

冷诱导下毛百合甘油-3-磷酸酰基转移酶活性变化及其基因保守区的克隆

陈丽静¹, 葛 菱¹, 李浩戈¹, 郭志富¹, 张 丽¹, 党晓璇¹, 陶承光², 李天来¹

(1. 沈阳农业大学 辽宁省生物技术重点实验室 设施园艺省部共建教育部重点实验室 辽宁 沈阳 110866; 2. 辽宁省农业科学院 辽宁 沈阳 110161)

摘要: 探讨了野生毛百合甘油-3-磷酸酰基转移酶活性在冷胁迫下的变化, 用简并引物扩增了甘油-3-磷酸酰基转移酶基因保守区序列的结果表明, 该保守区段长 744 bp, 推测编码 247 个氨基酸。在 GPAT 氨基酸序列中存在 1 个高度保守的区域(WIAPSGGRDRP), 在 NCBI 上经过 BLASTp 比对分析, 发现这段保守区序列为 *LPLAT* 基因超级家族酶类的催化活性区, 此家族多为催化酰基辅酶 A(acylCoAs) 或者酰基载体蛋白(acylACPs) 中的酰基与受体蛋白结合的酰基转移酶类。此序列 Genbank 登录号为 HQ654523。

关键词: 毛百合; 冷诱导; 甘油-3-磷酸酰基转移酶(GPAT); 简并引物; 保守区; 同源性

中图分类号: Q78 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-7091(2011)05-0034-06

Change in Glycerol-3-Phosphate Acyltransferase Activity of *Lilium dauricum* Ker Grawl. and Cloning of Its Conserved cDNA Region under Cold Stress

CHEN Li-jing¹, GE Ling¹, LI Hao-ge¹, GUO Zhi-fu¹,
ZHANG Li¹, DANG Xiao-xuan¹, TAO Cheng-guang², LI Tian-lai¹

(1. Bioscience and Technology Institute and Key Laboratory of Protected Horticulture(Ministry of Education), Shenyang Agricultural University Shenyang 110866 China; 2. The Liaoning Academy of Agricultural Sciences Shenyang 110161 China)

Abstract: Change in Glycerol-3-Phosphate Acyltransferase (GPAT) activity of *Lilium dauricum* under cold stress was explored and the conserved sequence of GPAT was amplified using degenerate primers. The results demonstrated that the conserved sequence was 744 bp in length, which was deduced coding 247 amino acids. There is a highly conserved domain(WIAPSGGRDRP) in the amino acid sequence of GPAT. Aligning the conserved domain with BLAST of NCBI, we found it was a catalytic domain of *LPLAT* gene superfamily enzymes. This family mostly catalyzed acyl-coenzyme A(acylCoAs) or acyltransferase which was acyl in the Acyl carrier protein(acylACPs) binding with receptor protein. The gene accession nucleotide sequence number in GenBank was bankit1413285.

Key words: *Lilium dauricum*; Cold stress; Glycerol-3-Phosphate acyltransferase; Degenerate primers; Conserved cDNA region; Homology

毛百合(*Lilium dauricum* Ker Grawl.) 属百合科(Liliaceae) 百合属(*Lilium*) , 原产于我国河北、黑龙江、吉林、辽宁以及朝鲜、日本、蒙古和俄罗斯的西伯利亚等北方寒冷地区, 是一种抗寒性极强的北方品系, 是百合属中培育抗寒品种的优良亲本之一。特别是其超强的抗逆性优势, 具有抗热、抗旱、抗寒、耐

盐碱、耐贫瘠、耐沙埋、抗风蚀等特性, 适应性很强。

植物的抗冷能力与叶绿体膜脂中磷脂酰甘油(PG) 的顺式不饱和脂肪酸水平密切相关^[1]。抗冷植物中 PG 的 sn-1 位具有较高比例的顺式不饱和脂肪酸, 而冷敏感植物中顺式不饱和脂肪酸比例则较低^[2, 3]。由于叶绿体中 PG 的 sn-2 位主要被饱和脂

