

水稻*OsFAD2*、*OsFAD6*的克隆及其家族成员对非生物胁迫的响应

曹英萍, 石金磊, 李钟, 明凤

复旦大学生命科学学院 植物科学研究所 遗传工程国家重点实验室, 上海 200433

摘要: 植物中的不饱和脂肪酸由脂肪酸去饱和酶 (Fatty acid desaturase, FAD) 合成, 它在植物的生长发育以及植物非生物胁迫方面起着重要的作用。文章采用RT-PCR方法, 从水稻日本晴 (*Oryza sativa* L.) 中克隆了分别与*FAD2*、*FAD6*同源的脂肪酸脱氢酶序列, 命名为*OsFAD2*和*OsFAD6*。*OsFAD2*的ORF为1 167 bp, 推测其编码蛋白含有388个氨基酸, 等电点为8.17, 分子量为52.24 kDa, C端有内质网定位序列; *OsFAD6*的ORF长度为1 365 bp, 推测编码454个氨基酸的蛋白质序列, 分子量44.35 kDa, 等电点为9.24, 推测N端38个氨基酸为叶绿体导肽。两者都具有膜整合脂肪酸去饱和酶特有的3个组氨酸簇。RT-PCR分析表明, *OsFAD2*和*OsFAD6*在水稻所有器官中都表达, 在叶中表达量为最高。在水稻FAD基因家族, 叶中*OsFAD2*、*OsFAD6*的mRNA对低温不响应, 而*OsFAD7*和*OsFAD8*的mRNA在低温下上升。水稻叶中*OsFAD2*、*OsFAD6*、*OsFAD3*和*OsFAD7*的mRNA表达具有昼夜节律性, 在光照下表达量低, 而在随后的黑暗中表达量高, *OsFAD6*和*OsFAD7* mRNA表达的昼夜节律性可能与水稻幼苗叶片中NADPH量的改变有关。

关键词: 水稻; 脂肪酸去饱和酶; 非生物胁迫; 昼夜节律; 表达谱

Isolation of *OsFAD2*, *OsFAD6* and FAD family members response to abiotic stresses in *Oryza sativa* L.

CAO Ying-Ping, SHI Jin-Lei, LI Zhong, MING Feng

State Key Laboratory of Genetic Engineering, Institute of Plant Biology, School of Life Science, Fudan University, Shanghai 200433, China

Abstract: Unsaturated fatty acids are synthesized by fatty acid desaturase in plant, which play an important role in plant development and defense to abiotic stresses. The key enzymes for the conversion of oleic into linoleic acid were isolated from rice (*Oryza sativa* L.) and were designated *OsFAD2* and *OsFAD6*, respectively. The open reading frame (ORF) of *OsFAD2* was 1 167 bp in length, which encoded a 388 amino acids sequence with the isoelectric point of 8.17 and molecular mass of 52.24 kDa, the *OsFAD2* protein contained a C-terminal ER retrieval motif. The ORF of *OsFAD6* was 1 365 bp in length and the predicted *OsFAD6* protein has 454 amino acids with an estimated molecular mass of 44.35 kDa and an isoelectric point of 9.24, the predicted *OsFAD6* protein possessed a putative N-terminal plastidial signal peptide. Both of them had three his-boxes, which were peculiar to membrane integrated fatty acid desaturase by Clustalx analysis. RT-PCR analysis showed that both genes were expressed in all tissues rice seedlings, with the maximum transcript accumulation in leaves. Among FAD family members of *Oryza sativa* L., the mRNA abundance of *OsFAD2* and *OsFAD6* in leaves did not change under cold stress; however, the mRNA abundance of *OsFAD7* and *OsFAD8* increased in the same condition. It was

收稿日期: 2009-10-23; 修回日期: 2010-01-08

基金项目: 国家 863 项目 (编号: 2008AA10Z116), 转基因生物新品种培育重大专项

(编号: #2008ZX08009-001), 上海市青年科技启明星计划 (编号: 08QH14003), 上海市科委重点科技攻关项目 (编号: 08391910400)和国家基础科学人才培养基金项目 (编号: J0630643) 资助。

作者简介: 曹英萍 (1985—), 女, 硕士, 专业方向: 植物遗传学。 Tel: 021-55665397;

E-mail: 072023108@fudan.edu.cn。

通讯作者: 明凤 (1971—), 女, 副教授, 博士, 研究方向: 植物遗传学。 Tel: 021-55665397;

E-mail: fming@fudan.edu.cn。

also found that the expression of FAD family members had diurnal rhythm phenomena. Based on the results of this study, it suggested that diurnal rhythm expression of *OsFAD6* and *OsFAD7* was related to the change of NADPH abundance.

Keywords: *Oryza sativa* L.; fatty acid desaturase; abiotic stress; diurnal rhythm; expression pattern.

高等植物细胞膜的特征之一就是含有大量的不饱和脂肪酸, 它们主要由脂肪酸去饱和酶 (Fatty acid desaturase, FAD) 合成^[1]。植物脂肪酸去饱和酶可以分为两大类: 一类在脂肪酸形成甘油酯之前引入第一个双键, 仅包括 18:0-ACP, 它是唯一的可溶性脂肪酸去饱和酶; 另一类在脂肪酸形成甘油酯之后在脂肪酸基团引入后面的双键, 主要包括 7 种 (FAD2、FAD3、FAD4、FAD5、FAD6、FAD7 和 FAD8)^[2], 其中 FAD2 与 FAD3 定位在内质网, 以 NADH 为电子供体, 而其他的 FAD 则位于叶绿体, 以 NADPH 为电子供体^[3]。FAD4 和 FAD5 以 16 碳原子的脂肪酸为底物, 催化 16:1 的脂肪酸生成 16:2 脂肪酸; 而 FAD2、FAD3、FAD6 和 FAD7 都是以 18 碳原子的脂肪酸为底物。FAD2、FAD6 是将油酸 (18:1) 催化生成亚油酸 (18:2), 在 ω -6 (Δ -12) 位置引入双键; FAD3、FAD7、FAD8 则是将亚油酸催化生成亚麻酸 (18:3), 在 ω -3 位引入双键 (Δ -15)^[3]。

