

缺刻缘绿藻二酰甘油酰基转移酶 2(DGAT2)的 基因特性与功能鉴定

房逢立¹, 吴 洪², 周志刚^{1*}

(1. 上海海洋大学水产与生命学院, 上海高校水产养殖 E-研究院, 上海 201306;

2. 新奥科技发展有限公司, 河北 廊坊 065001)

摘要: 酰基-CoA—二酰甘油酰基转移酶(DGAT)是微藻等植物三酰甘油(TAG)合成过程中的关键酶。为了解析缺刻缘绿藻 TAG 合成代谢的途径,在该藻转录组测序数据库中,通过同源搜索,发现了 1 个编码 DGAT2 的 cDNA 全长序列。该序列长 1 997 bp,其中 5'-非翻译区(UTR)长 44 bp,3'-UTR 长 897 bp,开放阅读框(ORF)长 1 056 bp,编码 1 个含有 351 个氨基酸的蛋白质,预测的分子量为 39.43 ku,等电点为 9.46。基于缺刻缘绿藻和其他物种相应的 DGAT 基因编码蛋白序列所构建的 Neighbor-Joining(NJ)系统进化树,结果表明该基因与 DGAT2 聚成一支,显著不同于 DGAT1 和 DGAT3。氨基酸序列比对发现,该基因编码产物含有 DGAT2 所具有的 HPHG 这 4 个氨基酸所组成的高度保守特征序列。因此,将该基因命名为 MiDGAT2。将它的 cDNA 与其 DNA 序列进行比较后发现,MiDGAT2 含有 6 个内含子,其剪接位点均符合“GT-AG”规则。为进一步了解其功能,利用反转录 PCR 克隆了该基因的 ORF 序列,然后将其亚克隆到表达载体 pYES2 中,成功地构建了重组表达质粒 pY-MiDGAT2。通过电穿孔法将该重组质粒转入酿酒酵母 TAG 合成缺陷株 H1246 中,经筛选与序列验证得到含有重组质粒 pY-MiDGAT2 的酵母转化株。酵母转化株在用 SC 培养基并加入半乳糖诱导表达培养后,其脂类的薄层色谱分析结果表明,所转的 MiDGAT2 基因能使酵母转化株恢复 TAG 合成的能力,从而证实了 MiDGAT2 基因具有 DGAT 的功能;利用荧光染料 Bodipy 对酵母细胞的染色结果显示,MiDGAT2 基因能使酵母转化株的细胞重现油滴,尽管重建的油滴大小明显比野生型酵母的小。

关键词: 缺刻缘绿藻; 酿酒酵母; 二酰甘油酰基转移酶(DGAT); 三酰甘油(TAG); 油滴

中图分类号: Q 781; S 917.3

文献标志码: A

随着石油资源的枯竭,石油替代产品的研究与开发越来越受到重视,具有可再生性且理化性质都和石化柴油相近的生物柴油被寄予厚望^[1]。相对于传统的生物柴油原料——油料作物来说,微藻因生物量大、生长周期短、不占用耕地等优势,在新一代的可再生能源资源研究与开发中,必将成为一个热点^[2]。微藻生物柴油是微藻生物的三酰甘油(triacylglycerol, TAG)等中性脂经甲酯化加工而形成的^[1],因此,微藻

TAG 的合成及其含量的提高对降低生物柴油的生产成本非常重要^[2]。

在藻类及高等植物中,TAG 主要是沿着 Kennedy 途径来合成的,即酰基-CoA:二酰甘油酰基转移酶(DGAT, EC 2.3.1.20)将一个酰基添加到二酰甘油碳骨架上的最后一个碳位从而产生 TAG^[3-4]。越来越多的研究表明,DGAT 在 TAG 合成中起着关键作用^[5-6]。例如,在拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)的 DGAT 活性缺陷

收稿日期:2013-03-31 修回日期:2013-04-24

资助项目:国家自然科学基金项目(30972243,31172389);国家海洋局可再生能源专项基金(SHME2011SW02);国家“九七三”重点基础研究项目(2012CB723606);上海高校海洋科学一流学科建设项目

通信作者:周志刚,E-mail:zgzhou@shou.edu.cn

突变体 AS11 中,其种子的油含量比野生型降低了 75%^[7],如果在拟南芥中过表达 DGAT 基因,可以提高其 TAG 净合成量^[8]。对油菜 (*Brassica napus* cv Shiralee)^[9]、大豆 (*Glycine max*)^[10]、油橄榄 (*Olea europaea*)^[11] 和玉米 (*Zea mays*)^[12] 等植物的研究都显示出类似的结果。因此,DGAT 被认为是 TAG 合成过程中的关键酶^[13]。

缺刻缘绿藻 (*Myrmecia incisa*) 是一种富含花生四烯酸 (ArA) 的球状绿藻,且这些 ArA 在细胞中以 TAG 形式贮存于油滴中^[14]。据此推测,DGAT 对该藻 TAG 合成及油滴形成可能起着非常重要的作用。自缺刻缘绿藻高通量的转录组数据中筛选到 1 个编码 DGAT 全长 cDNA 序列^[15],本研究在此基础上,经过蛋白序列比对、系统进化树等生物信息学分析,并利用转基因技术将该 cDNA 序列转化至 DGAT 缺陷型的酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) (以下简称酵母)突变株中进行互补实验,经酵母细胞的脂类薄层色谱法 (TLC) 及荧光染色等分析,证明自缺刻缘绿藻中获得的该基因具有 DGAT2 功能且能使缺陷型酵母细胞再现油滴。这些研究为缺刻缘绿藻 TAG 合成代谢途径与调控机理的探讨并利用基因工程手段进一步提高该藻 TAG 的含量研究奠定了基础。

1 材料与方 法

1.1 藻种与培养

缺刻缘绿藻 H4301 来源于布拉格查理斯大学藻类收藏中心 (Culture collection of algae of Charles University of Prague, CAUP),由暨南大学张成武教授惠赠。

将藻接种于 BG11 液体培养基^[16]中,在 25 °C 和 115 μmol/(m²·s) 的光照培养箱中培养,光周期为光照:黑暗为 14 h:10 h^[17],每天不定期地摇晃。待长至指数生长期,4 °C 下 5 500 r/min 离心 10 min,收集藻细胞,用灭菌去离子水洗涤 2 次并离心收集藻体,液氮速冻后 -80 °C 保存备用。

1.2 微生物培养基

SC-U 合成培养基:无氮源氨基酸 YNB 0.67%,碳源为 2% 的葡萄糖,氨基酸混合物 I (腺嘌呤、亮氨酸、赖氨酸、精氨酸、半胱氨酸、苏氨酸和色氨酸)0.01%,氨基酸混合物 II (天冬氨

