

## 薏苡3-酮酯酰-CoA合酶基因克隆和生物信息学分析

魏小艳<sup>1,2</sup>, 李勇<sup>2</sup>, 郭娟<sup>2</sup>, 王雅南<sup>2\*</sup>, 黄璐琦<sup>1,2\*</sup>

(1. 江西中医药大学院士工作站, 江西 南昌 330004; 2. 中国中医科学院中药资源中心, 道地药材国家重点实验室培育基地, 北京 100700)

**摘要:** 3-酮酯酰-CoA合酶 (3-ketoacyl-CoA synthase, KCS) 基因是调控长链脂肪酸生物合成过程中的关键基因, 在薏苡的生长发育过程中起着重要的调控作用。本文以薏苡 (*Coix lacryma-jobi* L.) 作为实验材料, 根据转录组测序数据, 从薏苡的cDNA中克隆出KCS基因, 并对其生物信息学分析。结果表明, 薏苡KCS基因的cDNA全长序列为1 548 bp, 编码515个氨基酸, 生物信息学预测结果显示该基因编码蛋白质为碱性亲水不稳定蛋白, 分子质量为58 608.12 Da, 等电点为9.20, 含有2个跨膜螺旋结构域, 不含信号肽剪切位点, 亚细胞定位主要在质体膜。多序列比对和进化树分析结果显示薏苡KCS与玉米、水稻、节节麦、高粱和小米等单子叶植物的同种基因具有3个相同的保守位点, 而且亲缘关系更近, 由此证明该基因在这些同科植物间的进化是保守的。此外, 基因的表达分析结果显示KCS基因在不同油脂含量的薏苡资源中有明显的差异变化。本实验对KCS基因的克隆及其结构、性质等的研究有利于深入研究该蛋白在脂肪酸合成过程中的调控机制。

**关键词:** 薏苡; 3-酮酯酰-CoA合酶; 基因克隆; 生物信息学分析

中图分类号: R931

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870(2021)02-0610-08

## Cloning and bioinformatic analysis of the 3-ketoacyl-CoA synthase gene in *Coix lacryma-jobi* L.

WEI Xiao-yan<sup>1,2</sup>, LI Yong<sup>2</sup>, GUO Juan<sup>2</sup>, WANG Ya-nan<sup>2\*</sup>, HUANG Lu-qi<sup>1,2\*</sup>

(1. Academician Workstation, Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, China;

2. State Key Laboratory Breeding Base of Dao-di Herbs, National Resource Center for Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China)

**Abstract:** As a key gene in the regulation of long-chain fatty acid biosynthesis, 3-ketoacyl-CoA synthase (KCS) plays an important role in the growth and development of *Coix lacryma-jobi* L. In this study, the KCS gene was cloned from cDNA of *Coix lacryma-jobi* L. and bioinformatics analysis was performed. Results showed that the full length KCS gene was 1 548 bp encoding 515 amino acids. Bioinformatics analysis indicated that the gene encoded a 58 608.12 Da protein with an isoelectric point of 9.20 containing two transmembrane helical structure domains and lacking a signal peptide, with a likely subcellular localization in main plastid membranes. The results of multiple sequence comparisons and evolutionary tree analysis revealed that KCS had three identical conserved sequences and was closely related to KCS from monocotyledons such as *Sorghum bicolor*, *Zea mays*, *Setaria italica*, *Panicum miliaceum*, *Oryza brachyantha*, *Hordeum vulgare*, *Aegilops tauschii* subsp. *Tauschii*. We speculated that the evolution of the gene was similar among these plants of the same family. In addition, gene expression analysis showed that the KCS gene was significantly different in *Coix lacryma-jobi* L. isolates having different lipid

收稿日期: 2020-08-26; 修回日期: 2020-09-27.

基金项目: 国家自然科学基金青年基金项目 (81703657); 中央本级重大增减支项目 (ZZXT201702, ZZ13-YQ-085, 20160302, 2060302).

\*通讯作者 Tel: 86-10-64087469, E-mail: wyn19870127@126.com;

Tel: 86-10-84044340, E-mail: huangluqi01@126.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2020-1407

content. This work will facilitate further study of the regulatory mechanism of this enzyme in fatty acid synthesis.

**Key words:** *Coix lacryma-jobi* L.; 3-ketoacyl-CoA synthase; gene cloning; bioinformatics analysis

薏苡 (*Coix lacryma-jobi* L.) 俗称薏米、薏苡仁等<sup>[1]</sup>, 为禾本科蜀黍族薏苡属一年生或多年生草本植物<sup>[2,3]</sup>, 在贵州、广西、福建、安徽、四川等地均有种植<sup>[4]</sup>, 是我国传统的药食和谷物资源, 被称为“禾本科植物之王”和“生命健康之禾”<sup>[5,6]</sup>。薏苡中含有多糖、油脂、蛋白质以及维生素等多种活性成分<sup>[7]</sup>, 营养价值和药用价值极高, 被广泛地应用于医药、食品和化妆品等领域<sup>[8]</sup>, 其油脂类提取物被证实具有多种生物功能特性, 主要包括抗肿瘤<sup>[9,10]</sup>、抗炎消肿<sup>[11]</sup>、镇痛止血<sup>[12]</sup>、抑菌<sup>[13]</sup>以及抑制酪氨酸酶<sup>[14,15]</sup>等药理活性。

