

## 拟南芥 *AtGPAT9* 基因 cDNA 的克隆及其转化大豆的研究

吴 兴,赵欢欢,张 锋,李宏伟,王茅雁

(内蒙古农业大学 生命科学学院,内蒙古 呼和浩特 010018)

**摘 要:** 甘油-3-磷酸酰基转移酶(Glycerol-3-phosphate acyltransferases, GPATs; EC 2. 3. 1. 15) 是植物种子中储藏性油脂三脂酰甘油(Triacylglycerols, TAGs)合成中的一个关键酶,它催化甘油-3-磷酸分子 sn-1 位的酰化反应,形成溶血磷脂酸(Lysophosphatidic acid, LPA),从而启动 TAGs 的生物合成。拟南芥内质网中表达的 *AtGPAT9* 在此过程中可能起着重要作用。运用 RT-PCR 方法克隆到 *AtGPAT9* 基因的编码区 cDNA,并构建了其植物表达载体,然后通过农杆菌介导的子叶节法对大豆进行了遗传转化,获得抗草丁膦(Phosphinothricin/PPT)筛选剂的再生植株。

**关键词:** 甘油-3-磷酸酰基转移酶;基因克隆;大豆转化

**中图分类号:** S565. 1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-9841(2012)06-0878-04

## Cloning of *AtGPAT9* cDNA from *Arabidopsis* and Its Transformation of Soybean

WU Xing, ZHAO Huan-huan, ZHANG Feng, LI Hong-wei, WANG Mao-yan

(College of Life Sciences, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot 010018, Inner Mongolia, China)

**Abstract:** Glycerol-3-phosphate acyltransferases (GPATs) play crucial role in the biosynthesis of triacylglycerols (TAGs) which are major form of the storage oils accumulated in developing seeds, and the enzymes catalyze the acylation of glycerol-3-phosphate at the sn-1 position and result in the formation of lysophosphatidic acid, which is the initial step of TAG biosynthesis. The endoplasmic reticulum-expressed *AtGPAT9*, a member of the GPAT family in *Arabidopsis thaliana*, was predicted to play an important role in the reaction. In the present study, the complete coding region cDNA of *AtGPAT9* was cloned by using reverse transcriptase-mediated PCR, and the gene's plant expression vector was constructed. Then soybean transformation was performed by the *Agrobacterium tumefaciens*-mediated cotyledon node method, and the regenerated plants resistant to selective agent phosphinothricin/PPT were obtained.

**Key words:** Glycerol-3-phosphate acyltransferases (GPATs); Gene cloning; Transformation of soybean

三脂酰甘油 (Triacylglycerol, TAG) 是植物种子中主要的储藏性油脂,其生物合成是通过前体物甘油-3-磷酸分子被脂酰辅酶 A 中的脂肪酰基连续酯化而完成的。甘油-3-磷酸酰基转移酶 (Glycerol-3-phosphate acyltransferases, GPATs) 可催化甘油-3-磷酸分子 sn-1 位的酰化反应,形成溶血磷脂酸 (Lysophosphatidic acid, LPA),后者再经过连续 2 次酰化反应而形成 TAGs<sup>[1]</sup>。因此,GPATs 是 TAGs 生物合成过程中的第一个关键酶,改变其活性会影响种子中油脂的组成和积累。

在植物细胞中已发现有 3 种类型的 GPATs,分别定位在质体 (包括叶绿体)、内质网和线粒体中<sup>[1-3]</sup>。其中质体/叶绿体中的 GPATs 是可溶性蛋白,通过影响叶绿体膜脂分子的饱和度而与植物的耐冷性密切相关<sup>[1,4-7]</sup>。分布于内质网和线粒体中的 GPATs 则属于膜结合型蛋白,其中前者参与种子中 TAGs 的生物合成,从而影响种子油份的积累<sup>[2]</sup>。

