

高山被孢霉 ATCC 32222 中细胞色素 b_5 还原酶 I 的克隆、 表达和功能鉴定

王明轩 陈海琴* 顾震南 陈卫 陈永泉

(江南大学食品学院 食品科学与技术国家重点实验室 江苏 无锡 214122)

摘要:【目的】鉴定产油微生物高山被孢霉 ATCC 32222 中细胞色素 b_5 还原酶 I 的功能。【方法】将高山被孢霉 ATCC 32222 中膜结合细胞色素 b_5 还原酶 I 基因与人可溶性细胞色素 b_5 还原酶基因序列比对, 去除该基因 N 端穿膜区域后, 与人可溶性细胞色素 b_5 基因分别在大肠杆菌中异源表达; 通过钴离子亲和层析、离子交换和分子排阻色谱等方法对表达产物进行纯化; 以 2,6-二氯靛酚钠(DCIP)为底物, 测定细胞色素 b_5 还原酶 I 的体外活性及其对 NADH 和 NADPH 的偏好性; 在反应体系中存在 NADH 时, 通过全波长扫描方法检测细胞色素 b_5 还原酶 I 与细胞色素 b_5 的相互作用。【结果】高山被孢霉 ATCC 32222 中膜结合细胞色素 b_5 还原酶 I 被成功可溶表达, 经纯化后检测到体外活性: 使用 NADH 时酶活为 564.57 U, 使用 NADPH 时为 51.97 U; 在 NADH 存在时, 细胞色素 b_5 还原酶 I 能够还原细胞色素 b_5 , 其吸收峰从 411 nm 偏移至 422 nm, 并在 521 nm 和 554 nm 处吸光值增加。【结论】细胞色素 b_5 还原酶 I N 端穿膜区域的去除增加了其可溶性, 并保持了蛋白质活性; 高山被孢霉 ATCC 32222 中细胞色素 b_5 还原酶 I 基因编码的是一种 NADH-细胞色素 b_5 还原酶, 其在体外能与细胞色素 b_5 相互作用。

关键词: 细胞色素 b_5 还原酶, 细胞色素 b_5 , 高山被孢霉, 脂肪酸脱饱和反应

Expression, purification and characterization of cytochrome b_5 reductase I from *Mortierella alpina* ATCC 32222

WANG Ming-Xuan CHEN Hai-Qin* GU Zhen-Nan CHEN Wei CHEN Yong-Quan

(School of Food Science and Technology, State Key Laboratory of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi, Jiangsu 214122, China)

Abstract: [Objective] This study focus on the functional characterization of membrane-bound cytochrome b_5 reductase I from *Mortierella alpina* ATCC 32222. [Methods] We identified the N-terminal transmembrane region in the *M. alpina* cytochrome b_5 reductase I through sequence alignment. The truncated *M. alpina* cytochrome b_5 reductase I gene and human soluble cytochrome b_5 gene were expressed in *Escherichia coli* BL21. The proteins were purified using Cobalt affinity, ion

Foundation item: National Natural Science Foundation of China (No. 21276108)

*Corresponding author: E-mail: haiqinchen@jiangnan.edu.cn

Received: January 30, 2016; Accepted: May 23, 2016; Published online (www.cnki.net): June 06, 2016
基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 21276108)

*通讯作者: E-mail: haiqinchen@jiangnan.edu.cn

收稿日期: 2016-01-30; 接受日期: 2016-05-23; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2016-06-06

exchange and gel filtration. The activity of purified cytochrome b_5 reductase I was determined using DCIP as substrate in the presence of NADH or NADPH. The interaction between purified cytochrome b_5 reductase I and cytochrome b_5 was monitored by wavelength scan. **[Results]** The truncated *M. alpina* cytochrome b_5 reductase I was successfully expressed as a soluble protein and purified to homogeneity. The resulting protein was active and able to reduce cytochrome b_5 in the presence of NADH. The reduction of cytochrome b_5 is characterized by a peak shift from 411 nm to 422 nm and an increase in absorbance at 521 nm and 554 nm. **[Conclusion]** The deletion of the N-terminal transmembrane region increased the solubility of *M. alpina* cytochrome b_5 reductase I and the activity was maintained. Functional characterization revealed that *M. alpina* cytochrome b_5 reductase I gene encoded a NADH-cytochrome b_5 reductase, and it's able to interact with human cytochrome b_5 *in vitro*.

