

熊 丹, 周 霆, 田方艳, 等. 甘蓝型油菜脂肪酸脱氢酶 2 兔源多克隆抗体的制备与应用[J]. 江苏农业学报, 2020, 36(4): 851-857.

doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2020.04.007

甘蓝型油菜脂肪酸脱氢酶 2 兔源多克隆抗体的制备与应用

熊 丹¹, 周 霆¹, 田方艳², 饶力群¹, 陈 松³, 汪启明¹

(1. 湖南农业大学生物科学技术学院, 湖南 长沙 410128; 2. 湖南远泰生物技术有限公司, 湖南 长沙 410000; 3. 江苏省农业科学院经济作物研究所/农业部长江下游棉花与油菜重点实验室, 江苏 南京 210014)

摘要: 脂肪酸脱氢酶 2(*FAD2*) 是调控油菜种子油酸含量的关键酶。为建立其灵敏、便捷的免疫学检测方法, 本研究合成了 *BnFAD2* (UniProtKB: C3W518) 中 2 个多肽片段, 与 KLH 载体蛋白偶联, 混合免疫新西兰大白兔, 分离纯化得到了油菜 *BnFAD2* 兔源多克隆抗体。应用于 *FAD2*-RNAi 高油酸转基因油菜品系 W-4 不同世代果荚及成熟叶片总蛋白质的免疫印迹检测, 结果表明, 该兔源多克隆抗体, 可在油菜内质网成分中识别 *FAD2*, 特征性条带大小为 95 000。在果荚总蛋白质样本中, WT 的 *FAD2* 含量高于转基因材料 W-4, 而在叶片总蛋白质样本中 WT 和 W-4 的 *FAD2* 含量相同。本研究成功制备出 *BnFAD2* 兔源多克隆抗体, 并首次验证出油菜内源性 *FAD2* 以多聚体形式行使功能, 为 *BnFAD2* 快速检测以及进一步研究 *BnFAD2* 对油脂稳定性影响提供研究工具。

关键词: 脂肪酸脱氢酶 2; 多克隆抗体; 油酸; 甘蓝型油菜

中图分类号: Q786 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2020) 04-0851-07

Preparation and application of rabbit-derived polyclonal antibody against fatty acid desaturase 2 in *Brassica napus*

XIONG Dan¹, ZHOU Ting¹, TIAN Fang-yan², RAO Li-qun¹, CHEN Song³, WANG Qi-ming¹

(1. College of Bioscience and Biotechnology, Hunan Agricultural university, Changsha 410128, China; 2. Hunan Foreverttech Biotechnology Co., Ltd., Changsha 410000, China; 3. Institute of Industrial Crops, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences/Key Laboratory of Cotton and Rapeseed, Ministry of Agriculture, Nanjing 210014, China)

Abstract: Fatty acid desaturase 2 (*FAD2*) is the key enzyme regulating oleic acid content. The immunological methods for its rapid detection are limited by the lack of antibodies. In this study, the *Brassica napus* *FAD2* polyclonal antibodies were successfully prepared with the rabbit immunized by two synthesized polypeptides from *BnFAD2* (UniProtKB:

C3W518). The pods or mature leaves extracts of different generations of W-4 which was the RNAi transgenic material were detected by western blot. The results showed that the rabbit-derived polyclonal antibody could recognize the *FAD2* in the endoplasmic reticulum, and the size of characteristic band was 95 000. The content of *FAD2* in WT was higher than that in transgenic material W-4 in pods extracts, but the content of *FAD2* in WT was the

收稿日期: 2020-01-05

基金项目: 国家转基因生物新品种培育科技重大专项(2018ZX08011-01B); 湖南省重点领域研发计划项目(2019DK2011)

作者简介: 熊 丹(1982-), 女, 湖南长沙人, 硕士研究生, 主要从事植物生物化学与分子生物学研究。(Tel) 13786122442; (E-mail) 17618159@qq.com。周 霆为共同第一作者。

通讯作者: 汪启明, (E-mail) wqmqmx21@126.com。陈 松, (Tel) 13913969008; (E-mail) chengsong1963@126.com

same as that in W-4 in leaves extracts. For the first time, the endogenous *BnFAD2* is verified to exercise function in the form of polymer, providing a research tool for rapid detection of *BnFAD2* and further study of the effect of *BnFAD2* on oil stability.

