

## 海洋破囊壶菌 *Thraustochytrium* sp. FJN-10 DHA 生物合成途径相关延长酶的克隆与表达

江贤章, 秦丽娜, 田宝玉, 舒正玉, 黄建忠\*

(福建师范大学工业微生物教育部工程研究中心, 福州 350108)

**摘要:** 二十二碳六烯酸(Docosahexaenoic acid, DHA)是具有各种重要生理功能的高度不饱和脂肪酸。以海洋真菌 *Thraustochytrium* sp. FJN-10 为研究对象, 利用 RT-PCR 结合 RACE, 获得了两个碳链延长酶(TFD6 和 TFD5)的完整基因, 其中 TFD6 cDNA 全长 816 bp, 编码 271 个氨基酸; TFD5 cDNA 全长 831 bp, 编码 276 个氨基酸。将 TFD6、TFD5 酶切后分别连接到 *Hind*III/*Xba* I 处理过的 pYES2 载体, 醋酸锂法转化酿酒酵母感受态细胞, 成功构建了延长酶酵母表达系统。气相色谱分析表明 TFD6 可延长 C18:3n-6 至 C20:3n-6, TFD5 可延长 C20:5n-3 至 C22:5n-3。

**关键词:** 高度不饱和脂肪酸; 二十二碳六烯酸; 破囊壶菌; 延长酶; 克隆与表达  
中图分类号: Q936 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209 (2008) 02-0176-08

二十二碳六烯酸(Docosahexaenoic acid, 简称 DHA)是目前发现的碳链最长、不饱和度最高的  $\omega$ -3 长链高度不饱和脂肪酸(Long-chain polyunsaturated fatty acids, Lc-PUFAs), 具有抗心血管疾病、抗血脂、降血压、预防各种癌症等重要生理功能<sup>[1,2]</sup>。深海鱼油是 DHA 的传统来源, 但鱼油的品质与数量难以满足商业化发展的需求。海洋真菌 *Thraustochytrium* 能合成大量 DHA<sup>[3,4]</sup>, 可作为研究高度不饱和脂肪酸生物合成的模式生物。DHA 的生物合成途径涉及到脂肪酸碳链的延长反应, 催化这一反应的酶是碳链延长酶。由于碳链延长酶是膜结合蛋白, 目前还没有行之有效生化手段通过分离纯化进行研究, 因此只能通过基因的克隆, 从分子水平对其酶学表征进行研究。本文以海洋真菌 *Thraustochytrium* sp. FJN-10 为研究对象, 利用 RT-PCR 结合 RACE, 获得了两个碳链延长酶的完整基因, 并在 *S.cerevisiae* INVSc1 中实现功能的表达。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌种与质粒:** 破囊壶菌 *Thraustochytrium* sp. FJN-10, 系本研究小组从海水中分离纯化并保存<sup>[3]</sup>, 酿酒酵母 *S.cerevisiae* INVSc1、pYES2 vector 购自 Invitrogen, pGEM<sup>®</sup>-T Easy Vector 购自 Promega。

**1.1.2 培养基(g/L):** 葡萄糖 30, 蛋白胨 10, 酵母抽提液 5, 海水晶 15。

**1.1.3 主要试剂:** Total RNA Isolation Reagent: Unizol 购自上海博星基因芯片有限责任公司。SuperScript<sup>™</sup> II RNase H<sup>-</sup> Reverse Transcriptase, S. c. EasyComp<sup>™</sup> Transformation Kit 购自 Invitrogen。SMART RACE cDNA amplification kit 购自 BD Biosciences。 $\gamma$ -Linolenic acid、Eicosapentaenoic acid 以及各种氨基酸购自 Sigma。其余试剂均购自上海化学试剂公司。

基金项目: 国家自然科学基金项目(30370028); 福建省自然科学基金重大项目(2003F005); 福建省发改委资助项目([2005]847); 福建省教育厅科技项目(JB07079)

\*通讯作者。Tel: +86-591-22868212; Fax: +86-591-22868195; E-mail: hjz@fjnu.edu.cn

作者简介: 江贤章(1980-), 男, 福建福州人, 助教, 主要从事微生物功能基因的克隆与表达。E-mail: jiangxz@fjnu.edu.cn

收稿日期: 2007-07-05; 修回日期: 2007-09-14

**1.2 总 RNA 的提取及 mRNA 的分离**

用 Unizol 提取培养 24 h 的 *Thraustochytrium* sp. FJN-10 的总 RNA。取一定量的细胞, 液氮处理后加入 Unizol, 匀浆, 加入等体积的酚: 氯仿抽提, 0.8 体积异丙醇沉淀, 75 %乙醇洗涤后溶于一定体积的 DEPC(diethylpyrocarbonate, 焦碳酸二乙酯)水中, 紫外分光光度计检测其浓度和纯

度。按照 QIAGEN Oligotex<sup>®</sup> mRNA Kit 说明分离 mRNA。

**1.3 RT-PCR 扩增延长酶基因保守区**

利用 CLUSTAL X 1.8 分别对 C18-Δ<sup>6</sup>、C20-Δ<sup>5</sup> 延长酶进行多重比对, 得到延长酶保守序列。根据保守序列设计 2 对简并引物(表 1), 以总 RNA 为模板, RT-PCR 扩增延长酶基因保守区域。

表 1 Δ6/Δ5 延长酶简并引物  
Table 1 Degenerate primers for RT-PCR

Primers	Length/bp	SD	Sequence(5'→ 3')	
Δ6 elnogase	E6F1 E6R2	23	F R	AARATHHTGGGARTGGTTYGAYAC AACTGGACNADCTGNARCTGSGT
Δ5 elnogase	E5F1 E5R1	20	F R	TCATGGGGGSCSTTKGTCGAT GGGTDGTCGCAGGGGTTKTA