Keywords: Cytochrome b_5 reductase, Cytochrome b_5 , *Mortierella alpina*, Fatty acid desaturation

细胞色素 b_5 还原酶是内质网上一种以黄素腺嘌呤二核苷酸(FAD)为辅酶的黄素蛋白,它在脂肪酸脱饱和反应电子传递链中将电子从 NADH 传递到细胞色素 b_5 (图 1)。在 20 世纪 70 年代, Strittmatter 等分离纯化了哺乳动物体内的细胞色素 b_5 还原酶,在体外构建了脂肪酸脱饱和反应的电子传递链^[1-3]。在植物拟南芥体内,细胞色素 b_5 还原酶不仅参与到油酸和亚油酸的脱饱和反应中,也在花粉的形成和种子的成熟中起到重要作用^[4]。而酵母中的细胞色素 b_5 还原酶则被发现可以在固醇类物质的合成中作为 P450 酶类的电子供体^[5-6]。

高山被孢霉(*Mortierella alpina*)是一种高产脂质的真菌,其既可以通过 ω_6 脂肪酸脱饱和途径生产花生四烯酸(ARA),又可以通过 ω_3 脂肪酸脱饱和途径生产二十碳五烯酸(EPA),是脂质生物化学基础研究的重要模式菌^[7-9]。目前,针对高山被孢霉中各种脂肪酸脱饱和酶的研究已经很广泛,但对于脂肪酸脱饱和反应机理的研究国际上鲜有报道^[10-12]。细胞色素 b_5 还原酶是脂肪酸脱饱和和电子传递链中第一个电子接受体,在脂肪酸脱饱和反应中起着重要作用。Sakuradani 等克隆和鉴定了高山被孢霉 1S-4 中的细胞色素 b_5 还原酶,但其与细胞色素 b_5 相互作用的机制尚不清楚^[13]。在本课题组已完成测序的高山被孢霉 ATCC 32222 基因组中发现存在 4 个潜在的细胞色素 b_5 还原酶编码基因(命名为细胞色素 b_5 还原酶 I-IV)^[14]。因此,本文选择高山被孢霉 ATCC 32222 中细胞色素 b_5 还原酶基

因 I 进行表达纯化和活性测定,并将表达纯化人源的细胞色素 b_5 与其进行相互作用。该菌株中细胞色素 b_5 还原酶的功能鉴定和细胞色素 b_5 的相互作用将为产油真菌高山被孢霉中脂肪酸脱饱和反应的机理研究奠定基础。

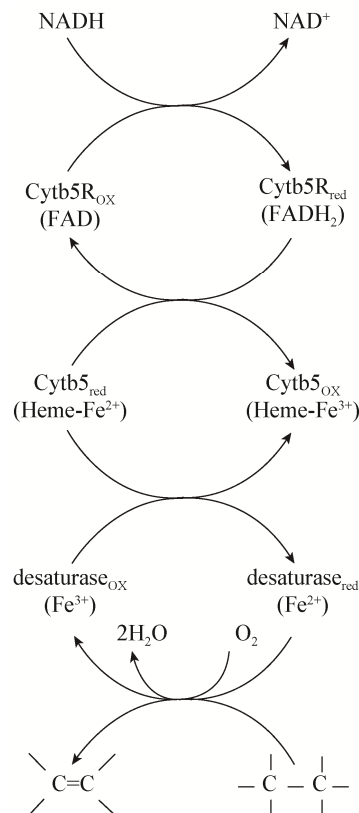


图 1 脂肪酸脱饱和反应电子传递链

Figure 1 Fatty acid desaturation electron transportation chain

1 材料与amp;方法

1.1 菌株和质粒、培养基

大肠杆菌(*Escherichia coli*) BL21(DE3)为实验室菌种库提供;高山被孢霉(*M. alpina* ATCC 32222)购于美国标准生物品收藏中心,由本实验室菌种库保藏,并已对其完成基因组测序^[14]。表达载体 pET-15b 购自 Novagen。LB 培养基(g/L):蛋白胨 10.0,酵母抽提物 5.0,NaCl 10.0,pH 7.5,琼脂粉 15.0(固体培养基)。需要时加入氨苄青霉素 10 mg/L。

