

DOI:10.3969/j.issn.1003-5060.2023.03.017

# *PuFAD8* 基因过表达载体的构建及其在番茄中的遗传转化

宋慧慧, 颜龙飞, 苟莎莎, 姚改芳, 胡康棣, 张 华

(合肥工业大学 食品与生物工程学院, 安徽 合肥 230601)

**摘 要:**脂肪酸去饱和酶 8(fatty acid desaturase 8, FAD8) 是 FAD 基因家族成员, 可参与催化不饱和脂肪酸的合成进而影响果实香气。为进一步研究 *PuFAD8* 基因的功能及其与番茄果实挥发性物质的关系, 文章构建了模式植物番茄 *PuFAD8* 基因的过表达载体, 通过农杆菌介导遗传转化、植物组织培养技术获得番茄 *PuFAD8* 基因过表达植株。结果表明, 番茄 *PuFAD8* 基因过表达载体构建成功, 并获得番茄过表达植株, 以便进一步研究该基因的分子功能, 为明确其在番茄果实成熟过程中挥发性物质的调控机制奠定了基础。

**关键词:**番茄; *PuFAD8* 基因; 过表达; 载体构建; 香气

中图分类号: Q784

文献标志码: A

文章编号: 1003-5060(2023)03-0392-05

## Construction of overexpression vector of *PuFAD8* gene and its genetic transformation in tomato (*Solanum lycopersicum*)

SONG Huihui, YAN Longfei, GOU Shasha, YAO Gaifang, HU Kangdi, ZHANG Hua

(School of Food and Biological Engineering, Hefei University of Technology, Hefei 230601, China)

**Abstract:** Fatty acid desaturase 8 (FAD8) is a member of the FAD gene family, which can catalyze the synthesis of unsaturated fatty acids and affect fruit aroma. In order to further study the function of *PuFAD8* gene and its relationship with volatile compounds in tomato (*Solanum lycopersicum*) fruit, the overexpression vector of tomato *PuFAD8* gene was constructed. The overexpression plant of tomato *PuFAD8* gene was obtained by *Agrobacterium*-mediated transformation and plant tissue culture. The results showed that the overexpression vector of tomato *PuFAD8* gene was successfully constructed and tomato overexpression plants were successfully obtained in order to further study the molecular function of *PuFAD8* gene and clarify the regulation mechanism of volatile compounds during tomato fruit ripening.

**Key words:** tomato (*Solanum lycopersicum*); *PuFAD8* gene; overexpression; vector construction; aroma

## 0 引 言

番茄 (*Solanum lycopersicum*) 是一种重要的园艺作物, 因果实风味可口, 深受消费者的喜爱。番茄的挥发性风味物质是消费者关注的重要特征之一。尽管挥发性风味特征种类繁多, 且有多种生物合成途径, 但最近有研究发现影响挥发性成

分的数量性状位点<sup>[1-2]</sup>。在番茄果实成熟过程中, 目前已鉴定出的芳香物质有 400 多种, 其中对番茄香气有重要贡献的有 20~30 种<sup>[3]</sup>。大多数受欢迎的番茄品种中都有含量更高的 (Z)-3-己烯醛/己醛<sup>[4-5]</sup>。这些 C6 醛和醇是由不饱和脂肪酸氧化而来的生物活性化合物。在植物体内, 己醛是由亚油酸产生的, 亚麻酸是己烯醛和衍生醇的

收稿日期: 2022-01-14; 修回日期: 2022-05-26

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (31970312; 32170315)

作者简介: 宋慧慧 (1997—), 女, 安徽阜阳人, 合肥工业大学硕士生;

张 华 (1973—), 男, 江苏徐州人, 博士, 合肥工业大学教授, 博士生导师, 通信作者, E-mail: hzhanglab@hfut.edu.cn.

