

ω-3 脂肪酸脱氢酶在高、低油大豆品种中的克隆与序列分析

刘文浩¹, 李伟², 陈相艳³, 戴海英², 张礼凤²

(¹山东省农业科学院奶牛研究中心, 山东 济南 250100; ²山东省农业科学院作物研究所, 山东 济南 250100; ³山东省农业科学院, 山东 济南 250100)

摘要: α-亚麻酸(ALA)被称为必需脂肪酸, 对人体有一系列的保健作用。ω-3 脂肪酸脱氢酶(FAD)催化亚油酸(LA)生成 ALA。大豆种子中 ALA 含量较高, 为了比较高、低油大豆 ω-3FAD 的序列差异, 用 RT-PCR 方法从大豆品种鲁豆 11 和郑 9525 的未成熟种子中扩增 *GmFAD3C* 的 cDNA, 获得的 cDNA 长度为 1174bp, 编码 380 个氨基酸。在推测的氨基酸序列中发现 19 处差异, 为研究 *GmFAD3C* 基因在高、低油大豆种质中的差异表达奠定了基础。

关键词: 大豆; 亚麻酸; ω-3 脂肪酸脱氢酶; 序列差异

中图分类号: S565.1

文献标识码: A

文章编号: 1000-9841(2008)04-0569-03

Cloning and Sequence Analysis of an ω-3 Fatty Acid Desaturase Gene from High-oil and Low-oil Soybean Cultivars

LIU Wen-hao¹, LI Wei², CHEN Xiang-yan³, DAI Hai-ying², Zhang Li-feng²

(¹Dairy Cow Research Centre, Shandong Academy of Agriculture Science, Jinan 250100; ²Crop Institute, Shandong Academy of Agriculture Science, Jinan 250100; ³Shandong Academy of Agriculture Science, Jinan 250100, Shandong, China)

Abstract: α-linolenic acid(ALA) is an essential fatty acid which has a lot of healthcare functions to human. In plants, ω-3 fatty acid desaturases(FAD) catalyze linoleic acid(LA) to form ALA. The seed oil of soybean contains high level of ALA. RT-PCR was used to amplify the cDNA of *GmFAD3C* from the cultivars of Ludou11 and Zheng 9525. The length of the acquired cDNA, containing 380 amino acids, was 1174bp. Nineteen different amino acids were detected in the amino acid sequences of *GmFAD3C* from Ludou11 and Zheng 9525. These differences will help us to research the differential expression of *GmFAD3C* between high-oil and low-oil soybean.

Key words: Soybean; Linolenic acid; ω-3 fatty acid desaturase; Sequence difference

α-亚麻酸是必需脂肪酸, 在人体内可以转化为具有抗血栓、抗肿瘤、调节血脂等一系列重要生理功能的长链多不饱和脂肪酸^[1-2], 对人体的健康十分重要。在植物体内, ω-3 脂肪酸脱氢酶(ω-3 Fatty Acid Desaturase, FAD3)催化亚油酸(Linoleic acid, LA)生成 α-亚麻酸。目前, 多种植物的微粒体 ω-3 脂肪酸脱氢酶基因或质体 ω-3 脂肪酸脱氢酶基因^[3-4]已经被克隆。

大豆种子中富含亚麻酸, 含量在常见的油料作物中最高, 占总脂肪酸的 8.98%^[5]。Bilyeu 等^[6]克隆了 3 个大豆(*Glycine max*) FAD3 基因(*GmFAD3A*、*GmFAD3B* 和 *GmFAD3C*), 在未成熟种子中, *GmFAD3A* 和 *GmFAD3C* 的表达量分别是持家基因的 60% 和 0.2%, 但未检测到 *GmFAD3B* 的表达。*GmFAD3A* 定位于大豆基因组的 fan 位点, 而 fan 位点

突变失活的大豆种子中 ALA 含量仍维持在 2.5% ~ 5.1%^[7-8], 说明 *GmFAD3A* 失活突变后, *GmFAD3C* 在表达量很低的情况下仍能维持种子较高的 ALA 水平, 推测 *GmFAD3C* 编码的 ω-3FAD 具有较高的活性。通过研究克隆高、低油大豆 *GmFAD3C* 基因, 比较其氨基酸序列差异, 为研究 *GmFAD3C* 基因在高、低油大豆种质中的差异表达奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

