



油用牡丹 Δ^9 -硬脂酰-ACP 脱氢酶(SAD) 生物信息学分析

侯晓宇,尚宏芹,刘梦迪,郭梦露,高昌勇

(菏泽学院 牡丹学院/生理生化及应用山东省高校重点实验室,山东 菏泽 274015)

摘要: Δ^9 -硬脂酰-ACP 脱氢酶(stearoyl-ACP desaturase, SAD)是控制植物油脂中饱和与不饱和脂肪酸比例的关键酶之一。利用生物信息学在线工具,对油用牡丹—凤丹(*Paeonia ostii*) Po-SAD 的氨基酸序列特征、理化性质、二硫键、磷酸化位点、高级结构进行预测,并利用 MEGA6.0 构建了不同植物 SAD 分子进化树。结果表明:Po-SAD 蛋白在相对分子量、理论 pI 与芍药、拟南芥的 SAD 相近,属于稳定的、可溶性蛋白。二级结构包括 α 螺旋(40.91%)、延伸串(12.37%)和不规则卷曲(46.72%),Po-SAD 含有 35 个磷酸化位点和 6 个糖基化位点,亚细胞定位在质体中。进化树分析表明,凤丹 Po-SAD 与芍药的高度同源且亲缘关系最近。

关键词: 油用牡丹;凤丹; Δ^9 -硬脂酰-ACP 脱氢酶(SAD);生物信息学分析

近年来,牡丹作为一种新兴的木本油料作物,越来越受到业内人士的关注^[1]。研究表明,牡丹籽油中,亚麻酸、亚油酸、油酸等对人体健康有益的不饱和脂肪酸含量达 90% 以上,特别是人体必需脂肪酸 α -亚麻酸(ω -3)含量高达 40%^[2-4]。植物中脂肪酸脱氢酶的种类与数量决定了其所含的不饱和脂肪酸的组成与含量。质体中, Δ^9 -硬脂酰-ACP 脱氢酶(stearoyl-ACP desaturase, SAD)将硬脂酰-ACP(18:0)的脂肪酸碳链在 9C-10C 间催化脱氢,分子中生成一个顺式双键,合成油酰-ACP(18:1),是植物中控制不饱和脂肪酸生物合成的关键酶^[5]。合成的油酸是植物体内亚油酸(18:2)(ω -6)、亚麻酸(18:3)等人体必需脂肪酸生物合成的前体物质^[6],因此,SAD 是决定植物油脂中不饱和脂肪酸总量、成分以及饱和脂肪酸与不饱和脂肪酸比例的关键酶之一^[5,7-8]。

目前,在许多植物中,如,拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)^[8]、大豆(*Glycine max* (Linn.) Merr)^[9]、油菜(*Brassica napus*)^[10]、花生(*Arachis hypogaea* Linn)^[11]等已经分离、克隆到

SAD,大量研究表明 SAD 在大多数高等植物中的表达呈现组织特异性,种子发育过程中的表达量比其他组织都高^[8,12-14]。前期试验结果显示,油用牡丹—凤丹(*Paeonia ostii*) SAD (Po-SAD)在发育种子中高表达,预示着 Po-SAD 在油用牡丹种子油脂合成与积累过程中发挥重要作用。研究人员通过超标达^[15]与沉默表达^[16]分析证实了该基因在植物油脂中不饱和脂肪酸生物合成过程中发挥着关键的作用。油用牡丹作为发展前景广阔的重要木本油料植物资源,目前国内外关于油用牡丹的研究主要集中在栽培、成分分析、药理及相关功能产品开发等方面,而对油用牡丹的分子生物学研究相对较少,尤其是对油脂中不饱和脂肪酸高效合成关键基因的生物学功能等决定其优异品质的重要环节缺乏相应的研究,国内外对于油用牡丹脂肪酸脱氢酶的分子作用机制等鲜有报道^[17]。目前,凤丹牡丹是油用牡丹的主要栽培品种,具有耐寒抗旱、适应力强、株型高大、结实率好等优点^[4,18-19],山东省菏泽市是全国主要的生产栽培与种苗培育基地之一。

本文以油用牡丹—凤丹 Po-SAD 酶为研究对象,利用生物信息学工具分析、预测该蛋白结构、理化性质等特征,为全面解析油用牡丹种子高水平合成积累 α -亚麻酸等不饱和脂肪酸的分子机理,以及后续高效定向遗传改良植物籽油脂脂肪酸成分提供理论基础。

收稿日期:2018-03-02

基金项目: 山东省“十三五”高等学校重点实验室资助项目;生理生化及应用实验室资助项目;山东省自然科学基金资助项目(ZR2015CL008);菏泽学院博士基金资助项目(XY17BS07);菏泽学院培育资助项目(XY17PY03)。

第一作者简介: 侯晓宇(1999-),女,在读学士,从事植物生物技术研究。E-mail:1870841586@qq.com。

通讯作者: 高昌勇(1976-),男,博士,副教授,从事植物油脂代谢工程、植物生物技术研究。E-mail:sxnydx@126.com。

1 材料与方法

1.1 凤丹硬脂酰脱氢酶鉴定及理化性质分析

从 NCBI 中下载凤丹 Po-SAD 编码序列(CDS)及其蛋白序列:KX078474. 1 和 ANU06063. 1。利用 NCBI 中的 CDD(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/structure/cdd/wrpsb.cgi>)库中鉴定凤丹的 Po-SAD 蛋白序列的保守域结构,准确确定是硬脂酰脱氢酶。Po-SAD 蛋白的氨基酸组成、相对分子量与等电点等理化性质应用 ExPasy 网站提供的 ProtParam 工具(<http://web.expasy.org/prot-param>)分析。

