

海洋球石藻病毒甾醇去饱和酶基因的克隆与表达

王彩凤^{1,2}, 刘静雯^{1,2}

(1. 集美大学食品与生物工程学院, 福建 厦门 361021;
2. 福建省食品微生物与酶工程重点实验室, 福建 厦门 361021)

[摘要] 以海洋球石藻 (*Emiliania huxleyi*) 病毒 EhV-99B1 基因组为模板, 用一对病毒甾醇去饱和酶 (sterol desaturase, SD) 基因的特异性引物进行 PCR 扩增, 获得 EhV-SD 基因, 将扩增产物克隆至 pMD19-T 载体后进行测序, 并对该基因编码的蛋白质序列进行生物信息学分析。将测序正确的目的基因亚克隆入酿酒酵母表达载体 pYES2/CT 中, 转化酿酒酵母缺陷型菌株 YMR015C, 并用 *D*-半乳糖诱导表达, 提取重组酵母和野生型酵母细胞总脂并进行薄层色谱 (thin layer chromatography, TLC) 分析。结果显示: EhV-SD 基因全长为 987 bp, 编码 328 个氨基酸, 该蛋白质的理论等电点为 8.31, 预测的蛋白质分子质量为 37.83 ku, 为疏水性、不稳定蛋白质, 存在 6 个跨膜结构域, 不存在信号肽; 其二级结构中, α -螺旋含量最多。氨基酸序列比对结果显示, EhV-SD 基因与宿主球石藻及金色藻属 (*Chrysochromulina* sp. CCMP 291) 亲缘关系较近。TLC 结果表明, EhV-SD 基因的表达导致酵母细胞极性较强的脂类明显减少, 而极性较弱的脂质成分显著增加, 表明 EhV-SD 具有一定的催化活性。

[关键词] 海洋球石藻病毒; 甾醇去饱和酶基因; 酿酒酵母; 克隆; 表达; 脂类; 薄层色谱

[中图分类号] Q 786

Cloning and Expression of Sterol Desaturase(SD) Gene from *Emiliania huxleyi* Virus

WANG Caifeng^{1,2}, LIU Jingwen^{1,2}

(1. College of Food and Biological Engineering, Jimei University, Xiamen 361021, China;

2. Key Laboratory of Food Microorganism and Enzyme Engineering of Fujian Province, Xiamen 361021, China)

Abstract: The genomic DNA of *Emiliania huxleyi* virus EhV-99B1 was used as the template for amplification of sterol desaturase SD gene by using PCR with a pair of specific primers. The amplified product was cloned into pMD19-T vector and then sequenced. The deduced protein sequence of this gene was further analyzed by bioinformatics. The target gene was subcloned into yeast pYES2/CT expression vector. The recombinant plasmid was transformed into SD gene defective *Saccharomyces cerevisiae* YMR015C and the target gene was induced to express by using *D*-galactose. The total lipids of recombinant and defective yeast cells were detected by thin layer chromatography (TLC). The results showed that EhV-SD gene was 987 bp, encoding a protein of 328 amino acids with deduced molecular mass of 37.83 ku and a theoretical isoelectric point (pI) of 8.31, respectively. It contained six transmembrane domains and there was no signal peptide. The α -helix is the

[收稿日期] 2018-12-21

[基金项目] 国家自然科学基金项目 (41576166); 福建省科技计划重点项目 (2015Y0039); 中国南方海洋研究中心项目 (14GZP71NF35)

[作者简介] 王彩凤 (1991—), 女, 硕士生, 从事生物化学与分子生物学方向研究。通信作者: 刘静雯 (1965—), 女, 教授, 博士, 从事海洋微生物资源开发利用研究。E-mail: ljwsbch@163.com

most abundant secondary structure in protein. Phylogenetic analysis showed that EhV-SD gene was closely related to those of its host *E. huxleyi* and *Chrysochromulina* sp. Compared to the defective yeast cells, the content of high-polarity lipids were significantly decreased, while the content of low-polarity lipids were significantly increased in recombinant yeast cells, indicating that the EhV-SD had certain catalytic activity.

Keywords: *Emiliania huxleyi* virus; sterol desaturase gene; *Saccharomyces cerevisiae*; cloning; expression; total lipid; TLC

