

## 三角褐指藻产油突变株的筛选

刘飞飞<sup>1,2</sup> 李秀波<sup>1</sup> 方仙桃<sup>1</sup> 孔任秋<sup>1</sup>

(1. 中国科学院水生生物研究所, 淡水生态国家重点实验室, 武汉 430072; 2. 中国科学院大学, 北京 100049)

### SELECTION OF OIL-CONTENT MUTANTS IN *PHAEODACTYLUM TRICORNUTUM*

LIU Fei-Fei<sup>1,2</sup>, LI Xiu-Bo<sup>1</sup>, FANG Xian-Tao<sup>1</sup> and KONG Ren-Qiu<sup>1</sup>

(1. State Key Laboratory of Freshwater Ecology and Biotechnology, Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072, China; 2. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

**关键词:** 三角褐指藻; 随机插入突变株; 含油量; 脂肪酸

**Key words:** *Phaeodactylum tricorutum*; Random insertion mutant; Oil-content; Fatty acids

**中图分类号:** Q789 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3207(2013)04-0799-04

能源短缺和原油价格上涨是全球关注的问题之一, 生物柴油作为一种优质的替代液体燃料越来越受到重视。以油料作物、废食用油和动物脂肪为原料生产生物柴油已远远不能满足需求。相比而言, 产油微藻具有光合效率高、生物量大、油含量高、生长速率快、不受季节的限制及不占用耕地等优势<sup>[1-5]</sup>, 被认为是制备生物柴油燃料的更有潜力的原料。由于目前微藻生物柴油生产成本过高, 尚未获得商业化生产。筛选含油量较高的藻株是降低生产成本的途径问题之一, 通过遗传修饰改造产油藻株, 提高其产油性状, 对于降低成本具有重要意义<sup>[6]</sup>。三角褐指藻 (*Phaeodactylum tricorutum*) 常用来作为水产养殖动物的饵料, 富含甘油三酯, 是研究微藻产油的模式种之一。该种在 2008 年公布了全基因组序列<sup>[7, 8]</sup>, 为进一步研究其产油等过程的机理提供了很大的便利。本研究利用基因枪转化的方法, 将 zeocin 抗性基因随机插入三角褐指藻的核基因组, 构建突变体文库, 通过筛选得到了油含量显著减少的突变株, 对于进一步鉴定影响产油量的基因位点奠定了基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 藻种培养

三角褐指藻以 50% 人工海水培养基(f/2), 在 pH 为

7.6—7.8、20℃、持续光照、光强为 60 μmol photons/(m<sup>2</sup>·s) 左右的条件下培养。测定生长曲线时设 3 个平行。固体培养基加 1.2% 的琼脂, 转化子在加 75 μg/mL zeocin 的平板上筛选。

### 1.2 质粒构建

以三角褐指藻基因组 DNA 为模板, fcpA-1 和 fcpA-2 (5'-AGGACGCAATGGAGGATTATCACCC-3' 和 5'-CTCTG-CCTAGCCTACACGAC-3') 为引物进行 PCR 扩增出 fcpA 基因<sup>[6]</sup>全长, 克隆到 HindIII 酶切、T4 DNA 聚合酶补平的 pUC19 中, 得到 pHB2976。以质粒 p105B124 为模板, ble-R5 和 ble-H3 (5'-CTAGATATCAAGATGGCCAAGTTG ACCA-3' 和 5'-GATAAGCTTCAGTCCTGCTCCTCGG-3') 为引物进行 PCR 扩增出 zeocin 抗性基因片段, 与 HindIII 和 EcoRV 双酶切 pHB2976 回收的 3.5 kb 片段连接, 得到 pHB2983。以引物 fcpB-1 和 fcpB-2 (5'-AAAGTGAGGA AGGCACAGGA-3' 和 5'-CTTGATATCCTTGACTTCGAA ATATGCGC-3') 从三角褐指藻基因组 DNA 中扩增出 fcpB 启动子序列克隆到 pMD18-T 中, 得到 pHB3130。Pst I 和 Sma I 双酶切 pHB3130 回收 700 bp 片段, 与 Pst I 和 EcoRV 双酶切 pHB2983 回收的 3.5 kb 片段连接, 得到 pHB3174。质粒 p105B124 由深圳大学胡章立教授惠赠。

