

油用向日葵脂肪酸脱氢酶基因 *FAD2-1* 的克隆与表达分析

周 菲,黄绪堂,梁春波,李 岑,王文军,马 军,刘 岩

(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:为了解 *FAD2-1* 基因在油用向日葵品质形成过程中的作用,以油用向日葵为材料,利用 RT-PCR 方法对高含油率保持系材料改 HA89(含油率为 46%)和低含油率保持系材料 86-1(含油率为 38%)的脂肪酸脱氢酶基因 *FAD2-1* 进行克隆与表达分析。结果表明:获得了脂肪酸脱氢酶基因 *FAD2-1* 全长 cDNA 编码序列,全长为 1 137 bp,编码 378 个氨基酸。核苷酸序列和蛋白序列比对结果表明,该基因在这 2 份材料中第 44 位和第 102 位核苷酸存在差异,并且都导致了氨基酸的改变。种子发育不同阶段油酸和亚油酸积累动态分析和 qRT-PCR 研究结果表明,*FAD2-1* 基因表达量变化趋势与亚油酸含量变化趋势基本一致,而与油酸含量变化趋势基本相反。

关键词:油用向日葵;*FAD2-1*;油酸;基因克隆;表达分析

中图分类号:S565.5 **文献标识码:**A **文章编号:**1002-2767(2016)05-0008-05 DOI:10.11942/j.issn1002-2767.2016.05.0008

不饱和脂肪酸根据双键个数的不同,分为单不饱和脂肪酸和多不饱和脂肪酸两种。在食物脂肪中,单不饱和脂肪酸有油酸,多不饱和脂肪酸有亚油酸、亚麻酸和花生四烯酸等^[1]。 Δ^{12} -脂肪酸脱氢酶(Δ^{12} Fatty Acid desaturases)又称油酸脱氢酶(Oleate Desaturases),是存在于植物细胞内质网膜、质体膜和蓝细菌的质膜和类囊体膜上的膜结合蛋白^[2-3]。其主要作用是在单不饱和脂肪酸油酸(Oleic Acid, OA, 18:1 Δ^9)的第 12 和 13 位碳原子之间插入一个双键,形成含有 2 个双键的多不饱和脂肪酸-亚油酸(Linoleic Acid, LA, 18:2 $\Delta^{9,12}$)^[4-5]。 Δ^{12} -脂肪酸脱氢酶是油酸脱氢形成亚油酸的关键酶,是多不饱和脂肪酸(Polyunsaturated Fatty Acid, PUFA)代谢、 ω -3、 ω -6 途径的限速酶,控制着植物细胞中大多数不饱和脂肪的合成,只存在于植物和微生物中,人和哺乳动物细胞中缺乏在脂肪酸的第 9 位碳原子以上位置引入不饱和双键的脱氢酶^[6-7]。

向日葵是世界上最重要的油料作物之一,其油中的亚油酸含量高达 73.9%,远高于大豆油、菜籽油、花生油和胡麻油。亚油酸是一种多不饱

和脂肪酸,是人体必需的脂肪酸,有益于人体健康,但是会选择性刺激血管内壁细胞产生炎症,并同样具有氧化稳定性差、储存时间短的缺点。而研究发现,植物油中的油酸作为一种重要的不饱和脂肪酸,具有降低人体低密度脂蛋白含量,减少胆固醇形成,减少氧化和酸败而使油的货架期延长等作用。我国向日葵产区主要分布在东北、西北和华北,在冷凉的气候条件下,生产的葵花籽油,一般含有 70% 或更多的亚油酸^[8],所以育种研究的一个重要目标就是提高种子油中油酸的含量。本研究分别在高低含油率不同的油用向日葵中克隆脂肪酸脱氢酶基因 *FAD2-1* 全长 cDNA 编码序列,并分析种子发育不同时期该基因的表达,这对于揭示向日葵油脂合成的基本规律具有重大的理论意义,对于提高向日葵品质的分子育种具有重大的实用价值。

