

橡胶树 *HbLPAT2* 基因的克隆与表达分析

王晓琳^{1,2}, 曲 鹏², 甘明洋^{1,2}, 仇 键¹, 范睿深^{1*}

1. 中国热带农业科学院橡胶研究所, 海南海口 571101; 2. 云南农业大学热带作物学院, 云南普洱 665099

摘 要: 溶血磷酸酰基转移酶 (lysophosphatidyl acyltransferase, LPAT) 是控制溶血磷脂酸生成磷脂酸的关键酶, 在植物磷脂合成中发挥重要作用。橡胶树 (*Hevea brasiliensis*) 是生产天然橡胶的重要来源, 其在国防、医疗、高端制品等领域具有不可替代的作用, 具有很高的社会价值和经济价值。本研究采用分子生物学技术在橡胶树胶乳中成功克隆出 2 个 *HbLPAT* 基因家族中负责磷脂合成的关键基因, 分别命名为 *HbLPAT2a* 和 *HbLPAT2b*, 其编码序列全长分别为 1161 bp 和 939 bp, 分别编码了 386 个和 312 个氨基酸。*HbLPAT2a* 和 *HbLPAT2b* 均含有 1 个 PLN02380 的溶血磷脂酸酰基转移酶功能结构域和高度保守的 NH(X)₄D 基序。*HbLPAT2a* 有 3 个跨膜结构域, *HbLPAT2b* 有 1 个跨膜结构域, 二者均无信号肽, 为亲水性蛋白, 且含有多个磷酸化位点。亚细胞定位分析表明, *HbLPAT2a* 和 *HbLPAT2b* 蛋白均定位于内质网上。不同组织部位表达分析表明, *HbLPAT2a* 和 *HbLPAT2b* 基因均在橡胶树种子中的表达量最高, 推测其具有脂质合成功能, 而在胶乳中, *HbLPAT2a* 和 *HbLPAT2b* 的表达量在 *HbLPAT* 基因家族中位居前 2 位。本研究结果有助于了解 *HbLPAT2a* 和 *HbLPAT2b* 在橡胶树胶乳磷脂合成过程中的功能, 为后期橡胶树胶乳品质的遗传改良提供科学依据。

关键词: 橡胶树; *HbLPAT2*; 生物信息学分析; 表达分析

中图分类号: S794.1

文献标志码: A

Cloning and Expression Analysis of *HbLPAT2* Gene from *Hevea brasiliensis*

WANG Xiaolin^{1,2}, QU Peng², GAN Mingyang^{1,2}, QIU Jian¹, FAN Ruishen^{1*}

1. Rubber Research Institute, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Haikou, Hainan 571101, China; 2. College of Tropical Crops, Yunnan Agricultural University, Pu'er, Yunnan 665099, China

Abstract: Lysophosphatidyl acyltransferase (LPAT), a key enzyme which controls the production of lysophosphatidic into phosphatidic, plays an important role in phospholipid biosynthesis in plants. *Hevea brasiliensis* is an important source for the production of natural rubber, which has an irreplaceable role in the fields of national defense, medical treatment, high-end products, and has high social and economic value. Cloning and analysis of *HbLPAT2* in *H. brasiliensis* would provide scientific basis for further exploration of its phospholipid biosynthesis function and the effect of phospholipid on nature rubber. In this study *HbLPAT2* was cloned from the latex of the *H. brasiliensis* by molecular biology techniques, and the bioinformatics analysis, expression analysis and subcellular localization analysis were performed. In this study, two key genes responsible for phospholipid biosynthesis in the *HbLPAT* gene family were successfully cloned from the latex of the *H. brasiliensis*, named *HbLPAT2a* and *HbLPAT2b*, the full length coding sequence of *HbLPAT2a* and *HbLPAT2b* genes was 1161 bp and 939 bp, encoding 386 and 312 amino acids. Both *HbLPAT2a* and *HbLPAT2b* contained a PLN02380 lysophosphatidyl acyltransferase functional domain and contained a highly conserved NH(X)₄D motif; *HbLPAT2a* protein had 3 transmembrane domains, and *HbLPAT2b* protein had 1 transmembrane domain, both of which had no signal peptide, were hydrophilic proteins, and contained multiple phosphorylation sites. The subcellular localization analysis showed that both *HbLPAT2a* and *HbLPAT2b* proteins were located in the endoplasmic reticulum. In different organs, the highest expression level of *HbLPAT2a* and *HbLPAT2b* was found in seeds, suggesting

收稿日期 2024-05-17; 修回日期 2024-06-12

基金项目 海南省自然科学基金青年项目 (No. 322QN407); 云南省黄华孙专家工作站 (No. 202305AF150125)。

作者简介 王晓琳 (2002—), 女, 本科生, 研究方向: 林木生物技术。*通信作者 (Corresponding author): 范睿深 (FAN Ruishen), E-mail: fanruishen@nwsuaf.edu.cn。

that they have a lipid biosynthesis function. However, in the latex of *H. brasiliensis*, the first and second expression level of whole HbLPAT gene family were *HbLPAT2a* and *HbLPAT2b*. The result is helpful to understanding that *HbLPAT2a* and *HbLPAT2b* play an important role in the phospholipid biosynthetic pathway in latex of *H. brasiliensis* and to providing a scientific basis for genetic improvement of latex quality of *H. brasiliensis*.

