

# 毛霉 $\Delta^6$ -脂肪酸脱氢酶随机突变文库的构建与分析

宋芬芬<sup>1,2,3</sup> 江贤章<sup>1,2,3</sup> 陈清霞<sup>1,2,3</sup> 黄建忠<sup>1,2,3\*</sup>

- (1. 福建师范大学工业微生物教育部工程研究中心 福建 福州 350108)  
(2. 福建师范大学生命科学学院 福建 福州 350108)  
(3. 福建师范大学福建省现代发酵技术工程研究中心 福建 福州 350108)

**摘要:** 毛霉 *Mucor* sp. EIM-10  $\Delta^6$ -脂肪酸脱氢酶是  $\gamma$ -亚麻酸合成途径的关键酶。为提高脂肪酸脱氢酶的活性以及研究该酶一级结构对酶活性的影响, 利用易错 PCR 对毛霉 $\Delta^6$ -脂肪酸脱氢酶基因(*mcd6*)进行随机突变, 将 PCR 产物与大肠杆菌-酿酒酵母穿梭表达载体 PYMD6PMCD6 连接, 获得随机突变质粒 PYTBMCD6, 转化酿酒酵母 *Saccharomyces cerevisiae*, 构建了原始库容为  $4.6 \times 10^4$  CFU 的 $\Delta^6$ -脂肪酸脱氢酶的随机突变表达文库。随机突变表达文库的构建与分析为定点突变等酶蛋白的理性设计奠定基础。

**关键词:**  $\Delta^6$ -脱氢酶, 易错 PCR, 随机突变, 毛霉,  $\gamma$ -亚麻酸

## Construction and analysis of a random mutation library of $\Delta^6$ -desaturase gene in *Mucor* sp. EIM-10

SONG Fen-Fen<sup>1,2,3</sup> JIANG Xian-Zhang<sup>1,2,3</sup> CHEN Qing-Xia<sup>1,2,3</sup> HUANG Jian-Zhong<sup>1,2,3\*</sup>

- (1. Engineering Research Center of Industrial Microbiology, Ministry of Education, Fujian Normal University, Fuzhou, Fujian 350108, China)  
(2. College of Life Science, Fujian Normal University, Fuzhou, Fujian 350108, China)  
(3. Engineering Research Center of Fujian Modern Fermentation Technology, Fujian Normal University, Fuzhou, Fujian 350108, China)

**Abstract:**  $\Delta^6$ -desaturase plays an important role in the biosynthesis of  $\gamma$ -linolenic acid in *Mucor* sp. EIM-10. To improve enzymatic activity and confirm the effect of primary structure on the  $\Delta^6$ -desaturase activity, a random mutation library was constructed. The  $\Delta^6$ -desaturase gene (*mcd6*,

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 30970047, 30370028); 福建省自然科学基金重大项目(No. 2003F005); 福建省自然科学基金项目(No. 2008F3036); 福建省教育厅资助项目(No. JB09035)

\* 通讯作者: Tel: 86-591-22868212; ✉ hjz@fjnu.edu.cn

收稿日期: 2010-10-27; 接受日期: 2010-12-24

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

GenBank accession No. EU717846) was mutated by error-prone PCR strategy. The PCR products were ligated into the yeast expression vector PYMD6PMCD6. The resulting plasmid was named PYTBMCD6 and transformed into *Saccharomyces cerevisiae* strain INVSc1. A random  $\Delta^6$ -desaturase gene mutation library was constructed in *Saccharomyces cerevisiae*. The titers of random mutation library were up to  $4.6 \times 10^4$  CFU. The random mutation library of  $\Delta^6$ -desaturase gene could be used for screening the mutants with change in catalytic activity and the subsequent site-directed mutagenesis.

