

DOI: 10.11964/jfc.20220613526

外源的微藻 DGAT 基因表达对酿酒酵母生长和脂质的影响

胡澄溪¹, 刘伟¹, 毕燕会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, 国家海洋生物科学国际联合研究中心, 上海 201306

第一作者: 胡澄溪, 从事藻类生物技术研究, E-mail: yjhcx@outlook.com



摘要:

【目的】三酰甘油 (TAG) 合成缺陷型酿酒酵母突变株 H1246 常用于其他生物二酰基甘油酰基转移酶 (DGAT) 的基因功能鉴定。为了解外源 DGAT 的基因表达对酵母细胞脂质及生长的影响。

【方法】将缺刻缘绿藻 1 个 I 型和 3 个 II 型的 *DGAT* 分别转化 H1246 菌株, 经筛选获得 tDGAT1、tDGAT2A、tDGAT2B 及 tDGAT2C 等 4 株转目的基因酵母。通过显微观察、分光光度法、重量法、棒状色谱分析、气相色谱-质谱分析对酿酒酵母的形态和脂滴、细胞密度、单位体积生物量、生物质生产率、总脂、总脂肪酸、TAG 含量进行检测。

【结果】稳定生长期时的显微观察结果显示, 这 4 个外源基因均能使 H1246 菌株恢复 TAG 的合成和贮存能力, 进而在细胞中出现油滴。油脂分析结果表明, tDGAT1 菌株的 TAG 及脂肪酸含量最高, 且显著高于野生型 Scy62 及其他 3 株转目的基因菌株的水平。生长性能数据显示, 4 个外源基因均能使 H1246 菌株的细胞密度达到 Scy62 的水平, 这可能是由于 TAG 的合成消耗了游离脂肪酸, 以减轻其对细胞产生的伤害所致。但 tDGAT1 菌株的生长迟滞期明显延长, 以致其生长速率最低。

【结论】将缺刻缘绿藻不同类型的外源 *DGAT* 转化酿酒酵母后, 使后者的生长性能及脂质含量产生不同的变化。该结果为利用基因工程改造酵母菌株以生产人类所需要的目的油脂研究奠定了基础。

关键词:酿酒酵母; 缺刻缘绿藻; 二酰基甘油酰基转移酶 (DGAT); 三酰甘油 (TAG); 生长

通信作者: 周志刚, 博士, 上海海洋大学生物学二级教授、博士生导师。主讲《植物生物学》本科生课程及《藻类生理生化》研究生课程, 主要从事海带细胞遗传学、微藻油脂合成代谢途径及其调控机理等科研工作, E-mail: zgzhou@shou.edu.cn



资助项目: 国家自然科学基金 (31772821); 国家“双一流”水产学科

收稿日期: 2022-06-05

修回日期: 2022-10-15

文章编号:

1000-0615(2025)05-059104-09

中图分类号: S 917.1

文献标志码: A

作者声明本文无利益冲突

©《水产学报》编辑部(CC BY-NC-ND 4.0)
Copyright © Editorial Office of Journal of Fisheries of China (CC BY-NC-ND 4.0)

酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) (以下简称“酵母”) 具有稳定的单倍体营养细胞^[1]、成熟的遗传操作系统^[2]、共享的突变体库 [例如位于德国法兰克福的欧洲酵母菌种保藏中心 (<http://www.euroscarf.de/>) 和位于日本大阪的国家生物资源计划的酵母资源 (<https://yeast.nig.ac.jp/yeast/>)] 等, 以及它所具有的简单脂质组成及其清晰代谢途径^[3-6], 进而成为脂质代谢途径及其调控研究的模式生物。例如, 酵母的脂肪酸主要由软脂酸 (palmitic acid, PA)、棕榈油酸 (palmitoleic acid, PoA)、硬脂酸 (stearic acid, SA) 和油酸 (oleic acid, OA) 等组成^[7-8], 使之成为其



他生物特别是非模式生物去饱和酶^[9]、延长酶^[10]等脂肪酸合成相关基因功能鉴定的常用工具。

酵母在沿着两条合成代谢途径合成三酰甘油 (triacylglycerol, TAG) 的最后一步时, 分别由酰基辅酶 A:二酰甘油酰基转移酶 (acyl CoA: diacylglycerol acyltransferase, DGAT) 及磷脂:二酰甘油酰基转移酶 (phospholipid:diacylglycerol acyltransferase, PDAT) 来催化完成, 这两种酶分别由基因 *DGAT1*^[11] 及 *LRO1*^[12] 编码。当把它们以及编码甾醇酯 (steryl ester, SE) 合成相关的酶基因 *ARE1* 和 *ARE2*^[13] 一并用可编程核酸酶扰动后, 所获得的突变株酵母 H1246^[14] 因无法合成 TAG 和 SE 等贮存脂, 被广泛应用于微生物^[15-16]、藻类^[17-18] 以及动植物^[19-20] TAG 合成代谢相关基因的功能鉴定与特征研究中。

Sandager 等^[14] 对酵母突变株 H1246 的研究结果表明, TAG 不是酵母生长的必需物质。但作为贮存脂的 TAG, 在合成与累积的过程中, 必然需要消耗大量的脂肪酸和能量^[21], 因而可能间接地影响酵母的生长。在利用该突变株进行 DGAT 的基因功能鉴定时, 人们所关注的是目的基因的表达及其产物的功能。而有关这些目的基因的转化对酵母生长特性及脂质组成的影响知之甚少。为此, 本研究在已构建的 4 株转缺刻缘绿藻 (*Myrmecia incisa*) *DGAT* 的酵母细胞株^[22-23] 基础上, 从细胞密度、单位体积生物量、生物质生产率、总脂、TAG 等方面比较分析转目的基因细胞系与突变株 H1246 之间的差异, 以揭示外源的 *DGAT* 是如何影响酵母的生长性能与脂质含量, 为利用基因工程改造的酵母菌株生产人类需要的目的油脂奠定基础。

