

引用格式:

胡蓉,汪慧慧,刘勇,熊兴华.甘蓝型油菜 *BnaLPAT2* 基因在拟南芥中的种子特异性表达及过表达分析[J].湖南农业大学学报(自然科学版), 2021, 47(1): 17–22.

HU R, WANG H H, LIU Y, XIONG X H. Analysis of seed-specific expression and overexpression of *BnaLPAT2* gene in *Arabidopsis thaliana*[J]. Journal of Hunan Agricultural University(Natural Sciences), 2021, 47(1): 17–22.

投稿网址: <http://xb.hunau.edu.cn>



## 甘蓝型油菜 *BnaLPAT2* 基因在拟南芥中的种子特异性表达及过表达分析

胡蓉<sup>1,2</sup>, 汪慧慧<sup>1,2</sup>, 刘勇<sup>1,2</sup>, 熊兴华<sup>1,2\*</sup>

(1.湖南农业大学农学院, 湖南 长沙 410128; 2.作物基因工程湖南省重点实验室, 湖南 长沙 410128)

**摘要:**以植物双元表达载体 pBI121 为骨架, 将其改造成 *BnaLPAT2* 的过表达载体(p35S-*BnaLPAT2*)和种子特异性表达载体(pNapin-*BnaLPAT2*)。采用冻融法将重组质粒分别转入农杆菌感受态细胞(GV3101)中, 通过农杆菌介导法转化拟南芥, 分别获得阳性植株。对转基因植株种子的脂肪酸成分进行分析, 结果表明: 与野生型拟南芥相比, p35S-*BnaLPAT2* 表达的后代植株种子油酸(C18 1)相对含量降低了 1.3, 亚麻酸(C18 3)相对含量提高了 3.2, 亚油酸(C18 2)相对含量降低了 0.7; pNapin-*BnaLPAT2* 表达的后代植株种子油酸相对含量降低了 1.29, 亚麻酸相对含量提高了 2.73, 亚油酸相对含量提高了 1.04, 推测 *BnaLPAT2* 对亚麻酸的亲和力高于对亚油酸和油酸的亲和力。

**关键词:**甘蓝型油菜; 拟南芥; *BnaLPAT2* 基因; 过表达载体; 脂肪酸

中图分类号: S565.4; Q786

文献标志码: A

文章编号: 1007-1032(2021)01-0017-06

### Analysis of seed-specific expression and overexpression of *BnaLPAT2* gene in *Arabidopsis thaliana*

HU Rong<sup>1,2</sup>, WANG Huihui<sup>1,2</sup>, LIU Yong<sup>1,2</sup>, XIONG Xinghua<sup>1,2\*</sup>

(1.College of Agronomy, Hunan Agricultural University, Changsha, Hunan 410128, China; 2.Crop Gene Engineering Key Laboratory of Hunan Province, Changsha, Hunan 410128, China)

**Abstract:** In this study, the plant binary expression vector pBI121 served as the backbone to transform into the *BnaLPAT2* overexpression vector (p35S-*BnaLPAT2*) and the seed-specific expression vector (pNapin-*BnaLPAT2*) by use of freeze-thaw transform method. Analysis of the fatty acids in the seeds of the transgenic plants showed that, compared to wild-type *Arabidopsis thaliana*, the relative content of seeds oleic acid of progeny plants expressing p35S-*BnaLPAT2* decreased by 1.3 and the relative content of linolenic acid (C18 3) increased by 3.2. The relative content of linoleic acid (C18 2) was reduced by 0.7; the relative content of seeds oleic acid of progeny plants expressed by pNapin-*BnaLPAT2* decreased by 1.29, the relative content of linolenic acid increased by 2.73, and the relative content of linoleic acid increased by 1.04. *BnaLPAT2* has a higher affinity for linolenic acid than linoleic acid and oleic acid.