酸、蛋氨酸、苯丙氨酸、组氨酸、丝氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、酪氨酸和缬氨酸)0.005%。

诱导培养基:在 SC-U 液体培养基中添加 2% 半乳糖。

LB 培养基:1% 蛋白胨、1% 氯化钠、0.5% 酵母提取物。

1.3 缺刻缘绿藻核酸提取及 cDNA 合成

采用 TRIzol 试剂法抽提总 RNA^[18]。基因组 DNA 的提取采用 CTAB 法^[19]。利用 TaKaRa 公司的反转录试剂盒将 RNA 进行反转录得到 cDNA。反应体系为 2 μL 的 5 × Prime ScriptTM 缓冲液,0.5 μL 的 Prime ScriptTM RT Enzyme MIX I,0.5 μL 的 Oligo dT Primer (50 μmol/L),0.5 μL 的 Random 6 mers (100 μmol/L),0.5 μL 的总 RNA,加无 RNA 酶的水至 10 μL。将反应液混和均匀,于 37 °C 进行 15 min 的反转录,85 °C 加热 5 s 以终止反应。

1.4 基因克隆及序列分析

MiDGAT2 基因是从缺刻缘绿藻转录组测序数据中搜索得到的^[15]。根据该序列设计 1 对引物:上游引物 5'-CGAGCTTGTGACAGCCACGGCAGG-3' 和下游引物 5'-GACCCCAACAACA-CAACCCTAA-3',利用反转录 PCR 及其产物测序,证实该基因的 cDNA 序列。MiDGAT2 基因 DNA 全长序列通过上游引物 5'-ATGCTACGCTGGTCGAGGGTCGAG-3' 和下游引物 5'-CTACTCGACCATGCGCAGCTCCTGCT-3' 并以基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增及测序获得。通过 ORF Finder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>) 在线预测该基因的 ORF 区。使用在线软件 ExPasy 中的工具 ProtParam (<http://web.expasy.org/protparam/>) 分析蛋白质的分子量和等电点。DGAT 蛋白序列自 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/?term=dgat>) 中搜索获得,其蛋白序列系统进化树利用 MEGA4^[20] 里的 Neighbor-Joining (NJ) 方法构建,同源序列比对利用 Clustal X 软件^[21],默认设置。氨基酸序列保守位点预测参考 Stone 等^[22] 的方法。跨膜区预测利用软件 TMpred,内质网返回基序 (retrieval motif) 预测来自网站 (<http://elm.eu.org/>)。

1.5 MiDGAT2 基因的表达载体构建

pMD19T-MiDGAT2 克隆载体的构建 根

<http://www.scxuebao.cn>

据 pYES2 载体 (Invitrogen) 和 缺刻缘绿藻 MiDGAT2 基因的序列设计引物, 其中上游引物序列为 5'-aagcttAACATGCTACGCTGGTTCG-AGGGTTCG-3' (小写字母为 *Hind* III 酶切位点, 酶切位点后的 AAC 为酵母一致性序列), 下游引物序列为 5'-gaattcTACTCGACCATGCGCAGCTCCTGC-3' (小写字母为 *Eco*R I 酶切位点)。以缺刻缘绿藻 MiDGAT2 的 cDNA 为模板进行 PCR 扩增, 得到含有酶切位点的序列。PCR 扩增反应体系为 25 μ L, 包含 2.5 μ L 的 10 \times PCR 缓冲液、1.5 μ L 的 Mg^{2+} (25 mmol/L)、2 μ L 的 dNTP、1 μ L 的模版、上下游引物 (10 μ mol/L) 各 1 μ L、0.25 μ L 的 *Taq* 酶 (5 U/ μ L) 以及 16 μ L 的无菌水。PCR 反应条件为 95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min, 94 $^{\circ}$ C 变性 1 min、66 $^{\circ}$ C 退火 1 min、72 $^{\circ}$ C 延伸 2 min, 30 个循环, 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。利用琼脂糖凝胶纯化回收试剂盒 (北京艾德莱生物科技有限公司) 进行 PCR 产物回收并克隆到 pMD19-T 载体 (TaKaRa) 中, 转化大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DH5 α 感受态细胞 (天根生化科技有限公司), 经蓝白斑筛选和阳性克隆的酶切鉴定, 挑取与目的片段大小一样的阳性克隆送生工生物工程 (上海) 有限公司测序以确保其序列无误。

pY-MiDGAT2 表达载体的构建 利用质粒提取试剂盒 (北京艾德莱生物科技有限公司) 从已筛选的大肠杆菌 DH5 α 中抽提 pMD19-T-MiDGAT2 质粒, 用限制性内切酶 *Eco*R I 和 *Hind* III 进行双酶切反应, 同时对载体质粒 pYES2 进行同样的双酶切反应。反应体系为 4 μ L 的 10 \times M 缓冲液, 4 μ L 的 0.1% BSA, *Eco*R I 及 *Hind* III 各 1 μ L, DNA \leq 2 μ g, 加无 RNA 酶的水至 20 μ L。37 $^{\circ}$ C 消化反应 4 h。割胶回收酶切后的目的片段, 并用 T_4 DNA 连接酶将该片段与 pYES2 片段连接得到重组载体 pY-MiDGAT2。连接反应体系为 2.5 μ L 的缓冲液, MiDGAT2 基因 DNA 片段约 0.3 pmol, 载体 pYES2 的 DNA 消化片段约 0.03 pmol, 1 μ L 的 T_4 DNA 连接酶, 加除 RNA 酶的水至 25 μ L, 16 $^{\circ}$ C 连接过夜。连接后转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞, 按照上述方法进行克隆、菌落 PCR 验证和测序, 构建得到重组载体 pY-MiDGAT2, 抽提后于 -20 $^{\circ}$ C 保存备用。

1.6 重组表达质粒 pY-MiDGAT2 的遗传转化

酵母电击感受态细胞的制备 酵母

DGA1、*LRO1*、*ARE1* 和 *ARE2* 4 基因缺陷株 H1246 以及野生型 scy62 均由瑞典农业科学大学 Sten Stymne 教授惠赠, 该缺陷株的表型不能合成 TAG^[23]。将酵母接种于 SC 培养基中, 30 $^{\circ}$ C 复苏培养过夜, 按 1:100 的比例接种扩大培养, 用摇床以 200 r/min 的转速振荡培养至细胞密度约为 1×10^8 /mL (4~5 h)。冰上冷却 15 min 使细胞停止生长, 4 $^{\circ}$ C 下以 5 000 r/min 的转速离心 5 min 收集酵母细胞, 再用预冷无菌水洗涤细胞 2 次, 同样条件离心收集。用 20 mL 预冷的 1 mol/L 山梨醇洗涤酵母细胞, 然后悬浮于 0.5 mL 预冷的 1 mol/L 山梨醇。4 $^{\circ}$ C 保存细胞, 便于电击转化使用。

