

油茶 *CoSAD* 基因载体的构建、鉴定及功能分析

陈鸿鹏¹, 谭晓凤^{2,①}, 谢耀坚¹, 张党权², 曾艳玲²

(1. 国家林业局桉树研究开发中心, 广东 湛江 524022; 2. 中南林业科技大学, 湖南 长沙 410004)

摘要: 为揭示油茶 (*Camellia oleifera* Abel) 硬脂酰-ACP 脱饱和酶 (SAD) 基因 (即 *CoSAD* 基因) 的功能, 构建了该基因的原核表达载体 pET28b-*CoSAD*、植物表达载体 pBI121-*CoSAD* 和 RNA 干扰载体 pBI121-*CoSAD* RNAi, 并采用 PCR 扩增及双酶切方法对 3 类载体进行鉴定; 在此基础上, 对原核表达载体中的 *CoSAD* 基因进行诱导表达分析, 并对 pBI121-*CoSAD* 转化的拟南芥 [*Arabidopsis thaliana* (Linn.) Heynh.] *sad* 突变体植株和 pBI121-*CoSAD* RNAi 转化的拟南芥野生型植株进行转基因鉴定和主要脂肪酸成分含量分析。PCR 扩增和双酶切结果显示: 从 pET28b-*CoSAD*、pBI121-*CoSAD* 和 pBI121-*CoSAD* RNAi 载体的阳性克隆中均可获得目的条带, 表明这 3 类载体均构建成功; 用 1 mmol·L⁻¹ IPTG 分别诱导 0.5、1.0、2.0、3.0、4.0 和 5.0 h, *CoSAD* 基因均能够在 pET28b-*CoSAD* 转化的大肠杆菌 BL21 感受态细胞中正常表达, 能够获得与预测结果相符的相对分子质量约 47 000 的特异目的蛋白条带, 且蛋白活性随诱导时间的延长而升高。从 pBI121-*CoSAD* 转化的拟南芥突变体植株和 pBI121-*CoSAD* RNAi 转化的拟南芥野生型植株中也均可扩增出目的条带。GC-MS 分析结果显示: 与拟南芥野生型植株相比, 其突变体植株的硬脂酸和棕榈酸含量较高、油酸和棕榈油酸含量较低; 但突变体植株经 pBI121-*CoSAD* 转化后, 硬脂酸和棕榈酸含量降低而油酸和棕榈油酸含量提高; 野生型植株经过 pBI121-*CoSAD* RNAi 转化后, 硬脂酸和棕榈酸含量提高、油酸和棕榈油酸含量降低, 表明 pBI121-*CoSAD* 转化能够促进拟南芥 *sad* 突变体植株体内饱和脂肪酸向不饱和脂肪酸转化, 而 pBI121-*CoSAD* RNAi 转化对拟南芥 *SAD* 基因的表达有明显的抑制作用, 这 2 种重组质粒均可影响拟南芥植株的脂肪酸含量。研究结果表明: 油茶 *CoSAD* 基因具有调控饱和和脂肪酸 (硬脂酸和棕榈酸) 向不饱和脂肪酸 (油酸和棕榈油酸) 转化的功能, 对茶油的脂肪酸组成具有关键的调控作用。

关键词: 油茶 *SAD* 基因 (*CoSAD* 基因); 原核表达载体; 植物表达载体; RNA 干扰载体; 脂肪酸组成; 调控功能

中图分类号: Q344+.13; S565.9 文献标志码: A 文章编号: 1674-7895(2015)02-0011-08

DOI: 10.3969/j.issn.1674-7895.2015.02.02

Construction, identification and function analysis on vectors of *CoSAD* gene from *Camellia oleifera*

CHEN Hongpeng¹, TAN Xiaofeng^{2,①}, XIE Yaojian¹, ZHANG Dangquan², ZENG Yanling² (1. China Eucalypt Research Centre, Zhanjiang 524022, China; 2. Central South University of Forestry and Technology, Changsha 410004, China), *J. Plant Resour. & Environ.*, 2015, 24(2): 11-18

Abstract: In order to reveal the function of stearyl-ACP desaturase (*SAD*) gene from *Camellia oleifera* Abel, that is *CoSAD* gene, its prokaryotic expression vector pET28b-*CoSAD*, plant expression vector pBI121-*CoSAD* and RNA interference vector pBI121-*CoSAD* RNAi were constructed, and three types of vectors were identified by PCR amplification and double enzyme digestion methods. On this basis, induced expression analysis on *CoSAD* gene in prokaryotic expression vector was carried out, transgenic identification and analysis on main fatty acid composition contents in *sad* mutant plant of *Arabidopsis thaliana* (Linn.) Heynh. transformed by pBI121-*CoSAD* and its wild type plant transformed by pBI121-*CoSAD* RNAi were also carried out. Results of PCR amplification and double enzyme digestion show that target bands all can be obtained from positive clones of pET28b-*CoSAD*, pBI121-*CoSAD* and pBI121-*CoSAD* RNAi vectors, meaning that these three types of vectors all are constructed successfully. Using

收稿日期: 2014-06-03

基金项目: 广东省林业科技创新项目 (2014KJCX016-03); 湛江市科技计划项目 (2012C02139; 2013A03016; 2014A03013); 国家自然科学基金资助项目 (31070603)

