



研究报告

纯化标签的不同位置对 $\Delta 6$ 脂肪酸脱饱和酶异源表达的影响

崔洁 陈海琴* 唐鑫 张灏 陈永泉 陈卫

江南大学食品学院 江苏 无锡 214122

摘要:【背景】目前利用酵母表达系统已鉴定了多种物种中的 $\Delta 6$ 脂肪酸脱饱和酶(FADS6)。由于 FADS6 是一种具有多个跨膜螺旋的膜蛋白, 使得其大量表达和纯化具有挑战性。【目的】探索 FADS6 的高效表达策略, 研究纯化标签添加的位置对高山被孢霉 FADS6I (*MaFADS6I*) 重组表达效率的影响。【方法】在毕赤酵母表达载体中插入串联亲和和标签 HRV 3C-Protein A-His, 利用改造后的载体构建带有 N 端或 C 端标签的 *MaFADS6I* 表达载体; 通过电转化获得毕赤酵母重组表达菌株; 利用斑点印迹杂交(Dot Blot)、聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis, SDS-PAGE)和免疫印迹(Western Blot)分析重组蛋白的表达水平, 并利用气相色谱-质谱(Gas Chromatography-Mass Spectrometry, GC-MS)分析检测 *MaFADS6I* 催化生成的脂肪酸。【结果】通过大量的毕赤酵母转化子筛选, 最终获得高效表达 *MaFADS6I* 的毕赤酵母重组菌, 证实各转化子的表达具有差异性, *MaFADS6I* 的 C 端带有纯化标签较 N 端更有利于表达。【结论】在 *MaFADS6I* 的 C 端添加纯化标签比在 N 端添加更有利于该蛋白在酵母系统中的表达以及底物的转化, 为进一步探究 FADS6 高效表达和结构功能奠定了基础。

关键词: ω -3 多不饱和脂肪酸, $\Delta 6$ 脂肪酸脱饱和酶, 毕赤酵母表达系统, 纯化标签

Effects of purification tag positions on the heterologous expression of $\Delta 6$ fatty acid desaturase

CUI Jie CHEN Haiqin* TANG Xin ZHANG Hao CHEN Yongquan CHEN Wei

School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi, Jiangsu 214122, China

Abstract: [Background] At present, the characteristics of $\Delta 6$ fatty acid desaturase (FADS6) from various species have been identified through the yeast expression system. Since FADS6 is a multiple transmembrane protein, it is challenging to achieve large-scale expression and purification. [Objective] To construct a high-efficiency expression strategy of FADS6, the present study will analyze the influence of the location of the purification tag on heterologous expression of *Mortierella alpina* FADS6I (*MaFADS6I*). [Methods] Tandem affinity tag HRV 3C-Protein A-His was added into the *Pichia pastoris* vector, followed by the insertion of *MaFADS6I* sequence to construct recombinant vectors with the N-terminal or C-terminal tag, respectively. Recombinants were obtained through electro-transformation. The protein expression level of *MaFADS6I* in recombinant strains was analyzed by dot blot hybridization (dot blot), polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and Western blot, and the fatty acids catalyzed by

Foundation item: National Natural Science Foundation of China (31722041)

*Corresponding author: E-mail: haiqinchen@jiangnan.edu.cn

Received: 22-10-2020; **Accepted:** 22-02-2021; **Published online:** 25-03-2021

基金项目: 国家自然科学基金(31722041)

*通信作者: E-mail: haiqinchen@jiangnan.edu.cn

收稿日期: 2020-10-22; **接受日期:** 2021-02-22; **网络首发日期:** 2021-03-25

MaFADS6I was detected by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). **[Results]** Transformants with different *MaFADS6I* expression levels and catalytic activities were obtained. Compared with the N-terminal tag, the C-terminal tag was more conducive for the expression and catalytic activity of *MaFADS6I*. **[Conclusion]** *MaFADS6I* with C-terminal purification tag is more conducive to the expression of the protein in the yeast system and the conversion of substrates than with N-terminal tag, providing a foundation for the high-efficiency expression and structural and functional studies of FADS6.

Keywords: ω -3 polyunsaturated fatty acids, $\Delta 6$ fatty acid desaturase, *Pichia pastoris* expression system, purification tag

脂肪酸脱饱和酶是生物体合成多不饱和脂肪酸(Polyunsaturated Fatty Acid, PUFAs)的主导酶,这是一类含非血红素二铁的酶家族,其中 $\Delta 6$ 脂肪酸脱饱和酶($\Delta 6$ Fatty Acid Desaturase, FADS6)作为 PUFAs 生成途径中的第一个脱饱和酶,可同时催化 ω -6 系的亚油酸(Linoleic Acid, LA, C18:2 ^{$\Delta 9,12$})生成同系的 γ -亚麻酸(γ -Linolenic Acid, GLA, C18:3 ^{$\Delta 6,9,12$})和 ω -3 系的 α -亚麻酸(α -Linolenic Acid, ALA, C18:3 ^{$\Delta 9,12,15$})生成十八碳四烯酸(Stearidonic Acid, SDA, C18:4 ^{$\Delta 6,9,12,15$}),因此被认为是 ω -6/ ω -3 PUFAs 合成途径中的关键酶^[1]。然而, FADS6 属于具有多个跨膜螺旋的膜蛋白,并以被酯化为 CoA 形式或磷脂形式的脂肪酸酰基链作为底物^[2]。这一类蛋白质依赖于与之结合的脂质才能实现正确的折叠,从而保持其特定的结构和功能的完整性^[3]。这也大大限制了我们对膜结合型脱饱和酶的结构-功能关系的理解。因此,目前对于 FADS6 的研究仅限于发掘和鉴定其功能。

酵母作为真核生物具有许多翻译后修饰等能力,能够表达真核来源的活性蛋白,而且操作简单,易于检测,可作为研究 FADS6 的首选。常见的毕赤酵母(*Pichia pastoris*)表达系统是在分子生物学中被广泛使用于生产重组蛋白的标准工具之一,其具有培养成本低、能够实现蛋白的共翻译和翻译后加工、表达异源蛋白时间相对较短等优势,被广泛地用于大规模表达实验以获取纯蛋白质^[4]。Byrne 研究表明 *P. pastoris* 表达系统在表达膜蛋白中更具有优势,包括钙和钾通道、硝酸盐和磷酸盐转运蛋白及组胺 H1 受体^[5]。Wang 等利用

*PichiaPink*TM表达系统成功表达 $\Delta 9$ 、 $\Delta 12$ 、 $\Delta 15$ 脂肪酸脱饱和酶,并纯化得到纯酶^[6]。

研究蛋白质功能或结构分析通常需要纯化形式的蛋白质。选择适合目的蛋白的纯化标签,不仅可实现快速纯化,而且能维持蛋白质的正确折叠与结构^[7-8],尽管已经开发了许多新颖的融合标签,但为蛋白质选择最佳的纯化系统几乎依靠经验^[9-10]。此外,已有研究指出纯化标签的位置和性质会影响蛋白质活性^[11]。

本文利用 *PichiaPink*TM表达系统异源表达来源于高山被孢霉(*Mortierella alpina*) ATCC 32222 的 *MaFADS6I*;根据实验室前期工作,设计可在纯化后直接特异性去除的串联亲和标签 HRV 3C-Protein A-His,并改造 pPink-HC 表达载体,以实现快速构建具有 N 端标签和 C 端标签的重组 *MaFADS6I*,并比较标签位置对 *MaFADS6I* 蛋白表达和酶活的影响,结合蛋白亚细胞定位预测和拓扑结构模型分析揭示产生影响的原因。该研究以期当前 FADS6 的结构和功能研究提供基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒

高山被孢霉(*Mortierella alpina*) ATCC 32222 购于美国菌种保藏中心,用于获得 *MaFADS6I* 基因,GenBank 登录号 EF413024; *PichiaPink*TM表达系统、质粒 pPink-HC、*Escherichia coli* DH5 α 均购自 Invitrogen 公司,用于 *MaFADS6I* 重组表达和表达载体的保存。

