

被孢霉 cDNA 文库的构建及 Δ^9 脂肪酸脱饱和酶 cDNA 序列的筛选*

张羽航** 林炜铁 姚汝华

(华南理工大学食品与生物工程学院 广州 510641)

鲍时翔 郑学勤

(中国热带农业科学院热带作物生物技术国家重点实验室 海口 571101)

摘 要: 为了克隆被孢霉不饱和脂肪酸生物合成途径的相关酶基因, 构建了基于 λ gt10 的被孢霉 cDNA 文库。cDNA 文库库容量为 2×10^6 pfu。以已克隆的被孢霉 Δ^9 脂肪酸脱饱和酶保守区 cDNA 为探针对被孢霉 cDNA 文库进行筛选。经过两轮筛选获得 1 个阳性克隆, 其插入片段长度大于 1.6kb。

关键词: 被孢霉, Δ^9 脂肪酸脱饱和酶, cDNA 文库, 多不饱和脂肪酸

中图分类号: Q781 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209(2000)06-0610-13

多不饱和脂肪酸(Polyunsaturated fatty acid, 简称 PUFA)对心脏病、高血压、炎症(如哮喘、关节炎及牛皮癣)和某些癌症的预防和治疗均有显著效果。近年来广泛研究采用被孢霉发酵法生产 PUFA^[1]。由于不饱和脂肪酸是以甘油三酯的形式存在于菌体内, 致使常规物理化学诱变育种工作不但工作量大, 而且效率低, 回复突变较高^[2,3]。基因工程育种具有常规育种无法比拟的优势。通过对不饱和脂肪酸生物合成途径关键酶在分子水平上的调节, 有可能大幅度提高菌种不饱和脂肪酸的合成能力。作为改造生产菌株的第一步, 必须首先克隆被孢霉不饱和脂肪酸生物合成途径的相关酶基因, 并在分子水平上理解它们的作用与调节机制。因此我们首先构建了被孢霉 cDNA 文库。

Δ^9 脂肪酸脱饱和酶催化反应是在软脂酰 CoA 和硬脂酰 CoA 第 9、10 位碳原子间脱氢形成一个双键, 产生棕榈油酰 CoA 和油酰 CoA。因此它是决定微生物脂肪酸不饱和程度的关键酶。我们已经克隆了被孢霉 Δ^9 脂肪酸脱饱和酶基因保守区的 cDNA 序列^[4]。为了获得 Δ^9 脂肪酸脱饱和酶基因全序列, 我们以此 cDNA 序列为探针进行了 cDNA 文库筛选工作。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌种和质粒: 被孢霉菌(*Mortierella* sp.)M10 华南理工大学发酵工程博士点保存。pDZ1 为本实验室克隆的 *Mortierella* sp. M10 Δ^9 脂肪酸脱饱和酶保守区序列与

* 海南省自然科学基金(39803) 中国热带农业科学院基金和热带作物生物技术国家重点实验室基金资助

**现在工作单位: 南京大学生物化学系(邮政编码 210008)

收稿日期: 1999-04-07, 修回日期: 1999-09-20

pGEM-T Easy 载体的重组质粒。

1.1.2 试剂 QuickPrep mRNA 纯化试剂盒和 TimeSaver cDNA 合成试剂盒为 Pharmacia 公司产品。 λ gt10 载体与包装蛋白购自 Promega 公司。DIG DNA 标记混合物和噬菌斑杂交膜为 Boehringer Mannheim 公司产品。Taq DNA 聚合酶、限制酶及其它工具酶购自 PE 公司或华美生物工程公司。其它常规试剂均为进口分装或国产分析纯试剂。

1.2 方法

1.2.1 培养基和培养方法 培养基和培养方法按文献 [5] 进行。

1.2.2 mRNA 的提取与纯化 菌种经液体培养,抽滤收集菌丝体,水洗 3 次置 4℃ 放置 20min。加入液氮研磨成粉末状后,按 Pharmacia 公司 QuickPrep mRNA 纯化试剂盒的使用说明提取 mRNA。

1.2.3 cDNA 合成 以所提取的被孢霉 mRNA 为模板,按 Pharmacia 公司 TimeSaver cDNA 合成试剂盒所附方法合成 cDNA。用 spin column 纯化 cDNA 后,在 T4DNA 连接酶作用下在 cDNA 两端接上 *Eco*RI/*Not*I 衔接头。-20℃ 保存备用。

1.2.4 cDNA 与 λ gt10 载体的连接 取 120 μ L 合成的 cDNA,依次加入 12 μ L λ gt10 载体、13 μ L 3M 的醋酸钠和 330 μ L 冰乙醇。混匀后置于 -70℃ 沉淀。离心沉淀,重溶于 32 μ L 无核酸酶的水中。加入 4 μ L T4 连接酶缓冲液和 4 μ L T4DNA 连接酶 4℃ 连接过夜。

