

三角褐指藻丙二酰单酰辅酶 A:酰基载体蛋白转酰基酶的功能分析

刘萍¹, 林彬², 初金玲², 王康², 高永林¹, 崔玉琳^{*2}

1 烟台大学生命科学学院, 山东 烟台 264003

2 中国科学院烟台海岸带研究所 海岸带生物学与生物资源利用重点实验室, 山东 烟台 264003

刘萍, 林彬, 初金玲, 王康, 高永林, 崔玉琳. 三角褐指藻丙二酰单酰辅酶 A:酰基载体蛋白转酰基酶的功能分析[J]. 微生物学通报, 2023, 50(3): 1052-1061.

LIU Ping, LIN Bin, CHU Jinling, WANG Kang, GAO Yonglin, CUI Yulin. Functional analysis of a malonyl-CoA:ACP transacylase gene from *Phaeodactylum tricornutum*[J]. Microbiology China, 2023, 50(3): 1052-1061.

摘要:【背景】丙二酰单酰辅酶 A:酰基载体蛋白转酰基酶(malonyl coenzyme A:acyl carrier protein transacylase, MCAT)是 II 型脂肪酸合酶(fatty acid synthase II, FASII)的重要亚基, 与脂肪酸合成直接相关, 然而关于微藻 MCAT 的信息却很少。【目的】验证三角褐指藻 MCAT 的功能。【方法】在模式硅藻三角褐指藻的全基因组序列中发现了一个可能的 *mcat* 基因序列, 对其进行生物信息学分析, 构建原核表达载体, 并转入 MCAT 缺陷型大肠杆菌 L48 菌株中, 最后利用 GC-MS 分析突变株脂肪酸的成分和含量。【结果】三角褐指藻 MCAT 主要结构为 α -螺旋和无规则卷曲, 与圆柱脆杆藻的亲缘关系最为接近, 为 protits 型 MCAT; 三角褐指藻 MCAT 的表达使 MCAT 缺陷型大肠杆菌 L48 菌株恢复了合成脂肪酸的功能; 对 L48 回复突变株的脂肪酸组成进行分析, 发现该酶对 C14:0 具有底物偏好性, 从而促进中长链脂肪酸如 C16:0 和 C17:1 的合成, 这一特点与 protits 型 MCAT 的特性基本相符。【结论】三角褐指藻 MCAT 能促进脂肪酸的合成, 这为微藻脂肪酸合成及代谢调控研究提供了新的线索, 有利于微藻脂质的研究和应用。

关键词: 三角褐指藻; 丙二酰单酰 CoA:ACP 转酰基酶; 脂肪酸合成; 功能验证

资助项目: 国家自然科学基金面上项目(42176140, 41876188)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (42176140, 41876188).

*Corresponding author. E-mail: yulincui@yic.ac.cn

Received: 2022-06-26; Accepted: 2022-09-17; Published online: 2022-11-16

Functional analysis of a malonyl-CoA:ACP transacylase gene from *Phaeodactylum tricornutum*

LIU Ping¹, LIN Bin², CHU Jinling², WANG Kang², GAO Yonglin¹, CUI Yulin^{*2}

¹ College of Life Sciences, Yantai University, Yantai 264003, Shandong, China

² Key Laboratory of Coastal Biology and Biological Resource Utilization, Yantai Institute of Coastal Zone Research, Chinese Academy of Sciences, Yantai 264003, Shandong, China

Abstract: [Background] Malonyl-CoA:ACP transacylase (MCAT), an important subunit of type II fatty acid synthase (FASII), is associated with fatty acid synthesis. However, little information is available on microalgal MCAT. [Objective] To validate the function of the MCAT gene from *Phaeodactylum tricornutum*. [Methods] We found a possible *mcat* gene in the whole genome sequence of the model diatom *P. tricornutum* and cloned this gene. We performed bioinformatic analysis of this gene and introduced it into the MCAT-deficient *E. coli* L48 strain. Gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) was employed to analyze the composition and content of fatty acids in the mutant strains. [Results] The MCAT in *P. tricornutum* had the secondary structure mainly composed of α -helix and random coil and the closest genetic relationship with that in *Fragilaria cylindrus*, being a protists-type MCAT. To verify the function of the gene, we introduced this gene into the MCAT-deficient *E. coli* L48 strain and found that the strain recovered the function of fatty acid synthesis. Further, we analyzed the fatty acid composition of the reverting and found that the enzyme had a substrate preference to C14:0. The MCAT promoted the synthesis of medium- and long-chain fatty acids such as C16:0 and C17:1. This feature is largely consistent with the characteristics of protists-type MCATs. [Conclusion] There is a protists-type MCAT in *P. tricornutum*. This study provides new clues for the study of fatty acid synthesis and metabolism in microalgae, which is beneficial to the research and application of microalgal lipids.