SD: Synthesis direction; F: Forward; R: Reverse; R: G or A; N: A or T or C or G; D: G or A or T; Y: T or C; S: G or C; K: G or T

**1.4 SuperScript Reverse Transcription PCR**

在 RNase-free 的 PCR 管中, 加入约 4 mg mRNA、Oligo dT<sub>(18)</sub> 引物(5'-GAGAGAGAGAGAGAGAGA GAACTAGTCTCGAGTTTTTTTTTTTTTTTTTTT-3'), 70℃反应 10 min, 再依次加入 5×first strand buffer、DTT、dNTP、RNase inhibitor, 42℃ 2 min 后加入反转录酶, 42℃反应 50 min; 70℃, 15min 灭活后, 作为下一步 PCR 的模板。PCR 条件如下: 94℃ 3 min; 94℃ 30s, 57℃ 30s, 72℃ 3min, 30 个循环; 72℃ 7min。

引物(NGSP), 用于 RACE(表 2)。利用通用引物 UPM 与 Δ6-5' GSP、Δ5-5' GSP 进行第一轮 5' RACE, 利用 NUP 与 Δ6-5' NGSP、Δ5-5' NGSP 进行第二轮的嵌套 PCR; 利用通用引物 UPM 与 Δ6-3' GSP、Δ5-3' GSP 进行第一轮 3' RACE, 利用 NUP 与 Δ6-3' NGSP、Δ5-3' NGSP 进行第二轮的嵌套 PCR。

**1.5 3'-5'-rapid amplification of cDNA ends (RACE)**

根据已获得的 Δ6、Δ5 延长酶部分序列, 分别设计 5' 和 3' 基因特异性引物(GSP)和嵌套基因特异性

PCR 扩增全长基因: 根据已经获得的 5' 和 3' 末端序列设计引物扩增 Δ6、Δ5 延长酶全长基因(表 3)。PCR 产物与 T Easy Vector 连接后, 电转化 *E.coli* DH10B, 利用 M13 通用引物对插入片段进行双向测序, 测序结果用 Phrep-Cross\_match-Phrap 软件包处理。

表 2 RACE 引物  
Table 2 Primers for RACE

Primers	Length/bp	Sequence(5'→ 3')
UPM		
Long	45	CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT
Short	22	CTAATACGACTCACTATAGGGC
NUP	25	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT
Δ6-5' GSP	25	TTCGGGAATGGGCGGAAGTAGTGCG
Δ6-5' NGSP	25	CGACGCCGTA CTTGATGGACGAGAG
Δ6-3' GSP	25	GCTCCGCTTCTGCACGTCTTGAC
Δ6-3' NGSP	25	ACGACCTTTTGGCTCTACGCCATCG
Δ5-5' GSP	24	AGGATGGTAGAGAAGTAGGCGTCG
Δ5-5' NGSP	24	TGCTTCCACTTCTTGCCGAGGATC
Δ5-3' GSP	24	CCAGGCATACCTCGGCGGCTACAA
Δ5-3' NGSP	24	TGGAGAAGGGCACCCGAGTCGCACG

UPM: Universal Primer A Mix; NUP: Nested Universal Primer A; 3' GSP: Gene-Specific primer for 3' RACE; NGSP: Nested Gene-Specific primer

表 3  $\Delta 6/\Delta 5$  延长酶全长克隆引物  
Table 3 Full length primers for  $\Delta 6/\Delta 5$  elongase

Primers	Length/bp	SD	Sequence(5'→3')	$T_m/$
$\Delta 6$ Full-1	24	F	ATGATGGAGCCGCTCGACAGGTACA	80
$\Delta 6$ Full-2	24	R	CTATGCCTTCTGGTTTTTGCGGGC	79
$\Delta 5$ Full-1	22	F	ATGGACGTCGTCGAGCAGCAAT	76.8
$\Delta 5$ Full-2	24	R	TTAGATGGTCTTCTGCTTCTTGGGC	74.2

### 1.6 延长酶空间结构和进化树分析

TR(Hidden markov model for local sequence-motif, 隐马尔夫结构预测)模型<sup>[5]</sup>结合 Rosetta 模拟程序<sup>[6]</sup>, 使用从头计算法<sup>[7,8]</sup>, 首先对可能的结构进行大规模的搜索, 计算肽链骨架的最低自由能, 接着建立精确模型, 对每一个分子进行空间结构详细定位。

用 ClustalX 1.8 将 C18- $\Delta 6$ 、C20- $\Delta 5$  延长酶与部分已知  $\Delta 5$ 、 $\Delta 6$ 、 $\Delta 9$  延长酶进行多重比对, 建立比对模型。用 Mega 4 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis, Version 3.0)程序包生成 1000 个自展数据集, 采用邻位相连(Neighbor-Joining)的距离算法<sup>[9]</sup>, 经

Consensus 计算多数一致树, 构建进化树。

### 1.7 $\Delta 6/\Delta 5$ 延长酶表达载体的构建

全长表达引物设计: 根据已获得的  $\Delta 6/\Delta 5$  延长酶序列, 设计全长表达引物, 其中正向引物 5' 端带 *Hind* III 酶切位点与起始密码子, 反向引物 5' 端带 *Xba* I 酶切位点与终止密码子(表 4)。以 RT 产物为模板, PCR 扩增后, 获得带酶切位点的  $\Delta 6$ 、 $\Delta 5$  延长酶完整的 ORF(Open reading frame, 开放阅读框)。扩增产物双酶切后, 连接到穿梭质粒 pYES2 半乳糖启动子下游, 命名为 pYTFD6、pYTFD5(图 1), 转化感受态 *E. coli* Top10, 扩增后提取质粒, 醋酸锂法转化感受

