

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2016.16.010

Mistic 融合蛋白促进 ω -3 脂肪酸去饱和酶 Fat-1 在大肠埃希菌中高效表达*

赵艳¹, 柳欣欣^{2△}, 王大新¹, 李湘鸣³, 陈平², 王昊²

(1. 扬州大学临床医学院江苏省苏北人民医院医学实验研究中心, 江苏扬州 225001; 2. 扬州大学临床医学院江苏省苏北人民医院普外科, 江苏扬州 225001; 3. 扬州大学医学院, 江苏扬州 225001)

[摘要] **目的** 构建真核膜蛋白 ω -3 脂肪酸去饱和酶 Fat-1 基因在大肠埃希菌中的高效表达质粒。**方法** 利用分子克隆技术构建携带 Fat-1 基因的重组原核表达质粒 pET32a-Fat-1 和插入膜蛋白表达分子伴侣 Mistic 基因的 pET32a-Mistic-Fat-1; 将两种重组质粒转化大肠埃希菌株 BL21(DE3), IPTG 诱导表达 Fat-1 蛋白和 M110-Fat-1 蛋白, 通过十二烷基-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 灰度分析其表达量, 蛋白免疫印迹法 (Western blot) 进一步鉴定蛋白表达。**结果** 经酶切鉴定和测序证实成功构建了 pET32a-Fat-1 和 pET32a-Mistic-Fat-1 原核表达载体; SDS-PAGE 和 Western blot 证实 ω -3 脂肪酸去饱和酶 Fat-1 在原核表达系统中没有明显诱导表达, 而 M110-Fat-1 融合蛋白在大肠埃希菌中获得了高效表达, 占全细胞蛋白总量的 15%。**结论** ω -3 脂肪酸去饱和酶 Fat-1 基因与 Mistic 基因融合表达, 实现了在原核宿主中高效表达真核膜整合蛋白 ω -3 脂肪酸去饱和酶 Fat-1。

[关键词] Mistic; ω -3 脂肪酸去饱和酶 Fat-1 基因; 膜蛋白; 高效表达

[中图分类号] R34 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2016)16-2190-04

Fusion to Mistic improved fatty acid desaturase Fat-1 overexpression in *E. coli**

Zhao Yan¹, Liu Xinxin^{2△}, Wang Daxin¹, Li Xiangming³, Chen Ping², Wang Hao²

(1. Medical Research Center, Northern Jiangsu People's Hospital Clinical College of Yangzhou University, Yangzhou, Jiangsu 225001, China; 2. Department of General Surgery, Northern Jiangsu People's Hospital Clinical College of Yangzhou University, Yangzhou, Jiangsu 225001, China; 3. Medical College, Yangzhou University, Yangzhou, Jiangsu 225001, China)

[Abstract] **Objective** To construct a highly efficient expression plasmid of eukaryotic nuclear membrane protein Omega 3 fatty acid desaturase gene Fat-1 in *E. coli*. **Methods** Using molecular cloning technology to construct the recombinant prokaryotic expression plasmid pET32a Fat-1 and pET32a-Mistic-Fat-1 fused with Membrane proteins expression chaperon mistic; the two recombinant plasmids were transformed into *E. coli* strain BL21 (DE3), the expression of Fat-1 protein and M110 Fat-1 protein induced by IPTG were identified by SDS-PAGE and gray degree analysed the amount of expression, further identified by Western blot. **Results** The results of enzyme digestion and sequencing demonstrated that we successfully constructed the prokaryotic expression vectors pET32a Fat-1 and pET32a-Mistic-Fat-1; SDS-PAGE and Western blot showed that Fat-1 fatty acid desaturase wasn't significantly induced, but the overexpression of M110 Fat-1 fusion protein was obtained in *E. coli*, accounting for 15% of the total amount of whole cell proteins. **Conclusion** The fusion with Mistic proteins to express the Fat-1 gene has realized the overexpression of eukaryotic nuclear membrane integrated protein Omega 3 fatty acid desaturase in prokaryotic host.