作者简介: 陈鸿鹏 (1979-), 男, 吉林公主岭人, 博士, 助理研究员, 主要从事林业生物技术和植物资源应用方面的研究。

① 通信作者 E-mail: tanxiaofeng@126.com

1 mmol · L⁻¹ IPTG induced for 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0 and 5.0 h, respectively, *CoSAD* gene can express normally in *E. coli* BL21 competent cell transformed by pET28b-*CoSAD*, and can obtain a specific target protein band with relative molecular mass about 47 000, which is consistent with predicted value, and the protein activity increases with prolonging of induction time. Also, target bands all can be amplified from mutant plant of *A. thaliana* transformed by pBI121-*CoSAD* and its wild type plant transformed by pBI121-*CoSAD* RNAi. GC-MS analysis result shows that compared with wild type plant of *A. thaliana*, contents of stearic acid and palmitic acid in mutant plant are higher, those of oleic acid and palmitoleic acid are lower. But, after transformed by pBI121-*CoSAD*, contents of stearic acid and palmitic acid in mutant plant decrease while those of oleic acid and palmitoleic acid increase. After transformed by pBI121-*CoSAD* RNAi, contents of stearic acid and palmitic acid in wild type plant of *A. thaliana* increase while those of oleic acid and palmitoleic acid decrease, meaning that transformation of pBI121-*CoSAD* can promote the conversion of saturated fatty acids to unsaturated fatty acids in *sad* mutant plant of *A. thaliana*, while transformation of pBI121-*CoSAD* RNAi has an obviously inhibition to expression of *SAD* gene from *A. thaliana*, these two recombinant plasmids both can influence fatty acid content in *A. thaliana* plant. It is suggested that *CoSAD* gene has the function in regulating saturated fatty acids of stearic acid and palmitic acid to transform into unsaturated fatty acids of oleic acid and palmitoleic acid, and plays a key regulatory role in fatty acid composition of tea oil.

Key words: *SAD* gene from *Camellia oleifera* Abel (*CoSAD* gene); prokaryotic expression vector; plant expression vector; RNA interference vector; fatty acid composition; regulation function

硬脂酰-ACP 脱饱和酶 (stearoyl-ACP desaturase, *SAD*) 是多种植物 (尤其是油料植物) 中重要的调控酶之一, 在饱和脂肪酸转化为不饱和脂肪酸的过程中起关键作用^[1-4]。Klinkenberg 等^[5] 的研究结果表明: *AtSAD6* 基因能够将拟南芥 [*Arabidopsis thaliana* (Linn.) Heynh.] 水杨酸非敏感型突变体 *ssi2-2* 的脂肪酸含量恢复至正常水平; 在干旱和缺氧逆境条件下, 该基因还能够增加拟南芥体内的不饱和脂肪酸含量、降低机体受伤害程度。Schlüter 等^[6] 认为: *Ophrys sphegodes* Mill. 不同品种间的相互授粉是在信号素的介导下实现的, 而信号素受 *SAD* 基因的调控, 并且这些 *SAD* 基因具有将硬脂酸和棕榈酸分别转变成油酸和棕榈油酸的功能。因此, 在植物的不饱和脂肪酸合成途径中, *SAD* 基因能够调控其体内脂肪酸的组成和含量, 为植物的正常生长发育提供必需的物质和能量; 同时, *SAD* 基因也是参与其他生理过程的重要功能基因之一。

油茶 (*Camellia oleifera* Abel) 为原产中国南方的重要木本油料树种, 所产茶油主要由油酸、亚油酸以及少量的亚麻酸等不饱和脂肪酸组成, 含量高达 90% 以上, 为优质的食用植物油之一^[7]。为了深入研究油茶不饱和脂肪酸生物合成的分子机制, 相关研究人员进行了多方面的研究。谭晓风等^[8] 构建了油茶种子的 cDNA 文库和 EST 文库, 并对重要基因进行了克隆和分析; 张党权等^[9] 采用 RACE 技术并结合 RT-PCR

技术获得了油茶 *SAD* 基因 (*CoSAD* 基因) 的全长 cDNA 序列并对该序列进行了全面的生物信息学分析; 曾艳玲等^[10] 的研究结果显示: 在油茶种子的生长和发育过程中, *CoSAD* 基因的表达量与油酸含量呈显著正相关。

为了进一步明确 *CoSAD* 基因的功能, 作者基于前期的研究工作构建了 *CoSAD* 基因的原核表达载体 pET28b-*CoSAD* 并进行了基因诱导表达分析; 此外, 还构建了植物表达载体 pBI121-*CoSAD* 和 RNA 干扰载体 pBI121-*CoSAD* RNAi, 并分别对 pBI121-*CoSAD* 转化的拟南芥 *sad* 突变体植株和 pBI121-*CoSAD* RNAi 转化的拟南芥野生型植株进行了转基因鉴定和主要脂肪酸成分含量分析, 以期为进一步揭示油茶种子中不饱和脂肪酸合成的分子机制提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料和试剂

含有 *CoSAD* 基因的 pMD18-*CoSAD* 质粒 DNA、原核表达载体 pET28b、植物表达载体 pBI121、大肠杆菌 DH5 α 和 BL21 感受态细胞、农杆菌 LBA4404 感受态细胞均为本实验室保存材料; 野生型拟南芥 Col-0 和 T-DNA 插入型突变体 (即 *sad* 突变体) *At3g02620* 的种子购自美国 Columbia 公司; 高保真聚合酶 PrimeStar 购自宝生物工程 (大连) 有限公司; 植物基因组 DNA

提取试剂盒、质粒提取试剂盒以及琼脂糖凝胶回收试剂盒购自德国 Qiagen 公司;各种限制性内切酶、 T_4 DNA 连接酶以及 DNA marker 购自美国 Thermo 公司;中间克隆载体 pEASY-Blunt-Simple 购自北京全式金生物技术有限公司。测序工作交由上海博尚生物技术有限公司完成。

主要仪器包括 C1000 梯度 PCR 仪(美国 Bio-Rad 公司)、CFX96 荧光定量 PCR 仪(美国 Bio-Rad 公司)、Agilent 7890A-5975C 气相色谱质谱联用仪(美国 Agilent 公司)、Mini-Sub Cell GT Cell 电泳设备(美国 Bio-Rad 公司)、ChemiDoc XRS 凝胶成像系统(美国 Bio-Rad 公司)、ST16R 高速冷冻离心机(美国 Thermo 公司)、SHKE8000 恒温摇床(美国 Thermo 公司)、KB240 低温恒温培养箱(德国 Binder 公司)和 KBWF720 植物生长光照培养箱(德国 Binder 公司)。

