

## 油茶2个甘油-3-磷酸酰基转移酶基因的克隆与组织表达特异性分析

魏琦琦, 赵广, 何潇, 龙洪旭, 李泽, 谭晓风, 张琳\*

中南林业科技大学, 经济林培育与保护省部共建教育部重点实验室, 经济林育种与栽培国家林业局重点实验室, 经济林培育与利用湖南省2011协同创新中心, 长沙410004

**摘要:** 甘油-3-磷酸酰基转移酶(glycerol-3-phosphate acyltransferase, GPAT)是三酰甘油生物合成Kennedy途径中的关键酶, 在植物的油脂合成与抗逆等方面起着重要作用。本研究在转录组数据基础上, 通过RACE技术, 从我国重要木本食用油料树种油茶中克隆了2个GPAT基因*CoATS1*和*CoGPAT6*的全长cDNA序列, 编码序列长度分别为1 353和1 488 bp, 分别编码450和495个氨基酸。蛋白结构预测发现2个蛋白C-端都含有1个酰基转移酶结构域, *CoGPAT6*的N-端还具有1个类卤酸脱卤酶结构域。多序列比对和系统进化分析结果表明, *CoATS1*与茶树的*CsGPAT*聚为一类, *CoGPAT6*与芝麻的*SiGPAT6*聚为一类。实时荧光定量PCR分析表明, *CoATS1*和*CoGPAT6*基因在检测的各样本中均有表达, 其中*CoATS1*在叶片中的表达量显著高于其他组织, 在种子的发育过程中, 表达呈递减变化; *CoGPAT6*在花瓣中表达量最高, 在种子中呈“降低-升高-降低”的表达特征。本研究为阐明GPAT类基因在油茶种子油脂合成途径中的功能奠定了基础。

**关键词:** 油茶; 甘油-3-磷酸酰基转移酶; 蛋白结构; 系统进化树; 表达分析

植物油脂包含多种脂肪酸及其衍生物, 在植物的生长发育等生命活动中起着重要作用。植物油脂用途广泛, 尤其是可以作为食物能源、工业原料、医药、化工以及近年来兴起的生物柴油制造原料等。在植物种子中, 油脂主要是以三脂酰甘油(triacylglycerol, TAG)的形式存在, 提高TAG的含量可导致种子含油量的提高。TAG的生物合成途径主要包括上游脂肪酸在质体中的生物合成和下游TAG在内质网上的组装两个过程。TAG的组装最为人熟知的是Kennedy途径(Manaf和Harwood 2000), 即以3-磷酸甘油(*sn*-glycerol-3-phosphate, Gly3P)为碳架, 以脂肪酸为底物, 先后在甘油-3-磷酸酰基转移酶(*sn*-glycerol-3-phosphate acyltransferase, GPAT; EC 2.3.1.15)、溶血磷脂酸酰基转移酶(lysophosphatidic acid acyltransferase, LPAAT; EC 2.3.1.51)、磷脂酸磷酸酯酶(phosphatidate phosphatase, PAP; EC 3.1.3.4)和二酰甘油脂酰基转移酶(diacylglycerol acyltransferase, DGAT; EC 2.3.1.20)的系列作用下形成TAG。因此, GPAT酶的催化反应是Kennedy途径的第一步, 是TAG生物合成的“阀门”, 已有研究表明该基因对种子含油量起着主效作用(张楠等2011)。迄今在拟南芥中共发现了10个GPAT基因家族成员(Nishida等1993; Zheng等2003; Xu等2006; Gidda等2009), 包括定位于叶绿体的*ATS1*、定位于线粒体的*GPAT1*~*GPAT3*和定位于内质网的*GPAT4*~*GPAT9*。目前在麻风树、花生、油菜等多种油料作物鉴定了GPAT基因(张楠等2011; 朱双等2012;

迟晓元等2013; 刘聪等2014; Chi等2015)。GPAT基因表现出多种生理功能, 在植物的生长发育中发挥着重要的作用, 尤其是与植物的育性(Zheng等2003; Li等2012)、抗逆(Sui等2007)以及种子含油量(Gidda等2009)等关系密切。

油茶(*Camellia oleifera*), 属山茶科山茶属多年生常绿乔木, 是我国南方重要的木本油料树种, 与油棕、油橄榄和椰子并称为世界四大木本食用油料植物。从油茶成熟种子中压榨获得的茶油富含油酸和亚油酸等不饱和脂肪酸, 含量一般在90%以上(李泽等2014), 其营养价值和保健价值可与橄榄油相媲美, 是名副其实的优质食用植物油。

但油茶的单位面积产油量较低, 一般每亩产油量仅20~30 kg。油茶低产问题严重制约了油茶产业的发展, 目前油茶生产已被置于国家粮油安全的高度而受到国家的高度重视。油茶低产的一个重要原因是油茶种子含油率较低, 为34%左右(陈永忠等2006), 因此, 如何提高油茶种子的含油率是目前油茶育种中亟待解决的问题。培育种子高含油率的油茶新品种的途径有两条, 一是通过常规育种(如选择育种、种间杂交育种等), 培育种皮薄、种仁含油率高的新品种, 但潜力非常有限; 二是通过分子育种方法改变油茶种仁油脂合成关

收稿 2016-05-06 修订 2016-06-16

资助 国家自然科学基金(31470684)。

\* 通讯作者(E-mail: triwoodtim918@126.com)。

键基因的表达,降低油茶种子中淀粉和蛋白质的含量,促使油脂的转化和积累,从而提高油茶种子的含油率,该途径发展潜力巨大。但油脂合成代谢途径复杂,涉及大量基因的参与和协同作用,因此理解油茶油脂合成代谢途径是开展分子育种的基础。基于此,近几年研究者从油茶中克隆了HCD、ACOT、SAD、FAD2、DGATI等油脂合成相关基因(谭晓风等2008, 2014; 刘凯等2012; 王建勇等2014, 2015; 陈鸿鹏等2015a, b)。但催化Kennedy途径第一步的GPAT基因,迄今未见报道。课题组前期开展了油茶花和种子等多个器官的转录组测序研究,根据注释发现了2个GPAT家族成员(部分序列),本研究在此基础上开展了基因的克隆、生物信息学以及组织表达分析,为明确GPAT基因的功能和将来油茶的分子育种奠定了基础。

## 材料与方法

### 1 材料与试剂

#### 1.1 植物材料

试验品种为六年生油茶(*Camellia oleifera*)国审良种‘华硕’,栽植于湖南长沙望城中南林业科技大学油茶试验基地。于春季取油茶嫩叶、幼嫩茎段和根;于11月份取尚未开放的花,快速分离花瓣、雄蕊和雌蕊;于果实发育周期内分别取花后30、34、38、42、44、46和48周等7个发育时期的果实。所有植物材料带回实验室置于-80°C冰箱保存。

