

# 转译起始密码子周边序列的改变对 $\Delta^6$ -脂肪酸脱氢酶基因表达的影响

张 琦<sup>1,2</sup> 李明春<sup>1</sup> 孙 颖<sup>1</sup> 马海庭<sup>1</sup> 邢来君<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>南开大学微生物学系 天津 300071)

(<sup>2</sup>云南大学微生物研究所教育部微生物资源开放研究重点实验室 昆明 650091)

**摘 要** 将少根根霉中  $\Delta^6$ -脂肪酸脱氢酶基因(*RAD6*)的起始密码子周边序列作适当的修改,并把修改后获得的片段(*RAD6-1*)亚克隆到表达载体 pYES2.0 构建重组表达载体 pYRAD6-1。经测序验证把 pYRAD6-1 转化到酿酒酵母的缺陷型菌株 INVSc1 进行表达分析,同时以空载体 pYES2.0 和出发序列所构建的 pYRAD6 作为对照。通过气相色谱(GC)和气相色谱/质谱(GC-MS)分析表明,在 pYRAD6 和 pYRAD6-1 转化的酿酒酵母中生成  $\gamma$ -亚麻酸,而 pYES2.0 中没有检测到。其中, pYRAD6-1 转化的酿酒酵母  $\gamma$ -亚麻酸表达量占细胞总脂肪酸含量的 5.23%,而对照 pYRAD6 转化的酿酒酵母中表达量只占 2.64%。

**关键词** 少根根霉  $\Delta^6$ -脂肪酸脱氢酶基因 转译起始密码子 酿酒酵母  $\gamma$ -亚麻酸 表达

中图分类号: Q78 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209(2004)04-0536-04

在真核生物蛋白质的合成过程中,核糖体通常是通过扫描机制(Scanning mechanism)来选择转译的起始位点<sup>[1]</sup>,其假设是携带 Met-tRNA<sup>met</sup>和各种转译起始因子的 40S 核糖体小亚基通过密码子与反密码子之间的碱基配对停在 AUG 处,此时 60S 大亚基与 40S 小亚基结合形成 80S 核糖体,从而起始蛋白质的转译。研究表明,转译起始密码子 AUG 周边序列的组成对 40S 小亚基停留在 AUG 位置并与 60S 大亚基结合起始转移具有一定的调节作用,Kozak 在比较了大量的序列并进行功能分析之后发现,转译起始密码子周边序列为 CCACCAUGGCU (Kozak 序列)的组合是最有利于基因在真核生物中的表达<sup>[2,3]</sup>。真核生物对于某碱基序列的偏好性可能是由于特定碱基组合以加强 mRNA 的稳定性或者提高蛋白转译的起始效率。

在人体内  $\gamma$ -亚麻酸( $\gamma$ -Linolenic acid, GLA; C18:3 $\Delta^6,9,12$ )是人体必需脂肪酸,它由  $\Delta^6$ -脂肪酸脱氢酶催化下由亚油酸(Linoleic acid, LA; C18:2 $\Delta^9,12$ )转化而来, GLA 具有降血脂、抗脂质过氧化、减肥、抑制溃疡、增强胰岛素、抗血栓性心血管疾病等一系列生物学功能<sup>[4,5]</sup>。在前期的工作中,我们从产 GLA 的丝状真菌少根根霉(*Rhizopus arrhizus*)中克隆到一个新的  $\Delta^6$ -脂肪酸脱氢酶基因,通过功能分析发现其表达水平比真菌中分离到的同类基因相对偏低(结果另文发表)。通过 DNA 序列分析发现,除了在其编码蛋白的保守的组氨酸 III 区中存在一个保守氨基酸残基的取代外,该基因转译起始密码子周边序列与

Kozak 序列的差别较大。为了研究其对表达水平的影响,我们参照 Kozak 序列把原来起始密码子周边序列作相应修改,并转化酿酒酵母中进行表达分析。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌株和质粒** 大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH5 $\alpha$ , 含有少根根霉  $\Delta^6$ -脂肪酸脱氢酶基因的重组质粒 pTRAD6, 由本室构建,酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)营养缺陷型菌株 INVSc1 及表达载体 pYES2.0 购自 Invitrogen 公司。

