

## 工业生物技术

# 圆红冬孢酵母新颖脂肪酸合酶的重组表达、纯化与活性检测

朱志伟<sup>1,3</sup>, 张素芳<sup>1,2</sup>, 林心萍<sup>1,3</sup>, 刘武军<sup>1,2</sup>, 赵宗保<sup>1,2</sup>

1 中国科学院大连化学物理研究所生物技术部, 辽宁 大连 116023

2 中国科学院大连化学物理研究所 大连洁净能源国家实验室(筹), 辽宁 大连 116023

3 中国科学院大学, 北京 100049

朱志伟, 张素芳, 林心萍, 等. 圆红冬孢酵母新颖脂肪酸合酶的重组表达、纯化与活性检测. 生物工程学报, 2014, 30(9): 1414-1423.

Zhu ZW, Zhang SF, Lin XP, et al. Expression, purification and characterization of a novel fatty acid synthase from *Rhodospiridium toruloides*. Chin J Biotech, 2014, 30(9): 1414-1423.

**摘要:** 脂肪酸合酶 (Fatty acid synthase, FAS) 催化乙酰辅酶 A 和丙二酸单酰辅酶 A 反应生成脂肪酸, 是油脂合成代谢途径中最重要的酶之一。在高产油脂的圆红冬孢酵母 *Rhodospiridium toruloides* 中发现了一种新颖的 FAS, 它含两个亚基, 与其他物种的 FAS 相比, 具有独特的结构域组成, 尤其是含两个酰基载体蛋白 (ACP) 结构域。由于 ACP 在脂肪酸合成反应中起辅因子作用, 推测多个 ACP 有利于提高 FAS 的催化活性, 为研究该 FAS 的生物化学和结构特征, 构建了表达 FAS 两个亚基的载体, 并转化大肠杆菌 *Escherichia coli* BL21(DE3), 含 pET22b-FAS1 和 pET24-FAS2 质粒的重组菌株 ZWE06 可同时高表达两个亚基, 经硫酸铵沉淀、蔗糖密度梯度离心和阴离子交换层析纯化, 得到的重组 FAS 比活力达到 548 mU/mg。纯化的 FAS 复合物可用于后续酶动力学和蛋白结构研究, 且表达与纯化方法的建立对研究其他 ACP 的功能具有参考价值。

**关键词:** 圆红冬孢酵母, 脂肪酸合酶, 过表达, 纯化, 酶活性

**Received:** December 11, 2013; **Accepted:** January 24, 2014

**Supported by:** National Natural Science Foundation of China (Nos. 31000052, 31170060).

**Corresponding author:** Zongbao K. Zhao. Tel/Fax: +86-411-84379211; E-mail: zhaozb@dicp.ac.cn

国家自然科学基金 (Nos. 31000052, 31170060) 资助。

网络出版时间: 2014-03-10

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.13345/j.cjb.130626.html>

# Expression, purification and characterization of a novel fatty acid synthase from *Rhodospiridium toruloides*

Zhiwei Zhu<sup>1,3</sup>, Sufang Zhang<sup>1,2</sup>, Xinping Lin<sup>1,3</sup>, Wujun Liu<sup>1,2</sup>, and Zongbao K. Zhao<sup>1,2</sup>

1 Division of Biotechnology, Dalian Institute of Chemical Physics, Chinese Academy of Sciences, Dalian 116023, Liaoning, China

2 Dalian National Laboratory for Clean Energy, Dalian Institute of Chemical Physics, Chinese Academy of Sciences, Dalian 116023, Liaoning, China

3 University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

**Abstract:** Fatty acid synthase (FAS) catalyses the reaction between acetyl-CoA and malonyl-CoA to produce fatty acids. It is one of the most important enzyme in lipid biosynthesis. FAS of the oleaginous yeast *Rhodospiridium toruloides* has two acyl carrier protein (ACP) domains and a distinct subunit composition compared with FASs of other species. As ACP is a protein cofactor crucial for fatty acid chain elongation, more ACPs in the FAS may facilitate the reaction. To study the biochemical and structural properties of this novel FAS from *R. toruloides*, plasmids were constructed and transformed into *Escherichia coli* BL21(DE3). The strain ZWE06 harboring plasmids pET22b-FAS1 and pET24b-FAS2 could co-overexpress the two subunits. The recombinant FAS was purified by sequentially using ammonium sulphate precipitation, sucrose density gradient centrifugation and anion exchange chromatography. The specific activity of the recombinant FAS was 548 mU/mg. The purified complex would be used to study enzyme kinetics and protein structure of FAS, and heterogeneous expression and purification will facilitate revealing the mechanism of this novel FAS with double ACPs.

