

特氏杜氏藻中乙酰辅酶 A 合成酶的基因克隆、表达、纯化及活性测定

金宏昊, 梁明华, 姜建国

(华南理工大学食品科学与工程学院, 广东广州 510640)

摘要: 乙酰辅酶 A 合成酶 (ACS) 催化合成乙酰辅酶 A, 它是油脂代谢和醋酸盐代谢的重要节点之一。本研究利用反转录 PCR (RT-PCR) 技术和 cDNA 末端快速扩增 (RACE) 技术分离得到了特氏杜氏藻 (*Dunaliella tertiolecta*) 乙酰辅酶 A 合成酶 (DtACS) 的 cDNA 全长 (2464 bp), 预测其开放阅读框 (ORF) 为 2184 bp, 727 个氨基酸由此段编码。序列比对显示 *DtACS* 与绿藻 ACS 最为相似 (与衣藻 *Chlamydomonas reinhardtii* 有 68% 一致; 与团藻 *Volvox carteri* f. *nagariensis* 有 70% 一致)。选用带有硫氧还蛋白标签 (Trx-tag) 的 pET32a(+) 作为原核表达载体, 并将 *DtACS* 转入 pET32a(+) 中从而构建了 pET-32a-*DtACS* 质粒。将其转入 BL21(DE3) 感受态细胞中, 同时将 pET-32a 空载体也转入 BL21(DE3) 感受态细胞中, 分别得到重组菌 pET-32a-*DtACS*-BL21(DE3) 和对照菌种 pET-32a-BL21(DE3)。将重组菌在 18 °C、终浓度为 0.6 mmol/L 的 IPTG 条件下诱导 12 h, 表达出来的带有 Trx-His 标签融合蛋白的 DtACS 约为 8.74 ku (6.99 ku+1.75 ku)。此外, 将表达得到的重组蛋白经 Ni²⁺ 亲和层析柱纯化, 纯化后蛋白比活力为 52.87 U/mg。

关键词: 乙酰辅酶 A 合成酶; 特氏杜氏藻; 基因克隆; 纯化; 比酶活

文章编号: 1673-9078(2017)3-67-73

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2017.3.011

Cloning, Expression, Purification, and Activity Assay of Acetyl-CoA

Synthetase from *Dunaliella tertiolecta*

JIN Hong-hao, LIANG Ming-hua, JIANG Jian-guo

(College of Food Science and Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

Abstract: Acetyl-coenzyme A (CoA) synthetase (ACS) catalyzes the synthesis of acetyl-CoA and is one of the important hubs of fat and acetate metabolism. In this study, reverse-transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) and rapid amplification of cDNA ends (RACE) techniques were used to obtain ACS cDNA from *Dunaliella tertiolecta* (DtACS). The cDNA contained 2,464 base pairs (bp) (full-length). The predicted length of open reading frame (ORF) was 2,184 bp, and 727 amino acids were encoded by the ORF. Sequence alignment showed that *DtACS* shared high identities with ACS from chlorophyta (*Chlamydomonas reinhardtii*, 68% identity and *Volvox carteri* f. *nagariensis*, 70% identity). pET32a (+) with the thioredoxin tag (Trx-tag) was selected as the prokaryotic expression vector, and *DtACS* was cloned into pET32a (+) to construct pET-32a-*DtACS*, which was then transformed into an *Escherichia coli* strain BL21(DE3). The blank vector pET-32a (+) was also transformed, successfully producing pET-32a-*DtACS*-BL21(DE3) and control pET-32a-BL21(DE3) recombinant bacteria. The recombinant bacteria were induced at 18 °C for 12 h with a final IPTG concentration of 0.6 mmol/L, and the molecular weight of the expressed DtACS with Trx-His-tagged fusion protein was about 8.74 ku (6.99 ku+1.75 ku). In addition, the recombinant protein was purified by nickel ion affinity chromatography column, and the specific enzyme activity of the purified protein was 52.87 U/mg.

