

小桐子磷脂二酰甘油酰基转移酶(JcPDAT1) cDNA 的克隆与功能鉴定

徐荣华¹, 邱丽俊^{1,2}, 阳天泉^{1,2}, 王如玲¹, 田波¹, 刘爱忠^{1*}

(1. 中国科学院西双版纳热带植物园, 热带植物资源开放实验室, 云南 昆明, 650223; 2. 中国科学院研究生院, 北京, 100049)

摘要: 使用简并 PCR 结合 RACE 技术从能源植物小桐子种子中克隆了一个 PDAT 基因的 cDNA 全长, 命名为 *JcPDAT1* (GenBank 登陆号为 HQ827796)。 *JcPDAT1* 全长 2 869bp, 包含一个长为 2 013bp 的开放阅读框, 编码 670 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 PDAT 高度同源, 具有典型的 PDAT 结构域。Realtime PCR 结果表明 *JcPDAT1* 在种子、叶和根里面都有表达, 且在种子发育过程中大量表达。酵母互补实验证实该基因编码蛋白具有 PDAT 酶活性。在与酿酒酵母突变体 H1246 α 的互补实验中发现, TLC 层析(薄层层析法)和尼罗红染色结果都显示 *JcPDAT1* 的表达使 H1246 α 恢复合成 TAG, 说明 *JcPDAT1* 具有 PDAT 的功能活性。

关键词: 小桐子; PDAT; 简并 PCR; 基因克隆; 荧光定量 PCR; 酵母互补实验

中图分类号: Q786, S565.903 **文献标识码:** A **文章编号:** 1007-9084(2013)02-0123-08

Cloning and functioning of phospholipids: diacylglycerol acyltransferase (JcPDAT1) cDNA from *Jatropha curcas*

XU Rong-hua¹, QIU Li-jun^{1,2}, YANG Tian-quan^{1,2}, WANG Ru-ling¹, TIAN Bo¹, LIU Ai-zhong^{1*}

(1. Xishuangbanna Tropical Botanical Garden, Chinese Academy of Sciences, Kunming 650223, China;

2. Graduate University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract: According to the conserved region of PDAT gene available from GenBank, cDNA sequence of PDAT gene from *Jatropha curcas* L. was cloned by degenerative PCR and RACE. The gene was named *JcPDAT1* (GenBank accession HQ827796). The full length cDNA of *JcPDAT1* was 2 869bp, encoding 670 amino acids. Sequence alignment and phylogenetic analysis revealed that *JcPDAT1* shared high homology with PDAT from other plants, such as RcPDAT1 (*Ricinus communis*, 75%) and AtPDAT1 (*Arabidopsis thaliana*, 74%). The sequence harbored typical functional domains of PDAT. Realtime PCR showed that *JcPDAT1* was expressed in different tissues including seeds, leaf, root tip, and was highly expressed in developing seeds, especially at the oil accumulation stage. TLC analysis and Nile red staining showed that *JcPDAT1* could restore the TAG biosynthesis and accumulation in *Saccharomyces cerevisiae* mutant strain H1246 α which indicated that the *JcPDAT1* possessed PDAT enzyme activity.

Key words: *Jatropha curcas*; PDAT; Degenerative PCR; Gene clone; Realtime PCR; Yeast complementary experiment

油料植物通常在种子的胚乳或子叶中积累大量的三脂酰甘油(triacylglycerol, TAG)。这些储存油脂既是种子萌发时的能量来源,也是人类食用油和工业用油的主要来源。尤其是近年来随着替代能源

发展的要求,大量的植物油被用作生物柴油的生产。然而制约生物柴油发展的关键因素就是植物油的产量不足,因此提高植物油的产量是人类克服能源危机和满足食物、工业原料等多种需求的必经之

收稿日期:2012-09-25

基金项目:国家自然科学基金(30871548);中国科学院重点方向性项目(KSCX2-EW-Z-15);国家自然科学基金(青年基金,30900908)

作者简介:徐荣华(1979-),男,安徽灵璧人,博士,主要从事植物分子遗传育种研究

*通讯作者:刘爱忠(1969-),男,安徽全椒人,教授,博士,研究方向植物分子遗传育种, E-mail: liuaizhong@xtbg.ac.cn

路^[1]。

在植物细胞中, TAG 的合成发生在内质网上, 以质体合成输出的脂肪酸(fatty acid, FA, 主要以脂酰-CoA 的方式存在)和三磷酸甘油(sn-glycerol-3-phosphate, G3P)为底物, 依次经过 3-磷酸甘油酰基转移酶(sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase, GPAT)、溶血磷脂酸酰基转移酶(lysophosphatidic acid acyltransferase, LPAT)、磷脂酸磷酸脂酶(phosphatidic acid phosphatase, PAP)和酰基辅酶 A:二酰甘油酰基转移酶(diacylglycerol acyltransferase, DGAT)的催化, 这条途径被称为 Kennedy 途径^[2]。在植物细胞中还存在一种不依赖于脂酰-CoA 的合成途径(PDAT 途径), 即磷脂(phospholipids)和二酰甘油(diacylglycerol)在磷脂二酰甘油酰基转移酶(phospholipids: diacylglycerol acyltransferase, PDAT)的作用下反应生成 TAG 和溶血磷脂(lyso-phospholipids)。PDAT 途径最初是在酿酒酵母中发现的, 且被认为是酵母对数生长时 TAG 合成的主要途径^[3], 然而后续的研究认为 DGAT 途径是酵母进入稳定期后 TAG 合成的主要途径, 且认为 DGAT 和 PDAT 对于酵母的 TAG 合成都有贡献。如酵母 DGAT 发生突变, TAG 含量比野生型下降了 50%, 而 DGAT 和 PDAT 双突变酵母的 TAG 仅剩下野生型 1% 的油含量^[4]。在一些产生羟基化(hydroxy)或环氧化(epoxy)特殊 FA 的植物中, PDAT 的主要作用被认为是与将这些特殊 FA 从膜脂中移除有关^[5]。特殊 FA 在磷脂中的大量积累会影响膜脂的结构导致其功能紊乱, 将特殊 FA 从磷脂转运到 TAG 中储存起来被视作植物适应的一种机制^[6]。因此 PDAT 也被认为与特殊 FA 在 TAG 中的积累有关。蓖麻是一种特殊 FA 植物, 在其种子中可积累 80%~90% 的羟基化 FA—蓖麻油酸。在蓖麻种子发育过程中可检测到较高的偏爱蓖麻油酸的 PDAT 酶活性, 在转化蓖麻油酸合成基因 *RcFAH12* 的拟南芥中过表达 *RcPDAT1* 可使得种子积累的蓖麻油酸由 17% 提高到 25%^[7]。在模式植物拟南芥中, 以酿酒酵母 PDAT 为探针鉴定了两个 PDAT 基因序列, At5g13460 (*AtPDAT1*) 和 At3g44830 (*AtPDAT2*), 对 *AtPDAT1* 进行酶学分析显示其具有 PDAT 酶的活性, 且能够催化不同链长的酰基(acyl groups)转移, 尤其对具有多个双键(double bond)的酰基、羟基化的酰基和环氧化的酰基具有强烈的偏爱性, 优先将它们从磷脂上转移到 TAG 中。这暗示植物 PDAT 对于特殊 FA 酰基的偏爱性是普遍的, 并非只在含有特殊 FA 的植物中才存在^[8]。然而这种假设是否