前体,亚油酸和亚麻酸是植物膜脂中最丰富的脂肪酸。

脂肪酸去饱和酶(fatty acid desaturase, FAD)可催化饱和脂肪酸从而产生不饱和脂肪酸,该酶与植物中的脂肪酸组成有关。改变不饱和脂肪酸组分会影响其衍生香气物质组分及含量。越来越多的研究表明脂肪酸的缺少会影响其果实挥发性物质的含量。

文献[6]发现梨果实添加外源亚油酸和亚麻酸,可以促进果实己醛和(E)-2-己烯醛含量的积累;在番茄中,添加外源亚油酸可提高果实中己醛等物质的含量<sup>[7]</sup>;文献[8]发现梨果实添加外源亚油酸和亚麻酸,可以促进果实 C6 醛和醇物质的积累。改变不饱和脂肪酸组分会影响其挥发性物质的含量,说明不饱和脂肪酸影响了果实香气的合成。脂肪酸作为 LOX 代谢途径的底物,在水果香气的合成中起重要作用<sup>[9]</sup>。水果中缺乏脂肪酸会导致其果实香气偏淡<sup>[10]</sup>。文献[11]发现过表达  $\omega$ -3FAD(*FAD3* 和 *FAD7*)影响番茄中香气的成分(Z)-3-己烯醛与己醛的质量比发生变化;文献[10]发现 *PpFAD3-1* 和 *PpFAD3-2* 与桃果实中的挥发物形成有关,在成熟的桃果实中 *PpFAD3-1* 表达量高,*PpFAD3-2* 表达量低。

相比之下,桃幼果中 *PpFAD3-2* 表达量高,*PpFAD3-1* 表达量低,这些结果表明这 2 个  $\omega$ -3FAD 在发育成熟过程中动态影响桃果实挥发性物质的形成<sup>[10]</sup>。因此,FAD 可能在香气的合成中起关键作用。

为了进一步研究 *PuFAD8* 的功能,由于梨的基因突变体难以获得且周期很长,因此本文利用同源重组技术和番茄异源表达体系构建番茄 *FAD8* 基因过表达材料来进一步研究 *PuFAD8*

的功能。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

#### 1.1.1 植物材料和载体

植物组织培养中的 Micro Tom 番茄种子购于广州浩美园艺公司;南果梨采自辽宁省鞍山市千山区食用果园;植物表达载体 pCAMBIA1300-221-35S-GUS 为本实验室保存。

#### 1.1.2 质粒和试剂

感受态大肠杆菌 DH5 $\alpha$ 、EHA105,均购于上海唯地生物技术有限公司;Phanta Super-Fidelity DNA Polymerase(P501-d1)、2 $\times$ Taq Plus Master Mix(P212-01)、ClonExpress One Step Cloning(C112-01)试剂盒,均购于 Vazyme 生物科技有限公司;限制性内切酶 *BamH* I、*Sac* I,均购于 NEB 公司;Prime Script<sup>TM</sup> RT Master Mix 试剂盒(RR036A)、SYBR Premix Ex Taq<sup>TM</sup> 试剂盒(DRR420A),均购于 Takara 生物科技有限公司;Plant Total RNA Isolation 试剂盒(RE-05011),购于 Foregene 生物技术有限公司;普通 DNA 产物纯化试剂盒(DP204)、普通琼脂糖凝胶回收试剂盒(DP209)、质粒小提试剂盒(DP103),均购于天根生化科技有限公司。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 *PuFAD8* 基因过表达载体的构建

本实验首先从南果梨果皮中提取 RNA,然后进行反转录获得 cDNA。从梨基因组数据库获取 *PuFAD8* 的编码序列,并使用引物设计软件 CE Design V1.04,线性化酶切位点选择 *BamH* I 与 *Sac* I,本文所构建载体的引物序列见表 1 所列。

表 1 引物序列

引物名称	引物序列(5'→3')
<i>PuFAD8</i> -F	ACGGGGGACTCTAGAGGATCCATGGAGGGTGAGAAGAAGTACATTACT
<i>PuFAD8</i> -R	CGATCGGGGAAATTCGAGCTCTCAACCATGGGTATTGACAGCTT
HYG-F	ATGAAAAAGCCTGAACTACCGCG
HYG-R	GGGATCTGGATTTTAGTACTGG

以上述反转录 cDNA 为模板:cDNA 2  $\mu$ L, *PuFAD8*-F/R (10 mmol/L) 各 2  $\mu$ L, 5  $\times$  SF Buffer (10 mmol/L MgSO<sub>4</sub>) 10  $\mu$ L, SF DNA Polymerase 1  $\mu$ L, dNTP Mix 1  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 补至 50  $\mu$ L。在冰上混匀后放入聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)仪中,设置反应程