**Keywords:** *Rhodospiridium toruloides*, fatty acid synthase, overexpression, purification, enzyme activity

近些年,随着能源、环境与气候问题日益严峻,迫切需要开发绿色的可再生能源,其中生物柴油是甘油三酯转酯化得到的脂肪酸甲酯(或乙酯)<sup>[1]</sup>,与现有石化柴油非常相似,因此受到广泛关注。目前,生产生物柴油的原料主要为植物油或废弃食用油,其生产依赖植物油脂资源。尽管油脂是可再生资源,但主要用于食品。全世界年产油脂约 1.67 亿 t (2009 年),其中植物油 1.42 亿 t,但 80%的油脂用于食品,少量用作动物饲料,只有 14%可作为油脂化工原料<sup>[2]</sup>。而越来越多的油脂被加工成生物柴油,导致油脂原料供应不足,必须开发新的油脂资源。

将廉价的生物质资源转化为油脂是其中一种可能的选择<sup>[3]</sup>。微生物可将碳源转化为油脂,作为能源物质储存在细胞内,其中部分微生物

可积累超过自身干重 20%的油脂,这些微生物被称为产油微生物 (Oleaginous microbes)<sup>[4]</sup>。圆红冬孢酵母 *Rhodospiridium toruloides* 可积累超过自身干重 70%的油脂<sup>[5]</sup>,高密度发酵最高油脂产量达到 78.7 g/L<sup>[6]</sup>,它可利用多种生物质水解液,并对其中的抑制成分有较好的耐受性<sup>[7]</sup>,因此是一株具有良好工业应用潜能的菌株。

对圆红冬孢酵母进行了基因组测序和注释,发现它含新颖的脂肪酸合酶 (FAS) 基因<sup>[8]</sup>,该酶由两个亚基组成,且与其他物种 (如酿酒酵母 *Saccharomyces cerevisiae*) 的 FAS 明显不同 (图 1)。其  $\beta$  亚基 (Fas1) 由乙酰转移酶 (Acetyl transferase) 和烯酰还原酶 (Enoyl reductase) 结构域组成,而  $\alpha$  亚基 (Fas2) 由脱水酶 (Dehydratase)、丙二酰/棕榈酰转移酶

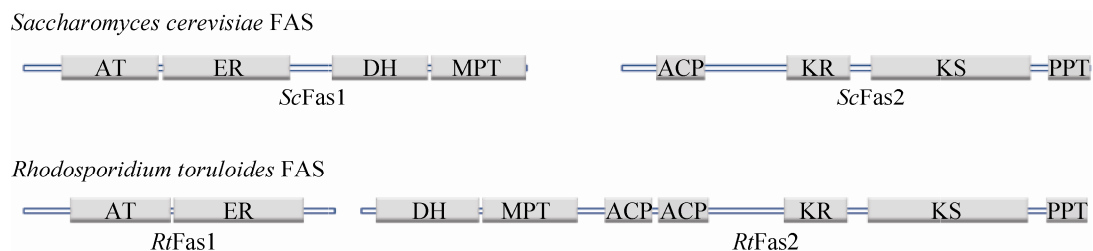


图 1 比较圆红冬孢酵母与酿酒酵母脂肪酸合酶

Fig. 1 Comparison of the fatty acid synthases from *R. toruloides* and *S. cerevisiae*. The FASs are composed of the following domains, acetyl transferase, AT; enoyl reductase, ER; dehydratase, DH; malonyl/palmitoyl transferase, MPT; acyl carrier protein, ACP; ketoacyl reductase, KR; ketoacyl synthase, KS and phosphopantetheinyl transferase, PPT.

(Malonyl/palmitoyl transferase)、酰基载体蛋白 (Acyl carrier protein, ACP)、酮酰还原酶 (Ketoacyl reductase)、酮酰合酶 (Ketoacyl synthase) 和磷酸泛酰巯基乙胺转移酶 (Phosphopantetheinyl transferase, PPT) 结构域组成。且 Fas2 含两个 ACP 结构域, 它们的序列一致性达到 76%。到目前为止, 首次发现 FAS 含两个 ACP 结构域<sup>[8]</sup>。ACP 在脂肪酸合成过程中, 起辅因子作用。被 PPT 活化后, 在保守的丝氨酸残基上修饰磷酸泛酰巯基乙胺, 而磷酸泛酰巯基乙胺含巯基, 可共价结合酰基基团<sup>[9]</sup>, 而酰基-ACP 在 FAS 的不同活性位点处完成各步反应, 每个周期增加一个二碳单元 ( $-\text{CH}_2\text{CH}_2-$ )<sup>[10-11]</sup>。酿酒酵母 FAS 为  $\alpha_6\beta_6$  异十二聚体, 分子量约为 2 600 kDa, 该巨型复合物形成 6 个反应活性空腔<sup>[10-12]</sup>, 每个空腔包含所有酶活性位点和一个辅因子 ACP。若圆红冬孢酵母 FAS 也形成类似复合物结构, 其活性空腔将含两个 ACP, 故可能提高空腔中反应中间物浓度, 有利于脂肪酸合成<sup>[13]</sup>。为研究圆红冬孢酵母 FAS 的生物化学与结构特性, 构建了表达 FAS 两个亚基的载体, 在大肠杆菌中过表达了该复合物, 经硫酸铵沉淀、蔗糖密度梯度离心和阴离子交换层析纯化,

