与转录组数据分析一致;同时分析华硕种仁不同时期含油率和脂肪酸成分变化,双变量统计分析发现 *CoLACS1* 表达模式与油茶油脂积累规律呈显著相关性。本研究为进一步研究油茶油脂积累与代谢的基因调控提供理论依据。

关键词:油茶;长链脂肪酰基 CoA 合成酶;基因表达;油脂积累

Molecular Characterization and Expression Analysis of Long Chain Fatty Acid Acyl-CoA Synthetase Gene 1 (*CoLACS1*) from Oil Camellia (*Camellia oleifera* C. Abel)

JIANG Nan^{1,2,3}, TAN Xiao-feng^{1,3}, ZHANG Lin^{1,3}, LI Ze¹, JIANG Yao^{1,3}, HUANG Li-yuan¹

(¹Key Laboratory of Cultivation and Protection for Non-wood Forest of Ministry of Education, The Key Laboratory of Non-wood Forest Product of Forestry Ministry, Central-south University of Forestry and Technology, Changsha 410004; ²School of Packing and Material Engineering, Hunan University of Technology, Zhuzhou 412007; ³Cooperative Innovation Center of Cultivation and Utilization for Non-wood Forest Trees of Hunan Province 2011, Changsha 410004)

Abstract: Long chain fatty acid acyl-CoA synthetase (LACS) plays an important role in fatty acid anabolism and catabolism. Based on seeds transcriptome Unigene sequence of oil Camellia cultivar *Camellia oleifera* C. Abel Huashuo ('HS'), the cDNA encoding LACS was isolated and cloned from the developing seed, which was designated as *CoLACS1* (GeneBank accession number: KJ960228). *CoLACS1* with complete sequence of 2114 bp had an open reading frame with 2088 bp encoding 695 amino acids. Sequence analysis demonstrated that the *CoLACS1* possessed three blocks which was the typical molecular characteristics of LACS, and belonged to LACS family. Phylogenetic analysis showed that *CoLACS1* was highly conserved and had the similarity (78%) with AtLACS7 and the sim-

收稿日期: 2016-03-17 修回日期: 2016-05-26 网络出版日期: 2016-12-14

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.4996.S.20161214.0905.006.html>

基金项目: 国家林业公益性行业科研专项重大项目(201404702); 湖南省自然科学基金项目(2016JJ5031); 国家自然科学基金项目(31470684)

第一作者研究方向为经济林栽培育种及农林生物技术。E-mail: namijiangnan@126.com

通信作者: 谭晓风, 研究方向为经济林栽培育种。E-mail: tanxiaofengcn@126.com

ilarity of over 80% with LACS6 (peroxisomal) of *Jatropha curcas* L., *Glycine max* (L.) Merr. and *Populus trichocarpa* Torr. & A. Gray et al. The expression vector of pET30a-*CoLACS1* was transformed to BL21 (DE3) bacteria, which was induced by 1 mmol/L IPTG to express the recombinant protein with molecular weight of about 76 kD. The gene expression patterns generated by qPCR were in consistent with the RPKM values in transcriptome data, indicating that the *CoLACS1* expresses stably at different developmental stage of *Camellia oleifera* C. Abel seeds. Moreover, the gene expression of *CoLACS1* was significantly correlated with the accumulation of lipid in *Camellia oleifera* C. Abel seed. The study provided a theoretical basis for the further research of gene regulation in lipid accumulation and metabolism of *Camellia oleifera* C. Abel.

Key words: *Camellia oleifera* C. Abel; long chain fatty acid acyl-CoA synthetase; gene expression; lipid accumulation

长链脂肪酰基 CoA 合成酶 (LACS, long chain fatty acid acyl-CoA synthetase, EC 6. 2. 1) 几乎在生物体内所有脂肪酸衍生物的生化合成途径中起着关键作用。最核心的作用 C. Abel 为将游离的长链脂肪酸和 CoA 酯化生成长链脂肪酸酰基 CoA, 这一反应是其他脂类代谢酶利用脂肪酸非常重要且必须的过程, 一些重要的生化反应如脂肪酸延伸和 β -氧化、磷脂和甘油三酯 (TAG) 的合成、酶的激活、细胞信号传导等均是长链脂肪酰基 CoA 为底物进行的^[1], 其中 TAG 是植物果实和种子中油脂贮藏和积累的主要形式^[2]。LACS 催化的反应包括游离的脂肪酸与 ATP 结合生成酰基-AMP 中间体及酰基-AMP 中间体与 CoA 的硫醇基团, 释放出 AMP 形成脂肪酰基 CoA 等过程^[3-4]。

真核生物 LACS 具有 ACS 家族的共同特征, 其一是 AMP-绑定域标签, 包含 10 ~ 12 个高度保守氨基酸序列, 是 ATP 结合的必须位点^[5-6], 其二是 ACS 信号序列, 由约 25 个高度保守的氨基酸序列组成, 这个序列可能是脂肪酸的结合部位和 ACS 的激活位点^[7]。此外, LACS 具有一个长度大约为 45 个氨基酸残基的连接域 (linker)^[8], 与 LACS 活性相关^[9], 这是其他 ACS 并不具备的一个显著特征。因此, AMP-绑定域标签和连接域是真核生物 LACS 具备的 2 个分子特征^[10-11]。目前关于 *LACS* 基因及其生化研究在细菌、酵母和哺乳动物中有详细报道^[3]。高等植物中 LACS 也逐渐有深入研究, 有文献报道模式植物拟南芥中已鉴定出 9 个 LACS 家族成员, 并证实各 *AtLACS* 在不同器官中有不同的表达模式, 在脂肪酸相关油脂代谢的不同节点起着重要作用^[4]; K. Ichihara 等^[12] 研究发现水稻种子发育阶段的 LACS 酶活变化与油脂积累变化完全一致且酰基辅酶 A 的合成速度大于 TAG 的合成速度; T. Tonon 等^[13]、X. He 等^[14] 和 K. Ichihara 等^[12] 分别对微藻、蓖麻和水稻种子的研究显示, LACS 活性还与游离脂肪酸数量以及储存性油脂的种类相关, 这些研究

