DOI: 10.3724/SP.J.1035.2012.00412

球等鞭金藻中 Δ5 去饱和酶基因的克隆与功能鉴定

孙全喜 李雪滢 郑德松 刘 江 李新征 亓宝秀
(山东农业大学作物生物学国家重点实验室, 泰安 271018)

摘要: 球等鞭金藻(*Isochrysis galbana*)是一类单细胞海洋微藻, 富含二十二碳六烯酸(DHA, 22: $6\Delta^{4, 7, 10, 13, 16, 19}$)。我们利用 RACE 的方法从球等鞭金藻 cDNA 文库中同源克隆到一个大小为 1329 bp 的 cDNA 片段, 编码 442 个氨基酸的多肽, 分子量约 49.9 kD。生物信息学分析表明, 其编码产物 N 端具有细胞色素 *b5* 结构域, 以及与电子传递有关的三个富含组氨酸的结构域, 与 *Pavlova salina* Δ5 去饱和酶同源性最高, 达 56%, 故将该基因命名为 *IgD5*。酿酒酵母功能鉴定实验表明, 其编码的蛋白质具有 Δ5 去饱和酶活性, 能够将二高-γ-亚麻酸(DGLA, $20:3\Delta^{8, 11, 14}$)转化成花生四烯酸(AA, $20:4\Delta^{5, 8, 11, 14}$), 转化效率平均为 34.6%, 最高可达 40.3%。

关键词: 球等鞭金藻; Δ5 去饱和酶; 超长链多不饱和脂肪酸
中图分类号: Q781 文献标识码: A 文章编号: 1000-3207(2012)03-0412-08

超长链多不饱和脂肪酸(VLCPUFAs), 如花生四烯酸、EPA($20:5\Delta^{5, 8, 11, 14, 17}$)以及 DHA($22: 6\Delta^{4, 7, 10, 13, 16, 19}$)等, 一般含有 20 或 22 个碳、4—6 个顺式双键, 对人类营养和健康具有重要的作用。经常补充这类脂肪酸不仅对胎、婴幼儿大脑皮层及神经元的发育具有重要作用[1], 而且能够减小心脑血管疾病、高血压以及炎症等疾病的发病率[2, 3]。目前, 这类长链多不饱和脂肪酸主要来源于深海鱼油。但是鱼类自身并不能合成 VLCPUFAs, 而是通过摄食富含 VLCPUFAs 的海洋微藻而富集到体内的。近些年来, 由于过度捕捞造成海洋野生鱼类资源日益减少, 鱼油产量已经不能够满足迅速增长的保健市场需要[4]。此外, 由于环境污染等原因造成鱼油中重金属离子、有机氯等有毒物质的含量升高[5, 6], 导致鱼油的食用安全性降低。虽然一些海洋微藻和真菌能大量合成此类 VLCPUFAs[7], 而且目前已经开发出商业化的海藻油和真菌油, 但是由于产量低、成本高而限制了该资源的大规模应用。因此, 寻找并开发一条安全、稳定、可持续生产的 VLCPUFAs 的替代途径势在必行。

高等植物能够合成油酸(LA, $18:2\Delta^{9, 12}$)和亚麻酸(ALA, $18:3\Delta^{9, 12, 15}$), 但是不能够进一步生成 VLCPUFAs, 通过代谢基因工程技术将海洋微藻或真菌中的 VLCPUFAs 合成代谢途径移植到植物中, 从而在植物特别是油料作物种子中生产 VLCPUFAs 将是一条理想的鱼油替代生产途径, 并成为近 10 年来的研究热点。

海洋微藻和真菌通过“Δ6 去饱和途径”将“从头合成”的 LA 和 ALA 生成 EPA 和 DHA(图 1)。在此途径中, LA 和 ALA 首先在 Δ6 去饱和酶的催化作用下, 分别通过 ω6 和 ω3 途径生成 γ-亚麻酸(GLA, $18:3\Delta^{6, 9, 12}$)和十八碳四烯酸(SDA, $18:4\Delta^{6, 9, 12, 15}$), 再由 Δ6 链延长酶催化生成 DGLA 和二十碳四烯酸(ETA, $20:4\Delta^{8, 11, 14, 17}$), 最后进一步由 Δ5 去饱和酶催化生成 AA 和 EPA。此外, 一些海洋微藻和真菌还存在一条“替代途径”-“Δ8 去饱和途径”-即 LA 和 ALA 先经 Δ9 链延长酶催化生成二十碳二烯酸(EDA, $20:2\Delta^{11, 14}$) 和二十碳三烯酸 (ETrA, $20:3\Delta^{11, 14, 17}$), 然后再经过 Δ8 去饱和作用生成 DGLA 和 ETA, 最后由 Δ5 去饱和酶催化生成 AA 和 EPA。DHA 则由 EPA 经过一次 Δ5 链延长和一次 Δ4 去饱和生成。ω6

收稿日期: 2011-03-21; 修订日期: 2012-01-12
基金项目: 国家自然科学基金(30970222); 长江学者和创新团队发展计划(IRT0635); 农业部 2009ZX08005-024B; 山东省科技攻关项目(2007GGB02001)资助
作者简介: 孙全喜(1983—), 男, 山东章丘人; 博士研究生; 主要从事生物化学与分子生物学研究。E-mail: sunqx1983@163.com
通讯作者: 李新征, E-mail: lxz@sdau.edu.cn; 亓宝秀, E-mail: qbx126@sdau.edu.cn

