

• 农业生物技术 •

大豆硬脂酰-ACP Δ^9 脱氢酶 (*GmSAD*) 基因家族的鉴定及功能分析

邓咪咪^{1,2}, 刘宝玲², 王志龙², 薛金爱², 张红梅¹, 李润植²

1 山西农业大学 生命科学学院, 山西 太谷 030801

2 山西农业大学 分子农业与生物能源研究所, 山西 太谷 030801

邓咪咪, 刘宝玲, 王志龙, 等. 大豆硬脂酰-ACP Δ^9 脱氢酶 (*GmSAD*) 基因家族的鉴定及功能分析. 生物工程学报, 2020, 36(4): 716–731.

Deng MM, Liu BL, Wang ZL, et al. Identification and functional analysis of soybean stearoyl-ACP Δ^9 desaturase (*GmSAD*) gene family. Chin J Biotech, 2020, 36(4): 716–731.

摘要: 硬脂酰-ACP Δ^9 脱氢酶 (Stearoyl-acyl carrier protein Δ^9 desaturase, SAD) 在质体中催化单不饱和油酸或棕榈油酸的合成, 是控制植物细胞饱和脂肪酸与不饱和脂肪酸比例的关键酶。为解析大豆油酸合成积累调控机制, 文中对大豆 *Glycine max* *GmSAD* 家族成员进行全基因组鉴定和保守功能域及理化性质等分析。应用 qRT-PCR 检测 *GmSAD* 各成员的时空表达谱, 构建表达载体并通过农杆菌介导烟草 *Nicotiana tabacum* 瞬时表达和油酸缺陷型酵母 *Saccharomyces cerevisiae* 突变株 BY4389 遗传转化测试 *GmSAD* 酶活性和生物学功能。结果表明, 大豆基因组含有 5 个 *GmSADs* 家族成员, 其编码酶蛋白均具有二铁中心和 SAD 酶特有的 2 个保守组氨酸富集基序 (EENRHG 和 DEKRHE), 预测其活性酶蛋白为同源二聚体。系统进化分析显示 5 个 *GmSAD* 分成 2 个亚组, 分别与拟南芥 *AtSSI2* 和 *AtSAD6* 亲缘关系较近。*GmSAD* 各成员在大豆根、茎、叶、花和不同发育时期种子等组织中表达谱差异明显, 其中 *GmSAD5* 在发育种子中、晚期高量表达, 与油脂富集时期相吻合。烟草叶片瞬时表达 *GmSAD5* 可使叶片组织中油酸和总油脂含量分别提高 5.56% 和 2.73%, 而硬脂酸含量相应降低 2.46%。缺陷型酵母遗传转化测试显示, 过表达 *GmSAD5* 能恢复缺陷酵母合成单不饱和油酸的能力和促进油脂积累。总之, 大豆 *GmSAD5* 对硬脂酸底物选择性较强, 能高效催化单不饱和油酸的生物合成, 为大豆种子油酸和总油脂积累机制的研究奠定了基础, 也可作为油脂品质遗传改良的优异靶标。

关键词: 大豆 *Glycine max*, 硬脂酰-ACP Δ^9 脱氢酶 (SAD), 功能分析, 油酸, 油脂品质

Received: December 11, 2019; **Accepted:** February 2, 2020

Supported by: National Natural Science Foundation of China (Nos. 31401430, 31201266, 30971806), National Department of Agriculture “948” Program (No. 2014-Z39), Coal-based Key Sci-Tech Project of Shanxi Province, China (No. FT-2014-01), Key Project of the Key Research and Development Program of Shanxi Province, China (No. 201603D312005), Key Research and Development Project of Shanxi Province (No. 201703D221002-3), Research Project Supported by Shanxi Scholarship Council of China (No. 2015-064).

Corresponding authors: Hongmei Zhang. Tel: +86-354-6286908; E-mail: tgzhhm@163.com

Runzhi Li. Tel: +86-354-6288344; E-mail: rli2001@126.com

国家自然科学基金 (Nos. 31401430, 31201266, 30971806), 国家农业部“948”项目 (No. 2014-Z39), 山西省煤基重点科技攻关项目 (No. FT-2014-01), 山西省重点科技项目 (No. 201603D312005), 山西省重点研发计划 (No. 201703D221002-3), 山西省留学归国人员科研基金 (No. 2015-064) 资助。

网络出版时间: 2020-03-10

网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1998.q.20200309.1006.001.html>

Identification and functional analysis of soybean stearoyl-ACP Δ^9 desaturase (*GmSAD*) gene family

Mimi Deng^{1,2}, Baoling Liu², Zhilong Wang², Jin'ai Xue², Hongmei Zhang¹, and Runzhi Li²

¹ College of Life Sciences, Shanxi Agricultural University, Taigu 030801, Shanxi, China

² Institute of Molecular Agriculture and Bioenergy, Shanxi Agricultural University, Taigu 030801, Shanxi, China

Abstract: Stearoyl-ACP Δ^9 desaturase (SAD) catalyzes the synthesis of monounsaturated oleic acid or palmitoleic acid in plastids. SAD is the key enzyme to control the ratio of saturated fatty acids to unsaturated fatty acids in plant cells. In order to analyze the regulation mechanism of soybean oleic acid synthesis, soybean (*Glycine max*) *GmSAD* family members were genome-wide identified, and their conserved functional domains and physicochemical properties were also analyzed by bioinformatics tools. The spatiotemporal expression profile of each member of *GmSADs* was detected by qRT-PCR. The expression vectors of *GmSAD5* were constructed. The enzyme activity and biological function of *GmSAD5* were examined by *Agrobacterium*-mediated transient expression in *Nicotiana tabacum* leaves and genetic transformation of oleic acid-deficient yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) mutant BY4389. Results show that the soybean genome contains five *GmSAD* family members, all encoding an enzyme protein with diiron center and two conservative histidine enrichment motifs (EENRHG and DEKRHE) specific to SAD enzymes. The active enzyme protein was predicted as a homodimer. Phylogenetic analysis indicated that five *GmSADs* were divided into two subgroups, which were closely related to *AtSSI2* and *AtSAD6*, respectively. The expression profiles of *GmSAD* members were significantly different in soybean roots, stems, leaves, flowers, and seeds at different developmental stages. Among them, *GmSAD5* expressed highly in the middle and late stages of developmental seeds, which coincided with the oil accumulation period. Transient expression of *GmSAD5* in tobacco leaves increased the oleic acid and total oil content in leaf tissue by 5.56% and 2.73%, respectively, while stearic acid content was reduced by 2.46%. Functional complementation assay in defective yeast strain BY4389 demonstrated that overexpression of *GmSAD5* was able to restore the synthesis of monounsaturated oleic acid, resulting in high oil accumulation. Taken together, soybean *GmSAD5* has strong selectivity to stearic acid substrates and can efficiently catalyze the biosynthesis of monounsaturated oleic acid. It lays the foundation for the study of soybean seed oleic acid and total oil accumulation mechanism, providing an excellent target for genetic improvement of oil quality in soybean.

Keywords: soybean (*Glycine max*), stearoyl-acyl carrier protein Δ^9 desaturase (SAD), functional analysis, oleic acid, oil quality

大豆 *Glycine max* L. Merr 是我国及世界重要的粮油作物之一，其高蛋白和高油脂等为人体提供了丰富的氨基酸和脂肪酸营养，是重要的优质食品资源，亦可用作畜禽及水产饲料和其他工业原料。大豆油是全球食用植物油的主要来源之一，占总食用植物油的 28%，而且市场需求量逐年增长^[1]。大豆油主要由 5 种脂肪酸组成：棕榈酸 (C16:0, 约 11.38%)、硬脂酸 (C18:0, 约 4.29%)、油酸 (C18:1 Δ^9 , 约 15.66%)、亚油酸 (C18:2 $\Delta^{9,12}$, 约 47.33%) 和亚麻酸 (C18:3 $\Delta^{9,12,15}$, 约 15.40%)^[2-3]。尽管亚油酸能降低血液胆固醇，预防动脉粥样硬化，但大豆种子油高达 60%–70%的

多不饱和脂肪酸 (亚油酸和亚麻酸) 使其容易氧化酸败，不宜长期贮存，也易引起基于大豆油的食物变质。常规食用油精炼过程中，需要经过高温脱臭和添加抗氧化剂来提高大豆油抗氧化性，而这又会产生大量对人体健康有害的反式脂肪酸和其他有害物质。单不饱和油酸兼具饱和脂肪酸和多不饱和脂肪酸的优良特性，特别是抗氧化性显著高于亚油酸等多不饱和脂肪酸^[4]。食用油酸能降低人体血液中的不良低密度脂蛋白胆固醇含量，避免高血脂症的发生，保护心血管健康。因此，诸多研究致力于提高大豆油的油酸比例以增加大豆油氧化稳定性和提高大豆油营养价值^[5-7]。

通过甲基磺酸乙酯 (Ethyl methane sulfonate, EMS) 诱变, 已筛选获得油酸含量显著增高的的大豆优良突变体。应用 RNAi 沉默大豆 *GmFAD2* (Δ^{12} fatty acid desaturase 2, 催化油酸 18:1 Δ^9 生成亚油酸 18:2 $\Delta^{9,12}$) 获得油酸含量达 80%, 亚油酸含量减低至 1% 的转基因大豆^[8]。我们实验室通过对转录因子锌指蛋白进行分析设计, 使它能特异地结合大豆 *FAD2-1* 酶基因靶序列, 关闭该基因表达, 获得了大豆种子高油酸 (>80%) 积累的转基因植株^[9-10]。最近, 应用 CRISPR/Cas9 基因编辑技术获得 *GmFAD2* 纯合突变体, 大豆种子油酸含量 >80%、亚油酸减至 1.3%–1.7%^[11]。这些研究大多是通过阻断油酸生成亚油酸的酶促反应来提高油酸积累, 然而, 催化硬脂酸生成油酸的酶分子是硬脂酰- Δ^9 脱氢酶 (Stearoyl- Δ^9 desaturase, SAD)。鲜有关于大豆 SAD 家族成员和功能以及遗传修饰提高油酸富集的详尽报道。

