

小桐子甘油-3-磷酸酰基转移酶(*JcGPAT*) cDNA 的克隆与序列分析

张楠^{1,2}, 徐荣华², 刘小烛¹, 刘爱忠^{2,*}

¹西南林业大学资源学院, 昆明 650224; ²中国科学院西双版纳热带植物园, 昆明 650223

摘要: 甘油-3-磷酸酰基转移酶是植物生物合成储存油脂过程中的关键酶, 对油料作物种子含油量具有重要的限制作用。本研究以植物甘油-3-磷酸酰基转移酶同源基因的保守区域序列为基础, 设计简并引物, 结合RACE技术, 从能源植物小桐子种子中克隆获得 *JcGPAT* 基因的 cDNA 全长序列(GenBank 登录号 HQ395225)。 *JcGPAT* cDNA 核苷酸序列长度为 1 672 bp, 开放阅读框为 1 125 bp, 编码 375 个氨基酸。该基因具有明显的 GPAT 基因结构域, 其编码的氨基酸序列与油桐、蓖麻等植物具有很高的同源性。RT-PCR 表达分析表明, 该基因在小桐子发育的种子、叶、根尖等多个组织表达。

关键词: 小桐子; GPAT; 简并引物; 基因克隆; 表达分析

Cloning and Sequence Analysis of *sn*-Glycerol-3-Phosphate Acyltransferase Gene (*JcGPAT*) from *Jatropha curcas* L.

ZHANG Nan^{1,2}, XU Rong-Hua², LIU Xiao-Zhu¹, LIU Ai-Zhong^{2,*}

¹Department of Bioresources, Southwest Forestry University, Kunming 650224, China; ²Xishuangbanna Tropical Botanical Garden, Chinese Academy of Sciences, Kunming 650223, China

Abstract: *sn*-Glycerol-3-phosphate acyltransferase (GPAT), a key enzyme in lipid metabolism, plays a critical role in biosynthesis of lipids in plants. In this study, based on the conserved regions of GPAT genes available from GenBank database, we designed degenerate primers and obtained the cDNA sequences of GPAT gene by RACE technology from *Jatropha curcas*, named *JcGPAT* (GenBank accession no. HQ395225). The full length cDNA is 1 672 bp, encoding 375 amino acids which have a high identity (ranging from 78% to 95%) with GPAT genes in other plants reported such as castor (*Ricinus communis*) and tung tree (*Vernicia fordii*). RT-PCR analysis showed that *JcGPAT* was expressed in different tissues including the developing seeds, leaf, root tip and callus.

Key words: *Jatropha curcas*; GPAT; degenerate primers; gene clone; expression analysis

植物储存油脂(storage lipids)不仅在植物生长、发育和繁衍过程中起着重要的生理、生化作用,而且是人类最主要的食物能源之一,也是重要的工业原料,广泛应用于化工、医药、轻纺和国防工业中。特别是近年来随着可替代生物能源发展的需求,生物柴油的产业化发展在国内外受到高度关注。然而制约生物柴油产业化发展的关键因素是植物油脂的产量受限(Gressel 2008)。提高植物油脂的产量是人类克服能源危机和满足食物、工业原料等多种需要的重要途径。

植物储存油脂主要以三脂酰甘油(triacylglycerol, TAG)的形式在植物种子(子叶或胚乳)成熟过程中累积与储存。其生物合成途径可概括为两个过程,即脂肪酸(fatty acid, FA)的生物合成和 TAG 的组装。FA 的生物合成主要是在叶绿体中以光合

作用的中间产物转化来的乙酰辅酶A (acetyl-CoA) 为底物,在一系列脂肪酸合成酶,特别是乙酰辅酶A 羧化酶(acetyl-CoA carboxylase, EC6.4.1.2, 简称 ACCase)和脂肪酸合酶复合体(fatty acid synthase complex, FAS)以及脂肪酸缩合酶(KASI、KASII、KASIII 等)等的作用下,进行初始碳链的合成和延伸,形成单链的FA; TAG的组装主要是在内质网上,以3-磷酸甘油(*sn*-glycerol-3-phosphate, Gly3P)为碳架,以 FA 为底物,在甘油-3-磷酸酰基转移酶(*sn*-

收稿 2010-09-03 修定 2010-10-25
资助 国家自然科学基金(30871548)和中国科学院重点方向性项目(KSCX2-YW-G-035-1)。