1.2 主要试剂和仪器

钴离子亲和柱,阴、阳离子交换柱,链霉亲和素琼脂糖,分子排阻柱 HiLoad 16/60 Superdex 200, Vivaspin 浓缩管均购自 GE Healthcare 公司; SanPrep 柱式质粒 DNA 小量抽提试剂盒购自生工生物工程(上海)股份有限公司;2,6-二氯酚靛钠(DCIP)、还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NADH)、还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(NADPH)、黄素腺嘌呤二核苷酸(FAD)等其它试剂均购自 Sigma;细胞破碎仪 EmulsiFlex-C3 购自 Avestin 公司。

1.3 实验方法

1.3.1 表达载体的构建:高山被孢霉细胞色素 b_5 还原酶 I 和人可溶性细胞色素 b_5 基因均由 Genscript 公司合成,密码子优化后连接至表达载体 pET-15b,目的基因 N 端连有 6 个组氨酸作为纯化标签。

1.3.2 细胞色素 b_5 还原酶 I 和细胞色素 b_5 在大肠杆菌中的表达和纯化:表达质粒的转化和转化子的筛选均按照《分子克隆实验指南》进行。筛选的转化子接种于 50 mL (250 mL 摇瓶)含有氨苄青霉素的 LB 液体培养基中,37 °C、220 r/min 振荡培养 15 h,使用此种子液按 1%的接种量接种于 1 L (2.8 L 摇瓶)含有氨苄青霉素的 LB 液体培养基中继续培养。当 OD_{600} 到达 0.6–0.8 时,置于 4 °C 冷却,加入 1 mmol/L 异丙基硫代半乳糖苷(IPTG) 24 °C 诱导 4 h。收集的菌体于–80 °C 冻藏。菌体被

重悬于 150 mL 缓冲液(20 mmol/L pH 7.9 Hepes, 500 mmol/L KCl, 5 mmol/L 咪唑, 0.1% Triton X-100, 10%甘油, 蛋白酶抑制剂苯甲基磺酰氟(PMSF)和 Benzamidine 各 0.1 mmol/L, 1 mmol/L $MgCl_2$, 40 mg/L DNase I)。在重悬细胞色素 b_5 还原酶 I 细胞时加入 0.2 mmol/L FAD。重悬后的细胞用 EmulsiFlex-C3 细胞破碎仪破碎,破碎液上清结合于 10 mL 钴离子柱子,然后用 3 倍柱体积的无甘油缓冲液(20 mmol/L pH 7.9 Hepes, 500 mmol/L KCl, 5 mmol/L 咪唑, 0.1% Triton X-100)洗涤。目的蛋白用 5–500 mmol/L 浓度的咪唑梯度洗脱。洗脱后的样品放入 20 mmol/L pH 7.5 Tris 缓冲液过夜透析,其中细胞色素 b_5 还原酶 I 样品中加入 0.2 U/mg 的凝血酶,凝血酶利用链霉亲和素琼脂糖去除。随后,细胞色素 b_5 还原酶 I 样品、细胞色素 b_5 样品分别结合于阴、阳离子交换柱,用 0–1 mmol/L NaCl 洗脱。最后通过 20 mmol/L pH 7.5 Hepes, 100 mmol/L NaCl 预平衡的分子排阻柱子 HiLoad 16/60 Superdex 200 进一步纯化。对于细胞色素 b_5 ,在分子排阻前加入 3 倍分子量的氯化血红素。含有目的蛋白的流出组分用 Vivaspin 浓缩管进行浓缩。

1.3.3 细胞色素 b_5 还原酶 I 的活性测定:纯化的高山被孢霉细胞色素 b_5 还原酶 I 的活性测定在 100 mmol/L pH 7.5 的磷酸钾缓冲液 24 °C 下进行。反应体系体积为 800 μ L,其中含有 50 nmol/L 纯化后的蛋白质,40 μ mol/L DCIP, 1 mmol/L NADH。反应检测 DCIP 在 600 nm 处的吸光值变化。酶活单位(1 U)定义为每摩尔蛋白质每分钟消耗 DCIP 的摩尔量。

