

# 甾醇 C-22 去饱和酶高表达对酵母细胞麦角甾醇合成的影响

蔡鹏丽<sup>1,2</sup>, 何秀萍<sup>1\*</sup>, 刘楠<sup>1</sup>, 张博润<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>中国科学院微生物研究所 北京 100080)

(<sup>2</sup>中国科学院研究生院 北京 100039)

**摘 要** 通过 PCR 扩增克隆到酵母菌甾醇 C-22 去饱和酶基因(*ERG5*)的编码序列及其终止子序列,以大肠杆菌-酿酒酵母穿梭质粒 YEp352 为载体,以磷酸甘油酸激酶基因 *PGK1* 启动子为上游调控元件构建了酵母菌表达质粒 pYPE5。以铜离子螯合蛋白基因 *CUP1* 替换 *ERG5* 基因内部序列获得 *ERG5* 破坏菌株 YSE5,其中麦角甾醇的合成被阻断,而积累了甾醇中间体 Ergosta-5,7-dien-3 $\beta$ -ol。表达质粒 pYPE5 转化破坏菌株后使细胞恢复了合成麦角甾醇的能力。说明表达质粒上的 *ERG5* 基因得到了功能性的表达。将表达质粒 pYPE5 转化酿酒酵母单倍体菌株 YS58,通过营养缺陷互补筛选到重组菌株 YS58(pYPE5)。对重组菌株、破坏菌株和互补菌株细胞甾醇组分和含量进行测定,发现重组菌株和互补菌株的麦角甾醇和总甾醇含量明显低于对照菌 YS58(YEp352)。测定不同培养时间细胞的麦角甾醇含量,发现重组菌株的麦角甾醇含量始终低于对照菌 YS58(YEp352)。可见,*ERG5* 在酵母中的高表达导致细胞麦角甾醇含量降低。

**关键词**: 酿酒酵母;甾醇 C-22 去饱和酶基因(*ERG5*);高表达;麦角甾醇

中图分类号:Q933 文献标识码:A 文章编号:0001-6209(2007)02-0274-06

麦角甾醇是真菌细胞各种膜结构的重要组成部分,在细胞内起着多方面的生理功能。并且它是合成维生素 D<sub>2</sub> 的前体,而维生素 D<sub>2</sub> 在调节生命代谢功能上有重要的作用。此外麦角甾醇还是一种重要的医药化工原料,用于甾醇类药物的生产。酵母菌是生产麦角甾醇的主要菌种,而酵母中麦角甾醇的生物合成是一个多酶催化的非常复杂的过程,已有的研究表明在酵母菌中至少有 21 个基因产物参与了麦角甾醇的生物合成,而且其生物合成的调控是多层次的<sup>[1]</sup>,其中相关基因在转录水平的调控是主要的,而且这种调控还与甾醇的反馈作用有关,在部分基因的调控序列中含有甾醇水平应答元件<sup>[2-4]</sup>。因此通过基因工程手段解除转录调控可能是改变甾醇合成和细胞内甾醇组分的有效途径<sup>[5]</sup>。

通过基因工程技术使代谢过程中催化特定反应的酶蛋白高效表达是定向改变代谢流的有效手段,但由于各反应在整个代谢途径中的位置不同,在代谢调控中的作用不同,因此相关基因高效表达的效果也不尽相同。在酵母菌麦角甾醇合成途径中,有些反应是甾醇合成的限速步骤,这些酶活性的提高,有些会提高甾醇的合成,如焦磷酸法呢酯合成酶、甾醇

