

胡麻 $\Delta 9$ 硬脂酰 ACP 脱氢酶(SAD2) 基因的表达分析

李闻娟

(甘肃省农业科学院作物研究所, 甘肃 兰州 730070)

摘要: 为了改良胡麻油脂脂肪酸组分, 通过半定量 RT-PCR 方法对 $\Delta 9$ 硬脂酰 ACP 脱氢酶(SAD2) 基因在胡麻蒴果不同发育阶段的表达情况进行了分析。结果表明, 在开花后 20 d 的蒴果中表达量最高, 在成熟期时表达量显著降低。据此认为, 开花后 20 d 可能是不饱和脂肪酸积累的关键时期。通过对 SAD2 基因的表达分析, 为进一步通过基因工程育种手段改良胡麻油品质建立基础。

关键词: 胡麻; $\Delta 9$ 硬脂酰 ACP 脱氢酶(SAD2); 基因; 表达分析

中图分类号: S565.9 **文献标志码:** A **文章编号:** 1001-1463(2018)10-0013-04

doi: 10.3969/j.issn.1001-1463.2018.10.006

Expression Analysis of Flax $\Delta 9$ Stearoyl-ACP Desaturase (SAD2) Gene

LI Wenjuan

(Institute of Crops, Gansu Academy of Agricultural Sciences, Lanzhou Gansu 730070, China)

Abstract: In order to improve the composition of flax oil fatty acids, the expression of $\Delta 9$ stearoyl ACP desaturase (SAD2) gene was analyzed by semi-quantitative RT-PCR incapsule at different development stages of flax. The results showed that the expression level was highest in the 20 days after flowering and the expression level decreased significantly at the maturity stage. Therefore, 20 days after flowering may be the critical period for the accumulation of unsaturated fatty acids. Through the analysis of SAD2 gene expression, a foundation was established for further improving the quality of flax oil through genetic engineering breeding methods.

Key words: Flax; SAD2 gene; Expression analysis

胡麻是一种富含不饱和脂肪酸的油料作物^[1-4], 其不饱和脂肪酸含量占 80% 以上。不饱和脂肪酸主要由单不饱和脂肪酸和多不饱和脂肪酸组成, 单不饱和脂肪酸是在碳骨架中有 1 个双键(如油酸), 有 2 个或 2 个以上双键的为多不饱和脂肪酸(如亚油酸和亚麻酸)。不饱和脂肪酸有降低胆固醇、减缓动脉粥样硬化、有效预防心血管疾病以及提高婴幼儿的视力及智力等营养功效^[5-7]。

不饱和脂肪酸主要受到脂肪酸脱氢酶的调控^[8]。在质体中, 由脂肪酸合酶复合体(Fatty acid synthase, FAS)催化生成 C16-ACP 和 C18-ACP;

然后在细胞质中, 由 $\Delta 9$ 硬脂酰 ACP 脱氢酶(stearoyl-ACP desaturase, SAD)催化, 脱饱和在第 9 个和第 10 个碳原子间引入 1 个双键生成油酰基 C18: 1-ACP, 使硬脂酸脱氢后形成油酸, 因此 SAD 是决定胡麻油中不饱和脂肪酸比例的关键酶。在胡麻籽里, 最初只报道了 SAD 基因^[9], 随后两个 SAD 基因的亚型在启动子区域分离出来(SAD1 和 SAD2)^[10]。在玉米种子中过量表达 ZmSAD1, 能够提高不饱和脂肪酸和饱和脂肪酸的比例(20.40%~20.61%)^[11]。在棉花中 RNAi 干扰 SAD, 硬脂酸含量从 20% 提高到 40%^[8]。为了改良胡

收稿日期: 2018-05-21

基金项目: 国家自然科学基金项目(31460388); 国家特色油料产业技术体系(CARS-14-1-05)。

作者简介: 李闻娟(1982—), 女, 山西闻喜人, 助理研究员, 硕士, 主要从事胡麻遗传育种工作。Email: liwenjuan@gsagr.ac.cn。

- [4] 邱小燕. 农药污染与生态环境保护[J]. 现代农业科学, 2008, 15(8): 53-54.
- [5] 侯梅芳, 潘栋宇, 黄赛花, 等. 微生物修复土壤多环芳烃污染的研究进展[J]. 生态环境学报, 2014, 23(7): 1233-1238.
- [6] 谭亚军, 李少南, 孙利. 农药对水生态环境的影响

[J]. 农药, 2003, 42(12): 12-14.

