

# 高山被孢霉 ATCC16266 $\Delta^6$ -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**  $\Delta^6$ -脂肪酸脱氢酶是形成  $\gamma$ -亚麻酸的关键酶。从含有高山被孢霉  $\Delta^6$ -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  $\gamma$ -亚麻酸。这是迄今为止,国内外  $\Delta^6$ -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**  $\Delta^6$ -脂肪酸脱氢酶基因  $\gamma$ -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<sup>[1,2]</sup>。 $\gamma$ -亚麻酸  $\gamma$ -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,  $\gamma$ -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<sup>[3]</sup>。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<sup>[4]</sup>。 $\Delta^6$ -脂肪酸脱氢酶是产生  $\gamma$ -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  $\gamma$ -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<sup>[5]</sup>。目前仅有玻璃苣<sup>[6]</sup>、小鼠肝脏<sup>[7,8]</sup>、线虫<sup>[9]</sup>、蓝细菌<sup>[10]</sup>和低等丝状真菌高山被孢霉<sup>[11]</sup>的  $\Delta^6$ -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  $\gamma$ -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  $\Delta^6$ -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  $\Delta^6$ -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



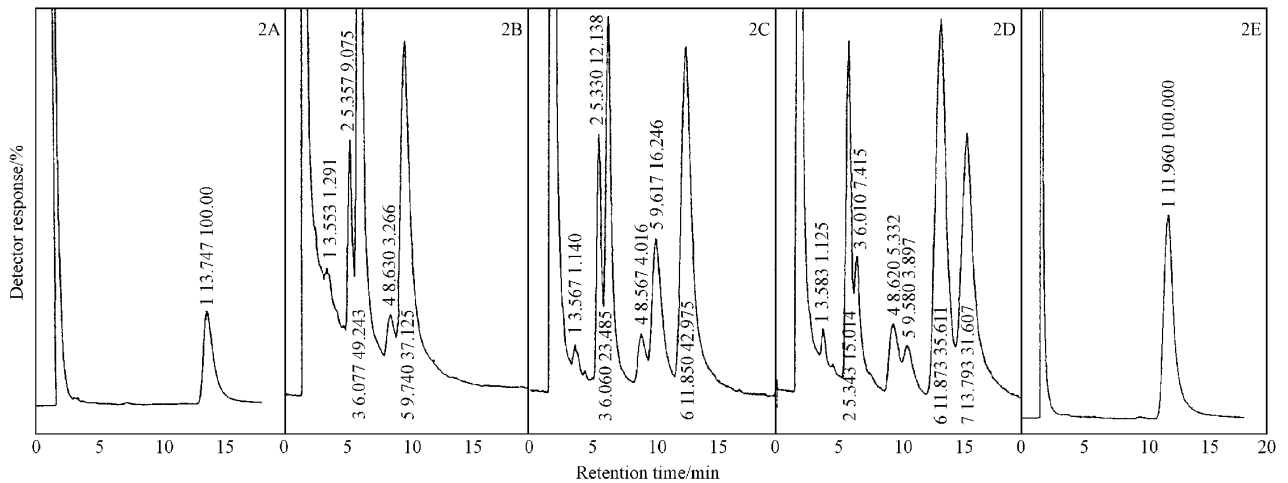


图 2 酿酒酵母总脂肪酸的气相色谱分析图

Fig. 2 Gas chromatographic analysis of fatty acid methyl esters of total lipids of *S. cerevisiae* grown under inducing conditions, (2A)  $\gamma$ -linolenic acid standard (2B) acceptor strain INCSc1 (2C) yeast transformed with pYES2.0, (2D) yeast transformed with pYMAD6 (2E) substrate linoleic acid

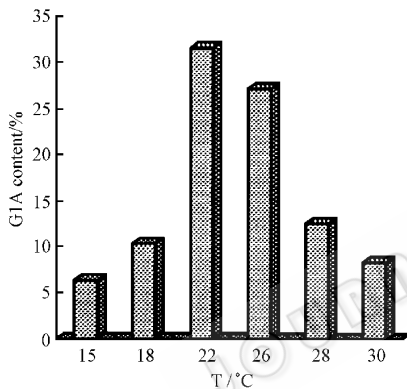


图 3 温度对酵母工程株 YMAD6 积累 GLA 的影响

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<sup>[15,16]</sup>。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 INVSc1 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  $\Delta^6$ -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  $\Delta^6$ -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  $\Delta^6$ -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.  $\gamma$ -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  $\Delta^6$ -desaturase. *J Biological Chem.* 1998, **274**:471~477
- [3] Horrobin D F. Nutritional and medical importance of  $\gamma$ -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  $\Delta^5$ -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  $\Delta^6$ -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  $\Delta^6$ -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*  $\Delta^6$ -fatty-acid-desaturase by heterologous expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem J*. 1998, **330**: 611~614
- [ 10 ] Reddy A S, Nuceio M L, Gross L M *et al.* Isolation of a  $\Delta^6$ -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  $\Delta^{12}$ - and  $\Delta^6$ -desaturase from *Mortierella alpina* and recombinant production of  $\gamma$ -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  $\gamma$ -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 $\Delta^6$ -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**  $\Delta^6$ -fatty acid desaturase is the rate-limiting enzyme of the desaturation of linoleic acid in the production of an essential fatty acid,  $\gamma$ -linolenic acid. The 1.4kb fragment in plasmid pTMACL6 encoding  $\Delta^6$ -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  $\Delta^6$ -fatty acid desaturase activity under appropriate media and temperature condition, the level of  $\gamma$ -linolenic acid reached 31.6% of the total yeast fatty acids by GC-MS detecting, which is the highest report of  $\Delta^6$ -fatty-acid desaturase gene in *S. cerevisiae*.

**Key words** *Mortierella alpina*  $\Delta^6$ -fatty acid desaturase gene  $\gamma$ -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