存在普遍性, 即在拟南芥之外的非特殊 FA 植物中 PDAT 是否也具有同样的性质, 仍有待于考察。在拟南芥中, 同时突变 *AtPDAT1* 基因和 *AtDGAT1* 基因会致死, 对 *AtPDAT1* 基因进行 RNA 干扰能够使 *AtDGAT1* 基因突变背景下的种子油含量下降 70%~80%, 且导致胚发育不良^[9], 这说明 *AtPDAT1* 基因与 *AtDGAT1* 基因在种子 TAG 合成中具有重叠的作用, 这也表明植物 PDAT 基因对种子 TAG 的合成和积累同样具有重要的作用。然而植物 PDAT 基因在拟南芥以外的非特殊 FA 植物中的功能如何, 目前尚不清楚, 仍有待于调查。

小桐子(*Jatropha curcas*), 又名膏桐或麻疯树, 是大戟科(Euphorbiaceae)多年生落叶灌木或小乔木。因其易于繁殖, 生长快速, 不择土壤、能在边际土地上生长, 种子油含量较高(30%~35%)、且种子油脂成份适于生产生物柴油等特点在生物柴油植物开发与利用中受到国内外高度重视, 被称为生物柴油植物^[10]。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^[11]。研究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。本文利用兼并 PCR 结合 RACE 的办法克隆了小桐子的 *JcPDAT1* 基因, 使用 Realtime PCR 技术调查其在不同组织和种子不同发育阶段的表达规律, 在酿酒酵母突变体中对其功能进行验证, 以期为进一步了解 *JcPDAT1* 在小桐子种子油脂合成和积累中的作用提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

小桐子(*Jatropha curcas* L., XTBG-Jc0032)种植于中国科学院西双版纳热带植物园实验地(21°56'N, 101°15'E, 平均海拔 600m)。以雌花完全展开, 但柱头尚未授粉为花开的第 1d 进行标记, 取第 12、18、24、30、40、50d 的种子, 完全舒展的嫩叶, 以及成体小桐子的根, 液氮速冻后 -80℃ 备用。酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)野生型菌株 INVSc1 购自 Invitrogen 公司, 突变体菌株 H1246α(MATαare1Δ::HIS3 are2Δ::LEU2 dga1Δ::KanMX4 lro1Δ::TRP1ADE2)由瑞典斯堪的纳维亚生物技术研究中心的 Sten Stymne 教授惠赠。

大肠杆菌感受态 Trans1-T1、pEasy™-T1 TA 克隆载体、pEasy™-Blunt 平端克隆载体、Trans Taq HiFi DNA polymerase 和 TransStart™ FastPfu 购自北京全式金生物技术有限公司, SMARTer™ RACE cD-

NA Amplification Kit 购自 Clontech 公司, PrimeScript 1st Strand cDNA Synthesis Kit 和 RNAiso plus 购自大 连宝生物工程有限公司, 酵母表达载体 pYES2. 1/ V5 – His – TOPO 和酵母转化试剂盒 (Sc EasyComp Transformation Kit) 购自 Invitrogen 公司。所有引物 均由上海捷瑞生物工程有限公司合成, 测序由上海 生物工程技术有限公司完成。

1.2 *JcPDAT1* cDNA 全长的克隆与分析

采用 CTAB 法提取叶片 DNA^[1], 采用酚:氯仿 硅胶粒方法提取总 RNA^[11]。以蓖麻 (XP_ 002514072)、葡萄 (XP_002278397)、杨树 (XP_ 002303252)、玉米 (NP_001130393) 和拟南芥 (NP_ 196868) 的 PDAT 蛋白序列为基础, 使用 CODEHOP (consensus – degenerate hybrid oligo nucleotide primers) 设计简并引物 *JcPDAT* – 1 和 *JcPDAT* – 2 (表 1), 以基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增。50μL PCR 反应体系中含有 10 × Trans Taq HiFi buffer 5μL, 基因组 DNA 模板 2μL (50ng), 10mmol · L⁻¹ 引物各 1μL, 2. 5mmol · L⁻¹ dNTP Mix 4μL, Trans Taq HiFi DNA polymerase (5U · L⁻¹) 1μL, ddH₂O 37μL。 扩增方法使用 Touchdown PCR: 94℃ 5min; 94℃

