

莱茵衣藻 FAB2 的原核表达以及不同胁迫条件下的表达模式

郭雪洁^{1,4}, 路延笃^{2,3}, 张 蕾^{2,4}, 姜 鹏¹, 秦 松¹

(1. 中国科学院 海洋研究所, 山东 青岛 266071; 2. 中国科学院 烟台海岸带研究所, 山东 烟台 264003; 3. 中国科学院 青岛生物能源与过程研究所, 山东 青岛 266101; 4. 中国科学院 研究生院, 北京 100049)

摘要: 脂肪酸去饱和酶(fatty acid desaturase)是不饱和脂肪酸合成途径的关键酶, 催化脂肪酸链的特定位置脱氢形成双键, 其通过引入双键调节脂肪酸不饱和度, 以适应周围环境的变化。莱茵衣藻(*Chlamydomonas reinhardtii*)质体酰基-酰基载体蛋白去饱和酶(plastid acyl-ACP desaturase, FAB2)在 $\Delta 9$ 位脱氢, 催化脂肪酸中第 1 个双键的形成。本文首先在大肠杆菌中异源表达了 FAB2, 另外将其氨基酸序列与其他高等植物、微藻、真菌等进行了多序列比对以及系统进化分析, 推测其与高等植物亲缘关系更近。利用定量 RT-PCR 技术研究了衣藻 FAB2 基因不同胁迫条件下的表达模式, 结果表明 $4^{\circ}\text{C}+0\%\text{NaCl}$, $25^{\circ}\text{C}+1\%\text{NaCl}$ 胁迫条件下 FAB2 基因表达量都有一定程度升高。

关键词: 莱茵衣藻(*Chlamydomonas reinhardtii*); 酰基-酰基载体蛋白去饱和酶; 表达; 实时荧光定量 PCR

中图分类号: Q943.2

文献标识码: A

文章编号: 1000-3096(2012)05-0034-08

不饱和脂肪酸在生物体的生命活动中占有重要地位, 动物、植物和微生物等的膜脂中都含有特定的不饱和脂肪酸, 它是机体生物膜的重要组成成分, 对生物膜结构、机能、相转变、通透性的调节及相关过程的调控有重要作用。并且, 它参与细胞生物化学反应、转运过程和细胞应激反应, 影响脂肪代谢、寻靶作用、免疫反应、耐寒、抗氧化等生理过程。此外, 不饱和脂肪酸还是哺乳动物体内生成前列腺素、凝血噁烷和白三烯等激素的前体, 具有提高人体免疫力、预防心血管疾病和癌症等重要的生理功能^[1]。多不饱和脂肪酸具有极其重要的营养价值和药用价值, 微藻是多不饱和脂肪酸的初级生产者, 但常温下含量极低, 通过分子生物学的方法改造微藻, 有望提高多不饱和脂肪酸的含量。多不饱和脂肪酸(PUFA)在微藻中的合成是以饱和脂肪酸如硬脂酸为底物, 通过一系列脱饱和酶(Desaturase, DS)和延长酶(Elongase, EL)的催化作用形成的, 脂肪酸去饱和酶是 PUFA 合成途径的关键酶^[2]。

脂肪酸去饱和酶能够在脂肪酸的烃链上引入双键, 存在于几乎所有生物中, 其在维持生物膜正确的结构和功能方面具有重要作用^[3]。根据脂肪酸结合的载体不同可分为 3 类: (1)酰基脂去饱和酶(acyl-lipid desaturase)只在糖脂结合态的脂肪酸中引

入不饱和键, 是一类膜蛋白, 存在于植物叶绿体、真核微藻和原核蓝藻。(2)酰基-酰基载体蛋白去饱和酶(acyl-ACP desaturase)只在酰基载体蛋白(ACP)结合态的脂肪酸中引入双键, 主要存在于植物细胞质, 以可溶的形式存在。(3)酰基-辅酶 A 去饱和酶(acyl-CoA desaturase)在辅酶 A 结合态的脂肪酸中引入不饱和键, 是一种膜蛋白, 存在于动物、真菌、酵母^[4]。 $\Delta 9$ 去饱和酶(简称 $\Delta 9\text{DES}$ 或 $\Delta 9\text{D}$)催化脂肪酸中第一个双键的形成, 是不饱和脂肪酸生物合成的关键调节酶, 都以铁为辅因子, 在蓝藻中又称为 DesC。其功能是催化 $16:0\text{-ACP}$ 和 $18:0\text{-ACP}$ 转化为 $16:1(\Delta 9)\text{-ACP}$ 和 $18:1(\Delta 9)\text{-ACP}$ ^[5]。有人已分别从 *Synechocystis* sp.、*Synechocystis* PCC 6803、*Spirulina platensis* 这 3 种蓝藻中克隆到基因序列, 都属于酰基脂去饱和酶。另外, Nishizaki 等^[6]也从 *A. nidulans* 中克隆了 $\Delta 9$ 去饱和酶基因 *desC*。它可以与多种膜脂的 C16 和 C18 碳脂肪酸作用, 形成 $\Delta 9$ 位双

收稿日期: 2011-11-05; 修回日期: 2012-03-22

基金项目: 国家 863 计划资助项目(2009AA10Z106); 中国科学院知识创新方向项目(KZCX2-YW-209); 国家自然科学基金项目(40876082)

