

雅致枝霉 Δ^6 -脂肪酸脱氢酶基因的克隆 及在酿酒酵母中的表达

王德培 李明春 魏东盛 张颖慧 邢来君*

(南开大学微生物系 天津市微生物功能基因组学重点实验室 天津 300071)

摘 要 根据真菌 Δ^6 -脂肪酸脱氢酶基因保守的组氨酸 II 区和 III 区附近保守序列设计兼并引物进行 RT-PCR,得到雅致枝霉(*Thamnidium elegans*) As3.2806 Δ^6 -脂肪酸脱氢酶基因 459bp 部分 cDNA 序列,然后通过快速扩增 cDNA 末端技术(RACE)向两端延伸得到 1504bp 的 Δ^6 -脂肪酸脱氢酶基因全长 cDNA 序列。序列分析表明有一个 1377bp,编码 459 个氨基酸的开放阅读框 TED6。推测的氨基酸序列与已知其他真菌的 Δ^6 -脂肪酸脱氢酶基因的氨基酸序列比对,具有 3 个组氨酸保守区、2 个疏水区及 N 末端细胞色素 b5 融合区。将此编码区序列亚克隆到酿酒酵母缺陷型菌株 INVSc1 的表达载体 pYES2.0 中,构建表达载体 pYTED6,并在酿酒酵母 INVSc1 中异源表达。通过气相色谱(GC)和气相色谱/质谱(GC-MS)分析表明,该序列在酿酒酵母中获得表达,产生 γ -亚麻酸(GLA)的含量占酵母总脂肪酸的 7.5%。证明此序列编码的蛋白能将外加的亚油酸转化为 γ -亚麻酸,是一个新的有功能的 Δ^6 -脂肪酸脱氢酶基因(GenBank, AY941161)。

关键词 雅致枝霉; Δ^6 -脂肪酸脱氢酶基因; γ -亚麻酸; 酿酒酵母; 表达

中图分类号: Q78 文献标识码: A 文章编号: 1001-6209(2006)01-0074-06

γ -亚麻酸(γ -linolenic acid, GLA)作为人体一种必需脂肪酸,被认为是具有重要生理活性物质前列腺素 PG-I 和 PG-II 的前体^[1],对人体的激素调节及脂肪酸代谢发挥着重要的生理作用。 γ -亚麻酸是通过 Δ^6 -脂肪酸脱氢酶将亚油酸的第六位碳原子脱氢转化形成的,因此, Δ^6 -脂肪酸脱氢酶是 γ -亚麻酸生产中的关键酶,并成为国内外学者的研究热点。自九十年代初期由美国的 Reddy 等人^[2]首次报道了产生 γ -亚麻酸的单细胞兰细菌(*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 -亚麻酸的兰细菌(*Anabaena* sp.)中成功表达以来,先后从植物琉璃苣^[3],丝状真菌高山被孢霉^[4],线虫^[5]等克隆到了该基因,并在酿酒酵母和烟草中进行了表达。2000 年, Sperling 等^[6]报道从苔藓(*Ceratodon purpureus*)中克隆到具有双重功能的 Δ^6 -脂肪酸脱氢酶基因,不仅可以在亚油酸 C6 上脱氢形成亚麻酸,而且可以在该位置上继续脱氢,形成一个按键。2003 年 Y. Michinaka^[7]报道了在卷枝毛霉中克隆到两个 Δ^6 -脂肪酸脱氢酶同工酶基因,而且

在低温下表达量存在明显差异。雅致枝霉是一种可以在低温条件下生长的毛霉目低等丝状真菌, Manocha 等^[8]报道在低温诱导下雅致枝霉不仅产生 γ -亚麻酸还可产生 α -亚麻酸,这在低等丝状真菌是首次发现,因此克隆和分析雅致枝霉 Δ^6 -脂肪酸脱氢酶基因,对研究低温诱导不饱和脂肪酸合成的调节具有重要的意义。本文采用 RT-PCR 及 RACE 方法得到一段 1504bp 的全长 cDNA 序列。对长度为 1377bp 的开放阅读框架进行了功能性表达。这是国际上首次从雅致枝霉克隆到 Δ^6 -脂肪酸脱氢酶基因并在酿酒酵母中进行功能性验证的报道。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒 雅致枝霉(*Thamnidium elegans* As3.2806)购于中国科学院微生物研究所;大肠杆菌(*Escherichia coli* DH5 α)由本实验室保藏,质粒载体 pGEM-T 购自 Promega 公司;酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae* INVSc1)营养缺陷型及表达载体 pYES2.0