1.2.5 连接产物的包装和滴度测定 连接产物的包装和铺板测定滴度按文献 [6] 的方法进行。合并包装混合物并在 *E. coli* C600 平板上测定 cDNA 文库容量。

1.2.6 DIG 标记探针的制备 在 PCR 反应体系中 DIG 标记的 dUTP 与 dTTP 的比例为 3:1。上游引物为:5' CATCGGCTATGGTCGCATCG3', 下游引物为:5' CGTGGT-GAAAGTTGTG3'。以 pDZ1 为模板,95℃ 变性 10min 后进行 PCR 循环。反应参数为 94℃ 变性 30s,55℃ 退火 1min,72℃ 延伸 1min。40 次循环后,在 72℃ 继续延伸 10min。-20℃ 保存。

1.2.7 被孢霉 cDNA 文库筛选 被孢霉 cDNA 文库的筛选参照文献 [7,8] 进行。采用上述制备的 DIG 标记 Δ^9 脂肪酸脱饱和酶基因保守区探针进行筛选。杂交液为含 50% 甲酰胺的标准杂交液,42℃ 杂交过夜。杂交结束后室温 2×SSC 洗膜两次,每次 5min。0.5×SSC 68℃ 洗膜两次,每次 15min。按 DIG 核酸检测试剂盒使用说明进行检测。用挖块法将筛选出的阳性噬斑琼脂块置于 1mol/L SM 缓冲液中,加入一滴氯仿。室温扩散 1~2h,重新铺板进行复筛。

1.2.8 cDNA 插入片段的分析 用挖块法将筛选出的阳性噬斑琼脂块置于 1mol/L 噬菌体缓冲液中,加入一滴氯仿。液体培养制备噬菌体裂解物。采用 Wizard Lambda Preps 纯化系统提取纯化 λ DNAs。用 *Eco*RI 和 *Not*I 酶切消化 λ DNAs,1% 琼脂糖凝胶电泳分析 cDNA 插入片段的大小。

2 结果和讨论

2.1 被孢霉 mRNA 的制备与鉴定

被孢霉在培养温度下降时不饱和脂肪酸的生物合成有一定增加。因此为了富集不饱和脂肪酸生物合成途径有关酶的 mRNA,在提取纯化 mRNA 前将收获的菌丝体置于 4℃

冷刺激 20min。

从 0.5g 被孢霉 (*Mortierella* sp.) M10 菌丝体分离纯化得到 8 μ g mRNA, 测定其 OD_{260}/OD_{280} 比值为 1.97, 说明纯度较好。取少量 mRNA 进行甲醛变性琼脂糖凝胶电泳, 主要的 mRNA 条带 (0.5kb~8.0kb) 清晰 (图未示)。

2.2 被孢霉 cDNA 文库的构建

因为难于确定可与 λ gt10 两臂相连接的 cDNA 末端的摩尔浓度, 所以必须进行预连接和滴度测定实验, 以确定最优连接比例。由实验可知 10 μ L cDNA 和 1 μ L λ gt10 的连接比例得到的结果最佳。因此采用 10 μ L cDNA 和 1 μ L λ gt10 载体的比例建立连接反应。的通过四个包装反应对所有连接反应产物进行包装。在 *E. coli* C600 上测定文库滴度得到构建的被孢霉 cDNA 文库库容量为 2×10^6 pfu。cDNA 插入片段的大小对 cDNA 文库的完整性有重要影响。随机挑取以 C600 为宿主的重组噬菌斑, 液体培养后提取 λ DNA。EcoRI 酶切 λ DNA 后 1% 琼脂糖凝胶电泳分析插入片段的大小。由图 1 可知 cDNA 插入片段在 0.95kb~1.70kb 之间且大小各异, 平均大小大于 1kb。这说明 cDNA 合成反应理想, cDNA 文库具相当完整性。

