

三角褐指藻 Δ^5 -脂肪酸脱氢酶基因的克隆及在酿酒酵母中的表达

杨哲, 魏东盛, 邢来君, 李明春

南开大学微生物学系 分子微生物学与技术教育部重点实验室, 天津 300071

摘要: Δ^5 -脂肪酸脱氢酶是合成花生四烯酸的关键酶。根据已报道的 Δ^5 -脂肪酸脱氢酶基因设计引物, 分别从三角褐指藻基因组 DNA 和总 cDNA 中扩增得到 1520 bp 和 1410 bp 的特异片段, 序列分析结果显示, 结构基因中含有一个大小为 110 bp 的内含子, 这是国内外首次报道。将 Δ^5 -脂肪酸脱氢酶基因亚克隆到大肠杆菌和酿酒酵母的穿梭表达载体 pYES2.0 中, 在大肠杆菌中筛选到含有目的片段的重组质粒 pYPTD5, 用电击转化的方法将重组质粒 pYPTD5 转化到营养缺陷型酿酒酵母菌株 INVScl 中, 在缺省培养基中筛选得到酿酒酵母转化菌株 YPTD5。在合适的培养条件下, 添加外源底物双高 γ -亚麻酸和诱导物半乳糖, 培养并收集菌体。通过脂肪酸甲酯气相色谱分析, 表明三角褐指藻 Δ^5 -脂肪酸脱氢酶基因在酿酒酵母中获得了高效的表达, 将双高 γ -亚麻酸转化为花生四烯酸, 其底物转化率达到了 45.9%。

关键词: 花生四烯酸, 酿酒酵母, 功能验证

Cloning and expression in *Saccharomyces cerevisiae* of Δ^5 -fatty acid desaturase gene from *Phaeodactylum tricornutum*

Zhe Yang, Dongsheng Wei, Laijun Xing, and Mingchun Li

Key Laboratory of Molecular Microbiology and Technology, Ministry of Education, Department of Microbiology, Nankai University, Tianjin 300071, China

Abstract: Δ^5 -fatty acid desaturase is the key enzyme in synthesis of arachidonic acid. Two specific fragment was cloned from genomic DNA and total cDNA of *Phaeodactylum tricornutum* through PCR with primer designed according to the reported sequences, respectively 1520 bp and 1410 bp. Comparison of the genomic and cDNA sequences revealed that the Δ^5 -fatty Acid Desaturase gene from genomic DNA had an 110 bp intron. The 1.4 kb was subcloned into the yeast-*E. coli* shuttle vector pYES2.0, then an expression recombinant plasmid pYPTD5 containing target gene was constructed. The plasmid pYPTD5 was transformed into defective mutant INVScl of *Saccharomyces cerevisiae* for expression by electrotransformation method. Dihomo- γ -linolenic acid was provided as an exogenous substrate to the yeast cultures, with galactose as inducer. By GC detecting, the recombinant *S. cerevisiae* had arachidonic acid. The results indicated that high level expression of Δ^5 -fatty acid desaturase, and the substrate conversion reached 45.9%.

Keywords: arachidonic acid, *Saccharomyces cerevisiae*, functional identification

Received: September 1, 2008; **Accepted:** November 13, 2008

Supported by: the National Natural Science Foundation of China (No. 30771355), the National High Technology Research and Development Program of China ("863" Program) (No. 2007AA10Z189), Doctoral Fund of the New Teacher Programme of Ministry of Education of China (No. 20070055061).

Corresponding author: Mingchun Li. Tel: +86-22-23508506; Fax: +86-22-23508800; E-mail: lmchun68@yahoo.com.cn

国家自然科学基金(No. 30771355), 国家科技部 "863" 项目(No. 2007AA10Z189), 教育部博士点基金新教师项目(No. 20070055061)资助。

