

Δ^6 -脂肪酸脱氢酶对 n-6 和 n-3 途径中脂肪酸底物的偏好*

张琦^{1,2} 李明春¹ 孙颖¹ 任勇¹ 孙红妍¹

(南开大学微生物学系国家微生物学重点学科 天津 300071)¹

(云南大学微生物研究所教育部微生物资源开放研究重点实验室 昆明 650091)²

摘要: 添加 α -亚麻酸作为底物, 经半乳糖诱导, 在含有少根根霉 Δ^6 -脂肪酸脱氢酶基因的酿酒酵母总脂肪酸中检测到十八碳四烯酸的生成; 同时添加亚油酸和 α -亚麻酸时, 检测到 γ -亚麻酸和十八碳四烯酸生成, 而且十八碳四烯酸的含量是 γ -亚麻酸含量的 3.81 倍, 表明在酿酒酵母中少根根霉 Δ^6 -脂肪酸脱氢酶不仅能催化 α -亚麻酸生成十八碳四烯酸, 而且偏好 n-3 途径中的底物 α -亚麻酸。同样, 在改变少根根霉 Δ^6 -脂肪酸脱氢酶基因的转译起始密码子周边序列后所构建的转基因酵母中, 也得到类似的结果, 而且各种目的脂肪酸的含量均有明显提高。

关键词: 少根根霉, Δ^6 -脂肪酸脱氢酶基因, 酿酒酵母, γ -亚麻酸, 十八碳四烯酸, 偏好

中图分类号: Q55 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2004) 06-0057-05

Preference of *Rhizopus arrhizus* Δ^6 -Fatty Acid Desaturase for N-3 and N-6 Substrates of Unsaturated Fatty Acid^{*}

ZHANG Qi^{1,2} LI Ming-Chun¹ SUN Ying¹ REN Yong¹ SUN Hong-Yan¹

(Department of Microbiology, Nankai University, Tianjin 300071)¹

(The Key Laboratory for Microbial Resource of Ministry of Education, Yunnan Institute of Microbiology, Yunnan University, Kunming 650091)²

Abstract: The transgenic *Saccharomyces cerevisiae* YRAD6 containing *Rhizopus arrhizus* Δ^6 -fatty acid desaturase gene was induced by 2% galactose, supplemented with 0.5mmol/L α -linolenic acid as substrate. GC analysis of the total fatty acids showed a novel peak corresponding to the standard of octadecatetraenoic acid methyl ester was detected, which was further demonstrated by GC-MS analysis. With the same method, γ -linolenic acid and octadecatetraenoic acid were detected in the total fatty acids of the yeast after supplementing linoleic acid and α -linolenic acid at the same time. The content of octadecatetraenoic acid was 3.81 times higher than that of γ -linolenic acid. The results indicated that *Rhizopus arrhizus* Δ^6 -fatty acid desaturase in the transgenic yeast catalyzed the conversion of α -linolenic acid to octadecatetraenoic acid with n-3 substrate preference. Similar results were obtained using the yeast YRAD6-1 transformed by the same gene with modification of the sequences flanking AUG codon, and the content of γ -linolenic acid and octadecatetraenoic acid was increased accordingly.

Key words: *Rhizopus arrhizus*, Δ^6 -fatty acid desaturase gene, *Saccharomyces cerevisiae*, γ -linolenic acid, Octadecatetraenoic acid, Preference

多不饱和脂肪 (polyunsaturated fatty acids, PUFAs) 的代谢可分为 n-6 和 n-3 两种途

* 国家自然科学基金资助项目 (No.30200176)

Project Granted by Chinese National Natural Science Fund (No.30200176)

天津市自然科学基金资助项目 (No.013802511)

