

大豆 ω -3 脂肪酸脱氢酶基因 *GmFAD3C* 在酿酒酵母中的表达 Functional Expression of an ω -3 Fatty Acid Desaturase Gene from *Glycine max* in *Saccharomyces cerevisiae*

张洪涛^{1,2} 杨家森^{1,2} 单 雷¹ 毕玉平^{1,2*}

ZHANG Hong-Tao^{1,2}, YANG Jia-Sen^{1,2} SHAN Lei¹ and BI Yu-Ping^{1,2*}

1 山东省农业科学院高新技术研究中心, 山东省作物与畜禽品种改良生物技术重点实验室, 济南 250100

2 山东师范大学生命科学学院, 济南 250014

1 High-Tech Research Center, Shandong Academy of Agricultural Sciences, Key Laboratory for Genetic Improvement of Crop Animal and Poultry of Shandong Province, Ji 'nan 250100, China

2 College of Life Sciences, Shandong Normal University, Ji 'nan 250014, China

摘 要 α -亚麻酸(ALA)被称为必需脂肪酸,对人体有一系列的保健作用。 ω -3 脂肪酸脱氢酶(FAD)催化亚油酸(LA)生成 ALA。大豆种子油中 ALA 含量较高,为了研究大豆 ω -3FAD 的功能,用 RT-PCR 方法从大豆未成熟种子中扩增出 *GmFAD3C* 的 cDNA,克隆到酵母表达载体 p416 中,并用醋酸锂法转化酿酒酵母营养缺陷型 K601,经筛选鉴定,得到阳性克隆。气相色谱分析脂肪酸成分,发现工程菌产生了新的脂肪成分-ALA,含量占总脂肪酸的 3.1%,LA 含量与对照相比相应地下降,证明该基因编码的蛋白具有催化 18 碳多不饱和脂肪酸(PUFA)底物 LA 在 Δ^{15} 位脱氢生成 ALA 的 ω -3 FAD 功能,首次实现大豆 ω -3 脂肪酸脱氢酶基因在酿酒酵母 K601-p416 系统中的表达,建立了一种新的高效低成本的 FAD 酵母表达系统。

关键词 α -亚麻酸, ω -3 脂肪酸脱氢酶, *GmFAD3C*, 酿酒酵母

中图分类号 Q786 文献标识码 A 文章编号 1000-306X(2006)01-0033-06

Abstract α -linolenic acid(ALA, C18:3 ^{$\Delta^9, \Delta^{12}, \Delta^{15}$}) is an essential fatty acid which has many sanitary functions to human. However, its contents in diets are often not enough. In plants, ω -3 fatty acid desaturases(FAD) catalyze linoleic acid(LA, C18:2 ^{Δ^9, Δ^{12}}) into ALA. The seed oil of *Glycine max* contains high level of ALA. To investigate the functions of *Glycine max* ω -3FAD, the cDNA of *GmFAD3C* was amplified by RT-PCR from immature seeds, then cloned into the shuttle expression vector p416 to generate the recombinant vector p4GFAD3C. The resulting vector was transformed into *Saccharomyces cerevisiae* K601 through LiAc method. The positive clones were screened on the CM(Ura-) medium and identified by PCR, and then cultured in CM(Ura-) liquid medium with exogenous LA in 20°C for three days. The intracellular fatty acid composition of the engineering strain Kp416 and Kp4GFAD3C was analyzed by gas chromatography(GC). A novel peak in strain Kp4GFAD3C was detected, which was not detectable in control. Comparison of the retention times of the newly yielded peak with that of authentic standard indicated that the fatty acid is ALA. The content of ALA reached to 3.1% of the total fatty acid in recombinant strain, the content of LA correspondingly decreased from 22% to 16.2% by contrast. It was suggested that the protein encoded by *GmFAD3C* can specifically catalyze 18 carbon PUFA substrate of LA into ALA by taking off hydrogen atoms at Δ^{15} location. In this study, we expressed a *Glycine max* ω -3 fatty acid desaturase gene in *S. cerevisiae*; An efficient and economical yeast expressing system(K601-p416 system) which is suitable for the expression of FAD was built.