收稿日期: 2011-05-01

基金项目: 辽宁省教育厅项目(L2010495); 中国博士后科学基金面上项目资助(20100471471); 国家高技术研究发展计划“863”计划项目(2006AA100109)

作者简介: 陈丽静(1971-), 女, 山东海阳人, 副教授, 博士, 主要从事植物基因工程与细胞工程研究。

通讯作者: 李天来(1955-), 男, 辽宁绥中人, 教授, 博士, 博士生导师, 主要从事蔬菜设施栽培研究。

肪酸和反式不饱和脂肪酸所占据^[4],人们推测 sn-1 位的顺式不饱和脂肪酸含量决定了不同植物的冷敏感性^[5]。人们通过基因工程的手段调控 PG 中顺式不饱和脂肪酸的含量,从而改变了烟草^[5]、拟南芥^[6]和水稻^[7]的冷敏感性。

甘油-3-磷酸酰基转移酶(GPAT)是叶绿体 PG 生物合成过程中的第一个酰基酯化酶,它将脂肪酰转移到 3-磷酸甘油的 C-1 位上合成 1-酰基-Sn-甘油-3-磷酸(溶血磷脂酸)。一般来说,抗冷植物 GPAT 优先选择酰基脂肪酸去饱和酶的作用下进一步去饱和化成为顺式多聚不饱和脂肪酸;然而,冷敏感植物 GPAT 很难区分 C18:1-ACP 和 C16:0-ACP,由于 16:0 脂肪酸不能被进一步去饱和形成顺式不饱和脂肪酸,导致冷敏感植物 PG 的 sn-1 位顺式不饱和脂肪酸含量较低,从而对低温较敏感^[4,9-11]。然而, Nishida 等^[12]从冷敏感植物南瓜中分离得到了 GPAT 的一个同工酶以 C18:1-ACP 为底物。因此, GPAT 基因在植物抗冷性中的作用引起了人们广泛的关注。

目前已从许多植物中克隆了 GPAT 基因,并研究了其部分功能,但在百合科植物中未见该基因克隆和功能分析的报道。在我国北方保护地栽培中,切花百合易受到低温危害。本研究试图克隆百合 GPAT 基因,并分析它在不同温度下的表达特征,从而为研究百合抗冷的分子机制奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

毛百合由内蒙古大兴安岭阿尔山市白狼林业局提供,为野生种驯化三年。

取毛百合的鳞茎,用软毛刷刷净上面的泥土后用清水洗净。在超净台上用 75% 乙醇一过,无菌水冲洗 3 次,再投入 0.1% HgCl₂ 溶液中消毒 10 min,中间更换 1 次 HgCl₂ 消毒液,无菌水冲洗 3 次,置于铺好滤纸的无菌培养皿上吸干水分用于接种。以 MS 为基本培养基,琼脂 7 g/L,蔗糖 30 g/L, pH 5.8,日光灯每天光照 14 h,光强 1 000 ~ 1 200 lx,培养温度(23 ± 3) °C,60 d 后,进行冷诱导处理,用于 RNA 的提取。RNAPlant 植物总 RNA 提取试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司;M-MLV Reverse Transcriptase 试剂盒购自 Promega 公司;其余试剂购自 TAKARA 公司;引物自行设计并由赛百盛公司合成。

