

工业生物技术

集胞藻 PCC 6803 中脂肪酸激活酶 Slr1609 互作蛋白的鉴定

徐乐*, 巫琴*, 晋虎, 陈磊, 张卫文

天津大学化工学院 合成微生物学实验室, 天津 300072

徐乐, 巫琴, 晋虎, 等. 集胞藻 PCC 6803 中脂肪酸激活酶 Slr1609 互作蛋白的鉴定. 生物工程学报, 2015, 31(8): 1194–1202.

Xu L, Wu Q, Jin H, et al. Identification and characterization of partner proteins interacting with fatty acid activation enzyme Slr1609 in *Synechocystis* sp. PCC 6803. Chin J Biotech, 2015, 31(8): 1194–1202.

摘要: 集胞藻中 *slr1609* 是编码脂肪酸激活酶的基因, 对与其相关的重要功能伴侣蛋白进行研究, 可以完善对脂肪酸合成模块的认识, 为进一步通过合成生物学技术改造蓝细菌提供理论支持。本研究在集胞藻 PCC 6803 中建立了蛋白质复合体分析及鉴定技术: 利用氯霉素抗性基因筛选, 构建带有 3×FLAG 标签的 Slr1609 突变株, 通过 RT-PCR 优化重组蛋白表达条件; 同时对突变株进行了 Western blotting 鉴定, 以及利用 Native-PAGE 验证了蛋白质复合体的存在。最后, LC-MS/MS 质谱鉴定获得了 Slr1609 蛋白复合体中的可能伴侣蛋白。

关键词: *slr1609*, 脂肪酸, 蛋白质复合体, 蓝细菌

Identification and characterization of partner proteins interacting with fatty acid activation enzyme Slr1609 in *Synechocystis* sp. PCC 6803

Le Xu*, Qin Wu*, Hu Jin, Lei Chen, and Weiwen Zhang

Laboratory of Synthetic Microbiology, School of Chemical Engineering and Technology, Tianjin University, Tianjin 300072, China

Abstract: To understand molecular modules related to polyunsaturated fatty acids (PUFA) synthesis and eventually

Received: October 20, 2014; **Accepted:** January 22, 2015

Supported by: National Basic Research Program of China (973 Program) (Nos. 2012CB721101, 2011CBA00803).

Corresponding author: Lei Chen. Tel: +82-22-27406364; Fax: +86-22-27403389; E-mail: lchen@tju.edu.cn

* These authors contributed equally to this study.

国家重点基础研究发展计划 (973 计划) (Nos. 2012CB721101, 2011CBA00803) 资助。

网络出版时间: 2015-03-25

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20150325.1122.003.html>

produce PUFA at high efficiency, we developed a protein complex analysis technology in *Synechocystis* sp. PCC 6803, and applied it to identify possible partner proteins interacting with the key enzymes that catalyze PUFA biosynthesis. We first constructed a recombinant expression of protein of *slr1609* encoding the fatty acid activation enzyme, by fusing 3×FLAG tag with the target protein. Then we verified its expression by Western blotting targeting 3×FLAG tag. To maximize purification of Slr1609 protein complex, we optimized the protein expression conditions of Slr1609 in *Synechocystis* in a 5 L fermenter by monitoring its gene expression using RT-qPCR. The purification of the Slr1609 protein complexes was demonstrated by a Native-PAGE analysis. Finally, LC-MS/MS proteomic analysis allowed identification of the possible partner proteins interacting with Slr1609.

Keywords: *slr1609*, fatty acid, protein complex, cyanobacterium

蓝细菌 Cyanobacteria 为最古老的光合自养型原核生物^[1], 分布广泛, 适应能力非常强, 可以在冰冻、缺氧、高温、干涸、高盐及强辐射等极端环境中生长^[2-3]。近年来, 通过合成生物学改造蓝细菌生产生物燃料, 正受到来自学术界和企业界越来越多的关注; 利用蓝细菌生产氢气、乙醇、乙烯^[4]、异戊二烯、正丁醇^[5]、脂肪酸和脂肪醇等多种生物燃料分子已取得了一定的成功^[6]。Atsumi 等^[7]通过定向工程改造聚球藻 PCC 7942 从 CO₂ 直接生产异丁醛和异丁醇, 并过表达二磷酸核酮糖羧化酶 (Rubisco) 大幅度提高了产物的产量。Lindberg 等^[8]用光诱导型启动子 P_{psbA2} 在集胞藻 PCC 6803 中异源表达葛根 (kudzu) 的 *IspS* 基因, 使之可以产生异戊二烯。Dexter 等^[9]通过同源双交换的方法, 将运动发酵单胞菌 *Zymomonas mobilis* 中的 *pdh* 和 *adh* 基因整合到集胞藻 PCC 6803 染色体上, 突变株可稳定生产生物乙醇, 且 OD₇₃₀ 为 1 的菌量日产乙醇 5.2 mmol/L。集胞藻 *Synechocystis* sp. PCC 6803 是一种单细胞嗜中温蓝细菌, 于 1996 年完成基因组测序^[10]。其具有遗传背景清楚、生长快速、光合作用效率高^[11]、培养条件简单、不产毒素、具有天然外源 DNA 转化系统^[12]等特点, 是研究光合作用以及合成生物学改造研究的重要模式菌株和底盘细胞^[13]。

