

深黄被孢霉 Δ^6 -脂肪酸脱氢酶基因在转基因烟草中的表达

李明春 刘 莉 胡国武 邢来君*

(南开大学微生物系,天津 300071)

摘 要 γ -亚麻酸 (GLA) 是人体和动物饮食中具有营养作用的重要的多烯不饱和脂肪酸,在大多数油料作物种子中不含有 GLA,而只含有其前体物亚油酸,只有少数油料植物种子中含有 GLA,如夜来香 (*Oenothera* spp.),琉璃苣 (*Borago officinalis*) 等。 Δ^6 -脂肪酸脱氢酶可将亚油酸转化为 γ -亚麻酸,为了能够在传统的油料作物种子中产生 GLA,我们将从深黄被孢霉中克隆的 Δ^6 -脂肪酸脱氢酶基因,与植物表达载体 pGA643 连接,构建了重组质粒 pGAM-ICL6,将其通过农杆菌介导法,导入模式植物烟草中。经 PCR 和 Southern 杂交分析表明该基因已导入并整合到烟草的基因组中,Northern 杂交结果表明该基因在转基因烟草的 mRNA 水平上获得表达。对转基因植株进行脂肪酸分析,结果显示,GLA 和十八碳四烯酸 (OTA) 分别占总脂肪酸含量的 19.7% 和 3.5%。

关键词 烟草, Δ^6 -脂肪酸脱氢酶基因, γ -亚麻酸, 转基因植株, 深黄被孢霉

中图分类号 Q786 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2003)02-0178-07

深黄被孢霉 (*Mortierella isabellina*) 是毛霉目中具有重要经济价值的丝状真菌,它能产生多种不饱和脂肪酸,尤其是只产生 γ -亚麻酸 (γ -Linolenic acid, GLA),而不含有其同分异构体 α -亚麻酸 (α -Linolenic acid, ALA) 因此为分离纯化光学特异的 GLA 带来了方便。GLA 做为人体必需的不饱和脂肪酸,目前已经在国际上做为一种新的维生素——维生素 F 被研究应用,尤其在心血管疾病、糖尿病以及癌症方面的医疗价值而成为学术界研究的热点^[1]。 Δ^6 -脂肪酸脱氢酶 (Δ^6 -fatty acid desaturase, D6D) 是 GLA 合成途径中的关键酶,催化亚油酸 (18:2 $\Delta^{9,12}$, LA) 的第 6、7 位碳原子间脱氢形成 GLA (18:3 $\Delta^{6,9,12}$),然后通过碳链的延长和脱氢作用进一步形成花生四烯酸 (AA) 和前列腺素类 (PGs) 及白三烯类生理活性物质。国内对 Δ^6 -脂肪酸脱氢酶的分子生物学研究起步较晚,仅有少数报道^[2-4],国外从 90 年代初期开始对产生 GLA 的关键酶 Δ^6 -脂肪酸脱氢酶基因进行了克隆和表达的研究,相继从蓝细菌^[5]、琉璃苣^[6]、线虫^[7]、小鼠^[8]、斑马鱼^[9]、高山被孢霉^[10,11] 等不同物种中克隆了 Δ^6 -脂肪酸脱氢酶基因,分别在啤酒酵母和烟草中进行了表达。

在大多数植物中不存在 γ -亚麻酸,只有少数几

种高等植物能合成 γ -亚麻酸。目前 γ -亚麻酸的主要来源是夜来香 (*Oenothera* spp.),其种子油中 GLA 的含量达 8% ~ 10%,而琉璃苣 (*Borago officinalis*) 种子中为 20% ~ 25%,但这些植物都存在农艺操作差、产量低的问题,如在英国琉璃苣产量约为 300 ~ 600kg/hm²,而相对于油菜籽为 3 t/hm²。因此提高现有作物的 GLA 含量及在传统的油料作物基础上产生 GLA 成为了人们关注的热点。

烟草是模式植物,且含有 GLA 的前体物亚油酸,因此,我们将从高产 GLA 的深黄被孢霉中克隆到的 Δ^6 -脂肪酸脱氢酶基因 (GenBank 号为 AF306634) 与表达载体 pGA643 连接,构建了重组质粒 pGAMICL6,将其转到烟草中,该嵌合基因在 CaMV35S 启动子的驱动下,使原不产 GLA 的烟草产生了 GLA。这是国际上将深黄被孢霉 Δ^6 -脂肪酸脱氢酶基因在烟草中表达的首次报道。为今后把该基因转入大豆、油菜等传统的油料作物进行转基因的研究打下了良好的基础。

