

## 薏苡 delta-12 脂肪酸去饱和酶基因 *FAD2* 的克隆和表达分析

魏小艳<sup>1,2</sup>, 李 勇<sup>2</sup>, 谭宇萍<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:** 本文克隆了薏苡 delta-12 脂肪酸去饱和酶基因 *FAD2* (fatty acid desaturase), 并对其分子结构特征和功能进行了研究。结果表明, 薏苡 *FAD2* 基因的 cDNA 全长序列为 936 bp, 编码 311 个氨基酸残基。生物信息学预测结果显示, 该基因编码蛋白为碱性亲水不稳定蛋白, 分子质量 34.87 kDa, 含有 3 个跨膜螺旋结构域, 不含信号肽剪切位点, 最可能定位在质体膜。与其他植物中的同类蛋白相比, 其仅具有一个组氨酸保守位点 His Box III (HXXHH), 由此推测其活性可能会降低。系统发育树分析显示, 薏苡 *FAD2* 与单子叶植物的亲缘关系较近, 尤其是玉米和粳稻, 而与双子叶植物的亲缘关系较远, 由此推测其与玉米和粳稻中的同类基因可能具有相似功能。此外, 基因表达分析结果显示, 在高油脂含量薏苡中可以检测到该基因的表达变化, 但在低油脂含量薏苡中未检测到该基因的表达。为明确薏苡 *FAD2* 的功能, 在圆红冬孢酵母中对该基因进行了异源表达, 结果显示该基因编码蛋白并未催化 C18:1 不饱和脂肪酸形成 C18:2 不饱和脂肪酸, 由此推测 *FAD2* 基因组氨酸保守位点的缺失可能造成其蛋白活性降低甚至失活。本研究为深入了解脂肪酸去饱和酶的分子结构特征提供了一定参考。同时, 为阐明薏苡脂肪酸类物质的生物合成途径奠定基础。

**关键词:** 薏苡; delta-12 脂肪酸去饱和酶; 克隆; 生物信息学分析; 表达特性

中图分类号: R931 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2021)05-1478-08

## Cloning and expression analysis of delta-12 fatty acid desaturase gene in *Coix lacryma-jobi* L.

WEI Xiao-yan<sup>1,2</sup>, LI Yong<sup>2</sup>, TAN Yu-ping<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:** In this study, the fatty acid desaturase gene *FAD2* was cloned from *Coix lacryma-jobi* L. and its molecular structure and function were studied. The results showed that the full-length cDNA sequence of *FAD2* gene was 936 bp encoding 311 amino acid residues. Bioinformatics prediction results showed that the protein encoded by the *FAD2* gene was an alkaline hydrophilic unstable protein with a molecular weight of 34.87 kDa. It contained three transmembrane helix domain, and did not contain the signal peptide splicing site, and was most likely to be located in plasmid membrane. Compared with other similar genes in plants, it has only a histidine conserved site, His Box III histidine site (HXXHH), suggesting its activity may be reduced. Phylogenetic tree analysis showed that *FAD2* was closely related to monocotyledonous plants, especially *Maize* and *Oryza sativa japonica* Group, but farther from dicotyledonous plants. Therefore, it was inferred that *FAD2* might have similar functions

收稿日期: 2020-12-08; 修回日期: 2021-01-18.

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.0513-4870.2020-1880

with similar genes in *Maize* and *Oryza sativa japonica* Group. In addition, the expression of *FAD2* gene could be detected in *Coix lacryma-jobi* L. with high oil content, but not in low oil content of *Coix lacryma-jobi* L. In order to clarify the function of *FAD2*, the gene was heterologously expressed in *Sporomyces cerevisiae*. The results showed that the protein encoded by *FAD2* gene did not catalyze the formation of C18:1 unsaturated fatty acid into C18:2 unsaturated fatty acid. Therefore, it was speculated that the deletion of histidine conserved site of *FAD2* gene might lead to the decrease of protein activity or even inactivation. This study provides reference value for further understanding the molecular structure characteristics of fatty acid desaturase. At the same time, it laid a foundation for elucidating the biosynthetic pathway of *Coix lacryma-jobi* L.

**Key words:** *Coix lacryma-jobi* L.; delta-12 fatty acid desaturase; cloning; bioinformatic analysis; expression characterization

薏苡 (*Coix lacryma-jobi* L.) 是我国传统的药食兼用中药植物, 具有悠久的栽培驯化史<sup>[1,2]</sup>, 目前在全国各地均有分布<sup>[3]</sup>。薏苡仁是薏苡干燥成熟的种仁<sup>[4]</sup>, 含有丰富的脂肪酸, 约占薏苡仁油脂的 85%<sup>[5]</sup>。研究表明, 薏苡仁油脂中的不饱和脂肪酸对癌细胞具有显著的抑制作用<sup>[6,7]</sup>。此外, 以薏苡仁油为主要成分的“康莱特”抗癌注射剂可明显提高胃癌、肝癌、肺癌等恶性肿瘤的临床治疗效果, 并降低不良反应<sup>[8-12]</sup>。