Keywords: *Phaeodactylum tricornutum*; malonyl-CoA:ACP transacylase; fatty acid synthesis; functional verification

脂肪酸广泛用于食品、化妆品、医药等行业, 主要依靠化学和微生物进行合成^[1-2]。化学合成法有产量低、生产成本较高等缺陷, 限制了大规模生产^[3], 因此, 利用微生物合成脂肪酸成为热点。三角褐指藻(*Phaeodactylum tricornutum*)是一种海洋真核单细胞硅藻^[4], 生长速度快, 基因组小且已完成测序, 基因操作技术成熟, 是硅藻研究的模式藻种之一^[5-6]。同时, 该藻富含蛋白质、多糖、脂肪酸及类胡萝卜素等物质^[7-8],

其中二十碳五烯酸(eicosapentaenoic acid, EPA)的积累量高达 35%, 被认为是工业生产 EPA 的良好来源^[9]。因此, 探索三角褐指藻脂肪酸合成途径具有重要意义。

由乙酰辅酶 A 到 14–18 碳脂肪酸的合成称为基础脂肪酸合成, 该过程主要由脂肪酸合酶(fatty acid synthase, FAS)催化完成, 生物界中主要存在 2 种 FAS。FASI 多存在于脊椎动物、酵母和一些细菌中, 在 1 条或 2 条肽链上, 包含

脂肪酸合成所需的全部活性位点^[10]。FASII 主要存在于植物和多数细菌中,其活性位点分布在不同基因产物上,以多亚基复合酶的形式发挥功能^[11]。微藻中的 FAS 与高等植物相似,为 FASII 型蛋白复合体,定位于质体中。

作为 FASII 中的关键酶,MCAT 以丙二酰 CoA 和酰基载体蛋白(acyl carrier protein, ACP)为底物,通过转移丙二酰形成脂肪酸生物合成过程中的延伸底物丙二酰单酰 ACP^[12-14]。以往对 MCAT 的探讨主要集中在构造上,如油桐的 MCAT 结构^[15],但人们对微藻 MCAT 及其在脂肪酸生物合成中的功能作用知之甚少。本研究以三角褐指藻基因组序列为基础,克隆一个可能的 *mcat* 基因,通过在 MCAT 缺陷型大肠杆菌 L48 中表达检验该酶的功能,并进一步分析 PtMCAT 的底物特异性等,以期对三角褐指藻脂肪酸合成途径研究和代谢工程研究提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 藻种和菌种

研究所用三角褐指藻购自中国科学院淡水藻种库,编号 FACHB-843,三角褐指藻接种于 f/2 培养基^[16]在(21±0.5) °C 培养箱中培养,每天摇瓶 2-3 次,光照强度为 60-70 μmol/(m²·s), 12 h/12 h 光暗比。

大肠杆菌 MCAT 缺陷株 L48 来自美国耶鲁大学 CGSC 大肠杆菌保藏中心(<http://cgsc.biology.yale.edu/>),该菌株是温度敏感型的突变株^[17],基因型是 F⁻、*araC14*、*lacY1*、*tsx-57*、*glnX44* (AS)、*gltA5*、*galK2* (Oc)、*fabD89* (ts)、*rpsL20* (strR)、*xylA5*、*mtl-1*、*lldD1*、*thiE1*、*tfr-5*,该菌株在 LB 培养基中 30 °C、200 r/min 条件下培养。大肠杆菌 DH5α 感受态细胞购自艾科瑞生物科技有限公司,在 LB 培养基中于 37 °C、

200 r/min 条件下培养。

1.2 主要试剂和仪器

LB 肉汤、琼脂粉,青岛海博生物技术有限公司;高保真酶 Apex HF HS DNA Polymerase FS Master Mix、*Evo M-MLV* 反转录预混型试剂盒、SYBR[®] Green Premix Pro *Taq* HS 预混型 qPCR 试剂盒等,艾科瑞生物科技有限公司;广谱型植物 RNA 提取试剂盒、琼脂糖凝胶 DNA/PCR 产物回收试剂盒,北京诺贝莱生物科技有限公司;ClonExpress II One Step Cloning Kit,南京诺唯赞生物科技股份有限公司。实时荧光定量 PCR 仪,Thermo Fisher Scientific 公司。

1.3 生物信息学分析

利用 ProtParam 工具(<https://web.expasy.org/protparam>)预测 MCAT 分子质量、等电点、不稳定系数及疏水性。使用在线 SOPMA 软件(https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/secpred_sopma.pl)对三角褐指藻 MCAT 蛋白进行二级结构分析。利用 SWISS-MODEL 在线工具[SWISS-MODEL Interactive Workspace (expasy.org)]进行三级结构预测。

对 MCAT 进行系统进化分析,下载 NCBI 上公布的 12 个物种 MCAT 序列:斑马鱼(*Danio rerio*) NP_001038508.1、猕猴(*Macaca mulatta*) NP_001248301.1、小家鼠(*Mus musculus*) NP_001025185.1、黄胸鼠(*Rattus tanezumii*) NP_001178717.1、破囊壶菌(*Aurantiochytrium* sp.) AKO69810.1、裂殖壶藻(*Schizochytrium*) AGG56551.1、同丝绵霉(*Achlyahypogyna*) OQR91679.1、圆柱脆杆藻(*Fragilaria cylindrus*) OEU21657.1、微拟球藻(*Nannochloropsis gaditana*) AGS78408.1、麻风树(*Jatropha curcas*) NP_001306855.1、亚麻(*Linum usitatissimum*) AGD95011.1、克里藻(*Klebsomidiut m nitens*) GAQ89624.1,使用 MEGA 7.0 软件(<https://www>.)