**Keywords:**  $\Delta^6$ -Desaturase, Error-prone PCR, Random mutation, *Mucor*,  $\gamma$ -Linolenic acid

$\gamma$ -亚麻酸( $\gamma$ -Linolenic acid, 简称 GLA)是具有各种生理功能的  $\omega$ -6 长链高度不饱和脂肪酸, 在抑制血栓形成、调节血糖、抗肿瘤以及对婴幼儿大脑、视网膜发育等各方面均具有十分重要的作用<sup>[1-3]</sup>。毛霉(*Mucor*)是已知的 GLA 优良高产菌株, 可以作为研究 GLA 生物合成相关酶基因及其合成机制的理想材料, 具有很高的研究价值。 $\Delta^6$ -脂肪酸脱氢酶是高度不饱和脂肪酸合成途径中的限速酶, 能催化亚油酸转化为 GLA。目前国际上对 $\Delta^6$ -脂肪酸脱氢酶的研究主要是 $\Delta^6$ -脂肪酸脱氢酶基因的克隆与表达及酶活性研究<sup>[4-7]</sup>。由于 $\Delta^6$ -脂肪酸脱氢酶自身的特性, 目前还没有有效的方法将其纯化并在蛋白质水平作进一步的研究, 转而从遗传学水平进行深入全面的研究。这就需要对其结构、功能以及表达调控进行全面深入的研究。我们研究小组利用苏丹黑染色法筛选获得一株极具开发前景的 GLA 高产菌株 *Mucor* sp. EIM-10<sup>[8]</sup>, 并从中扩增出 GLA 合成途径中的关键限速酶 $\Delta^6$ -脂肪酸脱氢酶基因(*mcd6*, GenBank accession No. EU717846), 并构建了穿梭表达载体 PYMD6PMCD6, 成功实现了在酿酒酵母中的高效表达<sup>[9]</sup>。

以易错 PCR 和 DNA 改组为基础的体外分子定向进化策略, 为蛋白质工程的发展提供了一个颇具前景的新方法<sup>[10-12]</sup>。该法无需事先了解蛋白质的三维结构信息, 人为地使基因发生适应性突变, 在短时间内完成目的特性或功能的进化。此外, 应用易错 PCR 技术构建突变文库, 突变体的遗传变化只发生在单一分子内部, 只能使原始蛋白质中仅有很小的序列空间发生突变, 适合用于蛋白质结构与功能的研究。迄今为止, 研究者们已用该法研究了各种各样的酶特征, 找到并发现了许多合理设计所不能

预测到的突变<sup>[13]</sup>。

为了探究 *Mucor* sp. EIM-10 GLA 生物合成的分子机理, 提高 GLA 的产量, 加速其在工业生产上的应用进程, 本研究旨在利用易错 PCR 等蛋白质工程技术对 $\Delta^6$ -脂肪酸脱氢酶基因进行随机突变, 来提高 $\Delta^6$ -脂肪酸脱氢酶的活性, 即提高催化亚油酸生成 GLA 的转化率, 以期获得转化率提高的突变株, 使其能够应用于生产。同时通过分析所获得的突变序列和结构, 了解 $\Delta^6$ -脂肪酸脱氢酶结构与功能的关系。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌株和质粒:** *Mucor* sp. EIM-10 经苏丹黑染色法筛选获得, 保存于福建师范大学工业微生物教育部工程研究中心; 宿主菌 *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  由福建师范大学工业微生物教育部工程研究中心提供; 酿酒酵母 *Saccharomyces cerevisiae* 尿嘧啶营养缺陷型 INVSc1 购自 Invitrogen 公司; 大肠杆菌-酿酒酵母穿梭质粒 PYMD6PMCD6 由工业微生物教育部工程研究中心构建并保藏。

**1.1.2 主要试剂和工具酶:** GeneMorph<sup>®</sup> II Random Mutagenesis Kit 购自 Stratagene 公司; DNA Ladder Marker, Ex Taq DNA 聚合酶, PCR 试剂, DNA 限制性内切酶 *Xho* I 和 *Eco*R I, T4 DNA 连接酶, 琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒均购自 TaKaRa 公司; 亚油酸、棉子糖、NP-40、Sc-U 培养基所需的各种氨基酸, 购自 Sigma 公司; *S.c.* Easy Comp<sup>™</sup> Transformation Kit 为 Invitrogen 公司产品; PCR 引物合成和 DNA 测序委托上海生工生物工程有限公司; 其余试剂均为国产分析纯以上或进口超级纯产品。

**1.1.3 培养基:**培养基 LB、YPD、Sc-U 平板均按 Invitrogen 公司操作手册推荐方法配制。

**1.2 方法**

**1.2.1 质粒 DNA 的提取:**利用碱裂解法<sup>[14]</sup>提取大肠杆菌中的重组质粒 PYMD6PMCD6。该质粒是本实验室自行构建,以 pYES2.0 载体为骨架,PCR 法去除 pGAL1 启动子,然后插入 $\Delta^6$ -脂肪酸脱氢酶基因,并且在前面加入 $\Delta^6$ -脂肪酸脱氢酶基因的启动子片段(约 612 bp)<sup>[1]</sup>。