Keywords: *Hevea brasiliensis*; *HbLPAT2*; bioinformatics analysis; expression analysis

DOI: 10.3969/j.issn.1000-2561.2024.12.003

橡胶树 (*Hevea brasiliensis*) 属大戟科 (Euphorbiaceae) 三叶橡胶树属 (*Hevea*) 植物, 迄今为止已有 100 多年的栽培历史^[1]。橡胶树原产于巴西, 于 1904 年引入我国云南, 现主产区为海南和云南^[2-3]。橡胶树是商用天然橡胶 (nature rubber, NR) 的主要来源, NR 作为一种重要的工业材料, 综合性能优异, 具有不可替代的作用, 广泛应用于航空航天、工农业、交通运输、医疗卫生等领域^[4]。NR 由橡胶树乳管细胞中排出的胶乳加工而来, 胶乳的实质是乳管的细胞质, 其主要成分为橡胶烃, 并含有少量的脂质和蛋白质等非胶物质。NR 中的脂质 (主要是磷脂) 和蛋白质作为支点与橡胶烃构成网状结构, 其含量不仅直接影响 NR 的品质, 也进一步影响其工艺操作性能与产品使用性能, 是 NR 优于合成橡胶的根本原因^[5-7]。目前, 提高胶乳品质是我国橡胶树育种的重要方向之一。

脂质是一类高溶于非极性溶剂而低溶于水的有机生物分子, 其化学本质是醇类和脂肪酸形成的酯类物质及其衍生物^[8]。脂肪酸的酯化最终合成油脂是在内质网中通过 Kennedy 途径实现^[9], 参与该途径的酶主要有 3-磷酸甘油酰基转移酶 (glycerol-3-phosphate acyltransferase, GPAT)、溶血磷酸酰基转移酶 (lysophosphatidyl acyltransferase, LPAT) 和二酰甘油酰基转移酶 (diacylglycerol acyltransferase, DGAT)^[10], 其中 LPAT 在磷脂合成中起到关键作用。甘油三酯合成的第一步反应是 GPAT 催化脂酰-CoA 与 3-磷酸甘油在 *sn*-1 位发生酯化反应生成溶血磷脂酸 (lysophosphatidic acid, LPA)^[11-12], 然后由 LPAT 在 *sn*-2 位发生酯化反应生成磷脂酸 (phosphatidic acid, PA)^[10], 再由磷脂酸磷酸化酶 (phosphatidic acid phosphatase, PAP) 脱去磷酸基团反应生成二酰甘油酯 (diacylglycerol, DAG), 最后 DAG 在 *sn*-3 发生催化脱酰基生成三酰基甘油酯 (triacylglycerol, TAG)^[12]。

LPAT 是控制溶血磷脂酸生成磷脂酸的关键

酶^[13], 根据 LPAT 基因家族的亚细胞定位及进化起源, 可将该基因家族分为 2 类: 质体型 LPATs 和微粒体型 LPATs^[14]。质体型 LPATs 对软脂酸底物有强烈的偏好性, 具有典型的原核酶类特征^[10, 15]。微粒体型 LPATs 种类较多, 主要参与真核途径的膜脂及油脂合成^[16]。前人在拟南芥中已对 LPAT 基因家族进行了较为系统的研究, AtLPAT 基因家族成员有 5 个, 其中, AtLPAT1 定位在叶绿体, 属于质体型; AtLPAT2 定位于内质网中, 属于微粒体型; AtLPAT3 亚细胞定位目前不清楚, 但是该基因对花可以特异性表达, 其功能暂时不清楚; AtLPAT4、AtLPAT5 的亚细胞定位和功能目前均尚不明确^[10]。已有研究表明, 拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 定位在内质网上的 AtLPAT2 参与了磷脂的从头合成途径, 在拟南芥生长发育各个阶段起着重要的作用, 而且它能够通过刺激磷脂的合成而参与拟南芥对低磷胁迫的响应^[17-19]; 在花生 (*Arachis hypogaea*) 中, 超表达 AhLPAT2 能显著提高种子的含油量^[20]; 在蓖麻 (*Ricinus communis*) 中, 超表达 RcLPAT2 不仅能提高其总含油量, 也能提高油脂 (TAG) 中的不饱和脂肪酸的含量^[21]。

提高胶乳品质是当前我国橡胶树育种研究的重要方向之一, 增加磷脂含量可提升天然橡胶的加工性能^[2], 这使得通过脂质含量的改变来提高胶乳品质成为可能。目前有关橡胶树油脂合成路径的研究较少, 脂质积累路径不清, 严重影响橡胶树脂质和磷脂的遗传改良, 成为提高胶乳品质的主要障碍。借助已知的油脂合成途径以及油料植物改良思路, 本研究选择橡胶树磷脂积累和油脂合成路径上的关键基因 *HbLPAT2* 为研究对象, 对其进行序列、结构和系统发育等生物信息学分析, 并通过基因表达分析以及亚细胞定位验证了解橡胶树 *HbLPAT2* 的基因结构及分子特征, 为进一步研究橡胶树 *HbLPAT2* 基因在胶乳磷脂合成过程中的功能提供理论依据, 对橡胶树高品质胶乳品种的选育及遗传改良具有一定的参考价值。

1 材料与方法

1.1 材料

供试材料为 10 年生的热研 73397 橡胶树组培苗植株，种植于中国热带农业科学院橡胶研究所儋州试验场三队（19°31'10"N，109°29'41"E）。橡胶树割制为 S/2 d4（1/2 树围、每 4 d 割 1 刀，不涂乙烯利）。于 2023 年 8 月连续采集 3 刀的胶乳样品，收集 5~10 min 流出的胶乳，割胶当天同时采集其他组织。胶乳用液氮速冻后，放于离心管，其他组织使用锡纸包好，立即放入液氮速冻后于 -80 ℃ 冰箱保存，用于 RNA 提取。

1.2 方法

1.2.1 橡胶树 RNA 的提取及 cDNA 的合成 取 50~100 mg 组织样品，液氮磨碎后，按照 RNA 提取试剂盒（TranGen, EasyPure Plant RNA Kit）说明书提取总 RNA，使用 NanoDrop 2000（Thermo Scientific）检测 RNA 的纯度和浓度。取检测合格的 RNA 进行反转录，使用反转录试剂盒（Thermo Scientific, RevertAid First Strand cDNA Synthesis Ki）合成 cDNA。

1.2.2 *HbLPAT2* 的克隆与鉴定 根据课题组已有的橡胶树胶基因组和胶乳转录组数据^[22]，共获得 6 条注释为 *LPAT* 的 Unigene 序列，通过 NCBI 的 Blast 功能进行对比，找到 *HbLPAT2* 基因，分别命名为 *HbLPAT2a* 和 *HbLPAT2b*。用 Premier 6.0 软件设计特异引物(表 1)，以稀释后的胶乳 cDNA 为模板，使用高保真酶（Vazyme，2×Phanta Flash Master Mix）进行扩增，扩增体系及 PCR 反应程序同说明书。PCR 扩增产物利用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳进行检测，使用胶回收试剂盒（Agarose Gel DNA Extraction Kit Ver.4.0, Takara）将正确条带进行胶回收，加 A 尾连接 T 载体后（TA-cloning Kit, TaKaRa）转换大肠杆菌 DH5-α 感受态细胞，涂板过夜培养后通过菌落 PCR 筛选阳性克隆，送至北京擎科生物科技有限公司广州分公司测序。

