

DOI:10.12403/j.1001-1498.20230338

文冠果种子高表达 *XsKCS7* 基因的克隆 和酵母表达功能鉴定

梁重钧^{1,2}, 李麟坤², 胡振华³, 张薇², 许慧慧², 王利兵^{1,2*}

(1. 海南大学 林学院, 海南 海口 570228; 2. 中国林业科学研究院林业研究所, 北京 100091;

3. 开鲁县林业和草原局, 内蒙古 通辽, 028400)

摘要: [目的] 探究调控文冠果种子神经酸合成关键基因。[方法] 本研究根据参考基因组联合转录组分析文冠果 3-酮酯酰-CoA 合酶 (3-ketoacyl-CoA synthase, KCS) 基因家族在不同发育时期种子中的表达模式; 通过 RT-PCR 扩增文冠果 *XsKCS7* 基因并进行生物信息学分析; *XsKCS7* 基因异源转化酿酒酵母鉴定基因功能。[结果] 文冠果 *XsKCS7* 基因在不同发育时期种子中的表达量远高于其他 KCS 基因; 克隆 *XsKCS7* 基因, 生物信息学分析显示, *XsKCS7* 基因的开放阅读框为 1 512 bp, 编码 503 个氨基酸, 含有典型的 KCS 家族保守基序“GMGCSA”、“FGNTSSSS”以及“GSGFKNSAVW”, 与橡胶树 KCS 的亲缘性关系最近, 为 67.62%; *XsKCS7* 异源转化酿酒酵母鉴定其具有调控芥酸和神经酸合成的功能。[结论] *XsKCS7* 基因确为调控文冠果种子芥酸和神经酸合成的关键基因。

关键词: 文冠果; 3-酮酯酰-CoA 合酶; 酵母表达; 神经酸合成

中图分类号: S722

文献标识码: A

文章编号: 1001-1498(2024)02-0001-08

我国是世界油料主产国和最大进口国, 粮油安全与国家安全息息相关。根据中华人民共和国国家统计局 (<http://www.stats.gov.cn/>) 数据显示, 2022 年我国油菜籽、芝麻、大豆、花生等油料总产量约 3 653 万吨, 而进口食用油籽达到 9 610 万吨, 另外进口食用油 648 万吨。我国食用油对外依存度已达到 70%, 超过了国际安全警戒线^[1]。因此, 开发和利用木本油料, 提高我国食用油产量和质量, 对满足我国社会需求和降低食用油对外依存具有十分重要的现实意义。我国油料树种资源十分丰富, 适用于食用的含油量 40% 以上的油料树种约 150 多种, 但目前开发利用程度较深的只有油茶 (*Camellia oleifera* Abel.)、核桃 (*Juglans regia* L.)、油橄榄 (*Olea europaea* L.) 等 10 余种。由此可见, 有大量的木本油料资源有待发掘及进一步开发利用。

文冠果 (*Xanthoceras sorbifolium* Bunge) 又名黄角 (Yellowhorn), 为无患子科 (Sapindaceae) 文冠果属木本油料, 是《关于加快木本油料产业发展的意见》中明确提出的 10 个木本油料树种之一。文冠果种子油脂含量丰富, 含油率达 60% 以上, 其中不饱和脂肪酸含量高达 92%, 富含在植物中极为罕见的神经酸 (3%~7%)^[2-4]。神经酸 (Nervonic acid, C24:1 Δ 15, cis-tetracos-15-enoic acid), 一种超长链单不饱和脂肪酸, 是大脑白质神经组织的主要组成部分, 具有修复大脑受损神经纤维的独特生理功效^[5-6], 1925 年在人类和哺乳动物大脑中首次发现, 次年从鲨鱼脑中提取, 并确定了神经酸的结构, 又名鲨鱼酸^[7-8]。人体难以合成神经酸, 远未达到人体健康推荐摄入量 300 mg·(60 kg)⁻¹^[9], 必须从食物中摄取, 鲨鱼脑中富含神经酸, 所提取的神经酸纯度高达 98%, 市场

收稿日期: 2023-09-04 修回日期: 2024-01-06

基金项目: 国家高层次人才特殊支持计划 (万人计划) 青年拔尖人才项目; 国家自然科学基金项目 (31870594)

* 通讯作者: 王利兵, 研究员, 主要研究方向: 木本油料种质创新。E-mail: wlibing@caf.ac.cn

价格约 120 万元·kg⁻¹，价格昂贵，国际社会也已禁止捕杀鲨鱼；而神经酸人工合成效率低，副产物多，同样无法满足人类的需求。由此可知，油料种子神经酸已成为获取神经酸的主要途径^[10]。目前，元宝枫和文冠果已生产出对应的食用油，应用于食品行业。文冠果具有抗逆性强、易存活、含油率高、童期短等特点，更易批量种植和规模化生产神经酸。

