

产蜡酯聚球藻 PCC 7002 的构建

何晨柳^{1,2} 孔任秋¹ 胡晗华¹

(1. 中国科学院水生生物研究所, 武汉 430072; 2. 中国科学院研究生院, 北京 100049)

SYNECHOCOCCUS SP. PCC 7002 ENGINEERED FOR WAX ESTER PRODUCTION

HE Chen-Liu^{1,2}, KONG Ren-Qiu¹ and HU Han-Hua¹

(1. Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072; 2. The Graduate University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049)

关键词: 聚球藻 PCC 7002; 蜡酯; 蜡酯合成酶/酰基辅酶 A:二酰基甘油酰基转移酶; 脂酰辅酶 A 还原酶

Key words: *Synechococcus* sp. PCC 7002; Wax ester; Wax ester synthase/acyl-CoA: diacylglycerol acyltransferase (WS/DGAT); Fatty acyl-CoA reductases

中图分类号: Q789 文献标识码: A 文章编号: 1000-3207(2010)06-1202-04

蜡酯是由含 C16 以上偶碳的高级脂肪酸与高级脂肪醇酯化形成的中性酯, 是一种重要的经济油脂, 被广泛应用于纺织、医药、化妆品和食品等行业。液态不饱和蜡酯还能作为航空航天工业、人工心脏、精密仪器仪表和特种机械等高科技领域专用的润滑剂^[1,2]。目前使用的蜡酯主要来源于动植物及矿石资源, 来源十分有限, 且提取和收集比较困难; 通过化学方法生产蜡酯则存在条件难以控制和产物分离困难等问题。因而, 蜡酯的价格十分昂贵, 这极大地限制了蜡酯的使用。所以, 开发完全以廉价可再生的原料合成的新型蜡酯来替代传统蜡酯成为了工业生产的必然要求。

在细菌中, 蜡酯的合成成分三步进行: 首先, 脂酰辅酶 A 在 NADPH 的参与下经脂酰辅酶 A 还原酶(Acr1)催化被还原为脂肪醛; 接着, 脂肪醛还原酶催化 NADPH 依赖的反应, 将脂肪醛还原为脂肪醇, 目前脂肪醛还原酶的编码基因还未被鉴定出来; 最后, 在双功能酶蜡酯合成酶/酰基辅酶 A:二酰基甘油酰基转移酶(WS/DGAT)的作用下, 脂肪醇与长链脂酰辅酶 A 通过转酯作用合成蜡酯^[3-5]。在动物和植物中, 脂酰辅酶 A 还原酶能够在 NADPH 的参与下, 直接将脂酰辅酶 A 还原为脂肪醇, 不会生成脂肪醛这个中间产物^[6,7]。

不动杆菌(*Acinetobacter baylyi* ADP1)中的 WS/DGAT 现已在香茅醇假单胞菌^[4]、酿酒酵母^[8]、大肠杆菌^[9,10]和鱼腥藻 PCC 7120^[11]等多种微生物中成功表达。Kalscheuer, *et al.*^[9]在大肠杆菌中共表达了来源于加州希蒙得木的脂酰辅酶 A 还原酶和不动杆菌的 WS/DGAT, 在外加油酸(C18:1)的条件下, 重组菌能够积累占细胞干重约 1%的蜡酯。在大肠杆菌中表达加州希蒙得木脂酰辅酶 A 还原酶, 仅检测到很低水平的脂肪醇合成, 这是由于加州希蒙得木的脂酰辅酶 A 还原酶偏好于使用 20—24 个碳原子的脂肪酸作为底物^[12]。我们实验室在鱼腥藻 PCC 7120 中共表达了来源于不动杆菌的 WS/DGAT 基因(*atfA*)和小鼠的脂酰辅酶 A 还原酶基因的编码序列(*far1* cDNA), 得到了产量约为细胞干重 1%的产蜡酯鱼腥藻, 并发现蜡酯的合成偏好于利用 C16 和 C18 饱和脂肪酸作为转酯反应的底物^[13]。在鱼腥藻 PCC 7120 中仅表达 WS/DGAT 基因, 则需在外加十六醇的条件下, 才能检测到蜡酯的合成^[11]。2010 年, Steen, *et al.*^[10]在大肠杆菌中除通过表达 WS/DGAT 和脂酰辅酶 A 还原酶合成蜡酯外, 还表达了两个与乙醇合成相关的基因, 使菌株能够直接积累生物柴油(脂肪酸乙酯), 并试图通过表达半纤维素酶, 以利用廉价的半纤维素, 建立起更加符合成本效益的可再生能源生产工艺。

