

小球藻 $\Delta 12$ 脂肪酸去饱和酶基因的克隆与序列分析

迟晓元^{1,2}, 路延笃^{1,3}, 王明清^{1,4}, 卞曙光^{1,5}, 杨庆利^{1,2}, 秦松¹

(1. 中国科学院海洋研究所, 山东青岛 266071; 2. 山东省花生研究所, 山东青岛 266100; 3. 中国科学院烟台海岸带可持续发展研究所, 山东烟台 264003; 4. 中国海洋大学, 山东青岛 266071; 5. 南京农业大学, 江苏南京 210095)

摘要:利用已报道的 $\Delta 12$ 脂肪酸去饱和酶基因序列的保守区域, 设计简并引物, 通过 RT-PCR 的方法获得了小球藻 NJ-7 的内质网型 $\Delta 12$ 脂肪酸去饱和酶基因 (*CvFAD2*) 的部分序列, 然后采用 RACE 的方法分别克隆到 5' 片段和 3' 片段, 拼接后设计特异引物扩增到全长 cDNA。该基因全长为 2 032 bp, ORF 为 1 158 bp, 编码 385 个氨基酸, 分子质量约为 44 ku。根据已经得到的 *CvFAD2* 序列推导成氨基酸序列与一些已知物种的 *FAD2* 氨基酸序列相比较, 同源性分别为普通小球藻 (*Chlorella vulgaris*) 75%, 莱茵衣藻 (*Chlamydomonas reinhardtii*) 57%, 石榴 (*Punica granatum*) 57%, 麻疯树 (*Jatropha curcas*) 52%。系统发育分析表明, 南极小球藻 *CvFAD2* 基因与真核微藻 (衣藻和普通小球藻) 的 *FAD2* 基因聚在一起, 介于真菌与高等植物之间, 并且真核微藻 *FAD2* 基因与高等植物的同源性更高, 推测其在进化上与高等植物的亲缘关系更近。

关键词: 南极小球藻; 脂肪酸去饱和酶; 基因克隆; 序列分析

中图分类号: Q73

文献标识码: A

文章编号: 1000-3096(2009)08-0011-10

不饱和脂肪酸在生物体的生命活动中占有重要地位, 脂肪酸去饱和酶 (fatty acid desaturase, FAD) 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^[1]。动物、植物和微生物等的膜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部分, 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、凝血啞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^[2]。不饱和脂肪酸对于微藻的生长、呼吸和光合作用也起着非常重要的作用, 它的含量直接影响着生物膜的相变温度及膜上各种酶的活性, 从而调节细胞的各项生理功能。

1990 年, Wada 等^[3] 从蓝藻 *Synechocystis* sp. PCC 6803 中克隆了 $\Delta 12$ FAD, 并在抗寒性能差的蓝藻 *Anacystis nidulans* 中表达, 结果表明其对 5°C 低温的抗性明显增强。Nishizaki 等^[4] 从 *A. nidulans* 中克隆了 $\Delta 9$ 去饱和酶基因 *desC*。它可以与多种膜的 C16 和 C18 碳脂肪酸作用, 形成 $\Delta 9$ 位双键。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。

Miyasaka 等^[5] 发现, 在 *Chlamydomonas* sp. strain W-80 中, 温度从 25°C 降到 4°C, 低温处理 6 h 后, $\Delta 12$ 的转录水平达到初始转录水平的 2.3 倍, 而温度从 25°C 升到 38°C 6 h 后, $\Delta 12$ 的转录水平仅为初始转录水平的 87%。在 *Chlorella vulgaris* IAM C-27 中, 两个定位于内质网的脂肪酸去饱和酶, $\Delta 12$ 和 $\Delta 15$, 已经被克隆出来^[6]。Zhou 等^[7] 发现, 在 *Pavlova salina* 中, 当温度高于生长的最适温度时, $\Delta 4$ 、 $\Delta 5$ 和 $\Delta 8$ 去饱和酶的表达水平增高, 而温度低于最适温度时表达水平降低, 其中 $\Delta 4$ 去饱和酶的变化最为明显。

收稿日期: 2008-06-12; 修回日期: 2008-08-11

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30670165); 中国科学院知识创新工程项目 (KSCX2-YW-G-002, KZCX2-YW-209)

作者简介: 迟晓元 (1979-), 女, 山东烟台人, 研究方向: 微藻脂肪酸去饱和酶研究, E-mail: xiaoyuanchi@yahoo.com.cn; 秦松, 通信作者, 电话: 0532-82898863, E-mail: sqin@ms.qdio.ac.cn

本实验室获得了从南极中山站附近分离纯化到的一株适应南极低温环境的小球藻(*Chlorella vulgaris*)NJ-7。该藻株能在 4℃ 的低温下正常生长, 同时也可在 20℃ 以上温度条件下生长。因此, 对该藻的脂肪酸去饱和酶基因进行研究, 可以阐明微藻脂肪酸随环境因子变化的机理, 并获取丰富的抗冷基因资源, 改良微藻的遗传特性, 提高藻细胞对低温的适应性; 还可以通过转基因技术改善藻细胞的多不饱和脂肪酸的组成, 培育高产、优质的微藻新品种。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 藻种和培养方法