植物中 C18 不饱和脂肪酸的组成是决定油脂品质的重要指标之一, 在生产上具有重要意义, 所以催化 C18 脂肪酸去饱和的酶及其编码基因一直受到研究工作者的普遍关注。1993 年, 拟南芥的 *FAD7* 被克隆以后^[4], 其 *FAD8*^[5]、*FAD2*^[6]、*FAD6*^[7] 也相继被克隆。大豆 (*Glycine max*)^[8]、油菜 (*Brassica napus*)^[8]、橄榄 (*Olea europaea*)^[9]、马齿苋 (*Portulaca oleracea*)^[10] 与玉米 (*Zea mays*)^[11] 等植物中也相继分离出 *FAD* 基因。在基因表达调控方面的研究也有一定进展, 光照条件下大豆 *FAD7* mRNA 的稳定性差, 而黑暗下 *FAD7* mRNA 稳定性好, 不易降解^[12]。藻类中也发现光照强度的变化可以改变藻类不饱和脂肪酸的含量^[13,14]。除了光照因素外, 不饱和脂肪酸相比于同样碳原子的饱和脂肪酸具有更低的相变温度^[15], 因此植物细胞膜中不饱和脂肪酸的含量与低温胁迫密切相关。15℃ 处理水稻 5 d 后, 其 *FAD8* mRNA 的量比对照增加了数倍^[16]。拟南芥^[17] 和玉米^[18] 中, 均指出 *FAD8* 具有低温诱导表达的特性。棉花的 *FAD2* 也受到光照和低温的调节^[19]。

不饱和脂肪酸在植物抵抗冷害等不利环境因子方面起着重要的作用^[20], 对其表达调控的深入研究可以帮助人们通过基因工程的手段来改变植物细胞膜中脂肪酸的组成, 从而达到提高植物抗逆性和育性, 获得含有特定脂肪酸组成的农产品^[21]。例如, 将拟南芥的 *FAD7*

基因转入烟草,发现转基因植株受到冷害程度远远低于野生型植株^[20];而抑制水稻中 *FAD7* 和 *FAD8* 的表达获得了抗病性高的水稻植株^[22]。

水稻是我国目前种植面积最广的农作物之一,其种植范围主要受到低温的限制^[16]。因此,深入研究水稻中的脂肪酸去饱和酶,对提高水稻的耐冷性以及水稻品质的改良具有一定的意义。继 1997 年水稻 *FAD3* (*OsFAD3*)^[23] 被克隆以后,*FAD7* (*OsFAD7*)^[22] 和 *FAD8* (*OsFAD8*)^[16] 也相继被克隆,并且功能也得到部分验证。本研究首次克隆了水稻的 *FAD2* 和 *FAD6* (*OsFAD2*、*OsFAD6*) 基因,并对其进行序列分析。同时对水稻 FAD 家族成员的表达及其对低温和光照非生物胁迫的响应进行了初步研究,为进一步明确两者在机体中的作用机理,确定水稻 FAD 家族中其他成员的功能,以及水稻优良品种的获得提供一定的理论和应用基础。

1 材料和方法

1.1 材料

将水稻日本晴 (*Oryza sativa* L.) 的种子放在八连管中,定期更换水分,待种芽长度为 3 cm 时,将水稻苗移入营养液。水稻营养液配方参考 Yoshida (1976)^[24] 并进行部分改进,pH 值为 5.5。每 3 d 更换一次营养液,置于植物光照培养箱中培养。培养条件为昼 16 h/夜 8 h,温度为 32℃。

1.2 方法

1.2.1 RNA 的提取及 cDNA 的获得

取三叶期的水稻幼苗,对其根、茎、叶分别取样,成熟种子直接取样。利用 RNAi plus 试剂盒(TaKaRa Biotechnology Co., LTD),按照试剂盒使用说明提取 RNA。采用 TaKaRa premix ExTaq™ 逆转录试剂盒(TaKaRa Biotechnology Co., LTD)进行逆转录,获得水稻 cDNA,待用。

1.2.2 *OsFAD2* 和 *OsFAD6* 的克隆

根据 NCBI 上推测的 *OsFAD2* 序列 (NM_001054462) 和 Tigr 上推测的 *OsFAD6* 序列 (LOC_Os08g34220) 设计两个基因的特意扩增引物:

OsFAD2: F: 5'-CGGAGCTCATGGCGGCGTCGGCGA-3';

R: 5'-CGGGTTACCTTAGAACTTGTGTGTACC-3';

OsFAD6: F: 5'-GCGAGCTCCCCCGCTGCTACCAGAG-3';

R: 5'-GCGGGTACCGCAAACACCAGCCAACAG-3'。

以根、茎、叶和种子混合的 cDNA 为模板,PCR 扩增程序为: 94℃ 3 min; 94℃ 40 s,

55℃ 40 s, 72℃ 1 min 30 s; 30 个循环; 最后 72℃ 延伸 10 min。扩增用的酶为 TOYOBO 公司的高保真性 *KOD plus* 试剂盒。将扩增产物连接到 pMD18-T 载体 (TaKaRa Biotechnology Co.), 转化大肠杆菌, Amp 抗性培养基进行筛选。PCR 鉴定阳性克隆后, 摇菌, 提取质粒, 酶切与 PCR 鉴定后, 送上海生工生物工程技术有限公司采用双脱氧终止法进行测序。

1.2.3 水稻 FAD 家族各成员的表达模式分析

取三叶期的水稻苗, 分别提取叶片、根和茎的 RNA, 反转录成为 cDNA 作为模板, 反转录方法同 1.2.1, 以 *OsActin* 基因为内参, 设计扩增水稻 *OsFAD2*、*OsFAD6*、*OsFAD7*、*OsFAD3*、*OsFAD8* 基因的特异性引物 (引物信息见表 1)。PCR 扩增程序: 94℃ 3 min; 94℃ 30 s, 55℃ 30 s, 72℃ 30 s, 30 个循环; 最后再 72℃ 延伸 7 min。