#### 1.2 主要试剂

2×Easy Taq PCR Super Mix酶、100 bp DNA Marker, 琼脂糖、Tris饱和酚、EDTA、CTAB、氯仿:异戊醇(24:1)、β-巯基乙醇、无水乙醇等购自全式金生物技术有限公司, DNase、Ambion® RNA提取试剂盒购自Invitrogen公司, 5' RACE试剂盒采用Invitrogen公司的5' RACE System for Rapid Amplification of cDNA Ends, 3' RACE试剂盒采用Clontech公司的SMARTer™ RACE cDNA Amplification Kit试剂盒。荧光定量用反转录试剂盒购自TaKaRa公司等。引物合成和DNA测序由南京金斯瑞生物科技有限公司完成。

### 2 试验方法

#### 2.1 RNA提取及质量检测

参考宋志波等(2014)方法,采用在Ambion® RNA提取试剂盒上改良的CTAB法提取油茶总

RNA。从各组织器官提取的RNA中各取2 μL进行1.5%琼脂糖凝胶电泳检测,通过观察28S、18S条带亮度对RNA完整性进行分析;并通过紫外分光光度计对RNA样品的OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub>比值及浓度进行重复检测。

#### 2.2 5' RACE和3' RACE

根据转录组获得的序列,经PCR扩增、测序验证后,分别通过5' RACE和3' RACE进行目的基因的2个末端扩增,所用引物见表1。5' RACE和3' RACE操作按试剂盒说明书进行,PCR循环条件根据所用引物退火温度而定,扩增结束后对目的条带进行切胶回收纯化、测序。将5' RACE和3' RACE测序结果整理后,分别进行Blast分析,确认其为目的基因的两端序列,分别设计包含目的基因ORF的引物(表1),以种子RNA为模板扩增全长序列,并进行测序验证。

#### 2.3 生物信息学分析

使用目的基因的氨基酸序列在NCBI网站(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)上进行Blastp分析,并利用NCBI上的保守区数据库(conserved domain database, CDD)分析目的蛋白的保守结合区域。用SignalP 4.1 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)预测目的蛋白信号肽;用ProtParam (<http://au.expasy.org/tools/protparam.html>)计算目的蛋白中各种氨基酸的含量和蛋白的理论分子量、等电点、稳定性;通过Plant-mPLoc进行蛋白质亚细胞定位预测;用SOPMA ([https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa\\_automat.pl?page=/NPSA/npsa\\_sopma.html](https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_sopma.html))进行蛋白二级结构预测;用TMPred ([http://www.ch.embnet.org/software/TM-PRED\\_form.html](http://www.ch.embnet.org/software/TM-PRED_form.html))预测跨膜结构和亲水/疏水性特性。使用MEGA6软件的ClustalW程序进行多序列比对,并使用邻接法构建基因系统树,自展重复次数设置为1 000次(Tamura等2013)。

#### 2.4 实时荧光定量PCR分析

根据目的基因序列,设计特异引物(表1),以油茶的*EFlα*基因为内参基因(宋志波等2014)。实时荧光定量PCR使用CFX96™ Real-time PCR反应系统(BIO-RAD, 美国),采用SYBR Premix Ex Taq™ (TaKaRa, 日本)。进行荧光定量PCR前,对扩增片段进行测序以验证序列真伪。总反应体系为25 μL,包括12.5 μL 2×SYBR Premix Ex Taq™ (Tli RNaseH

表1 本研究所用引物

Table 1 Primers used in this study

引物名称	序列(5'→3')	退火温度/°C	用途
CoATS1GPS1	CCACTTGGTGCAATCC	48.5	<i>CoATS1</i> 5' RACE扩增
CoATS1GPS2	CCCTTAAAAGCAAAGCCATT	57.2	<i>CoATS1</i> 5' RACE扩增
CoATS1GPS3	TTTCATCTCAGCAAAGCTCAGG	58.1	<i>CoATS1</i> 5' RACE扩增
CoATS1R3-1	AGGCCCTATATGATTCTGTGTGGACCA	69.2	<i>CoATS1</i> 3' RACE扩增
CoATS1R3-2	ACATGGCAAAAAAGGTCTGGAGGCA	69.9	<i>CoATS1</i> 3' RACE扩增
CoGPAT6GPS1	GACACCACTCTGGCCC	52.0	<i>CoGPAT6</i> 5' RACE扩增
CoGPAT6GPS2	AGGGGTGCCTTTTACGATGA	58.2	<i>CoGPAT6</i> 5' RACE扩增
CoGPAT6GPS3	TACCATACGATTCGCTCTGGC	59.6	<i>CoGPAT6</i> 5' RACE扩增
CoGPAT6R3-1	ATCACATTTTGAATCAATTGCCAGCG	68.4	<i>CoGPAT6</i> 3' RACE扩增
CoGPAT6R3-2	AAATCTGCGATTGAGGTTGCGAATT	67.0	<i>CoGPAT6</i> 3' RACE扩增
CoATS1F1	CTATGACATTATGCCCCACC	59.3	<i>CoATS1</i> qRT-PCR
CoATS1R1	CCTGAAAACAGACTGGGGGT	58.7	<i>CoATS1</i> qRT-PCR
CoATS1F2	ATGTTGATCCTCTCTCTCCGCG	60.0	<i>CoATS1</i> ORF扩增
CoATS1R2	CTAATCCATGGTTGCGACAATG	62.2	<i>CoATS1</i> ORF扩增
CoGPAT6F1	AATCTGGAAGAGCGACTGGGT	60.3	<i>CoGPAT6</i> qRT-PCR
CoGPAT6R1	TCAGTCTCTCTGCTCCCAATCC	59.8	<i>CoGPAT6</i> qRT-PCR
CoGPAT6F2	ATGGGTGCTCATCGCAA	60.0	<i>CoGPAT6</i> ORF扩增
CoGPAT6R2	TCAAGAACTCTCTTCTTGTGTTGGC	61.5	<i>CoGPAT6</i> ORF扩增

Plus, TaKaRa, 日本), 9.5  $\mu\text{L}$ 去RNA酶水, 各0.5  $\mu\text{L}$ 的引物(10  $\mu\text{mol}$ ), 2  $\mu\text{L}$  cDNA模板。PCR反应条件为94°C预变性30 s, 随后94°C变性5 s, 60°C退火30 s, 72°C延伸30 s, 39个循环。各反应重复3次。荧光定量PCR数据的分析采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法(Livak和Schmittgen 2001)。对获得的表达量数据通过SPSS软件进行差异显著性分析( $P < 0.01$ )。

## 实验结果

### 1 油茶GPAT基因的克隆

在前期转录组测序数据中(未发表), 预测得到

2个GPAT成员, 长度分别为658和651 bp, 经PCR确认后在此序列基础上通过RACE-PCR扩增2个基因的2个cDNA末端序列。*CoATS1*基因的5' RACE和3' RACE的扩增片段长度分别为900和550 bp左右(图1-A和B), 测序后分别可以找到起始密码子ATG和终止密码子TAG, 且与已知的中间片段分别有90和137 bp的序列重叠, 进一步通过RT-PCR扩增出该基因含起始密码子和终止密码子的全长克隆, 长度为1 353 bp(图1-C)。*CoGPAT6*基因, 5' RACE和3' RACE的扩增片段长度分别为1 000和500 bp左右(图2-A和B), 测序后可以找到起始密码子ATG

