

油用向日葵 *FAD2-1* 基因 RT-PCR 体系的建立与优化

周 菲,刘 岩,黄绪堂,梁春波,王文军,李 岑,郭永利
(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:为了建立向日葵 *FAD2-1* 基因高效特异的 PCR 扩增体系,以油用向日葵 86-1 为材料提取总 RNA,并反转录合成 cDNA,以 cDNA 第一条链为模板对 *FAD2-1* 基因全长编码序列的 PCR 体系进行了优化。结果表明:根据已公布的 *FAD2-1* 序列设计 3 对特异性引物,每对引物设计了 5 个退火温度,筛选出适于该基因 PCR 扩增的引物及其退火温度,并将 PCR 扩增条件中循环数缩短为 30 次,延伸时间缩短为 7 min,此改进提高了 PCR 反应的效率。

关键词:油用向日葵;*FAD2-1*;RT-PCR

中图分类号:S565.5 **文献标识码:**A **文章编号:**1002-2767(2016)11-0008-03 **DOI:**10.11942/j.issn1002-2767.2016.11.0008

向日葵属菊科向日葵属,是世界上最重要的油料作物之一,油用型向日葵生产的葵花油不饱和脂肪酸含量高于大豆、花生、油菜等油料作物,是优质的保健食用油。 Δ^{12} -脂肪酸脱氢酶基因 *FAD2-1*,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 $\Delta^9,12$)^[1-2]。为建立向日葵 *FAD2-1* 基因高效特异的 PCR 扩增体系,本研究以油用向日葵 86-1 籽仁为材料,对扩增 *FAD2-1* 基因全长编码序列的 RT-PCR 反应进行优化,为后续克隆该基因全长奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

以黑龙江省农业科学院经济作物研究所自育的油用向日葵保持系 86-1 的籽仁为试验材料,于开花后 12 d 进行取材,迅速放入液氮中冷冻,之后冻存于-80℃冰箱中备用。

收稿日期:2016-09-20
基金项目:黑龙江省农业科技创新工程资助项目(2014QN020);哈尔滨市科学技术局科技创新人才资助项目(2013RFQYJ027);哈尔滨市科学技术局科技创新人才资助项目(2013RFQYJ034);国家向日葵现代产业技术体系资助项目(CARS-16)
第一作者简介:周菲(1984-),女,辽宁省丹东市人,硕士,助理研究员,从事向日葵研究工作。E-mail:zhoufei66666@163.com。

Bioinformatics Analysis of the Gene *GRMZM2G398848* Related to Kernel Row Number in Maize

SUN Pei-yuan
(Qiqihar Branch of Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Qiqihar, Heilongjiang 161041)

Abstract: The characters of the gene *GRMZM2G398848* related to kernel row number was analyzed by bioinformatics tools, including the physical and chemical properties, transmembrane domain, subcellular localization, functional domain and 3D structure. The results showed that this protein was an unstable hydrophilic protein containing 9 195 atoms. The molecular weight of the protein containing a F-box superfamily and two AMN1 superfamilies was 65.681 1 kDa. It was no signal peptide, no transmembrane domain, and contained alpha-helix, random coil, extended strand and β folding.

Keywords: maize; kernel row number; *GRMZM2G398848*; bioinformatics analysis

RNA 的提取采用原平皓总 RNA 提取试剂盒。反转录采用购自 MBI 公司的 Fermentas Reverse Transcriptase 合成 cDNA 第一条链。PCR 所用试剂为购自 MBI 公司的 Fermentas *Taq* 酶、buffer、 Mg^{2+} 、dNTPmix。

1.2 方法

1.2.1 *FAD2-1* 基因的引物设计 根据 NCBI 公布的向日葵 *FAD2-1* 的 cDNA 序列 AF251842.1,全长编码序列长度为 1 137 bp。利用 Primer 5.0 软件在全长编码序列两侧保守区域设计 3 对特异引物(见表 1),引物由上海生工生物工程公司合成。

