

# 裂殖壶菌酰基载体蛋白(ACP)基因的克隆与表达

李志平 江贤章 田宝玉 舒正玉 黄建忠\*

(福建师范大学工业微生物教育部工程研究中心 福州 350108)

**摘要:** ACP(Acyl carrier protein, 酰基载体蛋白)参与高度不饱和脂肪酸的 PKS (Polyketide synthase) 生物合成途径。从 *Schizochytrium* sp.FJU-512 cDNA 文库中获得了 ACP 基因的 cDNA 克隆。该序列开放读码框全长 429 bp, 编码 142 个氨基酸, 等电点为 5.04, 具有 4'-磷酸泛酰巯基乙胺(4'-PP)的结合位点。利用 *Bam*H /*Hind* 双酶切, 并连接到原核表达载体 pET-30a, 构建了 pET-30a/acp 表达载体, 转化宿主菌 *E.coli* BL21(DE3), IPTG 诱导表达。SDS-PAGE 分析表明该蛋白得到高效表达。

**关键词:** 裂殖壶菌, 酰基载体蛋白, 二十二碳六烯酸

## Cloning and Expression of Acyl Carrier Protein Gene from *Schizochytrium*

LI Zhi-Ping JIANG Xian-Zhang TIAN Bao-Yu SHU Zheng-Yu HUANG Jian-Zhong\*

(Engineering Research Center of Industrial Microbiology, Ministry of Education, Fujian Normal University, Fuzhou 350108)

**Abstract:** Acyl carrier protein is an essential component involved in the biosynthesis of DHA (Docosahexaenoic Acid) via PKS (Polyketide synthase) pathway, which takes the growing acyl chain from one enzyme to another. One cDNA clone, with high homology of ACP, was isolated from *Schizochytrium* sp. FJU-512 cDNA library. The deduced amino acid sequence contained 142 residues with isoelectric point of 5.04 and had the 4'-phosphopantetheine prosthetic(4'-PP)binding site. The target fragment was digested with *Bam*H /*Hind* and inserted into the expression vector pET-30a resulting in the plasmid pET-30a/acp. The recombinant vector was transformed into *E.coli* BL21(DE3) and induced by IPTG. SDS-PAGE analysis demonstrated that ACP was effectively expressed.

**Keywords:** *Schizochytrium*, Acyl Carrier Protein, Docosahexaenoic Acid

裂殖壶菌 *Schizochytrium*, 生长速度快、杂酸含量少, 是 DHA(Docosahexaenoic Acid, 二十二碳六烯酸)发酵生产的理想菌种<sup>[1, 2]</sup>。DHA 对人体具有多种重要生理功能<sup>[3, 4]</sup>, 然而人体自身难以合成, 必须

从食物中摄取。要实现利用发酵技术规模生产 DHA, 就必须研究 DHA 生物合成与调节的分子机制。

真菌通常是在 C18 脂肪酸的基础上, 通过碳链脱饱和酶与延长酶的催化作用, 实现长链高度不饱

基金项目: 国家自然科学基金项目(No.30370028); 福建省科技厅重大项目(No.2003F005); 福建省发改委资助项目([2005]847)

\* 通讯作者: Tel: 0591-22868212; Fax: 0591-22868195; ✉: hjz@fjnu.edu.cn

收稿日期: 2007-09-06; 接受日期: 2007-11-05

和脂肪酸的生物合成<sup>[5, 6]</sup>。在破囊壶菌 *Thraustochytrium* (与 *Schizochytrium* 同科) 中, 已成功克隆了脱饱和酶, 然而在 DHA 高产菌 *Schizochytrium* 中尚未发现脱饱和酶与延长酶。Metz<sup>[7]</sup> 等人通过对 *Schizochytrium* sp. ATCC20888 高度不饱和脂肪酸合成酶 3 个亚基的开放阅读框对比分析以及<sup>[14C]</sup>同位素标记, 推断裂殖壶菌极有可能通过 PKS(Polyketide synthase)途径合成 DHA。Wallis<sup>[8]</sup> 等人揭示裂殖壶菌 DHA 生物合成不依赖碳链延长与脱氢反应, 他们的研究成果进一步揭示了裂殖壶菌 DHA 合成存在新机制。为了研究 *Schizochytrium* DHA 合成途径, 我们通过松花粉垂钓法筛选获得了 DHA 高产裂殖壶菌 *Schizochytrium* sp. FJU-512<sup>[9]</sup>, 并对其进行 EST 序列注释及功能分析, 发现了许多与 DHA 生物合成的 PKS 途径相关基因<sup>[10]</sup>。ACP (Acyl carrier protein) 作为脂酰基的载体是 PKS 途径中的关键蛋白, 但来源于海洋真菌 *Schizochytrium* 的 ACP 分子克隆表达与功能研究尚未见报道。本研究成功克隆了裂殖壶菌 ACP 基因, 并在大肠杆菌中实现了表达, 为研究海洋真菌 DHA 生物合成的 PKS 途径奠定了基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌种及质粒:** pBluescript R SK(+)XR-acp 重组质粒由本实验室构建, 大肠杆菌 Top10、BL21(DE3), pET-30a 质粒由本实验室保存, pMD18-T Simple vector 购于 TaKaRa。

