

中华绒螯蟹 *FAD6-b* 基因的全长克隆及原核表达分析

杨志刚, 姚琴琴, 成永旭*, 施秋燕, 杨青,
何杰, 马明君, 王瑶, 常东

(上海海洋大学农业部淡水水产种质资源重点实验室, 上海 201306)

摘要: 根据已登录的中华绒螯蟹一种 $\Delta 6$ 去饱和酶基因(Accession Number: JX946434)及菁夜蛾去饱和酶基因(Accession Number: KJ622055.1)的保守区设计引物, 通过逆转录PCR以及RACE技术克隆了中华绒螯蟹另一种 $\Delta 6$ 去饱和酶基因*FAD6-b*的全长序列。经序列分析, 中华绒螯蟹*FAD6-b* cDNA全长为2 310 bp, 其中开放阅读框(ORF)为1 326 bp, 共编码442个氨基酸(Accession Number: KP876058), 理论分子量为50.86 ku, 理论等电点为8.47, *FAD6-b*基因的氨基酸序列与已公布的一条中华绒螯蟹 $\Delta 6$ 去饱和酶基因的一致性为76%。原核表达载体构建及其表达实验表明, 中华绒螯蟹*FAD6-b*基因成功重组到原核表达载体pCold-TF DNA中, 重组质粒pCold TF-fad6b在大肠杆菌BL21(DE3)pLysS中进行表达, 经SDS-PAGE电泳分析表明, IPTG诱导后的重组菌出现了单一的蛋白条带, 且大小与预期(105.86 ku)一致, 可溶性分析显示目的蛋白主要存在于蛋白上清液中。对重组蛋白进行纯化, 蛋白纯化液经电泳检测后显示出特异性单一条带, 进一步证明了pCold TF-fad6b的成功构建和表达。目的蛋白经Western-blotting检测, 结果表明获得的重组蛋白与6×His抗体进行了特异性结合, 显示出良好的免疫学活性。

关键词: 中华绒螯蟹; $\Delta 6$ 脂肪酸去饱和酶; 基因克隆; 原核表达

中图分类号: Q 785; S 966.1

文献标志码: A

脂肪酸去饱和酶(fatty acid desaturase, FAD)能够催化饱和脂肪酸(saturated fatty acids)或不饱和脂肪酸(unsaturated fatty acids, UFAs)在酰基链上形成双键, 使脂肪酸的不饱和程度得以提高^[1]。FAD几乎存在于所有生物体中, 并具有很多种类^[2], 其可被分为可溶性的酰基-ACP去饱和酶和膜结合去饱和酶2类, 其中膜结合去饱和酶又包括酰基-CoA去饱和酶和酰基-lipid去饱和酶2种^[3]。膜结合去饱和酶在结构上具有组氨酸保守区和血红素结合域(HPGG)等典型特征^[4]。脂肪酸去饱和酶 $\Delta 6$ (fatty acid desaturase $\Delta 6$, FAD6)属于酰基-CoA去饱和酶, 是一种膜内在蛋白, 目前对膜结合蛋白的分离和纯化仍存在很

大困难。FAD6是合成长链多不饱和脂肪酸(long chain polyunsaturated fatty acids, LC-PUFAs)的限速酶^[5], 在脂肪酸代谢过程中发挥了重要作用, 其在高度不饱和脂肪酸(highly unsaturated fatty acids, HUFAs)的合成中, 能够催化饱和脂肪酸的第一步去饱和过程^[6-7], 可分别以亚麻酸(18:3n-3)和亚油酸(18:2n-6)为底物, 催化合成18:4n-3和18:3n-6, 另外, 在EPA(20:5n-3)合成DHA(22:6n-3)的过程中, FAD6也发挥重要作用^[5-8]。FAD6的研究在很多脊椎动物中得到了广泛关注, 而在无脊椎动物中的研究较少。

中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*), 又称河蟹, 作为一种极具营养价值和经济价值的水产动

收稿日期: 2015-03-26 修回日期: 2015-08-02

资助项目: 国家“八六三”高技术研究发展计划(2012AA10A409-5); 国家自然科学基金(31472287); 上海教委知识服务平台专项(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专项(12XD1402700); 上海市科技兴农重点攻关专项(沪农科2013第5-7号)

通信作者: 成永旭, E-mail: yxcheng@shou.edu.cn

物, 其体内含有十分丰富的PUFAs, 成为提供人体PUFAs的一种重要的食物来源。本研究采用反转录PCR (RT-PCR)和cDNA末端快速扩增(RACE)方法获得中华绒螯蟹*FAD6-b*基因的全长序列, 对其进行序列分析, 并选择适合的原核表达载体pCold-TF DNA, 成功构建了重组表达载体pCold TF-fad6b, 并对重组蛋白进行了纯化和Western-blotting验证, 旨在为进一步研究中华绒螯蟹*FAD6-b*基因的功能提供基础资料, 为*FAD6-b*蛋白的纯化及抗体制备提供参考。

1 材料与方法

1.1 实验材料

健康成熟的中华绒螯蟹(体质量约60 g)取自上海海洋大学竖新养殖基地; 实验用表达宿主菌BL21(DE3)pLysS购自北京天根生化科技有限公司; 原核表达载体pCold TF DNA购自TaKaRa公司。

1.2 中华绒螯蟹总RNA的提取与反转录

取0.1 g肝胰腺组织于液氮中充分研磨, 参照RNAiso™ Plus(TaKaRa)操作说明书进行总RNA的提取, 经1%琼脂糖凝胶电泳检测RNA完整性, 用微量紫外分光光度计(Q5000)检测RNA的纯度, 并于-80 °C超低温冰箱中保存。参照Primscript™ Reverse transcriptase (TaKaRa)说明书, 取-80 °C冰箱中中华绒螯蟹肝胰腺总RNA 1 μg作为反转录模板, 进行第一链cDNA的合成, 产物待用于PCR的扩增; 利用SMART™ RACE cDNA Amplification Kit(Clontech)反转录合成cDNA第一链, 分别作为中华绒螯蟹*FAD6-b*基因3'和5'端序列快速扩增的模板。

1.3 引物设计和PCR扩增反应

根据GenBank中已登录的中华绒螯蟹的一种Δ6去饱和酶基因(Accession Number: JX946434)及

菁夜蛾(*Agrotis segetum*)去饱和酶基因(Accession Number: KJ622055.1)的保守区序列设计引物FAD6b-F1(+)/FAD6b-R1(-), 并由生工生物工程(上海)股份有限公司合成(表1)。以FAD6b-F1(+)/FAD6b-R1(-)为引物, 以中华绒螯蟹的cDNA为模板进行*FAD6-b*基因cDNA片段的扩增。PCR反应体系: cDNA模板2 μL, dNTP Mixture(2.5 mmol/L) 4 μL, 上下游引物(10 μmol/L)各1 μL, 10×PCR buffer 5 μL, rTaq酶(5 U/μL) 0.5 μL, 加灭菌超纯水至总体积50 μL。PCR反应条件: 94 °C预变性5 min; 94 °C变性30 s, 57 °C退火30 s, 72 °C延伸30 s, 30个循环; 72 °C延伸10 min, 4 °C保存。从扩增产物中取5 μL经1.2%琼脂糖凝胶电泳检测其扩增结果。再按琼脂糖凝胶DNA回收试剂盒(TaKaRa)中的操作说明对PCR特异性扩增产物进行纯化回收, 并连接至pMD-19T载体(TaKaRa), 连接产物经热激转化至大肠杆菌Top10(Tiagen)感受态细胞中, 将转化产物于37 °C 200 r/min条件下振荡培养1~2 h, 涂布至含有X-Gal、IPTG和氨苄的LB固体培养基上, 并于恒温培养箱中37 °C过夜培养(12~16 h)。次日进行蓝白斑挑选后接种于含氨苄的LB液体培养基中, 振荡培养3~5 h, 经菌液PCR初步鉴定后, 将阳性克隆挑选出送至生工生物工程(上海)股份有限公司进行双向测序。

1.4 *FAD6-b*基因cDNA的克隆

根据获得的*FAD6-b*基因片段设计3'RACE上游引物FAD6b-3'(+)、5'RACE下游引物FAD6b-5'(-)(表1), 以SMART™ RACE cDNA Amplification Kit(Clontech)反转录合成的cDNA第一链为模板, 分别用3'RACE和5'RACE引物与SMART™ RACE cDNA Amplification Kit中的通用引物(UPM)配对, 并按照SMART™ RACE cDNA

