

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2015.14563

中华绒螯蟹 $\Delta 9$ 脂肪酸去饱和酶基因克隆与原核表达

姚琴琴, 杨志刚, 郭子好, 成永旭, 王瑶, 施秋燕, 刘启彬, 何杰, 杨筱珍

上海海洋大学 水产种质资源发掘与利用教育部重点实验室, 上海 201306

摘要: 根据中华绒螯蟹 FAD9 基因 cDNA 序列(Accession Number: JQ693685)设计引物, 扩增得到中华绒螯蟹 FAD9 基因的开放阅读框(ORF), 用原核表达载体 pCold-TF DNA 成功构建重组表达载体 pCold-fad9, 将 pCold-fad9 转入大肠杆菌 BL21(DE3)pLysS, 在异丙-D-硫代半乳糖苷(IPTG)的诱导下进行表达。SDS-PAGE 分析表明, 诱导后出现的特异性蛋白条带, 大小与预期理论值(95.10 kD)相符。当 IPTG 浓度为 0.3 mmol/L 时, 在 15℃ 条件下诱导 20 h, 重组蛋白的表达量最高。目的蛋白主要存在于上清溶液中, 为可溶性表达。利用镍离子亲和层析柱对重组蛋白进行了纯化, 用 Western-blotting 方法验证了该重组蛋白可以与 anti-His 抗体特异性结合。研究结果为中华绒螯蟹 FAD9 重组蛋白的大量纯化及活性检测奠定基础, 也为今后进一步开展脂肪酸去饱和酶功能的研究提供参考。

关键词: 中华绒螯蟹; $\Delta 9$ 脂肪酸去饱和酶; 克隆; 原核表达

中图分类号: S917

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2015)06-1177-09

多不饱和脂肪酸(Polyunsaturated fatty acids, PUFAs)是含有十六个碳以上并具有两个或两个以上双键的脂肪酸, 人类以及其他哺乳动物体内不能合成或者只能少量合成 PUFAs^[1-2], 它是组成生物膜结构的重要部分, 对细胞膜流动性的增加和选择性渗透过程的发挥起了重要作用, PUFAs 可参与机体细胞特定功能的维持及调节^[3]。因 PUFAs 也是生物体中很多活性分子的前体, 与机体许多重要的生理活动相关, 研究人员发现 PUFAs 特别是长链多不饱和脂肪酸(Long chain polyunsaturated fatty acids, LC-PUFAs)与人的健康密切相关, 如二十二碳六烯酸(DHA)关系到胎儿的生长发育, 某些 LC-PUFAs 可以降低炎症、癌症及心脑血管疾病的发病率等^[4-6]。PUFAs 是由一系列脂肪酸延长酶(Fatty acid elongase, FAE)及脂肪酸去饱和酶(Fatty acid desaturase, FAD)的作用, 以饱和脂肪酸作为最初的底物逐步生成的^[3]。

FAD9 是脂肪酸去饱和酶家族中重要的成员之一, 是锚定在内质网上的一种膜结合蛋白, 在脂肪酸代谢及细胞膜流动性的调节中发挥着重要作用^[7]。然而, 鉴于 FAD9 的膜结构特征, 目前还没有较好的方法对其进行纯化及蛋白水平上的进一步研究, 加之包括人类在内的很多高等哺乳动物, 其自身合成 PUFAs 的能力很弱, 只能从食物中获取。因此, 通过基因工程的手段来构建高效表达菌株便成为一种可行的方法。

水产动物体内含有较为丰富的 PUFAs, 成为一种重要的提供人体 PUFAs 的食物来源^[8]。中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*), 又称大闸蟹、河蟹, 是一种极具营养价值和经济价值的水产动物, 在中国被广泛养殖并广为消费者们喜爱, 近年来, 中华绒螯蟹营养代谢方面的研究成为热点^[9]。本实验通过选择适宜的原核表达载体, 依据本实验室已获得的中华绒螯蟹 FAD9 基因序列(GenBank 登

收稿日期: 2014-12-29; 修订日期: 2015-02-19。

基金项目: 国家 863 发展计划项目(2012AA10A409-5); 国家自然科学基金项目(31472287; 31272677); 上海教委知识服务平台项目(ZF1206); 科技部港澳台科技合作专项(2014DFT30270); 上海市科委优秀学术带头人项目(12XD1402700)。

作者简介: 姚琴琴(1988-), 女, 硕士研究生, 主要从事中华绒螯蟹分子营养学研究。E-mail: a1017604175@163.com

通信作者: 杨志刚, 副教授, 硕士研究生导师。Tel: 021-61900417; E-mail: zgyang@shou.edu.cn

录号: JQ693685), 构建了重组原核表达载体, 并成功在大肠杆菌 BL21(DE3)pLysS 中诱导表达, 对表达产物进行纯化, 用 6×His 抗体进行了 Western-blotting 检测, 旨在为中华绒螯蟹 FAD9 基因以后的纯化工作及其功能方面的进一步研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 实验材料

中华绒螯蟹取自上海海洋大学竖新养殖基地, 取其肝胰腺组织, 用液氮速冻后迅速放入 -80°C 冰箱保存用于 RNA 的提取。表达宿主菌 BL21(DE3)pLysS 购于北京天根生化科技有限公司; 限制性内切酶 QuickCutTM *Bam*H I、QuickCutTM *Sac* I、琼脂糖购自 TaKaRa 公司; *T*₄ DNA 连接酶购于 NEB 公司; 异丙-D-硫代半乳糖苷(IPTG)购自 Promega 公司; SDS-PAGE 凝胶配制试剂盒购于上海威奥生物科技有限公司; 预染蛋白质 Marker 购于 ThermoFisher 公司。

1.2 RNA 提取和 cDNA 的合成

取冻存的肝胰腺组织, 利用 RNAiso Plus (TaKaRa)提取其总 RNA, 并用紫外分光光度计(Q5000)检测其纯度和浓度, 经 1%琼脂糖凝胶电泳检测质量。

取 1 μg 总 RNA 为反转录模板, 根据 PrimscriptTM Reverse transcriptase (TaKaRa)说明书操作, 合成 cDNA, 然后保存于 -20°C 冰箱中, 待用于 PCR 的扩增。