1 材料与方法

1.1 菌种及培养

酿酒酵母的 TAG 合成缺陷型株 H1246 (基因型为 *MATa are1-Δ::HIS3 are2-Δ::LEU2 dga1-Δ::KanMX4 lro1-Δ::TRP1 ADE2*) 以及作为野生型的酵母株 Scy62 (基因型为 *MATa ADE2*) 均由瑞典农业科学大学 Sten Stymne 博士惠赠。转空载体 pYES2 的酵母 tYES2 以及转缺刻缘绿藻 *DGAT1*、*DGAT2A*、*DGAT2B*、*DGAT2C* 等基因的酵母株 tDGAT1、tDGAT2A、tDGAT2B 和

tDGAT2C 均按照 Chen 等^[22] 及 Liu 等^[23] 的方法构建并筛选获得。

Scy62 酵母株及转基因酵母株分别使用 YPD 培养基及 SC-U 培养基培养。将菌株以体积比 1 : 1000 的比例接种在对应的培养基中, 添加 2% 的葡萄糖后, 在 28 °C 的摇床中, 以 180 r/min 的转速培养 72 h, 以活化菌株。

1.2 生长曲线和生物量测定

将活化后的酵母菌株接种到 200 mL 的对应培养基上。每 8 小时测定各菌液的 OD₆₀₀ 值, 根据不同培养时间测量的 OD₆₀₀ 值绘制酵母的生长曲线, 并用“(稳定期-接种时的 OD₆₀₀ 值)/到达稳定期的时间”来计算酵母的生长速率。

待酵母生长至稳定期 8 h 后, 以 5000 r/min 的转速, 离心收集一定体积菌液的酵母菌并用冰的灭菌水洗涤 3 次。使用冷冻干燥机 (美国 Labconco 公司) 冷冻干燥 24 h 得到酵母粉。用“单位体积的酵母干重/培养时间”来计算酵母生物量的生产率。

1.3 激光共聚焦显微观察

取培养至稳定期的新鲜酵母菌液 1 mL, 直接加入 1 μL 的油体特异荧光染料 Bodipy (Genmed Scientifics Inc., 美国), 暗室中孵育 10 min 以染色。在激光共聚焦显微镜 (Carl Zeiss, 德国) 下观察并拍照。激发波长 490 nm, 发射波长 515 nm。

1.4 总脂提取

利用改进的 Blight & Dyer 法^[24] 提取酵母总脂。精确称取 50 mg 冷冻干燥的酵母粉放入洁净的离心管中; 加入 3 mL 的氯仿-甲醇溶液 (氯仿 : 甲醇 : BHT 甲醇 = 2.0 : 0.9 : 0.1, 体积比) 和 400 μL 酸洗过的玻璃珠 (直径为 0.4-0.6 mm, 美国 Sigma 公司), 涡旋振荡约 50 min, 镜检发现酵母细胞完全破碎。然后, 以 5000 r/min 的转速离心 15 min, 取上清液至新的离心管。加 400 μL 的 50 mmol/L 柠檬酸溶液和 600 μL 的氯仿, 振荡使混合物混匀, 再以 5000 r/min 的转速离心 15 min; 离心完毕后, 用一次性注射器将最下层溶液 (管内以蛋白层为中间界限, 分上下两层) 吸取至酯化瓶中。用氮气吹干酯化瓶中的有机试剂, 得到酵母总脂, 称重。

1.5 TAG 的棒状色谱分析

采用日本雅特隆 (Iatroscan) 公司生产的 MK-6S 型薄层色谱-氢火焰离子化检测器 (TLC-FID) 对样品的 TAG 进行定量分析。将储存氢气的钢瓶 (0.2 MPa) 阀门打开, 点燃氢气, 接着接通仪器的电源, 打开开关, 将氢气的流速调至 160 mL/min, 并将空气的流速调至 2 L/min。启动 AC controller 并且启动 SCI480-II 软件。将色谱棒架置入仪器, 进行空白扫描 2~3 次。总脂溶于 50 μ L 氯仿, 用取样器吸取 1 μ L 样品, 分 5~6 次点样至色谱棒的原点, 剩余总脂重新用氮气吹干保存。将色谱棒架放入盛有正己烷: 乙醚: 冰醋酸=80: 20: 1 (体积比) 展开剂的展开槽中。待展开至 100 mm 位置时, 取出色谱棒, 在 65 $^{\circ}$ C 烘箱中烘 2~3 min。待色谱棒冷却至室温后, 将色谱棒架放入仪器检测。检测完毕后, 通过仪器自带软件查看色谱积分结果, 对照 TAG 标样的上样量, 用“样品峰面积 \times 标样上样量/标样峰面积”来计算样品中的 TAG 量。

1.6 脂肪酸甲酯化

将分离出的 TAG 粉末, 加入 0.1 mg 的十七烷酸作为内标, 注入 1 mL 硫酸: 甲醇溶液=4: 96 (体积比), 充入氮气保护后, 于 85 $^{\circ}$ C 水浴锅中甲酯化反应 50 min。将反应液转移入新的离心管中, 加入 1 mL 去离子水及 1 mL 正己烷, 剧烈振荡后 5 500 r/min 离心 5 min。小心吸取上层溶液, 用 0.45 μ m 的亲水 PTFE 针式过滤器 (上海安谱实验科技股份有限公司) 过滤至酯化瓶中。氮气吹干后用正己烷复溶。