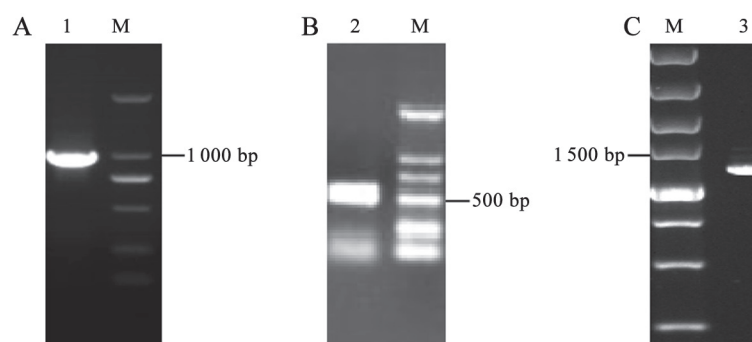


图1 油茶ATSI的cDNA全长克隆

Fig.1 Amplification of full-length cDNA of ATSI in *Camellia oleifera*

A: 5'端扩增; B: 3'端扩增; 3: 开放阅读框扩增。1、2、3分别为对应扩增产物; M: 分子量标准。图2同此。



和终止密码子TGA, 与已知中间片段的序列重叠分别为71和63 bp, 进一步通过RT-PCR扩增出该基因含起始密码子和终止密码子的全长克隆, 长度为1 488 bp (图2-C)。CoATS1和CoGPAT6基因序列已提交至NCBI数据库, 登录号分别为KX226430和KX226431。

## 2 油茶GPAT基因的序列结构分析

油茶CoATS1基因包含1个1 353 bp的开放阅读框, 编码450个氨基酸。该基因编码蛋白的预测分子量为49.71 kDa, 理论等电点为5.80, 负电荷残基(Asp+Glu)总数为52个, 正电荷残基(Arg+Lys)总数为42个, 不稳定系数为56.00, 属于不稳定蛋白, 平均亲水系数(grand average of hydropathicity, GRAVY)是-0.172。通过亚细胞定位预测, CoATS1蛋白定位于叶绿体上。蛋白二级结构预测发现该蛋白含 $\alpha$ -螺旋150个, 占33.33%;  $\beta$ -折叠30个, 占6.67%; 自由卷曲187个, 占41.56%。预测CoATS1蛋白不含信号肽, 在该基因的C-端具有典型的酰基转移酶结构域(acyltransferase domain, AT domain), 包括4个保守的AT结构基序AT-I、AT-II、AT-III和AT-IV (图3), 其中起催化作用的组氨酸残基(H)和天冬氨酸残基(D)位于AT-I基序, 甘氨酸残基(G)位于AT-III基序, 脯氨酸残基(P)位于AT-IV基序, 除此外, AT-II基序的精氨酸残基(R), AT-III基序的丝氨酸残基(S)被认为是与甘油3-磷酸(G3P)底物的结合位点。

油茶CoGPAT6基因包含一个1 488 bp的开放阅读框, 编码495个氨基酸。该基因编码蛋白的预测分子量为55.03 kDa, 理论等电点为9.26, 负电荷残基(Asp+Glu)总数为46个, 正电荷残基(Arg+Lys)

总数为61个, 不稳定指数为36.28, 属于稳定蛋白, 平均亲水系数(grand average of hydropathicity, GRAVY)是0.143。亚细胞定位预测显示CoGPAT6蛋白可能位于内质网。氨基酸序列二级结构预测发现该基因含 $\alpha$ -螺旋137个, 占27.68%;  $\beta$ -折叠50个, 占10.10%; 自由卷曲182个, 占36.77%。与油茶CoATS1相同的是, 油茶CoGPAT6蛋白也没有发现信号肽。跨膜分析发现其有2个跨膜区域(transmembrane domain), 分别位于48~71区和242~260区(图4)。和油茶CoATS1类似的是, 油茶CoGPAT6蛋白的C-端也具有AT-I、AT-II、AT-III和AT-IV等典型的酰基转移酶结构域, 在这些结构域中除了具有和CoATS1相同的组氨酸、天冬氨酸、甘氨酸、脯氨酸、精氨酸和丝氨酸残基外, 在AT-III基序中还发现多了一个结合甘油3-磷酸底物的谷氨酸残基(E)。除了C-端的酰基转移酶结构域, CoGPAT6的N-端还有一个类卤酸脱卤酶结构域(haloacid dehalogenase-like hydrolase, HAD-like), 具有类卤酸脱卤酶蛋白的4个高度保守的基序HAD-I、HAD-II、HAD-III和HAD-IV。类卤酸脱卤酶结构域中具有典型的DXD结构基序, 其中天冬氨酸残基(D)为用于共价催化的亲核基团。HAD-II和HAD-III中分别具有高度保守的苏氨酸残基(T)和赖氨酸残基(K), 两者作用于中间体的稳定性。HAD-IV中包含一个典型的GDXXXD识别序列, 该保守的识别序列连同HAD-IV中的酸性序列, 共同起到了稳定活性中心的镁离子的作用。