油脂在自然界的分布十分广泛, 各种植物的种子中都存在一定数量的油脂。而不饱和脂肪酸作为油脂的主要组分之一, 不仅在调节细胞生理功能方面发挥着重要的作用, 且有助于人类保持健康<sup>[13-15]</sup>。基于不饱和键的数目, 不饱和脂肪酸可分为单不饱和脂肪酸和多不饱和脂肪酸, 包括棕榈油酸、油酸、亚油酸、亚麻酸和花生四烯酸等, 其中亚油酸和亚麻酸是人和动物生长发育的必需多不饱和脂肪酸, 且在人体内不能自行合成只能通过食物获取, 而亚油酸又是合成亚麻酸的前体<sup>[16]</sup>。因此, 研究亚油酸的合成和调控机制具有十分重要的理论和现实意义。为明确植物油脂中脂肪酸的生物合成过程, 国内外学者已对不同物种脂肪酸合成基因进行了分析和研究。Wu 等<sup>[17]</sup>利用白屈菜 4 个不同发育时期的转录组, 筛选到 508 个脂质代谢基因, 包括显著差异表达基因 41 个, 其中 omega-6 脂肪酸去饱和酶 (fatty acid desaturase, *FAD*) 参与亚油酸的合成; Zhao 等<sup>[18]</sup>从玉米中共鉴定出 30 个 *FADs* 基因, 系统发育分析发现它们都具有高度保守的 *FADs* 结构域, 进一步的研究表明这些 *FADs* 的表达会受到冷热胁迫诱导。虽然现在对薏苡的组学分析已有相关报道, 但是薏苡油脂的合成通路尚不明晰, 因此本研究着重薏苡脂肪酸去饱和酶基因分子结构特征的解析及功能验证。

在植物油脂的生物合成过程中, delta-12 脂肪酸去饱和酶 (*FAD2*) 是油脂积累过程中的关键酶, 在不饱和脂肪酸的生物合成途径中起着极其重要的作用, 是控制亚油酸合成的限速酶, 其合成过程是以油酸为底

物, 在 delta-12 脂肪酸去饱和酶的催化下而形成的<sup>[19]</sup>。近年来, 产油酵母已被广泛应用于油脂类化合物的功能验证, 其中圆红冬孢酵母由于其胞内油脂量可达到细胞干重的 70% 以上而受到学者们的广泛青睐。为了对薏苡 delta-12 脂肪酸去饱和酶基因 *FAD2* 的分子结构特征和功能进行研究, 本文基于薏苡转录组测序数据获得 delta-12 脂肪酸去饱和酶基因序列, 从薏苡的 cDNA 中克隆 *FAD2* 基因, 利用生物信息学软件分析其氨基酸的理化性质、跨膜结构域、细胞定位、蛋白质结构及进化树等, 并通过在酵母中的异源表达验证其功能。此研究不仅可以深入了解薏苡 delta-12 脂肪酸去饱和酶的性质、结构和功能, 而且为今后利用该基因调控不饱和脂肪酸的生物合成研究奠定基础。

## 材料与amp;方法

**植物材料** 在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, 并将植物材料贮存于 -80 °C 冰箱。

**实验试剂** 实验所用试剂包括 TaKaRa 公司的植物 RNA 小量提取试剂盒和 DNA marker; OMEGA 公司的 Gel Extraction Kit; TransGen Biotech 公司的 *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; Thermo Fisher Scientific 公司的 Phusion<sup>™</sup> High-Fidelity DNA Polymerase; 实验所用引物及测序结果均由北京睿博兴科生物技术有限公司完成; 实验中 *FAD2* 基因的密码子偏好性优化及 pCAMBIA2300-pPGK-*FAD2*-tHSP 载体的构建由苏州泓讯生物科技股份有限公司完成; 其他试剂均为分析纯。

**总 RNA 的提取和反转录** 按照植物 RNA 小量提取试剂盒要求提取薏苡总 RNA, 然后使用 1.2% 琼脂糖凝胶电泳, 并结合分光光度计检测总 RNA 提取效果。样品检测合格后, 采用 TransGen Biotech 公司的反转录试剂盒, 按照以下体系完成薏苡总 RNA 到 cDNA

的转录, RNA 1  $\mu\text{g}$ , 5 $\times$ TransScript<sup>®</sup> All-in-One Super-Mix for PCR 4  $\mu\text{L}$  混合均匀, 加无菌水补足至 20  $\mu\text{L}$ , 混合均匀, 42  $^{\circ}\text{C}$  反应 30 min, 85  $^{\circ}\text{C}$  加热 5 s, 冰上冷却, 然后将其储存于 -20  $^{\circ}\text{C}$  冰箱。

**薏苡 FAD2 基因的克隆** 从薏苡转录组测序数据库中筛选出注释为 FAD2 的基因, 基于基因全长序列, 设计特异性引物 FAD2-F (ATGGCGGAGAAGAAGCGAG) 和 FAD2-R (TTAGAAGCTTGTGTGTACCGTAGACGC)。以薏苡 cDNA 作为模板, FAD2-F 和 FAD2-R 作为引物, 使用 Phusion 酶进行 FAD2 基因的 PCR 扩增。然后取 2  $\mu\text{L}$  回收纯化的 PCR 产物, 加至 1  $\mu\text{L}$  (30 ng) pEASY-Blunt Zero 载体中, 加入无菌水至 5  $\mu\text{L}$ , 室温下孵育 15 min 后置于冰上, 待冷却后加入 50  $\mu\text{L}$  Trans T1 感受态细胞, 混合均匀, 冰浴 30 min, 42  $^{\circ}\text{C}$  加热 30 s, 冰浴 2 min。转化成功后使用含有氨苄霉素的 LB 固体培养基筛选阳性克隆, 并送至北京睿博兴科生物技术有限公司测序。测序结果用 DNAMAN 8.0 软件对其基因序列进行对比验证。