megasoftware.net/)进行多序列比对, 构建系统发育树。

1.4 三角褐指藻总 RNA 的提取及单链 cDNA 的合成

取生长至对数期[细胞密度 $(5.5-6.0) \times 10^6$ 个/mL]的三角褐指藻藻液 500 mL, 12 000 r/min 离心 5 min 收集藻体后提取总 RNA, 而后按照反转录试剂盒合成三角褐指藻 cDNA 第一链, -80°C 冰箱保存。

1.5 实时荧光定量 PCR 检测三角褐指藻 MCAT 转录水平

为了鉴定 *mcat* 基因在三角褐指藻内的表达规律, 对三角褐指藻进行缺氮诱导处理。将培养至对数生长末期(细胞密度 6.5×10^6 个/mL)的三角褐指藻转移至无菌离心管中, 室温下 6 000 r/min 离心 10 min, 接种至 f/2 培养基或 f/2 缺氮培养基中培养。实验分为 3 组, a: 正常培养 3 d; b: 缺氮培养 3 d; c: 正常培养第 0 天(对照组)。按照 1.4 的步骤提取 RNA, 逆转录成 cDNA, 设计 *mcat* 基因 qPCR 引物对 4-F1/4-R1 (表 1), 使用 SYBR[®] Green Premix Pro Taq HS 预混型 qPCR 试剂盒进行, 荧光定量 PCR。该实验选取 18S rRNA 为内参基因, RT-qPCR 反应体系(20 μL): 2 \times SYBR[®] Green Pro Taq HS Premix II 10 μL , 上、下游引物

(10 $\mu\text{mol/L}$)各 1 μL , cDNA 模板 1 μL , ROX ReferenceR Dye 0.4 μL , RNase free ddH₂O 6.6 μL 。RT-qPCR 反应条件: 95°C 30 s; 95°C 5 s, 60°C 30 s, 40 个循环。每个样品做 3 次生物学重复, 反应结束后按照 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 计算 *mcat* 基因的相对表达量。

1.6 *mcat* 基因的克隆

根据三角褐指藻基因组中一段可能的 *mcat* 基因序列设计上、下游引物 1-F1 和 1-R1 (表 1), 以 1.4 获得的 cDNA 为模板, 采用高保真酶 Apex HF HS DNA Polymerase FS Master Mix 扩增 *mcat* 基因。PCR 反应体系(40 μL): Apex HF HS DNA Polymerase FS Master Mix 20 μL , 上、下游引物(10 $\mu\text{mol/L}$)各 2 μL , cDNA 模板 2 μL , ddH₂O 14 μL 。PCR 反应条件: 94°C 30 s; 98°C 10 s, 55°C 5 s, 72°C 10 s 35 个循环; 72°C 30 s。PCR 产物经胶回收后送至北京睿博兴科生物技术有限公司测序, 确认获得了特异性和正确的目的基因片段。

1.7 基因的原核表达

将 pET-30a 质粒用 *Bam*H I 在 37°C 酶切 40 min, 进行琼脂糖凝胶电泳后回收产物。设计同源重组所需要的引物对 2-F1/2-R1 扩增目的基因, 将目的基因和经 *Bam*H I 酶切处理过的 DNA 片段用 ClonExpress II One Step Cloning

表 1 本研究使用的引物

Table 1 Primers used in this study

Name	Sequence (5'→3')	Product length (bp)
1-F1	CTCGAGATGCATCATCATCA	850
1-R1	AAGCTTTTACACCTCAACGT	
2-F1	ACAAGGCCATGGCTGATATC <u>GGATCC</u> ATGGGGATGCTCCTACTGACTG	870
2-R1	TGTCGACGGAGCTCGAATTC <u>CCTAGGTT</u> TACACCTCAACGTTTTTCACATTCG	
3-F1	CTACGCCGTGAGTGGCAGTT	234
3-R1	ATGGTTTCGGGATCGGAATG	
4-F1	GTCGATAGTGGCATGGTTTC	135
4-R1	ACTCACGGCGTAGTTTCCG	

下划线部分代表 *Bam*H I 限制性内切酶位点

The underlined portion represents the *Bam*H I restriction endonuclease site.

Kit 进行重组连接, 将重组后载体送至青岛睿博兴科生物技术有限公司进行检测。将连接后的载体 pET-30a-*mcat* 通过电转染技术(电阻 200 Ω , 电容 25 μF , 电压 2 kV, 时间 4.3 ms) 导入大肠杆菌缺陷株 L48 中, 将转染后的菌液划线于 LB 固体培养基, 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养过夜。大肠杆菌 DH5 α 菌株用作阳性对照, 未转染 pET-30a-*mcat* 质粒的 L48 菌株用作阴性对照。挑取单克隆, 37 $^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min 培育 2–3 h, 直到 OD_{600} 值约为 0.5–0.8, 加入终浓度为 0.5 mmol/L 的 IPTG, 28 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 12 h。