**1.2.2 易错 PCR 引物设计:**根据已克隆得到的 *Mucor* sp. EIM-10 菌株的 $\Delta^6$ -脂肪酸脱氢酶基因序列,使用 Primer Premier 5.0 软件设计易错 PCR 引物。在引物的末端分别引入限制性内切酶 *EcoR* I (GAATTC)和 *Xho* I (TCGAG)酶切位点,并分别在 5' 端增加 3-5 个保护碱基。两段引物之间的长度为整个基因的完整序列。上游引物: 5'-CGGAATTCATGCCCCCAAATACTGC-3'; 下游引物: 5'-CCGCTCGAGCTAATGAGCGTGTCTTTATCA-3'(下划线分别为 *EcoR* I、*Xho* I 酶切位点,斜体分别为起始密码子与终止密码子)。

**1.2.3 易错 PCR 反应体系:**以 PYMD6PMCD6 质粒为模板,设计特异引物,利用 GeneMorph® II Random Mutagenesis Kit 对 $\Delta^6$ -脂肪酸脱氢酶基因进行易错 PCR 扩增。适合的突变率是定向进化技术的关键,突变率在 5-20 kb<sup>[15]</sup>之间,可以获得理想的突变效果。为了控制随机突变文库的质量,本研究将突变率控制在 2-7 kb (中等突变偏下)范围内。

根据突变频率和模板浓度的关系(表 1),我们确定了易错 PCR 反应体系和条件(表 2)。易错 PCR 结束后,取 1  $\mu$ L 产物进行 1%琼脂糖凝胶电泳检验分析,剩余 PCR 产物用 Bio Basic Inc PCR 产物回收试剂盒回收,用紫外分光光度法进行浓度测定并-20  $^{\circ}$ C 保存。

表 1 突变频率和模板浓度的关系 Table 1 The relationship between the concentration of template and the mutation frequency	
突变率 Mutations (kb)	模板浓度 Concentration of template (mg/L)
0-4.5 (Low range)	10.00-100.00
4.5-9.0 (Medium range)	0.01-10.00
9.0-16.0 (High range)	0.01-0.10

**1.2.4 重组质粒(PYTBMCD6 突变)的构建:**如图 1 所示,质粒 PYMD6PMCD6 经 *Xho* I 和 *EcoR* I 消化后,用琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒回收 6.0 kb 的片段,然后与经 *Xho* I 和 *EcoR* I 消化并回收的 1.57 kb 突变基因片段用 T4 DNA 连接酶 16  $^{\circ}$ C 过夜连接,获得重组质粒(PYTBMCD6 突变)。

**1.2.5 易错 PCR 突变表达文库的构建:**连接产物与大肠杆菌 DH5 $\alpha$  感受态细胞 42  $^{\circ}$ C 热激 90 s,涂布含 Amp<sup>r</sup> (100 mg/L)的 LB 平板,37  $^{\circ}$ C 培养 16 h 后将平板上所有克隆转入含有 Amp<sup>r</sup> 的液体 LB 培养基中,37  $^{\circ}$ C、200 r/min 培养过夜,获得突变质粒。抽取 DH5 $\alpha$  中突变质粒,转入酿酒酵母菌株 INVSc1 感受态细胞后,涂布在 Sc-U 选择性固体培养基上,置 30  $^{\circ}$ C 培养 3 d 至转化子出现。挑选具有插入片段的克隆,组成随机突变表达文库。

表 2 易错 PCR 反应体系和条件 Table 2 The reaction system and reaction qualifications of error-prone PCR					
反应体系 Reaction system	体积 Volume ( $\mu$ L)	反应阶段 Reaction stage	温度 Temperature ( $^{\circ}$ C)	时间 Time (min)	循环数 Cycle
10 $\times$ Mutazyme II reaction buffer	5.0	预变性	95	2.0	1
40 mmol/L dNTPs mix (200 $\mu$ mol/L)	1.0	变性	95	0.5	
Primers (10 $\mu$ mol/L)	各 1.5	退火	56	0.5	
DNA template	1.0	延伸	72	1.5	30
Mutazyme II DNA Polymerase	1.0	最后延伸	72	10.0	1
Aseptic ultra pure water	补足 50.0				

