

· 农业生物技术 ·

紫苏溶血磷脂酸酰基转移酶基因的克隆与功能分析

周雅莉, 黄旭升, 郝月茹, 蔡桂萍, 史先飞, 李润植, 王计平

山西农业大学 分子农业与生物能源研究所, 山西 太谷 030801

周雅莉, 黄旭升, 郝月茹, 蔡桂萍, 史先飞, 李润植, 王计平. 紫苏溶血磷脂酸酰基转移酶基因的克隆与功能分析. 生物工程学报, 2022, 38(8): 3014-3028.

ZHOU YL, HUANG XS, HAO YR, CAI GP, SHI XF, LI RZ, WANG JP. Cloning and functional characterization of a lysophosphatidic acid acyltransferase gene from *Perilla frutescens*. Chin J Biotech, 2022, 38(8): 3014-3028.

摘要: 紫苏 (*Perilla frutescens*) 是一种重要食药同源油料作物, 种子含油量高达 46%–58%, 其中 α -亚麻酸 (C18:3) 含量占 60% 以上。溶血磷脂酸酰基转移酶 (lysophosphatidic acid acyltransferase, LPAT) 是植物种子三酰基甘油组装过程中的一类关键限速酶。本研究从紫苏发育种子中克隆了其编码基因 (*PfLPAT2*), 并利用 qRT-PCR 技术检测 *PfLPAT2* 基因在紫苏不同组织及不同发育时期种子的表达特性。构建 *PfLPAT2*/GFP 融合表达载体并通过农杆菌介导瞬时侵染本氏烟草叶片, 检测 *PfLPAT2* 蛋白的亚细胞定位。构建大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 表达载体、酵母表达载体和组成型植物过表达载体, 分别转化大肠杆菌突变株 SM2-1、酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 野生型菌株 INVSc1 和普通烟草 (*Nicotiana tabacum*), 分析 *PfLPAT2* 蛋白的酶活性及生物学功能。结果表明, 紫苏 *PfLPAT2* 基因 ORF 为 1 155 bp, 编码 384 个氨基酸。功能结构域预测显示 *PfLPAT2* 蛋白具有溶血磷脂酸酰基转移酶典型的保守区。*PfLPAT2* 基因在紫苏根、茎、叶、花和开花后 10、20、30、40 d 的种子中均有表达, 且在开花后 20 d 的种子中高表达。亚细胞定位结果显示 *PfLPAT2* 蛋白定位于细胞质。大肠杆菌功能互补测试表明, *PfLPAT2* 可恢复 SM2-1 细胞膜脂生物合成, 具有 LPAT 酶活性。与非转基因对照相比, 转 *PfLPAT2* 基因酵母的总油脂含量显著提高, 且脂肪酸各组分的含量发生改变, 油酸 (C18:1) 含量增加明显, 预示 *PfLPAT2* 对 C18:1

Received: January 16, 2022; **Accepted:** April 19, 2022; **Published online:** May 12, 2022

Supported by: National Natural Science Foundation of China (31201266, 31401430); Key Project of the Key Research and Development Program of Shanxi Province, China (201603D312005, 201803D221005-9); Key Scientific & Technological Research and Development Project of Jinzhong, Shanxi Province, China (Y172007-5); Basic Research Program (Free Exploration) Project of Shanxi Province, China (20210302123418); Breeding Engineering Special Key Cultivation Project of Agricultural College, Shanxi Agricultural University (YZ2021-08)

Corresponding authors: LI Runzhi. E-mail: rli2001@126.com

WANG Jiping. E-mail: sxndwjp@163.com

基金项目: 国家自然科学基金 (31201266, 31401430); 山西省重点研发计划 (201603D312005, 201803D221005-9); 山西省晋中市科技重点研发计划 (Y172007-5); 山西省基础研究计划 (自由探索类) (20210302123418); 山西农业大学农学院育种工程专项重点培育项目 (YZ2021-08)

具有较高的底物偏好性。转基因烟草叶片总脂肪酸含量比对照组提高了约 0.42 倍, C18:1 含量增加了约 1 倍。转基因株系总脂提高和脂肪酸组分的改变表明 PflPAT2 异源表达可以促进宿主油脂合成和健康有益型脂肪酸 (C18:1 和 C18:3) 的积累。本研究为深入解析紫苏油脂特别是不饱和脂肪酸合成的分子调控机制和改良油料作物油脂品质提供理论依据和基因元件。

关键词: 紫苏; 溶血磷脂酸酰基转移酶; 基因功能; 表达特性分析; 遗传转化; 健康有益型油脂

Cloning and functional characterization of a lysophosphatidic acid acyltransferase gene from *Perilla frutescens*

ZHOU Yali, HUANG Xusheng, HAO Yueru, CAI Guiping, SHI Xianfei, LI Runzhi, WANG Jiping

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

Abstract: *Perilla* (*Perilla frutescens* L.) is an important edible-medicinal oil crop, with its seed containing 46%–58% oil. Of perilla seed oil, α -linolenic acid (C18:3) accounts for more than 60%. Lysophosphatidic acid acyltransferase (LPAT) is one of the key enzymes responsible for triacylglycerol assembly in plant seeds, controlling the metabolic flow from lysophosphatidic acid to phosphatidic acid. In this study, the *LPAT2* gene from the developing seeds of perilla was cloned and designated as *PfLPAT2*. The expression profile of *PfLPAT2* gene was examined in various tissues and different seed development stages of perilla (10, 20, 30, and 40 days after flowering, DAF) by quantitative real-time PCR (qRT-PCR). In order to detect the subcellular localization of PflPAT2 protein, a fusion expression vector containing PflPAT2 and GFP was constructed and transformed into *Nicotiana benthamiana* leaves by *Agrobacterium*-mediated infiltration. In order to explore the enzymatic activity and biological function of PflPAT2 protein, an *E. coli* expression vector, a yeast expression vector and a constitutive plant overexpression vector were constructed and transformed into an *E. coli* mutant SM2-1, a wild-type *Saccharomyces cerevisiae* strain INVSc1, and a common tobacco (*Nicotiana tabacum*, variety: Sumsun NN, SNN), respectively. The results showed that the *PfLPAT2* open reading frame (ORF) sequence was 1 155 bp in length, encoding 384 amino acid residues. Functional structure domain prediction showed that PflPAT2 protein has a typical conserved domain of lysophosphatidic acid acyltransferase. qRT-PCR analysis indicated that *PfLPAT2* gene was expressed in all tissues tested, with the peak level in seed of 20 DAF of perilla. Subcellular localization prediction showed that PflPAT2 protein is localized in cytoplasm. Functional complementation assay of PflPAT2 in *E. coli* LPAAT mutant (SM2-1) showed that PflPAT2 could restore the lipid biosynthesis of SM2-1 cell membrane and possess LPAT enzyme activity. The total oil content in the *PfLPAT2* transgenic yeast was significantly increased, and the content of each fatty acid component changed compared with that of the non-transgenic control strain. Particularly, oleic acid (C18:1) in the transgenic yeast significantly increased, indicating that PflPAT2 has a higher substrate preference for C18:1. Importantly, total fatty

acid content in the transgenic tobacco leaves increased by about 0.42 times compared to that of the controls, with the C18:1 content doubled. The increased total oil content and the altered fatty acid composition in transgenic tobacco lines demonstrated that the heterologous expression of PfLPAT2 could promote host oil biosynthesis and the accumulation of health-promoting fatty acids (C18:1 and C18:3). This study will provide a theoretical basis and genetic elements for in-depth analysis of the molecular regulation mechanism of perilla oil, especially the synthesis of unsaturated fatty acids, which is beneficial to the genetic improvement of oil quality of oil crops.

Keywords: perilla (*Perilla frutescens* L.); lysophosphatidic acid acyltransferase; gene function; expression characteristics analysis; genetic transformation; health-promoting fatty acids

紫苏 (*Perilla frutescens* L.) 是唇形科 (Labiatae)、紫苏属 (*Perilla*)、一年生自花授粉草本植物^[1]。紫苏原产于亚洲东部,在我国已有两千多年的栽培历史^[2]。紫苏种质资源丰富,含有丰富的营养成分,全草可入药,同时可食用,是我国卫生部颁布的既是食品又是药品的 60 种药食植物之一^[3-5]。紫苏种子富油,出油率高达 46%–58%,其不饱和脂肪酸 (油酸 C18:1、亚油酸 C18:2 和亚麻酸 C18:3) 含量占总含油量的 90%左右,特别是亚麻酸含量占 65%以上^[5-7]。 α -亚麻酸是一类健康有益型高值脂肪酸,具有促进大脑发育、提高人体免疫力、保护心血管系统等重要功效^[8]。因此,高品质的紫苏籽油可以作为人类饮食中 α -亚麻酸的优质来源。

