

Δ^{12} -脂肪酸脱氢酶基因在大肠杆菌中的表达*

李明春¹ 李 航¹ 张 琦¹ 张 飏² 邢来君^{1**}

(南开大学微生物系 天津 300071)¹ (天津中医学院 天津 300073)²

摘要: 把高山被孢霉 (*Mortierella alpina*) 和深黄被孢霉 (*Mortierella isabellina*) 的 Δ^{12} -脂肪酸脱氢酶基因亚克隆到大肠杆菌表达载体 pET21a 中, 获得重组表达载体 pMACL12 和 pMICL12, 并用氯化钙方法将重组表达载体转化到大肠杆菌 BL21 (DE3) 中。筛选阳性克隆进行培养, 然后分离其细胞膜蛋白, 并构建体外表达体系, 同时加入外源性底物油酸进行表达。经气相色谱 (GC) 分析表明, 分别有 17.87% 和 17.60% 的油酸转化为亚油酸。

关键词: Δ^{12} -脂肪酸脱氢酶, 亚油酸, 大肠杆菌, 被孢霉

中图分类号: Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2004) 04-0043-06

Heterologous Expression of *Mortierella alpina* and *Mortierella isabellina* Δ^{12} -Fatty Acid Desaturase Gene in *Escherichia coli**

LI Ming-Chun¹ LI Hang¹ ZHANG Qi¹ ZHANG Biao² XING Lai-Jun^{1**}

(Department of Microbiology, Nankai University, Tianjin 300071)¹

(Tianjin Traditional Chinese Medicine College, Tianjin 300193)²

Abstract: Δ^{12} -fatty acid desaturase genes (*D12D*) from *Mortierella alpina* and *Mortierella isabellina* were subcloned into expression vector pET21a to generate recombinant plasmid pMACL12 and pMICL12, which were subsequently transformed into *Escherichia coli* strain BL21 (DE3) by CaCl_2 method for expression. The resultant transformants *Escherichia coli* pMACL12 and pMICL12 were cultivated and induced by IPTG. The induced cells were further used to isolate membrane protein to form a reaction system in vitro in the presence of oleic acid as substrate. Total fatty acids was extracted from the system and esterified. The resultant fatty acid methyl esters (FAME) were analysed by gas chromatography (GC). A novel peak corresponding to linoleic acid methyl ester standards was detected with the same retention time, which was absent in the cell transformed with empty vector. The percentage of this new fatty acid to total fatty acids was 17.87% and 17.60% respectively for the transformants *Escherichia coli* pMACL12 and pMICL12. The results demonstrated that the transgenic products exhibited Δ^{12} -fatty-acid desaturase activity under appropriate temperature and media conditions in vitro. It is the first report about the expression of *M. isabellina* *D12D* gene in *Escherichia coli* in the world.

Key words: Δ^{12} -fatty acid desaturase gene, Linoleic acid, *Escherichia coli*, *Mortierella*

多不饱和脂肪酸及其衍生物在大脑发育、视觉、过敏反映及心血管运动等一系列生理功能中发挥重要作用, 同时也是众多生物信号物质的前体^[1,2]。由于人类和哺乳动物缺少 Δ^{12} -脂肪酸脱氢酶, 而不能将油酸 (oleic acid, C18: 1 Δ^9) 脱氢形成亚油酸 (linoleic acid, C18: 2 $\Delta^{9,12}$), 必需从外界获取亚油酸, 因此亚油酸被称为必需脂肪酸。 Δ^{12} -脂肪酸脱氢酶 (Δ^{12} -fatty acid desaturase, D12D) 是亚油酸合成的关键酶, 其作用是在油

* 国家自然科学基金资助项目 (No.30200176)

Project Granted by Chinese National Natural Science Fund (No.30200176)

天津市自然科学基金重点项目 (No.013802511)