所得重组 FAS 的比活力超过 500 mU/mg。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

pYX212-FAS1-FAS2-WT 质粒由本实验室构建和保存<sup>[14]</sup>; 抗生素、 $\beta$ -巯基乙醇 ( $\beta$ -ME)、苯甲基磺酰氟 (PMSF)、异丙基- $\beta$ -D-硫代半乳糖苷 (IPTG)、溶菌酶、HEPES、EDTA、*E. coli* DH5 $\alpha$  和 BL21(DE3)购自北京鼎国生物技术有限公司; pET22b(+), pET24b(+), 和 pACYCDuet-1 载体购自 Novagen 公司; PrimeSTAR DNA 聚合酶、限制性内切酶和 DNA 连接酶购自大连 TaKaRa 公司; 所用引物如表 1 所列, 引物由鼎国生物技术有限公司合成; DNA 测序由北京 Invitrogen 公司完成; NADPH、乙酰辅酶 A 和丙二酸单酰辅酶 A 购自 Sigma 公司; DEAE Sepharose Fast Flow 树脂购自 GE Healthcare 公司; cOmplete 蛋白酶抑制剂购自 Roche 公司; 其他化学试剂均为分析纯。LB 培养基组成为 10 g/L 蛋白胨, 5 g/L 酵母粉, 10 g/L NaCl, pH 7.0; TB 培养基组成为 12 g/L 蛋白胨, 24 g/L 酵母粉, 4 mL/L 甘油, 0.017 mol/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  和 0.072 mol/L  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ 。

表 1 质粒构建所用的引物序列

Table 1 Primers used in this study

Primer name	Primer sequence* (5'-3')
FAS1-5-NdeI	GGCATTCC <u>CATATG</u> gcaagctggagcca cccgagttcgaagggtgcaATGAACG GCCGAGCGACGCG
FAS1-3-EcoRI	<u>GGAATTCT</u> CAGAGCCCGCCGAA GACG
FAS1-5-NcoI	CGTACC <u>CCATGG</u> CAAGCTGGAGC CACCCGACG
FAS1-3-HindIII	CGCC <u>AAGCTT</u> CAGAGCCCGCCG AAGACGTCGAGC
FAS1-5-NdeI-His	GTGAAG <u>CATATG</u> gaccaccaccacc acagcagcggcATGAACGGCCGAGC GACGCG
FAS2-5-HindIII	GCCC <u>AAGCTT</u> ATGGTCGCGGCG CAGGACTTG
FAS2-3-NotI	CCGCATTGCGGCCG <u>CC</u> TTCTGG GCGATGACGACGGC
FAS2-5-NdeI	GTGAAG <u>CATATG</u> GTGTCGCGGCGC AGGACTTG
FAS2-3-His-AvrII	GT <u>CCTAGG</u> TCAgtggtggtggtggtg gtggtgCTTCTGGGCGATGACGAC GGCG

\*The restriction sites are underlined. Lowercase letters indicate Tag or Linker sequences.

## 1.2 方法

### 1.2.1 FAS 表达载体的构建

以 pYX212-FAS1-FAS2-WT 为模板, 使用 FAS1-5-NdeI/FAS1-3-EcoRI 引物扩增 *FAS1* 基因, 该片段在 5'端引入 Strep II-标签序列, 获得的片段经 *Nde* I/*Eco*R I 双酶切, 连入同样酶切的 pET24b(+)载体, 得到质粒 pET24b-FAS1。使用 FAS1-5-Nde I -His/FAS1-3-EcoR I 引物扩增 *FAS1* 基因, 该片段在 5'端引入 His-标签序列, 并连入 pET22b(+)载体的 *Nde* I/*Eco*R I 位点, 得到质粒 pET22b-His-FAS1。也将 pET24b-FAS1 上的 *Nde* I/*Eco*R I 插入片段连入 pET22b(+)载体得到 pET22b-FAS1。以 pET24b-FAS1 为模板, 使用 FAS1-5-Nco I/FAS1-3-Hind III引物扩增带

StrepII-标签的 *FAS1* 基因, 经 *Nco* I/*Hind* III双酶切后连入表达载体 pACYCDuet-1, 得到质粒 pACYC-FAS1。

以 pYX212-FAS1-FAS2-WT 为模板, 用 FAS2-5-HindIII/FAS2-3-Not I 引物扩增 *FAS2* 基因, 得到的片段经 *Hind*III/*Not* I 双酶切, 连入同样酶切的 pET24b(+)载体, 得到质粒 pET24b-FAS2, 用于表达 C 端带 His-标签的融合蛋白。用 FAS2-5-Nde I/FAS2-3-His-Avr II 引物扩增 *FAS2* 基因, 该片段在 3'端引入 His-标签序列, 经 *Nde* I/*Avr* II 双酶切后连入前面获得的 pACYC-FAS1 质粒, 得到 pACYC-FAS1-FAS2 质粒。前面所得正确质粒, 均经测序验证无碱基突变。上述质粒转化 *E. coli* BL21(DE3), 得到重组菌株。构建的质粒和重组菌株如表 2 所示。

### 1.2.2 重组蛋白的表达纯化

接种重组菌株 ZWE06 的单菌落于 5 mL LB 液体培养基 (含 100 μg/mL 氨苄青霉素和 50 μg/mL 卡那霉素), 37 °C 振荡培养过夜。取 1 mL 接种于 400 mL TB 培养基 (含 100 μg/mL 氨苄青霉素和 50 μg/mL 卡那霉素), 37 °C、200 r/min 培养至  $OD_{600}$  约为 0.8, 加入终浓度为 0.5 mmol/L 的 IPTG, 16 °C 诱导培养 36 h, 离心收集菌体, -20 °C 保存。

以下纯化步骤在冰上或 4 °C 进行。

细胞裂解: 湿菌体约 12 g, 以 1 : 3 比例加入裂解缓冲液 (100 mmol/L  $K_3PO_4$ , 5 mmol/L EDTA, 5 mmol/L β-ME, 1 mmol/L PMSF, 3 mmol/L  $MgCl_2$ , 0.5 mg/mL 溶菌酶, 蛋白酶抑制剂 2 片, pH 7.0), 超声裂解细胞, 18 000×g 离心 30 min, 去细胞碎片, 上清液转移至锥形瓶, 并加入磁转子。

