

油桐*LACS4*和*LACS8*基因克隆及其表达分析

李捷宇, 龙洪旭, 张琳, 王哲, 李泽, 谭晓风*

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, 长沙410004

摘要: 以油桐的近成熟种子为材料, 根据油桐转录组测序结果设计引物, 采用RT-PCR技术克隆了油桐长链脂酰辅酶A合成酶基因家族的两个成员的全长cDNA序列, 分别命名为*VjLACS4* (GenBank登录号: KP996689)和*VjLACS8* (GenBank登录号: KT362743), 通过实时定量PCR的方法检测了不同组织部位和种子不同发育时期该基因的表达水平, 并采用索式提取法测定了种子发育时期的油脂含量。结果表明: *VjLACS4*的CDS长度为1 989 bp, 编码662个氨基酸, 与其他物种的*LACS4*氨基酸序列具有较高的相似性, 其中与蓖麻的*LACS4*相似性最高; *VjLACS8*的CDS长度为2 199 bp, 编码732个氨基酸, 与麻疯树和蓖麻的*LACS8*具有较高的相似性; 实时定量RT-PCR结果表明*VjLACS4*基因在花、茎、叶和根中均有少量表达, 并在种子发育的10月10日表达量达到最大; *VjLACS8*基因在种子、花、茎、叶和根中均有一定量的表达, 在雌蕊中的表达量最高; 油桐种子发育过程中的油脂积累呈现出“S”型, *VjLACS8*基因的在发育种子中的表达模式与之相一致, 推测*VjLACS8*基因与种子发育过程中的油脂积累相关。

关键词: 油桐; *LACS4*; *LACS8*; 基因克隆; 基因表达

Isolation and Expression Analysis of *LACS4* and *LACS8* from *Vernicia fordii*

LI Jie-Yu, LONG Hong-Xu, ZHANG Lin, WANG Zhe, LI Ze, TAN Xiao-Feng*

The Key Laboratory of Cultivation and Protection for Non-Wood Forest Trees, Ministry of Education, Central South University of Forestry and Technology, Changsha 410004, China

Abstract: Primers were designed according to the results of the transcriptome sequencing analysis of *Vernicia fordii*, two LACS family members named *VjLACS4* and *VjLACS8* were isolated from nearly ripe seed in *Vernicia fordii* with the method of RT-PCR. Their expression in different tissues and different developmental stages of seed was checked with qRT-PCR. The oil content of different developmental stages of seed was determined by soxhlet extraction. The CDS of *VjLACS4* is 1 989 bp which codes a predicted protein of 662 amino acids. The amino acid identity compared with others is highly conserved and showed the highest similarity with the *LACS4* of *Ricinus communis*. The CDS of *VjLACS8* is 2 199 bp which codes a predicted protein of 732 amino acids. The amino acid identity compared with others is highly conserved and showed the highest similarity with the *LACS8* of *Jatropha curcas* and *Ricinus communis*. The real-time RT-PCR result showed that *VjLACS4* expressed not much in flower, stem, leaf and root, but reached the highest level in October 10th in developing seed; *VjLACS8* expressed in seed, flower, stem, leaf and root, and reached the highest level in pistil. The expression mode of *VjLACS8* in developmental seed is as same as the pattern of oil accumulation, *VjLACS8* gene was speculated that it was related to oil accumulation in the process of seed development.

Key words: *Vernicia fordii*; *LACS4*; *LACS8*; gene cloning; gene expression

油桐(*Vernicia fordii*)属大戟科(Euphorbiaceae)油桐属(*Vernicia*), 是我国特有的经济林木, 与油茶、核桃、乌桕并列为我国四大木本油料植物(谭晓风2006)。桐油是优质干性油, 是重要的工业油料(吴传万等2004), 具有干燥快、耐酸耐碱、附着力强等优良性能(孙颖等2007), 是制造涂料、油漆、生物柴油和高分子材料的重要生产原料。油料作物种子中的油脂主要以三酰基甘油(TAG)的形式贮存(Shen等2006), TAG是由作为底物的甘

油-3-磷酸和脂肪酰辅酶A硫酯在酰基转移酶作用下通过Kennedy循环途径合成的。在细胞内脂肪酶催化水解的游离脂肪酸具有毒性, 长链脂酰辅

收稿 2015-08-26 修定 2015-10-30

资助 国家林业公益性行业科研专项重大项目(201204403)、湖南省研究生科研创新项目(CX2015B292)和中南林业科技大学研究生科技创新基金(CX2015B11)。

* 通讯作者(E-mail: tanxiaofengcn@126.com; Tel: 0731-85623416)。

酶A合成酶(long chain acyl-CoA synthetase, LACS)基因家族能够活化游离的脂肪酸成为无毒的酰基辅酶A硫酯,从而参与TAG的合成,该硫酯还参与多种代谢途径,如跨膜转运、信号化、转录调节等,并且是 β -氧化的底物(Shrago 2000; Watkins 1997)。

酰基辅酶A合成酶根据其碳链长度不同有短链、中链和长链之分,长链脂酰辅酶A合成酶反应机制分两部分进行,首先,游离的脂肪酸同ATP反应生成腺苷化的中间体;然后,该中间体和辅酶A的硫酯键结合,生成酰基辅酶A。具体反应如下:

- ① $\text{Fatty acid} + \text{ATP} \rightleftharpoons [\text{fatty acyl-AMP}] + \text{PPi}$;
- ② $[\text{fatty acyl-AMP}] + \text{CoA-SH} \rightarrow \text{fatty acyl-S-CoA} + \text{AMP}$

