

海洋破囊壶菌 Δ^4 -脂肪酸脱饱和酶基因在 酿酒酵母中的表达*

陈金卿 江贤章 刘丽霞 黄建忠**

(福建师范大学工业微生物教育部工程研究中心 福州 350108)

摘要 :以质粒 pGEM-TFAD4 为模板,扩增获得 1.6 kb 的 Δ^4 -脂肪酸脱饱和酶基因(*FAD4*)。将 *FAD4* 酶切后连接到 *Hind*III/*Xba*I 处理过的 pYES2.0 载体,构建重组表达质粒 pYFAD4。转化酿酒酵母缺陷型菌 INVSc1,通过 SC-U 选择性培养基筛选阳性克隆子。添加外源脂肪酸 C22:5 底物,半乳糖诱导表达。气相色谱分析表明阳性克隆子总脂肪酸中出现了二十二碳六烯酸 C22:6 (占酵母总脂肪含量的 41.13%), Δ^4 -脂肪酸脱饱和酶基因在酿酒酵母中得到了表达。

关键词 海洋破囊壶菌 FJN-10,二十二碳六烯酸, Δ^4 -脂肪酸脱饱和酶,酿酒酵母
中图分类号 :Q93 **文献标识码** :A **文章编号** :0253-2654(2007)06-1154-04

Expression of *Thraustochytrium* sp. FJN-10 Δ^4 -Desaturase Gene in *Saccharomyces cerevisiae**

CHEN Jin-Qing JIANG Xian-Zhang LIU Li-Xia HUANG Jian-Zhong**

(Engineering Research Center of Industrial Microbiology, Ministry of Education, Fujian Normal University, Fuzhou 350108)

Abstract :1.6 kb Δ^4 -desaturase gene(*FAD4*) was amplified by PCR using plasmid pGEM-TFAD4 as template. The fragment was subcloned into the *Hind*III/*Xba*I restriction site of pYES2.0 vector. Recombinant plasmid pYFAD4 was transformed into *Saccharomyces cerevisiae* strain INVSc1 for expression. It was found to exhibit Δ^4 -fatty acid desaturase activity in the recombinant *S. cerevisiae* YFAD4 in the presence of exogenous fatty acid substrate docosapentaenoic acid(100 μ mol/L) under introduction of GAL1. Expression of the *FAD4* under appropriate media and temperature conditions led to the production of DHA and it reached 41.13% of the total yeast fatty acid by GC detection. It was suggested that the protein encoded by *FAD4* could specifically catalyze DPA into DHA.

Key words :*Thraustochytrium* sp. FJN-10, DHA, Δ^4 -desaturase, *Saccharomyces cerevisiae*

二十二碳六烯酸(Docosahexaenoic acid,简称DHA)具有促进婴幼儿视网膜、大脑发育、预防心血管疾病、抑制肿瘤生成等重要生理功能^[1-3],市场潜力巨大。海洋破囊壶菌(*Thraustochytrium*)已被证实为DHA的理想生产菌株^[4,5],其DHA生物合成是在一系列前体脂肪酸的基础上,通过脱饱和酶(Desaturase)催化的脱饱和反应以及延长酶(Elongase)催化的碳链延长反应而实现的^[6,7]。 Δ^9 -desaturase^[8], Δ^{12} -desaturase^[9]以及 Δ^6 -desaturase^[10,11]在长链高度不饱和脂肪酸合成过程中的功能已得到确认。作为DHA生物合成最关键的 Δ^4 -desaturase已

成为当前不饱和脂肪酸生物合成领域的研究热点。迄今,只从眼虫(*Euglena gracilis*)^[12]、微藻(*Pavlova*)^[13]和*Thraustochytrium* sp. ATCC 2168^[14]中成功克隆了能利用底物 Adrenic acid(ADA, C22:4 $\Delta^{7,10,13,16}$ n-6)合成 Docosapentaenoic acid(DPA, C22:5 $\Delta^{4,7,10,13,16}$ n-6)的 Δ^4 -desaturase。本课题组通过RT-PCR结合RACE从DHA高产菌株*Thraustochytrium* sp. FJN-10中成功克隆了 Δ^4 -desaturase(*FAD4*)全长序列(GenBank accession No. DQ133575)^[15]。本研究通过*FAD4*在酿酒酵母细胞中的异源表达来揭示其生物学功能。

* 国家自然科学基金项目(No. 30370028),福建省科技厅重大项目(No. 2003F005)

