

用同源重组法将 5 Des 整合在集胞藻 PCC6803 中的表达

张柯, 张浩玉, 姚强

(1. 洛阳理工学院环境工程与化学系, 河南洛阳 471023; 2. 河南省洛阳市质量技术监督检验测试中心, 河南洛阳 471023)

摘要 从枯草芽孢杆菌染色体中扩增出受冷诱导的 5Des 去饱和酶, 构建出可以与集胞藻 PCC6803 染色体发生同源双交换的质粒, 将 Km 抗性基因: PspbA1::5 脂肪酸去饱和酶基因和对照基因分别整合入 PCC6803 的染色体上, 获得转化子后, 对不饱和脂肪酸进行研究。结果发现, 30 ℃ 条件下脂肪酸成分的含量发生了较大变化, 20 ℃ 时有新成分的出现, 且长链脂肪酸的含量有所上升。

关键词 5 Des; 双交换; EPA; 集胞藻 PCC6803

中图分类号 Q78 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2009)07-02891-03

Integration and Expression of 5 Des Gene in *Synechocystis* sp. PCC 6803 by Homologous Recombination

ZHANG Ke et al (College of Environmental and Chemical Engineering, Luoyang Institute of Science and Technology, Luoyang, Henan 471023)

Abstract Through amplifying the cold-induced 5 desaturase from *Bacillus subtilis* chromosome, the plasmid that could make the homologous double-exchange with the chromosome of *Synechocystis* sp. PCC6803 was constructed. Km resistant gene (PspbA1::5 desaturase gene) and control gene were integrated into the chromosome of *Synechocystis* sp. PCC6803. After obtaining the transformant, the unsaturated fatty acids were studied. The results showed that the content of fatty acids had greater changes at 30 ℃. At 20 ℃, new components was generated and the content of PUFA rose.

Key words 5 Desaturase; Double-exchange; EPA; *Synechocystis* sp. PCC6803

多不饱和脂肪酸具有极其重要的营养价值和药用价值^[1-3], 其原料主要来自海洋鱼类。随着环境的恶化, 海洋鱼类资源日趋枯竭, 并且来源于鱼油的多不饱和脂肪酸在提纯过程中会残留鱼腥味, 提取工艺繁琐, 所以开发新的多不饱和脂肪酸资源成为人们关注的焦点。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^[4], 但在高等动物中缺乏 Δ^3 DS、 Δ^{12} DS、 Δ^{15} DS, 在哺乳动物中还缺乏 Δ^4 DS。

集胞藻 PCC6803 是一种单细胞嗜中温蓝藻, 在 BG 11 培养基中最适生长温度为 30 ℃, 在 25~40 ℃ 较适宜生长, 具有天然的转化系统, 易于进行基因操作, 既可进行光合作用自养生长, 又能够利用葡萄糖进行异养生长, 其全基因组序列于 1996 年公布^[5]。在其基因组中具有参与多不饱和脂肪酸合成的 Δ^6 (*dsA*, *sll0262*)、 Δ^9 (*dsC*, *sll0541*)、 Δ^{12} (*dsD*, *sll1350*) 和 Δ^3 (*dsB*, *sll1441*) 去饱和酶基因以及延长酶基因 (*sll2024*)。其中 Δ^6 (*dsA*, *sll0262*)、 Δ^{12} (*dsD*, *sll1350*) 和 Δ^3 (*dsB*, *sll1441*) 的表达受低温诱导, Δ^3 (*sll1441*) 的表达受低温诱导最为显著, 因此在 30 ℃ 下多不饱和脂肪酸含量极低。

枯草芽孢杆菌具有 5 去饱和酶基因 *des*, 也具有受冷诱导的特征^[6], 并且集胞藻 PCC6803 和枯草芽孢杆菌中的 5Des 都是去饱和酶, 有较近的亲缘关系, 完全不同于大肠杆菌中的脱氢酶。

笔者将来源于枯草芽孢杆菌的 5DS 基因导入 PCC6803 中, 以期构建产多不饱和脂肪酸的转基因集胞藻。

1 材料与方 法

1.1 菌株、藻株的来源与培养 *Escherichia coli* DH5 为江苏大学生物与环境工程学院保存。PHE956、pRL446、PHB256 和

集胞藻 *Synechocystis* sp. PCC6803 由中国科学院水生生物研究所徐旭东研究员赠送。集胞藻 PCC6803 和转基因藻在 BG 11 (自养生长) 或 BG 11 加 5 mmol/L 葡萄糖 (混养生长) 培养基中, 30 或 20 ℃、30 $\mu\text{E}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 连续光照下静置培养, 枯草芽孢杆菌由江苏大学生物与环境工程学院保存。

