

小眼虫藻 Δ^8 -脂肪酸脱氢酶基因的克隆及其在酿酒酵母中的表达

黎明^{1,2}, 欧秀元¹, 杨向东³, 郭东全³, 钱雪艳³, 邢来君¹, 魏东盛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 天津科技大学生物工程学院 工业微生物教育部重点实验室, 天津 300457
3 吉林省农业科学院生物技术研究中心, 长春 130033

摘要: Δ^8 途径是合成多不饱和脂肪酸的替代途径, Δ^8 -脂肪酸脱氢酶是该途径的关键酶之一。根据已报道的 Δ^8 -脂肪酸脱氢酶基因设计引物, 分别从小眼虫藻基因组 DNA 和 cDNA 中扩增得到该基因片段, 序列分析表明: 结构基因长 1 266 bp, 编码 421 个氨基酸; 该基因没有内含子, 比已经报道的 Δ^8 -脂肪酸脱氢酶基因长 6 bp, 并且 N 末端序列也有所不同。利用酿酒酵母的载体 pYES2.0 构建 Δ^8 -脂肪酸脱氢酶表达载体 pYEF8, 并转化到营养缺陷型酿酒酵母菌株 INVSc1 中, 在选择培养基中筛选得到酿酒酵母转化菌株 YD8。YD8 在合适的培养条件下, 添加外源底物二十碳二烯酸和二十碳三烯酸并诱导基因表达。脂肪酸甲酯气相色谱分析表明小眼虫藻 Δ^8 -脂肪酸脱氢酶基因在酿酒酵母中获得了高效表达, 将二十碳二烯酸和二十碳三烯酸分别转化成二高- γ -亚麻酸和二十碳四烯酸, 其底物转化率分别达到了 31.2% 和 46.3%。

关键词: Δ^8 -脂肪酸脱氢酶, 小眼虫藻, 多不饱和脂肪酸

Cloning of Δ^8 -fatty acid desaturase gene from *Euglena gracilis* and its expression in *Saccharomyces cerevisiae*

Ming Li^{1,2}, Xiuyuan Ou¹, Dongsheng Wei¹, Xiangdong Yang³, Dongquan Guo³, Xueyan Qian³, Laijun Xing¹, and Mingchun Li¹

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

2 Key Laboratory of Industrial Microbiology, Ministry of Education, School of Bioengineering, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300457, China

3 Biotechnology Research Center, Jilin Academy of Agriculture Sciences, Changchun 130033, China

Abstract: Δ^8 desaturase pathway, different from common Δ^6 desaturase pathway, is an alternate pathway of polyunsaturated fatty acids biosynthesis. Δ^8 -fatty acid desaturase is one of the key enzymes in Δ^8 desaturase pathway. Two specific fragments were separately cloned from genomic DNA and cDNA of *Euglena gracilis* by PCR with the primers designed according to the reported

Received: February 8, 2010; **Accepted:** May 17, 2010

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

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

国家自然科学基金 (No. 30771355), 国家高技术研究发展计划 (863 计划) (No. 2007AA10Z189), 教育部博士点基金新教师项目 (No. 20070055061) 资助。

sequence. Comparison of the genomic and cDNA sequences revealed that there wasn't intron in this Δ^8 -fatty acid desaturase gene. This gene has an open reading frame of 1 266 bp that encodes 421 amino acids. It is 6 bp longer than the reported gene sequence, and also showed certain difference from the reported sequence in the N-terminal. The recombinant expression plasmid pYEFB by subcloning Δ^8 -fatty acid desaturase gene into the yeast-*E. coli* shuttle vector pYES2.0 was constructed and was transformed into the defective mutant INVSc1 of *Saccharomyces cerevisiae* by electrotransformation. The resulting strain YD8 harboring plasmid pYEFB was selected and was cultured in the induction medium with exogenous substrates $\omega 6$ -eicosadienoic acid and $\omega 3$ -eicosatrienoic acid for the expression of Δ^8 -fatty acid desaturase gene. The results indicated that high level expressed Δ^8 -fatty acid desaturase could convert $\omega 6$ -eicosadienoic acid and $\omega 3$ -eicosatrienoic acid to dihomo- γ -linolenic acid and eicosatetraenoic acid with substrate conversion ratio 31.2% and 46.3%, respectively.