表1 核苷酸引物序列

Tab. 1 Oligo nucleotide primer sequence

引物名称 primer name	核苷酸序列(5'-3') sequence	用途 usage
universal primer mix (UPM)	CTAATACGACTCACTATAGGGC	RACE
FAD6b-F1(+)	CTCACCTGTGAGCTCCTCACG	RT-PCR
FAD6b-R1(-)	GAGCTCAACAGTGCGCAGGAG	RT-PCR
FAD6b-3'(+))	AGGGACAGATACGAGGTGGCGGG	3' RACE
FAD6b-5'(-)	CACAAACGACCATAAAGGCGAGAGCAGT	5' RACE

Amplification Kit推荐的反应体系和反应条件进行 *FAD6-b* 基因3'端序列和5'端序列的扩增。PCR扩增产物的回收纯化、克隆和测序与 *FAD6-b* 基因片段的克隆所述相同。

1.5 序列的拼接与生物信息学分析

使用DNASTar 5.0.1软件对测序得到的结果进行序列拼接,用ORF (open reading frame) finder软件(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>)寻找 *FAD6-b* 基因的开放阅读框;利用BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi)、ClustalW及DNAMAN等软件进行序列的验证、翻译及蛋白质相似性分析;使用Compute pI-Mw (http://cn.expasy.org/tools/pi_tool.html)计算蛋白质等电点和相对分子质量;分别用SignalP 4.1 Server(<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)和TMHMM2.0程序预测其信号肽和跨膜结构(<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>)。用MEGA 5.0软件的邻接法(Neighbor-Joining, NJ)构建系统进化树。

1.6 重组表达载体pCold TF-fad6b的构建

依据已获得中华绒螯蟹 *FAD6-b* 基因的全长序列(GenBank Accession no.KP876058)和原核表达载体pCold-TF DNA(TaKaRa)的序列特征,利用Primer Premier 5.0软件设计上下游引物,以中华绒螯蟹肝胰腺组织的cDNA为模板扩增 *FAD6-b* 基因开放阅读框(ORF),上游引物FAD6b-F2序列为5'-AGAGAGCTCATGGCACCTCGTGAGG-3',下游引物FAD6b-R2序列为5'-ATAGGATCCCTAAGAAGCTTTTTTC-3',并分别在上下游引物中引入了 *Sac* I和 *Bam* HI酶切位点(下划线标注)。以FAD6b-F2/FAD6b-R2为引物,以反转录得到的中华绒螯蟹肝胰腺cDNA为模板,用高保真酶(Tiagen)扩增 *FAD6-b* 基因的ORF序列,PCR反应体系: cDNA模板1 μ L, dNTP Mixture (2.5 mM) 4 μ L, 上下游引物(10 μ M)各0.5 μ L, 10 \times PCR buffer 2.5 μ L, Taq Plus DNA Polymerase (2.5 U/ μ L) 0.5 μ L, 加灭菌超纯水至总体积25 μ L。PCR反应条件: 94 $^{\circ}$ C预变性5 min; 94 $^{\circ}$ C变性30 s, 58 $^{\circ}$ C退火30 s, 72 $^{\circ}$ C延伸1 min, 共30个循环; 72 $^{\circ}$ C延伸10 min, 4 $^{\circ}$ C保存。取PCR扩增产物5 μ L经1%的琼脂糖凝胶电泳检测扩增结果,再将所有目的产物依据琼脂糖凝胶DNA回收试剂

盒(Tiagen)中的说明书进行回收纯化,回收产物与pGEM-T载体(Promega)进行连接,连接产物转化至大肠杆菌Top10感受态细胞(Tiagen)中,转化产物在37 $^{\circ}$ C、200 r/min条件下振荡培养1~2 h后涂布于含有X-Gal、IPTG以及氨苄的LB固体培养基上,培养基置于恒温培养箱中,经37 $^{\circ}$ C过夜培养。次日在长出的蓝白斑菌落中挑选白斑,接种于LB液体培养基(含氨苄)中继续振荡培养4~5 h,再进行菌液PCR验证,筛选阳性克隆由生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序。

取测序结果正确的pGEM-fad6b阳性克隆菌株、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,按照质粒小量提取试剂盒(北京索莱宝科技有限公司)中的操作说明分别抽提pGEM-fad6b和pCold-TF DNA质粒。使用限制性内切酶 *Bam* HI和 *Sac* I对原核表达载体pCold-TF DNA和pGEM-fad6b质粒进行双酶切,用1%的琼脂糖电泳检测酶切产物,并回收目的产物,再将回收的表达载体pCold-TF DNA与fad6-b片段用T₄ DNA连接酶在16 $^{\circ}$ C条件下连接4 h,构建成重组表达载体pCold TF-fad6b。将连接产物转化至 *E. coli* Top10感受态细胞,并于37 $^{\circ}$ C、200 r/min条件下振荡培养1 h,再涂布于含氨苄的LB固体培养基上,置于恒温培养箱中37 $^{\circ}$ C过夜培养后挑选阳性克隆菌株,经菌落PCR和双酶切实验验证后,将菌株送至生工生物工程(上海)股份有限公司测序,测序正确的菌株用15%的甘油保存菌种,并存储于-80 $^{\circ}$ C冰箱中待用。

1.7 pCold TF-fad6b在大肠杆菌中的诱导表达分析

取-80 $^{\circ}$ C冰箱中的阳性重组pCold TF-fad6b菌液,复性培养后抽提其质粒,将其重新转化入大肠杆菌BL21(DE3)pLysS中,构建成重组菌株BL21/pCold TF-fad6b,于含氨苄青霉素终浓度为100 μ g/mL、氯霉素终浓度为34 μ g/mL的LB固体培养基中过夜培养,次日挑取阳性克隆菌株送测序,并将测序正确的菌株甘油保种于-80 $^{\circ}$ C冰箱中,待用。

分别将5 μ L重组菌株BL21/pCold TF-fad6b、空载体菌株BL21/pCold TF接种于2 mL LB液体培养基中(已加入100 μ g/mL氨苄青霉素和

34 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 氯霉素), 37 $^{\circ}\text{C}$ 200 r/min条件下过夜活化, 然后以1:100比例加入到50 mL的LB液体培养基中(含100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 氨苄青霉素和34 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 氯霉素), 37 $^{\circ}\text{C}$ 200 r/min条件下继续培养, 当 OD_{600} 达到0.6~0.8时, 分别往对照组(BL21/pCold)和实验组(BL21/pCold TF-fad6b)菌液中加入IPTG进行诱导, IPTG终浓度为0.3 mmol/L, 15 $^{\circ}\text{C}$ 诱导表达10 h。参照细菌蛋白提取试剂盒(生工生物工程上海股份有限公司)中的操作说明提取蛋白: 取诱导的BL21/pCold TF-fad6b菌液、未诱导的BL21/pCold TF-fad6b菌液和诱导的BL21/pCold菌液各20 mL, 12 000 r/min下离心5 min, 收集细菌的细胞沉淀并称取其湿重, 按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已加入1 μL DTT、10 μL PMSF、2 μL Lysozyme和2 μL DNaseI, 反复吹吸使之成为均匀悬液, 再置于37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温摇床280 r/min振荡30 min, 然后在4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下以15 000 r/min的转速离心5 min, 收集诱导后的BL21/pCold TF-fad6b的蛋白上清液作为可溶性部分待检测, 剩下的沉淀用250 μL 提取试剂涡旋振荡重悬。将得到的BL21/pCold TF-fad6b上清液与沉淀悬浮液、诱导的BL21/pCold TF-fad6b蛋白全液、未诱导的BL21/pCold TF-fad6b蛋白全液等分别经10% SDS-PAGE电泳以检测目的蛋白的表达情况。