LACS 含有AMP 结合域标签,为高度保守的氨基酸序列,该序列是AMP结合蛋白超家族的标志(Babbitt等1992)。研究表明,LACS在多种生命体中均存在并参与有机体代谢,LACS存在于大肠杆菌、酵母、哺乳动物中并发挥重要的作用。克隆得到大肠杆菌的LACS命名为*fadD*基因,与长链脂肪酸转运相关(Black等1992);酵母*Faa1P*和*Faa4P*对长链脂肪酸的进入至关重要,表明这两个酶或其中之一是脂肪酸运输系统的组成部分(Faergeman等2001);目前已克隆得到5个大鼠ACS基因,其中*ACS1*、*ACS4*和*ACS5*在肝脏中表达(Lewin等2001)。在高等植物中也发现有LACS参与细胞反应,且认为植物较哺乳动物或酵母含有更多LACS(Fulda等2002),目前分析找到的拟南芥基因组中LACS基因家族成员有9个,命名为LACS1到LACS9,它们各自具有不同的表达模式和功能。LACS1在萌发后3~5 d表达水平最高,在成熟期主要表达在花、花序和茎中(谭小力2003),LACS2在幼嫩的组织叶、根、花芽、花和角果中有大量表达,推测与角质的合成有关(Schnurr等2004);实验证实LACS6和LACS7定位于过氧化物酶体中,推测可能参与酰基辅酶A的过氧化物酶体 β -氧化途径(Hayashi等2002; Fulda等2002, 2004);LACS9是主要存在于叶绿体中,与脂肪酸的合成相关(Schnurr等2002)。研究表明大豆中*GmLACS2*定位于过氧化物酶体,可能参与种子萌发并且与脂肪酸和脂质降解有关(于莉莉等2011);在油菜(*Brassica napus*)中也有LACS发现,它们在胚发生期和花期有强烈

表达(Pongdontri和Hills 2001),棉花中的*GhACS1*与花粉的形成相关(Wang和Li 2009),在蓖麻、水稻中也克隆得到了LACS家族的基因(He等2007; Ichihara等2003),但在林木中鲜少有与LACS相关的研究。近年来资源过度开发利用,如何挖掘油桐这一宝贵资源在生物质能源等领域的重要作用已成为当前科研的重要任务,油桐的相关生理研究陆续开展且已有油桐立体叶片通过间接器官发生途径获得再生植株的报道(谭晓风等2013),并成功建立了油桐叶柄高效可行的再生体系(林青等2014)。本研究以油桐的近成熟种子为材料,从分子生物学的角度通过对油桐长链脂酰辅酶A合成酶基因LACS4的分离克隆和该基因的表达情况进行检测,为进一步研究油桐脂肪酸的生物合成与代谢调控从而提高含油率提供理论依据。

材料与amp;方法

1 材料

1.1 植物材料

采用的油桐(*Vernicia fordii* Hemsl.)近成熟种子来自于湖南省永顺县青坪镇油桐基地-中南林业科技大学国家油桐种质资源保存库。2013年8月底采集油桐近成熟种子为实验材料,保存于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中。2014年7月至2014年11月分别采集油桐不同组织部位和不同时期种子用于荧光定量PCR分析。

1.2 试剂

PureLinkTM RNA Mini Kit购自Invitrogen公司,大肠杆菌Trans-T1感受态细胞、pEASY-Blunt Simple Cloning Kit购自全式金公司,RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit购自Fermentas公司,高保真DNA聚合酶PrimeSTAR HS DNA Polymerase、2 \times ExTaq PCR SuperMix、定量PCR试剂2 \times SYBR Green qPCR Mix购自Takara公司,100 bp Plus DNA Ladder购自Solarbio公司,琼脂糖凝胶DNA回收试剂盒购自博日公司,引物合成及测序分别由华大基因和博尚生物公司完成。

1.3 主要仪器设备

PCR仪S1000TM Thermal Cycler,荧光定量PCR仪C1000TM Thermal Cycler,离心机AllegraTM X-22R Centrifuge。

2 方法

2.1 总RNA的提取

参照Invitrogen公司的PureLink™ RNA Mini Kit试剂盒的方法进行,提取油桐不同组织部位以及种子不同时期的总RNA。利用1.0%琼脂糖凝胶电泳检测总RNA的完整性,用紫外/可见分光光度计(Lambda35, Perkin Elmer, USA)检测核酸的纯度。采用TaKaRa公司的cDNA合成试剂盒,方法参照试剂盒说明书,得到第一链cDNA。

2.2 油桐LACS4基因和LACS8基因的克隆

从油桐转录组测序结果中获得LACS4和LACS8基因的全长序列,LACS4基因的开放阅读框为1 989 bp,LACS8的开放阅读框为2 199 bp。利用Primer Premier 5软件设计引物,上游引物分别为L4F1: 5'-ATGGCGGCGAGGAAGTATCT-3'和L8F1: 5'-ATGGAAGATTGTAAGGGAAGAT-3';下游引物分别为L4R1: 5'-CTAGGCACTGG-GCTTGCTCG-3'和L8R1: 5'-TCACTCATA-GAGCTTTTGAAGC-3',以油桐近成熟种子反转录单链cDNA为模板,进行PCR扩增。PCR反应体系(20 μL): 5×Prime STAR Buffer (Mg²⁺) 4 μL, dNTP Mixture 1.6 μL, 上下游引物各0.4 μL, 模板cDNA 0.4 μL, Prime STAR HS 0.2 μL, dH₂O 13 μL。扩增条件: 94 °C 2 min; 94 °C 30 s, 65 °C 40 s, 72 °C 90 s, 30个循环; 72 °C 7 min; 4 °C 保持。将PCR产物用琼脂糖凝胶DNA回收试剂盒回收,回收产物与pEASY-Blunt Simple载体连接,并转化大肠杆菌Trans-T1感受态细胞,PCR鉴定后将阳性结果送博尚生物公司测序。

2.3 序列分析和结构预测

利用NCBI的BLAST功能对测序结果进行检索, DNAMAN和GENDOC进行序列分析和氨基酸翻译,用在线软件ProtParam (<http://web.expasy.org/protparam/>)分析和预测蛋白质的理化性质如分子量、等电点等;用Clustalx和MEGA4.0软件进行多序列比对并计算构建油桐LACS4的聚类分析图;并运用在线软件(<http://www.predictprotein.org/>)预测蛋白质二级结构。

