

深黄被孢霉 $\Delta 5$ -脱饱和酶基因在花生四烯酸合成中的作用

于长青^{1,2}, 杨健¹, 姚笛¹, 李丽娜¹

(¹ 黑龙江八一农垦大学食品学院, ² 农业部农产加工品质量监督检验测试中心, 大庆 163319)

摘要:【目的】研究 $\Delta 5$ -脱饱和酶基因的 mRNA 表达量与花生四烯酸产量之间的关系。【方法】实验利用荧光定量 PCR 方法检测了 $\Delta 5$ -脱饱和酶在五株深黄被孢霉的同一培养时间及菌株 YZ-124 在不同发酵阶段的 mRNA 表达水平, 同时利用气相色谱仪测定其花生四烯酸含量。【结果】结果表明: 不同菌株的 $\Delta 5$ -脱饱和酶基因的 mRNA 表达水平不同, 原始菌株 As3. 3410 最低, 诱变菌株 YZ-124 最高; 深黄被孢霉 YZ-124 不同发酵阶段的 $\Delta 5$ -脱饱和酶基因 mRNA 表达量随菌龄的增加逐渐增加。【结论】结合 ARA 的得率显示, $\Delta 5$ -脱饱和酶基因 mRNA 表达量与培养物油脂中 ARA 含量呈一定的正相关关系。

关键词: 深黄被孢霉; $\Delta 5$ -脱饱和酶; 花生四烯酸; 荧光定量 PCR

中图分类号: Q935 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2010) 06-0768-06

花生四烯酸 (Arachidonic acid, ARA), 系统名为 5, 8, 11, 14-全顺-二十碳四烯酸, 是 ω -6 系列的一种重要多不饱和脂肪酸, 在维持细胞膜的结构与功能方面具有重要的作用^[1]。它不仅作为一种极为重要的结构脂类广泛存在于哺乳动物的组织 (特别是神经组织) 器官中^[2], 而且还是许多二十碳衍生物如前列腺素 E₂、前列环素、血栓烷 A₂ 和白三烯等物质的前体^[3], 具有广泛的生物活性和重要的营养作用, 如益智健脑, 提高视敏度, 影响婴幼儿生长发育, 预防和治疗高血压、高血脂、糖尿病等疾病, 人体一旦缺乏 ARA 就会引起机体生理功能失调, ARA 已经在保健食品、化妆品、医药等领域得到广泛应用^[4]。

ARA 在体内不能从头合成, 必须由食物供给, 它们可在相应的前体脂肪酸-亚油酸和 α -亚麻酸的基础上经过脱氢和碳链的延长作用转化而来^[5]。在微生物体内, 多不饱和脂肪酸的合成通常是以油酸为底物, 合成途径中, 有两个主要的反应, 即碳链

的增加和去饱和作用^[6]。在转化过程中涉及到的脱饱和酶有 $\Delta 6$ -脱饱和酶、 $\Delta 5$ -脱饱和酶 ($\Delta 5$ -desaturases, D5D) 和 $\Delta 4$ -脱饱和酶, 其中 $\Delta 5$ -脱饱和酶是催化 ARA 形成的最后一步脱饱和反应的酶, 它以二高- γ 亚麻酸为底物, 催化其第 5 位碳脱氢形成 ARA, 是 ARA 合成途径上的限速酶^[7]。我们在前期研究中通过不同诱变方法获得了高产 ARA 的诱变菌株, 现通过荧光定量 PCR 技术, 研究在不同 ARA 产量的深黄被孢霉 (*Mortierella isabellina*) 以及高产菌株 YZ-124 的不同 ARA 生产阶段, $\Delta 5$ -脱饱和酶基因的转录表达水平, 评价该酶在 ARA 生物合成中的作用, 为进一步利用代谢工程构建高产 ARA 菌株的研究打下基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌种和质粒: 深黄被孢霉 (*Mortierella isabellina* As3. 3410), 购自中国科学院北京微生物

基金项目: 大庆市科学技术计划项目资助 (SGGH2009-029)