薏苡仁油脂中含有丰富的脂肪酸, 其中超长链脂肪酸可以保护薏苡受到非生物胁迫和生物胁迫作用, 但是近年来环境气候等因素的影响导致薏苡仁的质量参差不齐, 因此研究超长链脂肪酸的生物合成过程对提高其含量具有重要意义。超长链脂肪酸的延长过程通常是在内质网中以叶绿体内产生的16碳或18碳的脂肪酸为底物, 通过CoA延长酶复合体进行碳链的延伸而合成的<sup>[16]</sup>, 这个延长过程受到4种复合体酶的催化和调控, 包括3-酮酯酰-CoA合酶(3-ketoacyl-CoA synthase, KCS)、3-酮酯酰-CoA还原酶(3-ketoacyl-CoA reductase, KCR)、3-羟酯酰-CoA脱水酶(3-hydroxyacyl-CoA dehydrase, HCD)和羟酯酰-CoA还原酶(enoyl-CoA reductase, ECR), 其中3-酮酯酰-CoA合酶(KCS)在油脂的生物合成过程中起着极其重要的调控作用, 是控制超长链脂肪酸合成途径的关键酶基因<sup>[17,18]</sup>。目前, 已有大量关于3-酮酯酰-CoA合酶的研究报道, 其中从油菜(*B. napus* cv.)<sup>[19]</sup>、辣椒(*Capsicum annuum* L.)<sup>[20]</sup>、蒜头果(*Malania oleifera*)<sup>[21]</sup>、刺齿报春苣苔(*Primulina spinulosa*)<sup>[22]</sup>、滇牡丹(*Paeonia delavayi*)<sup>[23]</sup>等植物中均克隆分离并研究了KCS基因, 并且脂肪酸合成通路中的其他3种脂肪酰-CoA延长酶也已有相关报道<sup>[24-26]</sup>, 但尚未见薏苡脂肪酸合成通路关键酶基因的克隆及生物信息学分析。

本实验以薏苡作为材料, 基于转录组测序数据获得薏苡3-酮酯酰-CoA合酶基因(KCS)序列, 从薏苡中克隆KCS基因并通过生物信息学软件对其编码蛋白的理化性质、跨膜结构域、信号肽、蛋白质结构及系统进化树等方面进行预测, 这些初步预测的结果有助于对该基因序列及其所编码蛋白的研究, 并为挖掘薏苡脂肪酸类物质生物合成途径的关键酶基因提供参考。

## 材料与方 法

**植物** 实验所需薏苡材料生长于河北省安国市伊康药业有限公司的薏苡种植基地, 采集不同时期的纯种薏苡全株, 样品采集后经液氮速冻贮存于-80℃冰箱。

**仪器和试剂** PCR扩增仪(Applied Biosystems, 美国), Vortex-genie漩涡震荡仪(Scientific Industries, 美国), 紫外凝胶成像分析仪(Gene, 中国), 低温冷冻离心机(Eppendorf, 德国), Nanodrop 2000分光光度计(Thermo Fisher Scientific, 美国), 电热恒温培养箱(上海一恒科学仪器有限公司, 中国); 植物RNA小量提取试剂盒(TaKaRa公司), Gel Extraction Kit(OMEGA公司), *TransScript*<sup>®</sup> All-in-One First-Strand cDNA Synthesis SuperMix for qPCR、pEASY-Blunt Zero Cloning Kit和Trans T1感受态细胞(TransGen Biotech公司), Phusion<sup>™</sup> High-Fidelity DNA Polymerase和DNA marker(Thermo Fisher Scientific公司), 所有引物均由北京睿博兴科生物技术有限公司合成。

**总RNA的提取及反转录** 按照植物RNA小量提取试剂盒的操作步骤从薏苡叶中提取总RNA。使用1.2%的琼脂糖凝胶进行电泳并结合分光光度计以检测总RNA的提取浓度及其完整性。样品检测合格后, 将1μg总RNA、4μL 5×*TransScript*<sup>®</sup> All-in-One Super-Mix for qPCR和1μL gDNA Remover混合均匀, 用无菌水补足至20μL, 混合均匀后42℃反应15min, 85℃加热5s, 产物置于冰上冷却, 待冷却后将其储存于-20℃冰箱。

**薏苡KCS基因的克隆** 通过分析转录组测序结果获得薏苡KCS基因的全长序列, 利用Primer Premier 5软件设计该基因的特异性引物KCS-F(ATGGAGACGT CCGCGCC)和KCS-R(GAAGGTTGGCAGCGCTTGA)。以薏苡叶cDNA为模板, 再以KCS-F和KCS-R为引物使用Phusion酶扩增KCS基因, 反应程序如下: 98℃预变性2min; 98℃变性30s, 70℃(每个循环下降1℃)退火15s, 72℃延伸2min, 15个循环; 98℃变性30s, 55℃退火15s, 72℃延伸2min, 25个循环; 72℃延伸10min, 4℃结束反应。经1.2%的琼脂糖凝胶电泳检测后, 回收并纯化PCR产物。将2μL扩增产物加入1μL(30ng) pEASY-Blunt Zero载体中, 加入无菌水补足至5μL, 混合均匀后室温下孵育15min, 反应结束后, 置于冰上。将连接产物全部加至50μL的Trans T1感受

态细胞中,轻弹均匀,冰浴 30 min; 42 °C 热激 30 s 后冰浴 2 min。于超净台中加入 500 μL 预热至室温的液体 LB 培养基, 37 °C、200 r·min<sup>-1</sup> 摇床中培养 1 h。取 50 μL 菌液均匀地涂布于含有氨苄霉素的 LB 固体培养基上, 37 °C 过夜培养。挑选白色单菌落进行菌落 PCR 检测, 筛选阳性克隆送至北京睿博兴科生物技术有限公司测序。应用 DNA-MAN 8.0 软件对扩增的 *KCS* 基因序列进行对比验证。

**生物信息学分析** 基于 *KCS* 基因的克隆结果, 应用 NCBI 的 ORF finder 工具对薏苡的 *KCS* 基因进行蛋白翻译后, 推导出其氨基酸序列。采用 ProtParam (<http://web.expasy.org/protparam>) 分析 *KCS* 蛋白的理化性质; 应用 ProtScale (<http://web.expasy.org/protscale/>) 对 *KCS* 蛋白的亲水性进行预测; 利用 TMHMM Server 2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0>) 进行 *KCS* 蛋白质序列跨膜结构域分析; 使用 Signal P 5.0 server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP>) 分析 *KCS* 蛋白信号肽; PSORT (<http://psort.hgc.jp/>) 预测蛋白质亚细胞定位; 通过 MEGA 7.0 构建 Neighbor-joining 系统进化树<sup>[27-29]</sup>。

