

共轭亚油酸合成相关基因在耶氏解脂酵母中 异源表达及活性研究

刘云云, 杨波, 张灏, 陈永泉, 陈卫, 陈海琴

(江南大学食品学院, 江苏无锡 214122)

摘要:为了探究植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*)中与共轭亚油酸(CLA)生物合成相关的3个基因:(亚)油酸水合酶基因(*mcra*)、短链脱氢酶/氧化还原酶基因(*dh*)、乙酰乙酸脱羧酶基因(*dc*)在耶氏解脂酵母(*Yarrowia lipolytica*, *Y. lipolytica*)中异源表达后是否具有活性,利用两个耶氏解脂酵母整合表达质粒(pINA 1269和pINA 1312),将3个基因分别导入耶氏解脂酵母营养缺陷型宿主菌Polf(Ura⁻, Leu⁻)中,构建了重组菌株。在不同重组菌中添加相应的底物:亚油酸(LA)和10-羟基-顺-12-十八碳烯酸(10-HOE),然后对反应体系进行脂肪酸检测,得到基因对应的不同产物:10-HOE和10-氧代-反-11-十八碳烯酸(10-oxo-trans 11-octadecenoic acid),证明*mcra*、*dh*、*dc*在耶氏解脂酵母中进行了异源表达并且具有活性。

关键词:亚油酸;共轭亚油酸;耶氏解脂酵母;异源表达

中图分类号:Q78;TS201.3

文献标识码:A

文章编号:1003-7969(2018)09-0082-06

Heterologous expression and activity of the genes related to CLA synthesis in *Yarrowia lipolytica*

LIU Yunyun, YANG Bo, ZHANG Hao, CHEN Yongquan,
CHEN Wei, CHEN Haiqin

(School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China)

Abstract: To explore whether three genes involved in conjugated linoleic acid (CLA) biosynthesis in *Lactobacillus plantarum* (Myosin cross reactive antigen (*mcra*), Short-chain dehydrogenase/oxidoreductase (*dh*) and Acetoacetate decarboxylase (*dc*)) were active after heterologously expressed in *Yarrowia lipolytica* (*Y. lipolytica*), with two *Y. lipolytica* expression plasmids (pINA 1269 and pINA 1312), the three genes were introduced into *Y. lipolytica* auxotrophic host Polf (Ura⁻, Leu⁻), and finally the recombinant strains were constructed. The corresponding substrates linoleic acid (LA) and 10-hydroxy-cis-12-octadecenoic acid (10-HOE) were added into different recombinant strains, and the fatty acids were detected in the reaction system to obtain different products corresponding to the genes: 10-HOE and 10-oxo-trans 11-octadecenoic acid, demonstrating that *mcra*, *dh* and *dc* were heterologously expressed and were active in *Y. lipolytica*.

Key words: linoleic acid; conjugated linoleic acid; *Yarrowia lipolytica*; heterologous expression

收稿日期:2018-02-04;修回日期:2018-06-26

基金项目:国家自然科学基金资助项目(31571810)

作者简介:刘云云(1991),女,硕士,研究方向为食品微生物(E-mail)18811991981@163.com。

通信作者:陈海琴,教授,博士(E-mail)haiqinchen@jiangnan.edu.cn。

共轭亚油酸(Conjugated linoleic acid, CLA)是一类具有生理活性^[1-4]的脂肪酸。目前,合成CLA转化率较高的微生物有瘤胃菌、丙酸菌和乳酸菌等^[5]。其中,乳酸菌生物转化CLA多为多种酶参与的复合酶催化,因此酶学机制较为复杂。本实验室筛选出一株具有合成CLA能力的植物乳杆菌ZS2058,并且对反应机理进行了研究^[6]。研究发

现,植物乳杆菌 ZS2058 中与 CLA 生物合成相关的亚油酸异构酶系包含 3 个基因:(亚)油酸水合酶基因(*mcra*, GenBank: JF747255.1)、短链脱氢酶/氧化

