

# 小球藻 *Chlorella variabilis* NC64A 二酰甘油酰基转移酶基因的克隆表达与功能研究

杨金水<sup>†</sup> 高全秀 李兆胜 邢冠岚 袁红莉

农业生物技术国家重点实验室, 中国农业大学生物学院, 北京 100193; <sup>†</sup> E-mail: yangjsh1999@163.com

**摘要** 为了揭示二酰甘油酰基转移酶(DGAT)在小球藻油脂合成过程中的作用, 对单细胞小球藻 *Chlorella variabilis* NC64A 的二酰甘油酰基转移酶进行原核克隆表达及功能初步研究。结果表明, 其编码序列为 894 bp, 编码 297 个氨基酸, 表达蛋白的表现分子量为 33 kDa, pI 9.48。保守结构域分析表明, 该蛋白属于 Lysophospholipid acyltransferases (LPLATs)超家族, 具有二酰甘油酰基转移酶活性, 序列位点 H68, L71, F76, R94, I97 和 GAA(144–146)组成特定的酰基受体结合口袋, 能够结合酰基-酰基载体蛋白(ACP)或者酰基辅酶 A 上的酰基, 催化三酰甘油合成的最后一步。表达蛋白与 SsPDAT 和 AtPDAT 的序列相似性分别为 32%和 24%, 表明该蛋白可能具有磷脂酰甘油酰基转移酶(PDAT)活性, 能利用磷脂上的酰基合成三酰甘油。因此, 采用薄层层析方法以 L- $\alpha$ -磷脂酰胆碱和 1,2-二油酰-sn-甘油为底物, 检测到其确实具有 PDAT 活性, 表明限氮条件下 NC64A 中 DGAT 的 PDAT 活性可能促进了膜脂降解耦合三酰甘油的合成。

**关键词** *Chlorella variabilis*; 三酰甘油; 二酰甘油酰基转移酶; 磷脂酰甘油酰基转移酶; 克隆表达  
**中图分类号** Q786

## Clone, Expression and Function Analysis of Diacylglycerol Acyltransferase Gene from *Chlorella variabilis* NC64A

YANG Jinshui<sup>†</sup>, GAO Quanxiu, LI Zhaosheng, XING Guanlan, YUAN Hongli

State Key Laboratory of Agrobiotechnology, College of Biological Sciences, China Agricultural University, Beijing 100193;  
<sup>†</sup> E-mail: yangjsh1999@163.com

**Abstract** To reveal the function of diacylglycerol acyltransferase (DGAT) on algae lipid production, DGAT from *Chlorella variabilis* NC64A was cloned and expressed by *E.coli* BL21 (DE3). The results showed that the DGAT gene was 894 bp and was coded 297aa. The apparent molecular weight of DGAT was 33 kDa and the pI was 9.48. Conserved domain analysis showed that it belonged to the Lysophospholipid acyltransferases (LPLATs) super family and the amino acids of H68, L71, F76, R94, I97 and GAA (144–146) could form special acyl acceptor binding pocket to bind acyl of ACP or CoA and served as the catalyst in the synthesis of TAG. Sequence analysis showed that DGAT shared a 32% and 24% homology with SsPDAT and AtPDAT respectively. Thin layer chromatography showed that DGAT had PDAT enzyme activity, which may promote the membrane lipid degradation and couple TAG synthesis under nitrogen starvation.

**Key words** *Chlorella variabilis*; triacylglycerol; diacylglycerol acyltransferase; phospholipids:diacylglycerol acyltransferase; clone and expression