1.2.3 *HbLPAT2a* 和 *HbLPAT2b* 的生物信息学分析 利用生物信息学分析相关软件（表 2）对 *HbLPAT2a* 和 *HbLPAT2b* 进行生物信息学分析。

1.2.4 *HbLPAT2a* 和 *HbLPAT2b* 的表达分析 使用 Premier 6.0 软件设计 qRT-PCR 检测的引物(表 1)。以 *HbActin* 为内参基因，按照荧光定量试剂盒（TB GREEN® Premix Ex Taq™ II. ROX plus, TaKaRa）说明书进行定量反应。实验结果采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法计算相对表达量，每组实验重复 3 次。

表 1 本研究所用引物
Tab. 1 Primers in this study

引物名称 Primer name	引物序列（5'-3'） Primer sequence (5'-3')	用途 Usage
HbLPAT2a-F	ATGGCGATTCTGCGGCAGT	基因克隆
HbLPAT2a-R	TTAGTGTGTTTGTCTGTGCTGTTC	
HbLPAT2b-F	ATGGCGCTTCCTGCGGCTGT	
HbLPAT2b-R	TAATAGAACTGCAAAATCACAAAGAG-AC	
HbLPAT2a-GF	agtagatctggtaccgcattcATGGCGATTCTT-GCGGCA	亚细胞定位分析
HbLPAT2a-GR	gcccttgctcac-cattGTGTTGTTTGTCTTGTCTGTTTC	
HbLPAT2b-GF	agtagatctggtacctgggggATGGCGCTTCCTG-CGGC	
HbLPAT2b-GR	gcccttgctcaccaTGAAGTGAAGTGTATG	
HbLPAT1-QF	CATCTACTTCATTGCGGTTCTATG	荧光定量检测
HbLPAT1-QR	AAGAGCCATTCAAAGCAGAGTT	
HbLPAT2a-QF	GGACTTCTCTTCTTCTCTTCTGG	
HbLPAT2a-QR	GCTCTATTGATCGTTCTGTATGTG	
HbLPAT2b-QF	TGTTGTGGCTGGATCTTGTATG	
HbLPAT2b-QR	CAATGTCACTTCTGTGGTTGGA	
HbLPAT3-QF	GCTTGCTGAAGATTGAAGTGTATG	
HbLPAT3-QR	AATGTCGCTCCTGTGATTGC	
HbLPAT4-QF	GTCTGATATGTCTGCTGGTGT	
HbLPAT4-QR	TGGCAAGCCGTGTCATTAAG	
HbLPAT5-QF	ACTAAGGATGATAAGAGGTTGTG	
HbLPAT5-QR	CCTGCTCCAATGTATGCTGAA	
HbActin-F	GATGTGGATATCAGGAAGGA	
HbActin-R	CATACTGCTTGGAGCAAGA	

1.2.5 *HbLPAT2a* 和 *HbLPAT2b* 的亚细胞定位验证 以 pCAM-1300-GFP 为表达载体，选择 *BamH* I 为单酶切位点，设计 *HbLPAT2a* 和 *HbLPAT2b* 的同源臂，使用同源重组克隆酶（ClonExpress Ultra One Step Cloning Kit V2, Vazyme）将 *HbLPAT2a* 和 *HbLPAT2b* 连接到表达载体上，构成 *HbLPAT2*-GFP 重组质粒。将重组质粒转入大肠杆菌，测序成功后（方法同 1.2.2）使用质粒提取试剂盒（Plasmid Mini Kit I, Omega）提取质粒，将质粒转入农杆菌 GV3101（p19）感受态，筛选阳性菌株培养。将 *HbLPAT2*-GFP 与内质网 marker CFP-HDEL 按 1 : 1 比例注射烟草表面，同时注射空载体作为对照，培养 2~3 d。用烟草叶片制作临时切片，在共聚焦显微镜中观察，低倍镜下找到绿色荧光，20 倍镜观察并拍照。

表 2 本研究所用生物信息学软件
Tab. 2 Bioinformatics softwares in this study

软件 Soft	网址 Website	功能 Function
ProtParam	https://web.expasy.org/protparam/	蛋白质理化特性分析
Plant-mPLoc	http://www.csbio.sjtu.edu.cn/bioinf/plant-multi/	亚细胞定位预测
TMHMM 2.0	https://services.healthtech.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/	蛋白质跨膜结构预测
SignalP - 5.0	https://services.healthtech.dtu.dk/services/SignalP-5.0//	蛋白质信号肽预测
NerPhos 3.1	https://services.healthtech.dtu.dk/services/NetPhos-3.1/	蛋白质磷酸化位点分析
SOPMA	https://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_sopma.html	蛋白质二级结构预测
CDS	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi	蛋白质功能结构域分析

2 结果与分析

2.1 HbLPAT 基因家族的鉴定及表达分析

以橡胶树胶乳转录组数据为基础，将拟南芥 LPAT 基因家族蛋白序列与橡胶树蛋白序列进行对比，共鉴定出 6 个橡胶树 LPAT 基因家族成员。使用 MEGA 软件构建系统进化树，根据序列比对和聚类分析结果（图 1）将 6 个 LPAT 基因家族成员分别命名为 *HbLPAT1*、*HbLPAT2a*、*HbLPAT2b*、*HbLPAT3*、*HbLPAT4*、*HbLPAT5*。在橡胶树胶乳中对 *HbLPAT* 基因家族成员进行表达分析发现，有 4 个基因在胶乳中表达，其中 *HbLPAT2b* 相对表达量最高，显著高于其他 3 个基因；其次为 *HbLPAT2a*，显著高于 *HbLPAT1* 和 *HbLPAT5*；未检测到 *HbLPAT3* 和 *HbLPAT4*（图 2）。