## 结果与分析

### 1 总 RNA 的提取及检测

使用 TaKaRa 的植物 RNA 小量提取试剂盒进行总 RNA 提取, RNA 的琼脂糖凝胶电泳结果显示: 28S rRNA 的条带亮度约为 18S rRNA 的两倍,  $A_{260/280}$  值均处于 1.8~2.0 之间, 由此说明总 RNA 提取物的完整性较好且纯度较高, 可用于后续的反转录及 *KCS* 基因的扩增实验。

### 2 *KCS* 基因的克隆与序列分析

为深入研究薏苡长链脂肪酸的生物合成过程, 利用 Illumina Hiseq2000 平台对薏苡进行转录组测序分析, 通过分析薏苡转录组数据库获得的 *KCS* 基因片段, 依据获得的基因片段设计扩增的特异性引物, 以 cDNA 为模板进行高保真 PCR 扩增获得基因片段, 将获得的基因片段连接到克隆载体中, 转化 Trans T1 后进行测序比对验证, 最终获得 1 548 bp 的薏苡 *KCS* 基因全长 cDNA 序列。为进一步确定序列的正确性, 利用 NCBI ORF Finder 在线工具和 DNA-MAN 8.0 软件对获得的 *KCS* 基因序列进行序列分析, 结果表明 *KCS* 基因片段包含完整的 cDNA 开放阅读框, 编码 515 个氨基酸残基的蛋白质, 起始密码子为 ATG, 终止密码子 TAG (图 1)。基于获得的薏苡 *KCS* 基因片段设计插入 C 端蛋白标签, 并设计含有蛋白标签的上下游特异性引物, 以 cDNA 为模板进行克隆获得基因片段, 并将 PCR

```

1 ATGGAGACGTCCGGCCGCCCAATGCCCGCTCCGCCGCCGAG
  M E T S A P P N A A A P P A Q
46 CCACGGAGGGCTGCCGACTCCAGCAGTCAGTCCGGCTCAAG
  P R R R L P D F Q Q S V R L K
91 TATGTGAAGCTGGGTACCCTACCTCATCTCCACGGGATGAC
  Y V K L G Y H Y L I S H G M Y
136 CTGCTGCTGCCACTGATGGCGCTCGTCGGCTGACGCTCC
  L L L S P L M A L V A V Q L S
181 ACCGTCTCCCGCGGACCTCCGCGACTGTGGGACGCTCCG
  T V S P R D L A D L W E Q L R
226 TTCAACCTCCTCTCCGCTCGCTGCTCCAGCTGCTGCTTC
  F N L L S V V A C S T L L V F
271 CTCTCCACCGTCTACTTCTCACC GCCCGCCCGCTGTA
  L S T V Y F L T R P R P V Y L
316 CTGACTTCGCTGCTACAAGCCGAGGACGAGCGAAGTGCAG
  L D F A C Y K P E D E R K C T
361 CGCGAGACCTTCATGCACTGCTCCAAGCTCACCAGATCCTCAG
  R E T F M H C S K L T G S F T
406 GACGAGAACCTCGACTTCCAGCCGAAGTCTCGAGCCTCCGCG
  D E N L D F Q R K I L E R S G
451 CTCGGGAGGACACTACTTCCCGCCGCTCCTCCGGTGCC
  L G E D T Y L P P A V L R V P
496 CCCAACCCGTCATGGACGAGGCGCGAAGGAGCCCGCCGCTC
  P N P C M D E A R K E A R A V
541 ATGTTCCGCCATCGACGCTGCTCGGGAAGACCGGGTCAAG
  M F G A I D Q L L G K T G V R
586 CCCAAGGACATTGGCTCTGGTGTCACTGAGCAGCTGTTCAAC
  P K D I G V L V V N C S L F N
631 CCGAGCCGCTGCTGTCAGCGATGGTGGTGAACCTACAGGCTG
  P T P S L S A M V V N H Y R L
676 AGGGGAATATCGTGAAGTACAACCTGGCGGGATGGCTGCAGT
  R G N I V S Y N L G G M G C S
721 GCCGGGCTGCTGCTCATTGACCTCGCAAGGATGCTGCAAGTG
  A G L L S I D L A K D L L Q V
766 CACCAACTCTTACCGCTGCTCAGCATGAGGAAACATCAG
  H P N S Y A L V I S M E N I T
811 CTGAATTGGTACTTCCGGAACAACCGCTCCATGCTGTGTCAAT
  L N W Y F G N N R S M L V S N
856 TGCTGTCCGGATGGGTGGCGGCCATCCTGCTCACAACAGG
  C L F R M G G A A I L L S N R
901 CGTCTGACAGCGGAGTCCAAGTATGAGCTGGTGCACACCGTG
  R S D R R R S K Y E L V H T V
946 CGCAGCACAAAGGGCCGACGACAAAGTCTTCCGCTGGTGCACA
  R T H K G A D D K C F G C V T
991 CAGGAGGAAGATGGGATTGGCAAGATTGGCGTTCGCTGCTCAAG
  Q E E D G I G K I G V S L S K
1036 GACCTCATGGCGTGGCGGAGCAGCTCAAGCAACATCACC
  D L M A V A G D A L K T N I T
1081 ACGTGGGCGTGGTGTCTCCGCTATCAGAGCAGCTTCTCTTC
  T L G P L V L P L S E Q L L F
1126 ATGGGCACATTGATGCCAAGAAGTCTCAAGATGAAGTCAAG
  M G T L I A K K L L K M K I K
1171 CCGTACATCCCGACTTCAAGCTGGCTTCGAGCAGCTTCTGCATC
  P Y I P D F K L A F E H F C I
1216 CACGCTGGTGGCGTGTGCTGATGAGCTGGAAGAAGACCTG
  H A G G R A V L D E L E K N L
1261 GAGCTCACGACTGGCACATGGAGCCTCGAGGATGACCTGTAC
  E L T D W H M E P S R M T L Y
1306 AGTTTGGCAACACATCAAGCACTCCTGCTGAGGATGGCA
  R F G N T S S S S L W Y E L A
1351 TACACCGAGCGAAGGGTAGGATCAGGAGCCGACAGGATCTGG
  Y T E A K G R I R K R D R I W
1396 CAGATCGGTTCCGGTTCGGATTCAAGTGCAACAGCGCGCTCGG
  Q I A F G S G F K C N S A V W
1441 AAGGCGCTCCGACCGTGAACCCGCCAAGGAGAAGGCCCTGG
  K A L R T V N P A K E K S P W
1486 ATGGATGAGATTGACAACCTCCCGTGGATGTTCAAGATTTCG
  M D E I D N F P V D V P K I S
1531 AAGTTGGCAGCGCTTGA
  K V G S A *