与日益枯竭的化石燃料相比,从微藻等有机体中获取生物能源具有可持续性的优点<sup>[1]</sup>。三酰甘油(TAG)是微藻的主要能量储存形式,在限氮条件下其储量可占微藻干重的 60%<sup>[2]</sup>。真核生物中 TAG 的合成途径主要有两种:一种是酰基-辅酶 A (CoA) 依赖型途径,一种是非酰基-CoA 依赖性途径<sup>[3]</sup>。酰基-CoA 依赖型途径(即 Kennedy 途径)的最后一步是二酰甘油酰基转移酶(diacylglycerol acyltransferase, DGAT)催化酰基-CoA 中的脂肪酸转移到二酰甘油(DAG)的 sn-3 位置,生成 TAG,它是该途径唯一的限速酶<sup>[4]</sup>。Boyle 等<sup>[5]</sup>发现,限氮条件下,莱茵衣藻油脂含量的提高伴随着 DGAT2 的转录量增加,证实了 DGAT2 在微藻油脂合成中的重要作用。非酰基-CoA 依赖型途径首先在酵母和植物中发现,是在 PDAT 的作用下,将磷脂酰胆碱中的脂肪酸转移到 DAG 上<sup>[6]</sup>。但是,对于拟南芥中 PDAT 突变株及过表达植株的研究表明,PDAT 在 TAG 合成中并未起到重要的作用<sup>[7-8]</sup>,而 DGAT 催化的酰化反应是 TAG 合成的关键步骤。与植物不同,莱茵衣藻在限氮条件下,PDAT 可将膜脂上的酰基转到二酰甘油上,合成 TAG,从而增加油脂含量<sup>[9]</sup>。但是,这一现象在其他微藻中是否具有普遍性,尚不完全清楚。本研究对小球藻 NC64A 的 DGAT2a 基因进行克隆和原核表达,并进一步分析其保守结构域与活性位点。酶活检测发现,该 DGAT2a 具有 PDAT 活性,表明微藻在限氮条件下的油脂含量增加可能确实与 DGAT2a 的 PDAT 活性相关。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株及培养

*Chlorella variabilis* NC64A 由内布拉斯加大学 Van Etten 教授惠赠。将藻种接种于装有 100 mL 培养基的 300 mL 三角瓶中,恒温 25℃,140 rpm 光照摇床培养,光照强度为 50  $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ ,光暗比为 12:12,培养时间为 7 天。每升接种量约为  $10^{10}$  个细胞。培养结束后,6000 rpm 离心 10 分钟收集藻体,并冷冻干燥。使用 IM 培养基,成分为甘油 1 g,酸水解酪蛋白 1.385 g,酵母粉 0.1 g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.74 g,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0.207 g,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.013 g,  $\text{FeNaEDTA}$  0.01 g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.025 g,微量元素母液 1 mL,定容至 1 L,调节 pH 至 7.0。1 L 微量元素母液中包括  $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 18\text{H}_2\text{O}$  3.58 g,  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  12.98 g,  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  1.83 g,  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  3.2 g。

*E. coli* strain BL21 (DE3) 为本实验室保存,培养条件是 37℃,LB 培养基中 200 rpm 振荡培养过夜。抗生素筛选浓度为卡那霉素 30  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。质粒 pET30a(+)购自 Promega 公司。

### 1.2 RNA 提取及 PCR 克隆表达

将 IM 培养基中培养 7 天的 *Chlorella variabilis* NC64A 转接到无氮的相同培养基中,继续培养 2 天后,8000 rpm,2 分钟收集藻体,采用 TRIZOL Reagent 抽提总 RNA,并进行反转录。根据 NCBI 数据库中 NC64A 的 *dgat2a* 基因组序列 GL433848 设计引物 PNC64A28 (*Nde* I) GGAATT CCATATG ATGCTGCGCCTGCCCCCTCC 和 PNC 64A29 (*Xho* I) CCGCTCGAGCTCCACAAACCTCATGTCCCGC,下划线为引入的酶切位点。PCR 反应条件为:95℃ 4 分钟;95℃ 30 秒,58℃ 30 秒,72℃ 1.5 分钟,30 个循环;72℃ 10 分钟。凝胶电泳检测 PCR 结果,PCR 纯化试剂盒纯化 PCR 产物。

采用内切酶 *Nde* I 和 *Xho* I 对 PCR 纯化后的产物和表达载体 pET30a 分别进行双酶切,酶切产物纯化后使用 T4DNA 连接酶进行连接,转化 *E. coli* strain BL21 (DE3)感受态细胞,并涂布在含有 30  $\mu\text{g}/\text{mL}$  卡那霉素的 LB 平板上,最终选出阳性转化子 *E. coli* BL21(DE3)/pET30a-*dgat2a*。