**薏苡 FAD2 的生物信息学分析** 应用 NCBI 的 ORF finder 对薏苡 FAD2 基因进行蛋白翻译, 分析该基因的最大开放阅读框; 采用 ProtParam (<http://web.expasy.org/protparam>) 分析 FAD2 蛋白的理化性质; 应用 ProtScale (<http://web.expasy.org/protscale/>) 分析蛋白的亲水性; 利用 TMHMM Server 2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0>) 预测蛋白质序列的跨膜结构域; 使用 Signal P 5.0 server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP>) 分析蛋白质的信号肽; 应用 PSORT (<http://psort.hgc.jp/>) 预测蛋白质的亚细胞定位; 运用 SOPMA ([https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa\\_automat.pl?page=npsa\\_sopma.html](https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_sopma.html)) 在线工具预测蛋白的二级结构; 通过 MEGA 7.0 软件中的 Neighbor-joining 算法构建系统进化树<sup>[20,21]</sup>。

**圆红冬孢酵母表达载体的构建与酵母表达** 为提高 FAD2 基因在圆红冬孢酵母中的表达, 将其基因序列按照圆红冬孢酵母的密码子偏好性优化, 将优化后的 FAD2 基因进行合成, 然后插入到 pCAMBIA2300-pPGK-MCS-tHSP 改造载体的 KpnI 酶切位点, 获得 pCAMBIA2300-pPGK-FAD2-tHSP 表达载体。按照常规方法进行圆红冬孢酵母的农杆菌介导转化, 将筛选获得的含有 pCAMBIA2300-pPGK-FAD2-tHSP 载体的酵母菌株置于 YPD 液体培养基中, 在 30  $^{\circ}\text{C}$ 、200  $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$  条件下培养 100 h<sup>[22,23]</sup>。

**脂肪酸组分及含量的检测分析** 采用酸热法从发酵液中提取油脂<sup>[24]</sup>, 然后将油脂样品用氯仿 1 mL 溶解, 取油脂样品 50  $\mu\text{L}$  至 5 mL 圆底烧瓶内, 氮气吹干

溶剂后, 加入 1% 硫酸-甲醇溶液 2 mL 复溶, 70  $^{\circ}\text{C}$  回流 40 min 进行甲酯化反应。回流结束后, 冷却至室温, 然后加入正己烷 2 mL 萃取, 离心后取上清液用于气相色谱检测<sup>[25]</sup>。色谱条件如下<sup>[26]</sup>: FFAP 石英毛细管 (30  $\text{m}\times 0.32\text{ mm}\times 0.25\text{ }\mu\text{m}$ ) 为色谱柱; 检测器为氢火焰离子检测器 (FID); 进样方式为分流进样, 分流比为 10:1, 进样量为 1  $\mu\text{L}$ ; 进样口温度 250  $^{\circ}\text{C}$ ;  $\text{N}_2$  流速 25  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ; 载气为氦气 (He), 压力为 13 psi (1 psi = 6.9 kPa); 检测器温度为 280  $^{\circ}\text{C}$ ;  $\text{H}_2$  流速 30  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ , 空气 300  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ; 程序升温条件为: 初始温度 190  $^{\circ}\text{C}$ , 以 5  $^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$  升至 230  $^{\circ}\text{C}$ , 保持 10 min。脂肪酸通过对样品定性, 采用面积归一法确定其相对含量。

## 结果

### 1 薏苡 FAD2 基因的克隆与序列分析

对薏苡总 RNA 进行琼脂糖凝胶电泳检测, 结果表明 RNA 没有降解, 且 28S rRNA 和 18S rRNA 条带清晰, 说明总 RNA 提取效果较好, 可用于 cDNA 的合成以及 FAD2 基因的克隆。通过分析 Illumina Hiseq 2000 平台的薏苡转录组测序结果获得 FAD2 基因序列, 并设计特异性引物, 进行 PCR 扩增, 将获得的基因片段连接到载体, 并转化至 Trans T1 菌株, 最终获得 936 bp 的薏苡 FAD2 基因全长 cDNA 序列。为进一步验证基因序列的正确性, 利用 NCBI 的 ORF Finder 和 DNAMAN 8.0 对 FAD2 基因序列进行序列分析, 结果表明 FAD2 基因全长 cDNA 包含完整的开放阅读框, 编码 311 个氨基酸残基, 起始密码子为 ATG, 终止密码子 TAA (图 1)。

### 2 FAD2 蛋白的生物信息学分析

**2.1 理化性质分析** 应用在线工具 ProtParam 对 FAD2 蛋白的理化性质进行分析, 推测该蛋白质的分子式为  $\text{C}_{1594}\text{H}_{2437}\text{N}_{431}\text{O}_{426}\text{S}_{13}$ , 分子质量为 34 871.30 Da, 理论等电点 (theoretical pI) 为 9.17, 亲水性平均系数 (GRAVY) 为 -0.077, 不稳定指数 (instability index) 为 45.61, 说明 FAD2 蛋白属于碱性亲水不稳定蛋白。利用 Signal P 5.0 server 预测蛋白的信号肽, 结果显示 FAD2 蛋白不含信号肽, 不属于分泌蛋白。运用 TMHMM Server 2.0 在线工具对 FAD2 蛋白的结构域进行预测, 结果如图 2 所示, 其中 1~99 和 174~179 为 FAD2 蛋白的胞内区, 123~150 和 203~311 为胞外区, 100~122、151~173 和 180~202 为跨膜结构域位置, 由此表明该蛋白属于跨膜蛋白; 亚细胞定位结果显示 FAD2 定位于细胞质体膜。通过 SOPMA 在线软件预测 FAD2 蛋白的二级结构, 结果如图 3 所示, 无规则卷曲 (c) 占 44.69%、 $\alpha$ -螺旋 (h) 占 33.12%、延伸链 (e) 占 15.76%、 $\beta$ -折叠 (t) 占