C-24(28)还原酶<sup>[6]</sup>和甾醇酰基转移酶<sup>[7]</sup>,而甲羟戊酸焦磷酸脱羧酶的高表达则导致甾醇合成的降低<sup>[1]</sup>,还有些酶活性的提高对甾醇的合成几乎没有影响<sup>[8]</sup>。因此检测甾醇生物合成途径中不同位点酶活性的提高对麦角甾醇合成的影响,从而确定麦角甾醇合成途径中的限速步骤,既可以为全面阐述甾醇化合物生物合成的调控机制提供理论依据;同时对通过基因工程技术提高细胞麦角甾醇的生物合成,是很有意义的,并且是必要的。*ERG5* 基因编码的甾醇 C-22 去饱和酶催化酵母麦角甾醇生物合成途径中的第 20 步反应,在甾醇侧链的 C-22 位引入反式双键,形成四烯甾醇。该基因已被克隆和测序<sup>[9]</sup>,但有关甾醇 C-22 去饱和酶催化的此步反应在麦角甾醇生物合成中的调控作用还不清楚。本文报道了甾醇 C-22 去饱和酶基因 *ERG5* 高表达对酵母细胞麦角甾醇生物合成的影响。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌株和质粒**:酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)YS58(*MAT $\alpha$  flo1 leu2-3,112 his4-519 trp1-719 ura3-52*)<sup>[10]</sup>,酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)

基金项目:国家自然科学基金(30470035)

\* 通讯作者。Tel/Fax:86-10-64807427;E-mail:zhangbr@sun.im.ac.cn。Tel:86-10-64807405;E-mail:Hexp@sun.im.ac.cn

作者简介:蔡鹏丽(1980-),女,新疆克拉玛依市人,硕士研究生,主要从事酵母菌分子遗传与育种。E-mail:pengli\_cai@sohu.com

收稿日期:2006-06-15;接受日期:2006-07-24;修回日期:2006-11-08

YSF-20, 大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DH5 $\alpha$  [ *supE44*  $\Delta$  *lacU169*  $\Psi$ 80 *lacZ*  $\Delta$  *M15* ] *hsdR17* *recA1* *endA1* *gyrA96* *thi-1* *relA1* 均由本实验室保存。大肠杆菌/酵母菌穿梭质粒 YEp352 ( *Amp<sup>R</sup>URA3* )<sup>[11]</sup>, 质粒 pBluescript M13-, 含有 *CUP1* 基因的质粒 pYCU1<sup>[12]</sup> 和含有 *PGK1p* 的质粒 pVC727-6<sup>[13]</sup> 均由本实验室保存。

**1.1.2 培养基:** 酵母菌保存和培养用 YEPD 培养基, 大肠杆菌 DH5 $\alpha$  保存和培养用 LB 培养基均按文献 [14] 配制, 筛选大肠杆菌转化子用含有 50  $\mu$ g/mL 氨苄青霉素的 LB 培养基。酵母重组菌株筛选用含有色氨酸、亮氨酸和组氨酸的基本培养基 YNB<sup>[15]</sup>。

**1.1.3 酶和试剂:** 试验所用的限制性内切酶和 T4 DNA 连接酶均为 TaKaRa 公司产品; *Pfu* DNA 聚合酶购于天为时代公司。麦角甾醇为 Sigma 公司产品。氨苄青霉素为华美生物工程公司产品, 贮液浓度为 50 mg/mL, 使用浓度为 50  $\mu$ g/mL。X-gal 和 IPTG 购于上海生工生物工程有限公司, 用于大肠杆菌阳性转化子的筛选, 使用浓度为 40  $\mu$ g/mL。硫酸铜购于北京化学试剂公司, 贮液浓度为 0.5 mol/L。2010 气相色谱仪购于日本岛津公司。

## 1.2 酵母菌染色体 DNA 的制备

酵母菌染色体 DNA 的制备参照文献 [15] 进行。

## 1.3 引物设计与 PCR 扩增

根据 GenBank 中酿酒酵母 *ERG5* 基因的核苷酸序列<sup>[9]</sup> 设计引物: PL1 5'-GTCCGGTACCTCCAATGACAATAAATACC-3' 和 PL2 5'-AAGGATCCTAGCAGATCATTAGCTGTAG-3', 分别引入 *Kpn* I 和 *Bam* H I 的酶切位点(用下划线标出)。以酿酒酵母 YSF-20 的总 DNA 为模板, 进行高保真的 PCR 扩增。琼脂糖凝胶电泳鉴定 PCR 产物, PCR 产物纯化回收参照文献 [14] 的方法进行。

