

缺刻缘绿藻 $\Delta 15$ 脂肪酸去饱和酶的功能分析

梁浩, 周志刚

Functional analysis of $\Delta 15$ fatty acid desaturase from *Myrmecea incisa*

LIANG Hao, ZHOU Zhigang

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.12024/jsou.20210603485>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

微藻异养/兼养生产多不饱和脂肪酸以及向卤虫的传递

Heterotrophic and mixotrophic cultivation of microalgae for PUFA production and delivery to *Artemia* sp.

上海海洋大学学报. 2022, 31(6): 1373 <https://doi.org/10.12024/jsou.20210503451>

不同C/N对绿球藻生长和细胞组分的影响

Effects of different C/N ratios on growth and cell biochemical components of *Chlorococcum* sp.

上海海洋大学学报. 2020, 29(4): 542 <https://doi.org/10.12024/jsou.20190802775>

莱茵衣藻“细菌型”pepc2基因叶绿体表达及其对油脂蛋白质含量的影响

Regulation and expression of bacteria type pepc2 in *Chlamydomonas reinhardtii* and its effect on protein and lipid content

上海海洋大学学报. 2017, 26(5): 641 <https://doi.org/10.12024/jsou.20161201915>

即食虾干加工过程脂质变化研究

Changes in lipids of dried shrimp products during processing

上海海洋大学学报. 2021, 30(5): 932 <https://doi.org/10.12024/jsou.20200703113>

浙江南部近海小黄鱼肌肉脂肪酸组成及食源指示分析

Characteristics of fatty acid composition and dietary indication of small yellow croaker in the offshore waters of southern Zhejiang

上海海洋大学学报. 2021, 30(6): 992 <https://doi.org/10.12024/jsou.20200603085>

文章编号: 1674-5566(2022)06-1351-10

DOI:10.12024/jsou.20210603485

缺刻缘绿藻 $\Delta 15$ 脂肪酸去饱和酶的功能分析

梁 浩¹, 周志刚²

(1. 上海海洋大学 水产遗传资源开发利用教育部重点实验室, 上海 201306; 2. 上海海洋大学 科技部海洋生物科学国际研究中心, 上海 201306)

摘要: 缺刻缘绿藻 (*Myrmeccia incisa* Reisigl) 是一种富含多不饱和脂肪酸的球形单细胞淡水绿藻。在脂肪酸合成途径中, 脂肪酸去饱和酶与脂肪酸酰基结合载体结合进行脂肪酸去饱和反应。为探究与缺刻缘绿藻中 $\Delta 15$ 脂肪酸去饱和酶 (fatty acid desaturase, FAD) 结合的脂肪酸酰基结合载体, 选用酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) INVSc1 和聚球藻 (*Synechococcus* sp.) PCC7942 分别验证 $\Delta 15$ FAD 与酰基辅酶 A (酰基-CoA) 或酰基载体蛋白 (酰基-ACP) 结合的脂肪酸去饱和过程。根据缺刻缘绿藻的 $\Delta 15$ FAD 基因构建双源表达载体 pYES2- $\Delta 15$ FAD 和 pCAMBIA1300- $\Delta 15$ FAD, 通过电穿孔法将重组表达质粒分别转入酿酒酵母 INVSc1 和聚球藻 PCC7942 中, 筛选得到转基因菌株。取相同细胞数的转基因酵母和转基因聚球藻, 培养时分别添加等量的底物亚油酸 (linoleic acid, 18:2 ^{$\Delta 9,12$} , LA), 以 LA 作为酰基受体, 使其进入转基因酵母和转基因聚球藻的生物合成途径中, 培养 36~72 h。利用气相色谱-质谱联用系统对总脂肪酸的各组分进行分析, 结果显示, 在转基因实验组中检测到 LA 和 α -亚麻酸 (α -linolenic acid, 18:3 ^{$\Delta 9,12,15$} , ALA) 的存在, 空白实验则未检测出相应的产物。通过计算, 转基因酵母催化 LA 生成 ALA 的效率为 29.31%, 转基因聚球藻催化底物 LA 生成 ALA 的效率为 30.86%。结果证明无论是酰基-ACP 还是酰基-CoA, 与缺刻缘绿藻中的 $\Delta 15$ FAD 结合进行反应的效率相近, 不存在偏好性, 由于 $\Delta 15$ FAD 是特异性蛋白, 因此证明缺刻缘绿藻中的 $\Delta 15$ FAD 属于脂酰基结合蛋白。

关键词: 缺刻缘绿藻; $\Delta 15$ 脂肪酸去饱和酶; 酿酒酵母; 聚球藻; 脂肪酸; 气相色谱联用

中图分类号: S 917 **文献标志码:** A

脂肪酸去饱和酶 (fatty acid desaturase, FAD) 是在脂肪酸上引入不饱和键的酶。根据 FAD 所作用的底物, 可以将 FAD 分为 3 类^[1-3]: (1) 酰基酯去饱和酶 (acyl-lipid desaturase) 是与植物叶绿体膜、内质网膜以及蓝藻类囊体膜相结合的 FAD^[1], 将双键引入被酯化于甘油酯上的脂肪酸中。(2) 酰基-酰基载体蛋白 (acyl carrier protein, ACP) 去饱和酶 (acyl-ACP desaturase), 此类酶多存在于藻类及高等植物叶绿体的基质, 在结合于 ACP 上的脂肪酸中引入双键^[4-5]。(3) 酰基-CoA 去饱和酶 (acyl-CoA desaturase), 此类酶是一种内质网膜的结合蛋白, 多存在于动物和酵母等真菌细胞中, 它将双键引入至结合于 CoA 上的脂肪酸中^[6]。

缺刻缘绿藻 (*Myrmeccia incisa* Reisigl) 属绿藻

门 (Chlorophyta) 共球藻纲 (Trebouxiophyceae), 藻细胞常呈球形, 叶绿体较大, 形态常为缺刻状^[7]。研究^[8]发现, 缺刻缘绿藻能够合成大量的花生四烯酸 (arachidonic acid, 20:4 ^{$\Delta 5,8,11,14$} , ArA), 通过缺氮培养藻细胞中 ArA 可占细胞总脂肪酸的 60%、藻体干质量的 7%。罗梦柳等^[9]和童牧等^[10]研究表明, 在脂肪酸合成途径中, 亚油酸 (linoleic acid, 18:2 ^{$\Delta 9,12$} , LA) 是 $\Delta 6$ 系列脂肪酸合成途径中 ArA 的前体, 同时也是 $\Delta 3$ 系列脂肪酸 α -亚麻酸 (α -linolenic acid, 18:3 ^{$\Delta 9,12,15$} , ALA) 的前体。李慧等^[11]研究发现, 在酵母中 LA 转化为 ALA 时通过 $\omega 3$ 系列 FAD 中 $\Delta 15$ FAD 发挥去饱和作用, 于 LA 碳链上的第 15 位脱氢生成。但缺刻缘绿藻的 $\omega 3$ FAD 是膜结合蛋白, 在缺刻缘绿藻中的叶绿体中发挥主要作用, 结合酿酒酵母中进行的 $\Delta 15$ 去饱

