

学校编码: 10384

分类号_____密级_____

学 号: 20620091151297

UDC_____

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

高山被孢霉延长酶基因的反转录及其同源表达的
研究

**Studies on reverse transcription of *Mortierella alpina* elongase
gene and its homologous expression**

张长杰

指导教师姓名: 卢 英 华 教 授

专 业 名 称: 生 物 化 工

论文提交日期: 2 0 1 2 年 5 月

论文答辩日期: 2 0 1 2 年 6 月

学位授予日期: 2 0 1 2 年 月

答辩委员会主席: _____

评 阅 人: _____

2012 年 6 月

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为()课题(组)的研究成果,获得()课题(组)经费或实验室的资助,在()实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

1.经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，于
年 月 日解密，解密后适用上述授权。

2.不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月 日

目 录

摘要.....	I
Abstract.....	III
第一章 绪论.....	1
1.1 ARA 的理化性质.....	1
1.2 ARA 的应用.....	3
1.2.1 ARA 在婴幼儿奶粉中的应用.....	3
1.2.2 ARA 在畜禽业中的应用.....	3
1.2.3 ARA 在化妆品中的应用.....	4
1.3 ARA 的合成途径及相关研究.....	4
1.3.1 ARA 的合成途径.....	4
1.3.2 ARA 合成途径的相关研究.....	5
1.4 高山被孢霉产花生四烯酸的研究概况.....	6
1.5 高山被孢霉分子生物学方面的研究.....	9
1.6 高山被孢霉的遗传转化系统.....	10
1.7 丝状真菌的 DNA 转化方法.....	12
1.7.1 基因枪法 (Gene gun)	12
1.7.2 电击法 (Electrophoresis)	12
1.7.3 显微注射法 (Micro injection)	12
1.7.4 原生质体转化法 (Protoplast transformation)	13
1.8 本文研究内容及意义.....	13
第二章 高山被孢霉重组菌的构建.....	15
2.1 引言.....	15
2.2 实验材料及仪器.....	15
2.2.1 菌株与质粒.....	15
2.2.2 主要试剂.....	16

2.2.3 主要仪器与设备.....	17
2.2.4 培养基和常用溶液.....	17
2.3 实验方法.....	19
2.3.1 高山被孢霉总 RNA 的提取.....	19
2.3.2 目的基因 <i>GLELO</i> 的扩增.....	21
2.3.3 琼脂糖凝胶电泳.....	22
2.3.4 PCR 产物的纯化.....	22
2.3.5 目的基因 <i>GLELO</i> 与载体 T Simple Vector 的连接.....	23
2.3.6 DH5 α 感受态细胞的制备.....	23
2.3.7 大肠杆菌的转化.....	24
2.3.8 重组质粒的提取.....	24
2.3.9 酶切反应（双酶切）.....	25
2.3.10 <i>His h4. 1p-hpt-trpCt</i> 片段的扩增.....	25
2.3.11 <i>His h4. 1p-hpt-trpCt</i> 片段与 T Vector 连接.....	26
2.3.12 <i>GLELO</i> 基因的定点突变.....	26
2.3.13 T- <i>his-GLELO*-trpCt</i> 的构建.....	28
2.3.14 重组 pD4 质粒的构建.....	30
2.3.15 高山被孢霉原生质体制备及转化条件优化.....	31
2.4 结果与讨论.....	33
2.4.1 高山被孢霉总 RNA 的提取.....	33
2.4.2 高山被孢霉延长酶基因的反转录.....	33
2.4.3 <i>GLELO</i> 基因的测序与比对.....	34
2.4.2 <i>His h4. 1p-hpt-trpCt</i> 片段的扩增.....	35
2.4.3 <i>GLELO</i> 基因的定点突变与鉴定.....	36
2.4.4 T- <i>his-GLELO*-trpCt</i> 的构建.....	38
2.4.5 pD4- <i>GLELO*</i> 的构建.....	39
2.4.5 原生质体制备条件的优化.....	39