还原酶基因(*dh*, GenBank: KJ019513)、乙酰乙酸脱羧酶基因(*dc*, GenBank: KJ019514),并且通过一系列研究确定反应机理如图 1 所示。

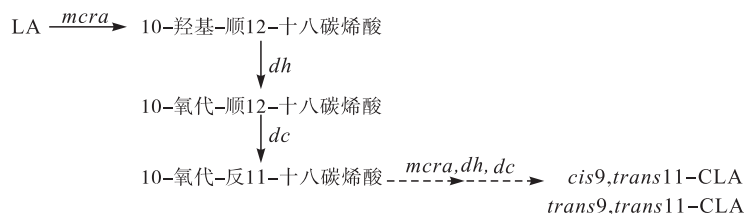


图 1 植物乳杆菌 ZS2058 转化 LA 生成 CLA 反应机理

耶氏解脂酵母具有方便、成熟的操作系统,且安全无害,因此适用于食品及工业生产^[7];除此之外,耶氏解脂酵母能合成 CLA 的底物——亚油酸。因此,本实验采用耶氏解脂酵母作为宿主菌株,将植物乳杆菌 ZS2058 中与 CLA 生物合成相关基因 *mcra*、*dh*、*dc* 分别导入耶氏解脂酵母中,通过添加相应底物分别对 3 个基因进行活性测定,为构建异源合成 CLA 的工程菌株进行初步研究。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 菌株及质粒

大肠杆菌 *Escherichia coli* (*E. coli*) DH5 α 由本实验室保存。耶氏解脂酵母 Polf 及质粒 pINA 1269、pINA 1312 均受赠于法国教授 Catherine Madzak。密码子优化后的基因 (*omcra*, *odh*, *odc*) 由南京金斯瑞生物科技有限公司合成,并连接在表达载体 pUC57 上,得到 pUC57-*omcra*, pUC57-*odh*, pUC57-*odc*。

1.1.2 培养基

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

YNBD 培养基:酵母含氮碱基(不含氨基酸)6.7 g/L,葡萄糖 20.0 g/L,调节 pH 5.5。

YPD 培养基:蛋白胨 20.0 g/L,酵母提取物

10.0 g/L,葡萄糖 20.0 g/L,调节 pH 6.5。

其中,固体培养基添加 1.5% ~ 2.0% 的琼脂;如有需要,在相应的培养基中添加抗生素及 0.1 g/L 尿嘧啶或者 0.1 g/L 亮氨酸。

1.1.3 主要试剂及仪器

DNA 限制性内切酶、PCR 产物回收试剂盒、凝胶回收试剂盒,均购自 Thermo Fisher 公司;DNA T4 连接酶,购自日本 TaKaRa 公司;质粒提取试剂盒,购自天根生化科技有限公司;醋酸锂(LiAc),购自国药集团;亚油酸(纯度 $\geq 99\%$)、酸洗玻璃珠、内标十七烷酸,均购自 Sigma-Aldrich 公司。

缓冲液 A: 0.1 mol/L Tris-HCl (pH 7.5), 0.1 mol/L NaCl, 2 mmol/L DTT, 1 mmol/L EDTA, 1 mmol/L 蛋白酶抑制剂 PMSF, 10% 甘油。

亚油酸(LA)乳化液:按亚油酸与吐温-80 质量比 3:2 称取,加入超纯水,使其质量浓度为 30 g/L,磁力搅拌器搅拌 0.5 h 至溶液呈均匀的乳液,0.22 μm 无菌滤膜过滤除菌。

T100 PCR 仪, Geldoc 2000 凝胶成像系统(美国 Bio-Rad 公司); GCMS-QP2010 Ultra 气质联用仪(日本岛津公司)。

1.1.4 PCR 引物(见表 1、表 2)

表 1 用于构建 *omcra*, *odh*, *odc* 表达载体的引物

序号	序列(5'-3')	酶切位点	目标片段	产物长度
P1/P2	ATACAAGAGCGTTTGCCAGCC CATCTCACTTGCCTATGTATGGAAA	-	通用验证引物	509 bp + 目的基因长度
P3/P4	GGAATTCTATCGATACGCGTGCATGCTGAG CATGGAATTCGGACACGGGCATCTC	<i>EcoR</i> I <i>EcoR</i> I	<i>odc</i> 表达单元	1 843 bp 1 843 bp