1.3 中华绒螯蟹 FAD9 编码区扩增

依据中华绒螯蟹 FAD9 基因全长序列和原核表达载体 pCold-TF DNA (TaKaRa)的序列特征、利用 Primer Premier 5.0 软件设计引物, 以肝胰腺组织 cDNA 为模板, 扩增中华绒螯蟹 FAD9 基因的 ORF, 上游引物为 FAD9-F: 5'-AGAGAGCTCATGGCTCCGCAAGCC-3', 下游引物为 FAD9-R: 5'-ATAGGATCCTTACTTGGCCTTGGTC-3', 已分别在 FAD9-F 和 FAD9-R 中引入了 *Sac* I 和 *Bam*H I 酶切位点(下划线标注处)。

用高保真酶(Tiagen)扩增 FAD9 基因的 ORF

序列, PCR 反应体系: cDNA 模板 1 μL , dNTP Mixture (2.5 mmol/L) 4 μL , 上下游引物(10 $\mu\text{mol/L}$) 各 0.5 μL , 10×PCR buffer 2.5 μL , *Taq* Plus DNA Polymerase (2.5 U/ μL) 0.5 μL , 加灭菌超纯水至总体积 25 μL 。PCR 反应条件: 94°C 预变性 5 min; 94°C 变性 30 s, 58°C 退火 30 s, 72°C 延伸 1 min, 共 30 个循环; 72°C 延伸 10 min, 4°C 保存。扩增产物经 1%的琼脂糖凝胶电泳检测, 再将所有目的产物按照琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒(Tiagen)中的说明书回收纯化, 取 1 μL 回收产物与 pGEM-T 载体 (Promega)连接, 连接产物经热激后转化至大肠杆菌 Top10 感受态细胞(Tiagen)中, 转化产物在无抗培养基中, 37°C 200 r/min 条件下振荡培养 1 h 后涂布于含有 X-Gal、IPTG 以及氨苄青霉素的 LB 固体培养基上, 置恒温培养箱中 37°C 过夜培养 (12~16 h)。次日在长出的蓝白斑菌落中挑选白斑, 接种于含氨苄青霉素的 LB 液体培养基中继续振荡培养 4~5 h 后, 进行菌液 PCR 验证并筛选出阳性克隆, 由生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序验证。

1.4 pCold-fad9 重组表达载体的构建

取测序结果正确的 pGEM-fad9 阳性克隆菌株、含有 pCold-TF DNA 原核表达载体的克隆菌株分别于 LB 液体培养基中扩大培养, 使用质粒小量提取试剂盒(北京索莱宝科技有限公司)分别提取 pGEM-fad9 和 pCold-TF DNA 质粒。

将原核表达载体 pCold-TF DNA 和 pGEM-fad9 质粒用限制性内切酶 *Bam*H I 和 *Sac* I 进行双酶切, 用 1%的琼脂糖电泳进行检测, 回收所有目的产物。将回收的表达载体 pCold-TF DNA 与 fad9 片段用 *T*₄ DNA 连接酶在 16 $^{\circ}\text{C}$ 条件下连接 4 h, 构建重组表达载体 pCold-fad9, 将连接产物转化到 *E. coli* Top10 感受态细胞中, 在无抗培养基中, 37°C 200 r/min 条件下振荡培养 1 h 后涂布于含有氨苄青霉素抗性的 LB 固体培养基上, 置恒温培养箱中 37°C 过夜培养后挑选阳性克隆菌株, 经菌落 PCR 并抽提质粒进行双酶切验证, 将菌株送至公司测序, 测序正确的菌株用 15%的甘油保存菌种, 并存储于 -80°C 冰箱中待用。

1.5 重组蛋白的诱导表达及表达产物的初步分析

对含有重组表达载体 pCold-fad9 的阳性克隆提取质粒, 重新转化进宿主菌 BL21(DE3)pLysS 以构建重组菌株 BL21/pCold-fad9, 将其在含氨苄青霉素终质量浓度为 100 $\mu\text{g/mL}$ 、含氯霉素终质量浓度为 34 $\mu\text{g/mL}$ 的 LB 固体培养基中过夜培养, 阳性菌株用甘油保种。

分别将 5 μL 空载体菌株 BL21/pCold、重组菌株 BL21/pCold-fad9 接种于 2 mL 的 LB 液体培养基中(含 100 $\mu\text{g/mL}$ 氨苄青霉素和 34 $\mu\text{g/mL}$ 氯霉素), 37 $^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min 过夜活化后以 1:100 比例分别加入到 50 mL 的 LB 液体培养基中(氨苄青霉素和氯霉素浓度同上), 37 $^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min 培养, 当 OD_{600} 达到 0.6~0.8 时, 将 IPTG 加入到对照组(BL21/pCold)和实验组(BL21/pCold-fad9)菌液中进行诱导, 使 IPTG 终浓度为 0.5 mmol/L, 25 $^{\circ}\text{C}$ 诱导表达 6 h。

依据细菌蛋白提取试剂盒(生工生物工程上海股份有限公司)中的操作说明进行蛋白提取: 分别取诱导的 BL21/pCold 菌液和 BL21/pCold-fad9 菌液及未诱导的 BL21/pCold-fad9 菌液 20 mL, 12000 r/min 离心 5 min 收集细菌细胞沉淀并称取湿重, 按照 1 g:5 mL 的比例加入提取试剂重悬细胞, 提取试剂使用前每 1 mL 提取试剂加入 1 μL DTT、10 μL PMSF、2 μL Lysozyme 和 2 μL DNaseI, 反复吹打使之成为均匀悬液, 置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温摇床 280 r/min 震荡 30 min, 然后在 4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下以 15000 r/min 离心 5 min, 收集诱导后的 BL21/pCold-fad9 的蛋白上清作为可溶性部分待检测, 沉淀用 250 μL 提取试剂涡旋震荡重悬。将 BL21/pCold-fad9 上清与沉淀悬浮液、BL21/pCold 及未诱导的 BL21/pCold-fad9 蛋白全液分别经 10% SDS-PAGE 电泳检测目的蛋白的表达情况。

