

续随子二酰甘油酰基转移酶2基因(*EIDGAT2*)克隆与功能分析

任国鹏¹, 葛丽萍^{1,3,*}, 孙超超¹, 刘宝玲², 李润植^{2,*}

¹山西农业大学林学院, 山西太谷030801

²山西农业大学分子农业与生物能源研究所, 山西太谷030801

³北方功能油料树种培育与研发山西省重点实验室, 山西太谷030801

摘要: 本文从续随子发育种子中分离编码二酰甘油酰基转移酶2的cDNA克隆(*EIDGAT2*), 采用生物信息学工具解析*EIDGAT2*酶蛋白的理化性质、高级结构、亚细胞定位及系统发育等特性。利用qRT-PCR研究该基因在续随子不同器官组织的表达谱。构建*EIDGAT2*的组成型植物表达载体(pCambia1303-*EIDGAT2*), 通过农杆菌介导烟草瞬时表达鉴定*EIDGAT2*基因的功能。结果显示, 续随子*EIDGAT2* cDNA全长1 939 bp, ORF为984 bp, 编码327个氨基酸。*EIDGAT2*蛋白定位于内质网上, 二级结构主要结构元件为 α -螺旋(37.00%)和无规则卷曲(34.25%)。DGAT2蛋白系统发育树分析揭示, 续随子*EIDGAT2*与同科植物蓖麻、油桐、麻疯树的DGAT2蛋白亲缘关系较近。基因表达分析表明, *EIDGAT2*基因在续随子不同器官中均有表达, 而且在种子中的表达量显著高于其他器官。在种子发育中期(花后30 d)即油脂快速合成积累时期的表达量最高, *EIDGAT2*表达量约为叶片的12.83倍。与野生型和空载体转化烟叶相比, *EIDGAT2*瞬时表达的烟叶组织总油脂含量提高1.59%, 饱和脂肪酸减少, 油酸等不饱和脂肪酸增加。研究表明, *EIDGAT2*编码一个具有催化活性的DGAT2酶蛋白, 异源表达可提高宿主组织总油脂和不饱和脂肪酸的合成积累, 显示*EIDGAT2*对油酸等不饱和脂肪酸有底物偏好性。

关键词: 续随子; 二酰甘油酰基转移酶2; 基因克隆; 表达谱; 烟草瞬时表达

续随子(*Euphorbia lathyris*)属于大戟科大戟属一年生或两年生草本植物, 原产于欧洲, 引入我国栽培已久, 在我国南北各地区均有栽培。续随子种子油脂含量高达45%~60%。对不同品种续随子的研究发现(危文亮等2007), 续随子种子油的脂肪酸成分以C₁₆、C₁₈为主, 主要包括棕榈酸(16:0)、硬脂酸(18:0)、油酸(18:1)、亚油酸(18:2)和亚麻酸(18:3), 其中油酸含量高达总脂肪酸含量的85%, 比花生、油菜中的油酸含量高出许多, 这是已测油料植物中油酸含量最高者(张卫明等2007)。油酸是一种单不饱和脂肪酸, 理化性质介于饱和脂肪酸与不饱和脂肪酸之间, 在食用和工业中都是最佳的脂肪酸(Davidson等2000)。油酸为健康有益型脂肪酸(Rudkowska等2006), 在人体的脂类代谢过程中可降低有害胆固醇, 具有预防一些心血管疾病发生的功效(刘永红等2011)。近年来, 我国相关科研部门已相继开始进行续随子种质资源的收集、新品种鉴定、创新利用及生物柴油制备的研究(龚德勇等2015)。然而, 鲜有关于续随子种子油脂合成机制的详尽研究, 尽管这对特色油料植物续随子优质油脂产品开发及可持续发展尤为重要。

二酰甘油酰基转移酶(diacylglycerol acyltransferase, DGAT)是一种微粒体酶, 定位于内质网上, 是油脂合成过程中的关键酶和限速酶(Meegalla等2002), 催化三酰甘油(triacylglycerol, TAG)合成的最后一步酰化反应。其主要功能是通过Kennedy途径将酰基-CoA以共价键的形式结合在二酰甘油(diacylglycerol, DAG)的sn-3碳原子上形成TAG(Lassner等1996)。研究发现参与这一步酰化反应的DGAT酶蛋白主要有两个家族, 即DGAT1和DGAT2。源于不同植物的多个DGAT1成员已相继克隆, 其参与植物种子油脂合成等生物学功能已被广泛研究(苑丽霞等2015; Gao等2018)。日渐增多的有关高等植物DGAT2家族成员的功能研究揭示, DGAT2不仅控制TAG的合成, 而且有助于特异

收稿 2019-01-29 修定 2019-07-22

资助 山西省自然科学基金(2010011039-1)、山西省教育厅项目(J2018076)、山西省煤基重点科技攻关项目(FT-2014-01)、山西省重点科技项目(201603D312005)和北方功能油料树种培育与研发山西省重点实验室(201805D111010)。

* 共同通讯作者: 葛丽萍(geliping@hotmail.com)、李润植(rli2001@126.com)。

脂肪酸的积累。例如, 过表达*DGAT2*基因能增加TAG的含量, 进而提高植物种子的含油量。木本油料植物油桐(*Vernicia fordii*) *VfDGAT2*在酵母中的过表达可使脂肪酸含量比对照提高约7.8倍, 表明*VfDGAT2*可提高酵母中脂肪酸在TAG中的积累效率(Shockey等2006)。崔琴琴(2013)将油桐*Vf-DGAT2*基因转入拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)的3个株系中, 对转基因拟南芥种子含油量检测发现比野生型提高了约17.24%。在转蓖麻羟化酶拟南芥中共表达蓖麻(*Ricinus communis*) *RcDGAT2*基因, 使得羟基脂肪酸(蓖麻酸)含量从17%增加至接近30% (Burgal等2008), 表明*RcDGAT2*对蓖麻酸有底物选择性。目前, 已在蓖麻、甘蓝型油菜(*Brassica napus*)、麻疯树(*Jatropha curcas*)和油桐等植物中克隆出*DGAT2*基因(徐玲娜等2011), 并证明异源表达*DGAT2*基因可以提高宿主组织油脂含量。然而, 有关续随子*EIDGAT2*基因的研究还未见报道。续随子种子不仅含油量高, 而且富含单不饱和和油酸。我们的假设是, *EIDGAT2*在续随子种子油脂合成以及油酸富集过程中起重要作用。

为此, 本研究基于我们前期续随子种子转录组数据分析发现的一条高表达的功能注释为*DGAT2*的转录本, 以续随子发育种子为试材, 采用PCR技术分离该*EIDGAT2*基因的cDNA克隆, 并分析该基因在不同器官组织的表达谱。应用生物信息学工具分析*EIDGAT2*基因编码蛋白的理化性质、高级结构和系统发育特征。进一步构建植物表达载体, 通过农杆菌介导侵染法在烟草叶组织瞬时表达*EIDGAT2*, 分析烟叶油脂积累和脂肪酸成分及含量, 以期鉴定*EIDGAT2*的功能。研究可为解析续随子油脂合成的分子机理以及油料作物油脂改良与开发利用提供科学参考。