* 通讯作者(E-mail: liuaizhong@xtbg.ac.cn; Tel: 0871-5140420)。

glycerol-3-phosphate acyltransferase, GPAT)、溶血磷脂酸酰基转移酶(lysophosphatidic acid acyltransferase, LPAAT)、磷脂酸磷酸酯酶(phosphatidate phosphatase, PAP)和二酰甘油酯酰基转移酶(diacylglycerol acyltransferase, DGAT)的作用下形成TAG, 这一过程称为Kennedy途径(Kennedy 1961)。Kennedy途径通常集中反映在油料作物种子的发育过程中。在这一过程中影响FA和TAG生物合成的一系列酶都会直接影响种子的含油量, 特别是一些关键酶, 如ACCase、GPAT和DGAT, 在不同的植物中对种子储存油脂的累积具有显著的主效作用。其中GPAT(EC2.3.1.15)是催化酰基辅酶A连接到甘油-3-磷酸(Gly3P) *sn*-1位上的酰基化反应(Roughan和Slack 1982), 是Kennedy途径的第一步, 被认为是TAG生物合成的“阀门”, 对种子的含油量具有显著的主效作用(Murata和Tasaka 1997)。研究表明在植物细胞中GPAT主要存在于叶绿体、细胞质和线粒体等部位, 其中叶绿体中的GPAT是基质中的可溶性蛋白, 细胞质中的GPAT是结合在内质网膜上的疏水蛋白, 线粒体中的GPAT是位于外层膜上的结合蛋白(Coleman和Lee 2004)。GPAT在植物脂类代谢中功能多样, 不但参与TAG的合成, 而且涉及膜脂的生物合成和植物的抗性(Sui等2007; Yan等2008; Zheng等2003)。在拟南芥中过表达GPAT基因, 显著地提高了种子含油量(Jain等2000), 说明GPAT基因对TAG的生物合成具有重要的限制作用。

小桐子(*Jatropha curcas* L.), 又名麻风树, 为大戟科(Euphorbiaceae)多年生落叶灌木或小乔木。原产热带美洲, 现在在亚洲和非洲的热带或亚热带地区有广泛的逸生和少量栽培(陈冀胜和郑硕1987; 丘华兴1996)。由于小桐子易于繁殖, 适应范围较广, 不择土壤, 能在贫瘠的荒地生长, 生长快速, 种植当年(或次年)可开花结果。一般种植3~4年的小桐子年亩产种子可达200~300 kg, 种子含油率在30%~35%。其油脂主要成分为油酸、亚油酸和棕榈酸, 通过简单的化学转换可得到优于目前0号柴油的生物柴油。特别是小桐子可以生长在大量的非农业用地、退耕还林地、路边坡地或荒山荒

地, 最有可能成为未来替代化石能源的具有巨大开发潜力的树种, 被称为生物柴油植物(Foidl等1996; Gubitz等1999)。然而小桐子种子含油量不稳定、缺乏优良品种, 严重限制了小桐子产业化开发和种植(Sujatha等2008)。调查小桐子种子含油量不稳定的遗传或分子基础是实现小桐子种质改良或良种培育的前提。本文利用简并引物的方法, 克隆了小桐子 *JcGPAT* 基因, 并进行了初步的生物信息学分析, 通过RT-PCR技术调查其在不同组织的表达规律, 以期为进一步探讨小桐子种子含油量累积不稳定的分子机理提供基础资料。

材料与方法

实验材料是种植于中国科学院西双版纳植物园的3年生小桐子(*Jatropha curcas* L.)植株。2009年10月采集幼嫩的叶片, 用于基因组DNA的提取; 分别采集生长旺盛的叶片组织、根尖组织、发育的种子, 及时用液氮速冻后储存在-80℃冰箱用于RNA的提取。用于提取RNA的小桐子胚愈伤组织来源于中科院西双版纳热带植物园分子遗传与育种实验室已有的材料资源。

小桐子基因组DNA的提取采用常规的CTAB方法(Taylor和Powell 1982), 用Ding等(2008)描述的硅胶粒方法分别提取叶片组织、根尖组织、发育的种子和愈伤组织的RNA。感受态大肠杆菌Top10和PrimeScript RT-PCR Kit购自天宝生物工程有限公司(大连), pGM-T载体购自天根生化科技(北京)有限公司, SMARTer™ RACE cDNA Amplification Kit购自Clontech公司, Trans Taq HiFi DNA Polymerase购自北京金全生物技术有限公司, 引物合成及DNA测序均由上海生物工程有限公司完成。

