

文 凤, 孙 亮, 刘 峰, 等. 陆地棉脂肪酸去饱和酶基因 *GhFAD2-1* 的克隆与表达分析[J]. 江苏农业科学, 2019, 47(12): 74-78.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2019.12.015

陆地棉脂肪酸去饱和酶基因 *GhFAD2-1* 的克隆与表达分析

文 凤, 孙 亮, 刘 峰, 张新宇, 孙 杰

(石河子大学农学院, 新疆石河子 832000)

摘要: $\Delta 12$ -脂肪酸去饱和酶基因 *FAD2-1* 是控制种子中单不饱和脂肪酸油酸(C18:1)向多不饱和脂肪酸亚油酸(C18:2)转化的关键基因, 其表达水平决定植物油的营养价值与氧化稳定性。棉花 *GhFAD2-1* 基因的深入研究有利于采用脂肪酸代谢基因工程技术对棉仁中脂肪酸成分进行定向修饰和改造。采用同源克隆技术获得棉花品种新陆早 33 号的 *GhFAD2-1* 基因, 该基因编码区全长 1 158 bp, 共编码 385 个氨基酸; 生物信息学分析结果表明, *GhFAD2-1* 基因序列具有 1 个典型的 FAD2 结构域和 1 个 FAD2-N 端结构, 其氨基酸序列与橄榄、芝麻、花生、油茶等作物的 FAD2 序列相似性较高, 在 75%~78% 之间。利用 qRT-PCR 技术分析发现, *GhFAD2-1* 基因的表达量随着棉籽的发育呈先升高后降低的趋势, 开花后 40 d 达到其表达峰值。使用气相色谱-质谱联用仪(GC-MS)测定其脂肪酸组成, 结果表明, 开花后 0~40 d, C18:1 含量/C18:2 含量与 *GhFAD2-1* 基因表达量变化趋势相反。

关键词: 棉花; *GhFAD2-1*; 脂肪酸; qRT-PCR; GC-MS

中图分类号: Q785; S562.01

文献标志码: A

文章编号: 1002-1302(2019)12-0074-05

棉花是世界上最重要的纤维作物, 同时也是重要的油料作物。棉籽脱壳后的棉仁中油脂含量为 25%~39%^[1], 是世界上次于棕榈、大豆、油菜、油葵、花生的第六大植物油来源。2016 年我国棉籽产量约为 677.59 万 t, 棉籽油的产量约为 110.00 万 t, 是我国主要食用植物油之一。

单不饱和脂肪酸油酸(C18:1)和多不饱和脂肪酸亚油酸(C18:2)是植物油中的主要脂肪酸组分, 这 2 种脂肪酸组分含量在油料作物种子中的相对比例决定了食用油的营养价值与氧化稳定性^[2]。多不饱和脂肪酸亚油酸在贮藏过程中易氧化变质, 且多不饱和脂肪酸通过氢化作用可产生反式脂肪酸及其异构体。反式脂肪酸会刺激身体合成胆固醇, 过多的胆固醇高于细胞代谢所需, 导致胆固醇集聚在血管中, 易引发心血管疾病^[3]。单不饱和脂肪酸能降低对人体健康有害的低密度胆固醇(LDL)水平, 且其稳定性较高, 富含 C18:1 的食用植物油可较长时间地保存, 在高温烹调时不易氧化变质^[4]。因此, 提高油酸的相对含量, 增加食用植物油脂中油酸含量与亚油酸含量的比值, 是油料作物品质改良的重要内容^[5-8]。

在植物脂肪酸合成代谢过程中, $\Delta 12$ -脂肪酸去饱和酶 FAD2 是催化油酸脱氢生成亚油酸的关键酶, 其编码基因 *FAD2* 的表达水平直接调控了植物中油酸与亚油酸的相对含量与比例^[9]。目前 *FAD2* 基因已从大豆(*Glycine max*)、玉米

(*Zea mays*)、花生(*Arachis hypogaea*)、棉花(*Gossypium hirsutum*)、油葵(*Helianthus annuus*)、油菜(*Brassica napus*)和橄榄(*Olea europaea*)等多种植物中分离得到^[10-15]。然而, 目前关于棉花、大豆、油菜、花生等作物种子特异表达 *FAD2-1* 基因的调控机制却鲜有报道。研究种子 *FAD2-1* 基因的时空表达调控模式以及脂肪酸组分形成的生理学机制, 是有效定向调控种子中油酸组分含量的前提。本研究于 2016—2017 年在石河子大学棉花研究所和绿洲生态实验室进行试验, 以新疆石河子棉区栽培种新陆早 33 号为材料, 克隆其种子脂肪酸去饱和酶基因 *GhFAD2-1*, 并对该基因编码蛋白进行序列分析; 利用 qRT-PCR 检测 *GhFAD2-1* 在种子发育过程中的表达情况; 同时用气相色谱-质谱联用仪(GC-MS)分析种子发育过程中的脂肪酸组分, 以期为进一步研究 *GhFAD2-1* 基因的调控机制、改良棉籽油的品质奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料、菌株、质粒及主要试剂