高等植物细胞含有两类硬脂酰- Δ^9 脱氢酶, 其一为质体型 SAD, 在质体内催化硬脂酰-ACP (18:0-ACP) 生成油酰-ACP (18:1 Δ^9 -ACP), 在硬脂酰链 Δ^9 位置引入第一个碳碳双键^[12-14], 该酶促反应需要 NADPH、NADPH-铁氧还蛋白还原酶、铁氧还蛋白等提供能量^[15-16]。其二为细胞型 SAD, 在细胞内质网上催化硬脂酰-CoA (18:0-CoA) 生成油酰-CoA (18:1 Δ^9 -CoA)。一些研究显示, 植物细胞绝大多数油酸 (18:1 Δ^9) 是在质体内合成, 仅有少部分油酸在内质网上合成^[17]。质体型 SAD 是控制植物细胞饱和脂肪酸转化为不饱和脂肪酸途径的重要限速酶, 其活性强弱决定着饱和脂肪酸与不饱和脂肪酸的比例大小^[18-19]。近年来, 人们已经从拟南芥 *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.^[14]、棉花 *Gossypium* spp.^[20]、马铃薯 *Solanum tuberosum* L.^[15]、花生 *Arachis hypogaea* Linn.^[21]、甘蓝型油菜 *Brassica napus* L.^[22]、可可 *Theobroma cacao* L.^[23] 等许多植物中分离得到了 SAD 基因, 并验证了 SAD 的硬脂酰-ACP 脱氢酶

活性。例如, 干扰表达棉花 *GhSAD* 基因可使油酸含量从 13% 显著降低到 4%, 同时硬脂酸含量从 2%–3% 增加到约 40%^[24]。同样, 在 6 个大豆突变体中, *SACPD-C* 的突变导致大豆种子硬脂酸含量升高, 比野生型高 1.5–3 倍^[25]。在 *ssi2* 拟南芥突变体中过表达 *S-ACP-DES1* 基因能够使突变体恢复催化硬脂酸生成油酸 (18:1 Δ^9)^[14]。过量表达黄羽扇豆 *Lupinus luteus* L. *SAD* 基因可显著提高烟草叶片中的油酸含量^[26]。在烟草中过表达马铃薯 *SAD* 基因, 叶片和种子的脂肪酸组分发生了变化, 不饱和脂肪酸含量增加^[27]。已有研究显示, 植物 *SAD* 基因家族不同成员的表达模式具有时空特异性。例如, 棉花 *GhSAD2* 和 *GhSAD4* 在发育种子中具有较高的表达量, 在其他组织中表达较低^[20]。可可 *TcSAD1* 在各组织中均有表达, *TcSAD3* 和 *TcSAD4* 在花中表达较高^[23]。凤丹牡丹 *Paeonia ostii* *PoSAD* 基因在根、茎、叶、花瓣、雌蕊、雄蕊、种子中均有表达, 且在花瓣中表达最高, 在根中表达最低^[28]。进一步深入研究这些差异表达 SAD 家族成员的具体生物学功能和催化底物选择性等特性, 有助于全面解析植物油脂生物合成代谢的调控机制及遗传改良。

为解析大豆 SAD 的硬脂酰-ACP 脱氢酶 (*GmSAD*) 家族各成员的功能和建立基于 *GmSAD* 遗传修饰改良大豆优质品质的技术策略, 本文应用生物信息学工具全基因组鉴定大豆质体型 SAD 家族成员、基因结构和酶蛋白理化性质等特征。采用实时荧光定量 PCR 技术分析 *GmSADs* 基因家族各成员的时空表达模式。通过农杆菌介导烟草叶片瞬时表达和在不饱和脂肪酸缺陷型酵母 BY4389 超表达目标基因鉴定大豆 *GmSAD* 的生物学功能。共检测到 5 个 *GmSADs*, 其中在大豆种子油脂积累过程中高表达的 *GmSAD5* 能高效催化油酸合成, 是遗传工程培育富集油酸或硬脂酸以及提高油脂积累的一个优异分子靶标。

1 材料与方法

1.1 材料

本试验所用的大豆品种 *Jack*, 种植于山西农业大学试验田。试验取材为: 两周龄的幼苗根、茎、幼叶、盛花期的花以及开花后 (Days Post-Anthesis, DPA) 25 d (种子 I)、35 d (种子 II)、45 d (种子 III) 的大豆种子。所有样品经液氮速冻后储存于 -80 °C 用于下一步试验。

本试验所用的本氏烟草 *Nicotiana tabacum* L. 种植于营养土中, 设置光照培养箱的生长条件为: 温度 26 °C、相对湿度 60%、光照: 黑暗=16 h: 8 h^[29]。本研究中使用的酿酒酵母 *Saccharomyces cerevisiae* H. 突变菌株为 BY4389 缺陷型酵母 (*MATa ole1Δ::LEU2 ura3-52 his4*), 购自日本 Osaka University, 该 BY4389 酵母菌株含有 *OLE1* 突变, 无法合成不饱和脂肪酸^[30]。

1.2 方法

1.2.1 大豆 RNA 提取、cDNA 链的合成及基因克隆

根据北京全式金生物技术 (TransGen Biotech) 有限公司的 Trizol 法提取上述组织的总 RNA。利用 ABM 公司 (爱必梦生物科技有限公司) 的 5× All-In-One RT MasterMix 反转录试剂盒合成 cDNA。以 cDNA 为模板, 使用基因特异引物及 2×GPV8 HF Polymerase Master (通用生物有限公司) 高保真酶扩增目的基因的 ORF, 目的片段经凝胶回收和纯化后连入 pMD18-T 载体并转入大肠杆菌中, 选取阳性菌, 并在通用生物公司 (安徽) 测序验证。

1.2.2 大豆 *GmSAD* 基因家族的鉴定及结构分析

选用模式生物拟南芥 SAD (AtSADs) 基因家族的蛋白序列作为检索序列 blastp 大豆基因组数据库 soybase (<https://soybase.org/>), 获得大豆全基因组 SAD 的基因组序列、CDS 序列、氨基酸序列及染色体的位置信息。将检索到的 *GmSADs* 氨基酸序列提交到 SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) 和 CDD 数据库进行验证, 分析鉴定

GmSADs 蛋白序列的保守结构域 (FA_desaturase_2)。

利用网站 GSDS2.0 (<http://gsds.cbi.pku.edu.cn/>) 对 *GmSADs* 家族进行基因结构分析。

1.2.3 大豆 *GmSAD* 家族蛋白的理化性质及结构分析

用 ExPASy 数据库 (<https://www.expasy.org/>) 中的 ProtParam 预测大豆 *GmSAD* 家族蛋白的分子量、等电点等理化性质^[31]。通过在线工具 TMHMM Server v.2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) 预测大豆 *GmSADs* 家族成员的跨膜结构区域; 然后通过 ChloroP 1.1 Server^[32] 和 TargetP 1.1 Server^[33] 预测 *GmSAD* 编码蛋白的亚细胞定位。

利用 SOPMA 网站 (https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_sopma.html) 预测 *GmSADs* 家族成员的二级结构。用在线网站 SWISS-MODEL 对 *GmSADs* 家族成员进行三级结构预测分析并建模。

1.2.4 大豆 *GmSADs* 蛋白保守域鉴定及系统进化分析

从 NCBI 中调取蓖麻 (*Ricinus communis* L.) RcSAD1、拟南芥 AtSSI2 的 SAD 蛋白序列, 用软件 GeneDoc 对大豆、蓖麻和拟南芥的 SAD 蛋白序列进行多序列比对。各物种 SAD 序列信息见表 1。

表 1 各物种 SAD 信息

Table 1 Information of SAD in different species

Species	Protein	Accession No.
<i>Arabidopsis thaliana</i>	AtSSI2	At2g43710
	AtSAD1	At5g16240
	AtSAD2	At3g02610
	AtSAD3	At5g16230
	AtSAD4	At3g02620
	AtSAD5	At3g02630
	AtSAD6	At1g43800
<i>Ricinus communis</i>	RcSAD1	XP_002531889
<i>Theobroma cacao</i>	TcSAD1	KP704662
<i>Brassica napus</i>	BnSAD	AAT65205
<i>Solanum tuberosum</i>	StSAD	AAA33839

运用 MEGA7.0 软件对拟南芥 *AtSADs*、蓖麻 *RcSAD1*、甘蓝型油菜 *BnSAD*、马铃薯 *StSAD*、可可 *TcSAD1* 和大豆 *GmSADs* 的氨基酸序列进行比对, 并采用邻接法(NJ)构建无根系统发育树, 自举检验值设置为 1 000 个循环^[34]。

1.2.5 大豆 *GmSADs* 家族基因的表达分析

以上述大豆各组织的 cDNA 为模板, 利用各 *GmSADs* 基因的特异性引物进行 qRT-PCR 分析。选用大豆 *Actin* 作为内参基因, 并设置 6 个生物学重复。用 NCBI 中的 Primer-BLAST 对 *GmSADs* 基因编码序列设计特异性引物 (表 2)。依照 TB Green™ Premix Ex Taq™ II (Tli RNaseH Plus) (TaKaRa 公司) 说明提供的方法, 进行 qRT-PCR 分析。反应体系为: cDNA 模板 1 μL, TB Green Premix Ex Taq II 5 μL, 正向引物 0.4 μL, 反向引物 0.4 μL, ROX Reference Dye II (50×) 0.2 μL, ddH₂O 3 μL。反应程序为: 95 °C 预变性 10 min, 95 °C 15 s, 退火 1 min; 40 个循环。反应在 Bio-Rad CFX96™ 荧光定量 PCR 仪上进行。用公式 $2^{-\Delta\Delta Cq}$ 计算各基因表达量, 利用 IBM SPSS Statistics 19 进行差异显著性分析。