多不饱和脂肪酸(Polyunsaturated fatty acids, PUFAs)是指含有 2 个或 2 个以上双键, 碳原子数在 16~22 的直链脂肪酸^[1]。多不饱和脂肪酸的代谢从油酸(Oleic acid, OA)开始, 在 Δ^{12} -脂肪酸脱氢酶的催化下形成亚油酸(Linoleic acid, LA), 亚油酸可以在 Δ^{15} -脂肪酸脱氢酶催化下形成 α -亚麻酸(α -linolenic acid, ALA), 从而进入多不饱和脂肪酸代谢的 n-3 途径, 也可以直接进入 n-6 途径, 经过一系列延长酶和脱氢酶的催化, 可以转化成一系列长链多不饱和脂肪酸(Long-chain polyunsaturated fatty acids, LC-PUFAs)。其中, n-6 途径中的双高 γ -亚麻酸(Dihomo- γ -linolenic acid, DHGLA)必须经 Δ^5 -脂肪酸脱氢酶的催化转变成花生四烯酸(Arachidonic acid, AA)。AA 是人体重要的多不饱和脂肪酸, 主要是以磷脂形式存在于细胞膜中, 对人体具有重要的功能。AA 主要存在于哺乳动物的器官、肌肉和血液组织中, 在血液、肝脏、肌肉、神经等器官系统中作为主要的与磷脂结合的结构脂类起重要作用。AA 还是许多重要生理活性物质, 如前列腺素 E2、前列腺环素、血栓素、白细胞三烯等的直接前体^[2]。这些生理活性物质对脂蛋白的代谢、血液流变学、血管弹性、白细胞功能, 血小板激活等具有重要的调节作用^[3]。AA 的代谢物还参与造血和免疫调节等重要的生理功能, 近年来的研究显示, 它们还有抗肿瘤、抗多种炎症和抗粥样硬化等作用^[4,5]。因此, 作为合成 AA 的关键酶, Δ^5 -脂肪酸脱氢酶已经成为国内外学者关注的热点^[6,7]。

海洋藻类产生的多不饱和脂肪酸(PUFAs)的含量高^[8], 氧化稳定性好, 受到了国内外的广泛关注^[9]。三角褐指藻(*Phaeodactylum tricornerutum*)属于硅藻门, 羽纹纲, 褐指藻目, 褐指藻属。三角褐指藻是具有重要经济价值的藻类, 含有较高量的多不饱和脂肪酸(PUFAs)^[10], 因此国内外学者对于其脂肪酸组成及合成途径进行了大量的研究^[11,12]。但光合自养藻类因生物量低, 培养条件对多不饱和脂肪酸(PUFAs)的产量影响较大, 产业化前景暗淡。大豆是我国重要的油料作物, 本实验室多年来致力于转基因大豆的研究, 期望得到产生多不饱和脂肪酸的转化大豆。之前已经成功地将深黄被孢霉 Δ^6 -脂肪酸脱氢酶基因转到大豆中, 获得了产生 γ -亚麻酸的转基因大豆。本研究是从三角褐指藻克隆 Δ^5 -脂肪酸脱氢

酶基因, 将带有目的基因的表达载体转入酿酒酵母 INVSc1 中, 通过脂肪酸甲酯气相色谱分析, 验证了 Δ^5 -脂肪酸脱氢酶具有将双高 γ -亚麻酸转化为花生四烯酸的功能, 为进一步获得产花生四烯酸的转基因大豆奠定基础。

1 材料和方法

1.1 藻种、菌种和载体

三角褐指藻(*Phaeodactylum tricornerutum*)来自中国海洋研究所; 大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH5 α 和酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)营养缺陷型 INVSc1, 本室保存; T-vector 试剂盒和反转录试剂盒购自 Promega 公司; 表达载体 pYES2.0 购自 Invitrogen 公司。

1.2 酶及试剂

T4 DNA 连接酶, 限制酶 *Bam*H I、*Not* I、X-gal、IPTG 购自宝生物工程(上海)有限公司; 双高 γ -亚麻酸(DHGLA)和花生四烯酸(AA)标准品购自 Cayman chemical 公司; NP-40, 购自 Sigma 公司; DNA 片段快速纯化/回收试剂盒、氨苄青霉素和 DNA Marker III 购自北京鼎国生物技术有限责任公司; 植物基因组 DNA 提取试剂盒、TRNzol RNA 提取试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司; 其他常规试剂均为国产分析纯。

1.3 培养基

LB 培养基和 YPD 培养基参见文献[13], 酵母营养缺陷型 SC-Ura 培养基和诱导表达培养基的配制按 Invitrogen 公司操作手册上进行。海藻养殖用 f/2 培养基参见文献[14]。