```

Figure 1 Sequence of *KCS* gene and deduced amino acid sequence

产物连接到克隆载体中, 置于 -80 °C 冰箱进行永久保存。

### 3 *KCS* 蛋白的生物信息学分析

**3.1 理化性质分析** 利用 ProtParam 在线工具对 *KCS* 蛋白理化性质分析结果显示, 该蛋白质带正电荷的氨

基酸 (Arg+Lys) 总数为 65, 带负电荷的氨基酸 (Asp+Glu) 总数为 50; 其分子式为  $C_{2627}H_{4164}N_{726}O_{735}S_{29}$ , 相对分子质量 (MW) 为 58 608.12, 理论等电点 (theoretical pI) 为 9.20; 蛋白的不稳定指数 (instability index) 为 41.83, 说明其属于不稳定性蛋白; 脂脂肪系数 (aliphatic index) 为 92.26, 亲水性平均系数 (GRAVY) 为 -0.133, 推测该蛋白为碱性亲水不稳定蛋白 ( $pI > 7$ , GRAVY 为负值, 图 2)。利用 TMHMM Server 2.0 对 KCS 蛋白跨膜结构进行预测, 其中 1~33 和 99~521 为胞外区, 57~75 为胞内区, 34~56 和 76~98 为跨膜结构域位置, 由此推测该蛋白为跨膜蛋白。Signal P 5.0 server 预测结果如图 3 所示, 图中无峰值出现, 由此可推断 KCS 蛋白不含信号肽, 属于非分泌蛋白 (图 4)。亚细胞定位结果显示 KCS 定位于质体膜。

**3.2 KCS 的结构预测** KCS 蛋白二级结构预测结果如图 5 所示, 黑色字体为氨基酸序列, 彩色字体为其对应的二级结构, 其中蓝色: h 代表  $\alpha$ -螺旋 (alpha helix)、

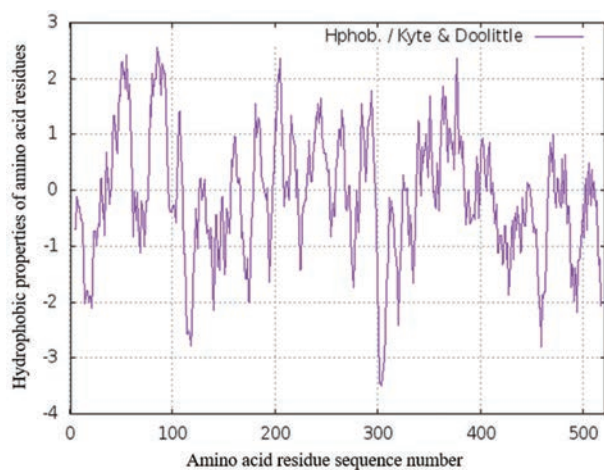


Figure 2 Hydrophilicity analysis of KCS protein

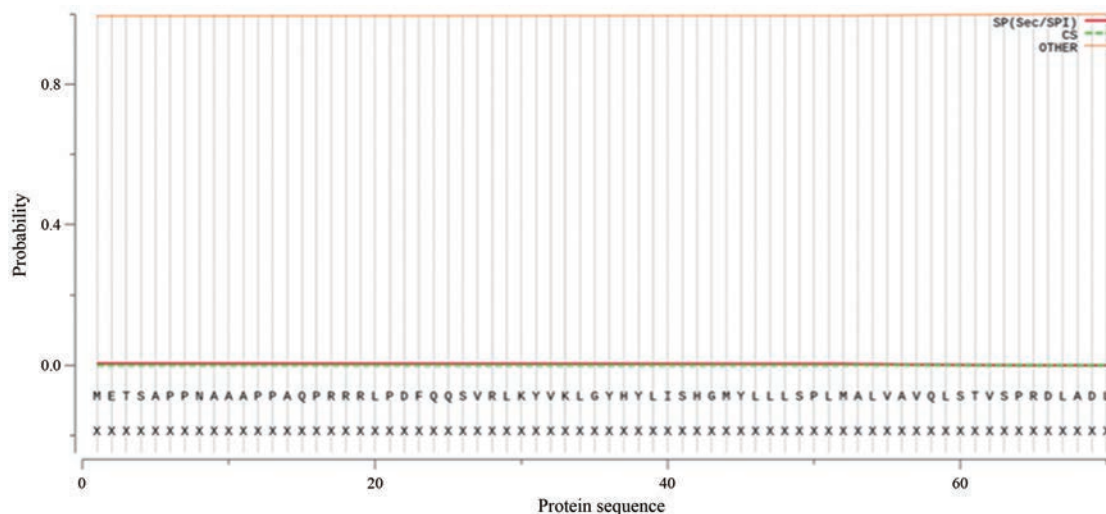


Figure 4 Signal peptide analysis of KCS protein

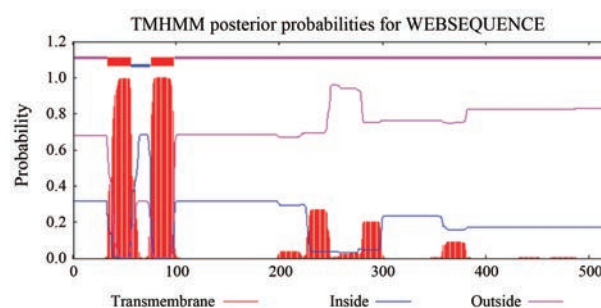


Figure 3 The result of transmembrane helices analysis by using TMHMM 2.0 topology prediction algorithms.