收稿日期: 2012-05-18; 修订日期: 2013-04-08

基金项目: 中国科学院知识创新工程重要方向项目(KSCX2-YW-G-060); 国家重点实验室专项经费自主研究项目(2011FBZ06)资助

作者简介: 刘飞飞 (1984—), 山东泰安人; 硕士研究生; 研究方向为藻类生物技术。E-mail: mycherish123@163.com

通信作者: 孔任秋, E-mail: kongr@ihb.ac.cn

PCR产物均经过测序验证。

### 1.3 三角褐指藻基因枪法转化

转化方法参照文献[6], 采用 GJ-1000 高压气体基因枪(宁波新芝科技有限公司)进行, 金粉直径为 1.0  $\mu\text{m}$ , 所用压力为 10.5 Mpa。轰击前取约  $1 \times 10^8$  个藻细胞涂布于无抗性固体平板中央约 1/3 处。将平板放置在样品室内进行轰击。被轰击过的平板放在 20 $^{\circ}\text{C}$  光照培养箱中复苏 24—48h 之后加 500  $\mu\text{L}$  海水培养基至每个平板上, 将藻细胞轻轻冲洗下来, 转涂于含 zeocin 的平板上培养, 待转化子长出。

### 1.4 PCR 扩增

基因组 DNA 的提取参照文献[9], 50  $\mu\text{L}$  的 PCR 反应体系中含 10 mmol/L Tris-HCl (pH 8.3), 50 mmol/L KCl, 2.5 mmol/L  $\text{MgCl}_2$ , 50 mol/L dNTPs, 引物各 100 pmol, 基因组 DNA 1—2  $\mu\text{L}$ , 2U *Taq* DNA 聚合酶。反应过程为: 94 $^{\circ}\text{C}$  预变性 6min, 之后按 94 $^{\circ}\text{C}$  30s, 58 $^{\circ}\text{C}$  30s, 72 $^{\circ}\text{C}$  30s 反应 30 个循环, 最后 72 $^{\circ}\text{C}$  延伸 10min。

### 1.5 突变体含油量的批量筛选

大量筛选突变株时, 将稳态生长期的突变体细胞悬液(30  $\mu\text{L}$ )加在 96 孔板中, 每板设有野生型对照, 再向每个孔中加入终浓度为 20% 的乙醇(170  $\mu\text{L}$ )和 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的尼罗红染液染色 10min。使用 Perkin-Elmer 公司的 LS55 型荧光分光光度计(配置 96 孔板模块)测定中性脂荧光值, 仪器参数设定为: 激发波长 529 nm, 荧光发射波长 578 nm, 狭缝宽度均为 5  $\mu\text{m}$ 。另外, 在加有等量藻悬液的 96 孔板中加入终浓度为 85% 的丙酮: 乙醇( $v:v=2:1$ )混合溶液(170  $\mu\text{L}$ ), 于 4 $^{\circ}\text{C}$  避光萃取 1h, 再以荧光分光光度计测定叶绿素 *a* 的荧光值, 参数设定为: 激发波长 440 nm, 荧

光发射波长 682 nm, 狭缝宽度分别为 5  $\mu\text{m}$  和 10  $\mu\text{m}$ 。根据中性脂荧光值和叶绿素 *a* 荧光值的比值, 判断藻株含油水平。

### 1.6 总脂提取和甘油三酯的分离

离心收集稳定生长期藻细胞, 用灭菌 ddH<sub>2</sub>O 洗涤 3 次, 冷冻干燥; 称取 50 mg 干藻粉于玻璃离心管中, 参照文献[10, 11]提取总脂, 计算细胞中总脂的含量。取总脂 15 mg, 与标样一起进行薄层层析<sup>[11]</sup>。分离纯化甘油三酯, 计算含量。运用 Spss 13.0 软件对野生型和突变株总脂和甘油三酯含量进行方差分析。

### 1.7 脂肪酸测定

取藻细胞总脂和甘油三酯各 3—5 mg, 经过甲酯化后, 以正己烷萃取 3 次, N<sub>2</sub> 吹干后定容至 100  $\mu\text{L}$ , 取 1  $\mu\text{L}$  进行气相色谱分析<sup>[11]</sup>。

## 2 结果与讨论

### 2.1 三角褐指藻突变体库的构建

zeocin 抗性基因分别采用三角褐指藻的启动子  $P_{fcpA}$  或  $P_{fcpB}$  驱动表达, 终止子采用来自该藻株的  $T_{fcpA}$ 。用携带不同启动子的两个质粒分别转化三角褐指藻, 发现使用  $P_{fcpB}$  的质粒转化效率比使用的  $P_{fcpA}$  质粒高 2—3 倍。因此, 用前一个质粒对三角褐指藻进行转化, 共挑取 zeocin 抗性藻落 5500 个建立突变子库, 接种到 24 孔细胞培养板中培养保种。