随着高通量测序技术的发展，神经酸的生物合成通路已有报道^[4,11-12]。脂肪酸在细胞质体中以乙酰辅酶 A 为原料，合成终产物油酸 (Oleic acid, C18 : 1Δ9, cis-9-octadecenoic acid)；转运蛋白长链酰基辅酶 A 合成酶 (LACS) 将游离脂肪酸 C18 : 1 以 C18 : 1-CoA 的形式转运至内质网；C18 : 1-CoA 在脂肪酸延伸酶复合体的作用下经过 3 个重复延伸反应依次生成辅酶 A 形式的花生烯酸 (cis-11-Eicosenoic acid, C20 : 1Δ11)、芥酸 (Erucic acid, C22 : 1, cis-13-docosaenoic acid) 和神经酸 (C24 : 1)；最后以三酰甘油的形式储存在植物种子和果实中。脂肪酸延伸酶复合体由 4 个组分构成，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 KCS 为单体酶，具有底物特异性，是 C18 以上超长链脂肪酸延长的限速酶；KCR、HCD 和 ECR 为寡聚酶，是所有脂肪酸延长反应共有^[13]。根据文冠果基因组 KCS 基因在染色体的位置分布^[14]，本研究将 KCS 基因编号为 *XsKCS1*~*XsKCS20* 以便于描述。文冠果参考基因组和种子发育不同时期转录组测序数据联合分析，发现 *XsKCS7* 基因在种子中的表达量较其他 KCS 基因最高，可能调控种子油超长链脂肪酸的合成，然而其具体的功能尚未解析^[15]。本研究在此基础上，克隆文冠果 *XsKCS7* 基因，并进行生物信息学分析和生物酵母转化功能鉴定。本研究初步鉴定了 *XsKCS7* 基因功能，为探索文冠果种子神经酸的合成通路提供分子依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

文冠果 (*Xanthoceras sorbifolium* Bunge) 特

色抗旱栽培良种‘中石 4 号’(国 S-SV-XS-015-2020) 五年以上稳产实生苗生长于辽宁省阜新市彰武县 (42°37' N, 122°53' E)，种植区域年平均降水量为 504 mm，年平均温度为 7 °C，最低温度为 -36 °C，最高温度为 38 °C (数据来源于全国天气网)，林间正常管理。用于本研究基因克隆所需的文冠果发育中期种子样品采集于 2022 年 6 月，种子样品经纯净水冲洗后擦干，液氮速冻后保存于 -80 °C 待用。用于酵母表达实验的生物酵母采用酿酒酵母菌株 INVSc1。

1.2 实验方法

1.2.1 文冠果 KCS 家族基因表达分析 下载 Wang 等公开的文冠果种子不同发育时期种子 (开花后第 40、54、68、81 d) 转录组原始数据 (SRA 编号: PRJNA493982)，以本研究室文冠果基因组数据为参考基因组进行联合分析^[16]，基因的表达水平根据 FPKM (Fragments Per Kilobase of exon model per Million mapped fragments) 进行计算。

1.2.2 RNA 提取和 cDNA 链合成 文冠果发育中期种子样品 RNA 的提取方法参照多糖多酚植物总 RNA 提取试剂盒 (天根, 中国) 说明书，经过降解酶 RQ1 RNase-Free Dnase (Promega, 美国) 降解残留的基因组 DNA 后，以 1 μg RNA 为模板，利用 GoScript™ Reverse Transcription System (Promega, 美国) 试剂盒反转录得到 cDNA。

1.2.3 基因克隆和生物信息学分析 依据文冠果基因组 *XsKCS7* 基因参考序列，设计上游 (5'-CTCTTCTTGTTTAGCTACCCTTT -3') 和下游 (5'-ATCCTTTTTATTCCATTCTCTTT -3') 特异性引物；以采集的文冠果发育中期种子 cDNA 为模板，利用 kod 高保真扩增酶 (Toyobo, 日本) 扩增，经测序验证无突变的 *XsKCS7* 连接至克隆载体 pGEM®-T Easy 载体系统构建 (Promega, 美国) 并转化至大肠杆菌 DH5α；再次测序验证序列后，将阳性菌液保存于 -80 °C。

多重序列比对通过软件 DNAMAN 7.0 中的 clustal X 程序进行；系统性进化树分析由软件 MEGA5.0 中的 neighbor-joining 程序进行。

1.2.4 生物酵母转化与表达 限制性内切酶 *Hind* III 酶切酵母表达载体 pYES2.0，设计带有同源臂的上游引物 (5'-taagcttggtaccgagctcgATGGCT

AATGAGAACAAAAA -3') 和下游引物序列 (5'-gcggccgttactagtgatcTTAATAACAATCGATGCAA -3') 扩增 *XsKCS7*, 以同源重组法构建酵母表达载体 pYES2.0-*Pro_{GAL1}::XsKCS7*, 操作方法参照试剂盒 SeamLess Assembly Cloning Kit (中美泰合, 中国); 酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) INVSc1 (Invitrogen, USA) 菌株的转化采用聚乙二醇/醋酸锂 (PEG/LiAc) 诱导法^[17]。