表 2 构建的质粒和重组菌株

Table 2 Plasmids and strains used in this study

Plasmids and strains	Description
<b>Plasmids</b>	
pET22b(+)	pBR322 origin, amp <sup>R</sup>
pET24b(+)	pBR322 origin, C terminal His-tag, kan <sup>R</sup>
pACYCDuet-1	P15A origin, 2 MCSs, chl <sup>R</sup>
pET24b-FAS1	The StrepII-FAS1 fragment inserted into the <i>Nde</i> I/ <i>Eco</i> R I site of pET24b(+)
pET24b-FAS2	The FAS2 fragment inserted into the <i>Hind</i> III/ <i>Not</i> I site of pET24b(+)
pET22b-His-FAS1	The His-FAS1 fragment inserted into the <i>Nde</i> I/ <i>Eco</i> R I site of pET22b(+)
pET22b-FAS1	The StrepII-FAS1 fragment inserted into the <i>Nde</i> I/ <i>Eco</i> R I site of pET22b(+)
pACYC-FAS1	The StrepII-FAS1 fragment inserted into the <i>Nco</i> I/ <i>Hind</i> III site of pACYCDuet-1
pACYC-FAS1-FAS2	The FAS2-His fragment inserted into the <i>Nde</i> I/ <i>Avr</i> II site of pACYC-FAS1
<b>Strains</b>	
<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$	F <sup>-</sup> $\Phi$ 80dlacZ $\Delta$ M15 <i>endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG <math>\Delta</math>(<i>lacZYA-argF</i>) U169 <i>hsdR17</i>(r<sub>K</sub><sup>-</sup> m<sub>K</sub><sup>+</sup>) <math>\lambda</math><sup>-</sup></i>
<i>E. coli</i> BL21(DE3)	F <sup>-</sup> <i>ompT gal dcm lon hsdS<sub>B</sub></i> (r <sub>B</sub> <sup>-</sup> m <sub>B</sub> <sup>-</sup> ) $\lambda$ (DE3 [ <i>lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 Sam7 nin5</i> ])
ZWE01	<i>E. coli</i> BL21(DE3) with pET24b-FAS1 plasmid used for expressing StrepII-Fas1 fusion protein
ZWE02	<i>E. coli</i> BL21(DE3) with pET24b-FAS2 plasmid used for expressing Fas2-His fusion protein
ZWE03	<i>E. coli</i> BL21(DE3) with pACYC-FAS1 plasmid used for expressing StrepII-Fas1 fusion protein
ZWE04	<i>E. coli</i> BL21(DE3) with pACYC-FAS1-FAS2 plasmid used for expressing StrepII-Fas1 and Fas2-His fusion protein
ZWE05	<i>E. coli</i> BL21(DE3) with pACYC-FAS1 and pET24b-FAS2 plasmids used for expressing StrepII-Fas1 and Fas2-His fusion protein
ZWE06	<i>E. coli</i> BL21(DE3) with pET22b-FAS1 and pET24b-FAS2 plasmids used for expressing StrepII-Fas1 and Fas2-His fusion protein
ZWE07	<i>E. coli</i> BL21(DE3) with pET22b-His-FAS1 and pET24b-FAS2 plasmids used for expressing His-Fas1 and Fas2-His fusion protein

硫酸铵沉淀：上述细胞裂解上清液中，加入 1/4 体积的饱和硫酸铵溶液 (pH 7.0)，使硫酸铵终浓度为 20%，搅拌 30 min，18 000×g 离心 30 min。上清液中加入 1/3 体积的饱和硫酸铵溶液，使硫酸铵终浓度增加到 40%，搅拌 30 min，18 000×g 离心 30 min。沉淀溶于 16 mL 缓冲液 A (20 mmol/L HEPES，100 mmol/L KCl，5 mmol/L EDTA，5 mmol/L  $\beta$ -ME，pH 8.0)。

蔗糖密度梯度离心：用缓冲液 A 配制 10%、

15%、20%、25%、30%、35%和 40% (W/V) 蔗糖溶液，使用 38.5 mL 的 Ultra Clear Open-top 离心管，依次加入 5 mL 上述蔗糖溶液，制成分阶蔗糖梯度溶液，室温放置 7 h，让其形成线性密度梯度。然后加入 2.8 mL 蛋白溶液，使用 Beckman SW32 转头，90 000×g、4 °C 离心 15 h。从上往下依次用针头抽取 3 mL 样品，进行 SDS-PAGE 分析，含 FAS 两个亚基的组分被混合，超滤浓缩。

弱阴离子交换层析：层析填料 DEAE Sepharose Fast Flow，层析柱直径 25 mm，装填量约 15 cm (约 80 mL)。先使用 400 mL 缓冲液 A 平衡层析柱，超滤浓缩的蛋白样品上样，然后用 100 mL 缓冲液 A 洗涤，再用 250 mL 缓冲液 A 和 250 mL 缓冲液 B (20 mmol/L HEPES, 800 mmol/L KCl, 5 mmol/L EDTA, 5 mmol/L  $\beta$ -ME, pH 8.0) 组成的梯度混合液洗脱，自动收集洗脱蛋白，洗脱组分用 Bradford 法测量蛋白浓度，SDS-PAGE 分析，含目的蛋白的组分被合并，并超滤浓缩。

