

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

李春阳¹, 杜道海¹, 于水燕¹, 李慧¹, 刘凡¹, 周志刚^{1,2*}

(1. 上海海洋大学农业部水产种质资源与利用重点开放实验室, 上海 201306;

2. 上海市高校水产养殖学 E-研究院, 上海海洋大学水产与生命学院, 上海 201306)

摘要: 根据莱茵衣藻和普通小球藻 $\omega 3$ 脂肪酸去饱和酶氨基酸序列 (GenBank 登录号分别为 ABL09485 和 BAB78717) 的保守区 (TMFWALF 和 HHDIGTH) 设计简并引物, 以缺刻缘绿藻 H4301 总 RNA 为模板, 通过反转录 PCR 和 cDNA 末端快速克隆技术 (RACE), 克隆了缺刻缘绿藻 $\omega 3$ 脂肪酸去饱和酶基因的 cDNA 全长序列 (GenBank 登录号: EU658930), 它与莱茵衣藻的这个基因具有 69% 相似性。该基因 cDNA 序列长 2 330 bp, 其中 5' - 非翻译区长 107 bp; 3' - 非翻译区 912 bp, 且具有明显的 poly(A) 尾巴; 开放阅读框 1 311 bp, 编码一个 436 个氨基酸的蛋白质, 分子量为 49.06 ku, 等电点 7.85; 该基因编码的蛋白为膜结合蛋白, 含有 2 个疏水区域和 3 个保守的组氨酸簇基序。将该基因的 cDNA 序列与其 DNA 序列比对后, 发现该基因在其编码区存在 6 个内含子, 剪切位点均符合“GT-AG”规则。实时荧光定量 PCR 结果显示, 在氮饥饿培养过程中, 缺刻缘绿藻 $\omega 3$ 脂肪酸去饱和酶基因的相对转录量在 4 h 时可能因休克显著提高 ($P < 0.05$), 然后开始下调, 12 h 开始显著下降 ($P < 0.05$), 并在 20 h 降到最低 (约为完全培养基的 11.6%), 此后保持在低水平 (为完全培养基的 23.2%) 波动 ($P < 0.01$)。脂肪酸组分的气相色谱结果表明, 在氮饥饿培养过程中, 花生四烯酸占总脂肪酸的百分含量逐步提高, 而作为多不饱和脂肪酸 $\omega 3$ 合成途径的产物, 如 α -亚麻酸和十六碳三烯酸 (16:3 $\omega 3$) 的百分含量在 40 h 或 96 h 后都显著降低 ($P < 0.05$)。这些结果表明缺刻缘绿藻 $\omega 3$ 脂肪酸去饱和酶基因在氮饥饿过程中的相对低转录量, 导致 $\omega 3$ 合成途径相关产物百分含量的降低, 确保了该藻沿着 $\omega 6$ 途径来合成与积累花生四烯酸以提高其百分含量。另外, 十六碳二烯酸 (16:2 $\omega 6$)、亚油酸及花生四烯酸可能是该克隆基因所编码 $\omega 3$ 脂肪酸去饱和酶的反应底物。

关键词: 缺刻缘绿藻; $\omega 3$ 脂肪酸去饱和酶基因; 氮饥饿; 实时荧光定量 PCR; 脂肪酸

中图分类号: S 917

文献标识码: A

缺刻缘绿藻 (*Myrmecea incisa* Reising) 隶属绿藻门 (Chlorophyta)、共球藻纲 (Trebouxiophyceae), 是一种单细胞球形绿藻, 细胞常聚集在一起形成非定型群体的细胞团^[1]。1996 年, Watanabe 等^[2]于日本 Tateyama 高山雪地中发现并分离该藻后, 将其改名为 *Parietochloris incisa* (Reising) Watanabe comb. nov.。研究发现, 该藻能够合成并积累大量的花生四烯酸 (arachidonic

acid, 20:4 $\omega 6$, AA)^[3], 尤其在氮饥饿及高密度连续培养的条件下^[4-5], 藻细胞中 AA 含量可达脂肪酸总量的 60%、藻体干重的 20%^[6]。它是人类迄今为止已知 AA 含量最高的藻类, 有望成为工业化生产 AA 的候选物种^[7-9]。

大多数藻类细胞的 AA 合成代谢途径中^[10-11], 油酸 (oleic acid, OA) 在 $\Delta 12$ 脂肪酸去饱和酶 (fatty acid desaturase, FAD) 的作用下形成亚

收稿日期: 2010-06-02 修回日期: 2010-07-15

资助项目: 国家自然科学基金项目 (30972243); 国家“八六三”高技术研究发展计划 (2009AA064401); 教育部留学回国人员科研启动基金资助项目; 上海市教育委员会科研创新项目 (09ZZ167); 海洋生物学重点学科资助项目 (J50701)

通讯作者: 周志刚, Tel: 021-61900424, E-mail: zgzhou@shou.edu.cn

油酸(linoleic acid, LA)。LA可以在 ω 3 FAD催化下产生 α -亚麻酸(α -linolenic acid, ALA),进入多不饱和脂肪酸代谢的 ω 3途径;也可以在 Δ 6 FAD的作用下生成 γ -亚麻酸(γ -linolenic acid, GLA),沿着 ω 6途径,经延长酶和FAD的作用生成AA。AA可以同样在 ω 3 FAD的作用下生成二十碳五烯酸(eicosapentenoic acid, EPA)。

缺刻缘绿藻不仅含有沿着 ω 6途径合成AA所需要的所有中间产物,而且还含有 ω 3途径的产物,如16:3 ω 3、ALA、EPA等^[3,6],鉴于氮饥饿胁迫可引起该藻沿着 ω 6途径合成与积累AA^[6],推测缺刻缘绿藻多不饱和脂肪酸代谢的 ω 3途径就会被抑制。因此,在 ω 3途径中起关键作用的 ω 3 FAD基因相对转录量以及该酶作用产物16:3 ω 3、ALA及EPA的含量都应该降低,这样才能确保AA的含量增加。为了证明这个推测,本研究首先利用设计的简并引物克隆缺刻缘绿藻 ω 3 FAD基因,然后通过实时荧光定量PCR(quantitative real-time PCR, Q-RT-PCR)分析在氮饥饿培养过程中 ω 3 FAD基因的相对转录量变化,并结合利用气相色谱分析该过程中脂肪酸组分的变化,探讨缺刻缘绿藻合成和积累AA的分子机理,为利用缺刻缘绿藻规模化生产AA提供理论指导。

1 材料与amp;方法

1.1 藻种及培养

缺刻缘绿藻(*Myrmecea incisa* Reisingl H4301)购自CAUP(Culture Collection of Algae of Charles University of Prague)。

将藻接种于BG-11液体培养基^[12],在25℃和115 $\mu\text{mol photons}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 的光照培养箱中培养,光周期为14L:10D,每天不定期地摇晃。待长至指数生长期,4℃下5 500 r/min离心10 min,收集藻细胞,用灭菌去离子水洗涤两次并离心收集,然后将其转入到缺氮的BG-11培养基中25℃全光照充气培养,光照强度为150 $\mu\text{mol photons}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 。在接种后的0、4、8、12、16、20、24、32、40、48、56、64、72 h分别离心收集藻细胞,液氮速冻后-80℃保存用于RNA提取或脂肪酸分析。考虑到基因转录到脂肪酸合成存在着时滞,若用于脂肪酸组成分析,上述72 h后每隔12 h继续取样至168 h。

