

高山被孢霉 Δ^6 -脂肪酸脱氢酶基因的克隆、结构 分析及其功能的研究*

李明春 刘 莉 胡国武 邢来君**

(南开大学微生物系 天津 300071)

摘 要:从高山被孢霉 ATCC16266 总 DNA 中扩增出大小为 1374bp 和 1947bp 的两条特异片段,序列分析表明后者在细胞色素 b5 和组氨酸 I 之间含有一大小为 573bp 的内含子和两条分别为 197bp 和 828bp 的外显子。推导的氨基酸二级结构分析表明,该基因有两个长的跨膜疏水区和 3 个组氨酸保守区。分别根据 D6D 内含子及组氨酸 II 区、III 区的序列设计引物,制备不同的探针与高山被孢霉的基因组杂交,证明在其基因组中确实存在两个 Δ^6 -脂肪酸脱氢酶基因,其中一个基因含有内含子。把不含有内含子的核基因 MAGL6-1 克隆到的酿酒酵母表达载体 pYES2.0 中,转化到酿酒酵母 INVSc1 中。对筛选得到的酵母工程菌株进行脂肪酸 GC 分析,检测到了 γ -亚麻酸,说明克隆的 D6D 基因 MAGL6-1 能在酿酒酵母中进行功能性表达。

关键词:高山被孢霉 Δ^6 -脂肪酸脱氢酶基因 基因组 内含子

中图分类号:Q786 文献标识码:A 文章编号:1001-6209(2003)02-0220-08

γ -亚麻酸(γ -linolenic acid, GLA)是人体一种必需脂肪酸,对人体的激素调节及脂肪酸代谢发挥着重要的生理作用。 Δ^6 -脂肪酸脱氢酶(Δ^6 -fatty acid desaturase, D6D)催化亚油酸(LA)的第 6 位碳原子脱氢形成 GLA^[1]。D6D 是 GLA 生产中的关键酶,自九十年代初期由美国的 Reddy 等人^[2]首次报道了从产生 GLA 的单细胞蓝细菌(*Synechocystis* sp.)PCC6803 分离出 D6D 基因,并在另一株不产生 GLA 的蓝细菌(*Anabaena* sp.)中表达产生 GLA 以来,先后又从植物琉璃苣^[3]、丝状真菌高山被孢霉^[4]、线虫^[5]等克隆到了该基因,并在啤酒酵母和烟草中进行了表达,使原不产生 GLA 的酵母和烟草产生了 GLA。近年来,有关其基因结构和功能的研究引起了广泛关注。2000 年, Sperling 等人^[6]报道从苔藓(*Ceratodon purpureus*)中克隆了具有双重功能的 Δ^6 -脂肪酸脱氢酶/炔化酶,不仅可以在亚油酸 C6 上脱氢形成亚麻酸,而且还可以在该位置上继续脱氢,形成一个炔键。2001 年, Hastings 等人^[7]从脊椎动物斑马鱼(*Zebrafish*)中克隆了同时具有 Δ^5 、 Δ^6 -脂肪酸脱氢酶两种活性的脱氢酶,但该酶对底物具有选择性,对 n-3 底物的活性要比 n-6 底物的活性高。本研究根据目前已知的 D6D 基因序列,设计引物,对高山被孢霉 ATCC16266 的总 DNA 进行 PCR 扩增,首次报道了从高山被孢霉的基因组中克隆到两个 D6D 核基因,其中一个含有 573bp 的内

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

** 通讯作者。E-mail: xinglaj@eyou.com

作者简介:李明春(1968-),女,副教授,主要从事微生物学及分子真菌学研究工作。

收稿日期:2002-08-09,修回日期:2002-11-11

含子,同时用 Southern 杂交验证了此结果,并将不含内含子的 D6D 基因在酿酒酵母中进行了功能性表达。

1 材料和方法

1.1 菌株和质粒

高山被孢霉(*Mortierella alpina*) ATCC 16266, *E. coli* JM109 为本实验室保存。酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)营养缺陷型 INVSc1 及表达载体 pYES2.0 购自 Invitrogen 公司。