1.8 pCold TF-fad6b重组蛋白的纯化

取存储于-80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中的保种菌2 mL, 经活化培养后在37 $^{\circ}\text{C}$ 下进行大量培养(200 mL), 当菌液 OD_{600} 值达0.6~0.8时加入IPTG(终浓度为0.3 mmol/L), 15 $^{\circ}\text{C}$ 诱导15 h, 于4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下12 000 r/min离心5 min, 用PBS缓冲液吹洗数遍后收集菌体, 并称量菌体的湿重, 按每克菌体加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, 再向菌体悬浮液中加入100 μL PMSF, 冰浴中进行超声波破碎, 400 W超声4 s间隔6 s, 共超声100次。将超声后的液体在4 $^{\circ}\text{C}$ 下12 000 r/min离心5 min, 收集上清液, 继续将此上清液12 000 r/min离心5 min, 再取其上清液, 用0.22 μm 滤头过滤上清液, 以除去颗粒物, 收集过滤液并保存于-20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中备用。

使用含His标签的镍离子亲和层析柱对蛋白

质进行纯化: 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液(流速为0.5~1 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 mmol/L Na_3PO_4 ; pH 7.4)进行洗脱, 收集洗脱液, 并用10% SDS-PAGE电泳检测。

1.9 重组蛋白的Western-blotting验证

取纯化前的蛋白上清液、经纯化的蛋白溶液、未诱导的BL21/pCold TF-fad6b蛋白上清液和经诱导的BL21/pCold TF蛋白上清液, SDS-PAGE电泳后用湿转法将凝胶上的蛋白转印至PVDF膜上, 使用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 $^{\circ}\text{C}$ 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 *FAD6-b*基因cDNA全长克隆及其序列分析

利用设计的FAD6b-F1(+)/FAD6b-R1(-)特异性引物, 以中华绒螯蟹肝胰腺cDNA为模板扩增得到*FAD6-b*基因的部分片段, 并依据此序列设计3'RACE和5'RACE引物进行RACE扩增, 克隆得到cDNA全长序列。中华绒螯蟹*FAD6-b*基因的cDNA序列全长为2 310 bp, 包括183 bp的5'UTR区域、1 326 bp的ORF和801 bp的3'UTR区域, 共编码442个氨基酸, 其中3'UTR区域具有典型的加尾信号AATAAA和polyA尾(图1), 经SignalP 4.1在线分析, *FAD6-b*的N端不含信号肽序列, 利用TMHMM2.0分析显示*FAD6-b*基因具有4次跨膜结构, 该cDNA序列编码的氨基酸分子量和蛋白理论等电点分别为50.86 ku和8.47。BLAST分析序列显示, *FAD6-b*的全长序列包括3个组氨酸簇保守区、1个细胞色素b5结构域以及血红素结合域HPGG(图2), 这些皆为去饱和酶结构上的典型特征, 并经多序列比对表明, 该基

1 CGATCAGTTCGATGATCGGGCCGCCTATTCGGCCGCGTGAATTCGAGTCTCATAGGACGCA
 61 CTATAGGGAAAGGGGAGGTATCGACGCCAAGCCCCTGGACGAAGTGC GACTCGTCGGGGC
 121 AGCAGTGTCCGTGCCGTCTACAACACAGGGTTAAAAAGAGGTACTTTTAAACCTGCTAC
 1 M A P R E G D S Q S G D S S I K L T A Y
 181 AGC[ATG]GCACCTCGTGAGGGTACTCCCAGAGTGGTGACAGCAGCATCAAGCTAACCGCTTAC
 21 K K F P T N Y P H K T F Q E W L S A K R
 244 AAAAAGTTTCCAACAAACTACCCGCACAAGACCTTCCAGGAGTGGCTAAGCGCGAAGAGA
 41 I D D D V G P Y W R V H D K L Y D L T D
 304 ATAGATGATGATGTTGGTCCCTACTGGCGAGTGCACGACAAGCTCTATGACCTCACAGAC
 61 F I D K H P G G K M W L Q V T K G T D I
 364 TTCATCGACAAACACCCAGGAGGGAAGATGTGGCTGCAGGTGACCAAGGGCACAGACATC
 81 T E A F E A S H I G E G P E K L L Q K Y
 424 ACGGAAGCCTTTGAGGCTTCACACATCGGTGAAGGACCGGAGAAGCTCCTTCAGAAATAC
 101 Y I K D T K T P R N S P Y T F H E N G F
 484 TACATCAAAGACACCAAAAACCCAGGAATTCGCCGTACACCTTTCACGAAAATGGCTTC
 121 Y K T L K R R V R P I L K N L G R G P S
 544 TACAAAACCTTGAAACGAAGGGTACGACCCATCCTGAAAAACCTTGACGAGGCCCTCC
 141 W K T V L I Q D A L A L S F V L L T L A
 604 TGGAAAACAGTGCTGATCCAGGACGCCCTGGCTCTCTCCTTTGTGCTCCTGACGCTTGCT
 161 S T A L S S Y T L A A F A G T A L A F M
 664 TCAACAGCATTATCTTCTACACTCTTGCAGCTTTTGCAGGCACTGCTCTCGCCTTTATG
 181 V V C A [H N F F H Q] R D N W R M Y Y Y D
 724 GTCGTTTGTGCTCACAACCTTTTCCATCAACGTGACAACCTGGAGAATGTATTACTATGAC
 201 L S L H S S Y E W R V T [H A L S H H] L H
 784 TTGTCACCTCACTCATCTTATGAATGGCGCGTGACTCATGCCCTCTCACACCACCTTAC
 221 T N T A N D I E I S A L E P F W E L L P
 844 ACCAACACGGCCAATGATATTGAGATATCTGCGCTGGAACCATTCTGGGAATTGTTACCA
 241 K S D K K F I Q R Y A G F I Y E Q A I I
 904 AAGTCTGACAAGAAATTCATCCAGAGATATGCTGGCTTCATCTACGAACAGGCAATAATT
 261 A V I Y F M E L S K R M Y N G F T G V T
 964 GCAGTCATTTACTTCATGGAACGTGCAAAACGGATGTATAATGGATTTACTGGGGTAACA
 281 P L R P E N F L I F L E L I V M A A I S
 1024 CCACTACGCCAGAAAATTTCTTGATATTCTTGGAGTTGATAGTGATGGCAGCCATTTCA
 301 S S F W V A L K L F L T I H V A F S I V
 1084 TCATCCTTTTGGGTGGCTCTCAAGCTATTTCTGACCATCCACGTGCGCTTCAGTATTGTA
 321 F L N I G L T V A H H H P D I F H D G D
 1144 TTCCTGAACATCGGTCTGACCGTAGCCACCACCACCCGGACATTTTCCACGATGGGGAC
 341 R M R D D P D W G L C Q L D A V R D R Y
 1204 AGGATGAGGGATGACCCAGACTGGGGTCTGTGCCAGCTGGATGCAGTGAGGGACAGATAC
 361 E V A G N L F L V L I S F G D [H T L H H]
 3' RACE Primer
 1264 GAGGTGGCGGGTAACCTATTCCTAGTGCTGATAAGCTTTGGTGACCACACCCTGCACCAC
 381 L L P T V D H S K L N S L Y P A F L E T
 1324 CTCCTGCCACTGTTGACCACTCCAAGCTGAACAGCCTCTACCCGGCCTTCTAGAAACA
 401 C K E F D I P F T F M K W S T L A V G K
 1384 TGCAAAGAATTCGATATTCGGTTTACCTTCATGAAATGGTCAACTTTGGCGGTGCGAAAG
 421 Y M Q M A R I T P N N N Y P G F K K K A

```

1444 TACATGCAGATGGCCAGAATCACCCCAAATAACAACACTATCCGGGATTTAAGAAAAAAGCT
441  S *
1504 TCTTAGAATTATAATCAATTGGCCAAATATTATTACAACGTGATCTACCTTCCTTGAAT
1564 CCATGTAGTGAAGTAAAGTTAGAATATGCTCTACTAAACACTCACAGTTTTTATATAAT
1624 ATAATGGACTCAACTAGTTAACCTGATACTGATGTAATACTTTTTGGCCGGTAGGGAGTC
1684 ATTCATTGTTCAATTAATTGTTTCATTGTATAGGAATAACATAGGTATGTCAGTTATTATA
1744 TAAGTAGAACATGAGTGCAGGGTTCCAGATGTTTGATATTGTTATCCAAAAGCTTGAAC
1804 TATTTACTGTCGGTGGGGATTCAGATGAAGTTTTGGATATTACAATATATCAGGGAAACT
1864 GCTGGATTTATTTCTAAAACACACACACACACACACACACACACACACACACACACACAC
1924 ACACACACACACACACACACACACACACACACACACACACACACACACACACACACACAC
1984 TGACTGATTATGAGCAATCTCCTTTCAATAGCAAATTAATTTATATTGTTTGATGTGGAG
2044 ATACGAATTCAGAGATAAAATTCCTTCAAATGACGTTTCGCGAAAGGAAATTTGAGTCTA
2104 TGTAAGGTTTTGTATCAAATATAAAGGAACACTTTCTTGTCAAAACCGATGAATATTAG
2164 AGAGTTAATTCTAAATGCATCAACTGTTTTCATACCTTGTGTTACAACCTCAGCTTATTA
2224 GTCATGTATGAAATAAAGATTTCTACCTAACGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
2284 AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

