

高山被孢霉 Δ^6 -脂肪酸脱氢酶基因在毕赤酵母中的胞内表达

李明春 孙 颖 张 琦 邢来君*

(南开大学微生物系、国家微生物学重点学科,天津 300071)

摘 要 γ -亚麻酸 (GLA) 作为人体必需的不饱和脂肪酸,具有重要的营养和药用价值。 Δ^6 -脂肪酸脱氢酶是 γ -亚麻酸合成途径中的关键酶。为了在毕赤酵母中建立一种新的合成 γ -亚麻酸的表达体系,将高山被孢霉 Δ^6 -脂肪酸脱氢酶基因与胞内表达载体 pPIC3.5K 连接, *Sac* I 线性化后电击法转化毕赤酵母 SMD1168,获得的转化子经 PCR 鉴定目的基因已整合到毕赤酵母的基因组中。用甲醇诱导表达,通过脂肪酸气相色谱和气相色谱-质谱 (GC-MS) 联用分析表明高山被孢霉 Δ^6 -脂肪酸脱氢酶基因在毕赤酵母中获得表达, γ -亚麻酸含量占总脂肪酸的 16.26%。

关键词 高山被孢霉, Δ^6 -脂肪酸脱氢酶, γ -亚麻酸, 毕赤酵母

中图分类号 Q786 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2004)01-0034-05

γ -亚麻酸 (γ -linolenic acid, GLA) 作为人体的一种必需脂肪酸,是具有重要生理活性物质的前列腺素 PG-I 和 PG-II 的前体,它在人体内由 Δ^6 -脂肪酸脱氢酶 (Δ^6 -fatty acid desaturase) 催化亚油酸转化而来。然而正常人群中许多人不能通过亚油酸的转化来保持血液中 γ -亚麻酸的正常含量,从而抑制了 PG-I, PG-II 的合成,导致生理失调、血压升高、动脉硬化、风湿病、肥胖症、糖尿病、皮肤老化等多种疾病^[1]。此外, GLA 还具有抗革兰氏阳性菌、阴性菌,抗 HIV 感染,抗肿瘤,抗多种炎症和抗粥样硬化等作用^[2],具有很高的药用价值。然而传统来源的 GLA 由于受许多自然条件的限制,资源有限不能满足市场需求,开发新的 GLA 来源已备受关注。 Δ^6 -脂肪酸脱氢酶以亚油酸为底物,在其第 6, 7 位原子间脱氢形成 GLA,是合成 GLA 的关键酶,因此对于 Δ^6 -脂肪酸脱氢酶的研究已逐渐成为国内外学者的关注热点。从 20 世纪 90 年代初,国外相继从蓝细菌^[3]、琉璃苣^[4]、线虫^[5]、小鼠^[6]、斑马鱼^[7]、高山被孢霉^[8,9]等不同物种中克隆了 Δ^6 -脂肪酸脱氢酶基因,且分别在酿酒酵母和烟草中进行了成功表达,但这些表达体系仅限于功能上的研究,不适于大规模生产 GLA。

毕赤酵母 (*Pichia pastoris*) 表达系统是近年来应

用较多的一种外源基因表达系统,其中含有底物亚油酸以及丰富的油酸(亚油酸的底物),是生产 GLA 很有潜力的表达系统。

本文将从高山被孢霉 (*Mortierella alpina*) 中克隆得到的 Δ^6 -脂肪酸脱氢酶基因同源重组整合到毕赤酵母细胞中,构建了毕赤酵母工程菌株 SMD3.5KMA6 成功表达了 GLA。这是首次将高山被孢霉 Δ^6 -脂肪酸脱氢酶基因在毕赤酵母中获得表达的报道。

1 材料与方法

1.1 质粒、菌株、酶及主要试剂

大肠杆菌 DH5 α , 含有高山被孢霉 Δ^6 -脂肪酸脱氢酶基因的 pTMAC16 质粒为本实验室保存。酵母胞内表达载体 pPIC3.5K 及宿主菌 SMD1168 购自 Invitrogen 公司。限制酶 *Eco*R I, *Not* I, *p*fuDNA 多聚酶, T4 DNA 连接酶均购自 TaKaRa。YNB (W/O) 购自 Difco 公司。G418、亚油酸为上海 Sangon 产品。其他常规试剂均为分析纯。

