

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
52 (11): 1369–1377; 4 November 2012
ISSN 0001–6209; CN 11–1995/Q
<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>

低温和外源不饱和脂肪酸对高山被孢霉脂肪酸脱氢酶基因表达的影响

于爱群¹, 石桐磊¹, 张飙², 邢来君¹, 李明春^{1*}

¹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

²天津中医药大学, 天津 300193

摘要: 【目的】在转录水平上研究低温和外源不饱和脂肪酸对于高山被孢霉脂肪酸脱氢酶基因的表达调控机制。【方法】通过实时定量 PCR 技术和启动子报告基因融合载体的方法, 研究低温和外源不饱和脂肪酸对于高山被孢霉 3 种脂肪酸脱氢酶基因表达随时间进程的影响。【结果】实时定量 PCR 的结果表明: 低温对于 3 种脂肪酸脱氢酶基因的转录具有激活作用, 外源不饱和脂肪酸对基因转录起抑制作用, 而且这两种作用都是快速响应的, 随时间延长逐渐减弱并消失。脂肪酸组成测定结果证明了基因转录水平变化与对应产物变化之间没有相关性。低温能够在短时间内诱导 pFAD6 启动子活性增加, 并随时间延长而持续增强; 外源不饱和脂肪酸对 pFAD6 启动子活性起抑制作用, 其不饱和度和浓度越高, 抑制作用越强, 而且抑制作用是快速且持续的。【结论】低温和外源不饱和脂肪酸除了在转录水平上调控高山被孢霉脂肪酸脱氢酶基因表达发生变化之外, 可能主要在转录后水平上介导了胞内脂肪酸组成的变化。而且, 脂肪酸脱氢酶基因的表达可能受到胞内脂肪酸组成变化的反馈调节作用。本文首次在转录水平上对高山被孢霉脂肪酸脱氢酶基因的表达调控机制进行了探索, 为深入了解脂肪酸脱氢酶基因表达及多不饱和脂肪酸合成对外界信号的应答机制提供了有用信息, 也对应用微生物发酵和转基因技术生产不饱和脂肪酸具有指导意义。

关键词: 低温, 不饱和脂肪酸, 脂肪酸脱氢酶, 实时定量 PCR, 启动子

中图分类号: Q786 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2012) 11-1369-09

不饱和脂肪酸 (Unsaturated fatty acids, UFAs), 尤其是多不饱和脂肪酸 (Polyunsaturated fatty acids, PUFAs) 是机体生物膜磷脂和血清甘油三酯等物质的主要组成成分, 也是前列腺素 (PGs)、白三烯 (LT) 和凝血恶烷 (TXB) 等生物活性物质合成的前体物质^[1]。从 20 世纪 80 年代以来, 许多学者利用不同种类的哺乳动物细胞作为研究对象, 结果发现大部分不饱和脂肪酸, 尤其是多不饱和脂肪酸都

具有多种重要的生物学功能。哺乳动物及人体膳食中一旦长期缺乏某些重要的多不饱和脂肪酸, 就容易导致多种疾病的产生, 例如癌症、炎症、肥胖症、糖尿病、神经疾病以及心脑血管疾病等, 膳食中补充适量的多不饱和脂肪酸, 就能够抑制或者减轻这些疾病的发生^[2]。

由于多不饱和脂肪酸在人体健康和营养方面的重要性, 现已成为食品、医药、化工和鱼类养殖等许

基金项目: 国家自然科学基金 (30771355, 31270096); 国家“863 计划” (2007AA10Z189)

* 通信作者。Tel: +86-22-23508506; E-mail: nklimingchun@yahoo.com.cn

作者简介: 于爱群 (1983 -), 男, 山东烟台人, 博士研究生, 研究方向为分子真菌学。E-mail: yuaiqun12345@126.com

收稿日期: 2012-06-15; **修回日期:** 2012-07-17

多领域的研究热点^[3]。因此,对于多不饱和脂肪酸合成途径中的关键酶-脂肪酸脱氢酶的研究就具有重要的理论和应用价值。到目前为止,对于脂肪酸脱氢酶的研究,主要集中在对脂肪酸脱氢酶基因表达和脂肪酸脱氢酶活性的研究上;对于脂肪酸脱氢酶的催化机理和表达调控机制的研究相对匮乏,主要原因是由于大多脂肪酸脱氢酶属于膜蛋白,现有技术又很难获取大量纯化的膜蛋白,因此对于膜结合型脂肪酸脱氢酶晶体结构的研究工作进展缓慢,可用的三维结构信息较少。鉴于上述原因,从转录水平探索脂肪酸脱氢酶基因的表达调控机制显得尤为重要。

随着人们对于多不饱和脂肪酸需求量的日益增加,再加上从动植物中提取油脂的传统方法存在许多缺点,因此急需为多不饱和脂肪酸的生产寻找新的更佳的可替代来源。利用产油真菌和微藻等微生物发酵法以及转基因方法生产某些有价值的多不饱和脂肪酸具有较好的生产潜力及应用前景^[4-5]。然而,要利用微生物发酵和转基因技术实现特异多不饱和脂肪酸的大量和优质生产,必须了解该微生物多不饱和脂肪酸合成的调控机制和信号通路、了解脂肪酸脱氢酶系统和其它蛋白之间的相互作用关系。这些问题的解答将有助于多不饱和脂肪酸的生产由过去完全靠经验的技术手段转变成将来可自行预测或者设计的合成方法。由此可见,这些课题具有很大的科学意义和应用价值,同时也是极具挑战的。

本研究选择产油丝状真菌高山被孢霉作为研究对象,在基因转录水平上综合分析和评价了不同条件对于其体内多不饱和脂肪酸生物合成途径中相关脂肪酸脱氢酶基因的表达调控机制,从而为推测及阐明丝状真菌多不饱和脂肪酸合成的调控机制鉴定基础,以求能对利用丝状真菌大规模地工业化生产多不饱和脂肪酸提供理论指导。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒:高山被孢霉 (*Mortierella alpina*) ATCC 16266 用于基因表达的研究,由本实验室保存;大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DH5 α 作为基因亚克隆的宿主菌,由本实验室保存;酿酒酵母