**Keywords:** *Brassica napus*; *Arabidopsis thaliana*; *BnaLPAT2* gene; overexpression vector; fatty acid

三酰甘油合成过程是油菜油脂合成的重要步骤之一<sup>[1]</sup>。三酰甘油合成过程中, 以甘油三磷酸

(glycerol-3-phosphate, G3P)和酰基辅酶 A(acyl-CoA)为底物, 在甘油-3-磷酸酰基转移酶(sn-

收稿日期: 2019-12-09

修回日期: 2020-01-03

基金项目: 农业农村部转基因重大专项(SQ2018ZD080068); 国家重点研发计划项目(2017YFD0101703); 湖南省研究生科研创新项目(CX2018B428)

作者简介: 胡蓉(1997—), 女, 湖南湘潭人, 硕士研究生, 主要从事油菜分子生物学研究, 2211895513@qq.com; \*通信作者, 熊兴华, 博士, 副研究员, 主要从事油菜分子生物学及基因工程研究, ndxiongenc@yahoo.com

glycerol-3-phosphate acyltransferase, GPAT)<sup>[2-3]</sup>、溶血磷脂酸酰基转移酶(lysophospholipid acyltransferase, LPAT 或 LPAAT)<sup>[4-5]</sup>、磷脂酸磷酸酶(phosphatidate phosphatase, PAP)<sup>[6]</sup>、二酰甘油酰基转移酶(diacylglycerol acyltransferase, DGAT)<sup>[7-8]</sup>等多种酶的作用下生成三酰甘油(triacylglycerol, TAG)。在该油脂合成过程中,溶血磷脂酸酰基转移酶是关键酶之一。

CHEN 等<sup>[9]</sup>研究表明,花生 LPAT 基因转录水平与花生种子的含油量有关,在种子不同的发育阶段,高油花生种子中 LPAT 基因的转录水平比低油品种的高。ZOU 等<sup>[10]</sup>将酵母中克隆得到的 LPAAT 基因转入甘蓝型油菜中,得到的转基因油菜种子含油量显著提高。MAISONNEUVE 等<sup>[11]</sup>将甘蓝型油菜 *BnaLPAT* 基因转入拟南芥中过表达,发现转基因株系种子的含油量显著提高。张军平等<sup>[12]</sup>发现 LPAAT 基因在酵母中的表达不仅提高了脂肪酸的含量,还能够有选择性地在不饱和脂肪酸结合到甘油三酯中。陈四龙<sup>[13]</sup>的研究表明,溶血磷脂酸酰基转移酶的表达量与种子含油量的积累变化一致。在拟南芥数据库中,已有 5 个拟南芥 *AtLPAT* (*AtLPAT1*、*AtLPAT2*、*AtLPAT3*、*AtLPAT4*、*AtLPAT5*)获得注释,其中,*AtLPAT1*、*AtLPAT2*、*AtLPAT3* 与植物正常发育相关。

目前许多基因的功能需要通过转基因手段来验证<sup>[14]</sup>。本研究中,对 *BnaLPAT2* 基因构建过表达载体和种子特异性表达载体,将构建好的表达载体转入拟南芥中并检测分析其转基因植株的脂肪酸含量,以期为进一步研究甘蓝型油菜 *BnaLPAT2* 基因的功能提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

供试野生型拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)为哥伦比亚型(Columbia)。野生型拟南芥、农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)GV3101 菌株与植物表达载体 pBI121 均由湖南农业大学作物基因工程重点实验室保存。

限制性内切酶 *Sac* I、*Hind* III、*Bam*H I、DNA Marker、*T*<sub>4</sub> DNA 连接酶、抗生素等购自北京全式金生物技术有限公司;琼脂糖购自博日科技有限公司;

pUCm-T 克隆载体、DNA 质粒提取试剂盒、DNA 胶回收试剂盒等购自上海生工生物技术有限公司;引物合成和测序由擎科生物技术有限公司完成。

拟南芥浸染缓冲液:大量元素 5 mL/(100 mL);微量元素 1 mL/(100 mL);铁盐 1 mL/(100 mL);蔗糖 3 g/(100 mL),Silwet-77 为 30  $\mu$ L。定容至 100 mL。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 构建 p35S-BnaLPAT2 过表达载体