1.3.4 细胞色素 b_5 还原酶 I 与细胞色素 b_5 的相互作用:纯化的高山被孢霉细胞色素 b_5 还原酶 I 与纯化的细胞色素 b_5 的相互作用在 100 mmol/L Hepes pH 7.5、150 mmol/L NaCl 的缓冲液,室温下进行。200 mL 缓冲液中含有 0.25 μ mol/L 纯化的细胞色素 b_5 还原酶 I 和 5 μ mol/L 纯化的细胞色素 b_5 ,加入 5 μ mol/L NADH 开始反应。使用贝克曼 DU800 对

反应前和反应后的样品进行波长扫描。

2 结果与分析

2.1 膜结合细胞色素 b_5 还原酶 I 穿膜区域的确定

高山被孢霉中细胞色素 b_5 还原酶 I 全长 298 个氨基酸, 其在 N 端有一个穿膜区域, 属于膜结合类型蛋白质。Kurian 等将人源的细胞色素 b_5 还原酶成功在大肠杆菌中表达为可溶性蛋白质^[15]。为了避免膜蛋白质纯化中筛选去垢剂等步骤, 研究中可溶性表达方法同样被应用于膜蛋白质的表达。如图 2 所示, 将高山被孢霉 ATCC 32222 中细胞色素 b_5 还原酶 I 的氨基酸序列与人细胞色素 b_5 还原酶可溶性片段进行比对, 结果显示, 在目的蛋白质 N 端鉴定出长度为 42 个氨基酸的片段, 推测为该蛋白质穿膜区域。因此将从第 43 个氨基酸 Phe 开始对应的 DNA 序列克隆至含有 6×His 标签的 pET-15b 载体, 转入大肠杆菌 BL21(DE3) 中进行表达试验。

2.2 膜结合细胞色素 b_5 还原酶 I 在大肠杆菌中的可溶性表达和纯化

表达试验中, 通过分析转化子诱导后的细胞破碎液上清对蛋白质可溶性进行判断。如图 3 所

示, 结果表明, 与诱导前阴性对照相比, 诱导后样品在 30 kD 处有明显条带, 其大小与目的蛋白理论分子量接近, 判断为细胞色素 b_5 还原酶 I 可溶性片段。因此高山被孢霉 ATCC 32222 细胞色素 b_5 还原酶 I 被成功表达为可溶性蛋白质, 且挑取的 5 个转化子表达量无显著差异。

细胞色素 b_5 还原酶是一种以 FAD 为辅酶的黄素蛋白, 为了保证纯化后的蛋白质含有足够的辅酶, 在细胞破碎时加入两倍蛋白质摩尔量的 FAD。利用 His 标签将蛋白质结合于钴离子柱子进行亲和层析, 样品透析时通过加入凝血酶对 His 标签进行切除。根据目的蛋白理论 pI 值 8.90, 使用阳离子交换进一步纯化。最终将样品通过分子排阻色谱进一步提高蛋白质纯度和检验纯化产物均一性。纯化结果如图 4 所示, 分子排阻色谱将样品中 55–70 kD 的杂蛋白质去除, 由于目的蛋白分子量较小, 于杂蛋白质后流出, 被收集于第 B28–52 号组分收集管。目的蛋白纯度 >99%, 且产物均一。浓缩后产物浓度为 46.5 g/L, 蛋白质呈亮黄色, 表明纯化后蛋白质含有足量辅助因子 FAD。