2.4 实时定量RT-PCR

取各试材的总RNA,以Oligo-d(T)为引物,反转录按RevertAid FirstStrand cDNA Synthesis Kit说

明书进行。用反转录后的cDNA做模板,设计实时定量PCR引物,上游引物分别为L4-F1: 5'-ATG-GCTTCAATGGGGACTTCAAATC-3'和L8-F1: 5'-TGGGAGAATATGAATGGGAAACCT-3';下游引物分别为L4-R1: 5'-TCACGTTCTATGTCAAAT-GGCTCAG-3'和L8-R1: 5'-CATCCCTGGAAG-GAAATGAACCAC-3',扩增长度分别为159 bp和150 bp。

琼脂糖凝胶电泳检测结果表明,两对引物均能扩增出特异的目的片段,而且没有引物二聚体。实时定量PCR的反应体积为12 μL,包括1 μL cDNA (RNA为2 μg), 6.25 μL 2×SYBR Green qPCR Mix,浓度为10 μmol·L⁻¹的正反向引物各0.5 μL,剩余体积用超纯水补足至12 μL,每个反应重复3次。定量PCR反应程序: 95 °C 30 s; 95 °C 5 s, 55 °C 30 s, 39个循环。使用BIO-RAD公司Mini option 定量PCR仪,八联排管完成PCR反应。以油桐GAPDH作为内参基因(Han等2012),上游引物GAPDHF: 5'-CTGCTAAGGCTGTTGGGAAG-3',下游引物GAPDHR: 5'-TCCCTCTGACTCCTCCTCCTGA-3',无菌水模板为阴性对照。

2.5 种子成熟过程中油脂含量测定

取种子发育的7月1日到10月20日各时期种子剥皮风干,采用索式提取法测定油桐种子各个时期的油脂含量,从而得出油桐种子成熟过程中的含油率。

实验结果

1 油桐LACS4基因克隆与序列分析

以油桐近成熟种子总RNA(图1-A)反转录的单链cDNA为模板,用特异性引物(L4F1、L4R1、L8F1、L8R1)分别进行扩增得到目的片段并回收,将回收的目的片段连接到pEASY-Blunt Simple上,转化大肠杆菌Trans-T1感受态细胞,检测获得阳性克隆后测序。测序结果显示两个基因的序列与转录组测序的序列一致性为100%,最终确认为油桐LACS4和LACS8基因的全长cDNA序列。LACS4基因全长1 989 bp(图1-B),编码662个氨基酸,长度与其他物种的LACS4基因相近;LACS8基因全长2 199 bp(图1-C),编码732个氨基酸,长度与其他物种的LACS8基因相近。用在线软件ProtParam对LACS4

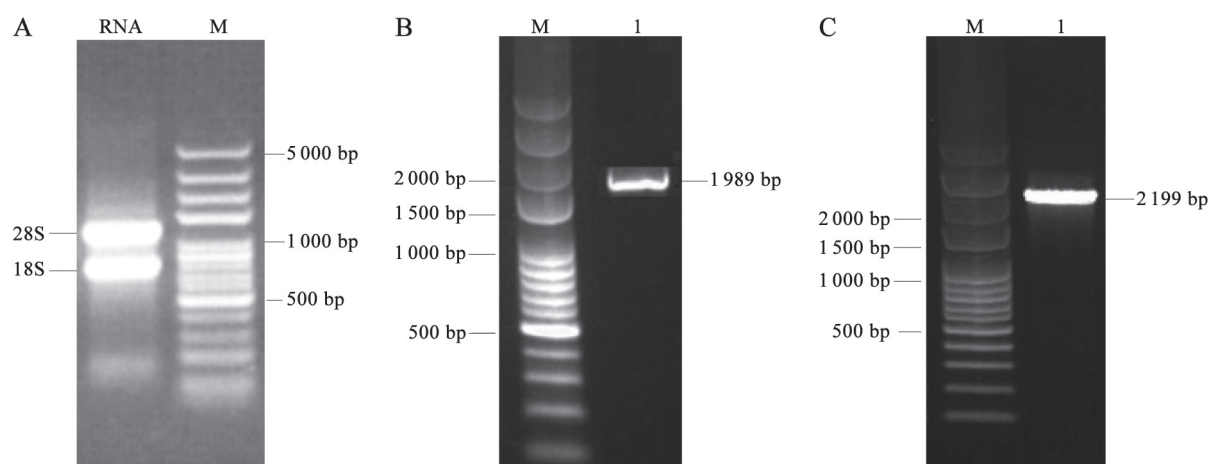


图1 总RNA电泳和基因CDS扩增结果

Fig.1 Electrophoresis of total RNA and PCR amplification results of CDS of *VfLACS4* and *VfLACS8*M: 100 bp plus DNA ladder; A: 总RNA; B: *VfLACS4* CDS扩增; C: *VfLACS8* CDS扩增。

蛋白质的理化性质进行分析, 结果表明, LACS4蛋白质分子量为73.79 kDa; 理论等电点为6.60; 分子式为 $C_{3338}H_{5222}N_{860}O_{968}S_{28}$; 该蛋白在大肠杆菌中半衰期大于10 h; 不稳定系数为34.38, 划分为稳定蛋白; 脂肪系数为89.20。用在线软件对LACS8蛋白质的理化性质进行分析, 结果表明, LACS4蛋白质分子量为80.5 kDa; 理论等电点为7.46; 分子式为 $C_{3605}H_{5699}N_{953}O_{1064}S_{34}$; 该蛋白在大肠杆菌中半衰期大于10 h; 不稳定系数为30.96, 划分为稳定蛋白; 脂肪系数为87.65。