在甘蓝型油菜 *BnaLPAT2-A04* 基因克隆的上游引物的 5' 添加 *Bam*H I (GGATCC)限制性内切酶和保护碱基(CG),即 *BnaLPAT2-A04-F*, (CGGGA TCC)GTCGTTGATTCATCCCTGTC;下游引物 5' 添加 *Sac* I (GAGCTC)限制性内切酶和保护碱基(C),即 *BnaLPAT2-A04-R* (CGAGCTC)AGCTTCTT GTTGATGATGTCG,以携带目的基因的 T 载体为模板,用上述引物进行 PCR 扩增。PCR 反应体系:DNA 模板 1  $\mu$ L、2.5 mmol/L dNTP 2  $\mu$ L、10 $\times$ Buffer 2  $\mu$ L、*Taq* 酶 0.5  $\mu$ L、*BnaLPAT2-F/BnaLPAT2-R* 各 0.75  $\mu$ L、ddH<sub>2</sub>O 13  $\mu$ L。PCR 反应程序:94  $^{\circ}$ C 预变性 3 min;94  $^{\circ}$ C 变性 45 s,54  $^{\circ}$ C 退火 45 s,72  $^{\circ}$ C 延伸 90 s,35 个循环;72  $^{\circ}$ C 延伸 10 min。随后将 PCR 反应产物在 1%的琼脂糖凝胶中电泳检测,回收目的片段。用 *Bam*H I 和 *Sac* I 对目的片段和 pBI121 载体分别进行双酶切,酶切体系(50  $\mu$ L):DNA 10  $\mu$ L、10 $\times$ Buffer FD 5  $\mu$ L、*Bam*H I 2  $\mu$ L、*Sac* I 2  $\mu$ L、ddH<sub>2</sub>O 31  $\mu$ L。37  $^{\circ}$ C 反应 3 h。反应结束后进行琼脂糖凝胶检测并胶回收备用。将胶回收后的目的基因和表达载体 pBI121 进行连接反应,使目的基因替换原载体上的 *GUS* 基因,构建 p35S-BnaLPAT2 过表达载体。连接体系(10  $\mu$ L):insert DNA 3  $\mu$ L、pBI121 DNA 1  $\mu$ L、*T*<sub>4</sub> DNA 连接酶 0.5  $\mu$ L、10 $\times$ Buffer 1  $\mu$ L、ddH<sub>2</sub>O 4.5  $\mu$ L。16  $^{\circ}$ C 连接过夜并转化大肠埃希菌感受态细胞。挑取菌落进行 PCR 鉴定。对鉴定出的阳性菌落进行测序,以确保载体构建的准确性。

#### 1.2.2 构建 pNapin-BnaLPAT2 种子特异性表达载体

通过甘蓝型油菜数据库查找 Napin 启动子序列。根据序列设计引物 Napin-F(AAGCTTGTTCAGCGAATGGCATAACCG)和 Napin-R(GGATCCTGTTTGATGATGAGTTTTGG),下划线为限制性内

切酶。

以甘蓝型油菜‘湘油 15’的 DNA 为模板。PCR 扩增反应体系(20  $\mu$ L) :DNA 1  $\mu$ L、2.5 mmol/L dNTP 2  $\mu$ L、10 $\times$ Buffer 2  $\mu$ L、Napin-F/Napin-R 各 0.75  $\mu$ L、*Taq* 酶 0.5  $\mu$ L、ddH<sub>2</sub>O 13  $\mu$ L。PCR 反应程序 :94  $^{\circ}$ C 预变性 3 min ; 94  $^{\circ}$ C 变性 45 s , 52  $^{\circ}$ C 退火 45 s , 72  $^{\circ}$ C 延伸 90 s ; 35 个循环 ; 72  $^{\circ}$ C 延伸 10 min。随后将 PCR 反应产物在 1%的琼脂糖凝胶中电泳检测 , 回收目的片段。将胶回收后的目的片段与 pUCm-T 载体连接。连接体系(10  $\mu$ L) : 目的片段 3  $\mu$ L、pUCm-T Vector 0.5  $\mu$ L、10 $\times$ Ligation Buffer 1  $\mu$ L、50% PEG 4000 1  $\mu$ L、T<sub>4</sub> DNA Ligase 1  $\mu$ L ,加 ddH<sub>2</sub>O 至 10  $\mu$ L。16  $^{\circ}$ C 连接过夜并转化大肠埃希菌感受态细胞。筛选出阳性菌落 , 使用 T-vector 的通用引物 M13-F/M13-R , 以阳性菌落为模板进行 PCR 扩增。选取阳性菌落摇菌测序。