```

图 1 中华绒螯蟹 *FAD6-b* 基因全长 cDNA 核苷酸序列及氨基酸序列预测

5' RACE PCR 引物用“←”表示, 3' RACE PCR 引物用“→”表示, 血红素结合域 HPGG 用双划线表示, 3 个保守的组氨酸簇用实线方框表示, 细胞色素 b5 结构域用阴影部分表示。起始密码子(ATG)和终止密码子(TAG)用虚线框表示, Poly(A)具有加尾信号 AATAAA, 出现在距 Poly(A)尾 16 bp 处

Fig. 1 cDNA nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of *E. sinensis FAD6-b* gene

“←” stand for 5' RACE PCR primers, and “→” stand for 3' RACE PCR primers, double-underlined stand for Heme-binding motif (HPGG), the solid line boxes stand for three conserved regions with known histidine-rich motifs, shaded stand for cytochrome b5 region. The start codon (ATG) and the stop codon (TAG) are in dotted boxes, the poly (A) addition signal AATAAA begins 16 bp from the poly (A) tail

因的氨基酸序列与已报道的中华绒螯蟹 $\Delta 6$ 去饱和酶基因、虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*)、菁夜蛾和海鳗 (*Muraenesox cinereus*) 等的 *FAD6* 氨基酸序列具有较高的相似性(图 2), 初步确定此序列为中华绒螯蟹另一条 $\Delta 6$ 去饱和酶基因。

2.2 *FAD6-b* 的同源性分析和进化树构建

将中华绒螯蟹 *FAD6-b* 氨基酸序列同 NCBI 上已知的中华绒螯蟹、尼罗罗非鱼 (*Oreochromis niloticus*)、尖吻鲈 (*Lates calcarifer*)、大西洋鲑 (*Salmo salar*)、虹鳟、菁夜蛾及小鼠 (*Mus musculus*) 等的 *FAD6* 氨基酸序列进行比对, 一致性为 40% ~ 76%。利用 MEGA (version 6.0) 软件的邻接法 (Neighbor-Joining) 将上述物种的氨基酸序列构建系统进化树, 置信度为 1 000, 结果显示中华绒螯蟹 *FAD6-b* 与 *FAD6* 单独聚为一支, 且二者与菁夜蛾一同聚为一支, 其余物种聚为一大支(图 3)。

2.3 pCold TF-fad6b 的构建和验证

基因的 ORF, 将测序结果与上述得到的全长序列进行比对, 结果表明, 得到的含 *Sac* I 和

*Bam*HI 位点的 ORF 序列完全正确。将其酶切后转入原核表达载体 pCold-TF DNA 中, 构建的重组质粒再经菌液 PCR (图 4)、双酶切 (图 5) 及测序验证。结果表明, 菌液 PCR 和测序结果的阳性检出率均为 100%, 且双酶切后发现在目的片段 (1 326 bp) 处出现一单一条带, 说明重组表达载体 pCold TF-fad6b 构建成功。甘油保存阳性菌株于 -80 °C 冰箱中, 用于后续实验。

2.4 pCold TF-fad6b 重组蛋白的诱导表达及表达产物的可溶性分析

利用蛋白提取试剂盒提取各培养组菌液中的蛋白, 并用 10% SDS-PAGE 电泳检测目的蛋白的表达情况, 发现与未诱导的重组菌株相比, 重组的表达载体菌株 pCold TF-fad6b 经 10 h 诱导培养后, 在 110 ku 附近出现了一单一条带 (图 6, 箭头), 该条带大小与预期结果 (105.86 ku) 相符, 且检测结果表明重组蛋白主要在上清液中存在, 为可溶性表达。

