

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2018.17357

缺刻缘绿藻溶血磷脂酰乙醇胺酰基转移酶(LPEAT)的基因克隆与特征分析

周志刚^{1,2,3}, 包虹¹, 欧阳珑玲¹

1. 水产种质资源发掘与利用教育部重点实验室, 上海海洋大学, 上海 201306;

2. 海洋生物科学国际联合研究中心, 上海海洋大学, 上海 201306;

3. 水产科学国家级实验教学示范中心, 上海海洋大学, 上海 201306

摘要: 缺刻缘绿藻三酰甘油(TAG)中花生四烯酸(ArA)占其总脂肪酸含量的 68.0%。为了弄清 ArA 是如何被优先地用于合成 TAG, 鉴于 Lands 循环是通过改变膜脂的脂肪酸组成进而影响 TAG 的脂肪酸组成, 本研究选择在 Lands 循环中起关键作用的溶血磷脂酰乙醇胺酰基转移酶(LPEAT)作为突破口。运用反转录 PCR 与 3'-及 5'-cDNA 末端快速扩增技术, 自缺刻缘绿藻(*Myrmeodia incisa* Reisinger)中克隆到 *MiLPEAT*; 它的 cDNA 序列全长 1303 bp, 其中, 5'-非翻译区(UTR)长 129 bp, 3'-UTR 长 193 bp, 开放阅读框长 981 bp, 编码 326 个氨基酸残基; 以缺刻缘绿藻基因组 DNA 为模板扩增得到该基因为 1871 bp 的 DNA 序列; 这两序列的比对结果显示, *MiLPEAT* 含有 6 个内含子, 将其开放阅读框(ORF)分割成 7 个外显子。通过多序列比对及生物信息学分析, 发现 *MiLPEAT* 存在一个磷酸酰基转移酶结构域 PlsC, 并含有 LPEAT 家族所具有的 NH(x)₄D、FPEGT 等 4 个特征性模体; Wolfpsort 等在线预测结果以及 *MiLPEAT* 羧基端存在的双赖氨酸模体“KKxx”, 暗示它可能位于内质网并参与分泌途径。基于不同植物 LPEAT 的氨基酸序列所构建的邻接聚类图表明, *MiLPEAT* 因与 2 型 LPEAT 有不同的序列特征而形成不同的分支, 但却与 1 型 LPEAT 聚类在一起, 推测它们的功能可能更近似。通过荧光定量 PCR 检测, 发现 *MiLPEAT* 的基因转录量在氮饥饿 8 h 时显著($P<0.05$)增加; 与其变化相应的溶血磷脂酰乙醇胺(LPE)相对丰度却极显著地($P<0.01$)减少 49%, 但磷脂酰乙醇胺(PE)相对丰度的增加却不显著; 推测在氮饥饿过程中增加的磷脂酰乙醇胺(PE)可能被磷脂:二酰甘油酰基转移酶作用以合成为 TAG, 致使缺刻缘绿藻 TAG 含量的增加。

关键词: 缺刻缘绿藻; 溶血磷脂酰乙醇胺酰基转移酶(LPEAT); 三酰甘油(TAG); 磷脂; 氮饥饿

中图分类号: S917

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2018)02-0251-12

缺刻缘绿藻(*Myrmeodia incisa* Reisinger)是一种单细胞微藻, 隶属绿藻门(Chlorophyta)、共球藻纲(Trebouxiophyceae)^[1]。它的细胞呈球形或卵圆形, 常聚集在一起形成类似非定型群体的细胞团。该藻的显著特征是能积累花生四烯酸(arachidonic acid, ArA), 尤其在氮饥饿或磷饥饿等胁迫条件下, ArA 最高含量可达到藻体干重的 7%^[2], 是目前已知 ArA 含量较高的藻株, 具有潜在的开发利用价值。在利用薄层层析(thin layer chromatography

TLC)技术分离获得该藻的三酰甘油(triacylglycerol, TAG)后, 欧阳珑玲等^[3]再利用气相色谱-质谱(gas chromatography-mass spectrometer, GC-MS)联用技术分析 TAG 的脂肪酸组成, 发现 ArA 占其总脂肪酸含量的 68.0%; 若在氮饥饿 4 d 后, 该含量可达 75.6%。该数据非常接近桐油酸($\Delta 9, 11t, 13t$ -十八碳三烯酸)和蓖麻油酸(12-羟基- $\Delta 9$ -十八碳一烯酸)等特殊脂肪酸分别在油桐(*Vernicia fordii*)、蓖麻(*Ricinus communis*)等种子 TAG 的百分含量(分

收稿日期: 2017-10-09; 修订日期: 2017-11-23.

基金项目: 国家自然科学基金项目(31772821, 31402274); 国家海洋局可再生能源专项基金项目(SHME2011SW02); 上海高校水产科学高峰学科建设项目。

作者简介: 周志刚(1964-), 博士, 教授, 主要从事藻类学及藻类生物技术的研究. E-mail: zgzhou@shou.edu.cn

别为 85% 和 89%)^[4-5]。

鉴于脂肪酸去饱和作用等酰基修饰过程主要发生在磷脂酰胆碱(也称卵磷脂, phosphatidylcholine, PC)、磷脂酰乙醇胺(也称脑磷脂, phosphatidylethanolamine, PE)等膜磷脂甘油骨架的 *sn*-2 碳位上^[6-7], 而长链多不饱和脂肪酸(polyunsaturated fatty acid, PUFA)的延长主要发生在内质网的酰基-CoA 池(acyl-CoA pool)中^[8], 这样以 PC 和 PE 等甘油磷脂为中心, 就必然存在着去酰基/酰基化的反应过程, 即 Lands 循环^[9]。在该循环过程中起着重要作用的酶如溶血磷脂酰乙醇胺酰基转移酶(lysophosphatidylethanolamine acyltransferase, LPEAT)^[10], 通过对溶血磷脂酰乙醇胺(lysophosphatidylethanolamine, LPE)进行酰基化作用, 使得酰基-CoA 池中的长链多不饱和脂肪酸酰基有机会结合到 LPE 甘油骨架上的 *sn*-2 碳位上, 这样, PE 就携带有长链 PUFA^[8]。这些含有特殊脂肪酸的 PE, 再沿着不依赖酰基-CoA 的 TAG 生物合成途径, 在磷脂:二酰甘油酰基转移酶(phospholipid:DAG acyltransferase, PDAT)的作用下, 将所携带的长链 PUFA 转到 DAG 上, 从而产生带有长链 PUFA 等特殊脂肪酸的 TAG^[11-14]。

自上述的分析可知, LPEAT 在膜脂脂肪酸组成的不对称性和多样性以及 TAG 中长链 PUFA 等特殊脂肪酸的引入起着非常重要的作用。目前, 有关 LPEAT 的报道, 多来自对人类等哺乳动物及无脊椎动物的研究^[15]。在植物中, 也只对拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)的 LPEAT 进行了探讨^[16-17]; 有关藻类 LPEAT 及其对藻类油脂合成代谢影响的研究至今未见报道。为此, 本研究在缺刻缘绿藻转录组^[18]文库数据基础上, 通过 NCBI(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)的 BLASTx 比对, 发现 contig8647 与胶球藻(*Coccomyxa subel lipsoidea*) C-169 的溶血磷脂酸酰基转移酶(lysophosphatidic acid acyltransferase, LPAAT)序列(GenBank 登录号: XP_005646810)有 57% 的相似度, 根据这段序列设计引物, 利用 cDNA 末端快速扩增技术(rapid amplification of cDNA ends, RACE)得到其 cDNA 全长序列。通过 NCBI 的 BLASTp 比对发现, 该基因编码的氨基酸序列与其他物种的 LPEAT 序