1.6 重组蛋白表达条件的优化

取 1 mL 复性后的重组菌 BL21/pCold-fad9, 加入到 100 mL 新鲜 LB 培养液中(氨苄青霉素和氯霉素浓度同上), 37 $^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min 培养至 OD_{600} 为 0.6~0.8 时, 分别取其中 5 mL 菌液至 12 个干净的试管中, 将 12 管菌液分成 6 组, 每组 2 管, 第 1 组

到第 6 组所加 IPTG 的终浓度依次为 0.1 mmol/L、0.3 mmol/L、0.5 mmol/L、0.8 mmol/L、1.0 mmol/L、1.2 mmol/L, 25 $^{\circ}\text{C}$ 下诱导 12 h, 收集不同浓度下诱导的菌液各 2 mL, 将样品在 4 $^{\circ}\text{C}$ 、12000 r/min 条件下离心 5 min, 用 200 μL PBS 缓冲液(137 mmol/L NaCl, 2.7 mmol/L KCl, 10 mmol/L Na_2HPO_4 , 2 mmol/L KH_2PO_4)重悬, 反复漂洗 3 次, 每次漂洗后经 12000 r/min 离心 2 min, 最后加入 30 μL PBS 缓冲液悬浮, 经 10% SDS-PAGE 电泳检测不同诱导剂浓度对重组蛋白表达水平的影响。

取 1 mL 复性的重组菌 BL21/pCold-fad9, 用上述方法扩大培养, 待菌液 OD_{600} 达 0.6~0.8 时, 往其中加入 IPTG 至终浓度为 0.3 mmol/L, 混匀, 分别取其中 5 mL 菌液至 8 个灭菌试管中, 将 8 管菌液分成 4 组, 每组 2 管, 4 组菌液分别置 15 $^{\circ}\text{C}$ 、18 $^{\circ}\text{C}$ 、25 $^{\circ}\text{C}$ 、35 $^{\circ}\text{C}$ 恒温摇床中 100 r/min 过夜培养(12 h), 取不同温度条件下诱导的菌液各 2 mL, 4 $^{\circ}\text{C}$ 、12000 r/min 离心 5 min, 用 200 μL PBS 缓冲液悬浮、漂洗后依上述方法进行 SDS-PAGE 电泳, 以确定目的蛋白的最佳诱导温度。

另取复性的重组菌 1 mL 扩大培养, 待菌液 OD_{600} 达 0.6~0.8 时, 加入 IPTG 至终浓度为 0.3 mmol/L, 在诱导温度为 15 $^{\circ}\text{C}$ 的条件下进行震荡培养, 分别在 2 h、5 h、10 h、15 h、20 h 时取 2 mL 菌液, 依据上述的方法进行 SDS-PAGE 电泳以确定目的蛋白的最佳诱导时间。

1.7 重组蛋白 pCold-fad9 的纯化

取 2 mL 活化的保种菌在 37 $^{\circ}\text{C}$ 条件下大量培养(200 mL), 至 OD_{600} 达 0.6~0.8, 加入终浓度为 0.3 mmol/L 的 IPTG, 15 $^{\circ}\text{C}$ 诱导 15 h 后, 于 4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下 12000 r/min 离心 5 min, 用 PBS 缓冲液反复吹洗后收集菌体并称湿重, 按照每克菌体加 10 mL Binding buffer(结合缓冲液, 500 mmol/L NaCl, 20 mmol/L 咪唑, 20 mmol/L Na_3PO_4 ; pH 7.4)的比例重悬细菌, 向菌体悬浮液中加入终浓度为 1 mmol/L 的 PMSF, 然后在冰浴条件中超声破碎(400 W 超声 4 s 间隔 6 s, 共超声 100 次), 4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下 12000 r/min 离心 5 min, 收集上清, 再将此上清 12000 r/min 离心 5 min 取其上清, 用 0.22 μm 滤头过滤

上清溶液,以除去颗粒物质,收集过滤液并贮存于 -20°C 冰箱中。

用 His 标签的镍离子亲和层析柱对蛋白质进行纯化。首先用 5 倍介质体积的去离子水洗涤柱子,再用 5 倍介质体积的 Binding buffer 对柱子进行平衡,接着加入已过滤的蛋白上清溶液(流速为 $0.5\sim 1\text{ mL/min}$),然后用 5 倍介质体积 Binding buffer 洗去层析柱中未结合蛋白,最后用 5 倍介质体积的 Elution buffer(洗脱缓冲液, 500 mmol/L NaCl , 250 mmol/L 咪唑, $20\text{ mmol/L Na}_3\text{PO}_4$; pH 7.4)进行洗脱,收集洗脱液,并用 SDS-PAGE 电泳检测之。

1.8 重组 pCold-fad9 融合蛋白 Western-blotting 验证

分别取纯化前的蛋白上清、纯化后的蛋白溶液、未经诱导的 BL21/pCold-fad9 蛋白上清、经诱导的 BL21/pCold 蛋白上清,经 SDS-PAGE 电泳,利用湿转法将凝胶上的蛋白转印至 PVDF 膜上, 5% 脱脂牛奶 PBST 溶液室温封闭 2 h,用 $1\times$ PBST 清洗 3 次,每次 5 min,将 PVDF 膜置于 anti-6 $\times$ His 的一抗(abcam)PBST 溶液中, 4°C 过夜。次日,PVDF 膜经 PBST 清洗 3~5 次,每次 5 min,再用鼠源的 IgG 荧光二抗(武汉博士德生物工程有限公司)室温孵育 2 h,TBST 洗脱 3 次后,接着用双色红外激光成像系统(Odyssey)进行成像。