## 3 油茶GPAT基因的系统进化

根据油茶CoATS1和CoGPAT6的Blast结果, 从GenBank中下载拟南芥、油菜、油棕等20个物种

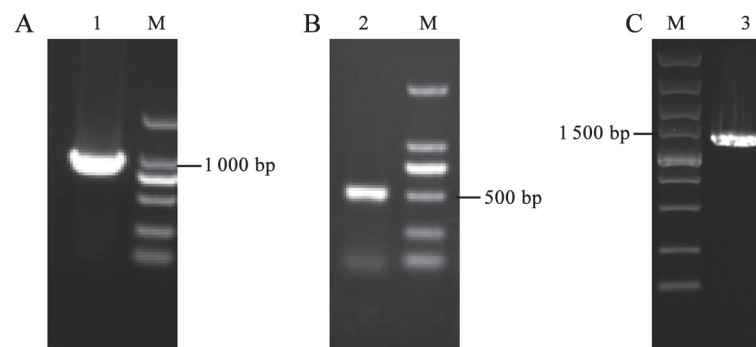


图2 油茶GPAT6的cDNA全长克隆

Fig.2 Amplification of full-length cDNA of GPAT6 in *Camellia oleifera*

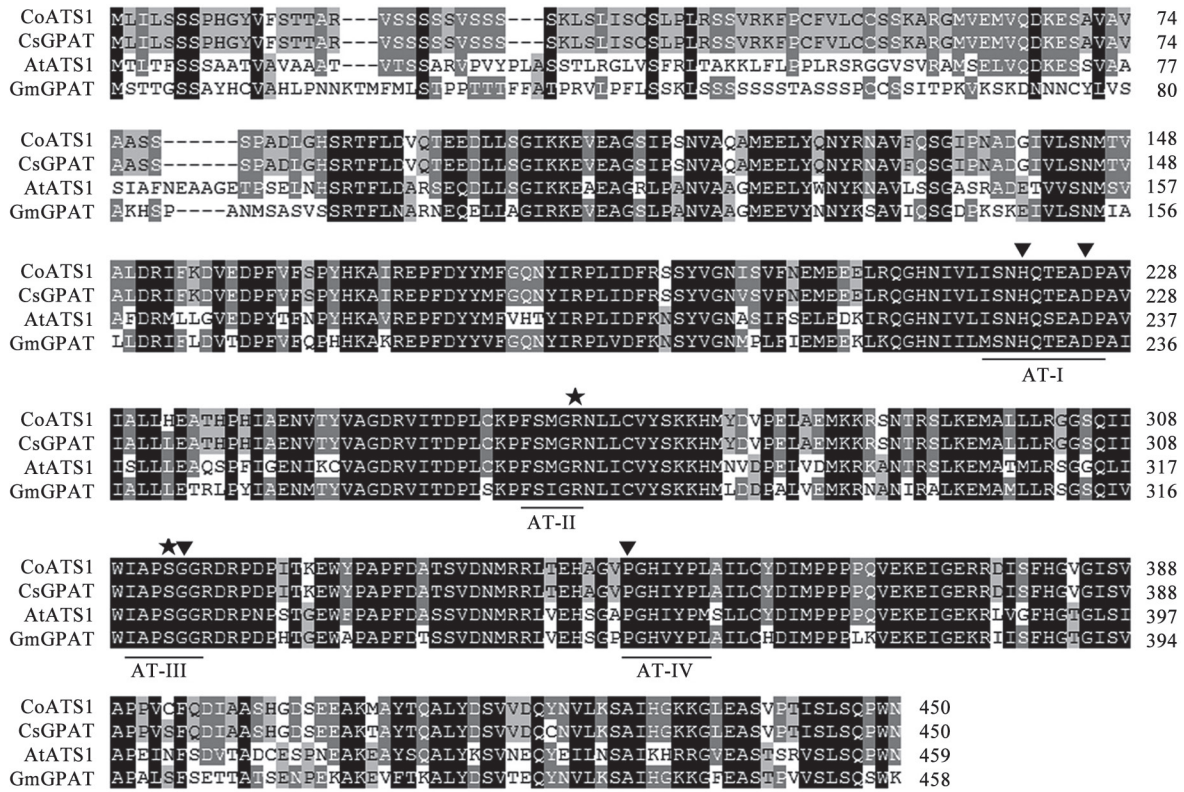


图3 油茶CoATS1氨基酸序列及结构

Fig.3 Amino acid sequence and structure of CoATS1

4个保守的酰基转移酶结构域由下划线表示; 催化作用的氨基酸残基以▼表示; 结合位点氨基酸残基以★表示。

的30个GPAT同源基因(包含完整开放阅读框和氨基酸序列), 其中叶绿体类GPAT和内质网类GPAT6各15个。通过MEGA6软件的ClustalW程序对这些氨基酸序列进行序列比对。油茶CoATS1与叶绿体类GPAT相似性较高, 为60.6% (大豆GmGPAT)至98.9% (茶树CsGPAT), 与油茶CoGPAT6间的相似性很低, 只有14.2%, 与其他物种的GPAT6的相似性也很低, 为12.2% (枣ZjGPAT6)至15.3% (拟南芥AtGPAT6)。油茶CoGPAT6与其他物种的GPAT6同源基因相似性较高, 为75.1% (水稻OsGPAT6)至88.1% (胡杨PeGPAT6)。

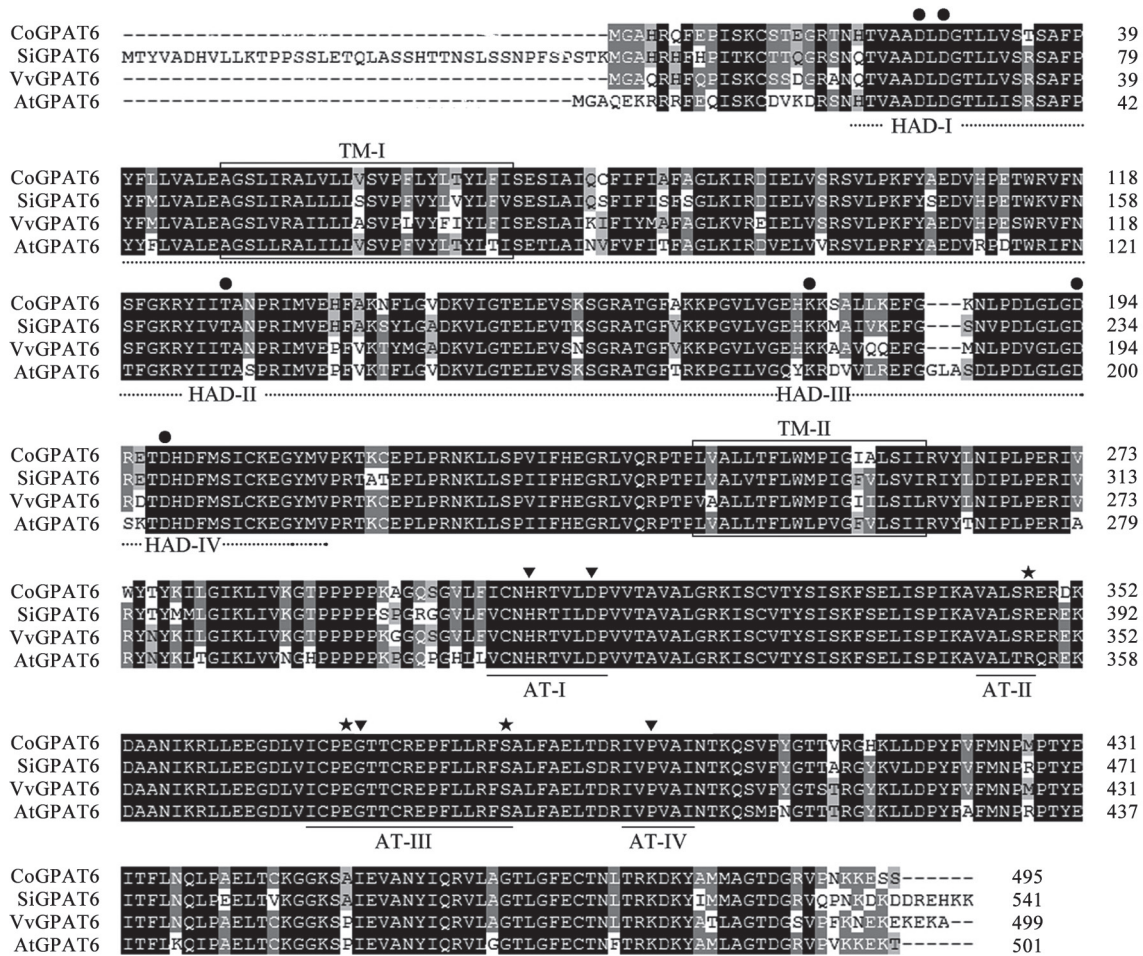
基于32个GPAT氨基酸序列的多序列比对, 用邻接法构建了基因系统树(图5)。可以看出, 32个GPAT基因可以明显地分为内质网类GPAT6和叶绿体类GPAT两个类群。油茶CoATS1和茶树CsGPAT聚为一起, 油茶与茶树同为山茶科植物, 反映了同源GPAT基因系统发生上的密切关系。除此外, 蔷薇科的白梨PbGPAT和梅的PmGPAT聚为一起, 大戟科的麻风树JcGPAT和蓖麻的RcGPAT聚为一起,