1.2 试剂 分子生物学工具酶购自 Takara 公司(大连), X-gal 和 IPTG 购自 Promega 公司, 微孔滤膜购自非罗门科技开发有限公司, 各种抗生素购自北京拜尔迪公司, PCR 引物合成自上海博亚生物技术有限公司, 其他试剂均为分析纯。

1.3 分子生物学操作 DNA 重组、枯草芽孢杆菌染色体的提取和分子克隆按标准方法进行^[7], 蓝藻染色体的提取参照徐旭东描述的方法^[8]。枯草芽孢杆菌 5-去饱和酶基因的全编码序列用 PCR 方法进行扩增, PCR 反应条件如下: 50 μl 反应体系中含 10 mmol/L Tris.Cl (pH 值 8.0), 50 mmol/L KCl, 215 mmol/L MgCl₂, 50 $\mu\text{mol}/\text{L}$ dNTPs, 引物各 100 pmol, 染色体 DNA 约 0.01 μg 和 2 μl Taq DNA 聚合酶 (BioStar International, Canada)。反应经 94 ℃ 5 min, 之后按 94 ℃ 1 min, 60 ℃ 1 min, 72 ℃ 3 min 反应 30 个循环, 最后于 72 ℃ 延伸 5 min。PCR 产物于 0.7% 琼脂糖电泳、用玻璃奶试剂盒 (BioStar International, Canada) 从凝胶上回收用于克隆。引物序列为 5-1: 5'-GAC TGA GTC TAG ATG ACT GAA CAA ACC ATT GCA G-3'; 5-2: 5'-GAC TGA GGA ATT CAT GGT CCA GCC TTTT GAG AG-3'。5-1 中划线标注的是添加的 XbaI 酶切位点, 5-2 中则添加了 EcoRI 位点。转化子 PCR 检测在相同反应条件下进行。含有卡那霉素(Km)抗性基因来自质粒 pRL446, 为方便起见, 文中仍称为 ck₂。

1.4 集胞藻 PCC6803 的转化及转化子的筛选 按殷春涛的方法^[9]将 PJS157 转化集胞藻 PCC6803, 并进行转基因集胞藻的筛选和培养, 转化有 PJS157 的藻抗生素采用卡那霉素, 筛选起始浓度为 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 在含卡那霉素 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的 BG 11 培养液中扩大培养。

以不含 5DS 基因但含卡那霉素抗性基因的质粒 PKW188 作为整合表达载体 PJS157 的对照, 分别转化集胞藻 PCC6803。

1.5 气相色谱的测定方法 在室温下分别收集30 和20 混养生长的转基因藻对照藻株及转基因藻,离心沉淀并经冷冻真空干燥。称取冻干样品0.5 g,加入石油醚和乙醚(1:2)混合液,20 浸提5 h,并且加入质量分数10%的KOH沉淀藻细胞,然后在4 000 r/min条件下离心15 min,取上清液,用氮气将有机溶剂吹干^[10]。将试样置于烧瓶中,加入0.5 ml/L氢氧化钠甲醇溶液及沸石,通入氮气将空气排空,皂化时持续通入氮气。在60 水浴中回流5~10 min,用移液管从冷凝管顶部加入7 ml 三氟化硼甲醇溶液,继续煮沸2 min,加入5 ml 正己烷,振摇,待分层后取上层液上气相色谱检测。

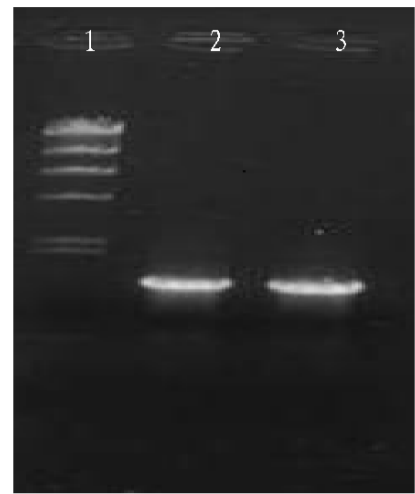
气相色谱条件:HP6890 气相色谱,色谱柱为HP-INNOWAX 30 m×0.32 mm×0.25 μm弹性石英毛细管柱;柱初温190 ,保持1 min,以6 /min升温至230 ,然后恒温至完成分析;汽化室温度250 ;载气为高纯He(99.999%);柱前压62.6 kPa;载气流速1.4 ml/min;进样量1 μ;分流比60:1。