0 引言

海洋球石藻 (*Emiliania huxleyi*) 是一种分布广泛且具有重要生态功能的真核微型浮游植物, 几乎每年都在大洋中形成大面积赤潮^[1-3]。海洋球石藻病毒隶属于大型核质双链 DNA 病毒目、藻类双链 DNA 病毒科、球石藻病毒属 (*Coccolithovirus*, EhVs), 已分离的该类病毒均为裂解性病毒^[4]。自然海域中, 海洋球石藻能够被特异性病毒感染, 并通过诱导宿主程序性细胞死亡以控制赤潮消亡及宿主的种群动力学过程^[5]。球石藻宿主 *E. huxleyi* CCMP1516 及其特异性裂解病毒 EhV86 的全基因组测序结果发现, 该病毒与宿主之间存在明显的基因横向转移现象, 如该病毒基因组中至少存在 7 个在功能上相互偶联的基因, 它们编码的产物可能参与了宿主鞘脂类代谢过程^[6-7]。这些基因分别是二氢神经酰胺合成酶/长寿保障基因类蛋白 LAG1 (*ehv014*)、甾醇去饱和酶 SD (*ehv031*)、丝氨酸棕榈酰转移酶 SPT (*ehv050*)、脂肪酸去饱和酶 DSD1 (*ehv061*) 和脂类磷酸酶 LPP (*ehv079*), 此外, 还有核酸内切酶 endonuclease (*ehv0415*)、跨膜脂肪酸伸长蛋白 TFAEP (*ehv077*) 等^[8]。上述 7 个基因中, 除了对 SPT 基因和 CerS 基因的结构及功能进行了初步研究报道外^[9-10], 其他几个基因的功能尚不清楚。

酿酒酵母细胞中 SD 的同源基因 *ERG5* 编码 C-22 甾醇去饱和酶 (sterol 22-desaturase), 催化甾醇中 C-22 (23) 双键侧链的形成, 进而合成四烯甾醇^[11]。茄属 (*Solanum*) 植物中, 甾醇 C-22 去饱和酶 (CYP710A11) 属于细胞色素 P450 (Cytochrome P450, CYP450, P450) 家族成员, 催化 β -谷甾醇生成豆甾醇, 在次生代谢中起重要作用^[12]。可见, 不同物种中, SD 同源基因编码的酶催化底物及产物的形成不尽一致。海洋球石藻病毒基因 *ehv031* 所编码的甾醇去饱和酶 SD 的功能尚不清楚。酿酒酵母作为真核生物, 易于培养, 繁殖速度快, 其表达系统是近年来极具潜力的真核表达系统^[16]。构建和利用相关基因敲除的酵母菌株, 可对未知基因的功能展开研究, 如: 构建 *SNF4* 基因缺陷型酿酒酵母, 并对其和出发菌株乙醇产量进行研究, 结果表明, *SNF4* 基因编码的蛋白质具有提高乙醇产量的作用^[13]; 张洪涛等^[14]将从大豆未成熟种子中扩增出 GmFAD3C 的 cDNA 克隆到酵母表达载体 p416 中, 转化酿酒酵母营养缺陷型 K601, 证明该基因编码的蛋白质具有催化十八碳多不饱和脂肪酸 (PUFA) 底物 LA 在 $\Delta 15$ 位脱氢生成 ALA 的 ω -3 FAD 功能; 张黎杰^[15]构建了基因敲除菌株 BY Δ JJJ1, 并对其和酿酒酵母 BY4741 的多种胁迫耐性进行比较, 发现 BY Δ JJJ1 对乙酸的胁迫耐性显著增强。

本文选用 SD 缺陷型酵母菌株 YMR015C 为出发菌株, 将海洋球石藻病毒 EhV99B1 的 SD 基因克隆入该缺陷型菌株并进行诱导表达, 恢复此缺陷型酵母 SD 基因的相关功能, 并通过薄层色谱 (thin layer chromatography) 初步分析含空载的和 SD 基因重组酵母总脂组分的变化, 以初步了解 EhV-SD 基因是否在酿酒酵母脂类代谢中具有催化功能。

1 材料与方法

1.1 实验材料

海洋球石藻 Ehux-BOF92 及其特异性裂解病毒株 EhV-99B1 由挪威卑尔根大学 Gunnar Bratbak 教授赠送并保存于本实验室; 野生型酿酒酵母 BY4741 (*Saccharomyces cerevisiae*) 和缺陷型酿酒酵母 YMR015C 均购自欧洲 (EUROSCARF) 菌种库。DH5 α 、Top10 克隆宿主购自厦门泰京生物科技有限公司。

克隆载体 pMD19-T 购自大连宝生物公司, 表达载体 pYES2/CT 购自美国 Invitrogen 公司; 限制性内切酶 (*Xba* I、*Hind* III)、DL 2000 DNA Marker、ExTaq 酶及 DNA 连接酶均购自大连宝生物公司; DNA 凝胶回收试剂盒购自 TIANGEN 生物公司, 质粒提取试剂盒购自北京天根生物技术有限公司; PCR 所用引物由生工生物工程 (广州) 有限公司合成。