十字花科的拟南芥AtAST1和油菜的BnGPAT聚为一起。在GPAT6类群中, 油茶CoGPAT6则与油料作物芝麻的SiGPAT6聚为一起, 茄科的番茄SIGPAT6和马铃薯StGPAT6聚为一起, 十字花科的拟南芥AtGAPT6和油菜的BnGPAT6聚为一起。

#### 4 油茶GPAT基因的表达分析

用qRT-PCR检测了CoATS1和CoGPAT6在油茶不同组织以及不同种子发育时期的表达特征。结果表明, 2个基因在各个组织中均有表达, 但表达规律有所不同(图6和7)。CoATS1在叶片中的表达量最高, 是根中表达量的约30倍; 在种子发育过程中的表达量普遍低于叶片, 其在花后30周种子中表达量最高, 随着种子的逐步成熟, 表达量呈逐步递减趋势。CoGPAT6基因在花瓣中的表达量最高, 是根中表达量的190倍左右, 其在雄蕊、雌蕊和花瓣中的表达量也较高。CoGPAT6在种子中的表达量呈现出“下降-升高-下降”的规律, 和CoATS1一样也是花后30周种子中表达量最高, 是花后48周(表达量最低)的10倍。



图4 油茶*CoGPAT6*氨基酸序列及结构Fig.4 Amino acid sequence and structure of *CoGPAT6*

酰基转移酶结构域由下划线表示,催化作用的氨基酸残基以▼表示,结合位点氨基酸残基以★表示;类卤酸脱卤酶结构域以虚线表示,重要氨基酸残基以●表示;2个跨膜区域(TM-I和TM-II)以方框表示。

## 讨 论

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(张楠等2011)。因而*GPAT*基因家族在植物种子含油量以及抗逆等方面表现出多种重要的生理功能。目前在GenBank中可以发现拟南芥、水稻、茶树以及油料作物油菜、花生、油棕、麻风树、蓖麻、油桐等许多物种都鉴定和登录了*GPAT*基因,其中在拟南芥中共发现了10个*GPAT*成员,在其他物种中,则鲜有全部10个*GPAT*登录GenBank的信息及相关文献报道。

10个成员中,定位于叶绿体的仅有1个,拟南芥中命名为*ATSI*(Nishida等1993),GenBank中登录的其他物种的*ATSI*则多以“叶绿体*GPAT*”称谓。本研究在前期转录组数据基础上,通过RACE方法克隆了2个*GPAT*基因家族成员,进一步通过Blast同源性鉴定,根据拟南芥中的*GPAT*基因命名规则,分别命名为*CoATSI*和*CoGAPT6*,虽然在油茶中已发现和鉴定多个油脂合成相关基因,但本研究的2个*GPAT*基因为首次报道。

油茶*CoATSI*比*CoGPAT6*少45个氨基酸,两者都具有典型的酰基转移酶结构域,包含4个高度保守的基序,且具有催化活性和结合位点的组氨酸、天冬氨酸、甘氨酸、脯氨酸、精氨酸、丝氨酸等重要氨基酸残基(Mañas-Fernández等2010; Chi

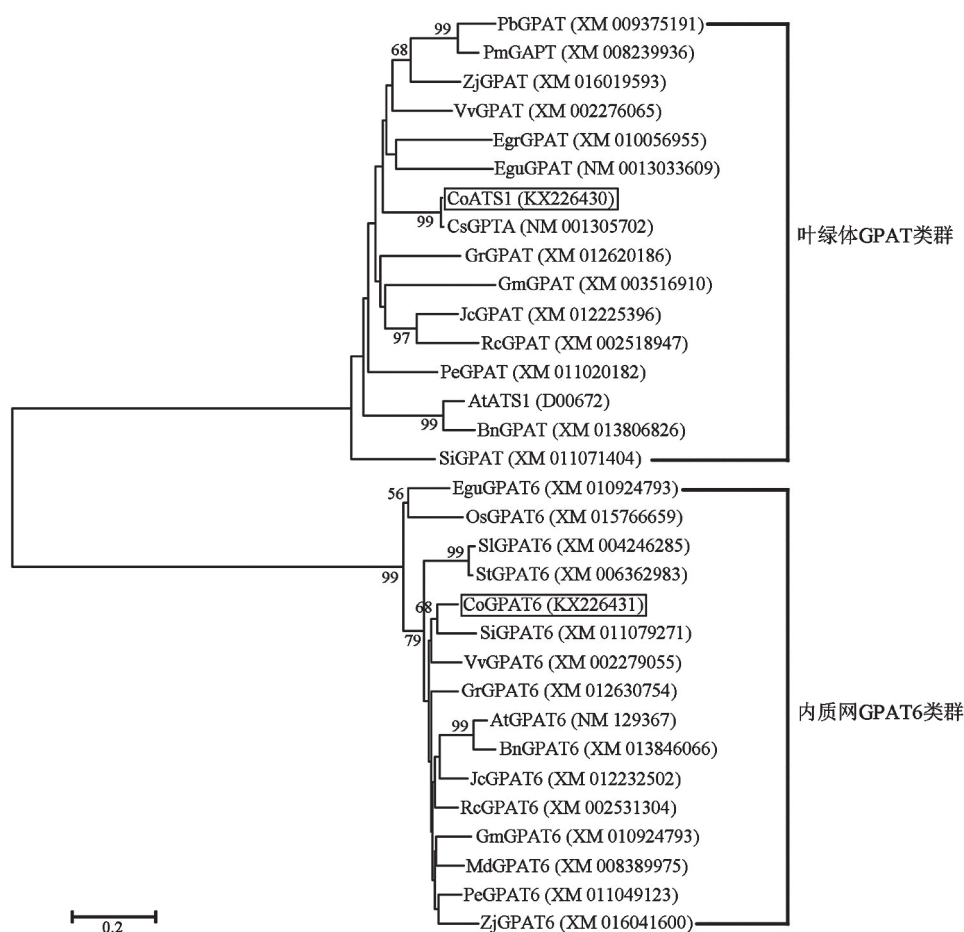


图5 不同物种GPAT同源基因的系统进化树分析

Fig.5 Phylogenetic analysis of GPAT homologous genes

括号内为该基因在GenBank的注册号, 本文克隆的2个油茶GPAT基因以方框表示。At: *Arabidopsis thaliana*, 拟南芥; Bn: *Brassica napus*, 油菜; Cs: *Camellia sinensis*, 茶树; Egr: *Eucalyptus grandis*, 桉树; Egu: *Elaeis guineensis*, 油棕; Gm: *Glycine max*, 大豆; Gr: *Gossypium raimondii*, 雷蒙德氏棉; Jc: *Jatropha curcas*, 麻风树; Md: *Malus domestica*, 苹果; Os: *Oryza sativa*, 水稻; Pe: *Populus euphratica*, 胡杨; Pm: *Prunus mume*, 梅; Pb: *Pyrus x bretschneideri*, 白梨; Rc: *Ricinus communis*, 蓖麻; Si: *Sesamum indicum*, 芝麻; Sl: *Solanum lycopersicum*, 番茄; St: *Solanum tuberosum*, 马铃薯; Tc: *Theobroma cacao*, 可可; Vv: *Vitis vinifera*, 葡萄; Zj: *Ziziphus jujube*, 枣。