- [7] 郭晨. 高危农药: 健康和环境的杀手[J]. 生态经济, 2016, 32(7): 6-9.

- [8] 邓成贵, 刘小娟. 4 种除草剂对马铃薯田杂草的防效[J]. 甘肃农业科技, 2016(9): 44-46.

(本文责编: 杨杰)

麻油脂肪酸的组分, 甘肃省农业科学院作物研究所胡麻课题组采用半定量 RT-PCR 方法研究了 $\Delta 9$ 硬脂酰 ACP 脱氢酶(SAD2)在胡麻籽不同发育阶段的表达情况, 对利用基因工程手段改良胡麻中脂肪酸的组分有重要意义。

1 材料与方法

1.1 供试材料

指示作物品种为陇亚 10 号, 由甘肃省农业科学院作物研究所提供, 供试材料为开花后 10 ~ 50 d 的蒴果。

1.2 试剂与仪器

转 SAD2 基因的载体质粒为阳性对照。TRI-ZOL 购自北京天根生物技术有限公司, 反转录酶(M-MLV reverse transcriptase)、寡聚引物 Oligo-(dT)₁₈ 和 dNTPs 均购自 NEB 公司, Tag polymerase 购自英骏生物工程有限公司, 其余化学试剂均为国产常规试剂。供试紫外分光光度计由北京普析通用仪器有限责任公司生产。

1.3 PCR 引物设计

根据 GenBank 中已发表的 SAD2 基因的序列 JQ963150, 根据序列设计引物。扩增片段长度约 1 405 bp, 引物序列为 Forward Primer: 5'-GCAAGTGACCCATTCCATGC-3', Reverse Primer: 5'-GAGCCAACA CTGTACCGTCA-3'; 按照胡麻 β -Actin 基因序列设计内参基因 PCR 扩增引物, 扩增产物为 400 bp。引物由上海生物工程有限公司合成, 引物序列为: Forward Primer: 5'-AAGGCCAACAGG GAGAAGATGACA-3', Reverse Primer: 5'-TGGAA CCACCACTGAGAACGATGT-3'。

1.4 RNA 的提取及反转录 cDNA 第 1 链的合成

选取开花后 10 ~ 50 d 的胡麻蒴果作为基因表达分析的材料。RNA 采用英骏公司的 QIAGEN RNA 试剂盒提取。用 Nanodrop 取 2 μ L 总 RNA 分析 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 值, 测定总 RNA 的纯度和浓度。取 2 μ L 提取的 RNA 于 1% 琼脂糖凝胶(含有 0.8 μ g/mL EB)中进行电泳(提前将电泳槽及梳子用 0.5 mol/L NaOH 浸泡 60 min), 在紫外灯照射下进行观察, 判断总 RNA 的完整性。参照 M-MLV 逆转录酶的 20 μ L 标准反转录体系, 总 RNA 取 2 μ g, 500 mg/L Oligo-(dT)₁₈ 取 1 μ L, 加 ddH₂O 补足 6 μ L。70 $^{\circ}$ C 10 min, 冰上骤冷 2 min, 加入 5 \times First-strand Buffer 2 μ L、40 U/ μ L RNA 酶抑制剂 0.25 μ L、200 U/ μ L M-MLV 反转录酶 0.25 μ L、10

mmol/L dNTP Mix 取 0.5 μ L, 轻微混匀在 40 $^{\circ}$ C 反应 60 min、70 $^{\circ}$ C 下反应 15 min 后中止反应。

