



蒺藜苜蓿 *DGAT1* 基因的克隆和功能鉴定

徐荣华¹, 崔 涛¹, 王建才², 苗永美¹, 钱立生¹, 胡庆森¹

(1 安徽科技学院 生命科学学院, 安徽凤阳 233100; 2 山东省农业科学院畜牧兽医研究所, 济南 250100)

摘 要: 该研究采用 RT-PCR 与电子克隆的方法, 从蒺藜苜蓿 cDNA 中克隆得到 2 个编码二脂酰甘油酰基转移酶 (diacylglycerol acyltransferase, DGAT) 的基因 *MtDGAT1-1* 和 *MtDGAT1-2*。*MtDGAT1-1* 长 1 620 bp, 编码 539 个氨基酸; *MtDGAT1-2* 长 1 524 bp, 编码 507 个氨基酸。多序列比对显示, *MtDGAT1-1* 和 *MtDGAT1-2* 编码蛋白具有典型的植物 DGAT1 结构域。表达分析显示, *MtDGAT1-1* 和 *MtDGAT1-2* 在根、茎、叶、花、种子中都有表达, 在种子发育中高表达, 且 *MtDGAT1-1* 于种子发育的中前期高表达, 而 *MtDGAT1-2* 于种子发育的中后期高表达。酵母互补实验证实, *MtDGAT1-2* 编码蛋白具有 DGAT 酶活性, 能够恢复 H1246 的 TAG 合成和油体形成; 而 *MtDGAT1-1* 编码蛋白不能恢复 H1246 的 TAG 合成和油体形成。

关键词: 二脂酰甘油酰基转移酶; 三脂酰甘油; 蒺藜苜蓿; 油体

中图分类号: Q785; Q786; Q789

文献标志码: A

Cloning and Functional Characterization of Diacylglycerol Acyltransferase Gene (*MtDGAT1*) from *Medicago truncatula*

XU Ronghua¹, CUI Tao¹, WANG Jiancai², MIAO Yongmei¹, QIAN Lisheng¹, HU Qingsen¹

(1 College of Life Sciences, Anhui Science and Technology University, Fengyang, Anhui 233100, China; 2 Institute of Animal Husbandry and Veterinary Medicine, Shandong Academy of Agricultural Sciences, Jinan 250100, China)

Abstract: In this study, we acquired two *MtDGAT1* genes (*MtDGAT1-1* and *MtDGAT1-2*) from cDNA of *Medicago truncatula* by using insilico cloning combined with RT-PCR. The length of *MtDGAT1-1* is 1 620 bp, encoding 539 amino acids, while the length of *MtDGAT1-2* is 1 524 bp, encoding 507 amino acids. Multiple alignments revealed that both *MtDGAT1-1* and *MtDGAT1-2* shared the typical functional motifs with DGAT1s from other plant species. Expression analysis showed that both *MtDGAT1-1* and *MtDGAT1-2* were expressed in root, stem, leaf, flower and seed, and highly expressed in developing seeds; *MtDGAT1-1* was highly expressed in early-middle periods of seed development, while *MtDGAT1-2* was highly expressed in the middle and later periods of seed development. Functional complementation in yeast H1246 confirmed that *MtDGAT1-1* encodes disfunctional DGAT and *MtDGAT1-2* encodes functional DGAT.

Key words: diacylglycerol acyltransferase; triacylglycerol; *Medicago truncatula*; oil body

三脂酰甘油(triacylglycerol, TAG)是真核生物中储存能量和结构分子——脂肪酸(fatty acid, FA)的主要方式,也是油料作物种子油脂的主要成份,对于植物的生长、发育、繁衍具有重要的作用^[1],同时也是人类日常生活中的食物资源和化工原料^[2]。TAG的生物合成分为两步:FA的从头合成及TAG组装。FA的初始碳链合成和延长是在质体内进行的,以光合作用中间产物转化的乙酰辅酶A(acetyl-CoA)为底物,在一系列脂肪酸合成酶复合体(fatty acid synthase complex, FAS)的共同作用下催化完成的。TAG组装的胞内场所为内质网,以质体输出的FA(脂酰 ACP 或脂酰辅酶 A 的形式)为底物,以三磷酸甘油(glycerol-3-phosphate, G3P)为骨架,在甘油-3-磷酸酰基转移酶(sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase, GPAT)、溶血磷脂酸酰基转移酶(lysophosphatidic acid acyltransferase, LPAAT)、磷脂酸磷酸酶(phosphatidate phosphatase, PAP)和二脂酰甘油酰基转移酶(diacylglycerol acyltransferase, DGAT)的次序催化下合成的。TAG组装是 Kennedy 在 1961 年发现的,因此也被称为 Kennedy 途径^[3]。