**1.1.2 酶及相关试剂:** rTaq 酶、ExTaq 酶、T4 DNA ligase 均购于 TaKaRa, Ampicillin、Kanamycin 购于上海生工生物工程技术有限公司, 内切酶 *Bam*H、*Hind* 购于 NEB。

**1.1.3 主要仪器与设备:** BIO IMAGING SYSTEM(GENE GENIUS), 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystems), 80-2114-98 GeneQuant pro (Amersham Bioscience)。

### 1.2 方法

**1.2.1 cDNA 文库中 ACP 基因片段的获得:** 利用 Blast 将 GenBank 中的已公布的 ACP 基因与 *Schizochytrium* sp. FJU-512 cDNA 文库 (GenBank accession No: EH401876~EH405880、EF483873~EF483917) 中的序列进行比对寻找 ACP 同源基因。

**1.2.2 ACP 基因克隆与鉴定:** 根据 pBluescript R

SK(+)XR-acp 测序结果, 设计引物, 其引物序列为 ACP-F: CGCGGATCCATGCGCCGTGCTGCTTCCCGT; ACP-R: CCCAAGCTTCTACTG GGCTTGCGGGTGCTG (下划线是 *Bam*H 或 *Hind* 酶切位点)。以提取的 pBluescript R SK(+)XR-acp 质粒为模板, PCR 扩增得到 ACP 基因全长序列。PCR 条件为 94 预变性 5 min; 94 变性 30 s, 65 1.5 min, 30 个循环; 72 8 min。PCR 产物连接入 pMD18-T Simple Vector, 转化宿主菌 *E. coli* Top10, 挑取阳性克隆并提取质粒由上海生工生物工程技术有限公司进行测序鉴定。利用 ExPASy 工具包分析目标蛋白的理化表征。

**1.2.3 pET-30a/acp 重组质粒的构建与表达:** 利用 *Bam*H 和 *Hind* 对上述重组质粒与 pET-30a 载体分别进行双酶切, 凝胶纯化目的基因与载体片段, T4 连接酶 16 过夜连接, 提取质粒进行酶切鉴定后测序验证。IPTG 诱导 5 h, 离心收集沉淀并重悬于 100  $\mu$ L SDS 加样缓冲液中, 100 加热 5 min, 15%SDS-PAGE 鉴定。

## 2 结果

### 2.1 ACP 基因的克隆

将本课题组提交 GenBank 的 *Schizochytrium* sp. FJU-512 cDNA 5 条 EST 序列 (EH404289、EH404403、EH403044、EH405356、EH405648) 拼接成 Contig521 (GenBank Accession NO: EF483911), Blast 分析表明 Contig521 与 GenBank 公布的 ACP 基因有较高的同源性。利用 ACP-F、ACP-R 引物 PCR 扩增, 以 EST 文库中的质粒 pBluescript R SK(+)XR-acp 为模板, 获得大小为 450 bp 的片段 (图 1), 与

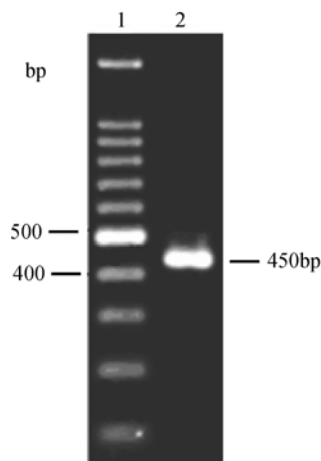


图 1 pBluescript R SK(+)XR-acp 质粒的 PCR 产物

Fig. 1 Amplification of ACP from pBluescript<sup>R</sup> SK(+)XR-acp plasmid

1: Marker; 2: ACP 基因 1: Marker; 2: ACP gene



泛酰巯基乙胺(4'-PP)的结合位点<sup>[11, 12]</sup>。

## 2.4 pET-30a/acp 重组质粒的表达

将构建的重组表达载体 pET-30a/acp, 转化宿主菌 BL21(DE3); 用 ACP-F, ACP-R 引物进行菌落 PCR 验证, 获得 450 bp 的目的片段(图 4), 提取质粒酶切, 电泳检测得到 450 bp 与 5422 bp 两条带, 均与预期片段相符(图 5)。经 DNA 测序证明重组表达质粒读码框正确, 插入 cDNA 序列无误, 命名为 pET-30a/acp。IPTG 诱导表达, SDS-PAGE 电泳显示, 表达产物的分子质量为 26 kD(图 6)。虽然经 ExPASy 在线计算, 分子量理论值为 20.4 kD(包括表达载体 N 端的融合蛋白序列), 但是这样的差别在其他文献中也有报道<sup>[13-15]</sup>, 主要与 ACP 这类蛋白具有较高的荷质比以及含有疏水性氨基酸的比例较低有关系<sup>[15]</sup>。