南极小球藻(*Chlorella vulgaris*)NJ-7 由武汉水生所徐旭东教授惠赠。南极小球藻接种于 BG11 培养基, 于 25℃ 光照条件下静止培养, 光照强度为 30 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$, 光/暗周期为 12 h/12 h。

1.1.2 菌种与质粒载体

菌种: *Escherichia coli* TOP10 由本实验室保存; 载体: T-A 克隆载体 pMD18-T 为 TaKaRa (大连) 公司产品。大肠杆菌的培养与转化使用 LB 培养基, 转化子的筛选所用抗生素的浓度: 氨苄青霉素 (Amp) 为 50~100 mg/L。

1.1.3 仪器设备与试剂

主要仪器设备: 常/低温台式离心机 (Labofuge 300/Biofuge Stratos), 美国 Therm electron 公司; 天平 (BP610), 德国 Sartorius® 公司; 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; 恒温水浴锅, 江苏省沙洲医疗器械厂。

试剂盒: T-A 克隆载体连接试剂盒和质粒酶切试剂盒, TaKaRa (大连) 有限公司; RNA 提取试剂盒 (RNeasy Plant MiniKit), Qiagen 公司; 凝胶回收试剂盒, 上海飞捷 (Fastagen) 生物技术有限公司; 试剂均为分析纯。

1.2 方法

1.2.1 南极小球藻总 RNA 的提取

采用 RNA 提取试剂盒 (RNeasy Plant MiniKit) 提取总 RNA, 具体操作如下:

(1) 取约 10^6 个经 30 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 光照处理 3 d 的新鲜细胞, 4℃, 5 000 r/min 离心 8 min, 收集藻

体, 转移到研钵中; (2) 向研钵中加入少量 200 目的石英砂, 再加液氮至满研钵使其冻透, 迅速研磨材料成粉末; (3) 将材料转移至 DEPC 处理过的 1.5 mL 离心管中, 加裂解液 RLT (含 10 mg/L β -巯基乙醇) 450 μL , 涡旋震荡 1~2 min; (4) 室温下, 10 000 r/min 离心 2 min, 转移上清到一新的 DEPC 处理过的 1.5 mL 离心管中; (5) 加 0.5 倍体积的无水乙醇到上清中, 混合均匀; (6) 将上述溶液全部转移至 RNeasy 小离心柱 (RNeasy minispin column) 中, 室温, 12 000 r/min 离心 15 s; (7) 取 700 μL 洗液 RW1 到柱上, 静置 5 min, 室温, 12 000 r/min 离心 15 s; (8) 将柱子转移到一新的收集管上, 取 500 μL 溶液 RPE 到柱子上, 12 000 r/min 离心 15 s; (9) RPE 溶液再洗一次, 室温, 12 000 r/min 离心 2 min; (10) 将柱子转移到一新的收集管上, 以 12 000 r/min, 离心 1 min; (11) 将柱子转移到一新的 1.5 mL 的 RNA-free 离心管上, 取 30~50 μL RNA-free 的水到柱子上, 静置 5 min, 室温, 12 000 r/min 离心 1 min; 取 3~5 μL 洗脱液, 用 1.4% 甲醛凝胶电泳检测 RNA 的质量。并用分光光度计测 A_{230} 、 A_{260} / A_{280} 的值, 检测提取的 RNA 纯度和浓度。

1.2.2 DNase 处理总 RNA 消化基因组 DNA

在一个无 RNase 污染的 0.5 mL 离心管中, 加入 7 μL 总 RNA、1 μL 10 \times RQ1 RNase-Free DNase Buffer、2 μL RQ1 RNase-Free DNase (1 U/ μL Promega), 混匀, 37℃ 处理 30 min, 加入 1 μL RQ1 RNase-Free DNase 终止液终止反应, 65℃ 10 min 失活 DNase 活性。

1.2.3 cDNA 第一链的合成

反转录反应体系 (20 μL) 如下:

MMLV RT Buffer (5 \times) 4 μL ; dNTP (10 mmol/L) 2 μL ; RNase Inhibitor (40 U/ μL) 1 μL ; MMLV RNase H (200 U/ μL) 0.5 μL ; Oligo dT₁₅ (0.2 mmol/L) 2 μL ; 总 RNA (0.5 μg) 5 μL ; H₂O (RNase-Free) 5.5 μL 。

42℃ 温育 2 h, 95℃ 变性 2 min, -20℃ 保存备用。

1.2.4 RT-PCR 法克隆 FAD2 cDNA 片段

根据 GenBank 中已登录的 FAD2 氨基酸序列, 用 Clustalw^[8] 进行比较分析, 根据其中高度保守的氨基酸序列, 设计一对简并引物。所有引物均由上海生物工程公司合成, 见表 1。