Key words: fatty acid desaturase 2(*FAD2*); polyclonal antibody; oleic acid; *Brassica napus*

油脂是人体必需的关键营养素之一,是维持身体机能正常运转的能量来源,更是细胞、组织、脏器的重要组成成分。油菜是仅次于大豆和花生的第三大植物油脂来源^[1],菜籽油含有丰富的油酸、亚油酸、亚麻酸以及维生素 E 等有效成分,亚油酸、亚麻酸是人自身无法合成的必需脂肪酸,百分之九十九能被人体所吸收^[2-3]。适量的补充亚油酸和亚麻酸等不饱和脂肪酸,可软化血管,预防心血管疾病的发生^[4],但是亚油酸和亚麻酸相较于油酸,更容易氧化发生酸败,产生不利于健康的物质^[5-6]。如何合理控制各脂肪酸比例构成,提高菜籽油品质,已成为油菜品种改良的重要研究方向。

前期对甘蓝型油菜高油酸品种的基因分析结果表明,其高油酸性状的产生是由于 *FAD2* 基因突变导致^[7-10]。*FAD2* 基因编码的是一种脂肪酸脱氢酶 2(*FAD2*),该蛋白质定位于内质网上,催化油酸转化为亚油酸^[11-13]。亚油酸又可被脂肪酸脱氢酶 3 转化为亚麻酸^[14]。所以,*FAD2* 是控制油菜高油酸产量,保持脂肪酸稳定性的关键基因,多个油菜品质改良项目曾围绕此基因进行^[15-17]。

目前,对于 *FAD2* 基因功能改变的检测,主要还是以 *FAD2* 酶催化的底物和产物含量的变化为主。即通过气相^[18]、液相^[19]以及红外光谱^[20-21]等手段,检测样本中油酸和亚油酸或亚麻酸含量的变化,从而监测此基因功能是否改变。在利用免疫学方法对蛋白质积累检测方面,由于暂未有商业化的可用于植物 *FAD2* 蛋白检测的特异性抗体及其相关制备报道,在前期研究中,主要是用基因工程方法融合其他标签,通过使用标签抗体对融合标签进行检测^[13,22]来体现 *FAD2* 蛋白表达变化,并不能完全体现内源性 *FAD2* 蛋白表达的变化。本研究对甘蓝型油菜 *FAD2* 蛋白进行生物信息学分析,通过合成特征性多肽片段免疫动物,获得特异性针对甘蓝型油菜 *FAD2* 蛋白的兔源多克隆抗体,为该蛋白质翻译后调控机制的研究提供

有利工具。可以用此抗体识别不同品种油菜不同栽培条件下 *FAD2* 蛋白表达差异,为后期育种筛选及栽培条件优化以及转基因安全评价方法的简化提供新思路。

1 材料和方法

1.1 主要植物材料

甘蓝型油菜品种(Westar)WT 和 *FAD2*-RNAi 高油酸转基因油菜品系 W-4 由江苏省农业科学院经济作物研究所提供。

1.2 试验动物

本研究选用的动物为 2 只雄性新西兰大白兔,购于湖南太平生物科技有限公司。在湖南远泰生物技术有限公司清洁级动物饲养房中饲养,室温维持 22 ℃,正常的昼夜频率,一兔一笼。提供充足的饲料和干净的饮用水,试验动物可以自由进食和饮水,维持体质量在 2.5~3.5 kg。该动物试验方案得到了湖南远泰生物技术公司动物伦理委员会的批准(依据《Guide for the Care and Use of Laboratory Animals》)。

1.3 主要试剂

HRP labeled anti-IgG、anti-Mouse IGG-HRP monoclonal antibody 由 Promab 提供,anti-actin Mouse monoclonal antibody 购于 CWbio 公司,anti-Rabbit IGG-HRP Polyclonal antibody、ECL 试剂盒购于 CST 公司,弗氏完全佐剂以及弗氏不完全佐剂购于 Sigma 公司,Protein A Sepharose 购于 GE 公司,SDS-PAGE 凝胶配制试剂盒购于北京鼎国公司,蛋白质 marker 购于 Thermo Fisher 公司,BCA 蛋白检测试剂盒购于 BioSharp 公司。

研磨缓冲液(0.240 mol/L Hepes·NaOH pH 7.5, 0.060 mol/L KCl, 0.250 mol/L 蔗糖, 0.024 mol/L $MgCl_2$),内质网分离缓冲液(0.040 mol/L Hepes·NaOH pH 7.5, 0.010 mol/L KCl, 0.040 mol/L $MgCl_2$, 0.005 mol/L EDTA),储存于 4 ℃ 条件下,使用前加入 0.006 mol/L DTT, 0.006 mol/L PMSF。

1.4 抗原确定与合成

在 UniProtKB 数据库中搜索关键词: BnFAD2, 得到油菜 FAD2 蛋白氨基酸序列信息。

采用 ABCpred Prediction Server 在线软件^[23]分析 BnFAD2 (UniProtKB: C3W518) 氨基酸 B 细胞抗原表位, 将预测表位阵列得分超过 0.9 的序列, 输入 NCBI 数据库中, 与油菜蛋白质库进行氨基酸序列比对, 验证氨基酸表位序列的特异性。选取得分以及特异性最高的 2 条多肽序列 (PA 和 PB), 于杭州中肽生化有限公司进行多肽合成, 并将合成好的多肽分别偶联到 KLH 和 BSA 上。