### 1.3 *dgat2a* 的诱导表达

分别挑取 *E. coli* BL21(DE3)/pET30a-*dgat2a* 和空载体宿主菌 *E. coli* BL21(DE3)/pET30a(做对照)单菌落,接种于含卡那霉素的 LB 培养基中,37℃ 培养至 OD<sub>600</sub> 约为 0.6,然后加入 IPTG 至终浓度为 1 mmol/L,37℃ 诱导 4 小时,离心收集菌体,超声破碎,4℃,12000 rpm 离心 10 分钟收集沉淀。

### 1.4 包涵体蛋白溶解及复性

使用天恩泽公司的包涵体蛋白溶解及复性试剂盒,对表达蛋白包涵体进行溶解和复性。

### 1.5 蛋白浓度测定、纯化及分子量测定

使用 BCA 蛋白定量试剂盒(TakaRa)测定蛋白浓度。使用 Ni Sepharose™ 6 Fast Flow 纯化目的蛋白。采用 SDS-PAGE 法测定表观分子量。

### 1.6 DGAT2a 的序列分析及同源建模

根据 NCBI 和 JGI Genome Portal (<http://genome.jgi-psf.org/NC64A>)数据库对 DGAT2a 进行同源性和保守位点比对<sup>[10]</sup>。采用 SignalP 3.0 和 TMHMM 分析其信号肽和跨膜区域。以 SWISS-MODEL 预测 DGAT2a 的三级结构。

## 1.7 DGAT2a 的酶活性检测

采用薄层层析法检测 DGAT2a 的 PDAT 酶活<sup>[9]</sup>。

## 2 结果与讨论

### 2.1 *Chlorella variabilis* NC64A 的 RNA 提取及 PCR 扩增

由于限氮条件可以提高微藻油脂含量,因此选取限氮培养的微藻细胞进行 RNA 提取,并反转录 cDNA 作为后续基因扩增的模板。RNA 提取后,琼脂糖凝胶电泳检测结果如图 1(a)所示,可以看出,提取的 RNA 无基因组 DNA 参杂,且无明显降解现象,反转录合成 cDNA 后,以 cDNA 为模板,以 PNC64A28 和 PNC64A29 为引物 PCR 扩增 *dgat2a*,电泳检测结果见图 1(b),阴性对照无条带,扩增出 900 bp 左右的条带,测序结果为 894 bp,与目的基因片段大小相符。翻译后的氨基酸序列与已有研究的 *Mortierella ramanniana* 的 MrDGAT2A 相似度为 40%,跨度为 100%,因此我们将来源于 NC64A 的该表达蛋白命名为 CvDGAT2a。

### 2.2 *dgat2a* 的诱导表达

重组菌株 *E. coli* BL21/pET30a-*dgat2a* 经 IPTG 诱导后,分别将诱导前及诱导后的全菌进行 SDS-PAGE 电泳检测,用空载体宿主菌 *E. coli* BL21/pET30a 做对照(图 2)。从图 2 可以看出,与对照(第 1, 2 泳道)及诱导前(第 3 泳道)相比,诱导后重组菌株(第 4 泳道)在 33 kDa 左右有一条表达条带,和预测结果相符,说明 *dgat2a* 已经被诱导表达。超声波破碎上清(第 5 泳道)无表达条带,超声波沉淀(第 6 泳道)有表达条带,说明目的蛋白是以包涵体的形式存在的。

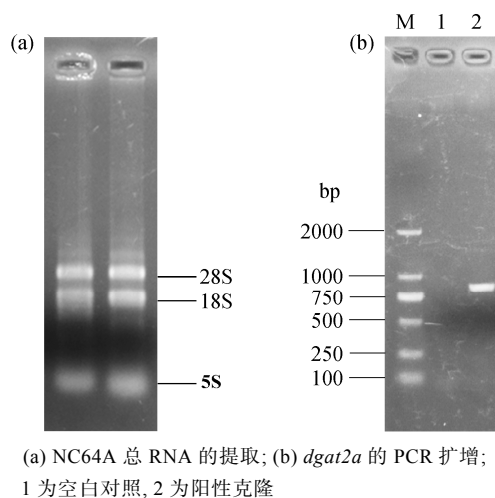
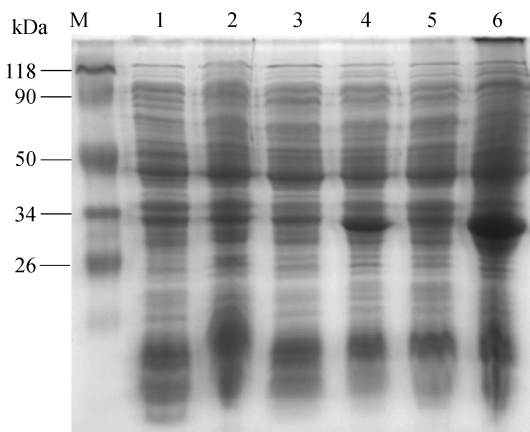