表 1 实验中用到的引物及序列

Tab. 1 Primers used in the experiments

引物名称	引物序列
CvFAD2-F1	CA(CT)CG(ATCG)CG(CTG)CACCA(CT)TCCAACAC
CvFAD2-R1	TGGTG(ATCG)GC(ATCG)AC(AG)TG(ATC)GTGTC
CvFAD2-F2	CCAACGCCACGTCCTACTGATT
CvFAD2-F3	GGGGGGACAAACACCTCGTC
CvFAD2-F4	CAGTGTTGGAATGGTGACGT
CvFAD2-R2	CACACACACCCAGAGCTGCC
CvFAD2-R3	CTACGGCTGGCTGCTCAACA
AOLP	GGCCACGCGTCGACTAGTAC(T) ₁₆ (A/C/G)
AP	GGCCACGCGTCGACTAGTAC
dG	GGGGGGGGGGGGGGGGGGGG
FAD2-TF	ATGGTGCAAACCCGCCGCCA
FAD2-TR	TCACCTTTCTGAACCAGTAGA

取第一链反应产物 1 μ L, 按下列反应体系 (20 μ L) 进行 PCR 扩增:

PCR Buffer (10 \times) 2.0 μ L; MgCl₂ (25 mmol/L) 1.6 μ L; dNTP (10 mmol/L) 0.4 μ L; CvFAD2-F1 (10 mmol/L) 1 μ L; CvFAD2-R1 (10 mmol/L) 1 μ L; 第一链反应产物 1 μ L; Taq DNA 聚合酶 (50 U/ μ L) 0.2 μ L; H₂O 12.8 μ L。

PCR 扩增程序: 94 $^{\circ}$ C 变性 5 min, 1 个循环; 94 $^{\circ}$ C 变性 1 min, 61 $^{\circ}$ C 退火 50 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 50 s, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min, 1 个循环; 4 $^{\circ}$ C 保温。

取 15 μ L PCR 反应产物以 1% 琼脂糖凝胶电泳进行分析和回收; 目的 DNA 片段的胶回收参阅 Fastagen 公司的小量胶回收试剂盒说明书, 凝胶的制备和操作参考分子克隆实验指南 (第三版)^[9]。

1.2.5 目的 DNA 片段的连接及转化

按照 TaKaRa (大连) 公司的 T-A 克隆载体连接试剂盒的说明书, 将目的 DNA 片段与 pMD18-T 质粒载体 16 $^{\circ}$ C 过夜连接; 连接后转化已制备好的大肠杆菌感受态细胞, 37 $^{\circ}$ C 培养箱中过夜培养。大肠杆菌感受态细胞的制备和连接转化等操作参考分子克隆实验指南 (第三版)^[9]。

1.2.6 阳性克隆的筛选与检测

挑取能在含有 Amp 的 LB 培养基平板上生长的单菌落, 37 $^{\circ}$ C 过夜培养后提取质粒, 进行 PCR 检测。PCR 检测采用上述引物 (CvFAD2-F1 和 CvFAD2-R1)、反应体系和条件, 检测结果用 1% 琼脂糖凝胶

电泳进行分析。

1.2.7 测序

将检测结果为阳性的单菌落, 37 $^{\circ}$ C 过夜培养后, 送 Sangon (上海) 生物工程技术有限公司测序。

1.2.8 *CvFAD2* 基因全长的获得

1.2.8.1 *CvFAD2* 基因的 3' RACE

网上 BLAST 比对 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) 以上测序得到的小球藻 *CvFAD2* 部分片段序列, 发现它与其他物种 *FAD2* 同源, 根据此测得序列再设计正向 (CvFAD2-R2 和 CvFAD2-R3)、反向 (CvFAD2-F2, CvFAD2-F3, CvFAD2-F4) 引物用于 RACE 技术扩增 *CvFAD2* 基因的 cDNA 全长。

(1) 以小球藻细胞总 RNA 为模板, AOLP 为引物, 反转录合成第一链 cDNA, 方法同前。

(2) 以合成的 cDNA 为模板, CvFAD2-R2 和 AP 为引物进行第一次 PCR, PCR 反应条件为: 94 $^{\circ}$ C 变性 5 min, 1 个循环; 94 $^{\circ}$ C 变性 1 min, 61 $^{\circ}$ C 退火 1 min, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min, 1 个循环; 4 $^{\circ}$ C 保温。

(3) 将第一次 PCR 产物稀释 50 倍, 取 1 μ L 作为模板进行第二次 PCR, 引物为 CvFAD2-R3 和 AP, PCR 反应条件为: 94 $^{\circ}$ C 变性 5 min, 1 个循环; 94 $^{\circ}$ C 变性 1 min, 61 $^{\circ}$ C 退火 1 min, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min, 1 个循环; 4 $^{\circ}$ C 保温。

(4) 电泳、DNA 片段回收、连接、转化、测序方法同前。

1.2.8.2 *CvFAD2* 基因的 5' RACE

(1) 以小球藻细胞总 RNA 为模板, Oligo dT₁₅ 为引物, 反转录合成第一链 cDNA, 方法同前。

(2) 用 PCR 产物纯化试剂盒纯化 cDNA。

(3) 以末端转移酶(TdT, TaKaRa)为 cDNA 加尾:

5×TdT buffer 5 μL; dCTP(10 mmol/L) 0.5 μL; cDNA 10 μL; BSA buffer(0.1%) 6.25 μL; ddH₂O 2.25 μL。

94℃保温 3 min, 冰上放置, 加入 TdT 酶 1 μL, 混匀, 37℃保温 10 min, 65℃保温 10 min, 失活 TdT, 置-20℃保存;

