

文章编号: 1001-1498(2007)01-0006-04

中间锦鸡儿 *fad2* 基因片段克隆、反义表达载体构建及遗传转化初步研究

汪阳东^{1,2}, 李春秀¹, 齐力旺¹, 张守攻^{1*}

(1. 中国林业科学研究院林业研究所, 国家林业局林木培育重点实验室, 北京 100091;

2. 中国林业科学研究院亚热带林业研究所, 浙江 富阳 311400)

摘要: 以我国重要的生物能源灌木——中间锦鸡儿枝叶和种子为材料, 根据 GenBank 中已经发表 *fad2* 基因的同源序列, 利用 PCR 技术克隆得到基因片段。在 GenBank 中 Blast (GenBank 登录号 AY957393) 所得基因片段和同属豆科的 *Glycine max Gmfad2-2a* 同源性高达 88%, 位于 *fad2* 基因编码区中部。将所得片段经 BamHI 和 SacI 酶切后插入表达载体质粒 pB II21, 构建了反义表达载体 pB II21*fad2*, 并利用农杆菌介导法转入烟草叶片, 获得了抗卡那霉素和氨苄青霉素的再生烟草植株。初步分析结果表明: 与对照烟草相比, 转基因烟草种子脂肪酸含量没有明显差异, 而亚油酸则减少 10.3%。

关键词: 中间锦鸡儿; 生物柴油; *fad2* 基因; 反义表达载体; 遗传转化

中图分类号: Q75

文献标识码: A

Cloning of *fad2* Gene Fragments from *Caragana intermedia*, Constructing of Anisense *fad2* Expression Vector and Its Genetic Transformation in Tobacco

WANG Yang-dong^{1,2}, LI Chun-xiu¹, QI Li-wang¹, ZHANG Shou-gong¹

(1. Research Institute of Forestry, CAF; Key Laboratory of Tree Breeding and Cultivation, state Forestry Administration, Beijing 100091, China;

2. Research Institute of Subtropical Forestry, CAF, Fuyang 311400, Zhejiang, China)

Abstract: -12 fatty acid desaturase is an important enzyme in the route of production of polyunsaturated lipids. Control the gene expression of -12 fatty acid desaturase can change plant fatty acid for good plant biodiesel. Two cDNA fragments of *fad2* gene were cloned using degenerate primers from *Caragana intermedia*, an important biodiesel plant. The DNA sequence analysis indicated that the fragments contained 452 and 480 bp respectively, and shared 88% of homology with *Glycine max Gmfad2-2a* in GenBank. Both of the gene fragments were registered in GenBank (AY957393). The fragment AY957394 (452 bp) was digested with the enzyme BamHI and SacI, and ligated to the corresponding sites of the pB II21 in the antisense orientation. The pB II21*fad2* vector was introduced into *Agrobacterium tumefaciens* strain LB4404 by electroporation and transformed to leaves of tobacco via *Agrobacterium tumefaciens* system. Plantlets were regenerated *in vitro* by resistance selection on medium containing Ampicillin and Kanamycin. PCR amplification with primer designed according to the *fad2* gene fragment and NPTII gene in pB II21 demonstrated that antisense *fad2* was integrated into tobacco genomes. The analysis of fatty acids of transgenic tobacco plants with antisense *fad2* showed that the content of linoleic acid was 10.3% less than that of the un-transgenic tobacco plants.

