

花生油酸脱氢酶基因在酿酒酵母中的高效表达

殷冬梅, 崔党群*

河南农业大学农学院, 郑州 450002

提要: 将克隆的油酸脱氢酶基因(AF900663)亚克隆到大肠杆菌和酿酒酵母的穿梭表达载体 pYES6/CT, 从大肠杆菌中筛选到含有目的基因的重组质粒 pYES/HO-A, 用醋酸锂方法转化到酿酒酵母缺陷型菌株 INVSc I 中, 经半乳糖诱导后, 收集菌体, 用气相色谱质谱(GC-MS)仪分析转化酵母的脂肪酸色谱的结果表明, HO-A 所编码的酶具有油酸脱氢酶活性, 能将酵母内源性油酸转化为亚油酸, 油酸脱氢酶的表达量为 15.6%, 高于已有的报道。

关键词: 花生; 油酸脱氢酶基因; 酿酒酵母; 功能鉴定

Function Expression of Oleate Desaturase Gene from Peanut in *Saccharomyces cerevisiae*

YIN Dong-Mei, CUI Dang-Qun*

College of Agronomy, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China

Abstract: Oleate desaturase is the rate limiting enzyme of the desaturation of linoleic acid in the production of an essential fatty acid. The 1.14 kb fragment in plasmid pRSET/HO-A encoding oleate desaturase was subcloned into the yeast-*Escherichia coli* shuttle vector pYES6, thus an expression recombinant plasmid pYES/HO-A containing target gene was constructed. The pYES/HO-A was introduced into defective mutant INCScl of *Saccharomyces cerevisiae* by LiAc method. Oleate desaturase activity was expressed under appropriate media and temperature conditions, the level of linolenic acid reached 18.6% of the total yeast fatty acids by GC-MS detection, and the function of oleate desaturase in *S. cerevisiae* was verified. Total fatty acids was extracted and esterified, then analyzed by gas chromatography. A novel peak corresponding to linoleic methyl ester standards was detected with the same retention time. GC-MS analysis demonstrated that the novel peak was linoleic acid methyl ester. These results exhibited $\Delta 12$ fatty acid desaturase activity, converting oleic to linoleic specifically.

Key words: peanut; oleate desaturase; *Saccharomyces cerevisiae*; function identification

花生种子中富含油酸和亚油酸。油酸脱氢酶是亚油酸合成的关键酶, 催化油酸(18:1)在 $\Delta 12$ 位上脱氢生成亚油酸(18:2)(Page 等 1994; Schmidt 等 1994), 其一般存在于植物细胞的内质网和叶绿体膜上(Alonso 等 2003)。不饱和脂肪酸(如油酸、亚油酸等)在增加膜的流动性中起作用, 通过改变脂肪酸脱氢酶活性, 可调节膜脂的不饱和程度, 从而增加生物体抗盐和抗寒能力(Ishizaki-Nishizawa 等 1996)。随着人们对高品质植物油的需求增加, 用基因工程手段调节不饱和脂肪酸含量的研究受到越来越多的关注(Sayanova 等 1997; Pirtle 等 2001)。但由于油酸脱氢酶具有膜结合蛋白的特性, 迄今还没有有效的方法将其纯化并在蛋白水平上作进一步的研究, 对其结构和功能以及表达调控尚应作更深入的研究。本文将我们从花生中

克隆的油酸脱氢酶基因(殷冬梅和崔党群2006)构建穿梭表达载体 pYES/HO-A 转化至酿酒酵母中, 通过半乳糖的诱导获得了外源目的蛋白的高效表达, 现报道如下。

材料与方法

酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)营养缺陷型 INVScI 及大肠杆菌 / 酿酒酵母穿梭表达载体 pYES6/CT 购自 Invitrogen 公司。限制性内切酶、T₄ DNA 连接酶、蛋白质分子量标准购自宝生物

收稿 2007-03-23 修定 2007-06-26

资助 河南省重点科研项目(2002AA207004)。

* 通讯作者(E-mail: cdq62@sohu.com; Tel: 0371-63558122)。

(大连) 生物工程有限公司, 稻瘟霉素购自 Invitrogen 公司, 酸洗玻璃珠、鲑鱼精 DNA 购自 Sigma 公司, 培养基、聚乙二醇(PEG3350)等生化试剂购自上海生物工程有限公司。