2.5 pCold TF-fad6b 重组蛋白的纯化

将扩大诱导培养后的菌液经超声破碎, 取其

中华绒螯蟹 <i>E. sinensis</i> FAD6-b	MAPREGDSQSGD-SSIKLTA ^Y KKFPNTY ^{PH} KT ^{FQ} EWLS ^{AKRID} DDVGPY ^W	49
中华绒螯蟹 <i>E. sinensis</i> FAD6	MAPREGDSR ^{NG} VYSSIKLTA ^F TKLPTNYP ^{HKS} FEQWL ^R GKRTD ^{DD} GVAPY ^W	50
菁夜蛾 <i>A. segetum</i> FAD6	MAP----NTERHQIS ^F PRLEYPILREVMP-KSAHNWLK ^G KRMQDGAEDL ^W	45
海鲢 <i>M. cinereus</i> FAD6-2	---MGGGGQOTESE-----SSCGRGG-GVFTWEEVQRHSHKGDQWL	37
虹鳟 <i>O. mykiss</i> FAD6	---MGGGGQOTESEPAKGDGVGPDGGRGGS ^{AVYT} WEEVQ ^{KHCHRS} DKWL	47
中华绒螯蟹 <i>E. sinensis</i> FAD6-b	RVHDKLYDLTDFIDKHPGGKMWLQVTKGTDITEAFEASHIG-EGPEKLLQ	98
中华绒螯蟹 <i>E. sinensis</i> FAD6	RVHDKLYDLTDFVDRHPGGKMWLQVTKGTDITEAFEASHFG-EGPEKLLQ	99
菁夜蛾 <i>A. segetum</i> FAD6	RIHDNLYDLTDFVTAHPGGTYWISVTKGTDITEAFETHHLK-GVAETLLP	94
海鲢 <i>M. cinereus</i> FAD6-2	VIDRKVYNTITD ^{WV} KRHPGGAR ^{VI} SHYAGEDATDAFA ^A FHPEP ^D FVRKFLK	87
虹鳟 <i>O. mykiss</i> FAD6	VIDRKVYNTITQ ^{WAKR} HPGGIR ^{VI} SHFAGEDATDAFVA ^F HPDPNFVRKFLK	97
中华绒螯蟹 <i>E. sinensis</i> FAD6-b	KYYIKDTKT ^{PRNS} PYTFHEN-----GFYKTLKRRV ^R PILK ^N LGRG ^{PSW}	141
中华绒螯蟹 <i>E. sinensis</i> FAD6	KYYVKDIT ^{TPRNS} PYTFHKN-----GFYKTFKRRV ^E PILRKT ^G KG ^{PSW}	142
菁夜蛾 <i>A. segetum</i> FAD6	NY ^Y IRKATK ^{PRSH} PETF ^{KED} -----GFYKTLK ^{LVMA} Q ^L PN ^I PK ^{DLR} K	137
海鲢 <i>M. cinereus</i> FAD6-2	PL ^L IGELATSEPNQ ^{DR} DKNA-----FRELREEVEREGLFR ^{TQ} PLFF ^{CL} HL	132
虹鳟 <i>O. mykiss</i> FAD6	PL ^L IGELATTEPS ^Q DHGKNAVLV ^Q DFQ ^{AL} RDR ^{VER} EGLLR ^{AR} PLFF ^{SL} YL	147
中华绒螯蟹 <i>E. sinensis</i> FAD6-b	KT ^V LITQDALALS ^F VLLT-----LASTALSSYTLA ^A FA ^G TALAF ^M VVCA ^H	185
中华绒螯蟹 <i>E. sinensis</i> FAD6	KSLVIQDGLALS ^F LLLT-----FASTVLSSYTLAVLAGM ^F L ^S FTI ^S CAH	186
菁夜蛾 <i>A. segetum</i> FAD6	KSDFVSDS ^L LALIL ^I LSPMS ^C WGWTQ ^S FLLGASLT ^I LNG ^L VLSS ^I ITCA ^H	187
海鲢 <i>M. cinereus</i> FAD6-2	GH ^I LLLEALAYLLI ^W VYG---TGWLQ ^T LLCAVILATS ^S Q ^S QAGWL ^Q HDF ^G H	179
虹鳟 <i>O. mykiss</i> FAD6	GH ^I LLLEALALGLL ^W VG---TSWSL ^T LLCS ^L MLATS ^S Q ^S QAGWL ^Q H ^D YGH	194
中华绒螯蟹 <i>E. sinensis</i> FAD6-b	NFFHQ ^R DNW----RMY ^Y YDLSLHSS ^Y EWRV ^T HALSH ^H LHTNTANDIE ^{IS}	230
中华绒螯蟹 <i>E. sinensis</i> FAD6	NYFHQRDNW----RMY ^F DLSG ^F SSHEWRV ^T HALSH ^H LYTNTANDIE ^{IS}	231
菁夜蛾 <i>A. segetum</i> FAD6	NYFHRSDSW----RMY ^L FN ^L GGMS ^Y SDWR ^I SHAMSH ^H LHTNTA ^Q DV ^E LS	232
海鲢 <i>M. cinereus</i> FAD6-2	LSV ^F KKSRWNHLLH ^K FVI ^G H ^L KGASANW ^W NHR ^H FQ ^H HAK ^P NI ^F SK ^D PD ^V N	229
虹鳟 <i>O. mykiss</i> FAD6	LSV ^C K ^T SSWNHVLH ^K FVI ^G H ^L KGASANW ^W NHR ^H FQ ^H HAK ^P NV ^F SK ^D PD ^V N	244
中华绒螯蟹 <i>E. sinensis</i> FAD6-b	ALEPFWELLPKS ^D KKFTI ^Q RYAG ^F IYE ^Q AI ^A --VIY ^F MEL ^S KRM ^Y NG ^F TG	278
中华绒螯蟹 <i>E. sinensis</i> FAD6	ALDPVWVFLPK ^P DKNLI ^Q RYGS ^Y IYDL ^P MAP--VIA ^F V ^A HL ^T RI ^F EV ^C IG	279
菁夜蛾 <i>A. segetum</i> FAD6	MIEPFLQFLPY ^K DKPI ^W AQMGA ^F Y ^P FVYGASFL ^V L ^F VT ^E L ^V L ^C AT ^N HEG	282
海鲢 <i>M. cinereus</i> FAD6-2	MLHTFVLGKTQ ^P VEYGI ^K EIKY ^M PN ^H QH ^Q Y ^F FLIG ^P PM ^L I ^P VY ^F HTI ^Q IM	279
虹鳟 <i>O. mykiss</i> FAD6	SLHV ^F V ^L GDKQ ^P VEYGI ^K KL ^K Y ^M PN ^H QH ^Q Y ^F FLIG ^P PL ^V I ^P V ^F FTI ^Q IF	294
中华绒螯蟹 <i>E. sinensis</i> FAD6-b	VTPLRPENFLIFLELIVMAAIS-SSF ^W VALKL ^F LTI ^H V ^A FSI ^V FLNIG ^L T	327
中华绒螯蟹 <i>E. sinensis</i> FAD6	ITPLRPEYLLPYSVLF ^M ATIS-PS ^F WQAF ^K L ^F MTI ^H ATT ^N CV ^F V ^A IG ^M T	328
菁夜蛾 <i>A. segetum</i> FAD6	KS-LS ^W KNLIPETIP ^T W ^Y LM ^G GLPL ^H WTIA ^I W ^L LTMI ^P ASL ^F FVI ^Y GLT	331
海鲢 <i>M. cinereus</i> FAD6-2	QTMF ^R RD ^W VDL ^V WSMS ^Y LY ^R FTCY ^T PFY ^G V ^F GA ^V ALIS ^F V ^R FL ^E SH ^W F	329
虹鳟 <i>O. mykiss</i> FAD6	QTM ^F S ^Q R ^N W ^V DL ^A W ^A MT ^F YL ^R FF ^C Y ^P PF ^E GF ^F GS ^V ALIS ^F V ^R FL ^E SH ^W F	344
中华绒螯蟹 <i>E. sinensis</i> FAD6-b	VAHHHPDIFHDGDRMRDD-PDWGLCQLDAVRDRYE ^V AGNL ^F LV ^L IS ^F GDH	376
中华绒螯蟹 <i>E. sinensis</i> FAD6	AAHHHPDIFHDGDRMRDD-PDWGLCQLDAVRDRVE ^T G ^N LL ^V L ^T S ^F GEH	377
菁夜蛾 <i>A. segetum</i> FAD6	AGHHSRNFEGD ^V PRDENIDWGLHQLDTIVERIDYAGNH ^F KSI ^T R ^F GDH	381
海鲢 <i>M. cinereus</i> FAD6-2	VWVTQMNH ^I P-M ^D I ^D HERHEDWLT ^M QL ^K AT ^C N-IE ^Q S ^F F ^N D ^W F ^S GH ^L N ^F Q	377
虹鳟 <i>O. mykiss</i> FAD6	VWVTQMNH ^L P-M ^E I ^D HERHQDWLT ^M QL ^S AT ^C N-IE ^Q S ^T F ^N D ^W F ^S GH ^L N ^F Q	392
中华绒螯蟹 <i>E. sinensis</i> FAD6-b	TLHHL ^L PTVDH ^S KLNSLYPAFLETCKE ^F DIP ^T F ^M K ^W STLAV ^G K ^Y M ^Q MAR	426
中华绒螯蟹 <i>E. sinensis</i> FAD6	TLHHL ^L PTVDH ^S KLSSLYPAFLETCKE ^F DIP ^T F ^M K ^W STLAV ^G K ^Y M ^Q MAR	427
菁夜蛾 <i>A. segetum</i> FAD6	ALHHL ^F PTLDHAE ^L NALYPTLFEHCEK ^F ESQL ^K TNT ^F YEALIS ^A SK ^Q LIR	431
海鲢 <i>M. cinereus</i> FAD6-2	IEHHL ^F PTMPRHNY ^C R ^V APLVR ^K VCEK ^H GV ^T Y ^Q E ^K TL ^W SG ^F R ^D V ^S SL ^R E	427
虹鳟 <i>O. mykiss</i> FAD6	IEHHL ^F PTMPRHNY ^H L ^V APL ^V RALCE ^K HGL ^P Y ^Q V ^K T ^L Q ^K AI ^I D ^V V ^G SL ^K K	442
中华绒螯蟹 <i>E. sinensis</i> FAD6-b	ITPN ^N NY ^P GF ^K KK ^K AS	441
中华绒螯蟹 <i>E. sinensis</i> FAD6	ITTN ^N NY ^P GF ^K KK ^K AS	442
菁夜蛾 <i>A. segetum</i> FAD6	KRP ^N ---FR ^D KK ^F	442
海鲢 <i>M. cinereus</i> FAD6-2	-SGDL ^W LDAY ^L H ^K --	439
虹鳟 <i>O. mykiss</i> FAD6	-SGDL ^W LDAY ^L H ^K --	454

图2 中华绒螯蟹FAD6-b与其他物种FAD6氨基酸序列比对

中华绒螯蟹 JX946434; 菁夜蛾 AID66663.1; 海鲢 AEV57605.1; 虹鳟 AAK26745.1

Fig. 2 FAD6-b amino acid sequences comparison of *E. sinensis* with different animals

GenBank accession number: *E. sinensis* JX946434; *A. segetum* AID66663.1; *M. cinereus* AEV57605.1; *O. mykiss* AAK26745.1

上清液后用含His标签的镍离子亲和层析柱进行分离纯化, 10% SDS-PAGE电泳检测纯化后的蛋白溶液(图7), 结果显示, 经纯化的蛋白出现单一条带, 且相对分子质量约为106 ku, 大小与预期一致。

2.6 pCold TF-fad6b重组蛋白的Western-blotting 验证

对纯化前的蛋白上清液、经纯化的蛋白溶液、未诱导的BL21/pCold TF-fad6b蛋白上清液和经诱导的BL21/pCold TF蛋白上清液进行Western-

