生物技术通报
· 研究报告 · BIOTECHNOLOGY BULLETIN 2026, 42(10):88-97

燕麦溶血磷脂酸酰基转移酶*AsLPAAT5*基因克隆与功能分析

胡荣芳[1] 丁家豪[1] 马菊花[1] 谭辉进[1] 宋亚楠[2] 薛金爱[1*]
（1.山西农业大学农学院 山西省特用作物遗传与代谢工程研究中心，太谷 030801；2.安徽财贸职业学院，合肥 230601）

摘 要： 【目的】溶血磷脂酸酰基转移酶（lysophosphatidic acid acyltransferase, LPAAT）是三酰甘油（triacylglycerol, TAG）组装途径中的关键限速酶。研究燕麦*AsLPAAT5*基因在油脂合成积累中的功能，为燕麦及其他作物油脂产量与品质改良提供新思路。【方法】从燕麦中克隆*AsLPAAT5*基因（Gene ID：AVESA.00001b.r1.1Ag0003121.1），生物信息学方法分析其结构特征，通过LPAAT缺陷型大肠杆菌突变株SM2-1、酿酒酵母INVSc1和拟南芥转化体系研究AsLPAAT5酶的活性及生物学功能。【结果】燕麦*AsLPAAT5*基因编码蛋白具有LPAAT的典型保守结构域。*AsLPAAT5*基因在燕麦根、茎、叶、穗以及开花后9、17、25 d的种子中均有表达，在开花后25 d的种子中表达量最高。大肠杆菌功能互补试验证实AsLPAAT5能够恢复突变株SM2-1的细胞膜脂生物合成功能，具备LPAAT酶活性。在酿酒酵母中过表达*AsLPAAT5*导致转基因酵母总脂含量相较于野生型酵母显著升高2.11%，C16:1含量增加14.25%。在拟南芥中过表达*AsLPAAT5*使转基因拟南芥种子千粒重增加2.2%-2.8%，总油脂含量提高1.9%-2.0%，C18:2含量显著升高25.49%-26.0%。【结论】AsLPAAT5是定位于内质网且具备典型LPAAT催化活性的酶蛋白，其异源表达能够显著促进宿主总油脂积累，并对不饱和脂肪酸（尤其是C18:2）的富集具有特异性调控作用。

关键词： 燕麦；溶血磷脂酸酰基转移酶；油脂合成；亚油酸；功能分析
DOI: 10.13560/j.cnki.biotech.bull.1985.2026-0470

Cloning and Functional Characterization of the Lysophosphatidic Acid Acyltransferase Gene *AsLPAAT5* in *Avena sativa*

HU Rong-fang[1] DING Jia-hao[1] MA Ju-hua[1] TAN Hui-jin[1] SONG Ya-nan[2] XUE Jin-ai[1*]
（1. *College of Agriculture, Shanxi Agricultural University, Shanxi Engineering Research Center for Genetics and Metabolism of Special Crops, Taigu* 030801; 2. *Anhui Finance & Trade Vocational College, Hefei* 230601）

Abstract: 【Objective】 Lysophosphatidic acid acyltransferase (LPAAT) is a key rate-limiting enzyme in triacylglycerol (TAG) assembly pathway. This study aimed to investigate the function of the oat (*Avena sativa* L.) *AsLPAAT5* gene in lipid biosynthesis and accumulation, providing new insights for improving oil yield and quality in oat and other crops. 【Method】 The *AsLPAAT5* gene (Gene ID: AVESA.00001b.r1.1Ag0003121.1) was cloned from oat, and its structural characteristics were analyzed using bioinformatics tools. The enzymatic activity and biological function of AsLPAAT5 were evaluated using the *Escherichia coli* LPAAT-deficient mutant strain SM2-1, *Saccharomyces cerevisiae* wild-type strain INVSc1, and *Arabidopsis thaliana* transformation systems. 【Result】 The protein encoded by *AsLPAAT5* possessed the typical conserved domains of LPAAT. *AsLPAAT5* was expressed in roots, stems, leaves, panicles, and seeds at 9, 17, and 25 days after flowering, with the highest expression level detected in seeds at 25 days after flowering. Functional complementation assays in *E. coli* confirmed that AsLPAAT5 can restore membrane lipid biosynthesis in the mutant strain SM2-1, demonstrating LPAAT enzymatic activity. Overexpression of *AsLPAAT5* in *S. cerevisiae* resulted in a significant 2.11% increase in total fatty acid content compared

收稿日期：2026-04-24
基金项目：国家自然科学基金项目（31401430），山西省基础研究计划（202103021224170），山西省高等学校科学研究优秀成果培育项目（J242042025），山西农业大学生物育种工程项目（YZGC101），山西农业大学其他纵向科研项目（2024QT043）
*通信作者：薛金爱 xuejinai@sxau.edu.cn

with wild-type yeast, along with a 14.25% increase in C16:1 content. Overexpression of *AsLPAAT5* in *A. thaliana* increased thousand-seed weight by 2.2%–2.8%, enhanced total oil content by 1.9%–2.0%, and significantly elevated C18:2 content by 25.49%–26.0%.【Conclusion】AsLPAAT5 is an endoplasmic reticulum-localized enzyme with typical LPAAT catalytic activity. Heterologous expression of *AsLPAAT5* significantly promotes total lipid accumulation in hosts and exerts a specific regulatory effect on the enrichment of unsaturated fatty acids, particularly C18:2.

Keywords: *Avena sativa* L.; lysophosphatidic acid acyltransferase; oil biosynthesis; linoleic acid; functional analysis

燕麦（*Avena sativa* L.）为禾本科燕麦属一年生草本作物，又称莜麦、铃铛麦等，是我国栽培历史悠久的传统谷类作物之一，也是全球农业体系中兼具杂粮生产、饲用价值与产业发展潜力的重要作物，对优化种植结构、保障粮食多元供给具有重要意义。燕麦籽粒的营养成分丰富且配比均衡，是功能性食品的优质原料，具有较高的经济开发价值。燕麦是唯一一种能在胚乳组织中大量积累油脂的禾谷类作物，其籽粒油脂含量远高于小麦、水稻、玉米等常见谷物[1-4]。燕麦籽粒中不饱和脂肪酸（unsaturated fatty acid, UFA）占总脂肪酸的比例超过80%，脂肪酸主要由油酸（oleic acid, OA, C18:1）和亚油酸（linoleic acid, LA, C18:2）构成，其中亚油酸占比可达38%–52%。亚油酸是人体必需脂肪酸，具有软化血管、增强血管壁弹性、预防血管硬化、延缓机体衰老等生理功能[5]。因此，解析燕麦油脂合成积累以及高亚油酸形成的分子调控机制，对提升燕麦等禾谷类作物油脂产量和品质具有重要意义。