** 通讯作者 Tel: 0591-22868212, E-mail: hjz@fjnu.edu.cn

收稿日期: 2007-04-30, 修回日期: 2007-06-18

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌种与质粒 :质粒 pGEM-TFAD4 由福建师范大学工业微生物教育部工程研究中心提供。酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)营养缺陷型 INVSc1、pYES2.0 购自 Invitrogen 公司。

1.1.2 培养基 :SC-U 合成培养基 :无氨基酸氮源 YNB 0.67% 碳源棉子糖 2% ,氨基酸混合物 I(腺嘌呤、精氨酸、半胱氨酸、亮氨酸、赖氨酸、苏氨酸和色氨酸) 0.01% ,氨基酸混合物 II(天冬氨酸、组氨酸、异亮氨酸、蛋氨酸、苯丙氨酸、脯氨酸、丝氨酸、酪氨酸和缬氨酸) 0.005%。

诱导培养基 :在 SC-U 液体培养基中添加 2% 半乳糖和 1% NP-40 进行诱导表达。

1.1.3 主要试剂 :T4 DNA 连接酶、限制性内切酶 *Hind* III 和 *Xba* I 购自 Promega 公司 ;SC-U 培养基所需的各种氨基酸、NP-40、各种脂肪酸甲酯标准品 购自 Sigma 公司。其余试剂均为进口超级纯或国产分析纯以上产品。

1.2 方法

1.2.1 Δ^4 -脂肪酸脱饱和酶基因的扩增 :根据 Kozak^[16~18]提出的真核生物偏好转译起始密码子周边序列,将 *FAD4* 基因转译起始密码子 ATG 上游 +4 位的 A 替换为 G,同时根据表达载体 pYES2.0 多克隆位点,在 5' 端分别引入 *Hind* III 和 *Xba* I 限制性酶切位点设计引物 P1、P2(表 1)。以质粒 pGEM-TFAD4 为模板,PCR 扩增 *FAD4* 基因,反应体系组成 :10 × Buffer(含 20mmol/L MgCl₂) 5 μ L, dNTP(10mmol/L) 4 μ L, pGEM-TFAD4 1 μ L, 引物 P1(10 μ mol/L) 1 μ L, 引物 P2(10 μ mol/L) 1 μ L, Advantage polymerase(5U/ μ L) 1 μ L, 去离子水补足至 50 μ L;扩增条件 :95 $^{\circ}$ C 5min ;95 $^{\circ}$ C 30s ;55 $^{\circ}$ C 30s ;72 $^{\circ}$ C 1min ;30 个循环 ;72 $^{\circ}$ C 10min。1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物。

表 1 Δ^4 -脂肪酸脱饱和酶基因全长引物

引物名称	引物序列 5'→3'
P1	CCC <u>AAGCCT</u> ATTATGGCGGTCGGCTAC
P2	GC TCTAGATCAGGCAGCGCGCTGC

注 :引物 P1 和 P2 5' 端的划线部分分别代表 *Hind* III 和 *Xba* I 限制性酶切位点

1.2.2 重组表达质粒的构建及转化 :用限制性内切酶 *Hind* III 和 *Xba* I 对 PCR 回收产物和表达载体 pYES2.0(20ng/ μ L DNA)分别进行双酶切并回收,4 $^{\circ}$ C 过夜连接。连接反应体系 :PCR 产物酶切片段 8 μ L 载体酶切片段 2 μ L,10 × T4 DNA ligase 缓冲液 2 μ L,T4 DNA ligase 2 μ L,去离子水补足至 20 μ L。

连接产物转化大肠杆菌 TOP10 感受态细胞。涂布在含氨苄青霉素(100 μ g/mL)的 LB 平板上,37 $^{\circ}$ C 过夜培养。引物 P1、P2 菌落 PCR 验证,碱裂解法提取重组质粒。重组质粒和载体 pYES2.0 分别用限制性内切酶 *Hind* III 和 *Xba* I 进行双酶切鉴定,最终获得重组质粒 pYFAD4。表达载体 pYES2.0 与重组质粒 pYFAD4 分别转化酿酒酵母缺陷型菌株 INVSc1,在 SC-U 培养基上筛选阳性克隆子。酿酒酵母感受态细胞的制备和转化参照 *S. c.* EasyCompTM Transformation Ki(invitrogen)操作说明。

