

油桐油质蛋白 Oleosin 编码基因 5 个 *VfOLE* 转录本的克隆与表达分析

吴庆珂, 杨素素, 汪阳东, 高 暝, 陈益存*

(中国林业科学研究院亚热带林业研究所, 浙江 富阳 311400)

摘要:植物种子中,油脂主要贮藏一种分散的、相对稳定的亚细胞微滴“油体”中,油质蛋白 Oleosin 是油体结构组成和功能调节的最主要蛋白质,在种子成熟、休眠和萌发过程中发挥重要作用。通过油桐种仁 EST 文库构建与测序,获得了油桐 Oleosin(OLE)蛋白编码基因的 5 个转录本 *VfOLE1*、*VfOLE2*、*VfOLE3*、*VfOLE4*、*VfOLE5*,完整阅读框长度分别为 474、465、414、414、429 bp。通过实时荧光定量 PCR 技术分析了 5 个 *VfOLE* 转录本在油桐不同组织以及种仁成熟过程中的表达变化。结果表明,5 个 *VfOLE* 转录本在成熟的种子中特异高效表达,其它组织中微弱表达;5 个 *VfOLE* 表达趋势与桐酸、桐油积累趋势一致,其中在桐酸快速合成、桐油快速积累时期,*VfOLE1*、*VfOLE2* 表达迅速上升并且表达量显著高于 *VfOLE3*、*VfOLE4*、*VfOLE5*。试验结果为进一步研究 *VfOLE* 基因在桐油合成中的生物学功能提供了参考。

关键词: Oleosin; 油桐; 基因表达

中图分类号: S718.46

文献标识码: A

Isolation and Expression Analysis on *Vernicia fordii* Oleosin Gene of Five *VfOLE* Isoforms

WU Qing-ke, YANG Su-su, WANG Yang-dong, GAO Ming, CHEN Yi-cun

(Research Institute of Subtropical Forestry, Chinese Academy of Forestry, Fuyang 311400, Zhejiang, China)

Abstract: Plant lipid in oilseeds is generally stored in a dispersive and stable sub-cellular droplet “oil body”. And oleosin protein, as the main structural protein of oil body, is responsible for its functional modification. Oleosin plays an important role in the process of oilseed maturation, dormancy and germination. In this study, five oleosin isoforms, named *VfOLE1*, *VfOLE2*, *VfOLE3*, *VfOLE4*, *VfOLE5*, were isolated from *Vernicia fordii* (tung tree). Quantitative real time PCR method was employed to identify the expression mode of oleosin gene of the 5 isoforms, and the results showed that the five *VfOLEs* were all expressed exclusively in the oilseeds. Furthermore, the rule of the five *VfOLEs* expression in the tung tree developing seeds was in accordance with those of tung oil and α -eleostearic acid accumulation. In addition, the *VfOLE1* and *VfOLE2* expression increased immediately and higher than those of the other *VfOLEs* in tung oil and α -eleostearic acid biosynthesis.

Key words: Oleosin; *Vernicia fordii*; gene expression

油桐 (*Vernicia fordii* (Hemsl.) Airy Shaw) 隶属大戟科 (Euphorbiaceae) 油桐属 (*Vernicia* Lour.), 是

重要的工业油料树种,干种仁含油率达 60% ~ 70%,是最好的干性油之一,用途广泛,是环保型新

收稿日期: 2013-11-02

基金项目: 浙江省自然科学基金重点项目 (LZ13C160001)

作者简介: 吴庆珂 (1989—),男,山东菏泽人,硕士研究生,主要从事能源植物功能基因研究。

* 通讯作者: 副研究员, 硕士,主要从事能源植物育种分子基础研究。E-mail: yicun_chen@163.com

型化工产品原料,具有绝缘、耐酸碱、防腐防锈等优良性能,可用来研制新型天然涂料、合成树脂、粘合剂、药品等^[1-2]。油桐种仁中,桐油主要以甘油三酯(Triacylglycerols, TAG)的形式贮藏在一种分散的、相对稳定的亚细胞微滴中,这些小的不连续的亚细胞器叫“油体(Oil body)”。油体不仅是能量、碳营养的贮藏单位,也是一个涉及油脂合成、降解和平衡的动力结构^[3]。作为植物体中最小的细胞器,油体直径一般为0.5~2.5 μm,外部是由磷脂单分子层(PL)及其镶嵌其中的油质蛋白(Oleosin、Caleosin等)组成的“半单位”膜,内部是甘油三酯(TAG)液态基质^[4]。在成熟的种子中,TAGs、PLs和Oleosin都在内质网上合成,再以油体的形式从内质网释放出来^[5]。与脂质体及人工脂滴不同,其表面结合的油质蛋白Oleosin(OLE)可以确保油体贮藏在成熟的种子中或在提取制备过程中不会发生聚集。

