

利用流式细胞仪筛选紫外诱变高含油小球藻

李青, 吴洪, 蔡忠贞, 陈传红, 尹顺吉, 崔春莉

(新奥科技发展有限公司 煤基低碳能源国家重点实验室, 河北 廊坊 065001)

摘要:为筛选得到高含油的小球藻藻株,对若夫小球藻(*Chlorella zofingensis*)进行紫外诱变,尼罗红染色后再利用流式细胞仪对高含油藻株进行筛选。结果表明:紫外诱变40 min后,经流式细胞仪筛选,分选出的90%的突变藻株总脂含量都高于野生对照株。最终筛选到的藻株S16经培养总脂产量达到2.4 g/L,比野生对照株提高了50%。

关键词:小球藻;紫外诱变;流式细胞仪分选;高含油

中图分类号:TS222;TQ92

文献标识码:A

文章编号:1003-7969(2018)05-0110-04

Screening of UV - mutated *Chlorella zofingensis* with high lipid content using flow cytometry

LI Qing, WU Hong, CAI Zhongzhen, CHEN Chuanhong,
YIN Shunji, CUI Chunli

(State Key Laboratory of Coal - Based Low - Carbon Energy, Xin'ao Scientific & Technological Developmental Co., Ltd., Langfang 065001, Hebei, China)

Abstract:In order to screen strain with high lipid content from *Chlorella zofingensis*, firstly *Chlorella zofingensis* was mutated by ultraviolet ray(UV), and then the cells of mutated *Chlorella zofingensis* were screened by flow cytometry after Nile red staining. The results showed that after being mutated by UV for 40 min and screened by flow cytometry, 90% of the mutated strains contained more lipid than wild control strain. The total lipid yield of the screened strain S16 reached 2.4 g/L, increasing by 50% compared with wild control strain.

Key words:*Chlorella zofingensis*; UV - mutated mutation; flow cytometry screening; high lipid content

能源是人类生存与发展的基础,不可再生化石能源日趋减少及使用过程中造成的环境污染问题全球瞩目^[1]。藻类由于其生长周期短、生物产量高、含油量高等特点,在众多生物质能源中备受关注。如何快速得到含油量高、油脂产量稳定的藻种是许多科研工作者研究的目标^[2-3]。流式细胞仪因其分选的高效性和准确性,被广泛应用于微藻技术,用于分析细胞活性、油脂、色素等各种指标并分选相应的目的藻株^[4]。Doan等^[5]通过3次流式细胞仪分选,

得到总脂含量达到55%的*Nannochloropsis* sp.子细胞,总脂含量比母细胞提高两倍以上。陈涵等^[6]通过DES与紫外复合诱变,利用流式细胞仪分选得到油脂含量53.79%的栅藻藻株,相比对照提高10.78%。

小球藻为普生性单细胞绿藻,在自然界分布广泛,能利用光能自养,也能在异养条件下利用有机碳源进行生长繁殖,生物量大,生长速度快,易于培养^[7]。若夫小球藻(*Chlorella zofingensis*)细胞中油脂含量高,也可以作为水产动物的优质饵料,在商业开发中具有很高的利用价值^[8]。

紫外线对高等植物具有较强的生物学效应,是应用广泛的多功能物理诱变剂。孟振等^[9]利用紫外线对*Dunaliella salina*进行诱变,最终获得1株生长速率快和积累 β -胡萝卜素能力强的优势藻株。

收稿日期:2017-09-13;修回日期:2017-10-16

基金项目:国家重大科学仪器设备开发专项(2012YQ15008715)

作者简介:李青(1983),女,工程师,硕士,研究方向为藻种选育和藻种养殖技术(E-mail)liqing@enn.cn。

通信作者:吴洪,研究员,博士(E-mail)wuhong@enn.cn。

胡小文等^[10]通过紫外诱变和脂荧光强度筛选,获得2株小球藻,其脂荧光强度分别是原始藻株的6.2倍和1.7倍。

本研究对若夫小球藻(*Chlorella zofingensis*)进行紫外诱变,再通过同步化培养和尼罗红染色,利用流式细胞仪分选高含油藻株,最终筛选出1株高产油脂的藻株,为高效筛选高产油脂藻株提供了方法学参考。