陆地棉(*Gossypium hirsutum*)品种新陆早 33 号、大肠杆菌菌株 *Escherichia coli* XL1-Blue 均由笔者所在实验室保存。Ex Taq DNA 聚合酶、限制性内切酶、DNA Marker 等购自宝生物工程(大连)有限公司。普通琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒(DP209)、植物总 RNA 提取试剂盒(DP437, 离心柱型)等购自天根生化科技(北京)有限公司。第 1 链反转录试剂盒(PrimeScriptTM 1st strand cDNA Synthesis Kit)、克隆载体 pGEM-T easy vector 和 SYBR[®] Premix Ex TaqTM (Perfect Real Time)等购自宝日医生物技术(北京)有限公司(TaKaRa)。

1.2 *GhFAD2-1* 基因的克隆

取新陆早 33 号花后 35 d 的棉花种子, 去除外层种壳后, 将棉仁在研钵中用液氮冷却后快速研磨, 将粉末快速装入

收稿日期: 2018-02-26

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 31460361); 石河子大学育种专项(编号: YZZX201601, gxjs2014-yz08)。

作者简介: 文 凤(1990—), 女, 四川遂宁人, 硕士研究生, 主要从事棉花遗传育种研究。E-mail: 897684437@qq.com。

通信作者: 刘 峰, 博士, 副教授, 主要从事植物分子生物学研究。E-mail: liufeng0993@sina.com。

RNase-free 的离心管中,保证样品不溶解,并让液氮挥发,采用植物总 RNA 提取试剂盒 (DP437,离心柱型) 提取总 RNA,利用 PrimeScript™ 1st strand cDNA Synthesis Kit 将 1 μg 总 RNA 反转录成 cDNA。利用已知的 *FAD2-1* 基因序列信息 (GenBank:HQ259410.1),设计特异性引物,上游:5′-ATGGG TGCCGGTGGTAGGA-3′,下游:5′-TTAGAACTTGTTACGATAC C-3′。特异性引物由北京六合华大基因科技有限公司合成。以反转录总 RNA 获得的 cDNA 为模板,进行 PCR 扩增。PCR 反应条件为:94 ℃ 5 min;94 ℃ 30 s,56 ℃ 30 s,72 ℃ 45 s,35 个循环;72 ℃ 10 min。目标条带回收步骤按照普通琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒 (DP209) 的说明书进行。利用克隆载体连接试剂盒将回收片段连接到 pGEM-T easy vector 上,获得 pGEM-T-*FAD2-1*。转化 *E. coli* XL1-Blue,筛选抗氨苄青霉素的菌落,并进行菌落 PCR 鉴定和测序。

1.3 序列分析、比对与进化树的构建

使用 DNAMAN 软件将克隆获得的棉花 *FAD2-1* 氨基酸序列与其他主要油料作物的 *FAD2-1* 氨基酸序列 (分别来源于 GenBank、EMBL、PDB 等) 进行多序列比对。利用 MEGA 5.0 软件,采用邻接法 (1 000 次重复) 聚类分析构建系统进化树。

1.4 不同发育时期棉籽 *GhFAD2-1* 的 qRT-PCR 分析

分别采集开花后 5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60 d 的棉铃,在室内用无菌的镊子剥去棉籽壳。采用植物总 RNA 提取试剂盒 (DP437,离心柱型) 提取总 RNA,使用第 1 链反转录试剂盒将 1 μg 总 RNA 反转录成 cDNA。利用 qRT-PCR 方法对 *GhFAD2-1* 基因在不同发育时期棉籽中的表达水平进行差异分析。qRT-PCR 在实时荧光定量 PCR 仪 LightCycler480 (Roche) 上进行,内参基因为 *UBI*,引物为 *RTGhFAD2-1* F: 5′-TGGCGTTAACTGCTTTCT-3′ 和 *RTGhFAD2-1* R: 5′-CGGAATGGCTTGCTTGAT-3′,反应体系为 10 μL;SYBR Primix Ex Taq™ (2×) 5 μL,10 μmol/L 引物各 0.5 μL,ddH₂O 3 μL,cDNA 模板 1 μL。每个样品设 3 次重复,试验结果采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法^[16] 分析。

1.5 棉籽脂肪酸组分的 GC-MS 分析

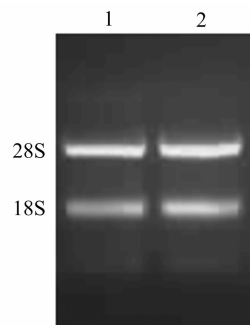
采用索氏提取法 (石油醚法)^[17-18] 提取棉籽中的总油脂。将种子在 80 ℃ 条件下烘干至恒质量,研磨后取 1 g 样粉包入定量滤纸中,放入萃取瓶套筒内,加 130 mL 石油醚 (沸点为 30~60 ℃) 浸泡 8 h;使用 Gerhardt (德国格哈特) 索氏全自动抽提仪提取棉籽总油脂。采用 KOH-甲醇法对所提取的油脂进行甲酯化:向提取的油脂中加入 5 mL 正己烷,摇晃均匀后向混合溶液中加入 5 mL 0.4 mol/L KOH-甲醇溶液,然后将溶液转移至玻璃瓶中,在 37 ℃ 恒温摇床上振荡 30 min,静置 20 min 后取上清,备用。