DGAT 催化的反应是 TAG 合成的最后一步,因此被认为是 TAG 合成过程中的关键酶^[4]。目前已发现的 DGAT 分为 4 类:DGAT1、DGAT2、可溶性的 DGAT3 和双功能的 DGAT4^[5]。其中研究较多主要为 DGAT1 和 DGAT2,这两类 DGAT 在基因结构、编码蛋白、进化和酶学活性及特异性等方面都存在巨大差异^[5],然而关于 DGAT1 和 DGAT2 对于种子油含量和油成分的作用如何,目前尚未完全明确。目前研究表明在不含特殊 FA 的植物中 DGAT1 对于种子油含量贡献较大,而在含有特殊 FA 的植物中, DGAT2 对于种子中特殊 FA 的积累具有较大的贡献^[6]。

蒺藜苜蓿(*Medicago truncatula*)因倍性小(2n=16),基因组小(5×10⁸ bp),自花受粉及种子较多,再生时间较短,具有较高的遗传转化效率,有大量的突变体和多种生态型,具有较高的生物多样性等特点,被认为是豆科模式植物^[7-8],从蒺藜苜蓿获得的信息有助于其它豆科植物的研究。目前已从拟南芥、油菜、烟草、蓖麻、小桐子等多种植物中克隆和鉴定了 DGAT1,然而对于蒺藜苜蓿 DGAT1 基因的功能却未见报道。本课题以豆科模式植物蒺藜苜蓿 A17 为研究对象,通过克隆鉴定蒺藜苜蓿中编码 DGAT1 的基因,不仅有助于揭示 DGAT1 基因在

蒺藜苜蓿中对 TAG 合成的影响,同时可以进一步丰富植物 DGAT1 基因的理论研究,对于豆科植物基因发掘和种质创新具有重要意义。

1 材料和方法

1.1 实验材料

大肠杆菌 TOP10 和蒺藜苜蓿 A17 由本实验室保存。酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)突变株 H1246,由瑞典斯基的纳维亚生物技术研究中心的 Sten Stymne 教授赠送。

1.2 方法

1.2.1 RNA 提取和反转录 将-80℃冻存的材料(A17 的叶片)在液氮中研磨成粉,采用 Trizol 法^[6]进行总 RNA 提取, RNA 沉淀使用适量的 DEPC 水溶解,用 1% 甲醛变性琼脂糖胶电泳法^[6]对 RNA 进行质量检测,用分光光度法^[8]对 RNA 浓度进行估算。使用 PrimeScript™ RT-PCR 试剂盒(大连宝生物)进行反转录获得 cDNA 第一链。

1.2.2 MtDGAT1-1 和 MtDGAT1-2 基因克隆及序列分析 以 AtDGAT1(NP_179535)为探针搜索蒺藜苜蓿基因组网站(<http://www.jcvi.org/medicago/>)的蛋白质数据库,获得 Medtr2g039940 和 Medtr4g125980 的参考序列,分别命名为 MtDGAT1-1 和 MtDGAT1-2。基于参考序列设计 ORF 引物(表 1)。以 A17 的 cDNA 为模板进行 PCR 扩增, PCR 反应体系按照 Ex Taq(大连宝生物)说明配制。PCR 反应条件为:94℃预变性 2 min;94℃变性 30 s,55℃退火 30 s,72℃延伸 1 min,32 个循环;72℃补充延伸 7 min。扩增产物电泳检测后纯化,克隆到 pGM-T 载体(北京天根生化有限公司)并转化大肠杆菌 TOP10,通过蓝白斑筛选及菌液 PCR 鉴定阳性克隆后测序。引物合成由通用生物系统(安徽)有限公司完成,测序由生工生物工程(上海)

表 1 引物信息*
Table 1 Primer information*

引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence(5'→3')
MtDGAT1-1-KpnI	CGCGGGTACCATGGCAATTTCCGATACACCG
MtDGAT1-2-XhoI	CGCGCTCGAGTCAGTCAATTTACCTTTCTATT
MtDGAT1-1-KpnI	CGCGGGTACCATGGCGATTTCGACGACCTT
MtDGAT1-2-XhoI	CGCGCTCGAGTTAATCAAGTTTACTATTCTGTTC

注: * 划线碱基为 KpnI 或 XhoI 位点
Note: * The underlined bases encode restriction enzyme site of KpnI or XhoI

股份有限公司完成。

使用 ORF finder 对获得的 cDNA 序列进行开放阅读框分析;ProtParam 在线分析蛋白的理化性质;TMHMM 在线分析跨膜结构;MEGA 6.0 进行进化树构建^[6];Vector NTI 11 软件包的 AlignX 模块构建多序列比对^[6]。

1.2.3 表达模式分析和酵母表达载体构建及转化

苜蓿基因 *MtDGAT1-1* 和 *MtDGAT1-2* 表达模式的数据来自蒺藜苜蓿基因组 Nobel 网站的表达芯片数据^[8],使用 Excel 进行数据分析,使用 Origin 进行作图。