(*Saccharomyces cerevisiae*) INVSc1 为营养缺陷型菌株,购自美国 Invitrogen 公司。大肠杆菌和酿酒酵母穿梭质粒 pYEP-356 (含有 *lacZ* 报告基因、无启动子)由本实验室保存;TA 克隆载体 pMD19-T simple 购自大连宝生物工程有限公司。

1.1.2 培养基:① 发酵培养基 (1L):酵母提取物 (Yeast extract) 2 g, (NH₄)₂SO₄ 3 g, KH₂PO₄·3H₂O 2 g, MgSO₄·7H₂O 0.8 g, NaCl 0.3 g, 葡萄糖 (Glucose) 50 g, pH 6.0;② PDA 培养基、LB 培养基、YPD 培养基和 SC-ura 培养基均按常规配方配制。

1.1.3 主要试剂和仪器:TRNzol 总 RNA 提取试剂、RealMasterMix (SYBR Green) 均购自北京天根生化科技有限公司;无 RNA 酶的 dNTP、Oligo d(T) 18 Primer、DNase I、RNA 酶抑制剂和限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、LA PCR in vitro cloning kit 均购自大连宝生物工程有限公司;M-MLV 反转录酶购自美国 Promega 公司;NP-40 购自美国 Sigma 公司;核酸分子量标准和琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒均购自加拿大新产业公司;脂肪酸标准品购自美国 Cayman 公司;其余试剂均为进口生化纯或国产分析纯产品。iCycler iQ5 型实时定量荧光 PCR 仪 (美国 Bio-Rad 公司), 6890N 型气相色谱仪 (美国 Agilent 公司)。

1.2 总 RNA 提取及反转录反应

将高山被孢霉接种到 PDA 斜面培养基上,30℃ 培养 7 d。用无菌水冲洗培养基表面以获得孢子混合液,剧烈振荡 1 min,用 4 层擦镜纸过滤混合液以去除菌丝和培养基碎块,得到分生孢子悬浮液。将等量孢子悬液接种到装有 50 mL 发酵培养基的 250 mL 三角瓶中,30℃、200 r/min 培养 8 d (通过测定生长曲线的方法确定为对数生长期后期)。使用不同刺激 (低温和外源添加不饱和脂肪酸 + 1% NP-40) 处理菌体,分别在 1 h、4 h 和 8 h 后纱布过滤收集菌体。利用 TRNzol 试剂提取总 RNA (按试剂说明书进行),用紫外分光光度计测量 RNA 样品的 OD₂₆₀ 值和 OD₂₈₀ 值,以确定其纯度和浓度;对 RNA 样品进行凝胶电泳检测 (150 V, 10 min),以确定其完整性。再用无 RNA 酶的 DNase I 37℃ 处理总 RNA 30 min 以消化可能存在的基因组 DNA 污染。立即进行反转录反应 (按试剂说明书进行),获得第一链 cDNA。

1.3 实时定量 PCR

根据本室先前公布的克隆自高山被孢霉基因组

的 $\Delta 6$ -脂肪酸脱氢酶基因序列 (GenBank 登录号: AF465283), 在其中的一段内含子两端设计引物对 MA-YAN-F 和 MA-YAN-R, 以第一链 cDNA 为模板进行 PCR 扩增, 以确定 cDNA 中是否有基因组 DNA 污染。确定无污染后, 立即进行实时定量 PCR 反应, 扩增体系如下: $2.5 \times \text{RealMasterMix}/20 \times \text{SYBR solution } 9 \mu\text{L}$, 上游引物 ($2 \mu\text{mol/L}$) $1 \mu\text{L}$, 下游引物 ($2 \mu\text{mol/L}$) $1 \mu\text{L}$, cDNA 模板 $1 \mu\text{L}$ ($-\text{ng-pg}$), ddH_2O $8 \mu\text{L}$, 总体积 $20 \mu\text{L}$ 。扩增条件: 94°C 3 min ; 94°C 20 s , 58°C 20 s , 68°C 30 s , 40 个循环; 在 68°C 读取

荧光值。PCR 扩增结束后, 进入熔解曲线程序, 绘制扩增产物的熔解曲线。熔解曲线程序为: 以每秒 0.5°C 的速度从 58°C 升至 95°C 。其中, 实时定量 PCR 所用引物是参照下列序列设计的: 高山被孢霉 $\Delta 6$ -脂肪酸脱氢酶编码基因 (*Fad6*)、 $\Delta 12$ -脂肪酸脱氢酶编码基因 (*Fad12*), $\omega 3$ -脂肪酸脱氢酶编码基因 (*Fad3*) 的 GenBank 登录号分别为 AF465281、AF417244 和 HQ612176, 均是本室先前提交的序列; 管家基因 β -actin 的 GenBank 登录号为 AB490771。引物序列见表 1。