1.5 BnFAD2 兔源多克隆抗体的制备

1.5.1 动物免疫 初次免疫前, 兔耳静脉采血作为免疫阴性对照血清。BnFAD2-PA-KLH 多肽与 BnFAD2-PB-KLH 多肽冻干粉溶解后, 各取 50 mg 混合均匀, 再与等体积弗氏完全佐剂按比例混合, 多点皮下注射新西兰大白兔。21 d 后, 混合抗原量减半与弗氏不完全佐剂混合, 进行第二次免疫。以此方式每隔 14 d, 进行第三以及第四次免疫。4 次免疫后 7 d, 兔耳静脉采血, 常温下 3 000 r/min 离心 20 min, 取血清, 用于后续检测。

1.5.2 免疫酶联法检测免疫血清 酶标板中抗原 BnFAD2-PA-BSA 以及 BnFAD2-PB-BSA 的包被量为每孔 0.2 μ g。以免疫前血清为阴性对照, 以 1 : 5 000 稀释 HRP labeled anti-IgG 作为二抗, 检测不同稀释度的免疫兔血清, TMB 显色终止后, 在酶标仪上读取吸光度值 (OD_{450})。

1.5.3 BnFAD2 兔源多克隆抗体的纯化 收集全兔血, 离心分离血清。按照说明书所述方法, 将血清进行 Protein A Sepharose 亲和层析纯化, 获得 BnFAD2 兔源多克隆抗体。用 SDS-PAGE 凝胶法鉴定该兔多抗的蛋白质分子量大小与纯度, BCA 法鉴定其浓度。

1.6 甘蓝型油菜品种 W-4 不同世代 FAD2 蛋白表达的鉴定

1.6.1 油菜样本总蛋白质的提取 取一定体积的样品 (WT、W-4 的 T_3 代, W-4 的 T_7 代植株开花 21 d 后的果荚以及成熟期叶片), 液氮研磨成粉末状后, 参照文献^[24]、^[25], 研磨缓冲液匀浆, 经 2 次 2 000 g 离心 5 min 后, 取 2 ml 上清液样品留样, 其余上清液加入到含有 5 ml 50% 蔗糖溶液

的超离心管中, 100 000 g 离心 20 min, 收集总膜层 (50% 蔗糖溶液与匀浆上清液之间), 等体积混合内质网分离缓冲液, 采用蔗糖梯度 (7 ml 15% 蔗糖溶液, 12 ml 35% 蔗糖溶液和 5 ml 40% 蔗糖溶液) 100 000 g 离心 30 min, 收集粗面内质网膜组分 (35% 蔗糖与 40% 蔗糖溶液之间), 加入 3 倍体积内质网分离缓冲液, 100 000 g 离心 30 min, 沉淀用少量预冷的内质网分离缓冲液重悬, 液氮速冻后于 -80 $^{\circ}$ C 冰箱保存。所有离心均在 4 $^{\circ}$ C 进行。

1.6.2 SDS-PAGE 分离蛋白质 根据 SDS-PAGE 凝胶配制试剂盒 (北京鼎国昌盛生物技术有限公司产品) 说明书配制分离胶浓度为 10%, 浓缩胶浓度为 5% 的 SDS-PAGE 凝胶。将样本分果荚总蛋白质、叶片总蛋白质、内质网蛋白质 3 个组别, 每个组别经 BCA 法进行蛋白质定量后, 统一上样量, 用 Mini-PROTEAN[®] Tetra (Bio-Rad) 系统进行凝胶电泳。

1.6.3 Western Blotting 法鉴定甘蓝型油菜同世代 FAD2 蛋白表达 样品通过 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳后, 电转至 NC 膜上。经 5% 的脱脂奶封闭 1 h, 一抗 (anti-BnFAD2 Rabbit Polyclonal antibody, 稀释比为 1 : 1 000, anti-actin Mouse monoclonal antibody, 稀释比为 1 : 2 500) 孵育过夜, 用 PBST 缓冲溶液进行洗膜后加入对应的二抗 (anti-Rabbit IGG-HRP Polyclonal antibody, 稀释比为 1 : 30 000, anti-Mouse IGG-HRP monoclonal antibody, 稀释比为 1 : 10 000), 室温孵育 2 h, 洗膜后, 使用 ECL 试剂盒进行显影。