1.2 培养基

LB 和 PDA 培养基见文献[9]表达培养基按 Invitrogen 公司操作手册配制。

1.3 分子克隆用酶、试剂盒及化学试剂

T-vector 试剂盒 随机引物标记试剂盒购自 Promega 公司;Taq DNA 聚合酶,多功能回收试剂盒,UNIQ-10 柱式基因组 DNA 试剂盒及 PCR 引物合成均购自上海 Sangon 生物工程公司;限制性内切酶购自华美生物工程公司;其它常规试剂为进口分装或国产分析纯。

1.4 基因组 DNA 的提取

高山被孢霉 ATCC16266 在 PDA 液体培养基中 28℃,180r/min 振荡培养 48h 后,抽滤收集菌体,并用磷酸盐缓冲液洗涤。液氮研磨细胞后,按上海 Sangon 生物工程公司提供的 UNIQ-10 柱试剂盒的使用说明提取高山被孢霉的基因组总 DNA。

1.5 PCR 的克隆策略及条件

参照已发表的高山被孢霉的 Δ^6 -脂肪酸脱氢酶基因序列^[4],设计两组引物如下:

P1 5'-TTTGTCCCTGATCATCCCGGTGG-3' (正链)

P2 5'-AGGGAACAAGTGGTCTCAATCTG-3' (负链)

P3 5'-TAGGCTGAATTCATGGCTGCTGCTCCCAGTGTGAGGACG-3' (正链)

P4 5'-AACTGCCTCGAGTTACTGCGCCTTACCCATCTTGGAGGC-3' (负链)

在引物 P3 引入 *Eco*RI 位点,引物 P4 引入 *Xho*I 位点,对 D6D 结构基因进行扩增。PCR 条件为 94℃ 20min 热启动 94℃ 1min 55℃ 1min 72℃ 2min 30 个循环 72℃ 10min。

PCR 扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳分离后切下相应大小的带,采用 UNIQ-10 柱多功能试剂盒回收纯化 PCR 产物,然后按照 pGEM-T vector 说明书进行连接,转化到 *E. coli* JM109 中,根据蓝白斑筛选转化子,对转化子按常规方法进行酶切和 PCR 鉴定后,送交大连宝生物公司测序。得到的基因组 DNA 及相应的氨基酸序列与 GenBank 数据库中的序列使用 Dnasis, Prosis 软件进行分析比较。

1.6 探针的制备及 Southern 杂交

根据内含子两端序列设计 P5 和 P6 引物,以含有内含子的 D6D 基因的质粒 pTMA-GL6-2 为模板进行扩增,得到 573bp 的内含子片段;根据 D6D 基因组氨基酸 II 区、III 区设计 P7 和 P2 引物,以含有 D6DcDNA 序列的质粒 pTMAC16 为模板进行扩增,得到 597bp 的 D6D 基因保守区片段。

P5 5'-CTGAAGCTTATGCTAAGACGATTGCTGT-3' (正链)

P6 5'-CGTGAATTCTTACTACATGAAGAAAAA-3' (负链)

P7 5'-TGGTGGAAGACAAGCACAACAC-3' (正链)

P2 5'-AGGGAACAAGTGGTGCTCAATCTG-3' (负链)

上述两条 PCR 产物分别用 Songong 多功能试剂盒回收纯化后,采用 Promega 公司随机引物试剂盒,利用 α - ^{32}P dCTP(北京亚辉医学工程公司)标记探针。提取高山被孢霉基因组 DNA,其大小均集中于 50kb 左右,分别用限制性内切酶部分酶切基因组 DNA,并于 0.8% 琼脂糖凝胶上进行分离。于真空转膜仪 50mbar 条件下将 DNA 转移到尼龙膜上,然后将膜在紫外交联仪中照射 5min。分别用内含子和保守区探针于 50℃ 预杂交 6~8h,杂交过夜后,杂交膜先于室温 $2\times\text{SSC}$ 0.5% SDS 下洗两次,每次分别为 15min;再于 42℃ $1\times\text{SSC}$ 0.5% SDS 下洗两次,每次分别为 15min;然后 -70℃ 放射自显影,详细方法见文献 [8]。