30s, 60℃ 30s, 72℃ 2min, 以后每 1 个循环退火温度 降低 1℃, 进行 10 个循环, 然后保持在 50℃ 退火, 再进行 24 个循环; 72℃ 延伸 7min。1% 的琼脂糖电 泳检测 PCR 产物, 连接 pEasyTM – T1 克隆载体, 转化 Tians1 – T1 感受态细胞, 通过蓝白斑筛选及菌液 PCR 鉴定阳性克隆后测序。对获得的中间片段进行 Blast 验证, 通过已知中间片段和 GenBank 数据库 中相关植物 *PDAT* 基因 cDNA 序列的比对, 鉴定 DNA 片段上外显子区域 (exon area), 并设计 5' 和 3' 端的 RACE 引物 *JcPDAT51* 和 *JcPDAT31* (表 1)。 按照 SMARTerTM RACE cDNA Amplification Kit 试剂 盒说明书进行 5' RACE 和 3' RACE, 扩增方法采用 Touchdown PCR, 回收目的片段并测序。将获得的 5' 端和 3' 端序列 Blast 验证, 设计 ORF (Open read- ing frame) 的全长引物 *JcPDAT1* – S 和 *JcPDAT1* – A (表 1), 按照 PrimeScript 1st Strand cDNA Synthesis Kit 的说明进行 cDNA 第一链的合成, 使用 *TransStart*TM *FastPfu* 进行 ORF 全长 PCR 扩增, PCR 产物经琼脂 糖胶检测后克隆到 pEasyTM – Blunt 载体上, 转化、测 序同上。

表 1 引物信息
Table 1 Primer information used in this study

引物名称 Primer	序列 Sequence (5' – 3')	用途 Use
<i>JcPDAT</i> – 1	GGCTACGAGGAGAAGACCATGTWYATGGC	简并引物 Degenerative PCR
<i>JcPDAT</i> – 2	GGGGCCCTCCACCCAYTTCAT	
<i>JcPDAT51</i>	TGGAATGCGGAATAGCAACCACCTTT	
<i>JcPDAT31</i>	ACTAATGCTGGGAGAAAGGTGGTTGCT	RACE
<i>JcPDAT</i> – S	ATGGCGATTTTGGCAGCGA	ORF 全长
<i>JcPDAT</i> – A	CTACAGCTGCAAGTTAATCCTTTCTGAC	
<i>JcPDAT1</i> – RTest1	GGTCAAAATGGGAAAGGGACTT	Primers for full length ORF
<i>JcPDAT1</i> – RTest2	TGGAGTCCCATGTACGAGTCAT	
<i>JcActin1</i>	GTACAACTGGTATCGTGCTGGATT	Realtime PCR
<i>JcActin2</i>	TTTCATGTCACGGACAATTTCC	
<i>PDAT1</i>	ATGGCGATTTTGGCAGCGAG	RT – PCR
<i>PDAT2</i>	CGCTCAGCTGCATCTTTTCC	
<i>LacZ</i> – 1	ATGATAGATCCCGTCGTTTACAAC	
<i>LacZ</i> – 2	CGTATTGCGAAAGGATCAGC	

将全长 ORF 进行 Blast 验证, 用 SeqMan 软件将 5' RACE 和 3' RACE 以及 ORF 进行拼接获得 cDNA 全长, 用 Vector NTI Advance 11 软件包的 AlignX 模 块对同源氨基酸序列进行比较分析, 用 MEGA 5 构 建系统发生树 (邻接法), 用在线工具 TMHMM (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM>) 进行跨膜 结构预测, 用在线软件 NetPhos 2. 0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>) 分析蛋白质磷酸化 位点。

1.3 *JcPDAT1* 基因的表达分析

采用 Realtime PCR 的方法调查 *JcPDAT1* (以 *JcActin* 为内参) 在叶片、根尖、发育中的种子中的表

达差异。各组织总 RNA 的提取、cDNA 的合成和 Realtime PCR 见文献^[11]。使用 2^{-ΔΔC_T} 法进行数据分 析, *JcPDAT1* 和 *JcActin* 的 realtime 引物见表 1。

1.4 酵母载体的构建转化和酵母突变体 H1246 的 互补实验

将得到的 *JcPDAT1* 通过 TOPO TA 克隆法克隆 到 pYES2. 1/V5 – His – TOPO 载体上, 构建穿梭表 达载体 pYES2. 1 – *JcPDAT1*, 按照 Sc EasyComp Transformation Kit 的说明转化酵母菌株 H1246α, 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, 通过菌落 PCR 鉴定阳性克隆, 同时将 pYES2. 1/

V5-His/LacZ 转化 H1246 和 INVSc1, 作为对照。以酸洗玻璃珠破碎酵母细胞, 使用 Trizol 法 (RNAiso plus) 提取酵母 RNA, 进行 RT-PCR 检测。

将转基因酵母在 SC-U 抑制培养基 (2% 葡萄糖) 中 250 r/min 30℃ 培养过夜, 测定 OD₆₀₀, 然后离心收集菌体, 使用 SC-U 诱导培养基 (2% 半乳糖) 重悬至 OD₆₀₀ = 0.4, 于 250 r/min 30℃ 继续培养。离心收集 10 mL 诱导培养 18 h 的转基因酵母菌液, 加入 4 mL 4 mol/L HCl, 室温 30 min, 沸水浴 10 min, 离心收集沉淀, 加入 4 mL 正己烷: 异丙醇 (3: 2) 抽提总脂^[11], 离心取上层正己烷相到一新的试管中, 真空干燥, 加入 500 μL 正己烷溶解油脂。TLC 层析参考文献^[12], TLC 显色使用碘染法^[13]。油体的尼罗红染色参考文献^[14]的方法, 酵母油体的观察使用奥林巴斯荧光显微镜 (BH2-UMA)。