脂肪酸产物可以通过一类 ω3 去饱和酶转变成相应的 ω3 脂肪酸, 例如, Δ15 去饱和酶将 LA 转化成 ALA[8], Δ17 去饱和酶将 AA 转化成 EPA[9](图 1)。VLCPUFAs 合成代谢途径中的链延长酶和去饱和酶基因已经陆续从高等植物、海藻、真菌、线虫、苔藓以及动物等中克隆到[8−19], 并在拟南芥、大豆和油菜等油料作物中重组该途径生产出来 AA、EPA 以及 DHA[20−22], 但是 EPA, 特别是 DHA 产量很低。

2002 年, Qi, *et al.*从富含 DHA 的球等鞭金藻中克隆到第一个 Δ9 链延长酶基因[12], 并将该基因以及 *Euglena gracilis* Δ8 去饱和酶基因、*Mortierella alpina* Δ5 去饱和酶基因通过转基因技术在拟南芥中进行表达, 检测到了 AA 和 EPA 的生成[21], 第一次验证了超长链多不饱和脂肪酸“Δ8 去饱和途径”的存在。由于目前克隆到植物与微藻中 VLCPUFAs 合成途径中的链延长酶主要以酰基-CoA 中的脂肪酸为底物, 去饱和酶主要以磷脂酰胆碱(PC)中的脂肪酸为底物[20], 所以 VLCPUFAs 合成涉及脂肪酸在酰基-CoA 库和-PC 库间的转移。“Δ8 去饱和途径”与“Δ6 去饱和途径”相比, 由于植物中 LA-CoA 和 ALA-CoA 含量较高, Δ9 链延长酶可以直接以其为底物进行催化延伸, 然后产物只需从 CoA 库中转移一次到 PC 库中, 即可连续进行两次去饱和, 产生 AA 和 EPA, 减少了 VLCPUFAs 合成过程中脂肪酸在酰基-CoA 库和-PC 库间的多次交替转移, 所以 VLCPUFAs 合成效率应更高[20]。

球等鞭金藻的 VLCPUFAs 合成可能是通过“Δ8 去饱和途径”来实现的, 目前从该微藻中已克隆到了和该途径有关的 Δ9 链延长酶基因[12]与 Δ4 去饱和酶基因[23]2 个基因。我们拟从球等鞭金藻中克隆 VLCPUFAs 合成代谢途径中的其他关键酶基因, 例如 Δ8 去饱和酶、Δ5 去饱和酶、Δ17 去饱和酶以及 Δ5 链延长酶基因等, 为在转基因植物中生产 VLCPUFAs 提供更多的有价值的基因资源。

1　材料与方法

1.1　实验材料及试剂

大肠杆菌 XL10 (Stratagene)、酿酒酵母 YPH500 (Stratagene)、酵母表达载体 pYES2 (Invitrogen)、球等鞭金藻(CCAP 927/1) cDNA 文库为本实验室保存; 克隆载体 pMD18-T simple、*Taq* 酶、限制性内切酶、T4 连接酶等均购自 TAKARA 公司; 脂肪酸底物等购自 Nuchek 公司。

1.2　全长基因的获得

5′末端快速扩增(5′-RACE)　根据 NCBI 上已知的 Δ5 去饱和酶氨基酸保守区 QI/VEHHLFP 设计反向互补兼并引物 His3R(本研究所用引物见表 1), 以球等鞭金藻 cDNA 文库为模板, His3R 与文库载体 pTRG 上通用引物 pTRG Forward primer 为引物进行 PCR 扩增。反应体系: ddH_2O35.5 μL; 10×PCR buffer

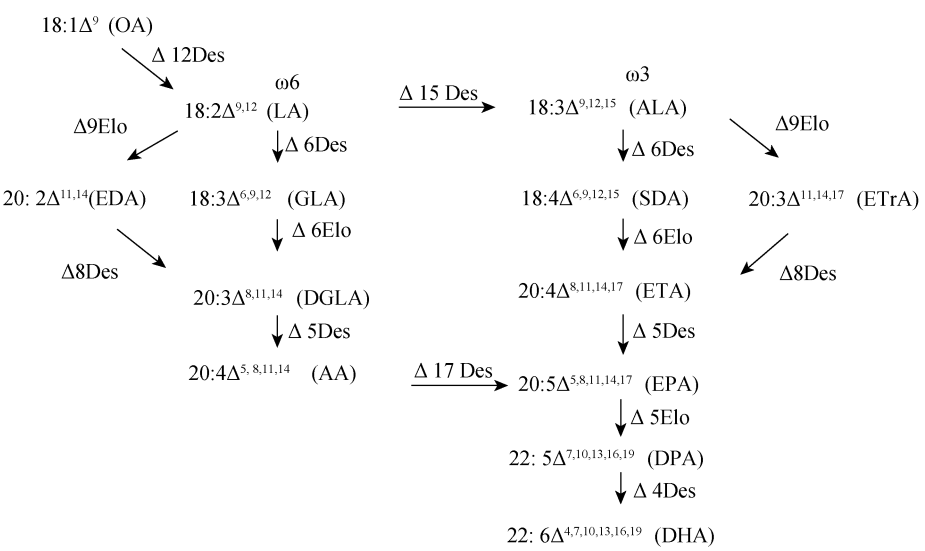


图 1　DHA 生物代谢途径

Fig. 1　Biosynthetic pathway of DHA

Des. 去饱和酶; Elo. 链延长酶

Des. desaturase; Elo. elongase

表 1 本研究所用到的引物

Tab. 1 Sequences of PCR primers used in this study

引物名称 Primers	序列 Sequences
His3R	5′-GGRAANARRTGRTGYTCNAYYTG-3′
pTRG Forward primer	5′-TCCGTTGTGGGGAAAGTTATC-3′
pTRG Reverse primer	5′-ATTCGTCGCCGGCCATAA-3′
IgD5GSP	5′-TCTTTCGGCTGGCAGTTCG-3′
IgD5Des-5 (*kpn*I)	5′-GGTACCATGGTGGCAGGCAAATCAGG-3′
IgD5Des-3 (*kpn*I)	5′-GGTACCCTAGTGCGTGTGCTCGTGGT-3′