2 结果与分析

2.1 Delta5Des 基因片段的扩增与序列分析 以引物delta5a delta5b从枯草芽孢杆菌染色体中可扩增出1.4 kb的5DesDNA片段,如图1所示。

重组质粒中扩增片段序列通过DNA Club软件分析,该片段存在1个开放阅读框(orf),在GenBank等基因数据库中搜索,结果表明,扩增片段与已公布全基因组序列的枯草Bacillus subtilis str.168中的5去饱和酶基因具有高度同源性(99%)。很有可能与枯草芽孢杆菌168中的5去饱和酶具有同样的生化功能。利用clustalx1.8.msw软件对该片段编码的氨基酸序列与枯草芽孢杆菌168中的5去饱和酶的氨基酸序列进行了比对,结果表明,PCR扩增片段所编码的氨基酸序列与枯草芽孢杆菌168中的5去饱和酶的氨基酸

序列完全相同(100%)。因此,PCR扩增片段中orf编码产物应为5去饱和酶,该DNA片段为5去饱和酶基因全编码序列。



注:1. DNA/Hnd ;2,3.以delta5a delta5b为引物所做的PCR。

Note:1. DNA/Hnd ;2 and 3,PCR with delta5a delta5b as primers.

图1 Delta5Des 基因片段的扩增

Fig.1 Amplification of Delta5Des gene fragment

2.2 重组质粒PJS157的构建及转基因藻株DR157的鉴定 质粒构建过程见图2,具体操作均为常用的分子生物学方法。转化方法如下:分别将带有整合平台的质粒PJS157、只含有卡那霉素抗性基因的对照质粒PKW188用直接转化法导入集胞藻PCC6803,两者在含有适当浓度青霉素的BG11平板上逐步筛选,14 d后,涂有转PJS157集胞藻6803及转PKW188质粒的集胞藻6803的滤膜上长出较多绿色藻落,而膜上的野生型藻落逐渐变黄直至死亡。挑取转化子藻落分别至含青霉素5~50 μg/ml的BG11培养液中筛选,最后扩大培养,所得的转基因藻分别命名为DR157、DR1188。转化子PCR检测在相同反应条件下进行。转化子的同源双交换及PCR鉴定见图3。