收稿日期: 2006-10-30

基金项目: 国家高技术研究发展项目 (“863”) “抗逆优质柠条新品种选育”(2002)资助

作者简介: 汪阳东 (1973—), 安徽岳西人, 硕士, 助理研究员, 在读博士生。

* 通讯作者

Key words: *Caragana intermedia*; biodiesel; *fad2* gene; antisense expression vector; genetic transformation

中间锦鸡儿 (*Caragana intermedia* Kuang et H. C. Fu) 是一种重要的生物质能源灌木, 广泛分布在我国华北和西北^[1,2]。根据测定, 中间锦鸡儿种子中含有各种脂肪酸, 如硬脂酸、油酸、亚油酸等, 其中不饱和脂肪酸含量平均为 87.5%, 多不饱和脂肪酸为 60.1%, 但制造优质生物柴油要求植物油中多不饱和脂肪酸含量尽量低, 单不饱和脂肪酸含量高^[3]。因此, 降低种子中多不饱和脂肪酸含量是中间锦鸡儿品质改良的重要目标之一。油酸脱氢酶 (EC1.3.1.35, 1-酰基-2-油酰基-sn-甘油磷酸胆碱脱氢酶) 是植物多不饱和脂肪酸合成的关键酶之一。1994年, Okely 等^[4]利用 T-DNA 标签法从拟南芥 (*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.) 中克隆得到了油酸脱氢酶基因。随后, 陆续从油菜 (*Brassica campestris* L.)、芝麻 (*Sesamum indicum* Linn.)、大豆 (*Glycine max* (Linn.) Merr.)、向日葵 (*Helianthus annuus* L.) 等植物中分离出了此基因, 并转化了油菜等植物^[5-11]。

本研究根据 GenBank 中发表的 *fad2* 基因序列设计兼并性引物, 从中间锦鸡儿中克隆到亚油酸合成酶基因 *fad2* 片段, 构建了反义表达载体, 并通过根癌农杆菌系统导入烟草, 获得转基因烟草再生植株, 以期通过抑制多不饱和脂肪酸的合成, 获得高含量的单不饱和脂肪酸的烟草植株。

1 材料与方法

1.1 材料

供试材料为盆栽多年生的中间锦鸡儿枝叶和未成熟种子。逆转录酶购自 Clontech 公司; 普通 Taq 酶购自北京鼎国生物技术有限公司; RNA 提取试剂 TRIzol、载体 pGEM T-easy、T4 连接酶、限制性内切酶 EcoR I、Sac I 和 BamH I 均购自 Promega 公司; DNA 胶纯化回收试剂盒购自 Millipore 公司。引物分别由北京赛百盛公司和上海生工公司合成, 测序由北京三博远志公司完成。大肠杆菌感受态细胞为北京天为时代公司生产。

1.2 方法

1.2.1 中间锦鸡儿叶和芽总 RNA 的提取与 cDNA 第 1 链和第 2 链合成 称取一定量的中间锦鸡儿枝叶和种子于液氮中充分研磨后, 按 Promega 公司提供的方法进行 RNA 提取、纯化和检测。cDNA 第 1

链和第 2 链的合成均按 Clontech 公司的 SMART cDNA Library Construction Kit 说明书进行。

1.2.2 cDNA 的特异性片段的扩增 根据 GenBank 中登录的 *fad2* 基因和蛋白质中氨基酸序列, 用 Clustalx (1.8) 软件比较其同源性, 选择一对保守氨基酸序列设计兼并性引物:

FAD2F1: 5'-CGTCGCCA (C/T) CA (C/T) TC (C/T) AACAC-3'

FAD2R1: 5'-CCCCTAA (A/G) CCA (A/G) TCCCA (C/T) TC-3'

PCR 扩增为 20 μ L 反应体系: 双链 cDNA 1 μ L (2 μ g \cdot μ L⁻¹), 10 \times PCR 缓冲液 (含镁离子 25 mmol \cdot L⁻¹) 2 μ L, 1 μ L FAD2F1 (10 μ mol \cdot L⁻¹), 1 μ L FAD2R1 (10 μ mol \cdot L⁻¹), 10 mmol \cdot L⁻¹ dNTP 0.6 μ L, Taq 聚合酶 0.5 μ L。扩增条件: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min, 94 $^{\circ}$ C 30 s, 54 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 7 min。