## 1.4 DNA 操作

DNA 酶切和连接参照产品说明进行。大肠杆菌感受态细胞的制备、转化及质粒提取参照文献 [14] 进行。

## 1.5 酵母菌的转化和转化子的筛选

酵母菌的转化参照文献 [15] 进行。重组菌株用含有色氨酸、亮氨酸和组氨酸的 YNB 培养基筛选; 破坏菌株用含有硫酸铜的 YEPD 培养基筛选。

## 1.6 重组菌株的遗传稳定性检测

重组菌株在 YEPD 培养基中连续传代培养 5d, 每隔 1d 以 10% 接种量转接入新鲜的 YEPD 培养基中。培养液在 YEPD 平板上划线, 挑取单菌落到无菌水中饥饿 4h, 然后点于不同的检测培养基平板上, 检测生长情况。

## 1.7 甾醇的提取和测定

甾醇的提取参见文献 [16], 部分有所改动。取 0.5g 湿菌体加入皂化液(40% KOH 溶液: 无水乙醇 = 2:3), 90 $^{\circ}$ C 水浴 3h, 取出冷却到室温, 加入石油醚萃取, 取上层萃取液挥发干燥, 加入氯仿溶解作为待测样品上柱, 气相色谱法(GC)测定麦角甾醇及其他甾醇含量。甾醇含量为每克干细胞中甾醇的毫克数(mg/g)。气相色谱测定条件: 仪器: 岛津 2010 气相色谱仪; 色谱柱: 毛细管色谱柱 DB-5(25cm  $\times$  0.25mm  $\times$  0.25  $\mu$ m); 升温程序<sup>[9]</sup>: 195 $^{\circ}$ C, 3min; 以 5.5 $^{\circ}$ C/min 升温至 300 $^{\circ}$ C, 持续 4min。

## 2 结果

### 2.1 甾醇 C-22 去饱和酶基因的克隆

以酿酒酵母 YSF-20 的总 DNA 为模板, PCR 扩增出 1.8kb 的 *ERG5* 基因。经 *Kpn* I 和 *Bam* H I 酶切后的 PCR 产物连接到经同样酶切的穿梭质粒 YEp352 上, 获得重组质粒 pYE5。对克隆到的 *ERG5* 基因进行序列分析, 结果表明克隆到的 *ERG5* 基因与 GenBank 中的序列一致性为 100%。

### 2.2 酵母菌重组表达质粒的构建

用 *Eco* R I 和 *Bam* H I 酶切质粒 pVC727-6, 回收 1.9kb 的 *PGK1* 启动子, 将其连接到经相同酶切的 pBluescriptM13 载体上, 得到质粒 pMP。用 *Sac* I 和 *Kpn* I 分别酶切质粒 pMP 和 pYE5, 将得到的 *PGK1* 启动子连接到质粒 pYE5 的 *ERG5* 基因上游, 获得重组表达质粒 pYPE5(图 1), 酶切分析表明质粒构建正确。

### 2.3 *ERG5* 基因的破坏及互补

**2.3.1 *ERG5* 基因的破坏:** 经 *Kpn* I 和 *Bam* H I 酶切后的 PCR 产物连接到经同样酶切的载体 pBluescriptM13 上, 得到质粒 pME5。用 *Bgl* II 和 *Pst* I 分别酶切质粒 pYCU1 和 pME5, 将 pYCU1 酶切后得到的 1.1kb 的 *CUP1* 基因与线性化的 pME5 质粒连接, 使 *ERG5* 基因内部约 400bp 的 DNA 片段被铜抗性基因 *CUP1* 所替代, 得到的质粒命名为 pMCE5。用 *Kpn* I 和 *Bam* H I 酶切质粒 pMCE5, 得到一个 2.5kb 的 DNA 片段, 此片段含有铜抗性基因 *CUP1*, 两端分别是 *ERG5* 基因的 5' 端和 3' 端序列。用此 DNA 片段转化酿酒酵母 YS58, 使该片段与染色体在 *ERG5* 位点发生双交换同源重组(图 2)。通过细胞对硫酸铜的抗性筛选转化子, 将筛选到的破坏菌株命名为 YSE5。PCR 分析结果与理论分析一致, 用 *ERG5* 基因两端引物进行 PCR 扩增, 从 YS58 染色体上扩增出 1.8kb DNA 片段, 从 YSE5 染色体