表 1 设计的引物

Table 1 Primer used in this study	
引物名称 Primer	引物序列 Primer sequence
FAD2-1aF	5'-CTGGTCAAACAGTCAACATATGGGT-3'
FAD2-1aR	5'-ACCCAGAACCAGGACAAG-3'
FAD2-1bF	5'-CTGGTCAAACAGTCAACATATGGGT-3'
FAD2-1bR	5'-CCAGAACCAGGACAAGAC-3'
FAD2-1cF	5'-CTGGTCAAACAGTCAACATATGGGT-3'
FAD2-1cR	5'-CACCCAACACGGCAACAC-3'

1.2.2 PCR 反应体系优化 以 cDNA 第一条链为模板,进行 PCR 扩增,采用 25 μ L 的反应体系:

cDNA 2 μ L, buffer 2.5 μ L, dNTP (2 mM) 2.5 μ L, Mg^{2+} 2 μ L, 引物各 1.5 μ L, *Taq* 酶 0.15 μ L, ddH₂O 12.85 μ L。

PCR 扩增的条件:95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min 后,94 $^{\circ}$ C 30 s,退火 30 s,72 $^{\circ}$ C 90 s,共 40 个循环,最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。

设计 3 对引物,每对引物设计 5 个退火温度,确定退火温度后,进一步优化 PCR 反应条件。

2 结果与分析

2.1 总 RNA 的提取

将提取的总 RNA 用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测,28 S、18 S、5 S 条带清晰,亮度比例适中(见图 1)。总 RNA 用紫外分光光度计检测 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 为 1.97,OD₂₆₀/OD₂₃₀ 为 2.02,说明 RNA 质量较好,可用于进一步试验。

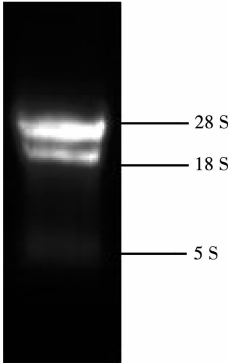
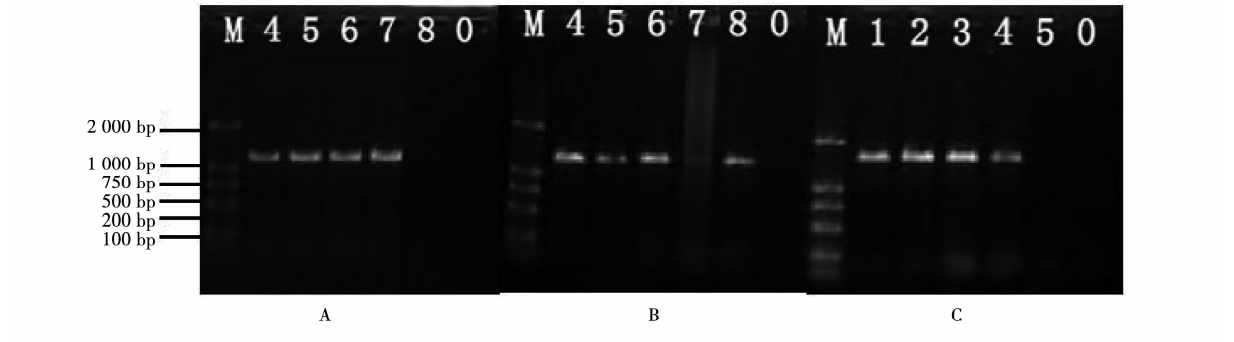


图 1 总 RNA 电泳图

Fig. 1 The electrophoretogram of total RNA



M: Marker; 1: Tm60 $^{\circ}$ C; 2: Tm59.5 $^{\circ}$ C; 3: Tm58.3 $^{\circ}$ C; 4: Tm56.4 $^{\circ}$ C; 5: Tm53.9 $^{\circ}$ C; 6: Tm52.1 $^{\circ}$ C; 7: Tm50.8 $^{\circ}$ C; 8: Tm50 $^{\circ}$ C; 0: 阴性对照
M: Marker; 1: Tm60 $^{\circ}$ C; 2: Tm59.5 $^{\circ}$ C; 3: Tm58.3 $^{\circ}$ C; 4: Tm56.4 $^{\circ}$ C; 5: Tm53.9 $^{\circ}$ C; 6: Tm52.1 $^{\circ}$ C; 7: Tm50.8 $^{\circ}$ C; 8: Tm50 $^{\circ}$ C; 0: negative control