作者简介: 于长青 (1969 -), 男, 黑龙江大庆人, 教授, 博士, 从事畜产品加工和功能性食品研究与开发。Tel: +86-459-6819231; Fax: +86-459-6819235; E-mail: spxyjb@126.com

收稿日期: 2009-11-19; 修回日期: 2010-01-22

研究所;以 As3.3410 为出发菌株,经微波、紫外线及原生质体等诱变方法获得的高产 ARA 菌株 W35s2-153、Z80s2-1、Y-69 和 YZ-124,本实验室前期工作获得并保存。受体菌 *E. coli* BL-21 由本实验室保存, PMD-18 T vector, 购自 Takara 公司。

1.1.2 主要试剂和仪器:ARA 标准品、DEPC 购自 Sigma 公司;Trizol 试剂购自 Gibco-BRL 公司;AMV 反转录酶、RNA 酶抑制剂、限制性内切酶 *EcoR* I、*Hind* III、10.0 mmol/L dNTP、*rTaq*TM 等购自 TaKaRa 公司;氯仿、异丙醇、乙醇等均为国产分析纯。荧光定量 PCR 仪(LightCycler3,美国 ABI 公司);气相色谱仪(GC9900 型,上海科创色谱仪器有限公司);凝胶成像系统(Gel Doc 2000, Bio-RAD 公司);PCR 扩增仪(Gene Amp PCR System 9600, RKIN-ELMER 公司)。

1.1.3 引物:根据高山被孢霉的 $\Delta 5$ -脱饱和酶基因序列和被孢霉属的 18S rRNA 序列,应用生物学软件 Primer5.0 设计了扩增 D5D、18S rRNA 基因的引物和荧光定量 PCR 的特异性探针,具体序列如表 1。探针 5' 端标记 FAM, 3' 端标记 TEMRA, 由上海 Sangon 生物公司合成。

表 1 D5D、18S rRNA 基因的引物和探针

Primer	Sequence(5'→3')	Size/bp
D5D-F	CATCTCGACATGGCAGACTGT	151
D5D-R	CAGCGCCAGCCAGTAAGAC	
D5D-P	CCCTGCAGTATCTGCCCTGG	
18S-F	AGGTGCAGCTGGACATTCTTC	151
18S-R	AGTCAGCATATAGCGCATTCTGA	
18S-P	TAGTCCCGTCAAACGGATTACTT	

1.2 菌种活化及培养

PDA 斜面培养、摇瓶种子培养和摇瓶产脂培养,请见参考文献[8]。

1.3 气相色谱分析花生四稀酸含量

将产脂培养的发酵液烘干至恒重,称干重,进行微生物油脂的提取,具体方法见参考文献[9]。样品处理后取上清液静置 4 h 后进样,气相色谱柱为弹性石英毛细管柱 FFAP(30 m × 0.32 mm × 0.5 μm)。

1.4 目的基因的克隆

总 RNA 的提取参考文献[10]。按照 TaKaRa 反转录试剂盒说明书进行反转录,以总 RNA 为模板, Oligo dT 为引物先合成 cDNA 第一链,然后以 D5D-F/ D5D-R, 18S-F/18S-R 为引物进行 $\Delta 5$ -脱饱和酶基因和 18S rRNA 基因的 PCR 扩增, D5D 基因

的扩增条件为 94℃ 5 min; 94℃ 40 s, 56.5℃ 50 s, 72℃ 45 s, 30 cycles; 72℃ 5 min。18S rRNA 基因的扩增条件为 94℃ 5 min; 94℃ 40 s, 52℃ 50 s; 72℃ 45 s, 30 cycles; 72℃ 5 min。PCR 扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳分离后切下相应大小的条带,用 DNA 凝胶回收试剂盒纯化 PCR 产物,然后按照 pMD18 vector 说明书进行连接,转化到 *E. coli* BL-21 中,挑取转化子进行 *EcoR* I / *Hind* III 双酶切鉴定和 PCR 鉴定,将鉴定正确的含有目的基因的重组质粒(pD5 和 p18S)提交上海 Sangon 生物公司测序,利用 DNASTAR 软件对测序结果进行分析。