绿色: t 代表  $\beta$ -折叠 (beta turn)、黄色: c 代表无规则卷曲 (random coil)、红色: e 代表延伸链 (extended strand)。预测结果表明: KCS 蛋白二级结构组分中,  $\alpha$ -螺旋 (h) 占 44.66%, 无规则卷曲 (c) 占 35.73%, 延伸链 (e) 占 14.56%,  $\beta$ -折叠 (t) 占 5.05%。由此可知,  $\alpha$ -螺旋和无规则卷曲是 KCS 的大量结构原件, 其他两种分布于整个 KCS 蛋白。

**3.3 KCS 序列比对及结构域分析** 对克隆得到的 KCS 基因进行序列分析, 发现其编码 515 个氨基酸。Blastp 结果显示薏苡中 KCS 基因编码的氨基酸与禾本科植物的同源性比较高, 其中与 *Saccharum hybrid cultivar* 甘蔗和 *Zea mays* 玉米的同源性最高 (98.06%); 与 *Sorghum bicolor* 高粱的同源性为 97.87%; 与 *Panicum miliaceum* 稷的同源性为 96.81%; 与 *Setaria italica* 小米的同源性为 95.56%; 与 *Oryza brachyantha* 水稻的同源性为 94.81%; 与 *Hordeum vulgare* 青稞的同源性为 89.78%; 与 *Aegilops tauschii* subsp. *Tauschii* 节节麦的同源性为 89.24%。利用 MEGA 7.0 软件中的 ClusterW 和 DNAMAN 8.0 软件进行蛋白序列的多重比对。结果如图 6 显示, 将 KCS 基因的氨基酸序列与其他 8 种植



Figure 5 Secondary structure prediction of KCS protein

物中同类基因的序列信息进行比对, 结果表明此类蛋白质 N 端及中间区域的保守性比较高, 且不存在基因的缺失位点, 但是 C 端保守性较差, 部份基因存在缺失现象, 且基因的差异也比较大。此外, 通过比较可知该蛋白具有与已报道的 KCS 含有 KCS 家族的高度保守区“FGNTSSSS”和“GSGFKNSAVW”, “GMGCSA”为其催化区域, 隶属 KCS 家族蛋白, 推测其催化位点可能为半胱氨酸 cys<sup>[21,23,30]</sup>。

**3.4 系统进化树的构建** 为了进一步研究薏苡 KCS 基因在不同科属间的进化关系, 从美国国立生物技

术信息中心 (NCBI) 中挑选出与 KCS 基因编码蛋白相似性比较高的 15 条植物蛋白序列。通过 MEGA 7.0 软件中的 Neighbor-Joining (NJ) 算法绘制薏苡 KCS 氨基酸序列的进化树。结果如图 7 所示, 薏苡 KCS 与同为禾本科植物的甘蔗、高粱、玉米、小米、黍、水稻、青稞和节节麦 8 种单子叶植物聚为一大类, 亲缘关系最近, 表明其可能具有相似的功能。其他科植物聚为一大类, 其中烟草 (*Nicotiana tabacum*) 和辣椒 (*Capsicum baccatum*) 聚为一支; 油棕 (*Elaeis guineensis*) 和铁皮石斛 (*Dendrobium catenatum*) 聚为一支; 罂粟 (*Papaver somniferum*) 和芝麻 (*Sesamum indicum*) 聚为一支; 可可 (*Theobroma cacao*) 单独聚为一支; 表明其与其他科属的亲缘关系较远。进化树分析显示 KCS 序列在不同植物间的同源性都很高, 推测其在植物间的分布比较广泛。

**4 KCS 基因的表达分析**

KCS 基因是油脂生物合成途径中的延长酶, 本课题组保存了不同油脂含量的薏苡资源的转录组测序数据, 通过对 KCS 基因的转录水平进行分析, 结果发现不同油脂量的 KCS 基因的表达量存在显著的差异 (表 1), 高油脂量的 KCS 基因的表达水平明显高于低油脂量的表达, 且达到近 3 倍的差异。此外, 该基因的表达