1.2 方法

1.2.1 PCR 反应体系 实验采用的 PCR 反应体系总体积为 50 μ L,包括上游和下游引物各 1 μ L、2 μ L 模板 DNA、0.5 μ L PrimeStar 酶、10 μ L 5 \times buffer、4 μ L dNTPs 和 31.5 μ L 重蒸水。

1.2.2 原核表达载体的构建和诱导表达 根据油茶 *CoSAD* 基因的 cDNA 编码区序列,设计并合成其原核表达载体引物 CoSAD-28b F1 和 CoSAD-28b R1,引物序列分别为 5'-CAGCCATATGGCTATGAAGCTCAATCCC-3' (下划线表示 *Nde*I 酶切位点)和 5'-GCTCGAATTCTCAGATCTTCAGTTCTCT-3' (下划线表示 *Eco*RI 酶切位点)。以 pMD18-CoSAD 质粒 DNA 为模板、按照上述 PCR 反应体系进行 PCR 扩增。扩增程序:98 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 98 $^{\circ}$ C 变性 10 s、54 $^{\circ}$ C 退火 10 s、72 $^{\circ}$ C 延伸 2 min,35 个循环;最后于 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。用质量体积分数 1.2% 琼脂糖凝胶进行 PCR 产物的电泳检测,并按照相关试剂盒使用说明书进行扩增产物的纯化和回收。

用 *Nde*I 和 *Eco*RI 分别对回收的目的产物和 pET28b 质粒进行双酶切并回收酶切产物,用 T_4 DNA 连接酶对酶切产物进行过夜连接,获得 pET28b-CoSAD。将 pET28b 和 pET28b-CoSAD 分别转化到大肠杆菌 BL21 感受态细胞中,经过 Kan 抗性培养筛选阳性菌落进行 PCR 检测和酶切鉴定,测序后使用 1 mmol \cdot L⁻¹ IPTG 对阳性克隆进行诱导表达和 SDS-PAGE 电泳分析,诱导时间分别设置为 0.5、1.0、2.0、3.0、4.0 和 5.0 h。

1.2.3 植物表达载体的改造和构建

1.2.3.1 植物表达载体的改造 由于 pBI121 载体上可用的酶切位点较少,且单酶切位点 *Xba*I 和 *Bam*HI 在此载体上紧靠,因此用片段替换方法改造 pBI121 载体。根据酶切位点设计 2 条单链反向互补 DNA 片段 Dimer F1 和 Dimer R1, Dimer F1 序列为: 5'-GACGTCTAGAAAGCTCGTACCCATGGTTCGAGTAGTGGATCCGATCAGTATGAGCTCCCAC-3' (下划线依次表示 *Xba*I、*Nco*I、*Bam*HI 和 *Sac*I 酶切位点); Dimer R1 序列为: 5'-GTGGGAGCTCATACTGATCGGATCCA CTACTCGACCATGGGTACGAGCTTCTAGACGTC-3' (下划线依次表示 *Sac*I、*Bam*HI、*Nco*I 和 *Xba*I 酶切位点)。用 TAE 溶液将上述 DNA 片段配制成浓度 200 mmol \cdot L⁻¹ 的溶液,各吸取 50 μ L 进行退火;退火程序为:94 $^{\circ}$ C 变性 5 min,90 $^{\circ}$ C、80 $^{\circ}$ C、70 $^{\circ}$ C、60 $^{\circ}$ C 和 50 $^{\circ}$ C 各退火 1 min,40 $^{\circ}$ C 退火 5 min。用质量体积分数 1.5% 琼脂糖凝胶进行电泳检测,并按照相关试剂盒的使用说明书进行退火产物的纯化和回收。

用 *Xba*I 和 *Sac*I 分别对回收的目的产物和 pBI121 质粒进行双酶切,回收酶切产物;用 T_4 DNA 连接酶对酶切产物进行连接,获得 pBI121-Dimer。将 pBI121-Dimer 转化到大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞中,经过 Kan 抗性培养筛选阳性菌落进行 PCR 检测和酶切鉴定及测序;提取质粒 DNA,-20 $^{\circ}$ C 保存、备用。

1.2.3.2 植物表达载体的构建 依据油茶 *CoSAD* 基因的 cDNA 编码区序列设计并合成带有 *Xba*I 和 *Bam*HI 酶切位点的引物 CoSAD PE F1 和 CoSAD PE R1, CoSAD PE F1 的序列为: 5'-GCTCTAGAAATGGAGTTTGTACACGA-3' (下划线表示 *Xba*I 酶切位点); CoSAD PE R1 的序列为: 5'-CGGGATCCGATCTTAACATATTGGAAG-3' (下划线表示 *Bam*HI 酶切位点)。以 pMD18-CoSAD 质粒 DNA 为模板、采用前述的 PCR 反应体系进行 PCR 扩增。扩增程序:98 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 98 $^{\circ}$ C 变性 10 s、57 $^{\circ}$ C 退火 10 s、72 $^{\circ}$ C 延伸 2 min,35 个循环;72 $^{\circ}$ C 延伸 7 min,并于 4 $^{\circ}$ C 保温 20 min。用质量体积分数 1.0% 琼脂糖凝胶进行电泳检测,按照相关试剂盒使用说明书进行扩增产物的纯化和回收。

用 *Xba*I 和 *Bam*HI 分别对回收的目的产物和 pBI121-Dimer 质粒进行双酶切并回收酶切产物,用 T_4 DNA 连接酶对酶切产物进行连接,获得 pBI121-CoSAD。将 pBI121-CoSAD 转化到大肠杆菌 DH5 α 感

受态细胞中进行大量扩增,经过 Kan 抗性培养筛选阳性克隆并进行 PCR 检测和酶切鉴定及测序。提取并回收 pBI121-CoSAD,将 pBI121 和 pBI121-CoSAD 分别转化到农杆菌 LBA4404 感受态细胞中,经过 Kan 抗性培养筛选阳性克隆并进行 PCR 检测。