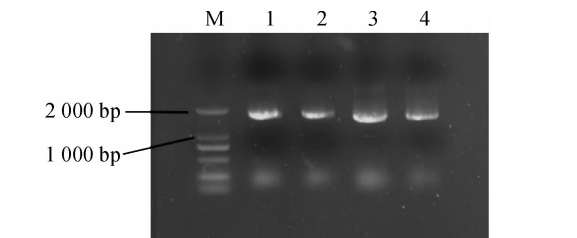
将所得 *MtDGAT1-1* 和 *MtDGAT1-2* 基因通过 *KpnI* 和 *XhoI*(Fermentas)双酶切克隆到酵母表达载体 pWXY3.1 上,分别构建酵母表达载体 pWXY3.1-*MtDGAT1-1* 和 pWXY3.1-*MtDGAT1-2*。按照醋酸锂-PEG 法^[6]转化酵母菌株 H1246,使用缺少尿嘧啶的合成培养基(synthetic minimal defined medium lacking uracil,SCU⁻)筛选阳性克隆,同时以空质粒 pWXY3.1 和含有酿酒酵母 *ScDGA1* 基因质粒 pWXY3.1-*ScDGA1* 做对照。在 SCU⁻ 平板培养基上 28 ℃ 生长 2~4 d,挑取酵母菌斑进行 PCR 验证。

1.2.4 转基因酵母油脂分析和油体观察 将转基因酵母接种 10 mL SCU⁻ 液体培养基(2%葡萄糖),250 r/min、30 ℃ 培养过夜,测 OD₆₀₀,离心收集菌体,用 SCU⁻ 液体培养基重悬菌体至 OD₆₀₀ 为 0.4,250 r/min、30 ℃ 重新开始培养。24 h 后,进行尼罗红染色观测酵母油体。84 h 后离心收集酵母细胞,使用酸热法破碎细胞,使用正己烷:异丙醇(3:2)法提取酵母油脂进行 TLC 分析和油脂百分含量测定。转基因酵母的油体观察、油脂抽提、TLC 层析按照参考文献^[3,6]记载的方法进行。

2 结果与分析

2.1 *MtDGAT1-1* 和 *MtDGAT1-2* 的克隆和序列分析

以蒺藜苜蓿野生型 A17 的叶片为材料进行 RNA



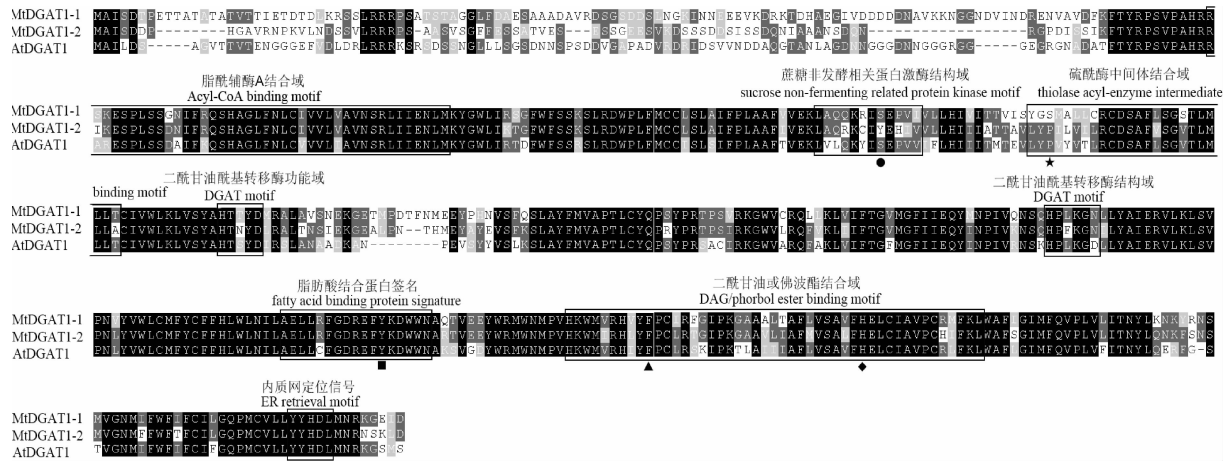
M. Marker 2501; 1~2. *MtDGAT1-1*; 3~4. *MtDGAT1-2*

图1 *MtDGAT1-1* 和 *MtDGAT1-2* 的克隆

Fig. 1 Amplification of *MtDGAT1-1* and *MtDGAT1-2*

抽提,反转录获得 cDNA,进行 *MtDGAT1-1* 和 *MtDGAT1-2* 基因克隆的 PCR 扩增,分别得到约 1.5 kb 目的条带(图 1),测序结果与预期序列完全一致。*MtDGAT1-1* 开放阅读框为 1 620 bp,编码蛋白长度为 539 个氨基酸,预测分子量为 61.6 kD,理论等电点为 8.27。*MtDGAT1-2* 开放阅读框为 1 524 bp,编码蛋白长度 507 个氨基酸,预测分子量为 58.4 kD,理论等电点为 9.00。*MtDGAT1-1* 和 *MtDGAT1-2* 在 cDNA 水平的序列相似性为 70.5%,在蛋白质水平的序列相似性为 73.5%。