1.7 气相色谱-质谱 (GC-MS) 分析

使用美国安捷伦 7890A-5975C 型 GC-MS 联用仪对甲酯化的脂肪酸样品进行定性和定量分析。MS 采集参数选用 EMV 模式, 跟踪检测的离子能为 70 eV (美国安捷伦公司)。GC 色谱柱为 HP-5MS 5% phenyl-ethylsiloxane 型毛细管柱 (250 μ m \times 0.25 μ m, 30 m)。柱箱运行程序为 50 $^{\circ}$ C 保持 1 min, 以 10 $^{\circ}$ C/min 升到 150 $^{\circ}$ C 保持 1 min, 然后再以 4 $^{\circ}$ C/min 升到 250 $^{\circ}$ C 保持 3 min。采用自动进样器上样, 上样量为 2 μ L, 分流比为 50: 1。氮气为载气体, 流速 1 mL/min。脂肪酸组分鉴定参照质谱存储的数据库 NIST08 MS。酿酒酵母的脂肪酸 (X_n) 含量采用“ X_n 的峰面积/十七烷酸峰面积 \times 0.1 mg”计算。

1.8 数据分析

所有实验均重复 3 次, 并使用 SPSS 17.0 软件单因素方差分析 (One-Way ANOVA) 中的 LSD 多重比较进行显著性分析。

2 结果

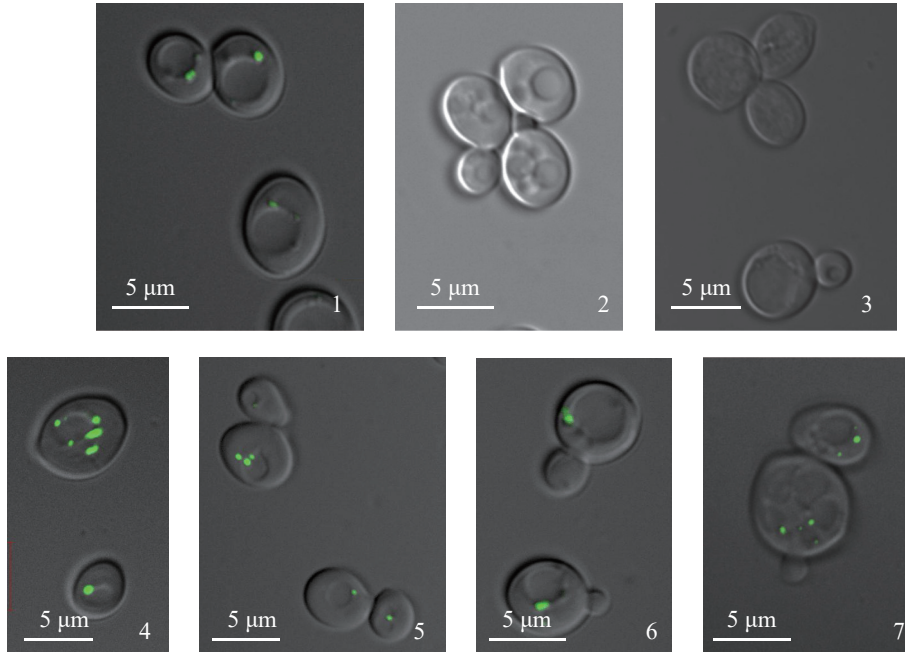
2.1 酵母细胞的显微结构与大小

基于 Chen 等^[22] 及 Liu 等^[23] 报道的序列合成引物并按照其方法, 首先自缺刻缘绿藻中分别克隆到编码其 DGAT 类型 I 和类型 II 的 4 个开放阅读框 (ORF) 的 cDNA 序列, 然后转化 TAG 合成的缺陷型酵母株 H1246, 筛选到转基因酵母株。接着, 利用油滴的特异性荧光染料 Bodipy 对酵母活细胞进行染色, 在激光共聚焦显微镜下观察, 发现缺陷型酵母株 H1246 和 pYES2 空载转化株 (tYES2) 的细胞中均没有出现油滴, 而野生型酵母株 Scy62 却具有油滴 (图版), 说明载体 pYES2 的转化不能使酵母恢复形成油滴的作用。但在 4 个转目的基因的酵母株中均出现油滴 (图版), 说明缺刻缘绿藻的 4 个 DGAT 在异源重组后均能使 H1246 菌株成功恢复 TAG 的合成能力。这些回补实验的显微观察结果均与 Chen 等^[22] 及 Liu 等^[23] 报道的一致。

将上述获得的酵母株培养至稳定期, 显微测量其长、短轴, 体积计算结果显示, H1246 [$V=(142.13\pm 51.59) \mu\text{m}^3$, $n=17$] 和 tYES2 [$V=(143.87\pm 55.45) \mu\text{m}^3$, $n=16$] 菌株的细胞体积略小于 Scy62 菌株的水平 [$V=(146.00\pm 45.53) \mu\text{m}^3$, $n=15$]。转目的基因的酵母中, DGAT1 转基因株 tDGAT1 的体积 [$V=(153.87\pm 53.46) \mu\text{m}^3$, $n=16$] 最大, tDGAT2A 菌株 [$V=(150.78\pm 36.3) \mu\text{m}^3$, $n=18$] 次之, tDGAT2C 菌株 [$V=(143.59\pm 27.10) \mu\text{m}^3$, $n=17$] 最小。这 7 株酵母间的多重比较结果显示, 细胞体积大小之间的差异不显著。以上结果表明, 缺刻缘绿藻 DGAT 基因的引入对酵母细胞大小的影响可以忽略。

2.2 酵母的生长性能

本研究使用与细胞密度有关的 OD₆₀₀ 值及与干物质累积有关的生物量来表征酵母细胞的生长性能。在批次培养过程中, H1246 和 tYES2 菌株进入稳定生长期时, 其 OD₆₀₀ 值分别为 2.56 和 2.51 (图 1, 二者无显著差异,



图版 酿酒酵母细胞经 Bodipy 染色后的显微图片

1. Scy62, 2. H1246, 3. tYES2, 4. tDGAT1, 5. tDGAT2A, 6. tDGAT2B, 7. tDGAT2C, 下同。油体被染成绿色。

Plate Fluorescence micrographs of *S. cerevisiae* cells stained with Bodipy

1. Scy62, 2.H1246, 3. tYES2, 4. tDGAT1, 5. tDGAT2A, 6. tDGAT2B, 7. tDGAT2C, the same below. The oil bodies were denoted in green.

