

烟草二脂酰甘油酰基转移酶基因(*NtDGAT2*)的克隆与功能分析

阳天泉^{1,2}, 徐荣华¹, 刘爱忠^{1,*}

¹中国科学院西双版纳热带植物园, 昆明650223; ²中国科学院大学, 北京100049

摘要: 二脂酰甘油酰基转移酶(diacylglycerol acyltransferase, DGAT2)是植物储存油脂生物合成过程中的关键酶, 对种子储存油脂累积具有重要的生理作用。本文采用电子克隆与实验相结合的方法, 从烟草种子cDNA中克隆到DGAT2基因的开放阅读框序列, 命名为*NtDGAT2* (GenBank登录号JX843807), 其序列长999 bp, 编码332个氨基酸。多序列比对和进化分析表明该基因编码蛋白与其他植物DGAT2具有较高相似性和典型的DGAT2结构域。利用Real-time PCR定量表达分析显示*NtDGAT2*在烟草种子、花、茎、叶和根里面都有表达, 且在发育中的种子和花的发育过程大量表达。酵母互补实验证实该基因编码蛋白具有DGAT酶活性。

关键词: 烟草; 二脂酰甘油酰基转移酶; 酵母; 油脂

Cloning and Characterization of Diacylglycerol Acyltransferase Gene (*NtDGAT2*) from Tobacco (*Nicotiana tabacum* L.)

YANG Tian-Quan^{1,2}, XU Rong-Hua¹, LIU Ai-Zhong^{1,*}

¹Xishuangbanna Tropic Botanical Garden, Chinese Academy of Sciences, Kunming 650223, China; ²University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

Abstract: Diacylglycerol acyltransferase (DGAT2), a key enzyme for lipid biosynthesis, plays a critical role in oil accumulation in oilseeds. In this study, using the silico cloning technique combined with RT-PCR method, a novel *DGAT2* gene with the length of 999 bp encoding 332 amino acids was isolated from seed cDNAs of tobacco (*Nicotiana tabacum*), named *NtDGAT2* (GenBank No JX843807). The sequence analyses showed that the amino acid sequence of *NtDGAT2* with the typical functional motifs of DGAT2 was high similarity to those identified from other species. Based on Real-time quantitative PCR expression analysis, *NtDGAT2* was expressed in all tissues such as root, stem, leaf, flower and developing seed; in particular, *NtDGAT2* was highly expressed in flowers and developing seeds. Further, the function of *NtDGAT2* was confirmed by heterologous transformation and the functional complementary experiments in yeast.

Key words: tabacco; diacylglycerol acyltransferase; yeast; lipid

植物储存油脂主要以三脂酰甘油(triacylglycerol, TAG)的形式在种子成熟过程中累积。三脂酰甘油是植物中最重要和最多的有机化合物之一, 在植物生长、发育和繁衍过程中起重要作用(Xu等2008), 同时也是人类重要的食物资源和化工原料(Yu等2008)。其生物合成途径可概括为两个过程, 即脂肪酸(fatty acid, FA)合成和TAG组装。FA的生物合成主要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、脂肪酸合成酶复合体(fatty acid synthase complex, FAS)以及脂肪酸缩合酶(KASI、KASII和KASIII等)的作用下, 进行初始碳链的合成和延伸; TAG的组装主要在内质网上, 以三磷酸甘油(sn-glycerol-3-phosphate, G3P)为骨架,

以FA为底物, 在甘油-3-磷酸酰基转移酶(sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase, GPAT)、溶血磷脂酰基转移酶(lysophosphatidic acid acyltransferase, LPAAT)、磷脂酸酯酶(phosphatidate phosphatase, PAP)和二脂酰甘油酰基转移酶(diacylglycerol acyltransferase, DGAT)的作用下形成TAG, 这一过程被称为Kennedy途径(Kennedy 1961)。其中, DGAT负责催化TAG合成的最后一步, 被认为在种子TAG合成中起关键作用(Lung和Weselake 2006)。在多种

收稿 2012-10-17 修定 2012-12-24
资助 国家自然科学基金(30871548)和中国科学院知识创新工程重要方向项目(KSCX2-EW-Z-15)。

* 通讯作者(E-mail: liuaizhong@xtbg.ac.cn; Tel: 0871-65140420)。

植物种子发育过程中, DGAT的表达与TAG的生物合成密切相关(An等2011; Banilas等2011; Xu等2011); 饲喂实验和酶学研究证实了DGAT的活性对TAG积累有明显影响(Ramli等2005); 基因缺失和过表达的研究也证实DGAT是多种植物中调控种子油含量的关键酶(Lardizabal等2008; Oakes等2011; Zou等1999), 对于调节植物种子的FA组成有重要的作用(Li等2010a, b)。