1.7 基因功能的分析

把没有内含子的核基因 MAGL6-1 亚克隆到酿酒酵母的表达载体 pYES2.0 中,得到阳性质粒 pYMAGL6-1,以空载体为对照,用醋酸锂的方法转化到酿酒酵母缺陷型菌株 INVSc1 中。酵母转化方法、酵母工程菌株的诱导方法及重组产物的分析方法同文献 [9]。

2 结果

2.1 高山被孢霉 Δ^6 -脂肪酸脱氢酶基因的 PCR 扩增及测序载体的筛选

以根据 D6D 基因 Cytb₅ 区 HPGG 和组氨酸 III 区 QIEHHLFP 序列设计的 P1/P2 为引物,以纯化后的总 DNA 为模板进行 PCR 扩增,得到两条 DNA 带,大小分别为 1071bp 和 1644bp。测序结果表明这两条序列属于 D6D 的基因片段。进而参照已知 D6D 基因的起始和终止序列设计了 P3/P4 引物,以扩增高山被孢霉 Δ^6 -脂肪酸脱氢酶结构基因,从总 DNA 中 PCR 扩增出大小分别为 1374bp (AF465281) 和 1947bp (AF465283) 的两条特异性片段。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳,回收纯化,与载体 pGEM-T 连接、转化到 *E. coli* JM109 中,经酶切及 PCR 鉴定,筛选到阳性克隆,带有高山被孢霉核基因的阳性克隆分别命名为 pTMAGL6-1 (1374bp) 及 pTMAGL6-2 (1947bp),鉴定结果图略。

2.2 克隆片段的序列分析

测序结果表明,高山被孢霉核基因 MAGL6-1 为 1374bp,核基因 MAGL6-2 为 1947bp,均含有 Cytb₅ 区 HPGG 及 3 个组氨酸保守区 HX₃H I 区、HX₃HH II 区和 HHLFP III 区,结果如图 1 用黑体所示。

同时,把克隆到的两个核基因的序列与本实验室已报道的高山被孢霉 Δ^6 -脂肪酸脱氢酶全长 cDNA 序列 MACL6 (AF307940)^[9] 进行比较发现,在 Cytb₅ 区 HPGG 与组氨酸保守 I 区 HX₃H 之间有一个长度为 573 bp 的内含子(位置 196bp~769bp)。该内含子剪接的供体信号为 GT,受体信号为 AG,内含子的序列如图 1 小写字母所示。且核基因 MAGL6-2 与全长 cDNA MACL6 相比,只有一个内含子的差别,MAGL6-2 去掉内含子后,与 MACL6 的基因序列完全一致,而核基因 MAGL6-1 和全长 cDNA MACL6 只在第 257 位和 433 位有 2 个核苷酸的差别,编码的氨基酸也有两个不同,这种不同可能是由于高山被孢霉种内株系间的变化或在 PCR 扩增过程中 Taq 酶错配造成的。从高山被孢霉基因组 DNA 中克隆出两个 D6D 基因是国际上的首次报道,并发现其中一个含有内含子,不含有内含子的 D6D 基因与国外已发表的高山被孢霉 D6D 核苷酸序列的最大同源性为 94%,与植物琉璃苣为