低温处理温度为 5℃, 处理时间为 8 h; 对照组为同样的光照条件, 温度为 32℃。

暗处理温度为 32℃, 完全黑暗。即光照 16 h 后, 进行黑暗处理, 8 h、1 d 和 2 d 处取样。异丙隆 (N'-(4-异丙苯基)-N,N-二甲基脲, 江苏禾业农化有限公司) 处理方法是茎叶喷施, 浓度 10 mg/mL, 正常光周期培养昼 16 h/夜 8 h, 3 d 后取样。

表 1 扩增水稻 *OsFAD2*、*OsFAD3*、*OsFAD6*、*OsFAD7*、*OsFAD8* 及 *OsActin* 的 RT-PCR 引物和片段大小

基因名称	引物 (5'-3')	片段大小 (bp)	基因在 NCBI 或 Tigr 的登录号
<i>OsFAD2</i>	F: ACCACCTCTTCT CCA CCA R: CTTGCTACGACGATT TCC	304	NM_001054462(NCBI)
<i>OsFAD3</i>	F: TCTTGATTCGTGATGTGG R: GAGCAGGTAAGTAGCC	570	LOC_Os11g01340(Tigr)
<i>OsFAD6</i>	F: TCGTGCTGCCTATGAT R: GCTCTGAAGCCGTGTAA	349	LOC_Os08g34220 (Tigr)
<i>OsFAD7</i>	F: GGGATTCTTGCTGGTCTG R: GAAATTCTAGGCTCAACG	569	LOC_Os03g18070(Tigr)
<i>OsFAD8</i>	F: ATGGCCCCGGCTGCTACTCTCCGGCG R: TTAGTTAGCAGGGTCGGTCTGGTAG	1239	XM_506593 (NCBI)
<i>OsActin</i>	F: CGCCCTGGA CTATGAC R: ATCTGCTGG AATGTGC	408	NM_001058705(NCBI)

1.2.4 聚类分析及 *OsFAD2*、*OsFAD6* 基因编码蛋白质的序列分析

对本研究所获得的两个新基因采用 Clustalx^[25] 进行氨基酸序列相似性分析; 以拟南芥 *FAB2* 作为外类群, 利用 Mega3.1^[26] 软件, Neighbour-Joining^[27] 法进行 FAD 成员的系统进化分析; 利用 <http://www.expasy.ch/cgi-bin/protparam> 网站进行基因编码区序列、分子量和等电点分析; 利用 TMHMM2.0 软件 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>) 进行蛋白

质序列的跨膜区分析；在<http://www.cbs.dtu.dk/services/ChloroP/>网站进行蛋白质的亚细胞定位分析。

2 结果与分析

2.1 水稻 *OsFAD2* 与 *OsFAD6* 基因的克隆和序列分析

以水稻根、茎、叶和种子混合的 cDNA 为模板，根据设计的引物（见方法 1.2.2），经 RT-PCR 和测序，从水稻日本晴（*Oryza sativa* L.）中克隆了分别与 *FAD2*、*FAD6* 同源的脂肪酸脱氢酶序列，命名为 *OsFAD2* 和 *OsFAD6*，开放阅读框（ORF）的长度分别为 1 167 bp 和 1 365 bp。推测 *OsFAD2* 编码 388 个氨基酸，*OsFAD6* 编码 454 个氨基酸。Clustal X 分析发现，两者都有 FAD 膜整合特有的 3 个组氨酸簇（图 1：A，B），为脂肪酸去饱和酶行使功能所必需^[2]。*OsFAD6* 编码的氨基酸序列与其他物种已发表的 *FAD6* 氨基酸序列具有 60.8% 的相似性，*OsFAD2* 编码的氨基酸序列与已报道的 *FAD2* 氨基酸序列具有 62.2% 的相似性，说明不同物种 *FAD2*、*FAD6* 基因在各自的进化过程中保守性较高。*OsFAD2* 和 *OsFAD6* 所编码的氨基酸序列经对比分析表明，两者仅有 30.6% 的氨基酸相同性（结果未显示），说明水稻 *FAD2* 和 *FAD6* 二者在基因进化过程中分歧较大。

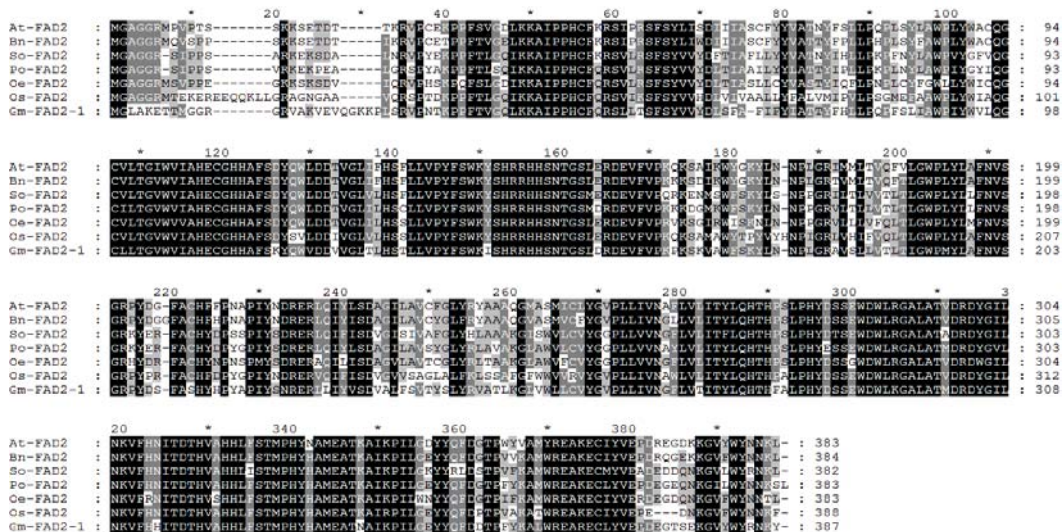
TMHMM2.0 软件分析表明，*OsFAD2* 有 4 个跨膜区，分别位于其氨基酸序列的 62~84 位、90~112 位、182~204 位、254~276 位；*OsFAD6* 具有 4 个跨膜区，分别位于其氨基酸序列的 156~178 位、247~269 位、284~301 位和 308~330 位。在 *OsFAD2* 的 C 端，具有内质网定位序列 YNNKL^[8]。利用 <http://www.cbs.dtu.dk/services/ChloroP/> 网站分析，表明 *FAD6* 的 N 端前 38 个氨基酸序列为叶绿体导肽。在 <http://www.expasy.ch/cgi-bin/protpara> 网站预测了两个蛋白的等电点与分子量：*OsFAD2* 的等电点为 8.17，分子量大小为 44.35 kDa；*OsFAD6* 的等电点为 9.24，分子量大小为 52.24 kDa。二者均为碱性蛋白。