目前在生物中发现的DGAT主要分为两类: DGAT1和DGAT2。Turchetto-Zolet等(2011)发现二者在基因结构、蛋白结构、进化和酶学活性等方面都表现出巨大的差异。如DGAT1基因通常包含15~17个外显子, 而DGAT2基因通常拥有8~9个外显子; DGAT1一般为515±44个氨基酸, 而DGAT2一般为344±29个氨基酸; 跨膜结构预测显示DGAT1普遍含有8~9个跨膜结构, 而DGAT2则一般含有1~2个跨膜结构; 在蓖麻油酸合成中, RcDGAT2相对于RcDGAT1表现出明显的偏爱性。尽管DGAT1和DGAT2在多个方面存在明显的差异, 但是过表达DGAT1或过表达DGAT2都能够提高种子的含油量, 暗示二者在TAG合成中都起一定的作用, 但二者对种子油含量贡献大小如何, 目前尚不明确。

烟草作为基因工程的模式植物, 转化容易且易于再生, 其种子的含油量为30%~40% (Giannelos等2002), 油脂的主要成份为TAG, 因此烟草可以作为研究TAG合成和调控分子机制的模式植物。研究已经表明对烟草*NtDGAT1*进行RNA干涉导致根、茎、叶和种子中*NtDGAT1*的表达量显著降低, 这些组织TAG含量也显著降低, 其中最严重的株系种子油含量下降了49% (Zhang等2005), 这说明*NtDGAT1*对烟草种子TAG的积累具有重要作用。然而目前在烟草中对DGAT2基因的认识, 还没有相关报道。本试验通过分析GenBank中烟草的EST (expressed sequence tags), 设计引物, 从烟草中克隆了DGAT2基因的ORF全长, 命名为*NtDGAT2*, 并对其编码蛋白的结构特征及其在不同器官中的表达差异进行分析, 同时使用酵母TAG合成突变体对其酶学功能进行互补验证, 为下一步分析DGAT2对烟草油脂合成过程的生理功能提供基础。

材料与方法

1 材料

烟草(*Nicotiana tabacum* L.) ‘红花大金元’品种作为实验材料, 于2011年10月至2012年6月种植在中国科学院西双版纳热带植物园的温室中。烟草种子萌发后, 长出第6片叶子时, 收获茎、根和早期的叶片(第4、5片), 长出13片叶子时, 收获中期的叶片(第9、10片)、盛开2 d后的花、开花后1周的早期种子和开花后2周的中期种子, 所有样品液氮速冻后于-80 °C保存。

用于异源表达分析的野生酵母INVSc1购于Invitrogen; 用于DGAT2基因功能鉴定的TAG合成缺陷酵母菌株H1246由瑞典的Sten Stymne教授(Scandinavian Biotechnology Research)提供。

2 RNA提取

将-80 °C冻存的材料在液氮中研磨成粉, 采取Trizol法进行总RNA提取, 步骤按RNAiso试剂[宝生物工程(大连)有限公司]说明进行。RNA沉淀用适量DEPC水溶解, 1%甲醛变性琼脂糖凝胶电泳检测, 超微量紫外分光光度计(NanoDrop® RND-1000)测定纯度和浓度。

3 *NtDGAT2*基因的克隆及序列分析

按照PrimeScript™ RT-PCR Kit [宝生物工程(大连)有限公司]试剂盒说明进行反转录。以拟南芥DGAT2基因序列为探针搜索GenBank中烟草的EST序列, DNASTar拼接后, 用Primer 3.0 (<http://primer3.wi.mit.edu/>)设计ORF正向引物*NtDGAT2-F* (带有BamHI位点)和反向引物*NtDGAT2-R* (带有XhoI位点) (表1), 以种子的cDNA为模板进行PCR

表1 引物信息

Table 1 Primer information

引物名称	序列(5'→3')
<i>NtDGAT2-F</i>	ATAGGATCCATGGCTATAGAGGAGGATGGT
<i>NtDGAT2-R</i>	ATACTCGAGTTAAAGAATTCTCAGCGGGA
<i>NtD1-RTs</i>	TGTTGCGAATGGTGAGGAAA
<i>NtD1-RTa</i>	GCCTGCGTGACTCTGTTTGA
<i>NtD2-RTs</i>	TTGTGCCAGGTGGAGTTTCAG
<i>NtD2-RTa</i>	ACATCAGACTGGCCGAAACAG
<i>NtActinF</i>	AAGGGATGCGAGGATGGA
<i>NtActinR</i>	CAAGGAAATCACCGCTTTGG
CYC1	GCGTGAATGTAAGCGTGAC

扩增, PCR反应体系按照Extaq [宝生物工程(大连)有限公司]说明配制。PCR反应条件为: 94 2 min; 94 30 s, 55 30 s, 72 1 min, 32个循环; 72 7 min。扩增产物电泳检测后纯化, 克隆到pGM-T载体(北京天根生化有限公司)并转化大肠杆菌Trans1-T1 (北京天根生化有限公司), 通过蓝白斑筛选及菌液PCR鉴定阳性克隆后测序。所用引物合成及测序均由深圳华大基因科技有限公司完成。