列相似度高, 并与 LPEAT 聚类在一起, 故在此本研究将其命名为 *MiLPEAT*。鉴于 LPEAT 主要是在膜磷脂 LPE 上进行酰基化作用, 在了解氮饥饿条件下, 缺刻缘绿藻的膜磷脂可以转变成贮藏的中性脂 TAG 的基础上^[3], 本研究分析了该藻在氮饥饿 4 d 前后 *MiLPEAT* 的基因转录量以及 LPE 与 PE 相对含量的变化, 为了解缺刻缘绿藻脂类合成特性, 尤其为氮饥饿胁迫条件下该藻含丰富 ArA 的 TAG 积累机制提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 藻种及培养

缺刻缘绿藻 H4301 由暨南大学张成武教授馈赠, 来源于布拉格查理斯大学藻类收藏中心(culture collection of algae of Charles University of Prague)。将藻接种于 BG-11 液体培养基^[19]中, 在 25℃ 和 115 $\mu\text{mol quanta}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ 的光照培养箱中培养, 光周期为光照:黑暗=14 h:10 h^[2], 每天不定期地摇晃。待长至指数生长期, 4℃ 下以 5500 r/min 离心 10 min, 收集藻细胞, 并用灭菌去离子水洗涤 3 次后再次同样离心收集藻细胞, 立即提取 RNA 或用液氮速冻, -80℃ 保存备用。

用于实时荧光定量 PCR (quantitative real-time PCR, q-RT-PCR) 实验的藻细胞先接种于内径为 3.5 cm 的圆柱体玻璃管(容量约 500 mL)中, 利用 Philips 荧光灯单侧提供 24 h 连续光照并使用过滤空气充气培养。先用 BG-11 培养基在 115 $\mu\text{mol quanta}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ 条件下培养 14 d, 5500 r/min 离心收集藻体, 用灭菌去离子水洗涤 3 次并同样离心收集, 然后将其转入到新鲜的或缺氮的 BG-11 培养基中, 同样条件培养。在接种后的 0 h、4 h、8 h、12 h、16 h、20 h、24 h、32 h、40 h、48 h、56 h、64 h、72 h、80 h、88 h、96 h 分别取样, 同样离心、洗涤并收集藻细胞, 液氮速冻后-80℃ 保存备用。每组设置 3 个平行样品。

用于氮饥饿胁迫下脂类含量变化分析的藻细胞培养方式同 q-RT-PCR 实验, 为保证数据统计分析的可靠性, 每组设 8 个平行, 在接种后的 0 d 和 4 d 分别取样, 离心收集, 液氮速冻后用冷冻干燥机将藻细胞冻干。

1.2 缺刻缘绿藻总 RNA 的提取及 LPEAT 基因 cDNA 全长序列的克隆

参照 TRIzol 试剂(Invitrogen 公司)的说明书抽提缺刻缘绿藻的总 RNA。按照 SMART RACE cDNA 扩增反应试剂盒(Clontech 公司)的使用说明, 分别反转录合成 5'-和 3'-RACE 技术所需的 cDNA 第一链, 作为基因克隆的 PCR 反应模板。

根据缺刻缘绿藻转录组数据库^[18]中筛选得到的 contig8647 序列利用 Primer3web (<http://bioinfo.ut.ee/primer3/>)网站在线设计 3'-及 5'-RACE 基因特异性引物及巢式引物各两对: 5'RACE1(F/R)和 3'RACE1(F/R)(表 1), 由上海生工生物工程有限公

司合成。

利用设计的巢式引物通过 RACE 技术获得 cDNA 的 5'-和 3'-末端序列。25 μL LPEAT 5'-RACE 的第一轮 PCR 反应体系: PCR 级水 16.75 μL, 10×Advantage 2 PCR 缓冲液 2.5 μL, dNTPs 2 μL, 5'RACE1 (R) (表 1)0.5 μL, 10×UPM 2.5 μL, 5'-RACE cDNA 1 μL, 聚合酶混合液 0.25 μL。5'-RACE 第二轮巢式 PCR 反应体系基本同第一轮, 只是引物为 NUP 和 5'RACE1 (F)(表 1), 模板为第一轮 PCR 产物。反应程序为: 94℃变性 5 min; 94℃变性 30 s, 70℃退火 30 s, 72℃延伸 2 min, 25 个循环; 72℃延伸 10 min。

表 1 缺刻缘绿藻 LPEAT 基因克隆及 q-RT-PCR 所用引物
Tab. 1 Primers employed for gene cloning and q-RT-PCR of LPEAT from *Myrmecia incisa*

引物 primer	引物序列(5'-3') sequence (5'-3')	退火温度/℃ annealing temperature
LPEAT 全长 cDNA 序列扩增及验证 cloning and verifying of the full-length cDNA sequence of <i>LPEAT</i> gene		
8647 (F)	CCGCCGGCATCGTGTCCAACCACAT	68
8647 (R)	TGAAGGAGCGCATGCTGCACGCTGG	
5'RACE1 (F)	CCAGCGTGCAGCATGCGCTCCTTCACA	70
5'RACE1 (R)	CCAGCCCATGTGGTTGGACACGATGCC	70
3'RACE1 (F)	TCAGTACACTTGTGAAGGAGCGCATGC	65
3'RACE1 (R)	TGTCTCACTCCTTCCCCAGCTTTGTCTG	67
1cDNA (F)	GGGGACAGCAAGCCCGCTGTCTGA	63.5
1cDNA (R)	CAACCCTGCCACAAATCCGTAAT	
LPEAT 全长 DNA 序列扩增 cloning of the full-length DNA sequence of <i>LPEAT</i> gene		
DNA1 (F)	ATGTCGAAGGTTCTCGGGCTA	58
DNA1 (R)	CCATAAGCAGCAGCCTAAGC	
DNA2 (F)	CCGTCAACGACACGATCTACGAC	62
DNA2 (R)	TCACTCCGACTTCTTGACAGACG	
DNA3 (F)	CGTCTGTCAAGAAGTCGGAGTGA	60
DNA3 (R)	ATTACGGATTGTGGCAGGGTTG	
LPEAT q-RT-PCR 特异性引物 q-RT-PCR amplification of <i>LPEAT</i> gene		
1 (F)	GCAAGTATCTCCTGCCCTTCAA	59
1 (R)	ACAGGCAGCTCGTATACTGTTAC	
<i>β</i> -actin 内参基因引物 <i>β</i> -actin as a reference gene		
act (F)	CGTCCAGCTCCACGATTGAGAAGA	62
act (R)	ATGGAGTTGAAGGCGGTCTCGT	

25 μL LPEAT 3'-RACE 反应体系基本上同 5'-RACE。在第一轮 PCR 反应体系中将引物及模板分别改成 3'RACE1 (F)(表 1)及 3'-RACE cDNA; 在第二轮巢式 PCR 反应体系中, 将引物及模板分别改成 3'RACE1 (R)(表 1)及第一轮 PCR 产物。反