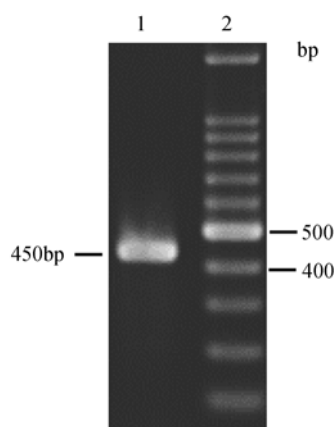


图 4 重组质粒的菌落 PCR 验证

Fig. 4 Verificaion of recombinant plasmid by colony PCR  
1: marker; 2: ACP 基因 1: marker; 2: ACP gene

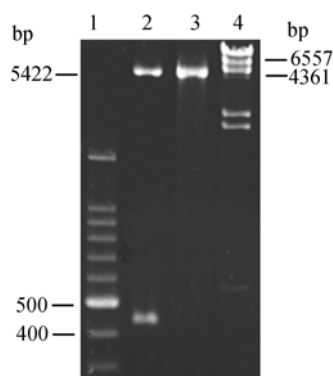


图 5 pET-30a/acp 重组质粒的双酶切验证

Fig. 5 pET-30a/acp digested by *Hind* and *Bam*H  
1: marker; 2: *Hind* III、*Bam*H 双酶切 pET-30a/acp;  
3: *Hind* III、*Bam*H 双酶切 pET-30a; 4:  $\lambda$ -*Hind* marker  
1: marker; 2: pET-30a/acp digested by *Hind* and *Bam*HI; 3:  
pET-30a digested by *Hind* and *Bam*HI; 4:  $\lambda$ -*Hind* marker

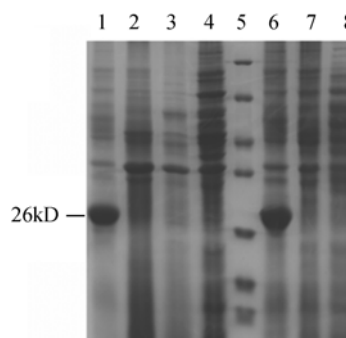


图 6 重组质粒蛋白表达产物的 SDS-PAGE 鉴定

Fig. 6 SDS-PAGE analysis of expressed product

1: 含 pET-30a/acp 的菌诱导破碎后沉淀; 2: 含 pET-30a 的菌诱导破碎后沉淀; 3: 含 pET-30a/acp 的菌诱导破碎后上清; 4: 含 pET-30a 的菌诱导破碎后上清; 5: 低分子量蛋白 marker; 6: 含 pET-30a/acp 的菌诱导后菌体总蛋白; 7: 含 pET-30a/acp 的菌未诱导菌体总蛋白; 8: 诱导空载体菌总蛋白

1: insoluble fraction of bacteria strain transformed with pET-30a/acp induced; 2: insoluble fraction of bacteria strain transformed with pET-30a induced 3: soluble fraction bacteria strain transformed with pET-30a/acp induced; 4: soluble fraction bacteria strain transformed with pET-30a induced; 5: Protein Molecular Weight Marker; 6: total proteins of bacteria strain transformed with pET-30a/acp induced; 7: total proteins of bacteria strain transformed with pET-30a/acp non-induced; 8: total proteins of bacteria strain transformed without plasmid induced

## 3 讨论

ACP 作为脂肪酸合成途径中脂酰基的载体, 其辅基是其丝氨酸残基上结合的 4'-磷酸泛酰巯基乙胺基(4'-PP), 脂肪酸生物合成的中间产物结合到 4'-PP 侧链的 -SH 基(携带脂酰基的功能部位), 最终通过磷酸二酯键共价结合于蛋白质部分的丝氨酸, 因此在氨基酸序列中是否具备 4'-PP 结合位点成为判定此类蛋白的依据<sup>[12, 16, 17]</sup>。本研究应用生物信息学及分子生物学手段分析并获得了裂殖壶菌的 ACP 基因(该基因序列具备 4'-PP 结合位点的保守区域), 构建了原核表达载体 pET-30a/acp, 在大肠杆菌中进行了表达, 为进一步研究裂殖壶菌 DHA 生物合成相关的 PKS 途径奠定了基础。Schizochytrium 高度不饱和脂肪酸生物合成的途径还涉及 3-酮脂酰-ACP 合成酶(KS)、3-酮脂酰-ACP 还原酶(KR)、烯脂酰-ACP-脱水酶/异构酶(DH)、烯脂酰-ACP-还原酶(ER)等酶的催化作用<sup>[18]</sup>, 故要彻底解析该途径, 还需要克隆上述基因, 表达这些蛋白, 并研究它们的功能。