表 1 本研究中使用的引物
Table 1 Primers used in this study

Names	Sequences (5'→3')	Usage
MA-YAN-F	CTGAATGAGGGCAAGAAGG	Verification of the absence of genomic DNA contamination
MA-YAN-R	CCAGAAGAGACCCAAGAGC	Verification of the absence of genomic DNA contamination
Real-MAD6-F	GTCTCAGGCTGTTGCGGTAA	Real-time PCR for <i>Fad6</i>
Real-MAD6-R	GTGGTGCTCAATCTGCTAGTT	Real-time PCR for <i>Fad6</i>
Real-MAD12-F	GCCGTTCAAGAGGAGGAC	Real-time PCR for <i>Fad12</i>
Real-MAD12-R	TCAAAGATGGGCGAGTAAGT	Real-time PCR for <i>Fad12</i>
Real-MAW3-F	TACCTATCTTCAGCACACCGA	Real-time PCR for <i>Fad3</i>
Real-MAW3-R	CTTGTAACACTACATCTCCCTC	Real-time PCR for <i>Fad3</i>
Real-MAACT-F	AGGCTGTCCTGCCTTGTA	Real-time PCR for β -actin gene
Real-MAACT-R	GAGAGCGTAACCCCTCGTAG	Real-time PCR for β -actin gene
C1	GTACATATTGCTGTAGAACGCGTAATACGACTCA	Cassette primer for 1st LA-PCR
S1-6	ATAACACTTCCACGGGATGATCAG	Specific primer for 1st LA-PCR
C2	CGTTAGAACGCGTAATACGACTCACTATAGGGAGA	Cassette primer for 2nd LA-PCR
S2-6	TGTCGATGATCATCAAGAAAGGTGC	Specific primer for 2nd LA-PCR
MAD6P1130-F	<u>CGGGATCC</u> ACGCCTTCTTGCCCTTTG (<i>Bam</i> HI)	Cloing promoter region of <i>Fad6</i>
MAD6P1130-R	A <u>ACTGCAGACTGGGAGCAGCAGCCAT</u> (<i>Pst</i> I)	Cloing promoter region of <i>Fad6</i>
lacZ-F276	TTACGATGCGCCCATCTACA	Verification of <i>S. cerevisiae</i> clones
lacZ-R635	AACGAGACGTCACGAAAAT	Verification of <i>S. cerevisiae</i> clones

Restriction sites used for cloning purposes are shown by underlining and italics.

1.4 基因相对表达量的数据分析

以 β -actin 基因作为内参, 每个样本 4 个平行, 并进行 3 次重复实验。用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法进行相对定量分析, 比较基因的 mRNA 相对表达量; 其中, $\Delta Ct =$ 目的基因 Ct - 内参基因 Ct, $\Delta\Delta Ct =$ 样本 ΔCt - 对照 ΔCt 。

1.5 总脂肪酸的提取及分析

1.5.1 总脂肪酸的提取及甲酯化: 在对应时间点上收集菌体, 无菌水洗涤两次, 在湿菌体中加入 2 mL 浓 HCl 剧烈振荡重悬菌体; 将湿菌体转入具塞试管中, 70°C 消化 1 - 1.5 h, 直至菌体完全溶解; 加入 1.5 mL 10% 盐酸甲醇溶液, 剧烈振荡 1 min; 62°C 酯化 3 h, 冷却后加入 3 mL 正己烷, 剧烈振荡 1 min;

4°C 、 $5000 \times g$ 离心 5 min; 将上清转移至新的具塞试管中, 氮气吹干; 用 50 μL 正己烷回溶, 立即用气相色谱仪对脂肪酸甲酯进行分析。

1.5.2 气相色谱 (GC) 分析: Agilent 6890N 型气相色谱仪配以 FID 检测器和 HP-INNOWAX 聚乙二醇 (PEG) 毛细管色谱柱 ($25 \text{ m} \times 0.53 \text{ mm} \times 0.20 \mu\text{m}$)。柱温升温程序: 从 160°C 升温至 210°C ($10^\circ\text{C}/\text{min}$), 再从 210°C 升温至 240°C ($2^\circ\text{C}/\text{min}$), 并在 240°C 保持 20 min; 高纯氮作为载气, 柱前压为 47.1 kPa; FID 检测器的氢气和空气流量分别为 48 mL/min 和 400 mL/min; 进样口和检测器温度均为 280°C ; 进样量为 5 μL ; 分流比为 4:1; 对照脂肪酸甲酯标准品的保留时间, 对不同脂肪酸进行定性; 采

用峰面积归一法计算各个脂肪酸的相对含量。

1.6 高山被孢霉脂肪酸脱氢酶基因 5' 端上游区域的扩增

采用玻璃珠法提取高山被孢霉的基因组 DNA, 用 *EcoRI* 对基因组进行充分酶切, 反应结束后, 乙醇沉淀回收酶切产物; 再使用 LA PCR in vitro cloning kit 中的 *EcoRI* cassette 和 Ligation solution 进行连接反应。以连接液为模板, 进行两轮 LA-PCR 反应 (按试剂说明书进行)。PCR 反应结束后, 将相应条带进行切胶回收, TA 克隆到 pMD19-T simple 载体上 (按试剂说明书进行), 挑取阳性克隆送交北京奥科鼎盛公司进行测序。

1.7 报告载体的构建及转化酿酒酵母

根据测序获得的 *Fad6* 基因 5' 端上游序列设计引物 MAD6P1130-F 和 MAD6P1130-R, 以基因组为模板进行 PCR, 扩增高山被孢霉 *Fad6* 基因的启动子片段 (1130 bp), 将其命名为 pFAD6。用 *Bam*HI 和 *Pst*I 分别对探针载体 pYEP356 和 pFAD6 进行双酶切, 回收纯化后, 用 T4 DNA 连接酶连接, 构建重组质粒 pYEP356-pFAD6。将 pYEP356-pFAD6 转化大肠杆菌 DH5 α , 碱裂解法提取质粒, 用 *Bam*HI 和 *Pst*I 进行双酶切验证。将验证正确的 pYEP356-pFAD6 质粒以及 pYEP356 质粒分别转化酿酒酵母 INVSc1 菌株, 在 SC-ura 平板上随机选取若干个转化子, 使用引物 lacZ-F276 和 lacZ-R635 进行菌落 PCR 验证。

1.8 启动子活性分析

采用通透法对酿酒酵母阳性转化子的 β -半乳糖苷酶活性进行测定, 具体步骤如下: 挑取单菌落至 5 mL 液体 Sc-ura 培养基中, 30 $^{\circ}$ C、200 r/min 培养过夜; 接种 100 μ L 过夜培养的菌液至 50 mL 新鲜的 Sc-ura 培养基中, 30 $^{\circ}$ C、200 r/min 培养至 $OD_{600} = 2.5$ 时, 使用不同刺激处理细胞 (同 1.2), 分别在 1 h、4 h、8 h 离心收集菌体, 无菌水洗涤两次, 加入 250 μ L Z 缓冲液 (1L: Na₂HPO₄·7H₂O 16.1 g、NaH₂PO₄·H₂O 5.5 g、KCl 0.75 g、MgSO₄·7H₂O 0.246 g、 β -巯基乙醇 2.7 mL, pH 7.0, 4 $^{\circ}$ C 保存) 充分悬浮细胞; 取 150 μ L 悬液转入新的离心管中, 加入 50 μ L 氯仿和 20 μ L 0.1% SDS, 剧烈振荡 1 min; 37 $^{\circ}$ C 预保温 10 min 后, 加入 700 μ L ONPG 母液 (Z 缓冲液配制, 1 mg/mL), 置于 37 $^{\circ}$ C 水浴中开始反应, 当样品变成淡黄色时, 立即加入 500 μ L 1 mol/L Na₂CO₃ 母液终