1.2 ω 3 FAD基因cDNA全长序列克隆

采用TRIzol法^[13]抽提总RNA取适量藻细

胞样品,液氮研磨,转入含有1 mL的TRIzol试剂(Invitrogen公司)离心管中,加入氯仿抽提,4℃下5 500 r/min离心10 min取上清,然后加入异丙醇离心,用75%乙醇洗涤沉淀,加适量无RNase水溶解RNA。取1~5 μg RNA用反转录试剂盒(TaKaRa)进行cDNA第一链合成,作为基因克隆的PCR反应模板。

根据莱茵衣藻(*Chlamydomonas reinhardtii*)和普通小球藻(*Chlorella vulgaris*) ω 3 FAD基因的氨基酸序列(GenBank登录号分别为ABL09485和BAB78717)保守区,设计一对简并引物序列Fdes1和Rdes1(表1),用于缺刻缘绿藻 ω 3 FAD基因cDNA片段的克隆。25 μL 反应体系含10 \times PCR缓冲液II 2.5 μL ,dNTPs(各10 mmol/L)2 μL ,引物Fdes1和Rdes1各1.0 μL (10 $\mu\text{mol/L}$),模板1.0 μL ,Taq酶0.5 μL (TaKaRa),无RNase水17 μL 。PCR反应程序:94℃预变性2 min;然后30个循环包括94℃变性30 s,58℃退火30 s,72℃延伸1 min;最后72℃延伸10 min。PCR产物经琼脂糖凝胶电泳检测、胶回收(北京天根)纯化与pMDT-19载体连接后转入大肠杆菌(*Escherichia coli*)DH5 α 感受态细胞,筛选阳性克隆后送到上海生工生物工程技术服务有限公司测序。

根据获得的缺刻缘绿藻 ω 3 FAD基因cDNA片段序列设计基因特异性引物(gene specific primers, GSPs)5'-GSP和3'-GSP(表1)。根据SMARTTM RACE cDNA扩增试剂盒(Clontech)的使用说明分别建立5'-RACE和3'-RACE反转录体系和PCR反应体系,应用降落PCR原理进行扩增。反应程序:94℃变性30 s,72℃延伸150 s,5个循环;94℃变性30 s,70℃退火30 s,72℃延伸150 s,5个循环;94℃变性30 s,68℃退火30 s,72℃延伸150 s,30个循环;72℃延伸7 min。按上述方法进行电泳检测、胶回收纯化、TA克隆并测序。

1.3 ω 3 FAD基因DNA序列克隆

采用CTAB法^[14-15]提取缺刻缘绿藻基因组DNA取适量藻细胞液氮研磨后,加入到65℃预热的CTAB提取缓冲液中,水浴1.0 h,加入等体积的氯仿:异戊醇(24:1)萃取,异丙醇沉淀DNA,75%的乙醇洗涤2~3次,适量TE缓冲液溶解沉淀,稀释50倍作为基因克隆的PCR反应

模板。

表 1 本研究所使用的引物及其序列
Tab. 1 Sequences of the primers employed in the present research

引物 primers	序列 sequences
Fdes 1	5'-ACCATGTTCTGGGC(C/T)CT(G/C)TT-3'
Rdes 1	5'-TG(G/C)GTGCC(A/G)ATGTCGTGGTG-3'
5'-GSP	5'-ATGTGTGCGGTGGCTGATCCTCCAGC-3'
3'-GSP	5'-CTTCTCCAGCAACAAGACGCTCAACAAC-3'
Fdes 2	5'-AAACCCGGCAACAATGCA-3'
Rdes 2	5'-AGAATCAGAACCCGAAGC-3'
Fdes 3	5'-GTGGCAACATCACACTC-3'
Rdes 3	5'-ACAGGATGCCAGGACTCATC-3'
18SF	5'-AGTCGCGAGGTTACTTTGA-3'
18SR	5'-ATCATTACTCCGGTCCCACA-3'

根据获得的缺刻缘绿藻 ω 3 FAD 基因 cDNA 全长序列,在该基因的 5'-非编码区(5'-UTR)和 3'-UTR 分别设计上、下游引物 Fdes 2 和 Rdes 2 (表 1),克隆 ω 3 FAD 基因的 DNA 序列。25 μ L 的 PCR 反应体系为 10 \times PCR 缓冲液 2.5 μ L, dNTPs(各 10 mmol/L)2 μ L, Mg^{2+} (25 mmol/L) 1.5 μ L,引物 Fdes 2 和 Rdes 2(10 μ mol/L)各 1.0 μ L,模板 1.0 μ L, *Taq* 酶 0.5 μ L (TaKaRa) 及无 RNase 水 15.5 μ L。PCR 反应程序:94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min;然后 35 个循环包括 94 $^{\circ}$ C 变性 1 min,55 $^{\circ}$ C 退火 1 min,72 $^{\circ}$ C 延伸 2 min;最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。按上述方法进行电泳检测、胶回收纯化、TA 克隆并测序。

1.4 序列分析

应用生物学分析软件 DNAMAN 6.0 和 Bioedit 7.0 将得到的序列进行拼接、蛋白质序列推导及同源性分析。使用在线软件 expasy 中的工具 ProtParam (<http://www.expasy.ch/tools/protparam.html>)分析蛋白质的组成、疏水性、分子量和等电点。分别用软件 Phobius (<http://phobius.sbc.su.se/>) 和 InterProScan (<http://swissmodel.expasy.org/workspace>)对蛋白质的跨膜区和二级结构进行预测。通过 PROSITE 数据库 (<http://www.predictprotein.org/>)对蛋白质序列的功能位点进行预测。利用 SMART 程序(<http://smart.embl-heidelberg.de/>)进行结构域分析。

1.5 实时荧光定量 PCR(Q-RT-PCR)

根据已经得到的 cDNA 序列,用软件 Primer

Premier 5 设计 Q-RT-PCR 的引物 Fdes 3 和 Rdes 3(表 1)。根据 18S rRNA 序列(GenBank 登录号 J384550)设计引物 18S F 和 18S R(表 1),利用 iCycler iQ5 (Bio-Rad)上完成 Q-RT-PCR 反应。20 μ L 的 Q-RT-PCR 反应体系为 SYBR Mix (TaKaRa 公司)12.5 μ L,正、反向引物(10 μ mol/L)各 1.0 μ L,模板 2.0 μ L 及 DEPC 水 3.5 μ L。反应程序:95 $^{\circ}$ C 预变性 3 min;然后 40 个循环包括 95 $^{\circ}$ C 变性 5 s,60 $^{\circ}$ C 退火 20 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 15 s。同一样品重复 3 个反应,以 18S rRNA 作为参照基因,用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 来表示基因的相对转录量,结果为 3 个反应的平均值 \pm 标准差。运用 *t* 检验进行显著性分析。