[Key words] Mistic; ω -3 fatty acid desaturase Fat-1; membrane protein; overexpression

ω -3 多不饱和脂肪酸 (ω -3 PUFA) 有提供能量、降脂、抗炎、防癌及抑制肿瘤等有益作用, 而 ω -6 多不饱和脂肪酸 (ω -6 PUFA) 在很多方面则具有相反的不利影响, 如促炎、促肿瘤增殖等有害作用, 补充 ω -3 PUFA 并减少 ω -6 PUFA 的摄入已成为广泛共识。 ω -3 脂肪酸去饱和酶是 ω -6 PUFA 转化为 ω -3 PUFA 的关键酶, 来自于线虫的脂肪酸去饱和酶 fat-1 基因, 可以在 18~20 碳的不饱和脂肪酸的烃链中添加一个双键, 将 ω -6 脂肪酸变为 ω -3 脂肪酸^[1-2]。而哺乳动物体内缺乏这种酶, 不能自然通过 ω -6 脂肪酸来产生 ω -3 脂肪酸, 必须依靠饮食补充来源。随着对脂肪酸代谢在基因水平的不断深入认识和研究, 通过基因工程及转基因技术获取大量 ω -3 PUFA 以满足人们的需求已成为研究的热点。

本研究拟用分子生物学技术构建原核表达载体, 使 Fat-1 基因在大肠埃希菌中高效表达。由于 ω -3 脂肪酸去饱和酶是

一种真核跨膜蛋白, 在原核系统表达外源性膜蛋白有其不兼容性, 有文献报道其在原核系统中表达效率低^[3]。本研究经过文献检索, 尝试引入 Mistic 基因 (NCBI 序列号: NC_000964.3) 作为分子伴侣, Mistic 基因最初在枯草芽孢杆菌中发现, 是一种细菌膜结合蛋白, 编码的蛋白是 M110 由 110 个氨基酸组成, 它可以提高真核细胞膜蛋白在细菌细胞膜上的表达^[4-6]。本研究设计将 ω -3 脂肪酸去饱和酶 Fat-1 基因与 Mistic 基因融合表达, 大大提高了 ω -3 脂肪酸去饱和酶表达效率, 为进一步开展 ω -3 脂肪酸去饱和酶的体外酶学研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料 原核表达载体 pET32a、菌株大肠埃希菌 DH5 α 、大肠埃希菌 BL21(DE3) 均由本室保存; Fat-1 基因质粒由上海交通大学吴际教授馈赠。Mistic 基因由金唯智生物技术有限公司合成; Hind III 和 Ecor I 购自 Fermentas 公司; T4 连接

酶购自本 TaKaRa 公司;DNA marker、Phanta[®] Super-Fidelity DNA 聚合酶、ClonExpress[®] MultiS One Step Cloning Kit 购自南京诺唯赞生物科技有限公司;蛋白 Maker 及蛋白电泳试剂购自碧云天生物技术公司;质粒抽提试剂盒、DNA 胶回收试剂盒和 PCR 纯化试剂盒购自 Axygen 公司;酵母粉和胰蛋白胨购自英国 Oxoid 公司;PCR 引物合成及测序由华大基因公司完成;其他均为国产分析纯生化试剂。

1.2 方法

1.2.1 pET32a-Fat-1 表达质粒的构建 以测序正确的 Fat-1 质粒为模板,根据已测得的全长序列设计引物,进行 PCR 扩增。上游引物为:5'-CGG AAT TCA TGG TCG CTC ATT CCA GCG AAG -3',其中导入 Ecor I 酶切位点;下游引物序列为:5'-CCC AAG CTT TCA CTT GGC CTT TGC CTT CTC -3',其中导入 HindIII 酶切位点。PCR 产物经 1% 的琼脂糖凝胶电泳回收,Ecor I 和 HindIII 酶切 pET32a 载体和 PCR 产物,T4 连接酶连接,转化 DH5 α 感受态细胞。挑取单个克隆于 5ml LB(Amp+) 培养液中培养过夜,提取重组质粒,Ecor I / HindIII 酶切鉴定,阳性克隆提交华大基因公司进行测序分析,见表 1。