**1.1.2 试剂和仪器** 实验所用的限制性内切酶 *Bam*HI、*Sph*I, 氨苄青霉素(贮存液 100mg/mL, 使用终浓度 100 $\mu$ g/mL)购自华美生物工程公司,PCR 用 *Taq* 酶、dNTP 及亚油酸为上海 Sangon 公司产品,棉籽糖、半乳糖购自上海试剂二厂, NP40、 $\gamma$ -亚麻酸甲酯标准品购自 Sigma 公司,气相色谱和气质联用分析的仪器分别为岛津 GC-7A 和 HP G1800A GCD SYSTEM。

**1.1.3 培养基** 大肠杆菌的培养基 LB 配制见文献[6],酿酒酵母营养缺陷型 Sc-Ura 培养基按 Invitrogen 公司操作手册进行配制,诱导表达的培养基按文献[7]配制。

### 1.2 转译起始密码子周边序列改变后的基因片段的扩增

以本室构建的含有少根根霉  $\Delta^6$ -脂肪酸脱氢酶基因(*RAD6*)出发序列的重组质粒 pTRAD6 为模板,根据  $\Delta^6$ -脂肪酸脱氢酶开放阅读框序列起始和终止密码子,并参照 Kozak<sup>[2,3]</sup>

基金项目: 国家自然科学基金(30200176) 教育部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: xinglaj@eyou.com

作者简介: 张 琦(1975-),男(白族),云南大理人,云南大学教师,助研,南开大学在读博士研究生,研究方向为分子真菌学。E-mail: zhangwaysq37@hotmail.com

其他作者: 孙红妍<sup>1</sup> 任 勇<sup>1</sup>

收稿日期: 2003-10-08, 修回日期: 2004-02-27

提出的真核生物偏好的转移起始密码子周边序列,将-1 到-5 位的序列改为 CCACC, +4 位由 G 替换 A 并合成上游引物(下划线表示改变后的序列):5'-TAGGAT CCACCATGGTCAT-CAGATCGTC-3',同时在 5' 端引入 BamHI 位点,下游引物 5'-TAGCATGCTAAAATGACTTTTGTCTCAATTGC-3',5' 端引入 SphI 酶切位点(黑体所示),引物由上海 Sangon 公司合成。PCR 扩增条件:94℃ 2min;94℃ 30s 68℃ 3min 35 个循环 72℃ 10min。所得片段命名为 RAD6-1,以区别于用出发序列 RAD6。

### 1.3 重组表达载体的构建

将 RAD6-1 和表达载体 pYES2.0 分别用 BamHI 和 SphI 双酶切回收、连接并转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$ 。大肠杆菌感受态细胞的制备与转化、重组表达质粒的构建和鉴定均按常规方法<sup>[8]</sup>进行,重组表达质粒命名为 pYRAD6-1,以区别于用出发序列所构建的 pYRAD6 最后测序验证。

### 1.4 酿酒酵母细胞的转化

按照毛小洪<sup>[8]</sup>报道的方法进行。活化酿酒酵母菌株 INVSc1 30℃ 振荡培养至 OD<sub>600</sub> 为 0.5~1.0,离心收集细胞,用 0.1mol/L LiAc-0.01mol/L TE 溶液悬浮细胞,离心弃上清,再加入 10 $\mu$ g 重组质粒 pYRAD6-1 和 10 $\mu$ g 变性鲑鱼精 DNA 混匀,28℃ 保温 30min,然后 42℃ 热冲击 25min,降至室温,按 100 $\mu$ L/皿涂于 SC-Ura(无尿嘧啶)选择培养基平板上,置 30℃ 培养 48~72h,同时以空载体 pYES2.0 和用出发序列所构建的表达重组质粒 pYRAD6 作为对照,转化酿酒酵母,并获得 3 种阳性转化子,分别命名为 YES2.0、YRAD6 和 YRAD6-1。

