

## 油茶*CoPDAT*基因的克隆与表达分析

赵广, 宋志波, 刘美兰, 龙洪旭, 李泽, 张琳\*

中南林业科技大学, 经济林培育与保护教育部重点实验室, 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:** 磷脂:二酰甘油酰基转移酶(PDAT)能够催化磷脂酰胆碱(PC) *sn*-2位的酰基转移至二酰甘油(DAG)上, 形成三酰甘油(TAG)和溶血磷脂酰胆碱, 这是另外一条不同于Kennedy途径的三酰甘油合成方式, 故明确油茶(*Camellia oleifera*) PDAT基因的功能对阐明油茶种子油脂合成机制具有重要意义。本研究通过cDNA末端快速扩增(RACE)技术克隆油茶*CoPDAT*基因的全长cDNA序列, 该序列长2 773 bp, 开放阅读框为2 022 bp, 编码673个氨基酸。亚细胞定位分析确定*CoPDAT*基因所编码蛋白质定位于内质网上。实时荧光定量PCR分析结果表明, *CoPDAT*在油茶不同组织/器官中均有表达, 在种子中不同发育时期的相对表达量呈“上升-下降-上升-下降-上升”的表达特征, 在花后42周表达量最高。*CoPDAT*基因与油茶种子油脂含量的灰色关联度值为0.8356, 表明该基因与油茶种子油脂的合成积累关系密切。本研究为阐明*CoPDAT*基因在油茶油脂合成过程中的功能以及为油茶的分子遗传改良提供参考。

**关键词:** 基因克隆; 生物信息学分析; 亚细胞定位; 表达模式; 灰色关联度

在植物种子中, 三酰甘油(triacylglycerol, TAG)是油脂的主要储存形式。TAG的生物合成发生于内质网(Chapman和Ohlrogge 2012), 可以通过两条途径实现, 第一条途径是Kennedy途径(Kennedy 1961), 即在甘油-3-磷酸酰基转移酶(glycerol-3-phosphate acyltransferase, GPAT)、溶血磷脂酰基转移酶(lysophosphatidic acid acyltransferase, LPAAT)的催化下, 将酰基辅酶A (acyl-CoA)上的脂肪酸转移到甘油-3-磷酸的*sn*-1和*sn*-2位置, 然后在磷脂酸磷酸酶(phosphatidate phosphatase, PAP)的催化下脱去磷酸基团, 生成二酰甘油(diacylglycerol, DAG), 最后在二酰甘油酰基转移酶(diacylglycerol acyltransferase, DGAT)的催化下, 将酰基辅酶A中的脂肪酸转移到*sn*-3位置, 生成TAG; 第二条途径不同于Kennedy途径, 在磷脂:二酰甘油酰基转移酶(phospholipid:diacylglycerol acyltransferase, PDAT)催化下, 磷脂酰胆碱(phosphatidylcholine, PC) *sn*-2位的酰基能够转移到DAG上, 形成TAG和溶血磷脂酰胆碱(Banaś等2000; Dahlqvist等2000; Oelkers等2000; Ståhl等2004)。PDAT基因最早在酵母中发现(Oelkers等2000)。拟南芥中有两个PDAT基因, 即PDAT1和PDAT2 (Ståhl等2004), 其中PDAT1和DGAT1在种子和花粉发育中的功能具有冗余性(Zhang等2009)。过量表达PDAT1基因对拟南芥种子油脂与脂肪酸组成没有影响(Ståhl等2004), 但可以提高拟南芥叶片中脂肪酸合成速率(Fan等2013)。

另有研究表明, PDAT具有不同的底物偏好性, 譬如, 亚麻(*Linum usitatissimum*) PDAT基因对亚麻酰基链有底物偏好性(Pan等2013), 在酵母及拟南芥中过量表达亚麻PDAT基因, 能够显著提高亚麻酸的含量; 蓖麻(*Ricinus communis*) PDAT1-2对磷脂上的蓖麻酰基链有底物偏好性, 其表达能够显著提高TAG中羟基脂肪酸的积累(Kim等2011)。

油茶(*Camellia oleifera*)是我国南方重要的木本食用油料树种, 茶油富含油酸等不饱和脂肪酸, 营养价值非常高(魏琦琦等2016)。研究油茶油脂合成代谢途径及相关基因功能, 对提高油茶种子含油率、茶油产量及改善油脂品质具有重要的理论意义和实际应用价值。近年来, 研究者分离克隆了SAD (张党权等2008)、FAD2 (谭晓风等2008)、HCD (王建勇等2014)、ACAD (王建勇等2015)、MCAT (王建勇等2015)、ACOT (王建勇等2015)、DGAT1 (刘凯等2012)、GPAT (魏琦琦等2016)等油茶油脂合成代谢相关重要基因。然而, 作为油脂合成另一途径的关键基因PDAT, 目前尚未有相关报道。鉴于此, 本研究分离克隆了油茶的PDAT基因, 研究了其亚细胞定位及表达模式, 以及与油脂积累的关联, 旨在阐明其在油茶油脂积累过程中的功能, 为油茶的分子遗传改良提供理论参考。

收稿 2017-04-26 修定 2017-08-10

资助 国家自然科学基金(31470684)。

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

## 材料与amp;方法

### 1 植物材料

试验材料为栽植于湖南省长沙市望城区中南林业科技大学油茶试验基地的八年生油茶(*Camellia oleifera* Abel.)国审良种‘华硕’(编号: 国S-SC-CO-011-2009)。于四月份采集幼根、幼嫩茎段(距茎尖1~4 cm处未木质化新梢)、嫩叶,于11月份采集叶芽、花瓣、雄蕊、子房、花柱,并于花后27、31、37、42、44、46、48周采集发育中种子,取样后迅速放于液氮中保存。采集的以上7个时期的种子用于油脂提取,去除种皮后于烘箱中烘干至恒重。

