

红花 ω 3 脂肪酸脱氢酶基因的分离及结构分析

官玲亮^{1,2}, 陈郡雯¹, 刘 千¹, 侯 凯¹, 邵金凤¹, 吴 卫¹

(¹ 四川农业大学农学院, 成都 611130; ² 中国热带农业科学院热带作物品种资源研究所, 儋州 571737)

摘要: 采用 RT-PCR 和 RACE (rapid amplification of cDNA ends) 技术, 从红花叶片中分离到 2 个质体类 ω 3 脂肪酸脱氢酶基因 (*CtFAD7* 和 *CtFAD8*) 的全长 cDNA 和 1 个微体类 ω 3 脂肪酸脱氢酶基因 (*CtFAD3*) 的部分序列。将其在 NCBI 中进行序列比对, 结果显示均与其他植物质体和微体 ω 3 脂肪酸脱氢酶基因具有较高的相似性。氨基酸序列分析表明红花 *CtFAD3*、*CtFAD7* 和 *CtFAD8* 均含有 3 个富含组氨酸的保守结构域, 分别为 HDCGH, HXXXXXHRTHH 和 HVIHH, 其中 *CtFAD7* 和 *CtFAD8* 的 N-端分别含有 56 和 27 个氨基酸残基的质体信号肽序列。疏水性和跨膜分析表明, 3 个红花 ω 3 脂肪酸脱氢酶氨基酸序列均包含 4 个疏水区域, 分别跨膜 1~3 次。蛋白质二级结构预测结果表明, 3 个 ω 3 脂肪酸脱氢酶蛋白主要由 α 螺旋和 β 折叠组成。通过对 cDNA 和 DNA 序列比较发现, *CtFAD7* 和 *CtFAD8* 的 DNA 序列中均包含有 7 个内含子和 8 个外显子。各内含子的碱基序列和长度在物种间表现出丰富的多态性, 在内含子出现的位置, 均为该基因的保守区; 而从第 2nd 到 7th 外显子的长度和序列相似性在物种间非常保守。推测 ω 3 脂肪酸脱氢酶基因的内含子对于保证基因在物种进化过程中功能的保守性起着关键作用。

关键词: 红花; ω 3 脂肪酸脱氢酶; RT-RACE; 基因结构

Isolation and Structural Analysis of Safflower ω 3 Fatty Acid Desaturase

GUAN Ling-liang^{1,2}, CHEN Jun-wen¹, LIU Qian¹, HOU Kai¹, SHAO Jin-feng¹, WU Wei¹

(¹ Agronomy College, Sichuan Agricultural University, Chengdu 611130;

² Tropical Crops Genetic Resources Institute, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Danzhou 571737)

Abstract: One microsomal ω 3 fatty acid desaturase gene fragment and two plastidial ω 3 fatty acid desaturase cDNA and genomic sequences, designated *CtFAD3*, *CtFAD7* and *CtFAD8* have been isolated from safflower (*Carthamus tinctorius* L.). The results of sequence alignment with other plant plastid and microbody ω 3 fatty acid dehydrogenase gene in the NCBI have showed high similarity. The deduced amino acid sequences of these genes showed three histidine boxes (HDCGH, HXXXXXHRTHH and HVIHH) characteristic of all membrane-bound desaturases, *CtFAD7* and *CtFAD8* possessed a putative N-terminal signal peptide, 56 and 27 aa respectively. Hydropathy and transmembrane analysis showed that the encoded polypeptides contain four putative hydropathy regions and transmembrane one to three times. The putative protein second-structure indicated that safflower ω 3 fatty acid desaturase were mainly composed by α -helix and β -sheet. Comparing the genome structures of safflower *CtFAD7* and *CtFAD8* with other plant plastidial ω 3 desaturase genes showed that all the sequences contain 8 exons and 7 introns. The base sequences and sizes of introns exhibited a wealth polymorphism between species, while the sizes of the internal 6 exons (from 2nd to 7th) were conservative. Comparing the location of the introns revealed that the intron occurs were the conserved regions of the enzyme. We speculated that these introns play an important role in keeping the gene function in the species evolutionary process.

Key words: Safflower; ω 3 fatty acid desaturase; RT-RACE; gene structures

收稿日期: 2012-10-11 修回日期: 2012-12-14 网络出版日期: 2013-08-09

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.4996.S.20130809.1212.010.html>

基金项目: 国家自然科学基金 (181274020)

第一作者研究方向为药用植物学。E-mail: gllgirl123@163.com

通信作者: 吴卫, 研究方向为药用植物学。E-mail: ewuwei@gmail.com

亚麻酸(18:3)是高等植物叶绿体膜中含量最多的脂肪酸,能在植物类囊体膜上捕获光子,在植物的光合作用中起到了必不可缺的作用^[1]。另外,亚麻酸是重要信号分子茉莉酸的前体,因此,在植物抵御低温、病虫害和机械损伤等不利外界因素的过程中有着重要作用。ω3 脂肪酸脱氢酶是不饱和脂肪酸合成途径中催化亚麻油酸 16:2^{Δ7,10}或亚油酸 18:2^{Δ9,12}转化为 16:3^{Δ7,10,13}或 18:3^{Δ9,12,15}的关键酶。在植物体内,根据定位差异以及电子供体的不同将其分为微体类和质体类 ω3 脂肪酸脱氢酶,前者定位于植物细胞的内质网,以细胞色素 b5 为电子供体,作用于磷脂酰甘油 (PG, phosphatidylglycerol) 或其他磷脂。后者定位于细胞质体,以铁氧还原蛋白为电子供体,作用于磷脂酰甘油、硫脂和半乳糖脂^[2]。

目前微体和质体 ω3 脂肪酸脱氢酶基因已从拟南芥^[3-4]、水稻^[5]、油菜^[6]、大豆^[7-8]、亚麻^[9]、小麦^[10]、紫苏^[11]、向日葵^[12]、播娘蒿^[13]和乌桕^[14]等多种植物中克隆得到,并且在植物的抗寒育种以及油脂品质调控等方面得到了广泛的应用。

研究表明,在拟南芥、小麦、水稻和播娘蒿等植物中 *FAD3* 基因均为单拷贝,主要在植物的非光合组织中高表达,如根、花以及种子^[2]。而在紫苏等植物中的 *FAD3* 基因只在种子中特异表达,与种子胚乳中亚麻酸的合成密切相关^[11]。而越来越多的研究发现,在一些种子亚麻酸含量高的植物中,如亚麻^[9]、紫苏^[11]和大豆^[7-8]等, *FAD3* 基因也存在多拷贝的形式。而另一些油料作物,如向日葵^[15]和红花^[16],其种子中不含(或含微量)亚麻酸。M. Venegas-Calderón 等^[12]在对向日葵的研究中没有分离到 *FAD3*,认为其种子中微量的亚麻酸是由 *HaFAD7* 催化合成的。而红花种子中不含(或含微量)亚麻酸的机理以及是否含有种子特异表达的 *FAD3* 基因尚不清楚。

为此,本研究通过采用 Reverse Transcription-Polymerase Chain 和 Reaction rapid- amplification of cDNA ends 联用 (RT-RACE) 的方法克隆到红花 ω3 脂肪酸脱氢酶基因,并利用生物信息学的方法对其功能、结构域及亚细胞定位进行预测,为探索红花脂肪酸的形成机制提供理论依据。同时,通过对多种植物 *FAD7/8* 基因结构的分析,为脂肪酸脱氢酶的进化及表达研究奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