Key words: acetyl-coenzyme A synthetase; *Dunaliella tertiolecta*; gene cloning; purification; specific enzyme activity

乙酰辅酶 A (acetyl-CoA) 是生物细胞内的重要因子, 它直接参与了诸如糖酵解途径、脂肪酸代谢、

收稿日期: 2016-03-30

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31171631)

作者简介: 金宏昊 (1991-), 男, 硕士, 研究方向: 分子生物学

通讯作者: 姜建国 (1963-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 同工酶种群遗传、水生生物学、生态学、环境毒理学、盐藻 b-胡萝卜素代谢途径等方面的研究

氨基酸代谢和糖异生作用等重要代谢过程。乙酰辅酶 A 在醋酸盐代谢过程中处在一个中心位置, 醋酸盐排泄(异化)和吸收(同化)作用的物质流都会经这一点^[1]。

在这个醋酸盐活化途径中, 一种相对保守并普遍存在于各种生物中的醋酸盐同化酶-AMP 形式的乙酰辅酶 A 合成酶 (acetyl-CoA synthetase AMP-forming, AMP-forming ACS, EC 6.2.1.1) 对大部分生物中醋酸盐向乙酰辅酶 A 的转化过程起主要作用, 而在真核生物

中,其更是唯一催化醋酸盐活化反应的酶^[2]。具体来说,这一催化过程分为两步。第一步,醋酸盐在 ACS 的作用下消耗 ATP 形成乙酰-AMP (acetyl-AMP) 中间体。第二步,这一中间体在 ACS 作用下与 CoASH 反应形成 acetyl-CoA 和 AMP。即, $1.\text{acetate}+\text{ATP}\rightarrow\text{acetyl-AMP}+\text{PPi}$, $2.\text{acetyl-AMP}+\text{CoASH}\rightarrow\text{acetyl-CoA}+\text{AMP}$ 。

十几年来,AMP-forming ACS 在古细菌,细菌以及一些真核生物中的性质均有被报道。

Brasen等发现古细菌*Haloarcula marismortui*的ACS有可能是单源发生,并测定了其ACS比酶活为 13 U/mg^[3]。Ingram-Smith C等发现不同种类古细菌的AMP-forming ACS的底物偏好不同^[4]。

在对结核杆菌 (*Mycobacterium tuberculosis*) 的 ACS 进行酶活力测定的研究中表明,其 ACS 比酶活为 0.3~0.5 U/mg^[5]。Stefanie Berger 等通过对细菌 *Methanosaeta thermophila* 中四段 AMP-forming ACS 的研究发现, *mthe 1194* 是最大量表达的。其在大肠杆菌中表达纯化得到的单一条带^[6]。

在酵母中,有两种 ACS 同工酶, *Acs1p* 和 *Acs2p*, 前者表达受葡萄糖阻遏作用控制, S 的晶体结构是一个稳定的三聚物^[8]。

其他真核生物中的 ACS 比酶活在 30~60 U/mg 范围之内^[9]。

此前并没有关于 ACS 在藻类中的特性描述文使得后者在葡萄糖培养环境中成为有重要作用的酶。Alaric A 等发现酵母 *Saccharomyces cerevisiae* 中 *Acs2p* 主要存在于细胞核,此前一直认为其主要存在于细胞质和线粒体^[7]。Gerwald Jogl 等发现酵母中 AMP-forming ACS 基因,本研究选取了真核生物中最为耐盐的生物之一的特氏杜氏藻 (*Dunaliella tertiolecta*, 简称特氏藻) 作为研究对象,这种藻类有着诸多培养条件方面的优势(方便扩大培养,极端条件,不易被微生物污染等),并能够积累大量的甘油三酯,是制备生物柴油的潜在原料^[10-12]。我们通过逆转录 PCR 技术 (RT-PCR) 和 cDNA 末端快速克隆技术 (RACE) 得到了特氏杜氏藻 ACS 基因 (*DtACS*), 序列比对显示其与其他藻类和植物中的相关基因相似性达 60~70%。同时,我们在大肠杆菌中表达、纯化了 *DtACS* 蛋白,并测定了酶活力。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种与载体

特氏藻 (*Dunaliella tertiolecta*) 购于中国科学院水生生物研究所(武汉),由本实验室保存。用 2.0 M NaCl 培养基, 26 °C 液体下培养,光暗比 14:10, 盐藻的培养参照 Ben-Amotz^[13] 的方法,并于对数生长期后期收集特氏杜氏藻细胞 *E. coli* BL21、*E. coli* DH 5 α 和 pET-32a(+) 则由本实验室保存于 -80 °C 冰箱中。