### 2 RNA提取

总RNA提取使用PureLink™ RNA Mini试剂盒(Life Technologies, 美国),按说明书进行操作。

### 3 油茶PDAT基因的cDNA克隆

使用RNase-free DNase I去除总RNA中的DNA,采用RevertAid First Strand试剂盒(Thermo Scientific, 美国)进行cDNA第一链的合成。接着,根据已报道其他物种PDAT基因同源序列设计简并引物CoPDATF1和CoPDATR1(表1),以cDNA为模板,扩增油茶PDAT基因的部分序列(PCR反应条件为: 94°C预变性5 min; 94°C解链40 s, 55°C退火30 s, 72°C延伸1 min, 进行35个循环; 最后72°C失活7 min)。对扩增产物进行回收和测序,在Blast分析确认为PDAT序列后,再分别使用Invitrogen公司的cDNA

5'末端快速扩增系统2.0试剂盒和cDNA 3'末端快速扩增系统2.0试剂盒扩增目的基因的两个末端cDNA序列,用于5'RACE (rapid amplification of cDNA ends, cDNA末端快速扩增技术)和3'RACE的引物见表1。PCR产物分别经回收、纯化、测序、验证后,组装得到油茶PDAT基因的全长cDNA序列,进一步设计引物PDAT-CDS-F和PDAT-CDS-R(表1),扩增PDAT基因的全部编码序列(PCR反应条件为: 94°C预变性5 min; 94°C解链40 s, 55°C退火30 s, 72°C延伸90 s, 进行35个循环; 最后72°C失活7 min)。

### 4 亚细胞定位

使用试剂盒Gateway® BP Clonase® Enzyme Mix和Gateway® LR Clonase® Enzyme Mix (ThermoFisher, 美国),在含有黄色荧光蛋白(yellow fluorescent protein, YFP)的表达载体(nYFP-CD3 686)上插入CoPDAT基因,并使用电击法将重组载体转化至农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens* Smith et Towns.) Gv3101感受态细胞中。采用农杆菌侵染法(刘美兰2015)将含有内质网Marker YFP-HDEL的农杆菌(基于在线软件SubLoc和WoLFPSORT分析预测的结果)和含有CoPDAT基因载体的农杆菌分别注射至野生型红花烟草(*Nicotiana × sanderae* W. Watson)叶片下表皮细胞中,暗培养10 h后室温培养3 d,在LSM510激光共聚焦显微镜下观察CoPDAT基因所编码蛋白与内质网Marker YFP-HDEL的共定位情况。

表1 引物信息

Table 1 Primers used in this study

引物名称	引物序列(5'→3')	用途
CoPDAT-F	ATTGGATATGARGAGAAAAMHATGT	部分序列扩增
CoPDAT-R	GCAATYCCATARGARAAATGAGC	
5'RACE-GSP1	ACAGAACACCCATTGA	5'末端扩增
5'RACE-GSP2	CACCTTTCTCCCACCACTG	
5'RACE-GSP3	CTTTGGTCACGTACCTCAGT	
3'RACE-GSP1	TGGTCACCTGAAGAAGGGTACAAATGTT	3'末端扩增
3'RACE-GSP2	AGGCACAGCCAACTGAAATTGAGAGG	
3'RACE-GSP3	CCCCGAAGATGATGAAGCGTGCCAGTG	
PDAT-CDS-F	TTTATTAATTCCGGAGTGA	编码框扩增
PDAT-CDS-R	AAGGACAACATACACTAACATAT	
EF1 $\alpha$ -F	GCAAAGAAGGGTGCCAAGTGA	实时荧光定量PCR分析
EF1 $\alpha$ -R	CCAAACAACCGACCTACGA	
CoPDAT-DL-F	TGTATGGACCGAGTACCATG	
CoPDAT-DL-R	GATCCAGTATTGATCCAGCTGTG	

## 5 实时荧光定量PCR

选择油茶管家基因*EF1 $\alpha$* 作为内参基因(宋志波等2014), 设计内参基因的荧光定量引物为EF1 $\alpha$ -F和EF1 $\alpha$ -R (表1), *CoPDAT*基因的荧光定量引物为CoPDAT-DL-F和CoPDAT-DL-R (表1)。实时荧光定量PCR (real-time quantitative PCR, qPCR)使用CFX96TM Real-time PCR反应系统(BIO-RAD, 美国), 反应试剂使用SYBR *Premix Ex Taq*<sup>TM</sup> (TaKaRa, Japan)。进行qPCR前, 对扩增片段进行回收、测序验证序列真伪。qPCR总反应体系为25  $\mu$ L, 包括12.5  $\mu$ L的2 $\times$ SYBR *Premix Ex Taq*<sup>TM</sup> (Tli RNaseH Plus, TaKaRa, 日本)、9.5  $\mu$ L去RNA酶水、各0.5  $\mu$ L的引物 (10  $\mu$ mol $\cdot$ L<sup>-1</sup>)、2  $\mu$ L的cDNA模板。PCR反应条件为: 预变性30 s; 94 $^{\circ}$ C解链5 s, 60 $^{\circ}$ C退火30 s, 72 $^{\circ}$ C延伸30 s, 进行40个循环。各反应重复3次。qPCR数据的分析采用2<sup>- $\Delta\Delta$ C<sub>t</sub></sup>法(Livak等2001)。

## 6 油茶种仁油脂提取

种仁油脂提取采用索氏抽提法, 具体步骤及含油率计算参考江南等(2017)。

## 7 数据分析

DNA和蛋白质序列分别用NCBI服务器(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)、GenDoc和Vector NTI 10.3.0等软件分析。蛋白质的理化性质预测分析、信号肽预测、跨膜结构域预测、磷酸化位点预测分别使用在线工具ProtParam (<http://web.expasy.org/protparam/>)、SignalP 4.1 ([http://www.cbs.dtu.dk/](http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/)

[services/SignalP/](http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/))、TMPred ([http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED\\_form.html](http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED_form.html))、NetPhos (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>)获得。蛋白质的二级结构预测使用在线工具SOPMA ([http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa\\_automat.pl?page=NPSA/npsa\\_sopma.html](http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=NPSA/npsa_sopma.html))和PredictProtein (<https://www.predictprotein.org/>)进行。预测亚细胞定位使用SubLoc (<http://www.bioinfo.tsinghua.edu.cn/SubLoc/>)和WoLF PSORT (<http://wolfsort.seq.cbrc.jp>)。使用MEGA 5.1进行蛋白质多序列比对和系统进化树的构建。

