

蓝藻正反义 *pepcA* 基因导入对大肠杆菌中脂类合成的调控*

侯李君¹ 施定基^{1,2**} 蔡泽富¹ 宋东辉¹ 王学魁¹

(1 天津科技大学海洋科学与工程学院 天津 300457 2 中国科学院植物研究所光合作用研究中心 北京 100093)

摘要 为了探索原核生物中磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶(PEPC)在调控脂类代谢中的作用。PCR法扩增了鱼腥藻 *Anabaena sp.* PCC 7120 PEPC 基因中含保守结构域 Fa 的一段基因片段 *pepcA*, 并将其克隆到 pMD 18-T 载体上。将 *pepcA* 正反向连接到穿梭表达载体 pRL-489 上 *Bam*HI 位点之间, 构建得带有 *pepcA* 正反义基因的载体 pRL-Sen *pepcA* 和 pRL-Anti *pepcA*, 转化入大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DH5 α 宿主细胞中。分析结果表明: *pepcA* 片段的转入对宿主菌的生长影响不大; 与野生型细胞相比较, 转反义 *pepcA* 片段 *E. coli* 中 PEPC 酶活性降低到野生菌的 30.2%, 蛋白合成减少 23.6%, 脂类的合成增加了 46.9% ; 而转正义 *pepcA* 片段 *E. coli* PEPC 酶活性是野生菌的 2.38 倍, 蛋白合成增加了 14.5%, 脂类合成减少了 49.6% ; 转基因菌中十八碳酸的含量明显增加。上述结果可能为利用原核生物做生物柴油原料提供线索。

关键词 蓝藻 大肠杆菌 磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶(PEPC) 脂类 调控 生物柴油

中图分类号 Q789

磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶(PEPC; EC 4.1.1.31)存在于所有进行光合作用的有机体中, 包括高等植物、绿藻、蓝细菌和光合细菌。在大多数非光合细菌和原生动物中也存在这种酶, 但动物、真菌和酵母中不存在^[1,2]。在 C_4 和 CAM 植物中, PEPC 负责无机碳的初始同化^[3~5], 在 Mg^{2+} 存在下它催化磷酸烯醇式丙酮酸(PEP)和 HCO_3^- 反应生成草酰乙酸, 并且释放 P_i 。另外, PEPC 的其它几种非光合型的同工酶还参与氨基酸代谢途径中碳骨架的回补作用等^[6]。对脂类代谢而言, 抑制 PEPC 活性有助于代谢流走向脂类的合成。因此, 可以借助 PEPC 的过表达生产一些对人类有用的氨基酸, 借助其反向表达可以合成更多的油脂。

近二十年来, PEPC 作为植物光合作用的关键酶倍受关注, 绝大多数有关研究都围绕植物的光合作用, 只有少数研究是关于油料作物中脂肪酸的合成。1999 年, 陈锦清等^[7,8]通过反义 RNA 的方法抑制了 *pepc* 基

因在油菜中的表达, 得到了高产油油菜; 2005 年, 赵桂兰^[9]等用农杆菌介导法将反义 *pepc* 基因导入大豆的基因组, 获得了稳定的超高油转基因大豆品系。在原核生物中, 主要是用 *E. coli* 来研究 PEPC 的结构、功能、性质和代谢途径。关于 PEPC 表达调控的研究多是用正向调控来合成一些有用的氨基酸, 如 1993 年, Chao 等^[10]研究了 PEPC 在 *E. coli* 中的过度表达对其产量的影响; 1996 年, Millard 等^[11]研究表明 PEPC 在 *E. coli* 中的过度表达可以加强琥珀酸的合成; 而负调控一般是为了研究 PEPC 的性质、功能, 如 1985 年, Marguerite 等^[12]分析了因突变缺失 PEPC 活性的 *E. coli* 的性质; Gokarn^[13]分析了 *E. coli* 在 PEPC 活性缺失时的代谢特点。原核生物中蛋白含量较高, 如果把合成蛋白的碳架转向合成脂类, 对食品工业和能源方面都有重要的意义, 潜力较大。同时 *E. coli* 遗传操作简单, 研究比较成熟, 易于做一些初步探索。本文首次报道了在 *E. coli* 中正、反向表达 PEPC, 分析了转基因菌株的生长和蛋白、脂类及脂肪酸的组成。

收稿日期: 2008-01-16 修回日期: 2008-02-28

* 天津市科委重点攻关项目(043182711)