蓝细菌的脂肪酸族生物燃料合成离不开其脂肪酸的代谢途径。脂肪酸合成途径属于 II 型脂肪酸合成途径^[14]。集胞藻 PCC 6803 在正常生理状态下, 细胞内存在大量自由脂肪酸, 而这些自由脂肪酸需要被脂肪酸激活酶激活成为脂酰 CoA 或脂酰 ACP, 才能被下游的膜脂合成途径、脂肪醇和脂肪烃等代谢途径所利用^[15-16]。在近期的工作中, Liu 等^[17]使用基因工程和代谢工程技术改造集胞藻 PCC 6803 使其生产 C10-C18 脂肪酸, 最高产量达 (197±14) mg/L。同时使用 CO₂ 诱导型启动子, 构建 CO₂ 诱导融膜系统, 突变株 SD239 回收的脂肪酸产量达到 36.1×10⁻¹² mg/cell^[18]。这一研究工作表明工程蓝细菌生产脂肪族类液体生物燃料的产量提高还有很大的空间。

蛋白质是细胞代谢活动的主要承担者, 它们通常通过形成蛋白质复合体来行使功能, 所以脂肪酸合成相关酶复合体的研究对于了解细胞代谢调控机理等具有重要的意义。复合体的纯化分离现阶段主要有免疫共沉淀、标签标记亲和纯化、GST 沉降技术和串联亲和纯化等^[19]。Boehm 等^[20]用 BN-PAGE 验证了 FPLC 对集胞藻 PCC 6803 中光合系统 II 的分离效果。Ma 等^[21]先用 Native-PAGE 分离出 NDH-1 复合体, 再通过第二维的 SDS-PAGE 分离出 8 个条带。Brown

等^[22]利用串联亲和纯化技术 (TAP) 在集胞藻 PCC 6803 纯化出少量的脂肪酸合成酶 (FAS) 复合体。以上研究成果证明通过蛋白质复合体纯化分离及鉴定技术可以为蓝细菌研究提供重要的生物学发现。

在早期研究中, Von Berlepsch 等^[15]将 *slr1609* 基因敲除, 利用同位素示踪法对集胞藻 PCC 6803 的脂肪酸代谢途径进行详细分析, 最后推测 *slr1609* 是编码蓝细菌中唯一的脂肪酸激活酶的基因。近期 Gao 等^[23]通过对 *slr1609* 这一基因进行亚细胞定位, 发现 *slr1609* 既存在于细胞膜系统中, 也存在于细胞质中。本研究针对编码脂肪酸激活酶的基因 *slr1609*^[23]展开互作蛋白的鉴定和分析研究, 以期完善对脂肪酸合成模块的认识, 为进一步通过合成生物学技术改造蓝细菌提供理论支持。

1 材料与方 法

1.1 菌株、质粒和培养条件

集胞藻 *Synechocystis* sp. PCC 6803 从 American Type Culture Collection 购买, 培养于 BG11 培养基, 30 °C, 50 μmol/(m²·s) 和 130 r/min 条件摇瓶培养^[24]。

含氯霉素抗性质粒 pACYC184 的大肠杆菌 *Escherichia coli* 培养于 LB 培养基, 37 °C、200 r/min 摇瓶中培养 12–24 h。

1.2 突变株的构建

在 *slr1609* 的 C 端插入 3×FLAG 标签, 并在其后插入氯霉素抗性基因。从 Cyanobase 数据库获取 *slr1609* 基因序列 (<http://genome.microbedb.jp/cyanobase/Synechocystis>), 并用 Primer 5 设计引物, 其中 R1 含有 3×FLAG 标签 (表 1)。首先用表 1 中的引物分别 PCR 扩增出 *slr1609* 目标

