

匍枝根霉(*Rhizopus stolonifer*)As 3.38 Δ 6-脂肪酸脱氢酶基因的克隆与酵母表达

陆 合² 柴友荣¹ 张学昆^{1,3*} 雷天刚¹ 李加纳¹

(¹ 西南大学农学与生命科学院 重庆 400716)

(² 重庆医科大学微生物与免疫学教研室 重庆 400050)

(³ 中国农业科学院油料作物研究所 武汉 430062)

摘 要 通过气相色谱法(GC)快速分析 8 种真菌的脂肪酸成分,发现匍枝根霉(*Rhizopus stolonifer*)具有较高的 γ -亚麻酸含量,利用 RT-PCR 和 RACE 方法获得了全长为 1475bp 的匍枝根霉 Δ 6-脂肪酸脱氢酶基因的 cDNA 序列,其中开放阅读框为 1380bp,编码 459 个氨基酸。生物信息学分析所克隆的基因具有 Δ 6-脂肪酸脱氢酶的典型结构:N 端具有细胞色素 b5 结构、具有 3 个保守的组氨酸区序列和跨膜结构;将该基因的开放阅读框序列连接到表达载体 pYES2.0 上,构建重组表达载体 pYRnD6D,并将其转入缺陷型酿酒酵母 INVScl 中进行表达。GC 分析表明,该序列在酵母中获得了表达,表达产物表现出 Δ 6-脂肪酸脱氢酶的酶学活性,能将底物亚油酸转化为 γ -亚麻酸。新生成的 γ -亚麻酸占酵母细胞总脂肪酸的 12.25%。

关键词: γ -亚麻酸; Δ 6-脂肪酸脱氢酶; 匍枝根霉(*Rhizopus stolonifer*); 酵母表达

中图分类号: Q78 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209(2007)01-0059-05

脂肪酸脱氢酶是形成不饱和脂肪酸的关键酶,具有催化脂肪酸链形成双键的功能。因此脂肪酸脱氢酶在维持生物体内脂肪酸的正常代谢、生物膜的正确结构和生理上起着重要的作用^[1]。近年以研究脂肪酸脱氢酶为主的植物油基因工程、植物抗寒育种和食品应用工程等日益成为热点。

由于 GLA 具有重要的药用和营养价值,而植物仅在月见草、琉璃苣等少数植物中含有。受植物资源、气候等影响使 GLA 的生产不能满足市场需要,使用真菌发酵生产 GLA 成为热点。目前国内外报道能产 GLA 的真菌主要有深黄被孢霉、高山被孢霉、毛霉、少根根霉等,相应研究主要集中在菌株的筛选和诱变上^[2],由于变异后的菌株易发生较高的回复突变。因此筛选到自身产量较高的菌株,并进一步利用其基因对发酵生产 GLA 和相应的抗寒研究具有重大的意义。

利用 GC 快速分析法,从高大毛霉、米根霉等酿造用真菌中筛选到产 γ -亚麻酸的几种真菌,并对它们进行发酵条件的优化,得到高产 γ -亚麻酸的匍枝根霉,通过 RT-PCR 和 RACE 成功得到匍枝根霉的脱

氢酶基因,通过生物信息学分析和酵母表达确认所得到的是匍枝根霉的 Δ 6-脂肪酸脱氢酶基因。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌种: 米根霉 Q303(*Rhizopus oryzae*) 匍枝根霉 As 3.38(*Rhizopus stolonifer*) 米曲霉 As3.384(*Aspergillus oryzae*) 由重庆市巴王酒业有限责任公司从中国科学院微生物研究所购买并提供,中华根霉(*Rhizopus chinensis*) 蓝色梨头霉(*Abasidia coerulea*) 高大毛霉(*Mucor mucedo*) 由西南大学资环院微生物教研室分离提供,微小毛霉 As3.204(*Mucor pusillus*) 小红酵母 As2.277(*Rhodotorula minuta*) 从中国科学院微生物研究所购买,大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH5 α 为本室保存,以上菌种均已经过相应的鉴定和确认。