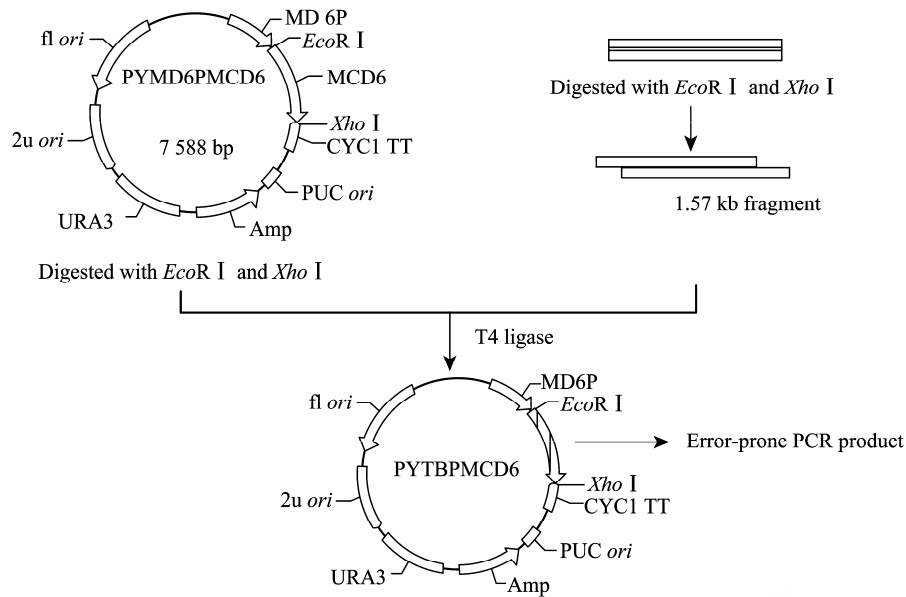


图 1 重组质粒 PYTBMCD6 的构建  
Fig. 1 Construction of recombination plasmid PYTBMCD6

**1.2.6 阳性克隆的筛选和鉴定:** 随机挑取上一步中 Amp<sup>r</sup> 平板上的单菌落进行菌落 PCR 鉴定并抽提质粒, 并且用限制性内切酶 *Xho* I 和 *Eco*R I 进行双酶切和 PCR 鉴定含有突变基因的重组子 PYTBMCD6 是否构建成功。将验证正确的阳性克隆子送交上海生工进行序列测定(ABI PRISM 377 DNA 自动测序仪), 分析 *Mucor* sp. EIM-10 菌株的  $\Delta^6$ -脂肪酸脱氢酶基因(*mcd6*)突变位点以及碱基突变率。

**1.2.7  $\Delta^6$ -脂肪酸脱氢酶基因随机突变文库的质量评价与分析:** 用 10 mL LB 培养基将 Amp 抗性 LB 平板上的全部克隆子洗涤下来, 涡旋混匀后每支冻存管加 1 mL 菌液并添加 10%的甘油,  $-80^{\circ}\text{C}$  保存。吸取 50  $\mu\text{L}$  PYTBMCD6/DH5 $\alpha$  混合菌液稀释 4 倍并均匀涂布在含有 Amp 抗性的 LB 平板上, 计算每个抗性平板上的菌落数, 分析整个文库库容与质量。

2 结果与分析

2.1  $\Delta^6$ -脂肪酸脱氢酶的易错 PCR

利用碱裂解法提取大肠杆菌中的重组质粒 PYMD6PMCD6, 1%的琼脂糖凝胶电泳检测分析并根据紫外分光光度法测定其浓度(表 3)。

表 3 重组子 PYMD6PMCD6 的浓度及其纯度 Table 3 Concentration of recombinant plasmid PYMD6PMCD6				
波长 Wavelength	吸光值 Absorption value	波长比 The ratio of wavelength	比值 Ratio	DNA 浓度 DNA concentration (mg/L)
<i>OD</i> <sub>230</sub>	0.693			
<i>OD</i> <sub>260</sub>	1.351	<i>OD</i> <sub>260</sub> / <i>OD</i> <sub>230</sub>	1.949	
<i>OD</i> <sub>280</sub>	0.722	<i>OD</i> <sub>260</sub> / <i>OD</i> <sub>280</sub>	1.870	135.1

根据提取的 PYMD6PMCD6 质粒 DNA 浓度和突变率要求, 将 1  $\mu\text{L}$  PYMD6PMCD6 (135 ng 左右) 质粒稀释 300 倍后, 取 1  $\mu\text{L}$  (0.45 ng 左右的模板浓度)作为模板, 以 $\Delta^6$ -脂肪酸脱氢酶上游和下游为引物, 利用 GeneMorph<sup>®</sup> II Random Mutagenesis Kit 对 $\Delta^6$ -脂肪酸脱氢酶基因进行易错 PCR(图 2), 结果获得大小约为 1 500 bp 的单一片段并进行胶回收。

2.2 重组质粒(PYTBMCD6 突变)的构建和突变文库的验证

将 Bio Basic Inc 琼脂糖凝胶回收试剂盒回收得到的 1 500 bp  $\Delta^6$ -脂肪酸脱氢酶突变基因混合物酶切连接到载体 PYMD6PMCD6 上, 形成的重组质粒 (PYTBMCD6 突变)转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$ , 涂布 Amp