2 结果与分析

2.1 pCold-fad9 重组表达载体的构建及验证

从中华绒螯蟹肝胰腺中提取总 RNA,经反转录后以 FAD9-F/FAD9-R 为特异性引物进行 RT-PCR 扩增并将产物纯化,克隆后测序结果与 NCBI 上登录的中华绒螯蟹去饱和酶 9 基因(Accession Number: JQ693685)的 ORF 完全一致,该序列长 1044 bp,共编码 347 个氨基酸,平均分子量为 40.10 kD。将测序正确的阳性菌株和 pCold-TF DNA 质粒用 *Bam*H I 和 *Sac* I 进行双酶切,得到两者的酶切产物经回收纯化后用 *T*₄ DNA 连接酶进行连接,连接产物转化到大肠杆菌

中,经菌液 PCR 检测(图 1)及双酶切鉴定(图 2),结果表明,菌液 PCR 的阳性率为 100%,且重组质粒 pCold-fad9 经双酶切后在 1000 bp 附近出现有一目的条带。再将验证结果正确的菌株送至公司测序,测序结果进一步证实了目的片段已正确的插入到 pCold-TF DNA 载体中,构建成功的原核表达载体可进行后续实验,将菌株用甘油保种并存放于 -80°C 冰箱中。

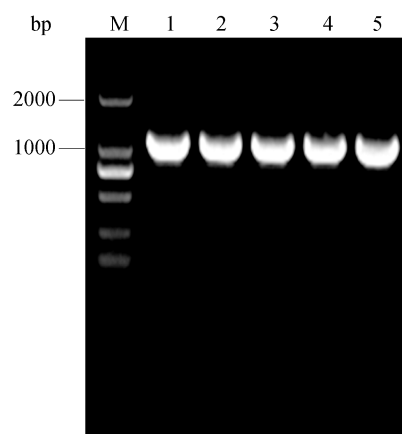


图 1 重组质粒 pCold-fad9 的菌落 PCR 检测

1~5: 重组质粒 pCold-fad9, 均为阳性克隆菌; M: DNA marker DL2000.

Fig. 1 Identification of recombinant plasmid pCold-fad9 by PCR
1~5: Positive clones detected by PCR; M: DNA marker DL2000.

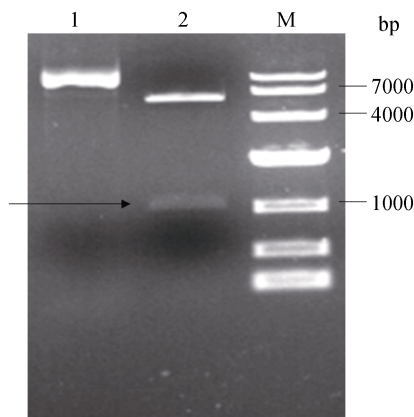


图 2 重组质粒 pCold-fad9 的双酶切鉴定

1: 重组质粒 pCold-fad9; 2: 重组质粒 pCold-fad9 双酶切; M: DNA marker DL10000.

Fig. 2 Electrophoresis analysis of double digestion of recombinant plasmid pCold-fad9
1: Recombinant plasmid pCold-fad9; 2: Double digestion of pCold-fad9 by *Bam*H I and *Sac* I; M: DNA marker DL10000.

2.2 重组蛋白的诱导表达及表达产物的可溶性分析

分别活化、培养、诱导 BL21/pCold 和 BL21/pCold-fad9 菌株, 用蛋白提取试剂盒分别提取各组菌液蛋白, 并分离诱导后的重组表达菌株的蛋白上清和沉淀, 将诱导的 BL21/pCold 蛋白全液、未诱导的 BL21/pCold-fad9 蛋白全液、诱导的 BL21/pCold-fad9 蛋白全液及其上清、沉淀分别进行 SDS-PAGE 电泳。检测结果显示(图 3), 与空载体表达菌株 BL21/pCold 及未经诱导的重组菌株相比, 重组表达载体菌株 BL21/pCold-fad9 诱导 6 h 后, 在分子量 100 kD 附近出现一特异条带, 由于空载体 BL21/pCold 菌株表达的蛋白分子量在约 55 kD 处(伴侣蛋白 TF 和组氨酸标签分子量), FAD9 的理论蛋白分子量为 40.10 kD, 因此, 可推测 BL21/pCold-fad9 表达出的蛋白与预期结果(95.10 kD)一致, 推断其可能为重组目的蛋白, 且重组蛋白主要存在于上清溶液中, 是可溶性表达。

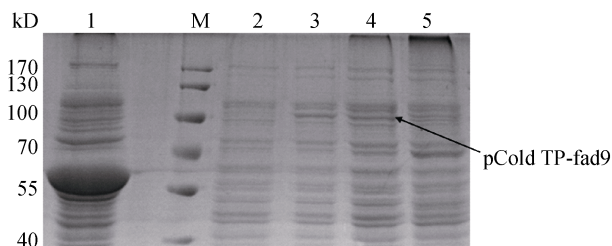


图 3 重组 pCold-fad9 蛋白 SDS-PAGE 检测及其可溶性分析
M: 蛋白质分子量标准; 1: 经 IPTG 诱导的 BL21/pCold TF 菌株; 2: 未诱导的 BL21/pCold-fad9 菌株; 3: 经 IPTG 诱导的 BL21/pCold-fad9 菌株; 4: 经 IPTG 诱导的 BL21/pCold-fad9 菌株蛋白上清; 5: 经 IPTG 诱导的 BL21/pCold-fad9 菌株蛋白沉淀。

Fig. 3 Analysis of pCold-fad9 expression in *E. coli* BL21(DE3)pLysS by SDS-PAGE

M: Protein molecular weight marker; 1: BL21/pCold TF induced by IPTG; 2: BL21/pCold-fad9 uninduced by IPTG; 3: BL21/pCold-fad9 induced by IPTG; 4: Supernate of BL21/pCold-fad9 induced by IPTG; 5: Precipitation of BL21/pCold-fad9 induced by IPTG.