Keywords: Δ^8 -fatty acid desaturase, *Euglena gracilis*, polyunsaturated fatty acids

多不饱和脂肪酸 (Polyunsaturated fatty acid, PUFAs) 是指含有 2 个或 2 个以上顺式双键、碳原子数为 16 至 22 的直链脂肪酸^[1]。主要包括 γ -亚麻酸 (γ -linolenic acid, GLA)、二高- γ -亚麻酸 (Dihomo- γ -linolenic acid, DGLA)、花生四烯酸 (Arachidonic acid, ARA)、二十碳五烯酸 (Eicosapentaenoic acid, EPA)、二十二碳六烯酸 (Docosahexaenoic acid, DHA) 等。多不饱和脂肪酸是以多种形式存在于细胞中, 如细胞膜、储存脂、甘油三酯磷脂、鞘脂和脂蛋白等。作为生物膜结构中磷脂的重要成分之一, PUFAs 的种类、数量、饱和度的改变会直接影响生物膜的刚性结构, 因此影响了与刚性结构相关的各种生理功能。经过研究发现 PUFAs 与包括心血管疾

病、糖尿病、关节炎、牛皮癣、溃疡性结肠炎在内的多种慢性疾病相关, 并且可以通过影响细胞的增殖和信号传导途径来影响癌症的发生和发展情况^[2-4]。最近的研究表明, PUFAs 还能影响骨骼的生长与修复过程。不仅如此, PUFAs 还能作为一种重要的生理活性物质影响胎儿的发育^[5]。因此 PUFAs 的生物合成以及合成途径中的一些关键酶受到广泛的关注。

多不饱和脂肪酸的代谢从硬脂酸 (Stearic acid, SA) 开始, 经过一系列的脱氢和延长反应, 形成各种不同的 PUFAs, 主要包括经典的 Δ^6 合成途径和替代的 Δ^8 合成途径 (图 1)。 Δ^6 合成途径广泛存在于微生物中, 其关键酶 Δ^6 脱氢酶和 Δ^6 延长酶及其基因已经被广泛克隆和研究。 Δ^8 合成途径主要存在于一

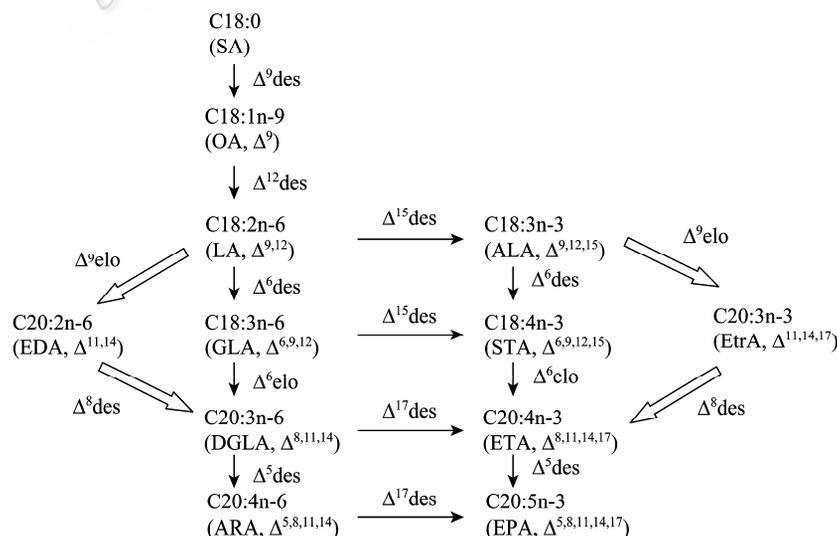


图 1 多不饱和脂肪酸的合成途径

Fig. 1 Pathways of polyunsaturated fatty acid synthesis. The common Δ^6 pathway is indicated by solid arrows and the alternate Δ^8 pathway is indicated by hollow arrows. Des: desaturase; elo: elongase; SA: Stearic acid; OA: Oleic acid; LA: Linoleic acid; ALA: α -linolenic acid; STA: stearidonic acid; ETA: eicosatetraenoic acid; EDA: $\omega 6$ -eicosadienoic acid; ETrA: $\omega 3$ -eicosatrienoic acid; EPA: eicosapentaenoic acid; GLA: γ -linolenic acid; DGLA: dihomo- γ -linolenic acid; ARA: arachidonic acid; EPA: eicosapentaenoic acid.