BlastP 结果显示 *MtDGAT1-1* 和 *MtDGAT1-2* 均与其他植物 DGAT1 高度同源,与 *GmDGAT1* (AAS78662)相似性分别为 78.3%(*MtDGAT1-1*)和 79.2%(*MtDGAT1-2*),与 *LjDGAT1* (AAW51456)的相似性分别为 70.9%(*MtDGAT1-1*)和 78.4%(*MtDGAT1-2*),与 *RcDGAT1* (AAR11479)的相似性分别为 65.4%(*MtDGAT1-1*)和 75.4%(*MtDGAT1-2*)。跨膜结构预测结果显示 *MtDGAT1-1* 和 *MtDGAT1-2* 均含有 9 个跨膜结构域,推测 *MtDGAT1-1* 和 *MtDGAT1-2* 属于膜蛋白。将 *MtDGAT1-1* 和 *MtDGAT1-2* 与 *AtDGAT1* 进行多序列比对分析,发现 *MtDGAT1-1* 和 *MtDGAT1-2* 具有典型的植物 DGAT 结构域,*MtDGAT1-1*、*MtDGAT1-2* 和 *AtDGAT1* 的序列差异主要表现在 N 端,而 C 端区域和中间区域的氨基酸序列则相对保守(图 2)。比较 *MtDGAT1-1* 和 *MtDGAT1-2* 的序列,可以发现 *MtDGAT1-1* 相对 *MtDGAT1-2* 在两处出现较大的插入,一是 *MtDGAT1-2* 的 Q74 和 N75 之间插入 KTDHAEGIVDDDDDDNAVKK,二是 S81 和 S82 之间插入 NDRENVVA 片段,推测这两处插入可能与 *MtDGAT1-1* 和 *MtDGAT1-2* 在蒺藜苜蓿中的功能分化相关。同时发现 *MtDGAT1-1* 和 *MtDGAT1-2* 均存在植物 DGAT1 中已知的结构域^[6]:(1)脂酰辅酶 A 结合域(acyl-CoA binding motif);(2)蔗糖非发酵相关蛋白激酶结构域(sucrose non-fermenting related protein kinase motif);(3)硫酰酶中间体结合域(thiolase acyl-enzyme intermediate-binding motif);(4)DGAT 结构域;(5)脂肪酸结合域(fatty acid binding protein signature);(6)二酰甘油或佛波酯结合域(DAG/phorbol ester binding motif);(7)内质网定位信号(ER retrieval motif)。在 *MtDGAT1-1* 和 *MtDGAT1-2* 的 C 端均发现的内质网定位信号遵循-Φ-X-X-K/R/D/E-Φ-COOH 的规则^[6]。系统进化分析(图 3)显示,

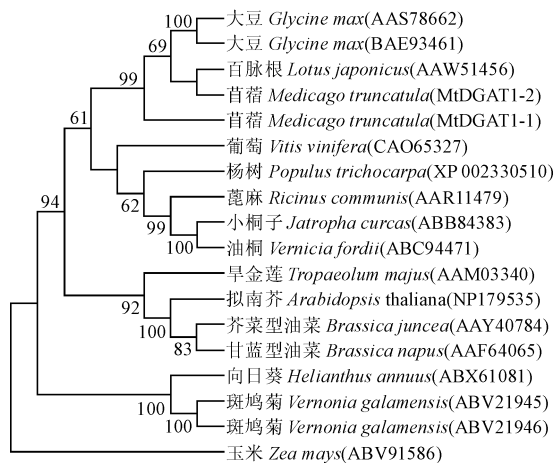


同源氨基酸残基以黑色背景显示,相似的氨基酸残基以灰色显示。脂酰辅酶 A 结合域、SnRK1 蛋白激酶结构域、硫酰酶中间结合域、DGAT 功能域、脂肪酸结合蛋白签名、DAG 或佛波酯结合域和内质网定位信号分别使用蓝色方框标出。关键的丝氨酸、脯氨酸、酪氨酸、苯丙氨酸和组氨酸分别以●、★、■、▲和◆标出。AtDGAT1. 拟南芥 DGAT1

图 2 *MtDGAT1*-1 编码蛋白、*MtDGAT1*-2 编码蛋白和 *AtDGAT1* 的多序列比对

Identical residues are shaded black, and similar residues are shaded grey. Conserved motifs or putative signatures are blue boxed, such as the acyl-CoA binding motif, sucrose non-fermenting related protein kinase motif, thiolase acyl-enzyme intermediate-binding motif, DGAT motif, fatty acid binding protein signature, DAG/phorbol ester binding motif, and ER retrieval motif. Critical serine, proline, tyrosine, phenylalanine and histidine were marked by ●, ★, ■, ▲ and ◆, respectively. *AtDGAT1*. *Arabidopsis thaliana* DGAT1

Fig. 2 Multiple sequence alignment of deduced amino acid sequences of *MtDGAT1*-1, *MtDGAT1*-2 with *AtDGAT1*



括号内为氨基酸登录号;分支上的数字为 Bootstrap 验证中基于 1 000 次重复该节点的可信度的百分比

图 3 *MtDGAT1*-1 和 *MtDGAT1*-2 与其他植物 DGAT1 的进化树分析

The accession No. was given in bracket; The numbers on the branches represent the reliability percent of bootstrap values based on 1 000 replications