表 4  $\Delta 6/\Delta 5$  表达引物  
Table 4 Expressed primers for  $\Delta 6/\Delta 5$  elongase

Primers	Length/bp	SD	Sequence(5'→3')	$T_m/$
$\Delta 6$ Express-1	33	F	CCCAAGCTTACC <u>ATG</u> GTTGGAGCCGCTCGACAGG	88.6
$\Delta 6$ Express-2	32	R	GCTCTAGACTATGCCTTCTGGTTTTTGCGGG	82.5
$\Delta 5$ Express-1	31	F	CCCAAGCTTACC <u>ATG</u> GATGTCGTCGAGCAGC	85.3
$\Delta 5$ Express-2	32	R	GCTCTAGAT <u>T</u> TAGATGGTCTTCTGCTTCTTGGG	81.3

Underlined sequence indicated start or stop codon; italic sequence indicated *Hind* III or *Xba* I site

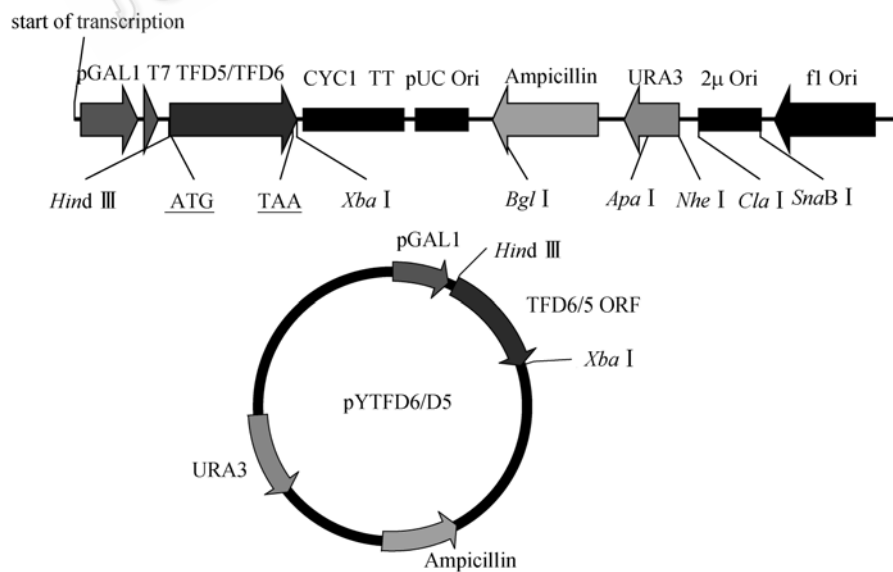


图 1 pYTFD6/D5 表达载体的构建  
Fig. 1 Construction of pYTFD6/D5 Vectors.

态酵母 *S.cerevisiae* INVSc1。重组酵母培养于 SC-U(Synthetic minimal medial without uracil, 含 2% 棉子糖)。培养  $OD_{600}$  至 0.4 后, 添加 2% 半乳糖, 1% Tergitol type NP-40, 300  $\mu\text{mol/L}$  GLA(C18:3n-6) 或 EPA(C20:5n-3), 25 $^{\circ}\text{C}$  培养 60h。

### 1.8 脂肪酸分析

离心收集菌体, 蒸馏水洗涤后, 加 1.5mL 10M HCl 于具塞试管中, 剧烈震荡, 80 $^{\circ}\text{C}$  消化 1h; 加 1.5mL HCl-CH<sub>3</sub>OH(1.25 Mol/L), 剧烈震荡 2min, 60 $^{\circ}\text{C}$  酯化 3h; 加 2 mL 正己烷, 剧烈震荡 1 min, 离心 (200 $\times$ g), 取上层正己烷液相于另一管中, 充氮气挥发后, 再用 100  $\mu\text{L}$  正己烷溶解甲酯, 立即分析<sup>[10]</sup>, 标准品为 GLA 和 EPA 混合甲酯。安捷伦气相色谱仪 (6890N, America), 配有 FID 氢火焰检测器, HP-INNOWax polyethylene glycol 极性柱 (30.0 m $\times$ 0.32 mm $\times$ 0.50  $\mu\text{m}$ )。柱温采用四阶段升温程序: 150 $^{\circ}\text{C}$  保持 1min, 150 升温至 200 $^{\circ}\text{C}$ (15 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ ), 200 $^{\circ}\text{C}$  升温至 250 $^{\circ}\text{C}$ (3 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ ), 250 $^{\circ}\text{C}$  保持 5min。检测器温度 280 $^{\circ}\text{C}$ 。上样模式: 不分流。载气: 氮气, 20 mL/min 恒流。

## 2 结果和分析

### 2.1 延长酶基因的克隆

**2.1.1  $\Delta 6$  延长酶:** 简并引物 E6F1 与 E6R2 RT-PCR 获得 242 bp 片段, 5' RACE 获得约 520 bp 片段, 3' RACE 获得约 350 bp 片段, 5' RACE 与 3' RACE 测序结果用 phrap 拼接后, 重叠 60 bp, 说明已经获得完整的 cDNA 全长序列。全长引物  $\Delta 6\text{Full-1}$  与  $\Delta 6\text{Full-2}$  扩增获得 816 bp  $\Delta 6$  延长酶全长基因(GenBank Accession No: DQ299828)。利用 EMBOSS 的 pepstats 对预测的 *Thraustochytrium* sp. FJN-10  $\Delta 6$  延长酶 (TFD6) 271 个氨基酸序列进行分析, 该酶分子量为 31.3 kDa, 等电点为 9.26。TFD6 蛋白在 151~157 氨基酸位点处具有一个 FLHXXHH 延长酶特征序列, C 末端具有一个内质网结合信号肽(-KK-)。