2.2 不同物种中 FAD 家族成员的系统进化分析

为研究 *OsFAD2* 及 *OsFAD6* 在植物 FAD 家族的进化地位，利用 Mega 3.1^[26] 软件，采用邻接法（Neighbour-Joining）^[27]，将 *OsFAD2*、*OsFAD6* 与其他物种已发表的 *FAD2*、*FAD6*、*FAD3*、*FAD7*、*FAD8* 的核苷酸序列进行聚类分析（图2）。*OsFAD2* 与其他物种的 *FAD2* 聚在一簇；而 *OsFAD6* 与其他物种的 *FAD6* 聚在一簇。18 碳原子脂肪酸为底物的膜整合 FAD 家族成员分为两个单系群，分别为 ω -3 脂肪酸去饱和酶和 ω -6 脂肪酸去饱和酶。 ω -3 脂肪酸去饱和酶包括 *FAD3*、*FAD7*、*FAD8*，这三大类酶都是合成三烯酸的脂肪酸去饱和酶； ω -6 脂肪酸去饱和酶包括 *FAD2* 和 *FAD6*，这两大类酶是合成二烯酸的脂肪酸去饱和酶。聚类结果表明：功能相同的酶，其核苷酸序列相同性较高。功能一致的酶类中，双子叶植物和单子叶植物的 ω -3 脂肪酸去饱和

酶各自聚为一簇；内质网定位的FAD2和叶绿体定位的FAD6各自聚在一簇，表明在功能一致的前提下，相同种属和定位相同的基因其序列相似性较高。

A



B

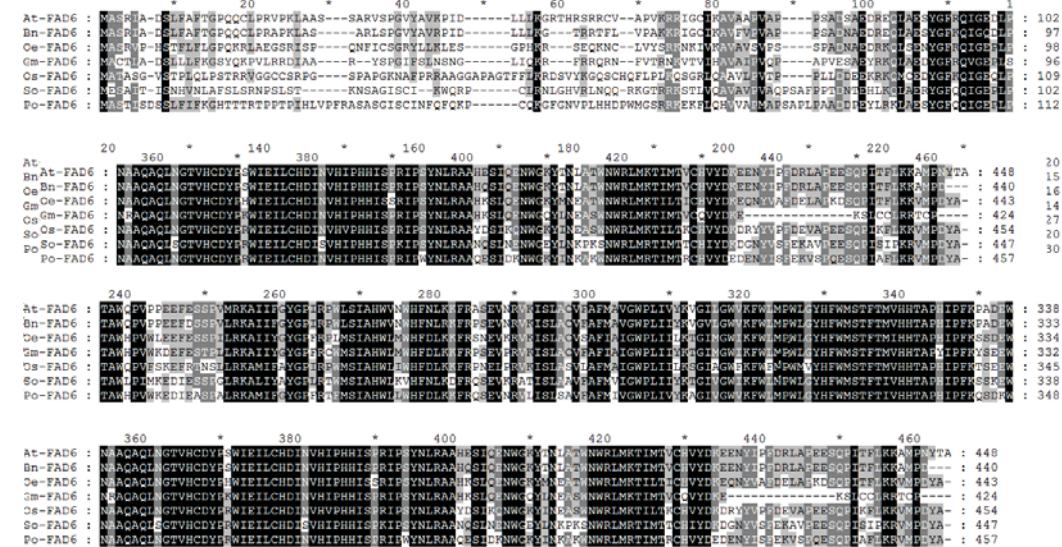


图1 水稻OsFAD2(A)、OsFAD6(B)推测的氨基酸序列与其他物种相似序列的比较

黑色部分表示氨基酸序列完全一致；灰色部分表氨基酸序列相似。FAD2中3个保守的组氨酸簇分别位于其氨基酸序列的110~114位、126~130位、322~326位，在FAD6中则分别位于其氨基酸序列的182~186位、217~221位、378~382位。At-FAD2: 拟南芥FAD2 (NP_001078140.1); Bn-FAD2: 油菜FAD2 (ACR47974.1); So-FAD2: 菠菜FAD2 (BAC22091.1); Po-FAD2: 马齿苋FAD2 (ACJ66779.1); Oe-FAD2: 橄榄FAD2 (AAL93620.1); Gm-FAD2-1: 大豆FAD2 (AAB00859.1)。At-FAD6: 拟南芥FAD6 (NP_194824.1); Bn-FAD6: 油菜FAD6 (AAA50157.1); Oe-FAD6: 橄榄FAD6 (AAV41001.1); Gm-FAD6: 大豆FAD6 (AAA50158.1); So-FAD6: 菠菜FAD6 (CAA55121.1); Po-FAD6: 马齿苋FAD6 (ACB14275.1)。