1.1.2 主要试剂与仪器

主要试剂:限制性内切酶 *EcoRI*、*XhoI*、反转录试剂盒和蛋白 Marker 购自 Thermo scientific 公司; DNA 连接酶、PrimeSTAR DNA 聚合酶、*Ex Taq* 酶和 DNA marker 购自 Takara 公司; RACE 试剂盒 SMARTer™ RACE cDNA Amplification Kit 购自 Clontech 公司; 胶回收试剂盒和质粒提取试剂盒购自 OMEGA 公司; Trizol reagent 购自 Life Technology 公司; HisTrap HP column 购自 GE 公司; Bradford 蛋白浓度测定试剂盒购自上海生工技术公司; 其他试剂均为分析纯,购于广州普博仪器有限公司。

主要仪器:PCR 扩增仪,购于 Eppendorf 公司; 蛋白质凝胶电泳系统,购自 BioRad 公司; 大型高速冷冻离心机购自日立公司; 超声波细胞粉碎机购自新芝生物科技有限公司。

1.1.3 培养基

LB 培养基:胰蛋白胨 10 g/L, 酵母提取物 5 g/L, NaCl 10 g/L。

1.2 实验方法

1.2.1 克隆杜氏盐藻 ACS 基因 (*DtACS*)

利用 RNA 提取试剂盒 (Trizol reagent, Life Technology) 将收集到的对数生长期后期的特氏杜氏藻细胞中提取总 RNA。而后利用反转录试剂盒 (RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit, Thermo Scientific) 进行 RT-PCR, PCR 仪上反应程序: 42 °C, 60 min; 70 °C, 5 min。

根据两段从一些物种中分析出来的 ACS 保守氨基酸片段,我们设计了一对相应的简并引物(见表 1) 并成功得到了 *DtACS* 的表达序列标签 (expressed sequence tag, EST)。在此表达序列标签的基础上,通过 SMART 技术 (switching mechanism at 5' end of the RNA transcript, SMART) 以及 5'-RACE 特异性引物 (表 1) 进行 5'-RACE PCR, 这一特定技术能够使有 5'帽子结构的 mRNA 扩增得到完整的 5'端 cDNA。这一过程用到了一个改进的 oligo(dT)引物, 5' SMARTer II A 寡核苷酸引物以及 SMARTScribe™ 逆转录酶 (BD Clontech)。梯度 PCR 反应条件如下: 95 °C 预变性 3 min; 94 °C 变性 30 s, 72 °C 延伸 3 min, 5 个循环; 94 °C

变性 30 s, 70 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 3 min, 5 个循环; 94 °C 变性 30 s, 68 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 3 min, 20 个循环; 最后 72 °C 延伸 5 min。5'-RACE 巢式 PCR 反应条件如下: 95 °C 预变性 3 min; 94 °C 变性 30 s, 68 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 3 min, 25 个循环; 最后 72 °C 延伸 5 min。

本实验利用 RNA PCR 试剂盒 (AMV) Ver.3.0 (TaKaRa) 来获取 3'-RACE cDNA, 3'-RACE 的第一次 PCR 用到了一个特异的上游引物和带有接头的 Oligo dT 引物, 3'-RACE 巢式 PCR 则用到了另外一个特异上游引物和接头引物, 上述引物见表 1。PCR 反应条

件如下: 94 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 30 s, 68 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 47 s, 30 个循环; 最后 72 °C 延伸 10 min。

上述所有扩增片段利用 pEASY[®]-T1 Cloning Kit 克隆连接试剂盒 (TransGen Biotech) 进行 TA 克隆, 这种试剂盒采用 DNA 拓扑异构酶 I, 并将其事先偶联在 pEASY-T1 Vector 上, 只需加入回收产物, 即可反应, 连接成功率高。具体步骤为将 pEASY-T1 Vector (1 μL) 和回收产物 (0.5~4 μL) 轻轻混匀, 25 °C 反应 10~20 min, 之后即可进行转化 *E. coli* DH5α, 筛选阳性克隆进行测序。

表 1 引物设计

Table 1 Design of the primers used in this study

引物	引物序列(5'→3')
Amino acid fragment F	L(M)ACA(S)RIG
Amino acid fragment R	HRI(M)GTAE
Degenerate primers F	HTNGCNTGYKCNMGNATYGG
Degenerate primers R	TCNGCNGTNCRRATDCKRTG
5'-RACE 第一次 PCR 特异引物 R	GTGTGAAGGGAGTGCCCCGAGCCT
5'-RACE 巢式 PCR 特异引物 R	GCCTTGCAGTCCTCCATGCGCCCT
3'-RACE 第一次 PCR 特异引物 F	TGGTGTGGAGCCTGTCATTCTGGA
3'-RACE 巢式 PCR 特异引物 F	TATGGCGACCACAAGCGGTATGAG
3'-RACE 巢式 PCR 接头引物	GTTTTCCCAGTCACGAC
ACS ORF Full F	ATGAAGTGCAGCGCACTGCCAG
ACS ORF Full R	TCAGTTCCTGGTTTCTATTAAT
<i>EcoR</i> I-ACS F	CTTGAATTC ATGAAGTGCAGCGCACT
ACS- <i>Xho</i> I R	ATCCTCGAGGTTCTGGTTTCTATTA

