

doi: 10.7541/2018.053

湖泊微拟球藻高含油突变株的构建及筛选

张玲香^{1,2} 陈怡雯¹ 胡晗华¹

(1. 中国科学院水生生物研究所藻类生物学重点实验室, 武汉 430072; 2. 中国科学院大学, 北京 100049)

摘要: 研究旨在建立湖泊微拟球藻(*Nannochloropsis*)的遗传转化体系, 然后根据外源基因随机插入的特性, 挑取抗性转化子构建突变体库, 并从突变体库中筛选高含油突变株。以湖泊微拟球藻自身 β -tubulin基因启动子和三角褐指藻*fcpA*终止子驱动和终止来源于细菌的*sh ble*抗性选择基因, 构建了一个转化载体pPha-T1-TUB。将线性化后的质粒以电穿孔的方法转化湖泊微拟球藻, 通过1 μ g/mL zeocin的抗性平板筛选, 并经液体培养基连续传代后, 得到了可以稳定遗传的转化子。我们从这些转化子中筛选得到了数株油含量高于野生型, 且生长也优于野生型的突变株。其中, 2个突变株K26和G5的总脂中多不饱和脂肪酸含量更低, 其脂肪酸组成更符合作为生物柴油原料的标准。研究通过随机插入构建突变体库的方法为快速获取优良目的性状的高产油突变株提供了一个有效手段。

关键词: 湖泊微拟球藻; 三酰基甘油; 电转化; 突变株

中图分类号: Q948.1

文献标识码: A

文章编号: 1000-3207(2018)02-0416-05

微拟球藻(*Nannochloropsis*)是一类属于真眼点藻纲(Eustigmatophyceae)、球形或近似球形的单细胞真核生物, 该属有7个已定种(*N. gaditana*、*N. salina*、*N. oculata*、*N. oceanica*、*N. australis*、*N. granulata*和*N. limnetica*)^[1,2], 其中仅有1个种类为淡水类型^[3]。与该属中的海洋种类相似, 淡水的湖泊微拟球藻(*N. limnetica*)也具有较高的光合作用效率、生物量和油脂含量, 并富含二十碳五烯酸(EPA)^[4-6]。作为最有潜力的工业产油的模式研究类群^[7], 迄今该属多个海洋种类的全基因组序列已经公布^[8-10], 它们的遗传转化体系也已建立^[8,9,11]。

当前, 由于生物燃料生产的成本远高于化石燃料, 且微藻培养过程中消耗的仅与产出的能量相当, 使得生物燃料包括微藻生物质仅在替代减排上具有一定的优势^[12]。将微藻生物质生产与污水处理相结合, 可在减少碳排放的同时增加经济效益, 由此使得利用微藻作为生产生物质的原料变得经济可行。因而, 从污水处理角度考虑, 研究利用淡水种类作为生物质原料具有更大的优势。由于湖泊微拟球藻的全基因组序列没有公布, 无法有效通过对靶基因的操作改良藻细胞的产油性状。本文利

用电击转化的方法, 将zeocin抗性基因随机插入湖泊微拟球藻的基因组, 构建突变体库, 通过筛选得到油含量及生长显著增加的突变株, 为快速获取优良目的性状的高产油突变株提供了一种有效途径。

1 材料与方法

1.1 藻株和培养

湖泊微拟球藻(*Nannochloropsis limnetica* KR 1998/3)由德国淡水生态和内陆渔业研究所(Institute of Freshwater Ecology and Inland Fisheries, Neuglobsow) Lothar Krienitz教授提供, 经稀释涂平板纯化后得到无菌藻落。常规培养使用BG11培养基, 在温度为22℃、光强约为50 μ mol photons/(m²·s)、光暗周期L:D为16:8的条件下进行。固体培养基加1.2%的琼脂, 转化子在加1 μ g/mL zeocin的平板上筛选。从平板上挑取转化子接种至48孔板(每孔含添加了0.5 μ g zeocin的1 mL液体培养基)中培养15d后用于鉴定。经鉴定的阳性转化子接入盛120 mL BG11培养基(将NaNO₃浓度减少到882 μ mol/L)的250 mL三角瓶中静置培养, 用于三酰基甘油相对含量及生物量(OD₇₃₀)的分析。用于总脂、三酰基甘