川红 1 号,由雅安三九药业提供,其油酸和亚油

酸含量分别为 12.5% 和 80.2%。于 2008 年播种于四川农业大学教学科研试验地,采集苗期生长旺盛的叶片分别置于 2.0 mL 的离心管中,迅速于液氮中固定,然后于 -75 ℃ 超低温冰箱冷藏。

1.2 红花总 RNA 的提取及 cDNA 第 1 链合成

总 RNA 的提取使用 TIANGEN 公司的 TRNzol 总 RNA 提取试剂盒,样品中 DNA 去除按照 DNA 酶说明书进行。取 5 μg 总 RNA 用于 cDNA 第 1 链的合成,具体步骤按照 TaKaRa 的 PrimeScript™ 1st Strand cDNA Synthesis Kit 试剂盒中说明书进行。

1.3 DNA 的提取及纯化

红花叶片基因组 DNA 的提取,采用 CTAB 法。参照 M. Murray 等^[17]的方法,略有改动。

1.4 ω3 脂肪酸脱氢酶基因片段的克隆

根据 NCBI 上其他植物的微体 ω3 脂肪酸脱氢酶 (*FAD3*) 和质体 ω3 脂肪酸脱氢酶 (*FAD7/8*) 基因碱基序列保守区域,分别设计 1 对简并引物,为 PF2/PR2 和 PF3/PR3 (表 1)。PCR 反应总体积为 50 μL, 1.5 mmol/L MgCl₂, 4 种 dNTP 各 200 μmol/L, 引物各 150 ng, 1.5 U *Taq* plus DNA polymerase (高保真), 100 ng cDNA。反应程序:94 ℃ 预变性 5 min, 40 个循环 (94 ℃ 变性 45 s, 63 ℃ 退火 1 min, 72 ℃ 延伸 1 min), 反应产物 72 ℃ 延伸 8 min。回收、纯化目的条带,并将其连接到 pMD18-T 载体,筛选阳性克隆,测序。在 NCBI 中进行 Blast 分析发现,所获得的序列与 GenBank 中的微体和质体 ω3 脂肪酸脱氢酶基因相应的区域具有很高的相似性,因此命名为 *CtFAD3*、*CtFAD7* 和 *CtFAD8*。

1.5 ω3 脂肪酸脱氢酶基因 3'/5'端的克隆

根据已经获得的 ω3 脂肪酸脱氢酶基因 cDNA 片段序列,设计特异引物,每个基因分别设计 2 条上游引物,2 条下游引物,分别用于 3'/5'-RACE。引物命名、序列及用途分别列于表 1。采用 SMART RACE cDNA amplification kit,扩增目的基因的 3'和 5'末端。取 4 μL 总 RNA 作为模板,用 3'-CDS primerA (5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTAC(T) 30VN-3') 逆转录合成 3'-RACE ready cDNA 作为 3'-RACE 模板。用 5'-CDS primer A (5'-(T)₂₅ VN-3') 逆转录合成 5'-RACE ready cDNA 作为 5'-RACE 模板。以通用引物和每个基因的 3'和 5'特异引物进行降落 PCR 扩增。降落 PCR 反应程序:94 ℃, 30 s; 72 ℃, 3 min, 进行 5 个循环; 94 ℃, 30 s; 70 ℃, 30 s; 72 ℃, 3 min, 进行 5 个循环; 94 ℃, 30 s; 68 ℃, 30 s; 72 ℃, 3 min, 进行 5 个循环; 最后 72 ℃ 延伸 8 min。上述 RACE PCR 产物亚克隆入 pMD18-T 载体,测序。

表 1 用于扩增红花 ω3 脂肪酸脱氢酶基因的引物名称、序列及功能

Table 1 Oligonucleotide primer names (Oligo), sequences, and function in the amplification of ω3 fatty acid desaturase genes in safflower

引物名称	碱基序列(5'-3')	功能
Primer name	Nucleotide sequence (5'-3')	Function
PF2	GTTCTGGGCTCTGTTTGTC	<i>CtFAD7/8</i> fragment
PR2	TGGATGTTAT TGATCCATCC	<i>CtFAD7/8</i> fragment
PF7-1	TCAGAACCA TGGGCATGTTG	3' RACE (<i>CtFAD7</i>)
PF7-2	GCTCTGCTT GTGGGTTTAT CCT	3' RACE (<i>CtFAD7</i>)
PR7-1	TACTAAATCC AACAAATGA	5' RACE (<i>CtFAD7</i>)
PR7-2	CCACAGATAG AAAGGGTATG	5' RACE (<i>CtFAD7</i>)
PF7-3	CTATGCCGAAC TGGTCTTATC	Full ORF clone (<i>CtFAD7</i>)
PR7-3	CTATTTTGAA AGGTTGGAGT	Full ORF clone (<i>CtFAD7</i>)
PF8-1	CCATTCCTGT ACCTTACCAT	3' RACE (<i>CtFAD8</i>)
PF8-2	GATGTCATCA CTTCAACAGT	3' RACE (<i>CtFAD8</i>)
PR8-1	TGAAGGATAA CCCCACAAGC	5' RACE (<i>CtFAD8</i>)
PR8-2	TCTTTTC AGATAACGGA TG	5' RACE (<i>CtFAD8</i>)
PF8-3	GTTATGGCTACCTGGGTCTT	Full ORF clone (<i>CtFAD8</i>)
PR8-3	TTACTTTCTG TTGGTGTCTG	Full ORF clone (<i>CtFAD8</i>)
PF3	TGTGGCCATGGAAGCTTTTC	<i>FAD3</i> gene fragment
PR3	TCCAACCACA TCACGAAT	<i>FAD3</i> gene fragment
PR3-1	CAGTTGA TAGATAGCAA AG	5' RACE (<i>CtFAD3</i>)
PR3-2	CTTGCTGGGA GCATCCAATG	5' RACE (<i>CtFAD3</i>)

根据对 3'/5'端序列以及红花 ω3 脂肪酸脱氢酶基因片断的序列比对发现,红花 *FAD7* 和 *FAD8* 能很好的匹配,进行电子拼接,得到红花 *FAD7* 和 *FAD8* 全长 cDNA 序列,然后分别在起始密码子上游和终止子下游区域设计引物(表 1)。分别以 cDNA 和基因组 DNA 为模板,扩增得到基因编码区全长 cDNA 序列和 DNA 序列(该基因的 DNA 序列分别命名为 *Ctg(genomic) FAD7* 和 *CtgFAD8*)。而红花微体 ω3 脂肪酸脱氢酶基因 *FAD3* 的 5'端能与保守区相匹配,而 3'端序列与保守区差异较大。

1.6 序列分析及结构预测

所获得的序列均已提交至 GenBank,登录号分别为 HQ831349、HQ831350 和 HQ831356。引物设计使用 Primer 5.0 完成;氨基酸序列翻译、比对及亲/疏水性在 DNAMAN 软件(version 4.0, Lynnon Biosoft, Quebec)中进行分析。在丹麦技术大学生物序列分析中心(<http://www.cbs.dtu.dk/services/>)使用 TM-HMM、SignalP、TargetP 程序分别对跨膜区、信号肽切割位点进行预测分析。使用 PSORT(<http://psort.hgc.jp/form.html>)在线预测蛋白的亚细胞定位。采用 D. Eisenberg 等^[18]的方法,对红花 ω3 脂肪酸脱氢

