第 31 卷 第 4 期　　华 中 农 业 大 学 学 报　　Vol. 31　No. 4
2012 年　8 月　　Journal of Huazhong Agricultural University　　Aug. 2012,419～422

油棕 P450 基因在果皮发育过程中的动态表达

梁远学　袁怡君　鲍玉佳　李东栋

海南大学热带生物资源教育部重点实验室,海口 570228

摘要　对油棕果实 5 个不同发育时期果皮中脂肪酸含量和类细胞色素 P450(cytochrome P450,P450)基因的表达情况进行了分析。结果表明:在所选择的 5 个不同发育时期中第 4 个时期 P450 的表达量最高,为第 1 个时期表达量的 201.07 倍。脂肪酸总含量分析表明第 3、4 个时期之间增加速率最高(15.79%)。在第 3 个时期脂肪酸的合成较少,脂肪酸含量变化趋势与同样组织中的 P450 基因表达趋势类似。由于细胞色素 P450 在植物脂肪酸代谢中起重要作用,油棕果实发育中细胞色素 P450 的表达极有可能对其脂肪酸的氧化、环氧化、烃基化等代谢产生影响,进而对脂肪酸的组成、产量及一些保护性化合物等的合成产生影响。

关键词　油棕;P450;果实发育;脂肪酸;动态表达

中图分类号　S 565.9　　**文献标识码**　A　　**文章编号**　1000-2421(2012)04-0419-04

油棕(*Elaeis guineensis*)俗称油椰子,属棕榈科椰子亚科油棕属,是热带多年生单子叶木本油料作物。油棕全年开花结果,其油不仅可以食用而且还可以作生物柴油的原材料,年平均产油量 4.17 t/hm^2(毛棕榈油 CPO,下同),是其他油料作物(花生、大豆、油菜、向日葵等)年平均产油量(0.42 t/hm^2)的近 20 倍[1]。油棕油因其产油量高、可再生、不受季节限制而成为 21 世纪具有很强竞争力的产品。目前,国内外针对油棕的研究主要集中在栽培、病虫害防治和种质资源的收集等方面,而针对脂肪酸代谢途径及其调控的研究还鲜有报道[2]。

细胞色素 P450 是一个古老的基因超家族,广泛参与不同生物中多种重要的生化反应,如甾类激素的合成、萜类、生物碱、脂溶性维生素代谢、药物代谢及脂肪酸代谢等[3-4]。在植物体内,细胞色素 P450 所催化的反应类型广泛而复杂,主要有:烯基的环氧化反应,烷基的羟化作用等 10 多种[5-7]。还广泛参与脂肪酸、植物激素、防御物质、药物、生物碱等的合成[8]。P450 在许多植物中都参与了脂肪酸的合成,目前已经证明细胞色素 P450 超家族中的 *CYP*86 和 *CYP*94 两个家族作用于脂肪酸[3]。拟南芥 P450 家族中的 *CYP*86*A*1 在酵母中表达后显示出 ω-羟基酶活性,对饱和或不饱和的 C12-C18 脂肪酸起作用,而对 16 碳烷烃不起作用;主要参与 C16-C18,C22-C24 的 ω-羟基化脂肪酸的合成。*CYP*94 家族主要参与植物的防御功能,其中从*V. sativa*中分离得到的 *CYP*94*A*1 编码脂肪酸 ω-羟化酶,可以参与软木脂前体物中的 C22 和 C24 脂肪酸的合成[9]。

本研究在前期油棕果皮果仁 SSH 文库构建和分析[10]的基础上,针对果皮中特异性表达的类细胞色素 P450(cytochrome P450,以下简称 P450)基因在果皮发育过程中的动态表达展开研究,为探究 P450 参与油棕脂肪酸代谢和果实发育过程中的调控功能研究提供基础,并为通过基因工程方式改变油棕脂肪酸代谢途径提供新的研究思路。

1　材料与方法

1.1　材　料

不同成熟度的油棕果实采自中国热带农业科学院椰子研究所,其中 YZG1 生长约 10 d,未授粉;YZG2、YZG3、YZG4、YZG5 分别为授粉后约 45、90、135、180 d。每次采集的样品取中果皮用液氮冷冻后保存于－70 ℃。TIANScript cDNA 第一链合成试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司;SYBR Premix Ex *Taq*™ Ⅱ(Perfect Real Time)试剂盒购自宝生物工程(大连)有限公司。引物由上海

收稿日期:2011-07-27
基金项目:国家自然科学基金项目(30560092,31060259)
梁远学,硕士研究生. 研究方向:植物基因工程. E-mail:haidalyx@163.com
通讯作者:李东栋,博士,教授. 研究方向:植物基因工程. E-mail:lidd@hainu.edu.cn