** 通讯作者, 电子信箱: cyano.shi@yahoo.com.cn

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 质粒、藻种和菌种 质粒 pRL-489 由美国密西根州立大学国家植物学实验室 Work C P 教授赠送。鱼腥藻 *Anabaema* sp PCC 7120 来自法国巴斯德研究所。宿主菌 *Escherichia* DH5 α 购自 TaKaRa 公司。

1.1.2 试剂 pMD-18 T 载体、*Bam*HI、*Xba*I 等各种限制性内切酶及 Taq 酶、T4DNA 连接酶、DNA Marker、各种抗生素购自 TaKaRa 公司;小牛肠碱性磷酸酶 CIAP 购自 Promega 公司;PCR 产物快速回收试剂盒、DNA 回收试剂盒为北京博大生物公司产品;NADH、苹果酸脱氢酶、磷酸烯醇式丙酮酸(PEP)等均为 BBI 公司产品;其他试剂为国产分析纯产品和进口分装产品。PCR 引物合成及基因序列测定由上海生工公司完成。

1.2 实验方法

1.2.1 蓝藻与大肠杆菌的培养 据异型胞丝状体蓝藻鱼腥藻 7120 培养在 BG-11 无氮^[14]培养基中,温度 28~30℃,于光强 120~150 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ 日光灯下,液体培养时摇床转速为 130r/min。

大肠杆菌 DH5 α 以及转基因菌株培养于 LB 培养基中,37℃过夜培养,液体培养时摇床转速为 200r/min。

1.2.2 基因的克隆与测序 GenBank 查得蓝藻鱼腥藻 7120 中 PEPC 基因的全序列,从中选择基因片段,从起始密码子 AUG 开始大约 670bp 的片段。进而设计引物:上游 P1:5'CATGGAGCATTGTGTTACGGC 3'下游 P2:3'ACGGATCCATCCAGCACAG 5'引入一个 *Bam*HI 位点 GGATCC;以蓝藻 *Anabaena* sp. PCC 7120 总基因组为模板用 PCR 法扩增片段,将该片段用 PCR 产物快速回收试剂盒,连接到 pMD18-T 载体上。(PCR、提取质粒、连接、酶切等基因重组操作参见^[15])。

1.2.3 *pepCA* 片段正反义穿梭表达载体的构建 将 *pepCA* 片段从 pMD-*pepCA* 重组质粒上用 *Bam*HI 单酶切后插入到穿梭表达载体 pRL-489 的 *Bam*HI 位点之间,位于启动子 *PbsbA* 下游,经过酶切鉴定筛选出了正反连重组质粒:pRL-Sen *pepCA* 和 pRL-Anti *pepCA*。

1.2.4 *pepCA* 酶活性检测 离心收集培养至对数生长期的 *E. coli*,用水洗涤两次,加入细胞破碎液,低温超声波破碎细胞,冷冻离心取上清即获得蛋白提取液。借助苹果酸脱氢酶的反应,监测 NADH 在 340nm 处吸光值变化,根据吸光值的减少,来进行 PEPC 的活性分析。活性检测液体积为 1ml,含有 100mmol/L Tris-HCl

pH8.5,10mmol/L MgCl_2 ,10mmol/L KHCO_3 ,4U 苹果酸脱氢酶,0.15mmol/L NADH,6mmol/L PEP,适量的蛋白提取液,反应在 20℃下进行^[16]。

1.2.5 总蛋白的提取与测定 总蛋白测定用 Lowry^[17]法。

1.2.6 总脂的提取与测定 用索氏抽提法进行总脂的提取与测定。

1.2.7 脂肪酸的提取 称取真空冷冻干燥后的菌粉于具塞试管中,加 $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}(2:1)$ 萃取,1mol/L KOH- CH_3OH 溶液,75℃,酯化 10min,1mol/L HCl- CH_3OH 溶液,使 pH<2,75℃,酸化 10min,冷却后加入正己烷,混匀,静置分层,吸出上清,置于 4℃,待上机分析。

1.2.8 脂肪酸的分析 Varian GC-MS 4000,柱子型号:VF-5ms,0.25 mm \times 0.10 μm \times 30 m;离子阱温度:220℃;传输线温度:280℃;色谱柱升温程序:初温 80℃,10℃/min 升至 280℃,保持 10min;载气为高纯氮(99.99%),流速为 1ml/min;进样方式:分流进样;分流比:100:1;进样量:1 μl ;质谱条件:电离方式:EI,电流能量 70ev,连接杆温度:280℃;离子源温度:200℃;溶剂延长时间:5min;使用选择离子法(SIM),选择离子为 m/z 260, m/z 150。