应程序也基本上同 5'-RACE, 但退火温度分别为 65℃(第一轮)和 67℃(第二轮巢式)。根据 LPEAT 基因 RACE 扩增结果及拼接后得到的 cDNA 全长, 分别设计上下游引物 1cDNA (F)和 1cDNA (R)(表 1)进行序列验证。

利用胶回收试剂盒(艾德来生物科技有限公司,北京)回收纯化上述 PCR 所扩增的目的片断,并将它们与 pMD[®] T-19 载体(TaKaRa 公司,大连)连接后转入大肠杆菌(*Escherichia coli*)DH5 α 感受态细胞(天根生化科技有限公司,北京),筛选阳性克隆并经过菌落 PCR 验证后送上海生工生物工程有限公司进行序列分析。

1.3 缺刻缘绿藻 DNA 的提取及 LPEAT 基因 DNA 全长序列的克隆

DNA 提取采用十六烷基三甲基溴化铵(cetyltrimethyl ammonium bromide, CTAB)法^[20]。

基于所得 *MiLPEAT* 的 cDNA 全长序列分段设计了 3 对引物 DNA1 (F/R)、DNA2 (F/R)、DNA3 (F/R)(表 1),以缺刻缘绿藻基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增。25 μ L 反应体系含有 PCR 级水 9.5 μ L、上下游引物各 1 μ L、基因组 DNA 模板 1 μ L 及 PCR Master Mix 12.5 μ L。反应程序: 94 $^{\circ}$ C 预变性 3 min; 30 个循环为 94 $^{\circ}$ C 变性 45 s, 在表 1 所列相应引物的退火温度退火 45 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 2 min; 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。

按上述 cDNA 克隆方法进行目的片断回收、

连接、转化大肠杆菌、阳性克隆筛选和测序。拼接后得到 *MiLPEAT* 的 DNA 全长序列,并利用 NCBI 的 SPIDEY 程序(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/spidey/spideyweb.cgi>)比对其 cDNA 全长序列以了解内含子位置。

1.4 缺刻缘绿藻 LPEAT 基因的生物信息学分析

MiLPEAT 的 cDNA 全长序列经过 NCBI 的 ORF Finder 预测得到其开放阅读框(ORF),并利用 Primer Premier 5 将其翻译成蛋白质序列,然后再运用相应的生物学网络服务器(表 2)分别对 *MiLPEAT* 所编码蛋白的等电点、分子量、跨膜区、疏水性、信号肽、转运肽、结构域、功能位点、二级结构等进行预测。

利用 Clustal_X 软件^[21]将缺刻缘绿藻与其他植物的 LPEAT 氨基酸序列进行比对,并利用 BioEdit 软件^[22]进行编辑。从 NCBI 的 GenBank 中下载植物等相关物种的 LPEAT,并以 3 个甘油-3-磷酸酰基转移酶(glycerol-3-phosphate acyltransferase, GPAT)9 氨基酸序列作为外群,使用 MEGA6 软件^[23]的 MUSCLE 程序先进行比对,然后构建邻接(Neighbor-Joining, NJ)聚类图。

表 2 序列分析所用网络服务器
Tab. 2 Web services applied in the sequence analysis

服务器 online server	功能 function	网址 website
BaCellLo	亚细胞定位预测	http://gpcr.biocomp.unibo.it/bacello/pred.htm
ChloroP 1.1 Server	叶绿体转运肽预测	http://www.cbs.dtu.dk/services/ChloroP/
ComputePI/MW	等电点和分子量预测	http://cn.expasy.org/tools/pi_tool.html
InterProscan Sequence Search	蛋白质结构功能域预测	http://www.ebi.ac.uk/interpro/search/sequence-search
iPSORT	N 端结构预测	http://ipsort.hgc.jp/
MemLoc	亚细胞定位预测	http://mu2py.biocomp.unibo.it/memloci/default/predict
Phobius	跨膜区和信号肽预测	http://phobius.sbc.su.se/
phyre	蛋白质二级结构预测	http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre
Predict Protein	疏水性氨基酸组成	http://ppopen.informatik.tu-muenchen.de/
Predotar	亚细胞定位预测	http://urgi.versailles.inra.fr/predotar/predotar.html
Protein Prowler v. 1.2	亚细胞定位预测	http://bioinf.scmb.uq.edu.au/pprowler_webapp_1-2/
protscale	疏水性分析	http://web.expasy.org/protscale/
SignalP 3.0 Server	信号肽预测	http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/
SMART	蛋白质结构功能域预测	http://smart.embl-heidelberg.de/
TargetP 1.1 Server	真核蛋白亚细胞定位预测	http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/
TMHMM Server v. 2.0	跨膜区预测	http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/
TMpred	跨膜区预测	http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED_form.html
Wolfpsort	亚细胞定位预测	http://www.genscript.com/psort/wolf_psort.html

1.5 缺刻缘绿藻 *LPEAT* 基因在氮饥饿胁迫下转录量分析

q-RT-PCR 使用的引物 1 (F)和 1 (R)(表 1)按照 SYBR[®] Premix Ex Taq[™] (Tli RNaseH Plus)试剂盒说明书(TaKaRa 公司, 大连)中的引物设计原理设计, 并使用 BLAST 检索确认引物的特异性。选择本实验室获得的缺刻缘绿藻 *β-actin* 基因(GenBank 登录号: FJ548973)^[24]作为内参基因, 设计的引物 act (F)和 act (R)见表 1。

将提取的缺刻缘绿藻总 RNA 使用 PrimeScript[®] RT reagent Kit With gDNA Eraser (Perfect Real Time)(TaKaRa 公司, 大连)进行反转录合成 cDNA 第一链。先进行基因组 DNA 去除反应, 该反应体系包含 gDNA Eraser 1 μL、总 RNA 1 μg 及 5×gDNA Eraser Buffer 2 μL, 加无 RNase 的 dH₂O 至 10 μL。在 PCR 仪中于 42℃ 孵育 2 min。然后依次加入 4×RT Primer Mix 1 μL、PrimeScript[®] RT 酶混合物 I 1 μL 及 5×PrimeScript[®] 缓冲液 2.4 μL 并补加无 RNase 的 dH₂O 至 20 μL。在 PCR 仪中于 37℃ 孵育 15 min、85℃ 孵育 5 s, 从而反转录得到 cDNA 第一链。

利用 q-RT-PCR 方法在 7500 PCR 仪(Bio-Rad 公司, USA)中对 *MiLPEAT* 的基因转录水平进行检测。反应体系包括 Dye II 0.4 μL、正/反向引物各 1 μL、cDNA 第一链模板 2 μL 及 2×SYBR Primix Ex Taq[™] II 10 μL, 并加无 RNase 的 dH₂O 至 20 μL。反应程序: 95℃ 预变性 30 s; 然后 40 个循环包括 95℃ 变性 5 s, 60℃ 退火 34 s; 最后 95℃ 变性 15 s, 60℃ 退火 1 min, 95℃ 变性 15 s。

对所有样品的检测均进行 3 次重复。收集数据并使用 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 法进行分析^[25], 结果为 3 个样品的平均值±标准差($\bar{x} \pm SD$), 运用 *t* 检验进行显著性分析。

1.6 缺刻缘绿藻 *LPE* 及 *PE* 在氮饥饿胁迫前后相对含量的变化分析

缺刻缘绿藻总脂的提取参考 Bligh 等^[26]的方法并稍作改良。50 mg 冻干藻粉中加入 3 mL 经 75℃ 预热的异丙醇处理后, 加入 1 mL 氯仿、0.6 mL 蒸馏水和 1 mL 玻璃珠涡旋振荡, 并收集有机相; 残渣用 5 mL 含 0.01% 的 2, 6-二叔丁基-4-甲基