图 1 *Chlorella variabilis* NC64A *dgat2a* 的克隆  
Fig. 1 The *dgat2a* clone from *Chlorella variabilis* NC64A



1. *E. coli* BL21/pET30a 的未诱导菌体; 2. *E. coli* BL21/pET30a 的诱导菌体; 3. *E. coli* BL21/pET30a-*dgat2a* 的未诱导菌体; 4. *E. coli* BL21/pET30a-*dgat2a* 的诱导菌体; 5. *E. coli* BL21/pET30a-*dgat2a* 的超声波上清; 6. *E. coli* BL21/pET30a-*dgat2a* 的超声波沉淀

图 2 诱导表达 *dgat2a* 的 SDS-PAGE 分析

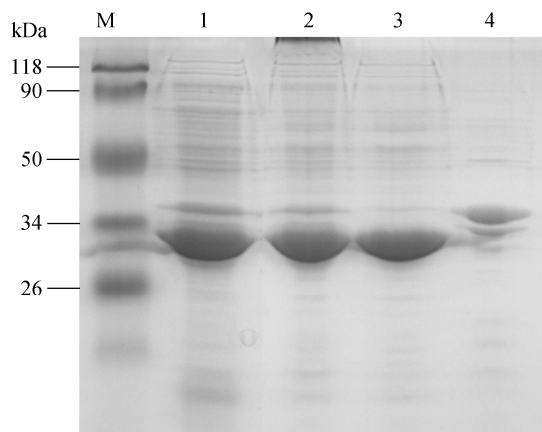
Fig. 2 SDS-PAGE analysis of induced *dgat2a* protein expression

目前,对来源于真核生物的酰基转移酶的异源表达所采用的表达体系有酵母体系和昆虫体系<sup>[9,11-12]</sup>,主要由于原核生物可能无法为真核生物来源的蛋白提供正确折叠的内环境。但相比真核表达系统,大肠杆菌原核表达系统具有简单快速、表达量高的特点,避免了酵母表达可能造成的糖基化修饰而使蛋白大小发生变化。因此,本研究中采用大肠杆菌表达体系对 *dgat2a* 进行异源表达,并进一步采用优化表达条件和包涵体复性,以快速得到具有活性的目的蛋白。

### 2.3 CvDGAT2a 的复性及纯化

将上述离心获得的包涵体进行洗涤,然后使用包涵体溶解液进行溶解,分别取洗涤前混合液、洗涤后混合液、包涵体溶解液以及包涵体未溶解部分进行 SDS-PAGE 检测,结果如图 3 所示。从图 3 中第 2 泳道和第 1 泳道比较可以看出,包涵体洗涤后杂带有所减少,目的条带亮度相差不多,说明在洗涤过程中洗去了一些可溶性的蛋白,而目的蛋白损失不多。从第 3 泳道和第 2 泳道相比可以看出,包涵体大部分已溶解。从第 5 泳道可以看出,部分杂蛋白未溶解,目的蛋白基本全部溶解。

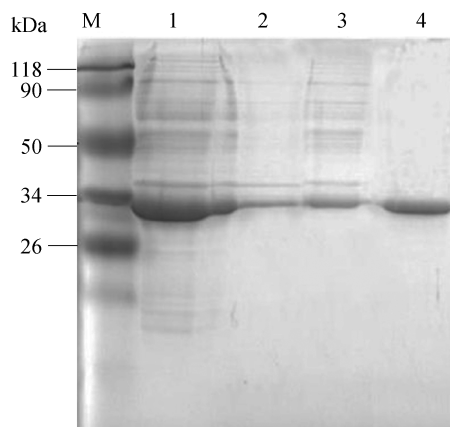
使用包涵体蛋白溶解及复性试剂盒中的复性液对得到的包涵体溶解液进行复性,复性后使用 Ni Sepharose™ 6 Fast Flow 填料对目的蛋白进行纯化。从图 4 中可以看出,250 mmol/L 咪唑的洗脱液