1 材料与方法

1.1 实验材料

若夫小球藻(*Chlorella zofingensis*),由本公司保种。

BG11培养基,121℃高压灭菌20 min;二甲基亚砜(DMSO),尼罗红。

流式细胞仪(FACSCalibur Becton - Dickinson, 美国),超净工作台。

1.2 实验方法

1.2.1 紫外诱变

取对数生长期的若夫小球藻(*Chlorella zofingensis*)藻液,将其稀释至 10^8 个/mL置于6孔板培养板中,每孔3 mL藻液,使藻液在培养板每孔底部铺一薄层,避免紫外线照射不到。在摇床振荡下,用平行并排的两个20 W的紫外灯照射,距离为20 cm,分别照射15、20、25、30、35、40 min。照射完毕后,将照射不同时间的藻液分别转移到50 mL三角瓶中,暗培养以避免光修复。遮光36 h后取出,每24 h计数,直到死亡率稳定,计算致死率。

1.2.2 尼罗红染色

分别取紫外诱变35 min和40 min的藻液,参照Demets等^[11]的方法于培养箱16 h/8 h光暗周期同步化培养15 d。取5 mL藻液于4 000 r/min离心5 min,去上清,并用去离子水洗涤2次,后用20% DMSO水溶液重新悬浮至5 mL,加入尼罗红使尼罗红质量浓度为 $1 \mu\text{g/L}$,35℃水浴10 min,后用去离子水洗涤1次,用于流式细胞仪分选。

1.2.3 高含油藻株的分选

采用流式细胞仪分选高含油藻株。取3 mL尼罗红染色的藻样,稀释至 10^6 个/mL置于上样管,以蒸馏水为鞘液,利用流式细胞仪在488 nm激光激发下捕获荧光信号。尼罗红染色后在488 nm激发波长下的发射波长为550~590 nm,因此选择FL2通道,(585 ± 21) nm带通滤片,设置Regions分析藻细胞的尼罗红荧光强度,构建FL2-H直方图对比油脂含量信息。根据FSC-H(细胞大小)和FL2-H(荧光强度)二维图细胞信号设定分选门进行收集,

捕获速率 300 s^{-1} ,用50 mL的无菌收集管收集目的细胞,离心浓缩后,将细胞逐级稀释至 10^4 个/mL涂布BG11平板培养。长起单藻落后,挑取体积较大、颜色浓绿的藻落扩至250 mL三角瓶缺氮培养,参照文献[12]方法测定总脂含量,考察流式细胞仪分选效果。

1.2.4 柱式反应器培养

将对数期藻种转接到 $\Phi 4 \text{ cm} \times 60 \text{ cm}$ 柱式反应器中,初始接种 OD_{750} 值为0.6。光源为日光灯,24 h光照,光照强度为 $200 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 。连续通入含1%~1.5% CO_2 的混合空气培养,温度为(25 ± 1)℃,pH控制在7左右。定期取适量藻液,测定总脂产量,验证筛选效果。

1.2.5 数据处理

实验分别设置3次平行,对实验数据进行标准差分析。

2 结果与讨论

2.1 紫外诱变

按照1.2.1方法对若夫小球藻进行紫外诱变,结果发现,用紫外线处理小球藻细胞后,藻液颜色由原来的绿色变浅甚至变为白色。照射时间越长,颜色越浅。照射时间为15、20、25、30 min的藻液变为浅绿;照射时间为35、40 min的藻液变为混浊白色,40 min的藻液可看到有糝状固体。在照射后4 d时藻细胞死亡率稳定,统计其致死率,结果见图1。