基金项目:国家自然科学基金资助(30200176);天津市自然科学基金(013802511)

* 通讯作者。Tel 86-22-23508506; Fax 86-22-23508800; E-mail: xinglaij@eyou.com

作者简介:王德培(1972-),女,辽宁锦州人,天津科技大学教师,南开大学在读博士研究生,研究方向为分子真菌学、酶工程。E-mail: shiyao218@eyou.com

其他作者:孙伟

收稿日期:2005-09-09;接受日期:2005-10-13;修回日期:2005-10-27

购自 Invitrogen 公司。

1.1.2 主要试剂和仪器 :所有 DNA 分子量标准、DNA 限制性内切酶购自 TaKaRa 公司 ,X-Gal、IPTG、*Taq* DNA 聚合酶购自北京鼎国生物公司 ,氨苄青霉素、NP-40 及亚油酸购自 Sangon 公司 ,脂肪酸甲酯标准品购自 Sigma 公司 ,反转录试剂盒和 pGEM-T 载体为 Promega 公司产品 , SMRT™ RACE cDNA Amplification Kit 为 Clontech 公司产品。气相色谱仪

为岛津 GC-7A。

1.1.3 培养基的配制 :大肠杆菌 LB 培养基 ,见文献 [9] 雅致枝霉 PDA 培养基 ,见文献 10 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 11]

1.1.4 引物合成和测序 :引物合成由北京奥科公司完成 ,引物序列及用途(表 1)。测序均由上海生工完成。

表 1 克隆雅致枝霉 Δ^6 -脂肪酸脱氢酶全长 cDNA 所用引物

Table 1 Primers used for the cloning of full-length cDNA of <i>Thamnidium elegans</i> Δ^6 -desaturase gene		
No.	Primers (5' - 3')	Application
P1	TTGGTGGAAG (G/A)AA (C/A)AA (C/T)AA (C/T) (G/T)CA	Partial cDNA amplification , forward primer
P2	ACIGGCATTC (A/G)TT (A/G)TT (A/G)TT	Partial cDNA amplification , reverse primer
P3	GTAGCAACGCTATCAGATGG	3'RACE forward primer
P4	CTGATCTAGAGGTACCGATCC	3'RACE reverse primer
P5	CTGATCTAGAGGTACCGATCCTTTTTTTTTTTTTTTTTT	Revers transcription primer of 3'RACE
P6	GGCTGTGTCAATGTCGGGATCCT	5'RACE reverse primer
P7	CTAATACGACTCACTATAGGGC	5'RACE forward primer
P8	CAC GGTACCATGAGTACATTAGATCGTCAA	ORF amplification , forward primer , black words is <i>Kpn</i> I restriction enzyme
P9	GGCT GAATTCAAACGACTTTTTGCTTAATTGC	ORF amplification , reverse primer , black words is <i>Eco</i> R I restriction enzyme

1.2 部分 cDNA 序列的 RT-PCR

按上海生工的 UNIQ-10 TRIzol 总 RNA 提取试剂盒方法 ,从液体培养 36h 的雅致枝霉中抽滤获得菌丝体然后液氮研磨提取总 RNA。按反转录试剂盒要求 ,取 1 μ g 总 RNA 为模板 ,Olig(dT)₅ 为反转录引物 ,70℃ 变性 10min ,冰浴 5min ,然后分别加入 , 5 μ L10 \times RT buffer ,2 μ L MgCl₂ (25mmol/L) ,0.5 μ L asin RNair(40U/ μ L) ,0.5 μ L AMV(20U/ μ L) ,加水补至 20 μ L 42℃ 反应 1h ,95℃ 加热 10min 终止反应 ,合成第一条 cDNA , - 20℃ 备用。