收稿日期: 2021-06-17 修回日期: 2021-09-22

基金项目: 国家自然科学基金(31772821)

作者简介: 梁 浩(1996—), 男, 硕士研究生, 研究方向为藻类生物技术。E-mail: 1095220126@qq.com

通信作者: 周志刚, E-mail: zgzhou@shou.edu.cn

和反应,因此预测缺刻缘绿藻的 $\Delta 15 FAD$ 属于酰基酯去饱和酶。

为了探究缺刻缘绿藻中 $\Delta 15 FAD$ 与何种脂肪酸结合载体结合产生去饱和功能,选用具有不同脂肪酸结合载体的生物对象进行 $\Delta 15 FAD$ 基因的转基因操作,以此来验证 $\Delta 15 FAD$ 与何种脂肪酸结合载体结合产生去饱和反应。聚球藻 (*Synechococcus* sp.) PCC7942 属于蓝藻门,细胞结构简单,只有核糖体这一细胞器。研究^[12-13]发现,聚球藻 PCC7942 内主要通过酰基载体蛋白去饱和酶以及酰基酯去饱和酶与脂肪酸结合进行去饱和反应,并且藻细胞内只含有 $\Delta 9 FAD$ 基因,可以作为酰基-ACP 供体来验证 $\Delta 15 FAD$ 的功能。酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) INVSc1 胞内缺乏 $\Delta 12$ 、 $\omega 3$ 等脂肪酸去饱和酶^[14-15],脂肪酸组分主要包括棕榈酸(16:0)、软油酸(palmitoleic acid, 16:1^{A7})、硬脂酸(18:0)和油酸(oleic acid, 18:1^{A9})^[11,16],其脂肪酸主要由酰基-CoA 去饱和酶以及酰基酯去饱和酶与脂肪酸结合进行合成。 $\Delta 15 FAD$ 功能的研究进一步完善了缺刻缘绿藻 $\omega 3$ 系列脂肪酸合成途径,为提高多不饱和脂肪酸产量奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 生物材料来源与培养

缺刻缘绿藻 H4301 藻种来源于 Culture collection of algae Charles University of Prague (CAUP),由暨南大学张成武教授馈赠。将适量的藻种接种于 BG-11 培养基^[17]中,在温度为 25 °C、光照强度为 115 $\mu\text{mol photons}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 的条件下,每天光照 12 h 培养。待藻细胞生长至对数期时,在 4 °C 下、5 500 r/min 离心 10 min,收集藻细胞,用灭菌去离子水洗涤 2 次。液氮速冻后, -80 °C 保存备用。

聚球藻 PCC7942 购于中国科学院淡水藻种库。置于温度为 25 °C、光照强度为 115 $\mu\text{mol photons}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 的人工培养箱中,使用 BG-11 培养基,每天光照培养 12 h。

载体 pMD19-T 和 pYES2 分别购自 TaKaRa 公司和 Thermo 公司;载体 pCAMBIA1300 为实验室保存。酿酒酵母 INVSc1 菌株 (His^- 、 Leu^- 、 Trp^- 、 Ura^- 缺陷型)购自 Thermo 公司,于 YPD 培养基中培养。大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DH5 α

感受态细胞购自天根生化科技(北京)有限公司,于 LB 培养基中培养。

1.2 缺刻缘绿藻的 RNA 提取及 cDNA 合成

将液氮冻存的缺刻缘绿藻置于盛满液氮的研钵中进行研磨。然后按照操作说明,按每 50 mg 藻粉加入 1 mL 的比例加入 TRIzol 试剂(Thermo 公司);在 4 °C 下、以 12 000 r/min 的转速离心 10 min,取上清液加入预冷的氯仿;得到水相并加入异丙醇以沉降 RNA,使用 75% 乙醇洗涤沉淀,在 4 °C 下、以 8 000 r/min 的转速离心 5 min。在沉淀中加入适量的 DEPC 水,溶解 RNA,利用 Nanodrop2000 测定 RNA 浓度。

使用反转录(RT)-PCR 试剂盒(TaKaRa)并按照其说明将提取的总 RNA 合成为 cDNA 第一链,作为克隆 $\Delta 15 FAD$ 基因($\Delta 15 FAD$)的模板。

1.3 携带缺刻缘绿藻 $\Delta 15 FAD$ 基因的重组表达载体构建

1.3.1 克隆载体 pMD19T- $\Delta 15 FAD$ 的构建

根据 pCAMBIA1300 载体、pYES2 载体和缺刻缘绿藻 $\Delta 15 FAD$ 基因序列(GenBank 登录号:EU658930)设计 1 对特异性引物:上游引物($\Delta 15 FAD$ -F) 序列为 5'-cgGAATTCATGCAGGCCCCCACTATGT-3',下游引物($\Delta 15 FAD$ -R) 序列为 5'-gcTCTAGACTACACATCCGAGCCACTG-3'(小写字母为保护碱基,斜体分别为 *Eco* R I 和 *Xba* I 酶切识别位点)。25 μL 扩增反应体系中含有 2 \times *Taq* Plus PCR MasterMix 12.5 μL ;上、下游引物(10 $\mu\text{mol/L}$)各 1 μL ;模板 1 μL ;无 RNA 酶水 9.5 μL 。PCR 反应程序:94 °C 预变性 5 min,35 个循环包括 94 °C 变性 1 min、63.8 °C 退火 1 min、72 °C 延伸 2 min,最后 72 °C 延伸 10 min,4 °C 保存。

使用琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物。胶回收纯化该产物并将其连接至载体 pMD19-T 以构建质粒 pMD19T- $\Delta 15 FAD$ 。然后转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞,筛选阳性克隆后送至生工生物工程(上海)股份有限公司进行序列分析。

1.3.2 双元表达载体 pC- $\Delta 15 FAD$ 的构建

使用天根生化科技(北京)有限公司生产的质粒提取试剂盒提取 pMD19T- $\Delta 15 FAD$ 质粒;使用限制性内切酶 *Eco* R I 和 *Xba* I 对质粒 pCAMBIA1300 和 pMD19T- $\Delta 15 FAD$ 进行同样的双酶切反应。20 μL 的酶切反应体系:10 $\mu\text{mol/L}$