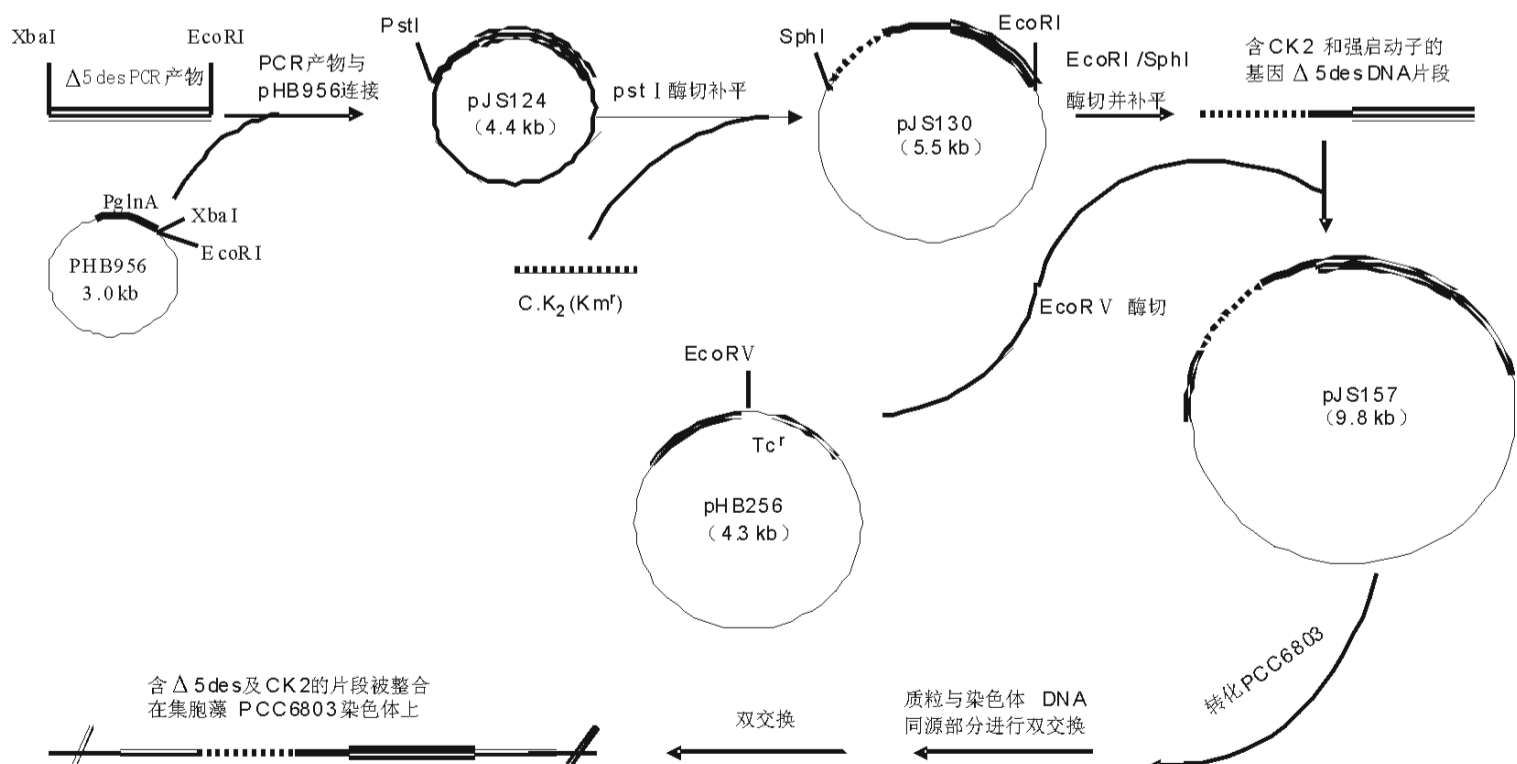


图2 DR157的构建和同源双交换流程

Fig.2 The flow of the construction of DR157 and homologous double exchange

2.3 转基因蓝藻的不饱和脂肪酸组成变化 在30 和20 混养培养条件下,DR1188、DR157培养物不饱和脂肪酸气相色谱分析结果见表1。由表1可知,30 混养条件下,藻株DR157不饱和脂肪酸成分与对照样品的基本一致,但相对含

量有所改变,即藻株DR157中油酸相对含量较DR1188明显升高,而-亚麻酸和-亚麻酸的多不饱和脂肪酸的相对含量有所下降。20 混养条件下,转基因蓝藻的脂肪酸组成较对照样品DR1188有所变化,DR157在约11 min处出现1个新组分,相对含量为0.70,脂肪酸相对含量较对照样品DR1188也

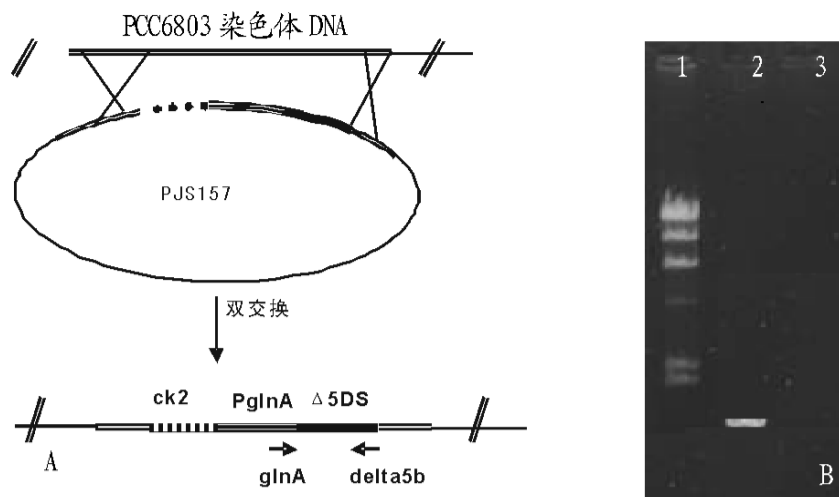
有所变化,DR157 中棕榈烯酸含量有所下降,而出峰时间为 12.262 min 的待定不饱和脂肪酸相对含量较对照样品 DR1188 明显升高(图4)。