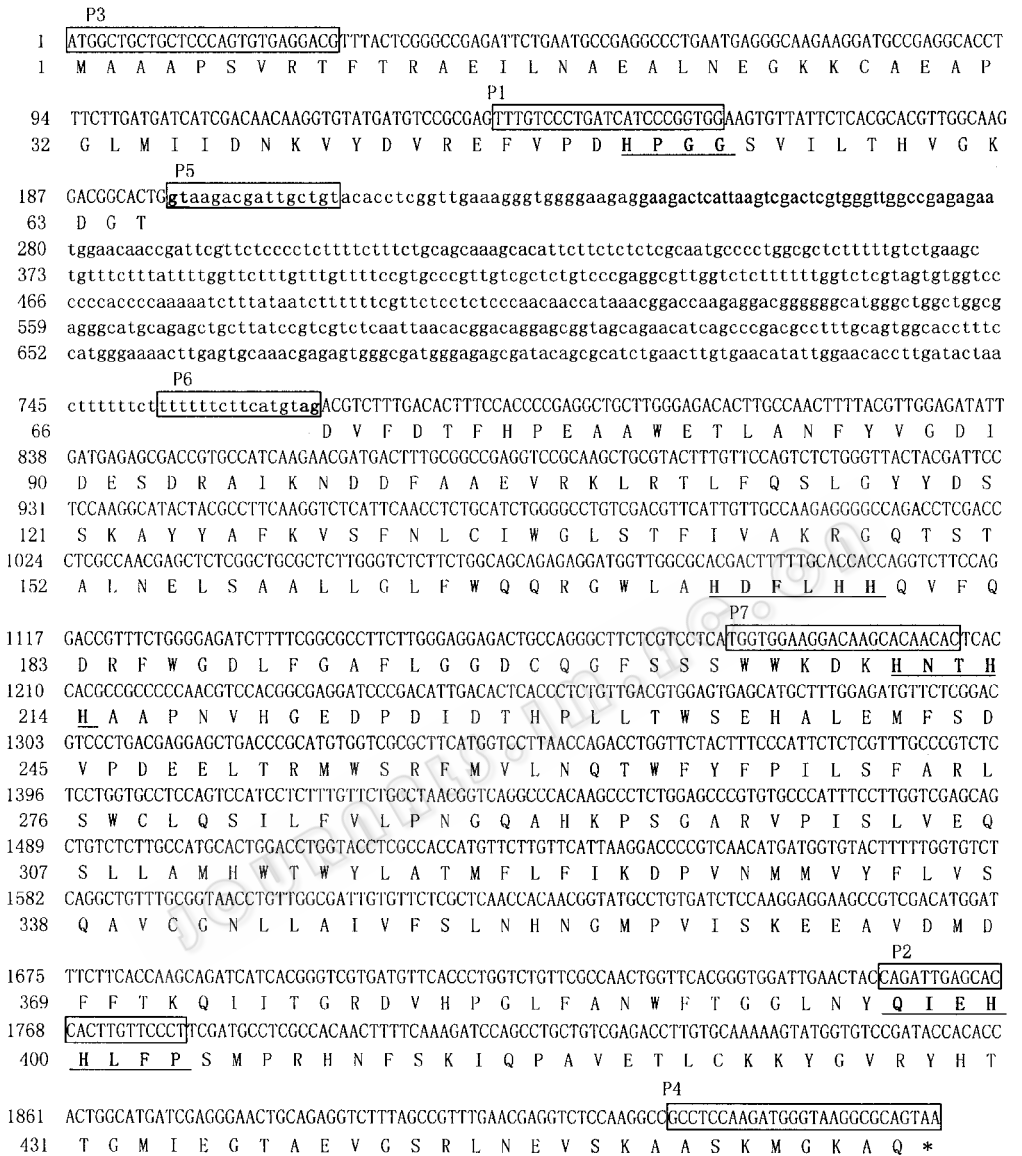


图 1 高山被孢霉 Δ^6 -脂肪酸脱氢酶基因(MAGL6-2)核苷酸序列及推导的氨基酸序列

Fig.1 Nucleotide and deduced amino acid sequences of the Δ^6 -fatty acid desaturase gen(MAGL6-2)from *Mortierella alpina*. The intron (196 ~ 769bp) is shown in lower case letters. The unique GT-end in the 5'-terminus of the intron is highlighted. Eight histidine residues including in three-histidine-cluster motifs are highlighted and underlined. The sequence reported in this paper has been deposited in the GenBank.(accession number cDNA ,AF307940 ;genomic DNA ,AF465283).