随机选取 40 个 zeocin 抗性藻落, 以其基因组 DNA 为模板, 以 ble-H3 和 ble-H5 为引物进行 PCR 扩增检查 zeocin 抗性基因是否存在。结果表明, 在这 40 个抗性藻落中只有 1 株没扩增出目的片段, 即其余 39 个均为真正的转化子。因此, 该突变体库的阳性率为 97.5%(图 1)。

### 2.2 含油量突变体的筛选和含油量测定

通过对不同藻液细胞密度与中性脂(甘油三酯)荧光强度及叶绿素 *a* 荧光强度进行相关性回归分析发现, 同一生长时期的藻细胞, 在一定的密度范围内中性脂荧光强度及叶绿素 *a* 荧光强度呈线性关系。因而两者的比值可以用于比较各藻株在同一生长时期的单位细胞含油量。对稳态生长期的突变体在  $6 \times 10^5$ — $2.7 \times 10^6$  cells/mL 细胞密度范围内进行尼罗红染色测定中性脂荧光, 并取等量藻细胞液测定叶绿素 *a* 荧光, 依据中性脂荧光和

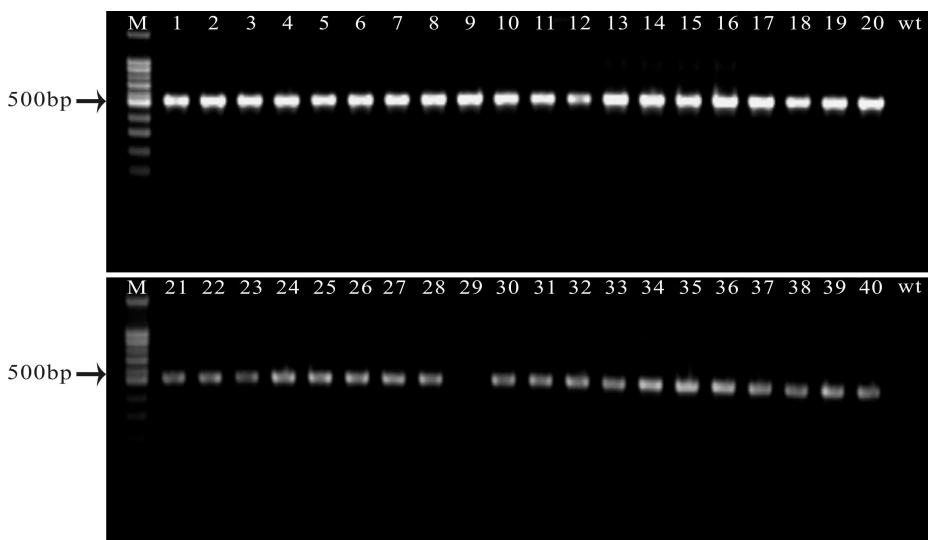


图 1 PCR 检测抗性转化子的电泳图

Fig. 1 Electrophoretograms showing PCR detection of the zeocin-resistance gene in transformants  
M. 100 bp DNA 分子量标准; 1—20 和 22—41 为抗性藻株; 21 和 42 为野生型对照  
M. 100 bp DNA markers; 1—20 and 22—41. resistant algal colonies; 21 and 42. wild type

叶绿素 *a* 荧光的比值比较各藻株单位生物量中性脂的含量, 经过四轮筛选, 获得 2 个(编号为 3-2734 和 4-2560) 比野生型含油量降低的突变株。野生型的荧光值比值为  $2.30 \pm 0.67$ , 而 3-2734 和 4-2560 分别为  $0.71 \pm 0.15$  和  $0.72 \pm 0.11$ 。

将突变株 3-2734、4-2560 和野生型对照培养至平台期, 分别收集进行冷冻干燥, 提取总脂称重, 然后分离纯化甘油三酯, 定量比较含油量的变化(图 2)。结果显示野生型的总脂含量为  $(42.20 \pm 1.1) \%$ , 而突变株 3-2734 和 4-2560 总脂含量分别为  $(30.42 \pm 1.96) \%$  和  $(35.5 \pm 0.35) \%$ , 相比野生型分别降低了 11.78% 和 6.66%; 野生型的甘油三酯含量为  $(25.11 \pm 0.43) \%$ , 3-2734 和 4-2560 甘油三酯含量分别为  $(17.24 \pm 0.63) \%$  和  $(21.35 \pm 0.10) \%$ , 相比野生型