1.8 *mcat* 基因在大肠杆菌中的表达

利用荧光定量 PCR 方法分析三角褐指藻的 *mcat* 基因在缺陷株大肠杆菌 L48 中的表达。将未诱导、诱导培养后第 6 小时及第 12 小时的菌液, 按照 RNA 提取试剂盒中的步骤提取细菌基因组 RNA, 根据反转录试剂盒的步骤合成 cDNA。设计引物对 3-F1/3-R1 (表 1), 扩增片段长度为 234 bp。使用 SYBR[®] Green Premix Pro Taq HS 预混型 qPCR 试剂盒进行荧光定量 PCR, 采用 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 计算 *mcat* 基因的相对表达量^[18]。RT-qPCR 反应体系(20 μL): 2 \times SYBR[®] Green Pro Taq HS Premix II 10 μL , 上、下游引物

(10 $\mu\text{mol/L}$)各 1 μL , cDNA 模板 1 μL , ROX ReferenceR Dye 0.4 μL , RNase free ddH₂O 6.6 μL 。RT-qPCR 反应条件: 95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s; 95 $^{\circ}\text{C}$ 5 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 40 个循环。每个样品做 3 次生物学重复。

1.9 脂肪酸成分分析

取 500 mL 诱导培养后的菌液, 于 4 000 r/min、离心 10 min 收集大肠杆菌菌体, 冻干磨碎后收集菌粉。借鉴杨青等^[19]萃取脂肪酸的方法, 使用异丙醇-正己烷萃取脂肪酸, 并将其甲酯化进行气相色谱分析。气相色谱分析于中国科学院青岛生物能源与过程研究所进行, 数据处理采用峰面积归一化法^[19]。

2 结果与分析

2.1 生物信息学分析结果

三角褐指藻 *mcat* 基因的开放阅读框长度为 1 059 bp, 编码 352 个氨基酸。蛋白分子质量为 37.436 kDa; 理论等电点 5.00, 为酸性蛋白; 不稳定系数 27.18, 属于稳定蛋白; 亲水性平均系数 0.051, 为疏水性蛋白。三角褐指藻 MCAT 蛋白的二级结构预测见图 1, 该蛋白 192 个氨基酸(54.55%)可能形成 α -螺旋(蓝色), 104 个

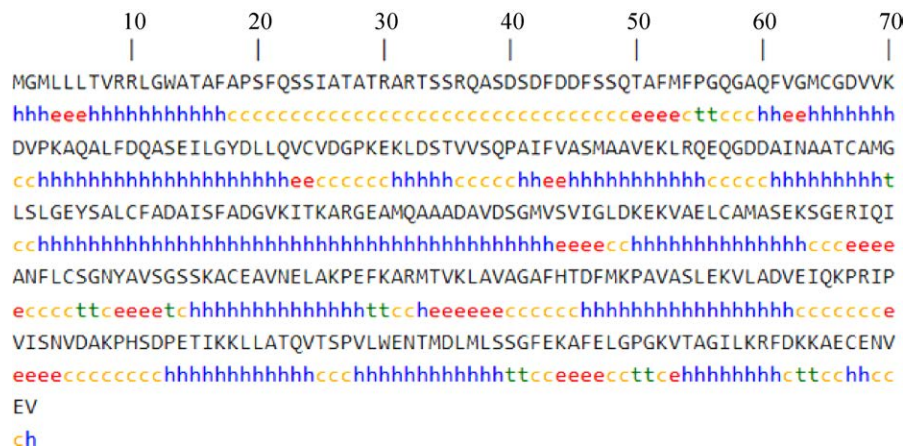


图 1 SOPMA 软件分析三角褐指藻 MCAT 的二级结构

Figure 1 Analysis of secondary structure of *Phaeodactylum tricornerutum* MCAT by SOPMA software.

氨基酸(29.55%)可能形成无规则卷曲(黄色), 42 个氨基酸(11.93%)可能形成延伸链(红色), 14 个氨基酸(3.98%)可能形成 β -转角(绿色)。三角褐指藻 MCAT 主要结构为 α -螺旋和无规则卷曲, 该结构有助于蛋白质的稳定性。三角褐指藻 MCAT 的三级结构见图 2, 主要是 α -螺旋和无规则卷曲形成的, 与二级结构的预测结果一致。

MCAT 的系统发育树结果如图 3 所示, 进化树共分为三大分支, 以斑马鱼、猕猴、小家鼠、黄胸鼠为代表的动物聚为一大支; 以破囊壶菌、裂殖壶菌、同丝绵霉、圆柱脆杆藻、微拟球藻为代表的原生生物聚为一大支; 最后以麻风树、亚麻、克里藻为代表的植物聚为一大支, 这与已知的 MCAT 的分类^[20]是一致的。

根据对比结果, 三角褐指藻与圆柱脆杆藻聚在一起形成一个系统发育分支, 支持度为 100, 与微拟球藻形成姐妹群, 支持度为 78, 属于 protists 类型。

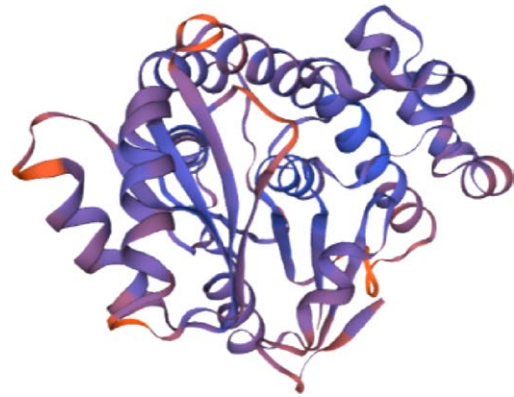


图 2 SWISS-MODEL 软件分析三角褐指藻 MCAT 蛋白的三级结构

Figure 2 SWISS-MODEL software to analyze the tertiary structure of MCAT protein of *Phaeodactylum tricornutum*.