53% ,与线虫为 55% ,与蓝细菌为 54%。D6D 基因部分序列测序的结果与全长基因测序的结果相符。

2.3 Southern 杂交

提取高山被孢霉基因组 DNA ,分别用 3 种限制性内切酶 *Eco* R I、*Hind* III、*Xho* I 对基

基因组 DNA 进行部分酶切 ,大小均集中在 2 ~ 4kH (图 2-A) 。先用内含子探针进行杂交 ,后用保守区探针进行杂交 ,图 2-B 是以内含子为探针的 Southern 杂交 ,3 种酶切的结果均有一条明显的杂交带 ,图 2-C 是以保守区为探针的 Southern 杂交 ,在相应的位置上均有两条杂交带 ,大小在 2 ~ 5kb 之间。本研究中所选用的内切酶都是 D6D 基因内部没有该限制酶的酶切位点 ,每一条杂交带代表一个基因片段。以内含子片段作为探针 ,杂交后得到一条杂交带 ,而用保守区片段作为探针 ,分别得到两条杂交带。因为这两个核基因均有保守区 ,保守区探针能和两个基因分别杂交 ,而其中一个基因没有内含子 ,所以用内含子为探针 ,只有一条杂交带 ,说明在高山被孢霉中 ,的确存在两个 D6D 核基因 ,与测序结果相符。

2.4 D6D 基因 MAGL6-1 在酿酒酵母中的表达

为了验证得到的 D6D 基因的功能性 ,我们把不含有内含子的 D6D 核基因 MAGL6-1 亚克隆到酿酒酵母表达载体 pYES2.0 ,在大肠杆菌中筛选到含有目的基因的重组质粒 pYMA-GL6-1 ,用醋酸锂法^[10]转化到酿酒酵母缺陷型菌株 INVSc1 中 ,以空载体 pYES2.0 为对照 ,在 SC-Urc 培养基上筛选到对照菌株和含有高山被孢霉 D6D 的阳性工程菌株 YMAGL6-1。按照 Invitrogen 公司的操作手册 ,加入外源底物亚油酸 ,在半乳糖的诱导下 ,28℃ 培养 72h 收集菌体 ,经脂肪酸甲酯化后 ,用气相色谱法分析其脂肪酸组分。结果如图 3 所示 ,3B 为酿酒酵母受体株 ,本身不含亚油酸 ,而含有空载体的对照株 (3C) 在加入亚油酸后与工程菌株 (3E) 相比 ,在出峰时间为 13.8 时明显有一个特殊峰 (如箭头所示) ,与 γ -亚麻酸标准品 (3D) 的出峰时间 13.747 一致。这是由于高山被孢霉 MAGL6-1 外源基因的导入 ,使原来不产 GLA 的酵母菌在加入底物亚油酸的情况下 ,产生了 GLA。说明这个基因的功能是在亚油酸的第六位碳原子上脱氢 ,形成一个双键 ,得到产物 GLA ,具有 D6D 基因功能。而高山被孢霉的 D6D 核基因 MAGL6-2 在剪接掉内含子后 ,同 MACL6 的序列相同 (该部分工作已报道)。

3 讨 论

3.1 高山被孢霉 D6D 基因的结构特征分析

通过对已知物种 D6D 基因的序列分析 ,发现它们具有共同的结构特点 ,都存在 3 个组氨酸保守区即 I 区 HX₃H、II 区 HX₃HH、III 区 HHLFP ,除了蓝细菌外 ,均有细胞色素 b₅ (Cytb₅) 区 HPGG。脂肪酸脱氢酶拓扑学模型分析 ,3 个组氨酸保守区全部位于脂肪酸脱氢酶的亲水区域。用 Prosis 软件对核基因 MAGL6-1 推导的氨基酸序列的二级结构进行疏水性分析 ,结果如图 4 所示 ,分离的基因具有 D6D 基因的典型结构特征 ,且有两个长的跨膜

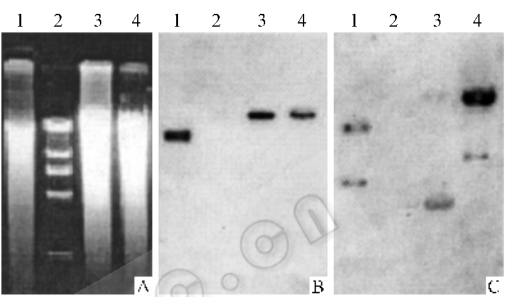


图 2 高山被孢霉基因组 Southern 杂交分析

Fig.2 Genomic southern blot analysis of *Mortierella aplanina*

A. Agarose gel electrophoresis genomic total DNA from *M. aplanina* were digested with *Eco*RI , *Hind*III and *Xho*I ; B. Genomic southern blot hybridization with D6D intron as probe ; C. Southern blot with D6D conserved region as probe .
1. MAgDNA/ *Xho*I ; 2. DNA marker ; 3. MAgDNA/ *Eco*RI ; 4. MAgDNA/ *Hind*III .