1.2 凤丹 Po-SAD 蛋白序列的一级结构分析

分别利用在线 DiANNA(<http://clavius.bc.edu/~clotelab/DiANNA>)和 CBS 工具(<http://www.cbs.dtu.dk/services>)预测分析 Po-SAD 蛋白序列中二硫键的分布和蛋白中磷酸化位点(<http://www.cbs.dtu.dk/services/Net-Phos>)和 β -O-葡萄糖基化位点(<http://www.cbs.dtu.dk/services/YinOYang/>)。Po-SAD 蛋白序列的跨膜区域、疏水区域和信号肽区分析预测分别利用 TMHMM(<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM>)、ProtScale(<http://web.expasy.org/protscale/>)及 Signal P(<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP>)等在线工具进行。

1.3 Po-SAD 蛋白高级结构预测分析

Po-SAD 蛋白序列的二级结构利用 PBIL-LYON-ERLAND(https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_hnn.html)在线工具进行预测分析。三级结构利用 Phyre2 网站(<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/html/page.cgi?id=index>)的在线工具,采用 Intensive 模式的同源建模法进行预测分析。

1.4 蛋白序列保守域鉴定及其系统发育关系

利用软件 DNAMAN 对 Po-SAD 和其它物种的 11 种蛋白序列进行多序列比对,分析其序列的保守性。在此基础上,运用 MEGA6.0 多序列比对软件对上述序列进行多序列比对,采用邻接法(Neighbor-Joining,NJ)构建系统发育树,其中自举检验值设置为 1000 个循环^[20]。

2 结果与分析

2.1 Po-SAD 理化性质分析

利用 ExPASy 网站 protparam 工具对 Po-

SAD 进行理化性质分析。结果表明,该蛋白由 20 种氨基酸构成,其中含量最高的氨基酸有 Leu、Glu、Ala,含量最少的为 Cys、Trp、His。Po-SAD 分子量为 45.13 kD(表 1),理论等电点 pI=5.86,在 280 nm 时消光系数分别为 56 630,不稳定系数 37.21。Po-SAD 的脂肪系数是 78.81,总的平均亲水性为-0.459,属于稳定的可溶性蛋白。这些理化特点与拟南芥、芍药的 SAD(拟南芥 Δ^9 -硬脂酰-ACP 脱氢酶为 At-SAD,芍药的 Δ^9 -硬脂酰-ACP 脱氢酶为 Pl-SAD)很相似。

表 1 凤丹 Po-SAD 蛋白理化性质分析

Table 1 Physical and chemical properties of Po-SAD protein analysis in *Paeonia ostii*

蛋白名称 Protein name	Po-SAD	Pl-SAD	At-SAD
蛋白长度/aa Number of amino acids	396	395	401
相对分子量/kD Molecular weight	45.13	45.06	45.69
理论等电点 Theoretical pI	5.86	5.63	6.05
不稳定系数 Instability index	37.21	37.49	36.08
是否稳定 stabilizes or not.	是	是	是
脂肪系数 Aliphatic index	78.81	80.25	75.94
总平均亲水性指数 Grand average of hydropathicity (GRAVY)	-0.459	-0.421	-0.532
Genbank accession	ANU06063.1	AHY24225.1	AAB64035.1

2.2 Po-SAD 一级结构分析

2.2.1 Po-SAD 二硫键分析 Po-SAD 二硫键分析结果显示,该蛋白分子中可能形成 2 个二硫键,位于第 130-361 位的分值最高,分值为 0.999 74,在第 2 号 α 螺旋和 4 号 α 螺旋之间形成二硫键($\alpha 2 \sim \alpha 4$),与芍药 Pl-SAD 的二硫键预测结果很接近,二者都比拟南芥 At-SAD 多一个二硫键(表 2)推测此类蛋白质体内中弯曲折叠程度低,有利于更好地结合底物,发挥其催化脱氢作用。

表 2 Po-SAD 二硫键分析

Table 2 The disulfide bond analysis of SAD in *Paeonia ostii*

蛋白名称 Protein name	二硫键位置 Position of disulfide bond	连接的螺旋 Connection of helix	序列位置 The position of sequence	最高分值 The highest score
Po-SAD	94 - 255	α 1- α 3	KPVEKCWQPQD-NLAQICGTIAS	0.99974
	130 - 361	α 2- α 4	DDYFVCLVGDM-AQDYVCGLAPR	
Pl-SAD	93 - 254	α 1- α 3	KPVEKCWQPQD-NLAQICGHAS	0.99975
	129 - 360	α 2- α 4	DDYFVCLVGDM-AQDYVCGLAPR	
At-SAD	34 - 366	α 1- α 3	SPKFLCLASSS-AQDYLCGLAPR	0.99965

