

基因工程蓝藻产蜡酯的研究

盛春霞^{1,2} 孔任秋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)

WAX ESTER BIOSYNTHESIS IN A GENETICALLY ENGINEERED CYANOBACTERIUM

SHENG Chun-Xia^{1,2} and KONG Ren-Qiu¹

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

关键词: 蜡酯; 蜡酯合成酶/酰基辅酶 A 二酰甘油酰基转移酶; 蓝藻

Key words: Wax ester; WS/DGAT; Cyanobacterium

中图分类号: Q789 文献标识码: A 文章编号: 1000-3207(2010)03-0652-04

蜡酯属于生物体内积累的一类氧酯,是由长链脂肪酸和长链脂肪醇酯化形成的,具有多种生物功能。比如在植物表面抵抗干旱,阻挡紫外线,防止病原侵袭,在鲸体内帮助调节浮力和传播声音,在有些植物果实中作为能量储存。从动植物中提纯的液体蜡酯对人类有重要的用途,譬如做精密仪器的高级润滑剂,或做药物、化妆品和食品的添加剂,市场需求大,被称之为液体黄金。过去,液体蜡酯的获得主要是从大型海洋动物鲸体内提取。由于对鲸类捕猎的限制,人们后来种植加州西蒙得木,从其果核中榨取液体蜡酯来替代鲸源蜡酯。工业化合成及利用固定化脂肪酶生产是目前满足蜡酯需求的另外一条渠道。

一些细菌也可在细胞中积累蜡酯^[1-3],对它们相关基因及关键酶的研究,有助于我们了解微生物中蜡酯的合成。蜡酯在不动杆菌(*Acinetobacter*)中是最常见的贮藏物,其分子结构类似于加州西蒙得木蜡酯,含量占细胞干重最多可达14%^[3]。不动杆菌中负责蜡酯合成最后一步的酶是一种对底物高度非特异性的双功能酶(WS/DGAT),它既可以作为蜡酯合成酶(WS),在蜡酯合成最后一步起作用,又可以作为酰基辅酶 A 二酰甘油酰基转移酶(DGAT)在三酰甘油合成中起作用^[4]。WS/DGAT (*atfA*)基因在一些积累蜡酯或油脂的细菌中都有同源序列^[5-7],与真核生物中参与脂肪和蜡酯合成的酶无同源性。细菌合成脂肪醇的关键酶:脂肪醛还原酶还未被鉴定出。2006

年, Kalscheuer, *et al.* 通过基因工程的方法在大肠杆菌中共表达了来自贝氏不动杆菌 ADP1 株的蜡酯合成酶基因和来自加州西蒙得木的脂肪酰辅酶 A 还原酶基因,成功构建了异源合成蜡酯的重组菌株^[8]。该重组菌在添加外源脂肪酸的条件下能合成蜡酯,产量约为细胞干重的1%。虽然其结果离应用还有很大差距,但为我们提供了寻找低成本生产液体蜡酯、满足市场需求的新思路。本研究尝试将不动杆菌属蜡酯合成酶基因在丝状蓝藻鱼腥藻(*Anabaena* sp.)中表达,以期待利用太阳光能和二氧化碳合成蜡酯。

1 材料与方法

1.1 质粒、菌株和试剂

限制性内切酶、T 载体 pMD18-T 购自大连宝生物工程有限公司, *Taq* 酶和 DNA 片段回收试剂盒购自晶美公司,末端补平所用 T_4 DNA 聚合酶是 Promega 公司产品;接合转移质粒 pRL443、pRL623 及穿梭载体 pRL25C 和鱼腥藻 EF113 来自 Peter Wolk 实验室^[9],贝氏不动杆菌(*Acinetobacter baylyi* ADP1)购自美国,编号为 ATCC33305。质粒 pHB1347 为本实验室构建^[10],十六醇购自上海国药集团化学试剂有限公司,三酰甘油和棕榈酰棕榈酯标样是 Sigma 公司产品。

