

比较转录组解析氮限制对微藻 *Ankistrodesmus* sp. HJ12 油脂和淀粉积累的分子调控机制

林伟泽^{1,2}, 马 帅², 李亚军², 张家明², 谭德冠², 邓茹茹², 刘平怀¹

(1. 海南大学 化学工程与技术学院, 海口 570228; 2. 中国热带农业科学院热带生物技术研究所 中国热带农业科学院海南热带农业资源研究院, 海南省热带微生物资源重点实验室, 海口 571101)

摘要:为明确微藻油脂与淀粉代谢过程中是否存在相互竞争与转化关系,以微藻 *Ankistrodesmus* sp. HJ12 为实验材料,对不同氮浓度培养条件下的微藻 *Ankistrodesmus* sp. HJ12 生物量、油脂含量和淀粉含量进行测定,并进行比较转录组研究,探讨其油脂和淀粉积累相关影响及分子调控机制。结果表明:氮浓度对该藻株油脂和淀粉积累具有显著影响,且油脂与淀粉积累呈显著负相关关系;培养基中添加氮源时,微藻 *Ankistrodesmus* sp. HJ12 油脂含量显著高于无氮源条件,油脂含量最高时的氮浓度为 7.6 mmol/L;无氮源时,其淀粉含量最高;比较转录组研究发现,促进微藻 *Ankistrodesmus* sp. HJ12 油脂积累的主要因素可能是脂肪酸合成途径、糖酵解途径与淀粉分解代谢途径的增强,为脂肪酸的合成提供了更多的乙酰-CoA 和碳源,从而促进了脂肪酸的合成;挖掘得到 4 个调控脂质合成代谢的关键基因 *ACACA*、 α -*AMY*、*PDC* 和 *adh*,采用实时荧光定量 PCR (RT-qPCR) 验证基因表达差异变化,结果与转录组分析差异一致。研究结果可为进一步了解微藻脂质合成代谢的分子机制提供一定的参考,同时为加快微藻油脂制备生物柴油实现规模化应用增添新的有利基础。

关键词:微藻;油脂;淀粉;转录组;分子调控机制

中图分类号:Q815;Q591

文献标识码:A

文章编号:1003-7969(2023)01-0137-09

Comparative transcriptome analysis of molecular regulation mechanism of lipid and starch accumulation in microalgae *Ankistrodesmus* sp. HJ12 under nitrogen limitation

LIN Weize^{1,2}, MA Shuai², LI Yajun², ZHANG Jiaming²,
TAN Deguan², DENG Ruru², LIU Pinghuai¹

(1. School of Chemical Engineering and Technology, Hainan University, Haikou 570228, China;

2. Hainan Key Laboratory of Tropical Microbe Resources, Hainan Academy of Tropical Agricultural Resources of Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences (CATAS), Institute of Tropical Bioscience and Biotechnology of CATAS, Haikou 571101, China)

Abstract: In order to clarify the relationship of lipid and starch metabolism in microalgae, with *Ankistrodesmus* sp. HJ12 as the experimental material, its biomass, lipid contents and starch contents

收稿日期:2021-10-29;修回日期:2022-04-07

基金项目:中国热带农业科学院基本科研业务费创新团队项目(1630052020020);国家重点研发计划资助项目(2021YFA0909600);海南省自然科学基金项目(321MS083)

作者简介:林伟泽(1996),男,在读硕士,研究方向为微藻代谢产物及其分子调控机制(E-mail) 971368134@qq.com。

通信作者:刘平怀,教授,博士生导师,硕士(E-mail) twlph@163.com。

were measured under different nitrogen concentrations, and comparative transcriptome were studied. The correlation between microalgae lipid and starch accumulation was explored and their molecular regulation mechanisms were investigated. The results showed that nitrogen concentration remarkably influenced lipid and starch accumulation in *Ankistrodesmus* sp. HJ12, and there was a negative correlation between