酶基因进行二级结构预测。*FAD7* 和 *FAD8* 基因结构在 Gene structure display server (GSDS) 中进行分析。

2 结果与分析

2.1 ω3 脂肪酸脱氢酶基因的克隆

根据 NCBI 其他植物质体和微体类 ω3 脂肪酸脱氢酶基因的保守区设计引物,叶片 cDNA 为模板,进行 PCR 扩增获得 3 条 600 bp 左右的片段。测序结果显示,3 条序列均与已知植物的 ω3 脂肪酸脱氢酶基因有很高的相似性,均在 80% 以上,因此分别命名为 *CtFAD7*、*CtFAD8* 和 *CtFAD3*。

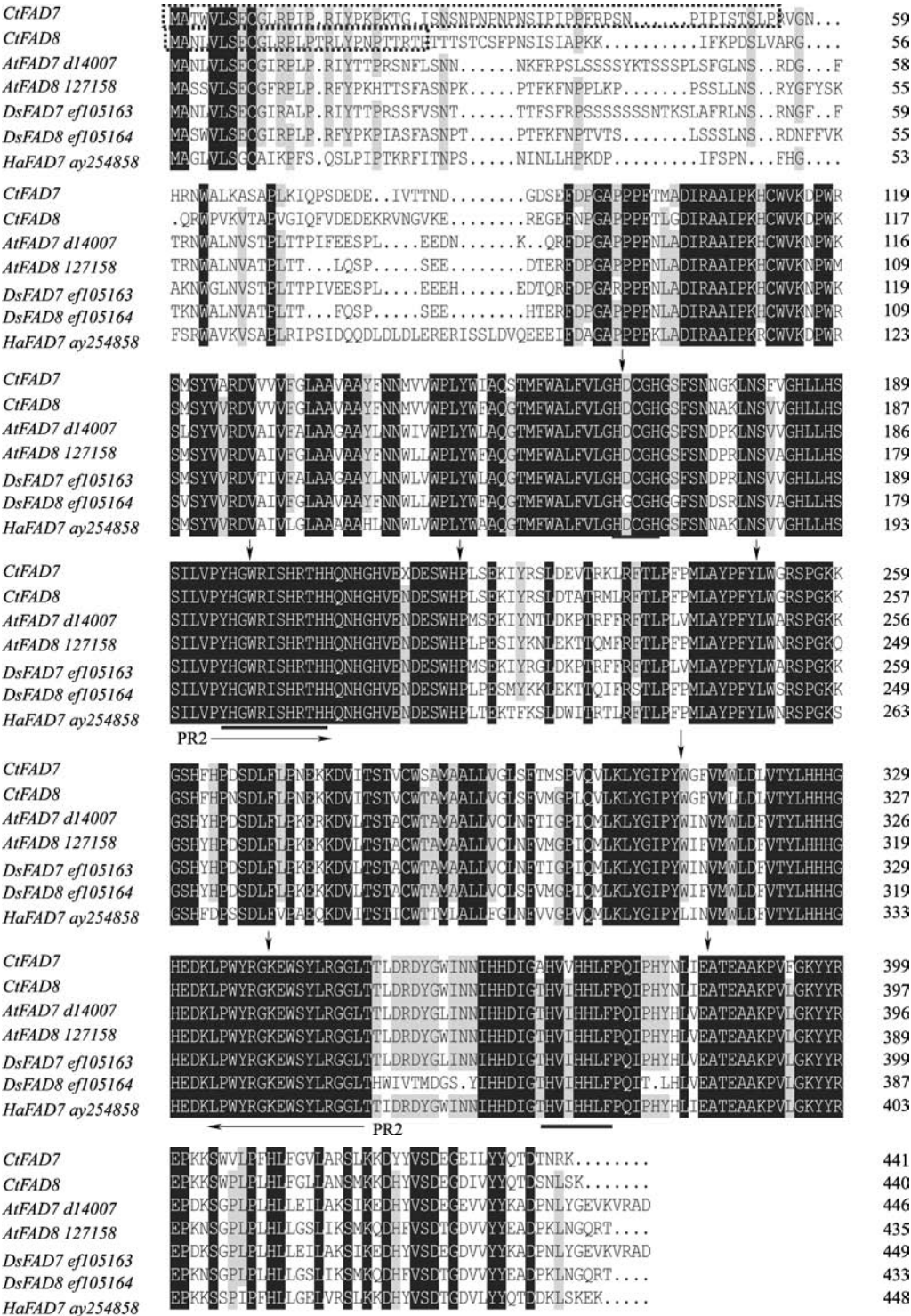
根据所得的 ω3 脂肪酸脱氢酶基因中间序列,分别对每条序列设计 2 条上游引物和 2 条下游引物,分别用于 3'和 5'-RACE。将获得的 3'和 5'端序列与中间片段进行序列比对,结果显示,*CtFAD7* 和 *CtFAD8* 的两端序列均与中间片段有重叠区域,初步断定该 3'和 5'端序列为 *CtFAD7* 和 *CtFAD8* 基因的两端非保守区序列。将各片段进行电子拼接,获得 *CtFAD7* 和 *CtFAD8* 的全长序列。分别在其 ORF 两端设计引物,扩增基因的全长 cDNA。

而对 *CtFAD3* 基因 3'/5'端序列比对发现,只有 5'端序列与中间编码区有重叠区,而 3'端序列则没有,因此,本研究中没有能获得红花 *FAD3* 基因的全长编码区序列。

2.2 基因序列分析

本研究首次从红花中分离到 2 个质体类 ω3 脂肪酸脱氢酶和 1 个微体类 ω3 脂肪酸脱氢酶片段 *CtFAD3*、*CtFAD7* 和 *CtFAD8*。其中, *CtFAD7* cDNA 全长 1671 bp,包含 248 bp 的 5'-UTR 和 103 bp 的 3'-UTR;ORF 为 1320 bp,编码氨基酸序列长度为 440 aa,分子量大小为 50.52 kD。 *CtFAD8* cDNA 全长1677 bp,包含 193 bp 的 5'-UTR 和 161 bp 的 3'-UTR;ORF 为 1323 bp,编码氨基酸序列长度为 441 aa,分子量为 50.18 kD。红花 *CtFAD3* 基因片段的序列长 839 bp,包括 65 bp 的 5'-UTR,编码区碱基序列 774 bp,编码氨基酸序列长 258 aa。

将氨基酸序列在 NCBI 中 Blast 分析,结果显示, *CtFAD7* 和 *CtFAD8* 与其他植物的质体类 ω3 脂肪酸脱氢酶具有很高的相似性(图 1),分别为 61% ~ 79%、63% ~ 78%,而 *CtFAD3* 与其他植物微体类 ω3 脂肪酸脱氢酶的相似性较高(图 2),为 60% ~ 93%。在 DNAMAN 中比对发现, *CtFAD7* 和 *CtFAD8* 的相似性较高,为 82.5%,而 *CtFAD7* 和 *CtFAD8* 分别与 *CtFAD3* 的相似性则相对较低,为 64.2%和 64.8%。