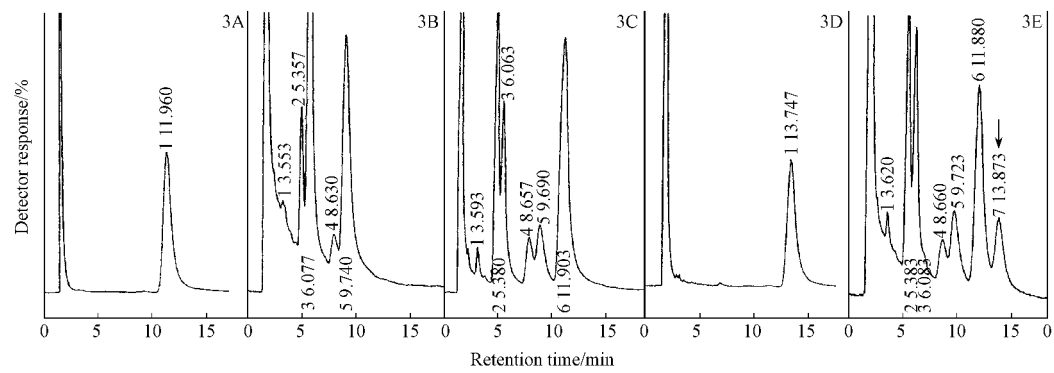


图 3 酿酒酵母总脂肪酸的气相色谱分析图

Fig.3 Gas chromatographic analysis of fatty acid methyl esters from total lipids of *S. cerevisiae* grown under inducing conditions
3A. Substrate linoleic acid ;3B. Acceptor strain INVSc1 ;3C. Yeast transformed with pYES2.0 ;
3D. γ -linolenic acid standard ;3E. Yeast transformed with pYAGL6-1.

疏水区,用黑线条表示 3 个组氨酸保守区在图中用带方框的 H 表示 3 个组氨酸保守区全部位于亲水区一侧,两个疏水的跨膜区穿过膜四次,与 3 个组氨酸保守区组成 D6D 的催化中心。

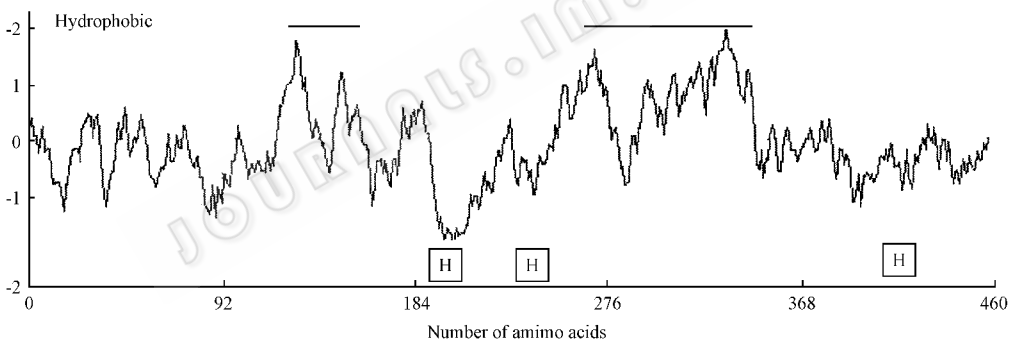


图 4 高山被孢霉 D6D 基因 (MAGL-1) 疏水区的分析

Fig.4 Hydropathy profile of Δ^6 -fatty acid desaturases gene (MAGL-1) of *Mortierella alpina*
The hydropathic pattern for D6D gene was plotted using the method of Kyte-thr, and the amino acid sequence was predicted by the respective ORF. Bars, the transmembrane regions. Boxed H, locations of histidine-rich regions.