1.1.2 试剂、仪器和引物: 胶回收试剂盒、T4 DNA 连接酶、Taq DNA 聚合酶、dNTP 从上海 Sangon 公司等处购买,PCR 引物和测序由上海博亚生物技术公司完成。其它化学药剂均为国产分析纯。 γ -亚麻酸

基金项目: 国家 948 项目(2003Q04)

* 通讯作者。Tel 86-23-68251383; E-mail: zhxk@swau.cq.cn

作者简介: 陆 合(1978-)男,重庆市人,硕士,从事分子微生物研究。E-mail: lhluhe@126.com

收稿日期: 2006-05-24; 接受日期: 2006-07-21; 修回日期: 2006-09-21

的标准样品从 Sigma 公司购买, GeneRacer Kit 与表达载体 pYES2.0 购自美国 Invitrogen 生物技术公司。气相色谱仪 GC-2010, μ B-wax 柱子为岛津公司产品。核酸快速测定仪(GENE spac)由瑞典制造。合成的 PCR 引物序列见表 1。

表 1 克隆中 PCR 所用的引物

Table 1 Primers used for the cloning

Primers(5' ~ 3')	Applications
P1 :AAGGTGTACGATGTTACTGAATTTAT	Partial cDNA amplification forward primer
P2 :TGTTGCGATTGATAGTTCAAACCACC	Partial cDNA amplification reverse primer
P3 :GCTTTGAACCACAATGGTATGCCTG	3' RACE forward primer
P4 :GCTGTCAACGATACGCTACGTAACG	3' RACE reverse primer
P5 :CGACTGGAGCAGGAGCACTGA	5' RACE forward primer
P6 :AAGCATACAAAAGAGAGACCAGC	5' RACE reverse primer
P7 :TAACTCTCTACTTCACTAATTAATTACC	Full-length cDNA amplification forward primer
P8 :AAGATTTATTTTATGCTTTCTAAAAGG	Full-length cDNA amplification reverse primer

1.2 菌种筛选

所有菌种用固态 PDA 培养基进行转接活化后, 转入基本固态培养基(每升水含葡萄糖 30g, KCl 0.5g, 蛋白胨 2g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5g, $FeSO_4$ 0.01g, K_2HPO_4 1g, 琼脂 15g) 28℃ 培养 5d 待用。将活化的 $4 \sim 5 \times 10^5$ 个/mL 不同菌株真菌孢子转接入液态 PDA 培养基中, 28℃、250r/min 震荡培养 5d。

培养好的菌丝用布氏漏斗抽滤, 蒸馏水清洗 5 次后, 放在 65℃ 下恒温干燥 2h, 测定菌丝体干重和粗脂肪酸。粗脂肪酸的抽提参照国家标准索氏抽提法。真菌脂肪酸的抽提参照刘莉等^[3]的方法: 将干菌丝用石油醚:乙醚(1:1)的有机混合溶剂浸提 1d 后, 用 5% 的 KOH-甲醇液进行酯化。提取的脂肪酸用气相色谱仪 GC-2010, μ B-wax 柱子进行气相色谱分析。分析条件为载气压力 150kpa, 柱温 220℃, 进样温度 250℃, 检测器温度 250℃。

1.3 发酵条件研究

将 $4 \sim 5 \times 10^5$ 个/mL 不同种的真菌孢子分别接种到以葡萄糖、可溶性淀粉、蔗糖、甘油为选择碳源, 以蛋白胨、硝酸铵、尿素、硝酸钾为选择氮源, 以不同浓度的葡萄糖为碳源, 其它成分与基本固态培养基相同的液体培养基中, 20℃、250r/min 震荡培养 5d, 进行最适碳源、氮源等培养条件的研究。将菌液接种到筛选出的最佳液态培养基中, 放在 15℃、20℃、25℃、30℃ 4 个不同温度下, 进行最佳生长温度的研究。培养条件为 250r/min、培养 5d。然后进行相应的