**2.1.2  $\Delta 5$  延长酶:** 简并引物 E5F1 与 E5R1 RT-PCR 获得 535 bp 片段, 5' RACE 获得约 430 bp 片段, 3' RACE 获得约 400 bp 片段, 5' RACE 与 3' RACE 序列拼接后, 重叠 121 bp, 说明已经获得完整的全长。全长引物  $\Delta 5\text{Full-1}$  与  $\Delta 5\text{Full-2}$  扩增获得 831 bp  $\Delta 5$  延长酶全长基因(GenBank Accession No: DQ299827)。利用 Pepstats 对  $\Delta 5$  延长酶基因编码的 276 个氨基酸序

列分析表明, *Thraustochytrium* sp. FJN-10  $\Delta 5$  延长酶 (TFD5) 蛋白分子量为 31.9 kDa, 等电点为 8.8。TFD5 蛋白在 152~158 氨基酸位点处同样具有一个 FLHXXHH 延长酶特征序列, C 末端也有一个内质网结合信号肽(-KK-)。

### 2.2 疏水性分析

利用 Kyte-Doolittle 算法对 TFD6、TFD5 延长酶进行疏水性分析<sup>[11]</sup>, 结果表明, TFD6、TFD5 延长酶蛋白疏水性很强, 其疏水性特征与酵母 ELO 延长酶相似, 从 N-末端到 C-末端平均分布 5~7 个强疏水区。

### 2.3 延长酶蛋白跨膜分析

利用 expasy 的 TMHMM 工具 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>) 对 TFD6、TFD5 延长酶进行跨膜分析, 结果表明, TFD6、TFD5 延长酶均是疏水性很强的跨膜蛋白, TFD6 具有 5 个跨膜区, TFD5 具有 7 个跨膜区; TFD6 延长酶特征保守序列位于膜外, 而 TFD5 延长酶特征保守序列位于跨膜区。

### 2.4 TFD6、TFD5 空间结构预测

将获得的延长酶蛋白提交蛋白质结构数据库 (PDB) 进行比对, 发现 TFD6、TFD5 与某些结构已经确定的蛋白, 如细胞色素氧化酶、核糖核苷二磷酸还原酶具有类似的结构域, 但同源性极低 (<10%), 这是因为目前国内外尚未有人对延长酶的结构进行研究。由于没有适宜的模型进行同源建模, 因此只能利用 HMMSTR 模型结合 Rosetta 模拟程序进行预测, 结果表明 TFD6、TFD5 空间结构相似性很小。TFD6、TFD5 跨膜区的主要结构是  $\beta$ -片层结构与无规则卷曲。此外, 在建模过程中, 发现 FLHXXHH 特征序列位于主要位于无规则卷曲中, 可能是延长酶的活性中心。延长酶空间结构的预测, 为研究 HXXHH 组氨酸高度保守序列功能、延长酶活性中心、定点突变奠定基础。

### 2.5 延长酶氨基酸序列分析

利用 Blast 进行的序列同源性分析表明, 不同物种间的延长酶同源性较低, 如 *Thraustochytrium* 延长酶与其它物种的延长酶同源性较低 (17.1%~35.7%), *Thraustochytrium* 各个种之间的  $\Delta 5$  延长酶同源性较高 (55.7%~99.2%)。 *Thraustochytrium* FJN-10 TFD6、TFD5 延长酶之间的同源性仅 21.8%, 这与空间结构预测结果相似。以上结果充分说明延长酶蛋白的保守性低, 功能高度分化, 对底物的专一性很强。将预测的 *Thraustochytrium* FJN-10  $\Delta 6$ 、 $\Delta 5$  延长酶氨基酸序

列与 GenBank 的  $\Delta 6$ 、 $\Delta 5$  延长酶进行比对(图 2), 结果发现, TFD6、TFD5 与其它延长酶一样, 具有一个 HXXHH 组氨酸高度保守序列。该序列在 PUFA 脱饱和酶、核酸还原酶、血红蛋白等其它与膜结合的蛋白中也存在<sup>[12-15]</sup>。虽然组氨酸保守序列在延长酶中作

用还不明确, 但 Baoxiu<sup>[16]</sup>利用定点突变, 证明该高度保守序列对 *Isochrysis galbana*  $\Delta 9$ -延长酶的活性有影响。此外, 在这些氨基酸肽链的 C-末端, 都有一个内质网结合信号肽(KKXX), 这表明, 碳链延长酶位于内质网上。