缓冲液 2 μL ; 0.1% BSA 2 μL ; DNA ($\leq 2 \mu\text{g}$) 4 μL ; 限制性内切酶 *Eco* R I 和 *Xba* I 各 1 μL ; 无 RNA 酶水 10 μL 。37 $^{\circ}\text{C}$ 消化反应 4 h, 琼脂糖凝胶电泳后回收酶切产物。使用 T4 DNA 连接酶将酶切后的载体片段和目的基因进行连接以构建二元表达载体 pC- $\Delta 15$ FAD。连接反应体系: 5 \times 连接反应缓冲液 4 μL ; 载体片段 DNA 约为 3×10^{-11} mol; $\Delta 15$ FAD 基因目的片段约 9×10^{-11} mol; T4 DNA 连接酶 1 μL ; 无 RNA 酶的水 7 μL 。16 $^{\circ}\text{C}$ 下连接反应 10 ~ 20 h 后, 转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞。阳性克隆筛选及菌液 PCR 验证后, 将阳性克隆菌液送至生工生物工程(上海)股份有限公司进行序列分析。测序无误后, -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存菌种备用。

1.4 重组表达载体的遗传转化

1.4.1 将重组表达载体 pC- $\Delta 15$ FAD 转化聚球藻 PCC7942

按 1.3 节方法利用质粒提取试剂盒自大肠杆菌中提取重组表达质粒 pC- $\Delta 15$ FAD, 利用聚球藻 PCC7942 藻细胞在天然状态下即可进行遗传转化的特性^[18], 收集聚球藻细胞并与 pC- $\Delta 15$ FAD 混合; 利用 Bio-Rad 公司生产的电穿孔仪, 选择 Agr 程序, 电击 1 次; 立即加入 1 mL 的 BG-11 培养基, 置于人工培养箱中恢复培养 4 ~ 5 h; 然后涂布在含有卡那霉素(Kan)的 BG-11 固体培养基上进行筛选。挑出在固体平板上生长的聚球藻细胞, 接种于 BG-11 液体培养基中继续培养至稳定生长期。使用十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)法^[19]提取转基因聚球藻的 DNA, 利用特异性引物 $\Delta 15$ FAD-F 和 $\Delta 15$ FAD-R 进行 PCR 反应以验证。同时使用空载体 pCAMBIA1300 进行遗传转化以作为阴性对照。

1.4.2 重组表达载体 pY- $\Delta 15$ FAD 的构建及在酿酒酵母中的转化

按照李慧等^[11]的方法将 $\Delta 15$ FAD 的 ORF 序列连接至 pYES2 上以构建 pY- $\Delta 15$ FAD; 然后将构建的重组质粒先后转化至大肠杆菌 DH5 α 及酿酒酵母 INVSc1 菌株, 以转空载体 pYES2 的酿酒酵母作为阴性对照; 经菌液 PCR 及测序验证后, 作为实验对象。

1.5 添加外源 LA 培养转基因细胞系

以野生型和转空载体的聚球藻和酿酒酵母为对照, 将上述携带缺刻缘绿藻 $\Delta 15$ FAD 基因的

转基因聚球藻和转基因酿酒酵母活化培养后, 按 1:100 的比例分别接种于 BG-11 和含 2% 半乳糖的 SC-U 液体培养基中; 添加 50 μL 终质量浓度为 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 LA (Sigma), 并在培养基加入 1% 的表面活性剂 IGEPAL CA-630 (Sigma) 以乳化 LA 便于其进入细胞; 置于温度为 25 $^{\circ}\text{C}$ 、光照强度为 115 $\mu\text{mol photons}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 的光照培养箱中每天光照 12 h, 将聚球藻培养至稳定期, 或置于 28 $^{\circ}\text{C}$ 摇床中以 180 r/min 的转速将酵母培养 36 ~ 72 h 至稳定期。实验设置 3 个平行样品, 同时设置未添加 LA 的实验组。

1.6 酵母和聚球藻脂肪酸组成的 GC-MS 分析

1.6.1 总脂的提取及脂肪酸甲酯化

采用改良的 Bligh-Dyer 脂类提取法^[20-21]抽提对照组、转基因聚球藻和转基因酵母的总脂。具体步骤如下: 自对照组和转基因组中, 分别取相同细胞数量的细胞系, 经液氮速冻及真空冷冻干燥; 每个样品中加入 1.5 mL 氯仿、0.6 mL 无菌水、1 mL 酸洗玻璃珠后涡旋振荡 30 min, 以 5 000 r/min 的转速离心 10 min; 残渣使用氯仿、甲醇、水(体积比为 1:2:0.8)溶液抽提 2 次后, 收集所有有机相加入 1/2 体积的灭菌水充分混匀; 同样离心收集下层有机相[聚球藻的样品中含有大量叶绿素, 应使用 CNWBOND Carbon-GCB 固相萃取小柱(CNW, 德国)去除总脂中的叶绿素]至酯化瓶, 氮气吹干后备用。

在上述获得的总脂中加入 1 mL 的 4% 硫酸甲醇(体积比为 4:96)溶液, 用 N_2 充满酯化瓶后迅速封口, 置于 80 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 1 h 以甲酯化反应; 待样品瓶冷却后加入 1 mL 的 0.9% 氯化钠溶液和 1 mL 正己烷, 以 5 500 r/min 的转速离心 10 min, 收集上清液; 上清液经 0.45 μm 的滤头过滤后, 收集滤液至新的酯化瓶中, N_2 吹干后用 500 μL 的正己烷复溶; -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

1.6.2 脂肪酸的 GC-MS 分析

以脂肪酸甲酯混标溶液(Sigma)作为参考, 采用 7890-5975 型 GC-MS 联用仪(Agilent 公司)对转基因酵母和转基因聚球藻的脂肪酸组成进行定性和定量分析^[22]。GC 色谱柱为 HP-5MS 5% phenyl-ethylsiloxane 型毛细管柱(30 m \times 250 μm \times 0.25 μm); 柱箱运行程序为 50 $^{\circ}\text{C}$ 保持 1 min, 以 10 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 升到 150 $^{\circ}\text{C}$ 保持 1 min, 然后再以 4 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 升到 250 $^{\circ}\text{C}$ 保持 3 min。采用自动

进样器上样,上样量为 1 μL ,分流比为 50:1。氮气为载气体,流速 1 mL/min。MS 采集参数选用 EMV 模式,跟踪检测的离子能为 70 eV。参照质谱存储的数据库 NIST08 MS 进行脂肪酸组分的鉴定。使用 GC-MS 数据分析软件,通过面积归一化法计算各种脂肪酸的百分含量,转化效率为新产物的量与剩余外源底物的量和新产物的量之和的比值。结果均以 3 个反应的平均值 \pm 标准差来表示。使用 SPSS 22.0 进行差异显著性分析,若 $P < 0.05$,则差异显著。