1.2 方法

1.2.1 毛百合 GPAT 活性测定 取毛百合鳞茎接种于 MS 基本培养基培养 60 d 后放入 4 °C 冷诱导。

取 8 瓶毛百合试管苗于 4 °C 分别冷诱导 0, 2, 4, 8, 16, 24, 48, 72 h。

取冷诱导后的百合试管苗叶片,加入适量 50 mmol/L Tris-HCl(pH 7.8),用 Waring blender 全速搅匀。将悬浮液用 Schleicher and Schull No. 520b II 过滤,滤液用稀释好的盐酸调 pH 值到 5.4,吸取上清液。再将上清液加稀释好的 NaOH 调 pH 到 7.8,并逐渐加入固体硫酸铵,使其浓度达到 30% 的饱和度,10 000 g 离心 10 min,上清液继续加入硫酸铵,使其达到 60% 的饱和度,10 000 g 离心 10 min,收集沉淀,用 20 mmol/L pH 8.0 的 Tris-HCl 溶解,并用这种 Buffer 透析过夜。加入 DTT,使其终浓度为 5 mmol/L,将透析的酶液过柱子(DEAE-Cellulose(5 × 14 cm))在 Buffer A(20 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0; 5 mmol/L DTT)中平衡。柱子在 Buffer A 中用 20, 40, 50 mmol/L 的 NaCl 洗脱。有酰基转移酶活性的部分用 70% 的硫酸铵饱和。透析后,蛋白部分被另一根柱子(DEAE-Cellulose(2.5 × 16 cm))吸附,先用 20 mmol/L 的 NaCl 在 Buffer A 中漂洗,再用含有 200 mL 20 mmol/L 的 NaCl 和 200 mL 70 mmol/L 的 NaCl 的混合物在 Buffer A 中漂洗。有活性的部分用 70% 的硫酸铵饱和。沉淀用最少量的 Buffer A 溶解,并转移到 Sephadex G100 column(2.5 × 94 cm)的柱子上,用 Buffer A(加入 0.02% (W/V) NaNO₃)平衡,收集酶液^[13]。

于 30 °C 条件下用日立 U-3010 型分光光度计测定 340 nm 处 30 min 内吸光值变化。按公式酶比活性 [nmol/(mg 蛋白·min)] = $\Delta OD \times 10^{-3} / (\epsilon_{\max} \times C) \times 10^9$ 计算酶活性。式中, ΔOD 为每分钟增加的平均吸光值; ϵ 为 NADH 摩尔消光系数(6 200); C 为加入酶量。

1.2.2 毛百合 GPAT 基因保守区的克隆与分析 以经过冷诱导处理的毛百合组培苗为样品,利用 RNAPlant 植物总 RNA 提取试剂盒提取总 RNA。以 1.2% 琼脂糖电泳检测总 RNA 的完整性,紫外分光光度计法确定 RNA 的纯度。cDNA 第一链的合成采用 M-MLV Reverse Transcriptase 试剂盒合成, -20 °C 保存。

利用 DNAMAN 生物软件对已报道的 GPAT 氨基酸序列进行比较分析,在植物 EST 库和 Genbank 中广泛查询 GPAT 基因的相关序列信息,利用 Primer 5.0 软件结合 Blastn 进行序列比对分析,设计 GPAT 基因的简并性引物:

GF1: 5'-ATATTGC(T/A)G(A/C)AGGAATGGA(G/A)GA-3'

GF2: 5'-AATGGA(G/A) GA(A/G) (C/A) TG-TAT(C/T) AGAA(T/C) TA-3'

GR1: 5'-GGAGG(G/A) GGCAT(A/G) AT(A/G) TCAT-3'

GR2: 5'-G(A/C) CCAGG(G/A) ACACCAG(C/A) ATGTT-3'

以反转录得到的第一链 cDNA 为模板,以 GF1、GR1 为上下游引物进行第一轮 PCR 扩增,再以 GF2、GR2 为嵌套引物,以第一轮 PCR 扩增产物为模板进行巢式扩增得到中间片段。扩增条件: 先 94℃ 预变性 5 min; 然后进入循环反应即 94℃ 30 s, 53℃ 45 s, 72℃ 60 s, 循环 35 次; 最后 72℃ 延伸 10 min。产物经 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测,回收纯化目的片段。回收产物与大 PMD-18T vector 连接,转化大肠杆菌 Top10 感受态细胞,菌落在含有 X-gal 和 IPTG 的 LB(Amp⁺) 固体培养基上进行蓝白斑筛选。随机挑取 5~6 个阳性克隆,在 LB(Amp⁺) 固体培养基上划线培养后进行菌落 PCR 鉴定。鉴定的阳性克隆菌株穿刺到含有 LB(Amp⁺) 固体培养基的离心管中,测序由天根生化科技(北京)有限公司完成。