苯酚(butylated hydroxytoluene, BHT)的氯仿/甲醇/水(1 : 2 : 0.8, 体积比)溶液重悬, 涡旋振荡 15 min 后离心收集有机相, 重复 1 次; 合并收集的有机相并加入 1/2 体积灭菌超纯水充分混匀后, 离心收集下层有机相。所得总脂用 CNWBOND Carbon-GCB 固相萃取柱(CNW 公司, 德国)以去除其中的叶绿素。

将总脂通过液相色谱-质谱(liquid chromatography-mass spectrometer, LC-MS)联用技术进行分析, LC-MS 条件参照 Liu 等^[14]。原始数据经 Thermo SIEVE 2.1 Qualitative Analysis Software (Thermo Fisher Scientific, USA)处理后, 就获得了包括保留时间(retention time)、质荷比(mass to charge)、观察量(样本)和峰强值(归一化处理)的二维数据矩阵。基于上述信息, 利用 Thermo 自带软件 Lipid Search 得到脂类化合物结构信息。氮饥饿胁迫 4 d 下, 缺刻缘绿藻细胞中 *PE* 和 *LPE* 的变化以相对丰度(%)表示, 即氮饥饿胁迫下藻细胞 *PE* 或 *LPE* 峰强值与正常培养细胞中 *PE* 或 *LPE* 峰强值的百分比^[27-29]。结果为 8 个样品的平均值±标准差($\bar{x} \pm SD$), 运用 *t* 检验进行显著性分析。

2 结果与分析

2.1 缺刻缘绿藻 *LPEAT* 基因的 cDNA 及 DNA 全长序列的克隆

首先根据缺刻缘绿藻转录组数据库^[18]中 252 bp 的 contig8647 序列设计一对引物 8647 (F)和 8647 (R)(表 1)验证这个 contig 序列, 并根据这个 contig 的验证序列设计引物 5'RACE1 (R/F)以及 3'RACE1 (R/F)(表 1), 利用 RACE 技术扩增该基因的 5'-及 3'-末端序列, 第二轮巢式 PCR 的扩增结果如图 1 所示。3'-末端的序列分析结果表明, 所得目的片段大小为 705 bp, 并含有真核生物核编码基因特征性的 poly A 尾巴; 5'-末端序列的测序结果表明目的片段的大小为 511 bp。

将所得的 5'-及 3'-末端序列与验证的 contig8647 序列进行拼接, 然后根据拼接的序列重新设计一对引物 1cDNA (R/F)(表 1)并进行 PCR 扩增反应以验证该序列。测序结果显示, 该基因的全长 cDNA 序列长为 1 303 bp; 经 ORF finder 预测可知, 它的

ORF 序列长为 981 bp, 编码 326 个氨基酸残基; 终止密码子为 TGA; 5'-非翻译区(UTR)长为 129 bp, 3'-UTR 序列长为 193 bp。通过 NCBI 的 BLASTp 比对(结果未展示)发现该基因所编码蛋白属于溶血磷脂酰基转移酶(lysophospholipid acyltransferase, LPLAT)超级家族成员, 且与众多物种的 LPEAT 具有 40%以上的同源性。如与小米(*Setaria italica*)的 LPEAT(XP_004962349.1)有 43%的同源性, 与拟南芥中已进行功能鉴定的 LPEAT1(NP_001321299.1)有 39%的同源性。值得一提的是, BLASTp 结果虽然显示其与胶球藻 C-169 的 GPAT (XP_005646810.1)具有 49%的同源性, 但后者的功能并未经过证实, 且通过聚类分析(具体见下文)指明我们得到的序列并不与 GPAT 聚类在一起, 所以本研究将自缺刻缘绿藻克隆的该基因命名为

MiLPEAT, GenBank 中的登录号为 MG558460。

根据 *MiLPEAT* 的 cDNA 序列设计 3 对引物 DNA1 (F/R)、DNA2 (F/R)、DNA3 (F/R)(表 1), 以缺刻缘绿藻基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增, 得到长度为 222 bp、1533 bp 以及 200 bp 的目的片段(图 1)。将得到的结果再进行拼接并验证, 最终获得 *MiLPEAT* 的全长 DNA 序列, 它长 1871 bp。利用 SPIDEY 软件将 *MiLPEAT* 的 cDNA 及 DNA 序列进行比对, 发现 *MiLPEAT* 含有 6 个内含子, 均位于编码区, 长度自 5'-末端起依次为 80 bp、84 bp、84 bp、82 bp、138 bp 和 106 bp; 这些序列均符合“GT-AG”剪接规则, 即每个内含子的 5'-端开始的两个核苷酸都是 GT, 3'-端末尾的两个核苷酸都是 AG; 它们将 ORF 分割成 7 个外显子(图 1)。

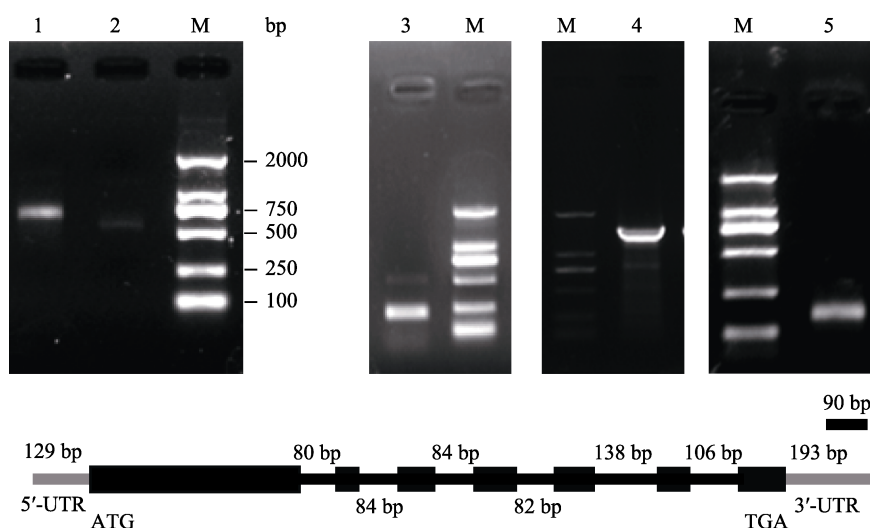


图 1 缺刻缘绿藻 *LPEAT* 基因 cDNA 及 DNA 全长扩增产物琼脂糖凝胶电泳图(上)及基因结构图(下)

M: DL2000 DNA 分子量标准品; 泳道 1: 3'-RACE 第二轮巢式引物 PCR 扩增产物; 泳道 2: 5'-RACE 第二轮巢式引物 PCR 扩增产物; 泳道 3: DNA1(F/R)引物 PCR 扩增产物; 泳道 4: DNA2(F/R)引物 PCR 扩增产物; 泳道 5: DNA3(F/R)引物 PCR 扩增产物。

基因结构图(下图)中两端灰色直线分别代表 5'-和 3'-UTR; 黑色矩形框代表外显子; 黑色直线代表内含子。

Fig. 1 Agarose gel electrophoretogram of PCR products for full-length cDNA and DNA cloning of *MiLPEAT* (upper panel) and its gene structure

M: DL2000 DNA standard marker; Lane 1: Products of the second 3'-RACE including two rounds of PCR reaction; Lane 2: Products of the second 5'-RACE including two rounds of PCR reaction; Lane 3: PCR products of DNA1 (F/R) primers; Lane 4: PCR products of DNA2 (F/R) primers; Lane 5: PCR products of DNA3 (F/R) primers; the grey lines represent 5'-/3'-UTR; the black boxes represent exons; and the black lines represent introns.