转基因酵母在 SD-U 液体培养基中震荡至吸光值 A_{600} 至 0.4~0.5 后, 加入总溶液 1/10 体积的 20% 半乳糖水溶液 (m/v) 激活酵母载体启动子 *GAL1* 表达 *XsKCS7*, 同时分别加入底物 0.5 mmol·L⁻¹ 花生烯酸 C20 : 1 芥酸 C22 : 1 以及不加底物 (酵母提取物自身含有油酸 C18 : 1), 20 °C 培养 4 d; 培养物于 3 500 g 离心 10 min, 收集酵母菌体, 以真空冷冻干燥机在 -40 °C 环境下干燥 12 h 成粉末状, -80 °C 保存用于脂肪酸含量和组分测定。

1.2.5 脂肪酸测定 酵母提取物脂肪酸提取采用硫酸甲醇酯化法^[18], 提取的脂肪酸甲酯由乙酸乙酯溶解。吸取 1.0 μL 乙酸乙酯用于 GC 检测, 检测仪器使用气相色谱仪, 柱子使用强极性气相色谱柱 DB-23。GC 检测设置条件为: 170 °C, 5 min; 2 °C·min⁻¹ 到 210 °C; 柱箱 210 °C; 压力 163.8 kpa; 总流量 48.3 mL·min⁻¹; 柱流量 4.2 mL·min⁻¹; 分流比 10.0。

2 结果与分析

2.1 文冠果 *KCS* 家族基因表达分析

SapBase 数据库 (<http://www.sapindaceae.com/>) 公开了由本研究室测序获得的文冠果基因组数据, 共注释 *KCS* 基因 20 个^[14,16], 根据这些基因在染色体的位置分布, 编号为 *XsKCS1*~*XsKCS20* (图 1)。基于参考基因组和转录组测序数据, 分析得到文冠果 *KCS* 基因家族在高油文冠果种子不同发育时期的表达模式。结果如图 2 所示, *XsKCS5*、*XsKCS6*、*XsKCS19* 及 *XsKCS20* 在文冠果种子各个发育时期的表达量均为 0, 不参与基因表达热图绘制; *XsKCS7* 基因在种子中的表达量远高于其他 *KCS* 基因, 表明 *XsKCS7* 基因可能调控文冠果种子油超长链脂肪酸的合成功能。

2.2 *XsKCS7* 基因的克隆

将采集的文冠果发育中期种子用液氮研磨后,

使用 RNA 提取试剂盒抽提种子 RNA, 经电泳检测发现 RNA 具有清晰的 28S 和 18S 条带 (图 3A), 同时 Agilent 2100 Bioanalyzer 分析仪检测 RIN (RNA integrity number) 值大于 7.0, 表明 RNA 完整性较好; 分光光度计测量其 OD_{260}/OD_{280} 值在 1.95~2.05 之间, 表明 RNA 纯度高。

以种子 cDNA 为模板, 依据文冠果基因组 *XsKCS7* 基因参考序列设计的特异性引物扩增, 连接至克隆载体后使用通用引物 T7/SP6 扩增并测序, 最终获得包括 *XsKCS7* 基因 CDS 区的 1 512 bp 序列, 扩增产物长度包括克隆载体骨架共 1 681 bp (图 3B)。

2.3 *XsKCS7* 蛋白序列分析

通过软件 DNAMAN5.0 将文冠果 *XsKCS7* 蛋白、桤叶槭 (*Acer negundo* L.) AnKCS (NCBI 注册号: KAI9194759.1; 下同)、橡胶 [*Hevea brasiliensis* (Willd. ex A. Juss.) Müll. Arg.] HbKCS11 (XP_021653194.1)、石榴 (*Punica granatum* L.) PgKCS11 (XP_031382877.1)、木薯 (*Manihot esculenta* Crantz) MeKCS20 (XP_021595702.1) 和白时钟花 (*Turnera subulata* Smith) TsKCS11 (KAJ4840348.1) 蛋白进行多重序列比对。结果如图 4 所示, 文冠果 *XsKCS7* 蛋白与其他植物 *KCS* 基因具有相似的保守基序 (红框标出)。

采用软件 MEGA5.0 neighbor-joining 程序将 *XsKCS7* 蛋白与其他物种 *KCS* 蛋白进行系统性分析, 参与构建系统进化树的物种包括: 蓖麻 (*Ricinus communis* L.) RckKCS6 (XP_002510886.3)、大豆 [*Glycine max* (L.) Merr.] GmKCS5 (XP_003555356.2)、甘蓝型油菜 (*Brassica napus* L.) BnKCS6 (LOC106410639)、花生 (*Arachis hypogaea* Linn.) AhKCS5 (XP_025620215.1)、苦楝 (*Melia azedarach* L.) MaKCS (KAJ4706144.1)、簸箕柳 (*Salix suchowensis* W. C. Cheng in S. Y. Jin) SsKCS (KAG5230593.1)、山核桃 [*Carya illinoensis* (Wangenh.) K. Koch] CiKCS5 (XM_043119331.1)、蒜头果 (*Malania oleifera* Chun & S. K. Lee) MoKCS (MK210592.1)、拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) AtKCS10 (NP_180193.1)、桃 [*Prunus persica* (L.) Batsch] PpKCS5 (XP_020411733.1)、