(4) 以加尾 cDNA 为模板, *CvFAD2*-F2 和 dG 为引物进行第一次 PCR, PCR 反应程序为: 94℃变性 4 min, 1 个循环; 94℃变性 5 min, 58℃退火 1 min, 72℃延伸 1 min, 30 个循环; 72℃延伸 10 min, 1 个循环; 4℃保存。

(5) 将第一次 PCR 产物稀释 20 倍, 取 1 μL 作为模板进行第二次 PCR, 引物为 *CvFAD2*-F3 和 dG; *CvFAD2*-F4 和 dG。PCR 反应程序为: 94℃变性 5 min, 1 个循环; 94℃变性 1 min, 57℃退火 50 s, 72℃延伸 50 s, 30 个循环; 72℃延伸 10 min, 1 个循环; 4℃保存。

(6) 电泳、DNA 片段回收、连接、转化、测序同前。

将 3'RACE 和 5'RACE 所得的序列进行拼接, 以获得 *CvFAD2* 基因的 cDNA 全长; 为验证其全长的正确性, 再设计引物 *CvFAD2*-TF 和 *CvFAD2*-TR 对该基因进行全长克隆, 此过程采用高保真 Pfu DNA 聚合酶, PCR 条件: 94℃变性 5 min, 1 个循环; 94℃变性 1 min, 63℃退火 1 min, 72℃延伸 1.5 min, 30 个循环; 72℃延伸 10 min, 1 个循环; 4℃保存。克隆、测序等方法同前。

1.2.9 序列分析

1.2.9.1 序列的网上比对与分析

将所测得的序列利用 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, 并利用这些序列进行基因同源性的比较, cDNA 全长序列 ORF 分析用 www.ncbi.nlm.nih.gov 网站 ORF finder 在线分析。

1.2.9.2 氨基酸序列分析

根据所测得基因的 cDNA 序列推导其氨基酸序列, 并利用序列分析工具对其进行分析: 采用在线 Tmpred 网站进行跨膜信号区分析 (http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED_form.html), 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 ProtParam (<http://www.expasy.ch/tools/protparam.html>) 网站进行蛋白质基本物理化学参数分析。

网站进行蛋白质基本物理化学参数分析。

1.2.9.3 系统发育分析

选取 GenBank 中不同种类的 FAD 基因采用 ClustalW^[7] 软件进行多序列比对分析, 创建一个不同来源的 FAD 多序列的比对结果; 系统发生和进化的分析在比对的基础上用 MEGA4.0 软件^[10] 完成, 系统树采用 Neighbour-Joining 方法构建。

2 结果

2.1 总 RNA 提取及检测

从小球藻 NJ-7 细胞中提取总 RNA, 在紫外分光光度计上进行 RNA 浓度测定和质量检验, 样品 RNA 的 A₂₆₀/A₂₈₀ 值在 1.9~2.0 之间。1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测结果进一步证实获得的总 RNA 完整性较好, 质量较高, 可以进行后续实验(图 1)。

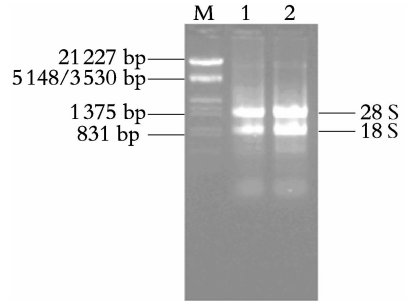


图 1 小球藻总 RNA

Fig. 1 Total RNA of *Chlorella vulgaris*

M. λDNA\EcoRI + HindIII 双酶切 Marker(21 227, 5 148, 3 530, 2 027, 1 904, 1 375, 941, 831, 564); 1, 2. 总 RNA

M. λ DNA digested by EcoRI and Hind III; 1, 2. Total RNA

2.2 小球藻 *CvFAD2* 基因特异性片段的 RT-PCR 扩增与鉴定

以小球藻的总 RNA 反转录后得到的 cDNA 第一条链为模板, 以简并引物 *CvFAD2*-F1/*CvFAD2*-R1 进行 RT-PCR 扩增。PCR 产物经 1.0% 的琼脂糖凝胶电泳检测(图 2), 获得了约 500 bp 的片段。将该片段进行测序, 长度为 542 bp。登录 GenBank 数据库比较发现, 该片段氨基酸序列与普通小球藻 (*Chlorella vulgaris*) *FAD2* (GenBank 登录号: BAB78716) 的相似性为 75%, 与莱茵衣藻 (*Chlamydomonas reinhardtii*) *FAD2* (GenBank 登录号: EDP04777) 的相似性为 60%, 与麻疯树 (*Jatropha curcas*) *FAD2* (GenBank 登录号: ABA41034) 的相似性为 56%, 与乌白 (*Triadica sebifera*) *FAD2* (GenBank 登录号: ABI96919) 的相似性为 57%, 表明该片段是所要克隆的目的基因的中间片段。