1.1.2 主要试剂和仪器

KOD-Plus⁻, Toyobo 公司; 2×Taq Plus MasterMix (Dye), 江苏康为世纪生物科技股份有限公司; 质粒提取试剂盒、DNA 产物回收试剂盒、所有限制性核酸内切酶、T4 DNA 连接酶等工具酶、GeneRuler DNA Ladder Mix、PageRuler™ Prestained Protein Ladder、Trizol 试剂、RevertAid RT 逆转录试剂盒、抗体 6×His Tag Monoclonal Antibody (HIS.H8), Invitrogen 公司; 真菌基因组 DNA 提取试剂盒, Bioflux 公司; 酵母破碎使用的酸洗玻璃珠、BCA 法蛋白浓度测定试剂盒, 生工生物工程(上海)股份有限公司; 脂肪酸检测使用的十五烷酸(C15:0)、脂肪酸标准品 GLA/SDA, Sigma-Aldrich 公司; HRP-Conjugated Goat Anti Mouse IgG, ImmunoReagents 公司; 使用的常规化学药品和试剂, 国药集团化学试剂有限公司。

PCR 仪、全自动凝胶成像系统, Bio-Rad 公司; 超微量紫外分光光度计, Implen 公司; 化学发光凝胶成像系统 FC3, Protein Simple 公司; 真空冷冻干燥机, LABCONCO 公司; QSC-12T 型氮吹仪, 上海泉岛实验器材有限公司; GCMS-QP2010Ultra 气相色谱质谱联用仪, 岛津公司; 毛细管 DB-WAX 色谱柱和 DB-FFAP 色谱柱, Agilent 公司; 小型蛋白垂直蛋白电泳仪、Mini Trans-Blot 电泳转膜设备, 上海天能科技有限公司。

1.1.3 培养基

YPD、YPDS、PAD、BMGY、BMMY 和 BMY 等培养基按照 Invitrogen 公司多克隆毕赤酵母表达手册配制。

1.2 重组表达菌株的构建与表达

1.2.1 纯化标签的设计及毕赤酵母表达载体的改造

为了快速在目的基因的 N 端和 C 端引入纯化标签, 根据 Wang 等的研究^[6], 在原有的 pPink-HC 表达载体基础上, 设计了一段含有人鼻病毒 3C 蛋白酶切位点, Protein A 部分序列, 10×His 序列(HRV 3C-Protein A-His)的串联亲和和标签, 命名为 T, 并分别在标签 T 的 N 端和 C 端设计了不同的多酶切

位点区, 以便目的基因的引入(图 1)。序列由金斯瑞生物科技公司合成并通过 *EcoR* I 和 *Swa* I 酶切插入 pPink-HC 表达载体, 命名为 pPink-T 表达载体, 用于后续目的基因的表达载体构建。

1.2.2 重组表达菌株的构建

根据 Chen 等^[12]研究中的方法培养高山被孢霉 ATCC 32222 菌株并提取其 mRNA, 利用 RevertAid RT 逆转录试剂盒反转录为 cDNA, 用超微量紫外分光光度计测定 cDNA 浓度, 并稀释至 200 ng/μL。使用表 1 中引物 F1 和 R1, 利用 KOD-Plus⁻进行 PCR 扩增目的基因 *Mafads6I* 的序列。PCR 反应体系 (50 μL): cDNA 1 μL, 引物 F1 和 R1 (10 μmol/L) 各 1 μL, 10×KOD Buffer 5 μL, dNTPs (2 mmol/L) 5 μL, MgSO₄ (25 mmol/L) 2 μL, KOD 酶 (1 U/μL) 1 μL, ddH₂O 34 μL。PCR 反应条件: 95 °C 5 min; 95 °C 30 s, 58 °C 30 s, 68 °C 1.5 min, 30 个循环; 68 °C 5 min。扩增产物通过 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测条带单一性, 采用 DNA 产物回收试剂盒回收扩增产物。分别用 *EcoR* I 和 *Xho* I 对回收的扩增产物和 pPink-T 质粒进行双酶切, 采用 DNA 产物回收试剂盒回收酶切片段, 用 T4 DNA 连接酶 16 °C 过夜连接回收的片段, 以构建表达载体 pPink-MaFADS6I-T。使用引物 F2 和 R2 按上述实验操作扩增目的基因 *Mafads6I* 的编码序列, 分别用 *Nae* I 和 *Xma* I 对目的基因和 pPink-T 质粒进行双酶切, 构建表达载体 pPink-T-MaFADS6I。所有表达载体均通过化学转化至 *E. coli* DH5α 中, 送至北京六合华大基因科技有限公司测序, 并将测序正确的转化子 -80 °C 保存。

用限制性内切酶 *Xga* I 将构建的表达载体线性化, 通过电穿孔分别转化到 *PichiaPink* 宿主菌中, 加入 1 mL YPDS 液体培养基在 28 °C 下孵育 2 h 后, 涂布 PAD 筛选板, 待白色菌落形成。挑取转化成功的阳性克隆接种于 3 mL PAD 液体培养基 28 °C、220 r/min 摇瓶培养 24 h, 5 000×g 离心 5 min 收集菌体, 用真菌基因组 DNA 提取试剂盒提取阳性转化子的基因组 DNA, 用超微量紫外