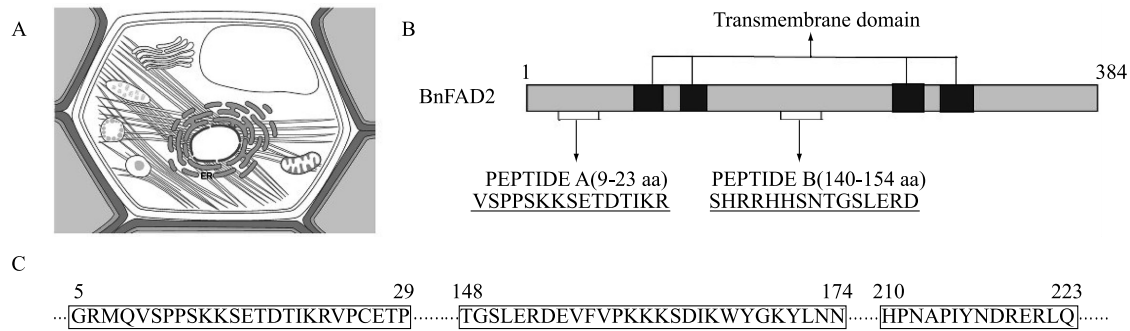
2 结果与分析

2.1 油菜 FAD2 抗原表位预测和鉴定

在 UniProtKB 数据库中搜索关键词: BnFAD2, 得到油菜 FAD2 蛋白氨基酸序列信息, 其 UniProtKB 序列号为 C3W518, 定位在内质网上 (图 1A), 是由 384 个氨基酸组成的 4 次跨膜结构蛋白质 (如图 1B 所示)。ABCpred 在线系统对该氨基酸序列进行 B 细胞表面抗原表位预测, 肽的较高得分意味着有较高的概率作为表位。方框中氨基酸部分为此抗原表位预测分数超过 0.9 的区域 (图 1C)。参考预测结果和蛋白质细胞亚定位的特点, 我们选择位于细胞质结构中并且预测分数较高的区域, 在 NCBI 数据库中对油菜蛋白质氨基酸序列进行比对, 最后选择

PA:VSPPSKKSETDTIKR (9~23 aa) 以及 PB:SHR-RHHSNTGSLERD (140~154 aa) 2 条多肽为免疫抗

原表位(命名及区域氨基酸序列如图 1 B 下划线部分所示)。



A: BnFAD2 蛋白的亚细胞定位(图片来源于 UniProtKB 数据库); B: BnFAD2 蛋白跨膜结构简图与抗原肽段选择位点; C: ABCpred 在线系统对 BnFAD2 B 细胞表面抗原表位的预测结果。划横线的表示合成多肽的氨基酸序列; 方框里表示抗原表位预测分数超过 0.9 的区域。

图 1 BnFAD2 抗原表位预测

Fig.1 Epitopes prediction of BnFAD2

用质谱法 (Mass spectrum, MS) 进行多肽鉴定。结果如图 2 显示, BnFAD2-PA 的相对分子质量为 1 776, BnFAD2-PB 的相对分子质量为 1 892, 2 条多肽测定的相对分子质量与理论值相符。

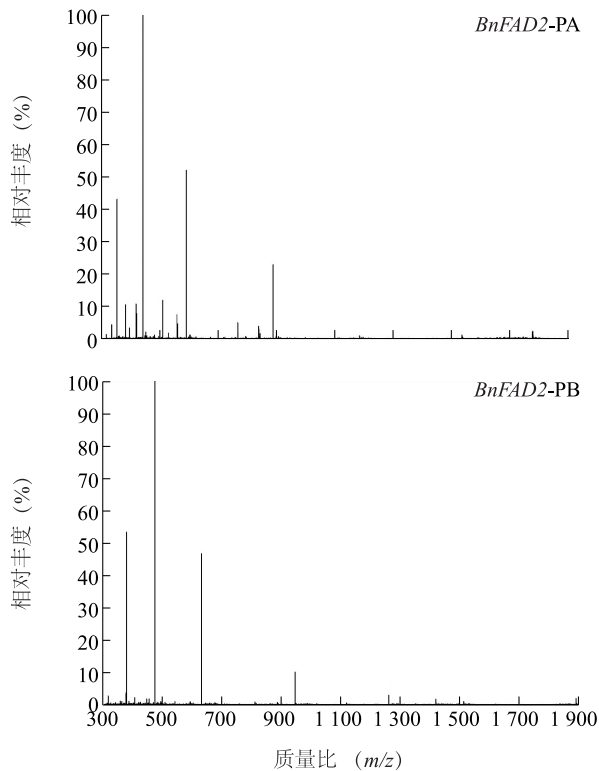


图 2 BnFAD2 多肽质谱鉴定结果

Fig.2 Identification of BnFAD2 polypeptide by mass spectrometry

用高效液相法 (High performance liquid chromatography, HPLC) 对 2 条合成的多肽进行纯度分析 (图 3), BnFAD2-PA 的纯度为 80.19%, BnFAD2-PB 的纯度为 96.24% (表 1)。