1.2 实验方法

1.2.1 病毒 EhV99B1 基因组的提取及 SD 基因片段的扩增

采用 CTAB 法提取病毒基因组 DNA^[18]。从球石藻病毒 EhV86 全基因组数据库 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/?term=EHV-86>) 中搜索 SD 基因开放阅读框 (open reading frame, ORF), 基于该 ORF 基因序列, 用 Primer 5.0 软件设计一对特异性引物 F: 5′ - AAGCTTATGTTTCGGTGGC - 3′ (下划线部分为 *Hind* III 酶切位点), R: 5′ - TCTAGATTAAGAAATGACATCCTTT - 3′ (下划线部分为 *Xba* I 酶切位点)。以球石藻病毒的基因组 DNA 作为模板进行 PCR 扩增。扩增产物经质量分数 1% 琼脂糖凝胶电泳检测并回收。

1.2.2 重组载体 pMD19-T-SD 的构建

EhV-SD 基因与克隆载体的连接、大肠杆菌感受细胞的制备和转化等操作参照文献 [19], 筛选获得阳性克隆送至厦门铂瑞生物科技有限公司测序验证。

1.2.3 EhV99B1-SD 的生物信息学分析

利用 ExPaSy 中的 ProtParam 程序在线对氨基酸序列进行理化性质分析, 利用 DNASTar、Blast 等软件对预测结果进行分析并预测其一级结构; 利用 ExPASy 网站的 ProtScale 程序分析蛋白质疏水性结构; 利用 SignalP 4.1 程序在线预测氨基酸序列的信号肽; 利用 TMHMM 程序预测蛋白质跨膜结构; 利用 Psipred 程序对蛋白质二级结构进行预测, 用 Swiss Model、ESPrpt、PyMOLVier 等在线软件对其三级结构进行预测; 利用程序 ESPrpt 3.0 将不同物种的氨基酸序列进行多重序列比对, 利用 MEGA 5.0 的邻接法 (Neighbor-Joining, NJ) 构建系统发育树。

1.2.4 重组表达质粒 pYES2/CT-SD 的构建与转化

利用限制性内切酶 *Hind* III、*Xba* I 对克隆载体 pMD19-T-SD 和酿酒酵母表达载体 pYES2/CT 分别进行双酶切, 酶切产物连接到表达载体 pYES2 中构建重组质粒, 对重组质粒 pYES2/CT-SD 进行质粒 PCR 和双酶切验证。利用 S. C. EasyComp Transformation Kit 进行感受态细胞制备, 重组质粒转化酿酒酵母感受态细胞采用化学转化法^[20]。

1.2.5 重组质粒在酿酒酵母 YMR015C 中的诱导表达

依照 Invitrogen 载体手册和文献 [21] 进行 pYES2/CT-SD 在酿酒酵母 YMR015C 中的诱导表达。挑取抗性重组酵母菌单克隆, 接种于 15 mL 含有 50 mg/L 卡那抗生素、20 g/L 葡萄糖的 SC 选择培养基中, 30 ℃、200 r/min 过夜培养至 OD₆₀₀ = 3.0, 将培养物于 4 ℃、1500g 离心 5 min, 弃上清液, 重悬菌体于 50 mL 诱导培养基中, 30 ℃、200 r/min 摇菌继续培养。培养 24 h, 离心收集 20 mL 细胞沉淀用于总脂的提取。

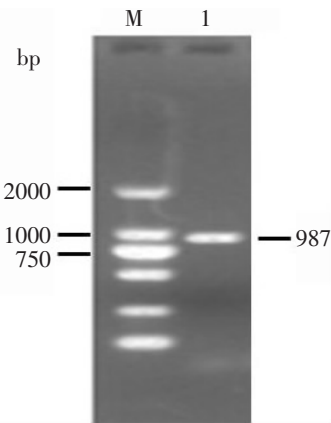
1.2.6 酿酒酵母总脂的提取及薄层层析

采用 Bligh&Dyer 法抽提酵母总脂^[22]。总脂用适量甲醇溶解, 然后进行 TLC 分析: 采用双展开剂, 展开剂 A: V (乙酸乙酯) : V (异丙醇) : V (氯仿) : V (甲醇) : V (0.9% KCl) = 30: 30: 30: 10: 9; 展开剂 B: V (正己烷) : V (乙醚) : V (冰乙酸) = 50: 10: 1。分别取乙酸乙酯、异丙醇、氯仿、甲醇、KCl、正己烷、乙醚、冰乙酸 826, 826, 826, 275, 247, 4.92, 984, 98 μL, 倒入层析缸中预先饱和 1 h。利用毛细管点样于硅胶板上, 点样量 3 ~ 5 μL, 样品条带宽 3 mm, 间隔 10 mm, 起始点样高度 15 mm, 点样后等样品先在展开剂 A 中展开到距离起始点 4.5 cm 时取出自然风干, 再放至展开剂 B 中展开至距起始点 8.8 cm 处时取出吹干, 放入碘缸中显色。碘显色后, 待硅胶板上斑点变淡, 可将硅胶板浸入醋酸铜显色, 取出后在电炉上烤干, 直至板上出现斑点, 并用凝胶成像仪拍照。