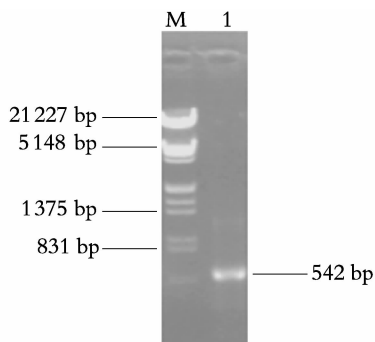


图2 小球藻 *CvFAD2* 基因简并 PCR 产物电泳图

Fig. 2 RT-PCR amplification of *CvFAD2* partial cDNA of *Chlorella vulgaris*

M. λ DNA\EcoR I + Hind III 双酶切 Marker(21 227,5 148,3 530,2 027,1 904,1 375,941,831,564);1. PCR 结果

M. λ DNA digested by *EcoR* I and *Hind* III ;1. *CvFAD2* partial cDNA

2.3 小球藻 *CvFAD2* 基因 3'端和 5'端的克隆

根据所得到的中间片段,设计特异引物 *CvFAD2-R2* 和 *CvFAD2-R3*,和接头引物 AP 进行 PCR,经两轮 PCR 后扩增得到一条约 1 000 bp 的条带,与预期目的基因 3'端的大小相符(图 3a)。根据所得的中间片段序列设计特异引物 *CvFAD2-F2*,*CvFAD2-F3*,*CvFAD2-F4*,和通用引物 dG 进行 PCR,以加尾后的 cDNA 为模板,经两轮 PCR 后得到两条约为 500 bp 的条带(图 3b)。将上述 5'/3' RACE 所得到的条带回收,克隆到 pMD18-T 载体中,筛选阳性克隆测序。3' RACE 所获得序列长度为 1 068 bp,5' RACE 所获得序列长度分别为 541 bp 和 507 bp。

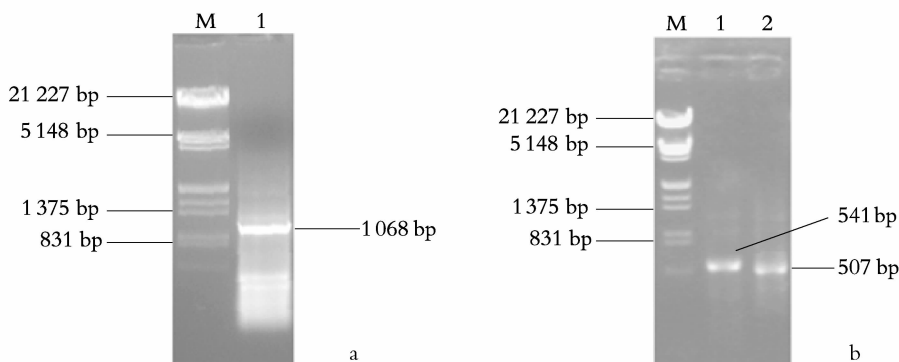


图3 小球藻 *CvFAD2* 基因 5'/3' RACE 二次 PCR 结果

Fig. 3 Secondary PCR of *CvFAD2* cDNA 5'/3' end

M. λ DNA\EcoR I + Hind III 双酶切 Marker(21 227,5 148,3 530,2 027,1 904,1 375,941,831,564);1,2. PCR 结果

M. λ DNA digested by *EcoR* I and *Hind* III ;1,2. *CvFAD2* 5'/3' cDNA

a. 3' RACE 二次 PCR 结果;b. 5' RACE 二次 PCR 结果

a. Secondary PCR of *CvFAD2* cDNA 3' end;b. Secondary PCR of *CvFAD2* cDNA 5' end

2.4 小球藻 *CvFAD2* 基因全长的克隆

根据所获得的中间片段,5'端和 3'端拼接出小球藻内质网型 $\Delta 12$ 脂肪酸去饱和酶基因的全长 cDNA 序列。该基因的 cDNA 全长为 2 032 个碱基(GenBank 登录号:EU596474),其中开放阅读框为 1 158 个碱基,编码 385 个氨基酸;cDNA 全长中还包含 5'非编码区(5'-UTR)的 50 个碱基、3'非编码区(3'-UTR)的 824 个碱基及终止密码子 TGA 和加尾信号。据此设计引物 *CvFAD2-TF* 和 *CvFAD2-TR*,经 PCR 扩增得到一条约 1 100 bp 的与拼接出的 *CvFAD2* 基因全长 cDNA 编码区大小相符的条带(图 4 和图 5)。