1. 洗涤前包涵体混合液; 2. 洗涤后包涵体混合液;  
3. 包涵体溶解液; 4. 包涵体未溶解物

图 3 包涵体洗涤和溶解

Fig. 3 SDS-PAGE of washed and dissolved inclusion bodies



1. 总复性液; 2. 穿透液; 3. 20 mmol/L 咪唑洗脱液;  
4. 250 mmol/L 咪唑洗脱液

图 4 CvDGAT2a Ni 离子柱纯化

Fig. 4 SDS-PAGE of CvDGAT2a purification  
with Ni Sepharose™ 6 Fast Flow

含有较大浓度的目的蛋白, 且其表观分子量为 33 kDa, pI 为 9.48, 这与已有报道的 MrDGAT2A 和 MrDGAT2B 相似<sup>[11]</sup>。虽然目前关于微藻 *dgat2a* 的原核表达尚未见报道, 但从图 3 可以看到包涵体初步复性率达 90% 以上。虽然其中可能还存在部分未正确折叠的蛋白, 但采用原核表达体系可提高目的蛋白的表达量和提高效率, 具有一定的可行性。

## 2.4 CvDGAT2a 的三维结构及保守结构域分析

TMHMM2.0, Signalp-HMM 和 target pv1.1 综合分析显示, CvDGAT2a 的 GRAVY 为 0.094, 推

测为疏水蛋白, 且在 N 段开头有一段由 20 个氨基酸组成的信号肽序列, 胞内定位为线粒体。

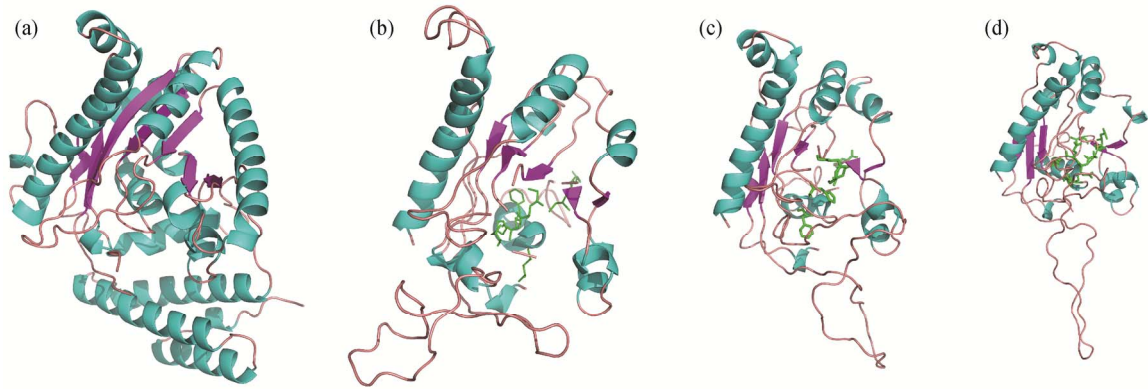
保守结构域分析表明该基因属于 Lysophospholipid acyltransferases (LPLATs) 超家族, 具有二酰甘油酰基转移酶活性。CvDGAT2a 与来源于 *Mortierella ramanniana* 的 MrDGAT2A 及来源于 *Schizosaccharomyces pombe* 的 SpDGAT2A 具有相似的三级空间结构, 其三级结构中,  $\alpha$ -螺旋占 28.5% (图 5(b)蓝色部分所示),  $\beta$ -折叠占 5.4% (图 5(b)紫红色所示), 序列位点 H68, L71, F76, R94, I97 和 GAA(144–146)组成特定的酰基受体结合口袋(图 5(b)–(d)中草绿色部分所示), 能够结合酰基 ACP 或者酰基 CoA 上的酰基, 催化三酰甘油合成的最后一步。

将 CvDGAT2a 和 LPLATs 超家族中其他蛋白质进行比对, 发现其具有酰基转移酶家族 D 和 E 基序中最保守的氨基酸(图 6 中灰点所示)。序列比对发现 CvDGAT2a 与 *Scheffersomyces stipitis* CBS 6054 的 SsPDAT 相似性为 32%, 与 *Arabidopsis thaliana* 的 AtPDAT 相似性为 24%。基于以上分析, 我们推测 CvDGAT2a 在具有 DGAT 活性的同时, 可能具有磷脂二酰甘油酰基转移酶活性。