基因 C 端插入 3×FLAG 标签的上游片段, 氯霉素抗性基因的中游片段和 *slr1609* 基因的下游片段, 3 条片段的长度都约为 1 kb。再以 F1 和 R3 为引物, 融合 PCR 扩增出大小约为 3 kb 的线性 DNA 片段 (图 1)。PCR 反应条件如下: 98 °C 预变性 30 s; 98 °C 变性 10 s, 72 °C 退火 10 s, 72 °C 延伸 1.5 min, 30 个循环; 最后 72 °C 延伸 5 min, 4 °C 保存。将 3 kb 线性 DNA 片段转化到集胞藻 PCC 6803 中, 筛选抗性菌落, 同时进行菌落 PCR 验证。

表 1 融合 PCR 所用引物

Table 1 Primers of fusion PCR

Primer name	Primer sequences (5'–3')
<i>slr1609</i> -F1	GCTTGAACCATCTCCACGCTTCG
<i>slr1609</i> -R1	TTACTTGTCATCGTCATCCTTGTAAT CGATATCATGATCTTTATAATCACCG TCATGGTCTTTGTAGTCAAACATTT GTCAATTAATGTT
<i>slr1609</i> -F2	TTACAAGGATGACGATGACAAGTAA GCTGATAGAAACAGAAGCCACTGG
<i>slr1609</i> -R2	TTACGCCCCGCCCTGCCACTCATCG
<i>slr1609</i> -F3	CGATGAGTGGCAGGGCGGGGCGTA AGAACCCTGTTATAAAGTCTGATTC
<i>slr1609</i> -R3	GGAATGGCTCCATCGGTCCAACCTG

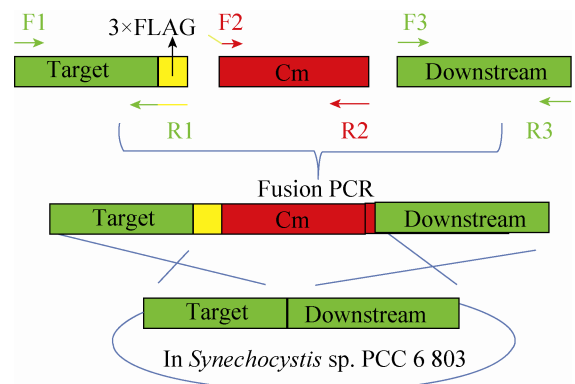


图 1 用融合 PCR 方法插入 3×FLAG 标签原理

Fig. 1 The principle of fusion PCR to introduce 3×FLAG label.

1.3 RT-qPCR (Reverse transcription quantitative PCR) 分析

用 RT-PCR 在转录水平上检测不同培养时间下 *slr1609* 的基因表达, 用 *rnpB* 作为内参基因进行校正。引物见表 2。取 3 d 和 5 d 两个时间点, 每个时间点做 3 个平行样, 用 ZR RNA MicroPrep™ RNA Kit (ZYMO) 提取总 RNA, 再用 SuperScript® VILO™ cDNA Synthesis Kit (Invitrogen) 将总 RNA 逆转录为 cDNA, 最后用 Power SYBR® Green RT-PCR Reagents Kit (ABI) 配制实时荧光定量 PCR 反应体系进行反应, PCR 程序如下: 95 °C 预变性 10 min; 95 °C 变性 15 s, 60 °C 退火/延伸 1 min, 40 个循环。

1.4 蛋白质的提取及纯化

1.4.1 蛋白质的提取

采用珠磨法破碎细胞, 取 1 L 培养 5 d 的集胞藻 PCC 6803 菌液, 4 °C、7 500 r/min 离心 15 min, 弃上清, 并均匀分别转入 10 个 1.5 mL 离心管中。加入与菌体等体积的玻璃珠 (直径 0.1 mm), 再加入 100 μL 裂解液 (20 mmol/L 4-羟乙基哌嗪乙磺酸 (HEPES), pH 7.4, 10 mmol/L MgCl₂, 5 mmol/L CaCl₂, 20% 甘油, 1% β-DM), PMSF 终浓度为 1 mmol/L^[25]重悬。放入样本快速破碎匀浆仪 (天津欧诺) 中进行破碎 (30 s, 2 min 冰浴, 4 500 r/min, 6 个循环), 离心取上清混在一起记为蛋白粗提液。

表 2 RT-PCR 引物

Table 2 Primers of RT-PCR

Primer name	Primer sequences (5'-3')
<i>slr1609</i> -F	AGTCCCCTGGGCAACAAAAG
<i>slr1609</i> -R	TTTGGGAAATGCCGAAAAAG
<i>rnpB</i> -F	GTGAGGACAGTGCCACAGAA
<i>rnpB</i> -R	GGCAGGAAAAAGACCAACCT