根据 HO-A 序列设计简并引物, 在其两端各加 1 个特异酶切位点 *EcoRI*、*BamHI*, 以花生总 RNA 为模板进行 RT-PCR 扩增, 目的片段接入克隆载体 pMD18-T, 转化大肠杆菌 DH5, 挑取阳性克隆交宝生物(大连)生物工程有限公司测序, 验证为正确的克隆命名为 pMD/HO-A。将 pMD/HO-A 和表达载体 pYES6/CT 分别用 *EcoRI*、*BamHI* 双酶切, 琼脂糖凝胶电泳检测, 切胶回收 1 140 bp 目的条带和表达载体 5 800 bp 片段, 将其按 5:1 比例 16 ℃ 连接过夜后, 取 10 μL 转化大肠杆菌 DH5α, 次日 PCR 检菌, 鉴定为阳性克隆的单菌落用质粒提取 Kit 提取质粒, 酶切鉴定正确的质粒由宝生物(大连)生物工程有限公司测序, 确定目的基因在 pYES6 中正确的读码框和插入方向。重组质粒命名为 pYES/HO-A。感受态细胞制备采用 Sangon 高效感受态细胞转化 Kit, 重组质粒的转化、酶切鉴定及阳性克隆的筛选按常规分子生物技术进行。质粒 DNA 转化酵母采用改进的醋酸锂法。

重组质粒在酿酒酵母中诱导表达时, 挑 1 个转化重组子单菌落, 接入 15 mL 含有稻瘟霉素及 2% 葡萄糖的 SC 选择性培养基中, 30 ℃ 振荡过夜培养; 测定过夜培养物的 OD₆₀₀ 值。将适量过夜培养物 4 000×g 离心 5 min (4 ℃), 弃去上清液。将细胞重悬在 50 mL 诱导培养基中, 于 22 ℃ 下继续振荡培养。细胞加入诱导培养基中后于 0、4、8、12、18、24、28、32、36、42 h 分别从三角瓶中取 5 mL 培养物于 4 ℃ 下 4 000×g 离心 5 min, 弃上清液, 收集的培养细胞用无菌水冲洗 1 次后, 将细胞沉淀保存在 -80 ℃ 中备用。在细胞培养过程中, 每隔 24 h 补加 1 次半乳糖至终浓度为 2%。重组蛋白检测中必需制备的细胞裂解物用酸洗玻璃珠小规模制备酵母细胞裂解物的方法较为方便。

分析酵母油脂的脂肪酸时, 取上述收集的酵母沉淀, 加入适量裂解缓冲液和等体积的酸洗玻璃珠, 涡旋 30 s, 然后放在冰上 30 s; 4 min

内重复 4 次以裂解细胞。然后加入等体积的氯仿: 甲醇: 水(2:1:2)抽提, 取氯仿层, 加入等体积 1% H₂SO₄- 甲醇进行甲基化处理, 于 55 ℃ 水浴中放置 6 h 后, 加入正己烷回溶, 具体方法参见寇秀颖和于国萍(2005)一文并略有改动。脂肪酸分析用日本岛津 GC-9A 和 GCMA-QP5000 仪器分析。

实验结果

1 重组表达质粒 pYES/HO-A 的构建和酶切鉴定

用 *EcoRI*、*BamHI* 双酶切将 HO-A 基因从质粒 pMD/HO-A 上切下连入 pYES6.0/CT, 经质粒的快速检测法筛选得到重组表达质粒 pYES/HO-A, 重组质粒经 *EcoRI*、*BamHI* 双酶切产生 1 140 bp 和 5 800 bp 两条片段, 表明外源片段已经插入表达载体 pYES6/CT 中(图 1)。测序结果表明外源片段 HO-A 插入方向正确、插入顺序合适。

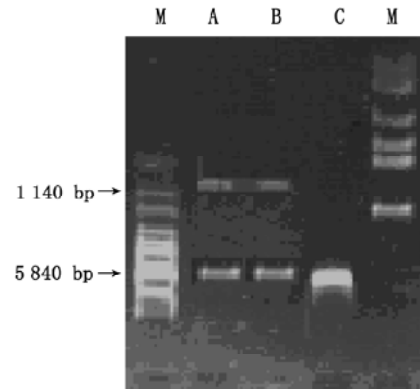


图 1 重组质粒 pYES/HO-A 的酶切电泳图谱

Fig.1 Electropherogram of restriction enzymes identification of recombinant plasmid

