

# 大豆内源基因调控与籽粒不饱和脂肪酸的形成

李丽丽<sup>1,2</sup>, 张雷<sup>1</sup>, 刘丽君<sup>1</sup>, 唐晓飞<sup>1</sup>, 杨喆<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>黑龙江省农业科学院大豆研究所, 黑龙江 哈尔滨 150086 ;<sup>2</sup>东北农业大学研究生学院, 黑龙江 哈尔滨 150030)

**摘 要:**大豆亚油酸主要的合成途径是在大豆内源基因 *fad2* 调控下由油酸生成亚油酸。与此同时, 在内源基因 *fad3* 作用下, 亚油酸又部分转化成为亚麻酸。采用 7 个国内外具有一定代表性的栽培品种, 对大豆籽粒成熟过程中不同时期的样本进行定量 PCR 分析。结果表明: 不饱和脂肪酸的合成过程是一个连锁反应, 单独一个基因的表达不但影响与其相关的代谢途径, 而且连带影响其他脂肪酸成分的积累。*fad3* 的高量表达, 促进不饱和脂肪酸积累总量的增加。籽粒发育后期, 油酸含量下降, 亚油酸, 亚麻酸含量稳步上升。当 *fad2* 表达受抑制时, 亚油酸含量也较低。

**关键词:**大豆; 亚油酸; 荧光定量; *fad2*; *fad3*

**中图分类号:**S565.1      **文献标识码:**A      **文章编号:**1000-9841(2008)06-0929-04

## Endogenous Gene Regulate the Formation of Unsaturated Fatty Acid of Soybean

LI Li-li<sup>1,2</sup>, ZHANG Lei<sup>1</sup>, LIU Li-jun<sup>1</sup>, TANG Xiao-fei<sup>1</sup>, YANG Zhe<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>Soybean Research Institute of Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin 150086; <sup>2</sup>The Graduate College of Northeast Agricultural University, Harbin 150030, Heilongjiang, China)

**Abstract:** Linoleic acid is one of the helpful composition in soybean for human health. Its main synthesis approach is from oleic acid under the regulation of endogenous gene *fad2*. At the same time, endogenous gene *fad3* plays some effect on the synthesis of linoleic acid. Seven soybean cultivars (lines) were planted and soybean pods were sampled every 5 days from full flowering, and the dynamic accumulation of unsaturated fatty acid and expression of *fad2* and *fad3* gene in soybean seeds were determined. Result suggested that the synthesis of unsaturated fatty acids was a chain reaction, the expression of single gene influenced both its related metabolic pathway and the accumulation of other unsaturated fatty acid. The high expression of *fad3* promoted the whole synthesis process. During the final stage of seed development, oleic acid content decreased while linoleic and linolenic content increased steadily. The linoleic content was lower when the expression of *fad2* was inhibited.

**Key words:** Soybean; Linoleic acid; Real-time PCR; *fad2*; *fad3*

大豆是我国重要的油料、经济作物之一, 是人们生活的植物蛋白和油份的重要来源。大豆的脂肪酸分为饱和脂肪酸和不饱和脂肪酸。不饱和脂肪酸有利于人体消化吸收, 对人们生产生活具有重要作用。不饱和脂肪酸脱饱和酶的活性是影响各种不饱和脂肪酸合成的主要因素。在亚油酸和亚麻酸的合成过程中, *fad2*, *fad3* 酶的活性尤其重要。根据双键的位置及功能又将多不饱和脂肪酸分为 W-3 系列和 W-6 系列。*fad2* 属于 W-6 系列脱饱和酶基因类型, 定位于内质网, 其功能是负责在脂肪酸链中引入第二个双键, 并且已在拟南芥、大豆等多种作物中得到分离。此外, *fad2* 对植物抗寒能力的影响非常显

著, 对该基因调控机制的深入研究对于了解高等植物的抗寒、抗旱、抗热、抗盐以及抗病机制都十分重要。*fad3* 属于 W-3 系列脱饱和酶基因类型, 定位于内质网, 其功能是负责在脂肪酸链中引入第三个双键。该酶是脂肪酸合成途径中的一个限速酶, 已在拟南芥、油菜、大豆等植物中得到分离。目前, 对脂肪酸去饱和酶基因的研究已取得很大进展, 对其催化和调节机制已有许多研究, 在植物脂质改善、抗寒工程和抗病工程等领域的广阔应用前景是不容置疑的。脂肪酸脱饱和酶的活性受其基因表达的直接影响, 因此对脱饱和酶基因表达方式的深入研究可以通过基因工程手段调整植物膜和储油组织的脂肪