将克隆得到的油桐LACS4 cDNA序列和油桐LACS8 cDNA序列推导出的氨基酸序列与其他物种的该基因所编码的氨基酸通过软件DNAMAN和GENDOC进行同源性分析(图2), 发现油桐LACS4基因与其他植物的LACS4基因所编码的氨基酸同源性大多在70%以上, 其中与蓖麻(*Ricinus communis*)的相似度最高达89%, 与胡杨(*Populus euphratica*)的相似度为84%, 与大豆(*Glycine max*)、芝麻(*Sesamum indicum*)、番茄(*Solanum lycopersicum*)的相似度为81%, 与葡萄(*Vitis vinifera*)相似度为80%, 与拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)、油菜(*Brassica napus*)的相似度为78%; 油桐LACS8基因与其他植物的LACS8基因所编码的氨基酸同源性大多在70%以上, 其中与麻疯树(*Jatropha curcas*)和蓖麻(*Ricinus communis*)的相似度最高, 相似度分别达86%和81%, 与胡杨(*Populus euphratica*)相似度为79%。

2 VfLACS4和VfLACS8蛋白聚类分析

用Clustalx和MEGA4.0软件对22种植物的LACS氨基酸序列进行聚类分析, 结果显示, 油桐LACS4蛋白首先与蓖麻(*Ricinus communis*) LACS4和ACS1聚在一起(图2), 对21种植物的LACS氨基酸序列进行聚类分析显示, 油桐LACS8也先与麻疯树(*Jatropha curcas*)和蓖麻的LACS8聚在一起(图3), 油桐与蓖麻和麻疯树同属于大戟科, 相对于上述其他物种遗传距离也应该是最近的。

进一步分析油桐LACS4和LACS8的结构特征, 结果显示均含有AMP 绑定域标签(PROSITEPS 00455)的高度保守的氨基酸序列, 分别位于227~238 aa和291~302 aa, 是LACS起催化反应的功能域, 油菜LACS4具有以block形式存在的氨基酸序列(崇保强等2009), 且3个block上分别有一个AMP 绑定基序存在, 该AMP结合结构域在酰基辅酶A形成反应中起到了很关键的作用(谭小力2003)。

3 不同组织部位和种子不同时期VfLACS4和VfLACS8的表达分析

3.1 不同组织部位的表达情况

实时荧光定量PCR结果显示, 油桐VfLACS4基因在所检测的组织包括根、茎、叶、花和种子中均有表达, 且不同组织部位的表达量存在差异(图4)。在花和老茎中的表达量相对较高, 特别是在雄蕊中表达量最高, 其次为老茎、花萼、花瓣; 在幼根中也有一定的表达; 在老叶、幼茎和子房中的表达量相对较低。

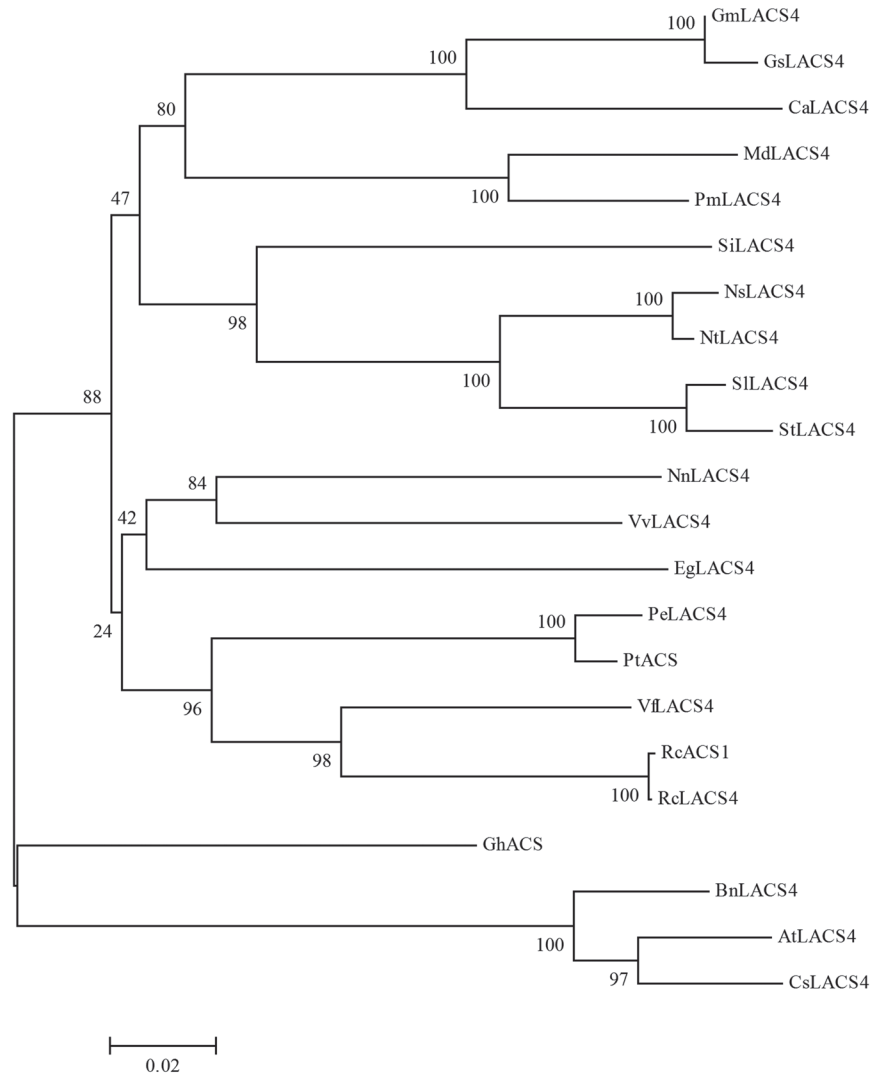


图2 油桐LACS4蛋白和其他植物LACS蛋白的聚类分析

Fig.2 Phylogenetic tree of the predicted LACS4 and other homologous proteins from different species

