

山定子 *MbFAD2* 基因的克隆及表达分析

刘修丽,卢静静,周爱琴,张玉刚,祝 军,戴洪义

(青岛农业大学 园艺学院,山东 青岛 266109)

摘要:以山定子为试材,利用 RT-PCR 技术从山定子中克隆到油酸去饱和酶基因 (*MbFAD2*),该基因的开放阅读框为 1 149 bp,编码 382 个氨基酸,分子量为 97.511 2 kDa,等电点为 5.01,该基因被命名为 *MbFAD2*,在 GenBank 中的登陆号为 KC702671。二级结构分析表明,*MbFAD2* 蛋白分子中, α -螺旋、随机卷曲和不规则卷曲分别为 35.86%,16.23%,47.91%。系统进化树关系分析表明,*MbFAD2* 与橡胶树和毛白杨的亲缘关系最近,共同形成一个分支,亲缘关系最远的为中间锦鸡儿。对 *MbFAD2* 进行蛋白跨膜区分析发现,该蛋白具有 6 个跨膜区域。通过实时荧光定量表达研究表明:*MbFAD2* 在山定子中的根、茎、叶和花均有表达,其中在花中的表达最高,其次是叶片。4℃低温诱导该基因在一年生山定子叶中快速表达,24 h 时该基因表达量最高,48 h 后该基因表达量下降;而在茎中短时间内表达不明显。结果表明:山定子 *MbFAD2* 的表达量与低温密切相关。

关键词:山定子;*MbFAD2*;低温处理;表达分析

中图分类号:Q78 **文献标识码:**A **文章编号:**1000-7091(2014)01-0031-05

Cloning and Expression Analysis of *MbFAD2* Gene in *Malus baccata*

LIU Xiu-li, LU Jing-jing, ZHOU Ai-qin, ZHANG Yu-gang, ZHU Jun, DAI Hong-yi

(College of Horticulture, Qingdao Agricultural University, Qingdao 266109, China)

Abstract: The cDNA sequence of *MbFAD2* was cloned from *Malus baccata* by RT-PCR. It's open reading frame possesses 1 149 bp, and encodes a peptide of 382 amino acids. It has a calculated molecular mass of 97.511 2 kDa and a theoretical PI of 5.01. The gene was named as *MbFAD2*, and its accession nucleotide sequence number in GenBank was KC702671. Secondary structure analysis showed that *MbFAD2* protein contains 35.86% α -helical domains, 16.23% extended strand, and 47.91% random coil. Phylogenetic tree analyses showed that *MbFAD2* is closest to the *Populus tomentosa* and *Hevea brasiliensis*, the farthest is *Caragana korshinskii*. The expression of *MbFAD2* was determined by real-time quantitative RT-PCR. The result showed that the *MbFAD2* was expressed in different tissue organs. The highest mRNA expression was found in flower, secondly is leaf. The *MbFAD2* expression could be significantly induced by low temperature (4℃) for 24 h, but the stem is difference. These results suggest that *MbFAD2* may be involved in low temperature.

Key words: *Malus baccata*; *MbFAD2*; Low temperature treatment; Expression analysis

低温是影响果树生长、发育及地理分布的主要环境因子之一。低温对植物的伤害首先发生在细胞膜上,细胞膜的稳定性直接影响植物的抗寒性,而细胞膜在低温下的稳定性主要决定于细胞膜磷脂的不饱和性,不饱和脂肪酸的含量与生物体抗寒等抗逆性有直接的相关性^[1-3],因此,细胞膜膜质的不饱和性和对植物的抗寒性有着重大影响。简令成^[4]、田景花^[5]认为细胞膜与植物的抗寒性有关。

油酸去饱和酶(FAD2)位于植物细胞的内质网中,是植物产生多聚不饱和脂肪酸的关键酶,该脂肪酸去饱和酶的重要功能是提供质膜结构所需的18:2多元不饱和脂肪酸,在不饱和脂肪酸中形成第2个双键^[6-8]。Anastasia^[9]认为,*FAD2*基因与植物的细胞膜不饱和酸的含量有关,且与植物的抗寒性有关。Mantyla认为,*FAD*基因与橄榄树的抗寒性有关^[10]。Zhou^[11]通过对转毛白杨*FAD2*基因的试验

收稿日期:2013-08-27

基金项目:国家苹果产业技术体系项目(CARS280107);“十二五”国家科技支撑计划项目(2013BAD02B00);中央财政农业技术推广项目;山东省良种工程项目;山东省优秀中青年科学家奖励基金项目;青岛市国际科技合作项目

作者简介:刘修丽(1986-),女,山东临沂人,硕士,主要从事果树分子生物学研究。

通讯作者:祝 军(1962-),男,山东诸城人,教授,博士,主要从事果树生物技术研究。

认为,不饱和脂肪酸对杨树的抗寒性起着重要的作用。Jinlei^[12]认为,*OsFAD2* 提高了细胞质膜中的不饱和脂肪酸的含量,并能提高水稻的抗寒性。通过转基因手段将不饱和酶基因转入烟草^[13]、马铃薯^[14]和银杏^[15]中,植株的抗寒性均增强。

本试验以抗寒性较强的山定子 (*Malus baccata*) 为材料,采用 RT-PCR 技术克隆 *MbFAD2*,对该基因编码蛋白质序列进行生物信息学分析,并利用实时荧光定量 RT-PCR 技术分析 *MbFAD2* 的表达特性,为植物的抗寒基因工程育种研究提供一定的理论基础。

1 材料和方法

1.1 试材及其处理

试验于 2012 年 3—11 月进行,山定子材料取自青岛农科院果树所,分别取山定子的根、茎、叶、花投入液氮中,于 $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 超低温冰箱中保存备用。一年生山定子由沈阳农业大学园艺学院惠赠,试验在青岛农业大学园艺学院完成。

冷胁迫处理:将一年生山定子盆栽苗至于 GXZ 智能型光照培养箱中 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 低温处理,以未处理的山定子盆栽苗作为对照,白天光照 16 h 夜间黑暗 8 h,每隔 0, 2, 4, 8, 16, 24, 48 h 取叶片和嫩茎,提取 RNA,分别重复 3 次,分析基因表达。

1.2 基因克隆及序列分析

从山定子幼叶中提取总 RNA,总 RNA 提取的试剂盒来自天根生化科技公司的 RNAprep pure Plant 合成。第一条链 cDNA 的合成用 TaKaRa 公司的 PrimeScript II 1st Strand cDNA Synthesis Kit,利用毛白杨 PtFAD2 蛋白的氨基酸序列作为探针,搜索苹果基因组数据库,对所获得的基因组序列用 Softberry 软件预测其编码区,并根据编码区序列设计特异性引物 5'-TCACAGCTTTTATTGTACCAGAAG-3' 和 5'-ATGGGTGCCGCTGGAAGAATGCTTG-3', PCR 扩增条件为 $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 变性; $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 30 s, $58\text{ }^{\circ}\text{C}$ 30 s, $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 1 min,循环 30 次; $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min,扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳分离后,经 T4 DNA 连接酶连接到 PMD18-4 载体上,转化大肠杆菌 DH5 α 经菌液 PCR 鉴定,阳性克隆由上海生工测序鉴定。

1.3 系统进化树的构建

由 ORF Finder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>) 分析其开放阅读框;使用 DNAMAN 6.0 软件对氨基酸预测、保守结构域进行初步分析。等电点及分子量分析 (<http://web.expasy.org/prot-param>) 分析二级结构预测 (http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_hnn。

html)。跨膜结构预测 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>)。

1.4 实时定量 PCR 检测 *MbFAD2* 的表达

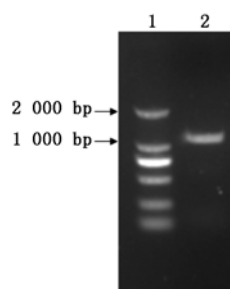
用实时荧光定量 PCR 进行基因的定量表达分析,分别取山定子根、茎、叶、花。荧光定量 PCR 采用 LightCycler 480 SYBY Green I Master 试剂盒,根据试剂盒说明书的方法,在罗氏 LightCycler480 系统上进行。所用 *MbFAD2* 的荧光定量引物为内参 5'-CGTGAGTGCTGTGATGTTGTG-3' 和 5'-CCTCTGAA TGGGACTGGTTTAG-3', β -actin (GQ339778.1) 的引物为 5'-CTGAACCCAAAGGCTAATCG-3' 和 5'-ACTG GCGTAGAGGGAAAGAA-3'。反应程序为: $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min;然后进入循环反应, $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 30 s, $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 30 s, $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 1 min,循环 45 次; $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。

数据分析采用 Livak^[16] 和柏素花^[17] 等报道的 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 法进行,分析组织表达量用最低的组织作为校正子,低温胁迫表达分析中用未处理的样品作为校正子。数据以相对 mRNA 表达量表示,并进行 SPSS 差异显著性分析。

2 结果与分析

2.1 *MbFAD2* 的克隆及序列分析

采用 RT-PCR 技术,从山定子叶片的 cDNA 中扩增出约 1 100 bp 的片段 (图 1),将 PCR 产物测序,测序结果如图 2 所示,得到一个开放阅读框为 1 149 bp,编码 382 个氨基酸。该基因命名为 *MbFAD2*,分子量为 97.511 2 kDa,等电点为 5.01,GenBank 的登陆号为 KC702671。



1. 分子量标准 (DL-2000); 2. RT-PCR 扩增产物。
1. DL-2000 Marker; 2. Products of RT-PCR.

图 1 山定子 *MbFAD2* 扩增产物

Fig. 1 Products of *MbFAD2*

2.2 *MbFAD2* 的二级结构及氨基酸序列的同源分析

二级结构分析表明 (图 2), *MbFAD2* 蛋白分子中, α -螺旋、随机卷曲和不规则卷曲分别为 35.86%, 16.23%, 47.91%。

通过 Blast 分析 *MbFAD2* 氨基酸与其他植物的 *FAD2* 的氨基酸序列一致性,表明 *MbFAD2* 与橡胶树 (DQ023609) 的氨基酸序列一致性为 81%,西葫

Fig. 3 Alignment of the deduced amino acid sequence of MbFAD2 and FAD2 of other plants

芦 (AY525163) 的为 80%, 与毛白杨 (DQ316788)、拟南芥 (L26296)、鳄梨 (AY057406)、玻璃苣 (AF074324) 和石榴 (AJ437139) 的一致性分别为 78%, 78%, 77%, 76%, 75%。预测氨基酸序列具有 3 个组氨酸保守区 (图 3), 分别为 HECGHH (His I 区)、HRRHH (His II 区) 和 HVAHH (His III 区)。

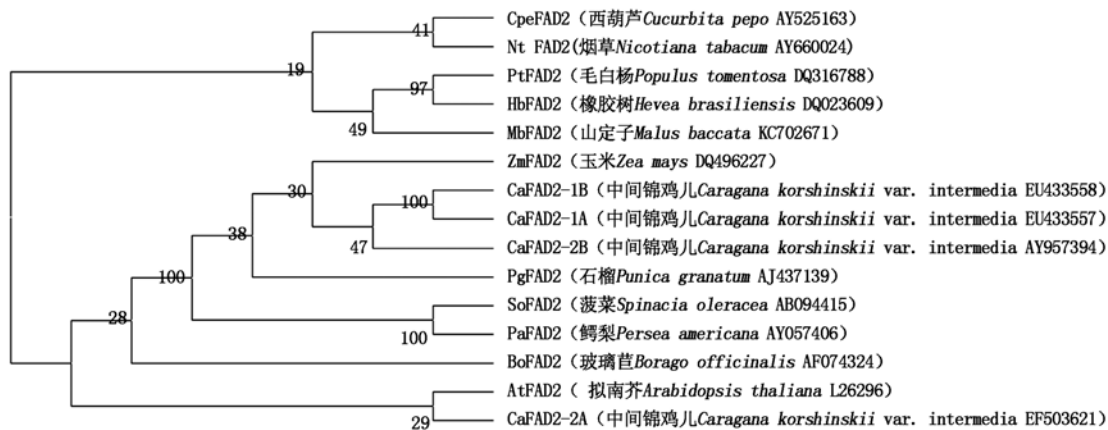


图 4 山定子 MbFAD2 蛋白与其他植物 FAD2 蛋白的系统进化树

Fig. 4 The phylogenetic tree of dehydrins in *Malus baccata* and another plants

2.4 MbFAD2 蛋白跨膜预测

利用 TMHMM Server v. 2.0 程序对 MbFAD2 进行蛋白跨膜区分析发现: 该蛋白具有 6 个跨膜区域 (图 5), 所处位置分别为氨基酸序列的 48 ~ 70 (23aa), 83 ~ 105 (23aa), 115 ~ 137 (23aa), 179 ~ 196 (17aa), 223 ~ 240 (18aa), 247 ~ 269 (23aa)。

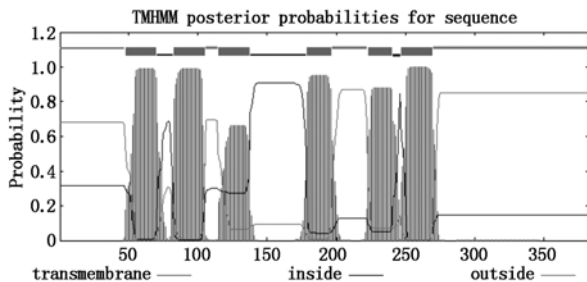


图 5 MbFAD2 蛋白跨膜结构域预测

Fig. 5 Prediction of the transmembrane domain of MbFAD2 from *Malus baccata*

2.5 MbFAD2 在山定子的表达分析

2.5.1 山定子 MbFAD2 在不同组织的表达 从山定子的根、茎、叶和花中提取细胞总 RNA, 实时荧光定量分析表明 (图 6), 在山定子中的根、茎、叶和花中都能检测到 MbFAD2 基因特异性片段, 表明 MbFAD2 在山定子中的根、茎、叶和花均有表达, 其中在花中的表达最高, 其次是叶片。

2.5.2 不同时间低温处理下 MbFAD2 在山定子叶片中的表达 4 °C 低温诱导 MbFAD2 基因在一年生山定子叶片中快速表达 (图 7), 整个低温胁迫处理叶片的过程中 MbFAD2 的表达量随着处理时间的增

2.3 MbFAD2 蛋白的系统发育分析

利用 MEGA 5.0 软件, 将不同植物的 FAD2 蛋白构建系统进化树 (图 4)。系统进化树分析表明, MbFAD2 与橡胶树和毛白杨的亲缘关系最近, 共同形成一个分支, 其次是烟草和西葫芦, 亲缘关系最远的为中间锦鸡儿。

加表现为先升高后下降的趋势, 其中 24 h 时该基因表达量最高, 48 h 后该基因表达量下降; MbFAD2 基因在 4 °C 低温不同时间处理茎中的表达情况与叶中的表达情况不同, 茎中该基因的表达是随着处理时间的增加表达量逐渐升高, 在 0 ~ 72 h 中在对照的表达量最低, 72 h 的表达量最高。在 0 ~ 24 h 中, 低温胁迫不同时间处理的山定子叶和茎中该基因在叶

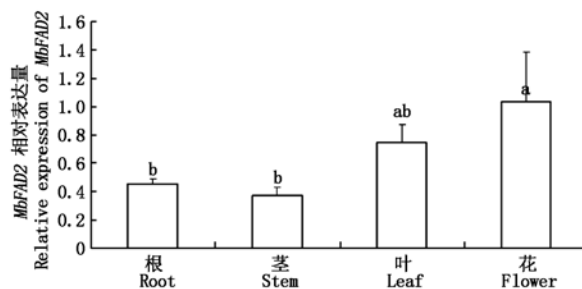


图 6 MbFAD2 在山定子不同组织的表达 ($P < 0.05$)

Fig. 6 The expression of MbFAD2 in different tissues of *Malus baccata* ($P < 0.05$)

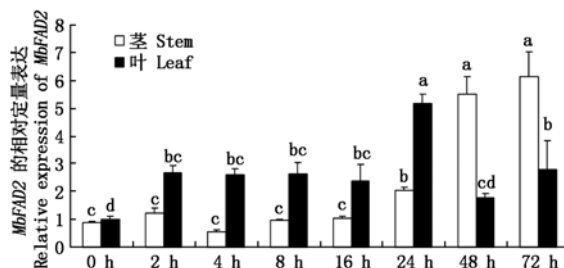


图 7 低温处理后 MbFAD2 在山定子叶片中的表达 ($P < 0.05$)

Fig. 7 The expression of MbFAD2 in leaves of *Malus baccata* ($P < 0.05$)

中的表达量比茎中的表达量高,而在 48 ~ 72 h 中,茎中该基因的表达量比叶中的高。本试验还说明该基因在叶中较敏感而在茎中段时间内该基因表达量较低。

3 结论与讨论

本研究首次从山定子中克隆到了 *MbFAD2* 基因,通过与橡胶树、西葫芦、毛白杨等植物的 *MbFAD2* 基因序列的同源性比较,证实所克隆的基因为 *MbFAD2*,并预测氨基酸序列结果表明,*MbFAD2* 与高等植物的 $\Delta 12$ -脂肪酸脱氢酶蛋白同都具有 3 个组氨酸保守区,分别为 HECGHH(His I 区)、HR-RHH(His II 区)和 HVAHH(His III 区)。氨基酸序列同源性比较结果表明,与山定子 *MbFAD2* 基因的亲缘关系最近的为橡胶树和毛白杨的亲缘关系最近,共同形成一个分支。4 °C 低温诱导 *MbFAD2* 基因在一年生山定子叶片中快速表达,*MbFAD2* 基因在 4 °C 低温不同时间处理茎中的表达情况与叶中的表达情况不同,茎中该基因的表达是随着处理时间的增加表达量逐渐升高。这与周洲^[18]以毛白杨叶片为材料,采用半定量 RT-PCR 的方法得出该基因没有组织表达特性一致,但是周洲认为该基因在叶片中短时间不会表达,而该试验表明该基因在茎中不会短时间表达。

参考文献:

- [1] Suresh C S, Rajeshwar P S, Donat P H. Role of lipids and fatty Acids in stress tolerance in Cyanobacteria[J]. Acta Protozool, 2002, 41: 297 - 308.
- [2] 刘汉梅, 张怀渝, 谭振波, 等. 植物抗寒基因及其在品种改良中的应用[J]. 四川农业大学学报, 2005, 23(1): 109 - 114.
- [3] 李 娇, 杨培珠, 李立功, 等. 影响小麦抗寒性的主要因素[J]. 天津农业科学, 2011, 17(5): 32 - 35.
- [4] 简令成, 吴素莹. 植物抗寒性细胞学研究—小麦越冬过程中细胞结构的变化[J]. 植物学报, 1965, 13(1): 1 - 15.
- [5] 田景花, 王红霞, 高 仪, 等. 核桃属 4 种树展叶期抗寒性鉴定[J]. 园艺学报, 2012, 39(12): 2439 - 2446.
- [6] Okuley J, Linghtner J, Feldmann K, et al. *Arabidopsis FAD2* gene encodes the enzyme that is essential for polyunsaturated lipid synthesis [J]. The Plant Cell, 1994, 6(1): 147 - 158.
- [7] 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]. J Exp Bot, 2008, 59(8): 2043 - 2056.
- [8] Teixeira M C, Coelho N, Olsson M E, et al. Omega-3 fatty acid desaturase genes isolated from purslane (*Portulaca oleracea* L.): expression in different tissues and response to cold and wound stress[J]. J Agric Food Chem, 2012, 58(3): 1870 - 1877.
- [9] Anastasia Kargiotidou, Dimitra Deli, Dia Galanopoulou, 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: 2043 - 2056.
- [10] Matteucci M, D'Angeli S, Errico S, et al. Cold affects the transcription of fatty acid desaturases and oil quality in the fruit of *Olea europaea* L. genotypes with different cold hardiness[J]. Journal of Experimental Botany, 2011, 62(10): 3403 - 3420.
- [11] Zhou Zhou, Min-Jie Wang, Shu-Tang Zhao. Changes in freezing tolerance in hybrid poplar caused by up-and down-regulation of *PtFAD2* gene expression[J]. Transgenic Res, 2010, 19(4): 647 - 654.
- [12] Jinlei Shi, Yingping Cao, Xiaorong Fan, et al. A rice microsomal delta-12 fatty acid desaturase can enhance resistance to cold stress in yeast and *Oryza sativa* [J]. Mol Breeding, 2012, 29(3): 743 - 757.
- [13] Kodama H, Horiguchi G, Nishiuchi T, et al. Fatty acid desaturation during chilling acclimation is one of the factors involved in conferring low-temperature tolerance to young tobacco leaves[J]. Plant Physiol, 1995, 107(4): 1177 - 1185.
- [14] Astakhova N V, Demin N I, Naraikina N V, et al. Effect of desA gene encoding $\Delta 12$ acyl-lipid desaturase on the chloroplast structure and tolerance to hypothermia of potato plants [J]. Russian Journal of Plant Physiology, 2011, 58(1): 18 - 23.
- [15] Wang Huanli, Cao Fuliang, Zhang Wangxiang, et al. Cloning and Expression of Stearoyl-ACP Desaturase and Two Oleate Desaturases Genes from *Ginkgo biloba* L. [J]. Plant Mol Biol Rep, 2013, 31(3): 633 - 648.
- [16] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method[J]. Methods, 2001, 25: 402 - 408.
- [17] 柏素花, 祝 军, 戴洪义. 苹果酰基辅酶 A 结合蛋白 2 编码基因 *MdACBP2* 的克隆和表达分析[J]. 园艺学报, 2012, 39(10): 1893 - 1902.
- [18] 周 洲, 张德强, 卢孟柱. 毛白杨油酸去饱和酶基因 *PtFAD2* 的克隆与表达分析[J]. 林业科学, 2007, 7(43): 16 - 21.