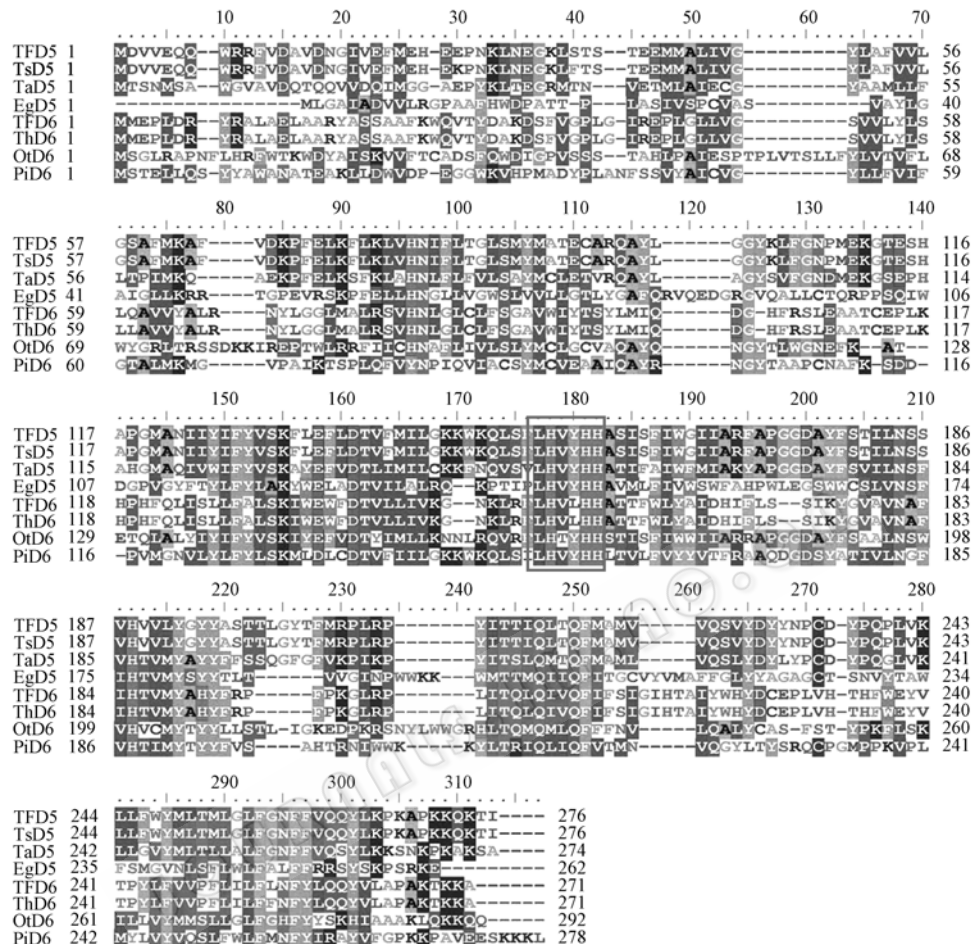


图 2  $\Delta 6$ 、 $\Delta 5$  延长酶比对

Fig. 2 Sequence comparison of  $\Delta 6$ 、 $\Delta 5$  elongase. Red box indicated conserved histidine-rich motif. TFD5: *Thraustochytrium* sp.FJN-10  $\Delta 5$  Elongase(DQ299827). TsD5: *Thraustochytrium* sp.  $\Delta 5$  Elongase(CAI58898). TaD5: *Thraustochytrium aureum*  $\Delta 5$  Elongase(CAI58889). EgD5: *Euglena gracilis*  $\Delta 5$  Elongase(CAJ30861). TFD6: *Thraustochytrium* sp.FJN-10  $\Delta 6$  Elongase(DQ299828). ThD6: *Thraustochytrium*  $\Delta 6$  Elongase(CAI58871). OtD6: *Ostreococcus tauri*  $\Delta 6$  Elongase(CAI58897). PiD6: *Phytophthora infestans*  $\Delta 6$  Elongase(CAF05416)

## 2.6 延长酶进化树分析

利用 N-J 距离法构建的延长酶系统进化树见图 3。从图中可以看出, N-J 构建的进化树对来自不同物种的延长酶按照  $\Delta 5$ 、 $\Delta 6$  和  $\Delta 9$  进行了功能聚类。TFD6 与 *Thraustochytrium*  $\Delta 6$  延长酶进化距离最近, 可能具有延长 C18:3n-6 至 C20:3n-6 的活性。TFD5 与 *Thraustochytrium* sp.  $\Delta 5$  延长酶进化距离最近, 可能具有延长 C20:5n-3 至 C22:5n-3 的活性; 同一物种、不同功能的延长酶(如 *Thraustochytrium* sp.FJN-10  $\Delta 5$  和  $\Delta 6$  延长酶, *Ostreococcus tauri*  $\Delta 5$  和  $\Delta 6$  延长酶)

进化距离较远; 不同物种、同一功能的延长酶进化距离较近(如 *Xenopus laevis*、*Clona intestinalis*  $\Delta 5$  延长酶, *Thraustochytrium* sp.FJN-10 和 *Thraustochytrium aureum*  $\Delta 5$  延长酶), 这可能是产油微生物在进化过程中, 其延长酶功能的分化与物种的系统发育并非同步进化, 因此, 其同源性不尽相同。

## 2.7 酵母表达载体 pYTFD5/D6 的构建

利用 *Hind* III、*Xba* I 对 TFD6、TFD5 以及穿梭质粒 pYES2 酶切鉴定。重组酵母菌落 PCR 电泳结果与测序结果表明, pYTFD5、pYTFD6 酵母表达系统构建成功。