抗性平板, 获得 $\Delta^6$ -脂肪酸脱氢酶基因的重组突变质粒。随机挑取白色菌落进行菌落 PCR 验证, 1.0% 的琼脂糖电泳检测分析(图 3)。并抽提阳性克隆子中的重组质粒进行 *Xho* I 和 *Eco*R I 双酶切验证分析。图 4 是重组质粒的酶切验证, 证明外源基因片段 (1 500 bp) 被克隆到了质粒载体 PYMD6PMCD6 上。

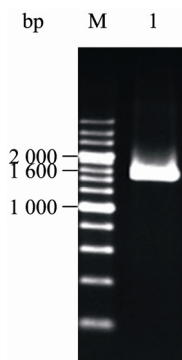


图 2 易错 PCR 电泳图

Fig. 2 Electrophoresis of error-prone PCR product

注: M: 200 bp DNA marker; 1: 易错 PCR 扩增片段。

Note: M: 200 bp DNA marker; 1: Amplification product of error-prone PCR.

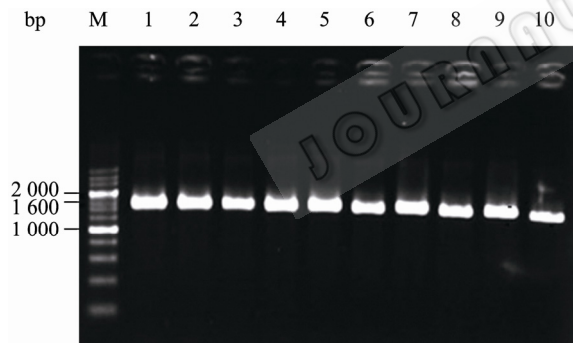


图 3 重组子菌落 PCR 电泳图

Fig. 3 Electrophoresis of colony PCR

注: M: 200 bp DNA marker; 1-10: 菌落 PCR 扩增片段。

Note: M: 200 bp DNA marker; 1-10: Amplification product of colony PCR.

从图 3 可以看出, 所有随机挑取的白色菌落 PCR 结果均出现 1 500 bp 左右的单一亮带, 与 $\Delta^6$ -脂肪酸脱氢酶基因序列大小是一致的。结果表明, 所挑取的克隆子均为阳性克隆子且 $\Delta^6$ -脂肪酸脱氢酶基因的随机突变体已经成功转入克隆宿主大肠杆菌 DH5 $\alpha$  内; 而且图 4 中的酶切泳道出现 6 000 bp

和 1 500 bp 左右的 2 条亮带, 与 PYMD6PMCD6 载体经双酶切后和 $\Delta^6$ -脂肪酸脱氢酶基因序列大小分别一致,  $\Delta^6$ -脂肪酸脱氢酶的随机突变体基因已经成功连接到 PYMD6PMCD6 载体上, 随机突变文库构建成功。

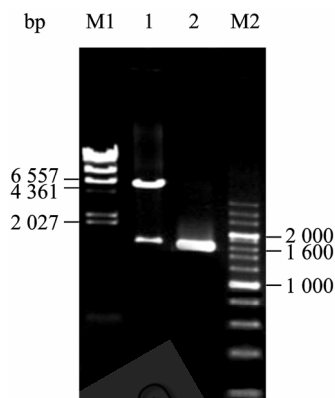


图 4 重组质粒 PYTBMCD6 双酶切鉴定

Fig. 4 Digested identification of recombination plasmid PYTBMCD6

注: M1:  $\lambda$ -Hind III marker; 1: *Eco*R I 和 *Xho* I 对 PYMD6PMCD6 双酶切; 2: PCR 产物; M2: 200 bp DNA marker.

Note: M1:  $\lambda$ -Hind III marker; 1: PYMD6PMCD6 digested with *Eco*R I and *Xho* I; 2: PCR product; M2: 200 bp DNA marker.

### 2.3 $\Delta^6$ -脂肪酸脱氢酶基因测序和突变位点分析

随机挑取 10 个克隆子送交上海生工测序, 利用 BioEdit 7.05 软件对 $\Delta^6$ -脂肪酸脱氢酶突变体的突变位点进行比对分析。对各个突变体的突变碱基统计(表 4)并计算突变率, 并对突变体的氨基酸序列进行比对分析(图 5)。

从表 4 中可以看出, 7 号突变碱基最多达到 17 个, 而 3 号突变碱基只有 9 个。10 个突变体的突变碱基达到 124 个, 平均突变 12 个, 突变率为 0.795%。其中, 碱基 A 突变 45 个, 突变率为 38%; 碱基 T 突变 25 个, 突变率为 20%; 碱基 C 突变 27 个, 突变率为 22%; 碱基 G 突变 25 个, 突变率为 20%; 缺失碱基 2 个, 突变率为 1.6%。34 个碱基突变为 A, 突变率为 27%; 41 个碱基突变为 T, 突变率为 33%; 17 个碱基突变为 C, 突变率为 14%; 31 个碱基突变为 G, 突变率为 25%; 符合试剂盒提供的各种碱基的突变率范围。A 和 T 的突变率会相对比较高