$P > 0.05$), 约为 Scy62 菌株 ($OD_{600} = 3.43$) 的 75%, 这不仅说明了 pYES2 空载的转化对酵母进入稳定生长期的细胞 OD_{600} 值没有产生显著的影响, 也说明了 TAG 合成相关的基因在被扰动后, 会降低酵母稳定生长期时的细胞密度, 尽管 Sandager 等^[14]认为 TAG 不是酵母生长的必需物质。不过, H1246 和 tYES2 菌株的生长速率 (0.08/h) 与 Scy62 菌株 (0.09/h) 接近。

但将缺刻缘绿藻的 4 个 *DGAT* 转化至酵母

细胞中, 无论是类型 I 还是类型 II 的 *DGAT*, 均能使酵母稳定生长期时的细胞 OD_{600} 值达到 3.4~3.5, 与 Scy62 菌株的值相近 (图 1)。说明缺刻缘绿藻的 *DGAT* 能使 TAG 合成缺陷型酵母的细胞生长能力恢复到野生型的水平。同时还发现, tDGAT2A、tDGAT2B 和 tDGAT2C 等转基因酵母株, 均较 Scy62 菌株提前 8~16 h 进入细胞生长的稳定期 (图 1), 因而, 其生长速率 (依次为 0.11/h、0.14/h 和 0.14/h) 快于 Scy62 菌株。但 tDGAT1 菌株因迟滞期延长, 致使其 OD_{600} 值需要 72 h 才达到峰值 ($OD_{600} = 3.51$), 这样, 它的生长速率只有 0.05/h, 说明缺刻缘绿藻的 *DGAT* 引入对酵母细胞进入稳定生长期所需的时间因基因而异。

在批次培养的稳定生长期, H1246 和 tYES2 菌株的单位体积生物量分别为 2.23 和 2.17 mg/mL (二者之间无显著差异, $P > 0.05$), 约为 Scy62 菌株 (4.33 mg/mL) 的 50% (图 2); H1246 和 tYES2 菌株在稳定生长期时的低水平体积生物量应与它们的低细胞 OD_{600} 值 (图 1) 有关。转缺刻缘绿藻 *DGAT* 的 4 个菌株, 其体积生物量虽较 H1246 菌株显著增加 ($P < 0.05$), 但却显著低于 Scy62 菌株的水平 ($P < 0.05$) (图 2)。结合上述转目的基因与野生型的酵母在稳定生长期时

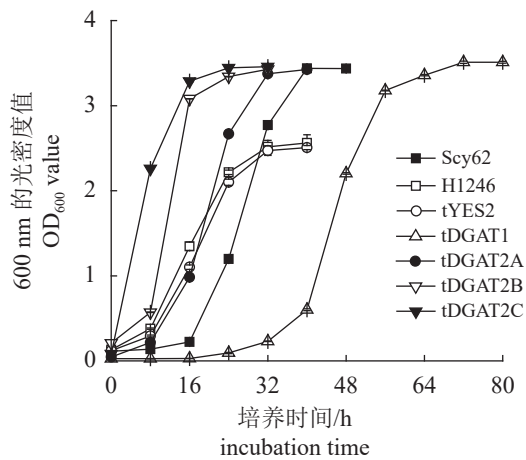


图 1 酿酒酵母的生长曲线

Fig. 1 Growth curve of *S. cerevisiae*

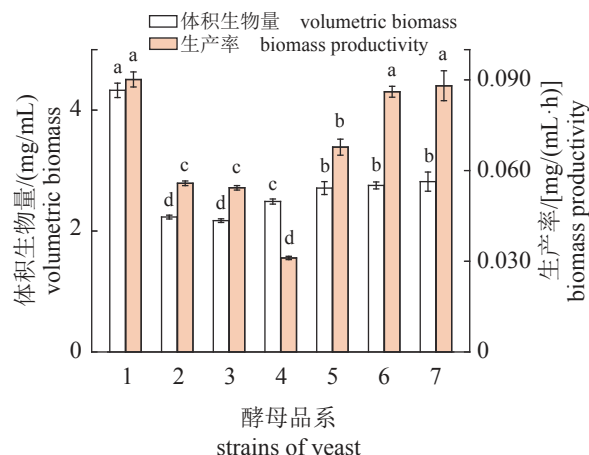


图2 酿酒酵母的生物量及其生产率

不同字母表示酵母品系之间差异显著 ($P < 0.05$), 下同。

Fig. 2 Biomass and its productivity in *S. cerevisiae*

Different letters indicate significant difference between the yeast strains ($P < 0.05$), the same below.