表明 LACS 在油脂的积累中具有重要作用。

油茶 (*Camellia oleifera* Abel) 是我国南方重要的木本食用油料树种, 油茶种仁所含油脂含有 90% 以上的不饱和脂肪酸, 是优质保健的绿色食用油。油茶种仁油脂的积累是一个复杂的过程, 与油茶种仁发育过程中各时期植物体的脂类代谢密切相关。油茶脂类代谢涉及多种酶类, 其中任何一种酶类的表达或调控异常均会使油脂积累受到影响。LACS 是调控植物脂类代谢极为重要的酶类, 本实验室构建的油茶种仁转录组数据分析显示 LACS 在油茶种子发育过程中表达并呈现出多基因家族特征。本研究在油茶转录组数据分析基础上, 从油茶种仁中分离克隆了 1 条 LACS 全长 cDNA 序列, 命名 *CoLACS1*; 运用生物信息学软件对 *CoLACS1* 进行了较为系统的分子特征分析, 并结合油茶种仁发育时期含油率及脂肪酸成分变化, 对 *CoLACS1* 在油茶种子发育过程中的表达规律与油茶油脂积累的相关性进行了研究。

1 材料与方法

1.1 材料与主要试剂

中南林业科技大学国家林业局重点实验室构建的国家审定油茶品种华硕油茶种仁 6 月、8 月和 10 月转录组数据^[15]; 华硕果实采自湖南省长沙市望城县东城镇实验室油茶基地, 分别于 2014 年 6 月、7 月、8 月、9 月、10 月的中旬和下旬采集, 果实采摘后立即剥取种仁, 液氮保存, 实验室超低温冰箱 (-80 °C) 保存。

RNA 提取试剂盒 (MiniBEST Universal RNA Extraction Kit)、ExTaq DNA 聚合酶和高保真酶 PrimeSTAR HS DNA Polymerase 均购自 TaKaRa 公司, 反转录试剂盒 (RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit) 购自 Fermentas 公司, 荧光定量试剂盒 (QuantiFast SYBR Green PCR Kit) 购自 QIAGEN 公司, 3'RACE 和 5'RACE 试剂盒购自 Invitrogen 公司, 氨苄青霉素、IPTG、Trans1-T1、pEASY-T1 和 pEASY-

Blunt Simple Cloning Kit 购自 TransGen Biotech 公司, pET30a 和 BL21 (DE3) 为本实验室保存, PCR 产物纯化试剂盒及质粒提取试剂盒购自 OMEGA 公司, 油茶油脂提取和脂肪酸成分测定所需试剂参考文献[16], 其他试剂为进口或国产分析纯。

所有引物由北京六合华大基因生物技术公司合成, DNA 测序由上海铂尚生物技术有限公司完成。

1.2 方法

1.2.1 油茶种仁总 RNA 提取及 cDNA 合成

按 TaKaRa 公司的 RNA 提取和 Fermentas 公司的反转录试剂盒说明书分别提取油茶各时期种仁 RNA, 1.5% 琼脂糖电泳检测 RNA 提取效果, Beckman DU-640 测定 RNA 浓度, 选取理想 RNA 为模板按照 Fermentas 反转录试剂盒及 Invitrogen 公司 3' RACE 和 5' RACE 试剂盒实验步骤制备 cDNA 用于 *CoLACS1* 克隆和荧光定量 PCR。

表 1 *CoLACS1* 克隆引物

Table1 Primer used in *CoLACS1* cloning

引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence 5'-3'	引物用途 Primer purpose
3'-GSP1	GCCATCTCTTCCATCGTCAACAGGAGT	3'RACE PCR
3'-GSP2	TATGAACGGGCGAACCAGGTCACAAT	3'RACE 巢式 PCR
3'-GSP3	TTGTTGCCGAGTGTGGAAGGTTATG	3'RACE 巢式 PCR
5'-GSP2	ACCACCAGATGTCTTCACAGCATT	5'RACE PCR
5'-GSP3	TGTCTCCCTGCTAGAAATCCAACCTG	5'RACE 巢式 PCR
PF1	GTGGAGATGGATTCATCACCTCAGC	<i>CoLACS1</i> 全长扩增
PR1	CTCTGCCTTTCTTCCTATTTTCACAT	<i>CoLACS1</i> 全长扩增
AUAP	GGCCACGCGTCTGACTAGTAC	3'末端序列 PCR
UPM-Long Primer:	CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT	5'末端序列 PCR
UPM-Short Primer:	CTAATACGACTCACTATAGGGC	

1.2.3 *CoLACS1* 生物信息学分析

利用 GenBank 数据库 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>)、GENDOC、MEGA5.03 等软件程序完成 *CoLACS1* 氨基酸序列及其同源进化分析; 使用 PROSITE PS00455 工具搜索注释的 LACS 保守域信息; 在线软件 ProtParam (<http://web.expasy.org/ProtParam>)、SignalP 4.1 Server、protscale (<http://web.expasy.org/protscale>)、TMHMM Server v. 2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0>)、Predictprotein (<http://www.Predictprotein.org>) 等进行 *CoLACS1* 基因编码的蛋白质的理化特性、结构特点分析及功能预测。