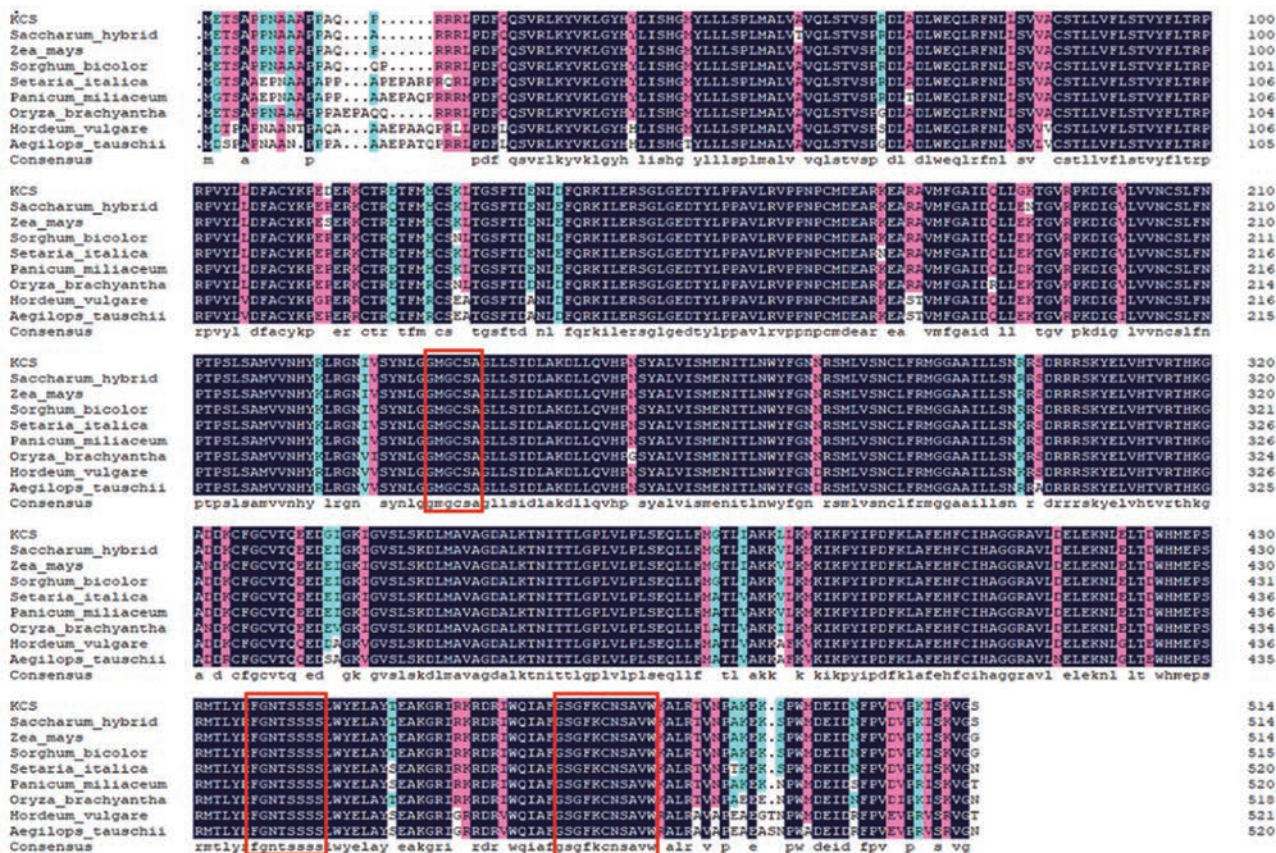


Figure 6 Multiple comparisons of amino acid sequence of KCS in *Coix lacryma-jobi* L. and other plant

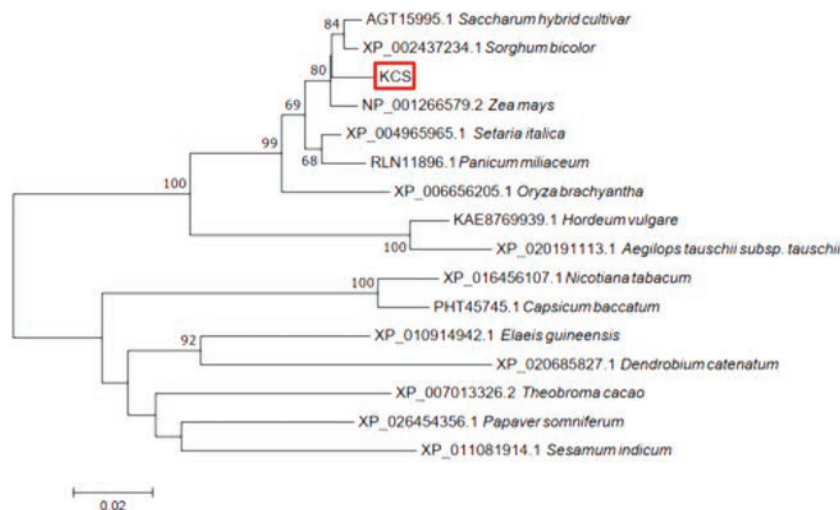


Figure 7 Phylogenetic trees of KCS protein in *Coix lacryma-jobi* L. and other plant

**Table 1** Transcriptome data of *KCS* genes from different *Coix lacryma-jobi* L. resources. Note: FPKM (Fragments per kilobase of transcript per million fragments) as a measure of the level of transcript or gene expression

Sample number	Description	FPKM
1	Low oil	15.599 053
2	High oil	42.951 454

量与油脂的含量呈正相关关系, 推测其可能参与油脂的生物合成。

## 讨论

薏苡作为药食同源的绿色食品之一, 不仅具有丰富的营养价值且兼具重要的药理作用, 尤其是防癌抗癌的作用, 目前以薏苡仁油为原料的康莱特注射液在临床的应用最为广泛<sup>[31,32]</sup>。研究表明, 薏苡仁油的主要成分为中性油脂和甘油三酯、甘油二酯、甘油单酯等酯类化合物, 其中组成酯类化合物的脂肪酸分为饱和脂肪酸和不饱和脂肪酸, 饱和脂肪酸包括月桂酸(十二烷酸)、肉豆蔻酸(十四烷酸)、棕榈酸(十六烷酸)、硬脂酸(十八烷酸)等, 不饱和脂肪酸包括油酸(十八碳一烯酸)、亚油酸(十八碳二烯酸)、亚麻酸(十八碳三烯酸)及花生四烯酸(二十碳四烯酸)等<sup>[33]</sup>, 其中碳原子数超过20的脂肪酸被称为超长链脂肪酸, 这类脂肪酸在植物的生长过程中通过合成角质层等来防止外界的各种胁迫作用, 因此受到了国内外学者地广泛关注。

近年来, 植物中超长链脂肪酸的生物合成途径分析逐渐成为一种比较热门研究, 主要是对其合成途径的关键酶 *KCS* 基因进行了生物信息学分析及功能验证的报道, 如 *Damián* 等<sup>[34]</sup>报道了在向日葵中, 两种 *KCS* 基因的异源表达不仅改变了脂肪酸的组成, 而且增加