2.3 中华绒螯蟹 pCold-fad9 重组蛋白在大肠杆菌中表达条件的优化

调节 IPTG 诱导浓度, 在 25℃ 条件下诱导 12 h。结果显示, IPTG 浓度为 0.1 mmol/L 时重组蛋白的表达量显著低于其余浓度梯度下的表达量, 且 IPTG 浓度为 0.3 mmol/L、0.5 mmol/L、0.8 mmol/L、

1.0 mmol/L、1.2 mmol/L 时的各组表达量没有明显差异(图 4)。

在 IPTG 浓度为 0.3 mmol/L 时, 检测不同温度对 pCold-fad9 重组蛋白表达情况的影响。图 5 表明, 经 12 h 诱导后, 15℃ 和 18℃ 诱导组的重组蛋白表达量最高, 且二者几乎无差异; 25℃ 和 35℃ 诱导组表达量较少, 两组差异亦不明显。结果表明, 本实验的最佳诱导温度为 15~18℃。

在 15℃、IPTG 浓度为 0.3 mmol/L 条件下, 调节重组菌的诱导时间, 分别在 2 h、5 h、10 h、15 h、

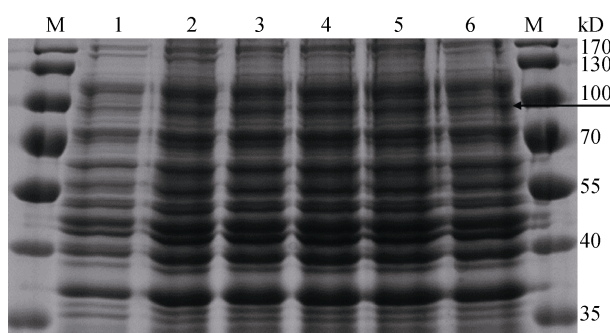


图 4 不同 IPTG 浓度对 pCold-fad9 重组蛋白表达量的影响
1~6: IPTG 浓度分别为 0.1 mmol/L、0.3 mmol/L、0.5 mmol/L、0.8 mmol/L、1.0 mmol/L、1.2 mmol/L; M: 蛋白质分子量标准。
Fig. 4 Effects of expression level of recombinant pCold-fad9 at different IPTG concentration

1~6: Induced by IPTG concentration of 0.1 mmol/L, 0.3 mmol/L, 0.5 mmol/L, 0.8 mmol/L, 1.0 mmol/L, 1.2 mmol/L, respectively; M: Protein molecular weight marker.

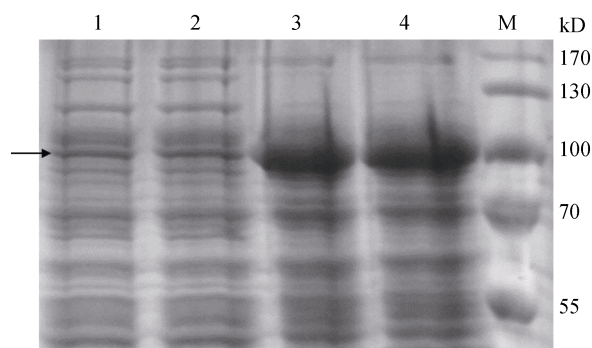


图 5 不同诱导温度对 pCold-fad9 重组蛋白表达量的影响
1: 35℃ 下诱导的重组菌; 2: 25℃ 下诱导的重组菌; 3: 18℃ 下诱导的重组菌; 4: 15℃ 下诱导的重组菌; M: 蛋白质分子量标准。
Fig. 5 Effects of expression level of recombinant pCold-fad9 at different induction temperatures

1~4: Expression of recombinant pCold-fad9 at 35℃, 25℃, 18℃, 15℃, respectively; M: Protein molecular weight marker.

20 h 时取样,发现重组蛋白 pCold-fad9 的表达量随诱导时间加长而增加,当诱导时间长于 15 h 时,重组蛋白的表达量不再显著增加(图 6)。

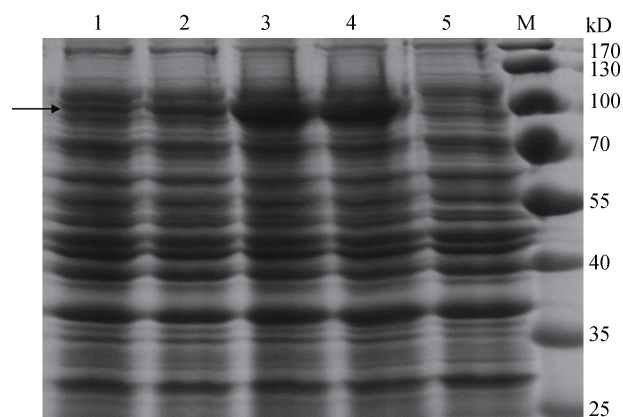


图 6 不同诱导时间对 pCold-fad9 重组蛋白表达量的影响
1~5: 分别为诱导 5 h、10 h、15 h、20 h、2 h 的重组菌;
M: 蛋白质分子量标准。

Fig. 6 Effects of expression level of recombinant pCold-fad9 at different induction time

1~5: Expression of recombinant pCold-fad9 after 5 h, 10 h, 15 h, 20 h, and 2 h of induction; M: Protein molecular weight marker.

2.4 中华绒螯蟹 pCold-fad9 重组蛋白的纯化

将经 0.3 mmol/L IPTG 诱导、15℃ 条件下培养 15 h 的重组菌株用超声波破碎,离心后取其上清液,利用 His-tag 镍离子亲和层析柱对目的蛋白质进行纯化,SDS-PAGE 电泳检测纯化产物,由图 7 可知,在 100 kD 附近出现一单一条带,与预期结果相符。

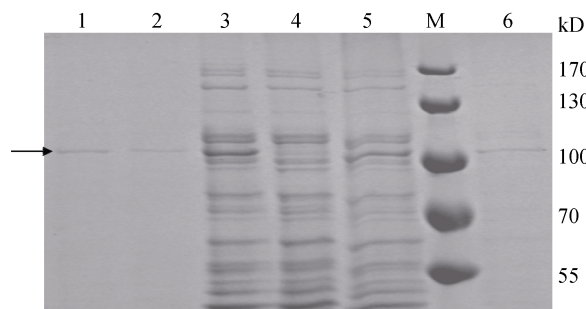


图 7 SDS-PAGE 检测纯化后的重组蛋白

1、2、6: 纯化后的重组蛋白; 3、5: 经诱导的重组蛋白溶液;
4: 未诱导的重组蛋白溶液; M: 蛋白质分子量标准。

Fig. 7 SDS-PAGE analysis of purified recombinant protein
1, 2, and 6: Purified recombinant protein; 3 and 5: Recombinant protein induced by IPTG; 4: Recombinant protein uninduced by IPTG; M: Protein molecular weight marker.