植物油脂生物合成主要包括脂肪酸 (fatty acid, FA) 从头合成和三酰甘油 (triacylglycerol, TAG) 组装两大过程^[9],由多个基因在多个细胞器内共同参与调控。TAG 是植物种子中油脂的主要贮存形式,其组装过程主要在内质网中以甘油-3-磷酸 (glycerol-3-phosphate, G3P) 和酰基-CoA (acyl-CoA) 为底物经各种酶的依次催化而完成。在 Kennedy 途径^[10]中,酰基-CoA 在甘油-3-磷酸酰基转移酶 (glycerol-3-phosphate acyltransferase, GPAT) 和溶血磷脂酸酰基转移酶 (lysophosphatidic acid acyltransferase, LPAT)

的催化作用下依次转移到 G3P 的 sn-1 和 sn-2 位置上,分别生成溶血磷脂酸 (lysophosphatidic acid, LPA) 和磷脂酸 (phosphatidic acid, PA)。然后在 G3P 的 sn-3 位上的磷酸被磷脂酸磷酸酶 (phosphatidic acid phosphatase, PAP) 水解,生成二酰甘油 (diacylglycerol, DAG),最后脂酰-CoA (fatty acyl-CoA) 在二酰甘油酰基转移酶 (diacylglycerol acyltransferase, DGAT) 的催化下转移到 DAG 的 sn-3 位上,生成 TAG,贮存于油体中^[11-12]。

溶血磷脂酸酰基转移酶 (LPAT) 是一个庞大的蛋白酶家族,属于 MBOAT 蛋白超级家族中的成员,是 TAG 组装途径中一类关键的限速酶。研究表明,在参与 Kennedy 途径中 TAG 组装的众多酶基因中,LPAT 的活性可能最高^[13]。LPAT 家族根据进化关系、亚细胞定位和底物偏好性等,可分为质体型 LPAT 与微粒体型 LPAT^[14],质体型 LPATs 对软脂酸具有强烈的底物偏好性^[15];微粒体型又可分为 LPAT-A 类和 LPAT-B 类^[16],参与膜脂和油脂的生物合成^[17],其中 LPAT-A 在植物的各个组织中广泛表达,对 18:1-CoA 具有较强的底物偏好性,而 LPAT-B 几乎仅在种子中表达,对不寻常酰基链脂肪酸 (如芥酸和月桂酸等) 具有底物偏好性。在模式植物拟南芥 (*Arabidopsis thaliana* L.) 中发现

了5个LPAT基因,根据其进化关系、亚细胞定位和底物偏好性,可分为质体膜结合型LPAT (AtLPAT1) 和内质网胞质结合型LPAT (AtLPAT2和AtLPAT3),其中质体膜结合型LPAT对16:0-CoA具有底物偏好性,而内质网胞质结合型LPAT则对18:1-CoA具有较高的偏好性^[14,18],AtLPAT4和AtLPAT5定位于内质网,但对它们功能的研究鲜有报道^[19]。LPAT酶活性的高低直接影响脂肪酸和膜脂类物质的合成积累。在拟南芥和甘蓝型油菜 (*Brassica napus* L.) 中转入酵母 (*Saccharomyces cerevisiae* H.) LPAT基因的突变型 *SLC1-1* 基因,导致转基因植株种子油脂含量提高8%–48%,且TAG含量和超长链脂肪酸含量均显著增加^[20]。在大豆 (*Glycine max* L.) 中过表达酵母 *SLC1* 基因,导致转基因体细胞胚和T2、T3代种子含油量均有明显提高^[21]。在拟南芥种子特异过表达花生 (*Arachis hypogaea* L.) AhLPAT2导致转基因植株后代种子总油脂产量显著增加,且种子重量提高^[22]。将甘蓝型油菜的2个LPAT基因转入拟南芥中,使得转基因后代种子含油量和重量均显著提高^[23]。紫苏种子油富含 ω -3脂肪酸,其油脂生物合成机制还未详尽解析,尽管已分离到一些紫苏油脂相关基因。紫苏 *PfDGAT1* 和 *PfPDAT*^[24]以及 *Pfpgat9*^[25]在紫苏油脂合成积累中发挥重要作用,然而紫苏LPAT酶基因的生物学功能及其对种子 ω -3脂肪酸富集的作用鲜有报道。

为解析紫苏溶血磷脂酸酰基转移酶 (PfLPAT) 的生物学功能,本研究基于前期紫苏转录组数据分析获得高表达 *PfLPAT2* 基因的转录本,以‘晋紫苏1号’发育种子 (开花后20 d) 为试验材料,利用RT-PCR技术克隆得到 *PfLPAT2* 基因的完整开放阅读框 (open reading frame, ORF) 序列,通过qRT-PCR分析 *PfLPAT2* 基因在紫苏不同器官及不同发育时期种子中的表达特性。构

建大肠杆菌表达载体,转化大肠杆菌LPAAT突变菌株SM2-1,检测PfLPAT2酶的活性。构建酵母表达载体和植物过表达载体,分别遗传转化酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 野生型菌株INVSc1和普通烟草 (*Nicotiana tabacum* L., Sumsun NN (SNN)), 检测转基因酵母和烟草中总油脂含量及各脂肪酸组分含量,综合分析 *PfLPAT2* 基因的生物学功能,为深入研究紫苏油脂特别是不饱和脂肪酸合成的调控机制及应用基因工程改良紫苏等油料作物的油脂品质提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

本试验所用紫苏品种为种子富油的优良品种‘晋紫苏1号’,2020年4月种植于山西农业大学农作站试验基地,取‘晋紫苏1号’根、茎、叶、花及不同发育时期的种子 (开花后10、20、30、40 d),液氮速冻后移至-80℃冰箱保存用于后续试验。

本试验所用的本氏烟草 (*Nicotiana benthamiana* L.) 种植于育苗基质中,设置光照培养箱的生长条件为:温度 (25±2)℃、相对湿度50%–60%、光照:黑暗=16 h:8 h^[26]。普通烟草品种为SNN,无菌苗接种于1/2 MS培养基 (含30 g/L蔗糖,7 g/L琼脂,pH 5.8)。转基因烟草种植于育苗基质中,培养条件与本氏烟草一致。

大肠杆菌DH5 α 、LPAAT缺失大肠杆菌突变株SM2-1、根癌农杆菌GV3101、酿酒酵母野生型菌株INVSc1,试验所用克隆载体pMD18-T、大肠杆菌表达载体pET28A、酵母表达载体pYES2.0、组成型植物过表达载体pCAMBIA1303和GFP融合植物表达载体pCAMBIA1300均保存于山西农业大学分子农业与生物能源研究所。

1.2 方法

1.2.1 紫苏 *PfLPAT2* 基因的克隆

使用艾德莱公司的 EASY spin 植物 RNA 快速提取试剂盒 RN09 (北京艾德莱生物科技有限公司) 提取紫苏不同组织的总 RNA。用 BioDrop 蛋白核酸浓度分析仪和琼脂糖凝胶电泳检测各组织总 RNA 的浓度和质量。采用 ABM 公司 (爱必梦生物科技有限公司) 的 5×All-In-One Master Mix (with AccuRT Genomic DNA Removal Kit) 反转录试剂盒反转录合成第一链 cDNA。

从本实验室紫苏转录组数据库筛选鉴定得到功能注释为溶血磷脂酸酰基转移酶 2 的转录本, 命名为 *PfLPAT2*。根据 *PfLPAT2* 序列设计 PCR 扩增引物 (表 1), 以紫苏开花后 20 d 种子的 cDNA 为模板, 使用 *Pfu* DNA Polymerase 高保真酶扩增 *PfLPAT2* 基因的 ORF。PCR 扩增程序为: 94 °C 3 min; 94 °C 30 s, 58.5 °C 30 s, 72 °C 2 min, 30 次循环; 72 °C 5 min。琼脂糖凝胶电泳检测 *PfLPAT2* 基因 PCR 扩增产物, 目的片段经割胶回收和纯化后克隆至 pMD18-T 载体, 将重组子 pMD18-T-*PfLPAT2* 转入大肠杆菌 DH5 α 中。经菌液 PCR 筛选得到阳性克隆,

并送通用生物公司测序验证。

1.2.2 紫苏 *PfLPAT2* 基因编码蛋白序列特征分析

通过在线软件 ProParam (<http://web.expasy.org/protparam/>) 分析 *PfLPAT2* 蛋白的分子量、理论等电点、脂溶系数、不稳定系数和亲疏水性等。用 NCBI 数据库中的 CDD (conserved domains database, <http://ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/Wrpsb.cgi>) 分析 *PfLPAT2* 序列是否有完整的功能结构域。用 GeneDoc 软件对 *PfLPAT2* 蛋白与 NCBI 上公布的其他几种植物的 LPAT2 蛋白质序列进行同源性比对, 各物种 LPAT2 蛋白信息见表 2。

1.2.3 紫苏 *PfLPAT2* 基因表达谱分析

以反转录合成的‘晋紫苏 1 号’各组织的 cDNA 为模板, 根据 *PfLPAT2* 基因设计 qRT-PCR 引物 (表 1), 以 *18S rRNA* 为内参基因^[27], 使用 2×RealStar Green Power Mixture 试剂盒 (GenStar 公司) 进行 qRT-PCR 扩增, 分析 *PfLPAT2* 基因在紫苏不同组织及不同发育时期种子中的表达模式。每个样品设置 3 次生物学重复和 3 次技术重复。