1.5 荧光定量 PCR

1.5.1 标准曲线的绘制:将测序正确的重组质粒作为各基因进行荧光定量 PCR 反应的标准品,定量后经 10 倍系列稀释成每 μL 含不同拷贝数的阳性质控标准品,用作标准曲线制备的模板。采用 TaqMan 荧光定量 PCR 方法进行扩增,分别制作 D5D 和 18S rRNA 的标准曲线。D5D 和 18S rRNA 的定量 PCR 体系采用 20 μL,反应条件分别为:(1)94℃ 3 min; 94℃ 30 s, 60℃ 40 s, 72℃ 30 s, 40 个循环;(2)94℃ 3 min; 94℃ 30 s, 59℃ 30 s, 72℃ 30 s, 40 个循环。

1.5.2 基因表达检测:选取深黄被孢霉 AS3.3410、W35s2-153、Z80s2-109、Y-69、YZ-124 的 7 d 培养物,以及高产 ARA 菌株 YZ-124 的 3—8 d 培养物进行总 RNA 提取,定量后采用 Oligo dT 反转录,制备 cDNA。以 18S cDNA 作为外标定量的模板, D5D cDNA 作为 $\Delta 5$ -脱饱和酶基因定量的模板, $\Delta 5$ -脱饱和酶基因的表达水平用 D5D 基因相对 18S rRNA 的表达量来衡量。

2 结果和分析

2.1 花生四烯酸的含量测定

本研究采用毛细管气相色谱程序升温条件,可以将饱和与不饱和长链脂肪酸甲酯分开。花生四烯酸标准品的保留时间为 17.554。根据保留时间和标准品浓度,测定深黄被孢霉的 ARA 的含量,结果以面积归一法计算。五株深黄被孢霉 7d 培养物及 YZ-124 诱变菌株的 3—8 d 培养物中 ARA 含量如表 2 和图 1,在相同的培养条件下, YZ-124 的 ARA 含量最高, As3.3410 含量最低。在 YZ-124 的发酵过程中,菌体中 ARA 的含量随种龄的增加而增加。

表2 五株深黄被孢霉 7d 培养物中 ARA 的含量

Table 2 ARA contents of 5 strains *Mortierella isabellina* cultures in 7 days

Strains	AS3. 3410	W35s2-153	Z80s2-17	Y-69	YZ-124
ARA contents/ (g/L)	0.82	2.61	2.74	2.92	4.72

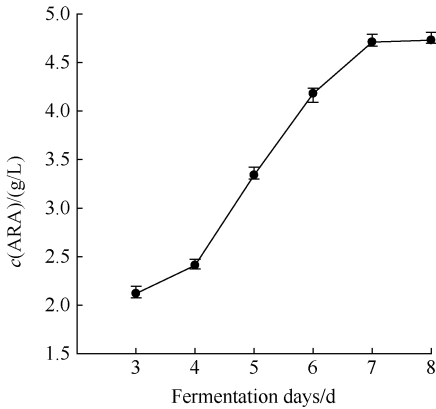


图1 深黄被孢霉 YZ-124 发酵不同天数的 ARA 含量

Fig.1 ARA contents of *Mortierella isabellina* YZ-124 in several days by fermentation.

2.2 深黄被孢霉 D5D、18S rRNA 基因的克隆

采用 RT-PCR 技术,分别从 5 株不同 ARA 产量的深黄被孢霉的培养物中扩增到 $\Delta 5$ -脱饱和酶基因和 18S rRNA 基因片段,在凝胶电泳图上均对应于 Marker 150 bp 左右处见到与预期大小相符的片段,可初步确定为目的片段。

5 株深黄被孢霉的 D5D 和 18S rRNA 基因经过 TA 克隆后测序,结果表明 5 个 D5D 基因序列完全一样,在 GenBank 数据库上的登录号为 GU140079,片段长 151 个核苷酸,5 个 18S rRNA 基因的序列也相同,GenBank 登录号为 GU140080。将获得的 D5D 基因序列和 18S rRNA 基因序列分别进行同源性分析,发现两个片段均具有高度的保守性,所以能够在其中设计荧光探针,将设计的探针序列同数据库序列文件进行 BLAST,证明探针序列具有特异性。