2 结果

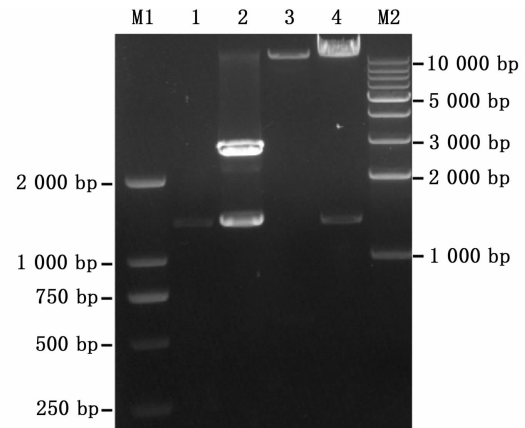
2.1 双元表达载体 pC- $\Delta 15$ FAD 的构建

使用 TRIzol 试剂法抽提缺刻缘绿藻总 RNA,然后利用 RT-PCR 试剂盒合成 cDNA 第一链。根据缺刻缘绿藻 $\Delta 15$ FAD 基因的开放阅读框(ORF)序列(GenBank 登录号:EU658930)以及载体 pMD19-T 和 pCAMBIA1300 的多克隆位点序列,设计 1 对携带限制性内切酶 *Eco* R I 和 *Xba* I 识别位点的特异性引物 $\Delta 15$ FAD-F 和 $\Delta 15$ FAD-R,以合成的 cDNA 第一链为模板进行 PCR 反应。扩增产物(图 1 泳道 1)被连接至克隆质粒 pMD19-T 上以构建 pMD19T- $\Delta 15$ FAD。经序列分析可知目的基因的大小为 1 311 bp,除了限制性内切酶识别位点的序列外,其余序列与在 GenBank 中注册的该基因 ORF 序列完全一致。

使用限制性内切酶 *Eco* R I 和 *Xba* I 对载体 pMD19T- $\Delta 15$ FAD 和 pCAMBIA1300 分别进行双酶切反应(图 1 泳道 2 和 3),将目的片段用 T4 DNA 连接酶连接以构建双元表达载体 pC- $\Delta 15$ FAD,然后转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞。挑取阳性克隆菌落并经 PCR 验证以及测序分析,确保目的基因及其插入方向的正确性。所构建的 pC- $\Delta 15$ FAD 经双酶切反应,其产物经电泳检测,结果(图 1 泳道 4)显示了 2 条产物带,其中一条分子量较小的与目的基因的大小一致(图 1 泳道 4 对泳道 1),另一条分子量较大的与载体 pCAMBIA1300 的双酶切产物一致(图 1 泳道 4 对泳道 3),从而表明已成功构建携带缺刻缘绿藻 $\Delta 15$ FAD 基因 ORF 的双元表达载体 pC- $\Delta 15$ FAD。

2.2 双元表达载体 pY- $\Delta 15$ FAD 的构建

利用质粒提取试剂盒(天根)从李慧等^[11]构



1. $\Delta 15$ FAD 基因 ORF 的扩增产物; 2. 克隆质粒 pMD19T- $\Delta 15$ FAD 经 *Eco*R I 和 *Xba* I 的双酶切产物; 3. 质粒 pCAMBIA1300 的双酶切产物; 4. 重组双元表达载体 pC- $\Delta 15$ FAD 的双酶切产物; M1. DL2000 的 DNA 分子量标准; M2. 1 kb DNA ladder 的分子量标准。

1. The amplified product of $\Delta 15$ FAD ORF; 2. The double-digested product of the construct pMD19T- $\Delta 15$ FAD using *Eco*R I and *Xba* I; 3. The double-digested product of the empty plasmid pCAMBIA1300 with the same restriction enzymes as in Lane 2; 4. The double-digested product of the recombinant binary expression vector pC- $\Delta 15$ FAD with the same restriction enzymes as in Lane 2; M1. DL2000 DNA standard; M2. 1 kb DNA ladder standard.

图 1 双元表达载体 pC- $\Delta 15$ FAD 构建过程中相关产物的电泳图

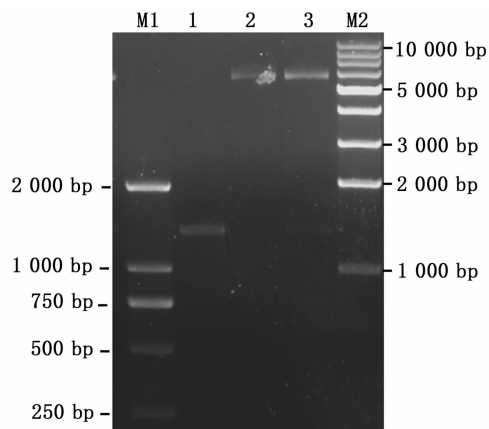
Fig. 1 Electrophoresis patterns of several products related to the construction of recombinant binary expression vector pC- $\Delta 15$ FAD

建的转 $\Delta 15$ FAD 基因酿酒酵母以及实验室保存的含 pYES2 空载菌种中抽提质粒,得到质粒 pYES2 和 pY- $\Delta 15$ FAD,使用限制性内切酶 *Eco* R I 和 *Xba* I 对 pYES2 空载和质粒 pY- $\Delta 15$ FAD 分别进行双酶切反应(图 2 泳道 2 和 3),泳道 3 中较小的条带与扩增得到的缺刻缘绿藻 $\Delta 15$ FAD 基因的 ORF(图 2 泳道 1)大小一致,较大的条带与载体 pYES2 双酶切产物大小一致,从而表明我们已成功地得到携带缺刻缘绿藻 $\Delta 15$ FAD 基因 ORF 的双元表达载体 pY- $\Delta 15$ FAD。

2.3 聚球藻及酿酒酵母脂肪酸的 GC-MS 分析

将 2.2 节构建的质粒 pC- $\Delta 15$ FAD 和 pY- $\Delta 15$ FAD 分别转化至聚球藻 PCC7942 和酿酒酵母 INVSc1 中,取相同细胞数的转基因聚球藻和转基因酵母,分别添加等量的 LA 底物进行培养;待二者生长至稳定期时,分别取含 $\Delta 15$ FAD 基因拷贝数相同的转基因酵母和转基因聚球藻,经液氮速冻后真空冷冻干燥,提取二者的总脂肪酸。脂肪酸甲酯的 GC-MS 分析结果(图 3 和图 4)显示,以