1.2.4 *CoLACS1* 原核表达载体构建和表达

提取 *CoLACS1* 全长克隆质粒, 设计特异引物 F: 5'CGGG-

1.2.2 *CoLACS1* 全长 cDNA 的克隆

分析本实验室构建的华硕油茶转录组数据共获得 *CoLACS1* Unigene 序列 32 条 (包含 202 ~ 1740 bp 序列长度), 对 Unigene15454 序列长度为 1740 bp 的 cDNA 片段设计 3' RACE 和 5' RACE 特异引物 (表 1), 采用 RACE 及降落 PCR (TD-PCR) 技术, 克隆 *CoLACS1* 基因。RACE 过程 PCR 扩增体系为: 94 °C 2 min; 94 °C 30 s, 退火温度 40 s, 72 °C 延伸 1 min 30 s, 70 °C、68 °C、65 °C 各 5 个循环, 61 °C 15 个循环, 57 °C 10 个循环, 72 °C 总延伸 10 min。OMEGA 试剂盒凝胶回收扩增产物, pEASY-T1 连接并转化 Trans1-T1, 抗生素筛选阳性克隆测序, 获得 *CoLACS1* 3' 和 5' 端序列。采用 Vector NTI 10.3.0 对 RACE 序列和 1740 bp 的 Unigene 序列进行拼接; 在全长 cDNA 拼接序列的 3' 端和 5' 端设计引物 (表 1), 高保真 DNA 聚合酶进行全长扩增, 连接转化后鉴定重组子, 挑选阳性克隆测序验证。

TACCATGGATTCATCACCTCAGCGTCGCC 3' (GGTACC 为 *Kpn* I 酶切位点) 和 R: 5' CGCGAATTCTCACCATTTTTGAGAGAGAGGGTTCAGACG 3' (GAATTC 为 *Eco*R I 酶切位点), 以提取的质粒为模板获得编码区完整的 2106 bp 的目的片段, 采用常规载体构建方法利用 *Kpn* I 和 *Eco*R I 双酶切将 *CoLACS1* 全长序列连接至载体 pET30a 的多克隆位点上, 构建 pET30a-*CoLACS1* 表达载体。将 pET30a-*CoLACS1* 转化至感受态大肠杆菌 BL21 (DE3) 中, 37 °C 充分培养 (至 OD₆₀₀ 约为 0.6 左右) 后, 28 °C 条件下用 IPTG (浓度 1 mmol/L) 诱导表达, 诱导总时间为 12 h, 在培养 2 h、6 h、10 h 和 12 h 取菌液, 聚丙烯酰胺电泳 (15% SDS-PAGE) 检测分析, 未加诱导剂 IPTG 的菌

液和空载体菌液作为对照。

1.2.5 *CoLACS1* 在油茶种子发育不同时期表达量

分析 油茶转录组数据中 Unigene 的 RPKM 值分析显示, *CoLACS* 参与了油茶脂肪酸的合成和脂肪酸的利用过程, 在油茶种子发育过程不同时期表达量变化不明显。采用实时荧光定量 PCR (qPCR) 技术验证 *CoLACS1* 在油茶种子不同发育时期的表达模式。荧光定量 PCR 的引物 (PF: 5' GCGAACCAGGTCA-CAATG 3', PR: 5' CTTCCACAACCTCGGCAAC 3'), PCR 产物 386 bp, 以油茶表达稳定的 *GAPDH* 基因 (rzots0_001325.y1.scf) 为内参对照基因 (引物: PF: 5' CTA CTGGAGTTTTACCGA 3', PR: 5' TAAGAC-CCTCAACAATGCC 3', PCR 产物 231 bp)。BIO-RAD 荧光定量 PCR 仪上完成 qPCR 过程, 反应体系 20 μ L (cDNA 1 μ L, 2 \times SYBR Green qPCR Mix 10 μ L, 10 μ mol/L 的正反向引物各 1 μ L, 超纯水补足至 20 μ L), 引物退火温度为 58 $^{\circ}$ C (反应程序: 95 $^{\circ}$ C 2 min; 95 $^{\circ}$ C 15 s, 58 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 20 s, 35 个循环), Bio-Rad CFX Manager 软件进行数据分析。

1.2.6 油茶种子发育不同时期出油率和脂肪酸成分测定 提取华硕种子发育不同时期 (8 月、9 月和 10 月中下旬) 油脂, 油脂提取及脂肪酸成分测定方法参考文献 [16], 同时采用 SPSS Statistics 19.0 统

计分析油茶种仁发育不同时期 *CoLACS1* 表达与油脂变化的相关性。

2 结果与分析

2.1 油茶 *CoLACS1* 基因全长 cDNA 克隆

根据 Unigene15454 序列设计的引物 (表 1) 进行 RACE 试验, 获得 5'RACE 和 3'RACE 片段 (图 1A 和 B), 序列拼接后获得长度为 2517 bp 的完整油茶长链脂肪酸酯酰辅酶 A 合成酶基因全长 cDNA 序列, 包含 5'非编码区 152 bp, 3'非编码区 277 bp (不包括 PolyA) 和开放阅读框 (ORF) 2088 bp, 命名为 *CoLACS1*。以基因全长特异引物和高保真酶对编码区进行全长 cDNA 特异扩增, 电泳检测获得清晰条带 (图 1C), 序列经克隆测序结果表明特异扩增所获序列长度为 2114 bp, 与拼接序列比对一致性为 100%, 包含 2088 bp 的 OFR 序列, 编码 695 个氨基酸, 分子式为 $C_{3432}H_{5380}N_{912}O_{999}S_{34}$, 分子量 76492.0, 等电点理论值为 7.51, 生理中性条件下蛋白质略呈碱性; 带正电荷氨基酸残基 (Arg + Lys) 72 个, 带负电荷氨基酸残基 (Asp + Glu) 71 个; 稳定系数 (II) 35.03, 属于稳定蛋白; 脂肪系数 88.66, 总平均亲水性 -0.068, ProtScale 在线分析可发现 LACS1 具有多个较强的亲水区域, 可确定为亲水性蛋白。序列提交 GeneBank, 登录号为 KJ960228。