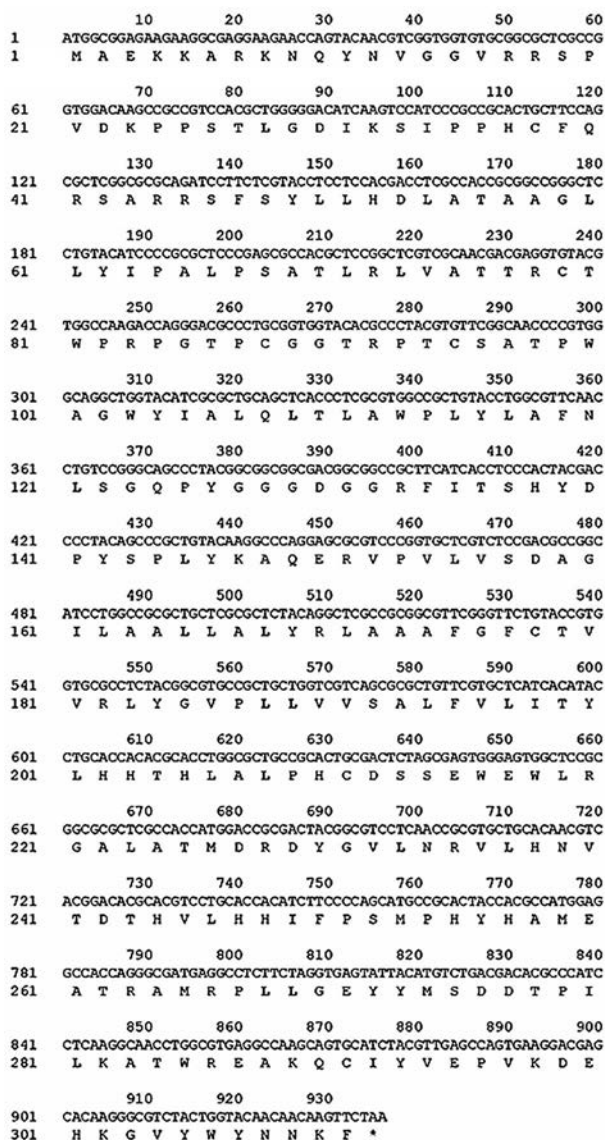


Figure 1 Sequence of gene and amino acid sequence

6.43%, 由此表明  $\alpha$ -螺旋和无规则卷曲是 *FAD2* 的大量结构元件。

**2.2 *FAD2* 序列比对及结构域分析** 为进一步研究薏苡 *FAD2* 氨基酸残基的相似性, 对克隆得到的 *FAD2* 基因进行 Blastp 分析, 其中薏苡 *FAD2* 基因编码的氨基酸

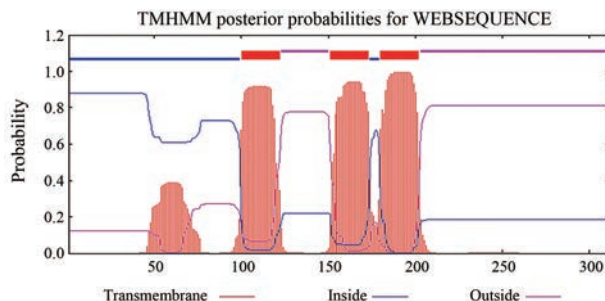


Figure 2 The result of transmembrane helices analysis of *FAD2* protein



Figure 3 Secondary structure prediction of *FAD2* protein by SOPMA

与玉米 (*Zea mays*) 中同类蛋白的同源性为 87.02%; 与狗尾草 (*Setaria viridis*) 的同源性为 66.35%; 与短柄草 (*Brachypodium distachyon*) 的同源性为 66.35%; 与谷子 (*Setaria italica*) 的同源性为 65.87%; 与粟米 (*Panicum miliaceum*) 的同源性为 65.87%; 与黍 (*Panicum hallii*) 的同源性为 65.87%; 与大麦 (*Hordeum vulgare*) 的同源性为 65.38%; 与节节麦 (*Aegilops tauschii*) 的同源性为 65.38%; 与薏苡 (*Coix lacryma-jobi*) 中已报道的脂肪酸去饱和酶同源性为 65.38%; 与高粱 (*Sorghum bicolor*) 的同源性为 64.90%。利用 DNAMAN 8.0 软件对 *FAD2* 基因的氨基酸序列与其他 10 种植物中同种基因的序列信息进行多重比对, 结果如图 4 所示, 该蛋白 N 端保守性较高, C 端保守性较低, 但是整个基因序列存在缺失位点。此外, 目前已报道的 delta-12 脂肪酸去饱和酶的保守位点是 3 个, 分别是 HXXXH、HXXXH 和 HXXXH, 其他 10 种植物的蛋白均有 3 个保守位点 (蓝色框和红色框标注)<sup>[27,28]</sup>, 而该蛋白仅具有一个组氨酸保守位点 “HXXXH” (红色框标注)。

**2.3 系统发育树的构建** 从 NCBI 中挑选出与 *FAD2* 基因编码蛋白相似性比较高的 13 条蛋白序列, 并分为单子叶植物和双子叶植物。基于 MEGA 7.0 软件中的 Neighbor-Joining (NJ) 算法构建薏苡 *FAD2* 氨基酸序列的系统进化树。结果如图 5 所示, 薏苡 *FAD2* 与同为单子叶植物的玉米、粳稻 (*Oryza sativa japonica*)、狗尾草、短柄草、谷子、粟米、薏苡、黍、大麦、节节麦和高粱聚为一大类, 而双子叶植物甘蓝型油菜 (*Brassica napus*) 和大豆 (*Glycine max*) 单独聚为一类; 说明其不同植物中的分布比较广泛, 且与单子叶植物的进化保持一致。此外, 薏苡 *FAD2* 与玉米聚为一类, 其次是水稻, 由此推测其与玉米和水稻中同类基因的功能更相似。