野生型和转空载体组为对照,在未添加底物 LA 时,聚球藻(图 3a)和酿酒酵母(图 4a)转基因组均无新的峰出现。添加底物 LA 后,与对照组相比,聚球藻(图 3b)和酿酒酵母(图 4b)转基因组均出现一个新的峰。通过对照标准脂肪酸甲酯的 GC 图谱及新产物的质谱图(图 5b),证实该物质为 ALA。此外,添加底物 LA 后,聚球藻和酿酒酵母对照组和转基因组中均检测出 LA(图 3b、图 4b、图 5a)。说明 $\Delta 15$ FAD 的基因产物能够在酿酒酵母和聚球藻的进入细胞的 LA 中 $\Delta 15$ 碳位引入一个双键,从而产生可以检测到的 ALA(表 1)。根据转基因细胞系各种脂肪酸的组分(表 1),计算可知,在转基因酵母和转基因聚球藻中,LA 转化为 ALA 的效率分别为 29.31% 和 30.86%;经统计分析,两者之间无显著差异($P > 0.05$)。



1. $\Delta 15$ FAD 基因 ORF 的扩增产物; 2. 质粒 pYES2 的双酶切产物; 3. 重组二元表达载体 pY- $\Delta 15$ FAD 的双酶切产物; M1. DL2000 的 DNA 分子量标准; M2. 1 kb DNA ladder 的分子量标准。

1. The amplified product of $\Delta 15$ FAD ORF; 2. The double-digested product of the empty plasmid pYES2 using *EcoR* I and *Xba* I; 3. The double-digested product of the recombinant binary expression vector pY- $\Delta 15$ FAD with the same restriction enzymes as in Lane 2; M1. DL2000 DNA standard; M2. 1 kb DNA ladder standard.

图 2 二元表达载体 pY- $\Delta 15$ FAD 构建过程中相关产物的电泳图

Fig. 2 Electrophoresis patterns of several products related to the construction of recombinant binary expression vector pY- $\Delta 15$ FAD

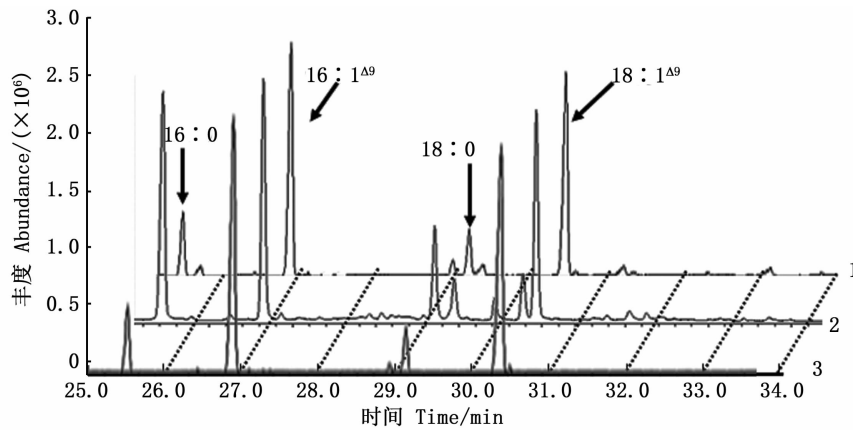
3 讨论

聚球藻 PCC7942^[23-25] 和酿酒酵母^[26-27] 细胞的脂肪酸组成简单,这些脂肪酸主要包含棕榈酸(16:0)、棕榈油酸(palmitoleic acid, 16:1^{Δ9})、硬脂酸(18:0)和油酸(oleic acid, 18:1^{Δ9})。聚球藻

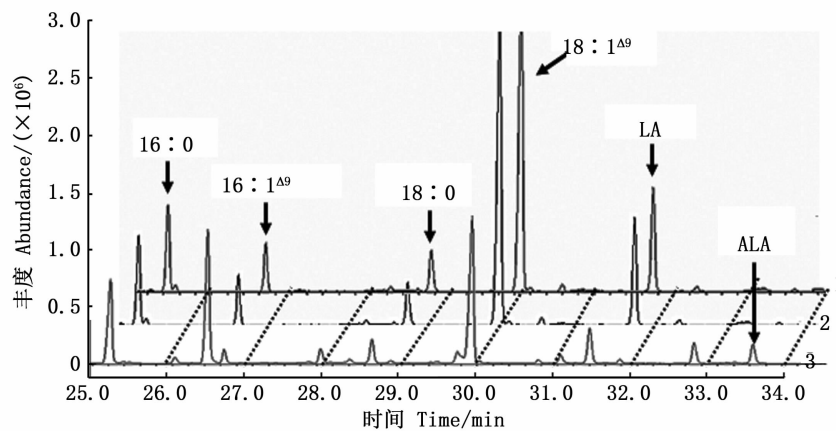
PCC7942 和酿酒酵母只含有单不饱和脂肪酸,因为它们均只有 1 个 $\Delta 9$ FAD,尽管聚球藻的 $\Delta 9$ FAD 是在酰基酯 *sn-1* 和 *sn-2* 位上的脂肪酸经过脱氢反应引入第 1 个双键^[1],而酿酒酵母的却和结合于 CoA 上的脂肪酸发生相同的作用^[27-28]。本研究从非转基因的聚球藻 PCC7942 和酿酒酵母中也只检测到这 4 种主要脂肪酸(图 3、图 4、表 1),说明本研究的脂肪酸检测结果是可信的。在检测聚球藻的脂肪酸组成时,保留时间 29 ~ 30 min,发现了 3 个小峰(图 3a),但经质谱分析,发现它们都是一些芳香族非脂肪酸的杂质峰;同样的情况也出现在添加外源 LA 培养的转基因聚球藻中(图 3b),但杂质峰的保留时间不同。

由于脂肪酸组成简单及其成熟的遗传转化系统,聚球藻 PCC7942^[12,29] 和酿酒酵母^[14,30] 常被用于 FAD 的功能鉴定。本实验室也曾利用酿酒酵母分别对缺刻缘绿藻 $\Delta 9$ FAD^[31]、 $\Delta 6$ FAD^[32] 及 $\omega 3$ FAD^[11] 的基因功能进行了分析。本研究将缺刻缘绿藻 $\Delta 15$ FAD 基因的 ORF 首次转化至聚球藻中,获得转基因藻后若添加外源的 LA 来培养,自转基因的藻细胞中能检测到 ALA(图 3a 和 3b),说明缺刻缘绿藻的 $\Delta 15$ FAD 也能在聚球藻 PCC7942 中把部分进入细胞的 LA 饱和成 ALA。这与李慧等^[11] 在酿酒酵母中的研究结果完全一致,从而进一步明确了缺刻缘绿藻 $\Delta 15$ FAD 基因的功能。