表 2 qRT-PCR 检测 *GmSADs* 基因表达所用特异引物
Table 2 Gene-specific primers of *GmSADs* genes used for qRT-PCR analysis

Primer name	Primer sequence (5'-3')	Size (bp)
<i>GmActin-F</i>	AAGCTGTTCTCTCCTTGACGCC	23
<i>GmActin-R</i>	GCACAGTGTGAGACACACCATCA	23
<i>GmSAD1-F</i>	GAACCGAGAACAGCCCCTAC	20
<i>GmSAD1-R</i>	GTCGGCAAACGCCATAACTG	20
<i>GmSAD2-F</i>	TTGCTATGCCAGCACACCTT	20
<i>GmSAD2-R</i>	GCAGCCCACAAACGTATTCC	20
<i>GmSAD3-F</i>	GTTCATCGAAGCGGTGAGGT	20
<i>GmSAD3-R</i>	TCTGAGCAAATCCCCGTGTC	20
<i>GmSAD4-F</i>	TATGCGACACGAGAACGCAA	20
<i>GmSAD4-R</i>	CTCCACCGTCCAACCAGAAA	20
<i>GmSAD5-F</i>	ATTCGAGCACTACTCCGCTG	20
<i>GmSAD5-R</i>	CAACCTCCTAATCCTCGGCG	20

1.2.6 大豆 *GmSAD5* 基因表达载体的构建

本试验所用的植物表达载体 pCAMBIA1303 由 CaMV35S 启动子驱动, 含有卡那霉素抗性。将上述克隆载体 pMD18-T-*GmSAD5* 和 pCAMBIA 1303 分别用 *Xba* I 和 *Kpn* I 进行双酶切反应, 酶切产物经回收纯化后, 用 T4 DNA 连接酶连接, 得到重组表达载体 (pCAMBIA1303-*GmSAD5*)。然后, 将其转入大肠杆菌, 经 PCR 和双酶切试验鉴定阳性克隆。靶基因特异全长引物为 *GmSAD5-F*: 5'-ATGCCTCCAGAAAAGAAAGAAATTT-3', *GmSAD5-R*: 5'-TCACAAAAGCAATTCTTTATTGAAAATC-3'。

本试验所用的酵母表达载体为 pYES2.0, 含 *URA3* 位点和氨苄青霉素抗性。经过密码子优化的 *GmSAD5* 基因序列通过 *Kpn* I 和 *Not* I 双酶切反应, 连入 pYES2.0 中形成重组酵母表达载体 pYES2.0-*GmSAD5*, 转到大肠杆菌 DH5α 并验证成功。

1.2.7 大豆 *GmSAD5* 基因的烟草叶片瞬时表达和突变体酵母功能互补检测

将上述构建成功的植物表达载体 pCAMBIA 1303-*GmSAD5* 通过冻融法转入根癌农杆菌菌株 GV3101。取六周龄烟草, 按照 Ji 等方法将农杆菌沿烟草叶片主脉一侧渗透注射, 形成直径约 1 cm 的斑块, 另一侧以含空载体的菌株作为对照^[35-36]。取侵染第 3 天的叶片提取 RNA 并检测目的基因表达。取注射第 6 天的烟草叶片冷冻干燥后, 用于提取总油脂和脂肪酸成分分析等。

缺陷型酿酒酵母菌株 BY4389 在含有 0.01% 油酸钠的 YPD 培养基中于 28 °C、220 r/min 振荡培养, 当 *OD*₆₀₀ 为 0.5 左右时, 离心收集细胞, 用无菌水洗涤。根据醋酸锂 (LiAc) 转化法, 将上述构建成功的酵母表达载体 pYES2.0-*GmSAD5* 转入 BY4389 缺陷酵母中, 经过缺尿嘧啶 (SC-URA) 培养基筛选和 PCR 鉴定出阳性转基因酵母。为了在酿酒酵母突变株中功能性表达, 首先在 SC-URA

(含 2% 葡萄糖和 0.01% 油酸钠) 的培养基上培养上述阳性转基因酵母。接着用不含油酸钠且添加 2% 半乳糖的培养基诱导酵母细胞转基因表达, 28 °C 振荡培养 72 h, 5 000 r/min 离心 5 min 收集酵母细胞, 冷冻干燥后提取油脂和分析脂肪酸成分。

1.2.8 脂肪酸甲酯提取与气相色谱 (GC) 分析

本试验采用内标法对上述烟草叶片和酵母提取脂肪酸甲酯。称取 50 mg 样品研磨至粉末, 加入 50 μ L 的 C17:0 作为内标 (浓度为 10 mg/mL)。用 500 μ L 的 2.5% 的浓硫酸-甲醇混合液进行甲酯化, 80 °C 水浴 2 h。用氮吹仪吹干后, 加入 500 μ L 的正己烷溶解混匀。将样品溶解液转移到 GC 瓶中, 用气相色谱仪对样品的脂肪酸成分及含量进行分析, 试验设置 3 个重复。脂肪酸含量通过安捷伦气相色谱仪进行定性定量检测, 用毛细管柱 (HP-88 100 m \times 0.25 mm \times 0.2 μ m) 分离, 火焰离子化检测器测定。自动进样, 进样次数为 3, 进样量为 1 μ L; 氮气用作载气, 流速为 2.64 mL/min; 进样温度和前检测器温度均为 250 °C; 采取程序升温的方式: 140 °C 的初始温度保持 5 min, 然后以 15 °C/min 的速度升至 250 °C。以样品峰的保留时间与脂肪酸甲酯标准品的保留时间定性, 按内标法计算各脂肪酸的含量。用下列公式计算各脂肪酸组分占样品的百分含量(k_i):

$$k_i = \frac{A_i \times m_s}{A_s \times m} \times 100\%$$

其中 i 为各脂肪酸组分; A_i 为第 i 种脂肪酸组分的峰面积; A_s 为内标的峰面积; m_s 为内标的质量; m 为样品质量。

1.2.9 总油脂提取与测定

采用氯仿-甲醇法提取烟草叶片的总油脂。称取 100 mg 粉末置于离心管中 (设置 3 个重复), 加入 7.5 mL 的氯仿-甲醇 (1:2), 混匀后于 37 °C 抽提 24 h。4 000 r/min 离心 10 min, 收集上层有机相。向沉淀再次加入氯仿-甲醇重复抽提两次,

每次 12 h。收集合并 3 次的有机相, 加 5 mL 氯仿和 9 mL 1% 的氯化钠溶液, 充分混匀后 8 000 r/min 离心 10 min, 回收下层有机相转移至已知质量 m_0 (mg) 的玻璃管中, 待管中液体蒸干后, 称取总重量 m_1 (mg)。

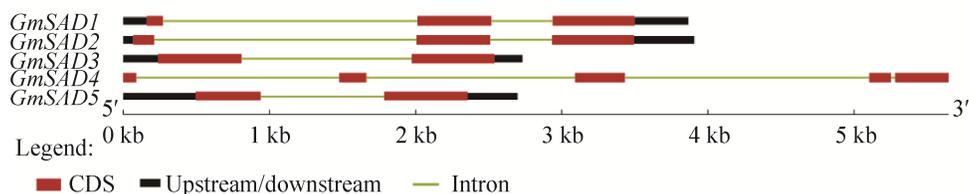
根据玻璃管质量 m_0 (mg) 和总重量 m_1 (mg) 计算烟草叶片中总脂的百分含量, 即总脂的百分含量 = $(m_1 - m_0) / \text{样品质量} \times 100\%$ 。

2 结果与分析

2.1 大豆 *GmSADs* 基因家族的鉴定及基因结构和蛋白理化性质分析

利用拟南芥 *AtSADs* 蛋白序列 (*AtSSI2* 和 *AtSAD1-6*) 搜索大豆数据库, 将获得的候选序列通过 SMART 和 CDD 结构鉴定分析, 最终共鉴定得到 5 个含有 *Acyl-ACP-Desat* 保守结构域的 *GmSADs* 家族成员, 且均属于具有 Fe-O-Fe 中心的 Ferritin-like 铁蛋白超家族, 其行使催化反应需要借助铁氧还蛋白 NADP⁺ 氧化还原酶的电子传递系统。根据染色体定位信息, 大豆 *GmSADs* 基因被依次命名为 *GmSAD1-GmSAD5*。利用在线 GSDS2.0 网站对 *GmSADs* 基因进行内含子、外显子分析。结果如图 1 所示, *GmSAD4* 的序列最长, 且无 5' 和 3' 非翻译区, 所含外显子 (5 个) 和内含子 (4 个) 数目最多。而 *GmSAD1* 和 *GmSAD2* 的基因不仅序列长度相近、均含有 3 个外显子和 2 个内含子, 且位置分布也相似。*GmSAD3* 和 *GmSAD5* 的基因均含 2 个外显子和 1 个内含子。

用 ExPASy 数据库中的工具 ProtParam 对 *GmSADs* 家族成员的理化性质进行分析。结果如表 3 所示, 这 5 个大豆 SAD 编码蛋白长度范围为 337 aa (*GmSAD5*)–402 aa (*GmSAD2*); 相对分子质量在 38.63 kDa (*GmSAD5*)–46.09 kDa (*GmSAD2*) 之间。除 *GmSAD3* 蛋白理论等电点为 7.68 外, 其余成员的平均理论等电点为 5.88。这 5 个 *GmSAD* 与拟南芥 *AtSSI2* 的理化性质相近。

图1 大豆 *GmSADs* 的基因结构Fig. 1 Gene structure of soybean *GmSADs*.表3 大豆 *GmSADs* 家族成员基本信息Table 3 Basic information of soybean *GmSAD* family members

Gene name	Transcript name	Number of amino acids (aa)	Molecular weight (kDa)	Theoretical pI	cTP-length (aa)	Predicted localization	Location
GmSAD1	Glyma.02G138100	391	44.89	5.94	50	C	Chr02:14302427-14306293
GmSAD2	Glyma.07G207200	402	46.09	6.05	61	C	Chr07:37640045-37643952
GmSAD3	Glyma.13G038600	378	43.03	7.68	25	C	Chr13:11956631-11959361
GmSAD4	Glyma.13G038700	375	43.75	5.87	10	-	Chr13:12002911-12008557
GmSAD5	Glyma.14G121400	337	38.63	5.66	10	-	Chr14:17499717-17502413
AtSSI2	AT2G43710	401	45.69	6.05	35	C	Chr2:18119962-18122889

C: chloroplast; -: any other location.