植物油脂生物合成是一套涉及多步酶促反应、多细胞器协同运作的复杂代谢体系，脂肪酸的从头合成与三酰甘油（triacylglycerol, TAG）的组装合成是实现植物体内油脂合成与积累的两大核心代谢环节[6]。TAG是植物油脂代谢途径中的核心终产物，也是植物种子中油脂的主要储存形式。溶血磷脂酸酰基转移酶（lysophosphatidic acid acyltransferase, LPAAT）是TAG组装过程中催化溶血磷脂酸（lysophosphatidic acid, LPA）*sn*-2位酰基化形成磷脂酸的关键限速酶[7-8]。LPAAT家族成员根据在细胞中的定位不同可分为质体型与内质网型两类。迄今，*LPAAT*基因已在拟南芥（*Arabidopsis thaliana*）[9-10]、花生（*Arachis hypogaea*）[11]、牡丹（*Paeonia suffruticosa* Andr.）[12]、紫苏（*Perilla frutescens*）[13-14]和油菜（*Brassica campestris*）[15]等多种植物中被分离和研究。在拟南芥中鉴定到5个*LPAAT*基因，包括定位在叶绿体上的AtLPAAT1（ATS2）[16]，以及定位在内质网上的AtLPAAT2、AtLPAAT3、AtLPAAT4、AtLPAAT5[17-18]。*LPAAT*在提高植物油脂含量和促进脂肪酸合成积累中起着重要作用。例如，在拟南芥中转入油菜*BnLPAAT2*基因，转基因植株种子重量和种子总脂肪酸含量比野生植株明显增加[19]；在拟南芥中过表达蓖麻*RcLPAAT2*基因，可提高三酰甘油*sn*-2位置上油酸的含量[20]；冬菟葵*EhLPAAT2*可恢复大肠杆菌LPAAT突变体的膜脂生物合成能力，其过表达亦能促进转基因种子的油脂积累[21]；在烟草中转入油莎豆*CeLPAAT2*基因，与野生植株相比，转基因植株叶片总脂肪酸含量明显增加[22]；花生*LPAAT*基因在种子发育过程中的表达趋势与油脂积累模式同步，提示AhLPAAT参与油脂合成调控[23]；对棉花*LPAAT*家族基因的表达分析表明，*LPAAT*基因除参与种子油脂合成外，还可能通过调节脂质代谢途径为纤维细胞的快速伸长提供能量保障及膜结构组分[24]。这些研究表明LPAAT家族成员在植物油脂合成和特异脂肪酸富集过程中具有关键作用。然而，关于燕麦AsLPAAT家族成员特别是*AsLPAAT5*基因在油脂合成和积累途径中的功能及其调控机制尚不明确。

为深入阐明燕麦胚乳中油脂尤其是高价值不饱和脂肪酸的合成与积累的分子调控机制，本研究对燕麦*AsLPAAT5*基因进行克隆和生物信息学分析，利用LPAAT功能缺陷型大肠杆菌突变株SM2-1转化验证*AsLPAAT5*基因编码蛋白的酶学催化活性，通过真核模式微生物酿酒酵母（*Saccharomyces cerevisiae*）INVSc1和高等模式植物拟南芥Columbia-0异源表达，系统分析AsLPAAT5在总油脂合成和不饱和脂肪酸积累中的生物学功能。研究结果将为后续利用基因工程技术定向改良油料作物的油脂含量与品质提供重要的理论依据与基因资源。

1 材料与方法

1.1 材料

本试验所用的燕麦试验材料为CEav5651品种，其种子由山西农业大学分子农业与生物能源研究所保存。分别取两叶一心期的根、茎、叶片，抽穗期的穗，以及不同发育时期的种子（开花后9、17、25 d），液氮速冻后存于-80 ℃备用。野生型（wild type, WT）拟南芥（*Arabidopsis thaliana*）为Columbia-0，放置于人工气候培养箱培养，生长条件设置为光暗周期16 h光照/8 h黑暗，光照强度90 μmol/m^2/s，温度22 ℃，相对湿度60%。LPAAT缺失大肠杆菌突变株SM2-1、大肠杆菌DH5α、根癌农杆菌GV3101、酿酒酵母野生型菌株INVSc1，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pCAMBIA1302以及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 燕麦AsLPAAT5蛋白的鉴定及基本理化性质分析 利用TAIR数据库（http://www.arabidopsis.org/）下载拟南芥AtLPAAT的蛋白序列（拟南芥AtLPAAT1-5的TAIR登录号分别为：At4g30580、At3g57650、At1g51260、At1g75020、At3g18850）作为查询序列，在燕麦基因组数据库（https://wheat.pw.usda.gov/GG3/graingenes-downloads/pepsico-oat-oc3098-v2-files-2021）中进行Blast比对分析，设置初始阈值E-value≤1e^{-10}。通过NCBI-CDD（https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi）对Blast鉴定到的所有序列的功能结构域进行预测分析，手动剔除结构域不完整的序列，最终获得12个具有典型LPLAT结构域的燕麦AsLPAAT家族成员。结合课题组内部转录组表达谱数据（未发表），选择在燕麦发育种子中高表达的AsLPAAT5成员（基因ID：AVESA.00001b.r1.1Ag0003121.1）作为目的序列进行后续研究。借助MEGA11软件对燕麦AsLPAAT5和其他物种LPAAT蛋白序列构建系统发育进化树。同时，通过ExPASy-ProParam在线工具（http://web.expasy.org/protparam/）系统分析AsLPAAT5蛋白的理化特性。

1.2.2 燕麦*AsLPAAT5*基因表达谱分析 提取燕麦根、茎、叶、穗和不同发育时期种子样本的总RNA，反转录合成第一链cDNA。用Primer6.0设计特异性引物（表1），并通过Blast比对确认所有引物的扩增特异性。以*AsEP*为内参基因[25]，使用2×RealStar Green Power Mixture试剂盒（GenStar公司）进行RT-qPCR扩增，反应程序为95 ℃ 2 min；95 ℃ 15 s，60 ℃ 30 s；40次循环。分析*AsLPAAT5*基因在燕麦