相似性高低分别用黑、灰、白色表示;N-端横线表示信号肽序列区,后面横线分别表示 3 个组氨酸保守区的位置。

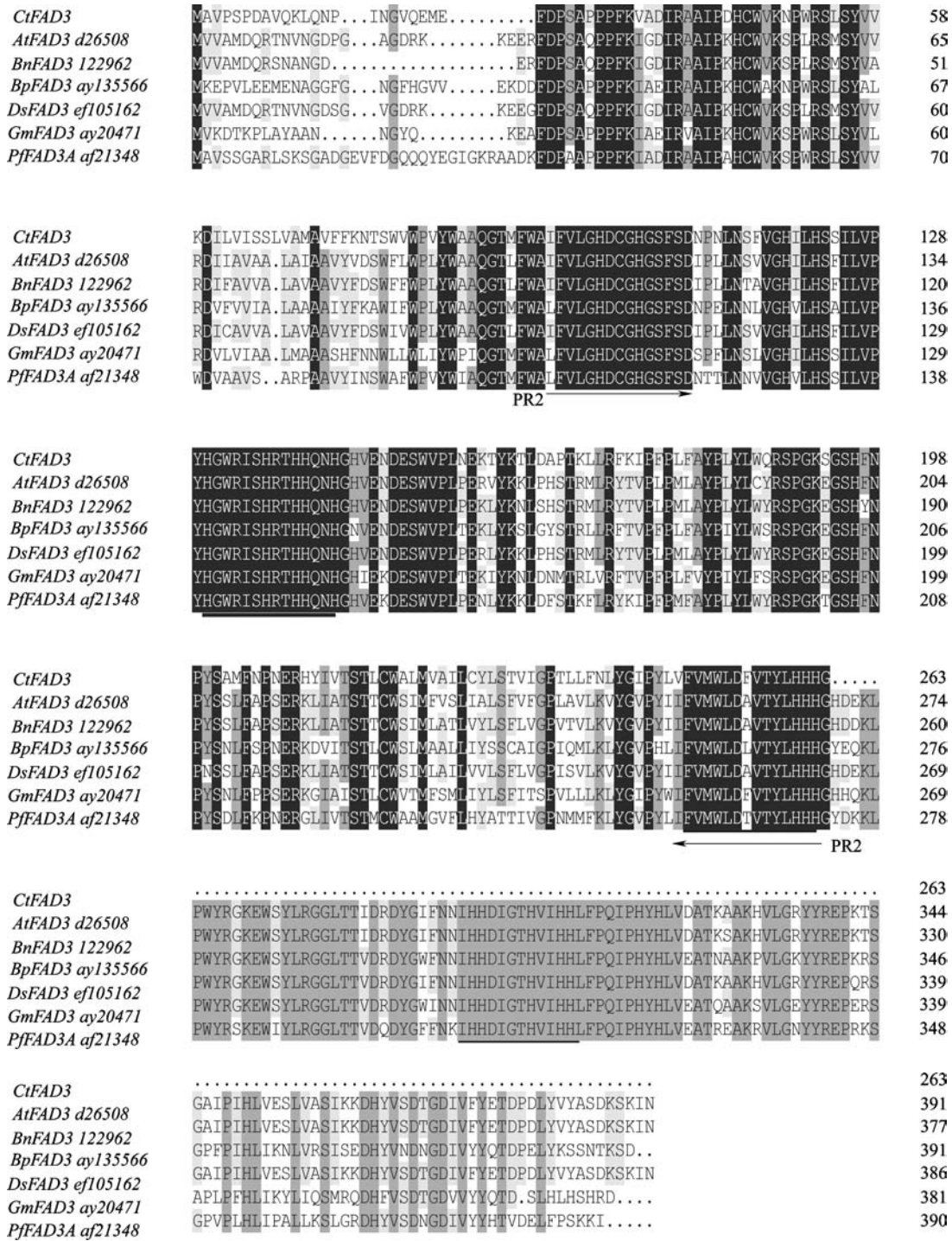
横向箭头标识引物 PF2 和 PR2 的位置,竖向箭头标识内含子在编码区的位置

Identical and similar amino acids residues are shaded with black, gray, and white respectively. N-terminal chloroplast signal peptide and the three characteristic histidine boxes encountered in $\omega 3$ fatty acid desaturase are underlined.

The horizontal arrows indicate the locations of the primers PF2 and PR2. While vertical arrows indicate the location of the introns

图 1 红花 *FAD7* 和 *FAD8* 与拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) *FAD7/8*、播娘蒿 (*Descurainia sophia*) *FAD7/8*、向日葵 (*Helianthus annuus*) *FAD7* 的质体 $\omega 3$ 脂肪酸脱氢酶基因的同源性比对

Fig. 1 Alignment of the deduced amino acids sequences of safflower *FAD7*, *FAD8* polypeptides and other plant plastidial $\omega 3$ fatty acid desaturase



相似性高低分别用黑、灰、白色表示;后面横线分别表示 3 个组氨酸保守区的位置;横向箭头标识引物 PF2 和 PR2 的位置
Identical and similar amino acids residues are shaded with black, gray, and white respectively. The three characteristic histidine boxes encountered in $\omega 3$ fatty acid desaturase are underlined. The arrows indicate the locations of the primers PF2 and PR2

图 2 红花 *FAD3* 片段与拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*)、油菜 (*Brassica napobrassica*)、垂枝桦 (*Betula pendula*)、播娘蒿 (*Descuminia sophia*)、大豆 (*Glycine max*)、紫苏 (*Perilla frutescens*) 的微体 $\omega 3$ 脂肪酸脱氢酶氨基酸序列的同源性比对

Fig. 2 Alignment of the deduced amino acids sequences of between safflower *FAD3* polypeptides and other plant microsomal $\omega 3$ fatty acid desaturase

对该 3 个基因的氨基酸结构进行分析,结果表明红花 ω3 脂肪酸脱氢酶均含有 3 个富含组氨酸的保守结构域,分别为 HDCGH、HXXXXXHRTHH 和 HVI-HH,与其他植物中报道的基序相似,只有 *CtFAD7* 基因中第 3 个保守区略有不同,为 HVVHH。大量研究报道表明,这 3 个氨基酸基序是膜上脂肪酸脱氢酶氨基酸序列的典型特征,主要构成酶的活性中心,与 Fe^{2+} 结合,参与酶的催化作用。

对 3 个红花 ω3 脂肪酸脱氢酶氨基酸序列在

PSORT (<http://psort.hgc.jp/form.html>) 上进行亚细胞定位预测。结果显示,*CtFAD7* 和 *CtFAD8* 在 N-端分别含有 56 aa 和 27 aa 的质体信号肽序列,并将其定位于质体膜上。不同植物种类的质体 ω3 脂肪酸脱氢酶氨基酸序列主要差异存在于质体信号肽序列,而其余片段在不同物种间较保守。