2.2.2 Po-SAD 磷酸化位点和糖基化位点预测与分析 磷酸化位点预测结果显示,Po-SAD、Pl-SAD 与 At-SAD 三种 SAD 蛋白具有同样多的磷酸化位点数,并且比例也相差不多。其中,Po-SAD 蛋白磷酸化位点有 35 个,丝氨酸激酶(Ser)、苏氨酸激酶(Thr)与酪氨酸激酶(Tyr)磷酸化位点数分别有 19、12 与 4 个(表 3),说明磷酸化位点修饰对 Po-SAD 结构或功能非常重要,这些磷酸化修饰位点也可能参与该蛋白活性的调控。其中,Ser 磷酸化位点主要在 N 端分布比较密集,Thr 磷酸化位点主要分布在在肽链中部,4 个 Tyr 磷酸化位点分布比较均匀(图 1)。

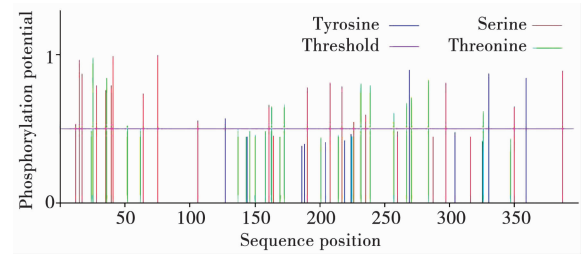


图 1 风丹 Po-SAD 蛋白磷酸化位点分布

Fig.1 Phosphorylation sites analysis of Po-SAD in *Paeonia ostii*

β -O-葡萄糖基化位点预测结果表明,Po-SAD 含有 6 个 β -O-葡萄糖基化位点,其中 Ser 2 个,Thr 4 个。Yin-O-Yang 位点 1 个:Thr 25,该位点在不同时期可逆地、动态地被磷酸化或 β -O-葡萄糖基化表观修饰,推测该位点在调控 Po-SAD 蛋白功能时可能发挥重要作用。

预测发现,Po-SAD 蛋白在 N-端具有 30 aa 长的转运肽,预示着蛋白在内质网合成后,在转运肽的引导下进入质体发挥催化作用,与亚细胞定位预测该蛋白位于叶绿体的预测结果相一致。

2.3 Po-SAD 高级结构分析

通过 PBILLYON-ERLAND 网站对 Po-SAD 二级结构预测(如图 2),发现在 Po-SAD、Pl-SAD

与 At-SAD 3 种蛋白仅含有 α 螺旋、延伸串和不规则卷曲三种类型的二级结构,这 3 种二级结构在 SAD 蛋白中所占比例相差不多,其中 α 螺旋、延伸串和不规则卷曲在 Po-SAD 中所占比例分别为 40.91%、12.37%和 46.72%。Po-SAD 不存在明显的跨膜结构特征,为可溶性蛋白。

表 3 Po-SAD 蛋白磷酸化位点分析

Table 3 Phosphorylation sites analysis of Po-SAD in *Paeonia ostii*

蛋白名称 Protein name	磷酸化位点数 Phosphorylationsite numbers	最高得分及位置 Highest score and location
Po-SAD	Ser19	35 0.993
	Thr12	0.981
	Tyr4	0.893
Pl-SAD	Ser20	35 0.987
	Thr11	0.990
	Tyr4	0.893
At-SAD	Ser21	35 0.994
	Thr11	0.802
	Tyr3	0.893

蛋白质保守结构经 NCBI 的 protein blast 功能、CD-Search 工具及 Cn3D 4.1 软件分析预测表明:Po-SAD 以同型二聚体形式存在,含一个属于类铁蛋白家族和属于酰基 ACP 脱氢酶家族的保守结构域。一个由 2 个铁原子组成的二铁中心埋藏于 SAD 保守区的 4 个螺旋结构中,Fe 原子的 6 个配基即是四螺旋束的 6 个氨基酸的侧链或其基团,两个铁原子的配基分别是:E239、H285 和 E148、H189,两个铁原子的桥连配基为 E186、E282。一个氧原子将两铁原子相联,形成非常对称的 Fe-O-Fe 二铁氧簇结构。SAD 每个亚基表面有 33 个多肽连接位点。推断底物的结合位点包括 14 个氨基酸的侧链或其基团(图 3)。此二铁中心及