### 1.5 酵母工程菌的诱导表达

按文献 7 的改良方法,分别挑取转化子 YES2.0、YRAD6 和 YRAD6-1,接种于 15mL SC-Ura 选择性液体培养基中(含 2% 棉籽糖),28℃ 振荡培养过夜,以 5% 的接种量加入含有 1% NP-40、2% 棉子糖的 100mL SC-Ura 培养基,再加入外源底物亚油酸,使其浓度达到 0.5mmol/L,28℃ 继续振荡培养,酵母细胞的密度达到 OD<sub>600</sub> 为 0.2~0.3 时加入 2% 半乳糖诱导,转入 20℃ 培养 48h 2500r/min 收集菌体,用去离子水洗涤 3 次,50℃ 烘干 研碎。

### 1.7 脂肪酸分析

细胞总脂肪酸的甲酯化及气相色谱分析按文献 7 进行。气相色谱/质谱联用(GC-MS)分析采用石英毛细管柱 HP-5(30m  $\times$  0.25mm  $\times$  0.25mm),载气:高纯 He,柱温:70℃ 2min,然后 70~250℃(10℃/min)程序升温,气化温度 230℃,离子源温度 250℃,电子能量 70eV。

## 2 结果

### 2.1 表达重组质粒 pYRAD6-1 的构建

根据 Kozak 提出的真核生物偏好的转译起始密码子的周边序列 CCACCAUGGCU,将少根根霉  $\Delta^6$ -脂肪酸脱氢酶基因出发序列中的 TCAATAUGAGU 在引物设计的过程中相应地改为 CCACCAUGGCU,-1 到-5 位的序列改为 CCACC,+4 位由 G 替换 A。以 pYRAD6 为模板,PCR 扩增出的目的带大小 RAD6-1 为 1.38kb,与预期的大小相符。将 PCR 产物和表达载体 pY-

ES2.0 连接,构建重组表达质粒 pYRAD6-1,该片段插入启动子 P<sub>GALL</sub> 和 TT 表达框内(图 1)。

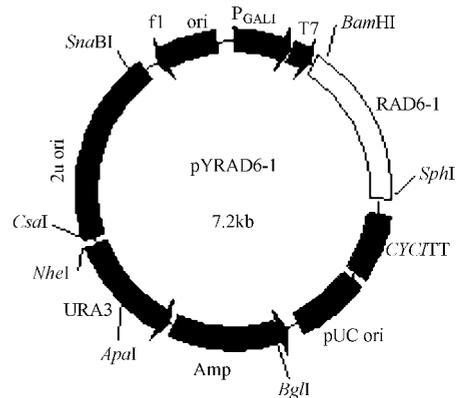


图 1 重组表达质粒 pYRAD6-1 的构建

Fig.1 Construction of recombinant plasmid pYRAD6-1

RAD6-1 represented the inserted *R. arrhizus*  $\Delta^6$ -fatty acid desaturase gene.

### 2.2 表达重组质粒的筛选

将扩增产物 RAD6-1 和 pYES2.0 分别用 KpnI 和 SphI 双酶切回收、连接并转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$ 。从 LB 平板上随机挑取转化子,小量提取质粒,用 KpnI 和 SphI 对 pYES2.0 和所提质粒进行双酶切分析及 PCR 鉴定,筛选到一阳性克隆,测序验证结果和预期一致。重组质粒 pYRAD6-1 双酶切产生大小为 5.9kb 和 1.38kb 两条带,pYES2.0 只有 5.9kb 的一条带,而且以重组质粒为模板,PCR 扩增获得与 1.38kb 大小相同的带,初步证明目的片段已经插入到表达载体 pYES2.0 中。测序结果也与预期相符。

### 2.3 RAD6-1 在酿酒酵母中的表达

将重组质粒 pYRAD6-1 连同出发序列构建的 pYRAD6 和空载体 pYES2.0 分别转化酿酒酵母,获得 3 种酵母转化子 YES2.0、YRAD6 和 YRAD6-1。3 种酵母转化子在添加外源性底物亚油酸,经半乳糖诱导,离心收集细胞并提取细胞总脂肪酸,脂肪酸经甲酯化后,以  $\gamma$ -亚麻酸甲酯标准品作为对照,进行脂肪酸甲酯的 GC 分析。如图 2 所示,用 pYRAD6 和 pYRAD6-1 转化的酵母工程菌株中出现保留时间约为 9.7min 的特殊峰(图 2-B 和 2-C 中用黑色箭头所示),其保留时间与  $\gamma$ -亚麻酸的甲酯化标准品的一致,而在空载体转化的对照 YES2.0 中没有出现相应的峰(图 2-A),其中,转基因酵母 YRAD6 中所合成的  $\gamma$ -亚麻酸含量占总脂肪酸的 2.64%,而 YRAD6-1 中的  $\gamma$ -亚麻酸占 5.23%,是前者的近 2 倍(表 1)。