作者还有: 马海庭 邢来君**

** 联系人 Tel: 022-23508506, E-mail: xinglaij@eyou.com

收稿日期: 2004-02-17, 修回日期: 2004-04-17

径,因而多不饱和脂肪酸可以划分为 n-6 和 n-3 两大类,它们分别由亚油酸 (linoleic acid, LA, C18:2 $\Delta^{9,12}$, n-6) 和 α -亚麻酸 (α -linolenic acid, ALA, C18:3 $\Delta^{9,12,15}$, n-3) 经 n-6 和 n-3 途径中的各种脱氢酶和延长酶的催化经过一系列脱氢和延长进一步转化成花生四烯酸 (arachidonic acid, AA, C20:4 $\Delta^{5,8,11,14}$, n-6)、二十碳五烯酸 (eicosapentanoic acid, EPA, C20:5 $\Delta^{5,8,11,14,15}$, n-3) 等长链多不饱和脂肪酸 (long-chain polyunsaturated fatty acids, LC-PUFAs)^[1]。 γ -亚麻酸 (γ -linolenic acid, GLA, C18:3 $\Delta^{6,9,12}$, n-6) 是多不饱和脂肪酸代谢 n-6 途径中的第一个中间代谢产物,由 Δ^6 -脂肪酸脱氢酶催化 LA 转化而来,而 n-3 途径中的第一个代谢产物十八碳四烯酸 (Octadecatetraenoic acid, OTA, C18:4 $\Delta^{6,9,12,15}$, n-3) 也是由同一个酶催化 ALA 转化而来,很明显 Δ^6 -脂肪酸脱氢酶是多不饱和脂肪酸最终合成 EPA 等长链多不饱和脂肪酸代谢途径的关键酶。自琉璃苣中克隆到第一个微体膜结合的 Δ^6 -脂肪酸脱氢酶,并发现与细胞色素 b5 融合的脂肪酸脱氢酶家族以来^[2],已经分别从动物、真菌、苔藓和高等植物中克隆到同一基因。在酿酒酵母中的功能分析表明,这些基因编码产物都能利用 LA 作为底物合成 GLA。有些实验证明 Δ^6 -脂肪酸脱氢酶能同时利用 LA 和 ALA 作为底物合成更不饱和脂肪酸,而且多数没有明显的底物偏好。本文将报告酿酒酵母中少根根霉 Δ^6 -脂肪酸脱氢酶对 n-3 和 n-6 途径中多不饱和脂肪酸底物的偏好。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株:转基因酵母采用少根根霉 Δ^6 -脂肪酸脱氢酶基因和 pYES2.0 连接所构建的 pYRAD6,并由此转化酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 营养缺陷型 INVScl 所得的工程菌株 YRAD6;同时我们参照 Kozak 提出^[3,4]的真核生物偏好的转移起始密码子的周边序列 CCACCAUGGCU,把少根根霉 Δ^6 -脂肪酸脱氢酶基因起始密码子周边序列相应修改为 CCACCAUGGGU,由此所得片段再与 pYES2.0 构建表达载体 pYRAD6-1 并转化酵母细胞得到的工程菌株 YRAD6-1。此外,以空载体 pYES2.0 转化的酵母细胞 YCK 作为对照。

1.1.2 试剂和仪器:实验所用的 NP40、亚油酸、 α -亚麻酸和 γ -亚麻酸和十八碳四烯酸甲酯标准品均为 Sigma 公司产品;棉籽糖、半乳糖购自上海试剂二厂;气相色谱 (GC) 和气质联用 (GC-MS) 分析的仪器分别为岛津 GC-7A 和 HP G1800A GCD SYSTEM。

1.1.3 培养基:酿酒酵母营养缺陷型 SC-Ura 培养基按 Invitrogen 公司操作手册进行,诱导表达的培养基按文献[5, 6]配制。

1.2 转基因酵母的诱导表达

按文献 [5, 6] 的改良方法,挑取 SC-Ura (无尿嘧啶) 选择培养基平板上生长的转基因酵母 YRAD6、YRAD6-1 和 YCK,分别接种于 5 mL SC-Ura 选择性液体培养基中 (含 2% 的棉籽糖或葡萄糖), 28℃ 过夜培养;以 5% 的接种量加入含有 1% NP-40、2% 棉子糖的 100 mL SC-Ura 培养基,此时一组中加入外源底物 α -亚麻酸,另一组中同时加亚油酸和 α -亚麻酸,使其终浓度均达到 0.5 mmol/L, 28℃ 继续培养;等酵母细胞的密度达到 $OD = 0.2 \sim 0.3$ 时加入 2% 半乳糖诱导,再转入 20℃ 培养 72 h,然后 2,500 r/min 收集菌体,用去离子水洗涤 3 次,50℃ 烘干,研碎。

1.3 细胞总脂肪酸分析

细胞总脂肪酸的甲酯化及气相色谱分析按文献 [5, 6] 进行。气相色谱/质谱联用

(GC-MS) 分析采用石英毛细管柱 HP-5 (30 m × 0.25 mm × 0.25 mm), 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 少根根霉 Δ^6 -脂肪酸脱氢酶催化 α -亚麻酸形成十八碳四烯酸