四螺旋束的氨基酸侧链形成 SAD 活性中心。

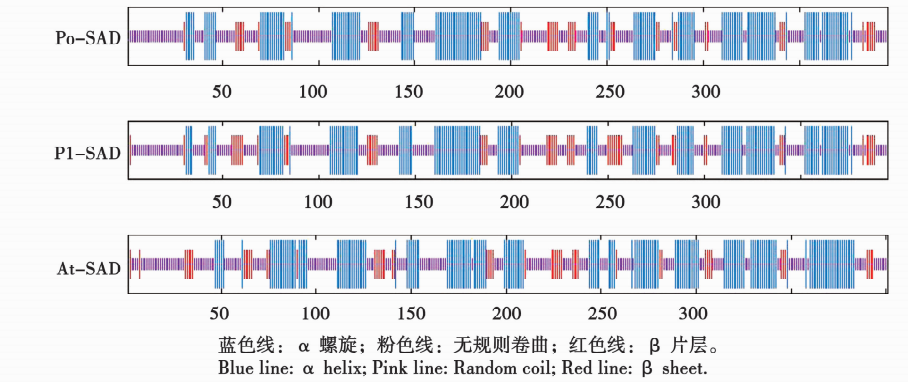


图 2 Po-SAD 二级结构预测
Fig. 2 The second structure prediction of Po-SAD

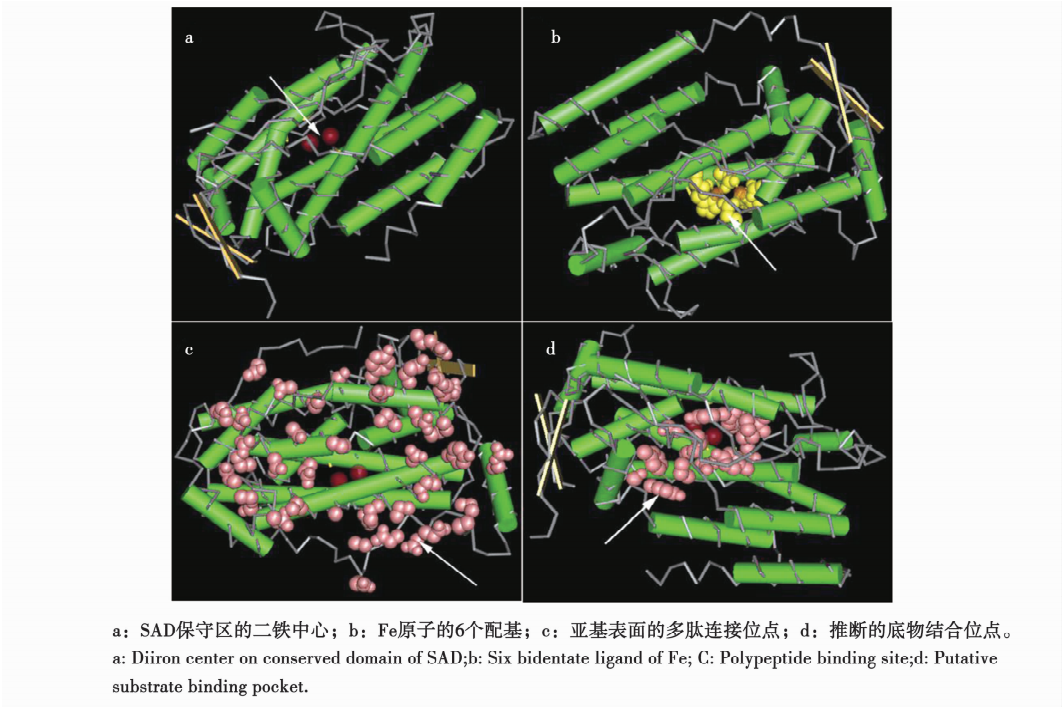


图 3 凤丹 Po-SAD 理论三维结构
Fig. 3 Theoretical three-dimensional structure of Po-SAD

将 Po-SAD 与 NCBI 蛋白数据库中注册的其他油料作物 SAD 的氨基酸序列比对,结果表明,凤丹 Po-SAD 与芍药、木油桐(*Vernicia montana*)、文冠果(*Xanthoceras sorbifolium*)、油菜(*Brassica napus*)、拟南芥、亚麻荠(*Camelina sativa*)、向日葵(*Helianthus annuus*)和水稻(*Oryza sativa* Japonica Group)间 SAD 氨基酸序列同源性依次为 98.2%、88.9%、87.4%、84.0%、83.5%、82.8%、82.1%和 75.8%。Po-SAD 与其他物种的 SAD 具有很高的同源性,所有 SAD 的核心区段几乎完全相同,仅在起始密码子和终止

密码子附件有较大差异(图 4)。说明 SAD 在进化比较保守,其功能对植物的生长发育很重要。在多序列比对的基础上绘制系统发育树聚类分析表明,单子叶的水稻与其它双子叶植物分为两大支。凤丹 SAD 与同科的芍药的亲缘关系最近,并与文冠果聚为一类,又与乌桕与木油桐聚为一大类,这一大类为多年生木本植物(芍药为多年生草本)。而双子叶中的一年生草本植物聚为另一类。聚类分析结果与各物种在经典分类学上的地位相一致(图 5)。