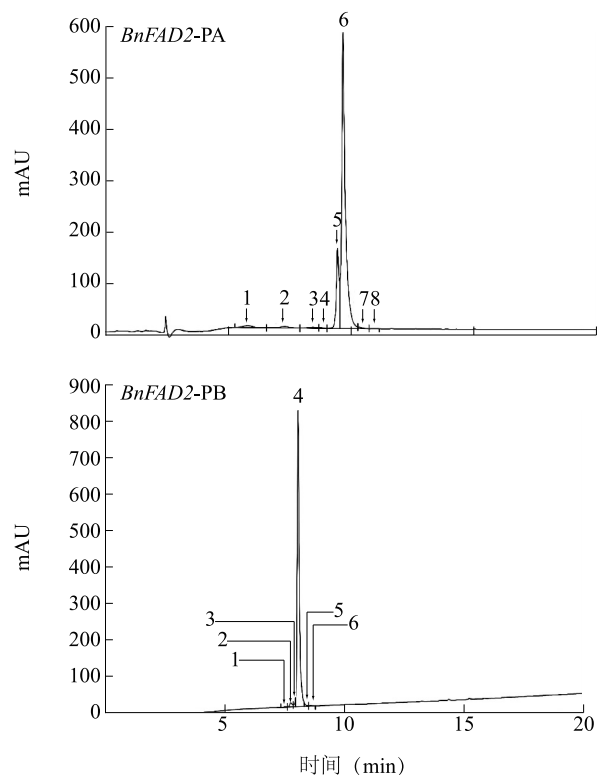


图 3 BnFAD2 多肽的高效液相分析结果

Fig.3 Identification of BnFAD2 polypeptide by high performance liquid chromatography

表 1 *BnFAD2*-PA 以及 *BnFAD2*-PB 纯度分析Table 1 Purity analysis of *BnFAD2*-PA and *BnFAD2*-PB

编号	滞留时间 (min)	峰面积	含量 (%)
<i>BnFAD2</i> -PA-1	5.79	105.62	1.43
<i>BnFAD2</i> -PA-2	7.29	86.84	1.17
<i>BnFAD2</i> -PA-3	8.43	52.64	0.71
<i>BnFAD2</i> -PA-4	8.74	11.27	0.15
<i>BnFAD2</i> -PA-5	9.43	1 172.24	15.87
<i>BnFAD2</i> -PA-6	9.65	5 920.83	80.19
<i>BnFAD2</i> -PA-7	10.25	29.87	0.41
<i>BnFAD2</i> -PA-8	10.91	4.01	0.05
<i>BnFAD2</i> -PB-1	7.53	13.64	0.26
<i>BnFAD2</i> -PB-2	7.76	85.14	1.65
<i>BnFAD2</i> -PB-3	7.91	45.29	0.88
<i>BnFAD2</i> -PB-4	8.06	4 954.90	96.24
<i>BnFAD2</i> -PB-5	8.31	37.84	0.74
<i>BnFAD2</i> -PB-6	8.58	11.84	0.23

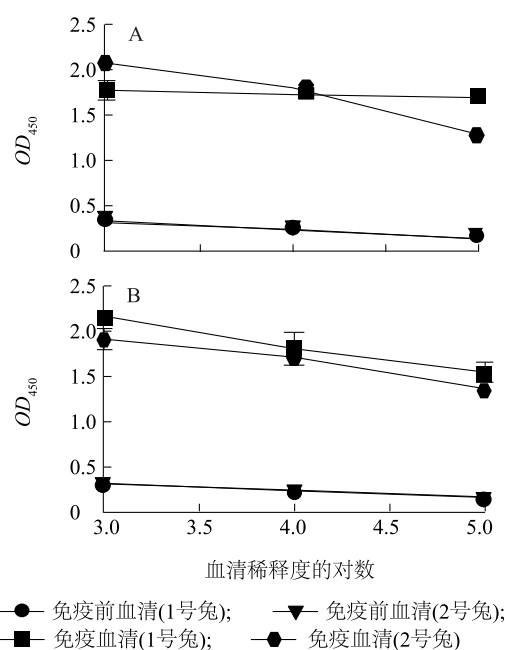
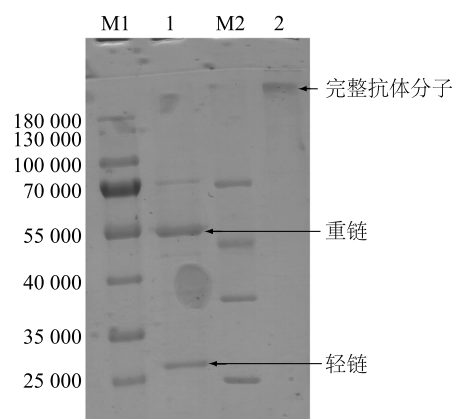
2.2 *BnFAD2* 兔源多克隆抗体的获得

将第四次免疫后第 7 d 采集的兔血清进行 ELISA 试验,鉴定免疫效果。如图 4 所示,1 号兔和 2 号兔免疫抗原后,对 *BnFAD2*-PA 与 *BnFAD2*-PB 多肽都产生了免疫反应。1 号兔免疫反应高于 2 号兔。

取全血进行 Protein A Sepharose 亲和层析,所得到的蛋白质溶液 10 倍稀释后进行 10% SDS-PAGE 凝胶电泳,如图 5 所示,在非变性条件下,该抗体在大于 150 000 处有条带,与完整抗体分子条带相符,变性条件下,在 50 000 以及 25 000 左右有两条带,即抗体重链和轻链。此蛋白质大小与抗体大小相符,抗体结构完整。BCA 法定量得到稀释后该抗体质量浓度为 0.57 mg/ml,获得的抗体总产品质量浓度为 5.7 mg/ml。