止反应, 记录反应时间 T; 25000 \times g 离心 10 min, 测定上清反应液的 OD_{420} 值; 取上步中的 Z 缓冲液细胞悬液 50 μ L, 加入无菌水稀释至 1 mL, 测定 OD_{600} 值; 用以下公式计算 β -半乳糖苷酶的活性: $[OD_{420} \text{ 值} \times 1000] / [OD_{600} \text{ 值} \times T(\text{min}) \times 3 \text{ (稀释倍数)}]$ 。

2 结果和分析

2.1 低温和外源脂肪酸对脂肪酸脱氢酶基因表达的影响

经检测后, 所提取的 RNA 质量好且无基因组污染。实时定量 PCR 反应的结果显示, 同一样本 4 个平行的 Ct 值重现性好, 结果稳定; 扩增曲线均呈现为典型的 S 型, 符合理想扩增曲线的标准; 溶解曲线均为单一峰型, 说明 PCR 扩增特异性强, 没有非特异性扩增和引物二聚体的形成, 能够保证定量结果的可靠性。

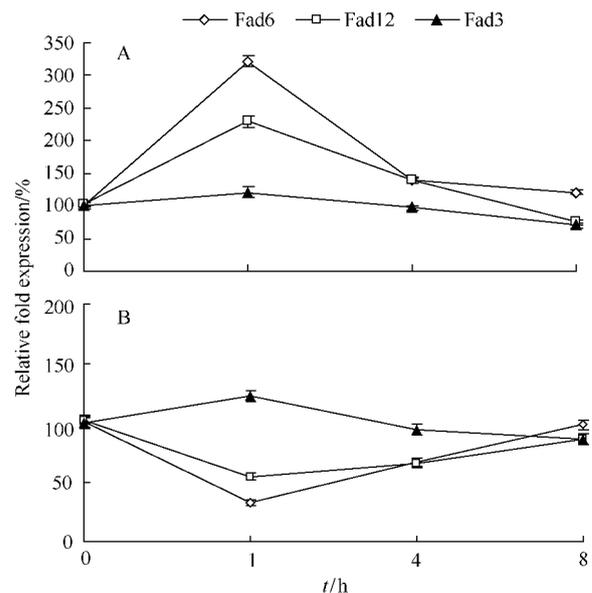


图 1 低温和外源添加油酸对高山被孢霉脂肪酸脱氢酶基因表达随时间进程的影响

Fig. 1 Time-course expression study of *M. alpina* desaturase genes in response to low temperature and exogenous OA. The graphs show the relative quantitation results of three desaturase gene expression (A: *Fad6* gene, *Fad12* gene and *Fad3* gene in response to low temperature; B: *Fad6* gene, *Fad12* gene and *Fad3* gene in response to exogenous OA) by real-time PCR. Relative gene expression measured relative to β -actin and normalized to controls was calculated as $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Error bars represent the average standard deviation of three separate experiments with four parallels.

相对定量的数据证明: 对数生长后期的高山被孢霉当培养温度从 30℃ 降至 15℃, 1 h 时 *Fad6* 基因和 *Fad12* 基因的 mRNA 表达量比初始值分别提高了约 3.2 和 2.3 倍, 4 h 时都降至初始值的约 1.4 倍, 8 h 时分别降至初始值的约 1.2 和 0.8 倍; 而低温处理细胞 1 h、4 h 和 8 h 后, *Fad3* 基因的 mRNA 表达量分别是初始表达量的约 1.2 倍、0.97 倍和 0.7 倍; 而在培养基中添加 1 mmol/L 的 OA 处理细胞 1 h、4 h 和 8 h 后, *Fad6* 基因的 mRNA 表达量分别是初始表达量的约 0.3 倍、0.7 倍和 0.98 倍; *Fad12* 基因的 mRNA 表达量分别是初始表达量的约 0.55 倍、0.66 倍和 0.86 倍; *Fad3* 基因的 mRNA 表达量分别是初始表达量的约 1.2 倍、0.94 倍和 0.86 倍 (图 1)。以 30℃ 正常生长的高山被孢霉中相应的脂肪脱氢酶基因的表达值作为对照, 结果发现, 在

1-8 h 内, 这几种基因的表达量随着时间的变化基本未发生变化。

2.2 对应时间点脂肪酸组成的变化

利用 GC 法测定了低温和外源添加 OA 处理后对应时间点上高山被孢霉细胞内脂肪酸组成的变化。结果发现: 在低温刺激 1-8 h 内, 脂肪酸组成的变化没有明显的规律, 而总脂肪酸的不饱和度表现为持续增加; 在培养基中添加单不饱和脂肪酸 OA 1-4 h 内, 随着时间的增加, OA 在总脂肪酸中的相对比例表现为持续增加, 但在 8 h 时 OA 的相对含量出现了下降; 而 DGLA 和 AA 这两种多不饱和脂肪酸的相对含量随着时间的变化表现为持续下降 (甚至在检测水平之下)。而 GLA 和 EPA 在添加 OA 1 h 后相对含量出现降低, 而随着时间的增加, 这两者的相对含量又开始增加 (但仍低于初始值) (表 2)。

表 2 低温和外源添加 OA 对高山被孢霉脂肪酸组成的影响

Table 2 Effect of low temperature and exogenous OA on relative fatty acid composition in *M. alpina*