拟南芥种子中 TAGs 的含量高达 30% ~ 40%,

为高油份植物<sup>[8]</sup>。目前在其基因组中共鉴定出 9 个编码膜结合型 GPAT 的基因<sup>[2-3]</sup>,其中 *AtGPAT1* 主要与花粉发育和种子油份的组成有关<sup>[2]</sup>, *AtGPAT4*、*AtGPAT5* 和 *AtGPAT8* 主要参与软木脂或角质的合成<sup>[9-10]</sup>,其余几个基因的功能尚未见报道。*AtGPAT9* 与其他 8 个拟南芥 GPAT 蛋白的同源性很低 (3% 的一致性和 17% 的相似性),而与哺乳动物的 MmGPAT3 具有较高同源性;已证明后者定位于内质网,在脂肪细胞储藏性 TAGs 的合成中起重要作用<sup>[3,11-12]</sup>。此外,还发现 *AtGPAT9* 在拟南芥种胚发生期表达量显著上调,其编码蛋白也定位于内质网;来自不同植物的 GPAT9 蛋白在序列上高度保守,暗示其在脂类代谢中起到重要作用。这些证据均表明 *AtGPAT9* 可能有着与 MmGPAT3 类似的生理功能,在种子发育期参与储藏性油脂的合成<sup>[3]</sup>,但至今尚未见到关于其功能验证的报道。

大豆是重要油料作物,其种子中 TAGs 的含量为 18% ~ 21%,有待进一步提高<sup>[13]</sup>。本研究克隆了

收稿日期:2012-07-25

基金项目:国家转基因生物新品种培育科技重大专项(2009ZX080042009B)。

第一作者简介:吴兴(1987-),男,在读硕士,研究方向为植物分子生物学。E-mail:daoqiwu2006@126.com。

通讯作者:王茅雁(1961-),女,教授,从事植物抗逆性和基因工程研究。E-mail:wangmaoyan@163.com

拟南芥 *AtGPAT9* 基因的编码区 cDNA,并将其构建到植物表达载体上,然后通过农杆菌介导的子叶节法对大豆品种东农 54 进行了转化,旨在为验证该基因的功能和获得油分含量提高的转基因大豆材料奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 拟南芥 cDNA 的合成

将野生型拟南芥(Ecotype Columbia 0)培养 10 ~ 15 d,取其幼叶用热酚法提取总 RNA,然后用 M-MLV 逆转录酶(Promega 公司)合成 cDNA 第一链。

### 1.2 基因克隆

根据已报道的 *AtGPAT9* 登录号(Accession No. FJ479752)从 GenBank 数据库中获取全长 cDNA 序列,在其 UTR 区设计正向引物 5'-GAAGATCTCGACGTAAGCTATGAGCAGT-3'(加 *Bgl* II 切点)和反向引物 5'-TAGGTCACCATCTTTACATTCACCTTCTCT-3'(加 *BstE* II 切点),用上述 cDNA 做模板进行 PCR 扩增。扩增体系总体积为 25  $\mu$ L,含 10  $\times$  PCR buffer 2.5  $\mu$ L,10 mmol $\cdot$ L<sup>-1</sup> dNTP mix 0.5  $\mu$ L,上下游引物各 0.5  $\mu$ L(10  $\mu$ mol $\cdot$ L<sup>-1</sup>),cDNA 2.5  $\mu$ L,*rTaq* 酶(5 U $\cdot$  $\mu$ L<sup>-1</sup>,博日公司)0.25  $\mu$ L,ddH<sub>2</sub>O 18.25  $\mu$ L。反应程序为:94 $^{\circ}$ C 3 min;94 $^{\circ}$ C 30 s,60 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 30 s,32 个循环;72 $^{\circ}$ C 10 min。将 PCR 产物进行电泳,回收目的片段与 pMD19-T 载体(TaKaRa 公司)连接,然后转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$ ,将菌落 PCR 鉴定为阳性的克隆送北京华大基因中心测序。