利用 DNAMAN 软件对测序结果进行氨基酸序列翻译,并将测序结果与预测的蛋白序列分别通过 NCBI-BLAST(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) 程序和 DNAMAN 软件进行同源性比对分析,确定克隆的序列为 GPAT 基因的保守区序列。将得到的毛百合 GPAT 保守区 cDNA 序列递交 NCBI 网站(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)。

1.2.3 毛百合 GPAT 基因的半定量表达 采用半定量 RT-PCR 对 4℃ 冷诱导不同时间百合 GPAT 基因的表达进行分析。根据 18 S rRNA 设计引物作为内参, *Lilium* Actin F(5'-TGTTAGATTCTGGTGACG-GAGTG-3'); *Lilium* Actin R(5'-AAGTTTCTCCTT-TATGTCCCTCA-3')。反应程序为: 94℃ 预变性 5 min; 然后进入循环反应即 94℃ 30 s, 55℃ 30 s, 72℃ 45 s, 循环 30 次; 最后 72℃ 延伸 10 min。根据获得的 GPAT 基因保守区设计特异引物, PF302(5'-GCAGGGGATAGGGTTATTACAGA-3'); PR772(5'-AGGATTCTCAATGGCAGCAGTA-3'), 片段为 470 bp。根据内参引物扩增结果所确定的模板用量,使用位于编码区内的特异引物对 PF302 和 PR772 进行扩增反应,反应体系及程序同前。

2 结果与分析

2.1 毛百合 GPAT 活性变化

如图 1 所示,毛百合 GPAT 活性在没有冷处理

时为 0.244 nmol/(mg·min), 以后随着冷处理时间的延长逐渐上升,当冷处理 16 h 时浓度达到 0.755 nmol/(mg·min) 酶活性达到最大值; 16 h 之后随着冷诱导时间的延长,酶活性开始下降,72 h 时的表达量与 0 h 处理时基本一致。

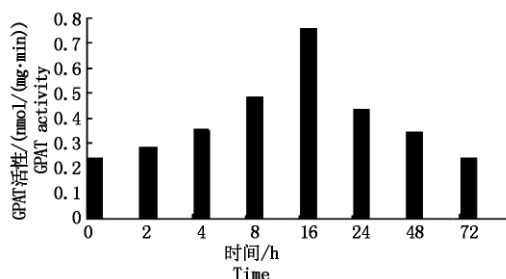


图 1 冷诱导下毛百合 GPAT 活性的变化

Fig. 1 Change in GPAT activity of *L. dauricum* under cold induced

2.2 毛百合 RNA 的质量检测

以 1.2% 琼脂糖检测 RNA 的完整性, RNA 基本未降解, 比较完整(图 2)。用日立 U-3010 型分光光度计检测 RNA 的吸光值, $A_{260}/A_{280} = 1.89$, 符合纯 RNA 溶液 A_{260}/A_{280} 介于 1.7~2.0 之间的要求, 表明采用此法得到的总 RNA 纯度较高。从纯度和完整性两方面分析, 此 RNA 符合试验要求。

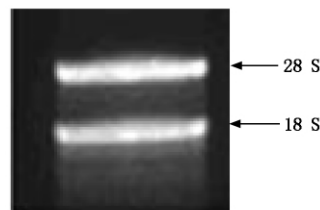
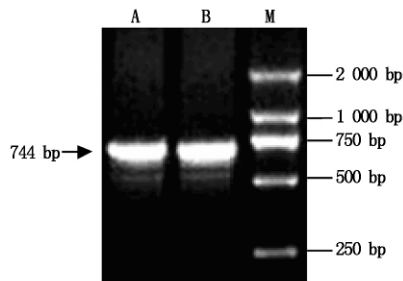


图 2 毛百合试管苗叶片总 RNA

Fig. 2 Total RNA isolated from *Lilium dauricum*

2.3 毛百合 GPAT 基因保守区的克隆与序列分析

提取 4℃ 冷诱导 12 h 毛百合试管苗叶片总 RNA, 反转录成 cDNA 作模板进行 PCR, 扩增百合 GPAT 基因的中间保守区, 最佳退火温度为 53℃, 获得 700 bp 左右的片段, 如图 3。克隆 PCR 产物并对