用 *Hind* III 和 *Bam*H I 对过表达载体 p35S-BnaLPAT2 和携带 Napin 启动子的 T 载体分别进行酶切。酶切体系(50  $\mu$ L) : DNA 10  $\mu$ L、10 $\times$ BufferFD 5  $\mu$ L、*Hind* III 2  $\mu$ L、*Bam*H I 2  $\mu$ L、ddH<sub>2</sub>O 31  $\mu$ L。37  $^{\circ}$ C 反应 3 h。反应结束后进行琼脂糖凝胶检测并胶回收备用。胶回收 Napin 启动子目的片段和过表达载体 p35S-BnaLPAT2 大片段后进行连接 , 使 Napin 启动子取代 CaMV35S 启动子 , 构建 pNapin-BnaLPAT2 种子特异性表达载体。连接体系 (5  $\mu$ L) : Napin 2.5  $\mu$ L , 载体 DNA 1  $\mu$ L , T4 DNA 连接酶 0.5  $\mu$ L , 10 $\times$ Buffer 1  $\mu$ L , 16  $^{\circ}$ C 过夜连接 , 转化大肠埃希菌感受态细胞。挑取单菌落进行 PCR 鉴定。对鉴定出的阳性菌落进行测序 , 以确保载体构建的准确性。

### 1.2.3 农杆菌介导法转化拟南芥

采用 SanPrep 柱式质粒 DNA 小量抽提试剂盒分别提取 p35S-BnaLPAT2 过表达载体和 pNapin-BnaLPAT2 种子特异性表达载体的质粒。用 CaCl<sub>2</sub> 冻融法将 p35S-BnaLPAT2 过表达载体和 pNapin-BnaLPAT2 种子特异性表达载体转入农杆菌 GV3101 , 将含有重组质粒的农杆菌接种在含有卡拉霉素(50 mg/L)和利福平(50 mg/L)的 YEB 固体培养基上 , 28  $^{\circ}$ C 培养 2~3 d。挑选单克隆菌落 PCR 鉴定 , -70  $^{\circ}$ C 保存阳性菌株 , 备用。采用农杆菌花絮

浸染法转化拟南芥 , 将转化后收获的种子平铺于含有卡拉霉素(50 mg/L)的 1/2 MS 固体培养基上筛选 T0 代。将 T0 代植株种植于植物培养箱(温度 24  $^{\circ}$ C , 光周期 16 h/8 h) , 收获 T0 代种子后再次筛选 , 直到筛选到纯合株系。从转基因拟南芥植株叶片中提取总 DNA , 对其进行 PCR 检测。为保证目的基因转化的可靠性 , 设计启动子和目的基因的引物 35S-F(GTCTCTTACGACTCAATGACA)、BnaLPAT 2-R1(ATACTCGGAGAACCACATTGA)和 Napin-F(TCAAACCGTTTCGGCTCCTAT)、BnaLPAT2-R2(TAAGTTTGCCTCTGTGAAGC)。同时用 Kan<sup>+</sup>基因引物对阳性苗进行抗性检测 , 其扩增产物大小为 730 bp , 所用引物 :Kan<sup>+</sup>-F , CTATGACTGGGCACAACAGAC ; Kan<sup>+</sup>-R , GCAATATCACGGGTAGCCAAC。

### 1.2.4 测定拟南芥种子脂肪酸成分

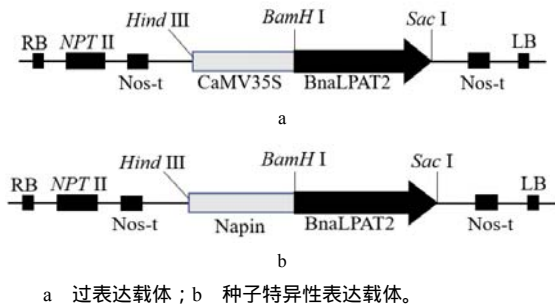
参照王昌伦<sup>[15]</sup>的方法测定拟南芥脂肪酸成分。收集一定量纯合株系的种子 , 去除杂质后置于 37  $^{\circ}$ C 恒温箱烘干至恒重 , 以相同条件下生长的野生型拟南芥种子为对照 , 用气相色谱仪检测种子脂肪酸组分 , 3 次重复。检测前的准备 : 取 20 mg 左右的种子放置在 2 mL 的离心管中 , 充分研磨至粉末 ; 加入 4 mL 2%硫酸甲醇溶液 , 90  $^{\circ}$ C 萃取 40 min 左右 , 预冷 ; 加入 5 mL ddH<sub>2</sub>O 和 3 mL 正己烷 , 漩涡混匀 , 离心 1 min ; 吸取 500  $\mu$ L 上清液至瓶中 , 上机 , 进行气相色谱分析。色谱仪型号为 Agilent 7890 , 进样量 1  $\mu$ L。柱箱加热程序 : 初始温度 180  $^{\circ}$ C , 以 20  $^{\circ}$ C/min 升温至 250  $^{\circ}$ C , 保持 10 min。