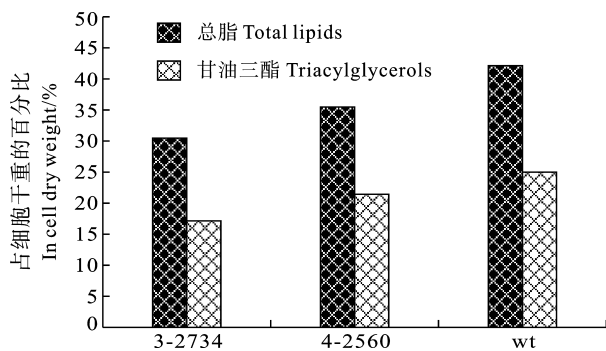


图 2 三角褐指藻两个突变株及野生型的总脂及甘油三酯含量  
Fig. 2 Contents of total lipids and triacylglycerols in 2 mutants and the wild type of *P. tricornutum*

分别降低了 7.87% 和 3.76%。以上结果统计学分析显示突变株和野生型总脂和甘油三酯含量差别显著 ( $P < 0.05$ )。两株藻株经 PCR 进一步验证 zeocin 抗性基因确实存在。

在通气培养条件下, 分别测定了 3-2734 和 4-2560 的生长情况, 并且与野生型比较, 结果显示 3-2734 和 4-2560 的生长比野生型略有减慢(图 3)。

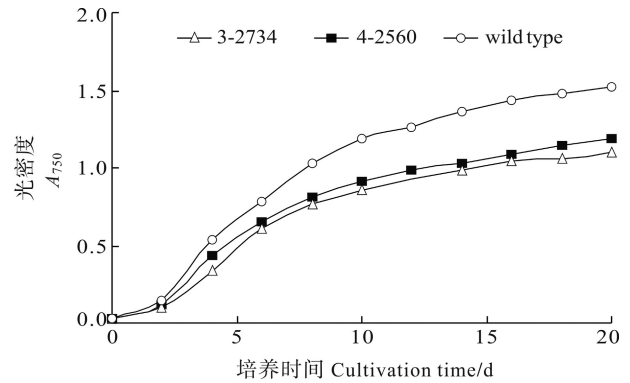


图 3 两个突变株和野生型三角褐指藻生长曲线  
Fig. 3 The growth of 2 mutants and the wild type of *P. tricornutum*

### 2.3 突变株脂肪酸组成的变化

进一步比较 3-2734、4-2560 和野生型的总值和甘油三酯中的脂肪酸组成(表 1)。这 3 个藻株总脂的脂肪酸组成集中在 C14:0、C16:0、C16:1、C20:5, 可达脂肪酸含量的 90% 以上。其中 C16(C16:0 和 C16:1) 为主要的脂肪酸, 在所有藻株中的比例都在 78% 以上, C20:5(EPA) 为主要的

表 1 两个突变藻株和野生型三角褐指藻细胞总脂和甘油三酯中脂肪酸组成(摩尔百分比)

Tab. 1 Fatty acid composition (mol%) in total lipids and triacylglycerols of 2 mutants and the wild type of *P. tricornutum*

脂肪酸 Fatty acids	总脂 Total lipids			甘油三酯 Triacylglycerols		
	3-2734	4-2560	野生型	3-2734	4-2560	野生型
C14:0	5.63±0.25	5.87±0.12	6.41±0.07	5.66±0.24	6.24±0.25	5.56±0.18
C14:1	0.02±0.01	0.02±0.00	0.01±0.00	0.02±0.01	0.01±0.01	0.05±0.04
C16:0	23.64±0.12	24.19±0.78	36.10±0.28	24.90±0.38	24.60±0.10	37.98±1.72
C16:1	55.18±0.61	53.94±1.09	48.12±0.30	59.09±0.55	57.19±1.67	49.44±1.51
C18:0	0.40±0.04	0.47±0.02	0.62±0.07	0.48±0.04	0.69±0.31	0.74±0.02
C18:1	1.71±0.05	2.78±0.61	1.76±0.06	1.63±0.04	2.74±0.88	1.74±0.06
C18:2	1.47±0.10	1.90±0.02	0.80±0.02	1.01±0.16	1.67±0.39	0.74±0.02
γ-C18:3	0.18±0.01	0.22±0.00	0.29±0.01	0.13±0.01	0.14±0.02	0.26±0.02
α-C18:3	0.79±0.04	1.08±0.02	0.11±0.01	0.60±0.04	0.88±0.01	0.11±0.01
C18:4	0.36±0.02	0.42±0.00	0.26±0.00	0.27±0.03	0.30±0.01	0.23±0.01
C20:0	0.02±0.01	0.01±0.00	0.01±0.01	0.01±0.01	0.01±0.02	0.01±0.00
C20:3	0.08±0.06	0.09±0.14	0.10±0.08	0.07±0.01	0.15±0.02	0.08±0.01
C20:4	0.07±0.01	0.08±0.01	0.15±0.00	0.03±0.01	0.02±0.02	0.07±0.01
C20:5	9.56±0.43	8.26±0.10	4.86±0.11	5.67±0.74	5.20±0.28	2.93±0.06
C22:0	0.13±0.03	0.07±0.01	0.05±0.02	0.07±0.02	0.05±0.06	0.02±0.00
C22:6	0.77±0.06	0.59±0.01	0.33±0.02	0.39±0.08	0.11±0.18	0.09±0.13