序为:94  $^{\circ}$ C、3 min;94  $^{\circ}$ C、10 s,58  $^{\circ}$ C、30 s,72  $^{\circ}$ C、45 s,35 个循环;72  $^{\circ}$ C、7 min;4  $^{\circ}$ C。扩增结束后的 PCR 产物在琼脂糖凝胶上进行鉴定。将剩余 48  $\mu$ L PCR 产物进行普通纯化,然后取 2  $\mu$ L 进行琼脂糖凝胶电泳检测,其余产物置于-20  $^{\circ}$ C 冰箱冷冻保存。

pCAMBIA1300-221-35S-GUS 载体选择酶切位点(*Bam*H I 和 *Sac* I),反应产物进行普通琼脂糖凝胶电泳,之后通琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒进行纯化回收。将 PCR 产物与双酶切后的质粒载体连接,转入大肠杆菌 DH5 $\alpha$ ,将转化后得到的阳性菌提取质粒送去测序,并将测序正确的质粒按照 EHA105 说明书进行转化农杆菌。待侵染番茄组织时使用。

### 1.2.2 农杆菌介导番茄遗传转化

取 100 粒饱满的番茄种子置于小烧杯底部,然后用 75% 无水乙醇对番茄种子表面消毒 5 min,再用 8% NaClO 溶液消毒种子 8 min,可以多次换新的无菌离心管冲洗。用移液枪吸干种子表面的残留液体,最后用消毒后的无菌镊子将 25~30 粒种子放置在培养基 T0 上,暗培养 5~7 d,待种子冒出小芽转入到光照下。将子叶叶片剪成小块,背面朝上放置在 T1 预培养基上,在黑暗的条件下培养 2 d。再将构建好的农杆菌在液体培养基中进行培养直到其  $A_{600}$  值在 0.50~0.60 之间后进行收菌。弃上清液,加入无菌水来稀释农杆菌至  $A_{600}$  值为 0.12~0.15,此时侵染液配置成功。

将培养好的农杆菌侵染液用于侵染已剪好的子叶。子叶放到无菌小烧杯中,缓慢倒入侵染液并充分摇晃。再用移液枪尽量吸干侵染液,并重新摆回预培养 T1 上,暗培养 2 d。将预培养的外植体用灭菌后的镊子小心夹出,缓慢置于 T21 培养基上,反面朝下,待外植体长出芽。待芽长至 2~3 cm 时,转入培养基 T22。当芽长至 5 cm 左右时,转入培养基 T3 中,直到生根并且根部健康。将生根的小苗开盖炼苗后转入土培,并且保持湿度。

### 1.2.3 *PuFAD8* 过表达番茄植株鉴定

根据 pCAMBIA1300-221-35S-GUS 载体中的潮霉素抗性序列设计引物 *HYG-F* 和 *HYG-R* (表 1)分别从野生型和过表达番茄植株叶片中提取 DNA,并将其作为模板进行转基因番茄植株的 PCR 鉴定。

## 2 结果与分析

### 2.1 *PuFAD8* 过表达载体构建

#### 2.1.1 *PuFAD8* 基因的克隆

本文以南果梨梨皮 cDNA 为模板,分别以 *PuFAD8-F* 和 *PuFAD8-R* 为引物进行 PCR 扩增,扩增结束后的产物进行琼脂糖凝胶电泳检测,

扩增产物为一条特异条带,*PuFAD8* 基因的 PCR 克隆结果如图 1 所示。从图 1 可以看出,与预期 *PuFAD8* 基因片段大小(1 344 bp)一致,表明 *PuFAD8* 基因克隆成功。

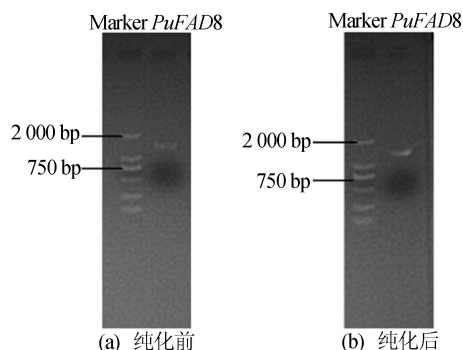


图 1 *PuFAD8* 基因 PCR 克隆

#### 2.1.2 载体的酶切

利用 *Bam*H I 和 *Sac* I 内切酶双酶切 PCAMBIA1300-221-35S-GUS 载体,回收酶切产物经琼脂糖凝胶电泳检测。PCAMBIA1300-221-35S-GUS 载体酶切及纯化结果如图 2 所示。由图 2 可知,条带在 11 939 bp 左右,条带位置正确,可进行下一步实验。