2 结果与分析

2.1 *JcPDAT1* 基因的克隆与分析结果

以小桐子总 DNA 为模板, 用简并引物 (*JcPDAT*-1 和 *JcPDAT*-2, 表 1) 进行 PCR 扩增, 获得了单一的条带, 克隆测序后, 鉴定获得 DNA 片段长 394 bp, 该片段的 Blast 结果显示, 有 137 bp 的核苷酸区域与蓖麻 *PDAT* (XM_002514026) 基因的 cDNA 部分区域重叠, 具有 51% 的同源性, 推测该区域为外显子区域。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 (表 1), 经 RACE PCR 扩增分别获得 5' 末端和 3' 末端的序列, 拼接后获得 cDNA 序列全长为 2 869 bp, 包括 5' 非编码区 484 bp, 开放阅读框 (ORF) 2013 bp 和 3' 编码区 372 bp (含 polyA 尾), 编码 670 个氨基酸。命名为 *JcPDAT1* (GenBank 登录号为 HQ827796)。该基因编码蛋白预测分子量为 74.47 kDa, 理论等电点为 8.35。氨基酸序列相似性搜索发现 *JcPDAT1* 与其他物种的 *PDAT* 高度同源, 与蓖麻 *RcPDAT1* (29706.m001305) 的同源性为 75%, 与拟南芥 *AtPDAT1* (AT5G13640) 的同源性为 74%, 与 *AtPDAT2* (AT3G44830) 的同源性为 57.5%, 与酿酒酵母 *Sclro1p* (YNR008W) 的同源性为 29%。多序列比对分析表明植物 *PDAT1* 序列差异主要表现在 N 端 44 个氨基酸, 而序列中部和 C 端区域则相对保守 (图 1)。 *JcPDAT1* 在 N 端 46~63 aa 位置存在内质网信号肽^[8] (图 1), 在 C 端同样存在内质网定位信号 (图 1), 且遵循先前鉴定的内质网定位信号 (-X-X-K/R/D/E, X 为疏水性的氨基酸)-COOH 的规则^[15]。在烟草悬浮细胞中瞬时表达荧光蛋白标记

的 *VjDGAT1* 和 *VjDGAT2* 发现此信号可以把蛋白定位到细胞的内质网上^[6]。此外, *JcPDAT1* 在 130-150 氨基酸处存在一个保守脂质结构域 (图 1), 此结构域被认为与脂双层分子的去稳定化和结合疏水性底物有关, 包含一个重要的 Trp¹³⁸ 残基 (图 1), 被认为是与阻止剪切的脂肪酸进入酶的活性位点有关^[16]。氨基酸序列比对显示这些位点和结构域在 *AtPDAT1*, *AtPDAT2* 和 *RcPDAT1* 中都存在, 且氨基酸位置和序列都非常保守, 推测 *JcPDAT1* 编码的蛋白为功能性的 *PDAT* (图 1)。SOSUI 的分析显示 *JcPDAT1* 在 51-73 氨基酸、103-125 氨基酸和 175-197 氨基酸存在三个跨膜区, 这与在 *AtPDAT1* 和 *RcPDAT1* 的研究结果类似, 进一步推测 *JcPDAT1* 是定位在内质网上的膜蛋白。使用 NetPhos 2.0 分析发现, *JcPDAT1* 有 15 个丝氨酸磷酸化位点、10 个苏氨酸磷酸化位点和 9 个酪氨酸磷酸化位点, 暗示 *JcPDAT1* 蛋白受到活跃的磷酸化调节, 这与油脂代谢途径中重要酰基转移酶 (GPAT、LPAT 和 DGAT) 多受到磷酸化调节相一致^[17,18,19]。用 SOPMA 预测 *JcPDAT1* 的二级结构发现该蛋白主要由 α-螺旋 (36.57%) 和随机卷曲 (44.03%) 构成, 另外还有 14.3% 的延伸链和 5.37% 的 β-转角。初步的系统发生分析显示 *PDAT* 的进化基本符合植物进化分类 (图 2), 植物的 *PDAT* 聚为一支, 酿酒酵母的 *PDAT* (*Sclro1p*) 单独一支。 *JcPDAT1* 与同是大戟科蓖麻的 *RcPDAT2* 关系最近, 单子叶植物的 *PDAT* 聚在一起, 双子叶植物的 *PDAT* 聚在一起, 反应了同源 *PDAT* 系统发生上的密切关系, 例外是 *AtPDAT2* 和 *RcPDAT3*, 暗示它们的分歧出现在单子叶和双子叶分化之前。

2.2 *JcPDAT1* 基因的表达分析结果

以种子发育过程中六个发育时期和根基叶抽提的总 RNA 反转录的 cDNA 为模板, 以 *JcActin* 基因 (GQ256649) 为内参, 采用 Realtime PCR 的方法进行表达差异分析。反应所得溶解曲线峰形单一 (数据未提供), 试验结果能够准确反应 *JcPDAT1* 的相对表达量。以根中的表达量作为参照进行作图, 结果显示 *JcPDAT1* 在根、叶和种子中都有表达, 但表达水平有明显差异 (图 3)。在种子发育过程中, 表现出明显的双峰现象, 在授粉后 12 d 就可以检测到 *JcPDAT1* 的表达, 在 18 d 出现一个小高峰, 在 24 d 到 30 d 表达较低, 在 40 d 和 50 d 表达量持续升高, 在 50 d 达到最高, 是 24 d 表达量的 9 倍。我们先前的研究表明小桐子种子整个发育时期为 65 d, 储存油脂积累主要发生在 24 d 到 50 d^[11], 而 *JcPDAT1* 的表达

量从 24d 到 50d 持续升高,说明 *JcPDAT1* 基因的表达与种子中储存油脂合成和积累具有一定的相关性。

2.3 *JcPDAT1* 恢复了酵母突变体 H1246α 的 TAG 和油体形成

分别抽提转基因酵母 INVSc1 和 H1246α 的 RNA,经 DNaseI 处理后进行 RT-PCR 检测, *JcPDAT1* 检测引物为 PDAT1 和 PDAT2,对照质粒引物为 LacZ1 和 LacZ2,结果显示目的基因已经在酵母中表达(图 4)。酵母突变体 H1246α 中编码 TAG 合成的 *DGA1*(编码 DGAT)和 *LRO1*(编码 PDAT)以及编码固醇合成的基因 *ARE1* 和 *ARE2* 都被敲除了,