## 2 结果与分析

### 2.1 植物表达载体的构建

以植物双元表达载体 pBI121 为骨架 , 改造过表达载体。pBI121-BnaLPAT2 过表达载体的构建过程如下 : 根据 pBI121 上原有的酶切位点设计两端带有 *Bam*H I 和 *Sac* I 的特异引物 BnaLPAT2-F、BnaLPAT2-R , 采用双酶切的方法 , 分别酶切原有载体的 *GUS* 基因和 pT-BnaLPAT2 载体 , 经 T<sub>4</sub> 连接酶连接、大肠埃希菌感受态细胞转化、重组质粒的鉴定获得所需的过表达载体 , 并将其命名为 p35S-BnaLPAT2(图 1-a)。种子特异性表达载体的构建过程如下 : 根据 pBI121 上原有的酶切位点设计两端带有

*Hind* III 和 *Bam*H I 的特异引物 Napin-F、Napin-R, 以‘湘油 15’的 DNA 为模板 PCR 扩增 Napin 启动子, 获得 694 bp 的目的片段。用相同的限制性内切酶切除 pBI121-BnaLPAT2 载体上的组成型启动子 35S, 经 *T*<sub>4</sub> 酶连接、大肠埃希菌细胞转化、重组质粒的鉴定, 获得所需的种子特异性表达载体, 并将其命名为 pNapin-BnaLPAT2(图 1-b)。



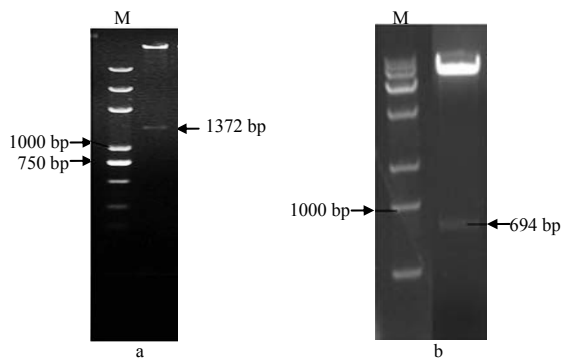
a 过表达载体; b 种子特异性表达载体。

图 1 植物表达载体的构建结果

Fig.1 Plant expression vector construction diagram

## 2.2 重组质粒的鉴定

用 *Bam*H I 和 *Sac* I 分别双酶切 pT-BnaLPAT2 和 pBI121, 回收目的条带, 连接并转化大肠埃希菌感受态细胞, 构建过表达载体 p35S-BnaLPAT2。从双酶切鉴定结果(图 2-a)可以看出, 经双酶切, 获得与预期大小(1372 bp)一致的目的片段, 说明过表达载体构建成功。用 *Hind* III、*Bam*H I 分别双酶切携带种子特异性启动子 Napin 的 T 载体和 p35S-BnaLPAT2 过表达载体, 回收目的条带, 连接并转化大肠埃希菌感受态细胞, 构建种子特异性表达载体。从双酶切鉴定结果可以看出, 获得了与预期大小(694 bp)一致的目的片段(图 2-b), 说明种子特异性表达载体构建成功。



M DNA Marker; a p35S-BnaLPAT2 双酶切; b pNapin-BnaLPAT2 双酶切。

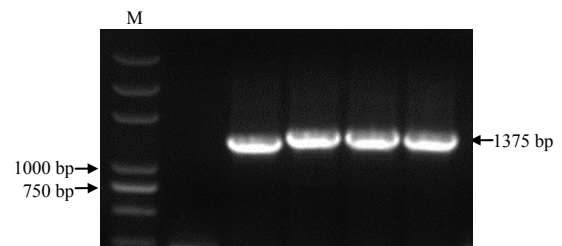
图 2 *BnaLPAT2* 重组质粒酶切鉴定结果

Fig.2 Enzymatic identification of recombinant plasmid of *BnaLPAT2*

## 2.3 转基因阳性植株的获得

### 2.3.1 重组质粒转化根癌农杆菌

采用冻融法将重组质粒 p35S-BnaLPAT2 和 pNapin-BnaLPAT2 分别转入农杆菌感受态细胞 GV3101 中, 并在含有卡那霉素(50 mg/L)和利福平(50 mg/L)的培养基上培养 2~3 d, 挑取长势良好的单菌落进行菌落 PCR 鉴定。结果如图 3 所示, 扩增出与目的条带大小(1375 bp)一致的条带, 说明植物过表达载体已成功转入根癌农杆菌中。