2.3 亲/疏水性及跨膜分析

对红花 *CtFAD7* 和 *CtFAD8* 蛋白进行疏水性分析(图 3),结果表明,在氨基酸序列的中间部分,

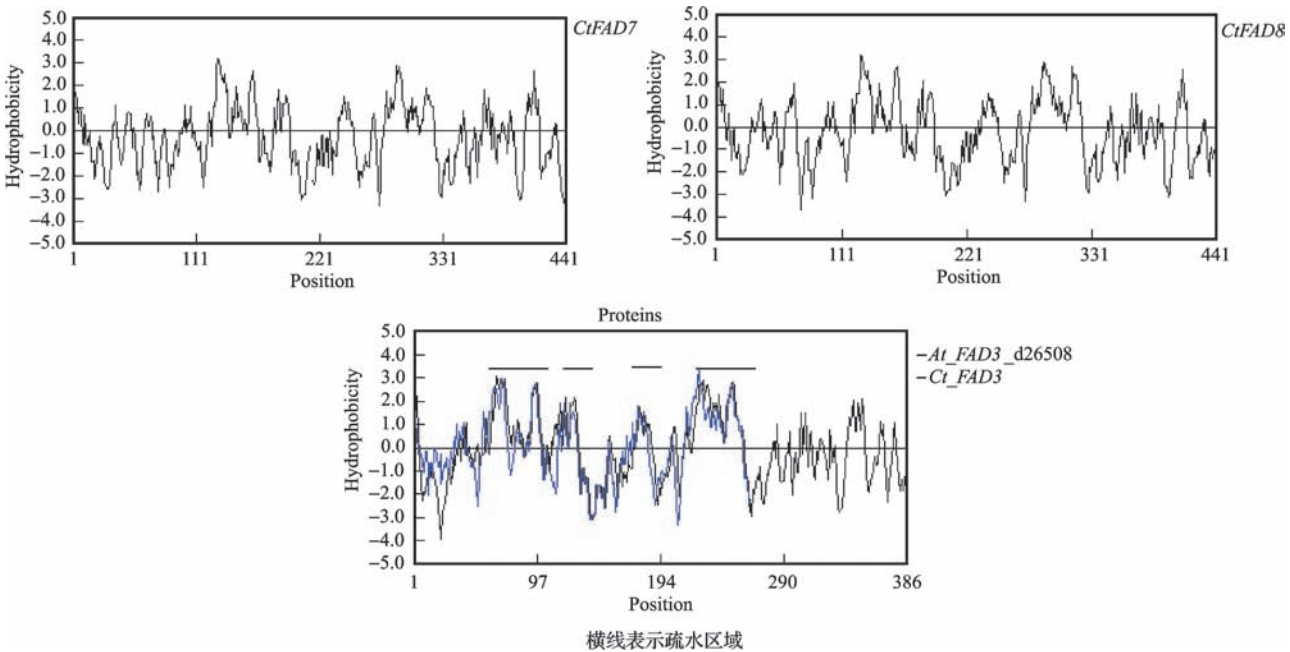


图 3 红花 ω3 脂肪酸脱氢酶基因疏水性分析

Fig. 3 Hydrophobicity profiles of Safflower ω3 fatty acids desaturase

均含有 4 个明显的疏水区域。在图中已分别用横线标注出。其中第 1[#]和第 4[#]较长。中间 2 个疏水区 2[#]和 3[#]的疏水区长度较短。由于本研究中没有获得红花 *CtFAD3* 的全序列,因此将其与拟南芥中的同类基因 *AtFAD3* (GenBank No. d26508) 进行比较分析。由图 3 可知,*CtFAD3* 与 *AtFAD3* 的疏水性结构非常相似,也含有 4 个疏水区;第 1[#]、第 4[#]疏水区长度较长,而第 2[#]、第 3[#]较短。尽管红花 *CtFAD3* 不是全长序列,但刚好包含了 4 个重要的疏水区。

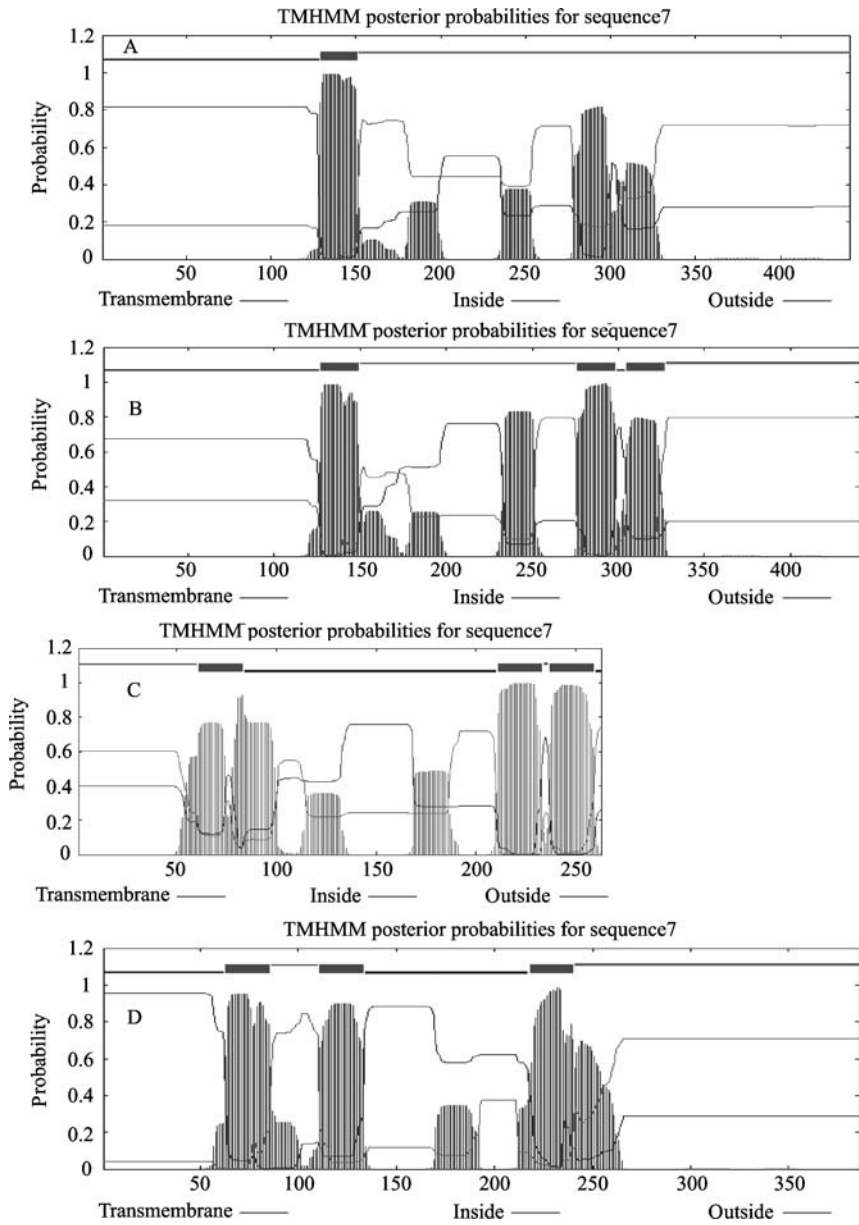
对红花 ω3 脂肪酸脱氢酶氨基酸进行在线跨膜预测,结果如图 4 所示,红花 *CtFAD7* 基因含有 4 个疏水区,与 DNAMAN 中预测结果一致,其中第 1[#]疏水区完成 1 次跨膜。红花 *CtFAD8* 同样含有 4 个疏水区,其中第 4[#]疏水区,其实是 2 个连续的短疏水区组成,可连续跨膜 2 次。另外第 1[#]疏水区也跨膜 1 次,因此 *CtFAD8* 总共跨膜 3 次。*CtFAD7* 和 *Ct-*

FAD8 的中间 2 个疏水区均没有跨膜。

红花 *CtFAD3* 的跨膜分析与 *CtFAD8* 相似,总共跨膜 3 次,分别由第 1[#]和第 4[#]疏水区完成,其中第 4[#]疏水区连续跨膜 2 次,而中间 2 个短的疏水区并没有跨膜。而拟南芥 *AtFAD3* 则与红花 *CtFAD3* 不同,同样是跨膜 3 次,却是由第 1[#]、2[#]、4[#]疏水区分别完成的。