Key words α -linolenic acid, ω -3 Fatty acid desaturase, *GmFAD3C*, *Saccharomyces cerevisiae*

Received: July 26, 2005; Accepted: October 9, 2005.

This work was supported by a grant from The National Sciences Foundation of Shandong Province(No.Z2002D06).

* Corresponding author. Tel: 86-531-83179842; E-mail: yuping-bi@hotmail.com

山东省自然科学基金资助项目(No. Z2002D06)

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

ω -3 脂肪酸脱氢酶(ω -3 fatty acid desaturase, ω -3FAD)催化亚油酸(linoleic acid, LA, C18 :2^{Δ9,12})生成 α -亚麻酸(α -linolenic acid, ALA, C18 :3^{Δ9,12,15})。ALA在人和高等动物体内都不能合成,必须从体外摄取,被称为必需脂肪酸^[1]。它在人体内可以转化为具有抗血栓、抗肿瘤、调节血脂等一系列重要生理功能的长链多不饱和脂肪酸^[2]。一般认为人类 ALA 摄入量太低,不能满足需要^[1]。因此,研究 ω -3 FAD, 增加植物 ALA 含量,甚至用微生物发酵的方法大量生产 ALA 产品,对人类健康有重大意义。

人们已经克隆了多种植物的微粒体 ω -3 脂肪酸脱氢酶基因(Microsomal ω -3 fatty acid desaturase gene, *FAD3*)或质体 ω -3 脂肪酸脱氢酶基因(Plastid ω -3 fatty acid desaturase gene, *FAD7*、*FAD8*)^[3,4], *FAD3* 是种子中 ALA 水平的主要贡献者^[4]。大豆种子油中 ALA 含量在常见的油料作物中是最高的,占总脂肪酸的 6.5%^[5]。Bilyeu KD^[6]等 2003 年克隆了 3 个大豆(*Glycine max*) *FAD3*(*GmFAD3A*, *GmFAD3B*, *GmFAD3C*),在未成熟种子中,*GmFAD3A* 和 *GmFAD3C* 的表达量分别是持家基因的 60% 和 0.2%,*GmFAD3B* 未检测到表达。并且他们发现 *GmFAD3A* 定位于大豆基因组的 *fan* 座位上,此前曾有人发现 *fan* 座位发生失活突变的大豆种子中 ALA 含量仍维持在 2.5% ~ 5.1%^[6,7,8],说明 *GmFAD3A* 失活突变后,*GmFAD3C* 在表达量很低的情况下仍能使种子维持较高的 ALA 水平,推测 *GmFAD3C* 编码的 ω -3FAD 具有较高的活性,然而该推测至今尚未得到实验验证。

用酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)作为宿主研究 FAD 的功能非常方便^[9]。目前在酵母中已实现了多种脂肪酸脱氢酶基因(fatty acid desaturase gene, *FAD*)的表达,但是成功表达 ω -3FAD 的报道尚不多见,大多要么表达不成功^[10],要么表达量很低^[11]。本实验从大豆未成熟种子中扩增出了 *GmFAD3C*,导入酿酒酵母营养缺陷型菌株 K601 中,得到高效表达 ALA 的工程菌,证明该基因编码一个活性较强的 ω -3FAD,催化 LA 在 $\Delta 15$ 位脱氢生成 ALA,并新建了一种高效表达 ω -3FAD 的酵母系统。

1 材料和方法

1.1 植物材料

大豆品种齐黄 29 由山东省农业科学院作物所大豆室提供。

1.2 菌株和质粒

大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH5 α 为本实验室保存;酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)营养缺陷型 K601(*ade2*, *his3*, *leu2*, *trp1*, *ura3*),单倍体,由山东农业大学郑成超惠赠;p416 酵母游离型穿梭表达载体,TEF 组成型启动子,CYC1 终止子,CEN6/ARSH4 复制起点,酵母中筛选标记为 URA3,大肠杆菌中筛选标记为 Amp,由本实验室保存;T 载体 pUCm-T 购自上海 Sangon。