多不饱和脂肪酸。比较 2 个突变藻株与野生型的区别,发现突变株的 C16:0 和 C16:1 脂肪酸组成都与野生型有较大区别,总的趋势是突变株的 C16:0 比例分别下降了 12.46% 和 11.91%, 而 C16:1 比例分别升高了 7.06% 和 5.82%; 多不饱和脂肪酸 EPA(C20:5) 比例分别升高 4.70% 和 3.40%; 其他的不饱和脂肪酸, 比如 C18:1、C18:2 和 -C18:3, 虽然含量较少, 但在突变株中的比例也有不同程度的升高。

两个突变株和野生型的甘油三酯中主要的脂肪酸种类与总脂类似, 脂肪酸组成多以 C14:0、C16:0、C16:1 和 C20:5 为主, 达到总脂肪酸的 90% 以上。饱和脂肪酸 C16:0 含量比野生型下降, 不饱和脂肪酸 C16:1 和 C20:5 的比例比野生型升高。值得注意的是, 三角褐指藻甘油三酯中的 C20:5 相对含量比在总脂中含量少, 而其他组成相差不大, 说明 C20:5 偏向于在膜脂中分布。

由于三角褐指藻为二倍体, 一般认为外源基因插入使一个基因失活可能不会导致表型的变化<sup>[12]</sup>。我们认为, 这很可能是由于基因剂量的效应, 或者是插入反而激活了某些基因导致某些性状的改变, 既可能直接影响到细胞的产油代谢途径, 也可能由于抑制了生长, 导致油脂的相对积累。这些推测尚需要通过基因鉴定和转化实验获得证明。通过本研究建立的突变株筛选方法, 有可能获得更多的产油突变株, 用于产油性状相关基因的定位。通过对相关基因的过量表达, 有望定向改造三角褐指藻产油特征和脂肪酸组成, 使之更适用于生物柴油或 EPA 生产。

### 参考文献:

- [1] Palligarnai T, Vasudevan M. Biodiesel production—current state of the art and challenges [J]. *Journal of Industrial Microbiology Biotechnology*, 2008, **35**(5): 421—430
- [2] Chisti Y. Biodiesel from microalgae beats bioethanol [J]. *Trends Biotechnology*, 2008, **26**(3): 126—131
- [3] Hu Q, Sommerfeld M, Jarvis E, *et al.* Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances [J]. *The Plant Journal*, 2008, **54**(4): 621—639
- [4] Williams P, Laurens L. Microalgae as biodiesel and biomass feedstocks: review and analysis of the biochemistry and economics [J]. *Energy & Environmental Science*, 2010, **3**(5): 554—590
- [5] Xu J, Xu X D, Fang X T, *et al.* Screening and lipid analyses of high oleaginous *Chlorella* species [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2012, **36**(3): 426—432 [徐进, 徐旭东, 方仙桃, 等. 高产油小球藻的筛选及其油脂分析. 水生生物学报, 2012, **36**(3): 426—432]
- [6] Radakovits R, Jinkerson R E, Darzins A, *et al.* Genetic Engineering of Algae for Enhanced Biofuel Production [J]. *Eukaryotic Cell*, 2010, **9**(4): 486—501
- [7] Apt K E, Kroth P G, Grossman A R. Stable nuclear transformation of the diatom *Phaeodactylum tricoratum* [J]. *Molecular Genetics and Genomics*, 1996, **252**(5): 572—579
- [8] Bowler C, Allen A E, Badger J H, *et al.* The *Phaeodactylum* genome reveals the evolutionary history of diatom genomes [J]. *Nature*, 2008, **456**(7219): 239—244
- [9] Murray M G, Thompson W F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA [J]. *Nucleic Acids Research*, 1980, **8**(19): 4321—4326
- [10] Bligh E G, Dyer W J. A rapid method of lipid extraction and purification [J]. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, 1959, **37**(8) 911—917
- [11] 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酸的研究. 水生生物学报, 2010, **34**(5): 893—897]
- [12] Kroth P. Molecular biology and the biotechnological potential of diatoms [J]. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 2007, **616**: 23—33