(含 Mg^{2+})5 μL; dNTP(2.5 mM)4 μL; 引物(5 μmol/L)各 2 μL; 模板 1 μL; *Taq* 酶 0.5 μL。反应条件: 94℃预变性 3min; 94℃变性 30s, 52℃退火 30s, 72℃延伸 2min, 5 个循环; 接着 94℃变性 30s, 52℃退火 30s, 每个循环温度降低 1℃, 72℃延伸 2min, 10 个循环; 然后 94℃变性 30s, 42℃退火 30s, 72℃延伸 2min, 24 个循环; 72℃延伸 10min。

3′末端快速扩增(3′-RACE) 以球等鞭金藻 cDNA 文库为模板, 基因特异引物 IgD5GSP 与文库载体 pTRG 上通用引物 pTRG Reverve primer 为引物, 反应体系与条件同上。

全长 cDNA 序列的获得 两次 RACE 获得的片段进行拼接, 得到整个基因的开放阅读框(ORF)序列。以球等鞭金藻 cDNA 文库为模板, 用 IgD5Des-5/3(*Kpn*I)引物扩增获得基因全长 cDNA 片段, 连接克隆载体 pMD18-T simple(Takara), 转化大肠杆菌 XL10, 取 5 个阳性克隆进行测序(上海生工生物工程有限公司), 获得正确的基因全长 cDNA 序列。

1.3 酵母表达载体的构建

将序列正确的基因 cDNA 片段用限制性内切酶 *Kpn*I 进行酶切, 同时用 *Kpn*I 酶切酵母表达载体 pYES2, 并对 pYES2 进行去磷酸化, 将酶切产物进行琼脂糖凝胶电泳纯化回收。用 T4 连接酶将回收载体与片段按摩尔比 1∶3—1∶9 进行连接, 然后转化大肠杆菌 XL10, 筛选正向连接的阳性克隆, 提取质粒, 经酶切及测序验证后, 用醋酸锂法[24]转化酵母 YPH500(Stratagene)。

1.4 酵母培养与诱导

取阳性酵母克隆于 10 mL SC-U(Synthetic complete medium without Uracil)液体培养基中, 28℃, 过夜培养; 次日, 取 1.5 mL 过夜培养物接种到 25 mL 含 1% NP40 的新鲜 SC-U 培养液中, 28℃, 180 r/min, 继续培养, 当培养液 A_{600} 到 0.4—0.6 之间, 添加 1 mL 50%的半乳糖及 50 μL 0.5 mol/L 脂肪酸钠盐底物如 DGLA, 22℃, 180 r/min, 继续培养 2d。

1.5 脂肪酸提取及气相色谱分析

海藻经离心收集并液氮研磨后, 用氮气吹干, 备用。离心收集诱导后的酵母培养物, 先分别用含 1%和 0.5% NP40 的去离子水冲洗一次, 再用去离子水冲洗一次, 然后用氮气吹干, 备用。将处理好的样品置于 3 mL 的玻璃瓶中, 添加 1 mL 甲基化溶液(含甲醇 8.5 mL, 2, 2-二甲氧丙烷 0.5 mL, 盐酸 1 mL), 85℃甲基化反应 1h; 冷却后, 添加 1%氯化钠 1 mL, 正己烷 0.5 mL, 漩涡振荡, 然后室温放置 10min 或更长时间; 离心取上层液相。由山东省分析测试中心进行气相色谱分析。

2 结果

2.1 球等鞭金藻脂肪酸成分分析

我们对球等鞭金藻的脂肪酸成分进行了气相色谱分析。结果显示, 球等鞭金藻富含 DHA, 达到总脂肪酸的 12%(表 2)。“Δ6 去饱和途径”的中间产物 18:4(n-3)达到 11.5%, 但是没有检测到 20:2(n-6)、20:3(n-6)、20:3(n-3)、20:4(n-3) 等“Δ8 去饱和途径”的中间产物。EPA(20:5n-3)的含量也仅为 1.6%。

表 2 球等鞭金藻主要脂肪酸组成成分

Tab. 2 Composition of the major fatty acids in *Isochrysis galbana*

脂肪酸 Fatty acid	比例 Mol% total
14:0	21.0
16:0	9.3
16:1n-7	2.6
16:3n-4	8.8
18:1n-9	18.1
18:2n-6	4.0
18:3n-3	11.0
18:4n-3	11.5
20:5n-3	1.6
22:6n-3	12.0

2.2　Δ5 去饱和酶基因 *IgD5* 全长 cDNA 的获得

利用已有的球等鞭金藻 cDNA 文库, 根据去饱和酶的氨基酸保守序列 Q I/V E H H L F P 设计反向互补兼并引物 His3R, 与文库载体 pTRG 上的通用引物 pTRG Forward primer 进行 5′ RACE, 得到大约 1.1 kb 的片段(图 2A), 回收、测序, 经生物信息学分析, 发现具备“Front-end”去饱和酶的四个保守区 HPGG、HxxxH、HxxHH 以及 LNxQIEHHLFP(图 3)。推测该基因可能是一个新的去饱和酶基因。