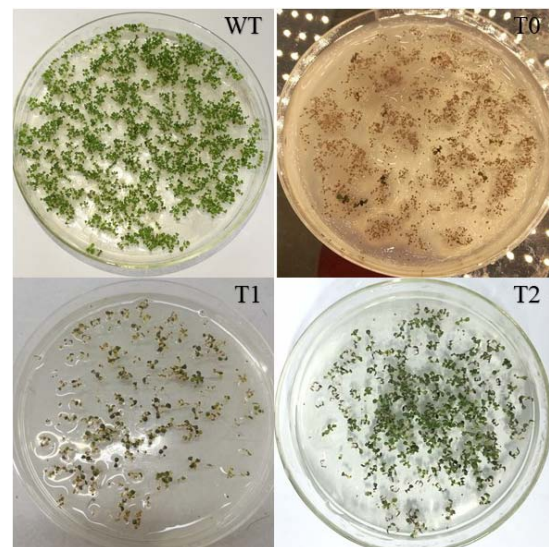
M DNA Marker。

图 3 农杆菌菌落 PCR 鉴定结果

Fig.3 PCR results of *Agrobacterium tumefaciens* colony identification

### 2.3.2 拟南芥的遗传转化

采用农杆菌介导法(浸花法)转化拟南芥。正常培养拟南芥 1 个月后侧枝开花, 在盛花期进行花序浸染, 隔 5 d 左右再次浸染, 总共浸染 3 次。待种子成熟后收取 T<sub>0</sub> 代的种子。将得到的 T<sub>0</sub> 代种子 37 °C 烘干后, 经消毒、清洗之后铺在含有卡那霉素抗性的 1/2 MS 培养基上继续筛选, 直至培养基上种子全部发芽且长势良好(图 4)。



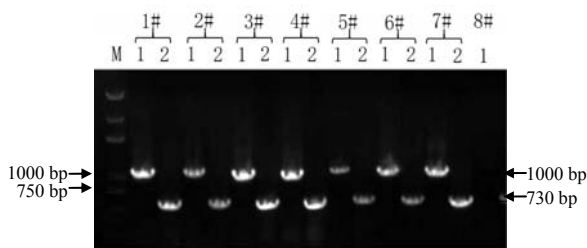
WT 野生型拟南芥; T<sub>0</sub> 拟南芥 T<sub>0</sub> 代植株; T<sub>1</sub> 拟南芥 T<sub>1</sub> 代植株; T<sub>2</sub> 拟南芥 T<sub>2</sub> 代植株。

图 4 拟南芥转化植株的抗性筛选结果

Fig.4 Screening of *Arabidopsis thaliana* transformed plants

### 2.3.3 转基因阳性植株的鉴定

取抗性筛选的转基因植株抽薹期的幼嫩叶片, 提取总 DNA 并进行 PCR 扩增。为保证结果的准确性, 对每个植株设计不同的引物进行 PCR 扩增。根据 Napin/35S 启动子和目的基因的序列设计 1 对引物, 目的条带为 1000 bp; 根据抗性标签 Kan<sup>r</sup>设计 1 对引物, 目的条带为 730 bp。通过 PCR 扩增(图 5), 2 对引物均扩增出目的条带(大小分别为 1000、730 bp), 证明拟南芥植株已经整合了外源目的基因。



1#、2#、3#、4#、5#、6# 表示转基因拟南芥植株; 7# 表示阳性对照质粒; 8# 表示非转基因植株; 1 Napin 启动子与基因特异性引物扩增; 2 Kan<sup>r</sup>基因扩增引物。