油质蛋白Oleosin是油体结构组成和功能调节最主要的蛋白^[6]。利用拟南芥(*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh)的突变体研究发现,Oleosin蛋白决定了油体大小^[7]。Oleosin作为油体主要蛋白质,占油体总成分的1%~4%^[8],而油体中90%以上的蛋白是Oleosin^[4]。Oleosin蛋白享有共同的结构特征,在中间部分含有一个约72个氨基酸组成的疏水性区域,目前还未在其它生物体中发现含有如此长疏水性区域的蛋白质。在这个长疏水性区域中间有个由12个氨基酸组成的脯氨酸结(Proknot,-PX5SPX3P-)^[9],可形成发卡结构使Oleosin能够渗入到油体的磷脂单分子层中,并且Oleosin蛋白之间可能通过该区域互相结合。Oleosin蛋白氨基和羧基端可能作为受体和脂酶相结合^[5],这对Oleosin发挥生物学功能具有重要作用。迄今,很多物种如咖啡(*Coffea canephora* P.)、芝麻(*Sesamum indicum* L.)、拟南芥等Oleosin基因被相继报道^[10-11],基因转录本数量在物种中存在差异,但都可归并为H-oleosin和L-oleosin两个大的亚型,两者的主要区别在于H-oleosin羧基端的18个氨基酸残基。最新研究报告,作为油体结构蛋白的Oleosin与油脂合成关键酶基因DGAT和油脂合成调控转录因子WRI1共同表达,可以使烟草(*Nicotiana tabacum* L.)叶片组织中产生干质量占15%的油脂TAG^[12]。Liu等将大豆(*Glycine max* L.)的两个24 kDa的Oleosin蛋白编码基因利用胚胎特异启动子在水稻(*Oryza sativa* L.)中进行过表达,导致种子中油脂含量从36.93%

提高到46.06%^[13]。本文通过油桐种仁EST文库构建及大规模测序获得了油桐Oleosin基因5个*VfOLE*转录本,对其在不同组织和种子成熟过程中的表达情况进行了分析,为进一步研究*VfOLE*基因在桐油合成中的生物学功能提供参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 实验材料 在浙江省金华市婺城区东方红林场国家级油桐基因库,选取油桐品种‘陈家圩9-24’种子为试材。在始开花后第90天(7月16日)开始,每次摘取3个单株果实,每个单株取3个果实,此后每隔15 d摘取1次,共6个发育时期。果实采摘后立即剥去果皮,将种子用液氮速冻,存于-80℃保存备用。

1.1.2 实验试剂及仪器 试验中使用的主要大型仪器为微量分光光度计(UV-Vis Spectrophotometer Q5000, Quawell公司)、实时荧光定量PCR仪(ABI7300, Applied Biosystems公司)。主要试剂RNA提取试剂盒(RN38 EASYspin plus Plant RNA kit)购自北京艾德来生物科技有限公司,SupeyScript III反转录试剂盒购自Invitrogen公司,Taq DNA聚合酶、DNA凝胶回收试剂盒、大肠杆菌DH5α感受态细胞、pMD-18T Simple Vector和荧光定量试剂盒SYBR PrimerScript™ RT-PCR Kit购自Takara公司。引物合成和DNA测序均在上海生物工程技术有限公司进行。

1.2 研究方法

1.2.1 油桐*VfOLE*基因cDNA序列分离 在本实验室构建的油桐种仁cDNA文库基础上^[14-15],通过大规模测序获得118条OLE EST序列,经序列同源性比对,归并为5个*VfOLE*基因,命名为*VfOLE1*、*VfOLE2*、*VfOLE3*、*VfOLE4*、*VfOLE5*。

1.2.2 RNA提取及逆转录 将-80℃保存的油桐种子迅速取出,敲碎去除种皮,将种仁放在液氮中快速研磨,按照RNA提取试剂盒说明书(RN38 EASYspin plus Plant RNA kit),提取油桐品种‘陈家圩9-24’6个发育时期的种子RNA,设置3个生物学重复。用UV-Vis Spectrophotometer Q5000微量分光光度计测定RNA浓度,并进行1%琼脂糖电泳分析其完整性。反转录时各取RNA 3 μg,使用SuperScript III反转录试剂盒反转录合成一链,合成后的cDNA稀释后用于实时荧光定量PCR。

1.2.3 实时荧光定量 PCR 法 油桐 5 个 *VfOLE* 转录本的 qRT-PCR 引物序列、 T_m 值以及扩增片段见表 1。引物分别是各个基因的特异性片段序列,以避免基因间的非特异性扩增。实时荧光定量 PCR 扩增的反应体系为: cDNA 模版 2 μL , 2 \times SYBR Premix Ex TaqTM 10 μL , 特异引物 (10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 0.4 μL , 50 \times ROX Reference Dye 0.4 μL , 用水补足 20 μL 。PCR 扩增条件为: 95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s 预变性后, 95 $^{\circ}\text{C}$