酵母感受态细胞的电击转化 取 5~10 μ L (约 5~200 ng) 冰上预冷且待转化的重组质粒 pY-MiDGAT2, 与酵母感受态细胞混匀, 然后将该混合液转移到 0.2 cm 的预冷电击杯中轻轻混匀, 冰浴 5 min。选择程序 Sc2 (电压 1.5 kV, 时间 5 ms) 利用电穿孔仪 (美国 Bio-Rad 公司) 电击 1 次。移走电击杯, 立即加入 1 mL 预冷的 1 mol/L 的山梨醇, 转移到新的 SC 培养基中, 30 $^{\circ}$ C 轻微振荡培养 5 h, 将菌液涂布于含有 1 mol/L 山梨醇的尿嘧啶缺陷固体培养基 (SC-U) 上, 30 $^{\circ}$ C 静置倒置培养 48~72 h。待菌落长起来后挑取单菌落于液体的 SC-U 液体培养基中。经菌落 PCR 验证后, 用含 2% 葡萄糖的 SC-U 甘油培养基保存菌种。

1.7 酵母的诱导培养与脂类分析

将保存的酵母及其转基因菌株接种于 SC 培养基中, 于 28 $^{\circ}$ C 以 220 r/min 转速振荡培养, 待 $OD_{600} = 4.0$ 后, 上述同样条件离心收集菌体, 重悬于 2% 半乳糖的 SC 培养基中, 离心收集酵母, 用去离子水洗涤并离心 3 次, 之后用冷冻干燥机冻干。实验设 3 个平行。

利用稍作改进的 Blight 等^[24]的方法提取酵母总脂。首先, 将 50 mg 酵母冻干粉加入到一个试管中, 再加入 1 mL 氯仿: 甲醇 (2:1, v/v) 和 200~300 μ L 玻璃珠 (0.4~0.6 mm), 然后涡旋震荡 15 min, 4 000 r/min 离心 15 min。取上清到一个新的试管中, 加入 400 μ L 的 50 mmol/L 的柠檬酸和 600 μ L 氯仿, 4 000 r/min 离心 15 min, 取下层有机相并且用氮气吹干。加 30 μ L 氯仿使样品重悬, 然后用 TLC 将样品点到硅胶

60 的 F254 薄层层析板(德国 Merck 公司)上,对照三油酰甘油标准品(英国 Nu-Chek 公司)进行脂类分析。展开流动相为正己烷:乙醚:冰醋酸(80:20:1, v/v/v)。最后将显色剂[含 8% (v/v) 的磷酸及 10% (w/v) 的 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$]喷洒在硅胶层析板上,于 140 °C 烘干 10 min 以显色。

1.8 酵母细胞显微观察

荧光染料 Bodipy(美国 Genmed Scientifics 有限公司)是一种亲脂性荧光染料,具有较高的油-水相分配系数,容易快速穿过细胞膜,聚集在细胞质的油滴内,在激发波长 450 ~ 490 nm 的激发下,显示强烈绿色荧光,因而可用于细胞油滴的观察与鉴定^[25]。利用该原理来进行酵母细胞油滴的观察就。首先,吸取 1 mL 菌液到新的 1.5 mL 离心管中,以 13 000 r/min 的转速离心 30 s,小心地弃上清液。加入 1 mL Genmed 缓冲液(Reagent A),充分混匀。再加入 1 μL Genmed 染色液(Reagent B)到离心管,并用手指轻轻弹动离心管,使其充分混匀。室温下避光孵育 10 min,之

后吸取 10 μL 混匀物至载玻片上,利用激光共聚焦显微镜(德国 Leica 公司)观察油滴并摄像。激发波长 490 nm,发射波长 515 nm。

2 结果

2.1 缺刻缘绿藻 DGAT2 的基因特性

对缺刻缘绿藻转录组进行高通量从头测序、拼接、组装与注释^[15]后,发现长度为 1 997 bp 且其序列被重新设计引物并进行 PCR 扩增验证的重叠群(编号 Contig590)所编码蛋白,与莱茵衣藻(*Chlamydomonas reinhardtii*)的 DGAT2(GenBank 登录号:AFB73929.1)有 42% 相似性,与拉曼被孢霉(*Mortierella ramanniana*)的 DGAT2(GenBank 登录号:Q96UY2.1)有 38% 相似性,因而将它命名为 MiDGAT2。经 ORF Finder 预测该基因的开放阅读框(ORF)长 1 056 bp,5'-非翻译区(UTR)长 44 bp,3'-UTR 长 897 bp(图 1)。它编码由 351 个氨基酸所组成的蛋白,其分子量为 39.43 ku,等电点为 9.46。

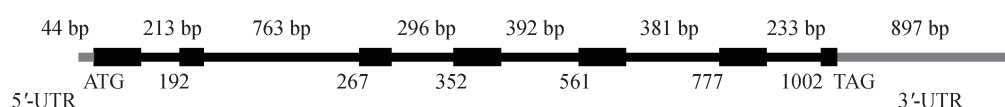


图 1 MiDGAT2 的基因结构示意图

外显子用黑框表示,黑线则代表内含子,非翻译区 UTR 用灰线代表。上排数字为 UTR 和内含子的长度,下排数字为外显子的起始碱基序号。

Fig.1 Gene structure scheme of MiDGAT2

Extron and intron are shown in a black box and in a black line, respectively, while UTR is indicated in a gray line. The numbers above indicate the length of UTRs and introns, respectively, while the numbers below indicate the start base of exons.