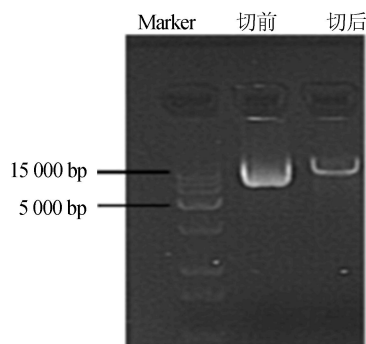


图 2 PCAMBIA1300-221-35S-GUS 载体酶切及纯化

#### 2.1.3 扩增产物与载体的连接转化

将上述 PCR 产物纯化回收后与 PCAMBIA1300-221-35S-GUS 载体连接后并转入大肠杆菌 DH5 $\alpha$  体内,培养后挑取菌落进行 PCR 鉴定。菌落 PCR 鉴定及测序比对如图 3 所示。图 3 中 1~6 表示转化时挑取的 6 个单克隆 PCR 结果。由图 3 可知,条带位置在 1 344 bp 左右,位置正确。之后将阳性菌落培养后提取的质粒送去测序,测序结果正确。最后将测序正确的质粒转入农杆菌 EHA105 中,农杆菌 PCR 鉴定,条带正确,之后将阳性的农杆菌培养起来,保存 -80  $^{\circ}$ C 冰箱待用。

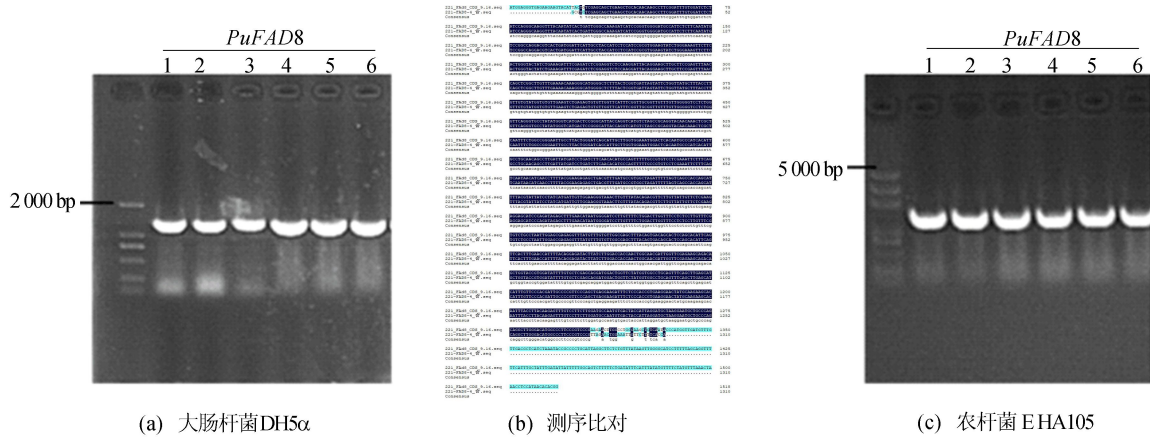


图 3 菌落 PCR 鉴定及测序比对

### 2.2 番茄植物组织培养

番茄植物组织培养的整个阶段如图 4 所示。由图 4 可知,首先将番茄 Micro Tom 种子消毒后放置在 T0 培养基上进行播种,然后黑暗情况下培养至种子萌发,待种子有小芽后从暗培养拿到光照下培养 2~3 d;再将番茄 2 片子叶切成小块,同时将茎剪成一小段,反面朝上摆在 T1 预培养基上;接着用 221-FAD8 农杆菌侵染剪好的外植体,并重新摆回到 T1 培养基上,暗培养 2 d 后,将叶片和茎转入培养基 T21 中,背面朝下,进行芽诱导阶段;然后是芽伸长阶段,培养基为 T22,待芽伸长至 4 cm 左右,剪下将其插入培养基 T3 中,直至生根;待根部成长状态良好时可转入营养土中进行土培。