1.4 引物合成和测序

引物合成和序列测定均由上海生工完成。

PT5UP: 5'-tagtctggatccatggctccggatgcgataagc-3'

PT5DOWN: 5'-tactacgcccgccttacgcccgtccggtaagg-3'

1.5 三角褐指藻 Δ^5 -脂肪酸脱氢酶基因的克隆

将三角褐指藻接种到 500 mL 三角瓶装有 150 mL 的 f/2 培养基中, 22°C 培养 3 d, 每天摇动 1~2 次。5000 r/min 离心收集藻体, 分别按照植物基因组 DNA 提取试剂盒和 TRNzol RNA 提取试剂盒的说明书提取三角褐指藻的基因组和总 RNA, 并按照反转录试剂盒要求, 取 1 μ g 总 RNA 为模板, 合成 cDNA 第一链, 冻存于 -20°C 备用。

根据已报道的三角褐指藻 Δ^5 -脂肪酸脱氢酶基因序列(GenBank Accession No. AY082392)设计引物 PT5UP 和 PT5DOWN, 并且参考酿酒酵母表达载体 pYES2.0 的多克隆位点, 分别在引物的 5'端引入 *Bam*H I, *Not* I 的酶切位点, 以三角褐指藻基因组和总 cDNA 为模板进行 PCR 扩增。PCR 扩增条件为 95°C 2 min, 然后 95°C 30 s, 53°C 30 s, 72°C 1.5 min, 30 个循环, 扩增产物进行筛选、鉴定、测序。

1.6 表达载体的构建与转化

将 PCR 产物和表达载体 pYES2.0 分别用 *Bam*H I/*Not* I 双酶切, 试剂盒回收之后连接, 并转化到大肠杆菌 DH5 α 中, 大肠杆菌感受态准备和转化方法参见文献[13]。筛选转化子, 经过 PCR 和酶切检测, 得到重组质粒 pYPTD5。将质粒 pYES2.0 和 pYPTD5 电击转化到营养缺陷型酿酒酵母 INVSc1 中, 在 SC-Ura 培养基上筛选得到转化子, 分别作为对照菌种和工程菌株 YPTD5。酿酒酵母电击转化方法和质粒提取方法参考文献[15]。

1.7 Δ^5 -脂肪酸脱氢酶基因的诱导表达

将对照菌株和工程菌株 YPTD5 接种到 100 mL 三角瓶装有 15 mL 的 SC-Ura 的液体培养基中, 在 30°C 和 120 r/min 条件下过夜培养, 将过夜培养物接种到 250 mL 三角瓶装有 50 mL 含有 1% NP40 和 2% 的半乳糖的 SC-Ura 培养基中, 参考 Invitrogen 公司操作手册中所示方法使 OD_{600} 达到 0.4。30°C 和 120 r/min 条件下诱导培养 72 h, 收获菌体。

1.8 脂肪酸提取及甲酯化

将收获的菌体用去离子水洗涤 3 次, 50°C 烘干 10 h 后, 磨碎。加入 5% KOH-CH₃OH 溶液, 70°C 反应 2 h, 之后加入 14% BF₃-CH₃OH, 70°C 反应 1 h, 合成脂肪酸甲酯。利用 1:4 的氯仿:正己烷萃取脂肪酸甲酯, 用氮气吹干, 正己烷回溶, 备用待测。

1.9 脂肪酸甲酯的气相色谱分析

气相色谱分析采用弹性石英毛细管柱, 载气为 N₂, 线速 10 cm/s。分流比 100:1, 气化温度 250°C, 柱温 180°C, 尾吹 50 mL/min, 检测器为氢火焰离子化检测器, 上样量 2 μ L^[16]。

2 结果

2.1 序列分析

利用引物 PT5UP 和 PT5DOWN, 分别从三角褐

指藻基因组和总 cDNA 扩增得到了 1520 bp 和 1410 bp 的片段, 测序结果与已报道的三角褐指藻 Δ^5 -脂肪酸脱氢酶基因进行序列比对, 结果显示在结构基因(GenBank Accession No. EU784839)中存在一个大小为 110 bp 的内含子(300~409 bp), 这是国内外首次报道。

