



周菲, 向日葵 *HaKAR1* 基因的生物信息学和表达分析[J]. 黑龙江农业科学, 2021(10):19-22.

向日葵 *HaKAR1* 基因的生物信息学和表达分析

周 菲^{1,2}

(1. 黑龙江省农业科学院 博士后科研工作站, 黑龙江 哈尔滨 150086; 2. 黑龙江省农业科学院 经济作物研究所, 黑龙江 哈尔滨 150086)

摘要: KAR 编码 β 酮脂酰-ACP 还原酶, 是在脂肪酸合成过程中催化酮脂酰还原反应的酶。为了解向日葵 *HaKAR1* 基因的表达特性及功能, 对向日葵 *HaKAR1* 编码蛋白进行生物信息学分析和基因表达模式分析, 预测 *HaKAR1* 编码蛋白为碱性蛋白且为亲水性蛋白, 蛋白二级结构主要为 α 螺旋, 预测亚细胞定位于叶绿体。系统进化分析发现, *HaKAR1* 与莴苣 (*Lactuca sativa* L.) *KAR1* 进化关系最近, 序列相似性高达 90%。基因表达模式分析发现, *HaKAR1* 在向日葵种子、舌状花和管状花中表达量较高, 其次为茎、叶, 在根中不表达。*HaKAR1* 在高、低油酸向日葵种子开花后 7~27 d 表达均呈先上升后下降再上升的趋势, 但在开花后 37 d, 低油酸材料种子中表达量明显高于高油酸材料, 表明 *HaKAR1* 在高、低油酸种子发育后期可能存在不同表达调控机制。

关键词: 向日葵; 油酸; *HaKAR1*; 生物信息学; 表达分析

向日葵是世界上重要的油料作物, 其所含饱和脂肪酸有助于人体发育和生理调节。植物种子发育过程中油脂的积累和脂肪酸的转化直接受脂类合成相关基因的表达和协同调控的影响^[1]。 β 酮脂酰-ACP 还原酶 (KAR), 是脂肪酸从头合成途径中的第一个还原酶^[2], 也是唯一催化酮脂酰还原反应的酶, 因此, 在植物脂肪酸合成途径中具有十分重要的功能。KAR 主要催化 β 酮脂酰-ACP 还原成 α, β -羟丁酰-ACP, 并将 NADPH 氧化成 NADP⁺^[3]。目前关于 KAR 的研究取得了一些进展, 但是成果主要是集中在少数的原核生物和顶门寄生虫上, 而对于植物 KAR 的研究相对滞后。

本研究通过分析实验室前期获得的高、低油酸向日葵种子的 RNA-seq 数据, 在脂肪酸生物合成代谢通路中鉴定出显著差异表达的 *HaKAR1* 基因, 本研究拟对该基因编码蛋白进行生物信息学分析, 并对 *HaKAR1* 基因在高、低油酸向日葵不同发育时期的种子以及其他组织部位的表达模式进行分析, 旨在为今后该基因功能的研究提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

向日葵高油酸“L-1-OL-1”和低油酸“86-1”两份保持系材料于 2019 年种植在黑龙江省农业科学院经济作物研究所试验基地 (呼兰区康金镇)。根据开花后不同天数每次在同一时间段对种子取样, 从开花 7 d 起, 每 5 d 取 1 次, 取至开花后 37 d, 每次取花盘最外 3 圈种子, 同时取向日葵开花后 7 d 的根、茎、叶、管状花、舌状花, 将材料液氮速冻后保存于 -80 °C 冰箱, 用于 qRT-PCR 分析。

1.2 方法

1.2.1 基因的生物信息学分析 在 NCBI 的 BLAST 数据库中进行序列同源性比对和相似性搜索。利用 ExPASy 系统下的 ProtParam 工具 (<https://web.expasy.org/protparam/>) 预测蛋白质基本理化性质。利用 SOPMA 程序 (https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_auto-mat.pl?page=npsa_sopma.html) 分析蛋白的二级结构。利用 ProtScale 软件 (<http://web.expasy.org/protscale/>) 分析基因氨基酸序列的亲/疏水性。利用 Cell-PLoc 2.0 (<http://www.cs-bio.sjtu.edu.cn/bioinf/Cell-PLoc-2/>) 在线软件预测基因的亚细胞定位。用 MEGA7 软件构建系统进化树。