注: 以上引物都是在软件 Primer Premier 5 上本着引物设计的普通原则和相应试剂盒的指导原则设计的。加粗为酶切位点: *EcoR* I 为 GAATTC; *Xho* I 为 CTCGAG。

1.2.2 构建原核表达载体 pET-32a-DtACS

1.2.2.1 目的片段与线性化载体的制备

为了将 *DtACS* 构建到表达载体 pET-32a, 我们选取了两个酶切位点 *EcoR* I 和 *Xho* I。首先, 利用 *EcoR* I-ACS F 和 ACS-*Xho* I R 这一对引物 (表 1), 以特氏藻总 RNA 为模板, 将带有 *EcoR* I 和 *Xho* I 酶切位点的 *DtACS* 基因的 ORF 扩增出来; 用 *EcoR* I 和 *Xho* I 同时酶切上述含 *DtACS* 的扩增片段和 pET-32a 载体, 并分别进行琼脂糖凝胶回收目的片段与线性化载体。

1.2.2.2 连接

连接之前先取少量胶回收产物进行琼脂糖凝胶电泳, 检测是否回收产物。本实验采用 Solution I 将目的片段与载体相连接。反应体系为: Solution I, 5 μL; 线性化 pET-32a, 1 μL; 目的片段, 4 μL; 总体系, 10 μL。在 16 °C 下反应 3 h 后进行转化。

1.2.2.3 转化连接产物

在无菌工作台向 100 μL 大肠杆菌 DH5α 感受态细胞中加入连接产物 (10 μL), 轻轻抽吸两下。之后将其置于冰上 30 min。而后转移至 42 °C 水浴锅中, 热击 1 min 30 s, 马上转移至冰上放置 2~3 min。向离心管中加入 890 μL LB 液体培养基并抽吸。置于培养箱中, 220 r/min, 37 °C 振荡培养 1 h。取 100 μL 菌液涂布在含 Amp 抗性的固体 LB 平板上, 37 °C 倒置过夜培养 12 h。

1.2.2.4 筛选阳性克隆

用无菌牙签在过夜培养的含有 Amp 的 LB 平板上随机挑取白色菌落 5~10 个分别于已装有 10 μL 无菌水的 PCR 管中, 混匀后成为菌悬液。准备另外 5~10 个 PCR 管, 向其中加入菌悬液 (3 μL)、引物 M13F (20 μM, 1 μL) 和引物 M13R (20 μM, 1 μL)、Premix Ex Taq (12.5 μL), 并用 dH₂O 将体系补至 25 μL。之后进行菌液 PCR。再利用琼脂糖凝胶电泳确定阳性克

隆。

1.2.2.5 测序与保存

经菌液 PCR 验证后, 将上述菌悬液接种至 2 mL LB 液体培养基中, 扩大培养后, 送菌液 1 mL 进行测序。将测序分析后确实含有目的片段的阳性克隆菌液 37 °C 培养 12 h 后, 吸取 1 mL 菌液至甘油管中, 放置 -80 °C 冰箱保存。

提取质粒, 并将 pET-32a-*DtACS* 质粒转入 BL21 感受态细胞中。并将 pET-32a 空载体也转入 BL21 感受态细胞中, 分别得到工程菌 pET-32a-*DtACS*-BL21 和对照组 pET-32a-BL21。37 °C 培养 12 h 后, 吸取 1 mL 菌液至甘油管中, 放置 -80 °C 冰箱保存。

1.2.3 在大肠杆菌中异源表达纯化重组 *DtACS*

1.2.3.1 确定最适表达条件

在预实验时, 我们观察到包涵体含量较多, 为了获得尽可能多的可溶蛋白, 在正式表达之前, 需要先确定表达时最适合可溶蛋白生成 (此时包涵体相对较低) 的诱导温度和 IPTG 浓度条件。