them. The lipid contents of algal cells cultured in media with nitrogen were significantly higher than those in nitrogen-free media. The optimal nitrogen concentration for lipid accumulation was 7.6 mmol/L. In contrast, the starch contents of algal cells were the highest in nitrogen-free media. Comparative transcriptome analysis showed that genes involved in fatty acid synthesis, glycolytic and amyolytic pathway were expressed at higher levels in *Ankistrodesmus* sp. HJ12 than the control, implying that the cells accumulated more acetyl-CoA and carbon source for fatty acid synthesis under nitrogen limitation, and promoting the synthesis of fatty acids. Moreover, four key genes of regulating lipids anabolism, *ACACA*, α -*AMY*, *PDC* and *adh*, were selected for RT-qPCR analysis, and the results of gene expression patterns were in consistent with those obtain by transcriptome analysis. The results of the study provided a basis to deeply understand the molecular mechanism of microalgae lipids anabolism. In addition, it added a new favorable foundation for accelerating producing biodiesel from microalgae lipids to achieve large-scale applications.

Key words: microalgae; lipid; starch; transcriptome; molecular regulation mechanism

随着世界人口和经济的持续快速增长,化石燃料的需求量和消耗量越来越大,过量的二氧化碳进入大气是导致当前全球气候变化的主要原因之一^[1],因此寻找可持续再生的绿色清洁能源一直是人们努力的目标。微藻通过光合作用固定二氧化碳富集产生的淀粉与油脂,可用于制备乙醇和生物柴油,且微藻生长周期短、生物质产率高、环境适应性强、不占用农耕土地面积,被认为是最具发展潜力的一种生物质燃料资源^[2]。然而,较高的生产成本限制了其进一步的规模化商业发展,并且如何提高油脂产量仍然是我们需要突破的重要瓶颈。

氮限制是一种可以促进藻细胞油脂积累的有效手段^[3-5]。但是在缺氮条件下往往会造成藻细胞生长迟缓甚至死亡,生物量减少,油脂产量偏低^[6]。如何在不影响藻细胞生长的前提下提高其油脂含量,是该领域现阶段需要解决的难题。目前,采用基因工程手段定向调控目的基因的表达水平,构建工程藻株是最常见的方法。脂质代谢通常与碳水化合物代谢密切相关,已有研究表明,油脂与淀粉合成途径都需要利用前体物质 3-磷酸甘油醛^[7-9],但尚不清楚两者在代谢过程中是否存在某种相互竞争与转化关系以及潜在的调控基因。

本文以微藻 *Ankistrodesmus* sp. HJ12 为研究对象,对不同氮浓度培养条件下的 *Ankistrodesmus* sp. HJ12 进行油脂和淀粉含量测定及转录组测序,对比脂质和碳水化合物合成相关代谢途径的基因表达变化差异,挖掘调控脂质合成代谢的关键基因,为进一步揭示微藻脂质合成代谢的分子机制提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

藻种 *Ankistrodesmus* sp. HJ12,由海南大学生物工程综合实验室提供;BG-11 培养基。

植物总 RNA 提取试剂盒,成都福际生物技术有限公司;BGISEQ-500 测序仪;Agilent 2100 生物分析仪;Hi Script III 1st Strand cDNA Synthesis Kit 试剂盒;Cham Q Universal SYBR qPCR Master Mix 试剂盒,南京诺唯赞公司。

1.2 实验方法

1.2.1 微藻的培养

为获得微藻 *Ankistrodesmus* sp. HJ12 最佳油脂积累氮浓度,以 BG-11 为基础培养基^[10],其他营养成分不变,改变硝酸钠的质量浓度,使培养基中氮的浓度分别为 0、7.6、12.6、17.6、22.6 mmol/L,在每天光照 12 h、黑暗 12 h,以及培养温度 27℃ 下培养。各处理设置 3 个重复,每隔 24 h 取样 1 次,测定 680 nm 下的光密度(OD_{680}),绘制生长曲线。