酸组成,从而达到提高植物生活力、育性以及获得含有特定脂肪酸组成的农产品的目的。在分析大豆籽粒发育的各个阶段组成成分的变化特点,各成分间的相互关系,及*fad2*、*fad3* 表达量特点的基础上,分析了基因表达量与不饱和脂肪酸积累的关系。

1 材料与方法

1.1 材料

哈 89015,哈 96016,K6-25,C1640,Ualle,N178/ON,K 派-17,共 7 个大豆品种(系)。

1.2 试验设计

田间试验于 2007 年在黑龙江省农业科学院试验地进行,6 月初播种,9 月底成熟。于盛花期开始,每隔 5 d 取发育中的豆荚一次,于 -70℃ 冷冻保存,共取样 6 次,3 次重复,备做脂肪酸分析与荧光定量分析。

1.3 测定项目和方法

1.3.1 Trizol 法提取豆粒中总 RNA 具体步骤参照 RNeasy Plant kit RNeasy 植物总 RNA 提取试剂盒。

1.3.2 mRNA 反转录 在 0.2 mL PCR 反应管中加入(1)olig(dT)(0.5 μg)1 μL,总 DNA(4~5 μg)10 μL,DEPC-H<sub>2</sub>O 加至 25 μL。(2)在另一个 0.2 mL PCR 管中,依次加入以下成分:10×SS II Buffer 5.0 μL,10 mmol·L<sup>-1</sup> Dntp Mix 1.0 μL,0.1 mmol·L<sup>-1</sup> DTT 2.0 μL,Rnase Inhibitor 1.0 μL,DEPC-H<sub>2</sub>O 24 μL 轻轻混合。在 50℃ 下与前一个反应管一起温育 5 min 后混合,加入 1 μL SS II,50℃ 保温 5 min,72℃ 保温 15 min,4℃ 终止反应,-20℃ 保存。

1.3.3 不饱和脂肪酸含量的测定 脂肪酸甲酯的制备:冷冻保存的大豆豆荚中发育的种子,冷冻干燥至衡重,精确称重后研磨成粉状,加入石油醚和乙醚(v/v=1:1)的混合溶剂 1 mL,振动溶解,再加入 KOH 甲醇溶液 1 mL,充分混匀,于 60℃ 温浴 1 h 进行甲酯化反应,冷却至室温后加入内标十九碳饱和脂肪酸甲酯(methy nonadecanoate),然后加入 2 mL 蒸馏水,剧烈震荡后离心,取上层清液,备做色谱分析。所仪器为 AgilentTechnologies 6890N。采用程序升温法,柱温 210℃~230℃,升温速率 10℃·min<sup>-1</sup>,进样口温度 260℃,入口压强 25 pa,高纯氮气 25 mL·min<sup>-1</sup>,氢气 40 mL·min<sup>-1</sup>,空气 400 mL·min<sup>-1</sup>。数据分析:每个取样时间点计算 3 次重复的平均数,不同亚油酸品种累积过程的相关性和主成分分析在亚油酸相对含量的基础上采用 SAS 软件进行分析。

1.3.4 荧光定量分析利用实时荧光定量 PCR 技术<sup>[1-2]</sup> (SYBR Green 染料法)在 PCR 反应体系中加入荧光基团,利用荧光信号积累实时监测整个 PCR 进程,最后通过标准曲线与ΔΔCT 值法,对未知模板进行相对定量分析。仪器采用 Stratagene MX3000。

2 结果与分析

2.1 籽粒发育各个阶段不饱和脂肪酸含量

2.1.1 油酸 由图 1 可以看出,各品种油酸含量变化的整体趋势比较相似,但各品种油酸含量相差很大,在 10.005%~32.196% 之间变化。随着籽粒的发育,油酸含量不断的积累,其中,品种 N178/ON,K 派-17,哈 89015 和 Ualla 在 7 月 28 日达到最大值,然后呈下降趋势。品种 K6-25 其含量在达到峰值后缓慢下降。哈 96015 油酸含量最低,起始含量只有 10.005%,但在接下来的时期其含量稳定增加。

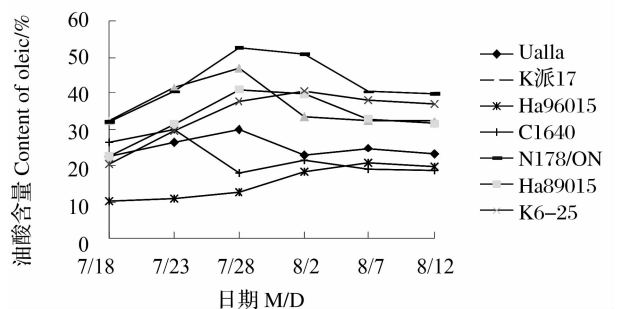


图 1 籽粒形成过程中油酸含量的变化  
Fig. 1 Dynamic of oleic acid content during seed development of soybean