2.2 缺氮条件下 *mcat* 基因的转录水平

利用 RT-qPCR 分析缺氮处理后 *mcat* 基因表达情况, 由图 4 可以看出, 在三角褐指藻缺氮培养 3 d 后, *mcat* 基因表达量与对照相比上升。三角褐指藻 *mcat* 基因在缺氮条件下被诱导, 说明缺氮能促进三角褐指藻中 *mcat* 基因的表达。

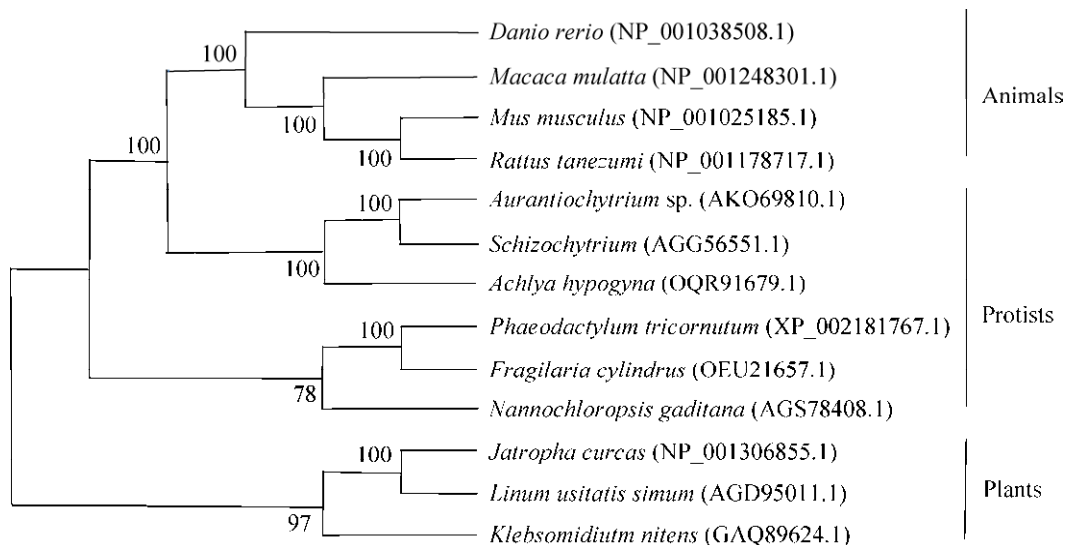


图 3 基于 *mcat* 基因序列用最大简约法建立的系统发育树 GenBank 登录号显示在括号中; 分支上的数字为 bootstrap 值

Figure 3 Phylogenetic tree based on the *mcat* gene sequence using the maximum parsimony method. GenBank accession No. are shown in parentheses; Bootstrap values are shown at branch points.

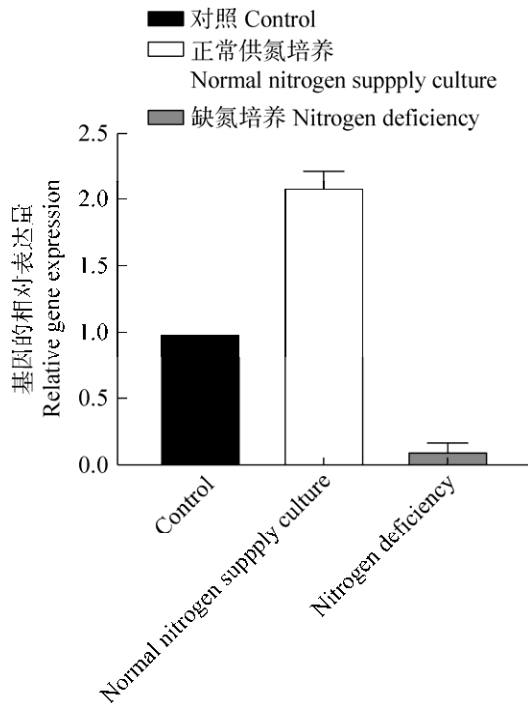


图 4 *mcat* 基因在正常培养和缺氮培养条件下的转录水平

Figure 4 Transcript level of *mcat* gene in normal culture and nitrogen-deficient culture conditions.