1 材料与方法

1.1 材料

选用高含油率保持系材料改 HA89(含油率为 46%,油酸含量 37%)和低含油率保持系材料 86-1(含油率为 38%,油酸含量 25%)种植于试验田。从开花后开始,选取开花一致的花盘挂牌,标明日期,按照开花不同的天数对向日葵籽粒进行取材,开花 7 d 后开始取样,每 5 d 取样 5 盘,取至开花后 47 d,每盘取中部籽粒 300 粒:一部分样品保存在室温下,用于油酸和亚油酸含量的测定;另一部分冻存于 -80℃ 冰箱中,用于 *FAD2-1* cD-

收稿日期:2016-04-05

基金项目:国家向日葵现代产业技术体系资助项目(CARS-16);哈尔滨市科技局资助项目(2013RFQYJ027);黑龙江省农业科技创新工程资助项目(2014QN020)

第一作者简介:周菲(1984-),女,辽宁省丹东市人,硕士,助理研究员,从事向日葵相关研究。E-mail:zhoufei66666@163.com。

NA 序列的克隆及荧光定量 PCR 表达分析。

1.2 方法

1.2.1 油酸和亚油酸含量的测定 送农业部谷物及制品质量监督检验测试中心检测,油酸、亚油酸含量的测定执行国标 GB/T 17376-2008 的规定。

1.2.2 *FAD2-1* 全长 cDNA 编码序列的克隆

(1)总 RNA 的提取和 cDNA 的合成:采用原平皓总 RNA 提取试剂盒分别提取改 HA89 和 86-1 开花 7、12、17、22、27、32、37、42、47 d 籽仁的总 RNA。采用购自 MBI 公司的 Fermentas Reverse Transcriptase 合成 cDNA 第一条链。(2)引物设计:根据 NCBI 公布的向日葵 *FAD2-1* 的 cDNA 序列 AF251842.1,利用 Primer 5.0 软件在全长编码序列两侧保守区域设计特异引物 *FAD2-1F1* 和 *FAD2-1R1*,以向日葵看家基因(House-Keeping Gene) β actin (GenBank 登录号:AF282624)作为内参,设计内参引物 β -actinF 和 β -actinR(见表 1)。(3)*FAD2-1* 全长 cDNA 编码序列的克隆:分别以改 HA89 和 86-1 开花 7 d 的籽仁 cDNA 为模板,用 *FAD2-1F1*/*FAD2-1R1* 引物扩增 *FAD2-1* 全长 cDNA 编码序列,PCR 扩增的条件:95℃预变性 5 min 后,94℃30 s,52℃30 s,72℃90 s,共 30 个循环,最后 72℃延伸 7 min。扩增产物用 1%琼脂糖凝胶电泳进行分离,回收目标产物并克隆到 pGM-T 载体,挑取阳性克隆,经菌落 PCR 验证送上海生工测序公司进行测序。

表 1 本研究设计的引物
Table 1 Primer used intest

引物名称 Primer name	引物序列 Sequence
<i>FAD2-1F1</i> (基因克隆)	5'-CTGGTCAAACAGTCAACATATGGGT-3'
<i>FAD2-1R1</i> (基因克隆)	5'-ACCCAGAACCAGGACAAG-3'
β -actinF	5'-ATGGCTCACGAAGGGGAAATCCAGC-3'
β -actinR	5'-GTCCCATACCAACCATAACACC-3'
<i>FAD2-1F2</i> (qRT-PCR)	5'-CTGGTCAAACAGTCAACATATGGGT-3'
<i>FAD2-1R2</i> (qRT-PCR)	5'-CAGCGTTATGTTGAGGT-3'

1.2.3 *FAD2-1* 全长 cDNA 编码序列的分析

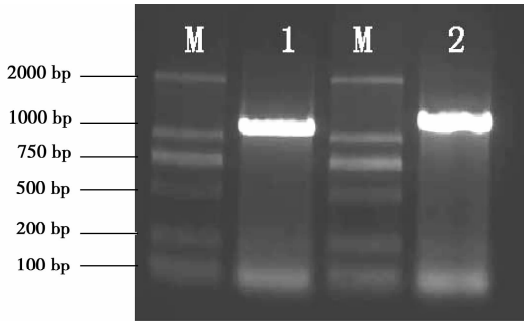
利用 DNAMAN 软件对克隆得到的 2 个 *FAD2-1* 序列和 NCBI 公布的向日葵 *FAD2-1* 序列进行比对,在 NCBI 提供并维护的 BLAST 数据库中进行序列同源性比对和相似性搜索,用 MEGA6.06 软件构建系统进化树。