表 1 不同质粒转化的酵母细胞的脂肪酸含量

Table 1 Fatty acid compositions of total lipid from yeast transformants YES2.0, YRAD6 and YRAD6-1

Transformants	Fatty acid composition/%					
	C16:0	C16:1	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3
YES2.0	21.78	13.98	8.00	9.50	46.55	0
YRAD6	21.70	14.12	7.60	8.78	45.07	2.64
YRAD6-1	21.62	14.32	7.35	8.96	40.77	5.23

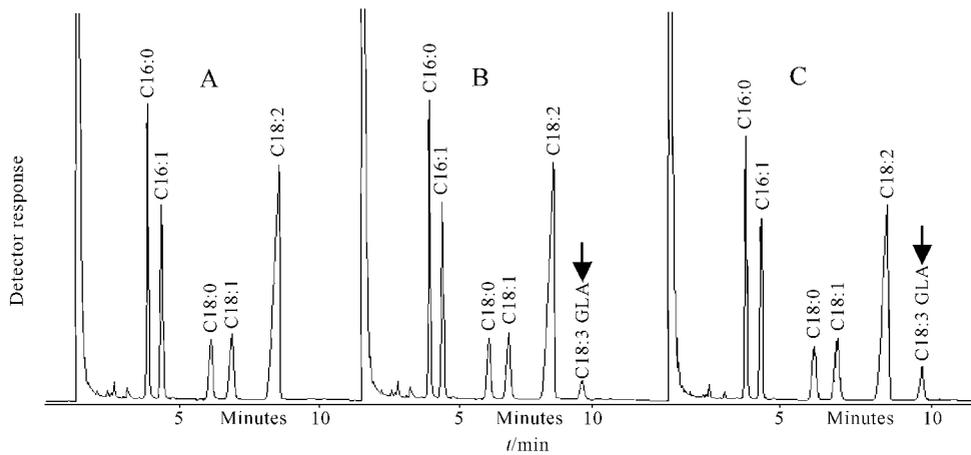


图2 不同质粒转基因酿酒酵母的总脂肪酸气相色谱分析图

Fig. 2 Identification of GLA in transgenic *Saccharomyces cerevisiae* by GC analysis

A: *Saccharomyces cerevisiae* transformed with control vector pYES2.0; B: *Saccharomyces cerevisiae* transformed with pYRAD6; C: *Saccharomyces cerevisiae* transformed with pYRAD6-1.

## 2.4 GC-MS 定性分析

为进一步确证出现的新峰为  $\gamma$ -亚麻酸甲酯,经 GC-MS 定性分析,然后通过 NIST/EPA/NIH 数据库的计算机检索,结果显示特殊峰为 GLA 甲酯,  $M/z = 292$  表示  $\gamma$ -亚麻酸甲酯化衍生物的分子量,与 GLA 甲酯标准物(图略)的相同,而且 YRAD6 和 YRAD6-1 转基因酵母中出现的特殊峰均为 GLA 甲酯。所有这些结果表明,改变少根根霉  $\Delta^6$ -脂肪酸脱氢酶基因序列中转移起始密码子的周边序列,其编码产物除保持特异性的将外源底物亚油酸成  $\gamma$ -亚麻酸的  $\Delta^6$ -脂肪酸脱氢酶活性外,还能明显提高  $\Delta^6$ -脂肪酸脱氢酶基因在酿酒酵母中的表达水平。

## 3 讨论

外源基因能否在宿主细胞中稳定表达,是基因工程实现生产价值的关键,更关系到基因工程的生命力。除了在转录水平能增强基因的表达外,在转译水平对转译序列进行一定的修饰也能增强基因表达。有证据表明,基因 5'和 3'端的非转译区序列(UTR)转译起始密码子周边序列组成以及不同宿主氨基酸密码子的偏好等都影响基因的高效表达。

