

何早柯, 周茜萍, 王梦瑶, 等. 油葵脂肪酸去饱和酶基因 *HaFAD2-1* 的克隆与功能鉴定[J]. 江苏农业学报, 2017, 33( 2 ) : 273-279.  
doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2017.02.006

## 油葵脂肪酸去饱和酶基因 *HaFAD2-1* 的克隆与功能鉴定

何早柯, 周茜萍, 王梦瑶, 朱新霞, 祝建波, 孙 黎  
(石河子大学生命科学学院/农业生物技术重点实验室, 新疆 石河子 832000)

**摘要:** 为研究油葵 *FAD2-1* 基因在脂肪酸合成中的催化功能, 利用 RT-PCR 技术, 从油葵品种新葵杂 4 号未成熟种子中克隆 *HaFAD2-1* 基因的全长 cDNA 序列。将该基因序列构建穿梭表达载体 pYES2-*HaFAD2-1*, 并转化到营养缺陷型酿酒酵母菌株 INVSc1 中。将重组酵母诱导培养后对其总脂肪酸进行 GC-MS 分析。结果显示, *HaFAD2-1* 基因编码一个长 378 个氨基酸的脂肪酸去饱和酶蛋白, 分子质量 43 719, 等电点(*pI*) 为 8.38, 具有 3 个高度保守的组氨酸簇。脂肪酸甲酯气相色谱分析结果表明 *HaFAD2-1* 基因在酿酒酵母中获得表达, 能将油酸转化为亚油酸, 证明克隆得到的 *HaFAD2-1* 具有完整的催化功能。

**关键词:** 油葵; 脂肪酸去饱和酶; 基因克隆; 酿酒酵母转化; 功能分析

**中图分类号:** S565.5; Q785 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2017)02-0273-07

## Cloning and functional identification of a fatty acid desaturase gene, *HaFAD2-1*, from oil sunflower

HE Zao-ke, ZHOU Xi-ping, WANG Meng-yao, ZHU Xin-xia, ZHU Jian-bo, SUN Li  
(Key Lab of Agriculture Biotechnology/College of Life Science, Shihezi University, Shihezi 832000, China)

**Abstract:** To study the catalytic function of oil sunflower *FAD2-1* gene in fatty acid synthesis, a full length cDNA of *FAD2* named *HaFAD2-1* was isolated from developing seeds of *Helianthus annuus* L. Xinza 4 by RT-PCR. The *HaFAD2-1* gene encodes a-378aa oleic acid desaturase with predicted molecular weight of 43 719, isoelectric point (*pI*) value of 8.38 and three his-boxes. *HaFAD2-1* gene was sub-cloned into the shuttle vector pYES2 to generate the recombinant vector pYES2-*HaFAD2-1* which was transformed into a defective mutant INVSc1 strain of *Saccharomyces cerevisiae* for expression. The total fatty acids of recombinant yeast were analyzed by GC-MS after induced culture. The result showed that transgenic yeast with the vector pYES2-*HaFAD2-1* could catalyze oleic acid into linoleic acid, indicating that *HaFAD2-1* is a functional enzyme of *FAD2*.

**Key words:** oil sunflower; fatty acid desaturase; gene clone; transgenic *Saccharomyces cerevisiae*; function analysis

收稿日期: 2016-06-23

基金项目: 国家自然科学基金项目(31360052); 兵团博士基金项目(2012BB005)

作者简介: 何早柯(1992-), 男, 湖北麻城人, 硕士研究生, 主要从事植物分子生物学研究。(Tel) 18086041837; (E-mail) hzk-shzu@163.com

通讯作者: 孙 黎, (Tel) 0993-2057207; (E-mail) sunlishz@126.com

高等植物脂肪酸去饱和酶(Fatty acid desaturases, *FADs*)可以分为两大类: 一类在脂肪酸形成甘油酯之前引入第 1 个双键, 仅包括 18:0-ACP (*SAD*); 另一类在脂肪酸形成甘油酯之后在脂肪酸基团引入后面的双键, 主要包括 7 种(*FAD2*、*FAD3*、*FAD4*、*FAD5*、*FAD6*、*FAD7* 和 *FAD8*)<sup>[1]</sup>。不同种类

的 *FADs* 在基因结构、拷贝数、亚细胞定位、底物和催化机理等方面存在差异,它们相互协调共同完成高等植物不饱和脂肪酸的合成<sup>[2-3]</sup>。其中 *FAD2* 定位在内质网,以 *NADH* 为电子供体,主要功能是催化单价不饱和脂肪酸油酸(18:1 $\Delta$ 9)在 C12 和 C13 之间脱氢,生成双价不饱和脂肪酸亚油酸(18:2 $\Delta$ 9,12)<sup>[4]</sup>。

由于植物油脂中脂肪酸的不饱和程度是决定油脂品质的重要指标之一,在农业生产上有重要意义,因此 *FAD2* 基因受到研究者的普遍关注。对 *FAD2* 基因进行表达调控的遗传操作,有望调整植物种子中油酸和亚油酸的比例,改变植物油脂的品质,相关研究已在大豆、油菜、棉花等作物中取得成果。利用 RNA 干扰技术将 *FAD2* 基因沉默,能使甘蓝型油菜和芥菜型油菜中的油酸含量分别升高到 89% 和 75%<sup>[5]</sup>。利用 RNA 干扰技术抑制棉籽中 *FAD2* 基因的表达,能使棉籽油中油酸含量从 15% 提高到 77%,同时亚油酸含量明显降低,从 60% 下降到了 4%<sup>[6]</sup>。Wagner 等<sup>[7]</sup> 通过基因工程抑制种子中 *FAD2-1* 基因的表达,使大豆油中油酸含量提高到了 85% 以上。由于高油酸植物油脂的稳定性高,更耐贮藏,高温烹调不易氧化变质,因此高油酸品质的植物油脂具有巨大的经济价值及应用前景。