1.2.2 生物量测定

收集培养 14 d 的藻液,以 8 000 r/min 离心 5 min,收集藻泥沉淀,置于冷冻干燥机中冻干,-20℃ 冰箱中保存备用。以冻干藻粉质量与藻液体积的比值计算生物量。

1.2.3 油脂含量测定

参考潘孝妍等^[11]的方法对藻株油脂进行提取,以油脂质量与藻粉质量的比值计算油脂含量。

1.2.4 淀粉含量测定

采用蒽酮-硫酸法^[6,12-13]对藻株淀粉含量进

行测定。配制 1 mg/mL 的葡萄糖标准溶液, 稀释成不同质量浓度 (x) 梯度, 分别与 4 mL 蒽酮试剂反应后于 625 nm 波长下测定吸光值 (y), 制作标准曲线并得到标准曲线方程 $y = 0.0021x - 0.0052$, 相关系数 (R^2) 为 0.9958。称取 0.1 g 藻粉, 先用 80% 乙醇洗脱至无色, 再用 30% 高氯酸进行振荡提取, 合并提取液。取一定量提取液与蒽酮试剂反应, 测定吸光值, 根据标准曲线计算样品中淀粉的含量。

1.2.5 转录组测序样品制备与总 RNA 提取

微藻 *Ankistrodesmus* sp. HJ12 在氮浓度分别为 0 (NT_0)、7.6 mmol/L (NT) 和 17.6 mmol/L (CK) 培养基中培养 14 d 后, 分别收集藻液, 4 °C 下以 8 000 r/min 离心 10 min, 收集沉淀。采用植物总 RNA 提取试剂盒提取样品总 RNA, 经生物分析仪检测 RNA 质量合格后送至深圳华大基因测序公司进行 cDNA 文库构建和测序。

1.2.6 原始数据处理与 *de novo* 拼接

对测序得到的原始数据 (Raw Reads) 使用过滤软件 SOAPnuke v1.4.0 和 Trimmomatic v0.36 进行过滤, 去除低质量、接头污染以及未知碱基 N 含量高于 10% 的 Raw Reads, 过滤后得到的 Clean Reads 使用 Trinity 软件^[14] 对其进行 *de novo* 组装, 完成拼接。

1.2.7 差异表达基因分析

通过华大基因 Dr. Tom 系统, 以表达量为原来的 2 倍以上和错误发现率 (FDR) 小于 0.001 为指标对差异表达基因 (DEGs) 进行筛选。查找京都基因与基因组百科全书 (Kyoto ency - clopedia of genes and genomes, KEGG) 的注释与分类对 DEGs 进行 KEGG 聚类与富集分析。使用 Bowtie 2 软件^[15] 将 Clean Reads 与基因组序列进行比对, 利用 RSEM v1.2.8 软件^[16] 计算样品中的基因表达丰度。

1.2.8 实时荧光定量 PCR (RT - qPCR)

为了验证转录组数据的准确性, 对挖掘得到的 4 个调控脂质代谢的关键基因进行 RT - qPCR 验证。按照 1.2.5 的方法对总 RNA 进行提取, 再反转录成 cDNA 作为 RT - qPCR 反应模板进行扩增。以微藻的 18S *rRNA* 基因作为内参基因, 使用 Primer 5.0 对引物进行设计, 由上海生工生物工程有限公司完成引物合成, CK 为对照组, NT 和 NT_0 为实验组, 每个样品 3 个重复, 采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算差异基因相对表达量, 引物序列信息见表 1。

表 1 RT - qPCR 引物序列信息

基因名称	引物序列 (5' ~ 3')
18S <i>rRNA</i>	F: AGTTGGTGGGTTGCCTTGTC R: CGTTGGTCGCGTCAGTGTA
ACACA	F: GAGGTCTGGGGCTACTTCTC R: TCGCCCTGATCTTGATCTC
α - AMY	F: TGTAAACGGGACTTGTGCG R: TCACAATGCGCTGTCTATGC
PDC	F: CCCCGTCATCATCTCATC R: GCACAACCTTCTCAGCAGCTT
<i>adh</i>	F: CGTTTGTCTCTGGTTCAGC R: TGAGCGACTTAGAGGACGG