1.2.2 pET32a-Mistic-Fat-1 表达质粒的构建 以测序正确的 pUC57-Mistic 质粒为模板,根据 Mistic 的 5' 序列和载体 pET32a 上的酶切位点 Ecor I 及上游序列设计 P1,根据 Mistic 的 3' 端序列和 Fat-1 的 5' 端序列设计引物 P2,PCR 扩增得到全长 Mistic 基因;以测序正确的 Fat-1 质粒为模板,根据 Fat-1 基因 5' 端序列设计上游引物 P3,根据 Fat-13' 端序列和载体上的 HindIII 酶切位点及下游序列设计下游引物 P4,PCR 扩增得到全长 Fat-1 基因。Ecor I 和 HindIII 酶切 pET32a 载体,将载体和两种 PCR 产物按比例混合,由重组酶 Exnase[®] MultiS 催化重组反应,产物转化 DH5 α 感受态细胞。挑取单个克隆于 5 mL LB(Amp+) 培养液中培养过夜,提取重组质粒,Ecor I / HindIII 酶切鉴定,阳性克隆提交华大基因公司进行测序分析。

表 1 本研究中所用的引物

引物序列	酶切位点
P1:5'-GCT GAT ATC GGA TCC GAA TTC ATG TTT TGT ACA TTT TTT G-3'	EcorI
P2:5'-CTT CGC TGG AAT GAG CGA CCA TTT CTT TTT CTC CTT CTT C-3'	
P3:5'-ATG GTC GCT CAT TCC AGC GAA G-3'	
P4:5'-CTC GAG TGC GGC CGC AAG CTT TCA CTT GGC CTT TGC CTT CT-3'	HindIII

1.2.3 菌体中表达产物的诱导表达及 SDS-PAGE 鉴定 将经鉴定的原核重组表达质粒转化宿主菌 BL21(DE3),涂布于含有相应抗生素的 LB 琼脂培养板上,37 °C 培养 10~16 h。挑选单个菌落接种到含抗生素的 5 mL LB 管中,与 37 °C 剧烈摇动培养 8~12 h。取上述培养物按 1:100 的比例接种到含抗生素的 5 mL 新鲜 LB 管中,37 °C 剧烈摇动培养 4 h,使菌液光密度(OD)₅₅₀ 达到 0.6~0.8 时,在转接管中加入终浓度为 0.1、0.3、0.5、0.8 和 1.0 mmol/L IPTG,30 °C 剧烈摇动,继续培养 4 h,对照管为未诱导的对照菌。分别用 1.5 mL 离心管收集培养液各约 1 mL,12 000 r/min,离心 1 min,收集菌体。菌体沉淀以 100 μ L 磷酸盐缓冲液(PBS)重悬浮混匀,取 10 μ L 加 5 \times SDS-PAGE 上样 buffer,于 100 °C 煮沸 10 min,进行 SDS-PAGE。0.25% 考马斯亮蓝 R250 染液染胶 2 h,脱色液(30%

甲醇,10% 乙酸)脱色至蛋白带清晰可见时,分析蛋白质诱导表达结果。同样方法改变诱导温度和时间,分析蛋白诱导表达情况。

1.2.4 蛋白免疫印迹法(Western blot)鉴定融合蛋白 对含 pET32a-Fat-1 和 pET32a-Mistic-Fat-1 重组质粒的 BL21(DE3)工程菌 IPTG 0.3 mmol/L 诱导 6 h 后的表达产物进行 Western blot 分析,以未诱导菌表达产物为对照。加入小鼠抗 His-tag 单克隆抗体(1:1 000)孵育过夜,TBS-T 充分洗涤,加入辣根过氧化物酶标记的山羊抗小鼠 IgG 作二抗(1:1 000),孵育 1 h,TBS-T 充分洗涤,ECL 显影。