以蓖麻(*Ricinus communis* L.) GPAT的氨基酸序列(XP_002525812)为基础在GenBank进行Blast, 选取同源性高的几个GPAT蛋白序列, 包括油桐(FJ479751)、杨树(XP_002305552)、葡萄(CAN62196)和拟南芥(FJ479752)进行Block make, 用CODEHOP (consensus-degenerate hybrid oligonucleotide primers)在线软件设计简并引物Block-Cs

和 Block-Ha (表 1)。利用简并引物, 以基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增。25 μ L PCR 反应体系中含有 10 $\times$ Trans Taq HiFi Buffer 2.5 μ L, 模板基因组 DNA 1 μ L (约 20 ng), 10 μ mol $\cdot$ L⁻¹ 引物各 1 μ L, 2.5 mmol $\cdot$ L⁻¹dNTP 混合物 2 μ L, Trans Taq HiFi DNA Polymerase (5 U $\cdot$ L⁻¹) 0.5 μ L, ddH₂O 17 μ L。扩增条件使用 Touchdown PCR 程序: 94 $^{\circ}$ C 5 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 60 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 3 min, 以后每 1 个循环退火温度降低 1 $^{\circ}$ C, 进行 10 个循环; 然后保持在 50 $^{\circ}$ C 退火, 再进行 24 个循环; 最后在 72 $^{\circ}$ C 延伸 7 min 后终止反应。1% 的琼脂糖电泳检测 PCR 扩增结果, 连接 pGM-T 载体, 转化 TOP10 感受态细胞, 生长过夜, 挑选白斑阳性克隆, 经 PCR 验证后测序。用获得的 DNA 片段, 在 NCBI 网页进行 Blast 验证, 通过已知的 DNA 片段和 GenBank 数据库中相关植物 GPAT 基因的 cDNA 序列的比对, 鉴别 DNA 片段上外显子区域(exon area)。进一步利用这些 DNA 外显子区域的序列, 分别设计 5' 和 3' 端的 RACE 引物 LG52 和 LG32 (表 1)。按照 SMARTerTM RACE cDNA Amplification Kit 试剂盒说明书, 以小桐子发育的种子组织总 RNA 为模版, 分别转录合成 5'RACE 和 3'RACE 的第一链、配制 RACE PCR 反应体系。PCR 反应条件为: 94 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 3 min, 5 个循环; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 70 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 3 min, 5 个循环; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 68 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 2 min, 35 个循环。RACE PCR 产物用 1% 的琼脂糖胶检测后, 克隆和测序同上。

将测序获得的 5' 和 3' 端 RACE 序列分别进行

Blast 验证, 推测 cDNA 的起始密码子和终止密码子的位置, 进一步将 5' 和 3' 端和已有的 DNA 外显子区域用 CAP3 软件进行拼接后设计全长引物 cDNAf 和 cDNAr (表 1), 以 cDNA 为模版, 扩增基因全长。PCR 反应体系同上, 反应条件为 94 $^{\circ}$ C 预变性 2 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 55 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 2 min, 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 7 min。扩增产物的克隆和测序同上。

将得到的全长 cDNA 序列与 GenBank 数据库中序列进行比对, 并用 Clustal 软件对同源氨基酸序列进行比较分析; 使用 NCBI 提供的 ORFfinder 与保守区数据库 (conserved domain database, CDD) 分别进行基因开放阅读框分析与蛋白保守结合区域分析; 用 ProtParam (<http://au.expasy.org/tools/protparam.html>) 软件计算 *JcGPAT* 中各种氨基酸的含量和蛋白的理论分子量、等电点、稳定性; 用在线软件 SubLoc (<http://www.bioinfo.tsinghua.edu.cn/SubLoc/>) 对其蛋白质亚细胞定位进行预测; 用在线工具 TMHMM (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) 和 ProtScale (<http://www.expasy.org/cgi-bin/protscale.pl>) 分别检测其跨膜结构和亲水 / 疏水性特性; 用 MEGA4 软件构建系统发生树。

利用 RT-PCR 的方法调查 *JcGPAT* 基因在叶片组织、根尖组织、发育的种子和愈伤组织的表达差异。按照 PrimeScript RT-PCR Kit 试剂盒说明书分别构建叶片组织、根尖组织、发育的种子和愈伤组织的 cDNA 库; 分别以对应组织的 cDNA 为模版, cDNAf 和 cDNAr 为引物, PCR 反应体系同上, 反应条件为: 94 $^{\circ}$ C 30 s, 55 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 2 min, 20