等2015)。与CoATS1相比, 除了C-端的酰基转移酶结构域, CoGAPT6还具有类卤酸脱卤酶结构域和4个高度保守的基序, 推测其可能具有磷酸酶活性。蓝莓的GPAT酶的N-端也存在类卤酸脱卤酶结构域(Mañas-Fernández等2010)。拟南芥的AtGPAT4和AtGPAT6具有类卤酸脱卤酶结构域, 且AtGPAT4和AtGPAT6可以将酰基(acyl-基团)连接到G3P的sn-2位上, 并去掉磷酸基团, 形成sn-2单酰甘油(sn-2 MAG) (Yang等2010)。油茶CoATS1和CoGPAT6结构的不同, 反映出这两个基因的功能分化。多序列比对和系统进化分析发现, 叶绿体GPAT和内质网GPAT6都比较保守, 形成两个不同

的类群, 两类基因间的相似性则很低, 如油茶CoATS1与CoGPAT6的相似性仅为14.2%, 在系统树上, 油茶CoATS1与同科的茶树的叶绿体GPAT聚在一起, CoGPAT6则与芝麻的SiGPAT6聚为一起, 结合之前的亚细胞定位、蛋白结构、功能域等方面的不同, 进一步反映出ATS1和GPAT6应该存在不同的功能。

qRT-PCR分析显示2个基因的表达规律不同, 其中CoATS1在叶绿体丰富的叶片中表达量最高, 与甜椒(陈娜等2005)、番茄(隋娜2007)、向日葵(Payá-Milans等2015)等植物相同, 而与麻风树叶绿体的GPAT基因JcGPAT2表达特征不同(朱双等

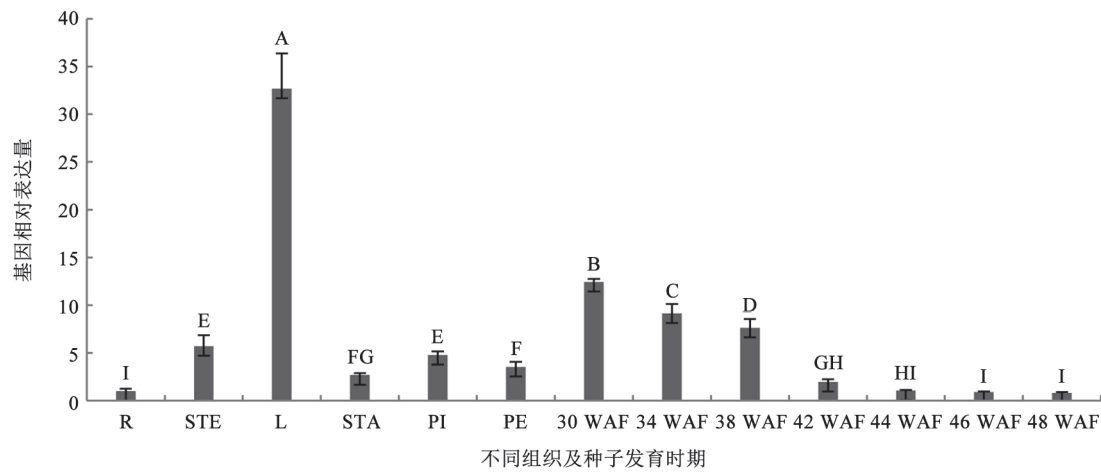


图6 油茶*CoATSI*基因在不同组织及不同种子发育时期的表达分析

Fig.6 Expression patterns of *CoATSI* in different tissues and different stages during seed development

R: 根; STE: 茎; L: 叶; STA: 雄蕊; PI: 雌蕊; PE: 花瓣; 30 WAF~48 WAF: 依次为花后30、34、38、42、44、46和48周的种子。不同大写字母表示显著性差异( $P < 0.01$ ), 图7同此。

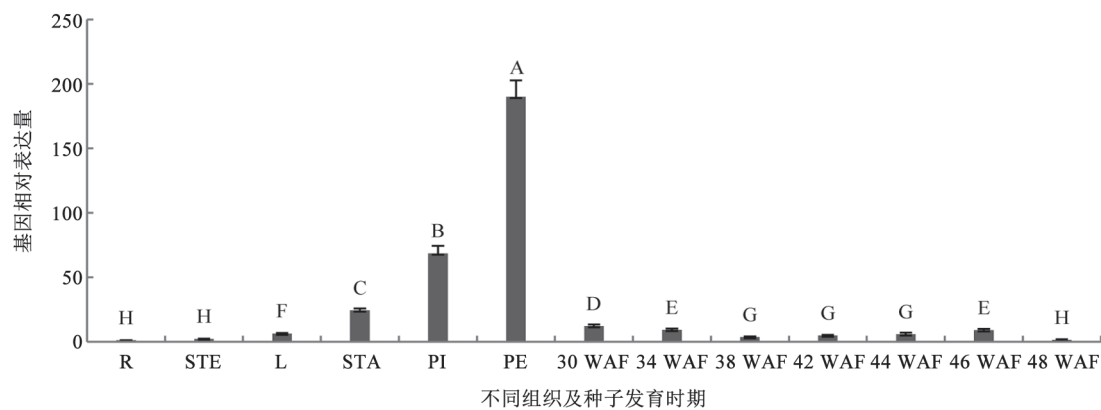


图7 油茶*CoGPAT6*基因在不同组织及不同种子发育时期的表达分析

Fig.7 Expression patterns of *CoGPAT6* in different tissues and different stages during seed development

2012), 表明虽同属叶绿体*GPAT*基因, 但油茶*CoATSI*与麻风树的*JcGPAT2*的功能或不尽相同。油茶*CoATSI*在种子不同发育时期也表达, 但其表达特征暗示着该基因可能与抗低温的关系更加密切。油茶*CoGPAT6*基因在花器官尤其是花瓣中的表达量远远高于根、茎、叶、种子等其他组织, 这一表达规律与油菜的*BnGPAT6*类似(刘聪等2014), 但不同于花生*AhGPAT6*的表达特性(Chi等2015)。研究表明, 拟南芥*AtGPAT6*在花中大量表达, 在花瓣和萼片几丁质的生物合成中其决定作用, 并与*AtGPAT1*共同影响拟南芥的结实率(Zheng等2003; Li等2012)。油茶*CoGAPT6*的表达与拟南

芥*AtGPAT6*一致, 表明*CoGPAT6*可能在花瓣几丁质的生物合成中起重要作用。油茶*CoATSI*和*CoGPAT6*在种子中的表达量都显著低于叶或花瓣, 表明这两个基因的主效作用可能在于膜脂而非种子储存油脂的合成。

油茶是我国南方重要木本食用油料树种, 提高油茶抗逆性及种子含油量对于提高茶油产量、缓解我国油料安全具有重要现实意义, 针对油茶油脂合成的关键基因, 对油茶品种进行定向改良潜力巨大。本研究首次在重要油料树种油茶中克隆了*ATSI*和*GPAT6*两个*GPAT*基因, 并开展了蛋白特征遗传、结构分析、系统进化分析和组织表达