2 结果

2.1 Fat-1 基因的生物信息学分析 Fat-1 基因最早发现源于线虫,编码 ω -3 脂肪酸去饱和酶。Fat-1 基因 cDNA 全长 1 209 bp,翻译产物是由 402 个氨基酸组成,相对分子质量约为 46.4×10^3 。对蛋白质序列进行跨膜区预测(<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM>)表明 ω -3 脂肪酸去饱和酶是 1 种有 3 个跨膜结构的膜蛋白,N 末端可能位于胞外,C 末端位于胞内。见图 1。

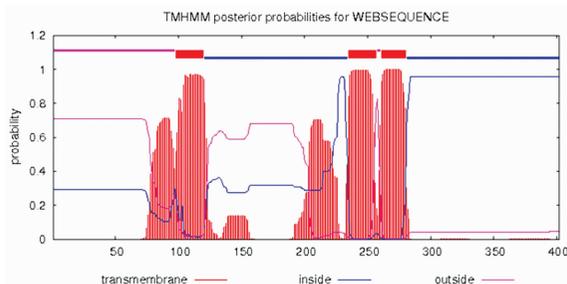
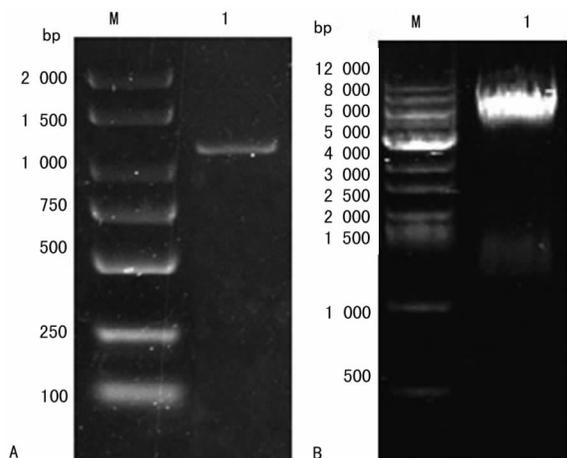


图 1 Fat-1 蛋白跨膜区预测

2.2 pET32a-Fat-1 原核表达质粒的鉴定 PCR 扩增获得大小为 1 206 bp 的片段,将该片段连入表达载体,构建 pET32a-Fat-1 重组质粒,经 Ecor I 和 HindIII 双酶切阳性克隆获得与理论值相符的目的条带(图 2)。测序结果表明,Fat-1 cDNA 序列为密码子优化的 Fat-1 基因,翻译的氨基酸序列与公布序列完全一致。

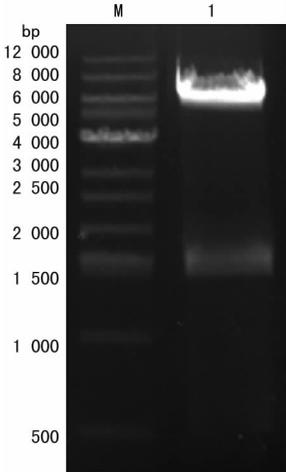


A: M 为 Marker,1 为 Fat-1 基因 PCR 产物;B: M 为 Marker,1 为 pET32a-Fat-1 质粒 Ecor I 和 HindIII 双酶切产物。

图 2 pET32a-Fat-1 重组质粒构建电泳

2.3 pET32a-Mistic-Fat-1 原核表达质粒的鉴定 PCR 扩增获得大小为 1 206 bp 的 Fat-1 片段和 330 bp 的 Mistic 片段,将两个片段无缝拼接重组连入表达载体。构建的 pET32a-Mistic-Fat-1 重组质粒,经 Ecor I / HindIII 双酶切阳性克隆获得 2

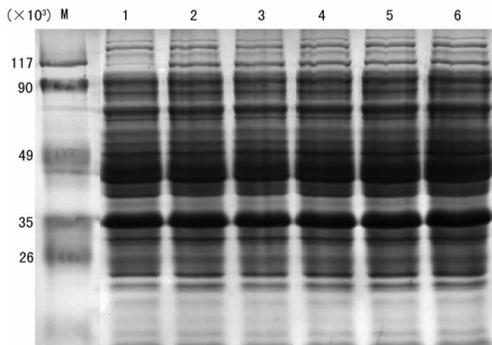
条与理论值相符的 1 536 bp 的目的片段和载体片段(图 3)。DNA 测序证明插入序列是目的序列,且与融合表达载体的读码框相符。