1.6 脂肪酸组分变化分析

按文献[16]报道方法进行脂肪酸组分的分析。将冻存的样品进行真空冷冻干燥,分别称取 10 mg 藻粉于酯化瓶中,加入 2 mL 含 2% 硫酸的甲醇溶液,同时加入 C17(1%)做内标,混匀充氮气,然后封闭瓶口,放入 85 $^{\circ}$ C 的水浴锅中加热 1 h,使结合的脂肪酸分子充分解离,并且甲酯化。把溶液转移到一个灭菌的 15 mL 离心管中,加 1 mL 双蒸水和 1 mL 正己烷,充分混匀后,4 $^{\circ}$ C 下 5 500 r/min 离心 10 min,将上清液转移到新的离心管中,并用氮气进行浓缩。然后放于 -20 $^{\circ}$ C 冰箱中保存备用。

利用气相色谱仪(Agilent 6890 plus)进行脂肪酸组分的分析。色谱柱型号为 HP-5 毛细管柱(30 m \times 0.25 mm);升温程序为 50 $^{\circ}$ C 保留 1 min,25 $^{\circ}$ C/min 升温至 200 $^{\circ}$ C,3 $^{\circ}$ C/min 升温至 230 $^{\circ}$ C,最后保留 18 min;分流比为 50:1;氮气、氢气与空气的流速分别为 30,450 与 40 mL/min。

对照标样中各个脂肪酸组分峰的保留时间,以确定缺刻缘绿藻脂肪酸的组成成分,再以面积归一化法确定样品中各种脂肪酸的相对百分含量。每个样品重复 3 个反应,结果以 3 个反应的平均值 \pm 标准差来表示。运用 *t* 检验进行显著性分析。

2 结果

2.1 缺刻缘绿藻 ω 3 FAD 基因的 cDNA 及 DNA 序列克隆

经过反复实验与筛选,其中根据莱茵衣藻和普通小球藻 ω 3 FAD 基因的氨基酸序列保守区

(TMFWALF 和 HHDIGTH) 设计的一对简并引物 Fdes 1 和 Rdes 1 (表 1), 可以很好地从缺刻缘绿藻 cDNA 中扩增出一条长 650 bp 的目的片段 (图 1-A); 然后利用 RACE 技术克隆了该基因的 5' - 和 3' - 末端产物, 它们的长分别为 671 bp (图 1-B) 和 1 759 bp (图 1-C); 将这三片段序列拼接并经过重新设计引物进行 PCR 反应与测序验证, 得到全长 2 330 bp 的 cDNA 序列 (GenBank 登录号: EU658930)。其中开放阅读框 1 308 bp, 编码一个含 436 个氨基酸的前体蛋白; 5'-UTR 长 107 bp; 3'-UTR 长 912 bp, 并具有明显的 poly(A) 尾

巴。经 BLAST 搜索, 发现该序列与莱茵衣藻 ω 3 FAD 基因的 cDNA 及其编码蛋白的氨基酸序列 (GenBank 登录号为 ABL09485) 相似性分别为 78% 和 69%。

将以缺刻缘绿藻基因组 DNA 为模板的 PCR 反应产物序列与 ω 3 FAD 基因 cDNA 序列进行比对, 发现该基因在其编码区存在 6 个内含子, 自起始密码子开始, 它们的长依次为 340、212、114、144、200 和 186 bp (图 2)。通过序列分析可知, 每个内含子的剪切位点均符合“GT-AG”规则。

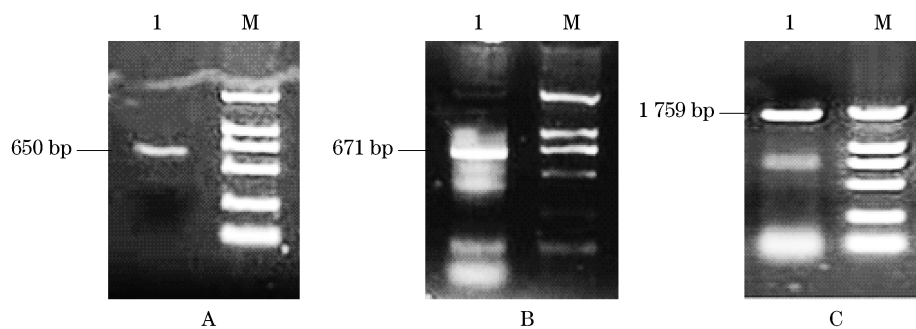


图 1 缺刻缘绿藻 ω 3 FAD 基因扩增的电泳图谱

M. DL-2000 分子量标准; 1 泳道. RT-PCR 扩增产物(A), 5'-RACE 扩增产物(B) 和 3'-RACE 扩增产物(C)。

Fig. 1 Electrophoresis patterns of amplified products of the ω 3 FAD gene from *M. incisa*

M. DL-2000 marker; Lane 1. product of RT-PCR(A), product of 5'-RACE(B), and product of 3'-RACE(C).

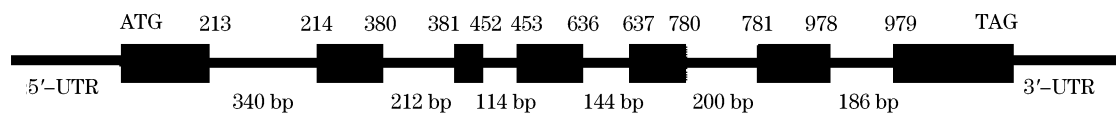


图 2 缺刻缘绿藻 ω 3 FAD 基因结构

Fig. 2 Schematic structure scheme of the ω 3 FAD gene cloned from *M. incisa*

2.2 序列特征分析

蛋白质组成等软件预测结果显示, 缺刻缘绿藻 ω 3 FAD 基因所编码蛋白的分子量为 49.06 ku, 等电点为 7.85。氨基酸组成分析结果表明, 该蛋白质富含疏水性氨基酸, 它们约占总氨基酸的 50.3%, 其中 Ala 占 9.9%、Leu 占 8.5%、Pro 占 8.5%、Val 占 6.7%、Tyr 占 5.0%、Ile 占 4.6%、Phe 占 4.1%、Trp 占 3.0%。

蛋白质跨膜区和二级结构等软件分析可知, 缺刻缘绿藻 ω 3 FAD 属于跨膜蛋白, 含 4 个跨膜区, 分别在 Phe106-Leu124, Trp130-Gly148, Ala266-Phe288, Phe292-His309 之间。疏水性分析 (图 3) 表明这 4 个跨膜区形成了 2 个富含疏水

性氨基酸残基的螺旋区 (Pro100-Trp151 和

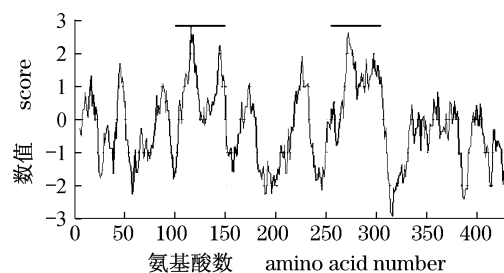


图 3 缺刻缘绿藻 ω 3 FAD 的疏水性分析

“—”表示跨膜区

Fig. 3 Hydrophobicity analysis of deduced ω 3 FAD from *M. incisa*

“—”indicates the transmembrane region

Lys256-Pro309),分别含有 52 和 54 个氨基酸残基,每个螺旋区分别跨膜两次。

蛋白质序列功能位点等软件推测,缺刻缘绿藻 ω3 FAD 含有 8 种、18 个功能位点,分别为 2 个 N-糖基化位点、1 个 cAMP 和 cGMP 依赖性蛋白激酶磷酸化位点(PKA 和 PCG)、5 个蛋白激酶 C 磷酸化位点(PKC)、4 个酪蛋白激酶 II 磷酸化位点、1 个酪氨酸激酶磷酸化位点、3 个 N-豆蔻酰基化位点、1 个酰胺化位点及 1 个原核膜脂蛋白脂结合位点。