油葵(*Helianthus annuus* L.)是“油用向日葵”的简称,菊科向日葵属植物,是中国四大油料作物之一,其籽粒是植物油脂的主要来源<sup>[8-9]</sup>。葵花籽的含油率(约为 50%)高,油中含有大量的不饱和脂肪酸(如油酸、亚油酸等),约占总脂肪酸含量的 90%,其中亚油酸 65% 以上,油酸 23% 以上<sup>[10]</sup>。亚油酸是人体的必需脂肪酸,能降低血液胆固醇,预防和治疗动脉粥样硬化等心血管疾病,对人体健康十分有益。但高亚油酸、低油酸的葵花籽油稳定性不高,因此,深入研究油葵中的脂肪酸去饱和酶,为今后通过基因工程方法调控油葵种子中油酸和亚油酸的比例、改良油葵的品质具有一定的意义。

酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)为单细胞真核生物,培养简单、生长周期短,加之其遗传背景清晰、转基因操作平台成熟,因此在真核生物基因的功能鉴定等方面被广泛运用。酿酒酵母缺乏合成多不饱和脂肪酸的相关 *FAD* 家族酶,其体内主要存在 4 种脂肪酸,即棕榈酸(16:0)、硬脂酸(18:0)、棕榈油酸(16:1 $\Delta$ 9)和油酸(18:1 $\Delta$ 9),因此成为鉴定

其他真核生物多不饱和脂肪酸合成相关基因功能的理想材料<sup>[11-12]</sup>。

本研究从油葵发育的种子中克隆了 *HaFAD2-1* 基因,并将其在酿酒酵母中诱导表达以鉴定其功能,为通过基因工程方法改良油葵的油脂品质提供一定的理论和应用基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

供试油葵品种为新疆农业科学院经济作物研究所培育的新葵杂 4 号;大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH5 $\alpha$ 、酿酒酵母 INVSc1 (Genotype, *MATa*-a his3 $\Delta$ 1 Leu2 trp1-289,ura3-52,Invitrogen)、大肠杆菌和酵母穿梭表达载体 pYES2 (Invitrogen 公司)均由本实验室保存;限制性内切酶和 T4 DNA 连接酶购自 TaKaRa 公司;pUC-T 载体、*Taq* DNA 聚合酶、快速琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒及高纯度质粒小提试剂盒购自北京康为世纪生物科技有限公司;RNA 提取试剂 TRIzol 购自 Invitrogen 公司;酵母提取物与胰蛋白酶购自 OXOID 公司;尿嘧啶(Ura)缺省培养基购自北京泛基诺科技有限公司;有机溶剂均为色谱纯;测序及引物合成均由上海生工生物工程有限公司完成。

### 1.2 试验方法

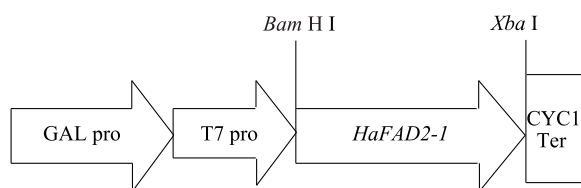
1.2.1 油葵 *HaFAD2-1* 基因全长 ORF 的克隆 根据 NCBI 中 GenBank 已报道的向日葵 *FAD2-1* 序列(AF251842),结合酵母表达载体 pYES2 的多克隆位点,设计带酶切位点、能扩增出完整 ORF 的引物:

SL145: 5'-CGGGATCCATCGGTGCAGGAGAAT-ACACG-3' (横线表示 *Bam* H I 酶切位点)

SL146: 5'-TGCTCTAGATTAATTCATCTTATTCT-TGTA-3' (横线表示 *Xba* I 酶切位点)

从油葵未成熟种子中扩增目的基因 *HaFAD2-1*。

1.2.2 *HaFAD2-1* 基因酿酒酵母表达载体的构建 以油葵 cDNA 为模板,SL145 和 SL146 为引物,PCR 得到 *HaFAD2-1* 完整的开放阅读框序列。扩增程序为:94 $^{\circ}$ C 预变性 2 min;94 $^{\circ}$ C 30 s,56 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 1 min,35 个循环;72 $^{\circ}$ C 延伸 8 min。将 PCR 产物利用琼脂糖凝胶试剂盒回收,用 *Bam* H I 和 *Xba* I 双酶切后,与用同样酶双酶切的 pYES2 载体在 T4 DNA 连接酶作用下,16 $^{\circ}$ C 过夜。将连接产物转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$  感受态细胞,鉴定正确的重组子命名为 pYES2-*HaFAD2-1* (图 1)。

图1 酵母表达载体 pYES2-*HaFAD2-1* 结构Fig.1 Structure of *Saccharomyces cerevisiae* expression vector pYES2-*HaFAD2-1*

1.2.3 酵母的遗传转化 重组质粒经菌落 PCR 及酶切鉴定后,送生工测序。分别将鉴定正确的重组子 pYES2-*HaFAD2-1* 和穿梭载体 pYES2 通过醋酸锂法<sup>[13-14]</sup>转化酿酒酵母 INVSc1,利用尿嘧啶营养缺陷型培养基筛选出重组子。