脂肪酸分析。 γ -亚麻酸的含量采用面积归一法。

1.4 $\Delta 6$ -脂肪酸脱氢酶基因克隆

取磷酸缓冲液处理过的葡枝根霉菌丝体, 加入 12mL 变性液(5mol/L 异硫氢酸胍, 37.5mol/L 柠檬酸, 0.75mol/L 十二烷基肌酸钠), 充分涡旋后, 参照上海 Sangon 公司的 RNA 抽提试剂盒说明书进行 RNA 提取。核酸快速测定仪测其 OD 值, 并取适量样品进行电泳检查。

按照 GeneRacer Kit 的使用说明进行操作, 获得完整的 cDNA 序列。根据已知深黄被孢霉、高山被孢霉等微生物 $\Delta 6$ -脂肪酸脱氢酶基因的第一个保守组氨酸序列和第三个保守组氨酸序列, 设计扩增基因部分 cDNA 的引物 P1 和 P2。扩增条件: 94℃ 2min, 1 个循环; 94℃ 1min, 56℃ 40s, 72℃ 1min, 35 个循环; 72℃ 10min。回收片段, 进行亚克隆和测序。根据测序结果设计进行 RACE 的 3' 和 5' 的基因特异引物 P3、P6, 利用试剂盒自带的 P4、P5 进行 RACE 扩增, 扩增条件同前, 回收 PCR 产物, 进行亚克隆和测序。利用所得的两个片段的末端设计基因的全长特异引物 P7、P8 进行保真扩增。回收所得片段, 进行亚克隆和测序。对 Race 后放大扩增的双链 cDNA 进行电泳检测, 如 cDNA 呈明显的拖带, 大小在 100 ~ 200bp 到 10kb 之间, 其中亮度最高的区域在 1kb 至 3kb 间, 说明反转录完全, 得到较高质量的 cDNA。

1.5 $\Delta 6$ -脂肪酸脱氢酶基因在酿酒酵母中的表达

1.5.1 重组表达载体的构建: 用带 *EcoR* I 酶切位点的引物 P9: 5'-TACGGTGAATTCATGAGTACA TTAGATCGTCAATCT-3' 和带 *Xho* I 酶切位点的引物 P10: 5'-ACCTGCCTCGAGTTAAAACGACTTTTTCCTTAA TTGC-3' 扩增 *RnD6D* 的 ORF 框, 将得到的 ORF 框和酵母表达载体 pYES2.0 分别用 *EcoR* I 和 *Xho* I 限制性内切酶进行双酶切, 回收后进行连接。转化大肠杆菌 DH5 α 。所有的分子操作均按常规分子生物学实验进行。重组载体经酶切和测序检验后命名为 pYRnD6D。

1.5.2 酵母细胞的转化表达和脂肪酸分析: 酵母细胞的转化和诱导表达参照 Invitrogen 公司载体 pYES2.0 的操作手册和毛小红^[4]报道的方法进行。酵母细胞总脂肪酸提取、产物气相色谱分析参照筛选的方法进行。

2 结果

2.1 产 γ -亚麻酸真菌的筛选

通过对 8 种不同真菌的 GC 快速筛选分析, 发

现所测 8 种真菌除小红酵母和米曲霉外,均能不同程度地产生一定量的 γ -亚麻酸,其中匍枝根霉的产量最高, γ -亚麻酸含量最高占到了菌丝总脂肪酸的 24.32%。通过 GC 方法从筛选的菌株中找到高产 γ -亚麻酸的匍枝根霉(*R. stolonifer* As 3.38),其最适生长温度为 20 $^{\circ}$ C,最适产 γ -亚麻酸的温度为 15 $^{\circ}$ C(图 1 表 2)。