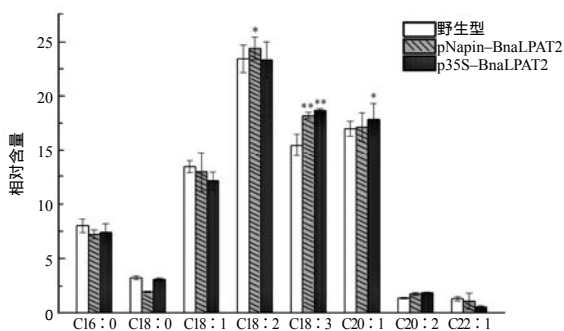
图 5 部分转基因植株的 PCR 检测结果

Fig.5 PCR detection of some transgenic plants

### 2.4 转基因植株的脂肪酸含量分析

为了分析外源基因 *BnaLPAT2* 对脂肪酸含量的影响, 采用气相色谱测定纯合拟南芥株系种子中各类脂肪酸的含量。选用在同一生长环境下成熟度一致、种子饱满度较好的野生型、pNapin-*BnaLPAT2*、p35S-*BnaLPAT2* 的转基因纯合株系的种子, 烘干后研磨成粉末状, 经甲酯化后进行气相色谱分析, 测定拟南芥种子中的脂肪酸含量。

比较转基因拟南芥与野生型拟南芥脂肪酸的含量(图 6), 发现 2 种转基因拟南芥中亚麻酸(C18:3)含量大幅度提高, 平均提高了 20%。种子特异性启



\*\*\*、\*\*、\* 分别示野生型和转基因株系在 0.01、0.05 水平差异显著。

图 6 转基因拟南芥脂肪酸分析

Fig 6 Analysis of fatty acids in transgenic *Arabidopsis*

动子驱动的 *BnaLPAT2* 转基因株系中, 亚油酸(C18:2)和亚麻酸(C18:3)的相对含量均明显提高, 分别增长 1.04、2.73; 35S 启动子驱动的 *BnaLPAT2* 转基因株系中, 亚麻酸(C18:3)的相对含量增加 3.2, 亚油酸(C18:2)的相对含量降低 0.7, 油酸(C18:1)的相对含量降低 1.3。通过转基因拟南芥种子甘油三酯脂肪酸组分分析, 推测 *BnaLPAT2* 对亚麻酸(C18:3)的亲合力高于对亚油酸(C18:2)和油酸(C18:1)的亲合力。

### 3 结论与讨论

LPAT 是 TAG 生物合成中的重要限速酶, TAG 是油料作物种子中的主要储藏物质。TAG 合成的主要过程在质体和内质网上完成, 碳原子数小于 16 的主要在质体上合成, 碳原子数大于 16 的主要在内质网上合成<sup>[16-17]</sup>。

将不同启动子驱动的 *BnaLPAT2* 基因转入拟南芥中过表达, 从测定的脂肪酸含量来看, 转基因植株中亚麻酸含量大幅度提高, 说明 *LPAT2* 基因在油脂合成中的底物选择上更偏向于亚麻酸。本研究中, pNapin-*BnaLPAT2* 和 p35S-*BnaLPAT2* 的转基因株系中, 亚油酸和亚麻酸均有不同幅度的提高, 说明 *LPAT2* 基因过表达对甘油三酯中亚油酸和亚麻酸含量的提高具有一定的作用。LASSNER<sup>[18]</sup>发现, *LPAT* 可以提高 sn-2 位芥酸的比例, 但不能提高芥酸的含量。本研究中, 克隆得到的 *BnaLPAT2* 基因通过不同启动子驱动后在拟南芥中过表达, 可以不同程度地提高亚油酸、亚麻酸的含量, 从而改变脂肪酸各组分的含量, 这为以后更深入地研究该基因提供了依据。

### 参考文献:

- [1] HILLS M J . Control of storage-product synthesis in seeds[J] . Current Opinion in Plant Biology , 2004 , 7(3) : 302-308 .
- [2] SUI N , TIAN S S , WANG W Q , et al . Overexpression of glycerol-3-phosphate acyltransferase from *Suaeda salsa* improves salt tolerance in *Arabidopsis*[J] . Frontiers in Plant Science , 2017 , 8 : 1337 .
- [3] SHOCKEY J , REGMI A , COTTON K , et al . Identification of *Arabidopsis* GPAT9 (At5g60620) as an essential gene involved in triacylglycerol biosynthesis[J] . Plant Physiology , 2016 , 170(1) : 163-179 .