1.2.4 RNA 干扰载体的构建 经过生物信息学分析与 BLAST 比对,CoSAD 基因的 cDNA 编码区序列的 126~631 bp 区间序列最为保守,据此区间序列设计并合成了带有 *Xba*I 和 *Nco*I 酶切位点的正向干扰片段引物以及带有 *Bam*HI 和 *Sac*I 酶切位点的反向干扰片段引物。引物 CoSAD RNAi F1 序列为:5'-GA CTCTAGAGGAGGTTGAGAATCTAAGGA-3' (下划线表示 *Xba*I 酶切位点);引物 CoSAD RNAi R1 序列为:5'-GATCCATGGCCATTCCTGACC-3' (下划线表示 *Nco*I 酶切位点);引物 CoSAD RNAi F2 序列为:5'-G ATCGGATCCCCATTCCTGACCCAAT-3' (下划线表示 *Bam*HI 酶切位点;引物) CoSAD RNAi R2 序列为:5'-GTACGAGCTCGGAGGTTGAGAATCTAAGGAA-3' (下划线表示 *Sac*I 酶切位点)。以 pMD18-CoSAD 质粒 DNA 为模板,按照前述的 PCR 反应体系进行 PCR 扩增。扩增程序为:98 °C 预变性 5 min;98 °C 变性 10 s、60 °C 退火 10 s、72 °C 延伸 2 min,共 35 个循环;72 °C 延伸 7 min,并于 4 °C 保温 20 min。经质量体积分数 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测后,分别按照相关试剂盒使用说明书对 2 个扩增产物进行纯化和回收。

由于油茶 CoSAD 基因的 DNA 序列中没有内含子,故选用拟南芥 *AtSAD* 基因的内含子作为正向干扰片段和反向干扰片段的中间片段,因此,根据 *AtSAD* 基因的 DNA 序列设计并合成了带有 *Nco*I 和 *Bam*HI 酶切位点的引物。引物 *AtSAD* RNAi F1 序列为:5'-GACCATGGTGAGATAGTTTCAGGCA-3' (下划线表示 *Nco*I 酶切位点);引物 *AtSAD* RNAi R1 序列为:5'-CAGGATCCCCTATGAAAGATAAGTTAAAG-3' (下划线表示 *Bam*HI 酶切位点)。用植物基因组 DNA 提取试剂盒提取和纯化拟南芥叶片的基因组 DNA,并以此为模板,以 *AtSAD* RNAi F1 和 *AtSAD* RNAi R1 为引物、采用前述的 PCR 反应体系进行 PCR 扩增。扩增程序为:98 °C 预变性 5 min;98 °C 变性 10 s、62 °C 退火 10 s、72 °C 延伸 2 min,35 个循环;72 °C 延伸 7 min,并于 4 °C 保温 20 min。用质量体积分数 1.0% 琼脂糖凝胶进行电泳检测,按照相关试剂盒使用说明书进行扩增产物的纯化和回收。

对正向干扰片段引物的扩增产物以及 pBI121-Dimer 质粒进行 *Xba*I 和 *Nco*I 双酶切,用 T₄ DNA 连接酶对酶切产物进行连接,获得 pBI121-CoSAD Sense 质粒;对该质粒及 *AtSAD* RNAi 引物的扩增产物进行 *Nco*I 和 *Bam*HI 双酶切,用 T₄ DNA 连接酶对酶切产物进行连接,获得 pBI121-CoSAD Sense+*AtSAD* Intron 质粒;对该质粒以及反向干扰片段引物的扩增产物进行 *Bam*HI 和 *Sac*I 双酶切,用 T₄ DNA 连接酶对酶切产物进行连接,最终获得 pBI121-CoSAD RNAi 质粒。将该质粒转化到农杆菌 LBA4404 感受态细胞中,经过 Kan 抗性培养筛选阳性克隆进行酶切检测。

1.2.5 拟南芥的转化与筛选 用 pBI121-CoSAD 转化拟南芥 *sad* 突变体植株,用 pBI121-CoSAD RNAi 转化野生型植株。将含有 pBI121-CoSAD 和 pBI121-CoSAD RNAi 质粒的农杆菌分别扩大培养至菌液 OD₆₀₀ 值为 1.2~1.6;于 4 500 r·min⁻¹ 离心 15 min,收集沉淀,将沉淀悬浮于渗透培养基中,使菌液 OD₆₀₀ 值约 0.8、pH 5.6。将野生型和突变体拟南芥幼苗培养至茎高约 3 cm,去除顶生花序;分别将花序浸入上述菌液中,轻轻晃动约 1 min;用薄膜包裹植株,避光倒置培养 24 h 后进行正常光照培养,1 周后重复 1 次上述浸染操作。培养 21~28 d 后收集 T₀ 代成熟种子,并在含有 50 mg·L⁻¹ Kan 的 MS 培养基上进行筛选,将能够正常生长的幼苗移至蛭石中继续栽培。20 d 后分别提取各植株叶片的 DNA,以 CaMV 35S 启动子基因的部分序列为检测对象进行 PCR 扩增。

1.2.6 脂肪酸的提取和 GC-MS 分析 称取拟南芥野生型、突变体以及二者的阳性转基因植株的新鲜叶片各 500 mg,于液氮中研磨成粉末;迅速向粉末中加入 1.4 mL 甲醇终止酶活性,再加入核糖酶、十九酸甲酯和超纯水各 50 μL,手动振荡后置于 70 °C 温浴 15 min,于 4 000 r·min⁻¹ 离心 3 min,收集上清液;向沉淀中加入 750 μL 三氯甲烷,37 °C 摇床振荡 5 min,于 4 000 r·min⁻¹ 离心 3 min,取上清液;合并上清液,加入 900 μL 三氯甲烷,手动振荡,于 4 000 r·min⁻¹ 离心 15 min;取 1 mL 上层溶液,加入 1 mL 浓硫酸和甲醇混合液(体积比 3:97),于 100 °C 条件下甲酯化反应 4 h;反应完成后,在冷却的反应液中加入 4 mL 超纯水进行振荡洗涤,于 4 000 r·min⁻¹ 离心 10 min,弃下层溶液,重复此操作 2 次;在上层溶液中加入适量无水硫酸钠,于 -20 °C 条件下过夜脱水。上清液用氮吹仪浓缩至约 80 μL,加入 10 μL 吡啶和 10 μL MSTFA,