1.4.2 蛋白质的纯化

Gel 预处理: 1) 将 ANTI-FLAG M2 Affinity Gel 置于冰上融化后, 取 10 μL 于离心管中, 4 °C、8 000×g 离心 30 s, 去上清; 2) 向离心管中加入 1 mL 裂解液, 轻轻颠倒摇动清洗 Gel, 4 °C、8 000×g 离心 30 s, 去上清; 3) 重复清洗 1 次。

蛋白质结合: 1) 向 Gel 中加入 1 mL 蛋白质粗提物; 2) 4 °C 轻柔振荡过夜, 然后 4 °C、8 000×g 离心 30 s, 去上清。

Gel 清洗: 1) 向 Gel 中加入 1 mL 裂解液, 轻轻颠倒摇动清洗 Gel, 4 °C、8 000×g 离心 30 s, 去上清; 2) 重复清洗 2 次。

蛋白质洗脱: 1) 配制洗脱液: 100 μL 蛋白纯化洗脱缓冲液 (20 mmol/L HEPES, pH 7.4, 10 mmol/L MgCl₂, 5 mmol/L CaCl₂, 150 mmol/L NaCl, 20% 甘油) 中加入 6 μL 5 μg/μL 3×FLAG peptide 溶液, 终浓度为 300 ng/μL。2) 将洗脱液加入 Gel 中, 在冰上轻柔振荡 1 h, 在 4 °C 下, 8 000×g 离心 30 s, 上清即为纯化的蛋白。

以上过程均在冰上进行以防抗体失效。

1.5 Western blotting 检测纯化产物

根据标准的方法^[26]进行 Western blotting。蛋白样品的上样量为 20 μL (约 300 ng), 用 SDS-PAGE (12%) 或 Native-PAGE (5%) 进行分离, 通过电转移方法将蛋白转移至 PVDF 膜上, 然后进行免疫反应。

用鼠抗 FLAG 抗体和辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠 IgG 分别作为一抗和二抗进行免疫印迹检测, ECL 检测试剂盒显色后用 Chemi Doc XRS+凝胶成像仪曝光成像。

1.6 蛋白质复合成分的质谱鉴定

取 20 μL 纯化后蛋白质溶液, 进行 Native-PAGE 并进行银染 (Sigma)。切下所对应

条带即为全细胞中目标蛋白质复合体样品。将蛋白样品酶解处理,进行质谱检测(华大蛋白质研发中心有限公司)。对质谱数据进行分析,利用数据分析软件即 Data Analysis Software 软件标峰后,将原始文件转换成 mgf 格式,再用 Mascot search engine version 2.3.01 将数据与已建立的集胞藻 PCC 6803 全蛋白数据库(来自于 NCBI)进行数据搜索比对。其中, Mascot 程序使用基于概率的 MOWSE 算法、前体肽离子 m/z 信息和 MS-MS 肽片段离子数据来鉴定蛋白质。

搜索的参数设置如下: Database: PCC 6803 ; Taxonomy: All entries ; Enzyme: Trypsin ; Missed missed cleavage: 1 ; Fixed modification: Carbamidomethyl(C) ; Quantitation method: None ; Varied modification: Oxidation(M), Gln->pyro-Glu(N-term Q) ; Peptide mass tolerance: ± 0.1 Da ; Fragment Mass Tolerance: ± 0.1 Da ; Mass values: Monoisotopic ; Instrument type: ESI-QUAD-TOF ;

进行数据搜索时,蛋白鉴定的 Mascot score 值大于 14 ($P < 0.05$),序列覆盖度 (Sequence coverage) $> 1\%$ 则认为是阳性匹配。

2 结果与分析

2.1 *slr1609* 突变株的构建

集胞藻 PCC 6803 经过转化后,从平板上挑取单菌落进行菌落 PCR 验证,由于集胞藻 PCC 6803 含有多条染色体,所以需要检验是否单菌落的细胞中所有染色体均带上 $3 \times \text{FLAG}$ 标签以及氯霉素抗性基因。菌落 PCR 利用扩增上、下游同源臂的特异性引物 F1 和 R3 进行,分别以突变株和野生株为扩增模板进行 PCR,然后通过琼脂糖凝胶电泳来检测扩增片段大小是否正