转译起始密码子 AUG 周边序列的组成对基因的表达产生影响,在 AUG 上游-1 到-5 位中,-3 位的 A 对表达有最显著的影响。突变分析结果显示 A 的改变会导致 40S 核糖体小亚基越过该起始密码子,而通过其它机制识别下一个 AUG 密码子并起始转译。下游+4 位的 G 作用也类似于-3 位的 A,在真核生物中高度保守并对转译起始影响显著。此外,-3 位两侧的 4 个 C 也是利用频率很高的碱基,但影响没有-3 位的 A 和+4 位的 G 那么显著,+5 位 C 和+6 位 U 也没有观察到有显著影响<sup>[3,9,10]</sup>。密码子周边序列对转译起始效率的影响首先在哺乳动物中得到研究,在植物中也获得证明。Taylor 等<sup>[11]</sup>通过几丁质酶在植物体内的表达实验也证明植物对于-3 位的 A 和+4 位的 G 的偏好性。我们参照 Kozak 序列把出发序列 RAD6 中转移起始密码子的周边序列 TCAATAUGAGU 相应地修改为 CCACCAUGGGU,并转化酿酒酵母中进行诱导表达,检测其对

表达的影响。分析结果表明这种改变提高了少根根霉  $\Delta^6$ -脂肪酸脱氢酶基因在酿酒酵母中的表达, $\gamma$ -亚麻酸含量从总脂肪酸含量的 2.64% 增加到 5.23%,提高了近两倍,其表达水平已接近报道的鲁氏毛霉<sup>[12]</sup> (*Mucor rouxii*) 和卷枝毛霉<sup>[13]</sup> (*Mucor circinelloides*)  $\Delta^6$ -脂肪酸脱氢酶基因的表达水平,再次证明,在真核生物中转移起始密码子周边序列对于基因的表达具有调节作用。

GLA 是人体必需脂肪酸,由于其在食品、医药、保健品等领域的重要作用以及传统来源的局限性,近年来逐渐受到国内外学者的广泛关注。GLA 可转化成诸如 AA、DHA、EPA 等长链多不饱和脂肪酸(Long-chain polyunsaturated fatty acids, LC-PUFAs) 这些 LC-PUFAs 是前列腺素、环前列腺素和白三烯类等具有强烈生理活性的自身调节物的前体<sup>[5]</sup>随着现代分子生物学技术的发展,人们对 GLA 合成的关键酶在分子水平上的作用与调节机制有了进一步的了解,借助于现代生物工程技术构建 GLA 高产量性状的基因工程菌株或植株,使特定的细胞或生物产生“特殊的油”已成为人类营养和健康方面研究的热点之一。然而,外源基因在宿主生物中的稳定高效表达是一个多方面、多级水平综合调节的过程,随着对  $\Delta^6$ -脂肪酸脱氢酶基因结构和功能之间,以及表达调控等方面进行深入全面的研究,大规模生产基因工程化的包括 GLA 在内的多不饱和脂肪酸已为时不远。

## 参考文献

- [1] Kozak M. Initiation of translation in prokaryotes and eukaryotes. *Gene*, 1999, **234**(2):187-208.
- [2] Kozak M. Point mutations define a sequence flanking the AUG initiator codon that modulates translation by eukaryotic ribosomes. *Cell*, 1986, **44**(2):283-292.
- [3] Kozak M. Recognition of AUG and alternative initiator codons is augmented by G in position +4 but is not generally affected by the nucleotides in positions +5 and +6. *EMBO J*, 1997, **16**(9):2482-2492.