一点, 这与试剂盒提供的 AT 突变率 56.2%、GC 突变率为 43.8%基本吻合。其中转换多于颠换, 表明在易错 PCR 过程中, 碱基的突变确实具有一定的偏向性; A、G 间的转换多于 T、C 间的转换, 可能与易错 PCR 过程中 dATP 和 dGTP 两种脱氧核苷酸的含量高于其它两种有关。

从表 4 中还可以看出, 随机挑取的 $\Delta^6$ -脂肪酸脱氢酶突变体均有碱基发生随机突变且整个突变文库质量较好, 10 个突变体中没有重复突变体。

从图 5 中可以看出, 随机挑取的 $\Delta^6$ -脂肪酸脱氢酶突变体均有氨基酸发生不同程度的变化。除了后两个突变株由于缺失掉一个碱基导致框移或移码突变, 从而使蛋白质氨基酸排列顺序发生很大改变外, 其它突变体氨基酸变化相对温和。10 个突变体中没有重复突变体, 从另一方面证明整个突变文库

质量较好。至于氨基酸突变的效果如何以及催化活力是否发生改变还需要通过后续的筛选等试验进一步验证。

**2.4  $\Delta^6$ -脂肪酸脱氢酶基因随机突变文库的分析**  
选取 5 支冻存管, 每管吸取 100  $\mu\text{L}$  混合菌液并稀释 4 倍分别均匀涂布在 20 个含有 Amp 抗性的 LB 平板上(分 10 组, 每组 2 个)过夜培养, 计算每个平板的菌落数(表 5)。从表 5 中可以看出, 随机选取的 5 管每管克隆数在 205 CFU/50  $\mu\text{L}$  左右, 表明整个突变体菌液混合度比较均一。500  $\mu\text{L}$  突变体菌液共含有 2 089 个克隆子, 平均每 100  $\mu\text{L}$  突变体菌液含有 417.8 个克隆子, 因此我们整个随机突变文库的总库容为 417.8 CFU/100  $\mu\text{L} \times 100 \mu\text{L}/\text{管} \times 10 \text{管} = 4.6 \times 10^4$  CFU。整个文库库容达到  $10^4$  级, 基本能够满足文库筛选的要求。

表 4  $\Delta^6$ -脂肪酸脱氢酶易错 PCR 的碱基突变位点的分析  
Table 4 Analysis of  $\Delta^6$ -desaturase base mutations in select error-prone PCR product

突变体 Mutant	突变个数 Amount	突变位点与突变碱基 Mutant sites and mutant bases					
		碱基颠换 Transversions			碱基转换或缺失 Transitions and Deletions		
1	10	67A→T 1445A→C	581A→T	932T→A	99A→G 413A→G	190G→A 1016T→C	193C→T 1332T→C
2	12	67A→T 1264A→T	581A→T 1480C→A	932T→A 1507T→A	99A→G 413A→G	190G→A 1170G→A	193C→T 1405A→G
3	9	128A→T	201A→T		193C→T 604C→T 1380G→A	413A→G 665C→T	563C→T 1037A→G
4	13	475A→C	601T→G		108T→C 413A→G 774C→A 1332A→G	193C→T 621T→C 900C→T 1484A→G	394G→A 728A→G 1184T→C
5	13	173A→T 976T→A	527A→T 1073T→G	815T→A 1305G→T	193C→T 722C→T 1497T→C	413A→G 1164G→A	589C→G 1453A→G
6	10	369A→T 1160T→A	423T→A 1253C→A	455C→A 1355T→A	193C→T 769T→C	413A→G	767A→G
7	17	281A→T 513G→T 1001T→G	362C→G 662T→A 1291G→T	475A→T 682C→G 1389C→G	193C→T 241G→A 799A→G	195G→A 413A→G 1003G→A	219C→T 703G→A
8	15	512A→T 909C→G 1382G→C	628G→T 1328T→A 1481T→A	646G→T 1332A→T	135T→C 428A→G 1466T→C	193C→T 707G→A	413A→G 1423G→A
9	14	95A→T 505A→T 1464G→C	119A→C 531G→T	442T→A 1191A→T	109G→A 541A→G 303C 缺失	193C→T 661T→C	413A→G 840G→A
10	11	551A→T 1414G→C	881T→A	1033G→T	167G→A 637C→A 818A 缺失	193C→T 740A→C	413A→G 1214A→G