1 材料与方法

1.1 菌株与质粒

大肠杆菌 DH5 α ,带有深黄被孢霉 D6D 基因的

pTMICL6 质粒,根癌农杆菌 LBA4404 (*Agrobacterium tumefaciens* LBA4404) 为本实验室保存。植物表达载体 pGA643 为内蒙古大学哈斯阿古拉教授惠赠。

1.2 植物材料

烟草 (*Nicotiana tabacum* cv. Xanthi) 由中国科学院遗传所惠赠。

1.3 培养基、酶及试剂

大肠杆菌的 LB 培养基参见文献 [12], 农杆菌 YEB 培养基及 MS 培养基见文献 [13], 各种限制酶购自华美生物工程公司; PCR 用 Taq 酶及 dNTP、UNIQ-10 柱式多用途 DNA 试剂盒购自上海 Sangon 公司, γ -亚麻酸标准品购自 Sigma 公司, 地高辛标记及显色试剂盒购自 Roche 公司; 卡那霉素 (Kan)、利福平 (Rif)、氨苄青霉素 (Amp)、羧苄青霉素 (Cb) 和链霉素 (Str) 等主要购自华美生物工程公司, 宝生物公司, 其余试剂均为国产分析纯。

1.4 Δ^6 -脂肪酸脱氢酶基因的合成

以含有 D6D 基因的 pTMICL6 质粒为模板, PCR 扩增 Δ^6 -脂肪酸脱氢酶基因。为了便于构建含有 D6D 基因的植物表达载体, 我们在对质粒 pTMICL6 进行扩增时, 在编码区的上游引物中添加了 *Xba* I 酶切位点, 下游引物添加了 *Bgl* II 酶切位点, 这两个寡核苷酸引物是根据 D6D 基因结构序列设计的:

上游引物 (P1):

5'-GGCTTCTAGAATGGCTGCTGCTCCCAGT-3'

下游引物 (P2):

5'-CTGCAGATCTTTACTGCGCCTTACC-3'

于 PE9700 型 DNA thermal cycler 上进行 PCR 扩增反应, 条件为 94°C 2min, 然后 94°C 1min, 55°C 1min, 72°C 2min, 30 个循环, 最后 72°C 5min。采用上海 Sangon 公司 UNIQ-10 柱式多用途 DNA 试剂盒进行 PCR 产物纯化, 方法参照说明书进行。

1.5 植物表达载体的构建

将回收的 Δ^6 -脂肪酸脱氢酶基因的 PCR 产物和质粒 pGA643 分别用 *Xba* I 和 *Bgl* II 双酶切后, 进行连接, 构建出含有外源基因的重组表达质粒 pGAMICL6, 将该重组质粒转化到大肠杆菌 DH5 α 中, 通过 Kan 抗性筛选重组子, 并对重组子进行酶切鉴定。大肠杆菌感受态细胞的制备及转化等分子克隆技术按常规方法 [12] 进行。

1.6 农杆菌的转化

采用液氮冻融法 [13, 14], 将重组表达质粒 pGAMICL6 导入根癌农杆菌 LBA4404 中。首先制备农杆菌感受态细胞, 将单菌落 LBA4404 接至含 125 μ g/mL

Str 25 μ g/mL Rif 的 YEB 中 28°C 培养过夜, 按 1% 接种量转到新鲜的 YEB 培养基中, 继续培养 3~4h, 4°C 离心, 用 TE 洗涤后重悬于 YEB 中, 取 500 μ L 于 1.5mL 离心管中, 加入 1 μ g 质粒 DNA, 于冰上 5min, 然后置液氮中 5min, 37°C 保温 5min, 用 1mL YEB 稀释, 28°C 振荡 2~4h, 取 200 μ L 涂布于含 Kan 和 Str 的双抗 YEB 或 LB 平板上, 28°C 培养, 挑取转化子进行 PCR 鉴定。

1.7 植物转化

按照常规叶盘法转化烟草 [14]。将构建的植物表达载体 pGAMICL6 通过农杆菌介导的方法转化到烟草 *Nicotiana tabacum* cv. Xanthi 中。首先在适宜的农杆菌液中将叶盘浸泡 10min, 在共培养基中暗培养 2~3d, 然后在幼芽培养基中光照培养 7~10d 后转到分化培养基, 待抗性芽长到 3~4cm 时, 转到生根培养基, 生根后将幼苗移到花盆中。整个培养条件为 25°C, 光/暗周期 16h/18h, 相对湿度 70%~80%。