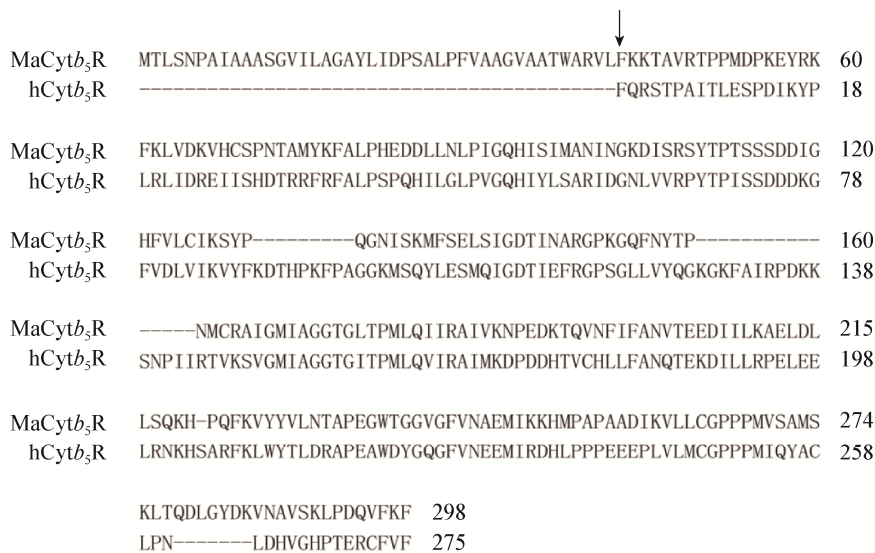


图 2 高山被孢霉 ATCC 32222 膜结合细胞色素 b_5 还原酶 I (MaCyt b_5 R) 与人可溶性细胞色素 b_5 还原酶 (hCyt b_5 R) 的氨基酸序列比对结果

Figure 2 Sequence alignment of *M. alpina* ATCC 32222 membrane-bound cytochrome b_5 reductase and human soluble cytochrome b_5 reductase

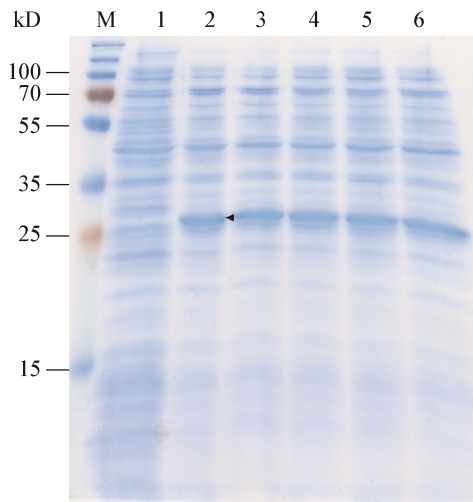


图3 细胞色素 b_5 还原酶 I 的 SDS-PAGE 分析
Figure 3 SDS-PAGE analysis of the cytochrome b_5 reductase I

注: M: Marker; 1: 诱导前的转化子 1; 2-6: 诱导后的转化子 1-5.

Note: M: Marker; 1: Transformant 1 before induction; 2-6: Transformant 1-5 after induction.

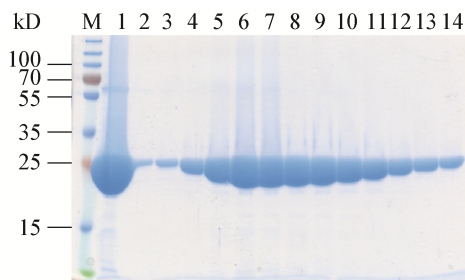


图4 细胞色素 b_5 还原酶 I 的分子排阻色谱组分 SDS-PAGE 分析

Figure 4 SDS-PAGE analysis of gel filtration fractions of the cytochrome b_5 reductase I

注: M: Marker; 1: 分子排阻色谱前样品; 2-14: 流出组分 B28-52.

Note: M: Marker; 1: Sample loaded; 2-14: Fractions B28-52.

2.3 细胞色素 b_5 还原酶 I 的活性测定

在 NADH 或 NADPH 存在条件下, 细胞色素 b_5 还原酶在体外可以还原底物 DCIP^[13,16]。为了研究高山被孢霉 ATCC 32222 细胞色素 b_5 还原酶 I 对 NADH 和 NADPH 的偏好性, 分别使用 NADH 和 NADPH 为还原力, 测定细胞色素 b_5 还原酶 I 的活性。测定结果如图 5 所示, NADH 为足量时, 细胞

色素 b_5 还原酶中的辅助因子 FAD 被还原为 FADH₂。当底物浓度为 40 $\mu\text{mol/L}$ 时, DCIP 被还原, 其在 600 nm 处的吸光值快速下降, 在 2 min 内降为 0。经计算, 其活性为 564.57 U。另一方面, 结果表明 N 端穿膜区域去除后, 蛋白质具有活性。