表1 本研究所用的引物

Table 1 Primers used in this study

引物名称 Primer name	引物序列 Sequence(5′-3′)	用途 Purpose
1302-*AsLPAAT5*-F	acgggggactcttgaccatggATGTGGTTAGCCATGTTTCCATT	载体构建
1302-*AsLPAAT5*-R	aagttcttctcctttactagtTCAGAGTTTCTTGGCATGTGCG	
pYES2.0-*AsLPAAT5*-F	gggaatattaagcttggtaccATGTGGTTAGCCATGTTTCCATT	载体构建
pYES2.0-*AsLPAAT5*-R	tacatgatgcggccctctagaTCAGAGTTTCTTGGCATGTGCG	
1300-*AsLPAAT5*-F	gcccttgctcaccatggtaccATGTGGTTAGCCATGTTTCCATT	载体构建
1300-*AsLPAAT5*-R	atacaccaaatcgactctagaGAGTTTCTTGGCATGTGCGC	
pET28A-*AsLPAAT5*-F	gcaagcttgtcgacggagctcATGTGGTTAGCCATGTTTCCATT	载体构建
pET28A-*AsLPAAT5*-R	ggataacaattcccctctagaTCAGAGTTTCTTGGCATGTGCG	
AsLPAAT5-qRT-F	ATACAAGCATCGGCTGCCAACT	qPCR
AsLPAAT5-qRT-R	CCTGAACCACACGGACGAGAAC	
AsEP-F	GCACAAGTGATGCCAGAATAGC	内参基因
AsEP-R	CGAGATGCATTAGATTCGTTGG	

注：小写字母表示载体骨架上的同源臂序列或者同源重组接头序列

Note: Lowercase letters indicate homology arm sequences or homologous recombination linker sequences on the vector backbone

不同组织及种子不同发育时期的表达水平。采用$2^{-\Delta\Delta Ct}$法计算*AsLPAAT5*基因的相对表达量。

1.2.3　AsLPAAT5蛋白在大肠杆菌突变株SM2-1中的功能互补测试　采用同源重组法构建表达载体：根据*AsLPAAT5*基因CDS序列设计携带*Xba* I和*Sac* I酶切位点的同源臂引物（表1），以燕麦cDNA为模板，使用*Xba* I和*Sac* I限制性内切酶对pET28A载体进行线性化，将*AsLPAAT5*片段连接至pET28A载体后转化大肠杆菌DH5α感受态，经菌液PCR和测序鉴定获得pET28A-*AsLPAAT5*重组质粒。将其与空载体pET28A分别转化大肠杆菌SM2-1感受态细胞，在含50 μg/mL卡那霉素的LB平板上筛选阳性克隆，并经菌液PCR验证。将验证为阳性的pET28A-*AsLPAAT5*及pET28A转化菌株于液体培养基中30 ℃过夜培养，调整OD_{600}至0.1，对菌液进行稀释并划线到两个添加0.1 mmol/L异丙基-β-D-硫代半乳糖苷（isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside, IPTG）的选择性琼脂培养基上，分别置于30 ℃和42 ℃培养，观察菌落生长差异并拍照。

1.2.4　燕麦AsLPAAT5蛋白亚细胞定位分析　采用同源重组法构建表达载体，将目标基因片段*AsLPAAT5*连接至pCAMBIA1300植物表达载体中，并转化大肠杆菌DH5α感受态，经菌液PCR和测序鉴定获得pCAMBIA1300-*AsLPAAT5*重组质粒。通过农杆菌介导法将构建好的GFP融合植物表达载体pCAMBIA1300-*AsLPAAT5*、pCAMBIA1300空载体分别和内质网定位标记载体pCAMBIA1300-35S-ER-mCherry-HDEL（ER-mCherry）注射侵染本氏烟草叶片（6周龄左右），黑暗条件下培养2 d后使用激光共聚焦显微镜（LEICA TCS SP8，德国）观察GFP荧光信号的亚细胞定位并拍照。

1.2.5　*AsLPAAT5*基因在酵母中的过表达及功能分析　将*AsLPAAT5*连接至酵母表达载体pYES2.0（经*Xba* I和*Kpn* I内切酶线性化）并转化DH5α感受态，经测序验证后获得重组质粒pYES2.0-*AsLPAAT5*。采用醋酸锂法将重组质粒及空载体分别转化酿酒酵母INVSc1，于SC-URA平板30 ℃培养2–4 d，经PCR鉴定阳性菌株后，接种于SC-URA液体培养基培养2–3 d，离心收集菌体。取一部分菌体沉淀重悬至OD_{600}≈0.2，与等体积BODIPY染液混合，37 ℃避光孵育10–15 min，激光共聚焦显微镜下观察酵母细胞中油滴染色情况。剩余菌体经冷冻干燥研磨后用于脂肪酸分析[26–27]。

1.2.6　*AsLPAAT5*植物表达载体构建及在拟南芥中的遗传转化　采用同源重组法构建植物表达载体pCAMBIA1302-*AsLPAAT5*，鉴定阳性克隆后提取质粒并进一步转入农杆菌GV3101细胞，通过花序侵染法转化拟南芥。转基因种子经潮霉素筛选后，挑选生长健壮、根系发达的幼苗移栽至营养土。取转基因植株叶片，通过CTAB法提取DNA并经PCR鉴定阳性株系。连续筛选至T_3代，获得稳定遗传的纯合系。收集T_3代纯合株系种子，真空冷冻干燥后研磨成粉末，用于后续指标测定。

1.2.7　总脂肪酸提取及含量测定　将冻干样品研磨成粉末，准确称取50 mg样品加入置于50 mL离心管中，加入7.5 mL甲醇–氯仿（2∶1，v/v）混合提取液，置于37 ℃摇床中，200 r/min振荡提取24 h。离心后收集上清液，向剩余沉淀中加入7.5 mL混合提取液，抽提12 h，合并两次上清液，向其中加入5 mL氯仿和9 mL 1% NaCl溶液，使体系中氯仿∶甲醇∶水相体积比达到2.0∶2.0∶1.8。充分混匀后离心，小心吸取下层有机相并转移至预先称重的玻璃管中（m_0），挥干溶剂后再次称重（m_1）。总脂肪酸含量计算公式如下。

$$总脂肪酸含量（\%）=[(m_1-m_0)/0.05]\times100\%$$

1.2.8　脂肪酸甲酯的制备及各组分含量测定　准确称取50 mg转基因酵母或拟南芥种子冻干样品置于玻璃管中，加入50 μL十七烷酸甘油三酯作为内标。随后加入1 mL氯仿–甲醇（2∶1，v/v）混合液，涡旋混匀后，依次加入500 μL 0.9% KCl溶液与1 mL氯仿，混匀后4 000 r/min离心10 min，小心吸取下层氯仿相至新玻璃管，60 ℃烘干。向烘干样品中加入500 μL含2.5%浓硫酸的甲醇溶液，混匀后于80 ℃水浴2 h。反应结束后加入500 μL正己烷与1 mL 0.9% KCl溶液，涡旋混匀，4 000 r/min离心10 min，收集上清液于新玻璃管，60 ℃挥干溶剂。最后加入500 μL正己烷复溶，转移至气相色谱进样小瓶待测。