2 实验结果

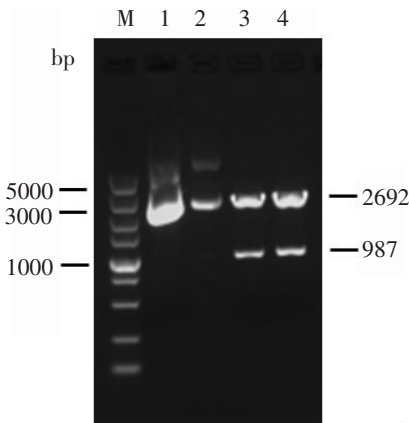
2.1 EhV-SD 基因的扩增及序列分析

以 EhV-99B1 的基因组 DNA 为模板，利用病毒甬醇去饱和酶 SD 基因的特异性引物进行 PCR 扩增，扩增产物约为 900 bp 的 DNA 片段（见图 1）。将该基因克隆入 T 载体后进行测序分析，结果显示，目的基因的大小为 987 bp。将提取的重组质粒用 *Hind* III 和 *Xba* I 进行双酶切反应，酶切产物与目的片段的大小一致（见图 2）。



说明：M—DL2000 DNA 标准；
1—EhV-SD 基因的 PCR。
Notes:M—DL2000 DNA marker;
1—PCR of EhV-SD gene.

图 1 PCR 扩增产物的琼脂糖凝胶电泳图
Fig.1 Agarose gel electrophoresis of PCR product



说明：M—DL5000 DNA 标准；1,2—重组质粒 pMD19-T-SD；3,4—*Hind* III、*Xba* I 双酶切后的产物。
Notes:M—DL5000 DNA marker; 1,2—recombinant plasmid pMD19-T-SD; 3,4—*Hind* III、*Xba* I double-digested products.

图 2 重组 T 载体双酶切的琼脂糖凝胶电泳图
Fig.2 Agarose gel electrophoresis of the double-digested product of recombinant T vector

2.2 EhV-SD 基因编码蛋白质的理化性质

应用 BioEdit 对 EhV-SD 基因的核苷酸序列分析结果显示：EhV-SD 共有 987 个核苷酸，单链相对分子质量为 299 177，含量最多的为胸腺嘧啶核苷酸，占 33.03%，C + G 占总核苷酸的 35.76%；用在线工具 ProtParam 对 SD 的氨基酸序列分析，共有 328 个氨基酸，分子质量为 37 831 u，分子式为 C₁₇₈₀H₂₆₄₉N₄₃₁O₄₅₈S₁₃，总原子数为 5331，理论等电点为 8.31。其中 Leu 含量最高，占 10.7%，有 24 个负电荷的氨基酸（Asp + Glu），26 个带正电的氨基酸（Arg + Lys）。氨基酸疏水性平均值为 0.169，说明是疏水性蛋白质。不稳定系数为 40.40，属于不稳定蛋白质。