因此 H1246α 不能合成中性油脂,且 H1246α 不能形成油体,尤其适合鉴定合成 TAG 的 DGAT 或 PDAT 的活性^[12]。对转 p426 - *JcPDAT1* 的 H1246α 和 pYES2. 1/V5 - His/LacZ 转化的 H1246 和 INVSc1 进行诱导表达培养,18h 后抽提油脂进行 TLC 层析和碘染显色。如图 5 所示,转对照质粒的野生型菌株 INVSc1 能检测到 TAG 的斑点,转对照质粒的 H1246α 不能检测到 TAG 的斑点,而转 p426 - *PDAT1* 的 H1246α 可以检测到 TAG 的斑点。这说明 *JcPDAT1* 的表达恢复 H1246α 合成 TAG 的能力,尼罗红染色的结果也证实了这一点。图 6 显示转对

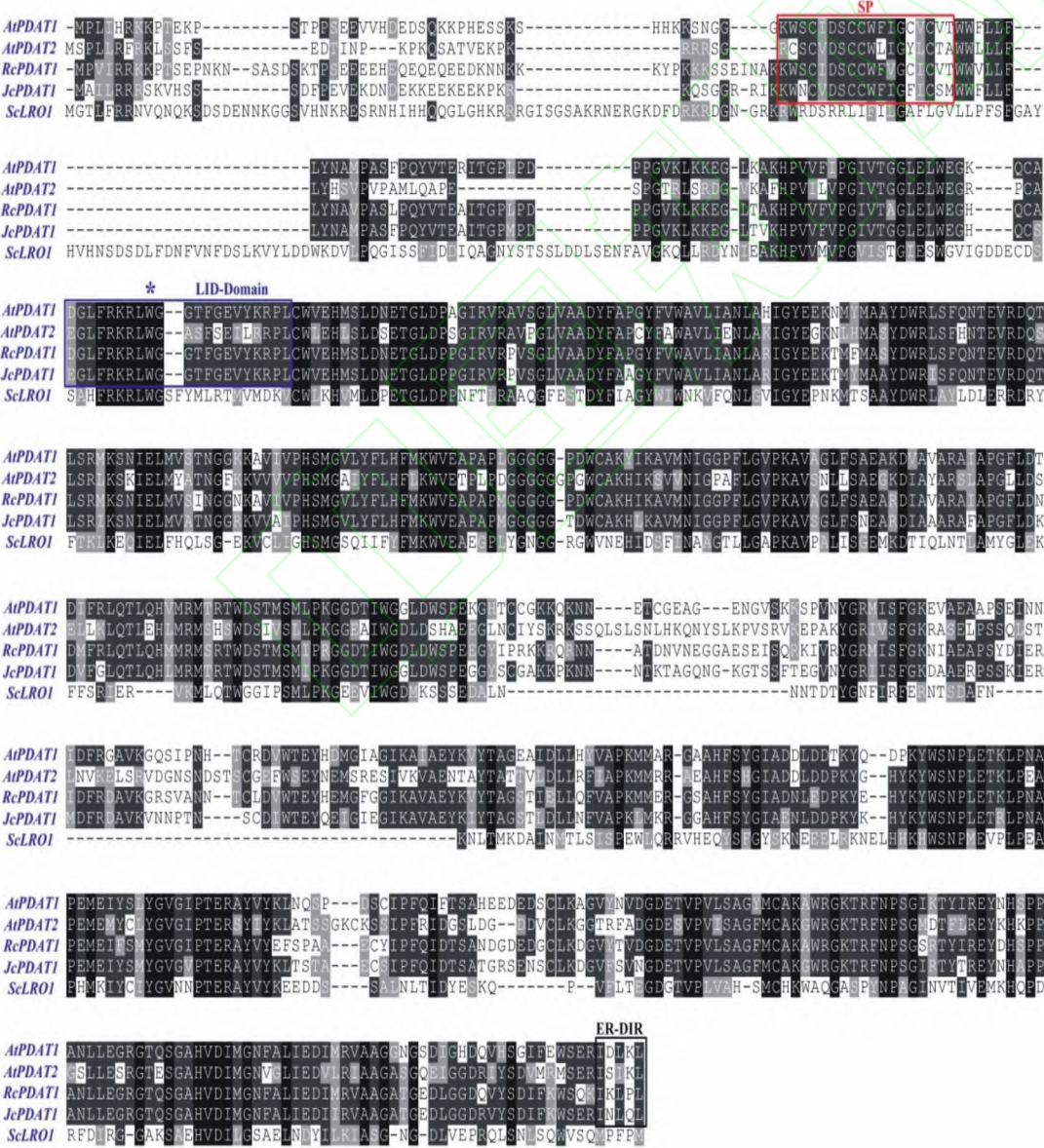


图 1 *JcPDAT1* 与其物种 PDAT 的氨基酸序列比对
Fig. 1 Comparison of deduced amino sequence of *JcPDAT1* with PDATs from other species

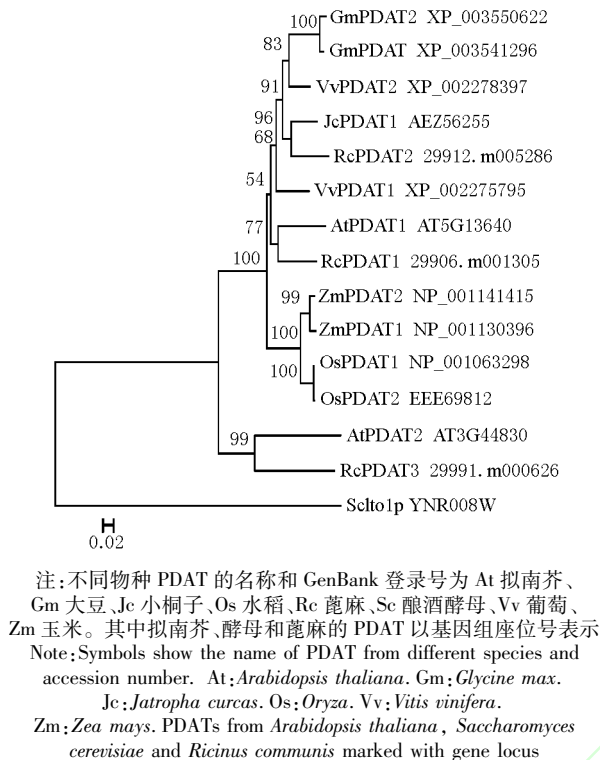


图2 *JcPDAT1* 与其他物种 PDAT 蛋白的系统进化树分析
Fig.2 Phylogenetic analysis of PDAT in various species