2.2 大豆 *GmSADs* 的蛋白结构分析

通过 TMHMM Server v. 2.0、ChloroP 1.1 和 TargetP 1.1 分别预测 *GmSADs* 家族成员的跨膜结构域和 N-末端转运肽 (TP), 其中拟南芥 *AtSSI2* 作为对照。结果表明, *GmSAD* 家族成员均不存在跨膜结构域。*GmSAD1*、*GmSAD2* 和 *GmSAD3* 分别含有 50、61 和 25 个氨基酸的叶绿体转运肽, 类似于拟南芥 *AtSSI2*。表明这 3 种蛋白可能在叶绿体中发挥作用, 这与前人报道的 *SAD* 一般在细胞质体内进行脂肪酸催化反应相一致^[37]。此外, 这种叶绿体转运肽也存在于其他植物的酰基-ACP Δ^9 去饱和酶中^[32]。

根据 SOPMA 网站的预测结果, *GmSAD* 成员的二级结构共有 4 种 (图 2A), 其中 α -螺旋与无规则卷曲的比例较高, β -转角和扩展链比例较少。*GmSADs* 各家族成员的二级结构 α -螺旋的含量最高, 其中 *GmSAD4* 和 *GmSAD5* 的 α -螺旋比例分别为 60.80% 和 61.72%, 其余成员的比例平均约为 52.38%; *GmSADs* 成员的无规则卷曲比例范围

为 25.22%–33.50%, β -转角和扩展链结构的占比均小于 10%。

用在线网站 SWISS-MODEL 对 *GmSADs* 家族成员进行三级结构预测分析并建模, 结果如图 2B, 预测到大豆 *GmSAD1* 蛋白活性形式为二聚体, 每个单体的二级结构主要由 11 个 α -螺旋、2 个 β -折叠和其他无规则卷曲组成, 还含有 1 个由 4 个 α 螺旋束包围的二铁离子, Fe 离子的配基是四螺旋束的氨基酸侧链, 两个单体的二铁离子位于 *SAD* 二聚体底物结合凹槽的内部, 共同组成了脱氢酶催化活性中心。

2.3 大豆 *GmSADs* 蛋白保守域及系统进化分析

利用 GeneDoc 软件对大豆 *GmSADs* 蛋白家族进行多序列比对分析, 选用对 18:0-ACP 具有底物选择性的蓖麻 *RcSAD1* (NP_001310659.1) 和拟南芥 *AtSSI2* 作为对照。由图 3 可知, 大豆 *GmSADs* 家族序列与蓖麻 *RcSAD1*、拟南芥 *AtSSI2* 蛋白的氨基酸序列相似性较高, 而且其保守结构域类似

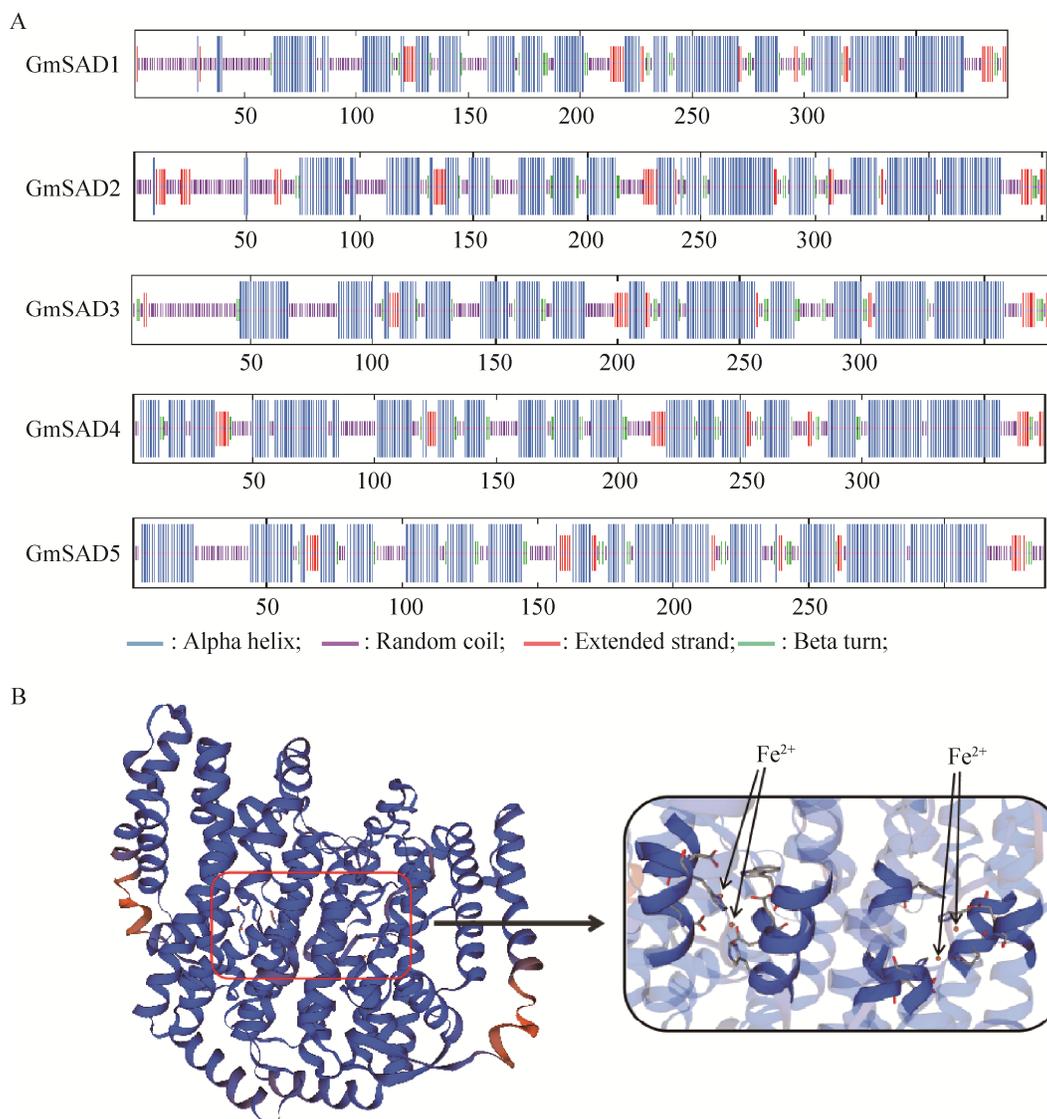


图 2 大豆 GmSADs 蛋白的高级结构预测

Fig. 2 Prediction of the advanced structure of soybean GmSADs proteins. (A) Secondary protein structures of soybean GmSADs. Blue: alpha helix; pink: random coil; red: extended strand; green: beta turn. (B) Tertiary protein structure of soybean GmSAD1. The box is the two diiron centers of the two dimers, and the ligand of the Fe atom is the amino acid side chain or group of the four-helix bundle.

于 RcSAD1、AtSSI2, 也分布在 11 个 α 螺旋和 2 个 β 片层之内^[38-39]。前人研究表明, SAD 脱氢酶的 8 个关键氨基酸种类影响着 SAD 对不同链长脂肪酰-ACP 的选择特异性。例如, 蓖麻 RcSAD1 的关键氨基酸残基 (M114、L115、T117、L118、P179、T181、G188 和 F189) (图 3) 和拟南芥 AtSSI2 (M152、L153、T155、L156、P217、T219、G226

和 F227) 均能使二者特异性选择并催化 18 : 0-ACP 生成 18 : 1-ACP^[40]。另外, 将蓖麻 RcSAD1 的 T117、L118、F189 和 T206 突变为其他氨基酸, 则 RcSAD1 的催化底物由 Δ^9 -18 : 0-ACP 改变为 Δ^6 -16 : 0-ACP 或烯丙醇反式异构体(E)-10-18 : 1-9-OH^[37,41]。多序列比对结果显示, 大豆 GmSAD1 和 GmSAD2 的关键氨基酸与 RcSAD1