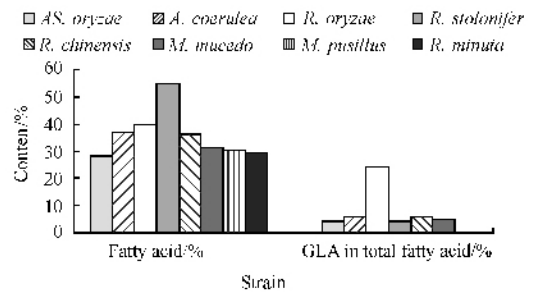


图 1 8 种不同真菌的脂肪酸和 γ -亚麻酸含量

Fig.1 Relative percentage of fatty acid and GLA of fungal.

表 2 温度对匍枝根霉的干重、脂肪酸和 γ -亚麻酸含量的影响

Table 2 The effect of temperature on fatty acid concentration and dry weight of the *R. stolonifer* As3.38

Temperature	15 $^{\circ}$ C	20 $^{\circ}$ C	25 $^{\circ}$ C	30 $^{\circ}$ C
Dry mycelium weight (g/L)	2.10 \pm 0.37	9.60 \pm 0.33	4.65 \pm 0.24	3.32 \pm 0.27
Fatty acid /%	54.83 \pm 0.27	50.69 \pm 0.31	31.50 \pm 0.28	32.04 \pm 0.22
Oleic acid in total fatty acid /%	40.54 \pm 0.23	37.97 \pm 0.17	37.85 \pm 0.20	38.88 \pm 0.13
Linoleic acid in total fatty acid /%	7.21 \pm 0.16	7.59 \pm 0.22	8.07 \pm 0.18	8.25 \pm 0.21
Gamma linolenic acid in total fatty acid /%	24.32 \pm 0.17	18.96 \pm 0.16	14.01 \pm 0.17	13.69 \pm 0.20

2.2 与其它产 GLA 真菌的比较

由于对细胞膜的结构了解不够,使得目前国内对外对利用真菌发酵生产 GLA 还主要处于菌种筛选、诱变和优化发酵条件来提高产量。国内外先后报道了能产 GLA 的高山被孢霉(*Mortierella alpina*)、深黄被孢霉(*Mortierella isabellina*)、刺孢小克银汉霉(*Cunninghamella echinulata*)、高大毛霉(*Mucor mucedo*)和少根根霉(*Rhizopus arrhizus*)等。将筛选得到的匍枝根霉 As 3.38 同已报道的产 GLA 的真菌进行比较^[2,5-7],匍枝根霉 As 3.38 的 GLA 含量仅比诱变后的拉曼被孢霉低(表 3)。

表 3 几种真菌产 GLA 的比较

Table 3 Relative percentage of fatty acid and GLA of fungal

Strain	Dry mycelium weight(g/L)	Fatty acid /%	GLA in fatty acid /%
<i>Mortierella alpina</i>	9.03	23.25	3.52
<i>M. isabellina</i>	25.10	49.20	6.25
<i>M. ramannianae</i>	24.59	44.09	10.67
<i>Mucor mucedo</i>	2.33	7.00	41.50
<i>R. stolonifer</i> As 3.38	9.60	50.69	18.96

2.3 基因克隆

通过采用加大裂解液浓度的方法,获得了最完整的 RNA。PCR 扩增所得到的 cDNA 部分序列长 1085bp,没有预测到 ORF 区,Blast 比对发现该序列与深黄被孢霉的 Δ 6-脱氢酶基因有 50%的相似性,初步认为获得了基因中间的序列。设计与 GeneRacer Kit 自带锚定引物相对应的 PCR 引物 P4、P5。进行 5'端和 3'端的 RACE 扩增,分别得到了预测大小在 420bp 和 360bp 左右的片段。将片段回收,进行亚克隆和测序,测序结果表明 5'端序列与