1.5 β -Actin 和 SAD2 基因的 PCR 扩增

以上述合成的 cDNA 为模板, 反应体积为 20 μ L, 其中包含 10 μ mol/L dNTPs、0.3 μ mol/L 引物浓度、cDNA 模板 1.5 μ L、Tag 酶 1.5 U。将样品置 PCR 扩增仪中进行 PCR 扩增。PCR 扩增程序为: 95 $^{\circ}$ C 预变性 30 s; 95 $^{\circ}$ C 变性 10 s, 58 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 50 s, 28 个循环; 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 2 min。取 5 μ L PCR 产物于 1.5% 琼脂糖凝胶电泳中电泳 50 min, 在 EB 溶液中染色 10 min。

1.6 确定 PCR 循环次数及检验引物对间的竞争

β -Actin 和 SAD2 扩增反应分别从 18 个循环和 22 个循环开始, 每隔 2 个循环取出 1 管。34 个循环或 38 个循环后, 所有样品在 1.5% 的凝胶上进行电泳, 凝胶成像系统拍摄检验。对胡麻的 β -Actin 基因和 SAD2 基因进行同管 PCR 扩增, 检验是否 2 对引物可以在同一体系中进行半定量 RT-PCR。PCR 后用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳分析, 检验是否在引物对之间有竞争抑制存在。

2 结果与分析

2.1 胡麻蒴果总 RNA 检测

对提取的 RNA 样品用紫外分光光度计进行测定, OD₂₆₀/OD₂₈₀ 均为 2.0。进行 1% 的琼脂糖电泳(见图 1), 从图 1 可以看出, 总 RNA 有 3 条(28S、18S、5S)明显的条带, 表明所提取的总 RNA 较完整, 符合进一步半定量 RT-PCR 的要求。

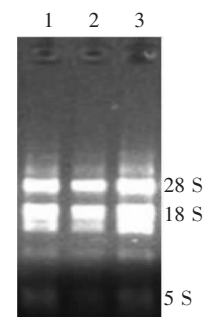
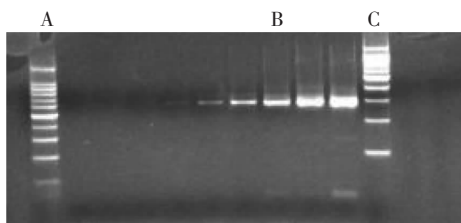


图 1 胡麻蒴果 RNA 电泳结果

2.2 RT-PCR 循环次数的确定

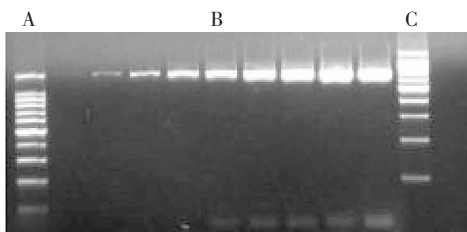
对 β -Actin 基因在 18 ~ 34 个循环进行扩增, 对 SAD2 基因在 22 ~ 38 个循环进行扩增(图 2、图 3), 每隔 2 个 PCR 循环取出 1 管检测 PCR 的扩增产物。经过琼脂糖凝胶电泳分析, β -Actin PCR 产物是 574 bp, SAD2 PCR 产物是 1 405 bp。确定在进行半定量 RT-PCR 分析时, 采用 28 个循环进

行 PCR 扩增。



(A 为 100 bp DNAladder; B 为 18 ~ 34 循环的 PCR 扩增产物; C 为 200 bp DNAladder)

图 2 β -Actin 不同循环数的 PCR 扩增电泳结果

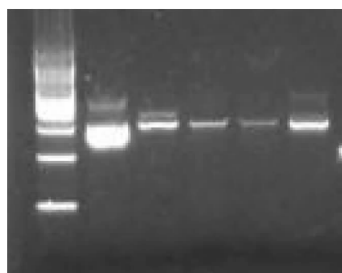


(A 为 100 bp DNAladder; B 为 22 ~ 38 循环的 PCR 扩增产物; C 为 200 bp DNAladder)

图 3 SAD2 不同循环数的 PCR 扩增电泳结果

2.3 引物对间的竞争对 RT-PCR 的影响

在半定量 RT-PCR 中, 同管扩增时常会发生目的基因由于内参基因的竞争而受到抑制, 因而降低扩增效率。图 4 表明, SAD2 基因和 β -Actin 基因在同管扩增时 PCR 产物条带不理想, 虽然两对引物的退火温度相同。但将两对引物在同一 PCR 管中进行反应则无法扩增出理想的条带。因此, 将 β -Actin 基因和 SAD2 基因使用同批异管 PCR 扩增。