1.2.4 *FAD2-1* 的荧光定量 PCR 表达分析 所用试剂为 SYBR Green Realtime PCR Master Mix 试剂盒,所用仪器为 ABI 7500 实时荧光定量 PCR 仪,反应体系为 cDNA 模板(50 mg·μL⁻¹) 2.0 μL、上下游引物(10 μmol·L⁻¹)各 1.0 μL、PCR Master Mix 10.0 μL 和 ddH₂O 6.0 μL,所用引物为 *FAD2-1F2* 和 *FAD2-1R2*(见表 1),每个样品 3 个重复。*FAD2-1* 和 β -actin PCR 扩增条件为:94℃30 s 预变性后,95℃15 s,58℃15 s,72℃45 s,共 40 个循环,,95℃15 s,60℃15 s,95℃15 s,60℃15 s。荧光定量 PCR 数据分析采用相对 2^{-ΔΔCT} 法。

2 结果与分析

2.1 *FAD2-1* 全长编码序列的克隆及序列分析

通过引物 *FAD2-1F1* 和 *FAD2-1R1* 扩增,从两份油用向日葵材料中都得到了长度为 1 137 bp 的片段(见图 1)。测序表明,改 HA89 和 86-1 的 *FAD2-1* 基因编码区的核苷酸序列长度均为 1 137 bp,编码 378 个氨基酸。



M: Marker; 1: 86-1中扩增产物; 2: 改HA89中扩增产物
M: Marker; 1: Amplification production in 86-1; 2: Amplification production in ModifiedHA89

图 1 *FAD2-1* 基因全长 cDNA 编码序列的扩增电泳图
Fig.1 RT-PCR anlysis of *FAD2-1* complete encoding sequence

通过比对 2 份材料 *FAD2-1* 基因的核苷酸序列(见图 2)结果发现,86-1 与 NCBI 上公布的向日葵 *FAD2-1* 基因(Genebank: AAL68981.1)的核苷酸序列完全一致。改 HA89 与 NCBI 上公布的向日葵中 *FAD2-1* 基因序列一致性为 99.82%,其中第 44 位和第 102 位核苷酸存在差异,公布的 *FAD2-1* 这两个位置核苷酸分别为 T 和 A,而改 HA89 中分别为 C 和 T。其中第 44 位核苷酸差异导致甘氨酸改变为谷氨酸,第 102 位核苷酸差异导致异亮氨酸改变为苯丙氨酸。

2.2 进化关系分析

利用 Mega6.06 软件对 30 个物种间 *FAD2*

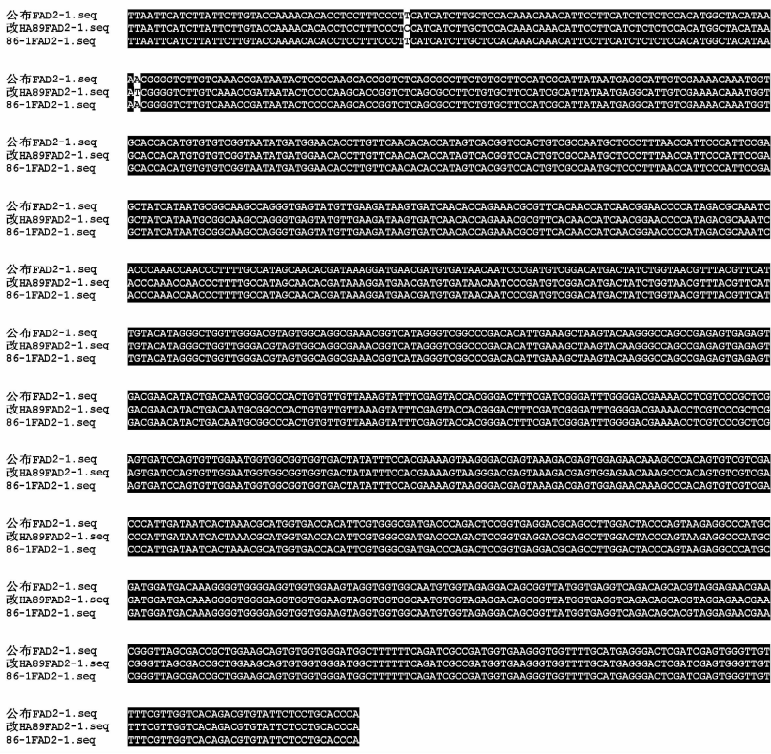


图 2 两份向日葵材料与 NCBI 上公布向日葵 *FAD2-1* 序列的核苷酸序列比对

Fig. 2 Nucleotide sequence alignment of *FAD2-1* sequence in different sunflower materials and sequence published on NCBI

