

大肠杆菌 holo-ACP 的过表达、分离纯化及 长链脂酰 ACP 的合成

汪玲玲^{**}, 杨辑^{**}, 黄诚之, 王海洪^{*}

(华南农业大学生命科学学院, 广州 510642)

摘要:【目的】获得高纯度大肠杆菌 holo-ACP 和多种长链脂酰 ACP, 为研究细菌脂肪酸、类脂 A 和 N-脂酰高丝氨酸内脂等物质的合成提供底物。【方法和结果】采用 PCR 方法扩增得到大肠杆菌酰基载体蛋白基因 (*acpP*) 和 holo-ACP 合成酶基因 (*acpS*)。使用载体 pBAD24、pBAD34 和 pET28b 分别克隆了 *acpP* 和 *acpS*, 得到 pBAD-ACP、pET-ACP 和 pET-ACP-ACPS 3 个 ACP 表达质粒和一个 AcpS 表达质粒 pBAD-ACPS。分别用 3 个 ACP 表达质粒转化大肠杆菌 DH5 α 和 BL21 (DE3), 构建了 DH5 α /pBAD-ACP、BL21(DE3)/pET-ACP 和 BL21(DE3)/pET-ACP-ACPS 3 种 ACP 生产菌株。与 holo-ACP 纯化常用菌株 DK574 相比, 虽然三菌株在诱导时均能过量表达 ACP, 但是 holo-ACP 所占比例偏低。为了提高 ACP 生产菌株 holo-ACP 的产量, 用质粒 pBAD-ACPS 分别转化上述 3 种 ACP 生产菌株, 获得了 3 种携带双质粒的 ACP 生产菌株。表达结果显示携带 pBAD-ACP 和 pBAD-ACPS 双质粒的 DH5 α 菌株比 DK574 菌株能产生更多的 holo-ACP, 且纯度也得到提高 (纯度达 99%)。同时使用 UNOsphere Q 阴离子交换层析从这一菌株培养物中分离纯化到了高纯度的 holo-ACP, 并以纯化到的 holo-ACP 和多种长链脂肪酸为底物在哈氏弧菌脂酰 ACP 合成酶的催化下, 合成了多种长链脂酰 ACP。【结论】通过研究获得一株 holo-ACP 高产菌株, 并证明在大肠杆菌菌株中, 同时表达 *acpP* 基因和 *acpS* 基因, 有利于 holo-ACP 的产生。

关键词: holo-ACP; AcpS 和脂酰 ACP 合成酶

中图分类号: Q78 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2008) 07-0963-07

酰基载体蛋白 (acyl carrier protein, 简称 ACP) 是生物体脂肪酸合成酶系的重要组成成份^[1, 2]。在以哺乳动物为代表的 α -型脂肪酸合成酶系中, ACP 是脂肪酸合成酶的一个结构域^[2]; 在以细菌为代表的 β -型脂肪酸合成酶系中, ACP 是一个独立的可溶性蛋白^[1]。虽然两种类型的 ACP 存在方式不同, 但都具有连接脂酰基团, 传递中间产物的基本功能^[1, 2]。

各种细菌的 ACP 蛋白序列同源, 结构功能相似^[3, 4]。大肠杆菌 (*Escherichia coli*) ACP 是细菌中第一个被研

究的该类蛋白质^[5, 6], 由 *acpP* 基因编码^[7]。新合成的 ACP (称为 apo-ACP) 无生物活性的, 必需由 holo-ACP 合成酶 (holo-acyl carrier protein synthase, AcpS) (由 *acpS* 基因编码) 催化, 在 apo-ACP 的 36 位丝氨酸残基的羟基上通过磷脂键连接一个来自辅酶 A 的 4' 磷酸泛酰基巯基乙胺后, 方能成为活性 ACP 蛋白 (称为 holo-ACP) ^[8]。

细菌在一系列酶依次催化下, 经循环反应合成各种脂酰 ACP (acyl-acyl carrier proteins) ^[1]。在这一过

基金项目: 华南农业大学校长基金资助项目

*通讯作者。Tel: +86-20-85281389; E-mail: wanghh36@scau.edu.cn

**作者简介: 对本文有同等贡献。汪玲玲(1977-), 女, 安徽省安庆人, 博士, 讲师, 研究方向微生物学, E-mail: llwang417@scau.edu.cn; 杨辑(1984-), 男, 广东省河源人, 硕士研究生, 专业方向微生物学, E-mail: rainman@126.com

收稿日期: 2008-01-02; 修回日期: 2008-03-07

程中脂酰基团通过硫酯键始终与 holo-ACP 上 4'磷酸泛酰基巯基乙胺的巯基连接^[1]。脂酰 ACP 不仅是细菌脂肪酸或磷脂合成的前体,同时也是类脂 A、硫辛酸和 N-脂酰高丝氨酸内脂等化合物生物合成的中间产物^[9]。然而细菌体内游离的脂酰 ACP 很少^[10],很难从细菌中直接分离纯化到各种脂酰 ACP。目前脂酰 ACP 主要由细菌脂酰 ACP 合成酶 (acyl-acyl carrier protein synthetase) 催化,以脂肪酸和 holo-ACP 为底物体外合成^[11]。因此,获得高纯度的 holo-ACP 将有利于众多细菌代谢机制的研究。