1 材料与方法

1.1 材料

试验所用的续随子(*Euphorbia lathyris* L.)材料栽培于山西农业大学林学院苗圃, 分别采集续随子根、茎、叶、花及3个不同发育时期的种子: S1 (花后15 d)、S2 (花后30 d)、S3 (花后45 d), 保存于-80℃冰箱备用。

1.2 实验方法

1.2.1 续随子RNA的提取及cDNA的合成

用全式金TRNzol Up RNA提取试剂提取续随子的根、茎、叶、花及3个不同发育时期的种子的RNA。采用ABM公司的5×All-In-One MasterMix (with AccuRT Genomic DNA Removal Kit)反转录试剂盒反转录合成cDNA。

1.2.2 *EIDGAT2*基因的克隆

本实验室将续随子的根、茎、叶、花混样及S1、S2、S3时期的种子送到安诺优达基因科技(北京)有限公司进行测序, 从而得到该植物的转录组数据。利用BLAST的方法, 以模式植物拟南芥(*Arabidopsis thaliana* L.)的*AtDGAT2*基因与续随子转录组数据库进行对比, 并结合转录组数据功能注释发现一个编码二酰甘油酰基转移酶2, 即*DGAT2*的转录本, 命名为*EIDGAT2*。以该转录本序列为模板, 设计PCR扩增引物(表1), 以续随子S1时期的种子cDNA为模板, 按照全式金2×*EasyTaq*® PCR SuperMix说明书的反应体系与程序进行PCR扩增, 割胶回收PCR产物后, 将其克隆入pMD18-T载体上, 得到pMD18-T-*EIDGAT2*并转化大肠杆菌DH5α, 菌液PCR鉴定筛选阳性克隆, 送通用生物公司(安徽)进行双向测序鉴定。

1.2.3 *EIDGAT2*蛋白理化性质分析

使用在线软件ProParam (<https://web.expasy.org/protparam/>)对*EIDGAT2*蛋白的理论等电点、分子量和不稳定性等进行分析。使用软件PSORTII (<https://psort.hgc.jp/form2.html>)对*EIDGAT2*蛋白进行亚细胞定位。采用软件TMHMM (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>)对*EIDGAT2*的跨膜结构域进行预测。

表1 引物信息
Table 1 Primer information

引物名称	序列(5'→3')
ORF- <i>EIDGAT2</i> -F	ATGGCGGATACGGAGGCG
ORF- <i>EIDGAT2</i> -R	TCAAAAGATTCAAGTTTAAGGTCCGG
qPCR- <i>EIDGAT2</i> -F	ATGAAGCGCGACTCTGAGATTGC
qPCR- <i>EIDGAT2</i> -R	CCACCTGTACGCCTGCGATTG
<i>ElActin</i> -F	ATGTATGTCGCCATTCAAGCCGTTCT
<i>ElActin</i> -R	TCATCAGAGCATCAGTAAGGTCACG

1.2.4 EIDGAT2蛋白高级结构与结构域分析

通过在线软件SOPMA (https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_sopma.html)和SWISS-MODEL (<https://swissmodel.expasy.org/>)对EIDGAT2蛋白进行二级结构及三级结构的预测和建模。利用NCBI-CDD (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>)预测EIDGAT2蛋白的功能结构域。

1.2.5 EIDGAT2蛋白的多序列比对与系统进化分析

采用软件PRALINE program (<http://www.ibi.vu.nl/programs/pralinewww/>)对续随子与其他物种的氨基酸序列进行比对。运用MEGA 7.0对续随子和其他物种的DGAT2蛋白构建系统发育树。

1.2.6 实时荧光定量PCR检测

实时荧光定量PCR使用abm公司的EvaGreen 2×qPCR试剂盒,并设计qPCR引物(表1),以续随子*ElActin*(表1)作为内参基因(李春霞2013),进行PCR检测。反应体系(10 μL)为: cDNA模板0.5 μL、正反向引物各0.3 μL、EvaGreen 2×qPCR Master Mix 5 μL、Nuclease-free H₂O 3.9 μL,设置3次生物学重复。反应程序采用两步法进行: 95°C 10 min, 95°C 15 s, 60°C 1 min, 40个循环。

1.2.7 EIDGAT2基因植物表达载体构建及烟草瞬时表达

用内切酶*Xba*I和*Kpn*I分别对克隆载体pMD18-T-*EIDGAT2*及空载体pCAMBIA1303进行双酶切,酶切反应体系(50 μL)为: 质粒DNA 9.5 μL、10×buffer 5.0 μL、限制性内切酶各2.0 μL、无菌水(ddH₂O)补足至50.0 μL, 37°C消化1 h。得到的酶切产物用琼脂糖凝胶电泳进行检测和分离,并用DNA纯化回收试剂盒分别割胶回收和纯化*EIDGAT2*片段和开环的pCAMBIA1303载体。然后,将获得的的目的基因*EIDGAT2*连接到表达载体pCAMBIA1303上,连接反应体系(10 μL)为: 开环载体片段4 μL、目的基因片段4 μL、T4 DNA连接酶1 μL和buffer 1 μL,反应结束后得到重组表达载体pCAMBIA1303-*EIDGAT2*。将连接后的重组表达载体转入大肠杆菌DH5α感受态细胞中,培养提取质粒后进行双酶切验证。

将鉴定成功的阳性的重组质粒及空载体转入

农杆菌菌株GV3101中,菌液PCR鉴定阳性转化菌株。将阳性菌株接种于LB培养基中(含卡那霉素和利福平),培养菌液至OD₆₀₀为0.4~0.6。离心收集菌体后用现配的侵染液[0.1 mol·L⁻¹的乙酰丁香酮、1 mol·L⁻¹的硫酸镁和1 mol·L⁻¹的2-(N-吗啉代)乙磺酸]重悬菌液浓度至OD₆₀₀为0.2左右,室温静置4 h后侵染本氏烟草(*Nicotiana benthamiana* L.)的叶片,具体方法见Ji等(2018)一文。最后,取培养3 d后的叶片,用于提取RNA,验证目的基因是否转入烟草叶片中且有效表达。取培养5 d后的叶片冷冻干燥后进行脂肪酸含量与成分分析。

1.2.8 转基因烟草叶片的总脂肪酸含量测定及脂肪酸成分分析

称取50 mg冷冻干燥48 h后的转基因烟草叶片研磨成粉末后置于离心管中,加入甲醇与氯仿(体积比为2:1)混合液7.5 mL,在37°C恒温摇床中提取24 h,低速离心收集上层有机相。在离心管中的沉淀中再次加入甲醇与氯仿混合液7.5 mL,提取12 h后离心收集有机相,再次重复一次该步骤。最后将3次所得有机相混合,再加入一定比例的1% NaCl溶液和氯仿溶液。混匀离心后吸取下层有机相至已经称重的新的玻璃管中,氮吹仪吹干后称管重,每个样3个重复。总脂肪酸含量=(氮吹仪吹干后的管重-加样前的管重)/烟草叶片重量。