英骏技术有限公司(Invitrogen)合成。其他相关试剂购自上海生物工程公司。

1.2 类P450基因片段的生物信息学分析

在对油棕果皮、果仁RNA进行抑制消减杂交(SSH)文库构建和筛选的基础上,对其中表达量差异10倍以上的克隆进行序列分析。测序结果应用BlastX进行在线分析,并运用MEGA5 Beta 6.1构建进化树。

1.3 油棕RNA提取及cDNA合成

油棕果皮中RNA采用CTAB-LiCl法提取[11],提取的RNA用30 μL超纯水溶解,经甲醛变性凝胶电泳检查所提RNA的质量,电压控制在75～90 V,电流为30～45 mA,时间控制在40～50 min,然后贮藏于－70 ℃备用。cDNA合成采用TIANScript cDNA第一链合成试剂盒(TIANGEN,CHINA)。具体操作步骤如下:2 μL油棕总RNA、2 μL 10 μmol/L oligo(dT)^{15}、2 μL 2.5 mmol/L dNTP、8.5 μL RNase-free ddH_2O;70 ℃加热5 min后迅速在冰上冷却2 min。简短离心收集反应液后加入以下组分:4 μL 5×first-strand buffer(含有DTT)、0.5 μL RNasin、1 μLTIANScipt M-MLV(200 U);轻轻用移液器混匀上述混合液;42 ℃温浴50 min;95 ℃加热5 min终止反应,置冰上进行后续试验或冷冻保存。

1.4 荧光定量PCR检测不同时期P450基因的表达水平

以获得的cDNA为模板,建立如下荧光定量PCR(4×)反应体系:40.0 μL SYBR Premix Ex *Taq*™ II(2×)、3.2 μL PCR上游引物(10 μmol/L)、3.2 μL PCR下游引物(10 μmol/L)、1.6 μL ROX Reference Dye(50×)、2.0 μL油棕cDNA第一链、30.0 μL ddH_2O(引物序列:β-actin PF:TGGAAGCTGCTGGAATCCAT,β-actin PR:TCCTCCACTGAGCACAACGTT;P450 PF:CAAGCCTGGTTGATGTCT,P450 PR:AAGGATGAGGGCGGTTTT),每个反应重复4次。实时荧光定量PCR反应程序为:95 ℃预变性30 s,95 ℃变性5 s、60 ℃退火31 s,循环40次。反应结束后,电泳检查是否为P450基因的扩增产物并对实验结果进行解读,采用$2^{-\Delta\Delta Ct}$法做出相对表达差异图并进行分析。

1.5 油棕果皮中脂肪酸含量的测定

利用改进的Folch法[12]进行脂肪酸含量的测定。步骤如下:将新鲜的油棕中果皮样品经液氮研磨后准确测定质量,加入20倍体积的氯仿-甲醇(2∶1)混合液,0.02%(*m*/*V*)的BHT抗氧化剂,室温磁力搅拌匀质化1 h后2 400 r/min离心10 min分离得有机相。将有机相用0.9%的NaCl溶液洗涤,涡旋混合振荡几秒后离心分层,将得到的氯仿相使用旋转蒸发仪浓缩至约1 mL后,在烘箱中烘干至恒定质量,计算油脂的质量百分比。

2 结果与分析

2.1 P450基因生物信息学分析结果

对从油棕果皮、果仁RNA SSH文库中筛选出来的表达量差异10倍以上的克隆序列在NCBI上进行BlastX分析,结果显示从文库中所挑选出的基因片段可能属于细胞色素基因P450家族中的一员。其与数据库中的一个假P450基因(假P450基因与真正的P450基因有较大的同源性但是该基因经过了长期进化之后而被关闭,或者被插入了许多外源基因片段,导致该基因不能表现出P450基因的功能)具有31%的同源性。正是因为数据库中的基因为假P450基因,所以即使只有31%的同源性也可以在一定程度上说明本研究中的候选基因为P450家族基因。

进一步对来源于数据库中的10多个P450家族基因序列(主要来源于油料作物)采用邻位比对法(neighbor joining)构建了系统进化树,从比对的结果可以得知本研究中编号为*H*09(功能可能类似于P450)的基因片段与多个来源于不同植物种类的P450基因类似,且与芸薹属植物中的P450基因相似程度最高,可初步认为*H*09基因应为P450家族基因中的一员(图1)。