2.3 甘蓝型油菜品种 W-4 不同世代 FAD2 蛋白表达鉴定

果荚总蛋白质、叶片总蛋白质以及内质网蛋白质通过 BCA 法测定每个样本浓度后,样本的上样量总蛋白质为每孔 2 μ g,内质网蛋白质为每孔 1 μ g,进行 FAD2 蛋白的 Western blotting 检测。其结果如图 6 所示,WT、W-4-T₃ 代、W-4-T₇ 代果荚以及 WT、W-4-T₃ 代、W-4-T₇ 代成熟叶片的总蛋白质以及内质网蛋白质均能在 95 000 左右检测到条带,WT 条带最高,而 W-4-T₇ 代最弱。叶片中,3 个样本差异不明显。

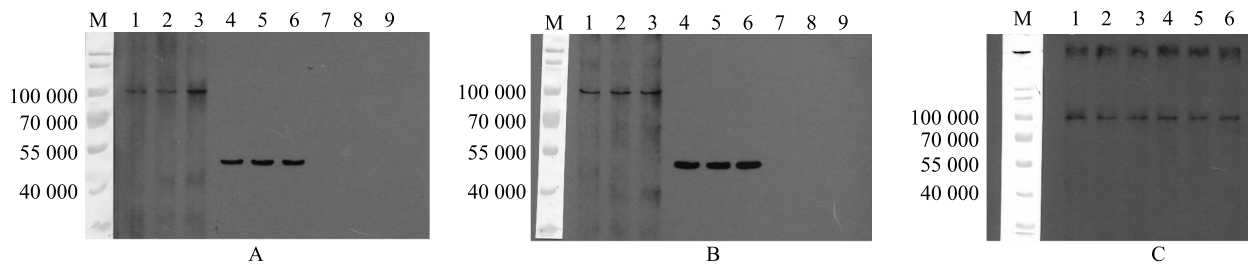
A:包被抗原为 *BnFAD2*-PA-BSA;B:包被抗原为 *BnFAD2*-PB-BSA。图 4 *BnFAD2* 多肽的免疫效果鉴定Fig.4 Immune effect identification of *BnFAD2* polypeptide

M1: PageRuler 预染蛋白质相对分子质量标准 (Thermo); M2: Pierce 非预染蛋白质相对分子质量标准 (Thermo); 1: anti-*BnFAD2* 纯化后 10 倍稀释样本经还原性上样缓冲液处理; 2: anti-*BnFAD2* 纯化后 10 倍稀释样本经非还原性上样缓冲液处理。

图 5 *BnFAD2* 兔源多克隆抗体的 SDS-PAGE 鉴定Fig.5 Identification of anti-*BnFAD2* rabbit-derived polyclonal antibody by SDS-PAGE

3 讨论

抗体作为哺乳动物被动免疫应答的产物,其对抗原的特异性识别功能已被研究者们成功应用到基因表达水平变化的检测中。目前,哺乳动物蛋白质



A 图中抗原为果荚总蛋白。1,4,7 为 W-4-T7 代;2,5,8 为 W-4-T3 代;3,6,9 为 WT;B 图中抗原为叶片总蛋白。1,4,7 为 W-4-T7 代;2,5,8 为 W-4-T3 代;3,6,9 为 WT;A,B 图中,1,2,3:一抗为 anti-BnFAD2;4,5,6:一抗为 anti-actin;7,8,9:一抗为免疫前兔血清;依据一抗种属选择相应二抗;C 图抗原,1,2,3:果荚内质网蛋白,样本依次为 WT、W-4-T3 代、W-4-T7 代。4,5,6:叶片内质网蛋白,样本依次为 WT、W-4-T3 代、W-4-T7 代。一抗为 anti-BnFAD2,二抗为 anti-Rabbit IGG-HRP Polyclonal antibody。

图 6 甘蓝型油菜品种 W-4 不同世代中 FAD2 蛋白表达鉴定

Fig.6 Identification of FAD2 protein expression in different generations of *Brassica napus* cultivar W-4

检测抗体的种类齐全,免疫学检测方法应用较广泛。植物在与生物胁迫以及非生物胁迫对抗的漫长进化过程中,造成了植物蛋白质编码基因的多样性以及蛋白质翻译后的修饰非常复杂。因此与哺乳动物抗体相比,对其特异性抗体的开发和免疫学方法的应用研究步伐较缓慢。特异性抗体的获得,其免疫抗原的品质很关键。目前多采用体外表达重组蛋白质的方式来获得高品质抗原^[26]。重组全长蛋白质可以提供足够的特征性抗原表位,用其免疫获得的多克隆抗体,具有多种表位识别能力,可以更准确地捕获天然裂解液中的微量抗原蛋白质。而重组全长蛋白质的获得,受到多种因素的制约,如蛋白质本身的结构特征、蛋白质的大小及其等电点、疏水性等。FAD2 是定位于内质网上的膜蛋白,预测相对分子质量大小为 44 171,具有 4 个跨膜区。利用原核表达系统得到其重组蛋白质的难度较大。利用合成生物学,体外合成特征性多肽,再将其偶联到具有强免疫原性的大分子上,可以解决免疫抗原的获得问题^[27-28]。而多个肽段的混合免疫,使免疫得到的多克隆抗体尽可能多地拥有多个表位的识别,提高抗体对微量抗原的识别能力。

