

三角褐指藻 *DGAT1* 基因生物信息学分析及表达调控研究

王何瑜¹, 龚一富^{2,3*}, 郑小辉^{2,3}, 李申睿^{2,3}

(1. 宁波大学 食品与药学学院, 浙江 宁波 315832; 2. 宁波大学 海洋学院, 浙江 宁波 315832;

3. 浙江省海洋生物工程重点实验室, 浙江 宁波 315832)

摘要: 本研究采用转录组测序获得了三角褐指藻 *DGAT1* 基因 cDNA 全长序列(GeneBank 登录号: 7200924), 并对其生物信息学分析和表达调控研究. 结果表明, 三角褐指藻 *DGAT1* 基因 cDNA 序列全长为 1 438 bp, 开放阅读框(ORF)为 1 098 bp, 编码 365 氨基酸序列, 含有脂肪酸蛋白特性(I)和 DAG 结合位点(II)等功能结构域. 预测三角褐指藻 *DGAT1* 蛋白为亲水性蛋白, 含有 6 个跨膜结构域和 7 个超强跨膜螺旋区, 无信号肽. 进化树分析表明, 三角褐指藻与海链藻 *DGAT1* 蛋白同源性最高. RT-qPCR 结果表明, 光照强度和温度均显著促进三角褐指藻 *DGAT1* 基因的表达. 随着光照强度和温度的增加, 三角褐指藻 *DGAT1* 基因的表达量呈先升高后降低趋势, 在光照强度为 2 500 lx 或温度为 25 °C 时, 三角褐指藻 *DGAT1* 基因的表达量达到最大, 这与三角褐指藻总脂含量的变化趋势一致, 同样揭示 *DGAT1* 蛋白与三角褐指藻总脂生物合成与积累密切相关.

关键词: 三角褐指藻; *DGAT1* 基因; 克隆; 生物信息学; 基因表达调控

中图分类号: S917.3; Q943.2

文献标志码: A

文章编号: 1001-5132 (2021) 04-0001-07

二脂酰甘油酰基转移酶(Diglyceride Acyltransferase, DGAT)是三脂酰甘油(TAG)合成途径中的唯一限速酶, 催化二脂酰甘油结合脂肪酸酰基形成 TAG. 三角褐指藻(*Phaeodactylum tricornutum*)是海洋微藻中生长较快、脂质含量较高的藻种^[1], 其油脂含量约占细胞干重的 20%~30%, 是一种可以用来制备生物柴油的微藻^[2]. 三角褐指藻碳储存的主要形式为油脂, 特别是三脂酰甘油(TAG). 甘油-3-磷酸酰基转移酶(Glycerol-3-Phosphate Acyltransferase, GPAT)催化 3-磷酸甘油形成溶血磷脂酸, 随后由 1-酰基甘油-3-磷酸酰基转移酶(AGPAT)催化生成磷脂酸, 随后在磷脂酸磷酸酶(Phosphatidic Acid Phosphatase, PAP)的催化下形成甘油二脂, 最后在二脂酰甘油酰基转移酶(Diglyceride Acyltransferase, DGAT)的催化下生成 TAG. DGAT 是 TAG 合成途径中的最后一步, 也是 TAG 合成途

径中的限速酶^[3], 能调控脂肪代谢以及脂类在细胞中的沉积. 根据其结构差异, DGAT 有 DGAT1、DGAT2、WS/DGAT 和胞质内 DGAT (CytoDGAT) 共 4 种类型^[4]. DGAT1 与 DGAT2 是普遍存在的 2 个亚型, DGAT1 主要作用于 TAG 代谢, 而 DGAT2 则侧重于积累特殊脂肪酸^[5]. DGAT 通过影响种子发育过程中 TAG 含量, 对种子质量和脂肪酸组成成分起一定作用^[6]. Jako 等^[6]发现将 *DGAT* 基因插入拟南芥染色体中, 能降低拟南芥种子中 DGAT1 活性, 从而减少 TAG 含量与油脂含量. Lardizabal 等^[7]将深黄伞形霉(*Umbelopsis ramanniana*) *DGAT2* 在大豆中过量表达后, 使其种子的含油量提高了 1.5%. 研究表明, 在有利条件下微藻会积累大量脂质^[8], 三角褐指藻可以作为生产生物燃料的有效原料广泛应用^[9]. 目前 *DGAT1* 基因已在玉米(*Arachis hypogaea*)^[10]、大豆(*Glycine max*)^[11]、棉花(*Gossy-*

收稿日期: 2019-11-20.

宁波大学学报(理工版)网址: <http://journal.lg.nbu.edu.cn/>

基金项目: 浙江省科技厅重点科技创新团队项目(2012R10029-07, 2010R50029); 宁波市科技攻关项目(2014C91023, 2013C10018); 宁波市社会发展重大项目(2017C510002).