1.2.9 大肠杆菌生长曲线的测定 37℃,200r/min 培养 *E. coli* 12 h,用紫外可见分光光度计于 550nm 下,每隔两个小时检测菌体的生长情况。以培养时间和 OD₅₅₀ 的值绘制生长曲线。

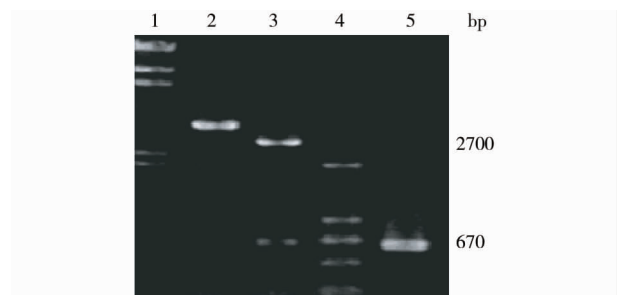


图1 重组质粒 pMD-*pepCA* 的扩增和酶切鉴定图谱

Fig. 1 PCR and restriction pattern of the recombinant plasmid pMD-*pepCA*

1: DNA Marker λ Hind III; 2: pMD-*pepCA*/*Eco*RI; 3: pMD-*pepCA*/*Eco*RI, *Xba*I; 4: DNA Marker 2000; 5: pMD-*pepCA* PCR product

2 结果

2.1 *pepCA* 片段的克隆与序列分析

以蓝藻鱼腥藻 PEPC 总基因组为模板扩增 *pepCA* 片

段,大小约为 670bp,与理论相符合。将基因克隆到 pMD18-T 载体中,单双酶切和扩增鉴定,显示得到了含有目的片段的重组质粒 pMD-pepCA(图 1)。上海生工

测序后,经 NCBI Blast 比对,发现该序列与 GenBank 中 *Anabaena* sp. PCC7120 PEPC(BA000019)序列的同源性为 100%。

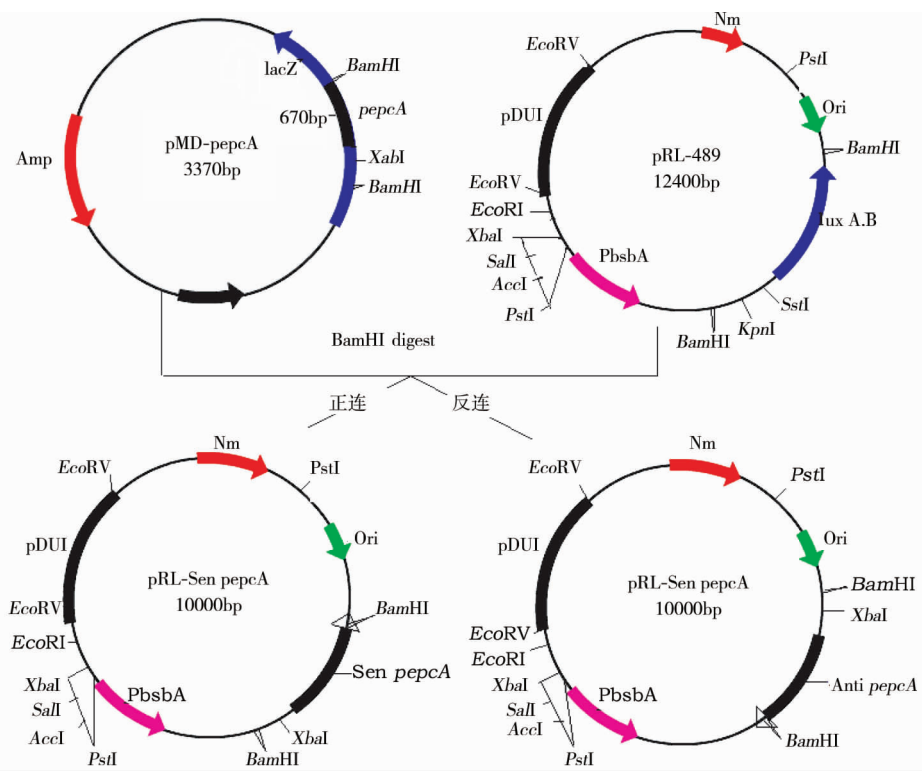


图 2 穿梭表达载体 pRL-pepCA 的构建

Fig. 2 Construction of recombinant shuttle vectors pRL-Sen pepCA and pRL-Anti pepCA