1.8 转基因植株的分子检测

1.8.1 PCR 检测: 分别提取转基因和未转基因烟草叶片的基因组 DNA [12], 用方法 1.4 的上下游引物于 25 μ L 体系中进行 PCR 扩增, PCR 产物于 1% 琼脂糖凝胶中电泳。

1.8.2 Southern 杂交: 分别提取转基因和未转基因烟草叶片的基因组 DNA [12], 以 *Hind* III 单酶切, 进行 0.8% 琼脂糖凝胶电泳后, 把胶放在用 20 \times SSC 浸润的尼龙膜上, 于真空转膜仪 50mbar 条件下进行转膜, 然后将膜在紫外交联仪中照射 5min。以深黄被孢霉 Δ^6 -脂肪酸脱氢酶基因为探针, 按地高辛标记及显色试剂盒说明书进行标记和显色。

1.8.3 Northern 杂交: 按 Promega "RNAzol" 说明书提取转基因和未转基因烟草叶片的总 RNA, 总 RNA 于 1% 甲醛变性凝胶电泳中进行分离, 同 Southern 杂交方法进行转膜和杂交显色。

1.9 转基因烟草的脂肪酸分析

取转基因烟草叶片研碎后称重, 加入 5% 的 KOH-CH₃OH 溶液, 70°C 反应 3h, 再加入 14% BF₃-CH₃OH, 70°C 反应 1.5h, 形成脂肪酸甲酯。用 1:4 的氯仿:正己烷抽提 2 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 [3] 方法略加改动测定样品。仪器为岛津 GC-9A 柱子, SE 52/25m, 载气: N₂, 50mL/min, 气化室

温度 :280℃ ,柱温 :210℃ ,检测器 :氢火焰离子化检测器。

2 结 果

2.1 植物表达载体的构建

以含有 D6D 基因的 pTMICL6 为模板 ,PCR 扩增出的目的带大小为 1.37kb ,与预期的相符。将载体 pGA643 及 D6D 基因分别用 *Xba* I 和 *Bgl* II 双酶切 ,回收后于 16℃ 过夜连接(见图 1)。

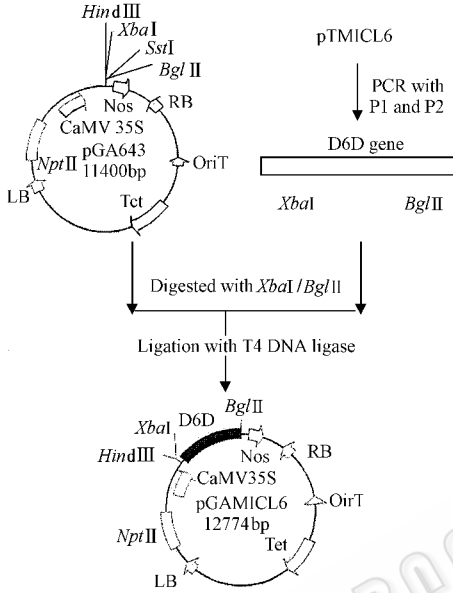


图 1 植物表达载体 pGAMICL6 的构建

Fig.1 Construction of expression vector pGAMICL6

将连接产物转化到 *E. coli* DH5 α 中。从含有 Kan 抗性的 LB 平板上筛选转化子。提取重组质粒 ,经酶切及 PCR 鉴定 ,筛选到阳性克隆 pGAMICL6。用 *Xba* I 和 *Bgl* II 双酶切 pGA643 和 pGAMICL6 ,结果如图 2。pGAMI6/*Xba* I + *Bgl* II 双酶切后有 11.4kb 及 1.37kb 两条带 ,而 pGA643 双酶切后只有一条 11.4kb 带。同时将 pGAMICL6 进行 PCR 扩增 ,得到 1.37kb 大小均一的片段 ,说明含有 D6D 基因的植物表达载体 pGAMICL6 已构建成功。

2.2 农杆菌的转化与鉴定

采用液氮冻融法将构建好的植物表达载体 pGAMICL6 转化到根癌农杆菌 LBA4404 ,然后在含有 125 μ g/mL Str ,25 μ g/mL Rif 和 100 μ g/mL Kan 的 YEB 选择培养基上 28℃ 培养 48h 后出现白色菌落 ,采用菌落 PCR 法鉴定农杆菌的转化子。电泳检测表明其 PCR 产物大小一致均为 1.37kb ,从而证明构建的植物表达载体 pGAMICL6 已转入农杆菌中 ,结果如图 3。