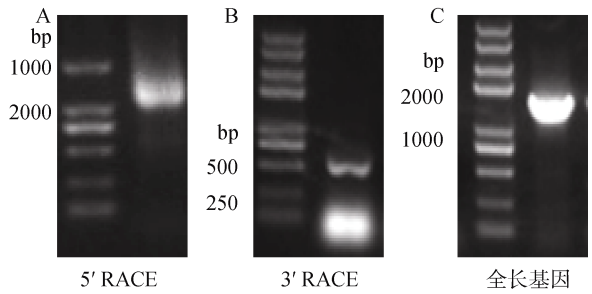


图 2　*IgD5* 基因全长 cDNA 的获得

Fig.2　Isolation of the full length cDNA of *IgD5*

A. 5′ RACE 获得大约 1.1 kb 的片段; B. 3′ RACE 获得大约 500 bp 的片段; C. 1.3 kb 全长 cDNA 的扩增

A. a 1.1 kb fragment obtained from 5′ RACE; B. a 500 bp DNA fragment obtained from–3′ RACE; C. amplification of the 1.3 kb full length cDNA

为了进一步克隆该基因的全长 cDNA, 我们根据已经获得的 5′端序列设计基因特异引物 IgD5GSP, 与文库载体上通用引物 pTRG Reverse primer 进行 3′ RACE, 获得大约 500 bp 片段(图 2B), 回收、测序, 生物信息学分析发现具备去饱和酶保守区 LNx QIEHHLFP, 并且与 5′RACE 获得的片段重叠 345 bp。将序列进行拼接, 获得长 1329 bp 的完整开放阅读框, 编码 442 个氨基酸的多肽, 预测分子量为 49.9 kD。

将氨基酸序列与已知功能的去饱和酶序列进行了同源性比较(图 3), 发现该基因编码的蛋白质与来源于其他海洋微藻如 *Pavlova salina*[24]、*Perkinsus marinus*[25]和 *Thraustochytrium* sp.[26]中的 Δ5 去饱和酶分别有 56%、49%和 44%的相似性。推测该基因可能是一个新的 Δ5 去饱和酶基因。利用特异引物 IgD5Des-5(*Kpn*I)和 IgD5Des-3(*Kpn*I)进行 PCR 扩增得到该基因全长 cDNA(图 2C), 连接 pMD18-T Simple 载体, 测序鉴定正确, 将该质粒命名为 pMD18-IgD5。

2.3　*IgD5* 去饱和酶活性测定

我们将构建好的酵母表达载体 pYES2-IgD5 利用醋酸锂法转化酵母菌 YPH500[27]。在不含尿嘧啶的固体酵母培养基上筛选获得带有 pYES2-IgD5 的阳性克隆。挑取阳性克隆于酵母培养基中培养, 然后分别添加 LA 18:2(n6)、ALA 18:3(n3)、EDA 20:2(n6)、ETrA 20:3(n3)和 DGLA 20:3(n6)等脂肪酸底物, 加半乳糖诱导 IgD5 的表达, 气相色谱检测有无新的脂肪酸产物生成。发现只有添加 20:3(n6)时能够检测到新的产物 20:4(n6)的生成(图 4), 转化率平均为 34.6%(表 3), 最高能达到 40.3% [转化率=产物/(产物+底物)×100]。这表明该基因表达的蛋白具有 Δ5 去饱和酶活性, 能够将 DGLA 20:3(n6)转化成 AA 20:4(n6)。

3　讨论

海洋单细胞微藻球等鞭金藻中 DHA 的含量为 12%, Qi, *et al.*从中克隆到高催化活性的 Δ9 链延长酶基因, 推测球等鞭金藻可能是通过“Δ8 去饱和途径”合成的 DHA。由于微藻和真菌链延长酶主要以酰基-CoA 中的脂肪酸为底物, 去饱和酶主要以磷脂酰胆碱(PC)中的脂肪酸为底物[20], 因此该途径减少了由于脂肪酸去饱和酶和链延长酶所需底物的形式不同而造成的脂肪酸在酰基-CoA 库和 PC 库间的转移次数, 从而使该途径在超长链多不饱和脂肪酸合成过程中比“Δ6 去饱和途径”效率更高[20]。

在本研究中, 我们从球等鞭金藻中克隆到一个类似于去饱和酶的 cDNA。氨基酸序列分析表明其编码产物具有“front-end”去饱和酶的典型特征, N 端具有细胞色素 *b5* 结构域 HPGG, 这表明该酶可能定位于微粒体而不是质体中, 因为质体中的去饱和酶通常以铁氧化还原蛋白作为电子供体的[28], 并且具备与电子传递有关的三个富含组氨酸的结构域 HxxxH、HxxHH 和 LNxQIEHHLFP, 并与来源于 *Pavlova salina*[24]、*Perkinsus marinus*[25]和 *Thraustochytrium* sp.[26]等海洋微藻的 **Δ**5 去饱和酶氨基酸序列的同源性较高, 分别为 56%、49%和 44%。利用酿酒酵母表达进行功能鉴定, 发现该基因表达产物能够将二高-γ-亚麻酸(DGLA)转化成花生四烯酸(AA), 但是不能转化包括 LA 等 18 碳及 EDA 等 20 碳脂肪酸, 证明它是一个 DGLA 专一的 20 碳 **Δ**5 脂肪酸去饱和酶基因。其将 DGLA 转化成 AA 的效率