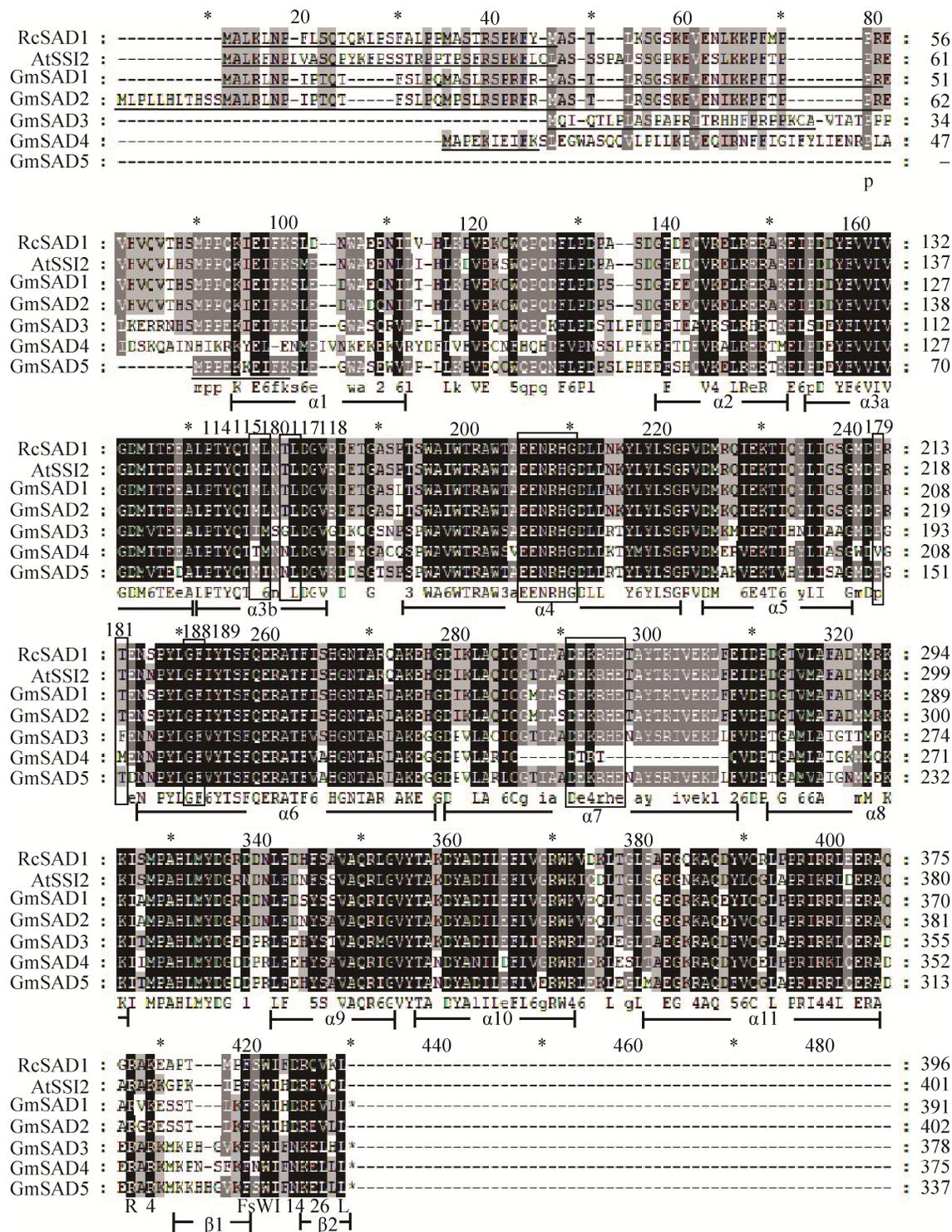


图 3 大豆 GmSADs 的多序列比对

Fig. 3 Multiple sequence alignment of soybean GmSADs with SADs from castor bean (RcSAD1) and *Arabidopsis* (AtSSI2). Residues in black represent 100% conservation of all sequences; residues in dark gray represent >75% identity of all sequences; Residues in light gray >50% identity of all sequences. The underline indicates the transit peptides. The boxes represent two conserved histidine-rich motifs EENRHG and DEKRHE. Functional determinative amino acids were marked in rectangles and numbered according to the start codon of RcSAD1.

和 *AtSSI2* 的完全相同, *GmSAD5* 含有 2 个变异氨基酸 (L86I, T88N), *GmSAD3* 和 *GmSAD4* 含有的变异氨基酸数目最多, 分别为 4 (M127I、L128M、T130G 和 T194F) 和 5 (M142T、L143M、T145N、P207V 和 T209M)。推测这些 *GmSADs* 的催化功能可能在底物选择方面存在差异。此外, *GmSADs* 家族除了 *GmSAD4* 之外, 还存在两个具有典型 SAD 特征的保守的组氨酸富集区, 即 EENRHG 和 DEKRHE, 其中天冬氨酸 (D) 和组氨酸 (H) 为 *GmSAD* 催化活性中心的二铁离子提供了必需的结合位点, 保证脱氢酶具备一定的催化活性。

利用 MEGA 7.0 软件对大豆 *GmSAD* 家族和其他植物 SADs 蛋白进行多序列系统进化分析。结果如图 4 所示, *GmSAD* 家族 5 个成员大致分为两类: *GmSAD1* 和 *GmSAD2* 与拟南芥 *AtSSI2*、

蓖麻 *RcSAD1*、油菜 *BnSAD1* 等亲缘关系较近, 聚为一类; 而 *GmSAD3*、*GmSAD4* 和 *GmSAD5* 则与拟南芥 *AtSAD6* 亲缘关系较近。

2.4 大豆 *GmSADs* 家族成员的表达模式

为鉴定这些大豆 *GmSADs* 家族成员是否行使功能, 我们应用 qRT-PCR 分析这些基因的表达模式。结果如图 5 所示, *GmSAD1*、*GmSAD2* 和 *GmSAD5* 在所有组织中均高水平表达, 其中 *GmSAD1* 和 *GmSAD2* 在根、茎、叶、花、果荚中表达量较高 (图 5A 和 5B), 表明 *GmSAD1* 和 *GmSAD2* 可能在这些营养组织中发挥重要脱氢功能。*GmSAD3* 和 *GmSAD4* 在各组织的表达量均极低 (图 5C 和 5D)。重要的是, *GmSAD5* 在发育种子中的表达量显著高于在其他组织中的表达 (图 5E), 显示其主要在种子中行使功能。对不同发育时期大豆种子检测表明, 随着种子发育,

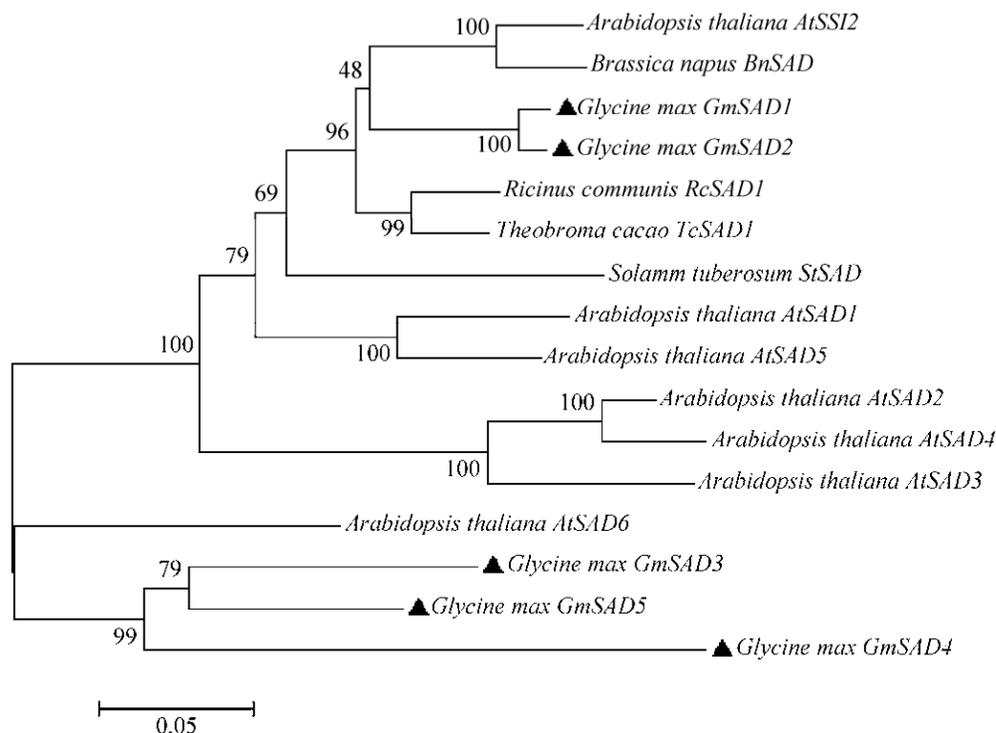


图 4 大豆 *GmSADs* 蛋白与其他植物 SAD(*AtSSI2*、*AtSAD1*–6、*RcSAD1*、*BnSAD*、*StSAD* 和 *TcSAD1*) 的系统发育分析

Fig. 4 Phylogenetic analysis of soybean *GmSADs* and other plant SADs (*AtSSI2*, *AtSAD1*–6, *RcSAD1*, *BnSAD*, *StSAD* and *TcSAD1*).