利用NCBI的ORF finder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/orfig.cgi>)对获得的cDNA序列进行开放阅读框分析; ProtParam (<http://cn.expasy.org/tools/protparam.html>)在线分析蛋白的理化性质; SignalP 3.0 Server (<http://www.bs.dtu.dk/service/SignalP>)在线分析其信号肽; 用SOSUI (classification and secondary structure prediction of membrane proteins, http://bp.nuap.nagoya-u.ac.jp/sosui/sosui_submit.html)在线软件分析跨膜结构; MEGA 5 (Tamura等2011)进行蛋白序列多重比对以及构建系统树。

4 表达模式分析

采用Real-time PCR调查*NtDGAT1*和*NtDGAT2*在叶片、根、花和种子中的表达规律, 分别提取各样品的总RNA, 按照宝生物的PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser (Perfect Real Time)试剂盒说明进行反转录, 获得cDNA第一链。使用Primer Express 3.0软件设计目的基因及内参基因(*NtActin*, NTU60495)实时定量PCR引物(表1)。Realtime PCR在ABI 7500荧光定量PCR系统上运行, 每个反应重复3次。20 μ L PCR体系包括: 1 μ L cDNA、10 μ L 2 $\times$ FastStart Universal SYBR Green Master with ROX、10 μ mol $\cdot$ L⁻¹正向引物和反向引物各0.5 μ L、8 μ L ddH₂O。PCR程序为: 95 10 min; 95 15 s, 60 15 s, 72 32 s, 40个循环。反应完成后进行95 20 s, 60 20 s, 95 20 s, 59 20 s以绘制融解曲线判断扩增产物的正确与否, 是否存在引物二聚体。

5 酵母表达载体的构建及转化

将得到的*NtDGAT2*基因通过*Bam*HI和*Xho*I (Fermentas)双酶切克隆到酵母表达载体p426-Gal上, 构建酵母表达载体p426-NtDGAT2。按照Sc EasyComp Transformation Kit (Invitrogen, USA)的说明转化酵母菌株H1246, 使用尿嘧啶缺陷的合成

完全培养基(synthetic minimal defined medium lacking uracil, SC-U)筛选阳性克隆, 同时以p426-Gal转化H1246及INVSc1作对照。在SC-U平板培养基上28 生长2~4 d, 挑取酵母菌斑通过引物CYC1 (表1)和*NtDGAT2*-R进行PCR验证。

6 目的基因在酵母中的表达分析

离心收集酵母菌液, 用蒸馏水洗涤3次后离心收集菌体, 加入同体积的盐酸洗玻璃珠和1 mL Trizol, 在涡旋仪上振荡10 min。每次振荡30 s在冰上静置30 s, 加入0.2 mL氯仿, 继续振荡1~2 min, 室温放置2~5 min, 离心后取上清转入RNAase free的离心管, 加入等体积异丙醇, 置于-80 快速沉淀5~10 min, 离心收集沉淀, 用70%乙醇(RNAase free)洗涤后室温干燥, 用DEPC水溶解, DNaseI消化后, 1%甲醛变性琼脂糖凝胶电泳检测, 通过RT-PCR检测基因的表达。

7 转基因酵母油脂分析和油体观察

将转基因及转对照质粒的酵母在SC-U抑制培养基(2%葡萄糖)中250 r $\cdot$ min⁻¹、30 过夜培养, 紫外分光光度计测OD₆₀₀后, 离心收集菌体, 用SC-U诱导培养基(2%半乳糖)重悬菌体至OD₆₀₀=0.4, 在250 r $\cdot$ min⁻¹、30 条件下培养。诱导表达培养24 h后, 通过尼罗红染色的方法(Wagner等2010)观测酵母油体。诱导表达36 h后使用酸热法(孙晓璐等2007)破碎细胞, 使用正己烷: 异丙醇(3:2)法(Burja等2007)提取酵母油脂进行TLC分析和油脂百分含量测定。

实验结果

1 *NtDGAT2*基因的克隆及序列分析

以烟草叶片cDNA为模板, 克隆获得一个999 bp的片段, 测序结果与EST拼接的结果完全一致, 命名为*NtDGAT2* (GenBank登录号JX843807)。该基因编码蛋白长度为332个氨基酸, 预测分子量为37.72 kDa, 理论等电点为9.3。SignalP 3.0 Server在线分析表明, 该基因编码的蛋白质属于非分泌型蛋白, 无信号肽。推测该蛋白在合成后, 很可能不进行蛋白转运, 而是留在细胞质基质中起作用。

BlastP (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)搜索发现*NtDGAT2*与小桐子*JcDGAT2* (GenBank登录号AEZ56254)、拟南芥*AtDGAT2* (GenBank登录号NP_566952)、大豆*GmDGAT2* (GenBank登录号ACU20344)、蓖麻*RcDGAT2* (GenBank登录号