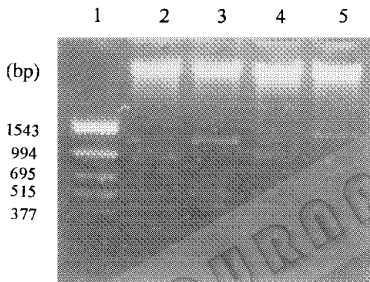


图 1 cDNA 插入片段的分析

Fig. 1 Analysis of cDNA insert

1. PCR Marker ; 2~5. Random plaque.

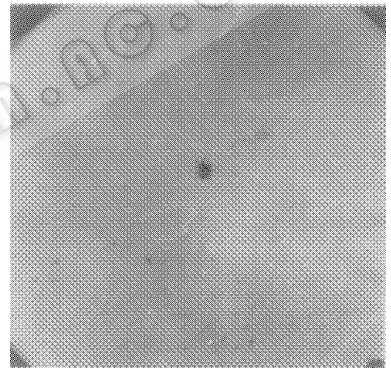


图 2 第一轮筛选得到的阳性噬菌斑

Fig. 2 Positive signal displayed on hybridization

2.3 文库筛选

采用 *E. coli* C600hfl 为铺板菌株。该菌带有 hfl⁻ 突变可以使亲本 λ gt10 所形成的噬菌体减少到原来的 1/50~1/100, 从而使铺板形成的噬菌斑中非重组噬菌体的数目大为减少。在直径 90mm 的平板上铺约 1.5×10^4 噬菌斑。以 DIG 标记被孢霉 Δ^9 脂肪酸脱饱和酶基因保守区探针对其中 7.5×10^4 噬菌斑进行杂交, 筛选到 6 个阳性克隆 (图 2)。取少量从阳性噬菌斑洗脱的噬菌体悬液稀释, 以每板 500 个噬菌斑的密度铺板进行复筛, 筛选得到清晰明确的阳性噬菌斑 (图 3)。经酶切鉴定后得到一个插入片段大于 1.6kb 的阳性克隆 (图 4)。目前我们已将此插入片段亚克隆到 pGEM-7zf 的 EcoRI 位点中, 对此 cDNA 的全序列分析工作正在进行中。

近年来微生物油脂基因工程在国外受到广泛关注, 而国内在此领域一直未展开研究工作。被孢霉作为目前多不饱和脂肪酸生产的主要菌株, 对其进行基因工程改造具有特殊意义。有关脂肪酸脱饱和酶基因的克隆目前也是刚刚起步, 且主要集中于酵母菌。我们成功构建了被孢霉文库并开始筛选包括脂肪酸脱饱和酶在内的有关脂肪酸合成途径酶

基因 将为进一步改造被孢霉生产菌提供条件。

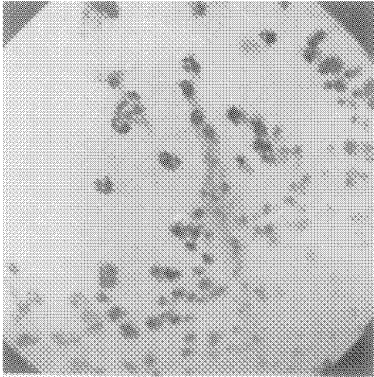


图 3 第二轮筛选得到的阳性噬菌斑

Fig. 3 Positive plaque after two rounds of screening

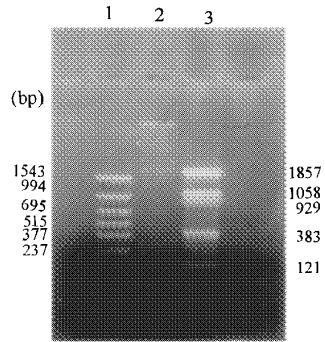


图 4 插入片段的酶切分析

Fig. 4 Enzymatic digest of cDNA insert of positive clone
1. PCR marker; 2. *EcoRI* digest; 3. pBR322/*BstNI* marker.

参 考 文 献

- [1] 张羽航, 林炜铁, 鲍时翔, 等. 中国油脂, 1998, 23(1): 42~45.
[2] 杨 革, 王玉萍, 李翔太, 等. 菌物系统, 1998, 17(1): 86~90.
[3] 李明春, 刑来君. 微生物学通报, 1998, 25(1): 9~12.
[4] 张羽航, 彭世清, 鲍时翔, 等. 菌物系统, 1999, 18(2): 210~214.
[5] 鲍时翔, 朱法科, 林炜铁, 等. 微生物学报, 1998, 37(5): 374~377.
[6] Promega corporation. Protocol and Application Guide. Third Edition, Madison, WI, 1996.
[7] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular Cloning: A laboratory Manual. 2nd ed. Cold Spring Harbor, NY: CSHL press, 1989.
[8] Boehringer Mannheim. The DIG system user's guide for filter hybridization. Boehringer Mannheim GmbH, Biochemica, 1995.

CONSTRUCTION OF cDNA LIBRARY OF *MORTIERELLA* AND SCREENING OF Δ^9 FATTY ACID DESATURASE cDNA SEQUENCE*

Zhang Yuhang Lin Weitie Yao Ruhua

(College of Food and Bioengineering, South China University of Technology, Guangzhou 510641)

Bao Shixiang Zheng Xueqin

(National Key Laboratory for Tropical Crops, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Haikou 571737)

Abstract: *Mortierella* species have potential for fermentative production of polyunsaturated fatty acids including γ -linolenic acid, Arachidonic acid and EPA, etc. In order to clone genes encoding enzymes in the unsaturated fatty acid biosynthetic pathway, cDNA library of *Mortierella* was constructed using λ gt10 vector. Using cDNA encoding conserved region of Δ^9 fatty acid desaturase gene as probe, *Mortierella* cDNA library was screened. After two rounds of screening one positive clone was identified which has insert length of larger than 1.6kb.

Key words: *Mortierella*, Δ^9 fatty acid desaturase, cDNA library, Unsaturated fatty acid (PUFA)

* This work is supported by Natural Science Foundation of Hainan Province and Chinese Academy of Tropical Agricultural Science Grants.
© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>