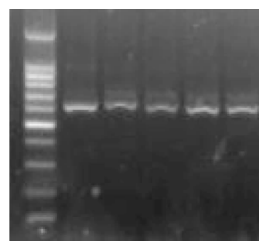


(200 bp DNAladder, 胡麻 10 ~ 50 d 的蒴果)

图 4 PCR 同批同管扩增电泳结果

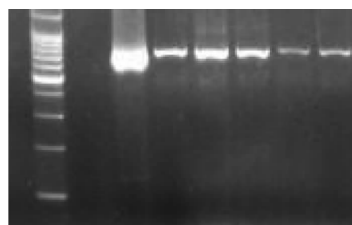
2.4 不同发育阶段胡麻蒴果中 SAD2 基因的表达分析

通过对不同发育阶段胡麻蒴果的 SAD2 基因进行半定量 RT-PCR 分析, 可以看到 SAD2 基因在不同发育阶段的蒴果中表达有明显的差异, 开花后 10 ~ 30 d 时表达量较高, 40 d 和 50 d 的表达量很低。其中在开花后 20 d 时表达量最高(见图 5、图 6)。



(100 bp DNAladder, 胡麻 10 ~ 50 d 的蒴果)

图 5 胡麻开花后 10~50 d 的 β -Actin 基因半定量 RT-PCR 电泳结果



(200 bp DNAladder, 胡麻 10 ~ 50 d 的蒴果)

图 6 胡麻开花后 10~50 d 的 SAD2 基因半定量 PT-PCR 电泳结果

3 小结与讨论

通过对胡麻不同发育阶段蒴果的半定量 RT-PCR 检验, SAD2 在开花后 10 ~ 30 d 的蒴果里表达量较高, 在 40 ~ 50 d 的表达量显著降低, 在开花后 20 d 的蒴果里表达量最高。因此, 开花后 20 d 可能是不饱和脂肪酸积累的关键时期。

半定量 RT-PCR 方法是检测基因转录水平的技术。因为半定量 RT-PCR 方法比定量 RT-PCR 方法费用低、很多实验室容易做到而被经常使用, 具有操作简单、特异性高、可靠性强的优点。半定量 RT-PCR 方法的关键是要保证所有样品的可参考性, 这就需要内参基因和目的基因在同一管内进行扩增, 但是由于内参基因常常比目的基因表达水平高很多, 在同管扩增时, 目的基因就会由于内参基因的竞争受到抑制, 从而降低扩增效率, 因此有时采用异管扩增^[13]。

不同油料作物的脂肪酸组分各不相同, 其中不饱和脂肪酸对人体健康更有益, 因此培育更高不饱和脂肪酸的作物新品种是油料作物育种的任务之一。SAD 基因是不饱和脂肪酸生物合成途径的第一步去饱和的重要基因, 在调控植物脂肪酸组分上具有重要作用^[14]。研究 SAD 基因在胡麻不同发育阶段的表达水平, 可为进一步通过基因工程育种手段改良胡麻油的品质建立基础。

参考文献:

[1] 邵洁. 11 个胡麻新品(系)在景泰县的引种初报[J].

起垄覆膜方式对岷县当归生产发育及产量和品质的影响

赵 荣¹, 王富胜¹, 宋振华²

(1. 定西市农业科学研究院, 甘肃 定西 743000; 2. 定西市农业技术推广站, 甘肃 定西 743000)