收稿日期: 2010-05-10; 修订日期: 2010-09-01

基金项目: 国家自然科学基金(30770049); 中国科学院创新工程重要方向项目(KSCX2-YW-G-060)资助

作者简介: 何晨柳(1982—), 女, 湖北荆门人; 硕士研究生; 主要从事蓝藻基因工程研究。E-mail: hechenliu@yahoo.com.cn

通讯作者: 胡晗华, E-mail: hanhuahu@ihb.ac.cn

聚球藻 PCC 7002 是一种海洋蓝藻, 更能适应大规模培养的要求。通过基因工程手段, 利用海洋微藻合成蜡酯可以进一步降低生产成本。本研究将蜡酯合成酶基因与脂酰辅酶 A 还原酶基因转入到聚球藻 PCC 7002 中, 以利用其直接合成蜡酯。

1 材料与方法

1.1 藻株和培养

聚球藻 PCC 7002 由中国科学院水生生物研究所赵进东院士提供, 转基因株 *wax-far1* 7002 的基因组中插入有壮观霉素抗性片段, 用 A^+ 液体或固体培养基^[14], 在 28—30℃、30 $\mu\text{E}/\text{m}^2\cdot\text{s}$ 光照条件下培养, 转基因株在培养基中外加 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的壮观霉素(Sp)。

1.2 质粒和转化

质粒 pHB2876 和 pHB3161 为本实验室构建^[13], 分别含有来自于 KM 小鼠的脂酰辅酶 A 还原酶基因的编码序列(*far1* cDNA)和来源于聚球藻 PCC 7002 的 *rbcL* (Large subunit of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase)启动子、不动杆菌 ADP1 的蜡酯合成酶编码基因 *atfA* 及壮观霉素抗性基因片段。用 *Xba* I 和 *Sal* I 从 pHB2876 上切下完整的 *far1* cDNA, 以 T4 DNA 聚合酶补平末端后, 与 pHB3161 经 *Xba* I 酶切并回收补平的 6.6 kb 片段连接, 最终得到用于转化聚球藻 PCC 7002 的质粒 pHB3486。聚球藻 PCC 7002 的转化按照 Williams^[15]的方法进行。

1.3 DNA 操作

聚球藻 PCC 7002 的基因组 DNA 按徐旭东等^[16]描述的方法提取。以野生型聚球藻 PCC 7002 为阴性对照, 质粒 pHB3486 为阳性对照, 分别以 *PrbcL*-1 (5'-GACAGCA CCAAGAGGCA-3')/*FAR1*-2(5'-GTTCTAATGCTAAATT CTTGGTCTTCAGTATC-3')和 *FAR1*-1 (5'-ACTAGGAGG AGTCAGGATGGTTTCAATCCAG-3')/*wax*-2 (5'-ACGG CATGCAATCAAACCAACT-3')为配对引物, 通过 PCR 的方法检测转化子。50 μL PCR 反应体系含有 10 mmol/L Tris-HCl (pH 8.3)、50 mmol/L KCl、2 mmol/L MgCl_2 、200 $\mu\text{mol}/\text{L}$ dNTPs、引物各 100 pmol、50 ng DNA 模板和 2 U *Taq* DNA 聚合酶。PCR 反应程序为: 94℃变性 6min, 接下来是 30 个循环反应(94℃变性 30s, 60℃复性 30s, 72℃延伸 2min), 最后是 72℃延伸 10min。