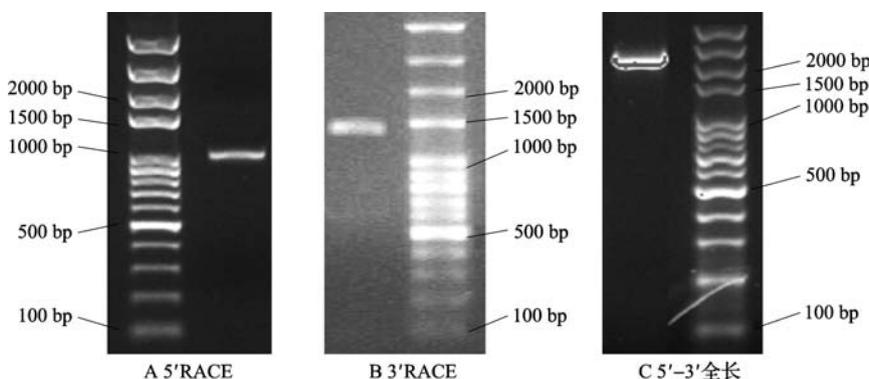


图 1 油茶 *CoLACS1* cDNA 克隆

Fig.1 Cloning of *CoLACS1* cDNA from *Camellia oleifera* C. Abel

2.2 *CoLACS1* 氨基酸序列及进化分析

以植物、动物和真菌等 LACS 同源蛋白氨基酸序列作为查询对象, 使用 PROSITE PS00455 工具搜索注释的保守域信息, 得到 *CoLACS1* 的保守域序列 (图 2A 和 B)。位于第 261 ~ 272 位由 12 个高度保守的氨基酸组成的序列为 AMP 结合域, 是 ATP 必须的结合位点 (图 2A 中※标记); 第 521 ~ 545 位包含 25 个高度保守的氨基酸序列 (图 2A 中★标记),

为 *CoLACS1* 的 ACS 信号序列。同时 *CoLACS1* 还含有 LACS 特殊的 linker 结合域 (图 2A 中△标记), 位于 2 个保守域 (图 2B ★标示区) 之间, 包含 60 个氨基酸残基, 不同物种不同 LACS linker 结合域所含氨基酸序列长度不同 (图 2B)。保守域信息分析表明 *CoLACS1* 既具备 ACS 家族的共同特征, 又具有真核生物 LACS 的 2 个分子特征, 可确定本研究克隆的基因为油茶所含有的 1 条 LACS 基因。

```

MDSSPQRRLTIQNHLTSAAGDIQHLFLRPNPTAGEFFYEQGYSVLLPEKLOTGK
WNVYRSARSPIKLLNRFDPHPEIGTLHDNFVRSVETFRDYKYLGRTRIRVDGIVGE
YKWMTYGEAGTARSAGISGLVLHGIPKGCACVGLYFINRPEWLIVDHACSAYSIS
VPLYDTLGPDAVKFIHNAVQAI FCLPETLNILLSFLSEIPSVHILIVVGGIDEQMP
SLPSSLGVEVISYSKLLSEGRSSPQFPCKPPKDDVATICYTSGTITGTPKGAVLSHEN
LITNVAGASLSVKFCPSDIYISYLP LAHIYERANQVTMAHFVAVGEYQGDNLKL
MDDMAALRPTLFCSSVPRLYNRIYAGITNAVKTSGGLKERLFNVAYNAKKOSII SG
KNPSMWDRDLVFNKIKAKLGGRRVFMASGASPLSPDVMNFLRVCFCGRVVEGY
GMTETACVISAMDEGDNLSGHVGSNPACEVKLMDVPEMNYTSDDKPYRGEI
CVRGPLVFLGYHKDEVQTRVIDEDGWLHTGDIGLMSSGGRLKIIDRKKNIKFLA
QGEYIAPEKIENVYAKCKFVAQCFVYGDSL NSSLVAVISVDPDVLKAWAASEGMK
YKDLGELCNDPRARA AVLADMDAVGREAQLRGFEFAKSVTLVLEQFTMENGLL
TPTEKIKRPQAKAYFAKAIANMYAELSTSEPSLSKM

```

A

AMP-binding domain signature

<i>Jatropha curcas</i> LACS6	258	ICVTSGTTGTPK
<i>CoLACS1</i>	261	ICVTSGTTGTPK
Faa4	267	IMVTSGTTGTPK
<i>AtLACS9</i>	250	IMVTSGTTGLPK
mmFACL1	274	ICVTSGTTGNPK
<i>AtLACS7</i>	266	ICVTSGTTGTPK
BnLACS	262	ICVTSGTTGTPK

ACS signature motif

<i>Jatropha curcas</i> LACS6	518	DG---WLHTGDIGLWLPGGRLKIIDRKK
<i>CoLACS1</i>	521	DG---WLHTGDIGLMSSGGRLKIIDRKK
mmFACL1	534	DG---WLHTGDIGKWLPNGLTKIIDRKK
Faa4	527	DG---WFRITGDIKEWTPKQVMIIDRKK
<i>AtLACS9</i>	525	DEKGMRFVITGDIGREHPDGCEIIDRKK
<i>AtLACS7</i>	526	DG---WLHTGDIGLWLPGGRLKIIDRKK
BnLACS	522	DG---WLHTGDIGLWLPGGRLKIIDRKK

LACS specific linker domain

<i>Jatropha curcas</i> LACS6	346	SVPRLYNRIYISITSAVKTSGLPKERLFNAAYNAKKQAIENGKSPS-----PWDRDLVFNKIRERLGGRVR
<i>CoLACS1</i>	349	SVPRLYNRIYAGITNAVKTSGGLKERLFNVAYNAKKQSIIISGKNPS-----PWDRDLVFNKIKAKLGGRRV
Faa4	363	GVAAYWETVRKGI LAKENELPGNSQILEWTVVALKERNIPGSGLLSG-----LIFKRIREATGGNER
<i>AtLACS9</i>	348	AVPAALDRVRDGRKKVDARGGLSKMLEDFAYARLSAINGSWFGWGLEKLEWDLVFRKIRAVLGGQIR
mmFACL1	366	VVPRLLNRMPDRIFGQANTS--LKRWLLDFASKRKEAELRSGIVRNN-----SLWDRLEFHKIQSSSLGGKVR
<i>AtLACS7</i>	354	SVPRLYNRIYDGIITSAVKS SGVVKRLEFIAYNSKKQAIENGRTPS-----AFWDLVFNKIKKELGGRRV
BnLACS	350	SVPRLYNRIYDGIITNAVKTSGGLKERLFNAAYNAKKQALENGKSAF-----PWDRDLVFNKIKDRLLGGRVR