GmLACS4: 大豆 *Glycine max*; GsLACS4: 野生大豆 *Glycine soja*; CaLACS4: 鹰嘴豆 *Cicer arietinum*; MdLACS4: 苹果 *Malus domestica*; PmLACS4: 梅花 *Prunus mume*; SiLACS4: 芝麻 *Sesamum indicum*; NsLACS4: 美花烟草 *Nicotiana sylvestris*; NtLACS4: 茸毛烟草 *Nicotiana tomentosiformis*; SiLACS4: 番茄 *Solanum lycopersicum*; StLACS4: 马铃薯 *Solanum tuberosum*; NnLACS4: 莲 *Nelumbo nucifera*; VvLACS4: 葡萄 *Vitis vinifera*; EgLACS4: 巨桉 *Eucalyptus grandis*; PeLACS4: 胡杨 *Populus euphratica*; PtACS: 毛果杨 *Populus trichocarpa*; RcACS1: 蓖麻 *Ricinus communis*; RcLACS4: 蓖麻 *Ricinus communis*; GhACS: 陆地棉 *Gossypium hirsutum*; BnLACS4: 油菜 *Brassica napus*; AtLACS4: 拟南芥 *Arabidopsis thaliana*; CsLACS4: 芥蓝 *Camelina sativa*。

*VfLACS4*基因在茎中的表达量最低,而在发育的种子中(10月10日)表达量最高(图5),明显高于其他的组织。*VfLACS4*基因在不同组织的表达量大小为:发育的种子>雄蕊>老茎>花萼>花瓣>幼根>嫩叶>雌蕊>花托>老叶>子房>幼茎。

油桐 *VfLACS8*基因在根、茎、叶、花和种子中均有表达,但是在不同组织部位的表达量存在差异(图4)。*VfLACS8*基因在花瓣中的表达量最低,

在雌蕊中的表达量最高,且明显高于其他的组织部位,其在雌蕊中的表达量是花瓣中62.5倍。*VfLACS8*基因在雌蕊中表达量最大,其次为老茎、雄蕊以及幼茎,而在其他部位表达量相对较低。

3.2 种子不同时期的表达情况

实时荧光定量PCR结果显示, *VfLACS4*基因在种子的发育过程中的表达在时间上具有一定差异性(图5),7月份和8月份 *VfLACS4*基因的表达量基本

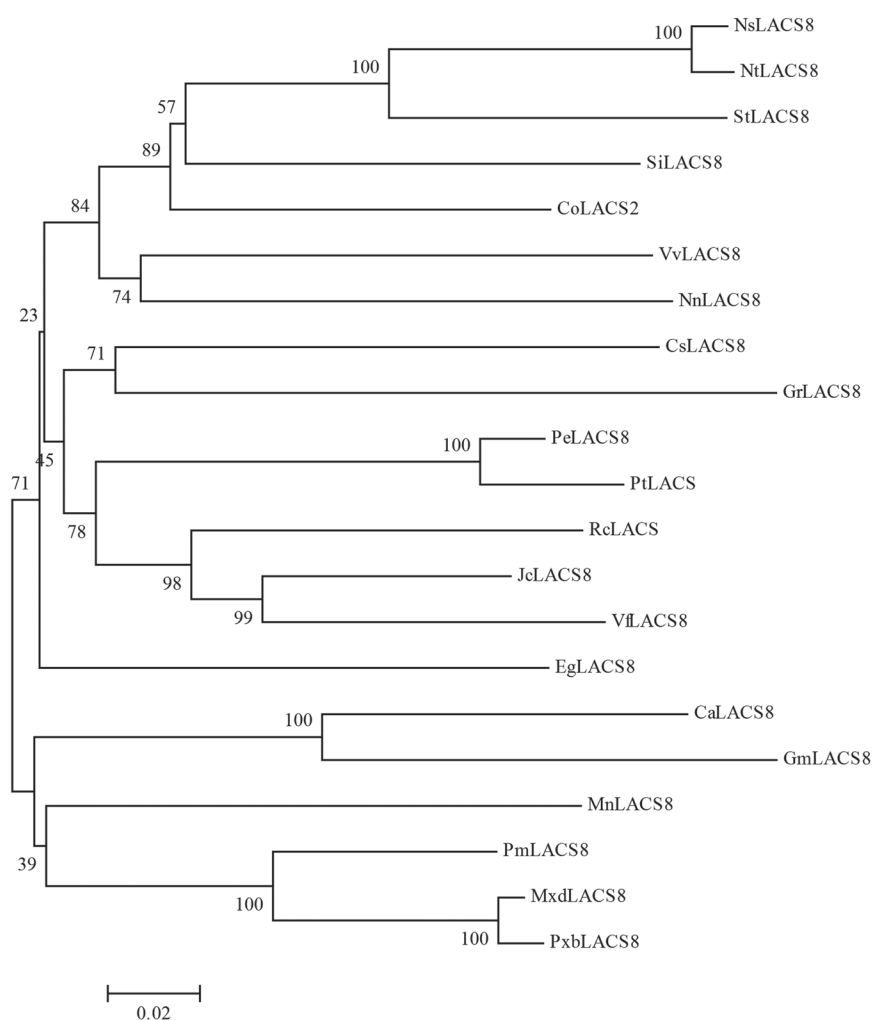


图3 油桐LACS8蛋白和其他植物LACS蛋白的聚类分析

Fig.3 Phylogenetic tree of the predicted LACS8 and other homologous proteins from different species