第一作者: 王何瑜(1982-), 女, 重庆江津人, 助理实验师, 主要研究方向: 藻类生物技术. E-mail: wangheyu@nbu.edu.cn

*通信作者: 龚一富(1973-), 男, 重庆开县人, 博士/副教授, 主要研究方向: 植物次生代谢产物及机理. E-mail: gongyifu@163.com

pium hirsutum)^[12]与油茶(*Camellia oleifera*)^[13]等陆地植物中克隆出来,但未见从海洋藻类,特别是三角褐指藻中有克隆 *DGAT1* 基因的报道。鉴于三角褐指藻是目前油脂生产的理想海洋藻类,从三角褐指藻中克隆 *DGAT1* 基因,深入研究藻类油脂积累分子机制,并采用代谢工程策略提高藻类油脂含量,以期提供优良基因资源,为最终实现藻类的生物柴油生产提供前期的研究基础。

不同微藻藻种积累脂肪的能力不同,但当它们处于不利生长时,微藻往往会合成大量的脂肪。影响微藻脂类合成的因素有光照、温度、pH、营养盐等。光照可促进陆地植物油脂的积累,光反应为质体中脂肪酸的合成提供 ATP 和 NADPH,激活 Rubisco 旁路,使得在油脂合成过程中能更有效地利用碳流^[4]。吕文兵等^[14]发现,杜氏盐藻(*Dunaliella Salina*)的叶绿体 *psbA* 基因的表达量在光照强度 4 500 lx 时显著升高,但是过高的光强反而会抑制基因的表达。温度通常会影响到油料种子的脂肪酸组成,其原因是温度影响了 *FAD2* 基因和 PEP 羧化酶活性,进而影响到油脂的合成^[4]。光照和温度可调控陆地植物脂类合成,在微藻研究中有类似报道^[15-16]。但光照强度和温度对微藻 *DGAT1* 基因的表达调控研究较少,光照和温度是否通过调节 *DGAT1* 基因进而表达来促进三角褐指藻脂类的含量,目前还未见相关报道。因此,本研究通过转录组测序获得三角褐指藻 *DGAT1* 基因 cDNA 全长序列,通过研究三角褐指藻在不同光照强度和温度下, *DGAT1* 基因转录差异及其与脂质含量之间的相关性,以期为进一步研究三角褐指藻脂类合成与积累的途径、机制提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 三角褐指藻培养与处理

三角褐指藻藻种由宁波大学海洋生物工程实验室微藻种质库提供,培养方法参照文献^[17]方法进行。取高温灭菌的过滤海水,以 1:1 000 比例加入 MVA 母液^[18],以 1:3(藻种:海水)比例接藻。培养温度为(20±0.5)℃,光暗周期比 12 h:12 h,每天摇瓶 3 次。光照处理组的培养温度为(20±0.5)℃,光照强度为 0、1 000、2 500、5 000 lx,每个处理组设置 3 个平行。温度处理组的光照强度为 1 000 lx,温

度设置为 15、20、25、30℃,每个处理组设置 3 个平行。培养至第 7 天时,测定总脂含量。

1.2 三角褐指藻 *DGAT1* 基因的获得与生物信息学分析

取处于对数生长期的三角褐指藻藻液,用植物总 RNA 提取试剂盒(北京奥莱博生物技术有限公司)提取总 RNA。用反转录试剂盒(TaKaRa,大连)将总 RNA 反转录成 cDNA。通过转录组测序分析获得三角褐指藻 *DGAT1* 基因 cDNA 全长序列,设计扩增 ORF 的引物(F-DGAT: 5'-ATGTTGTGCC GGAAATACTTC-3', R-DGAT: 5'-TCAACGAATC AAGCA GGA AT-3')进行 PCR 验证,PCR 产物经回收后连接 T 载体,转化大肠杆菌 DH5a,PCR 验证后送公司测序。

使用 Vector 软件对三角褐指藻和其他物种的 *DGAT1* 蛋白进行多序列的比对(表 1)^[19]。通过

表 1 *DGAT1* 氨基酸序列分析所用物种

缩写	拉丁文名	NCBI 序列号	物种名
NtDGAT	<i>Nicotiana tomentosiformis</i>	XP_009606357.1	烟草
TpDGAT	<i>Thalassiosira pseudonana</i>	XP_002287215.1	假微型海链藻
CvDGAT	<i>Chlorella vulgaris</i>	ALP13863.1	小球藻
SmDGAT	<i>Selaginella moellendorffii</i>	XP_002994237.1	江南卷柏
GmDGAT	<i>Glycine max</i>	K7LC65.1	大豆
AiDGAT	<i>Arachis ipaensis</i>	XP_016202335.1	花生
JrDGAT	<i>Juglans regia</i>	XP_018845396.1	核桃
CaDGAT	<i>Corylus Americana</i>	A0A161IUT7.1	美洲榛
SlDGAT	<i>Solanum lycopersicum</i>	XP_010313759.1	番茄
TsDGAT	<i>Triadica sebifera</i>	APQ41596.1	乌柏
StDGAT	<i>Solanum tuberosum</i>	XP_006353543.1	马铃薯
DsDGAT	<i>Daucus carota</i>	XP_017220179.1	黄胡萝卜
HaDGAT	<i>Helianthus annuus</i>	OTG30061.1	向日葵
BtDGAT	<i>Bos taurus</i>	NM_010046.3	家牛
CaDGAT	<i>Chlorocebus aethiops</i>	NM_053437.1	绿猴
HsDGAT	<i>Homo sapiens</i>	NM_012079.5	人