### 1.3 植物表达载体构建

用限制酶 *Bgl* II 和 *BstE* II 将 pMD19-T-*AtGPAT9* 和 pCAMBIA 3301(p3301)质粒 DNA 进行双酶切,分别回收目的基因 cDNA 和载体片段,然后用 T4 DNA 连接酶进行连接并转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$  感受态细胞。挑取单菌落摇菌,用 *AtGPAT9* 特异性引物进行菌落 PCR 鉴定(方法同 1.2),将阳性克隆用碱裂解法提取质粒 DNA,然后用 *Bgl* II 和 *BstE* II 进行酶切鉴定。

### 1.4 农杆菌的转化

制备根癌农杆菌 EHA105 感受态细胞,取 1  $\mu$ g 构建好的表达载体质粒 DNA 用冻融法对其进行转化,挑取单菌落摇菌,用 *AtGPAT9* 特异性引物进行菌落 PCR 鉴定(方法同 1.2),阳性克隆用于转化大豆。

### 1.5 大豆转化菌液的制备

将农杆菌阳性克隆在 YEB 液体培养基(加 Kan 至终浓度为 100 mg $\cdot$ L<sup>-1</sup>)中于 28 $^{\circ}$ C 摇菌,当 OD<sub>650</sub> 达到 0.4 ~ 0.7 时将菌液在 3 500 r $\cdot$ min<sup>-1</sup> 离心 15 min

集菌,用 B5 液体培养基(含 1.7 mg $\cdot$ L<sup>-1</sup> 6-BA 和 0.25 mg $\cdot$ L<sup>-1</sup> GA3)重悬菌体至 OD<sub>650</sub> 为 0.6,用于转化大豆。

### 1.6 大豆的遗传转化

按照张展元的子叶节法([www.plantsci.missouri.edu/mugtcf](http://www.plantsci.missouri.edu/mugtcf))将大豆品种东农 54 的种子(东北农业大学朱延明教授提供)用 3% 的 NaClO 灭菌,接种于 B5 基本培养基上于 25 $^{\circ}$ C 培养 5 ~ 6 d(每天 16 h 光照、8 h 黑暗);用手术刀切除下胚轴,保留 2 ~ 3 mm 长的子叶节,然后沿着下胚轴将种子纵向切为两半,刮掉顶芽,在子叶节处纵向平行划伤 7 ~ 8 刀(沾有制备好的菌液),刀口深约 0.5 mm,长约 3 ~ 4 mm;将划伤的子叶置于农杆菌转化菌液中侵染 25 ~ 30 min;用无菌滤纸吸掉子叶上的多余菌液,腹面向下置于铺有一层滤纸的 B5 固体共培养基(含 6-BA 1.7 mg $\cdot$ L<sup>-1</sup>, GA3 0.25 mg $\cdot$ L<sup>-1</sup>)上,于 24 $^{\circ}$ C、每天 16 h 光照和 8 h 黑暗条件下共培养 5 d;在含有 6-BA(1.7 mg $\cdot$ L<sup>-1</sup>)的 B5 芽诱导培养基上培养 2 周,然后继代至含有筛选剂 PPT(5 mg $\cdot$ L<sup>-1</sup>)的芽诱导培养基上进行抗性芽的筛选鉴定;筛选培养 2 ~ 3 次后,将外植体大子叶切除,并在接触培养基的位置切出新的切口,转接至芽伸长培养基(含 IAA 0.1 mg $\cdot$ L<sup>-1</sup>, GA3 0.5 mg $\cdot$ L<sup>-1</sup>, Zeatin-R 1.0 mg $\cdot$ L<sup>-1</sup>, PPT 3 mg $\cdot$ L<sup>-1</sup>)上继续培养;芽伸长继代约 3 次之后,当抗性芽伸长至 2 ~ 3 cm 时将其从基部切下,将有切口的植物学下端在 IBA 溶液(1.0 mg $\cdot$ mL<sup>-1</sup>)中浸没 3 min,然后插入 B5 培养基中进行生根培养;再生苗长出 3 ~ 5 个侧根,且根长达到 5 cm 左右时进行炼苗,然后移栽到营养土:蛭石为 1:1 的花盆中生长。