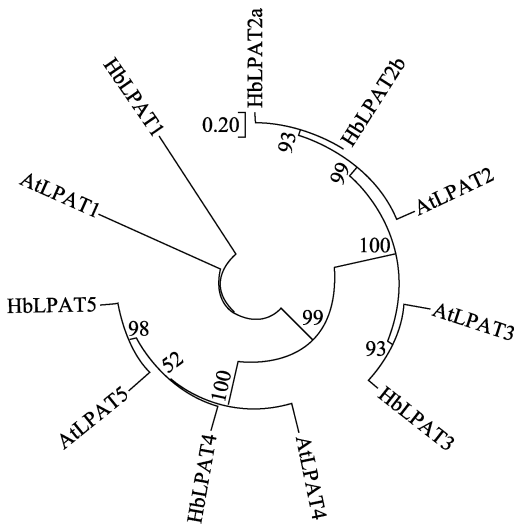
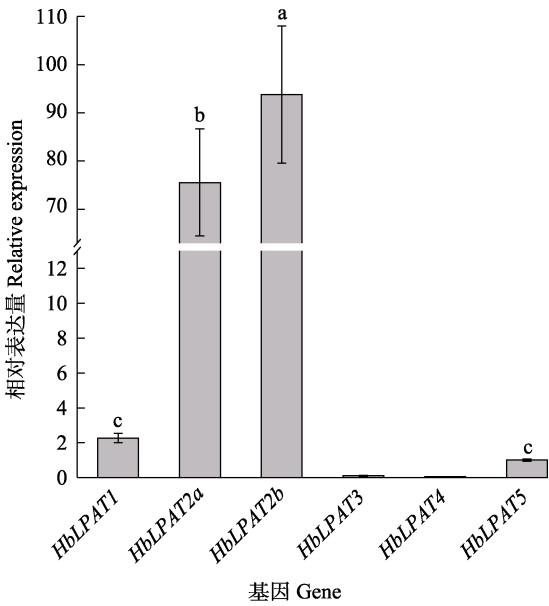


图 1 橡胶树 *HbLPAT* 和拟南芥 *AtGPAT* 基因家族系统进化分析

Fig. 1 Phylogenetic analysis of *HbLPAT* and *AtGPAT* gene family in *H. brasiliensis* and *A. thaliana*

2.2 *HbLPAT2* 的克隆及蛋白序列分析

以橡胶树胶乳 cDNA 为模板,进行 PCR 扩增，



不同小写字母表示差异显著 ($P<0.05$)。
Different lowercase letters indicate significant difference among treatments ($P<0.05$).

图 2 橡胶树胶乳中不同 *HbLPATs* 的相对表达量
Fig. 2 Relative expression levels of different *HbLPAT* in latex of *H. brasiliensis*

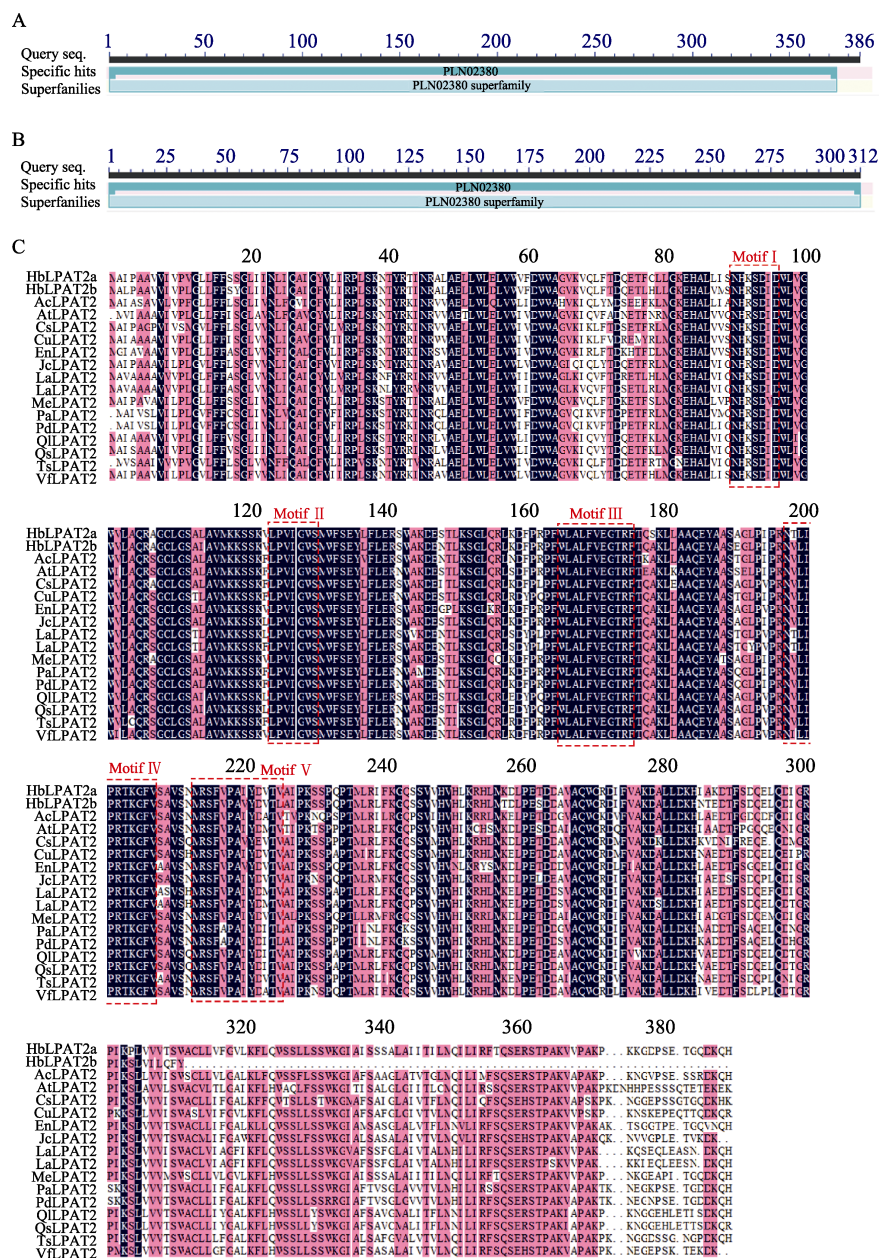
克隆出 2 个长度分别为 2397 bp 和 1719 bp 的基因片段，经胶回收和阳性克隆测序，获得 1161 bp 的 *HbLPAT2a* 和 939 bp 的 *HbLPAT2b* 的蛋白质编码序列（coding sequence, CDS）。CDD 预测结果表明，*HbLPAT2a* 和 *HbLPAT2b* 蛋白均具有 1 个完整的溶血磷脂酸酰基转移酶功能结构域（图 3A，图 3B）。目前 LPAT2 基因已在多种植物中被成功克隆并公布了序列，酰基转移酶功能在部分植物中也得到了验证，如拟南芥、矮牵牛（*Aquilegia coerulea*）、茶树（*Camellia sinensis*）、蜜柑（*Citrus unshiu*）、古柯（*Erythroxylum novogranatense*）、麻风树（*Jatropha curcas*）、白羽扇豆（*Lupinus albus*）、木薯（*Manihot esculenta*）、银白杨（*Populus alba*）、美洲黑杨（*Populus del-*