ProtParam (<http://eapasy.org/tools/protparam.html>)在线工具对三角褐指藻 *DGAT1* 氨基酸序列进行分析,预测其相对分子量、等电点等特性,并用 ExPASy 预测 *DGAT1* 蛋白质的二级结构^[20]. 利用 TMHMM (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>) 对三角褐指藻 *DGAT1* 蛋白进行跨膜区域预测. 用 Clustal_X 1.8 和 Mega 3.0 软件对 *DGAT1* 蛋白进行系统进化树构建.

1.3 三角褐指藻 *DGAT1* 基因的表达调控研究

对三角褐指藻光照处理组和温度处理组培养 24 h, 然后分别提取总 RNA, 并反转录. 以三角褐指藻 β -*ACTIN* 基因作为管家基因, 引物为 β -*actin*-F (5'-CGTGAAGCTTGACGGACTACCTG-3') 和 β -*actin*-R (5'-TAGTTTTTGTCCAGAGCCGAG-3'). 三角褐指藻 *DGAT1* 基因的定量 PCR 引物为 *dgat1*-F (5'-GGTATGTTTGCCTAGACTTGT-3') 和 *dgat1*-R (5'-

TCGTTATTTACTTCGGAGATT-3'), 由生工生物工程(上海)有限公司合成. 使用 SYBR Premix Ex TaqTM (TaKaRa, 大连) 进行荧光定量 PCR. 荧光定量 PCR 反应体系为 SYBR[®] Premix Ex TaqTM (2 $\times$) 10 μ L, F-prime、R-primer (10 μ mol $\cdot$ L⁻¹) 各 0.8 μ L, cDNA 模板 2 μ L, 超纯水 6.4 μ L. 每组样品重复 3 次, 反应程序: 94 $^{\circ}$ C 3 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 53 $^{\circ}$ C 40 s, 72 $^{\circ}$ C 20 s, 40 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min, 4 $^{\circ}$ C 保存. 三角褐指藻 *DGAT1* 基因相对转录水平用 2^{- $\Delta\Delta C_t$} 方法计算, 使用 SPSS 20.0 软件对数据进行分析^[21].