ABI83668)的相似性分别为69%、63%、60%和59%。多序列比对分析(图1)发现, NtDGAT2编码的蛋白具有典型的植物DGAT2酶的结构域, 具体如下: (1)一个YFP的保守结构域, 在部分物种中对应的区域则为保守的YFP, 在酿酒酵母中删除或突变研究表明, 此结构域对保持DGAT活性非常关键(Stone等2006); (2) EPSH的保守结构, 在脊椎动物中对应区域为保守的HPHG, 在小鼠中对此区域进行突变会使DGAT2的活性丧失(Stone等2006); (3) RXGFX(K/R)XAXXXGXX(L/V)VPXXXFG(E/Q)是一个DGAT2同源蛋白中都保守的功能元件(Liu等2011); (4) C端内质网定位的信号肽LKLEI, 遵循先前鉴定的内质网定位信号结构为-Φ-X-X-K/R/D/E-Φ-COOH的规则, 其中为疏水性的氨基酸(McCartne等2004)。SOSUI的分析显示NtDGAT1在32~54 aa、60~81 aa和125~147 aa存在3个跨膜区, 这与在JcDGAT2和RcDGAT2中的研究结果类似(徐荣华2011), 进一步推测NtDGAT2是定位在内质网上的膜蛋白。

利用MEGA软件(邻接法)对NtDGAT2的进化关系分析表明, 植物DGAT2的进化基本符合植物系统进化分类, 并具有明显的种属特征(图2)。双子叶植物的DGAT2聚为一支, 而单子叶植物的DGAT2聚为一支。在双子叶植物中, NtDGAT2与同是茄科的番茄SIDGAT2聚类, 然后与亲缘关系较近的油橄榄和莲花聚类, 大戟科的小桐子、油

桐蓖麻和斑鸠菊则单独聚为一支。单子叶植物和双子叶植物的DGAT2能够清晰地和裸子植物北美云杉分开, 高等植物和低等植物(青绿藻、小球藻和小立碗藻)也能很好的分开, 暗示DGAT2在植物进化的早期就已经存在, 是一个很古老的基因。

2 NtDGAT2基因的表达模式分析

为进一步了解DGAT基因在烟草中生理作用, 以烟草的花、叶片、茎、根和种子5个不同器官中提取的总RNA反转录而来的cDNA为模板, 采用Real-time PCR的方法对NtDGAT1和NtDGAT2的表达差异进行了检测。所得溶解曲线峰形单一(数据未提供), 说明引物具有高度特异性, 实验数据能够比较准确反映出NtDGAT1和NtDGAT2基因的表达差异。以茎为参照进行相对表达量的分析发现, NtDGAT1和NtDGAT2基因在所检测的器官中都有表达(图3), 说明二者在催化TAG合成功能方面的普遍性。比较不同组织中NtDGAT1和NtDGAT2的表达发现, 花中NtDGAT1和NtDGAT2的表达量最高, 发育的种子中NtDGAT2表达量其次。NtDGAT1在根、茎和叶中的表达差异不明显。

3 NtDGAT2恢复了酵母突变体H1246的TAG和油体形成

酵母突变体H1246中编码TAG合成的DGA1(编码DGAT)和LRO1(编码PDAT)以及编码固脂合成的基因ARE1和ARE2都被敲除了, 因此H1246不能合成中性油脂, 且H1246不能形成油体