1.4 薄层层析

藻细胞中总脂的提取采用氯仿/甲醇萃取的方法^[3], 略有修改。培养至稳定期($A_{750}=1.8$)的藻液以 6000 r/min 离心收集, 用新鲜的 A^+ 培养基洗涤一次, 离心弃上清, 加入 1% 原始培养物体积的氯仿: 甲醇(50: 50), 在旋涡振荡器上以最大速度振荡 1—2min, 然后加入 3/10 体积的 1 mol/L 氯化钾的 0.2 mol/L 磷酸溶液并混匀, 12000 r/min 离心 5min, 吸取下层氯仿相至新的 EP 管中, 置于通风橱中吹干溶剂, 根据生物量的不同重悬于一定体积的氯仿

中, -20℃保存待测。

薄层层析参考文献[3]进行。薄层层析板的型号为 Silica gel 60 F254 (Merk KgaA Darmstadt, Germany), 标准品棕榈酰棕榈酯(palmityl palmitate)购自 Sigma 公司, 展层剂体系为正己烷: 乙醚: 乙酸(90: 10: 1, v/v/v)。展层完毕从展层缸中取出层析板, 待层析板上的展层剂挥发干后向上喷 50% 硫酸并立即置于 160℃烘箱中烘烤 5min 显色。

2 结果与讨论

为了在聚球藻 PCC 7002 中合成蜡酯, 我们将 *FAR1* cDNA 和 *atfA* 这两个基因置于聚球藻 PCC 7002 的启动子 *P_{rbcL}* 的控制下, 构建了质粒 pHB3486(图 1), 通过 *P_{rbcL}* 处的同源片段发生单交换整合到聚球藻 PCC 7002 基因组, 得到转化子。该质粒中的 *FAR1* cDNA 编码的脂酰辅酶 A 还原酶, 能够将脂酰辅酶 A 还原成相应的脂肪醇, 再在 *atfA* 基因编码的蜡酯合成酶的催化下, 与长链脂酰辅酶 A 发生转酯反应生成蜡酯。

以 *PrbcL*-1/*FAR1*-2 和 *FAR1*-1/*wax*-2 为配对引物, PCR 鉴定质粒 pHB3486 转入野生型聚球藻 PCC 7002 所得的转化子。琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 结果(图 2), 野生型未能扩出条带, 而阳性对照和转化子则有相应基因的条带出现, 大小符合, 说明表达质粒已成功导入聚球藻 PCC 7002 中, 得到了转基因株 *wax-far1* 7002。生长实验显示, 在 A^+ 培养基中, pHB3486 的导入对藻株的生长没有明显影响。

将培养至稳定期的野生型和转基因藻株离心收集, 提取总脂进行薄层层析分析, 结果显示, 转基因株 *wax*-

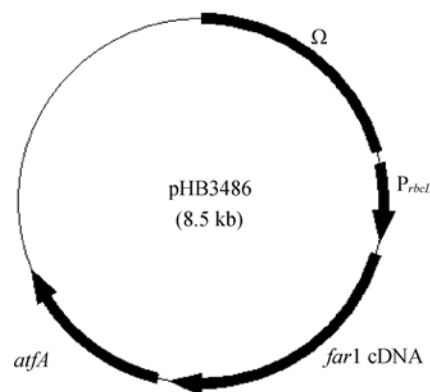


图 1 表达质粒 pHB3486

Fig. 1 The expression plasmid pHB3486

P_{rbcL}, 聚球藻 1,5-二磷酸核酮糖羧化酶大亚基基因启动子; *far1* cDNA, 小鼠脂酰辅酶 A 还原酶基因的编码序列; *atfA*, 细菌蜡酯合成酶基因; Ω , 壮观霉素抗性基因

P_{rbcL}, *Synechococcus* promoter of large subunit of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase gene; *far1* cDNA, mice cDNA of fatty acyl-CoA reductase; *atfA*, bacterial wax ester synthase/acyl-CoA: diacylglycerol acyltransferase gene; Ω , spectinomycin resistant gene