2.2 pepCA 片段正反义表达载体的构建与分子鉴定

构建穿梭表达载体 pRL-pepCA(图 2),转化入 *E. coli* DH5 α 宿主细胞中,37 $^{\circ}$ C 培养过夜,提取质粒,PCR 扩增出 670bp 的条带, BamHI 单酶切出 10000bp 和 670bp 的两条片段(图 3),与预期符合,证明了基因的插入。 BamHI 单酶切后连接会出现正反连接两种情况,质粒载体 pRL-489 上带有一个 XbaI 位点,从克隆载体上切下来的片段含有一个 XbaI 位点,用 XbaI 单酶切可以验证正反连,如果是正连,可以切得只有几十个碱基的片段,电泳图谱难以显示;若是反连,将切得含有目的片段的 750bp 的片段(图 3),经过验证获得正义基因载体 pRL-Sen pepCA 和反义基因载体 pRL-Anti pepCA。

2.3 PEPC 在宿主菌 *E. coli* 中的表达分析

首先测定了野生型 *E. coli*、转空质粒 pRL-489、转正反义 pepCA 的 *E. coli* 这四种菌 PEPC 酶活性鉴定 PEPC 的表达,进而对转基因菌的表达产物:总蛋白、总脂(表 1)及脂肪酸组成(表 3)作了分析,表 2 对表达产物作了显著性差异分析。

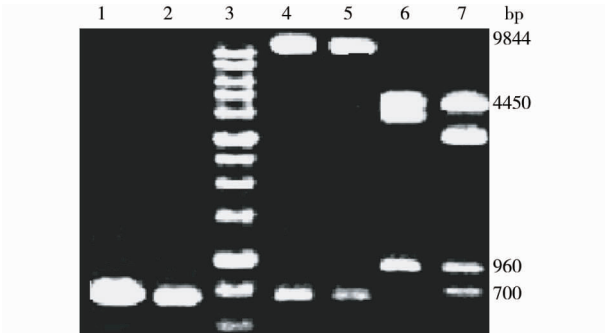


图 3 pRL-Sen pepCA、pRL-Anti pepCA 的酶切和扩增鉴定图谱

Fig. 3 PCR and restriction pattern of pRL-Sen pepCA and pRL-Anti pepCA

1,2:pRL-Sen pepCA、pRL-Anti pepCA PCR product;3:DNA 1kb Marker;4,5:pRL-Sen pepCA、pRL-Anti pepCA/BamHI; 6,7:pRL-Sen pepCA、pRL-Anti pepCA/XbaI

2.3.1 PEPC 活性分析 表 1 中看出含反义 pepCA 的菌株酶活性明显减弱,与野生菌相比降低了 69.8%,降

低非常显著;而含正义 *pepCA* 的菌株的酶活性与野生型相比增加了 2.38 倍,增加非常显著;野生菌与转空质粒菌的 PEPC 活性相差不多,无显著差异性。说明正义 *pepCA* 的插入使得宿主菌 PEPC 得到了正、反向表达。

表 1 野生菌 DH5α、转空质粒 pRL-489 和转正义 *pepCA* 菌株的总蛋白、总脂及 PEPC 酶活性

Table 1 The total proteins,total lipids and PEPC activities in wide strain,transformed strains of pRL-489,pRL-Sen pepCA、pRL-Anti pepCA of *Escherichia coli*

Strains	PEPC specific activities(U/mg) ^c	protein(g/g) ^a	lipids(g/g) ^b	Protein/lipids
DH5α	0.251 ±0.004(100%) ^d	0.245 ±0.004(100%) ^d	0.0708 ±0.0003(100%)	3.46 ±0.024
pRL-489	0.239 ±0.004(95%)	0.233 ±0.002(94.9%)	0.0747 ±0.00033(105.5%)	3.12 ±0.024
pRL-Sen pepCA	0.598 ±0.005(238%)	0.281 ±0.003(114.5%)	0.0357 ±0.0001(50.4%)	7.86 ±0.041
pRL-Anti pepCA	0.0758 ±0.0009(30.2%)	0.187 ±0.0008(76.4%)	0.104 ±0.0005(146.9%)	1.80 ±0.015

a. b. The total protein and lipid content represented in per g dry cells. c. One unit of enzyme activity was defined as the amount of enzyme resulting in the consumption of 1umol of NADH per min(umol/min). The specific activity was defined as the amount of enzyme units per microgram protein(U/mg)^[16]. d. Bracketed numbers showed the relative value compared with wild type set at 100. Each experiment independently repeated three times and the numbers calculated and represented as averages.