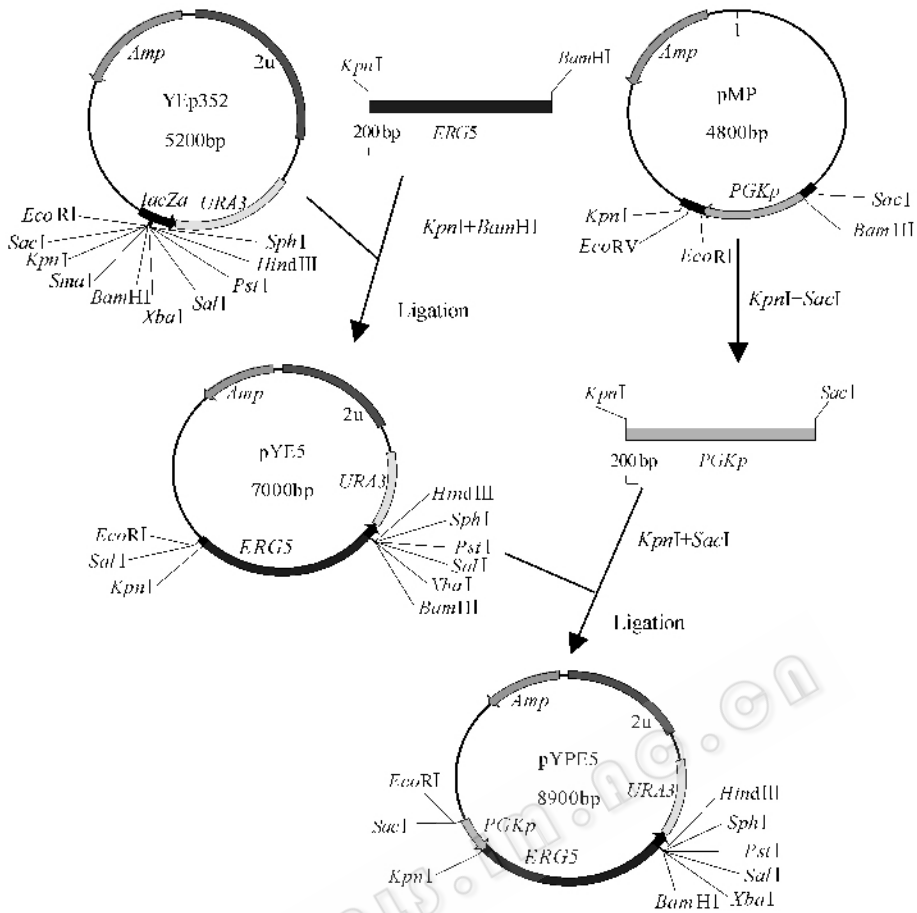


图1 重组表达质粒 pYPE5 的构建示意图

Fig.1 Construction of recombinant plasmid of pYPE5.

上扩增出 2.5kb 的片段;用 *ERG5* 基因的引物 PL-1 和 *CUP1* 基因的引物 P2 进行 PCR 扩增,在 YS58 中没有扩增出任何 DNA 片段,而 YSE5 中则扩增出一

条 1.5kb 的片段。说明在菌株 YSE5 的染色体上 *CUP1* 基因已经插入到 *ERG5* 基因内部。对细胞甾醇组分和含量分析,发现 *ERG5* 破坏菌株 YSE5 中麦角甾醇的合成被阻断,而积累了甾醇中间体 Ergosta-5,7-dien-3 $\beta$ -ol。

**2.3.2 *ERG5* 基因的互补:**用重组表达质粒 pYPE5 转化 YSE5 通过营养缺陷互补,在含有亮氨酸、组氨酸和色氨酸的 YNB 选择性培养基上筛选转化子。甾醇组分和含量测定表明互补转化子 YSE5 (pYPE5) 恢复了麦角甾醇合成能力(图 3)。表明表达质粒 pYPE5 上的 *ERG5* 基因得到了功能性表达。