表 1 引物信息

Table 1 Primers used in this study

引物名称	引物序列	T_m	用途
Block-Cs	5' GCTTCAAGTCTAATCCTCCAGAACCNTGGAAYTG 3'	62.80	中间片段扩增
Block-Ha	5' TCCAGAAAGCATCAACGAAAATYTTTRTRTA 3'	61.00	中间片段扩增
LG52	5' CCAACCCATCCAGGATGCTTCTGCATAA 3'	73.63	5' RACE
LG32	5' GGGATCATGTTCAGGGGGCTGACAATAA 3'	72.77	3' RACE
cDNAf	5' ATGGCTACTCCAGGTAAGCTAA 3'	55.90	全长克隆、表达分析
cDNAr	5' TCATTTCCTCCTCCAGTCGCT 3'	57.00	全长克隆、表达分析
Act1	5' TGGTTCCACTATGTTCCCTGGTA 3'	61.00	表达分析
Act2	5' CTTATGCTGCTTGGAGCAA 3'	59.72	表达分析

个循环。同时以小桐子 *Actin* 基因(HM044307, 引物 Act1 和 Act2 见表 1)为对照, 利用 Genetools 软件进行相对表达量计算。独立实验重复 3 次, 用 Minitab 软件统计分析, 用 Origin8.0 软件作图。

结果与讨论

1 小桐子 *GPAT* 基因全长 cDNA 序列的克隆和分析

以小桐子基因组 DNA 为模板, 用简并引物 (Block-Cs 和 Block-Cs, 表 1)进行 PCR 扩增, 获得了单一的条带, 约 2 100 bp, 如图 1-A 所示, 克隆测序

后, 鉴别获得的 DNA 片段为 2 194 bp, 该片段的 Blast 结果显示, 有一个 286 bp 的核苷酸区域与油桐(FJ479751)、蓖麻(XM002525766)和拟南芥(FJ479752)的 *GPAT* 基因 cDNA 的部分区域重叠, 重叠部分的序列相似性分别为 96%、93% 和 95%, 推测该 286 bp 的核苷酸片段为外显子区域。以该外显子区域的序列为基础, 分别设计 5' 和 3' 端的 RACE 引物。5' 和 3' 端 RACE PCR 扩增分别获得约 900 bp 和 700 bp 长度的单一的条带, 如图 1-B 所示。

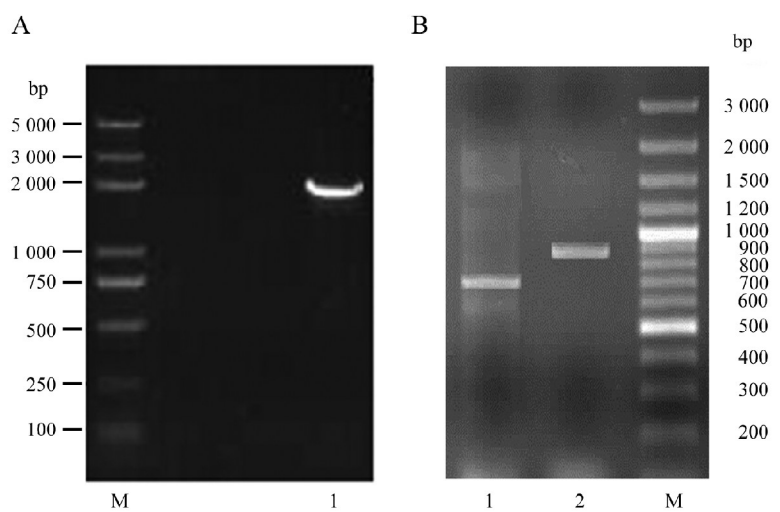


图 1 PCR 产物电泳图

Fig.1 Agarose gel electrophoresis analysis of PCR product

A: 1 泳道为用简并引物扩增小桐子基因组 DNA 获得的 PCR 产物片段; B: 1 泳道是 3' RACE PCR 产物片段, 2 泳道是 5' RACE PCR 产物片段; M 是分子量标记。