表 2 转基因大肠杆菌与野生对照中表达产物分析数据的显著性分析

Table 2 Significance testing of the expression product in transgenic and wide type *E. coli*

Strains	protein(g/g)	lipids(g/g)	Protein/lipids	PEPC specific activities(U/mg)
DH5α	—	—	—	—
pRL-489	P>0.05 ^a	P>0.05	P>0.05	P>0.05
pRL-Sen pepCA	P<0.005 ^b	P<0.005	P<0.005	P<0.005
pRL-Anti pepCA	P<0.005	P<0.005	P<0.005	P<0.005

a. P<0.005; Highly significant difference b. P>0.05; No significant difference

2.3.2 总蛋白含量分析(表 1) 含反义 *pepCA* 的菌株与野生菌相比,总蛋白量减少了 23.6%,非常显著地降低;而含正义 *pepCA* 的菌株与野生菌相比,总蛋白量提

高了 14.5%,非常显著地升高;转空质粒菌与野生菌的总蛋白含量相差不大,没有显著性差异。

表 3 野生菌 DH5α、转空质粒 pRL-489 和转正义 *pepCA* 菌株中脂肪酸分析

Table 3 Composition and content of the fatty acids in wide strain,transformed strains of pRL-489, pRL-Sen pepCA、pRL-Anti pepCA of *Escherichia coli*

Fatty acids	Strains				P ^b
	DH5α%(m/m) ^a	pRL-489 %(m/m)	pRL-Sen pepCA %(m/m)	pRL-Anti pepCA %(m/m)	
C12:0	1.837 ±0.006	1.955 ±0.006	1.913 ±0.007	1.965 ±0.005	>0.05
C14:0	5.229 ±0.009	5.889 ±0.008	4.804 ±0.008	5.450 ±0.007	>0.05
C15:0	1.527 ±0.005	1.075 ±0.005	0.485 ±0.001	0.439 ±0.001	<0.05
C16:0	34.57 ±0.012	36.79 ±0.015	33.34 ±0.014	34.01 ±0.012	>0.05
C16:1(cis)	1.044 ±0.004	1.405 ±0.005	1.098 ±0.004	1.072 ±0.004	>0.05
C16:1(trans)	4.654 ±0.006	—	17.02 ±0.009	15.04 ±0.009	<0.005
C17:1	20.34 ±0.012	11.57 ±0.008	5.977 ±0.007	8.996 ±0.008	<0.005
C18:0	1.572 ±0.005	0.576 ±0.002	2.480 ±0.009	1.954 ±0.007	<0.01
C18:1(cis)	0.460 ±0.003	0.786 ±0.003	2.553 ±0.008	1.859 ±0.006	<0.01
C18:1(trans)	7.642 ±0.008	14.01 ±0.005	21.71 ±0.013	19.28 ±0.011	<0.005
C19:1	8.231 ±0.009	1.921 ±0.006	0.611 ±0.003	1.265 ±0.005	<0.01

a. %(m/m)Represent the percentage of a fatty acid in total fatty acids.

b. P>0.05 ;No significant difference. P<0.05,0.1,0.005 represent significant difference strengthens gradually.

2.3.3 总脂含量测定(表1) 转反义 *pepCA* 菌株的总脂含量最高,与野生菌相比较增加了 46.9%,呈现出非常显著性提高;而转正义 *pepCA* 的菌株正好相反,它的总脂含量最少,与野生菌相比减少了 49.6%,差异非常显著;而转空质粒菌株和野生菌的总脂含量无显著性差异。

2.3.4 蛋白与脂类含量比 从表1中可以明显看出四种菌株中的蛋白与脂类含量比值有明显差别。转反义基因载体的菌株比值最小,而转正义基因载体的菌株比值最大。也说明在 *E. coli* 体内,PEPC 是控制大肠杆菌体内蛋白和脂类含量的关键的酶。

2.3.5 转基因 *E. coli* 的脂肪酸分析 气相色谱-气质联用仪检测了野生 *E. coli* 和转基因 *E. coli* 中所含脂肪酸的种类与相对含量。