确。由于 *slr1609* 突变株中插入了 $3 \times \text{FLAG}$ 标签以及氯霉素抗性基因,与集胞藻 PCC 6803 野生株相比大了 1 kb 左右,若替换完全,突变株菌落 PCR 应当只得到一条 3 kb 的条带,而野生株只有 2 kb 左右的片段,琼脂糖凝胶电泳检测结果见图 2,可知突变型菌株已经完全替换。

2.2 突变株培养时间的优化

集胞藻 PCC 6803 野生株的生长在培养 3 d 后达到平台期^[27],实验选取即将进入平台期的 3 d 和进入平台期的 5 d 两个时间点,用 RT-PCR 检测,结果采用相对表达量法定义 *slr1609* 表达水平,设初始模板量为 X_0 ,则相对表达量的计算公式为 $X_0^{5d}/X_0^{3d} = 2^{-(\Delta C_T^{5d} - \Delta C_T^{3d})}$ 。分别得出两个基因的平均 C_T 值以及两个基因的 C_T 值之差 ΔC_T (表 3),将 X_0^{3d} 取为 1,以相对表达量为纵坐标,培养时间为横坐标,作柱状图 (图 3)。从图中可

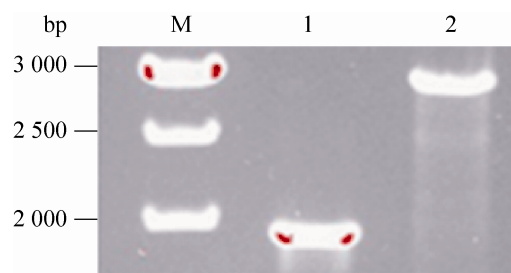


图 2 菌落 PCR

Fig. 2 Colony PCR. M: DNA marker; 1: wild type; 2: mutant strain of *slr1609*.

表 3 *slr1609* 和 *rnpB* 的 RT-PCR C_T 值

Table 3 The C_T values of *slr1609* and *rnpB*

	3 d	5 d
<i>slr1609</i> C_T	24.548 \pm 0.338	23.787 \pm 0.180
<i>rnpB</i> C_T	17.244 \pm 0.031	19.040 \pm 0.177
Relative quantity ΔC_T	7.304 \pm 0.369	4.747 \pm 0.357

RNA preparation, reverse transcription and real-time PCR were performed as described in section 1.3.

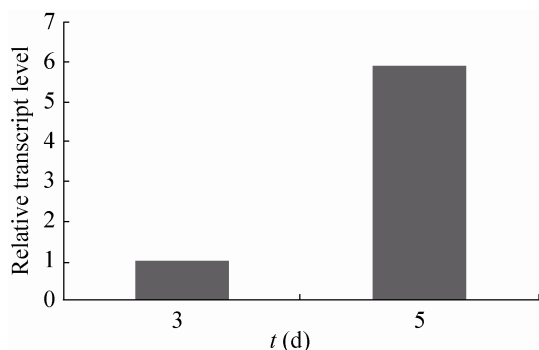


图3 不同培养时间点 *slr1609* 的相对表达量
Fig. 3 The relative transcript levels of *slr1609* at different cultivation time points (days).

可以看出, 5 d 时 *slr1609* 基因的表达明显高于 3 d, 因而确定为取样时间点。

2.3 带 3×FLAG 标签目的蛋白的表达、纯化及 Western blotting 分析

根据 UniProt 数据库 (<http://www.uniprot.org>), *slr1609* 编码的脂肪酸激活酶的蛋白质分子量为 77.7 kDa, 而 3×FLAG 标签的大小为 2.7 kDa, 可以计算出融合蛋白大小约为 80.4 kDa。取 200 mL 培养 5 d 的 *slr1609* 突变株和野生株, 用 BugBuster Master Mix (Novagen) 提取蛋白质, 并通过 Western blotting (12% 分离胶) 初步验证 3×FLAG 标签的表达。从图 4 可以看出, *slr1609* 突变株中 *slr1609* 的 C 端插入 3×FLAG 标签后仍能够正常表达, 并且蛋白分子量大小也正确, 而在集胞藻 PCC 6803 野生株检测不到 3×FLAG 信号, 在蛋白水平表明突变株的正确构建和 3×FLAG 标签具有较强的特异性, 可以用于蛋白质复合体的分析。