扩增产物用 1% 琼脂糖凝胶检测, 回收, 并连接到 pGEM T-easy 载体, 得到克隆载体 pGEM Tfad2, 转化大肠杆菌 DH5 感受态细胞, 涂板, 挑选阳性克隆测序。

1.2.3 反义表达载体的构建与转化 根据测序结果选取大小 452 bp 的基因片段 (AY957394) 进行转化检测。设计带 Sac I 和 BamH I 酶切位点的引物: N8FAD2-Sac I F: 5'-CGC TGA GCT CCG TCG CCA TCA TTC TAA CAC-3'; N8FAD2-BamH I R: 5'-CTA TGG ATC CCC CCT AAG CCA GTC CCA TTC-3'。以 pGEM Tfad2 为模板进行 PCR, 回收 450 bp 左右片段和表达载体 pB II21 均用 Sac I 和 BamH I 双酶切, 连接并转化大肠杆菌 DH5 感受态细胞, 碱法提取质粒 DNA, 酶切鉴定插入片段大小。构建的植物表达载体命名为 pB II21fad2。采用电击法将质粒转化根癌农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens* (Smith et Townsend) Conn) 感受态细胞 LB4404, 电激仪为 Electroporator 2510, 在 2500 V 电压下 (电阻 200 Ω) 进行转化, 电激时间为 3~4 s。具体操作方法在参考文献 [12] 基础上作了部分修改。

1.2.4 根癌农杆菌介导的遗传转化和转基因烟草的再生 参照文献 [13], 将所构建的植物表达载体 pB II21fad2 和空载体 pB II21 通过根癌农杆菌介导入烟草叶片中, 并经抗卡那霉素和氨基青霉素双

重筛选,获得抗性再生烟草植株,同时将未转化的烟草再生植株作为对照。将抗性再生烟草和对照再生烟草移植温室内,正常培养,观察其生长状况。

1.2.5 转化再生烟草的初步检测 转基因烟草和对照烟草 DNA 提取采取 CTAB 法。PCR 鉴定采取目的基因片段和表达载体 pB II21 上 NPTII 片段双重检测。*fad2* 基因片段 PCR 检测的引物采用 N8FAD2-Sac I 和 N8FAD2-BamH I。NPTII 基因引物由北京赛百盛公司提供。目的基因片段和表达载体 pB II21 上 NPTII 片段 PCR 检测反应体系均为 25 μ L,条件为: 94 5 min, 94 30 s, 54 30 s, 72 1 min, 35 个循环; 72 延伸 7 min。

1.2.6 烟草种子脂肪酸含量分析 转基因烟草和对照烟草植株种子按单株收集,提取脂肪酸,

利用 GC-MS 法分别测定脂肪酸含量和成分。

2 结果与分析

2.1 *fad2* cDNA 特异性片段的 RT-PCR 扩增

用兼并性引物扩增的 PCR 产物经 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测,得到 1 条特异性 cDNA,长度约 450 bp (图 1、2)。序列测序长度为 452 bp。在 GenBank 中进行同源性比较,克隆得到的中间锦鸡儿核酸序列与大豆 *fad2-a* (AB188252)、*fad2-2* (SOYMO6DA) 的同源性分别高达 88% 和 87%; 其氨基酸序列与大豆、马铃薯、芝麻等的同源性约 80% ~ 86%。将该克隆片段在 GenBank 中进行注册,获得注册号为 AY957393。

