

深黄被孢霉 M_{6-22} Δ^6 -脂肪酸脱氢酶基因 在酿酒酵母中的表达*

刘 莉 李明春 胡国武 张 丽 邢来君**

(南开大学微生物系 天津 300071)

摘 要:应用 PCR 技术,从含有深黄被孢霉 Δ^6 -脂肪酸脱氢酶基因的重组质粒 pTMICL6 中,扩增出 1.38kb 的目的片段,亚克隆到大肠杆菌和酿酒酵母的穿梭表达载体 pYES2.0,在大肠杆菌中筛选到含有目的基因的重组质粒 pYIMID6,用醋酸锂方法转化到酿酒酵母的缺陷型菌株 INVScl 中,在 SC-Ura 合成培养基中,选择到酵母工程株 YIMID6。在合适的培养基及培养条件下,加入外源底物亚油酸,经半乳糖诱导后,收集菌体。通过 GC-MS 对酵母工程株所含的全部脂肪酸进行色谱分析,结果表明, γ -亚麻酸的含量占酵母总脂肪酸的 8.69%。

关键词:深黄被孢霉,酿酒酵母, γ -亚麻酸, Δ^6 -脂肪酸脱氢酶基因,表达

中图分类号:Q786 **文献标识码:**A **文章编号:**0001-6209 (2001) 04-0397-05

被孢霉属 (*Mortierella*) 是一类可以产生多烯不饱和脂肪酸的低等真菌,被广泛应用于 γ -亚麻酸的发酵生产^[1]。 γ -亚麻酸 (γ -linolenic acid, GLA) 作为人体必需的不饱和脂肪酸,目前在国际上已作为一种新的维生素-维生素 F 被研究应用^[2]。当前仅限于从部分高等植物的种子和一些低等真菌及某些藻类生产 GLA。在真菌中,不饱和脂肪酸是通过整合膜脂肪酸脱氢酶作用在内质网上形成的,是在脂酰基链连续脱氢形成双键^[3]。 Δ^6 -脂肪酸脱氢酶 (Δ^6 -fatty acid desaturase, D6D) 是将亚油酸 (linoleic acid, LA, 18:2 $\Delta^9,12$) 的第六位碳原子脱氢转化为 γ -亚麻酸 (18:3 $\Delta^6,9,12$), 然后通过 C 链延长和脱氢作用进一步形成花生四烯酸、前列腺素类和白三烯类生理活性物质^[4]。因此, Δ^6 -脂肪酸脱氢酶是 γ -亚麻酸生产中的关键酶,国外在八十年代末期和九十年代初期开始进行这方面的研究工作。1993 年首先由美国的 Reddy 等人,从产生 γ -亚麻酸的单细胞蓝细菌 (*Synechocystis* sp. PCC6803) 分离出 Δ^6 -脂肪酸脱氢酶基因,并在另一株不产生 γ -亚麻酸的蓝细菌 (*Anabaena* sp.) 中表达产生 γ -亚麻酸^[5]。1997 年 Sayanova 等人报道从高等植物玻璃苣 (*Borago officinalis*) 中克隆了 Δ^6 -脱氢酶基因并转入烟草中获得表达^[6]。1999 年, Huang Y SH 等人报道了从高山被孢霉中克隆该基因并在酿酒酵母中表达^[7]。本文以本研究室通过常规诱变育种,得到的一株高产 GLA 的深黄被孢霉 (*Mortierella isabellina*) M_{6-22} ^[8] 为材料,将深黄被孢霉通过 RT-PCR 克隆到的 Δ^6 -脂肪酸脱氢酶基因,转入酿酒酵母缺陷型 INVScl 菌株中,得到产 GLA 的酵母工程菌。这是国际上对深黄被孢霉 M_{6-22} 的 D6D 基因在酿酒酵母中表达的首次报道。

* 国家自然科学基金项目 (39870020) 和高等学校骨干教师资助计划项目

** 联系人 (E-mail: xinglaij@tj.cnuninet.net)

作者简介: 刘 莉 (1967 -), 女, 博士, 研究方向: 真菌分子生物学。

收稿日期: 2000-10-08, 修回日期: 2001-01-18

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株与质粒:大肠杆菌 DH5 α , 深黄被孢霉 (*Mortierella isabellina*) M₆₋₂₂, 南开大学真菌实验室保存。质粒 pTMCL6, 本室构建。酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 营养缺陷型 INVSc1 及表达载体 pYES2.0 购自 Invitrogen 公司。