1.2.3 酿酒酵母工程菌的诱导表达 :挑取 SC-U 平板上阳性克隆子 YFAD4 和 YES2.0,分别接种于 5mL SC-U 选择性培养基,振荡过夜培养(30 $^{\circ}$ C,250r/min),以 5% 接种量加入到含 1% NP-40 的 100mL SC-U 液体培养基中,添加外源脂肪酸底物二十二碳五烯酸(Docosapentaenoic acid, ω 3-DPA,22:5 $\Delta^{7,10,13,16,19}$ -n-3)至终浓度为 100 μ mol/L,30 $^{\circ}$ C 继续培养。当酵母细胞密度达到 $OD_{600} = 0.2$ 时,加入 2% 半乳糖诱导,20 $^{\circ}$ C 继续培养 72h,收集菌体。

1.2.4 重组产物气相色谱分析 :培养液 5000r/min 离心 10min,得湿菌体,50 $^{\circ}$ C 烘干。称取干菌体 0.3g 于带塞试管中,加 1.5mL 蒸馏水,混匀后加入 1.5mL 盐酸,剧烈震荡 2min,70 $^{\circ}$ C 保温 1h,至菌体完全裂解。加入 2mL 10% 盐酸甲醇溶液,62 $^{\circ}$ C 酯化 3h。冷却后,加入 2mL 正己烷,剧烈震荡 1min,6000r/min 离心 5min,取上层正己烷液相于另一具塞试管中,氮气吹干溶剂,用 100 μ L 正己烷回溶,使用 Sigma 公司的脂肪酸甲酯标准品作为对照进行 GC 分析。GC 分析条件 :HP6890 气相色谱仪(安捷伦),FID 检测器。HP-INNOWAX 极性毛细管柱,0.5 μ m × 0.32mm × 30m;载气为 N₂;总流量 18mL/min,柱流量 1.5mL/min,恒定流量;燃气为 H₂ 和空气,流量分别为 30mL/min 和 400mL/min;不分流模式;进样量 2 μ L,进样口温度 220 $^{\circ}$ C;检测器温度 280 $^{\circ}$ C;升温程序 :50 $^{\circ}$ C 保持 1min,15 $^{\circ}$ C/min 升温至 200 $^{\circ}$ C,3 $^{\circ}$ C/min

升温至 250℃,保持 5min。

2 结果

2.1 Δ^4 -脂肪酸脱饱和酶基因的扩增

以含 *FAD4* 基因的质粒 pGEM-T*FAD4* 为模板, P1、P2 为引物进行 PCR 扩增。1.0% 的琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 扩增产物,大小约 1.6 kb(图 1),与目的条带大小相符。

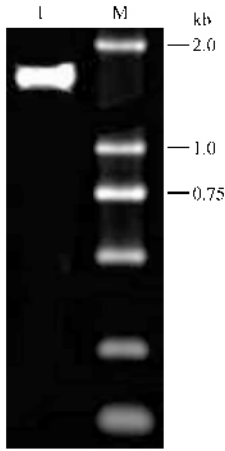


图 1 *FAD4* 基因片段的扩增

2.2 重组表达质粒的构建与鉴定

用限制性内切酶 *Hind*III 和 *Xba*I 将回收纯化的 PCR 产物和表达载体 pYES2.0 分别进行双酶切,酶切回收产物按照 T4 DNA 连接酶的操作说明进行连接,构建出重组表达载体 pYFAD4(图 2),实现 *FAD4* 基因插入启动子 *pGAL1* 和 T7 的表达框内。

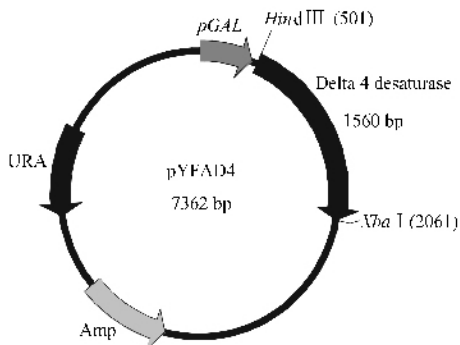


图 2 重组表达质粒 pYFAD4 的构建

从含氨苄青霉素(100 μ g/mL)的 LB 平板上随机挑取大肠杆菌阳性转化子,过夜培养。菌落 PCR(图 3A)鉴定表明阳性转化子含有 1.6kb 的目的基因。*Hind*III 和 *Xba*I 双酶切验证(图 3B)阳性转化子所含的重组质粒 pYFAD4 出现了 5.9kb 和 1.6kb 两条