2.1.2 亚油酸 大豆籽粒形成过程中,各品种亚油酸含量的变化趋势总体上比较一致,亚油酸含量随着籽粒的不断成熟呈波浪形状有起伏的上升。由图 2 可以看出,高亚油酸品种哈 96015 和 Ualla 含量在 7 月 18 日后一直呈稳步上升趋势。品种 C1640 在 7 月 18 日亚油酸含量为 43.231%,随后一直稳定增长至 56.603%。品种哈 89015 和 K 派-17 变化趋势基本保持一致。7 月 28 日,亚油酸含量均达到最低值,随后稳定增长。品种 K6-25 亚油酸含量在 7 月 28 日达最大值后下降,在 8 月 2 日后缓慢上升。品种 N178/ON 在 7 月 23 日含量最低,其后亚油酸含量稳步上升。

2.1.3 亚麻酸 由图 3 可以看出,不同类型大豆品种的亚麻酸含量变化趋势有所不同。其中,品种 N178/ON 和哈 89015 变化趋势相同。且在 7 月 18 日亚麻酸含量均较高,之后急剧下降,到 7 月 28 日达到

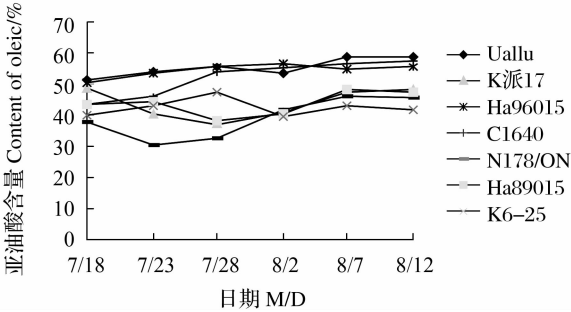


图2 籽粒形成过程中亚油酸含量的变化  
Fig.2 Dynamic of linoleic content during seed development of soybean

最低点。品种 Ualla 亚麻酸含量在前期一直稳定在 4.779% ~5.287% 之间,8 月 2 日后开始急剧上升,最终达到 9.092%。而在 8 月 2 日前 C1640 含量一直在下降,之后上升。哈 96015 和 K6-25 呈现波浪状变化趋势,均是 7 月 28 日达到最高值,在 8 月 2 日达到最低值。只是哈 96015 亚麻酸含量高于 K6-25。而品种 K 派-17 亚麻酸含量一直在下降。

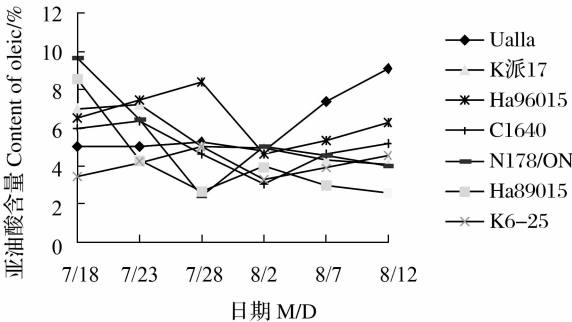


图3 籽粒形成过程中亚麻酸含量的变化  
Fig.3 Dynamic of linolenic content during seed development of soybean

2.1.4 不饱和脂肪酸的形成积累 在大豆籽粒形成过程中,油酸,亚麻酸的积累主要在大豆籽粒形成的早期,亚油酸的积累主要在籽粒形成的中后期<sup>[3-6]</sup>。不同品种间的各脂肪酸含量均有一定的差异。亚油酸含量的差异最小说明亚油酸的含量在不同品种间比较稳定,遗传也相对稳定。而油酸,亚麻酸含量的变异较大说明二者的含量较易变化。此外,通过对不同品种 6 个时期不饱和脂肪酸组分含量的分析,将 7 个品种分成两种类型,即高亚油酸低油酸品种哈 96015、C1640 和低亚油酸高油酸品种 K 派 17、N178/ON、哈 89015 和 K6-25。其中 Ualla 也属于高亚油酸低油酸品种,只是其亚麻酸含量比较高,达到 9.092%。