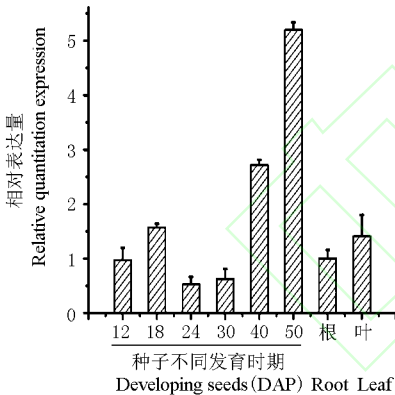
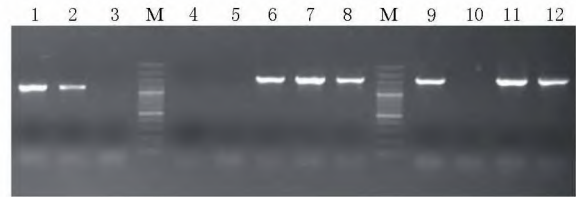


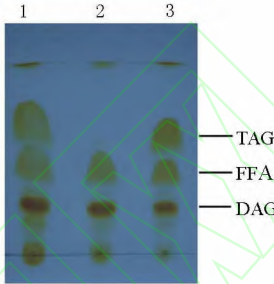
图3 种子不同发育时期和不同组织中 *JcPDAT1* 的相对表达量
Fig.3 Relative quantity of *JcPDAT1* expression in seeds, roots and leaves



注:1~3 为 H1246α 转 pYES2.1-JcPDAT1 酵母, 扩增长度为 1 241bp;4~8 为 H1246α 转对照质粒 pYES2.1/V5-His/LacZ 酵母,扩增长度为 1 603bp;
9~12 为 INVSC1 转对照质粒 pYES2.1/V5-His/LacZ 酵母,扩增长度为 1 603bp;M 为分子量标准 DL2000
Note: Lane 1 to 3 showed RT-PCR of H1246α transformed with pYES2.1-JcPDAT1; Lane 4 to 8 showed RT-PCR of 1 246α transformed with pYES2.1/V5-His/LacZ; Lane 9 to 12 showed RT-PCR of INVSC1 transformed with pYES2.1/V5-His/LacZ

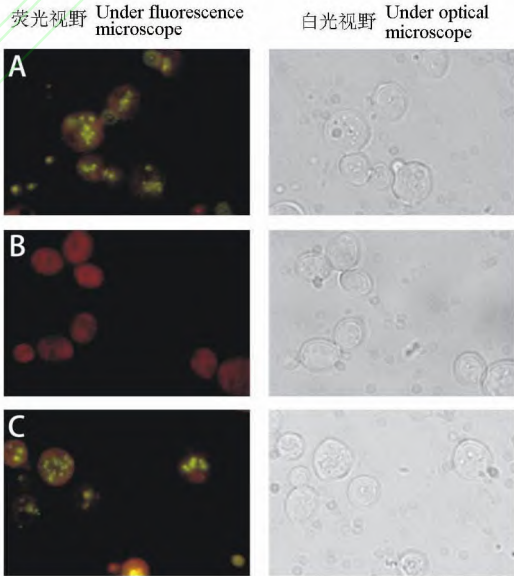
图4 转基因酵母的 RT-PCR 检测
Fig.4 RT-PCR of transgenic yeast

照质粒的野生型菌株 INVSC1 能够检测到油体,而转对照质粒的 H1246α 中检测不到油体,转 p426-PDAT1 的 H1246α 中可以检测到油体,表明 *JcPDAT1* 的表达恢复了 H1246α 油体缺陷的表型。综上所述,*JcPDAT1* 的表达使得 H1246α 中 TAG 的合成和累积得到了恢复,表明克隆所得的 *JcPDAT1* 编码具有 PDAT 酶活性的蛋白。



注:1 为 INVSC1 转对照质粒 pYES2.1/V5-His/LacZ 酵母;
2 为 H1246α 转对照质粒 pYES2.1/V5-His/LacZ 酵母;
3 为 H1246α 转 pYES2.1-JcPDAT1 酵母;TAG 三脂酰甘油;FFA 自由脂肪酸;DAG 二脂酰甘油
Note:1, INVSC1 transformed with pYES2.1/V5-His/LacZ;
2, H1246α transformed with pYES2.1/V5-His/LacZ;
3, H1246α transformed with pYES2.1-JcPDAT1;
TAG, triacylglycerol; FFA, free fatty acid; DAG, diacylglycerol

图5 转基因酵母油脂的 TLC 分析
Fig.5 TLC analysis of transgenic yeast



注:A 为 INVSC1 转对照质粒 pYES2.1/V5-His/LacZ 酵母;
B 为 H1246α 转对照质粒 pYES2.1/V5-His/LacZ 酵母;
C 为 H1246α 转 pYES2.1-JcPDAT1 酵母
Note:A, Nile red staining of INVSC1 transformed with pYES2.1/V5-His/LacZ; B, H1246α transformed with pYES2.1/V5-His/LacZ; C, H1246α transformed with pYES2.1-JcPDAT1

图6 转基因酵母中油体的检测
Fig.6 Oil-body of transgenic yeast

3 讨论

理解小桐子储存油脂合成的分子机制和克隆鉴定调控储存油脂合成的主效基因,是通过基因工程

技术发展高产优质小桐子种质的基础。目前小桐子的基因组测序已经基本完成^[20,21],但是拼接和组装的工作尚未完成,在基因组上仍存在很多的缺口,大量的功能基因仍然没有获得全长,因此功能基因的克隆和鉴定仍是小桐子研究工作的重要组成部分。