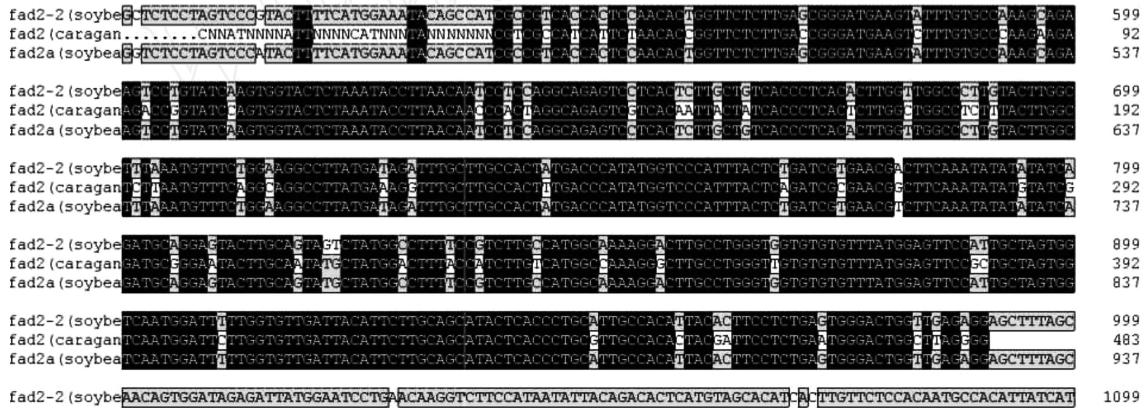
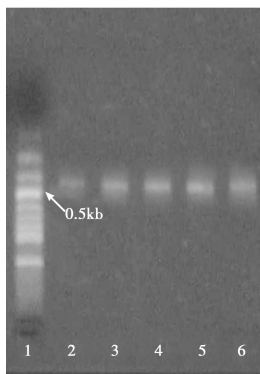
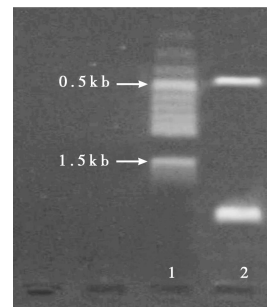


图 1 中间锦鸡儿 *fad2* 基因片段和大豆 *fad2-a*、*fad2-2* 序列同源性比较



1: 1 kb DNA 分子标记; 2~6: PCR 结果
图 2 *fad2* 基因 cDNA 片段 PCR 扩增



1: 1 kb DNA 分子标记; 2: pB II21*fad2* 载体酶切结果
图 3 pB II21*fad2* 载体 BamH I 和 Sac I 双酶切

2.2 中间锦鸡儿 *fad2* 基因反义表达载体的构建与转化烟草

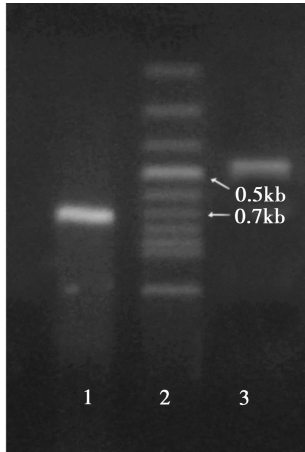
对 pB II21*fad2* 载体扩增出的目的产物及 Sac I 和 BamH I 双酶切后的产物用 1% 琼脂糖胶电泳分离,结果见图 3,显示均有约 450 bp 片段,说明所克

隆的 *fad2* 基因片段已经插入表达载体质粒 pB II21 中。Sac I 和 BamH I 双酶切后连接, *fad2* 基因的插入方向是反向。

2.3 转化烟草的检测和分析

经过 *fad2* 基因片段和载体 pB II21 上 NPTII 联合 PCR 检测 (图 4), 结果成阳性的初步确定为阳性转基因烟草植株,获得 44 株。转基因烟草与对照烟

草在生长、表型和开花结实方面都无明显差异。种子脂肪酸初步测定分析,与对照烟草相比,转基因烟草的脂肪酸含量没有明显变化,其中 32 株转基因烟草多不饱和脂肪酸降低,亚油酸平均减少 10.3%。