使用 GC-MSQP2020 气相色谱-质谱联用仪 (岛津公司) 分析棉籽油脂脂肪酸组分。色谱柱为 HP-88 弹性石英毛细管柱 (长度:100 m,膜厚:0.20 μm,内径:0.25 mm),采用程序升温法升温:40 ℃ (2 min)→4 ℃/min→240 ℃ (15 min),柱箱温度为 40 ℃;进样口温度为 250 ℃;分流比为 10:1;载气为 He;吹扫流量为 3 mL/min。质谱的离子源为电子轰击电离 (EI) 源,离子源温度为 200 ℃,接口温度为 250 ℃,溶剂延迟 13 min。

2 结果与分析

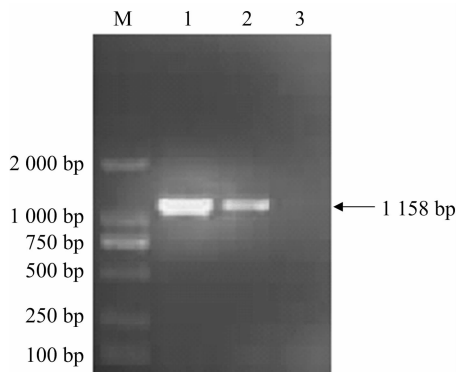
2.1 *GhFAD2-1* 基因的克隆

应用植物总 RNA 提取试剂盒 (DP437,离心柱型) 提取获得高质量的棉籽总 RNA (图 1);采用第 1 链反转录试剂盒 (TaKaRa) 将总 RNA 反转录成 cDNA。对新陆早 33 号的 cDNA 进行扩增时,在 1 100 bp 左右出现目标条带 (图 2)。取 3 个阳性克隆进行测序,结果 (图 3) 表明,该 cDNA 全长为 1 158 bp,为一个完整的基因编码区。



1、2 表示开花后 35 d 棉仁中的总 RNA

图 1 新陆早 33 号总 RNA 检测



M—Marker 2000; 1、2—*FAD2-1* 基因的 PCR 产物; 3—阴性对照

图 2 目标基因的 PCR 扩增结果

2.2 *GhFAD2-1* 基因编码蛋白氨基酸序列比较与分析

对获得的 *GhFAD2-1* 基因序列进行分析,结果表明,基因编码区全长 1 158 bp,共编码 385 个氨基酸 (图 3)。利用在线分析平台 ExPASy (<http://web.expasy.org/cgi-bin/protparam/protparam>) 分析该基因编码蛋白的基本理化性质,结果表明,*GhFAD2-1* 编码的蛋白分子式为 $C_{355}H_{595}N_{115}O_{149}S_{295}$,分子量为 98.360 94 ku。预测蛋白的等电点是 5.01,脂肪指数为 22.80,蛋白疏水性预测平均值为 0.752,属于疏水性蛋白。使用 SOPMA 软件对 *GhFAD2-1* 的二级结构进行分析预测,结果表明,该蛋白主要由 α -螺旋、 β -片层、 β -转角及无规则卷曲等组成,其中 α -螺旋包含 160 个氨基酸,占 41.56%; β -片层包含 83 个氨基酸,占 21.56%; β -转角包含 36 个氨基酸,占 9.35%;无规则卷曲包含 106 个氨基酸,约占 27.53%,说明 α -螺旋是二级结构中的主要组成部分。