- [4] 柏杨, 章文华. 二酰甘油从头合成途径的关键酶及其功能[J]. 植物生理学报, 2018, 54(12): 1763-1773. BAI Y, ZHANG W H. Key enzymes for *de novo* synthesis of diacylglycerol in plant cells[J]. Plant Physiology Journal, 2018, 54(12): 1763-1773.
- [5] 肖旦望, 刘少锋, 刘聪, 等. 甘蓝型油菜 BnLPAT4 启动子的克隆及表达分析[J]. 分子植物育种, 2016, 14(6): 1455-1461. XIAO D W, LIU S F, LIU C, et al. Cloning and expression analysis of LPAT4 promoter from *Brassica napus*[J]. Molecular Plant Breeding, 2016, 14(6): 1455-1461.
- [6] HASSANINASAB A, HSIEH L S, SU W M, et al. Yck1 casein kinase I regulates the activity and phosphorylation of Pah1 phosphatidate phosphatase from *Saccharomyces cerevisiae*[J]. The Journal of Biological Chemistry, 2019, 294(48): 18256-18268.
- [7] ISKANDAROV U, SILVA J E, KIM H J, et al. A specialized diacylglycerol acyltransferase contributes to the extreme medium-chain fatty acid content of *Cuphea* seed oil[J]. Plant Physiology, 2017, 174(1): 97-109.
- [8] LAI X J, YANG R, LUO Q J, et al. Glycerol-3-phosphate metabolism plays a role in stress response in the red alga *Pyropia haitanensis*[J]. Journal of Phycology, 2015, 51(2): 321-331.
- [9] CHEN S L, LEI Y, XU X, et al. The peanut (*Arachis hypogaea* L.) gene *AhLPAT2* increases the lipid content of transgenic *Arabidopsis* seeds[J]. PloS one, 2015, 10(8): e0136170.
- [10] ZOU J, KATAVIC V, GIBLIN E M, et al. Modification of seed oil content and acyl composition in the brassicaceae by expression of a yeast sn-2 acyltransferase gene[J]. The Plant Cell, 1997, 9(6): 909-923.
- [11] MAISONNEUVE S, BESSOULE J J, LESSIRE R, et al. Expression of rapeseed microsomal lysophosphatidic acid acyltransferase isozymes enhances seed oil content in *Arabidopsis*[J]. Plant Physiology, 2010, 152(2): 670-684.
- [12] 张军平, 江木兰, 龚阳敏, 等. 三角褐指藻 *LPAAT* 基因在酵母中表达对脂肪酸的影响[J]. 中国油料作物学报, 2012, 34(5): 483-488. ZHANG J P, JIANG M L, GONG Y M, et al. Influence of expression of *Phaeodactylum tricornutum* *LPAAT* gene in yeast on oil content and fatty acid composition of TAG[J]. Chinese Journal of Oil Crop Sciences, 2012, 34(5): 483-488.
- [13] 陈四龙. 花生油脂合成相关基因的鉴定与功能研究[D]. 北京: 中国农业科学院, 2012. CHEN S L. Identification and functional analysis of lipid biosynthesis related genes in peanut (*Arachis hypogaea* L.) [D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences Dissertation, 2012.
- [14] 施春霖, 刘聪, 肖旦望, 等. 甘蓝型油菜 *WR11* 基因 cDNA 的克隆与序列分析[J]. 湖南农业大学学报(自然科学版), 2013, 39(3): 247-252. SHI C L, LIU C, XIAO D W, et al. Cloning and sequence analysis of cDNA *WR11* gene from *Brassica napus*[J]. Journal of Hunan Agricultural University (Natural Sciences), 2013, 39(3): 247-252.
- [15] 王昌伦. 气相色谱法测定油菜籽中的七种脂肪酸[J]. 油脂科技, 1983(3): 56-61. WANG C L. Determination of seven fatty acids in rapeseed by gas chromatography[J]. Oil and Fat Technology, 1983(3): 56-61.
- [16] 郭彦丽. 甘蓝型油菜种子含油量遗传及油脂合成相关基因功能分析[D]. 武汉: 华中农业大学, 2017. GUO Y L. Genetic analysis of seed oil content and function analysis of gene involved in lipid biosynthesis in *Brassica napus* L [D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2017.
- [17] BAUD S, BOUTIN J P, MIQUEL M, et al. An integrated overview of seed development in *Arabidopsis thaliana* ecotype WS[J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2002, 40(2): 151-160.
- [18] LASSNER M W. Lysophosphatidic acid acyltransferase from meadowfoam mediates insertion of erucic acid at the sn-2 position of triacylglycerol in transgenic rapeseed oil[J]. Plant Physiology, 1995, 109(4): 1389-1394.

责任编辑: 毛友纯  
英文编辑: 柳正