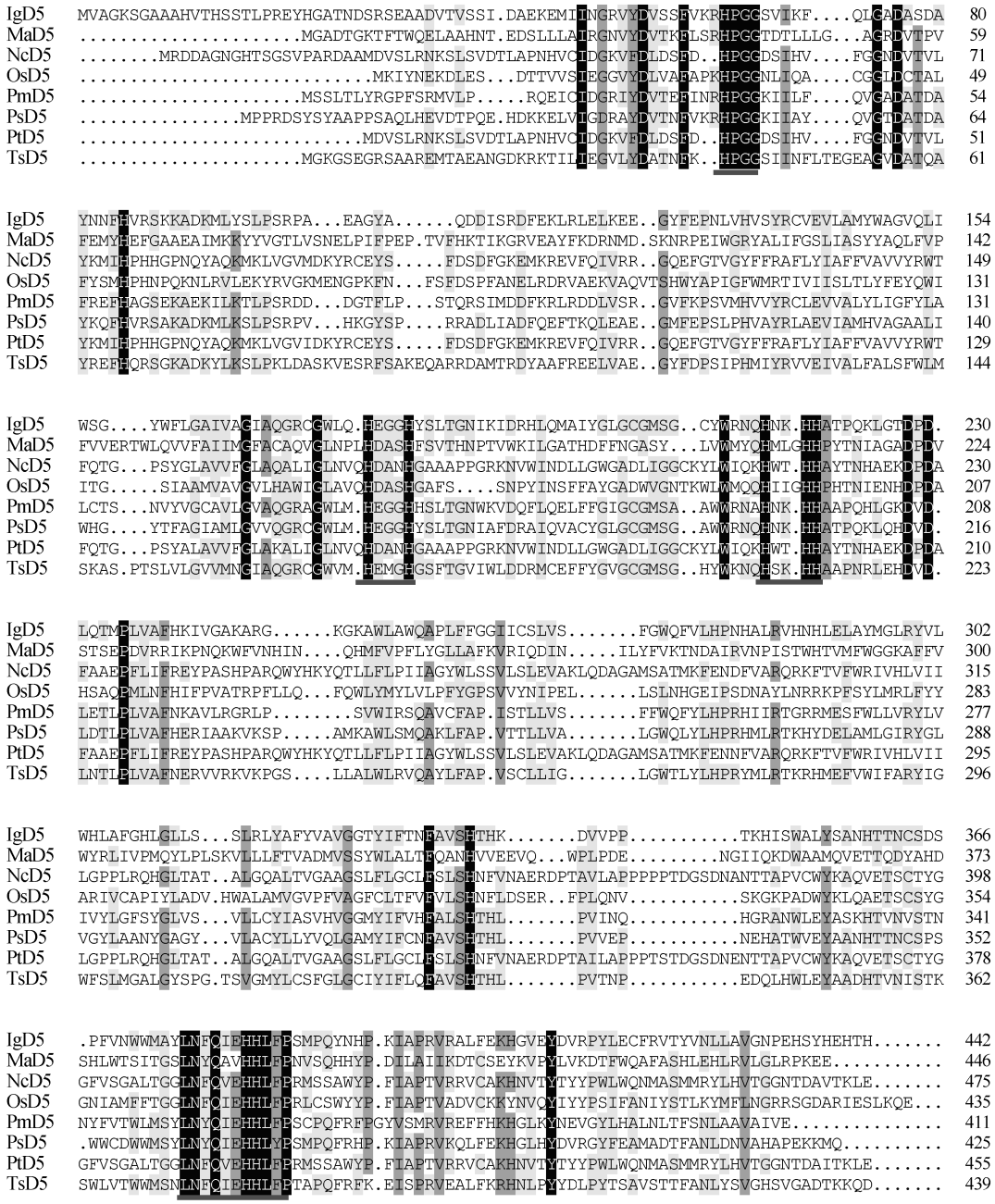


图 3 球等鞭金藻 Δ5 去饱和酶与已知功能的 Δ5 去饱和酶同源性比较

Fig. 3 Alignment of deduced amino acid sequences of *I. galbana* Δ5 desaturase and closely related proteins

Ig. *Isochrysis galbana*; Ma. *Mortierella alpine*; Nc. *Nitzschia closterium*; Os. *Oblongichytrium* sp.; Pm. *Perkinsus marinus*; Pt. *Phaeodactylum tricornutum*; Ps. *Pavlova salina*; Ts. *Thraustochytrium* sp.

平均为 34.6%, 最高可达 40.3%(图 4 和表 3)。据我们所知, 它是迄今为止克隆到的活性最高的具有类似功能的去饱和酶。远远高于其他已经鉴定功能的 **Δ**5 去饱和酶[24−32], 如, *Phaeodactylum tricornutum* 将 DGLA 转化成 AA 的效率为 24.7%, 而 *Physcomitrella patens* 中 **Δ**5 去饱和酶将 DGLA 转化成 AA 的效率仅为 14.7%等。此外, 已经克隆到的一些具有 Δ5 去饱和酶活性的基因[29, 31], 除了能够将 DGLA 转化成 AA 外, 还能够将 EDA20:2$\Delta^{11,14}$和 ETrA20:3$\Delta^{11,14,17}$分别转化为 20:3$\Delta^{5,11,14}$和 20:4$\Delta^{5,11,14,17}$, 因此, IgD5 相对于上述已克隆到的 **Δ**5 去饱和酶, 是一个很好的用于在高等植物中生产 EPA 和 DHA 的去饱和酶。

虽然 *IgD5* 基因所编码的 Δ5 去饱和酶能高效地将 DGLA 转化成 AA, 但是球等鞭金藻脂肪酸组分中没有检测到 AA(表 2), 推测在球等鞭金藻中很可

