

# 家蚕超长链脂肪酸延长酶基因 *Bmelo424* 的克隆及功能分析

左伟东<sup>1,2</sup>, 康宁<sup>2</sup>, 李春林<sup>1</sup>, 栾悦<sup>1</sup>, 童晓玲<sup>1</sup>, 代方银<sup>1</sup>, 鲁成<sup>1</sup>

1 西南大学 家蚕基因组生物学国家重点实验室 农业农村部蚕桑生物学与遗传育种重点实验室, 重庆 400715

2 西南大学 生物技术学院, 重庆 400715

左伟东, 康宁, 李春林, 等. 家蚕超长链脂肪酸延长酶基因 *Bmelo424* 的克隆及功能分析. 生物工程学报, 2019, 35(3): 435-444.

Zuo WD, Kang N, Li CL, et al. Cloning and function analysis of elongase of very long chain fatty acid gene *Bmelo424* in silkworm. Chin J Biotech, 2019, 35(3): 435-444.

**摘要:** 超长链脂肪酸延长酶家族基因影响生物体的多种生理功能。文中克隆了家蚕的一个该家族成员 *Bmelo424* 基因, 其 ORF 为 558 bp。该基因的蛋白序列预测有 4 个跨膜结构域, 并有 6 个丝氨酸磷酸化位点、8 个苏氨酸磷酸化位点和 4 个酪氨酸磷酸化位点, 其亚细胞定位于内质网中, 二级结构分析结果显示其  $\alpha$ -螺旋和  $\beta$ -折叠股分别占 26.7% 和 20%。荧光定量 PCR 结果显示 *Bmelo424* 基因在家蚕各组织均有表达, 尤其在头部表达量最高。通过在酿酒酵母中异源表达 *Bmelo424* 基因的方法研究其对脂肪酸延伸的作用, GC-MS 结果表明, 携带 pYES2-*Bmelo424* 重组质粒的酿酒酵母的 C16:1n-7 脂肪酸含量有显著提高, 而 C16:0、C18:0 和 C18:1n-9 的含量下降。温度胁迫结果显示, *Bmelo424* 基因能够提高酿酒酵母的低温适应能力, 但却降低其高温适应能力。这为探究家蚕 *Bmelo424* 基因的功能提供了参考。

**关键词:** 家蚕, 超长链脂肪酸延长酶, 表达特征, 酿酒酵母, 温度胁迫

**Received:** October 6, 2018; **Accepted:** December 4, 2018

**Supported by:** National Natural Science Foundation of China (Nos. 31830094, 31472153), National High Technology Research and Development Program of China (863 Program) (No. 2013AA102507), Funds of China Agriculture Research System (No. CARS-18-ZJ0102), Fundamental Research Funds for the Central Universities (No. XDJK2013C129).

**Corresponding author:** Cheng Lu. Tel: +86-23-6825-0793; E-mail: lucheng@swu.edu.cn

国家自然科学基金 (Nos. 31830094, 31472153), 国家高技术研究发展计划 (863 计划) (No. 2013AA102507), 现代农业产业技术体系项目 (No. CARS-18-ZJ0102), 中央高校基本科研业务费 (No. XDJK2013C129) 资助。

# Cloning and function analysis of elongase of very long chain fatty acid gene *Bmelo424* in silkworm

Weidong Zuo<sup>1,2</sup>, Ning Kang<sup>2</sup>, Chunlin Li<sup>1</sup>, Yue Luan<sup>1</sup>, Xiaoling Tong<sup>1</sup>, Fangyin Dai<sup>1</sup>, and Cheng Lu<sup>1</sup>

<sup>1</sup> State Key Laboratory of Silkworm Genome Biology, Key Laboratory of Sericultural Biology and Genetic Breeding, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Southwest University, Chongqing 400715, China

<sup>2</sup> College of Biotechnology, Southwest University, Chongqing 400715, China

**Abstract:** Genes belonging to the elongases of very long chain fatty acid (ELOVL) family affect many physiological functions in organism. In this paper, *Bmelo424* gene, a member of the ELOVL family in silkworm, was cloned and its ORF was 558 bp. Its protein sequence was predicted to have four transmembrane domains, six serine phosphorylation sites, eight threonine phosphorylation sites and four tyrosine phosphorylation sites, and its subcellular localization was in the endoplasmic reticulum. Secondary structure analysis showed that the percentage of alpha-helix and beta-strand was 26.7% and 20% respectively. The results of fluorescence quantitative PCR showed that *Bmelo424* gene was expressed in all tissues of silkworm, especially with the highest expression in head. By heterologous expression of *Bmelo424* gene in *Saccharomyces cerevisiae*, the effect of *Bmelo424* gene on fatty acid elongation was studied. GC-MS results indicated that the fatty acid content of C16:1n-7 in *S. cerevisiae* with pYES2-*Bmelo424* recombinant plasmid increased significantly, whereas the content of C16:0, C18:0 and C18:1n-9 decreased. The results of temperature stress revealed that *Bmelo424* gene could improve the low temperature adaptability of *S. cerevisiae*, but its high temperature adaptability decreased. This provides a reference for exploring the function of *Bmelo424* gene in silkworm.

**Keywords:** silkworm, elongase of very long chain fatty acid, expression profile, *Saccharomyces cerevisiae*, temperature stress

超长链脂肪酸延长酶 (Elongases of very long chain fatty acid, ELOVL) 是定位于内质网中的微粒体酶, 在催化合成长链脂肪酸 (C16, C18) 和超长链脂肪酸 ( $\geq$ C20) 的过程中起到限速作用<sup>[1]</sup>。酵母中首次鉴定出的该酶的编码基因 *ELO1* 参与延伸 C14 脂肪酸到 C16, 而 *ELO2* 和 *ELO3* 则分别对延伸 C24 和 C26 脂肪酸必不可少<sup>[2-3]</sup>。目前, 在哺乳动物中已经有 7 个家族成员被鉴定 (ELOVL1-ELOVL7)。其中, ELOVL1 负责延伸 C20 到 C28 的脂肪酸, 并与 C24 鞘脂类的合成相关<sup>[4-5]</sup>。ELOVL2 控制精巢中 C28:5n-6 和 C30:5n-6 的脂肪酸合成, 进而影响小鼠的精子成熟和雄性生殖力<sup>[6]</sup>。ELOVL3 参与 C20-C24 脂肪酸的合成, 并与毛囊皮脂腺的发育以及饮食性肥胖抵抗 (Diet induced obesity resistant, DIO-R) 相关<sup>[7-8]</sup>。ELOVL4 参与合成 C28 和 C30 饱和脂肪酸以及 C28-C38 多不饱和脂肪酸, 且与黄斑营养不良、脊