M. DL 2 000™ DNA Marker; A, B. 毛百合 GPAT 基因的保守片段。

图 3 毛百合的 GPAT 基因保守序列电泳

Fig. 3 Agarose electrophoresis of amplification of GPAT conserved sequence from *L. dauricum*

克隆后的片段测序的结果表明,此片段长 744 bp, 编码 247 个氨基酸(图 4)在 NCBI 中 BLAST 分析,该序列和已测得的其他物种的 *GPAT* 基因有很高的同

源性,从而确定扩增得到了百合 *GPAT* 基因的保守区片段。

```

1      CCTGTGGAACATATATCATTAATTATCGACATGCGGTTTTCGAAAAGTGGAAATCCTAATGC
1      L V E L Y H N Y R H A V L Q S G N P N A
61     GAGTAAAAATTATACTCTCCAATATGGCTGTTGTGTTTGTATCGCATTTTGTGGATGTGGA
21     S K I I L S N M A V V F D R I L L D V E
121    GGATCCTTTTACCTTTTACCTCATCACAAGCAATTCGTGAGCCTTTTGACTACTACAT
41     D P F T F S P H H K A I R E P F D Y Y M
181    GTTTGGTCAAAATTATATTAAGCCGCTGGTAGATTTTCAGGAGATCATACATTGGGAACAT
61     F G Q N Y I K P L V D F R R S Y I G N I
241    CACACTTTTGTATGACATTGAAGAGAACTCAAGCAGGGCCACAATATAGTTTGTGCTC
81     T L F D D I E E K L K Q G H N I V L V S
301    AAACCATCAGACGGGAAGCAGATCCTGCAGTCATTGCTTTGTTGCTTGAAGAACAACATC
101    N H Q T E A D P A V I A L L L E R T N S
361    ATATATTGCTGAGAAGCTGGTATATGTCGCAGGGGATAGGGTTATTACAGATCCGCTTTG
121    Y I A E K L V Y V A G D R V I T D P L C
421    CAAGCCGTTTCAGTATGGGAAGGAATCTTCTTTGTGTATCTCGAAAAAGCATATGAATGA
141    K P F S M G R N L L C V Y S K K H M N D
481    TGATCCTGAGCTTGGCGAGATGAAAAGGAGATCAAAATACCCGAAAGTCTCAAGGAAATGGC
161    D P E L A E M K R R S N T R S L K E M A
541    TACACTTTTGAGGGCTGGATCACAATAATATGGATCGCACCAAGTGGTGGGAGAGACCG
181    T L L R A G S Q I I W I A P S G G R D R
601    TCCTGATCCAGTGACAGGGGAATGGTATCCTGCACCTTTTGTATGATCTTCAGTTGACAA
201    P D P V T G E W Y P A P F D A S S V D N
661    TATGAGAAGGCTTGTGGAACATTCTAGTTTCTGACATATACATCCCATGGCATTGCT
221    M R R L V E H S S F P G H I H P M A L L
721    ATGTCATGATATCATGCCTCCACC
241    C H D I M P P
  
```

图 4 毛百合 *GPAT* 基因保守区的核苷酸序列及推导的氨基酸序列

Fig. 4 Conserved nucleotides and deduced amino acid sequences of *GPAT* from *L. dauricum*

2.4 毛百合 *GPAT* 氨基酸序列的同源性分析

使用 Clustalx 1.83 软件对 GenBank 数据库 (http://www.ncbi.nlm.nih.gov) 进行同源性搜索获得的其他植物的 *GPAT* 基因氨基酸序列,用 DNAMAN 生物软件将得到的 *LiGPAT* 基因推导的氨基酸序列在 NCBI 上同源性比对的结果表明(进行 BlastP 比对分析),发现 *LiGPAT* 基因推导的氨基酸与已知其