**2.4 *FAD2* 基因的表达分析** *FAD2* 基因编码催化油脂中的饱和或不饱和脂肪酸在烃链不同位置形成双键的去饱和酶。本课题组保存了不同油脂含量薏苡在不同时期的转录组数据, 通过分析 *FAD2* 基因的转录水平, 结果如表 1 所示, S/M/L 分别指的是从抽穗期以后每

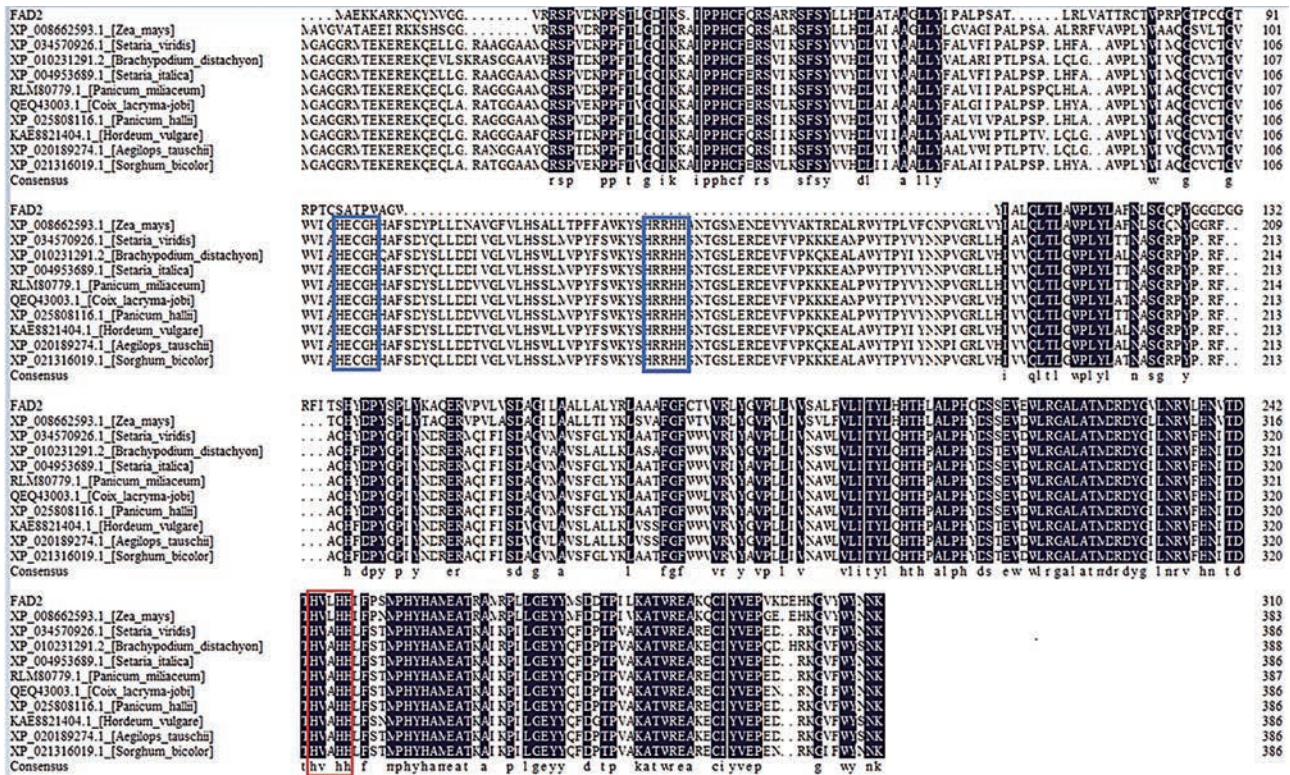


Figure 4 Multiple comparisons of FAD2 protein in *Coix lacryma-jobi* L. and other plants