toides)、大叶栎 (*Quercus lobata*)、欧洲栓皮栎 (*Quercus suber*)、时钟花 (*Turnera subulata*)、油桐 (*Vernicia fordii*) 等。将上述植物的 LPAT2 与橡胶树 LPAT2 的蛋白序列比对发现, 在 HbLPAT2 中含有 5 个 LPAT2 蛋白保守基序 (图 3C), 分别是 NH (X)₄D (Motif I)、LPVIGW (Motif II)、VLALFVEGTRF (Motif III)、N (X) LIPRIKGFV (Motif IV) 和 MRSFVPA (X)₄T (X) (Motif V)。Motif I 的组氨酸 (H) 及天冬氨酸 (D) 残基是酰

基转移酶催化活性的重要功能位点; Motif III 中则含有 EGT-Box, 它不但是酰基转移酶的功能位点, 还含有酰基转移酶作用底物溶血磷脂酸的结合位点。此外, 不同物种间的 LPAT2 序列在 C 端部分的差异性略大于 N 端。

2.3 橡胶树 HbLPAT2 蛋白的生物信息学分析

蛋白质理化特性分析结果如表 3 所示, 橡胶树 HbLPAT2a 和 HbLPAT2b 的相对分子质量分别为 43.23 kDa 和 35.41 kDa, 原子总数分别为 6208



A: HbLPAT2a 的功能结构域; B: HbLPAT2b 的功能结构域; C: LPAT2 蛋白序列比对, 红色虚线框代表保守基序。
A: The domain of HbLPAT2a protein; B: The domain of HbLPAT2b protein; C: Multiple alignment analysis of LPAT2 protein, red dashed line represents the motifs.

图 3 橡胶树 HbLPAT2 蛋白序列的对比分析

Fig. 3 Multiple alignment analysis of HbLPAT2 in *H. brasiliensis*

表 3 橡胶树 HbLPATs 生物信息学分析
Tab. 3 Bioinformatics analysis of HbLPATs
in *H. brasiliensis*

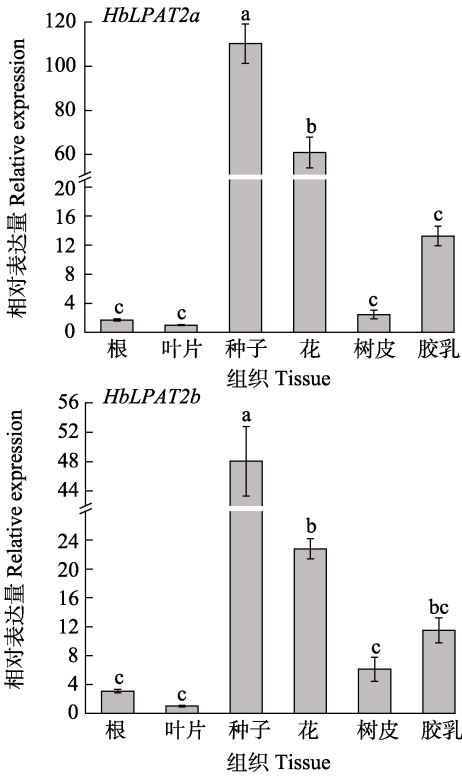
项目 Item	HbLPAT2a	HbLPAT2b
分子量/kDa	43.23	35.41
分子式	C ₁₉₉₇ H ₃₁₅₅ N ₅₁₅ O ₅₂₉ S ₁₂	C ₁₆₃₇ H ₂₅₅₅ N ₄₂₃ O ₄₃₃ S ₁₀
原子数	6208	5058
等电点 (pI)	9.53	5.02
负电荷残基 (Asp+Glu)	31	29
正电荷残基 (Arg+Lys)	44	33
脂肪系数	109.38	109.68
不稳定系数	41.20	39.73
亲水性	0.231	0.201
亚细胞定位	Endoplasmic reticulum	Endoplasmic reticulum
跨膜结构域	3	1
信号肽	0	0
磷酸化位点	S: 20; T: 11; Y: 2	S: 16; T: 9; Y: 1
α-螺旋/%	44.82	47.44
延伸链/%	17.36	17.95
β-转角/%	3.63	5.13
无规则卷曲/%	34.20	29.49

和 5058, 理论等电位点分别为 9.53 和 5.02; 脂肪系数分别为 109.38 和 109.68, 不稳定系数分别为 41.20 和 39.73, 均大于 39, 推测其属于不稳定蛋白; 亲水性系数分别为 0.231 和 0.200, 均属于亲水性蛋白。亚细胞定位、跨膜结构域和信号肽预测表明, HbLPAT2a 和 HbLPAT2b 均定位于内质网, HbLPAT2a 有 3 个跨膜结构域, HbLPAT2b 有 1 个跨膜结构域, 二者均无信号肽, 属于非分泌型蛋白。HbLPAT2a 具有 33 个潜在的磷酸化位点, HbLPAT2b 具有 26 个潜在的磷酸化位点。二级结构域预测表明, HbLPAT2a 和 HbLPAT2b 的 α-螺旋 (α-helix) 分别为 44.82%和 47.44%, 无规则卷曲 (random coil) 分别为 34.20%和 29.49%, 是构成 HbLPAT 蛋白的主要结构元件, 而延伸链 (extended strand) 和 β-转角 (β-turn) 分散于整个蛋白中, 分别占 17.36%~17.95%和 3.63%~5.13%。

2.4 橡胶树 HbLPAT2s 的表达分析

实时荧光定量分析结果表明, HbLPAT2a 和 HbLPAT2b 在橡胶树的根、叶片、种子、花、树皮和胶乳组织部位中均有表达, 二者在种子中的相对表达最高, 显著高于其他组织; 其次为花, 也显著高于另外 4 个组织部位; 在剩余 4 个组织中

的表达量由高到低依次为胶乳、树皮、树根和树叶, 差异不显著 (图 4)。



不同小写字母表示差异显著 (P<0.05)。
Different lowercase letters indicate significant difference among treatments (P<0.05).