1.4 三角褐指藻总脂含量的测定

分别取光照处理组和温度处理组培养 7 d 的三角褐指藻 30 mL, 4 $^{\circ}$ C, 5 000 r $\cdot$ min⁻¹ 离心 10 min. 使用无菌水冲洗 2~3 次, 并在 4 $^{\circ}$ C, 8 000 r $\cdot$ min⁻¹ 条件下离心 10 min. 总脂含量的测定采用改良的 Bligh-Dyer 法^[22].

```

1   CATCGTGCGGCAGAGCCCTCATACCTCAGCGCGGATGCTCCCATTCAAAACCTACCGAGGATTTCTGAATTTAGGC
76  GTTATTATTTTATTGTTTCTAACTTTCGGCTGATCTTGGGCACAATCCGTAGCAACGGATTTGTCTTGACGACT
151 GCAGTGAAGCACTACAAGAACCCTAAATCACCTCAAGGAAGATCCCTGGCAGGAATTTCTTTTGTATCAGGATTT
226 CTTCTCCAGCTCGTCTTTGTTTCGATTGCGTTTGGGATCGAATGGAATGTTGTGCCGGAATACTTCAACGAAAAAC
1   M L C R K Y F N E N
301 TTCGGCATGATCCTTCATCACTTCAATGCCCACTCAGCCTTGCTGATACCTTTAGGTATTGTTTGAATCTCATC
11  F G M I L H H F N A H S A L L I P L G I V W N L T
376 GATAGACCTGCGGTTGGTGCAATTTTGCTTTTACACGCTACGATAACATGGATGAACTCATTTCTTACATGTTG
36  D R P A V G A I L L L H A T I T W M K L I S Y M L
451 GCGAACGAAGATTACCGGCTATCATCGCTCGCGTTGGGGGCAACCCACACCTAGCTACGTCGATAGTCGAA
61  A N E D Y R L S S R R V G G N P H L A T L A L V E
526 AATCTAGATTACAGATGAGGCGAACATTAACCTACCCCAAAATGTTACTCTCCGCAACATTTTATTTTGGTGT
86  N L D S D E A N I N Y P Q N V T L R N I F Y F W C
601 GCTCCGACGTTGACTTACCAGATTGCCTTCCCGAAGTCCCGCGAGTTGCTATTGGAAAATCGCGGATATCCTG
111 A P T L T Y Q I A F P K S P R V R Y W K I A D I L
676 ATGCGCATGACGGTGTCCATCGCACTATTACCTTTTGTGCTGGCACAAATTGTTTACGCTGCATTGGAAGAGCTA
136 M R M T V S I A L F T F L L A Q I V Q P A L E E L
751 GTGAGCGACCTGGACGAGACCAATGGATCTACACCGCAGCAATATTGCGGAGCTGAAACTTTCGATTGCTAAC
86  N L D S D E A N I N Y P Q N V T L R N I F Y F W C
601 GCTCCGACGTTGACTTACCAGATTGCCTTCCCGAAGTCCCGCGAGTTGCTATTGGAAAATCGCGGATATCCTG
111 A P T L T Y Q I A F P K S P R V R Y W K I A D I L
676 ATGCGCATGACGGTGTCCATCGCACTATTACCTTTTGTGCTGGCACAAATTGTTTACGCTGCATTGGAAGAGCTA
136 M R M T V S I A L F T F L L A Q I V Q P A L E E L
751 GTGAGCGACCTGGACGAGACCAATGGATCTACACCGCAGCAATATTGCGGAGCTGAAACTTTCGATTGCTAAC
161 V S D L D E T N G S Y T A A I F A E L K L S I A N
826 ACATATTTATGGCTTCTTATGTTCTATACATATTTCCATTTGTATCTGAACCTCTTTGCTGAGCTTCTGCGATT
186 T Y L W L L M F Y T Y F H L Y L N L F A E L L R E
901 GGAGATCGTGTGTTCTACAAAGATTGGTGAATTGCTCGGAAGTATCTGCATATTGGAGGCTTTGGAATATGCCT
211 G D R V F Y K D W W N S S E V S A Y W R L W N M P
976 GTTCACTATTGGTTGATCCGACATGTGATTTCCCTGCGTGCGACTGAAGATGCCGAAGGTGCGCTGCAACCTTT
236 V H Y W L I R H V Y F P C V R L K M P K V A A T F
1051 GTCGTTTTTTTCTCTCCGCCGTTATGCACGAGGTGCTTGTACGCGTACCCTTTCATATTATTCGTCGGTGGTCT
261 V V F F L S A V M H E V L V S V P F H I I R P W S
1126 TTTATCGGGATGATGATGCAGATTCCTTTGGTTGCGTTTACAAAAGTATCTCTATCGCAAATTCGCGGCGCTCG
286 F I G M M M Q I P L V A F T K Y L Y R K P G G S
1201 TTTGGTAATGTCTGTTCTGGATGACATTTGCGTCATTGGCCAGCAATGGCGATTCTCTGTACACAGTTGAT
311 F G N V L F W M T F C V I G Q P M A I L Y T V D
1276 TACCAGTATGGGAACACCAACAGCAGCAACATGGAGATTCGATACGGACGACTGCCGCTTTTATGGAAAAAT
336 Y Q Y G K H H S T N M E I F D T D D C R F L W K N
1351 TCCTGCTTGATTGCTGATCATCTCGGAAAAACATGGTACAAGGTGTTATAGAAATTGTAATATCAACTGTAA
361 S C L I R *
1426 ACGGGCTTAGCCC

```

加粗下划线标注为起始密码子; 加粗下划线下带有 “*” 标注为终止密码子; 下划线标注部分为保守序列.

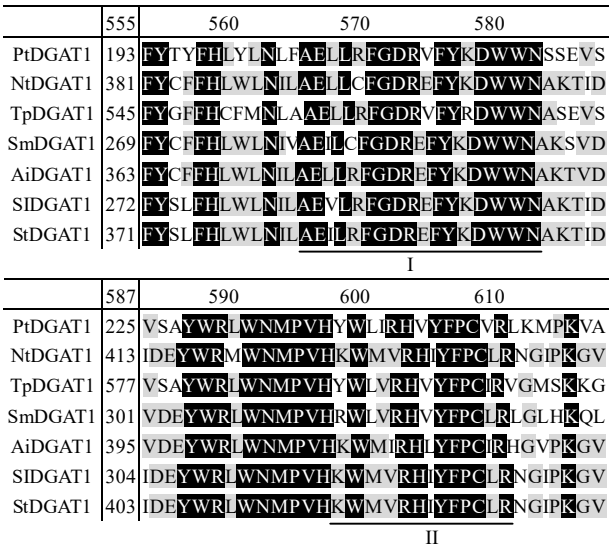
图1 三角褐指藻 *DGAT1* 基因 cDNA 全长及其推导的氨基酸序列

2 结果与分析

2.1 三角褐指藻 *DGAT1* 基因的生物信息学分析

通过三角褐指藻转录组测序分析获得了 *DGAT1* 基因的 cDNA 全长序列, 并经过 PCR 测序验证. 三角褐指藻 *DGAT1* 基因 cDNA 序列全长为 1 438 bp, 开放阅读框(ORF)为 1 098 bp, 编码 365 氨基酸序列(图 1).