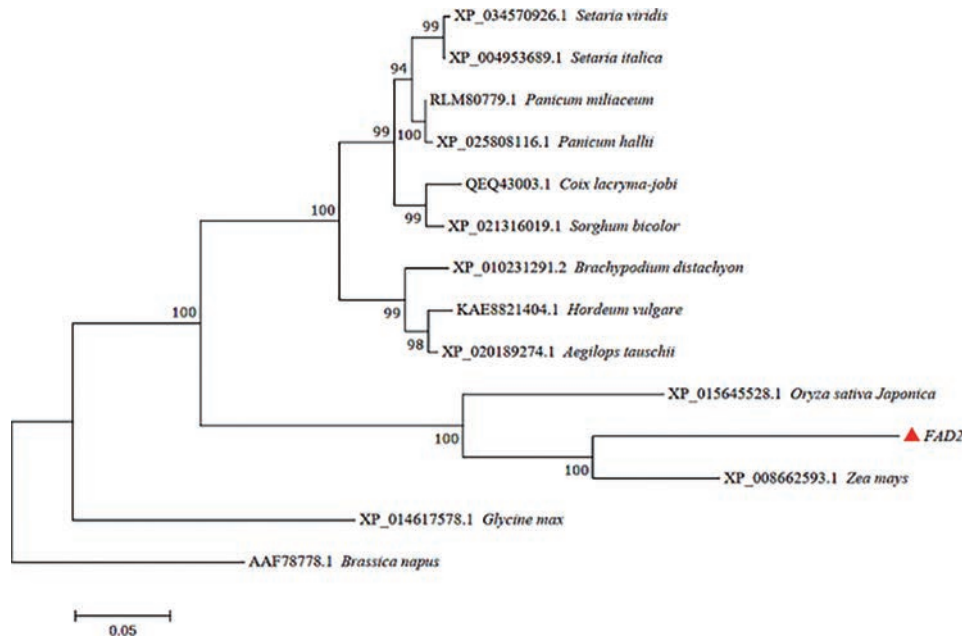


Figure 5 Phylogenetic trees of FAD2 protein from other plants

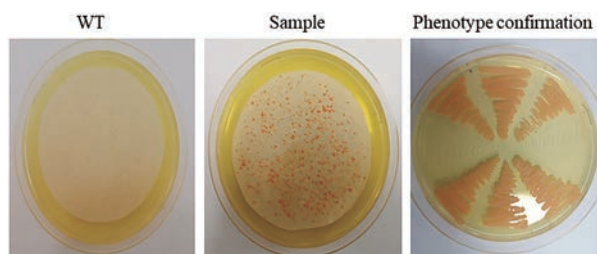
Table 1 Analysis of the expression level of *FAD2* gene from different *Coix lacryma-jobi* L. resources. S/M/L refers to the sampling time every 20 days after the heading date, respectively. FPKM: Reads per kilobase of exon per million reads mapped

Sample number	Description	S-FPKM	M-FPKM	L-FPKM
1	Low oil	0	0	0
2	High oil	0.206 378	0.149 86	0.035 348

隔 20 天采样的时间, FPKM (reads per kilobase of exon per million reads mapped) 代表的是 *FAD2* 基因的表达水平, 其中在低油脂含量薏苡中, 并未检测到 *FAD2* 基因的表达, 而高油脂含量薏苡在不同时期均可检测到基因的表达, 并随着植物的成熟表达水平呈现出逐渐降低的趋势。

### 3 *FAD2* 基因在圆红冬孢酵母中的异源表达

将 pCAMBIA2300-pPGK-FAD2-tHSP 载体转入野生型圆红冬孢酵母菌株, 然后从诱导平板上随机挑取转化子, 并划线于含有  $300 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  头孢克肟和  $20 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  新霉素的 YEPD 筛选平板, 同时以野生型圆红冬孢酵母作为对照,  $30^\circ\text{C}$  培养至菌落长起, 验证转化子表型的正确性。随后挑取筛选平板上生长的菌株, 接入含有  $300 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  头孢克肟和  $20 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  新霉素的 YPD 液体培养基中继续培养, 观察菌体生长情况, 并进一步确认。结果如图 6 所示, 农杆菌工程菌株与野生型圆红冬孢酵母结合共转化后, 均在含有新霉素的筛选平板上成功获得了转化子, 而没有和农杆菌工程菌株互相作用的野生型圆红冬孢酵母, 不能在筛选平板上获得转化子。



**Figure 6** The *R. toruloides* resulted from *Agrobacterium*-mediated transformation with pCAMBIA2300-pPGK-FAD2-tHSP

将转化获得的工程菌株在  $30^\circ\text{C}$ 、 $200 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$  的摇床中摇瓶发酵, 并从发酵液中提取油脂, 使用气相色谱鉴定。结果如表 2 所示, 总共检测到 7 类脂肪酸, 分别是肉豆蔻酸 (C14:0)、棕榈酸 (C16:0)、棕榈油酸 (C16:1)、硬脂酸 (C18:0)、油酸 (C18:1)、亚油酸 (C18:2) 和亚麻酸 (C18:3), 其中 *FAD2* 基因的表达产物中, 检测到 C18:1 和 C18:2 的相对含量分别为 57.6% 和 7%。与野生型酵母菌株相比, C18:1 相对含量提高了 4.5%, 而 C18:2 降低了 1.2%, 由此表明该基因编码的产物未催化 C18:1 到 C18:2 的去饱和, 从而使得 C18:1 的相对含量有所提高。基于表达产物中油酸和亚油酸的含量变化规律, 推测 *FAD2* 蛋白可能没有活性。

### 讨论

不饱和脂肪酸是细胞膜的主要组分, 也是人体生长发育所必需的一类营养物质, 其主要在质体和内质网中, 通过一系列的脂肪酸去饱和酶催化各类型的脂

肪酸去饱和而合成, 并受到环境胁迫以及发育的调控<sup>[29]</sup>。本研究通过在线软件对薏苡脂肪酸生物合成途径中的 delta-12 脂肪酸去饱和酶 (*FAD2*) 进行了理化性质和结构功能等分析。理化性质预测结果显示, 薏苡 *FAD2* 基因全长 cDNA 为 936 bp, 编码一个 311 氨基酸构成的碱性亲水不稳定蛋白, 分子质量为 34 871.30 Da, 含有 3 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。系统发育树分析表明, 薏苡 *FAD2* 与同为单子叶植物的玉米、粳稻、狗尾草、短柄草、谷子、粟米、薏苡、黍、大麦、节节麦和高粱聚为一大类, 而双子叶植物甘蓝型油菜和大豆单独聚为一类, 由此推测其在单子叶植物的进化过程中比较保守。