变性 5 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 复性 31 s, 共 40 个循环, 同时对实时荧光定量 PCR 产物进行 SYBR 熔解曲线分析, 每个试样平行做 4 次反应, 生物学试验重复 3 次, 基因的相对表达量分析参考 Pfaffl “Delta-delta” 方法计算 $2^{-[\Delta\text{CP}_{\text{sample}}-\Delta\text{CP}_{\text{control}}]}$ 值反应基因表达量^[16]。基因相对表达量数值之间的差异采用统计学软件 PASW Statistics 18 进行单因素方差分析, 显著性水平 (Significance Level) < 0.05 为显著差异。

表 1 油桐 5 个 *VfOLE* 转录本 qRT-PCR 和 cDNA 完整阅读框扩增的引物

基因简称	基因名称	引物序列 (5' to 3') (上游/下游)	$T_m/^{\circ}\text{C}$	扩增子/bp
<i>EF1a</i>	<i>Elongation factor 1-a</i>	GCCTGGTATGTTGTGACCT/ GGATCATCTTGGAGTTGGA	83.9	180
<i>VfOLE1</i>	<i>Oleosin1</i>	GCCCTCAACTTCACAGATTT / CCGACAAGCCAATAACGAA	84.1	178
<i>VfOLE2</i>	<i>Oleosin2</i>	CCGCTATGATGCCTACAAG / AGAACAGGGCTAAAGATGAAA	83.8	177
<i>VfOLE3</i>	<i>Oleosin3</i>	TGGTGGTTTTGGCGTCGCA / GCACTTCTCAAGTATGTTGGCCCG	86.1	188
<i>VfOLE4</i>	<i>Oleosin4</i>	GGTGGTTTTGGCGTCGCGAG / CCCACGATCAATCTTCAATCTCAACAT	86.1	187
<i>VfOLE5</i>	<i>Oleosin5</i>	TGTCTCAGATGATCCGTGAAGC / AGGACTAAACAGGACCAGAAT	83.6	164
<i>VfOLE1</i>	<i>Oleosin1</i>	CAATTAAGCCTAGCTAGCTCC / AGCTCGTCTTCTCTCGTGTCT	52	476
<i>VfOLE2</i>	<i>Oleosin2</i>	TTCTCTGTAATCACCTCG / CGACACAAATGCAACAAAAG	55	645
<i>VfOLE3</i>	<i>Oleosin3</i>	CAAGGCATCAATCAATG / CCATCAAAAAGCACTTC	52	444
<i>VfOLE4</i>	<i>Oleosin4</i>	GGGCCAAGGCATCAATCA / CAACTAGTCATCAGAAGCTG	55	503
<i>VfOLE5</i>	<i>Oleosin5</i>	GCAGTACGCATTACGAGAAGA / AGATGCTCGAGTTTGAGTAGTAGCC	55	530

1.2.4 桐油提取及桐酸含量测定 采用索氏热萃取法提取油桐种仁油脂。具体步骤是, 首先去除种壳, 将种仁置于 60 $^{\circ}\text{C}$ 真空干燥箱中干燥 24 h; 取出烘干后的种仁研磨至粉末, 称取 1.5 g 粉末装入一个烘干的滤纸包内 (烘干滤纸包称质量 M_1), 每个时期样品装 3 个滤纸包, 将带有种仁粉末的滤纸包置于 60 $^{\circ}\text{C}$ 真空烘箱中干燥 4 h; 取出带有样品的滤纸包, 真空干燥器中冷却 30 min, 称取样品与滤纸包的质量 M_2 ; 将样品包装入索氏抽提器抽提筒中进行抽提; 将回收的石油醚进行真空旋转蒸发, 收集油脂; 取出滤纸包, 在 105 $^{\circ}\text{C}$ 烘箱中干燥 4 h, 真空干燥器中冷却 30 min, 称取滤纸包与样品残渣的质量 M_3 ; 计算种仁的含油率: $\frac{(M_2 - M_3)}{(M_2 - M_1)}$ 。

桐酸测定采用气相色谱分析, 称取桐油 60 mg 左右至具塞试管中, 加入 4 mL 异辛烷溶解; 加入 200 μL KOH-CH₃OH 溶液 (2 mol \cdot L⁻¹), 盖上玻璃塞猛烈振摇 30 s 进行甲酯化; 加入 1 g Na₂HSO₄ \cdot H₂O, 然后猛烈振摇 15 s, 盐沉淀后取上清液待测定; 色谱条件为 HP-INNOWAX 毛细管色谱柱 (30 m \times 0.25 μm \times 0.25 μm); 程序升温: 初始温度 140 $^{\circ}\text{C}$, 保持 1 min, 以 4 $^{\circ}\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$ 升至 250 $^{\circ}\text{C}$, 保持 5 min; 进样口温度 220 $^{\circ}\text{C}$, 进样量 1 μL ; 载气为高纯