蛋白质多序列比对结果表明(图 2), 获得的 *DGAT1* 蛋白序列属于跨膜 O-酰基转移酶超家族 (Membrane-Bound O-Acyltransferases Superfamily, MBOAT). 三角褐指藻 *DGAT1* 氨基酸序列含有脂肪酸蛋白特性(I)和 DAG 结合位点(II)结构域, *DGAT1* 具有 ACC 合成酶(ACC synthase)家族基因保守基团 FYXDWWN.



I 为脂肪酸蛋白特征; II 为 DAG 结合位点.

图 2 *DGAT1* 氨基酸多序列比对分析

2.2 三角褐指藻 *DGAT1* 蛋白质基本理化分析

三角褐指藻 *DGAT1* 蛋白理化性质分析结果表明, 三角褐指藻 *DGAT1* 蛋白由 365 个氨基酸组成, 总原子数为 6 054, 分子式 $C_{2018}H_{3020}N_{494}O_{500}S_{22}$, 相对分子质量为 42 906.51, 等电点为 8.77. *DGAT1* 蛋白中亮氨酸(Leu)含量最高, 占总氨基酸的 12.9%, 半胱氨酸(Cys)含量最少, 不含有吡咯赖氨酸(Pyl)和硒半胱氨酸(Sec). 三角褐指藻 *DGAT1* 蛋白的正电荷残基数(Asp+Glu)为 25, 负电荷残基数(Arg+Lys)为 30, 不稳定指数为 37.97, 推测该蛋白为稳定蛋白, 其脂肪指数为 103.92.

三角褐指藻 *DGAT1* 蛋白的 N 端为亲水区, C 端为疏水区, 位于第 264 位的苯丙氨酸(Phe)有最强亲水性, 最大值为 2.867, 在约 25~50、80~90、100~115、140~155、180~205、250~280 和 320~330 位置 AA 处有 7 个亲水峰. 其他区域则均以疏水性区域为主, 339 位的 Gly 具有最强疏水性, 值为 -2.34, 总平均亲水系数为 0.333, 推测 *DGAT1* 蛋白为亲水性蛋白.

通过 TMHMM-2.0 软件能够推测三角褐指藻 *DGAT1* 蛋白存在 6 个跨膜结构域, 其具体位置在 13~35、39~61、134~153、186~208、259~281 和 314~336 氨基酸处. 通过 TMPRED 推测, 三角褐指藻 *DGAT1* 蛋白可能含有 7 个强跨膜螺旋区域.

2.3 三角褐指藻 *DGAT1* 蛋白结构预测

二级结构预测结果表明, 三角褐指藻 *DGAT1* 蛋白中 α -螺旋所占区域比例最高, 约为 41.37%, 延长链约占 25.48%, 无规则卷曲也同样约占 25.48%, β -转角所占比例最低, 约 7.64%.

2.4 三角褐指藻 *DGAT1* 蛋白系统进化树分析

相似性搜索及比对出 17 个物种 18 种 *DGAT1* 蛋白基因(图 3), 进化树分为 3 个分支, 被子植物、藻类和动物各汇成分支, 三角褐指藻与海链藻的亲缘关系最近, 汇成一支. 而小球藻与其他藻类生物同源性不高, 反而与被子植物间的亲缘关系较近, 但也是植物中最原始的, 这与目前藻类在分类上将部分藻类划归植物, 而部分藻类划归为微生物的结果一致. 从进化树结果表明, 三角褐指藻可划入微生物类.

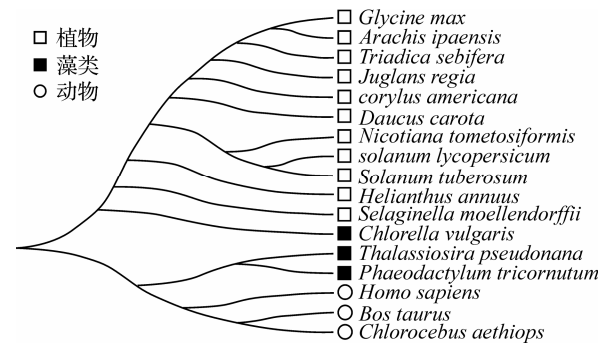


图 3 三角褐指藻与其他物种的 *DGAT1* 氨基酸序列系统进化树

2.4 光照强度和温度对三角褐指藻总脂含量及 *DGAT1* 基因表达的影响

不同光照强度对三角褐指藻 *DGAT1* 基因的表

达量和总脂含量结果表明(图 4(a)), 随着光照强度的增强, 三角褐指藻 *DGAT1* 基因表达量不断上升, 在光强为 2 500 lx 时, *DGAT1* 基因表达量达到最大, 此后呈下降趋势。与此同时, 三角褐指藻总脂含量也与 *DGAT1* 基因表达量呈相同趋势, 总脂含量随光强增大而增加, 超过 2 500 lx 后总脂合成减少, 说明光照强度对三角褐指藻脂类合成的影响与 *DGAT1* 基因表达量相关。