2.4 检测蛋白质复合物纯化效果

取 1 L 培养 5 d 的 *slr1609* 突变株培养液, 按照上述方法纯化突变株中的蛋白质。取 20 μL

突变株纯化后蛋白质溶液进行 Native-PAGE 并进行银染 (图 5A), 同时蛋白溶液稀释 10 倍后等量进行 Western blotting 分析, 以检测融合蛋白是否以蛋白质复合体的形式被纯化出来, 分离出的复合物以备质谱分析。图 5B 中的 Western blotting 结果可以看出分子量大于 170 kDa 的位置显示明显的 FLAG 信号; 图 5A 中可以看出, *slr1609* 突变株纯化后的蛋白质在分子量大于 170 kDa 的位置同样有蛋白质存在, 表明细胞中 Slr1609 融合蛋白以蛋白质复合体的形式被纯

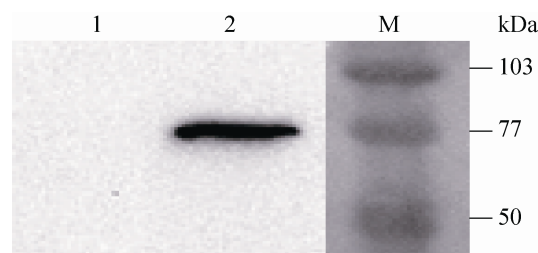


图4 Western blotting 验证 3×FLAG 标签的插入与表达

Fig. 4 Confirmation of 3×FLAG tag by Western blotting. M: protein marker; 1: wild type; 2: mutant strain of *slr1609*.

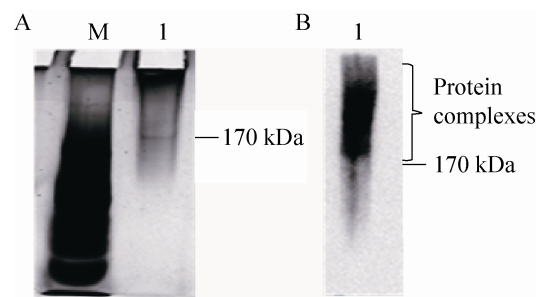


图5 Native-PAGE 检测蛋白质复合物纯化效果

Fig. 5 Analysis of protein complex purification efficiency by Native-PAGE (A) and Western blotting (B). (A) M: protein marker; 1: purified proteins from the *slr1609* mutant; (B) 1: purified protein from the *slr1609* mutant, diluted by 10 folds.

化和分离出来, 并且可能因为一些蛋白的离体产生拖尾现象。

2.5 质谱结果分析

将上述银染后的蛋白带切下后进行质谱检测, 再把 NanoLC-MS/MS 结果提交至集胞藻 PCC 6803 全蛋白数据库检索, 在肽段容差 ± 0.1 Da、 $P < 0.05$ 的检索条件下进行数据搜索对比, 根据蛋白质丰度、序列匹配程度与覆盖率、检测到肽段数量及可信度、同一肽段检测次数等指标, 对鉴定出的结果进行综合评分, 共鉴定到 5 个阳性结果 (表 4)。其中, Slr1834 鉴定得分为 30, 有 3 个肽段归属于同一蛋白质, 2 个肽段可信度超过阈值分数 ($P < 0.05$), 覆盖率为 4%; Slr1783 鉴定得分为 21, 鉴定到 1 个可信度超过阈值分数 ($P < 0.05$) 的肽段, 覆盖率为 6%; Slr0415 鉴定得分为 19, 有 3 个肽段归属于同一蛋白质, 1 个肽段可信度超过阈值分数 ($P < 0.05$), 覆盖率为 3%; Sll0350 鉴定得分为 19, 有 3 个肽段归属于同一蛋白质, 1 个肽段可信度超过阈值分数 ($P < 0.05$), 覆盖率为 1%; Slr1609 鉴定得分为 18, 鉴定到 1 个可信度超过阈值分数 ($P < 0.05$) 的肽段, 覆盖率为 2%。

从表中可以看出 LC-MS/MS 鉴定得到的各

个蛋白质的功能。Slr1834 是光系统 I 中 P700-叶绿素 a 复合体上的脱辅基蛋白亚基, 属于能量代谢中光合作用的功能蛋白; Slr1783 是双组分信号系统的应答调控子 NarL 的亚基, 属于信号转导调控功能蛋白; Slr0415 是 ATP 结合盒转运蛋白, 属于运载功能蛋白; Sll0350 是未知功能蛋白; Slr1609 是我们的目标融合蛋白, 即脂肪酸激活酶。此结果进一步确认了我们的纯化和 Native-PAGE 系统正确地将 Slr1609 及其蛋白质复合体的蛋白进行了成功分离。