克隆获得的 cDNA 序列全长 1 672 bp, 包括 5' 非编码区 255 bp, 开放阅读框(ORF) 1 125 bp 和 3' 非编码区 289 bp, 编码 375 个氨基酸(图 2)。该基因编码蛋白的预测分子量为 43.07 kDa, 理论等电点为 8.18, 负电荷残基(Asp+Glu)总数为 37 个, 正电荷残基(Arg+Lys)总数为 48 个, 不稳定系数为 41.70, 属于不稳定蛋白。Zeng 等(2009)注册了一个小桐子的 *GPAT* 基因(FJ952147.1), 但未见任何报道, 故将我们克隆的 *GPAT* 基因命名为 *JcGPAT* (GenBank 登录号 HQ395225)。

在拟南芥中已经发现了 9 个 *GPAT* 基因 (*GPAT1*~9), 相互之间并不完全同源, 其中 *GPAT8*

和 *GPAT9* 同源, 位于内质网膜上, 有着相似的功能, 即在 Kennedy 途径中控制 TAG 生物合成(Gidda 等 2009)。拟南芥 *GPAT9* 基因的功能结构域主要有 4 个基序(Motif I~IV)组成。其中, 催化酰化反应氨基酸残基是基序 I 中的组氨酸 H 和天冬氨酸 D, 识别与底物甘油-3-磷酸结合的氨基酸残基是基序 II 中的精氨酸 R 和基序 III 中的谷氨酸 E 和甘氨酸 G, 识别与酰基辅酶 A 结合的氨基酸残基是基序 IV 中的脯氨酸 P (Coleman 和 Lee 2004; Gonzalez-Baro 等 2007)。将 *JcGPAT* 编码的氨基酸序列与拟南芥 *GPAT* 及其他植物 *GPAT* 基因编码的氨基酸序列进行比较, 发现 *JcGPAT* 基因含有全部的 4 个功能结

1	acatggggccgaataaatgaaaggaatcaggagagaggggaagttaaatacataacgtgccttgcttggctctg	
76	cgcaagaaggacgacatagatttctcatccattctcatttctttaccacaaacacaaaaattagaataccgtaataaagaaaaagatc	
166	aaatctatcagtttttacagaataccgtatcagaatatacctctctctctctctctctctctgatttgctatatacaatacagcaaaaa	
256	atggctactccaggttaagctaaagacctcgagctctgaattggacttggatcgacccaatatcgaagactaccttctcttgaggtctct	30
	M A T P G K L K T S S S E L D L D R P N I E D Y L P S G V S	
346	attcaagaacctcgctggcaagcttctctgctgctgatttgccttgacatttccgacccetaacggaggctgctgggtgccattgttgatgac	60
	I Q E P R G K L R L R D L L D I S P T L T E A A G A I V D D	
436	acctttacaaggtgtttcaagtcaaatcctccagaacatggaattggaacatatatctatttccctttgggtgctgcggtgtggtgtgt	90
	T F T R C F K S N P P E P W N W N I Y L F P L W C C G V V C	
526	cgatatgggattttgtttcccatcagggttctagtactgacaatagggtggaataatttcttctcatgctacattcctgtgcatttcccta	120
	R Y G I L F P I R V L V L T I G W I I F L S C Y I P V H F L	
616	cttaaaggacatgacagttgagaaaaagcttgagagatgtttggaggagtttaatttgcagcttcttttggcatcttgacggaggtt	150
	L K G H D K L R K K L E R C L V E L I C S F F V A S W T G V	
706	gtcaagtaccatggctccagcgctagcatccgacctaaacaggtttttgtggcaatcatacctccatgattgattttatcatcttggaa	180
	V K Y H G P R P S I R P K Q V F V A N H T S M I D F I I L E	
796	cagatgactgcatttgcctgtattatgcagaagcatcctggatgggttggactactgcaaagcactatattagagagtgtcggatgtatc	210
	Q M T A F A V I M Q K H P G W V G L L Q S T I L E S V G C I	
886	tggttcaatcgcttcagaggcaaggatcgtaaaattgttaacaaaagtttaaggatcatgtacaggggctgacaataacacctctctctc	240
	W F N R S E A K D R S E I V T A K K L R D H V Q G A D N N P L L	
976	atatttctgaaggaacttgtgtaataatcactatactgtaattgttcaagaagggtgcattcgaactgggatgtactgtttgtccaatt	270
	I F P E G T C V N N H Y T V M F K K G A F E L G C T V C P I	
1 066	gcaatcaatacaacaaaattttgttgatgctttttggaacagccggaagcagtcatttacaacgcatttgcgcaactcatgacttcc	300
	A I K Y N K I F V D A F W N S R K Q S F T T H L L Q L M T S	
1 156	tgggctgttgtttgtgatgtatggctacttggagccacaaaatctgaacctggagagacaccattgagtttgcgagagggtcaggagac	330
	W A V V C D V W Y L E P Q N L K P G E T P I E F A E R V R D	
1 246	ataatatctgtacgagcaggtctcaaaaaggttcttgggatggatattctaaagtattctcgccctagcccaagcatagagagcgaaaag	360
	I I S V R A G L K K V P W D G Y L K Y S R P S P K H R E R K	
1 336	caacaaagcttctgctgagtcagtgctgcagcgactggaggagaaatgatggtgtatgtttgtgcttagtcattgttagttgtacttaacc	
	Q Q S F A E S V L Q R L E E K *	
1 426	caagtaggggtcatggttgtgcacgagacatcctttttcagatacagacttcgatcttttagcaacgggtcaagttgtgggcatgaaaaca	
1 516	gaagcaaatgttttaaggaaattcaatgtttacaactgtaattgttataggttttactttcacagtaataataatgctatgaaaaagcttg	
1 606	attcaattttgtgcagaaaagttctggttgcacgactttttcaagacatgatacaciaaaattcatt	