1.2.2 荧光定量 PCR 分析 利用植物总 RNA 提取试剂盒 (天根, 中国北京) 对向日葵种子总 RNA 进行提取, 取 0.5 μ g RNA 利用 ReverTra

收稿日期: 2021-05-07

基金项目: 黑龙江省农业科学院院级科研项目 (2020FJZX 005, 2019YYF012); 国家特色油料产业技术体系 (CARS-14); 黑龙江省农业科学院“农业科技创新跨越工程”项目 (HNK2019CX06-02, HNK2019CX14)。

作者简介: 周菲 (1984—), 女, 博士, 助理研究员, 从事向日葵品质育种研究。E-mail: zhoufei66666@163.com。

Ace qPCR RT Master Mix with gDNA Remover (TOYOBO,日本)合成 cDNA 第一条链。采用 THUNDERBIRD SYBR qPCR Mix(TOYOBO,日本)试剂,Roche LightCycler 480II 荧光定量 PCR 仪,以向日葵 *βactin* 基因(AF282624)为内参基因,qRT-PCR 总反应体系为 20 μL:cDNA 1.2 μL,SYBR Green 10 μL,Primer 各 0.6 μL,ddH₂O 7.6 μL。反应程序如下:98 ℃ 2 min;98 ℃ 10 s,58 ℃ 10 s,68 ℃ 30 s,共 45 个循环,待 PCR 反应结束后进行溶解曲线分析,采用 2^{-ΔΔC_t}法进行目标基因的表达量分析。内参基因 *βactin* 引物为 F:GCAAAAAGCAGCTCGTCTGT,R:AGCAGCTTCCATTCCAATCA, *HaKAR1* 荧光定量引物为 F:TTGAGTTAGCCAAGAAAGG;R:TACCCTCAGTCAAATCACC。

2 结果与分析

2.1 *HaKAR1* 生物信息学分析

2.1.1 蛋白质基本理化性质预测 *HaKAR1* 基因包含有 966 bp 的开放阅读框,编码 321 个氨基酸。蛋白质基本理化性质预测表明:*HaKAR1* 基因编码蛋白的原子总数为 5 132 个,分子式为

C₁₆₄₆ H₂₆₀₀ N₄₂₈ O₄₅₀ S₈,蛋白分子量 35.84 kD,等电点理论值 9.60,预测该蛋白是碱性蛋白, *HaKAR1* 编码蛋白氨基酸组成详见表 1。

表 1 向日葵 *HaKAR1* 编码蛋白质氨基酸组成

种类	数量	质量分数/%	种类	数量	质量分数/%
Ala(A)	22	6.9	Met(M)	3	0.9
Arg(R)	14	4.4	Phe(F)	15	4.7
Asn(N)	13	4.0	Pro(P)	14	4.4
Asp(D)	14	4.4	Ser(S)	22	6.9
Cys(C)	5	1.6	Thr (T)	18	5.6
Gln(Q)	10	3.1	Trp(W)	7	2.2
Glu(E)	12	3.7	Tyr(Y)	13	4.0
Gly(G)	24	7.5	Val(V)	27	8.4
His(H)	3	0.9	Pyl(O)	0	0
Ile(I)	24	7.5	Lys(K)	29	9.0
Leu(L)	32	10.0	Sec(U)	0	0

2.1.2 蛋白质二级结构预测 *HaKAR1* 编码蛋白质的二级结构预测结果显示,该蛋白质具有 52.34%α 螺旋,26.48%无规则卷曲,15.26%延伸链,5.92%β 转角,表明 *HaKAR1* 编码蛋白质的二级结构主要为 α 螺旋(图 1)。

