

花生

高油酸

基因工程

殷冬梅 著



中国农业科学技术出版社

花生

高油酸

基因工程

殷冬梅 著



中国农业科学技术出版社

图书在版编目 (CIP) 数据

花生高油酸基因工程 / 殷冬梅著. —北京: 中国农业科学技术出版社, 2011. 5

ISBN 978 - 7 - 5116 - 0424 - 8

I. ①花… II. ①殷… III. ①花生 - 油酸 - 基因工程
IV. ①S565. 2

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2011) 第 051038 号

责任编辑 崔改泵

责任校对 贾晓红

出 版 者 中国农业科学技术出版社

北京市中关村南大街 12 号 邮编: 100081

电 话 (010) 82106631 (编辑室) (010) 82109704 (发行部)
(010) 82109703 (读者服务部)

传 真 (010) 82106624

网 址 <http://www.castp.cn>

印 刷 者 北京富泰印刷有限责任公司

开 本 880 mm × 1 230 mm 1/32

印 张 5.75

字 数 150 千字

版 次 2011 年 5 月第 1 版 2011 年 5 月第 1 次印刷

定 价 30.00 元

—— 版权所有 · 翻印必究 ——

前 言

花生是世界范围内广泛种植的重要油料作物之一，中国是世界花生生产大国，年产量居世界第一位。在我国，花生总产的 50% 以上用于榨油，花生油一直是我国主要的食用植物油之一，其绝对消费量呈稳定上升趋势。花生油富含油酸、亚油酸，其营养价值高、气味醇香，深受群众喜爱，被誉为中国的“橄榄油”。

油酸有利于提高油的稳定性、风味和营养。因此，提高花生油中油酸与亚油酸的比值（O/L）是国内外科研工作者进行花生油脂改良的重要研究领域之一。油酸脱氢酶基因（FAD2）被认为是控制高油酸特性的重要基因，直接决定了种子油脂中多不饱和脂肪酸的含量与比例，是多不饱和脂肪酸合成的第一步，也是关键的一步。它在生物体内对脂肪酸代谢、维持膜的正确结构和生物学功能方面起着重要作用。

基因工程技术自诞生以来，在医药、农业和食品科学领域得到了广泛的应用。运用基因工程技术，可以打破物种间的界限，培养优质、高产、抗性好和具有特殊用途的新品种。目前改良作物品质的主要基因有：控制果实成熟的基因、谷物种子贮藏蛋白基因、控制脂肪合成基因等。自从

1983 年首例转基因植物（烟草）诞生以来，世界上有 40 多种农作物品种得到改良，如水稻、大豆、油菜、棉花、番茄、马铃薯、瓜类等，更有 10 余种转基因植物（如转基因棉花、大豆等）已进入商业化种植。植物基因工程技术在农业生产上的应用和发展，特别是近 10 年来转基因农作物在全世界的商业化推广种植，在解决环境恶化、资源匮乏、粮食短缺等方面显示出了巨大的作用。

作者多年来一直从事花生品质遗传改良工作，较系统研究了调控花生油脂代谢的重要功能基因——油酸脱氢酶基因及其调控表达规律，利用 RNAi 技术创造出高油酸花生种质（油酸含量 80%），相关研究论文已陆续在《Molecular Biotechnology》《Plant Molecular Biology Report》《Euphytica》《J. Genet. Genom.》等期刊发表，其研究成果将对油用花生新品种选育和花生种质资源的创新有一定的理论和实用价值。本书在参考了国内外大量有关专著、实验手册和原始研究论文的基础上，结合作者多年来从事及指导研究生学习和科研过程中的心得和经验，尽可能详尽地介绍近年来花生高油酸基因工程研究的新技术及新成果；尽可能涵盖花生基因工程中常用的实验方法和技术，并力求做到理论结合实践，借以开拓读者的思路。

本书共分 3 篇。第一篇是综述篇，分五章，主要介绍植物脂肪酸代谢的遗传调控及基因工程、植物脂肪酸脱氢酶的分子生物学研究进展、RNAi 在植物遗传改良中的应用、花生脂肪酸脱氢酶基因研究进展以及花生遗传转化和再生研究进展。第二篇是技术篇，分十三章，主要介绍适合花生基因工程操作的主要技术，诸如核酸提取与纯化、文库构建、外

源基因的转化与检测等，有的实验方法是作者多年摸索出来的新技术。第三篇是成果篇，分四章，主要介绍花生油酸脱氢酶基因的克隆、体外重组、遗传转化及功能分析等内容。

基因工程技术的发展日新月异，花生基因工程研究的成果也层出不穷。虽然作者希望本书尽可能全面地介绍最新的花生高油酸基因工程研究的成果和技术，但限于时间和精力，错误和不妥之处在所难免，恳请同行专家和读者不吝赐教。