图2 *JcGPAT* cDNA 的核苷酸序列及其推导的氨基酸序列Fig.2 The cDNA and deduced amino acid sequences of *JcGPAT*

终止子用 * 标记, 粗下划线部分显示植物 *GPAT* 基因家族的保守区域, 细下划线部分显示跨膜区域。左右两侧的数字分别标注核苷酸及氨基酸的位置。

构域(基序 I~IV)和对应的功能残基(图 3)。

细胞定位预测显示, *JcGPAT* 基因位于内质网上, 和序列高度相似的拟南芥 *GPAT9* 基因在细胞内的定位相同(Gidda 等 2009)。我们同时预测了已经注册的小桐子 *GPAT* 基因(FJ952147.1)的亚细胞定位, 结果显示其位于叶绿体上; 比对已经注册的小桐子 *GPAT* 基因和 *JcGPAT*, 没有发现 *GPAT* 基因有对应的功能结构域, 说明两者不仅在序列上有明显差异, 在功能上可能也有差异。对 *JcGPAT* 编码的蛋白进行跨膜分析, 发现 3 个跨膜区域, 分别位于 73~95 区、104~121 区和 134~151 区, 如图 2 所示, 这些结构和拟南芥 *GPAT9* 编码的蛋白跨膜区域一致(Gidda 等 2009)。

2 *JcGPAT* 同源性分析

用 NCBI BlastX 对 *JcGPAT* 基因进行同源氨基酸序列搜索, 发现小桐子 *JcGPAT* 基因编码的氨基酸序列与其他植物的 *GPAT* (包括拟南芥的 *GPAT9*: ACT32031、油桐: ACT32030、蓖麻: XP_002525812) 具有很高的相似性(图 3), 相似性系数为 78%~95%, 其中和大戟科植物的油桐、蓖麻相似性最高, 均为 95%; 和禾本科的玉米和水稻相似性相对较低, 均为 78% 和 79%。氨基酸多序列比对显示植物 *GPAT* 具有较高的保守性(图 3)。初步的系统发生分析(图 4)显示, *JcGPAT* 基因编码的氨基酸序列和同科的蓖麻、油桐的 *GPAT* 聚类, 禾本科植物的水稻、玉米和高粱聚类, 反映了同源 *GPAT* 基因系统发生上的密切关系。在 NCBI BlastX 对 *JcGPAT* 基因进

图3 不同植物来源的 GPAT 氨基酸序列比对

保守的功能基序 I~IV 用方框标出, 基序中对其功能有重要作用的氨基酸残基用(■)表示。比对序列为 *JcGPAT* (小桐子, 395225)、*VfGPAT* (油桐, ACT32030)、*PtGPAT* (杨树, XP_002305552)、*RcGPAT* (蓖麻, XP_002525812)、*GmGPAT* (大豆, ACU23757)、*VvGPAT* (葡萄, CAN62196)、*AtGPAT9* (拟南芥, ACT32031)、*ZmGPAT* (玉米, NP_001146225)、*SbGPAT* (桑, XP_002462955)和 *OsGPAT* (水稻, NP_001059853)。