从高山被孢霉总 DNA 中克隆到两个 D6D 基因的片段 MAGL6-1 和 MAGL6-2 ,MAGL6-2 剪接内含子后与本室报道的从 cDNA 中克隆的 D6D 基因 MACL6 序列相同,说明从 cDNA 中克隆到的序列可能是 D6D 核基因 MAGL6-2 经过 mRNA 加工后得到。Southern 杂交的结果很好地验证了高山被孢霉存在两个 D6D 基因。迄今为止,在丝状真菌高山被孢霉中克隆到两个 D6D 基因尚属国内外首次报道,其中一个含有 573bp 的内含子,该内含子以典型的 GT 开始,以 AG 结尾,遵守一类内含子的剪接规律^[11]。

断裂基因中内含子的剪接序列不是随机的。本研究所分离的 D6D 基因内含子的剪接供体遵守 ACTGGT 的保守序列,受体为 TAGA,与报道的受体序列 TAG/G 相似^[12]。其

次,在该内含子 3'端的上游第 6 位起是富含嘧啶的区域,共有 11 个 T 和 3 个 C。在酵母内含子中,3'端富含多聚嘧啶,有利于接剪复合体的识别,在一个蛋白或 RNA-蛋白复合体通过直接结合识别供体,通过剪接系统结合在多聚嘧啶来识别 AG 而完成剪接^[13]。酵母内含子的大小为 551bp,同我们报道 D6D 核基因 MAGL6-2 中的内含子大小相似。通过对该内含子的序列和结构进行分析,发现在该内含子的 3'端的上游的第 24 位起有 TCCTA-AC 的保守序列,即在多聚嘧啶区的上游。该保守序列可以与其 5'端 GT 形成 lariat 结构^[14],形成 5'端剪切的分支位点,这一点同酵母内含子一样。而在高等的真核生物中,这个区域的保守性不强。该内含子的 GC 含量为 49.6%,与植物的内含子含有较高的 AT 含量有所不同。高山被孢霉 D6D 核基因内含子的发现,有助于了解低等真菌的基因结构,进而了解基因的表达与调控的机制。

3.2 高山被孢霉 D6D 基因在酿酒酵母中的功能性分析

在酿酒酵母中表达高山被孢霉 D6D 基因 MAGL6-1,在没有供给外源底物亚油酸时,或者有底物存在,含有空载体的对照菌株和野生型菌株中均没有新的特征峰出现,只有在含有目的基因的酵母工程株中出现与标准品 GLA 一致的特征峰出现,说明该基因具有 Δ^6 -脂肪酸脱氢酶功能,可以在亚油酸的第六位的碳原子上脱氢,形成 GLA。而另外的一个核基因 MAGL6-2 剪接掉内含子后,同该基因 cDNA 的序列完全一致,说明该基因是 MAGL6 基因的转录前体物。在酿酒酵母表达体系中,受体菌是尿嘧啶缺陷型 INVSc1,它本身只含有 Δ^9 -脂肪酸脱氢酶,即只有油酸,而没有 LA 和 GLA。因此,只要在酵母工程菌中检测到产物 LA 和 GLA,就可以确定外源基因的功能。所以酿酒酵母已经作为研究外源的 Δ^{12} 、 Δ^6 -脂肪酸脱氢酶基因功能性鉴定的最常用、最有效的表达系统,且有许多成功的报道。所以,本文也选用该表达系统,来确定所分离基因片段的功能。