了超长链脂肪酸的浓度, 由此推断这两种酶有助于葵花中 C20~C24 脂肪酸的合成; 夏凌峰等<sup>[35]</sup>已将禾本科植物小麦的 *KCS* 基因进行克隆与酿酒酵母表达, 结果表明小麦中该基因编码的蛋白主要参与 C<sub>24</sub> 以上的超长链脂肪酸的合成; 张芄晨等<sup>[36]</sup>通过考察沙棘中不同器官脂肪酸的含量差异, 报道了沙棘果肉和种子中高富集不同脂肪酸是源于 *KCS* 等基因在果肉和种子中表达差异的原因, 这对改良植物油脂组成具有重要意义。虽然油脂在多种植物中普遍存在, 但是植物中超长链脂肪酸的含量均比较低。因此通过揭示植物超长链脂肪酸生物合成途径的关键酶基因, 可以为利用基因工程等手段研究脂肪酸合成途径关键酶基因的功能及获得更多脂肪酸奠定基础。故本研究开展薏苡中超长链脂肪酸生物合成途径关键酶 *KCS* 基因的克隆及生物信息学分析。

本实验开展薏苡脂肪酸生物合成途径的关键酶 *KCS* 基因的克隆及分析。从薏苡中克隆得到3-酮酯酰-CoA合酶 (*KCS*), 生物信息学分析结果表明: *KCS* 基因序列为1 548 bp, 编码515个氨基酸, 分子质量为58 608.12 Da, 等电点为9.20。该基因编码蛋白质为碱性亲水不稳定蛋白, 含有2个跨膜螺旋结构域, 不含信号肽, 亚细胞定位主要在质体膜, 属于非分泌蛋白。多序列比对发现薏苡 *KCS* 基因的核苷酸序列与已报道的 *KCS* 的相似性高达98.06%, 且含有 *KCS* 蛋白家族的保守结构域“GMGCSA”“FGNTSSSS”和“GSGFKNSAVW”。进化树分析发现薏苡的 *KCS* 基因与玉米、水稻、节节麦、高粱、小米和节节麦等同科植物的 *KCS* 基因具有较近的亲缘关系, 与其他科属的关系较远, 由此表明该基因在同科植物间具有高度一致性, 且在单子叶植物的进化过程中是高度保守的。基因的

表达分析结果显示, 薏苡在不同油脂含量中的 *KCS* 基因的转录水平有所差异, 且高油脂量薏苡 *KCS* 基因的表达量是明显高于低油脂量薏苡, 将近达到3倍。由此推测 *KCS* 基因在油脂的生物合成过程中具有极其重要的作用。本研究从薏苡中克隆得到 *KCS* 基因并进行生物信息学分析, 为进一步揭示薏苡的脂肪酸生物合成途径及获得优质薏苡油脂提供一定的参考价值。

**作者贡献:** 魏小艳是本研究的实验设计者和实验研究的执行人; 魏小艳和李勇完成数据分析, 论文初稿的写作; 魏小艳和李勇参与实验设计, 实验结果分析; 郭娟、王雅南、黄璐琦是项目的构思者及负责人, 指导实验设计、数据分析、论文写作与修改。