些藻类微生物,其关键酶基因 Δ^8 脱氢酶基因和 Δ^9 延长酶基因首先被 Wallis 等^[6]和 Qia 等^[7]从小眼虫藻和球等鞭金藻中克隆出来,并在酿酒酵母中进行了功能验证。Fraser 等^[8]用这 2 个基因在转基因拟南芥植物中重构了 Δ^8 合成途径并且合成了 ARA 和 EPA。但是,其他关于 Δ^8 脱氢酶基因和 Δ^9 延长酶基因的报道却很少。

ARA 和 EPA 等人体必需的 PUFAs 在植物油中含量极低,主要从深海鱼油中提取。由于资源匮乏,而且受季节、产地等因素的影响,鱼油中的 ARA、EPA 等含量低且不稳定,产品已经不能满足市场需求。虽然一些藻类的多不饱和脂肪酸 (PUFAs) 含量高^[9],但生物量低,培养条件对多不饱和脂肪酸的产量影响较大,产业化前景暗淡。大豆是我国主要的油料作物,如果能在大豆种子中合成 ARA 和 EPA,可以提高大豆油的品质。 Δ^8 -脂肪酸脱氢酶基因的克隆及其在酿酒酵母中的表达,不仅为生产含 ARA 和 EPA 的转基因大豆奠定基础;同时,不同 Δ^8 -脂肪酸脱氢酶基因的克隆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。

1 材料与方法

1.1 藻种、菌种和载体

小眼虫藻 *Euglena gracilis* FH277 购自中国科学院水生生物研究所淡水藻种库;大肠杆菌 *Escherichia coli* DH5 α 由本实验室保存;pGEM-T easy 载体试剂盒购自 Promega 公司;表达载体 pYES2.0 和酿酒酵母 *Saccharomyces cerevisiae* 营养缺陷型 INVSc1 (MATa his3 Δ 1 leu2 trp1-289 ura3-52/MAT α his3 Δ 1 leu2 trp1-289 ura3-52) 购自 Invitrogen 公司。

1.2 酶及试剂

限制酶 *Bam*H I、*Not* I、T4 DNA 连接酶、X-gal、IPTG 购自宝生物工程(北京)有限公司;逆转录酶购自 Promega 公司;EDA、EtrA、DGLA 和 ETA 标准品购自 Cayman chemical 公司;NP-40、CTAB 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;TRNzol 总 RNA 提取试剂购自天根生

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^[10],酵母营养缺陷型选择 SC-Ura 培养基和诱导表达培养基的配制按照 Invitrogen 公司操作手册进行。小眼虫藻养殖使用 HUT 培养基^[6]。

1.4 引物设计、合成与序列测定

引物(表 1)合成和序列测定均由上海生工完成。

表 1 本研究所用引物

Table 1 Primers used in this study

Primer name	Primer sequence (5'-3')
TEFDF	ATGAAGTCAAAGCGCCAAGC
TEFDR	TTATAGAGCCTTCCCCGCG
YEFDF	TTCGGATCCGCCACCATGAAGTCAAA GCGCCAAGCGC
YEFDR	ATCCTCGAGTTATAGAGCCTTCCCCGCG GGGTTG

为了克隆 Δ^8 -脂肪酸脱氢酶基因,根据已经报道的小眼虫藻 Δ^8 -脂肪酸脱氢酶基因序列 (GenBank Accession No. AF139720) 设计引物 TEFDF、TEFDR,引物没有引入限制性酶切位点。为了构建表达载体 pYEFDF,根据克隆测序的 EFD 基因序列以及酿酒酵母表达载体 pYES2.0 的多克隆位点设计引物 YEFDF、YEFDR,并分别被引入限制性酶切位点 *Bam*H I 和 *Xho* I (下划线部分)。同时,为了能够准确识别翻译起始密码子和提高翻译效率,在起始密码子上游加入了酵母一致序列 GCCACC。