根据 MiDGAT2 的 cDNA 序列设计引物并以提取的基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增,序列分析后可知该基因的 DNA 序列全长 3 334 bp。将这个基因的 cDNA 与 DNA 序列进行比对,发现 MiDGAT2 基因含有 6 个内含子(图 1),其长度不等,为 213 ~ 763 bp,所有内含子的剪接位点均符合“GT-AG”规则。

当将 MiDGAT2 与已知功能的 6 个 DGAT2 氨基酸序列进行比对时,发现它们都含有 DGAT2 高度保守序列“HPHG”(图 2),在缺刻缘绿藻的 MiDGAT2 中,它位于第 121 ~ 124 位氨基酸之间。当对小鼠(*Mus musculus*)该保守序列进行突变时,将导致 DGAT2 活性显著降低^[22],因此推测它是一个功能性的结构域或活性位点。经跨膜区预测,可知 MiDGAT2 有 2 个分别位于第 35 ~ 57 位

氨基酸和第 62 ~ 84 位氨基酸的跨膜区(图 2),表明它是一个膜结合蛋白。内质网返回基序的预测结果显示,在 MiDGAT2 羧基端的第 285 ~ 291 位氨基酸之间存在一个“LPRRQPL”的返回基序(图 2),对维持酶蛋白的稳态及酶蛋白随油滴分泌及形成后返回并重新定位于内质网以继续合成 TAG 起着重要作用^[26]。

将来自不同物种的 9 个 DGAT1、15 个 DGAT2 和 1 个 DGAT3 等 3 个家族的部分成员进行聚类分析,所构建的 NJ 系统进化树结果(图 3)表明,MiDGAT2 与同是绿藻的莱茵衣藻 DGAT2 关系较近,并与其他 2 种海洋微藻(*Ostreococcus lucimarinus* 及 *Ostreococcus tauri*)以及微生物、高等植物甚至爪蟾(*Xenopus laevis*)等物种的 DGAT2 共同形成一个大的分

支,显著地(自举值达到 96)不同于 DGAT1 及 DGAT3 这 2 支,不仅表明 MiDGAT2 属于 DGAT2 基因家族成员,而且也预示着 DGAT 这 3 个家族的起源可能不同,却呈现朝着同样功能方向的趋同演化趋势。

2.2 pY-MiDGAT2 表达载体的构建、转化及转化子筛选

根据 MiDGAT2 基因序列设计带有酶切位点的引物,以 cDNA 为模板,经过 PCR 扩增、TA 克隆及序列验证,最终得到 1 071 bp 大小的片

段(图 4-a),其序列及大小,除增加的酶切位点碱基外,与该基因编码序列完全一致。将该片段与克隆载体 pMD19T 连接并转化大肠杆菌,挑选阳性克隆菌以培养、提取质粒 pMD19T-MiDGAT2(图 4-b)并经酶切、测序验证,然后再对该质粒和 pYES2 载体(图 4-c)同时经 *Eco*R I/*Hind* III 双酶切反应,用 T_4 DNA 连接酶将 MiDGAT2 基因的片段与 pYES2 连接,从而获得可适宜在酵母中表达且携带目的基因的 pY-MiDGAT2 载体。

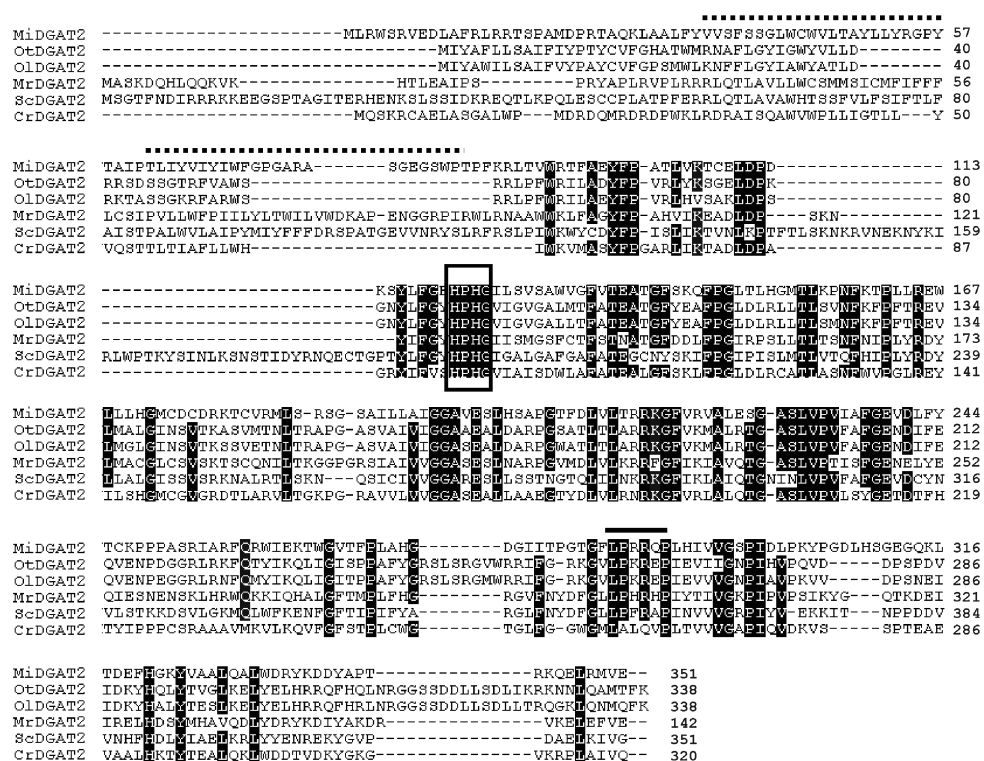


图 2 DGAT2 氨基酸序列比对

MiDGAT2: 缺刻缘绿藻 DGAT2 (本研究); OtDGAT2: *Ostreococcus tauri* DGAT2 (GenBank 登录号: CAL56438); OldGAT2: *Ostreococcus lucimarinus* DGAT2 (GenBank 登录号: XP_001421075); MrDGAT2: 拉曼被孢霉 DGAT2 (GenBank 登录号: ABC94474.1); ScDGAT2: 酿酒酵母 DGAT2 (GenBank 登录号: NP_014888.1); CrDGAT2: 莱茵衣藻 DGAT2 (GenBank 登录号: XP_001702848.1)。黑色方框中是保守序列 HPHG, 黑线下方是内质网返回基序。MiDGAT2 两个预测的跨膜区用虚线在上方标出。

Fig. 2 Sequence alignment of DGAT2 putative proteins

MiDGAT2, *Myrmecia incisa* DGAT2 (this study); OtDGAT2, *Ostreococcus tauri* DGAT2 (GenBank accession No. CAL56438); OldGAT2, *Ostreococcus lucimarinus* DGAT2 (GenBank accession No. XP_001421075); MrDGAT2, *Mortierella ramanniana* DGAT2 (GenBank accession No. ABC94474.1); ScDGAT2, *Saccharomyces cerevisiae* DGAT2 (GenBank accession No. NP_014888.1); CrDGAT2, *Chlamydomonas reinhardtii* DGAT2 (GenBank accession No. XP_001702848.1). Conserved sequence of amino acid HPHG is in a black box, putative C-terminal ER retrieval motif is under a black line. Two putative transmembrane domains are indicated in dashed lines.