在植物合成不饱和脂肪酸的过程中, 除了 delta-12 脂肪酸去饱和酶以外, 还包括 delta-6、delta-9 和 delta-15 脂肪酸去饱和酶等, 这些不同类型的去饱和酶均含有 3 个极度保守的组氨酸富集区: His Box I、His Box II 和 His Box III, 其中 delta-12 脂肪酸去饱和酶的 3 个组氨酸保守位点依次为 HXXXH、HXXHH 和 HXXHH。在本研究中, 薏苡 *FAD2* 编码的蛋白序列仅具有一个 His Box III 保守位点“HXXHH”。有研究表明 His Box I 和 II 的缺失或取代可能会导致酶活性下降, His Box III 的缺失或取代可能会导致酶失去活性<sup>[30-32]</sup>。Libisch 等<sup>[33]</sup>将玻璃苣 delta-6 脂肪酸去饱和酶中的 HIS1 区和 HIS2 区的氨基酸和 delta-8 脂肪酸去饱和酶 HIS III 区进行重组, 结果发现重组酶丧失催化 C18 脂肪酸脱氢的功能, 但可以催化棕榈烯酸 (C16:1) 和肉豆蔻烯酸 (C14:1) 脱氢, 且提出 HIS1 和 HIS2 参与了底物结合位点的形成, 而这个位点似乎限制了脂肪酸底物的链长。为了验证脂肪酸去饱和酶功能位点的缺失对其功能的影响, 将 *FAD2* 基因在圆红冬孢酵母中进行了异源表达, GC 的检测结果显示 C18:1 的含量升高, C18:2 的含量降低, 若此蛋白在 C18:1 到 C18:2 的不饱和脂肪酸之间发挥作用, GC 的检测结果应为 C18:1 的含量降低, C18:2 的含量上升, 但是 GC 检测结果与此相反。由此推测 C18:1 的相对含量比对照株系有所提高, 是由于该基因的 HXXHH 位点有利于在 C18:0 到 C18:1 的去饱和反应。此外, 转录水平分析显示, 高油脂含量薏苡中该基因的表达水平较低, 且呈现逐渐下降的趋势, 而低油脂含量薏苡中并未检测到该基因的表达。基于上述分析, 推测组氨酸保守位点的缺失可能会造

**Table 2** Fatty acid composition analysis of *FAD2* gene

Sample ID	DCW/g·L <sup>-1</sup>	Lipid content (wt%)	Lipid/g·L <sup>-1</sup>	Normalized relative fatty acid percentage/%						
				C14:0	C16:0	C16:1	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3
AS 2.1389	11.4 ± 0.6	52.8 ± 5	6.4 ± 0.4	1.5 ± 0	23.7 ± 1.2	0.6 ± 0	10.1 ± 0.5	53.1 ± 0.8	8.2 ± 0.3	1.7 ± 0
FAD2	9.4 ± 0.9	49.4 ± 5	4.6 ± 0.3	1.7 ± 0.1	22.6 ± 1.1	0.7 ± 0	8.1 ± 0.3	57.6 ± 0.7	7.0 ± 0.1	1.1 ± 0

成FAD2蛋白活性降低甚至失活,以至于无法催化油酸合成亚油酸。

此研究从薏苡中克隆出脂肪酸去饱和酶基因,并对其进行生物信息学分析和功能验证,不仅有助于进一步研究薏苡中其他类脂肪酸去饱和酶的结构和功能,而且也为其植物油脂合成途径同类基因的研究提供了一定的参考。

**作者贡献:** 魏小艳和李勇是本研究的实验设计者和执行人;魏小艳完成了数据分析及论文初稿的撰写;谭宇萍参与文章的修改;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。全体作者都阅读并同意最终的文本。