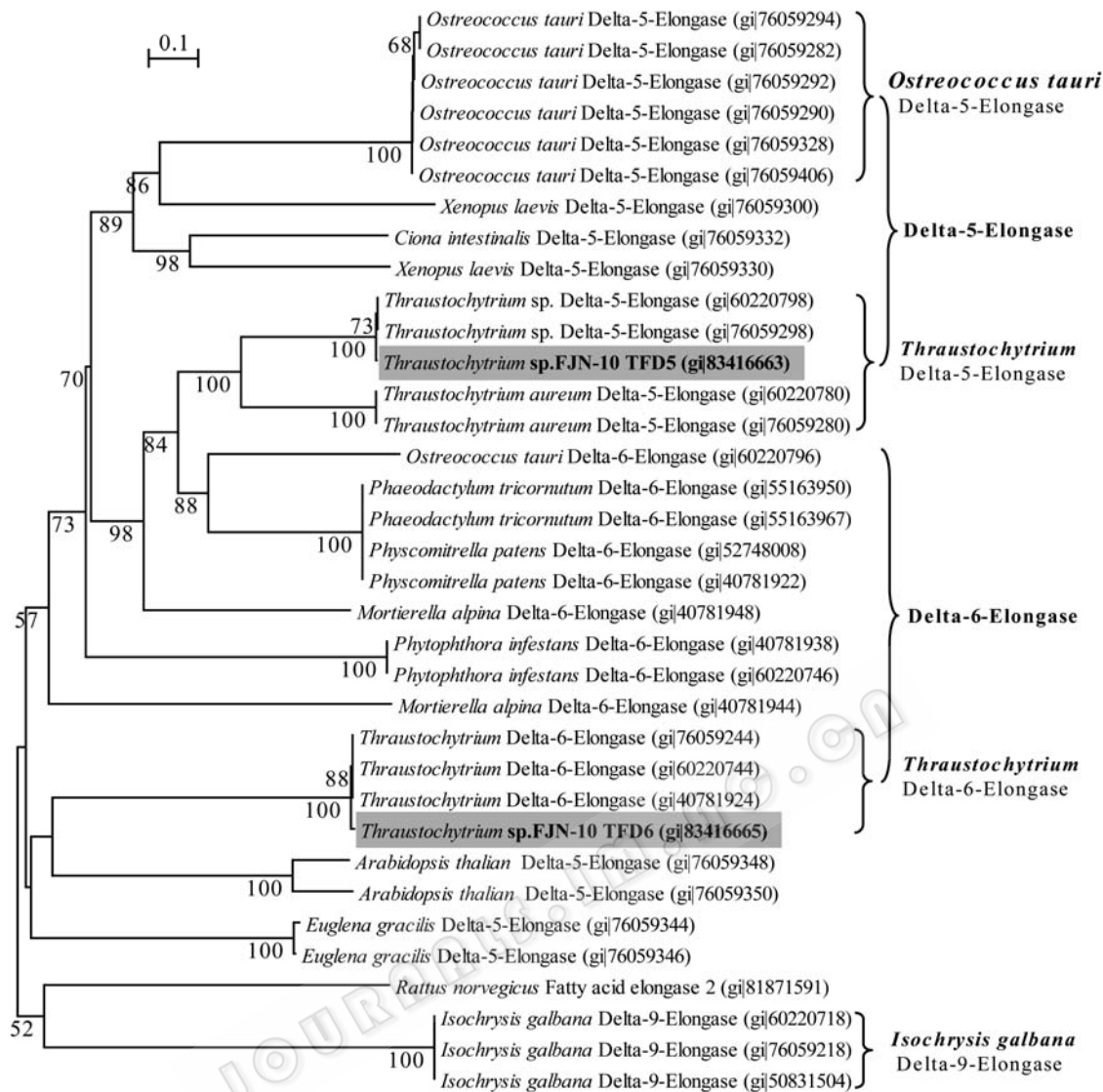


图3 延长酶进化树分析

Fig. 3 Phylogenetic analysis of elongases. Numbers at the nodes indicate the confidence level from 1000 replicate bootstrap samplings. The scale bar indicates the 0.1 evolutionary distance unit. Numbers in bracket refer to GenBank accession number.

## 2.8 TFD6、TFD5 功能鉴定

重组酵母经半乳糖诱导后, 提取总脂肪酸并甲酯化, 以底物 GLA、EPA 甲酯为标准品, 以空载体 pYES2 转化的酵母为对照进行气相色谱分析, 结果见图 4。从图中可以看出, 当添加底物 GLA 后, pYTFD6 重组酵母的脂肪酸甲酯组分中出现 DGLA(Dihomo- $\gamma$ -linolenic acid, 二十碳三烯酸, C20:3n-6)新峰。当添加底物 EPA 后, pYTFD5 重组酵母的脂肪酸甲酯组分中出现 DPA(Docosapentaenoic acid, 二十二碳五烯酸, C22:5n-3)新峰。以上结果表明, TFD6、TFD5 分别具有 C18:3n-6 和 C20:5n-3 碳链延长酶活性。

## 3 讨论

*Thraustochytrium* sp.FJN-10 TFD6、TFD5 高度不饱和脂肪酸碳链延长酶是强疏水性跨膜蛋白, 必须在内质网结合信号肽的引导下, 结合于内质网上, 才能执行碳链延长的催化反应。本试验构建了碳链延长酶重组酵母表达系统, 成功地催化了 GLA 和 EPA 的延长, 这表明, 所表达的延长酶也是膜结合的蛋白, 具有生物活性。已有许多报道指出, *Thraustochytrium* 油脂中含有 C18:0、C18:1n-9、C18:2n-6、C20:3n-6、C20:4n-6、C20:5n-3、C22:5n-3 以及 C22:6n-3<sup>[3,4,10,17]</sup>。根据重组酵母活性鉴定的 TFD6、TFD5 延长酶的活