2.2 缺刻缘绿藻 *LPEAT* 基因的序列特征分析

经 ComputepI/MW 网络服务器(表 2)预测可知, *MiLPEAT* 所编码蛋白的分子量为 36.2 kD, 等电点为 9.3。通过 SMART 搜索工具并利用 InterProscan

Sequence Search 程序(表 2)分析表明, *MiLPEAT* 含有一个磷酸酰基转移酶结构域 PlsC, 位于其氨基酸序列的 I¹¹⁹~G²³⁴ 之间; 还有一个含 LPLAT_LPCAT1-like 结构域蛋白, 位于 A⁸⁶~R³⁰⁸ 之间, 以

测结果也表明, 在 $L^{37}\sim C^{63}$ 的区域形成一次跨膜; TMpred 则预测在 $I^{93}\sim Q^{109}$ 区域又进行一次跨膜。而结合疏水性分析结果, 本研究发现 $L^{37}\sim C^{63}$ 区域的疏水性很高; 经 Predict Protein 预测, 可知 MiLPEAT 中疏水性氨基酸占总氨基酸含量的 47.87%, 有助于保证蛋白空间结构的稳定性, 使其内部折叠形成二级结构和三级结构。综上所述, MiLPEAT 至少在 $L^{37}\sim C^{63}$ 区域存在一个跨膜区, 从而说明该蛋白为膜结合蛋白。

通过 TargetP、Predotar、ChloroP、SignalP、Phobius 和 iPSORT 等网络服务器(表 2)的预测,发现 MiLPEAT 不带有信号肽; BaCelLo 的预测结果显示, MiLPEAT 定位于细胞核; 而利用 Wolfpsort 则预测它可能定位在内质网上; Protein Prowler 的预测结果表明, MiLPEAT 在分泌途径中。这些有关 MiPLEAT 亚细胞定位的不确定预测也出现在

关 MiPLEAT 亚细胞定位的不确定预测也出现在



Asterisks denote the residues that play a role in LPEAT catalysis. Triangles denote the residues that are important in binding the substrate LPE. The carboxyl-terminal dilysine motif is indicated in a box.

拟南芥中: AtLPEAT1 和 AtLPEAT2 都没有明确的亚细胞定位, 但通过 Aramemnon 拓扑学一致性搜索发现它们都被预测处在分泌途径^[16]; 而在拟南芥细胞器蛋白质组学的研究报告中, AtLPEAT1 则被预测定位于内质网上^[31]。显然, 有关 LPEAT 的亚细胞定位需要更多直接的细胞学证据。

在酵母 LPEAT 所编码蛋白 ALE1p 的羧基端中存在一个“KKxx”双赖氨酸模体^[32], 其作用可能使这个膜蛋白自高尔基体返回并驻留内质网上^[33]。有趣的是, MiLPEAT 的羧基端也存在这样的模体(图 2), 这在一定程度上支持了 MiLPEAT 内质网定位并参与分泌途径的 Wolfpsort 及 Protein Prowler 预测结果。

由于 GPAT9 与 LPEAT 都具有相同的酰基供体并且酰基化相似的酰基受体, 因而在构建系统发育树时可以作为外群^[34]。相对于高度保守的 GPAT9 来说, LPEAT1 和 LPEAT2 序列差异较大, 甚至保守模体都不完全相同(图 2), 这可能解释了为什么 1 型和 2 型的 LPEAT 功能不完全一致^[16]。从我们构建的 NJ 系统发育树上(图 3), 可以了解到 1 型和 2 型的 LPEAT 在进化关系上明显(靴带值分别达到 99% 和 100%) 呈两个独立的分支; 本研究所克隆得到的 MiLPEAT 显然(靴带值为 99%) 与 1 型 LPEAT 聚类在一起(图 3), 预示着 MiLPEAT 具有 1 型 LPEAT 的结构和功能, 为后续功能鉴定等研究奠定了基础。

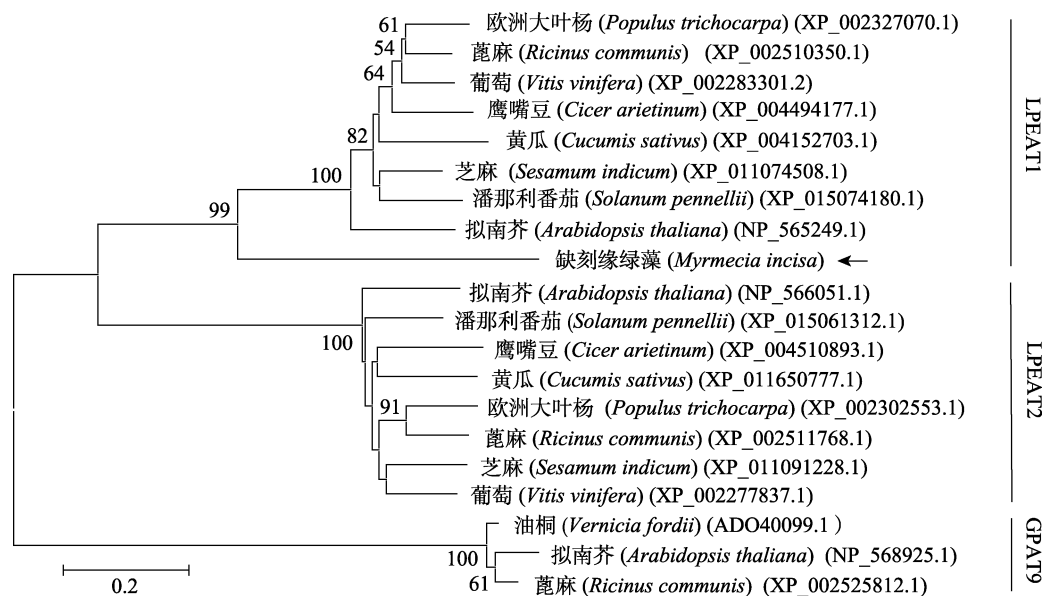


图 3 基于 LPEAT 蛋白氨基酸序列所构建的邻接聚类图

节点上的数据为靴带值, 小于 50% 的数值不显示; 拉丁学名后括号内的数据指示基因登录号; 箭头指示本研究的物种。

Fig. 3 Phylogenetic tree inferred from the deduced amino acid sequences of LPEAT genes

Branch lengths are proportional to the number of substitutions per site (see the scale bar). The numbers at the nodes indicate the neighbour-joining bootstrap proportion (BP) values (only values $\geq 50\%$ are shown). All of the accession numbers are presented in the parentheses after the Latin names of each species. The position of MiLPEAT is marked by an arrow.