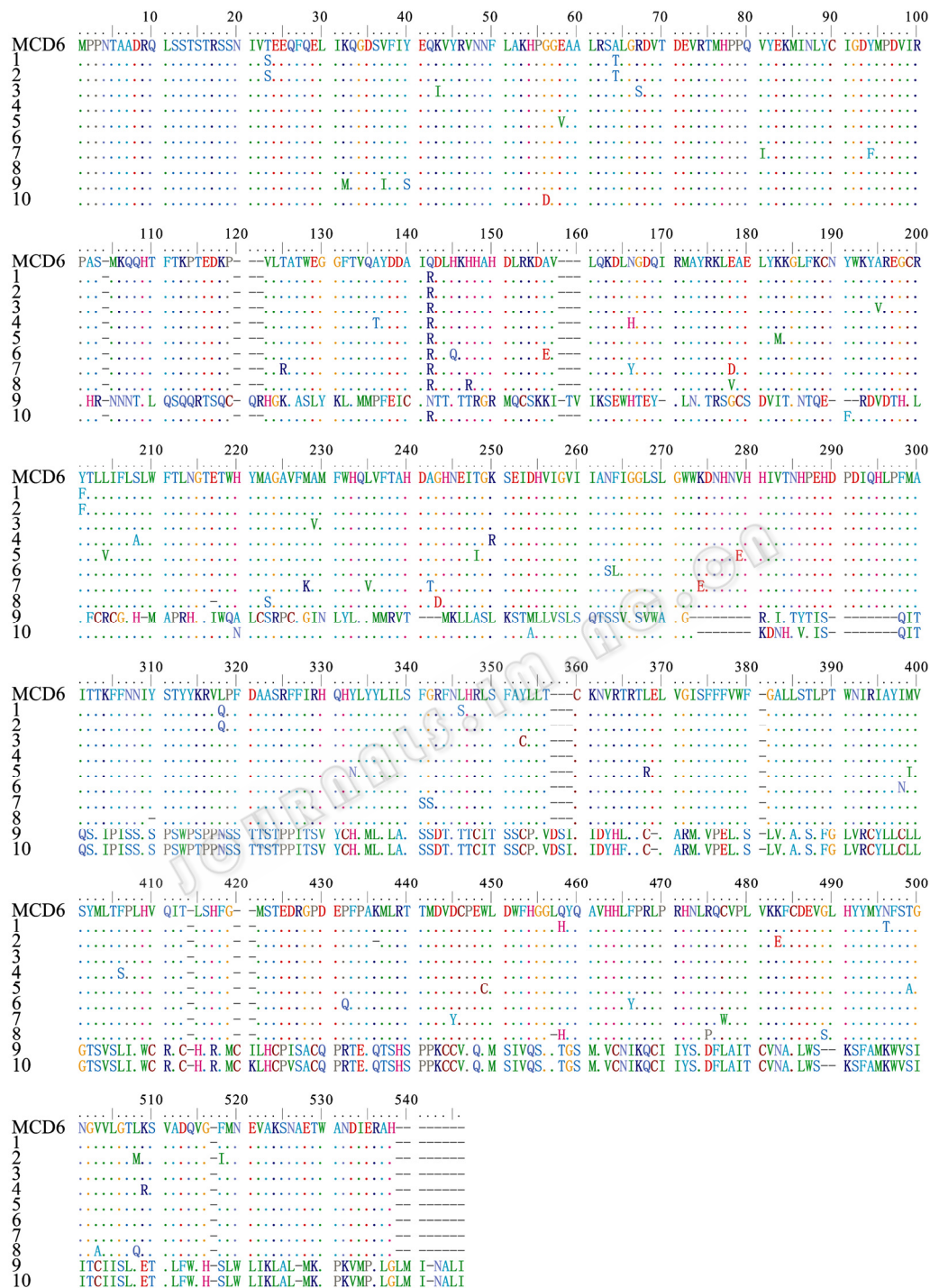


图5 突变体氨基酸序列的比对分析

Fig. 5 Amino acid mutation analysis



表 5 突变体克隆子的菌落分析  
Table 5 Analysis of mutant clones

编号 Number	第 1 管 No. 1		第 2 管 No. 2		第 3 管 No. 3		第 4 管 No. 4		第 5 管 No. 5	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
菌落数 Number of colonies	216	197	213	191	207	215	221	209	218	206
平均数 Average colonies (CFU/50 $\mu$ L)	206.5		202		211		215		210	