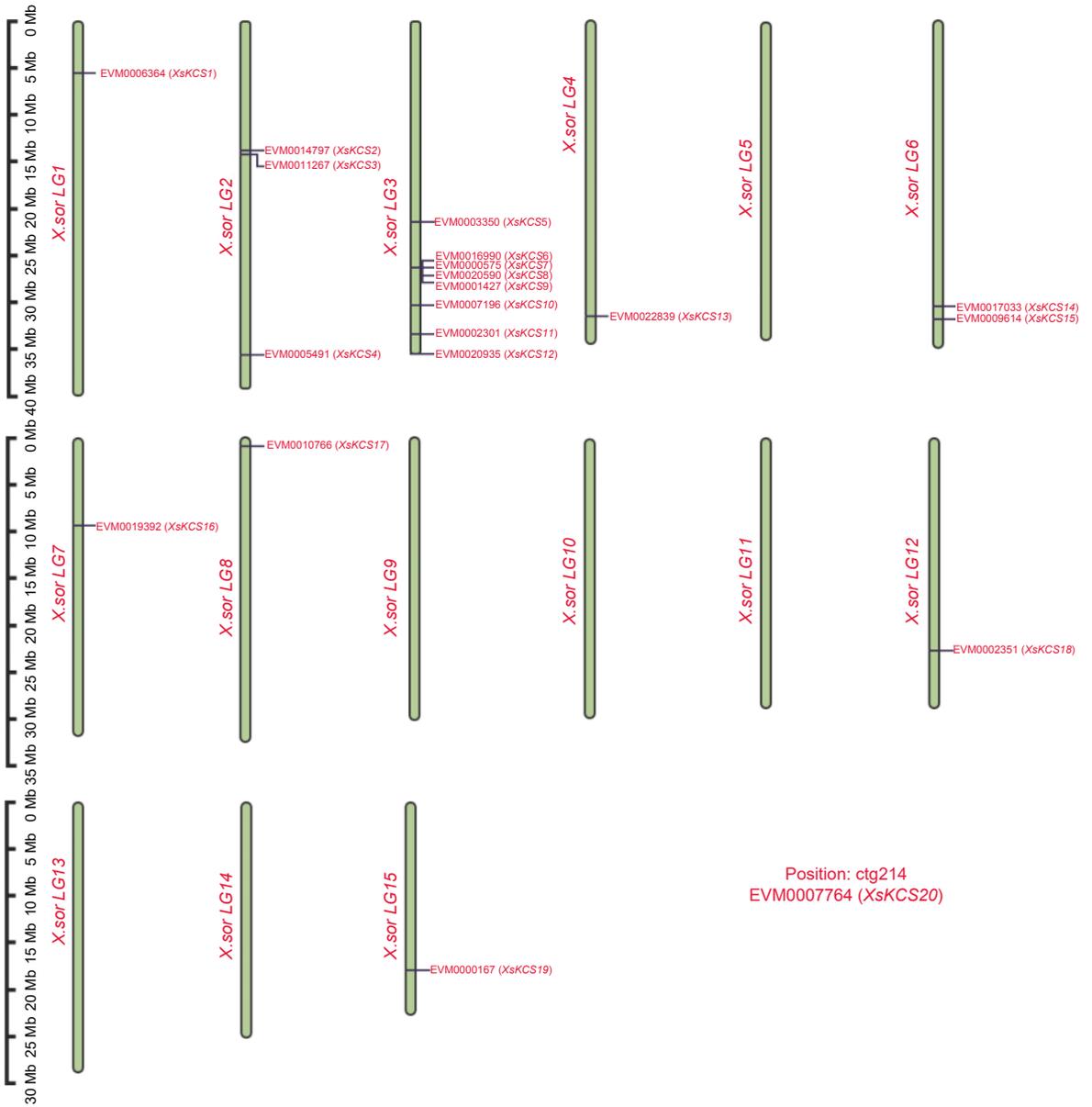


图 1 *KCS* 基因在文冠果染色体中的位置

Fig. 1 The position of *KCS* genes in the chromosome of *Xanthoceras sorbifolium*

栲叶槭 AnKCS (KAI9162263.1)、漾濞槭 (*Acer yangbiense* Y. S. Chen & Q. E. Yang) AyKCS (TXG70798.1)、蔷薇 (*Rosa chinensis* Jacq.) RsKCS6 (XP_024164718.1)、巴西橡胶树 HbKCS11 (XM_021797502.1)、阿月浑子 (*Pistacia vera* L.) PvKCS20 (XM_031416789.1)。结果如图 5 所示, XsKCS7 蛋白与其他物种 KCS 蛋白亲缘性关系较近, 其中与橡胶树亲缘关系最近, 为 67.62%。