GmSAD5 表达快速升高, 在大豆种子发育晚期的表达量达到峰值 (图 5F), 而其他 4 个 *GmSAD* 表达量极低。大豆种子发育中、晚期正是油脂积累高峰期, 推测 *GmSAD5* 可能在大豆种子发育过程中参与油脂合成和储存等重要过程。

2.5 大豆 *GmSAD5* 基因的克隆和表达载体构建

为解析 *GmSAD5* 编码的酶蛋白是否具有 SAD 酶活性以及在大豆油脂生物合成中的功能, 我们克隆了 *GmSAD5* 基因, 并分别构建植物表达载体

和酵母表达载体。以发育中晚期的大豆种子 cDNA 为模板, 通过高保真 PCR 扩增出 *GmSAD5* 基因片段, 经回收纯化和测序验证, 成功克隆出 *GmSAD5*。

利用 *Xba* I 和 *Kpn* I 分别双酶切上述基因片段和植物表达载体 pCAMBIA1303, 然后利用 T4 DNA 连接酶将二者进行连接, 双酶切验证获得重组植物表达载体 pCAMBIA1303-*GmSAD5*。采用类似方法, 构建了 *GmSAD5* 的酵母表达载体 (pYES2.0-*GmSAD5*)。

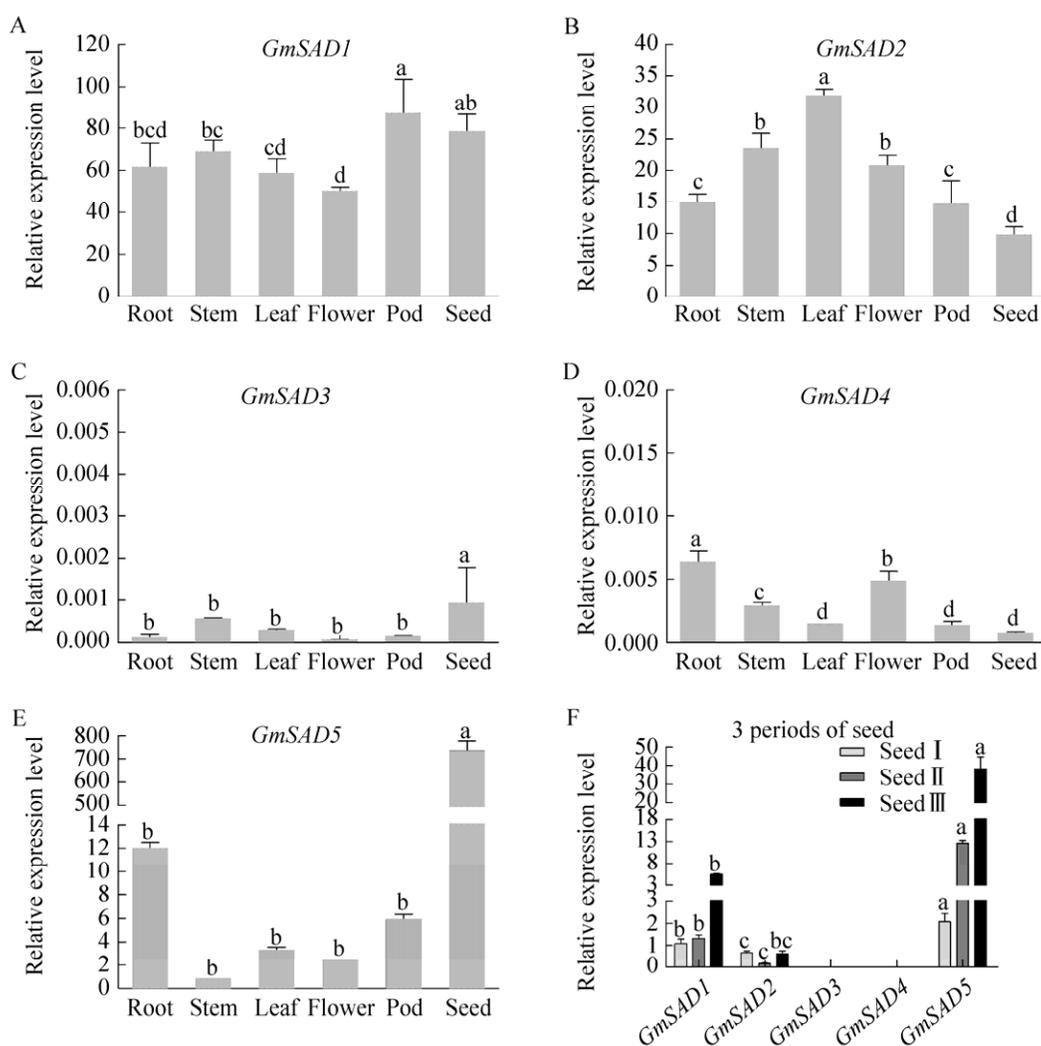


图 5 大豆 *GmSADs* 基因在不同组织(A-E)和种子不同发育阶段(F)的表达模式

Fig. 5 Expression pattern of soybean *GmSADs* gene in different tissues (A-E) and developing seeds (F). Error bars indicate the standard deviation of 6 biological replicates; Letters a, b, c, represent the significant differences between the different groups ($P < 0.05$).

2.6 大豆 *GmSAD5* 基因在烟草叶片的异源表达及对总油脂含量和脂肪酸成分的影响

利用农杆菌介导本氏烟草叶片瞬时表达 *GmSAD5* 基因, 检测 *GmSAD5* 过表达是否引起叶组织脂肪酸成分和油脂积累的改变。取注射 2 d 的叶片检测 *GmSAD5* 的表达, 结果如图 6A 所示, 转基因烟草叶片能扩增出约 1 014 bp 的目的条带, 而转空载的烟草叶片则无目的条带, 表明短时间内, *GmSAD5* 基因在烟草叶片中得以有效表达。取注射 6 d 的叶片进行总脂检测 (图 6B) 显示, 转基因烟草叶片的总脂含量明显比野生型和转空载的烟叶高 2.73% 和 2.80%。脂肪酸成分分析 (图 6C) 表明, 与野生型和转 pCAMBIA1303 空载的烟草叶片相比, 转 *GmSAD5* 烟草叶片的不饱和油酸 (C18:1) 和亚油酸 (C18:2) 分别增

加了 5.56% 和 8.14%, 而 C16:0、C18:0、C18:3 和 C20:0 的含量均降低, 尤其是硬脂酸 (C18:0), 下降了约 2.46%。另外, 亚麻酸 (C18:3) 的含量也明显下降了约 10.29%。总之, *GmSAD5* 能够提高烟草叶片中总脂的含量, 其中饱和脂肪酸 (尤其是硬脂酸) 含量显著降低, 不饱和油酸 (C18:1) 含量显著增加。这表明 *GmSAD5* 在烟叶组织中能行使 SAD 功能, 催化 18:0-ACP 生成 18:1-ACP, 且促进总油脂的积累。

2.7 大豆 *GmSAD5* 基因在 SAD 缺陷酵母中的异源表达及对脂肪酸成分的影响

在不饱和脂肪酸合成缺陷的酿酒酵母 (BY4389) 中异源表达 *GmSAD5* 基因, 转化酵母经缺尿嘧啶培养基筛选和 PCR 检测分析 (图 7A) 显示, 转基因酵母均扩增出大小为 1 014 bp 的条

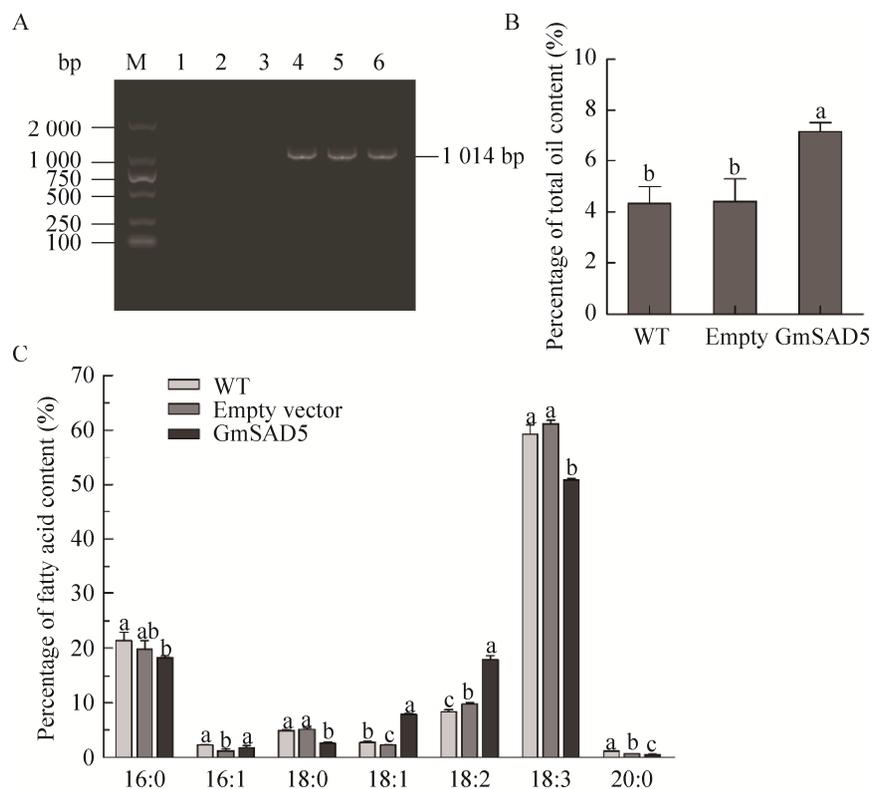


图 6 转 *GmSAD5* 基因烟草叶片中的目的基因表达分析 (A)、总脂质含量 (B) 和脂肪酸谱 (C)

Fig. 6 Expression analysis of *GmSAD5* gene (A), total lipid content (B) and fatty acid profiles (C) in the transgenic tobacco leaves. (A) M: 2 000 bp marker; 1–3: transgenic tobacco leaves; 4–6: transgenic tobacco leaves with *GmSAD5*. (B–C) Error bars indicate the standard deviation of 6 biological replicates; Letters a, b, c, represent the significant differences between the different groups ($P < 0.05$).