本研究中利用生物信息学分析,获得油菜 Bn-FAD2 蛋白高抗原性多肽序列,经多肽合成后,混合免疫动物获得抗体。BnFAD2-PA 肽段位于跨膜导肽与第一跨膜区之间,是多种植物 FAD2 的共有序列,BnFAD2-PB 肽段位于胞质区域,是油菜 FAD2 的特异性序列。因此,混合免疫得到的兔源多克隆抗体,对于油菜 FAD2 有 2 个表面抗原识别位点,也可以利用其对植物 FAD2 共有序列的识别能力,应用

到其他植物 FAD2 的检测鉴定中。

FAD2 是将油酸转化为亚油酸的关键酶,而 FAD3 是将亚油酸转化为亚麻酸的关键酶,这两个酶同时位于细胞内质网上,在脂肪酸代谢途径中属于递呈关系。有研究结果表明,拟南芥原生质体中,当 FAD2 和 FAD3 维持酶活性行使功能时,多以同源二聚体以及异源二聚体的形式存在^[22],其二聚体的比例与产物中亚油酸和亚麻酸的比例有直接关系。前期研究结果表明,FAD2 在油菜开花后 21 d 含量达到最高,成熟期叶片维持一致^[29]。W-4 转基因油菜与以往外源导入某种基因来增加或减弱相应蛋白质表达的方法不同,其是在导入含种子特异性启动子的 FAD2 某段序列,利用 RNAi 的方法,有效抑制种子中 FAD2 的转录^[30]。本研究中,采用野生型甘蓝型油菜品种 WT 以及 RNAi 干扰转基因型油菜品种 W-4 为试验材料,提取其果荚和叶片中的总蛋白质,分离收集其内质网蛋白质成分,BnFAD2 兔源多克隆抗体均能在免疫印迹反应中检测到相应物质。果荚样本中,Western blotting 的结果显示 W-4 的不同世代样本 FAD2 蛋白表达较 WT 均呈现下降。在成熟叶片样本中,W-4 的不同世代样本 FAD2 蛋白表达基本维持一致,提示该 RNAi 干扰载体中引入的种子特异性启动子元件,组织特异性作用效果明显。RNAi 干扰转基因型油菜品种 W-4 的 FAD2 组织特异性表达抑制效果,通过该 BnFAD2 兔源多克隆抗体得到蛋白质水平上的内源性验证,为相关转基因油菜品种提供了 FAD2 蛋白表达的检测抗体。此外,免疫印迹检测中,阳性条带的位置与前期体外研究结果相符^[22],首次验证内源性油菜 FAD2 同样

以多聚体的形式在细胞内质网上行使功能,而其多聚体的组合方式及其相应生理功能的调控机制,还需要进一步试验验证。

参考文献:

- [1] 李 娜,杨 涛. 我国油菜籽产业发展现状及趋势展望[J]. 农业展望,2009(2):21-23.
- [2] 王永进,于 潇. 天然植物功能性油脂的相关研究进展[J]. 现代食品,2017(4):48-51.
- [3] 靳 革,李 娟,赵福阳,等. 油脂中脂肪酸的构成及功能研究进展[J]. 饲料与畜牧,2017(20):60-61.
- [4] 徐建国,潘娅静,赵 洁. ω -3 多不饱和脂肪酸与心血管疾病[J]. 临床内科杂志,2008,25(12):855-856.
- [5] VERARDO V, FERIOLI F, RICIPUTI Y, et al. Evaluation of lipid oxidation in spaghetti pasta enriched with long chain n-3 polyunsaturated fatty acids under different storage conditions [J]. Food Chemistry, 2009, 114(2):472-477.
- [6] 王 洁,邹惠玲,夏攀登,等. 植物油氧化及其氧化稳定性研究进展[J]. 保鲜与加工,2019,19(4):207-210.
- [7] PIRJO T, VILKKI J, VIHINEN M. Mapping and cloning of *FAD2* gene to develop allele-specific PCR for oleic acid in spring turnip rape (*Brassica rapa* ssp. *oleifera*) [J]. Molecular Breeding, 1998, 4(6):543-550.
- [8] HOBBS D H, FLINTHAM J E, HILLS M J. Genetic control of storage oil synthesis in seeds of arabidopsis [J]. Plant Physiology, 2004, 136(2):3341-3349.
- [9] SCHIERHOLT A, BECKER H C, ECKE W. Mapping a high oleic acid mutation in winter oilseed rape (*Brassica napus* L.) [J]. Theoretical and Applied Genetics, 2000, 101(5/6):897-901.
- [10] HU X, SULLIVAN-GILBERT M, GUPTA M, et al. Mapping of the loci controlling oleic and linolenic acid contents and development of *fad2* and *fad3* allele-specific markers in canola (*Brassica napus* L.) [J]. Theoretical and Applied Genetics, 2006, 113(3):497-507.
- [11] MCCARTNEY A W, DYER J M, DHANOA P K, et al. Membrane-bound fatty acid desaturases are inserted co-translationally into the ER and contain different ER retrieval motifs at their carboxy termini [J]. Plant Journal, 2004, 37(2):156-173.
- [12] JUNG J H, KIM H, GO Y S, et al. Identification of functional-*BrFAD2-1* gene encoding microsomal delta-12 fatty acid desaturase from *Brassica rapa* and development of *Brassica napus* containing high oleic acid contents [J]. Plant Cell Reports, 2011, 30(10):1881-1892.
- [13] 刘睿洋,刘 芳,官春云. 甘蓝型油菜 *BnFAD2* 基因的克隆、表达及功能分析[J]. 作物学报,2016,42(7):1000-1008.
- [14] RADOVANOVIC N, THAMBUGALA D, DUGUID S, et al. Functional characterization of flax fatty acid desaturase *FAD2* and *FAD3* isoforms expressed in yeast reveals a broad diversity in activity [J]. Molecular Biotechnology, 2014, 56(7):609-620.
- [15] 杨庆勇. 油菜种子高油酸低亚麻酸的遗传控制及等位基因特异标记开发[D]. 武汉:华中农业大学,2012.
- [16] 倪雪峰. 利用 *DGATI*、*SLC*、*FAD2* 和 *FAD3* 基因改良拟南芥和甘蓝型油菜的含油量和脂肪酸不饱和性[D]. 杨凌:西北农林科技大学,2014.
- [17] 陈 松,彭 琦,高建芹,等. *FAD2* 基因下调表达的甘蓝型油菜 W-4 株系脂肪酸及品质分析[J]. 农业科学与技术(英文版),2015,16(8):1769-1774.
- [18] 杨明轩,周 扬,陆 俊,等. 气相色谱内标法测定沙棘果肉油和种子油中的主要脂肪酸[J]. 湖北农业科学,2017,56(9):1734-1738,1741.
- [19] 汪海滔,薄华本,陈业诚,等. GC 法同时测定火麻仁油中油酸、亚油酸和 α -亚麻酸的含量[J]. 广东化工,2016,43(7):177-179.
- [20] 罗国平,梁宇柱,闫梦茹,等. HPLC 法测定牡丹籽油中游离型和结合型 α -亚麻酸、亚油酸及油酸的含量[J]. 中国油脂,2017,42(8):140-144.
- [21] 宋 涛,张凤枰,刘耀敏,等. 透反射近红外光谱法快速测定大豆油中的脂肪酸[J]. 光谱学与光谱分析,2012,32(8):2100-2104.
- [22] LOU Y, SCHWENDER J, SHANKLIN J. *FAD2* and *FAD3* desaturases form heterodimers that facilitate metabolic channeling *in Vivo* [J]. Journal of Biological Chemistry, 2014, 289(26):17996-18007.
- [23] SAHA S, RAGHAVA G P S. Prediction of continuous B-cell epitopes in an antigen using recurrent neural network [J]. Proteins Structure Function and Bioinformatics, 2006, 65(1):40-48.
- [24] EPRINTSEV A T, GATAULLINA M O. Isolation, purification, and properties of peroxisomal malate dehydrogenase from maize mesophyll [J]. Applied Biochemistry and Microbiology, 2018, 54(3):320-323.
- [25] 王 凤. 拟南芥内质网上的 Profilin2 蛋白结合蛋白的分离与纯化[D]. 北京:中国农业大学,2005.
- [26] 孔 君,刘 箐,韩跃武,等. 单克隆抗体制备技术的最新进展及应用前景[J]. 免疫学杂志,2011,27(2):170-173.
- [27] 刘 媛,刘贤进,余向阳,等. Milbemycin Oxime 半抗原设计及其抗体制备[J]. 农药学报,2005,7(3):285-288.
- [28] 晁 博,薛飞群. 小分子半抗原抗体制备技术的研究进展[J]. 中国兽医科学,2006,36(9):757-762.
- [29] 周晓婴,申爱娟,张洁夫,等. RNAi 沉默转基因油菜 *fad2* 基因表达的种子特异性分析[J]. 分子植物育种,2012,10(3):305-310.
- [30] 陈 松,彭 琦,周晓婴,等. 转基因油菜 W-4 *fad_2* 基因沉默的种子特异性分析(英文) [J]. 农业科学与技术,2014,15(8):1308-1311,1316.

(责任编辑:陈海霞)