## 2 结果与分析

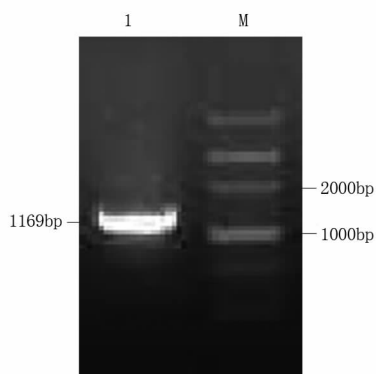
### 2.1 *AtGPAT9* cDNA 的克隆

取拟南芥幼苗叶片提取总 RNA(图略),然后通过反转录合成 cDNA,用 RT-PCR 方法扩增 *AtGPAT9* 的编码区 cDNA,得到与预期大小 1 169 bp 相近的目的条带(图 1)。将该条带回收后连接到克隆载体并转化大肠杆菌,经菌落 PCR 鉴定获得阳性克隆(图略)并进行测序验证,证明获得目的片段。该基因的 cDNA 编码区由 1 131 bp 组成,推测其蛋白产物含 376 aa,分子质量为 43.01 kD,等电点为 8.66。

### 2.2 *AtGPAT9* 植物表达载体构建

将 *AtGPAT9* 编码区 cDNA 片段从克隆载体上酶切下来,定向连接到植物表达载体 p3301 的 35S 启动子之后(图 2),然后转化大肠杆菌,经菌落 PCR 鉴定获得阳性克隆(图略)。进一步将阳性克隆进

行质粒酶切鉴定,证明表达载体构建成功(图3),并命名为 p3301-*AtGPAT9*。



M:DL3000 DNA Marker;1:RT-PCR 扩增产物  
M:DL3000 DNA Marker;1:RT-PCR product

图1 *AtGPAT9* RT-PCR 扩增图谱

Fig.1 Amplification pattern of *AtGPAT9* by RT-PCR

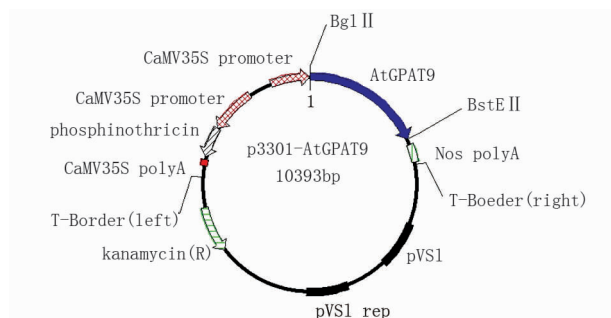
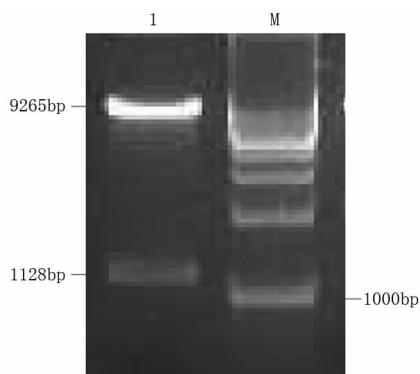


图2 p3301-*AtGPAT9* 载体示意图

Fig.2 Sketch map of vector p3301-*AtGPAT9*



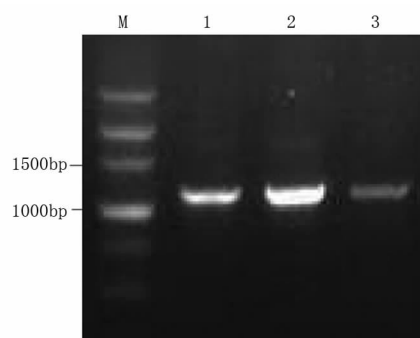
M:DL3000 DNA Marker;1:质粒 DNA 双酶切  
M:DL3000 DNA Marker;1:Double enzyme digestion of plasmid DNA

图3 p3301-*AtGPAT9* 质粒酶切鉴定图谱

Fig.3 Restriction analysis pattern of vector p3301-*AtGPAT9*

### 2.3 表达载体转化农杆菌

目前大豆的遗传转化主要通过农杆菌介导的子叶节法,为此用构建好的表达载体质粒 DNA 转化根癌农杆菌 EHA105,然后进行了菌落 PCR 鉴定,获得阳性克隆(图4),证明农杆菌转化成功,可进一步用于转化大豆。



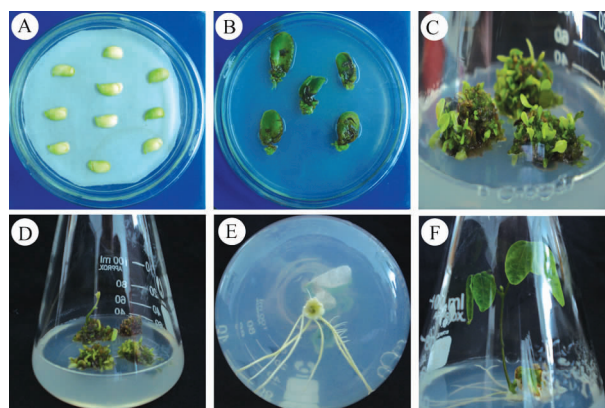
M:DL3000 DNA Marker;1~3:3 个单克隆  
M:DL3000 DNA Marker;1-3:3 single clones

图4 p3301-*AtGPAT9* 转化 EHA105 菌落 PCR 鉴定图谱

Fig.4 Identification of the transformed EHA105 with p3301-*AtGPAT9* vector by colony PCR

### 2.4 大豆转化及抗性再生植株的获得

用手术刀划伤大豆无菌苗的子叶节,置于农杆菌转化菌液中侵染 25 ~ 30 min,然后接种于共培养基中培养 5 d,以促使目的基因随农杆菌 T-DNA 转入大豆核基因组中。接着将子叶外植体转接到芽诱导培养基中继代培养 2 ~ 3 次。为了利于不定芽的诱导,在第一次芽诱导培养基中不添加抗性筛选剂 PPT,待子叶节处有丛生绿芽长出后(通常需 14 d)再进行抗性筛选。一般经过连续 2 次筛选后大部分绿芽变黄枯死,存活下来的少数绿芽被转接到含 PPT 的芽伸长培养基上继续培养。当绿芽长到 2 ~ 3 cm 高时将其移栽到 B5 基本培养基上培养,大约两周长出 不定根,获得抗 PPT 的再生植株(图5)。试验共进行了 2 次大豆转化,合计约 300 个子叶节;其绿芽诱导率在 90% 左右,每块子叶节上绿



A:共培养;B:不定芽诱导;C:不定芽抗性筛选;D:芽伸长培养;E和F:生根培养

A:Co-culture;B:Induction of adventitious buds;C:Screening of resistant buds;D:Shoot elongation culture;E and F:Rooting culture

图5 大豆子叶节转化获得 PPT 抗性再生植株  
Fig.5 Transformation of soybean cotyledon nodes and the PPT-resistant plantlet

芽的数目为 2~9 个,但经 PPT 筛选后最终只有少数绿芽能够存活并伸长为有效芽;绿芽生根率在 80% 以上,目前正在进行抗性再生植株的炼苗移栽工作。

### 3 讨 论

在发育的种子中,储藏性油脂 TAGs 的合成是其前体物甘油-3-磷酸(Glycerol-3-phosphate, Gly3P)被脂酰辅酶 A(Acyl-CoA)连续酰基化的过程,大致可分为四步反应:(1)在 GPATs(主要是内质网中表达的膜结合型)的催化下将脂酰辅酶 A 中的脂肪酰基转移到甘油-3-磷酸的 sn-1 位,形成溶血磷脂酸 LPA,这是 TAGs 生物合成的起始和限速步骤;(2)在 LPA 酰基转移酶(Lysophosphatidate acyltransferases, LPAATs)的催化下将 LPA 的 sn-2 位酰基化而形成磷脂酸(Phosphatidic acid/phosphatidate, PA);(3)在 PA 磷酸酯酶(Phosphatidate phosphatases, PAPs)的催化下将 PA 脱磷酸化而形成二酰基甘油(Diacylglycerol, DAG),它是 TAGs 合成的直接前体;(4)在 DAG 酰基转移酶(Diacylglycerol acyltransferases, DGATs)的催化下使 DAG 的 sn-3 位发生酰化作用,从而形成 TAG<sup>[14-15]</sup>。可见,GPATs、LPAATs、PAPs 和 DGATs 几种酶在 TAGs 的生物合成中起着关键作用,可作为基因工程操作的靶标。

前人将大肠杆菌和红花质体中表达的 *GPAT* 基因转入拟南芥,结果使种子含油量增加 10%~21%<sup>[16]</sup>。将酵母的 *LPAAT* 基因在油菜和拟南芥中过量表达,也可显著提高种子的含油量<sup>[17]</sup>,转基因油菜在大田试验中含油量可提高 10%<sup>[18]</sup>。将酵母、拟南芥和旱金莲等植物的 *DGAT* 基因在烟草、拟南芥和油菜中过量表达,可使种子中 TAGs 的含量增加 10%~70%<sup>[19-22]</sup>。但至今尚未见到将内质网上表达的膜结合型 *GPAT* 基因转入植物,以增加种子含油量的报道。目前主要在哺乳动物中鉴定出此类基因,其中 *MmGPAT3* 在脂肪细胞 TAGs 的合成中起关键作用,而从植物中鉴定此类基因鲜有报道。2009 年, Gidda 等首次在高油份植物拟南芥中鉴定出 *AtGPAT9* 基因,因其编码蛋白与哺乳动物 *MmGPAT3* 同源性最高,并且定位于内质网、主要在种胚发生发育时期高表达,故此推测其在种子储藏性 TAGs 的合成中起重要作用<sup>[3]</sup>,但至今尚未见到关于其功能验证的报道。本论文克隆了该基因的编码区 cDNA,并将其转化大豆,获得一批抗筛选剂 PPT 的绿芽和再生植株。期望能验证该基因的功能并获得油份含量提高的转基因大豆材料。

### 参考文献

- [1] Murata N, Tasaka Y. Glycerol-3-phosphate acyltransferase in plants[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Lipids and Lipid*, 1997, 1348:10-16.
- [2] Zheng Z, Xia Q, Dauk M, et al. *Arabidopsis* AtGPAT1, a member of the membrane-bound glycerol-3-phosphate acyltransferase gene family, is essential for tapetum differentiation and male fertility [J]. *The Plant Cell*, 2003, 15:1872-1887.
- [3] Gidda S K, Shockey J M, Rothstein S J, et al. *Arabidopsis thaliana* GPAT8 and GPAT9 are localized to the ER and possess distinct ER retrieval signals; Functional divergence of the dilysine ER retrieval motif in plant cells[J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2009; 47: 867-879.
- [4] Yokoi S, Higashi S I, Kishitani S, et al. Introduction of the cDNA for *Arabidopsis* glycerol-3-phosphate acyltransferase (GPAT) confers unsaturation of fatty acids and chilling tolerance of photosynthesis on rice[J]. *Molecular Breeding*, 1998, 4: 269-275.
- [5] Ariizumi T, Kishitani S, Inatsugi R, et al. An increase in unsaturation of fatty acids in phosphatidylglycerol from leaves improves the rates of photosynthesis and growth at low temperatures in transgenic rice seedlings[J]. *Plant and Cell Physiology*, 2002, 43(7):751-758.
- [6] Sui N, Li M, Zhao S J, et al. Overexpression of glycerol-3-phosphate acyltransferase gene improves chilling tolerance in tomato [J]. *Planta*, 2007, 226:1097-1108.
- [7] Zhu S Q, Zhao H, Zhou R, et al. Substrate selectivity of glycerol-3-phosphate acyl transferase in rice[J]. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2009, 51:1040-1049.
- [8] 赵欢欢. 拟南芥 *AtLACS9* 和 *AtGPAT9* 基因的克隆及大豆的遗传转化[D]. 呼和浩特:内蒙古农业大学, 2010:17-18. (Cloning of *AtLACS9* and *AtGPAT9* from *Arabidopsis* and the transformation of soybean[D]. Hohhot: Inner Mongolia Agricultural University, 2010:17-33.)
- [9] Beisson F, Li Y, Bonaventure G, et al. The acyltransferase GPAT5 is required for the synthesis of suberin in seed coat and root of *Arabidopsis*[J]. *The Plant Cell*, 2007, 19:351-368.
- [10] Li Y, Beisson F, Koo A J K, et al. Identification of acyltransferases required for cutin biosynthesis and production of cutin with suberin-like monomers[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 2007, 104:18339-18344.
- [11] Gimeno R E, Cao J. Thematic review series: glycerolipids. Mammalian glycerol-3-phosphate acyltransferases: new genes for an old activity [J]. *Journal of Lipid Research*, 2008, 49: 2079-2088.
- [12] Shan D, Li J, Wu L, et al. GPAT3 and GPAT4 are regulated by insulin-stimulated phosphorylation and play distinct roles in adipogenesis[J]. *The Journal of Lipid Research*, 2010, 51: 1971-1981.
- [13] Hajdich M, Ganapathy A, Stein J W, et al. A systematic proteomic study of seed filling in soybean. Establishment of high-resolution two-dimensional reference maps, expression profiles, and an interactive proteome database[J]. *Plant Physiology*, 2005, 137:1397-1419.