进一步利用 EMBL-EBI (<https://www.ebi.ac.uk/interpro/search/sequence-search>) 在线分析工具,结合 NCBI 中 BlastP 比对,对该基因编码的氨基酸序列进行蛋白保守结构域分析,结果 (图 4) 发现,*GhFAD2-1* 蛋白具有 1 个典型

```
1 ATGGGTGCCGGTGGTAGGATGCTAGTTGACGGTAAAAAGGAGAAAAACGAGGCTCGGTCAATCGAGTTCGATCGAGAAGCCCTCCGTTT
M G A G G R M L V D G K K E E K R G S V N R V P I E K P P F
91 ACGTCCGGTCAGATCAAGCAAGCCATTCCGCCCATCTTTTCGCCCTCCTCCTCGATCCTTCTCCTACGTGGTCCATGACCTATGCT
T L G Q I K Q A I P P H C F R R S L L R S F S Y V V H D L
181 TTAGCTCTCTCTTTTACCTTTCATCTTCCACACACCTTTTCCACATGCTTGGCTGGCTTATTGGGTT
L A S L F Y Y I A T S Y F H F L P Q P F S Y I A W P V Y W V
271 CTCGAAGTTCATCTCACCCTGCTTCCGATCATCGACAGTCCGCTCACCAGCTTTCAGTACCTACCAATGGGTGGTACGACACAC
L Q G G C I L T G V W V I A H E C G H H A F S D Y I Q W V D T
361 GTCGGTGTATCCTTCCGCTCTTCTAGTCCGCTACTTCTCGTGGAAAAATCAGTACCGCGCTCACCCTCGAACCACCGGTTCCATG
V G L I L H S A L L P Y F S W K I S H R R H S N T G S M
451 GAGCGTGACGAAGTATTCGTGCCAAACCAAGTCTAAATATCATGCTTTGCGAAATACCTTAAACAATCCACCGGTCGAGTTCTATCT
E R D E V F V P K P K S K L S C F A K Y L N N P P G R V L S
541 CTTGATGTCATGATCTTGGTGGCTTATGACTTAGCTTCAACGTTTCGGGTGCGATACCTATGATTCAGTCTCCCATCATTAAC
L V T L T L G W P M Y L A F N V S G R Y Y D R L A G S H Y N
631 CTTATGGCCCATCTTACCGATCGGACGAGGCTACAAGTTTACATCTCCGATCTGGTATGCTTGGGTGAATTTATGACTTTTATAAG
P Y G P I Y S D R E R L Q V Y I S D T G I F A V I Y V L Y K
721 ATTGCTGCAACAAAGGCTGGCTGGCTTTTATGCACTTATGGGTGCCTTACTTATTGGAATGCCTTCTTGTGTTGATCACTTAC
I A A T K W L L C T Y G V P L L I V N A F L V L I T Y
811 TTGCAACATACCTACCTCGCATTCGCGCATTACTGCTCGGAATGGGATGGTTCGAGGAGCATTCGACGATGGATCGAGATTTT
L Q H T H S A L P H Y D S S E W D W L R G A L S T M R D R F
901 GGGGTGTTGAACAAAGTGTTCATACATCAGCATGACGATGCTGCTCATCACTCTTCTCAACGATGCCACATCATGCAATGGAG
G V L N K V L T H V A H H L F S T M P H Y H A M E
991 GCCATTAAGCAATCAACCAATCTCGGCAAGTATTCCTTTTCGACGGGACACCGATTACAAGGCAATGGAGGGGAGGCAAAAGAG
A T K A I K I L G K Y Y P F D G T P I Y K A M W R E A K E
1081 TGCCTTACGTTGAGCTGACGTTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGT
C L Y V E P D V G G G G G G S K G V F W Y R N K F *
```

起始密码子和终止密码子分别用阴影与星号标出

图3 *GhFAD2-1* 基因全长 cDNA 及其推导的氨基酸序列



图4 *GhFAD2-1* 蛋白结构

的 FAD2 结构域(在生物体的细胞内维持细胞膜的结构和功能)和 1 个 FAD2 - N 端结构(具有氧化还原酶活性,作用于成对的供体,氧化成对的供体,导致 1 分子氧还原为 2 分子水),表明 *GhFAD2-1* 基因属于典型的 FAD2 基因家族成员。

为了解棉花 *GhFAD2-1* 与其他油料作物 FAD2-1 蛋白的亲缘关系,利用 ClustalX 软件和 MEGA 6.0 软件对 *GhFAD2-1* 氨基酸序列与 NCBI 上公布的主要油料植物 FAD2-1 蛋白进行多重比较。结果(图 5)表明,本研究从新