作者简介: 郭雪洁(1986-), 女, 山东聊城人, 硕士, 主要从事藻类功能基因研究, 电话: 0532-82898863, E-mail: xuejie.ll@163.com; 秦松, 通信作者, 研究员, E-mail: sqin@yic.ac.cn

键。将 *desC* 基因转入烟草植株,转基因植株膜脂中单不饱和脂肪酸含量降低。植株暴露于 1°C 达 7 d 或者种子在 10°C 萌发并生长 70 d 都没有任何受伤症状。这说明烟草的抗寒性能在表达了 $\Delta 9$ 去饱和酶后大为提高。衣藻 CC503 FAB2 是一种质体酰基-酰基载体蛋白脂肪酸去饱和酶,理论上可以将 18:0-ACP 转化为 18:1($\Delta 9$)-ACP,在多不饱和脂肪酸的生物合成途径中引入第一个双键,是多不饱和脂肪酸生物合成的关键调节酶。

在高等植物或藻类中都存在一些应对逆境的途径,其中就包括脂肪酸介导的抵御外界胁迫的途径^[7-14]。在微藻的光合膜中,脂肪酸的不饱和水平决定着膜脂的相转变温度,即不饱和程度越高,膜的相转变温度越低^[15]。外界环境因素(如温度、盐度、光照等)正是通过某些分子机理来调节脂肪酸去饱和酶的表达和活性的,通过调节去饱和酶的酶量和活性,就能够改变膜脂的不饱和度,从而使细胞得以迅速改变脂肪酸的组成来适应环境的变化。很多研究表明外界环境中的温度、光照、活性氧浓度、氧化还原电位、N/P 比、盐度等因素对微藻生长和脂肪酸的组成有显著影响。脂肪酸去饱和酶及其基因克隆、转基因技术的发展,理论上为进一步研究温度、盐度等外界因素调节去饱和酶表达的模式,明确微藻低温适应等的分子机理奠定了基础。

为了阐述衣藻 CC503FAB2 是否在衣藻适应低温、高盐环境时发挥作用,本文在测定相应胁迫条件下衣藻脂肪酸组成和含量变化的之后,进一步运用 Real-time PCR 技术研究衣藻 FAB2 不同温度、盐度胁迫条件下的表达模式来帮助阐述这一过程。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 藻株和培养方法

莱茵衣藻 (*Chlamydomonas reinhardtii*)CC503, 购自美国 Chlamydomonas Genetic Center of Duke University。衣藻 CC503 接种于 TAP (Tris-acetate-phosphate)培养基^[16],于 25°C 光照条件下静止培养,光照强度 2 000 lx,光/暗周期为 12h/12h。

1.1.2 菌种与质粒载体

菌种:大肠杆菌菌株 TOP10, *Escherichia coli* BL21 由本实验室保存。

载体: T-A 克隆载体 pMD18-T 载体购自 TAKARA 公司,表达载体 pET-28a(+)由本实验室保存。

1.1.3 仪器设备与试剂

仪器设备: PCR 仪(Tpersonal), 德国 Biometra 公司; 电泳仪(PAC300), 美国 Bio-Rad 公司; 凝胶成像分析系统(ImageMaster VDS), 日本 FujiFilm 公司; 常/低温台式离心机(Labofuge300/ Biofuge Stratos); ABI 7500 Fast Real-Time PCR 仪(ABI)。

试剂: T-A 克隆载体连接试剂盒, TaKaRa(大连)有限公司; 凝胶回收试剂盒, 上海飞捷(Fastagen)生物技术有限公司; Taq 酶(TaKaRa 公司); TRIzol Reagent(Invitrogen 公司); 反转录试剂盒 PrimeScript[®] RT reagent Kit Perfect Real Time (TaKaRa); Real-time PCR 试剂盒 SYBR[®] Premix Ex Taq[™] II(Perfect Real Time), TaKaRa; 10×DNaseI Buffer、RNase-inhibitor、DnaseI 均购自 Fermentas 公司。

1.2 方法

1.2.1 莱茵衣藻总 RNA 的提取、RT-PCR 法克隆 FAB2cDNA 片段

1.2.1.1 莱茵衣藻总 RNA 的提取

采用 Trizol 法提取总 RNA, 具体操作如下: 取对数生长期的新鲜藻细胞, 4°C, 5 000 r/min 离心 8min, 收集藻体, 液氮速冻后加入到液氮充分预冷的研钵中, 添加液氮充分迅速研磨材料成粉末。将材料转移至 DEPC 处理过的 1.5 mL 离心管中, 加入 1 mL Trizol, 室温静置 3 min; 然后加入 200 μ L 氯仿, 盖紧 EP 管, 剧烈振荡 15 s 后, 室温孵育 3 min; 4°C, 12 000 r/min 离心 15 min, 上清转入新的离心管中, 加入等体积的异丙醇, 颠倒混匀, 室温静置 15min; 4°C, 12 000 r/min 离心 15 min, 弃上清, 用 700 μ L 75%乙醇洗沉淀一次, 4°C, 12 000 r/min 离心 5 min; 室温下晾干后溶于适量的 DEPC 处理的水中(约 20 μ L), 于 -70°C 储存备用。