提取 holo-ACP 一般使用大肠杆菌菌株 DK574^[12,13]。虽然该菌株可过量表达 ACP,但是 holo-ACP 纯度不高。为了提高 holo-ACP 的纯度,研究者采取不同的措施改进大肠杆菌 ACP 的表达,但是始终未能得到满意的结果^[14]。

本课题组采用 PCR 分别扩增了大肠杆菌野生型 *acpP* 基因和 *acpS* 基因,构建了 holo-ACP 生产菌株,使得 holo-ACP 产量和纯度均得到了提高。并且用哈氏弧菌 (*Vibrio harveyi*) 的脂酰 ACP 合成酶催化^[11],以不同链长的脂肪酸和 holo-ACP 为底物,合成了不同链长的脂酰 ACP。

1 材料与方 法

1.1 实验材料、菌株及培养条件

1.1.1 主要试剂和仪器:总 DNA 提取纯化试剂盒、质粒提取纯化试剂盒和 DNA 片段琼脂糖凝胶纯化试剂盒购自天根公司;DNA 限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、*Taq* DNA 聚合酶、*Pfu* DNA 聚合酶和 T 载体试剂盒购自 TaKaRa 公司;强阴离子交换树脂 (UNOsphere Q) 和蛋白浓度测定试剂盒购自 Bio-Rad 公司;异丙基-β-D-硫代半乳糖苷 (IPTG)、L-阿拉伯糖、β-羟基癸酸和各种抗生素购自 Sigma 公司;标准品 holo-ACP (2 μg/μL) 由美国伊利诺依大学微生物系 Cronan 教授馈赠;其它试剂为进口分装或国产分析纯。离心机为 Hermle 公司的 Z36HK 型台式高速冷冻离心机和 Eppendorf 公司的 5415D 型高速离心机,PCR 仪为 MJ 公司的 PTC-100。

1.1.2 菌株及培养条件:菌株 DK574^[13]、MG1655 (wild type)、DH5α (*lacZ*ΔM15/Δ (*lacZYA-argF*)U169 *recA1 endA1 hsdR17*) 和 BL21 (DE3) (*ompT hsdS B*[rB mB][γDE3]) 均为大肠杆菌 K-12 菌株的衍生株,其中 DK574 菌株由美国伊利诺依大学微生物系 Cronan

教授赠送,其余菌株由本课题组收存。而本研究使用的 holo-ACP 生产菌株是以 DH5α 或 BL21 (DE3) 为受体菌株,用本研究构建的质粒载体 (见下文) 化学转化获得。菌株均用 LB 丰富培养基,37 °C 恒温培养。同时,抗生素和诱导剂的工作浓度如下:氨苄青霉素,100 μg/mL;卡那霉素,30 μg/mL;氯霉素,30 μg/mL;IPTG,200 μg/mL 和 L-阿拉伯糖,2 mg/mL。

1.2 基因克隆与表达质粒构建

1.2.1 PCR 扩增:使用总 DNA 提取纯化试剂盒,抽提大肠杆菌 MG1655 菌株的总 DNA。根据大肠杆菌 *acpP* 和 *acpS* 的基因序列分别设计下列引物: *Pacp1*, 5'-GAAATTTAAGAtcATGAGCAC; *Pacp2*, 5'-GGAAAAAAGGATcCTAGTGG; *Pacps1*, 5'-CGCGTGGCccATGGCAATATTAG 和 *Pacps2*, 5'-CCATCAAT-AaaGCTTTCTTCG, 引物由上海生工公司合成 (下划线处分别代表限制性内切酶 *BspH*、*BamH*、*Nco* 和 *Hind* 的酶切位点)。用 *Pfu* DNA 聚合酶,以总 DNA 为模板,上述寡核苷酸为引物,PCR 分别扩增 *acpP* (*Pacp1* 和 *Pacp2*) 和 *acpS* (*Pacps1* 和 *Pacps2*) 两种 DNA 片段 (PCR 反应参数:94 °C 4 min;94 °C 30 s, 55 °C 45 s, 70 °C, 30 个循环;70 °C 10 min)。

1.2.2 表达质粒构建:回收上述两种 DNA 片段,经 *Taq* DNA 聚合酶催化末端加尾后,分别连接 pMD19-T 载体并转化大肠杆菌 DH5α 菌株,筛选阳性克隆,抽提质粒,测序验证 T 载体上携带的基因序列。

根据引物中设计的限制性内切酶位点,酶切回收 T-载体上携带的 *acpP* 基因,分别与载体 pBAD24 或 pET28b 连接,构建 ACP 表达质粒 pBAD-ACP 和 pET-ACP。将 T-载体上含有的 *acpS* 基因,以同样的方法分别与载体 pBAD34 或 pET28b 连接,构建 *AcpS* 表达质粒 pBAD-ACPS 和 pET-ACPS。而 ACP 表达质粒 pET-ACP-ACPS 的构建如下:先使用 *Xba* 和 *Xho* 酶切质粒 pET-ACPS,并将 *acpS* 基因连接到载体 pSU18 上,得到中间质粒 pSU-ACPS,再使用 *EcoR* 和 *Hind* 酶切 pSU-ACPS,回收 *acpS* 基因,并与载体 pET-ACP 连接,获得 ACP 表达质粒 pET-ACP-ACPS。