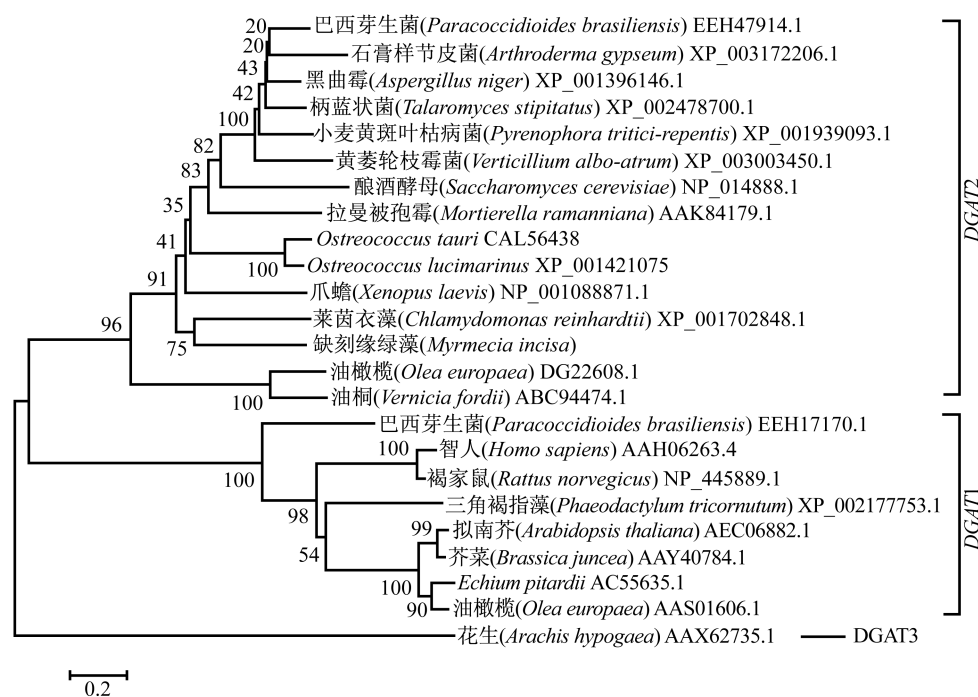


图 3 基于 DGAT 蛋白序列构建的 NJ 系统进化树

节点处的数值为自举值,基因的登录号放在拉丁学名后。

Fig. 3 Neighbor-Joining phylogenetic tree inferred from the deduced amino acid sequences of DGAT genes from various organisms

Numerals at the nodes are bootstrap values. Gene accession number is placed after the Latin name of a species.

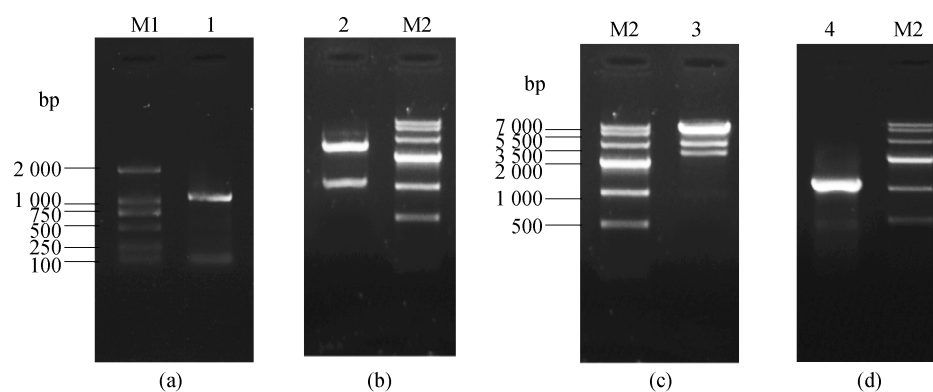


图 4 缺刻缘绿藻 MiDGAT2 基因带酶切位点的 cDNA 扩增产物 (a)、重组质粒的限制性内切酶酶切 (b,c) 及转 MiDGAT2 基因酵母的 PCR 扩增产物电泳图 (d)

M1:DL 2000 分子量标准; M2:DNA IV 分子量标准; 泳道 1:MiDGAT2 基因带酶切位点 cDNA PCR 产物; 泳道 2:*EcoR* I/*Hind* III 双酶切 pMD19T-MiDGAT2 重组质粒; 泳道 3:*EcoR* I/*Hind* III 双酶切 pYES2 载体; 泳道 4:目标产物。

Fig. 4 Electrophoresis patterns of cDNA amplified product (a) of *M. incisa* MiDGAT2 gene, the endonuclear restrictive digestion of the recombinant vectors (b,c) and amplified product from the transgenic yeast containing recombinant vector pY-MiDGAT2 (d)

M1, DL 2 000 marker; M2, DNA IV marker; lane 1, The cDNA PCR product of MiDGAT2 gene; lane 2, The *EcoR* I/*Hind* III-digested pMD19T-MiDGAT2 vector, lane 3, The *EcoR* I/*Hind* III-digested pYES2 vector; lane 4, The target product.

pYES2 载体上有编码尿嘧啶的 *URA3* 基因,在被转化至酵母 H1246 菌株 (*Ura*⁻ 缺陷型)后,由于 pYES2 质粒能自主复制、表达并产生尿嘧啶供

酵母生长,因而将构建好的表达载体 pY-MiDGAT2 采用电穿孔法转化到酵母 H1246 菌株中,在含 2% 半乳糖的固体 SC-U 培养基 (不含尿

嘧啶)上,就可以筛选出转化子。挑取单克隆菌落的转化子进行液体培养后,进行菌落 PCR 验证,扩增得到约 1 071 bp 的目的片段(图 4-d),测序结果与克隆的目的基因序列完全一致。说明已成功利用 pYES2 将 MiDGAT2 基因转化至酵母细胞中,从而筛选得到携带目的基因的转基因酵母。

按照同样的方法将 pYES2 空载体转化至酵母细胞并筛选出不带目的基因的转基因酵母。

2.3 酵母细胞的脂肪分析与油滴观察

自培养的酵母细胞中提取总脂肪后, TLC 分析结果(图 5)显示:scy62 野生型酵母的细胞显然含有 TAG(图 5 中第 1 泳道);但在 TAG 合成缺陷株 H1246 及其转 pYES2 空载体的转基因株的酵母细胞中都没有检测到 TAG 的存在(分别对应于图 5 中第 2 和 3 泳道);当将缺刻缘绿藻的 MiDGAT2 基因转化至 TAG 合成缺陷的酵母株 H1246 中,发现该转基因株可以恢复合成 TAG(图 5 中第 4 泳道)。这个异源表达的互补实验结果说明, MiDGAT2 基因编码的蛋白能使 TAG 合成缺陷的酵母细胞表现出 DGAT 的功能。