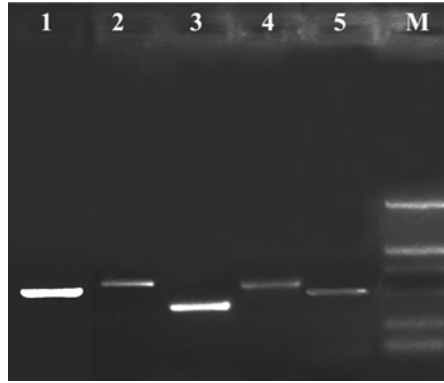
氮气, 纯度 $\geq 99.999\%$ 。各组分参考标准品出峰情况进行定性定量。

2 结果与分析

2.1 油桐 5 个 *VfOLE* 转录本序列分析

从油桐种仁 cDNA 中所分离到的 *VfOLE1*、*VfOLE2*、*VfOLE3*、*VfOLE4*、*VfOLE5* 完整阅读框 (Open Reading Frame, ORF) 长度分别为 474、465、414、414、429 bp, 在 GenBank 上的登陆号分别为 *OLE1* (GR218754)、*OLE2* (GR218943)、*OLE3* (GR219005)、*OLE4* (GR219158)、*OLE5* (GR218198)。

表 1 中列出了从种仁 cDNA 中扩增 5 个 *VfOLE* 转录本的引物, 扩增子序列等于或者大于各个基因的 ORF 长度。扩增结果如图 1, *VfOLE1*、*VfOLE2*、*VfOLE3*、*VfOLE4*、*VfOLE5* 扩增子的长度分别为 476、645、444、503、530 bp, 因为引物序列覆盖了基因的阅读框, 所以扩增子的长度大于等于基因阅读框的长度。5 个 *VfOLE* 转录本的阅读框 ORF 序列见图 2, 中间序列比较保守, 氨基端和羧基端序列存在多样性, *VfOLE3*、*VfOLE4* 序列氨基端序列一致, 羧基端不同。此外, 5 个 *VfOLE* 转录本编码氨基酸的序列分析及同源性比对情况见文献 [15]。



1: *VjOLE1*; 2: *VjOLE2*; 3: *VjOLE3*; 4: *VjOLE4*; 5: *VjOLE5*; M: Marker 2000

图1 油桐5个 *VjOLE* 转录本 cDNA 扩增图

```

VjOLE3 -----ATGGCAGAACAGCAACAG-----T-CACAG-CAACC TG TOCAACA--ACCACGCTCTCAACCAGG TAG TCAAGGCAGCAACTGCC
VjOLE4 -----ATGGCAGAACAGCAACAG-----T-CACAG-CAACC TG TOCAACA--ACCACGCTCTCAACCAGG TAG TCAAGGCAGCAACTGCC
VjOLE5 -----ATGTCGTGATCAATCAAAAGCCTATG-T-CACAGTGA TCOG TGAAGCAGCACCAOOG TCTCAOCCOAGOG TCAAGTCTTAAACAGCA
VjOLE1 ATGGCCGAC TATCAGCAACGACCTGGCCAAAGAGGCTACAAGGCGGGCTCTGG TOCCG TGA TCAAAAAGGCTCG TGG ATC TGGCCCT TCAACTTTCAGATTT TAGCTGTGTGCTACTG
VjOLE2 ATGGCTGAAOGTTTACAGCCACACCAGGTTCAG TOCACCA--CAAC-TOCGTATGATGCGCTACAAGGCTCAACAAAAGCGTCCATCAACCTCTAAGGTGT TAGCTGTGATCAOCCIT
                                     * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
VjOLE3 GTCACACTGCTGG TGGTTCCTTCTAGTCTCTCTGTTTAAC TCTCAC TGGGACTGTCAT TGG ACTCACTA TAGCCAC TOCAT TGT TCGTCTT TTTT CAG TCOGG TTCTTGT TOC TGCTG TG
VjOLE4 GTCACACTGCTGG TGGTTCCTTCTAGTCTCTCTGTTTAAC TCTCAC TGGGACTGTCAT TGG ACTCACTA TAGCCAC TOCAT TGT TCGTCTT TTTT CAG TCOGG TTCTTGT TOC TGCTG TG