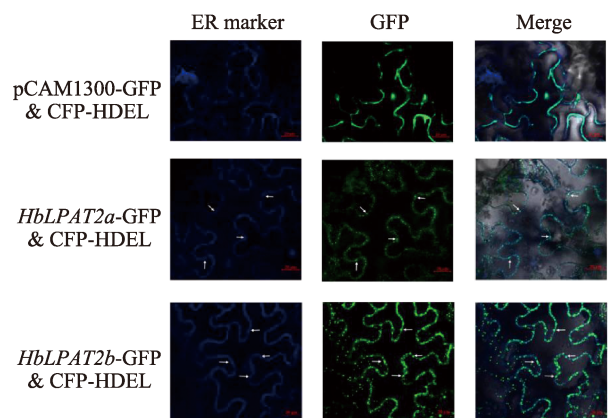
图 4 HbLPAT2 基因在橡胶树不同组织中的相对表达量
Fig. 4 Relative expression levels of HbLPAT2 genes in different tissues of *H. brasiliensis*

2.5 橡胶树 HbLPAT2 的亚细胞定位

为了进一步研究 HbLPAT2a 和 HbLPAT2b 的功能及细胞内的表达部位, 本研究构建了 HbLPAT2-GFP 的融合蛋白, 利用农杆菌侵染的方法在烟草叶表皮细胞共表达 HbLPAT2-GFP 和细胞内质网定位的 CFP-HDEL。亚细胞定位分析结果表明, 空载的 GFP 信号在细胞中分散表达, HbLPAT2a 和 HbLPAT2b 的 GFP 信号呈点状分布并与内质网定位的 CFP 信号重合 (图 5), 说明 HbLPAT2a 和 HbLPAT2b 定位于细胞的内质网上, 与之前的蛋白亚细胞定位预测结果相同。

3 讨论

天然橡胶具有弹性强、可塑性强、回弹力强、抗冲击力强以及散热性良好等诸多性能, 可用于生产包括航空轮胎和医用手套在内的 50 多万种橡胶制品, 对运输、医药和国防等行业至关重要。



蓝色: 内质网标记 CFP-HDEL; 绿色: *HbLPAT2a*-GFP 和 *HbLPAT2b*-GFP; 白色箭头: *HbLPAT2a*-GFP 内质网共定位处和 *HbLPAT2b*-GFP 内质网共定位处。

Blue: The endoplasmic reticulum marker CFP-HDEL; Green: *HbLPAT2a*-GFP and *HbLPAT2b*-GFP; White arrows: Co-location of *HbLPAT2a*-GFP and endoplasmic reticulum and *HbLPAT2a*-GFP and endoplasmic reticulum.

图 5 *HbLPAT2a* 和 *HbLPAT2b* 基因的亚细胞定位

Fig. 5 Subcellular localization of *HbLPAT2a* and *HbLPAT2b*

天然橡胶之所以具有高弹性是源于其具有较大的分子量和交互网络结构, 双亲性的磷脂与橡胶链 α 端相连有利于天然橡胶形成分支结构。此外, 磷脂作为天然橡胶中最重要的非胶物质之一还显著影响胶乳的产量和稳定性, 并且对生胶的硫化特性和抗氧化性能也有一定影响^[2]。鉴定参与橡胶树磷脂生物合成的酰基转移酶, 对于理解这些基因在胶乳代谢和胶乳品质调控中的功能具有重要的意义。随着分子生物学的发展, 大量研究表明, LPAT 参与调控植物磷脂合成积累过程, 介导酰基-CoA 连接到甘油骨架 *sn*-2 位上的酰化反应, 催化 LPA 生成 PA, 是磷脂生物合成的一个限速酶。目前, LPAT 基因已在多种植物中被克隆出来, 并对其基因功能进行了初步验证, 如紫苏 (*Perilla frutescens*)、花生、水稻 (*Oryza sativa*) 等^[23-25], 但在橡胶树中未见报道。

本研究克隆获得的 2 个橡胶树 *HbLPAT2* 基因, 序列分析表明 *HbLPAT2* 共有 5 个保守的 Motifs, 具有高度保守性。其中 Motif I (NHXXXXD) 为膜结合的 O-酰基转移酶 (MBOAT) 家族, 其组氨酸 (H) 及天冬氨酸 (D) 是催化酰基转移酶活性的重要位点, Motif III (VLALFVEGTRF) 上的 EGT-Box 不但不是酰基转移酶的功能位点, 还是与酰基转移酶作用底物溶血磷脂酸的结合位点^[26-27], 基因结构的高度保守意味着它们在植物磷脂生物合

成过程中发挥着相似的功能。同时发现这 2 个蛋白均具有完整的 PLN02380 (1~374, 1~312) 溶血磷脂酸酰基转移酶功能结构域, 推测 *HbLPAT2* 很可能参与橡胶树胶乳的磷脂生物合成和代谢调控。生物信息学分析发现 *HbLPAT2a* 和 *HbLPAT2b* 分别有 3 个跨膜结构域和 1 个跨膜结构域, 均无信号肽, 为亲水性蛋白, 且含有多个磷酸化位点。*HbLPAT2* 的跨膜结构域均位于 N 端, 这些跨膜区有助于 *HbLPAT2* 锚定于膜上。磷酸位点作为修饰位点, 可激活或抑制染色质构型, 调控基因座的转录。*HbLPAT2a* 和 *HbLPAT2b* 蛋白分别具有 33 个和 26 个潜在的磷酸化位点 (数量最多的为丝氨酸), 说明可逆磷酸化调控在实现 *HbLPAT2* 蛋白的功能上具有一定作用, 在以后的分子育种中可以对它加以利用。如 AtWRI1 受蔗糖非发酵相关蛋白激酶 (SNF1-related protein kinase) KIN10 介导降解, 其 70 位点的苏氨酸和 166 位点的丝氨酸发挥了重要作用, 2 个位点突变后能够增强 AtWRI1 蛋白的稳定性^[28]。