Treatment	16:0 PA	16:1 n-7	18:0 SA	18:1 n-9 OA	18:2 n-6 LA	18:3 n-6 GLA	18:3 n-3 ALA	20:3 n-6 DGLA	20:4 n-6 AA	20:5 n-3 EPA	others	Δ
15℃ 0 h	15.89 ± 0.35	1.33 ± 0.02	5.23 ± 0.08	38.7 ± 0.54	4.98 ± 0.06	4.13 ± 0.06	1.02 ± 0.02	2.16 ± 0.03	11.52 ± 0.18	6.84 ± 0.08	8.2 ± 0.34	1.56 ± 0.04
15℃ 1 h	15.63 ± 0.31	1.47 ± 0.02	5.67 ± 0.07	32.5 ± 0.49	4.83 ± 0.05	4.14 ± 0.07	1.01 ± 0.01	2.43 ± 0.03	12.12 ± 0.21	11.73 ± 0.19	8.4 ± 0.43	1.77 ± 0.05
15℃ 4 h	13.84 ± 0.32	1.49 ± 0.03	5.02 ± 0.06	37.6 ± 0.55	4.29 ± 0.07	3.83 ± 0.06	0.72 ± 0.01	2.53 ± 0.04	11.95 ± 0.24	11.4 ± 0.29	7.28 ± 0.18	1.76 ± 0.02
15℃ 8 h	12.89 ± 0.29	1.25 ± 0.02	4.35 ± 0.05	35.3 ± 0.49	4.94 ± 0.06	4.7 ± 0.09	1.12 ± 0.02	2.56 ± 0.06	12.03 ± 0.37	11.97 ± 0.32	8.85 ± 0.26	1.84 ± 0.03
OA 0 h	15.89 ± 0.46	1.33 ± 0.02	5.23 ± 0.06	38.7 ± 0.53	4.98 ± 0.07	4.13 ± 0.11	1.02 ± 0.01	2.16 ± 0.03	11.52 ± 0.31	6.84 ± 0.18	8.2 ± 0.21	1.56 ± 0.02
OA 1 h	18.58 ± 0.62	0.16 ± 0.01	1.48 ± 0.03	54.8 ± 0.7	14.5 ± 0.37	0.85 ± 0.02	0.16 ± 0.01	0.28 ± 0.01	ND	2.75 ± 0.04	6.4 ± 0.19	1.06 ± 0.02
OA 4 h	18.45 ± 0.68	0.16 ± 0.01	1.07 ± 0.02	54.07 ± 0.74	15.67 ± 0.29	0.83 ± 0.03	0.51 ± 0.01	ND	ND	3.71 ± 0.03	5.5 ± 0.07	1.30 ± 0.03
OA 8 h	20.38 ± 0.45	0.13 ± 0.01	1.03 ± 0.02	40.27 ± 0.59	20.39 ± 0.43	3.71 ± 0.04	1.13 ± 0.02	ND	ND	5.36 ± 0.04	7.6 ± 0.18	1.06 ± 0.02

All values are mean of three replicates ± standard deviation, Δ represents degree of unsaturation in lipids (Δ/mol), ND represents under the detection level.

2.3 高山被孢霉 *Fad6* 基因 5' 端上游区域的扩增

经两轮巢式 PCR 扩增得到了单一且特异性条带。测序结果证明序列长度为 3130 bp, 经 Blast 比对证明该序列就是高山被孢霉 *Fad6* 基因的 5' 端上游序列, 并将这一序列提交至 GenBank 数据库中, 登录号为 HQ589840。将所获序列的 1130 bp 部分在酿酒酵母启动子数据库中 (SCPD, <http://rulai.cshl.edu/>) 进行预测分析, 结果显示该序列中含有 TATA box、CAAT box、GC box 等典型的真核生物顺式作用元件。此外, 还含有可能参与脂肪酸代谢的一些重要转录因子的结合元件: 如 AP-1、SP-1、STRE、GCN4、NF- κ B、LORE 及 SREBP 位点等, 研究证明这些转录元件可能在酿酒酵母脂肪脱氢酶基因 (*OLE1*) 的表达调控过程中起到了重要的作用, 但它们参与转录调控的具体机制尚不明确^[6]。

2.4 重组表达载体 pYEP356-pFAD6 的构建及转化

从高山被孢霉基因组中扩增 *Fad6* 基因 5' 端上游 1130 bp 的启动子片段 pFAD6, 再将 pFAD6 克隆到 pYEP356 载体的 *Bam*HI 和 *Pst*I 位点间, 构建重组质粒 pYEP356-pFAD6 (图 2), 双酶切鉴定结果证明了 pYEP356-pFAD6 构建成功。将 pYEP356-pFAD6 和对照 pYEP356 分别转化酿酒酵母 INVSc1, 在缺乏尿嘧啶的 SC-ura 平板上筛选转化子, 随机挑取 5 个转化子进行菌落 PCR 验证, 结果均产生了 0.3 kb 的目的条带, 阳性率为 100% (图 3)。

2.5 低温和外源脂肪酸对启动子活性的影响

分别将含有 pYEP356 和 pYEP356-pFAD6 质粒的转化株接种到液体 SC-ura 培养基中进行培养, 当培养至对数生长后期 ($OD_{600} = 2.5$) 时, 立即转入低

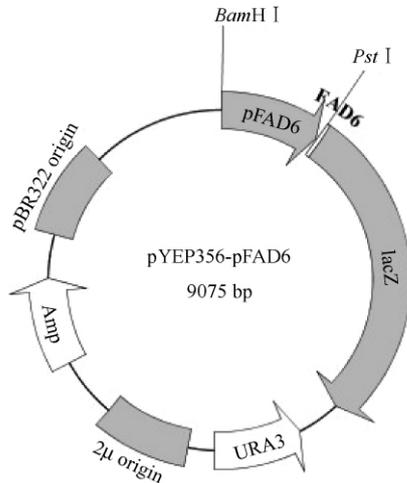


图2 报告载体 pYEP356-pFAD6 的结构示意图

Fig. 2 Structure of reporter vector pYEP356-pFAD6.