1.2.3.2 大量表达

在两根装有 10 mL LB 液体培养基的试管中分别接入 10 μ L 的工程菌 pET-32a-*DtACS*-BL21(DE3) 和 pET-32a-BL21(DE3) (空白对照), 并培养 12 h (37 °C, 220 r/min), 将培养得到的菌体分别接种至两个装有 1 L LB 液体培养基的 2 L 三角瓶, 并培养至 OD₆₀₀ 为 0.6 时 (37 °C, 220 r/min)。在三角瓶中加入终浓度为 0.6 mmol/L 的 IPTG, 并在 18 °C 下过夜培养 12 h。

用容量为 500 mL 的离心瓶分批在高速冷冻离心机中收集过夜培养的菌体 (8000 r/min, 5 min, 4 °C), 加入适量 PBS (PH 7.4) 溶液清洗各离心瓶 1~2 次, 分批溶解收集得到的菌体, 再次以上述条件离心, 并用一定量的 PBS 溶液重悬 (值得注意的是, 需要控制 PBS 溶液总体积, 否则之后纯化时间会过长, 从而导致重组蛋白活性降低)。而后在超声波细胞粉碎机中进行细胞破碎 (480 W, 5 s 破碎, 8 s 间歇, 共 20 min, 破碎过程维持在 4 °C)。最后, 将破碎液进行离心 (13000 g, 15 min, 4 °C) 得到上清和沉淀, 收集上清液, 并经过 0.22 μ m 孔径过滤器过滤制成粗酶液, 以待纯化。沉淀部分用 PBS 溶液重悬至与上清液相等体积。分别取 pET-32a-BL21(DE3) 工程菌悬浮液 (空白对照)、pET-32a-*DtACS*-BL21(DE3) 菌体悬浮液 (未经破碎)、上清液和沉淀液样品制成聚丙烯酰胺凝胶电泳的样品。

1.2.3.3 纯化蛋白

因镍柱纯化系统非常精细, 故所有液体应当经 0.22 μ m 孔径过滤器过滤、超声波除气 40 min 后, 方

可进入镍柱纯化系统。包括以下液体:

(1) 结合缓冲液 1: 20 mM Na₂HPO₄-NaH₂PO₄, pH 8.0, 500 mM NaCl, 40 mM 咪唑;

(2) 结合缓冲液 2: 20 mM Na₂HPO₄-NaH₂PO₄, pH 8.0, 500 mM NaCl, 80 mM 咪唑;

(3) 结合缓冲液 3: 20 mM Na₂HPO₄-NaH₂PO₄, pH 8.0, 500 mM NaCl, 100 mM 咪唑;

(4) 洗脱缓冲液: 20 mM Na₂HPO₄-NaH₂PO₄, pH 8.0, 500 mM NaCl, 500 mM 咪唑;

(5) 剥离缓冲液: 20 mM Na₂HPO₄-NaH₂PO₄, pH 8.0, 500 mM NaCl;

(6) 20%乙醇: 200 mL 无水乙醇, 加蒸馏水定容至 1 L;

(7) 0.1 M NiSO₄: 称取 2.63 g NiSO₄·6H₂O, 加 80 mL 蒸馏水溶解, 最后定容至 100 mL;

(8) 双蒸水: 经过两次蒸馏的重蒸水。

采用 5 mL 镍柱进行纯化:

(1) 清洗和平衡: 先将系统用 ddH₂O 清洗, 而后使用 10 倍柱体积的结合缓冲液 1 平衡柱子, 流速为 5 mL/min;

(2) 上样: 将待纯化的酶液以 2.5 mL/min 的速度通过已平衡后的镍柱系统, 收集穿透液, 在一次上样完毕后, 可将穿透液再次上样以提高镍柱对样品的吸收率;

(3) 梯度洗脱: 分别以含 40 mM、80 mM 和 100 mM 咪唑的结合缓冲液来梯度洗脱镍柱中的杂蛋白, 而后用洗脱缓冲液洗脱目的蛋白至无蛋白检出, 梯度洗脱过程中流速始终为 5 mL/min, 并在每一次洗脱时注意屏幕曲线斜率的变化 (斜率刚开始变化时收集洗脱液)。同时, 在每一次换缓冲液洗脱之前必需平衡 5 个柱体积以上。最后将各收集液取样制成 SDS-PAGE 样品, 经 SDS-PAGE 检测实验结果;