1.2 DNA 操作

DNA 重组一般操作按 Molecular Cloning^[11] 描述的

收稿日期: 2009-01-20; 修订日期: 2009-06-30

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: 盛春霞(1981—),女,山东微山县人;硕士研究生;主要从事蓝藻基因工程研究。E-mail: chunerbio@yahoo.com.cn

通讯作者: 孔任秋, E-mail: kongr@ihb.ac.cn

方法进行, 工具酶的使用按供货商提供的条件进行; DNA 黏性末端以 T_4 DNA 聚合酶补平; PCR 反应条件为: 94°C 变性 6min; 94°C 1min, 60°C 1min, 72°C 1min 30s, 之后 30 个循环; 最后, 72°C 延伸反应 10min。蓝藻基因组 DNA 的提取参考本实验室通用的方法^[12]。根据 GenBank 数据库 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/>) 中 *Acinetobacter baylyi* ADP1 株 *atfA* 基因的核苷酸序列, 设计了一对引物, *aftA*-1 (5'-GAGGACACGCTATGCGCCATTACATCCGATTG-3') 和 *aftA*-2 (5'-TTAATTGGCTGTTTAAATATCTTCCTGCT-3')。以贝氏不动杆菌基因组 DNA 为模板, *aftA*-1 和 *aftA*-2 为引物, PCR 扩增出一条 DNA 带, 经分离纯化克隆于 pMD18-T 载体, 克隆片段经测序确认, 获得质粒 pHB904。

以 *Nhe* 和 *Sal* 酶切质粒 pHB1347 获得带有壮观霉素抗性基因和鱼腥藻 *rbcL* 启动子(Ω - P_{rbcL})的片段, 用于在鱼腥藻表达 *atfA* 基因。该片段经补平末端后插入以 *Bam*HI 酶切并补平的 pHB904 中 *atfA* 的上游, 得到质粒 pHB2850。然后将 pHB2850 以 *Kpn* 和 *Sal* 酶切回收 Ω - P_{rbcL} -*atfA* 片段, 补平末端后连接到以 *Eco*RI 酶切并补平的穿梭载体 pRL25C 中, 得到质粒 pHB2803。质粒构建过程中, 以引物 *PrbcL*-1a (5'-ACCTCCAGCCATTAGCGAAAC-3'), *PrbcL*-1b (5'-CTCTCACAATTGCCCTACCT-3'), *wax*-1 (5'-AATCCCTGTTCCACCATTCA-3') 和 *wax*-2 (5'-ACGGCATGCAATCAAACCAACT-3') 通过 PCR 方法鉴定 *rbcL* 启动子及 *atfA* 基因的插入方向。

1.3 蓝藻培养和接合转移

蓝藻用 BG11 液体或固体培养基, 在 $28\sim 30^{\circ}\text{C}$ 、 $30\ \mu\text{E}/\text{m}^2\cdot\text{s}$ 光照条件下培养。抗生素浓度分别为壮观霉素(Sp) $5\ \mu\text{g}/\text{mL}$, 新霉素(Nm) $25\ \mu\text{g}/\text{mL}$ 。接合转移按文献^[13]描述的方法进行。

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, 将诱导培养过的转基因藻细胞离心收集, 然后加入 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, 再加入 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, 油脂就溶在氯仿相中。置通风橱中吹干溶剂, -20°C 保存待测。

薄层层析参照文献^[14]进行, 所用薄层层析板的型号是 Silica gel 60 F254 (Merk KgaA Darmstadt, Germany), 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向上喷 50% 硫酸并立即置 160°C 烘箱中烘烤 5min 显色。

2 结果和讨论

利用不动杆菌基因组 DNA 作为模板, 以 PCR 方法

扩增出含有 *atfA* 基因的 DNA 片段, 克隆于 pMD18-T 载体, 经测序证明正确, 获得质粒 pHB904。将含有鱼腥藻 PCC7120 *rbcL* 基因启动子的片段插入 *atfA* 基因上游获得质粒 pHB2850。从该质粒中切下 Ω - P_{rbcL} -*atfA* 片段, 克隆于穿梭载体 pRL25C 得到可以在蓝藻中表达 *atfA* 基因的质粒 pHB2803(图 1)。用于表达 *atfA* 基因的 P_{rbcL} 是鱼腥藻 PCC7120 的 RUBP 羧化酶大亚基基因的启动子, 具有较强的转录活性。 Ω 片段含有壮观霉素抗性基因。