GmFAD2-1MGLAKETITNGGRGR...VAKVEV	20
OeFAD2-1MGAGGRLSVPATRAE	15
AhFAD2-1MGAGGR...VTKTEA	12
GhFAD2-1MGAGGRM.LVDGKKE	14
BnFAD2-1	MEGETCKERKEMSINRLTRAFVNLNGLPSAQSILITRREIHYCRDREKERRQRESLRRSFEVGIIVINVKSSSPFSSASSRNMGAGGRMCMVSPFSKK	100
CcFAD2-1MGAGGRMSVFPFGKK	15
HaFAD2-1	0
SiFAD2-1	...MRERKAERNATCIFHHHHHCINCRQENINTHTLIKRFKRRKESASAEVLSRDFFFCVFRFSWIFFVEVITSTLPILVNWRGLDKMGAGGRMSDPTTKDE	97
Consensusmgaggrm	
GmFAD2-1	GRKKPLSRVENTIPFFVGLKKRIIPPHCEQRSLTSFSYVYDLISFA.FIFYIATTYEHLLPCPFSLINWPIYVVLQGLITGVVIAHECGHHAFSY	119
OeFAD2-1	EKKNPILKRVFYLPPFFVGDIDKTIIPPHCEKRSILRSFSYVYDLIFIVFLFYIATSYEHLLSPFSYILGSEVYNILQCGVCTGVVIAHECGHHAFSY	115
AhFAD2-1	C.KKPLSRVHSNPPFSVGLKKRIIPPHCEKRSILRSFSYVYDLIMAYLLFYIATSYEHLLSPFSYILGSEVYNILQCGVCTGVVIAHECGHHAFSY	111
GhFAD2-1	EKRGSNVRVIEIPFFVGLQIKRIIPPHCEKRSILRSFSYVYDLICLASIFYIATSYEHLLSPFSYILGSEVYNILQCGVCTGVVIAHECGHHAFSY	114
BnFAD2-1	SETINIKRVCEETPFFVGLKKRIIPPHCEKRSILRSFSYVYDLIIASCFYIATSYEHLLSPFSYILGSEVYNILQCGVCTGVVIAHECGHHAFSY	200
CcFAD2-1	SDREVIRRVYIPFFVGEIKKRIIPPHCEKRSILRSFSYVYDLIIAIFYIATSYEHLLSPFSYILGSEVYNILQCGVCTGVVIAHECGHHAFSY	115
HaFAD2-1PPFFVGLDIDKRIIPPHCEKRSILRSFSYVYDLITITAVLNHFIATSYEHLLSPFSYILGSEVYNILQCGVCTGVVIAHECGHHAFSY	88
SiFAD2-1	QKKNPIRCVYIPFFVGLDIDKRIIPPHCEKRSILRSFSYVYDLIVIVFLLYIATSYEHLLSPFSYILGSEVYNILQCGVCTGVVIAHECGHHAFSY	197
Consensus	k p l r v p k p f f v g i k k a i p p h c f r s l l r s f s y v y d l i a i f y i a t t y e h l l p c f s y l a w p y w q c v l t g v w i a h e c g h h a f s y	
GmFAD2-1	CQVDDVGLIHLSTLIVPYFSWKYSHRRHHSNTGSLERDEVFVPEKRSVAFTGSKYLNPPGRVSLVTLITGWPYLAENVSGRPYD.FACHYDEYA	218
OeFAD2-1	CQVDDVGLIHLSTLIVPYFSWKYSHRRHHSNTGSLERDEVFVPEKRSKLSWFTKLYLNPPGFVMTIVTLITGWPYLAENVSGRPYD.FACHYDEHG	214
AhFAD2-1	CQVDDVGLIHLSTLIVPYFSWKYSHRRHHSNTGSLERDEVFVPEKRSVSVNYKMNPPGGRVSLVTLITGWPYLAENVSGRPYD.FACHYDEYA	210
GhFAD2-1	CQVDDVGLIHLSTLIVPYFSWKYSHRRHHSNTGSLERDEVFVPEKRSKLSCAKLYLNPPGFVLSLVTLITGWPYLAENVSGRPYD.LASHYNEYG	213
BnFAD2-1	CQVDDVGLIHLSTLIVPYFSWKYSHRRHHSNTGSLERDEVFVPEKRSKLSVYKLYLNPPGRVMTVQTLITGWPYLAENVSGRPYD.FACHYDEYA	300
CcFAD2-1	CQVDDVGLIHLSTLIVPYFSWKYSHRRHHSNTGSLERDEVFVPEKRSKLSVYKLYLNPPGRVMTVQTLITGWPYLAENVSGRPYD.FACHYDEYA	214
HaFAD2-1	CQVDDVGLIHLSTLIVPYFSWKYSHRRHHSNTGSLERDEVFVPEKRSVSVNYKLYNNPGRVSLVTLITGWPYLAENVSGRPYD.FACHYDEYA	187
SiFAD2-1	CQVDDVGLIHLSTLIVPYFSWKYSHRRHHSNTGSLERDEVFVPEKRSKLSVYKLYLNPPGRVMTVQTLITGWPYLAENVSGRPYD.FACHYDEYA	296
Consensus	qvwddvtvglihs llvpyfswkysyshrhrhsntgslerdevfvpkpskswyskylppgr sl vtlitgwpylafnvsgrpydr facydygy	
GmFAD2-1	FHYSNRERILTVSIVALESVTLISLYVATLGLVALLCVYGVPELLVNGFIVITITVIGHTHFALEPHYSSSEWDWRGALATMDRDIYGLINVFHHITDT	318
OeFAD2-1	FHYNDRERLTVSIVCVIATSVILYVATLGLVALLCVYGVPELLVNGFIVITITVIGHTHFFLEPHYSSSEWDWRGALATVDRDIYGLINVFHHITDT	314
AhFAD2-1	FHYSNRERILTVSIVSSEFAVTLISLYVATLGLVALLCVYGVPELLVNGFIVITITVIGHTHFALEPHYSSSEWDWRGALATVDRDIYGLINVFHHITDT	310
GhFAD2-1	FHYSNRERILTVSIVSTGFAVTLISLYVATLGLVALLCVYGVPELLVNGFIVITITVIGHTHFALEPHYSSSEWDWRGALATVDRDIYGLINVFHHITDT	313
BnFAD2-1	FHYNDRERLTVSIVSAGIIVAGVLYYFAVAGVASMVYGVPELLVNGFIVITITVIGHTHFALEPHYSSSEWDWRGALATVDRDIYGLINVFHHITDT	400
CcFAD2-1	FHYNDRERLTVSIVSAGIIVAGVLYYFAVAGVASMVYGVPELLVNGFIVITITVIGHTHFALEPHYSSSEWDWRGALATVDRDIYGLINVFHHITDT	314
HaFAD2-1	FHYNDRERLTVSIVSAGIIVAGVLYYFAVAGVASMVYGVPELLVNGFIVITITVIGHTHFALEPHYSSSEWDWRGALATVDRDIYGLINVFHHITDT	287
SiFAD2-1	FHYNDRERLTVSIVSAGIIVAGVLYYFAVAGVASMVYGVPELLVNGFIVITITVIGHTHFALEPHYSSSEWDWRGALATVDRDIYGLINVFHHITDT	396
Consensus	piyndrerliqiysid gi av y lyrv a kglaw l cvygvpllivngflvltitylqthp lphydssewdwrgalatvdrdyginkvfnhntdt	
GmFAD2-1	EVVHHILSTMPHYHAMEAKNAIRPLGEYYQDGTFFVVAWREARECLVVEDEGTS...EKGVYFNK 76%	386
OeFAD2-1	EVVHHILSTMPHYHAMEAKNAIRPLGEYYQDGTFFVVAWREARECLVVEDE...P...NKGVYFNK 78%	390
AhFAD2-1	EVVHHILSTMPHYHAMEAKNAIRPLGDYYQDGTFFVVAWREARECLVVEDEGAS...OKGVYFNK 75%	378
GhFAD2-1	EVVHHILSTMPHYHAMEAKNAIRPLGGYYPHDGTFFVVAWREARECLVVEDEVGSGGGGSGKGVFNK ---	384
BnFAD2-1	EVVHHILSTMPHYHAMEAKNAIRPLGEYYQDGTFFVVAWREARECLVVEDEDRGE...KKGVYFNK 70%	468
CcFAD2-1	EVVHHILSTMPHYHAMEAKNAIRPLGDYYQDGTFFVVAWREARECLVVEDESDQ...TKGVYFNK 65%	382
HaFAD2-1	EVVHHILSTMPHYHAMEAKNAIRPLGEYYQDGTFFVVAWREARECLVVEDEOD...E...GKGG..... 64%	347
SiFAD2-1	EVVHHILSTMPHYHAMEAKNAIRPLGGYYQDGTFFVVAWREARECLVVEDESTP...DKGVYFNK 77%	464
Consensus	hvahhilstmphyhameatkaikpilgeyyqdgtdgtpfykavwreareclvvepde kgvfywnk	