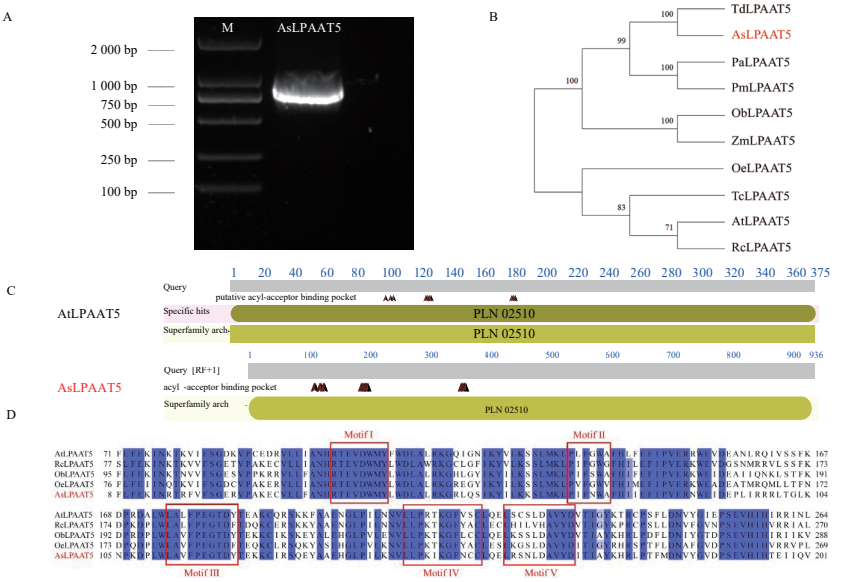
1.2.9　数据统计分析　每个试验均进行3次生物学重复。使用SPSS 27.0软件对数据进行单因素方差分析，并采用邓肯检验进行事后多重比较以判断差异

显著性（$P<0.05$）。

2 结果

2.1 *AsLPAAT5*基因的克隆与生物信息学分析

以燕麦种子的cDNA为模板，用高保真酶通过RT-PCR技术对*AsLPAAT5*基因进行扩增。将扩增产物纯化回收后进行测序验证，获得一长度为936 bp的核酸片段，其序列与燕麦基因组中*AsLPAAT5*基因（Gene ID：AVESA.00001b.r1.1Ag0003121.1）CDS区域完全一致，表明*AsLPAAT5*基因克隆成功（图1-A）。理化性质分析表明，*AsLPAAT5*基因编码氨基酸数为311，AsLPAAT5蛋白的不稳定性系数和亲水性指数分别为41.72和0.75，预测其为不稳定性疏水蛋白。利用MEGA11软件对燕麦AsLPAAT5蛋白和野生二粒小麦（*Triticum dicoccum*）、芦苇（*Phragmites australis*）、稷（*Panicum miliaceum*）、短花稻（*Oryza brachyantha*）、玉米（*Zea mays*）、油橄榄（*Olea europaea*）、可可树（*Theobroma cacao*）、拟南芥（*Arabidopsis thaliana*）、蓖麻（*Ricinus communis*）LPAAT蛋白构建进化树（图1-B），结果显示，燕麦AsLPAAT5蛋白与野生二粒小麦TdLPAAT5在进化上亲缘关系较近。功能结构域预测分析表明AsLPAAT5蛋白具有溶血磷脂酸酰基转移酶功能结构域，属于溶血磷脂酰基转移酶（LPLAT）蛋白超家族成员。LPAATs蛋白氨基酸多序列比对分析发现（图1-C、D），燕麦和其他物种LPAAT5均具有LPAAT蛋白的保守基序：NHRSDID（motif Ⅰ）、LPVIGW（motif Ⅱ）、WLALFVEGTR（motif Ⅲ）、NVLIPRIKGFV（motif Ⅳ）和MRSFVPAIYD(X)TV（motif Ⅴ），说明LPAAT5蛋白在进化过程中保守性较高。



A：燕麦*AsLPAAT5*基因的克隆，M：DNA marker DL 2000；B：不同物种LPAATs蛋白系统进化树；C：AsLPAAT5蛋白结构域；D：LPAAT5蛋白保守氨基酸序列

A: Cloning of *AsLPAAT5*, M: DNA marker DL 2000. B: Phylogenetic tree of LPAAT proteins from different plant species. C: Protein domain of AsLPAAT5. D: Conserved amino acid sequences of LPAAT5 proteins

图1 *AsLPAAT5*基因克隆及其序列特征分析

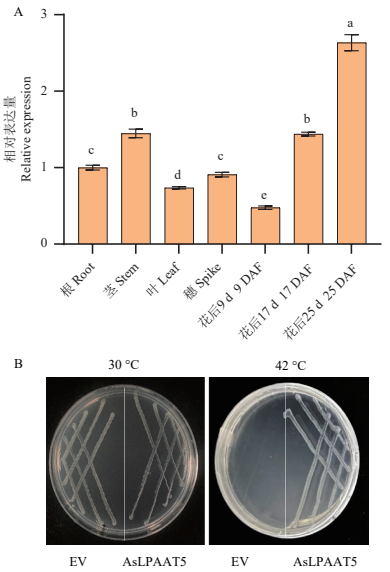
Fig. 1 Cloning and sequence characterization of *AsLPAAT5* gene

2.2 燕麦*AsLPAAT5*基因在发育种子中高表达且具有LPAAT酶活性

对*AsLPAAT5*基因在燕麦不同组织及不同发育阶段种子中的表达水平进行定量分析（图2-A）。结果表明，*AsLPAAT5*在燕麦所有检测组织中均有表达，具有组成型表达的特点。其中，在种子发育进程中，*AsLPAAT5*表达量呈逐渐上升趋势，于开花后25 d达到峰值，约为发育前期种子（开花后9 d）中表达量