不同温度对三角褐指藻总脂含量和 *DGAT1* 基因表达量的影响结果表明(图 4(b)), 25 °C 时的三角褐指藻 *DGAT1* 基因表达量和总脂含量均达到最大值, 30 °C 与其相比差异并不显著。而培养温度低于 20 °C 时, 三角褐指藻 *DGAT1* 基因表达量受到明显抑制, 此时的总脂含量也减少明显, 说明温度对三角褐指藻脂类合成的影响与 *DGAT1* 基因的表达量相关。

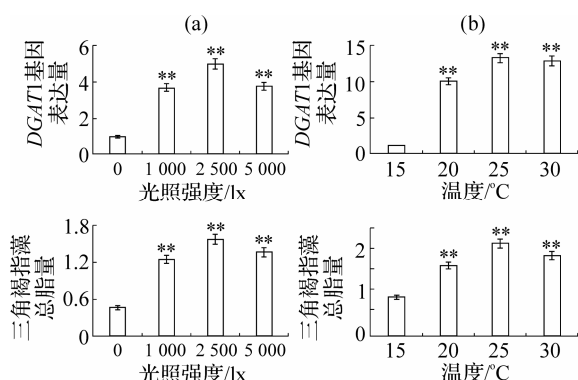


图4 不同处理条件下的三角褐指藻 *DGAT1* 基因表达量和总脂含量

研究三角褐指藻总脂的含量与 *DGAT1* 基因表达量的关系, 可以发现三角褐指藻总脂含量与 *DGAT1* 基因表达量呈正相关性。 *DGAT1* 基因表达受抑制时, 总脂含量也随之下降; *DGAT1* 基因表达增加时, 总脂含量也相应增多。两者具有高度的一致性, 表明 *DGAT1* 蛋白是三角褐指藻脂类合成和积累途径中的关键酶基因之一。

3 讨论

本文获得的三角褐指藻 *DGAT1* 氨基酸 N 端序列包括脂肪酸蛋白特征和 DAG 结合位点, 该特征与油菜 *DGAT1* 蛋白结构相类似^[23]。通过 *DGAT* 蛋白结构特点与序列比对, 认为该基因属于 *DGAT1*。 *DGAT1* 蛋白一般含有 6~9 个跨膜区域^[24], 蛋白较大,

N 端有亲水域位于内质网膜的胞质面^[25]。 *DGAT1* 具有 ATACS 保守基团 FYXDWWN, 可能与酰基辅酶 A 的形成有关^[26]。三角褐指藻 *DGAT1* 氨基酸序列第 215~221 也为该基团, 且位于脂肪酸蛋白特征处。人与动物 *DAGT1* 蛋白 N 端功能研究表明, 此段序列可能与 acyl-CoA 互相作用形成二聚体或四聚体^[27]。

从进化树可看出, 三角褐指藻与海链藻的亲缘关系较近, 与其他陆生植物、动物的亲缘关系较远。郝敬云等^[27]则发现莱茵衣藻(*Chlamydomonas reinhardtii*) *DGAT2* 家族中的 CreDGTT1-5 与三角褐指藻有较近的关系。而张晓琼等^[28]研究模式生物 *DGAT2* 基因进化树时发现, 藻类植物 *DGAT* 蛋白独自形成进化分支, 并且与其他陆生植物的亲缘关系较远。序列分析可以发现各个物种 *DGAT* 具有较高的多样性^[29], 但是 *DGAT* 基因家族动植物之间的同源关系及其起源仍然不够清晰, 需要进行更加深入的探究。

在 RT-qPCR 结果中, 三角褐指藻 *DGAT1* 基因表达量和总脂含量对于光照和温度的变化呈相类似的趋势。适当加强光照、升高温度可增加三角褐指藻 *DGAT1* 基因的表达量和总脂含量。进一步研究发现 *DGAT1* 基因与三角褐指藻脂质合成与积累呈正相关, 说明 *DGAT1* 基因是脂类合成的关键酶基因。尹航等^[15]的研究结果也表明, 在一定温度和光照强度处理下, 三角褐指藻 *GPAT* 基因的表达量与总脂含量呈显著正相关, 说明光照强度和温度可通过促进三角褐指藻内 TAG 生物合成途径中的 *DAGT1* 和 *GPAT* 关键酶基因的表达, 增加关键酶活性, 进而加速藻内脂类合成与代谢。而在高温和强光胁迫下, 不仅酶活性受到抑制, 藻细胞的生理活性也会遭到破坏, 导致细胞死亡。沈城等^[30]发现持续高温胁迫使珊瑚共生虫黄藻(*Symbiodinium spp.*) *psbA* 基因的表达量随着温度的升高显著增加。华雪铭等^[16]实验发现, 35 °C 下的绿色巴夫藻(*Pavlova viridis*)全部死亡, 10 °C 时的藻细胞大量死亡, 而在最适温度 20 °C 下, 绿色巴夫藻生长最快, 合成脂质最多。周洪琪等^[31]研究发现, 不同藻类的最适温度和光照不相同, 但总是在最适时有最大生长量和总脂含量。以上结果表明, 适宜的光照和温度能促进脂类生物合成, 除了与脂类生物合成途径基

因 *DGAT1* 和 *GPAT* 的表达有关以外, 还有可能通过 *psbA* 基因的表达与光合作用有关. 如果为了更深入地研究光照和温度促进微藻脂类合成的分子机理, 还需要采用转录组学技术、代谢组学技术等技术进行深入的研究.