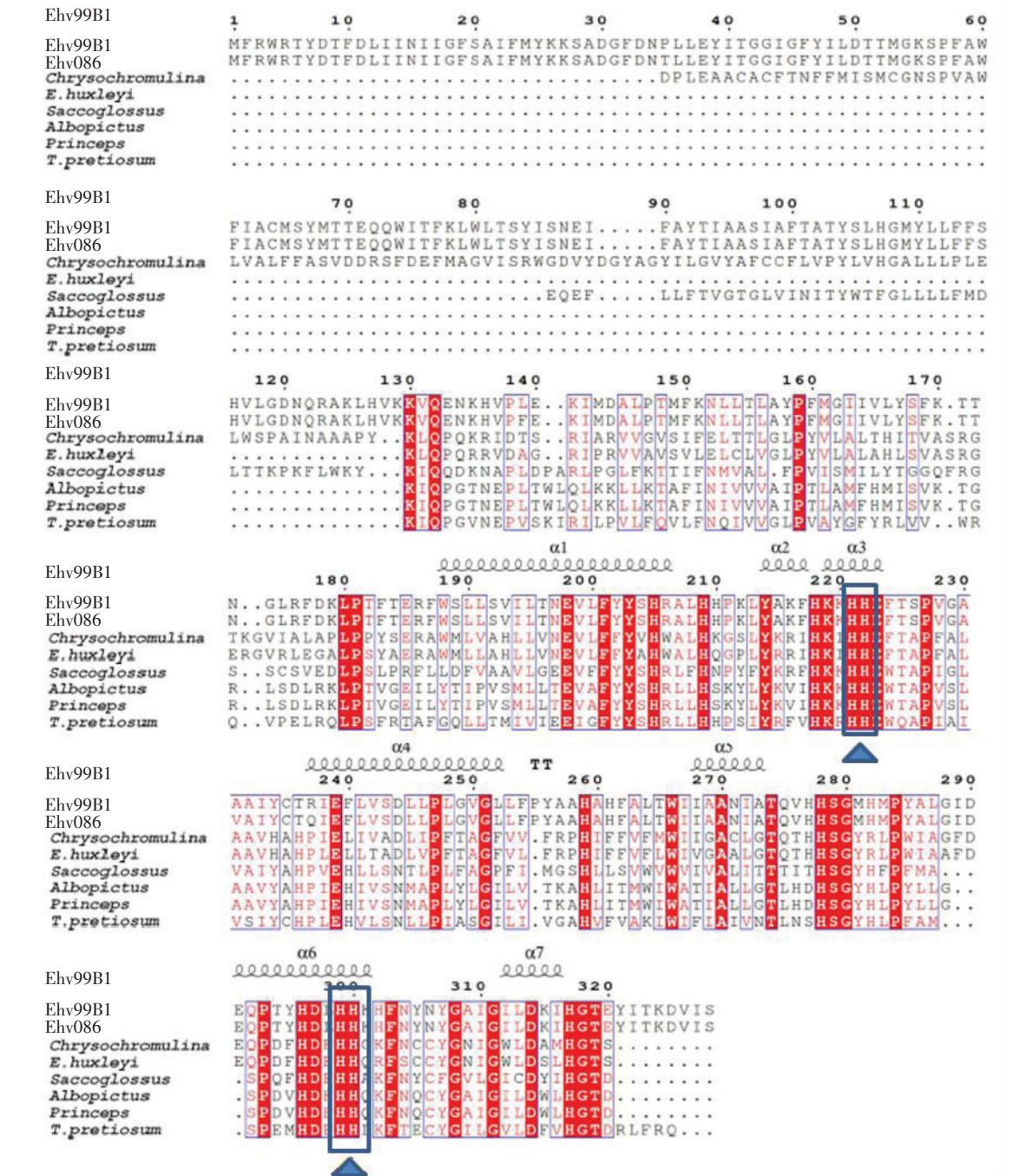
2.3 EhV-SD 的二级结构分析

利用 Psipred 在线分析蛋白质二级结构，结果显示：EhV-SD 中有 208 个氨基酸可形成 α -螺旋，占氨基酸总数的 63.41%，120 个氨基酸形成无规则卷曲，占氨基酸总数的 36.59%，无氨基酸可形成延伸链。EhV-SD 含有线粒体转运肽，可能属于线粒体蛋白质。

2.4 EhV-SD 氨基酸序列同源性分析

利用 ESPript 程序对 EhV99B1(CAZ69370.1)、EhV86(YP_293785.1)、海洋球石藻 *Emiliania huxleyi* CCMP1516 (XP_005769289.1)、金色藻属 *Chrysochromulina* (K0023105.1)、黄岛长吻虫 *Saccoglossus*(XP_002737755.1)、伊蚊 *Albopictus* (KXJ72277.1)、翠凤蝶 *Princeps*(XP_004587559.1) 及亦眼蜂 *Trichogramma pretiosum*(XP_014228099.1) 等不同物种的 SD 进行氨基酸序列多重比对，第 221、222 和 299、300 位的保守组氨酸簇为 EhV99B1-SD 的催化活性位点（见图 3）。

EhV-SD 序列与其他物种的 SD 序列进行系统发育分析，根据系统发育树结构可将所有物种的 SD



说明:与其他代表生物相比,在第 221、222 和 299、300 位的 His 保守区域为 EhV99B1-SD 催化活性位点(蓝色三角标注), α-螺旋 β-转角等二级结构元件标注于序列顶端。

Notes:The conserved region of His at position 221,222 and 299,300 marked with a blue triangle show the EhV99B1-SD catalytically active site. The alpha helix and beta turns(TT letters) are marked on the top of alignment sequence.

图 3 EhV-SD 氨基酸序列与其他不同物种 SD 氨基酸序列的部分比对

Fig.3 Partial alignment of the SD amino acid sequence of EhV 9981 with those of other different species

聚类归属为两大类,其中球石藻病毒 EhV86、EhV99B1、球石藻 *E. huxleyi*、金色藻属 *Chrysochromulina* 聚为一类,其他物种归属于另一类(见图 4)。

2.5 病毒蛋白酶去饱和酶 EhV-SD 的三级结构

用 SWISS MODEL 对 SD 三级结构进行同源建模,通过与数据库里的模型(4ZR1)序列比较,以与

其相似度最高的神经酰胺长链脂肪酸羟化酶 SCS（编号 4zr1.1A）为模板进行建构，结果表明，EhV-SD 的三级结构中含有多个 α -螺旋，第 221、222 位和 229、300 位的 His 处可形成类似口袋状活性位点结构。