表 2 *omcra*, *odh*, *odc* DNA 验证引物

序号	序列(5'-3')	目标片段	产物长度/bp
P5/P6	ACGGTCACTGGGACGGCA AGGACCTCAGGTCGGTGGGA	<i>omcra</i>	1 414
P7/P8	TGCTGCTCACGGTTTCGG CGCTTCACTCGGTCCTCAAT	<i>odh</i>	771
P9/P10	GCCTCTTTCATTGCTTCCGA GCCTTGGGGTTGAAGAAGGA	<i>odc</i>	824

1.2 实验方法

1.2.1 耶氏解脂酵母重组表达载体的构建(见图2)

表达载体 pINA 1269 - *omcra* 和 pINA 1312 - *odh*、pINA 1312 - *odc* 的构建:用限制性内切酶 *Pml*I 和 *Kpn*I 酶切质粒(pINA 1269, pINA 1312)和目的基因片段(*omcra*, *odh*, *odc*), PCR 产物纯化试剂盒进行

纯化,用 T4 连接酶过夜连接。将得到的连接液转化至 *E. coli* DH5 α 感受态细胞,涂布于氨苄青霉素或卡那霉素抗性的 LB 固体平板(pINA 1269, 氨苄青霉素抗性;pINA 1312, 卡那霉素抗性),放入 37 $^{\circ}$ C 恒温培养箱中培养 12 ~ 16 h。

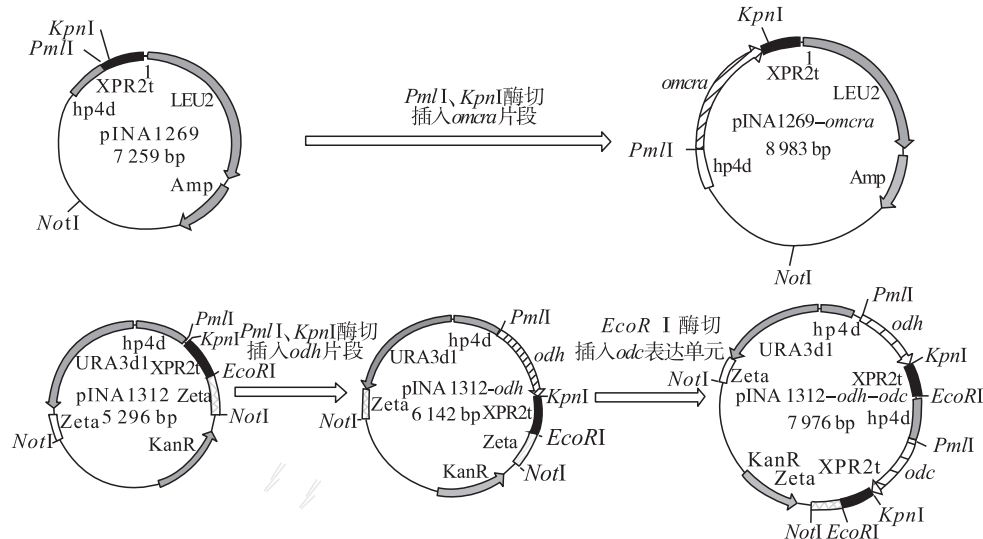


图2 pINA 1269 - *omcra* 和 pINA 1312 - *odh* - *odc* 的构建设计

表达载体 pINA 1312 - *odh* - *odc* 构建:用扩增引物从 pINA 1312 - *odc* 上扩增出带有启动子、终止子及 *odc* 基因的完整表达单元,两端添加 *Eco*RI 酶切位点。用 *Eco*RI 分别酶切表达载体 pINA 1312 - *odh* 和表达单元。为避免后续连接反应过程中载体 DNA 发生自身环化反应,将酶切后的表达载体进行去磷酸化处理。用 T4 连接酶过夜连接。将得到的连接液转化至 *E. coli* DH5 α 感受态细胞,涂布于卡那霉素抗性的 LB 固体平板,放入 37 $^{\circ}$ C 恒温培养箱中培养 12 ~ 16 h。