4 结论

三角褐指藻 *DGAT1* 基因 cDNA 序列全长为 1 438 bp, ORF 为 1 098 bp, 编码 365 氨基酸序列, 含有脂肪酸蛋白特性(I)和 DAG 结合位点(II)等功能结构域. 预测三角褐指藻 *DGAT1* 蛋白为亲水性蛋白, 含有 6 个跨膜结构域和 7 个超强跨膜螺旋区, 无信号肽. 三角褐指藻与海链藻同属于藻类聚类为同一支. 光照强度和温度处理均显著促进三角褐指藻 *DGAT1* 基因的表达, 在光照强度为 2 500 lx 或温度为 25 °C 时, 三角褐指藻 *DGAT1* 基因的表达量达到最大, 这与三角褐指藻总脂含量的变化趋势一致, 暗示 *DGAT1* 蛋白可能与三角褐指藻总脂生物合成与积累密切相关, 是总脂合成途径的关键酶之一.

参考文献:

- [1] Gouveis L, Liveira A C. Microalgae as a raw material for biofuels production[J]. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2009, 36(2):269-274.
- [2] Chisti Y. Biodiesel from microalgae[J]. *Biotechnology Advances*, 2007, 25(3):294-306.
- [3] 马海明, 施启顺, 柳小春. *DGAT* 相关基因研究进展[J]. *遗传学报*, 2005, 32(12):1327-1332.
- [4] 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.
- [5] Shockey J M, Gidda S K, Chapital D C, et al. Tung tree *DGAT1* and *DGAT2* have nonredundant functions in triacylglycerol biosynthesis and are localized to different subdomains of the *Endoplasmic reticulum*[J]. *Plant Cell*, 2006, 18(9):2294-2313.
- [6] Jako C, Taylor D C. Seed-specific over-expression of an *Arabidopsis* cDNA encoding a diacylglycerol acyltransferase enhances seed oil content and seed weight[J]. *Plant Physiology*, 2001, 126(2):861-874.
- [7] Lardizabal K, Effertz R, Levering C, et al. Expression of *Umbelopsis ramanniana DGAT2A* in seed increases oil in soybean[J]. *Plant Physiology*, 2008, 148(1):89-96.
- [8] Gómez-Loredo A, Benavides J, Rito-Palomares M. Growth kinetics and fucoxanthin production of *Phaeodactylum tricornutum*, and *Isochrysis galbana*, cultures at different light and agitation conditions[J]. *Journal of Applied Phycology*, 2016, 28(2):849-860.
- [9] Jaeyon L, Chan Y, Soyoung J, et al. Comparison of several methods for effective lipid extraction from microalgae[J]. *Bioresource Technology*, 2009, 101(1):75-77.
- [10] 李书霞, 刘伟, 李威, 等. 玉米 *DGAT* 基因家族的全基因组分析[J]. *核农学报*, 2015, 29(4):643-650.
- [11] 刘贵芹, 邵群, 黄荣峰, 等. 大豆 *DGAT* 基因家族的鉴定和表达分析[J]. *中国农学通报*, 2013, 29(12):55-61.
- [12] 李书霞. 玉米和棉花 *DGAT* 基因家族的全基因组分析[D]. 杭州: 浙江大学, 2015.
- [13] 刘凯. 油茶 *DGAT1* 基因的全长 cDNA 克隆与原核表达[D]. 长沙: 中南林业科技大学, 2012.
- [14] 吕文兵, 刘红涛, 薛乐勋. 不同盐浓度和光照强度对杜氏盐藻 *psbA* 基因表达的影响[J]. *华中师范大学学报(自然科学版)*, 2010, 44(2):288-292.
- [15] 尹航, 袁岚瑛, 俞凯, 等. 三角褐指藻 *GPAT* 基因生物信息学及表达差异分析[J]. *核农学报*, 2019, 33(8):1483-1489.
- [16] 华雪铭, 周洪琪, 丁卓平. 温度和光照对微藻的生长、总脂肪含量及脂肪酸组成的影响[J]. *上海海洋大学学报*, 1999, 8(4):309-315.
- [17] 叶丽, 蒋霞敏, 毛欣欣, 等. 温、光、盐对三角褐指藻紫外诱变株生长、总脂及脂肪酸的影响[J]. *生态学杂志*, 2015, 34(2):454-462.
- [18] 蒋霞敏, 郑亦周. 14 种微藻总脂含量和脂肪酸组成研究[J]. *水生生物学报*, 2003, 27(3):243-247.
- [19] 吕军, 张颖, 冯立芹, 等. 生物信息学工具 BLAST 的使用简介[J]. *内蒙古大学学报(自然科学版)*, 2003, 34(2):179-191.
- [20] Gasteiger E, Hoogland C, Gattiker A, et al. Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server[M]//The Proteomics Protocols Handbook. Totowa, NJ: Humana Press, 2005:571-607.
- [21] 余舜武, 刘鸿艳, 罗利军. 利用不同实时定量 PCR 方法分析相对基因表达差异[J]. *作物学报*, 2007, 33(7):1214-1218.
- [22] Bligh E G, Dyer W J. A rapid method of total lipid extraction and purification[J]. *Canadian Journal of Biochemistry & Physiology*, 1959, 37(8):911-917.
- [23] 马燕斌, 吴霞, 王霞, 等. 甘蓝型油菜 *BnDGAT1* 基因表达的特异性分析[J]. *西北植物学报*, 2013, 33(10):1958-1963.
- [24] 周丹. 大豆二酰基甘油酰基转移酶(*DGAT*)基因克隆及其