far1 7002 中有蜡酯的积累, 而野生型则没有蜡酯的合成(图 3)。我们的实验表明, 来自不动杆菌 ADP1 的蜡酯合成酶基因 *atfA* 和小鼠的脂肪酰辅酶 A 还原酶基因在强启动子 P_{rbcL} 的驱动下成功地在聚球藻 PCC 7002 中得到共表达。在高温条件下聚球藻 PCC 7002 细胞的主要脂肪酸类型是 C16:0(palmitic acid)、C18:1(oleic acid)和 C18:2(linoleic acid)^[17]; 小鼠脂肪酰辅酶 A 还原酶 1(FAR1)偏好 C16 和 C18 脂肪酸做底物^[12]。因而, 聚球藻细胞中的脂肪酸在外源的脂肪酰辅酶 A 还原酶 1 作用下可以生成脂肪醇, 然后, 在来自不动杆菌 ADP1 的双功能酶蜡酯合成酶/酰基辅酶 A:二酰基甘油酰基转移酶(WS/DGAT)的作用下合成蜡酯。

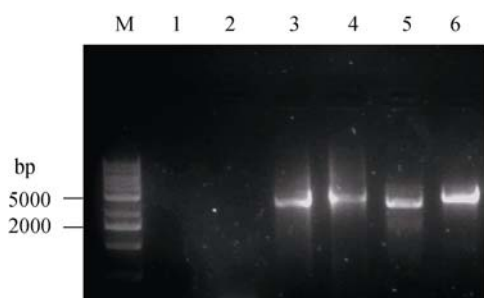


图 2 聚球藻 PCC 7002 (pHB3486)的 PCR 检测

Fig. 2 PCR examination of *Synechococcus* sp. PCC 7002 (pHB3486)

1、3、5. 以 P_{rbcL} -1 和 FAR1-2 为引物检测 P_{rbcL} -FAR1; 2、4、6. 以 FAR1-1 和 wax-2 为引物检测 FAR1-*atfA*; 1、2. 野生型聚球藻 PCC 7002; 3、4. 质粒 pHB3486; 5、6. 聚球藻 PCC 7002 (pHB3486); M. 1 kb DNA 分子量标准

Lanes 1, 3 and 5, detection of P_{rbcL} -FAR1 using P_{rbcL} -1 and FAR1-2 as primers; lanes 2, 4 and 6, detection of FAR1-*atfA* using FAR1-1 and wax-2 as primers; Lanes 1 and 2, *Synechococcus* sp. PCC 7002; 3 and 4, plasmid pHB3486; 5 and 6, *Synechococcus* sp. PCC7002 (pHB3486); M, 1 kb DNA markers

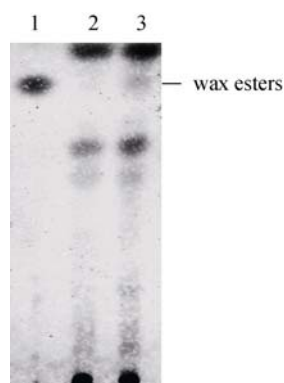


图 3 转基因株的蜡酯合成

Fig. 3 Wax esters biosynthesis in transgenic strain

1. 棕榈酰棕榈酯; 2. 聚球藻 PCC 7002; 3. 聚球藻 PCC 7002 (pHB3486)

1. Palmitoyl palmitate; 2. *Synechococcus* sp. PCC7002; 3. *Synechococcus* sp. PCC7002 (pHB3486)

本研究通过基因工程手段, 成功构建了能够异源合成蜡酯的转基因聚球藻 PCC 7002。聚球藻 PCC 7002 作为一种单细胞的海洋蓝藻, 具有易培养, 生长速率快, 且在利用海水进行培养不易污染等优点, 更适于户外大规模的养殖。所以, 通过进一步的培养条件优化, 可望使其成为廉价和可再生的生产蜡酯资源的新途径, 以满足经济生活对蜡酯的大量需求。

参考文献:

- [1] Benzioni A. Jojoba domestication and commercialization in Israel [J]. *Horticultural Reviews*, 1995, **17**: 233—266
- [2] Zhao J J, Deng L, Tan T W, *et al.* Wax esters synthesis from rapeseed oil by immobilized lipase [J]. *Chemical Industry And Engineering Progress*, 2007, **26**: 1311—1315 [赵晶晶, 邓利, 谭天伟, 等. 固定化脂肪酶催化菜籽油合成蜡酯. 化工进展, 2007, **26**: 1311—1315]
- [3] Reiser S and Somerville C. Isolation of mutants of *Acinetobacter calcoaceticus* deficient in wax ester synthesis and complementation of one mutation with a gene encoding a fatty acyl coenzyme A reductase [J]. *Journal of Bacteriology*, 1997, **179**: 2969—2975
- [4] Kalscheuer R and Steinbüchel A. A novel bifunctional wax ester synthase/acyl-CoA:diacylglycerol acyltransferase mediates wax ester and triacylglycerol biosynthesis in *Acinetobacter calcoaceticus* ADP1 [J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2003, **278**: 8075—8082
- [5] Stöveken T, Kalscheuer R, Malkus U, *et al.* The wax ester synthase/acyl coenzyme A:diacylglycerol acyltransferase from *Acinetobacter* sp. strain ADP1: characterization of a novel type of acyltransferase [J]. *Journal of Bacteriology*, 2005, **187**: 1369—1376
- [6] Pollard M R, McKeon T, Gupta L M, *et al.* Studies on biosynthesis of waxes by developing jojoba seed. II. The demonstration of wax biosynthesis by cell-free homogenates [J]. *Lipids*, 1979, **14**: 651—662
- [7] Cheng J B and Russell D W. Mammalian wax biosynthesis. I. Identification of two fatty acyl-coenzyme A reductases with different substrate specificities and tissue distributions [J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2004, **279**: 37789—37797
- [8] Kalscheuer R, Luftmann H and Steinbüchel A. Synthesis of novel lipids in *Saccharomyces cerevisiae* by heterologous expression of an unspecific bacterial acyltransferase [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2004, **70**: 7119—7125
- [9] Kalscheuer R, Stöveken T, Luftmann H, *et al.* Neutral lipid biosynthesis in engineered *Escherichia coli*: jojoba oil-like wax esters and fatty acid butyl esters [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2006, **72**: 1373—1379
- [10] Steen E J, Kang Y, Bokinsky G, *et al.* Microbial production of fatty-acid-derived fuels and chemicals from plant biomass

- [J]. *Nature*, 2010, **463**: 559—562
- [11] Sheng C X and Kong R Q. Wax ester biosynthesis in a genetically engineered cyanobacterium [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2010, **34**(3): 652—655 [盛春霞, 孔任秋. 基因工程蓝藻产蜡酯的研究. 水生生物学报, 2010, **34**(3): 652—655]
- [12] Metz J G, Pollard M R, Anderson L, *et al.* Purification of a jojoba embryo fatty acyl-coenzyme A reductase and expression of its cDNA in high erucic acid rapeseed [J]. *Plant Physiology*, 2000, **122**: 635—644
- [13] Sheng C X. Genetic modifications of fatty acids metabolism pathway in *Anabaena* sp. [D]. Master Dissertation of Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan. 2008 [盛春霞. 鱼腥藻脂肪酸代谢途径的遗传改造. 硕士学位论文, 中国科学院水生生物研究所, 武汉. 2008]
- [14] Stevens S E Jr, Patterson C O P and Myers J. The production of hydrogen peroxide by blue-green algae: a survey [J]. *Journal of Phycology*, 1973, **9**: 427—430
- [15] Williams J G K. Construction of specific mutations in photosystem II photosynthetic reaction center by genetic engineering methods in *Synechocystis* 6803 [J]. *Methods in Enzymology*, 1988, **167**: 766—778
- [16] Xu X D, Wang Y Q and Li S H. Construction of biphasic CAT promoter probe vector shuttling between *Anabaena* (blue-green algae) and *Escherichia coli* [J]. *Journal of Graduate School, Academia Sinica*, 1993, **10**: 203—209 [徐旭东, 王业勤, 黎尚豪. 鱼腥藻-大肠杆菌 CAT 启动子探测载体的构建. 中国科学院研究生院学报, 1993, **10**: 203—209]
- [17] Sakamoto T, Shen G, Higashi S, *et al.* Alteration of low-temperature susceptibility of the cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC 7002 by genetic manipulation of membrane lipid unsaturation [J]. *Archives of Microbiology*, 1998, **169**: 20—28