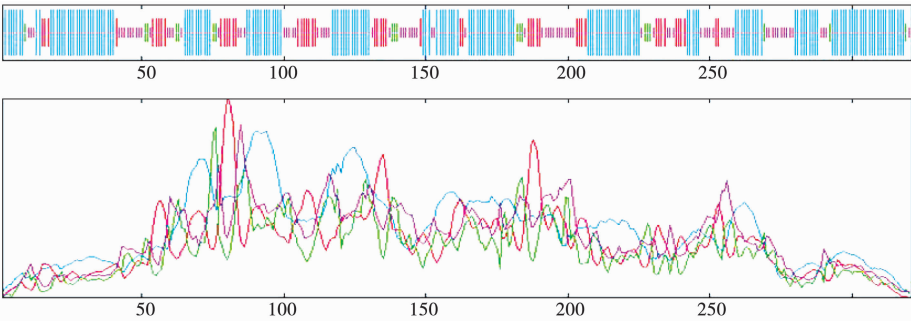


图 1 向日葵 *HaKAR1* 编码蛋白质二级结构预测

2.1.3 蛋白质亲疏水性分析和亚细胞定位预测 对 *HaKAR1* 编码蛋白质的氨基酸序列进行亲疏水性分析。大于零部分多于 50%为疏水性蛋白,而小于零部分多于 50%为亲水性蛋白,结果表明 *HaKAR1* 编码蛋白为亲水性蛋白(图 2)。Cell-PLoc 2.0 软件预测 *HaKAR1* 编码蛋白亚细胞定位于叶绿体。

2.1.4 *HaKAR1* 基因系统进化分析 将向日葵 *HaKAR1* 基因与拟南芥(*Arabidopsis thaliana* L.)、芝麻(*Sesamum indicum* L.)、棉花(*Gossypium hirsutum* L.)和亚麻芥(*Camelina sativa* L.)等物种 KAR 的氨基酸序列进行了系统进化树的构建与分析(图 3),结果发现向日葵 *HaKAR1* 与拟南芥和其它物种的 *KAR1* 聚在一

个大分支上,拟南芥 *KAR2* 聚在另一个大分支上, *HaKAR1* 与莴苣(*Lactuca sativa* L.) *KAR1* 进化关系最近,序列相似性高达 90%。

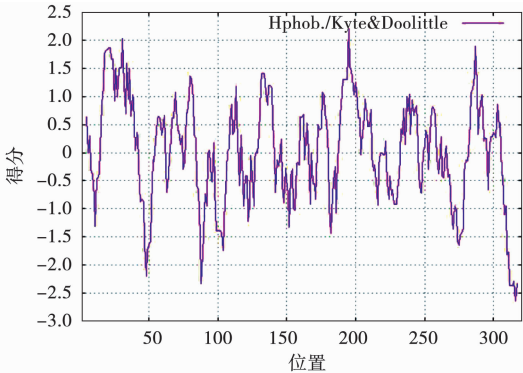


图 2 向日葵 *HaKAR1* 编码蛋白质亲/疏水性分析

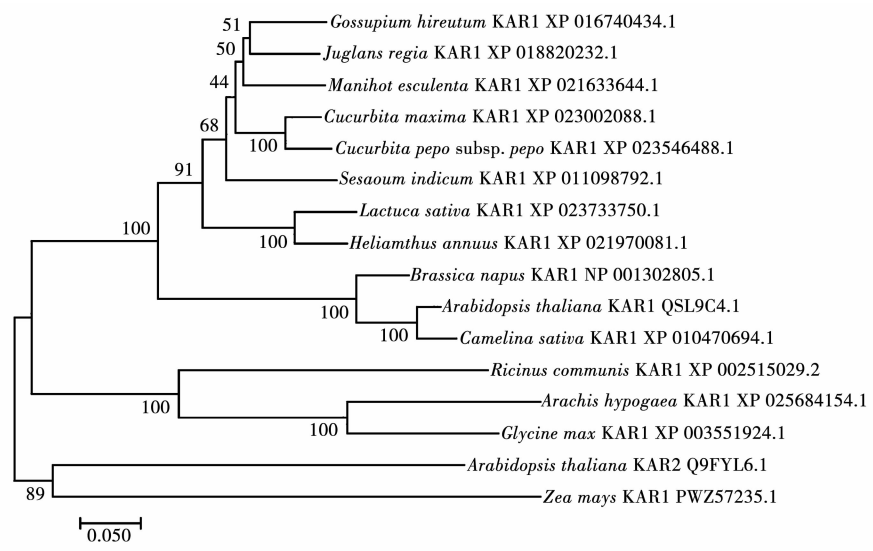


图 3 向日葵 *HaKAR1* 基因系统进化树分析

2.2 *HaKAR1* 基因表达分析

通过 qRT-PCR 检测基因表达,发现 *HaKAR1* 在向日葵种子、舌状花和管状花中表达量较高,其次为茎、叶,在根中不表达。*HaKAR1* 在高、低油酸种子发育不同时期表达变化基本一致,两份材料在开花后 7~12 d 和 22~27 d 种子中表达均较高,在种子发育其他时期表达较低,除了低油酸材料“86-1”在 37 d 种子中表达量较高,此时表达明显高于高油酸材料“L-1-OL-1”(图 4)。

