

拟南芥硫酯酶基因(*atfata*)在大肠杆菌中的表达及其对游离脂肪酸合成的影响*

程 涛¹ 杨建明² 刘 辉² 张英伟³ 宋秋华¹ 咸 漠^{2**}

(¹江西理工大学材料与化学工程学院 赣州 341000)

(²中国科学院青岛生物能源与过程研究所 青岛 266101)

(³旭阳控股有限公司 北京 100070)

摘要 硫酯酶催化脂酰ACP(酰基载体蛋白)水解生成游离脂肪酸和ACP载体蛋白,能够解除脂肪酸合成与磷脂合成的偶联,是获得游离脂肪酸的关键基因。将拟南芥的硫酯酶基因*atfata*克隆到原核表达载体pET30a上,在大肠杆菌BL21(DE3)中成功表达了His-tag融合蛋白,经SDS-PAGE检测获得特异性表达条带。对该重组菌株进行摇瓶发酵实验,GC-MS检测表明其与对照菌株脂肪酸组成并未发生变化;但其脂肪酸产量达到232.06 mg/L,比对照菌株提高了70%;同时胞外游离脂肪酸产量达到了33 mg/L,占总脂肪酸含量的15%,是野生菌株胞外脂肪酸产量的7倍。图3表2参17

关键词 拟南芥; 硫酯酶; 工程大肠杆菌; 胞外游离脂肪酸

CLC Q939.9 : Q78

Expression of *Arabidopsis thaliana* Thioesterase Gene (*atfata*) in *Escherichia coli* and Its Influence on Biosynthesis of Free Fatty Acid*

CHENG Tao¹, YANG Jianming², LIU Hui², ZHANG Yingwei³, SONG Qiuuhua¹ & XIAN Mo^{2**}

(¹College of Material Science and Chemical Engineering, Jiangxi University of Science and Technology, Ganzhou 341000, China)

(²Qingdao Institute of Bioenergy and Bioprocess Technology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266101, China)

(³Xuyang Holding Ltd., Beijing 100070, China)

Abstract Acyl-acyl carrier protein (ACP) thioesterase catalyzes the hydrolysis of acyl-ACP to fatty acids and ACP. This reaction removes the coupling between fatty acid biosynthesis and phospholipid biosynthesis, which is a key to obtain free fatty acids. In this study, a thioesterase gene from *Arabidopsis thaliana* (*atfata*) was cloned into pET30a vector and heterologously expressed in *Escherichia coli* BL21 (DE3). SDS-PAGE analysis revealed a special band corresponding to the fusion protein. Under shake-flask conditions, this recombinant strain produced 232.06 mg/L fatty acid (70% improvement compared to the control strain). Meanwhile, the extracellular free fatty acid production reached 33 mg/L, namely seven-fold improvement to the control strain. The research laid the foundation for obtaining engineered *E. coli* to produce free fatty acid with high production. Fig 3, Tab 2, Ref 17

Keywords *Arabidopsis thaliana*; thioesterase; engineered *Escherichia coli*; extracellular free fatty acid

CLC Q939.9 : Q78

随着石油资源的紧缺以及环境的日益恶化,对环保且可再生的能源需求变得越来越迫切^[1~2],而生物能源便能很好地解决此问题。目前,可利用的商业化生物燃料包括来自于玉米和蔗糖的短链的醇类以及来自于油菜和动物油脂的脂肪酸甲酯衍生物^[3],但这些却存在着原料与人类本身需求相矛盾的问题。为了克服这些限制^[4],最好的方法便是利用发酵法生产生物燃料,主要包括短链的醇类^[5~6]、类异戊二烯合成途径中的碳氢化合物以及微生物脂肪酸衍生物^[7]。目前为止,能生产生物柴油的微生物主要包括细菌、真菌、酵母、微藻,但由于天然菌株不能高效合成脂肪酸,油脂产量

有限,且天然脂肪酸多为胞内分泌,必须从组织、细胞中分离后,才能应用于生物柴油生产,这一过程关系到生物柴油的质量、成本以及对环境的污染。而与天然菌株相比,大肠杆菌具有遗传背景清楚,易于工程调控,可高密度发酵,生长速度快等诸多优点,已经成为微生物催化合成化学品和燃料的理想受体菌,近年来通过对大肠杆菌的改造生产生物柴油已取得一定的成果^[8]。因此本文以大肠杆菌为出发菌株,利用基因工程手段来提高其胞外脂肪酸的产量。