1.3 试剂和培养基

所用 DNA 限制酶和 DNA 分子量标准为 TaKaRa 公司产品;X-gal、IPTG、Taq DNA 聚合酶、反转录酶(RevertAidTM M-MuLV Reverse Transcriptase) LA 均为上海 Sangon 产品;TRIzol 总 RNA 提取试剂购自天为时代公司;鲑鱼精 DNA 和 ALA 甲酯标准品购自 Sigma 公司;LB、YPD、2 \times YPD、CM(Ura-)培养基参照《分子克隆实验指南》第三版^[12];其他常规试剂均为分析纯。

1.4 引物合成

根据网上已登录的 *GmFAD3C* 核苷酸序列(AY204712)设计引物如下

Sense primer 5'aat ggt tca agc aca gcc 3', Antisense primer: 5'ctt tag ttg gac tgg gtc 3'。引物合成由上海 Sangon 完成。

1.5 全长 cDNA 序列的 RT-PCR 和表达载体的构建

大豆未成熟种子总 RNA 的提取参照 TRIzol 总 RNA 提取试剂说明书进行。取 1 μ g 所提总 RNA 为模板,Oligo(dT)18 300pmol 为反转录引物,65 $^{\circ}$ C 变性 5 min,冰浴 5 min,然后分别加入 5 \times RT Buffer 4 μ L, dNTP Mixture(各 10mmol/L)1 μ L, RNase Inhibitor 20u, RevertAidTM M-MuLV Reverse Transcriptase 200u,加 DEPC 水至 20 μ L 42 $^{\circ}$ C 反应 1h,70 $^{\circ}$ C 加热 10min 后冰上冷却,合成第一链 cDNA。用 1.4 所合成的引物,以反转录产物作为模板进行 PCR 扩增,扩增条件:94 $^{\circ}$ C 变性 3min,然后 94 $^{\circ}$ C 50s,54 $^{\circ}$ C 50s,72 $^{\circ}$ C 1min 20s 35 个循环,最后 72 $^{\circ}$ C 10min。将 PCR 产物回收并克隆到 pUCm-T 载体中,并转化大肠杆菌 DH5 α ,重组质粒命名为 pUGFAD3C。蓝白斑筛选和酶切鉴定阳性克隆,挑取正确的阳性克隆送上海生工测序。将目的基因片段从 pUGFAD3C 上切下导入 p416,得到重组表达载体 p4GFAD3C。大肠杆菌感受态细胞的制备、载体构建、转化和重组质粒的筛选和鉴定均按《分子克隆实验指南》第三版^[12]所提供的常规

方法进行。

1.6 *GmFAD3C* 在酿酒酵母中的表达

1.6.1 酿酒酵母细胞的转化及阳性克隆的鉴定 :用醋酸锂法 ,分别将 p416 和 p4GFAD3C 转化到酿酒酵母缺陷型 K601 中。通过合成培养基的筛选 ,获得含有 p416 空载体的对照菌株 Kp416 和含有 p4GFAD3C 的酵母工程菌株 Kp4GFAD3C。粗提 Kp4GFAD3C 的质粒 ,进行 PCR 检测。具体步骤参照《精编分子生物学实验指南》^[13]。

1.6.2 工程菌遗传稳定性检测 :接种工程菌 Kp4GFAD3C 到 YPD 培养基中 30℃振荡培养 24h 将培养液稀释 50000 倍 ,取 100uL 稀释液涂布到 YPD 平板上 ,待平板上有菌落形成 ,用牙签挑取 100 个单克隆到固体 CM(Ura⁻)培养基上 ,再待菌斑出现后 ,统计 CM 平板上的菌斑数量 ,计算工程菌种质粒的丢失率。该实验做 3 个重复。