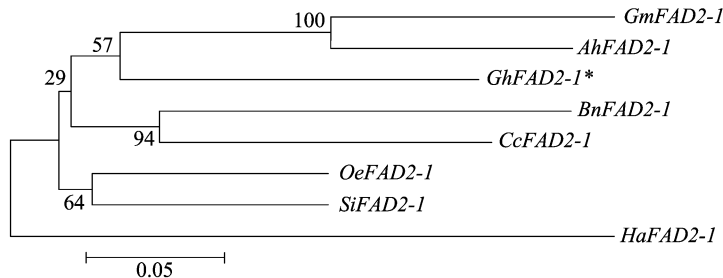
氨基酸序列的相似性列于序列比对的末端。GenBank数据库登录号分别为花生 (*Arachis hypogaea*, AhFAD2-1, AAF82293.1)、油菜 (*Brassica napus*, BnFAD2-1, XP_013749970.1)、油茶 (*Camellia chekiangoleosa*, CcFAD2-1, AGH32914.1)、大豆 (*Glycine max*, GmFAD2-1, ARE72427.1)、油葵 (*Helianthus annuus*, HaFAD2-1, AFK12551.1)、橄榄 (*Olea europaea*, OeFAD2-1, AAW63040.1)、芝麻 (*Sesamum indicum*, SiFAD2-1, XP_011080226.1)

图5 棉花 *GhFAD2-1* 氨基酸序列与其他油料作物 FAD2-1 氨基酸序列的比对结果

陆早 33 号中克隆的陆地棉 *GhFAD2-1* 编码蛋白与花生、油菜、油茶、大豆、油葵、橄榄、芝麻等油料作物 *FAD2-1* 蛋白的一致性分别为 75%、60%、75%、76%、64%、78%、77%，且一致性主要集中在 *FAD2* 结构域部分。

基于棉花 *GhFAD2-1* 与其他油料植物 *FAD2-1* 基因编

码蛋白序列构建进化树，采用邻接法 (neighbour joining) 进行聚类分析，结果 (图 6) 表明，棉花 *GhFAD2-1* 与花生 *AhFAD2-1*、大豆 *GmFAD2-1* 基因属于同一个进化分支，与油葵、芝麻等作物的 *FAD2-1* 基因遗传距离相对较远，同源性相对较低。



本研究克隆获得的 *GhFAD2-1* 后面标注*。分叉点上的数值为 Bootstrap 值。氨基酸序列号参见图5
图6 系统进化树

2.3 *GhFAD2-1* 表达水平与油酸含量/亚油酸含量的相关性

为了解 *GhFAD2-1* 表达水平与油酸/亚油酸含量比的相关性，本研究分别取开花后 5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60 d 共 12 个不同发育时期的棉籽样品进行分析。由于发育早期棉籽体积快速增加，但水分含量高，因此棉籽发育早期取样量较大。为减少试验误差，所取棉铃统一位于第 3 果枝。采用 GC-MS 对棉籽发育过程中的各脂肪酸组分进行分析，结果 (表 1) 表明，棉籽中最主要脂肪酸成分为单不饱和脂肪酸油酸和多不饱和脂肪酸亚油酸。

籽中的表达水平进行分析。结果 (图 7) 表明，*GhFAD2-1* 在棉籽发育早期表达量较低；随着棉籽的发育，*GhFAD2-1* 表达量逐渐升高，在开花后 40 d 表达量达到峰值，随着棉籽成熟度的继续增加表达量下降，表明 *GhFAD2-1* 基因可能在棉籽发育过程中发挥着重要的作用。