2.4.6 影响高山被孢霉原生质体转化的因素.....	44
2.4.7 高山被孢霉转化子的 PCR 检测.....	45
2.5 小结.....	46
第三章 高山被孢霉重组菌的发酵研究.....	47
3.1 实验材料.....	47
3.1.1 菌种.....	47
3.1.2 实验所需主要药品与仪器设备.....	47
3.1.3 常用培养基及溶液.....	47
3.2 实验方法.....	48
3.2.1 菌种保藏.....	48
3.2.2 培养方法.....	48
3.2.3 生物量的测定.....	49
3.2.4 葡萄糖浓度测定.....	49
3.2.5 总油脂产量的测定.....	50
3.2.6 ARA 产量的测定.....	50
3.3 结果与讨论.....	52
3.4.1 重组菌的摇瓶验证.....	52
3.4.2 重组菌的发酵罐培养.....	53
3.4 小结.....	54
第四章 结论和展望.....	55
4.1 结论.....	55
4.1 展望.....	56
参 考 文 献.....	57
在读期间发表论文.....	64
致谢.....	65

CONTENTS

Chinese abstract.....	I
Abstract.....	III
Chapter 1 Introduction.....	1
1.1 Physical and chemical properties of Arachidonic acid.....	1
1.2 Application of Arachodonic acid.....	3
1.2.1 Application of Arachodonic acid in infant milk powder.....	3
1.2.2 Application of Arachodonic acid in graziery.....	3
1.2.3 Application of Arachodonic acid in makeup.....	4
1.3 Synthetic pathway of Arachidonic acid and it's regulation.....	4
1.3.1 Synthetic pathway of Arachidonic acid.....	4
1.3.2 Regulation of Arachidonic synthetic pathway.....	5
1.4 Research progress of Arachidonic acid production.....	6
1.5 Genetics research progress of <i>Mortierella alpina</i>.....	9
1.6 Genetic modification system of <i>Mortierella alpina</i>.....	10
1.7 DNA transformation of filamentous fungi.....	12
1.7.1 Gene gun.....	12
1.7.2 Electrophoresis.....	12
1.7.3 Micro injection.....	12
1.7.4 Protoplast transformation.....	13
1.8 Purpose and contents of this study.....	13
Chapter 2 Construction of recombinant <i>Mortierella alpina</i>.....	15
2.1 Intruction.....	15
2.2 Materials and methods.....	15
2.2.1 Strains and plasmid.....	15

2.2.2 Reagents.....	16
2.2.3 Equipment.....	17
2.2.4 Culture media and solution.....	17
2.3 Experimental methods.....	19
2.3.1 Extraction of total RNA.....	19
2.3.2 Reverse transcription of <i>GLELO</i> gene.....	21
2.3.3 Agarose gel electrophoresis.....	22
2.3.4 Purification of PCR products.....	22
2.3.5 Ligation of DNA fragment and T vector.....	23
2.3.6 Preparation of competent <i>E. coli</i> DH5 α	23
2.3.7 Transformation of recombinant plasmid into <i>E. coli</i>	24
2.3.8 Extraction of recombinant plasmid.....	24
2.3.9 Enzyme digestion of recombinant plasmid.....	25
2.3.10 PCR amplification of <i>His h4. 1p-hpt(mod)-trpCt</i>	25
2.3.11 Ligation of <i>His h4. 1p-hpt(mod)-trpCt</i> and T vector.....	26
2.3.12 Sited-directed mutation of <i>GLELO</i> gene.....	26
2.3.13 Construction of T- <i>his-GLELO*-trpCt</i> plasmid.....	28
2.3.14 Construction of recombinant pD4 plasmid.....	30
2.3.15 Optimization of protoplast transformation of <i>Mortierella alpina</i>	31
2.4 Results and discussion.....	33
2.4.1 Extraction of total RNA.....	33
2.4.2 Reverse transcription of <i>GLELO</i> gene.....	33
2.4.3 DNA sequence of <i>GLELO</i> gene.....	34
2.4.2 Amplification of <i>His h4. 1p-hpt(mod)-trpCt</i>	35
2.4.3 Identification of sited-directed mutation of <i>GLELO</i> gene.....	36
2.4.4 Construction of T- <i>his-GLELO*-trpCt</i>	38
2.4.5 Construction of recombinant pD4- <i>GLELO*</i>	39