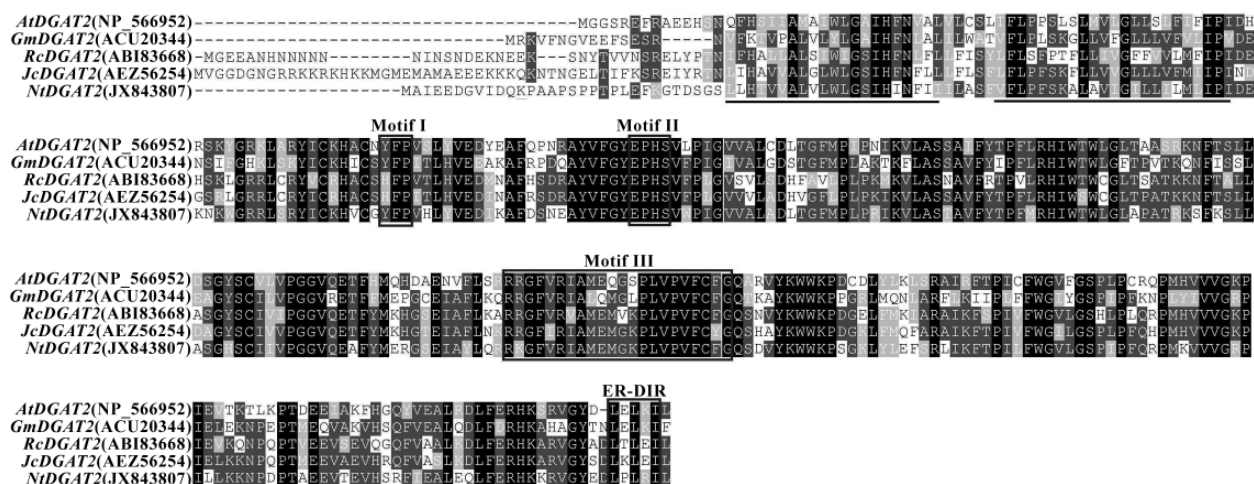


图1 不同植物的DGAT2氨基酸序列比对

Fig.1 Comparison of the amino acid sequences of DGAT2 in different plants

保守的功能基序I~ 用方框标出。

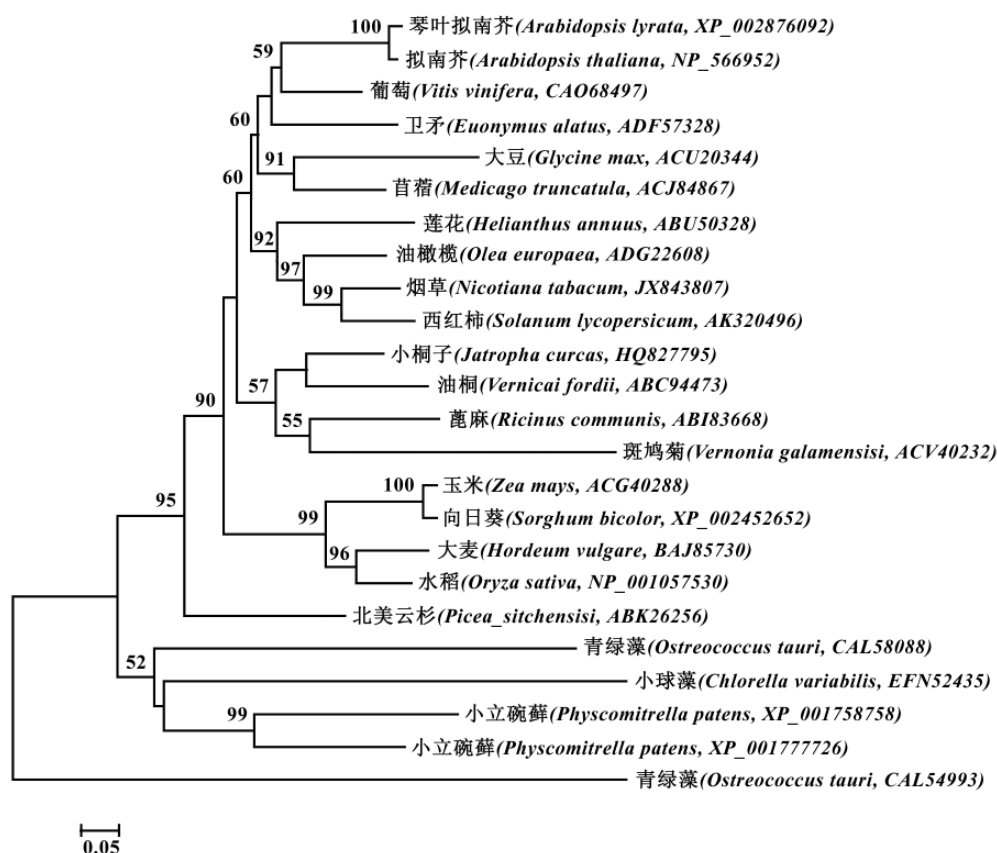


图2 不同植物中DGAT2的进化树分析

Fig.2 Phylogenetic analysis of DGAT2 in different plant species

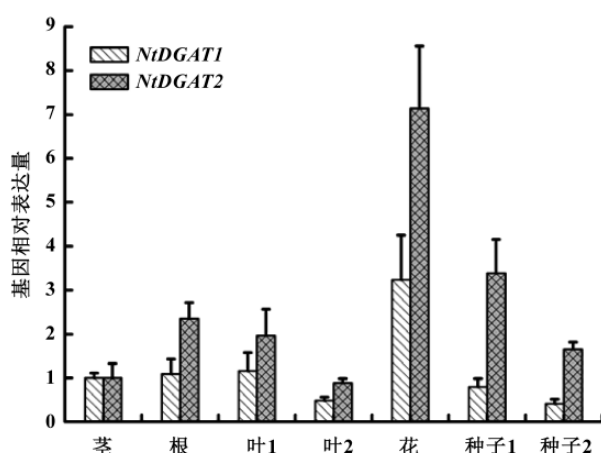

 图3 不同组织中*NtDGAT1*和*NtDGAT2*的相对表达量

 Fig.3 Relative expression levels of *NtDGAT1* and *NtDGAT2* in different tissues

(Sandager等2002)。过表达异源的DGAT能够恢复H1246中TAG的合成和积累, 从而使得油体缺陷的表型得到恢复, 因此H1246尤其适合DGAT的鉴定

(Siloto等2009), 而避免使用同位素检测酶活性的方法来鉴定DGAT的功能(Xu等2008; Manas-Fernandez等2009)。

分别抽提转基因和转空载体酵母的RNA, 经DNaseI处理后进行RT-PCR检测, 转p426-*NtDGAT2*基因的H1246能够扩增出特异的*NtDGAT2*条带, 而转空质粒p426-Gal的H1246不能够扩增出特异的*NtDGAT2*条带, 说明*NtDGAT2*基因已经成功地在酵母中进行了表达(图4)。诱导表达培养36 h之后提取酵母的油脂进行TLC层析, 结果(图5)显示, 转空质粒p426-Gal的野生型菌株INVSC1能检测到TAG的斑点, 而转空质粒的H1246突变株不能检测到TAG的斑点, 转p426-*NtDGAT2*的H1246突变株可以检测到TAG的斑点, 这说明*NtDGAT2*的表达恢复H1246合成TAG的能力。尼罗红染色的结果显示转空质粒的H1246中检测不到油体, 转空质粒的野生型酵母INVSc1中能够观察到油体, 转*NtDGAT2*的H1246中可以检测到油体(图6), 说明*NtD-*