1.2.4 紫苏 *PfLPAT2* 蛋白亚细胞定位分析

设计用于构建 *PfLPAT2* 亚细胞定位载体

表 1 本研究所用的引物

Table 1 Primers used in this study

Primer names	Primer sequences (5'→3')	Purposes
<i>PfLPAT2</i> -ORF-F	ATGGCGATTGCGCCGGCGATAG	Cloning
<i>PfLPAT2</i> -ORF-R	CTGCTGTTTATCTTGTTTAGTCT	
<i>PfLPAT2</i> -q-F	TCCCAGAAATTCTCCCGCAC	qRT-PCR
<i>PfLPAT2</i> -q-R	GCATCCTTGGCTACAAACGC	
<i>18S rRNA</i> -F	CGGCTACCACATCCAAGGAA	Reference gene
<i>18S rRNA</i> -R	GCTGGAATTACCGCGGCT	
pCAMBIA1300- <i>PfLPAT2</i> -F	CCAAATCGACTCTAGAATGGCGATTGCGCCGGCGATAG	Vector construction
pCAMBIA1300- <i>PfLPAT2</i> -R	TGCTCACCATGGTACCCTGCTGTTTATCTTGTTTAGTCT	
pET28A- <i>PfLPAT2</i> -F	ACAATTCCCCTCTAGAATGGCGATTGCGCCGGCG	Vector construction
pET28A- <i>PfLPAT2</i> -R	GCTCGAATTCGGAATCCTTACTGCTGTTTATCTTGTTTAGTCTGC	
pYES2.0- <i>PfLPAT2</i> -F	TTAAGCTTATGGCGATTGCGCCGGCGATAG	Vector construction
pYES2.0- <i>PfLPAT2</i> -R	TGCTCGAGCTGCTGTTTATCTTGTTTAGTCT	
pCAMBIA1303- <i>PfLPAT2</i> -F	ACTCTAGAATGGCGATTGCGCCGGCGATAG	Vector construction
pCAMBIA1303- <i>PfLPAT2</i> -R	TCGGTACCCTGCTGTTTATCTTGTTTAGTCT	

表 2 各物种 LPAT2 信息

Table 2 Information of LPAT2 in different species

Species	Protein	Accession No.
<i>Perilla frutescens</i>	LPAT2	
<i>Sesamum indicum</i>	LPAT2	XP_011078878.1
<i>Olea europaea</i>	LPAT2	XP_022842224.1
<i>Arabidopsis thaliana</i>	LPAT2	NP_567052.1
<i>Brassica napus</i>	LPAT2	Q9XFW4.1
<i>Tropaeolum majus</i>	LPAT2	ACV73676.1
<i>Ricinus communis</i>	LPAT2	XP_002513487.1

的引物 pCAMBIA1300-*PfLPAT2*-F/R (表 1), 以 pMD18-T-*PfLPAT2* 质粒为模板, 使用 *Pfu* DNA Polymerase 高保真酶扩增 *PfLPAT2* 基因的编码区。将扩增产物用 *Xba* I 和 *Kpn* I 限制性内切酶进行双酶切, 同时用 *Xba* I 和 *Kpn* I 内切酶对亚细胞定位载体 pCAMBIA1300 (载有 GFP) 进行双酶切, 重组后得到 *PfLPAT2*/GFP 融合表达载体 pCAMBIA1300-*PfLPAT2*/GFP。

将构建好的融合表达载体 pCAMBIA1300-*PfLPAT2*/GFP 通过冻融法转化根癌农杆菌 GV3101 感受态细胞, 选择阳性重组子至含有相应抗生素的 LB 液体培养基中振荡培养至 OD_{600} 约 0.6。离心收集菌体, 配制农杆菌悬浮液, 重悬各菌液至 OD_{600} 约 0.2, 室温孵育 2-4 h 后侵染本氏烟草叶片, 以 pCAMBIA1300-GFP 空载体作为对照。暗培养 48 h 后取侵染区域叶片制片, 使用激光共聚焦显微镜观察烟草表皮细胞中 GFP 荧光信号的分布。

1.2.5 紫苏 *PfLPAT2* 蛋白在大肠杆菌突变株 SM2-1 中的功能互补测试

用限制性内切酶 *Xba* I 和 *Bam*H I 对大肠杆菌表达载体 pET28A 进行双酶切, 以 pMD18-T-*PfLPAT2* 质粒为模板, 设计引物 pET28A-*PfLPAT2*-F/R (表 1) 进行 PCR 扩增, 将上述产物经酶连重组后得到 pET28A-*PfLPAT2* 大肠杆菌表达载体。将连接产物转化大肠杆菌突变株 SM2-1 感受态细胞, 挑取单菌落进行 PCR 鉴定,

并提取质粒进行双酶切验证。

将检测为阳性的突变型转化体 pET28A (空载体) 和 pET28A-*PfLPAT2* 首先在 30 °C 条件下过夜培养, 将过夜培养物重悬至相同的起始浓度, OD_{600} 为 0.5。然后将由初始浓度菌液制成的梯度稀释液 (10^0 、 10^1 、 10^2 、 10^3 和 10^4) 点样到两个具有 0.1 mmol/L 异丙基- β -D-硫代半乳糖苷 (isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside, IPTG) 的选择性琼脂板上, 一个在 30 °C 培养, 另一个在 42 °C 培养, 观察菌落生长情况^[28]。

1.2.6 紫苏 *PfLPAT2* 基因酵母表达载体构建与转化

用限制性内切酶 *Hind* III 和 *Xho* I 对酵母表达载体 pYES2.0 进行双酶切, 以 pMD18-T-*PfLPAT2* 质粒为模板, 设计引物 pYES2.0-*PfLPAT2*-F/R (表 1) 进行 PCR 扩增, 将上述产物经酶连重组后得到 pYES2.0-*PfLPAT2* 酵母表达载体。将连接产物转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞, 挑取单菌落进行 PCR 鉴定, 提取质粒进行双酶切验证。

使用酵母转化试剂盒 (SK2400-200, 北京酷来博科技有限公司) 制备酵母 INVSc1 感受态细胞, 采用醋酸锂 (LiAc) 转化法将上述鉴定为阳性的重组质粒 pYES2.0-*PfLPAT2* 和空载体 pYES2.0 分别转化至 INVSc1, 30 °C 培养 2-4 d 后挑取单菌落进行 PCR 验证。将检测为阳性的转基因酵母转至 SC-Ura 抑制培养基 (含 2% 葡萄糖) 中, 30 °C 过夜培养, 离心后将菌体接入 SC-Ura 诱导培养基 (2% 半乳糖) 中, 继续培养至 OD_{600} 约 1.0^[29-30]。离心收集菌体后进行冷冻干燥, 研磨成粉末用于后续总脂和脂肪酸组分分析。

1.2.7 紫苏 *PfLPAT2* 基因植物过表达载体构建与烟草遗传转化

用限制性内切酶 *Xba* I 和 *Kpn* I 对植物过表达载体 pCAMBIA1303 进行双酶切, 设计引物 pCAMBIA1303-*PfLPAT2*-F/R (表 1) 对 pMD18-

T-*PfLPAT2* 质粒进行 PCR 扩增, 经重组后得到 pCAMBIA1303-*PfLPAT2* 植物表达载体。将重组产物转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞, 挑取单菌落进行 PCR 和双酶切鉴定阳性重构质粒。

将构建好的重组表达载体 pCAMBIA1303-*PfLPAT2* 转化根癌农杆菌 GV3101 感受态细胞, 置于含有相应抗生素的 LB 液体培养基中培养至 OD_{600} 约 0.4, 用于侵染普通烟草叶片。取生长健壮的 6 周龄的普通烟草无菌苗, 将叶片切成 0.5 cm^2 大小的块状, 置于上述农杆菌菌液中侵染 8 min, 无菌水冲洗 1 min^[31]。将侵染后的烟草叶片置于共培养基 (MS+1.0 mg/L 6-BA+0.1 mg/L NAA) 上暗培养 48 h, 转到筛选培养基 (MS+1.0 mg/L 6-BA+0.1 mg/L NAA+500 mg/L Cef+5 mg/L Hyg) 上进行筛选培养, 直至长出丛生芽。将丛生芽转到生根培养基进行生根培养 (1/2 MS+500 mg/L Cef), 待转基因苗长大后进行炼苗移栽。

通过 CTAB 法提取转基因烟草叶片的 DNA, 以 *PfLPAT2* 基因全长 ORF 引物进行 PCR 扩增检测。对 DNA 水平鉴定为阳性的转基因烟草叶片提取总 RNA, 反转录合成 cDNA 后, 从转录水平进一步验证 *PfLPAT2* 基因是否有效表达。取基因组水平和转录水平鉴定为阳性的转基因烟草叶片, 冷冻干燥后研磨成粉末, 用于总脂肪酸含量和各脂肪酸组分测定。