1.3 ACP 的表达和纯化

挑取含有 ACP 表达质粒的单菌落,接种于含有适当抗生素的 LB 液体中,37 °C 恒温振荡过夜培养。取 1% 过夜培养物接种于新鲜的 LB 液体中,37 °C 培养 4 h,加 IPTG 和 L-阿拉伯糖后,继续培养 4 h,离心收集菌体。用相当于离心前菌液体积 2% 的 MES

(50 mmol/L, pH6.1) 溶液悬浮菌体;超声波破碎菌体后,加等体积预冷的异丙酮,0 振荡混合 1 h;40000×g 离心 20 min;取上清液置于真空蒸发器中,旋转蒸发异丙酮;补充双蒸水后,再次 40000×g 离心去沉淀;将上清蛋白样品加到装有预先用 50 mL MES (50 mmol/L, pH6.1) 溶液平衡过的 10 mL 强阴离子交换树脂 UNOsphere Q 的层析柱中,用 150 mL 含有 LiCl (0.1 mol/L) 的 MES (25 mmol/L, pH6.1) 溶液梯度洗脱 ACP 蛋白,用部分收集器收集蛋白样品(每管 3.5 mL),并在 280 nm 波长下测定样品 OD 值;根据洗脱峰取样,用含 2.5 mol/L 尿素的 20% 的非变性聚丙烯酰胺凝胶分析样品的 ACP 含量;收集 ACP 样品,加 0.1% 脱氧胆酸和 1% 三氯乙酸沉淀蛋白,离心 (13000×g) 收集沉淀的 ACP,用少许 Tris-HCl (0.5 mol/L, pH8.0) 溶液溶解沉淀,并将蛋白溶液注入透析袋中,在含 1 mmol/L DTT 的 Tris-HCl (10 mmol/L, pH8.0) 1000 mL 溶液中 4 透析过夜。将得到的 ACP 样品置于 -20 °C 冰箱中保存。

1.4 holo-ACP 浓度及纯度测定

将标准品 holo-ACP 和待测样品用含 2.5 mol/L 尿素的非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳分离,使用 Bio-Rad 公司的凝胶蛋白定量分析软件 (Quantity One),测定二者的相对含量,根据标准 holo-ACP 的浓度推算待测样品 holo-ACP 的浓度。同时,使用 Bradford 方法,以牛血清白蛋白为标样测定待测样品蛋白浓度。通过计算样品 holo-ACP 占总蛋白的比率,得到 holo-ACP 的纯度。

1.5 哈氏弧菌 (*Vibrio harveyi*) 脂酰 ACP 合成酶的纯化及脂酰 ACP 的合成

哈氏弧菌脂酰 ACP 合成酶的纯化采用 Jiang 所描述的方法^[11]进行。脂酰 ACP 合成的如下:总反应体系为 50 μL,其中含有 Tris-HCl (pH8.0) 100 mmol/L; holo-ACP, 20 μM; ATP, 10 mmol/L; MgSO₄, 10 mmol/L; DTT, 5 mmol/L; 脂肪酸, 300 μmol/L (取 10 mmol/L 脂肪酸溶液 3 μL 于 0.2 mL 离心管中,添加 10 mmol/L NaOH 1 μL,将离心管置于真空蒸发器干燥);脂酰 ACP 合成酶 0.2 μg, 37 °C 保温 2 h。反应结束后,用含有 2.5 mol/L 尿素的 20% 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳分析脂酰 ACP。

2 结果和分析

2.1 *acpP* 及 *acpS* 基因的克隆及重组质粒构建

PCR 扩增大肠杆菌 MG1655 的 *acpP* 和 *acpS* 基

因片段,并克隆到 T 载体 pMD19 上(图 1),经测序证明 *acpP* 和 *acpS* 正确。根据 PCR 引物上设计的酶切位点,分别构建了 ACP 表达质粒 pBAD-ACP、pET-ACP、pET-ACP-ACPS 和 AcpS 表达质粒 pBAD-ACPS (图 1)。双酶切上述重组质粒,电泳结果显示 pBAD-ACP 和 pET-ACP (图 1-A) 携带 *acpP* 基因, pET-ACP-ACPS 和 pBAD-ACPS (图 1-B) 携带 *acpS* 基因(由于检测时未使用与质粒构建时相同的限制性内切酶,所以各基因片段间有微小差异),说明这些重组质粒构建成功。