2.3 MiLPEAT 基因在转录水平上对氮饥饿胁迫的响应

以 β -actin 基因作为内参基因, 利用 q-RT-PCR 方法, 分析了缺刻缘绿藻的 MiLPEAT 在氮饥饿过程中的基因相对转录量变化。结果表明(图 4), 在氮饥饿培养过程中, MiLPEAT 的基因相对转录量在前 8 h 内快速增加并达到峰值, 氮饥饿 8 h 时的基因转录量约是刚开始时(0 h)的 3.4 倍, 两者之

间的差异显著($P < 0.05$); 随后 4 h 内, 转录量迅速下降, 然后始终在与氮饥饿刚开始时的水平上下波动, 且无明显差异。这些结果说明氮饥饿在刚开始时对缺刻缘绿藻 MiLPEAT 的基因转录具有明显的上调作用。

2.4 缺刻缘绿藻 LPE 和 PE 含量在氮饥饿条件下的变化

利用 LC-MS 联用分析技术, 对氮饥饿处理

0 d 和 4 d 的缺刻缘绿藻脂质样品进行了定性与定量的分析。结果(图 5)显示, 与处理 0 d 的脂质样品相比, 经过 4 d 氮饥饿处理后, 缺刻缘绿藻 LPE 的相对丰度下降了约 49% ($P < 0.01$), 而 PE 的相对丰度只增加了 10% ($P = 0.264 > 0.05$)。说明氮饥饿过程中, 缺刻缘绿藻中的 LPE 因被酰基化为 PE, 而其量减少。结合 *MiLPEAT* 在该过程中的转录量变化(图 4)来分析, LPE 的减少及 PE 的增加与该基因在氮饥饿条件下转录量的上调有一定的关系。

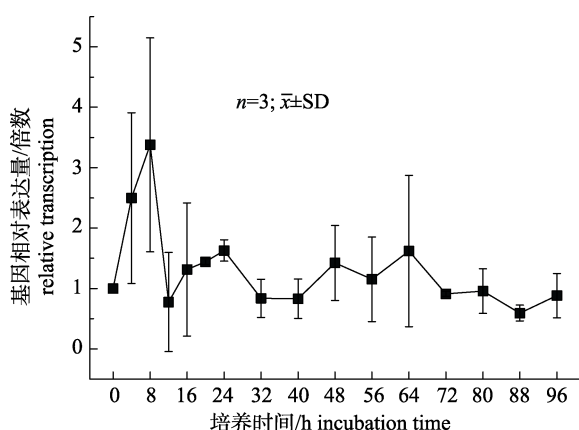


图 4 *MiLPEAT* 在氮饥饿过程中的基因相对转录量变化

Fig. 4 Transcriptional level of *MiLPEAT* during the course of nitrogen starvation

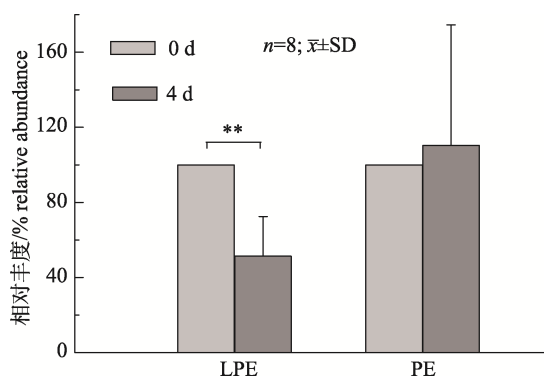


图 5 缺刻缘绿藻在氮饥饿胁迫前后溶血磷脂酰乙醇胺(LPE)和磷脂酰乙醇胺(PE)的相对含量变化

“***”表示差异极显著($P < 0.01$)。

Fig. 5 Comparison of the lysophosphatidylethanolamine (LPE) and phosphatidylethanolamine (PE) levels before and after the stress of nitrogen starvation
“***” means significant difference ($P < 0.01$).

3 讨论

本研究是有关真核藻类 LPEAT 基因研究的首次报道。其实, 自缺刻缘绿藻的转录组数据库^[18]中,

本研究筛选到的含有酰基转移酶结构域 PlsC 的基因不只本研究的 *MiLPEAT*, 还有一个定位于叶绿体中的 *GPAT* 基因^[35]、一个预测在内质网中的 *GPAT* 基因以及一个在分泌途径中的 *LPAAT* 基因。通过这些基因序列的克隆与聚类分析(数据未展示)了解到, 本研究所克隆的基因与其他物种的 *LPEAT* 聚成一支, 明显不同于 *GPAT* 以及 *LPAAT*。在此基础上, 本研究扩大了相应物种的 *LPEAT* 数据, 再进行聚类。结果(图 3)显示, *MiLPEAT* 与其他高等植物的 *LPEAT1* 关系最近, 但不同于 *LPEAT2*, 支持了 Shockey 等^[34]认为 *LPEAT* 的 1 型与 2 型有较大差异的结论; *MiLPEAT* 虽与高等植物的 *LPEAT1* 相近, 但仍不同于它们(从序列比对图 2 中也可以看出), 因而就从 *LPEAT1* 这一分支的根部明显独立出一亚支(subclade)。由于缺少藻类 *LPEAT* 的确切数据, 这一亚支有待完善; 这个聚类结果是否体现出藻类的低等性, 也有待于进一步探讨。

LPEAT 是一类将 LPE 酰基化为 PE 的酰基转移酶, 它主要在 Lands 循环^[9]中起作用, 即利用酰基池中的酰基-CoA, 在 LPE 碳骨架的 *sn*-2 上接上酰基, 从而产生 PE。通过这样的循环, 使得 PE 等膜脂上的脂肪酸有机会与酰基池中的脂肪酸发生交换, 这样就能导致膜脂的不对称及多样性^[8]。通过序列比对(图 2), 可知本研究自缺刻缘绿藻中克隆的基因所编码的 *MiLPEAT* 具有 1-酰基甘油-3-磷酸酰基转移酶 (1-acylglycerol-3-phosphate O-acyltransferase, AGPAT) 这个家族特征性的保守模体: NH(x)₄D、GCxYVxR、FPEGT 及 PVxPVx^[36]。据 Lewin 等^[30]及 Yamashita 等^[36]的报道: 在这些模体中, NH(x)₄D 中的残基 Asp(D)和 His(H)是重要的酰基转移酶活性中心, 虽在 2 型中有的 Asp 突变成了 Glu(E), 但在 1 型中却高度保守, 这也预示着 1 型和 2 型的 *LPEAT* 在酶活性方面可能存在着差异; FPEGT 模体在所有比对的序列中高度保守, 显示了它的重要性, 该模体中的 Gly(G)是酰基转移酶的重要活性中心, 而 Glu 则是底物中磷的结合位点; 模体 PVxPVx 中的 Pro(P)也是酰基转移酶催化活性中心; GCxYVxR 模体中的 Arg(R)是甘油-3-磷酸底物结合的重要位点。所有这些重

要位点在 MiLPEAT 中都高度保守(图 2), 从而从一级结构上确保了它的酰基转移酶作用。

二级结构的预测及疏水性氨基酸计算结果表明, MiLPEAT 至少含有一个跨膜区, 位于 L³⁷~C⁶³ 区域。虽然缺乏明确的亚细胞定位分析结果, 但结合上述 LPEAT 在膜脂形成中的作用分析以及它与酵母 LPEAT^[33]羧基端相同的双赖氨酸模体“KKxx”(图 2), 推测这个跨膜蛋白在内质网上定位的可能性较大。