1.2.1.2 DNaseI 处理消化基因组 DNA

用 RNase-free DNaseI 消化总 RNA 样品中的 DNA, 按顺序加入每一种试剂, 总反应体积为 20 μ L。依次加入: 总 RNA(3 μ g/ μ L)16 μ L, 10× DNaseI buffer 2 μ L, RNase-free DNaseI(1 U/ μ L)1 μ L, RNase Inhibitor(40 U/ μ L)1 μ L, 37°C 下温浴 20 min。加入终止 buffer 2.5 μ L, 80°C 处理 2 min, 于 -70°C 储存。

1.2.1.3 cDNA 第一链的合成

cDNA 第一链的合成采用反转录试剂盒。反应体系如下: 5×PrimeScript[™] Buffer 2 μ L, PrimeScript[™] RT Enzyme Mix I 0.5 μ L, Oligo dT Primer(50 μ mol/L)0.5 μ L, Random 6 mers(100 μ mol/L)0.5 μ L,

Total RNA 6.5 μ L, RNase Free dH₂O 补齐。轻甩混合上述体系,并快速离心,37 °C 温育 15 min,85 °C 处理 5 s,-20 °C 可保存 3 个月以上。

1.2.1.4 RT-PCR 法克隆 FAB2cDNA 片段

根据 NCBI 上公布的莱茵衣藻 CC503 FAB2 的 cDNA 序列,设计特异性引物(引物由上海生工生物技术有限责任公司合成):上游引物 fab2-F (5'-CAGGATCCCATATGGCTCTGGGCCAGCAGG-3') 和下游引物 fab2-R (5'-CCCAAGCTTTACAGG-GCCACCTCGCGG-3'),分别包含 *Bam*HI 和 *Hind*III 酶切位点。以上一步合成的 cDNA 为模板 PCR 扩增 FAB2cDNA 片段。25 μ L PCR 体系中含 10 \times Buffer 2.5 μ L, dNTP mix 0.5 μ L, cDNA 模板为 1 μ L,上下游引物各 1 μ L,ddH₂O 18.7 μ L, Taq 酶(5U/ μ L)0.3 μ L。反应条件为:94 °C 预变性 5 min,然后 94 °C 30 s,56 °C 30 s,72 °C 1 min30 s,30 个循环,最后 72 °C 延伸 7 min。取 40 μ L PCR 扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳回收特异性扩增片段,并克隆至 pMD18-T 载体中,挑取阳性克隆进行序列测定。基础的分子生物学操作参考分子克隆实验指南(第三版)^[17]。

1.2.2 莱茵衣藻 FAB2 基因原核表达载体构建及在大肠杆菌中的表达

将测序鉴定正确的 pMD18-T-fab2 质粒用 *Bam*HI 和 *Hind*III 双酶切,将目的基因亚克隆至 pET-28a(+) 载体上。将重组的原核表达质粒转化大肠杆菌 BL21 后,挑取单个菌落接种 5 mL LB 培养基(Amp⁺)中,37 °C 继续振荡培养 3 h 后(A 值大约为 0.5 左右),加 IPTG 至终浓度为 1 mmol/L,37 °C 继续振荡培养。IPTG 诱导不同时间(1、2、3、4、5、6 h)收集菌体进行 SDS-PAGE 分析。

1.2.3 序列分析

1.2.3.1 氨基酸序列分析

利用 NCBI 网站(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)上的 BLAST 工具进行基因序列的相似性及同源性查找,将目的基因氨基酸序列与其他真核藻类及高等植物的采用 ClustalW^[18]软件进行多序列比对分析,进而进行基因同源性的比较。此外,根据其氨基酸序列,运用在线工具进行序列分析。采用在线 HNN 网站(http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_nn.html)进行蛋白质二级结构分析,采用在线 Prot Param (<http://www.expasy.ch/tools/protparam.html>)网站进行蛋白质基本物理化学参数分析。

1.2.3.2 系统进化分析

获取 NCBI 中同种类不同物种的 FAB2 基因采用

ClustalW 软件进行多序列比对分析,然后利用 MEGA 4.0^[19]软件进行系统发生和进化的分析。系统树采用 NJ 法(Neighbour-Joining)方法构建。

1.2.4 莱茵衣藻 FAB2 不同胁迫条件下表达模式研究

1.2.4.1 不同培养条件下衣藻生长曲线的测定

接种对数生长期相同藻量的衣藻于 100 mL 新鲜 TAP 培养基中,待生长至对数生长期($A_{750}=0.4\sim 0.5$)时,转入各不同诱导条件(25 °C+0%NaCl,15 °C+0%NaCl,4 °C+0%NaCl,25 °C+0.5%NaCl,25 °C+1%NaCl)下分别进行培养,而后测定一段时间内不同生长条件下衣藻的生长曲线。