B

A: *CoLACS1*氨基酸全序列; B: *CoLACS1*保守域序列

A: Amino acid complete sequence of *CoLACS1*, B: Conserved sequence of *CoLACS1*

图 2 *CoLACS1* 氨基酸序列分析

Fig.2 Analysis of amino acid sequence of *CoLACS1*

此外,生物信息学分析显示, *CoLACS1* 没有跨膜区,不是结合蛋白,可能属于可溶性蛋白。平均信号肽与最大剪接位点分值平均为 0.098,未达到最大阈值 0.450,可推断 *CoLACS1* 不存在信号肽切割位点,不是分泌蛋白。蛋白质二级结构预测发现 *CoLACS1* 亚细胞定位于过氧化物酶体(预测置信度达 69%), *CoLACS1* 包含 34.96%的 α -螺旋结构(H值),19.14%的 β -折叠(E值)和 45.9%的无规则卷曲结构(L值)。同时发现 7 种蛋白质功能位

点,其中包括 N-糖基化位点(N-glycosylation site)3 个,分别位于第 460~463 位的 NLSG、第 483~486 位的 NYTS 和第 582~585 位的 NSSL(图 2A 中下划线 1~3);cAMP 和 cGMP 依赖的蛋白激酶磷酸化位点(cAMP-and cGMP-dependent protein kinase phosphorylation site)1 个(383~386 KKQS)(图 2A 中下划线 4);蛋白激酶 C 磷酸化位点(Protein kinase C phosphorylation site)8 个(53~55 TKG,61~63 SAR、91~93 TFR、121~123 TAR、270~272 TPK、291~

293 SVK、389 ~ 391 SGK 和 662 ~ 664 TFK) (图 2A 中下划线 5 ~ 12); 酪蛋白激酶 II 磷酸化位点 (Casein kinase II phosphorylation site) 9 个 (33 ~ 36 TAGE、80 ~ 83 TLHD、91 ~ 94 TFRD、107 ~ 110 TVGE、115 ~ 118 TYGE、229 ~ 232 TGVE、453 ~ 456 SAMD、485 ~ 488 TSDD 和 686 ~ 689 STSE) (图 2A 中下划线 13 ~ 21); N-豆蔻酰化位点 8 个 (120 ~ 125 GTARSA、134 ~ 139 GIPKGA、269 ~ 274 GTPKGA、287 ~ 292 GASLSV、322 ~ 327 GVAVGF、360 ~ 365 GITNAV、444 ~ 449 GMTETA 和 530 ~ 535 GLMSSG) (图 2A 中下划线 22 ~ 29); 1 个微体细胞 C 端靶信号 (Microbodies C-terminal targeting signal) (693 ~ 695 SKM) (图 2A 中下划线 30); 1 个 AMP- 绑定域标签 (ICYTSGTTGTPK 261 ~ 272 位氨基酸) (图 2A 中※标记)。AMP- 绑定域标签氨基酸位点和序列与 CoLACS1 保守序列分析结果一致。CoLACS1 这些功能化位点使 CoLACS1 在油茶种子发育的不同时期发挥其功能参与调控油茶种仁脂类代谢多个节点重要的生理反应。

将 CoLACS1 氨基酸序列与其他 15 种动、植物 LACS 所编码的氨基酸序列比对进行同源性分析, 采

用 MEGA5.03 程序构建的系统进化树如图 3。结果显示 CoLACS1 与其他植物 LACS 家族同源蛋白亲缘关系较近, CoLACS1 与川桑 (*Morus notabilis*)、欧洲油菜 (*Brassica napus*) 和模式植物拟南芥 LACS7 (*AtLACS7*)、油棕 (*Elaeis guineensis*)、苹果 (*Malus domestica*)、桉 (*Eucalyptus grandis*)、大豆 (*Glycine max*)、麻疯树 (*Jatropha curcas*)、毛果杨 (*Populus trichocarpa*) 和可可 (*Theobroma cacao*) 等物种 LACS6 (peroxisomal) 在进化树上处在同一个分支, NCBI 氨基酸 BLAST 结果显示 CoLACS1 与这些植物 LACS 氨基酸相似性可达 78% ~ 85%。高等植物的 LACS 家族不同成员可位于叶绿体的外膜、过氧化物酶体、内质网和叶绿体等不同的亚细胞结构^[3,6], 参与植物不同组织器官不同生理时期脂类合成和分解中重要的生化过程。例如拟南芥 LACS9 是叶绿体 LACS 编码基因, 主要参与油脂合成, LACS7 位于过氧化物酶体 (peroxisome) 上, 参与脂肪酸氧化过程^[4]。由氨基酸同源性分析推测 CoLACS1 在油茶种仁发育过程中可能与 AtLACS7 及油棕等 LACS6 功能相似, 在过氧化物酶体中参与调控长链脂肪酸的分解代谢过程。