Po	MAIKI.NPI.PF.QSQKSI.SFGI.PPMTTIRSPRV.FMASTI...RSGSKEVRNKKKPTTREVHVQVTHSMFPKQKTRTFKSLRDM	79
Pl	MALKLPLPF.QSQKSLSFGLPPMTTIRSPRV.FMASTI...RSGSMEVENLKKPFTTREVHVQVTHSMFPKQKTRTFKSLRDM	78
At	MALKFNPLVASQPYKFPSSRPTTFSRSPKFLCLASS.PALSSGPKVESIKKPTTREVHVQVTHSMFPKQKTRTFKSLRDM	84
Cs	MALKFNPLVASQPYKFPSSRPTTFSRSPKFLCLASS.PALSSGAKVESIKKPTTREVHVQVTHSMFPKQKTRTFKSLRDM	84
Vm	MALKLNPIFS.QSQKFSFALPFPANLRSKPF.YMASTI...RSGSKEIEHLKKPFTTREVHVQVTHSMFPKQKTRTFKSLRDM	79
Os	MAFAASTAG...PYSCGGVQARRSNGMSKVMMASTI...NRVKTAKKTYTREVHVQVTHSMFPKQKTRTFKSLRDM	73
Ts	MALKFNPIFS.QPKT.PSFAI.PPMANITRSPRV.YMASTI...KSGSKEVRNKKKPTTREVHVQVTHSMFPKQKTRTFKSLRDM	79
Ha	MAKRINPATF.QSDMYRSFAFPQPKPLRSKPF.AMASTIG...SATTKVESTKKPTTREVHVQVTHSMFPKQKTRTFKSLRDM	79
Xs	MALKFSPFAT.QTKFSPFATLQPMASLRSPKFSMMASTL...RNSKEVENKKKPTTREVHVQVTHSMFPKQKTRTFKSLRDM	80
Bn	MALKFNPLVS.QPYKLASSARPVSTFRSPKFLCLASSSSPALSS..KEVESIKKPTTREVHVQVTHSMFPKQKTRTFKSLRDM	82
Po	AEONITITHLKPEVKQKQDFDLPPDASDGFEEQKELRERARELPDDYFVVLVGDMMTEALPTYQTMINTLDGVRDETGA	164
Pl	AEONITITHLKPEVKQKQDFDLPPDASDGFEEQKELRERARELPDDYFVVLVGDMMTEALPTYQTMINTLDGVRDETGA	163
At	AEONITITHLKPEVKQKQDFDLPPDASDGFEEQKELRERARELPDDYFVVLVGDMMTEALPTYQTMINTLDGVRDETGA	169
Cs	AEONITITHLKPEVKQKQDFDLPPDASDGFEEQKELRERARELPDDYFVVLVGDMMTEALPTYQTMINTLDGVRDETGA	169
Vm	AEONITITHLKPEVKQKQDFDLPPDASDGFEEQKELRERARELPDDYFVVLVGDMMTEALPTYQTMINTLDGVRDETGA	164
Os	AEONITITHLKPEVKQKQDFDLPPDASDGFEEQKELRERARELPDDYFVVLVGDMMTEALPTYQTMINTLDGVRDETGA	158
Ts	AEONITITHLKPEVKQKQDFDLPPDASDGFEEQKELRERARELPDDYFVVLVGDMMTEALPTYQTMINTLDGVRDETGA	164
Ha	AEONITITHLKPEVKQKQDFDLPPDASDGFEEQKELRERARELPDDYFVVLVGDMMTEALPTYQTMINTLDGVRDETGA	164
Xs	AEONITITHLKPEVKQKQDFDLPPDASDGFEEQKELRERARELPDDYFVVLVGDMMTEALPTYQTMINTLDGVRDETGA	165
Bn	AEONITITHLKPEVKQKQDFDLPPDASDGFEEQKELRERARELPDDYFVVLVGDMMTEALPTYQTMINTLDGVRDETGA	167
Po	WAWWTRAWTAENRHGDLINKLYLSGRVDMROTEKTIQYILGSGMDRTEENPYLGLIYTSFQERATFISHGNTARQAKHSDGL	249
Pl	WAWWTRAWTAENRHGDLINKLYLSGRVDMROTEKTIQYILGSGMDRTEENPYLGLIYTSFQERATFISHGNTARQAKHSDGL	248
At	WAWWTRAWTAENRHGDLINKLYLSGRVDMROTEKTIQYILGSGMDRTEENPYLGLIYTSFQERATFISHGNTARQAKHSDGL	254
Cs	WAWWTRAWTAENRHGDLINKLYLSGRVDMROTEKTIQYILGSGMDRTEENPYLGLIYTSFQERATFISHGNTARQAKHSDGL	254
Vm	WAWWTRAWTAENRHGDLINKLYLSGRVDMROTEKTIQYILGSGMDRTEENPYLGLIYTSFQERATFISHGNTARQAKHSDGL	249
Os	WAWWTRAWTAENRHGDLINKLYLSGRVDMROTEKTIQYILGSGMDRTEENPYLGLIYTSFQERATFISHGNTARQAKHSDGL	243
Ts	WAWWTRAWTAENRHGDLINKLYLSGRVDMROTEKTIQYILGSGMDRTEENPYLGLIYTSFQERATFISHGNTARQAKHSDGL	249
Ha	WAWWTRAWTAENRHGDLINKLYLSGRVDMROTEKTIQYILGSGMDRTEENPYLGLIYTSFQERATFISHGNTARQAKHSDGL	249
Xs	WAWWTRAWTAENRHGDLINKLYLSGRVDMROTEKTIQYILGSGMDRTEENPYLGLIYTSFQERATFISHGNTARQAKHSDGL	250
Bn	WAWWTRAWTAENRHGDLINKLYLSGRVDMROTEKTIQYILGSGMDRTEENPYLGLIYTSFQERATFISHGNTARQAKHSDGL	252
Po	NLAQICGIIASDEKRHETAYTKIVEKLEIFIDPDTVMASDMMRKKISMPAHLMYDGRDNLFENFSAVAQRLGVYTAQDYADIL	334
Pl	NLAQICGIIASDEKRHETAYTKIVEKLEIFIDPDTVMASDMMRKKISMPAHLMYDGRDNLFENFSAVAQRLGVYTAQDYADIL	333
At	NLAQICGIIASDEKRHETAYTKIVEKLEIFIDPDTVMASDMMRKKISMPAHLMYDGRDNLFENFSAVAQRLGVYTAQDYADIL	339
Cs	NLAQICGIIASDEKRHETAYTKIVEKLEIFIDPDTVMASDMMRKKISMPAHLMYDGRDNLFENFSAVAQRLGVYTAQDYADIL	339
Vm	NLAQICGIIASDEKRHETAYTKIVEKLEIFIDPDTVMASDMMRKKISMPAHLMYDGRDNLFENFSAVAQRLGVYTAQDYADIL	334
Os	NLAQICGIIASDEKRHETAYTKIVEKLEIFIDPDTVMASDMMRKKISMPAHLMYDGRDNLFENFSAVAQRLGVYTAQDYADIL	328
Ts	NLAQICGIIASDEKRHETAYTKIVEKLEIFIDPDTVMASDMMRKKISMPAHLMYDGRDNLFENFSAVAQRLGVYTAQDYADIL	334
Ha	NLAQICGIIASDEKRHETAYTKIVEKLEIFIDPDTVMASDMMRKKISMPAHLMYDGRDNLFENFSAVAQRLGVYTAQDYADIL	334
Xs	NLAQICGIIASDEKRHETAYTKIVEKLEIFIDPDTVMASDMMRKKISMPAHLMYDGRDNLFENFSAVAQRLGVYTAQDYADIL	335
Bn	NLAQICGIIASDEKRHETAYTKIVEKLEIFIDPDTVMASDMMRKKISMPAHLMYDGRDNLFENFSAVAQRLGVYTAQDYADIL	337
Po	EFVLGRWKVENITGLSGEGKKAQDYVCGAPRIKREERAAGRAKQGPVIFFSWIFDRQWQ	395
Pl	EFVLGRWKVENITGLSGEGKKAQDYVCGAPRIKREERAAGRAKQGPVIFFSWIFDRQWQ	394
At	EFVLGRWKQIDITGLSGEGKKAQDYVCGAPRIKREERAAGRAKQGPVIFFSWIFDRQWQ	400
Cs	EFVLGRWKQIDITGLSGEGKKAQDYVCGAPRIKREERAAGRAKQGPVIFFSWIFDRQWQ	400
Vm	EFVLGRWKVDKITGLSGEGKKAQDYVCGAPRIKREERAAGRAKQGPVIFFSWIFDRQWQ	395
Os	EFVLGRWKVDKITGLSGEGKKAQDYVCGAPRIKREERAAGRAKQGPVIFFSWIFDRQWQ	389
Ts	EFVLGRWKVDKITGLSGEGKKAQDYVCGAPRIKREERAAGRAKQGPVIFFSWIFDRQWQ	395
Ha	EFVLGRWKVDKITGLSGEGKKAQDYVCGAPRIKREERAAGRAKQGPVIFFSWIFDRQWQ	395
Xs	EFVLGRWKVDKITGLSGEGKKAQDYVCGAPRIKREERAAGRAKQGPVIFFSWIFDRQWQ	396
Bn	EFVLGRWKVDKITGLSGEGKKAQDYVCGAPRIKREERAAGRAKQGPVIFFSWIFDRQWQ	398