根据已报道深黄被孢霉(*Mortierella alpina*)^[12] , 卷枝毛霉(*Mucor circinelloides*)^[7]、畸雌腐霉(*Pythium irregulare*)^[13]、少根根霉(*Rhizopus arrhizus*)^[14] 的 Δ^6 -脂肪酸脱氢酶基因同源序列组氨酸保守区 HisII (WWKNKHNTTH)和另一氨基酸保守区的氨基酸序列(HNGMPV)设计简并引物 P1 和 P2 ,取 2 μ L cDNA 进行 PCR。扩增条件 :94℃ 变性 3min ; 94℃ 1 min , 37℃ 2 min ,72℃ 1min 5 个循环 ; 94℃ 1 min ,57℃ 2 min ,72℃ 1.5 min ,30 个循环 ; 72℃ 10min。将 PCR 产物回收并克隆到 pGEM-T 载体上 ,转化 *E. coli* DH5 α ,蓝白斑筛选和酶切鉴定阳性克隆 ,挑选正确的阳性克隆测序。

1.3 全长 cDNA 的扩增

1.3.1 3'cDNA 末端扩增(3'RACE) :以 P5 作为反转

录引物 ,按上述方法反转录合成第一条 cDNA。根据已获得的部分 cDNA 序列设计基因特异性引物 P3 与 3'RACE 下游引物 P4 进行 3'cDNA 末端扩增 ,条件 94℃ 变性 3min ; 94℃ 1 min ,57℃ 1 min ,72℃ 1 min ,30 个循环 ,72℃ 10min。将 PCR 产物回收并克隆到 pGEM-T 载体上 ,挑选正确的阳性克隆测序。

1.3.2 5' cDNA 末端扩增(5' RACE) :按 SMRT™ RACE cDNA Amplification Kit 要求 ,取 1 μ g 总 RNA 为模板 ,合成第一条 cDNA ,以 P7 和特异性引物 P6 进行 5'cDNA 末端的扩增。条件为 94℃ 变性 3min ,然后按 94℃ 1min ,60℃ 1min ,72℃ 2min ,30 个循环 ; 72℃ 10min。将 PCR 产物回收并克隆到 pGEM-T 载体上 ,挑选正确的阳性克隆测序。

1.3.3 序列拼接 :将部分 cDNA 序列和 3'和 5'RACE 获得的序列用 DNAMAN Version4.0 进行序列拼接 ,结合测序峰图进行序列校正 ,最后获得拼接好的序列。

1.3.4 全长 cDNA 的扩增 :根据序列拼接结果设计两端引物 P8 和 P9 ,按 94℃ 1min ,58℃ 1min ,72℃ 2min 30 个循环 ,将 PCR 产物回收并克隆到 pGEM-T 载体上构建质粒 pTTED6。引物 P8 和 P9 中黑体表示在 5'和 3'端引入的酶切位点 *Kpn* I、*Eco*R I。

1.4 酿酒酵母表达质粒的构建

提取的含有雅致枝霉 Δ^6 -脂肪酸脱氢酶基因的质粒 pTTED6 用 *Km* I、*Eco*R I 双酶切 ,回收并与以

同样双酶切的质粒 pYES2.0 连接,构建得到新质粒 pYTED6(图1),并转化到大肠杆菌 DH5 α ,以 Amp⁺ 筛选阳性转化子,提取质粒 pYTED6 冻存-20℃备用。

1.5 酿酒酵母工程菌的构建

1.5.1 酿酒酵母感受态细胞的制备与转化 按文献[15]方法进行操作。

1.5.2 酿酒酵母工程菌的诱导 按文献[15]方法进行操作。

1.6 酵母工程菌的脂肪酸甲酯化

按文献[15]方法进行。

1.7 脂肪酸的气相色谱分析(Gas Chromatography, GC)

柱子:弹性石英毛细管柱 0.32 × 30m,固相支持物:聚二乙二醇丁二酸酯(Poly-diethylene glycol succinate, DEGS)镀膜物:聚酰亚胺。载气:N₂,线速:10cm/s。分流比:100:1,气化室温度:250℃,柱温:180℃,尾吹:50mL/min,检测器:氢火焰离子化检测器。以 Sigma 公司生产的 GLA 甲酯为标准品,上海生工公司产 LA 甲酯化后为底物对照。把上述方法制备的脂肪酸甲酯化的样品,进行 GC 分析,上样量为 1 μ L。分析软件:ANSTAR,分析之星色谱工作站。