利用荧光染料 Bodipy 对酵母细胞进行染色的结果(图 6)显示, TAG 合成缺陷株 H1246 及其转 pYES2 空载体的转基因株的酵母细胞中都没有油滴形成,而转 MiDGAT2 基因的转基因株和

野生型 scy62 酵母细胞中都存在油滴,进一步表明缺刻缘绿藻的 MiDGAT2 基因能使 TAG 合成缺陷的酵母株 H1246 恢复合成 TAG 的能力。不过转 MiDGAT2 基因的转基因株中的油滴明显小于野生型酵母 scy62 的,说明这个基因只能使 TAG 合成缺陷的酵母株 H1246 部分地恢复合成 TAG 的能力。

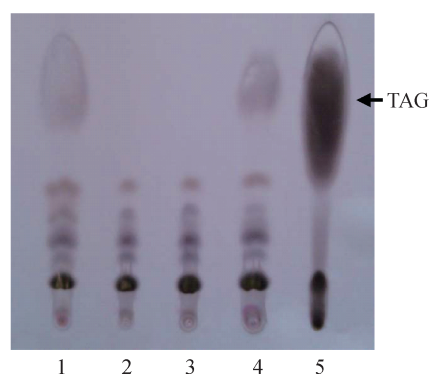


图 5 酵母脂类的薄层色谱图

泳道 1:野生型酵母 scy62;泳道 2:缺陷性酵母 H1246;泳道 3:H1246 转空载体 pYES2;泳道 4:H1246 转重组质粒 pY-MiDGAT2;泳道 5:标准品三油酰甘油(购自英国 Nu-Chek 公司)。

Fig. 5 TLC analysis of yeast lipids

Lane 1, scy62 wild type; lane 2, H1246 mutant; lane 3, H1246 transformed with empty pYES2; lane 4, H1246 transformed with pY-MiDGAT2; lane 5, triolein standard (Nu-Chek).

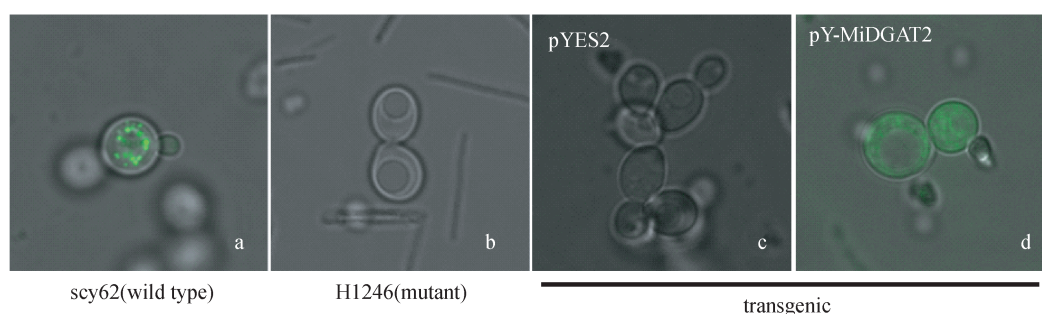


图 6 酵母细胞经荧光染料 Bodipy 染色后的显微图片

a. scy62 系野生型酵母; b. H1246 系 DGAT 缺陷株酵母; c. pYES2 为转空载体株; d. pY-MiDGAT2 为转目的基因株。

Fig. 6 Fluorescent staining of yeast cells with Bodipy

a. scy62 is wild type of yeast; b. H1246 is a mutant lacking of DGAT; c. pYES2 is a transformant with empty vector; d. pY-MiDGAT2 is also a transformant with target gene.

3 讨论

本研究在缺刻缘绿藻转录组测序、拼接及注释的基础上,克隆了 1 个编码 DGAT 的基因。通过序列比对(图 2)、NJ 系统演化树(图 3)构建等

特征分析,认为它编码缺刻缘绿藻的 DGAT2。为了证实其功能,利用 DGAT 缺陷型酵母进行互补实验,酵母脂类的 TLC 分析结果(图 5)显示, MiDGAT2 能使该缺陷型酵母株重新恢复合成 TAG 的能力,但细胞荧光染色的结果(图 6)表明

转基因酵母的油滴没有野生型的明显。导致这一现象的可能原因至少有 2 点。其一,酵母 TAG 合成缺陷株 H1246 缺乏 4 个基因,它们是 *DGA1*、*LRO1*、*ARE1* 和 *ARE2*,且都与 TAG 合成有关。其中,*DGA1* 属于 DGAT2 基因家族,在酵母 TAG 的合成中起主要作用^[23]。而本研究的互补实验只转 1 个类似于 *DGA1* 的 *MiDGAT2* 的基因,其他 3 个类似的基因仍没有补足,以致在转 *MiDGAT2* 的酵母株中没有发现野生型酵母细胞那么明显的油滴(图 6)。如果将酵母的 *DGA1* 基因转入缺陷株作为对照,可能会更清楚地表明 *MiDGAT2* 基因对酵母细胞 TAG 合成及油滴形成的贡献程度。其二,酵母与缺刻缘绿藻毕竟是 2 个不同的真核生物,正如 Wagner 等^[27]对 *Ostreococcus tauri* 这种海洋绿藻的 DGAT2 基因功能研究后所认为的那样,缺刻缘绿藻的 DGAT2 基因能否完全地在酵母的表达系统中表现出活性难以确定。

另外,从真核细胞所具有的 DGAT 家族类型也能理性地推测出这个 DGAT2 基因或许在缺刻缘绿藻的 TAG 合成及油滴形成过程中只贡献部分作用。DGAT1 家族的基因首先是利用与老鼠酰基-CoA—胆固醇酰基转移酶的同源性克隆得到的^[28],此后,类似的基因也在拟南芥^[29-30]和其他物种^[31-36]中克隆到。DGAT2 基因家族,于 2001 年在拉曼被孢霉中被发现^[37],后来在其他物种中也发现它的存在^[38]。通过同源性搜索,Chen 等^[39]在所有可获得数据的藻类中发现,除了 *Ostreococcus lucimarinus* 及 *Ostreococcus tauri* 没有 DGAT1 外,其他藻类都含有 DGAT1 和 DGAT2 这 2 个家族基因,且 DGAT2 家族基因都有几个同功型(isoform),这点不同于其他真核生物。例如莱茵衣藻存在 *DGAT2a*、*DGAT2b* 和 *DGAT2c* 等 3 个基因^[40],*Ostreococcus tauri* 也如此^[27]。其实,在缺刻缘绿藻转录组测序的数据^[15]中,通过搜索,该藻也存在 DGAT1 和 DGAT2 家族成员多个基因的同源序列,它们的特性与功能都有待进一步探讨。这些都预示着藻类在沿着 Kennedy 途径合成 TAG 的最后一步可能有多个类型的 DGAT 参与。