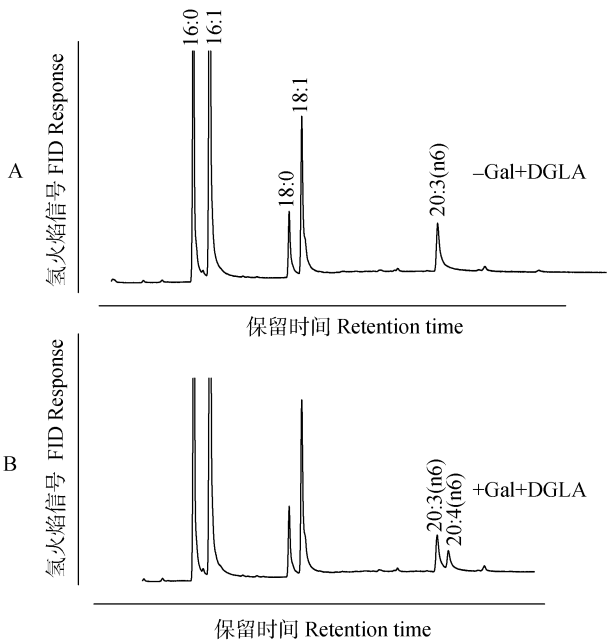


图 4　重组酵母添加底物 DGLA 诱导前后脂肪酸成分气相色谱检测图

Fig. 4　Gas chromatograms of fatty acid methyl esters extracted from transformed yeast containing pYES2-IgD5
A. 未添加半乳糖; B. 添加半乳糖
A. non-induced; B. induced

表 3　喂食 **DGLA** 底物的重组酵母诱导前后脂肪酸组成成分分析

Tab. 3　Fatty acid profile between non-induced and induced yeast cells habouring the pYes2-IgD5 fed with DGLA

脂肪酸 Fatty acid	比例 Mol% of fatty acid	
	+DGLA (20:3n6)	
	–Gal	+Gal
16:0	25.2	25.4
16:1 (n9)	44.3	47.8
18:0	5.8	5.3
18:1 (n9)	16.9	16.3
20:3 (n6)	7.8	3.4
20:4 (n6)	–	1.8
转化率 Conversion (%)	0	34.6

能存在活性极高的 ω3 去饱和酶(也称 Δ17 去饱和酶), 能将此 ω6 产物高效地转化为 ω3 产物 EPA(图 1), 然而 EPA 的含量也很低(1.6%, 表 1), 所以催化 EPA 生成 DHA 的 Δ5 链延长酶的活性也较高。Δ5 链延长酶能够将 EPA 转化 DPA, 但是 DPA 并没被检测到。催化 DPA 到 DHA 的 Δ4 去饱和酶已克隆到[23], 它在酵母中转化 DPA 到 DHA 的效率高达 28%, 这可能是球等鞭金藻含 DHA 高的原因。当然以上推测还需进一步研究证明。

另外, 在球等鞭金藻脂肪酸组成成分中, 脂肪酸 SDA(18:4n3)的含量竟然达到 11.5%, 由于 SDA 是 ALA Δ6 去饱和的产物, 这是否暗示球等鞭金藻中除“Δ8 去饱和途径”之外还存在一条“Δ6 去饱和途径”, 还需要进一步研究。

综上所述, 我们通过对球等鞭金藻脂肪酸组成成分分析, 结合新克隆、鉴定到的高催化活性的 Δ5 去饱和酶基因 *IgD5* 及已知的 IgΔ9 链延长酶[12]和 IgΔ4 去饱和酶[23]基因信息, 初步揭示了其 DHA 高效合成的可能途径与机理, 并为从该微藻中克隆鉴定其他与催化 LA 或 ALA 到 DHA 的高效代谢途径中有关的酶基因提供了线索。此外, 新克隆到 *IgD5* 基因编码的 Δ5 去饱和酶不但酶活性远远高于其他已知同类酶的活性, 而且具有很高的底物专一性, 是用于转基因油料作物中替代生产鱼油的一个理想酶基因。

参考文献:

[1] Crawford M. Placental delivery of arachidonic and docosahexaenoic acids: implications for the lipid nutrition of preterm infants [J]. *American Journal of Clinical Nutrition*, 2000, 71, 275—284

[2] Thies F, Garry J M, Yaqoob P, *et al*. Association of n-3 polyunsaturated fatty acids with stability of atherosclerotic plaques: a randomised controlled trial [J]. *Lancet*, 2003, **361**(9356): 477—485

[3] Kinsella J E, Lokesh B, Broughton S, *et al*. Dietary polyunsaturated fatty acids and eicosanoids: potential effects on the modulation of inflammatory and immune cells: an overview [J]. *Nutrition*, 1990, **6**(1): 24—44

[4] Pauly D, Alder J, Bennett E, *et al*. The future for fisheries [J]. *Science*, 2003, **302**(5649): 1359—1361

[5] Yokoo E M, Valente J G, Grattan L, *et al*. Low level methylmercury exposure affects neuropsychological function in adults [J]. *Environmental Health*, 2003, **2**(1): 8

[6] Drexler H, Spiekermann P, Meyer A, *et al*. Metabolic engineering of fatty acids for breeding of new oilseed crops: strategies, problems and first results [J]. *Journal of Plant Physiology*, 2003, **160**(7): 779—802

[7] Li X B, Xu X D, Kong R Q. Studies on the production of oil and polyunsaturated fatty acids in five species of *Nannochloropsis* [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2010, **34**(5): 893—897 [李秀波, 徐旭东, 孔任秋. 五种微绿球藻产油和产多不饱和脂肪酸的研究. 水生生物学报, 2010, **34**(5): 893—897]