分别挑取平板上长出的单菌落接种至含有相应抗生素的 LB 液体培养基中,于 37 $^{\circ}$ C、200 r/min 恒温摇床中振荡培养 12 h 后收集菌体,抽提质粒,用验证引物进行 PCR 扩增验证;然后将验证正确的重组菌进行测序分析。相关引物(表1)由上海桑尼生物科技有限公司合成,基因测序由华大基因完成。

1.2.2 重组表达载体的转化及重组菌的鉴定

用限制性内切酶 *Not*I 线性化处理表达载体,之后采用醋酸锂化学转化法^[8]将线性化表达载体导入耶氏解脂酵母感受态细胞中,并将处理后的酵母涂布于 YNBD 筛选培养基上培养 2 ~ 3 d,挑取在筛选培养基上生长的酵母转化子,接种至 5 mL YNBD 液体培养基中,28 $^{\circ}$ C 摇床培养 24 h。收集菌体,提取基因组;以基因组为模板,用 P1/P2 进行 PCR 验证。验证为阳性的转化子即为成功导入异

源基因片段的耶氏解脂酵母重组菌。

1.2.3 耶氏解脂酵母重组菌转录验证

耶氏解脂酵母重组菌在液体 YPD 培养基中培养 24 h(对数生长期)后收集菌体,用液氮研磨,采用 Trizol 法^[9]提取 RNA。按照 TaKaRa 公司的反转录试剂盒 PrimeScriptTM RT reagent Kit with gDNA Eraser 说明书要求,以 RNA 为模板进行反转录得到 cDNA,以 cDNA 为模板,用 *omcra*、*odh*、*odc* 基因的验证引物(表2)进行 PCR 验证。

1.2.4 重组耶氏解脂酵母的培养及 *omcra*、*odh*、*odc* 的酶活测定

(1) 酵母培养:将 -80 $^{\circ}$ C 甘油管保存的重组耶氏解脂酵母菌株在 YNBD 固体培养基上划线,在 28 $^{\circ}$ C 恒温培养箱中培养;用接种环挑取 YNBD 固体培养基上的单菌落于 5 mL YNBD 液体培养基中,于 28 $^{\circ}$ C、200 r/min 摇床培养 48 h。将种子液以 2% 的接种量接种至 YPD 培养基,28 $^{\circ}$ C、200 r/min 培养 36 h。

(2) 粗酶液制备:吸取 1 mL 菌液收集菌体,用 0.85% NaCl 冲洗两次。加入 200 μ L 酸洗玻璃珠和 250 μ L 缓冲液 A,振荡破碎后,500 \times g 离心 10 min,上层即为粗酶液。

(3) 吸取上层 200 μ L 粗酶液于带盖玻璃瓶中,加入 10 μ L LA 乳化液(质量浓度为 30 g/L),28 $^{\circ}$ C、200 r/min 反应 2 h。

(4)对反应后的反应体系进行脂肪酸提取及分析。

1.2.5 脂肪酸的提取及分析

(1)脂肪酸提取:向反应体系中加入 40 μL C17:0, 1 mL 氯仿, 1 mL 甲醇, 振荡 30 s, 3 000 $\times g$ 离心 3 min 后吸取下层氯仿层;再加入 1 mL 氯仿重复萃取。氮气吹干,加入 1 mL 10% 盐酸-甲醇甲酯化,置于 60 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 3 h (每隔 30 min 振荡 1 min)。冷却至室温后加入 1 mL 正己烷和 1 mL 饱和 NaCl 振荡混匀,离心后吸取上层溶液;再向原体系中加 1 mL 正己烷振荡,重复萃取。氮气吹干,加入 1 mL 正己烷混匀,转入气相瓶,进行气相色谱分析。