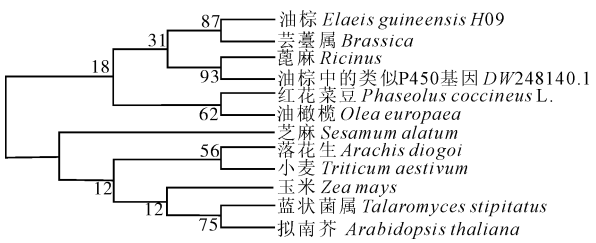


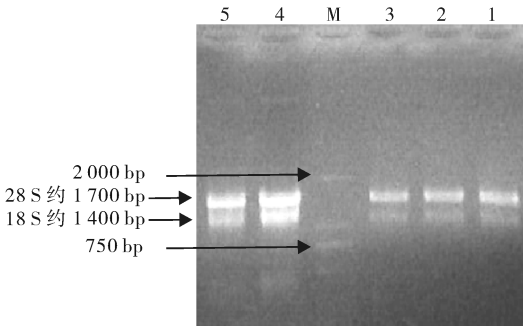
图1 采用neighbor joining法所得油棕类P450基因与其他基因的进化树

Fig.1 Phylogenetic tree acquired by neighbor joining derived from oil palm's P450-like gene and other P450

2.2 RNA电泳及cDNA合成后进行的*β-actin*扩增结果

应用CTAB法提取油棕中果皮总RNA并进行

电泳(图 2)分析，结果表明：本次所提取的总 RNA 中的 18S、28S 条带清晰而且 28S rRNA 条带亮度约为 18S rRNA 条带亮度的 2 倍，说明提取的效果较好，但 5S 条带不明显；从图 2 中几乎看不见 DNA 条带，说明 RNA 质量较好。进行 *β-actin* 基因扩增后结果表明：扩增片段与预期目标片段的长度一致。可以说明反转录的 cDNA 质量较好，可用于后续的 P450 基因鉴定试验。



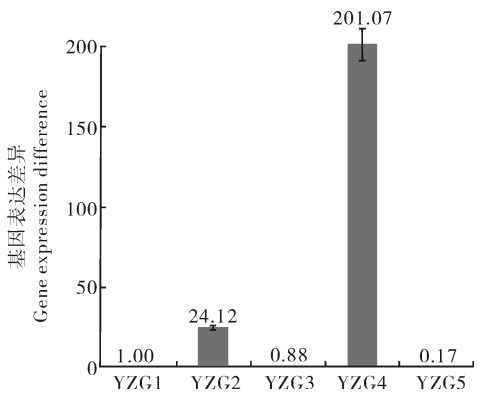
M：DS 2000 marker；1，2，3，4，5 分别代表油棕果实的 5 个时期的 RNA，1 为刚生长约 10 d，但还未授粉；2、3、4、5 分别为授粉后约 45、90、135、180 d。1，2，3，4，5 represent RNA from the fruit of the first，the second，the third，the fourth and the fifth period of the oil plam's development. 1 for just about 10 d growth，but was not pollinated，2，3，4，5 for 45，90，135，180 d after pollination.

图 2　油棕果实 RNA 琼脂糖凝胶电泳分析

Fig. 2　The oil palm's mesocarp RNA's agarose gel

2.3　荧光定量 PCR 结果

对荧光定量 PCR 数据采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法进行处理，结果表明：*H*09(类 P450)基因在第 2 个时期和第 4 个时期的相对表达量较高，分别达到了第1个时期的 24.12 倍和 201.07 倍，其余 3 个阶段(1、3、5)表达量较低(图 3)，第 5 个时期表达量最低。总体的表达动态并不是同样的趋势，而是呈现出高低交错的状态。



YZG1、YZG2、YZG3、YZG4、YZG5 分别表示油棕果实第 1、2、3、4、5 个时期。YZG1，YZG2，YZG3，YZG4，YZG5 in this article separate represent the first，the second，the third，the fourth and the fifth period of the oil plam's development.

图 3　油棕 P450 基因 RT-PCR 表达分析

Fig. 3　The relative expression P450-like gene *in Elaeis guineensis*'s mesocarp

2.4　脂肪酸总含量

经氯仿-甲醇法测得油棕第 1、2、3、4、5 个时期的脂肪酸总含量占鲜质量百分比依次为 6.00%、14.21%、20.78%、36.57%、48.81%；脂肪酸总含量在第 1、2 个时期间增加了 8.213%，第 2、3 时期间增加 6.57%，第 3、4 时期间增加 15.79%，第 4、5 个时期间增加 12.24%；在第 3 个时期脂肪酸的合成较少，而这种增加的趋势与同样组织中的 P450 基因表达趋势类似，证明 P450 基因在脂肪酸合成调控中有重要作用。