总之,在了解基因特性的基础上,通过酵母的异源表达进一步探讨缺刻缘绿藻 *MiDGAT2* 基因的功能,为缺刻缘绿藻 TAG 合成途径与调控机制以及基于微藻 TAG 生产生物柴油的研究与开发

打下了坚实基础。

衷心感谢瑞典农业科学大学 Sten Stymne 教授惠赠的酵母缺陷株及其突变的出发株。感谢上海交通大学张大兵教授在激光共聚焦显微镜方面提供的方便。

参考文献:

- [1] Ma F, Hanna M A. Biodiesel production: A review [J]. *Bioresource Technology*, 1999, 70(1): 1-15.
- [2] Chisti Y. Biodiesel from microalgae [J]. *Biotechnology Advances*, 2007, 25(3): 294-306.
- [3] Dircks L, Sul H S. Acyltransferases of de novo glycerophospholipid biosynthesis [J]. *Progress in Lipid Research*, 1999, 38(5-6): 461-479.
- [4] Lehner R, Kuksis A. Biosynthesis of triacylglycerols [J]. *Progress in Lipid Research*, 1996, 35(2): 169-201.
- [5] Cahoon E B, Shockey J M, Dietrich C R, et al. Engineering oilseeds for sustainable production of industrial and nutritional feedstocks: Solving bottlenecks in fatty acid flux [J]. *Current Opinion in Plant Biology*, 2007, 10(3): 236-244.
- [6] Bao X, Ohlrogge J. Supply of fatty acid is one limiting factor in the accumulation of triacylglycerol in developing embryos [J]. *Plant Physiology*, 1999, 120(4): 1057-1062.
- [7] Katavic V, Reed D W, Taylor D C, et al. Alteration of seed fatty acid composition by an ethyl methanesulfonate-induced mutation in *Arabidopsis thaliana* affecting diacylglycerol acyltransferase activity [J]. *Plant Physiology*, 1995, 108(1): 399-409.
- [8] Jako C, Kumar A, Wei Y, et al. Seed-specific overexpression of an *Arabidopsis* cDNA encoding a diacylglycerol acyltransferase enhances seed oil content and seed weight [J]. *Plant Physiology*, 2001, 126(2): 861-874.
- [9] Perry H J, Bligny R, Gout E, et al. Changes in Kennedy pathway intermediates associated with increased triacylglycerol synthesis in oil-seed rape [J]. *Phytochemistry*, 1999, 52(5): 799-804.
- [10] Settlage S B, Kwanyuen P, Wilson R F. Relation between diacylglycerol acyltransferase activity and oil concentration in soybean [J]. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 1998, 75(7): 775-781.

- [11] Giannoulia K, Haralampidis K, Poghosyan Z, *et al.* Differential expression of diacylglycerol acyltransferase (DGAT) genes in olive tissues [J]. *Biochemical Society Transactions*, 2000, 28 (6): 695 – 697.
- [12] Zheng P, Allen W B, Roesler K, *et al.* A phenylalanine in DGAT is a key determinant of oil content and composition in maize [J]. *Nature Genetics*, 2008, 40(3): 367 – 372.
- [13] Lung S C, Weselake R J. Diacylglycerol acyltransferase: A key mediator of plant triacylglycerol synthesis [J]. *Lipids*, 2006, 41 (12): 1073 – 1088.
- [14] Ouyang L L, Du D H, Yu S Y, *et al.* Expressed sequence tags analysis revealing the taxonomic position and fatty acid biosynthesis in an oleaginous green microalga, *Myrmezia incisa* Reising (Trebouxiophyceae, Chlorophyta) [J]. *Chinese Science Bulletin*, 2012, 57(25): 3342 – 3352.
- [15] 陈思弘, 周志刚. 缺刻缘绿藻转录组测序及脂质代谢相关基因注释 [J]. *上海海洋大学学报*, 2012, 21 (5): 662 – 670.
- [16] Stanier R Y, Kunisawa R, Mandel M, *et al.* Purification and properties of unicellular blue-green algae (order Chroococcales) [J]. *Bacteriological Reviews*, 1971, 35(2): 171 – 205.
- [17] 童牧, 于水燕, 欧阳珑玲, 等. 氮饥饿与磷饥饿促使缺刻缘绿藻花生四烯酸含量增加的比较 [J]. *水产学报*, 2011, 35(5): 763 – 773.
- [18] 杜道海, 周志刚. 缺刻缘绿藻总 RNA 提取方法的比较研究 [J]. *华北农学报*, 2008, 23 (B10): 103 – 106.
- [19] Richards E, Reichardt M, Rogers S. Preparation of genomic DNA from plant tissue [M] // Ausubel F M, Brent R, Kingston R, *et al.* *New York: Current Protocols in Molecular Biology*, 2003: 231 – 237.
- [20] 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(8): 1596 – 1599.
- [21] Thompson J D, Gibson T J, Plewniak F, *et al.* The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools [J]. *Nucleic Acids Research*, 1997, 25 (24): 4876 – 4882.
- [22] Stone S J, Levin M C, Farese R V. Membrane topology and identification of key functional amino acid residues of murine acyl-CoA: diacylglycerol acyltransferase-2 [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2006, 281 (52): 40273 – 40282.
- [23] Sandager L, Gustavsson M H, Ståhl U, *et al.* Storage lipid synthesis is non-essential in yeast [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2002, 277(8): 6478 – 6482.
- [24] Bligh E G, Dyer W J. A rapid method of total lipid extraction and purification [J]. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, 1959, 37 (8): 911 – 917.
- [25] Elamin A A, Stehr M, Spallek R, *et al.* The *Mycobacterium tuberculosis* Ag85A is a novel diacylglycerol acyltransferase involved in lipid body formation [J]. *Molecular Microbiology*, 2011, 81 (6): 1577 – 1592.
- [26] McCartney A W, Dyer J M, Dhanoa P K, *et al.* Membrane-bound fatty acid desaturases are inserted co-translationally into the ER and contain different ER retrieval motifs at their carboxy termini [J]. *Plant Journal*, 2004, 37(2): 156 – 173.
- [27] Wagner M, Hoppe K, Czabany T, *et al.* Identification and characterization of an acyl-CoA: diacylglycerol acyltransferase 2 (DGAT2) gene from the microalga *O. tauri* [J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2010, 48(6): 407 – 416.
- [28] Cases S, Smith S J, Zheng Y W, *et al.* Identification of a gene encoding an acyl CoA: diacylglycerol acyltransferase, a key enzyme in triacylglycerol synthesis [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1998, 95 (22): 13018 – 13023.
- [29] Hobbs D H, Lu C, Hills M J. Cloning of a cDNA encoding diacylglycerol acyltransferase from *Arabidopsis thaliana* and its functional expression [J]. *FEBS Letters*, 1999, 452(3): 145 – 149.
- [30] Routaboul J M, Benning C, Bechtold N, *et al.* The TAG1 locus of *Arabidopsis* encodes for a diacylglycerol acyltransferase [J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 1999, 37(11): 831 – 840.
- [31] Bouvier-Navé P, Benveniste P, Oelkers P, *et al.* Expression in yeast and tobacco of plant cDNAs encoding acyl-CoA: diacylglycerol acyltransferase [J]. *European Journal of Biochemistry*, 2000, 267 (1): 85 – 96.
- [32] Nykiforuk C L, Furukawa-Stoffer T L, Huff P W, *et al.* Characterization of cDNAs encoding diacylglycerol acyltransferase from cultures of *Brassica napus* and sucrose mediated induction of enzyme biosynthesis [J]. *Biochimica et Biophysica*