2.4 氨基酸序列二级结构预测

在 DNASTAR 软件中采用 D. Eisenberg 等^[18]的方法,对红花 ω3 脂肪酸脱氢酶蛋白进行二级结构预测(图 5)。结果显示,红花 *CtFAD7* 和 *CtFAD8* 相似,均含有大量的 α 螺旋和 β 折叠,二者占氨基酸全序列的 73% 以上,其余为转角和无规则卷曲。*CtFAD7* 和 *CtFAD8* 分别含 α 螺旋 27 和 25 个,β 折叠 31 和 42 个,尽管数目差别较大,但主要是在一些短小区域上,区域较大的 α 螺旋和 β 折叠的位置和数目却非常相似。从整体上看,这些 α 螺旋和 β 折



A: *CtFAD7*, B: *CtFAD8*, C: *CtFAD3*, D: *AtFAD3* (GenBank No. d26508)

图 4 红花 $\omega 3$ 脂肪酸脱氢酶氨基酸序列跨膜分析

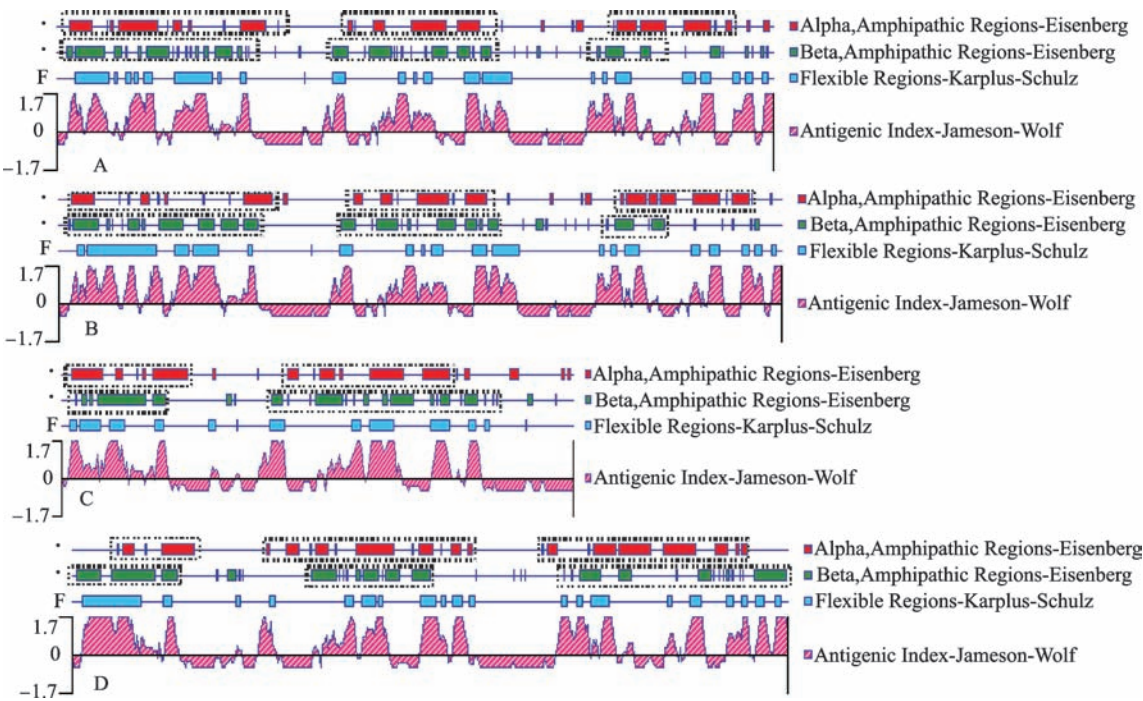
Fig. 4 Transmembrane analysis of safflower $\omega 3$ fatty acids amino acids sequences

叠主要分布在 3 个区域,在图中分别用虚线的方框表示,推测这与酶的跨膜特性密切相关。本研究中所分离到的红花 *CtFAD3* 片段只包含 2 个 α 螺旋区域。

2.5 基因结构分析

以红花基因组 DNA 为模板,PF/R7-3 和 PF/R8-3 为引物,PCR 扩增得到长度分别为 2384 bp 和 2131 bp 的 *Ctg (genomic) FAD7* 和 *CtgFAD8* 序列。通过比较 *CtgFAD7* 和 *CtgFAD8* 与其对应的 cDNA 序列,发现 2 个基因的 DNA 序列中均包含有 7 个内含子,8 个外显子。本研究同时将所有在 NCBI 上具有 DNA 序列信息的质体 $\omega 3$ 脂肪酸脱氢酶基因进

行结构分析发现,除水稻基因组 *OsgFAD8* 外,所有质体 $\omega 3$ 脂肪酸脱氢酶基因与红花 *CtgFAD7* 和 *CtgFAD8* 相似,也含有 7 个内含子、8 个外显子(图 6)。比较各外显子的长度发现,各基因除第 1[#]和最后 8[#]外显子以外,所有中间的外显子的长度在物种间非常保守:2[#]:90 bp;3[#]:67 bp;4[#]:93 bp;5[#]:186 bp;6[#]:81 bp;7[#]:138 bp。而各内含子在物种间则表现出丰富的多态性,序列和长度大小均各不相同。总体上看,水稻和玉米 *FAD7* 和 *FAD8* 的第 6[#]内含子明显(其中水稻 *FAD8* 为第 5[#]内含子)要比该基因中其余内含子长,这是否是单子叶植物在该基因上特殊



A: *CtFAD7*, B: *CtFAD8*, C: *CtFAD3*, D: *AtFAD3* (GenBank no. d26508)

图 5 红花油酸脱氢酶蛋白质二级结构预测

Fig. 5 Secondary structure prediction of safflower oleate desaturase protein

的结构还有待更多数据的证实。将各内含子的位置表现在氨基酸序列上发现(图 1),在内含子出现的位置,均为该基因的保守区。通过比较水稻与其他植物(图 6)该基因内含子的位置及外显子的大小,发现水稻 *OsgFAD8* 发生了第 1[#]内含子的丢失,其余保守外显子序列大小和内含子的位置均与其他物种相似。