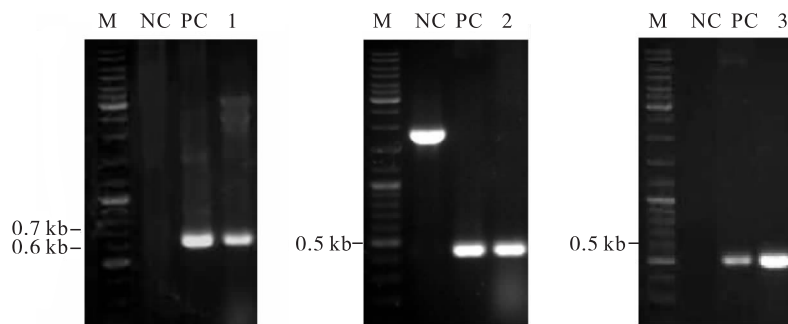
(2)气相色谱条件:岛津气相色谱仪(GC 2010 plus),气相柱 Rtx-wax (30 m \times 0.25 mm \times 0.25

μm),质谱仪(岛津 Ultra QP2010)。程序升温条件为初始温度 150 $^{\circ}\text{C}$,以 5 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 的速度上升至 200 $^{\circ}\text{C}$,保持 10 min,然后以 4 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 升温至 240 $^{\circ}\text{C}$,保持 10 min。采用分流进样,进样量 1 μL ,分流比 10:1,载气为氦气。进样器和检测器温度均为 240 $^{\circ}\text{C}$ 。

2 结果与讨论

2.1 表达载体的构建及耶氏解脂酵母重组菌的筛选鉴定

将构建好的表达载体进行 PCR 验证,结果如图 3 所示,PCR 扩增得到的条带与理论值大小一致,说明已经成功将目的基因导入表达载体中。经过进一步测序验证,验证正确的表达载体用于耶氏解脂酵母重组菌的构建。



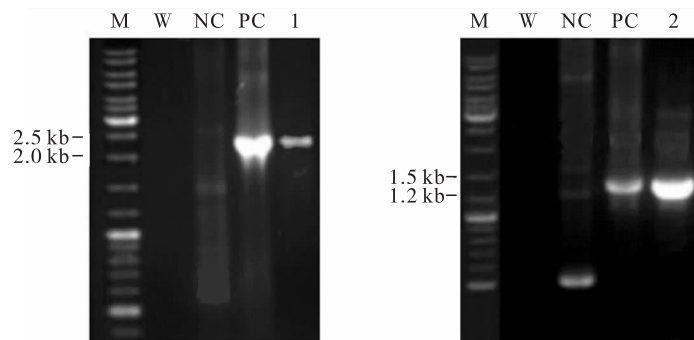
注:M. DNA 标记;NC. 阴性对照,空质粒 pINA 1269 或 pINA 1312;PC. 阳性对照,pUC57-*omcra*/pUC57-*omcra*;1. pINA 1269-*omcra* 质粒;2. pINA 1312-*odh* 质粒;3. pINA 1312-*odh-odc* 质粒。

图3 表达载体 pINA 1269-*omcra* 和 pINA 1312-*odh-odc* PCR 验证

耶氏解脂酵母 Polf (Leu⁻, Ura⁻) 是敲除 *URA3* 和 *LEU2* 基因得到的营养缺陷型菌株^[10],不能在无尿嘧啶和亮氨酸的培养基上生长。表达载体 pINA 1269-*omcra* 上携带 *LEU2* 基因,通过同源交换的方式整合到耶氏解脂酵母中,重组菌能在添加尿嘧啶的筛选培养基上生长。

挑取在筛选培养基上长出的酵母转化子,提取基因组,以基因组为模板,用引物 P1/P2 进行

PCR 扩增,得到预期大小片段(2 200 bp)。同样地,将成功构建的表达载体 pINA 1312-*odh-odc* 线性化后,转化至耶氏解脂酵母感受态细胞中,重组菌在含有亮氨酸的筛选培养基上生长。提取基因组,PCR 验证,最终获得正确的耶氏解脂酵母转化子(预期大小片段 1 355 bp)。PCR 验证结果如图 4 所示。