收稿日期: 2017-03-20; 修订日期: 2017-06-23

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(41576144)资助 [Supported by the National Natural Science Foundation of China (41576144)]

作者简介: 张玲香(1989—), 女; 山东潍坊人; 硕士研究生; 主要从事藻类分子生物学研究。E-mail: 996102643@qq.com

通信作者: 胡晗华, E-mail: hanhuahu@ihb.ac.cn

油及其脂肪酸组成分析的藻细胞在通空气的条件下培养。

1.2 质粒构建

以湖泊微拟球藻基因组DNA为模板, 用引物 *tub-fw* (5'-atgcTCCGGAATCATATCGTGCCACAGCAGATTGG-3', 下划线为*Aor*13H I酶切位点)和 *tub-rv* (5'-agctTGGCCATTGGTTGAGACTAGTTGAGAGGAGG-3', 下划线为*Bal* I酶切位点)进行PCR扩增得到 β -*tubulin*启动子区域(约570 bp)^[11]。PCR产物经测序验证后纯化回收, 用*Aor*13H I和*Bal* I酶切, 与经同样双酶切后回收的pPha-T1载体大片段相连, 以替换其中的*fcgB*启动子片段(位于抗性基因*sh ble*上游), 得到质粒pPha-T1-TUB。

1.3 电击转化方法

通过电击转化野生型湖泊微拟球藻的方法参照文献[11]进行, 略有修改。简述如下: 生长至对数期藻细胞收集后用375 mmol/L山梨醇溶液洗涤3次并重悬, 加入3—5 μ g用*Sca* I线性化的pPha-T1-TUB质粒DNA, 最终悬浮液体积为200 μ L, 转至2 mm电击杯中。电击参数及电击后藻细胞处理与已报道的对海洋微拟球藻种类的转化流程相同^[8, 9, 11]。

1.4 PCR扩增

用CTAB法提取基因组DNA。以野生型为阴性对照, 质粒pPha-T1-TUB为阳性对照, 分别以*tub-fw*和*FcpAt_rv* (5'-TCGAGAAACTCATCCTGTGC-3')为配对引物, 通过PCR的方法检测转化子。50 μ L PCR反应体系含有25 μ L 2 $\times$ PCR Mix(擎科生物)、引物各100 pmol和50 ng DNA模板。PCR反应程序为: 94 $^{\circ}$ C变性5min, 接下来是34个循环反应(94 $^{\circ}$ C变性30s, 60 $^{\circ}$ C复性30s, 72 $^{\circ}$ C延伸1min), 最后是72 $^{\circ}$ C延伸10min。

1.5 突变株生长及含油量分析

相对生物量通过测定培养液的OD₇₃₀值获得。分别在培养的第10和第12天收集相同量的藻细胞, 按照Bligh和Dyer^[13]的方法提取总脂。总脂在薄层层析(TLC)板上展层后分析三酰基甘油的相对含量^[14]。薄层层析板的型号是Silica gel 60 F254 (Merk KGaA Darmstadt, Germany), 展层剂体系为正己烷: 乙醚: 乙酸(70:30:1, v/v/v)。展层结束后层析板置于含有适量颗粒碘的烧杯中显色5—10min^[15]。标准品三油酸甘油酯(Glyceryl trioleate)购自Sigma公司。采用称重法确定总脂和用薄层层析板回收的三酰基甘油的绝对含量。