他植物 *GPAT* 基因序列有 40.8% ~ 76.7% 相似性,其中与油料作物油棕 (*Elaeis guineensis*) *GPAT* 基因相似性最高,为 76.7% 以上,其次是柑橘 (*Citrus unshiu*)、南瓜 (*Cucurbita moschata*)、蓖麻 (*Ricinus communis*) 等相似性分别为 67%, 66.8%, 66.1% (图 5)。

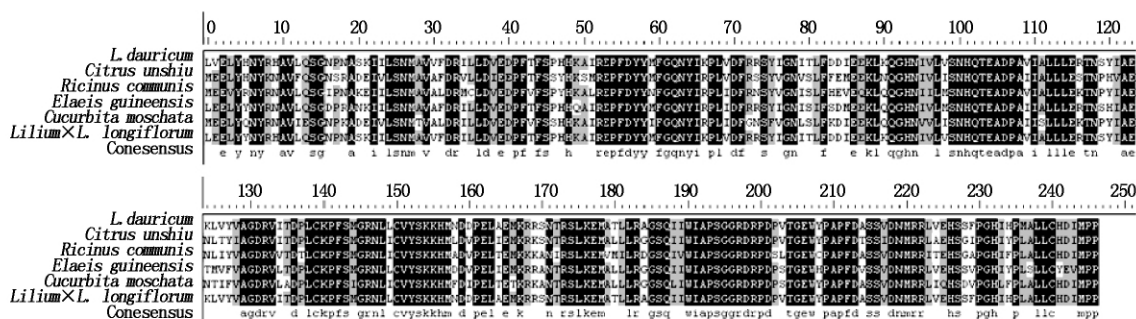


图 5 毛百合 *GPAT* 保守区氨基酸序列与其他物种该基因氨基酸同源性的比较

Fig. 5 Comparison of partial amino acids between *L. dauricum* and other species

结合序列分析和同源性比较结果可以初步认定该序列为毛百合 *GPAT* cDNA 的保守区序列。该保守区核苷酸序列已在 NCBI 登录,登录号为 Bankit1413285。在同源性比较中,发现在 *GPAT* 氨基酸序列中存在 1 个高度保守的区域 (WIAPSG-GRDRP) 在 NCBI 上经过 BLASTp 比对分析,发现这段保守区序列为 *LPLAT* 基因超级家族酶类的催

化活性区,此家族多为催化酰基辅酶 A (acylCoAs) 或者酰基载体蛋白 (acylACPs) 中的酰基与受体蛋白结合的酰基转移酶类(图 6 中方框部分)。

2.5 毛百合 *GPAT* 基因的表达分析

以管家基因 β -actin 作内参调控扩增反应的 cDNA 模板用量比较一致的情况下,毛百合 *LiGPAT* 基因在 4℃ 冷诱导不同时间处理的表达情况如图 7 所示。