图 2 *FAD2-1a*(A), *FAD2-1b*(B), *FAD2-1c*(C) 3 对引物不同退火温度下的 PCR 电泳图

Fig. 2 The PCR electrophoretogram of three pairs of primers *FAD2-1a*(A), *FAD2-1b*(B), *FAD2-1c*(C) in defferent annealing temperature

2.2 *FAD2-1* 基因全长编码序列的 PCR 扩增

分别设计 *FAD2-1a*、*FAD2-1b*、*FAD2-1c* 3 对引物,每对引物设 5 个退火温度梯度,PCR 结果经电泳检测发现:引物 *FAD2-1a* 在 56.4、53.9、52.1、50.8 °C 扩增出特异性条带,引物 *FAD2-1b* 在 56.4、52.1、50 °C 扩增出特异性条带,且条带清晰,引物 *FAD2-1c* 虽然在 4 个温度下扩增出清晰的特异性条带,但是片段长度与目标基因长度不符。

2.3 PCR 体系的优化

将 PCR 扩增的条件中循环数缩短为 30 次,延伸时间缩短为 7 min,PCR 检测结果表明,可扩增得到 *FAD2-1* 全长编码序列的特异性条带。因此,此改进可提高 PCR 反应的效率。

3 结论与讨论

反转录 PCR 是一种从 RNA 扩增 cDNA 拷贝的方法。RT-PCR 对于获得与克隆 mRNA 的 5'、3'末端序列和从非常少量的 mRNA 样品构建大容量的 cDNA 文库方面都是极为灵敏与通用的方法^[3]。引物是 RT-PCR 重要的影响因素,可

以通过合理设计引物,减少引物量、模板量、循环次数,提高退火温度提高引物特异性,避免非特异性条带的产生。本研究根据已公布的 *FAD2-1* 序列设计 3 对特异性引物,每对引物设计了 5 个退火温度,筛选出适于该基因 PCR 扩增的引物与退火温度,并将 PCR 扩增条件中循环数缩短为 30 次,延伸时间缩短为 7 min,此改进提高了 PCR 反应的效率。此体系的建立与优化为进一步基因克隆奠定了基础。

参考文献:

- [1] Liu Q,Brubaker C L,Green A G,et al. Evolution of the *fad2-1*fatty acid desaturase 5'UTR intron and the molecular systematics of *Gossypium*(Malvaceae)[J]. American Journal of Botany,2001,88(1): 92-102.
- [2] 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.
- [3] J 萨姆布鲁克,DW 拉塞尔. 分子克隆实验指南[M]. 3 版. 黄培堂等,译. 北京:科学出版社,2005:636-637.

Establishment and Optimization of RT-PCR System for *FAD2-1* in Oil Sunflower

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

Abstract: In order to establish a specific and efficient RT-PCR amplification system of *FAD2-1* gene in sunflower. Total RNA was extracted from oil sunflower 86-1 and reverse transcription were carried out. The first strand of cDNA as template, the PCR system of complete encoding sequence of *FAD2-1* was optimized. The results showed that three pairs of specific primers were designed according to the *FAD2-1* sequence published. Five annealing temperature were designed in each pair of primers. The appropriate primers and annealing temperature were screened out for PCR amplification of the gene. The cycles number was reduced to 30 times, and the extension time was shortened to 7 min in PCR amplification conditions. This improvement improved the efficiency of PCR reaction.

Keywords: oil sunflower; *FAD2-1*; RT-PCR

(该文作者还有马军,单位同第一作者)