**2.4 *ERG5* 基因高表达对酿酒酵母甾醇合成的影响**

用表达质粒 pYPE5 转化酿酒酵母单倍体菌株 YS58,通过营养缺陷互补,在含有亮氨酸、组氨酸和色氨酸的 YNB 培养基上筛选到转化子。遗传稳定性分析表明在无选择压力下,连续传代培养 5d,转化子中质粒丢失很少,能稳定遗传。使用气相色谱对破坏菌株 YSE5、互补菌株 YSE5 (pYPE5) 高表达菌株 YS58 (pYPE5) 及对照菌株 YS58 (YE352) 的甾醇

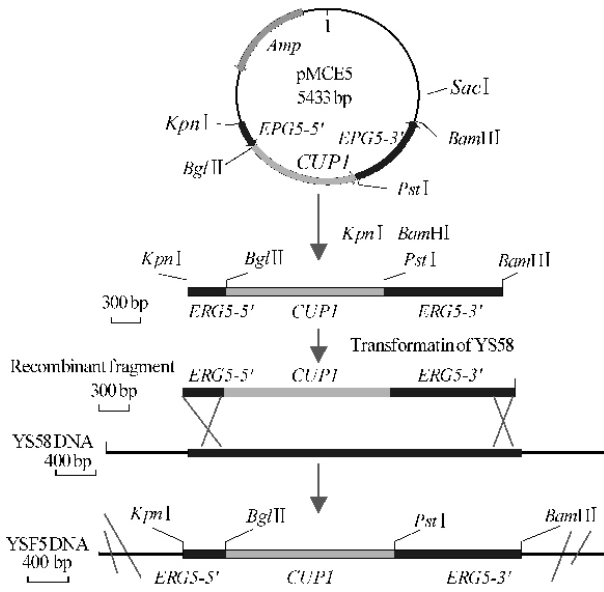


图2 *ERG5* 破坏菌株 YSE5 的构建

Fig.2 Construction of disruptant YSE5.

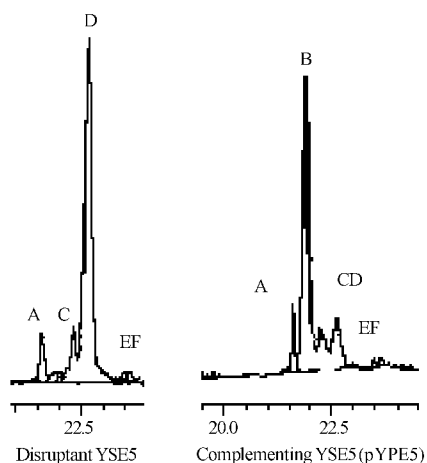


图3 破坏菌株 YSE5 和互补菌株 YSE5(pYPE5) 的气相色谱图

Fig.3 GC pictures of YSE5 and YSE5(pYPE5). A :Zymosterol ; B : Ergosterol ; C :Fecosterol ; D :Ergosta-5,7-dien-3 $\beta$ -ol ; E :Lanosterol ; F : 4,4-dimethylzymosterol.

醇组分和含量进行测定和显著性分析,结果发现:与对照菌 YS58(YEp352)相比,含高拷贝 *ERG5* 基因表达框的重组菌株 YS58(pYPE5)和互补菌株 YSE5(pYPE5)的总甾醇有所降低,麦角甾醇含量明显降低,而其他代谢上游的甾醇组分如酵母甾醇(zymosterol),表甾醇(fecosterol),羊毛甾醇(lanosterol),4,4-二甲基酵母甾醇(4,4-dimethylzymosterol)均有所增加(表1)。说明了 *ERG5* 基因在酵母中的高表达导致细胞内麦角甾醇生物合成能力的降低,预示着 *ERG5* 基因的高表达可能对酵母细胞麦角甾醇的合成产生负调控作用。

表1 重组菌株、破坏菌株、互补菌株及对照菌中甾醇含量

Table 1 Sterol content in disruptant strain, complementation strain and recombinant strain