根据潜在的开放阅读框推测其编码的氨基酸序列并与报道的序列进行比对分析, 发现存在 3 个氨基酸残基的差异, 利用软件 DNAMAN(Version 5.2.2) 对这 3 个存在差异的氨基酸残基进行疏水性分析, 发现本研究得到的氨基酸残基具有更高的疏水特性。

2.2 表达载体 pYPTD5 的构建与鉴定

将利用引物 PT5UP 和 PT5DOWN 克隆得到的 PCR 产物和 pYES2.0 用 *Bam*H I、*Not* I 双酶切, 回收连接后, 转化到大肠杆菌 DH5 α , 从含有 Amp 的 LB 平板上随机挑选转化子, 小量提取质粒, 经过 PCR 和酶切鉴定正确(图 1), 得到构建成功的重组质粒 pYPTD5。

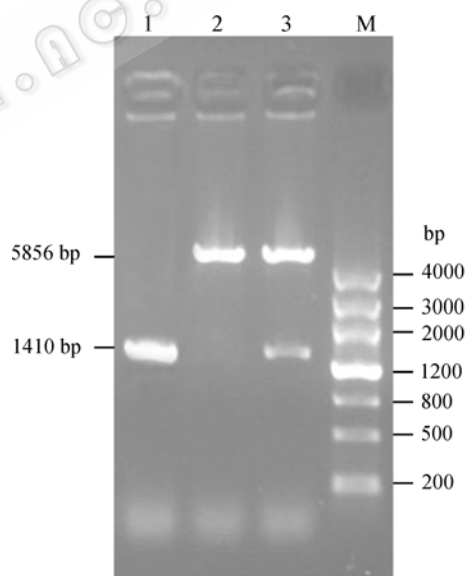


图 1 重组质粒 pYPTD5 检测结果

Fig. 1 Analysis of recombinant plasmid pYPTD5. 1: PCR product of PT5D5; 2: pYES2.0 restricted by *Bam*H I and *Not* I; 3: pYPTD5 restricted by *Bam*H I and *Not* I; M: DNA marker III.

2.3 三角褐指藻 Δ^5 -脂肪酸脱氢酶基因诱导表达

将空载体 pYES2.0 和重组质粒 pYPTD5 电击转化到酿酒酵母缺陷型 INVSc1 中, 在 SC-Ura 平板上筛选到对照菌株和转化菌株 YPTD5。以双高 γ -亚麻酸(DHGLA)和花生四烯酸(AA)标准品、受体菌和转化了空载体的受体菌为对照, 按材料方法 1.7 所述

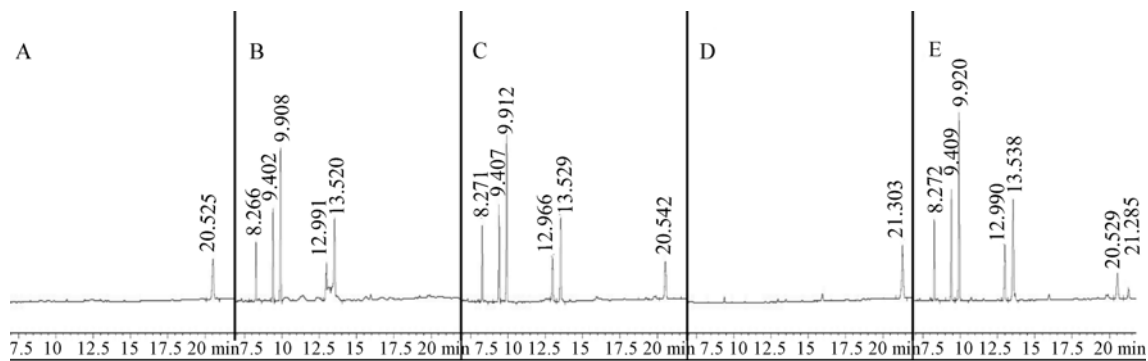


图 2 酿酒酵母总脂肪酸气相色谱分析图

Fig. 2 GC analysis of fatty acid methyl esters of total lipids of *S. cerevisiae* grown under inducing conditions. (A) Dihomo- γ -linolenic acid standard. (B) Acceptor strain INCSc1. (C) Yeast transformed with pYES2.0. (D) Arachidonic acid standard. (E) Yeast transformed with pYPTD5.