3 种转基因酵母细胞在添加外源性底物 α -亚麻酸, 经半乳糖诱导, 20℃ 培养 72 h 后, 进行总脂肪酸分析, 以十八碳四烯酸甲酯标准品作为对照 (图 1A、1B 和 1C)。结果如图 1 所示, 在 YRAD6 和 YRAD6-1 转基因酵母的总脂肪酸中都出现保留时间约为 10.13 min 的特殊峰 (黑色箭头所示), 其保留时间与十八碳四烯酸甲酯标准品的一致

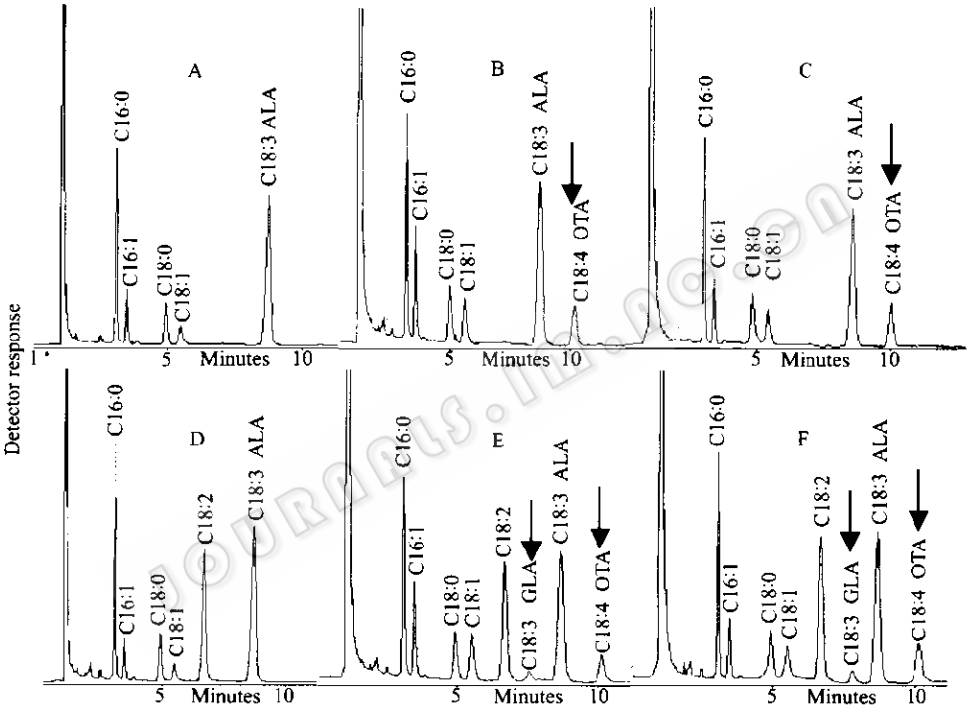


图 1 转基因酿酒酵母总脂肪酸的气相色谱分析图

A、D 空载体 pYES2.0 转化的 *Saccharomyces cerevisiae*, B、E pYRAD6 转化的 *Saccharomyces cerevisiae*, C、F pYRAD6-1 转化的 *Saccharomyces cerevisiae*, A、B、C 添加 α -亚麻酸, D、E、F、添加亚油酸和 α -亚麻酸

表 1 添加不同底物后转基因酵母细胞的脂肪酸含量

底物	转基因酵母	脂肪酸百分含量							
		C16:0	C16:1	C18:0	C18:1	C18:2	GLA	ALA	OTA
亚油酸	YCK	23.73	7.83	9.89	6.74	ND	ND	51.89	0
	YRAD6	24.15	11.57	9.21	7.33	ND	ND	39.45	7.13
	YRAD6-1	23.72	9.32	10.65	8.26	ND	ND	36.77	10.23
亚油酸和 α -亚麻酸	YCK	21.19	5.63	7.63	4.45	25.36	0	35.52	0
	YRAD6	18.97	8.39	7.84	7.55	20.94	1.45	28.03	5.53
	YRAD6-1	16.83	4.92	8.43	6.76	23.61	2.15	28.57	8.48

* ND 没有检测

(图未附),而在空载体转化的对照样 YCK 中没有出现相应的峰(图 1A),其中, YRAD6 中生成的新脂肪酸的含量占总脂肪酸的 7.13%,而 YRAD6-1 中占 10.23%(表 1)。结果表明少根根霉 Δ^6 -脂肪酸脱氢酶基因的编码产物在酿酒酵母中催化 n-3 途径中的 ALA 转化成 OTA,而且改变转译起始密码子周边序列所得的转基因酵母中 OTA 的含量更高。