2.3 荧光定量 PCR 的标准曲线

以不同拷贝数阳性重组质粒模板的对数为横坐标,以荧光 PCR 反应过程中出现荧光信号的初始循环数(Ct)为纵坐标,绘制标准曲线。目标基因的标准曲线如图 2、3 所示。结果显示反应体系中含有 10^5 — 10^8 个 D5D 基因拷贝时,扩增反应的 Ct 值与拷贝数对数呈线性关系, R^2 达到了 0.995,直线方程

为 $y = -3.42x + 46.43$;反应体系中含有 10^6 — 10^{10} 个 18SrRNA 基因拷贝时, R^2 为 0.992,直线方程为 $y = -3.07x + 49.42$ 。两条标准曲线都获得了好的线性关系,符合定量 PCR 的要求。

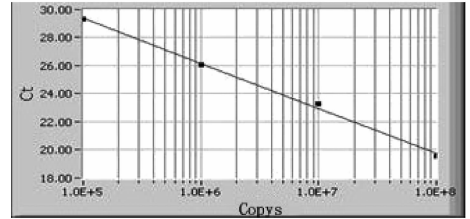
图2 $\Delta 5$ -脱饱和酶基因的标准曲线

Fig.2 Standard curve of D5D.

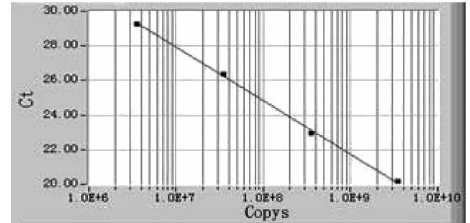


图3 18S rRNA 基因的标准曲线

Fig.3 Standard curve of 18S rRNA.

2.4 $\Delta 5$ -脱饱和酶基因的转录表达水平

通过对五株深黄被孢霉的 7 d 培养物以及高产菌株 YZ-124 的 3—8 d 培养物进行 D5D 和 18S rRNA 基因的荧光定量 PCR,得到检验样品循环数与荧光强度的关系,根据标准曲线算出 D5D 和 18S rRNA 基因的 mRNA 表达量, $\Delta 5$ -脱饱和酶基因的表达水平用 D5D 基因相对 18S rRNA 的表达量来衡量。

5 株深黄被孢霉 7d 培养物的 D5D mRNA 表达水平变化模式如表 3,深黄被孢霉原始菌株 AS3.3410 的 D5D mRNA 表达量最低,其他四株高产 ARA 诱变菌株的 D5D mRNA 表达水平均高于原始菌株,其中 YZ-124 最高。YZ-124 不同发酵天数的 D5D 基因 mRNA 表达水平的变化趋势如图 4, YZ-124 3 d 培养物的 D5D mRNA 表达水平较低,随后逐渐增加,8 d 达到最高。

表3 五株深黄被孢霉 7d 培养物 D5D mRNA 表达水平

Table 3 Expression level of D5D mRNA in 5 strains *Mortierella isabellina* cultures of 7 days

Strains	AS3. 3410	W35s2-153	Z80s2-109	Y-69	YZ-124
D5D mRNA expression level	0.011	0.041	0.053	0.089	0.111

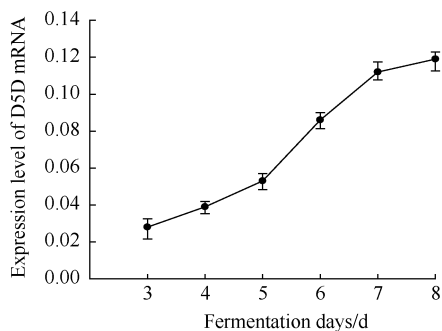


图4 不同发酵天数深黄被孢霉 YZ-124 D5D mRNA 表达水平变化

Fig. 4 Expression diversification of D5D mRNA in *Mortierella isabellina* YZ-124 of several days by fermentation.