方法诱导表达外源基因,再按 1.8 所述方法进行脂肪酸甲酯化。经过 GC 分析,如图 2 所示,图 2A 为双高 γ -亚麻酸(DHGLA)标准品,出峰时间为 20.525 min;图 2B 为酿酒酵母缺陷型 INVSc1 对照菌株;图 2C 为转化了空载体的对照菌株并加入了底物双高 γ -亚麻酸(DHGLA),底物出峰时间为 20.542 min;图 2D 为花生四烯酸(AA)标准品,出峰时间为 21.303 min;图 2E 为转化菌株 YPTD5 并加入了底物双高 γ -亚麻酸(DHGLA)。经对比分析,在受体菌中不含有 DHGLA 和 AA,转化了空载体的受体菌中加入了底物 DHGLA 但是没有产物 AA 产生,只有在工程菌株 YPTD5 中加入了底物 DHGLA 并经过半乳糖诱导之后才有 AA 产生,产物出峰时间为 21.285 min,产物 AA 的出现也伴随着底物 DHGLA 的降低。经过计算,转化菌株 YPTD5 中的双高 γ -亚麻酸(DHGLA)和花生四烯酸(AA)分别占总脂肪酸含量的 8.54% 和 7.24%,底物转化率达到 45.9%,底物得到了高效的转化。

3 讨论

三角褐指藻是具有重要经济价值的藻类,可以积累大量的多不饱和脂肪酸,如 AA。在多不饱和脂肪酸合成途径中, Δ^5 -脂肪酸脱氢酶是合成 AA 的关键酶^[17]。在本研究中,根据已经报道的三角褐指藻 Δ^5 -脂肪酸脱氢酶设计引物,从基因组 DNA 和总 cDNA 中分别克隆得到了 Δ^5 -脂肪酸脱氢酶基因的结构基因和 ORF 区片段,经过序列分析,发现三角褐指藻 Δ^5 -脂肪酸脱氢酶基因结构基因中存在一个 110 bp 的内含子,并且这个内含子以 GT 开始,以 AT 结束,符合典型的一类内含子剪切规律^[18]。该基

因内含子的报道,在国内外都是首次。内含子的报道不仅得到了新的序列信息,也在一定程度上可以反映出本实验中得到的三角褐指藻 Δ^5 -脂肪酸脱氢酶在进化地位上与以往所得基因存在不同,这也为研究多不饱和脂肪酸脱氢酶系的进化关系提供了新的信息。

由于多不饱和脂肪酸的重要生理功能,对其消费需求也越来越多,尽管近年来关于海藻中提取多不饱和脂肪酸方法的报道越来越多,但目前的水平还不能达到规模化生产的要求,以 AA 为代表的多不饱和脂肪酸的主要来源还是深海鱼类。本实验室出于实现规模化生产,以及研究多不饱和脂肪酸合成途径的目的,正在构建可以产生多不饱和脂肪酸的转基因大豆植株,并且已经实现了深黄被孢霉 Δ^6 -脂肪酸脱氢酶基因在大豆中的表达^[19]。为了得到多不饱和脂肪酸产量性状优良的转化株,还需要将更多的脱氢酶基因转入大豆,并且需要待转入的目的基因具有高效的催化功能,除此之外还要考虑基因源与大豆在进化树上的亲缘关系,亲缘关系越近,转入基因在大豆中的稳定性将更为可靠。本研究证明了三角褐指藻 Δ^5 -脂肪酸脱氢酶具有高效的催化功能,并且这种光合自养型藻类与植物的亲缘关系较近,所以该酶具有在大豆中实现高效催化功能的潜力。

由于酿酒酵母是真菌中的一种模式生物,其转基因手段和培养条件成熟,对于外源基因的表达可以更有效的控制,因此在本研究中选择将该基因导入酿酒酵母中表达,并通过定量添加底物的方法,计算底物的转化率。经过计算,显示底物 DHGLA