2.4.5 Optimization of protoplast preparation.....	39
2.4.6 Factors affecting protoplast transformation of <i>Mortierella alpina</i>	44
2.4.7 PCR identification of recombinant <i>Mortierella alpina</i>	45
2.5 Conclusions.....	46
Chapter 3 Fermentation of recombinant <i>Mortierella alpina</i>.....	47
3.1 Materials.....	47
3.1.1 Strains.....	47
3.1.2 Reagents and equipment.....	47
3.1.3 Culture media and solutions.....	47
3.2 Methods.....	48
3.2.1 Culture preservation.....	48
3.2.2 Culture methods.....	48
3.2.3 Determination of dry biomass.....	49
3.2.4 Determination of glucose concentration.....	49
3.2.5 Determination of gross oil.....	50
3.2.6 Determination of Arachidonic acid.....	50
3.3 Results and discussion.....	52
3.4.1 Shake flask culture of recombinant <i>Mortierella alpina</i>	52
3.4.2 Bioreactor fermentation of recombinant <i>Mortierella alpina</i>	53
3.4 Conclusions.....	54
Chapter 4 Conclusions and Prospects.....	55
4.1 Conclusions.....	55
4.1 Prospects.....	56
References.....	57
Publications.....	64
Acknowledgement.....	65

摘 要

花生四烯酸 (Arachidonic acid, ARA) 是人体一种必需的多不饱和脂肪酸, 它不仅在营养代谢中起重要作用, 而且还被广泛应用于医药、食品和饲料等各种领域, 有着广阔的应用前景。但是传统的发酵工艺并不能满足日益增加的市场需求, 需要从分子水平进行改造以提高ARA的发酵生产水平。

本文首先以高山被孢霉的总RNA为模板, 通过PCR反转录技术扩增出高山被孢霉延长酶基因 (*GLELO*), 将其克隆到simple T Vector, 构建重组质粒T-*GLELO*。由于*GLELO*序列上有含有*Bam*H I酶切位点, 与要插入pD4质粒所用酶切位点一致, 需敲除*GLELO*基因上的*Bam*H I酶切位点, 实验在不改变蛋白质氨基酸序列的前提下, 选取370, 371和372这3个碱基 (GGG) 所编码的Gly进行定点突变将其突变成GGT (Gly)。酶切鉴定和测序结果均表明定点突变成功, 得到重组质粒T-*GLELO*。

其次, 为了使高山被孢霉的延长酶基因实现同源表达, 必须在*GLELO**上下游加入高山被孢霉能识别的启动子*his H 4.1 p*和终止子*trpCt*。实验以pD4质粒为模板, 通过PCR扩增出*his H 4.1-hpt-trpCt*片段, 并克隆到simple T Vector, 得到重组质粒T-*his H 4.1-hpt-trpCt*。再将重组质粒T-*his H 4.1-hpt-trpCt*上的潮霉素基因 (*hpt*) 替换成经过定点突变的延长酶基因 (*GLELO**), 获得重组质粒T-*his H 4.1-GLELO*-trpCt*。最后将*his H 4.1-GLELO*-trpCt*片段再插入到pD4质粒中, 获得重组质粒pD4-*GLELO*。