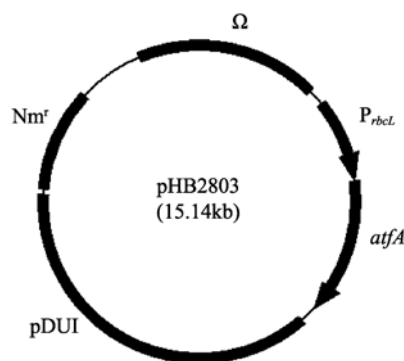


图 1 表达质粒 pHB2803

Fig. 1 The expression plasmid pHB2803

P_{rbcL} , 鱼腥藻 PUBP 梭化/氧化酶大亚基基因启动子; *atfA*, 细菌蜡酯合成酶基因; pDUI, 可以在蓝藻中复制的 DNA 片段; Nm^r , 新霉素抗性基因; Ω , 壮观霉素抗性基因

P_{rbcL} , *Anabaena* promoter of large subunit of ribulose-bisphosphate carboxylase/oxygenase gene; *atfA*, bacterial wax ester synthase/acyl-CoA:diacylglycerol acyltransferase gene; pDUI, a DNA fragment which can replicate in cyanobacteria; Nm^r , neomycin resistant gene; Ω , spectinomycin resistant gene

穿梭载体 pRL25C 既能在大肠杆菌也能在鱼腥藻中复制, 在接合质粒和辅助质粒存在的情况下可被驱动从大肠杆菌转移到鱼腥藻。通过这种方法将由 pRL25C 构建的表达质粒 pHB2803 导入鱼腥藻 PCC7120 的衍生株 EF113 中。EF113 是通过紫外诱变得到的突变株, 其异形胞多糖层缺失^[9]。用该藻株表达产蜡酯基因可能有利于光合产物在缺氮条件下向蜡酯方向积累。取 4 个接合子, 分别针对 *atfA* 和 P_{rbcL} -*atfA* 进行 PCR 检测, 均证明表达质粒已成功导入该藻株。图 2 显示其中一个转化子的 PCR 检测结果。在 BG11 培养基中, pHB2803 的导入不对 EF113 株的生长产生明显影响。

提取转基因藻 EF113 (pHB2803) 的总脂进行薄层层析分析, 并未发现蜡酯产物。这种情况可能是由于蓝藻细胞内没有脂肪醇底物或者含量很低。为此, 向其培养液中补加 0.1% 十六醇。在培养 48h 后提取总脂, 发现有蜡酯合成, 而不含 *atfA* 的 EF113 株则没有或只有很微量的蜡酯产物(图 3)。虽然在培养基中减少氮盐含量可能导致光合产物向碳水或碳氢化合物合成途径分配, 但作者并未发现减少氮盐对蜡酯的积累有明显的作用(结果未附)。

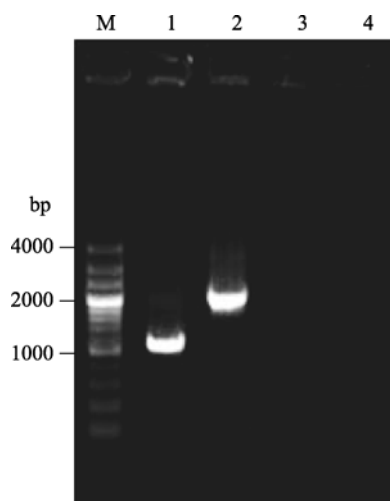


图2 鱼腥藻 PCC 7120 EF113 (pHB2803) 的 PCR 检测

Fig. 2 PCR examination of *Anabaena* sp. PCC 7120 EF113 (pHB2803)