1.1.2 培养基的配制:大肠杆菌的 LB 培养基, 见文献[9], 深黄被孢霉的 PDA 培养基, 见文献[8], 酵母营养缺陷型按 Invitrogen 公司操作手册进行, 诱导表达的培养基按文献[10]。

1.1.3 酶、抗生素及化学试剂:实验所用的限制性内切酶 *Eco*RI、*Xho*I, 氨苄青霉素(贮存液 50mg/mL, 使用终浓度 60 μ g/mL), 购自华美生物工程公司, PCR 用 Taq 酶、dNTP 及亚油酸为上海 Sangon 公司产品, NP-40 购自 Sigma 公司。

1.2 方法

1.2.1 D6D 基因的扩增:以本室构建含有深黄被孢霉的 D6D 基因的质粒 pTMCL6 为模板, 根据 Dnasis 软件对该基因序列的分析及与酵母载体多克隆位点的匹配, 设计如下引物, 上游引入 *Eco*RI 位点, 下游引入 *Xho*I 位点。

引物 P1: 5'-TAGGCTGAATTCATGGCTGCTGCTCCCAGTGTGAGGACG-3'

引物 P2: 5'-AACTGCCTCGAGTTACTGCGCCTTACCCATCTTGGAGGC-3'

均由上海 Sangon 公司合成。扩增方法为: 94 $^{\circ}$ C 变性 2 min 后, 以 94 $^{\circ}$ C 1 min, 55 $^{\circ}$ C 1 min, 72 $^{\circ}$ C 2 min 条件, 30 个循环后, 72 $^{\circ}$ C 10 min。

1.2.2 大肠杆菌感受态细胞的制备与转化:PCR 产物的纯化, 与载体连接、转化, 重组子的酶切鉴定, 大肠杆菌感受态细胞的制备与转化等分子克隆技术按常规方法^[9]进行。

1.2.3 酵母感受态细胞的制备与转化:按文献[11]方法进行。

1.2.4 酵母工程菌的诱导方法:用醋酸锂法转化到酿酒酵母缺陷型 INVSc1 中, 通过合成培养基的选择筛选到含有深黄被孢霉的 D6D 基因的酵母工程株 YMID6, 在缺少尿嘧啶的 SC 培养基上, 28 $^{\circ}$ C 培养过夜, 以 5% 的接种量加入含有 1% NP-40, 4% 棉子糖的 SC-Ura 培养基中。加入外源底物亚油酸, 使其浓度达到 0.5 mmol/L。28 $^{\circ}$ C 继续培养。当酵母细胞的密度达到 5×10^6 细胞/mL 时, 加入 2% 半乳糖诱导, 20 $^{\circ}$ C 培养 72 h, 收集菌体。

1.2.5 重组基因表达产物样品的制备:酵母菌体经去离子水洗涤三次, 50 $^{\circ}$ C 烘干。研碎后, 加入 5% 的 KOH-CH₃OH 溶液, 70 $^{\circ}$ C 反应 3h, 再加入 14% BF₃-CH₃OH, 70 $^{\circ}$ C 反应 1.5h, 形成脂肪酸甲酯。用 1:4 的氯仿:己烷抽提两次, 合并提取液。加入适量无水 Na₂SO₄ 干燥提取液, 静置 1h, 去掉 Na₂SO₄, 用氮气吹干。用少许正己烷回溶, 备用。

1.2.6 重组基因表达产物样品的测定:以 Sigma 公司生产的 GLA 甲酯为标准品, 正己烷为溶剂, 采用文献^[12]方法测定样品。仪器为岛津 GC-7A, 柱子: DEGS 0.25 mm \times 25 m, 分流比: 100:1, 柱温: 180 $^{\circ}$ C, 尾吹: 50mL/min, 气化室温度: 250 $^{\circ}$ C, 检测器: 氢火焰离子化检测器。