于 37 °C 条件下反应 30 min;用正己烷将反应液稀释至约为叶片质量的 25 倍后进行 GC-MS 分析^[11]。

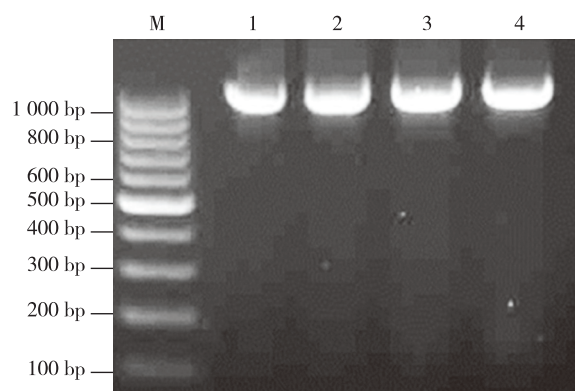
GC-MS 分析条件:HP-5 MS 石英弹性毛细管柱 (30.0 m×0.25 mm,0.25 μm)。载气为高纯度的氦气 (99.999%),流速 1.0 mL·min⁻¹,进样口温度 250 °C。升温过程为:色谱柱初始温度 50 °C,保持 2 min;以 4 °C·min⁻¹ 速率升温至 120 °C,保持 2 min;最后以 6 °C·min⁻¹ 速率升温至 230 °C,保持 5 min。采取分流方式进样,分流比 10:1^[12-13]。

电离方式:EI 离子源,电离能量 70 eV;离子源温度 230 °C,四极杆温度 150 °C,传输线温度 280 °C;电子倍增器电压 1 588 V。质量扫描范围 m/z 30 ~ 400,谱图检索采用 Nist08. L 数据库完成^[12-13]。

2 结果和分析

2.1 油茶 *CoSAD* 基因原核表达载体的鉴定及诱导表达分析

将油茶 *CoSAD* 基因连接到 pET28b 载体上,获得的重组质粒 pET28b-*CoSAD* 转入大肠杆菌 BL21 感受态细胞中,经 Kan 抗性培养筛选出阳性菌落并进行 PCR 检测,结果显示 PCR 扩增产物为 1 条明显的条带,长度约 1 200 bp(图 1)。双酶切鉴定结果(图 2)表明,该重组质粒包含 2 条明显的条带,其中一条条带的长度约 5 300 bp,另一条条带的长度约 1 200 bp。对酶切鉴定正确的克隆进行测序,结果显示 *CoSAD* 基因的开放阅读框已经正确地连接在 pET28b 载体上,



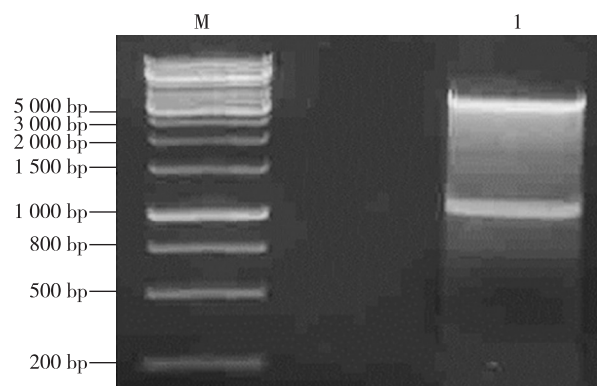
M: DNA marker; 1-4: pET28b-*CoSAD*.

图1 油茶 *CoSAD* 基因原核表达载体中重组质粒 pET28b-*CoSAD* 的 PCR 扩增结果

Fig. 1 Result of PCR amplification of recombinant plasmid pET28b-*CoSAD* in prokaryotic expression vector of *CoSAD* gene from *Camellia oleifera* Abel

说明 pET28b-*CoSAD* 重组质粒构建成功。

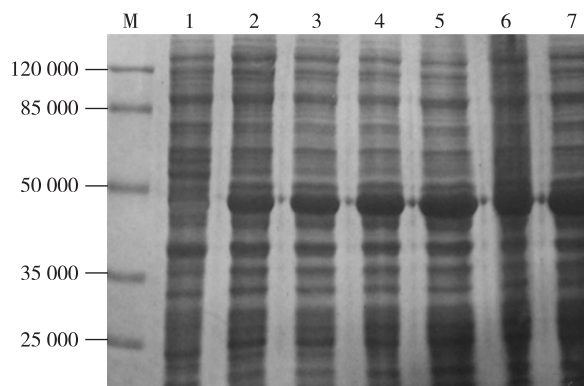
经 1 mmol·L⁻¹ IPTG 诱导不同时间后,对含有 pET28b 和 pET28b-*CoSAD* 质粒的大肠杆菌 BL21 感受态细胞进行 SDS-PAGE 电泳检测,结果(图 3)显示:在 SDS-PAGE 电泳谱中可观察到明显增亮的预测条带,该条带的相对分子质量约为 47 000,且随诱导时间延长条带越来越明显;而携带空质粒 pET28b 的大肠杆菌中并未出现相应的蛋白条带。说明在构建



M: DNA marker; 1: 双酶切后的重组质粒 Recombinant plasmid after double enzyme digestion.

图2 油茶 *CoSAD* 基因原核表达载体中重组质粒 pET28b-*CoSAD* 的双酶切结果

Fig. 2 Result of double enzyme digestion of recombinant plasmid pET28b-*CoSAD* in prokaryotic expression vector of *CoSAD* gene from *Camellia oleifera* Abel



M: 标准蛋白标记 Standard protein marker; 1: 含有 pET28b 的菌液 Bacterium liquid containing pET28b; 2-7: 含有 pET28b-*CoSAD* 的菌液,用 1 mmol·L⁻¹ IPTG 分别诱导 0.5、1.0、2.0、3.0、4.0 和 5.0 h Bacterium liquid containing pET28b-*CoSAD*, which were induced for 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0 and 5.0 h by 1 mmol·L⁻¹ IPTG, respectively.