## 参 考 文 献

- [1] Morita E, Kumon Y, Nakahara T, *et al.* Docosahexaenoic Acid Production and Lipid-Body Formation in *Schizochytrium limacinum* SR21. *Mar Biotechnol*, 2006, **8**(3): 319–327.
- [2] Fan KW, Jiang Y, Faan YW, *et al.* Lipid Characterization of Mangrove Thraustochytrid-Schizochytrium mangrovei. *J Agric Food Chem*, 2007, **55**(8): 2906–2910.
- [3] Sudheera SD, Leitch J, Garg ML. N-3 Polyunsaturated fatty acid supplementation alters inositol phosphate metabolism and protein kinase C activity in adult porcine cardiomyocytes. *J Nutr Biochem*, 2001, **12**(1): 7–13.
- [4] Muskiet FAJ, Fokkema MR, Schaafsma A, *et al.* Is Docosahexaenoic Acid (DHA) Essential? Lessons from DHA Status Regulation, Our Ancient Diet, Epidemiology and Randomized Controlled Trials. *J Nutr*, 2004, **134**(1): 183–186.
- [5] Nakamura MT, Nara TY. Structure, function, and dietary regulation of  $\Delta 6$ ,  $\Delta 5$ , and  $\Delta 9$  desaturases. *Annu Rev Nutr*, 2004, **24**: 345–376.
- [6] Meyer A, Kirsch H, Domergue F, *et al.* Novel fatty acid elongases and their use for the reconstitution of docosa-hexaenoic acid biosynthesis. *J Lipid Res*, 2004, **45**(10): 1899–1909.
- [7] Metz JG, Roessler P, Facciotti D, *et al.* Production of Polyunsaturated Fatty Acids by Polyketide Synthases in Both Prokaryotes and Eukaryotes. *Science*, 2001, **293**(5528): 290–293.
- [8] Wallis JG, Watts JL. Polyunsaturated fatty acid synthesis: what will they think of next? *Trends Biochem Sci*, 2002, **27**(9): 467–473.
- [9] 黄建忠, 江贤章. DHA 高产菌 *Schizochytrium* sp. FJU-512 的分离及其 18S rRNA 基因序列比较分析. *应用与环境生物学报*, 2005, **11**(2): 202–207.
- [10] 江贤章, 刘丽霞, 黄建忠. DHA 高产菌 *Schizochytrium* sp. FJU-512 cDNA 文库的构建与分析. *中国医学研究与临床*, 2005, **3**(11): 9–14.
- [11] 刘祚军, 张部昌, 马清钧. 磷酸泛酰巯基乙胺基转移酶的研究进展. *中国抗生素杂志*, 2006, **31**(6): 335–338.
- [12] Zhang YM, Marrakchi H, White SW, *et al.* The application of computational methods to explore the diversity and structure of bacterial fatty acid synthase. *J Lipid Res*, 2003, **44**(1): 1–10.
- [13] Morbidoni HR, Mendoza D, Cronan JE. *Bacillus subtilis* acyl carrier protein is encoded in a cluster of lipid biosynthesis genes. *J Bacteriol*, 1996, **178**(16): 4794–4800.
- [14] Kutchma AJ, Hoang TT, Schweizer HP. Characterization of a *Pseudomonas aeruginosa* Fatty Acid Biosynthetic Gene Cluster: Purification of Acyl Carrier Protein (ACP) and Malonyl-Coenzyme A: ACP Transacylase (FabD). *J Bacteriol*, 1999, **181**(17): 5498–5504.
- [15] Liu Q, Ma Y, Zhou L, *et al.* Gene cloning, expression and functional characterization of an acyl carrier protein AcpV from *Vibrio anguillarum*. *Arch Microbiol*, 2006, **185**(2): 159–163.
- [16] Parris KD, Lin L, Tam A, *et al.* Crystal structures of substrate binding to *Bacillus subtilis* holo-(acyl carrier protein) synthase reveal a novel trimeric arrangement of molecules resulting in three active sites. *Structure*, 2000, **8**(8): 883–895.
- [17] Flugel RS, Hwangbo Y, Lambalot RH, *et al.* Holo-(Acyl Carrier Protein) Synthase and Phosphopantetheinyl Transfer in *Escherichia coli*. *J Biol Chem*, 2000, **275**(2): 959–968.
- [18] Napier JA. Plumbing the depths of PUFA biosynthesis: a novel polyketide synthase-like pathway from marine organisms. *Trends Plant Sci*, 2002, **7**(2): 51–54.