



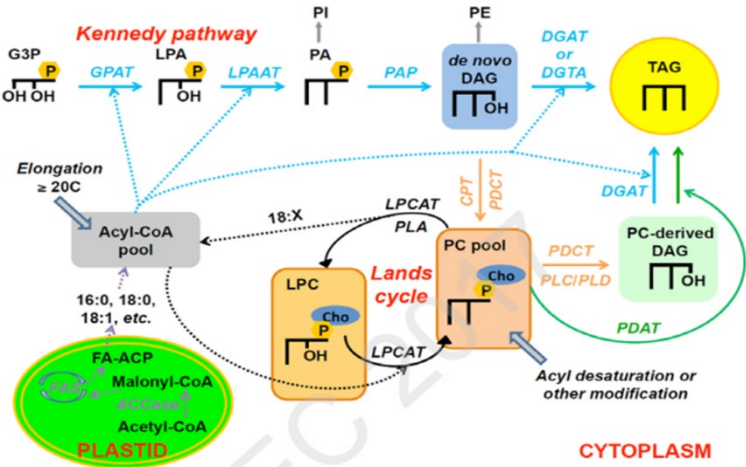
缺刻缘绿藻磷脂酶A2（PLA2）的基因特征与功能鉴定

林美枝¹, 李斯琪¹, 周志刚^{2*}

1. 上海海洋大学水产遗传资源开发利用教育部重点实验室, 上海 201306;
2. 上海海洋大学科技部海洋生物科学国际研究中心, 上海 201306

前言

磷脂酶A₂ (PLA₂) 是一种水解酶 (EC 3.1.1.4), 它特异性地水解并释放甘油磷脂sn-2位的酰基, 以释放溶血磷脂和游离脂肪酸, PLA₂参与膜的酰基修饰, 并借助Kennedy等途径将某些特殊的脂肪酸合成成为三酰甘油 (TAG)。三酰甘油(TAG)是微生物、植物、动物和微藻细胞主要的储藏性脂类, 它可以供给生物体在适宜生长条件下重建叶绿体等细胞器时所需要的各种膜脂和脂肪酸, 也是一种新型可再生能源³——生物柴油生产的重要原料。缺刻缘绿藻 (*Myrmecia incisa*) 是一种富含光合膜脂的淡水单胞藻, 通过了解TAG合成过程中关键酶——PLA₂的调控机制, 按照需求的底物和产物来合理利用PLA₂, 从而来增加生物的含油量。



结果

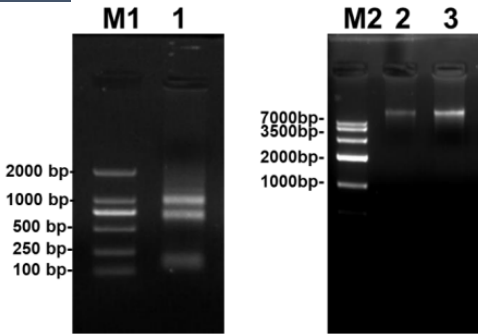


图1 缺刻缘绿藻总 RNA (左) 和基因组 DNA (右) 的琼脂糖凝胶电泳图
M1: D2000 分子量标准; M2: Marker IV 分子量标准; 泳道 1: 总 RNA; 泳道 2: 总 DNA
Fig. 1 Electrophoresis profiles of total RNA and genomic DNA in *Myrmecia incisa*
M1: DL 2000 marker; M2: Marker IV; Lane 1: RNA; Lane 2: DNA.

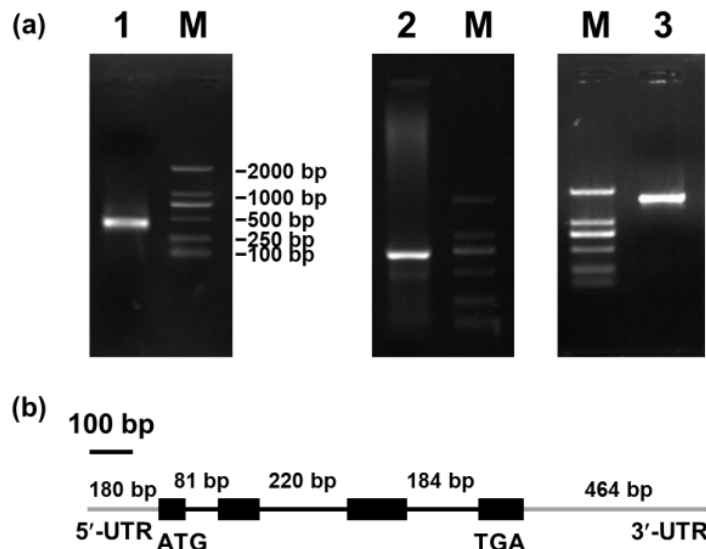


图2 缺刻缘绿藻 PLA₂ 基因的 cDNA 全长序列扩增和 DNA 全长扩增的琼脂糖凝胶电泳图
(a) M: DL-2000 分子量标准; 泳道 1: 5' RACE 的 PCR 克隆产物; 泳道 2: 3' RACE 的 PCR 克隆产物; 泳道 3: MiPLA₂ 基因的 DNA 扩增序列, 产物长度分别为 1594 bp; (b) MiPLA₂ 的基因结构示意图: 黑框表示外显子, 黑线表示内含子, 灰线为 UTR。
Fig. 2 The full-length sequences amplification of cDNA and DNA cloning products
(a) M: DL-2000 marker; Lane 1: MiPLA₂ products of 5' RACE; Lane 2: MiPLA₂ products of 3' RACE; Lanes 3: MiPLA₂ DNA cloning products; (b) Schematic gene structure of MiPLA₂: Exon and intron are shown by black boxes and black lines, and UTR is indicated by grey lines.