### 1.2.3 活性检测

酶活测定反应体系含 100 mmol/L  $K_3PO_4$  (pH 7.0), 5 mmol/L EDTA, 5 mmol/L DTT, 12.5  $\mu$ mol/L 乙酰辅酶 A, 50  $\mu$ mol/L 丙二酸单酰辅酶 A, 75  $\mu$ mol/L NADPH, 加入适量酶, 在 200  $\mu$ L 的微型石英比色皿中, 室温 (约 25  $^{\circ}C$ ) 反应, 检测 340 nm 吸光值的变化, 以不加丙二酸单酰辅酶 A 为对照。酶活单位定义, 每分钟消耗 1 nmol NADPH (1 mL 反应体系中, 吸光度减少 0.006 2) 所需酶量为 1 mU。

## 2 结果与分析

### 2.1 FAS 表达菌株构建与优化

圆红冬孢酵母 FAS 含有两个亚基, 分别由 *FAS1* 和 *FAS2* 基因编码, Fas1 含 1 266 个氨基酸, Fas2 含 2 928 个氨基酸 (GenBank Accession No. 分别为 EMS21161 和 EMS21268), 故这两个亚基均为大蛋白。将 *FAS1* 和 *FAS2* 基因分别克隆到表达载体 pET24b(+), 并转化 *E. coli* BL21(DE3) 得到重组菌株 ZWE01 和 ZWE02, IPTG 可诱导表达目的蛋白, 且均为可溶性蛋白 (图 2)。

为纯化 FAS 复合物, 需在同一菌株中表达

两个亚基, 使表达产物形成复合物<sup>[15]</sup>。为此, 将 *FAS1* 和 *FAS2* 克隆到可表达两个蛋白的 pACYCDuet-1 载体, 该载体含有两个多克隆位点, 且都置于表达元件 (T7 启动子/lac 操纵子和核糖体结合位点) 下游。然而, 含 pACYC-FAS1-FAS2 质粒的重组菌株 ZWE04 只大量表达

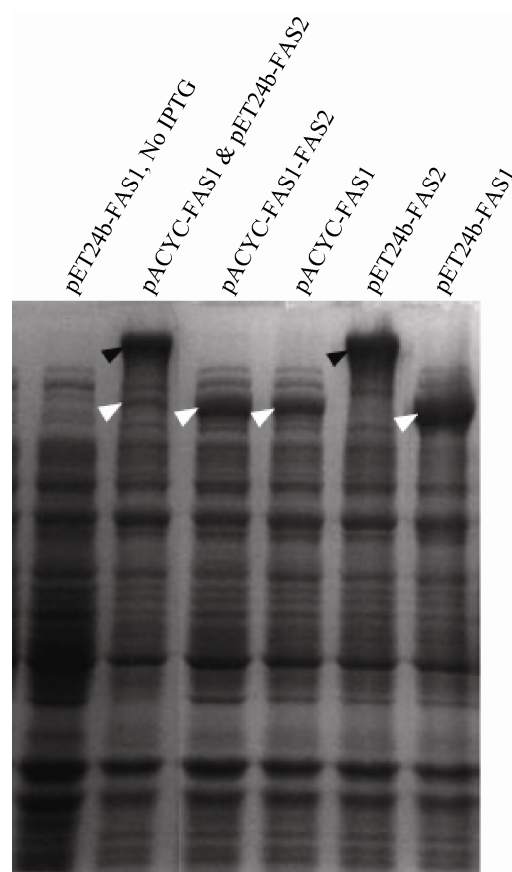


图 2 SDS-PAGE 分析重组菌株表达目的蛋白

Fig. 2 SDS-PAGE analysis of the cell lysates from recombinant strains with the indicated plasmids. White and black arrows indicated expressed Fas1 and Fas2 subunits, respectively. The cells were precultured in LB broth with appropriate amount of antibiotics at 37  $^{\circ}C$  to  $OD_{600} \sim 0.8$ , then 0.5 mmol/L IPTG was added and the temperature was reduced to 16  $^{\circ}C$  to induce the expression of recombinant proteins, excepting the control culture without IPTG. Cell pellets harvested from overnight culture were used for SDS-PAGE analysis.

Fas1 蛋白,而更大的 Fas2 蛋白基本不表达 (图 2)。

然后,在 *E. coli* BL21(DE3)中同时转化 pACYC-FAS1 和 pET24b-FAS2 质粒,得到重组菌株 ZWE05。这两个质粒含不同复制区和抗性标记基因,具有很好的兼容性。虽然重组菌株 ZWE05 可同时表达两个蛋白,但 Fas1 表达量明显低于 Fas2 (图 2),可能是由于 pACYCDuet-1 质粒使用 P15A 复制子,而 pET24b(+)使用 pBR322 复制区,前者质粒拷贝数只有后者的 1/4<sup>[16]</sup>,故导致 Fas1 表达水平偏低。