M: DNA Marker; A、B: *EcoRI* 和 *BamHI* 双酶切重组质粒 pMD/HO-A; C: 重组质粒 pMD/HO-A。

2 油酸脱氢酶基因在酿酒酵母中的表达

将重组质粒 pYES/HO-A 转化到酿酒酵母营养缺陷型 INVScI, 在 SC 固体培养基上筛选转化子, 经质粒检测得到重组酵母工程菌, 按前述方法进行诱导表达。从诱导后开始, 每间隔 4~6 h 取样, 离心收集发酵液, 用于相同条件下培养的酿酒酵母上清液作为对照。在诱导 4~42 h 期间的工程菌发酵液中均可检测出重组蛋白, 说明 HO-A 在酿酒酵母中已获得表达, 以诱导 36 h 时的发酵液中

目的蛋白含量为最高(图2)。将收集的菌体经甲酯化处理后,进行气相色谱分析的结果出现保留时间(5.207)与亚油酸标准品一致的特异脂肪酸峰(图3),而插入空载体的无此峰出现。对酵母油脂中出现的这个特异峰进一步进行气质联谱(GC-MS)分析证实为亚油酸。说明油酸脱氢酶基因在酿酒酵母中获得了表达,于是原来不产生亚油酸的酿酒酵母由于外源油酸脱氢酶基因的导入,其内源

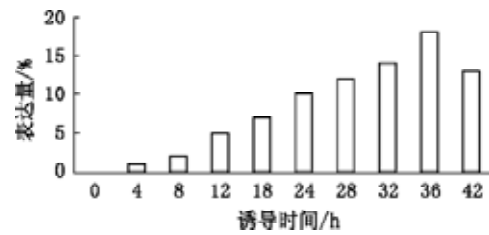


图2 酿酒酵母中重组蛋白在不同诱导时期的表达
Fig.2 Expression of the recombinant proteins in *S. cerevisiae* at the different inducible time