采用SPSS软件(20.0)的邓肯多量程试验程序进行数据显著性分析。采用灰色关联度法分析基因表达量与油脂含油率间的关联程度, 即通过对统计序列几何关系的比较来分清系统中多因素的关系的紧密程度(曹明霞2007)。

## 实验结果

### 1 油茶*CoPDAT*克隆

使用简并引物CoPDATF1和CoPDATR1, 以油茶cDNA为模板, 从中扩增中约800 bp的特异条带(图1-A), 测序后获得875 bp的cDNA序列, 经Blast分析, 与已报道的*PDAT*同源基因具有较高的相似性, 确定该序列即为油茶*PDAT*基因的部分cDNA序列。在此序列基础上, 通过5'RACE扩增获得了1 156 bp的序列(图1-B), 通过3'RACE扩增获得了

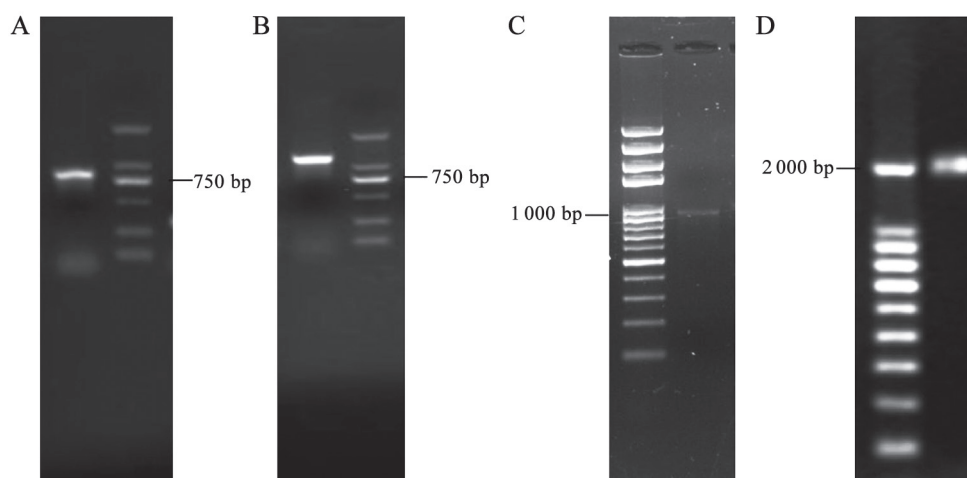


图1 油茶*PDAT*基因的克隆

Fig.1 Cloning of *PDAT* gene from *C. oleifera*

A: 保守区域的扩增; B: 5'RACE扩增; C: 3'RACE扩增; D: 全部编码序列的扩增。



1 054 bp的序列(图1-C), 组装拼接后获得2 773 bp的序列, 进一步对该序列的开放阅读框(open reading frame, ORF)进行验证, 得到2 022 bp的全部序列(图1-D)。油茶*PDAT*基因的cDNA序列包括5'非转录区473 bp, ORF 2 022 bp, 3'非转录区278 bp, 编码673个氨基酸, 命名为*CoPDAT*, 该基因GenBank登记号为KP329198。

## 2 生物信息学分析

预测油茶*CoPDAT*蛋白的分子质量为74.7 kDa; 理论等电点为6.62; 分子式为 $C_{3348}H_{5165}N_{903}O_{970}S_{35}$ ; 总平均亲水性为-0.295, 为亲水性蛋白; 不稳定指数计算为40.60, 属于不稳定蛋白; 脂肪系数为76.67。油茶*CoPDAT*的二级结构中含有251个 $\alpha$ 螺旋(占37.29%)、123个延伸链(占18.28%)、59个 $\beta$ 折叠(占8.77%)和240个无规则卷曲(占35.66%)。信号肽预测结果显示, 油茶*CoPDAT*不含信号肽。跨膜结构域预测结果表明该蛋白有4个跨膜区, 分别为第54到72位, 跨膜方向由内到外; 第184到203位, 跨膜方向由外到内; 第248到267位, 跨膜方向由内到外; 第288到307位, 跨膜方向由外到内。将油茶*CoPDAT*与其他物种*PDAT*进行多序列比对分析, 结果显示油茶与麻风树(*Jatropha curcas*)、可可(*Theobroma cacao*)、野大豆(*Glycine soja*)的相似性分别为80.09%、79.73%、78.96%, *PDAT*间存在较长的高度同源区域, 并具有保守的脂质结构域(lipid domain, LID), 其主要差异存在于N端(图2)。此外, 油茶*CoPDAT*含有5个丝氨酸磷酸化位点、3个苏氨酸磷酸化位点和4个酪氨酸磷酸化位点(图2)。

基于多序列比对使用MEGA 5.1软件采用邻接法构建进化树(图3)。结果表明, 油茶的*CoPDAT*与大豆(*Glycine max*)、菜豆(*Phaseolus vulgaris*)、鹰嘴豆(*Cicer arietinum*)、巨桉(*Eucalyptus grandis*)、川桑(*Morus notabilis*)、野草莓(*Fragaria vesca*)、苹果(*Malus pumila*)、麻风树、葡萄(*Vitis vinifera*)、荷花(*Nelumbo nucifera*)、甜菜(*Beta vulgaris*)、绒毛状烟草(*Nicotiana tomentosiformis*)、番茄(*Solanum lycopersicum*)、马铃薯(*Solanum tuberosum*)等的*PDAT*同属一个进化类群里, 其中与烟草、番茄、马铃薯的亲缘关系最接近。

## 3 油茶*CoPDAT*的亚细胞定位

通过生物信息学软件SubLoc和WoLF PSORT

预测油茶*CoPDAT*蛋白定位于内质网。利用注射器将油茶*CoPDAT*的重组表达载体注射至野生型红花烟草叶片中, 培养3 d后通过激光共聚焦显微镜观察YFP的信号。共定位结果表明, 油茶*CoPDAT*融合蛋白与内质网标记YFP-HDEL在烟草叶片中的YFP信号完全一致(图4), 通过该结果可初步确定*CoPDAT*基因编码的蛋白质在烟草内质网结构中成功表达。

## 4 油茶*CoPDAT*基因表达模式分析

### 4.1 *CoPDAT*基因在不同器官中的表达模式

油茶*CoPDAT*基因在根、茎、叶芽、叶片、花瓣、雄蕊、花柱、子房等器官中均有表达, 其中在茎段和叶芽中的表达量相对较高, 在根和子房中的表达量相对较低。在茎段中的表达量是子房中表达量的11.24倍, 差异显著(图5)。