1.2.4.2 不同胁迫条件下莱茵衣藻 FAB2 实时荧光定量

接种对数生长期相同藻量的衣藻于 50 mL 新鲜 TAP 培养基中,待生长至对数生长期($OD_{750}=0.4\sim 0.5$)时,分别转入各不同诱导条件(25 °C+0%NaCl,15 °C+0%NaCl,4 °C+0%NaCl,25 °C+0.5%NaCl,25 °C+1%NaCl)下诱导 36 h 后收集藻体(每个条件下 5 个平行)。液氮中速冻 10 min,放入 -80 °C 冰箱中保存。提取不同条件诱导下样品的 RNA 并反转录成 cDNA(具体方法参见 1.2.1)。设计衣藻 FAB2 基因的上游引物 RT-FAB2F: 5'-CTCAACACCCTGGACGGC-3'和下游引物 RT-FAB2R: 5'-GGTAGGGGTTGTTCTCGGTC-3',内参 actin 上游引物 RT-actinF: 5'-GCAGTAGGAGGCATAGGGTT-3'和下游引物 RT-actinR: 5'-TCATCATCCTCCGTCGTTAG-3'。采用 SYBR Green I 染料法在荧光定量 PCR 仪上采用 ABI 7500 Fast Real-Time PCR System 标准程序进行扩增,对上述不同诱导条件下 FAB2 基因表达量进行分析。20 μ L 的 PCR 反应体系中含有: SYBR[®] Premix Ex Taq[™] II(2 \times)10.0 μ L, PCR Forward Primer(10 μ)0.8 μ L, PCR Reverse Primer(10 μ)0.8 μ L, ROX Reference Dye II(50 \times)0.4 μ L, cDNA 模板 2.0 μ L, dH₂O(灭菌蒸馏水)6.0 μ L, 总共为 20.0 μ L。

采用两步法 PCR 扩增标准程序,数据分析根据公式 $\Delta CT = CT(\text{Target}) - CT(\text{Actin})$,取每份样品 5 个重复样的平均 CT 值计算目的基因 FAB2 相对于内参基因 actin 的 ΔCT 值,采用常用的 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法^[20]计算目的基因衣藻 FAB2 在不同胁迫条件下的相对表达量。

2 结果

2.1 目的片段的克隆及验证

根据 NCBI 上已公布的衣藻 CC503FAB2

的 cDNA 序列, 设计特异性引物通过 RT-PCR 方法扩增出了与预期大小基本一致的 DNA 条带, 大小约为 1206bp。切胶回收该片段, 将其与 pMD18-T 载体连接。挑选阳性克隆, 菌液 PCR 检测, 提取质粒酶切检测均为阳性。送交测序结果也与预期相符。

2.2 莱茵衣藻 FAB2 基因的原核表达

将测序鉴定正确的 pMD18-T-fab2 质粒用 *Bam*HI 和 *Hind*III 双酶切, 将目的基因亚克隆至 pET-28a(+) 载体上。图 1 显示含重组质粒的单克隆细菌经 IPTG 诱导不同时间后的表达状况, SDS-PAGE 电泳结果检测到大约在分子量 45 kD 处有明显 1 条表达量很高的蛋白条带。图中箭头指向 a 即表达的目的蛋白。

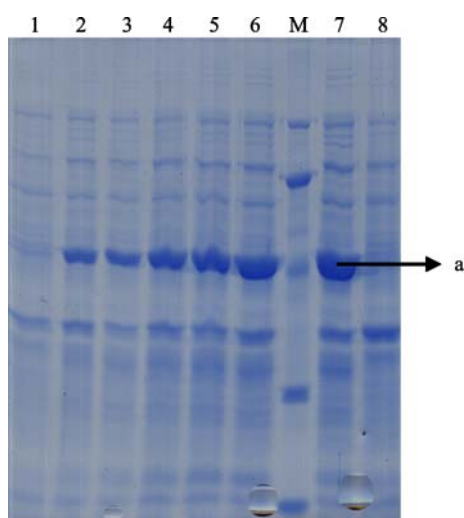


图 1 衣藻 FAB2 基因原核表达粗蛋白的 SDS-PAGE 分析
Fig. 1 SDS-PAGE of crude protein extracts of FAB2 expressed in *E. coli* BL21 strain

M: 蛋白质 Marker(自上而下分别是: 116.0, 66.2, 45.0, 35.0, 25.0 kD); 1. 未经 IPTG 诱导的 pET-28a-fab2 的表达; 2、3、4、5、6、7 分别为经 0.5 mmol/L IPTG 诱导 1、2、3、4、5、6h 的 pET-28a-fab2 的表达; 8 为空载体 pET-28a(+) 转化 BL21 菌后的表达

M: Protein molecular weight marker(from the top: 116.0, 66.2, 45.0, 35.0, 25.0 kD); 1: Expression of pET-28a-fab2 not induced by IPTG; 2、3、4、5、6、7: Expression of pET-28a-fab2 induced by 0.5 mmol/L IPTG for 1、2、3、4、5、6 h; 8: Expression of pET-28a(+)

2.3 与其他真核藻类及高等植物的多序列比对分析

氨基酸多序列比对(图 2)发现, 序列之间的同源性较高, 在连续多个位点出现多个氨基酸一致的情况。莱茵衣藻 FAB2 基因的氨基酸序列与团藻(*Volvox carteri f. nagariensis*)、雨生红球藻(*Haematococcus pluvialis*)、木油桐(*Vernicia montana*)、拟南芥

(*Arabidopsis thaliana*) 基因的氨基酸序列同源性分别为 83%、71%、59%、59%(图 2)。

2.4 蛋白质二级结构预测

采用在线 HNN 数据库(http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_hnn.html)对莱茵衣藻 FAB2 氨基酸序列的二级结构进行预测分析。莱茵衣藻 FAB2 基因蛋白二级结构分析结果表明是由其大量分布在蛋白内的 α -螺旋结构、大量的无规则卷曲和少量扩展链结构组成, 含 α -螺旋 189 个, 占 47.13%; 扩展链 31 个, 占 7.73%; 无规卷曲 181 个, 占 45.14%;