2 结果

2.1 雅致枝霉 Δ^6 -脂肪酸脱氢酶基因 cDNA 扩增

根据已报道的深黄被孢霉、卷枝毛霉、畸雌腐霉、少根根霉的 Δ^6 -脂肪酸脱氢酶同源序列中保守的组氨酸富集区 II(WWKNKHNT)和同源性较高的区域(HNGMPV)的氨基酸序列设计简并引物进行 RT-PCR,获得长度约为 500 bp 的片段。将片段回收后,测序结果显示所扩增得到的片段全长为 459 bp,编码 153 个氨基酸。通过其编码的氨基酸序列在 GenBank 数据库中用 BLAST(Basic Local Alignment Search Tool)进行相似性搜索,结果显示该 cDNA 所编码的氨基酸序列和所搜索得到的序列的相同性在 29%~65%,表明已获得的 cDNA 序列可能是编码 Δ^6 -脂肪酸脱氢酶基因的部分序列。

在获得部分 cDNA 序列的基础上,采用 cDNA 末端快速扩增(RACE)技术进行两个末端序列的扩增。根据所获得的部分 cDNA 序列设计基因特异性引物,进行 3'和 5'cDNA 末端扩增,结果分别获得约 500bp 和 800bp 的片段,测序分析结果显示,3'cDNA 末端扩增获得长度为 499bp 的序列信息,包括 22bp 的 PolyA 尾,其和已获得的部分 cDNA 序列之间存在 104bp 的重叠区,即在后者下游延伸出 395bp 的末端

序列。两个片段拼接所得到的序列在转译分析中能形成编码 254 个氨基酸通读序列,并在 PolyA 尾上游的第 42bp 处因存在一个 TAA 而中断,在编码的氨基酸序列中发现存在 QIEHHVFP 序列,和上述真菌来源的 Δ^6 -脂肪酸脱氢酶的组氨酸富集区 III 的序列 QIEHHLFP 基本相同,表明两者属于同一 cDNA 片段。同样,5'cDNA 末端扩增获得长度为 785 bp 的序列信息,其与已知部分 cDNA 序列存在 74bp 的重叠区,即在部分 cDNA 序列上游延伸出 711bp,两个片段拼接的序列转译分析中也获得了通读的编码 359 个氨基酸序列,而且存在 HDFGHH 和 WWKNKHNTTHH 的两个组氨酸富集区,与上述已报道脱氢酶中对应序列相似,这也表明 5'RACE 扩增片段与上述两个扩增片段属于同一 cDNA。因此,经上述 3 个步骤的扩增,用序列分析软件将 3 个片段进行拼接,得到全长为 1504bp 的核苷酸序列信息(GenBank, AY941161)。

2.2 雅致枝霉 Δ^6 -脂肪酸脱氢酶基因序列分析

通过分析软件进行的序列分析结果表明,在 1504 bp 的 cDNA 序列中存在一个潜在的开放阅读框,位于 5'末端下游 36~1413 bp 之间,全长为 1377 bp,编码 459 个氨基酸、分子量为 52.4kDa 的蛋白和其它已报道的 Δ^6 -脂肪酸脱氢酶氨基酸序列特别是真菌来源的相比较,并从编码蛋白的分子量和序列长度分析,有可能编码一个完整的 Δ^6 -脂肪酸脱氢酶,命名为 TED6。ORF 两侧为 36 bp 的 5'非转译区和 91 bp 的 3'非转译区,而且,在 3'末端的 polyA 尾上游 56 bp 有一个加尾信号 aataaa,进一步表明所获得片段包含全长的 mRNA 3'非转译区。

将所推测的氨基酸序列和已报道真菌的 Δ^6 -脂肪酸脱氢酶氨基酸序列相似性分析表明,该序列和少根根霉、卷枝毛霉、高山被孢霉^[16]、深黄被孢霉和畸雌腐霉的 Δ^6 -脂肪酸脱氢酶氨基酸序列具有较大同源性,相同性分别为:87.6%、56.4%、48.8%和 48.8%、37.2%。通过氨基酸序列分析结果显示在其 N 端有细胞色素 b5 区 HPGG 氨基酸位点 49-52,氨基酸序列的 174~179、211~215 和 395~399 位点具有膜整合酶特异性保守的 3 个组氨酸富集区 HDFGHH(His I)、HNTTH(His II)和 QIEHH(His III),其中 His III 中组氨酸 H 被谷氨酰胺 Q 取代和其它真核生物中的 Δ^6 -脂肪酸脱氢酶相同。