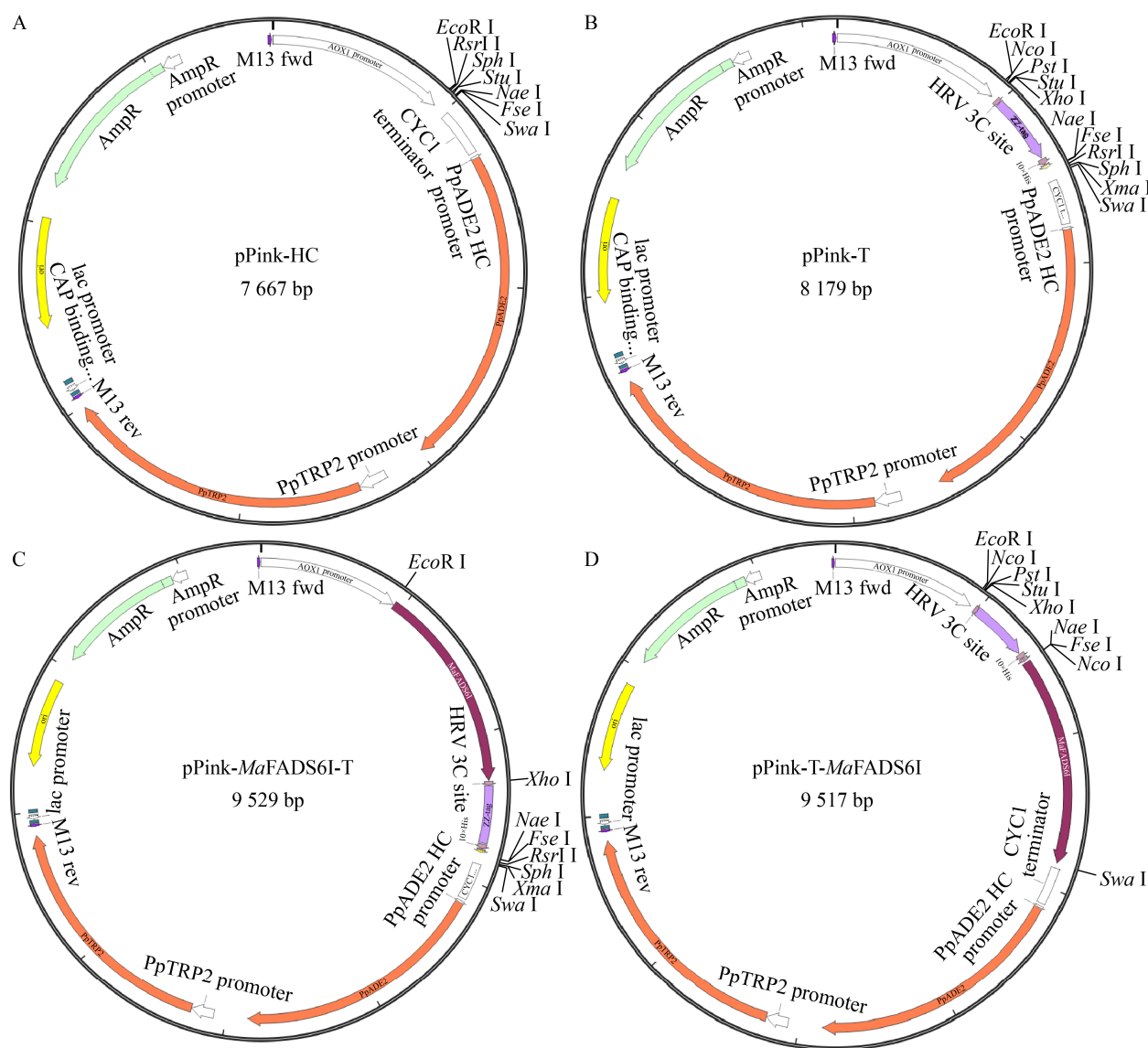


图1 高山被孢霉 $\Delta 6$ 脂肪酸脱饱和酶酵母表达载体构建示意图

Figure 1 Yeast expression vectors construction of *Mortierella alpina* $\Delta 6$ fatty acid desaturase

注: A: 原始载体: pPink-HC; B: 插入串联亲和和标签 HRV 3C-Protein A-His 的载体: pPink-T; C: *MaFADS6I* 带有 C 端纯化标签的表达载体: pPink-*MaFADS6I*-T; D: *MaFADS6I* 带有 N 端纯化标签的表达载体: pPink-T-*MaFADS6I*

Note: A: Original vector: pPink-HC; B: Vector inserted with tandem affinity tag HRV 3C-protein A-His: pPink-T; C: Expression vector of *MaFADS6I* with C-terminal purification tag: pPink-*MaFADS6I*-T; D: Expression vector of *MaFADS6I* with N-terminal purification tag: pPink-T-*MaFADS6I*

分光光度计测定基因组 DNA 浓度, 并稀释至 200 ng/ μ L。PCR 反应体系(20 μ L): 基因组 DNA 1 μ L, 引物 AOX 和 CYC (10 μ mol/L)各 1 μ L, 2 \times Taq Plus MasterMix (Dye) 10 μ L, 无菌水 7 μ L。PCR 反应条件: 95 $^{\circ}$ C 5 min; 95 $^{\circ}$ C 30 s, 54 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 1.5 min, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 5 min。扩

增产物通过 1.0%琼脂糖凝胶电泳进行分析, 条带正确的阳性转化子分别命名为 *P. pastoris*-pPink-*MaFADS6I*-T 和 *P. pastoris*-pPink-T-*MaFADS6I*。

1.2.3 重组表达菌株的表达

所有获得的酵母转化子均按照 Invitrogen 公司多克隆毕赤酵母表达手册进行培养。用 BMGY 液

表 1 引物及其序列
Table 1 Primers and sequences

引物 Primers	限制性酶切位点 Restriction enzyme site	引物序列 Primers sequence (5'→3')	功能 Function
F1	<i>EcoR</i> I	TACCGGAATTCATGCCACCAGAGTCAACATACG	表达载体 pPink- <i>MaFADS6I</i> -T 的构建
R1	<i>Xho</i> I	GACTCGAGCTAGAGGGTATTCTTGTCCGC	Construction of expression vector pPink- <i>MaFADS6I</i> -T
F2	<i>Nae</i> I	CGGCCGGCGATGTGCCCCGCAAGACGGAC	表达载体 pPink-T- <i>MaFADS6I</i> 的构建
R2	<i>Swa</i> I	GCATTATAATCTAGTGCGCCTTCTCCGCCTTGCCG	Construction of expression vector pPink-T- <i>MaFADS6I</i>
AOX	—	GACTGGTTCCAATTGACAAGC	pPink-T 表达载体的验证
CYC	—	GTGGGAGGAGGGCGTGAAT	Verification of pPink-T expression vector

注：—：不含限制性酶切位点；下划线表示限制性酶切位点
Note: —: The primer without the restriction enzyme site; The underline indicates the restriction enzyme site

体培养基 28 °C、220 r/min 摇瓶培养 24 h，通过 3 000×g 低速离心 5 min 去除 BMGY 培养基，按原体积 1/5 量的 BMMY 液体培养基重悬沉淀菌体，28 °C、220 r/min 摇瓶诱导 24 h 后，5 000×g 离心 5 min 收集菌体待验证。

1.3 Dot Blot、SDS-PAGE 蛋白电泳和 Western Blot 分析

用 5 mL 裂解缓冲液(0.02 mol/L Tris-HCl pH 7.9, 0.001 mol/L EDTA, 5%甘油)重悬 1 g 菌体，取 200 μ L 于 1.5 mL EP 管中，加入等体积量的 0.5 mm 酸洗玻璃珠，并在 4 °C 下涡旋振荡 10 min。使用 BCA 法蛋白浓度测定试剂盒确定破碎液中蛋白浓度，调整每个样品的蛋白浓度一致。取 200 μ L 调整后的样品，与 2×SDS 上样缓冲液混合，并于 95 °C 加热 5 min。采用 NC 膜进行 Dot Blot 分析，筛选表达量较高的转化子，再利用 1.0%浓度的蛋白胶进行 SDS-PAGE，随后用考马斯亮蓝染色分析处理。使用 Mini Trans-Blot 电泳转膜设备(250 mA, 1 h)，将蛋白从凝胶转移到 PVDF 膜上，以进行 Western Blot 分析。利用凝胶图像分析软件 FluorChem FC3 对重组蛋白的总灰度进行分析，以相对灰度值表示，转化子 33 的蛋白的灰度值设为 100。

1.4 重组表达菌脂质组成分析

诱导后，5 000×g 离心 5 min 分离菌体和发酵液。根据 Shi 等^[1]研究中的方法将诱导后的菌体冻

干，诱导上清液旋转蒸发。在 50 mg 冻干细胞和诱导上清液中分别添加 1 mL 盐酸甲醇和 20 μ g 十五烷酸(C15:0)，65 °C 加热 3 h 进行甲酯化，加入正己烷萃取脂肪酸甲酯，后续利用气相色谱-质谱 (Gas Chromatography-Mass Spectrometry, GC-MS) 进行脂肪酸甲酯(Fatty Acid Methyl Ester, FAME) 分析。根据 Zhang 等^[13]研究中的方法，使用配备 FID 检测器和毛细管 DB-WAX 色谱柱的 GCMS-QP2010Ultra 气相色谱质谱联用仪进行 GC 分析，分流比 15:1。程序升温条件：初始 120 °C，保持 3 min，以 5 °C/min 的速率升温至 190 °C，以 5 °C/min 的速率升温至 210 °C，保持 3 min。通过与商业 FAME 标准品进行比较来鉴定 FAME，并通过内标法添加 20 μ g 商业 C15:0 进行定量。使用配备毛细管 DB-FFAP 色谱柱的 GCMS-QP2010Ultra 气相色谱质谱联用仪进行 GC-MS 分析，氦气用作载气(0.8 mL/min)。程序升温条件：初始 180 °C，保持 1 min，以 5 °C/min 的速率升温至 250 °C，保持 21 min。离子强度为 70 eV，并将离子源温度和传输线温度分别保持在 200 °C 和 260 °C。各菌株脂肪酸的测定值按菌株总蛋白量进行归一化处理。