2.5 编码蛋白的生化特性分析

采用在线 Prot Param(<http://www.expasy.ch/tools/protparam.html>)网站进行蛋白质基本物理化学参数分析。

莱茵衣藻 FAB2 基因编码蛋白中各种氨基酸数量及比例显示: 其中含有 48 个带负电的氨基酸残基(Asp + Glu), 占总数的 11.9%; 46 个带正电的氨基酸残基(Arg + Lys), 占总数的 11.4%。经推算该蛋白的分子质量约为 44709.9 kD, 理论等电点为 6.65。在 *E. coli* 中的半衰期大于 10 h, 稳定系数为 28.88, 属于稳定的蛋白质类型。

2.6 系统发育分析

作者对比了来自不同物种的 21 个 $\Delta 9$ -acyl-ACP 脂肪酸去饱和酶基因的氨基酸序列, 并利用 MEGA4 软件对这些基因进行了分子系统学分析, 据此构建系统发育树研究了衣藻 FAB2 基因与其他物种基因之间的进化关系。从(图 3)系统发育树中可以看到, 衣藻 FAB2 与几种真核绿藻聚成一个分支, 介于细菌和高等植物之间, 但序列比对显示衣藻的 FAB2 与高等植物的同源性更高, 揭示其在进化上可能与高等植物有更近的亲缘关系。

2.7 不同培养条件下莱茵衣藻生长曲线

在光照强度等其他培养条件一致的情况下, 25°C+0%NaCl, 15°C+0%NaCl, 4°C+0%NaCl, 25°C+0.5%NaCl, 25°C+1%NaCl 五种不同培养条件下莱茵衣藻的生长曲线如图 4 所示。

莱茵衣藻在不同培养条件下的平均生长速率不同, 由实验所绘制的生长曲线可知, 正常生长条件 25°C+0%NaCl 下, 莱茵衣藻细胞生长速率最快。其他培养条件下衣藻的生长速率均有所减缓, 但又不