1.2 目的基因片段的扩增

引物由上海 Sangon 合成。上游引物: 5'-TAG-GCTGAATTCATGGCTGCTGCTCCCAGTGTG AGGACG-3' 引入 *Eco*R I 位点; 下游引物: 5'-TACTGCGGC-

CGCTTACTGCGCCTTACC-3'引入 *Not* I 位点。以本室构建的含有高山被孢霉 Δ^6 -脂肪酸脱氢酶基因的质粒 pTMACL6 为模板进行 PCR 扩增反应。反应条件为 95℃ 2min ,94℃ 30s ,58℃ 30s ,72℃ 60s 30 个循环 ,最后 72℃延伸 10min。

1.3 重组质粒 pPIC3.5K-MA6 的构建

将 PCR 产物和表达载体 pPIC3.5K 分别用 *Eco*R I ,*Not* I 双酶切 ,回收后连接 ,转化大肠杆菌 DH5 α 。酶切鉴定重组质粒。感受态细胞制备及转化参照《分子克隆》第二版^[10]方法进行。

1.4 Δ^6 -脂肪酸脱氢酶基因转化酵母细胞

取 10 μ g 重组质粒 pPIC3.5K-MA6 经 *Sac* I 单酶切线性化后 ,电击法转化宿主菌 SMD1168(*his*⁻ *pep*⁻ *mut*⁺)在 MDS 选择培养基^[11]30℃生长 2~3d ,直到转化子出现。随机挑转化子转至不同 G418 浓度 (0.5 ,1 ,2 ,4 ,5mg/mL)的 YPD 培养基中筛选具 G418 高抗性的菌株。

1.5 PCR 方法鉴定阳性转化子及其表型

毕赤酵母基因组 DNA 抽提方法参考文献^[12]进行。引物由上海 Sangon 合成。

5' *AOX1* :5'-GACTGGTTCCAATTGACAAGC-3'
3' *AOX1* :5'-GCAAATGGCATTCTGACATCC-3'
扩增条件 :94℃ 5min ,94℃ 45s ,50℃ 45s ,72℃ 60s 30 个循环 ,最后 72℃延伸 10min。

1.6 酵母转化子的诱导表达及脂肪酸提取

将毕赤酵母重组子接种于 BMGY 培养基^[13]中 ,30℃培养 16~18h ,当 OD₆₀₀为 2~6 时 ,离心去上清后重悬菌体于 BMMY 培养基^[13]中 ,20℃诱导 3 天 ,每 24h 补加甲醇至终浓度 0.5%。将诱导培养物离心 ,去离子水洗涤 3 次 ,50℃烘干。磨碎后加入 5% KOH-CH₃OH 溶液 ,70℃ 5h ,再加入 14% BF₃-CH₃OH ,70℃ 1.5h ,合成脂肪酸甲酯。用 1:4 的氯仿 :正己烷萃取脂肪酸甲酯。氮气吹干 ,正己烷回溶 ,备用。

1.7 脂肪酸分析

以 Sigma 公司生产的 GLA 甲酯为标准品 ,对样品进行气相色谱分析和 GC-MS 分析。气相色谱分析采用弹性石英毛细管柱 (0.32mm \times 30m) ,载气 :N₂ 线速 :10cm/s。分流比 :100:1 ,气化温度 :250℃ ,柱温 :180℃ ,尾吹 :50mL/min 检测器 :氢火焰离子化检测器 ,上样量 1 μ L ,分析软件 :Anstar 分析之星色谱工作站。GC-MS 分析采用石英毛细管柱 HP-5(30m \times 0.25mm \times 0.25mm) ,载气 :高纯 He ,柱温 :70℃ 2 min ,然后 70~250℃ (10℃/mm)程序升温 ,气化温度 230℃ ,离子源温度 250℃ ,电子能量 70eV。

2 结 果

2.1 重组质粒 pPIC3.5K-MA6 构建和鉴定

按材料方法 1.3 构建的重组表达载体 pPIC3.5K-MA6 见图 1 Δ^6 -脂肪酸脱氢酶基因(*D6D*)插入 5' *AOX1* 和 TT 表达框内。重组质粒经 *Eco*R I ,*Not* I 双酶切鉴定 ,得到 1.38kb 的目的片段和已线性化的约 9.0kb 的质粒片段 ,如图 2。