20 和30 相比,高级脂肪酸如 - 亚麻酸和长链脂肪酸的含量明显上升,这与笔者的设想基本一致。因为集胞藻 PCC6803 中的 desA、desB、desD 基因都受冷诱导,而且 desB 基因随温度变化最大,desC 基因转录产物则基本保持不变,枯草芽孢杆菌 5 去饱和酶基因也是受冷诱导才大量表达的,在低温诱导下,长链不饱和脂肪酸的量会大量增加,但室温下表达量不大。

3 讨论

在30 混养条件下,DR157 与对照样品 DR1188 不饱和脂肪酸成分没有变化,其原因是细胞中不饱和脂肪酸合成酶的 desD、desA 或 desB 基因受低温诱导,在30 时基因表达产物含量较低,因此相应产物多不饱和脂肪酸的含量相应较低,以致无法检测到。

在20 混养条件下,DR157 在约11 min 处有1 个对照样品DR1188 所没有的多不饱和脂肪酸成分,表明转 5 去饱



注:A. 转化子中重组质粒与染色体同源双交换示意;B.PCR 鉴定 DR157、DR1188。其中,1 为 DNA/ Hnd ;2 为 DR157 染色体;3 为 DR1188 染色体。

Note:A. Homologous double - exchange of recombinant plasmid and chromosome in transformat ; B. PCR identification of DR157 and DR1188 ; 1 , DNA/ Hnd marker ; 2 , DR157 chromosome ; 3 , DR1188 chromosome .

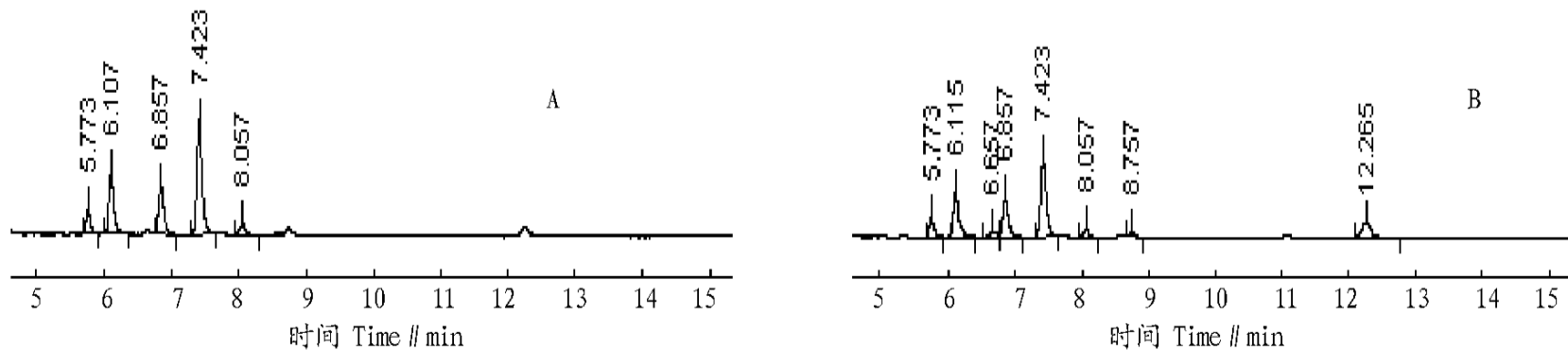
图3 转化子PJS157 的同源双交换及转基因藻的PCR 鉴定
Fig 3 The homologous double exchange of transformat PJS157 and PCR identification of transgenic Synechocystis sp. PCC6803

表1 转基因集胞藻PCC6803 的脂肪酸组成

Table 1 Fatty acid composition of transgenic Synechocystis sp. PCC6803

培养温度 Culture temperature	转基因藻 Transgenic Synechocystis sp.	脂肪酸组成 % Fatty acid composition							
		豆蔻酸 Myristic acid	棕榈酸 Palmitic acid	棕榈烯酸 Palmitoleic acid	十七碳烷酸 Heptadecanoic acid	十七碳一烯酸 Heptadec- enic acid	硬脂酸 Stearic acid	油酸 Oleic acid	亚油酸 Linoleic acid
30	DR1188	0.1	39.3	5.900	0.4	0.3	2.1	11.7	12.3
	DR157	0.1	38.4	5.800	0.4	0.3	1.9	16.3	12.5
20	DR1188	0.8	40.0	4.200	0.5	0.4	3.3	9.3	7.3
	DR157	0.6	44.5	0.025	0.1	0.4	3.1	9.0	8.2