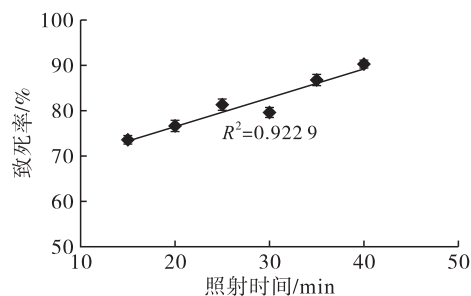
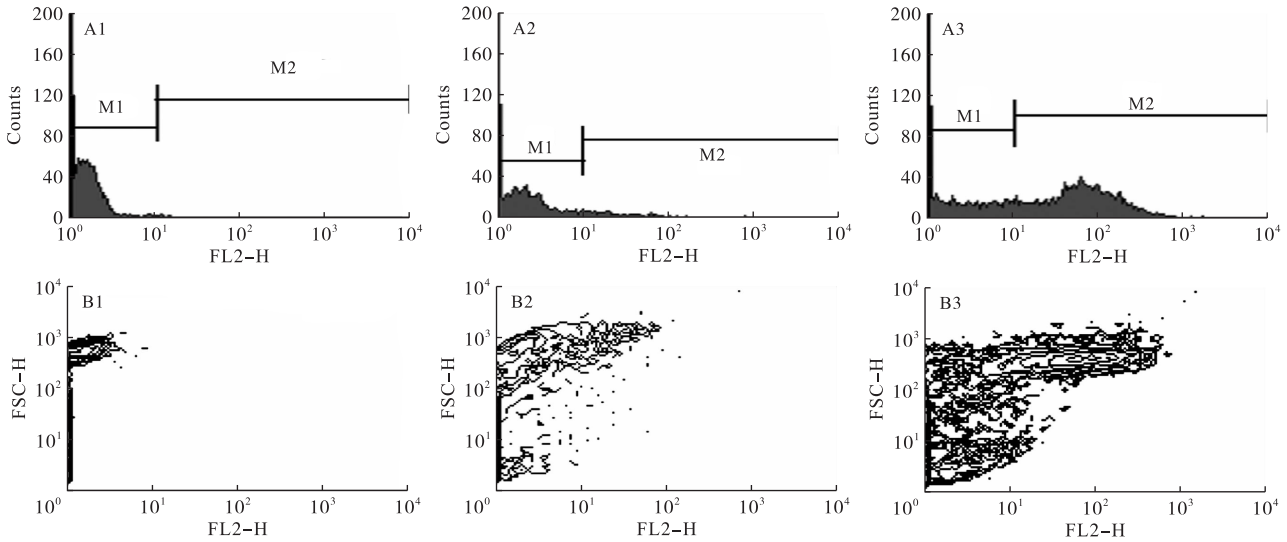


图1 紫外线照射致死率

由图1可知,紫外线对小球藻细胞有致死作用,照射时间延长,藻细胞死亡率增加。为了获得较多的突变型,又不至于因为照射剂量过大造成大部分细胞死亡而残留一些不活跃的细胞,选择致死率在80%~90%之间,因此选择照射35 min和40 min的藻液对其进行染色和流式细胞仪分选处理。

2.2 流式细胞仪分析

诱变后藻液经尼罗红染色后,利用流式细胞仪捕获荧光信号,分析藻细胞突变情况。以紫外诱变0 min的藻株作为对照,分析紫外诱变35 min和40 min后细胞的荧光强度,结果见图2。



注: A1、B1 为小球藻对照组; A2、B2 为小球藻诱变 35 min; A3、B3 为小球藻诱变 40 min。

图 2 若夫小球藻细胞群落分布及油脂荧光强度

由图 2 可知, 诱变组落在更高强度荧光信号的细胞数明显高于对照组。对照组细胞群落更加集中, 镜检也可以看到对照组的细胞均一度比较高, 99.9% 的细胞均落在油脂荧光强度较低的 M1 门内, 而在油脂荧光强度更高的 M2 门内几乎没有细胞; 紫外诱变 35 min 细胞群落要分散一些, 10.6% 的细胞落在油脂荧光强度更高的 M2 门内, 油脂含量明显高于对照组; 紫外诱变 40 min 细胞群落更加分散, 56.8% 的细胞落在油脂荧光强度更高的 M2 门内, 说明其含油细胞更多且油脂含量更高。因此, 选择若夫小球藻紫外诱变 40 min 为最佳诱变条件进行诱变, 再利用流式细胞仪对高产油细胞进行分选, 结果见图 3。