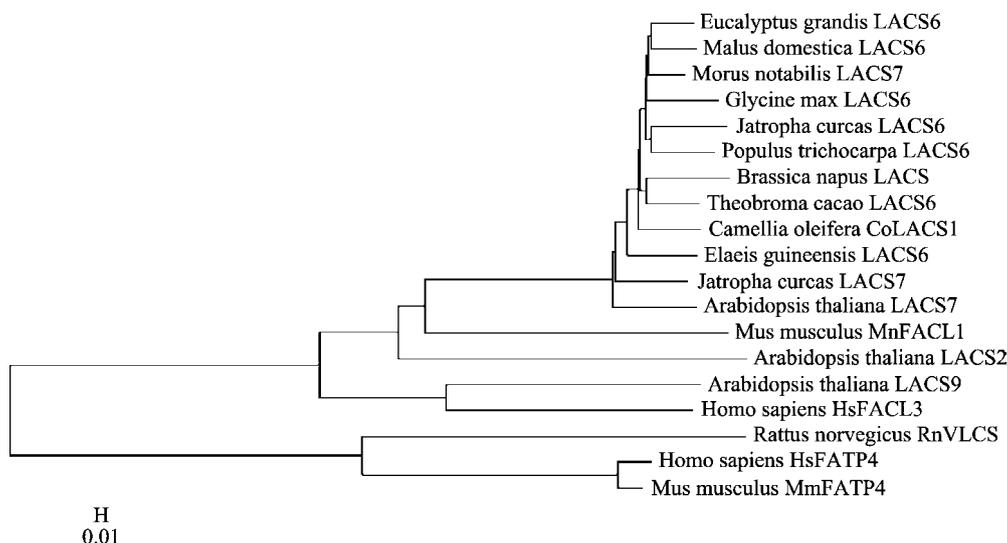


图 3 CoLACS1 蛋白的系统进化树分析

Fig. 3 Phylogenetic tree analysis of CoLACS1 protein

2.3 CoLACS1 的原核表达分析

采用常规方法构建 pET30a-CoLACS1 表达载体如图 4。载体转化至感受态 BL21 (DE3) 后, 聚丙烯酰胺凝胶电泳检测 pET30a-CoLACS1 表达, 结果如图 5。和空载体及未加诱导剂的 BL21 (DE3) 相比, IPTG 诱导不同时间的 BL21 (DE3) 菌株均有 1 条清

晰的蛋白条带, 分子量约为 76 kD, 图 5 显示随着诱导时间延长, 蛋白浓度增大, 条带颜色变深, 而未加诱导剂的菌液和空载体菌液相应条带不明显, CoLACS1 原核表达结果与预测的结果一致, 说明所构建的表达载体 pET30a-CoLACS1 被成功诱导表达, 克隆所获得的 CoLACS1 基因全长序列是完整且正确的。

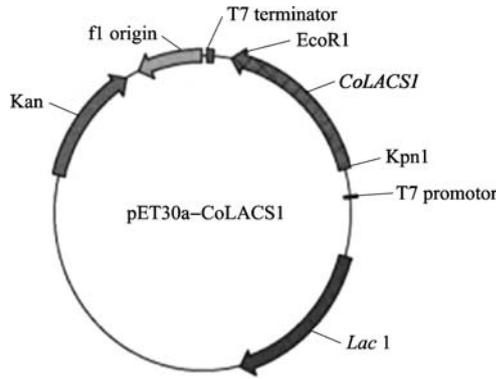
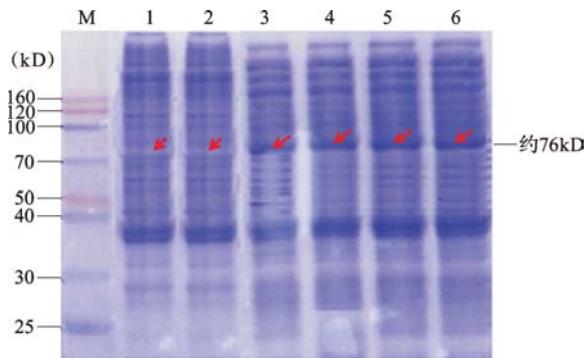


图 4 表达载体 pET30a-*CoLACS1* 的构建

Fig. 4 Constructed expression vector of pET30a-*CoLACS1*



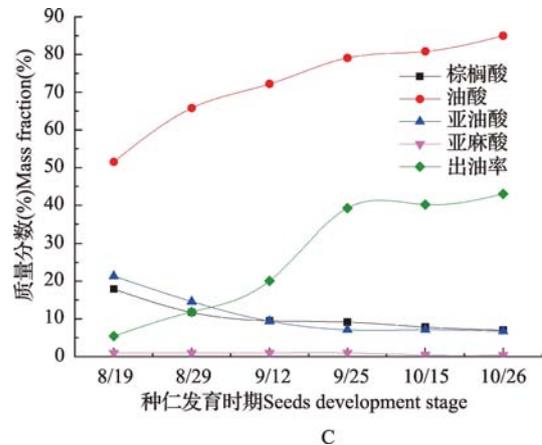
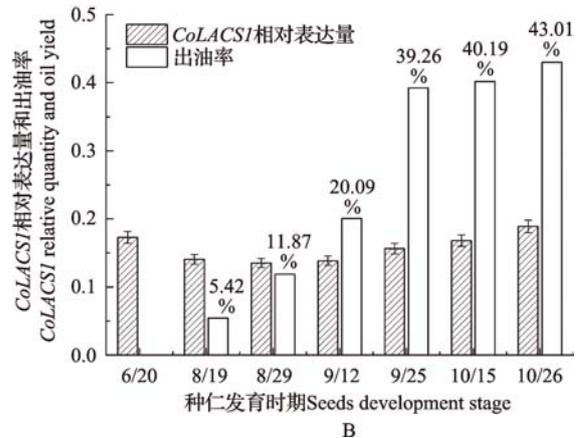
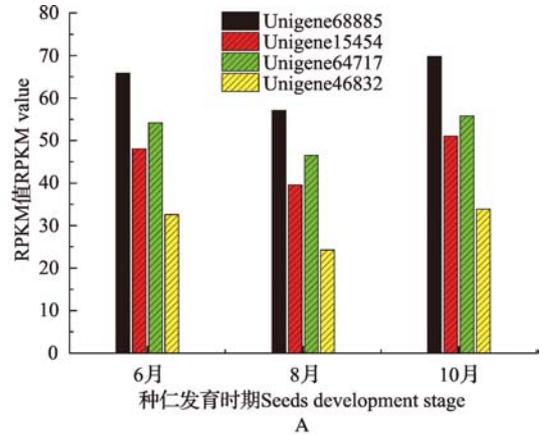
1: 未经 IPTG 诱导的菌体总蛋白; 2: 转化空载体菌体总蛋白; 3~6: 1 mmol/L IPTG 诱导 2 h, 6 h, 10 h 和 12 h 重组菌总蛋白 (红色箭头为目的蛋白条带)