Strains	YS58 (YEp352)	YSE5	YSE5 (pYPE5)	YS58 (pYPE5)
Zymosterol	0.13	0.38	0.34	0.26
Ergosterol	3.21	0.00	1.90	2.20
Fecosterol	0.33	0.61	0.66	0.69
Ergosta-5,7-dien-3 $\beta$ -ol	0.34	3.20	0.75	0.28
Lanosterol	0.09	0.15	0.14	0.14
4,4-dimethylzymosterol	0.07	0.15	0.16	0.12
Total sterols	4.17	4.49	3.95	3.69

The referring strain YS58(YEp352), disruptant strain YSE5, complementation strain YSE5(pYPE5) and recombinant strain YS58(pYPE5) were cultured in YEPD at 28 $^{\circ}$ C for 24h. Values represent the mean value of three experiments. Sterol content is expressed as milligram sterol content per gram dried cells.

## 2.5 培养时间对重组菌株麦角甾醇生物合成的影响

为了进一步证实 *ERG5* 基因的高表达对细胞麦角甾醇合成的影响,检测了不同培养时间细胞的生物量和麦角甾醇含量。结果发现,在检测的时间范

围内,*ERG5* 基因高表达菌株 YS58(pYPE5) 中麦角甾醇含量始终比对照菌株 YS58(YEp352) 低(图4)。表明 *ERG5* 的高表达使酵母细胞麦角甾醇合成能力降低。

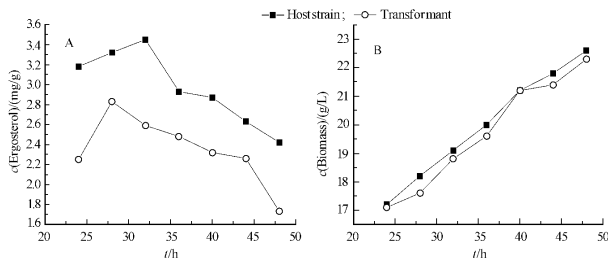


图4 培养时间对酵母细胞麦角甾醇生物合成的影响

Fig.4 The effect of incubation time on the ergosterol production.

## 3 讨论

麦角甾醇不仅是真菌细胞膜结构的重要组成部分,同时也是重要的医药化工原料,酵母菌发酵是生产麦角甾醇的主要方法,由于酵母菌中麦角甾醇的生物合成受到严格的调控,并且调控作用主要是基因的转录水平,因此通过基因工程技术解除转录水平的调控,使催化麦角甾醇生物合成的酶高效表达是改变细胞内甾醇生物合成的有效途径,也将是发酵上提高酵母菌合成麦角甾醇能力的有效方法。通过研究与麦角甾醇生物合成相关的各个不同基因的高表达对细胞甾醇代谢的影响来确定麦角甾醇生物合成途径中的限速步骤,不但可以为全面阐述甾醇化合物生物合成代谢的调控机制提供试验依据,同时可以通过麦角甾醇生物合成相关基因的高表达和组合表达构建麦角甾醇产量明显提高的酵母工程菌,提高商业化生产的水平。

由于麦角甾醇生物合成调控的复杂性,不同基因的高表达,产生的结果有所不同,如甾醇 C-24(28)还原酶基因(*ERG4*)的高表达导致细胞中麦角甾醇的含量提高<sup>[6]</sup>,而甲羟戊酸焦磷酸脱羧酶的高表达则导致甾醇合成的降低<sup>[1]</sup>等。本研究结果表明甾醇 C-22 去饱和酶基因(*ERG5*)的高表达导致酵母细胞麦角甾醇含量的降低,对甾醇组分的进一步分析发现,重组菌株中甾醇 C-22 去饱和酶催化反应上游的中间体甾醇含量与对照菌株相比却有所增加,这说明甾醇 C-22 去饱和酶活性提高后产生的中间体甾醇可能对代谢途径下游反应产生了负调控作用,从而使麦角甾醇含量降低。此外甾醇 C-22 去饱和酶促反应下游除了已有的合成代谢途径外,可能还存在其它的分支代谢途径,而分支代谢途径中产生的中间体甾醇可能对甾醇 C-22 去饱和酶促反应