1.2.4 重组酵母的分子鉴定 利用 TRIzol 法提取经诱导培养的 pYES2-*HaFAD2-1* 酵母重组子总 RNA,以空载体 pYES2 酵母重组子为阴性对照,反转录成 cDNA,以酵母 18S rRNA 为内参,以各重组酵母 cDNA 为模板,SL145 和 SL146 为引物,进行 RT-PCR 扩增检测 *HaFAD2-1* 基因在酿酒酵母中的表达。

1.2.5 重组酵母诱导培养及脂肪酸的检测 将阳性重组子单菌落接种于 5 ml 溶液 I(4.0 ml SC-Ura+1.0 ml 10%棉籽糖)中,在 28 ℃预培养 2 d。再将预培养物加入 15.0 ml 溶液 II 中(10.8 ml SC-Ura+2.7 ml 10%棉籽糖+1.5 ml 20% 半乳糖),至  $OD_{600} = 0.2$ ,22~25 ℃培养 3 d。收集细胞,提取脂肪酸。

参照文献[15]、[16],采用酸化甲醇对提取的脂肪酸甲酯化。将甲酯化后的脂肪酸进行 GC-MS 测定,根据总离子流色谱图及各色谱峰的质谱图,通过计算机谱库检索对各组分进行定性分析。气相色谱条件为色谱柱:Rxi-5MS (30 m×0.25 mm×0.25 μm);程序升温:100 ℃保持 3 min,以 5 ℃/min 升到 260 ℃保持 5 min;载气:氮气;柱箱温度:100 ℃;进样温度:270 ℃;吹扫流量:5.0 ml/min;分流比:100:1;进样量:1 μl。

## 2 结果与分析

### 2.1 油葵 *HaFAD2-1* 基因全长的克隆及序列分析

提取油葵未成熟种子的总 RNA,反转录成 cDNA 后,通过 RT-PCR 扩增得到 *HaFAD2-1* 基因。Protparam (<http://www.expasy.ch/tools/protparam.html>) 分析 *HaFAD2-1* 序列,结果(图 2)显示,

*HaFAD2-1* 基因全长 1 137 bp,编码 378 个氨基酸,理论等电点(*pI*)为 8.38,估算蛋白质分子质量为 43 719,与已报道的向日葵 *FAD2* 基因序列(AF251842)同源性为 98.91%。TMHMM (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>)跨膜结构分析结果显示,该蛋白具有 5 个跨膜结构域,2 个跨膜结构域之间相隔很近,这是由于该类蛋白定位于内质网膜,需要借助 2 个相近跨膜结构进行膜上锚定<sup>[17]</sup>。蛋白质活性位点通过 PROSITE 数据库分析,发现有 3 个高度保守性的组氨酸簇,分别为 HECGHH、HRHH、HVVHH,位于氨基酸序列的 100~105、137~140、310~314。Los 等<sup>[18]</sup>与 Shanklin 等<sup>[19]</sup>研究结果表明,3 个特有的组氨酸簇是 *FAD2* 的活性作用位点,是催化反应的必要条件,被认为是铁原子的配合体。该功能结构预测结果与其他不同物种的 *FAD2* 去饱和酶的氨基酸簇序列相似,由此可进一步确认,该序列为 *FAD2* 去饱和酶序列。

### 2.2 油葵 *HaFAD2-1* 的同源性比较及系统进化分析

利用 DNAMAN 软件,对拟南芥 *AtFAD2* (OAP05311.1)、油菜 *BnFAD2* (AAS92240.1)、异果菊 *DaFAD2* (AAS72902.1) 及向日葵 *HaFAD2-2* (AAL68982.1)、*HaFAD2-3* (AAL68983.1) 的氨基酸序列进行同源比对,结果(图 2)显示,油葵 *HaFAD2-1* 与同属于菊科的异果菊氨基酸同源性最高,为 69.41%;与油菜同源性最低,为 62.07%。在不同拷贝数同源性比较中,油葵 *HaFAD2-1* 与向日葵 *FAD2-2*、*FAD2-3* 的氨基酸同源性分别为 61.80%、60.74%。利用 MEGA6 软件,采用 ClustalW 方法比对,将 *HaFAD2-1* 氨基酸序列与已报道的其他植物 *FAD2* 氨基酸序列进行比对,构建 Neighbor-joining 系统进化树(图 3)。聚类分析结果表明,膜结合的脂肪酸去饱和酶分成了三大支系:Δ7/Δ9 去饱和酶、Δ12/ω3 去饱和酶、Δ15 去饱和酶。基于功能标准和聚类集成位置,Δ7/Δ9 被认为是其他去饱和酶的祖先<sup>[20]</sup>。高等植物 Δ7/Δ9 基因与在进化树基础位置的藻类 Δ7 基因同源,由此说明在绿藻和植物分支中,Δ9 去饱和酶的出现可能是独立基因重复事件。油葵 *HaFAD2-1* 与花生、大豆等 *FAD2* 聚类在一起,说明高等植物在进化过程中,物种的进化与 *FAD2* 基因进化保持一致,这与传统的植物分类学吻合。