称取10 mg磨成粉末的烟草叶片,置于玻璃试管中,加入10 μg的内标Tri 17:0,再加入氯仿与甲醇(体积比为2:1)混合溶液1 mL,混匀离心后加入0.9%的KCl溶液0.5 mL,搅拌后加入1 mL氯仿混匀后再次离心。收集下层的氯仿相至新的试管中并用氮吹仪吹干后,加入甲醇钠0.5 mL,振荡30~35 min。接着加入正己烷0.5 mL搅拌混匀,最后加入0.9% KCl溶液1 mL混匀后离心分层,收集上层溶液于GC瓶中用于气相检测。用安捷伦气相色谱仪7890B对脂肪酸的成分与含量进行分析,方法见王计平等(2016)文献。

2 实验结果

2.1 续随子EIDGAT2基因的克隆

以续随子种子S1时期的cDNA作为模板,进行PCR扩增反应,扩增所得片段长度与序列分析长度

一致(图1)。割胶回收目的片段, 纯化后进行测序, 测序获得一条984 bp的核苷酸序列(ORF), 并且测序结果与转录组数据比对分析结果一致, 确定该片段为*EIDGAT2*基因的编码序列。

2.2 续随子*EIDGAT2*蛋白理化性质分析

对*EIDGAT2*基因的序列分析(图2)表明, *EIDGAT2*基因的cDNA序列全长为1 939 bp, 开放阅读框为984 bp, 共编码327个氨基酸。对*EIDGAT2*基因编码的蛋白质进行在线分析预测, 结果显示: 其编码蛋白的分子式为 $C_{1754}H_{2662}N_{444}O_{430}S_{14}$, 原子总数为5 304个, 相对分子量为37.30 kDa, 理论等电点为9.30, 不稳定系数为41.42, 平均亲水系数为0.262, 脂质指数为98.10, 属于不稳定的脂溶蛋白。亚细胞定位分析表明: *EIDGAT2*蛋白定位于内质网上。跨膜结果分析显示: *EIDGAT2*蛋白分别在第28~50位、60~82位氨基酸之间存在2个典型的跨膜螺旋区。

2.3 续随子*EIDGAT2*蛋白高级结构与结构域分析

*EIDGAT2*蛋白的二级结构主要由4种元件组成: α -螺旋(37.00%)、无规则卷曲(34.25%)、延伸链(20.80%)和 β -折叠(7.95%)。其中, 前两者是*EIDGAT2*蛋白的主要元件, 后两者分散于整个蛋白质中。

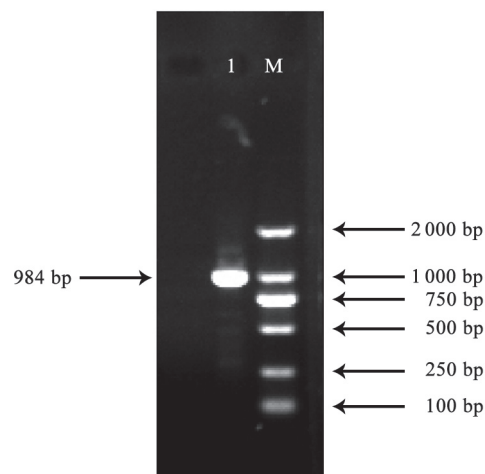


图1 *EIDGAT2*基因ORF的PCR扩增产物电泳结果

Fig.1 Electrophoresis of the amplified PCR product of *EIDGAT2* ORF

M: DL2000 Marker; 1: *EIDGAT2*基因ORF扩增产物。

利用SWISS-MODEL在线软件以海栖热袍菌(*Thermotoga maritima*) (Robertson等2017)为模板对*EIDGAT2*蛋白进行同源建模, 结果(图3)发现: *EIDGAT2*蛋白与模板蛋白的覆盖率为60%, 氨基酸保守序列范围为78~317, 表明建立的模型可信度高。模板蛋白亚基通过与配体DD9 (图3-C)和HGX

```

1 GCATACTATCGATGGAAGACGGTGAGATACAGTTTCGATTTCATTGTTTGTCTAGGCT
61 TTTGTGAATTGATGTTTCTCTGTTTGAATTTCTTTGGGTATATGATTAGCTGTTTACT
121 ACTTTGTGTTCTTATCGTTCTTAATTTGGTTTCTATCTTTTTTCTGTTAGTTTCTT
181 CTTTCTCTTCTGTTAGTCCAAGTATAGTTCAACTGTTTCTATTATTAATGACGTTTGA
241 GGTTCCTGGGATTTGGTATCTTACTCTTGACTTCATTGGGATTAGATAGTAATTAGTT
301 AGTTCTCACTGCTCTCCATATGTATAGCTTTTGGAGTTCAATTTTCTGTTGGGCGG
361 TGATTATGGTGTGTTAATCGTGAATTTATGATTTTCTTATTGTAATGTAAGGCTC
421 TCATTGGATCATTTCTTACCGGCTTAAGTGTCTATGGGCTTTCTGTTCTGGTTTCTGA
481 ATTGATGTTAATCTCTGATAATAAAAGTCAGTGTTATTATTAATTAACATAGTTC
541 CCATGAATCAGAAATAAATACCGCAACCAACGAATAGGTATGGTACATATAGGCGG
601 AGATTTCAATAAACTATCAAGATAAATAATTCCTGTGCAAGCAGAAAGATCAGAA
661 GTAGAAGCAGAAAGTAGTAGTGATAATATGTCGGATACGGAGCGGAGAAGAAGCTG
      M A D T E A E K K K L
721 CAACAGCTTACTGTTATCAATTCAAGAGATAAATATCCATCTAACACTTTTCTCGCACTC
  Q Q L T V I N S R D K Y P S N T F L A L
781 GTAGCTTTAGCGTTATGGCTCGGTTGTATCCATTTCAATCTCTTACTTTTCTTCTCT
  V A L A L W L G C I H F N L F L L F F S
841 TTTCTCTCTCTCTCTTTCCAAATCTTACTGTTTGGGATTGCTTTTGTCTTTATG
  F L F L S F S K F L L V F G L L L L F M
901 CTCATTCGATCAGCGAAACAATCAATAGGTCGCTTTGTGAGGAACATATGATAGA
  L I P I S E N N Q L G R R L C R N I C R
961 CATGCTTGCAAGTATTTTCTATCACTCTCATGTTGAAGACATGAGTATTTCAATCG
  H A C S Y F P I T L H V E D M S D F H S
1021 GATCGAGCTTATGTTCTCGGTATGAGCCACATTCAGTTTCCCAATGGTGTGCTGCA
  D R A Y V F G Y E P H S V F P I G V A A
1081 CTTGCAGACCAATTTGGTTTTCATGCTCTTCCCAAAATAAAAGTCCTCGCGAGTAGTGT
  L A D H L G F M P L P K I K V L A S S A
1141 GTCTTCTATACCACTTTTAAAGACATATATGGACATGGTGTGGTCTTACTCCAGCAACC
  V F Y T P F L R H I W T W C G L T P A T
1201 AAGAAAAATTCATTCCCTACTGGAGGCGGGTTATAGTTGCATAGTCATCCAGGTGGA
  K K N F I S L L E A G Y S C I V I P G G
1261 GTCCAAGAGACTTTTAAATGAAGCGGACTCTGAGATGCTTTCCTTAACGGAAGAAGA
  V Q E T F L M K R D S E I A F L N G R R
1321 GGATTGTCAAACCTAGCTATAGAAACAGGCAACCTTTGGTTCAGTTTCTGCTTTGGT
  G F V K L A I E T G K P L V P V F C F G
1381 CAATCGCAGGCGTACAGGTGGTGAACCTGGTGGAGGATTGTTTTGAAATTTGCTAGG
  Q S Q A Y R W W K P G G G L F L K F A R
1441 GCAATTAAGTTTACCCCAATTATTTTGGGGAATTTTGGGTCTTTTGGCCCCATCAA
  A I K F T P I I F W G I F G S F L P H Q
1501 CATCCAATGCATGTTTGTGGGTAGACCTATTGAAGTGAAGAAAAATCCGATCCTACA
  H P M H V V V G R P I E V K K N P H P T
1561 ATGGAAGAGATTGGTGAAGTTACACGGTGAATTCGTTGACGCTTTTAGAGATCTAATTGAA
  M E E I G E L H G E F V A A F R D L F E
1621 AGACACAAAGGGCGGGTTGGCCATCCGACCTAAACCTGAAATCTTTTGAAGACTGTTT
  R H K G R V G H P D L K L E I F *
1681 TATTTTATCCATTTCTATTATATGATGCTGTTTGTGAATATGTTGATTCTTTAAAAA
1741 TGAACATAGAAAAGATCAATAAAAAAATGATAGATGCACATGTTATATGTTCTGAT
1801 AAATTAACCAATAAAAGTTGCCACAGAGCTTAAATTTCTAGTATATTCATTGAGGA
1861 ACTACATAAACATGGTGTTCGGGATAATTTGATGAGGTGGATGATGTTTGAAGAGTAGT
1921 TTATATTTGGAGACAGGG