### 4.2 *CoPDAT*基因在油茶种子不同发育时期的表达模式

油茶*CoPDAT*基因在种仁不同发育时期的相对表达量呈“上升-下降-上升-下降-上升”表达特征(图6)。在花后42周表达量最高, 是花后44周的3.39倍, 是花后27周的117.38倍, 差异显著。

### 5 *CoPDAT*基因与油茶油脂积累的关联分析

通过索氏抽提法, 从花后37周开始提取到油脂, 截止花后48周果实完全成熟, 含油率分别为8.08%、16.94%、39.03%、43.57%和50.61%, 整体呈“S型”上升趋势, 先缓慢上升, 然后进入一个快速上升时期, 花后44周后上升趋势又趋于平缓(图7)。通过灰色关联度软件计算, 结合对应时期的*CoPDAT*基因表达量值, 花后37周后, *CoPDAT*基因表达量与油脂含量间存在较高的灰色关联度值, 为0.8356, 表明*CoPDAT*基因与油茶种子油脂的积累密切相关。

## 讨 论

植物种子中, 油脂是以TAG的形式储存, 而TAG的合成迄今发现有两条途径, 其一为Kennedy途径, 其二为*PDAT*介导的途径, 即*PDAT*催化磷脂酰胆碱sn-2位的酰基转移到DAG上, 形成TAG和溶血磷脂酰胆碱。研究油脂的合成途径对于提高种子含油量具有重要意义。相对于Kennedy途径, 对于*PDAT*介导的油脂合成途径研究较少, 但有报道将外源*PDAT*转入酵母突变体H1246a, 会恢复酵母

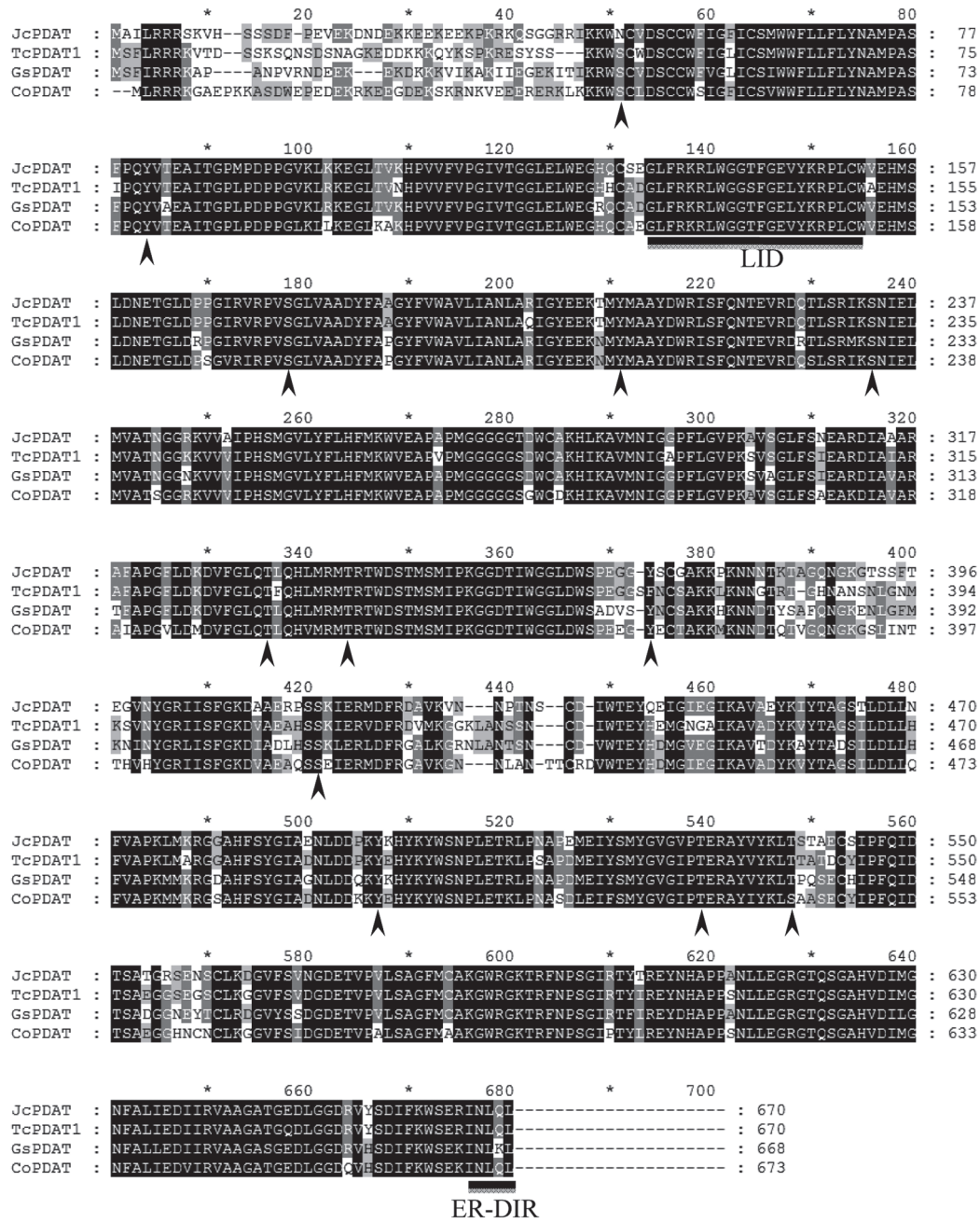


图2 CoPDAT与同源PDAT的氨基酸序列比对

Fig.2 Comparison of deduced amino acid sequences of CoPDAT with PDATs from other species

Jc: 麻风树; Tc: 可可; Gs: 野大豆; Co: 油茶。黑底部分为高度同源区域, 向上箭头为磷酸化位点, LID为保守脂质结构域, ER-DIR为内质网定位信号。

突变体合成TAG的能力(徐荣华等2013; 谭太龙等2016), 可见PDAT对于TAG的合成发挥着不可或缺的作用。为明晰油茶中PDAT介导的油脂合成途径, 本研究以油茶良种‘华硕’为实验材料, 通过RACE方法获得了油茶PDAT基因的全长cDNA序