部分序列有 179bp 的完全重叠、3'端与部分序列有 180bp 的完全重叠,表明所得 3 个片段是同一个基因的部分序列。进行 Blast 比对发现与深黄被孢霉和高山被孢霉 Δ 6-脂肪酸脱氢酶基因有 54%以上的相似性,表明扩增正确,可能得到了匍枝根霉 Δ 6-脱氢酶基因的 5'端和 3'端。结合测序图在软件 Vector NTI suite 9.0 对上对 3 段序列进行序列拼接,得到了一条包括长 1475bp 具有完整 ORF 区的 cDNA 序列。根据所得序列的末端从新设计基因特异全长引物在 cDNA 上进行 PCR 保真扩增,电泳检测发现在 cDNA 中仅获得了一条带(图 2)。回收片段,进行亚克隆和测序,结果表明与拼接序列一致。

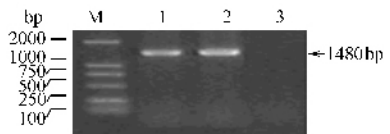


图 2 cDNA 全长序列的电泳图

Fig.2 Agarose gel electrophoresis for amplification of gene full length cDNA. M, Marker; 1-2, PCR products of gene recombinant; 3, Negative control.

2.4 序列分析

利用生物信息学软件对序列进行分析,全长 1475bp 的序列在 5'端下游 38~1417bp 具有一个 1380bp 的开放阅读框,编码 459 个氨基酸。在编码区的两侧 3'端具有一个 20bp 的 poly A 结构,且在 poly A 尾上游 8bp 处有一个典型的加尾信号 AAATAA;5'端有 37bp 的非转译区。没有预测到信号肽的存在。利用相应引物从匍枝根霉的总 DNA 中扩增出基因组序列,比对发现该基因的基因组序列中含有 4 个内含子,说明分离到了基因的全长。

将预测的匍枝根霉的 RnD6D 氨基酸序列与报道的其它真菌 $\Delta 6$ -脂肪酸脱氢酶氨基酸序列进行比较, 结果表明匍枝根霉的 $\Delta 6$ -脂肪酸脱氢酶与其它报道的真菌 $\Delta 6$ -脂肪酸脱氢酶一样, 氨基酸序列具有膜结合酶特异保守的 3 个组氨酸区 HDFGHH、HNTTHH、QIEHH。同时在蛋白质的 N 端还具有类似细胞色素 b5 的血红素结合区 HPGG。匍枝根霉的 ORF 与 GenBank 上登录的同属少根根霉核苷酸序列相似性为 82%, 基因组序列比少根根霉的多一个内含子。经 EXPASY 的生物信息学软件分析, 该蛋白质的分子量为 52.41kDa, 等电点 pI 是 5.94。利用软件 Tmpred 进行蛋白质跨膜结构预测, 获得了氨基酸序列的疏水特性, 发现它具有两个长的跨膜疏水结构, 3 个保守的组氨酸序列全部在亲水的一侧(图 3)。这种结构符合膜脱氢酶的特性。序列结构的分析表明所得到的序列是匍枝根霉 $\Delta 6$ -脂肪酸脱氢酶基因。

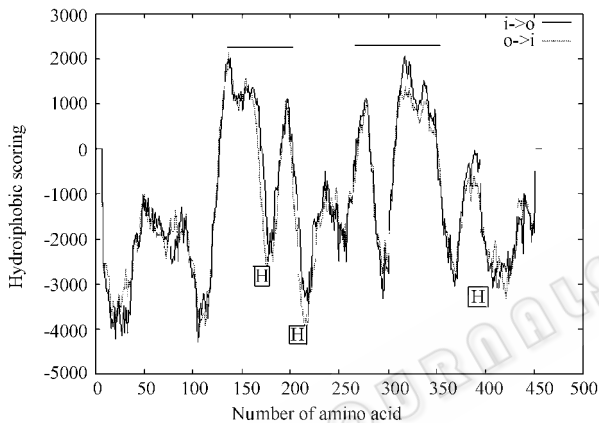


图 3 匍枝根霉 RND6D 的疏水性分析

Fig. 3 Hydropathy profile of RND6D of *R. stolonifer*. Bars, the transmembrane regions. Boxed H, locations of histidine-rich regions.