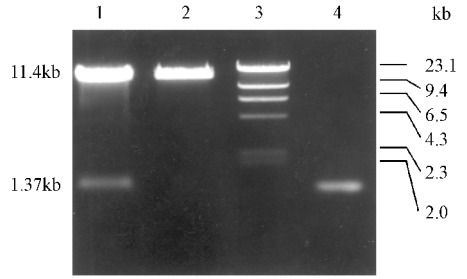


图 2 重组表达载体 pGAMICL6 酶切及 PCR 鉴定

Fig.2 Restriction and PCR analysis of recombinant expression vector pGAMICL6

- 1. pGAMICL6/*Xba* I + *Bgl* II
- 2. pGA643/*Xba* I + *Bgl* II ;
- 3. λ DNA/*Hind*III Marker ;4. D6D gene PCR product

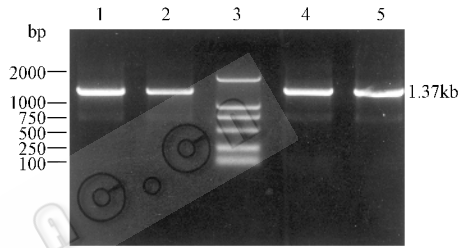


图 3 PCR 法鉴定农杆菌中的 D6D 基因

Fig.3 Identification of D6D gene in *Agrobacterium tumefaciens* by PCR

- 1 2 4 5. PCR product of transformants ;3. DL2000 marker

2.3 烟草转化

把含有目的基因的农杆菌经过活化后 ,利用叶盘法对烟草叶片进行转化。经 1~2 次继代培养 ,外植体产生愈伤组织(图 4A)。经 2~3 次继代培养 ,愈伤组织分化出芽(图 4B)。把芽转到分化培养基上继续培养 ,等芽长到 2cm 左右 ,转到生根培养基上 ,从而长成完整植株(图 4C)。等到根发育完全后 ,移栽到花盆里(如图 4D)。

2.4 转基因烟草的分子检测

2.4.1 转基因烟草的 PCR 检测 :含有深黄被孢霉 D6D 基因的根癌农杆菌通过叶盘法转化到烟草中 ,共获得 Kan 抗性植株 80 株 ,提取 Kan 阳性植株总 DNA ,以 pTMICL6 为阳性对照 ,未转基因烟草的总 DNA 为阴性对照 ,用引物 P1、P2 对其进行 PCR 扩增 ,如图 5 所示 ,结果表明 80 株中有 48 株扩增出了 1.37kb 的目的片段 ,而未转化的对照则没有该片段 ,转化率为 60% ,表明深黄被孢霉 D6D 基因已导入到烟草中。

2.4.2 转基因烟草的 Southern 杂交 :提取经 PCR 鉴定为阳性的转基因烟草总 DNA ,取 15 μ g ,用 *Hind*III

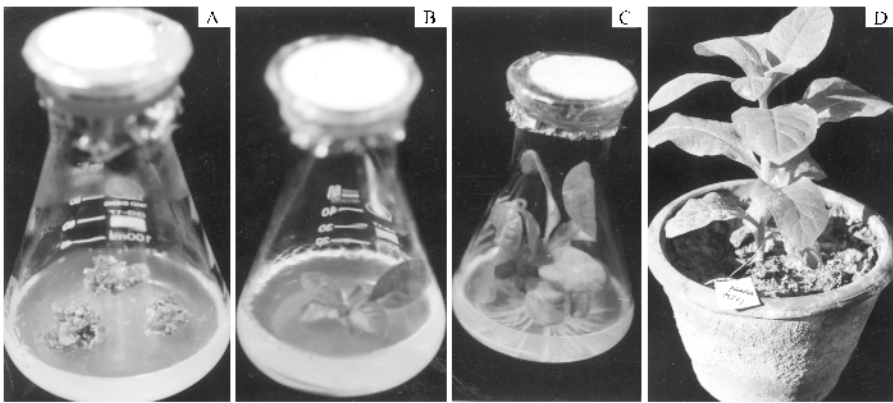


图4 叶盘法转化的转基因烟草

Fig.4 Transgenic tobacco by leaf disc method

酶切消化后进行 Southern 杂交,以 DIG 标记的 D6D 基因作为探针。结果如图 6,从中可以看出转基因植株显示出特征带,而未转化植株则没有杂交带,从而表明外源基因已整合到烟草的基因组中。

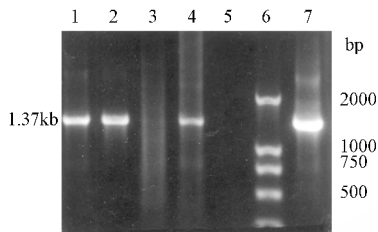


图5 转基因烟草的 PCR 鉴定

Fig.5 Identification of transgenic tobacco by using PCR

1~4. Transgenic tobacco; 5. Non-transgenic tobacco; 6. DL2000 marker; 7. PCR product of pTMICL6

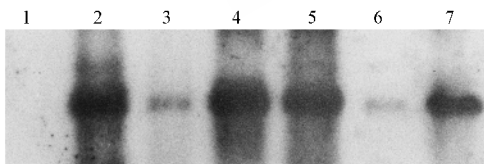


图6 转基因烟草的 Southern 杂交鉴定

Fig.6 Identification of transgenic tobacco by Southern blot

1. Non-transgenic tobacco; 2. Positive control; 3~7. Transgenic tobacco

2.4.3 转基因烟草的 Northern 杂交:为了检测 Δ^6 -脂肪酸脱氢酶基因在转基因烟草中的表达,以 D6D 基因为探针,提取 PCR 和 Southern 杂交鉴定为阳性的转基因植株和未转基因植株的总 RNA 20 μ g,在 1% 甲醛变性胶上进行电泳分离,结果见图 7,转基因烟草与未转基因烟草相比有明显的杂交信号,说明深黄被孢霉 D6D 基因在转基因烟草的转录水平得到了表达。

2.5 转基因烟草中脂肪酸含量的分析

对经过 PCR 和 Southern 杂交鉴定为阳性并在

mRNA 水平上有表达的转基因烟草的全苗进行气相色谱分析,结果见图 8,与未转基因烟草相比,转基因烟草中出现了 11.62 和 12.86 的两个特殊峰(用箭头表示),其中,11.62 与标准品 GLA 的出峰时间 11.67 一致,表达的 GLA 占其总脂肪酸含量的 19.7%,表达量较高。同时,由于在烟草中存在 α -亚麻酸(ALA),D6D 基因也可以 ALA 为底物合成十八碳四烯酸(octadecatetraenoic acid, OTA),生成量为 3.5%,而在未转基因烟草中不存在这两种物质,说明深黄被孢霉 D6D 基因在模式植物烟草中得到了表达,产生了预期产物 GLA 和 OTA。

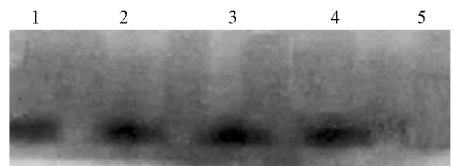


图7 转基因烟草的 Northern 杂交鉴定

Fig.7 Identification of transgenic tobacco by Northern blot

1~4. Transgenic tobacco; 5. Non-transgenic tobacco

3 讨论

本文所表达的 Δ^6 -脂肪酸脱氢酶基因是从丝状真菌深黄被孢霉中克隆的,多不饱和脂肪酸代谢途径如图 9 所示,从图中可以看出 Δ^6 -脂肪酸脱氢酶可以同时催化 n-6 途径中的亚油酸(LA)和 n-3 途径中的 ALA,分别生成 GLA 和 OTA。从本研究的结果也证实,由于烟草含有较丰富的 ALA 和 LA,所以当低等真菌的 D6D 基因转入烟草植株后,能够利用植物体系中的脂肪酸脱氢酶系统,进行脂肪酸的代谢,通过对转基因烟草植株进行脂肪酸分析,检测到了 D6D 基因的产物 GLA 和 OTA,说明转入的外源基因获得了表达,并发挥了该酶的催化活性,证明丝状真

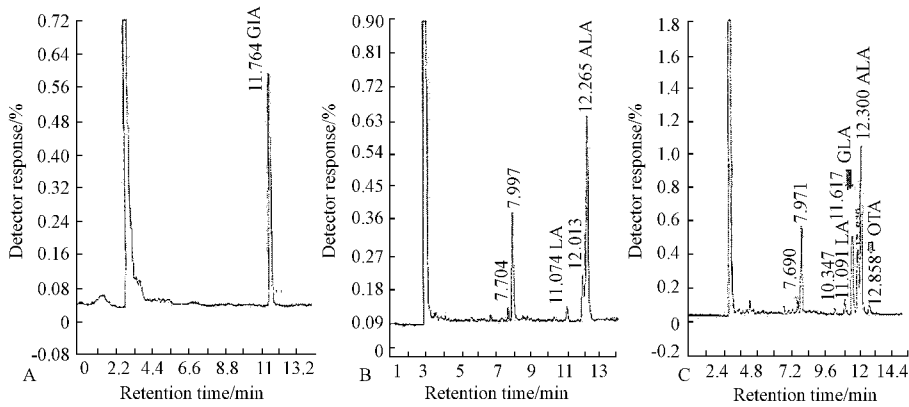


图 8 转基因烟草总脂肪酸含量的气相色谱分析图

Fig. 8 Gas chromatographic analysis of fatty acid methyl esters of total lipids of transgenic tobacco A. 17-linolenic acid standard ; B. Non-transgenic tobacco ; C. Transgenic tobacco with pGAMICL6. Two novel penks are seen in 8C , the solid arrow indicate GLA and the blank arrow indicate OTA

菌深黄被孢霉和植物烟草的脂肪酸代谢路线是相似的。

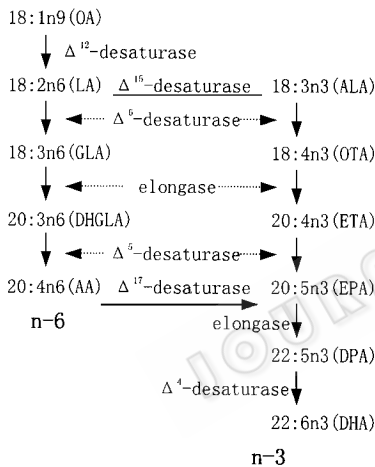


图 9 多不饱和脂肪酸的生物合成途径

Fig. 9 The biosynthetic pathway of polyunsaturated fatty acids

利用农杆菌介导转化的方法具有技术简单易操作,转化周期短,易获得再生植株等优点,因此广泛应用于各种植物的遗传转化中。在实验中,我们发现在培养农杆菌时,培养基中补加乙酰丁香酮可明显地提高农杆菌的转化能力,这主要是因为乙酰丁香酮是农杆菌 *vir* 基因表达的诱导因子,促进 T-DNA 向植物细胞的转化,提高植物细胞的转化频率。本研究采用该方法,转化率可达 60% 以上;另外,通过叶盘法转化烟草时,叶盘在菌液中浸泡 10min,取出叶盘后,应先用无菌滤纸吸干后,转入覆盖有无菌滤纸的共培养基中,加无菌滤纸的作用是防止叶盘周围农杆菌生长过于旺盛,同时还应注意浸染农杆菌用的菌液浓度不应过高,因为菌浓度过高会引起植物组织褐化,并影响后期的杀菌,应控制

OD_{600} 在 0.1 左右。

本文构建由 CaMV35S 驱动 D6D 基因表达的植物表达载体,并在转基因烟草中产生了 GLA,说明深黄被孢霉 Δ^6 -脂肪酸脱氢酶基因可以改变植物脂肪酸组成,但是异源基因在转基因植物中表达的局限性限制了在油料种子作物中改变脂肪酸成分的操作,主要有两个问题,一是转基因表达的水平受空间和时间的限制;另一个是组织特异性表达及亚细胞定位的问题。本研究也证明在转基因植株的根部, GLA 的含量明显高于叶片;在愈伤组织中 GLA 的含量高于苗(结果未显示),说明深黄被孢霉的 Δ^6 -脂肪酸脱氢酶基因在烟草中表达是不均一的,可能具有组织特异性。

GLA 在转基因植物的表达水平有几个因素起着关键性作用,包括形成脱氢酶转录物的数量,底物的可用性,密码子的使用等。另外,表达载体的启动子在决定外源基因的表达水平方面也起着重要作用,因此选择合适的植物启动子和改进其活性是增强外源基因表达首要考虑的问题。本研究中选用的植物载体为 CaMV35S 启动子,是属于组成型启动子,这样外源基因在转基因植物的所有部位和所有的发育阶段都会表达^[15]。由于外源基因在受体植物内持续、高效的表达不但造成浪费,往往还会引起植物的形态发生改变,影响植物的生长发育。为了使外源基因在植物体内有效发挥作用,同时又可减少对植物的不利影响,可以选用特异性启动子。主要包括组织器官特异性启动子和诱导特异性启动子。因此对于通过遗传操作改良品质油的植物基因工程来讲,最好选用种子特异性启动子,使脂肪酸的变化集

中在种子中,达到品质油改良的目的。

本研究将 Δ^6 -脂肪酸脱氢酶基因转到植物烟草中使其积累了 GLA,改变了其原有的脂肪酸组成,为下一步构建种子特异性启动子表达载体,使 Δ^6 -脂肪酸脱氢酶基因在大豆、油菜等油料作物的种子中特异性积累 GLA,改变脂肪酸组成,满足人们对营养的需求,同时产生新型的作物品种提供了理论基础。

REFERENCES(参考文献)

- [1] Muphy D J , Piffaneth P . Fatty acid desaturase : structure mechanism and regulation . In *Plant Lipid Biosynthesis : Recent Advances of Agricultural importance* , 1998 , **11** : 95 - 130
- [2] LI M (李明春) , LIU I (刘莉) , ZHANG I (张丽) *et al.* Cloning and sequencing analysis of Δ^6 -fatty acid desaturase gene from *Mortierella isabellina* . *Mycosystema(菌物系统)* , 2001 , **20(1)** : 44 - 50
- [3] LIU I (刘莉) , LI M (李明春) , HU G W (胡国武) *et al.* Identification of *Mortierella isabellina* M₆₋₂₂ Δ^6 -fatty acid desaturase by heterologous expression in *Saccharomyces cerevisiae* . *Acta Microbiologica Sinica(微生物学报)* , 2001 , **41(4)** : 397 - 401
- [4] LIU I (刘莉) , LI M (李明春) , HU G W (胡国武) *et al.* Expression of Δ^6 -fatty acid desaturase gene from *Mortierella alpina* in *Saccharomyces cerevisiae* . *Chinese Journal of Biotechnology(生物工程学报)* , 2001 , **17(2)** : 161 - 164
- [5] 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 Molecular Biology* , 1993 , **27** : 293 - 300
- [6] Sayanova O , Smith M A , Lapinskas P *et al.* Expression of a borage desaturase cDNA containing an N-terminal cytochrome b5 domain re-

sults 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] 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
- [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] Nicola H , Morris A , Douglas R T *et al.* A vertebrate fatty acid desaturase with Δ^5 and Δ^6 activities . *Biochemistry* , 2001 , **25** : 14304 - 14309
- [10] 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
- [11] Sakuradani E , Kobayashi M , Shimizu S . Δ^6 -fatty acid desaturase from an arachidonic acid-producing *Mortierella* fungus Gene cloning and its heterologous expression in a fungus *Aspergillus* . *Gene* , 1999 , **238** : 445 - 453
- [12] Sambrook J , Fritsch E F , Maniatis T . *Molecular Cloning* , 2 nd ed , Beijing : Science Press , 1993
- [13] GU H Y (顾红雅) , ZHAI L J (翟礼嘉) , MING X T (明小天) . *Plant gene and molecular manipulation(植物基因与分子操作)* , Beijing : Beijing University Press , 1995
- [14] LI M (李明刚) . *Principle and technique of plant genetic manipulation(植物基因操作原理与技术)* , Tianjin : Tianjin Science and Technology Press , 2000
- [15] HUO B K (侯丙凯) , XIA G M (夏光敏) , CHEN Z H (陈正华) . Strategies for optimizing expression vectors used in plant genetic engineering . *Hereditas(遗传)* , 2001 , **23(5)** : 492 - 497

Expression of *Mortierella isabellina* Δ^6 -fatty Acid Desaturase Gene in γ -linolenic Acid Production in Transgenic Tobacco

LI Ming-Chun LIU Li HU Guo-Wu XING Lai-Jun*

(Department of Microbiology , Nankai University , Tianjin 300071 , China)

Abstract γ -linolenic acid (GLA , C18 :3 $\Delta^{6,9,12}$) is nutritional and important polyunsaturated fatty acid in human and animal diets . GLA play an important role in hormone regulation and fatty acid metabolism . Furthermore it is also the biological precursor of a group of molecules , including prostaglandins , leukotrienes and thromboxanes . Vast majority of oilseed crops do not produce GLA , but linoleic acid (LA , C18 :2 $\Delta^{9,12}$) as its substrate . GLA is only produced by a small number of oilseed plants such as evening primrose (*Oenothera* spp.) , borage (*Borago officinalis*) and *etc.* . Δ^6 -fatty acid desaturase (D6D) is the rate-

Received : 08-01-2002

This work was supported by the grants from National Natural Science Foundation of China (No. 39870020) and Foundation for University Key Teacher by the Ministry of Education .