1.6.3 酵母工程菌的表达 :分别挑取单克隆 Kp416 和 Kp4GFAD3C 接入缺少尿嘧啶的 CM(Ura⁻)液体培养基中 ,培养基中含 2% 葡萄糖、0.5mmol/L LA 和 1% NP-40。30℃培养 ,当酵母的密度达到 5×10^6 细胞/mL 时 ,改为 20℃继续培养 72h 收集菌体。

1.6.4 重组基因表达产物样品的制备 :酵母菌体经去离子水洗涤干净 ,真空冷冻干燥 ,研碎 ,加入 2mL 0.5mol/L 氢氧化钾甲醇溶液 ,充入氮气 ,60℃反应 30min ,室温冷却 ,加入 15% 三氟化硼甲醇溶液 2mL ,60℃水浴放置 2min ,加入足够量饱和氯化钠溶液和 1.0 ~ 1.5mL 石油醚 ,振摇 ,静置 ,取上层 (石油醚层) 溶液进行色谱分析。

1.6.5 重组基因表达产物样品的气相色谱(GC)分析 :采用 Agilent6890N 气相色谱仪 ,FFAP 柱子 ,分流比 20:1 ,进样口温度 250℃ ,柱温 :150℃ ~ 230℃ 程序升温 ,检测器温度 :250℃ ,气化室温度 350℃ ,尾吹 40mL/min ,氢气流速 :45mL/min ,空气流速 450 mL/min 检测器 :氢火焰离子化检测器(FID) ,进样量 :1μL。参照文献方法测定样品^[14]。

2 结果

2.1 目的基因的扩增

根据已发表的 *GmFAD3C* 序列设计引物 ,用 RT-PCR 方法从大豆未成熟种子的总 RNA 中扩增出一条 1146bp 的条带(图 1) ,克隆到 pUCm-T 载体中获得重组质粒 pUGFAD3C。测序结果表明 ,该 cDNA 片段与 GenBank 上登录的序列完全一致 ,证明所扩增出的片段确实是 *GmFAD3C* cDNA ,包括 *GmFAD3C*

基因的全长编码区。

2.2 表达载体的构建

用 *Bam*H I 和 *Eco*R I 双酶切将 *GmFAD3C* 基因从 pUGFAD3C 上切下连入 p416 ,得到重组质粒 p4GFAD3C ,重组质粒构建过程如图 2。

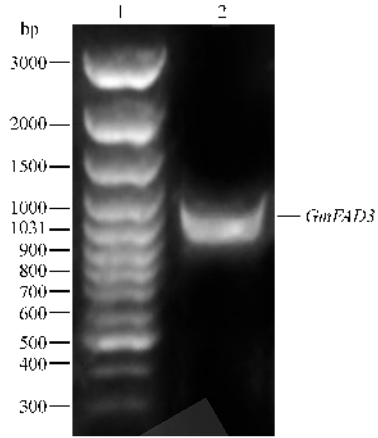


图 1 *GmFAD3C* mRNA 的反转录 PCR
Fig. 1 *GmFAD3C* mRNA reverse transcriptional PCR
1 : 100bp DNA ladder ; 2 : RT-PCR product of *GmFAD3C* .