1.2.8 总油脂提取与含量测定

称取冷冻干燥后的转基因酵母和烟叶粉末 50 mg 置于 50 mL 离心管中, 每个样品设置 3 次重复。加入甲醇: 氯仿 (2:1, $V:V$) 溶液 7.5 mL, $37\text{ }^\circ\text{C}$ 、100 r/min 抽提 24 h, 离心后吸取上层有机相至另一新的离心管中。向剩余沉淀中加入甲醇: 氯仿 7.5 mL, $37\text{ }^\circ\text{C}$ 、100 r/min 抽提 12 h, 重复 2 次。将 3 次收集的上层有机相合并, 充分混匀后加入 5 mL 氯仿溶液和 9 mL 1% NaCl

溶液, 混匀后离心收集下层有机相, 转至新的已称重 (m_0) 的玻璃指形管中, 待有机试剂蒸干后再次称重 (m_1)。转基因酵母或烟草总油脂含量= $(m_1-m_0)/0.05\times 100\%$ ^[32]。

1.2.9 脂肪酸甲酯制备与各组分含量测定

称取冷冻干燥后的转基因酵母和烟叶粉末 50 mg 于玻璃指形管中, 向其中加入 50 μL 的 Tri 17:0 (10 mg/mL) 作为内对照。每个样品中加入甲醇: 氯仿 (1:2, $V:V$) 混合液 (含 0.001% BHT) 1 mL, 振荡混匀。加入 500 μL 0.9% 的 KCl 振荡混匀, 再加入 1 mL 氯仿, 振荡混匀后低速离心 10 min, 吸取下层氯仿相转移至一个新的指形管中, 蒸干后加入 500 μL 甲醇 (含 2.5% 浓硫酸), 混匀后置于 $80\text{ }^\circ\text{C}$ 水浴锅中甲酯化 2 h。随后加入 500 μL 正己烷、1 mL 0.9% KCl, 振荡混匀后离心, 吸取上清液于另一干净的玻璃管中, 蒸干后再次加入 500 μL 正己烷, 使脂肪酸甲酯完全溶解, 然后转移至 GC 小瓶中用于脂肪酸组分及含量分析。每个样品设置 3 次重复。

使用气相色谱仪 (7890B, 安捷伦) 测定各样品脂肪酸组分及含量^[24], 通过内标法计算各脂肪酸组分的相对含量, 计算公式为: $ki=(Ai\times ms)/(As\times m)\times 100\%$ 。其中 i 表示脂肪酸各组分, Ai 表示脂肪酸各组分的峰面积, ms 表示内标的质量, As 表示内标 Tri17:0 的峰面积, m 表示样品质量^[32]。

2 结果与分析

2.1 紫苏 *PfLPAT2* 基因的克隆与序列特征分析

以‘晋紫苏 1 号’开花后 20 d 种子的 cDNA 为模板, 用高保真酶通过 PCR 扩增得到 *PfLPAT2* 基因的 ORF。扩增产物经纯化回收和测序验证, 得到一条长度为 1 155 bp 的核酸序列, 与转录组数据一致, 说明成功克隆得到 *PfLPAT2* 基因(图 1)。

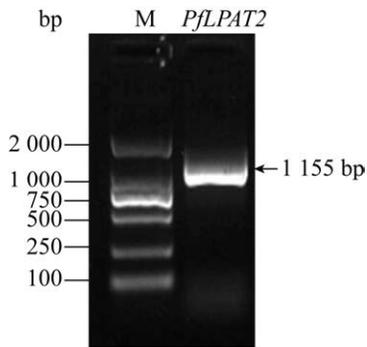


图1 紫苏 *PflPAT2* 基因的克隆

Figure 1 Cloning of *PflPAT2*. M: DNA marker DL 2 000.

使用在线软件 ProParam 预测 *PflPAT2* 基因编码蛋白的基本理化性质, *PflPAT2* 基因编码氨基酸数为 384 (附图 1, 详见《生物工程学报》网络版附件)。PflPAT2 蛋白亲水性系数和不稳

定系数分别为 0.229、43.520, 预测其为不稳定疏水性蛋白。CDD 预测结果表明, PflPAT2 蛋白具有完整的溶血磷脂酸酰基转移酶功能结构域 (图 2A)。GeneDoc 多序列比对显示, PflPAT2 蛋白含有已公布其他物种 (如芝麻、油橄榄、拟南芥、甘蓝型油菜、旱金莲和蓖麻等) LPAT2 蛋白的保守基序 (图 2B), 分别是 NHRSDID (motif I)、LPVIGW (motif II)、WLALFVEGTR (motif III)、NVLIPRIKGFV (motif IV) 和 MRSFVPAIYD(X)TV (motif V)。

亚细胞定位预测结果显示 PflPAT2 蛋白定位于细胞质, 为了验证这一结果, 将含 35S::PflPAT2::GFP 的农杆菌注射侵染本氏烟草叶片, 以 35S::GFP 作为对照, 使用激光共聚焦显微镜观察绿色荧光蛋白 GFP 在烟草表皮细胞中

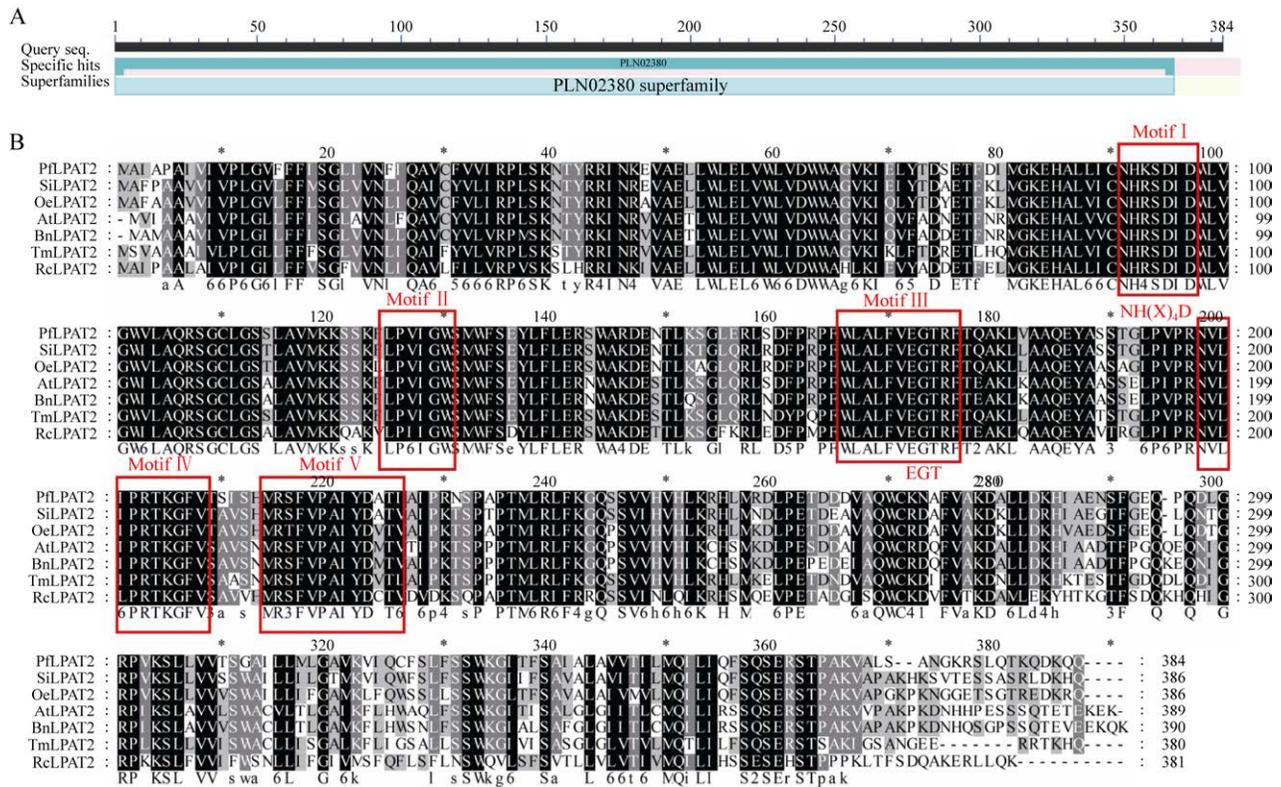


图2 *PflPAT2* 基因编码蛋白序列特征分析

Figure 2 Characterization of perilla PflPAT2 protein. (A) The domain of PflPAT2 protein. (B) Alignment of LPAT2 protein sequences derived from perilla and other plants.