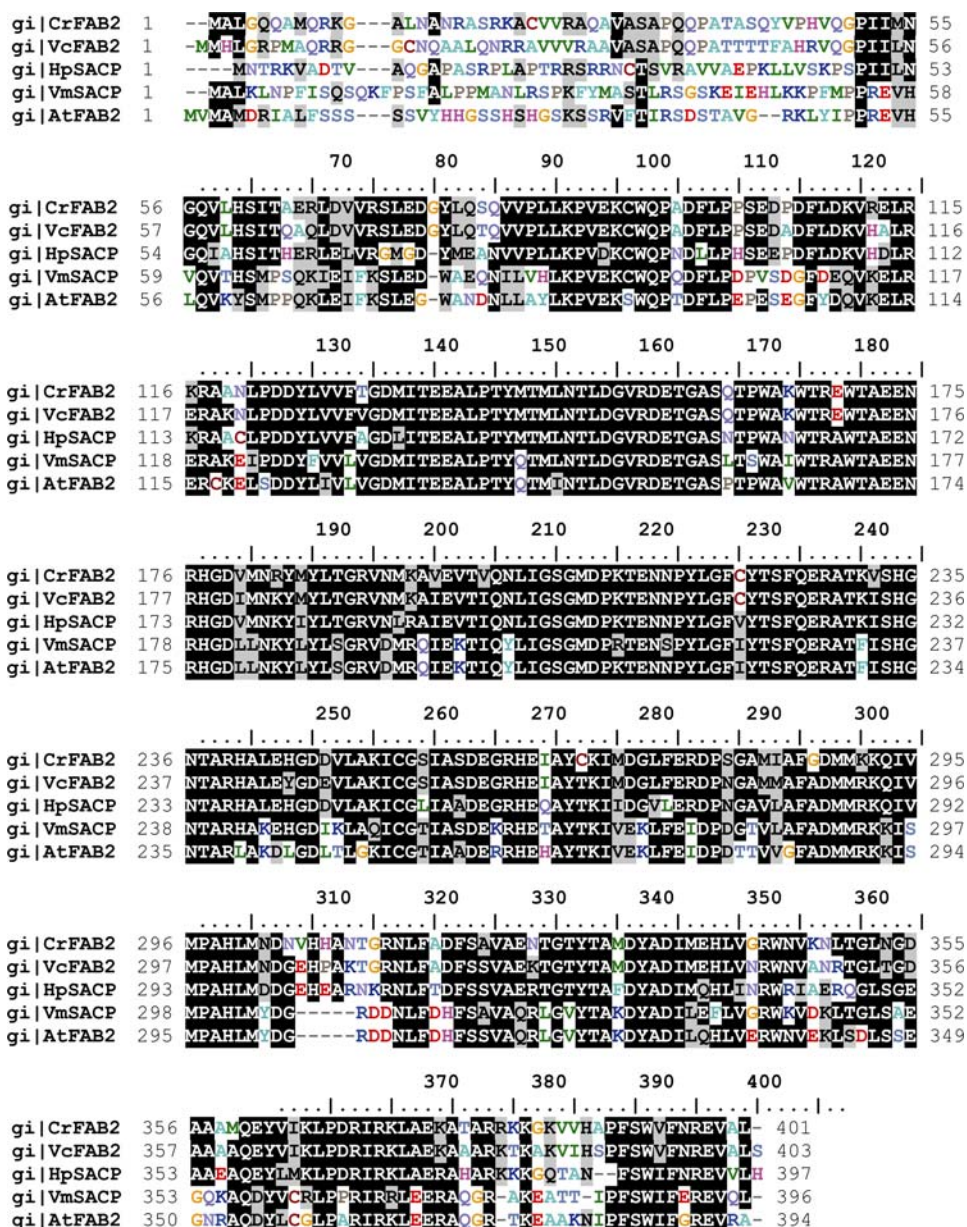


图 2 莱茵衣藻 FAB2 与其他真核藻类及高等植物氨基酸序列比对结果

Fig. 2 Amino acid sequences of FAB2 in comparison with the microsomal homologs from other plants *Chlamydomonas reinhardtii*(CrFAB2)、*Volvox carteri* f. *nagariensis*(VcFAB2)、*Haematococcus pluvialis*(HpSACP)、*Vernicia montana*(VmSACP)、*Arabidopsis thaliana*(AtFAB2)

至于胁迫细胞致死(在衣藻耐受范围内)。因此设置以上温度、盐度梯度对莱茵衣藻进行诱导,以 25°C+0%NaCl 下培养的衣藻作为对照,研究目的基因表达量的变化。

2.8 莱茵衣藻 FAB2 不同胁迫条件下的表达特征

目标基因的相对表达量按 Livak 和 Schmittgen

的方法计算^[20]。根据扩增曲线得到的 CT 值(荧光信号达到设定的阈值时所经历的循环数),计算出目标基因 FAB2 和内参基因 actin CT 值的差异 ΔCT ;进而以差异最大的样本作为参照样本,计算出不同样品相对于参照样本基因表达倍数 $2^{-\Delta\Delta CT}$,从而制作出相对定量的图表(图 5)。

由图 5 中可以看出,与正常生长条件 25°C+0%NaCl 相比,目的基因 FAB2 在 15°C+0%NaCl、

25°C+0.5%NaCl 条件下相对表达量没有明显变化,而在 4°C+0%NaCl、25°C+1%NaCl 条件下表达量均有一定程度的升高,但表达量的增加很小,统计学

分析显示与对照组没有显著性差异。说明 FAB2 基因的表达确实受到温度、盐度的影响,但可能不是在响应刺激过程中起最关键作用的基因。

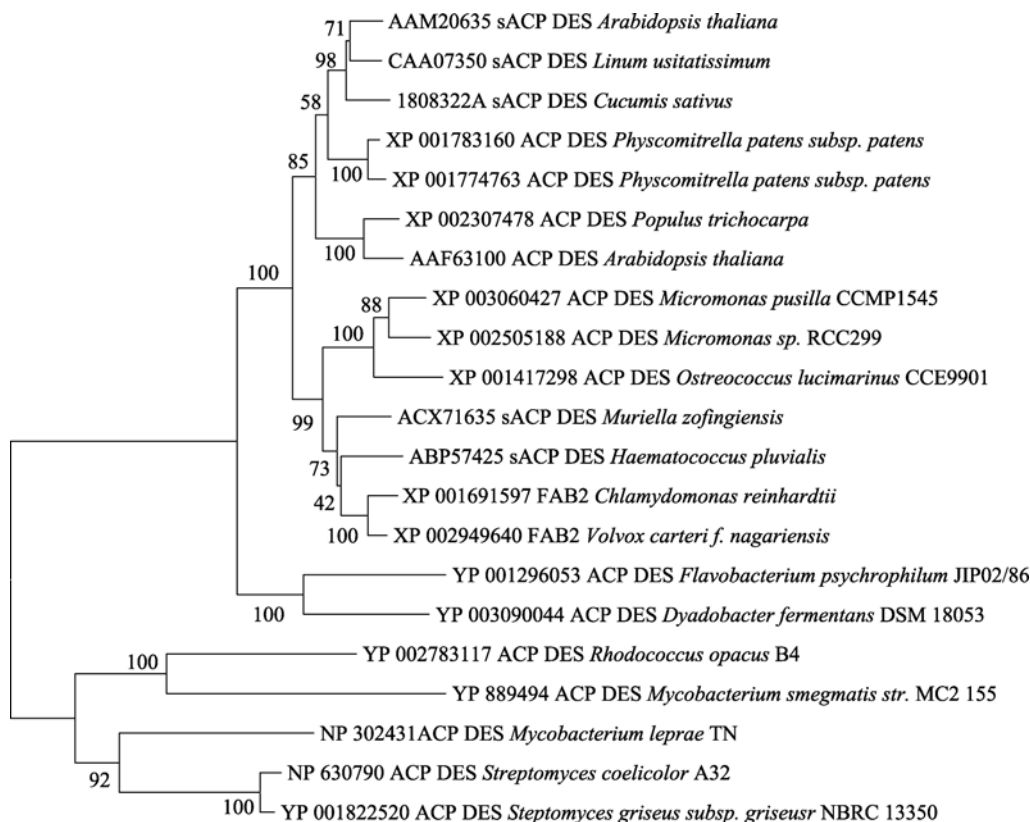


图 3 来自不同物种的 $\Delta 9$ -acyl-ACP 脂肪酸去饱和酶的系统进化树分析

Fig. 3 Phylogenetic tree based on the amino acid sequences of $\Delta 9$ -acyl-ACP desaturase homologous genes of different species