2.5 重组蛋白 pCold-fad9 的 Western-blotting 验证

取诱导的 BL21/pCold TF 蛋白上清、未诱导的 BL21/pCold-fad9 蛋白上清、纯化前的蛋白上清及纯化后的蛋白溶液进行 Western-blotting 反应,结果显示,纯化后的重组蛋白组在 PVDF 膜上出现了单一印迹,与预期条带大小一致,且纯化前的重组蛋白溶液亦有此目的条带,而阴性对照组则无此条带(图 8),表明 BL21(DE3)pLysS 中的 pCold-fad9 重组蛋白得到了成功表达并具有抗原活性。

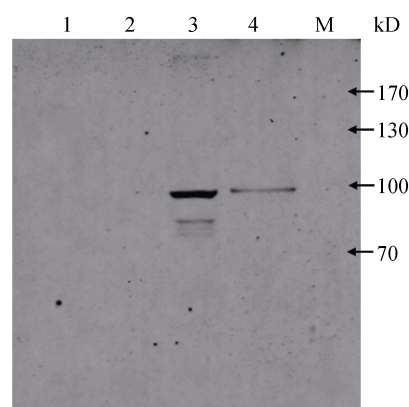


图 8 重组蛋白的 Western-blotting 分析

1: 经诱导的 BL21/pCold TF 蛋白; 2: 未诱导的 BL21/pCold-fad9 蛋白; 3: 纯化前的蛋白溶液; 4: 纯化后的蛋白溶液;

M: 蛋白质分子量标准。

Fig. 8 Western-blotting analysis of recombinant pCold-fad9 protein
1: BL21/pCold TF induced by IPTG; 2: Recombinant protein uninduced; 3: Recombinant protein before purified; 4: Recombinant protein after purified; M: Protein molecular weight marker.

3 讨论

脂肪酸去饱和酶可催化饱和脂肪酸(saturated fatty acids)或不饱和脂肪酸(unsaturated fatty acids, UFAs)在酰基链上形成双键,使脂肪酸不饱和程度得以提高^[10]。FAD 可分为可溶性的酰基-ACP 去饱和酶、膜结合去饱和酶两类,后者包括酰基-CoA 去饱和酶及酰基-lipid 去饱和酶^[11]。FAD9 属于酰基-CoA 去饱和酶,是一种膜结合蛋白,具有两次跨膜结构^[9, 12-13]。在 UFAs 的生物合成中, FAD9 可作为限速酶将第一个双键引进软脂酸(C_{16:0})和硬脂酸(C_{18:0}),分别生成棕榈油酸(C_{16:1Δ9})

和油酸($C_{18:1\Delta 9}$)^[14]。FAD9 在动物、植物、真菌及藻类中都有研究,近 20 多年来 FAD9 在脊椎动物中的研究越来越深入,但是在无脊椎动物中的研究大多只局限于昆虫。

一个正确的原核表达载体和表达菌株对原核表达的研究至关重要。本实验选用 pCold-TF DNA 作为表达载体,该原核表达载体自带冷休克蛋白 A(*cspA*)启动子及其相关原件,能够在较低温培养的情况下使宿主菌大量表达目的蛋白,并且此载体以大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 的伴侣蛋白 (Trigger Factor, TF) 为可溶性标签,能够大大增加重组蛋白的可溶性和纯度^[15]。pCold-TF DNA 载体的 TF 来自于大肠杆菌,其在大肠杆菌中的表达效率要高于其他菌体,因此,实验选择了大肠杆菌 BL21(DE3)pLysS 作为外源表达系统,该菌具有氯霉素抗性以及表达 T7 溶菌酶的基因,可在不干扰 IPTG 诱导表达的前提下降低目的基因的背景表达水平^[16]。实验结果显示,目的基因 FAD9 成功构建到原核表达载体 pCold-TF DNA 中,得到重组表达载体 pCold-fad9,表达出的目的蛋白分子量为 95.10 kD,且为可溶性表达。用 His-tag 镍离子亲和层析柱对重组蛋白进行纯化,得到单一的且大小与目的蛋白相同的条带,进一步表明了重组蛋白成功得到表达。培养条件对目的蛋白的表达水平具有很大影响^[17],本实验设置了在不同 IPTG 诱导剂浓度(0.1 mmol/L, 0.3 mmol/L, 0.5 mmol/L, 0.8 mmol/L, 1.0 mmol/L, 1.2 mmol/L)、不同诱导温度(35℃, 25℃, 18℃, 15℃)及不同诱导时间(2 h, 5 h, 10 h, 15 h, 20 h)下的表达组,结果表明,诱导剂浓度的差异对蛋白的表达有一定影响,当 IPTG 浓度为 0.1 mmol/L 时重组蛋白的表达量显著低于其余浓度的表达量,而诱导剂浓度高于 0.3 mmol/L 的各组间表达量几乎无差异,由于较高浓度的 IPTG 对大肠杆菌的生长可能造成影^[18],因此将 0.3 mmol/L 确定为本实验中的最适诱导剂浓度。较多在动植物和真菌中的研究指出,FAD9 基因应对温度变化时会通过调节细胞膜的流动性以减少细胞自身伤害^[19-20],在蛋白外源表达系统中,温度对重组蛋白的影响很大,可

直接影响到蛋白的正确折叠及蛋白的可溶性等^[16],本实验发现,目的蛋白在温度较低时(18℃, 15℃)具有较高的表达量,这可能与所选表达载体是冷休克表达载体有关^[21],表明为了达到更好的表达效果,脂肪酸去饱和酶在大肠杆菌中进行外源表达时,需要一个比菌体自身所需最适生长温度更低的温度进行培养^[22]。在不同诱导时间表达组中,当诱导时间长于一定值(15 h)时,目的蛋白的表达量不再随时间延长而明显升高,说明适当地延长诱导时间有利于蛋白的表达。因此,最终确定 IPTG 浓度为 0.3 mmol/L、15℃ 条件下、诱导 20 h 时目的蛋白的表达量最高。Western-blotting 检测结果表明,目的蛋白可被 anti-6×His 鼠抗识别,证明在大肠杆菌 BL21(DE3)pLysS 中目的蛋白能正确折叠,具有抗原活性。