M:Marker;1:pET32a-Mistic-Fat-1 质粒 Ecor I 和 Hind III 双酶切产物。

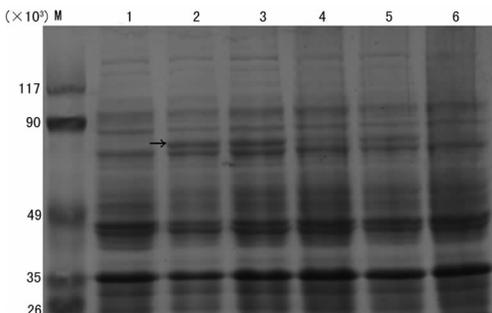
图 3 pET32a-Mistic-Fat-1 重组质粒酶切鉴定图

2.4 重组蛋白 Fat-1 在大肠埃希菌 BL21 中的诱导表达 转化 pET32a-Fat-1 重组质粒的 BL21 不同浓度 IPTG 诱导后, SDS-PAGE 结果显示,预期在相对分子质量约 64×10^3 的位置上出现诱导的蛋白条带,但是与对照组相比并没有明显增亮的条带,见图 4。



M:蛋白 Marker 条带及相对分子质量;1~6:未诱导组与不同浓度 IPTG 诱导组(0.1、0.3、0.5、0.8、1.0 mmol/L)的全细胞。

图 4 Fat-1 蛋白诱导表达 10%SDS-PAGE

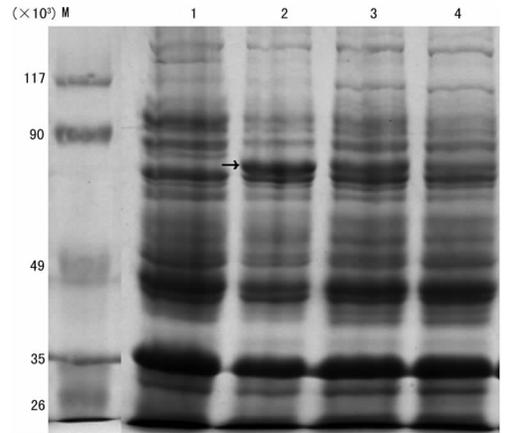


M:蛋白 Marker 条带及相对分子质量;1~6:未诱导组与不同浓度 IPTG 诱导组(0.1、0.3、0.5、0.8、1.0 mmol/L)的全细胞。

图 5 M110-Fat-1 蛋白诱导表达 8%SDS-PAGE

2.5 重组蛋白 M110-Fat-1 在大肠埃希菌 BL21 中的诱导表达 转化 pET32a-Mistic-Fat-1 重组质粒的 BL21 在不同浓度 IPTG 诱导后,SDS-PAGE 结果显示,与未诱导的对照组相比,

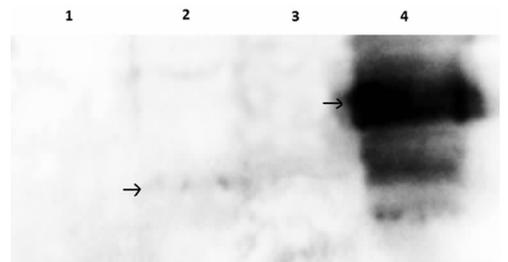
在相对分子质量约为 78×10^3 的位置上出现一条较浓集带(图 5),说明插入的融合基因已经在大肠埃希菌中表达。重组蛋白在 30°C 、0.3 mmol/L IPTG 诱导 6 h 后表达量较高,灰度扫描分析占全细胞总蛋白的 15%,见图 6。



M:蛋白 Marker 条带及相对分子质量;1:未诱导组全细胞;2:0.3 mmol/L IPTG, 30°C 诱导 6 h 全细胞;3:0.3 mmol/L IPTG, 25°C 诱导 16 h 全细胞;4:0.3 mmol/L IPTG, 20°C 诱导 20 h 全细胞。