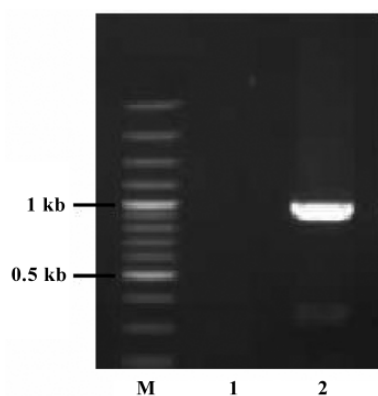


图4 转基因酵母菌株的RT-PCR检测

Fig.4 RT-PCR analysis of transgenic yeast

M: 100 bp plus DNA分子量参照; 1: H1246转p426-Gal的RT-PCR结果; 2: H1246转p426-*NtDGAT2*的RT-PCR结果。

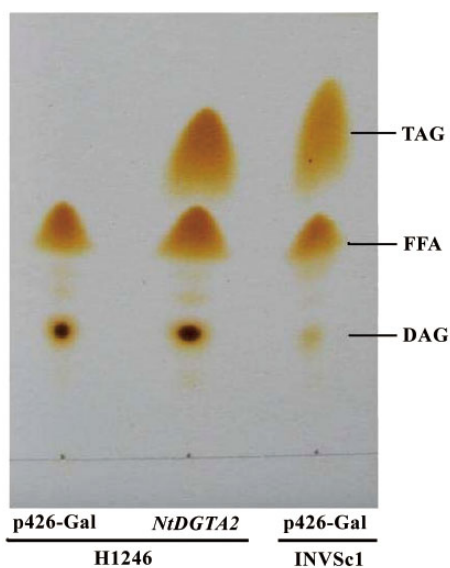


图5 转基因酵母的油脂TLC层析

Fig.5 TLC analysis lipid of complementation

quadruple mutant strain H1246

FFA: 自由脂肪酸; DAG: 二脂酰甘油。

*GAT2*的表达恢复H1246油体缺陷的表型。对转基因酵母的油含量进行检测, INVSc1转空质粒的油脂含量是14.21%, H1246转空质粒的含油量为5.39%, 而H1246转p426-*NtDGAT2*的含油量为13.93% (图7), 说明*NtDGAT2*在H1246的过表达使得突变体中的含油量得到了显著的恢复, 接近野生型的水平。综上所述, *NtDGAT2*的过表达使得H1246中TAG的合成和积累得到了恢复, 说明*NtDGAT2*基因编码的DGAT酶是有功能的。

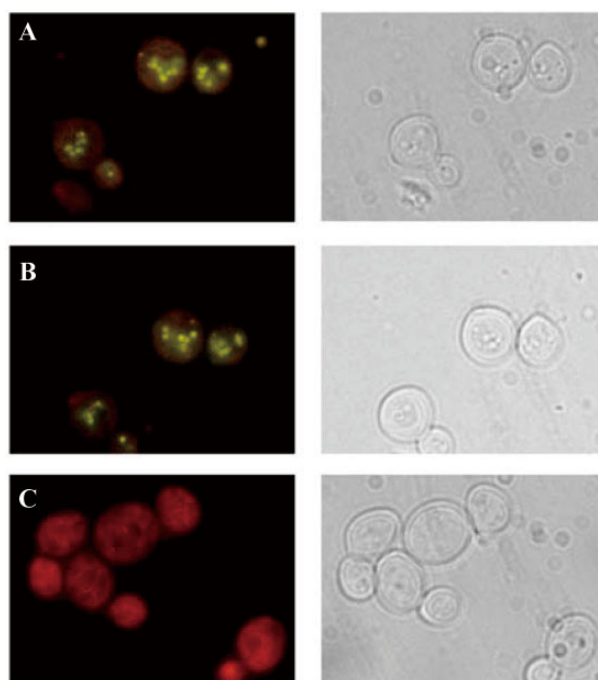


图6 转基因酵母的油体观察

Fig.6 Oil-body observation of transgenic yeast

A: INVSc1转空质粒p426-Gal; B: H1246转p426-*NtDGAT2*; C: H1246转空质粒p426-Gal。左边为荧光; 右边为自然光。