1: Total protein of BL21 (DE3),
2: Total protein of empty vector-transferred BL21 (DE3),
3-6: Fusion protein induced by 1 mmol/L IPTG for 2 h, 6 h, 10 h and 12 h for pET30a-*CoLACS1*
(The red arrows direct the purpose protein banding)

图 5 SDS-PAGE 分析 pET30a-*CoLACS1* 表达蛋白
Fig. 5 SDS-PAGE analysis of expression protein of pET30a-*CoLACS1*

2.4 油茶种仁发育不同时期油脂含量与 *CoLACS1* 基因表达分析

本实验室构建的华硕油茶转录组数据分析获得的 *LACS* Unigene 序列中有 4 条能完全比对到 *CoLACS1* cDNA 序列上, 4 条 Unigene 的 RPKM 值在油茶种仁发育 6 月、8 月、10 月份变化如图 6A。RPKM 值代表各 Unigene 在油茶种子发育不同时期的表达量, 可直接用于比较相应基因不同时期表达差异^[17]。qPCR 分析 *CoLACS1* 表达模式如图 6B, 在油茶种仁发育 6 月、8 月、9 月和 10 月中下旬 *CoLACS1* 均有表达。同时分析种仁发育相应时期含油率和脂肪酸变化规律如图 6C。结果表明, 油茶种仁发育 8 月至 10 月含油率处于逐渐上升趋势, 8 月、9 月为油



A: 转录组中 4 个 Unigenes RPKM 值;
B: 油茶种仁 *CoLACS1* qPCR 相对表达量变化和出油率;
C: 油茶种仁出油率、脂肪酸成分变化
A: RPKM value of Unigenes from transcriptom,
B: *CoLACS1* expression abundance and oil yield of *C. oleifera* C. Abel seed,
C: Variations of oil yield and fatty acid components of *C. oleifera* C. Abel seed

图 6 油茶种仁不同发育时期 *CoLACS1* 表达丰度、出油率和脂肪酸成分变化
Fig. 6 Variations of *CoLACS1* expression abundance, oil yield and fatty acid components of *C. oleifera* C. Abel seed in different period

脂积累高峰期。根据脂肪酸成分变化规律(图6C),8月至10月油酸含量处于逐渐递增状态,棕榈酸、亚油酸和亚麻酸含量均处于逐渐递减状态,含油率及脂肪酸成分变化规律与油茶种仁发育过程中多种不饱和脂肪酸合成的基因表达变化规律一致^[16]。与此同时,qPCR显示*CoLACS1*在油茶种仁发育各时期表达丰度不高且趋于平稳,与转录组4条Unigene RPKM值变化规律相符,6月和10月相对表达量接近,8月和9月略有下调,各时期表达丰度无显著差别。*CoLACS1*在油茶种仁发育各时期的表达模式与油脂相应时期变化规律明显不一致,出现在8月、9月油脂快速积累时*CoLACS1*表达还略有下调,各时期表达量也并未随含油率和脂肪酸成分的明显变化而发生显著变化。用双变量相关性统计分析二者相关性,结果显示Pearson相关性为0.854,显著性为0.030,显示*CoLACS1*在油茶种仁发育不同时期表达模式与油茶种仁含油量变化显著相关,推测油茶*CoLACS1*在油茶种仁发育过程中没有直接参与调控油脂的合成和积累的过程,而是协同表达参与调控油茶种仁油脂积累的变化过程。

3 讨论

长链脂肪酰基 CoA 合成酶(LACS)在生物的脂类代谢中具有重要的作用。在植物体中,脂肪酸链延伸和去饱和修饰前阶段、脂肪酸的运输和利用脂肪酸生成其他脂类衍生物等生理过程均依赖于LACS^[18]。目前酵母、大鼠、大豆、油菜、拟南芥和微拟球藻等不同物种的长链酰基 CoA 合成酶基因序列和功能均陆续被鉴定。油茶品种华硕种仁转录组数据显示,油茶含有5个成员组成的LACS蛋白家族,32条LACS Unigene序列GeneBank比对发现分别与拟南芥等模式植物的*LACS2*、*LACS4*、*LACS7*、*LACS8*和*LACS9*同源。拟南芥LACS蛋白家族含有LACS1~LACS9,已有文献报道LACS2和LACS9在油脂合成和积累过程中起着重要的作用^[19-20],LACS6和LACS7定位于过氧化物酶体上^[21],活化游离脂肪酸形成脂肪酸酰基 CoA 进行 β -氧化,因此可推测油茶LACS基因蛋白家族参与了油茶油脂合成和代谢的全过程。本研究从油茶种仁cDNA中克隆得到*CoLACS1*的cDNA全长,氨基酸序列分析发现*CoLACS1*具有与拟南芥LACS7、麻疯树LACS6、欧洲油菜BnLACS序列一致的AMP结合域、ACS信号基序、特殊的结合域(图2B),符合真核长链脂肪

酰基 CoA 合成酶的典型特征^[10-11],从基因分子特征可确定*CoLACS1*为典型的LACS家族基因。系统同源性分析显示*CoLACS1*与拟南芥LACS7、油棕等物种的LACS6(long chain acyl-CoA synthetase 6, peroxisomal)同源性较大。油茶种仁发育过程中*CoLACS1*在各时期的平稳表达明显与油脂变化规律不一致,而Pearson分析二者又呈现显著相关性,同时*CoLACS1*氨基酸序列分析表明*CoLACS1*含有过氧化物酶体的定位序列^[22](微体细胞C端靶信号,图2A),位于C端,由3个高度保守的氨基酸残基组成(SKM),由此可初步判断油茶*CoLACS1*没有参与催化调控油茶种仁油脂的合成,而是在诸如 β -氧化等油脂代谢的生理过程中起着重要作用,这些生理过程可为油茶种仁发育油脂积累过程中提供必要的能量和碳源,甚至提供适应外界环境而进行的信号传导^[20,23]。结合油茶果实和种仁发育过程中性状变化规律^[24]研究,*CoLACS1*表达规律与油茶果实和种仁发育生理变化规律是一致的,8、9月份是油茶果实的膨大期,也是油脂积累的高峰期,一方面果实和种子重量增加,植物器官的发育需要大量的物质和能量,必然加强过氧化物酶体 β 氧化过程,利用脂肪酸提供能量,另一方面这个时期种仁完成油脂的快速积累在一定程度上会抑制脂肪酸的消耗。*CoLACS1*的平稳表达不但为机体能量供应提供了一定的保障,对应8、9月份表达略有下调,脂肪酸利用得到控制,也保证了油茶种仁油脂积累的顺利进行。