- [ 4 ] 吴 定 路桂红.  $\gamma$ -亚麻酸研究进展. 中国乳品工业, 1997, 25 (3): 42-45.
- [ 5 ] Horrobin D F. Nutritional and medical importance of gamma-linolenic acid. *Prog Lipid Res*, 1992, 31(2): 163-194.
- [ 6 ] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. 分子克隆试验指南. 金冬雁, 黎孟枫, 等译. 第二版. 北京: 科学出版社, 1993, 34-68.
- [ 7 ] 刘 莉, 李明春, 胡国武, 等. 高山被孢霉 ATCC 16266  $\Delta^6$ -脂肪酸脱氢酶基因在酿酒酵母中的表达. 生物工程学报, 2001, 17 (2): 161-164.
- [ 8 ] 毛小洪, 蔡金科. 酵母完整细胞快速高效转化法. 生物工程学报, 1990, 6(2): 102-107.
- [ 9 ] Kozak M. Context effects and inefficient initiation at non-AUG codons in eucaryotic cell-free translation systems. *Mol Cell Biol*, 1989, 9: 5073-5080.
- [ 10 ] Lin F T, MacDougald O A, Diehl A M, et al. A 30-kDa alternative translation product of the CCAAT/enhancer binding protein alpha message: transcriptional activator lacking antimetabolic activity. *Proc Natl Acad Sci*, 1993, 90: 9606-9610.
- [ 11 ] Taylor J L, Jones J D G, Sandler S, et al. Optimizing the expression of chimeric genes in plants cells. *Mol Gen Genet*, 1987, 210: 572-577.
- [ 12 ] Laoteng K, Mannontarat R, Tanticharoen M, et al.  $\Delta^6$ -desaturase of *Mucor rouxii* with high similarity to plant  $\Delta^6$ -desaturase and its heterologous expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2000, 279: 17-22.
- [ 13 ] Michinaka Y, Aki T, Shimauchi T, et al. Differential response to low temperature of two  $\Delta^6$  fatty acid desaturases from *Mucor circinelloides*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2003, 62: 362-368.

## Influence of Sequence Modification Flanking AUG Codon on $\Delta^6$ -fatty Acid Desaturase Gene Expression

ZHANG Qi<sup>1,2</sup> LI Ming-Chun<sup>1</sup> SUN Ying<sup>1</sup> MA Hai-Ting<sup>1</sup> XING Lai-Jun<sup>1</sup>

(<sup>1</sup> Department of Microbiology, Nankai University, Tianjin 300071, China)

(<sup>2</sup> The Key Laboratory for Microbial Resource of Ministry of Education, Yunnan Institute of Microbiology, Yunnan University, Kunming 650091, China)

**Abstract:** With modification of sequences flanking AUG codon, a novel fragment (*RAD6-1*) of *Rhizopus arrhizus*  $\Delta^6$  fatty acid desaturase gene (*RAD6*) was subcloned into expression vector pYES2.0. A recombinant vector pYRAD6-1 was constructed and sequenced for conformation. The resultant recombinant vector was then transformed into *Saccharomyces cerevisiae* strain INVSc1 for expression, along with the yeasts transformed with vacant vector pYES2.0 and pYRAD6 derived from original sequence as controls. Yeast cultures, grown to logarithmic phase at 30 °C, were supplemented with 0.5mmol/L LA and 2% galactose and cultivated at 20 °C for a further 48h. Total fatty acids were extracted from the induced cells and esterified. Gas chromatogram (GC) and gas chromatogram mass spectrum (GC-MS) analysis of the resultant fatty acid methyl esters (FAME) showed that  $\gamma$ -linolenic acid was detected only in pYRAD6 and pYRAD6-1 transformed yeasts. Furthermore, the percentage of  $\gamma$ -linolenic acid to total fatty acids in pYRAD6-1-transformed yeasts was 5.23%, and only 2.64% in pYRAD6-transformed yeast was detected. The results demonstrated that the expression level of  $\Delta^6$ -fatty acid desaturase gene was increased by the modification of sequences flanking AUG codon.

**Key words:** *Rhizopus arrhizus*,  $\Delta^6$ -fatty acid desaturase gene, Initiation codon, *Saccharomyces cerevisiae*,  $\gamma$ -linolenic acid, Expression

Foundation item: Chinese National Natural Science Foundation (30200176); The Project to Subsidize Core Teachers in Colleges and Universities

\* Corresponding author. Tel 86-22-23508506; Fax 86-22-23508800; E-mail xinglaj@you.com

Other authors: SUN Hong-Yan<sup>1</sup>, REN Yong<sup>1</sup>

Received date: 10-08-2003