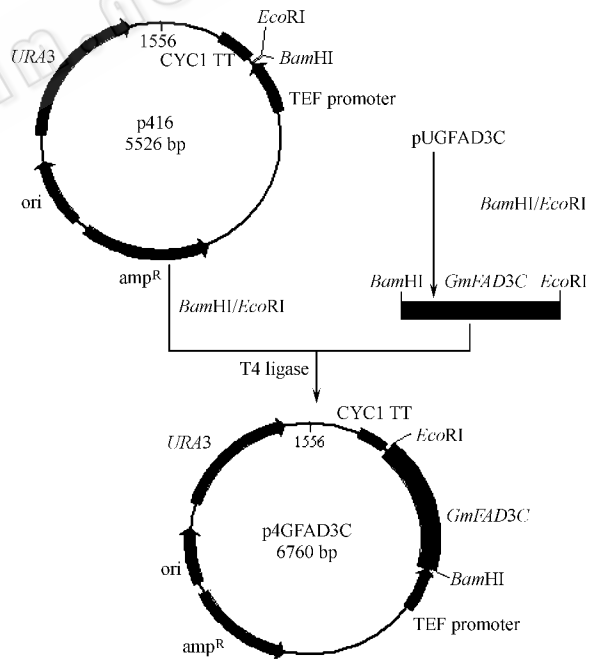


图 2 重组质粒 p4GFAD3C 的构建
Fig. 2 Construction of expression plasmid p4GFAD3C

2.3 阳性克隆的鉴定

挑取阳性克隆 ,酶切鉴定结果显示 ,p4GFAD3C 经 *Bam*H I 和 *Eco*R I 双酶切产生 5.53kb 及 1.25kb 两条带 ;经 *Eco*R I 单酶切仅有 6.78kb 一条带(图 3) ,说明 *GmFAD3C* 基因已成功克隆到 p416 中。

2.4 工程菌的遗传稳定性

按照 1.6.2 的方法测定菌株的质粒稳定性 ,在

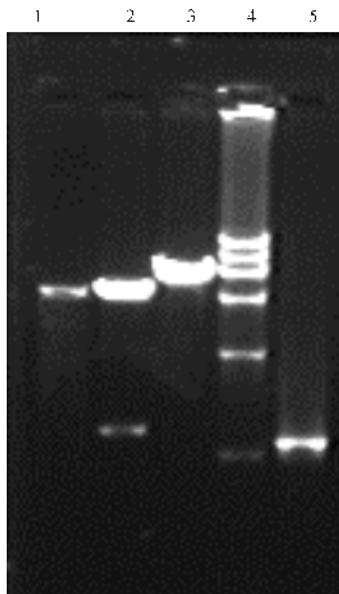


图3 重组质粒 p4GFAD3C 酶切及 PCR 鉴定

Fig. 3 Restrictive and PCR analysis of recombinant plasmid p4GFAD3C

1 : p416/ *Bam*H I + *Eco*R I ; 2 : p4GFAD3C/ *Bam*H I + *Eco*R I ; 3 : p4GFAD3C/ *Eco*R I ; 4 : DNA marker DL15 000 (15000 , 10000 , 7500 , 5000 , 2500 , 1000) ; 5 : PCR product of ORF .

营养丰富的培养基中 酵母大约 90min 增殖一代 ,所以 24h 大约传了 15 世代 ,从 YPD 平板上用牙签挑取 100 个单克隆到 CM 筛选培养基平板上 ,3 个重复 CM 平板上出现的菌斑数量分别为 81 ,75 ,63 ,质粒平均丢失率为 27%。

2.5 GmFAD3C 基因在酿酒酵母中的表达

用 p416 及 p4GFAD3C 重组质粒分别转化酿酒酵母缺陷型 K601 ,在 CM(Ura-)培养基上挑选到含有 p416 的对照菌 Kp416 和含有 p4GFAD3C 的工程菌 Kp4GFAD3C。以 p4GFAD3C 的质粒粗提液为模板 ,扩增出一条 1.15kb 的条带 ,与预期结果完全相符(图 3)从 p4GFAD3C 切下的目的基因片段比 PCR 片段稍大些 ,是因为前者含有 pUCm-T 载体上的约 100bp 片段。接种并培养 Kp416 和 Kp4GFAD3C 后 ,收集菌体 ,甲脂化。经 GC 分析发现 ,与 Kp416 相比 ,Kp4GFAD3C 出现了一个新的波峰 ,出峰时间与 ALA 甲脂标准样的出峰时间一致 ,说明该新成分为 ALA(图 4) 。计算出 Kp4GFAD3C 中 ALA 含量占总脂肪酸的 3.1% 。具体各脂肪酸的成分的含量见表 1。

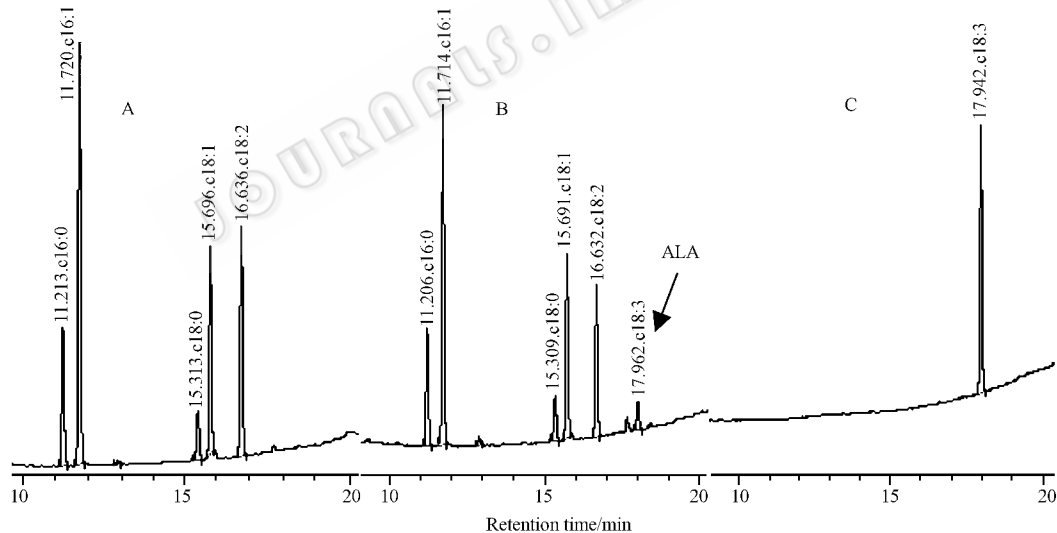


图4 酿酒酵母总脂肪酸的气相色谱分析图

Fig. 4 Gas Chromatographic analysis of total lipid fatty acids in *Saccharomyces cerevisiae*
A : Kp416 ; B : Kp4GFAD3C ; C : ALA standard ; 16 : 0 : palmitic acid ; 16 : 1 : palmitoleic acid ; 18 : 0 : stearic acid ; 18 : 1 : oleic acid ; 18 : 2 : linoleic acid ; 18 : 3 : α -linolenic acid .

表 1 转基因菌株脂肪酸组成 (%)

Table 1 Fatty acid composition of transformed *S. cerevisiae* (%)

Transformants	Percent of total fatty acids						Others
	C16 : 0	C16 : 1	C18 : 0	C18 : 1	C18 : 2	C18 : 3	
Kp416	13.2	36.9	5.4	19.1	22.0	—	3.4
Kp4GFAD3C	13.0	34.1	5.4	19.7	16.2	3.1	8.5

3 讨论

一般的酿酒酵母由于缺乏 ω -6 ($\Delta 12$) 和 ω -3FAD, 不能产生内源 PUFA^[10]。除了脱氢酶活性, 还有很多因素能影响脂肪酸产物在酵母细胞中的积累水平, 包括底物的含量^[11]。研究表明, 当酵母中的 LA 含量不低于 7%(W/W) 时, 依赖于 ω -3 脂肪酸脱氢酶的 ALA 积累水平就不会受 LA 含量的影响^[11]。本实验在培养 Kp416 时, 培养基中加入适量的外源 LA, 使菌体中 LA 含量增加到 22%, 高于 7%, 为 ALA 的合成提供了充足的底物, 也说明酿酒酵母 K601 可以吸收外源 LA。

作为对照的 Kp416 中未检出 ALA, 而 Kp4GFAD3C 中 ALA 含量占总脂肪酸含量的 3.1%, LA 含量由对照的 22% 相应地降为 16.2%, 说明本实验所扩增的 *GmFAD3C* 基因确实得到了表达, 并且其表达导致酵母菌中产生了 ALA。从 LA 含量相应下降说明检测到的 ALA 是由 LA 转化而来, 进一步表明该基因编码的蛋白具有催化 18 碳 PUFA 底物 LA 在 $\Delta 15$ 位脱氢生成 ALA 的 ω -3FAD 活性, 并能在酿酒酵母中高效表达。迄今为止所发现的植物和蓝细菌的 ω -3FAD 都能催化 18 碳 PUFA 底物 LA 生成 ALA, 但是不能作用于 20 碳 PUFA^[15,16]。

拟南芥质体外油酸脱氢酶基因在酵母中表达受温度影响很大^[17], 培养物在 15℃ 生长能比在通常的 28℃ 生长积累更多的脱饱和产物^[11]。但是, 生长温度越低, 酵母的生长速度就越慢, 本实验兼顾 ALA 的表达量和酵母的生长速度, 采用 20℃ 培养, 收到了良好的表达效果。Darwin 等 2000 年在酵母中表达甘蓝型油菜的 *BnFAD3* 基因, ALA 含量最高达到酵母总脂肪酸的 2.4%^[11]。Koushirou 等 2002 年将绿藻 *CvFad3* 基因转入酵母, 未表达成功^[10]。本实验构建的重组菌株 ALA 含量占总脂肪酸含量的 3.1%, 表达效果优于前二者。目前只有 Takahiro 等 2004 年在酵母中表达 *Saccharomyces kluyveri FAD3* 基因的 ALA 表达量比本实验高^[18]。

酵母作为基因工程的表达系统, 特别是表达真核生物基因方面得到广泛应用^[16]。一直以来, FAD 的酵母表达常采用酿酒酵母营养缺陷型 *INVScl* 及表达载体 pYES2.0^[18,19]。本研究选择酿酒酵母营养缺陷型 K601 为受体菌, 含有 TEF 启动子的 p416 质粒为表达载体。K601-p416 表达系统有很多与 *INVScl*-pYES2.0 表达系统相似的优点, p416 和 pYES2.0 都是酵母游离型穿梭质粒, 它们在大肠杆

菌和酵母菌中都稳定存在, 它们携带的 URA3 基因能互补 *ura3* 突变型的酵母菌, 可作为筛选标记; K601 和 *INVScl* 两种菌株本身都不产生 ALA, 便于验证外源脂肪酸脱氢酶的功能。不同的是 pYES2.0 的 *GAL1* 启动子是受半乳糖诱导的启动子, 而 p416 的 TEF 启动子是组成型启动子。由于 *GAL1* 启动子可被葡萄糖阻遏^[13], 需要使用棉子糖作为碳源^[20], 而 TEF 启动子则不受葡萄糖影响。棉子糖的价格比葡萄糖的价格高 20 倍左右, 因此使用 K601-p416 表达系统可以在很大程度上节省成本, 为 ALA 的大量生产提供了新的可能。由于 TEF 启动子是组成型启动子, 外源基因的表达受培养条件影响较小, 表达量较稳定, 方便操作。经过 15 世代, 工程菌在非筛选培养基中培养表达载体的丢失率为 27%, 遗传稳定性较低, 有待改进, 这也是所有酵母游离型质粒的缺点。本实验所建立的这种新的脂肪酸脱氢酶酵母表达系统, 为脂肪酸脱氢酶基因在酵母中的表达提供了新的探索。

REFERENCES (参考文献)