2.4 转基因酵母鉴定 XsKCS7 基因功能

将重组质粒 pYES2.0-*Pro*_{GAL1}::XsKCS7 (简写

为 pYES2.0-XsKCS7) 和对照空载体 pYES2.0 转化酿酒酵母菌株 INVSc1。酿酒酵母本身不具有超长链延长酶活性, pYES2.0 对照组中未检测到花生烯酸 (C20 : 1)、芥酸 (C22 : 1) 以及神经酸 (C24 : 1)。与 pYES2.0 对照组相比, pYES2.0-XsKCS7 转基因酵母提取物未检测到其他脂肪酸 (图 6A1、B1); 与 pYES2.0 + C20 : 1 对照组相比, pYES2.0-XsKCS7 转基因酵母提取物中检测到了芥酸和微量的神经酸 (图 6A2、B2); 与 pYES2.0 + C22 : 1 对照组相比, pYES2.0-XsKCS7 转基因酵母提取物中检测到神经酸 (图 6A3、B3)。上述结果表明 XsKCS7 基因具有催化花生

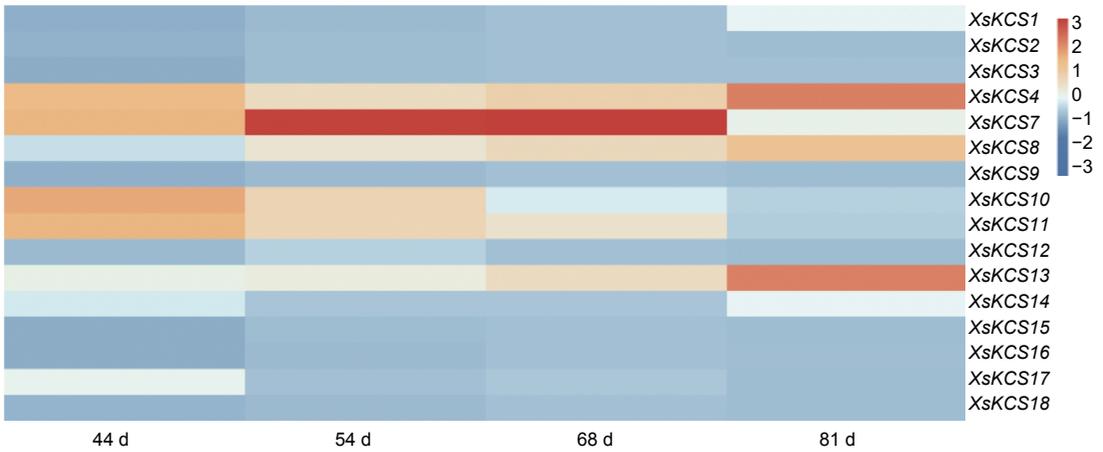


图 2 *XsKCS* 基因在文冠果不同发育时期种子中的表达量

Fig. 2 Expression of *XsKCS* genes in seeds of *Xanthoceras sorbifolium* at different developmental stages

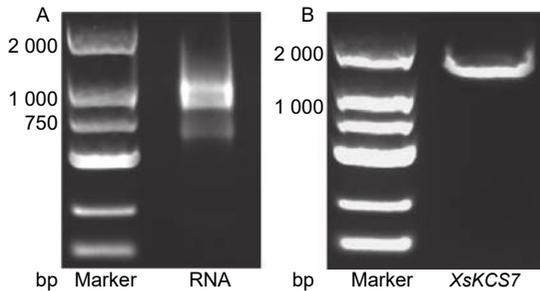


图 3 RNA 电泳图 (A); *XsKCS7* 基因扩增电泳图 (B)

Fig. 3 Electrophoresis of RNA(A) and electrophoresis of the amplification of *XsKCS7* gene(B)

烯酸生成芥酸和催化芥酸生成神经酸的功能, 但不具备油酸生成花生烯酸的功能。

3 讨论

文冠果是一种罕见的种子中富含神经酸的经济油料树种, 而神经酸具有潜在的药用保健效用^[5], 是近年来国内外研究的热点。3-酮酯酰-CoA 合酶基因 (*KCS*) 是调控超长链脂肪酸合成的限速酶基因, 已在蒜头果^[19]、银扇草 (*Lunaria annua* L.)^[20]、碎米荠 (*Cardamine graeca* L.)^[21] 等物种中克隆