1.5 序列信息分析

通过 PSIPRED (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>) 预测和分析 *MaFADS6I* 的二级结构。CELLO^[14] (<http://cello.life.nctu.edu.tw/>)和 BUSCA^[15] (<http://busca.>

biocomp.unibo.it/)对亚细胞定位的预测。

1.6 数据分析

所有实验均设置 3 组平行,所有数据均通过 IBM SPSS Statistics 软件进行统计学分析,以平均值 \pm 标准差表示, $\alpha<0.05$ 用上标小写字母表示。

2 结果与分析

2.1 MaFADS6I 毕赤酵母重组菌株的构建

将目的基因 *Mafads6I* 和改造后的毕赤酵母表达载体 pPink-T 分别用 *EcoR* I 和 *Xho* I 进行双酶切,酶切产物用 1%的琼脂糖凝胶电泳检测并使用 DNA 产物回收试剂盒进行回收,回收后的 *Mafads6I* 基因片段与 pPink-T 载体用 T4 连接酶连接过夜,将连接产物转化至 *E. coli* DH5 α 中,利用菌落 PCR 测序验证其正确性,将测序正确的质粒命名为 pPink-MaFADS6I-T (图 1C),使用限制性内切酶 *Xga* I 将重组质粒 pPink-MaFADS6I-T 进行线性化后,通过电转化至预先制备的 *PichiaPink* 感受态中,在 PAD 固体筛选板上随机挑选 5 个白色单菌落,经 PAD 液体培养 24 h 后收集菌体,提取基因组并通过特异性引物 F1/R1 和 pPink-T 的通用引物 AOX/CYC 分别进行 PCR 验证目的基因

Mafads6I (1 371 bp)和表达载体(2 070 bp)的正确性,如图 2A 所示,其大小与理论值一致,将正确的转化子命名为 *P. pastoris*-pPink-MaFADS6I-T。同样的方法成功构建转化子 *P. pastoris*-pPink-T-MaFADS6I (图 1D 和图 2B)。

2.2 MaFADS6I 在毕赤酵母重组菌株中的蛋白表达水平

在 PAD 固体筛选板上各挑选 50 个白色单菌落,接入 BMGY 液体培养基中,28 $^{\circ}$ C 摇瓶培养 24 h,通过低速离心去除 BMGY 培养基,按原体积 1/5 量的 BMMY 液体培养基重悬沉淀菌体,28 $^{\circ}$ C 摇瓶诱导 24 h 后,收集细胞采用 Dot Blot 对获得的转化子进行第一轮筛选。如图 3A 所示,NC (2 \times SDS 上样缓冲液)作为空白对照组,序号 1 表示 *P. pastoris*-pPink-MaFADS6I-T,其中 27、33、34 和 45 号转化子相对灰度值达到 81.73%、100%、96.61%和 86.71%,与其他转化子相比,目的蛋白的表达量较高;序号 2 表示 *P. pastoris*-pPink-T-MaFADS6I,其中 3、19、29 和 39 号转化子相对灰度值达到 66.81%、68.98%、65.98%和 56.72%,与其他转化子相比,目的蛋白的表达量较高。

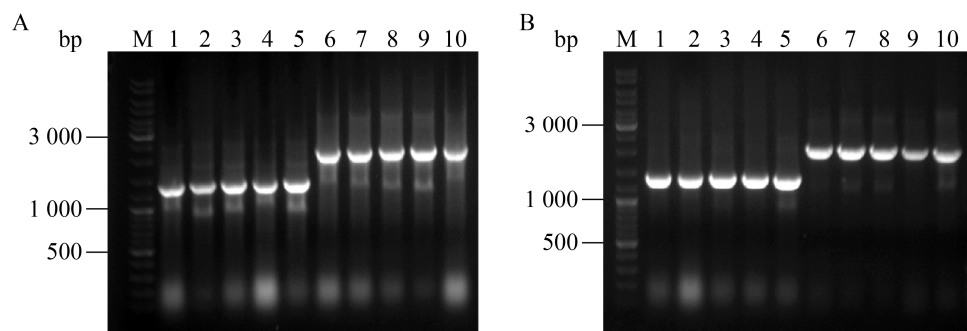


图 2 高山被孢霉 $\Delta 6$ 脂肪酸脱饱和酶重组酵母表达菌株 PCR 产物验证

Figure 2 Verification of *Mortierella alpina* $\Delta 6$ fatty acid desaturase recombinant yeast strains by PCR

注: A: *P. pastoris*-pPink-MaFADS6I-T; B: *P. pastoris*-pPink-T-MaFADS6I. M: GeneRuler DNA Ladder Mix; 1-5: 特异性引物验证 *Mafads6I* 基因(1 371 bp); 6-10: pPink-T 的通用性引物验证重组酵母中表达载体 pPink-MaFADS6I-T (2 070 bp 图 A)或 pPink-T-MaFADS6I (2 058 bp 图 B)

Note: A: *P. pastoris*-pPink-MaFADS6I-T; B: *P. pastoris*-pPink-T-MaFADS6I. M: GeneRuler DNA Ladder Mix; 1-5: The specific primers to verify *Mafads6I* gene (1 371 bp); 6-10: The universal primer to verify the pPink-MaFADS6I-T gene (2 070 bp figure A) or pPink-T-MaFADS6I gene (2 058 bp figure B) in *P. pastoris*