(4) 清洁系统: 在柱子内无残余蛋白后, 用 10 个柱体积的 20%乙醇冲洗镍柱和系统, 取下镍柱, 于 4 °C 保存。最后关闭系统电源。

将最后一步收集到的流出液进行 SDS-PAGE 鉴定是重组目的蛋白后, 加入截留分子量为 2.62 ku 的透析袋中, 将整个透析袋置入缓冲液 (100 mM Tris-HCl, pH 8.0) 中 12 h, 收集此蛋白样品, 用作酶活力测定样品。

在透析重组蛋白后, 有时需要进行浓缩才能使蛋白浓度更加适合酶活力测定实验的要求。本文利用 UFC903096 超滤离心管 (15 mL、30 kd millipore) 配 50 mL 外管来浓缩重组蛋白, 适用蛋白质的浓缩、纯化、脱盐和缓冲液更换等。这种离心管采用垂直结构

的膜减少浓差极化，加快了离心速度，整个离心操作大概 10~30 min。浓缩后的样品能保证极高的回收率 (>90%的高回收率)。

1.2.4 酶活力测定

酶活力测定反应体系见表 2。这个反应体系通过一个偶联反应来测定乙酰辅酶 A 的生成，加入 ATP 为反应起始标志，反应在 37 °C 持续 5 min。在此反应中，NAD 在苹果酸酶和柠檬酸合成酶的催化作用下还原为 NADH。此还原率可以利用 Bradford 蛋白浓度测定试剂盒在 340 nm 下测定。

比酶活(定义为 μmol NADH/(min·mg))通过下文公式计算：

$$SP = \frac{10^6 \times \Delta A_{340} \times V_t}{\epsilon \times b \times W}$$

式中 SP: 比酶活 (U/mg); ΔA₃₄₀: 340 nm 下单位时间内吸光度变化值; V_t(mL)是反应总体积; ε 是 NADH 的摩尔吸光系数, 为 6.22×10³ L/(mol·cm); b 为 1 cm 比色皿光程长度; W(mg) 是蛋白质含量。

表 2 酶活力测定反应体系

Table 2 Reaction system for the determination of enzyme activity

组成体系成分	各成分在体系中的量/mL
Tris-Cl (pH 8.0)	100 μmol
MgCl ₂	5 μmol
L-malic acid	5 μmol
Malic enzyme	150 U
Citrate synthase	2.75 U
Potassium acetate	10 μmol
NAD	5 μmol
ATP	10 μmol
CoA	0.1 μmol
纯化蛋白	一定量

2 结果与讨论

2.1 扩增基因与序列分析

用 RNA 提取试剂盒提取特氏藻总 RNA，以反转录得到 cDNA 为模板，以 ACS ORF Full F 和 ACS ORF Full R (表 1) 为引物，获得 *DtACS* 的完整 ORF。凝胶电泳显示 PCR 产物条带为清晰的单一条带 (图 1)，约 2200 bp，经测序发现该 PCR 产物与 Genbank 登录号 KT692941 中的完整编码区 (CDS) 2184 bp 长度一致。这段 2184 bp 的 *DtACS* ORF 编码了 727 个氨基酸，测序结果经比对后显示扩增出的基因与绿藻 ACS 最为相似 (*Chlamydomonas reinhardtii* 68% 和 *Volvox*

carteri f. nagariensis 70%)，与真核生物、真细菌和古细菌中的 ACS 具有较高相似性，证明克隆得到的序列为 *DtACS* cDNA。

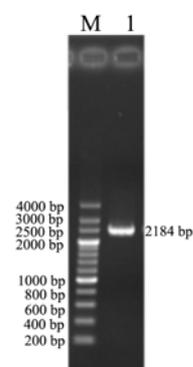


图 1 PCR 产物的琼脂糖凝胶电泳图

Fig.1 Gel electrophoresis of PCR-amplified *DtACS*

注: M 为 DNA 分子量标准; 1 为 PCR 产物。

2.2 双酶切鉴定

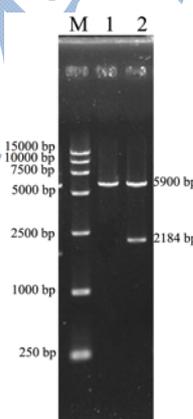


图 2 双酶切鉴定电泳图

Fig.2 Gel electrophoresis of double-digest verification

注: M 为 DNA 分子量标准; 1 为双酶切后的空白质粒; 2 为双酶切过后的重组质粒。

将重组后的质粒 pET-32a-*DtACS* 用 *EcoR* I 和 *Xho* I 进行双酶切，然后进行琼脂糖凝胶电泳，结果如图 2，从图中可以看到泳道 1 (空白对照，双酶切后的 pET-32a) 在 5900 bp 左右有单一明亮的条带，而泳道 2 (双酶切后的 pET-32a-*DtACS*) 除了 5900 bp 处同样有一条带之外，在 2200 bp 左右也能看到清晰条带，由此可以看出 pET-32a-*DtACS* 质粒被 *EcoR* I 和 *Xho* I 双酶切成两条片段，而空白质粒在双酶切后没有切出 2200 bp 的条带，说明表达质粒 pET-32a-*DtACS* 已构建成功。