通过对上述蛋白质的功能分析, Slr1834、Slr1783 和 Slr0415 3 个蛋白均为细胞膜中常见的参与光合作用、信号转导、运载的功能蛋白, 可能是由于这些蛋白的丰度较高从而非特异性结合在纯化柱上, 造成亲和纯化不可避免的假阳性。质谱还鉴定出一个未知功能蛋白 Sll0350, 利用 SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de>) 工具对该蛋白的结构域进行分析, 并未发现跨膜结构域, 可以排除膜蛋白的可能性, 而鉴于此蛋白可能与脂肪酸激活酶 Slr1609 形成蛋白质复合体, 因此我们认为该蛋白有可能与脂肪酸代谢有关, 但仍需进一步的实验 (例如, 基因敲除等) 验证来提供更有力的证据。

表 4 LC-ESI-MS/MS 检测蛋白质复合体结果

Table 4 Database search results for LC-ESI-MS/MS identification of protein complex

Protein ID	Protein description	Mass (kDa)	Score	Coverage (%)	Peptides
Slr1834	photosystem I p700 chlorophyll a apoprotein a1	83	30	4	VSDNNPVPTSFEKVSVDNNPVPT SFEKDIPLPHEFILEPSK
Slr1783	probable transcriptional regulator ycf29	32	21	6	FQSLPVVFLTARGMTGDR
Slr0415	NA(+)/H(+) antiporter, putative	76	19	3	NELLQQATELATNLKVD AHPALR NELLQQATELATNLKVD AHPALR NELLQQATELATNLKVD AHPALR
Sll0350	hypothetical protein	88	19	1	FANGLLLADRLRFANGLLLADRLR FANGLLLADRLR
Slr1609	AMP-binding protein	78	18	2	SLGALIVPNFDALQK

3 结论

目前对多不饱和脂肪酸的代谢和调控途径的认识十分有限,限制了将这类高效代谢和调控模块用于大幅度提高生物产品。集胞藻 PCC 6803 中脂肪酸合成相关的酶复合物研究,对大规模生成多不饱和脂肪酸这种重要生物产品有重要意义。迄今为止,我们建立并优化了集胞藻 PCC 6803 中高通量快速的基因突变体系:经过优化过的融合 PCR 方法,从拿到引物到获得基因突变所需 DNA 片段并进行转化,仅需半天时间。利用 RT-PCR 技术通过鉴定目标基因转录水平,优化了重组蛋白表达条件。对 3×FLAG 标记的 *slr1609* 突变株进行了 Western blotting 鉴定。利用 LC-MS/MS 鉴定了 *slr1609* 重组突变株目标蛋白质复合体成分,质谱结果表明,蛋白质复合体中能够检测到目标蛋白 Slr1609,证明 3×FLAG 标签构建正确且能正常表达纯化,整个重组突变-亲和纯化技术是可行的。质谱结果还鉴定出一个未知功能蛋白 Sll0350,可能是与脂肪酸代谢有关的蛋白。下一步实验中我们将利用分子生物学(基因敲除、基因过表达等)和组学手段(基因组、转录组和代谢组等)对有效候选伴侣蛋白进行功能研究与鉴定,进而解析集胞藻 PCC 6803 中多不饱和脂肪酸相关代谢和调控途径。

REFERENCES

- [1] Badger MR, Price GD. CO₂ concentrating mechanisms in cyanobacteria: molecular components, their diversity and evolution. *J Exp Bot*, 2003, 54(383): 609–622.
- [2] Kehr JC, Gatte Picchi D, Dittmann E. Natural product biosyntheses in cyanobacteria: a treasure trove of unique enzymes. *Beilstein J Org Chem*, 2011, 7: 1622–1635.
- [3] Dantas EW, Moura AN, Bittencourt-Oliveira MC. Cyanobacterial blooms in stratified and destratified eutrophic reservoirs in semi-arid region of Brazil. *An Acad Bras Cienc*, 2011, 83(4): 1327–1338.
- [4] Ungerer J, Tao L, Davis M, et al. Sustained photosynthetic conversion of CO₂ to ethylene in recombinant cyanobacterium *Synechocystis* 6803. *Energ Environ Sci*, 2012, 5(10): 8998–9006.
- [5] Lan EI, Liao JC. ATP drives direct photosynthetic production of 1-butanol in cyanobacteria. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, 109(16): 6018–6023.
- [6] Lu X. A perspective: photosynthetic production of fatty acid-based biofuels in genetically engineered cyanobacteria. *Biotechnol Adv*, 2010, 28(6): 742–746.
- [7] Atsumi S, Higashide W, Liao JC. Direct photosynthetic recycling of carbon dioxide to isobutyraldehyde. *Nat Biotechnol*, 2009, 27 (12): 1177–1180.
- [8] Lindberg P, Park S, Melis A. Engineering a platform for photosynthetic isoprene production in cyanobacteria, using *Synechocystis* as the model organism. *Metab Eng*, 2010, 12(1): 70–79.
- [9] Dexter J, Fu PC. Metabolic engineering of cyanobacteria for ethanol production. *Energ Environ Sci*, 2009, 2(8): 857–864.
- [10] Ikeuchi M. Complete genome sequence of a cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803, the oxygenic photosynthetic prokaryote. *Tanpakushitsu Kakusan Koso*, 1996, 41(16): 2579–2583.
- [11] Wu Q, Chen L, Wang JX, et al. Engineering photosynthetic cyanobacterial chassis: a review. *Chin J Biotech*, 2013, 29(8): 1086–1099 (in Chinese). 巫琴, 陈磊, 王江新, 等. 应用合成生物学策略优化光合蓝细菌底盘. *生物工程学报*, 2013, 29(8): 1086–1099.
- [12] Kufryk GI, Sachet M, Schmetterer G, et al. Transformation of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 as a tool for genetic mapping: optimization of efficiency. *FEMS*