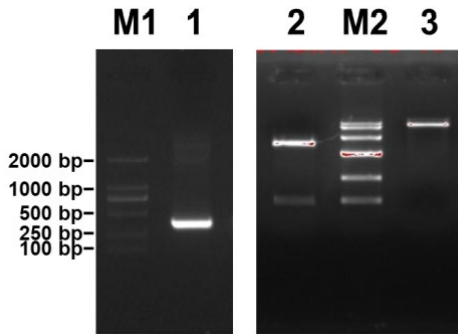


图3 原核表达载体的酶切产物电泳图
M1: D2000 标准分子量; M2: Marker IV 分子量标准; 泳道 1: 带有酶切位点的引物扩增 MiPLA₂ 基因的产物; 泳道 2: pMD19T-MiPLA₂ 双酶切; 泳道 3: pET32a 双酶切。
上海海洋大学硕士学位论文
28
Fig. 3 Enzymatic identification of prokaryotic expression vector pET32a-MiPLA₂
M1: D2000; M2: Mark IV marker; Lane 1: Products of primers with restriction sites amplification of MiPLA₂; Lane 2: Double enzyme digestion Electrophoresis patterns of pMD19T-MiPLA₂; Lane 3: Double enzyme digestion Electrophoresis patterns of PET32aparticles/μm².

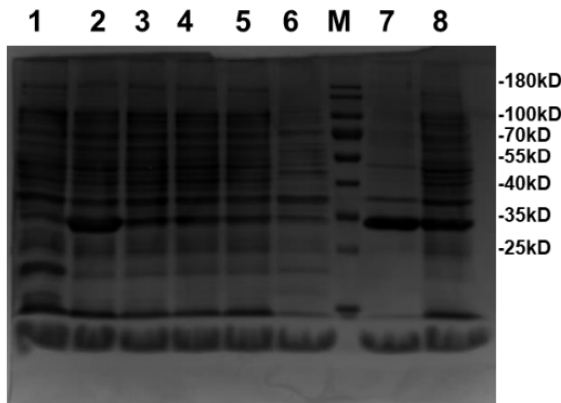


图4 重组蛋白的诱导表达
M: 预染蛋白质分子量标准; 泳道 1: 空载对照; 泳道 2-6: 分别为 IPTG 诱导表达 5 h、4 h、3 h、2 h、1 h 的粗蛋白液; 泳道 7: 沉淀; 泳道 8: 上清
Fig. 4 Expression profile of recombinant MiPLA₂ in *E. coli*
M: Prestained Protein Ladder; Lanes 1: control without insertion of MiPLA₂ gene; Lanes 2 to 6: Recombinant protein expression induced by IPTG for 5 h, 4 h, 3 h, 2 h, 1 h; Lane 7: insoluble fraction; Lane 8: soluble fraction

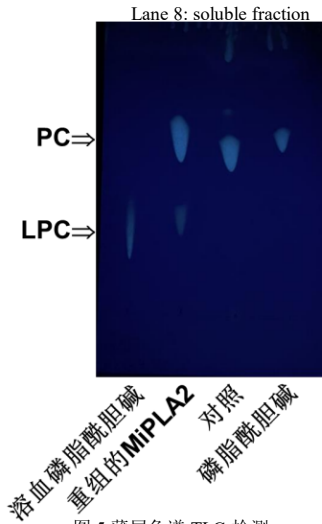


图5 薄层色谱 TLC 检测
Fig. 5 thin-layer chromatography analysis
22.5 particles/μm², the other place

结论

本研究中对高通量测序筛选获得的 contig 序列进行了 cDNA 和 DNA 的全长克隆。得到的 cDNA 总长为 1109 bp, 其中包含一个长为 438 bp 的 ORF 区、491 bp 的 5' -UTR 以及 180 bp 的 3' -UTR, 起始和终止密码子分别为 ATG 和 TGA; DNA 总长为 1594 bp, 包含有 4 个外显子, 3 个内含子。软件综合预测显示所研究基因属于 PLA₂ 家族, 因此命名为 MiPLA₂, 且该基因编码一条长为 145 个氨基酸的前体蛋白。³为了测其活性, 本研究构建了原核表达载体 pET32a-PLA₂, 并将其转化至大肠杆菌 (*Escherichia coli*) BL21 (DE3) 中通过 IPTG 诱导表达, 然后利用 Bio-Scale Mini 预装滤柱纯化表达的重组蛋白。体外酶活的薄层色谱 (TLC) 结果显示, 纯化的重组蛋白能将磷脂酰胆碱 (PC) 水解成溶血磷脂酰胆碱 (LPC), 从而鉴定了 MiPLA₂ 的基因功能。