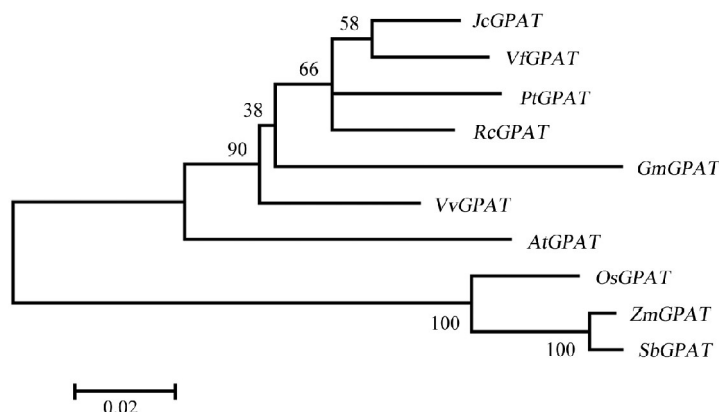


图4 不同植物中 GPAT 的进化树分析

Fig.4 Phylogenetic analysis of GPAT in various plant species
比对的 GPAT 氨基酸序列及 GenBank 登录号见图 3 注释。

行同源氨基酸序列搜索结果中, 没有发现在 GenBank 中已经注册的小桐子 GPAT 基因, 说明这 2 个基因可能有不同的起源。结合前面基因序列功能结构域比较和亚细胞定位的分析结果, 可以看出 *JcGPAT* 和在 GenBank 中已经注册的小桐子 GPAT 基因在起源、功能结构域和亚细胞定位等方面具有显著的分化, 很可能具有不同的功能。

使用 ProtScale 对 *JcGPAT* 进行蛋白亲水/疏水性分析, 结果显示其为疏水性蛋白, 与 Frentzen (1990) 报道的菠菜胞质 GPAT 结果一致。

3 *JcGPAT* 的表达分析

RT-PCR 半定量表达分析显示: *JcGPAT* 基因在小桐子叶、根尖、愈伤和发育的种子组织中均有表达(图 5-A), 但在不同的组织表达强度有所不同。在发育的种子中表达最强, 在叶片中表达次之, 在根尖组织表达最弱(图 5-B)。植物 GPAT 基因的功能是催化酰基辅酶 A 连接到 Gly3P 的 sn-1 位上的酰基化反应, 该反应产物溶血磷脂酸(lysophosphatidic acid, LPA)既是 Kennedy 途径合成 TAG 的初始产物, 也是细胞膜脂(特别是磷脂)和其他脂类合成的前体。TAG 在小桐子发育的种子中高效累积, 在叶片和愈伤组织均有少量累积, 而在根尖组织的累积很难被检测。*JcGPAT* 基因在发育的种子中表达最强, 但在根尖组织中也有表达, 说明 *JcGPAT* 基因不仅可能参与 TAG 的生物合成, 而且可能涉及其他脂类(如膜脂)的代谢活动。该结果和 GPAT 基因

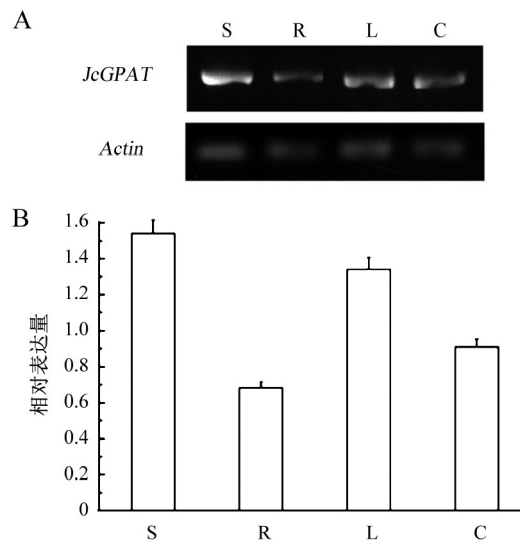


图5 RT-PCR 表达分析

Fig.5 Expression analysis by semi-quantitative
RT-PCR method

A: 不同组织中 *JcGPAT* 的表达分析; B: 不同组织中 *JcGPAT* 的相对表达量。S 代表发育的种子, R 代表根尖, L 代表叶片, C 代表愈伤组织。

在其他植物中的表达类似, 如西红柿(Sui等2007)和烟草(Yan 等 2008)。

本研究利用同源基因保守区域的序列为基础, 设计简并引物, 扩增获得基因组 DNA 片段, 通过鉴别基因组 DNA 片段上的外显子序列, 进一步设计 RACE 引物, 利用 RACE cDNA 扩增技术, 获得基因的 cDNA 全长。该方法对于从全基因组(或 EST)背