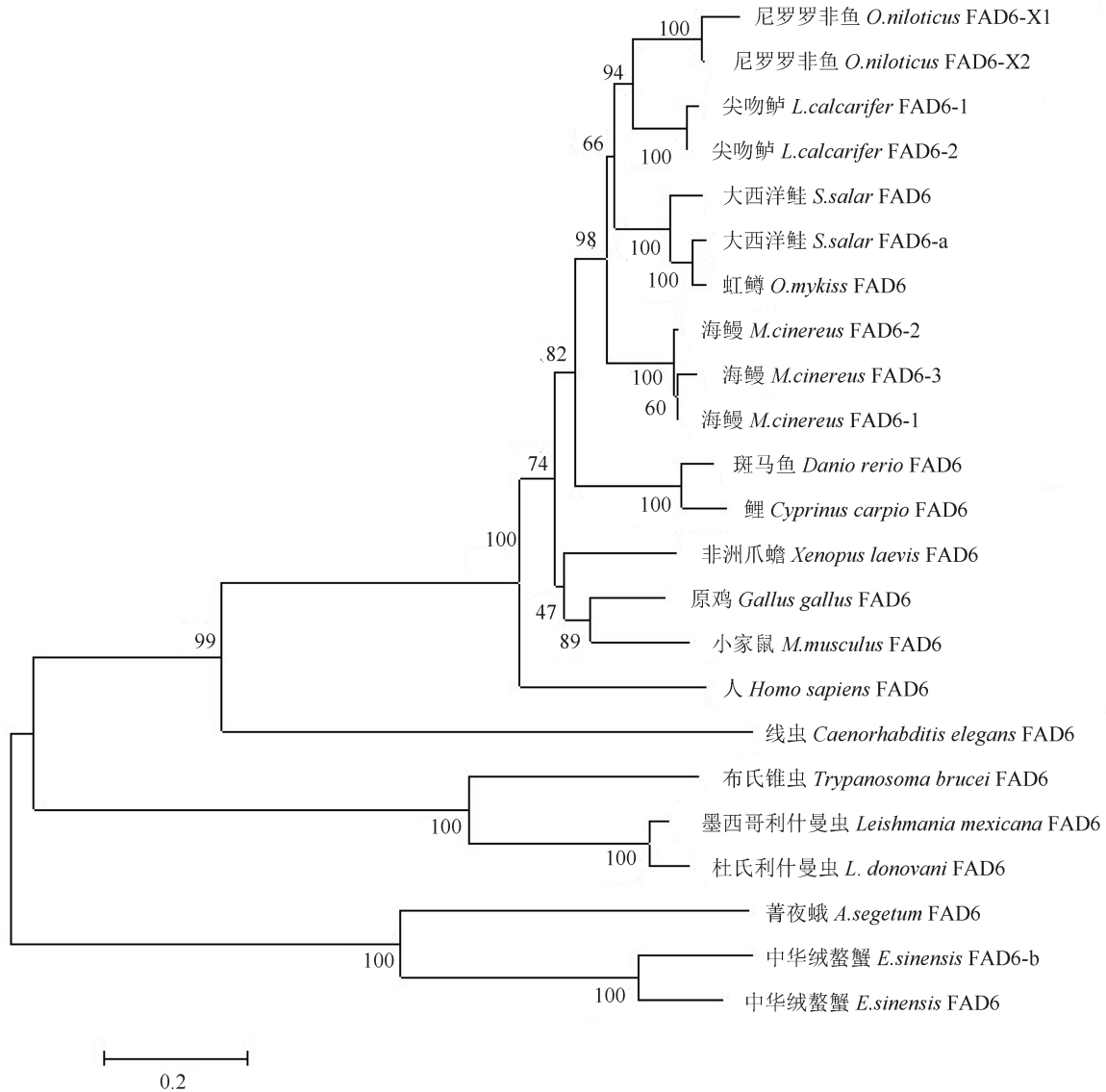


图 3 FAD6氨基酸序列的系统进化树

中华绒螯蟹FAD6-b(KP876058), 中华绒螯蟹FAD6(JX946434), 布氏锥虫 XP_822945.1, 墨西哥利什曼虫XP_003873509.1, 非洲爪蟾 Q6DDK2.1, 尼罗罗非鱼FAD6-X1(XP_005470661.1), 尼罗罗非鱼FAD6-X2(XP_005470662.1), 尖吻鲈FAD6-1(ACS91458.1), 尖吻鲈FAD6-2(ACY25091.2), 海鲷FAD6-1(AEV57604.1), 海鲷FAD6-2(AEV57605.1), 海鲷FAD6-3(AEV57606.1), 大西洋鲑FAD6-a(AAU47273.1), 大西洋鲑FAD6(NP_001165752.1), 虹鳟 NP_001117759.1, 斑马鱼 Q9DEX7.1, 鲤 AAG25711.1, 蓍夜蛾 NO. AID66662.1, 杜氏利什曼虫 XP_003859509.1, 线虫 AAC15586.1, 原鸡 ABR24806.2, 小家鼠 AAD20017.1, 人 AAD31282.1

Fig. 3 phylogenetic tree of FAD6 amino acid sequences

GenBank accession number: *Eriocheir sinensis*(FAD6-b: KP876058, FAD6: JX946434), *Trypanosoma brucei* XP_822945.1, *Leishmania mexicana* XP_003873509.1, *Xenopus laevis* Q6DDK2.1, *Oreochromis niloticus* (FAD6-X1: XP_005470661.1, FAD6-X2: XP_005470662.1), *Lates calcarifer*(FAD6-1: ACS91458.1, FAD6-2: ACY25091.2), *Muraenesox cinereus*(FAD6-1: AEV57604.1, FAD6-2: AEV57605.1, FAD6-3: AEV57606.1), *Salmo salar*(FAD6-a: AAU47273.1, FAD6: NP_001165752.1), *Oncorhynchus mykiss* NP_001117759.1, *Danio rerio* Q9DEX7.1, *Cyprinus carpio* AAG25711.1, *Agrotis segetum* NO. AID66662.1, *Leishmania donovani* XP_003859509.1, *Caenorhabditis elegans* AAC15586.1, *Gallus gallus* ABR24806.2, *Mus musculus* AAD20017.1, *Homo sapiens* AAD31282.1

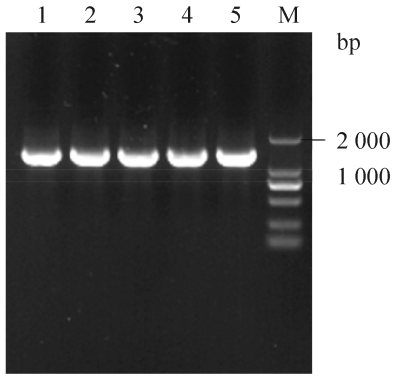


图4 重组质粒pCold TF-fad6b菌落PCR检测

编号1~5为重组质粒pCold TF-fad6b; M为DNA Marker DL2000

Fig. 4 Identification of recombinant plasmid pCold TF-fad6b by PCR

1-5. positive clones detected by PCR; M. DNA Marker DL2000

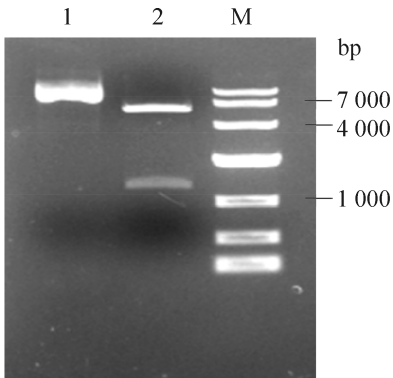


图5 重组质粒pCold TF-fad6b双酶切鉴定

1.重组质粒pCold TF-fad6b; 2.重组质粒pCold TF-fad6b双酶切; M. DNA Marker DL10000

Fig. 5 Electrophoresis analysis of double digestion of recombinant plasmid pCold TF-fad6b

1. recombinant plasmid pCold TF-fad6b; 2. double digestion of pCold TF-fad6b by BamH I and Sac I; M. DNA Marker DL10000

blotting检测, 经双色红外激光成像系统成像, 发现与对照组相比, 经纯化的重组蛋白在膜上出现了一条印迹, 且是预期的条带大小(图8)。

3 讨论

PUFAs是指含有16个碳以上且具有2个或者2个以上双键的脂肪酸, 人类及其他哺乳动物体内不能合成或者只能少量合成PUFAs^[9-10]。PUFAs不仅是生物膜结构的重要组成部分, 也是生物体中众多活性分子的前体, 其与机体细胞重要功能的维持和调节有关^[11], 众多研究发现PUFAs特别是LC-PUFAs与人的健康有密切的关系, 一些LC-PUFAs关系到炎症、癌症等疾病的发病率^[12-14]。研究表明, PUFAs是由一系列的