2.2 少根根霉 Δ^6 -脂肪酸脱氢酶对 n-3 和 n-6 途径中脂肪酸底物的偏好

采用上述相同的方法,同时添加 LA 和 ALA 作为底物,经诱导表达和脂肪酸 GC 分析(图 1D, E, F)。结果表明,在其总脂肪酸中同时生成 GLA 和 OTA(保留时间分别为 7.82 min 和 10.15 min,黑色箭头所示), YRAD6 和 YRAD6-1 中新生成的 GLA 和 OTA 含量分别占细胞总脂肪酸含量的 1.45% 和 2.15%、5.53%和 8.48%(表 1),而在空载体转化的酵母 YCK 中没有检测到 GLA 和 OTA。从含量来看, YRAD6-1 中新生成的 GLA 和 OTA 都比 YRAD6 中的高,说明改变少根根霉 Δ^6 -脂肪酸脱氢酶基因转移起始密码子周边序列对基因表达所起的增强作用在这也体现出来。此外, YRAD6 中 OTA 和 GLA 百分含量比为 3.81,而 YRAD6-1 中所生成 OTA 和 GLA 百分含量比为 3.94,证明少根根霉 Δ^6 -脂肪酸脱氢酶对 n-3 途径中的底物 ALA 有很强的偏好。

2.3 GC-MS 定性分析

为了进一步确证所出现的新峰为 GLA 和 OTA 甲酯,将 YRAD6 和 YRAD6-1 转基因酵母的脂肪酸提取物进行 GC-MS 定性分析,然后通过 NIST/EPA/NIH 数据库的计算机检索,结果显示特殊峰分别为 GLA 和 OTA 甲酯, $m/z = 292$ 和 $m/z = 290$ 分别表示 GLA 和 OTA 甲酯的分子量(图 2),与标准物的相同,说明所生成新峰的为 γ -亚麻酸和十八碳四烯酸。