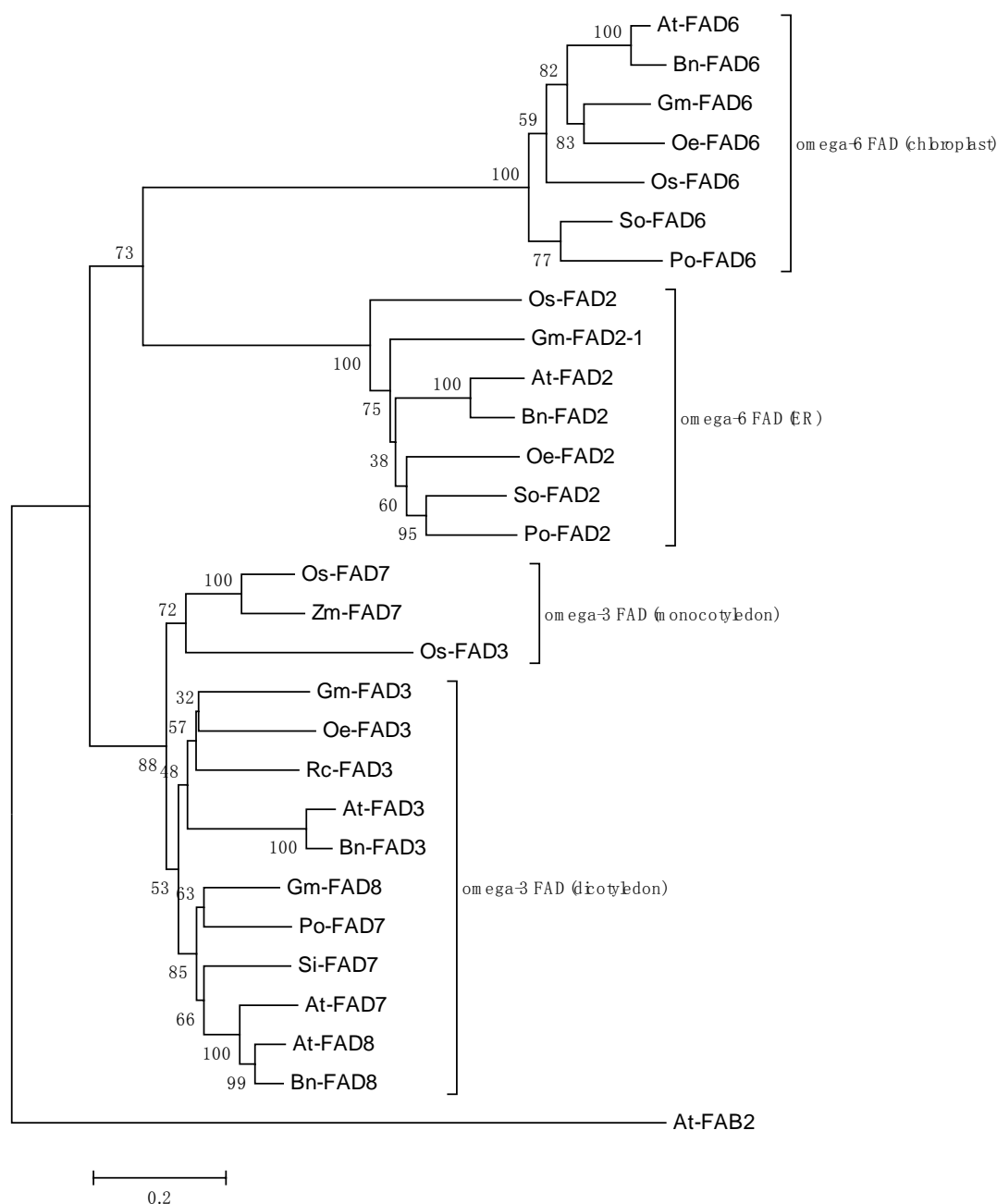


图2 不同物种中FAD基因家族成员的系统进化树

At-FAD2: 拟南芥FAD2 (NM_001084671); So-FAD2: 菠菜FAD2(AB094415); Bn-FAD2: 油菜FAD2 (FJ952144); Gm-FAD2-1: 大豆FAD2 (L43920); Oe-FAD2: 橄榄FAD2 (AY083163); Po-FAD2: 马齿苋FAD2 (EU872254); At-FAD6: 拟南芥FAD6 (NM_119243); Bn-FAD6: 油菜 (L29214); Gm-FAD6: 大豆FAD6 (L29215); So-FAD6: 菠菜FAD6 (X78311); Oe-FAD6: 橄榄FAD6 (AY772187); Po-FAD6: 马齿苋FAD6 (EU376530); At-FAD3: 拟南芥FAD3 (NM_128552); Bn-FAD3: 油菜FAD3 (L22962); Gm-FAD3: 大豆FAD3 (AY204710); Oe-FAD3: 橄榄FAD3 (DQ788673); Rc-FAD3: 月季FAD3 (XM_002525611); At-FAD7: 拟南芥FAD7 (NM_111953); Po-FAD7: 马齿苋FAD7 (DQ991249); Si-FAD7: 芝麻FAD7 (U25817); Zm-FAD7: 玉米FAD7 (NM_001111833); At-FAD8: 拟南芥FAD8 (NM_120640); Bn-FAD8: 油菜FAD8 (AY894813); Gm-FAD8: 大豆FAD8 (FJ393229); Os-FAD8: 水稻FAD8 (AY848920)。Tigr上的序列: Os-FAD7: 水稻FAD7 (LOC_Os03g18070), Os-FAD3L: 水稻FAD3 (LOC_Os11g01340)。

2.3 *OsFAD2*、*OsFAD6*、*OsFAD3*、*OsFAD7*和*OsFAD8*的表达分析

FAD家族成员都有其器官表达的特性，为揭示*OsFAD2*、*OsFAD6*以及水稻其他FAD家族成员的表达特性，对水稻植株的不同器官取样，提取RNA，进行器官表达谱分析。如图3所示，*OsFAD2*、*OsFAD6* 和*OsFAD7*在水稻根、茎和种子中的表达量远低于其在叶中的表达量，其中*OsFAD2*在叶中的表达量最高。*OsFAD3*在叶中表达量很低，而在种子、根、茎中有一定表达。*OsFAD8*的表达情况正好与*OsFAD3*相反，它在叶中有微弱表达，而在其他器官的表达很低，几乎检测不到。