**利益冲突:** 本文不存在利益冲突。

## References

- [1] Shen JQ, Li Z, Zhou LB, et al. Progress on main components and functions of Coix seed oil [J]. China Oils Fats (中国油脂), 2020, 45: 90-95.
- [2] Li XK, Gu K, Liang MW, et al. Research progress on chemical constituents and pharmacological effects of Coicis Semen [J]. Chin Tradit Herb Drugs (中草药), 2020, 51: 5645-5657.
- [3] Luo YY, Du WF, Kang XJ, et al. Process of application history and modern research of Coix seed [J]. Chin J Tradit Chin Med Pharm (中华中医药杂志), 2018, 33: 5666-5673.
- [4] State Pharmacopoeia Committee. Pharmacopoeia of the People's Republic of China (中华人民共和国药典) [S]. Vol 1. Beijing: China Medical Science Press, 2020.
- [5] Hou JJ, Cao CM, Xu YW, et al. Exploring lipid markers of the quality of Coix seeds with different geographical origins using supercritical fluid chromatography mass spectrometry and chemometrics [J]. Phytomedicine, 2018, 45: 1-7.
- [6] Xi XJ, Zhu YG, Tong YP, et al. Assessment of the genetic diversity of different Job's Tears (*Coix lacryma-jobi* L.) accessions and the active composition and anticancer effect of its seed oil [J]. PLoS One, 2016, 11: e0153269.
- [7] Yu F, Gao J, Zeng Y, et al. Inhibition of Coix seed extract on fatty acid synthase, a novel target for anticancer activity [J]. J Ethnopharmacol, 2008, 119: 252-258.
- [8] Hou DR, Yang LJ, Xiong J, et al. Efficacy and safety of Kanglaite injection for gastric cancer: a protocol for systematic review and meta-analysis [J]. Medicine (Baltimore), 2020, 99: e21619.
- [9] Qi FH, Zhao L, Zhou AY, et al. The advantages of using traditional Chinese medicine as an adjunctive therapy in the whole course of cancer treatment instead of only terminal stage of cancer [J]. Biosci Trends, 2015, 9: 16-34.
- [10] Pan P, Wu Y, Guo ZY, et al. Antitumor activity and immunomodulatory effects of the intraperitoneal administration of Kanglaite *in vivo* in Lewis lung carcinoma [J]. J Ethnopharmacol, 2012, 143: 680-685.
- [11] Chung C, Hsia S, Lee M, et al. Gastroprotective activities of adlay (*Coix lacryma-jobi* L. var. ma-yuen Stapf) on the growth of the stomach cancer AGS cell line and indomethacin-induced gastric ulcers [J]. J Agric Food Chem, 2011, 59: 6025-6033.
- [12] Fang T, Jiang YX, Chen L, et al. Metabonomics study of Coix seed oil on suppressing the growth of triple negative breast cancer [J]. Shanghai J Tradit Chin Med (上海中医药杂志), 2020, 54: 78-84.
- [13] Nie LJ, Sun ZS, Cheng XF, et al. Effect of unsaturated fatty acid on PSII function in chrysanthemum (*Dendranthema morifolium*) leaves under low temperature stress [J]. J Northeast Forest Univ (东北林业大学学报), 2020, 48: 61-65.
- [14] Bazinet RP, Layé S. Polyunsaturated fatty acids and their metabolites in brain function and disease [J]. Nat Rev Neurosci, 2014, 15: 771-785.
- [15] Wiktorowska-Owczarek A, Berezińska M, Nowak JZ. PUFAs: structures, metabolism and functions [J]. Adv Clin Exp Med, 2015, 24: 931-941.
- [16] Tvřizicka E, Kremmyda LS, Stankova B, et al. Fatty acids as biocompounds: their role in human metabolism, health and disease -- a review. Part 1: classification, dietary sources and biological functions [J]. Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub, 2011, 155: 117-130.
- [17] Wu JY, Peng LL, Dong SB, et al. Transcriptome analysis of *Chelidonium majus* elaiosomes and seeds provide insights into fatty acid biosynthesis [J]. PeerJ, 2019, 7: e6871.
- [18] Zhao X, Wei J, He L, et al. Identification of fatty acid desaturases in maize and their differential responses to low and high temperature [J]. Genes (Basel), 2019, 10: 445.
- [19] Lamers D, Visscher B, Weusthuis RA, et al. Overexpression of delta-12 desaturase in the yeast *Schwanniomyces occidentalis* enhances the production of linoleic acid [J]. Bioresour Technol, 2019, 289: 121672.
- [20] Wei XY, Li Y, Guo J, et al. Cloning and bioinformatic analysis of the 3-ketoacyl-CoA synthase gene in *Coix lacryma-jobi* L. [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2021, 56: 610-617.
- [21] 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.
- [22] Lin XP, Wang YN, Zhang SF, et al. Functional integration of multiple genes into the genome of the oleaginous yeast *Rhodospiridium toruloides* [J]. FEMS Yeast Res, 2014, 14: 1-17.
- [23] Wang YN, Zhang SF, Pötter M, et al. Overexpression of  $\Delta 12$ -fatty acid desaturase in the oleaginous yeast *Rhodospiridium toruloides* for production of linoleic acid-rich lipids [J]. Appl Biochem Biotechnol, 2016, 180: 1497-1507.
- [24] Li ZF, Zhang L, Shen XJ, et al. A comparative study on four

- method of fungi lipid extraction [J]. *Microbiol China* (微生物学通报), 2001, 28: 72-75.
- [25] Li Y, Wei XY, Guo J, et al. The study of lipid production by reusing of herb residues of Songling Xuemaikang capsule [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2020, 45: 4392-4397.
- [26] Li YC, Zhao JF, Liu HY. The content of fatty acids in fish oil was determined by GCMS [J]. *Heilongjiang Environ J* (黑龙江环境通报), 2008, 32: 58-60.
- [27] Dehghan Nayeri F, Yarizade K. Bioinformatics study of delta-12 fatty acid desaturase 2 (*FAD2*) gene in oilseeds [J]. *Mol Biol Rep*, 2014, 41: 5077-5087.
- [28] Yang TQ, Wang XJ, Dong TN, et al. Isolation and functional analyses of *PvFAD2* and *PvFAD3* involved in the biosynthesis of polyunsaturated fatty acids from Sacha Inchi (*Plukenetia volubilis*) [J]. *PeerJ*, 2020, 8: e9169.
- [29] Wang LM, Fu ZZ, Gao J, et al. Molecular mechanism of unsaturated fatty acids synthesis and regulation in plant [J]. *Gen Appl Biol* (基因组学与应用生物学), 2020, 39: 254-258.
- [30] Zhang Y. Clone and Functional Verification of  $\Delta 9$ - and  $\Delta 15$ - Fatty Acid Desaturase Gene from *Lipomyces kononenkoae* (橘林油脂酵母  $\Delta 9$ -和  $\Delta 15$ -脂肪酸去饱和酶基因的克隆及功能验证) [D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2011.
- [31] Zhang Q, Li MC, Sun HY, et al. Progress on molecular biology of  $\Delta 6$ -fatty acid desaturases [J]. *Chin J Biotechnol* (生物工程学报), 2004, 20: 319-324.
- [32] Sayanova O, Shewry PR, Napier JA. Histidine-41 of the cytochrome b5 domain of the borage  $\Delta 6$  fatty acid desaturase is essential for enzyme activities [J]. *Plant Physiol*, 1999, 121: 641-646.
- [33] Libisch B, Michaelson LV, Lewis MJ, et al. Chimeras of delta6-fatty acid and delta8-sphingolipid desaturases [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2000, 279: 779-785.