检测, 不仅丰富了*GPAT*基因家族信息, 而且为进一步研究其在油脂合成、抗逆等方面的功能奠定了重要基础。

### 参考文献

- Chen HP, Tan XF, Xie YJ, Wu ZH, Zhang DQ, Zeng YL (2015a). Constructing and function of plant expression vector and RNA interference vector of a *FAD2* gene from *Camellia oleifera*. *Bull Bot Res*, 35 (3): 347–354 (in Chinese with English abstract) [陈鸿鹏, 谭晓风, 谢耀坚, 吴志华, 张党权, 曾艳玲(2015a). 油茶 *FAD2* 基因的植物表达载体和RNA干扰载体构建及其功能分析. *植物研究*, 35 (3): 347–354]
- Chen HP, Tan XF, Xie YJ, Zhang DQ, Zeng YL (2015b). Construction, identification and function analysis on vectors of *CoSAD* gene from *Camellia oleifera*. *J Plant Resour Environ*, 24 (2): 11–18 (in Chinese with English abstract) [陈鸿鹏, 谭晓风, 谢耀坚, 张党权, 曾艳玲(2015b). 油茶 *CoSAD* 基因载体的构建、鉴定及功能分析. *植物资源与环境学报*, 24 (2): 11–18]
- Chen N, Guo SJ, Yan K, Dong XC, Meng QW (2005). Cloning and expression analysis of glycerol-3-phosphate acyltransferase gene from sweet pepper. *Acta Horti Sin*, 32 (5): 823–827 (in Chinese with English abstract) [陈娜, 郭尚敬, 颜坤, 董新纯, 孟庆伟(2005). 甜椒甘油-3-磷酸酰基转移酶基因的克隆与表达分析. *园艺学报*, 32 (5): 823–827]
- Chen YZ, Xiao ZH, Peng SF, Yang XH, Li DX, Wang XN, Duan W (2006). Study of fruit growing specialties and its oil content in oil-tea camellia. *Forest Res*, 19 (1): 9–14 (in Chinese with English abstract) [陈永忠, 肖志红, 彭邵锋, 杨小胡, 李党训, 王湘南, 段玮(2006). 油茶果实生长特性和油脂含量变化的研究. *林业科学研究*, 19 (1): 9–14]
- Chi X, Yang Q, Pan L, Chen N, Chen M, Wang T, Wang M, Yang Z, Guan X, Yu S (2015). Isolation and expression analysis of glycerol-3-phosphate acyltransferase genes from peanuts (*Arachis hypogaea* L). *Grasas Aceites*, 66 (3): 1–17
- Chi XY, Pan LJ, Chen MN, Chen N, Yang Z, Wang T, Wang M, He YN, Yu SL (2013). Cloning and sequence analysis of glycerol-3-phosphate acyltransferase genes in peanut. *J Peanut Sci*, 42 (4): 14–24 (in Chinese with English abstract) [迟晓元, 潘丽娟, 陈明娜, 陈娜, 杨珍, 王通, 王冕, 和亚男, 禹山林(2013). 花生甘油-3-磷酸酰基转移酶基因的克隆与序列分析. *花生学报*, 42 (4): 14–24]
- Gidda SK, Shockey JM, Rothstein SJ, Dyer JM, Mullen RT (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 Bioch*, 47 (10): 867–879
- Li XC, Zhu J, Yang J, Zhang GR, Xing WF, Zhang S, Yang ZN (2012). Glycerol-3-phosphate acyltransferase 6 (*GPAT6*) is important for tapetum development in *Arabidopsis* and plays multiple roles in plant fertility. *Mol Plant*, 5 (1): 131–142
- Li Z, Tan XF, Yuan J, Lu K, Zhang L, Lin Q, Lü JB (2014). Tissue culture and highly efficient rooting of *Camellia oleifera* ‘Huashuo’. *Plant Physiol J*, 50 (11): 1721–1726 (in Chinese with English abstract) [李泽, 谭晓风, 袁军, 卢锬, 张琳, 林青, 吕佳斌(2014). 油茶良种‘华硕’的组织培养及高效生根. *植物生理学报*, 50 (11): 1721–1726]
- Liu C, Xiao DW, Hu XF, Wu KB, Guan CY, Xiong XH (2014). Cloning and expression analysis of two homologous genes coding *sn*-Glycerol-3-Phosphate acyltransferase 6 in *Brassica napus*. *Acta Agron Sin*, 40 (7): 1304–1310 (in Chinese with English abstract) [刘聪, 肖旦望, 胡学芳, 邬克彬, 官春云, 熊兴华(2014). 甘蓝型油菜2个*GPAT6*同源基因的克隆与表达分析. *作物学报*, 40 (7): 1304–1310]
- Liu K, Tan XF, Long HX, Chen HP, Zeng YL, Zhang L (2012). Cloning of full-length cDNAs and sequence analysis of *DGAT1* gene from *Camellia oleifera*. *J Cent S Forest Univ*, 32 (4): 148–152 (in Chinese with English abstract) [刘凯, 谭晓风, 龙洪旭, 陈鸿鹏, 曾艳玲, 张琳(2012). 油茶*DGAT1*基因的全长cDNA序列克隆及分析. *中南林业科技大学学报*, 32 (4): 148–152]
- Livak KJ, Schmittgen TD (2001). Analysis of relative gene expression data using realtime quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  method. *Methods*, 25 (4): 402–408
- Manaf AM, Harwood JL (2000). Purification and characterisation of acyl-CoA: glycerol 3-phosphate acyltransferase from oil palm (*Elaeis guineensis*) tissues. *Planta*, 210 (2): 318–328
- Mañas-Fernández A, Li-Beisson Y, Alonso DL, García-Maroto F (2010). Cloning and molecular characterization of a glycerol-3-phosphate *O*-acyltransferase (*GPAT*) gene from *Echium* (Boraginaceae) involved in the biosynthesis of cutin polyesters. *Planta*, 232: 987–997
- Nishida I, Tasaka Y, Shiraiishi H, Murata N (1993). The gene and the RNA for the precursor to the plastid-located glycerol-3-phosphate acyltransferase of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol Biol*, 21: 267–277
- Payá-Milans M, Venegas-Calderón M, Salas JJ, Garcés R, Martínez-Force E (2015). Cloning, heterologous expression and biochemical characterization of plastidial *sn*-glycerol-3-phosphate acyltransferase from *Helianthus annuus*. *Phytochemistry*, 111: 27–36
- Song ZB, Liu M, Jia BG, Tian L, Zeng YL, Zhou JQ, Tan XF, Zhang L (2014). RNA extraction and primary screening of reference genes in *Camellia oleifera*. *Nonwood Forest Res*, 32 (2): 93–98 (in Chinese with English abstract) [宋志波, 刘敏, 贾宝光, 田雷, 曾艳玲, 周俊琴, 谭晓风, 张琳(2014). 油茶总RNA的提取与内参基因的初选. *经济林研究*, 32 (2): 93–98]
- Sui N (2007). Functional analysis of the chloroplast *LeGPAT* in tomato under temperature stress (PhD thesis). Tai’an, Shandong: Shandong Agricultural University (in Chinese with English abstract) [隋娜(2007). 温度胁迫下番茄叶绿体甘油-3-磷酸酰基转移酶基因的功能分析(博士论文). 山东泰安: 山东农业大学]
- 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 (5): 1097–1108
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S (2013). MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol Biol Evol*, 30 (12): 2725–2729
- Tan XF, Chen HP, Zhang DQ, Zeng YL, Li W, Jiang Y, Xie LS, Hu XY, Hu FM (2008). Cloning of full-length cDNA of *FAD2* gene