**利益冲突:** 全体作者都阅读并同意最终的文本, 声明本文不存在利益冲突。

## References

- [1] Chiang H, Lu HF, Chen JC, et al. Adlay seed (*Coix lacryma-jobi* L.) extracts exhibit a prophylactic effect on diet-induced metabolic dysfunction and nonalcoholic fatty liver disease in mice [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2020, 29: 1-12.
- [2] Wang S, He JB, Nong MY, et al. Research on SRAP molecular markers in germplasm resources of *Coix lacryma-jobi* [J]. *Chin Tradit Herb Drugs (中草药)*, 2015, 46: 112-117.
- [3] Liu GQ, Li W, Li HQ, et al. Research progress of biology in *Coix lacryma-jobi* [J]. *J Henan Agric Univ (河南农业科学)*, 2015, 19: 1-5, 28.
- [4] Peng ZX, Peng YW, Zhang JQ. Green and high-yield cultivation technique in Coix, Panzhou, China [J]. *Cult Plant (耕作与栽培)*, 2018, 26: 59-61.
- [5] Hu SH, Xiao XN, Yi X, et al. New progress in Coix seed research [J]. *Lishizhen Med Mater Med Res (时珍国医国药)*, 2009, 20: 1059-1060.
- [6] Zhang XL, Yao Y, Ren GX, et al. Research progress in functional activity and application of *Coix lacryma* [J]. *Food Safe Qual Detec Technol (食品安全质量检测学报)*, 2018, 9: 1579-1584.
- [7] Kuo CC, Chen HH, Chiang WC. Adlay (yì yī; "soft-shelled job's tears"; the seeds of *Coix lacryma-jobi* L. var. *ma-yuen* Stapf) is a potential cancer chemopreventive agent toward multistage carcinogenesis processes [J]. *J Tradit Complement Med*, 2012, 22: 267-275.
- [8] Xu L, Chen L, Ali B, et al. Impact of germination on nutritional and physico-chemical properties of adlay seed (*Coix lacryma-jobi* L.) [J]. *Food Chem*, 2017, 7: 312-318.
- [9] Liang XY, Ding ZH. Pharmacological action and clinical application of Coix seed oil on respiratory and urogenital tumors [J]. *Chongqing Med (重庆医学)*, 2017, 46: 4292-4295.
- [10] Lin Y, Lu SH, Yu QR, et al. Study on the antitumor activity of petroleum ether fractions of the extract from stems and leaves of the extract from stems and leaves of Coix *in vitro* [J]. *Chin J Clin Pharmacol (中国临床药理学杂志)*, 2018, 34: 282-284.
- [11] Yang S, Wang LM, Wang SL, et al. A review of chemical composition and activity of *Coix lacryma-jobi* L. [J]. *Chin Med Mat (中药材)*, 2011, 34: 1306-1312.
- [12] Tao XJ, Lei XF, Li YX, et al. Analgesic and hemostatic effects of Coix seed oil [J]. *Chin J Exp Tradit Med Form (中国实验方剂学杂志)*, 2010, 16: 161-163.
- [13] Zhang WQ, Qiu GJ, Pang BZ, et al. Study on the diversity and antimicrobial activity of endophytic fungi from *Coix lacryma-jobi* L. in southwest Guizhou [J]. *Biotic Resources (生物资源)*, 2020, 42: 428-436.
- [14] Nishimura M, Ohkawara T, Kagami-Katsuyama H, et al. Alteration of intestinal flora by the intake of enzymatic degradation products of adlay (*Coix lacryma-jobi* L. var. *ma-yuen* Stapf) with improvement of skin condition [J]. *J Funct Foods*, 2014, 7: 487-494.
- [15] Huang DW, Chung CP, Kuo YL, et al. Identification of compounds in adlay (*Coix lacryma-jobi* L. var. *ma-yuen* Stapf) seed hull extracts that inhibit lipopolysaccharide-induced inflammation in RAW 264.7 macrophages [J]. *J Agric Food Chem*, 2009, 57: 10651-10657.
- [16] Tian DY, Wang SA, Wang LH, et al. Biosynthesis and metabolic engineering of ultra-long-chain monounsaturated fatty acids [J]. *Biotechnol Bull (生物技术通报)*, 2015, 31: 42-49.
- [17] Haslam TM, Kunst L. Extending the story of verylong-chain fatty acid elongation [J]. *Plant Sci*, 2013, 210: 93-107.
- [18] Guo Y, Mietkiewska E, Francis T. 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 Mol Biol*, 2009, 69: 565-575.
- [19] Zhao N, Xing SN, Cao YL, et al. Cloning and functional characterization of *BnKCS10* gene from *Brassica napus* [J]. *Chin J Oil Crop Sci (中国油料作物学报)*, 2013, 35: 349-356, 363.
- [20] Yi T, Zhang ZS, Tang BQ, et al. Identification and expression analysis of 3-ketoacyl-CoA synthase gene family in capsicum [J]. *Acta Hort Sin. (园艺学报)*, 2020, 47: 370-380.
- [21] Li YQ, Chen ZZ, Yuan XL, et al. Cloning and expression analysis of 3-ketoacyl-CoA synthase gene in *Malania oleifera* [J]. *China Oils Fats (中国油脂)*, 2019, 44: 128-133.
- [22] Liang YN, Tan XM, Chen CJ. Identification and sequence analysis of the 3-ketoacyl-CoA synthase gene in *Primulina spinulosa* [J]. *Fujian J Agric Sci (福建农业学报)*, 2019, 34: 544-550.
- [23] Zhu JX, Sun JJ, Yuan XL, et al. Cloning and functional analysis of the 3-ketoacyl-CoA synthase gene in *Paeonia delavayi* [J]. *Jiangsu Agric Sci (江苏农业科学)*, 2016, 46: 20-23.
- [24] Li YQ, Chen ZZ, Yuan XL, et al. Cloning and functional analysis of 3-ketoacyl CoA reductase gene in *Malania oleifera* [J]. *Mol Plant Breed (分子植物育种)*, 2019, 17: 4580-4585.
- [25] Wang JY, Tan XF, Zeng YL, et al. Cloning and expression

- analysis of 3-ketoacyl-CoA synthase gene of tea-oil tree [J]. *J Plant Physiol* (植物生理学报), 2014, 50: 1574-1584.
- [26] Liu ML, Tan XF, Long HX. Cloning and expression pattern analysis of oleoyl CoA reductase [J]. *J Cent South Univ Forest Technol* (中南林业科技大学学报), 2014, 34: 9-17.
- [27] Chen TY, Liu J, Yuan Y, et al. Bioinformatics analysis and expressed level of Auxin response factor genes in *Scutellaria baicalensis* [J]. *Acta Pharm Sin* (药学报), 2017, 52: 1770-1776.
- [28] Hao DD, Hu QT, Yuan Y, et al. Cloning and sequence analysis of codeine-O-demethylase gene from *Papaver somniferum* and *Papaver rhoeas* [J]. *Acta Pharm Sin* (药学报), 2019, 54: 1312-1316.
- [29] Zheng H, Yu MY, Pu CJ, et al. Cloning and expression analysis of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase (CtHMGR) genes in *Cinnamomum camphora* (L.) Presl [J]. *Acta Pharm Sin* (药学报), 2020, 55: 152-159.
- [30] Li W. Full-length cDNA Cloning of the 3-Ketoacyl-CoA Synthase Gene from *Camellia oleifera* (油茶3-酮酰辅酶A合成酶基因的全长cDNA克隆) [D]. Changsha: South Central Forestry S&T University, 2009.
- [31] Shi G, Zheng X, Zhang S, et al. Kanglaite inhibits EMT caused by TNF- $\alpha$  via NF- $\kappa$ B inhibition in colorectal cancer cells [J]. *Oncotarget*, 2017, 9: 6771-6779.
- [32] Wu Y, Zhang J, Hong Y, et al. Effects of kanglaite injection on serum miRNA-21 in patients with advanced lung cancer [J]. *Med Sci Monit*, 2018, 5: 2901-2906.
- [33] Wang QX, Yu JH, Zhang LF. Chemical composition analysis of eight kinds of Coix seed oil [J]. *China Oils Fats* (中国油脂), 2008, 43: 63-67, 75.
- [34] Damián GM, Joaquín JS, Mónica VC, et al. Functional characterization and structural modelling of *Helianthus annuus* (sunflower) ketoacyl-CoA synthases and their role in seed oil composition [J]. *Planta*, 2019, 4: 1823-1836.
- [35] Xia LF, Shi X, Yang HH, et al. Cloning and yeast expression of 3-ketoacyl-CoA synthase gene KCS in wheat [J]. *J Triticeae Crops* (麦类作物学报), 2016, 36: 1121-1129.
- [36] Zhang WC, Ruan CJ, Ding J, et al. Coordinated regulation of multigenes involved in difference of fatty acids in different organs of sea buckthorn fruits [J]. *Mol Plant Breed* (分子植物育种), 2019, 17: 2117-2125.