景缺乏的物种中克隆特定基因, 具有快速、经济和简便的优势。利用该方法我们克隆的 *JcGPAT* 基因具有明显的植物 *GPAT* 基因家族特征, 在系统发生上和近缘植物油桐的同源基因聚类, 且和拟南芥 *GPAT9* 同源, 表达分析进一步验证 *JcGPAT* 基因在小桐子种子储存油脂 TAG 累积过程中具有重要作用。该基因是否对小桐子种子含油量的累积具有主效(或限量)作用, 目前还不清楚, 值得深入研究。

参考文献

- 陈冀胜, 郑硕(1987). 中国有毒植物. 北京: 科学出版社, 258
- 丘华兴(1996). 中国植物志 44 卷. 北京: 科学出版社, 148
- Coleman RA, Lee DP (2004). Enzymes of triacylglycerol synthesis and their regulation. *Prog Lipid Res*, 43: 134~176
- Ding LW, Sun QY, Wang ZY, Sun YB, Xu ZF (2008). Using silica particles to isolate total RNA from plant tissues recalcitrant to extraction in guanidine thiocyanate. *Anal Biochem*, 374: 426~428
- Foidl N, Foidl G, Sanchez M, Mittelbach M, Hackel S (1996). *Jatropha curcas* L. as a source for the production of biofuel in Nicaragua. *Bioresource Technol*, 58: 77~82
- Frentzen M (1990). Comparison of certain properties of membrane bound and solubilized acyltransferase activities of plant microsomes. *Plant Sci*, 69: 39~48
- Gidda KS, Shockey MJ, Rothstein JS, Dyer MJ, Mullen TR (2009). *Arabidopsis thaliana* GPAT8 and GPAT9 are localized to the ER and possess distinct ER retrieval signals: functional divergence of the dilysine ER retrieval motif in plant cells. *Plant Physiol Biochem*, 47: 867~879
- Gonzalez-Baro MR, Lewin TM, Coleman RA (2007). Regulation of triglyceride metabolism II. Function of mitochondrial GPAT1 in the regulation of triacylglycerol biosynthesis and insulin action. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 292: 1195~1199
- Gressel J (2008). Transgenics are imperative for biofuel crops. *Plant Sci*, 174: 246~263
- Gubitz GM, Mittelbach M, Trabi M (1999). Exploitation of the tropical oil seed plant *Jatropha curcas* L. *Bioresource Technol*, 67: 73~82
- Jain RK, Coffey M, Lai K, Kumar A, MacKenzie SL (2000). Enhancement of seed oil content by expression of glycerol-3-phosphate acyltransferase genes. *Biochem Soc T*, 28: 958~961
- Kennedy EP (1961). Biosynthesis of complex lipids. *Fed Proc*, 20 (4): 934~940
- Murata N, Tasaka Y (1997). Glycerol-3-phosphate acyltransferase in plants. *Biochim Biophys Acta Lipids Lipid Metabol*, 1348: 10~16
- Roughan PG, Slack CR (1982). Cellular organisation of glycerolipid metabolism. *Annu Rev Plant Physiol*, 33: 97~132
- Sui N, Li M, Zhao SJ, Li F, Liang H, Meng QW (2007). Overexpression of glycerol-3-phosphate acyltransferase gene improves chilling tolerance in tomato. *Planta*, 226: 1097~1108
- Sujatha M, Reddy TP, Mahasi MJ (2008). Role of biotechnological interventions in the improvement of castor (*Ricinus communis* L.) and *Jatropha curcas* L. *Biotechnol Adv*, 26: 424~435
- Taylor B, Powell A (1982). Isolation of plant DNA and RNA. *Focus*, 4: 4~6
- Yan K, Chen N, Qu YY, Dong XC, Meng QW, Zhao SJ (2008). Overexpression of sweet pepper *glycerol-3-phosphate acyltransferase* gene enhanced thermotolerance of photosynthetic apparatus in transgenic tobacco. *J Integr Plant Biol*, 50: 613~621
- Zheng ZF, Xia Q, Dauk M, Shen WY, Selvaraj G, Zou JT (2003). *Arabidopsis* AtGPAT1, a member of the membrane-bound glycerol-3-phosphate acyltransferase gene family, is essential for tapetum differentiation and male fertility. *Plant Cell*, 15: 1872~1887