本研究利用二元表达载体 pCAMBIA1300 将缺刻缘绿藻的 $\Delta 15$ FAD 基因转化至聚球藻 PCC7942,这样, $\Delta 15$ FAD 基因的 ORF 在 pCAMBIA1300 载体上 CaMV35S 启动子的作用下^[33] 整合至聚球藻的基因组中,因而能随着聚球藻的基因组被翻译和表达,从而发挥作用,而在酿酒酵母中的重组表达则使用质粒 pYES2,它在酵母细胞中独立复制、翻译和表达^[34],因此完全不同于聚球藻的遗传转化。但缺刻缘绿藻的 $\Delta 15$ FAD 无论在酿酒酵母还是在聚球藻中,均能将 LA 脱氢去饱和成 ALA,且两者的转化效率(分别达到了 29.31% 和 30.86%)无显著差异。结合缺刻缘绿藻 $\Delta 15$ FAD 属于膜结合去饱和酶(含 4 个跨膜区两次跨膜^[8])且缺乏细胞色素 *b5* 功能域^[35],以及酿酒酵母和聚球藻中都存在,这个无差异的转化效率预示着缺刻缘绿藻 $\Delta 15$ FAD 可能属于酰基酯 FAD,即在酰基酯 *sn-1* 和 *sn-2* 位上



(a) 未添加LA培养聚球藻PCC7942脂肪酸的GC图

GC profiles of fatty acids from *Synechococcus* sp. PCC7942 cultivated without addition of LA

(b) 添加LA培养聚球藻PCC7942脂肪酸的GC图

GC profiles of fatty acids from *Synechococcus* sp. PCC7942 cultivated with addition of LA

1. 野生型聚球藻; 2. 转空载聚球藻; 3. 转目的基因聚球藻。

1. The wild-type *Synechococcus* sp. PCC7942; 2. The transgenic *Synechococcus* sp. PCC7942 with plasmid of pCambia1300; 3. The transgenic *Synechococcus* sp. PCC7942 with recombinant plasmid of pC- $\Delta 15$ FAD.

图3 聚球藻 PCC7942 脂肪酸的 GC 图谱

Fig. 3 GC profiles of fatty acids from *Synechococcus* sp. PCC7942

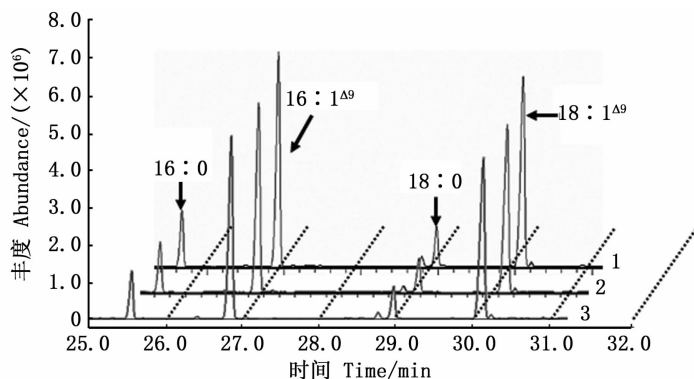
表1 转基因酵母和转基因聚球藻在添加外源 LA 培养后脂肪酸的组分

Tab.1 Fatty acid compositions of the transgenic *Synechococcus* and yeast under the culture supplemented with exogenous linoleic acid (LA)

脂肪酸 Fatty acid	转基因酿酒酵母 Transgenic yeast		转基因聚球藻 Transgenic <i>Synechococcus</i>	
	未添加底物 LA Without addition of LA	添加底物 LA Supplemented with LA	未添加底物 LA Without addition of LA	添加底物 LA Supplemented with LA
16:0	8.269 ± 0.434	11.702 ± 0.214	24.354 ± 3.153	20.896 ± 2.069
16:1 ^{Δ9}	33.956 ± 3.533	6.234 ± 0.211	39.753 ± 9.340	36.949 ± 0.948
18:0	3.981 ± 2.344	6.204 ± 0.403	4.997 ± 3.173	2.806 ± 0.604
18:1 ^{Δ9}	33.174 ± 4.176	34.533 ± 1.213	17.465 ± 5.124	17.734 ± 1.532
18:2 ^{Δ9,12}	-	14.378 ± 0.216	-	4.235 ± 1.413
18:3 ^{Δ9,12,15}	-	5.961 ± 2.055	-	1.891 ± 0.619
转化效率 Conversion efficiency	0	29.3 ± 0.08	0	30.86 ± 0.02

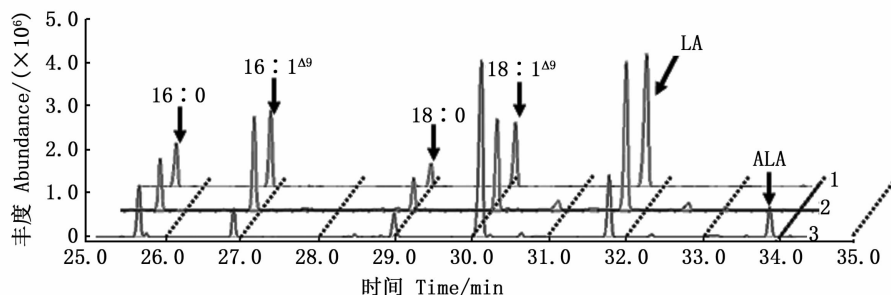
注：“-”代表没有检测到相应脂肪酸。

Notes: “-” represented no corresponding fatty acids.



(a) 未添加LA培养酿酒酵母INVSc1脂肪酸的GC图

GC profiles of fatty acids from *S. cerevisiae* INVSc1 cultivated without addition of LA



(b) 添加LA培养酿酒酵母INVSc1脂肪酸的GC图

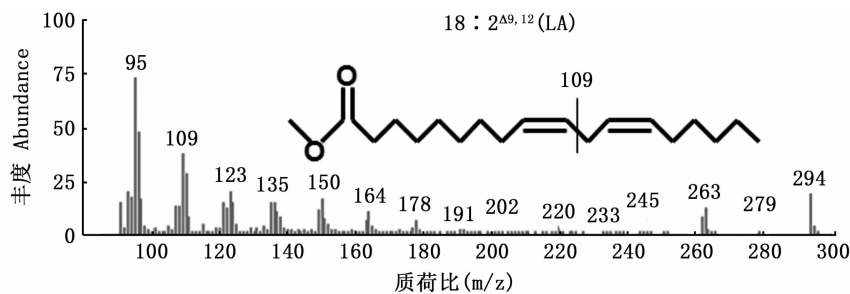
GC profiles of fatty acids from *S. cerevisiae* INVSc1 cultivated with addition of LA

1. 野生型酵母; 2. 转空载酵母; 3. 转目的基因酵母。

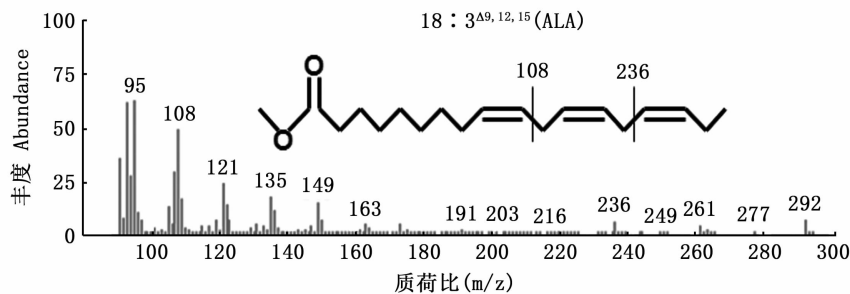
1. The wild-type yeast; 2. The transgenic yeast with plasmid of pYES2; 3. The transgenic yeast with recombinant plasmid of *pY- $\Delta 15$ FAD*.