列, 将其命名为CoPDAT。对CoPDAT蛋白的理化性质进行预测, 其分子质量为74.7 kPa, 理论等电点为6.62, 分子式为C<sub>3348</sub>H<sub>5165</sub>N<sub>903</sub>O<sub>970</sub>S<sub>35</sub>, 总平均亲水性为-0.295, 不稳定指数为40.60, 这些预测结果符合PDAT基因的特征。在油茶中, 目前已分离克隆

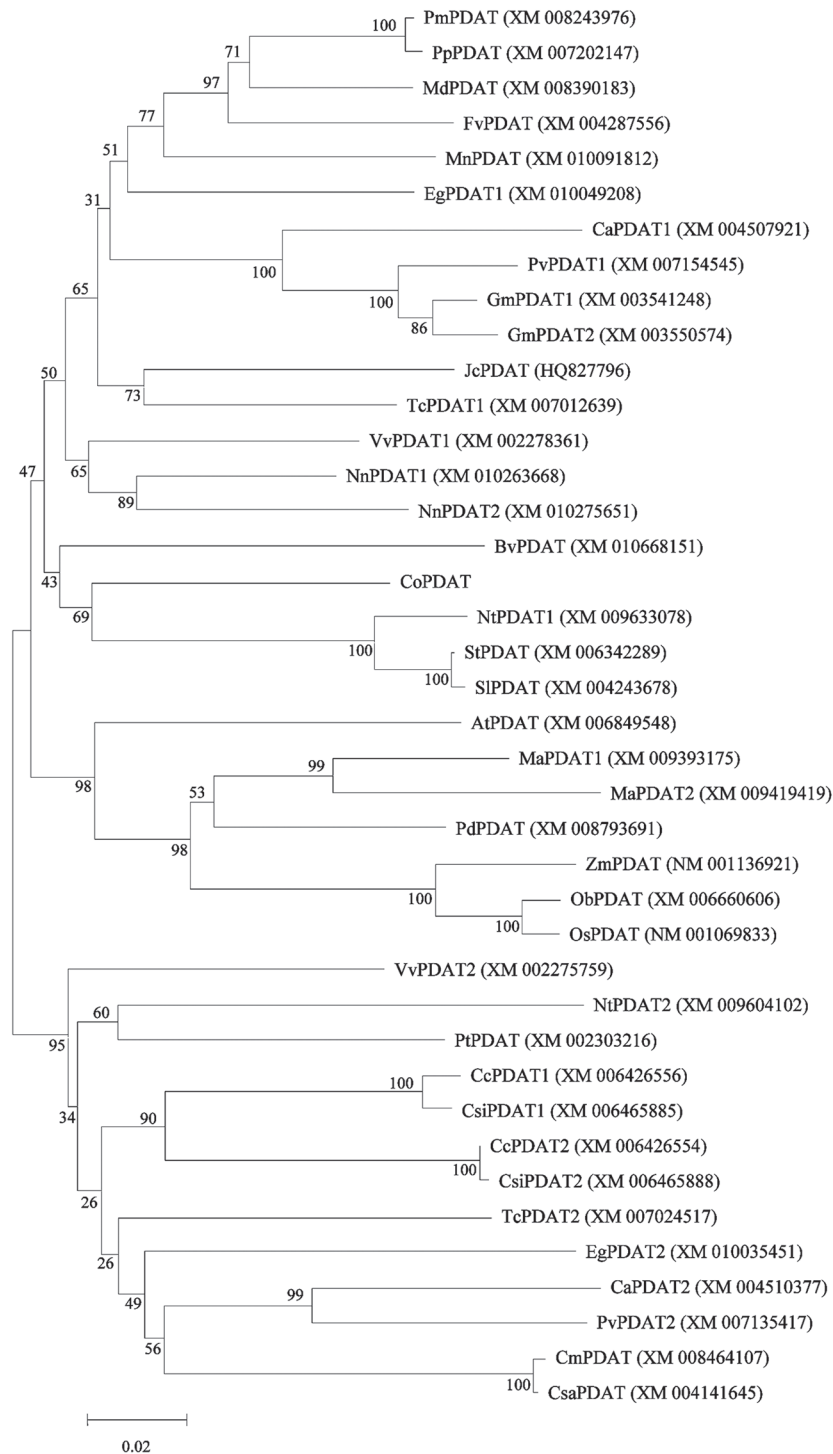


图3 不同物种PDAT基因的系统进化树分析

Fig.3 Phylogenetic analysis of plant PDAT homologous genes

标尺: 进化距离。At: *Amborella trichopoda*, 无油樟; Bv: 甜菜; Ca: 鹰嘴豆; Cc: *Citrus clementina*, 克莱门柚; Csi: *Citrus sinensis*, 甜橙; Cm: *Cucumis melo*, 西瓜; Csa: *Cucumis sativus*, 黄瓜; Eg: 巨桉; Fv: 野草莓; Gm: 大豆; Jc: 麻风树; Md: 苹果; Mn: 川桑; Ma: *Musa acuminata*, 小果野芭蕉; Nn: 荷花; Ns: *Nicotiana sylvestris*, 美花烟草; Nt: 绒毛状烟草; Ob: *Oryza brachyantha*, 短花药野生稻; Os: *Oryza sativa*, 水稻; Pv: 菜豆; Pd: *Phoenix dactylifera*, 海枣; Pt: *Populus trichocarpa*, 毛果杨; Pm: *Prunus mume*, 梅; Pp: *Prunus persica*, 碧桃; Sl: 番茄; St: 马铃薯; Tc: 可可; Vv: 葡萄; Zm: *Zea mays*, 玉米。