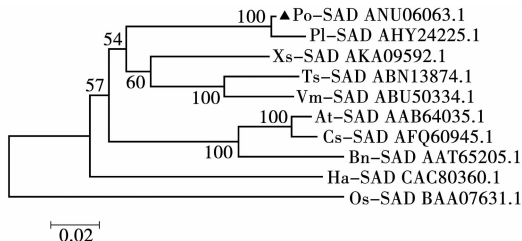
Po: 凤丹; Pl: 芍药; At: 拟南芥; Cs: 亚麻荠; Vm: 木油桐; Os: 水稻; Ts: 乌柏; Ha: 向日葵; Xs: 文冠果; Bn: 甘蓝型油菜。

“.”表示该处氨基酸残基缺失; 阴影标注表示该处氨基酸完全相同。

Po: *Paconia ostii*; Pl: *Paconia lactiflora*; At: *Arabidopsis thaliana*; Cs: *Camelina sativa*; Vm: *Vernicia montana*; Os: *Oryza sativa Japonica Group*; Ts: *Triadica sebifera*; Ha: *Helianthus annuus*; Xs: *Xanthoceras sorbifolium*; Bn: *Brassica napus*. “.” represents absences of amino acids residual, shading indicates that the amino acids are identical.

图 4 凤丹与主要油料作物 SAD 氨基酸序列比较

Fig. 4 Alignment of Po-SAD and other SAD of major oil plants based on amino acid sequence



Po: 凤丹; Pl: 芍药; At: 拟南芥; Cs: 亚麻荠; Vm: 木油桐; Os: 水稻; Ts: 乌柏; Ha: 向日葵; Xs: 文冠果; Bn: 甘蓝型油菜。
Po: *Paconia ostii*; Pl: *Paconia lactiflora*; At: *Arabidopsis thaliana*; Cs: *Camelina sativa*; Vm: *Vernicia montana*; Os: *Oryza sativa Japonica Group*; Ts: *Triadica sebifera*; Ha: *Helianthus annuus*; Xs: *Xanthoceras sorbifolium*; Bn: *Brassica napus*.