在本试验中，C18：1、C18：2 含量总计占脂肪酸总量的 37.69%~75.68%，对棉籽发育过程中 C18：1 含量/C18：2 含量的值进行分析，结果 (图 7) 表明，在棉籽发育早期该比值随着棉籽的发育逐渐减小，到开花后 40 d 减小至最低值，为 0.17。之后，C18：1 含量/C18：2 含量的值略有上升但总体变幅较小。棉籽发育初期 *GhFAD2-1* 基因表达量在逐渐升高的同时，C18：1 含量/C18：2 含量的值减小，至开花后 40 d 时，*GhFAD2-1* 基因表达量达到峰值的同时，C18：1 含量/C18：2 含量的值减小到最小值；棉籽发育后期，*GhFAD2-1* 基因表达量降低而 C18：1 含量/C18：2 含量的值则呈现上升趋势。总体来说，在棉籽发育过程中 C18：1 含量/C18：2 含量的值与 *GhFAD2-1* 基因的表达量呈负相关关系。

3 讨论

FAD2 是位于植物细胞内质网与质体膜上的膜蛋白^[19]，其功能是催化含有 1 个不饱和键的脂肪酸油酸 (C18：1) 碳链脱氢，在其第 12 位碳原子上引入 1 个双键，从而形成含有 2 个双键的多不饱和脂肪酸亚油酸 (C18：2)^[20]。*FAD2* 基因是控制油酸向亚油酸转化的关键酶基因，其表达水平对细胞中多不饱和脂肪酸的含量与比例起着重要的调控作用^[21]。

表 1 不同发育时期棉籽中 C18：1 与 C18：2 的相对含量

开花后时间 (d)	C18：1 含量 (%)	C18：2 含量 (%)	C18：1 含量/C18：2 含量
5	24.77	30.01	0.83
10	21.47	26.25	0.82
15	14.54	23.15	0.63
20	11.97	34.07	0.35
25	13.43	49.14	0.27
30	13.16	53.07	0.25
35	11.53	59.75	0.19
40	10.19	60.96	0.17
45	13.14	58.73	0.22
50	13.44	59.39	0.23
55	13.60	59.00	0.23
60	15.75	59.93	0.26

为了解 *GhFAD2-1* 在棉籽发育过程中的时空表达特性，利用 qRT-PCR 技术对 *GhFAD2-1* 基因在不同发育时期棉

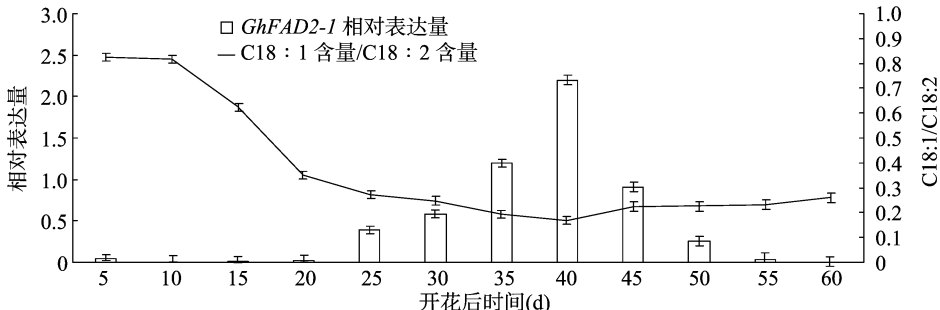


图7 *GhFAD2-1* 在棉籽不同发育时期中 mRNA 表达水平与 C18：1 含量/C18：2 含量的值

FAD2-1 是在种子中特异高效表达的 *FAD2* 基因,对调控植物油中脂肪酸组分有重要作用^[22]。本研究从新陆早 33 号中克隆了 *GhFAD2-1* 基因,对该基因编码的氨基酸序列进行蛋白保守结构域分析,结果发现,*GhFAD2-1* 基因具有 1 个典型的 FAD2 结构域和 1 个 FAD2-N 端结构,*GhFAD2-1* 基因属于典型的 *FAD2* 基因家族成员,多序列比对发现,不同油料植物 FAD2-1 同源性主要集中在 FAD2 结构域,而 FAD2-N 端结构差异较大。

脂肪酸组分的组成及相对比例是决定食用油品质的重要因素。棉籽脂肪酸的种类、总量、相对比例在不同品种之间是不同的^[23]。C18:1 和 C18:2 是组成棉籽脂肪酸的最主要成分,棉籽油的品质在很大程度上取决于 C18:1、C18:2 的含量以及 C18:1 含量/C18:2 含量的值。本研究气相色谱-质谱分析结果表明,陆地棉新陆早 33 号棉籽脂肪酸不同组分的含量在棉籽发育过程中并非恒定不变,而是随着棉籽发育呈现动态变化。结合 qRT-PCR 分析结果来看,C18:1 含量/C18:2 含量的值总体上与 *GhFAD2-1* 基因表达量呈高度负相关关系。*GhFAD2-1* 在棉籽发育早期表达量逐渐增加,编码的 FAD2-1 促进 C18:1 向 C18:2 转化,C18:2 在总脂肪酸中的相对含量呈增长趋势,而同时 C18:1 含量相应减少,即 C18:1 含量/C18:2 含量的值逐渐减小。而在棉籽发育的后期,*GhFAD2-1* 基因表达量降低,C18:1 含量/C18:2 含量的值稍有增加,但随着棉籽的逐渐成熟,棉籽中 C18:1 和 C18:2 的积累量减少,C18:1 含量/C18:2 含量的值趋于平稳。综上所述,*GhFAD2-1* 基因在棉籽发育过程中对 C18:1 含量和 C18:2 合成发挥着重要的调控作用。本研究克隆获得棉花的 *GhFAD2-1* 基因,并对其在不同发育时期棉籽中的表达水平与 C18:1 含量/C18:2 含量的相关性进行分析,可为进一步在分子水平上研究 *GhFAD2-1* 的表达与调控机制以及棉籽油的品质改良奠定基础。