1.5 小眼虫藻 Δ^8 -脂肪酸脱氢酶基因的克隆

将小眼虫藻接种到 150 mL HUT 培养基中,22 $^{\circ}$ C 培养 3 d,每天光照 12 h,摇动 1~2 次。5 000 r/min 离心收集藻体,分别用 TRNzol 法提取小眼虫藻的总 RNA 和 CTAB 法提取小眼虫藻的基因组 DNA。按照 Promega 公司的逆转录酶说明书,以小眼虫藻总 RNA 为模板,以 TEFDR 为引物合成 cDNA,冻存于 -20 $^{\circ}$ C 备用。

以 TEFDF 和 TEFDR 为引物,以小眼虫藻基因组和总 cDNA 为模板分别进行 PCR 扩增。PCR 扩增条件为:94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min;然后 94 $^{\circ}$ C 变性 40 s,55 $^{\circ}$ C 退火 30 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 1.5 min,30 个循环;最后

72℃延伸 10 min。扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳，目的片段用凝胶回收试剂盒回收，然后连接到 pGME-T easy 载体，转化大肠杆菌 DH5 α ，先通过菌落 PCR 筛选阳性克隆，然后将阳性克隆提质粒进行酶切验证，最后将验证正确的质粒送上海生工测序。重复 3 次。

1.6 表达载体的构建、转化与 Δ^8 -脂肪酸脱氢酶基因的诱导表达

以测序正确 Δ^8 -脂肪酸脱氢酶基因 ORF 为模板，以 YEFDF、YEFDR 为引物进行 PCR 扩增，PCR 产物和表达载体 pYES2.0 分别用 *Bam*H I 和 *Xho* I 双酶切，将目的片段回收之后连接，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考文献 [10]。筛选转化子，经过 PCR 和酶切检测，得到重组质粒 pYEFD。将质粒 pYES2.0 和 pYEFD 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，分别作为对照菌株和工程菌株 YD8。酿酒酵母电击转化方法和质粒提取方法参考文献 [11]。

将对照菌株和工程菌株 YD8 接种到 100 mL 三角瓶装有 15 mL 的 SC-Ura 的液体培养基中，在 30℃ 和 180 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 诱导培养基中，使 OD_{600} 达到 0.4，同时在培养基中添加终浓度为 0.1 mol/L 的底物 EDA 和 EtrA。22℃ 和 180 r/min 条件下诱导培养 72 h，收获菌体。

1.7 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℃ 烘干 10 h 后，磨碎。加入 5% KOH-CH₃OH 溶液，70℃ 反应 2 h，之后加入 14% BF₃-CH₃OH，70℃ 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。

1.8 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 8 cm/s。分流比 100:1，气化温度 280℃，柱温 240℃，尾吹 32 mL/min，检测器为氢火焰离子化检测器，上样量 2 μ L。

1.9 转化率的计算方法

转化率=产物所占总脂肪酸的含量/(产物所占总脂肪酸的含量+底物所占总脂肪酸的含量) \times 100%。重复试验 3 次，求平均值。

2 结果

2.1 Δ^8 -脂肪酸脱氢酶基因克隆与序列分析

提取小眼虫藻的总 RNA，并以 TEFDR 为引物反转录得到 cDNA，再提取小眼虫藻的基因组，分别以 cDNA 和基因组 DNA 为模板，以 TEFDF 和 TEFDR 为引物进行 PCR 扩增，都得到了约 1.2 kb 的片段 (图 2)。将 2 个片段分别连接到 pGEM-T easy 载体上构建成载体 pTEFD 和 pTEFDm，转化大肠杆菌 DH5 α ，筛选阳性克隆并测序。测序结果表明：2 种方式克隆的片段均为 1 266 bp，是一个完整的 ORF，共编码 421 个氨基酸；同时还发现，该基因没有内含子。该基因序列已经提交到 GenBank (Accession No. GU812432)。已经报道的小眼虫藻 Δ^8 -脂肪酸脱氢酶基因序列 (GenBank Accession No. AF139720) 所编码的脱氢酶被定义为 EFD1，所以将我们克隆的小眼虫藻 Δ^8 -脂肪酸脱氢酶基因序列所编码的脱氢酶定义为 EFD2。