图 5 Po-SAD 与其它主要油料作物 SAD 蛋白的系统发育树
Fig. 5 Phylogenetic tree of Po-SAD protein and other biological SAD protein

3 结论与讨论

本文分别以 Pl-SAD 与 At-SAD 为参照, 利用生物信息学工具对凤丹 Po-SAD 蛋白序列做了较为全面的预测分析, 结果表明, Po-SAD 为含有质体转运肽的、在质体中发挥催化作用的的可溶性蛋白。分析发现, Po-SAD 中二硫键数目较少, 具有多个磷酸化和糖基化修饰位点, 这些特点与 Pl-SAD、At-SAD 蛋白一致, 推测该蛋白在细胞内活性较强, 表明其在细胞代谢过程中发挥着重要作用。研究人员应用 X-射线晶体衍射研究测定

了蓖麻 SAD 的晶体结构^[5],采用同源建模法构建了油茶 SAD 的三维结构^[21],结果两种 SAD 均为同型二聚体,亚基含有 11 个 α -螺旋,其中 9 个 α -螺旋形成一个反平行螺旋束,该螺旋束上的 4 个 α -螺旋与 Fe^{2+} 共同形成 SAD 的活性中心。这与本文研究结果一致, Po-SAD 存在同样的同型二聚体亚基结合位点和底物作用位点,具有植物 SAD 的空间结构特征。研究结果为凤丹 SAD 功能在蛋白水平上深入研究奠定了基础。

SAD 是高等植物中生物合成脂肪酸的关键酶, SAD 在质体将硬脂酰-ACP(18:0)催化合成油酰-ACP(18:1)。拟南芥、大豆、花生等很多植物中已经分离、克隆到 SAD,有了较深入的研究。凤丹作为一种新型的油料作物,牡丹籽油于 2011 年被卫生部批准为新资源食品, Po-SAD 的研究鲜有报道,本文得到的 Po-SAD 生物信息学结果,进一步研究该基因的表达、调控方式、牡丹籽油脂脂肪酸合成分子机制、分子辅助育种等奠定基础。

参考文献:

- [1] 李育才. 中国油用牡丹工程的战略思考[J]. 中国工程科学, 2014, 16(10): 58-63.
- [2] 张延龙, 韩雪源, 牛立新, 等. 9 种野生牡丹籽油主要脂肪酸成分分析[J]. 中国粮油学报, 2015, 30(4): 72-76.
- [3] 韩继刚, 李晓青, 刘焰胡, 等. 牡丹油用价值及其应用前景[J]. 粮食与油脂, 2014, 27(5): 21-25.
- [4] 林萍, 姚小华, 曹永庆, 等. 油用牡丹‘凤丹’果实性状及其脂肪酸组分的变异分析[J]. 经济林研究, 2015, 33(1): 67-72.
- [5] Lindqvist Y, Huang W, Schneider G, et al. Crystal structure of delta9 stearoyl-acyl carrier protein desaturase from castor seed and its relationship to other di-iron proteins[J]. EMBO Journal, 1996, 15(16): 4081-4092.
- [6] 宋淑香, 郭先锋, 马燕, 等. 凤丹(*Paonia ostii*)脂肪酸去饱和酶基因 PoFAD2 的克隆及表达分析[J]. 园艺学报, 2016, 43(2): 347-355.
- [7] 石磊, 苗利娟, 齐飞艳, 等. 花生 $\Delta 9$ -硬脂酰-ACP 脱氢酶基因启动子的克隆及功能分析[J]. 作物学报, 2016, 42(11): 1629-1637.
- [8] Kachroo A, Shanklin J, Whittle E, et al. The Arabidopsis stearoyl-acyl carrier protein-desaturase family and the contribution of leaf isoforms to oleic acid synthesis[J]. Plant Mol Biol, 2007, 63: 257-271.
- [9] Zhang P, Burton J W, Upchurch R G, et al. Mutations in a Δ^9 -Stearoyl-ACP-Desaturase gene are associated with enhanced stearic acid levels in soybean seeds[J]. Crop Science, 2008, 48: 2305-2313.
- [10] 贾艳丽, 吴磊, 卢长明. 甘蓝型油菜 $\Delta 9$ 硬脂酰 ACP 脱氢酶(SAD)基因的克隆与表达分析[J]. 中国油料作物学报, 2014, 36(2): 135-141.
- [11] 东金玉, 万勇善, 刘凤珍. 花生 $\Delta 9$ -硬脂酰-ACP 脱氢酶基因(SAD)的序列分析[J]. 作物学报, 2013, 38(7): 1167-1177.
- [12] Zaborowska Z, Starzycki M, Femiak I, et al. Yellow lupine gene encoding stearoyl-ACP desaturase organization, expression and potential application[J]. Acta Biochimica Polonica, 2002, 49(1): 29-42.
- [13] Chen M, Ren Z, Chi X, et al. Isolation, characterization and expression analysis of stearoyl-ACP desaturase gene from *Kosteletzkya virginica* [J]. International Conference on Bioinformatics & Biomedical Engineering, 2010, 4: 1-5.
- [14] Zhao N, Zhang Y, Li Q, et al. Identification and expression of a stearoyl-ACP desaturase gene responsible for oleic acid accumulation in *Xanthoceras sorbifolia* seeds[J]. Plant Physiol Biochem, 2015, 87: 9-16.
- [15] Craig W, Lenzi P, Scotti N, et al. Transplastomic tobacco plants expressing a fatty acid desaturase gene exhibit altered fatty acid profiles and improved cold tolerance[J]. Transgenic Res, 2008, 17: 769-782.
- [16] Liu Q, Singh S P, Green A G. High-steric and oleic cottonseed oils produced by hairpin RNA-mediated post-transcriptional gene silencing[J]. Plant Physiology, 2002, 129(4): 1-12.
- [17] 黄兴琳, 陆俊杏, 廖冰楠, 等. 油用牡丹脂肪酸脱氢酶基因 FAD3 的克隆与表达分析[J]. 中国农业科学, 2017, 50(10): 1914-1921.
- [18] 周志钦, 潘开玉, 洪德元. 牡丹组野生种间亲缘关系和栽培牡丹起源研究进展[J]. 园艺学报, 2003, 30(6): 751-757.
- [19] Huliang C, Fangyun C, Liping P. Determination of the fatty acid composition in tree peony seeds using near-infrared spectroscopy[J]. Journal of the American Oil Chemists' Society, 2016, 93(7): 943-952.
- [20] 刘宝玲, 孙岩, 高昌勇, 等. 亚麻荠 FAD2-1 和 FAD3-1 编码蛋白的生物信息学分析[J]. 山西农业大学学报: 自然科学版, 2016, 36(4): 242-250.
- [21] 张党权, 谭晓风, 陈鸿鹏, 等. 油茶 SAD 基因的全长 cDNA 克隆及生物信息学分析[J]. 林业科学, 2008, 44(2): 155-159.