2.6 EhV-SD 重组酵母的验证及其总脂的 TLC 分析

经过质粒 PCR 和双酶切验证重组质粒构建成功。分别提取携带空载和重组质粒酵母菌株的总脂进行 TLC 分析，结果如图 5 所示：与含有空载的缺陷型酵母细胞（样品 1）相比，EhV-SD 重组酵母细胞（样品 2）极性较强的脂质（样品 1 中箭头所示）含量显著减少，相应的极性较弱的脂类组成和含量均明显增加（样品 2 中三个箭头所示），表明 EhV-SD 的表达改变了酵母细胞中总脂的组成和含量，具有一定的催化活性。

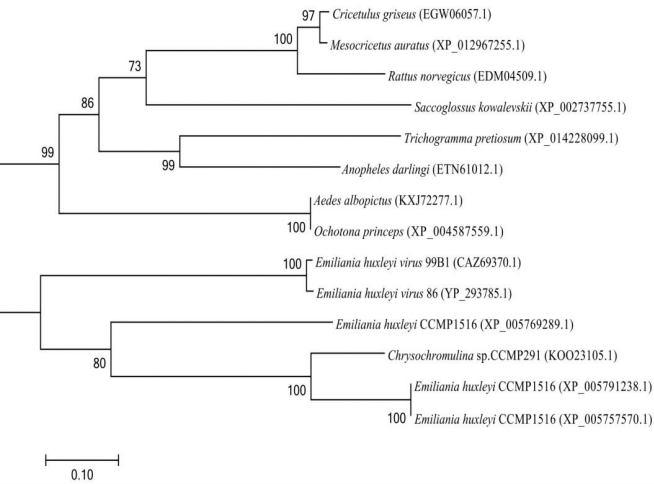
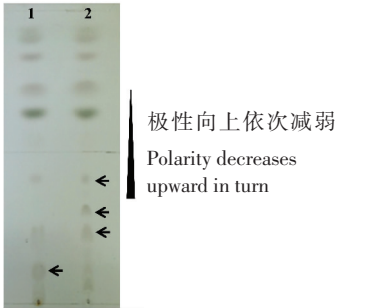


图 4 根据不同物种的 SD 氨基酸序列绘制的系统发育树
Fig.4 The phylogenetic tree based on the amino acid sequences of different organisms



说明：条带 1—含空载 pYES2/CT 的酿酒酵母 YMR015C 总脂类薄层层析；条带 2—含重组载体 pYES2/CT-SD 的酿酒酵母 YMR015C 总脂类薄层层析。

Notes:Lane 1—results of total lipid thin layer chromatography of defective *S. cerevisiae* YMR015C containing pYES2/CT vector; lane 2—results of total lipid thin layer chromatography of defective *S. cerevisiae* YMR015C containing pYES2/CT-SD recombinant vector.

图 5 酿酒酵母细胞总脂的 TLC 结果

Fig.5 TLC results of total lipid in *S. cerevisiae* cells

3 讨论

本研究从海洋球石藻病毒 EhV99B1 基因组中成功扩增获得了长度 987 bp 的甾醇去饱和酶 SD 基因 ORF 序列，生物信息学分析显示，EhV-SD 基因编码 328 个氨基酸，为疏水性、不稳定蛋白质，二级结构中以 α -螺旋为主。EhV99B1 与 EhV86 的 SD 氨基酸序列同源性为 100%，而与宿主球石藻 *E. huxleyi* CCMP1516 的同源性仅为 42%，和金色藻属 *Chrysochromulina* sp 的同源性为 34%，与其他物种的同源性更低，表明 EhV-SD 是脂肪酸羟化酶超家族成员之一。该超家族的酶是完整的膜蛋白，使用类似的电子传递系统，保守的组氨酸基序是该酶的活性位点^[23-24]。从进化关系看，海洋球石藻不同病毒株系间的亲缘关系较近，但其与宿主 SD 的同源性仅为 42%。通过最大似然系统发育树分析发现，100% 的自展值支持 EhV-SD 与球石藻宿主 SD 相似，表明它们在遗传谱系中可能发生了基因横向转移，促使病毒与宿主协同进化。基因的差异性主要源于自然选择，这反映了该病毒对环境的适应性，在 EhV86 基因组中存在编码一系列在功能上相互偶联的酶的基因，并预测它们可能参与了宿主鞘脂类合成途径 SBP。这些基因不存在于其他任何已知的病毒中，却都存在于球石藻宿主基因组中，因此推测，球石藻病毒与宿主基因组间可能通过基因横向转移而共享这些代谢酶基因。