- 功能的初步研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2012.
- [25] Lung S C, Weselake R J. Diacylglycerol acyltransferase: A key mediator of plant triacylglycerol synthesis[J]. *Lipids*, 2006, 41(12):1073-1088.
- [26] Guo Z, Cromley D, Billheimer J T, et al. Identification of potential substrate-binding sites in yeast and human acyl-CoA sterol acyltransferases by mutagenesis of conserved sequences[J]. *Journal of Lipid Research*, 2001, 42(8): 1282-1291.
- [27] Weselake R J, Madhavji M, Szarka S J, et al. Acyl-CoA-binding and self-associating properties of a recombinant 13.3 kDa N-terminal fragment of diacylglycerol acyltransferase-1 from oilseed rape[J]. *BMC Biochemistry*, 2006, 7(1):24-36.
- [28] 郝敬云, 周广航, 邵雪梅, 等. 莱茵衣藻 *DGAT2* 基因家族的鉴定与功能分析[J]. *分子植物育种*, 2016, 14(9): 2343-2352.
- [29] 张晓琼, 乔琳, 胡利宗, 等. 棉花与模式植物 *DGAT2* 基因的鉴定与分析[J]. *江苏农业科学*, 2016, 44(10):69-73.
- [30] 沈城, 刘楚吾, 刘丽. 温度胁迫及恢复初期稀杯盔形珊瑚共生虫黄藻 *Hsp70*、*Hsp90*、*psaA*、*psbA* 基因表达分析[J]. *热带海洋学报*, 2016, 35(3):72-78.
- [31] 周洪琪, Renaud S M, Pany D L, 等. 温度对新月菱形藻、铲状菱形藻和耙夫藻的生长、总脂肪含量以及脂肪酸组成的影响[J]. *水产学报*, 1996, 20(3):235-240.

Bioinformation analysis and expression regulation of *DGAT1* gene in *Phaeodactylum tricornutum*

WANG Heyu¹, GONG Yifu^{2,3*}, ZHENG Xiaoyun^{2,3}, LI Shenrui^{2,3}

(1.College of Food and Pharmaceutical Sciences, Ningbo University, Ningbo 315832, China;

2.School of Marine Sciences, Ningbo University, Ningbo 315832, China;

3.Key Laboratory of Marine Biotechnology of Zhejiang Province, Ningbo 315832, China)

Abstract: In the current study, the full-length cDNA sequence of *DGAT1* (GeneBank Accession Number: 7200924) in *Phaeodactylum tricornutum* was cloned by transcriptome sequencing. Bioinformatics analysis and expression difference were also studied. The results showed that the full length of the *DGAT1* gene from *P. tricornutum* was 1 438 bp, had an open reading frame (ORF) of 1 098 bp with the fatty acid-binding protein signature (I) and DAG binding site (II) domains, encoding 365 amino acids. The protein prediction results showed that the *DGAT1* protein from *P. tricornutum* was a hydrophilicity protein including 6 transmembrane structure domains and 7 super transmembrane helical regions, without signal peptide. Phylogenetic analysis results showed that *DGAT1* protein from *P. tricornutum* had closed homologous relationship with the *DGAT1* protein of *Thalassiosira pseudonana*. RT-qPCR results showed that light intensity and temperature could significantly promote the expression of *DGAT1* gene of *P. tricornutum*. With the increase of light intensity and temperature, the expression quantity of *DGAT1* gene from *P. tricornutum* showed an increased first and then decreased trend. The expression quantity of *DGAT1* gene reached the maximum at light intensity of 2 500 lx or temperature of 25 °C. The expression of *DGAT1* gene was consistent with the total fat content. The results indicated that *DGAT1* protein might be one of the key enzymes in the biosynthesis and accumulation of total lipid in *P. tricornutum*.

Key words: *Phaeodactylum tricornutum*; *DGAT1* gene; cloning; bioinformatics; gene expression regulation

(责任编辑 章践立)