Bioinformatics Analysis of Δ^9 -stearoyl-ACP Desaturase(SAD) in *Paeonia ostii*

HOU Xiao-yu, SHANG Hong-qin, LIU Meng-di, GUO Meng-lu, GAO Chang-yong

(Paeon College, Heze University/Shandong Universities Key Laboratory of Physiology, Biochemistry and Application, Heze 274015, China)

Abstract: Δ^9 -stearoyl-ACP desaturase(SAD) is the key enzyme regulating the ratio of saturated and unsaturated fatty acid in plant. In the present paper, bioinformatics tools were employed to characterize SAD proteins in *Paeonia ostii*, including physicochemical properties, disulfide, phosphorylation sites, subcellular localization, advanced 3D structure. And molecular phylogenetic tree of SAD from different plant were constructed by MEGA 6.0 software. The results showed that the molecular weight and theoretical pI of Po-SAD were similar to the *Arabidopsis thaliana* and *Paeonia lactiflora* SADs, belonging to stable, soluble protein. The secondary structure of Po-SAD protein contained 40.91% α helices, 12.37% extended strand, 46.72% random coil, and contained 35 phosphorylation sites, 6 β -O-glycosylation sites. Prediction of subcellular localization showed that Po-SAD located in chloroplast. Analysis of molecular phylogenetic tree showed that the Po-SAD was highly homologous and close to *Paeonia lactiflora*. All these results provide a scientific reference for understanding the molecular mechanism underlying lipid biosynthesis and special fatty acid high accumulation in oil peony seeds.

Keywords: oil peony; *Paeonia ostii*; Δ^9 -stearoyl-ACP desaturase(SAD); bioinformatics analysis

(上接第 18 页)

3 讨论与结论

枣的成熟期出现的较大降水或连阴雨,是影响枣裂果的主要气象因子,造成植株环境相对湿度过高、日照时数偏低、蒸发减少,致使大量水分被果皮吸收发生裂果,影响枣果品质。

枣裂果是因枣果直接吸收雨水为主,还是由根系吸水传送至果实引起裂果为主,从该项目的试验结果来看,认为二者都是引起裂果的主要因

素,但以前者为主。

在生长季干旱时及时浇水,保持土壤湿润,土壤湿度变化小可以降低裂果率。长时间干旱突然降雨导致裂果严重。

参考文献:

[1] 王芝学,杨丽芳,朱庆善. 天津地区枣裂果原因初探[J]. 中国果树, 2007(1): 34-35.
[2] 沈佳. 绝招防裂果[N]. 山西日报, 2017-05-18(015).
[3] 王艳. 设施灵武长枣果实裂果特性与防控技术研究[D]. 银川: 宁夏大学, 2017.

Research on Ningxia Meteorological Early Warning of Chinese Jujube Fruit

ZHANG Yu-lan^{1,2}, LIU Jing¹, TAN Hua¹, HUANG Wen-yan¹

(1. Key Laboratory of Meteorological Disaster of Ningxia, Ningxia 750002, China; 2. Meteorological Bureau of Ningxia, Ningxia 750002, China)

Abstract: In order to establish meteorological early warning method and disaster prevention and mitigation measures of Ningxia jujube fruit cracking, taking Ningxia Jujube as test material, we studied the relationship between jujube fruit cracking and meteorological conditions, by 4 methods field contrast experiment and investigation, such as canopy, bagging, film covering and natural state, and the way the investigation. The results showed that in mid to late September, the more the number of rainy days, the greater air humidity, and the lower the temperature, the more higher the rate of jujube fruit in Ningxia. In jujube mature, rain-proof measures could reduce fruit cracking rate, bagging was the best way to reduce the cracking rate.

Keywords: jujube fruit cracking; meteorological warning; disaster prevention and mitigation