## 2.5 CvDGAT2a 的 PDAT 酶活性测定

已有研究表明, 微藻在限氮条件下 PDAT 表达量增加, 可以促进膜脂降解合成三酰甘油<sup>[9]</sup>, 而 DGAT 表达量的增加, 主要是促进了酰基辅酶 A 依赖的途径中的 TAG 含量的增加<sup>[5]</sup>。但是, 关于 DGAT2a 是否也参与了非酰基辅酶 A 依赖的 TAG 合成途径, 尚未见报道。为了验证 CvDGAT2a 在非酰基辅酶 A 依赖的 TAG 合成途径中是否起作用, 我们对目的蛋白的 PDAT 酶活进行检测, 结果如图 7 所示。反应后, 出现较微弱的 TAG 条带, 说明目的蛋白确实具有 PDAT 活性。但是, 从图 7 也可以看出, 表达蛋白的酶活不是很高, 反应后还有大量的底物残余, 这可能是因为目的蛋白复性不彻底导致大量蛋白呈非活性折叠状态所致。

Li 等<sup>[2]</sup>报道, 莱茵衣藻在限氮培养时, *dgat2a* 转录量在 12~48 小时之间比正常条件下显著增加。本实验首次证实 CvDGAT2a 具有 PDAT 活性, 由此可推测, 限氮条件下 *dgat2a* 转录量的增加也许与其参与酰基辅酶 A 非依赖途径有关。我们推测, 小球藻 NC64A 在合成油脂的过程中, CvDGAT2a 分别通过催化酰基辅酶 A 依赖的 TAG 合成途径和酰



(a) 为用于(b)~(d)模拟三级结构的模板 liu.q.1.A; (b)~(d)为 CvDGAT2a, MrDGAT2A 和 SpDGAT 的三级结构图。草绿色代表酰基结合口袋, 蓝色代表  $\alpha$ -螺旋, 紫红色代表  $\beta$ -折叠

图 5 CvDGAT2a 三级结构比较

Fig. 5 Comparison of the predicted structure of conserved domain of CvDGAT2a, MrDGAT2A and SpDGAT respectively

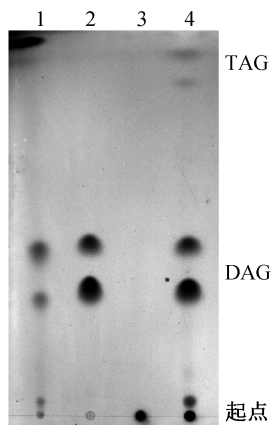
CvDGAT2A	RI VKTADLDPQRRYI FAGHPHGLLGNCYFLAFCTDVLDFRQLYPGIRLSIGVLDLNL CV S
SpDGAT	RLHKTTELDSEKNYI FGYHPHGI I SLGAFGGFASEGADF SKLFPGI NVSVLTLNSNFYVP
DdDGAT2	SLI I NSNYDPKKNYI FAYHPHGI I SI GAF CNFATNANNI DEKLPGLKVHLLTLESNFKI P
MrDGAT2B	TLI KEGDLDPKGN YI MS YHPHGI I SMAAFANFATEATGFSEQYPGI VPSLLTLASNFRLP
MrDGAT2A	HVI KEADLDP SKNYI FGYHPHGI I SMGSFCTFSTNATGFDDLFPGI RPSLLTLTSNFNIP
XtMGAT1	RLVKTCDLDPQHNYI MGFHPHGV LVAGAFGNFCTNYTGF KELFPGLTPYLHI LPFWFRCP
DrDGAT2	RLI KTHNLLPSRNYI FGYHPHGI LCFGAF CNFGTEATGFTKVFPPI KPSLATLAGNFRLP
MmDGAT2	KL VKTHDLS PKHNYI ILSHPHGI LSYGAFI NFATESTGFSRVFPSI TPFLATLEGI FWI P
HsDGATC3	KL VKTHDLS PKHNYI I ANHPHGI LSFVGF I NFATEATGI ARI FPSI TPFVGTLERI FWI P
BtDGAT2	KL VKTHDLS PRHNYI I ASHPHGVLPYGTFI NFATETTGFARI FPGI TPYVATLEGI FWI P
	: : ** : **** : : * * : : : * . : : * :
CvDGAT2A	FCREI CLLFGLCDVDRHTLLARL-RQGP GS AVFLAVGGAAESLLTQP GTMDLVLKRRKGF
SpDGAT	VYRDYLMALNI NSVSKKSCVSI L-SRKP GDSVLI VI GGAQESLLSRPGQNNLV LKRRFGF
DdDGAT2	FLRDVLMSFGMS SVSKKSCENI L-NSGAGESI CLVVGGAESLDARPLNEI TLKRRKGF
MrDGAT2B	LYRDFMMSLGMCS VSRHSCAI L-RSGPGRSI VI VTGGASESL SARPGTNDLTLKRRLGF
MrDGAT2A	LYRDYLMACGLCS VSKTSCQNI LTKGGPGRSI AI VVGGAESLNARPGVMDLV LKRRFGF
XtMGAT1	FFREYAMCVGLVSATKKS VNHVLSKENGNI SI I VI GGAEE SLDAHPGSLI LHI LKRRKGF
DrDGAT2	MFREYLMCGGI CPVNRNSI DYLLSSNGTGN AVVI VI GGAESLDCAPGRNSV MLKRRKGF
MmDGAT2	FVRDYLM SLGI CPVSKLSLTHKLTQKDS GNAVI I VPGGASESLLSRPGVSMI YLKKRQGF
HsDGATC3	I VREYVMS MGVC PVSSS ALKYL LTQKGS GNAVVI VVGGAEEALLCRPGASTLFLKQRKGF
BtDGAT2	I VREYVMS MGVC PVSEL ALKYL LTQKGS GNAVVI MVGGGAEEALLCHPGATTVLLKQRKGF
	. * : : : . : * * : ** . * : * ** : : : * *
CvDGAT2A	VRVALEAGADLVPVLA FGENEVYQRSQLVPGSLADRMQTAT- - - KQICGFTVPRGYGRG
SpDGAT	VKLAF LTGSSLVPCFAFGESDI FEQVDNNPRTRI YKFQEI V- - - KKIAGFTVPFFYGRG
DdDGAT2	IKLALVNGASLVPVYSFGENDI YDQVPNPRGSLVRKI QTKI - - - KDLTGIAPPLFMGRG
MrDGAT2B	IRLAI R NGASLVPI FSFGENDI YEQYDNKKGSLI WRYQKWF- - - QKI TGFTVPLAHARG
MrDGAT2A	IKI AVQTGASLVPTI SFGENELYEQIESNENSKLHRWQKKI - - - QHALGFTMPLFHGRG
XtMGAT1	IKVAFKQGAHLVPVFSFGENELFQQVNP KGSFLRCVQERL- - - QKI MGFAMPLFHARG
DrDGAT2	VKLALKQGAHLVPVYSFGENEVYKQLI FEEGSWRTIQRKL- - - QKFLGFAPCLFHGCG
MmDGAT2	VKLALKTGAYLVPSYSFGENETYNQETFAEGTWLRFFQKNI QKIGKRI LGI NLCTI HGRG
HsDGATC3	VKMALQTGAYLVPSYSFGENEVFNQETFP EGTWLRFLQKTFQDTFKKI LGLNFCTFHGRG
BtDGAT2	VKVALETGAYLVPSYSFGQNEVHNQETFP EGTWKRFFQKALQDTLKKLLRLSVCTFHGRG
	: : * . * : * * : * * : : : : : : : *

图 6 CvDGAT2a 与其他同源序列氨基酸比对结果

Fig. 6 Sequence alignment of derived DGAT2a polypeptide sequences

基辅酶 A 非依赖 TAG 合成途径促进油脂含量增加 (图 8)。这一方面说明 CvDGAT2a 作为酶分子的底物的非专一性; 另一方面, 进一步解释了限氮条件

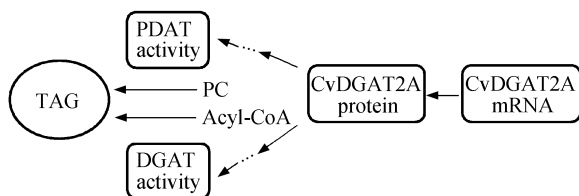
下膜脂含量的下降不仅仅只有 PDAT 的催化, DGAT2a 可能也起到一定的促进作用, 这为进一步阐明微藻油脂积累的机理奠定了基础。