参考文献:

- [1] 宋俊乔,孙培均,张霞,等. 棉仁高油分材料筛选及其脂肪酸发育分析[J]. 棉花学报,2010,22(4):291-296.
- [2] Vos E, Cunnane S C. Alpha-linolenic acid, linoleic acid, coronary artery disease, and overall mortality[J]. American Journal of Clinical Nutrition, 2003, 77(2):521-522.
- [3] McConn M, Browse J. Polyunsaturated membranes are required for photosynthetic competence in a mutant of *Arabidopsis*[J]. The Plant Journal, 1998, 15(4):521-530.
- [4] Pham A T, Shannon J G, Bilyeu K D. Combinations of mutant *FAD2* and *FAD3* genes to produce high oleic acid and low linolenic acid soybean oil[J]. Theoretical and Applied Genetics, 2012, 125(3):503-515.
- [5] Heppard E P, Kinney A J, Stecca K L, et al. Developmental and growth temperature regulation of two different microsomal omega-6 desaturase genes in soybeans[J]. Plant Physiology, 1996, 110(1):311-319.
- [6] Buhr T, Sato S, Ibrahim F, et al. Ribozyme termination of RNA transcripts down-regulate seed fatty acid genes in transgenic soybean[J]. Plant Journal, 2002, 30(2):155-163.
- [7] Kinney A J. Genetic modification of the storage lipids of plants[J]. Current Opinion in Biotechnology, 1994, 5(2):144-151.
- [8] Peng Q, Hu Y, Wei R, et al. Simultaneous silencing of *FAD2* and *FAE1* genes affects both oleic acid and erucic acid contents in *Brassica napus* seeds[J]. Plant Cell Reports, 2010, 29(4):317-325.
- [9] Shanklin J, Cahoon E B. Desaturation and related modifications of fatty acids[J]. Annual Review of Plant Biology, 1998, 49:611-641.
- [10] Li L Y, Wang X L, Gai J Y, et al. Isolation and characterization of a seed-specific isoform of microsomal omega-6 fatty acid desaturase gene (*FAD2-1B*) from soybean[J]. DNA Sequence, 2008, 19(1):28-36.
- [11] Liu Q, Singh S P, Brubaker C L, et al. Molecular cloning and expression of a cDNA encoding a microsomal omega-6 fatty acid desaturase in cotton (*Gossypium hirsutum*) [J]. Australian Journal of Plant Physiology, 1999, 26(2):101-106.
- [12] Pirtle I L, Kongcharoensuntorn W, Nampaisansuk M, et al. Molecular cloning and functional expression of the gene for a cotton $\Delta-12$ fatty acid desaturase (*FAD-2*) [J]. Biochimica et Biophysica Acta, 2001, 1522(2):122-129.
- [13] Mikkilineni V, Rocheford T R. Sequence variation and genomic organization of fatty acid desaturase-2 (*fad2*) and fatty acid desaturase-6 (*fad6*) cDNAs in maize[J]. Theoretical and Applied Genetics, 2003, 106(7):1326-1332.
- [14] 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 Reports, 2011, 30(8):1393-1404.
- [15] 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.
- [16] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method[J]. Methods, 2001, 25(4):402-408.
- [17] 姚虹. 索氏提取法测定脂肪含量方法改进[J]. 中州大学学报, 1996(4):64-65.
- [18] 王小艺, 曹一博, 张凌云, 等. 油茶生长发育过程中脂肪酸成分的测定分析[J]. 中国农学通报, 2012, 28(13):76-80.
- [19] Alonso D L, García-Maroto F, Rodríguez-Ruiz J, et al. Evolution of the membrane-bound fatty acid desaturases[J]. Biochemical Systematics and Ecology, 2003, 31(10):1111-1124.
- [20] 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.
- [21] Qin Y M, Hu C Y, Pang Y, et al. Saturated very-long-chain fatty acids promote cotton fiber and *Arabidopsis* cell elongation by activating ethylene biosynthesis[J]. Plant Cell, 2007, 19(11):3692-3704.
- [22] 赵立群, 李仁, 李蔚, 等. 棉花 *FAD2-1* 基因的克隆及其 ihpRNA 和 amiRNA 干扰载体的构建[J]. 棉花学报, 2011, 23(2):189-192.
- [23] 王美霞, 周大云, 马磊, 等. 棉籽油脂脂肪酸组成分析与评价[J]. 食品科学, 2016, 37(22):136-141.