从表3中的数据可以得出以下结论:四种细菌体内含的主要的脂肪酸为 C16, C17, C18。从表中可以明显看出: C16:0 在各菌株中含量最高,且在不同菌株中无显著性差异; *pepCA* 基因的导入使得转基因菌中 C16:1(trans), C18:0, C18:1(cis, trans) 与野生菌相比较都极其显著地提高;而奇数碳链脂肪酸 C15, C17, C19 在转基因菌中的含量显著地下降;其他一些低碳数酸如 C12 和 C14 在各菌株中含量相近,无显著性差异;转空质粒菌中不含有 C16:1。说明 *pepCA* 基因的插入影响到了 *E. coli* 合成脂肪酸的种类和含量。

2.4 PEPC 的表达对 *E. coli* 生长的影响

从图4中可以看出,转正义 *pepCA* 的菌株生长速率最快,超过了野生型和空质粒型,而转反义 *pepCA* 基因的菌株长得最慢。但是从总体上来说,四种菌株的生长无明显差异性($P > 0.05$)。说明 *pepCA* 基因的转入对 *E. coli* 的生长影响不大。

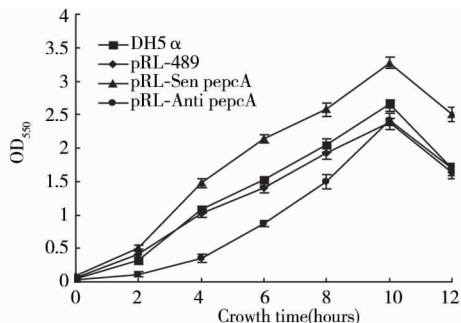


图4 野生 *E. coli* 和转基因 *E. coli* 生长曲线

Fig. 4 Growth curves of wide type and transgenic *E. coli*

3 讨论

本文在前人的基础上,在原核生物中构建了 *pepCA* 基因的正反义表达载体,通过检测转基因 *E. coli* 中 PEPC 的酶活性鉴定出:鱼腥藻 7120 *pepCA* 基因的插入影响到了 *E. coli* 中 PEPC 的表达,即当 *pepCA* 基因正向插入到 *E. coli* 中时,PEPC 表达加强,反向插入则会使 PEPC 表达减弱。我们从正反两个方向推断出转基因型 *E. coli* 表达产物的变化正是 *pepCA* 基因插入的直接结果。PEPC 表达的加强与减弱直接影响到了宿主菌的蛋白质和脂肪酸的含量:PEPC 的过表达促进了蛋白质的形成,抑制了脂类的合成;而消弱 PEPC 的表达会促进脂类的合成,减弱蛋白的合成。在转基因菌体内,蛋白和脂类含量的比例呈负相关,这一结论与本世纪 50 年代品质遗传学家报道的油菜蛋白质含量与油脂含量呈高度负相关相吻合^[18]。

针对上面的结果,我们引用 2002 年因得到高产油油菜而获得全国十大科技成就奖的陈锦清教授的“底物竞争假说”^[8]来解释反义 *pepCA* 基因的导入对表达产物影响的结果:即在生物体的新陈代谢过程中,葡萄糖酵解产物丙酮酸有两个去向:一、在 PEPC 的催化下合成草酰乙酸,进而生成天冬氨酸进入蛋白质代谢;二、在丙酮酸脱氢酶的作用下合成乙酰辅酶 A,然后在乙酰辅酶 A 羧化酶 (ACCase) 的催化下生成丙二酸单酰辅酶 A,进入脂类代谢。如果抑制了 PEPC 的表达,将会有更多的丙酮酸用于合成脂类,蛋白质的合成即会减少。这一假说是基于研究油菜反义 PEPC 基因调控脂类合成提出的,随后赵桂兰等^[9]从大豆中引用此假说用反义 RNA 的方法得到了高产油的大豆。本文从原核生物中呼应上面的假说,即当抑制 PEPC 的表达时,积累的中间底物丙酮酸会向脂类代谢的方向进行。虽然高等植物和原核生物 PEPC 氨基酸序列同源性比较低 (NCBI BLAST),但是从以上结果可以推测它们的功能,代谢途径基本上是一致的。而正义 *pepCA* 基因导入会使大肠杆菌中 PEPC 活性增大,这是因为, PEPC 催化一个有序的多步反应,在这个反应中,反应剂结合的最合适的顺序是:二价阳离子, PEP, 最后是 HCO_3^- 。 *E. coli* PEPC H177 位于疏水区,用于稳定羧化磷酸酯中间产物,并且从羧基中提取质子;而位于距 PEP 磷酸基团 3A 的距离的 R647 能够部分中和磷酸基团的负电荷^[2],这两步缺一不可。H177 是 PEPC 基因第一个保守序列 Fa 中的活性氨基酸残基,当含有保守序列 Fa 的