2.3 MCAT 的功能验证

通过电转染技术把 pET-30a-*mcat* 质粒转化至大肠杆菌缺陷株 L48 中, 培养过夜后如图 5 所示, 阴性对照组 L48 菌株未生长, 实验组和阳性对照组大肠杆菌 DH5 α 能够正常长出菌斑, 说明克隆获得的三角褐指藻 *mcat* 基因在 L48 菌株中表达并行使功能, 使得大肠杆菌 MCAT 缺陷株 L48 回复突变。

2.4 *mcat* 基因的表达及脂肪酸含量分析

运用 RT-qPCR 分析 *mcat* 基因的相对表达, 结果显示, 在培养的第 12 小时 *mcat* 基因的表达量最高, 相对表达水平远远高于第 6 小时 (图 6)。因此, 在转录水平上证实了 *mcat* 基因的表达。

突变株 L48-2 的脂肪酸组成变化如表 2 所示。结果表明, 突变株与对照菌株细胞内积累

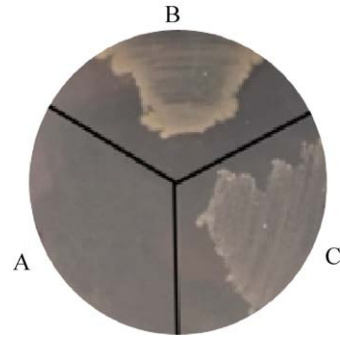


图 5 大肠杆菌在 LB 培养基中的生长状况 A: 阴性对照, 大肠杆菌缺陷株 L48. B: 实验组, 含有 *mcat* 基因的突变株 L48-2. C: 阳性对照, 大肠杆菌 DH5 α

Figure 5 Growth of *Escherichia coli* in LB medium. A: Negative control, *Escherichia coli* deficient strain L48. B: Test group, mutant strain L48-2 containing *mcat* gene. C: Positive control, *Escherichia coli* DH5 α .

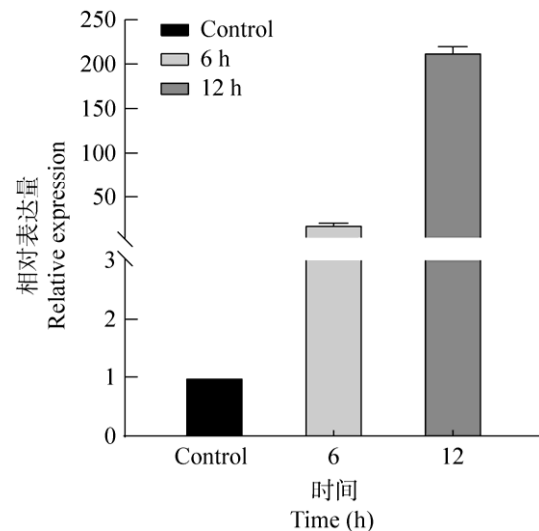


图 6 6 h 和 12 h 诱导后 *mcat* 基因的表达水平

Figure 6 Expression levels of *mcat* genes after 6 h and 12 h induction.

脂肪酸的种类基本相同, 主要为 C14:0、C14:1、C16:0、C16:1、C17:0、C18:1。 *mcat* 基因的突变株 C12:0、C14:0、C16:0、C17:1、C18:0 及总脂肪的含量相较于对照菌株都有所增加。此外, 突变株的脂肪酸组成占比并未发生明显变

表 2 菌株 L48 及突变株 L48-2 的脂肪酸组成
Table 2 Fatty acid composition of strain L48 and mutant L48-2

Fatty acid	L48 (%)	L48-2 (%)
C12:0	2.00	2.65
C14:0	4.66	6.10
C14:1	42.85	28.87
C15:0	1.80	1.10
C16:0	16.18	25.70
C16:1	13.29	11.58
C17:0	4.89	2.72
C17:1	2.50	8.60
C18:0	0.73	0.88
C18:1	11.09	10.82
Total lipid (% of DW)	4.38	4.90

DW: 干重

DW: Dry weight.

化, 脂肪酸中主要种类仍为 C14:1, 总脂肪的含量略有增加。结果表明表达 *mcad* 基因可促使胞和脂肪酸的合成, 这可能是因为该酶对 C14:0 具有底物偏好性, 促进中长链脂肪酸如 C16:0 和 C17:1 的合成, 这一特点与 protists 类型 MCAT 的特性相符^[21]。

3 讨论与结论

本研究克隆了三角褐指藻中一个可能的 *mcad* 基因, 该基因被导入 MCAT 缺陷型大肠杆菌 L48 菌株中, MCAT 缺陷型大肠杆菌 L48 是不能在 LB 培养基中生长的, 但被导入 *mcad* 基因后该菌株正常生长, 这反映了大肠杆菌 MCAT 缺陷株 L48 回复了 MCAT 的功能。经诱导缺陷型大肠杆菌中表达了 *mcad* 基因且改变了脂肪酸组成, 促使脂质含量的升高(表 2), 发现该酶对 C14:0 具有底物偏好性, 从而促进中长链脂肪酸如 C16:0 和 C17:1 的合成, 有可能为以后高值化微藻产业提供理论依据。

MCAT 已被证明参与 II 型脂肪酸合成, 是脂肪酸合成的关键酶之一, 通过基因工程表达

MCAT 被应用于许多物种^[13]。之前有研究表明, 在大肠杆菌中表达 *mcad* 基因, 突变菌株中的脂肪酸比对照菌株增加了 11%^[22]。Cheng 等^[23]克隆裂殖壶藻的 *mcad* 基因, 在酿酒酵母中成功表达该基因, 而且该基因通过增加 MCAT 的活性来提高酿酒酵母中脂肪酸的含量。在本研究中, 我们对三角褐指藻的 *mcad* 基因进行功能验证, 发现在 L48 菌株中表达并行使功能, 增加了脂肪酸的含量, 由此可判断三角褐指藻的 *mcad* 基因能促进脂肪酸合成。