1: NPT 基因 PCR 检测;
2: 1 kb DNA 分子标记; 3: *fad2* 基因 PCR 检测
图 4 转 *fad2* 基因烟草 PCR 检测

3 讨论

fad2 基因已经从大豆、花生、芝麻等很多草本植物中克隆得到,但从木本植物中克隆并进行反义表达鲜见报道。植物去饱和脂肪酸酶是一个很大的家族,具有比较高的保守性,但在不同植物中克隆的基因核苷酸序列和数量都不一样,*fad2* 基因也不例外^[7,8]。中间锦鸡儿 *fad2* 基因在烟草中的反义表达,初步分析结果表明转基因烟草种子中多不饱和脂肪酸含量下降。这为进行下一步锦鸡儿类 (*Carragana* spp.) 植物分子改良,获得高含量单不饱和脂肪酸的优质中间锦鸡儿新品种以及改造其它木本生物柴油用原料植物奠定了基础。此外,该基因在植物中的作用部位,与其它不饱和脂肪酸合成酶基因之间的相互关系,外界温度和光照等环境条件对基因表达的影响等问题仍需要进一步研究。本研究中获得转基因烟草还需要进行观测和分析,以确定所导入的 *fad2* 基因的稳定性及表达情况。

参考文献:

- [1] 阿拉塔,赵书元,李敬忠. 三种锦鸡儿生物学特性及栽培利用的研究 [J]. 内蒙古畜牧科学, 1997 (4): 8 ~ 11
- [2] 贾丽,曲式曾. 豆科锦鸡儿属植物研究进展 [J]. 植物研究, 2001, 21 (4): 515 ~ 518
- [3] Harrington K J. Chemical and physical properties of vegetable oil esters and their effect on diesel fuel performance [J]. Biomass, 1986 (9): 1 ~ 17
- [4] Okuley J, Lightner J, Feldmann K, et al. A *Rabidopsis* FAD2 gene encodes the enzyme that is essential for polyunsaturated lipid synthesis [J]. Plant Cell, 1994, 6 (1): 147 ~ 158
- [5] Marillia E F, Taylor D. Cloning and nucleotide sequencing of a cDNA encoding a *B. nussica carinata* FAD2 (Accession No. AF124360) [J]. Plant Physiology, 1999, 120 (1): 339
- [6] Hitz W D, Yadav N S, Reltter R S, et al. Reducing polyunsaturation in oils of transgenic canola and soybean [A]. In: Kader J C, Mazliak P. Plant Lipid Metabolism [C]. Wilmington: Kluwer Academic Publishers, 1995: 506 ~ 508
- [7] 张羽航,林炜铁,姚汝华,等. 植物油脂基因工程 [J]. 中国油脂, 1999, 24 (5): 56 ~ 58
- [8] 卢善发. 植物脂肪酸的生物合成与基因工程 [J]. 植物学通报, 2000, 17 (6): 481 ~ 491
- [9] Sayanova O, Smith M A, Lapinskas P, et al. Expression of borage desaturase cDNA containing an N-terminal cytochrome b5 domain results in accumulation of high levels of 6-desaturated fatty acids in transgenic tobacco [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1997, 94 (8): 4211 ~ 4216
- [10] Yukawa Y, Takaïwa F, Shojik K, et al. Structure and expression of two seed-specific cDNA encoding stearyl-acyl carrier protein desaturase from sesame, *Sesamum indicum* [J]. Plant Cell Physiol, 1996, 37 (2): 201 ~ 205
- [11] Chung C H, Kim J L, Lee Y C, et al. Cloning and characterization of a seed-specific 3 fatty acid desaturase cDNA from *Perilla frutescens* [J]. Plant Cell Physiol, 1999, 40 (1): 114 ~ 118
- [12] 萨姆布鲁克 J, 弗里奇 E F, 曼尼阿蒂斯 T. 分子克隆实验指南 (第二版) [M]. 金冬雁, 黎孟枫, 侯云德译. 北京: 科学出版社, 1996
- [13] Zabarovsky E R, Winberg G. High efficiency electroporation of ligated DNA into bacteria [J]. Nucl Acids Res, 1990, 18: 5912 ~ 5919