2 结果和讨论

2.1 表达载体的构建

PCR 扩增出的目的带大小为 1.38 kb, 与预期的相符, 把载体 pYES2.0 及 PCR 产物分

别用 *Eco*RI 及 *Xho*I 双酶切,电洗脱回收后连接,转化大肠杆菌 DH5 α 。

2.2 阳性克隆的筛选

从 LB 的 Amp 平板上随机选取转化子,小量提取质粒,经酶切及 PCR 鉴定,筛选到阳性克隆 pYIMID6。用 *Eco*RI、*Xho*I 双酶切 pYES2.0 及 pYIMID6,结果如图 1。pYIMID6/*Eco*RI/*Xho*I 有 5.9kb 及 1.38kb 两条带,pYES2.0 有 5.9kb 一条带,与预期结果完全相符。

2.3 D6D 基因在酿酒酵母中的表达

把 pYIMID6 重组质粒转化酿酒酵母缺陷型 INVSc1,在 SC-Ura 培养基上挑选到含有深黄被孢霉的 D6D 基因的酿酒酵母工程株 YIMID6。YIMID6 的脂肪酸经甲酯化后,经 GC-MS 分析,如图 2 所示,我们共做了六个样品的测定,分别是:GLA 甲酯标准品(图 2-a),受体菌 INVSc1(图 2-b),酵母工程菌 YIMID6 中

只加底物亚油酸(LA)(图 2-c),只加诱导物半乳糖(GAL)(图 2-d),同时加底物亚油酸和诱导物半乳糖的空载体 pYES2.0 的酵母菌(图 2-e),YIMID6(图 2-f)。经对比发现,只有酵母工程菌株在同时加底物亚油酸和诱导物半乳糖时,具有出峰时间为 13.793min 的特殊峰(图 2-f 中用→所示),与标准品 GLA 的出峰时间 13.747min 相对应,说明深黄被孢霉的 D6D 基因在酿酒酵母中获得表达,YIMID6 的 GLA 表达量占其总脂肪酸的 8.69%。

所选的受体菌酿酒酵母的 INVSc1 本身不产生亚油酸及 GLA(图 2-b),因此,必须加入外源底物。由于重组质粒启动子为 GAL1,必须加入诱导物半乳糖才能诱导 D6D 表达。所以,基因工程菌株 YIMID6 在仅有诱导物 GAL(图 2-c),仅有外源底物 LA(图 2-d),没有 D6D 基因的空载体 YES2.0 的酵母菌(图 2-e),与标准品相比,均没有 GLA 相对应的特殊峰。只有在加入外源底物 LA,同时有诱导物 GAL 存在的情况下,D6D 基因才能被表达(图 2-f)。

一般说来,选择合适的载体和受体菌对表达外源基因非常重要。酿酒酵母的分子生物学研究取得迅速发展,遗传背景已经非常清楚,具有比大肠杆菌更完备的基因表达调控机制和表达产物的加工修饰及分泌能力。因此,酵母作为基因工程的表达系统特别是表达真核生物基因方面得到广泛应用^[13]。本项研究中,选择不产生 GLA 的酿酒酵母营养缺陷型 INVSc1 为受体菌,含有 GAL1 启动子的表达载体 pYES2.0。pYES2.0 是一种酵母游离型质粒,也是一种穿梭质粒,它在大肠杆菌和酵母菌中都稳定存在。它带有酵母 GAL1 启动子,受半乳糖的诱导,但可被葡萄糖阻遏,不受棉子糖的影响。它携带的 URA3 基因能互补 *ura3* 突变型的酵母菌,可作为筛选标记。在大肠杆菌中可用氨苄抗性作为筛选标记。在实验中,分别使用葡萄糖、棉子糖作为表达培养基的碳源,结果表明,4%的葡萄糖

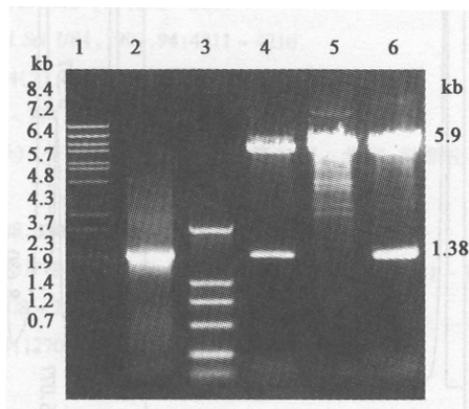


图 1 重组质粒 pYIMID6 和载体 pYES2.0 酶切鉴定的琼脂糖凝胶电泳图

Fig.1 Agarose gel electrophoresis of pYIMID6 and pYES2.0 digested with restriction enzymes