3 讨论

3.1 植物中的 *FAD3* 基因与种子亚麻酸含量的关系

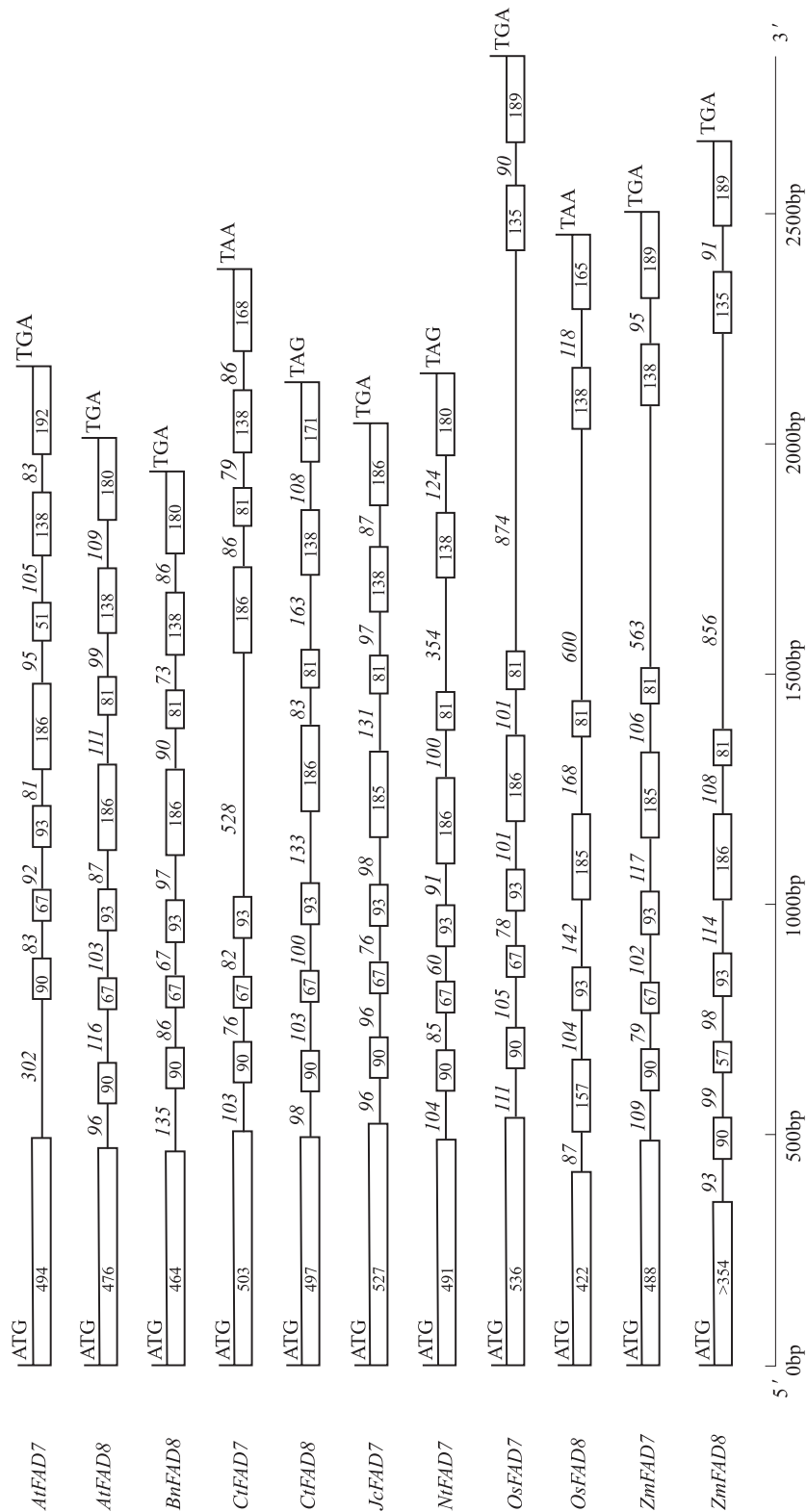
$\omega 3$ 脂肪酸脱氢酶主要分为定位于内质网的 *FAD3* 和定位于质体的 *FAD7/FAD8*。其中植物 *FAD3* 是调控种子 α -亚麻酸 (18:3) 合成的主要贡献者,同时也在其他非光合组织,如根、茎、花等器官膜脂的去饱和过程中起着重要作用。而 *FAD7* 和 *FAD8* 主要与叶绿体等内囊体膜脂的去饱和有关。油料作物种子中 α -亚麻酸的含量与 *FAD3* 的拷贝数目有着密切的关系。在亚麻、紫苏、大豆等富含 α -亚麻酸的油料作物中,均分离到 2 ~ 3 个拷贝的 *FAD3*^[19,11,8]。而 M. Venegas-Calerón 等^[12]在向日葵中只分离到质体 $\omega 3$ 脂肪酸脱氢酶基因,认为向日葵种子中微量的 α -亚麻酸是 *HaFAD7* 催化合成的。与向日葵相似,红花子油中不含(微量) α -亚麻酸。但本研究却分离到 1 个微体 $\omega 3$ 脂肪酸脱氢酶基因的部分序列, *CtFAD3*。虽然本研究中并没有获得该

基因的全长序列,但至少证明红花中存在微体 $\omega 3$ 脂肪酸脱氢酶基因。因此,红花中不含(微量) α -亚麻酸可能与该基因转录调控或酶活性有关。

3.2 红花 $\omega 3$ 脂肪酸脱氢酶基因的生物信息学分析

红花 $\omega 3$ 脂肪酸脱氢酶基因所编码的氨基酸序列同其他所有定位在膜上的脂肪酸脱氢酶相似,均具有 3 个富含组氨酸的保守区域,被认为是构成酶活性中心与 Fe^{2+} 所必需的^[20]。对 *CtFAD7* 和 *CtFAD8* 的氨基酸序列进行亚细胞定位分析,发现其 N-端分别检测到 56 aa 和 27 aa 的质体信号肽序列,可能定位于叶绿体膜上。而 *CtFAD3* 没有检测到 N-端信号肽序列,且与其他植物 *FAD3* 基因高度的相似性,所有植物类 *FAD3* 氨基酸序列 C-端均含有 KKXX 内质网滞留信号,因此推测 *CtFAD3* 也是定位于内质网膜上的酶。

疏水性分析结果显示, *CtFAD7* 和 *CtFAD8* 均含有 4 个疏水区,其中第 1[#]和第 4[#]较长。跨膜分析结果显示, *CtFAD7* 和 *CtFAD8* 分别跨膜 1 次和 3 次,均由第 1[#]和第 4[#]疏水区完成。为研究是否所有定位于质体上脂肪酸脱氢酶氨基酸序列的中间 2 个短疏水区均不跨膜,本研究对大量植物质体 $\omega 3$ 脂肪酸脱氢酶的跨膜进行分析,结果表明,并不是所有质体类脂肪酸脱氢酶的中间 2 个短疏水区都不能跨膜,至少玉米 *ZmFAD7* (GenBank No. d63954) 的第 3[#]疏



外显子和内含子分别由方框和横线表示,其碱基个数分别由数字表示,同时起始密码子(ATG)和终止密码子(TGA、TAG或TAA)均标注在序列两端
Exons and introns are indicated by clear boxes and lines respectively. The length of each exon is shown in the box, while the length of each intron is shown above the lines.
The exon/intron structures corresponding to the regions from the initiation codon (ATG) and termination (TGA, TAG or TAA) codons are shown

图 6 红花 *CtFAD7*、*CtFAD8* 以及其他植物体质类 $\omega 3$ 脂肪酸脱氢酶基因结构示意图
Fig. 6 Organization of safflower *CtFAD7* and *CtFAD8* genes with reference to other higher plant plastidial $\omega 3$ fatty acids desaturases genes

水区就完成 1 次跨膜。

另外,红花 *CtFAD3* 与拟南芥中的同类基因 *AtFAD3* 进行比较发现该基因也含有 4 个疏水区;第 1[#]、第 4[#]疏水区长度较长,而 2[#]、3[#]较短。其中第 4[#]疏水区连续跨膜 2 次,而中间 2 个短的疏水区并没有跨膜。而拟南芥 *AtFAD3* 则与红花 *CtFAD3* 不同,同样是跨膜 3 次,却是由第 1[#]、第 2[#]、第 4[#]疏水区分别完成的。对大量植物的 *FAD3* 基因进行跨膜预测(油橄榄 *OeFAD3*, GenBank No. abg88130; 油菜 *BnFAD3*, 122962; 播娘蒿 *DsFAD3*, ef105162; 大豆 *GmFAD3*, ay204710 等),结果显示,植物 *FAD3* 的跨膜较同为微体类脂肪酸脱氢酶的 *FAD2* 更为复杂,第 1[#]、第 4[#]疏水区跨膜 0~2 次,中间 2[#]、3[#]疏水区分别跨膜 0~1 次,但总跨膜次数均在 3~6 次。