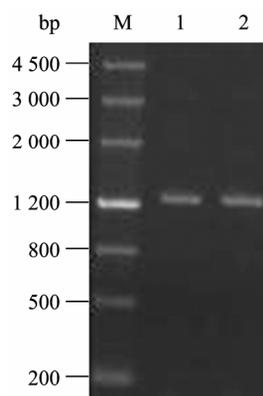


图 2 PCR 产物电泳图

Fig. 2 Electrophoresis analysis of PCR product. M: DNA marker III; 1: cDNA PCR; 2: genome DNA PCR.

efd1 基因为 1 260 bp，编码 419 个氨基酸，比 *efd2* 短 6 bp、2 个氨基酸。利用软件 DNAMAN 对 *efd1* 和 *efd2* 进行比较，两者核苷酸相似性 98.5%，氨基酸相似性 96.4%。由图 3 可以看出，EFD1 和

EFD2 的主要区别在于 N 端氨基酸残基不同, 后面虽然也有 6 个氨基酸残基不一样, 但是, 3 个典型的组氨酸模体 (Motif) HXXXHH、HXXHH 和 QXXHH 和一个细胞色素 b5 样的结构域却没有改变, 具有典型的脂肪酸脱氢酶的结构特征。

2.2 表达载体 pYEFD 的构建与鉴定

将以载体 pTEFD 为模板, 以 YEFDF、YEFDR

为引物进行 PCR 扩增的产物和载体 pYES2.0 分别用 *Bam*H I 和 *Xho* I 双酶切, 回收连接之后, 转化到大肠杆菌 DH5 α 中, 从含有 Amp 的 LB 平板上随机挑选转化子, 小量提取质粒, 分别通过 PCR 和酶切验证 (图 4), 最后将验证正确的质粒送上海生工测序, 序列与阅读框架正确, 表明表达载体 pYEFD 构建成功。

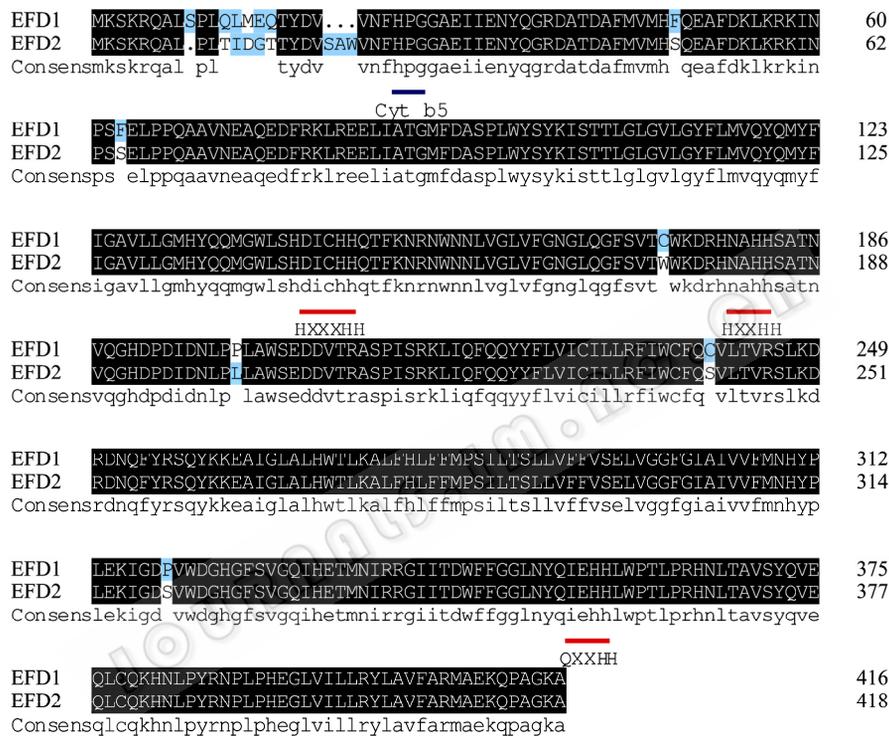


图 3 EFD1 和 EFD2 氨基酸序列比较

Fig. 3 Alignment of amino acid sequences of EFD1 and EFD2.