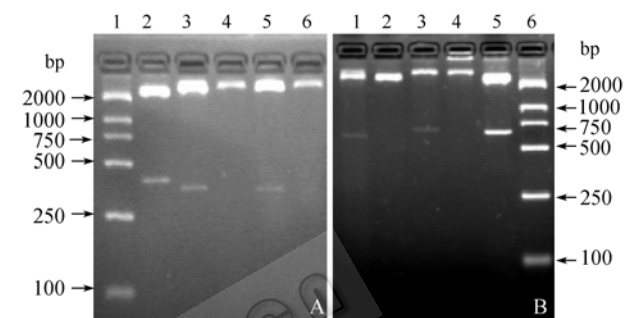


图 1 大肠杆菌 ACP 及 AcpS 表达质粒的双酶切检测

Fig. 1 Digestion of ACP and AcpS expression plasmids of *E. coli* with double restriction enzymes. A. 1. DNA marker; 2. pMD19-ACP/*EcoR*I & *Hind*III; 3. pBAD-ACP/*EcoR*I & *Hind*III; 4. pBAD24/*EcoR*I & *Hind*III; 5. pET-ACP/*Xba*I & *Bam*H I; 6. pET28b/*Xba*I & *Bam*H I. B. 1. pBAD-ACPS/*EcoR*I & *Hind*III; 2. pBAD34/*EcoR*I & *Hind*III; 3. pET-ACP-ACPS/*EcoR*I & *Hind*III; 4. pET-ACP/*EcoR*I & *Hind*III; 5. pMD19-ACPS/*EcoR*I & *Hind*III.

用 pBAD-ACP、pET-ACP 和 pET-ACP-ACPS 分别转化大肠杆菌 DH5α 或 BL21 (DE3),并在分别含有 L-阿拉伯糖和 IPTG 的 LB 平板上检测转化菌株的生长,发现菌株 DH5α/pBAD-ACP 不能生长在含有 L-阿拉伯糖的 LB 平板上,而菌株 BL21 (DE3) /pET-ACP 和 BL21 (DE3) /pET-ACP-ACPS 不能生长在含有 IPTG 的 LB 平板上(结果未列)。这与过量表达 ACP 抑制大肠杆菌生长的结论一致^[12]。

2.2 holo-ACP 生产菌株的获得

采用非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳分析上述三菌株在诱导和非诱导条件下 ACP 蛋白的表达,结果显示在诱导条件下三菌株(图 2-A, lane 5, lane 7 和 lane 9)均能过量表达 ACP,且 ACP 总量(apo-ACP 和 holo-ACP 量的总和)均超过了菌株 DK574(图 2-A, lane 3)与 DK574 相比, DH5α/pBAD-ACP(图 2-A, lane 5)和 BL21(DE3) /pET-ACP(图 2-A, lane 7)产生的 holo-ACP 量较少,

而 BL21 (DE3) /pET-ACP-ACPS (图 2-A, lane 9) 能产生较多的 holo-ACP。

细菌细胞中新生的 ACP 蛋白是 apo-ACP, 需要在 AcpS 的催化下, 连接 4' 磷酸泛酰基巯基乙胺, 方能转变为 holo-ACP^[8]。菌株 DH5 α /pBAD-ACP 和 BL21(DE3)/pET-ACP 中仅有染色体上的单拷贝 *acpS* 基因, AcpS 活性较低, 不能将过量表达的 apo-ACP 充分转化成 holo-ACP, 故 holo-ACP 的产量较低, 表达产物以 apo-ACP 为主 (图 2-A, lane 5 和 lane 7)。而在菌株 BL21 (DE3) /pET-ACP-ACPS 中, 由于质粒 pET-ACP-ACPS 携带有 *acpS* 基因, 在细胞中表达 AcpS, AcpS 活性高, 能转化较多的 apo-ACP, 因此, holo-ACP 的产量有一定的提高 (图 2-A, lane 9)。为了提高 holo-ACP 的产量, 用重组质粒 pBAD-ACPS 分别转化含有 pBAD-ACP、pET-ACP 或 pET-ACP-ACPS 的大肠杆菌菌株, 得到 DH5 α /pBAD-ACP & pBAD-ACPS、BL21 (DE3) /pET-ACP & pBAD-ACPS 和 BL21 (DE3) /pET-ACP-ACPS & pBAD-ACPS 菌株。诱导这 3 种菌株表达, 非变性凝胶电泳分离细胞蛋白组分, 结果 (图 2-B) 显示与不携带 pBAD-ACPS 的菌株 (图 2-A) 相比, 携带 pBAD-ACPS 质粒的菌株产生的 apo-ACP 比例明显下降, 而 holo-ACP 均得到不同程度的提高, 其中菌株 DH5 α /pBAD-ACP & pBAD-ACPS (图 2-B, lane 3) 的 holo-ACP 纯度最高, 在电泳胶上几乎看不到 apo-ACP。用 Bio-Rad 公司的凝胶蛋白定量分析软件 (Quantity One) 分析各菌株 holo-ACP 占细胞可溶性蛋白的比例, 结果分别为 DK574 (图 2-B, lane 2): 2.83%; DH5 α /pBAD-ACP &

pBAD-ACPS (图 2-B, lane 3): 5.27%; BL21 (DE3) /pET-ACP & pBAD-ACPS (图 2-B, lane 4): 6.35%; BL21 (DE3) /pET-ACP-ACPS (图 2-B, lane 5): 6.07%; BL21 (DE3) /pET-ACP-ACPS & pBAD-ACPS (图 2-B, lane 6): 6.63%。与 DK574 相比, 携带 pBAD-ACPS 质粒的各菌株 holo-ACP 都有更高的产量, 其中 BL21 (DE3) /pET-ACP-ACPS & pBAD-ACPS 菌株产生的 holo-ACP 最多。表明在大肠杆菌中同时表达 *acpP* 和 *acpS* 基因有助于提高 holo-ACP 的产量和纯度。