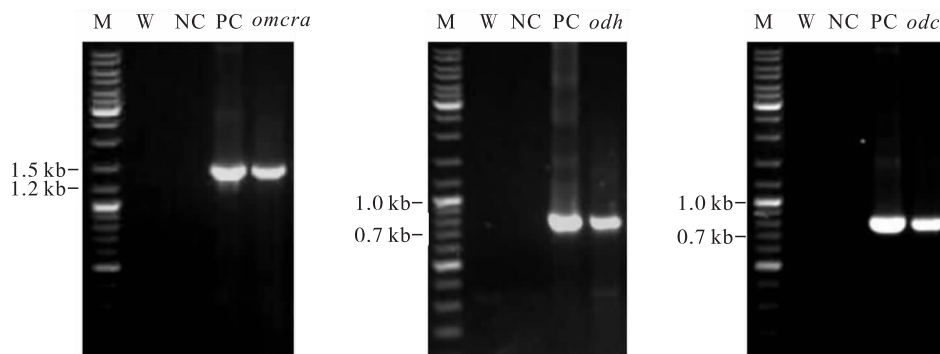
注:M. DNA 标记;W. 水;NC. 阴性对照,空质粒 pINA 1269/pINA 1312;PC. 阳性对照,载体 pINA 1269-*omcra*/pINA 1312-*odh-odc*;1. Polf 1269-*omcra* 基因组;2. Polf 1312-*odh-odc* 基因组。

图4 耶氏解脂酵母 Polf 1269-*omcra* 及 Polf 1312-*odh-odc* 重组菌 PCR 验证

2.2 耶氏酵母重组菌转录水平验证

获得耶氏解脂酵母重组菌株后,为了验证导入的3个基因是否成功表达,首先对获得的阳性重组菌进行转录水平验证。在培养过程中,耶氏解脂酵母一般都会经历延迟期、对数生长期、稳定期和衰亡

期。菌体细胞处于对数生长期时,生长代谢比较旺盛,基因表达水平较高。因此,选取 YPD 液体培养基中培养 24 h 的菌体(对数生长期)进行转录水平验证,结果如图 5 所示。



注:M. DNA 标记;W. 水;NC. 阴性对照,空质粒 pINA 1269/pINA 1312;PC. 阳性对照,载体 pINA 1269 - *omcra* 或 pINA 1312 - *odh* - *odc*; *omcra*, *odh*, *odc*. 耶氏解脂酵母重组菌 cDNA。

图 5 耶氏解脂酵母重组菌转录验证

由图 5 可知,分别得到与阳性参照对应且与理论片段大小一致的条带。由此可知,基因 *omcra*、*odh*、*odc* 都进行了转录。

2.3 耶氏解脂酵母重组菌中 *omcra*、*odh*、*odc* 的酶活测定

Ogawa^[5,11]、Takeuchi^[12] 等通过一系列研究证明,植物乳杆菌 AKU 1009a 催化 LA 合成 CLA 过程是一个多反应体系。本实验室筛选的植物乳杆菌 ZS2058 生成 CLA 的反应机理与之类似。并且在植

物乳杆菌中,通过对 *mcra*、*dh*、*dc* 分别进行敲除及回补,进一步验证了 3 个基因在植物乳杆菌 ZS2058 中的反应机理。由此可见,植物乳杆菌中 *mcra*、*dh*、*dc* 基因在 CLA 的生物合成过程中都发挥重要作用。只有确保 3 个基因都具有活性,才能进行进一步研究。