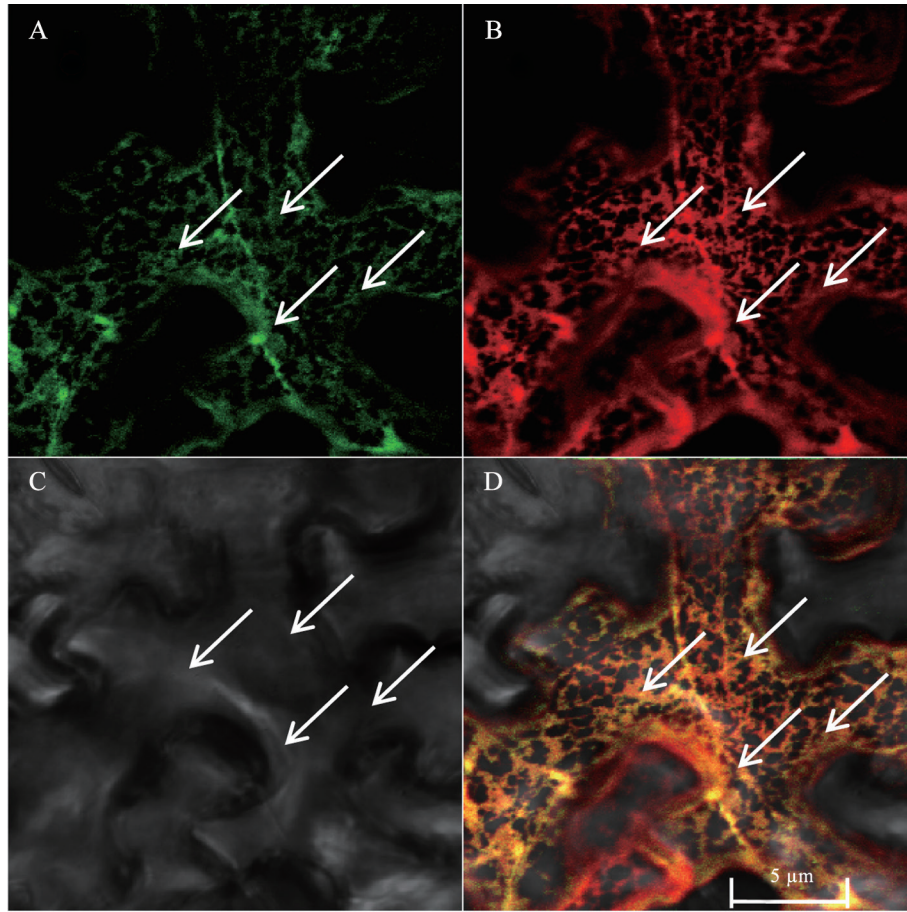


图4 油茶*CoPDAT*蛋白的亚细胞定位分析

Fig.4 Subcellular localization analysis of *CoPDAT*

A: YFP; B: 内质网Marker YFP-HDEL; C: 白光; D: 共定位图。箭头指向为明显重合区域。

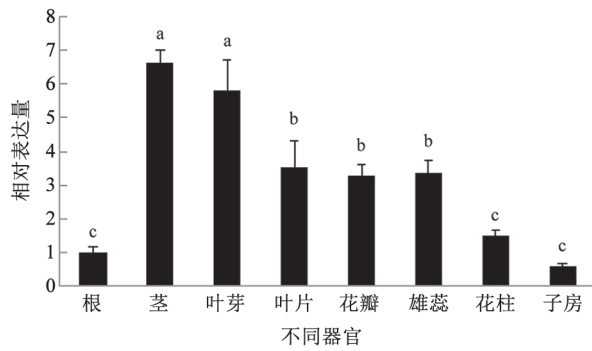


图5 油茶不同组织/器官中*CoPDAT*表达模式

Fig.5 Expression pattern of *CoPDAT* in different tissues/organs in *C. oleifera*

各柱形上用不同小写字母标识表示数据间差异显著( $P < 0.05$ ), 图6同。

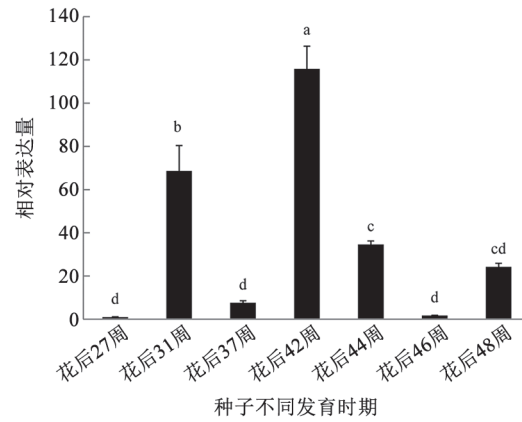


图6 油茶不同发育时期种仁中*CoPDAT*表达模式

Fig.6 Expression pattern of *CoPDAT* at different developmental stages of kernel in *C. oleifera*

若干油脂合成相关基因, 本研究获得的*CoPDAT*基因为首次报道, 也是TAG合成非Kennedy途径中克隆

得到的第一条基因。其他物种中存在两个或以上的*PDAT*基因成员, 譬如在拟南芥中含有两个不同

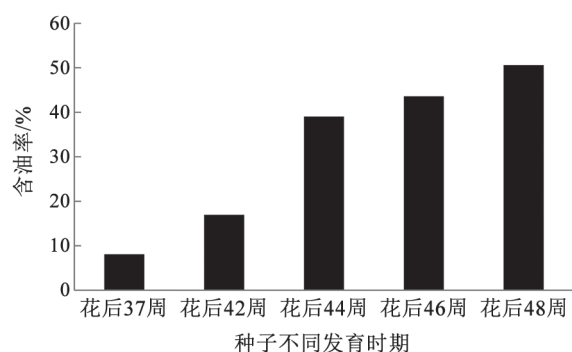


图7 油茶种子不同发育时期油脂含量

Fig.7 Oil contents at different developmental stages in *C. oleifera* seeds

的PDAT基因(Ståhl等2004), 在蓖麻中有3个不同的PDAT基因(Kim等2011), 推测油茶中应该也不止一个PDAT基因, 下一步的工作可以通过转录组测序等方法鉴定油茶中其他PDAT基因成员。