图 6 M110-Fat-1 蛋白诱导表达 8%SDS-PAGE

2.6 Western blot 检测 用抗 His-tag 单克隆抗体对 Fat-1 和 Mistic-Fat-1 融合蛋白进行 Western blot 检测。抗 His-tag 的抗体可以检测到相对分子质量约为 78×10^3 的 Mistic-Fat-1 融合蛋白高效表达条带,而 Fat-1 融合蛋白在相对分子质量约 64×10^3 的位置上出现了较弱的诱导蛋白条带,见图 7。



1,2:未诱导与诱导的含 pET32a-Fat-1 和重组质粒的表达产物;3,4:未诱导与诱导的含 pET32a-Mistic-Fat-1 重组质粒的表达产物。

图 7 Western blot 检测

3 讨论

本文通过将 ω -3 脂肪酸去饱和酶 Fat-1 基因与 Mistic 基因融合表达,实现了在原核宿主中高效表达真核膜蛋白 ω -3 质粒脂肪酸去饱和酶。在原核系统表达外源性真核膜蛋白有其不兼容性,在真核系统表达有利于其活性的发挥,但是相对昂贵,与 Mistic 蛋白融合高效表达外源性真核膜蛋白提供了一种相对简单并且廉价的方法。在大肠埃希菌中单独表达 Fat-1 基因时其产量很低,原因可能是膜蛋白在大肠埃希菌中过度表达,暴露的疏水性靶向信号超出了信号识别颗粒,大肠埃希菌易位复合子过饱和,进一步导致膜蛋白表达被抑制^[7]。

Mistic 是一种在枯草芽孢杆菌中发现的膜整合蛋白,2005 年 Roosild 等^[8]首次报道了 Mistic 蛋白的溶解结构,并且预测它作为伴侣与目的蛋白 N-末端融合表达,可以提高外源性膜蛋白在大肠埃希菌中的表达水平。国内外有文献报道它作为伴侣分子辅助了组氨酸激酶受体、叶绿体 ATP/ADP 转运体、G 蛋白偶联受体、盐藻八氢番茄红素脱氢酶等多种真核膜蛋白分子的高效表达^[7,9-11]。有研究表明,Mistic 蛋白单独表达或

融合表达时都缺乏信号识别序列,过表达无明显组织毒性,它的合成和转运到细胞膜有可能绕过大肠埃希菌易位子复合体^[8]。Mistic 有紧凑的 4 个 α 螺旋结构,不同于其他膜蛋白,这 4 个螺旋结构并不形成疏水跨膜部分,它的表面富有极性和带电残基,有特殊的表面亲水性质,是这种表面极性而不是疏水性促使它与细胞膜结合紧密,对膜蛋白在大肠埃希菌中的表达起到强大的促进作用,并增加其溶解性^[12]。

去饱和酶均是多次跨膜的固有膜蛋白,他们的过量表达即进行相关研究的第一步,也是最大的瓶颈之一。本文利用遗传工具成熟的大肠埃希菌表达系统,结合与 Mistic 的融合表达,成功过量表达了 ω -3 脂肪酸去饱和酶,实现分子生物学意义上的过量表达。此研究结果为进一步对跨膜型脂肪酸去饱和酶的结构和功能研究奠定基础,为改造出一个高活性的 ω -3 脂肪酸去饱和酶的研究奠定基础。在原核宿主中重组高效表达 ω -3 脂肪酸去饱和酶,作用于 18~20 碳的脂肪酸底物,有效将 ω -6 脂肪酸转变为 ω -3 脂肪酸,具有重要的医学和营养学价值。

参考文献

- [1] 华晓敏,陈俏俏,潘庆杰. Fat-1 基因及其功能的研究进展[J]. 青岛农业大学学报(自然科学版),2012(1):41-47.
- [2] 杨慧婷,王洪梅,方永志,等. Fat-1 转基因动物研究进展[J]. 生物技术通报,2012(12):8-12.
- [3] 元冬娟,吴萍,熊继红,等. 蓖麻和线虫的两种不同结构脂肪酸去饱和酶的原核表达[J]. 生物技术通报,2008(S1):393-396.
- [4] Xu Y, Kong J, Kong W. Improved membrane protein expression in lactococcus lactis by fusion to mistic[J]. Microbiology,2013(159):1002-1009.
- [5] Lee KA, Lee SS, Kim SY, et al. Mistic-fused expression of algal rhodopsins in Escherichia coli and its photochemical

properties[J]. Biochim Biophys Acta, 2015, 1850(9): 1694-1703.