大豆品种鲁豆 11 和郑 9525 由山东省农业科学院作物所大豆室提供, 种子油份含量分别为 23% 和 17%。大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH5α 为本实验室保存, 筛选标记为氨苄青霉素, T 载体 pGEM-T 购自 Promega 公司。

收稿日期: 2008-04-09

基金项目: 山东省自然科学基金资助项目(Y2006D20); 山东省农业科学院青年科研基金资助项目(2005YQ007)。

作者简介: 刘文浩(1972-), 男, 助理研究员, 研究方向为生物技术。李伟为共同第一作者。

通讯作者: 张礼凤, 副研究员。E-mail: zhanglifeng 9639@sina.com。

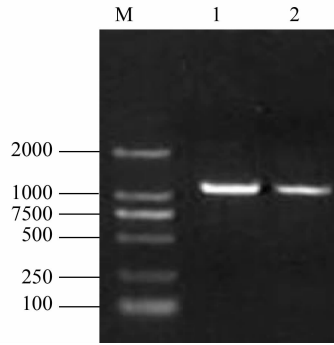
1.2 方法

根据网上已登录的 *GmFAD3C* 核苷酸序列 (AY204712)设计引物 FAD3CF:5'-gaa aca ttt gag caa aaa tgg-3'和 FAD3CR:5'-tag cat caa aaa ctt tag ttg g-3'。引物合成由上海 Sangon 完成。大豆未成熟种子总 RNA 的提取参照 TRIzol 总 RNA 提取试剂说明书进行。取 1 μg 所提总 RNA 为模板, Oligo(dT)₁₈ 300 pmol 为反转录引物, 70℃ 变性 5 min, 冰浴 5 min, 然后分别加入 5 × RT Buffer 4 μL, dNTP Mixture (各 10mM) 1 μL, RNase Inhibitor 20 U, RevertAid™ M-MuLV Reverse Transcriptase 200 U, 加 DEPC 水至 20 μL, 42℃ 反应 1 h, 70℃ 加热 10 min 后冰上冷却, 合成第一链 cDNA。用合成的引物, 以反转录产物作为模板进行 PCR 扩增, 扩增条件: 94℃ 变性 3 min, 然后 94℃ 50 s, 54℃ 50 s, 72℃ 1 min 20 s 35 个循环, 最后 72℃ 10 min。将 PCR 产物回收并克隆到 pUCm-T 载体中, 并转化大肠杆菌 DH5α, 蓝白斑筛选和酶切鉴定阳性克隆, 挑取正确的阳性克隆送上海生工测序。大肠杆菌感受态细胞的制备、载体构建、转化和重组质粒的筛选和鉴定均按《分子克隆实验指南》^[9] 所提供的常规方法进行。

2 结果与分析

2.1 *GmFAD3C* 基因的扩增

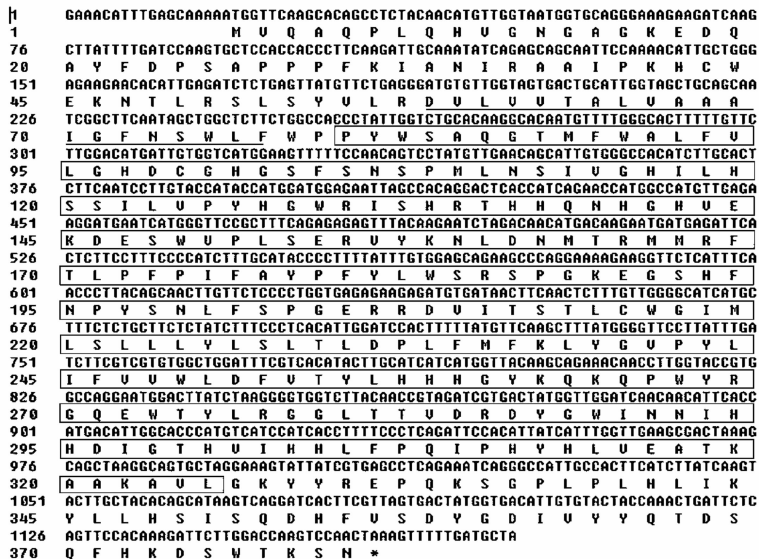
根据已发表的 *GmFAD3C* 序列设计特异性引



M 为 D2000 marker。1. 鲁豆 11, 2. 郑 9525。
M indicates D2000 marker 1. Ludou 11, 2. Zheng 9525.