具有相近的细胞密度(图1), 推测转目的基因酵母的细胞在进入生长稳定期时, 因时间短, 干物质可能还没有来得及积累, 进而导致它们的体积生物量显著低于 Scy62 菌株。此推论也得到物质生产率的间接支持, 尤其是快速进入稳定生长期的 tDGAT2B 和 tDGAT2C 菌株(图1), 其物质生产率分别为 0.086 和 0.088 mg/(mL·h), 均与 Scy62 菌株的水平 [0.090 mg/(mL·h)] 无显著差异 ($P > 0.05$)(图2)。至于 tDGAT1 菌株, 因其迟滞期明显长于其他菌株(图1), 才导致其物质生产率只有 0.043 mg/(mL·h), 为 7 株酵母菌中的最低者(图2)。

2.3 酵母总脂及 TAG 的含量

图3显示酵母各菌株在稳定长期时的总脂及TAG的含量。H1246及tYES2菌株的总脂含量分别为 3.20 和 3.27 mg/100 mg 干重, 二者差异不显著 ($P > 0.05$), 说明 pYES2 的引入不会改变酵母的总脂含量, 但它们的总脂含量只有 Scy62 (7.60 mg/100 mg 干重) 的 42%, 与 Sandager 等^[14]的研究结果 (29%) 相近, 说明 *DGA1*、*LRO1*、*ARE1* 和 *ARE2* 与 TAG 及 SE 等贮存脂合成相关的基因在被扰动后, 显著降低了酵母的总脂含量 ($P < 0.05$), 这是可预料的结果, 毕竟贮存脂也是酵母总脂的主要组成部分^[3-6]。

缺刻缘绿藻的 *DGAT* 在被转化至 H1246 菌株后, 酵母总脂的含量得到提高, 但增加的量取决于所转入的基因。tDGAT1、tDGAT2A 及

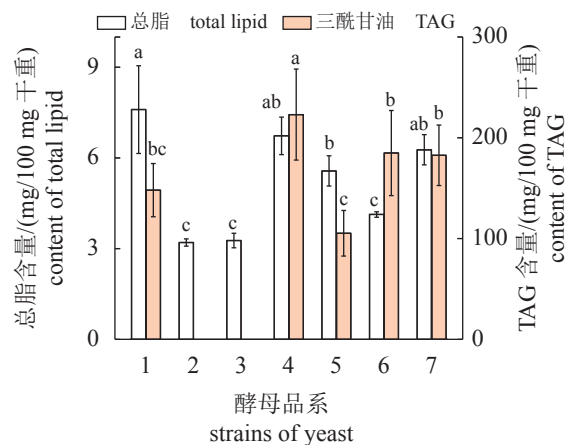


图3 酿酒酵母的总脂及 TAG 含量

Fig. 3 Contents of total lipids and TAG in *S. cerevisiae*

tDGAT2C 菌株的总脂含量较 H1246 菌株相比虽大幅增加, 但仍低于 Scy62 菌株(图3)。不过, 多重比较的结果显示, 它们之间的差异不显著 ($P > 0.05$)。tDGAT2B 菌株的总脂含量 (4.13 mg/100 mg 干重) 虽高于 H1246 菌株, 二者的差异也不显著 ($P > 0.05$); 但它却显著 ($P < 0.05$) 低于 Scy62 菌株。这些结果表明, 缺刻缘绿藻的 *DGAT2B* 对 TAG 合成缺陷型酵母株 H1246 的总脂贡献度最低, 而 *DGAT2A*、*DGAT2C* 及 *DGAT1* 的贡献度却依次增大。

如前文所述, H1246 系缺少 4 个基因的突变株^[14], 而本研究在每株转基因细胞系中仅转化微藻的 1 个 *DGAT*, 虽然它们的表达能恢复 H1246 菌株沿着 Kennedy 途径合成 TAG^[6] 的能力(图版), 但酵母的 SE 合成能力未得到恢复, 尽管 *ARE1* 的扰动对酵母 SE 没有显著影响, 但 *ARE2* 的删除却导致酵母的 SE 水平只有对照组的 25%^[13]。这可能是这些转基因酵母株的总脂含量仍低于 Scy62(图3)的主要原因。

作为在真核生物沿着 Kennedy 途径合成 TAG 的最后一步起催化作用的关键酶^[6], 缺刻缘绿藻的 *DGAT* 基因若能在酵母中异源表达并发挥作用, 必然使 H1246 菌株恢复 TAG 的合成能力, 转基因菌株的细胞中出现的油滴已证明此推论(图版)。稳定生长期各酵母株系 TAG 的定量分析结果显示, 在转目的基因菌株中, tDGAT2A 菌株略低于 Scy62 的 TAG 含量, 而 tDGAT2B 和 tDGAT2C 菌株略高于 Scy62 的 TAG 含量(图3), 经多重比较, 它们之间均无显著差异 ($P > 0.05$)。但 tDGAT1 菌株的 TAG 含

量达到 223.0 $\mu\text{g}/100\text{ mg}$ 干重, 显著高于 Scy62 菌株的水平 (148.1 $\mu\text{g}/100\text{ mg}$ 干重) ($P<0.05$)。说明缺刻缘绿藻 *DGAT1* 的引入更能提高酵母合成 TAG 的能力。

2.4 酵母总脂肪酸的含量

H1246 和 tYES2 菌株的总脂肪酸含量分别为 1 443.44 和 1 501.69 $\mu\text{g}/100\text{ mg}$ 干重 (表 1), 二者之间无显著差异 ($P>0.05$), 且在 7 株酵母菌中, 几乎处于最低水平, 约为 Scy62 菌株总脂肪酸含量 (2 447.90 $\mu\text{g}/100\text{ mg}$ 干重) 的 60%。说明贮存脂合成相关的 4 个基因在被扰动后, 酵母的总脂肪酸含量也显著减少。另外, pYES2 空载的转化并不影响 H1246 菌株的总脂肪酸含量。

但缺刻缘绿藻的 4 个 *DGAT* 分别被转化至 H1246 菌株后, 相应转基因菌株的总脂肪酸含量在稳定生长期时, 几乎与 Scy62 菌株的水平无显著差异, 尽管 tDGAT1 菌株的含量 (2 903.41 $\mu\text{g}/100\text{ mg}$ 干重) 最高, 而 tDGAT2B 的含量 (1 976.28 $\mu\text{g}/100\text{ mg}$ 干重) 最低 (表 1)。说明 *DGAT* 在被转化至 TAG 合成的缺陷型酵母细胞中, 因 TAG 合成 (图版) 能力的恢复, 进而促进酵母的脂肪酸合成, 以满足 TAG 合成所需要的脂肪酸。这也得到不同菌株酵母的总脂肪酸含量分别与其总脂 ($r=0.88$, $P=0.009<0.01$) 及 TAG ($r=0.849$, $P=0.016<0.05$) 含量之间呈高度正相关的支持。