NsLACS8: 美花烟草 *Nicotiana sylvestris*; NtLACS8: 茸毛烟草 *Nicotiana tomentosiformis*; StLACS8: 马铃薯 *Solanum tuberosum*; SiLACS8: 芝麻 *Sesamum indicum*; CoLACS2: 油茶 *Camellia oleifera*; VvLACS8: 葡萄 *Vitis vinifera*; NnLACS8: 莲 *Nelumbo nucifera*; CsLACS8: 芥蓝 *Camelina sativa*; GrLACS8: 雷蒙德氏棉 *Gossypium raimondii*; PeLACS8: 胡杨 *Populus euphratica*; PtLACS: 毛杨 *Populus trichocarpa*; RcLACS: 蓖麻 *Ricinus communis*; JcLACS8: 麻疯树 *Jatropha curcas*; EgLACS8: 巨桉 *Eucalyptus grandis*; CaLACS8: 鹰嘴豆 *Cicer arietinum*; GmLACS8: 大豆 *Glycine max*; MnLACS8: 川桑 *Morus notabilis*; PmLACS8: 梅花 *Prunus mume*; MxdLACS8: 苹果 *Malus x domestica*; PxbLACS8: 白梨 *Pyrus x bretschneideri*。

稳定在同一水平, 无明显的变化, 9月份下旬和10月份上旬的表达量有所升高, 在10月10日表达量骤然增高并且达到最大, 出现了表达高峰, 其表达量约为7月15日表达量最低时的21.3倍, 而后在10月20日表达量降低到低于9月20日的水平。

*VtLACS8*基因在油桐种子不同发育时期的表达量情况也存在较大的差异, 其在发育过程中具有时间上的特异性(图5)。 *VtLACS8*基因在7月1日到8月1日表达量较低, 进入8月份后直到9月份表达量逐渐升高, 后在9月中旬略微有所下降, 从9月

20日到10月20日表达量逐渐升高, 且在10月20日的表达量达到最大, 此时的表达量为8月1日表达量的18倍。

4 种子成熟过程中油脂含量分析

采用索式提取法对油桐种子十个时期的油脂进行提取(图6), 7月份桐油初步形成, 并逐渐开始积累, 其中7月15日和8月1日的种仁含油率分别为13.8%和17.1%; 之后油脂在8月份和9月份迅速积累, 8月15日的含油率为26.9%, 9月份油脂继续积累, 但与较之前相比积累速度减缓, 9月10日含油率

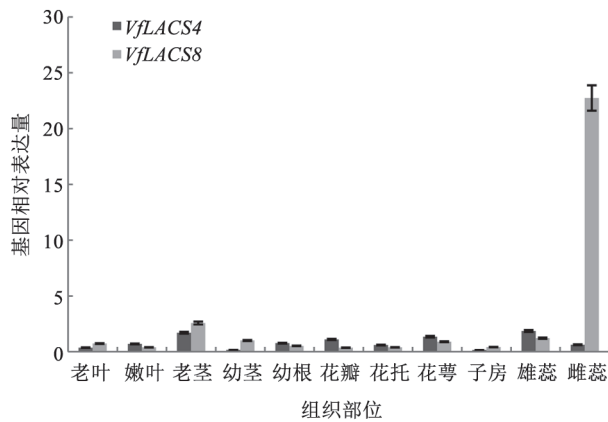


图4 *VfLACS4*和*VfLACS8*在油桐不同组织部位的表达情况
Fig.4 Expression of *VfLACS4* and *VfLACS8* in different tissue sites of *Vernicia fordii*

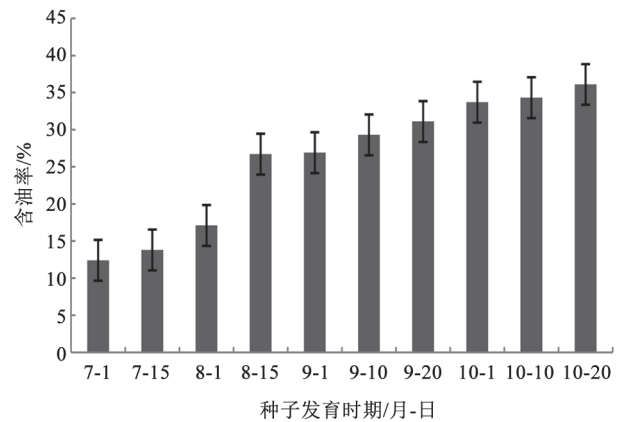


图6 不同发育时期油桐种子的含油率
Fig.6 Oil content of developmental seed in *Vernicia fordii*

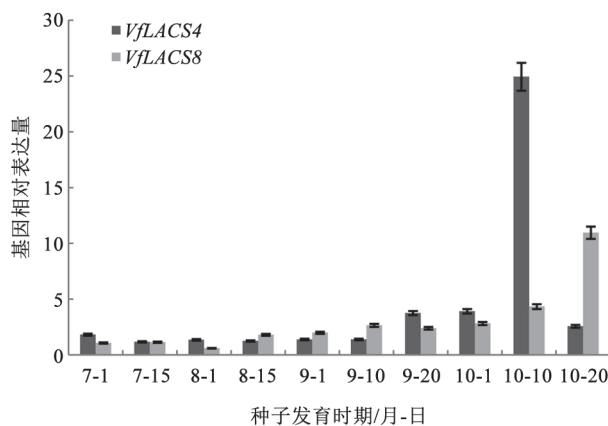


图5 *VfLACS4*和*VfLACS8*在油桐种子发育时期的表达情况
Fig.5 Expression of *VfLACS4* and *VfLACS8* in different stages of seed of *Vernicia fordii*

达到29.3%; 油脂积累在10月份逐渐趋于平缓, 10月10日和10月20日的含油率分别为34.3%和36.1%。由此可以表明桐油的生物合成呈“S”型曲线, 并在8月份到10月份为桐油油脂合成高峰期。

讨 论

本试验分别克隆得到油桐*LACS4*基因和油桐*LACS8*基因, *LACS4*基因CDS长度为1 989 bp, 保守序列为IMYTS GTT GDPK, *LACS8*基因CDS长度为2 199 bp, 保守序列为IMYTS GST GLPK, 属于AMP 绑定蛋白家族, 与其他物种的*LACS*基因编码蛋白具有一致性(Black等1992; 崇保强2008; 顾守来2012)。对油桐*LACS4*的氨基酸序列比对分析和聚