1. DNA size marker λ DNA/*Bst* II ; 2. PCR product of D6D cDNA;
3. DNA marker DL2000 (2000bp, 1000bp, 750bp, 500bp, 250bp, 100bp);
4. pYIMID6/*Eco*RI/*Xho*I; 5. pYES2.0/*Eco*RI/*Xho*I;
6. pYIMID6/*Eco*RI/*Xho*I.

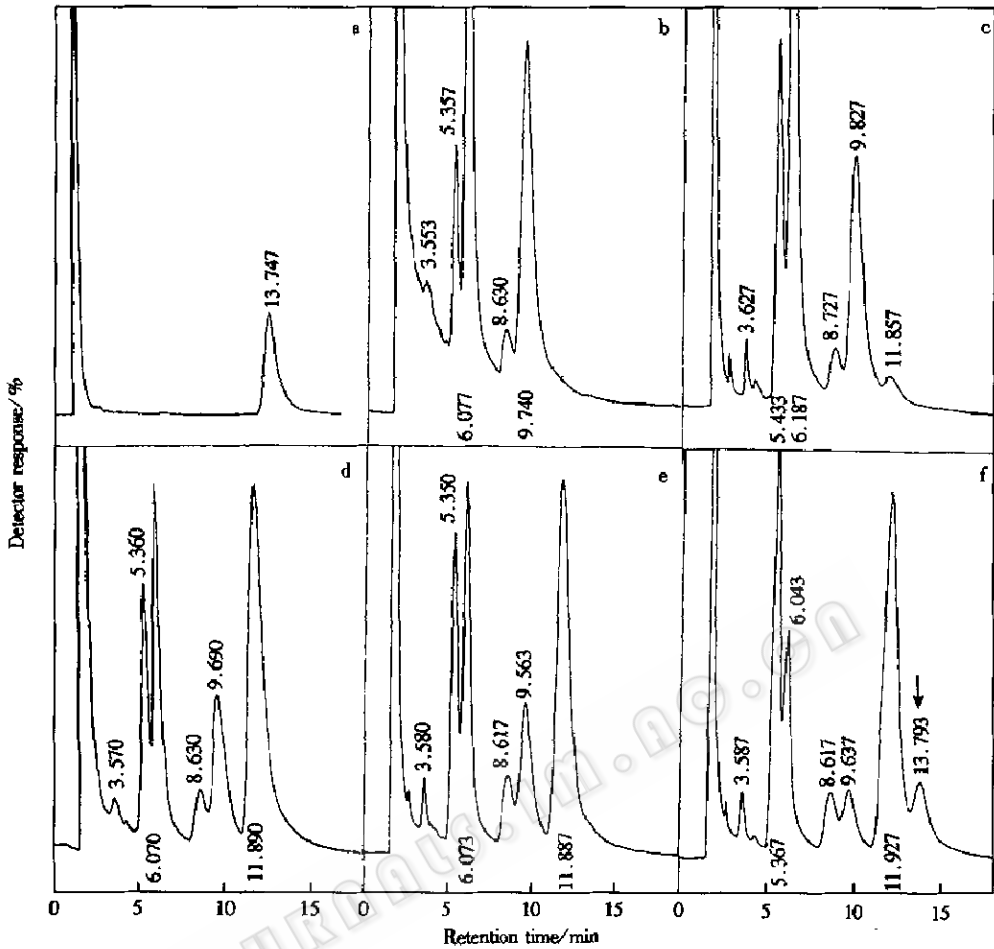


图2 酿酒酵母总脂肪酸的气相色谱分析图

Fig.2 GLC chromatograms of fatty acid methyl esters obtained from the control strain and YMID6

(a).GLA standard; (b).INVScl host strain; (c).YMID6/GLA; (d).YMID6/LA;

(e).INVScl/YES2.0; (f).YMID6/LA/GAL.