[8] Yadav N S, Wierzbicki A, Aegerter M, *et al*. Cloning of higher plant omega-3 fatty acid desaturases [J]. *Plant Physiology*, 1993, **103**(2): 467—476

[9] Pereira S L, Huang Y S, Bobik E G, *et al*. A novel omega3-fatty acid desaturase involved in the biosynthesis of eicosapentaenoic acid [J]. *Biochemical Journal*, 2004, **378**(2): 665—671

[10] Yuan D J, Zhou K Y, Kang J X. The cloning and preliminary characterization of a C18:0 Δ9 desaturase gene from marine microalgae *Pavlova viridis* [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2009, **33**(4): 732—739 [元冬娟, 周克元, 康景轩. 绿色巴夫藻脂肪酸去饱和酶的克隆和初步研究. 水生生物学报, 2009, **33**(4): 732—739]

[11] Wallis J G, Browse J. The Delta8-desaturase of *Euglena gracilis*: an alternate pathway for synthesis of 20-carbon polyunsaturated fatty acids [J]. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 1999, **365**(2): 307—316.

[12] Qi B, Beaudoin F, FraseR T, *et al*. Identification of a cDNA encoding a novel C18-Delta(9) polyunsaturated fatty acid-specific elongating activity from the docosahexaenoic acid (DHA)-producing microalga, *Isochrysis galbana* [J]. *FEBS Letters*, 2002, **510**(3): 159—165

[13] Michaelson L V, Lazarus C M, Griffiths G, *et al*. Isolation of a Delta5-fatty acid desaturase gene from *Mortierella alpina* [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1998, **273**(30): 19055—19059

[14] Sayanova O, Haslam R, Qi B, *et al*. The alternative pathway C20 Delta8-desaturase from the non-photosynthetic organism *Acanthamoeba castellanii* is an atypical cytochrome b5-fusion desaturase [J]. *FEBS Letters*, 2006, **580**(8): 1946—1952

[15] Kajikawa M, Yamato K T, Sakai Y, *et al*. Isolation and functional characterization of fatty acid delta5-elongase gene from the liverwort *Marchantia polymorpha* L. [J]. *FEBS Letters*, 2006, **580**(1): 149—154

[16] Cho H P, Nakamura M T, Clarke S D. Cloning, expression, and nutritional regulation of the mammalian Delta-6 desaturase [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1999, **274**(1): 471—477

[17] Sperling P, Lee M, Girke T, *et al*. A bifunctional delta-fatty acyl acetylenase/desaturase from the moss *Ceratodon purpureus*. A new member of the cytochrome b5 superfamily [J]. *European Journal of Biochemistry*, 2000, **267**(12): 3801—3811

[18] Leonard A E, Kelder B, Bobik E G, *et al*. cDNA cloning and characterization of human Delta5-desaturase involved in the biosynthesis of arachidonic acid [J]. *Biochemical Journal*, 2000, **347**(3): 719—724

[19] Watts J L, Browse J. Isolation and characterization of a Delta 5-fatty acid desaturase from *Caenorhabditis elegans* [J]. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 1999, **362**(1): 175—182

[20] Abbadi A, Domergue F, Bauer J, *et al*. Biosynthesis of very-long-chain polyunsaturated fatty acids in transgenic oilseeds: constraints on their accumulation [J]. *Plant Cell*, 2004, **16**(10): 2734—2748

[21] Qi B, Fraser T, Mugford S, *et al*. Production of very long chain polyunsaturated omega-3 and omega-6 fatty acids in plants [J]. *Nature Biotechnology*, 2004, **22**(6): 739—745

[22] Wu G, Truksa M, Datla N, *et al*. Stepwise engineering to produce high yields of very long-chain polyunsaturated fatty acids in plants [J]. *Nature Biotechnology*, 2005, **23**(8): 1013—1017

[23] Pereira S L, Leonard A E, Huang Y S, *et al*. Identification of two novel microalgal enzymes involved in the conversion of the omega3-fatty acid, eicosapentaenoic acid, into docosahexaenoic acid [J]. *Biochemical Journal*, 2004, **384**(2): 357—366

[24] Zhou X R, Robert S S, Petrie J R, *et al*. Isolation and characterization of genes from the marine microalga *Pavlova salina* encoding three front-end desaturases involved in docosahexaenoic acid biosynthesis [J]. *Phytochemistry*, 2007, **68**(6): 785—796

[25] Venegas-caleron M, Beaudoin F, Sayanova O, *et al*. Co-transcribed genes for long chain polyunsaturated fatty acid biosynthesis in the protozoon *Perkinsus marinus* include a plant-like FAE1 3-ketoacyl coenzyme A synthase [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2007, **282**(5): 2996—3003

[26] Qiu X, Hong H, Mackenzie S L. Identification of a Delta 4 fatty acid desaturase from *Thraustochytrium sp*. involved in the biosynthesis of docosahexanoic acid by heterologous expression in *Saccharomyces cerevisiae* and *Brassica juncea* [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2001, **276**(34): 31561—31566

[27] Elble R. A simple and efficient procedure for transformation of yeasts [J]. *Biotechniques*, 1992, **13**(1): 18—20

[28] Sperling P, Heinz E. Desaturases fused to their electron donor [J]. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 2001, **103**: 158—180

[29] Tonon T, Sayanova O, Michaelson L V, *et al*. Fatty acid desaturases from the microalga *Thalassiosira pseudonana* [J]. *FEBS Journal*, 2005, **272**(13): 3401—3412