VjOLE5 GCGACGCTGG TGCAGCTTCTT TGAICTTGTCTGGTTAACTACTAAC TGGGACAGTAAATAGC TCTTTATTA TGGCAAC TCCAATTC TGGTCTGTIT TAG TCCTATTATAG TOCCAGCTGGG
VjOLE1 TTGCGCTTGG TGGGACCTACTCTTCTTCTGCTGATAC TCTTAC TGGGACCTCAT TGGGT TAGCTG TG AC TACCCAC TTTT TGTAT TTT CAG OCOGG TTCTGG TCCGGCAGCC
VjOLE2 CTCGCCCTTGG TGGTGGGC TTTCTGCACTTTCAGGTATAACCTAGT AGGTACACTCATOGGCT TAGOCATT ACCACOOCTCTTTT TTTTCATCTT TAGOCCGT TCTTGT TCCGGCAGCC
* * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
VjOLE3 ATTACAGTTTTCTTATAG TCAACAGGCTTCTTGGCTCTGG TGG TTTTGGGG TCGCAGCAATCTOOG TOCTCTCATGATCTACAGG TATGTGACOGGGAAGCAACOGCCAGG AGCAGAA
VjOLE4 ATTACAGTTTTCTTATAG TCAACAGGCTTCTTGGCTCTGG TGG TTTTGGGG TCGCAGCAATCTOOG TOCTCTCATGATCTACAGG TATGTGACOGGGAAGCAACOGCCAGG AGCAGAA
VjOLE5 ATAGTTGATTCTTGG TAGCTACTGGTTCCTTTT TTTCCGG TGGGTG TGG TTTTGGGG TCGCAGCAATCTOOG TCAATGATCTACAGG TATGTGACOGGGAAGCAACOGCCAGG AGCAGAA
VjOLE1 TTCGTTATTGGCTTGTGG TGA TGGG TTTT TGGCCTCTGG AGCTTT TGGGATCAGTGC ACTTCTTCTCTG TCTTTGGATGG TTAAT TATATCOG TAGGATGAGAGGCC TCTTTCOGCTG
VjOLE2 TTTTCTTGGCTTGTGG TGA TGGG TTTT TGGCCTCTGG AGCTTT TGGGATCAGTGC ACTTCTTCTCTG TCTTTGGATGG TTAAT TATATCOG TAGGATGAGAGGCC TCTTTCOGCTG
* * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
VjOLE3 AGTCTGGACAGGCAGCATG AAGCTGGCTGAAAGGCAOOGGAAATGAAAGACAGGGCTGAGCAGTTAGGACAGCATGTAACGGGCCAACATACTTGA-----
VjOLE4 AGTCTGGACAGGCAGCATG AAGCTGGCTGAAAGGCAOOGGAAATGAAAGACAGGGCTGAGCAGTTAGGACAGCATGATGTTGAGATTGAAAGATTGA-----
VjOLE5 AAGTTGATTATGOGAGAGGC AAAAT TCGCAAAAAGGCACAGGATATGAAGAAATATGTCAGCAAAAAGCTCAGGAGGCTACTA-----CTCAACTCGAGCATCTTAA-----
VjOLE1 CAGATGGAACATGCTAAGCGCGCTGACAGACACTACTGG TCAATTGGGCCAGAGGCTAGGGATA TGGGCCAGACTGTC-CAGAG TAAGGCCAAG AAGGTGGCAAGACTTAA
VjOLE2 CAGCTGATCAGGCAAGGAGGCATGCAAG ATATGGCTGG TTAGTGGGACAG AAGACTAAGGAAA TGGGACAAGAAATC-CAGAAGAAGACATG AAGG-GAAATGA-----
**** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