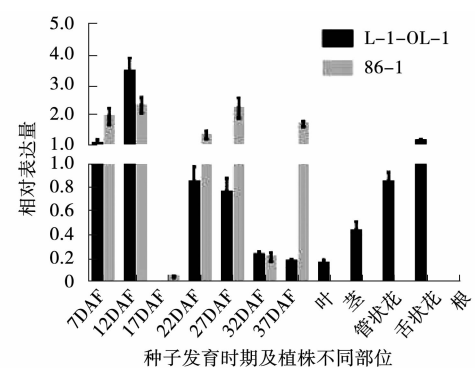


图 4 *HaKAR1* 基因在种子不同发育时期及植株不同部位表达模式

3 讨论

尽管油菜^[4]和披针叶鄂距花^[5]等植物的 *KAR* 基因被克隆出来,但有关植物 *KAR* 基因的功能研究报道非常少。*KAR* 基因的持续上调表达使转化更多的 C16:0-ACP,为硬脂酸和棕榈酸的合成提供了充足的底物^[6]。陆地棉中共转 *Gh-KAR* 和 *GhENR* 两个基因,发现转基因株系种子的含油量比野生型对照提高 10.2%~14.1%,不

饱和脂肪酸含量比野生型对照提高 4.04%~6.02%,且转基因株系的抗寒性有所提高^[7]。在热激处理条件下,水稻 *KAR1* 的表达可影响 18:3(亚麻酸)的含量^[8]。本研究发现 *HaKAR1* 在高、低油酸种子发育不同时期表达变化趋势较为相似,但在 37DAF,低油酸材料种子中表达量明显高于高油酸材料,这表明 *HaKAR1* 在高、低油酸种子发育后期可能存在不同表达调控机制。

已报道的植物中 *KAR1* 的表达模式不同。披针叶鄂距花中存在至少 2 个成员编码 *KAR* 基因家族,表达于根、叶、花和种子中^[5]。油桐 *Vf-KAR1* 和 *Vf-KAR2* 在 12 个不同组织中都有表达,但 *Vf-KAR1* 主要是在种仁中表达,*Vf-KAR2* 主要在茎和叶片中表达,*Vf-KAR1* 基因在油桐种子 9 个不同发育时期的表达规律与油桐种子内油脂合成呈正相关^[9]。水稻中发现 *KAR1* 在各种组织表达相对较低,在苗期的根和开花期的根及花序中的表达量相对较高^[8]。在油茶种子发育过程中,*KAR* 基因在种子发育初期呈明显上升,之后呈先下降后略有上升趋势^[10]。沙棘不同发育期种子中 *KAR* 基因表达量呈先略有下降再略有上升后略有下降的变化趋势^[11]。文冠果种仁发育过程中,*KAR* 基因表达呈不断上升趋势^[12]。本研究中 *HaKAR1* 在向日葵种子、舌状花和管状花中表达量较高,其次为茎、叶,但在根中不表达,这与披针叶鄂距花^[5]和 水稻^[8] 表达部位不同,*HaKAR1* 在向日葵种子在开花后 7~27 d 表达呈上升后下降,之后又上升的趋势,这与油茶^[10] 种子不同发育时期 *KAR* 的表达趋势相同。

4 结论

预测向日葵 *HaKAR1* 编码蛋白为碱性且为亲水性蛋白,蛋白二级结构主要为 α 螺旋,预测亚细胞定位于叶绿体。*HaKAR1* 与莴苣 (*Lactuca sativa* L.) *KAR1* 进化关系最近,序列相似性达 90%。基因表达分析发现,*HaKAR1* 在向日葵种子、舌状花和管状花中表达量较高,其次为茎、叶,在根中不表达。*HaKAR1* 在高、低油酸向日葵种子开花后 7~27 d 表达均呈先上升后下降,之后又上升的趋势,但在开花后 37 d,低油酸材料种子中表达量明显高于高油酸材料,表明 *HaKAR1* 在高、低油酸种子发育后期可能存在不同表达调控机制。

参考文献:

[1] HUANG J Q,ZHANG T,ZHANG Q X,et al. The mechanism of high contents of oil and oleic acid revealed by transcriptomic and lipidomic analysis during embryogenesis in *Carya cathayensis* Sarg [J]. BMC Genomics, 2016, 17(1):113.