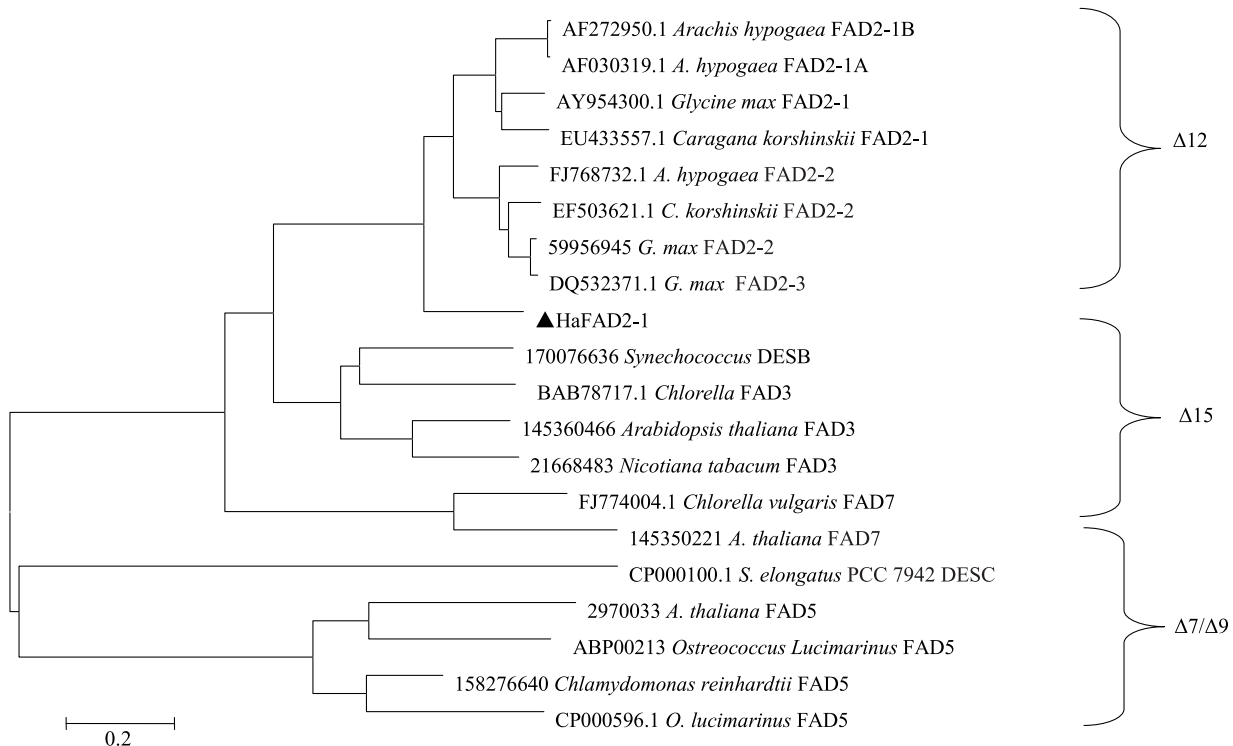


HaFAD2-1	MGAGEYTSVT...NENNF..LDVVFHARPPFTIGLKKKIPPHCFKRSLSRS..SYVLSLTIITAVLHHITTEHHLEHTFISSIAWASYVWVQGCVLTG	94
HaFAD2-2	MGAGGRMSNFVNGERKPNFDPLOQVVEYQKPPFTVGVVKKKIPPHCFKRSLSRS..SYVYVLTIASIFVYLNMYIALLESFIAYVAVPVYVWICQGCVLTG	100
HaFAD2-3	MGAGGRMSSP..NGKEKDGPKLERALHEKPPFTVGLIKKVIIPPHCFKRSLSRS..SYVYVLTIASIFVYLNMYIPLNSIAYVAVPVYVWIFQGCVLTG	99
AtFAD2-1	MGAGGRMPVF..TSSKKSETDITKRVFCERPPFTVGVVKKKIPPHCFKRSLSRS..SYVLSLTIITAVLHHITTEHHLEHTFISSIAWASYVWVQGCVLTG	99
BnFAD2-1	MGAGGRMQVS..PFSKKSETDNKICVFCETPPFTVGVVKKKIPPHCFKRSLSRS..SYVLSLTIITAVLHHITTEHHLEHTFISSIAWASYVWVQGCVLTG	99
DsFAD2-1	MGAGGCISVSETKPNQKNS..LEAFYDYPPFTISLKKKIPPHCFKRSLSRS..SYVASLTIITAVLHHITTEHHLEHTFISSIAWASYVWVQGCVLTG	97
Consensus	mgag ppf kk ipph f rs rs sy d y a y lp aw yw qgcvtg	
HaFAD2-1	VWVIAHECGHHAESDYQWDDTVGVFVILHSSLLVPYFSWKYSRRHHSNTGSLERDEVFVFPKSPKVPWYSKYFNNTVGRVSMFVTPWYSKYFNNTVGRI	194
HaFAD2-2	VWVIAHECGHHAESDYQWDDTVGVFVILHSSLLVPYFSWKYSRRHHSNTGSLERDEVFVFPKSPKVPWYSKYFNNTVGRVSMFVTPWYSKYFNNTVGRI	200
HaFAD2-3	VWVIAHECGHHAESDYQWDDTVGVFVILHSSLLVPYFSWKYSRRHHSNTGSLERDEVFVFPKSPKVPWYSKYFNNTVGRVSMFVTPWYSKYFNNTVGRI	199
AtFAD2-1	VWVIAHECGHHAESDYQWDDTVGVFVILHSSLLVPYFSWKYSRRHHSNTGSLERDEVFVFPKSPKVPWYSKYFNNTVGRVSMFVTPWYSKYFNNTVGRI	199
BnFAD2-1	VWVIAHECGHHAESDYQWDDTVGVFVILHSSLLVPYFSWKYSRRHHSNTGSLERDEVFVFPKSPKVPWYSKYFNNTVGRVSMFVTPWYSKYFNNTVGRI	199
DsFAD2-1	VWVIAHECGHHAESDYQWDDTVGVFVILHSSLLVPYFSWKYSRRHHSNTGSLERDEVFVFPKSPKVPWYSKYFNNTVGRVSMFVTPWYSKYFNNTVGRI	197
Consensus	wvi hecghh s y ddtvg hs llvpyfswkys rhhhsntgs devfvpk s nn gr	
HaFAD2-1	VSMFVT..FACHYVETSPYNERKRYQVMSDIIIGIVITSEFLLVWVMAKGLVWVICVWGVPLMVVAFVLVLTLYLQHTHPLPHYDSEEWELKGALETVD	293
HaFAD2-2	GRYYIR..FACHYVETSPYNERKRYQVMSDIIIGIVITSEFLLVWVMAKGLVWVICVWGVPLMVVAFVLVLTLYLQHTHPLPHYDSEEWELKGALETVD	299
HaFAD2-3	GRYYIR..FACHYVETSPYNERKRYQVMSDIIIGIVITSEFLLVWVMAKGLVWVICVWGVPLMVVAFVLVLTLYLQHTHPLPHYDSEEWELKGALETVD	298