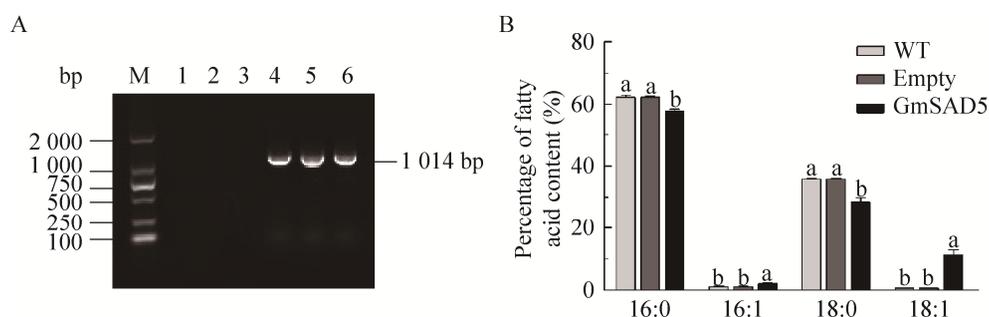


图7 *GmSAD5* 基因在缺陷酵母 BY4389 中的异源表达及对脂肪酸成分的影响

Fig. 7 Heterologous expression of *GmSAD5* gene in SAD-defective yeast BY4389 and its impact on fatty acid profiles. (A) PCR verification of *GmSAD5* expression in the transgenic BY4389; M: 2 000 bp marker; 1–3: transgenic BY4389 yeast with empty vector; 4–6: transgenic BY4389 yeast with *GmSAD5* gene. (B) Fatty acid content in the transgenic BY4389 yeast. WT: the SAD-defective BY4389 yeast; Empty: BY4389 yeast transformed with empty vector; GmSAD5: BY4389 yeast transformed with *GmSAD5* gene. Error bars indicate the standard deviation of 6 biological replicates; Letters a, b, c, represent the significant differences between the different groups ($P < 0.05$).

带,且能够在不含油酸的培养基中正常生长扩繁。然而, *SAD* 缺陷型和转空载的酵母则无法正常生长。这表明转基因酵母能够合成不饱和脂肪酸并满足自身生长需求,证明 *GmSAD5* 具有 *SAD* 酶活性。经气相色谱进一步检测酵母细胞脂肪酸成分,发现转基因酵母经半乳糖诱导表达后合成的棕榈酸 (C16:0) 和硬脂酸 (C18:0) 含量均明显下降了约 4.19% 和 7.46% (图 7B),但是产生了大量的单不饱和油酸 (C18:1, 约 10.72%) 和少量棕榈油酸 (C16:1)。而缺陷型和转空载酵母均不含上述不饱和脂肪酸 (图 7B)。这表明 *GmSAD5* 确实能使缺陷型酵母生成不饱和脂肪酸,且主要选择硬脂酰-ACP (18:0-ACP) 为底物并催化其脱氢形成油酰-ACP (18:1-ACP)。

3 讨论

大豆作为我国农业的主要经济作物之一,除了为人们提供豆类蛋白之外,还是人们日常生活食用植物油的主要来源之一^[42]。尽管大豆油含量较高,在食品加工工业应用广泛,但高含量的多不饱和脂肪酸增加容易使大豆油氧化酸败,从而限制了大豆油食用价值和利用率。而高油酸大豆油兼具饱和脂肪酸和多不饱和脂肪酸特性,氧化稳定性强,长期食用能够减少人体有害胆固醇并使

人体内的有益胆固醇得到很好地保持,从而可减少心脑血管等疾病的发生。因此,探究大豆硬脂酰-ACP Δ^9 脱氢酶的催化活性以解析油酸分子合成机制并为后续通过转基因工程培育高油酸大豆具有重要的指导意义。

本研究从大豆基因组鉴定获得 5 个 *GmSAD* 家族成员,预测到这些酶均以同型二聚体形式存在,每个单体含有一个二铁中心,且含一个属于类铁蛋白家族和属于酰基-ACP 脱氢酶家族的保守结构域,此外,由 2 个铁原子组成的二铁中心包裹于 4 螺旋束中。硬脂酰-ACP Δ^9 脱氢酶 (*SAD*) 是一种脱氢酶,在将油中的饱和脂肪酸转化为不饱和脂肪酸中起关键作用,大豆 *GmSADs* 家族中这 5 个大豆 *GmSADs* 基因的内含子数目差异较大,如 *GmSAD4* 有 4 个内含子, *GmSAD3* 和 *GmSAD5* 基因仅有 1 个内含子。*GmSADs* 成员在编码蛋白长度、相对分子量、理论等电点等理化性质也随着基因编码序列的长短和碱基比例不同而表现出不同的差异,如 *GmSAD5* 编码蛋白长度为 337 aa,相对分子量为 38.63 kDa,二级结构的 α 螺旋含量最高,分布较为均匀;而 *GmSAD2* 编码蛋白序列最长 (402 aa),相对分子质量也较大 (46.09 kDa),二级结构的 α 螺旋含量相对较少,在序列中间分布密集。

时空表达分析揭示, 这些 *GmSADs* 基因在大豆根、茎、叶、花、果荚和不同发育时期的豆子中都具有不同的表达模式。*GmSAD1* 和 *GmSAD2* 在大豆各组织中均有表达, 而只有 *GmSAD5* 在整个发育阶段的大豆种子, 特别是在中晚期具有极高的表达量, 且与种子油脂积累时期相吻合。这表明 *GmSAD5* 主要在发育种子中行使功能, 在种子油脂积累中起重要作用。与之相似的是, Zhang 等报道, 可可 *TcSAD1* 在发育胚中的表达量较高, *TcSAD1* 能提高拟南芥 *ssi2* 突变体种子的油酸 ($18:1\Delta^9$) 含量, 其功能类似于拟南芥 *AtSSI2*^[23]。

已有研究表明, SAD 酶蛋白催化中心的 8 个关键氨基酸可能决定着 SAD 的底物特异性。这 8 个关键氨基酸残基种类发生改变时常导致该脱氢酶对底物选择活性的改变。例如, 拟南芥 *AtSSI2* 这 8 种关键氨基酸依次为 M152、L153、T155、L156、P217、T219、G226 和 F227, *AtSSI2* 则对 $18:0$ -ACP 选择活性远远高于 $16:0$ -ACP; 当 T219 突变为 F219 时, 其对 $16:0$ -ACP 的选择活性远远高于 $18:0$ -ACP。然而, *AtSSI2* 蛋白 P217 突变为 S217, 则不影响 *AtSSI2* 对 $18:0$ -ACP 的选择活性^[40,43]。同样, 猫爪草 *MucACP- Δ^9* 脱氢酶对 $16:0$ -ACP 有特异的选择活性, 其仅在和 *AtSSI2* 脱氢酶 L156 的对应位置处含有一个变异氨基酸, 即 L152W^[40]。序列分析表明, *GmSAD5* 在与 *AtSSI2* 的 L153 和 T155 对应位置处也含有两个变异的关键氨基酸 (L86I 和 T88N)。通过 *GmSAD5* 基因烟草叶片瞬时表达和缺陷型酵母遗传转化测试显示, *GmSAD5* 仍表现出对 $18:0$ -ACP 的特异选择性。这表明, 并非所有 SAD 的底物选择性都由 SAD 酶蛋白催化中心这 8 个关键氨基酸决定, 这 8 个关键氨基酸及其相邻氨基酸的空间排列构型也可能控制着催化底物的选择性。值得注意的是, 农杆菌介导的烟草瞬时表达是一种常用的鉴别目标基因功能方法, 具有简单、快速、周期短、生物安全性高等优点。但有时不能反映所测目的基因功能的全貌, 所测表型的变化准确性也受到

接种量的多少、叶片的生理状况及环境条件等因素影响。进一步论证 *GmSAD5* 基因功能, 还需要进行种子特异过表达该基因, 或沉默及敲除该基因及该基因家族其他成员的遗传转化试验。本研究鉴定获得 5 个 *GmSAD* 特别是 *GmSAD5* 分子克隆可作为大豆油脂品质改良及油脂合成途径基因修饰的优异靶标。

4 结论

本研究鉴定获得 5 个大豆 *GmSAD* 家族成员, 预测分析表明, 均具有 Fe-O-Fe 中心和 SAD 酶特有的两个保守组氨酸富集基序 (EENRHG 和 DEKRHE), 为同源二聚体活性酶蛋白。五个 *GmSAD* 基因在大豆各组织中表达模式不同, 其中 *GmSAD5* 在发育种子中晚期高量表达, 与大豆油脂快速积累时期相吻合。烟草叶片瞬时表达和酵母突变体功能互补测试表明 *GmSAD5* 能高效催化硬脂酸生成油酸, 促进细胞总油脂合成积累。本研究为解析大豆种子油脂生物合成调控机制和大豆油脂品质改良提供了新知识和优异分子靶标。

REFERENCES

- [1] Qi WD, Shang MR. Research on China's soybean industry development. *Chin Agric Sci Bull*, 2014, 30(17): 88-96 (in Chinese).
祁旺定, 尚明瑞. 中国大豆产业发展问题研究. *中国农学通报*, 2014, 30(17): 88-96.
- [2] Fan SX, Li B, Sun JM, et al. A quantitative gas chromatographic method for determination of soybean seed fatty acid components. *Chin J Oil Crop Sci*, 2015, 37(4): 548-553 (in Chinese).
范胜栩, 李斌, 孙君明, 等. 气相色谱方法定量检测大豆 5 种脂肪酸. *中国油料作物学报*, 2015, 37(4): 548-553.
- [3] 顾和平, 凌以禄, 韩锋, 等. 栽培和野生大豆脂肪酸的组成、相关及其差异的研究. *江苏农业科学*, 1989(10): 13-15.
- [4] Rodríguez MFR, Sánchez-García A, Salas JJ, et al. Characterization of soluble acyl-ACP desaturases from *Camelina sativa*, *Macadamia tetraphylla* and