目的条带,而对照质粒 pYES2.0 只有 5.9kb 一条带。上述结果充分表明重组表达质粒(命名为 pYFAD4)构建成功。

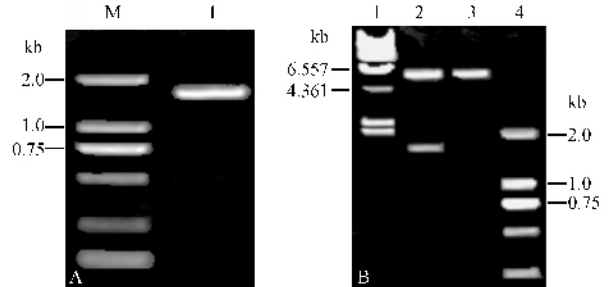


图 3 重组表达质粒 pYFAD4 的鉴定

A:菌落 PCR 鉴定, M:DL2000 marker, I:PCR 产物; B:重组表达质粒 pYFAD4 的双酶切鉴定, 1: λ -*Hind*III marker, 2:*Xba*I 和 *Hind*III 双酶切重组质粒 pYFAD4, 3:*Xba*I 和 *Hind*III 双酶切 pYES2.0, 4:DL2000 marker

2.3 酿酒酵母工程菌的诱导表达

将重组表达质粒 pYFAD4 及空载体 pYES2.0 分别转化酵母细胞,获得转化子 YFAD4 及对照菌株 YES2.0,半乳糖诱导后,分别提取转化子与对照菌细胞总脂肪酸,制备甲酯。对照菌株 YES2.0(图 4A)中出现与脂肪酸底物 DPA 相对应的峰(保留时间为 22.169min)。而在转化子 YFAD4(图 4B)中除了出现底物 DPA 峰外(保留时间为 22.431min),还出现了 DHA 产物特殊峰(与 DHA 甲酯标准品相对应,保留时间为 24.037min),其含量占酵母总脂肪的 41.13%。值得指出的是,与对照菌株 YES2.0 相比,转化子 YFAD4 底物含量从 53.472% 下降到 5.185%,以上结果证明 *FAD4* 编码产物具有 Δ^4 -desaturase 活性,它能特异性地利用底物二十二碳五烯酸(Docosapentaenoic acid ω 3-DPA, 22:5 $\Delta^{7,10,13,16,19}$ -n-3),并将其转换成二十二碳六烯酸(Docosahexaenoic acid ω 3-DHA, 22:6 $\Delta^{4,7,10,13,16,19}$ -n-3)。

3 讨论

通过构建表达载体 pYFAD4,转化酿酒酵母 INVSc1 进行功能表达分析。添加外源性底物 DPA (22:5 $\Delta^{7,10,13,16,19}$ -n-3),经半乳糖诱导,在转化子总脂肪酸中出现一个与 DHA(22:6 $\Delta^{4,7,10,13,16,19}$ -n-3)脂肪酸甲酯标准品相同保留时间的峰。*FAD4* 基因能特异利用底物 DPA 转换成 DHA,在 delta 4 位的脱饱和生物学功能得到确证。我们的实验结果证实了“front-end”的 Δ^4 -desaturase 不仅能将 ADA(22:

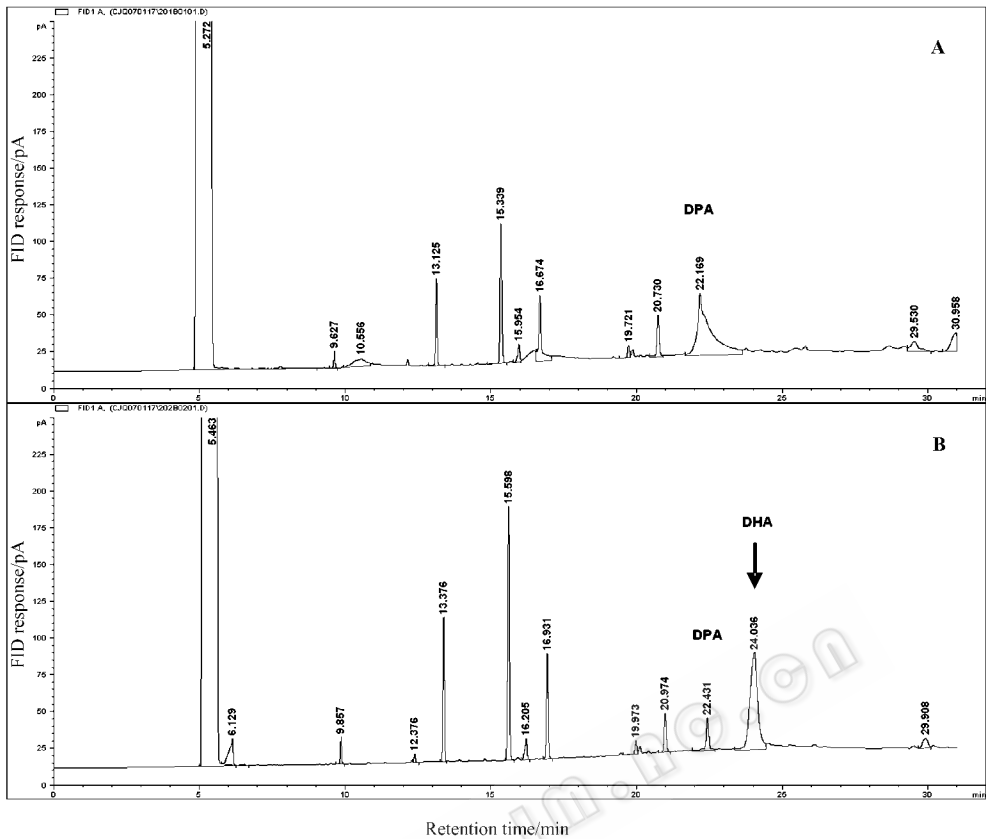


图4 转化子脂肪酸甲酯的气相色谱分析

A: 对照菌 YES2.0, B: 酿酒酵母工程菌 YFAD4

$4\Delta^{7,10,13,16}n-6$ 转换成 $DPA(22:5\Delta^{4,7,10,13,16}n-6)^{[14]}$ 而且能在 C4 和 C5 间引入一个双键, 将 $DPA(22:5\Delta^{7,10,13,16,19}n-3)$ 进行脱氢, 转换 C22:5 生成 $DHA(22:6\Delta^{4,7,10,13,16,19}n-3)$ 。

值得指出的是转化子细胞中 DHA 含量高达 41.13%, *FAD4* 基因得到了高效表达。究其原因有以下三种可能: ①碳源选用棉子糖, 对基因表达不存在阻遏作用; ②诱导培养基加入 1% 的表面活性剂 NP-40, 可使底物 DPA 在培养基中充分扩散, 利于酵母吸收利用; ③ *FAD4* 转译起始密码子 ATG 上游 +4 位的 A 修改为 G, 可加强 mRNA 的稳定性或提高蛋白转译的起始效率^[19]。 *FAD4* 基因在酿酒酵母中的成功表达可为转基因技术生产 DHA 提供一项崭新的技术, 具有广阔应用前景。

参考文献

[1] Hoffman D R, DeMar J C, Heird W C, *et al.* J Lipid Res, 2001, **42** (9):1395 ~ 1401.
 [2] Llorente A M, Jensen C L, Voigt R G, *et al.* Am J Obstet Gynecol, 2003, **188** (5):1348 ~ 1353.
 [3] Sijtsma L S. Applied Microbiology and Biotechnology 2004, **64**:146 ~

153.
 [4] Huang J Z, Aki T, Yokochi T, *et al.* Mar Biotechnol, 2003, **5** (5):450 ~ 457.
 [5] Huang J Z, Aki T, Hachida K, *et al.* J Am Oil Chem Soc, 2001, **78** (6):605 ~ 610.
 [6] Qiu X. Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids, 2003, **68**:181 ~ 186.
 [7] Astrid M, Helene K, Frédéric D, *et al.* J Lipid Res, 2004, **45**:1899 ~ 1909.
 [8] MacKenzie DA, Carter AT, Wongwathanarat P, *et al.* Microbiology, 2002, **148** (6):1725 ~ 1735.
 [9] Metz JG, Roessler P, Facciotti D, *et al.* Science, 2001, **293** (5528):290 ~ 293.
 [10] Sakurada E, Kobayashi M, Shimizu S. Gene, 1999, **238** (2):445 ~ 453.
 [11] Huang YS, Chaudhary S, Thurmond JM, *et al.* Lipids, 1999, **34** (7):649 ~ 659.
 [12] Meyer A. Biochemistry, 2003, **42** (32):9779 ~ 9788.
 [13] Tonon T. FEBS Lett, 2003, **553** (3):440 ~ 444.
 [14] Qiu X, Hong H, MacKenzie SL. J Biol Chem, 2001, **276** (34):31561 ~ 31566.
 [15] 刘丽霞, 江贤章, 覃文新, 等. 工业微生物, 2006, **36** (1):1 ~ 6.
 [16] Kozak M. Embo J, 1997, **16** (9):2482 ~ 2492.
 [17] Kozak M. Nucleic Acids Res, 1984, **12** (2):857 ~ 872.
 [18] Kozak M. Cell, 1986, **44** (2):283 ~ 292.
 [19] 张琦, 李明春, 孙颖, 等. 微生物学报, 2004, **44** (4):536 ~ 543.
 © 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn