

高山被孢霉 ATCC16266 Δ^6 -脂肪酸脱氢酶基因在酿酒酵母中的表达

刘 莉 李明春 胡国武 葛 军 张 丽 程志晖 邢来君*

(南开大学微生物系 天津 300071)

摘 要 Δ^6 -脂肪酸脱氢酶是形成 γ -亚麻酸的关键酶。从含有高山被孢霉 Δ^6 -脂肪酸脱氢酶基因的重组质粒 pT-MACL6 中 酶切出 1.4kb 的目的片段,亚克隆到大肠杆菌和酿酒酵母的穿梭表达载体 pYES2.0,在大肠杆菌中筛选到含有目的基因的重组质粒 pYMAD6,用醋酸锂方法转化到酿酒酵母的缺陷型菌株 INCS1 中,在 SC-Ura 合成培养基中,选择得到酿酒酵母工程株 YMAD6。在合适的培养基及培养条件下,加入外源底物亚油酸,经半乳糖诱导后,收集菌体。通过 GC-MS 对酵母工程株进行脂肪酸色谱分析,结果表明,产生了 31.6% 的 γ -亚麻酸。这是迄今为止,国内外 Δ^6 -脂肪酸脱氢酶基因在酿酒酵母中表达量最高的报道。

关键词 Δ^6 -脂肪酸脱氢酶基因 γ -亚麻酸 酿酒酵母 表达 高山被孢霉

中图分类号 Q789 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2001)02-0161-04

花生四烯酸 Arachidonic acid 20 :4(n-6) 和二十二碳六烯酸 Docosahexaenoic acid 22 :6(n-3) 等长链不饱和脂肪酸及其衍生物在大脑发育、视觉、过敏反应及心血管运动等一系列生理功能中发挥重要作用^[1,2]。 γ -亚麻酸 γ -linolenic acid (GLA, 18 :3) 是一种十八碳三烯全顺式不饱和脂肪酸,在碳链的第 6, 9, 12 位各有一个双键。在酯肪酸代谢过程中, γ -亚麻酸是产生上述不饱和脂肪酸的重要前体。它在体内水平是否正常,直接关系到 20 碳和 22 碳不饱和脂肪酸的合成,从而对机体的一系列生理功能产生影响^[3]。GLA 对人体的激素调节、脂肪酸代谢和心血管系统有重要作用,是一种人体必需脂肪酸^[4]。 Δ^6 -脂肪酸脱氢酶是产生 γ -亚麻酸的关键酶,是将亚油酸(18 :2 $\Delta^9,12$) 的第六位碳原子脱氢转化为 γ -亚麻酸(18 :3 $\Delta^6,9,12$) ,然后通过 C 链延长和脱氢作用进一步形成花生四烯酸、前列腺素类和白三烯类生理活性物质^[5]。目前仅有玻璃苣^[6]、小鼠肝脏^[7,8]、线虫^[9]、蓝细菌^[10]和低等丝状真菌高山被孢霉^[11]的 Δ^6 -脂肪酸脱氢酶基因被克隆和表达的报道。

被孢霉属 (*Mortierella*) 是毛霉目中具有重要经济价值的丝状真菌,被广泛应用于 γ -亚麻酸的发酵生产,但发酵法有一定的局限,不能从根本上解决菌种发酵周期长、产率低的问题,为了彻底解决上述问

题,我们从高山被孢霉 (*Mortierella alpina*) 的总 RNA 入手,通过 RT-PCR 方法克隆到 Δ^6 -脂肪酸脱氢酶基因,转入酿酒酵母的缺陷型 INVSc1,以期得到产 GLA 的酵母工程菌株。本文报道了高山被孢霉 ATCC16266 的 Δ^6 -脂肪酸脱氢酶基因在酿酒酵母的高效表达。

1 材料和方法

1.1 菌株与质粒

大肠杆菌 JM109,高山被孢霉 (*Mrtierella alpina*) ATCC16266,南开大学真菌实验室保存。酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 营养缺陷型 INVSc1 及表达载体 pYES2.0 购自 Invitrogen 公司。

1.2 酶及试剂

T4DNA 连接酶,限制酶 *EcoR* I、*Xho* I,购自华美生物工程公司;酵母浸出膏和胰蛋白胨 (Ox-foid) 及亚油酸购自上海 Sangon 公司;棉子糖,半乳糖购自上海试剂二厂;NP-40,购自 Sigma 公司。培养基所需的各种氨基酸及常规试剂均为国产试剂。

1.3 培养基的配制

大肠杆菌的 LB 培养基,参见文献 [12],高山被孢霉的 PDA 培养基,参见文献 [13],酵母营养缺陷型 SC-Ura 培养基按 Invitrogen 公司操作手册上进

收稿日期 2000-10-08,修回日期 2000-12-18。

国家自然科学基金项目(39870020)和高等学校骨干教师资助计划项目。

* 通讯作者。Tel 86-22-23508506; Fax 86-22-23508800; E-mail xinglaij@public.tjcu.com.cn

行,而诱导表达的培养基按文献[11]。

1.4 表达载体的构建与转化

在大肠杆菌 JM109 中扩增本室构建含有高山被孢霉的 Δ^6 -脂肪酸脱氢酶基因的质粒 pTMACL6, 用内切酶 *EcoR* I 及 *Xho* I 双酶切,电洗脱法回收 1.4kb Δ^6 -脂肪酸脱氢酶基因片段,亚克隆到酿酒酵母的表达载体 pYES2.0 中,先转化到大肠杆菌 JM109 中。感受态细胞的制备及转化按文献[12]方法进行。筛选转化子,酶切、PCR 鉴定后,确定重组质粒 pYMAD6。把空载体 pYES2.0 和重组质粒 pYMAD6 再转化到酿酒酵母的缺陷型菌株 INVSc1 中,在 SC-Ura 培养基上筛选白色转化子分别为对照株和酵母工程株 YMAD6。酵母感受态细胞的制备与转化按文献[14]方法进行。

1.5 酵母工程菌的诱导方法

把对照株和酵母工程株 YMAD6,在缺少尿嘧啶的 SC 培养基上,28℃ 培养过夜,以 5% 的接种量加入含有 1% NP-40,4% 棉子糖的 SC-Ura 培养基^[11]。再加入外源底物亚油酸,使其浓度达到 0.5mmol/L。28℃ 继续培养。当酵母细胞的密度达到 5×10^6 细胞/mL 时,加入 2% 半乳糖诱导,22℃ 培养 72h 收集菌体。

1.6 重组产物分析

酵母菌体经去离子水洗涤 3 次,50℃ 烘干。研碎后,加入 5% 的 KOH-CH₃OH 溶液,70℃ 反应 3h,再加入 14% BF₃-CH₃OH,70℃ 反应 1.5h,合成脂肪酸甲酯。用 1:4 的氯仿:己烷抽提两次,合并提取液。加入适量无水 Na₂SO₄ 干燥提取液,静置 1h,去掉 Na₂SO₄,用氮气吹干备用。以 Sigma 公司生产的 GLA 甲酯为标准品,采用文献[11]方法略加改动测定样品。仪器为岛津 GC-7A,柱子:DEGS 0.25mm \times 25m,分流比:100:1,柱温:180℃,尾气:50mL/min,气化室温度:250℃,检测器:氢火焰离子化检测器。

2 结 果

2.1 Δ^6 -脂肪酸脱氢酶基因重组质粒的构建

从 LB 的 Amp 抗性平板上随机筛选转化子,少量提取质粒,经酶切及 PCR 鉴定,筛选到阳性克隆 pYMAD6。用 *EcoR* I、*Xho* I 双酶切 pYES2.0 及 pYMAD6,结果如图 1。pYMAD6/*EcoR* I/*Xho* I 有 5.9kb 及 1.4kb 两条带,pYES2.0 有 5.9kb 一条带,与预期结果完全相符。

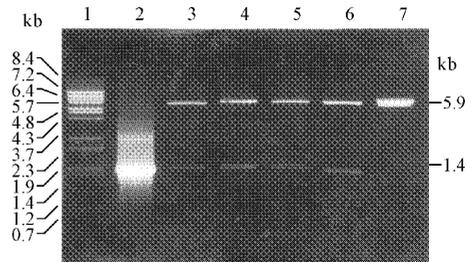


图 1 重组质粒 pYMAD6 和 pYES2.0 酶切图

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis of pYMAD6 and pYES2.0 digested with restriction enzymes

1. DNA size marker λ DNA/*Bst* II 2. PCR product of D6D cDNA ;
3-6. pYMAD6/*EcoR* I/*Xho* I 7. pYES2.0/*EcoR* I/*Xho* I

2.2 Δ^6 -脂肪酸脱氢酶基因在酿酒酵母中的表达

把空载体 pYES2.0 和重组质粒 pYMAD6 转化到酿酒酵母缺陷型 INVSc1,在 SC-Ura 培养基上挑选到对照株和含有高山被孢霉的 Δ^6 -脂肪酸脱氢酶基因的酿酒酵母工程株 YMAD6。以含有空载体 pYES2.0 的受体菌为对照,YMAD6 的脂肪酸甲酯化后,经 GC-MS 分析,如图 2 所示,结果为:图 2A GLA 甲酯标准品,图 2B 为受体菌,图 2C 空载体对照,图 2D 酵母工程菌 YMAD6,图 2E 为底物亚油酸。经对比发现,在受体菌中本身不含亚油酸和 GLA,对照空载体有底物 LA 没有 GLA 生产,底物 LA 只有出峰时间为 11.960 的一个峰,只有酵母工程株 YMAD6 在同时加底物亚油酸和诱导物半乳糖时,有出峰时间为 13.793 的特殊峰,标准品 GLA 的出峰时间为 13.747,说明高山被孢霉的 Δ^6 -脂肪酸脱氢酶基因在酿酒酵母中获得了表达,使原来不产生 GLA 的酿酒酵母由于导入外源的 Δ^6 -脂肪酸脱氢酶基因,而产生了 GLA,并且 YMAD6 的 GLA 含量占其总脂肪酸含量的 31.61%。与 Y S Huang 在 1999 年报道的高山被孢霉 Δ^6 -脂肪酸脱氢酶基因在酿酒酵母中表达的 GLA 为 10%^[11]相比,是表达量最高的报道。

同时,对不同温度条件下诱导酵母工程菌 YMAD6,分别在 15℃,18℃,22℃,26℃,28℃,30℃ 诱导 YMAD6,发现在 22℃ 时,GLA 的表达量最高(图 3)。

3 讨 论

一般说来,选择合适的载体和受体菌,对表达外源基因非常重要。本项研究中,选择不产 GLA 的酿酒酵母营养缺陷型 INVSc1 为受体菌,含有 GAL1 启动子的表达载体 pYES2.0,对 Δ^6 -脂肪酸脱氢酶

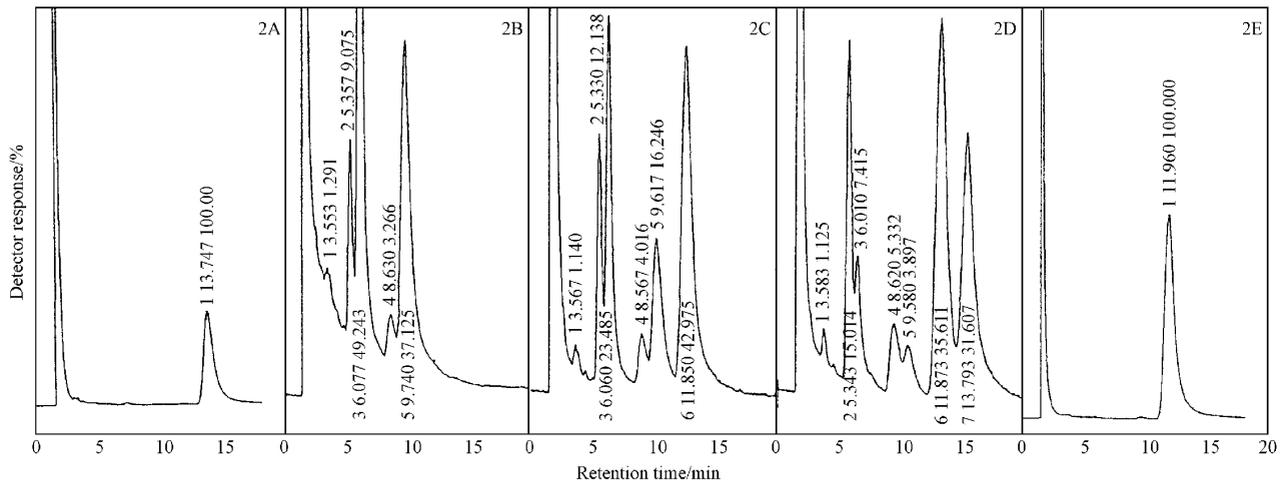


图 2 酿酒酵母总脂肪酸的气相色谱分析图

Fig. 2 Gas chromatographic analysis of fatty acid methyl esters of total lipids of *S. cerevisiae* grown under inducing conditions, (2A) γ -linolenic acid standard (2B) acceptor strain INCScl (2C) yeast transformed with pYES2.0, (2D) yeast transformed with pYMAD6 (2E) substrate linoleic acid

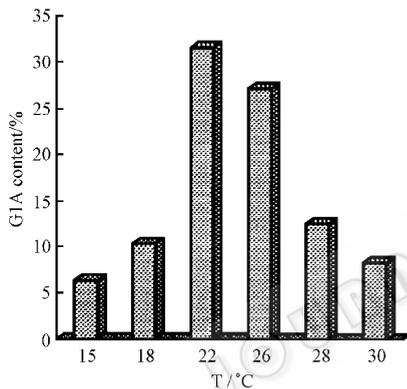


图 3 温度对酵母工程株 YMAD6 积累 GLA 的影响

Fig. 3 Effect of temperature on the accumulation of GLA in the YMAD6 yeast strain

基因的表达有可控性,同时,在表达的培养中加少许表面活性剂 NP-40,以使底物亚油酸在培养基中充分分散。酿酒酵母作为一种模式生物,在实验系统研究方面具有许多内在的优势^[15,16]。其一,酵母是真核生物,毒性比细菌小,它还可以使某些蛋白质糖基化而更加稳定,还能把外源基因产生的蛋白质分泌到培养基中,便于产品的分离纯化;其二,酵母是一种单细胞生物,能在简单培养基上生长,使得实验者能够通过改变物理或化学环境完全控制其生长。如酵母 INVScl 就是 *URA3* 突变的结果为尿嘧啶缺陷型,可作为选择标识,方便筛选转化子;其三,酵母繁殖速度快,能进行高密度培养,并且能够耐受较高的流体静压,即使细胞死亡仍不溶解,发酵周期短,因此能够大规模的生产,具有降低基因工程产品成本的潜力。因此,酿酒酵母的表达系统是表

达真核基因系统的首选。

综上所述,从高山被孢霉中克隆出 Δ^6 -脂肪酸脱氢酶基因,转化到大肠杆菌和酿酒酵母的穿梭表达载体 pYES2.0,构建表达重组质粒 pYMAD6,将其转化到受体菌,构成酵母工程菌 YMAD6。表达的重组酶 Δ^6 -脂肪酸脱氢酶可把底物亚油酸(18:2)脱氢形成 GLA(18:3)。该研究是国内外高山被孢霉 Δ^6 -脂肪酸脱氢酶基因在酿酒酵母中表达量最高的报道,为 GLA 的工业化生产打下了扎实的基础,同时,为真核生物基因的高效表达提供了一定的经验。

REFERENCES (参考文献)

- [1] Gunstone F D. γ -linolenic acid occurrence and physical and chemical properties. *Prog. Lipid Res.* 1992, **31**(2):145~161
- [2] Cho H P, Nakamura M T, Clarke S D. Cloning, expression, and nutritional regulation of the mammalian Δ^6 -desaturase. *J Biological Chem.* 1998, **274**:471~477
- [3] Horrobin D F. Nutritional and medical importance of γ -linolenic acid. *Prog Lipid Res.* 1993, **31**(2):163~194
- [4] Shankin J, Whittle E, Fox B G. Eight histidine residues are catalytically essential in a membrane-associated iron enzyme, stearoyl-CoA desaturase: are conserved in alkane hydroxylase and xylene monooxygenase. *Biochemistry.* 1994, **33**:12787~12794
- [5] Deborah S K, Jennifer M T, Huang Y S et al. Identification of Δ^5 -desaturase from *Mortierella alpina* by heterologous expression in bakers' yeast and canola. *J Biol Chem.* 1998, **273**(45):29360~29366
- [6] Sayanova O, Smith M A, Lapinskas P et al. Expression of a bor-