```

图2 *EIDGAT2* cDNA序列及翻译的氨基酸序列

Fig.2 Sequence of *EIDGAT2* cDNA and the translated amino acid sequence

方框ATG为起始密码子, TGA为终止密码子; 下划线为*EIDGAT2*保守结构域PLN02783。

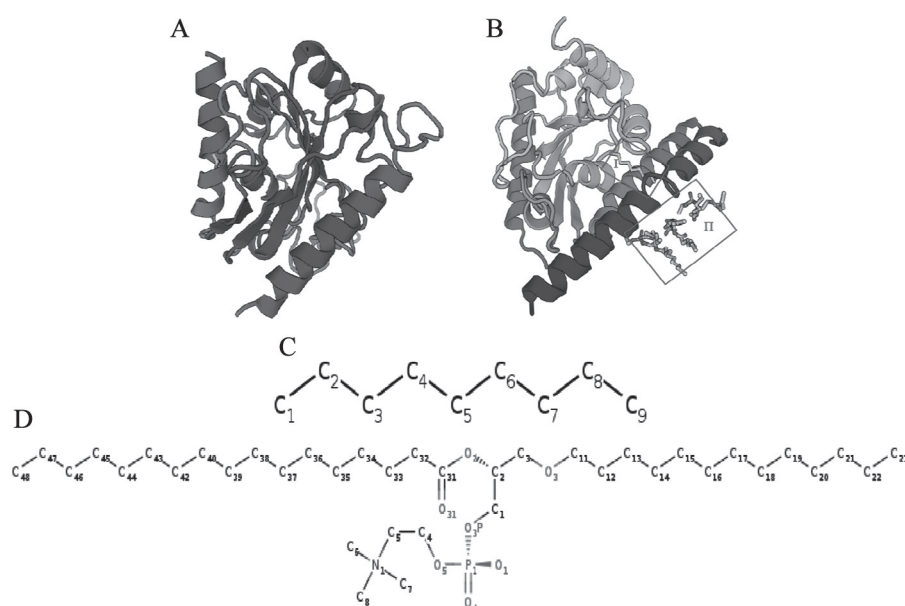


图3 EIDGAT2蛋白三级结构预测

Fig.3 The tertiary structure prediction of DGAT2 protein in *E. lathyris*

A: EIDGAT2蛋白的三维结构; B: 海栖热袍菌蛋白的三维结构; C: 配体DD9结构式; D: 配体HGX结构式。

(图3-D)形成共价键而连接在一起, 这两个配体有着不同的结构式, 且它们均为蛋白疏水相互作用相关的配体。对比图3-A和图3-B可以发现, EIDGAT2蛋白与模板蛋白的外形结构几乎相似, 可以推测EIDGAT2蛋白有着相同的亚基, 且与配体结合部位大致相似, 也存在着疏水作用的配体。NCBI-CDD分析该蛋白的功能结构域发现: EIDGAT2蛋白含有PLN02783保守结构域, 属于LPLAT超蛋白家族中的成员。

2.4 续随子EIDGAT2蛋白多序列比对与系统发育分析

通过PRALINE program对续随子、蓖麻、油桐和麻疯树等8种植物的氨基酸序列比对分析表明(图4), DGAT2蛋白之间的分化程度较低, 在中间部分的氨基酸序列高度保守, 相似度高达90%以上。研究表明, 不同物种的DGAT2前100个氨基酸残基相似性较低(低于20%), 而100以后的氨基酸残基相似性较高(大于70%) (Milcamps等2005), 这与本研究结果一致。通过比对分析发现, 续随子EIDGAT2与其他植物DGAT2蛋白结构相似, 共有7个保守基团, 分别为YFP、EPHS、PFLRH、GGVQE、LN-GRRGFVKLA、VPVFCFG和VVGRPI, 其中YFP

和EPHS保守域为DGAT2蛋白的酶活性位点。这与Liu等(2012)和郝敬云等(2016)对植物和真菌的序列比对分析结果一致。

使用MEGA 7.0对续随子EIDGAT2基因编码的蛋白序列与大豆(*Glycine max*)、花生(*Arachis hypogaea*)等已知功能的蛋白序列及其蓖麻、油桐和麻疯树等其他同源性较高植物的DGAT2蛋白构建系统发育树。结果显示, 续随子与蓖麻、油桐、麻疯树的亲缘关系较近, 这与传统分类学中将续随子与蓖麻、油桐、麻疯树归为大戟科的结论相一致, 与大豆、花生的关系次之, 而与拉曼被孢霉(*Mortierella ramanniana*)关系最远(图5)。