AtFAD2-1	GRPYTG..FACHYVETSPYNERKRYQVMSDIIIGIVITSEFLLVWVMAKGLVWVICVWGVPLMVVAFVLVLTLYLQHTHPLPHYDSEEWELKGALETVD	298
BnFAD2-1	GRPYTG..FACHYVETSPYNERKRYQVMSDIIIGIVITSEFLLVWVMAKGLVWVICVWGVPLMVVAFVLVLTLYLQHTHPLPHYDSEEWELKGALETVD	299
DsFAD2-1	GRPYIR..FACHYVETSPYNERKRYQVMSDIIIGIVITSEFLLVWVMAKGLVWVICVWGVPLMVVAFVLVLTLYLQHTHPLPHYDSEEWELKGALETVD	296
Consensus	fach p p y r r q i s d q i l r a g y p l n flvl t lqthp lphyd ew wl gal t d	
HaFAD2-1	RDGVLNKMFFHITDTHVHHLFETMPHYAMEATBAVIFILGYYQIDGTFVVKAMWRBAKECIYVEDRQGGEGVFWYNNRM	378
HaFAD2-2	RDGVLNKMFFHITDTHVHHLFETMPHYAMEATBAVIFILGYYQIDGTFVVKAMWRBAKECIYVEDRQGGEGVFWYNNRM	383
HaFAD2-3	RDGVLNKMFFHITDTHVHHLFETMPHYAMEATBAVIFILGYYQIDGTFVVKAMWRBAKECIYVEDRQGGEGVFWYNNRM	382
AtFAD2-1	RDGVLNKMFFHITDTHVHHLFETMPHYAMEATBAVIFILGYYQIDGTFVVKAMWRBAKECIYVEDRQGGEGVFWYNNRM	383
BnFAD2-1	RDGVLNKMFFHITDTHVHHLFETMPHYAMEATBAVIFILGYYQIDGTFVVKAMWRBAKECIYVEDRQGGEGVFWYNNRM	384
DsFAD2-1	RDGVLNKMFFHITDTHVHHLFETMPHYAMEATBAVIFILGYYQIDGTFVVKAMWRBAKECIYVEDRQGGEGVFWYNNRM	380
Consensus	rd g ln fh td h hhlf t phy amea k p g yy d t am re kec v d k gv wy nk	

At: *Arabidopsis thaliana* (拟南芥); Bn: *Brassica napus* (油菜); Da: *Dimorphotheca sinuata* (异果菊); Ha: *Helianthus annuus* (向日葵)。

图2 几种植物 FAD2 的同源性比较

Fig.2 Homology of oil sunflower and other plants based on amino acid sequence of FAD2



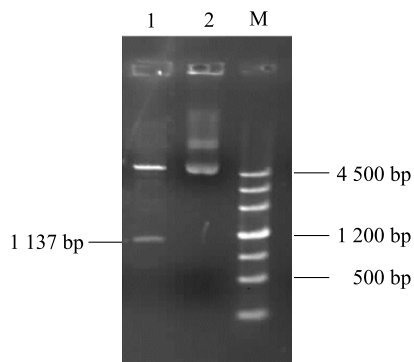
*Arachis hypogaea*: 花生; *Glycine max*: 大豆; *Caragana korshinskii*: 柠条; *Synechococcus*: 聚球藻; *Chlorella*: 小球藻; *Arabidopsis thaliana*: 拟南芥; *Nicotiana tabacum*: 烟草; *Chlamydomonas reinhardtii*: 绿藻; *Ostreococcus lucimarinus*: 绿色鞭毛藻。

图3 几种植物 FAD2 的系统进化树分析

Fig.3 Phylogenetic tree based on FAD2 of oil sunflower and other plants

### 2.3 *HaFAD2-1* 基因酵母表达载体的构建

以 pYES2 为基础载体,经酶切、回收及连接后,构建 GAL1 半乳糖诱导驱动的 pYES2-*FAD2-1* 酵母表达载体。用 *Bam* H I 和 *Xba* I 双酶切,得到大小约为 1 137 bp 的目的条带(图 4),与预计大小相符。挑选 3 个阳性克隆测序,结果表明构建载体成功。