- domain results in the accumulation of high levels of Δ^6 -desaturated fatty acids in transgenic tobacco. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, **94**: 4211~4216
- [7] Michel N, Philippe A, Claire M D *et al.* Influence of spontaneous hypertension on n-3 delta-6-desaturase activity and fatty acid composition of rat hepatocytes. *Molecular Cellular Biochemistry*. 1995, **152**: 7~12
- [8] Tsunehiro A, Yayoi S, Katsuya I *et al.* Molecular cloning and functional characterization of rat Δ^6 -fatty acid desaturase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 1999, **255**: 575~579
- [9] Napier J A, Sandra J H, Dominic J L *et al.* Identification of a *Caenorhabditis elegans* Δ^6 -fatty-acid-desaturase by heterologous expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem J*. 1998, **330**: 611~614
- [10] Reddy A S, Nuccio M L, Gross L M *et al.* Isolation of a Δ^6 -desaturase gene from the cyanobacterium *Synechocystis sp.* strain PCC6803 by gain-of-function expression in *Anabaena sp.* strain PCC7120. *Plant Mol Biol*. 1993, **27**: 293~300
- [11] Yung-Sheng H, Sunita C, Jennifer M T *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
- [12] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T, *Molecular Cloning* 2nd ed., Beijing Science Press, 1993, pp. 463~468
- [13] XING L J (邢来君), ZHONG H (钟辉), ZHOU H (周辉)等, Study On The Fermentation Production of γ -linolenic acid by *Mortierella isabellina*, *Acta Mycologica Sinica* (真菌学报), 1996, **15**(4): 272~277
- [14] Adams A, Gottschling D E, Kaiser C A *et al.* *Methods in Yeast Genetic* (酵母遗传学方法实验指南): A Cold Spring Harbor Laboratory Course Manual, Beijing: Science Press, 2000, pp. 81~82
- [15] LIU W (刘文), WANG H H (王洪海). Yeast is a model organism, *Letters in Biotechnology* (生物技术通讯), 1998, **9**(1): 68~71
- [16] LIU Q (刘擎), YU Y (余尤). The analysis of property of genetic engineering products expressed in yeast, *Chemistry of life* (生命的化学) 2000, **20**(2): 61~65

Expression of Δ^6 -fatty Acid Desaturase Gene from *Mortierella alpina* in *Saccharomyces cerevisiae**

LIU Li LI Ming-Chun HU Guo-Wu GE Jun ZHANG Li CHENG Zhi-Hui XING Lai-Jun
(Department of Microbiology, NanKai University, Tianjin 300071, China)

Abstract Δ^6 -fatty acid desaturase is the rate-limiting enzyme of the desaturation of linoleic acid in the production of an essential fatty acid, γ -linolenic acid. The 1.4kb fragment in plasmid pTMACL6 encoding Δ^6 -fatty acid desaturase from *Mortierella alpina* ATCC16266 was subcloned into the yeast-*E. coli* shuttle vector pYES2.0, thus an expression recombinant plasmid pYMAD6 containing target gene was constructed and obtained in the SC-Ura media. The pYMAD6 was introduced into defective mutant INCScl of *Saccharomyces cerevisiae* by LiAc method. When linoleic acid was provided as an exogenous substrate to the yeast cultures expressing Δ^6 -fatty acid desaturase activity under appropriate media and temperature condition, the level of γ -linolenic acid reached 31.6% of the total yeast fatty acids by GC-MS detecting, which is the highest report of Δ^6 -fatty-acid desaturase gene in *S. cerevisiae*.

Key words *Mortierella alpina* Δ^6 -fatty acid desaturase gene γ -linolenic acid Expression, *Saccharomyces cerevisiae*.

Received October 8, 2000

* This work was supported by the National Natural Science Foundation (39870020) and the Project to Subsidize Core Teachers in Colleges and Universities.

* Corresponding author. Tel: 86-22-23508506; Fax: 86-22-23508800; E-mail: xinglaijun@nankai.edu.cn; 邢来君 南开大学微生物研究所 联合编辑部 http://journals.im.ac.cn