1: 三酰甘油标准样品; 2: 1,2-二油酰-sn-甘油;  
3: L- $\alpha$ -磷脂酰胆碱; 4: 酶活反应底物

图 7 CvDGAT2a 的酶活检测

Fig. 7 Enzyme activity analysis of CvDGAT2a



方框表示限氮条件下上调; PC 为磷脂酰胆碱

图 8 CvDGAT2a 在 TAG 合成途径中的作用模式

Fig. 8 Model of function of DGAT2a in TAG synthesis

### 3 结论

本文首次克隆并在大肠杆菌中异源表达了小球藻 NC64A 的 DGAT 蛋白, 其表观分子量为 33 KDa, pI 为 9.48。通过序列分析发现, CvDGAT2a 具有 LPLATs 超家族的保守氨基酸序列, 在限氮条件下, CvDGAT2a 具有 PDAT 活性, 这从一个侧面解释了微藻油脂含量增加的原因, 为进一步的微藻油脂代谢调控奠定了一定的研究基础。

### 参考文献

- [1] Georgianna D R, Mayfield S P. Exploiting diversity and synthetic biology for the production of algal biofuels. *Nature*, 2012, 488: 329–335
- [2] Li J, Han D, Wang D, et al. Choreography of transcriptomes and lipidomes of nanochloropsis reveals the mechanisms of oil synthesis in microalgae. *The Plant Cell*, 2014, 26: 1645–1665
- [3] Kroon J T, Wei W, Simon W J, et al. Identification and functional expression of a type 2 acylCoA:diacyl-

glycerol acyltransferase (DGAT2) in developing castor bean seeds which has high homology to the major triglyceride biosynthetic enzyme of fungi and animals. *Phytochemistry*, 2006, 67: 2541–2549

- [4] Settlege S B, Kwanyuen P, Wilson R F. Relation between diacylglycerol acyltransferase activity and oil concentration in soybean. *J Am Oil Chem Soc*, 1998, 75: 775–781
- [5] Boyle N R, Page M D, Liu B S, et al. Three acyltransferases and nitrogen-responsive regulator are implicated in nitrogen starvation-induced triacylglycerol accumulation in *Chlamydomonas*. *Journal of Biological Chemistry*, 2012, 287: 15811–15825
- [6] Dahlqvist A, Stahl U, Lenman M, et al. Phospholipid:diacylglycerol acyltransferase: an enzyme that catalyzes the acyl-CoA-independent formation of triacylglycerol in yeast and plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2000, 97: 6487–6492
- [7] Mhaske V, Beldjilali K, Ohlrogge J, et al. Isolation and characterization of an *Arabidopsis thaliana* knockout line for phospholipid:diacylglycerol transacylase gene (At5g13640). *Plant Physiol Bioch*, 2005, 43: 413–417
- [8] Stahl U, Carlsson A S, Lenman M, et al. Cloning and functional characterization of a phospholipid:diacylglycerol acyltransferase from *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 2004, 135: 1324–1335
- [9] Yoon K, Han D, Li Y, et al. Phospholipid: diacylglycerol acyltransferase is a multifunctional enzyme involved in membrane lipid turnover and degradation while synthesizing triacylglycerol in the unicellular green microalga *Chlamydomonas reinhardtii*. *The Plant Cell*, 2012, 24: 3708–3724
- [10] Blanc G, Duncan G, Agarkova I, et al. The *Chlorella variabilis* NC64A genome reveals adaptation to photosymbiosis, coevolution with viruses, and cryptic sex. *The Plant Cell*, 2010, 22: 2943–2955
- [11] Lardizabal K D, Mai J T, Wagner N W, et al. DGAT2 is a new diacylglycerol acyltransferase gene family: purification, cloning, and expression in insect cells of two polypeptides from *Mortierella ramanniana* with diacylglycerol acyltransferase activity. *The Journal of Biological Chemistry*, 2001, 276: 38862–38869
- [12] Liang M H, Jiang J G. Advancing oleaginous microorganisms to produce lipid via metabolic engineering technology. *Progress in Lipid Research*, 2013, 52: 395–408