Fig. 3 Phylogenetic relationships of *MtDGAT1*-1, *MtDGAT1*-2 with other plant DGAT1s

双子叶植物的 DGAT1 聚为一支,单子叶植物 DGAT1 聚为一支,*MtDGAT1*-1 和 *MtDGAT1*-2 与同属豆科植物中大豆的 *GmDGAT1* 以及百脉根 *LjDGAT1* 聚在一起。

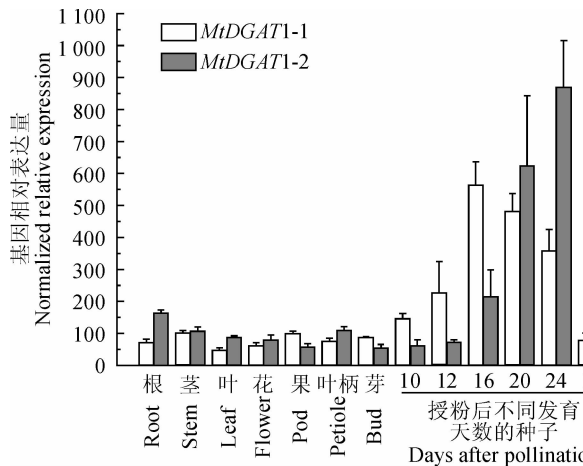


图 4 *MtDGAT1*-1 和 *MtDGAT1*-2 基因的表达模式

Fig. 4 Expression pattern of *MtDGAT1*-1 and *MtDGAT1*-2

2.2 *MtDGAT1*-1 和 *MtDGAT1*-2 基因的表达分析

以 Nobel 网站的基因芯片数据为基础,构建了 *MtDGAT1*-1 和 *MtDGAT1*-2 基因的表达模式(图 4),图 4 显示 *MtDGAT1*-1 和 *MtDGAT1*-2 在蒺藜苜蓿的根、茎、叶、花和种子等组织中均有表达, *MtDGAT1*-1 和 *MtDGAT1*-2 在花、芽和茎中的表达差异不大。在根和叶中, *MtDGAT1*-2 表达量高于 *MtDGAT1*-1 的表达量, *MtDGAT1*-2 的表达量分别是 *MtDGAT1*-1 的 2.3 和 1.8 倍。在果中, *MtDGAT1*-2 表达量低于 *MtDGAT1*-1 的表达量,

MtDGAT1-2 是 *MtDGAT1-1* 表达量的 0.59 倍。在种子中 *MtDGAT1-1* 和 *MtDGAT1-2* 的表达存在明显差异。*MtDGAT1-1* 在苜蓿种子发育中呈现单峰表达模式,即在种子发育初期(10~12 d)表达量较低,随着种子的发育表达量逐渐增高,在 16 d 时达到最高,随后逐渐降低,36 d 时降到最低,约为其第 10 天表达量的 0.5 倍。*MtDGAT1-2* 在苜蓿种子发育中也呈现单峰的表达模式,也随着种子的发育表达量逐渐增高,在 24 d 时达到最高,在 36 d 时仍维持着很高的表达量,约为其第 10 天表达量的 7.5 倍。

2.3 酿酒酵母表达载体构建和互补实验

为证实 *MtDGAT1-1* 和 *MtDGAT1-2* 编码蛋白具有 DGAT 酶功能,使用酵母突变体 H1246 进行互补实验,该突变体中负责中性油脂 TAG 和固醇酯合成的基因都被敲除,因此 H1246 既不能合成 TAG,也不能形成油体^[3]。通过 *KpnI* 和 *XhoI* 双酶切和连接的方法将 *MtDGAT1-1* 和 *MtDGAT1-2*

插入酵母表达载体 pWXY3.1,置于 TEF1 启动子的下游和 CYC1 终止子的上游,菌落 PCR 的结果(图 5)证实酵母表达载体 pWXY3.1-*MtDGAT1-1* 和 pWXY3.1-*MtDGAT1-2* 已经构建成功。抽提质粒后使用醋酸锂-PEG 的方法将重组质粒导入 H1246,同时以空质粒转化为阴性对照,以转化酿酒酵母 *ScDGA1* 为阳性对照挑取 SCU⁻ 平板上阳性克隆进行扩大培养,提取油脂进行 TLC 层析和碘显色,结果显示转化空质粒的阴性对照中 TAG 条带处无斑点出现,转化阳性对照 *ScDGA1* 的处理中可以检测到 TAG 斑点,转化 *MtDGAT1-1* 的处理中不能检测到 TAG 斑点,转化 *MtDGAT1-2* 的处理中可以检测到 TAG 斑点(图 6, A),这说明 *MtDGAT1-2* 的表达恢复 H1246 合成 TAG 的能力,而 *MtDGAT1-1* 不能恢复。随后对转基因酵母进行尼罗红染色,结果表明 *MtDGAT1-1* 编码蛋白不能互补 H1246 的油体缺陷表型,而 *MtDGAT1-2* 的表达则可以互补 H1246 的油体缺陷表型(图 6, B)。