pepCA 基因在大肠杆菌中转录和翻译后,保守结构域(活性中心)的表达对整个 PEPC 的表达起重要作用,会使得 PEPC 的活性增加。

除了检测转基因菌的蛋白和脂类含量变化外,我们还检测了转基因型 *E. coli* 和野生菌中脂肪酸组成和含量的变化,*pepCA* 基因的插入对宿主菌合成的脂肪酸种类没有太大影响,但是从含量来看,转基因菌中 C18 含量明显增加。而 C18 是合成生物柴油最理想的脂肪酸种类^[19],这可能对于生产应用有重要的意义。

抑制基因表达的方法有很多,如干扰 RNA,反义 RNA,自杀基因,同源重组等。干扰 RNA 是近几年来研究的热点,但是在原核生物中还未发现干扰 RNA。而反义 RNA 是原核生物中天然存在的系统,因此我们选择了反义 RNA 来抑制基因表达。反义 RNA 主要从翻译水平上达到基因表达的阻断,从其作用机制看,在蛋白水平上的作用方式之一是与 mRNA 5'端编码区,主要是起始密码子 AUG 结合,抑制翻译起始,这种抑制效果是三种作用方式中效果最好的^[20]。另外 Prosite 网站查得 PEPC 含有两个保守结构域:Fa:151~162 个氨基酸和 Fb:619~631 个氨基酸,我们比对了对不同生物 PEPC 氨基酸序列和保守序列的同源性,发现虽然他们的全序列同源性不明显,但是拥有类似的保守序列(结果另文发表),说明这两个保守序列在 PEPC 基因表达中起关键作用。根据以上两个因素,我们选择的目的片段包含了 PEPC 的起始密码子和它的一段保守结构序列 Fa,片段长达 670bp,便于基因操作。从转反义基因菌株的 PEPC 活性和它的总脂含量推断,抑制效果明显。由此得出,虽然我们只选择了一小段基因序列,但是也对 PEPC 基因的表达起到了抑制作用。

本文采用 *E. coli* 为宿主菌,一方面因为 *E. coli* 遗传背景清楚,基因操作简单,培养容易且周期短,表达量高;另一方面 *E. coli* 和蓝藻遗传背景相似,本研究所用的载体是在 *E. coli* 和蓝藻中都能表达的穿梭表达载体 pRL-489,带有 *PpsbA* 启动子,这也便于我们将转基因载体直接转化入蓝藻中,可为今后在蓝藻中进一步研究作基础。依据 2003 年,中国工程科学院关于微藻生物柴油的院士会上的报告:蓝藻作为一种简单的原核光合生物,生长迅速,油脂含量较高(8%~13%),同时适应性强,便于基因操作,适合作为生物柴油的原料。

参考文献

[1] Kai Y, Matsumura H, Izui K. Phosphoenolpyruvate carboxylase:

three-dimensional structure and molecular mechanisms. Arch Biochem Biophys, 2003, 414: 170~179

[2] Izui K. Phosphoenolpyruvate carboxylase: a new era of structural biology. Annu Rev Plant Biol, 2004, 55: 67~84

[3] Chollet R, Vidal J, O'Leary M H. Phosphoenolpyruvate carboxylase: a ubiquitous, highly regulated enzyme in plants. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol, 1996, 47: 273~298

[4] Nimmo H G. The regulation of phosphoenolpyruvate carboxylase in CAM plants. Trends Plant Sci, 2000, 5: 75~80

[5] Lepoint L, Vidal J, Chollet R, et al. Phosphoenolpyruvate carboxylase: structure, regulation and evolution. Plant Sci, 1994, 99: 111~124

[6] Leegood R C, Osmond C B. The flux of metabolites in C4 and CAM plants. In: D T Dennis, D H Turpin. Plant Physiology, Biochemistry and Molecular Biology. UK: Longman Sci Tech Essex, 1990, 274~298

[7] 陈锦清, 郎春秀, 胡张华, 等. 反义 PEP 基因调控油菜籽粒蛋白/油脂含量比率的研究. 农业生物技术学报, 1999, 7(4): 316~320

Chen J Q, Lang C X, Hu Z H, et al. Journal of Agricultural Biotechnology, 1999, 7(4): 316~320