基因的氨基酸序列进行比较,结果表明,异果菊 *FAD2* 蛋白序列 (gi45643653) 与克隆得到的改 HA89 的 *FAD2* 蛋白序列 同源性最高,为 74.35%。利用 MEGA6.06 软件,选择邻位相连法 (NJ),设定重复抽样次数为 1 000,对 30 个物种的 *FAD2* 蛋白序列构建 NJ 系统进化树表明,向日葵的 *FAD2-1* 基因和异果菊 (gi45643653) 的亲缘关系最近,除异果菊外与之最相近的物种为还阳参 (见图 3)。

2.3 *FAD2-1* 的表达分析

2.3.1 油酸和亚油酸含量的测定 两份材料亚油酸含量都是花后 17 d 后开始下降,27 d 后开始上升,86-1 上升幅度大于改 HA89,改 HA89 在 42 d 后有所下降,86-1 在 37 d 后有所下降,42 d 后又有所上升。油酸含量积累动态正好相反,都是在 17 d 后开始大幅度增长,27 d 上升至最高点 后开始有所下降,改 HA89 在 42 d 后有所上升,86-1 在 37 d 后有所上升,42 d 后又有所下降 (见图 4 和图 5)。两份材料在种子发育不同阶段的油酸和亚油酸含量积累动态基本一致。

2.3.2 *FAD2-1* 在种子发育不同时期的荧光定量 PCR 检测 在含油率不同的两份材料中, *FAD2-1* 在 7~12 d 表达量均上升,在 12~22 d

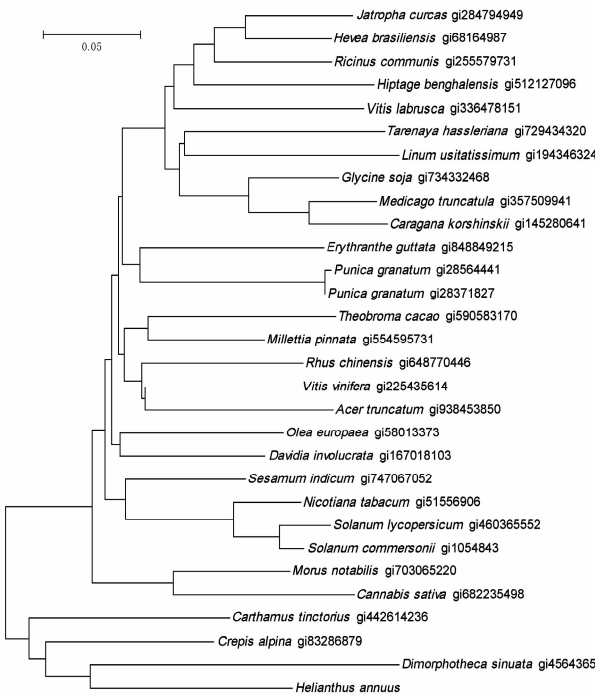


图 3 不同物种间 *FAD2* 氨基酸序列 NJ 树

Fig. 3 Neighbor-joining tree of *FAD2* amino acid sequences in different species

都是表达量较高时期,都有小幅度的变化,其中,

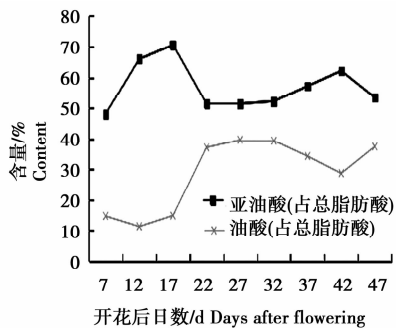


图 4 改 HA89 油酸和亚油酸的积累动态
Fig. 4 Oleic acid and linoleic acid accumulative dynamics of Modified HA89