的5.53倍。

大肠杆菌LPAAT突变株SM2-1不能合成组成细胞膜的甘油酯，是温度敏感型菌株，在30–37 ℃条件下培养可以正常生长，而在42 ℃下死亡，已广泛用于验证植物LPAAT酶蛋白的功能。将载有过表达载体pET28A-*AsLPAAT5*和pET28A（空载）的SM2-1菌株于30 ℃过夜培养，调整OD_{600}约为0.1。将由初始浓度菌液制成的稀释液在两个含IPTG的选择性培养基上划线，分别置于30 ℃和42 ℃培养。温度敏感性测试结果显示（图2-B），30 ℃条件下，转空载体pET28A与转AsLPAAT5的SM2-1菌株均能正常生长；但在42 ℃下，仅AsLPAAT5转化菌株存活，空载体对照菌株死亡。这表明AsLPAAT5成功互补了SM2-1突变株的LPAAT功能，可催化大肠杆菌中膜脂的生物合成。



A：*AsLPAAT5*基因表达分析；B：AsLPAAT5在SM2-1菌株中的功能互补测试。不同小写字母表示差异显著（$P<0.05$），下同

A: Expression analysis of *AsLPAAT5*. B: Functional complementation test of AsLPAAT5 in the SM2-1 strain. Different lowercase letters indicate significant differences ($P<0.05$). The same below

图2　AsLPAAT5蛋白酶活验证

Fig. 2　Enzyme activity validation of AsLPAAT5 protein

2.3　AsLPAAT5蛋白亚细胞定位

将构建好的35S:AsLPAAT5:GFP载体和pCAMBIA1300空载转入GV3101并注射侵染本氏烟草叶片，暗培养2 d后撕取烟草表皮细胞，在激光共聚焦显微镜下观察绿色荧光蛋白的分布（图3）。结果显示AsLPAAT5/GFP重组质粒携带绿色荧光与内质网定位marker质粒ER-mCherry携带红色荧光重合，说明AsLPAAT5酶蛋白主要与内质网相关。

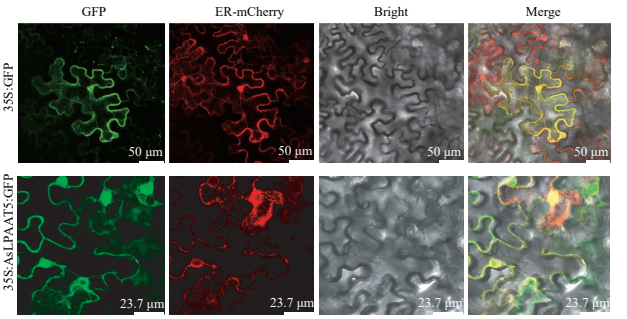


图3　AsLPAAT5蛋白的亚细胞定位

Fig. 3　Subcellular localization of AsLPAAT5 protein

2.4　燕麦*AsLPAAT5*异源表达促进转基因酵母脂质合成

为研究*AsLPAAT5*基因在油脂合成过程中发挥的具体作用，本研究将酵母重组表达载体pYES2.0-*AsLPAAT5*转入野生型酿酒酵母INVSc1，同时将空载体pYES2.0转化作为对照，诱导培养后对各酵母菌株进行BODIPY染色，通过共聚焦显微镜观察酵母细胞中的油滴分布，对转基因酵母脂质合成进行定性分析。结果表明（图4），与转pYES2.0空载体的对照酵母相比，过表达*AsLPAAT5*的酵母细胞中油滴染色信号明显增强，提示转基因酵母细胞内中性脂积累水平上升。

随后，分别对各组酵母的总脂肪酸含量和脂肪酸组分进行定量分析。结果发现（图5-A），转入空载体pYES2.0的酵母，其总脂肪酸含量和野生型酵母相比未出现明显变化，说明空载体的导入不会对酿酒酵母的油脂合成造成显著影响。而转入pYES2.0-*AsLPAAT5*重组载体的酵母，其总脂肪酸含量相较于野生型对照酵母提升了2.11%，这一结果证明*AsLPAAT5*基因过表达可介导酿酒酵母的脂肪酸代谢过程，并且能有效提升酿酒酵母细胞内的油脂积累量。脂肪酸组分检测结果显示（图5-B），野生型酵母INVSc1、转入空载体pYES2.0的酵母与转入

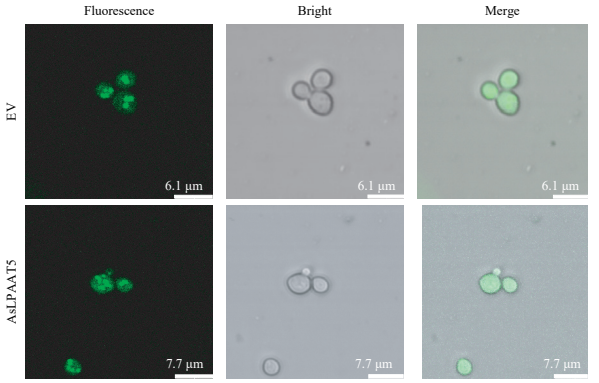
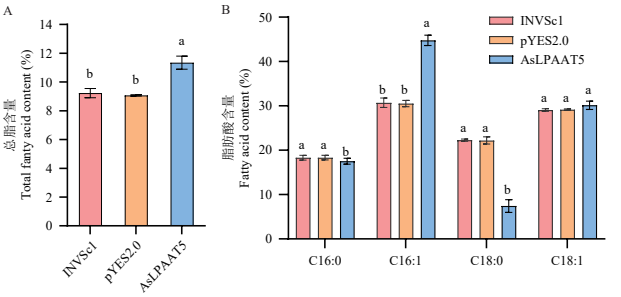


图4 转基因酵母油滴BODIPY染色

Fig. 4 Oil-bodies staining of transgenic yeast



A:*AsLPAAT5*转基因酵母总脂含量;B:*AsLPAAT5*转基因酵母脂肪酸含量

A: Total fatty acid content of *AsLPAAT5* transgenic yeast. B: Fatty acid content of *AsLPAAT5* transgenic yeast