蛋白质结构域预测结果表明,缺刻缘绿藻 ω3 FAD 含有一个 FA_desaturase domain(脂肪酸去饱和酶结构域),位于 ORF 的 Tyr133-Phe380 之间(表 2)。从该结构域的序列来分析,缺刻缘绿藻与其它的绿藻甚至苔藓以及种子植物的关系比较接近。有趣的是虽同属于藻类,三角褐指藻与缺刻缘绿藻只有 28% 的相似性(表 2),它与其他绿藻甚至蓝藻的相似性也都比较低,显示了这个基因在硅藻中可能存在着趋异现象。

表 2 不同物种 ω3 FAD 的 FA_desaturase 结构域比较
Tab.2 Comparison of FA_desaturase domains of ω3 FAD from different species

Table with 4 columns: Protein sequence number/GenBank ID, Species, Phylum, and FA_desaturase structure domain/FA_desaturase domain. Rows include Myrmecia incisa, Chlamydomonas reinhardtii, Chlorella vulgaris, Dunaliella salina, Phaeodactylum tricorutum, Physcomitrella patens, Arabidopsis thaliana, Jatropha curcas, Nicotiana tabacum, Helianthus annuus, Zea mays, Triticum aestivum, Synechocystis sp. PCC 6803, and Microcystis aeruginosa.

注: * 括号内的数据是相似性,以缺刻缘绿藻为 100% 来计算的。

Notes: * the numeral in the parentheses means the identity with M. incisa ω3 FAD sequence as a reference.

2.3 ω3 FAD 同源序列比较

把缺刻缘绿藻与 NCBI 数据库中所有藻类及部分高等植物(表 2)的 ω3 FAD 氨基酸序列进行

比对,结果(图 4)发现,缺刻缘绿藻的第一个(HDCGH)与第二个(HRTHH)组氨酸簇基序与其它绿藻(除盐生杜氏藻外)、高等植物及蓝藻完

Myrmecia incisa H4301 YGRAAPPFFTLADIKAAVPAHCWKKSTWRSMFLARD...VGVVAAALAVGAYTLNAAWAWPLY...MV
Chlamydomonas reinhardtii YDLSAPPFFTLQDLRNAIPAHCEKNTFRSNAHLALD...VGIVFGLAAVAFVFNQWMMWPLY...MV
Chlorella vulgaris KRLANAPPFTLQDMRDAIPAECEKDTFRSAAHLALD...VGIVAAALAI GAYTIGNPLVWPLY...WF
Arabidopsis thaliana FDPGAPPFFMLADIRAAIPKHCWVKNPWKSLSYVVRD...VAIVFALLAAGNAYLNNUVWPLY...WL
Jatropha curcas FDPGSPFFPKLADIRAAIPKHCWVKDPWRSMSYVVRD...VAUVFGLAAIAAFNNVWVWPLY...MF
Nicotiana tabacum FDPGAPPFFKLSDIRAAIPKHCWVKNPWKSMSYVVRD...VAIVFGLAAIAAFNNVWVWPLY...MF
Helianthus annuus FDAGAPPFFKLAADIRAAIPKRCWVKDPWRSMSYVVRD...VAIVLGLAAIAAHLNNUVWPLY...MA
Zea mays FDPGAPPFFGLAEIRAAIPKHCWVKDPWRSMSYVLRD...VAUVLGLAAIAAARLDSULVWPLY...MA
Triticum aestivum FDPGAPPFFGLADIRAAIPKHCWVKDPWRSMSYVVRD...VVVVALAATAARLDSULWAVVY...MA
Physcomitrella patens subsp. Patens FDASRKPFFTLSDIRAAIPKHCWEKNTWKSLSYVLRD...VAIVFGLAAGAAAVNSWVWPLY...WL
Dunaliella salina YPKTEELPFTLQELRNAIPADCFEPSVVRSLGYFFLD...VGLIAGFYALAAVLDSSUFFYIF...WL
Synechocystis sp. PCC 6803 SLKREFLPFTLQDVRLLIPARCFOSSVFRSLAYFFFD...IGIITLLYWTYQINQAWFFPLF...MF
Microcystis aeruginosa NIES-843 RDWTHDEPKLSEVKRMLPQEAHFHIDTATSLFYFAVDFIAWASTMGHLNSVVSDDIYLSFFIWKGLAVAPLQI
Phaeodactylum tricorutum CCAP 1055

...TLNMLVGNITHESSII...LVPYHGURISHRTHHANGHVENDESWHFVSKRIYNQMESMAKIGRLAFLLPLFAFF
...ALNDFIGHLTHESSII...LVPYHGURISHRTHHANGHVENDESWHFVTKKLYDHLPEMARVGRLSMPWALFAFF
...TLNDFVGNIVHESSII...MVPYHGURISHRTHHANGHVENDESWHFIVKSNYEKLDKRWAKLGRLLFPPLFAFF
...KLNsvvghllhssii...LVPYHGURISHRTHHANGHVENDESWHFMSEKIYNTLDKPTRFFRFTLPLVMLAYP
...KLNsvvghllhssii...LVPYHGURISHRTHHANGHVENDESWHFLSEKIFKSLDNLTKMLRFTLFPPLLAYP
...KLNsvvghllhssii...LVPYHGURISHRTHHANGHVENDESWHFIPEKIYNSLDLTKKLRFTLFPPLLAYP
...KLNsvvghllhssii...LVPYHGURISHRTHHANGHVENDESWHFLTEKTFKSLDWITRFTLFTLFPPLLAYP
...KLNsvvghllhssii...LVPYHGURISHRTHHANGHVENDESWHFLPERLYKSLDFMTRKLRFTLFPPLLAYP
...KLNsvvghllhssii...LVPYHGURISHRTHHANGHVENDESWHFLPEKLYRSLDSSSTRKLRFALEFPPLLAYP
...TLNslighlthssii...LVPYHGURISHRTHHANGHVENDESWHFLTKSQYDGHDFWAKVGRKLFPPAMFAFF
...Y...MVPYHGURISHRTHHANGHVENDESWHFTRKSVYDKMDDLGRIGRLTLFW...SMFAFF
...TLNnwiighlshstpi...LVPYHGURISHRTHHANGHVENDESWHFVSEQKYNQMAWYEKLLRFTLFPPLLAYP
...WLNnliighlshstpi...LVPYHGURISHRTHHANGHVENDESWHFTQYNNMAWYEKLLRFTLFPPLLAYP
...LTFGAMMCMUCIGHDAGHTTVSKDRRFGALINRVVGEVAHSAICLTPFFVMAKSHLKHMGHNHLTRDYSHQWFIREERESLHPLIQLSHATRNLQPLILYL

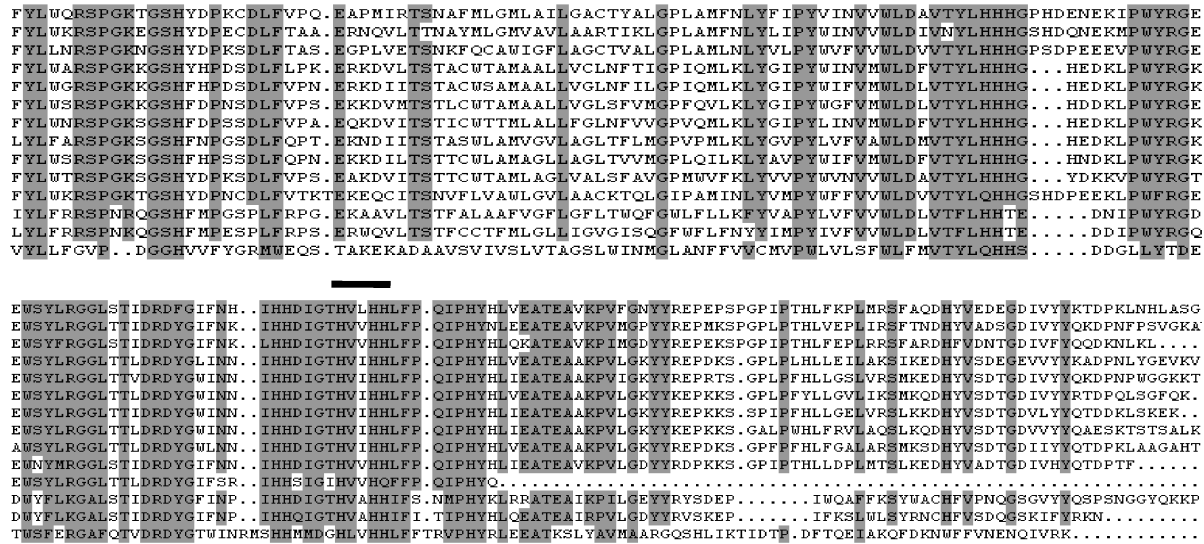


图4 不同物种 ω3 FAD 氨基酸同源序列比对

“—”表示3个组氨酸簇。

Fig. 4 Sequence alignment of the deduced ω3 FAD proteins from the selected 14 species

“—” shows the histidine-rich motifs.

全一致,但它的第3个基序(HVLHH)中,出现了以 Leu 取代莱茵衣藻与小球藻的 Ile 或高等植物的 Val 残基。总之,该结果表明 ω3 FAD 的3个组氨酸簇基序非常保守,本研究自缺刻缘绿藻中所克隆到的这个基因是 ω3 FAD 家族的一员。有关其功能鉴定等研究有待进一步完善。

2.4 ω3 FAD 基因相对转录量的变化

Q-RT-PCR 的结果(图5)显示,在氮饥饿胁迫过程中,缺刻缘绿藻 ω3 FAD 基因的相对转录量变化明显。在氮饥饿培养4 h时,该基因可能因氮饥饿胁迫引起的休克(shock),其相对转录量显著($P < 0.05$)提高;然后开始下降,自12 h开始,下降显著($P < 0.05$),并在20 h降到最低,此时仅为完全培养基(0 h)时相对转录量的11.6%;此后在设计的时间范围内,该基因的相对转录量都极显著地($P < 0.01$)保持在低水平(平均值为完全培养基中的23.2%)波动。表明氮饥饿胁迫确实导致了缺刻缘绿藻 ω3 FAD 基因相对转录量的下调,这与推测的结果完全吻合。

2.5 脂肪酸组分的变化

利用气相色谱分析脂肪酸组成的结果显示,把氮饥饿条件下与完全培养基(0 h)中培养的缺刻缘绿藻进行比较时,发现其脂肪酸组分的变化非常明显,总体表现在16:3ω3(图6)、LA和ALA(图7)等占总脂肪酸的百分含量均逐渐降低,而

AA等的百分含量(图8)逐步增加,且随着胁迫时间的延长,差异越来越显著。

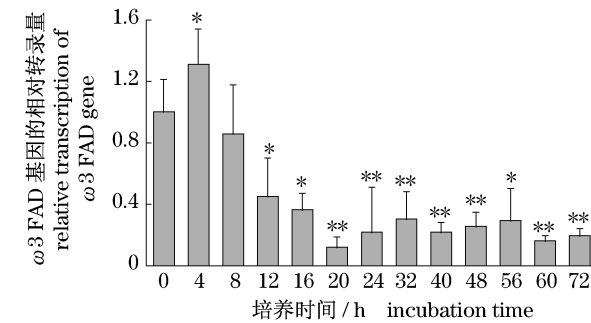


图5 缺刻缘绿藻 ω3 FAD 基因在氮饥饿过程中的相对转录量

与0 h相比,差异显著($P < 0.05$)的用*表示,差异极显著($P < 0.01$)的用**表示。

Fig. 5 Relative transcription of ω3 FAD gene from *M. incisa* during the culture course of nitrogen starvation

“*” and “**” mean the significant ($P < 0.05$) and extremely significant ($P < 0.01$), respectively, difference between the sampling at a given time and 0 h.

图6表明,16:3ω3 占总脂肪酸的百分含量在氮饥饿培养开始一直到96 h内变化不明显,但随着缺氮培养时间延长,它们的百分含量迅速降低,与0 h时相比,其变化越来越显著($P < 0.05$)或极显著($P < 0.01$)。ALA的变化(图7)也是如此,

只是在氮饥饿胁迫后的 48 h 出现显著差异。这两者的变化与预测的结果也完全吻合,而且出现显著降低的时间都比 $\omega 3$ FAD 基因相对转录量显著下降的时间晚,表明 $\omega 3$ FAD 基因相对转录量的降低会导致这两种脂肪酸百分含量的下调。

图 7 显示,当氮饥饿培养到 48 h, LA 的百分含量开始显著性 ($P < 0.05$) 下降,此时 ALA 的百

分含量也显著降低,说明降低的 LA 不是经过 $\omega 3$ 代谢途径用来合成 ALA,那么降低的 LA 去哪里?其实,LA 还可以经过 $\omega 6$ 途径先后合成 GLA 与 AA,这从 AA 百分含量(图 8)的逐渐升高得到印证。AA 在氮饥饿 168 h 时间内,从占总脂肪酸的 24.4% (0 h 时)增加到 168 h 时的 31.8%。

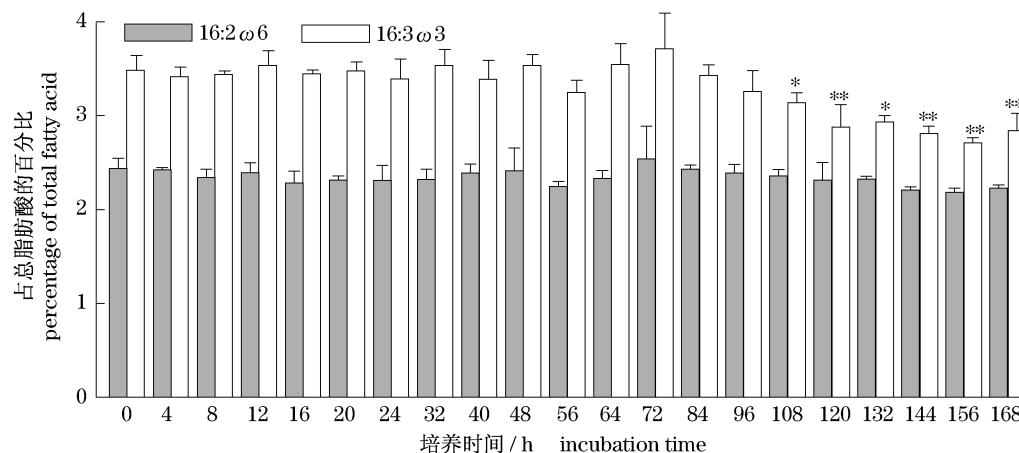


图 6 氮饥饿过程中,缺刻缘绿藻 16:2 $\omega 6$ 和 16:3 $\omega 3$ 占总脂肪酸的百分含量

与 0 h 时相比,差异显著 ($0.01 < P < 0.05$) 的用 * 表示,差异极显著 ($P < 0.01$) 的用 ** 表示。

Fig. 6 Percentage of 16:2 $\omega 6$ and 16:3 $\omega 3$ accounted for total fatty acids in *M. incisa* during the culture course of nitrogen starvation

“*” and “**” mean the significant ($P < 0.05$) and extremely significant ($P < 0.01$), respectively, difference between the sampling at a given time and 0 h.