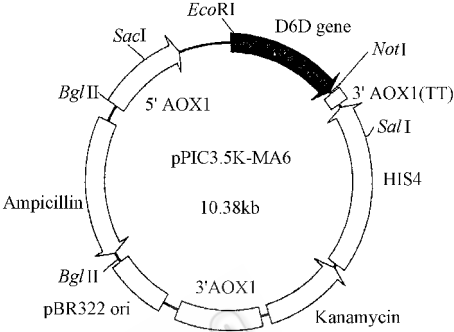


图 1 重组质粒 pPIC3.5K-MA6 的构建
Fig.1 Construction of expression plasmid pPIC 3.5K-MA6

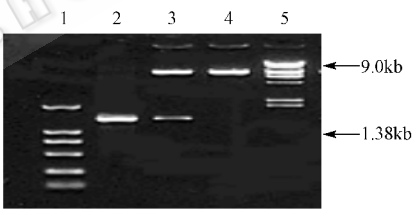


图 2 重组质粒 pPIC3.5K-MA6 酶切鉴定
Fig.2 Agarose gel electrophoresis of pPIC3.5K-MA6 digested with restriction enzymes

1 : DNA 2000 marker 2 : PCR product of *D6D* cDNA 3 : pPIC3.5K-MA6/*Eco*R I + *Not* I ; 4 : pPIC 3.5 K/*Eco*R I + *Not* I ; 5 : λ DNA/*Eco*R I + *Hind*III

2.2 阳性克隆的筛选和鉴定

以电击法将重组质粒 pPIC3.5K-MA6 转化 SMD1168 感受态细胞 ,为增加外源基因的同源重组整合机率 ,用 *Sac* I 酶切使质粒线性化。通过 MDS 和 G418 平板筛选 ,最后在 G418 5.0mg/mL 的平板上筛选到 9 株高抗性重组子。进一步以 5' *AOX1* 和 3' *AOX1* 为引物 PCR 鉴定阳性重组子。如图 3 所示 ,9 株重组子均扩增出 1.38kb 大小的目的片段 ,表明 Δ^6 -脂肪酸脱氢酶基因已整合到酵母染色体上。虽然用 *Sac* I 单酶切的质粒多数是以单点重组方式整合入酵母染色体基因组中 (即 *AOX1* 不被破坏 ,转化子呈快速生长型 ,*Mut*⁺ 型)但仍有少数存在双点重组的可能 (即 *AOX1* 基因被替换 ,转化子呈缓慢生长型 ,*Mut*⁻ 型)用 PCR 方法不仅可以进行阳性克隆的

筛选也可以确定其表型。如果阳性重组子表型为 Mut⁺,PCR 产物就有两条带,一条为 1.38kb 目的片段,一条为 2.2kb 的 *AOX1* 基因片段。如果重组子表型为 Mut^s,那么 PCR 产物只有一条 1.38kb 大小的带。如图 3 中,第 2 3 4 5 9,10 泳道为 Mut⁺ 型转化子,6 7 8 为 Mut^s 型转化子。

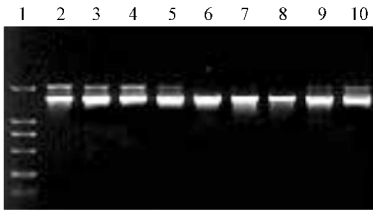


图 3 毕赤酵母转化子目的基因整合的 PCR 分析

Fig.3 PCR analysis of *P. pastoris* integrants

Lane1 is DNA 2000 marker ;Lane2 3 4 5 9,10 contain a clone carrying both the *AOX1* gene(2.2kb)and the *D6D* gene(1.38kb) insert ; Lane6,7,8 contain a clone carrying only the *D6D* gene.

2.3 表达产物气相色谱分析和 GC-MS 分析

经 PCR 鉴定为阳性的酵母重组菌株命名为

SMD3.5KMA6。以整合空载体的酵母菌 SMD1168 为对照,首先对它们进行气相色谱分析(图 4),与对照相比,转入 Δ^6 -脂肪酸脱氢酶基因的毕赤酵母工程菌 SMD3.5KMA6 在 11.600 min 新出现了一个特殊峰,该峰出峰时间与标准品 GLA 的出峰时间 11.540min 相一致。对照菌与转化工程菌的脂肪酸含量比例见表 1。同时我们将样品进行 GC-MS 分析,见图 5。色谱分析新出现的特殊峰 *m/z* 为 292(图 5B) 将其与 GLA 甲酯标准品(图 5A)比较,经计算机分析两者的质谱图一致,说明新出现的峰为 GLA。