- Dolichandra unguis-cati*. J Plant Physiol, 2015, 178: 35–42.
- [5] Zhang F, Gao XQ, Zhang JJ, et al. Seed-specific expression of heterologous gene DGAT1 increase soybean seed oil content and nutritional quality. Chin J Biotech, 2018, 34(9): 1478–1490 (in Chinese).
张飞, 高秀清, 张靖洁, 等. 种子特异表达异源 DGAT1 基因提高大豆种子含油量和营养品质. 生物工程学报, 2018, 34(9): 1478–1490.
- [6] Fehr WR. Breeding for modified fatty acid composition in soybean. Crop Sci, 2007, 47(S3): S-72–S-87.
- [7] Al Amin N, Ahmad N, Wu N, et al. CRISPR-Cas9 mediated targeted disruption of *FAD2-2 microsomal omega-6 desaturase* in soybean (*Glycine max. L*). BMC Biotechnol, 2019, 19: 9.
- [8] Kinney AJ. Improving soybean seed quality. Nat Biotechnol, 1996, 14: 946.
- [9] Wu YM, Mao X, Wang SJ, et al. Improving the nutritional value of plant foods through transgenic approaches. Chin J Biotech, 2004, 20(4): 471–476 (in Chinese).
吴永美, 毛雪, 王书建, 等. 转基因改良植物的营养价值. 生物工程学报, 2004, 20(4): 471–476.
- [10] Yue AQ, Sun XP, Li RZ. Metabolic engineering of edible plant oils. J Plant Physiol Mol Biol, 2007, 33(6): 489–498 (in Chinese).
岳爱琴, 孙希平, 李润植. 食用植物油脂的代谢工程. 植物生理与分子生物学学报, 2007, 33(6): 489–498.
- [11] Do PT, Nguyen CX, Bui HT, et al. Demonstration of highly efficient dual gRNA CRISPR/Cas9 editing of the homeologous *GmFAD2-1A* and *GmFAD2-1B* genes to yield a high oleic, low linoleic and α -linolenic acid phenotype in soybean. BMC Plant Biol, 2019, 19: 311.
- [12] Fox BG, Shanklin J, Somerville C, et al. Stearoyl-acyl carrier protein delta 9 desaturase from *Ricinus communis* is a diiron-oxo protein. Proc Natl Acad Sci USA, 1993, 90(6): 2486–2490.
- [13] Ramesh AM, Kesari V, Rangan L. Characterization of a stearyl-acyl carrier protein desaturase gene from potential biofuel plant, *Pongamia pinnata* L. Gene, 2014, 542(2): 113–121.
- [14] Kachroo A, Shanklin J, Whittle E, et al. The *Arabidopsis* stearyl-acyl carrier protein-desaturase family and the contribution of leaf isoforms to oleic acid synthesis. Plant Mol Biol, 2007, 63(2): 257–271.
- [15] Li F, Bian CS, Xu JF, et al. Cloning and functional characterization of *SAD* genes in potato. PLoS One, 2015, 10(3): e0122036.
- [16] Shanklin J, Cahoon EB. Desaturation and related modifications of fatty acids. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol, 1998, 49: 611–641.
- [17] Xue JA, Mao X, Wu YM, et al. Expression of yeast acyl- Δ^9 desaturase for fatty acid biosynthesis in tobacco. Chin J Biotech, 2013, 29(5): 630–645 (in Chinese).
薛金爱, 毛雪, 吴永美, 等. 酿酒酵母脂酰- Δ^9 脱氢酶亚细胞定位表达及其对烟草脂肪酸合成的影响. 生物工程学报, 2013, 29(5): 630–645.
- [18] Han YJ, Xu G, Du HW, et al. Natural variations in stearyl-acyl carrier protein desaturase genes affect the conversion of stearic to oleic acid in maize kernel. Theor Appl Genet, 2017, 130(1): 151–161.
- [19] Lindqvist Y, Huang W, Schneider G, et al. Crystal structure of delta9 stearyl-acyl carrier protein desaturase from castor seed and its relationship to other di-iron proteins. EMBO J, 1996, 15(16): 4081–4092.
- [20] Shang XG, Cheng CZ, Ding J, et al. Identification of candidate genes from the *SAD* gene family in cotton for determination of cottonseed oil composition. Mol Genet Genomics, 2017, 292(1): 173–186.
- [21] Dong JY, Wan YS, Liu FZ. Sequence analysis of Δ^9 -Stearoyl-ACP desaturase gene (*SAD*) in peanut. Acta Agronom Sin, 2012, 38(7): 1167–1177 (in Chinese).
东金玉, 万勇善, 刘凤珍. 花生 Δ^9 -硬脂酰-ACP 脱氢酶基因 (*SAD*) 的序列分析. 作物学报, 2012, 38(7): 1167–1177.
- [22] Jia YL, Wu L, Lu CM. Stearoyl-acyl carrier protein desaturase (*SAD*) gene cloning and expression in *Brassica napus*. Chin J Oil Crop Sci, 2014, 36(2): 135–141 (in Chinese).
贾艳丽, 吴磊, 卢长明. 甘蓝型油菜 Δ^9 硬脂酰 ACP 脱氢酶 (*SAD*) 基因的克隆与表达分析. 中国油料作物学报, 2014, 36(2): 135–141.
- [23] Zhang YF, Maximova SN, Guiltinan MJ. Characterization of a stearyl-acyl carrier protein desaturase gene family from chocolate tree, *Theobroma cacao* L. Front Plant Sci, 2015, 6: 239.

- [24] Liu Q, Singh SP, Green AG. High-stearic and High-oleic cottonseed oils produced by hairpin RNA-mediated post-transcriptional gene silencing. *Plant Physiol*, 2002, 129(4): 1732–1743.
- [25] Carrero-Colón M, Abshire N, Sweeney D, et al. Mutations in SACPD-C result in a range of elevated stearic acid concentration in soybean seed. *PLoS One*, 2014, 9(5): e97891.
- [26] Zaborowska Z, Starzycki M, Femiak I, et al. Yellow lupine gene encoding stearyl-ACP desaturase—Organization, expression and potential application. *Acta Biochim Pol*, 2002, 49(1): 29–42.
- [27] Craig W, Lenzi P, Scotti N, et al. Transplastomic tobacco plants expressing a fatty acid desaturase gene exhibit altered fatty acid profiles and improved cold tolerance. *Transgenic Res*, 2008, 17(5): 769–782.
- [28] Liao BN, Lu JX, Huang XL, et al. Cloning and expression analysis of stearyl-ACP desaturase gene *PoSAD* from *Paeonia ostii*. *Acta Bot Boreal Occident Sin*, 2018, 38(1): 35–40 (in Chinese).
廖冰楠, 陆俊杏, 黄兴琳, 等. 牡丹 *PoSAD* 基因克隆与表达分析. *西北植物学报*, 2018, 38(1): 35–40.
- [29] Iskandarov U, Silva JE, Kim HJ, et al. A specialized diacylglycerol acyltransferase contributes to the extreme medium-chain fatty acid content of *Cuphea* seed oil. *Plant Physiol*, 2017, 174(1): 97–109.
- [30] Xue WB, Liu F, Sun Z, et al. A Δ -9 fatty acid desaturase gene in the microalga *Myrmecia incisa* *Reisigl*: cloning and functional analysis. *Int J Mol Sci*, 2016, 17(7): 1143.
- [31] Wilkins MR, Gasteiger E, Bairoch A, et al. Protein identification and analysis tools in the ExPASy server. *Methods Mol Biol*, 1999, 112: 531–552.
- [32] Emanuelsson O, Nielsen H, Von Heijne G. ChloroP, a neural network-based method for predicting chloroplast transit peptides and their cleavage sites. *Protein Sci*, 1999, 8(5): 978–984.
- [33] Emanuelsson O, Nielsen H, Brunak S, et al. Predicting subcellular localization of proteins based on their n-terminal amino acid sequence. *J Mol Biol*, 2000, 300(4): 1005–1016.
- [34] Tamura K, Dudley J, Nei M, et al. MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol*, 2007, 24(8): 1596–1599.
- [35] Wu YJ, Jang B, Zhang Y, et al. Transient expression in tobacco by agrobacterium-mediated transformation. *J Northeast For Univ*, 2010, 38(9): 110–112 (in Chinese).
吴英杰, 姜波, 张岩, 等. 农杆菌介导的烟草瞬时表达试验条件优化. *东北林业大学学报*, 2010, 38(9): 110–112.
- [36] Ji XJ, Mao X, Hao QT, et al. Splice variants of the castor *WR11* gene upregulate fatty acid and oil biosynthesis when expressed in tobacco leaves. *Int J Mol Sci*, 2018, 19: 146.
- [37] Cahoon EB, Lindqvist Y, Schneider G, et al. Redesign of soluble fatty acid desaturases from plants for altered substrate specificity and double bond position. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94(10): 4872–4877.
- [38] Chi XY, Yang QL, Pan LJ, et al. Isolation and characterization of fatty acid desaturase genes from peanut (*Arachis hypogaea* L.). *Plant Cell Rep*, 2011, 30(8): 1393–1404.
- [39] Hwangbo K, Ahn JW, Lim JM, et al. Overexpression of stearyl-ACP desaturase enhances accumulations of oleic acid in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Biotechnol Rep*, 2014, 8(2): 135–142.
- [40] Liu BL, Sun Y, Xue JA, et al. Stearyl-ACP Δ^9 Desaturase 6 and 8 (GhA-SAD6 and GhD-SAD8) are responsible for biosynthesis of palmitoleic acid specifically in developing endosperm of upland cotton seeds. *Front Plant Sci*, 2019, 10: 703.
- [41] Whittle EJ, Tremblay AE, Buist PH, et al. Revealing the catalytic potential of an acyl-ACP desaturase: Tandem selective oxidation of saturated fatty acids. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105(38): 14738–14743.
- [42] Li RZ, Hatanaka T, Yu KS, et al. Soybean oil biosynthesis: role of diacylglycerol acyltransferases. *Funct Integr Genomics*, 2013, 13(1): 99–113.
- [43] Troncoso-Ponce MA, Barthole G, Tremblais G, et al. Transcriptional activation of two Delta-9 Palmitoyl-ACP desaturase genes by MYB115 and MYB118 is critical for biosynthesis of Omega-7 monounsaturated fatty acids in the endosperm of arabidopsis seeds. *Plant Cell*, 2016, 28(10): 2666–2682.

(本文责编 郝丽芳)