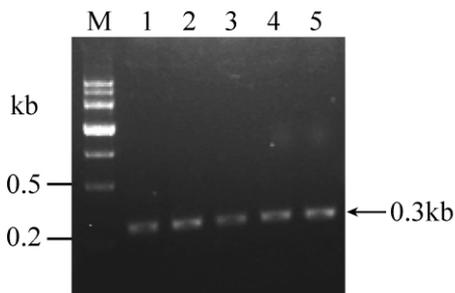


图3 酿酒酵母阳性克隆子的菌落 PCR

Fig. 3 Colony PCR of *S. cerevisiae* positive clones transformed with pYEP356-pFAD6. M: NI DNA marker III, 1 - 5: PCR products of transformants 1, 2, 3, 4, 5.

温条件(15℃)进行培养,或者分别在培养基中添加不同浓度的PA、SA、OA、LA和ALA和1% NP-40的条件下进行培养,在1、4、8 h时收集菌体,测定各转化株的 β -半乳糖苷酶活性。结果证明,含有对照质粒 pYEP356 的转化株基本检测不到 β -半乳糖苷酶活性;而含有报告载体 pYEP356-pFAD6 的转化株中,能够检测到 β -半乳糖苷酶活性。在低温刺激1 h后,pFAD6 的 lacZ 活性增加了约 1.5 倍;4 h后增加了约 2 倍;而8 h后增加了约 4 倍(图4)。外源添加的饱和脂肪酸(PA和SA)对 lacZ 的表达水平基本没有影响;添加不饱和脂肪酸(1 mmol/L OA、LA、ALA)1 h后,pFAD6 启动子的 lacZ 活性分别下降到了大约 44%、35% 和 27%,而且随着作用浓度的增加和作用时间的延长,lacZ 活性进一步下降(图5)。以 30℃ 正常生长的 pYEP356-pFAD6 转化株作为对照,在1-8 h内,pFAD6 启动子活性基本未发生变

化。

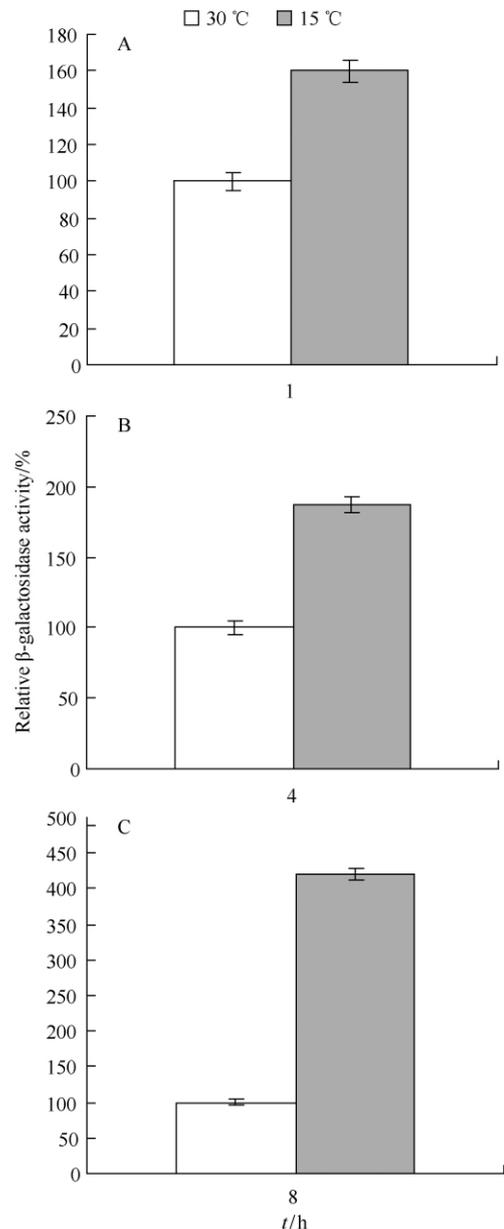


图4 低温条件下 pFAD6 启动子的活性分析

Fig. 4 Analysis of pFAD6 promoter activity under low temperature by β -galactosidase assays. The results were obtained after 1 h (A), 4 h (B), 8 h (C) incubation. All values are mean of three replicates \pm standard deviation.

3 讨论

高山被孢霉是工业化生产二高- γ -亚麻酸(DGLA)、花生四烯酸(AA)和二十碳五烯酸(EPA)的主要菌株。研究发现,高山被孢霉 ATCC 16266

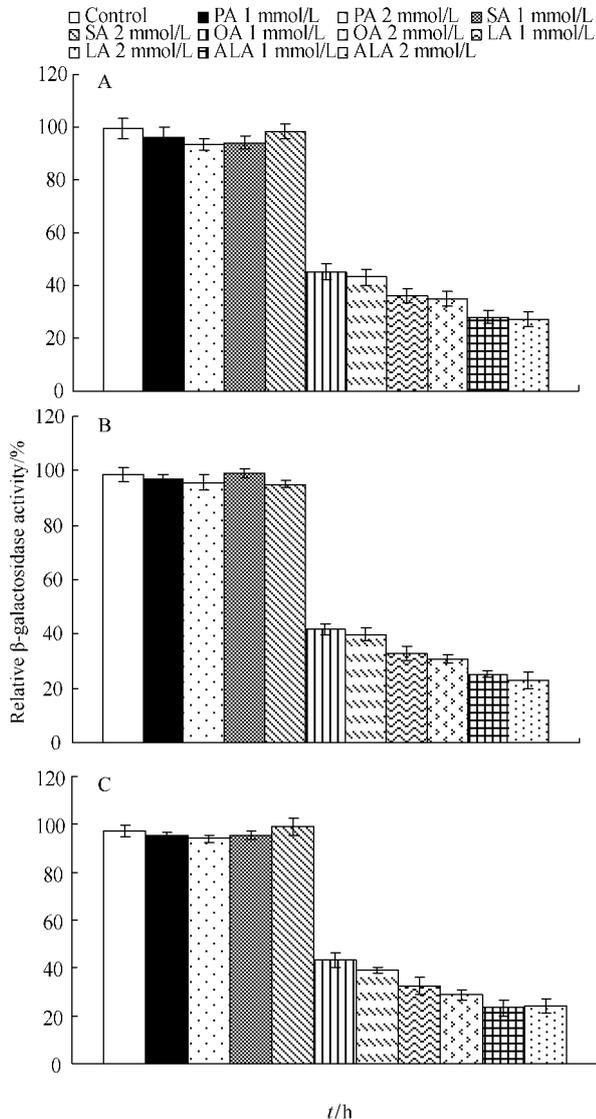


图5 外源脂肪酸对 pFAD6 启动子活性的影响

Fig. 5 Effects of exogenous fatty acids on pFAD6 promoter activity by β -galactosidase assays. The results were obtained after 1 h (A), 4 h (B), 8 h (C) incubation. All values are mean of three replicates \pm standard deviation.