### 3 讨论

突变文库的构建能够快速鉴定适应性突变, 以最小的序列变化产生大的表型差异, 从而使氨基酸序列差异与蛋白质功能差异之间的真正相互关系变得清楚, 极大地简化了序列比较与分析工作。我们选用的易错 PCR 程序操作简单, 容易引入点突变, 而且最重要的是其突变频率可被确切控制。易错 PCR 方法突变频率高于传统的物理和化学诱变, 是目前定向进化领域最为常用的随机突变手段。

本研究采取易错 PCR 技术构建了高质量 $\Delta^6$ -脂肪酸脱氢酶的随机突变表达文库, 通过测定转化子 $\Delta^6$ -脂肪酸脱饱和酶活力的变化筛选酶活力提高的突变株, 使其能够应用于生产实际。同时筛选过程中获得大量催化活力改变的突变体, 关于 $\Delta^6$ -脂肪酸脱氢酶催化活力发生改变的原因可通过分析所获得的突变序列和结构利用定点突变等试验进一步验证。相信随着研究的不断深入,  $\Delta^6$ -脂肪酸脱氢酶催化底物亚油酸(LA)合成  $\gamma$ -亚麻酸(GLA)的结构基础和分子机理也会进一步阐明, 从而实现更高的催化效率, 加速其在工业生产上的应用进程。以上研究对提高多不饱和脂肪酸产量奠定了基础, 具有重要的理论和应用价值。

### 参 考 文 献

- [1] Joshi K, Lad S, Kale M, et al. Supplementation with flax oil and vitamin C improves the outcome of attention deficit hyperactivity disorder (ADHD)[J]. Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids, 2006, 74(1): 17-21.
- [2] Albert CM, Oh K, Whang W, et al. Dietary  $\alpha$ -linolenic acid intake and risk of sudden cardiac death and coronary heart disease[J]. Circulation, 2005, 112(21): 3232-3232.
- [3] Kapoor R, Huang YS. Gamma linolenic acid: an anti-inflammatory omega-6 fatty acid[J]. Current Pharmaceutical Biotechnology, 2006, 7(6): 531-534.
- [4] Khoomrung S, Laoteng K, Jitsue S, et al. Significance of fatty acid supplementation on profiles of cell growth, fatty acid, and gene expression of three desaturases in *Mucor rouxii*[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2008, 80(3): 499-506.
- [5] Hao YL, Mei XH, Zhao F, et al. Expression of *Mucor circinelloides* gene for  $\Delta^6$ -desaturase results in the accumulation of high levels of  $\gamma$ -linolenic acid, in transgenic tobacco[J]. Russian Journal of Plant Physiology, 2008, 55(1): 77-81.
- [6] Song LY, Lu WX, Hu J, et al. Identification and functional analysis of the genes encoding  $\Delta^6$ -desaturase from *Ribes nigrum*[J]. Journal of Experimental Botany, 2010, 61(6): 1827-1838.
- [7] Zhou XR, Robert S, Singh S, et al. Heterologous production of GLA and SDA by expression of an *Echium plantagineum*  $\Delta^6$ -desaturase gene[J]. Plant Science, 2006, 170(3): 665-673.
- [8] 于爱群, 江贤章, 夏晓峰, 等.  $\gamma$ -亚麻酸产生菌 *Mucor* sp. EIM-10 的筛选及分子鉴定[J]. 生物加工过程, 2009, 7(2): 74-78.
- [9] 毛若雨, 江贤章, 陈晓峰, 等. *Mucor* sp. EIM-10 C18- $\Delta^6(15)$  脂肪酸脱氢酶启动子区域的克隆和功能鉴定[J]. 药物生物技术, 2010, 17(1): 15-20.
- [10] Arnold FH, Georgiou G. Directed Evolution Library Creation: Methods and Protocols[M]. Clifton: Humana Press, 2003: 3-10.
- [11] 王楠, 马荣山. 酶分子体外定向进化的研究进展[J]. 生物技术通报, 2007(2): 63-66.
- [12] 蔡勇, 杨江科, 闫云君. 酶的定向进化策略[J]. 生命的化学, 2007, 27(2): 186-189.
- [13] Miyazaki K, Wintrode PL, Grayling RA, et al. Directed evolution study of temperature adaptation in a psychrophilic enzyme[J]. Mol Biol, 2000, 297(4): 1015-1026.
- [14] Joseph S, David WR. 黄培堂, 王嘉玺, 朱厚础, 等译. 分子克隆实验指南[M]. 第 3 版. 北京: 科学出版社, 2002: 27-29.
- [15] 贾向东, 陈德富, 陈喜文, 等. 几种定向进化技术的比较及文库构建策略[J]. 中国生物工程杂志, 2003, 23(12): 68-72.