多序列比对分析发现, 油茶CoPDAT与其他物种同源PDAT具有较高的同源性, 如与麻风树、可可、野大豆的相似性分别为80.09%、79.73%、78.96%, 尤其麻风树也属木本油料树种, 根据高度同源的结果可以推测两者的PDAT在TAG合成过程中具有相似的功能机制。CoPDAT存在功能得到验证的保守脂质结构域, 表明其具有PDAT酶功能。在系统进化关系上, 油茶CoPDAT与茄科的绒毛状烟草、番茄和马铃薯的PDAT亲缘关系最接近, 表明虽然物种间的亲缘关系不同, 但它们的PDAT基因在催化合成TAG途径中或具有相似的功能机制。本试验对CoPDAT基因进行了亚细胞定位分析, 可以确定油茶CoPDAT基因所编码的蛋白质在烟草中成功表达, 并定位于内质网, 与软件预测结果一致, 另有报道麻风树、蓖麻的PDAT也定位于内质网中(徐荣华等2013), 这与TAG在内质网进行合成高度一致。qPCR结果显示CoPDAT基因在检测的油茶各组织/器官中均有表达, 表明其在各个部位都可能行使功能。在种子发育过程中, 通过索氏抽提法从花后37周开始可以提取到油脂, 此时CoPDAT基因表达量很低, 随着油脂含量的快速累积, CoPDAT基因的表达量也快速增高, 在花后42周达到最高水平, 与花后37周有显著差异。随着含油率的进一步提高, CoPDAT基因的表达量却在降低, 表明除了CoPDAT基因外, 可能还存在

其他PDAT基因成员或Kennedy途径中的DGAT等基因对油脂的合成起重要作用。我们根据CoPDAT基因的表达量, 结合对应的种子发育时期的油脂含量, 计算出两者间存在较高的关联度值, 表明CoPDAT基因与油茶种子油脂的合成积累有密切的关联。灰色关联度是通过统计序列几何关系的比较来分清系统中多因素的关系的紧密程度, 它不能证明CoPDAT基因的表达量与油脂含量间存在必然因果关系, 但可以反映出该基因与油脂合成的关系较密切, 是油脂积累的关键基因之一。相对于DGAT等基因, CoPDAT对于油茶种子油脂积累的具体贡献还须进一步研究。CoPDAT基因在油茶不同组织/器官中也有表达, 在茎段和叶芽中的表达量明显高于其他部位, 有报道表明PDAT对拟南芥叶片中膜磷脂的合成具有重要作用(Fan等2013)。CoPDAT基因的表达特征表明它不仅对叶片, 还对茎、芽、花等器官的脂类合成起重要作用。油茶作为我国重要的木本食用油料树种, 虽然具有茶油品质优良等优点, 但却因低产低效严重制约了产业化发展, 因此提高产量是油茶栽培育种的主要目标。围绕油茶油脂合成关键基因开展研究, 是提高种子含油率和茶油产量的重要途径之一。作为油茶种子油脂合成另一途径的关键酶基因CoPDAT, 本研究通过基因克隆、进化树分析、qPCR表达模式分析以及关联度分析等, 证明该基因与油茶种子油脂合成密切相关。本研究为完全阐明CoPDAT基因的功能、选育高含油油茶新品种提供科学参考。

#### 参考文献

- Banaś A, Dahlqvist A, Ståhl U, Lenman M, Stymne S (2000). The involvement of phospholipid:diacylglycerol acyltransferases in triacylglycerol production. *Biochem Soc Trans*, 28: 703–705
- Cao M (2007). Research on grey incidence analysis model and its application (Master's Thesis). Nanjing: Nanjing University of Aeronautics and Astronautics (in Chinese with English abstract) [曹明霞(2007). 灰色关联分析模型及其应用的研究(硕士论文). 南京: 南京航空航天大学]
- Chapman KD, Ohlrogge JB (2012). Compartmentation of triacylglycerol accumulation in plants. *J Biol Chem*, 287 (4): 2288–2294
- Dahlqvist A, Ståhl U, Lenman M, Banas A, Lee M, Sandager L, Ronne H, Stymne S (2000). Phospholipid:diacylglycerol acyltransferase: an enzyme that catalyzes the acyl-CoA-independent formation of triacylglycerol in yeast and plants. *Proc Natl Acad Sci USA*, 97 (12): 6487–6492
- Fan J, Yan C, Zhang X, Xu C (2013). Dual role for phospholipid-di-