1.6 脂肪酸组成分析

总脂和三酰基甘油甲酯化后用正己烷萃取3次, 合并有机相, 取1 μ L用Ultra Trace气相色谱分析仪

(Thermo Scientific, United States)进行脂肪酸组成分析。用面积归一法计算各脂肪酸组分的相对百分比。

2 结果与讨论

2.1 湖泊微拟球藻突变体库的构建

自2011年Killian等^[16]利用电击的方法在海洋微拟球藻(*N. oceanica*)中建立起高效的遗传转化体系以来, 该属中另外4个海洋种类的遗传转化方法也已被陆续报道^[8, 11]。南方微拟球藻(*N. australis*)是最近才被鉴定的一个新种, 与海洋微拟球藻有非常近的亲缘关系, 因而两者的转化程序应该相同。我们采用同样的转化策略, 构建带有zeocin抗性基因的质粒, 由湖泊微拟球藻 β -*tubulin*基因的启动子驱动表达, 转化后可筛选得到阳性转化子。初步计算转化效率仅为海洋种类的约1%, 因而转化方法尚待进一步优化。微拟球藻属的种类具有厚的细胞壁, 电转化需要很高的电场强度(通常为11000—12000 V/cm)^[16], 而对淡水种类而言, 由于渗透压等因素的不同, 可能需要对电场强度等电击参数进行优化。

从平板上挑取的转化子接入zeocin浓度为0.5 μ g/mL的BG11培养基中培养, 以便进一步筛选。连续传代6个月后, 我们共获得了约300个可在含有抗性的液体培养基中生长的转化子, 将这些作为突变子库, 用于筛选具有优良产油性状的突变株。从中随机选取30个突变株, 以其基因组DNA为模板, 以*tub-fw*和*FcpAt_rv*为引物进行PCR扩增检查zeocin抗性基因及终止子序列片段(共约1.2 kb)。结果表明, 所有30个抗性藻落均可扩增出目的片段, 得到了可稳定遗传的转化子。

2.2 高含油突变株的筛选

由于BG11培养基中的氮浓度高达17.6 mmol/L, 培养早期收获检测到的湖泊微拟球藻仅含很低的三酰基甘油^[17]。将起始硝酸盐的浓度降低至882 μ mol/L (与海水培养基f/2中的氮浓度一致), 培养湖泊微拟球藻, 淡水的微拟球藻三酰基甘油含量与海洋的微拟球藻相当^[18]。对上述随机挑选的30个突变株与野生型在氮浓度为882 μ mol/L的条件下培养, 利用薄层层析比较三酰基甘油含量, 培养10d的结果显示共有16个突变株的三酰基甘油含量高于野生型, 培养12d共有14个突变株的三酰基甘油含量高于野生型, 10d和12d检测的油含量均高于野生型的突变株有11株, 占比为37%。其中突变株G5的油含量在12 d比野生型增加超过50% (图1)。

大量的研究显示藻细胞油脂积累与生长之间

不具有同步性^[19]。各种胁迫(尤其是氮限制)可导致TAG积累,但严重阻碍藻的生长。利用基因工程手段提高细胞油脂含量通常也会导致细胞生长受到影响。为获得生长不受影响的高含油突变株,我们进一步比较了野生型与突变株的生长情况。如图2所示,9个突变株的相对生物量高于野生型,其余21株的生长均受到不同程度抑制,其中K36的生物量仅为野生型的约40%。

综合油含量及生长的结果,9个生长优于野生型的突变株中,K14、K24、K26、K29和G5等5株的油含量也高于野生型,占有分析突变株的约17%。K26和G5两个突变株的相对生物量分别比野生型增加约5%—10%和3%—6%。