为了比较高山被孢霉 ATCC 32222 细胞色素 b_5 还原酶 I 在不同还原力条件下的活性, 在同样浓度的 NADPH 和底物 DCIP 条件下对细胞色素 b_5 还原酶 I 的活性进行测定。测定结果如图 6 所示, DCIP 在 2 min 内不能被完全还原, 且反应速率显著下降。经计算, NADPH 条件下的活性为 51.97 U, 反应速率为 NADH 条件下的十分之一, 该细胞色素 b_5 还原酶显示出了对还原力来源的偏好性。因此, 纯化后的高山被孢霉 ATCC 32222 细胞色素 b_5 还原酶 I 偏好 NADH 为电子供体。

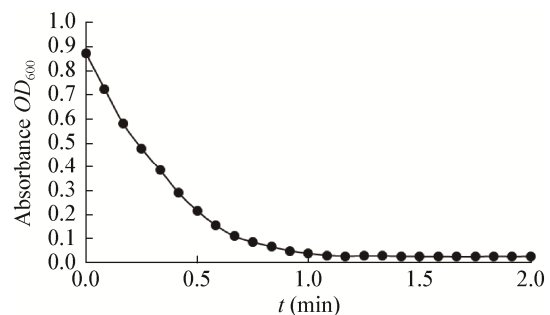


图5 细胞色素 b_5 还原酶 I 在 NADH 条件下的活性
Figure 5 Activity of the cytochrome b_5 reductase I using NADH as reductant

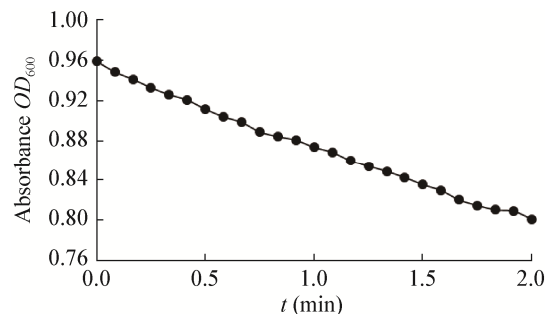


图6 细胞色素 b_5 还原酶 I 在 NADPH 条件下的活性
Figure 6 Activity of the cytochrome b_5 reductase I using NADPH as reductant

2.4 可溶性细胞色素 b_5 的表达和纯化

人来源的可溶性细胞色素 b_5 同样在大肠杆菌中表达和纯化, 用来考察纯化后的高山被孢霉 ATCC 32222 细胞色素 b_5 还原酶 I 的功能。该细胞色素 b_5 的 DNA 序列由 Novagen 公司合成并连接至 pET-15b 载体, 转入大肠杆菌 BL21(DE3) 中进行表达实验。表达结果如图 7 所示, 通过与诱导前阴性对照比较发现, 诱导后样品在 14 kD 处有明显条带, 其大小与目的蛋白质理论分子量接近, 因此细胞色素 b_5 被成功表达。

细胞色素 b_5 的纯化同样利用 His 标签与钴离子柱的亲合作用和离子交换进行纯化, 而与细胞色素 b_5 还原酶 I 相比, 此蛋白质有较低的理论 pI 值 5.81, 因此采用阴离子交换方法。流出组分最终通过分子排阻色谱进一步提高纯度和检验产物均一性。细胞色素 b_5 是一种以血红素为辅酶的血红素蛋白, 辅酶对纯化后蛋白质的活性至关重要, 因此在通过分子排阻色谱前加入氯化血红素孵育, 并通过分子排阻色谱将未结合的游离血红素分离。纯化结果如图 8 显示, 分子排阻色谱将 25–35 kD 的杂蛋白质分离, 由于目的蛋白质分子量较小, 于杂蛋白质后流出, 被收集于第 B57–82 号组分管。目的蛋白质纯度 >99%, 且产物均一。浓缩后产物浓度为 5.3 g/L, 蛋白质呈深红色, 表明细胞色素 b_5 含有足量辅酶。