2.5 续随子EIDGAT2基因表达特性分析

本研究选取续随子根、茎、叶、花及种子发育的3个不同时期S1、S2、S3, 对EIDGAT2基因进行了表达特性分析。结果(图6)表明: 该基因在续随子根、茎、叶、花及种子中均有表达, 其中在种子中的表达量显著高于其他器官, 并且在种子的不同发育时期, 基因的表达量存在显著差异。在种子发育的S1时期表达量较高, S2时期表达量达到最高, S3时期则降低。以叶的表达量作为对照, S2时期的表达量是叶的12.83倍。

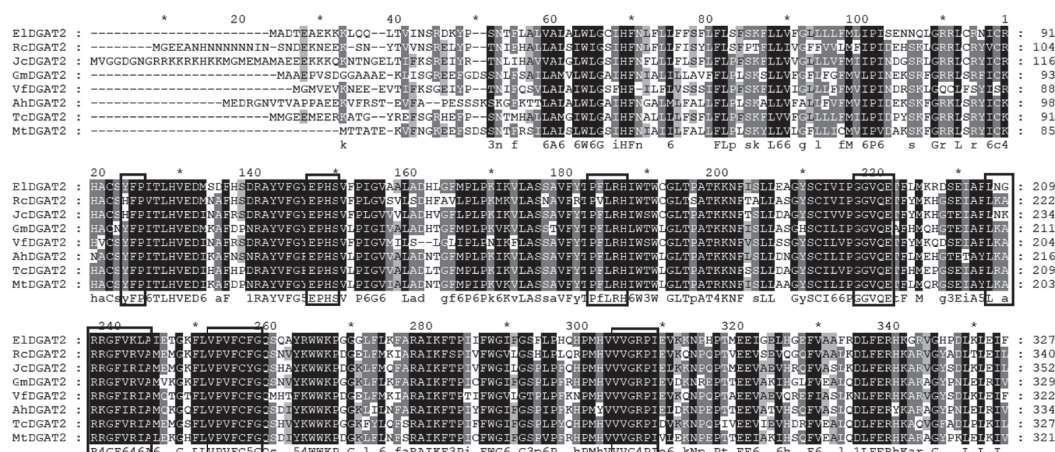


图4 不同物种的DGAT2氨基酸序列比对分析

Fig.4 Sequence alignment of DGAT2 proteins from different plant species

GmDGAT2: 大豆(NP_001299586.1); MtDGAT2: 蒺藜苜蓿(XP_003612436.1); RcdGAT2: 蓖麻(NP_001310616.1); JcdGAT2: 麻疯树(NP_001292973.1); AhdGAT2: 花生(AEO11790.1); TcdGAT2: 可可(EXO90582.1); VfdGAT2: 油桐(ABC94473.1)。方框代表DGAT2保守域。

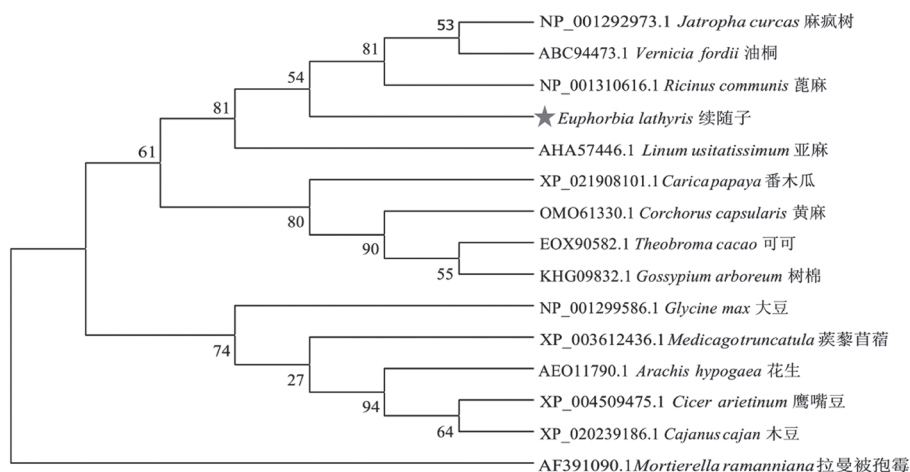


图5 EIDGAT2与其他物种DGAT2蛋白的系统发育分析

Fig.5 Phylogenetic tree of DGAT2 proteins of *E. lathyris* and other species

2.6 重组质粒的双酶切及转基因烟草叶片的阳性鉴定

利用 *Xba*I 和 *Kpn*I 对重组质粒 pCambia1303-*EIDGAT2* 进行双酶切, 以空载体作为对照。图7为经双酶切后的电泳图, 其中第一泳道为双酶切后得到的目的基因条带, 其长度大小为996 bp, 与目的基因 *EIDGAT2* 的长度大小一致。第二泳道为空载体(12 361 bp)。因此, 可以说明植物表达载体构建成功, 可用于后续实验。

提取转基因烟草叶片的RNA, 反转录成cDNA, 以该cDNA为模板, 用 *EIDGAT2* 基因的定量引物进行RT-PCR扩增反应, 检测目的基因是否在烟草叶片中有效表达。在RT-PCR产物的电泳检测中, 3个转基因的样品均扩增出条带, 产物长度为123 bp, 与目的片段的长度相一致, 说明 *EIDGAT2* 基因发生了表达, 而在转空载的烟草叶片中未扩增出条带(图8)。表明 *EIDGAT2* 基因已在烟草叶片中正常有效表达。