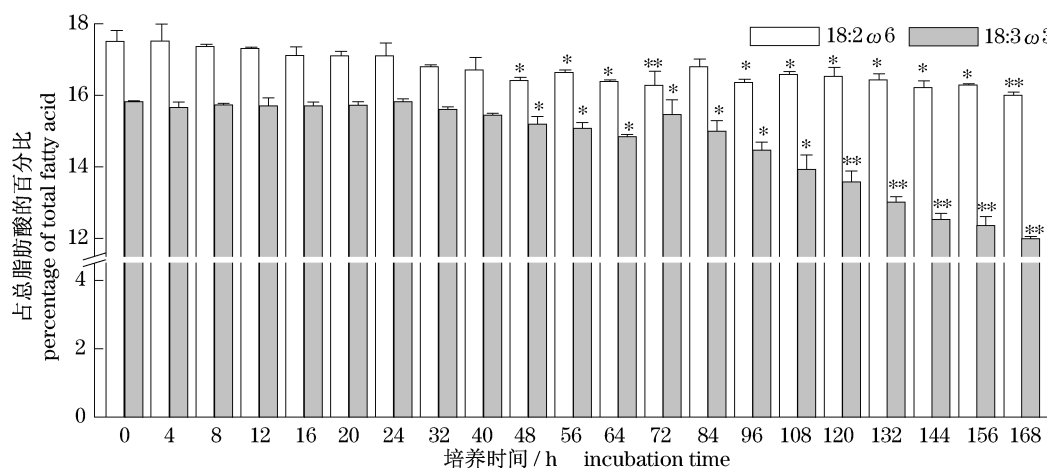


图 7 氮饥饿过程中,缺刻缘绿藻 LA 和 ALA 占总脂肪酸的百分含量

与 0 h 时相比,差异显著 ($0.01 < P < 0.05$) 的用 * 表示,差异极显著 ($P < 0.01$) 的用 ** 表示。

Fig. 7 Percentage of LA and ALA accounted for total fatty acids in *M. incisa* during the culture course of nitrogen starvation

“*” and “**” mean the significant ($P < 0.05$) and extremely significant ($P < 0.01$), respectively, difference between the sampling at a given time and 0 h.

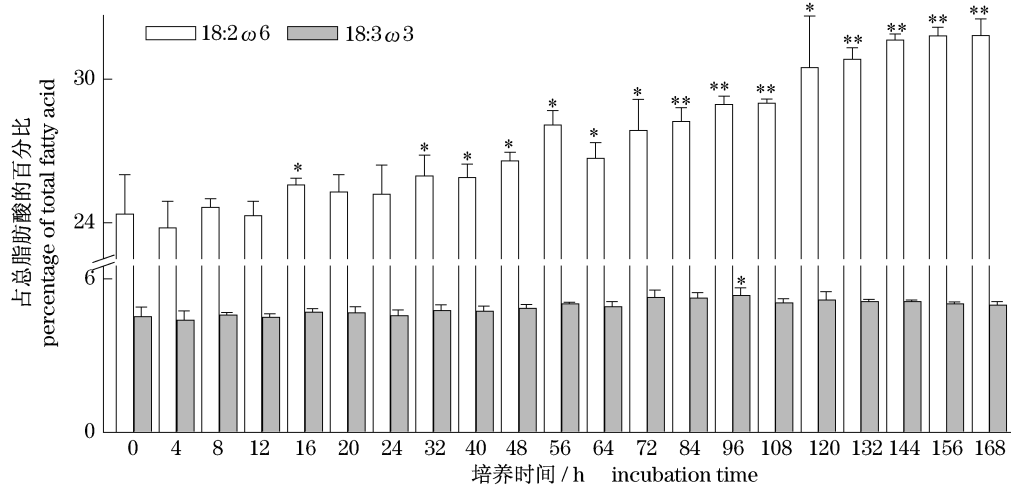


图8 氮饥饿过程中,缺刻缘绿藻 AA 和 EPA 占总脂肪酸的百分含量

与 0 h 时相比,差异显著($P < 0.05$)的用 * 表示,差异极显著($P < 0.01$)的用 ** 表示。

Fig. 8 Percentage of AA and EPA accounted for total fatty acids in *M. incisa* during the culture course of nitrogen starvation

“*” and “**” mean the significant ($P < 0.05$) and extremely significant ($P < 0.01$), respectively, difference between the sampling at a given time and 0 h.

其实,AA 也可以作为 $\omega 3$ FAD 的反应底物,沿着 $\omega 3$ 途径以合成 EPA。图 8 显示,在氮饥饿胁迫过程中,EPA 占总脂肪酸的百分含量自 72 h 开始似乎有所增加,但差异大多不显著(只在 96 h 时有显著性增加)。这似乎与我们的预测不一致,但仔细分析其结果还是一致的。那么 EPA 的百分含量为什么没有降低呢? 当 $\omega 3$ FAD 基因的相对转录量降低时,EPA 的百分含量也应该降低;但随着 AA 的百分含量(反应物浓度)大大增加,从代谢过程的反应平衡角度来看,EPA 的百分含量(产物浓度)可能会增加。这样降低的与增加的量近似平衡,从而才导致 EPA 的百分含量与完全培养基(0 h)时没有显著性的变化。

上述结果也从另一角度显示,16:2 $\omega 6$ 、LA 及 AA 都可能是从缺刻缘绿藻中克隆的这个 $\omega 3$ FAD 基因所编码脂肪酸去饱和酶的反应底物。有关反应底物特异性的研究,有待进一步深入。

3 讨论

3.1 缺刻缘绿藻 $\omega 3$ FAD 基因的特征

真核微藻脂肪酸代谢主要有 $\omega 6$ 和 $\omega 3$ 两条不同的途径^[17],其中起重要作用的脂肪酸去饱和酶分别叫作 $\omega 6$ 和 $\omega 3$ FAD。它们基本结构和序列大都含有 α 和 β 链,在结构上都属于 $\alpha + \beta$ 酶折叠方式^[18],许多保守序列都是重要的结构和功

能域。这些保守区包括两条长的疏水区,一般跨膜 4 次,因此属于膜整合蛋白;有 3 个富含组氨酸簇的基序,这些基序被认为在空间结构上组成了酶的催化活性中心以及酶活性所必需的铁原子结合位点^[19]。经过克隆、测序、生物信息学分析等研究可知,缺刻缘绿藻 $\omega 3$ FAD 基因序列与其他绿藻、苔藓甚至高等植物 $\omega 3$ FAD 都具有较高的同源性、相似的结构及相同的功能域等共同特点,从而在多不饱和脂肪酸合成代谢的 $\omega 3$ 途径中起作用。