- acylglycerol acyltransferase: enhancing fatty acid synthesis and diverting fatty acids from membrane lipids to triacylglycerol in *Arabidopsis* leaves. *Plant Cell*, 25 (9): 3506–3518
- Jiang N, Tan XF, Zhang L, Li Z, Jiang Y, Huang LY (2017). Molecular characterization and expression analysis of long chain fatty acid acyl-CoA synthetase gene 1 (*CoLACSI*) from oil camellia (*Camellia oleifera* C. Abel). *J Plant Genet Res*, 18 (1): 139–147 (in Chinese with English abstract) [江南, 谭晓风, 张琳, 李泽, 蒋瑶, 黄丽媛(2017). 油茶长链脂肪酰基CoA合成酶基因1 (*CoLACSI*)分子特征与表达分析. 植物遗传资源学报, 18 (1): 139–147]
- Kennedy EP (1961). Biosynthesis of complex lipids. *Fed Proc*, 20: 934–940
- Kim HU, Lee KR, Go YS, Jung JH, Suh MC, Kim JB (2011). Endoplasmic reticulum-located PDAT1-2 from castor bean enhances hydroxy fatty acid accumulation in transgenic plants. *Plant Cell Physiol*, 52 (6): 983–993
- 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 South Univ For Technol*, 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]
- Liu M (2015). Study on cloning and functional expression of *KAR* gene in *Vernicia fordii* (Master's thesis). Changsha: Central South University of Forestry & Technology (in Chinese with English abstract) [刘美兰(2015). 油桐*KAR*基因的克隆与功能研究(硕士论文). 长沙: 中南林业科技大学]
- Livak KJ, Schmittgen TD (2001). Analysis of relative gene expression data using realtime quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  method. *Methods*, 25 (4): 402–408
- Oelkers P, Tinkelenberg A, Erdeniz N, Cromley D, Billheimer JT, Sturley SL (2000). A lecithin cholesterol acyltransferase-like gene mediates diacylglycerol esterification in yeast. *J Biol Chem*, 275 (21): 15609–15612
- Pan X, Siloto RMP, Wickramarathna AD, Mietkiewska E, Weselake RJ (2013). Identification of a pair of phospholipid:diacylglycerol acyltransferases from developing flax (*Linum usitatissimum* L.) seed catalyzing the selective production of trilinolenin. *J Biol Chem*, 288 (33): 24173–24188
- Song L, Fan C, Chen Y, Zhang X, Hu Z (2016). The molecular regulation mechanism of the plant lipid biosynthesis. *Mol Plant Breeding*, 14 (8): 2178–2187 (in Chinese with English abstract) [宋雷, 范成明, 陈宇红, 张新永, 胡赞民(2016). 植物油脂合成的分子调控机制. 分子植物育种, 14 (8): 2178–2187]
- 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 For 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]
- Ståhl U, Carlsson A, Lenman M, Dahlqvist A, Huang B, Banaś W, Banaś A, Stymne S (2004). Cloning and functional characterization of a phospholipid:diacylglycerol acyltransferase from *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 135: 1324–1335
- Tan TL Feng T, Luo HY, Peng Y, Liu RY, Guan CY (2016). Cloning and characterization of phospholipids:diacylglycerol acyltransferase (BnPDAT1) cDNA from *Brassica napus* L. *Acta Agron Sin*, 42 (5): 658–666 (in Chinese with English abstract) [谭太龙, 冯韬, 罗海燕, 彭焯, 刘睿洋, 官春云(2016). 甘蓝型油菜磷脂二酰甘油酰基转移酶BnPDAT1的克隆和功能鉴定. 作物学报, 42 (5): 658–666]
- Tan X, Chen H, Zhang D, Zeng Y, Li W, Jiang Y, Xie L, Hu X, Hu F (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, Chen HP, Zeng YL, Long HX, Mei FF, Liu K (2015). Cloning and prokaryotic expression of a malonyl-CoA:ACP transacylase gene from *Camellia oleifera*. *Sci Silvae Sin*, 51 (3): 148–154 (in Chinese with English abstract) [王建勇, 谭晓风, 陈鸿鹏, 曾艳玲, 龙洪旭, 梅芳芳, 刘凯(2015). 油茶丙二酰单酰CoA:ACP转酰基酶基因的克隆与原核表达. 林业科学, 51 (3): 148–154]
- Wang JY, Tan XF, Long HX, Zeng YL, 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]
- 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 Resour*, 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]
- Wei QQ, Zhao G, He X, Long HX, Li Z, Tan XF, Zang L (2016). Cloning and expression analysis of two glycerol-3-phosphate acyltransferase (GPAT) genes in oil-tea tree (*Camellia oleifera*). *Plant Physiol J*, 52 (7): 1099–1109 (in Chinese with English abstract) [魏琦琦, 赵广, 何潇, 龙洪旭, 李泽, 谭晓风, 张琳(2016). 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. 植物生理学报, 52 (7): 1099–1109]
- Xu RH, Qiu LJ, Yang TQ, Wang RL, Tian B, Liu AZ (2013). Cloning and functioning of phospholipids:diacylglycerol acyltransferase (JcPDAT1) cDNA from *Jatropha curcas*. *Chin J Oil Crop Sci*, 35 (2): 123–130 (in Chinese with English abstract) [徐荣华, 邱丽俊, 阳天泉, 王如玲, 田波, 刘爱忠(2013). 小桐子磷脂二酰甘油酰

- 基转移酶(JcPDAT1) cDNA的克隆与功能鉴定. 中国油料作物学报, 35 (2): 123–130]
- Yang TQ, Xu RH, Liu AZ (2013). Cloning and characterization of diacylglycerol acyltransferase gene (*NtDGAT2*) from tobacco (*Nicotiana tabacum* L.). *Plant Physiol J*, 49 (1): 81–88 (in Chinese with English abstract) [阳天泉, 徐荣华, 刘爱忠(2013). 烟草二脂酰甘油酰基转移酶基因(*NtDGAT2*)的克隆与功能分析. 植物生理学报, 49 (1): 81–88]
- Zhang D, Tan X, Chen H, Zeng Y, Jiang Y, Li W, Hu F (2008). Full-length cDNA cloning and bioinformatic analysis of *Camellia oleifera* SAD. *Sci Silvae Sin*, 44 (2): 155–159 (in Chinese with English abstract) [张党权, 谭晓风, 陈鸿鹏, 曾艳玲, 蒋瑶, 李魏, 胡芳名(2008). 油茶SAD基因的全长cDNA克隆及生物信息学分析. 林业科学, 44 (2): 155–159]
- 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 (12): 3885–3901

## Cloning and expression analysis of a phospholipid:diacylglycerol acyltransferase (PDAT) gene in *Camellia oleifera*

ZHAO Guang, SONG Zhi-Bo, LIU Mei-Lan, LONG Hong-Xu, LI Ze, 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:** Phospholipid:diacylglycerol acyltransferase (PDAT) can catalyze the *sn*-2 acyl of phosphatidylcholine (PC) to transfer to the diacylglycerol (DAG), forming triacylglycerol (TAG) and lysophosphatidyl choline. PDAT-based TAG synthesis pathway is different from the well-known Kennedy pathway, therefore it is of great significance to clarify the function of *PDAT* gene in *Camellia oleifera*. In this study, a specific band of about 800 bp was amplified from *C. oleifera* seeds by reverse transcription PCR. The full-length cDNA sequence of *PDAT* from *C. oleifera* was cloned by RACE (rapid amplification of cDNA ends) technology. *CoPDAT* (*C. oleifera PDAT*) was 2 773 bp in length and included an open reading frame of 2 022 bp, encoding 672 amino acids. By subcellular localization analysis, *CoPDAT* was located on the endoplasmic reticulum. Real-time quantitative PCR (qPCR) analysis showed that the *CoPDAT* was expressed in varied tissues/organs of *C. oleifera*. Relative expression amount in the developing seeds exhibited a pattern of “increase, decrease, increase, decrease and increase”, and the highest expression was at 42 weeks after flowering (WAF). Gray correlation value between *CoPDAT* and the seed oil content was 0.8356, indicating that the expression of *CoPDAT* had a close relation with seed oil content. This study lays an solid foundation for elucidating the function of *CoPDAT* in the seed oil synthesis and provided scientific guidance for molecular genetic improvement in *C. oleifera*.

**Key words:** gene cloning; bioinformatic analysis; subcellular localization; expression pattern; gray correlation analysis

Received 2017-04-26 Accepted 2017-08-10

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

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