分布。观察到 PflPAT2 蛋白定位于细胞质 (图 3), 与亚细胞定位预测结果一致。

2.2 紫苏 *PfLPAT2* 基因在发育种子高表达

取紫苏的根、茎、叶、花和开花后 10、20、30、40 d 的种子提取总 RNA 并反转录成 cDNA, 以 *18S rRNA* 为内参基因进行实时荧光定量 PCR 检测 *PfLPAT2* 基因在紫苏不同组织的表达量。结果显示, *PfLPAT2* 基因在紫苏不同组织中均有表达, 但表达量存在差异。*PfLPAT2* 基因在紫苏种子中的表达水平显著高于其他组织, 随着种子的发育, 其表达水平呈现先升高后下降的趋势, 且在开花后 20 d 达到最高丰度 (图 4)。这与紫苏种子发育过程中油脂和 α -亚麻酸积累模式基本吻合, 因此推测 *PfLPAT2* 基因可能在紫苏种子油脂合成和 α -亚麻酸积累过程行使功能。

2.3 紫苏 PflPAT2 具有 LPAT 酶活性

大肠杆菌 LPAT 突变株 SM2-1 不能合成组成细胞膜的甘油酯, 且对温度极敏感。该突变体在 30 °C 条件下能正常生长, 在 42 °C 条件下不能生

长 (致死表型), 已广泛应用于检测植物 LPAT 酶的功能^[15,17]。将构建成功的突变型转化体 pET28A (空载) 和 pET28A-*PfLPAT2* 在 30 °C 过夜培养, 重悬至 OD_{600} 约为 0.5。然后将由初始浓度菌液制成的梯度稀释液 (10^0 、 10^1 、 10^2 、 10^3 和 10^4) 分别点样到两个含 IPTG 的选择性培养基上, 一个置于 30 °C 培养, 另一个置于 42 °C 培养。测试结果显示, 过表达空载体 pET28A 和 *PfLPAT2* 的 SM2-1 在 30 °C 条件下均能正常生长, 过表达 *PfLPAT2* 的 SM2-1 能在 42 °C 条件下正常生长, 然而空载体转化的 SM2-1 则在 42 °C 下死亡 (图 5)。测试结果表明, PflPAT2 能恢复 LPAT 酶功能, 在大肠杆菌 SM2-1 细胞催化膜脂生物合成。

2.4 紫苏 PflPAT2 在酵母异源表达促进总油脂和油酸合成

用限制性内切酶 *Hind* III 和 *Xho* I 分别对重组质粒 pYES2.0-*PfLPAT2* 和空载体 pYES2.0 进行双酶切, 结果显示酶切后得到目的基因条带 (附图 2A, 详见《生物工程学报》网络版附件), 说明 *PfLPAT2* 基因酵母表达载体构建成功。

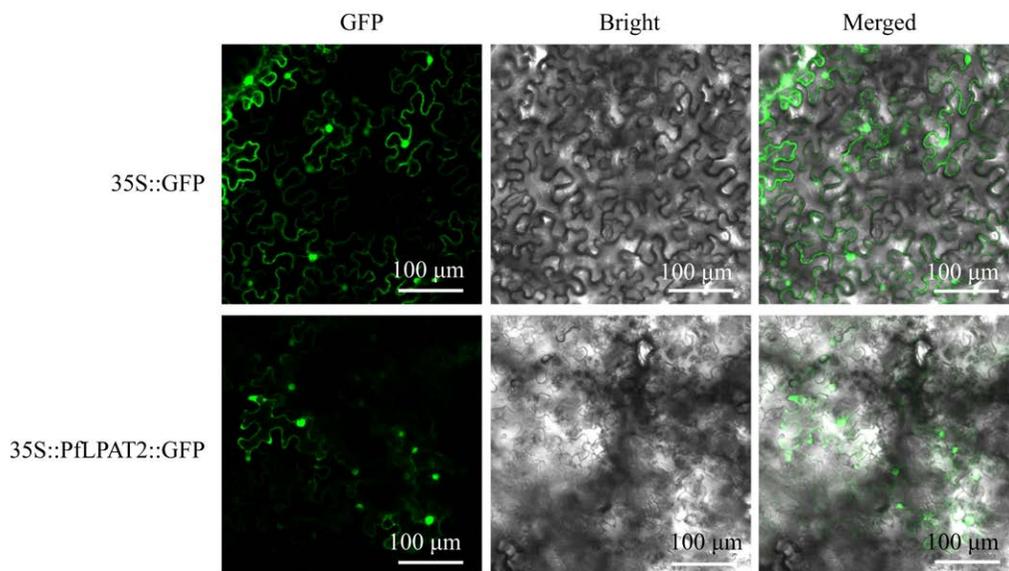


图 3 PflPAT2 蛋白在烟草表皮细胞的亚细胞定位

Figure 3 Subcellular localization of PflPAT2 in the epidermal cells of *N. benthamiana*.

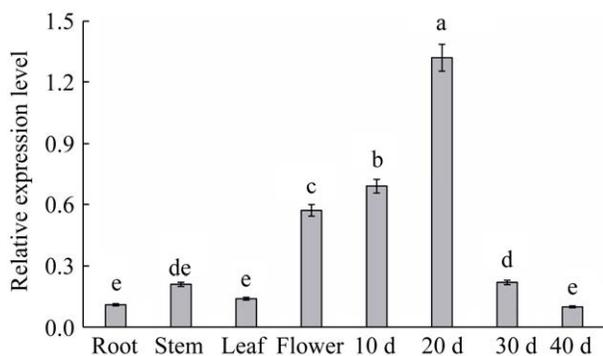


图 4 *PflPAT2* 基因在紫苏不同组织中的相对表达量

Figure 4 The expression profiles of *PflPAT2* gene in different tissues of perilla. Values are the mean and standard error ($n=3$). Small letters indicate statistically significant differences between the different groups ($P<0.05$).

将 pYES2.0-*PflPAT2* 重组载体转入酵母 INVSc1 中进行异源表达,以转空载体 pYES2.0 作为对照,经尿嘧啶缺陷型培养基 SC-Ura 初步筛选和菌落

PCR 检测显示 (附图 2B, 详见《生物工程学报》网络版附件),转 pYES2.0-*PflPAT2* 重组载体酵母经 PCR 扩增出长度约为 1 155 bp 的条带,说明目的基因 *PflPAT2* 已成功转入 INVSc1 酵母中。

为研究 *PflPAT2* 基因的异源表达对 INVSc1 酵母油脂合成积累的影响,将阳性转基因酵母进行诱导表达,富集菌体后真空冷冻干燥用于总油脂含量及脂肪酸组分测定与分析。结果显示,转 pYES2.0 空载酵母的总油脂含量约为酵母菌体干重的 7.31% (图 6A),与 INVSc1 酵母总油脂含量无显著差异,说明 pYES2.0 空载体的表达并不影响酵母自身的生长。与转 pYES2.0 空载酵母相比,转 *PflPAT2* 基因酵母的总油脂含量提高了约 19.3%,说明 *PflPAT2* 基因的表达能够提高酿酒酵母 INVSc1 的总油脂含量。

提取阳性转基因酵母的脂肪酸甲酯,通过气相色谱仪进一步测定各脂肪酸组分和含量。结果显示,INVSc1 酵母、转 pYES2.0 空载酵母

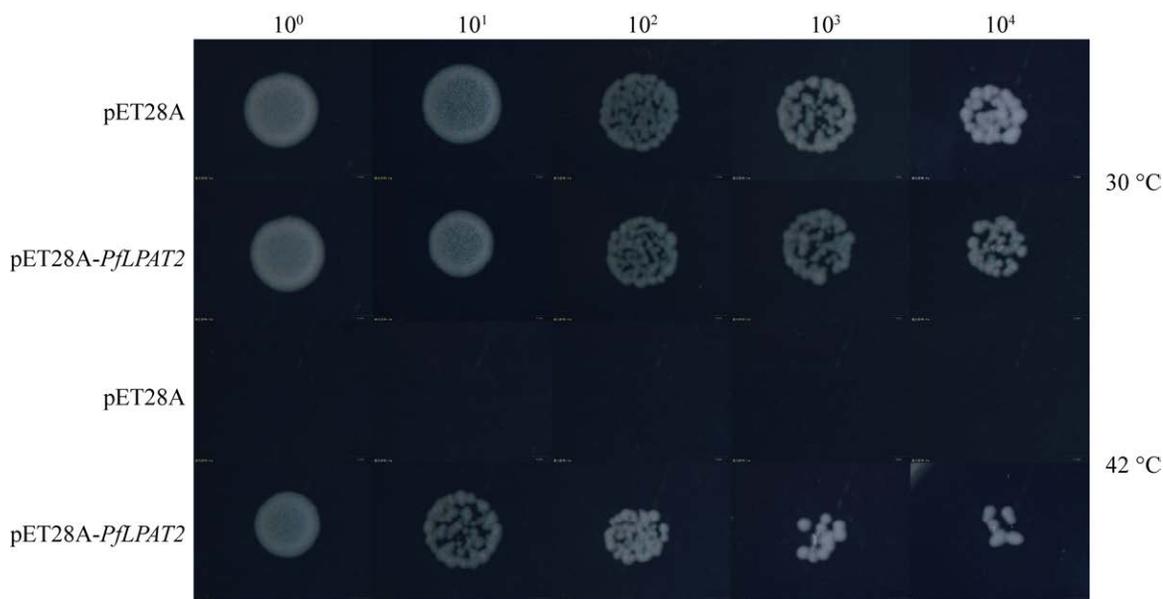


图 5 紫苏 *PflPAT2* 转化大肠杆菌突变株 SM2-1 的功能互补测试

Figure 5 Functional complementation assay of *PflPAT2* in *E. coli* LPAAT mutant SM2-1. SM2-1 cells were transformed with pET28A empty vector or pET28A-*PflPAT2*. Each cells were spotted onto plates containing 0.1 mmol/L IPTG with a series of dilutions. Plates were incubated at 30 °C and 42 °C, respectively.