图3 经 1 mmol·L⁻¹ IPTG 诱导不同时间后含有重组质粒 pET28b-*CoSAD* 的大肠杆菌 BL21 感受态细胞总蛋白的 SDS-PAGE 电泳图谱
Fig. 3 SDS-PAGE electrophoretogram of total protein of *Escherichia coli* BL21 competent cell containing recombinant plasmid pET28b-*CoSAD* after induced for different times by 1 mmol·L⁻¹ IPTG

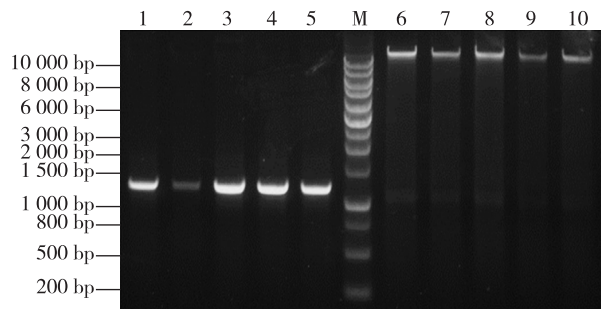
的原核表达载体中 *CoSAD* 基因能够进行正常转录和翻译,获得的目的蛋白与预期结果一致。

2.2 油茶 *CoSAD* 基因植物表达载体的鉴定

将获得的 pBI121-*CoSAD* 转化到大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞中并进行大量扩增,对提取的质粒 DNA 进行 PCR 检测,结果(图4)表明:多数阳性克隆均能扩增出1条长度约为1200 bp 的特异条带,与油茶 *CoSAD* 基因 cDNA 编码区的长度相符。经过 *Xba*I 和 *Bam*HI 双酶切后,多数阳性克隆均被分成2条带,长度分别约为14500 和1200 bp(图4),2条带的长度分别与 pBI121 载体和 *CoSAD* 基因 cDNA 编码区的长度相近,表明所得质粒与目的载体的序列相同,由此说明油茶 *CoSAD* 基因植物表达载体构建成功。

2.3 油茶 *CoSAD* 基因 RNA 干扰载体的鉴定

扩增结果显示:油茶 *CoSAD* 基因正/反向干扰片段长度为506 bp,拟南芥 *AtSAD* 基因的内含子长度为500 bp。从大肠杆菌中获取的多个质粒 DNA 经过



M: DNA marker; 1-5: PCR 扩增结果 Results of PCR amplification; 6-10: 双酶切结果 Results of double enzyme digestion.

图4 油茶 *CoSAD* 基因植物表达载体中重组质粒 pBI121-*CoSAD* 的 PCR 扩增和双酶切结果

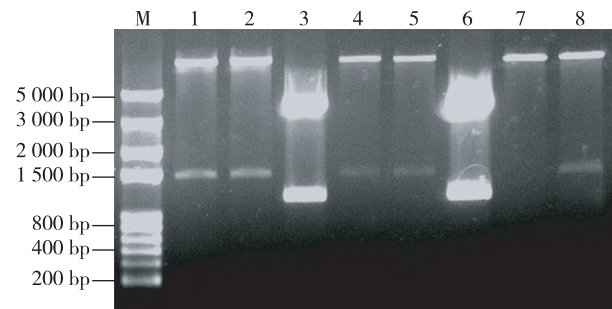
Fig. 4 Results of PCR amplification and double enzyme digestion of recombinant plasmid pBI121-*CoSAD* in plant expression vector of *CoSAD* gene from *Camellia oleifera* Abel

*Xba*I 和 *Sac*I 双酶切后,扩增产物的电泳图谱上共出现2条带,长度分别约为14000 和1500 bp(图5),其中第3、第6、第7泳道的质粒 DNA 经过双酶切后获得的片段长度与预期结果不一致,推测它们可能为假阳性质粒或菌液;而第1、第2、第4、第5和第8泳道的质粒序列与目的载体序列相同。

2.4 油茶 *CoSAD* 基因转基因植株的鉴定

采用油茶 *CoSAD* 基因的植物表达载体 pBI121-*CoSAD* 转化拟南芥 *sad* 突变体植株,转基因鉴定结果见图6。结果表明:野生型和突变体对照组植株的 PCR 产物中均无目的条带,而第6泳道的转基因突变体植株中也未出现目的条带,推测其为假阳性植株;其他的 T₀代植株中均含有 CaMV 35S 启动子基因,可扩增出200 bp 的目的条带,据此可初步确定这些植株为转基因植株。

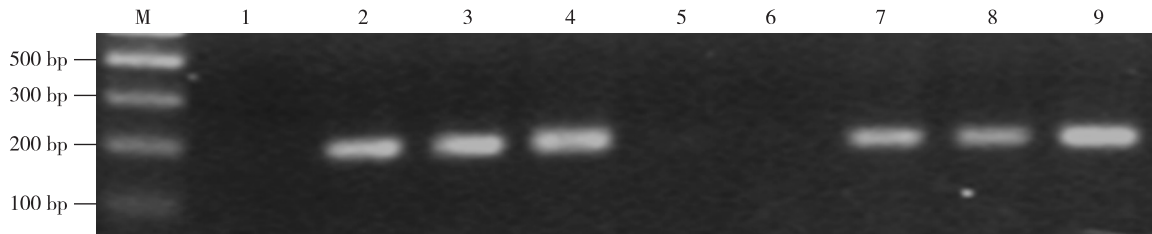
采用油茶 *CoSAD* 基因的 RNA 干扰载体 pBI121-*CoSAD* RNAi 转化拟南芥野生型植株,转基因鉴定结



M: DNA marker; 1-8: 双酶切后的重组质粒 Recombinant plasmid after double enzyme digestion.