2.3 Δ^8 -脂肪酸脱氢酶基因诱导表达

将空载体 pYES2.0 和表达载体 pYEFD 电击转化到酿酒酵母缺陷型 INVSc1 中, 在 SC-Ura 平板上筛选到转化空载体的对照菌株和转化 pYEFD 的工程菌株 YD8。对照菌株和工程菌株先接种在碳源为蔗糖的 SC-Ura 培养基中培养过夜, 然后转接到碳源为半乳糖并添加有底物 EDA 和 EtrA 诱导培养基中 22 $^{\circ}$ C 培养 72 h, 收集菌体, 提取脂肪酸并甲酯化后进行气相色谱分析, 结果如图 5 所示。图 5A 标准品 EDA、DGLA、EtrA 和 ETA, 出峰时间分别为 21.337 min、22.301 min、23.544 min 和 24.669 min。图 5B 为转化了空载体 pYES2.0 的对照菌株, 由于

加入了底物 EDA 和 EtrA, 所以在相应时间点出现了底物峰。图 5C 为转化了 pYEFD 的工程菌株 YD8。与图 5B 对比, 除了相应位置的底物峰而外, 还出现

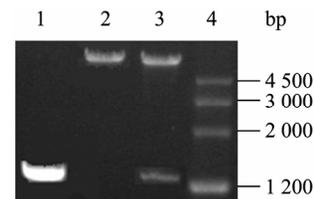


图 4 重组质粒 pYEFD 的鉴定

Fig. 4 Identification of recombinant plasmid pYEFD. 1: PCR product of pYEFD; 2: pYES2.0 digested with *Bam*H I and *Xho* I; 3: pYEFD digested with by *Bam*H I and *Xho* I; 4: DNA marker III.

了 DGLA 和 ETA 的产物峰。说明 EDA 经过 Δ^8 脱氢转变成 DGLA, EtrA 经过 Δ^8 脱氢转变成 ETA, 也说明克隆的 EFD2 基因产物具有位置专一的 Δ^8 -脂肪酸脱氢酶活性。经过 3 次重复试验进行计算, 转化菌株 YD8 中的 DGLA 和 ETA 分别占总脂肪酸含量的 8.32% 和 9.24%, 底物 EDA 和 EtrA 转化率分别达到了 31.2% 和 46.3%。