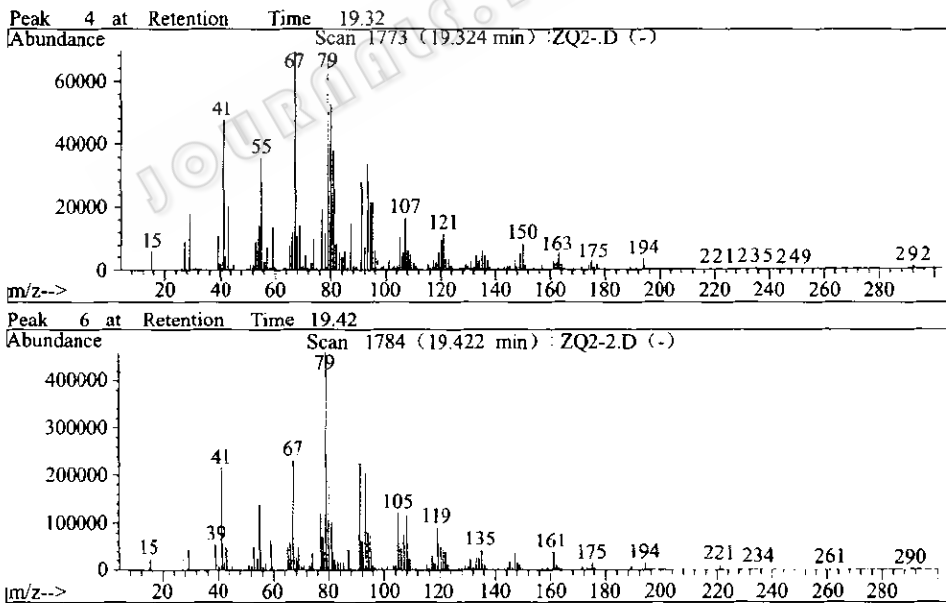


图 2 转基因酿酒酵母中脂肪酸 GC-MS 分析图

A γ -亚麻酸甲酯, B 十八碳甲烯酸甲酯

3 讨论

众所周知, n-3 多不饱和脂肪酸参与脂肪代谢,降低血脂浓度,有利于人体前列腺

的分泌平衡, 减低血液中胆固醇, 抑制血小板凝集, 减少脑血栓的形成和防止心肌梗塞等特殊功能, 而且 n-6 和 n-3 多不饱和脂肪酸在食用油中的合适比例对健康的影响也逐渐受到人们的重视^[7]。△⁶-脂肪酸脱氢酶能同时催化 n-6 和 n-3 途径中底物合成更高不饱和脂肪酸。到目前为止, 已报道的多数△⁶-脂肪酸脱氢酶在酿酒酵母中对 n-6 和 n-3 途径中底物没有明显偏好, 但是苔藓 (*Ceratodon purpureus*) △⁶-脂肪酸脱氢酶对 n-6 途径中底物 LA 具有很强的偏好^[8], 而樱草 (*Primula vialii*) △⁶-脂肪酸脱氢酶却偏好 n-3 途径中的 ALA^[9]。丝状真菌中除了畸雌腐霉 (*Pythium irregulare*) △⁶-脂肪酸脱氢酶在转基因油菜能合成少量的 OTA^[10]外, 其它没有其可以利用 n-3 途中的 ALA 作为底物合成 OTA 和底物偏好的类似研究报道。

在前期的工作中, 我们分离到一株产 γ-亚麻酸的丝状真菌—少根根霉 NK030037, 并从中克隆到一个新的编码△⁶-脂肪酸脱氢酶的基因。功能性分析结果表明, 在添加外源性底物亚油酸时, 该基因编码产物能将亚油酸转化为 γ-亚麻酸 (结果即将发表)。根据 Kozak 序列组成, 我们把少根根霉 △⁶-脂肪酸脱氢酶基因起始密码子周边序列做相应修改并在酿酒酵母进行表达, 证明这种改变明显能提高 GLA 的表达水平 (结果即将发表)。在本试验中, 我们利用其转基因酵母, 添加 ALA 作为底物, 经半乳糖诱导生成 OTA, 证明少根根霉△⁶-脂肪酸脱氢酶基因的编码产物对 n-3 途径中底物 ALA 也具有催化功能, 而且存在相同底物浓度的情况下, 所生成 OTA 的量比 GLA 的量高。我们同时添加 LA 和 ALA 作为底物, 结果显示少根根霉△⁶-脂肪酸脱氢酶对 n-3 底物 ALA 有很强的偏好。而改变起始密码子周边序列除了能保持对脂肪酸底物的偏好外, 还能提高转基因酵母中 GLA 和 OTA 的表达水平。

外源基因在宿主生物中的稳定高效表达是一个多方面、多级水平综合调节的过程。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^[11]。本研究中, 选择酿酒酵母营养缺陷型 INVScl 为受体菌, 酿酒酵母内具有△⁹-脂肪酸脱氢酶, 能合成单不饱和的棕榈酸和油酸, 但不产生 γ-亚麻酸和十八碳四烯酸, 它具有酯酰脱氢酶基因功能表达所需要的各种辅因子^[12], 因此, 将此构建的工程菌用于△⁶-脂肪酸脱氢酶的功能分析, 所得结果可靠。本研究一方面为△⁶-脂肪酸脱氢酶在 n-3 PUFAs 生物合成中的作用提供证据, 同时也为利用少根根霉△⁶-脂肪酸脱氢酶基因进行 n-3 PUFAs 的大规模基因工程化应用建立基础。

参 考 文 献

- [1] Gill I, Valivety R. Trends Biotechnol, 1997, 15 (10): 401 ~ 409.
- [2] Sayanova O, Smith M A, Lapinskas P, et al. Proc Natl Acad Sci, 1997, 94 (8): 4211 ~ 4216.
- [3] Kozak M. Cell, 1986, 44 (2): 283 ~ 292.
- [4] Kozak M. EMBO J, 1997, 16 (9): 2482 ~ 2492.
- [5] 刘 莉, 李明春, 胡国武, 等. 生物工程学报, 2001, 17 (2): 161 ~ 164.
- [6] 刘 莉, 李明春, 胡国武, 等. 微生物学报, 2001, 41 (4): 397 ~ 401.
- [7] 杨彩霞, 计 成, 戎 易. 中国农业大学学报, 1997, 2 (1): 65 ~ 70.
- [8] Sperling P, Lee M, Girke T, et al. 2000, 267 (12): 3801 ~ 3811.
- [9] Sayanova O V, Beaudoin F, Michaelson L V, et al. FEBS Lett, 2003, 542 (1 ~ 3): 100 ~ 104.
- [10] Hong H, Datla N, Reed D W, et al. Plant Physiol, 2002, 129 (1): 354 ~ 362.
- [11] 刘 擎, 余 尤. 生命的化学, 2000, 20 (2): 61 ~ 65.
- [12] Martin C E, Oh C S, Kankasamy P, et al. Biochem Soc Trans, 2002, 30 (pt 6): 1080 ~ 1082.