缺刻缘绿藻不同的 *DGAT* 对酵母总脂肪酸组成的影响略有差异。最显著的是 *DGAT2A* 被

引入后, 转基因酵母株的单不饱和脂肪酸 (PoA 和 OA) 含量显著低于 Scy62 菌株的水平, 从而相对增加了饱和脂肪酸 (PA 和 SA) 的含量 (表 1)。另外, tDGAT1 及 tDGAT2C 菌株中的 PoA 相对含量也显著低于 Scy62 菌株的水平; 但它们以及 H1246、tYES2 菌株中的 OA 相对含量却显著高于 Scy62 菌株的水平 (表 1)。

3 讨论

作为在真核生物中沿着 Kennedy 途径进行 TAG 生物合成最后一步中起关键作用的酶, DGAT 能将脂肪酰-CoA 酰化至二酰甘油 (diacylglycerol, DAG) 碳骨架的 *sn*-3 位上, 从而产生 TAG^[25]。因此, 将缺刻缘绿藻的 4 个 DGAT (1 个 I 型和 3 个 II 型) 的基因分别回补至 TAG 合成缺陷型的酿酒酵母 H1246 菌株中, 如果能成功地表达, 必然使 H1246 菌株恢复合成和贮存 TAG 的能力, 以致在酵母细胞中出现油滴 (图版)。这 4 株转目的基因酵母的油脂成分比较结果显示, tDGAT1 菌株的 TAG 含量最高, 并显著高于 Scy62 菌株的水平 (图 3)。

缺刻缘绿藻的 DGAT1 属于 DGAT 家族的 I 型成员, 而它的 DGAT2A、DGAT2B 及 DGAT2C^[22-23] 却与酿酒酵母 Scy62 菌株中的 DGAT^[14] 同属于该家族的 II 型成员。DGAT2 与缺刻缘绿藻 DGAT1 之间的最大区别在于后者具有一个氨基端的特殊结构域 (domain): pleckstrin homology (PH)。PH 结构域由约 120 个氨基酸组成, 虽在动、植物以及微生物细胞

表 1 酿酒酵母细胞中的脂肪酸组成

Tab. 1 Fatty acids composition in *S. cerevisiae* cells

酵母品系 yeast strain	脂肪酸含量/ $(\mu\text{g}/100\text{ mg}$ 干重) content of fatty acids	棕榈酸 PA (16:0)	棕榈油酸 PoA (16:1 ^{Δb})	硬脂酸 SA (18:0)	油酸 OA (18:1 ^{Δb})
Scy62 (WT)	2 447.90±312.81 ^{ab}	10.01±0.40 ^b	42.04±0.09 ^b	7.04±0.40 ^c	40.91±0.73 ^b
H1246	1 443.44±130.13 ^c	3.73±0.07 ^c	39.67±2.13 ^{bc}	4.12±0.11 ^d	52.48±2.10^a
tYES2	1 501.69±318.53 ^c	4.48±0.10 ^c	38.51±1.28 ^c	4.40±0.37 ^{cd}	52.61±1.42^a
tDGAT1	2 903.41±326.88^a	10.32±0.80 ^b	22.22±0.54^c	13.64±0.86 ^b	53.82±1.03^a
tDGAT2A	2 180.28±271.25 ^b	23.14±3.61^a	18.02±1.92^f	22.86±3.12^a	35.98±4.87^c
tDGAT2B	1 976.28±189.82 ^{bc}	11.22±1.04 ^b	45.45±0.98 ^a	6.35±0.17 ^{cd}	36.99±0.31 ^{bc}
tDGAT2C	2 114.29±79.42 ^b	6.83±0.32 ^c	29.38±1.06^d	7.09±0.63 ^c	56.69±1.20^a

注: 同列数据的不同字母表示差异显著 ($P<0.05$), 加粗数据表示其与同列中其他数据的不同。

Notes: Different letters superscripts in the same column indicate significant differences ($P<0.05$). The data in bold emphasizes its difference from others in the same column.

的许多蛋白中都有发现, 但只存在于一些像缺刻缘绿藻等单细胞绿藻以及极个别轮藻、硅藻和苔藓等植物的 DGAT1 中^[26]。具有 PH 结构域的蛋白参与细胞内信号转导、磷脂结合、膜运输以及膜定位等过程^[27]。Chen 等^[22]将不含有 PH 结构域的缺刻缘绿藻 DGAT1 转化 H1246 菌株, 发现该转基因酵母的 TAG 合成能力显著低于携带该藻 DGAT1 全长 ORF 的菌株。该发现也被 Sitnik 等^[26]在 *Lobosphaera incisa* (缺刻缘绿藻的同种异名) 中得到证实: PH 结构域的删除使转基因酵母的 TAG 生产量下降 50%。Zienkiewicz 等^[28]利用荧光显微技术观察到 *L. incisa* 的 DGAT1 和脂滴呈现密切的空间关系, 而 II 型的 DGAT 与脂滴不存在这种共定位的关系。由此推测, 缺刻缘绿藻的 DGAT1 在被转化至 H1246 中, 其表达产物借助 PH 结构域优先与膜磷脂结合, 并直接或通过 PH 介导的信号转导促进膜运输乃至脂滴的形成, 以致 tDGAT1 菌株的 TAG 含量显著高于其他转目的基因菌株及 Scy62 菌株的水平 (图 3), 尽管其作用的具体机制有待进一步解析。鉴于 TAG 对于细胞总脂的贡献^[3, 5]以及 TAG 合成需要消耗大量的脂肪酸^[21], 转目的基因菌株总脂 (图 3) 及总脂肪酸 (表 1) 的含量必然随着 TAG 含量的增加而增加, 呈现同样的变化趋势。