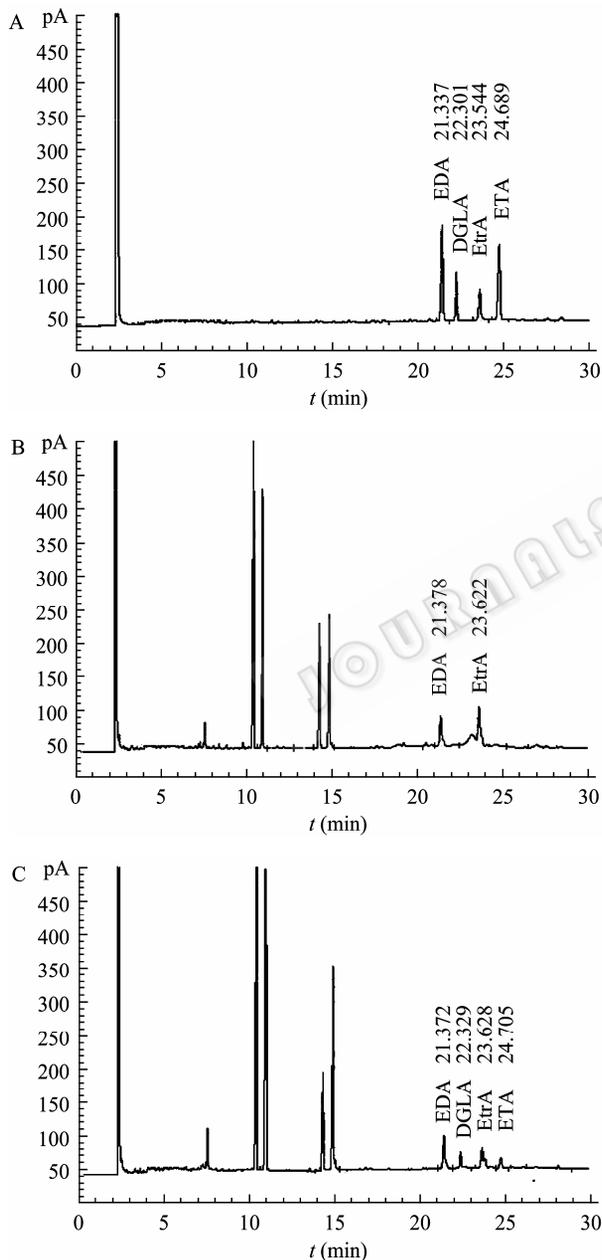


图 5 酿酒酵母总脂肪酸气相色谱分析图

Fig. 5 GC analysis of fatty acid methyl esters of total lipids of *S. cerevisiae* grown under inducing conditions. (A) Standard of EDA, DGLA, EtrA and ETA. (B) INVSc1 transformed with pYES2.0. (C) INVSc1 transformed with pYPTD5.

3 讨论

Δ^8 途径和 Δ^6 途径的主要区别是 Δ^8 途径是先经过 Δ^9 -延长酶催化延长 2 个碳原子后再在 Δ^8 位脱氢形成 20 碳的多不饱和脂肪酸, 因此 Δ^8 途径的关键酶是 Δ^9 -延长酶和 Δ^8 -脱氢酶; Δ^6 途径是先在 Δ^6 位脱氢后再经过 Δ^6 -延长酶催化延长 2 个碳原子形成 20 碳的多不饱和脂肪酸, 因此 Δ^6 -脱氢酶催化 Δ^6 位脱氢是该途径的限速步骤。小眼虫藻是单细胞的裸藻, 由于缺乏 Δ^6 -脱氢酶, 是通过 Δ^8 途径合成并积累大量的多不饱和脂肪酸。目前, Δ^8 途径主要存在于原生动物 *Tetrahymena pyriformis*、变形虫 *Acanthamoeba* sp.、眼虫藻和金藻。但是目前只有眼虫藻 Δ^8 -脱氢酶基因已被克隆, 因此, 新的 Δ^8 -脱氢酶基因的克隆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。

所有鉴定的脂肪酸脱氢酶都有几个短且高度保守的区域: 即 3 个组氨酸模体 HXXXHH、HXXHH 和 HXXHH, 这 3 个组氨酸模体及其相对位置对于酶活性是必需的。 Δ^5 -和 Δ^6 -脱氢酶的 N-末端还有一个细胞色素 b5 样的结构域, 这时脱氢酶的第 3 个组氨酸模体就变成 QXXHH^[12]。我们克隆的 Δ^8 -脱氢酶 N-末端包含一个细胞色素 b5 样的结构域和改变了的第 3 个组氨酸模体 QXXHH, 说明 Δ^8 -脱氢酶在结构上是和 Δ^5 -和 Δ^6 -脱氢酶一致的。我们进行了 3 次重复实验, 克隆的 Δ^8 -脱氢酶基因的氨基酸序列与文献报道的 Δ^8 -脱氢酶基因的氨基酸序列相似性为 96.4%, 其组氨酸模体和细胞色素 b5 样结构域完全一致, 主要是细胞色素 b5 样结构域之前的 N-末端序列不同。我们还试图从小眼虫藻 FH849 和 FH850 (均购自中国科学院水生生物研究所淡水藻种库) 中克隆 Δ^8 -脱氢酶基因, 无论是以基因的 5' 和 3' 末端还是以保守区域组氨酸模体和/或细胞色素 b5 样结构域设计引物, 都没有克隆出 Δ^8 -脱氢酶基因 (数据未显示), 这说明, 不同小眼虫藻的 Δ^8 -脱氢酶基因序列不同, 甚至相差很大, 而且, Δ^8 -脱氢酶基因序列可能还反映出不同小眼虫藻的进化及亲缘关系的远近。