图 4 酿酒酵母脂肪酸的 GC 图谱

Fig. 4 GC profiles of fatty acids from *S. cerevisiae*



(a) 亚油酸质谱分析 Ms analysis of LA



(b) α -亚麻酸质谱分析 Ms analysis of ALA

图 5 LA 和 ALA 的 MS 图谱

Fig. 5 MS profiles of LA and ALA

的脂肪酸自羧基端的第 15 个碳位上进行去饱和反应。但排除不了缺刻缘绿藻 $\Delta 15$ FAD 在酿酒酵母和聚球藻中对与脂肪酸相结合的 ACP 或 CoA 不存在底物特异性的可能,不过,基于至今所报道的 $\Delta 15$ FAD 对底物的特异性^[36]来分析,这种对底物没有偏好型的可能性非常小。因此,要想明确缺刻缘绿藻的 $\Delta 15$ FAD 一定是酰基酯的 FAD,还需要先重组表达这个膜结合蛋白,并在体外添加酰基酯作为反应底物的直接实验证据来证明。

参考文献:

- [1] MURATA N, WADA H. Acyl-lipid desaturases and their importance in the tolerance and acclimatization to cold of cyanobacteria[J]. *Biochemical Journal*, 1995, 308(1): 1-8.
- [2] LOS D A, MURATA N. Structure and expression of fatty acid desaturases [J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Lipids and Lipid Metabolism*, 1998, 1394(1): 3-15.
- [3] TOCHER D R, LEAVER M J, HODGSON P A. Recent advances in the biochemistry and molecular biology of fatty acyl desaturases[J]. *Progress in Lipid Research*, 1998, 37(2/3): 73-117.
- [4] HWANGBO K, AHN J W, LIM J M, et al. Overexpression of stearoyl-ACP desaturase enhances accumulations of oleic acid in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*[J]. *Plant Biotechnology Reports*, 2014, 8(2): 135-142.
- [5] KAZAZ S, MIRAY R, BAUD S. Acyl-acyl carrier protein desaturases and plant biotic interactions[J]. *Cells*, 2021, 10(3): 674.
- [6] MACARTNEY A, MARESCA B, COSSINS A R. Acyl-CoA desaturases and the adaptive regulation of membrane lipid composition [J]. *Temperature Adaptation of Biological Membranes*, 1994, 14(7): 129-139.
- [7] REISIGL H. Zur systematik und Ökologie alpiner bodenalgen [J]. *Österreichische Botanische Zeitschrift*, 1964, 111(4): 402-499.
- [8] 李春阳, 杜道海, 于水燕, 等. 缺刻缘绿藻 $\omega 3$ 脂肪酸去饱和酶基因的特性及在氮饥饿过程中相对转录量的分析[J]. *水产学报*, 2010, 34(9): 1343-1353.
- [9] LI C Y, DU D H, YU S Y, et al. Characterization of a $\omega 3$ fatty acid desaturase gene from *Myrmecea incisa* and its relative transcription during the stress course of nitrogen starvation[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2010, 34(9): 1343-1353.
- [10] 童牧, 于水燕, 欧阳珑玲, 等. 氮饥饿与磷饥饿促使缺刻缘绿藻花生四烯酸含量增加的比较[J]. *水产学报*, 2011, 35(5): 763-773.
- [11] TONG M, YU S Y, OUYANG L L, et al. Comparison of increased arachidonic acid content in *Myrmecea incisa* cultured during the course of nitrogen or phosphorus starvation [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2011, 35(5): 763-773.
- [12] 李慧, 欧阳珑玲, 周志刚. 缺刻缘绿藻 $\omega 3$ 脂肪酸去饱和酶基因($\omega 3$ FAD)在酿酒酵母中的低温诱导表达[J]. *农业生物技术学报*, 2012, 20(7): 735-744.
- [13] LI H, OUYANG L L, ZHOU Z G. Low-temperature-induced expression of a $\omega 3$ fatty acid desaturase gene ($\omega 3$ FAD) from *Myrmecea incisa* in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2012, 20(7): 735-744.
- [14] SANTOS-MERINO M, GARCILLÁN-BARCIA M P, DE LA CRUZ F. Engineering the fatty acid synthesis pathway in *Synechococcus elongatus* PCC 7942 improves omega-3 fatty acid production [J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2018, 11(1): 239.
- [15] LOS D A, MURATA N. Membrane fluidity and its roles in the perception of environmental signals [J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 2004, 1666(1/2): 142-157.
- [16] NIU B, GUO L, ZHAO M M, et al. Molecular cloning, characterization, and expression of an ω -3 fatty acid desaturase gene from *Sapium sebiferum* [J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2008, 106(4): 375-380.
- [17] LIU W, SUN Z, CHEN C X, et al. Novel insights into type 2 diacylglycerol acyltransferases in microalga *Myrmecea incisa* [J]. *Journal of Applied Phycology*, 2021, 33(1): 25-35.
- [18] 欧秀元. 多不饱和脂肪酸 ARA 和 EPA 合成途径在酿酒酵母中的重构[D]. 天津: 南开大学, 2011.
- [19] OU X Y. Polyunsaturated fatty acids ARA and EPA biosynthetic pathway in *Saccharomyces cerevisiae* [D]. Tianjin: Nankai University, 2011.
- [20] STANIER R Y, KUNISAWA R, MANDEL M, et al. Purification and properties of unicellular blue-green algae (Order Chroococcales) [J]. *Bacteriological Reviews*, 1971, 35(2): 171-205.
- [21] SHESTAKOV S V, KHYEN N T. Evidence for genetic transformation in blue-green alga *Anacystis nidulans* [J]. *Molecular and General Genetics*, 1970, 107(4): 372-375.
- [22] 余海霞, 罗聪, 徐趁, 等. 一种简单高效提取高质量转基因拟南芥和烟草 DNA 的方法[J]. *分子植物育种*, 2016, 14(6): 1436-1440.
- [23] YU H X, LUO C, XU C, et al. A simple and efficient method for high quality DNA extraction from transgenic