```

图2 油桐5个 *VjOLE* 转录本的 ORF 序列

2.2 5个 *VjOLE* 转录本在油桐不同组织中的表达分析

实时荧光定量 PCR 选用 *EF1 α* (Elongation factor 1 α) 基因,实验室前期试验表明, *EF1 α* 基因是不同组织以及种子不同成熟时期的最适内参照基因之一^[17]。本试验结果表明,5个 *VjOLE* 转录本在油桐不同组织中表达均有显著差异,所检测组织包括根、茎、叶、花瓣、雌蕊、雄蕊、幼果(开花后 100 d)和发育中的种子(开花后 145 d)。5个 *VjOLE* 转录本在油桐发育中的种子中均特异高效表达,表达量显著高于根、茎、叶、花瓣、雄蕊、雌蕊等其它组织(表 2)。

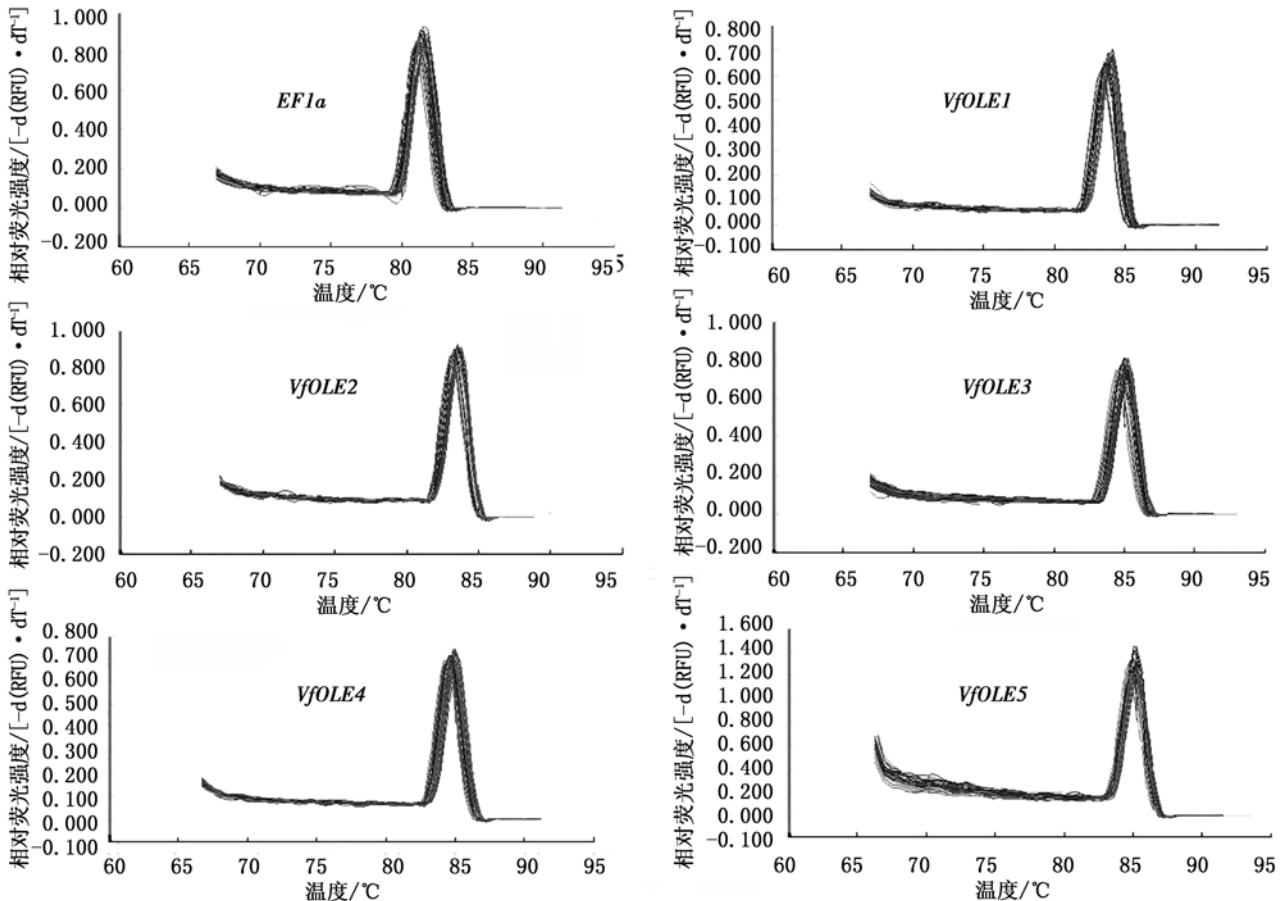
此外, *VjOLE3* 在根、叶中有微弱表达, *VjOLE1*、*VjOLE2* 在叶片中也有微弱表达。

2.3 油桐5个 *VjOLE* 转录本在油桐种仁成熟过程中的表达分析

利用表 1 中设计的 5 个 *VjOLE* 转录本及内参照基因特异性的引物,采用实时荧光定量 PCR 的方法检测 *VjOLE1*、*VjOLE2*、*VjOLE3*、*VjOLE4*、*VjOLE5* 基因在油桐不同组织以及种仁成熟过程中不同时期的表达,从图 3 中 5 个 *VjOLE* 转录本和内参照基因 *EF1 α* qRT-PCR 溶解曲线可以看出,所设计的各个扩增产物的引物扩增均显示出良好的特异性。

表 2 油桐 5 个 *VfOLE* 转录本在油桐不同组织中的表达量分析

油桐组织	<i>VfOLE1</i>	<i>VfOLE2</i>	<i>VfOLE3</i>	<i>VfOLE4</i>	<i>VfOLE5</i>
根	0.72 ± 0.183	0.14 ± 0.06	9.60 ± 0.97	1.21 ± 0.29	0.08 ± 0.045
茎	0.04 ± 0.03	0.04 ± 0.02	0.06 ± 0.01	0.01 ± 0.00	0.02 ± 0.00
叶	3.04 ± 0.55	2.65 ± 0.25	4.33 ± 0.01	0.04 ± 0.00	1.81 ± 0.60
花瓣	0.03 ± 0.01	0.04 ± 0.02	0.08 ± 0.02	0.01 ± 0.00	0.01 ± 0.00
雌蕊	0.20 ± 0.04	0.09 ± 0.02	0.07 ± 0.02	0.00 ± 0.00	0.04 ± 0.00
雄蕊	0.65 ± 0.06	0.01 ± 0.01	0.01 ± 0.00	0.01 ± 0.00	0.00 ± 0.00
幼果	0.03 ± 0.02	0.01 ± 0.01	0.14 ± 0.01	0.00	0.00 ± 0.00
种子	236.13 ± 20.20	276.69 ± 12.39	501.48 ± 16.47	113.89 ± 7.539	10.14 ± 0.384