此外, 实验对高山被孢霉原生质体的形成因素和重组pD4-*GLELO**的转化效率进行了考察。结果表明, 采用总酶浓度为8 mg/mL, 蜗牛酶和纤维素酶1:1的比例的酶解液在25 °C下酶解菌龄为3 d的菌丝3 h后, 回收原生质体溶解于以1 mol/L的山梨醇为稳定剂的磷酸盐缓冲液中, 可获得最大的原生质体产量 4.16×10^7 个/mg; 采用线性化的重组质粒和聚乙二醇PEG4000来介导转化, 原生质体转化率最高为1.8 个/ μg 。

最后，实验对转化成功的高山被孢霉重组菌株进行了初步的摇瓶培养和发酵罐实验。摇瓶实验结果表明，重组菌株与野生型菌株在生物量和总油脂产量方面没有较大区别，但是 ARA 的产量由 3.2 g/L 提高到了 4.2 g/L，且 ARA 占总油脂的比例提高了近 10%。发酵罐实验结果表明，高山被孢霉重组菌株的生物量可达 48 g/L，油脂和 ARA 的产量分别为 17.3 g/L 和 7.9 g/L，ARA 的产量比野生菌株中的产量提高了 22%

关键词：高山被孢霉；花生四烯酸；延长酶基因；原生质体；转化

Abstract

Arachidonic acid (ARA) is one of the essential polyunsaturated fatty acids in human, which plays an important role in nutrition metabolism. ARA has a wide application prospect in the field of medicine, food industry and feed additive. While ARA yield produced by traditional fermentation strategy cannot meet the increasing market demand, it is necessary to improve the production of ARA through molecular modification .

In this study, the total mRNA of *Mortierella alpina* was firstly used as template in the reverse transcription to clone the elongase gene (*GLELO*) of *Mortierella alpina*, which was inserted into simple T vector (T-*GLELO*). Due to *GLELO* sequence has the same restriction enzyme cutting site of *Bam*H I with the pD4 plasmid (which was used as the recombinant vector transformed into *Mortierella alpina*), the cutting site of *Bam*H I should be changed. The bases GGG at the position of 370, 371 and 372, which encode glycine (Gly) in *Bam*H I, were chosen to be mutated as GGT(Gly) through the site-directed mutation. The results of enzyme digestion analysis and DNA sequencing showed that the site-directed mutation was right, and the recombinant plasmid was named as T-*GLELO**.

Secondly, in order to ensure the homologous expression of *GLELO**, the *GLELO** gene must inserted between appropriate promoter (*his H 4.1 p*) and terminator (*trpCt*). The DNA fragment of *his H 4.1-hpt-trpCt* from the pD4 plasmid, which carries the promoter (*his H 4.1 p*), selective marker hygromycin gene (*hpt*) and terminator (*trpCt*), was cloned to simple T vector. The recombinant plasmid was named as T-*his H 4.1-hpt-trpCt*. Then the selective marker *hpt* in which was replaced by *GLELO** in T-*GLELO**, and the recombinant vector of T-*his H 4.1-GLELO*-trpCt* was got. Eventually, the recombinant plasmid of pD4-*GLELO** was constructed by inserting *his H 4.1-GLELO*-trpCt* into pD4 plasmid.

In addition, those factors affecting protoplast yield of *Mortierella alpina* and transformation efficiency of pD4-*GLELO** were studied. The results showed that the

maximum yield of protoplasts of 4.16×10^7 per/mg was got when mycelia of 3 days age was hydrolyzed for 3 h under the temperature of 25 °C with the mixtures of helicase and cellulase (the total enzyme concentration is 8 mg/mL and the concentration ratio is 1:1), and then the protoplasts were recovered in the phosphate buffer using sorbitol as stabilizing agent. When the protoplasts were transformed into *Mortierella alpina* conducted by linear recombinant plasmid and PEG4000, the highest transformation ratio of 1.8 per/ μ g was got.