2.5 $\Delta 5$ -脱饱和酶基因的表达水平与 ARA 生产之间的关系

比较深黄被孢霉的 7d 培养物和 YZ-124 的 3-8 d 培养物的 ARA 产量及 $\Delta 5$ -脱饱和酶基因转录表达水平,可以考察培养物中脱饱和酶转录表达与菌体油脂中 ARA 含量的关系,结果表明: $\Delta 5$ -脱饱和酶基因 mRNA 的相对表达量与培养物油脂中 ARA 含量具有一定的相关性,随着深黄被孢霉培养物中脱饱和酶基因表达水平的提高,油脂中 ARA 含量也增加,这种关系同时存在于不同 ARA 产量的深黄被孢霉菌株中以及高产 ARA 菌株 YZ-124 的不同 ARA 合成阶段,显示 $\Delta 5$ -脱饱和酶基因表达直接影响 ARA 的生物合成,暗示 $\Delta 5$ -脱饱和酶在深黄被孢霉的 ARA 合成中起到了重要作用。

3 讨论

花生四烯酸是一种 ω -6 系列的多不饱和脂肪酸,具有广泛的生物活性和重要的营养作用^[11]。其传统来源是动物的组织、血液、鱼油和深海藻类,但从这些材料中提取花生四烯酸的成本较高、提取率低,导致目前花生四烯酸的价格昂贵,不能满足市场需要,微生物发酵法生产花生四烯酸是制备花生四烯酸的新途径,可以降低成本、提高产量^[12-14]。深黄被孢霉被认为是生产花生四烯酸的优良菌种^[15]。在微生物体内,ARA 的合成通常是以单不饱和脂肪酸油酸为底物,合成途径中,有两个主要的反应,即碳链的增加和去饱和作用^[6]。 $\Delta 5$ -脱饱和酶是催化花生四烯酸形成的最后一步脱饱和反应的酶,是花生四烯酸合成途径上的限速酶,本文采用荧光定量 PCR 技术对 $\Delta 5$ -脱饱和酶在 ARA 生物合成中的作

用进行了评价。

定量 PCR (Q-PCR) 是一种对目的基因定量的快速高效的方法^[17],是目前为止最精确和可靠的技术,被广泛应用在基因表达、基因转移以及病原体检测等方面^[18]。荧光定量 PCR 实验中引物、探针的设计是至关重要的环节,引物探针的位置关系到是否能够检测到样品中的 $\Delta 5$ -脱饱和酶基因微小的表达量,它的特异性也是整个实验研究成败的关键。定量 PCR 实验设计和数据分析可以采用相对定量和绝对定量两种方法,其中相对定量可以对基因、基因产物、甚至环境样品进行有效定量^[19]。相对定量需要选择合适的内参,使用内参基因的目的是为了对加入到反转录反应中的 RNA 进行均一化处理。标准的看家基因一般都可被用作内参基因。适合于定量 PCR 反应的内参基因包括 GAPDH、 β -actin、 β -2-microglobulin 以及 rRNA。由于 rRNA 占总 RNA 的 80%,对于研究特异基因在不同环境条件下的表达非常重要,其含量变化受外界环境影响很小^[20]。因此本实验选择深黄被孢霉的 18S rRNA 作为内参基因,以保证该基因的表达不会受实验处理的影响。

朱敏^[21]等扩增了高山被孢霉 M6 (*Mortierella alpina*) 的 $\Delta 5$ -脱饱和酶基因,其大小为 1366 bp,编码 446 个氨基酸,并对 $\Delta 5$ -脱饱和酶基因的 mRNA 表达量与 ARA 的关系进行了探讨,对深黄被孢霉 $\Delta 5$ -脱饱和酶基因的研究未见报道。我们在前期研究中以深黄被孢霉 AS3.3410 为出发菌株通过不同诱变方法获得了 W35s2-153、Z80s2-109、Y-69、YZ-124 高产 ARA 的诱变菌株,它们在相同培养条件下,生物量和总油脂含量差别不大,但油脂中 ARA 的含量有显著的差异。通过荧光定量 PCR 技术,检测了 $\Delta 5$ -脱饱和酶在不同 ARA 产量的深黄被孢霉菌株中的 mRNA 表达水平,以及在高产 ARA 菌株 YZ-124 培养过程中的 mRNA 表达水平的动态变化。发现 $\Delta 5$ -脱饱和酶基因的 mRNA 表达水平与 ARA 的产生之间存在一定的相关性,不同菌株的 $\Delta 5$ -脱饱和酶基因的 mRNA 表达量与很多因素有关,不仅与菌株的培养条件(如 pH、温度、通气量等)有关,还决定于基因内部的调控因素(如复制过程、转录等),这些因素不是人为控制的,而是基因内部的一个调控机制。 $\Delta 5$ -脱饱和酶在深黄被孢霉 ARA 合成途径中起到了非常重要的作用,为 ARA 生产工艺的调控、高产 ARA 生产菌株的筛选,以及利用代谢