- [1] Shahidi F, Wanasundara UN. Omega-3 fatty acid concentrates: nutritional aspects and production technologies. *Trends Food Sci Technol*, 1998, **9**: 230-240
- [2] Lu DQ (卢定强), Chen ZL (陈庶来), Chen J (陈钧). Metabolism and physiological function of Docosahexaenoic Acid and Eicosapentaenoic Acid. *Journal of Jiangsu University of Science and Technology* (江苏理工大学学报), 1998, **19**(3): 29-36
- [3] Arondol V, Lemieux B, Hwang I *et al.* Map-based cloning of a gene controlling omega-3 fatty acid desaturation in Arabidopsis. *Science*, 1992, **258**: 1353-1355
- [4] Yadav NS, Wierzbicki A, Aegerter M *et al.* Cloning of higher plant omega-3 fatty acid desaturase. *Plant Physiol*, 1993, **103**: 467-476
- [5] Fasman GD. Handbook of biochemistry and molecular biology. New York: CRC Press, 1975
- [6] Bilyeu KD, Palavalli L, Sleper DA *et al.* Three microsomal Omega-3 fatty-acid desaturase genes contribute to soybean linolenic acid levels. *Crop Sci*, 2003, **43**: 1833-1838
- [7] Rahman SM, Takagi Y, Kumamaru T. Low linolenate sources at the fan locus in soybean lines M-5 and IL-8. *Breed Sci*, 1996, **46**: 155-158
- [8] Stojisin D, Luzzi BM, Ablett GR *et al.* Inheritance of low linolenic acid level in the soybean line RG10. *Crop Sci*, 1998, **38**: 1441-1444
- [9] Watts JL, Browne J. Isolation and characterization of a delta-5 fatty acid desaturase from *Caenorhabditis elegans*. *Arch Biochem*

- [10] Koushirou S , Ken-ichi H , Naoki F *et al.* Two low-temperature-inducible *Chlorella* genes for Δ^{12} and ω -3 fatty acid desaturase (FAD) : isolation of Δ^{12} and ω -3 *fad* cDNA clones , expression of Δ^{12} *fad* in *Saccharomyces cerevisiae* , and expression of ω -3 *fad* in *Nicotiana tabacum* . *Biosci Biotechnol Biochem* , 2002 **66** (6) : 1314 – 1327
- [11] Darwin WR , Ulrike AS , Patrick SC. Characterization of the *Brassica napus* extraplastidial linoleate desaturase by expression in *Saccharomyces cerevisiae* . *Plant Physiology* , 2000 , **122** : 715 – 720
- [12] Sambrook J , David WR. Molecular Cloning : A Laboratory Manual . 3rd ed , New York : Cold Spring Harbor Laboratory Press 2001
- [13] Frederick MA , Roger B , Robert EK. Short Protocols in Molecular Biology . 3rd ed , New York : Wiley John & Sons Inc , 1995
- [14] Eiji S , Michihiko K , Sakayu S. Δ^9 -Fatty acid desaturase from arachidonic acid-producing fungus : Unique gene sequence and its heterologous expression in a fungus , *Aspergillus* . *Eur J Biochem* , 1999 , **260** : 208 – 216
- [15] Tocher DR , Leaver MJ , Hodgson PA. Recent advances in the biochemistry and molecular biology of fatty acyl desaturases . *Prog Lipid Res* , 1998 **37** : 73 – 117
- [16] Meesapyodsuk D , Reed DW , Savile CK *et al.* Characterization of the regiochemistry and cryptoregiochemistry of a *Caenorhabditis elegans* fatty acid desaturase (FAT-1) expressed in *Saccharomyces cerevisiae* . *Biochemistry* , 2000 **39** : 11948 – 11954
- [17] Covello PS , Reed DW. Functional expression of the extraplastidial *Arabidopsis thaliana* oleate desaturase gene (FAD2) in *Saccharomyces cerevisiae* . *Plant Physiol* , 1996 **111** : 223 – 226
- [18] Takahiro O Susumu. *Saccharomyces kluyveri* FAD3 encodes an ω -3 fatty acid desaturase . *Microbiology* , 2004 , **150** : 1983 – 1990
- [19] Zhang Q(张 琦) , Li MC(李明春) , Sun Y(孙 颖) *et al.* Cloning and heterologous expression of a novel Δ^6 -Desaturase gene from *Rhizopus arrhizus* NK030037. *Acta Genetica Sinica* (遗传学报) , 2004 **31** (7) : 740 – 749
- [20] Liu L(刘 莉) , Li MC(李明春) , Hu GW(胡国武) *et al.* Identification of *Mortierella isabellina* M₆₋₂₂ Δ^6 -fatty acid desaturase by heterologous expression in *Saccharomyces cerevisiae* . *Acta Microbiologica Sinica* (微生物学报) , 2001 **41** (4) : 397 – 401