本研究还发现,缺刻缘绿藻 $\omega 3$ FAD 基因的编码区存在 6 个内含子,这与高等植物拟南芥中已知的 $\omega 3$ FAD 基因编码区内含有 7 个内含子相近^[20],但在藻类中迄今没有相关的报道。缺刻缘绿藻脂肪酸延长酶基因在其编码区也存在 3 个内含子^[21]。有报道认为内含子在基因转录、表达过程中可能起着重要的调控作用^[22]。因此,有关这些内含子的功能以及缺刻缘绿藻 $\omega 3$ FAD 的理化等性质有待进一步探索。

3.2 缺刻缘绿藻 $\omega 3$ FAD 基因转录与脂肪酸合成代谢的关系

缺刻缘绿藻在氮饥饿的 168 h 时间内,AA 从占总脂肪酸的 24.4% (0 h 时)增加到 31.8% (168 h 时)(图 8),说明在此过程中,该藻的脂类代谢主要以 $\omega 6$ 途径来合成并积累 AA 的,这与文

献报道^[6]的结果是一致的。但本研究中 AA 占总脂肪酸的百分含量远低于已报道的 58.9% 结果^[6],主要原因在于氮饥饿的时间不同。报道的氮饥饿时间是 14 d^[6],而本研究的实验因目的不同只设计到 7 d,从图 8 的变化趋势来看,AA 的百分含量仍在继续稳步增加。有研究表明,氮饥饿 60 d 后,缺刻缘绿藻中 AA 占总脂肪酸的百分含量就增加到 64.3%^[4]。因此,相信随着氮饥饿时间的适当延长,AA 的百分含量会接近已报道的结果。当然,光照强度^[5,23]、藻细胞密度^[6]等因素也可能会影响 AA 占总脂肪酸百分含量的变化。

其实,在缺刻缘绿藻的脂肪酸组分分析时,就发现了诸如 16:3 $\omega 3$ 、ALA、EPA 等 $\omega 3$ 途径的产物(图 6、图 7 和图 8),这与报道的结果^[3,6,9]也一致。表明该藻在沿着 $\omega 6$ 代谢途径来合成并积累 AA 的同时,仍然存在着 $\omega 3$ 代谢途径。通过对 $\omega 3$ FAD 基因相对转录量以及脂肪酸成分的变化趋势比较后,可知缺刻缘绿藻在氮饥饿过程中, $\omega 3$ FAD 基因的相对转录量降低时间发生在前,相应的 $\omega 3$ 途径脂肪酸产物占总脂肪酸百分含量的下降时间发生较晚,表明后者的变化可能是由于前者而引起的。在利用¹⁴C 同位素标记醋酸盐探讨 AA 在缺刻缘绿藻的合成代谢途径时,发现从添加标记物开始到 AA 能检测到同位素信号的时间约 9 h 或 24 h^[24]。在探讨缺刻缘绿藻脂肪酸延长酶基因转录量与 AA 含量变化的关系时,也发现它们之间存在 24 h 的时滞^[21]。因此,缺刻缘绿藻 $\omega 3$ FAD 基因相对转录量与 $\omega 3$ 途径脂肪酸产物百分含量的下降存在时滞是可以理解的。推测在氮饥饿的早期,因细胞中存在着 $\omega 3$ FAD,它们继续执行着功能,因此,相应 $\omega 3$ 途径脂肪酸产物的百分含量并没有明显下降;但随着饥饿时间的延长,因 $\omega 3$ FAD 基因相对转录量降低、蛋白质合成受阻以及蛋白周转(turnover)等因素,表达的 $\omega 3$ FAD 总量或其活性降低,以致其作用产物的含量下降。进而我们认为脂肪酸组分的变化中,AA 含量最先增加显著是因为,在氮饥饿初期,与 AA 合成有关的酶的活性及转录量迅速提高,使得 AA 的积累加快,但是合成过程的中间产物的含量变化不明显;而作为支路的 $\omega 3$ 途径, $\omega 3$ FAD 的酶活没有改变,只是转录量有所降低,经过一定的时滞后,其反应产物的含量才会表现

出显著下降的趋势。有关 $\omega 3$ FAD 的酶活及其生化方面的工作有待开展。

总之,氮饥饿引起缺刻缘绿藻 $\omega 12$ 、 $\omega 6$ 与 $\omega 5$ 去饱和酶基因^[25]以及延长酶基因^[21]相对转录量的增加,使其主要沿着 $\omega 6$ 代谢途径来合成并积累 AA;同时氮饥饿又引起 $\omega 3$ FAD 基因相对转录量的降低,从而使 $\omega 3$ 途径脂肪酸产物的含量下降,更加确保该藻沿着 $\omega 6$ 途径合成 AA。两者的结果,共同造成缺刻缘绿藻合成并积累大量的 AA。氮饥饿引起缺刻缘绿藻大量合成并积累 AA 以贮存物质与能量,有利于缺刻缘绿藻快速适应变化的环境条件以生存^[3]。有关氮对缺刻缘绿藻 $\omega 3$ 脂肪酸去饱和酶基因的调控机理,值得深入探讨。

感谢暨南大学张成武教授馈赠缺刻缘绿藻。

参考文献:

- [1] Reisingl H. Zur systematik und ökologie alpiner Bodenalgae [J]. Österreichische Botanische Zeitschrift, 1964, 111(4): 402 - 499.
- [2] Watanabe S, Hirabayashi S, Boussiba S, et al. *Parietochloris incisa* comb. nov. (Trebouxiophyceae, Chlorophyta) [J]. Phycological Research, 1996, 44(2): 107 - 108.
- [3] Bigogno C, Khozin-Goldberg I, Cohen Z. Accumulation of arachidonic acid-rich triacylglycerols in the microalga *Parietochloris incisa* (Trebouxiophyceae, Chlorophyta) [J]. Phytochemistry, 2002, 60(2): 135 - 143.
- [4] Merzlyak M N, Chivkunova O B, Gorelova O A, et al. Effect of nitrogen starvation on optical properties, pigments, and arachidonic acid content of the unicellular green alga *Parietochloris incisa* (Trebouxiophyceae, Chlorophyta) [J]. Journal of Phycology, 2007, 43(4): 833 - 843.
- [5] Solovchenko A E, Khozin-Goldberg I, Didi, Cohen S, et al. Effects of light intensity and nitrogen starvation on growth, total fatty acids and arachidonic acid in the green microalga *Parietochloris incisa* [J]. Journal of Applied Phycology, 2008, 20(3): 245 - 251.
- [6] Khozin-Goldberg I, Bigogno C, Shrestha P, et al. Nitrogen starvation induces the accumulation of arachidonic acid in the freshwater green alga *Parietochloris incisa* (Trebouxiophyceae) [J].