2 结果与讨论

2.1 不同氮浓度对微藻 *Ankistrodesmus* sp. HJ12 生长的影响 (见图 1、图 2)

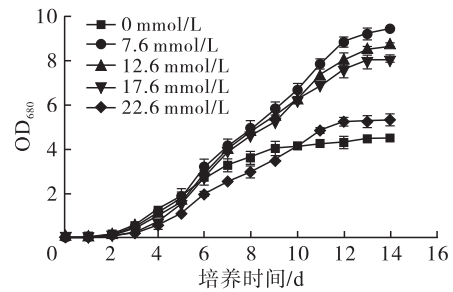
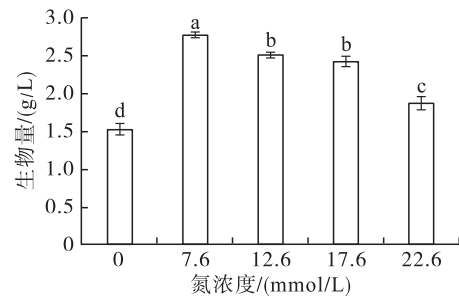


图 1 不同氮浓度下 *Ankistrodesmus* sp. HJ12 的生长曲线



注: 图中不同字母表示差异显著 ($p < 0.05$)。下同

图 2 不同氮浓度下 *Ankistrodesmus* sp. HJ12 的生物量

生长曲线能直观反映微藻的生长状态和生长趋势^[10]。由图 1 可知, 不同氮浓度处理的微藻 *Ankistrodesmus* sp. HJ12 在培养至 3 d 时均进入对数生长期, 但进入稳定生长期的时间及藻液浓度存在较大差异。在不添加硝酸钠的无氮源培养基中, 培养至 9 d 时进入稳定生长期, 这一时期的藻液浓度在所有处理中最低。在含氮源的培养基中, 氮浓度为 7.6、12.6 mmol/L 的处理在培养至 14 d 时进入稳定生长期, 而氮浓度为 17.6、22.6 mmol/L 的处理分别于 13、12 d 进入稳定生长期; 稳定生长期中氮浓度越高, 藻液浓度越低, 其中氮浓度为 7.6 mmol/L 的处理藻液浓度最高, 而氮浓度为

22.6 mmol/L的处理藻液浓度最低。

由图2可知:当藻株培养至14 d时,在含氮源的培养基中,氮浓度为7.6 mmol/L的处理生物量达2.79 g/L,显著高于其他处理;高氮浓度的处理(22.6 mmol/L)生物量为1.88 g/L,显著低于其他处理;而无氮源处理生物量最低,仅为1.53 g/L,显著低于含氮源的处理。过高或过低的氮浓度均不利于微藻的生长,如氮浓度过高会降低微藻对氮的利用率,使氮吸收处于饱和状态,抑制藻细胞的生长^[17]。培养基中无氮源会增加活性氧化物的生成,对光合作用器官产生破坏,光合活性降低^[18]会抑制藻细胞的生长,但细胞分裂仍可以进行,这是因为微藻利用自身细胞内源氮化合物,如蛋白质或叶绿素等物质的降解补充了相应的氮源,从而维持了其在无氮环境下的生长^[19-20],这与实验中观察到无氮源处理藻液明显偏黄现象相符。

上述结果表明:培养基中无氮源时会抑制微藻 *Ankistrodesmus* sp. HJ12 生长;添加低浓度的氮源有利于微藻的生长,延长其对数生长期,增加其生物量;而氮源浓度过高时会抑制其生长,缩短其对数生长期;在氮浓度为7.6 mmol/L条件下,藻株生长状态最佳,生物量最高。李涛等^[21]报道降低产油绿球藻培养基中的氮浓度,可以显著提高其生物质浓度;吴桂秀等^[6]研究发现,随着氮浓度的提高,标志链带藻的生物质浓度先增加后降低:均与本实验结果一致。