由于 FAS 两个亚基的计量关系为 1 : 1,但重组菌株 ZWE05,两个亚基的表达水平不协调。pET22b(+)与 pET24b(+)载体都使用 pBR322 复制区,但含不同抗性标记基因,因此用两种抗生素可维持这两个并不兼容的质粒复制,且质粒拷贝数相近。用不兼容质粒共表达目的蛋白已有文献报道<sup>[17]</sup>,因此,将 pET22b-FAS1 和 pET24b-FAS2 质粒同时转化 *E. coli* BL21(DE3),得到的重组菌株 ZWE06,可表达 FAS 的两个亚基。SDS-PAGE 分析表明,含 pET22b-FAS1 和 pET24b-FAS2 质粒的重组菌株 ZWE06,两个蛋白的表达量相当 (图 3)。

## 2.2 纯化重组的 FAS

重组菌株 ZWE06,表达 N 端带 StrepII-标签的 Fas1 和 C 端带 His-标签的 Fas2,尝试了 Ni-NTA 树脂亲和层析纯化 FAS 复合物,但没有成功。为此,又构建了 pET22b-His-FAS1 质粒用于表达 N 端带 His-标签的 Fas1。含 pET22b-His-FAS1 和 pET24b-FAS2 质粒的重组菌株 ZWE07 也可较好地表达两个蛋白 (结果未列出),但使用 Ni-NTA 树脂亲和层析纯化 FAS,仍然没有成功。

最后,使用重组菌株 ZWE06 表达 FAS 两个

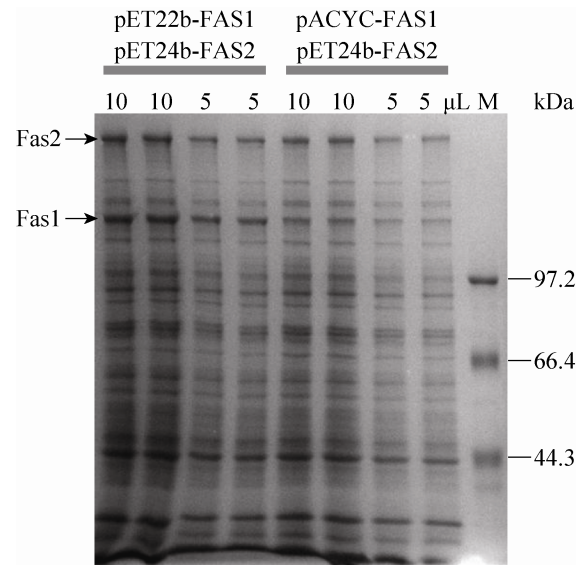


图 3 比较两重组菌株目的蛋白表达水平

Fig. 3 Comparison of the expression of FAS subunits in the strains with plasmids as indicated. The arrows indicated expressed Fas1 and Fas2 subunits. The culture conditions were the same as Fig. 2, and 5 or 10  $\mu$ L cell lysates (as indicated) from the same volume of culture broth were loaded into the gel. M: protein molecular weight standard.

亚基,经硫酸铵沉淀富集目的蛋白,预实验表明 30%–40%饱和硫酸铵分级沉淀,回收目的蛋白最多,回收率达 70%,最终选择 20%–40%饱和硫酸铵沉淀,目的蛋白回收率为 92%。

由于酿酒酵母 FAS 为  $\alpha_6\beta_6$  复合物,其分子量达 2 600 kDa,推测圆红冬孢酵母 FAS 也可能组装成类似的复合物结构,而具有相当的分子量。对于该巨型复合物,可采用蔗糖密度梯度离心进行分离。使用 10%–40%线性蔗糖密度梯度,Beckman SW32 转头,90 000 $\times$ g 离心 15 h,两个亚基蛋白同时出现在蔗糖密度超过 25%的梯度层 (图 4,泳道 8),该结果与酿酒酵母 FAS 的蔗糖密度梯度离心结果类似<sup>[10]</sup>,表明圆红冬孢酵母 FAS 可能具有与酿酒酵母 FAS 类似的复

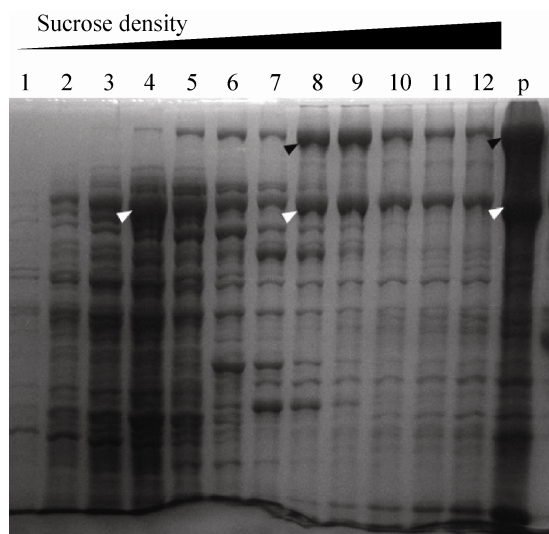


图4 SDS-PAGE 分析蔗糖密度梯度离心分离组分  
Fig. 4 SDS-PAGE analysis of the protein fractions from sucrose density gradient centrifugation. From lane 1 to 12, the sucrose density increased from 10% to 40%. Lane p was loaded with proteins from the centrifugation pellets. White and black arrows indicated the Fas1 and Fas2 subunits, respectively.