2.2 不同类型大豆品种 *fad2* 表达量特点

不饱和脂肪酸去饱和酶的活性是影响各种不饱

和脂肪酸合成的主要因素。在亚油酸和亚麻酸的合成过程中,*fad2* 酶的活性尤为重要<sup>[7]</sup>,因为它同时控制着这两种脂肪酸的合成。

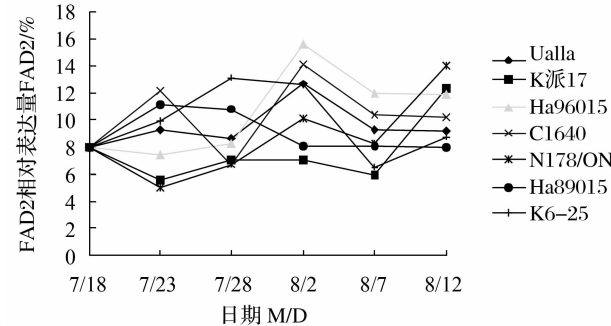


图4 不同大豆品种籽粒发育各个时期的 *fad2* 的表达  
Fig.4 Expression of *fad2* during seed development of different soybeans

由图 4 可以看出,对于高亚油酸低油酸品种哈 96015 和 C1640,低亚油酸高油酸品种 K 派 17、N178/ON、哈 89015 和 K6-25,其 *fad2* 总体表达均表现出了一致性。在早期各个品种表达量不是很稳定,从中期各个品种都呈现有规律性的上升。而在决定亚油酸含量的后期,各个品种均开始下降。在最后一个时期,高亚油酸低油酸品种哈 96015 和 C1640,其表达量几乎没有变化,而 Ualla、K-派 17、N178/ON、哈 89015 和 k6-25 的 *fad2* 表达量开始回升。由此推断,对于高亚油酸低油酸品种哈 96015 和 C1640,其亚麻酸是由油酸转化而来。

2.3 不同类型大豆品种 *fad3* 表达量特点

在由亚油酸合成亚麻酸的过程中,*fad3* 起到主导调控作用<sup>[8]</sup>。

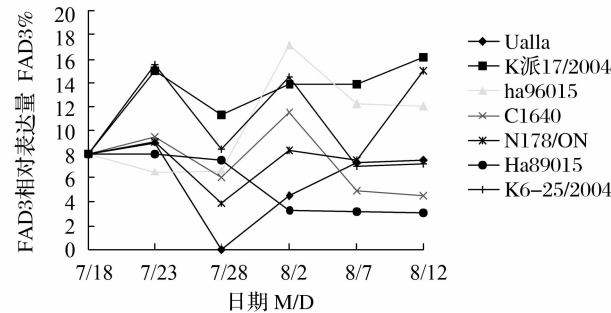


图5 不同大豆品种籽粒发育各个时期 *fad3* 的表达  
Fig.5 Expression of *fad3* during seed development of different soybeans

由图 5 看出,对于高亚油酸低油酸品种哈 96015 和 C1640,低亚油酸高油酸品种 K 派-17、N178/ON、哈 89015 和 K6-25, *fad3* 总体表达均表现出一致性。在早期各个品种表达量不是很稳定,在

中期各个品种都呈现出不同程度的上升。而在决定亚油酸含量的后期,*fad3* 在哈 96015 和 C1640 中的表达均开始下降,而其他 4 个低亚油酸品种 *fad3* 表达出现上调趋势,亚油酸被转化。

2.4 不同类型大豆品种 *fad2*、*fad3* 表达与不饱和脂肪酸积累的关系

大豆的脂肪酸组成有两种类型。一类是以油酸为主要成分,各组分含量依次为油酸>亚油酸>棕榈酸>亚麻酸>硬脂酸,此类品种亚麻酸较低。另一类是以亚油酸为主要成分,各组分含量依次为亚油酸>油酸>棕榈酸>亚麻酸>硬脂酸<sup>[9]</sup>。由以上分析可以看出,品种 Ualla 属于高亚麻酸品种。其含量高达 9.092%。而哈 96015, C1640 属于高亚油酸低油酸品种类型。亚麻酸含量也较高,在 5.152%~6.31% 之间。结合 *fad2*、*fad3* 表达图,可以看出,在决定不饱和脂肪酸含量后期的 *fad2*、*fad3* 表达量都开始下调。且两个品种基因表达一致。说明这两个品种的油酸间接脱饱和生成了亚麻酸。K 派-17, N178, 哈 89015, K6-25 属于高油酸,低亚油酸品种类型。其亚麻酸含量与品种哈 96015, C1640 相比较,也比较低,在 2.616%~4.562% 之间。结合 *fad2*、*fad3* 表达图,在后期,基因调控较为一致。均由上调过度到下调,最后再次上调。这 4 个品种亚油酸含量较低, *fad3* 上调,由亚油酸直接脱饱和生成亚麻酸。