下游合成途径有负调控作用。对 *ERG5* 基因破坏菌株的甾醇组分分析发现, *ERG5* 基因的破坏并未导致前体物质 ergosta-5, 7, 24(28)-trienol 的累积, 而是积累了另一种目前报道的代谢途径中不存在的甾醇中间体 ergosta-5, 7-dien-3 $\beta$ -ol, 可见甾醇合成途径中的中间体组分及其相互转化过程要比目前已知的复杂的多, 除了甾醇 C-22 去饱和酶催化的这条合成途径外, 甾醇 C-5 去饱和酶促反应的下游可能还存在另一个分支代谢途径, 从而生成了 ergosta-5, 7-dien-3 $\beta$ -ol。已有研究表明甾醇 C-22 去饱和酶所催化反应的下游反应活性的提高(甾醇 C-24(28)还原酶基因 *ERG4* 高表达)可导致麦角甾醇含量的提高<sup>[6]</sup>。因此通过研究 *ERG4* 基因和 *ERG5* 基因的共表达对酵母细胞甾醇组分和含量的影响, 有可能为进一步阐述甾醇合成途径及其调控机制提供重要的理论依据。此方面的推测值得进一步证实。

### 参 考 文 献

- [ 1 ] Lees ND, Bard M, Kisch DR. Biochemistry and molecular biology of sterol synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 1999, **34**(1):33-47.
- [ 2 ] Arthington-Skaggs BA, Crowell DN, Yang H, *et al.* Positive and negative regulation of a sterol biosynthesis gene (*ERG3*) in the post-squalene portion of the yeast ergosterol pathway. *FEBS Lett*, 1996, **392**(2):161-165.
- [ 3 ] Dimster-Denk D, Rine J. Transcriptional regulation of a sterol-biosynthetic enzyme by sterol levels in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*, 1996, **16**(8):3981-3989.
- [ 4 ] Leber R, Zenz R, Schrottner K, *et al.* A novel sequence element is involved in the transcriptional regulation of expression of the *ERG1* (squalene epoxidase) gene in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur J Biochem*, 2001, **268**(4):914-924.

- [ 5 ] Polakowski T, Stahl U, Lang C. Overexpression of a cytosolic hydroxylmethylglutaryl-CoA reductase leads to squalene accumulation in yeast. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1998, **49**(1):66-71.
- [ 6 ] He X, Zhang B, Tan H. Overexpression of a sterol C-24(28) reductase increases ergosterol production in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology Letters*, 2003, **25**(10):773-778.
- [ 7 ] 何秀萍, 郭雪娜, 张博润. 甾醇酰基转移酶高表达对酵母麦角甾醇合成的影响. *微生物学报*, 2004, **44**(1):67-71.
- [ 8 ] Tsay YH, Robinson GW. Cloning and characterization of *ERG8*, an essential gene of *Saccharomyces cerevisiae* that encodes phosphomevalonate kinase. *Mol Cell Biol*, 1991, **11**(2):620-632.
- [ 9 ] Skaggs BA, Alexander JF, Pierson CA, *et al.* Cloning and characterization of the *Saccharomyces cerevisiae* C-22 sterol desaturase gene, encoding a second cytochrome P-450 involved in ergosterol biosynthesis. *Gene*, 1996, **169**(1):105-109.
- [ 10 ] Teunissen ARH, Holub E, Hucht JVD. Physical localization of the flocculation gene *FLO1* on chromosome I of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 1993, **9**(1):1-10.
- [ 11 ] Hill JE, Meyers AM, Koemer TJ, *et al.* A Yeast/*E. coli* shuttle vectors with multiple unique restriction sites. *Yeast*, 1993, **9**(2):163-167.
- [ 12 ] 张吉娜, 何秀萍, 张博润. 低双乙酰抗老化啤酒酵母工程菌的构建. *生物工程学报*, 2005, **21**(6):942-946.
- [ 13 ] 刘玉芳, 朱邦民, 蔡金科. 酿酒酵母 3-磷酸甘油酸激酶基因 (*PGK1*) 启动子片段的亚克隆. *微生物学报*, 1995, **35**(1):21-27.
- [ 14 ] Smveok J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning A Laboratory Manual*. 2<sup>nd</sup> ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory press, 1989.
- [ 15 ] Alison A, Daniel EG, Chris AK. *Methods in Yeast Genetics: A Cold Spring Harbor Laboratory Course Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1997.
- [ 16 ] He X, Huai W, Tie C, *et al.* Breeding of high ergosterol-producing yeast strains. *J Indust Microbiol & Biotechnol*, 2000, **25**(1):39-44.