图 1 *ω-3* 脂肪酸脱氢酶基因 *GmFAD3C* 的克隆
Fig. 1 The cloning of *GmFAD3C* from soybean

物, 用 RT-PCR 方法从大豆未成熟种子的总 RNA 中扩增出约 1.1kb 的单一一条带 (图 1), 克隆到 pGEM-T 载体中, 挑单克隆测序, 所获片段长度为 1174bp, 包含完整的 ORF (18-1157bp), 编码 380 个氨基酸 (图 2)。利用 SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/smart/>) 软件分析, 发现在 59-78 氨基酸处含有一个跨膜结构域 (transmembrane), 表明 *GmFAD3C* 是一个定位于膜系统上的蛋白; 81-325 氨基酸处含有一个脂肪酸脱饱和酶 (FA_desaturase) 结构域 (图 2)。



直线标出的为跨膜结构域, 方框标出的为脂肪酸脱饱和酶结构域, 终止密码子用星号表示。

The black lines indicate the transmembrane domain. The positions of the fatty acid desaturase domain are indicated by black rectangles. The star indicates the stop codon.

图 2 鲁豆 11 的 *GmFAD3C* 基因的 cDNA 序列及推导的氨基酸序列

Fig. 2 The cDNA and deduced amino acid sequences of *GmFAD3C* from soybean cultivar Ludou 11

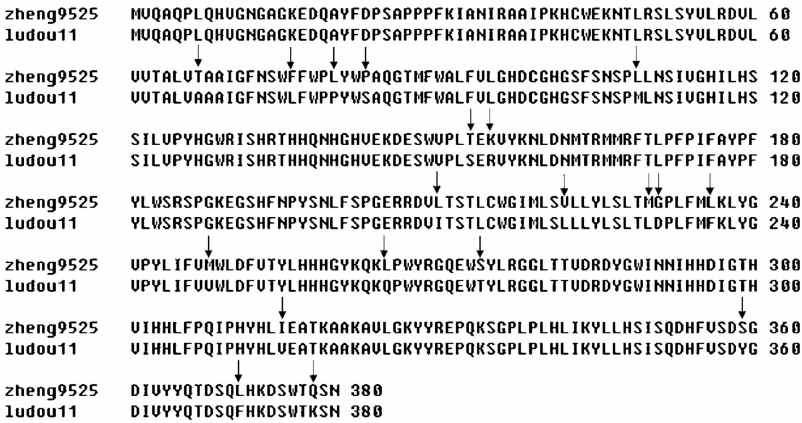
2.2 *GmFAD3C* 基因在高、低油大豆中的序列差异

利用 ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>) 软件分析鲁豆 11 和郑 9525 的

GmFAD3C 基因的氨基酸序列, 发现有 19 处氨基酸存在差异 (图 3), 从氨基酸电荷和极性变化上考虑, 其中 11 个是同义氨基酸的差异, 9 个为非同义差异。

ω-3 脂肪酸脱氢酶蛋白 N 端保守性很强,在鲁豆 11 和郑 9525 中没有差异。C 端存在 3 处差异,2 处为非

同义差异,1 处为同义差异。跨膜结构域中存在 2 处差异,脂肪酸脱饱和酶结构域中有 14 处氨基酸差异。



箭头代表序列差异处。The positions of the differential amino acid are indicated by arrows.

图 3 鲁豆 11 和郑 9525 的 *GmFAD3C* 基因的氨基酸序列比较

Fig. 3 The comparison of amino acid sequence of *GmFAD3C* between Ludou 11 and Zheng 9525

3 讨论

在作物的驯化和人工改良过程中,新表型的产生主要有两种机制,一种是转录调控的顺式调控元件发生变化,如玉米中控制分支结构的 *tb1* 基因^[10]和番茄中控制果型大小的 *fw2.2* 基因^[11];另一种是基因或蛋白序列本身发生变化,如小麦控制落粒的 *Q* 基因^[12]和玉米控制籽粒裸露的 *Tga1* 基因^[13]。

最近,美国先锋公司的 Zheng 等^[14]采用图位克隆的方法从高油玉米中克隆了一个控制玉米种子油份含量和油酸含量的主效 QTL,经分析该 QTL 为 DGAT 编码基因。通过比较高油和普通玉米中该基因的氨基酸序列,共发现 4 处氨基酸差异,其中靠近 C 端的第 469 氨基酸处的苯丙氨酸的插入,对高油玉米油份含量和油酸含量的提高起重要作用。序列分析发现,苯丙氨酸插入的 469 位置为跨膜螺旋区域。普通玉米中该氨基酸的缺失,将会改变跨膜螺旋残基的侧链位置,进而影响蛋白结构和蛋白活性。研究中,*GmFAD3C* 蛋白的跨膜结构域在鲁豆 11 和郑 9525 中亦存在差异,其中一处为同义氨基酸差异,另一处为非同义氨基酸差异。这种差异是否影响到 *GmFAD3C* 蛋白的结构和活性,还有待进一步研究。

参考文献

[1] 卢定强,陈庶来,陈钧. 二十碳五烯酸和二十二碳六烯酸的代谢和生理机能[J]. 江苏理工大学学报,1998,5:29-36. (Lu D Q, Chen S L, Chen J. Metabolism and physiological function of docosahexaenoic acid and eicosapentaenoic acid[J]. Journal of Jiangsu University of Science and Technology, 1998, 5: 29-36.)
[2] Shahidi F, Wanasundara U N. Omega-3 fatty acid concentrates: nutritional aspects and production technologies[J]. Trends in Food Science & Technology, 1998, 9: 230-240.

[3] Arondol V, Lemieux B, Hwang I, et al. Map-based cloning of a gene controlling omega-3 fatty acid desaturation in Arabidopsis [J]. Science, 1992, 258: 1353-1355.
[4] Yadav N S, Wierzbicki A, Aegerter M, et al. Cloning of higher plant omega-3 fatty acid desaturase [J]. Plant Physiology, 1993, 103: 467-476.
[5] 刘兴媛,胡传璞. 中国大豆种质资源的脂肪酸组成分析[J]. 作物品种资源, 1998, 2: 40-42. (Liu X Y, Hu C P. The fatty acid composition analysis of soybean germplasm resource in China [J]. Journal of Crop Germplasm Resources, 1998, 2: 40-42.)
[6] Bilyeu K D, Palavalli L, Sleper D A, et al. Three microsomal omega-3 fatty-acid desaturase genes contribute to soybean linolenic acid levels [J]. Crop Science, 2003, 43: 1833-1838.
[7] Rahman S M, Takagi Y, Kumamaru T. Low linolenate sources at the fan locus in soybean lines M-5 and IL-8 [J]. Breeding Science, 1996, 46: 155-158.
[8] Stojin D, Luzzi B M, Ablett G R, et al. Inheritance of low linolenic acid level in the soybean line RG10 [J]. Crop Science, 1998, 38: 1441-1444.
[9] Sambrook J, David W R. Molecular cloning: A laboratory manual [M]. 3rd, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001: 96-109.
[10] Doebley J, Lukens L. Transcriptional regulators and the evolution of plant form [J]. The Plant Cell, 1998, 10: 1075-1082.
[11] Nesbitt T C, Tanksley S D. Comparative sequencing in the genus lycopersicon. Implications for the evolution of fruit size in the domestication of cultivated tomatoes [J]. Genetics, 2002, 162: 365-379.
[12] Simons K J, Fellers J P, Trick H N, et al. Molecular characterization of the major wheat domestication gene Q [J]. Genetics, 2006, 172: 547-555.
[13] Wang H, Nussbaum-Wagler T, Li B, Zhao Q, et al. The origin of the naked grains of maize [J]. Nature, 2005, 436: 714-719.
[14] Zheng P, Allen W B, Roesler K, et al. A phenylalanine in DGAT is a key determinant of oil content and composition in maize [J]. Nature genetics, 2008, 40(3): 257-373.