植物脂肪酸具有重要的生理功能, 是细胞膜脂的主要成分, 能提高植物的抗寒性和抗病性。同时, 脂肪酸具有重要的食用和工业价值, 在植物中可以合成维持机体正常生长所需的一些脂肪酸如亚油酸和亚麻酸等, 满足人们的营养需求; 而且其是生产生物柴油、油漆、润滑剂、尼龙等化工产品的重要原料^[24-25]。MCAT 作为三角褐指藻 II 型脂肪酸合成代谢的重要亚基, 对其进行功能验证将有助于微藻脂质产业的研究开发。

REFERENCES

- [1] 王凯峰, 丁颖, 纪晓俊. 微生物合成丙二酰辅酶 A 衍生物的代谢工程[J]. 生物加工过程, 2020, 18(1): 35-43.
WANG KF, DING Y, JI XJ. Metabolic engineering for microbial synthesis of malonyl-CoA derivatives[J]. Chinese Journal of Bioprocess Engineering, 2020, 18(1): 35-43 (in Chinese).
- [2] 邓文辉, 赵燕, 李建科, 涂勇刚, 马晓娟. 游离脂肪酸在几种常见食品风味形成中的作用[J]. 食品工业科技, 2012, 33(11): 422-425.
DENG WH, ZHAO Y, LI JK, TU YG, MA XJ. The role of free fatty acid in the flavor of several common foods[J]. Science and Technology of Food Industry, 2012, 33(11): 422-425 (in Chinese).
- [3] FARGIONE J, HILL J, TILMAN D, POLASKY S, HAWTHORNE P. Land clearing and the biofuel carbon debt[J]. Science, 2008, 319(5867): 1235-1238.

- [4] KWON DY, VUONG TT, CHOI J, LEE TS, UM JI, KOO SY, HWANG KT, KIM SM. Fucoxanthin biosynthesis has a positive correlation with the specific growth rate in the culture of microalga *Phaeodactylum tricorutum*[J]. Journal of Applied Phycology, 2021, 33(3): 1473-1485.
- [5] BOWLER C, ALLEN AE, BADGER JH, GRIMWOOD J, JABBARI K, KUO AL, MAHESWARI U, MARTENS C, MAUMUS F, OTILLAR RP, RAYKO E, SALAMOV A, VANDEPOELE KL, BESZTERI B, GRUBER A, HEIJDE M, KATINKA M, MOCK T, VALENTIN K, VERRET F. The *Phaeodactylum* genome reveals the evolutionary history of diatom genomes[J]. Nature, 2008, 456(7219): 239-244.
- [6] APT KE, GROSSMAN AR, KROTH-PANCIC PG. Stable nuclear transformation of the diatom *Phaeodactylum tricorutum*[J]. Molecular and General Genetics MGG, 1996, 252(5): 572-579.
- [7] CUI Y, THOMAS-HALL SR, CHUA ET, SCHENK PM. Development of a *Phaeodactylum tricorutum* biorefinery to sustainably produce omega-3 fatty acids and protein[J]. Journal of Cleaner Production, 2021, 300: 126839.
- [8] KIM SM, JUNG YJ, KWON ON, CHA KH, UM BH, CHUNG D, PAN CH. A potential commercial source of fucoxanthin extracted from the microalga *Phaeodactylum tricorutum*[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2012, 166(7): 1843-1855.
- [9] 雷娜娜. 三角褐指藻多不饱和脂肪酸合成的研究[D]. 福州: 福建师范大学硕士学位论文, 2020.
LEI NN. The synthesis of polyunsaturated fatty acids from *Phaeodactylum tricorutum*[D]. Fuzhou: Master's Thesis of Fujian Normal University, 2020 (in Chinese).
- [10] MEHBOOB S, TRUONG K, SANTARSIERO BD, JOHNSON ME. Structure of the *Francisella tularensis* enoyl-acyl carrier protein reductase (FabI) in complex with NAD⁺ and triclosan[J]. Acta Crystallographica Section F Structural Biology and Crystallization Communications, 2010, 66(11): 1436-1440.
- [11] IZUMIZONO Y, AREVALO S, KOSEKI Y, KUROKI M, AOKI S. Identification of novel potential antibiotics for tuberculosis by *in silico* structure-based drug screening[J]. European Journal of Medicinal Chemistry, 2011, 46(5): 1849-1856.
- [12] 张赶, 刘祖碧, 李娟娟, 俞继华, 李洋洋, 廖海, 周嘉裕, 谭睿. 决明丙二酰 CoA:ACP 转酰基酶基因的克隆及序列分析[J]. 生物技术, 2015, 25(2): 103-108.
- ZHANG G, LIU ZB, LI JJ, YU JH, LI YY, LIAO H, ZHOU JY, TAN R. Molecular cloning and sequence analysis of Malonyl-CoA transacylase gene in *Cassia obtusifolia* L.[J]. Biotechnology, 2015, 25(2): 103-108 (in Chinese).
- [13] 王建勇. 油茶种子脂肪酸代谢过程 7 个关键酶基因的克隆与功能研究[D]. 长沙: 中南林业科技大学硕士学位论文, 2014.
WANG JY. The study on cloning and function of seven genes involved in the fatty acid metabolism of *Camellia oleifera* seeds[D]. Changsha: Master's Thesis of Central South University of Forestry & Technology, 2014 (in Chinese).
- [14] TIAN JH, ZHENG MG, YANG GP, ZHENG L, CHEN JL, YANG BJ. Cloning and stress-responding expression analysis of malonyl CoA-acyl carrier protein transacylase gene of *Nannochloropsis gaditana*[J]. Gene, 2013, 530(1): 33-38.
- [15] 刘美兰, 谭晓风, 龙洪旭, 王哲, 刘璐, 王僊僊. 油桐丙二酰单酰 CoA:ACP 转酰基酶的克隆与序列分析[J]. 经济林研究, 2014, 32(4): 1-7.
LIU ML, TAN XF, LONG HX, WANG Z, LIU L, WANG SS. Cloning and sequence analysis of malonyl CoA:ACP transacylase from *Vernicia fordii*[J]. Non-wood Forest Research, 2014, 32(4): 1-7 (in Chinese).
- [16] GUILLARD RRL. Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates[A]//Culture of Marine Invertebrate Animals[M]. Boston, MA: Springer US, 1975: 29-60.
- [17] VERWOERT IIGS, BROWN A, SLABAS AR, STUITJE AR. A *Zea mays* GTP-binding protein of the ARF family complements an *Escherichia coli* mutant with a temperature-sensitive malonyl-coenzyme A: acyl carrier protein transacylase[J]. Plant Molecular Biology, 1995, 27(3): 629-633.
- [18] 王丹晖, 杨又兵, 雷莹, 马彦博, 王丁丁, 娄然. 日粮中添加甘草多糖对肉鸡生长性能、体尺以及 IGF-1 基因相对表达量的影响[J]. 现代畜牧兽医, 2021(12): 28-31.
WANG DH, YANG YB, LEI Y, MA YB, WANG DD, LOU R. Effect of *Glycyrrhiza* polysaccharide in diets on growth performance, body size index and IGF-1 gene relative expression in broilers[J]. Modern Journal of Animal Husbandry and Veterinary Medicine, 2021(12): 28-31 (in Chinese).