2.3 holo-ACP 的分离纯化

大肠杆菌 ACP 是一种酸性可溶蛋白, 其等电点为 3.84^[12, 15]。根据这一特性本课题组采用强阴离子交换树脂 (UNOsphere Q), 以 LiCl 梯度洗脱方法首先纯化了 500mL BL21 (DE3) /pET-ACP-ACPS & pBAD-ACPS 菌体的 holo-ACP。依据洗脱体积绘制洗脱曲线 (图 3-A), 并收集与四个峰值对应洗脱液, 用非变性的聚丙烯酰胺凝胶电泳检测各洗脱液的 holo-ACP 的含量及纯度, 同时与预处理菌体裂解液比较。结果显示菌体经超声波裂解后上清中杂蛋白含量较高 (图 3-B lane 2), holo-ACP 仅占 6.0%; 经异丙醇沉淀后 (图 3-B, lane 3), 杂蛋白减少, holo-ACP 含量提高为 53.8%。经 LiCl 梯度洗脱, holo-ACP 的纯度进一步提高, 其中 peak1 (图 3-B, lane 4) 和 peak3 (lane 6) 检测不到蛋白; peak2 为杂蛋白 (图 3-B, lane 5), 不含 ACP; peak4 仅含有 ACP 蛋白 (图 3-B, lane 7), 其中 holo-ACP 占到 88%, 仍有 12% 的 apo-ACP。为了提高 holo-ACP 的纯度, 本课题组使用了改变洗脱体积、调整溶液离子强度和 pH 等多种措施洗脱, 但始终未能将 apo-ACP 和 holo-ACP 分开 (结果未列)。表明采用强阴离子交换树脂不能得到高纯度的 holo-ACP, 这与前人使用 DE-53 阴离子交换树脂或 Vivaspin D 型弱阴离子交换柱纯化 holo-ACP 的结果一致^[12, 13]。

本课题组采用同样方法还分别从菌株 DK574 和 DH5 α /pBAD-ACP & pBAD-ACPS 中分离纯化了 holo-ACP, 并测定了各菌株 holo-ACP 产量, 分别为 DK574: 17.58 mg/L; DH5 α /pBAD-ACP & pBAD-ACPS: 23.77 mg/L; BL21 (DE3) /pET-ACP-ACPS & pBAD-ACPS: 35.59 mg/L。同时测定各菌株产生的 holo-ACP 纯度, 分别是, DK574: 89.3%; DH5 α /pBAD-ACP & pBAD-ACPS: 99.0%; BL21 (DE3) /pET-ACP-ACPS & pBAD-ACPS: 88.5%。比较结果显示使用菌株

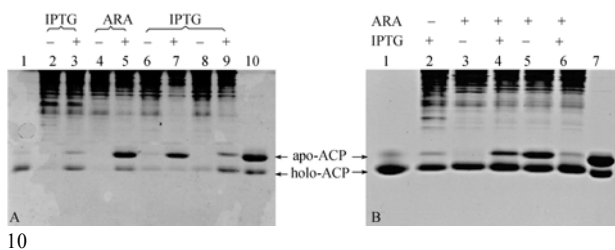


图 2 携带不同载体的大肠杆菌 ACP 的 SDS-PAGE 结果
Fig. 2 SDS-PAGE analysis of ACP of *E.coli* strains carrying different plasmids. (A) 1. Standard holo-ACP; 2 and 3. DK574; 4 and 5. DH5 α /pBAD-ACP; 6 and 7. BL21(DE3)/pET-ACP; 8 and 9. BL21 (DE3)/pET-ACP-ACPS; 10. ACP. +addition of inducer; -no addition of inducer. (B) 1. Standard holo-ACP; 2. DK574; 3. DH5 α /pBAD-ACP & pBAD-ACP; 4. BL21(DE3)/pET-ACP & pBAD-ACP; 5. BL21 (DE3)/pET-ACP-ACPS; 6. BL21(DE3)/pET-ACP-ACPS & pBAD-ACP; 7. ACP. IPTG. Isopropyl- β -D-thiogalactoside; ARA. L- arabinose; +addition of inducer; -no addition of inducer.