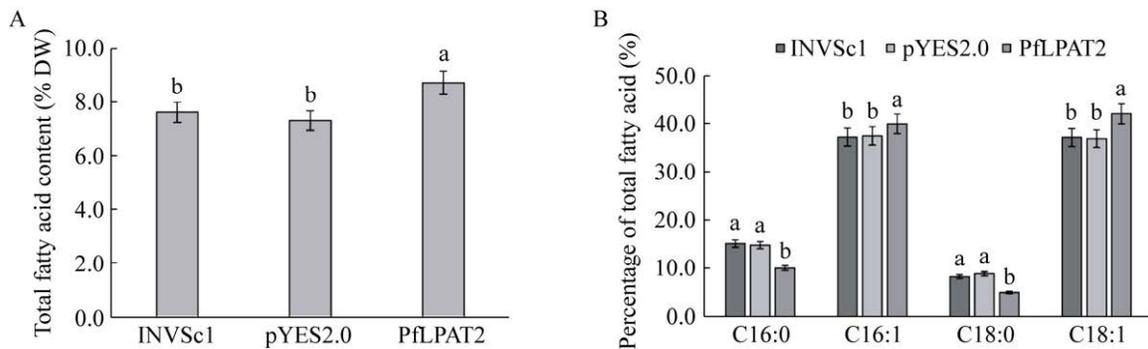


图 6 *PfLIPAT2* 基因在酵母 INVSc1 中的异源表达对脂肪酸合成积累的影响

Figure 6 Heterologous expression of *PfLIPAT2* gene in wild-type yeast INVSc1 and its impact on the biosynthesis and accumulation of oils and fatty acids. (A) Total fatty acid content of transgenic yeast. (B) Fatty acid composition analysis of transgenic yeast. Values are the mean and standard error ($n=3$), a and b indicate statistically significant differences between the different groups ($P<0.05$).

和转 *PfLIPAT2* 基因酵母的脂肪酸组成一致，都包括 C16:0 (棕榈酸)、C16:1 (棕榈油酸)、C18:0 (硬脂酸)、C18:1 (油酸) (图 6B)。转 pYES2.0 空载酵母与野生型酵母 INVSc1 中各脂肪酸组分含量基本相同，说明 pYES2.0 空载体的表达基本不影响酵母的脂肪酸组分与含量。与转 pYES2.0 空载酵母相比，转 *PfLIPAT2* 基因酵母中 C16:1 和 C18:1 含量显著提高，分别增加了 6.58% 和 13.89%，表明紫苏 *PfLIPAT2* 基因在酵母中的异源表达能够改变酵母的脂肪酸组成，推测其更有助于不饱和脂肪酸的合成，特别是油酸的积累。

2.5 紫苏 *PfLIPAT2* 过表达提高烟叶油脂和健康有益型脂肪酸的富集

为进一步研究 *PfLIPAT2* 基因的表达能否提高其他高等植物的油脂含量，改善其品质，我们以普通烟草为宿主，构建组成型过表达载体 pCAMBIA1303-*PfLIPAT2*，通过农杆菌介导的叶盘法转化烟草，潮霉素作为筛选标记。取转基因烟草植株的叶片提取 DNA，用 ORF 全长引物 (表 1) 进行 PCR 扩增验证。*PfLIPAT2* 转基因阳性植株经 PCR 扩增会出现 1 155 bp 的目的条带 (附图 3A，详见《生物工程学报》网络版附件)。将基因组 DNA 水平鉴定为阳性的烟草叶

片提取总 RNA，反转录后进行 RT-PCR 扩增进一步检测目的基因 *PfLIPAT2* 在烟草中的表达。结果显示 (附图 3B，详见《生物工程学报》网络版附件) *PfLIPAT2* 有效表达的转基因烟草经 RT-PCR 扩增出长度约为 156 bp 的条带，结果证明目的基因 *PfLIPAT2* 已成功整合入烟草植株中且能够有效表达。

提取转基因纯合系烟草叶片的总脂肪酸和脂肪酸甲酯，测定其总脂肪酸含量和各脂肪酸组分的含量。总脂肪酸含量检测结果显示，转空载 pCAMBIA1303 叶片与野生型相比，总油脂含量几乎无差异；而与转空载叶片相比，转 *PfLIPAT2* 基因烟草叶片总脂肪酸含量显著增加，提高了约 0.42 倍 (图 7A)。

脂肪酸各组分及含量分析结果显示，转空载 pCAMBIA1303、转 pCAMBIA1303-*PfLIPAT2* 烟草叶片与野生型烟草叶片的脂肪酸组分一样，且转空载烟草叶片与野生型的各脂肪酸组分含量基本相同，但转 pCAMBIA1303-*PfLIPAT2* 烟草叶片中 C16:0 和 C18:0 含量显著下降，C18:2 略有下降。然而，C18:1 含量增加明显，提高了约 1 倍，C18:3 含量升高了约 3.77% (图 7B)。这说明紫苏 *PfLIPAT2* 基因能够应用于其他作物提高

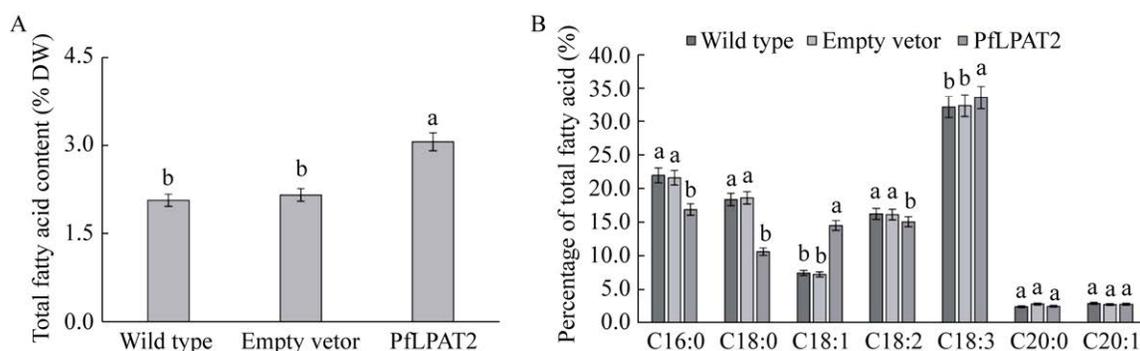


图7 转基因烟草叶片中 *PfLPAT2* 基因的表达对脂肪酸合成积累的影响

Figure 7 Heterologous expression of *PfLPAT2* gene in the transgenic tobacco leaves and its impact on the biosynthesis and accumulation of total oil and fatty acids. (A) Total fatty acid content of transgenic tobacco leaves. (B) Fatty acid composition analysis of transgenic tobacco leaves. Values are the mean and standard error ($n=3$), a and b indicate statistically significant differences between the different groups ($P<0.05$).

总油脂含量, 改良油脂品质, 促进健康有益型脂肪酸 (油酸和 α -亚麻酸) 的富集。

3 讨论

紫苏作为一种新型的多用途油料经济作物, 具有丰富的营养成分和活性物质, 其研究与应用越来越引起国内外的广泛关注。紫苏整株均可入药, 可用于制作香料、香精、油墨、油漆、饲料、饵料等, 还可作为食用油和化妆品等的生产原料。 α -亚麻酸是维持人类生命健康的必需脂肪酸, 人体自身不能合成, 只能通过外源食物供给^[33]。富含 α -亚麻酸的油脂用于人类饮食中, 可起到降低血压、血脂、胆固醇, 提高免疫力等作用。目前市场上 α -亚麻酸的主要来源为深海鱼类, 但由于人类过度捕捞及环境恶化等原因导致深海鱼类资源锐减, 且深海鱼类产品含有动物脂肪和胆固醇, 不适宜人们日常高量食用, α -亚麻酸市场缺口日渐加剧。因此, 亟需建立 α -亚麻酸可持续替代供应资源。在人们日常食用油中, 紫苏籽油的 α -亚麻酸含量最高, 是良好的保健食用油, 高品质的紫苏籽油可作为一种理想的 α -亚麻酸优质资源。LPAT 参与调控植物油脂合成积累过程, 是 TAG

组装中介导 sn-2 位置上酰化反应的一个关键酶, 催化 LPA 生成 PA^[34]。因此, 研究紫苏 *PfLPAT2* 酶基因的功能对解析紫苏油脂、尤其是 α -亚麻酸的调控机制以及通过基因工程手段改良紫苏或其他油料作物油脂品质具有重要的意义。