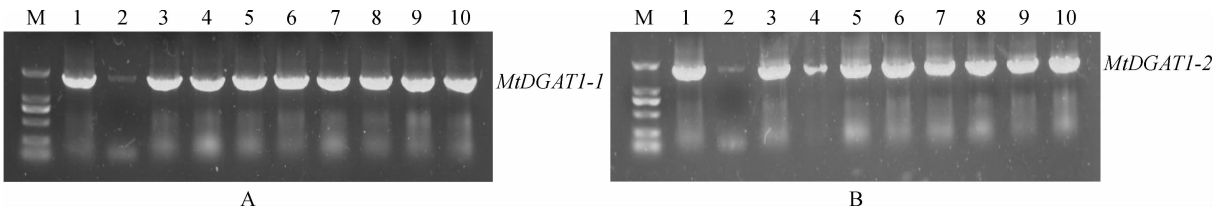
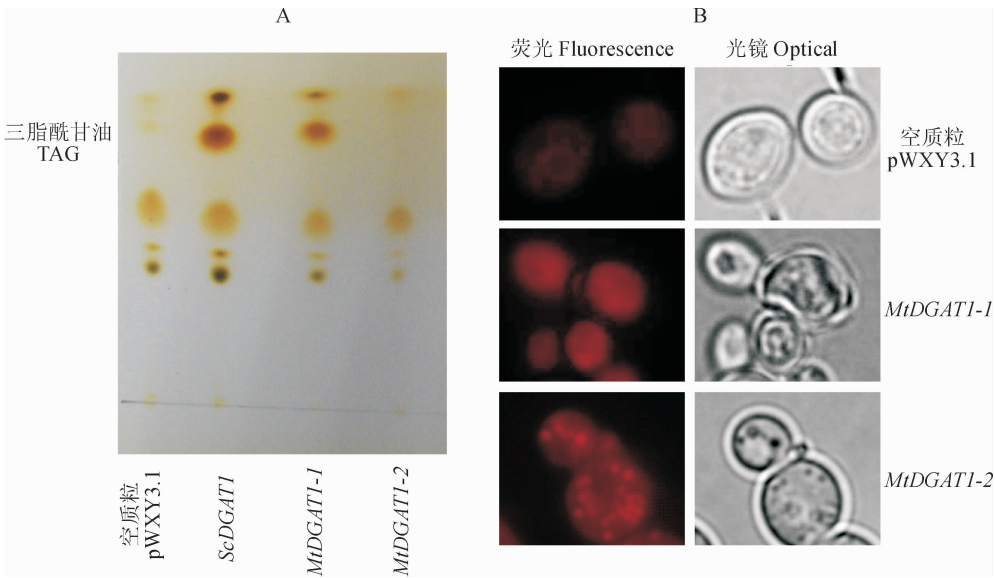


图 5 pWXY3.1-*MtDGAT1-1* 和 pWXY3.1-*MtDGAT1-2* 的菌落 PCR 结果
Fig. 5 Colonies PCR analysis of pWXY3.1-*MtDGAT1-1* and pWXY3.1-*MtDGAT1-2*



ScDGA1 编码酿酒酵母内源的 DGAT2
图 6 转基因酵母油脂的 TLC 层析(A)和油体观察(B)
ScDGA1 encoding endogenous DGAT2 of *Saccharomyces cerevisiae*
Fig. 6 TLC analysis (A) and oil body (B) of transgenic yeasts

3 讨论

研究表明在牲畜快速生长时添加高油饲料(如高油玉米)能显著改善牲畜的生产性能以及畜产品的品质^[9]。紫花苜蓿被誉为牧草之王,在世界各国广泛种植,然而其叶片几乎不含油脂,严重限制了紫花苜蓿作为高油饲料的应用。植物通常不在叶片中积累 TAG,但是近年来的研究表明在烟草叶片中异位表达拟南芥 *AtDGAT1*、*AtWRI1* 和 *AtOLE1* 可以使得叶片积累干重 30% 的油脂^[10]。研究也表明模式植物拟南芥的研究结果在紫花苜蓿中并不适用,如在苜蓿中异位表达调控花青素代谢途径的转录因子 *AtPAP1* 不能导致苜蓿叶片中花青素的积累,而异位表达苜蓿中 *AtPAP1* 的同系物 *MtLAP1* 则可以导致苜蓿叶片中大量积累花青素^[8],暗示拟南芥和苜蓿中的代谢调控机制的细节并不相同。理解苜蓿 TAG 合成和积累的分子机制是使用基因工程技术发展高油牧草的前提。然而紫花苜蓿是四倍体,基因组复杂,难以操作^[7-8]。而蒺藜苜蓿是二倍体,且与紫花苜蓿的亲缘关系较近,基于蒺藜苜蓿的研究可以直接推广到紫花苜蓿上面。