- Microbiol Lett, 2002, 206(2): 215–219.
- [13] Lü J, Sun HL, He H, et al. Synthetic biology: its applications in biotechnology. Prog Biochem Biophys, 2012, 39(2): 105–118 (in Chinese).
吕静, 孙洪磊, 何皓, 等. 合成生物学及其在生物技术中的应用进展. 生物化学与生物物理进展, 2012, 39(2): 105–118.
- [14] White SW, Zheng J, Zhang YM, et al. The structural biology of type II fatty acid biosynthesis. Annu Rev Biochem, 2005, 74: 791–831.
- [15] Von Berlepsch S, Kunz HH, Brodesser S, et al. The Acyl-acyl carrier protein synthetase from *Synechocystis* sp. PCC 6803 mediates fatty acid import. Plant Physiol, 2012, 159(2): 606–617.
- [16] Kaczmarzyk D, Fulda M. Fatty acid activation in cyanobacteria mediated by acyl-acyl carrier protein synthetase enables fatty acid recycling. Plant Physiol, 2010, 152(3): 1598–1610.
- [17] Liu X, Sheng J, Curtiss R 3rd. Fatty acid production in genetically modified cyanobacteria. Proc Natl Acad Sci USA, 2011, 108 (17): 6899–6904.
- [18] Liu X, Fallon S, Sheng J, et al. CO₂-limitation-inducible green recovery of fatty acids from cyanobacterial biomass. Proc Natl Acad Sci USA, 2011, 108(17): 6905–6908.
- [19] Dziembowski A, Séraphin B. Recent developments in the analysis of protein complexes. FEBS Lett, 2004, 556(1/3): 1–6.
- [20] Boehm M, Romero E, Reisinger V, et al. Investigating the early stages of photosystem II assembly in *Synechocystis* sp. PCC 6803: isolation of CP47 and CP43 complexes. J Biol Chem, 2011, 286(17): 14812–14819.
- [21] Ma W, Deng Y, Ogawa T, et al. Active NDH-1 complexes from the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. Plant Cell Physiol, 2006, 47(10): 1432–1436.
- [22] Brown AP, Affleck V, Fawcett T, et al. Tandem affinity purification tagging of fatty acid biosynthetic enzymes in *Synechocystis* sp. PCC 6803 and *Arabidopsis thaliana*. J Exp Bot, 2006, 57(7): 1563–1571.
- [23] Gao Q, Tan X, Lu X. Enzymatic and physiological characterization of fatty acid activation in *Synechocystis* sp. PCC 6803. J Basic Microb, 2013, 53(10): 848–855.
- [24] Stanier, RY, Kunisawa R, Mandel M, et al. Purification and properties of unicellular blue-green algae (order *Chroococcales*). Bacteriol Rev, 1971, 35(2): 171–205.
- [25] Sobotka R, Tichy M, Wilde A, et al. Functional assignments for the carboxyl-terminal domains of the ferrochelatase from *Synechocystis* sp. PCC 6803: the CAB domain plays a regulatory role, and region II is essential for catalysis. Plant Physiol, 2011, 155(4): 1735–1747.
- [26] Sambrook J, Russell DW. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
- [27] Tian X, Chen L, Wang J, et al. Quantitative proteomics reveals dynamic responses of *Synechocystis* sp. PCC 6803 to next-generation biofuel butanol. J Proteomics, 2013, 78: 326–345.

(本文责编 郝丽芳)