[30] Kaewsuwan S, Cahoon E B, Perroud P F, *et al*. Identification and functional characterization of the moss *Physcomitrella patens* delta5-desaturase gene involved in arachidonic and eicosapentaenoic acid biosynthesis [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2006, **281**(31): 21988—21997

[31] Domergue F, Lerchl J, Zahringer U, *et al*. Cloning and functional characterization of *Phaeodactylum tricornutum* front-end desaturases involved in eicosapentaenoic acid biosynthesis [J]. *European Journal of Biochemistry*, 2002, **269**(16): 4105—4113

[32] Iskandarov U, Khozin-goldberg I, Cohen Z. Identification and characterization of Delta12, Delta6, and Delta5 Desaturases from the green microalga *Parietochloris incisa* [J]. *Lipids*, 2010, **45**(6): 519—530

ISOLATION AND FUNCTIONAL ANALYSIS OF A Δ5 DESATURASE GENE FROM *ISOCHRYSIS GALBANA*

SUN Quan-Xi, LI Xue-Ying, ZHENG De-Song, LIU Jiang, LI Xin-Zheng and QI Bao-Xiu

(*State Key Laboratory of Crop Biology*, *Shandong Agricultural University*, *Tai'an* 271018, *China*)

Abstract: The very long chain (≥C20) polyunsaturated fatty acids (VLCPUFA), such as arachidonic acid (AA; 20:4ω6), eicosapentaenoic acid (EPA; 20:5ω3) and docosapentaenoic acid (DHA; 22:6ω3) are essential for human health and nutrition. Dietary supplementation with these fatty acids is not only helpful for fetal neuronal, but also can reduce the risk of cardiovascular disease, hypertension, inflammatory and other diseases. Human beings can synthesize these fatty acids from the two essential fatty acid, linoleic acid (LA; 18:2ω6) and α-linolenic acid (ALA; 18:3ω3), which must be obtained from the diet. However, the synthetic efficiency is somewhat limited, and can not meet our daily requirement. AA can be obtained easily from meat, egg and milk, often in excessive amounts, EPA and DHA, however, can only be obtained from marine fish that are so often omitted from the modern diet, in much lower amounts than required. This shortage is further worsened by the fact that the natural marine fish resources have been depleting fast in recent years. In addition, the recent findings of toxic chemicals in fish oil has created fears for the consumption of fish products hence reduced the intake of EPA and DHA even further. Therefore, alternative source of these VLCPUFAs are therefore desirable. To obtain them from oil plants in commercial and sustainable quantities is particularly attractive. However, no oil-seed species produce such products naturally. The VLCPUFA biosynthesis pathways in organisms such as filamentous fungus and marine microalgae have been elaborated. Accordingly, genes encoding for elongases and desaturases involved in their metabolic pathway have been cloned from a variety of organisms including algae, mosses, fungi, nematodes and humans in the last 10 years. The reconstruction of the VLCPUFAs metabolic pathway into higher plants has been achieved in Arabidopsis, linseed, mustard and soya bean by introducing a set of 3—9 fatty acid desaturase and elongase genes. However, the production of VLCPUFAs, especially DHA, in these transgenic plants is somewhat low, much lower than that found in the EPA and DHA producing microorganisms from which these genes were originally isolated. This may be attributed to the usual 'pick-and-mix' strategies to choose the gene set to produce these transgenics. We aim to mine the whole set of enzymes from the same organism and use them as a gene set for the production of EPA and DHA in oilseed plants. *Isochrysis galbana*, a marine microalga, rich in docosahexaenoic acid (DHA, 22:6n-3, $\Delta^{4, 7, 10, 13, 16, 19}$), was chosen in this study. The Δ8 desaturation pathway may be operating in the production of EPA/DHA in this organism, and this pathway was thought to be more efficient over the conventional Δ6 desaturation pathway. Previously, two of the five genes involved in the conversion of C18 fatty acid substrates to the final product DHA have been isolated. The first one was the Δ9 elongase gene that catalyses the first step in the DHA biosynthesis pathway, the elongation of LA to EDA and A LA to ETrA. The second one was a Δ4 desaturase, which was involved in the final step of the biosynthesis of DHA. Both enzymes showed high catalytic activities and also had restricted substrate specificity. Here, we reported the isolation of the third gene, a Δ5 desaturase gene that was capable to convert DGLA to AA. That was achieved by the RACE strategy using different degenerate primers based on the conserved motifs of known desaturase sequences to isolate a partial cDNA from an *I. galbana* cDNA library. The full length cDNA was subsequently assembled and it consisted of 1329 nucleotides, encoding a protein of 442 amino acids with predicted molecular mass of 49.9 kD. Bioinformatics analysis showed that it shared homology with other functionally known front-end fatty acid desaturases and the highest homology of 56% was found with a Δ5 desaturase from *Pavlova salina*. As characterized by this family of desaturases, it contained an N-terminal cytochrome *b5* domain, and three histidine rich motifs (his-boxes) related to electron transfer. Functional analysis by expression in *Saccharomyces cerevisiae* revealed that it could convert DGLA (20:3$\Delta^{8, 11, 14}$) to AA (20:4$\Delta^{5, 8, 11, 14}$) by introducing a double bond in the acyl chain at the Δ5 position, indicating that this newly isolated cDNA sequence encodes a protein that specifically catalyzes for the conversion of C20-Δ5-polyunsaturated fatty acid, AA, hence it was designated as IgD5.

Key words: *Isochrysis galbana*; Δ5 desaturase; Very long chain polyunsaturated fatty acid