- [6] Gong Z, Kessans SA, Song L, et al. Recombinant expression, purification, and biophysical characterization of the transmembrane and membrane proximal domains of HIV-1 gp41[J]. Protein Sci, 2014, 23(11):1607-1618.
- [7] Kefala G, Kwiatkowski W, Esquivies L, et al. Application of mistic to improving the expression and membrane integration of histidine kinase receptors from escherichia coli[J]. J Struct Funct Genomics, 2007, 8(4):167-172.
- [8] Roosild TP, Greenwald J, Vega M, et al. NMR structure of Mistic, a membrane-integrating protein for membrane protein expression[J]. Science, 2005, 307(5713):1317-1321.
- [9] Deniaud A, Bernaudat F, Frelet-Barrand A, et al. Expression of a chloroplast ATP/ADP transporter in E. coli membranes: behind the Mistic strategy[J]. Biochim Biophys Acta, 2011, 1808(8):2059-2066.
- [10] Marino J, Bordag N, Keller S, et al. Mistic's membrane association and its assistance in overexpression of a human GPCR are independent processes[J]. Protein Sci, 2015, 24(1):38-48.
- [11] 周峰,黄非,白林含. 盐藻 PDS 基因的同源克隆及在大肠杆菌中的表达[J]. 微生物学报, 2015, 55(2):149-155.
- [12] Broecker J, Fiedler S, Gimpl K, et al. Polar interactions trump hydrophobicity in stabilizing the self-inserting membrane protein Mistic[J]. J Am Chem Soc, 2014, 136(39):13761-13768.

(收稿日期:2015-11-30 修回日期:2016-02-16)

(上接第 2189 页)

- [6] Palmer DJ, Huang RC, Craig JM, et al. Nutritional influences on epigenetic programming: asthma, allergy, and obesity[J]. Immunol Allergy Clin North Am, 2014, 34(4):825-837.
- [7] Wang HQ, Jin JJ, Wang J. Matrine induces mitochondrial apoptosis in cisplatin-resistant non-small cell lung cancer cells via suppression of β -catenin/survivin signaling[J]. Oncol Rep, 2015, 33(5):2561-2566.
- [8] Aboulaiwi WA, Muntean BS, Ratnam S, et al. Survivin-induced abnormal ploidy contributes to cystic kidney and aneurysm formation[J]. Circulation, 2014, 129(6):660-672.
- [9] Marques I, Teixeira AL, Ferreira M, et al. Influence of survivin (BIRC5) and caspase-9 (CASP9) functional polymorphisms in renal cell carcinoma development: a study in a southern European population[J]. Mol Biol Rep,

2013, 40(8):4819-4826.

- [10] Mayer A, Debusson D, Denanglaire S, et al. Antigen presenting cell-derived IL-6 restricts Th2-cell differentiation[J]. Eur J Immunol, 2014, 44(11):3252-3262.
- [11] Kaneko Y, Masuko H, Sakamoto T, et al. Asthma phenotypes in Japanese adults-their associations with the CCL5 and ADRB2 genotypes[J]. Allergol Int, 2013, 62(1):113-121.
- [12] Wu D, Tan W, Zhang Q, et al. Effects of ozone exposure mediated by BEAS-2B cells on T cells activation: a possible link between environment and asthma[J]. Asian Pac J Allergy Immunol, 2014, 32(1):25-33.
- [13] Wells RE, Garb J, Fitzgerald J, et al. Factors associated with emergency department visits in asthma exacerbation[J]. South Med J, 2015, 108(5):276-280.

(收稿日期:2015-11-18 修回日期:2016-02-26)