2.3 两个高含油突变株的产油特性

将上述2个生长及油含量优于野生型的突变株

K26和G5在通空气的条件下培养7d,收获藻细胞用于分析总脂、三酰基甘油含量及其脂肪酸组成。表1显示,在本研究条件下培养的湖泊微拟球藻总脂的含量为22%—26%,略低于海洋微拟球藻的总脂含量^[18]。2个突变株的三酰基甘油均高于野生型,含量占总脂的一半左右。湖泊微拟球藻总脂中的脂肪酸以C16:0、C16:1和C20:5为主,三者之和占总脂肪酸的70%以上。另外2种含量较高的脂肪酸为C14:0和C18:1,尤其是在三酰基甘油中所占的比例较高。与野生型比,突变株总脂的C20:5较低,特别是突变株G5中C20:5的含量仅为野生型的约40%,相应地C18:1的含量增加了一倍多。突变株中丰富的短链脂肪酸组成特性符合作为生物柴油原料的标准。

通过生理胁迫或对相应靶基因的遗传操作均

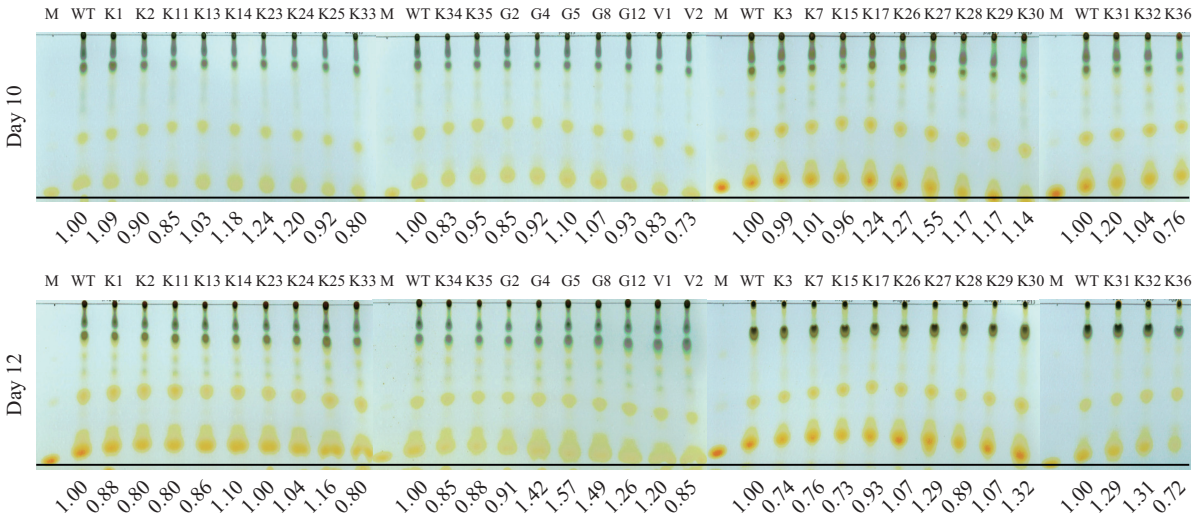


图1 野生型和突变株培养10d(上)和12d(下)后提取总脂的硅胶板薄层层析图

Fig. 1 Lipid composition and content in mutants and wild type (WT) of *Nannochloropsis limnetica* at day 10 and 12
薄层层析板上的数字表示突变株中三油酸甘油酯相对于野生型(设为1.00)的量; M. 三油酸甘油酯, Triolein; WT. 野生型, wild type; 其他为抗性藻株, others are resistant algal colonies

The values above the TLC panel indicate the relative triacylglycerols normalized to the WT, which was set as 1