培养温度 Culture temperature	转基因藻 Transgenic Synechocystis sp.	脂肪酸组成 % Fatty acid composition							
		- 亚麻酸 -linolenic acid	- 亚麻酸 - linolenic acid	花生酸 Arachic acid	花生二烯酸 Eicosadienic acid	11.070 (待定)	11.395 (待定)	12.262 (待定)	其他 Other
30	DR1188	11.5	1.8	1.0	0.2				13.4
	DR157	10.0	1.0	1.3	0.2				11.8
20	DR1188	17.3	1.6	1.4	0.4	0	0	2.2	15.3
	DR157	17.3	1.8	1.4	0.7	0.7	0	5.3	6.9



注:A.DR1188 20 培养条件下脂肪酸气相色谱检测;B.DR157 20 培养条件下气相色谱检测。

Note:A. Fatty acid detection of DR1188 by gas chromatography cultured at 20 ;B. Fatty acid detection of DR157 by gas chromatography cultured at 20 .

图4 20 培养条件下 DR1188 和 DR157 脂肪酸气相色谱检测

Fig 4 Fatty acid detection of DR1188 and DR157 cultured at 20 by gas chromatography

和酶基因集胞藻 PCC6803 能合成新的多不饱和脂肪酸组分。在20 混养条件下,转基因蓝藻的脂肪酸相对含量较对照样品 DR1188 也有所变化:DR157 中棕榈烯酸含量有所下降,而 - 亚麻酸和出峰时间为12.262 min 的待定不饱和脂肪

酸相对含量较对照样品DR1188 明显升高,提示 5 去饱和酶基因表达的 5 去饱和酶可能与亚麻酸和出峰时间为 12.262 min 的待定不饱和脂肪酸之间的转化有关。但其转化和调控 (下转第2949 页)

从实现花园式风景城市的目标入手,建设特色肇庆、园林肇庆,将城市地域特点及历史文化与立体花坛有机结合起来;充分利用肇庆市气候温暖、雨量充沛、多湿且适宜多物种生长的优势,增加花坛植物的多样性,强化地域性植物的应用;应以丰富的物种和合理的配置,提高城区立体花坛生态系统的功能,实现其绿化、美化、香化、净化、亮化的多种功能^[5]。

3.1 大胆创新的设计观念,营造丰富多彩的城市景观 当前,创新是立体花坛设计面临的主要问题。设计既要满足一定的政治要求,又要有新意,有时代感,还要便于短短十几天现场施工的要求。创新的设计关键在于我们的思想观念一定要跟得上时代的步伐,舍弃坚守不变的陈旧模式,积极采纳新生事物^[5]。创新离不开学习借鉴他人,除了各种花展外,还可以参照国外街头大型节日花坛。

3.2 建立色彩丰富的立体花坛,注重植物配置的多样性 可供制作立体花坛的植物有200多种,而常见的五色苋品种也多达几十种,包括红、绿、黄、粉红、深红等系列,另外有银灰色略带香味的银香菊、银叶菊,开紫色小花的半柱花,花色多样的匍匐美女樱,金灿灿的金叶景天等。这些植物不但色彩缤纷,有些还暗带微香,不仅满足游人视觉上的满足,还得到了嗅觉上的愉悦。也只有多样的植物配置,才能制作出形象动人的立体花坛,才能从根本上给它赋予生命。立体花坛的植物配置需要通过精心设计使其具有本地的风格和特色,选择本地特有、珍贵和有发展前景的植物,与具有民族风格或地方特色的建筑和景物合理配置。

3.3 加强管理,建立完善的花坛养护制度 当花坛施工完毕后,养护管理便显得尤为重要。在管理中应做到:加强宣传,提高广大市民的文明道德水准,形成人人热爱家乡,自觉管理维护绿地花坛的新风尚。明确绿地花坛的维护责

任。市政、房产、物业及有关单位,按照“谁建设、谁负责管理”的原则,落实责任,坚持按时栽培花卉及时清扫。加强监督检查。市政府有关部门应不定期地对绿地花坛管护进行巡回检查,及时发现问题并予以纠正。