由于酿酒酵母缺乏内源的多不饱和脂肪酸, 因此酿酒酵母成为鉴定多不饱和脂肪酸脱氢酶和延长

酶活性及其底物专一性的理想宿主^[6-7,13]。当我们在培养基中添加底物 EDA 和 EtrA 诱导酿酒酵母工程菌 YD8 表达 EFD2 时, 有产物 DGLA 和 ETA 生成, 由于工程菌缺乏内源的 DGLA 和 ETA, 说明是 EDA 经过 Δ^8 脱氢转变成 DGLA, EtrA 经过 Δ^8 脱氢转变成 ETA, 说明 EFD2 基因产物具有 Δ^8 -脂肪酸脱氢酶活性; 同样, 当我们在培养基中添加底物 LA 和 ALA 诱导酿酒酵母工程菌 YD8 表达 EFD2 时, 却没有新的产物生成 (数据未显示), 说明 EFD2 基因产物具有位置专一的 Δ^8 -脂肪酸脱氢酶活性。

Δ^8 -脂肪酸脱氢酶克隆对于用 Δ^8 途径生产多不饱和脂肪酸具有重要意义。已经有研究者将该途径引入到拟南芥中并且成功合成了 ARA 和 EPA^[8]。大豆是我国最主要的油料作物, 含有丰富的 Δ^8 途径底物 LA 和 ALA, 如果在大豆中重构 Δ^8 途径, 就可以在大豆种子中合成 ARA 和 EPA, 提高大豆油的品质。本实验室已经克隆了大豆种子特异性启动子 BCSP952^[14]、 Δ^9 -脂肪酸延长酶 ASE2 (结果另文发表) 基因和 Δ^5 -脂肪酸脱氢酶基因^[15], 为大量合成 ARA 和 EPA 的转基因大豆提供了参考。

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] Wallis JG, Browse J. The Δ^8 -desaturase of *Euglena gracilis*: an alternate pathway for synthesis of 20-carbon polyunsaturated fatty acids. *Arch Biochem Biophys*, 1999, **365**(2): 307–316.
- [7] Qia B, Beaudoin F, Fraser T, *et al.* Identification of a cDNA encoding a novel C18- Δ^9 polyunsaturated fatty acid-specific elongating activity from the docosahexaenoic acid (DHA)-producing microalga, *Isochrysis galbana*. *FEBS Lett*, 2002, **510**: 159–165.
- [8] Fraser T, Qia B, Elhussein S, *et al.* Expression of the isochrysis C18- Δ^9 polyunsaturated fatty acid specific elongase component alters *Arabidopsis* glycerolipid profiles. *Plant Physiol*, 2004, **135**: 859–866.
- [9] Yongmanitchal W, Ward OP. Screening of algae for potential alternative sources of eicosapentaenoic acid. *Phytochemistry*, 1991, **30**(9): 2963–2967.
- [10] Sambrook J, Russel DW. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3rd ed. Beijing: Science Press, 2002.
- [11] J. 萨姆布鲁尔, D. W. 拉塞尔. *分子克隆实验指南*. 3 版. 北京: 科学出版社, 2002.
- [11] Adams A, Gottschling DE, Kaiser CA, *et al.* *Methods in Yeast Genetics: A Cold Spring Harbor Laboratory Course Manual*. Beijing: Science Press, 2000.
- [11] A. 亚当斯, D. E. 戈特施林, C. A. 凯泽, 等. *酵母遗传学方法实验指南*. 北京: 科学出版社, 2000.
- [12] Tocher DR. Recent advances in the biochemistry and molecular biology of fatty acyl desaturases. *Prog Lipid Res*, 1998, **37**: 73–17.
- [13] Napier JA, Michaelson LV. Genomic and functional characterization of polyunsaturated fatty acid biosynthesis in *Caenorhabditis elegans*. *Lipids*, 2001, **36**: 761–766.
- [14] Caiyin QGL, Li MC, Cai Y, *et al.* Isolation and sequencing analysis of the seed-specific promoter from soybean. *Acta Agron Sin*, 2005, **31**(1): 11–17.
- [14] 财音青格乐, 李明春, 蔡易, 等. 大豆种子特异性启动子的克隆及序列分析. *作物学报*, 2005, **31**(1): 11–17.
- [15] Yang Z, Wei DS, Xing LJ, *et al.* Cloning and expression in *Saccharomyces cerevisiae* of Δ^5 -fatty acid desaturase gene from *Phaeodactylum tricorutum*. *Chin J Biotech*, 2009, **25**(2): 195–199.
- [15] 杨哲, 魏东盛, 邢来君, 等. 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. *生物工程学报*, 2009, **25**(2): 195–199.