2.5 $\Delta 6$ -脂肪酸脱氢酶基因在酿酒酵母中的表达

为进一步确定所克隆基因的功能, 把经 PCR 保真扩增和测序验证正确的 ORF 框与外源表达载体 pYES2.0 进行连接, 构建表达载体 pYRnD6。经酶切

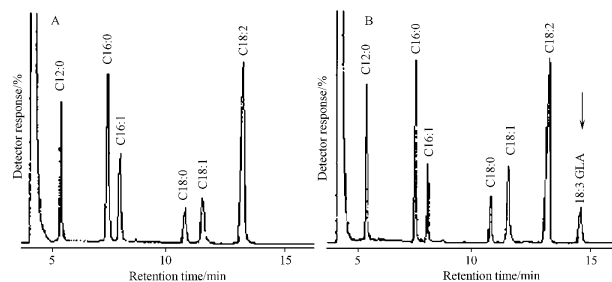


图 4 转化空载体 pYES2.0 和重组载体 pYRnD6 酵母的 GC 图

Fig. 4 Identification of GLA in transgenic *S. cerevisiae* by GC analysis with GLA as the internal standard. A: *S. cerevisiae* transformed with control vector pYES2.0. B: *S. cerevisiae* transformed with recombinant plasmid pYRnD6. The arrowhead indicates the novel peak of GLA.

验证后转入缺陷型酵母 *S. cerevisiae* INVSc1 中进行功能验证。通过添加底物亚油酸和半乳糖的诱导后, 提取酵母细胞和发酵液的总脂肪酸, 甲酯化处理后进行 GC 分析。分析酵母的发酵液没有发现相应的 γ -亚麻酸, 这表明 $\Delta 6$ -脂肪酸脱氢酶与预测一致, 是一个膜结合酶。在转入表达载体 pYRnD6 的缺陷型酵母中我们发现了与 γ -亚麻酸标样一致的一个新峰, 这表明所导入的基因在酵母内能够将底物亚油酸转化为 γ -亚麻酸, 新产生的 γ -亚麻酸含量占总脂肪酸的 12.25%(图 4)。

3 讨论

$\Delta 6$ -脂肪酸脱氢酶是脂肪酸代谢过程中的一个重要酶, 常以亚油酸为底物, 在碳链的第 6 位碳上脱氢形成 γ -亚麻酸, 并在此基础上通过碳链延长或其他脱氢作用形成新的生理活性物质, 其活性的降低会导致人体机能的紊乱^[8]。早期对 $\Delta 6$ -脱氢酶的研究主要集中在动物体内。虽然较早从鼠肝中分离了 $\Delta 6$ -脱氢酶^[9], 但由于对膜的结构了解缺乏, 所以对 $\Delta 6$ -脱氢酶的研究一直没有重要的进展。1993 年 Reddy 等^[10]第一次从产 GLA 的蓝细菌中克隆到 $\Delta 6$ -脱氢酶基因, 并在 $\Delta 6$ -脱氢酶缺陷的蓝细菌中获得功能表达, 从而推动了对 $\Delta 6$ -脱氢酶的分子水平研究。目前, 国外一些实验室通过 cDNA 文库、cDNA 末端扩增等方法已经从多种生物中克隆了 $\Delta 6$ -脱氢酶基因, 并在烟草、油菜、大豆等生物中获得功能表达^[11-15], 有效地增加了这些作物的抗寒性。但目前报道的真菌 $\Delta 6$ -脱氢酶基因还不多。对已报道的 $\Delta 6$ -脱氢酶氨基酸序列比较发现, $\Delta 6$ -脱氢酶具有 3 个保守的组氨酸区 (Histidine-rich region): 即 His I、His II 和 His III^[16]。