本研究从紫苏转录组数据库中筛选鉴定得到 *PfLPAT2* 基因, 通过分子克隆技术分离得到其 ORF, 并对其序列特征进行了预测分析。结果表明, *PfLPAT2* 基因共编码 384 个氨基酸残基, 属于不稳定疏水性蛋白质。CDD 功能结构域预测结果显示 *PfLPAT2* 蛋白具有一个溶血磷脂酸酰基转移酶典型的保守区。多序列比对结果表明, *PfLPAT2* 与其他物种 LPAT2 蛋白序列之间高度保守, 且存在 MBOAT 基序 [NH(X)4D] 和“EGT” Box, 它们是酰基转移酶中重要的催化活性位点及结合位点^[35-36]。实时荧光定量 PCR 表明, *PfLPAT2* 基因在紫苏不同组织及不同发育时期种子中均有表达, 但表达量存在差异, 在开花后 20 d 的种子中相对表达水平最高, 这与紫苏种子发育过程中油脂及 α -亚麻酸的积累基本吻合^[24], 推测 *PfLPAT2* 基因在紫苏种子油脂及 α -亚麻酸富集过程中行使重要功能。亚细胞定位表明, *PfLPAT2* 蛋白定位于细胞质,

与 TargetP 和 PSORTII 在线软件预测结果一致。为了确定 PfLPAT2 具有 LPAT 酶活性而发挥功能, 利用大肠杆菌突变株 SM2-1 (pIsC ts) 进行功能互补测定^[37]。大肠杆菌有一个单一的 *plsC* 基因, 它编码对细胞膜甘油酯生物合成至关重要的 LPAT, 敲除该基因后大肠杆菌是致死的^[37]。SM2-1 菌株是一种能够在 30 °C 条件下生长的温度敏感型突变体, 而在 42 °C 条件下为致死表型。测试结果显示, 过表达 *PfLPAT2* 的 SM2-1 能在 42 °C 条件下正常生长, 而转化空载体的 SM2-1 则死亡。该试验证明 PfLPAT2 能够恢复 LPAT 功能, 在大肠杆菌细胞催化膜脂生物合成, 这与冬菟葵 (*Eranthis hyemalis* L.) EhLPAAT2^[38] 的大肠杆菌功能互补测试结果一致。

目前, 已有不少植物来源的 LPAT 基因被鉴定和克隆, 也已发现一些 LPAT 基因能够提高植物的油脂合成。在油菜中过表达 *ScLPAT* 使种子含油量提高 6.84%–8.55%^[39]。在拟南芥中过表达甘蓝型油菜的 LPAT 基因 *BATI.5*、*BATI.12*、*BATI.13*, 转基因植株种子中含油量提高 11%^[23]。另有研究表明, LPAT-A 型对 C18 酰基链具有更高的底物选择偏好性, 体外测定拟南芥 AtLPAT2 的酶活性发现其对油酸 (C18:1) 有较高的偏好性, 蓖麻 RcLPAT2 在底物选择上更偏好于 C18:1^[40-41]。紫苏 PfLPAT2 亦属于 LPAT-A 型基因, 本研究对转 *PfLPAT2* 基因酵母的脂肪酸组分进行测定与分析发现, 与转空载对照相比, 转 *PfLPAT2* 基因酵母脂肪酸各组分的含量发生了改变, C16:1 和 C18:1 所占比例显著提高, 特别是 C18:1 含量增加了 13.89%。这表明 *PfLPAT2* 基因的表达能够提高酵母的油脂合成能力, 促进酵母积累更多的不饱和脂肪酸, 尤其是 C18:1。据此推测, PfLPAT2 可能对 C18:1 具有更高的偏好性。通过农杆菌侵染法将 BnLPAT2-A7 转化至拟南芥, 发现转基因株系中平均含油量比

对照组 33.15% 提高了约 1.86%, 亚麻酸含量提高了 30%, 而油酸含量降低^[42]。本研究通过农杆菌介导的叶盘法将 *PfLPAT2* 基因转化至普通烟草, 导致转基因烟草叶片总脂肪酸含量提高约 0.42 倍, C18:1 含量增加了约 1 倍, C18:3 含量亦提高了 3.77%, 表明 *PfLPAT2* 的表达可以显著提高烟草叶片的油脂生物合成, 特别是能同时提高油酸和 α -亚麻酸的积累, 改良油脂品质。

为深入论证 *PfLPAT2* 基因的功能, 本实验室正在建立紫苏遗传转化体系, 构建敲除或沉默表达载体, 进行紫苏遗传转化和转化体的生理生化表型研究。通过这些研究将全面解析 *PfLPAT2* 基因对紫苏油脂特别是 α -亚麻酸等健康有益型不饱和脂肪酸的生物合成分子机制。

4 结论

本研究从紫苏发育种子中成功分离得到 *PfLPAT2* 基因的 ORF, 其编码蛋白具有溶血磷脂酰基转移酶活性。qRT-PCR 分析表明, *PfLPAT2* 基因在紫苏发育种子高量表达且与紫苏种子发育过程中油脂及 α -亚麻酸的快速积累相吻合。紫苏 PfLPAT2 具有 LPAT 酶活性, 能够催化膜脂的生物合成。*PfLPAT2* 基因在酵母和普通烟草中的异源表达均能够提高宿主组织的总脂肪酸合成水平, 特别是显著促进 C18:1 和 18:3 的富集。该研究为深入解析紫苏油脂特别是不饱和脂肪酸生物合成积累的分子机制和紫苏及其他油料作物油脂品质的遗传改良提供了科学基础和分子靶标。

REFERENCES

- [1] 陆洁静, 任文彬. 紫苏的研究概况. 农产品加工(学刊), 2009(6): 32-34.
Lu JJ, Ren WB. Research survey of *Perilla frutescens*. Acad Period Farm Prod Process, 2009(6): 32-34 (in Chinese).

- [2] 李鹏, 朱建飞, 唐春红. 紫苏的研究动态. 重庆工商大学学报(自然科学版), 2010(3): 271-275.
Li P, Zhu JF, Tang CH. Research progress of *Perilla frutescens* and *Perilla meal*. J Chongqing Technol Bus Univ (Nat Sci Ed), 2010(3): 271-275 (in Chinese).
- [3] 黄明发, 郭莉, 郑炯, 等. 紫苏的研究进展. 中国食品添加剂, 2007(4): 85-89.
Huang MF, Guo L, Zheng J, et al. Study advances in *Perilla frutescens*. China Food Addit, 2007(4): 85-89 (in Chinese).
- [4] 贾春伶, 王锦燕, 赵奎君, 等. 《本草纲目》草部药食同源药用植物的记载及启示. 中国现代中药, 2020, 22(11): 1769-1777.
Jia CL, Wang JY, Zhao KJ, et al. Records of medicinal and edible plants in the herb section of compendium of materia medica and their revelation. Mod Chin Med, 2020, 22(11): 1769-1777 (in Chinese).
- [5] 许万乐, 李会珍, 张志军, 等. 紫苏籽油理化性质测定及脂肪酸组分分析. 中国粮油学报, 2013, 28(12): 106-109.
Xu WL, Li HZ, Zhang ZJ, et al. Determination of physicochemical properties and analysis on fatty acid composition of different *Perilla* seed oil. J Chin Cereals Oils Assoc, 2013, 28(12): 106-109 (in Chinese).
- [6] 牟朝丽, 陈锦屏. 紫苏油的脂肪酸组成、维生素 E 含量及理化性质研究. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2006, 34(12): 195-198.
Mou ZL, Chen JP. Study on the composition of fatty acid, vitamin E content and physicochemical properties of *Perilla* oil. J Northwest Sci Tech Univ Agric For (Nat Sci Ed), 2006, 34(12): 195-198 (in Chinese).
- [7] Tang WZ, Liu YZ, Zhao YQ. A new homogenizing technology to obtain rosmarinic acid from *Perilla* oil meal. Chin Herb Med, 2012, 4(1): 70-73.
- [8] 徐章华, 邵玉芬, 朱国辉. 苏子油对大鼠血脂及血液流变性的影响. 营养学报, 1997, 19(1): 11-15.
Xu ZH, Shao YF, Zhu GH. Effects of *Perilla frutescens* (L.) Britt. oil on blood lipid and hemorrheology in rats. Acta Nutr Sin, 1997, 19(1): 11-15 (in Chinese).
- [9] 王龙龙. 花生二酰甘油酰基转移酶(DGAT)基因的克隆与分析[D]. 济南: 山东师范大学, 2010.
Wang LL. Cloning and characterization of diacylglycerol acyltransferase (*DGAT*) gene in peanut (*Arachis hypogaea* L.) [D]. Jinan: Shandong Normal University, 2010 (in Chinese).
- [10] Chapman KD, Ohlrogge JB. Compartmentation of triacylglycerol accumulation in plants. J Biol Chem, 2012, 287(4): 2288-2294.
- [11] Ohlrogge J, Browse J. Lipid biosynthesis. Plant Cell, 1995, 7(7): 957-970.
- [12] 黄卓烈, 朱利泉. 生物化学. 北京: 中国农业出版社, 2004.
Huang ZL, Zhu LQ. Biochemistry. Beijing: China Agriculture Press, 2004 (in Chinese).
- [13] 戚维聪. 油菜发育种子中油脂积累与 Kennedy 途径酶活性的关系研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2008.
Qi WC. Studies on correlations of developing seed lipid accumulation with Kennedy pathway enzyme activities in *Brassica napus* [D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2008 (in Chinese).
- [14] Misra N, Panda PK, Parida BK. Genome-wide identification and evolutionary analysis of algal *LPAT* genes involved in TAG biosynthesis using bioinformatic approaches. Mol Biol Rep, 2014, 41(12): 8319-8332.
- [15] Kim HU, Huang AHC. Plastid lysophosphatidyl acyltransferase is essential for embryo development in *Arabidopsis*. Plant Physiol, 2004, 134(3): 1206-1216.
- [16] Kim HJ, Silva JE, Iskandarov U, et al. Structurally divergent lysophosphatidic acid acyltransferases with high selectivity for saturated medium chain fatty acids from *Cuphea* seeds. Plant J, 2015, 84(5): 1021-1033.
- [17] Arroyo-Caro JM, Chileh T, Kazachkov M, et al. The multigene family of lysophosphatidate acyltransferase (*LPAT*)-related enzymes in *Ricinus communis*. Cloning and molecular characterization of two *LPAT* genes that are expressed in castor seeds. Plant Sci, 2013, 199/200: 29-40.
- [18] 郝月茹, 周雅莉, 王志龙, 等. 紫苏油脂合成相关基因家族鉴定及表达分析. 西北植物学报, 2020, 40(10): 1663-1671.
Hao YR, Zhou YL, Wang ZL, et al. Identification and expression analysis of gene family related to *Perilla* lipid synthesis. Acta Bot Boreali Occidentalia Sin, 2020, 40(10): 1663-1671 (in Chinese).
- [19] Angkawijaya AE, Nguyen VC, Nakamura Y. Lysophosphatidic acid Acyltransferases 4 and 5 are involved in glycerolipid metabolism and nitrogen starvation response in *Arabidopsis*. New Phytol, 2019, 224(1): 336-351.
- [20] Zou J, Katavic V, Giblin EM, et al. Modification of seed oil content and acyl composition in the Brassicaceae by expression of a yeast sn-2 acyltransferase gene. Plant Cell, 1997, 9(6): 909-923.
- [21] Rao SS, Hildebrand D. Changes in oil content of transgenic soybeans expressing the yeast *SLC1* gene. Lipids, 2009, 44(10): 945-951.
- [22] Chen SL, Lei Y, Xu X, et al. The peanut (*Arachis hypogaea* L.) gene *AhLPAT2* increases the lipid content of transgenic *Arabidopsis* seeds. PLoS One, 2015, 10(8): e0136170.
- [23] Maisonneuve S, Bessoule JJ, Lessire R, et al. Expression of rapeseed microsomal lysophosphatidic acid acyltransferase isozymes enhances seed oil content in *Arabidopsis*. Plant Physiol, 2010, 152(2): 670-684.