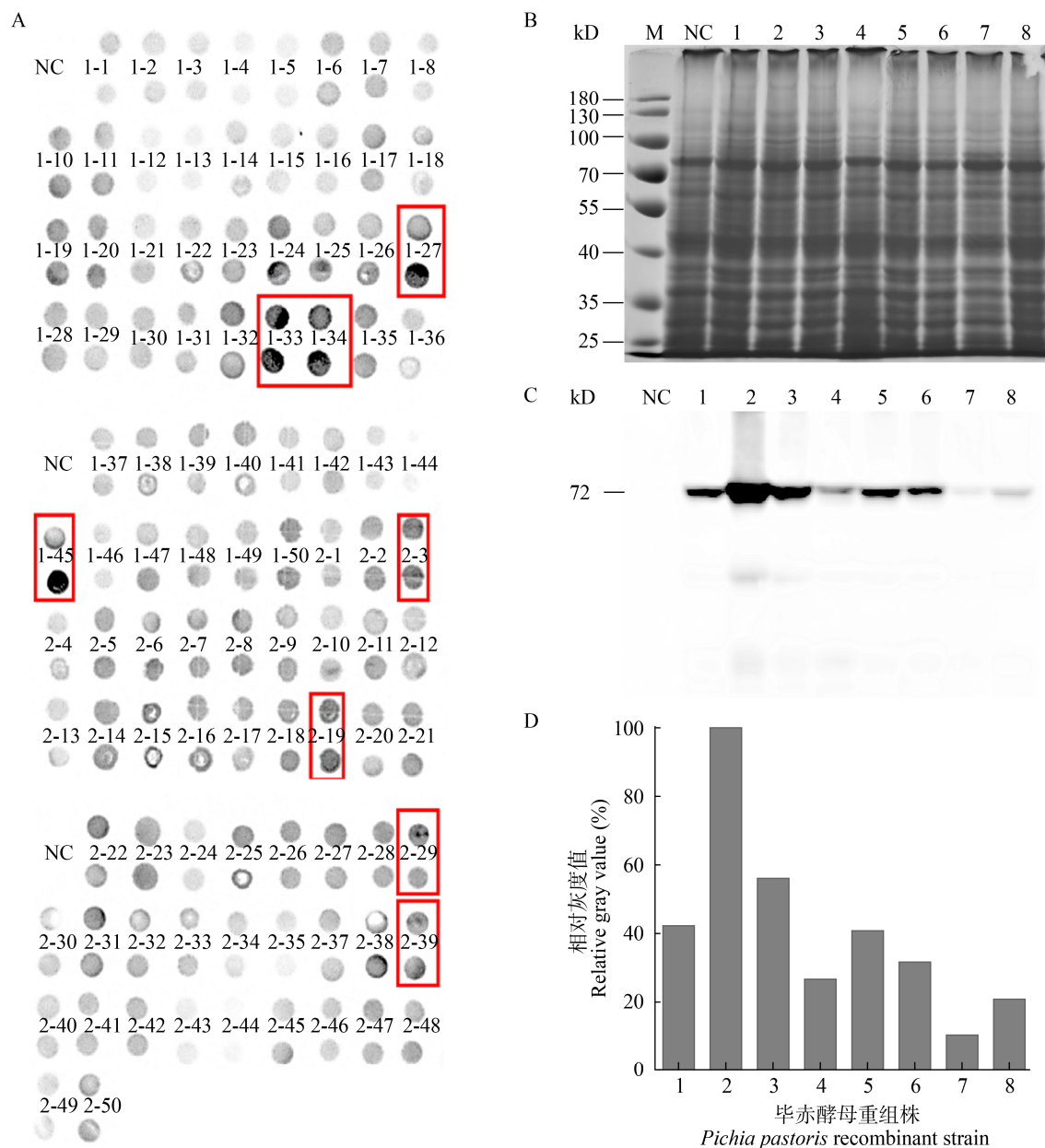


图3 高山被孢霉 $\Delta 6$ 脂肪酸脱饱和酶重组酵母表达菌株 Dot Blot、SDS-PAGE 和 Western Blot 分析

Figure 3 Dot Blot, SDS-PAGE and Western Blot analysis of *Mortierella alpina* $\Delta 6$ fatty acid desaturase

注: A: Dot Blot 筛选所有可获得的毕赤酵母转化子; NC: $2\times$ SDS 上样缓冲液; 序号 1-x: *P. pastoris*-pPink-MaFADS6I-T 的 x 号转化子; 序号 2-y: *P. pastoris*-pPink-T-MaFADS6I 的 y 号转化子; B: SDS-PAGE 分析筛选的 8 株毕赤酵母转化子目的蛋白表达水平; M: PageRuler™ Prestained Protein Ladder; C: Western Blot 分析筛选的 8 株毕赤酵母转化子目的蛋白表达水平; D: 筛选的 8 株毕赤酵母转化子目的蛋白表达的灰度分析; NC: 含有空载体的重组酵母菌株 *P. pastoris*-pPink-T; 1-4: *P. pastoris*-pPink-MaFADS6I-T (71.8 kD) 的 27、33、34 和 45 号转化子; 5-8: *P. pastoris*-pPink-T-MaFADS6I (71.8 kD) 的 3、19、29 和 39 号转化子

Note: A: Dot blot to screen all transformants; NC: $2\times$ SDS loading buffer; Number 1-x: the transformant x of *P. pastoris*-pPink-MaFADS6I-T; Number 2-y: the transformant y of *P. pastoris*-pPink-T-MaFADS6I; B: SDS-PAGE analysis of MaFADS6I in 8 selected *P. pastoris*; M: PageRuler™ Prestained Protein Ladder; C: Western blot analysis of MaFADS6I in 8 selected *P. pastoris*; D: Grayscale analysis of Western blot; NC: *P. pastoris*-pPink-T is recombinant strain containing an empty vector; 1-4: *P. pastoris*-pPink-MaFADS6I-T (71.8 kD) transformants 27, 33, 34 and 45; 5-8: *P. pastoris*-pPink-T-MaFADS6I (71.8 kD) transformants 3, 19, 29 and 39

进一步通过 SDS-PAGE 和 Western Blot 分析上述 8 株转化子的 *MaFADS6I* 表达水平。如图 3B 所示, 对照组 NC 为含有 pPink-T 载体的毕赤酵母, 在 SDS-PAGE 结果中各重组菌株与 NC 相比没有明显条带; Western Blot 结果(图 3C)显示约 72 kD 处存在一条明显的条带, 其大小与融合标签后的蛋白分子量一致, NC 未产生相应的条带, 表明 *Mafads6I* 基因在所有酵母转化子中均成功表达, 且各转化子对 *MaFADS6I* 具有差异性。由于酵母菌在 72 kD 处存在本底蛋白, 无法通过 SDS-PAGE 分析目的蛋白的表达情况, 我们进一步通过 Western Blot 灰度结果进行分析。表达量最高的 *P. pastoris*-pPink-*MaFADS6I*-T-33 号转化子的表达量是 *P. pastoris*-pPink-T-*MaFADS6I*-29 号转化子的 10 倍; 根据 Dot Blot 和 Western Blot 灰度分析表明, 具有 C 端标签的 *P. pastoris*-pPink-*MaFADS6I*-T 转化子的表达量总体高于具有 N 端标签的 *P. pastoris*-pPink-T-*MaFADS6I* 转化子, 平均约为 N 端的 2 倍。表明标签的位置影响了 *MaFADS6I* 在毕赤酵母中的表达, C 端的标签更利于 *MaFADS6I* 的表达。

2.3 *MaFADS6I* 毕赤酵母表达菌的活性验证

根据蛋白水平分析结果, 对 2 种形式的 *MaFADS6I* 转化子各取相对表达量较高的 *P. pastoris*-pPink-*MaFADS6I*-T-33/34 和 *P. pastoris*-pPink-T-*MaFADS6I*-3/19 进行酶活分析。通过脂肪酸甲酯对 *MaFADS6I* 活性的分析表明, 与对照菌株 *P. pastoris*-pPink-T 相比, 所有重组表达菌株的脂肪酸组成中检测出明显的产物 b 和 c, 如图 4A-C 所示。根据质谱图 4D, 产物 b 具有 m/z 79、261 和 292 离子峰, 是十八碳三烯酸甲酯的特征离子^[16], 存在较强的 α 离子 m/z 194, 可判断此多不饱和脂肪酸甲酯羰基端的第 6、9 号碳原子具有双键, 结合质谱图中 ω 离子 m/z 150 可确定产物 b 是 n-6 型 C18:3 ^{$\Delta^{6,9,12}$} , 即 GLA (质谱图 4E)。从产物 c 的质谱图 4F 可看出 ω 离子和 α 离子为

m/z 108 和 m/z 194, 并具有十八碳四烯酸甲酯的特征离子 m/z 79、91、233、261 和 290^[16], 因此产物 c 是 n-3 型 C18:4 ^{$\Delta^{6,9,12,15}$} , 即 SDA (质谱图 4G)。产物 b 和 c 均为典型的 *FADS6* 脱饱和产物。脂肪酸分析表明在 LA 和 ALA 同时存在时, *MaFADS6I* 更偏好将 LA 转化成 GLA, 与 Shi 等^[1]报道的结果一致, 这表明标签的位置并不影响底物的特异性。本文利用外源添加 C15:0 作为内标, 通过 GC-MS 检测各转化子的脂肪酸, 根据测得的标准品 C15:0 与各个脂肪酸的峰面积比, 计算出相应脂肪酸的相对含量, 并用新生成的脂肪酸与总脂肪酸的比值表示 *MaFADS6I* 活性。分析各转化子中脂肪酸组成发现, 不同形式的 *Mafads6I* 基因的导入对毕赤酵母其余脂肪酸含量未产生显著影响, 各转化子的总脂水平一致(表 2)。图 5 表明标签在基因同一端的转化子 *P. pastoris*-pPink-*MaFADS6I*-T-33/34 之间的活性并没有明显差异; 同样的结果出现在转化子 *P. pastoris*-pPink-T-*MaFADS6I*-3/19 之间; 带有不同位置纯化标签的基因之间的酶活性差异显著, 表明标签的位置影响了 *MaFADS6I* 的活性。