的转化率达到 45.9%, 并且产物 AA 在总脂肪酸含量中的比例达到 7.24%, 这是国内外关于在酿酒酵母中表达脂肪酸脱氢酶基因的报道中催化效率较高的。

REFERENCES

- [1] James GM, Paul R, Daniel F, *et al.* Production of polyunsaturated fatty acids by polyketide synthases in both prokaryotes and eukaryotes. *Science*, 2001, **293**: 290–293.
- [2] Kankaanpaa P, Yang B, Kallio H, *et al.* Effects of polyunsaturated fatty acids in growth medium on lipid composition and on physicochemical surface properties of lactobacilli. *Appl Environ Microbiol*, 2004, **70**(1): 129–136.
- [3] Dariush M, Alberto A, Frank BH, *et al.* Interplay between different polyunsaturated fatty acids and risk of coronary heart disease in men. *Circulation*, 2005, **111**(2): 157–164.
- [4] Alan RB. Arachidonic acid as a bioactive molecule. *J Clin Invest*, 2001, **107**(11): 1339–1345.
- [5] Riana C, Annette JT, Charles F, *et al.* Docosahexaenoic acid and eicosapentaenoic acid antagonize the proinflammatory interactions of pneumolysin with human neutrophils. *Infect Immun*, 2004, **72**(7): 4327–4329.
- [6] Deborah SK, Jennifer MT, Huang YS, *et al.* Identification of $\Delta 5$ -desaturase from *Mortierella alpina* by heterologous expression in bakers' yeast and canola. *J Biol Chem*, 1998, **273**(45): 29360–29366.
- [7] Amanda EL, Bruce K, Emil GB, *et al.* cDNA cloning and characterization of human $\Delta 5$ -desaturase involved in the biosynthesis of arachidonic acid. *Biochem J*, 2000, **347**: 719–724.
- [8] Yongmanitchal W, Ward OP. Screening of algae for potential alternative sources of eicosapentaenoic acid. *Phytochemistry*, 1991, **30**(9): 2963–2967.
- [9] Ben-Amotz A, Tornabene TG, Thomas WH. Chemical profile of selected species of microalgae with emphasis on lipids. *J Phycol*, 1985, **21**: 72–81.
- [10] Moreno VJ, Julia EA, Moreno D, *et al.* Biosynthesis of unsaturated fatty acids in the diatom *Phaeodactylum tricorutum*. *Lipids*, 1978, **14**(1): 15–19.
- [11] Frederic D, Patricia S, Jens L, *et al.* New insight into *phaeodactylum tricorutum* fatty acid metabolism. Cloning and functional characterization of plastidial and microsomal $\Delta 12$ -fatty acid desaturases. *Plant Phys*, 2003, **131**(4): 1648–1660.
- [12] Frederic D, Jens L, Ulrich Z, *et al.* Cloning and functional characterization of *Phaeodactylum tricorutum* front-end desaturases involved in eicosapentaenoic acid biosynthesis. *Eur J Biochem*, 2002, **269**: 4105–4113.
- [13] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning*. 3rd Ed. Beijing: Science Press, 2002.
- [14] Guillard RRL. *Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates//Culture of Marine Invertebrate Animals*. New York: Plenum Press, 1975.
- [15] Adams A, Gottschling DE, Kaiser CA, *et al.* *Methods in Yeast Genetics*. 1st Ed. A Cold Spring Harbor Laboratory Course Manual, 2000.
- [16] Yung-Sheng H, Sunita C, Jennifer MT, *et al.* Cloning of Δ^{12} and Δ^6 desaturase from *Mortierella alpina* and recombinant production of γ -linolenic acid in *Saccharomyces cerevisiae*. *Lipids*, 1999, **34**(7): 649–659.
- [17] Howard GD, Zhang HX, Leonard F, *et al.* Identification of bifunctional $\Delta 12/\omega 3$ fatty acid desaturases for improving the ratio of $\omega 3$ to $\omega 6$ fatty acids in microbes and plants. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, **106**(25): 9446–9451.
- [18] Hu ZH, Jonathan EP. Sequencing, genomic organization, and preliminary promoter analysis of a Black cherry (R)-(+)-mandelomitrile lyase gene. *Plant Phys*, 1997, **115**: 1359–13691.
- [19] Li MC, Bu YP, Wang GK, *et al.* Heterologous expression of *Mortierella isabellina* $\Delta 6$ -fatty acid desaturase gene in soybean. *J Genet Genom*, 2004, **31**(8): 858–863.