在本研究中,我们从小桐子中克隆了一个 *PDAT* 基因(*JcPDAT1*)的 cDNA 全长,并对其功能进行了初步鉴定。多序列比对分析发现 *JcPDAT1* 编码的蛋白与目前已鉴定的植物 *PDAT* 具有高度同源性,结构域分析和进化分析表明 *JcPDAT1* 具有明显的植物 *PDAT* 结构特征。在拟南芥中除 *AtPDAT1* 和 *AtPDAT2* 外,还发现有四个预测的基因序列与酵母 *ScPDAT* 具有较高的同源性,其中两个基因编码磷脂:固醇酰基转移酶(*At1g04010*)和磷脂酶 A1(*At3g03310*)。这四个 *PDAT* 类似的序列预测的编码蛋白并不具有 *Lid domain* 结构,而在功能已经验证的 *AtPDAT1* 和 *RcPDAT1* 中 *Lid domain* 非常保守^[8],我们克隆的 *JcPDAT1* 在这个区域与 *AtPDAT1* 和 *RcPDAT1* 完全一致(图 1),暗示 *JcPDAT1* 是有 *PDAT* 酶活性的蛋白。以拟南芥的 *AtPDAT1* 基因为探针,Margis 等^[16]从蓖麻基因组中鉴定了六个推测的 *RcPDAT* 基因,而 Kim 等^[7]则认为在蓖麻中存在三个 *RcPDAT* 基因,出现这种情况的原因在于二者判断的阈值不同。以 *JcPDAT1* 基因为探针在小桐子的基因组数据库(<http://www.kazusa.or.jp/jatropha/>)中进行 Blast,发现在小桐子中 *PDAT* 基因至少存在三个拷贝(数据未提供),Jiang 等^[21]的研究结果也证实了这一点。系统发育分析显示 *JcPDAT1* 与 *RcPDAT2*(蓖麻基因组座位号:29912. m005286)的亲缘关系最近,然后与 *AtPDAT1* 和 *RcPDAT1*(29706. m001305)聚类,与 *AtPDAT2* 和 *RcPDAT3*(29991. m000626)的亲缘关系较远(图 2)。实验表明 *AtPDAT1* 和 *RcPDAT1*、*RcPDAT2* 都是具有 *PDAT* 酶活性的蛋白^[7,8],而 *AtPDAT2* 和 *RcPDAT3* 是否具有 *PDAT* 酶活性还有待于研究,*JcPDAT1* 与 *AtPDAT1* 和 *RcPDAT1*、*RcPDAT2* 聚为一支,强烈暗示 *JcPDAT1* 基因编码有功能的 *PDAT* 酶。我们随即在酵母突变体 H1246 α 中过表达了 *JcPDAT1* 基因,TLC 分析和尼罗红染色结果都显示 *JcPDAT1* 基因的表达可以恢复 H1246 α 中 TAG 的合成和积累(图 5 和图 6),进一步证实 *JcPDAT1* 编码的蛋白具有 *PDAT* 活性,这说明我们克隆获得的 *PDAT* 基因是功能完整的拷贝。对拟南芥和蓖麻 *PDAT* 基因的时空表达研究表明,*PDAT* 基因的不同拷贝在植物不同组织间的表达有所差异。Kim 等^[7]使用半定量 PCR

检测了蓖麻中 *PDAT* 基因三个拷贝的表达,发现三者在叶、茎、花、雌蕊、雄蕊、种子、幼苗和根中都可以检测到表达,但表达丰度相差很大,*RcPDAT1* 在种子中的表达量很低,*RcPDAT2* 和 *RcPDAT3* 则在种子中大量表达。蓖麻中负责蓖麻油酸合成的 *RcFAH12* 在种子也是大量表达,因此推测 *RcPDAT2* 和 *RcPDAT3* 可能与蓖麻种子中蓖麻油酸在 TAG 中的大量累积密切相关。亚细胞定位实验表明 *RcPDAT2* 基因的表达产物定位于细胞的内质网上,*RcPDAT3* 基因的表达产物定位于质膜,而 TAG 的合成发生在内质网上,说明上述两个基因中与蓖麻油酸累积有关的是 *RcPDAT2*,进一步的转基因实验也证实了这一点。在本研究中 *JcPDAT1* 在小桐子的根、叶和种子中均检测到表达,且在种子油脂快速积累的时期大量表达,结合系统发育上 *JcPDAT1* 与 *RcPDAT2* 的关系最近,推测 *JcPDAT1* 可能与小桐子种子油脂中的 FA 成份有关。尽管小桐子种子不积累特殊的 FA,但是小桐子种子含有 28.8% ~ 34.6% 的亚油酸,对 *AtPDAT1* 的研究也表明植物 *PDAT* 对于含有多个双键的 FA 酰基具有较高的偏爱性,而序列比对和系统发育都表明 *JcPDAT1* 与 *AtPDAT1* 具有高度同源性,因此 *JcPDAT1* 可能在转录水平上参与了小桐子种子 TAG 中亚油酸的累积。植物种子积累储存 TAG 是一个非常复杂的生理生化过程,尽管其基本的代谢途径是一致的(都包括 DGAT 途径和 *PDAT* 途径)。研究表明 DGAT 是植物种子中 TAG 合成和积累的限制因子,而 *PDAT* 在 TAG 合成和积累中限制作用却尚未明确^[22]。拟南芥中 *AtDGAT2* 基因的突变种子油含量未见显著降低,说明 *AtDGAT2* 对于种子中 TAG 积累是没有功能的,而 *AtDGAT1* 基因的突变使得种子油含量下降了 30%,暗示 *AtPDAT1* 是决定剩余 70% 种子油的限制基因^[23]。本研究中 *JcPDAT1* 在种子发育后期的表达量明显高于在根和叶中的表达,具有明显的组织特异性,即种子油脂快速累积时期高量表达,也暗示了该基因可能是影响种子油含量的一个限制因子。