在水产动物中,对于一些鱼类的 FAD9 报道较多^[23-26];节肢动物中,较多是关于昆虫体内 FAD9 的研究^[27-28]。中华绒螯蟹既属于节肢动物门,也是一种重要的水产动物,本实验中,中华绒螯蟹 pCold-fad9 原核表达载体的成功构建及其可溶性表达的分析,可为今后中华绒螯蟹 FAD9 结构及功能的研究提供参考,特别是在 FAD9 重组蛋白的纯化、活性检测、抗体制备等方面提供了依据,也为进一步阐述甲壳动物脂肪酸去饱和酶的调控机制及生理功能奠定基础。

参考文献:

- [1] Kang J X. The importance of Omega-6/Omega-3 fatty acid ratio in cell function: The gene transfer of Omega-3 fatty acid desaturase[M]//Simopoulos A P, Cleland L G. Omega-6/Omega-3 essential fatty acid ratio: The scientific evidence, World Rev Nutr Diet. New York: Basel Karger, 2003, 92: 23-36.
- [2] Zhu M G, Chen H, Zhou Y R, et al. The synthesis and function analysis of ω -3 fatty acid desaturase gene from *Caenorhabditis briggsae*[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2006, 22(5): 763-771. [朱贵明, 陈宏, 周艳荣, 等. 来源于 *Caenorhabditis briggsae* 的 ω -3 脂肪酸去饱和酶基因的合成及其功能分析[J]. 生物工程学报, 2006, 22(5): 763-771.]
- [3] Wallis J G, Watts J L, Browse J. Polyunsaturated fatty acid synthesis: what will they think of next?[J]. Trends Biochem Sci, 2002, 27(9): 467-473.

- [4] Leaf A, Kang J X, Xiao Y F, et al. Clinical prevention of sudden cardiac death by n-3 polyunsaturated fatty acids and mechanism of prevention of arrhythmias by n-3 fish oils[J]. *Circulation*, 2003, 107: 2646–2652.
- [5] Kimura Y, Kono S, Toyomura K, et al. Meat, fish and fat intake in relation to subsite-specific risk of colorectal cancer: The Fukuoka Colorectal Cancer Study[J]. *Cancer Sci*, 2007, 98(4): 590–597.
- [6] Rasmussen B M, Vessby B, Uusitupa M, et al. Effects of dietary saturated, monounsaturated, and n-3 fatty acids on blood pressure in healthy subjects[J]. *Am J Clin Nutr*, 2006, 83(2): 221–226.
- [7] Man W C, Miyazaki M, Chu K, et al. Membrane topology of mouse stearoyl-CoA desaturase 1[J]. *J Biol Chem*, 2006, 281: 1251–1260.
- [8] Su X Q, Antonas K N, Li D. Comparison of n-3 polyunsaturated fatty acid contents of wild and cultured Australian abalone[J]. *Int J Food Sci Nutr*, 2004, 55(2): 149–154.
- [9] Guo Z H, Yang Z G, Cheng Y X, et al. Molecular characterization, tissue expression of acyl-CoA Δ^9 -desaturase-like gene, and effects of dietary lipid levels on its expression in the hepatopancreas of the Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*)[J]. *Aquaculture*, 2013, 402–403: 58–65.
- [10] Li M C, Sun Y, Zhang Q, et al. Expression of Δ^6 -fatty acid desaturase gene from *Mortierella alpine* in *Pichia pastoris*[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2004, 20(1): 34–38. [李明春, 孙颖, 张琦, 等. 高山被孢霉 Δ^6 脂肪酸脱氢酶基因在毕赤酵母中的胞内表达[J]. *生物工程学报*, 2004, 20(1): 34–38.]
- [11] Tocher D R, Leaver M J, Hodgson P A. Recent advances in the biochemistry and molecular biology of fatty acyl desaturases[J]. *Prog Lipid Res*, 1998, 37(2–3): 73–117.
- [12] Shanklin J, Whittle E, Fox B G. Eight histidine residues are catalytically essential in a membrane-associated iron enzyme, stearoyl-CoA desaturase, and are conserved in alkane hydroxylase and xylene monooxygenase[J]. *Biochemistry*, 1994, 33(43): 12787–12794.
- [13] Stukay J E, McDonough V M, Martin C E. The *OLE1* gene of *Saccharomyces cerevisiae* encodes the Δ^9 fatty acid desaturase and can be functionally replaced by the rat stearoyl-CoA desaturase gene[J]. *J Biol Chem*, 1990, 265(33): 20144–20149.
- [14] Jeffcoat R, Brawn P R, Safford R, et al. Properties of rat liver microsomal stearoyl-coenzyme A desaturase[J]. *Biochem J*, 1977, 161(2): 431–437.
- [15] Wang Y G, Zhou Y, Yang L, et al. Construction and solvable expression of the recombinant plasmid pCold TF-Der f 2 of *Dermatophagoides farinae*[J]. *Journal of Pathogen Biology*, 2012, 7(2): 118–123. [王运刚, 周鹰, 杨李, 等. 尘螨变应原 Der f 2 编码基因重组 pCold TF 体系构建及可溶性表达[J]. *中国病原生物学杂志*, 2012, 7(2): 118–123.]
- [16] Yin D M, Cui D Q, Jia B. Construction of a high-efficient expression vector of Δ^{12} fatty acid desaturase in peanut and its prokaryotical expression[J]. *J Genet Genomics*, 2007, 34(1): 81–88.
- [17] Xu W T, Huang K L, Luo Y B. High expression of *bar* gene in *Escherichia coli* and isolation and purification of its expressed protein[J]. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2004, 12(5): 583–588. [许文涛, 黄昆仑, 罗云波. *Bar* 基因在大肠杆菌中的高效表达及其表达产物的分离和纯化. *农业生物技术学报*, 2004, 12(5): 583–588.]
- [18] Yang Y N, Huang H Y, Huang X S, et al. Molecular cloning and prokaryotic expression of *cyclin B* from shrimp *Metapenaeus affinis*[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2013, 37(2): 184–191. [杨亚男, 黄辉洋, 黄小帅, 等. 近缘新对虾 *cyclin B* 基因的克隆与原核表达[J]. *水产学报*, 2013, 37(2): 184–191.]
- [19] Tiku P E, Gracey A Y, Macartney A I, et al. Cold-induced expression of Δ^9 -desaturase in carp by transcriptional and posttranslational mechanisms[J]. *Science*, 1996, 271(5250): 815–818.
- [20] Vigh L, Los D A, Horvath I, et al. The primary signal in the biological perception of temperature: Pd-catalyzed hydrogenation of membrane lipids stimulated the expression of the *desA* gene in *synechocystis* PCC6803[J]. *Proc Nat Acad Sci USA*, 1993, 90(19): 9090–9094.
- [21] Qing G L, Ma L C, Khorchid A, et al. Cold-shock induced high-yield protein production in *Escherichia coli*[J]. *Nat Biotechnol*, 2004, 22: 877–882.
- [22] Yazawa K. Production of eicosapentaenoic acid from marine bacteria [J]. *Lipids*, 1996, 31(1): S297–S300.
- [23] Hsieh S L, Liao W L, Kuo C M. Molecular cloning and sequence analysis of stearoyl-CoA desaturase in milkfish, *Chanos chanos*[J]. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, 2001, 130(4): 467–477.
- [24] Chang B E, Hsieh S L, Kuo C M. Molecular cloning of full-length cDNA encoding delta-9 desaturase through PCR strategies and its genomic organization and expression in grass carp (*Ctenopharyngodon idella*)[J]. *Mol Reprod Dev*, 2001, 58(3): 245–254.
- [25] Hsieh S L, Chang H T, Wu C H, et al. Cloning, tissue distribution and hormonal regulation of stearoyl-CoA desaturase in tilapia, *Oreochromis mossambicus*[J]. *Aquaculture*, 2004, 230(1–4): 527–546.