2.3 蛋白表达与纯化

一般诱导条件下，产生的蛋白质大部分都是包涵体。经过预实验确定，产生可溶性蛋白质最多的条件

(尽管这一条件下,包涵体含量仍然占大部分)是IPTG终浓度为0.6 mmol/L,诱导温度为18℃,并培养12 h。结果如图3。

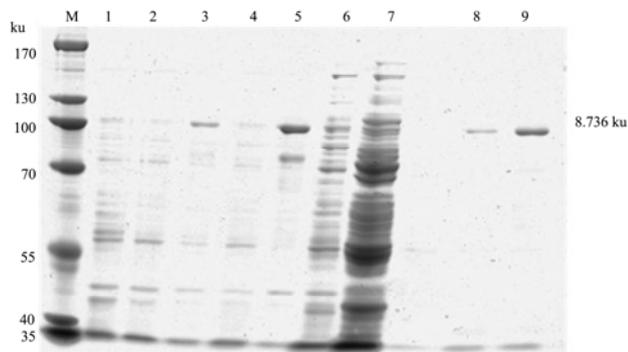


图3 重组蛋白镍柱亲和层析纯化后的SDS-PAGE电泳图

Fig.3 SDS-PAGE pattern of recombinant protein purified by HisTrap HP affinity chromatography

注: 条带 M, 蛋白质分子质量标准(Thermo); 条带 1, pET32a(+)-BL21(DE3)总蛋白; 条带 2, 未诱导的 pET32a(+)-DtACS-BL21(DE3)的总蛋白; 条带 3, pET32a(+)-DtACS-BL21(DE3)诱导破碎离心后不可溶部分的蛋白; 条带 4, pET32a(+)-DtACS-BL21(DE3)诱导破碎离心后可溶部分的粗蛋白; 条带 5, pET32a(+)-DtACS-BL21(DE3)在 18℃用终浓度为 0.6

mmol/L IPTG 诱导 12 h 之后的总蛋白; 条带 6, 含有 40 mM 咪唑的结合液进入系统后洗脱下来的蛋白; 条带 7, 含有 100 mM 咪唑的结合液进入系统后洗脱下来的蛋白; 条带 8-9, 含有 500 mM 咪唑的洗脱液进入系统后洗脱下来的蛋白。

镍柱纯化过程中,在经过分别含有 40 mM 和 100 mM 咪唑的缓冲液洗脱杂蛋白后,我们用含 500 mM 咪唑的缓冲液洗脱 DtACS 目的蛋白,接收各步骤流出液。聚丙烯酰胺凝胶电泳后显示如图 3。如图所示,经含 500 mM 咪唑的洗脱液洗脱出来的流出液含有一条明亮单一的条带,其大小约为 8.736 ku,与我们预测的 DtACS (6.989 ku) 加上标签蛋白(1.747 ku)一致。

2.4 DtACS 酶活测定

HisTrap™ HP 镍柱纯化后和超滤后的 ACS 比活力分别是 56.921 U/mg 和 52.873 U/mg, 收率分别为粗蛋白的 78.33%和 56.26%, 纯化倍率分别为粗蛋白的 64.3 倍和 59.7 倍(表 3)。这个值与另外一项关于其他真核生物中 ACS 比酶活的研究结果不谋而合(30~60 U/mg)^[9], 而又高于 *Mycobacterium tuberculosis* 中 ACS 的比酶活(0.3~0.5 U/mg)^[5], 亦高于极度嗜盐古细菌 *Haloarcula marismortui* 中 ACS 的比酶活^[3]。

表 3 酶活力数据

Table 3 Enzyme activity parameters

步骤	取样量/ μ L	ΔA_{340}	酶活/(U/mL)	比活/(U/mg)	总酶/U	产率/%	纯化倍数
粗酶液	50	0.0015	1.929	0.885	270.097	100	1.0
纯化后蛋白	50	0.047	30.225	56.921	211.576	78.333	64.319
浓缩后蛋白	50	0.0675	43.408	52.873	151.929	56.25	59.744

注: 1 U=1 μ mol NADH/min.