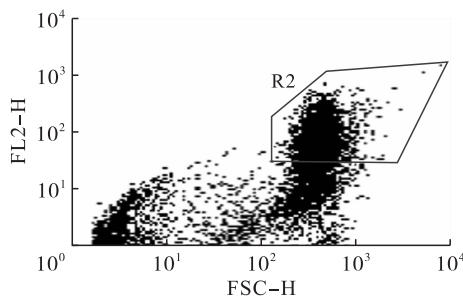


图 3 流式细胞仪分选小球藻图

如图 3, 综合考虑细胞大小和油脂荧光强度, 小球藻紫外诱变 40 min 同步化培养后针对 R2 门进行细胞分选收集。收集细胞数达到 2×10^5 个后离心再稀释至合适浓度涂布于 BG11 平板, 于 16 h/8 h 光暗周期培养。挑取体积较大、颜色浓绿单藻落 40 个逐级扩培, 同野生对照株 (WT) 一起, 分别置于含有 150 mL 缺氮 BG11 培养基的 250 mL 三角瓶中培养 7 d, 测定总脂含量考查藻株的产油脂能力, 结果见图 4。

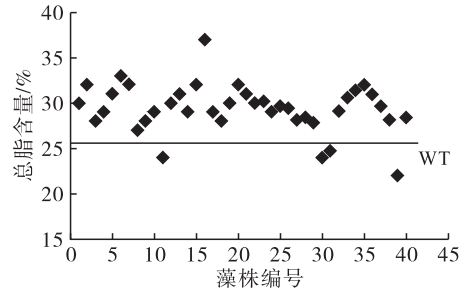


图 4 分选突变株总脂含量图

由图 4 可知, 大部分藻株总脂含量在 24% ~ 35% 之间, 分选出的 90% 的突变藻株总脂含量都比野生对照株高, 说明利用流式细胞仪分选高含油的突变株效果明显。其中 S16 藻株总脂含量达到 37.2%, 将其选出进行进一步的培养验证。

2.3 柱式反应器培养验证

将野生对照株与优势突变株 S16 在柱式反应器中培养 8、12 d 和 15 d 测定总脂产量, 结果如图 5 所示。

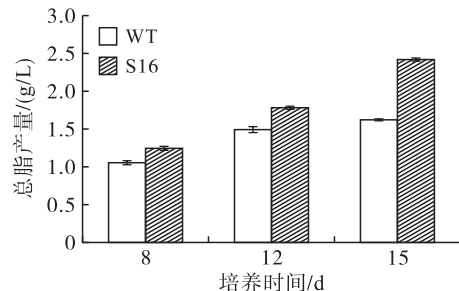


图 5 总脂产量变化

由图 5 可知, 突变株 S16 总脂产量始终高于野生对照株。S16 培养结束总脂产量达到 2.4 g/L, 比对照株的 1.6 g/L 高出 50%, 证明利用流式细胞仪对高含油突变株进行分选效果显著。

(下转第 122 页)

参考文献:

- [1] 中国科学院中国植物志编委会. 文冠果[M]. 北京: 科学出版社, 1985: 72.
- [2] 戚建华, 姚增玉. 生物柴油原料树种文冠果的化学成分与综合利用研究进展[J]. 林产化学与工业, 2012, 32(2): 47-54.
- [3] 杨春艳, 杨军丽, 哈伟, 等. 文冠果果壳化学成分与生物活性研究进展[J]. 中草药, 2016, 17(8): 1418-1424.
- [4] 王颖, 潘英, 邢亚超, 等. 文冠果种皮化学成分的分离与鉴定[J]. 中国药物化学杂志, 2013, 23(5): 397-399.
- [5] RASHM I, NAGATSU A. New flavonoids from seed skin of *Xanthoceras sorbifolia* [J]. Med Plants Res, 2011, 5(6): 1034-1036.
- [6] 张严磊, 肖鸿飞, 施欢贤, 等. 文冠果壳抗氧化活性及抑制人 HepG₂ 细胞增殖活性部位筛选[J]. 中国现代中药, 2017, 19(11): 1572-1574.
- [7] 毛迪锐, 姜贵全, 张卓睿, 等. 超声波辅助提取文冠果壳总黄酮的工艺及其抗氧化性研究[J]. 食品工业科技, 2015, 36(19): 237-242.
- [8] YANG C Y, HA W, LIN Y, et al. Polyphenols isolated from *Xanthoceras sorbifolia* husks and their anti-tumor and radical-scavenging activities [J]. Molecules, 2016, 21(12): 1694.
- [9] XIE X, TU Z C, ZHANG L, et al. Antioxidant activity, α -glucosidase inhibition, and phytochemical fingerprints of *Anoectochilus roxburghii* formula tea residues with HPLC-QTOF-MS/MS [J]. J Food Biochem, 2017, 41(6): e12402.
- [10] 王笑晴. 基于 DPPH 自由基清除能力的姜黄提取物抗氧化活性评价 [J]. 药物评价研究, 2011, 34(5): 360-363.
- [11] ESCRIBANO J, CABANES J, JIMÉNEZ-ATIÉNZAR M, et al. Characterization of betalains, saponins and antioxidant power in differently colored quinoa (*Chenopodium quinoa*) varieties [J]. Food Chem, 2017, 234: 285-294.
- [12] 郭婕, 崔桂友. 加拿大一枝黄花总酚超声提取工艺 [J]. 光谱实验室, 2010, 27(1): 335-339.
- [13] 陈晨, 胡文忠, 田沛源, 等. 超声辅助提取香蕉皮多酚工艺优化及其抗氧化性的分析 [J]. 食品科学, 2014, 35(2): 12-17.
- [14] 李媛, 施欢贤. 文冠果壳总多酚的含量测定 [J]. 中国民族民间医药, 2017, 26(16): 13-14.
- [15] BENZIE I F, STRAIN J J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of 'antioxidant power': the FRAP assay [J]. Anal Biochem, 1996, 239(1): 70-76.