** 联系人 Tel: 022-23508506, E-mail: xinglaij@eyou.com

收稿日期: 2003-09-28, 修回日期: 2003-11-12

酸的 Δ^{12} 位上加上一个双键形成亚油酸。 Δ^{12} -脂肪酸脱氢酶最先在蓝细菌中发现,但在植物中的 Δ^{12} -脂肪酸脱氢酶得到了深入的研究,其在质膜和内质网上通过不同的途径进行脂肪酸脱氢^[3~5]。改变膜脂中多不饱和脂肪酸的含量是一种生物体对温度压力耐受的关键因素,膜脂中多不饱和脂肪酸的含量是影响膜生理学的重要因素,生物体内脂肪酸脱氢酶可在膜脂中引入双键补偿由于温度下降造成的膜脂分子运动和膜流动性的下降^[2];因此,研究 Δ^{12} -脂肪酸脱氢酶的生物学功能以及其对生物体适应包括温度等各种极端环境的机理显得十分重要。然而 Δ^{12} -脂肪酸脱氢酶是一种膜结合蛋白,很难被纯化来进行体外活性的表达研究。

在真菌中,只有包括被孢霉属(*Mortierella*)在内的少数低等真菌具备合成多不饱和脂肪酸的能力,多不饱和脂肪酸是通过整合在内质网上的膜脂肪酸脱氢酶催化脂酰基链连续脱氢形成的^[6]。本室通过 RT-PCR 的方法从高山被孢霉(*Mortierella alpina*) ATCC16266 和深黄被孢霉(*Mortierella isabellina*) M622 中克隆 Δ^{12} -脂肪酸脱氢酶基因(*D12D*)(GenBank Accession Number: AF417244 和 AF417245),将其转入大肠杆菌 BL21 (DE3),通过超离心技术得到含有 Δ^{12} -脂肪酸脱氢酶的膜蛋白,并在体外反应体系证实了其表达活性,为体外研究 Δ^{12} -脂肪酸脱氢酶提供了良好的基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株与质粒:大肠杆菌 DH5 α , 本室保藏;含有深黄被孢霉和高山被孢霉 Δ^{12} -脂肪酸脱氢酶基因的质粒 pTMACLI2 及 pTMICLI2, 本室构建;大肠杆菌 BL21 (DE3) 及表达载体 pET21a, 购自 Novegon 公司。

1.1.2 培养基:大肠杆菌的 LB 培养基见文献[7], M9 培养基见文献[8]。

1.1.3 酶、抗生素及化学试剂:所用的限制性内切酶 *Eco*R I、*Xho* I 购自宝生物公司, T4 DNA 连接酶、氨苄青霉素(贮存液 50 mg/mL, 使用终浓度 60 μ g/mL), 购自华美生物工程公司, 亮抑蛋白酶肽、水解酪蛋白氨基酸、EGTA、IPTG、PCR 用 Taq 酶、dNTP 及回收胶纯化试剂盒, 购自上海 Sangon 公司, 油酸、亚油酸标准品购自 Sigma 公司。

1.2 方法

1.2.1 表达载体的构建:将构建含有高山被孢霉和深黄被孢霉的 *D12D* 基因的质粒 pTMACLI2 和 pTMICLI2 和表达载体 pET21a 分别用 *Eco*R I 和 *Xho* I 双酶切, 回收、连接并转化大肠杆菌 DH5 α 。大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞的制备与转化、载体构建和转化、重组质粒的鉴定均按常规方法^[7]进行, 重组质粒分别命名为 pMACLI2 和 pMICLI2。

1.2.2 大肠杆菌 BL21a 感受态细胞的制备与转化:感受态细胞的制备与重组质粒的转化, 以及阳性克隆的筛选按常规方法^[7]进行。

1.2.3 转化细胞的诱导表达:挑取阳性克隆先在少量 M9 培养基中 37 $^{\circ}$ C 过夜培养, 然后以 1% 接种量接种 M9 培养基扩大培养。当 OD_{600} 达到 0.5 后, 加入终浓度 0.4 mol/L IPTG 诱导 4 h, 离心收集菌体。菌体-70 $^{\circ}$ C 保存备用。

1.2.4 膜蛋白的提取和制备:冷冻的菌体在室温下融化, 悬于 30 mL 缓冲液 A (含有 10 mol/L MgCl₂、50 mol/L MOPS-NaOH、1 mol/L EDTA、10 μ g/mL DNase) 中。450Hz 超声波 4 s 一个循环, 共 40 个循环破碎菌体。5,000 g 离心 10min, 收集未被破碎的菌体和细胞残体, 取上清, 4 $^{\circ}$ C 150,000 g 离心 30 min, 收集膜回溶于 200 μ L 缓冲液 A。