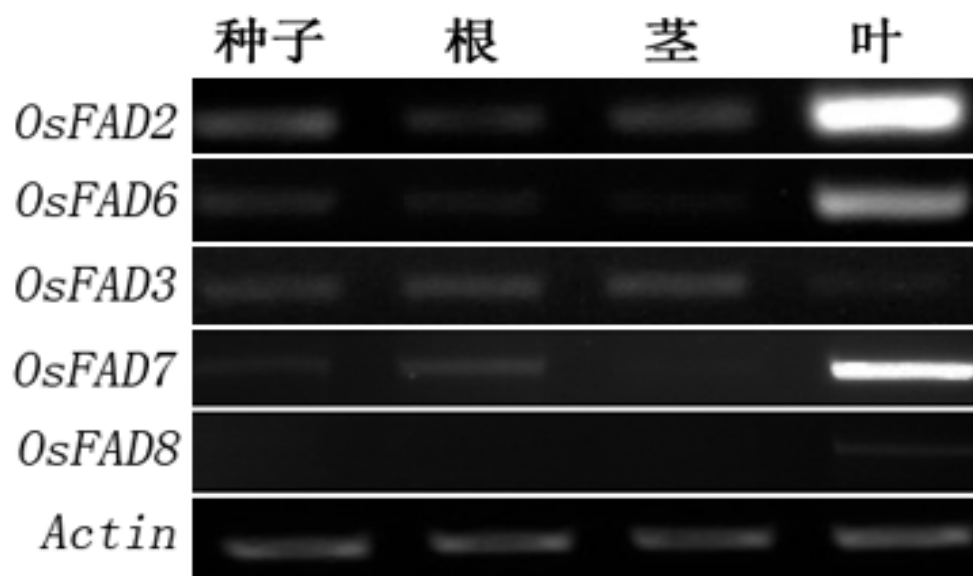


图3 水稻 FAD 家族各成员的器官表达谱分析

2.4 *OsFAD2*、*OsFAD6*、*OsFAD3*、*OsFAD7*对低温的响应研究

选取三叶期的水稻苗，持续8 h、5℃低温处理，对照的生长温度为32℃，光照条件相同。低温处理和正常培养的水稻苗中FAD家族各个成员mRNA表达量的变化如图4所示。*OsFAD2*、*OsFAD6* mRNA量在低温处理后变化不大，而*OsFAD7*和*OsFAD8* mRNA量明显上升，*OsFAD3* mRNA无论在低温还是对照情况下，表达都很低，几乎检测不到。

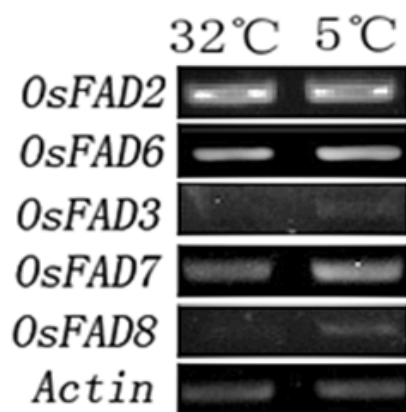


图4 水稻 FAD 家族各成员对低温的响应

2.5 *OsFAD2*、*OsFAD6*、*OsFAD3*、*OsFAD7*对光照的响应

利用RT-PCR对水稻（日本晴）苗中*OsFAD2*、*OsFAD6*、*OsFAD3*和*OsFAD7*的mRNA表达与光照的关系进行了分析。在16 h光照/8 h黑暗的正常光周期培养条件下，*OsFAD2*、*OsFAD6*、*OsFAD3*和*OsFAD7*的表达都表现出明显的昼夜节律性，即其mRNA在光照条件下表达量少，黑暗条件下表达量多（图5A）。随着黑暗处理时间的增加，目标基因mRNA表达量如何改变？本研究对水稻苗进行了8 h、1 d和2 d的黑暗处理，*OsFAD2*、*OsFAD6*、*OsFAD3*和*OsFAD7*的mRNA只在光照后黑暗处理8 h时表达量明显增高，延长黑暗处理时间（1 d、2 d），表达量则下降（图5B）。

短暂黑暗处理下目标基因的明显诱导趋势是否与前期的光照有关？本研究选取了叶绿体定位的*OsFAD6*和*OsFAD7*做为代表，通过阻断电子供体来研究目标基因的表达情况。采用异丙隆（N'-(4-异丙苯基)-N,N-二甲基脲）特异性地抑制水稻幼苗叶的光合电子传递^[28]，喷施后，在16 h光照/8 h黑暗的光周期培养条件下，*OsFAD6*和*OsFAD7*在8 h黑暗之后的表达量低于之前16 h光照的表达量（图6）。

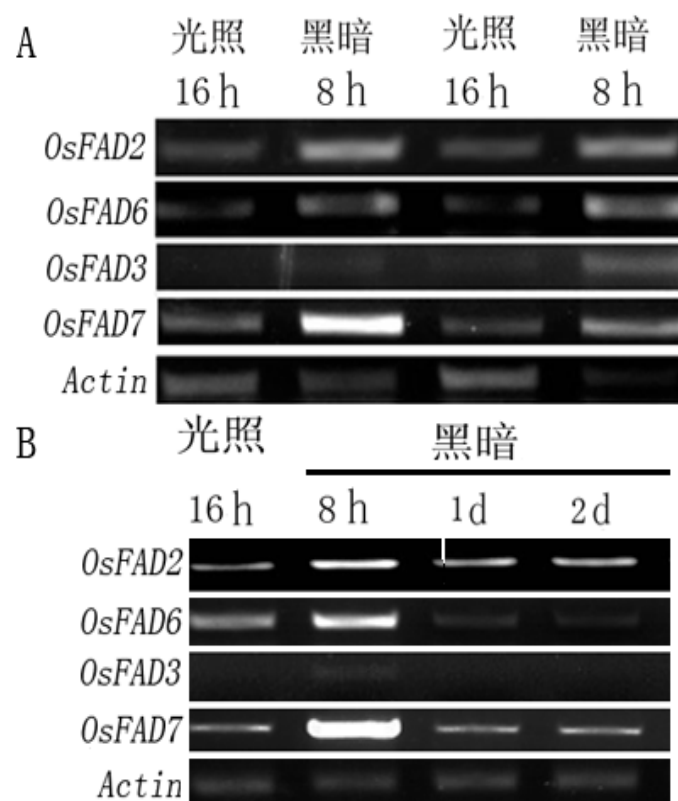


图 5 FAD 家族成员 mRNA 的表达量与光照的关系

A: 叶中 FAD 家族成员表达昼夜节律; B: FAD 成员在短暂黑暗 (8 h) 下高表达, 随着黑暗时间增加, 表达量减少。

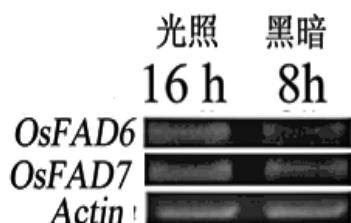


图 6 施加 N'-(4-异丙苯基)-N,N-二甲基脲之后 *OsFAD6* 和 *OsFAD7* 的表达情况

3 讨论

不饱和脂肪酸是构成细胞膜中磷脂双分子层的主要成分, 不仅与植物的生长发育密切相关, 而且在植物抵抗外界不利环境因子的侵害方面起着重要作用^[29,30]。本研究克隆了水稻日本晴中两个 ω -6脂肪酸去饱和酶*OsFAD2*和*OsFAD6*的ORF序列(图1)。通过Clustal x^[25]软件分析发现, *OsFAD2*和*OsFAD6*分别与内质网和质体定位的 ω -6(Δ -12)脂肪酸去饱和酶具有较高的相似性。两个基因的ORF框中都具有3个组氨酸簇, 其中包含了8个组氨酸残基HX(3-4)HX(20-50)HX(2-3)HHX(100-200)HX(2-3)HH, 这个序列是所有膜整合脂肪酸去饱和