亚细胞定位预测和验证均表明 *HbLPAT2a* 和 *HbLPAT2b* 定位于内质网上, 这与大部分调控磷脂合成基因的定位相同。胶乳中 *HbLPAT* 家族成员表达量分析结果表明, *HbLPAT2* 的表达量显著高于另外 4 个 *HbLPATs*, 在拟南芥的 AtLPAT 家族成员中, AtLPAT2 定位于内质网且参与了磷脂的合成。在底物选择上更偏好 18:1-CoA^[10], 橡胶树胶乳中的脂肪酸主要为棕榈酸 (C16:0)、硬脂酸 (C18:0)、油酸 (C18:1) 和亚油酸 (C18:2), 这 4 个主要脂肪酸中 3 个为 C18 脂肪酸, 这可能是橡胶树胶乳的 *HbLPATs* 中 *HbLPAT2* 表达量高的原因。*HbLPAT2a* 和 *HbLPAT2b* 在橡胶树不同组织中的表达分析结果表明, 二者均在种子中的相对表达最高, 显著高于其他组织, 其次为花。种子作为植物合成油脂的主要场所, 绝大多数负责油脂合成相关的基因均在种子中高表达, 花作为生殖器官, 在开花过程中也需要大量脂质的合成^[29], 这也解释了 *HbLPAT2* 为何会在橡胶树种子和花中的表达量显著高于其他组织。而在其他组织部位中, 胶乳的 *HbLPAT2* 表达量最高, 考虑到与其他组织部位相比胶乳中丰富的磷脂含量, 再结合之前的研究结果, 说明 *HbLPAT2* 是橡胶树胶乳中主要负责磷脂合成的基因, 但是否为唯一负责磷脂合成的基因, 还需要后续实验进行验证。

4 结论

本研究通过分子生物学手段首次克隆出了橡胶树 *HbLPAT2a* 和 *HbLPAT2b* 两个基因并完成了生物信息学分析和表达分析, 结果初步表明 *HbLPAT2a* 和 *HbLPAT2b* 参与了橡胶树胶乳磷脂的生物合成。后续将进一步探究 *HbLPAT2a* 和 *HbLPAT2b* 通过参与磷脂合成过程对胶乳品质的影响, 为橡胶树胶乳品质的遗传改良提供科学基础和分子靶标。

参考文献

- [1] 蔡志英, 施玉萍, 刘一贤, 熊斌, 戴利铭, 李岚岚, 李发昌, 李国化. 橡胶树毛色二孢叶斑病的病原菌[J]. 云南农业大学学报(自然科学), 2018, 33(2): 224.
CAI Z Y, SHI Y P, LIU Y X, XIONG B, DAI L M, LI L L, LI F C, LI G H. The pathogen causing lasiodiplodia leaf spot on rubber tree[J]. Journal of Yunnan Agricultural University (Natural Science), 2018, 33(2): 224. (in Chinese)
- [2] 林位夫. 橡胶树农学词典[M]. 北京: 中国农业出版社, 2014.
LIN W F. Dictionary of rubber tree agriculture[M]. Beijing: China Agriculture Press, 2014. (in Chinese)
- [3] 曾霞. 中国天然橡胶产业发展和技术展望(2021—2025)[M]. 北京: 中国农业出版社, 2021.
ZENG X. Development and technology prospect of natural rubber industry in China (2021–2025)[M]. Beijing: China Agriculture Press, 2021. (in Chinese)
- [4] 何映平. 天然橡胶加工学[M]. 海口: 海南出版社, 2008.
HE Y P. Processing of natural rubber[M]. Haikou: Hainan Publishing House, 2008. (in Chinese)
- [5] 魏丽娜, 李婧, 程原, 刘宏超. 天然橡胶中磷脂的作用[J]. 材料导报, 2015, 29(26): 418-420, 432.
WEI L N, LI J, CHENG Y, LIU H C. The functions of phospholipids in natural rubber[J]. Materials Reports, 2015, 29(26): 418-420, 432. (in Chinese)
- [6] TANAKA Y, TARACHIWIN L. Recent advances in structural characterization of natural rubber[J]. Rubber Chemistry Technology, 2009, 82(3): 283-314.
- [7] TARACHIWIN L, SAKDAIPANICH J, UTE K, KITAYAMA K, BAMBA T, FUKUSAKI T, KOBAYASHI E, TANAKA A. Structural characterization of alpha-terminal group of natural rubber decomposition of branch-points by lipase and phosphatase treatments[J]. Biomacromolecules, 2005, 6(4): 1851-1857.
- [8] 范睿深. 山桐子油脂合成相关基因的克隆及功能分析[D]. 杨陵: 西北农林科技大学, 2021.
- FAN R S. Cloning and functional analysis of genes related to oil synthesis in tung seed[D]. Yangling: Northwest A&F University, 2021. (in Chinese)
- [9] JAIN R K, COFFEY M, LAI K, KUMAR A, MACKENZIE S L. Enhancement of seed oil content by expression of glycerol-3-phosphate acyltransferase genes[J]. Biochemical Society Transactions, 2000, 28(6): 958-961.
- [10] BOURGIS F. A plastidial lysophosphatidic acid acyltransferase from oilseed rape[J]. Plant Physiology, 1999, 120(3): 913-922.
- [11] YANG W, SIMPSON J P, LI-BEISSON Y, BEISSON F, POLLARD M, OHLROGGE J B. A land plant specific Glycerol 3 phosphate acyltransferase family in *Arabidopsis*: substrate specificity, sn-2 preference, and evolution[J]. Plant Physiology, 2012, 160(2): 638-652.
- [12] CHEN X, SNYDER C L, TRUKSA M, SHAH S, WES-ELAKE J R. Sn-Glycerol-3-phosphate acyltransferases in plants[J]. Plant Signal Behavior, 2011, 6(11): 1695-1699.
- [13] LIANG H M, JIAN G J. Advancing oleaginous microorganisms to produce lipid via metabolic engineering technology[J]. Progress in Lipid Research, 2013, 52(4): 395-408.
- [14] MISRA N, PANDA P K, PARIDA B K. Genome-wide identification and evolutionary analysis of algal *LPAT* genes involved in TAG biosynthesis using bioinformatic approaches[J]. Molecular Biology Reports, 2014, 41(12): 8319-8332.
- [15] KIM H U. Plastid lysophosphatidyl acyltransferase is essential for embryo development in *Arabidopsis*[J]. Plant Physiology, 2004, 134(3): 1206-1216.
- [16] ARROYO-CARO J M, CHILEH T, KAZACHKOV M, ZOU J T, ALONSO D L, GARCIA-MAROTO F. 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[J]. Plant Science, 2013, 199/200: 29-40.
- [17] KIM H U. Ubiquitous and endoplasmic reticulum-located lysophosphatidyl acyltransferase, *LPAT2*, is essential for female but not male gametophyte development in *Arabidopsis*[J]. The Plant Cell, 2005, 17(14): 1073-1089.
- [18] ANGKAWIJAYA A E, NGUYEN V C, NAKAMURA Y. Enhanced root growth in phosphate-starved *Arabidopsis* by stimulating *de novo* phospholipid biosynthesis through the overexpression of *LYSOPHOSPHATIDIC ACID ACYLTRANSFERASE 2 (LPAT2)*[J]. Plant Cell and Environment, 2017, 40(9): 1807-1818.
- [19] CHEN S, LEI Y, XU X, HUANG J Q, JIANG H F, WANG J, CHENG Z S, ZHANG J N, SONG Y H, LIAO B S, LI Y R, MARIE-JOELLE V. The peanut (*Arachis hypogaea* L.) gene