2.3 Δ^6 -脂肪酸脱氢酶基因在酿酒酵母中的表达及产物分析

为了验证 TED6 的功能,用重组表达质粒

pYTED6(图1)转化酵母细胞,获得转基因酵母工程菌株 YTED6.经半乳糖诱导后,提取转基因酵母细胞的总脂肪酸.脂肪酸经甲酯化后,以 γ -亚麻酸甲酯标准品、受体菌 INVSel、空载体 pYES2.0 转化的酵母菌细胞作为对照进行 GC 分析(图 2-A)。结果只有酵母工程菌株 YTED6 产生保留时间为 14.95 min 的特殊峰(图 2-B 中黑色箭头所示),与 GLA 甲酯标准品的保留时间 14.92 min 相对应,而在空载体和空菌体的对照样中没有出现相应的峰。GLA 含量占细胞总脂肪酸含量的 7.5%(表 2)。

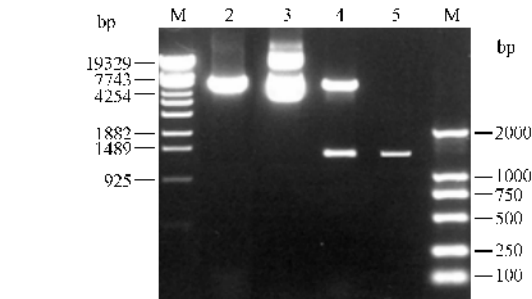


图 1 重组表达质粒 pYTED6 的鉴定

Fig.1 Identification of the expression plasmid pYTED6

M. DNA marker λ -EcoT4I digest; 1. pYES2.0 digested by *Kpn* I and *Eco*R I; 2. pYTED6; 3. pYTED6 digested by *Kpn* I and *Eco*R I; 4. PCR product of pYTED6; M. DNA Marker DL2000.

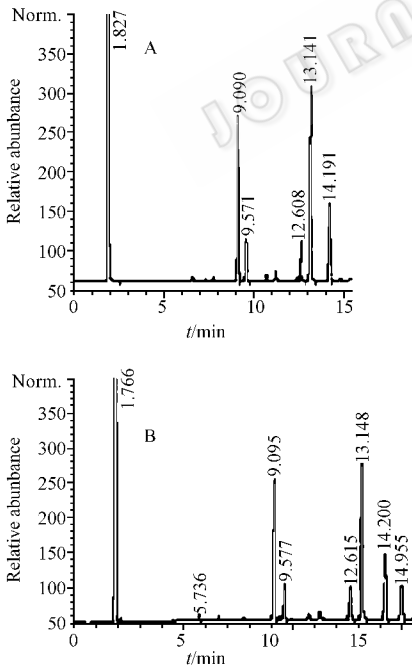


图 2 转基因酿酒酵母总脂肪酸的气相色谱分析图

Fig.2 Identification of GLA in transgenic *Saccharomyces cerevisiae* by GC analysis

A: *S. cerevisiae* strain INVSel transformed with the control vector pYES2.0; B: *S. cerevisiae* transformed with pYTED6.

表 2 不同质粒转化的酵母细胞的脂肪酸含量

Table 2 Fatty acid compositions(wt %)of total lipid from yeast transformants YES2.0 and YTED6

Transformants	Fatty acid composition					
	C16:0	C16:1	C18:0	C18:1	C18:2	GLA
YES2.0	20.37	13.67	8.71	11.45	45.78	0
YTED6	20.75	10.36	8.52	12.57	40.45	7.5

2.4 GC-MS 定性分析

为了进一步确证所出现的新峰为 GLA 甲酯,经 GC-MS 定性分析,然后通过 NIST/EPA/NIH 数据库的计算机检索,结果显示特殊峰为 GLA 甲酯(图 3-A), $m/z = 292$ 表示 GLA 甲酯化衍生物的分子量,与 GLA 甲酯标准物(图 3-B)的相同,这些结果表明 TED6 的编码产物能催化外源性亚油酸转化成 GLA,具有 Δ^6 -脂肪酸脱氢酶的功能。