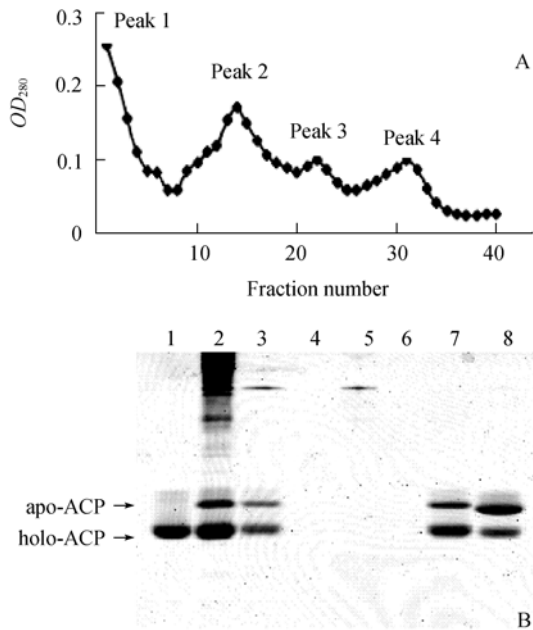


图3 UNOsphere Q 阴离子交换纯化 ACP 蛋白

Fig. 3 UNOsphere Q anion-exchange chromatography of ACP. A: Fractionation of cell extract on UNOsphere Q column with linear gradient from 0 to 1M LiCl in MES (25mM, pH6.1). B: Analysis of fractions from anion-exchange chromatography by native polyacrylamide gel electrophoresis. 1. Standard holo-ACP; 2. crude cell extract; 3. supernatant of cell extract treated with isopropanol; 4. peak 1 from chromatography column; 5. peak 2 from chromatography column; 6. peak 3 from chromatography column; 7. peak 4 from chromatography column; 8. ACP.

DH5 α /pBAD-ACP & pBAD-ACPS 可以获得高纯度的 holo-ACP, 且产量也较使用 DK574 多。这表明获得高纯度的 holo-ACP, 改造菌株是关键。

2.4 脂酰 ACP 的合成

用哈氏弧菌的脂酰 ACP 合成酶^[11]催化, 以不同链长的脂肪酸和纯化到的 holo-ACP 为底物, 体外进行了脂酰 ACP 的合成, 通过含尿素的非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳区分不同链长的脂酰 ACP。结果表明(图4), 本研究纯化到的 holo-ACP 可以作为脂酰 ACP 合成酶的底物合成不同链长的脂酰 ACP, 且各种脂酰 ACP 在凝胶上的迁移速率不同: 软脂酰 ACP

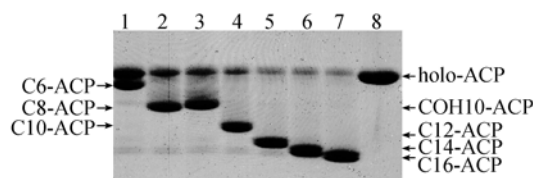


图4 脂酰 ACP 的合成后的 SDS-PAGE 分析

Fig. 4 Synthesis of acyl-ACP by Aas from *Vibrio harveyi* in vitro. 1. hexanoic acid (C6); 2. octanoic acid (C8); 3. β -OH decanoic acid (COH10); 4. decanoic acid (C10); 5. dodecanoic acid (C12); 6. tetradecanoic acid (C14); 7. palmitic acid (C16); 8. Standard holo-ACP.

迁移率最大, 之后依次为豆蔻酰 ACP、月桂酰 ACP、癸酰 ACP、辛酰 ACP、 β -羟基癸酰 ACP 和己酰 ACP。这一结果与文献报道的一致^[11]。

3 讨论

一段时期以来 holo-ACP 的提取多使用大肠杆菌菌株 DK574^[12, 13, 16]。DK574 携带两个质粒: pMR19 和 pMS421, 前者克隆有 *acpP*, 后者表达 LacI^q, 菌体中 ACP 的表达严格受 IPTG 的诱导^[12]。与直接从大肠杆菌野生菌株中纯化 ACP^[15]相比, 使用 DK574 菌株 holo-ACP 的产量和纯度均有较大的提高。但是 pMR19 上的 *acpP* 基因是人工合成的, 使用的密码子与野生型 *acpP* 基因中的不同^[14]。由于密码子偏好性, 细胞中 apo-ACP 虽有表达, 但产量并未过剩, 使得细胞中的原有 AcpS 能有足够的时间将辅酶 A 上的 4' 磷酸泛酰基巯基乙胺连接到 apo-ACP 上, 形成比例较多的 holo-ACP 蛋白。然而 DK574 携带 *panD* 突变^[12], 细胞不能正常合成辅酶 A, 只能从体外吸收辅酶 A, 而培养基中的辅酶 A 的含量有限, 故仍有部分 apo-ACP 未能转化。正是上述原因, 造成 DK574 的 holo-ACP 产量和纯度均未达到最佳水平。