合物结构。同时大量游离的 Fas1 亚基蛋白存在于低蔗糖密度层 (图4, 泳道4, 白色箭头), 且许多 FAS 蛋白凝集体存在于离心沉淀中 (图4, 泳道 p, 白色和黑色箭头), 说明蔗糖密度梯度离心不仅能分离杂蛋白, 而且可以去除游离的亚基和蛋白凝集体。

收集含 FAS 复合物的蔗糖层, 超滤浓缩后, 经阴离子交换层析进一步纯化, 使用的填料为 DEAE Sepharose 弱阴离子交换树脂, KCl 浓度梯度洗脱, 目的蛋白被 100–200 mmol/L 的 KCl 洗脱。经过上述三步纯化, FAS 的纯度达到 90% 以上 (图5)。再次用蔗糖密度梯度离心分析表明只有一条单一的蛋白区带。

### 2.3 FAS 的酶活性测定

由于 FAS 的底物 NADPH 在 340 nm 有特征

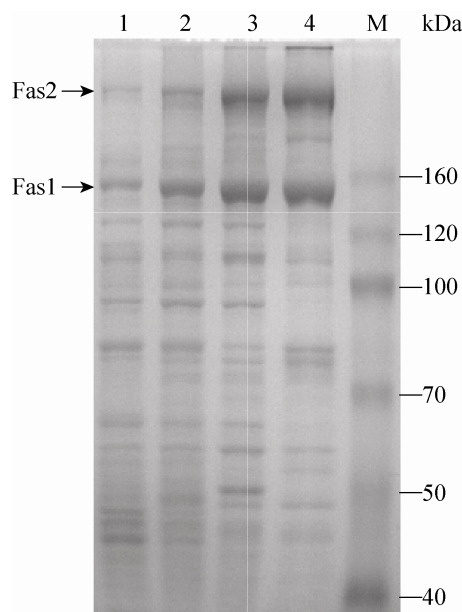


图5 SDS-PAGE 分析纯化过程的蛋白样品  
Fig. 5 SDS-PAGE analysis of proteins obtained from the purification procedures. The arrows indicated Fas1 and Fas2 subunits. Equal amount of proteins (3  $\mu$ g) were loaded in each lane. lane 1: lysate supernatant; lane 2: 20%–40%  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  precipitation; lane 3: sucrose density gradient centrifugation; lane 4: DEAE sepharose anion exchange chromatography; M: protein molecular weight standard.

吸收峰, 比摩尔消光系数为  $6.2 \times 10^3 \text{ L}/(\text{mol} \cdot \text{cm})$ , 故可直接检测底物 NADPH 消耗速率<sup>[18]</sup>。采用分光光度法进行酶活性测定, 发现重组圆红冬孢酵母 FAS 的比活力为  $(548 \pm 16) \text{ mU}/\text{mg}$ 。

## 3 讨论

圆红冬孢酵母是一株性状突出的产油酵母, 为了解其油脂积累机制, 进行了基因组、转录组和蛋白质组学分析, 发现了一些可能与油脂过量积累相关的基因, 其中包括 FAS 基因, 编码 FAS 两个亚基的基因 *FAS1* 和 *FAS2*, 在油脂积累过程中表达上调<sup>[8]</sup>。而检查了两个亚基的



氨基酸序列,发现它们具有独特的结构域组成,并含有两个 ACP 结构域(图 1)。到目前为止,只在红酵母中发现了这种含多个 ACP 结构域的 FAS。然而与 FAS 类似的由多结构域组成的聚酮合酶(Polyketide synthases, PKS),经常含有多个 ACP<sup>[19]</sup>。有研究证明,含 5 个串联 ACP 的多不饱和脂肪酸合酶(属于 PKS,而非 FAS),活性 ACP 数量越多,其合成多不饱和脂肪酸的能力越强<sup>[20]</sup>。Curacin A 合成途径的 CurA 蛋白含有 3 个 ACP 结构域,类似研究也证明 ACP 数量越多, Curacin A 得率越高<sup>[21]</sup>。

脂肪酸合成是生物界通用的代谢反应,然而不同物种的 FAS 却有很大差别。在原核生物或植物体中, FAS 由多个分开的蛋白组成;而在真菌或动物中, FAS 是由不同结构域组成的多酶体系<sup>[22]</sup>。圆红冬孢酵母 FAS 为真菌型多结构域蛋白,且该酵母只含一套 FAS 系统。ACP 是脂肪酸合成必需的蛋白辅因子<sup>[23]</sup>,在 *E. coli* 中, ACP 是高丰度蛋白(胞内浓度约为 100 mol/L),而在真菌中,由于 FAS 复合物形成 6 个反应空腔,有学者认为在每个反应空腔中, ACP 的浓度比 *E. coli* 中高一个数量级,从而有效地提高了反应中间物浓度,使催化效率更高<sup>[13]</sup>。圆红冬孢酵母 FAS 含有两个 ACP,且蔗糖密度梯度离心结果表明它可能形成与酿酒酵母 FAS 类似的巨型复合物,按照前面的假设,则活性中心 ACP 浓度更高,将可能具有更好的催化活性。本文建立了圆红冬孢酵母 FAS 表达纯化条件,为研究其酶动力学和蛋白结构奠定了基础,同时该新颖的 FAS 可用于脂肪酸类生物燃料的代谢工程和合成生物学研究<sup>[24-26]</sup>。