1994 年, Jackowski 等^[37]在大肠杆菌中发现了一个双功能酰基载体蛋白合成酶, 它具有 PlsC 酰基转移酶保守结构域, 并且能够利用及酰化 1-酰基-甘油磷脂乙醇胺(1-acyl-glycerophosphoethanolamine, 1-acylGPE), 这是在动物之外的物种中最早发现的 LPEAT。2009 年, Stålberg 等^[16]在高等植物的拟南芥中也发现了两个能够酰化 LPE 的酰基转移酶, 即 AtLPEAT1 和 AtLPEAT2。Jasieniecka-Gazarkiewicz 等^[17]在拟南芥的 LPEAT 插入突变株中发现, LPEAT 的突变不仅使拟南芥的生长紊乱、叶子变小、根变短、挂果少、种子油脂含量低等特性, 也导致叶中 LPE 含量大量增加。说明拟南芥 LPEAT 对 LPE 的酰基化作用一旦受阻, 就会影响到植株生长等性能。

当缺刻缘绿藻处于氮饥饿条件下, 本研究发现 LPE 的相对丰度显著性地减少(图 5), 这可能是由于 MiLPEAT 的基因转录量(图 4)或表达量有所增加, 以致更多的 LPE 被酰基化为 PE。但在图 5 中也发现, 在氮饥饿 4 d 后, 藻细胞中 PE 的相对丰度并没有达到预期值(在 MiLPEAT 的作用下, 降低 50% 的 LPE, 理论上就应该多产生相应的 PE)。这可能是由于生成的 PE 大部分被 PDAT 作用以合成 TAG, 从而造成细胞膜脂含量的降低而 TAG 含量的增加^[3, 38]。因为已知 TAG 既可以沿着 Kennedy 途径^[38-39]从头合成, 也可能由 PDAT 作用^[8, 14], 将 PE 等膜脂甘油骨架 sn-2 位上的脂肪酸转至 DAG 的 sn-2 位上而形成。当然, 这个推测还需要实验进一步证实。

参考文献:

[1] Reisigl H. Zur systematik und ökologie alpiner Bodenalggen [J]. Österreichische Botanische Zeitschrift, 1964, 111(4):

402-499.

- [2] Tong M, Yu S Y, Ouyang L L, et al. Comparison of increased arachidonic acid content in *Myrmecia incisa* cultured during the course of nitrogen or phosphorus starvation[J]. Journal of Fisheries of China, 2011, 35(5): 763-773. [童牧, 于水燕, 欧阳珑玲, 等. 氮饥饿与磷饥饿促使缺刻缘绿藻花生四烯酸含量增加的比较[J]. 水产学报, 2011, 35(5): 763-773.]
- [3] Ouyang L L, Li X L, Zhou Z G. Alternations of photosynthetic membrane lipids and triacylglycerol and their fatty acids in *Myrmecia incisa* grown in a shift from nitrogen starvation to replenishment[J]. Marine Fisheries, 2016, 38(6): 653-662. [欧阳珑玲, 李晓蕾, 周志刚. 缺刻缘绿藻的光合膜脂与中性脂及其脂肪酸组成在氮饥饿/氮恢复培养过程中的变化[J]. 海洋渔业, 2016, 38(6): 653-662.]
- [4] Dyer J M, Stymne S, Green A G, et al. High-value oils from plants[J]. Plant Journal, 2008, 54(4): 640-655.
- [5] Park J Y, Kim D K, Wang Z M, et al. Production and characterization of biodiesel from tung oil[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2008, 148(1-3): 109-117.
- [6] Stymne S, Appelqvist L Å. The biosynthesis of linoleate from oleoyl-CoA via oleoyl-phosphatidylcholine in microsomes of developing safflower seeds[J]. European Journal of Biochemistry, 1978, 90(2): 223-229.
- [7] Sperling P, Linscheid M, Stöcker S, et al. *In vivo* desaturation of cis-Δ⁹-monounsaturated to cis-Δ⁹, 12-diunsaturated alkenylether glycerolipids[J]. Journal of Biological Chemistry, 1993, 268(36): 26935-26940.
- [8] Bates P D. Understanding the control of acyl flux through the lipid metabolic network of plant oil biosynthesis[J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids, 2016, 1861(9Pt B): 1214-1225.
- [9] Lands W E M. Metabolism of glycerolipids: A comparison of lecithin and triglyceride synthesis[J]. Journal of Biological Chemistry, 1958, 231(2): 883-888.
- [10] Shindou H, Hishikawa D, Harayama T, et al. Generation of membrane diversity by lysophospholipid acyltransferases[J]. Journal of Biochemistry, 2013, 154(1): 21-28.
- [11] Kim H U, Lee K R, Go Y S, et al. Endoplasmic reticulum-located PDAT1-2 from castor bean enhances hydroxy fatty acid accumulation in transgenic plants[J]. Plant and Cell Physiology, 2011, 52(6): 983-993.
- [12] Yoon K, Han D, Li Y, et al. Phospholipid: diacylglycerol acyltransferase is a multifunctional enzyme involved in membrane lipid turnover and degradation while synthesizing triacylglycerol in the unicellular green microalga *Chlamydomonas reinhardtii*[J]. Plant Cell, 2012, 24(9): 3708-3724.
- [13] Fan J, Yan C, Zhang X, et al. Dual role for phospholipid: diacylglycerol acyltransferase: enhancing fatty acid synthesis and diverting fatty acids from membrane lipids to triacylglycerol