图5 油茶 *CoSAD* 基因的 RNA 干扰载体中重组质粒 pBI121-*CoSAD* RNAi 的双酶切结果

Fig. 5 Result of double enzyme digestion of recombinant plasmid pBI121-*CoSAD* RNAi in RNA interference vector of *CoSAD* gene from *Camellia oleifera* Abel



M: DNA marker; 1: 野生型植株 Wild type plant; 2-4: 转基因突变体植株 Transgenic mutant plants; 5: 突变体植株 Mutant plant; 6-8: 转基因突变体植株 Transgenic mutant plants; 9: pBI121 质粒 Plasmid pBI121.

图6 拟南芥野生型和 *sad* 突变体植株及转基因突变体植株(经 pBI121-*CoSAD* 转化)的 PCR 扩增结果

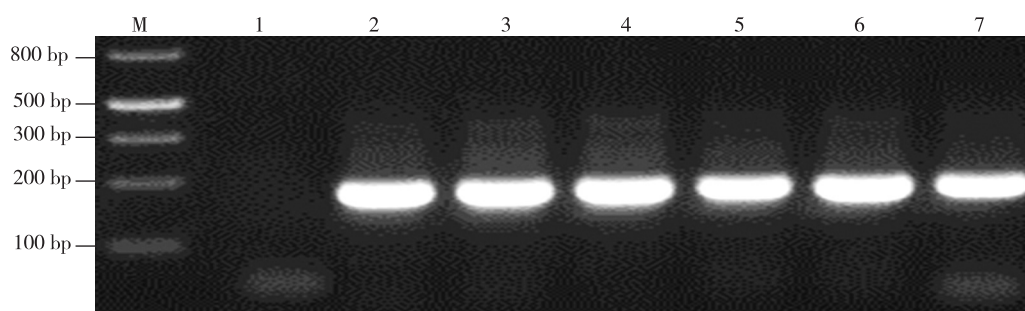
Fig. 6 Result of PCR amplification of wild type plant, *sad* mutant plant and transgenic mutant plant (transformed by pBI121-*CoSAD*) of *Arabidopsis thaliana* (Linn.) Heynh.

果见图 7。结果表明:野生型植株的 PCR 扩增产物中无目的条带,而转基因野生型植株均能扩增出目的条带。

2.5 转基因植株的脂肪酸含量分析

对转油茶 *CoSAD* 基因的拟南芥转基因野生型和 *sad* 突变体植株及非转基因植株的 4 种主要脂肪酸成分含量的分析结果(表 1)显示:与野生型植株相比,突变体植株中脂肪酸含量有明显差异,主要表现为不饱和脂肪酸油酸的含量大幅下降、棕榈油酸的含量也明显下降,而饱和脂肪酸棕榈酸和硬脂酸的含量则显著提高($P \leq 0.05$)。经过 pBI121-*CoSAD* 转化后,突变体植株的脂肪酸含量有明显变化,其中,不饱和脂

肪酸油酸和棕榈油酸的含量增加,而饱和脂肪酸棕榈酸和硬脂酸的含量下降,且这 4 个脂肪酸成分的含量接近野生型植株。经过 pBI121-*CoSAD* RNAi 转化后,野生型植株的脂肪酸组分也有明显变化,主要表现为不饱和脂肪酸油酸的含量明显下降、棕榈油酸的含量也有所降低,而饱和脂肪酸棕榈酸和硬脂酸的含量则增加。表明 pBI121-*CoSAD* 转化能够促进拟南芥 *sad* 突变体植株体内饱和脂肪酸向不饱和脂肪酸转化,而 pBI121-*CoSAD* RNAi 转化对拟南芥 *SAD* 基因的表达具有明显的抑制作用,这 2 种重组质粒均能影响拟南芥植株体内的脂肪酸含量。



M: DNA marker; 1: 野生型植株 Wild type plant; 2-6: 转基因野生型植株 Transgenic wild type plants; 7: pBI121 质粒 Plasmid pBI121.

图 7 拟南芥野生型植株及转基因野生型植株(经 pBI121-*CoSAD* RNAi 转化)的 PCR 扩增结果

Fig. 7 Result of PCR amplification of wild type plant and transgenic wild type plant (transformed by pBI121-*CoSAD* RNAi) of *Arabidopsis thaliana* (Linn.) Heynh.

表 1 拟南芥野生型和 *sad* 突变体植株及其转基因植株的主要脂肪酸成分含量的比较($\bar{X} \pm SD$)

Table 1 Comparison on content of main fatty acid compositions in wild type, *sad* mutant plants and their transgenic plants of *Arabidopsis thaliana* (Linn.) Heynh. ($\bar{X} \pm SD$)

植株类型 Type of plant	脂肪酸成分的相对含量/% Relative content of fatty acid compositions			
	棕榈酸 Palmitic acid	棕榈油酸 Palmitoleic acid	硬脂酸 Stearic acid	油酸 Oleic acid
野生型植株 Wild type plant	15.8±0.5	4.4±0.1	1.4±0.1	2.5±0.1
突变体植株 Mutant plant	17.7±0.3	2.7±0.2	2.7±0.1	1.3±0.1
转基因突变体植株 ¹⁾ Transgenic mutant plant ¹⁾	14.7±0.3	5.6±0.1	1.1±0.1	3.1±0.1
转基因野生型植株 ²⁾ Transgenic wild type plant ²⁾	16.9±0.3	2.3±0.1	2.5±0.1	1.5±0.1

¹⁾ 经 pBI121-*CoSAD* 转化 Transformed by pBI121-*CoSAD*.

²⁾ 经 pBI121-*CoSAD* RNAi 转化 Transformed by pBI121-*CoSAD* RNAi.