- Journal of Phycology, 2002, 38(5): 991–994.
- [7] Zhang C W, Cohen Z, Khozin-Goldberg I, *et al.* Characterization of growth and arachidonic acid production of *Parietochloris incisa* comb. nov. (Trebouxiophyceae, Chlorophyta) [J]. Journal of Applied Phycology, 2002, 14(6): 453–460.
- [8] Dyal S D, Narine S S. Implications for the use of *Mortierella* fungi in the industrial production of essential fatty acids [J]. Food Research International, 2005, 38(4): 445–467.
- [9] Bigogno C, Khozin-Goldberg I, Boussiba S, *et al.* Lipid and fatty acid composition of the green oleaginous alga *Parietochloris incisa*, the richest plant source of arachidonic acid [J]. Phytochemistry, 2002, 60(5): 497–503.
- [10] Guschina I A, Harwood J L. Lipids and lipid metabolism in eukaryotic algae [J]. Progress in Lipid Research, 2006, 45(2): 160–186.
- [11] Nichols B W, Appleby R S. The distribution and biosynthesis of arachidonic acid in algae [J]. Phytochemistry, 1969, 8(10): 1907–1915.
- [12] Stanier R Y, Kunisawa M M, Cohen-Bazir G. Purification and properties of unicellular blue-green algae (*Order chlorococcales*) [J]. The Bacteriological Review, 1971, 35(2): 171–201.
- [13] 杜道海, 周志刚. 缺刻缘绿藻总 RNA 提取方法的比较研究 [J]. 华北农学报, 2008, 23(增刊): 103–106.
- [14] Dellaporta S L, Wood J, Hick J B. A plant DNA miniprep: version II [J]. Plant Molecular Biology Reporter, 1983, 1(4): 19–21.
- [15] Richards E, Reichardt M, Rogers S. Preparation of genomic DNA from plant tissue [M] // Ausubel F M, Brent R, Kingston R, *et al.* Current Protocols in Molecular Biology. New York: John Wiley & Sons, Inc., 2003.
- [16] 刘建国, 刘伟, Cohen Z, 等. 雪藻高密度连续培养中生物量和花生四烯酸的高产率 [J]. 海洋与湖沼, 2002, 33(5): 499–508.
- [17] Khozin I, Adlerstein D, Bigogno C, *et al.* Elucidation of the biosynthesis of EPA in the microalga *Porphyridium cruentum* II: Radiolabeling studies [J]. Plant Physiology, 1997, 114(1): 223–230.
- [18] Tanhuanpää P K, Vilkki H J, Vihinen M. Mapping and cloning of FAD2 gene to develop allele-specific PCR for oleic acid in spring rape (*Brassica rapa* ssp. *oleifera*) [J]. Molecular Breeding, 1998, 4(6): 543–550.
- [19] 戴晓峰, 肖玲, 武玉花, 等. 植物脂肪酸去饱和酶及其编码基因研究进展 [J]. 植物学通报, 2007, 24(1): 105–113.
- [20] Iba K, Gibson S, Nishiuchi T, *et al.* A gene encoding a chloroplast omega-3 fatty acid desaturase complements alterations in fatty acid desaturation and chloroplast copy number of the *fad7* mutant of *Arabidopsis thaliana* [J]. The Journal of Biological Chemistry, 1993, 268(32): 24099–24105.
- [21] Yu S Y, Liu S C, Li C Y, *et al.* Characteristics and transcription of a fatty acid elongase gene from a freshwater green microalga, *Myrmeccia incisa* Reising [J]. Chinese Journal of Oceanology and Limnology, 2010, in press.
- [22] 邱晓云, 卢大儒. 内含子在基因表达调控中的作用 [J]. 国外医学遗传学分册, 1996, 38(1): 50–53.
- [23] Solovchenko A E, Merzlyak M N, Chivkunova O B, *et al.* Effects of illumination and nitrogen starvation on accumulation of arachidonic acid by the microalga *Parietochloris incisa* [J]. Moscow University Biological Sciences Bulletin, 2008, 63(1): 44–48.
- [24] Bigogno C, Khozin-Goldberg I, Adlerstein D, *et al.* Biosynthesis of arachidonic acid in the oleaginous microalga *Parietochloris incisa* (Chlorophyceae): Radiolabeling studies [J]. Lipids, 2002, 37(2): 209–216.
- [25] Iskandarov U, Khozin-Goldberg I, Cohen Z. Identification and characterization of ω 12, ω 6, and ω 5 desaturases from the green microalga *Parietochloris incise* [J]. Lipids, 2010, DOI 10.1007/s11745-010-3421-4.

Characterization of a ω 3 fatty acid desaturase gene from *Myrmezia incisa* and its relative transcription during the stress course of nitrogen starvation

LI Chun-yang¹, DU Dao-hai¹, YU Shui-yan¹, LI Hui¹, LIU Fan¹, ZHOU Zhi-gang^{1,2*}

(1. Key Laboratory of Aquatic Genetic Resources and Utilization, Ministry of Agriculture,

Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;

2. Aqualulture Division, E-Institute of Shanghai Municipal Education Commission,

Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract: Based on the conserved amino acid sequences (TMFWALF and HHDIGTH) of ω 3 fatty acid desaturase from *Chlamydomonas reinhardtii* and *Chlorella vulgaris* (GenBank accession Nos. ABL09485 and BAB78717, respectively), a degenerated pair of primers was designed. A gene was cloned from *Myrmezia incisa* Reisigl H4301 with these primers using reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and rapid amplification of cDNA ends (RACE). Its homology with *C. reinhardtii* ω 3 fatty acid desaturase reached 69% in amino acid sequence. The full-length cDNA sequence (GenBank accession No. EU658930) was composed of 2 330 bp. It comprised a 107 bp 5'-untranslated region (UTR), a 912 bp 3'-UTR with a typical poly A tail, and a 1 311 bp open reading frame (ORF) encoding a 436-amino-acid protein with a putative molecular weight of 49.06 ku and pI at 7.85. The deduced amino acid sequence was characterized by a membrane-bound desaturase with two hydrophobic regions and three conserved histidine-rich motifs. Compared to the DNA sequence of this gene, its coding region was found to be interrupted by 6 introns with splicing sites well matching the GT-AG rule. Quantitative real-time PCR result showed that during the stress course of nitrogen starvation, the relative transcription of ω 3 fatty acid desaturase gene increased ($P < 0.05$) at 4 h possibly due to shock, subsequently declined and did so significantly from 12 h on ($P < 0.05$). The transcript level of this gene dropped to minimum at 20 h, where it accounted for 11.6% of that at 0 h, thereafter fluctuated at a low level only 23.2% of that at 0 h ($P < 0.01$). Composition of fatty acid analysis illustrated that arachidonic acid percentage of total fatty acids in *M. incisa* increased gradually during this stress course. On the contrary, the percentages of ω 3 pathway products, such as α -linolenic acid and 16:3 ω 3, descended significantly ($P < 0.05$) from 40 h or 96 h on. These results suggested that the lower relative transcription of ω 3 fatty acid desaturase gene was responsible for the decreased percentages of ω 3 pathway products, ensuring the biosynthesis and accumulation of arachidonic acid along the ω 6 pathway in *M. incisa* growing under the condition of nitrogen starvation. In addition, 16:2 ω 6, linoleic acid and arachidonic acid were possibly the substrate of this enzyme encoded by this cloned gene in this microalga.

Key words: *Myrmezia incisa*; ω 3 fatty acid desaturase gene; nitrogen starvation; quantitative real-time PCR; fatty acid

Corresponding author: ZHOU Zhi-gang. E-mail: zgzhou@shou.edu.cn