利用 RT-PCR 和 RACE 等方法从匍枝根霉中获得 $\Delta 6$ -脂肪酸脱氢酶基因, 并在缺陷型酵母中得到了表达。这为下一步我们将其用于基因工程生产 γ -亚麻酸和强力改造植物的脂肪酸代谢网络提供了条件。该序列的 cDNA 序列和基因组序列已在 GenBank 注册, 序列号为 AY795076 和 AY795075。

γ -亚麻酸作为一类多不饱和脂肪酸, 对在低温下维护生物体膜的流动性具有重要作用。说明 $\Delta 6$ -脂肪酸脱氢酶具有适应低温环境的能力。Feller 等^[17]认为酶中较少的脯氨酸能使酶的非折叠多肽构象的自由度减少, 有利于提高酶的柔韧性。我们将已报道的真菌 $\Delta 6$ -脂肪酸脱氢酶的氨基酸进行比较, 发现无论是脯氨酸的总数或是在总氨基酸中所占的比例, 匍枝根霉的 $\Delta 6$ -脂肪酸脱氢酶所含有的脯氨酸都是最低的。匍枝根霉的氨基酸序列仅比报道的少根根霉 $\Delta 6$ -脂肪酸脱氢酶氨基酸序列多一个氨基酸, 但无论是菌种本身或是转化的酵母中所含

有的 γ -亚麻酸都比少根根霉的多。这到底是由于匍枝根霉的 Δ 6-脂肪酸脱氢酶比其它真菌的更具有低温适应性,还是其它原因造成的我们将作进一步的研究。因此进一步加强对 Δ 6-脂肪酸脱氢酶基因的研究,不仅能为油脂的代谢工程提供理论和实践基础,还能为研究低温酶的冷适应机制和低温酶的应用提供新的理论基础。

参 考 文 献

- [1] Los DA, Murata N. Structure and expression of fatty acid desaturase. *Biochim Biophys Acta*, 1998, **1394**(1):3-15.
- [2] 朱国胜,刘作易,雷邦星,等.被孢霉 γ -亚麻酸高产菌株选育.菌物学报,2005, **24**(1):85-92.
- [3] 刘莉,李明春,胡国武,等.深黄被孢霉 M6-22 Δ 6-脂肪酸脱氢酶基因在酿酒酵母中的表达.微生物学报,2001, **41**(4):397-401.
- [4] 毛小洪,蔡金科.酵母完整细胞快速高效转化法.生物工程学报,1990, **6**(2):102-107.
- [5] 陈波,张玲,贺新生,等.用抗性筛选法选育 γ -亚麻酸(GLA)高产菌株.微生物通报,2003, **30**(1):53-56.
- [6] 李植峰,张玲,赖炳森,等.拉曼被孢霉 γ -亚麻酸高产突变株的选育.中国生化药物杂志,2001, **22**(3):129-131.
- [7] 章银良,熊卫东,刘庭森,等.用高大毛霉生产 γ -亚麻酸的原生质体制备与诱变.郑州轻工业学院学报(自然科学版),2004, **19**(2):22-24.
- [8] Guillou H, Rioux V, Catheline D, et al. Conversion of hexadecanoic acid to hexadecenoic acid by rat Delta 6-desaturase. *J Lipid Res*, 2003, **44**(3):450-454.
- [9] Okayasu T, Nagao M, Ishibashi T, et al. Purification and partial