- in *Arabidopsis* leaves[J]. *Plant Cell*, 2013, 25(9): 3506-3518.
- [14] Liu X Y, Ouyang L L, Zhou Z G. Phospholipid: diacylglycerol acyltransferase contributes to the conversion of membrane lipids into triacylglycerol in *Myrmecia incisa* during the nitrogen starvation stress[J]. *Scientific Reports*, 2016, 6: 26610.
- [15] Shindou H, Shimizu T. Acyl-CoA: lysophospholipid acyltransferases[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2009, 284(1): 1-5.
- [16] Ståhlberg K, Ståhl U, Stymne S, et al. Characterization of two *Arabidopsis thaliana* acyltransferases with preference for lysophosphatidylethanolamine[J]. *BMC Plant Biology*, 2009, 9: 60.
- [17] Jasieniecka-Gazarkiewicz K, Lager I, Carlsson A S, et al. Acyl-CoA: lysophosphatidylethanolamine acyltransferase activity regulates growth of *Arabidopsis*[J]. *Plant Physiology*, 2017, 174(2): 986-998.
- [18] Ouyang L L, Chen S H, Li Y, et al. Transcriptome analysis reveals unique C4-like photosynthesis and oil body formation in an arachidonic acid-rich microalga *Myrmecia incisa* Reisigl H4301[J]. *BMC Genomics*, 2013, 14: 396.
- [19] Stanier R Y, Kunisawa R, Mandel M, et al. Purification and properties of unicellular blue-green algae (Order Chlorococcales)[J]. *Bacteriology Reviews*, 1971, 35(2): 171-205.
- [20] Richards E, Reichardt M, Rogers S. Preparation of genomic DNA from plant tissue[M]// Ausubel F M, Brent R, Kingston R, et al. *Current Protocols in Molecular Biology*. New York: John Wiley & Sons, 2003.
- [21] Thompson J D, Gibson T J, Plewniak F, et al. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools[J]. *Nucleic Acids Research*, 1997, 25(24): 4876-4882.
- [22] Hall T A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT[J]. *Nucleic Acids Symposium Series*, 1999, 41: 95-98.
- [23] Tamura K, Stecher G, Peterson D, et al. MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2013, 30(12): 2725-2729.
- [24] Yu S Y, Li H, Tong M, et al. Identification of a $\Delta 6$ fatty acid elongase gene for arachidonic acid biosynthesis localized to the endoplasmic reticulum in the green microalga *Myrmecia incisa* Reisigl[J]. *Gene*, 2012, 493(2): 219-227.
- [25] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method[J]. *Methods*, 2001, 25(4): 402-408.
- [26] Bligh E G, Dyer W J. A rapid method of total lipid extraction and purification[J]. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, 1959, 37(8): 911-917.
- [27] Okazaki Y, Kamide Y, Hirai M Y, et al. Plant lipidomics based on hydrophilic interaction chromatography coupled to ion trap time-of-flight mass spectrometry[J]. *Metabolomics*, 2013, 9(Suppl 1): 121-131.
- [28] Su X, Xu J, Yan X, et al. Lipidomic changes during different growth stages of *Nitzschia closterium* f. *minutissima*[J]. *Metabolomics*, 2013, 9(2): 300-310.
- [29] Li Z G, Zeng H Z, Ao P X, et al. Lipid response to short-term chilling shock and long-term chill hardening in *Jatropha curcas* L. seedlings[J]. *Acta Physiologiae Plantarum*, 2014, 36(10): 2803-2814.
- [30] 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.
- [31] Dunkley T P, Hester S, Shadforth I P, et al. Mapping the *Arabidopsis* organelle proteome[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2006, 103(17): 6518-6523.
- [32] Jain S, Stanford N, Bhagwat N, et al. Identification of a novel lysophospholipid acyltransferase in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2007, 282(42): 30562-30569.
- [33] Stornaiuolo M, Lotti L V, Borgese N, et al. KDEL and KKXX retrieval signals appended to the same reporter protein determine different trafficking between endoplasmic reticulum, intermediate compartment, and Golgi complex[J]. *Molecular Biology of the Cell*, 2003, 14(3): 889-902.
- [34] Shockey J, Regmi A, Cotton K, et al. Identification of *Arabidopsis* GPAT9 (At5g60620) as an essential gene involved in triacylglycerol biosynthesis[J]. *Plant Physiology*, 2016, 170(1): 163-179.
- [35] Ouyang L L, Li H, Yan X J, et al. Site-directed mutagenesis from Arg195 to His of a microalgal putatively chloroplastidial glycerol-3-phosphate acyltransferase causes an increase in phospholipid levels in yeast[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2016, 7: 286.
- [36] Yamashita A, Nakanishi H, Suzuki H, et al. Topology of acyltransferase motifs and substrate specificity and accessibility in 1-acyl-sn-glycero-3-phosphate acyltransferase 1[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 2007, 1771(9): 1202-1215.
- [37] Jackowski S, Jackson P D, Rock C O. Sequence and function of the *aas* gene in *Escherichia coli*[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1994, 269(4): 2921-2928.
- [38] Chen C X, Sun Z, Cao H S, et al. Identification and characterization of three genes encoding acyl-CoA: diacylglycerol acyltransferase (DGAT) from the microalga *Myrmecia incisa* Reisigl[J]. *Algal Research*, 2015, 12: 280-288.
- [39] Kennedy E P, Weiss S B. The function of cytidine coenzymes in the biosynthesis of phospholipids[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1956, 222(1): 193-214.

Cloning and characterization of a gene encoding lysophosphatidylethanolamine acyltransferase (LPEAT) in the green microalga *Myrmecia incisa* Reisigl

ZHOU Zhigang^{1,2,3}, BAO Hong¹, OUYANG Longling¹

1. The Key Laboratory of Exploration and Utilization of Aquatic Genetic Resources Conferred by Ministry of Education, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;
2. International Research Center for Marine Biosciences Conferred by Ministry of Science and Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;
3. National Demonstration Center for the Experimental Teaching of Fisheries Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China

Abstract: *Myrmecia incisa* Reisigl, a coccoid green microalga, is an oleaginous alga that can accumulate an unprecedentedly high level of arachidonic acid (ArA, 20:4 ω 6)-rich triacylglycerols (TAG) under the growth stress of nitrogen starvation. ArA accounts for 68.0% of total fatty acids in TAG. How is ArA preferentially utilized for the biosynthesis of TAG? The Lands' cycle plays an important role in the composition change of fatty acids of phospholipids, thus altering the composition of fatty acids in TAG. Lysophosphatidylethanolamine acyltransferase (LPEAT), a key enzyme in the Lands' cycle, was the focus of the present study. *Myrmecia incisa* (Mi)LPEAT was cloned using reverse transcription-PCR and 3'- and 5'-cDNA rapid amplification of cDNA ends technique. The full-length cDNA was 1303 bp long, and contained a 129-bp 5'-untranslated region (UTR) and 193-bp 3'-UTR. The length of the open read frame was 981 bp that encoded a 326-amino acid protein. The DNA sequence of *MiLPEAT* was also cloned from *M. incisa* with the isolated algal genomic DNA as a template, and it was 1871 bp long. Comparison of the cDNA and DNA sequences showed that *MiLPEAT* possessed 6 introns that separated the coding sequence into 7 exons. Multiple sequence alignment and bioinformatics analysis of LPEATs from different species demonstrated that *MiLPEAT* possessed a phosphate acyltransferase domain, PlsC, thus suggesting that it was one member of the lysophospholipid acyltransferase (LPLAT) superfamily. *MiLPEAT* also had the 4 typical motifs, NH(x)₄D, GCxYVxR, FPEGT, and PVxPVx, which are characterized in the LPLAT superfamily. Both the prediction, as analyzed online by Wolfspport and Protein Prowler, and the presence of a dilysine motif at the carboxyl terminus of *MiLPEAT*, implied that *MiLPEAT* might reside at the algal endoplasmic reticulum and possibly participate in the secretion pathway. A neighbor-joining phylogeny was constructed on the basis of deduced amino acids of LPEATs from different species of plants. It illustrated that *MiLPEAT* was so different from LPEAT2 that they located at different clades due to their various characteristics of sequences. *MiLPEAT* was clustered phylogenetically with LPEAT1, suggesting their similar functions in the acylation of phospholipids. Quantitative real-time PCR detection pointed out that *MiLPEAT* transcripts increased at a statistically significant level ($P<0.05$) at 8 h after treatment with nitrogen starvation in *M. incisa*. By coincidence, the relative abundance of lysophosphatidylethanolamine (LPE) in the microalgal cells reduced by approximately 49% at an extreme significance level ($P<0.01$) under the nitrogen starvation stress. The corresponding phosphatidylethanolamine (PE) generated from LPE as catalyzed by *MiLPEAT*, however, did not increase significantly. It is assumed that the net increase of PE under nitrogen starvation in *M. incisa* was possibly utilized for TAG biosynthesis by the phospholipid DAG acyltransferase (PDAT), so that the content of TAG has been reported to increase. This research lays a foundation for us to understand the TAG and phospholipid biosynthetic pathway and how to regulate TAG synthesis in *M. incisa*.

Key words: *Myrmecia incisa*; lysophosphatidylethanolamine acyltransferase (LPEAT); triacylglycerol (TAG); phospholipid; nitrogen starvation

Corresponding author: ZHOU Zhigang. E-mail: zgzhou@shou.edu.cn