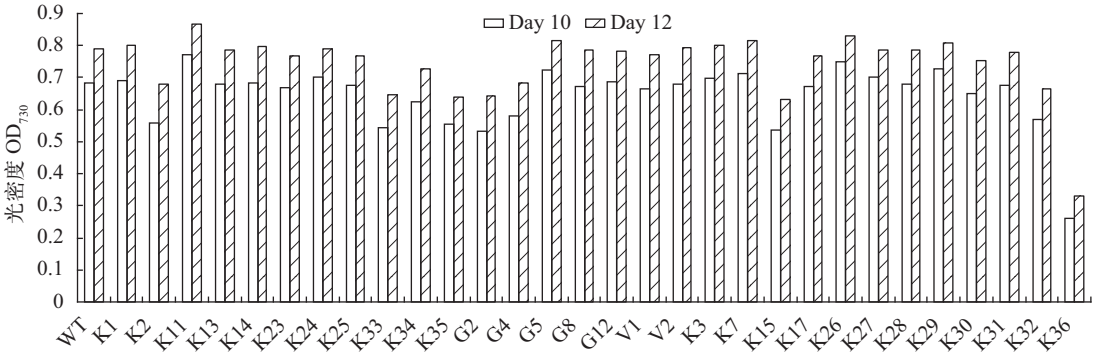


图2 野生型和突变株培养10d和12d后相对生物量(OD₇₃₀)的比较

Fig. 2 The relative biomass (OD₇₃₀) in mutants and wild type (WT) of *Nannochloropsis limnetica* at day 10 and 12

WT. 野生型, wild type; 其他为抗性藻株, others are resistant algal colonies

表 1 野生型湖泊微拟球藻与富油突变株K26和G5的总脂与三酰基甘油脂肪酸组成及含量

Tab. 1 Fatty acid composition (mol %) in total lipids and triacylglycerol (TAG) of mutants (strains K26 and G5) and wild type (WT) of *Nannochloropsis limnetica*

脂肪酸Fatty acids	野生型WT	野生型WT	突变株K26	突变株K26	突变株G5	突变株G5
	总脂Total lipids	三酰基甘油TAG	总脂Total lipids	三酰基甘油TAG	总脂Total lipids	三酰基甘油TAG
C14:0	8.34±0.45	12.15±1.86	6.97±0.88	11.31±0.78	8.26±0.2	10.36±0.45
C14:1	0.03±0.01	0.15±0.01	0.02±0	0.06±0.07	0.02±0.01	0.02±0
C16:0	25.96±1.42	42.23±0.34	26.09±0.53	39.02±0.33	27.35±1.87	39.85±1.38
C16:1	28.43±0.49	24.6±2.27	32.39±0.18	31.31±2.08	33.84±0.37	30.52±1.13
C18:0	2.03±0.71	5.4±1.17	1.74±1.14	4.14±1.91	0.01±0.01	8.9±1.02
C18:1	4.3±0.61	6.11±0.82	5.29±1.64	6±1.65	10.18±1.27	5.21±2.18
C18:2	3.09±0.36	1.1±0.1	2.91±0.09	0.69±0.01	4.81±0.55	1.2±0.03
γ-C18:3	0.08±0	2.74±0.42	0.08±0	1.52±1.93	0.11±0	0.04±0.03
α-C18:3	0.59±0.11	0.67±0.13	0.76±0.02	0.09±0.09	0.65±0.06	0.23±0.16
C18:4	0.03±0.03	0.23±0.01	0.12±0.09	1.04±0.63	0.05±0.07	0.44±0.04
C20:0	0.17±0	0.26±0.06	0.1±0.01	0.29±0.11	0.07±0.01	0.28±0.01
C20:4	4.58±0.49	0.68±0.14	4.67±0.3	0.14±0.15	5.46±0.73	0.02±0
C20:5	22.2±1.09	2.2±1.91	18.49±1.9	2.79±0.89	8.69±1.16	2.15±0.17
C22:0	0.01±0.01	0.95±0.04	0.08±0.1	0.94±0.03	0.04±0.04	0.45±0.31
C22:4	0.02±0.02	0.05±0.01	0.03±0.03	0.2±0.08	0.02±0.03	0.05±0.04
C22:5	0.14±0.20	0.26±0.29	0.22±0.25	0.24±0.07	0.05±0.04	0.15±0.02
C22:6	0±0	0.2±0.25	0.03±0.04	0.23±0.22	0.38±0.11	0.13±0.08
占干重百分比 % dry cell weight	22.0	11.0	24.1	12.2	25.5	12.3