毛百合 <i>Lilium dauricum</i>	AEMXKRSNTRSLK . EMATLLRGGGQIIQ IAPSGGRDRPOP	283
油棕 <i>Elaeis guineensis</i>	IEEMXKRSNTRSLK . EMALLRGGGQIIQ IAPSGGRDRPOP	331
柑橘 <i>Citrus unshiu</i>	IEEMXKRSNTRSLK . EMALLRGGGQIIQ IAPSGGRDRPOP	339
蓖麻 <i>Ricinus communis</i>	TEEMXKRSNTRSLK . EMVMILRGGGQIIQ IAPSGGRDRPOP	326
南瓜 <i>Cucurbita moschata</i>	TETMKRSNTRSLK . EMALLRGGGQIIQ IAPSGGRDRPOP	268
麻风树 <i>Jatropha curcas</i>	TEEMXKRSNTRSLK . EMALPLRGGGQIIQ IAPSGGRDRPOP	333
黄瓜 <i>Cucumis sativus</i>	AETMKRSNTRSLK . EMALLRGGGQIIQ IAPSGGRDRPOP	341
黑子南瓜 <i>Cucurbita ficifolia</i>	AETMKRSNTRSLK . EMALLRGGGQIIQ IAPSGGRDRPOP	268
水稻 <i>Oryza sativa</i>	VDMMKRSNTRSLK . EMALLRGGGQIIQ IAPSGGRDRPOP	298
拟南芥 <i>Arabidopsis thaliana</i>	VDMMKRSNTRSLK . EMATMLRGGGQIIQ IAPSGGRDRPOP	330
蚕豆 <i>Vicia faba</i>	IDMMKRSNTRSLK . EMATLLRGGGQIIQ IAPSGGRDRPOP	330
豌豆 <i>Pisum sativum</i>	VDMMKRSNTRSLK . EMAMLLRGGGQIIQ IAPSGGRDRPOP	328
红花 <i>Carthamus tinctorius</i>	AEMXKRSNTRSLK . EMALLRGGGQIIQ IAPSGGRDRPOP	331
甜椒 <i>Capsicum annuum</i>	ADMMKRSNTRSLK . EMAMLLRGGGQIIQ IAPSGGRDRPOP	335
菜豆 <i>Phaseolus vulgaris</i>	VEEMKRSNTRSLK . EMAMLLRGGGQIIQ IAPSGGRDRPOP	332
玉米 <i>Zea mays</i>	IEEMXKRSNTRSLK . EMALLRGGGQIIQ IAPSGGRDRPOP	313
菠菜 <i>Spinacia oleracea</i>	VDMMKRSNTRSLK . ELVLLRGGGQIIQ IAPSGGRDRPOP	342
番茄 <i>Solanum lycopersicum</i>	AEMXKRSNTRSLK . EMALLRGGGQIIQ IAPSGGRDRPOP	342
沙棘 <i>Hippophae rhamnoides</i>	AEMXKRSNTRSLK . EMALLRGGGQIIQ IAPSGGRDRPOP	68
莱茵衣藻 <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	KAAKMETNRKTLV . AMQRKLNELGTLQ IAPSGGRDRPOP	281
Consensus	k n l g wiapsgrdrp	

图 6 毛百合与其他植物 *GPAT* cDNA 推导蛋白质序列多重比对部分比对结果

Fig. 6 Alignment of deduced amino acid sequences from 20 plants *GPAT* cDNAs

从图 7 可以看出,该基因在无冷诱导处理条件下也可表达,但表达量较低;随冷诱导时间延长,基因表达量不断增大,4 h 时已有大量表达,16 h 时基因的表达量达到最高,16 h 之后表达量随着冷诱导时间的延长逐渐下降,72 h 时的表达量与 0 h 处理时基本一致。初步的表达分析显示,低温可以诱导百合 *LiGPAT* 基因快速表达,表达量随着冷诱导时间的延长呈现先升高后降低的趋势,16 h 时达到峰值,基因的持续表达时间不低于 48 h。与酶活性测定结果一致。

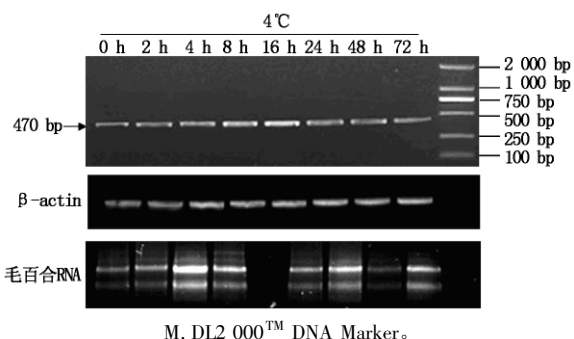


图 7 毛百合 *LiGPAT* 基因在 4°C 冷诱导不同时间处理的表达情况

Fig. 7 Expression of *LiGPAT* in *L. dauricum* under different cold induced time at 4°C

3 讨论

首次从百合科植物毛百合鳞茎中克隆了 *GPAT* 基因,通过与油棕、柑橘、蓖麻、南瓜等植物的 *GPAT* 基因序列进行同源性比较,证实所克隆的基因为百合甘油-3-磷酸酰基转移酶的基因(*LiGPAT*)。氨基酸序列同源性比较结果表明,亲缘关系较近的植物