3 讨论和结论

Cao 等^[14] 将从拟南芥中获得的 *SAD* 基因在大肠杆菌中进行表达,获得了相对分子质量类似的目的蛋白,同时,大肠杆菌中棕榈酸的含量从 45.2% 下降至

35.2%,但油酸含量明显增加。作者用油茶 *CoSAD* 基因构建了 pET28b-*CoSAD* 原核表达载体,并在大肠杆菌中进行诱导表达,获得了相对分子质量约 47 000 的特异目的蛋白,说明油茶的 *CoSAD* 基因能够在其体外编码相应蛋白并进行正常翻译,推测该基因可能具有类似拟南芥 *AtSAD* 基因的功能,可以通过拟南芥的转

基因研究对 *CoSAD* 基因进行详细分析。

Lightner 等^[15]发现拟南芥 *sad* 突变体植株的硬脂酸含量高于其野生型植株,且油酸等不饱和脂肪含量较低。Kachroo 等^[16]从拟南芥中克隆获得 6 条 *SAD* 同源基因,各基因的突变体植株的脂肪酸组成与野生型植株均有不同程度的差异,其中 *AtSAD4* 基因对应的突变体 *At3g02620* 的脂肪酸含量变化较明显。因此,本研究以此突变体为材料,利用油茶 *CoSAD* 基因的植物表达载体、通过功能互补,使拟南芥突变体植株的脂肪酸含量改变并接近其野生型植株,说明油茶的 *CoSAD* 基因在拟南芥中能够发挥与 *AtSAD4* 基因类似的功能。

利用油茶 *CoSAD* 基因构建的 RNA 干扰载体对拟南芥野生型植株进行转化,结果显示转基因植株中饱和脂肪酸含量升高、而不饱和脂肪酸含量则下降,推测该 RNA 干扰载体中的重组质粒 pBI121-CoSAD RNAi 主要是基于油茶 *CoSAD* 基因中非常保守的功能区构建的,因此,该重组质粒在拟南芥的转基因植株中能够干扰多个 *AtSAD* 同源基因的正常表达,导致拟南芥植株的脂肪酸组成改变。

综上所述,油茶的 *CoSAD* 基因能够调控棕榈酸和硬脂酸等饱和脂肪酸向棕榈油酸和油酸等不饱和脂肪酸的转化,对油茶种子的脂肪酸合成及代谢具有重要作用,是油茶种子发育过程中必不可少的基因。

参考文献:

- [1] WHITTLE E, CAHOON E B, SUBRAHMANYAM S, et al. A multifunctional acyl-acyl carrier protein desaturase from *Hedera helix* L. (English ivy) can synthesize 16- and 18-carbon monoene and diene products [J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2005, 280: 28169–28176.
- [2] HWANGBO K, AHN J W, LIM J M, et al. Overexpression of stearoyl-ACP desaturase enhances accumulations of oleic acid in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii* [J]. *Plant Biotechnology Reports*, 2014, 8: 135–142.
- [3] RUDDLE P, II, WHETTEN R, CARDINAL A, et al. Effect of Δ^9 -stearoyl-ACP-desaturase-C mutants in a high oleic background on soybean seed oil composition [J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 2014, 127: 349–358.
- [4] RAMESH A M, KESARI V, RANGAN L. Characterization of a stearoyl-acyl carrier protein desaturase gene from potential biofuel plant, *Pongamia pinnata* L. [J]. *Gene*, 2014, 542: 113–121.
- [5] KLINKENBERG J, FAIST H, SAUPE S, et al. Two fatty acid desaturases, stearoyl-acyl carrier protein Δ^9 -desaturase 6 and fatty acid desaturase 3, are involved in drought and hypoxia stress signaling in *Arabidopsis* crown galls [J]. *Plant Physiology*, 2014, 164: 570–583.
- [6] SCHLÜTER P M, XU S, GAGLIARDINI V, et al. Stearoyl-acyl carrier protein desaturases are associated with floral isolation in sexually deceptive orchids [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2011, 108: 5696–5701.
- [7] 胡芳名, 谭晓风, 刘惠民. 中国主要经济树种栽培与利用 [M]. 北京: 中国林业出版社, 2006: 370–383.
- [8] 谭晓风, 胡芳名, 谢禄山, 等. 油茶种子 EST 文库构建及主要表达基因的分析 [J]. *林业科学*, 2006, 42(1): 43–48.
- [9] 张党权, 谭晓风, 陈鸿鹏, 等. 油茶 *SAD* 基因的全长 cDNA 克隆及生物信息学分析 [J]. *林业科学*, 2008, 44(2): 155–159.
- [10] 曾艳玲, 谭晓风, 张党权, 等. 油茶脂肪酸代谢途径中关键酶基因调控油脂合成的规律研究 [J]. *中国粮油学报*, 2014, 29(2): 26–29, 35.
- [11] FIEHN O, KOPKA J, TRETHERWEY R N, et al. Identification of uncommon plant metabolites based on calculation of elemental compositions using gas chromatography and quadrupole mass spectrometry [J]. *Analytical Chemistry*, 2000, 72: 3573–3580.
- [12] 周大鹏, 王金梅, 尹震花, 等. HS-SPME-GC-MS 分析槟榔果皮和种子的挥发性成分 [J]. *天然产物研究与开发*, 2012, 24(12): 1782–1786.
- [13] 谢婧, 徐俐, 张秋红, 等. 顶空固相微萃取法提取菜籽油挥发性风味成分 [J]. *食品科学*, 2013, 34(12): 281–285.
- [14] CAO Y J, XIAN M, YANG J M, et al. Heterologous expression of stearoyl-acyl carrier protein desaturase (S-ACP-DES) from *Arabidopsis thaliana* in *Escherichia coli* [J]. *Protein Expression and Purification*, 2010, 69: 209–214.
- [15] LIGHTNER J, WU J, BROWSE J. A mutant of *Arabidopsis* with increased levels of stearic acid [J]. *Plant Physiology*, 1994, 106: 1443–1451.
- [16] KACHROO A, SHANKLIN J, WHITTLE E, et al. The *Arabidopsis* stearoyl-acyl carrier protein-desaturase family and the contribution of leaf isoforms to oleic acid synthesis [J]. *Plant Molecular Biology*, 2007, 63: 257–271.

(责任编辑: 佟金凤)