* Corresponding author . Tel 86-22-23508506 ; Fax 86-22-23508800 ; E-mail : xinglaij@eyou.com

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

limiting enzyme in the production of GLA. It can convert from linoleic acid to linolenic acid. To produce GLA in tobacco, plant expression vector was first constructed. To facilitate preparation of plant expression constructs, flanking *Xba* I and *Bgl* II restriction enzyme sites were added to the coding region of clone pTMICL6 by PCR amplification. pTMICL6 contains Δ^6 -fatty acid desaturase gene cloned from *Mortierella isabellina* which is an oil-producing fungus. The PCR product was purified and subcloned into the plant expression vector pGA643 to generate the recombinant vector pGAMICL6 which contains the ORF of the D6D gene of *Mortierella isabellina*, together with regulatory elements consisting of the cauliflower mosaic virus 35S promoter and the nopaline synthase (nos) termination sequence. The plasmid pGAMICL6 was transformed into *Agrobacterium tumefaciens* strain LBA4404 by method of freeze thawing of liquid nitrogen. Transformants were selected by plating on YEB medium plates containing kanamycin and streptomycin and grown overnight at 28°C, then transformants were further identified by PCR. The positive transformant containing the plant expression vector pGAMICL6 was transformed into tobacco (*Nicotiana tabacum* cv. Xanthi) via *Agrobacterium* infection. Transgenic plants were selected on 100 µg/mL kanamycin. Plants were maintained in axenic culture under controlled conditions. Total nucleic acids were extracted and purified from anti-kanamycin transgenic tobacco and were analysed by PCR. 48 out of 80 transgenic plants were positive, in other words, transformation efficiency is 60%. This shows that *Mortierella isabellina* D6D gene is transformed into tobacco. Genomic DNA from PCR positive transgenic tobacco plants was digested with *Hind* III restriction enzyme and fractionated by agarose gel electrophoresis. Southern blotting was performed with standard procedures for vacuum transfer of nucleic acids to nylon membrane. The probe was Δ^6 -fatty acid desaturase gene from *M. isabellina*, which was labeled with DIG-dUTP via random-primed labeling. Hybridization and immunological detection were carried out the kit of DIG detection. The result shows single hybridizing bands in each of the transgenic tobacco plants DNA, but no hybridization was observed to non-transgenic tobacco. This indicates that Δ^6 -fatty acid desaturase gene is integrated into the genome of transgenic tobacco. To provide further evidence that the introduction of the *M. isabellina* cDNA into the tobacco genome was responsible for the novel desaturation products, total RNA was isolated from GLA-positive transgenic tobacco plants via both PCR and Southern blotting and separated by electrophoresis through 1% formaldehyde agarose gel. Northern blotting including probe labeling, hybridization and detection was the same as Southern blotting in operation approach. A positive hybridization signal of identical mobility was obtained from RNA isolated from the transgenic tobacco plants, but not from the control tobacco plant. At last, total fatty acids extracted from the positive transgenic tobacco were analyzed by gas chromatography (GC) of methyl esters to confirm the transgenic tobacco containing a functional Δ^6 -fatty acid desaturase gene. The result shows that two peaks were observed in the chromatogram of FAMES. GLA and octadecatetraenoic acid (OTA, C18:4 $\Delta^{6,9,12,15}$) respectively have 19.7% and 3.5% of the total fatty acids in the transgenic plant. The presence of both GLA and OTA indicates that the Δ^6 -fatty acid desaturase used both linoleic acid and α -linolenic acid (ALA, C18:3 $\Delta^{6,9,12,15}$) as substrates, and this may be responsible for the decrease in ALA observed in the transgenic line. That was the first report about the expression of *M. isabellina* Δ^6 -fatty acid desaturase gene in tobacco. All results mentioned above have laid the foundation of the thorough studying on an breeding transgenic oilseeds containing GLA to change the fatty acid composition of conventional oilseeds, it is significant to study on regulation mechanism of fatty acid desaturase.

Key words Tobacco, Δ^6 -fatty acid desaturase gene, γ -linolenic acid, *Mortierella isabellina*, transgenic plant