本书能够顺利并及时出版，得益于参考文献作者们的研究成果和智慧，得益于崔党群教授的鼓励和帮助，得益于教育部“新世纪优秀人才”和郑州市“领军人才”的资助，得益于中国农业科学技术出版社的精心编审。在此，向他们表示最诚挚的谢意！

殷冬梅

2011年3月

目 录

第一篇 花生脂肪酸代谢的遗传 调控与基因工程

第一章 植物脂肪酸代谢的遗传调控与基因工程	(3)
1.1 脂肪酸的种类及其重要性	(3)
1.1.1 脂肪酸的种类	(3)
1.1.2 植物脂肪酸的生理功能	(4)
1.1.3 植物脂肪酸的食用及工业价值	(4)
1.2 脂肪酸生物代谢途径与调控	(5)
1.2.1 脂肪酸生物代谢途径	(5)
1.2.2 植物脂肪酸代谢调控的基因工程	(6)
第二章 植物脂肪酸脱氢酶的分子生物学研究进展 ...	(11)
2.1 脂肪酸脱氢酶的种类与分布	(11)
2.1.1 植物脂酰 ACP 脱氢酶	(12)
2.1.2 植物脂酰 - 脂脱氢酶	(13)
2.2 脂肪酸脱氢酶的克隆与序列分析	(14)
2.3 脂肪酸脱氢酶的催化机理与活性中心	(17)

第三章 RNAi 在植物遗传改良中的应用	(19)
3.1 植物的转基因沉默	(19)
3.2 RNAi 的产生机制	(20)
3.3 RNAi 在植物遗传改良中的应用	(22)
3.3.1 植物的功能基因组学研究	(22)
3.3.2 植物品质的遗传改良	(24)
第四章 花生脂肪酸脱氢酶基因研究进展	(27)
4.1 油酸脱氢酶基因	(27)
4.2 油酸脱氢酶基因的调控表达	(28)
4.3 磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶 (PEPC)	(30)
第五章 花生遗传转化和再生研究进展	(33)
5.1 花生遗传转化的目的和意义	(33)
5.2 农杆菌介导的转化	(34)
5.3 基因枪介导的转化	(39)

第二篇 花生基因工程实验技术

第六章 花生总 DNA 提取	(45)
6.1 目的	(45)
6.2 材料	(45)
6.3 DNA 粗提液微量制备	(45)
6.3.1 试剂	(45)
6.3.2 操作	(46)
6.4 DNA 提取与纯化	(46)
6.4.1 试剂	(46)
6.4.2 操作步骤	(46)

第七章 花生总 RNA 提取	(48)
7.1 目的	(48)
7.2 材料	(48)
7.3 一步提取法	(48)
7.3.1 试剂	(48)
7.3.2 操作步骤	(49)
7.4 通用的方法	(50)
7.4.1 试剂	(50)
7.4.2 操作	(50)
第八章 质粒 DNA 的提取与酶切	(52)
8.1 目的	(52)
8.2 试剂	(52)
8.3 操作步骤	(52)
第九章 核酸提取物纯度及浓度检测	(55)
9.1 目的	(55)
9.2 材料	(55)
9.3 分光光度计法	(55)
9.3.1 操作	(55)
9.4 琼脂糖凝胶电泳法	(56)
9.4.1 试剂	(56)
9.4.2 操作	(57)
第十章 目的基因的 PCR 扩增	(59)
10.1 目的	(59)
10.2 材料	(59)
10.3 操作	(59)

第十一章 cDNA 文库构建	(61)
11.1 目的	(61)
11.2 材料	(61)
11.3 试剂	(61)
11.4 操作	(62)
第十二章 农杆菌法转化外源基因	(65)
12.1 目的	(65)
12.2 材料	(65)
12.3 实验步骤	(65)
第十三章 基因枪法转化外源基因	(67)
13.1 目的	(67)
13.2 材料	(67)
13.3 操作	(67)
第十四章 组织化学染色法检测 GUS 活性	(70)
14.1 目的	(70)
14.2 材料	(70)
14.3 试剂	(70)
14.4 操作步骤	(71)
第十五章 Southern-Blot	(73)
15.1 目的	(73)
15.2 试剂	(73)
15.3 操作步骤	(74)
15.3.1 基因组 DNA 的限制酶切	(74)
15.3.2 DNA 消化产物的琼脂糖凝胶电泳	(74)
15.3.3 DNA 从琼脂糖凝胶转移到固相支持物	(74)
15.3.4 探针标记	(76)