- [24] 王计平, 张玲慧, 赵静, 等. 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, 2016, 31(3): 91-95.
Wang JP, Zhang LH, Zhao J, et al. Regulation of controlling oil synthesis by fatty acid metabolism of *Perilla* seed and key enzyme gene. J Chin Cereals Oils Assoc, 2016, 31(3): 91-95 (in Chinese).
- [25] 任文燕, 郝月茹, 李润植, 等. 紫苏 *Pf*gpat9 基因的鉴定与功能分析. 激光生物学报, 2020, 29(2): 183-192.
Ren WY, Hao YR, Li RZ, et al. Identification and function analysis of *Pf*gpat9 gene from *Perilla frutescens*. Acta Laser Biol Sin, 2020, 29(2): 183-192 (in Chinese).
- [26] Iskandarov U, Silva JE, Kim HJ, et al. A specialized diacylglycerol acyltransferase contributes to the extreme medium-chain fatty acid content of *Cuphea* seed oil. Plant Physiol, 2017, 174(1): 97-109.
- [27] 张玲慧. 紫苏种子油脂代谢及限速酶 *DGAT1* 基因的表达分析[D]. 太谷: 山西农业大学, 2014.
Zhang LH. Study on the lipid metabolism in seeds and expression pattern of the rate-limiting enzyme gene *DGAT1* of *Perilla*[D]. Taiyu: Shanxi Agricultural University, 2014 (in Chinese).
- [28] Xie X, Meesapyodsuk D, Qiu X. Functional analysis of the dehydratase domains of a PUFA synthase from *Thraustochytrium* in *Escherichia coli*. Appl Microbiol Biotechnol, 2018, 102(2): 847-856.
- [29] 徐荣华, 邱丽俊, 阳天泉, 等. 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, 2013, 35(2): 123-130.
Xu RH, Qiu LJ, Yang TQ, et al. Cloning and functioning of phospholipids: diacylglycerol acyltransferase (*JcPDAT1*) cDNA from *Jatropha curcas*. Chin J Oil Crop Sci, 2013, 35(2): 123-130 (in Chinese).
- [30] 谭太龙, 冯韬, 罗海燕, 等. 甘蓝型油菜磷脂二酰甘油酰基转移酶(*BnPDAT1*) cDNA 的克隆和功能鉴定. 作物学报, 2016, 42(5): 658-666.
Tan TL, Feng T, Luo HY, et al. Cloning and characterization of phospholipids: diacylglycerol acyltransferase (*BnPDAT1*) cDNA from *Brassica napus* L.. Acta Agron Sin, 2016, 42(5): 658-666 (in Chinese).
- [31] 陈莹, 高宇, 李腾, 等. 过表达 *NtAGPase* 小亚基基因提高烟叶淀粉含量和生物量. 生物工程学报, 2021, 37(8): 2845-2855.
Chen Y, Gao Y, Li T, et al. Overexpression of *NtAGPase* small subunit gene increases leaf starch content and tobacco biomass. Chin J Biotech, 2021, 37(8): 2845-2855 (in Chinese).
- [32] 邓咪咪, 刘宝玲, 王志龙, 等. 大豆硬脂酰-ACP Δ^9 脱氢酶(*GmSAD*)基因家族的鉴定及功能分析. 生物工程学报, 2020, 36(4): 716-731.
Deng MM, Liu BL, Wang ZL, et al. Identification and functional analysis of soybean stearoyl-ACP Δ^9 desaturase (*GmSAD*) gene family. Chin J Biotech, 2020, 36(4): 716-731 (in Chinese).
- [33] 李璐. 紫苏种子脂肪酸代谢及合成相关基因 *PfPDAT* 的功能分析[D]. 太谷: 山西农业大学, 2017.
Li L. Fatty acid metabolism and functional analysis on *PfPDAT* gene related to fatty acid biosynthesis in *Perilla* seeds[D]. Taiyu: Shanxi Agricultural University, 2017 (in Chinese).
- [34] Baud S, Dubreucq B, Miquel M, et al. Storage reserve accumulation in *Arabidopsis*: metabolic and developmental control of seed filling. Arabidopsis Book, 2008, 6: e0113.
- [35] Lewin TM, Wang P, Coleman RA. Analysis of amino acid motifs diagnostic for the sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase reaction. Biochemistry, 1999, 38(18): 5764-5771.
- [36] Taylor DC, Francis T, Lozinsky S, et al. Cloning and characterization of a constitutive lysophosphatidic acid acyltransferase 2 (*LPAT2*) gene from *Tropaeolum majus* L.. Open Plant Sci J, 2010, 4(1): 7-17.
- [37] Coleman J. Characterization of *Escherichia coli* cells deficient in 1-acyl-sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase activity. J Biol Chem, 1990, 265(28): 17215-17221.
- [38] Meesapyodsuk D, Chen Y, Ye SJ, et al. Co-expressing *Eranthis hyemalis* lysophosphatidic acid acyltransferase 2 and elongase improves two very long chain polyunsaturated fatty acid production in *Brassica carinata*. Metab Eng Commun, 2021, 12: e00171.
- [39] Liu F, Xia YP, Wu L, et al. Enhanced seed oil content by overexpressing genes related to triacylglyceride synthesis. Gene, 2015, 557(2): 163-171.
- [40] Kim HU, Li YB, Huang AHC. Ubiquitous and endoplasmic reticulum-located lysophosphatidyl acyltransferase, *LPAT2*, is essential for female but not male gametophyte development in *Arabidopsis*. Plant Cell, 2005, 17(4): 1073-1089.
- [41] Tomosugi M, Ichihara K, Saito K. Polyamines are essential for the synthesis of 2-ricinoleoyl phosphatidic acid in developing seeds of castor. Planta, 2006, 223(2): 349-358.
- [42] 尹永泰. 甘蓝型油菜溶血磷脂酰基转移酶家族基因的克隆与表达[D]. 武汉: 华中科技大学, 2016.
Yin YT. Cloning and expressing of lysophosphatidic acid acyltransferase family genes from *Brassica napus* L.[D]. Wuhan: Huazhong University of Science and Technology, 2016 (in Chinese).

(本文责编 陈宏宇)