大肠杆菌脂肪酸生物合成与调控机制已得到广泛的研究^[7, 9~10]。在大肠杆菌脂肪酸合成途径中,硫酯酶基因可催化水解脂酰基ACP生成游离脂肪酸和ACP,解除由脂酰ACP导致的脂肪酸生物合成调节机制中的反馈抑制作用,释放游离脂肪酸。有关文献报道在大肠杆菌内过表达内源或植物硫酯酶基因,可产生游离脂肪酸^[10~13]。本研究首次在大肠杆菌内过表达拟南芥硫酯酶*atfata*基因,通过SDS-PAGE电泳检测,

收稿日期: 2010-09-14 接受日期: 2010-10-14

*中国科学院知识创新工程重要方向项目(No. KGCXZ-YW-801)资助 Supported by the Knowledge Innovation Engineering Program of the Chinese Academy of Sciences (No. KGCXZ-YW-801)

**通讯作者 Corresponding author (E-mail: Xianmo@qibebt.ac.cn)

验证了外源真核基因在大肠杆菌中成功表达，并利用产物检测方法验证了该基因在工程菌内的功能，以期为今后利用重组菌生产游离脂肪酸奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 菌株与材料 大肠杆菌BL21(DE3)(购自ATCC)、pET-30a质粒购自Novagen。

1.1.2 培养基 LB液体培养基(1%蛋白胨, 0.5%酵母提取物, 1%氯化钠), 固体培养基为上述成分再加入2%的琼脂粉。M9培养基(2%葡萄糖, 磷酸氢二钠6 g/L, 磷酸二氢钾3 g/L, 氯化铵1 g/L, 氯化钠0.5 g/L, 硫酸镁1 mmol/L)。

1.1.3 工具酶和试剂 Taq DNA聚合酶, T4 DNA连接酶, dNTP, 感受态细胞制备试剂盒购自Takara公司; Ni SephrosetTM 6×fast flow购自GE Healthcare公司; 限制性内切酶及胶回收试剂盒购自Fermentas公司; 异丙基硫代-β-D-半乳糖苷(IPTG)为AMERSCO公司产品; 胰蛋白胨Trypton和酵母抽提物Yeast Extract为Oxoid公司产品; 其它试剂均为国产分析纯。

1.2 试验方法

1.2.1 PCR扩增 根据GenBank中拟南芥atfata基因序列(AK176105)设计合成PCR引物, 并分别引入NcoI和BamHI酶切位点(下划线), 引物由上海捷瑞生物工程有限公司合成(表1)。

表1 atfata引物序列

Table 1 Primers used for amplification of atfata

引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence (5'-3')
AtFatA-F	CATGCCATGGTTTGAAAGCTTCGTGTAATGTGAC
AtFatA-R	CGCGGATCCTAACCTGAAGGCTTCTTCTCAC

拟南芥总RNA采用上海生工UNIQ-10柱式Trizol总RNA试剂盒提取, 以拟南芥总RNA为总模板, 采用Fermentas公司Revert Aid First strand cDNA Synthesis Kit试剂盒反转录合成cDNA。以拟南芥cDNA为模板扩增基因atfata, PCR反应条件为: 94℃预变性3 min; 94℃变性30 s, 56℃退火30 s, 72℃延伸1 min, 35个循环; 72℃延伸10 min。PCR反应产物经1.2%琼脂糖凝胶电泳检测。

1.2.2 表达载体的构建 PCR产物和pET-30a质粒匀采用用NcoI及BamHI双酶切, 将纯化后的DNA片段与线性化的pET-30a载体连接, 转化大肠杆菌BL21(DE3)感受态细胞。菌液PCR筛选阳性克隆, 提取质粒, 酶切鉴定并测序。鉴定正确的重组质粒命名为pYJM1。

1.2.3 重组菌的蛋白表达及纯化 参考文献[14], 将YJM1菌接种于含有卡那抗性的液体LB培养基, 37℃振荡培养过夜。d2按1%接种量转接至50 mL新鲜的LB培养基, 振荡培养至对数生长期($D_{600\text{ nm}}$ 约为0.6), 加入异丙基-β-D-硫代半乳糖苷(IPTG)至终浓度为0.5 mmol/L, 37℃诱导2~3 h, 离心收集菌体。用1 mL Tris-HCl缓冲液(pH 8.0)重悬菌体后, 置于冰上超声破碎, 4℃、12 000 r/min离心10 min, 取部分上清进行SDS-PAGE检测, 剩余部分用Ni SephrosetTM 6×fast flow纯化系统纯化His-tag融合蛋白。