(下转第 886 页)

在同样的荧光强度下,利用较高的退火温度进行PCR反应可获得较好的分型结果。

## 参考文献

- [1] Zhu Y, Song Q, Hyten D, et al. Single-nucleotide polymorphisms in soybean[J]. *Genetics*, 2003, 163(3): 1123-1134.
- [2] Gundry C, Vandersteen J, Reed G, et al. Amplicon melting analysis with labeled primers: a closed-tube method for differentiating homozygotes and heterozygotes[J]. *Journal of the Chinese Chemical Society*, 2003, 49(3): 396-406.
- [3] Montgomery J, Wittwer C T, Palais R, et al. Simultaneous mutation scanning and genotyping by high-resolution DNA melting analysis[J]. *Nature Protocols*, 2007, 2: 59-66.
- [4] Li J, Wang X, Dong R, et al. Evaluation of high-resolution melting for gene mapping in rice[J]. *Plant Molecular Biology Reporter*, 2011, 29: 979-985.
- [5] Hofinger B J, Jing H C, Hammond-Kosack K E, et al. High-resolution melting analysis of cDNA-derived PCR amplicons for rapid and cost-effective identification of novel alleles in barley[J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 2009, 119: 851-865.
- [6] Han Y, Khu D M, Monteros M J, et al. High-resolution melting analysis for SNP genotyping and mapping in tetraploid alfalfa (*Medicago sativa* L.)[J]. *Molecular Breeding*, 2012, 29: 489-501.
- [7] 朱振雷, 束永俊, 李勇, 等. 大豆种子 DNA 快速提取方法的改良及应用[J]. *东北农业大学学报*, 2009, 40(10): 60-63. (Zhu Z L, Shu Y J, Li Y, et al. Improvement and application of the rapid DNA extraction method from soybean seeds[J]. *Journal of North-east Agricultural University*, 2009, 40(10): 60-63.)
- [8] 尤崇革, 李玉民, 马克君, 等. 基于高分辨熔解技术进行单核苷酸多态性基因分型的方法学评价[J]. *中华临床医师杂志*, 2012, 6(7): 1786-1790. (You C G, Li Y M, Ma K J, et al. Evaluation on the methodology of SNP genotyping based on high resolution melting[J]. *Chinese Journal of Clinicians*, 2012, 6(7): 1786-1790.)
- [9] 白牡丹, 王彩虹, 殷豪, 等. 苹果不同 HRM 反应体系分析效果评价[J]. *分子植物育种*, 2012, 10(1): 115-120. (Bai M D, Wang C X, Yin H, et al. Evaluation of different reaction systems for HRM analysis in apple[J]. *Molecular Plant Breeding*, 2012, 10(1): 115-120.)
- [10] 焦丽, 刘相国, 王虎义, 等. 高分辨率溶解曲线分析技术在大豆 Ecotilling 中的应用[J]. *大豆科学*, 2011, 30(5): 843-846. (Jiao L, Liu X G, Wang H Y, et al. Application of high resolution melting analysis in soybean ecotilling[J]. *Soybean Science*, 2011, 30(5): 843-846.)
- [11] 欧展辉. HRM 分析检测单基因遗传病点突变及  $\beta$ -地中海贫血的临床检测[D]. 广州医学院第三附属医院, 2011. (Ou Z H. Screening of gene mutations in hereditary disease by HRM and detecting  $\beta$ -thalassemia in clinic[D]. Third Affiliated Hospital of Guangzhou Medical College, 2011.)
- [12] Reed G H, Wittwer C T. Sensitivity and specificity of single-nucleotide polymorphism scanning by high-resolution melting analysis[J]. *Clinical Chemistry*, 2004, 50(10): 1748-1754.