- [19] 杨青, 孙子羽, 满都拉, 王佳, 刘瑾, 金晶晶, 陈忠军. 异源表达乙酰辅酶 A 羧化酶对大肠杆菌产脂肪酸的影响[J]. 食品研究与开发, 2021, 42(23): 150-155.
YANG Q, SUN ZY, MANDLAA, WANG J, LIU J, JIN JJ, CHEN ZJ. Effect of heterologous expression of acetyl-CoA carboxylase in *Escherichia coli* on fatty acid production[J]. Food Research and Development, 2021, 42(23): 150-155 (in Chinese).
- [20] WANG X, LIU YH, WEI W, ZHOU X, YUAN W, BALAMURUGAN S, HAO TB, YANG WD, LIU JS, LI HY. Enrichment of long-chain polyunsaturated fatty acids by coordinated expression of multiple metabolic nodes in the oleaginous microalga *Phaeodactylum tricorutum*[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2017, 65(35): 7713-7720.
- [21] CHEN JW, LIU WJ, HU DX, WANG X, BALAMURUGAN S, ALIMUJIANG A, YANG WD, LIU JS, LI HY. Identification of a malonyl CoA-acyl carrier protein transacylase and its regulatory role in fatty acid biosynthesis in oleaginous microalga *Nannochloropsis oceanica*[J]. Biotechnology and Applied Biochemistry, 2017, 64(5): 620-626.
- [22] ZHANG XJ, AGRAWAL A, SAN KY. Improving fatty acid production in *Escherichia coli* through the overexpression of malonyl coA-acyl carrier protein transacylase[J]. Biotechnology Progress, 2012, 28(1): 60-65.
- [23] CHENG RB, GE YQ, YANG B, ZHONG XM, LIN XZ, HUANG Z. Cloning and functional analysis of putative malonyl-CoA:acyl-carrier protein transacylase gene from the docosahexaenoic acid-producer *Schizochytrium* sp. TIO1101[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2013, 29(6): 959-967.
- [24] 李昌珠, 李正茂. 植物脂肪酸的生物合成及其生理功能的研究进展[J]. 湖南林业科技, 2009, 36(6): 45-49.
LI CZ, LI ZM. Research progress on biosynthesis and physiological functions of plant fatty acids[J]. Hunan Forestry Science & Technology, 2009, 36(6): 45-49 (in Chinese).
- [25] 卢善发. 植物脂肪酸的生物合成与基因工程[J]. 植物学通报, 2000, 35(6): 481-491.
LU SF. Biosynthesis and gene engineering of plant fatty acids[J]. Chinese Bulletin of Botany, 2000, 35(6): 481-491 (in Chinese).