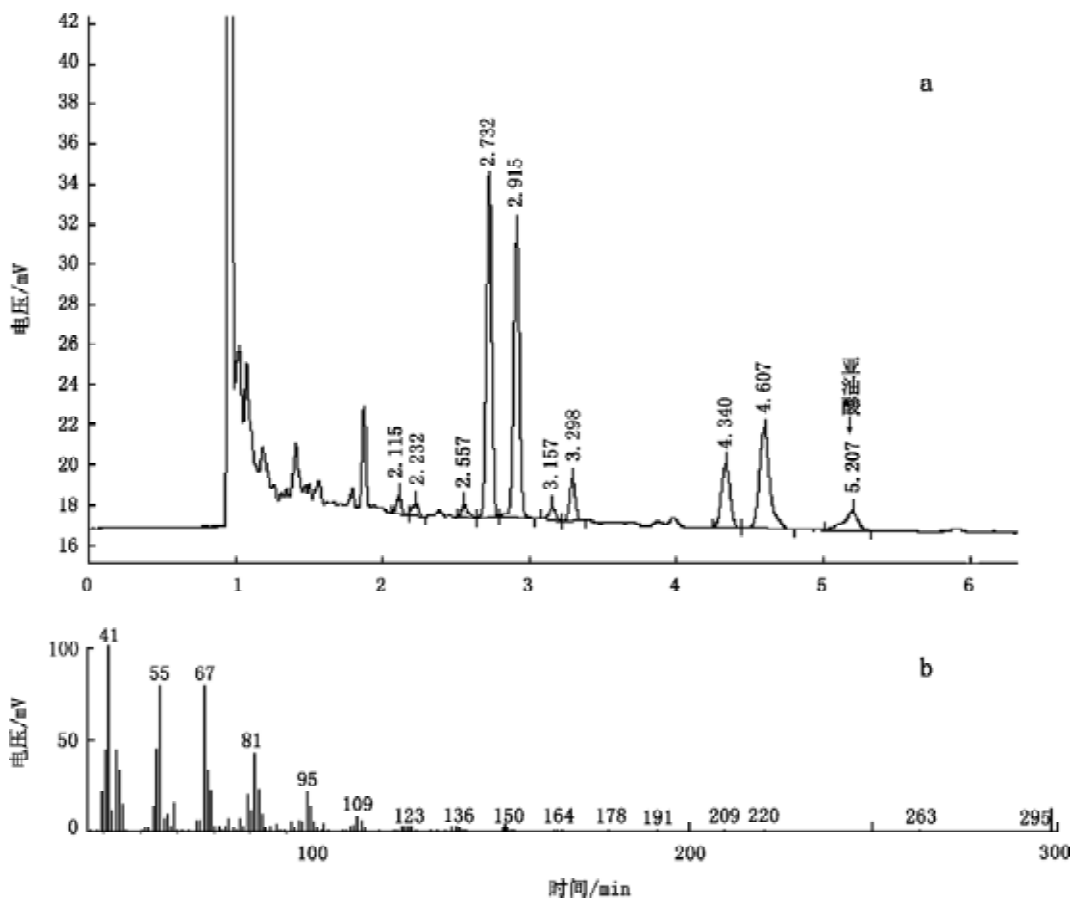


图3 脂肪酸甲酯的气相色谱和气相色谱/质谱图谱

Fig.3 Gas chromatogram and gas chromatogram-mass spectrometry of fatty acid methyl esters
a: 含有质粒 pYES/HO-A 的酵母脂肪酸; b: 亚油酸甲酯标准品。

油酸转化为亚油酸。

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。酿酒酵母是单细胞真核生物,既具有大肠杆菌等原核生物繁殖快、易培养

的优点,又可对蛋白质产物进行适当加工,如修饰、折叠和分泌等,是最早发展成为基因表达系统的优良宿主菌,至今已广泛用于表达各种各样的外源基因(Covello 和 Reed 等 1996; Kuiper 等 2005; 张琦等 2004; Hao 等 2005; 王德培等 2006)。本文选择酿酒酵母营养缺陷型 INVSc1 为

受体菌, pYES6/CT 为表达载体。pYES6/CT 是一种酵母游离型质粒, 也是一种穿梭质粒, 它在大肠杆菌和酵母菌中都稳定存在。它带有酵母 GAL1 启动子, 受半乳糖的诱导。本文中油酸脱氢酶基因获得了稳定表达, 表达量高达 15.6%, 这是迄今花生酸脱氢酶基因在真核生物中的最高表达量(Jung 等 2000)。由于油酸脱氢酶是形成亚油酸的限速酶, 并且不同基因型, 尤其是油酸/亚油酸(O/L)比差异较大的花生品种, 其油酸脱氢酶序列有明显的差别, 因此我们构建了不同 O/L 比基因型的表达载体, 诱使其在酵母中表达, 发现不同基因型的油酸脱氢酶表达量明显不同, O/L 比值高的表达量低, 结果油酸脱氢酶的蛋白活性也低, 从而限制了亚油酸的形成, 提高了该基因型的 O/L 比值(待发表资料)。

培养条件对酿酒酵母的蛋白表达量有很大影响。本文将最佳诱导时间确定为 36 h, 诱导的最理想温度为 22 (数据未列出)。这一诱导温度与我们在原核表达该基因的诱导温度相同(Yin 等 2007), 说明诱导温度对蛋白表达量有较大影响。

植物脂肪酸脱氢酶基因的表达受 ABA、温度、光照、盐和伤害刺激等多种因子调节, 表达具有组织特异性(Berberich 等 1998; Nishiuchi 等 1997), 这也可能是同一品种在不同年份间脂肪酸差异明显的原因。如何调控脂肪酸脱氢酶基因的稳定表达, 油酸脱氢酶与其他脂肪酸脱氢酶以及作用底物与 *cytb5* 之间的关系, 尚待深入探讨。近年来, 国内外一些实验室从不同的油料作物中克隆出油酸脱氢酶基因, 但由于花生基础理论研究起步较晚, 故许多研究, 尤其是花生脂肪酸代谢调控的研究更是落后于其他作物。本文结果为进一步构建花生油酸脱氢酶特异表达载体, 利用种子特异性启动子, 使其在花生的种子中特异地积累油酸或亚油酸, 改变脂肪酸组成以满足人们对营养的需求提供了可能。