鉴于 *PDAT* 基因对于植物种子油含量和油脂成份都有一定限制作用,因此通过过表达或者抑制改变 *PDAT* 基因的表达水平,从而引起种子中油脂含量和成份的变化,不仅有助于明确植物 *PDAT* 基因的功能,而且还可以实现植物种子油脂的基因改良。因此,本实验室下一步拟通过转基因技术在小桐子中进行过表达和 RNAi 抑制实验,以探讨 *JcPDAT1* 基因对于小桐子种子油含量和油脂成份的限制作用,从而进一步明确 *PDAT* 途径在植物油脂合成中

的分子机制,同时为发展高产优质的小桐子种质提供实验基础。

参考文献:

- [1] 张楠,徐荣华,刘小烛,等.小桐子甘油-3-磷酸酰基转移酶(JcGPAT) cDNA 的克隆与序列分析[J].植物生理学报,2011,47(2):181-188.
- [2] Kennedy E P. Biosynthesis of complex lipids[J]. Federation Proceedings,1961,20:934-940.
- [3] Dahlqvist A, Stah U, Lenman M, et al. Phospholipid:diacylglycerol acyltransferase: an enzyme that catalyzes the acyl-CoA-independent formation of triacylglycerol in yeast and plants[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America,2000,97:6487-6492.
- [4] Sandager L, Gustavsson M H, Stahl U, et al. Storage lipid synthesis is non-essential in yeast[J]. Journal of Biological Chemistry,2002,277:6478-6482.
- [5] Banas A, Dahlqvist A, Stahl U, et al. The involvement of phospholipid:diacylglycerol acyltransferases in triacylglycerol production[J]. Biochemistry Society Transactions,2000,28:703-705.
- [6] Shockey J M, Gidda S K, Chapital D C, et al. Tung tree DGAT1 and DGAT2 have nonredundant functions in triacylglycerol biosynthesis and are localized to different subdomains of the endoplasmic reticulum[J]. The Plant Cell,2006,18:2294-2313.
- [7] Kim H U, Lee K R, Go Y S, et al. Endoplasmic reticulum-located PDAT1-2 from castor bean enhances hydroxy fatty acid accumulation in transgenic plants[J]. Plant & cell physiology,2011,52:983-993.
- [8] Stahl U, Carlsson A S, Lenman M, et al. Cloning and functional characterization of a phospholipid:diacylglycerol acyltransferase from *Arabidopsis*[J]. Plant Physiology,2004,135:1324-1335.
- [9] Zhang M, Fan J, Taylor D C, et al. DGAT1 and PDAT1 acyltransferases have overlapping functions in *Arabidopsis* triacylglycerol biosynthesis and are essential for normal pollen and seed development[J]. The Plant Cell,2009,21:3885-3901.
- [10] Fairless D. Biofuel: The little shrub that could - maybe[J]. Nature,2007,449:652-655.
- [11] Xu R H, Wang R L, Liu A Z. Expression profiles of genes involved in fatty acid and triacylglycerol synthesis in developing seeds of jatropha (*Jatropha curcas* L.)[J]. Biomass & Bioenergy,2011,35:1683-1692.
- [12] Siloto R M P, Truksa M, He X H, et al. Simple methods to detect triacylglycerol biosynthesis in a yeast-based recombinant system[J]. Lipids,2009,44:963-973.
- [13] Kalscheuer R, Stoveken T, Malkus U, et al. Analysis of storage lipid accumulation in *Alcanivorax borkumensis*: evidence for alternative triacylglycerol biosynthesis routes in bacteria[J]. Journal of Bacteriology,2007,189:918-928.
- [14] Wagner M, Hoppe K, Czabany T, et al. Identification and characterization of an acyl-CoA: diacylglycerol acyltransferase 2 (DGAT2) gene from the microalga *O. tauri*[J]. Plant Physiology and Biochemistry,2010,48:407-416.
- [15] McCartney A W, Dyer J M, Dhanoa P K, et al. Membrane-bound fatty acid desaturases are inserted co-translationally into the ER and contain different ER retrieval motifs at their carboxy termini[J]. The Plant Journal,2004,37:156-173.
- [16] Margis R, Cagliari A, Margis-Pinheiro M, et al. Identification and expression analysis of castor bean (*Ricinus communis*) genes encoding enzymes from the triacylglycerol biosynthesis pathway[J]. Plant Science,2010,179:499-509.
- [17] Chen H C, Rao M, Sajan M P, et al. Role of adipocyte-derived factors in enhancing insulin signaling in skeletal muscle and white adipose tissue of mice lacking acyl-CoA: diacylglycerol acyltransferase 1[J]. Diabetes,2004,53:1445-1451.
- [18] Tang W, Yuan J, Chen X, et al. Identification of a novel human lysophosphatidic acid acyltransferase, LPAAT-theta, which activates mTOR pathway[J]. Journal of Biochemistry and Molecular Biology,2006,39:626-635.
- [19] Collison L W, Jolly C A. Phosphorylation regulates mitochondrial glycerol-3-phosphate-1 acyltransferase activity in T-lymphocytes[J]. Biochimica et Biophysica Acta,2006,1761:129-139.
- [20] Tabata S, Sato S, Hirakawa H, et al. Sequence analysis of the Genome of an oil-bearing tree, *Jatropha curcas* L.[J]. DNA Research,2011,18:65-76.
- [21] Jiang H, Wu P, Zhang S, et al. Global analysis of gene expression profiles in developing physic nut (*Jatropha curcas* L.) seeds[J]. PLoS ONE,2012,7(5):e36522. doi:10.1371/journal.pone.0036522.
- [22] Chapman K D, Ohlrogge J B. Compartmentation of triacylglycerol accumulation in plants[J]. Journal of Biological Chemistry,2012,287:2288-2294.
- [23] Xu J, Carlsson A S, Francis T, et al. Triacylglycerol synthesis by PDAT1 in the absence of DGAT1 activity is dependent on re-acylation of LPC by LPCAT2[J]. BMC Plant Biology,2012,12:4-26.