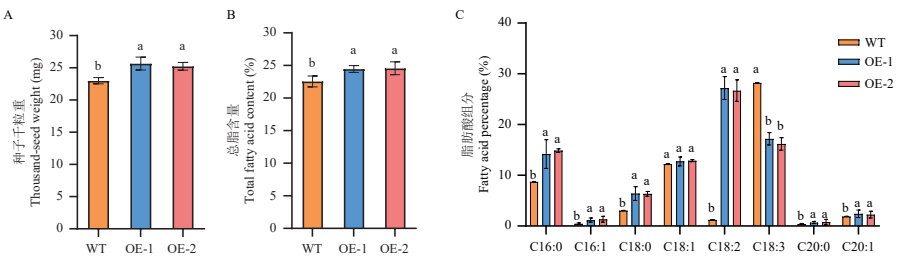
图5 *AsLPAAT5*转基因酵母油脂含量分析

Fig. 5 Analysis of lipid content in *AsLPAAT5* transgenic yeast

*AsLPAAT5*基因的酵母脂肪酸组分种类一致。对各组分含量进行对比后发现，与转空载体pYES2.0的对照酵母相比，转*AsLPAAT5*基因的酵母菌株中，C16:1（棕榈油酸）的含量显著提高了14.25%，同时C18:1（油酸）含量也有小幅提升（1.1%），C16:0（棕榈酸）与C18:0（硬脂酸）含量分别下降了0.8%和14.78%。这一结果表明，*AsLPAAT5*基因在酿酒酵母中异源表达能够显著改变酵母细胞内脂肪酸组分的占比。检测数据进一步显示，该基因能够有效促进不饱和脂肪酸的合成，其中对C16:1的积累表现出显著的上调作用。

2.5 燕麦*AsLPAAT5*过表达提高拟南芥油脂合成与积累

为了研究*AsLPAAT5*在其他作物油脂合成积累中发挥的生物学功能，将其在拟南芥中异源过表达，筛选获得阳性转基因拟南芥后进行表型测定。结果表明，*AsLPAAT5*过表达拟南芥的种子千粒重明显高于野生型拟南芥，转基因种子较野生型种子千粒重增加了2.2%–2.8%（图6-A）。提取转基因拟南芥和野生型拟南芥种子的油脂并对其含量进行分析，与野生型相比，转基因拟南芥种子含油量提高了1.9%–2.0%（图6-B）。对拟南芥种子进行脂肪酸组分的测定，结果表明，与野生型拟南芥相比，转基因拟南芥种子中C16:0含量上升了5.47%–6.15%，C16:1含量上升了0.71%–0.8%，C18:0含量上升了3.31%–3.36%，C18:1略微上升了0.54%–0.68%，C18:2显著升高了25.49%–26%，C18:3含量显著下降了11%–12.02%，C20:0含量上升了0.3%–0.38%，C20:1含量上升了0.34%–0.51%（图6-C）。总之，*AsLPAAT5*基因的异源表达提高了拟南芥种子总油脂的合成并改变了脂肪酸组分的含量。



A:拟南芥种子千粒重;B:总脂含量;C:脂肪酸组分

A: Thousand-seed weight of *A. thaliana*. B: Total fatty acid content. C: Fatty acid composition

图6 转基因拟南芥表型及油脂分析

Fig. 6 Phenotypic and lipid analysis of transgenic *Arabidopsis*

3　讨论

燕麦是禾本科中唯一能在胚乳组织中大量积累油脂的作物，其籽粒油脂含量显著高于小麦、水稻及玉米等谷物，且不饱和脂肪酸占总脂肪酸的比例超过80%[5]，具有重要的营养健康价值。然而，目前关于燕麦种子油脂合成及不饱和脂肪酸富集的分子调控机制仍缺乏系统研究。LPAAT是催化TAG组装过程中LPA的*sn*-2位酰基化形成PA的关键限速酶，在植物油脂合成中发挥重要作用[7-8]，但其在燕麦油脂代谢中的具体功能尚不明确。

本研究从燕麦中成功克隆得到*AsLPAAT5*基因（AVESA.00001b.r1.1Ag0003121.1，位于A亚基因组1号染色体），其CDS全长为936 bp，编码311个氨基酸。AsLPAAT5蛋白属于LPLAT超家族，包含LPAAT典型的5个保守基序（motif I–V），表明其在进化过程中高度保守。系统进化树分析进一步揭示，AsLPAAT5与野生二粒小麦TdLPAAT5亲缘关系最近，符合禾本科物种间的演化关系。蛋白理化性质预测其为不稳定性疏水蛋白，这与LPAAT作为膜结合酶的特性相符[28]。亚细胞定位结果显示，AsLPAAT5蛋白与内质网定位相关，这与多数真核生物内质网型LPAAT的定位特征一致[17-18, 29-30]。但关于AsLPAAT5蛋白的精细亚细胞定位今后仍需采用其他内质网标记物或生化方法进一步验证。表达模式分析表明，*AsLPAAT5*在燕麦各组织中均表达，但在发育后期的种子（开花后25 d）中表达量最高，约为开花后9 d的5.53倍。这一时空表达特征暗示该基因可能在种子油脂快速积累阶段发挥关键作用，与多种植物中*LPAAT*基因在种子发育后期高表达的研究结果相似[11-12, 31]。大肠杆菌温度敏感突变株SM2-1菌株因缺失LPAAT功能在非允许温度（42 ℃）下无法合成细胞膜脂而死亡[21]，但转化外源LPAAT酶基因的菌株能够恢复正常生长，因此常被用于验证LPAAT酶的甘油酯合成活性。如紫苏*PfLPAT1B*[14]、冬菟葵*EhLPAAT2*[21]等在SM2-1菌株中的过表达均证实了LPAAT的酶活特性。本研究中大肠杆菌SM2-1菌株互补功能测试结果显示，转入*AsLPAAT5*的SM2-1菌株在42 ℃下可正常生长，而空载体对照无法存活，结果证明AsLPAAT5蛋白具有典型的LPAAT催化活性，能够恢复大肠杆菌膜脂的生物合成。