3.3 质体 ω3 脂肪酸脱氢酶基因中内含子的功能

本研究分离获得 2 个质体类 ω3 脂肪酸脱氢酶基因 *CtFAD7* 和 *CtFAD8* 的全长 cDNA 和 DNA 序列。序列比较发现,2 个基因均含有 7 个内含子和 8 个外显子,并且位于中间的 6 个外显子的长度在物种间非常保守。M. Long 等^[21]的研究表明,基因中内含子的功能不仅仅是为了调节阅读框的位置,产生更多的基因,某些内含子还具有启动子和增强子的功能,调控基因的表达模式和表达量,以及对环境的应答等。另外,在转录的过程中,通过 RNA 剪接酶对内含子的剪切,能够使基因更精确的转录,因此内含子的另一个功能则是使基因在物种的进化过程更保守^[22-24]。

本研究将各内含子的位置标注在氨基酸序列上发现(图 1),在内含子出现的位置,均为该酶的保守区域。其中第 1[#]和第 2[#]内含子的位置均位于第 1 和第 2 个组氨酸保守区内。这就进一步证实了 M. Long 等^[21]的观点,因此 ω3 脂肪酸脱氢酶基因的内含子对于保证基因在物种进化过程中功能的保守性起着关键的作用。在水稻中,*OsgFAD8* 只含有 6 个内含子,通过与其他物种该基因的外显子长度和内含子位置的比较发现,*OsgFAD8* 基因的第 1[#]内含子发生了丢失,其余外显子和内含子的位置均与其他物种相似,这与 H. Kodama 等^[25]对水稻脂肪酸脱氢酶基因结构的研究结果相同。

参考文献

[1] Harwood J L. Fatty acid metabolism [J]. Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol,1988,39:101-138
[2] 刘训言,孟庆伟,李滨. 植物 omega-3 脂肪酸去饱和酶研究进展[J]. 细胞生物学杂志,2004,26(1):34-38
[3] Iba K, Gibson S, Nishiuchi T, et al. A gene encoding a chloroplast omega-3 fatty acid desaturase complements alterations in fatty acid desaturation and chloroplast copy number of the *fad7* mutant

of *Arabidopsis thaliana* [J]. J Biol Chem, 1993, 268 (32): 24099-24105
[4] Gibson S, Arondel V, Iba K, et al. Cloning of a temperature-regulated gene encoding a chloroplast omega-3 desaturase from *Arabidopsis thaliana* [J]. Plant Physiol, 1994, 106 (4): 1615-1621
[5] Kodama H, Akagi H, Kusumi K, et al. Structure, chromosomal location and expression of a rice gene encoding the microsomal omega-3 fatty acid desaturase [J]. Plant Mol Biol, 1997, 33 (3): 493-502
[6] Reed D W, Schafer U A, Covello P S, et al. Characterization of the *Brassica napus* extraplastidial linoleate desaturase by expression in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. Plant Physiol, 2000, 122: 715-720
[7] Bilyeu K D, Palavalli L, Slepser D A, et al. Three microsomal omega-3 fatty-acid desaturase genes contribute to soybean linolenic acid levels [J]. Crop Sci, 2003, 43: 1833-1838
[8] Andreu V, Lagunas B, Collados R, et al. The *GmFAD7* gene from soybean: identification of novel genes and tissue-specific conformations of the FAD7 enzyme involved in desaturase activity [J]. J Exp Bot, 2010, 61 (12): 3371-3384
[9] Patricia V, Hu Z Y, Munchinsky M A, et al. Two FAD3 desaturase genes control the level of linolenic acid in flax seed [J]. Plant Physiol, 2005, 139: 79-87
[10] Horiguch G, Iwakawa H, Kodama H, et al. Expression of a gene for plastid omega-3 fatty acid desaturase and changes in lipid and fatty acid compositions in light- and dark-grown wheat leaves [J]. Physiol Plant, 1996, 96: 275-283
[11] Chung C H, Kim J L, Lee Y C, et al. Cloning and characterization of a seed-specific ω3 fatty acid desaturase cDNA from *Perilla frutescens* [J]. Plant Cell Physiol, 1999, 40 (1): 114-118
[12] Venegas-Calderón M, Beaudoina F, Garcésb R, et al. The sunflower plastidial ω3-fatty acid desaturase (*HaFAD7*) contains the signalling determinants required for targeting to, and retention in, the endoplasmic reticulum membrane in yeast but requires co-expressed ferredoxin for activity [J]. Phytochemistry, 2010, 71(10): 1050-1058
[13] Tang S Y, Guan R Z, Zhang H S, et al. Cloning and expression analysis of three cDNAs encoding omega-3 fatty acid desaturases from *Descurainia sophia* [J]. Biotech Lett, 2007, 29 (9): 1417-1424
[14] Niu B, Guo L, Zhao M, et al. Molecular cloning, characterization, and expression of an omega-3 fatty acid desaturase gene from *Sapium sebiferum* [J]. J Biosci Bioeng, 2008, 106: 375-380
[15] 董贵俊, 刘公社, 潘卫东. 向日葵种质资源维生素 E 含量及相关变量的初步评价 [J]. 植物遗传资源学报, 2005, 6 (2): 178-181
[16] 赵欢, 吴卫, 郑有良, 等. 应用 RAMP 分子标记研究红花资源遗传多样性 [J]. 植物遗传资源学报, 2007, 8 (1): 64-71
[17] Murray M, Thopson W F. Rapid isolation of molecular weight plant DNA [J]. Nucleic Acid Res, 1980, 8: 4321-4325
[18] Eisenberg D, Wilcox W, McLachlan A D. Hydrophobicity and amphiphilicity in protein structure [J]. J Cell Biochem, 1986, 31 (1): 11-17
[19] Vrinten P, Hu Z Y, Munchinsky M A, et al. Two FAD3 desaturase genes control the level of linolenic acid in flax seed [J]. Plant Physiol, 2005, 139 (1): 79-87
[20] Shanklin J, Whittle E, Fox B G. Eight histidine residues are catalytically essential in a membrane-associated iron enzyme, stearoyl-CoA desaturase, and are conserved in alkane hydroxylase and xylene monooxygenase [J]. Biochemistry, 1994, 33 (43): 12787-12794
[21] Long M, Rosenberg C, Gilbert W. Intron phase correlations and the evolution of the intron/exon structure of genes [J]. Proc Natl Acad Sci, 1995, 92(26): 12495-12499
[22] Bolle C, Herrmann R G, Oelmüller R. Intron sequences are involved in the plastid- and light-dependent expression of the spinach *PsaD* gene [J]. Plant J, 1996, 10 (5): 919-924
[23] Deyholos M K, Sieburth L E. Separable whorl-specific expression and negative regulation by enhancer elements within the AGAMOUS second intron [J]. Plant Cell, 2000, 12 (10): 1799-1810
[24] Maniatis T, Tasic B. Alternative pre-mRNA splicing and proteome expansion in metazoans [J]. Nature, 2002, 418: 236-243
[25] Kodama H, Akagi H, Kusumi K. Structure, chromosomal location and expression of a rice gene encoding the microsomal omega-3 fatty acid desaturase [J]. Plant Mol Biol, 1997, 33 (3): 493-502