以酿酒酵母为代表的酵母表达系统，因其特有的生物学性质已经成为有效表达外源基因的重要工具^[25]。梁会超等^[26]将人参达玛烯二醇-Ⅱ合酶（dammarenediol-II synthase，DS）转化酿酒酵母 IN-VSc1，在酿酒酵母中实现重组表达和定位，结果表明，DS 为膜结合型蛋白质，在体外能催化 2，3-氧化鲨烯生成达玛烯二醇-Ⅱ。利用酿酒酵母营养缺陷型 IN-VSc1 及表达载体 pYES2 表达 ω 3-脂肪酸去饱和酶，结果表明，Pp-FAD3 编码的 ω -3-FAD 负责酵母中 ALA 的合成^[27]。酵母中甾醇的生物合成

是一个由多酶催化的非常复杂的过程。酿酒酵母 YS58 甾醇 C-22 去饱和酶基因 (ERG5) 编码的甾醇 C-22 去饱和酶催化酵母麦角甾醇生物合成途径中的第 20 步反应, ERG5 的高表达在甾醇侧链的 C-22 位引入反式双键, 将极性较强的甾醇转化为极性较弱的四烯甾醇^[28]。本文通过构建含有 EhV-SD 基因的重组酵母菌株, TLC 结果表明, EhV-SD 基因的表达导致酵母细胞中极性强的脂类明显减少, 而极性弱的脂质成分显著增加, 这似乎表明 EhV-SD 与酵母同源基因 ERG5 可能具有类似的功能。关于 EhV-SD 基因表达如何调控脂类代谢则需进一步借助质谱学分析方法进行更深入的研究。

4 结论

本文成功构建了酿酒酵母重组表达载体 pYES2/CT-SD, 并转化 SD 缺陷型的酿酒酵母菌株 YM-RO15C, 对阳性菌株用 D-半乳糖诱导目的基因表达。TLC 结果显示: 重组酵母细胞与含空载的酵母细胞的总脂薄层层析结果差异显著, 其中重组酵母细胞中极性强的脂类的成分明显减少, 而极性弱的脂质成分则显著增加, 表明甾醇去饱和酶 SD 基因在酵母细胞中得到表达并能够引起酵母细胞中脂类含量和组成成分的变化, 具有一定的催化活性。下一步的研究将基于脂质代谢组学分析鉴定总脂的组成和含量的变化情况, 深入解析 EhV-SD 基因的功能, 在此基础上构建用于合成新型鞘脂类活性物质的基因工程酵母菌株。

[参考文献]

- [1] WESTBROEK P, BROWN C W, VAN BLEIJSWIJK J, et al. A model system approach to biological climate forcing: the example of *Emiliania huxleyi* [J]. Global and Planetary Change, 2001, 8(1/2): 27-46. DOI:10.1016/0921-8181(93)90061-R.
- [2] BALCH W M, HOLLIGAN P M, KILPATRICK K A. Calcification, photosynthesis and growth of the bloom-forming coccolithophore, *Emiliania huxleyi* [J]. Cont Shelf Res, 1992, 12(12): 1353-1374. DOI: 10.1016/0278-4343(92)90059-S.
- [3] TOWNSEND D W, KELLER M D, HOLLIGAN P M, et al. Blooms of the coccolithophore *Emiliania huxleyi* with respect to hydrography in the gulf of maine [J]. Cont Shelf Res, 1994, 14(9): 979-1000. DOI:10.1016/0278-4343(94)90060-4.
- [4] MARTINEZ J M, POULTON N J, STEPANAUSKAS R, et al. Targeted sorting of single virus-infected cells of the coccolithophore, *Emiliania huxleyi* [J]. Plos One, 2011, 6(7): e22520 (1-6). DOI:10.1371/journal.pone.0022520.
- [5] SHIJIE B, HUI W, TIANLING Z. Marine algal viruses and their application in red-tide control [J]. Chin J Appl Environ B, 2012, 18(6): 1056. DOI:10.3724/SP.J.1145.2012.01056.
- [6] ROHWER F, THURBER R V. Viruses manipulate the marine environment [J]. Nature, 2009, 459(7244): 207-212. DOI:10.1038/nature08060.
- [7] WILSON W H, SCHROEDER D C, ALLEN M J, et al. Complete genome sequence and lytic phase transcription profile of a *Coccolithovirus* [J]. Science, 2005, 309(5737): 1090-1092. DOI:10.1126/science.1113109.
- [8] 刘旭宏. 海洋球石藻病毒 (*Coccolithovirus*) 丝氨酸棕榈酰转移酶 (SPT) 基因克隆、表达及其与宿主神经酰胺合成之间的关系 [D]. 厦门: 集美大学, 2012.
- [9] HAN G, GALE K, YAN L, et al. Expression of a novel marine viral single-chain serine palmitoyltransferase and construction of yeast and mammalian single-chain chimera [J]. J Biol Chem, 2006, 281(52): 39935-39942. DOI:10.1074/jbc.M609365200.
- [10] LU D, TRILLOTINOCO J, BAI A, et al. Ceramides promote apoptosis for virus-infected lymphoma cells through induction of ceramide synthases and viral lytic gene expression [J]. Oncotarget, 2015, 6(27): 24246-24260. DOI:10.18632/oncotarget.4759.
- [11] 何秀萍, 郭雪娜, 张博润, 等. 甾醇酰基转移酶基因高表达对酵母麦角甾醇合成的影响 [J]. 微生物学报, 2004, 44(1): 67-71. DOI:10.3321/j.issn:0001-6209.2004.01.014.