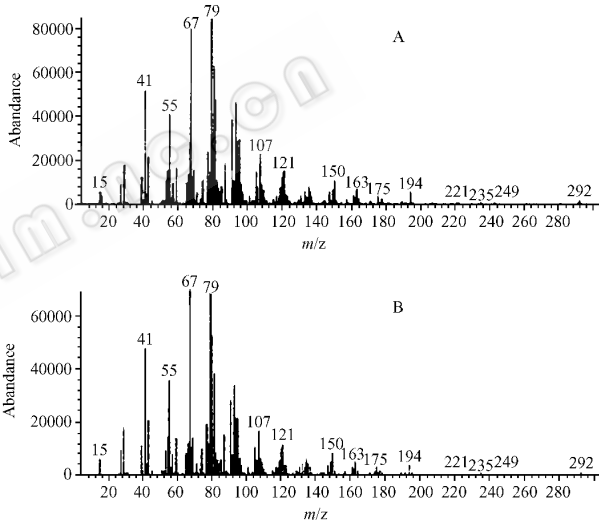


图 3 转基因酿酒酵母脂肪酸 GC-MS 分析图

Fig.3 GC-MS analysis of the novel peak identified in *Saccharomyces cerevisiae* transformed with pYTED6

A: *S. cerevisiae* transformed with vector pYRAD6; B: γ -linolenic acid methylated ester standard.

3 讨论

3.1 雅致枝霉 Δ^6 脂肪酸脱氢酶基因的结构分析

Δ^6 -脂肪酸脱氢酶是 PUFAs 代谢途径中的限速酶,它也是一种膜整合的脂肪酸脱氢酶,具有特征性的 3 个保守的组氨酸富集区和细胞色素 b_5 区,目前这些结构特征已成为 Δ^6 -脂肪酸脱氢酶基因克隆的主要依据。真核生物中的 Δ^6 -脂肪酸脱氢酶是一种定位于微体膜的“front-end”脂肪酸脱氢酶,属于 Cytb₅ 融合蛋白超家族,其特点就是除了 3 个保守的组氨酸富集区外,在氨基酸序列中具有细胞色素 b_5 区的结构 HPGG^[17]。细胞色素 b_5 区的存在表明脂

肪酸脱氢酶定位于微体膜上,而不是质体中,因为质体中的脂肪酸脱氢酶一般只利用铁氧还蛋白作为电子供体。通过 Δ^6 和 Δ^6 -脂肪酸脱氢酶中突变分析证明 HPGC 起到电子供体的功能,是维持酶活性所必需的^[18]。在所获得 cDNA 序列所编码的氨基酸序列中存在上述 3 个保守的组氨酸富集区,其 N 端也具有类似于细胞色素 b5 区的结构 HPGC,表明所编码蛋白也是一种“front-end”脂肪酸脱氢酶。采用 Kyte-Doolittle 方法进行氨基酸疏水性分析(Hydrophathy profile)结果也表明和已报道的 Δ^6 -脂肪酸脱氢酶一样,所推测的氨基酸序列存在两个长的具有膜整合蛋白特征的疏水结构。如图 4 横线条所示,第 1 个疏水区位于细胞色素 b5 区和第 1 个组氨酸富集区之间,第 2 个疏水区则位于第 2 个和第 3 个组氨酸富集区之间,疏水区形成四次跨膜结构。以上结果说明所获得的 cDNA 序列编码一个潜在的 Δ^6 -脂肪酸脱氢酶。

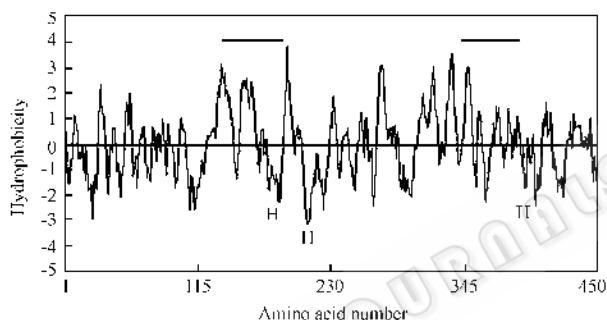


图 4 雅致枝霉 Δ^6 -脂肪酸脱氢酶的疏水分析图

Fig. 4 Hydrophathy profiles of *Thamnidium elegans* Δ^6 -fatty acid desaturase of (TED6) Bars indicate the two hydrophobic domains