在反应体系中添加 LA 乳化液对 *omcra* 进行活性测定,结果如图 6 所示。

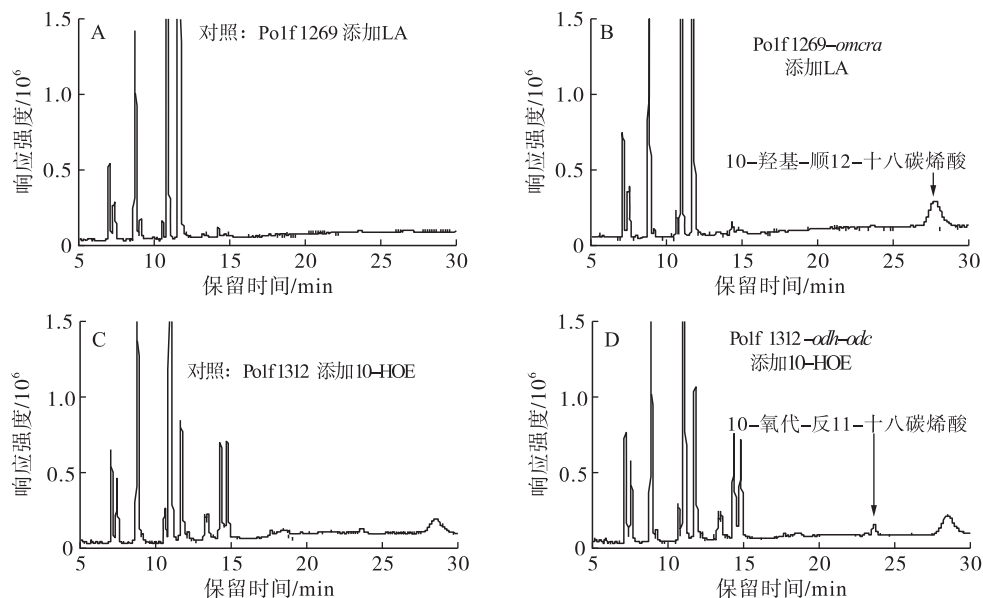


图 6 重组菌及其对照组体外粗酶反应体系脂肪酸 GC-MS 结果

由图 6 可知,与对照组相比,反应体系中检测到保留时间为 28.5 min 的产物峰,结合质谱(MS)碎片信息及 10-羟基-顺 12-十八碳烯酸(10-

HOE)的理论碎片断裂方式可知,*omcra* 基因在重组菌中成功表达,得到的酶具有催化 LA 生成 10-HOE 的活性。因为 *odc* 对应的底物 10-氧代-顺

12-十八碳烯酸产量少而且难以分离纯化,所以将 *odh*、*odc* 基因同时导入耶氏解脂酵母中,通过添加本实验室分离纯化的 10-HOE,判断是否有 10-氧代-反 11-十八碳烯酸生成,以此证明两个基因是否成功表达。GC-MS 结果显示,反应体系(图 6D)中检测到保留时间为 23.6 min、且与理论碎片断裂方式对应的反应产物——10-氧代-反 11-十八碳烯酸,而对照组(图 6C)没有检测出该产物。说明 *odh*、*odc* 基因对应的酶分别将 10-HOE 催化生成 10-氧代-顺 12-十八碳烯酸,从而进一步生成 10-氧代-反 11-十八碳烯酸。综上所述,经过优化后的 *omcra*、*odh*、*odc* 基因在耶氏解脂酵母中成功实现了异源表达。

3 结论

本实验成功地将植物乳杆菌 ZS2058 中与 CLA 生物合成相关基因在耶氏解脂酵母中进行了表达。在添加游离亚油酸作为底物时,含有密码子优化基因 *omcra* 的重组菌 Polf 1269-*omcra* 将亚油酸催化为 10-羟基-顺 12-十八碳烯酸;以本实验室分离纯化的 10-羟基-顺 12-十八碳烯酸为底物,含有 *odh*、*odc* 基因的重组菌 Polf 1312-*odh*-*odc* 将底物催化为 10-氧代-反 11-十八碳烯酸。3 个基因在耶氏解脂酵母中异源表达后均具有活性,这对后期得到能合成 CLA 的耶氏解脂酵母工程菌提供了良好的实验基础和理论支持。