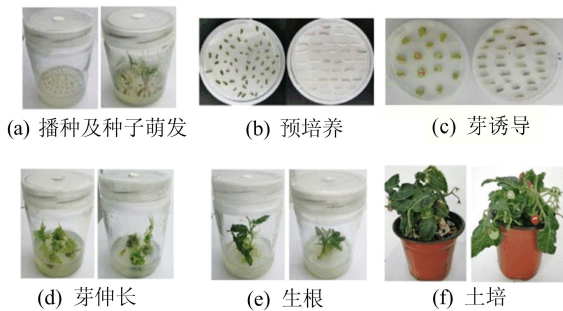


图 4 植物组织培养

### 2.3 转基因植株的鉴定

通过植物组织培养获得转基因番茄植株后,分别从野生型和过表达番茄植株叶片中提取 DNA,利用植物表达载体 PCAMBIA1300-221-35S-GUS 携带的潮霉素抗性对植株进行阳性鉴定,预期扩增片段长度为 1 226 bp。转基因番茄植株鉴定结果如图 5 所示,图 5 中:1~5 为转基因番茄植株;6 为阳性对照;7 为野生型番茄。由

图 5 可知,阳性对照及 5 株转基因植株扩增条带大小在 1 226 bp 左右,野生型番茄植株未能扩增出条带,表明 T 代成功获得 5 株 *PuFAD8* 过表达番茄植株。

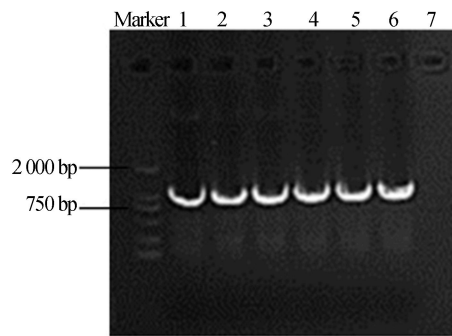


图 5 转基因番茄植株鉴定

### 2.4 转基因植株中 *PuFAD8* 的表达情况

利用 PCR 方法分析过表达植株叶片中 *PuFAD8* 基因表达情况。提取野生型和 5 株鉴定正确的 T1 代番茄植株叶片中的 DNA,以此为模板,以 *PuFAD8*-F 和 *PuFAD8*-R 为引物进行 PCR 扩增。转基因番茄 *PuFAD8* 表达情况如图 6 所示。

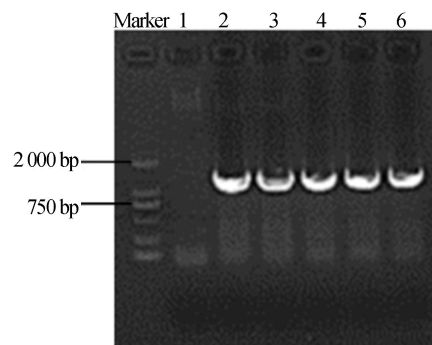


图 6 转基因番茄 *PuFAD8* 表达分析

图 6 中:1 为野生型番茄;2~6 为转基因番茄。从图 6 可以看出,野生型植株叶片未能克隆出梨皮 *FAD8* 基因,而 T1 代转基因番茄植株均在 1 344 bp 位置有条带,表明 *PuFAD8* 基因成功遗传转化,但是 *PuFAD8* 的具体功能验证还需要在后代纯合体中进行研究。

### 3 讨 论

令人愉悦的果实香气作为重要的果实品质特征之一,是吸引人们的重要因素。许多挥发性和非挥发性化学物质对整体风味做出了巨大贡献。然而,代谢过程和果实香气的挥发物非常复杂,调节果实代谢和香气物质排放的关键基因尚不清楚。脂肪酸代谢是形成果实香气成分的重要途径<sup>[7]</sup>。脂肪酸的缺乏或增加会影响水果中挥发性酯的生物合成<sup>[8]</sup>,挥发性酯类的产生也与梨果实中亚油酸和亚麻酸的含量密切相关<sup>[6]</sup>,这表明亚油酸和亚麻酸的含量影响果实香气的合成。

改善果实感官特性是番茄育种中一个被忽视的问题,这可能是由于这一特性的因素比较复杂以及评估其筛选方案比较困难导致的,也可能是由于植物育种者的主要工作在于提高产量和抗病性。然而,更浓郁的果实香气更能受到消费者的青睐,从而对人类自身的营养产生有益的影响。增加己烯醛与己醛质量比来改善番茄果实的香气特征,这种改变可能会提高果实香气,对消费者来说是一种有价值的特质<sup>[3]</sup>。