髓小脑性共济失调和可变性红斑角皮症相关<sup>[9-10]</sup>。ELOVL5 能够延伸 C18 和 C20 的多不饱和脂肪酸底物, 而且和脊髓小脑性共济失调以及开角型青光眼相关<sup>[11-13]</sup>。ELOVL6 延伸稍短的 C12-C16 脂肪酸, 其基因多态性和 II 型糖尿病相关联<sup>[14-15]</sup>。ELOVL7 延伸 C16-C22 脂肪酸, 并参与前列腺癌细胞增殖和巨细胞病毒复制<sup>[16-18]</sup>。

与哺乳动物不同, 昆虫 ELOVL 基因数量较多但功能验证的结果较少。果蝇中第一个被鉴定的 ELOVL 基因 *elo68a* 在雄性生殖系统中特异性表达, 其产物能够延伸 C14 和 C16 单不饱和脂肪酸, 参与雄性信息素的合成<sup>[19]</sup>。在雌性果蝇中专一表达的 *eloF* 基因, 其产物能够延伸 C19-C30 脂肪酸, 与雌性果蝇信息素合成和求偶行为相关<sup>[20]</sup>。另外, 与 ELOVL6 基因相似度较高的 *noa* 基因, 其 RNA 水平的减少导致果蝇运动障碍和生存能力显著下降, 而针对精巢包囊细胞的 RNAi 会引起

雄性不育<sup>[21]</sup>。过表达果蝇脂肪酸延长酶基因 *Bond* 能使酿酒酵母 *elo2/elo3* 双缺失致死突变菌株恢复活力, 突变 *Bond* 基因影响精母细胞胞质分裂; 而且 *Bond* 基因沉默能显著抑制雄性生育力<sup>[22-23]</sup>。此外, 白纹伊蚊中脂酰辅酶 A 延长酶 (ELO) 的表达水平是其滞育卵抗干燥能力的重要影响因素<sup>[24]</sup>。与表皮碳氢化合物生物合成相关的 *ELOVL* 基因, 在欧洲蜜蜂中也采用 RT-qPCR 进行了表达谱分析<sup>[25]</sup>。桔小实蝇被单增李斯特菌、金黄色葡萄球菌和大肠杆菌侵染后, *noa* 基因的表达上调, 参与调节 Toll/Imd 免疫信号传导途径<sup>[26]</sup>。在黄粉虫中, *TmELO1* 主要参与 C16 和 C20 脂肪酸的合成, 且能形成痕量的 C22 和 C24 脂肪酸, 而 *TmELO2* 仅合成 C16 脂肪酸, 这两个基因的 RNAi 都没有改变黄粉虫的脂肪酸组分, 但 *TmELO1* 基因的 RNAi 会导致黄粉虫死亡率上升<sup>[27]</sup>。

*ELOVL* 基因在昆虫中已有影响育性、抗干燥性、免疫信号传导和致死等方面的功能研究, 而家蚕作为重要的经济昆虫和鳞翅目昆虫的典型代表, 其 *ELOVL* 基因仅有信息分析方面的报道<sup>[28]</sup>。为了进一步探索 *ELOVL* 基因在家蚕中的具体功能, 本研究从家蚕幼虫中克隆获得 *Bmelo424* 的基因序列, 分析其组织表达特征及蛋白结构特点, 并借助酿酒酵母真核表达系统和 GC-MS 探究其基因功能, 同时对重组酵母细胞的温度胁迫响应也作了分析。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 实验昆虫

家蚕品种 Dazao 取自西南大学家蚕基因资源库, 幼虫在 25 °C 室温的自然光照条件下以新鲜桑叶饲养。在五龄三天幼虫期取整蚕和各组织冻存于 -80 °C 冰箱备用。

#### 1.1.2 试剂耗材

DNA 胶回收试剂盒和小量质粒提取试剂盒

购自 Omega 公司; 感受态细胞 Trans1-T1 购自北京全式金公司; 酿酒酵母 INVSc1 和表达载体 pYES2 购自 Invitrogen 公司; *Taq* DNA 聚合酶、M-MLV 反转录试剂盒、pMD19-T 载体、DNA Marker、限制性内切酶 *Not* I、*Bam*HI 和 T4 DNA 连接酶等购自 TaKaRa 公司; 酵母抽提物、蛋白酶和葡萄糖等购自生工生物工程 (上海) 股份有限公司; 酵母尿嘧啶缺陷型合成培养基 (SC-Ura) 购自上海哈灵公司, 酵母化学感受态细胞制备试剂盒购自北京天恩泽公司; RNA 提取试剂盒购自 BioTeke 公司; SYBR Green 荧光定量 PCR 试剂盒购自 Bio-Rad 公司。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 RNA 提取及 cDNA 合成

将五龄三天家蚕各组织 (头、体壁、中肠、脂肪体、前中丝、后丝、马氏管、精巢、卵巢和血液) 及整蚕的冻存样品取出, 分别放入液氮预冷后的研钵中, 快速研磨至细滑粉末状, 用无 RNase 枪头取适量粉末于 Trizol 中裂解。通过 RNA 提取试剂盒获得家蚕各组织及整蚕的总 RNA, 并使用分光光度计测定每个样品的 RNA 浓度, 之后利用反转录试剂盒制备 cDNA 模板。