3 结论

本研究以特氏杜氏藻的总 RNA 为模板, 利用反转录 PCR 和 SMART 技术来获取 *DtACS* cDNA 的 ORF 全长 2184 bp, 编码 727 个氨基酸, 与绿藻 ACS 更为相近。我们将 *DtACS* 的 ORF 构建到原核表达载体 pET-32a 上, 并转化至 *E. coli* BL21 中, 由此得到重组工程菌 pET-32a-*DtACS*-BL21。此工程菌在诱导剂 IPTG 的诱导下表达, 产生可溶性蛋白最多的表达条件为 IPTG 终浓度 0.6 mmol/L, 并在 18℃下过夜培养 12 h。离心得到细胞后, 将其超声破碎, 取上清液进行镍柱亲和层析, 由此得到纯化后的 DtACS, 并得到超滤后的 DtACS 的比酶活为 52.873 U/mg, 产率为 56.26%。本研究成功克隆了 *DtACS* cDNA 并构建了重组质粒 pET-32a-*DtACS*-BL21, 表达纯化并测定了 DtACS 酶活, 为以后研究特氏杜氏藻 ACS 及其油脂代谢通路奠定基础。

参考文献

- [1] Wolfe A. The acetate switch [J]. Microbiol. Mol. Biol. Rev., 2005, 69(1): 12-50
- [2] Starai, Escalante-Semerena. Acetyl-coenzyme A synthetase (AMP forming) [J]. Cell. Mol. Life Sci., 2004, 61(16): 2020-2030
- [3] Brasen C, Schonheit P. AMP-forming acetyl-CoA synthetase from the extremely halophilic archaeon *Haloarcula marismortui*: purification, identification and expression of the encoding gene, and phylogenetic affiliation [J]. Extremophiles, 2005, 9(5): 355-65
- [4] Ingram-Smith C, Smith K. AMP-forming acetyl-CoA synthetases in *Archaea* show unexpected diversity in substrate utilization [J]. Archaea, 2007, 2(2): 95-107
- [5] Li R, Gu J, Chen P, et al. Purification and characterization of

- the acetyl-CoA synthetase from *Mycobacterium tuberculosis* [J]. *Acta Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai)*, 2011, 4(11): 891-899
- [6] Berger S, Welte C, Deppenmeier U. Acetate activation in *Methanosaeta thermophila*: characterization of the key enzymes pyrophosphatase and acetyl-CoA synthetase [J]. *Archaea*, 2012, 2012(1): 315153
- [7] Falcon A, Chen S, Wood M, et al. Acetyl-coenzyme A synthetase 2 is a nuclear protein required for replicative longevity in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *Mol. Cell Biochem.*, 2010, 333(1): 99-108
- [8] Jogl G, Tong L. Crystal structure of yeast acetyl-coenzyme A synthetase in complex with AMP [J]. *Biochemistry*, 2004, 43(6): 1425-31
- [9] Martinez B, H, Reglero A, Fernandez V, et al. Isolation and characterization of the acetyl-CoA synthetase from *Penicillium chrysogenum*. Involvement of this enzyme in the biosynthesis of penicillins [J]. *J. Biol. Chem.*, 1992, 267(8): 5474-81
- [10] Chen H, Lao Y, Jiang J. Effects of salinities on the gene expression of a (NAD(+))-dependent glycerol-3-phosphate dehydrogenase in *Dunaliella salina* [J]. *Sci. Total Environ.*, 2011, 409(7): 1291-1297
- [11] Chen H, Lu Y, Jiang, J. Comparative analysis on the key enzymes of the glycerol cycle metabolic pathway in *Dunaliella salina* under osmotic stresses [J]. *Plos One*, 2012, 7: e37578
- [12] Qv X, Zhou Q, Jiang J. Ultrasound-enhanced and microwave-assisted extraction of lipid from *Dunaliella tertiolecta* and fatty acid profile analysis [J]. *J. Sep. Sci.*, 2014, 37(20): 2991-2999
- [13] Ben A, Avron M. The biotechnology of cultivating the halotolerant alga *Dunaliella* [J]. *Trends in Biotechnology*, 1990, 8(90): 121-126