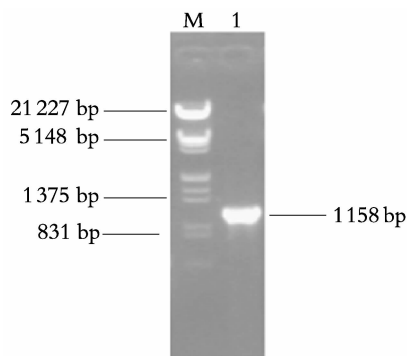


图4 小球藻 *CvFAD2* 基因全长 PCR 产物电泳图

Fig. 4 RT-PCR amplification of *CvFAD2* total cDNA of *Chlorella vulgaris*

M. λ DNA\EcoR I + Hind III 双酶切 Marker(21 227,5 148,3 530,2 027,1 904,1 375,941,831,564);1. PCR 结果

M. λ DNA digested by *EcoR* I and *Hind* III ;1. *CvFAD2* total cDNA

表 2 *CvFAD2* 基因编码蛋白中各种氨基酸数量及比例

Tab.2 The amount and proportion of amino acids of *CvFAD2*

种类	数量	比例(%)	种类	数量	比例(%)	种类	数量	比例(%)
Ala (A)	44	11.4	His (H)	21	5.5	Thr (T)	21	5.5
Arg (R)	20	5.2	Ile (I)	11	2.9	Trp (W)	20	5.2
Asn (N)	8	2.1	Leu (L)	38	9.9	Tyr (Y)	18	4.7
Asp (D)	16	4.2	Lys (K)	16	4.2	Val (V)	36	9.4
Cys (C)	4	1.0	Met (M)	6	1.6	Pyl (O)	0	0.0
Gln (Q)	12	3.1	Phe (F)	16	4.2	Sec (U)	0	0.0
Glu (E)	16	4.2	Pro (P)	22	5.7			
Gly (G)	17	4.4	Ser (S)	23	6.0			

此外, *CvFAD2* 基因编码蛋白中各种氨基酸数量及比例列于表 2 中。其中含有 32 个带负电的氨基酸残基(Asp + Glu), 占总数的 8.4%; 36 个带正电的氨基酸残基(Arg + Lys), 也占总数的 9.4%。经推算 *CvFAD2* 蛋白的分子质量约为 44 119.6 ku, 理论等电点为 8.72, 在 *E. coli* 中的半衰期为 10 h, 稳定系数为 60.54, 属于稳定的蛋白质类型。

2.6 小球藻 *CvFAD2* 基因与其他真核藻类及高等植物的多序列比对分析

多序列比对(图 7)发现, 序列之间的同源性比较

高, 在多个位点出现连续几个氨基酸一致的情况, 特别是在 3 个保守的组氨酸簇处。南极小球藻 *CvFAD2* 基因的推导氨基酸序列与普通小球藻(*Chlorella vulgaris*)、莱茵衣藻、石榴(*Punica granatum*)、麻疯树 *FAD2* 基因的氨基酸序列同源性分别达到 75%、57%、57%、52%。(图 7)。其中, 南极小球藻 *CvFAD2* 基因(385 个氨基酸)比已知的普通小球藻 *FAD2* 基因(377 个氨基酸)在编码框 5' 端附近多 5 个氨基酸, 与莱茵衣藻 *CrFAD2* 基因(383 个氨基酸)长度相似。



图 7 小球藻 *CvFAD2* 与其他真核藻类及高等植物 *FAD2* 氨基酸序列比对结果

Fig.7 Amino acid sequences of *CvFAD2* in comparison with the microsomal homologs from other plants

脂肪酸去饱和酶的 3 个保守的组氨酸簇用下划线标出。本文克隆的南极小球藻 *CvFAD2* 基因在图中表示为 *Chlorella_Fad2*。序列同源性比对参照的其他生物的 *FAD2* 基因序列: *Chlorella vulgaris* *CvFAD2* (BAB78716), *Chlamydomonas reinhardtii* *CrFAD2* (EDP04777), *Punica granatum* *PgFAD2* (AAO37754), *Jatropha curcas* *JcFAD2* (ABA41034)

Amino acid residues that are conserved are highlighted in black boxes. Three conserved histidine clusters are underlined. Accession numbers or locus tags for the sequences were as follows: *Chlorella vulgaris* *CvFAD2* (BAB78716), *Chlamydomonas reinhardtii* *CrFAD2* (EDP04777), *Punica granatum* *PgFAD2* (AAO37754), *Jatropha curcas* *JcFAD2* (ABA41034). The conserved amino acids are shaded

2.7 系统发育树分析

作者比对了来自不同物种的 25 个 $\Delta 12$ 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,在构建系统发育树的基础上研究了南极小球藻 *CvFAD2* 基因的分类归属以及该基因与其他物种基因之间的进化关系,结果如图 8。从图 8 中可以看出,蓝藻 $\Delta 12$ 去饱和酶基因与叶绿体型 $\Delta 12$ 基因(*FAD6*) (真核微藻和高等植物)聚在一起,位于基点,Bootstrap 的支持度为 100%,表明叶绿体型 *FAD6* 基因比内质网型 *FAD2* 基因原始,*FAD2* 基因可能起源于 *FAD6* 基

因;真核微藻衣藻和小球藻这两个属的内质网型 $\Delta 12$ 去饱和酶基因聚在一起,介于真菌与高等植物之间,序列比对显示其与高等植物的同源性更高,推测其在进化上与高等植物的亲源关系更近;聚球藻、原绿球藻、硅藻、红藻等属的去饱和酶基因聚在一起,与前一支的进化关系较远。本研究采用的材料与小球藻属的另 1 个种(品)系聚在一起,Bootstrap 的支持度为 100%,表明本文所采用的南极小球藻与 GenBank 登录的藻种(BAB78716)可能是同一藻种不同的品系。同时,结果也表明 *FAD2* 蛋白的保守性较强,能很好的反应各物种之间的进化距离。