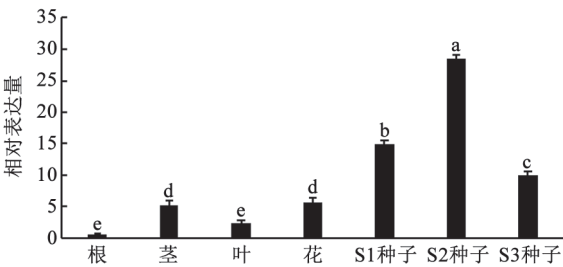


图6 *EIDGAT2*基因在续随子不同器官及种子不同发育时期的表达特性分析

Fig.6 *EIDGAT2* gene expression in different organs and seed developing stages

不同小写字母代表在0.05水平方差分析差异显著性。

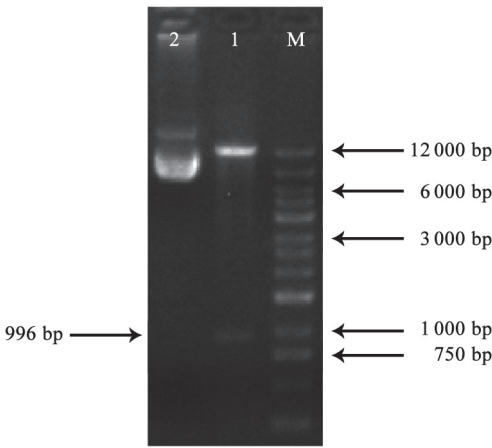


图7 *EIDGAT2*表达载体双酶切鉴定

Fig.7 Double digestion of the *EIDGAT2* expression vector

M: DL12000 Marker; 1: pCambia1303-*EIDGAT2*双酶切结果; 2: 空载体pCambia1303。

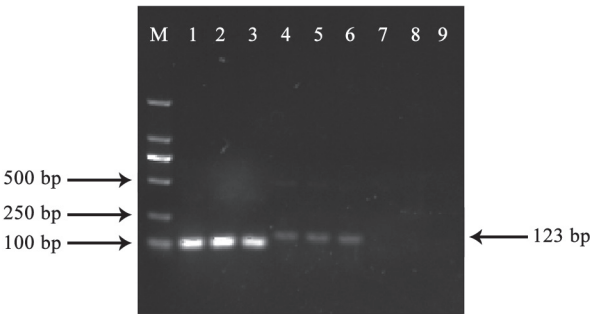


图8 转*EIDGAT2*基因烟叶RT-PCR检测

Fig.8 Detection of *EIDGAT2* transient expression in tobacco leaves by RT-PCR

M: DL2000 Marker; 1~3: 转基因烟叶的内参基因; 4~6: 转基因烟叶的目的基因; 7~9: 转空载烟叶。

2.7 过表达*EIDGAT2*促进烟叶总油脂含量升高及脂肪酸成分的变化

选择野生型(WT)、转pCambia1303空载体(对照)及转pCambia1303-*EIDGAT2*的烟草叶片进行总油脂含量、各脂肪酸成分及含量的测定。结果显示, 与野生型和对照相比, 转基因烟叶的总油脂合成积累显著增加, 总油脂含量平均提高1.59% (占叶片干重的百分比, 图9)。

各脂肪酸成分及含量检测结果(图10)表明, 转基因叶片与对照叶片脂肪酸组成相似, 均主要含有棕榈酸(16:0)、硬脂酸(18:0)、油酸(18:1)、亚油酸(18:2)和亚麻酸(18:3)。与其他株系相比, 转基因烟草叶片中各脂肪酸含量发生显著变化, 其中18:1增长最多, 含量提高了6.63%, 18:2和18:3也分别增加4.52%和5.98%; 相应地16:0和18:0含量减少。这

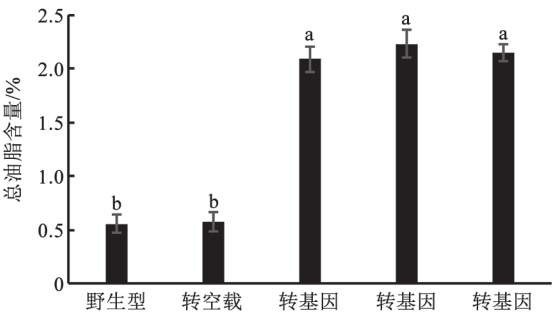


图9 过表达*EIDGAT2*基因的烟叶总油脂含量

Fig.9 Total oil contents in tobacco leaves expressing *EIDGAT2*

不同小写字母代表在0.05水平方差分析差异显著性。

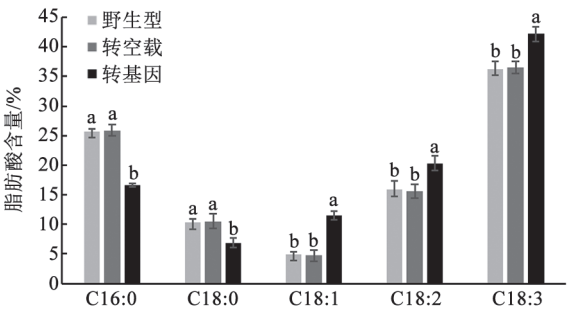


图10 过表达*EIDGAT2*基因的烟叶脂肪酸成分变化

Fig.10 Changes in fatty acid profiles in tobacco leaves expressing *EIDGAT2*

不同小写字母表示同一脂肪酸组分不同株系之间差异显著 ($P<0.05$)。

表明*EIDGAT2*异源过表达不仅促进总油脂合成积累, 亦导致油酸等不饱和脂肪酸增加, 预示着*EIDGAT2*对油酸等不饱和脂肪酸有底物特异性。

3 讨论

能源植物是一种有前景的生物质能, 生产成本低, 对保护环境、保护生态系统具有重要作用。因此, 开发能源植物作为现有能源的补充和替代可逐步缓解能源危机, 为寻找新能源开辟新途径。续随子是一种新型的有发展前景的能源油料植物(刘冲等2011), Calvin (1979)研究发现, 该植物种子油中含有30%~40%的化合物类似于石油中的碳氢化合物, 其组成与理想柴油替代品的分子组成相似, 经处理可以代替石油作为新型能源, 是生产优质生物柴油的理想能源植物(Ayerbe等1984)。随着植物油脂代谢途径研究的逐渐深入, *DGAT2*基因的研究也越来越多。*DGAT2*在油脂合成积累途径中催化最后一步反应, 该酶的活性高低直接关系到植物油脂的积累速率及脂肪酸组分和含量的变化。因此, 对*EIDGAT2*基因的研究有助于续随子生产优质脂肪酸及提高油脂含量, 进而提高续随子的利用价值。

本文克隆获得*EIDGAT2*基因, 并对其蛋白序列特征进行了分析。*EIDGAT2*蛋白存在2个跨膜区, 这与已知的大部分植物*DGAT2*家族成员中一般含有1~2个跨膜结构域的特征一致。多序列比对发现*EIDGAT2*蛋白符合*DGAT*酶蛋白的典型特征, 含有7个保守域, 其中EPHS保守域的缺失将导致该酶的活性丧失。系统进化分析表明, 续随子*EIDGAT2*与同科植物蓖麻、油桐、麻疯树的亲缘关系较近。目前, 已从蓖麻、油桐和麻疯树克隆到*DGAT2*基因, 并通过实验表明了该基因可以使TAG的含量升高。qRT-PCR分析发现, *EIDGAT2*基因在续随子的各个器官中均有表达, 但在种子中的表达量显著高于其它器官。这种表达模式与紫苏(*Perilla frutescens*)的*PfDGAT2*和蓖麻的*RcDGAT2*基因表达趋势一致(梁倩等2017; He等2004)。元博(2018)对续随子种子油脂成分积累的研究表明, 在种子发育初期油脂积累缓慢, 而后迅速增加到最大值, 然后再次减慢, 这种油脂积累规律与*EIDGAT2*的表达模

式一致, 表明两者之间呈现正相关, 预示着*EIDGAT2*在续随子种子油脂合成积累中起重要作用。大豆*GmDGAT2*的活性随着油脂含量的增加也不断增加(周丹2012), 油桐*VfDGAT2*基因在种子中的表达规律与油脂积累的趋势大体一致(Turchetto-Zolet等2011)。Chen等(2015)从油桐种子中克隆出*VfDGAT2*基因, 在酵母和拟南芥转化体中*VfDGAT2*表达水平与总脂肪酸含量增加呈正相关。