Finally, the recombinant *Mortierella alpina* were cultured in shake and bioreactor to study its yield of ARA. The results of shake culture showed that, the recombinant *Mortierella alpina* had the same production of biomass and total fatty acid with the wild type, but the production of ARA in recombinant *Mortierella alpina* was improved from 3.2 g/L to 4.2 g/L, and the ratio of ARA in total fatty acid also increased by almost 10%. The results of bioreactor culture showed that the biomass, total fatty acid and ARA yield of the recombinant *Mortierella alpina* were 48, 17.3 and 7.9 g/L, respectively, and the yield of ARA was improved by 22% than the wild type.

Key words : *Mortierella alpina*, Arachidonic acid; elongase gene; protoplast; transformation

第一章 绪论

花生四烯酸（Arachidonic acid），系统名为 5, 8, 11, 14-全顺-二十碳四烯酸，简称 AA 或 ARA，是 ω -6 系列的一种多不饱和脂肪酸（polyunsaturated fatty acid, PUFAs）。ARA 通过其多种生理活性，在人体的代谢网络中，发挥着各项重要的生理功能。基于此，各国研究者在 20 世纪七八十年代就对 ARA 展开了各种研究，并开拓了 ARA 广阔的应用市场。随着各种专项研究的逐渐深入，ARA 的应用范围被进一步拓宽。但是研究一直以来都无法解决 ARA 的生产工艺复杂，产量低的难题，进而无法满足日益增长的市场需求。近年来，随着诱变筛选和 DNA 重组技术在微生物育种的应用以及代谢工程原理被引入 ARA 的合成研究中，使得 ARA 的产量获得了一定程度的提高，大大促进了 ARA 的工业化进程。

1.1 ARA 的理化性质及功能

ARA 分子式为 $C_{20}H_{32}O_2$ ，化学式 $CH_3(CH_2)_4(CH=CH-CH_2)_4(CH_2)_2COOH$ ，相对分子质量 304.5，结构式如图 1.1 所示。



图 1.1 ARA 的结构式

Fig. 1.1 The structure of ARA

ARA 是一种重要的人体必需脂肪酸，也是人体中含量最高，分布最广的一种多不饱和脂肪酸，其中含有四个碳-碳双键，一个碳-氧双键，为高级不饱和脂肪酸。ARA 在室温下呈液体，其熔点 $-49.5\text{ }^{\circ}\text{C}$ ，沸点 $245\text{ }^{\circ}\text{C}$ （分解），溶解于醇、醚和水中，紫外吸收波长为 257、268 和 $315\text{ nm}^{[1]}$ 。ARA 在血液、肝脏、肌肉和其他器官系统中作为磷脂结合的结构脂类起重要作用，在血液磷

脂、肝磷脂和脑磷脂中含量约为1%，在肾上腺磷脂脂肪酸中含量约为15%，在人脑和神经组织中ARA占总多不饱和脂肪酸的40%，在神经末梢中甚至高达70%^[2]。此外，ARA是许多循环二十烷酸衍生物（一大类由许多哺乳动物组织产生的激素类的物质，它们只在产生的器官中起作用，并且大部分是由不饱和脂肪酸衍生而来）如前列腺素E₂（PGE₂）、前列腺环素（PGI₂）、血栓烷素A₂（TXA₂）和白细胞三烯和C₄（LTC₄）的直接前体。这些生物活性物质对脂质蛋白的代谢、血液流变学、血管弹性、白细胞功能和血小板激活等具有重要的调节作用^[3]。因此ARA具有重要的营养、保健和医疗功能。

研究发现ARA具有调节血脂和血糖，预防心血管疾病的作用。ARA的代谢产物前列腺素PG I和PG II具有抑制血管紧张素合成及其它物质转化为血管紧张素的作用，对高血压病人的收缩压和舒张压有明显的降压作用，前列环素又是目前发现的对血小板聚集最安全、最有效的内源抑制剂。ARA的另一代谢产物血栓烷素有促进血小板聚集和诱发血栓的作用^[4]。有研究表明，ARA降血脂、降血压和降血胆固醇的效果均强于亚油酸和亚麻酸；同时能缓解氯化钡、乌头碱等引起的心律不齐，其作用效果也强于亚油酸和亚麻酸^[3]。