- [26] Polley S D, Tiku P E, Trueman R T, et al. Differential expression of cold- and diet-specific genes encoding two carp liver $\Delta 9$ -acyl-CoA desaturase isoforms[J]. *Am J Physiol-Regul Integr Comp Physiol*, 2003, 284: 41–50.
- [27] Riddervold M H, Tittiger C, Blomquist G J, et al. Biochemical and molecular characterization of house cricket (*Acheta domestica*, Orthoptera: Gryllidae) $\Delta 9$ desaturase[J]. *Ins Biochem Molec Biol*, 2002, 32(12): 1731–1740.
- [28] Liu W, Ma P W K, Marsella-Herrick P, et al. Cloning and functional expression of a cDNA encoding a metabolic acyl-CoA $\Delta 9$ -desaturase of the cabbage looper moth, *Trichoplusia ni*[J]. *Insect Biochem Mol Biol*, 1999, 29(5): 435–443.

Prokaryotic expression of fatty acyl-CoA $\Delta 9$ desaturase in *Eriocheir sinensis*

YAO Qinqin, YANG Zhigang, GUO Zihao, CHENG Yongxu, WANG Yao, SHI Qiuyan, LIU Qibin, HE Jie, YANG Xiaozhen

Key Laboratory of Freshwater Aquatic Genetic Resources, Ministry of Agriculture; Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China

Abstract: Fatty acyl-CoA $\Delta 9$ desaturase (FAD9) is a membrane-bound enzyme anchored in the endoplasmic reticulum that plays an important role regulating cell membrane fluidity and fatty acid metabolism. The FAD9 sequence has two transmembrane domains and three amino acid motifs. Purifying the FAD9 protein can be difficult because of its membrane structural characteristics. Fish species frequently express FAD9 heterologously. The Chinese mitten crab, *Eriocheir sinensis*, is an important aquatic species. We designed primers based on the FAD9 cDNA sequence from *E. sinensis* (Accession Number: JQ693685) to obtain the opening reading frame (ORF). The ORF was subcloned into the pCold-TF DNA prokaryotic expression vector to generate the pColdTF-fad9 recombinant expression vector, which was transformed into *E. coli* BL21(DE3)pLysS, and FAD9 was expressed successfully in *E. coli* BL21(DE3)pLysS using IPTG induction. The sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis results showed that the recombinant protein had an approximate molecular weight of 95.10 kD, which was consistent with the theoretical molecular weight, and that it was mainly detected in the supernatant. We tested different IPTG concentrations (0.1 mmol/L, 0.3 mmol/L, 0.5 mmol/L, 0.8 mmol/L, 1.0 mmol/L, and 1.2 mmol/L), induction temperatures (35 °C, 25 °C, 18 °C, and 15 °C), and induction times (2 h, 5 h, 10 h, 15 h, and 20 h). The results showed that when the IPTG concentration was 0.1 mmol/L, expression of the recombinant protein was significantly lower than that at the other IPTG concentrations. Temperatures of 15–18 °C and an induction time of 20 h were optimal. The highest recombinant protein expression was detected when the IPTG concentration was 0.3 mmol/L, with a 20-h incubation at 15 °C. The fusion protein was identified by purification and western blotting. The protein contained a 6×His-tag, so we used His-tag nickel ion affinity chromatography to purify the protein and an anti-6×His-tag antibody for western blotting. The results showed that the pColdTF-fad9 recombinant protein was successfully expressed in *E. coli*, and western blotting revealed that the pColdTF-fad9 recombinant protein was specifically recognized by the 6×His antibody, indicating that the recombinant protein had antigen activity. Our study provides basic methods to purify and detect the activity of *E. sinensis* FAD9 and will promote further study on the functions of FADs.

Key words: *Eriocheir sinensis*; fatty acyl-CoA $\Delta 9$ desaturase; clone; prokaryotic expression

Corresponding author: YANG Zhigang. E-mail: zgyang@shou.edu.cn