工程技术构建高产 ARA 菌株指明了研究方向。

参考文献

- [1] 姚昕,秦文,齐春梅,等.花生四烯的生理活性及其应用.粮油加工与食品机械(*Mechinery for Cereals Oil and Food Processing*),2004,(05):57-59.
- [2] 张鹏,杨培林,戴美学.微生物多不饱和脂肪酸的研究进展.微生物学杂志(*Journal of Microbiology*),2006,(01):34-37.
- [3] 鲍时翔,朱法科.被孢霉生物合成花生四烯酸的初步研究,菌物系统(*Mycosystema*)1999,(03):326-329.
- [4] 杨朝霞,张丽,李朝阳.花生四烯酸的营养保健功能.食品与药品(*Food and Drug*),2005,7(1):69-71.
- [5] 王啸,邱树毅.微生物发酵生产花生四烯酸的研究进展.中国油脂(*China Oils and Fats*),2004,(09):37-40.
- [6] 符嫦娥,韩伟,卞进发,等.花生四烯的研究进展.云南化工(*Yunnan Chemical Technology*),2004,31(5):31-34.
- [7] Kajikawa M, Yamato K T, Kohzu Y. Isolation and characterization of $\Delta 6$ -desaturase, an ELO-Like enzyme and $\Delta 5$ -desaturase from the Liverwort *Marchantia Polymorpha* and production of arachidonic and eicosapentaenoic acids in the methylotrophic Yeast *Pichia Pastoris*. *Plant Microbiology*,2004,(4):335-352.
- [8] 王啸,邱树毅,叶丹,等.花生四烯产生菌的选育.贵州工业大学学报(自然科学版) [*Journal of Guizhou University of Technology (Natural Science Edition)*],2005,(01):56-59.
- [9] 于长青,李丽娜.深黄被孢霉高产花生四烯酸菌株的紫外诱变原生质体育种.微生物学报(*Acta Microbiologica Sinica*),2009,49(1):44-48.
- [10] Li MC,Wang JQ, Xing LJ. Method for isolation of RNA from filamentous fungi of *Mortierella isabellina*. *Mycosystem*,1999,18(1):108-111.
- [11] Brick EE, Garfield S, Hoffman DR, et al. A randomized controlled trial of early dietary supply of long chain polyunsaturated fatty acids and mental development in term infants. *Developmental Medicine and Child Neurology*. 2000,42:173-181.
- [12] Sakuradani E, Hirano Y, Kamada N, et al. Improvement of arachidonic acid production by mutants with lower n-3 desaturation activity derived from *Mortierella alpine* IS-4. *Microbiol Biotechnol*,2004,(66):242-248.
- [13] Takeno S, Sakuradani E, Tomi A, et al. Transformation of Oil-Producing Fungus, *Mortierella alpina* IS-4. Using Zeocin, and Application to Arachidonic Acid Production. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2005, 100(6):617-622.
- [14] LIU L, Li M C, HU G W, et al. Identification of *Mortierella isabellina* M6-22 $\Delta 6$ -fatty acid desaturase by heterologous expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Acta Microbiologica Sinica*,2001,41(4):397-401.
- [15] Nicola H, Morris A, Douglas R T, et al. A vertebrate fatty acid desaturase with $\Delta 5$ and $\Delta 6$ activities. *Biochemistry*,2001,25:14304-14309.
- [16] Li MC, Liu L, Zhang L, et al. Cloning and sequencing analysis of $\Delta 6$ -fatty acid desaturase gene from *Mortierella isabellina*. *Mycosystema*, 2001, 20(1):44-50.
- [17] Chung HW. Reverse transcriptase PCR (RT-PCR) and quantitative-competitive PCR (QC-PCR). *Experimental Molecular Medicine*,2001,33(1 Suppl):85-97.
- [18] 阳成波,印遇龙,龚建华,等.定时定量 PCR 研究进展及其应用.中国预防兽医学报(*Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine*),2003,25(5):395.
- [19] Liljekvist-Larsson I, Torngren M, Abrahamson M, Johansson K. Growth of the postnatal rat retina in vitro: quantitative RT-PCR analyses of mRNA expression for photoreceptor protein. *Molecular Vis*,2003,9:657-64.
- [20] Tesson L, Heslan JM, Menoret S, et al. Rapid and accurate determination of zygosity in transgenic animals by real-time quantitative PCR. *Transgenic Trend*, 2003, 7(1):76-79.
- [21] 朱敏,刘智,余龙江,等.高山被孢霉 $\Delta 5$ 脱饱和酶基因的分离与验证.遗传学报(*genetica sinica*),2005,32(9):986-992.