1.2.4 重组菌脂肪酸提取及甲酯化 参考文献[15], 采用M9培

养基对YJM1菌进行摇瓶发酵, 取50 mL发酵液, 离心分别收集上清与沉淀。上清加入50 mL抽提剂(氯仿: 正庚烷: 甲醇=56: 42: 2)萃取, 旋蒸去除抽提剂, 加入1 mL甲醇溶解萃取物, 再加入2 mL甲酯化试剂(三氟化硼: 甲醇=1: 4), 于60℃水浴中反应30 min, 采用2 mL色谱纯正己烷萃取脂肪酸甲酯。菌体沉淀加入3 mL提取剂(氯仿: 甲醇=2: 1)旋涡振荡, 抽提细胞总脂, 然后用5 mL皂化试剂(甲醇: 水=4: 1, 含6%NaOH), 60℃水浴1 h进行皂化反应, 再按照上述方法进行甲酯化。

1.2.5 GC-MS检测脂肪酸甲酯 参考文献[16], 对正己烷萃取的脂肪酸甲酯样品进行GC-MS检测, 色谱条件如下: TR-Wax MS GC毛细管色谱柱(30 m, 0.25 mm, 0.25 μm), 载气: 高纯氮气(99.999%), 进样器温度: 250℃, 检测器温度: 300℃, 载气柱头压: 10 psi; 程序升温: 起始100℃, 持续2 min, 100℃/min升温至250℃, 保持5 min。以C20脂肪酸为内标进行定量。

2 结果与分析

2.1 重组菌的构建与鉴定

将目的片段atfata克隆到表达载体pET30上得到重组质粒pYJM1, PCR法扩增atfata基因片段, 扩增产物经琼脂糖凝胶电泳鉴定, 在1 000 bp处可见一条与预期大小相符的条带(图1)。重组质粒经过NcoI/BamHI双酶切后同样得到大约为1 000 bp大小的片段(图1), 与预期相符。DNA序列分析显示插入的atfata基因片段与GenBank(检索号: AK176105)中已报道的序列一致, 二者的基因同源性为100%。

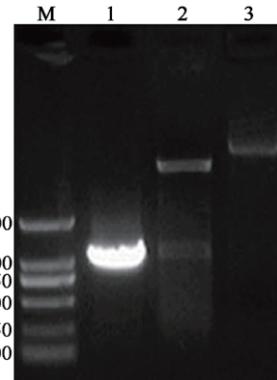


图1 重组质粒pYJM1酶切鉴定与PCR鉴定

Fig. 1 Double digestion and PCR amplification of recombinant plasmid pYJM1

Lane M: DNA分子量标准; Lane 1: PCR扩增产物; Lane 2: 质粒pYJM1双酶切; Lane 3: 质粒pYJM1
Lane M: DNA marker; Lane 1: PCR amplification; Lane 2: Double digestion of pYJM1; Lane 3: Plasmid pYJM1

2.2 重组菌YJM1的蛋白表达与纯化

重组菌YJM1经IPTG诱导3 h后, 菌体超声破碎后, 裂解液进行SDS-PAGE检测, 在相对分子质量约45×10³处出现一特异条带(图2), 与预期的His-tag融合蛋白理论大小数值相符, 而对照BL(DE3)无特异条带出现。而蛋白经Ni柱纯化之后, SDS-PAGE检测结果获得单一条带(图2), 说明拟南芥硫酯酶基因atfata在大肠杆菌BL21(DE3)中以可溶性的形式得到正确表达。

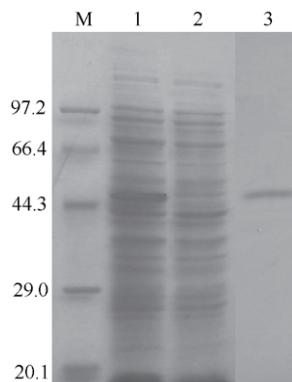


图2 植物硫酯酶基因在大肠杆菌内的表达与纯化

Fig. 2 Expression and purification of *atfata* gene in recombinant *E. coli*. Lane M: 蛋白质分子标准量; Lane 1: IPTG诱导后蛋白; Lane 2: 未经诱导蛋白; Lane 3: 纯化后蛋白
Lane M: Molecular weight maker; Lane 1: Induced strain YJM1 with IPTG; Lane 2: Non-induced strain YJM1; Lane 3: Purified protein

2.3 GC-MS检测重组菌脂肪酸

经GC-MS检测分析, 重组菌YJM1与对照菌BL21(DE3)的均含有6种脂肪酸(图3), 分别为肉豆蔻酸(14:0)、棕榈酸(16:0)、棕榈油酸(16:1)、十七碳-9-环丙烷酸(17:0)、顺十八碳-9-烯酸(18:1)和十九碳-11-环丙烷酸(19:0), 其中棕榈酸、棕榈油酸和顺十八碳-9-烯酸是主要成分, 拟南芥硫酯酶*atfata*基因的过量表达不能改变大肠杆菌脂肪酸的种类。