参 考 文 献

- [1] Gunstone F D. Gamma linolenic acid occurrence and physical and chemical properties. *Prog Lipid Res*, 1992, **31**(2):145 ~ 161.
- [2] Reddy A S, Nuccio M L, Gross L M, et al. Isolation of a Δ^6 -desaturase gene from the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC6803 by gain-of-function expression in *Anabaena* sp. strain PCC7120. *Plant Mol Biol*, 1993, **27**:293 ~ 300.
- [3] Sayanova O, Smith M A, Lapinskas P, et al. Expression of a borage desaturase cDNA containing an N-terminal cytochrome b5 domain results in the accumulation of high levels of Δ^6 -desaturated fatty acids in transgenic tobacco. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, **94**:4211 ~ 4216.
- [4] Huang Y S H, Sunita C, Jennifer M T, et al. Cloning of Δ^{12} - and Δ^6 -desaturase from *Mortierella alpinia* and recombinant production of γ -linolenic acid in *Saccharomyces cerevisiae*. *Lipids*, 1999, **34**(7):649 ~ 659.
- [5] Napier J A, Sandra J H, Dominic J L, et al. Identification of a *Caenorhabditis elegans* Δ^6 -fatty-acid-desaturase by heterologous expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem J*, 1998, **330**:611 ~ 614.
- [6] Petra S, Michael L, Thomas G, et al. A bifunctional Δ^6 -fatty acyl acetylenase/desaturase from the moss *Ceratodon purpureus*. *Eur J Biochem*, 2000, **267**:3801-3811.
- [7] Nicola H, Morris A, Douglas R T, et al. A vertebrate fatty acid desaturase with Δ^5 and Δ^6 activities. *Biochemistry*, 2001, **25**:14304-14309.
- [8] 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.
- [9] 刘莉, 李明春, 邢来君, 等. 高山被孢霉 ATCC16266-脂肪酸脱氢酶基因在酿酒酵母中的表达. 生物工程学报. © 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

2001, 17(2):161~164.

- [10] 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.
- [11] Zihua Hu, Jonathan E P. Sequencing genomic organization and preliminary promoter analysis of a *Black cherry* (R)(+) mandelonitrile lyase gene. *Plant Physiol*, 1997, 115:1359~1369.
- [12] Mount S M. A catalogue of splice junction sequences. *Nucleic Acids Research*, 1982, 10:459~472.
- [13] Bruce P, Christine G. A U-rich tract enhances usage of an alternative 3'splice site in yeast. *Cell*, 1991, 64:181~187.
- [14] Robin R, Tom M. Intron sequence involved in lariat formation during pre-mRNA splicing. *Cell*, 1985, 41:95~105.

Studies on the Cloning, Structure and Function of the Δ^6 -Fatty Acid Desaturase Genes from *Mortierella alpine**

Li Mingchun Liu Li Hu Guowu Xing Laijun**

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

Abstract: The genomic genes were cloned from the fungal strain, *Mortierella alpine* ATCC16266, through PCR with primer pairs designed on information of conserved region of the Δ^6 -fatty acid desaturase genes from the several different species. Results show genomic DNA sequences in 1347bp and 1947bp respectively. Comparison of the genomic and cDNA sequences revealed that the D6D gene from genomic DNA had an 573bp intron, ranging from 196 to 769 nucleotides in length and locating of between the Cytb₃ and His I regions. The exons are 196bp and 828bp. Furthermore, genomic southern blot analysis with the *M. alpine* Δ^6 -fatty acid desaturase cDNA and intron fragments as the probes respectively confirmed that there are two D6D genes in *M. alpine*. The one gene doesn't contain a intron named MAGL-1, another gene contains a intron named MAGL-2. Then, the gene MAGL-1 was subcloned into the yeast-*E. coli* shuttle vector pYES2.0, thus expression recombinant plasmid containing *M. alpine* ATCC16266 D6D gene was constructed. The plasmid was introduced into *Saccharomyces cerevisiae* for expression by LiAc method. When linoleic acid was provided as an exogenous substrate to the yeast culture expressing Δ^6 -fatty acid desaturase activity under appropriate media and temperature conditions, the recombinant *S. cerevisiae* had γ -linolenic acid by GC detecting, not normally present in wild-type yeast cells. This results indicated that the gene encoded functional Δ^6 -fatty acid desaturase. It is first report that there are two D6D genes in *M. alpine*.

Key words: *Mortierella alpine*, Δ^6 -fatty acid desaturase gene, Genomics, Intron

* This work was supported by the national natural science foundation of China(39870020) and the project to subsidize core teachers in colleges and universities.

** Corresponding author. E-mail: xinglaij@eyou.com