3.2 雅致枝霉 Δ^6 脂肪酸脱氢酶基因在酿酒酵母中的表达分析

经过上述的基因克隆、序列分析,我们初步推测从雅致枝霉中获得的 cDNA 序列具有一个潜在编码 Δ^6 -脂肪酸脱氢酶的基因。为了验证其功能,将其编码序列和 pYES2.0 连接,构建重组表达载体,以尿嘧啶缺陷型酿酒酵母 INVSc1 作为宿主进行功能表达分析。在添加外源性底物亚油酸,分别于 28℃、20℃诱导培养,在转基因酵母总脂肪酸中出现一个和 GLA 甲酯标准品相同保留时间的新峰,进一步的 GC-MS 定性分析表明产生的新脂肪酸为 GLA,但于 28℃培养转基因酵母脂肪酸含量较低,其中的 GLA 占总脂肪酸含量微弱(图略),而于 20℃培养所得脂肪酸含量明显增加,并且 GLA 占总脂肪酸含量 7.5%,说明酵母细胞脂肪酸的表达有可能受到温度的调节。这些结果证明所获得序列的编码产物具有

Δ^6 -脂肪酸脱氢酶活性,它能特异性地在亚油酸 C6 和 C7 位之间脱氢形成双键。这是国际上首次报道从雅致枝霉中克隆的 Δ^6 -脂肪酸脱氢酶基因并在酿酒酵母中进行表达,该基因序列已经注册到 NCBI 的 GenBank 中,序列号为 AY941161。

近年来,国内外一些实验室从植物、动物和微生物等不同来源中克隆到 Δ^6 -脂肪酸脱氢酶基因,然而,到目前为止,只有 6 个从真菌中克隆到同一基因的报道。从雅致枝霉中克隆与 GLA 生物合成相关基因,有助于阐明其体内 GLA 的生物合成途径,并可作为遗传工具对丝状真菌的 PUFA_s 生物合成途径进行全面综合的研究,为研究真核生物多不饱和脂肪酸代谢提供一个简单模型。与此同时,借助于现代生物工程技术构建 GLA 高产量性状的基因工程菌株或植株,为大规模的生产应用建立基础。

参考文献

- [1] 邢来君,钟辉,周辉,等.深黄被孢霉发酵生产 γ -亚麻酸的研究.真菌学报,1996,15(4):272-277.
- [2] Reddy AS, Nuccio ML, Gross LM, 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 PCC120. *Plant Mol Biol*, 1993, 27(7):293-300.
- [3] Sayanova O, Smith MA, 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*, 1997, 94(8):4211-4216.
- [4] Huang YS, Chaudhary S, Thurmond JM, et al. Cloning of Δ^12 - and Δ^6 -desaturases from *Mortierella alpina* and recombinant production of gamma-linolenic acid in *Saccharomyces cerevisiae*. *Lipids*, 1999, 34(7):649-659.
- [5] Napier JA, Hey SJ, Lacey DJ, et al. Identification of a *Caenorhabditis elegans* Δ^6 -fatty-acid-desaturase by heterologous expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem J*, 1998, 330(Pt 2):611-614.
- [6] Sperling P, Lee M, Thomas G, et al. A bifunctional Δ^6 -fatty acyl acetylase desaturase from the moss *Ceratodon purpureus*. *Eur J Biochem*, 2000, 267:3801-3811.
- [7] Michinaka Y, Aki T, Shimauchi T, et al. Differential response to low temperature of two Δ^6 fatty acid desaturases from *Mucor circinelloides*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2003, 62:362-368.
- [8] Manocha MS, Campbell CD. The effect of growth temperature on the fatty acid composition of *Thamnidium elegans* Link. *Can J Microbiol*, 1978, 24(6):670-674.
- [9] 卢圣栋.现代分子生物学实验技术.北京:高等教育出版社,1993.
- [10] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 4.39-4.50.49-55.
- [11] 沈萍,范秀容,李广武.微生物学实验.第三版.北京:高等教育出版社,1999.