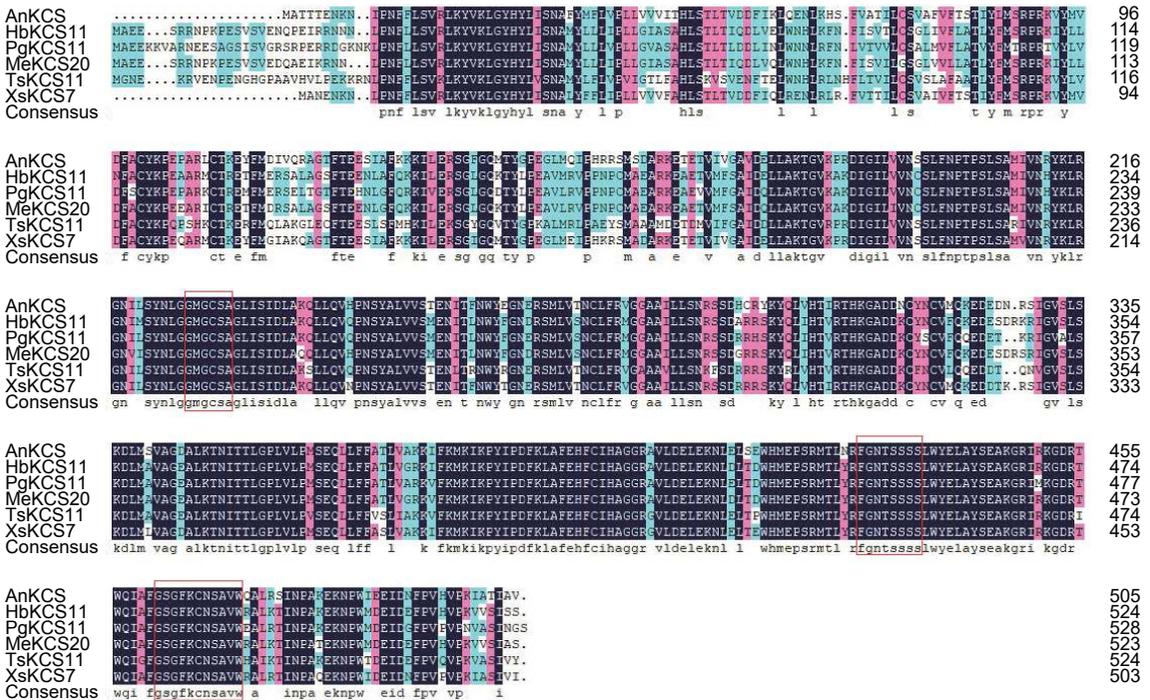


图 4 *KCS* 蛋白多重序列比对

Fig. 4 Multiple sequence alignment of *KCS* protein

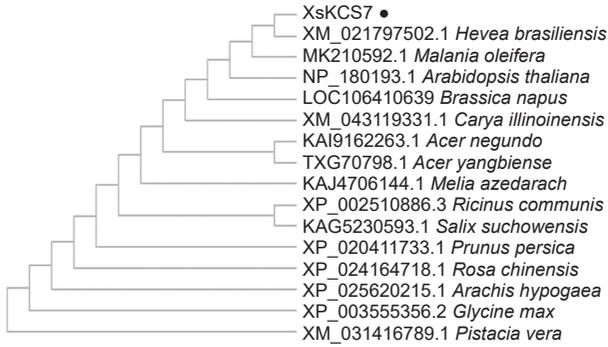
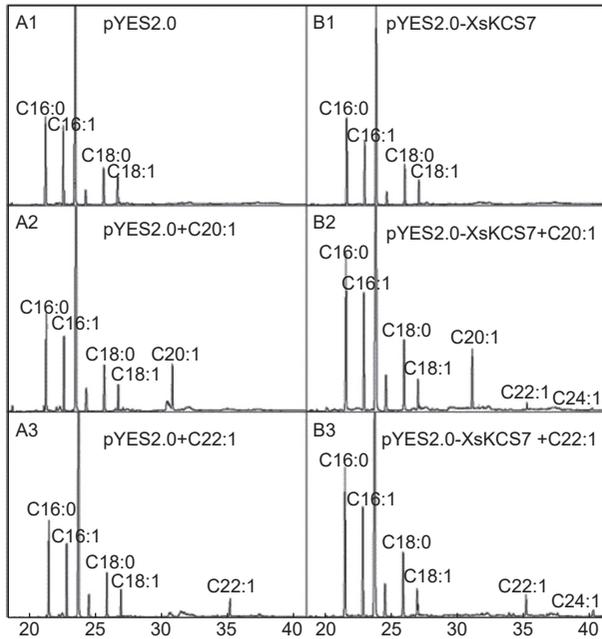


图 5 KCS 蛋白系统性进化树分析

Fig. 5 Phylogenetic tree analysis of KCS protein



注：对照组 pYES2.0 (A1, A2, A3)，实验组 pYES2.0-XsKCS7 (B1, B2, B3)；C18 : 1 油酸，C20 : 1 花生烯酸，C22 : 1 芥酸，C24 : 1 神经酸

Notes: The control (A1, A2, A3) and pYES2.0-XsKCS7 (B1, B2, B3). C18 : 1, oleic acid; C20 : 1, arachidonic acid; C22 : 1, erucic acid; C24 : 1, nervonic acid

图 6 酵母细胞提取物脂肪酸甲酯 GC-MS 峰图

Fig. 6 GC-MS analysis for FA components in yeast cells

并鉴定其具有调控神经酸合成的功能，然而在文冠果中尚未解析。

本研究以文冠果基因组为参考基因组，重新分析文冠果种子不同发育时期转录组测序数据，发现 *XsKCS7* 基因在种子的表达量明显高于其他 *KCS* 基因。通过 PCR 法扩增得到 *XsKCS7* 基因序列，编码 503 个氨基酸；生物信息学分析发现，*XsKCS7* 蛋白序列与其他物种 *KCS* 蛋白序列均具有