1、3. 以 wax-1 和 wax-2 为引物检测 *atfA*; 2、4. *PrbcL-1a* 和 wax-2 为引物检测 *P_{rbcl}-atfA*; 1、2. EF113 (pHB2803); 3、4. EF113; M. 200bp DNA 分子量标准

Lanes 1 and 3, detection of *atfA* using wax-1 and wax-2 as primers; lanes 2 and 4, detection of *P_{rbcl}-atfA* using *PrbcL-1a* and wax-2 as primers; Lanes 1 and 2, EF113 (pHB2803); 3 and 4, EF113; M, 200bp DNA markers

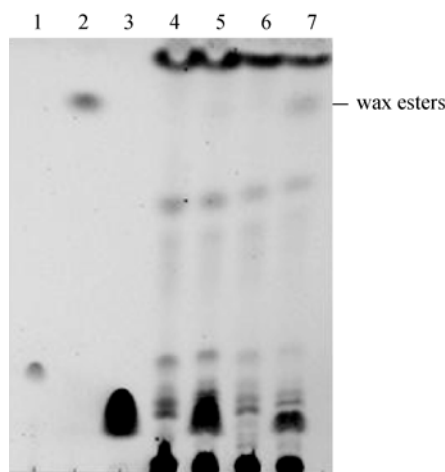


图3 转基因株在外加十六醇条件下的蜡酯合成

Fig. 3 Wax esters biosynthesis in transgenic strains in the presence of exogenous hexadecanol

1. 三酰甘油; 2. 棕榈酰棕榈酯; 3. 十六醇; 4 和 5. EF113; 6 和 7. EF113 (pHB2803); 4 和 6. 未加十六醇; 5 和 7. 加 0.1% 十六醇
1. triacylglycerol; 2. palmityl palmitate; 3. hexadecanol; 4 and 5. EF113; 6 and 7. EF113 (pHB2803); 4 and 6. without hexadecanol; 5 and 7. supplemented with 0.1% hexadecanol

本研究结果表明, 不动杆菌的 *atfA* 基因在蓝藻中获得了表达, 转基因藻株具有蜡酯合成酶活性, 并且与表达该基因的 *E. coli* 不同的是, 蓝藻合成蜡酯并不需要添加外源的脂肪酸。由于未表达脂肪酰辅酶 A 还原酶, 藻细胞内没有长链脂肪醇底物, 所以需要外加十六醇。因此,

如果进一步导入有关脂肪酰辅酶 A 还原酶基因, 使得蓝藻自身能合成足够的脂肪醇, 则培养基中不添加任何有机成分就可能生产蜡酯。有研究证明, 哺乳动物小鼠脂肪酰辅酶 A 还原酶 1 (FAR1) 在反应过程中偏好 C16 和 C18 脂肪酸做底物^[15], 而加州西蒙得木脂肪酰辅酶 A 还原酶偏好较长链的脂肪酸(C22—1)做底物^[16]。在鱼腥藻中, 90%以上的脂肪酸都具有 16 或 18 碳链。因此, 在蓝藻中引入小鼠的 FAR1 基因可能更具优势。我们将进一步尝试克隆小鼠 FAR1, 并与 *atfA* 在蓝藻共表达。

参考文献:

- [1] Bryn K, Jantzen E, Bovre K. Occurrence and patterns of waxes in Neisseriaceae [J]. *Journal of General Microbiology*, 1977, **102**: 33—43
- [2] Russell N J, Volkman J K. The effect of growth temperature on wax ester composition in the psychrophilic bacterium *Micrococcus cryophilus* ATCC 15174 [J]. *Journal of General Microbiology*, 1980, **118**: 131—141
- [3] Fixter L M, Nagi M N, McCormack J G, et al. Structure, distribution and function of wax ester in *Acinetobacter calcoaceticus* [J]. *Journal of General Microbiology*, 1986, **132**: 3147—3157
- [4] Kalscheuer R, Steinbüchel A. A novel bifunctional wax estersynthase/ 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] Daniel J, Deb C, Dubey VS. Induction of a novel class of diacylglycerol acyltransferases and triacylglycerol accumulation in *Mycobacterium tuberculosis* as it goes into a dormancy-like state in culture [J]. *Journal of Bacteriology*, 2004, **186**: 5017—5030
- [6] Rainer K, Tim S, Ursula M. Analysis of storage lipid accumulation in *Alcanivorax borkumensis*: evidence for alternative triacylglycerol biosynthesis routes in bacteria [J]. *Journal of Bacteriology*, 2007, **189**: 918—928
- [7] Adrian F A, Hector M A, Rainer K. Cloning and characterization of a gene involved in triacylglycerol biosynthesis and identification of additional homologous genes in the oleaginous bacterium *Rhodococcus opacus* PD630 [J]. *Microbiology*, 2008, **154**: 2327—2335
- [8] 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
- [9] Wolk C P, Cai Y, Cardemil L. Isolation and complementation of mutants of *Anabaena* sp. strain PCC 7120 unable to grow aerobically on dinitrogen [J]. *Journal of Bacteriology*, 1988, **170**: 1239—1244
- [10] Wang Y, Xu X. Regulation by *hetC* of genes required for

- heterocyst differentiation and cell division in *Anabaena* sp. strain PCC 7120 [J]. *Journal of Bacteriology*, 2005, **187**: 8489—8493
- [11] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd ed. [C]. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1989, 1. 21—1.87
- [12] Luo Q, Xu X D. The essential role of ORF sl0260 in maintenance of basic life activities of *Synechocystis* sp. PCC6803 [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2009, **33**(5): 789—794 [罗泉, 徐旭东, 集胞藻 PCC6803 中 ORF sl0260 对于维持基本生命活动的必要作用. 水生生物学报, 2009, **33**(5): 789—794]
- [13] Elhai J, Wolk C P. Conjugal transfer of DNA to cyanobacteria [J]. *Methods in Enzymology*, 1988, **167**: 747—754
- [14] Reiser S, 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
- [15] Cheng J B, 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
- [16] James G M, Michael R P. 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

《水生生物学报》编辑委员会

EDITORIAL BOARD OF ACTA HYDROBIOLOGICA SINICA

主 编 Chief Editor 桂建芳 GUI Jian-Fang

副主编 Associate Editor 解绶启 XIE Shou-Qi

委 员 Members (以姓氏拼音为序)

蔡庆华	CAI Qing-Hua	曹文宣	CAO Wen-Xuan	常剑波	CHANG Jian-Bo
陈家宽	CHEN Jia-Kuan	陈宜瑜	CHEN Yi-Yu	陈毅峰	CHEN Yi-Feng
高坤山	GAO Kun-Shan	何舜平	HE Shun-Ping	洪云汉	HONG Yun-Han
胡征宇	HU Zheng-Yu	李文鑫	LI Wen-Xin	李钟杰	LI Zhong-Jie
林浩然	LIN Hao-Ran	刘建康	LIU Jian-Kang	刘永定	LIU Yong-Ding
麦康森	MAI Kang-Sen	聂 品	NIE Pin	曲久辉	QU Jiu-Hui
沈韞芬	SHEN Yun-Fen	宋立荣	SONG Li-Rong	唐启升	TANG Qi-Sheng
王 丁	WANG Ding	吴灶和	WU Zao-He	吴振斌	WU Zhen-Bin
相建海	XIANG Jian-Hai	肖 伟	XIAO Wei	谢 平	XIE Ping
谢小军	XIE Xiao-Jun	熊邦喜	XIONG Bang-Xi	熊思岳	XIONG Si-Yue
徐旭东	XU Xu-Dong	杨先乐	YANG Xian-Le	于 丹	YU Dan
余其兴	YU Qi-Xing	游 力	YOU Li	张奇亚	ZHANG Qi-Ya
朱作言	ZHU Zuo-Yan	Harald Rosenthal (德国)			

编辑部 Editorial office 杜新征 DU Xin-Zheng 王 芹 WANG Qin 余 茜 YU Xi