2.4 硫酯酶过表达提高工程菌脂肪酸产量

根据C20脂肪酸内标对重组菌YJM1和对照菌BL21(DE3)脂肪酸产量进行定量分析, 结果如表2所示。野生菌株BL21(DE3)总脂肪酸产量为136.95 mg/L, 其中胞内脂肪酸产量为131.13 mg/L, 胞外脂肪酸产量为5.82 mg/L, 胞外脂肪酸产量占总产量的4%; 而重组菌YJM1总脂肪酸产量为232.06 mg/L, 比野生菌株提高了约70%, 胞内脂肪酸产量提高了50%, 而胞外脂肪酸产量提高了近6倍, 占总产量的15%。以上结果表明, 转入基因的重组菌与未转入基因的空白大肠杆菌相比, 其脂肪酸产量有大幅度的增加, 说明该重组菌脂肪酸合成大幅度增加与转入基因相关。

表2 胞内外脂肪酸产量

Table 2 The fatty acid production of extracellular and intracellular

菌株 Strain	$D_{600\text{ nm}}$	胞外脂肪酸含量 Extracellular fatty acid ($\mu\text{g}/\text{mg/L}$)	胞内脂肪酸含量 Intracellular fatty acid ($\mu\text{g}/\text{mg/L}$)	Ration (r/%)
BL21(DE3)	3.12	5.82	131.13	4
YJM1	2.89	35.13	196.93	15

Ration: 胞外脂肪酸在总脂中所占的比例

Ration: The percentage of extracellular free fatty acid in the total fatty acids

3 讨论

大肠杆菌具有遗传背景清楚, 易于工程调控, 可高密度发酵, 生长速度快等诸多优点, 已经成为微生物催化合成化学品和燃料的理想受体菌。但是野生型大肠杆菌自身硫酯酶表达水平很低, 且主要以胞外分泌的形式存在, 因此无法合成游离脂肪酸^[17]。本研究采用大肠杆菌做为宿主, 通过分子生物学技术和代谢工程手段, 定向调控了大肠杆菌脂肪酸的代谢路径, 将拟南芥的硫酯酶基因*atfata*构建到质粒载体pYJM1上, 并成功转化大肠杆菌BL21(DE3), 得到一株高产脂肪酸的重组菌株。

通过摇瓶发酵实验验证, 重组菌株YJM1脂肪酸产量是野生菌株的1.7倍, 其中胞外脂肪酸产量达到了33 mg/L, 是野生菌株的6倍, 胞外脂肪酸产量在总脂中的比例达到了15%。以上结果表明, 在大肠杆菌内过表达拟南芥硫酯酶基因*atfata*, 解除了产物反馈抑制作用^[15], 能够明显提高脂肪酸产量, 并且脂肪酸能以游离的形式分泌到胞外。胞外脂肪酸产量的增加简化了脂肪酸的提取工艺, 降低了生产成本以及减少了对环境的污染。为了考察重组大肠杆菌对脂肪酸合成的稳定性, 我们做了4次传代实验, 通过对这5代菌的脂肪酸产量的对比, 发现其各代之间脂肪酸产量差别不大, 说明该重组菌对增加脂肪酸合成具有一定的稳定性。虽然我们获得了产胞外游离脂肪酸的工程菌株, 但由于处于摇瓶阶段, 脂肪酸产量有限, 而且脂肪酸的合成受多种酶和蛋白的共同调节, 因此在今后的工作中将对发酵方法与分子操作进行更加深入的研究, 以期大幅度地提高胞外脂肪酸产量。

本研究通过定向调控了大肠杆菌脂肪酸合成代谢路

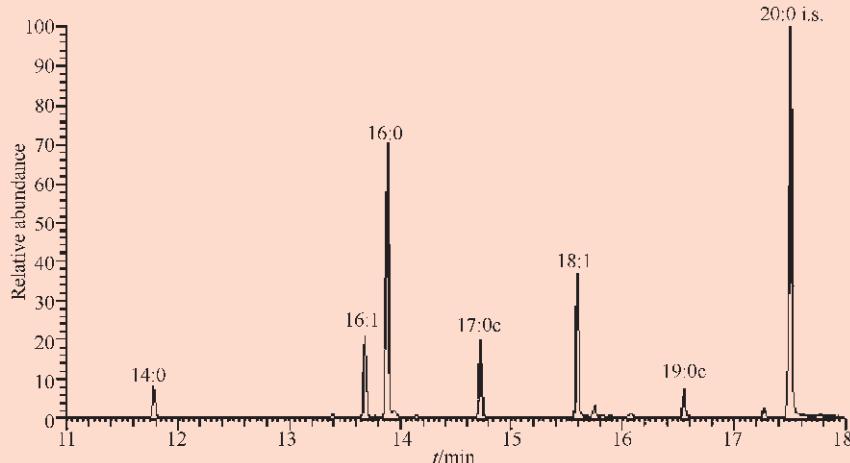


图3 GC-MS检测重组菌YJM1脂肪酸组成
FIG 3 GC-MS analysis of fatty acid composition from strain YJM1