可促进微藻细胞油脂的积累。然而,前者严重抑制细胞的生长,后者通常也会影响藻细胞的生长。由于生长和油脂积累的不同步性,在不影响或是增加细胞生长的同时提高细胞油脂积累可能涉及多个基因的协同作用。因而,有目的地通过基因工程手段对产油性状进行改良不但需要长时间的多次尝试,也可能需要多个抗性筛选标记。通过随机插入突变,从大量突变子库中筛选生长和油含量均显著增加的方法是切实可行的有效手段^[20, 21]。由于外源基因多拷贝的随机插入,尽管不易确定影响性状的目的基因,但至少可以获得对目标性状显著改良的突变株。通过本研究建立的突变株筛选方法,可以快速获得具有优良产油性状的藻株。进一步,通过对插入位点的深入分析还可以确定影响生长及油脂合成的相关基因,阐明藻细胞的油脂代谢机理,为更有效地改造湖泊微拟球藻产油性状提供理论支撑。

参考文献:

- [1] Andersen R A, Brett R W, Potter D, *et al.* Phylogeny of the Eustigmatophyceae based upon 18S rDNA, with emphasis on *Nannochloropsis* [J]. *Protist*, 1998, **149**(1): 61—74
- [2] Fawley M W, Jameson I, Fawley K P. The phylogeny of the genus *Nannochloropsis* (Monodopsidaceae, Eustigmatophyceae), with descriptions of *N. australis* sp. nov. and *Microchloropsis* gen. nov [J]. *Phycologia*, 2015, **54**(5): 545—552
- [3] Krienitz L, Hepperle D, Stich H B, *et al.* *Nannochloropsis limnetica* (Eustigmatophyceae), a new species of picoplankton from freshwater [J]. *Phycologia*, 2000, **39**(3): 219—227
- [4] Krienitz L, Wirth M. The high content of polyunsaturated fatty acids in *Nannochloropsis limnetica* (Eustigmatophyceae) and its implication for food web interactions, freshwater aquaculture and biotechnology [J]. *Limnologia*, 2006, **36**(3): 204—210
- [5] Li F J, Wan X, Fang X T, *et al.* Effects of nitrogen sources and CO₂ levels on the growth and oil accumulation in *Nannochloropsis limnetica* [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2015, **39**(2): 436—440 [李凤娟, 万秀, 方仙桃, 等. 不同氮源及CO₂浓度下湖泊微拟球藻的生长及产油特性分析. 水生生物学报, 2015, **39**(2): 436—440]
- [6] Freire I, Cortina-Burgueño A, Grille P, *et al.* *Nannochloropsis limnetica*: A freshwater microalga for marine aquaculture [J]. *Aquaculture*, 2016, **459**: 124—130
- [7] Jinkerson R E, Radakovits R, Posewitz M C. Genomic insights from the oleaginous model alga *Nannochloropsis gaditana* [J]. *Bioengineered*, 2013, **4**(1): 37—43
- [8] Radakovits R, Jinkerson R E, Fuerstenberg S I, *et al.* Draft genome sequence and genetic transformation of the oleaginous alga *Nannochloropsis gaditana* [J]. *Nature Communications*, 2012, **3**: 686