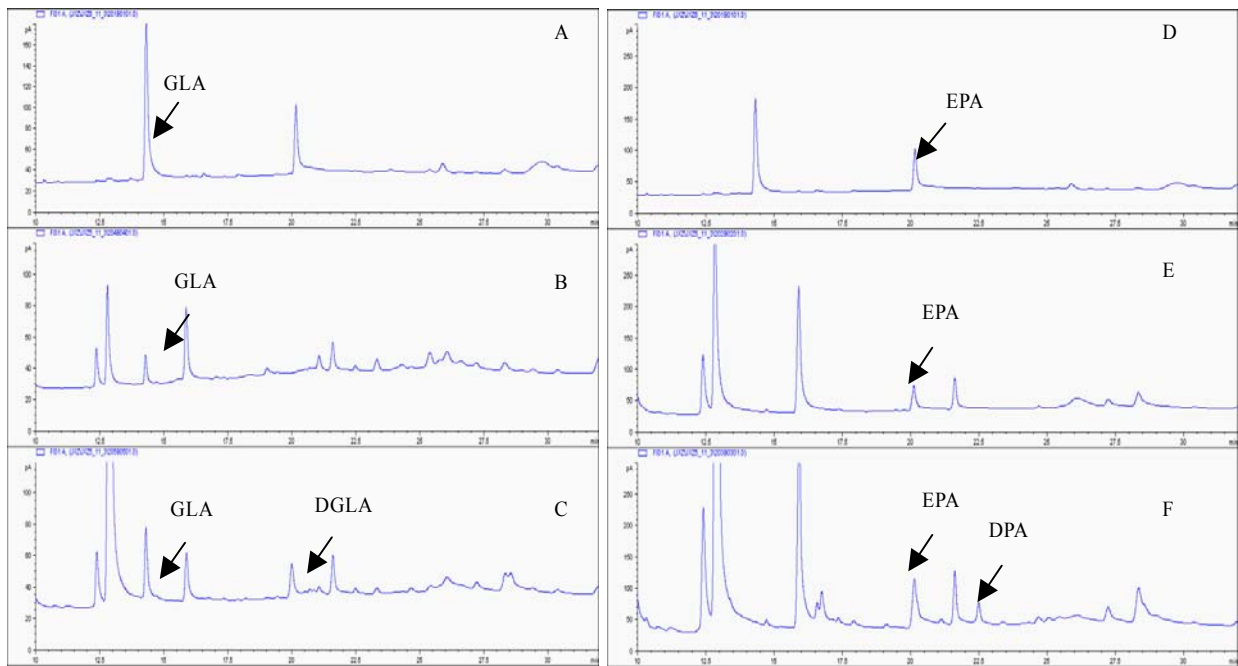


图 4 pYTFD6、pYTFD5 重组酵母脂肪酸甲酯气相色谱图

Fig. 4 Gas chromatograms of fatty acid methyl esters extracted from transformed yeast containing pYTFD6 and pYTFD5. A: GLA standard esters; B: without pYTFD6; C: with pYTFD6; D: EPA standard esters; E: without pYTFD5; F: with pYTFD5

性, 结合 *Thraustochytrium* 脂肪酸组成, 可以推测 *Thraustochytrium* 是通过一系列的碳链延长与脱饱和合成 DHA: 首先乙酰辅酶 A 与丙二酰辅酶 A 在 FAS 作用下生成 C16:0 饱和脂肪酸; C16:0 在 FAE 的作用下, 延长碳链骨架生成 C18:0; C18:0 接着在  $\Delta 9$ 、 $\Delta 12$ 、 $\Delta 15$  FAD 的依次作用下生成 C18:2n-6 与 C18:3n-3; 随后在  $\Delta 6$  FAD、 $\Delta 6$  FAE、 $\Delta 5$  FAD、 $\Delta 5$  FAE 的依次作用下, 生成  $\omega 6$ -DPA 与  $\omega 3$ -DPA; 最后  $\omega 3$ -DPA 在  $\Delta 4$  FAD 的作用下生成 DHA。在植物<sup>[18]</sup>、蓝细菌<sup>[19]</sup>、线虫<sup>[20]</sup>中相继发现  $\omega$ -3 脱饱和酶可在转化  $\omega$ -6 PUFA 生成  $\omega$ -3 PUFA, 但在 *Thraustochytrium* 中尚未发现  $\omega$ -3 脱饱和酶, 因此该转化步骤仍有待于考证。此外在 *Thraustochytrium* 中, 目前未发现 C18:3n-3、C18:3n-6、C18:4n-3 以及 C20:4n-3 PUFA, 这可能是以这些 PUFA 为底物的 FAD 和 FAE 催化活性很高, 大部分的上述 PUFA 被转化为不饱和度更高或碳链长度更长的 PUFA。

#### 参 考 文 献

- [1] Rinaldi B, Di Pierro P, Vitelli MR, *et al.* Effects of docosahexaenoic acid on calcium pathway in adult rat cardiomyocytes. *Life Sci.* 2002, 71(9): 993–1004.
- [2] Zeman M, Zak A, Vecka M, *et al.* Effect of n-3 polyunsaturated
- [3] 黄建忠, 刘丽霞. 高产 DHA 海洋真菌 *Thraustochytrium* sp. FJN-10 脂肪酸组成及其 18S rDNA 序列分析. *药物生物技术 (Pharm Biotechnol)*. 2005, 12(1): 1–5.
- [4] Huang JZ, Aki T, Hachida K, *et al.* Profile of polyunsaturated fatty acids produced by *Thraustochytrium* sp KK17-3. *J Am Oil Chem Soc.* 2001, 78(6): 605–610.
- [5] Bystroff C, Thorsson V, Baker D. HMMSTR: a hidden Markov model for local sequence-structure correlations in proteins. *J Mol Biol.* 2000, 301(1): 173–190.
- [6] Bradley P, Misura KM, Baker D. Toward high-resolution de novo structure prediction for small proteins. *Science.* 2005, 309(5742): 1868–1871.
- [7] Shao Y, Bystroff C. Predicting interresidue contacts using templates and pathways. *Proteins.* 2003, 53(S6): 497–502.
- [8] Yuan X, Shao Y, Bystroff C. Ab initio protein structure prediction using pathway models. *Comparative and Functional Genomics.* 2003, 4(4): 397–401.
- [9] Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol.* 1987, 4(4): 406–425.
- [10] 黄建忠, 江贤章, 刘丽霞, 等. 高产 DHA 海洋真菌 *Thraustochytrium* sp.N4-103 脂肪酸组成及其 18S rRNA 基因

fatty acids on plasma lipid, LDL lipoperoxidation, homocysteine and inflammation indicators in diabetic dyslipidemia treated with statin + fibrates combination. *Cas Lek Cesk.* 2005, 144(11): 737–741.