本研究从蒺藜苜蓿中克隆得到 2 个编码 DGAT1 的基因 *MtDGAT1-1* 和 *MtDGAT1-2*,并对其功能进行了初步的分析和鉴定。前人研究表明疏解酰基酶结合域中存在一个重要的脯氨酸残基,在玉米中此脯氨酸残基的缺失可使得 DGAT 酶活性下降 50%,异位表达带有此脯氨酸残基的玉米 *DGAT1* 可使得玉米种子中油含量增加 41%,油酸含量增加 107%^[11],*MtDGAT1-1* 在此位置氨基酸残基为丝氨酸,而 *MtDGAT1-2* 在此位置则为脯氨酸,暗示 *MtDGAT1-2* 具有 DGAT 酶活性,而 *MtDGAT1-1* 可能没有 DGAT 酶活性。使用酵母突变株 H1246 对 *MtDGAT1-1* 和 *MtDGAT1-2* 进行功能互补验证,TLC 分析和尼罗红染色的结果都显示异源表达 *MtDGAT1-2* 可以恢复 H1246 的 TAG 合成和油体形成,暗示 *MtDGAT1-2* 具有 DGAT 酶活,而 *MtDGAT1-1* 不能恢复 H1246 的 TAG 合成和油体形成,暗示 *MtDGAT1-1* 可能不具有 DGAT 酶活。*AtDGAT2* 曾一度被认为是编码无功能的 DGAT 酶,因为 *AtDGAT2* 不能互补 H1246,而且拟南芥中 *AtDGAT2* 的突变没有产生影响种子油含量和成分改变的表型,然而后续的研究表明对 *AtDGAT2* 进行酵母密码子优化表达则可以使得 *AtDGAT2* 互补 H1246^[12],在烟草叶片中瞬

时表达的结果也证实 *AtDGAT2* 能够催化合成 TAG,但具有脂酰基辅酶 A 底物的依赖性^[13],因此推断 *AtDGAT2* 不易互补 H1246 的原因在于植物和酵母密码子偏爱的差异以及酵母中没有合适的底物。据此同样可以推断 *MtDGAT1-1* 不能互补 H1246 也可能是因为密码偏爱性和酵母中不存在 *MtDGAT1-1* 偏爱的脂酰基辅酶 A 底物,因此是否 *MtDGAT1-1* 为无功能的 DGAT,仍需进一步的实验证实。

先前的研究发现在多数二倍体物种 *DGAT1* 通常为单一拷贝,如拟南芥、蓖麻、小桐子等植物^[6],目前仅在斑鸠菊中发现 2 个 *DGAT1*,分别为 *Vg-DGAT1a* 和 *VgDGAT1b*,二者在核苷酸水平的相似性为 92%,蛋白质水平的相似性为 94%^[14],远高于本研究克隆的 *MtDGAT1-1* 和 *M12* 在核苷酸和蛋白质水平的相似性,暗示 *VgDGAT1a* 和 *Vg-DGAT1b* 是属于斑鸠菊内部的基因进化事件的结果。进化树研究中,*MtDGAT1-2* 与 *GmDGAT1* 和 *LjDGAT1* 聚在一起,而 *MtDGAT1-1* 单独一枝,说明 *MtDGAT1-1* 与 *MtDGAT1-2* 形成的分歧要早于豆科物种内部分化开始之前,这也表明 *MtDGAT1-1* 与 *MtDGAT1-2* 不是简单的基因复制关系。为何在蒺藜苜蓿中出现 2 个序列差异如此之大的 *DGAT1* 基因,需要进一步研究。

对早金莲和小桐子中的 *DGAT1* 基因时空表达研究发现 *DGAT1* 在根、茎、叶、花、种子中都可以检测到表达,在种子中的表达量显著高于其他组织,而且表达丰度的变化与种子中油脂积累的曲线变化正相关^[6,11]。本研究中 *MtDGAT1-1* 和 *MtDGAT1-2* 表达与早金莲和小桐子中 *DGAT1* 的研究相一致,说明 *MtDGAT1-1* 和 *MtDGAT1-2* 与苜蓿中油脂的积累相关。在发育的初期,*MtDGAT1-1* 的表达明显高于 *MtDGAT1-2* 的表达,*MtDGAT1-1* 的表达高峰(16 d)也比 *MtDGAT1-2*(24 d)出现早,在种子接近成熟的 36 d,*MtDGAT1-1* 的表达已经降到与叶片中水平类似的时候,*MtDGAT1-2* 的表达水平仍然很高,推测 *MtDGAT1-1* 和 *MtDGAT1-2* 在苜蓿种子发育中都起作用,*MtDGAT1-1* 发挥作用的时段主要为中前期,可能与种子的胚发育和成熟有关,而 *MtDGAT1-2* 发挥作用则主要为中后期,可能与子叶中油脂的积累相关。

综上所述,本研究首次从蒺藜苜蓿 cDNA 中克隆得到 2 个编码 DGAT1 的基因 *MtDGAT1-1* 和 *MtDGAT1-1*,发现 *MtDGAT1-1* 和 *MtDGAT1-2*