- [12] 毛萍, 黄宝玉, 喻宏, 等. 番茄细胞色素 P450 基因 CYP710A11 的抗逆功能 [C] //2011 中国遗传学会大会论文摘要汇编. 乌鲁木齐: 中国遗传学会, 2011: 24.
- [13] 林晓华, 柯崇榕, 吴毕莎, 等. 酿酒酵母 SNF4 基因敲除缺失菌株的构建 [J]. 生物工程学报, 2011, 27(4): 572-578.
- [14] 张洪涛, 杨家森, 单雷, 等. 大豆 ω -3 脂肪酸脱氢酶基因 GmFAD3C 在酿酒酵母中的表达 [J]. 生物工程学报, 2006, 22(1): 33-38.
- [15] 张黎杰. 酿酒酵母 JJJ1 基因敲除提高乙酸耐性和纤维乙醇发性能 [D]. 杭州: 浙江大学, 2016.
- [16] 贾向东, 陈喜文, 陈德富, 等. 谷胱甘肽 S-转移酶 Zeta 类基因在酿酒酵母中的表达 [J]. 遗传, 2006, 28(5): 551-556. DOI:10.3321/j.issn:0253-9772.2006.05.010.
- [17] 陈永金. 酿酒酵母 HOR2 基因缺失突变株的构建及其生物学性质研究 [D]. 福州: 福建师范大学, 2010.
- [18] DEVI K D, PUNYARANI K, SINGH N S, et al. An efficient protocol for total DNA extraction from the members of order Zingiberales-suitable for diverse PCR based downstream applications [J]. Springerplus, 2013, 2: 669. DOI:10.1186/2193-1801-2-669.
- [19] 萨姆布鲁克 J, 拉塞尔 D W. 分子克隆实验指南 [M]. 3 版. 黄培堂, 王嘉玺, 朱厚础, 等, 译. 北京: 科学出版社, 2002.
- [20] GIETZ R D, SCHIESTL R H, WILLEM S A R, et al. Studies on the transformation of intact yeast cells by the LiAc / SS- DNA / PEG procedure [J]. Yeast, 1995, 11(4): 355-356. DOI:10.1002/yea.320110408.
- [21] 吴丽娟, 蒋建新, 朱佩芳, 等. 酵母表达系统及其应用研究 [J]. 生命的化学, 2003, 23(1): 46-49. DOI:10.3969/j.issn.1000-1336.2003.01.019.
- [22] BLIGH E L G, DYER W J A. A rapid method of total lipid extraction and purification [J]. Can J Biochem Physiol, 1959, 37: 911-917. DOI:10.1139/059-099.
- [23] TOMAZIC M L, NAJLE S R, NUSBLAT A D, et al. A novel sterol desaturase-like protein promoting dealkylation of phytosterols in tetrahymena thermophile [J]. Eukaryot Cell, 2011, 10(3): 423-434. DOI:10.1128/EC.00259-10.
- [24] HUSSELSTEIN T, SCHALLER H, GACHOTTE D, et al. Δ 7-Sterol-C5-desaturase: molecular characterization and functional expression of wild-type and mutant alleles [J]. Plant Mol Biol, 1999, 39(5): 891. DOI:10.1023/a:1006113919172.
- [25] FERGUSON O, HOLLOMAN W K. Recombinational repair of gaps in DNA is asymmetric in *Ustilago maydis* and can be explained by a migrating D-loop model [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1996, 93(11): 5419-5424. DOI:10.1073/pnas.93.11.5419.
- [26] 梁会超, 高丽丽, 胡宗风, 等. 人参达玛烯二醇-II 合酶在酿酒酵母中的表达、定位及功能研究 [J]. 药学报, 2016, 51(6): 998-1003.
- [27] ZHANG X, LI M, WEI D, et al. Identification and characterization of a novel yeast ω 3-fatty acid desaturase acting on long-chain n-6 fatty acid substrates from *Pichia pastoris* [J]. Yeast, 2010, 25(1): 21-27. DOI:10.1002/yea.1546.
- [28] 蔡鹏丽, 何秀萍, 刘楠, 等. 甾醇 C-22 去饱和酶高表达对酵母细胞麦角甾醇合成的影响 [J]. 微生物学报, 2007, 47(2): 274-279. DOI:10.3321/j.issn:0001-6209.2007.02.018.

(责任编辑 马建华 英文审校 刘静雯)