研究表明，LPAAT对酰基底物的选择性在不同物种间具有差异，如杯状花（*Cuphea*）LPAAT对中链饱和脂肪酸有较高选择性[32]，而三角褐指藻（*Phaeodactylum tricornutum*）LPAAT则影响酵母中多种脂肪酸的组成[33]。为进一步探究AsLPAAT5的生物学功能，本研究构建了酿酒酵母异源过表达体系。结果表明，在酵母中过表达*AsLPAAT5*导致总脂肪酸含量显著提升2.11%，表明该基因能有效促进宿主油脂积累。脂肪酸组分分析显示，转*AsLPAAT5*基因酵母中C16:1相对含量显著提高14.25%，而C16:0和C18:0等饱和脂肪酸含量下降，表明AsLPAAT5在异源宿主酵母中对C16:1具有较高的底物偏好性。同时，在拟南芥中过表达*AsLPAAT5*进一步验证了其促进油脂合成及调控脂肪酸组分的能力。转基因拟南芥种子的总脂肪酸含量与野生型相比显著提高了1.9%–2.0%，千粒重增加了2.2%–2.8%，表明该基因能够有效提升种子油脂产量与粒重，这与在拟南芥中过表达油菜*BnLPAAT2*[15, 19]及蓖麻*RcLPAAT2*[20]的研究结果一致。值得注意的是，转基因拟南芥种子中C18:2含量显著升高25.49%–26.0%，而C18:3含量下降。这一变化可能与AsLPAAT5对特定酰基供体的选择性有关，其优先催化将C18:2-CoA引入LPA的*sn*-2位，从而改变了种子中不饱和脂肪酸的最终分配。此外，LPAAT的转录调控也是影响其功能的重要层面。例如，在油棕等作物中还发现*LPAAT*基因受上游转录因子如EgMADS3的调控，参与油棕长链脂肪酸的合成代谢[34]。在烟草中过表达*LPAAT*基因或WRI1转录因子均提高种子油脂含量[35]，但二者共表达时未观察到协同增效作用，表明植物油脂生物合成可能受底物供给水平和与其他基因互作关系的协同调控。

本研究通过大肠杆菌、酿酒酵母及拟南芥异源表达体系证实了AsLPAAT5具有LPAAT酶活性，并能促进油脂积累及调控脂肪酸组成，但仍存在一定局限性。首先，缺乏燕麦内源的遗传操作（基因敲除、沉默或过表达）证据，因此AsLPAAT5在燕麦胚乳油脂合成中的原位功能有待验证。其次，AsLPAAT5在油脂合成网络中的调控层级尚不清晰，其

与上游底物供给、下游TAG组装关键酶（如DGAT、PDAT）的协同关系亦有待阐明。此外，AsLPAAT5酶在酿酒酵母中偏好C16:1，在拟南芥中偏好C18:2，这一差异可能主要归因于宿主酰基-CoA底物库的不同，即酿酒酵母天然缺失C18:2和C18:3合成途径，导致观察到的底物利用表型差异可能反映的是宿主背景效应，而非酶本身内在底物选择性的改变。然而，内质网膜微环境对酶活性的潜在影响尚不能完全排除。未来研究需在可控底物条件下（如外源脂肪酸饲喂试验或体外酶活测定）进一步明确AsLPAAT5的底物选择性，并通过建立燕麦稳定遗传转化体系，结合多组学与代谢流技术，系统解析其在燕麦油脂代谢网络中的功能与调控机制。

4 结论

*AsLPAAT5*基因在燕麦发育的种子中高表达。在酿酒酵母INVSc1中过表达*AsLPAAT5*基因显著提升了酵母宿主的总脂肪酸和C16:1的积累量；在拟南芥中异源过表达*AsLPAAT5*能够显著提高转基因拟南芥种子的总脂肪酸含量，同时特异性促进C18:2不饱和脂肪酸的富集。

参考文献

[1] Banaś A, Debski H, Banaś W, et al. Lipids in grain tissues of oat (*Avena sativa*): differences in content, time of deposition, and fatty acid composition [J]. J Exp Bot, 2007, 58(10): 2463-2470.

[2] Snell P, Wilkinson M, Taylor GJ, et al. Characterisation of grains and flour fractions from field grown transgenic oil-accumulating wheat expressing oat WRI1 [J]. Plants, 2022, 11(7): 889.

[3] Heneen WK, Banaś A, Leonova S, et al. The distribution of oil in the oat grain [J]. Plant Signal Behav, 2009, 4(1): 55-56.

[4] Grimberg Å, Wilkinson M, Snell P, et al. Transitions in wheat endosperm metabolism upon transcriptional induction of oil accumulation by oat endosperm WRINKLED1 [J]. BMC Plant Biol, 2020, 20: 235.

[5] 陈磊. 燕麦的营养功能及综合加工利用 [J]. 食品与机械, 2012, 28(2): 236-237.
Chen L. Nutritional functions and process utilizations of oat [J]. Food Mach, 2012, 28(2): 236-237.

[6] 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.

[7] 张美莹, 莫倩, 齐秀双, 等. 牡丹*PoLPAT2*基因的克隆及表达分析 [J]. 浙江农业学报, 2025, 37(2): 321-328.
Zhang MY, Mo Q, Qi XS, et al. Cloning and expression analysis of peony *PoLPAT2* gene [J]. Acta Agric Zhejiangensis, 2025, 37(2): 321-328.

[8] 吉白璐, 孙艺文, 刘万峰, 等. 烟草脂类合成关键基因*NtLPAT*的功能验证 [J]. 作物学报, 2025, 51(9): 2527-2537.
Ji BL, Sun YW, Liu WF, et al. Functional verification of the key gene *NtLPAT* involved in lipid biosynthesis in tobacco [J]. Acta Agron Sin, 2025, 51(9): 2527-2537.

[9] Yu B, Wakao S, Fan JL, et al. Loss of plastidic lysophosphatidic acid acyltransferase causes embryo-lethality in *Arabidopsis* [J]. Plant Cell Physiol, 2004, 45(5): 503-510.

[10] Barroga NAM, Nguyen VC, Nakamura Y. The role of lysophosphatidic acid acyltransferase 1 in reproductive growth of *Arabidopsis thaliana* [J]. J Exp Bot, 2024, 75(22): 7190-7201.

[11] 董芳, 迟晓元, 杨庆利, 等. 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(1): 1-11.
Dong F, Chi XY, Yang QL, et al. Cloning and sequence analysis of three lysophosphatidic acid acyltransferase (*LPAT*) encoding genes in peanut [J]. J Peanut Sci, 2013(1): 1-11.

[12] Zhang QY, Yu R, Sun DY, et al. PrLPAAT4, a putative lysophosphatidic acid acyltransferase from *Paeonia rockii*, plays an important role in seed fatty acid biosynthesis [J]. Molecules, 2017, 22(10): 1694.

[13] 周雅莉, 黄旭升, 郝月茹, 等. 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 YL, Huang XS, Hao YR, et al. Cloning and functional characterization of a lysophosphatidic acid acyltransferase gene from *Perilla frutescens* [J]. Chin J Biotechnol, 2022, 38(8): 3014-3028.

[14] 黄旭升, 周雅莉, 柴旭东, 等. 紫苏质体型*PfLPAT1B*基因的克隆及其在油脂合成中的功能分析 [J]. 生物技术通报, 2025, 41(7): 226-236.
Huang XS, Zhou YL, Chai XD, et al. Cloning of plastidial *PfLPAT1B* gene from *Perilla frutescens* and its functional analysis in oil biosynthesis [J]. Biotechnol Bull, 2025, 41(7): 226-236.