为进一步鉴定我们克隆到的*EIDGAT2*基因的功能, 本研究通过农杆菌介导侵染法使*EIDGAT2*基因在烟草叶片组织中瞬时表达。对转基因烟草叶片总油脂及其脂肪酸成分检测表明, *EIDGAT2*过表达显著促进烟叶总油脂积累, 且引起18:1、18:2和18:3等不饱和脂肪酸含量显著升高, 以及相应地减少16:0和18:0饱和脂肪酸的含量, 显示出*EIDGAT2*对油酸等不饱和脂肪酸有较高的底物选择性。

总之, 本研究从续随子发育种子中成功克隆到*EIDGAT2*基因, 且编码的酶蛋白具有较高的*DGAT*酶活性。异源表达显示, *EIDGAT2*可显著促进宿主组织总油脂合成以及油酸等不饱和脂肪酸的富集。本研究为深入解析续随子种子油脂合成以及富集油酸的分子调控机制提供了新见解, *EIDGAT2*基因未来可用于油料作物油脂产量及品质的基因工程改良。

参考文献(References)

- Ayerbe L, Tenorio JL, Ventas P, et al (1984). *Euphorbia lathyris* as an energy crop—Part 1. Vegetative matter and seed productivity. *Biomass*, 4 (4): 283–293
- Burgal J, Shockey J, Lu C, et al (2008). Metabolic engineering of hydroxy fatty acid production in plants: Rc*DGAT2* drives dramatic increases in ricinoleate levels in seed oil. *Plant Biotechnol J*, 6 (8): 819–831
- Calvin M (1979). Petroleum plantations for fuel and materials. *Bioscience*, 29 (9): 533–538
- Chen YC, Cui QQ, Xu YG, et al (2015). Effects of tung oilseed *FAD2* and *DGAT2* genes on unsaturated fatty acid accumulation in *Rhodotorula glutinis* and *Arabidopsis thaliana*. *Mol Genet Genomics*, 290 (4): 1605–1613
- Cui QQ (2013). Functional analysis of *Vernicia fordii* *FAD2* and *DGAT2* (dissertation). Beijing: Chinese Academy of Forestry (in Chinese with English abstract) [崔琴琴 (2013). 油桐*FAD2*与*DGAT2*基因的功能分析(学位论文). 北京: 中国林业科学研究院]

- Davidson KG, Bersten AD, Barr HA, et al (2000). Lung function, permeability, and surfactant composition in oleic acid-induced acute lung injury in rats. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 279 (6): 1091–1102
- Gao CY, Mao X, Shang HQ, et al (2018). Enhanced oil accumulation in tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) leaves by ectopic overexpression of *VgDGAT1a* for renewable production of biofuels. *Curr Sci*, 114 (6): 1234–1240
- Gong DY, Wang XM, Ou ZG, et al (2015). Research advance of energy oil plants *Euphorbia lathyris* L. and its development and utilization prospect. *Mod Agric Sci Technol*, 17: 226–227 (in Chinese with English abstract) [龚德勇, 王晓敏, 欧珍贵等(2015). 能源油料植物续随子研究进展及其开发利用前景. 现代农业科技, 17: 226–227]
- Hao JY, Zhou GH, Shao XM, et al (2016). Characterization and functional analysis of *DGAT2* gene family in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Mol Plant Breed*, 14 (9): 2343–2352 (in Chinese with English abstract) [郝敬云, 周广航, 邵雪梅等(2016). 莱茵衣藻*DGAT2*基因家族的鉴定与功能分析. 分子植物育种, 14 (9): 2343–2352]
- He XH, Turner C, Chen GQ, et al (2004). Cloning and characterization of a cDNA encoding diacylglycerol acyltransferase from castor bean. *Lipids*, 39 (4): 311–318
- Ji XJ, Mao X, Hao QT, et al (2018). Splice variants of the castor *WR11* gene upregulate fatty acid and oil biosynthesis when expressed in tobacco leaves. *Int J Mol Sci*, 19 (1): 146
- Lassner MW, Lardizabal K, Metz JG (1996). A jojoba β -ketoacyl-CoA synthase cDNA complements the canola fatty acid elongation mutation in transgenic plants. *Plant Cell*, 8 (2): 281–292
- Li CX (2013). Cloning of three candidate internal reference genes of *Euphorbia lathyris* and expression analysis of Na^+/H^+ antiporter in vacuolar membrane (dissertation). Nanjing: Nanjing Normal University (in Chinese with English abstract) [李春霞(2013). 续随子三个候选内参基因的克隆及液泡膜 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白的表达分析(学位论文). 南京: 南京师范大学]
- Liang Q, Li L, Zhou YL, et al (2017). Bioinformatics and expression analysis of *PfDGAT2* gene in *Perilla frutescens*. *Acta Agric Boreali Sin*, 32 (5): 86–90 (in Chinese with English abstract) [梁倩, 李璐, 周雅莉等(2017). 紫苏*PfDGAT2*基因生物信息学及表达特性分析. 华北农学报, 32 (5): 86–90]
- Liu C, Hong LZ, Wang MW, et al (2011). Progress of study on energy plant *Euphorbia lathyris* L. *Anhui Agric Sci Bull*, 17 (23): 119–120 (in Chinese with English abstract) [刘冲, 洪立洲, 王茂文等(2011). 能源植物续随子及其研究进展. 安徽农学通报, 17 (23): 119–120]
- Liu Q, Siloto RMP, Lehner R, et al (2012). Acyl-CoA: diacylglycerol acyltransferase: molecular biology, biochemistry and biotechnology. *Prog Lipid Res*, 51 (4): 350–377
- Liu YH, Zhang LJ, Zhang HR, et al (2011). Progress of research on $\Delta 12$ fatty acid desaturases and their coding genes. *Acta Pratacult Sin*, 20 (3): 256–267 (in Chinese with English abstract) [刘永红, 张丽静, 张洪荣等(2011). $\Delta 12$ -脂肪酸脱氢酶及其编码基因研究进展. 草业学报, 20 (3): 256–267]
- Meegalla RL, Billheimer JT, Cheng D (2002). Concerted elevation of acyl-coenzyme A: diacylglycerol acyltransferase (DGAT) activity through independent stimulation of mRNA expression of DGAT1 and DGAT2 by carbohydrate and insulin. *Biochem Biophys Res Commun*, 298 (3): 317–323
- Milcamps A, Tumaney AW, Paddock T, et al (2005). Isolation of a gene encoding a 1,2-diacylglycerol-*sn*-acetyl-CoA acetyltransferase from developing seeds of *Euonymus alatus*. *J Biol Chem*, 280 (7): 5370–5377
- Robertson RM, Yao J, Gajewski S, et al (2017). A two-helix motif positions the lysophosphatidic acid acyltransferase active site for catalysis within the membrane bilayer. *Nat Struct Mol Biol*, 24 (8): 666–671
- Rudkowska I, Roynette CE, Nakhasi DK, et al (2006). Phytosterols mixed with medium-chain triglycerides and high-oleic canola oil decrease plasma lipids in overweight men. *Metabolism*, 55 (3): 391–395
- Shockey JM, Gidda SK, Chapital DC, et al (2006). Tung tree DGAT1 and DGAT2 have nonredundant functions in triacylglycerol biosynthesis and are localized to different subdomains of the endoplasmic reticulum. *Plant Cell*, 18 (9): 2294–2313
- Turchetto-Zolet AC, Maraschin FS, de Moraes GL, et al (2011). Evolutionary view of acyl-CoA diacylglycerol acyltransferase (DGAT), a key enzyme in neutral lipid biosynthesis. *BMC Evol Biol*, 11 (1): 263
- Wang JP, Zhang LH, Zhao J, et al (2016). Regulation of controlling oil synthesis by fatty acid metabolism of perilla seed and key enzyme gene. *J Chin Cereal Oil Ass*, 31 (3): 91–95 (in Chinese with English abstract) [王计平, 张玲慧, 赵静等(2016). 紫苏种子脂肪酸代谢及关键酶基因调控油脂合成规律的研究. 中国粮油学报, 31 (3): 91–95]
- Wei WL, Jin MY, Ma C, et al (2007). Fatty acid composition analysis of *Euphorbia lathyris* L seed oil. *China Oils and Fats*, 32 (5): 70–71 (in Chinese with English abstract) [危文亮, 金梦阳, 马冲等(2007). 续随子油脂脂肪酸组成分析. 中国油脂, 32 (5): 70–71]
- Xu LN, Wang YD, Chen YC, et al (2011). Cloning of tung tree *DGAT2* gene and construction of RNAi binary expression vector with convergent promoters. *Fore Res*, 24 (5): 668–673 (in Chinese with English abstract) [徐玲娜, 汪