3.4 体现地方风格特色和文化内涵 肇庆市是一座有地域特征和地方历史文化特色的城市,应充分挖掘其地方植被特色、主题文化和环境等重要潜质,以营造出独特的城市文化、艺术氛围与绿色环境背景。应将地方文化运用到立体花坛设计规划中,充分体现立体花坛的个性。利用肇庆特有的宋文化、端砚文化,结合当地重要的旅游资源——七星岩,创造一个充满文艺气息与地方特色的城市绿化环境。

4 结语

立体花坛本身是生态雕塑的载体,同时也是雕塑设计的“生态化趋势”。随着城市建设步伐日益加快、人们对生存环境要求的提高和对精神价值追求的关注,立体花坛在城市景观中的积极作用将日益显著,它将给城市环境增添生命的活力和自然魅力。可以相信,只要尊重科学,按照客观规律办事,经过不懈努力,一定能使肇庆市成为绿化、美化水平一流的现代化旅游城市。

参考文献

(上接第2893页)

因表达的 Δ^5 去饱和酶可能与亚麻酸和出峰时间为12.262 min的待定不饱和脂肪酸之间的转化有关。但其转化和调控机制值得进一步研究,待定不饱和脂肪酸成分有待明确。

综上所述,转 Δ^5 去饱和酶基因集胞藻PCC6803能合成新的多不饱和脂肪酸,但低温仍然是其合成或提高不饱和脂肪酸含量的诱导因素,并且细胞中 Δ^5 去饱和酶作用产物可能具有类似枯草芽孢杆菌中反馈抑制其基因转录的调控机制。但是,集胞藻用于气相色谱分析的样品需要量比较大,样品收集比较困难,实现高密度培养尚有一定的难度。

参考文献

- [1] NORDAY A, HANSEN J B. Omega 3 fatty acids and cardiovascular risk factors [J]. *World Rev Nutr Diet*, 1994, 76: 51-54.
- [2] INNS S M. Essential fatty acids in growth and development [J]. *Prog Lipid Res*,

- [1] 王丽琼,陈志华.充满魅力的立体花坛——2006上海国际立体花坛大赛先睹[J].*园林*,2006(9):28.
- [2] 王迎新,付彦荣.立体花坛的制作与欣赏[J].*农业科技与信息(现代园林)*,2007(5):80.
- [3] 张爱芳,陈芳华.肇庆市城区绿化存在的问题、对策及建议[J].*肇庆学院学报*,2006,27(5):51-54.
- [4] 李玉琴.花坛造景艺术在园林中的运用[J].*湖南林业*,2007(11):10-11.
- [5] 王显红,彭光勇.试论首都大型节日花坛的发展及展望[J].*中国园林*,2002(6):17-20.

- [1] ROBINSON D R, XULL L, KNOELL C T, et al. Alleviation of autoimmune disease by omega 3 fatty acids [J]. *World Rev Nutr Diet*, 1994, 76: 95-102.
- [2] WCHEN Y, WARD O P. -3 fatty acids: Alternative sources of production [J]. *Process Biochem*, 1989, 8(3): 117-125.
- [3] KANEKOT, TABATA S. Complete genome structure of the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 [J]. *Hart Cell Physiol*, 1997, 38(11): 1845-1890.
- [4] AGUILAR P S, CRONAN J E JR, DE MENDOZA D. A *Bacillus subtilis* gene induced by cold shock encodes a membrane phospholipid desaturase [J]. *Journal of Bacteriology*, 1998, 180(8): 2194-2200.
- [5] J·萨姆布鲁克, E·F·弗里奇, T·曼尼阿蒂斯. 分子克隆实验指南 [M]. 2版. 北京: 科学出版社, 1993.
- [6] 郭海涛. 无类囊体蓝藻(*Gloeobacter violaceus*)遗传转移系统的建立及其基因文库的构建[D]. 武汉: 中国科学院武汉水生生物研究所, 2004.
- [7] 殷春涛. 集胞藻6803适应寒冷条件的遗传学基础[D]. 武汉: 中国科学院武汉水生生物研究所, 2004.
- [8] 吴庆, 蔡昭玲, 丛威, 等. 从微藻中提取多不饱和脂肪酸[J]. *北京化工大学学报: 自然科学版*, 2004, 31(4): 5-8.