3　讨　论

据文献报道，油棕果实在授粉后的70 d内是中果皮细胞的快速增殖期，而 70～100 d 内油棕果皮质量几乎没有改变[11]。由于细胞增殖需要多种脂肪酸参与并且需要对其进行各类修饰，而 P450 基因恰好拥有此功能，所以在该过程中应该有 P450 基因参与，由此使得第 2 个时期 P450 的表达量上调。第 4 个时期也有大量的脂肪酸合成，同样需要 P450 的修饰，而且需求量应该是最大的，所以第 4 个时期 P450 的表达量相对很高，达到第1 个时期的 200 多倍。而第 3 个时期是介于细胞的快速增殖与脂肪酸的大量合成之间的时段，该时段细胞的增殖几乎停止，且没有开始合成次级代谢的脂肪酸，所以 P450 基因的表达量相对第 2 个时期下降。本研究结果与 Timothy 等[13]关于油棕果皮脂肪酸含量及油棕长度与授粉时间关系基本一致，但与其研究结果存在一定的差异。本研究结果表明该类 P450 基因可能在不同时期还承担着不同的生物学功能，也许与激素的调节有一定关联。而在整个果实发育过程中 P450 基因的动态表达相对差异柱状图会形成类似于“M”的形状，与脂肪酸的积累存在何种关系还需作进一步的深入研究。后续的研究将主要致力于该 P450 基因全长序列的克隆和生物学功能分析。而针对油棕 P450 基因在脂肪酸代谢中的功能研究也将为今后油料作物脂肪酸代谢调控相关的遗传改良提供研究基础。

参 考 文 献

[1] YUSOF B. Palm oil production through sustainable plantations [J]. Eur J Lipid Sci Tech,2007,109:289-295.

[2] 曹建华,林位夫,张以山,等. 油棕的产油潜力及其影响因子探析[J]. 中国热带农业,2009(6):48-50.

[3] PINOT F,BEISSON F. Cytochrome P450 metabolizing fatty acids in plants: characterization and physiological roles[J]. FEBS Journal,2010,278(2):195-205.

[4] WHITBRED J M,SCHULER M A. Molecular characterization of CYP73A9 and CYP82A1 P450 genes involved in plant defense in pea[J]. Biology-Botany,2000,124(1):47-58.

[5] 赵剑,杨文杰,朱蔚华. 细胞色素 P450 与植物的次生代谢[J]. 生命科学,1999,11(3):127-131.

[6] DONALDSON R P,LUSTER D C. Multiple forms of plant cytochrome P450[J]. Plant Physiology,1991,96:669-674.

[7] BOLWELL G P. Plant cytochrome P450 [J]. Phytochemisty, 1994,37(6):1491-1506.

[8] LI H,PINOT F,SAUVEPLANE V,et al. Cytochrome P450 family member *CYP704B2* catalyzes the {omega}-hydroxylation of fatty acids and is required for anther cutin biosynthesis and pollen exine formation in rice[J]. Plant Cell,2010,22:173-190.

[9] COMPAGNON V,DIEHL P,BENVENISTE I,et al. *CYP86B1* is required for very long chain ω-hydroxyacid and α,ω-dicarboxylic acid synthesis in root and seed suberin polyester[J]. Plant Physiology,2009,150(4):1831-1843.

[10] XU L,YUAN Y J,ZHANG L,et al. Identification and characterization of differential gene expression in the mesocarp and kernel of oil palm nuts using suppression subtractive hybridization[J]. Tree Genetics & Genomes,2011,19(7):999-1010.

[11] 李东栋,范永梅. 椰子果肉组织中总 RNA 的提取及质量分析[J]. 分子植物育种,2007,5(6):883-886.

[12] LVERSON S J,LANG S L C,COOPER M H. Comparison of the bligh and dyer and folch methods for total lipid determination in a broad range of marine tissue[J]. Lipids, 2001, 36 (11):1283-1287.

[13] TIMOTHY J. TRANBARGE R,STEPHANE D,et al. Regulatory mechanisms underlying oil palm fruit mesocarp maturation,ripening and functional specialization in lipid and carotenoid metabolism[J]. Plant Physiology,2011,156(2):564-584.

Dynamic expression of one cytochrome P450-like gene in mesocarp of oil palm nut

LIANG Yuan-xue YUAN Yi-jun BAO Yu-jia LI Dong-dong

Key Laboratory of Tropic Biological Resources of Ministry of Education, Hainan University, Haikou 570228, China

Abstract The dynamic expression of one cytochrom P450-like gene in mesocarp of oil palm (*Elaeis guineensis*) nut at five different development stages were analyzed. The content of fatty acid in mesocarp tissues was investigated with chloroform-methanol method. The results showed that mRNA level of the P450-like gene was the highest at the fourth period with 201.07 times of the first stage. The ratio of fatty acid accumulation reached the maximum during the 3rd-4th stage (15.79%). The change of fatty acid accumulation during five stages fitted well with P450 gene expression. According to previous studies, the expression of P450 in the development of oil palm nuts may affect the oxidation, epoxidation or alkylation of fatty acid in oil palm. This study will provide a basis for further research about the regulation of P450 gene during the maturation of oil palm, and open up a new field of modifying oil palm fatty acid metabolism pathway by genetic improvement.

Key words oil palm(*Elaeis guineensis*); P450; fruit development; fatty acid; dynamic expression

(责任编辑:张志钰)