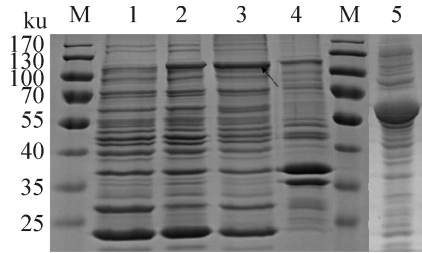


图6 pCold TF-fad6b重组蛋白SDS-PAGE检测及可溶性分析

M.蛋白质分子量标准; 1.未诱导的BL21/pCold TF-fad6b菌株; 2.经IPTG诱导的BL21/pCold TF-fad6b菌株; 3.经诱导的BL21/pCold TF-fad6b蛋白上清液; 4.经诱导的BL21/pCold TF-fad6b蛋白沉淀; 5.经诱导的BL21/pCold TF菌株; 箭头示目的条带

Fig. 6 Analysis of pCold TF-fad6b expression in E.coli BL21(DE3)pLysS by SDS-PAGE

M. protein molecular weight Marker; 1. BL21/pCold TF-fad6b uninduced by IPTG; 2. BL21/pCold TF-fad6b induced by IPTG; 3. supernatant of BL21/pCold TF-fad6b induced by IPTG; 4. precipitation of BL21/pCold TF-fad6b induced by IPTG; 5. BL21/pCold TF induced by IPTG; the arrow stands for the target protein bands

脂肪酸延长酶(fatty acid elongase, FAE)和FAD的作用, 并以饱和脂肪酸为最初底物逐步生成的^[11]。动物中FAD主要有FAD9、FAD6、FAD5和FAD4等, FAD6作为LC-PUFA合成过程中的限速酶, 近年来在脊椎动物中得到广泛关注, 而无脊椎动物特别是甲壳动物中, 关于FAD6的研究很少^[2]。本研究采用物种间的基因同源性技术和RACE技术, 克隆得到中华绒螯蟹另一种FAD6基因全长, 命名为FAD6-b, 对该基因进行序列分析, 发现FAD6-b在结构上具有4次跨膜, 同时具有膜结合脂肪酸去饱和酶所具有的典型特征^[15-16]: 3个组氨酸保守区、1个细胞色素b5结构域以及血红素结合域HPGG, 与NCBI上已登录的中华绒螯蟹FAD6(Accession Number: JX946434)在结构上具有高度相似性(图2), 二者的氨基酸序列特征都符合FAD6基因的特征。有研究表明膜结合FAD中的3个组氨酸簇(HisI、HisII、HisIII)对酶活性的维持是必需的, 该保守区可与1个Fe²⁺结合形成催化活性中心^[4, 17-18]; HPGG在FAD催化过程中发挥着电子供体的作用, 该区域中的His对FAD的活性也十分重要^[19]。经多序列比对分析及MEGA6.0构建的进化树显示, FAD6-b基因的氨基酸序列与所选其他动物的20多种氨基酸序列有40%~76%的同源性, 并且发现甲壳动物的FAD6单独聚为一支, 其次再与另一大支中的无脊椎动物杜氏利什曼虫和布氏锥虫等具有较近的亲缘关系(图3)。

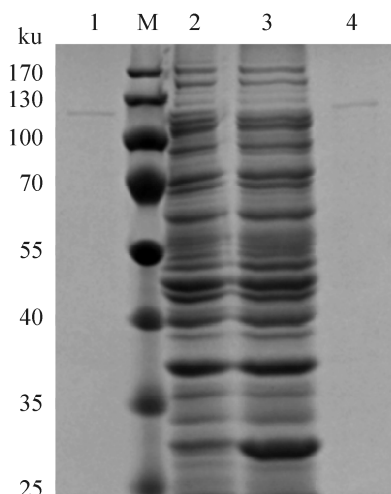


图 7 SDS-PAGE检测纯化后的重组蛋白

1、4. 纯化后的重组蛋白；2. 经诱导的重组蛋白溶液；3. 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, 4. purified recombinant protein; 2. recombinant protein induced by IPTG; 3. recombinant protein uninduced by IPTG; M. protein molecular weight marker

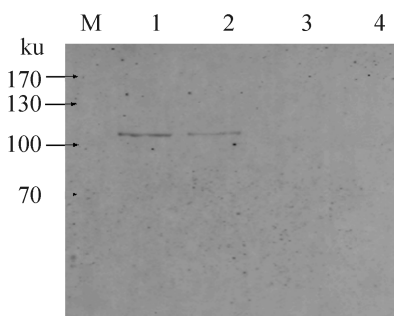


图 8 pCold TF-fad6b重组蛋白的Western-blotting验证

M. 蛋白质分子量标准；1. 纯化前的蛋白溶液；2. 纯化后的蛋白溶液；3. 未诱导的BL21/pCold TF-fad6b蛋白；4. 经诱导的BL21/pCold TF蛋白

Fig. 8 Western-blotting analysis of recombinant protein pCold TF-fad6b

M. protein molecular weight Marker; 1. recombinant protein before purified; 2. recombinant protein after purified; 3. recombinant protein uninduced; 4. BL21/pCold TF induced by IPTG

鉴于表达载体pCold-TF DNA本身具有冷休克蛋白启动子和相关原件，本研究选择pCold-TF DNA为原核表达载体，此载体以大肠杆菌的伴侣蛋白TF为可溶标签，其很大程度上可以提高蛋白的可溶性和纯度^[20]。二硫键对维持蛋白质的结构及活性发挥着重要的作用，它是蛋白分子的侧链间唯一存在的共价键^[21-22]。在体外，二硫键的形成也可发生，但其生成速率要比在体

内慢很多^[23-24]。在大肠杆菌中，其产生蛋白质二硫键的场所一般都是在周质腔^[25-26]，本实验选用大肠杆菌BL21(DE3) pLysS作为宿主菌体，该菌株自带pLysS质粒，该质粒含有可以降低目的基因背景表达水平而不干扰IPTG诱导表达水平的T7溶菌酶。实验结果表明，*FAD6-b*基因的ORF成功构建到目的载体pCold-TF DNA中，且经诱导培养后，pCold TF-fad6b表达出可溶性的目的蛋白，条带大小约为110 ku，由于pCold-TF DNA空载体自身具有的伴侣蛋白TF和His标签的分子量为55 ku，中华绒螯蟹FAD6-b蛋白的理论分子量是50.86 ku，因此可判定表达出的重组蛋白与预期结果(105.86 ku)相符。利用表达出的目的蛋白在N端融合有6×His标签的特点，选用His-tag镍离子亲和层析柱对目的蛋白进行纯化检测，并得到单一且大小合适的目的条带，重组蛋白构建并表达成功得到了进一步验证，得到的纯度较高的目的融合蛋白可用于后续相关实验。本研究中的Western-blotting实验结果显示，目的蛋白可被anti-6×His鼠抗识别，表明在大肠杆菌BL21(DE3) pLysS中，重组蛋白能够正确折叠，且表达出的目的蛋白具有抗原活性。

目前，中华绒螯蟹基因的体外研究水平与动物整体体外研究水平还有很大差距，本实验的结果为进一步开展中华绒螯蟹FAD6-b蛋白在体外的高效表达、抗体制备、活性检测等方面奠定基础，也为今后研究甲壳动物FAD的调控机制和生理功能提供参考。

参考文献:

- [1] 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.
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 (in Chinese).
- [2] 杨志刚, 郭子好, 姚琴琴, 等. 脂肪酸去饱和酶基因的研究进展[J]. 生物技术通报, 2013, 12: 21-26.
Yang Z G, Guo Z H, Yao Q Q, *et al.* Research advance in fatty acid desaturase genes [J]. Biotechnology Bulletin, 2013,12:21-26 (in Chinese).
- [3] Tocher D R, Leaver M J, Hodgson P A. Recent advances in the biochemistry and molecular biology of fatty acyl desaturases [J]. Progress in Lipid Research, 1998, 37(2-3): 73-117.