1.2.5 SDS-PAGE 检测:10% 聚丙烯酰胺凝胶电泳, 考马斯亮蓝 R250 染色。

1.2.6 脱氢酶活性的体外测定：向溶于 Buffer A 的膜蛋白中按终浓度 150 mol/L 加入钠盐。加入底物油酸后在 25℃ 水浴摇床培养 30 min，立即以氯仿：甲醇：水（体积比 2：1：2）抽提。以 5% HCl/甲醇进行甲基化，85℃ 处理 2.5 h。加入正己烷回溶。

1.2.7 脂肪酸气相色谱分析：采用文献[9]的方法进行，仪器为岛津 GC-7A，柱子：DEGS 0.32 mm × 30 m，分流比：30：1，柱温：180℃，尾吹：50 mL/min，气化室温度 250℃，检测器：氢火焰离子化检测器。

2 结果

2.1 表达载体的构建

双酶切获得的目的带大小为 1.2 kb，与预期的相符，把载体 pET21a 同样用 *EcoR* I 及 *Xho* I 双酶切，回收后连接，转化大肠杆菌 DH5α，重组质粒构建如图 1。

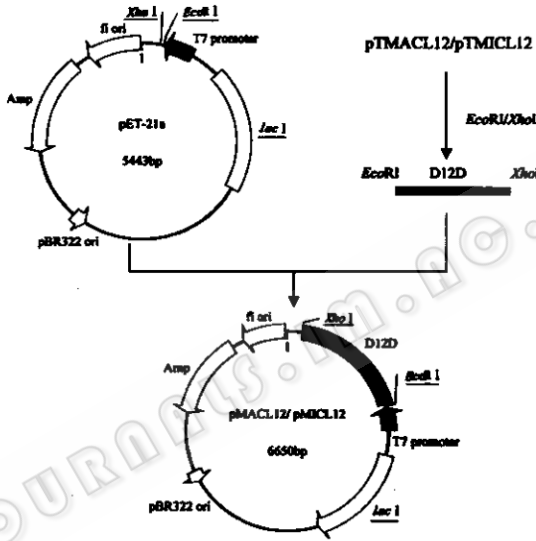


图 1 pMACL12/pMICL12 质粒构建图

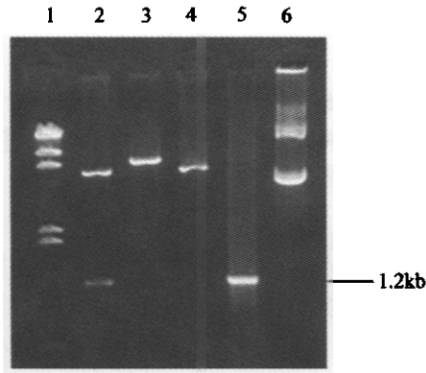


图 2 重组质粒 pMACL12 的酶切鉴定

1 λDNA/*Hind*III marker, 2 pMacL12/*Eco*RI + *Xho*I, 3 pMACL12/*Xho*I, 4 pET21a/*Eco*RI + *Xho*I, 5 D12D PCR 产物, 6 pMACL12

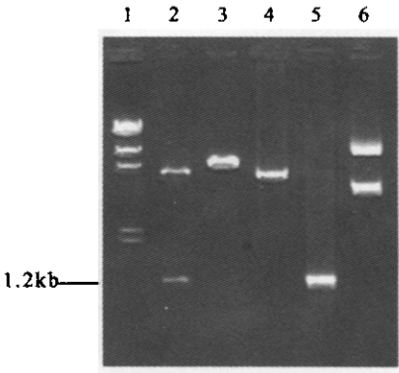


图 3 重组质粒 pMICL12 的酶切鉴定

1 λDNA/*Hind*III marker, 2 pMacL12/*Eco*RI + *Xho*I, 3 pMACL12/*Xho*I, 4 pET21a/*Eco*RI + *Xho*I, 5 D12D PCR 产物, 6 pMACL12

2.2 阳性克隆的筛选

从含 Amp 的 LB 平板上随机挑取转化子, 小量提取质粒, 经酶切和 PCR 鉴定), 筛选到阳性克隆 pMACL12 和 pMICL12。从图 2 和图 3 可以看出, 阳性克隆 pMACL12 和 pMICL12 在双酶切后都产生了两条特异性的带。经与 DNA 分子量标记和其他对照比较, 一条与插入的外源基因 *D12D* 等大, 另一条与双酶切的 pET21a 载体等大, 表明 pMACL12 和 pMICL12 均为正确的重组质粒。

2.3 *D12D* 基因在大肠杆菌中的表达

把重组质粒转化大肠杆菌 BL21, 并在 M9 培养基中培养后以 IPTG 诱导表达, 利用超速离心获得诱导后的细胞膜蛋白, 进行 SDS-PAGE 分析。如图 4 所示, 可以清楚的看出, 大小为 43 kD 左右, 重组质粒 pMACL12 和 pMICL12 转化的 BL21 细胞总蛋白和膜蛋白中均有相同大小特异性带。其中 pMACL12 转化的 BL21 中蛋白表达量占菌体总蛋白 1.09%, 占膜蛋白 3.01%, 而 pMICL12 转化的 BL21 的表达量分别为 1.18% 和 4.03%, 从表达量上来说深黄被孢霉的 *D12D* 基因表达量略高于高山被孢霉的。特异带大小与已报道的 Δ^{12} -脂肪酸脱氢酶分子量相近, 这说明此蛋白可能为 Δ^{12} -脂肪酸脱氢酶, 而且如预期的一样, 定位在细胞的质膜上, 但在超速离心后的可溶性蛋白部分中不存在。

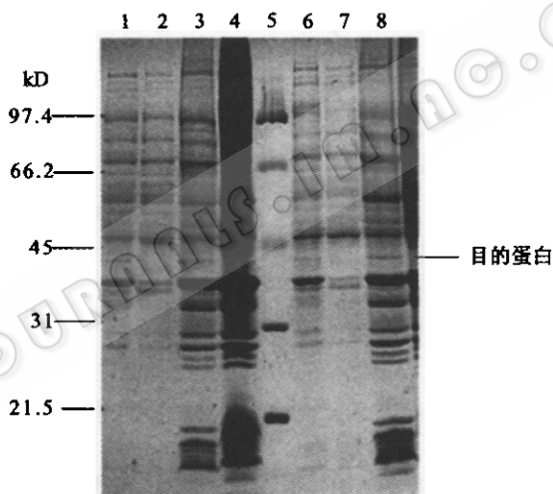


图 4 转化后大肠杆菌膜蛋白的 SDS-PAGE

1 pMACL12 转化 BL21 细胞总蛋白, 2 pMACL12 转化 BL21 细胞超速离心后的可溶性总蛋白, 3 pMACL12 转化 BL21 细胞膜蛋白, 4 BL21 细胞总蛋白, 5 分子量标记, 6 pMICL12 转化 BL21 细胞总蛋白, 7 pMICL12 转化 BL21 细胞超速离心后的可溶性总蛋白, 8 pMICL12 转化 BL21 细胞膜蛋白

2.4 Δ^{12} -脂肪酸脱氢酶活性的体外检测

由于大肠杆菌 BL21 本身并不产生油酸, 所以在 IPTG 诱导后提取的膜蛋白中加入底物, 通过脂肪酸的气相色谱 (GC) 分析, 五个测定样品分别为: 重组质粒 pMACL12 转化的大肠杆菌 BL21、pMICL12 转化的大肠杆菌 BL21、空载体 pET21a 转化的大肠杆菌 BL21、以及油酸和亚油酸甲酯标准品 (图 5)。通过比较可以看出, 含有重组质粒 pMACL12 和 pMICL12 的大肠杆菌的膜蛋白在体外表达体系中出现和亚油酸甲酯标准品

保留时间一致的特殊峰,表明其转基因产物表现出了 Δ^{12} -脂肪酸脱氢酶的活性,分别使外加的油酸中的 17.87% 和 17.60% 转化成了亚油酸,而空载体 pET21a 转化的大肠杆菌 BL21 所得结果和图 5-3 的一致,没有新的特殊峰产生(结果未附)。这些结果也进一步说明了 D12D 基因的表达产物 Δ^{12} -脂肪酸脱氢酶定位在细胞膜上,另一方面证明了此酶在体外环境中的活性。

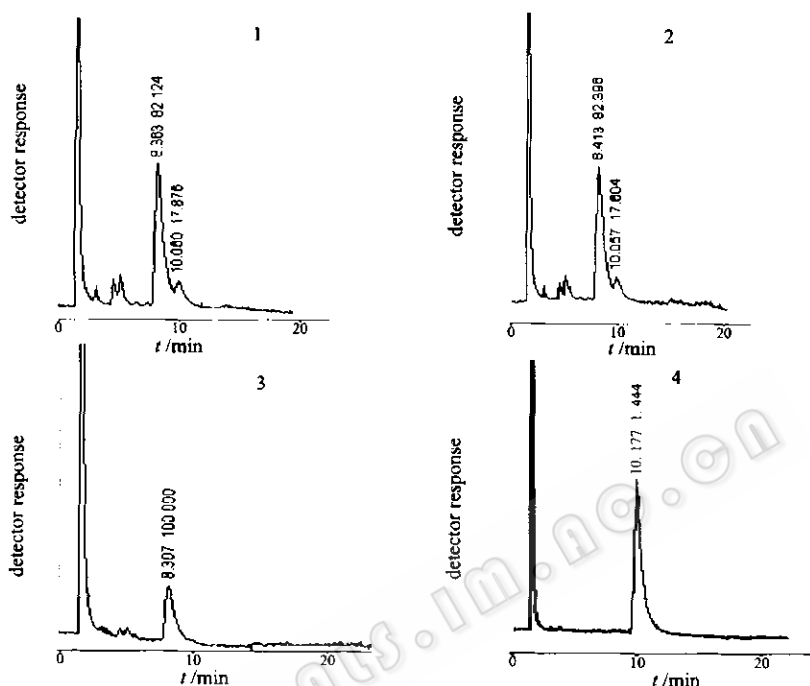


图 5 大肠杆菌膜蛋白在体外反应体系中催化后的脂肪酸含量的气相色谱检测

1 pMAC12 转化 BL21 细胞的膜蛋白反应后的脂肪酸组成, 2 pMIC12 转化 BL21 细胞的膜蛋白反应后的脂肪酸组成, 3 亚油酸, 4 油酸

3 讨论

3.1 表达体系的选择

外源基因在大肠杆菌中的稳定、高效表达受多种因素的影响,包括载体、密码子偏好、mRNA 的稳定性、宿主与培养条件的选择等。

一个好的大肠杆菌表达系统是大肠杆菌高效表达外源蛋白产物的基础,一般选用蛋白酶缺失的菌株作为宿主菌,减少目的产物的降解,选用 *E. coli* BL21 (λ DE3) 作为宿主菌,其具有受启动子 lacUV5 控制的 T7 RNA 聚合酶基因,通过培养基中加入 IPTG 来启动表达。pET 表达系统是在 *E. coli* 中克隆和表达外源蛋白的一个良好系统,目的基因克隆到 pET 上,受噬菌体 T7 强转录和翻译信号控制,表达由宿主细胞提供的 T7 RNA 聚合酶诱导。此外,含目的基因的质粒在转化宿主中具有结构不稳定性 and 分配不稳定性,表达外源基因时可以根据启动子的特性先培养生长菌体再诱导表达外源蛋白。还可以通过培养条件的改变,如不同 IPTG 浓度、温度、pH 值和溶氧量等来调节基因的表达。

3.2 目的蛋白的检测

本实验选用 pET21a 为表达载体, λ DE3 噬菌体溶源化的大肠杆菌 *E. coli* BL21 (DE3) 为宿主菌, 将目的基因克隆在 T7 启动子下游, 同时表达高山被孢霉和深黄被孢霉的 *D12D* 基因。IPTG 的诱导下, 分离其膜蛋白, 经 SDS-PAGE 分析表明, 表达的特异蛋白分子量均为 43 kD, 重组质粒 pMACLI2 和 pMICLI2 转化的大肠杆菌中蛋白表达量分别占膜蛋白的 3.01% 和 4.03%, 占菌体总蛋白 1.09% 和 1.18%。由于脂肪酸脱氢酶本身特殊性质, 其相对含量较低, 也不存在于超速离心后可溶性蛋白部分 (图 4)。此外, 在相继的体外表达中发现, 蛋白活性不易保持, 推测部分原因可能是由于采用体外表达体系检测被孢霉 *D12D* 基因的表达式部分残留蛋白酶或酶的生理条件的改变等因素所致。

3.3 活性分析

将提出的膜蛋白进行体外表达, 验证目的蛋白的功能。结果发现, 高山被孢霉和深黄被孢霉 *D12D* 基因在大肠杆菌中均获得表达, 其中高山被孢霉的 *D12D* 基因在大肠杆菌中催化合成亚油酸的量占膜总脂肪酸的 17.87%, 而深黄被孢霉的占 17.60%, 两者相近。在蛋白合成上, 虽然二者的蛋白量在总蛋白中的百分比相差不多, 但在膜蛋白中, 深黄被孢霉 *D12D* 基因的蛋白表达量的百分比略高于高山被孢霉 *D12D* 基因的 (4.03% 和 3.01%), 因此, 在体外表达体系中, 酶的催化活性方面高山被孢霉 *D12D* 基因产物要高于深黄被孢霉 *D12D* 基因产物。

体外表达时维持酶活性很重要。根据 Δ^{12} -脂肪酸脱氢酶是膜蛋白这一特性, 先分离膜蛋白, 提高目的酶蛋白的含量, 减少可溶性蛋白或其他杂蛋白对目的蛋白活性的影响。在研究中, 蛋白酶抑制子被证明保持脱氢酶活性的作用十分明显, 添加蛋白酶抑制剂, 可以起到延迟酶活迅速丧失的作用, 但是, 试验过程中酶活性仍会随着膜蛋白分离时间的增长和蛋白酶抑制剂的失效而逐渐丧失。在试验过程中还发现, 提取的膜蛋白在不同温度下保存后 Δ^{12} -脂肪酸脱氢酶的活性存在很大差异, 室温下保存 24 h 活性完全丧失, 而 4℃ 下保存同样长的时间仍具有 Δ^{12} -脂肪酸脱氢酶的活性。

同时铁离子的存在也是必要的, 一些研究者发现由于膜结合的脂肪酸脱氢酶的活性中心与铁原子密切相关^[2]。环境中可溶的、处于正确的氧化还原状态的铁原子的存在对 Δ^{12} 脂肪酸脱氢酶活性是必需的, 否则将造成活性的丧失。有关这方面的研究将在以后的工作中进一步证实。

参 考 文 献

- [1] Gunstone F D. Prog Lipid Res, 1992, 31 (2): 145 ~ 161.
- [2] Cho H P, Nakamura M T, Clarke S D. J Biological Chem, 1998, 273: 471 ~ 477.
- [3] Reddy A S, Thomas T L. Nat Biotechnol, 1996, 14: 639 ~ 42.
- [4] Falcone D L, Gibson S G, Lemieux B, et al. Plant Physiol, 1994, 106: 1453 ~ 1459.
- [5] Heppard E P, Kinney A J, Stecca K L, et al. Plant Physiol, 1996, 110: 311 ~ 319.
- [6] Sprecher H. Prog Lipid Res, 1981, 20: 13 ~ 22.
- [7] 萨姆布鲁克 J, 佛里奇 E F, 曼尼阿蒂斯著 T (金冬燕等译). 分子克隆试验指南 (第二版). 北京: 科学出版社, 1993. 463 ~ 468.
- [8] Panpoom S, los A D. Biochimica et Biophysica Acta, 1998, 1390: 323 ~ 332.
- [9] 刘 莉, 李明春, 胡国武, 等. 生物工程学报, 2001, 17 (2): 161 ~ 164.