ARA主要以磷脂的形式存在于机体各个组织的细胞膜上，浓度通常小于1 μmol/L，决定着细胞膜的一些重要生物活性^[5]。胎儿和婴儿约有1/4的大脑固形物是由磷脂质构成的，ARA又是主要的构成物质之一。在脑发育期，如果膳食中缺乏PUFAs，会引起智力和认知功能不可逆转的损伤。因此ARA在婴幼儿大脑发育中具有重要作用，它本身及其代谢产物对神经细胞能造成多种影响，主要包括调整神经元的跨膜信号、神经元之间有效信号传递、调节神经递质的释放以及葡萄糖的摄取等^[6]。作为人乳汁的天然成分，ARA对婴儿的神经及其生理的发育必不可少，对婴幼儿的生长发育以及大脑和视网膜的功能完善具有特别重要的意义，被认为是人类早期发育的必需营养素并且有降低胆固醇和预防心脏病的作用^[7]。

此外ARA还具有美容祛斑和减肥的功用。ARA约占表皮细胞中总脂肪酸含量的9%，在真皮细胞中含量更高。表皮中由于缺乏ω-6和ω-5去饱和酶，其自身无法通过油酸（LA）、γ-亚油酸（GLA）来合成ARA，必须通过内源性来源（如肝脏转运）或从膳食中摄取^[8]，因此直接补充ARA是最为有效的方

式。这些ARA及其代谢产物对活化肌肤细胞，维持其弹性和修复功能极为重要。

1.2 ARA 的应用

1.2.1 ARA 在婴幼儿奶粉中的应用

20世纪80年代末以前，ARA仅限于作为试剂使用，基本无其它应用。21世纪，随着对ARA研究的深入，ARA的作用越来越受到重视。ARA的应用最初始于婴幼儿营养领域，而且该领域已经迅速发展成为ARA最重要的应用领域之一。虽然作为人体必需脂肪酸中的亚油酸、亚麻酸与婴幼儿的生理保健关系已被人们所认识，但是ARA的生理保健功能是在最近几十年才深入地进行研究并被充分重视。

牛奶是人体补充营养物质最常用的载体之一，而ARA作为长链多不饱和脂肪酸，在牛奶中的含量极低，所以在牛奶中强化ARA显得非常必要。之前关于ARA应用研究的报道极少，导致许多企业对其工艺特性缺乏了解，这极大地限制了ARA在许多领域中的应用。近几年来由于ARA在婴幼儿成长发育方面的重要作用，引起人们越来越多的注意。世界各国科学家对ARA进行了广泛而深入的研究。国际粮农组织（FAO）和世界卫生组织（WHO）宣称，为了保证婴幼儿生长发育，建议配方奶粉中加入每天每公斤婴儿体重40 mg的二十二碳六烯酸（DHA）和60 mg的ARA^[9]。至今，许多国家已批准早产儿婴儿奶粉配方食品中添加ARA。由此，ARA的广泛应用在世界各国开始了极为迅速的发展。作为一种新型的婴幼儿营养强化剂，ARA添加到配方奶粉中，能加快婴幼儿配方奶粉的母乳化进程；添加到液体奶中，能丰富产品体系，可以大大提升产品品质和增加附加值^[10]。

1.2.2 ARA 在畜禽业中的应用

ARA能促进动物胚胎的正常发育，提高种禽种蛋的蛋重、产蛋率和孵化率。Murakami等^[11]报道，当家禽饲料中缺乏LA和GLA时，会导致家禽出现营养缺乏症，雏鸡生长不良，成年鸡产蛋少，孵化率低，当添加GLA或ARA时上述症状消失。同时ARA有利于鱼类的存活、生长及提高逆境抗性。

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士学位论文摘要库