- from *Camellia oleifera*. *Sci Silvae Sin*, 44 (3): 70–75 (in Chinese with English abstract) [谭晓风, 陈鸿鹏, 张党权, 曾艳玲, 李魏, 蒋瑶, 谢禄山, 胡孝义, 胡芳名(2008). 油茶*FAD2*基因全长cDNA的克隆和序列分析. *林业科学*, 44 (3): 70–75]
- Tan XF, Wang JY, Long HX, Zeng YL, Mei FF, Liu K, Chen HP (2014). Cloning and expression analysis of an acyl-CoA thioesterase gene from *Camellia oleifera*. *Plant Physiol J*, 50 (12): 1845–1856 (in Chinese with English abstract) [谭晓风, 王建勇, 龙洪旭, 曾艳玲, 梅芳芳, 刘凯, 陈鸿鹏(2014). 油茶脂酰辅酶A硫酯酶基因的克隆与表达分析. *植物生理学报*, 50 (12): 1845–1856]
- Wang JY, Tan XF, Mei FF, Zeng YL, Long HX, Liu K, Chen HP (2015). Cloning and expression analysis of an Acyl-CoA dehydrogenase gene from *Camellia oleifera*. *J Plant Genet Res*, 16 (5): 1080–1088 (in Chinese with English abstract) [王建勇, 谭晓风, 梅芳芳, 曾艳玲, 龙洪旭, 刘凯, 陈鸿鹏(2015). 油茶脂酰辅酶A脱氢酶基因的克隆与表达分析. *植物遗传资源学报*, 16 (5): 1080–1088]
- Wang JY, Tan XF, Zeng YL, Long HX, Chen HP, Liu K (2014). Cloning and expression analysis of a 3-hydroxyacyl-CoA dehydratase gene from *Camellia oleifera*. *Plant Physiol J*, 50 (10): 1574–1584 (in Chinese with English abstract) [王建勇, 谭晓风, 曾艳玲, 龙洪旭, 陈鸿鹏, 刘凯(2014). 油茶3羟酰CoA脱水酶基因的克隆与表达分析. *植物生理学报*, 50 (10): 1574–1584]
- Xu C, Cornish AJ, Froehlich JE, Benning C (2006). Phosphatidylglycerol biosynthesis in chloroplasts of *Arabidopsis* mutants deficient in acyl-ACP glycerol-3-phosphate acyltransferase. *Plant J*, 47: 296–309
- Yang WL, Pollard M, Li-Beisson YH, Beisson F, Feig M, Ohlrogge JB (2010). A distinct type of glycerol-3-phosphate acyltransferase with *sn-2* preference and phosphatase activity producing 2-monoacylglycerol. *Proc Natl Acad Sci USA*, 107 (26): 12040–12045
- Zhang N, Xu RH, Liu XZ, Liu AZ (2011). Cloning and sequence analysis of *sn*-glycerol-3-phosphate acyltransferase gene (*JcGPAT*) from *Jatropha curcas* L. *Plant Physiol J*, 47 (2): 181–188 (in Chinese with English abstract) [张楠, 徐荣华, 刘小焯, 刘爱忠(2011). 小桐子甘油-3-磷酸酰基转移酶(*JcGPAT*) cDNA的克隆与序列分析. *植物生理学报*, 47 (2): 181–188]
- 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 (8): 1872–1887
- Zhu S, Zeng L, Wu ZP, Chen YP, Jiang WH, Wu GJ, Li MR (2012). Cloning and sequence analysis of the cDNA of plastid-located glycerol-3-phosphate acyltransferase (*JcGPAT2*) from *Jatropha curcas* L. *Guangdong Agr Sci*, 39 (11): 1–5 (in Chinese with English abstract) [朱双, 曾玲, 吴平治, 陈雅平, 姜华武, 吴国江, 李美茹(2012). 麻疯树质体甘油-3-磷酸酰基转移酶(*JcGPAT2*) cDNA的克隆及序列分析. *广东农业科学*, 39 (11): 1–5]

## Cloning and expression analysis of two glycerol-3-phosphate acyltransferase (GPAT) genes in oil-tea tree (*Camellia oleifera*)

WEI Qi-Qi, ZHAO Guang, HE Xiao, LONG Hong-Xu, LI Ze, TAN Xiao-Feng, ZHANG Lin\*

Key Laboratory of Cultivation and Protection for Non-Wood Forest Trees, Ministry of Education, Key Lab of Non-Wood Forest Products of State Forestry Administration, Cooperative Innovation Center of Cultivation and Utilization for Non-Wood Forest Trees of Hunan Province, Central South University of Forestry and Technology, Changsha 410004, China

**Abstract:** As a functionally important enzyme in the Kennedy pathway involved in triacylglycerol (TAG) accumulation, glycerol-3-phosphate acyltransferase (GPAT) plays a key role in lipid biosynthesis and tolerance to abiotic stress in plants. Based on *Camellia oleifera* transcriptome data obtained before, we cloned two full-length cDNA of GPAT, i.e. *CoATS1* and *CoGPAT6* via RACE method. The coding sequences of the two cDNA are 1 353 and 1 488 bp in length, encoding 450 and 495 amino acids, respectively. Prediction of protein structure showed that both *CoATS1* and *CoGPAT6* display an acyltransferase domain (AT domain), and *CoGPAT6* has a haloacid dehalogenase-like hydrolase (HAD-like) domain as well. Protein multiple sequence alignment and phylogenetic analysis showed that chloroplast GPATs and endoplasmic reticulum-GPATs are divided into two different groups. On the phylogenetic tree, *CoATS1* clustered with CsGAPT of *Camellia sinensis*, and *CoGPAT6* clustered with SiGPAT6 of *Sesamum indicum*. qRT-PCR analysis indicated that both *CoATS1* and *CoGPAT6* expressed in all of the tissues used in this study. The expression level of *CoATS1* in leaf was significantly higher than that in the other tissues and it gradually decreased in the developing seeds. *CoGPAT6* had a highest expression amount in petal and exhibited a pattern of “decrease first, then increase and decrease finally”. This study provides an important basis for uncovering the detailed role of *CoATS1* and *CoGPAT6* in lipid biosynthesis in seeds of *C. oleifera*.

**Key words:** *Camellia oleifera*; glycerol-3-phosphate acyltransferase; protein structure; phylogenetic tree; expression analysis

---

Received 2016-05-06 Accepted 2016-06-16

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No. 31470684).

\*Corresponding author (E-mail: triwoodtim918@126.com).