*FAD* 参与了不饱和脂肪酸的形成并且通过改变脂肪酸组分进而参与植物生长发育过程,不同家族的成员在果实成熟衰老中具有功能差异。据报道,脂肪酸与挥发性物质产生相关<sup>[8]</sup>。桃果实中 *PpFAD2* 的表达模式与亚油酸变化趋势相似,并且通过实验发现 *PpFAD2* 与桃果实中亚油酸合成相关,在己醛等青香型香气成分上有着重要作用<sup>[6]</sup>。文献<sup>[12]</sup>发现 *LeFAD3* 可有效增加番茄果实中亚麻酸含量;文献<sup>[13]</sup>发现 *FAD7* 突变体番茄中亚麻酸含量会大量减少,己烯醇和己烯醛含量也会显著降低。因此,*FAD* 类基因作为脂肪酸代谢中一个重要的基因,会影响脂肪酸的组成,进而影响果实挥发性物质的产生。

本文通过构建梨 *PuFAD8* 基因过表达载体,在番茄中异源表达 *PuFAD8* 基因,通过植物组织培养,成功获得过表达植株并鉴定 *PuFAD8* 基因阳性植株,为进一步研究 *PuFAD8* 在果实香气合成机制中的功能奠定了基础。

### [参 考 文 献]

- [1] TIEMAN D M, ZEIGLER M, SCHMELZ E A, et al. Identification of loci affecting flavour volatile emissions in tomato fruits [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2006, 57: 887-896.
- [2] MATHIEU S, CIN V D, FEI Z, et al. Flavour compounds in tomato fruits; identification of loci and potential pathways affecting volatile composition [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2009, 60: 325-337.
- [3] 王利斌, 李雪晖, 石珍源, 等. 番茄果实的芳香物质组成及其影响因素研究进展 [J]. *食品科学*, 2017, 38(17): 291-300.
- [4] CARBONELL-BARRACHINA A, AGUSTI A, RUIZ J. Analysis of flavor volatile compounds by dynamic headspace in traditional and hybrid cultivars of Spanish tomatoes [J]. *European Food Research and Technology A*, 2006, 222: 536-542.
- [5] FEUSSNER I, WASTERNAK C. The lipoxygenase pathway [J]. *Annu Rev Plant Biol*, 2002, 53: 275-297.
- [6] ZHANG B, YIN X R, LI X, et al. Lipoxygenase gene expression in ripening kiwifruit in relation to ethylene and aroma production [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2009, 57(7): 2875-2881.
- [7] TIES P, BARRINGER S. Influence of lipid content and lipoxygenase on flavor volatiles in the tomato peel and flesh [J]. *Journal of Food Science*, 2012, 77(7): C830-C837.
- [8] QIN G H, TAO S T, ZHANG H P, et al. Evolution of the aroma volatiles of pear fruits supplemented with fatty acid metabolic precursors [J]. *Molecules*, 2014, 19(12): 20183-20196.
- [9] 乜兰春, 孙建设, 黄瑞虹. 果实香气形成及其影响因素 [J]. *植物学报*, 2004, 21(5): 631-637.
- [10] WANG J J, LIU H R, GAO J, et al. Two  $\omega$ -3 *FADs* are associated with peach fruit volatile formation [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2016, 17(4): 1-11.
- [11] DOMINGUEZ T, HERNANDEZ M L, PENNYCOOKE J C, et al. Increasing omega-3 desaturase expression in tomato results in altered aroma profile and enhanced resistance to cold stress [J]. *Plant Physiology*, 2010, 153(2): 655-665.
- [12] YU C, WANG H S, YANG S, et al. Overexpression of endoplasmic reticulum omega-3 fatty acid desaturase gene improves chilling tolerance in tomato [J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2009, 47(11/12): 1102-1112.
- [13] CANOLES M A, BEAUDRY R M, LI C, et al. Deficiency of linolenic acid in *lefad7* mutant tomato changes the volatile profile and sensory perception of disrupted leaf and fruit tissue [J]. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 2006, 131(2): 284-289.

(责任编辑 闫杏丽)