油茶种子含油量及油脂成分的变化是受多基因调控的,对油茶油脂合成和代谢过程中关键基因的分克隆和功能研究可为油茶分子育种提供科学依据。本研究为进一步完成油茶种仁*CoLACS1*的亚细胞定位和底物特异性的鉴定等内容的研究提供了理论基础,也为油茶LACS家族中其他成员的克隆和功能研究及揭示*CoLACSs*在油茶种仁发育过程中脂质合成、积累和生物代谢过程中的调控作用提供了理论依据。

参考文献

- [1] Watkins P A. Fatty acid activation[J]. Prog Lipid Res, 1997, 36(1): 55-83
- [2] 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 Biotechnol J, 2009, 7(7): 694-703
- [3] 李庆岗,陶著,杨玉增,等.长链脂肪酰基 CoA 合成酶(ACSL)的研究进展[J].中国畜牧兽医,2012,39(6):137-140
- [4] Shockey J M, Fulda M S. *Arabidopsis* contains nine long-chain

- acyl-coenzyme A synthetase genes that participate in fatty acid and glycerolipid metabolism [J]. *Plant Physiol*, 2002, 129 (4): 1710-1722
- [5] 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: adenylyl ligases, enoyl-CoA hydratases/isomerases, and acyl-CoA thioesterases [J]. *Biochemistry*, 1992, 31 (24): 5594-5604
- [6] 于莉莉, 谭小力, 侯文胜. 大豆长链脂肪酰辅酶 A 合成酶基因 *GmLACS* 在酵母中的表达 [J]. *大豆科学*, 2011, 30 (5): 719-723
- [7] Mashek D G, Li L O, Coleman R A. Long-chain acyl-CoA synthetases and fatty acid channeling [J]. *Future Lipidol*, 2007, 2 (4): 465-476
- [8] Steinberg S J, Morgenthaler J, Heinzer A K, et al. Very long acyl-CoA synthetases human "bubblegum" represents a new family of proteins capable of activating very long chain fatty acids [J]. *J Biol Chem*, 2000, 275 (45): 35162-35169
- [9] Iijima H, Fujino T, Minekura H, et al. Biochemical studies of two rat acyl-CoA synthetases, ACS1 and ACS2 [J]. *Eur J Biochem*, 1996, 242 (2): 186-190
- [10] Chong B, Tan X, Zhou J, et al. In silicon cloning and analysis of a LACS gene in *Brassica napus* [C]//Shanghai: The 2nd International Conference on Bioinformatics and Biomedical Engineering, 2008: 140-143
- [11] 崇保强, 谭小力. 油菜 *LACS4* 基因的电子克隆和功能分析 [J]. *江苏农业学报*, 2008, 25 (1): 38-43
- [12] Ichihara K, Kobayashi N, Saito K. Lipid synthesis and acyl-CoA synthetase in developing rice seeds [J]. *Lipids*, 2003, 38 (8): 881-884
- [13] Tonon T, Qing R, Harvey D, et al. Identification of a long-chain polyunsaturated fatty acid acyl-coenzyme A synthetase from the diatom *Thalassiosira pseudonana* [J]. *Plant Physiol*, 2005, 138 (1): 402-408
- [14] He X, Chen G Q, Kang S T, et al. *Ricinus communis* contains an acyl-CoA synthetase that preferentially activates ricinoleate to its CoA thioester [J]. *Lipids*, 2007, 42 (10): 931-938
- [15] 邵奉公. 油茶种子油脂合成调控的转录组与表达谱研究 [D]. 长沙: 中南林业科技大学, 2011
- [16] 曾艳玲, 谭晓风, 张党权, 等. 油茶脂肪酸代谢途径中关键酶基因调控油脂合成的规律研究 [J]. *中国粮油学报*, 2014, 29 (2): 26-29
- [17] Mortazavi A, Williams B A, McCue K, et al. Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq [J]. *Nat Methods*, 2008, 5 (7): 621-628
- [18] Lü S, Song T, Kosma D K, et al. *Arabidopsis* CER8 encodes long-chain acyl-CoA synthetase (LACS1) that has overlapping functions with LACS2 in plant wax and cutin synthesis [J]. *Plant J*, 2009, 59 (4): 553-564
- [19] Schnurr J, Shockey J. The acyl-CoA synthetase encoded by *LACS2* is essential for normal cuticle development in *Arabidopsis* [J]. *Plant Cell Online*, 2004, 16 (3): 629-642
- [20] 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 Physiol*, 2002, 129 (4): 1700-1709
- [21] 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]. *Plant J*, 2002, 32 (1): 93-103
- [22] 王教瑜, 吴小燕, 杜新法, 等. 植物病原真菌过氧化物酶体的发生机制及功能 [J]. *微生物学报*, 2008, 42 (12): 1681-1686
- [23] 徐靖, 李辉亮, 朱家红, 等. 植物脂肪酸 β -氧化的研究进展 [J]. *生物技术通讯*, 2008, 19 (1): 141-144
- [24] 王建勇, 谭晓风, 梅芳芳, 等. 油茶脂肪酰辅酶 A 脱氢酶基因的克隆与表达分析 [J]. *植物遗传资源学报*, 2015, 16 (5): 1080-1088