参考文献

寇秀颖, 于国萍(2005). 脂肪和脂肪酸甲酯化方法的研究. 食品研究与开发, 26 (2): 46~47
 王德培, 李明春, 魏东盛, 张颖慧, 邢来君(2006). 雅致枝霉 $\Delta 6$ -脂肪酸脱氢酶基因的克隆及在酿酒酵母中的表达. 微生物学报, 46 (1): 74~79
 殷冬梅, 崔俊群(2006). 不同花生基因型脂肪酸脱氢酶基因序列

分析. 作物学报, 32 (10): 1466~1471
 张琦, 李明春, 孙颖, 马海庭, 任勇, 邢来君(2004). 少根根霉 $\Delta 6$ -脂肪酸脱氢酶基因的克隆和表达. 遗传学报, 31 (7): 740~749
 Alonso DL, Maroto FG, Ruiz RG (2003). Evolution of the membrane bound fatty acid desaturases. Biochem Syst Ecol, 31: 1111~1124
 Berberich T, Harada M, Sugawara K, Kodama H, Iba K, Kusano T (1998). Two maize genes encoding omega-3 fatty acid desaturase and their differential expression to temperature. Plant Mol Biol, 36 (2): 297~306
 Covello PS, Reed DW (1996). Functional expression of the extraplastidial *Arabidopsis thaliana* oleate desaturase gene (*FAD2*) in *Saccharomyces cerevisiae*. Plant Physiol, 111: 223~226
 Hao YL, Wang Y, Zhu BZ, Luan CG, Luo YB (2005). Cloning of Δ^6 -desaturase from *Mucor circinelloides* and its high expression in *Saccharomyces cerevisiae*. Acta Genet Sin, 32 (3): 303~308
 Ishizaki-Nishizawa O, Fujii T, Azuma M, Sekiguch K, Murata N, Ohtani T, Toguri T (1996). Low-temperature resistance of higher plants is significantly enhanced by a nonspecific cyanobacterial desaturase. Nat Biotechnol, 14 (8): 1003~1006
 Jung S, Powell G, Moore K, Abbott A (2000). The high oleate trait in the cultivated peanut [*Arachis hypogaea* L.]. II. Molecular basis and genetics of the trait. Mol Gen Genet, 263: 806~811
 Kuiper GGJM, Klootwijk W, Visser TJ (2005). Expression of recombinant membrane-bound type Iiodothyronine deiodinase in yeast. J Mol Endocrinol, 34: 865~878
 Nishiuchi T, Hamada T, Kodama H, Iba K (1997). Wounding changes the spatial expression pattern of the *Arabidopsis* plastid omega-3 fatty acid desaturase gene (*FAD7*) through different signal transduction pathways. Plant Cell, 9 (10): 1701~1712
 Page RA, Okada S, Harwood JL (1994). Acetyl-CoA carboxylase exerts strong flux control over lipid synthesis in plants. Biochim Biophys Acta, 1210 (3): 369~372
 Pirtle IL, Kongcharoensuntorn W, Nampaisansuk M, Knesek JE, Chapman KD, Pirtle RM (2001). Molecular cloning and functional expression of the gene for a cotton Delta-12 fatty acid desaturase (*FAD2*). Biochim Biophys Acta, 1522 (2): 122~129
 Sayanova O, Smith MA, Lapinskas P (1997). Expression of a borage desaturase cDNA containing an N-terminal cytochrome b5 domain results in the accumulation of high levels of delta6-desaturated fatty acids in transgenic tobacco. Proc Natl Acad Sci USA, 94 (8): 4211~4216
 Schmidt H, Dresselhaus T, Buck F, Heinz E (1994). Purification and PCR-based cDNA cloning of a plastidial n-6 desaturase. Plant Mol Biol, 26 (2): 631~642
 Yin DM, Cui DQ, Jia B (2007). Construction of a high-efficient expression vector of $\Delta 12$ fatty acid desaturase in peanut and its prokaryotical expression. J Genet Genomics, 34: 81~88