图 3 油桐 5 个 *VfOLE* 转录本以及内参照基因 *EF1α* 实时荧光定量 PCR 溶解曲线

在油桐种仁成熟过程中的不同时期,5 个 *VfOLE* 转录本表达分析结果显示(图 4),各个基因表达趋势与桐酸、桐油积累趋势一致,其中在桐酸快速合成、桐油快速积累时期(7 月 26 日至 8 月 25 日),*VfOLE1*、*VfOLE2* 表达量和 *VfOLE3*、*VfOLE4*、*VfOLE5* 相比较,增长趋势更为明显。在桐酸、桐油快速增长点(8 月 11 日),干种仁中桐油含量 $26.43\% \pm 1.6\%$,桐油中桐酸含量 $65.87\% \pm 2.2\%$,5 个 *VfOLE* 转录本的表达量分别为 400.55 ± 6.29 、 574.48 ± 14.66 、 72.42 ± 8.96 、 36.00 ± 4.96 、 4.83 ± 1.21 ,在

此后的半个月中(8 月 11 日至 8 月 25 日),桐油、桐酸以及基因表达量都持续快速增长,干种仁桐油含量达到 $34.17\% \pm 2.5\%$,桐油中桐酸含量 $72.10\% \pm 3.8\%$,5 个 *VfOLE* 转录本的表达量分别为 597.19 ± 14.85 、 682.60 ± 31.49 、 148.01 ± 17.65 、 132.92 ± 30.46 、 36.85 ± 12.43 。单因素方差分析结果显示,在油桐种仁成熟过程中的各个时期,*VfOLE1* 和 *VfOLE2* 表达量均显著高于 *VfOLE3*、*VfOLE4*、*VfOLE5* (显著性水平 < 0.05),并且基因表达量 *VfOLE1*、*VfOLE2* $>$ *VfOLE3* $>$ *VfOLE4* $>$ *VfOLE5*。

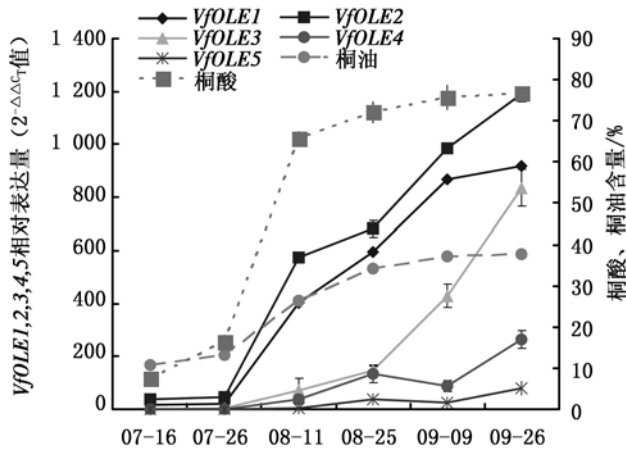


图4 油桐5个VjOLE转录本在油桐种仁成熟过程中的表达变化

3 结论与讨论

Oleosin 的表达对油脂积累及脂肪酸成分有显著的影响^[7,13],因此 Oleosin 基因的分离及表达分析可以为研究油脂合成机理和解析 Oleosin 功能提供思路。本文从油桐种仁 cDNA 文库中分离了油桐 VjOLE 基因的 5 个转录本,完整阅读框长度分别为 474、465、414、414、429 bp,分析发现 5 个 VjOLE 转录本在成熟的种子中特异高效表达,在根、茎、叶、花瓣、雌蕊、雄蕊、幼果组织中微弱表达。进一步分析 VjOLE 基因 5 个转录本在种仁成熟过程中的表达表明,5 个 VjOLE 转录本表达趋势与桐油、桐酸积累趋势一致,其中在桐酸快速合成、桐油快速积累时期,VjOLE1、VjOLE2 表达迅速上升并且表达量显著高于 VjOLE3、VjOLE4、VjOLE5 (显著性水平 < 0.05)。同时根据分子量大小分析,VjOLE1、VjOLE2 编码蛋白属于高分子量 Oleosin (H-OLE),VjOLE3、VjOLE4、VjOLE5 编码蛋白属于低分子量 Oleosin (L-OLE),即油桐种子中 H-OLE (VjOLE1、VjOLE2) 基因表达量高于 L-OLE (VjOLE3、VjOLE4、VjOLE5)。H 型和 L 型 OLE 在功能上的区别目前文献报道较少,Hsiao 等^[19]报道芝麻种子萌发过程中泛素化只发生在 H-OLE 蛋白,因此 H 型和 L 型 OLE 功能上的差别还有待于进一步研究。

文中报道的油桐 5 个 VjOLE 转录本包含文献已报道的 2 个 VjOLE^[14,18]。与木本油料植物序列同源性分析结果显示,油桐 Oleosin 氨基酸序列与麻风树 (*Jatropha curcas* L.)、油茶 (*Camellia oleifera* Abel.)、油橄榄 (*Olea europaea* L.)、欧榛 (*Corylus Avellana* L.)、扁桃 (*Prunus dulcis* L.)、油棕 (*Elaeis guineensis*

Jacq.) 同源性较高,在序列中间存在一个保守区域,称为脯氨酸结,而在氨基端和羧基端存在多样性^[15]。此外,Huang 等^[20]分析了 Oleosin 在莱茵衣藻 (*Chlamydomonas reinhardtii*) 中转录和蛋白水平的表达,推测 Oleosin 由莱茵衣藻到植物的进化过程。Vindigni 等^[21]利用荧光蛋白研究发现拟南芥 Oleosin 在转化酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 的油体中呈现 Beta 折叠的二级结构,但酵母与拟南芥的油体结构还存在差异,因此,Oleosin 作为油体的主要结构蛋白,其高级结构、相互结合蛋白及作用方式还有待于进一步研究。

参考文献:

- [1] 方嘉兴,何方. 中国油桐 [M]. 中国林业出版社,1998
- [2] 谭晓风,蒋桂熊,谭方友,等. 我国油桐产业化发展战略调查报告 [J]. 经济林研究,2011,29(3): 1-7
- [3] Nguyen H M, Baudet M, Cuin  S, et al. Proteomic profiling of oil bodies isolated from the unicellular green microalga *Chlamydomonas reinhardtii*: with focus on proteins involved in lipid metabolism [J]. Proteomics, 2011, 11(21): 4266-4273
- [4] Tzen J T C, Lie G C, Huang A H C. Characterization of the charged components and their topology on the surface of plant seed oil bodies [J]. The Journal of Biological Chemistry, 1992, 267(22): 15626-15634
- [5] Hsieh K, Huang A H C. Endoplasmic reticulum, oleosins, and oils in seeds and tapetum cells [J]. Plant Physiology, 2004, 136(3): 3427-3434
- [6] Katavic V, Agrawal G K, Hajduch M, et al. Protein and lipid composition analysis of oil bodies from two *Brassica napus* cultivars [J]. Proteomics, 2006, 6(16): 4586-4598
- [7] Siloto R M P, Findlay K, Lopez-Villalobos A, et al. The accumulation of oleosins determines the size of seed oilbodies in *Arabidopsis* [J]. Plant Cell, 2006, 18(8): 1961-1974
- [8] Anthony H, Huang C. Oil bodies and oleosins in seeds [J]. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol, 1992, 43: 177-200
- [9] Abell B M, Holbrook L A, Abenes M, et al. Role of the proline knot motif in oleosin endoplasmic reticulum topology and oil body targeting [J]. Plant Cell, 1997, 9(8): 1481-1493
- [10] Simkin A J, Qian T, Caillet V, et al. Oleosin gene family of *Coffea canephora*: quantitative expression analysis of five oleosin genes in developing and germinating coffee grain [J]. J Plant Physiol, 2006, 163(7): 691-708
- [11] Tai S S, Chen M C, Peng C C, et al. Gene family of oleosin isoforms and their structural stabilization in sesame seed oil bodies [J]. Biosci Biotechnol Biochem, 2002, 66(10): 2146-53
- [12] Vanhercke T, Tahchy A E, Liu Q, et al. Metabolic engineering of biomass for high energy density: oilseed-like triacylglycerol yields from plant leaves [J]. Plant Biotechnol J, 2013, Oct 24. doi: 10.1111/pbi.12131

- [13] Liu W X, Liu H L, Qu L Q. Embryo-specific expression of soybean oleosin altered oil body morphogenesis and increased lipid content in transgenic rice seeds [J]. *Theor Appl Genet*, 2013, 126(9): 2289 – 2297
- [14] 周冠, 汪阳东, 陈益存, 等. 油桐种仁 cDNA 文库的构建及其油体蛋白 Oleosin 基因的生物信息学分析[J]. *林业科学研究* 2009, 22(2): 177 – 181
- [15] Chen Y C, Zhou G, Wang Y D, *et al.* F-BOX and Oleosin: additional target genes for future metabolic engineering in tung trees [J]. *Industrial Crops and Products*, 2010, 32(3): 684 – 686
- [16] Pfaffl M W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR [J]. *Nucleic Acids Research*, 2001, 29(9): e45
- [17] Han X, Lu M, Chen Y, *et al.* Selection of reliable reference genes for gene expression studies using real-time PCR in tung tree during seed development [J]. *PLOS ONE*, 2012, 7(8): e43084
- [18] 龙洪旭, 谭晓风, 陈洪, 等. 油桐油体蛋白基因的克隆及序列分析 [J]. *中南林业科技大学学报*, 2010, 30(4): 31 – 38
- [19] Hsiao E S, Tzen J T. Ubiquitination of oleosin-H and caleosin in sesame oil bodies after seed germination [J]. *Plant Physiol Biochem*, 2011, 49(1): 77 – 81
- [20] Huang N L, Huang M D, Chen T L L, *et al.* Oleosin of subcellular lipid droplets evolved in green algae [J]. *Plant Physiol*, 2013, 161(4): 1862 – 1874
- [21] Vindigni J D, Wien F, Giuliani A, *et al.* Fold of an oleosin targeted to cellular oil bodies [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2013, 828(8): 1881 – 1888