1: pYES2-*HaFAD2-1*; 2: 空载体 pYES2 阳性对照; M: DNA marker III。

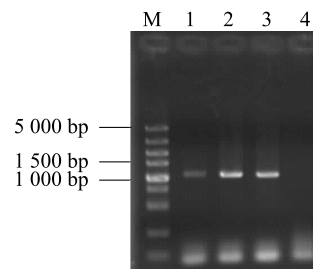
图 4 pYES2-*HaFAD2-1* 表达载体的鉴定

Fig.4 Identification of pYES2-*HaFAD2-1* vector

### 2.4 酿酒酵母的遗传转化及分子鉴定

用醋酸锂法将鉴定正确的重组子 pYES2-*HaFAD2-1* 转化至酿酒酵母 INVScl, 尿嘧啶营养缺陷型培养基筛选重组子, pYES2 空载为阴性对照。提取阳性克隆总 RNA, 并反转录成 cDNA。以阳性克隆菌株 cDNA 为模板, *HaFAD2-1* 特异性引物进行 RT-PCR, 结果 3 个转基因菌株能特异性扩增出约 1 137 bp 的片段(图 5), 而转空质粒的酵母没有扩增出该片段, 说明 *HaFAD2-1* 基因成功转入酵母中

并获得表达。



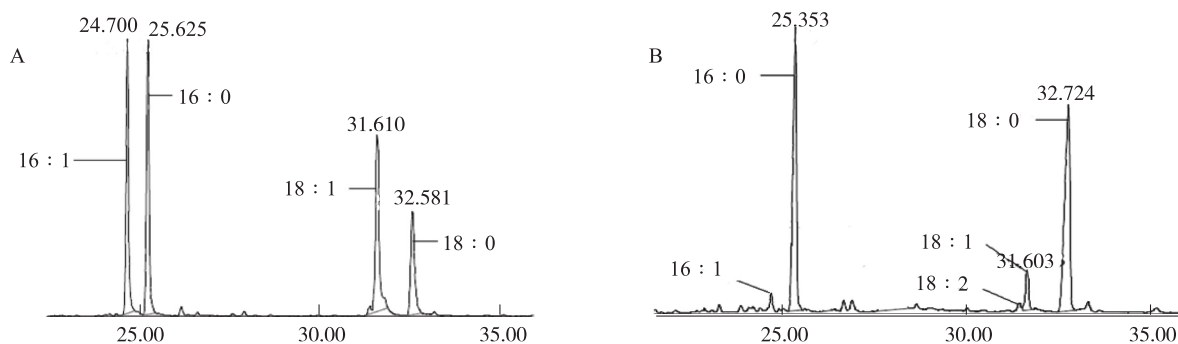
1~3: 转重组质粒酵母; 4: 转空质粒酵母。

图 5 重组质粒酵母 RT-PCR 鉴定

Fig.5 RT-PCR detection of *HaFAD2-1* gene in yeast

### 2.5 重组酵母总脂肪酸分析

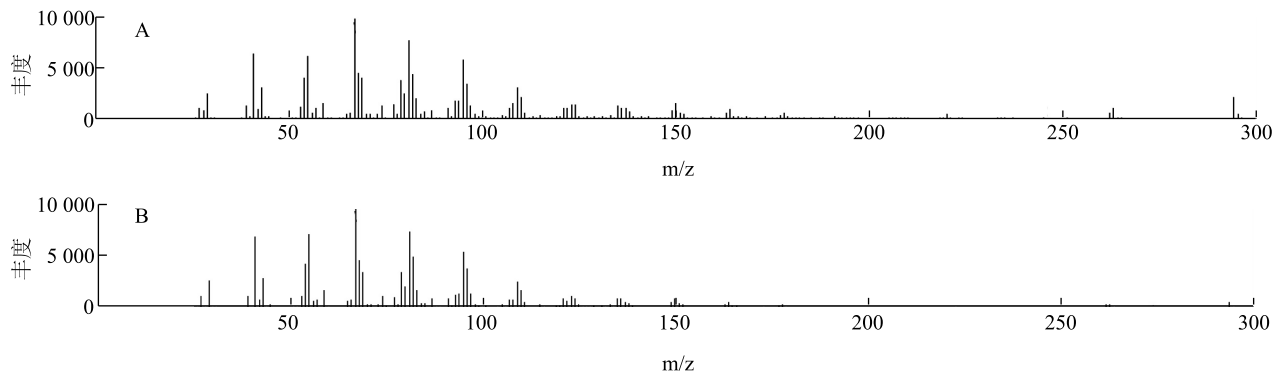
选取分子水平鉴定正确的重组酵母 2 号菌株在半乳糖诱导培养后, 提取酵母总脂肪酸, 甲酯化后, 以转空载体 pYES2 为对照, 采用 GC-MS 分析脂肪酸组分变化(图 6)。结果显示, 转 pYES2 空质粒酿酒酵母脂肪酸成分从左至右依次为棕榈油酸(16:1 $\Delta$ 9)、棕榈酸(16:0)、油酸(18:1 $\Delta$ 9)、硬脂酸(18:0)。对比两图发现, 转 pYES2-*HaFAD2-1* 重组质粒酿酒酵母总脂肪酸中有新峰出现。通过与标准谱图库进行对比, 待检测峰与标准谱图库中的标准谱图匹配度达到 95% 以上(图 7), 确认新出现的波峰为亚油酸(18:2 $\Delta$ 9, 12)。这一结果表明, *HaFAD2-1* 编码的 *FAD2* 酶能催化油酸在  $\Delta$ 12 位碳原子上去饱和, 形成亚油酸。在各组分含量(图 8)上, 新合成亚油酸含量占总脂肪酸含量的 2.58%。对比转空载体 pYES2 和转 pYES2-*HaFAD2-1* 的酵母脂肪酸含量发现, 重组酵母总脂肪酸含量无明显变化, 但饱和脂肪酸含量增加, 不饱和脂肪酸含量降低。