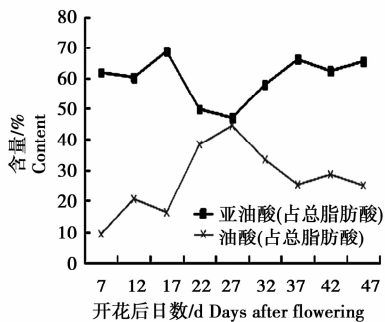


图 5 86-1 油酸和亚油酸的积累动态
Fig. 5 Oleic acid and linoleic acid accumulative dynamics of 86-1

改 HA89 中在 12~22 d 表达量先下降后上升, 86-1 中表达量则是先上升后下降, 从 22~37 d 表达量均大幅度下降, 改 HA89 中在 37 d 后表达量有所上升, 86-1 中表达量继续下降至 42 d 后有所上升(见图 6)。在两份材料中, *FAD2-1* 在种子发育不同阶段表达量的变化趋势基本一致。

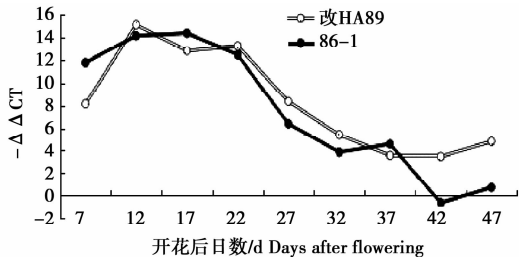


图 6 *FAD2-1* 在两份材料开花不同日数种子中的表达量
Fig. 6 Expression quantity of *FAD2-1* from seeds of the two materials in different flowering days

3 结论与讨论

在两份油用向日葵中, 亚油酸在 7~22 d 含量较高, 此时 *FAD2-1* 表达量也是相对较高时期; 在 22~37 d, 亚油酸含量相对降低, 油酸含量较高, 此时 *FAD2-1* 表达量大幅度下降, 表明

FAD2-1 基因表达量变化与亚油酸的含量变化趋势一致, 而与油酸含量变化趋势相反, 也就是说 *FAD2-1* 可能控制着种子中脂肪的脱饱和, 是向日葵种子油酸转化成亚油酸的关键基因。在高低含油率不同的这两份材料之间在种子发育不同阶段的油酸和亚油酸含量积累动态和表达量的变化趋势稍有差别, 但大体基本一致。

油酸去饱和酶 *FAD2* 是植物合成多不饱和脂肪酸的关键酶, *FAD2* 全长基因目前已经在多种植物、动物、藻类、真菌和细菌得到了分离, 在拟南芥、棉花、烟草、油菜等植物中已经进行了 *FAD2* 基因的转基因研究, 大量的油料作物已经被改良^[9-12]。本研究在向日葵中克隆得到了 *FAD2-1* 全长 cDNA 编码序列, 推测它是种子油酸转化成亚油酸的关键基因, 今后可通过反义表达等分子手段提高向日葵油酸含量, 对于向日葵品质育种以及阐述向日葵种子发育分子机理具有重要意义。

利用 RT-PCR 方法从两份高低含油率不同的油用向日葵保持系材料中克隆出 *FAD2-1* 全长 cDNA 编码序列, 该基因在两份材料中第 44 位和第 102 位核苷酸存在差异, 改 HA89 中这两个位置核苷酸分别为 C 和 T, 而 86-1 中分别为 T 和 A, 并且都导致了氨基酸的改变, 其中第 44 位核苷酸差异导致甘氨酸改变为谷氨酸, 第 102 位核苷酸差异导致异亮氨酸改变为苯丙氨酸。蛋白序列同源分析表明, 向日葵 *FAD2-1* 基因和异果菊(gi45643653)的亲缘关系最近。种子发育不同阶段油酸和亚油酸积累动态分析和 qRT-PCR 研究结果表明: *FAD2-1* 基因表达量变化趋势与亚油酸含量变化趋势基本一致, 而与油酸含量变化趋势基本相反, 推测 *FAD2-1* 很可能控制着向日葵种子中脂肪的脱饱和, 是油酸转化成亚油酸的关键基因。

参考文献:

[1] 戴晓峰, 肖玲, 武玉花, 等. 植物脂肪酸去饱和酶及其编码基因研究进展[J]. 植物学通报, 2007, 24(1): 105-113.
[2] Alonso D L, Maroto F G, Ruiz R G, et al. Evolution of the membrane-bound fatty acid desaturases [J]. Biochemical Systematics and Ecology, 2003, 31: 1111-1124.
[3] Laszlo M, Dmitry A L, Zoltan G, et al. Immunocytochemical localization of acyl-lipid desaturases in cyanobacterial cells: Evidence that both thylakoid membranes and cytoplasmic membranes are sites of lipid desaturation[J]. Plant Biology, 1996, 93: 10524-10527.
[4] Liu Q, Brubaker C L, Green A G, et al. Evolution of the f

- ad2-1 fatty acid desaturase 5'UTR intron and the molecular systematics of *Gossypium* (Malvaceae)[J]. American Journal of Botany, 2001, 88(1): 92-102.
- [5] Seiki T, Eiji S, Akiko T, et al. Improvement of the fatty acid composition of an oil-producing filamentous fungus, *Mortierella alpina* 1S-4, through RNA interference with 12-desaturase gene expression[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2005, 71(9): 5124-5128.
- [6] 张琦, 李明春, 孙红妍, 等. Δ^6 -脂肪酸脱氢酶的分子生物学研究进展[J]. 生物工程学报, 2004, 20(3): 319-324.
- [7] Jung S, Swift D, Sengoku E, et al. The high oleate trait in the cultivated peanut (*Arachis hypogaea* L.). I. Isolation and characterization of two genes encoding microsomal oleoyl-PC desaturases[J]. Molecular and General Genetics, 2000, 263: 796-805.
- [8] 葛春芳, 张鉴, 刘秋. 气候条件对向日葵脂肪酸组成的影响[J]. 辽宁农业科学, 1996(4): 10-12.
- [9] Mietkiewska E, Brost J, Giblin E, et al. A *Tropaeolum majus* FAD2 cDNA complements the FAD2 mutation in transgenic *Arabidopsis*[J]. Plant Sci, 2006, 171: 187-193.
- [10] Chapman K, Brown S, Sparace S, et al. Transgenic cotton plants with increased seed oleic acid content[J]. JAOCS, 2001, 8: 941-947.
- [11] Yang M F, Zheng G L, Zhang F Y, et al. FAD2-silencing has pleiotropic effect on polar lipids of leaves and varied effect in different organs of transgenic tobacco[J]. Plant Science, 2006, 46: 1225-1236.
- [12] Scarth R, Tang J. Modification of Brassica oil using conventional and transgenic approaches[J]. Crop Science, 2006, 46: 1225-1236.

Molecular Cloning and Expression Analysis of Fatty Acid Dehydrogenase Gene *FAD2-1* in Oil Sunflower (*Helianthus annuus* L.)

ZHOU Fei, HUANG Xu-tang, LIANG Chun-bo, LI Cen, WANG Wen-jun, MA Jun, LIU Yan
(Institute of Industrial Crops, Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin, Heilongjiang 150086)

Abstract: In order to understand the role of *FAD2-1* gene in the process of sunflower quality formation, taking oil sunflower as material, full length cDNA coding sequence of the fatty acid dehydrogenase gene in high oil content keep materials Modified HA89 (oil content of 46%) and low oil content keep materials 86-1 (oil content of 38%) was obtained by RT-PCR method. Sequence analysis showed that the full length of the cDNA was 1 137 bp, encoding 378 amino acids. Nucleotide sequence and protein sequence alignment showed that the 44th and 102nd nucleotides of the gene were different between the two materials, and which both lead to the change of the amino acid. The results of oleic acid and linoleic acid accumulation dynamic analysis in different stages of seed development and qRT-PCR showed that the variation trend of *FAD2-1* gene expression was consistent with linoleic acid content, which was opposite to oleic acid content.

Keywords: oil sunflower; *FAD2-1*; oleic acid; gene clone; expression analysis

(该文作者还有郭永利, 单位同第一作者)

致 读 者

为适应我国信息化建设, 扩大大刊及作者知识信息交流渠道, 本刊现被《中国学术期刊网
络出版总库》及 CNKI 等系列数据库收录, 其作者文章著作权使用费与本刊稿酬一次性给付。
如作者不同意文章被收录, 请在来稿时声明, 本刊将做适当处理。

《黑龙江农业科学》编辑部