#### 1.2.2 *Bmelo424* 基因的克隆

依据家蚕基因组数据库 SilkDB 中的超长链脂肪酸延长酶信息<sup>[28]</sup>, 利用 Primer Premier 5.0 设计 *Bmelo424* 基因 (*BGIBMGA000424*) 的克隆引物 (表 1)。以五龄三天 Dazao 整蚕 cDNA 为模板进行 PCR 扩增, 然后通过 1% 琼脂糖凝胶电泳检测产物大小。目的 DNA 片段经切胶回收后, 与 pMD19-T 载体连接, 将连接产物转化到大肠杆菌感受态细胞中, 通过菌液 PCR 筛选阳性克隆并进行测序验证。

#### 1.2.3 *Bmelo424* 基因的组织表达特征

基于文献报道合成 *Bmelo424* 基因的荧光定量 PCR 引物 *Q-Bmelo424* 和内参引物 *sw22934*<sup>[28]</sup>,

表 1 文中所用引物序列

Table 1 Primers used in this paper

Primer name	Primer sequence (5'-3')	Use
<i>Bmelo424-F</i>	ATGCCATTACAGATCTTCTTTGTGC	ORF cloning
<i>Bmelo424-R</i>	TCAGTTGCCGCGCCGCGCAGAACGGTG	
<i>Bmelo424-F</i> ( <i>BamH I</i> )	<i>GGATCC</i> ATGCCATTACAGATCTTCTTTGTGC	Vector
<i>Bmelo424-R</i> ( <i>Not I</i> )	<i>GCGGCCGCTCAGTTGCCGCGCCGCGCAGAACGGTG</i>	construction
<i>Q-Bmelo424-F</i>	GTTCTTCGGACTCCTCAATACG	qRT-PCR
<i>Q-Bmelo424-R</i>	AGAGTAAGATTGGTCGTAGAAGTCCT	
<i>sw22934-F</i>	TTCGTAAGTGGCTCTTCTCGT	qRT-PCR
<i>sw22934-R</i>	CAAAGTTGATAGCAATTCCT	

Note: restriction sites are highlighted in italics.

以家蚕五龄三天不同组织的 cDNA 为模板, 检测其组织表达特征。反应总体系为 10  $\mu$ L (SYBR Green II 4.2  $\mu$ L, 上下游引物各 0.3  $\mu$ L, 去离子水 4.2  $\mu$ L, cDNA 模板 1  $\mu$ L)。反应程序: 95  $^{\circ}$ C, 30 s; 95  $^{\circ}$ C, 5 s, 60  $^{\circ}$ C, 30 s, 共 40 个循环。每个样品 3 个生物学重复, 收集目的基因和内参基因的  $C_q$  值计算其相对表达量。

#### 1.2.4 *Bmelo424* 蛋白序列和结构分析

利用在线工具对 *Bmelo424* 的跨膜结构域 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) 和磷酸化位点 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>) 进行预测, 采用 Cell-PLoc 2.0<sup>[29]</sup> (<http://www.csbio.sjtu.edu.cn/bioinf/euk-multi-2/>) 进行其亚细胞定位, 通过 PSIPRED v3.3 (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>) 进行其二级结构预测。

#### 1.2.5 *Bmelo424* 表达载体的构建

通过 *Bmelo424* 基因的克隆序列设计分别带有 *BamH I* 和 *Not I* 的上下游引物 (表 1), 采用 TA 克隆的方式首先构建 pMD-*Bmelo424* 重组质粒。将 pMD-*Bmelo424* 质粒和穿梭载体 pYES2 同时用 *BamH I* 和 *Not I* 双酶切, 酶切产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳后, 分别切胶回收 *Bmelo424* 和 pYES2 目的 DNA 片段。回收产物用 T4 DNA 连接酶过夜连接, 连接反应体系为: *Bmelo424* 片段 7  $\mu$ L, pYES2 片段 1  $\mu$ L, 10 $\times$ T4 缓冲液 1  $\mu$ L, T4 DNA 连接酶 1  $\mu$ L。连接产物转化大肠杆菌感受态

细胞, 采用菌液 PCR 筛选阳性克隆并进行酶切和测序双重验证。

#### 1.2.6 pYES2-*Bmelo424* 的诱导表达

依据酵母化学感受态细胞制备试剂盒操作说明, 将 pYES2-*Bmelo424* 和 pYES2 分别转化酿酒酵母 INVSc1 感受态细胞, 把菌液涂布在含 2% 葡萄糖的 SC-Ura 固体选择培养基中, 30  $^{\circ}$ C 恒温培养 48 h, 挑取单菌落做菌液 PCR 进一步验证阳性转化子。

分别挑取阳性转化单菌落接种于 10 mL 含 2% 葡萄糖的 SC-Ura 液体选择培养基中, 30  $^{\circ}$ C、200 r/min 振荡培养并测定  $OD_{600}$  吸光度。计算并取出相应体积菌液 (参照酵母表达载体 pYES2 使用手册), 3 000 r/min 离心 5 min, 然后将菌体重悬于 50 mL 含 2% 半乳糖和 1% 棉籽糖的 SC-Ura 液体诱导培养基中, 使得初始菌液  $OD_{600}$  为 0.4, 30  $^{\circ}$ C、200 r/min 振荡培养 30 h 后, 3 000 r/min 离心 5 min 收集菌体, 无菌水洗涤菌体 3 次, 真空冷冻干燥 48 h, 置于 -80  $^{\circ}$ C 冰箱备用, 每个样品做 3 个重复。

#### 1.2.7 重组产物的 GC-MS 分析

脂肪酸提取及甲酯化依据文献略有调整<sup>[30]</sup>: 称取 50 mg 酿酒酵母冻干粉于 10 mL 离心管, 加入 3 mL 氢氧化钠甲醇溶液 (1 mol/L), 振荡混匀, 80  $^{\circ}$ C 水浴 20 min, 水浴期间多次振荡混匀。甲酯化: 往样品中加入 3 mL 盐酸甲醇溶液 (2 mol/L) 混匀, 然后 80  $^{\circ}$ C 水浴 20 min, 快速冷却。萃取净

化:待上述溶液冷却,加入 1 mL 正己烷 (含 0.01% BHT),充分振荡萃取。离心,取 1  $\mu$ L 正己烷层上机测定,使用仪器为安捷伦气相色谱质谱联用仪 (Agilent7890-5975)。