KCS 家族保守基序“GMGCSA”、“FGNTSSSS”以及“GSGFKCNSAVW”^[22]；系统进化树分析结果表明 *XsKCS7* 与其他物种 *KCS* 蛋白亲缘性关系较近，与橡胶树最近（图 5）。以上结果表明克隆的 *XsKCS7* 基因具有潜在的 3-酮酯酰-CoA 合酶功能，然而其具体的功能还需进一步研究。

真核酿酒酵母表达是适合研究具有单一催化功能蛋白的异源表达系统，该系统已被许多研究用于鉴定 *KCS* 酶的功能。例如，在酿酒酵母菌株 INVSc1 中异源表达毛果杨 (*Populus trichocarpa* L.) *PtKCS1* 和 *PtKCS2*，发现 *PtKCS1* 底物偏好为单不饱和脂肪酸，而 *PtKCS2* 偏好为多不饱和脂肪酸^[23]；银扇草和碎米荠 *KCS* 也通过酵母表达系统鉴定其具有以花生烯酸 (C20 : 1) 为底物，生成神经酸的功能^[20-21]。本研究同样使用酿酒酵母菌株 INVSc1 表达系统，分别以油酸 (C18 : 1)、花生烯酸、芥酸 (C22 : 1) 为底物异源表达文冠果 *XsKCS7* 基因，发现 *XsKCS7* 基因具有调控花生烯酸生成芥酸和催化芥酸生成神经酸的功能。以上结果表明不同物种 *KCS* 基因具有明显的底物特异性调控功能，而至今为止已被功能鉴定的 *KCS* 基因较少，应用生物信息学预测其功能的准确性较差，由此可见，单一 *KCS* 基因的功能研究极为必要。本研究通过酵母异源表达系统鉴定 *XsKCS7* 基因具有调控芥酸和神经酸的合成功能，同时前期研究表明 *XsKCS7* 基因在文冠果种子发育期高表达，由此可见，*XsKCS7* 基因是调控文冠果种子油超长链脂肪酸芥酸和神经酸合成的关键基因，为解析文冠果神经酸合成通路提供了扎实基础。

4 结论

依据 *KCS* 基因在文冠果基因组染色体中的位置分布将 20 个 *KCS* 基因编号为 *XsKCS1*~*XsKCS20*。以本研究室测序得到的文冠果基因组为参考基因组，重新分析文冠果种子不同发育时期转录组数据 (SRA 编号: PRJNA493982)，发现 *XsKCS7* 基因在种子中的表达量远高于其他 *KCS* 基因。本研究克隆了文冠果 *XsKCS7* 基因，生物信息学分析其具有潜在的 3-酮酯酰-CoA 合酶功能，在酿酒酵母异源表达 *XsKCS7* 基因鉴定其具有调控芥酸和神经酸的合成功能。综上所述，*XsKCS7* 基因是调控文冠果种子芥酸和神经酸合成的关键基因。

参考文献:

- [1] 李育材. 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] MA Y X, BI Q X, LI G T, *et al.* Provenance variations in kernel oil content, fatty acid profile and biodiesel properties of *Xanthoceras sorbifolium* Bunge in northern China[J]. Industrial Crops and Products, 2020, 151: 112487.
- [3] YU H Y, FAN S G, BI Q X, *et al.* Seed morphology, oil content and fatty acid composition variability assessment in yellow horn (*Xanthoceras sorbifolium* Bunge) germplasm for optimum biodiesel production[J]. Industrial Crops and Products, 2017, 97: 425-430.
- [4] LIANG Q, LIU J N, FANG H C, *et al.* Genomic and transcriptomic analyses provide insights into valuable fatty acid biosynthesis and environmental adaptation of yellowhorn[J]. Frontiers in Plant Science, 2022, 13: 991197.
- [5] TERLUK M R, TIEU J, SAHASRABUDHE S A, *et al.* Nervonic acid attenuates accumulation of very long-chain fatty acids and is a potential therapy for adrenoleukodystrophy[J]. Neurotherapeutics, 2022, 19(3): 1007-1017.
- [6] UMEMOTO H, YASUGI S, TSUDA S, *et al.* Protective effect of nervonic acid against 6-hydroxydopamine-induced oxidative stress in PC-12 cells[J]. Journal of Oleo Science, 2021, 70(1): 95-102.
- [7] TSUJIMOTO M, KIMURA K. New fatty acids in shark-liver oil[J]. Journal of the Society of Chemical Industry Japan, 1926, 46: 385-388.
- [8] KLENK E. A new cerebroside from the brain[J]. Physiological Chemistry, 1925, 145: 244-260.
- [9] 杜显龙, 钱进, 杨晓理. 神经酸(顺-15-二十四碳烯酸)的毒性研究 II——90天喂养试验[J]. 中国老年保健医学, 2020, 18(1): 31-34.
- [10] LIU J F, WANG T, JIANG Y X, *et al.* Harnessing β -estradiol inducible expression system to overproduce nervonic acid in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Process Biochemistry, 2020, 92: 37-42.
- [11] MA Q Y, SUN T L, LI S S, *et al.* The *Acer truncatum* genome provides insights into nervonic acid biosynthesis[J]. Plant Journal, 2020, 104(3): 662-678.
- [12] YANG T Q, YU Q, XU W, *et al.* Transcriptome analysis reveals crucial genes involved in the biosynthesis of nervonic acid in woody *Malania oleifera* oilseeds[J]. BMC Plant Biology, 2018, 18(1): 247.
- [13] MILLAR A A, KUNST L. Very-long-chain fatty acid biosynthesis is controlled through the expression and specificity of the condensing enzyme[J]. Plant Journal, 1997, 12(1): 121-131.
- [14] LI J W, CHEN C J, ZENG Z H, *et al.* SapBase (Sapinaceae Genomic DataBase): a central portal for functional and comparative genomics of Sapindaceae species[J]. BioRxiv, 2022, v1: 517904.
- [15] WANG L, RUAN C J, LIU L Y, *et al.* Comparative RNA-seq analysis of high- and low-oil yellow horn during embryonic development[J]. Int. J. Mol. Sci., 2018, 19(10): 3071.
- [16] BI Q X, ZHAO Y, DU W, *et al.* Pseudomolecule-level assembly of the Chinese oil tree yellowhorn (*Xanthoceras sorbifolium*) genome[J]. Giga Science, 2019, 8(6): giz070.
- [17] 胡又佳, 高枫, 朱春宝, 等. PEG/LiAc转化酵母细胞方法的改进[J]. 生物技术, 1998, 8(5): 22-26 + 49.
- [18] LIU Y F, LI Q T, LU X, *et al.* Soybean *GmMYB73* promotes lipid accumulation in transgenic plants[J]. BMC plant biology, 2014, 14(1): 73.
- [19] LI Z W, MA S J, SONG H, *et al.* A 3-ketoacyl-CoA synthase 11 (KCS11) homolog from *Malania oleifera* synthesizes nervonic acid in plants rich in 11Z-eicosenoic acid[J]. Tree Physiology, 2021, 41(2): 331-342.
- [20] GUO Y M, MIETKIEWSKA E, FRANCIS T, *et al.* 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 Molecular Biology, 2009, 69(5): 565-575.
- [21] TAYLOR D C, FRANCIS T, GUO Y M, *et al.* Molecular cloning and characterization of a KCS gene from *Cardamine graeca* and its heterologous expression in Brassica oilseeds to engineer high nervonic acid oils for potential medical and industrial use[J]. Plant Biotechnology Journal, 2009, 7(9): 925-938.
- [22] 李云琴, 陈中华, 原晓龙, 等. 蒜头果中3-酮酰-CoA合酶基因克隆与表达分析[J]. 中国油脂, 2019, 44(3): 128-133.
- [23] CHEN J Y, MUMTAZ A, GONZALES-VIGIL E. Evolution and molecular basis of substrate specificity in a 3-ketoacyl-CoA synthase gene cluster from *Populus trichocarpa*[J]. Journal of Biological Chemistry, 2022, 298(10): 102496.

Cloning and Yeast Expression Function Identification of High Expression *XsKCS7* Gene in *Xanthoceras sorbifolium* Seed

LIANG Chong-jun^{1,2}, LI Lin-kun², HU Zhen-hua³, ZHANG Wei², XU Hui-hui², WANG Li-bing^{1,2}

(1. Forestry College, Hainan University, Haikou 570228, Hainan, China; 2. Research Institute of Forestry, Chinese Academy of Forestry, Beijing 100091, China; 3. Kailu Forestry and Grassland Administration, Tongliao 028400, Neimenggu, China)

Abstract: [Objective] To explore the key genes of regulating nervonic acid biosynthesis in *Xanthoceras sorbifolium* seeds. [Method] This study analyzed the expression pattern of the 3-ketoesteryl-CoA synthase (3-ketoacyl-CoA synthase, KCS) gene family in seeds at different developmental periods according to the combined transcriptome of the reference genome. Gene *XsKCS7* was cloned by RT-PCR, and was analyzed by Bioinformatics analysis of *XsKCS7* protein. And the *XsKCS7* gene was transformed into *Saccharomyces cerevisiae* to identify the gene function. [Result] The expression level of *XsKCS7* gene in seeds of *X. sorbifolium* was much higher than other *KCS* genes. The open reading frame of *XsKCS7* was 1,512 bp, encoding 503 amino acids, had three typical conserved domains of *KCS* family "GMGCSA", "FGNTSSSS" and "GSGFKCNSAVW", and a close relationship with the homologous gene of *Hevea brasiliensis*, at 67.62%. *XsKCS7* heterologous transformation of *Saccharomyces cerevisiae* regulated the synthesis of erucic acid and nervonic acid. [Conclusion] : *XsKCS7* gene is a key gene that regulates the synthesis of erucic acid and nervonic acid in seeds of *X. sorbifolium*.

Keywords: *Xanthoceras sorbifolium*; 3-ketoacyl-CoA synthase; yeast expression; Nervonic acid synthesis.

(责任编辑: 张 研)