表 1 用 pPIC3.5K 和 pPIC3.5K-MA6 转化的毕赤酵母脂肪酸组成

Table 1 Fatty-acid compositions of *Pichia pastoris* transformants

Fatty acid	Fatty-acid composition/%	
	Control strain	SMD3.5KMA6
C16:0	8.592	13.437
C16:1	4.589	2.400
C18:0	3.157	7.355
C18:1	43.852	43.005
C18:2	20.128	5.079
C18:3	—	16.262

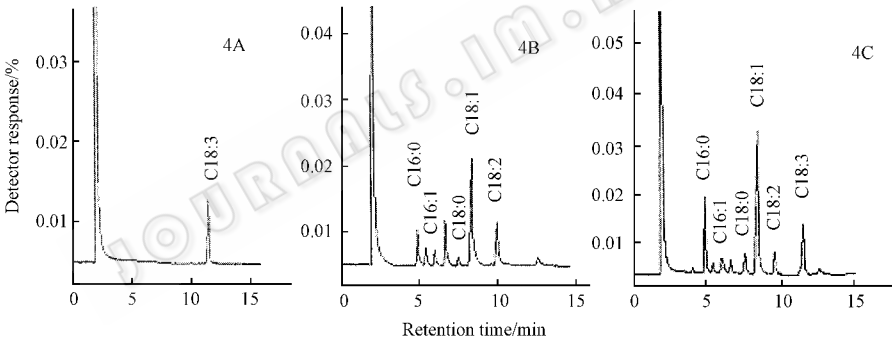


图 4 毕赤酵母重组株总脂肪酸的气相色谱分析图

Fig.4 Identification of GLA in transgenic *P. pastoris* by GC

A :GLA standard ; B :*P. pastoris* transformed with control vector pPIC3.5K ; C :*P. pastoris* transformed with pPIC3.5K-MA6

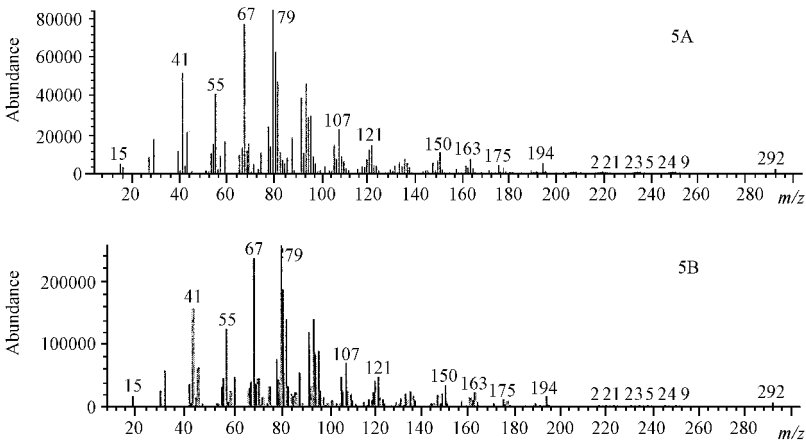


图 5 毕赤酵母重组株脂肪酸 GC-MS 分析图

Fig.5 GC-MS analysis of the novel peak identified in *P. pastoris* transformed with pPIC3.5K-MA6

通过上述气相色谱和 GC-MS 分析表明对照菌 SMD1168 含有 20% 的亚油酸而不含有 GLA, 转入外源的 Δ^6 -脂肪酸脱氢酶基因后酵母工程菌中产生了 GLA, GLA 含量占总脂肪酸含量的 16.26%, 而亚油酸含量降至 5.08% (表 1), 说明高山被孢霉 Δ^6 -脂肪酸脱氢酶基因已在毕赤酵母中获得成功表达, 催化底物亚油酸形成了 GLA, 其他多不饱和脂肪酸的含量均变化不大, 该结果表明 Δ^6 -脂肪酸脱氢酶是以亚油酸为特异底物在其 C6 位上脱氢形成 GLA。

3 讨论

毕赤酵母表达系统是一种新型有效的外源基因表达系统。其本身含有丰富的多不饱和脂肪酸, 是一种研究多不饱和脂肪酸的良好表达系统。毕赤酵母表达载体分为胞外型 and 胞内型两种。因为毕赤酵母只分泌很低水平的内源蛋白, 分泌的外源蛋白纯化非常方便, 所以目前已有许多表达外源蛋白选择分泌表达载体。但本研究的 Δ^6 -脂肪酸脱氢酶是一种膜结合蛋白, 为非天然分泌蛋白, 难以分泌表达。我们曾用分泌型表达载体 pHIL-S 表达过 Δ^6 -脂肪酸脱氢酶, 结果在培养基中没有检测到特异蛋白, 胞内也没有检测到 γ -亚麻酸, 所以选用 Invitrogen 公司专用于毕赤酵母胞内表达的载体 pPIC3.5K, 成功地在毕赤酵母中表达了 Δ^6 -脂肪酸脱氢酶, 产生 16.26% 的 GLA。

对高山被孢霉 Δ^6 -脂肪酸脱氢酶基因目前已有在酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 中表达的报道, 与酿酒酵母相比毕赤酵母表达系统对于用于生产 γ -亚麻酸有其独特的优点 (1) 毕赤酵母具有强烈的好氧生长特性, 适于工业化生产。且表达菌株很容易从摇瓶培养过渡到高密度发酵, 不影响外源基因表达水平, 而酿酒酵母生长密度较小。(2) 酿酒酵母本身不含底物亚油酸, 因此在生产 γ -亚麻酸时必须另加外源底物, 不仅工艺繁琐而且成本高。而毕赤酵母天然含有 20% 左右的亚油酸, 是生产 γ -亚麻酸的天然受体。此外, 毕赤酵母还含有 45% 左右的油酸 (合成亚油酸的底物), 可考虑 Δ^{12} 、 Δ^6 -脂肪酸脱氢酶基因共表达, 使高水平表达 γ -亚麻酸成为很大可能。(3) 酿酒酵母外源基因是克隆到 2 μ 质粒上, 需要选择压力才能保持稳定, 在工业化生产上如果没有选择压力质粒会丢失。而毕赤酵母允许外源基因在染色体上特定位点整合, 产生稳定的基因工程菌株。

综上所述, 由于在毕赤酵母中表达 Δ^6 -脂肪酸

脱氢酶具有重要的实际意义以及可行性, 本文构建了含有 Δ^6 -脂肪酸脱氢酶基因的毕赤酵母工程菌 SMD3.5KMA6, 获得成功表达, GLA 含量占酵母总脂肪酸含量的 16.26%。这是国内外高山被孢霉 Δ^6 -脂肪酸脱氢酶在毕赤酵母中表达的首次报道, 为 GLA 的工业化生产提供了可能, 同时也是首次利用毕赤酵母表达系统对多不饱和脂肪酸的合成进行的初步研究。

REFERENCES (参考文献)

- [1] Li SY (吕飒音), Pan F (潘璠). Studies on fermentation conditions of producing GLA by *Mortierella* sp. *Journal of Anhui University Natural Science Edition* (安徽大学学报自然科学版), 2002, 26 (2): 82 - 86
- [2] Hai H (海华), Shang DJ (尚德静), Li QW (李庆伟). Advance in research of gamma-linolenic acid production by fungi. *Industrial Microbiology* (工业微生物), 2002, 33 (4): 46 - 50
- [3] 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 PCC7120. *Plant Molecular Biology*, 1993, 27: 293 - 300
- [4] 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 USA*, 1997, 94: 4211 - 4216
- [5] Napier JA, Sandra JH, Dominic JL *et al.* Identification of a *Caenorhabditis elegans* Δ^6 -fatty-acid-desaturase by heterologous expression in *S. cerevisiae*. *Biochem J*, 1998, 330: 611 - 614
- [6] Tsumehiro A, Yayoi S, Katsuya I *et al.* Molecular cloning of and functional characterization of rat Δ^6 -fatty-acid desaturase. *Biochemical and Bio-physical Research Communications*, 1999, 255: 575 - 579
- [7] Nicola H, Morris A, Douglas RT *et al.* A vertebrate fatty acid desaturase with Δ^5 and Δ^6 activities. *Biochemistry*, 2001, 25: 14304 - 14309
- [8] Yung-Sheng H, Sunita C, Jennifer MT *et al.* Cloning Δ^{12} - and Δ^6 -desaturases from *Mortierella alpina* and recombinant production of γ -linolenic acid in *S. cerevisiae*. *Lipids*, 1999, 34 (7): 649 - 659
- [9] Sakuradani E, Kobayashi M, Shimizu S. Δ^6 -Fatty acid desaturase from an arachidonic acid-producing *Mortierella* fungus: gene cloning and its heterologous expression in a fungus *Aspergillus*. *Gene*, 1999, 238: 445 - 453
- [10] Romnos M. Advances in the use of *Pichia pastoris* for high level gene expression. *Curr Opin Biotechnology*, 1995, 6: 527
- [11] Cai CQ (蔡传奇), Fang RX (方荣祥). Technical improvements in genetic manipulation of *Pichia pastoris* and their application in hirudin expression. *Chinese Journal of Biotechnology* (生物工程学报), 2001, 17 (2): 155 - 160
- [12] Lee FJS. Modified protocol for Yeast DNA mini-preparation. *Biotech-*