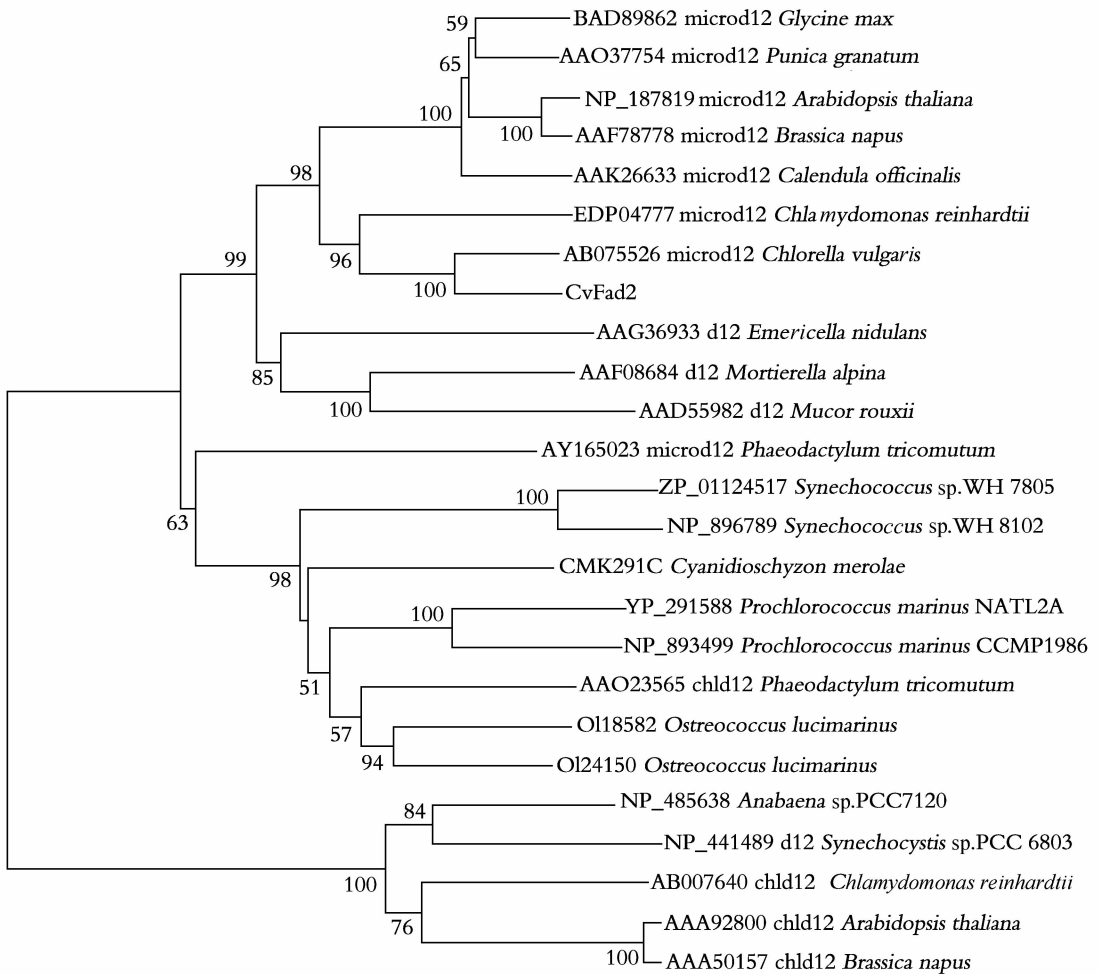


图 8 来自不同物种的 $\Delta 12$ 脂肪酸去饱和酶的系统进化树分析

Fig. 8 Phylogenetic tree based on the deduced amino acid sequences of $\Delta 12$ homologous genes of cyanobacteria, eukaryotic algae and higher plants

进化树采用 NJ 方法构建,利用了 350 个氨基酸位点

About 350 positions spanning the three histidine boxes were employed

3 讨论与小结

随着不饱和脂肪酸其重要性越来越受到人们的关注,人们对脂肪酸去饱和酶(FAD)基因的研究也越来越多。海洋微藻约占海洋生物物种的40%~86%,许多种类能够产生PUFAs且含量较高^[11]。目前,已有多重微藻的脂肪酸去饱和酶或延伸酶基因被克隆,而且其中一些已在大肠杆菌、酿酒酵母、拟南芥或油菜中获得成功表达。

南极是地球上最寒冷的地区,一般而言,南极的沿岸海水温度常年保持在-1.8℃到5℃之间。然而,在南极这种恶劣的持续低温环境下,却生活着多种冷适应生物,其中包括蓝藻、甲藻、硅藻、金藻以及绿藻等多种微藻^[12~15]。本实验室获得了从南极中山站附近分离纯化到的一株小球藻NJ-7,该藻株能在4℃的低温下正常生长,同时也可在20℃的温度下生长。不饱和脂肪酸是生物膜的主要组成部分,它的含量直接影响着生物膜的相变温度及膜上各种酶的活性,从而调节细胞的各项生理功能。本研究以小球藻NJ-7为研究对象,克隆得到了内质网型 $\Delta 12$ 脂肪酸去饱和酶基因的全长cDNA序列,并利用生物学软件对该序列进行了同源性比较分析、功能结构域的预测、氨基酸使用频率的统计等,获知了该序列的部分信息,为微藻脂肪酸去饱和酶基因的结构和特性的研究提供了参考;并为进一步研究温度调节去饱和酶表达的模式,明确微藻低温适应的分子机理奠定了基础。

参考文献:

[1] Singh S C, Sinha R P, Häder D P. Role of lipids and fatty acids in stress tolerance in Cyanobacteria [J]. **Acta Protozool**, 2002, 41: 297-308.