A: 转空载体酵母; B: 重组酵母。

图 6 酵母脂肪酸含量的气相色谱分析

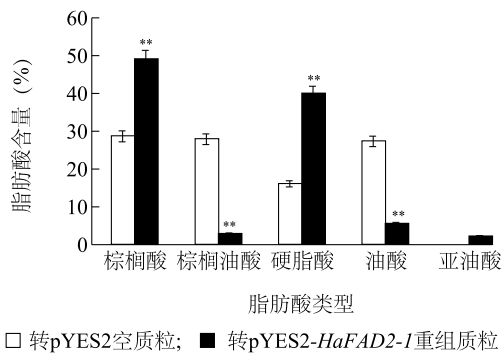
Fig.6 Gas chromatographic analysis of fatty acid content in *S. cerevisiae*



A: 亚油酸(18:2 $\Delta$ 9,12)标准品;B: 重组酵母。

图7 转基因酿酒酵母脂肪酸 GC-MS 分析图

Fig.7 GC-MS analysis of fatty acids in transgenic *S. cerevisiae*



\*\* 表示差异极显著 ( $P < 0.01$ )。

图8 转基因酵母脂肪酸含量

Fig.8 Fatty acids contents in the leaves of transgenic *S. cerevisiae*

### 3 讨论

*FAD2* 基因编码的脂肪酸去饱和酶 *FAD2* 主要作用是催化油酸生成亚油酸,该途径是产生多不饱和脂肪酸的主要途径,主要负责植物体内非光合组织中亚油酸的合成,是植物多不饱和脂肪酸代谢的关键酶。油葵是中国重要的油料作物,其种子油脂中通常含有大量的亚油酸,但其合成与调控机制目前还不清楚,因此还需对油葵 *FAD2* 基因进行深入研究。

在不同的植物中,*FAD2* 基因以不同的拷贝形式存在,甘蓝型油菜每个单倍体基因组中有 4~6 个拷贝的 *FAD2* [21],芝麻中含 2 个拷贝 [22],玉米中含有 3 个以上拷贝 [23],棉花基因组中分离到 4 个拷贝 [24],与向日葵同属于菊科的红花中则发现 11 个不同拷贝 [2]。同一植物 *FAD* 不同拷贝可能具有不同的表达特性与功能,如向日葵 *FAD2-1* 在种子中特异性表达,*FAD2-2* 与

*FAD2-3* 在各组织中均表达,其中 *FAD2-3* 在发芽后 2 d 的子叶中表达量迅速提高,推测其可能在种子萌发时油酸的去饱和过程中发挥重要作用 [25]。由于 *FAD* 基因多拷贝现象的存在,增加了植物脂肪酸合成与调控的复杂性,这也是不同植物种子脂肪酸含量与组分不同的重要原因之一。深入挖掘油葵种子脂肪酸合成的重要基因,并研究其功能,对于揭示油葵脂肪酸合成代谢机理具有重要意义。

本研究通过构建酵母表达载体 pYES2-*HaFAD2-1*,探究 *HaFAD2-1* 在脂肪酸合成与调控过程中的作用。通过与空载体 pYES2 气相色谱图对照比较,发现转 pYES2-*HaFAD2-1* 重组质粒酿酒酵母总脂肪酸中出现亚油酸。在转基因酵母总脂肪酸中,亚麻酸 (C18:3) 没有被检测到,说明 *HaFAD2-1* 作用单底物油酸,这与花生及小球藻 *FAD2* 作用单底物相同 [26-28]。与转空载体酵母相比较,转基因酵母各脂肪酸含量也发生了变化,饱和脂肪酸含量呈现上升趋势,不饱和脂肪酸含量呈现下降趋势,这可能与不饱和脂肪酸去饱和酶 *FAD2* 的作用底物为不饱和脂肪酸有关。新合成的亚油酸含量较低,这可能与诱导培养温度有关。Cui 等 [29] 的研究结果表明,当诱导温度从 30 °C 降低到 15 °C 时,亚油酸含量相对增加 43.4%。*FAD2* 的活性受各种外界非生物胁迫调节,从而使各组分脂肪酸含量发生较大变化,具体的调节过程及变化趋势,还需要进一步研究。

### 参考文献:

- [1] LOS D A, MURATA N. Structure and expression of fatty acid desaturases[J]. Biochimica et Biophysica Acta, 1998, 1394(1): 3-15.