[15] Zhang K, He JJ, Yin YT, et al. Lysophosphatidic acid acyltransferase 2 and 5 commonly, but differently, promote seed oil accumulation in *Brassica napus* [J]. Biotechnol Biofuels, 2022, 15: 83.

[16] Maisonneuve S, Guyot R, Delseny M, et al. A multigene family of lysophosphatidic acid acyltransferases of *Arabidopsis thaliana* [M]// Advanced Research on Plant Lipids. DordrechtSpringer Netherlands2003: 183-186.

[17] Wattelet-Boyer V, Le Guédard M, Dittrich-Domergue F, et al. Lysophosphatidic acid acyltransferases: a link with intracellular

protein trafficking in *Arabidopsis* root cells? [J]. J Exp Bot, 2022, 73(5): 1327-1343.

[18] Angkawijaya AE, Nguyen VC, Nakamura Y. LYSOPHOSPHATIDIC ACID ACYLTRANSFERASES 4 and 5 are involved in glycerolipid metabolism and nitrogen starvation response in *Arabidopsis* [J]. New Phytol, 2019, 224(1): 336-351.

[19] 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 acyltransferases family genes from *Brassica napus* L. [J]. Wuhan: Huazhong University of Science and Technology, 2016.

[20] Chen G, Van Erp H, Martin-Moreno J, et al. Expression of *Castor* LPAT2 enhances ricinoleic acid content at the Sn-2 position of triacylglycerols in *Lesquerella* seed [J]. Int J Mol Sci, 2016, 17(4): 507.

[21] 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* [J]. Metab Eng Commun, 2021, 12: e00171.

[22] 李昕儒. 油莎豆溶血磷脂酸酰基转移酶基因(*CeLPATs*)的鉴定及功能分析 [D]. 太谷: 山西农业大学, 2023.
Li XR. Identification and functional analysis of lysophosphatidic acid acyltransferase gene (*CeLPATs*) in *Cyperus esculentus* [D]. Taigu: Shanxi Agricultural University, 2023.

[23] 陈四龙, 黄家权, 雷永, 等. 花生溶血磷脂酸酰基转移酶基因的克隆与表达分析 [J]. 作物学报, 2012, 38(2): 245-255.
Chen SL, Huang JQ, Lei Y, et al. Cloning and expression analysis of lysophosphatidic acid acyltransferase (*LPAT*) encoding gene in peanut [J]. Acta Agron Sin, 2012, 38(2): 245-255.

[24] 丁检, 吴双, 蔡彩平, 等. 棉花溶血磷酸酯酰转移酶(LPAT)家族基因的发掘和表达分析 [J]. 作物学报, 2015, 41(3): 378-385.
Ding J, Wu S, Cai CP, et al. Genome-wide identification of lysophosphatidic acid acyltransferase gene family and their expression analysis in cotton [J]. Acta Agron Sin, 2015, 41(3): 378-385.

[25] Yang Z, Wang K, Aziz U, et al. Evaluation of duplicated reference genes for quantitative real-time PCR analysis in genome unknown hexaploid oat (*Avena sativa* L.) [J]. Plant Meth, 2020, 16: 138.

[26] Zhou YL, Huang XS, Hu T, et al. Genome-wide analysis of glycerol-3-phosphate acyltransferase (GPAT) family in *Perilla frutescens* and functional characterization of PfGPAT9 crucial for biosynthesis of storage oils rich in high-value lipids [J]. Int J Mol Sci, 2023, 24(20): 15106.

[27] Huang XS, Zhou YL, Shi XF, et al. PfbZIP85 transcription factor mediates ω-3 fatty acid-enriched oil biosynthesis by down-regulating *PfLPAT1B* gene expression in plant tissues [J]. Int J Mol Sci, 2024, 25(8): 4375.

[28] 汪慧慧, 胡蓉, 岳宁燕, 等. 植物*LPATs*基因研究进展 [J]. 分子植物育种, 2020, 18(4): 1138-1143.
Wang HH, Hu R, Yue NY, et al. Research progress on lysophosphatidic acid acyltransferase (*LPATs*) gene in plants [J]. Mol Plant Breed, 2020, 18(4): 1138-1143.

[29] 王晓琳, 曲鹏, 甘明洋, 等. 橡胶树*HbLPAT2*基因的克隆与表达分析 [J]. 热带作物学报, 2024, 45(12): 2515-2523.
Wang XL, Qu P, Gan MY, et al. Cloning and expression analysis of *HbLPAT2* gene from *Hevea brasiliensis* [J]. J Trop Crops, 2024, 45(12), 2515-2523.

[30] 杨琳, 徐宗乐, 崔玮桐, 等. 核桃溶血磷脂酸酰基转移酶基因家族分析 [J]. 河南农业大学学报, 2025, 59(6): 977-987.
Yang L, Xu ZL, Cui WT, et al. Analysis of the gene family of walnut lysophosphatidic acid acyltransferase [J]. J Henan Agric Univ, 2025, 59(6): 977-987.

[31] Maisonneuve S, Bessoule JJ, Lessire R, et al. Expression of rapeseed microsomal lysophosphatidic acid acyltransferase isozymes enhances seed oil content in *Arabidopsis* [J]. Plant Physiol, 2010, 152(2): 670-684.

[32] 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 [J]. Plant J, 2015, 84(5): 1021-1033.

[33] 张军平, 江木兰, 龚阳敏, 等. 三角褐指藻*LPAAT*基因在酵母中表达对脂肪酸的影响 [J]. 中国油料作物学报, 2012, 34(5): 483-488.
Zhang JP, Jiang ML, Gong YM, et al. Influence of expression of *Phaeodactylum tricornutum LPAAT* gene in yeast on oil content and fatty acid composition of TAG [J]. Chin J Oil Crop Sci, 2012, 34(5): 483-488.

[34] Wang YN, Yan JQ, Yang M, et al. EgMADS3 directly regulates EgLPAAT to mediate medium-chain fatty acids (MCFA) anabolism in the mesocarp of oil palm [J]. Plant Cell Rep, 2024, 43(4): 107.

[35] Shams MR, Razvi K, Rahnama H, et al. Enhanced seed oil content by overexpressing *LPAAT* and *WRI1* genes in tobacco plant [J]. Plant Cell Rep, 2025, 44(7): 163.

（责任编辑　朱琳峰）