- [4] Stuke J E, McDonough V M, Martin C E. The OLE1 gene of *Saccharomyces cerevisiae* encodes the delta 9 fatty acid desaturase and can be functionally replaced by the rat stearoyl-CoA desaturase gene [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1990, 265(33): 20144–20149.
- [5] Alonso D L, Maroto F G, Ruiz J R, *et al.* Evolution of the membrane-bound fatty acid desaturases [J]. *Biochemical Systematics and Ecology*, 2003, 31(10): 1111–1124.
- [6] Wallis J G, Watts J L, Browse J. Polyunsaturated fatty acid synthesis: what will they think of next [J]. *Trends in Biochemical Sciences*, 2002, 27(9): 467–473.
- [7] Sprecher H. Metabolism of highly unsaturated n-3 and n-6 fatty acids [J]. *Biochimica et Biophysica Acta-Molecular and Cell Biology of Lipids*, 2000, 1486(2–3): 219–231.
- [8] Zheng X Z, Ding Z K, Xu Y Q, *et al.* Physiological roles of fatty acyl desaturases and elongases in marine fish: characterisation of cDNAs of fatty acyl $\Delta 6$ desaturase and *elov15* elongase of cobia (*Rachycentron canadum*) [J]. *Aquaculture*, 2009, 290(1–2): 122–131.
- [9] 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 [J]. *World Review of Nutrition and Dietetics*, 2003, 92: 23–36.
- [10] 朱贵明, 陈宏, 周艳荣, 等. 来源于线虫 *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.
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 (in Chinese).
- [11] Wallis J G, Watts J L, Browse J. Polyunsaturated fatty acid synthesis: what will they think of next [J]. *Trends in Biochemical Sciences*, 2002, 27(9): 467–473.
- [12] 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(21): 2646–2652.
- [13] 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 Science*, 2007, 98(4): 590–597.
- [14] 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]. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 2006, 83(2): 221–226.
- [15] Monroig O, Zheng X, Morais S, *et al.* Multiple genes for functional $\Delta 6$ fatty acyl desaturases (Fad) in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.): gene and cDNA characterization, functional expression, tissue distribution and nutritional regulation [J]. *Biochimica et Biophysica Acta- biomembranes*, 2010, 1801 (9): 1072–1081.
- [16] Vagner M, Santigosa E. Characterization and modulation of gene expression and enzymatic activity of delta-6 desaturase in teleosts: a review [J]. *Aquaculture*, 2011, 315(1–2): 131–143.
- [17] Libisch B, Michaelson L V, Lewis M J, *et al.* Chimeras of Δ^6 -fatty acid and Δ^8 -sphingolipid desaturases [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2000, 279(3): 779–785.
- [18] Sayanova O, Shewry P, Napier J A. Histidine-41 of the cytochrome b5 domain of the borage delta6 fatty acid desaturase is essential for enzyme activity [J]. *Plant Physiology*, 1999, 121(2): 641–646.
- [19] Sayanova O, Beaudoin F, Libisch B, *et al.* Mutagenesis and heterologous expression in yeast of a plant $\Delta 6$ -fatty acid desaturase [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2001, 52(360): 1581–1585.
- [20] 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.
Wang Y G, Zhou Y, Yang L, *et al.* Construction and solvable expression of the recombinant plasmid pCold TF-Der 2 of *Dermatophagoides farina* [J]. *Journal of Pathogen Biology*, 2012, 7(2): 118–123 (in Chinese).
- [21] Darby N J, Morin P E, Talbo G, *et al.* Refolding of bovine pancreatic trypsin inhibitor via non-native disulphide intermediates [J]. *Journal of Molecular Biology*, 1995, 249(2): 463–477.
- [22] Schultz S C, Dalbadie M G, Neitzel J J, *et al.* Stability of wild-type and mutant RTEM-1 beta-lactamases: effect of the disulfide bond [J]. *Proteins*, 1987, 2(4): 290–297.
- [23] Anfinsen C B. Principles that govern the folding of protein chain [J]. *Science*, 1973, 181(4096): 223–230.
- [24] Saxena V P, Wetlaufer D B. Formation of three-dimensional structure in proteins [J]. *Biochemistry*, 1970, 9: 5015–5022.
- [25] Raina S, Missiakas D. Making and breaking disulfide bonds [J]. *Annual Review of Microbiology*, 1997, 51: 179–202.
- [26] Batisson I, Vartanian M. Extracellular DsbA-insensitive folding of *Escherichia coli* heatstable enterotoxin STa *in vitro* [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2000, 275(14): 10582–10589.

Full length cDNA cloning and prokaryotic expression of fatty acyl-CoA $\Delta 6$ -b desaturase in *Eriocheir sinensis*

YANG Zhigang, YAO Qinqin, CHENG Yongxu*, SHI Qiuyan,
YANG Qing, HE Jie, MA Mingjun, WANG Yao, CHANG Dong
(Key Laboratory of Freshwater Aquatic Genetic Resources, Ministry of Agriculture,
Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract: Fatty acyl-CoA $\Delta 6$ -b desaturase is a membrane-bound enzyme, and it is the rate-limiting enzyme in the biosynthetic pathway of highly unsaturated fatty acids (HUFA). Fatty acyl-CoA $\Delta 6$ desaturase can catalyze the first step of the desaturation in the HUFA pathway, and it can convert linoleic acid(LA, 18 : 2n-6) to Gamma linolenic acid(GLA, 18 : 3n-6), convert α -linolenic acid(ALA, 18 : 3n-3) to Stearidonic acid(SDA, 18 : 4n-3), and it also can convert Eicosapentaenoic acid (EPA, 20 : 5n-3) to Docosahexaenoic acid (DHA, 22 : 6n-3) with other enzymes. In this study, fatty acyl-CoA $\Delta 6$ -b desaturase gene was cloned from *Eriocheir sinensis* using reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) and rapid-amplification of cDNA ends (RACE). The full-length cDNA sequence of fatty acyl-CoA $\Delta 6$ -b desaturase is 2 310 bp, including a 1 326 bp open reading frame (ORF) and codes a protein of about 442 amino acids. The molecular weight is 50.86 ku, and the isoelectric point is 8.47. GenBank accession number of this gene is KP876058. A homology analysis using BLASTn and BLASTx revealed that the fatty acyl-CoA $\Delta 6$ -b desaturase gene shared 76% identity with fatty acyl-CoA $\Delta 6$ desaturase gene of *E. sinensis*. The ORF of fatty acyl-CoA $\Delta 6$ -b desaturase gene was subcloned into the prokaryotic expression vector pCold-TF DNA, to generate recombinant expression vector pColdTF-fad6b, which was then transformed into the expression *E. coli* BL21(DE3)pLysS. Experiments showed that the fatty acyl-CoA $\Delta 6$ -b desaturase was successfully expressed in *E. coli* BL21(DE3)pLysS by the IPTG induction and at the temperature of 15 , and the concentration of IPTG was 0.3 mmol/L. The result of SDS-PAGE analysis showed that the recombinant protein had an approximately molecular weight of 105.86 ku which was consistent with the theoretical molecular weight, and the target protein was mainly detected in supernatant. As the purpose protein contains a 6 \times His-tag, we have chosen His-tag nickel ion affinity chromatography column for recombinant protein purification and anti-6 \times His-tag antibody for Western-blotting experiments, and results showed that pColdTF-fad6b recombinant protein was successfully expressed in *E. coli*. The Western-blotting revealed that recombinant protein pColdTF-fad6b had specifically been recognized by the 6 \times His antibody, indicating that the recombinant protein had antigen activity. Our report provides a new fatty acyl-CoA $\Delta 6$ desaturase gene, FAD6b. It may offer a basic method for purification and activity detection of *E. sinensis* FAD6b, and promote further study of the FADs function.

Key words: *Eriocheir sinensis*; fatty acyl-CoA $\Delta 6$ -b desaturase; gene cloning; prokaryotic expression

Corresponding author: CHENG Yongxu. E-mail:yxcheng@shou.edu.cn

Funding projects: National High Technology R & D Program of China (863 program) (2012AA10A409-5); National Natural Science Foundation of China (31472287); Shanghai University Knowledge Service Platform Shanghai Ocean University Aquatic Animal Breeding Center (ZF1206); Science and Technology Cooperation Project between Hong Kong, Macao and Taiwan from Ministry of Science and Technology(2014DFT30270); Excellent Academic Leaders of Shanghai(12XD1402700); Shanghai Agriculture Science and Technology Key grant(2013D5-7)