- [2] CAO S J, ZHOU X R, CRAIG C W et al. A large and functionally diverse family of *FAD2* genes in safflower (*Carthamus tinctorius* L.) [J]. Plant Biology, 2013, 13(5): 1-18.
- [3] SIMOPOULOS A P. Genetic variants in the metabolism of omega-6 and omega-3 fatty acids: their role in the determination of nutritional requirements and chronic disease risk [J]. Experimental Biology and Medicine, 2010, 235(7): 785-795.
- [4] LEE K R, SOO I S, JUNG J H, et al. Functional analysis and tissue-differential expression of four *FAD2* genes in amphidiploid *Brassica napus* derived from *Brassica rapa* and *Brassica oleracea* [J]. Gene, 2013, 531 (2): 253-262.
- [5] STOUTJESDIJK P A, SINGH S P, LIU Q, et al. Hp RNA-mediated targeting of the *Arabidopsis thaliana* *FAD2* gene gives highly efficient and stable silencing [J]. Plant Physiology, 2002, 129: 1723-1731.
- [6] LIU Q, SINGH S P, GREEN A G. High-stearic and high-oleic cottonseed oils produced by hp RNA-mediated posttranscriptional gene silencing [J]. Plant Physiology, 2002, 129: 1732-1743.
- [7] WAGNER N, MROCZKA A, ROBERTS P D, et al. RNAi trigger fragment truncation attenuates soybean *FAD2-1* transcript suppression and yields intermediate oil phenotypes [J]. Plant Biotechnology Journal, 2011, 9(7): 723-728.
- [8] 孙黎,寇尚龙,欧阳超,等.油葵含油量相关基因在烟草中的表达[J].西北植物学报, 2011, 31(5): 861-867.
- [9] 刘公社, ALAIN B, 彭克敬. 向日葵研究与开发[M]. 北京: 中国科学技术出版社, 1994.
- [10] HUNTER K, ROSE A H. Lipid composition of *Saccharomyces cerevisiae* as influenced by growth temperature [J]. Biochimica et Biophysica Acta, 1972, 260 (4): 639-653.
- [11] NIU B, GUO L, ZHAO M M, et al. Molecular cloning, characterization, and expression of an  $\omega$ -3 fatty acid desaturase gene from *Sapim sebiferum* [J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2008, 106(4): 375-380.
- [12] ISKANDAROV U, KHOZIN-GOLDBERG I, COHEN Z. Identification and characterization of  $\Delta 12$ ,  $\Delta 6$ , and  $\Delta 5$  desaturases from the green microalga *Parietochloris incisa* [J]. Lipids, 2010, 45(6): 519-530.
- [13] 房志家, 陈婷, 郝贺龙, 等. 酿酒酵母转化方法的新探索[J]. 实验室研究与探索, 2012, 31(4): 5-8.
- [14] ADAMS A, COTTSCHLING D E, KAISER C A, et al. Methods in yeast genetics: a cold spring harbor laboratory course manual [M]. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1997: 81-88.
- [15] KARGIOTIDOU A, DELI D, GALANOPOULOU D, et al. Low temperature and light regulate delta 12 fatty acid desaturases (*FAD2*) at a transcriptional level in cotton (*Gossypium hirsutum*) [J]. Journal of Experimental Botany, 2008, 59(8): 2043-2056.
- [16] HE X, TURNER C, CHEN G Q, et al. Cloning and characterization of a cDNA encoding diacylglycerol acyltransferase from castor bean [J]. Lipids, 2004, 39(4): 311-318.
- [17] JOHN M D, DORSELYN C C, JUI-CHANG W K, et al. Molecular analysis of a biofunctional fatty acid conjugase/desaturase from tung. Implications for the evolution of plant fatty acid diversity [J]. Plant Physiology, 2002, 130(4): 2027-2038.
- [18] LOS D A, MURATA N. Structure and expression of fatty acid desaturases [J]. Biochimica et Biophysica Acta, 1998, 1394(1): 3-15.
- [19] SHANKLIN J, CAHOON E B. Desaturation and related modifications of fatty acids [J]. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology, 1998, 49(6): 611-641.
- [20] MOCHE M, SHANKLIN J, GHOSH A, et al. Azide and acetate complexes plus two iron-depleted crystal structures of the di-iron enzyme delta9 stearoyl-acyl carrier protein desaturase implications for oxygen activation and catalytic intermediates [J]. Journal of Biological Chemistry, 2003, 278(27): 25072-25080.
- [21] SCHEFFLER J A, SHARPE A G, SCHMIDT H, et al. Desaturase multigene families of *Brassica napus* arose through genome duplication [J]. Theoretical and Applied Genetics, 1997, 94(5): 583-591.
- [22] KIM M J, KIM H, SHIN J S, et al. Seed-specific expression of sesame microsomal oleic acid desaturase is controlled by combinatorial properties between negative cis-regulatory elements in the *SeFAD2* promoter and enhancers in the 5'-UTR intron [J]. Molecular Genetics and Genomics, 2006, 276 (4): 351-368.
- [23] BELÓ A, ZHENG P, LUCK S, et al. Whole genome scan detects an allelic variant of *fad2* associated with increased oleic acid levels in maize [J]. Molecular Genetics and Genomics, 2008, 279 (1): 1-10.
- [24] ZHANG D, PIRTLE I L, PARK S J, et al. Identification and expression of a new delta-12 fatty acid desaturase (*FAD2-4*) gene in upland cotton and its functional expression in yeast and *Arabidopsis thaliana* plants [J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2009, 47 (6): 462-471.
- [25] MARTINEZ-RIVAS J M, SPERLING P, LUHS W, et al. Spatial and temporal regulation of three different microsomal oleate desaturase genes (*FAD2*) from normal-type and high-oleic varieties of sunflower (*Helianthus annuus* L.) [J]. Molecular Breeding, 2001, 8(2): 159-168.
- [26] CHI X Y, YANG Q L, PAN L J et al. Isolation and characterization of fatty acid desaturase genes from peanut (*Arachis hypogaea* L.) [J]. Plant Cell Report, 2011, 30(8): 1393-1404.
- [27] LU Y, CHI X, YANG Q, et al. Molecular cloning and stress-dependent expression of a gene encoding D12-fatty acid desaturase in the Antarctic microalga *Chlorella vulgaris* NJ-7 [J]. Extremophiles, 2009, 13(6): 875-884.
- [28] LU Y, CHI X, LI Z, et al. Isolation and characterization of a stress-dependent plastidial  $\Delta^{12}$  fatty acid desaturase from the Antarctic microalga *Chlorella vulgaris* NJ-7 [J]. Lipids, 2010, 45 (2): 179-187.
- [29] CUI J J, HE S W. Identification and characterization of a novel biofunctional  $\Delta^{12}/\Delta^{15}$ -fatty acid desaturase gene from *Rhodospiridium kratochvilovae* [J]. Biotechnology Letters, 2016, 38(7): 1155-1164.

(责任编辑:陈海霞)