菌株中 AA 的相对含量可达到总脂肪酸的 20% 以上, 说明该菌株为 AA 生产优良的出发菌株, 具有极大的应用潜力。

本研究室先前已经通过 RT-PCR 结合 RACE 技术, 从高山被孢霉 ATCC 16266 菌株中克隆得到了 $\Delta 6$ - $\Delta 12$ -和 $\omega 3$ -脂肪酸脱氢酶基因, 并将序列提交了 GenBank。这些脂肪酸脱氢酶基因分别在酿酒酵母中实现了异源表达, 各自的功能也得到了验证。本文选择高山被孢霉体内这 3 种重要的脂肪酸脱氢酶基因作为研究对象, 并对其受不同外界刺激的表

达调控进行了初步探索。

先前的研究证明了低温和外源不饱和脂肪酸这两个条件能够在转录水平上调节枯草芽胞杆菌 (*Bacillus subtilis*)^[7-8]、酿酒酵母 (*S. cerevisiae*)^[9-10] 和鲁氏毛霉 (*Mucor rouxii*)^[11-12] 脂肪酸脱氢酶基因的表达。所以, 我们首先选择这两种条件作为研究对象。实时定量 PCR 的结果说明, 低温对于 3 种脂肪酸脱氢酶基因的转录具有激活作用, 外源不饱和脂肪酸对于 3 种脂肪酸脱氢酶基因的转录具有抑制作用, 而且这种激活作用和抑制作用都是快速响应的, 并且随着时间的延长逐渐减弱和消失。值得注意的是, $\Delta 6$ -脂肪酸脱氢酶基因对于低温和外源不饱和脂肪酸刺激的反应似乎更敏感, 两者的激活和抑制作用更为明显。这可能是由于 $\Delta 6$ -脂肪酸脱氢酶基因是整个多不饱和脂肪酸合成途径中关键的限速酶, 所以对其进行的调控更为重要。通过比较脂肪酸组成的变化情况, 结果证明了脂肪酸脱氢酶基因转录水平的变化与对应脂肪酸产物的变化之间没有相关性, 说明低温和外源不饱和脂肪酸这两种条件除了在转录水平上调控基因表达发生变化之外, 可能主要是在转录后水平上介导了胞内脂肪酸组成的变化。本文的结果及结论也与先前的研究结果是相似的、基本一致的^[9-12]。

酿酒酵母是一种优良的真核模式生物, 遗传背景清楚、易于遗传操作。所以, 我们选用酿酒酵母细胞作为初步分析高山被孢霉脂肪酸脱氢酶基因启动子活性的表达宿主, 实验证明这是一种较为理想的方法。由于我们通过 LA-PCR 的方法克隆只得到了 $\Delta 12$ -和 $\omega 3$ -脂肪酸脱氢酶基因 5' 端较短片段 (<0.3 kb), 所以首先选择 $\Delta 6$ -脂肪酸脱氢酶基因启动子区域作为研究对象。通过构建 $\Delta 6$ -脂肪酸脱氢酶基因启动子与报告基因的融合载体, 然后导入宿主细胞测定 β -半乳糖苷酶活性的方法, 也证实了低温条件能够增加 pFAD6 启动子的活性, 而且在短时间内就能够表现出激活作用, 并随着时间的延长而持续增强; 外源不饱和脂肪酸能够抑制 pFAD6 启动子的活性, 脂肪酸的不饱和度和浓度越高, 抑制作用越强, 而且这种抑制作用也是快速响应的, 随着时间的延长而持续增强。这与 *Fad6* 基因在转录水平上基因表达量的变化情况不完全相同, 说明高山被孢霉脂肪酸脱氢酶基因的表达可能受到细胞内脂肪酸组成变化的反馈调节作用。

本文中,我们研究了不同刺激对于多不饱和脂肪酸合成和脂肪酸脱氢酶基因表达的影响,期待寻找脂肪酸脱氢酶基因表达的转录物和多不饱和脂肪酸终产物之间的分子关系。实验结果表明,高山被孢霉在面对外界刺激时,能够自我调整脂肪酸组成产生变化,并在一定程度上维持不饱和脂肪酸含量的相对平衡。而基因转录水平的差异并不能有效地反映脂肪酸产物的变化,所以,在高山被孢霉中,很有可能是通过转录后水平上的调节机制调控了多不饱和脂肪酸的合成量。而基因转录水平上的变化可能是由于末端产物对脂肪酸脱氢酶基因的反馈调控而实现的。而且,同一生物体中不同脂肪酸脱氢酶对于环境变化的应答可能存在不同的应答机制。目前,主要的技术障碍是缺少有效的方法对膜结合型脂肪酸脱氢酶的数量以及活性进行准确定量。我们的实验结果为进一步研究不同条件刺激对于高山被孢霉脂肪酸脱氢酶基因的表达调控机制提供了一些基本信息和方向。随着高山被孢霉全基因组测序工作的完成^[13],对其体内脂肪酸代谢和调控机制(明确哪些调控蛋白参与了脂肪酸脱氢酶基因表达的调控过程)等相关工作可以进一步开展。