15.3.5	杂交	(77)
15.3.6	洗膜与检测	(77)
15.3.7	放射自显影	(78)
第十六章	Northern 印迹杂交	(79)
16.1	目的	(79)
16.2	材料	(79)
16.3	总 RNA 或 mRNA 琼脂糖凝胶电泳分离	(79)
16.3.1	试剂	(79)
16.3.2	操作	(80)
16.4	印迹	(81)
16.4.1	操作	(81)
16.5	RNA 杂交和显影	(81)
第十七章	外源基因表达的 RT-PCR 检测	(83)
17.1	目的	(83)
17.2	试剂	(83)
17.3	操作	(83)
第十八章	外源基因整合的原位杂交	(85)
18.1	目的	(85)
18.2	材料	(85)
18.3	试剂	(85)
18.4	操作	(86)

第三篇 花生油酸脱氢酶基因研究成果

第十九章	花生属脂肪酸脱氢酶基因的克隆和序列分析	(91)
19.1	材料和方法	(92)

19.1.1	试验材料	(92)
19.1.2	RNA 提取与 RT-PCR 扩增	(92)
19.1.3	目的基因片段的克隆与序列测定	(94)
19.1.4	分子系统发育树的分析	(99)
19.2	结果与分析	(99)
19.2.1	花生属 FAD2 基因的克隆和序列测定 ...	(99)
19.2.2	花生属 FAD2 基因的序列比较与 蛋白分析	(100)
19.2.3	花生属 FAD2 基因的系统进化关系	(102)
19.3	讨论	(102)
第二十章 花生油酸脱氢酶基因高效表达载体构建与		
	原核表达	(109)
20.1	材料与方法	(110)
20.1.1	菌株与质粒	(110)
20.1.2	酶及试剂	(110)
20.1.3	培养基	(110)
20.1.4	表达载体构建与转化	(110)
20.1.5	外源蛋白的诱导表达	(111)
20.1.6	重组蛋白的提取	(112)
20.1.7	SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE) ...	(112)
20.1.8	重组蛋白的纯化	(114)
20.1.9	FAD2 活性测定与脂肪酸 GC-MS 分析	(114)
20.2	结果与分析	(115)
20.2.1	高效表达载体构建	(115)
20.2.2	目的基因在大肠杆菌中的蛋白表达 SDS-PAGE 分析与纯化	(115)

20.2.3 重组蛋白的功能鉴定	(117)
20.3 讨论	(118)
20.3.1 表达载体与受菌体的选择	(118)
20.3.2 培养条件的优化	(119)
20.3.3 影响脂肪酸脱氢酶表达的其他因素与 途径	(120)
第二十一章 花生油酸脱氢酶在酿酒酵母中的表达和 功能鉴定	(121)
21.1 材料和方法	(122)
21.1.1 菌株与质粒	(122)
21.1.2 主要试剂	(122)
21.1.3 培养基	(122)
21.1.4 含油酸脱氢酶的表达载体 pYES/HO-A 的 构建	(124)
21.1.5 重组质粒在酿酒酵母中的诱导表达	(125)
21.1.6 重组蛋白的检测	(126)
21.1.7 酵母油脂的脂肪酸分析	(128)
21.2 结果与分析	(128)
21.2.1 重组表达质粒 pYES/HO-A 的构建和酶切 鉴定	(128)
21.2.2 油酸脱氢酶在酿酒酵母中的诱导 表达	(128)
21.2.3 酵母油脂的脂肪酸分析	(129)
21.3 讨论	(131)

第二十二章 花生 FAD2 基因特异表达载体的构建和

RNAi 对内源基因表达的抑制作用	(134)
22.1 材料与方法	(135)
22.1.1 植物材料	(135)
22.1.2 菌种与质粒	(136)
22.1.3 酶与试剂	(136)
22.1.4 培养基	(136)
22.1.5 PCR 引物	(137)
22.1.6 特异表达载体的构建	(137)
22.1.7 根癌农杆菌 LBA4404 感受态细胞的 制备	(139)
22.1.8 冻融法直接转化 LBA4404	(140)
22.1.9 菌落 PCR	(140)
22.1.10 农杆菌介导的花生遗传转化体系的 建立	(141)
22.1.11 转基因花生的分子生物检测	(142)
22.2 结果与分析	(143)
22.2.1 构建 FAD2 基因反向重复序列表达 载体	(143)
22.2.2 建立转化再生体系及筛选 Km 抗性 浓度	(145)
22.2.3 转基因植株的获得	(147)
22.2.4 转化植株的 PCR 检测	(148)
22.2.5 Real Time PCR 检测目的基因的表达	(149)
22.3 讨论	(152)

22.3.1	关于影响农杆菌介导花生遗传转化的因素	(152)
22.3.2	RNA 干扰 (RNAi) 技术在植物基因工程中的应用	(153)
22.3.3	实时荧光定量 PCR 在基因表达方面的应用	(153)
参考文献		(155)

第一篇

花生脂肪酸代谢的遗传 调控与基因工程