为了提高 ACP 的产量和 holo-ACP 的纯度, 本课题组 PCR 扩增了大肠杆菌野生型 *acpP* 基因和 *acpS* 基因, 构建了 3 种 ACP 表达质粒。结果显示携带克隆有野生型 *acpP* 质粒的大肠杆菌 *panD*⁺ 菌株在诱导条件下可高效表达 apo-ACP 蛋白, 产生的 ACP 蛋白的总量明显高于 DK574 的, 但是 holo-ACP 的产量明显较低(图 2-A)。将克隆有 *acpS* 的质粒引入 apo-ACP 表达菌株中, 大幅度提高了菌株 holo-ACP 的产量和纯度(图 2-B)。其中菌株 DH5 α /pBAD-ACP & pBAD-ACPS 摇瓶培养可产生 23.77 mg/L 的 holo-ACP, 纯度达 99%, 产量和纯度均高于菌株 DK574 产生的(产量和纯度分别为 17.58 mg/L 和 89.3%)。分析原因我们认为主要有 3 个方面: (1) 使用野生 *acpP* 避免了在蛋白翻译中的密码子偏性, 使 apo-ACP 产量提高。(2) 同时表达 *acpS*, 增加了细胞中 AcpS 活性, 利于 4' 磷酸泛酰基巯基乙胺与 apo-ACP 的连接, 促进 apo-ACP 向 holo-ACP 的转化。(3) 使用 *panD* 野生菌株, 利于细胞合成辅酶 A, 使得辅酶 A 得到补充。诚然, 采取以上措施虽能提高菌株 ACP 蛋白的产量, 但不能保证每种菌株均产生高纯度的 holo-ACP。pBAD 系列载体使用阿拉伯糖启动子, pET 系列载体

使用 T7 启动子, 前者的启动效果比后者弱, 造成 pBAD 载体表达的 apo-ACP 和 AcpS 适中, 能实现 apo-ACP 的完全转化, 而 pET 载体表达的 apo-ACP 的量过高, 即使细胞中有大量的 AcpS 的存在, 但是由于辅酶 A 量的限制, 不能使 apo-ACP 完全转化。

使用 DE-53 阴离子交换树脂是常规大量纯化 ACP 的方法^[12], 该方法操作步骤繁琐, 费时费力。2005 年 Thomas 报道了一种使用 Vivaspin D 型弱阴离子交换柱纯化 ACP 的方法^[13], 此法操作简单易行, 但是只适合纯化小量 ACP, 且一次性使用, 纯化成本昂贵。鉴于上述问题, 结合以上方法的优点, 本课题组设计了一种使用 Bio-Rad 公司 UNOsphere Q 强阴离子交换树脂纯化 ACP 的方法。该方法操作简便, 纯化时间大大缩短。同时, 本研究也试图将 apo-ACP 和 holo-ACP 在纯化过程分离开来, 但是未获成功。这表明普通的离子交换层析很难将 apo-ACP 和 holo-ACP 分开, 要得到高纯度的 holo-ACP, 改造菌株的特性是关键。

体外合成脂酰 ACP 通常使用细菌的脂酰 ACP 合成酶。早期主要用大肠杆菌脂酰 ACP 合成酶, 2006 年 Jiang 克隆到了哈氏弧菌的脂酰 ACP 合成酶基因^[11], 并成功分离纯化了该酶。与大肠杆菌的脂酰 ACP 合成酶相比, 该酶是可溶性蛋白, 能以 C6-C18 的脂肪酸为底物^[11]。使用哈氏弧菌的脂酰 ACP 合成酶, 本课题组体外合成了不同链长的脂酰 ACP, 并用含有尿素的非变性电泳将这些脂酰 ACP 展示在聚丙烯酰胺凝胶上。这为今后研究其他含有脂肪酸链的化合物的生物合成提供了前体物质。

参 考 文 献

- [1] White SW, Zheng J, Zhang YM, *et al.* The Structural Biology of Type II Fatty Acid Biosynthesis. *Annu Rev Biochem*, 2005, 74: 791–831.
- [2] Smith S. Structural biology. Architectural options for a fatty acid synthase. *Science*, 2006, 311(5765): 1251–1252.
- [3] Rock CO, Cronan JE, Armitage IM. Molecular properties of acyl carrier protein derivatives. *J Biol Chem*, 1981, 256(6): 2669–2674.
- [4] De Lay NR, Cronan JE. In vivo functional analyses of the type II acyl carrier proteins of fatty acid biosynthesis. *J Biol Chem*, 2007, 282(28): 20319–20328.
- [5] Vagelos PR, Majerus PW, Alberts AW, *et al.* Structure and function of the acyl carrier protein. *Fed Proc*, 1966, 25(5): 1485–1494.
- [6] Sauer F, Pugh EL, Wakil SJ, *et al.* 2-Mercaptoethylamine and Beta-Alanine as Components of Acyl Carrier Protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1964, 52: 1360–1366.
- [7] Rawlings M, Cronan JE. The gene encoding Escherichia coli acyl carrier protein lies within a cluster of fatty acid biosynthetic genes. *J Biol Chem*, 1992, 267(9): 5751–5754.
- [8] Flugel RS, Hwangbo Y, Lambalot RH, *et al.* Holo-(acyl carrier protein) synthase and phosphopantetheinyl transfer in Escherichia coli. *J Biol Chem*, 2000, 275(2): 959–968.
- [9] Heath RJ, White SW, Rock CO. Lipid biosynthesis as a target for antibacterial agents. *Prog Lipid Res*, 2001, 40(6): 467–497.
- [10] Rock C O and Cronan J E. Escherichia coli as a model for the regulation of dissociable (type II) fatty acid biosynthesis. *Biochem Biophys Acta*, 1996, 1302(1): 1–16.
- [11] Jiang Y, Chan CH, Cronan JE. The soluble acyl-acyl carrier protein synthetase of Vibrio harveyi B392 is a member of the medium chain acyl-CoA synthetase family. *Biochemistry*, 2006, 45(33): 10008–10019.
- [12] Keating DH, Carey MR, Cronan JE. The unmodified (apo) form of Escherichia coli acyl carrier protein is a potent inhibitor of cell growth. *J Biol Chem*, 1995, 270(38): 22229–22235.
- [13] Thomas J, Cronan JE. The enigmatic acyl carrier protein phosphodiesterase of Escherichia coli: genetic and enzymological characterization. *J Biol Chem*, 2005, 280(41): 34675–34683.
- [14] Hill RB, MacKenzie KR, Flanagan JM, *et al.* Overexpression, purification, and characterization of Escherichia coli acyl carrier protein and two mutant proteins. *Protein Expr Purif*, 1995, 6(4): 394–400.
- [15] Rock CO, Cronan JE. Acyl carrier protein from Escherichia coli. *Methods Enzymol*, 1981, 71: 341–351.
- [16] Thomas J, Rigden DJ, Cronan JE. Acyl carrier protein phosphodiesterase (AcpH) of Escherichia coli is a non-canonical member of the HD phosphatase/phosphodiesterase family. *Biochem*, 2007, 46(1): 129–136.