类分析表明其与蓖麻的亲缘关系最近, 而油桐*LACS8*的氨基酸序列比对分析和聚类分析表明与麻疯树和蓖麻的亲缘关系最近。

植物进行生命活动离不开基因的调控作用, 控制植物生长发育的相关基因的表达影响着植物的生长发育, 所以了解基因表达的时空性和差异性显得尤为重要; 而通过分析这些基因的表达模式与油脂积累的联系, 则更有助于了解基因的分子机制与功能。本实验检测了油桐*VfLACS4*基因和*VfLACS8*基因在油桐各个组织器官中的表达情况, 并发现它们在所有被检测的组织中均有不同程度的表达, 说明它们在油桐植株中分布广泛, 且具有一定的组织特异性。

Shockey (2002)研究表明拟南芥*AtLACS1*主要在成年植株中的花序、花、茎及角果中表达, 在叶、根中无表达; 而拟南芥*AtLACS4*在根、叶、花中表达, 在茎中无表达。崇保强(2008)研究表明油菜*BnLACS1*在成熟植株的花和茎中的表达量相对较高, 而在根和叶中的表达量很低; *BnLACS4*在根和花中表达水平较高, 而在茎和叶中较低; 这说明*LACS*基因在不同物种中的表达既有相似性又有差异性。本实验通过研究*VfLACS4*基因在植物不同组织中的表达情况表明, *VfLACS4*基因在油桐的根、茎、叶、花和种子中均有表达, 并且主要成熟植株的花和茎中表达, 这与崇保强(2008)研究得出的油菜*BnLACS1*的表达谱一致, 与油菜*BnLACS4*相似, 与拟南芥*AtLACS*的表达谱存在一定差异。而*VfLACS4*基因在种子中的表达量明显高于其他

的组织部位,表明该基因在种子中代谢反应起到了一定的作用。而*VjLACS8*基因在植物不同组织部位的表达情况与*VjLACS4*有一定的差异,*VjLACS8*基因在雌蕊中的表达量显著高于其他组织部位,其次在老茎中的表达量较高,*VjLACS8*表达谱与*BnLACS1*的表达谱一致,与油菜*BnLACS4*的表达谱有一定的相同之处,与拟南芥*AtLACS*差异较大。表达量越高说明其具有较高的转录水平,高水平的转录出现在茎和花中,说明该基因与这些组织的生长发育有密切的联系,*VjLACS8*基因在雌蕊中的高表达量表明其与花的发育特别是雌蕊的发育紧密相关,花是油脂大量合成的组织,在花中的大量表达说明油桐*VjLACS4*可能参与油脂的合成代谢。

实验通过对7月1日至10月20日各个时期油桐种子中*VjLACS4*基因和*VjLACS8*基因的表达情况进行研究表明,*VjLACS4*基因和*VjLACS8*基因在种子不同发育阶段的表达具有时间特异性。*LACS4*在发育的油桐种子中的表达整体呈现出先趋于平稳后上升的趋势,种子的油脂合成开始于7月份,基因在7月1日的表达量稍高可能是由于油桐*VjLACS4*不只是参与油脂的合成代谢,可能还和其他的代谢活动相关。*VjLACS4*在7月15日表达量最低,在9月20日和10月1日的表达量较高,在10月10日表达量达到最大且显著高于其他的时期,总的来说*LACS4*基因在发育的种子中的表达明显高于其他组织部位,推测该基因在种子10月份时期的某一代谢活动中起到了至关重要的作用。*LACS8*在发育的油桐种子中的表达同样是在7月1日稍高,后稍有下降并逐渐保持相对稳定上升的状态,从9月20日到10月20日表达量逐渐升高直至达到最大。油桐种籽在成熟过程中,油分形成和累积的特点是种籽内含油率在不断增加,油桐种籽油分形成、累积、转化最旺盛时期是8~9月上旬(陈炳章1983),本文研究同样表明桐油的生物合成呈“S”型曲线。对油桐种子不同发育时期的含油量测定结果与*VjLACS8*基因在种子不同发育时期的表达量结果对比分析表明,除7月1日和7月15日基因表达量较高,而桐油含量较低以外,从8月1日到10月20日基因的表达量与桐油的合成趋势相一致,随着时间的推移,*VjLACS8*基因的表达量升高,桐油

的积累也逐渐迅速,*VjLACS8*基因在种子不同发育阶段表达的时间特异性表明该基因可能在油桐脂肪酸的合成中发挥着重要的作用。而对蓖麻研究表明,*RcLACS2*参与蓖麻油脂合成过程,该基因与蓖麻种子中储存油脂的种类和含量相关(He等2007),油桐与蓖麻的亲缘关系最近,由此推测*VjLACS4*和*VjLACS8*有可能对游离脂肪酸和油脂种类积累产生一定的影响。

本研究从油桐种子中克隆得到*VjLACS4*基因和*VjLACS8*基因并对其进行了生物信息学分析和表达模式分析,获得了两个基因的表达谱,通过对桐油积累与*VjLACS8*基因表达的相关性分析进而预测了该基因的功能。但*LACS*基因家族成员在不同组织中对脂肪酸的活化存在不同的调控机制(李庆岗等2012),油桐*LACS*基因家族成员的数量以及各成员的作用和调控方式尚不清楚,各成员的主要功能仍有待验证,下一步需继续克隆*LACS*基因家族的其他成员,弄清基因的结构特征、表达模式和生理生化特性,为筛选和培育高含油量油桐品种以适应生产发展需求提供材料和依据。