径, 构建了产游离脂肪酸的工程大肠杆菌, 使细胞内形成的脂肪酸以游离形式定向分泌到细胞外, 在大肠杆菌中构建了一条新的游离脂肪酸合成途径, 为获得高产游离脂肪酸的工程大肠杆菌奠定了理论与实验基础。

References

- 1 Kerr RA. Climate change. Global warming is changing the world. *Science*, 2007, **316** (5822): 188~190
- 2 Stephanopoulos G. Challenges in engineering microbes for biofuels production. *Science*, 2007, **315** (5813): 801~804
- 3 Fortman JL, Chhabra S, Mukhopadhyay A, Chou H, Lee TS, Steen E, Keasling JD. Biofuel alternatives to ethanol: Pumping the microbial well. *Trends Biotechnol*, 2008, **26** (7): 375~381
- 4 Lee SK, Chou H, Ham TS, Lee TS, Keasling JD. Metabolic engineering of microorganisms for biofuels production: From bugs to synthetic biology to fuels. *Curr Opin Biotechnol*, 2008, **19** (6): 556~563
- 5 Zhang K, Sawaya MR, Eisenberg DS, Liao JC. Expanding metabolism for biosynthesis of nonnatural alcohols. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008, **105** (52): 20653~20658
- 6 Atsumi ST, Hanai T, Liao JC. Non-fermentative pathways for synthesis of branched-chain higher alcohols as biofuels. *Nature*, 2008, **451** (7174): 86~89
- 7 Withers ST, Gottlieb SS, Lieu Bet, Newman JD, Keasling JD. Identification of isopentenol biosynthetic genes from *Bacillus subtilis* by a screening method based on isoprenoid precursor toxicity. *Appl Environ Microbiol*, 2007, **73** (19): 6277~6283
- 8 Kalscheuer RT, Stolting T, Steinbuchel A. *Microdiesel: Escherichia coli engineered for fuel production*. *Microbiology*, 2006, **152** (Pt 9): 2529~2536
- 9 Fujita YH, Matsuoka H, Hirooka K. Regulation of fatty acid metabolism in bacteria. *Mol Microbiol*, 2007, **66** (4): 829~839
- 10 Magnuson K, Jackowski S, Rock CO, Cronan JE. Regulation of fatty acid biosynthesis in *Escherichia coli*. *Microbiol Rev*, 1993, **57** (3): 522~542
- 11 Hunt MC, Alexson SE. The role Acyl-CoA thioesterases play in mediating intracellular lipid metabolism. *Prog Lipid Res*, 2002, **41** (2): 99~130
- 12 Sauer U, Eikmanns BJ. The PEP-pyruvate-oxaloacetate node as the switch point for carbon flux distribution in bacteria. *FEMS Microbiol Rev*, 2005, **29** (4): 765~794
- 13 Davis MS, Solbiati J, Cronan JE Jr, Overproduction of acetyl-CoA carboxylase activity increases the rate of fatty acid biosynthesis in *Escherichia coli*. *J Biol Chem*, 2000, **275** (37): 28593~28598
- 14 Cao, Y, Xian M, Yang J, Liu W, Li LZ. Heterologous expression of stearoyl-acyl carrier protein desaturase (S-ACP-DES) from *Arabidopsis thaliana* in *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif*, 2009, **69** (2): 209~214
- 15 Voelker TA, Davies HM. Alteration of the specificity and regulation of fatty acid synthesis of *Escherichia coli* by expression of a plant medium-chain acyl-acyl carrier protein thioesterase. *J Bacteriol*, 1994, **176** (23): 7320~7327
- 16 Cho H, Cronan JE Jr. Defective export of a periplasmic enzyme disrupts regulation of fatty acid synthesis. *J Biol Chem*, 1995, **270** (9): 4216~4219
- 17 Spencer AK, Greenspan AD, Cronan JE. Thioesterases I and II of *Escherichia coli*. *J Biol Chem*, 1978, **253**: 5922~5926