(上接第 112 页)

3 结论

利用流式细胞仪筛选高含油若夫小球藻 (*Chlorella zofingensis*)。通过紫外线对小球藻进行诱变, 对诱变 40 min 藻株进行流式细胞仪分选, 最终筛选到 1 株藻株 S16, 柱式反应器培养 15 d 后总脂产量为 2.4 g/L, 比野生对照株提高了 50%。

参考文献:

- [1] KOSARIC N, VELIKONJA J. Liquid and gaseous fuels from biotechnology: challenge and opportunities [J]. Fems Microbiol Rev, 1995(16): 111-142.
- [2] 刘长斌, 佟少明, 侯和胜. 利用叶绿素荧光快速筛选紫外诱变高含油小球藻 [J]. 激光生物学报, 2016, 26(2): 126-131.
- [3] 刘婷婷, 王涛, 杨翼, 等. 低场核磁共振技术快速检测小球藻油脂含量及其在高通量选育中的应用 [J]. 生物工程学报, 2016, 32(3): 385-396.
- [4] HYKA P, LICKOVA S, PRIBYL P, et al. Flow cytometry for the development of biotechnological processes with microalgae [J]. Biotech Adv, 2013, 31(1): 2-16.
- [5] DOAN T T Y, OBBARD J P. Enhanced lipid production in *Nannochloropsis* sp. using fluorescence-activated cell sorting [J]. GCB Bioenergy, 2011, 3: 264-270.
- [6] 陈涵, 李小妹, 蔡钊, 等. 诱变结合流式细胞仪筛选栅藻高产油脂藻株 [J]. 中国油脂, 2016, 41(5): 65-68.
- [7] 杨鹭生, 李国平, 陈林水. 蛋白核小球藻粉的蛋白质、氨基酸含量及营养评价 [J]. 亚热带植物学, 2003, 32(1): 36-38.
- [8] LIU J, HUANG J C, SUN Z, et al. Differential lipid and fatty acid profiles of photoautotrophic and heterotrophic *Chlorella zofingensis*: assessment of algal oils for biodiesel production [J]. Bioresour Technol, 2011, 102(1): 106-110.
- [9] 孟振, 张学成, 时艳侠. 光照与温度对紫外筛选盐生杜氏藻藻株的生长及色素积累的影响 [J]. 海洋科学, 2008, 32(7): 20-29.
- [10] 胡小文, 马帅, 付莉莉, 等. 紫外诱变热带微藻选育高油脂藻株 [J]. 热带农业科学, 2011, 31(7): 25-28.
- [11] DEMETS R, TOMSON A M, RAN E T H, et al. Synchronization of the cell division cycle of *Chlamydomonas eugametos* [J]. J General Microbiol, 1985, 131: 2919-2924.
- [12] KHOZIN-GOLDBERG I, SHRESTHA P, COHEN Z. Mobilization of arachidonyl moieties from triacylglycerols into chloroplastic lipids following recovery from nitrogen starvation of the microalga *Parietochloris incise* [J]. Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids, 2005, 1738(1/2/3): 63-71.