- Arabidopsis and tobacco [J]. *Molecular Plant Breeding*, 2016, 14(6): 1436-1440.
- [20] BLIGH E G, DYER W J. A rapid method of total lipid extraction and purification [J]. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, 1959, 37(8): 911-917.
- [21] 魏东, 袁显渊, 向文洲. 微藻总脂含量快速测定的方法比较[J]. *现代食品科技*, 2014, 30(7): 242-246.
- WEI D, YUAN X Y, XIANG W Z. Comparison of methods for rapid determination of total lipid content in microalgae [J]. *Modern Food Science & Technology*, 2014, 30(7): 242-246.
- [22] MEYER A, KIRSCH H, DOMERGUE F, et al. Novel fatty acid elongases and their use for the reconstitution of docosahexaenoic acid biosynthesis [J]. *Journal of Lipid Research*, 2004, 45(10): 1899-1909.
- [23] SATO N, MURATA N, MIURA Y, et al. Effect of growth temperature on lipid and fatty acid compositions in the blue-green algae, *Anabaena variabilis* and *Anacystis nidulans*[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Lipids and Lipid Metabolism*, 1979, 572(1): 19-28.
- [24] MURATA N, WADA H, GOMBOS Z. Modes of fatty acid desaturation in cyanobacteria[J]. *Plant and Cell Physiology*, 1992, 33(7): 933-941.
- [25] LOS D A, MIRONOV K S. Modes of fatty acid desaturation in cyanobacteria: An update[J]. *Life*, 2015, 5(1): 554-567.
- [26] HUNTER K, ROSE A H. Lipid composition of *Saccharomyces cerevisiae* as influenced by growth temperature[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Lipids and Lipid Metabolism*, 1972, 260(4): 639-653.
- [27] STUKEY J E, MCDONOUGH V M, MARTIN C E. The *OLE1* gene of *Saccharomyces cerevisiae* encodes the $\Delta 9$ fatty acid desaturase and can be functionally replaced by the rat stearoyl-CoA desaturase gene [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1990, 265(33): 20144-20149.
- [28] MCDONOUGH V M, STUKEY J E, MARTIN C E. Specificity of unsaturated fatty acid-regulated expression of the *Saccharomyces cerevisiae* *OLE1* gene [J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 1992, 267(9): 5931-5936.
- [29] HITZ W D, CARLSON T J, BOOTH J R, et al. Cloning of a higher-plant plastid $\Delta 6$ fatty acid desaturase cDNA and its expression in a cyanobacterium[J]. *Plant Physiology*, 1994, 105(2): 635-641.
- [30] BEAUDOIN F, MICHAELSON L V, HEY S J, et al. Heterologous reconstitution in yeast of the polyunsaturated fatty acid biosynthetic pathway [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2000, 97(12): 6421-6426.
- [31] XUE W B, LIU F, SUN Z, et al. A $\Delta 9$ fatty acid desaturase gene in the microalga *Myrmeclia incisa* Reisigl: cloning and functional analysis [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2016, 17(7): 1143.
- [32] ZHANG L, CAO H S, NING P, et al. Functional characterization of a $\Delta 6$ fatty acid desaturase gene and its 5'-upstream region cloned from the arachidonic acid-rich microalga *Myrmeclia incisa* Reisigl (Chlorophyta) [J]. *Journal of Oceanology and Limnology*, 2018, 36(6): 2308-2321.
- [33] TAN X L, KONG F M, ZHANG L L, et al. Cloning and analysis of hemoglobin gene in cyanobacterium and transformation into *Brassica napus* [J]. *Acta Agronomica Sinica*, 2009, 35(1): 66-70.
- [34] 詹瑶, 曹高燧, 曹雪松, 等. 酿酒酵母起始密码子表达载体 pYES2-ATG 的构建及应用[J]. *分子植物育种*, 2018, 16(23): 7683-7688.
- ZHAN Y, CAO G Y, CAO X S, et al. Construction and application of initiation codon expression vector pYES2-ATG of *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *Molecular Plant Breeding*, 2018, 16(23): 7683-7688.
- [35] 刘凡, 李慧, 李春阳, 等. 缺刻缘绿藻 *FAD* 基因的序列特征及其相对转录量对氮饥饿的响应[J]. *中国水产科学*, 2012, 19(5): 729-740.
- LIU F, LI H, LI C Y, et al. Characterization of fatty acid desaturase (*FAD*) genes in *Myrmeclia incisa* and the effect of nitrogen starvation on their transcription [J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2012, 19(5): 729-740.
- [36] WANG M X, CHEN H Q, GU Z N, et al. $\omega 3$ fatty acid desaturases from microorganisms: structure, function, evolution, and biotechnological use [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2013, 97(24): 10255-10262.

Functional analysis of $\Delta 15$ fatty acid desaturase from *Myrmeclia incisa*

LIANG Hao¹, ZHOU Zhigang²

(1. Key Laboratory of Exploration and Utilization of Aquatic Genetic Resources, Ministry of Education, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 2. International Research Center for Marine Biosciences, Ministry of Science and Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract: *Myrmeclia incisa* Reisi gl is a green coccoid freshwater microalga which is rich in polyunsaturated fatty acid. In the fatty acid synthesis pathway, the fatty acid desaturase was combined with the fatty acid acyl binding carrier to perform fatty acid desaturation. In order to explore the fatty acid acyl binding carrier combined with $\Delta 15$ fatty acid desaturase (FAD) of *M. incisa* Reisi gl, *Saccharomyces cerevisiae* INVSc1 and (*Synechococcus* sp.) PCC 7942 were selected for verification whether $\Delta 15$ FAD bound to acyl-CoA (acyl-CoA) or acyl carrier protein (acyl-ACP) in the desaturation process, respectively. The binary expression vectors of pYES2- $\Delta 15$ FAD and pCAMBIA1300- $\Delta 15$ FAD were constructed on the basis of the $\Delta 15$ FAD gene of *M. incisa* Reisi gl. The recombinant expression plasmids were transferred into INVSc1 and PCC7942 respectively, and the transgenic strains were screened. The similar number of transgenic yeast and transgenic cyanobacteria cells were cultured with addition of the same volume of linoleic acid (LA). After 36-72 h culture, the components of the total fatty acid were analyzed using the gas chromatography-mass (GC-MS) spectrometry system. The results showed that LA and ALA were detected in the transgenic cells, but the corresponding products were not detected in the blank control groups. By calculation, the efficiencies of conversion of LA to ALA were 29.31% and 30.86% in the transgenic yeast and transgenic cyanobacteria, respectively. According to the results, similar conversion efficiencies were obtained whether $\Delta 15$ FAD of *M. incisa* Reisi gl combined with acyl-ACP or acyl-CoA, and there was no preference. In conclusion, $\Delta 15$ FAD was a fatty acyl binding protein in *M. incisa* Reisi gl.

Key words: *Myrmeclia incisa*; $\Delta 15$ fatty acid desaturase; INVSc1; PCC7942; fatty acid; GC-MS