2.4 结合拓扑结构分析 2 种位置的标签对 *MaFADS6I* 活性影响的原因

为了探究标签的位置对 *MaFADS6I* 活性产生影响的原因, 通过 PSIPRED 对 *MaFADS6I* 的二级结构进行了预测和分析(图 6A), 根据 Shi 等^[1]的研究结果给出精细的拓扑结构模型。如图 6B 所示, *MaFADS6I* 具有混合的二级结构: α -螺旋、 β -折叠和无规卷曲, 并观察到 4 个跨膜螺旋 (Transmembrane Region, TM) 和 2 个两亲螺旋 (Amphipathic Helices, AH)。3 个保守的组氨酸域 (HIS I、HIS II、HIS III) 和 2 个 Fe^{2+} 形成了 *MaFADS6I* 的活性中心。N 端存在 HPGG 区域, 具有细胞色素 b_5 的功能, 可进行电子传递。接近 HPGG 区域的 K61 和 D68 位点对 *MaFADS6I* 的催化活性具有重要影响。接近保守域的 L175、

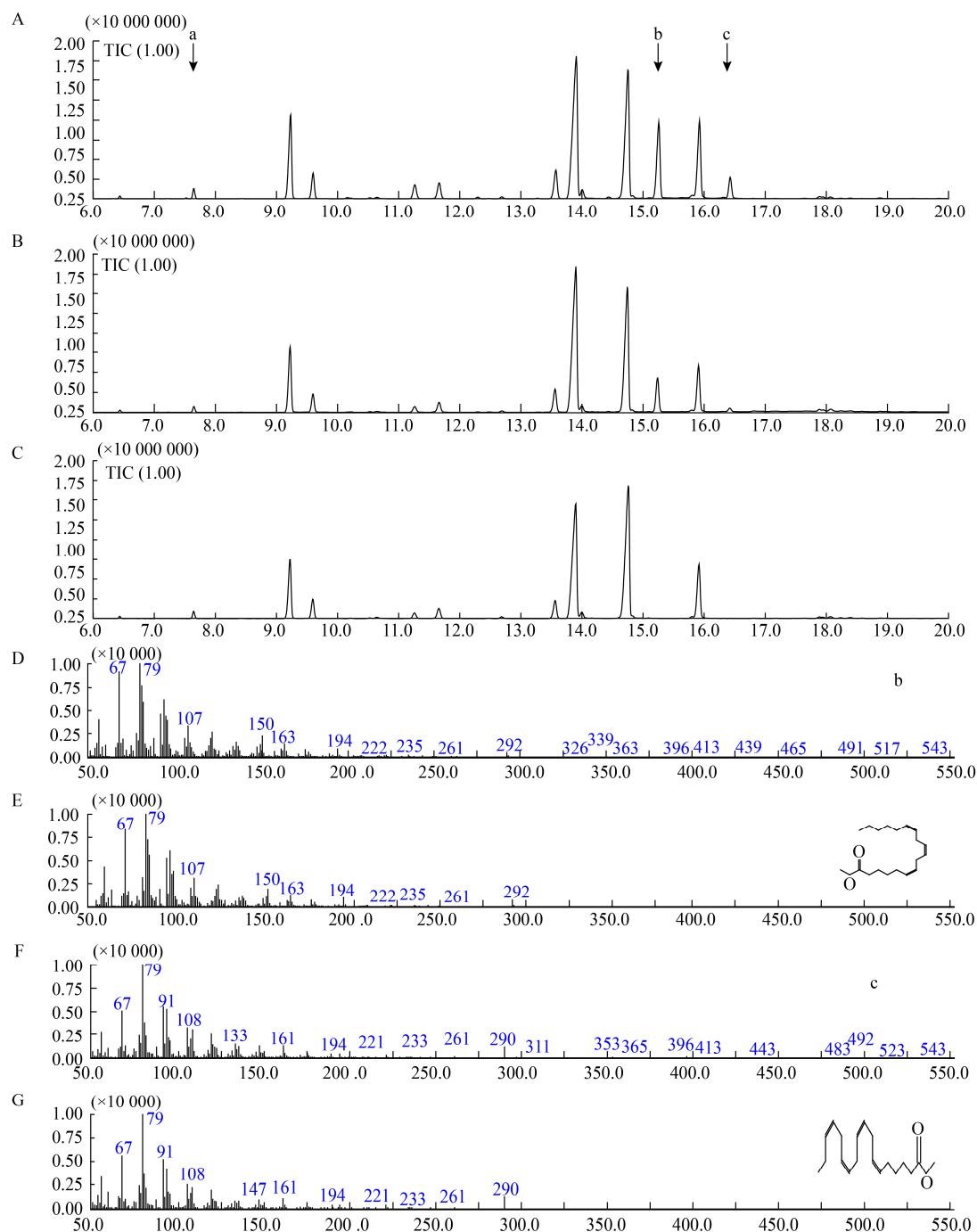


图 4 高山被孢霉 $\Delta 6$ 脂肪酸脱饱和酶重组酵母表达菌株脂肪酸组成分析

Figure 4 Fatty acids composition of recombinant yeast strains with *Mortierella alpina* $\Delta 6$ fatty acid desaturase

注: A: 重组表达菌株 *P. pastoris*-pPink-MaFADS6I-T 脂肪酸组成分析; B: 重组表达菌株 *P. pastoris*-pPink-T-MaFADS6I 脂肪酸组成分析; C: 重组酵母菌株 *P. pastoris*-pPink-T 脂肪酸组成分析; D: 物质 b 的质谱图, 由 LA 通过 FADS6 转化生成; E: 标准品 GLA 的质谱图; F: 物质 c 的质谱图, 由 ALA 通过 FADS6 转化生成; G: 标准品 SDA 的质谱图; a 表示外源添加的内标 C15:0

Note: A: The fatty acid composition of *P. pastoris*-pPink-MaFADS6I-T; B: The fatty acid composition of *P. pastoris*-pPink-T-MaFADS6I; C: The fatty acid composition of *P. pastoris*-pPink-T; D: Mass spectrum of substance b, converted from LA by MaFADS6I; E: Mass spectrum of standard GLA; F: Mass spectrum of substance c, converted from ALA by MaFADS6I; G: Mass spectrum of standard SDA; The letter a represents C15:0 as the externally added internal standard

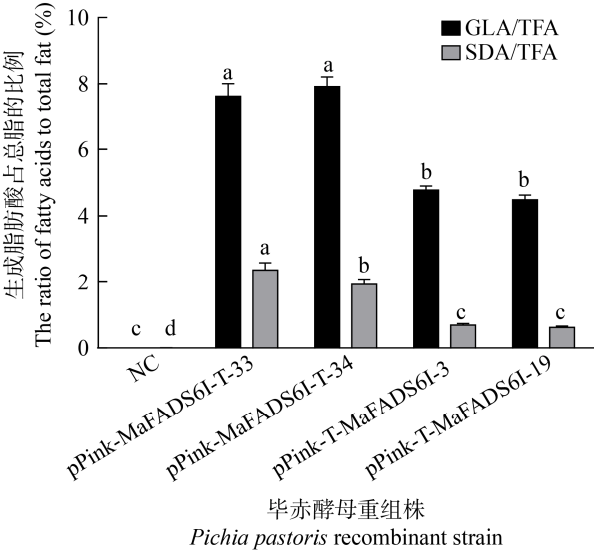


图 5 毕赤酵母重组菌表达高山被孢霉 $\Delta 6$ 脂肪酸脱饱和酶的酶活性

Figure 5 The enzyme activity of *Mortierella alpina* $\Delta 6$ fatty acid desaturase in *P. pastoris*

注：字母表示 $\alpha < 0.05$ ，具有相同字母组即为差异性不显著，无相同字母组即为差异显著

Note: The letters mean $\alpha < 0.05$, a group with the same letter means that the difference is not significant, and a group without the same letter means the significant difference

S203、K206 和 I394/E395 位点在底物识别中起重要作用^[1]。根据亚细胞定位预测，*MaFADS6I* 是具有多重跨膜螺旋的内质网膜结合蛋白，这些特征使得 *MaFADS6I* 更容易利用 NADH-细胞色素 b_5 氧化还原酶-细胞色素 b_5 (HPGG 结构域)作为电子供体，催化复杂脂质的脱饱和作用^[17-18]。结合