[2] ZHANG H,JI Y,WANG Y,et al. Cloning and characterization of a novel beta-ketoacyl-ACP reductase from *Comamonas testosteroni* [J]. Chemico-biological Interactions, 2015,234:213-220.

[3] ROSADO L A,CACERES R A,JR W F A,et al. Role of Serine140 in the mode of action of *Mycobacterium tuberculosis* β -ketoacyl-ACP Reductase (MabA) [J]. BMC Research Notes,2012,5(1):526.

[4] FISHER M,KROON J T,MARTINDALE W,et al. The X-ray structure of *Brassica napus* beta-keto acyl carrier protein reductase and its implications for substrate binding and catalysis[J]. Structure,2014,8(4):339-347.

[5] KLEIN B,PAWLOWSKI K,HRICKE-GRANDPIERRE C,et al. Isolation and characterization of a cDNA from *Cuphea lanceolata* encoding a beta-ketoacyl-ACP reductase[J]. MGG-Molecular and General Genetics,1992,233(1-2):122-128.

[6] 韩平,阮成江,丁健,等. 紫斑牡丹种子高积累碳十八不饱和脂肪酸的多基因调控[J]. 分子植物育种,2019,17(7):2101-2108.

[7] 刘丽,王玉美,赵彦朋,等. 棉花脂肪酸合成酶基因 *GhKAR* 和 *GhENR* 表达载体构建及其功能初探[J]. 棉花学报,2016,28(6):527-537.

[8] 杨佩. 水稻 β 酮脂酰-ACP 还原酶的克隆及功能初探[D]. 武汉:华中农业大学,2016:16-28.

[9] 刘美兰. 油桐 *KAR* 基因的克隆与功能研究[D]. 长沙:中南林业科技大学,2015:35-42.

[10] 吴波,阮成江,熊朝伟,等. 油茶种子油酸合成积累相关基因的表达模式分析[J]. 分子植物育种,2019,17(5):1493-1502.

[11] 张莞晨,阮成江,丁健,等. 沙棘果实不同器官脂肪酸差异的多基因协同调控[J]. 分子植物育种,2019,17(7):2117-2125.

[12] 刘祿悦,阮成江,王莉,等. 文冠果种仁油脂脂肪酸形成的多基因协同调控[J]. 分子植物育种,2019,17(6):1834-1842.

Bioinformatics and Expression Analysis of *HaKAR1* Gene in Sunflower

ZHOU Fei^{1,2}

(1. Postdoctoral Programme, Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin 150086, China; 2. Industrial Crops Institute, Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin 150086, China)

Abstract: *KAR* encodes beta-ketoacyl ACP reductase, which catalyzes ketoacyl reduction in fatty acid synthesis. In order to understand the expression characteristics and function of *HaKAR* gene in sunflower, the bioinformatics of *HaKAR* protein and gene expression pattern were analyzed. It was predicted that the protein encoded by *HaKAR1* was basic protein and hydrophilic protein. The secondary structure of the protein encoded by *HaKAR1* was mainly α -helix, and the subcellular localization was predicted in the chloroplast. Phylogenetic analysis showed that *HaKAR1* was closely related to *Lactuca sativa* L. *KAR*, and the sequence similarity was as high as 90%. The expression pattern analysis of the gene showed that *HaKAR1* was highly expressed in sunflower seeds, ligulate flowers and tubular flowers, followed by stems and leaves, but not in roots. The expression of *HaKAR1* in both high and low oleic acid sunflower seeds increased at first and then decreased, and then increased again at 7-27 days after flowering. However, the expression level of *HaKAR1* in sunflower seeds with low oleic acid was significantly higher than that in sunflower seeds with high oleic acid at 37 days after flowering, which indicated that there might be different expression regulation mechanisms of *HaKAR1* in high and low oleic acid sunflower seeds at late development stage.

Keywords: sunflower; oleic acid; *HaKAR1*; bioinformatics; expression analysis