## REFERENCES

- [1] Ma F, Hanna MA. Biodiesel production: a review. *Bioresour Technol*, 1999, 70(1): 1-15.
- [2] Biermann U, Bornscheuer U, Meier MAR, et al. Oils and fats as renewable raw materials in chemistry. *Angew Chem Int Ed*, 2011, 50(17): 3854-3871.
- [3] Zhao ZB, Hua YY, Liu B. How to secure triacylglycerol supply for Chinese biodiesel industry. *China Biotechnol*, 2005, 25(11): 1-6 (in Chinese).  
赵宗保, 华艳艳, 刘波. 中国如何突破生物柴油产业的原料瓶颈. *中国生物工程杂志*, 2005, 25(11): 1-6.
- [4] Ratledge C, Wynn JP. The biochemistry and molecular biology of lipid accumulation in oleaginous microorganisms. *Adv Appl Microbiol*, 2002, 51: 1-51.
- [5] Li Y, Zhao Z, Bai F. High-density cultivation of oleaginous yeast *Rhodospiridium toruloides* Y4 in fed-batch culture. *Enzyme Microb Technol*, 2007, 41(3): 312-317.
- [6] Zhao X, Hu C, Wu S, et al. Lipid production by *Rhodospiridium toruloides* Y4 using different substrate feeding strategies. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2011, 38(5): 627-632.
- [7] Hu C, Zhao X, Zhao J, et al. Effects of biomass hydrolysis by-products on oleaginous yeast *Rhodospiridium toruloides*. *Bioresour Technol*, 2009, 100(20): 4843-4847.
- [8] Zhu Z, Zhang S, Liu H, et al. A multi-omic map of the lipid-producing yeast *Rhodospiridium toruloides*. *Nat Commun*, 2012, 3: 1112.
- [9] Johansson P, Mulinacci B, Koestler C, et al. Multimeric options for the auto-activation of the *Saccharomyces cerevisiae* FAS type I megasynthase. *Structure*, 2009, 17(8): 1063-1074.
- [10] Lomakin IB, Xiong Y, Steitz TA. The crystal structure of yeast fatty acid synthase, a cellular machine with eight active sites working together. *Cell*, 2007, 129(2): 319-332.
- [11] Leibundgut M, Jenni S, Frick C, et al. Structural basis for substrate delivery by acyl carrier protein in the yeast fatty acid synthase. *Science*, 2007, 316: 288-290.

- [12] Jenni S, Leibundgut M, Boehringer D, et al. Structure of fungal fatty acid synthase and implications for iterative substrate shuttling. *Science*, 2007, 316: 254–261.
- [13] Johansson P, Wiltschi B, Kumari P, et al. Inhibition of the fungal fatty acid synthase type I multienzyme complex. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105(35): 12803–12808.
- [14] Zhao ZB, Zhu ZW, Zhang SF. A fatty acid synthase from the oleaginous yeast, the coding genes and application: CN, 201310067825. 2013-03-05 (in Chinese).  
赵宗保, 朱志伟, 张素芳. 一种产油酵母脂肪酸合酶及其编码基因与应用: 中国专利, 申请号 201310067825. 2013-03-05.
- [15] Selleck W, Tan S. Recombinant Protein Complex Expression in *E. coli*. In *Current Protocols in Protein Science*. Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons, Inc., 2008: Chapter 5, Unit 5 21.
- [16] Tolia NH, Joshua-Tor L. Strategies for protein coexpression in *Escherichia coli*. *Nat Methods*, 2006, 3(1): 55–64.
- [17] Pang YQ, Jia HG, Fang RX, et al. A simple and visible assay for cre recombinase activity in *Escherichia coli* by using two incompatible plasmids. *Acta Microbiol Sin*, 2005, 45(1): 125–128 (in Chinese).  
庞永奇, 贾红革, 方荣祥, 等. 利用不相容质粒共转化大肠杆菌对 Cre 重组酶体内重组活性的可视检测. *微生物学报*, 2005, 45(1): 125–128.
- [18] Lynen F. Yeast fatty acid synthase. *Methods Enzymol*, 1969, 14: 17–33.
- [19] Zheng P, Xia Y, Xiao G, et al. Genome sequence of the insect pathogenic fungus *Cordyceps militaris*, a valued traditional Chinese medicine. *Genome Biol*, 2011, 12(11): R116.
- [20] Jiang H, Zirkle R, Metz JG, et al. The role of tandem acyl carrier protein domains in polyunsaturated fatty acid biosynthesis. *J Am Chem Soc*, 2008, 130(20): 6336–6337.
- [21] Gu L, Eisman EB, Dutta S, et al. Tandem acyl carrier proteins in the curacin biosynthetic pathway promote consecutive multienzyme reactions with a synergistic effect. *Angew Chem Int Ed*, 2011, 50(12): 2795–2798.
- [22] Schweizer E, Hofmann J. Microbial type I fatty acid synthases (FAS): major players in a network of cellular FAS systems. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2004, 68(3): 501–517.
- [23] Chan DI, Vogel HJ. Current understanding of fatty acid biosynthesis and the acyl carrier protein. *Biochem J*, 2010, 430(1): 1–19.
- [24] Steen EJ, Kang Y, Bokinsky G, et al. Microbial production of fatty-acid-derived fuels and chemicals from plant biomass. *Nature*, 2010, 463: 559–562.
- [25] Leber C, Da Silva NA. Engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for the synthesis of short chain fatty acids. *Biotechnol Bioeng*, 2014, 111(2): 347–358.
- [26] Runguphan W, Keasling JD. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for production of fatty acid-derived biofuels and chemicals. *Metab Eng*, 2014, 21: 103–113.

(本文责编 郝丽芳)