- 阳东, 陈益存等(2011). 油桐*DGAT2*基因克隆及其RNAi 二元表达载体构建. 林业科学研究, 24 (5): 668–673]
- Yuan B (2018). The research on the growth and development characteristics of *Euphorbia lathyris* and dynamic change of fatty acids in the seed (dissertation). Taigu, Shanxi: Shanxi Agricultural University (in Chinese with English abstract) [元博(2018). 续随子生长发育特性及其种子脂肪酸积累动态的研究(学位论文). 山西太谷: 山西农业大学]
- Yuan LX, Mao X, Gao CY, et al (2015). Seed-specific over-expression of a diacylglycerol acyltransferase 1 gene (*Vg-DGATI*) increase seed oil accumulation in *Camelina sativa*. Plant Physiology J, 51 (5): 668–678 (in Chinese with English abstract) [苑丽霞, 毛雪, 高昌勇等(2015). 种子特异表达二酰甘油酰基转移酶基因(*VgDGATI*)提高亚麻荠种子油脂积累. 植物生理学报, 51 (5): 668–678]
- Zhang WM, Shi JS, Gu GP (2007). Utilization of biomass energy and exploitation of energy plant. J Nanjing Normal Univ (Nat Sci Ed), 30 (3): 68–74 (in Chinese with English abstract) [张卫明, 史劲松, 顾龚平(2007). 生物质能的利用和能源植物的开发. 南京师范大学学报(自然科学版), 30 (3): 68–74]
- Zhou D (2012). Cloning and primary characterization genes of diacylglycerol acyltransferase (DGAT) in soybean (*Glycine max*) (dissertation). Nanjing: Nanjing Agricultural University (in Chinese with English abstract) [周丹(2012). 大豆二酰甘油酰基转移酶(DGAT)基因克隆及其功能的初步研究(学位论文). 南京: 南京农业大学]

Cloning and functional analysis of acyl-CoA: diacylglycerol acyltransferase 2 gene (*EIDGAT2*) in *Euphorbia lathyris*

REN Guo-Peng¹, GE Li-Ping^{1,3,*}, SUN Chao-Chao¹, LIU Bao-Ling², LI Run-Zhi^{2,*}

¹College of Forestry, Shanxi Agricultural University, Taigu, Shanxi 030801, China

²Institute of Molecular Agriculture and Bioenergy, Shanxi Agricultural University, Taigu, Shanxi 030801, China

³Shanxi Key Laboratory of Northern Functional Oil Tree Cultivation and Research, Taigu, Shanxi 030801, China

Abstract: In this study, a cDNA that encoding diacylglycerol acyltransferase 2 was isolated and cloned from the developing seed of *Euphorbia lathyris* (named *EIDGAT2*). The physicochemical properties, high-order structure, subcellular localization and phylogenetic tree of the *EIDGAT2* protein were analyzed by bioinformatics tools. The expression profile of *EIDGAT2* in different organs were investigated by qRT-PCR. A constitutive plant expression vector (pCambia1303-*EIDGAT2*) of *EIDGAT2* was constructed, and the function of the *EIDGAT2* was identified by agrobacterium-mediated transient expression in *Nicotiana benthamiana*. Results showed that the full-length *EIDGAT2* cDNA was 1 939 bp and the ORF was 984 bp, encoded 327 amino acids. The *EIDGAT2* protein was localized on the endoplasmic reticulum, secondary structure analysis indicated that the major structural elements were alpha-helix (37.00%) and random coil (34.25%). The phylogenetic tree based on DGAT2 protein showed that the *EIDGAT2* from *Euphorbia lathyris* had closer relationship with other DGAT2s from Euphorbiaceae, including *Ricinus communis*, *Vernicia fordii* and *Jatropha curcas*. Gene expression analysis showed that the *EIDGAT2* was expressed in different organs, and the expression in seeds was significantly higher than those in other organs. The highest expression level in the middle of seed development (30 d DAF), which was the period of rapid synthesis and accumulation of oil, and it reached 12.83 times than that of the leaf. Compared with the total oil contents of wild-type and empty vector transformed tobacco leaves, the total oil content of tobacco leaves expressed by *EIDGAT2* increased by 1.59%, the saturated fatty acids decreased, the oleic acid and unsaturated fatty acids increased. These results showed that *EIDGAT2* encodes a catalytically active DGAT2 enzyme protein, heterologous expression of *EIDGAT2* can increase the synthesis and accumulation of total lipids and unsaturated fatty acids in host organs, and *EIDGAT2* has substrate preference for unsaturated fatty acids such as oleic acid.

Key words: *Euphorbia lathyris*; DGAT2; gene cloning; expression profile; tobacco transient expression

Received 2019-01-29 Accepted 2019-07-22

This work was supported by the Natural Science Foundation of Shanxi Province (2010011039-1), the Education Department Project of Shanxi Province (J2018076), the Key Project of Coal-based Science and Technology of Shanxi Province (FT-2014-01), the Key Project of the Key Research and Development Program of Shanxi Province (201603D312005), and Shanxi Key Laboratory of Northern Functional Oil Tree Cultivation and Research (201805D111010).

*Co-corresponding authors: Ge LP (geliping@hotmail.com), Li RZ (rli2001@126.com).