[8] 陈锦清, 黄锐之, 郎春秀, 等. 油菜 PEP 基因的克隆及 PEP 反义基因的构建. 浙江大学学报, 1999, 25(4): 365~367

Chen J Q, Huang R Z, Lang C X, et al. Journal of Zhejiang University, 1999, 25(4): 365~367

[9] 赵桂兰, 陈锦清, 尹爱萍, 等. 获得转反义 PEP 基因超高油大豆新材料. 分子植物育种, 2005, 3(6): 792~796

Zhao G L, Chen J Q, Yin A P, et al. Molecular Plant Breeding, 2005, 3(6): 792~796

[10] Chao Y P, Liao J C. Alteration of growth yield by overexpression of phosphoenolpyruvate carboxylase and phosphoenolpyruvate carboxykinase in *Escherichia coli*. Applied and Environmental Microbiology, 1993, 59(12): 4261~4265

[11] Millard C S, Chao Y P, Liao J C, et al. Enhanced production of succinic acid by overexpression of phosphoenolpyruvate carboxylase in *Escherichia coli*. Applied and Environmental Microbiology, 1996, 62(5): 1808~1810

[12] Coomes M W, Mitchell K B, Beezley A, et al. Properties of an *Escherichia coli* mutant deficient in phosphoenolpyruvate carboxylase catalytic activity. J Bacteriology, 1985, 646~652

[13] Gokarn R R, Eiteman M A, Altman E. Metabolic analysis of *Escherichia coli* in the presence and absence of the carboxylating enzymes phosphoenolpyruvate carboxylase and pyruvate carboxylase. Applied and Environmental Microbiology, 2000, 66: 1844~1850

[14] Rippka R. Isolation and purification of cyanobacteria. Methods Enzyme, 1988, 167: 3~27

- [15] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular Cloning. 3rd edition. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2002
- [16] Cánovas J L, Kornberg H L. Properties and regulation of phosphopyruvate carboxylase activity in *Escherichia coli*. Proc R Soc Lond B Biol Sci, 1966, 165(999): 189 ~ 205
- [17] Lowry O H, Rosebrough N J, Farr A L, et al. Protein measurement with the follin pheol reagent. J Biol Chem, 1951, 193: 265 ~ 275
- [18] Sugimoto T, Tanaka K, Monma M, et al. Phosphoenolpyruvate carboxylase level in soybean seed highly correlates to its contents of protein and lipid. Agri Bio Chem, 1989, 53(3): 885 ~ 887
- [19] Kevin J H. Chemical and physical properties of vegetable oil eaters and their effect on diesel fuel performance. Biomass, 1996, 9: 1
- [20] 赵利金. 反义 RNA 和 DNA. 武汉: 武汉大学出版社, 1993
- Zhao L J. Antisense RNA and DNA. Wuhan: Wuhan University Press, 1993

Regulation of Lipids Synthesis in Transgenic *Escherichia coli* by Inserting Cyanobacterial Sense and Antisense *pepcA* Gene

HOU Li-jun¹ SHI Ding-ji^{1,2} CAI Ze-fu¹ SONG Dong-hui¹ WANG Xue-kui¹

(1 School of Marine Science and Engineering, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China)

(2 Research Center of Photosynthesis, Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100093, China)

Abstract The role of phosphoenolpyruvate carboxylase of procaryote to the genetic regulation of lipids synthesis was reported. A gene fragment (*pepcA*) containing the conservative sequence (Fa) of PEPC gene from filamentous cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC 7120 was cloned and inserted between *Bam*HI sites of the shuttle expression vector pRL-489 in forward or reversely orientation. The recombinants (pRL-Sen *pepcA* and pRL-Anti *pepcA*) were transferred into the host cells *Escherichia coli* DH5 α . The results showed that the introduction of *pepcA* fragment hadn't obvious influence to the growth of transgenic *E. coli*. Compared to the wide cells, the enzyme activity of the transgenic *E. coli* of pRL-Anti *pepcA* reduced to 30.2%, the protein content of that was 23.6% lower than in wide cells, and the lipid content of that increased 46.9%. While the enzyme activity of the transgenic *E. coli* of pRL-Sen *pepcA* was 2.38 fold of wide cells, the protein content of that increased 14.5%, and the lipid content was lower 49.6% than in wide type cells; The content of C₁₈ in transgenic *E. coli* increased obviously. The above results may offer a clue to produce biodiesel with procaryote.

Key words Cyanobacteria *Escherichia coli* Phosphoenolpyruvate Carboxylase (PEPC) Lipids Regulation Biodiesel