2.5 细胞色素 b_5 还原酶 I 与细胞色素 b_5 的相互作用

纯化后细胞色素 b_5 的辅酶血红素卟啉环中含有正三价铁离子, 蛋白质处于氧化态。如图 9 波长扫描结果显示, 氧化态的细胞色素 b_5 在 412 nm 处有较强吸收。当加入 NADH 和细胞色素 b_5 还原酶 I 后, 还原态的细胞色素 b_5 还原酶 I 将电子传递给细胞色素 b_5 , 细胞色素 b_5 血红素中的三价铁离子被还原成二价, 蛋白质变成还原态。波长扫描显示血红素在 412 nm 的吸收峰偏移至 422 nm 处, 并且在 521 nm 和 554 nm 处吸收增加。这与文献报道的现象一致^[17-18], 因此该实验证实纯化的高山被孢霉 ATCC 32222 细胞色素 b_5 还原酶 I 在体外能与人细胞色素 b_5 相互作用。

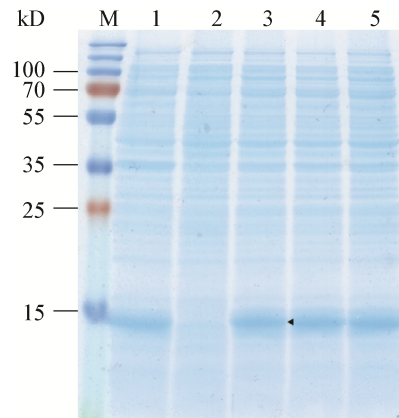


图 7 人细胞色素 b_5 的 SDS-PAGE 分析

Figure 7 SDS-PAGE analysis of human cytochrome b_5

注: M: Marker; 1: 转化子 1 全细胞样品; 2: 诱导前转化子 1; 3-5: 诱导后转化子 1-3.

Note: M: Marker; 1: Whole cell sample of transformant 1; 2: Transformant 1 before induction; 3-5: Transformant 1-3 after induction.

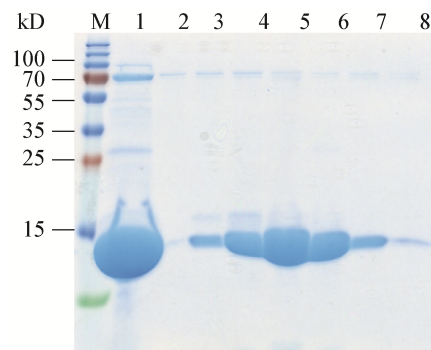


图 8 细胞色素 b_5 的分子排阻色谱组分 SDS-PAGE 分析

Figure 8 SDS-PAGE analysis of gel filtration fractions of the cytochrome b_5

注: M: Marker; 1: 分子排阻色谱前样品; 2-8: 流出组分 B57-82.

Note: M: Marker; 1: Sample loaded; 2-8: Fractions B57-82.

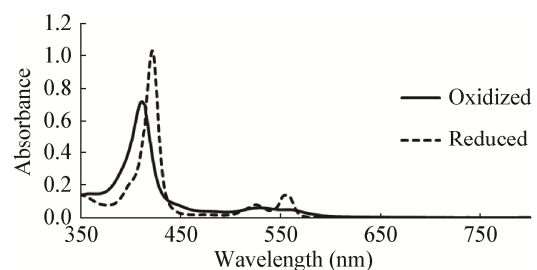


图 9 高山被孢霉 ATCC 32222 细胞色素 b_5 还原酶 I 与细胞色素 b_5 的相互作用

Figure 9 Interactions between *M. alpina* ATCC 32222 cytochrome b_5 reductase I and human cytochrome b_5

3 结论

经实验验证产脂真菌高山被孢霉 ATCC 32222 中的细胞色素 b_5 还原酶 I 基因编码的是一种 NADH-细胞色素 b_5 还原酶, 体外实验证实该细胞色素 b_5 还原酶能够与细胞色素 b_5 相互作用, 将其辅助因子血红素还原为亚铁血红素。高山被孢霉 ATCC 32222 中的细胞色素 b_5 还原酶 I 能够将电子传递给细胞色素 b_5 , 有能力为脂肪酸脱饱和反应提供还原力。这为产脂真菌高山被孢霉 ATCC 32222 中脂肪酸脱饱和反应的机理研究奠定了基础。