- [12] 李明春, 刘莉, 张丽, 等. 深黄被孢霉 Δ^6 -脂肪酸脱氢酶基因的克隆及序列分析. 菌物系统, 2001, **21**(1): 44–51.
- [13] Hong H, Datla N, Reed DW, *et al.* High-Level Production of gamma Linolenic Acid in *Brassica juncea* Using a Delta6 Desaturase from *Pythium irregulare*. *Plant Physiol*, 2002, **129**: 354–362.
- [14] Zhang Q, Li M, Ma H, *et al.* Identification and characterization of a novel Δ^6 -fatty acid desaturase gene from *Rhizopus arrhizus*. *FEBS Letters*, 2004, **556**(1–3): 81–85.
- [15] Alison A, Daniel E Gottschling, Chris A Kaiser, *et al.* Methods in Yeast Genetics. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1998, 31–38.
- [16] Sakuradani E, Kobayashi M, Shimizu S. Delta6-fatty acid desaturase from an arachidonic acid-producing *Mortierella* fungus. Gene cloning and its heterologous expression in a fungus, *Aspergillus*. *Gene*, 1999, **238**(2): 445–453.
- [17] Napier JA, Sayanova O, Sperling P, *et al.* A growing family of Cytochrome b5-domain fusion protein. *Trends Plant Sci*, 1999, **4**: 2–4.
- [18] Sayanova O, Shewry PR, Napier JA. Histidine-41 of the cytochrome b5 domain of the borage delta6 fatty acid desaturase is essential for enzyme activity. *Plant Physiol*, 1999, **121**(2): 641–646.

Cloning and expression of Δ^6 -desaturase gene from *Thamnidium elegans* in *Saccharomyces cerevisiae*

WANG De-pei, LI Ming-chun, WEI Dong-sheng, ZHANG Ying-hui, XING Lai-jun*

(Tianjin Key Laboratory of Microbial Functional Genomics, Department of Microbiology, NanKai University, Tianjin 300071, China)

Abstract: A 459 bp DNA fragment was amplified from *Thamnidium elegans* As3.2806 with degenerate oligonucleotides primers designed based on the sequences information from the conserved histidine-rich motifs II and near III of fungal Δ^6 -fatty acid desaturases genes by RT-PCR and sequenced. Gene specific primers designed according to this partial sequence were used for the amplification of the 3'- and 5'- end of this cDNA by RACE method, and sequence information coming from these two ends were used to design two CSPs to clone the 1504bp full-length cDNA. Sequence analysis showed this cDNA sequence had an open reading frame (ORF) of 1377bp encoding 458 amino acids of 52.4kD. The deduced amino acid sequence of the ORF showed similarity to those of the above Δ^6 -fatty acid desaturases which comprise the characteristics of membrane-bound desaturases, including three conserved histidine-rich boxes and hydropathy profile. A cytochrome b5-like domain was observed at the N-terminus. To elucidate the function of the protein, two specific primers corresponding to the nucleotide sequences of start and stop codons were used to amplify the coding sequence. The amplified cDNA *TED6* was subcloned into the expression vector pYES2.0 to generate a recombinant plasmid pYTED6, which was subsequently transformed into *Saccharomyces cerevisiae* strain INVSc1 for heterologous expression by lithium acetate method. Grown to logarithmic phase at 30°C, the transformed cells were supplemented with 0.5mmol/L Linoleic acid and induced by 2% galactose for a further 48 h of cultivation at 20°C. Total fatty acids were extracted from the induced cell and subjected to methyl-esterification. The resultant fatty acid methyl esters (FAME) were analyzed by gas chromatography (GC). A novel peak corresponding to γ -linolenic acid (GLA) methyl ester standards was detected with the same retention time, which was absent in the cell transformed with empty vector. The percentage of this new fatty acid to total fatty acids was 7.5%. Gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) analysis of this fatty acid methyl derivative demonstrated that the novel peak was GLA methyl ester. These results showed that the coding product of this sequence exhibited the activity of converting linoleic acid (LA) to γ -linolenic (GLA), and indicated that amino-acid sequence exhibited Δ^6 -fatty acid desaturase activity.

Keywords: *Thamnidium elegans*; Δ^6 -fatty acid desaturases; Cloning, *Saccharomyces cerevisiae*; Expression

Foundation item: Chinese National Natural Science Foundation (30200176); The Project to Subsidize Core Teachers in Colleges and Universities

* Corresponding author. Tel 86-22-23508506; Fax 86-22-23508800; E-mail xinglaij@eyou.com

Other author: SUN Wei

Received 9 September 2005/Accepted 13 October 2005/Revised 27 October 2005