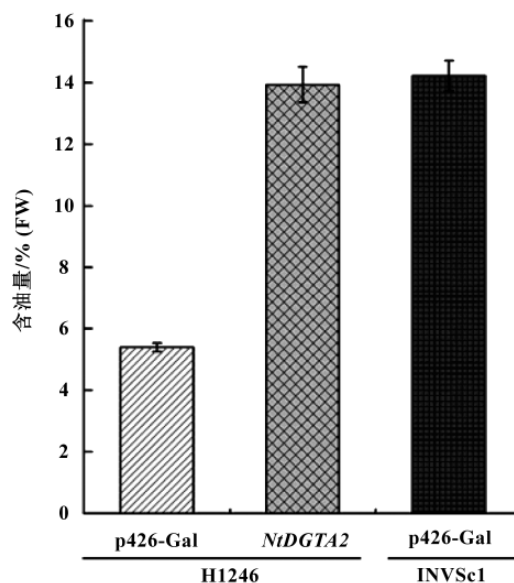


图7 转基因酵母的油含量

Fig.7 Lipid analysis of transgenic yeast

讨 论

在模式植物拟南芥中*AtDGAT1*的T-DNA突变导致种子油脂含量显著下降, 说明DGAT1在拟南

芥种子油脂合成中的重要作用(Zou等1999)。然而*AtDGAT2*位点的T-DNA插入没有导致明显的表型, 种子油脂也没有显著的变化(Zhang等2009)。*AtDGAT2*在TAG合成缺陷的酵母菌株H1246的过表达不能恢复H1246的TAG合成, 且*AtDGAT2*在昆虫细胞表达也检测不到明显的DGAT酶活性(Lardizabal等2001), 可能*AtDGAT2*在进化中丧失了功能, 因此难于在拟南芥中比较*AtDGAT1*和*AtDGAT2*对TAG合成的贡献大小。尽管表达分析和异源过表达实验都已经证实DGAT2在种子油脂累积中同样起重要作用(Banilas等2011; Li等2010b; Oakes等2011), 但是目前却没有植物DGAT2基因功能的反向遗传学证据。

本文从烟草种子克隆得到*NtDGAT2*基因, 生物信息学分析证实该基因编码的蛋白质具有典型的植物DGAT2的结构和功能域, 进化分析也证实*NtDGAT2*与其他植物DGAT2在系统发育上具有一定的关系。*NtDGAT2*可以恢复H1246中TAG的合成和油体缺陷的表型说明*NtDGAT2*编码的DGAT酶是有功能的。研究表明除了种子中会大量累积TAG以外, 植物的花粉在发育中也会积累TAG (Xu等2008), 拟南芥中*AtDGAT1*和*AtPDAT1*的突变会显著减少花粉中TAG的含量以及花粉的育性(Zhang等2009)。比较*NtDGAT1*和*NtDGAT2*在烟草不同组织中表达变化发现, *NtDGAT1*的表达在各组织间的变化幅度不如*NtDGAT2*的, 说明*NtDGAT1*在烟草各组织间具有普遍性的功能; 而*NtDGAT2*的表达与*NtDGAT1*的表达有所重叠, 但在花和种子中具有最高的表达, 暗示*NtDGAT2*在花和种子的TAG合成起重要作用。目前*NtDGAT1*和*NtDGAT2*各自对于烟草种子TAG积累的贡献程度如何还不清楚, 值得深入研究。

参考文献

- 孙晓璐, 孙玉梅, 曹芳, 华艳艳, 赵宗保(2007). 对产油脂酵母的细胞破碎方法及油脂提取效果的比较. 河南工业大学学报, 28: 67~69
- 徐荣华(2011). 小桐子油含量关键基因的克隆、鉴定与功能分析 [博士论文]. 昆明: 中国科学院西双版纳热带植物园
- An CC, Yang Y, Yu XC, Song LF (2011). ABI4 activates DGAT1 expression in *Arabidopsis* seedlings during nitrogen deficiency. *Plant Physiol*, 156: 873~883
- Banilas G, Karampelias M, Makariti I, Kourti A, Hatzopoulos P (2011). The olive *DGAT2* gene is developmentally regulated and shares overlapping but distinct expression patterns with *DGAT1*. *J Exp Bot*, 62: 521~532
- Burja AM, Armenta RE, Radianingtyas H, Barrow CJ (2007). Evaluation of fatty acid extraction methods for *Thraustochytrium* sp. ONC-T18. *J Agric Food Chem*, 55: 4795~4801
- Giannelos PN, Zannikos F, Stournas S, Lois E, Anastopoulos G (2002). Tobacco seed oil as an alternative diesel fuel: physical and chemical properties. *Industrial Crops Prod*, 16: 1~9
- Kennedy EP (1961). Biosynthesis of complex lipids. *Fed Proc*, 20: 934~940
- Lardizabal K, Effertz R, Levering C, Mai J, Pedrosa MC, Jury T, Aasen E, Gruys K, Bennett K (2008). Expression of *Umbelopsis ramanniana* *DGAT2A* in seed increases oil in soybean. *Plant Physiol*, 148: 89~96
- Lardizabal KD, Mai JT, Wagner NW, Wyrick A, Voelker T, Hawkins DJ (2001). DGAT2 is a new diacylglycerol acyltransferase gene family-Purification, cloning, and expression in insect cells of two polypeptides from *Mortierella ramanniana* with diacylglycerol acyltransferase activity. *J Biol Chem*, 276: 38862~38869
- Li RZ, Yu KS, Hatanaka T, Hildebrand DF (2010a). *Vernonia* DGATs increase accumulation of epoxy fatty acids in oil. *Plant Biotechnol J*, 8: 184~195
- Li RZ, Yu KS, Hildebrand DF (2010b). *DGAT1*, *DGAT2* and *PDAT* expression in seeds and other tissues of epoxy and hydroxy fatty acid accumulating plants. *Lipids*, 45: 145~157
- Liu Q, Siloto RM, Snyder CL, Weselake RJ (2011). Functional and topological analysis of yeast acyl-CoA: diacylglycerol acyltransferase 2, an endoplasmic reticulum enzyme essential for triacylglycerol biosynthesis. *J Biol Chem*, 286: 13115~13126
- Lung S-C, Weselake R (2006). Diacylglycerol acyltransferase: a key mediator of plant triacylglycerol synthesis. *Lipids*, 41: 1073~1088
- Manas-Fernandez A, Vilches-Ferron M, Garrido-Cardenas JA, Belarbi EH, Alonso DL, Garcia-Maroto F (2009). Cloning and molecular characterization of the acyl-CoA: diacylglycerol acyltransferase 1 (*DGAT1*) gene from *Echium*. *Lipids*, 44: 555~568
- McCartney AW, Dyer JM, Dhanoa PK, Kim PK, Andrews DW, McNew JA, Mullen RT (2004). Membrane-bound fatty acid desaturases are inserted co-translationally into the ER and contain different ER retrieval motifs at their carboxy termini. *Plant J*, 37: 156~173
- Oakes J, Brackenridge D, Colletti R, Daley M, Hawkins DJ, Xiong H, Mai J, Screen SE, Val D, Lardizabal K, Gruys K et al (2011). Expression of Fungal *diacylglycerol acyltransferase2* genes to increase kernel oil in maize. *Plant Physiol*, 155: 1146~1157
- Ramli US, Salas JJ, Quant PA, Harwood JL (2005). Metabolic control analysis reveals an important role for diacylglycerol acyltransferase in olive but not in oil palm lipid accumulation. *FEBS J*, 272: 5764~5770
- Sandager L, Gustavsson MH, Stahl U, Dahlqvist A, Wiberg E, Banas A, Lenman M, Ronne H, Szymne S (2002). Storage lipid synthesis is non-essential in yeast. *J Biol Chem*, 277: 6478~6482
- Siloto RM, Truksa M, He X, McKeon T, Weselake RJ (2009). Simple methods to detect triacylglycerol biosynthesis in a yeast-based

- recombinant system. *Lipids*, 44: 963~973
- Stone SJ, Levin MC, Farese RV (2006). Membrane topology and identification of key functional amino acid residues of murine acyl-CoA: diacylglycerol acyltransferase-2. *J Biol Chem*, 281: 40273~40282
- Tamura K, Peterson D, Stecher G, Nei M, Kumar S (2011). MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Bio Evol*, 28: 2731~2739
- Turchetto-Zolet AC, Maraschin FS, de Moraes GL, Cagliari A, Andrade CM, Margis-Pinheiro M, Margis R (2011). Evolutionary view of acyl-CoA diacylglycerol acyltransferase (DGAT), a key enzyme in neutral lipid biosynthesis. *BMC Evol Biol*, 11: 263
- Wagner M, Hoppe K, Czabany T, Heilmann M, Daum G, Feussner I, Fulda M (2010). Identification and characterization of an acyl-CoA:diacylglycerol acyltransferase 2 (DGAT2) gene from the microalga *O. tauri*. *Plant Physiol Biochem*, 48: 407~416
- Xu J, Francis T, Mietkiewska E, Giblin EM, Barton DL, Zhang Y, Zhang M, Taylor DC (2008). Cloning and characterization of an acyl-CoA-dependent *diacylglycerol acyltransferase 1 (DGAT1)* gene from *Tropaeolum majus*, and a study of the functional motifs of the DGAT protein using site-directed mutagenesis to modify enzyme activity and oil content. *Plant Biotechnol J*, 6: 799~818
- Xu RH, Wang RL, Liu AZ (2011). Expression profiles of genes involved in fatty acid and triacylglycerol synthesis in developing seeds of *Jatropha* (*Jatropha curcas* L.). *Biomass Bioenerg*, 35: 1683~1692
- Yu K, Li R, Hatanaka T, Hildebrand D (2008). Cloning and functional analysis of two type 1 diacylglycerol acyltransferases from *Vernonia galamensis*. *Phytochemistry*, 69: 1119~1127
- Zhang FY, Yang MF, Xu YN (2005). Silencing of *DGAT1* in tobacco causes a reduction in seed oil content. *Plant Sci*, 169: 689~694
- Zhang M, Fan J, Taylor DC, Ohlrogge JB (2009). *DGAT1* and *PDAT1* acyltransferases have overlapping functions in *Arabidopsis* triacylglycerol biosynthesis and are essential for normal pollen and seed development. *Plant Cell*, 21: 3885~3901
- Zou JT, Wei YD, Jako C, Kumar A, Selvaraj G, Taylor DC (1999). The *Arabidopsis thaliana TAG1* mutant has a mutation in a diacylglycerol acyltransferase gene. *Plant J*, 19: 645~653