MaFADS6I 的拓扑模型推测，N 端的标签影响了 *MaFADS6I* 位于 N 端的 HPGG 域与细胞色素 b_5 氧化还原酶的电子传递，从而影响了酶活；C 端的标签距离活性中心较远，因此对酶活的影响较小；N 端或 C 端的标签对位于中部的保守域以及底物识别位点没有较大影响。

3 讨论与结论

FADS6 作为生物体合成 ω -6 和 ω -3 PUFAs 的关键酶，了解其反应机制非常重要。然而 FADS6 属于“Front-End”脱饱和酶家族，这是一类典型的具有多次跨膜结构域的膜蛋白质。一方面，大多数脂肪酸脱饱和酶天然表达不能满足纯化需求；另一方面，作为膜蛋白，脂肪酸脱饱和酶维持功能构象需要特定脂质环境，这使得异源表达和纯化获取大量目的蛋白变得相当复杂^[18]。因此，异源过表达以及开发高效表达策略是不可避免的步骤。自 1993 年以来，各物种中的 FADS6 不断被发现，扩充了我们对这一类酶的物种分布及功能的了解，但对于 FADS6 的研究仅在功能表征及过表达生产特定脂肪酸方面，对于获得其纯酶，研究其结构与反应机制方面鲜有报道^[19]。Cui 等对已报道的具有不同底物特性的 FADS6 进行汇总，综述中绝大多数 FADS6 的研究止步于通过酿酒酵母异源表达并表征其功能^[19]。大多数实验表明，相较于酿酒酵母，毕赤酵母在工业酶和生物制药等领域更

表 2 重组酵母菌株脂肪酸组成

Table 2 Fatty acid compositions of recombinant yeast constant

重组酵母菌株	硬脂酸	油酸	亚油酸	γ -亚麻酸	α 亚油酸	十八碳四烯酸	总脂肪酸
Recombinant yeast	SA (mg/g)	OA (mg/g)	LA (mg/g)	GLA (mg/g)	ALA (mg/g)	SDA (mg/g)	TFA (mg/g)
NC	0.39±0.01	0.93±0.17b	1.39±0.24ab	0.00±0.00c	0.57±0.05	0.00±0.00d	4.90±0.51
pPink-MaFADS6I-T-33	0.50±0.03	1.04±0.05ab	1.07±0.04ab	0.43±0.02a	0.60±0.02	0.13±0.01a	5.65±0.22
pPink-MaFADS6I-T-34	0.43±0.02	1.01±0.10ab	0.96±0.10b	0.40±0.05a	0.47±0.06	0.10±0.02b	5.03±0.49
pPink-T-MaFADS6I-3	0.51±0.07	1.43±0.18a	1.48±0.14a	0.30±0.02b	0.57±0.03	0.04±0.00c	6.33±0.64
pPink-T-MaFADS6I-19	0.47±0.01	1.36±0.03ab	1.32±0.06ab	0.26±0.01b	0.50±0.04	0.04±0.00c	5.85±0.14

注：数据均以平均值±标准差表示， $\alpha < 0.05$ 用上标小写字母表示，具有相同字母组即为差异性不显著，无相同字母组即为差异显著。SA: Stearic acid; OA: Oleic acid; LA: Linoleic acid; GLA: γ -linoleic acid; ALA: α -linoleic acid; SDA: Stearidonic acid; TFA: Total fatty acid

Note: The data are expressed as mean±standard deviation, and $\alpha < 0.05$ is expressed in superscript letters. A group with the same letter means that the difference is not significant, and a group without the same letter means the significant difference. SA: Stearic acid; OA: Oleic acid; LA: Linoleic acid; GLA: γ -linoleic acid; ALA: α -linoleic acid; SDA: Stearidonic acid; TFA: Total fatty acid

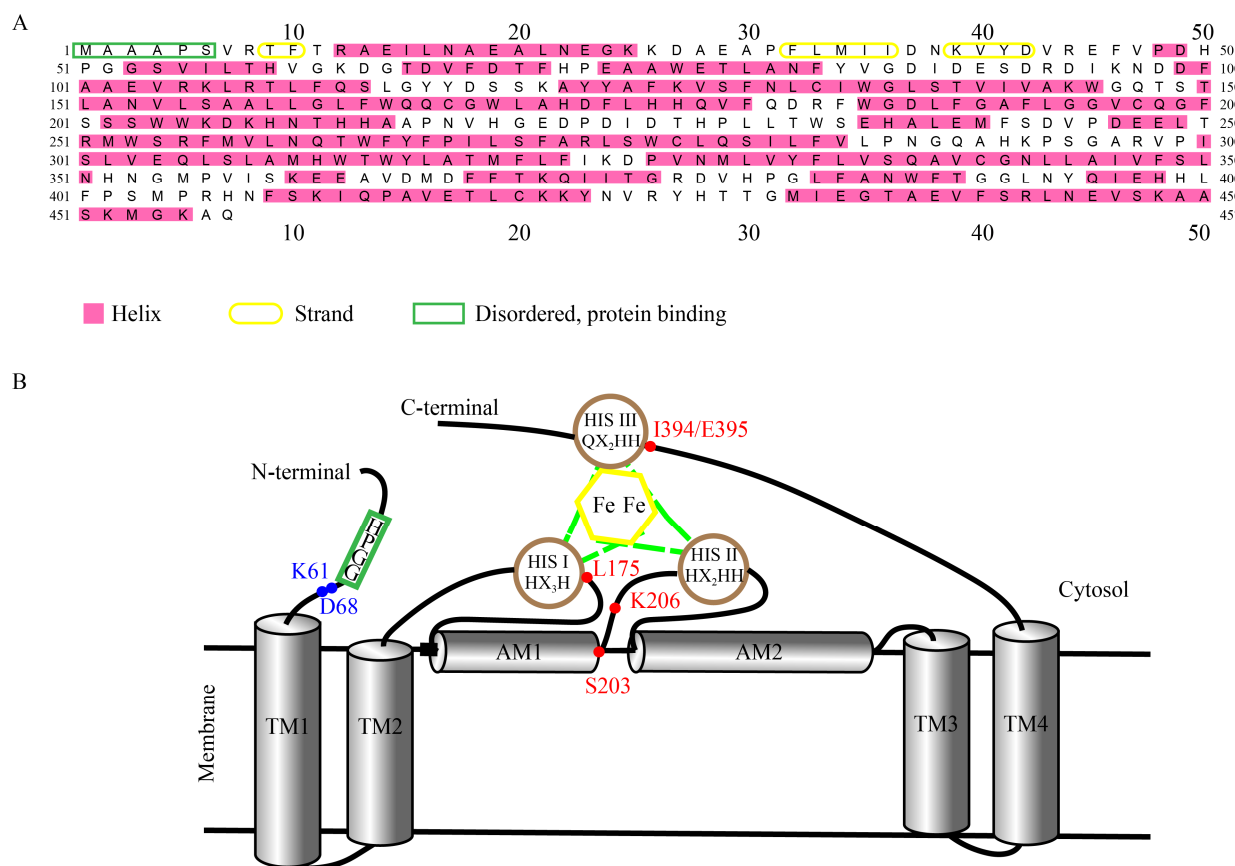


图 6 高山被孢霉的 $\Delta 6$ 脂肪酸脱饱和酶二级结构信息(A)和拓扑结构模型(B)

Figure 6 Secondary structure (A) and topological model (B) of *Mortierella alpina* $\Delta 6$ fatty acid desaturase

注: A: 粉色背景标注的部分被预测为 Helix, 其余空白背景部分被预测为 Coil; B: 3 个保守的组氨酸域用棕色圈表示, HPGG 区域位于 N 端的绿色方框表示, K61 和 D68 位点对 *MaFADS6I* 的催化活性具有重要影响, 以蓝色圆点突出; 在底物识别中起重要作用的 L175、S203、K206 和 I394/E395 位点用红点突出显示; TM: 跨膜螺旋; AM: 与膜相关的两亲性螺旋