摘要: 以当归品种岷归 1 号为试材, 在岷县试验观察了不同起垄覆膜方式对当归鲜根产量、综合农艺性状、抗病性、品质、经济收益等指标的影响, 结果表明, 黑膜垄作栽培的当归综合农艺性状最好, 平均折合鲜根产量最高, 为 14 047.62 kg/hm², 较露地平作(CK)增产 35.94%; 产值最高, 较露地平作(CK)增收 37 653.2 元/hm²; 纯收益最高, 较露地平作(CK)增加 35 103.2 元/hm²; 根病发病最轻, 发病率为 37.5%, 较露地平作(CK)降低 9.3 百分点; 一级品、二级品出成率均为最高, 分别为 35.6%、28.2%, 较露地平作(CK)分别增加 14.1、7.9 百分点; 阿魏酸含量最高, 较露地平作(CK)提高 15.9%。认为在岷县等高寒阴湿区黑膜垄作栽培是提高当归单产、增强抗病性、改良品质、提升种植效益的最佳栽培方式。

关键词: 当归; 黑膜垄作栽培; 产量; 品质

中图分类号: S567.23 **文献标志码:** A **文章编号:** 1001-1463(2018)10-0016-05

[doi:10.3969/j.issn.1001-1463.2018.10.007](https://doi.org/10.3969/j.issn.1001-1463.2018.10.007)

当归是著名常用药材之一^[1-4], 素有“十方九归”之说。在临床应用上, 具有调理与调节人体免

疫功能、抗缺氧、抑菌、抗癌、抗动脉硬化之功效, 还可用于药膳保健、护肤美容、航天事业等领

收稿日期: 2018-03-31; 修订日期: 2018-07-25

作者简介: 赵 荣(1960—), 男, 甘肃定西人, 农艺师, 主要从事中药材规范化栽培技术研究工作。联系电话: (0)18993208091。

通信作者: 宋振华(1982—), 男, 甘肃定西人, 高级农艺师, 主要从事中药材规范化栽培技术推广工作。联系电话: (0)13830290653。

甘肃农业科技, 2016(11): 45-48.

- [2] 王宗胜. 平凉市胡麻产业发展刍议[J]. 甘肃农业科技, 2017(5): 72-75.
- [3] 杨 丽, 祁双桔, 王宗胜, 等. 11 个胡麻品种在平凉旱地引种初报[J]. 甘肃农业科技, 2016(11): 56-58.
- [4] 杜彦斌, 王立军, 张 金, 等. 胡麻新品种天亚 11 号选育报告[J]. 甘肃农业科技, 2018(2): 24-26.
- [5] 孙翔宇, 高贵田, 段爱莉. 多不饱和脂肪酸的研究进展[J]. 食品工业科技, 2012, 33(7): 418-423.
- [6] 王景梓, 徐贵发. 单不饱和脂肪酸与冠心病的关系[J]. 食品与药品, 2005, 7(10): 21-23.
- [7] 王雪青, 苗 惠, 胡 萍. 膳食中多不饱和脂肪酸营养与生理功能的研究进展[J]. 食品科学, 2004, 25(11): 337-339.
- [8] 戴晓峰, 肖 玲, 武玉花. 植物脂肪酸去饱和酶及其编码基因研究进展[J]. 植物学报, 2007, 24(1): 105-113.
- [9] SINGH S, S MCKINNEY, A GREEN. Sequence of a cDNA from *Linum usitatissimum* encoding the stearoyl-acyl carrier protein desaturase[J]. Plant Physiology,

1994, 104(3): 1075-1078.

- [10] JAIN R K, R G THOMPSON, D C TAYLOR, *et al.* Isolation and characterization of two promoters from linseed for genetic engineering[J]. Crop Science, 1999, 49(12): 1867-1878.
- [11] DU H, M HUANG, J HU, *et al.* Modification of the fatty acid composition in *Arabidopsis* and maize seeds using a stearoyl-acyl carrier protein desaturase-1 (Zm-SAD1) gene[J]. BMC Plant Biology, 2016, 16(1): 137.
- [12] LIU Q, S P SINGH, A G GREEN. High-stearic and High-oleic cottonseed oils produced by hairpin RNA-mediated post-transcriptional gene silencing[J]. Plant Physiology, 2002, 129(4): 1732-1743.
- [13] 高海波, 张拴林, 陈燕红. 半定量 RT-PCR 在基因表达方面的应用[J]. 畜禽业, 2008(2): 34-37.
- [14] 张党权, 谭晓风, 陈鸿鹏. 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.

(本文责编: 郑立龙)