Effect of *Mortierella isabellina* $\Delta 5$ -desaturases gene on arachidonic acid synthesis

Changqing Yu^{1, 2*}, Jian Yang¹, Di Yao¹, Lina Li¹

(¹College of Food Science, Heilongjiang Bayi Agricultural University, ²Agricultural Product Testing Centre of Agriculture Department, Daqing 163319, China)

Abstract: [**Objective**] To study the relation between mRNA expression of $\Delta 5$ -desaturase gene and arachidonic acid production. [**Methods**] Using fluorescence quantitative PCR, we determined the mRNA expression levels of $\Delta 5$ -desaturase gene of five *Mortierella isabellina* strains cultured for the same time and strain YZ-124 cultured for different time. Simultaneously, we measured the contents of arachidonic acid by gas chromatography. [**Results**] The results showed that $\Delta 5$ -desaturase gene mRNA expression level of distinct strains was different. Expression level of the original strain As3.3410 was the lowest, whereas that of the mutant strain YZ-124 was the highest. The mRNA expression of $\Delta 5$ -desaturases gene decreased gradually with fermentation time. [**Conclusion**] According to arachidonic acid yield, mRNA expression quantity of $\Delta 5$ -desaturase gene presented a positive correlation with arachidonic acid content in cultured oil.

Keywords: *Mortierella isabellina*; $\Delta 5$ -desaturases; arachidonic acid; fluorescence quantitative PCR

(本文责编:王晋芳)

Supported by the Science and Technology Research Focus Projects of Education Ministry(200148) and the Daqing Science and Technology Program Projects(SGG2009-010)

* Corresponding author. Tel: +86-459-6819231; Fax: +86-459-6819235; E-mail: spxypjb@126.com

Received: 19 November 2009/ Revised: 22 January 2010

系统发育树的构建方法

构建系统树是为了鉴定菌株的分类学地位,应该使用正确的方法构建。具体要求如下:

1. 将鉴定菌的 16S rRNA 序列递交 GenBank,用 Blast 软件搜索相似的 16S rRNA,然后一起构树。
2. 采用能反应分支长度的软件(如 NJ 法),并用 Bootstrap 值分析分支聚类的稳定性。
3. 用国际较为通用的一些建树方法,如 Neighbour - Joining 等,这样结果就更为可靠,更直观。
4. 请严格按照下列具体要求写作[参见:微生物学报,2004,44(2):143.]

① 系统树中:菌名应列出全称,且属和种名应斜体,名称后再加括号,其内含序列号。

② 图注(本刊的图注要求用英文写作):应表明"树"上所有的内容,包括:括号中的序号、分支点上的数字涵义、0.01 代表的意义。

③ 作图要求:要求达到印刷清晰,字体为"Time New Roman",字号为"8p"。可以选用两种方式——(A)文件格式为"*.Tif",分辨率为 600 线;(B)文件格式为"word",画出树,输入文字。