Note: A: The part marked on the pink background are predicted as helices, and the remaining with blank background are predicted as coils; B: The three conserved histidine domains are represented by brown circles, and the HPGG region is represented by green box. K61 and D68 have important effects on the catalytic activity of *MaFADS6I*, highlighted by blue dots. The L175, S203, K206 and I394/E395 sites that play an important role in substrate recognition are highlighted with red dots. TM: Transmembrane helix; AM: Amphipathic helix

具有表达优势^[20], 并且根据杨青对中华绒螯蟹 *FADS9* 和 *FADS6* 真核表达的研究^[21], 以及我们的前阶段工作结果显示, 酿酒酵母系统表达更适于表征 *FADS6* 的功能, 毕赤酵母表达系统产生的重组蛋白量更适于进一步纯化, 研究 *FADS6* 的酶学特性。

总之, 由于脂肪酸脱饱和酶异源表达困难, 蛋白量较低, 目前研究主要聚焦于 *FADS6* 的功能表征。杨青在酵母体系中比较不同标签对 *FADS6* 蛋白检测的影响^[21], 更多实验表明, 纯化标签的

位置对某些在 N 端或 C 端具有功能性结构域的蛋白质的表达和活性影响较大^[22-23]。因此, 本文聚焦于探讨纯化标签的位置对 *FADS6* 的异源表达和活性的影响, 分别构建了带 N 端标签和 C 端标签的 *MaFADS6I*, 并获得相应的重组毕赤酵母菌株, 通过大量酵母重组菌株的筛选, 证实了标签位置对 *MaFADS6I* 表达水平具有影响。C 端带有标签更利于 *MaFADS6I* 的表达且相对酶活性更高, 研究结果为进一步探究 *FADS6* 反应机制奠定了基础。

REFERENCES

- [1] Shi HL, Chen HQ, Gu ZN, Song YD, Zhang H, Chen W, Chen YQ. Molecular mechanism of substrate specificity for delta 6 desaturase from *Mortierella alpina* and *Micromonas pusilla*[J]. Journal of Lipid Research, 2015, 56(12): 2309-2321
- [2] Vanhercke T, Shrestha P, Green AG, Singh SP. Mechanistic and structural insights into the regioselectivity of an acyl-CoA fatty acid desaturase via directed molecular evolution[J]. Journal of Biological Chemistry, 2011, 286(15): 12860-12869
- [3] Hunte C. Specific protein-lipid interactions in membrane proteins[J]. Biochemical Society Transactions, 2005, 33(Pt 5): 938-942
- [4] Karbalaeei M, Rezaee SA, Farsiani H. *Pichia pastoris*: a highly successful expression system for optimal synthesis of heterologous proteins[J]. Journal of Cellular Physiology, 2020, 235(9): 5867-5881
- [5] Byrne B. *Pichia pastoris* as an expression host for membrane protein structural biology[J]. Current Opinion in Structural Biology, 2015, 32: 9-17
- [6] Wang MX, Chen HQ, Ailati A, Chen W, Chilton FH, Todd Lowther W, Chen YQ. Substrate specificity and membrane topologies of the iron-containing $\omega 3$ and $\omega 6$ desaturases from *Mortierella alpina*[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2018, 102(1): 211-223
- [7] Terpe K. Overview of tag protein fusions: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2003, 60(5): 523-533
- [8] Waugh DS. Making the most of affinity tags[J]. Trends in Biotechnology, 2005, 23(6): 316-320
- [9] Monteiro J, Leslie M, Moghadasian MH, Arendt BM, Allard JP, Ma DWL. The role of n-6 and n-3 polyunsaturated fatty acids in the manifestation of the metabolic syndrome in cardiovascular disease and non-alcoholic fatty liver disease[J]. Food & Function, 2014, 5(3): 426-435
- [10] Swanson D, Block R, Mousa SA. Omega-3 fatty acids EPA and DHA: health benefits throughout life[J]. Advances in Nutrition, 2012, 3(1): 1-7
- [11] Pagny S, Bouissonnie F, Sarkar M, Follet-Gueye ML, Driouich A, Schachter H, Faye L, Gomord V. Structural requirements for *Arabidopsis* beta1, 2-xylosyltransferase activity and targeting to the Golgi[J]. The Plant Journal, 2003, 33(1): 189-203
- [12] Chen H, Hao G, Wang L, Wang H, Gu Z, Liu L, Zhang H, Chen W, Chen YQ. Identification of a critical determinant that enables efficient fatty acid synthesis in oleaginous fungi[J]. Scientific Reports, 2015, 5: 11247
- [13] Zhang BX, Rong CC, Chen HQ, Song YD, Zhang H, Chen W. *De novo* synthesis of *trans*-10, *cis*-12 conjugated linoleic acid in oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica*[J]. Microbial Cell Factories, 2012, 11(1): 1-8
- [14] Zhu L, Yang J, Shen HB. Multi label learning for prediction of human protein subcellular localizations[J]. The Protein Journal, 2009, 28(9/10): 384-390
- [15] Savojardo C, Martelli PL, Fariselli P, Proffitti G, Casadio R. BUSCA: an integrative web server to predict subcellular localization of proteins[J]. Nucleic Acids Research, 2018, 46(W1): W459-W466
- [16] Lou QM, Xu J, Wang YM, Xue CH, Sun ZM. Analysis of fatty acid composition of *Ulva pertusa* Kjellm by gas chromatography/mass spectrometry[J]. Chinese Journal of Chromatography, 2010, 28(7): 668-672 (in Chinese)
楼乔明, 徐杰, 王玉明, 薛长湖, 孙兆敏. 气相色谱/质谱法分析孔石莼中的脂肪酸[J]. 色谱, 2010, 28(7): 668-672
- [17] Mitchell AG, Martin CE. A novel cytochrome b5-like domain is linked to the carboxyl *Terminus* of the *Saccharomyces cerevisiae* Δ -9 fatty acid desaturase[J]. Journal of Biological Chemistry, 1995, 270(50): 29766-29772
- [18] Hryciay EG, O'Brien PJ. Microsomal electron transport. II. Reduced nicotinamide adenine dinucleotide--cytochrome *b*₅ reductase and cytochrome P450 as electron carriers in microsomal NADH-peroxidase activity[J]. Archives of Biochemistry and Biophysics, 1974, 160(1): 230-245
- [19] Cui J, Chen HQ, Tang X, Zhao JX, Zhang H, Chen YQ, Chen W. Δ 6 fatty acid desaturases in polyunsaturated fatty acid biosynthesis: insights into the evolution, function with substrate specificities and biotechnological use[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2020, 104(23): 9947-9963
- [20] Looser V, Bruhlmann B, Bumbak F, Stenger C, Costa M, Camattari A, Fotiadis D, Kovar K. Cultivation strategies to enhance productivity of *Pichia pastoris*: a review[J]. Biotechnology Advances, 2015, 33(6): 1177-1193
- [21] Yang Q. The eukaryotic expression of Δ 9 and Δ 6-fatty acid desaturase of *Eriocheir sinensis*[D]. Shanghai: Master's Thesis of Shanghai Ocean University, 2017 (in Chinese)
杨青. 中华绒螯蟹 Δ 9 和 Δ 6 脂肪酸去饱和酶的真核表达[D]. 上海: 上海海洋大学硕士学位论文, 2017
- [22] Farrokhi N, Hrmova M, Burton RA, Fincher GB. Heterologous and Cell-Free Protein Expression Systems[A]//Gustafson JP, Langridge P, Somers DJ. Plant Genomics[M]. Totowa, NJ: Humana Press, 2009: 175-198
- [23] Mohanty AK, Wiener MC. Membrane protein expression and production: effects of polyhistidine tag length and position[J]. Protein Expression and Purification, 2004, 33(2): 311-325