参考文献

- [1] Jones R, Adel-Alvarez LA, Alvarez OR, Broaddus R, Das S. Arachidonic acid and colorectal carcinogenesis. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 2003, 253 (1): 141-149.
- [2] Zamaria N. Alteration of polyunsaturated fatty acid status and metabolism in health and disease. *Reproduction Nutrition Development*, 2004, 44 (3): 273-282.
- [3] Gill I, Valivety R. Polyunsaturated fatty acids, part 1: occurrence, biological activities and applications. *Trends in Biotechnology*, 1997, 15 (10): 401-409.
- [4] Yazawa H, Iwahashi H, Kamisaka Y, Kimura K, Uemura H. Improvement of polyunsaturated fatty acids synthesis by the coexpression of CYB5 with desaturase genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied microbiology and biotechnology*, 2010, 87 (6): 2185-2193.
- [5] Kang DH, Anbu P, Kim WH, Hur BK. Coexpression of Elo-like enzyme and $\Delta 5$, $\Delta 4$ -desaturases derived from *Thraustochytrium aureum* ATCC 34304 and the production of DHA and DPA in *Pichia pastoris*. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 2008, 13 (4): 483-490.
- [6] Vasconcelles M, Jiang Y, McDauid K, Gilooly L, Wretzel S, Porter D, Martin C, Goldberg M. Identification and characterization of a low oxygen response element involved in the hypoxic induction of a family of *Saccharomyces cerevisiae* genes. *Journal of Biological Chemistry*, 2001, 276 (17): 14374-14384.
- [7] Aguilar PS, Hernandez-Arriaga AM, Cybulski LE, Erazo AC, De Mendoza D. Molecular basis of thermosensing: a two-component signal transduction thermometer in *Bacillus subtilis*. *The EMBO Journal*, 2001, 20 (7): 1681-1691.
- [8] Kaan T, Homuth G, Mäder U, Bandow J, Schweder T. Genome-wide transcriptional profiling of the *Bacillus subtilis* cold-shock response. *Microbiology*, 2002, 148 (11): 3441-3455.
- [9] Nakagawa Y, Sakumoto N, Kaneko Y, Harashima S. Mga2p is a putative sensor for low temperature and oxygen to induce *OLE1* transcription in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2002, 291 (3): 707-713.
- [10] McDonough V, Stuke J, Martin C. Specificity of unsaturated fatty acid-regulated expression of the *Saccharomyces cerevisiae* *OLE1* gene. *Journal of Biological Chemistry*, 1992, 267 (9): 5931-5936.
- [11] Khoomrung S, Laoteng K, Jitsue S, Cheevadhanarak S. Significance of fatty acid supplementation on profiles of cell growth, fatty acid, and gene expression of three desaturases in *Mucor rouxii*. *Applied microbiology and biotechnology*, 2008, 80 (3): 499-506.
- [12] Cheawchanlertfa P, Cheevadhanarak S, Tanticharoen M, Maresca B, Laoteng K. Up-regulated expression of desaturase genes of *Mucor rouxii* in response to low temperature associates with pre-existing cellular fatty acid constituents. *Molecular Biology Reports*, 2011, 38 (5): 3455-3462.
- [13] Wang L, Chen W, Feng Y, Ren Y, Gu Z, Chen H, Wang H, Thomas MJ, Zhang B, Berquin IM. Genome characterization of the oleaginous fungus *Mortierella alpina*, 2011, *Plos One*, 6 (12): e28319.

Effects of low temperature and exogenous unsaturated fatty acids on fatty acid desaturase gene expression of *Mortierella alpina* ATCC 16266

Aiqun Yu¹, Tonglei Shi¹, Biao Zhang², Laijun Xing¹, Mingchun Li^{1*}

¹Key Laboratory of Molecular Microbiology and Technology, Ministry of Education, Department of Microbiology, Nankai University, Tianjin 300071, China

²Tianjin Traditional Chinese Medical University, Tianjin 300193, China

Abstract: [Objective] In order to investigate the regulatory mechanisms of *Mortierella alpina* desaturase genes by low temperature and exogenous unsaturated fatty acids (UFAs) at the transcriptional level. [Methods] We performed time-course studies of fatty acid desaturase gene expression by real-time PCR and determined fatty acid desaturase gene promoter activity using promoter-reporter constructs. [Results] Relative expression results in real-time PCR showed that the mRNA levels of three fatty acid desaturase genes (*Fad6*, *Fad12* and *Fad3*) were rapidly and transiently enhanced after 1 h of shifting to low temperature, in contrast, high concentration of exogenous oleic acid (OA) which was a monounsaturated fatty acid containing a D9 double bond suppressed the transcription of these genes and the transcriptional response appeared to be rapid and transient. Also, there was no absolute correlation between mRNA abundance and production of corresponding fatty acids. The pFAD6 promoter activity was induced by low temperature in a time-dependent manner and reduced in a dose- and time-dependent manner by addition of UFAs to the media, and α -linolenic acid (ALA) containing three double bonds appeared to have a more effective inhibition than linoleic acid (LA) and OA. [Conclusion] These results indicate that there may be post-transcriptional control and other modes of regulation of UFAs synthesis in *M. alpina* when facing different stimuli such as low temperature and exogenous unsaturated fatty acids besides the regulation in the transcription of fatty acid desaturase genes at the initial stage. Also, there may be an unknown end-product (changes in fatty acid compositions) feedback regulation in the transcription of fatty acid desaturase genes to maintain cellular UFAs' homeostasis. In a word, we assessed mechanisms of transcriptional regulation in *M. alpina* fatty acid desaturase gene expression for the first time and we wish to make it possible to obtain a better understanding of the mechanisms and get some theoretical knowledge to offer some guidance to the industrial production of UFAs by transgenic technology and microbial fermentation technology.

Keywords: low temperature, unsaturated fatty acids, fatty acid desaturase, real-time PCR, promoter

(本文责编:王晋芳)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30771355, 31270096) and by the National High Technology Research and Development Program of China (2007AA10Z189)

* Corresponding author. Tel: +86-22-23508506; E-mail: nklimingchun@yahoo.com.cn

Received: 15 June 2012/Revised: 17 July 2012