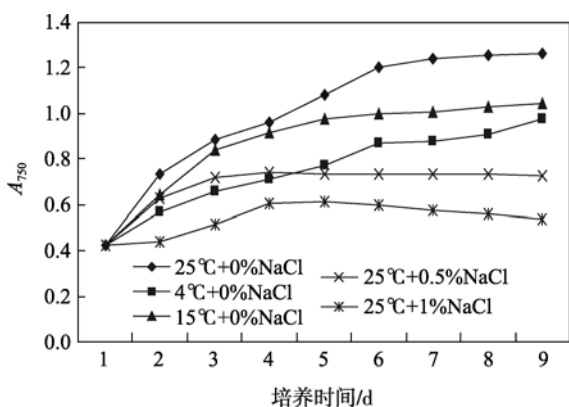


图 4 衣藻在不同培养条件下的生长曲线

Fig. 4 The growth curve of *C. reinhardtii* at different temperature and salinity stresses

3 讨论

本文选取模式生物莱茵衣藻来研究酰基-酰基载体蛋白脂肪酸去饱和酶基因的相关特性及不同条件

下表达特征。首先将克隆到的衣藻 FAB2 的 cDNA 序列的编码区连接到原核表达载体上,将该基因在大肠杆菌中进行了表达,蛋白条带大小与预测的相符。衣藻 FAB2 基因的原核表达为后续研究该基因编码蛋白的活性(体内活性及体外活性)奠定了基础。衣藻属于绿藻,在现存的所有单细胞真核藻类中,绿藻是与陆生植物亲缘关系最近的一支^[21]。本文系统发育分析结果也表明,衣藻的 FAB2 基因与高等植物的该基因同源性更高,提示其与高等植物有更近的亲缘关系。另外,很多研究表明温度、盐度等外界条件会在一定程度上影响到脂肪酸去饱和酶的表达。为了探究不同胁迫诱导条件下衣藻 FAB2 基因的转录谱,本实验选取不同温度、盐度梯度为诱导条件,使用实时荧光定量 PCR 手段检测发现:与正常生长条件 25°C+0%NaCl 相比,目的基因在 15°C+0%NaCl、25°C+0.5%NaCl 条件下相对表达量没有明显变化,而在 4°C+0%NaCl、25°C+1%NaCl

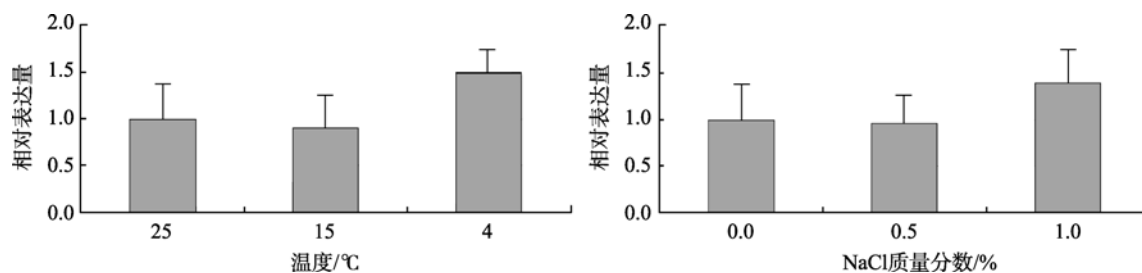


图 5 衣藻 FAB2 不同温度、盐度胁迫下(36 h)的相对表达量

Fig. 5 Relative expression quantity of FAB2 from *Chlamydomonas reinhardtii* in response to temperature and salinity changes

诱导条件下表达量均有一定程度的升高,但升高程度也非特别显著,分析存在以下原因:实验中设置的该温度、盐度梯度尚不足以充分说明问题,还应进一步降低温度、提高盐度(在衣藻生长可耐受范围内)重复该研究;亦或是因为在莱茵衣藻响应温度、盐度刺激时,本文所研究的衣藻 FAB2 基因并非起关键作用的基因,也可能存在其他关键脂肪酸去饱和酶基因或其他基因。本研究初步说明温度、盐度影响到了衣藻 FAB2 基因的表达,即该基因在衣藻应答不同温度、盐度外界环境刺激时起了一定作用,但可能不是响应该刺激的最关键基因。也说明了莱茵衣藻逆境适应过程的复杂性,具体的作用机制有待深入研究。

多不饱和脂肪酸(PUFA)是机体生物膜的重要组成部分,对维系和调节细胞的正常生物学功能起着重要的作用,Δ9-desaturase 又是多不饱和脂肪酸合成途径中的第一个关键酶,环境因素(如温度、光照等)正是通过某些分子机理来实现对去饱和酶的表达及其活性调控,使细胞得以迅速改变脂肪酸的组成来适应环境的变化。本文对莱茵衣藻 FAB2 基因不同温度、盐度下表达模式的研究,理论上为明确微藻低温适应、高盐适应的分子机理奠定了基础,同时对进一步开展其他脂肪酸去饱和酶的研究提供了示例。

参考文献:

[1] 元冬娟, 江黎明. 海洋微藻脂肪酸去饱和酶[J]. 生命的化学, 2006, 26(5): 422-424.
 [2] WICHEN Y, WARD O P. -3 fatty acids: Alternative sources of production[J]. Process Biochem, 1989, 8(3): 117-125.
 [3] Los D A, Murata N. Structure and expression of fatty acid desaturases[J]. Biochim Biophys Acta, 1998, 1394: 3-15.
 [4] Pereira S L. Recent advances in the study of fatty acid

desaturases from animals and lower eukaryotes[J]. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids, 2003, 68(2): 97-106.
 [5] Los D A, Ray M K. Differences in the control of the temperature-dependent expression of four genes for desaturases in *Synechocystis* sp. PCC 6803[J]. Mol Microbio, 1997, 25(6): 1167-1175.
 [6] Nishizawa O I, Fujii T, Azuma M, et al. Low temperature resistance of higher plants is significantly enhanced by a nonspecific cyanobacterial desaturase [J]. Nature Biotechnology, 1996, 14: 1003-1006.
 [7] Vijayan P, Shockey J, Levesque C A, et al. A role for jasmonate in pathogen defence of Arabidopsis[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1998, 95: 7209-7214.
 [8] Kachroo P, Shanklin J, Shah J, et al. A fatty acid desaturase modulates the activation of defense signaling pathways in Plants[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2001, 98: 9448-9453.
 [9] Kachroo A, Lapchuk L, Fukushige H, et al. Plastidial fatty acid signaling modulates plants epigenetically suppressed in phenylalanine ammonia-lyase expression do not develop systemic acquired resistance in response to infection by tobacco mosaic virus[J]. Plant Cell, 2003b, 10: 281-293.
 [10] Kachroo A, Venugopal S C, Lapchuk L, et al. Oleic acid levels regulated by glycerolipid metabolism modulate defense gene expression in Arabidopsis[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2004, 101: 5152-5157.
 [11] Kachroo P, Venugopal S C, Navarre D A, et al. Role of salicylic acid and fatty acid desaturation pathways in *ssi2*-mediated signaling[J]. Plant Physiol, 2005, 139: 1717-1735.
 [12] Weber H. Fatty acid derived signals in plants[J]. Trends Plant Sci, 2002, 7: 217-224.

- [13] Li C, Liu G, Xu C, et al. The tomato suppressor of prosystemin-mediated responses gene encodes a fatty acid desaturase required for the biosynthesis of jasmonic acid and the production of a systemic wound signal for defense gene expression[J]. *Plant Cell*, 2003, 15: 1646-1661.
- [14] Yaeno T, Matsuda O, Iba K. Role of chloroplast trienoic fatty acids in plant disease defense responses[J]. *Plant J*, 2004, 40: 931-941.
- [15] Kis M, Zsiros O. Light-induced expression of fatty acid desaturase genes[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95(8): 4209-4214.
- [16] Harris E H. *The Chlamydomonas Sourcebook: A Comprehensive Guide to Biology and Laboratory Use*[M]. San Diego, California: Academic Press, 1989.
- [17] 萨姆布鲁克, 拉塞尔. *分子克隆实验指南*[M]. 第3版. 黄培堂译. 北京: 科学出版社, 2002.
- [18] Thompson J D, Higgins D G, Gibson T J. CLUSTALW: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice [J]. *Nucleic Acids Res*, 1994, 22: 4673-4680.
- [19] Tamura K, Dudley J, Nei M, et al. MEGA4 : Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2007, 24: 1596-1599.
- [20] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C (T)) method[J]. *Methods*, 2001, 25(4): 402-408.
- [21] Qiu Y L, Palmer J D. Phylogeny of early land plants: insights from genes and genomes[J]. *Trends Plant Sci*, 1999, 4: 26-30.

Heterologous expression of acyl-ACP desaturase (FAB2) from *Chlamydomonas reinhardi* in *Escherichia coli* and its expression features in response to different temperature and salinity stresses

GUO Xue-jie^{1,4}, LU Yan-du^{2,3}, ZHANG Lei^{2,4}, JIANG Peng¹, QIN Song¹

(1. Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China; 2. Yantai Institute of Coastal Zone Research, Chinese Academy of Sciences, Yantai 264003, China; 3. Qingdao Institute of BioEnergy and Bioprocess Technology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266101, China; 4. Graduate School of the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Received: Nov., 5, 2011

Key words: *Chlamydomonas reinhardtii*; acyl-ACP desaturase; expression; quantitative real-time PCR

Abstract: Fatty acid desaturases are enzymes that introduce double bonds into the hydrocarbon chains of fatty acids. The expression of genes for desaturase is very important since it provides the molecular basis for the acclimation of organisms to changing environment. The plastid acyl-ACP desaturase (FAB2) from *Chlamydomonas reinhardi* is a kind of $\Delta 9$ desaturase, which catalyses the formation of a double bond between the ninth and tenth carbon in the fatty acid chain. In this paper, acyl-ACP desaturase (FAB2) from *C. reinhardi* was heterologously expressed in *Escherichia coli*. Homologous analysis indicated that amino sequence of FAB2 is quite similar to those homologies from plants. The expression levels of FAB2 from *C. reinhardi* cells which under different temperature and salinity stresses were relatively analysed by using fluorescent quantitative real-time PCR technology. Results showed that the expression quantity of FAB2 during 4 +0%NaCl, 25 +1%NaCl were much higher than that of normal situations.

(本文编辑: 梁德海)