对 D6D 基因的表达有一定的阻遏作用,该条件下酵母工程株中 GLA 的含量很低或检测不到(资料没有列出),因此,选用棉子糖作了碳源。同时在表达的培养基中加少许表面活性剂 NP-40,以使底物亚油酸在培养基中充分分散,有利于酵母菌利用底物亚油酸。亚油酸进入酵母菌中,在深黄被孢霉的 D6D 基因表达的重组酶的作用下,在酵母细胞内完成亚油酸的 C6 脱氢,形成产物 GLA。说明深黄被孢霉 D6D 基因在酿酒酵母中表达成功。该研究首次将深黄被孢霉的 D6D 基因在酿酒酵母中表达,为 GLA 的大量生产打下了坚实的基础,同时,对真菌分子生物学的研究有一定的作用。

参 考 文 献

- [1] Horrobin D F. *Prog Lipid Res*, 1992, 31(2): 163 ~ 194.
- [2] Tsunehiro A, Ysayoi S, Katsuya I, et al. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1999, 255: 575 ~ 579.
- [3] Sprecher H. *Prog Lipid Res*, 1981, 20: 13 ~ 22.

- [4] Deborah S K, Jennifer M T, Huang Y SH, *et al.* *J Biol Chem*, 1998, **273**(45):29360 ~ 29366.
- [5] Reddy A S, Nuccio M L, Gross L M, *et al.* *Plant Mol Biol*, 1993, **27**(7):293 ~ 300.
- [6] Sayanova O, Smith M A, Lapinskas P, *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, **94**:4211 ~ 4216.
- [7] Huang Y SH, Sunita C, Jennifer M T, *et al.* *Lipids*, 1999, **34**(7):649 ~ 659.
- [8] 邢来君, 钟 辉, 周 辉, 等. 真菌学报, 1996, **15**(4):272 ~ 277.
- [9] J 萨姆布鲁克, E F 佛里奇, T 曼尼阿蒂斯(金冬雁等译). 分子克隆实验指南. 第二版. 北京:科学出版社, 1993. 463 ~ 468.
- [10] Napier J A, Sandra J H, Dominic J L, *et al.* *Biochem J*, 1998, **330**:611 ~ 614.
- [11] A 亚当斯, D E 戈特施林, C A 凯泽特, 等. 酵母遗传学方法实验指南. 北京:科学出版社, 2000. 81 ~ 82.
- [12] Eiji S, Michihiko K, Sakayu S. *Eur J Biochem*, 1999, **260**:208 ~ 216.
- [13] 王洪海, 高卜渝, 陈佩丽, 等, 中国科学(B 辑), 1994, **24**:1270 ~ 1276.

IDENTIFICATION OF *MORTIERALLA ISABELLINA* $M_{6-22} \Delta^6$ -FATTY ACID DESATURASE BY HETEROLOGOUS EXPRESSION IN *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* *

Liu Li Li Mingchun Hu Guowu Zhang Li Xing Laijun

(Department of Microbiology, Nankai University, Tianjin 300071, China)

Abstract: Using plasmid pTMICL6 containing Δ^6 -fatty-acid desaturase gene from *Mortierella isabellina* M_{6-22} as a template, 1.38kb DNA fragment was amplified by PCR. The fragment was subcloned into the yeast-*E. coli* shuttle vector pYES2.0, then an expression recombinant plasmid pYMID6 containing target gene was constructed. The pYMID6 was transformed into *Saccharomyces cerevisiae* for expression by LiAc method. It was found to exhibit Δ^6 -fatty acid desaturase activity in the recombinant *S. cerevisiae* YMID6 in the presence of exogenous fatty acid substrate linoleic acid under introduction of GAL. Expression of the Δ^6 -fatty acid desaturase gene under appropriate media and temperature conditions led to the production of γ -linolenic acid reached 8.69% of the total yeast fatty acid by GC-MS detection. It is the first report about expression of *M. isabellina* D6D gene in *S. cerevisiae*.

Key words: *Mortierella isabellina*, *Saccharomyces cerevisiae*, γ -linolenic acid, Δ^6 -fatty acid desaturase gene, Expression

* This work was supported by the National Nature Science Foundation(39870020) and the project to subsidize core teachers in colleges and universities.