- [9] Vieler A, Wu G, Tsai C H, *et al.* Genome, functional gene annotation, and nuclear transformation of the Heterokont oleaginous alga *Nannochloropsis oceanica* CCMP1779 [J]. *PLoS Genetics*, 2012, **8**: e1003064
- [10] Wang D, Ning K, Li J, *et al.* *Nannochloropsis* genomes reveal evolution of microalgal oleaginous traits [J]. *PLoS Genetics*, 2014, **10**: e1004094
- [11] Li F, Gao D, Hu H. High-efficiency nuclear transformation of the oleaginous marine *Nannochloropsis* species using PCR product [J]. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 2014, **78**(5): 812—817
- [12] Chisti Y. Biodiesel from microalgae [J]. *Biotechnology Advances*, 2007, **25**(3): 294—306
- [13] 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
- [14] Reiser S, Somerville C. Isolation of mutants of *Acinetobacter calcoaceticus* deficient in wax ester synthesis and complementation of one mutation with a gene encoding a fatty acyl-coenzyme A reductase [J]. *Journal of Bacteriology*, 1997, **179**(9): 2969—2975
- [15] Yu E T, Zendejas F J, Lane D P, *et al.* Triacylglycerol accumulation and profiling in the model diatoms *Thalassiosira pseudonana* and *Phaeodactylum tricornutum* (Bacillariophyceae) during starvation [J]. *Journal of Applied Phycology*, 2009, **21**(6): 669—681
- [16] Kilian O, Benemann C S E, Niyogi K K, *et al.* High-efficiency homologous recombination in the oil-producing alga *Nannochloropsis* sp [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2011, **108**(52): 21265—21269
- [17] 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]
- [18] Huang W C, Hu H H. Study on the salinity tolerance and oil accumulation in *Nannochloropsis* [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2013, **37**(2): 383—387 [黄伟超, 胡晗华. 微拟球藻属对盐度的耐受及其产油特性分析. 水生生物学报, 2013, **37**(2): 383—387]
- [19] Tsai C H, Warakanont J, Takeuchi T, *et al.* The protein Compromised Hydrolysis of Triacylglycerols 7 (CHT7) acts as a repressor of cellular quiescence in *Chlamydomonas* [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2014, **111**(44): 15833—15838
- [20] Liu F F, Li X B, Fang X T, *et al.* Selection of oil-content mutants in *Phaeodactylum tricornutum* [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2013, **37**(4): 799—802 [刘飞飞, 李秀波, 方仙桃, 等. 三角褐指藻产油突变株的筛选. 水生生物学报, 2013, **37**(4): 799—802]
- [21] Li X, Zhang R, Patena W, *et al.* An indexed, mapped mutant library enables reverse genetics studies of biological processes in *Chlamydomonas reinhardtii* [J]. *The Plant Cell*, 2016, **28**(2): 367—387

CONSTRUCTION OF OIL-RICH MUTANTS IN *NANNOCHLOROPSIS LIMNETICA*

ZHANG Ling-Xiang^{1,2}, CHEN Yi-Wen¹ and HU Han-Hua¹

(1. Key Laboratory of Algal Biology, Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072, China;

2. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract: *Nannochloropsis* are model species for investigating biofuel production by algae. Many marine *Nannochloropsis* genomes have been sequenced recently and their transformation systems have been established. *N. limnetica* is the only freshwater species, and its genome and transformation system are not yet available. In this study, a genetic transformation method for *N. limnetica* is established and a zeocin-resistance gene is introduced into the genome to obtain mutant library, then high oil-yield mutants are screened from the library. A vector pPha-T1-TUB that has a *sh ble* gene derived by *Nannochloropsis* β -tubulin promoter and *Phaeodactylum tricornutum* *fcpA* terminator was constructed, and the linearized plasmid was introduced to *N. limnetica* by electroporation. Transformants were able to grow on 1 μ g/mL zeocin. PCR detection indicated that 100% of the selected colonies were positive transformants and all resistant colonies contained *sh ble* gene after half a year. Several mutants with higher triacylglycerols content and biomass were obtained. Among them, K26 and G5 showed lower polyunsaturated fatty acid contents than wild type, which meets the requirements of the European Standard EN 14214 (2004) for biodiesel production. This study provides an efficient method to obtain advantageous mutants via generating a library of random resistant gene insertion mutations in *N. limnetica*.

Key words: *Nannochloropsis limnetica*; Triacylglycerols; Electroporation transformation; Mutants