酶共有的，主要与Fe螯合，为脂肪酸去饱和酶行使功能所必需^[2]。进一步分析表明OsFAD2的C端有内质网定位序列(-YNNLT)，而OsFAD6的N端有一段38个氨基酸残基组成的导肽，预测这个导肽可以引导后面的氨基酸残基进入质体。聚类树和相似性分析表明（图2），*OsFAD2*、*OsFAD6*为定位于不同细胞器的FAD基因。二者所参与的脱氢功能需要进一步验证，相关的转基因研究正在进行中。

本研究克隆到的*OsFAD2*和*OsFAD6*器官表达谱基本一致，为“House keeping”型（图3）。其转录本在水稻叶片中的表达量最高，为三烯酸的产生提供充足的底物—二烯酸。生成三烯酸的主要脂肪酸去饱和酶有*OsFAD3*、*OsFAD7*和*OsFAD8*。本研究中，*OsFAD8*、*OsFAD3*正常情况下在水稻叶片中的表达量极低，说明在正常情况下，*OsFAD8*、*OsFAD3*对叶片中三烯酸的生成贡献较低，此时叶片中合成三烯酸这一任务主要由*OsFAD7*负责；而根中三烯酸的合成由*OsFAD7*、*OsFAD3*共同承担。

细胞中不饱和脂肪酸的含量对植物抵抗低温至关重要^[31]。很多研究也表明，脂肪酸去饱和酶受到低温的诱导。例如，在拟南芥中，*FAD8* mRNA在20℃能被检测到，而温度提高到30℃时，检测不到*FAD8* mRNA^[17]。玉米中也同样发现，低温（5℃）处理后玉米的*FAD8* mRNA上升^[18]。同时，在水稻中*OsFAD8* mRNA在低温下表达量上升也已被确定^[16]。在本实验中，*OsFAD2*和*OsFAD6*对低温的响应不是很明显。而*OsFAD7*和*OsFAD8*的表达量在低温条件下上升，这也许与机体通过增加三烯酸含量，进而增加膜的流动性抵抗冷害有关^[16,20]。

OsFAD2、*OsFAD6*、*OsFAD3*和*OsFAD7*的转录本表达具有昼夜节律性，光照条件下表达量低，短期黑暗处理下表达量高（8 h）（图5A），但其表达随着黑暗处理时间的增加而下降。上述结果暗示水稻FAD家族成员转录本在短期黑暗下的高表达是依赖于之前的光照处理。为了进一步揭示其中的机制，选取相同叶绿体定位的*OsFAD6*和*OsFAD7*进行评价。叶绿体中光合电子传递和PPP途径提供自身所需的NADPH。光照条件下PPP途径的酶活较低，此时NADPH主要来源于光合作用电子传递；而在黑暗条件下，光合作用不能进行，植物所需的NADPH由PPP途径提供^[32]。正常光周期条件下（L / D为16 h/8 h），黑暗处理后取样，这时植株尚有光反应积累的NADPH，而且PPP途径也开始起作用，因此NADPH含量是最多的。之后随着黑暗的继续，光合作用暗反应，脂肪酸的合成和去饱和等过程的进行，NADPH被大量消耗；此时只有PPP这一个途径的电子供体来源，于是*OsFAD6*和*OsFAD7*短暂黑暗条件下的高表达便不能维持。为了验证这一推论，本文对水稻的叶片施加N'-(4-异丙苯基)-N,N-二甲基脲，该除草剂可以部分抑制光合作用中电子的传递^[28]，从而抑制由光合作用电子传递提供的NADPH的合成。施加除草剂后，虽然经过16 h的光照，植物仍不能积累充足的

NADPH供随后的黑暗处理使用，只能通过PPP途径来提供NADPH，因此光照之后的黑暗处理没有同于图5中*OsFAD6*和*OsFAD7*的高表达现象发生（图6），这暗示了*OsFAD6*和*OsFAD7*的mRNA昼夜变化趋势与NADPH量的积累有关。但是光照下有充足的电子供体而目标基因的mRNA表达量低（图5A, B），这可能暗示了水稻FAD家族成员的转录本在光照下不稳定，而在黑暗下稳定。这种趋势与大豆相同^[12]，但仍需进一步的研究以揭示其分子机制。

参考文献 (References):