参考文献

- [1] Enoch HG, Catala A, Strittmatter P. Mechanism of rat liver microsomal stearyl-CoA desaturase[J]. The Journal of Biological Chemistry, 1976, 251(16): 5095-5103
- [2] Strittmatter P, Rogers MJ, Spatz L. The binding of cytochrome b_5 to liver microsomes[J]. The Journal of Biological Chemistry, 1972, 247(22): 7188-7194
- [3] Strittmatter P, Spatz L, Corcoran D, et al. Purification and properties of rat liver microsomal stearyl coenzyme A desaturase[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1974, 71(11): 4565-4569
- [4] Wayne LL, Wallis JG, Kumar R, et al. Cytochrome b_5 reductase encoded by CBR1 is essential for a functional male gametophyte in *Arabidopsis*[J]. The Plant Cell, 2013, 25(8): 3052-3066
- [5] Gutiérrez MS, Rojas MC, Sepúlveda D, et al. Molecular characterization and functional analysis of cytochrome b_5 reductase (CBR) encoding genes from the carotenogenic yeast *Xanthophyllomyces dendrorhous*[J]. PLoS One, 2015, 10(10): e0140424
- [6] Lamb DC, Kelly DE, Manning NJ, et al. Biodiversity of the P450 catalytic cycle: yeast cytochrome b_5 /NADH cytochrome b_5 reductase complex efficiently drives the entire sterol 14-demethylation (CYP51) reaction[J]. FEBS Letters, 1999, 462(3): 283-288
- [7] Shinmen Y, Shimizu S, Akimoto K, et al. Production of arachidonic acid by *Mortierella* fungi[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 1989, 31(1): 11-16
- [8] Shimizu S, Kawashima H, Shinmen Y, et al. Production of eicosapentaenoic acid by *Mortierella* fungi[J]. Journal of the American Oil Chemists' Society, 1988, 65(9): 1455-1459
- [9] Sakuradani E, Ando A, Shimizu S, et al. Metabolic engineering for the production of polyunsaturated fatty acids by oleaginous fungus *Mortierella alpina* 1S-4[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2013, 116(4): 417-422
- [10] Sakuradani E, Abe T, Iguchi K, et al. A novel fungal ω 3-desaturase with wide substrate specificity from arachidonic acid-producing *Mortierella alpina* 1S-4[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2005, 66(6): 648-654
- [11] Huang YS, Chaudhary S, Thurmond JM, et al. Cloning of Δ 12- and Δ 6-desaturases from *Mortierella alpina* and recombinant production of γ -linolenic acid in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Lipids, 1999, 34(7): 649-659
- [12] Wongwathanarat P, Michaelson LV, Carter AT, et al. Two fatty acid Δ 9-desaturase genes, *ole1* and *ole2*, from *Mortierella alpina* complement the yeast *ole1* mutation[J]. Microbiology, 1999, 145(10): 2939-2946
- [13] Sakuradani E, Kobayashi M, Shimizu S. Identification of an NADH-cytochrome b_5 reductase gene from an arachidonic acid-producing fungus, *Mortierella alpina* 1S-4, by sequencing of the encoding cDNA and heterologous expression in a fungus, *Aspergillus oryzae*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1999, 65(9): 3873-3879
- [14] Wang L, Chen W, Feng Y, et al. Genome characterization of the oleaginous fungus *Mortierella alpina*[J]. PLoS One, 2011, 6(12): e28319
- [15] Kurian JR, Bajad SU, Miller JK, et al. NADH cytochrome b_5 reductase and cytochrome b_5 catalyze the microsomal reduction of xenobiotic hydroxylamines and amidoximes in humans[J]. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 2004, 311(3): 1171-1178
- [16] Wang Y, Wu YS, Lan FH, et al. Expression and purification of wild and mutant type NADH cytochrome b_5 reductase in *E. coli*[J]. Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology, 2000, 16(4): 452-457 (in Chinese)
王瑶, 吴玉水, 兰风华, 等. NADH-细胞色素 b_5 还原酶在大肠杆菌中的表达及其产物的纯化[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2000, 16(4): 452-457
- [17] Holmans PL, Shet MS, Martin-Wixtrom CA, et al. The high-level expression in *Escherichia coli* of the membrane-bound form of human and rat cytochrome b_5 and studies on their mechanism of function[J]. Archives of Biochemistry and Biophysics, 1994, 312(2): 554-565
- [18] Mulrooney SB, Waskell L. High-level expression in *Escherichia coli* and purification of the membrane-bound form of cytochrome b_5 [J]. Protein Expression and Purification, 2000, 19(1): 173-178