中 *GPAT* 基因的氨基酸序列同源性较高,而且冷感性相近的植物的氨基酸序列同源性也较高,这预示 *GPAT* 与植物抗冷性相关。

低温可以诱导 *LiGPAT* 快速表达,4 h 即大量表达,16 h 达到峰值,说明甘油-3-磷酸酰基转移酶可能在百合抵抗低温胁迫时具有重要作用。当百合受到低温胁迫后,*LiGPAT* 基因的迅速表达,产生该酶使叶片类囊体膜脂不饱和度提高,从而最大限度抵抗低温伤害。由于该基因持续高表达时间不短于 48 h,因而能在长时间的低温下持续表达以获得抗寒能力。当植物对低温适应之后,该酶表达量即开始下降。

参考文献:

- [1] Nishida I, Murata N. Chilling sensitivity in plants and cyanobacteria: the crucial contribution of membrane lipids [J]. Ann Rev Physiol Plant Mol Biol, 1996, 47: 541 - 568.
- [2] Murata N, Sato N, Takahashi N *et al.* Composition and positional distributions of fatty acids in phospholipids from leaves of chilling-sensitive and chilling-resistant plants [J]. Plant Cell Physiol, 1982, 23: 1071 - 1079.
- [3] Murata N. Molecular species composition of phosphatidylglycerols from chilling-sensitive and chilling resistant plant [J]. Plant Cell Physiol, 1983, 24: 81 - 87.
- [4] Bertrams M, Heinz E. Positional specificity and fatty acid selectivity of purified sn-glycerol 3-phosphate acyltransferase from chloroplasts [J]. Plant Physiol, 1981, 68: 653 - 657.
- [5] Murata N, Isizaki-Nishizawa O, Higashi S *et al.* Genetically engineered alteration in the chilling sensitivity of

- plants [J]. *Nature* ,1992 ,356: 710 – 713.
- [6] Wolter F P ,Schmidt R ,Heinz E. Chilling sensitivity of *Arabidopsis thaliana* with genetically engineered membrane lipids [J]. *EMBO J* ,1992 ,11: 685 – 692.
- [7] Yokio S ,Higashi S I ,Kishitani S *et al.* Introduction of the cDNA for *Arabidopsis* glycerol-3-phosphate acyltransferase (GPAT) confers unsaturation of fatty acids and chilling tolerance of photosynthesis on rice [J]. *Molecular Breeding* ,1998 ,4: 269 – 275.
- [8] Ariizumi T ,Kishitani S ,Inatsugi R *et al.* An increase in unsaturation of fatty acids in phosphatidylglycerol from leaves improves the rates of photosynthesis and growth at low temperatures in transgenic rice seedlings [J]. *Plant Cell Physiol* 2002 ,43(7) : 751 – 758.
- [9] Frentzen M ,Heins E ,Mekeon A *et al.* Specificities and selectivities of glycerol-3-phosphate acyltransferase from pea and spinach chloroplasts [J]. *FEBS Lett* ,1983 ,129: 629 – 636.
- [10] Frentzen M ,Nishida I ,Murata N. Properties of the plastidial acyl-(acyl-carrier-protein) : glycerol-3-phosphate acyltransferase from the chilling-sensitive plant squash (*Cucurbita moschata*) [J]. *Plant Physiology* ,1987 ,28(7) : 1195 – 1201.
- [11] Weber S ,Wolter F P ,Buck F *et al.* Purification and cDNA sequencing of an oleate-selective acyl-ACP: sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase from pea chloroplasts [J]. *Plant Molecular Biology* ,1991 ,17: 1067 – 1076.
- [12] Nishida I ,Sugiura M ,Enju A. A second gene for acyl-(acyl-carrier-protein) : glycerol-3-phosphate acyltransferase in squash, *Cucurbita moschata* cv. shirogikuza^{*}, codes for an oleate-selective isozyme: molecular cloning and protein purification studies. *Plant and Cell Physiology* 2000 ,41(12) : 1381 – 1383.
- [13] 中国科学院上海植物生理研究所 ,上海市植物生理学会. 现代植物生理学实验指南 [M]. 北京: 科学出版社 ,1999: 127 – 128.