本研究发现, 4 个 DGAT 的异源表达几乎不影响酵母细胞的大小 (图版), 但均能使 H1246 菌株稳定生长期的细胞密度恢复到野生型 Scy62 菌株的水平 (图 1)。人们早就了解到, 细胞的游离脂肪酸 (free fatty acid, FFA) 特别是一些中、短链饱和脂肪酸及其单酰甘油 (monoacylglycerol, MAG)^[29-30]可能通过增加细胞膜的透过性而引起细胞的伤害^[31]。缺刻缘绿藻的 DGAT 被引入到 H1246 菌株并成功表达 (图版), 细胞中的 FFA 甚至 MAG 必然被消耗以生成毒性相对微弱的 TAG^[7, 21]。由此推测, H1246 及转 pYES2 空载体的菌株 tYES2 在稳定生长期时的细胞密度难以达到 Scy62 菌株的水平 (图 1), 可能因 FFA 及 MAG 的伤害而致。微藻的 DGAT 一旦在被转化至 H1246 菌株并成功表达, 所产生的转基因菌株就会减轻这种伤害, 以致达到 Scy62 稳定生长期时的细胞密度 (图 1), 进而间接地证明了这个推测。

与上述油脂含量变化趋势不一致的是, 转

4 个目的基因菌株的单位体积生物量显著低于 Scy62 菌株的水平 (图 2)。该结果至少说明酵母细胞的 SE 对生长的促进作用难以被排除。当酵母 SE 合成相关酶基因 *ARE1* 和 *ARE2* 被敲除后, Arhar 等^[32]在酵母中确实没有检出 SE, 但发现其生物质干重随之降低。本研究每个转基因株只转 1 个微藻 DGAT 的 cDNA, 没能将它们与 SE 合成相关酶基因 *ARE1* 和 *ARE2* 一起实现共同转化缺陷型酵母株, 再观察和比较它们的生长性能, 有待进一步探究。

本研究的结果很难解释缺刻缘绿藻 DGAT1 的转化为什么会导致转基因酵母株的迟滞期明显延长现象 (图 1), 但推测可能是由 4 个目的基因的差异引起。正如上文所述, 酵母的 DGAT 属于 II 型^[14], 相比较转化微藻 I 型 DGAT 的基因来说, 转化同样属于 II 型的微藻 DGAT 基因, 宿主细胞更倾向于接受并迅速适应环境, 如图 1 中的 tDGAT2A、tDGAT2B 和 tDGAT2C 菌株。因此, tDGAT2B 和 tDGAT2C 菌株的生物质生产率达到了 Scy62 的水平, 而 tDGAT1 菌株因难以快速适应环境, 以致延长了生长迟滞期, 必然导致生物质生产率的下降以及最慢的生长速率 (图 2)。

参考文献 (References):

- [1] Sherman F. Getting started with yeast[J]. *Methods in Enzymology*, 2002, 350: 3-41.
- [2] Gietz R D, Woods R A. Genetic transformation of yeast[J]. *Bio-Techniques*, 2001, 30(4): 816-831.
- [3] Rattray J B M, Schibeci A, Kidby D K. Lipids of yeasts[J]. *Bacteriological Reviews*, 1975, 39(3): 197-231.
- [4] Daum G, Lees N D, Bard M, et al. Biochemistry, cell biology and molecular biology of lipids of *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Yeast*, 1998, 14(16): 1471-1510.
- [5] Ejsing C S, Sampaio J L, Surendranath V, et al. Global analysis of the yeast lipidome by quantitative shotgun mass spectrometry[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2009, 106(7): 2136-2141.
- [6] Kohlwein S D. Analyzing and understanding lipids of yeast: a challenging endeavor[J]. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2017, 2017(5): 373-378.
- [7] Tehlivets O, Scheuringer K, Kohlwein S D. Fatty acid synthesis and elongation in yeast[J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2007, 1771(3): 255-270.
- [8] Uemura H. Synthesis and production of unsaturated and polyunsaturated fatty acids in yeast: current state and