上述分析结果同时表明不饱和脂肪酸的合成过程是一个连锁反应,单独一个基因的表达不单影响与其相关的代谢途径,还连带影响其他脂肪酸成分的积累。

3 讨论

试验中, *fad3* 表达量出现了周期性变化规律,即出现循环性调节。这对于油酸、亚油酸和亚麻酸含量的稳定积累起到了重要影响。研究得到 *fad2*、*fad3* 的表达与油酸及亚油酸积累的相关性与规律性,说明 *fad2*、*fad3* 在油酸及亚油酸积累中发挥着重要的作用。然而由于大多数物种中脂肪酸去饱和酶的编码基因都不止一个,而且即使同一植物中同一基因的不同拷贝在序列结构乃至功能和表达调控上都有所不同,所以对于植物中去饱和酶的研究和认识一直处于不断探索和更新之中。对于高油酸,或是高亚油酸两种不同大豆品质类型的形成,可能与后几个时期 *fad2*、*fad3* 的表达调控相一致有关。因为大豆不饱和脂肪酸含量的多少主要取决于后期脂肪酸的积累。关于这方面的具体论证,可继续做生化方面的研究。在由油酸生成亚油酸的过程中,到

后期时 *fad2* 表达量达到最大值,这对后期高亚油酸品种含量的形成具有重要意义。而 *fad2* 的基因家族还包括 *fad2-1*、*fad2-2*、*fad2-3*。所以,需要进一步设计 *fad2-1*、*fad2-2*、*fad2-3* 相关引物,进行表达量分析。从而找到 *fad2* 基因家族中对不饱和脂肪酸积累起到主导作用的基因。

参考文献

[1] 朱文斯,朱水芳. 实时荧光 PCR 技术在快速检测植物及其加工产品中转基因成分中的应用[J]. 中国医药导刊,2003,5(1): 31-34. (Zhu W S, Zhu S F. The application of Real-Time PCR to the fast detection of plant and trans- gene composition in the processing product[J]. The Leading Publication in the Chinese Medicine,2003,5(1):31-34. )

[2] 张明辉,敖金霞. 大豆深加工产品两种荧光定量 PCR 检测方法的比较研究[J]. 生物技术,2006,16(2):56-59. (Zhang M H, Ao J X. Comparison of the Real-time PCR technology for quantification in highly processed products [J]. Biological Technology, 2006,16(2):56-59. )

[3] 刘丽君,薛永国,赵贵兴,等. 大豆亚麻酸相关基因的标记研究[J]. 湖南农业大学学报,2007-S1-077. (Liu L J, Xue Y G, Zhao G X, et al. Related research on soybean linoleic gene maker [J]. Journal of Hunan Agricultural University( Natural Sciences ), 2007-S1-077. )

[4] 李晓丹,吴刚. 大豆种子发育过程中脂肪酸积累模式研究[J]. 大豆科学,2007,26(4):506-510. (Li X D, Wu G. The accumulation pattern of fatty acids during the development of soybean seeds[J]. Soybean Science,2007,26(4):506-510. )

[5] 李晓丹. 油料作物种子脂肪酸积累模式及相关基因的克隆与序列比较研究[D]. 北京:中国农业科学院,2007. (Li X D. Comparative study on pattern of fatty acid biosynthesis and sequence of relative genes clones in oilseed crops[ D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences,2007. )

[6] 任波,李毅. 大豆种子脂肪酸合成代谢的研究进展[J]. 分子植物育种,2005,3(3):301-306. (Ren B, Li Y. Research advances on fatty acid biogynthesis metabolism in soybean seed[J]. Molecular Plant Breeding,2005,3(3):301-306. )

[7] 陶芳. 玉米 FAD2 序列克隆分析[J]. 大豆科学,2006,32(6): 649-656. (Tao F. Cloning and sequence analysis of Maize FAD2 Gene[J]. 大豆科学,2006,32(6):649-656. )

[8] 张洪涛,杨家森. 大豆  $\omega$ 23 脂肪酸脱氢酶基因 *GmFAD3* C 在酿酒酵母中的表达[J]. 生物工程学报,2006,22(1):33-37. (Zhang H T, Yang J S. Functional expression of an  $\omega$ 2-3 fatty acid desaturase Gene from *Glycine max* in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Chinese Journal of Biotechnology,2006,22(1):33-37. )

[9] 徐杰. 不同品质类型大豆品种脂肪酸形成规律的研究[D]. 哈尔滨:东北农业大学,2005. (Xu J. Study on accumulation law of fatty acid of soybean with different quality character[ D]. Harbin: Northeast Agricultural University,2005. )