参考文献:

- [1] IP C, BANNI S, ANGIIONI E, et al. Conjugated linoleic acid enriched butter fat alters mammary gland morphogenesis and reduces cancer risk in rats [J]. *Nutrition*, 1999, 129:2135-2142.
- [2] PARK Y, ALBRIGHT K J, STORKSON J M, et al. Changes in body composition in mice during feeding and withdrawal of conjugated linoleic acid [J]. *Lipids*, 1999, 34(3):234-248.
- [3] YAMASAKI M, MANSHO K, et al. Acute reduction of se-

rum leptin level by dietary conjugated linoleic acid in Sprague-Dawley rats [J]. *J Nutr*, 2000, 11(9):467-471.

- [4] JEAN-MICHEL G, JOHAN H, KJITIL H, et al. Supplementation with conjugated linoleic acid for 24 months is well tolerated by and reduces body fat mass in healthy, overweight humans [J]. *J Nutr*, 2005, 135(4):778-784.
- [5] OGAWA J, KISHINO S, ANDO A, et al. Production of conjugated fatty acids by lactic acid bacterial [J]. *J Biosci Bioeng*, 2005, 100(4):355-364.
- [6] YANG B, CHEN H Q, SONG Y D, et al. Myosin-cross-reactive antigens from four different lactic acid bacteria are fatty acid hydratases [J]. *Biotechnol Lett*, 2013, 35(1):75-81.
- [7] GROENEWALD M, BOEKHOUT T, NEUVEGLISE C, et al. *Yarrowia lipolytica*: safety assessment of an oleaginous yeast with a great industrial potential [J]. *Crit Rev Microbiol*, 2014, 40(3):187-206.
- [8] ZHANG B X, RONG C C, CHEN H Q, et al. *De novo* synthesis of *trans*-10, *cis*-12 conjugated linoleic acid in oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica* [J]. *Microb Cell Fact*, 2012, 11(1):1475-2859.
- [9] 郝光飞. 高山被孢霉脂肪酸合成过程转录水平调控和还原力来源研究 [D]. 江苏 无锡:江南大学, 2014.
- [10] JEAN M N, CAHERINE M, PETER V D B, et al. Protein expression and secretion in the yeast *Yarrowia lipolytica* [J]. *Fems Yest Res*, 2002, 2:371-379.
- [11] OGAWA J, MATSUMURA K, KISHINO S, et al. Conjugated linoleic acid accumulation via 10-hydroxy-12-octadecaenoic acid during microaerobic transformation of linoleic acid by *Lactobacillus acidophilus* [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2001, 67(3):1246-1252.
- [12] TAKEUCHI M, KISHINO S, PARK S B, et al. Characterization of hydroxy fatty acid dehydrogenase involved in polyunsaturated fatty acid saturation metabolism in *Lactobacillus plantarum* AKU 1009a [J]. *J Mol Catal B Enzym*, 2015, 17:7-12.

(上接第 74 页)

- [31] 成尔军, 周天池. 核桃青皮黑色素媒染羊毛的染色工艺初探 [J]. *山东纺织经济*, 2016(3):35-38.
- [32] 巩芳娥, 张进德, 汪海, 等. 陇南市核桃青皮开发植物农药探讨 [J]. *林业实用技术*, 2015(6):82-85.
- [33] 王全杰, 李超, 王纯, 等. 核桃青皮中单宁的类型及含量测定 [J]. *皮革与化工*, 2011, 28(3):25-27.
- [34] LI X F. Progress of research on the chemical components

and pharmaceutical action of walnut green husk [J]. *Food Sci Technol*, 2007(4):241-242.

- [35] 刘姗姗, 王正红, 禄璐, 等. 响应面法优化分心木袋泡茶饮料冲泡工艺研究 [J]. *食品工业科技*, 2015, 36(21):249-253, 258.
- [36] 王艳梅, 高莉, 刘梦, 等. 核桃隔膜化学成分定性研究 [J]. *食品工业科技*, 2008, 29(12):123-124.