[2] 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.

[3] Wada H, Murata N. Temperature-induced changes in the fatty acid composition of the cyanobacterium, *Synechocystis* PCC6803 [J]. **Plant Physiol**, 1990, 92: 1 062-1 069.

[4] 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: 1 003-1 006.

[5] Miyasaka H, Tanaka S, Kanaboshi H. Cloning and ex-

pression of a gene encoding a putative chloroplast ω -6 fatty acid desaturase of marine *Chlamydomonas* [J]. **Plant Biotechnology**, 2000, 17(2): 167-171.

[6] Suga K, Honjoh K, Furuya N, *et al.* Two low-temperature-induced *Chlorella* genes for $\Delta 12$ and $\omega 3$ fatty acid desaturase (FAD): Isolation of $\Delta 12$ and $\omega 3$ *fad* cDNA clones, expression of $\Delta 12$ *fad* in *Saccharomyces cerevisiae*, and expression of $\omega 3$ *fad* in *Nicotiana tabacum* [J]. **Biosci Biotechnol Biochem**, 2002, 66(6): 1 314-1 327.

[7] Zhou X R, Robert S S, Petrie J R, *et al.* Isolation and characterization of genes from the marine microalga *Pavlova salina* encoding three front-end desaturases involved in decosaheptaenoic acid biosynthesis [J]. **Phytochemistry**, 2007, 68: 785-796.

[8] 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: 4 673-4 680.

[9] 萨姆布鲁克, 拉塞尔. 分子克隆实验指南 [M]. 第三版. 黄培堂译. 北京: 科学出版社, 2002.

[10] 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: 1 596-1 599.

[11] Tonon T, Sayanova O, Michaelson L V, *et al.* Fatty acid desaturases from the microalga *Thalassiosira pseudonana* [J]. **Graham FEBS Journal**, 2005, 272: 3 401-3 412.

[12] Bunt J S, Wood Z J F. Microalgae and Antarctic sea-ice [J]. **Nature**, 1963, 19: 1 254-1 255.

[13] Morgan-Kiss R M, Ivanov A G, Huner N P. The Antarctic psychrophile, *Chlamydomonas subcaudata*, is deficient in state I-state II transitions [J]. **Planta**, 2002, 214: 435-450.

[14] Gast R J, Dennett M R, Caron D A. Characterization of protistan assemblages in the Ross Sea, Antarctica, by denaturing gradient gel electrophoresis [J]. **Appl Environ Microbiol**, 2004, 70: 2 028-2 037.

[15] Fernandez-Valiente E, Camacho A, Rochera C, *et al.* Community structure and physiological characterization of microbial mats in Byers Peninsula, Livingston Island (South Shetland Islands, Antarctica) [J]. **FEMS Microbiol Ecol**, 2007, 59: 377-385.

Cloning and sequence analysis of $\Delta 12$ fatty acid desaturase of *Chlorella vulgaris*

CHI Xiao-yuan^{1,2}, LU Yan-du^{1,3}, WANG Ming-qing^{1,4}, BIAN Shu-guang^{1,5}, YANG Qing-li^{1,2}, QIN Song¹

(1. Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China; 2. Shandong Peanut Research Institute, Qingdao 266100, China; 3. Institute of Coastal Zone Research for Sustainable Development, Chinese Academy of Science, Yantai 264003, China; 4. Ocean University of China, Qingdao 266003, China; 5. Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Received: Jun. , 12, 2008

Key words: *Chlorella vulgaris*; *FAD2*; gene cloning; sequence analysis

Abstract: A pair of degenerate primers was designed to amplify specific DNA fragment of *FAD2* using cDNA of *Chlorella vulgaris* from the South Pole according to the homologous sequences. The middle fragment of interested cDNA was obtained by RT-PCR. Then the full length of the cDNA was isolated by 5' RACE and 3' RACE. The clone contains 2 032 bp nucleotides with an open reading frame (ORF) of 1 158 bp comprising 385 amino acid residues with the predicted molecular mass of 44 ku. The sequence shares a high homologue with the following *FAD2*: *C. vulgaris* 75%, *Chlamydomonas reinhardtii* 57%, *Punica granatum* 57%, and *Jatropha curcas* 52%. Phylogenetic analysis shows that the microsomal $\Delta 12$ desaturase genes from *C. reinhardtii* and *C. vulgaris* are clustered together with genes from fungi and higher plants while they are separated from those of marine cyanobacteria, diatoms, rhodophytes and prasino-phyceae. Moreover, the microsomal $\Delta 12$ desaturases of eukaryotic microalgae and higher plants may arise through gene duplication events independently from a common ancestor.

(本文编辑:张培新)