- Acta,2002,1580(2-3):95-109.
- [33] He X, Turner C, Chen G Q, *et al.* Cloning and characterization of a cDNA encoding diacylglycerol acyltransferase from castor bean[J]. *Lipids*,2004,39(4):311-318.
- [34] Milcamps A, Tumaney A W, Paddock T, *et al.* Isolation of a gene encoding a 1,2-diacylglycerol-sn-acetyl-CoA acetyltransferase from developing seeds of *Euonymus alatus* [J]. *Journal of Biological Chemistry*,2005,280(7):5370-5377.
- [35] Wang H W,Zhang J S, Gai J Y, *et al.* Cloning and comparative analysis of the gene encoding diacylglycerol acyltransferase from wild type and cultivated soybean [J]. *Theoretical and Applied Genetics*,2006,112(6):1086-1097.
- [36] Shockey J M,Gidda S K, Chapital D C, *et al.* Tung tree DGAT1 and DGAT2 have nonredundant functions in triacylglycerol biosynthesis and are localized to different subdomains of the endoplasmic reticulum[J]. *Plant Cell*,2006,18(9):2294-2313.
- [37] Lardizabal K D, Mai J T, Wagner N W, *et al.* DGAT2 is a new diacylglycerol acyltransferase gene family;Purification, cloning, and expression in insect cells of two polypeptides from *Mortierella ramanniana* with diacylglycerol acyltransferase activity[J]. *Journal of Biological Chemistry*,2001,276(42):38862-38869.
- [38] Kroon J T,Wei W, Simon W J, *et al.* Identification and functional expression of a type 2 acyl-CoA: diacylglycerol acyltransferase(DGAT2) in developing castor bean seeds which has high homology to the major triglyceride biosynthetic enzyme of fungi and animals [J]. *Phytochemistry*, 2006, 67 (23): 2541-2549.
- [39] Chen J E, Smith A G. A look at diacylglycerol acyltransferases(DGATs) in algae [J]. *Journal of Biotechnology*,2012,162(1):28-39.
- [40] La Russa M,Bogen C,Uhmeyer A, *et al.* Functional analysis of three type-2 DGAT homologue genes for triacylglycerol production in the green microalga *Chlamydomonas reinhardtii* [J]. *Journal of Biotechnology*,2012,162(1):13-20.

Characterization and functional identification of an acyl-CoA : diacylglycerol acyltransferase 2 (DGAT2) gene from the green microalga *Myrmecia incisa*

FANG Fengli¹, WU Hong², ZHOU Zhigang^{1*}

(1. College of Fisheries and Life Science, Aquaculture Division, E-Institute of Shanghai University,
Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;

2. State Key Laboratory of Coal-Based Low Carbon Energy, Xin'ao Scientific & Technological
Development Co. Ltd., Langfang 065001, China)

Abstract: Acyl-CoA :diacylglycerol acyltransferase (DGAT; EC 2.3.1.20) is regarded as a key enzyme in triacylglycerol (TAG) biosynthesis of microalgae and other plants. In order to understand the biosynthesis of TAG in *Myrmecia incisa*, we found a putative full-length DGAT2 cDNA sequence in the homology search of a pyrosequencing transcriptome of this microalga. The full-length cDNA sequence was composed of 1 997 bp. It comprised a 44-bp 5'-untranslated region (UTR), a 897-bp 3'-UTR with a typical poly A tail, and a 1 056 bp open reading frame (ORF) encoding a 351-amino-acid protein with a putative molecular weight of 39.43 ku and *pI* at 9.46. Neighbor-Joining (NJ) phylogenetic tree inferred from the putative proteins of *DGAT* genes indicated that this gene belongs to DGAT2 gene family, significantly different from DGAT1 and DGAT3 families. Multiple sequence alignment of amino acids indicated that a conserved and characteristic sequence HPHG of the DGAT2's was present in this gene. Therefore, this gene was designated as *MiDGAT2*. Compared with the DNA sequence of *MiDGAT2*, it was found that its coding region was interrupted by 6 introns with all splicing sites well matching the GT-AG rule. In order to investigate the function of *MiDGAT2*, its open reading frame was amplified by RT-PCR and sub-cloned into the shuttle vector pYES2 to generate the recombinant vector pY-*MiDGAT2*. This recombinant plasmid was transformed into a TAG-defective mutant H1246 of *Saccharomyces cerevisiae* for expression by electroporation. The target gene integrated in the yeast genome was confirmed by sequencing and a transformant with pY-*MiDGAT2* was screened out. This yeast transformant was cultured in SC medium with galactose as an inducer. Thin layer chromatogram (TLC) analysis of yeast lipids showed that the TAG-defective mutant H1246 transformed with *MiDGAT2* could restore the ability to synthesize TAG, indicating that *MiDGAT2* encodes a DGAT enzyme involved in the biosynthesis of TAG. When the yeast cells were stained with fluorescent dye Bodipy, it was found that lipid droplets were present in the TAG-defective mutant H1246 transformed with *MiDGAT2*, although the diameter of lipid droplets was smaller than that of wild type.

Key words: *Myrmecia incisa*; *Saccharomyces cerevisiae*; diacylglycerol acyltransferase (DGAT); triacylglycerol (TAG); lipid droplet

Corresponding author: ZHOU Zhigang. E-mail: zgzhou@shou.edu.cn