## Effect of over-expression of sterol C-22 desaturase on ergosterol production in yeast strains

CAI Peng-li<sup>1,2</sup>, HE Xiu-ping<sup>1\*</sup>, LIU Nan<sup>1</sup>, ZHANG Bo-run<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup> Institute of Microbiology of Chinese Academy of Sciences, Beijing, 100080, China)

(<sup>2</sup> Graduate University of Chinese Academy of Sciences, Beijing, 100039, China)

**Abstract** Ergosterol, the main sterol in yeast, is responsible for structural membrane features such as fluidity and permeability. Additionally, ergosterol is economically important as a precursor of vitamin D<sub>2</sub>. The biosynthesis of sterols in yeast is complex. As an enzyme of the later ergosterol biosynthesis, the sterol C-22 desaturase encoded by *ERG5* gene is required to form the C-22(23) double bond in the sterol side chain. In order to know the regulation of C-22 sterol desaturase in the ergosterol biosynthesis, *ERG5* gene was cloned and over-expressed in the *Saccharomyces cerevisiae*.

Primer 1 (5'-GTCGGTACCTCCAATGACAATAAATACC-3', *Kpn* I ) and primer 2 (5'-AAGGATCCTAGCAGATCATTAGCTGTAG-3', *Bam*H I ) were designed according to the *ERG5* sequence in GenBank. A 1.8kb DNA fragment containing the open reading frame and terminator of *ERG5* gene was amplified from *Saccharomyces cerevisiae* YSF-20 by PCR and inserted into YEp352 to generate recombinant plasmid pYE5. To express *ERG5* gene properly in *S. cerevisiae*, the recombinant expression plasmid pYPE5 containing *ERG5* from pYE5 under the control of *PGK1* promoter, the *URA3* gene as the selection marker and the plasmid YEp352 as the vector was constructed, and then they were introduced into *Saccharomyces cerevisiae* YS58.

To make sure the plasmid pYPE5 in the YS58 acted properly, the disruptant (YSE5) was created by deleting a 0.4kb fragment of *ERG5* gene and inserting the *CUP1* gene into the *ERG5* and transforming the YS58. And then the disruptant (YSE5) was transformed with the plasmid pYPE5 carrying the corresponding complementing *ERG5* gene to control the activity of the over-expressed *ERG5* gene and restoration of the wild-type sterol pattern. The sterol profile of the disruptant (YSE5) demonstrated that ergosta-5,7-dien-3 $\beta$ -ol was accumulated which was very similar to ergosterol but with a saturated side chain. In contrast, the YSE5 (pYPE5) strain contains predominantly ergosterol.

The sterol content of the transformant was analyzed using gas chromatography (GC) analysis. The result shows that ergosterol production in recombinant strains was reduced. And the experiment of the effect of culturing time shows that ergosterol productions in recombinant strains were always lower than YS58 (pYPE5) from 24 ~ 48h culturing time. Under the optimal culture condition, ergosterol content in recombinant strain YS58 (pYPE5) was about 0.70-fold of that in the referring strain.

**Keywords** : *Saccharomyces cerevisiae* ; sterol C-22 desaturase gene ; over-expression ; ergosterol

Foundation item : National Natural Science Foundation of China (40470035)

\* Corresponding author. Tel/Fax : 86-10-64807427 ; E-mail : zhangbr@sun.im.ac.cn. Tel : 86-10-64807405 ; E-mail : Hexp@sun.im.ac.cn

Received : 15 June 2006/ Accepted : 24 July 2006/ Revised : 8 November 2006

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>