在根、茎、叶、花、种子中都有表达,在种子发育中期表达量最高,同时也发现 *MtDGAT1-1* 高表达种子发育的中前期,而 *MtDGAT1-2* 则高表达于种子发育的中后期。酵母互补实验证实 *MtDGAT1-2* 编码蛋白具有 DGAT 酶活性,能够恢复 H1246 的 TAG 合成和油体形成;而 *MtDGAT1-1* 编码蛋白

不能够恢复 H1246 的 TAG 合成和油体形成。考虑到酵母互补系统没有能够成功检测到 *MtDGAT1-1* 编码蛋白的活性,本实验室下一步拟采用烟草瞬时表达系统来测试 *MtDGAT1-1* 和 *MtDGAT1-2* 的功能,从而探讨 *MtDGAT1-1* 和 *MtDGAT1-2* 对于 TAG 合成和 FA 成份的限制作用。

参考文献:

[1] YEN C L, STONE S J, KOLIWAD S, *et al.* Thematic Review Series: Glycerolipids. DGAT enzymes and triacylglycerol biosynthesis[J]. *Journal of Lipid Research*, 2008, **49**(11): 2 283-2 301.

[2] 王安可,孙英超,何秋伶,等. 植物 I 型二酰甘油酰基转移酶研究进展[J]. 中国油料作物学报, 2014, **36**(2): 281-288.
WANG A K, SUN Y C, HE Q L, *et al.* Recent advances in research of type I diacylglycerol acyltransferase in plants[J]. *Chinese Journal of Oil Crop Sciences*, 2014, **36**(2): 281-288.

[3] 阳天泉,徐荣华,刘爱忠. 烟草二脂酰甘油酰基转移酶基因(*NtDGAT2*)的克隆与功能分析[J]. 植物生理学报, 2013, **49**(1): 81-88.
YANG T Q, XU R H, LIU A Z. Cloning and characterization of diacylglycerol acyltransferase gene (*NtDGAT2*) from tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) [J]. *Plant Physiology Journal*, 2013, **49**(1): 81-88.

[4] LUNG S C, WESELAKE R J. Diacylglycerol acyltransferase: A key mediator of plant triacylglycerol synthesis[J]. *Lipids*, 2006, **41**(12): 1 073-1 088.

[5] 唐桂英,柳展基,单雷. 二酰基甘油酰基转移酶(DGAT)研究进展[J]. 中国油料作物学报, 2010, **32**(2): 320-328.
TANG G Y, LIU Z J, SHAN L. Progress of diacylglycerol acyltransferase (DGAT) study[J]. *Chinese Journal of Oil Crop Sciences*, 2010, **32**(2): 320-328.

[6] XU R H, YANG T Q, WANG R L, *et al.* Characterisation of *DGAT1* and *DGAT2* from *Jatropha curcas* and their functions in storage lipid biosynthesis[J]. *Functional Plant Biology*, 2014, **41**(3): 321-329.

[7] 魏臻武,盖钧镒. 豆科模式植物——蒺藜苜蓿[J]. 草业学报, 2008, **17**(1): 114-120.
WEI Z W, GAI J Y. Model legume: *Medicago truncatula* [J]. *Acta Prataculturae Sinica*, 2008, **17**(1): 114-120.

[8] PEEL G J, PANG Y, MODOLO L V, *et al.* The LAP1 MYB transcription factor orchestrates anthocyanidin biosynthesis and glycosylation in *Medicago* [J]. *The Plant Journal*, 2009, **59**(1): 136-149.

[9] 马延华,李德全,李绥艳,等. 高油玉米的饲用价值及在畜牧业中的应用前景[J]. 黑龙江农业科学, 2005,(1): 1-3.
MA Y H, LI D Q, LI S Y, *et al.* The high oil corn's feeding value and the practical prospect in livestock agriculture[J]. *Heilongjiang Agricultural Sciences*, 2005,(1): 1-3.

[10] VANHERCKE T, TAHCHY A E, LIU Q, *et al.* Metabolic engineering of biomass for high energy density: Oilseed-like triacylglycerol yields from plant leaves[J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2014, **12**(2): 231-239.

[11] ZHENG P, ALLEN WB, ROESLER K, *et al.* A phenylalanine in DGAT is a key determinant of oil content and composition in maize[J]. *Nature Genetics* 2008, **40**(3):367-372.

[12] AYME L, BAUD S, DUBREUCQ B, *et al.* Function and localization of the *Arabidopsis thaliana* diacylglycerol acyltransferase DGAT2 expressed in yeast[J]. *PLoS One*, 2014, **9**(3): e92237.

[13] ZHOU X R, SHRESTHA P, YIN F, *et al.* AtDGAT2 is a functional acyl-CoA: diacylglycerol acyltransferase and displays different acyl-CoA substrate preferences than AtDGAT1[J]. *FEBS Letters*, 2013, **587**(15): 2 371-2 376.

[14] YU K, LI R, HATANAKA T, *et al.* Cloning and functional analysis of two type 1 diacylglycerol acyltransferases from *Vernonia galamensis* [J]. *Phytochemistry*, 2008, **69**(5): 1 119-1 127.

(编辑:宋亚珍)