- [1] Dai XF, Xiao L, Wu YH, Wu G, Lu GM. An overview of plant fatty acid desaturases and the coding genes. *Chinese Bull Bot*, 2007, 24(1): 105–113.
- [2] Los DA, Murata N. Structure and expression of fatty acid desaturases. *Biochim Biophys Acta-Lipids Lipid Metabol*, 1998, 1394(1): 3–15.
- [3] Somerville C, Browse J. Dissecting desaturation: plants prove advantageous. *Trends Cell Biol*, 1996, 6(4): 148–153.
- [4] Iba K, Gibson S, Nishiuchi T, Fuse T, Nishimura M, Arondel V, Hugly S, Somerville C. 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 Biol Chem*, 1993, 268(32): 24099–24105.
- [5] Gibson S, Arondel V, Iba K, Somerville C. Cloning of a temperature-regulated gene encoding a chloroplast omega-3 desaturase from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol*, 1994, 106(4): 1615–1621.
- [6] Okuley J, Lightner J, Feldmann K, Yadav N, Lark E, Browse J. *Arabidopsis* Fad2 gene encodes the enzyme that is essential for polyunsaturated lipid-synthesis. *Plant Cell*, 1994, 6(1): 147–158.
- [7] Falcone DL, Gibson S, Lemieux B, Somerville C. Identification of a gene that complements an *Arabidopsis* mutant deficient in chloroplast ω -6 desaturase activity. *Plant Physiol*, 1994, 106(4): 1452–1459.
- [8] Hita WD, Carlson TJ, Booth JR, Jr, Kinney AJ, Stecca Kland Yada NS. Cloning of a higher-plant plastid ω -6 fatty acid desaturase cDNA and its expression in a *Cyanobacterium*. *Plant Physiol*, 1994, 105(2): 634–641.
- [9] Banilas G, Moressis A, Nikoloudakis N, Hatzopoulos P. Spatial and temporal expressions of two distinct oleate desaturases from olive (*Olea europaea* L.). *Plant Sci*, 2005, 168(2): 547–555.
- [10] Teixeira MC, Coelho N, Olsson ME, Brodelius PE, Carvalho IS, Brodelius M. Molecular cloning and expression analysis of three omega-6 desaturase genes from purslane (*Portulaca oleracea* L.). *Biotechnol Lett*, 2009, 31(7): 1089–1101.
- [11] Mikkilineni V, Rocheford TR. Sequence variation and genomic organization of fatty acid desaturase-2 (*fad2*) and fatty acid desaturase-6 (*fad6*) cDNAs in maize. *Theor Appl Genet*, 2003, 106(7): 1326–1332.
- [12] Collados R, Andreu V, Picorel R, Alfonso M. A light-sensitive mechanism differently regulates transcription and transcript stability of ω -3 fatty-acid desaturases (*FAD3*, *FAD7*

- and FAD8) in soybean photosynthetic cell suspensions. *FEBS Lett*, 2006, 580(20): 4934–4940.
- [13] Kis M, Zsiros O, Farkas T, Wada H, Nagy F, Gombos Z. Light-induced expression of fatty acid desaturase genes. *Biochemistry*, 1998, 95(8): 4209–4214.
- [14] Klyachko-Gurvicha GL, Tsoglina LN, Douchab J, Kopetskiib J, Shebalina (Ryabykh) IB, Semenenko VE. Desaturation of fatty acids as an adaptive response to shifts in light intensity. *Physiol Plant*, 1999, 107(2): 240–249.
- [15] Neidleman SL. Effects of temperature on lipid unsaturation. *Biotechnol Genet Eng Rev*, 1987, 5: 245–268.
- [16] Wang JW, Ming F, Pittman J, Han YY, Hu J, Guo B, Shen DL. Characterization of a rice (*Oryza sativa* L.) gene encoding a temperature-dependent chloroplast ω -3 fatty acid desaturase. *Biochem Biophys Res Commun*, 2002, 340(4): 1209–1216.
- [17] Gibson S, Arondel V, Iba K, Somerville C. Cloning of a temperature-regulated gene encoding a chloroplast ω -3 desaturase from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol*, 1994, 106(4): 1615–1621.
- [18] Berberich T, Harad M, Sugawara K, Kodama H, Iba K, Kusano T. Two maize genes encoding ω -3 fatty-acid desaturase and their differential expression to temperature. *Plant Mol Biol*, 1998, 36(2): 297–306.
- [19] Kargiotidou A, Deli D, Galanopoulou D, Tsaftaris A, Farmaki T. Low temperature and light regulate delta 12 fatty acid desaturases (FAD2) at a transcriptional level in cotton (*Gossypium hirsutum*). *J Exp Bot*, 2008, 59(8): 2043–2056.
- [20] Kodama H, Hamada T, Horiguchi G, Nishimura M, Iba K. Genetic enhancement of cold tolerance by expression of a gene for chloroplast Omega-3 fatty-acid desaturase in transgenic tobacco. *Plant Physiol*, 1994, 105(2): 601–605.
- [21] 刘立侠, 柳青, 许守民. 基因工程在改善植物油营养价值中的应用. *植物学通报*, 2005, 22(5): 623–631.
- [22] Yara A, Yaeno T, Hasegawa M, Seto H, Montillet JL, Kusumi K, Seo S, Iba K. Disease resistance against *Magnaporthe grisea* is enhanced in transgenic rice with suppression of ω -3 fatty acid desaturases. *Plant Cell Physiol*, 2007, 48(9): 1263–1274.
- [23] Kodama H, Akagi H, Kusumi K, Fujimura T, Iba K. Structure, chromosomal location and expression of a rice gene encoding the microsome omega-3 fatty acid desaturase. *Plant Mol Biol*, 1993, 33(3): 493–502.
- [24] Yoshida S, Forno DA, Cock JH, Gomez KA. Laboratory manual for physiological studies of rice, International Rice Research Institute, Manila, The Philippines, 1976.
- [25] Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. Clustal W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting matrix choice. *Nucleic Acids Res*, 1994, 22(22): 4673–4680.
- [26] Kumar S, Tamura K, Jakobsen IB, Nei M. MEGA2: molecular evolutionary genetics analysis software. *Arizona State University*, 2001, Tempe, AZ.
- [27] Saitou N, Nei M. The neighbour-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol*, 1987, 4: 406–425.
- [28] Terry R r. Metabolic pathways of agrochemicals, Cambridge, the Royal Society of Chemistry, 1998, p. 735.
- [29] McConn M, Browse J. The critical requirement for linolenic acid is pollen development, not

- photosynthesis, in an *Arabidopsis* mutant. *Plant Cell*, 1996, 8(3): 403–416.
- [30] McConn M, Creelman RA, Bell E, Mullet JE, Browse J. Jasmonate is essential for insect defense in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94(10): 5473–5477.
- [31] Percy RW. Effect of growth temperature on the fatty acid composition of the leaf lipids in *Atriplex lentiformis* (Torr.) Wats. *Plant Physiol*, 1978, 61(4): 484–486.
- [32] Huang J, Wang JF, Zhang HS. Advance on plant pentose phosphate pathway and its key enzymes. *Chinese Bull Bot*, 2004, 21(2): 139–145.