- AhLPAT2* increases the lipid content of transgenic *Arabidopsis* seeds[J]. PLoS One, 2015, 10(8): e0136170.
- [20] BARROGA N A M, NAKAMURA Y. Lysophosphatidic acid acyltransferase 2 (LPAT2) is required for *de novo* glycerolipid biosynthesis, growth, and development in vegetative and reproductive tissues of *Arabidopsis*[J]. The Plant Journal, 2022, 112(3): 709-721.
- [21] CHEN G, VAN ERP H, MARTIN-MORENO J, JOHNSON K, MORALES E, BROWSE J, EASTMOND P, LIN J T. Expression of castor LPAT2 enhances ricinoleic acid content at the sn-2 position of triacylglycerols in *lesquerella* seed[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2016, 17(4): 507.
- [22] TANG C R, YANG M, FANG Y J, LUO Y F, GAO S H, XIAO X H, AN Z W, ZHOU B H, ZHANG B, TAN X Y, YEANG H Y, QIN Y X, YANG J H, LIN Q, MEI H L, MONTORO P, LONG X Y, QI J Y, HUA Y W, HE Z L, SUN M, LI W J, ZENG X, CHENG H, LIU Y, YANG J, TIAN W M, ZHUANG N S, ZENG R Z, LI D J, HE P, LI Z, ZOU Z, LI S L, LI C J, WANG J X, WEI D, LAI C Q, LUO W, YU J, HU S N, HUANG H S. The rubber tree genome reveals new insights into rubber production and species adaptation[J]. Nature Plants, 2016, 2: 1-10.
- [23] 曹华盛, 李堂, 熊亮, 王福军, 李曙光, 顾海永, 何高, 罗文永, 梁世胡. 水稻溶血磷脂酸酰基转移酶基因(*LPAT*)家族生物信息学分析及在籽粒油脂合成中的作用[J]. 华南农业大学学报, 2013, 44(6): 925-935.
- CAO H S, LI T, XIONG L, WANG F J, LI S G, GU H Y, HE G, LUO W Y, LIANG S H. Bioinformatics analysis of lysophosphatidyl acyltransferase gene (LPAT) family in rice and its role in grain oil synthesis[J]. Journal of South China Agricultural University, 2013, 44(6): 925-935. (in Chinese)
- [24] 董芳, 迟晓元, 杨庆利, 陈娜, 潘丽娟, 陈明娜, 和亚男, 杨珍, 王通. 三个花生溶血磷脂酸酰基转移酶基因的克隆与序列分析[J]. 花生学报, 2013, 42(1): 1-11.
- DONG F, CHI X Y, YANG Q L, CHEN N, PAN L J, CHEN M N, HE Y N, YANG Z, WANG T. Cloning and sequence analysis of three lysophosphatidic acid acyltransferase (LPAT) encoding genes in peanut[J]. Journal of Peanut Science, 2013, 42(1): 1-11. (in Chinese)
- [25] 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[J]. 生物工程学报, 2022, 38(8): 3014-3028.
- ZHOU Y L, HUANG X S, HAO Y R, CAI G P, SHI X F, LI R Z, WANG J P. Cloning and functional analysis of a lysophosphatidyl acyltransferase gene from *Perilla frutescens*[J]. Chinese Journal of Bioengineering, 2022, 38(8): 3014-3028. (in Chinese)
- [26] LEWIN T M, WANG P, COLEMAN R A. Analysis of amino acid motifs diagnostic for the sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase reaction[J]. Biochemistry, 1999, 38(18): 5764-5771.
- [27] TAYLOR D C, FRANCIS T, LOZINSKY S, HOFFMAN T, MARILLIA E F. Cloning and characterization of a constitutive lysophosphatidic acid acyltransferase 2 (LPAT2) gene from *Tropaeolum majus* L.[J]. Open Plant Science Journal, 2010, 4(1): 7-17.
- [28] PFLUGER J, WAGNER D. Histone modifications and dynamic regulation of genome accessibility in plants[J]. Current Opinion in Plant Biology, 2007, 10(6): 645-652.
- [29] MUNOZ C F, WEUSTHUIE R A, D'ADAMO S, WIJFFELS R H. Effect of single and combined expression of lysophosphatidic acid acyltransferase, glycerol-3-phosphate acyltransferase, and diacylglycerol acyltransferase on lipid accumulation and composition in *Neochloris oleoabundans*[J]. Frontiers in Plant Science, 2019, 10: 1573.