- characterization of linoleoyl-CoA desaturase from rat liver microsomes. *Arch Biochem Biophys*, 1981, **206**(1):21-28.
- [10] Reddy AS, Nuccio ML, Gross LM, et al. Isolation of a Δ 6-desaturase gene from the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803 by gain-of-function expression in *Anabaena* sp. strain PCC 7120. *Plant Mol Bio*, 1993, **22**(2):293-300.
- [11] Huang YS, Chaudhary S, Thurmond JM, et al. Cloning of Δ 12- and Δ 6-desaturase from *Mortierella alpina* and recombinant production of γ -linolenic acid in *S. cerevisiae*. *Lipids*, 1999, **34**(7):649-659.
- [12] Murphy DJ. Engineering oil production in rapeseed and other oil crops. *Trends Biotechnol*, 1996, **14**:206-213.
- [13] Napier JA, Michaelson LV, Stobart AK. Plant desaturase: harvesting the fat of the land. *Curr Opin Plant Biol*, 1999, **2**(2):123-127.
- [14] Sayanova O, Smith MA, Lapinskes 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 acid in transgenic tobacco. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, **94**(8):4211-4216.
- [15] Sayanova O, Beaudoin F, Libisch B, et al. Mutagenesis and heterologous expression in yeast of a plant Delta6-fatty acid desaturase. *J Exp Bot*, 2001, **52**(360):1581-1585.
- [16] Shankin J, Whittle E, Fox BG. Eight histidine residues are catalytically essential in a membrane-associated iron enzyme, stearoyl-CoA desaturase are conserved in alkane hydroxylase and xylene monooxygenase. *Biochemistry*, 1994, **33**(43):12787-12794.
- [17] Feller G, Payan F, They F, et al. Stability and structural analysis of α -amylase from the antarctic psychrophile *Alteromonas haloplanctis* A23. *Eur J Biochem*, 1994, **222**(2):441-447.

Cloning and expression of a Δ 6-fatty acid desaturase gene from *Rhizopus stolonifer* in *Saccharomyces cerevisiae*

LU He², CHAI You-rong¹, ZHANG Xue-kun^{1,3*}, LEI Tian-gang¹, LI Jia-na¹

(¹ College of Agronomy and Life Science, South West University, Chongqing 400716, China)

(² Staff Room of Microbiology and Immunology, Chong Qing Medicine University, Chongqing 400050, China)

(³ Oil Crops Research Institute CAAS, Wuhan 430062, China)

Abstract Fatty acid composition of fungi is analysed through the gas chromatography(GC) technique. With specific activity a novel enzyme Δ 6-fatty acid desaturase was screened and isolated from *Rhizopus stolonifer*. In this study *R. stolonifer* was identified as a fungal species that produced plentiful γ -linolenic acid. A 1475bp full-length cDNA, designated as *RnD6D* here, with high homology to fungal Δ 6-fatty acid desaturase genes was isolated from *R. stolonifer* using reverse transcription polymerase chain reaction and rapid amplification of cDNA ends methods. Sequence analysis indicated that this cDNA sequence had an open reading frame of 1380bp encoding a deduced polypeptide of 459 amino acids. Bioinformatics analysis characterized the putative RnD6D protein as a typical membrane-bound desaturase, including three conserved histidine-rich motifs, hydrophathy profile and a cytochrome b5-like domain in the N-terminus. To elucidate the function of this novel putative desaturase, the coding sequence was expressed in *Saccharomyces cerevisiae* strain INVSc1. 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 GLA was 12.25% of total fatty acids. The result demonstrated that the coding produced Δ 6-fatty acid desaturase activity of *RnD6D* which led to the accumulation of γ -linolenic acid.

Keywords: γ -Linolenic acid; Δ 6-fatty acid desaturase gene; *Rhizopus stolonifer*; Expression

Foundation item: National "948" Program of China(2003Q04)

* Corresponding author. Tel 86-23-68251383; E-mail: zhxk@swau.cq.cn

Received 24 May 2006/Accepted 21 July 2006/Revised 21 September 2006