- perspectives[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2012, 95(1): 1-12.
- [9] Wallis J G, Watts J L, Browse J. Polyunsaturated fatty acid synthesis: what will they think of next?[J]. *Trends in Biochemical Sciences*, 2002, 27(9): 467-473.
- [10] 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.
- [11] Oelkers P, Cromley D, Padamsee M, *et al.* The *DGA1* gene determines a second triglyceride synthetic pathway in yeast[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2002, 277(11): 8877-8881.
- [12] Dahlqvist A, Ståhl U, Lenman M, *et al.* Phospholipid: diacylglycerol acyltransferase: an enzyme that catalyzes the acyl-CoA-independent formation of triacylglycerol in yeast and plants[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2000, 97(12): 6487-6492.
- [13] Yang H Y, Bard M, Bruner D A, *et al.* Sterol esterification in yeast: a two-gene process[J]. *Science*, 1996, 272(5266): 1353-1356.
- [14] Sandager L, Gustavsson M H, Ståhl U, *et al.* Storage lipid synthesis is non-essential in yeast[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2002, 277(8): 6478-6482.
- [15] Kalscheuer R, Luftmann H, Steinbüchel A. Synthesis of novel lipids in *Saccharomyces cerevisiae* by heterologous expression of an unspecific bacterial acyltransferase[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2004, 70(12): 7119-7125.
- [16] Zhang L N, Zhang H Y, Song Y D. Identification and characterization of diacylglycerol acyltransferase from oleaginous fungus *Mucor circinelloides*[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2018, 66(3): 674-681.
- [17] Khozin-Goldberg I, Cohen Z. Unraveling algal lipid metabolism: Recent advances in gene identification[J]. *Biochimie*, 2011, 93(1): 91-100.
- [18] Ma X M, Wu T, Kou Y P, *et al.* Characterization of type I and type II diacylglycerol acyltransferases from the emerging model alga *Chlorella zofingiensis* reveals their functional complementarity and engineering potential[J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2019, 12: 28.
- [19] Liu Q, Siloto R M P, Lehner R, *et al.* Acyl-CoA: Diacylglycerol acyltransferase: molecular biology, biochemistry and biotechnology[J]. *Progress in Lipid Research*, 2012, 51(4): 350-377.
- [20] Bhunia R K, Sinha K, Chawla K, *et al.* Functional characterization of two type-1 diacylglycerol acyltransferase (DGAT1) genes from rice (*Oryza sativa*) embryo restoring the triacylglycerol accumulation in yeast[J]. *Plant Molecular Biology*, 2021, 105(3): 247-262.
- [21] Sorger D, Daum G. Triacylglycerol biosynthesis in yeast[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2003, 61(4): 289-299.
- [22] Chen C X, Sun Z, Cao H S, *et al.* Identification and characterization of three genes encoding acyl-CoA: diacylglycerol acyltransferase (DGAT) from the microalga *Myrmeccia incisa* Reisingl[J]. *Algal Research*, 2015, 12: 280-288.
- [23] Liu W, Sun Z, Chen C X, *et al.* Novel insights into type 2 diacylglycerol acyltransferases in microalga *Myrmeccia incisa*[J]. *Journal of Applied Phycology*, 2021, 33(1): 25-35.
- [24] 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.
- [25] Dos Santos Maraschin F, Kulcheski F R, Segatto A L A, *et al.* Enzymes of glycerol-3-phosphate pathway in triacylglycerol synthesis in plants: Function, biotechnological application and evolution[J]. *Progress in Lipid Research*, 2019, 73: 46-64.
- [26] Sitnik S, Shtaida N, Guihéneuf F, *et al.* DGAT1 from the arachidonic-acid-producing microalga *Lobosphaera incisa* shows late gene expression under nitrogen starvation and substrate promiscuity in a heterologous system[J]. *Journal of Applied Phycology*, 2018, 30(5): 2773-2791.
- [27] Lemmon M A. Pleckstrin homology (PH) domains and phosphoinositides[J]. *Biochemical Society Symposia*, 2007, 74: 81-93.
- [28] Zienkiewicz K, Benning U, Siegler H, *et al.* The type 2 acyl-CoA: Diacylglycerol acyltransferase family of the oleaginous microalga *Lobosphaera incisa*[J]. *BMC Plant Biology*, 2018, 18(1): 298.
- [29] Nieman C. Influence of trace amounts of fatty acids on the growth of microorganisms[J]. *Bacteriological Reviews*, 1954, 18(2): 147-163.
- [30] Kelsey J A, Bayles K W, Shafii B, *et al.* Fatty acids and monoacylglycerols inhibit growth of *Staphylococcus aureus*[J]. *Lipids*, 2006, 41(10): 951-961.
- [31] Wu J T, Chiang Y R, Huang W Y, *et al.* Cytotoxic effects of free fatty acids on phytoplankton algae and cyanobacteria[J]. *Aquatic Toxicology*, 2006, 80(4): 338-345.
- [32] Arhar S, Gogg-Fassolter G, Ogrizović M, *et al.* Engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for the accumulation of high amounts of triacylglycerol[J]. *Microbial Cell Factories*, 2021, 20(1): 147.

Effects of expressing exogenous microalgal DGAT genes on the growth and lipids of *Saccharomyces cerevisiae*

HU Chengxi¹, LIU Wei¹, BI Yanhui¹, ZHOU Zhigang^{2*}

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: The H1246 mutant of *Saccharomyces cerevisiae*, which is deficient in triacylglycerol (TAG) synthesis, is commonly used to elucidate the functions of exogenous genes encoding diacylglycerol acyltransferase (DGAT). To investigate the effects of exogenous DGATs on lipid synthesis and yeast cell growth, one type I (*DGAT1*) and three type II *DGAT* (*DGAT2a*, *DGAT2b*, *DGAT2c*) genes of *Myrmecia incisa* were individually transformed into the H1246 strain, yielding four transgenic yeast strains. The morphology, lipid droplet formation, cell density, volumetric biomass, biomass productivity, total lipids, total fatty acids, and TAG content of *S. cerevisiae* were analyzed using microscopic observation, spectrophotometry, gravimetry, Rod thin-layer chromatography, and gas chromatography-mass spectrometry. Microscopic observation during the stable growth phase revealed oil droplets in all four transgenic strains, indicating that the exogenous genes promoted TAG synthesis and storage. Lipid component analysis showed that the tDGAT1 strain exhibited the highest TAG and fatty acid content among all the transgenic strains and the wild-type Scy62. Growth performance analysis revealed that cell densities of strains transformed with the exogenous genes reached the levels comparable to Scy62 yeast, likely due to the consumption of free fatty acids during TAG synthesis, thereby reducing cellular damage. However, the tDGAT1 strain exhibited the lowest growth, attributed to a significantly prolonged period of growth retardation. Differences in growth performance and lipid components among the transgenic strains may be due to unique domains with the DGATs. This study provides a foundation for producing desired lipids using genetically engineered yeast strains.

Key words: *Saccharomyces cerevisiae*; *Myrmecia incisa*; diacylglycerol acyltransferase (DGAT); triacylglycerol (TAG); growth

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

Funding projects: National Natural Science Foundation of China (31772821); National "Double First-class" Aquatic Science