色谱条件:所用色谱柱为安捷伦 HP-5MS (60 m $\times$ 0.25 mm $\times$ 0.25  $\mu$ m)。进样口温度为 280  $^{\circ}$ C,进样量为 1  $\mu$ L,分流比为 20:1,载气为氦气,恒线速度流速为 1.5 mL/min;升温程序:初始柱温为 120  $^{\circ}$ C,保持 1 min;以 6  $^{\circ}$ C/min 的速率升到 170  $^{\circ}$ C;再以 2  $^{\circ}$ C/min 的速率升到 230  $^{\circ}$ C,保持 12 min;最后以 10  $^{\circ}$ C/min 的速率升到 285  $^{\circ}$ C,保持 10 min。

质谱条件:离子源温度为 200  $^{\circ}$ C,四级杆温度为 150  $^{\circ}$ C,传输线温度为 260  $^{\circ}$ C,电子轰击能量为 70 eV,采用全扫描模式,扫描范围  $m/z$  40–550,扫描速率为 2.83 次/s,溶剂切除时间为 4.4 min。

通过检索 NIST11 谱图库并结合标准品图谱和各组分的保留时间来定性脂肪酸,再按照峰面积归一法计算其百分含量。

## 1.2.8 酿酒酵母温度胁迫处理

将 1.2.6 中用诱导培养基振荡培养 30 h 后的菌液分别取出 5 mL,调整 pYES2-*Bmelo424* 和 pYES2 菌液密度至  $OD_{600}$  值相同,分别在 4  $^{\circ}$ C 和 40  $^{\circ}$ C 胁迫处理 24 h,然后对处理后的菌液分别作 10 倍梯度稀释,最后各取 2  $\mu$ L 接种在含 2% 葡萄糖的 SC-Ura 固体培养基上,30  $^{\circ}$ C 培养 48 h,观察酿酒酵母受温度胁迫后的生长状况。

## 2 结果与分析

### 2.1 *Bmelo424* 基因的克隆与分析

以家蚕品种 Dazao 五龄三天幼虫整蚕的 cDNA 为模板,用 *Bmelo424* 基因的克隆引物进行 PCR 扩增,PCR 产物的大小采用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测,电泳结果显示有 600 bp 左右的特异性条带,和预期片段大小相同 (图 1A)。对该 PCR 产物进行切胶回收,连接转化 pMD19-T 载体,筛选出阳性克隆进行测序,得到 558 bp 的开放阅读框 (ORF) 序列,编码 185 个氨基酸,具备高度

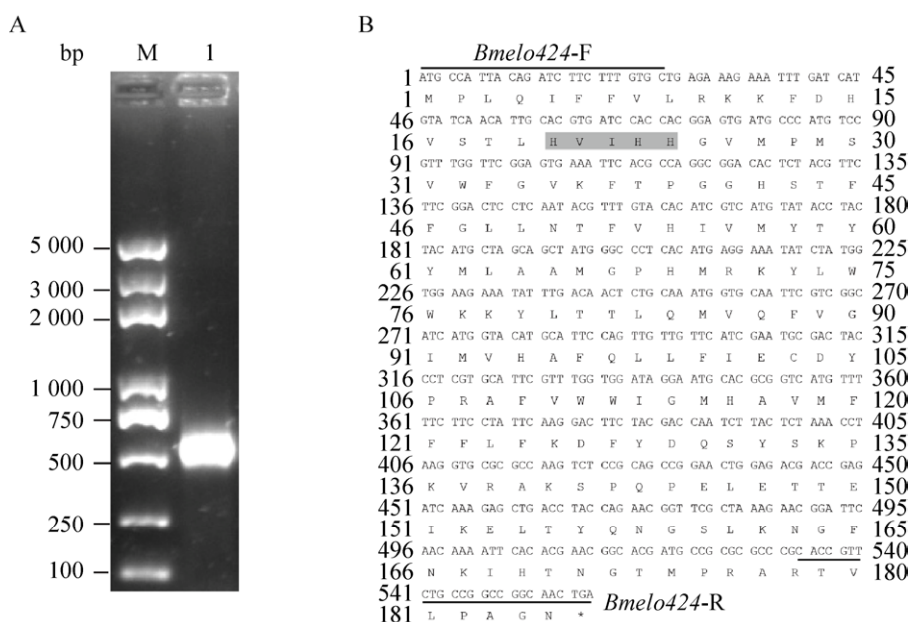


图 1 家蚕 *Bmelo424* 基因的克隆 (A) 及分析 (B)

Fig. 1 Cloning and analysis of *Bmelo424* gene. (A) PCR amplification of the *Bmelo424* gene. (B) The ORF sequence of *Bmelo424* gene and its deduced amino acid, HXXHH motif was highlighted in grey.

保守的组氨酸簇 HXXHH (图 1B), 比对结果表明 *Bmelo424* 克隆序列和家蚕 SilkDB 数据库预测基因序列完全一致。

## 2.2 *Bmelo424* 蛋白序列分析

通过 TMHMM Server 2.0 工具在线预测 *Bmelo424* 蛋白的跨膜区域, 结果显示其有 4 个跨膜区, 预测位置分别在 13–35、45–67、79–101、105–124 的氨基酸区域 (图 2A)。利用 NetPhos 3.1 Server 预测 *Bmelo424* 的磷酸化位点有: 6 个丝氨酸 (Serine) 磷酸化位点 (分别在第 30、43、131、133、141 和 204 位点)、8 个苏氨酸 (Threonine) 磷酸化位点 (第 38、44、81、82、148、149、173 和 179 位点)、4 个酪氨酸 (Tyrosine) 磷酸化位点 (第 61、128、132 和 156 位点) (图 2B)。通过 PSIPRED v3.3 工具在线分析其二级结构, 其中, 无规则卷曲所占比例最大, 为 53.3%,  $\alpha$ -螺旋和  $\beta$ -折叠股分别占 26.7% 和 20% (图 2C)。蛋白质亚

细胞定位预测结果显示 *Bmelo424* 蛋白位于内质网中。

## 2.3 *Bmelo424* 基因的组织表达特征

采用荧光定量 PCR 的方法对 *Bmelo424* 基因在五龄三天家蚕幼虫组织的表达模式进行分析, 结果显示, 其在精巢、卵巢、头、体壁、脂肪体、中肠、血细胞、前中丝、后丝和马氏管中均有表达 (图 3)。其中, 在头和体壁中表达量较高, 在精卵巢中表达量稍低, 在血细胞中表达量最低。

## 2.4 重组质粒的构建和鉴定

用带有酶切位点的引物 PCR 扩增 *Bmelo424* 基因 (表 1), 通过 TA 克隆获得 pMD-*Bmelo424* 重组质粒, 将该重组质粒与 pYES2 质粒用 *Bam*H I 和 *Not* I 分别双酶切后进行连接和转化, 筛选阳性质粒并进行双酶切鉴定 (图 4), 阳性质粒酶切后出现目的基因大小的片段, 同时双酶切后的载体片段与空质粒 pYES2 的大小一致, 而且阳性质

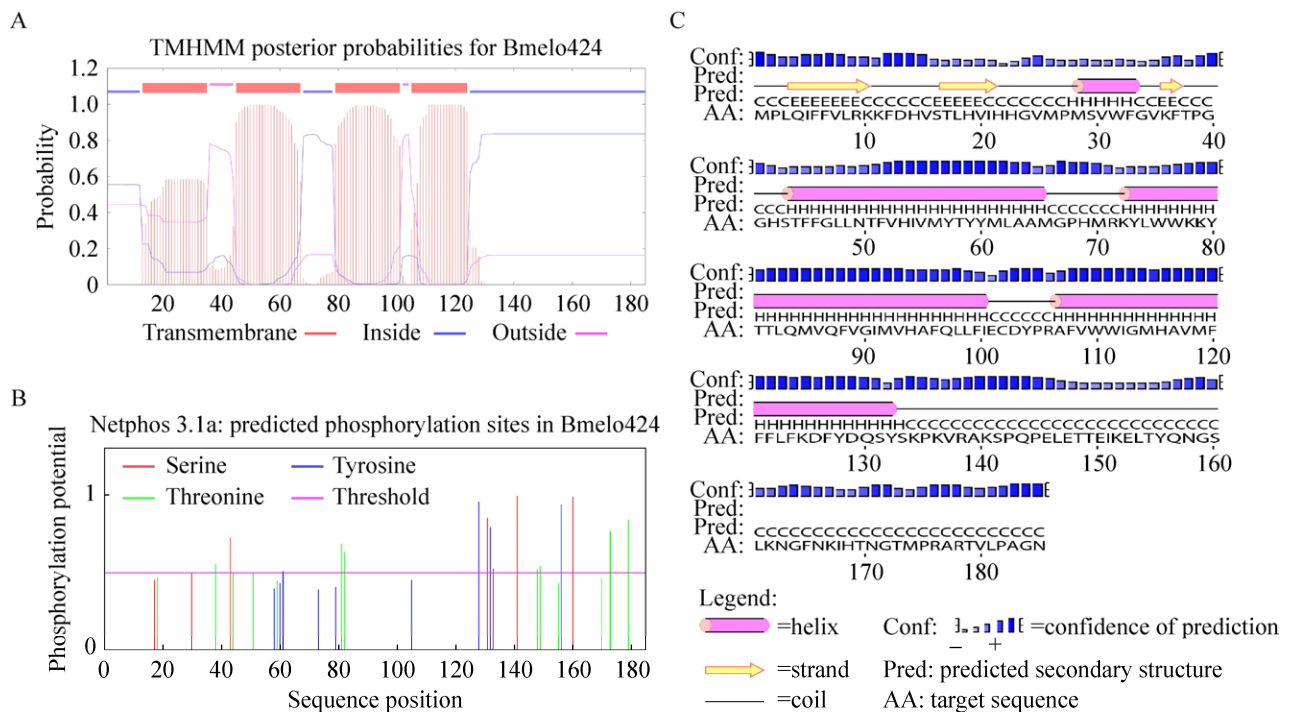


图 2 *Bmelo424* 蛋白序列分析

Fig. 2 Protein sequence analysis of *Bmelo424*. (A) Transmembrane domain prediction of *Bmelo424*. (B) Phosphorylation sites prediction of *Bmelo424*. (C) Secondary structure prediction of *Bmelo424*.

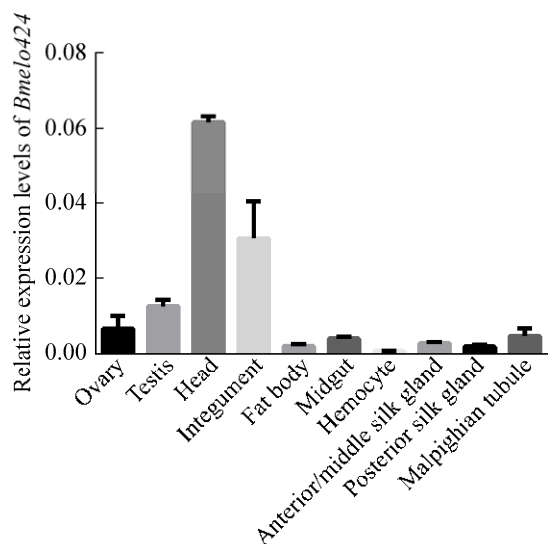


图3 *Bmelo424* 基因的组织表达谱

Fig. 3 Expression profiles of *Bmelo424* gene in different tissues.

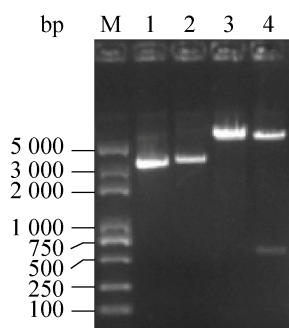


图4 pYES2-*Bmelo424* 重组质粒的双酶切鉴定

Fig. 4 Restriction enzyme digestion of the recombinant pYES2-*Bmelo424*. M: marker; 1: pYES2; 2: pYES2-*Bmelo424*; 3: pYES2 plasmid digested with *BamH* I and *Not* I; 4: pYES2-*Bmelo424* plasmid digested with *BamH* I and *Not* I.

粒测序结果也和克隆序列相同, 说明成功构建 pYES2-*Bmelo424* 表达载体。

## 2.5 重组质粒转化酿酒酵母细胞

酿酒酵母 INVSc1 属于营养缺陷型菌株, 只有在 pYES2 存在的情况下, 才能在尿嘧啶缺陷型培养基 (SC-Ura) 上生长。提取构建好的 pYES2-*Bmelo424* 重组质粒和 pYES2 空质粒, 转化酿酒酵母 INVSc1 感受态细胞, 涂布培养后在 SC-Ura 培养基上长出

单菌落。挑取单菌落进行菌液 PCR 反应, 得到与目的基因大小相符的片段, 进一步验证重组质粒成功转化至酿酒酵母 INVSc1 细胞中 (图 5)。

## 2.6 重组质粒诱导产物的鉴定

将含有空质粒和重组质粒的酿酒酵母分别接种 SC-Ura 液体培养基, 过夜培养后收集适量菌体, 再把菌体重悬于诱导培养基中振荡培养 30 h, 离心收集菌体后冷冻干燥, 并对培养物进行脂肪酸提取和甲酯化, 利用 GC-MS 检测其脂肪酸组分。结果显示, 携带空质粒 pYES2 的酿酒酵母细胞中主要含有棕榈酸 (C16:0)、棕榈油酸 (C16:1n-7)、硬脂酸 (C18:0) 和油酸 (C18:1n-9) 4 种脂肪酸。而携带 pYES2-*Bmelo424* 重组质粒的酵母细胞中, 主要脂肪酸含量发生变化, 除了棕榈油酸含量显著上升外, 其余 3 种脂肪酸的含量都有所下降 (图 6)。

## 2.7 转基因酿酒酵母的温度胁迫响应

酿酒酵母在正常温度 (30 °C) 培养时, 携带 pYES2-*Bmelo424* 重组质粒和 pYES2 空质粒的细胞的生长速度和菌落形态没有明显差别。而不同温度胁迫处理后的两种酿酒酵母在细胞生长活性上表现出差异, 其中, 低温 (4 °C) 处理后, 携带 pYES2-*Bmelo424* 重组质粒的酿酒酵母细胞比携带 pYES2 空质粒的酿酒酵母细胞生长状况要好, 但是高温 (40 °C) 处理后, 其生长状况却截然相反 (图 7)。

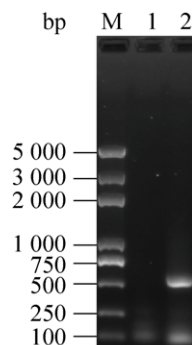


图5 酵母转化子的 PCR 鉴定

Fig. 5 Identification of yeast transformants by PCR. M: marker; 1: pYES2; 2: pYES2-*Bmelo424*.

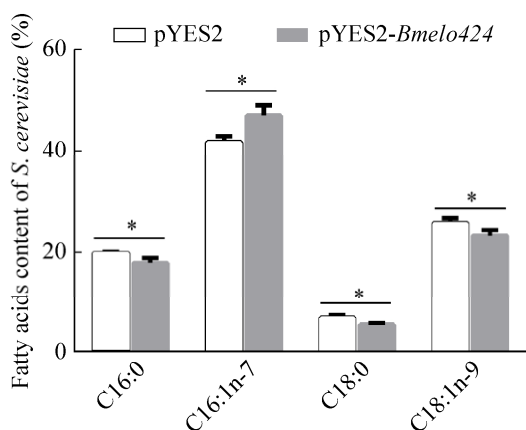


图 6 pYES2 酵母细胞和 pYES2-*Bmelo424* 重组酵母细胞的脂肪酸含量比较

Fig. 6 Comparison of fatty acids content between pYES2 and pYES2-*Bmelo424* of yeast cells. \* $P < 0.05$ .

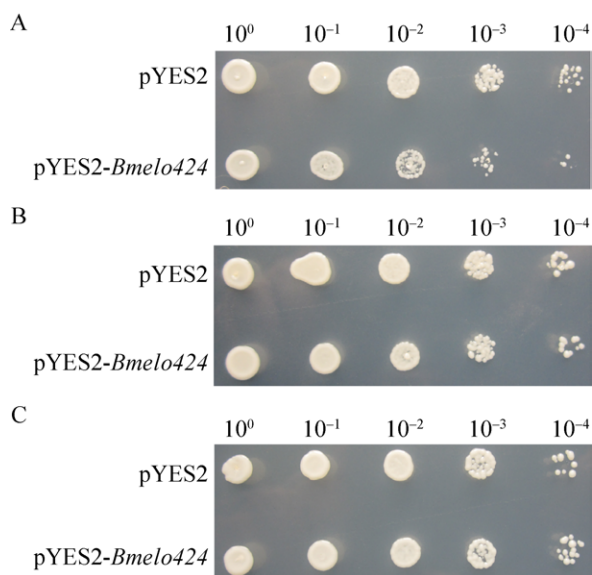


图 7 两种酵母细胞在不同温度胁迫处理后的生长状况比较

Fig. 7 Comparison of the growth of two kinds of yeast cells after different temperature stress treatments. (A) 40 °C. (B) 30 °C (Control). (C) 4 °C.

### 3 讨论

*ELOVL* 基因突变会引起诸如鱼鳞癣、黄斑退化、肌病、智力缺陷和髓鞘脱失等遗传性疾病<sup>[31]</sup>, 昆虫中 *ELOVL* 基因具有影响信息素合成、雄性生育力和 Toll/Imd 免疫信号传导调节等功能<sup>[19,23-24]</sup>。

家蚕是典型的鳞翅目经济昆虫, 其 *ELOVL* 基因多达 13 个, 但还没有功能鉴定报道<sup>[28]</sup>。本文以家蚕五龄三天全蚕 cDNA 为模板克隆获得 *Bmelo424* 基因 558 bp 的 ORF 序列, 其推导氨基酸序列具有 4 个潜在的跨膜结构域, 高度保守的组氨酸簇 HXXHH, 蛋白质亚细胞定位预测显示其位于内质网中, 表明 *Bmelo424* 和其他延长酶一样属于膜结合蛋白, 但其主要功能发挥区域同样局限于内质网中<sup>[32]</sup>, 另外, 其具备发挥活性所必需的 HXXHH 基序, 并且其活性位点和赖氨酸残基之间的距离决定超长链脂肪酸的碳链合成长度<sup>[33]</sup>。

*Bmelo424* 有 6 个丝氨酸磷酸化位点、8 个苏氨酸磷酸化位点和 4 个酪氨酸磷酸化位点, 这些磷酸化位点可能对其生物学功能行使有重要影响。蛋白质二级结构预测结果显示  $\alpha$ -螺旋和  $\beta$ -折叠股占 46.7%, 二者常位于内部且不易变形, 可稳定维持蛋白质的高级结构。*Bmelo424* 基因在每个组织中均有表达, 这与芯片数据基本一致<sup>[28]</sup>。在昆虫类超长链脂肪酸延长酶家族成员中, 既有在各组织中广泛表达的成员<sup>[23,26]</sup>, 也有组织特异性表达的成员<sup>[19]</sup>, *Bmelo424* 基因在家蚕各组织均有表达, 而其表达水平的高低暗示该基因在不同组织中行使的功能可能有所差异。此外, 鉴于昆虫表皮脂类在失水屏障、影响化学农药吸收、阻止病原入侵以及信息素组成等方面的作用<sup>[34]</sup>, 结合 *Bmelo424* 基因主要在头和体壁高表达的结果, 我们推测其可能与家蚕的环境适应性相关。

*Bmelo424* 基因的异源表达会引起酿酒酵母细胞的脂肪酸组分含量的变化, pYES2-*Bmelo424* 重组酵母比 pYES2 酵母的 C16:1n-7 脂肪酸含量有显著提高, 表明外源 *Bmelo424* 基因在酿酒酵母细胞中对催化生成 C16:1n-7 脂肪酸有积极作用。家蚕 *Bmelo424* 基因仅影响长链脂肪酸的合成, 值得一提的是, *ELOVL* 参与合成不同碳链长度脂肪酸的功能在其他物种中也有报道, 诸如酵母中



ELO1 限于延伸 C14 脂肪酸到 C16<sup>[2]</sup>; 锥虫中 ELO1 延伸 C4 脂肪酸到 C10, ELO2 延伸 C10 脂肪酸到 C14, ELO3 延伸 C14 脂肪酸到 C18<sup>[35]</sup>; 小鼠中 ELOVL6 参与延伸 C12–C16 脂肪酸<sup>[14]</sup>; 果蝇中 ELO68 $\alpha$  可以合成 C16 和 C18 脂肪酸<sup>[19]</sup>; 黄粉虫中 TmELO2 可以合成 C16 脂肪酸<sup>[27]</sup>。这些研究结果都说明 ELOVL 除了主要负责超长链脂肪酸的延伸外, 也参与其他碳链长度的脂肪酸延伸。同时, 我们将昆虫中已涉及功能实验的 ELOVL 成员作了比较, 发现 *Bmelo424* 与黄粉虫的 TmELO2 亲缘关系最近, 且黄粉虫的 TmELO2 也仅影响 C16 脂肪酸合成<sup>[27]</sup>, 因此, 家蚕 *Bmelo424* 与黄粉虫中已报道的同系物功能基本吻合。

在果蝇中, 其耐冷性增强后会导致单烯酸比例增加而二烯酸比例降低, 同时伴有 C16 脂肪酸增加而 C18 脂肪酸减少的现象<sup>[36]</sup>, *Bmelo424* 基因引起酵母 C16:1n-7 脂肪酸含量提高可以增加酵母细胞的冷胁迫后的适应能力, 但对热胁迫后的适应能力却明显减弱, 这也间接暗示 *Bmelo424* 基因可能影响家蚕的抗逆性。另外, 白纹伊蚊中 *ELO* 表达水平的上调和滞育卵抗干燥能力的提高相关, 也说明 ELOVL 家族的部分基因影响其抗逆性<sup>[24]</sup>。这也提示我们可以通过改变 ELOVL 抗逆相关基因的表达, 以提高经济昆虫适应逆境的能力, 或用类似方式降低害虫适应逆境的能力以达到控害目标。

## REFERENCES

- [1] Guillou H, Zdravec D, Martin PGP, et al. The key roles of elongases and desaturases in mammalian fatty acid metabolism: Insights from transgenic mice. *Prog Lipid Res*, 2010, 49(2): 186–199.
- [2] Toke DA, Martin CE. Isolation and characterization of a gene affecting fatty acid elongation in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*, 1996, 271(31): 18413–18422.
- [3] Oh CS, Toke DA, Mandala S, et al. *ELO2* and *ELO3*, homologues of the *Saccharomyces cerevisiae* *ELO1* gene, function in fatty acid elongation and are required for sphingolipid formation. *J Biol Chem*, 1997, 272(28): 17376–17384.
- [4] Sassa T, Ohno Y, Suzuki S, et al. Impaired epidermal permeability barrier in mice lacking *elovl1*, the gene responsible for very-long-chain fatty acid production. *Mol Cell Biol*, 2013, 33(14): 2787–2796.
- [5] Ohno Y, Suto S, Yamanaka M, et al. ELOVL1 production of C24 acyl-CoAs is linked to C24 sphingolipid synthesis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107(43): 18439–18444.
- [6] Zdravec D, Tvrdik P, Guillou H, et al. ELOVL2 controls the level of n-6 28:5 and 30:5 fatty acids in testis, a prerequisite for male fertility and sperm maturation in mice. *J Lipid Res*, 2011, 52(2): 245–255.
- [7] Westerberg R, Tvrdik P, Undén AB, et al. Role for ELOVL3 and fatty acid chain length in development of hair and skin function. *J Biol Chem*, 2004, 279(7): 5621–5629.
- [8] Zdravec D, Brolinson A, Fisher RM, et al. Ablation of the very-long-chain fatty acid elongase ELOVL3 in mice leads to constrained lipid storage and resistance to diet-induced obesity. *FASEB J*, 2010, 24(11): 4366–4377.
- [9] Agbaga MP, Brush RS, Mandal MNA, et al. Role of Stargardt-3 macular dystrophy protein (ELOVL4) in the biosynthesis of very long chain fatty acids. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105(35): 12843–12848.
- [10] Cadieux-Dion M, Turcotte-Gauthier M, Noreau A, et al. Expanding the clinical phenotype associated with ELOVL4 mutation: study of a large French-Canadian family with autosomal dominant spinocerebellar ataxia and erythrokeratoderma. *JAMA Neurol*, 2014, 71(4): 470–475.
- [11] Leonard AE, Bobik EG, Dorado J, et al. Cloning of a human cDNA encoding a novel enzyme involved in the elongation of long-chain polyunsaturated fatty acids. *Biochem J*, 2000, 350(3): 765–770.
- [12] Mabuchi F, Sakurada Y, Kashiwagi K, et al. Association between *SRBD1* and *ELOVL5* gene polymorphisms and primary open-angle glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2011, 52(7): 4626–4629.
- [13] di Gregorio E, Borroni B, Giorgio E, et al. *ELOVL5* mutations cause spinocerebellar ataxia 38. *Am J Hum Genet*, 2014, 95(2): 209–217.
- [14] Moon YA, Shah NA, Mohapatra S, et al. Identification

- of a mammalian long chain fatty acyl elongase regulated by sterol regulatory element-binding proteins. *J Biol Chem*, 2001, 276(48): 45358–45366.
- [15] Liu Y, Wang F, Yu XL, et al. Genetic analysis of the *ELOVL6* gene polymorphism associated with type 2 diabetes mellitus. *Braz J Med Biol Res*, 2013, 46(7): 623–628.
- [16] Tamura K, Makino A, Hullin-Matsuda F, et al. Novel lipogenic enzyme *ELOVL7* is involved in prostate cancer growth through saturated long-chain fatty acid metabolism. *Cancer Res*, 2009, 69(20): 8133–8140.
- [17] Naganuma T, Sato Y, Sassa T, et al. Biochemical characterization of the very long-chain fatty acid elongase *ELOVL7*. *FEBS Lett*, 2011, 585(20): 3337–3341.
- [18] Purdy JG, Shenk T, Rabinowitz JD. Fatty acid elongase 7 catalyzes lipidome remodeling essential for human cytomegalovirus replication. *Cell Rep*, 2015, 10(8): 1375–1385.
- [19] Chertemps T, Duportets L, Labeur C, et al. A new elongase selectively expressed in *Drosophila* male reproductive system. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, 333(4): 1066–1072.
- [20] Chertemps T, Duportets L, Labeur C, et al. A female-biased expressed elongase involved in long-chain hydrocarbon biosynthesis and courtship behavior in *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104(11): 4273–4278.
- [21] Jung A, Hollmann M, Schäfer MA. The fatty acid elongase *NOA* is necessary for viability and has a somatic role in *Drosophila* sperm development. *J Cell Sci*, 2007, 120(16): 2924–2934.
- [22] Szafer-Glusman E, Giansanti MG, Nishihama R, et al. A role for very-long-chain fatty acids in furrow ingression during cytokinesis in *Drosophila spermatocytes*. *Curr Biol*, 2008, 18(18): 1426–1431.
- [23] Ng WC, Chin JS, Tan KJ, et al. The fatty acid elongase *Bond* is essential for *Drosophila* sex pheromone synthesis and male fertility. *Nat Commun*, 2015, 6: 8263.
- [24] Urbanski JM, Benoit JB, Michaud MR, et al. The molecular physiology of increased egg desiccation resistance during diapause in the invasive mosquito, *Aedes albopictus*. *Proc Biol Sci*, 2010, 277(1694): 2683–2692.
- [25] Falcón T, Ferreira-Caliman MJ, Franco-Nunes FM, et al. Exoskeleton formation in *Apis mellifera*: cuticular hydrocarbons profiles and expression of desaturase and elongase genes during pupal and adult development[J]. *Insect Biochem Mol Biol*, 2014, 50: 68–81.
- [26] Dong XL, Li QJ, Zhang HY. The *noa* gene is functionally linked to the activation of the Toll/Imd signaling pathways in *Bactrocera dorsalis* (Hendel). *Dev Comp Immunol*, 2016, 55: 233–240.
- [27] Zheng TX, Li HS, Han N, et al. Functional characterization of two elongases of very long-chain fatty acid from *Tenebrio molitor* L. (Coleoptera: Tenebrionidae). *Sci Rep*, 2017, 7(1): 10990.
- [28] Zuo WD, Li CL, Luan Y, et al. Genome-wide identification and analysis of elongase of very long chain fatty acid genes in the silkworm, *Bombyx mori*. *Genome*, 2018, 61(3): 167–176.
- [29] Chou KC, Shen HB. A new method for predicting the subcellular localization of eukaryotic proteins with both single and multiple sites: Euk-mPLOC 2.0. *PLoS ONE*, 2010, 5(4): e9931.
- [30] Li MZ, Mai KS, He G, et al. Characterization of two  $\Delta^5$  fatty acyl desaturases in abalone (*Haliotis discus hannai* Ino). *Aquaculture*, 2013, 416–417: 48–56.
- [31] Sassa T, Kihara A. Metabolism of very long-chain Fatty acids: genes and pathophysiology. *Biomol Ther* (Seoul), 2014, 22(2): 83–92.
- [32] Jakobsson A, Westerberg R, Jacobsson A. Fatty acid elongases in mammals: their regulation and roles in metabolism. *Prog Lipid Res*, 2006, 45(3): 237–249.
- [33] Denic V, Weissman JS. A molecular caliper mechanism for determining very long-chain fatty acid length. *Cell*, 2007, 130(4): 663–677.
- [34] Blomquist GJ, Nelson DR, de Renobales M. Chemistry, biochemistry, and physiology of insect cuticular lipids. *Arch Insect Biochem Physiol*, 1987, 6(4): 227–265.
- [35] Lee SH, Stephens JL, Paul KS, et al. Fatty acid synthesis by elongases in trypanosomes. *Cell*, 2006, 126(4): 691–699.
- [36] Ohtsu T, Kimura MT, Katagiri C. How *Drosophila* species acquire cold tolerance--qualitative changes of phospholipids. *Eur J Biochem*, 1998, 252(3): 608–611.

(本文责编 郝丽芳)