- [13] Hofinger B J, Jing H C, Hammond-Kosack K E, et al. High-resolution melting analysis of cDNA-derived PCR amplicons for rapid and cost-effective identification of novel alleles in barley[J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 2009, 119(5): 851-865.
- [14] Ye M H, Chen J L, Zhao G P, et al. Sensitivity and specificity of high-resolution melting analysis in screening unknown SNPs and genotyping a known mutation[J]. *Animal Science Papers and Reports*, 2010, 28(2): 161-170.
- [15] Liew M, Seipp M, Durtschi J, et al. Closed-tube SNP genotyping without labeled probes/a comparison between unlabeled probe and amplicon melting[J]. *American Journal of Clinical Pathology*, 2007, 127(3): 341-348.
- [16] 兰青阔, 张桂华, 王永, 等. 基于高分辨率熔解曲线技术快速筛选黄瓜 SNP[J]. *分子植物育种*, 2011, 9(5): 642-647. (Lan Q K, Zhang G H, Wang Y, et al. Discovery of single nucleotide polymorphism in cucumber based on high resolution melting analysis[J]. *Molecular Plant Breeding*, 2011, 9(5): 642-647.)
- [17] 刘阳, 杨淑霞, 李敏惠, 等. 引物浓度与退火温度不当导致巢式 PCR 非特异性扩增[J]. *成都医学院学报*, 2008, 3(2): 111-114. (Liu Y, Yang S X, Li H M, et al. Improper primer concentration and annealing temperature may cause nonspecific amplification in nested PCR[J]. *Journal of Chengdu Medical College*, 2008, 3(2): 111-114.)
- [18] Taylor D C, Katavic V, Zou J T, et al. Field testing of transgenic rapeseed cv. Hero transformed with a yeast sn-2 acyltransferase results in increased oil content, erucic acid content and seed yield[J]. *Molecular Breeding*, 2002, 8: 317-322.
- [19] Bouvier-Navé P, Benveniste P, Oelkers P, et al. Expression in yeast and tobacco of plant cDNAs encoding acyl CoA:diacylglycerol acyltransferase[J]. *European Journal of Biochemistry*, 2000, 267: 85-96.
- [20] Jako C, Kumar A, Wei Y, et al. Seed-specific over-expression of an *Arabidopsis* cDNA encoding a diacylglycerol acyltransferase enhances seed oil content and seed weight[J]. *Plant Physiology*, 2001, 126: 861-874.
- [21] Weselake R J, Shah S, Tang M, et al. Metabolic control analysis is helpful for informed genetic manipulation of oilseed rape (*Brassica napus*) to increase seed oil content[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2008, 59: 3543-3549.
- [22] Xu J, Francis T, Mietkiewska E, et al. Cloning and characterization of an acyl-CoA-dependent diacylglycerol acyltransferase 1 (DGAT1) gene from *Tropaeolum majus*, and a study of the functional motifs of the DGAT protein using site-directed mutagenesis to modify enzyme activity and oil content[J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2008, 6: 799-818.

(上接第 881 页)