Overexpression and purification of *Escherichia coli* holo-acyl carrier protein and synthesis of acyl carrier protein

Lingling Wang^{**}, Ji Yang^{**}, Chengzhi Huang, Haihong Wang^{*}

(College of Life Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract: [Objective] To investigate the mechanism of fatty acids, lipid A and *N*-acylhomoserine lactones biosynthesis of bacteria by using high quality *Escherichia coli* holo-ACP and varied length chain acyl-ACPs as substrates. **[Methods and Results]** Using PCR technique we amplified the *acpP* and *acpS* gene fragments from genomic DNA of *E. coli* strain MG1655. Ligating these gene fragments with plasmids pBAD24 or pET28b respectively, we obtained 3 expression plasmids of acyl carrier protein: pBAD-ACP, pET-ACP and pET-ACP-ACPS, and one expression plasmid of holo-acyl carrier protein synthase: pBAD-ACPS. Then we constructed 3 acyl carrier protein producer strains: DH5 α /pBAD-ACP, BL21 (DE3)/pET-ACP and BL21(DE3)/pET-ACP-ACPS by transforming *E. coli* strains DH5 α or BL21(DE3) with pBAD-ACP, pET-ACP or pET-ACP-ACPS, respectively. Although these 3 strains could produce more acyl carrier protein under induction than strain DK574, which was used to purify holo-acyl carrier protein in general, the yield of holo-acyl carrier protein of these strains was still lower. In order to increase the yield of holo-acyl carrier protein in these strains, we introduced pBAD-ACPS into these strains. The assay of expressions of new strains was shown that strain DH5 α harbored pBAD-ACP and pBAD-ACPS double plasmids produced more holo-acyl carrier protein than strain DK574, and the purity of holo-acyl carrier protein was also increased (up to 99%). Then we purified high quality holo-acyl carrier protein from the culture of the strain DH5 α harbored pBAD-ACP and pBAD-ACPS by using UNOsphere Q anion-exchange chromatography. Utilizing holo-acyl carrier protein and long chain fatty acids as substrates and under *Vibrio harveyi* acyl-acyl carrier protein synthetase catalyzing, we synthesized several different acyl-acyl carrier proteins. **[Conclusion]** From this study we obtained a high holo-ACP producer strain and demonstrated that co-expressing *acpP* with *acpS*, *E. coli* strains could produce more holo-ACP.

Keywords: holo-ACP; AcpS and acyl-ACP synthetase

Supported by the President Foundation of South China Agricultural University

*Corresponding author. Tel: +86-20-85281389; E-mail: wanghh36@scau.edu.cn

Received: 2 January 2008/ Revised: 7 March 2008

科学出版社科学出版中心生物分社新书推介(2008-05)

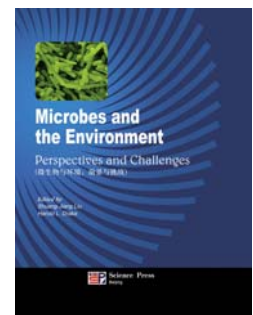
微生物与环境(英文版)

Shuang-Jiang Liu Harold L. Drake

978-7-03-021339-6 ¥98.00 2008年5月22日出版

《微生物与环境》(Microbes and the Environment)一书,是由活跃在环境微生物学领域的多名专家和学者共同撰写的一部专著,旨在反映我们人类对微生物与环境关系的科学认知。全书共21章,分为概述、不同生境中微生物介导的元素循环、生物修复和生物强化等3个部分。

本书适合从事环境微生物学研究的科技工作者作为参考,也适合研究生作为了解环境微生物学研究热点的入门参考书。



欢迎各界人士邮购科学出版社各类图书(免邮费)

邮购地址:北京东黄城根北街16号 科学出版社 科学销售中心 邮编:100717

联系人:周文宇 联系电话:010-64031535(带传真)

更多精彩图书请登陆网站 <http://www.lifescience.com.cn>, 欢迎致电索要书目