参考文献

- 陈炳章(1983). 油桐种籽油分累积、转化的初步研究. 植物生理学通讯, (2): 27~29
- 崇保强(2008). 油菜*LACS1*基因和油菜*LACS4*基因的克隆与鉴定[学位论文]. 江苏镇江: 江苏大学
- 崇保强, 谭小力, 周佳, 袁伟伟, 朱福各(2009). 油菜长链酰基辅酶A合成酶基因(*LACS4*)的电子克隆和表达分析. 江苏农业学报, 25 (1): 38~43
- 顾守来(2012). 莱茵衣藻长链酰基辅酶A合成酶*LACS*同源基因的生物信息学分析. 生物学杂志, 29 (4): 5~8
- 李庆岗, 陶著, 杨玉增, 张博, 史利华, 班东梅, 张浩(2012). 长链脂酰CoA合成酶(*LACS*)的研究进展. 中国畜牧兽医, 39 (6): 137~140
- 林青, 吴玲利, 张琳, 谭晓风, 龙洪旭, 李泽(2014). 油桐叶柄高效直接再生体系的建立. 植物生理学报, 50 (10): 1608~1612
- 孙颖, 卢彰显, 李建安(2007). 中国油桐栽培利用与应用基础研究进展. 经济林研究, 25 (2): 84~87
- 谭晓风(2006). 油桐的生产现状及其发展建议. 经济林研究, 24 (3): 62~64
- 谭晓风, 李泽, 张琳, 龙洪旭, 袁军, 曾艳玲, 林青(2013). 油桐叶片愈伤组织诱导及植株再生. 植物生理学报, 49 (11): 1245~1249
- 谭小力(2003). 拟南芥长链脂酰辅酶A合成酶基因的克隆及功能鉴定[学位论文]. 陕西杨凌: 西北农林科技大学
- 吴传万, 杜小凤, 王伟中(2004). 植物源抑菌活性成分研究进展. 淮阴工学院学报, 13 (3): 28~31
- 于莉莉, 谭小力, 侯文胜(2011). 大豆长链脂酰辅酶A合成酶基因

- GmLACS*在酵母中的表达. 大豆科学, 30 (5): 719~722
- Babbitt PC, Kenyon GL, Martin BM, Charest H, Slyvestre M, Scholten JD, Chang KH, Liang PH, Dunaway-Mariano D (1992). Ancestry of the 4-chlorobenzoate dehalogenase: analysis of amino acid sequence identities among families of acyl: adenyl ligases, enoyl-CoA hydratases/isomerases, and acyl-CoA thioesterases. *Biochemistry*, 31 (24): 5594~5604
- Black PN, DiRusso CC, Metzger AK (1992). Cloning, sequencing and expression of the *fadD* gene of *Escherichia coli* encoding acyl coenzyme A synthetase. *J Biol Chem*, 267 (35): 25513~25520
- Faergeman NJ, Black PN, Zhao XD, Knudsen J, DiRusso CC (2001). The acyl-CoA synthetases encoded within *FAA1* and *FAA4* in *Saccharomyces cerevisiae* function as components of the fatty acid transport system linking import, activation, and intracellular utilization. *J Biol Chem*, 276 (40): 37051~37059
- Fulda M, Schnurr JA, Abbadi A, Heinz E, Browse JA (2004). Peroxisomal acyl-CoA synthetase activity is essential for seedling development in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell*, 16 (2): 394~405
- Fulda M, Shockey JM, Werber M, Wolter FP, Heinz E (2002). Two long-chain acyl-CoA synthetases from *Arabidopsis thaliana* involved in peroxisomal fatty acid beta-oxidation. *Plant J*, 32 (1): 93~103
- Han XJ, Lu MZ, Chen YC, Zhan ZY, Cui QQ, Wang YD (2012). Selection of reliable reference genes for gene expression studies using real-time PCR in tung tree during seed development. *PLoS ONE*, 7 (8): 1~10
- Hayashi H, De BL, Hayashi Y, Nito K, Kato A, Hayashi M, Hara-Nishimura I, Nishimura M (2002). Molecular characterization of an *Arabidopsis* acyl-coenzyme A synthetase localized on glyoxysomal membranes. *Plant Physiol*, 130 (4): 2019~2026
- He XH, Chen GQ, Kang ST, McKeon TA (2007). *Ricinus communis* contains an acyl-CoA synthetase that preferentially activates ricinoleate to its CoA thioester. *Lipids*, 42 (10): 931~938
- Ichihara K, Kobayashi N, Saito K (2003). Lipid synthesis and acyl-CoA synthetase in developing rice seeds. *Lipids*, 38 (8): 881~884
- Lewin TM, Kim JH, Granger DA, Vance JE, Coleman RA (2001). Acyl-CoA synthetase isoforms 1, 4, and 5 are present in different subcellular membranes in rat liver and can be inhibited independently. *J Biol Chem*, 276 (27): 24674~24679
- Pongdontri P, Hills M (2001). Characterization of a novel plant acyl-CoA synthetase that is expressed in lipogenic tissues of *Brassica napus* L. *Plant Mol Biol*, 47 (6): 717~726
- Schnurr JA, Shockey JM, Browse JA (2004). The acyl-CoA synthetase encoded by *LACS2* essential for normal cuticle development in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 16 (3): 629~642
- Schnurr JA, Shockey JM, de Boer GJ, Browse JA (2002). Fatty acid export from the chloroplast. Molecular characterization of a major plastidial acyl-coenzyme A synthetase from *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 129 (4): 1700~1709
- Shen B, Sinkevicius KW, Selinger DA, Tarczynski MC (2006). The homeobox gene *GLABRA2* affects seed oil content in *Arabidopsis*. *Plant Mol Biol*, 60 (3): 377~387
- Shockey JM, Fulda M, Browse JA (2002). *Arabidopsis* contains nine long-chain acyl-coenzyme a synthetase genes that participate in fatty acid and glycerolipid metabolism. *Plant Physiol*, 129 (4): 1710~1722
- Shrago E (2000). Long chain acyl-CoA as a multi-effector ligand in cellular metabolism. *J Nutr*, 130 (2): 290~293
- Wang XL, Li XB (2009). The *GhACS1* gene encodes an acyl-CoA synthetase which is essential for normal microsporogenesis in early anther development of cotton. *Plant J*, 57 (3): 473~486
- Watkins PA (1997). Fatty acid activation. *Prog Lipid Res*, 36 (1): 55~83