- 的克隆与序列分析. 福建师范大学学报(*J Fujian Norm Univ*). 2005, 21(1): 85–94.
- [11] Kyte J, Doolittle RF. A simple method for displaying the hydrophobic character of a protein. *J Mol Biol*. 1982, 157(1): 105–132.
- [12] Tonon T, Harvey D, Qing R, *et al*. Identification of a fatty acid Delta11-desaturase from the microalga *Thalassiosira pseudonana*. *FEBS Lett*. 2004, 563(1-3): 28–34.
- [13] Kajikawa M, Yamato KT, Kohzu Y, *et al*. 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 Mol Biol*. 2004, 54(3): 335–352.
- [14] Huang JZ, Aki T. Cloning and Expression of Two  $\Delta 6$  Desaturase Isozymes from *Mucor*. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*. 2004, 36(2): 163–164.
- [15] Sakuradani E, Shimizu S. Gene cloning and functional analysis of a second delta 6-fatty acid desaturase from an arachidonic acid-producing *Mortierella* fungus. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2003, 67(4): 704–711.
- [16] Qi B, Fraser TC, Bleakley CL, *et al*. The variant 'his-box' of the C18-Delta9-PUFA-specific elongase IgASE1 from *Isochrysis galbana* is essential for optimum enzyme activity. *FEBS Lett*. 2003, 547(1-3): 137–139.
- [17] Bongiorni L, Jain R, Raghukumar S, *et al*. *Thraustochytrium gaertnerium* sp. nov.: a new thraustochytrid stramenopilan protist from mangroves of Goa, India. *Protist*. 2005, 156(3): 303–315.
- [18] Yadav NS, Wierzbicki A, Aegerter M, *et al*. Cloning of higher plant omega-3 fatty acid desaturases. *Plant Physiol*. 1993, 103(2): 467–476.
- [19] Sakamoto M, Akahane Y, Tsuda F, *et al*. Entire nucleotide sequence and characterization of a hepatitis C virus of genotype V/3a. *J Gen Virol*. 1994, 75(7): 1761–1768.
- [20] Spychalla JP, Kinney AJ, Browse J. Identification of an animal omega-3 fatty acid desaturase by heterologous expression in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997, 94(4): 1142–1147.

## Cloning and expression of two elongase genes involved in the biosynthesis of docosahexaenoic acid in *Thraustochytrium* sp. FJN-10

Xianzhang Jiang, Lina Qin, Baoyu Tian, Zhengyu Shu, Jianzhong Huang\*

(Engineering Research Center of Industrial Microbiology, Ministry of Education, Fujian Normal University, Fuzhou 350108, China)

**Abstract:** Docosahexaenoic acid (DHA C22:6n-3), a typical long chain polyunsaturated fatty acids (PUFAs) has many positive effects on diseases such as arteriosclerosis, hypertriglyceridemia, hypertension and cancers. Marine fungi, especially *Thraustochytrium* spp. producing much DHA can serve as model organisms for explaining the mechanism on the biosynthesis of PUFA. We described two elongase genes (TFD6 and TFD5) involved in the biosynthesis of DHA in *Thraustochytrium* sp. FJN-10 was cloned by using reverse transcription PCR and rapid amplification of cDNA ends. TFD6 cDNA was 816 bp in length and encoded a protein of 271 amino acids. TFD5 cDNA was 831 bp in length and encoded a protein of 276 amino acids. Transmembrane analysis revealed that TFD6 contained five transmembrane domains while TFD5 contained seven. Tertiary structures of TFD6, TFD5 elongases were predicted by HHMMSTR (Hidden markov model for local sequence-structure) model and Rosetta program. Alignment of TFD6, TFD5 with other elongases showed that both of them shared an HXXHH conserved histidine-rich motif. Phylogenetic analysis showed that TFD6 was the closest to *Thraustochytrium*  $\Delta 6$  elongase, while TFD5 was the closest to *Thraustochytrium* sp.  $\Delta 5$  elongase. TFD6 and TFD5 were subcloned into the *Hind* III/*Xba* I restriction site of pYES2 vector respectively. Recombined plasmids were transformed into *Saccharomyces cerevisiae* using lithium acetate method. Gas chromatography analysis showed that TFD6 could elongate C18:3n-3 to C20:3n-3 while TFD5 could elongate C20:5n-3 to C22:5n-3.

**Keywords:** polyunsaturated fatty acid; docosahexaenoic acid; *thraustochytrium*; elongase; cloning; expression

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30370028), Natural Science Foundation of Fujian Province (2003F005), the Fujian Development and Reform Commission([2005]847) and the Education Department of Fujian Province (JB07079)

\* Corresponding author. Tel: +86-591-22868212; Fax: +86-591-22868195; E-mail: hjz@fjnu.edu.cn

Received: 5 July 2007/ Revised: 14 September 2007