- [13] Angela JA , Carol EJ , Gino VH. Production of human tissue factor using the *Pichia pastoris* expression system. *Protein Expression and*

Purification ,1998 ,13 :136 - 142

Expression of Δ^6 -fatty Acid Desaturase Gene from *Mortierella alpina* in *Pichia pastoris*

LI Ming-Chun SUN Ying ZHANG Qi XING Lai-Jun
(Department of Microbiology , NanKai University , Tianjin 300071 , China)

Abstract γ -linolenic acid (GLA , C18 :3 Δ^6 , 9 , 12) , an essential polyunsaturated fatty acid , plays an important role in hormone regulation and fatty acid metabolism. Δ^6 -fatty acid desaturase (*D6D*) is the rate-limiting enzyme of the desaturation of linoleic acid (C18 :2 Δ^9 , 12) in the production of γ -linolenic acid. A deficiency of GLA may have occurred when Δ^6 -fatty acid desaturase activity decreases in aging , stress , diabetes , eczema , and some infections. To establish a new expression system for Δ^6 -fatty acid desaturase gene in *Pichia pastoris* , which is an increasingly popular heterologous gene expression system , a gene encoding Δ^6 -fatty acid desaturase from *Mortierella alpina* was isolated by PCR amplification. The PCR product was then digested by *EcoR* I and *Not* I and subcloned into the intracellular expression vector pPIC3.5K to generate the recombinant vector pPIC3.5K-MA₆. The resulting vector was linearized by *Sac* I and electroporated into *P. pastoris* SMD1168 (*his*⁻ *pep*⁻) host cells. After electroporation , aliquots were spreaded on the MDS plates and incubated at 30°C for three days until colonies appeared. Those transformants were subsequently screened for clones with high copy number by using the YPD plates containing G418. To identify the *D6D* constructs that were produced , chromosomal DNA of the transformants were prepared and used as template for PCR with the primer 5 'AOX and 3 'AOX. The PCR product of Mut⁺ recombinants was shown as a band of 1.38kb of *D6D* gene and the product of 2.2kb of *AOX1* gene , while the product of Mut^s transformants only was shown as a band of 1.38kb of the *D6D* gene. To further confirm the transformants containing a functional *D6D* gene , the positive clones were selected and induced by methanol for expression. Those induced cultures were taken for analyses of the intracellular fatty acid composition by GC. The resultant chromatograms of fatty acid methyl esters showed that a novel peak was detected , which was not apparent in the case of control . Comparisons of the retention times of the newly yielded peaks with those of authentic standards have anticipated that the fatty acid is GLA. And this prospect was positively supported by definitive assignments of the compounds by GC-MS analyses. Thus , the active Δ^6 -fatty acid desaturase was expressed intracellularly in *P. pastoris* and γ -linolenic acid reached 16.26% of the total fatty acid in recombinant *P. pastoris* strains. It was the first report about the expression of *Mortierella alpina* *D6D* gene in *P. pastoris* .

Key words *Mortierella alpina* , Δ^6 -fatty acid desaturase , γ -linolenic acid , *Pichia pastoris*

Received : 07-08-2003

This work was supported by the grants from National Natural Science Foundation of China (No.39870020) and Foundation for University Key Teacher by the Ministry of Education .

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

本刊加入《中国学术期刊(光盘版)》声明

为适应我国信息化建设需要 ,扩大作者学术交流渠道 ,本刊已加入《中国学术期刊(光盘版)》和“中国期刊网”。如作者不同意将文章编入该数据库 ,请在来稿时声明 ,本刊将做适当处理。