2.2 不同氮浓度对微藻 *Ankistrodesmus* sp. HJ12 油脂与淀粉含量的影响

不同氮浓度下微藻 *Ankistrodesmus* sp. HJ12 油脂与淀粉含量见图3,微藻 *Ankistrodesmus* sp. HJ12 油脂含量与淀粉含量相关性见图4。

由图3、图4可知,氮浓度显著影响藻细胞油脂与淀粉的积累($p < 0.05$),且油脂与淀粉的积累呈显著负相关关系($R = -0.97$)。在氮浓度7.6 ~ 22.6 mmol/L范围内,藻株油脂含量达23.93% ~ 32.12%,均显著高于无氮源处理(12.66%),其中以氮浓度为7.6 mmol/L处理微藻油脂含量最高,达32.12%。无氮源处理时藻株淀粉含量达32.60%,均显著高于含氮源的处理。结果表明,在无氮源时,微藻 *Ankistrodesmus* sp. HJ12 主要以合成淀粉作为储能物质,而添加适量氮源时,微藻则更多地转为积累油脂。冯迪娜等^[22]报道湛江等鞭金藻在氮限制条件下主要积累碳水化合物,氮充足条件下主要进

行油脂积累,与本实验研究结果一致。

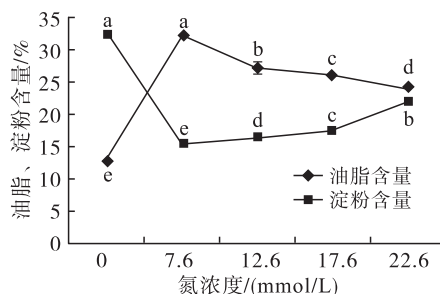


图3 不同氮浓度下微藻 *Ankistrodesmus* sp. HJ12 油脂与淀粉含量

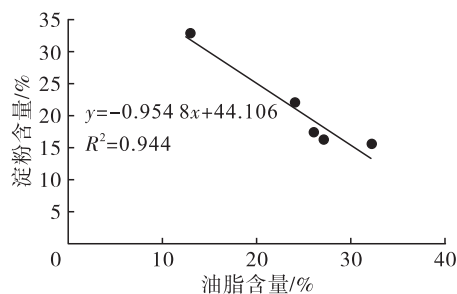


图4 微藻 *Ankistrodesmus* sp. HJ12 油脂含量与淀粉含量的相关性

通过综合分析藻细胞生长状态、油脂与淀粉含量积累情况,最适合微藻 *Ankistrodesmus* sp. HJ12 油脂积累的氮浓度是7.6 mmol/L,而最适合微藻 *Ankistrodesmus* sp. HJ12 淀粉积累的是培养基中无氮源。油脂和淀粉作为微藻氮限制条件下积累的两种主要储能物质,通常情况下,大多微藻会选择积累能量值更高的油脂作为长期储能物质,但也有部分藻种选择积累淀粉,如亚心形四片藻和小球藻等^[23],这表明微藻在响应氮限制积累大量淀粉(碳水化合物)过程中可能还存在物种依赖性^[24]。

2.3 差异表达基因聚类与富集分析

将CK、NT和NT_0 3组转录组序列信息进行对比,NT和CK与NT_0和CK两组相互对比得到4900个共同的DEGs,对得到的DEGs进行KEGG聚类分析,结果见图5。

由图5可知,分别有145个和341个DEGs注释到脂质代谢和碳水化合物代谢。进一步对这两条代谢途径中的DEGs进行KEGG富集分析发现,脂质代谢的DEGs主要富集于甘油磷脂代谢、三酰甘油的生物合成以及脂肪酸合成等代谢途径,而碳水化合物代谢的DEGs则主要富集于糖酵解与糖异生、柠檬酸循环、淀粉和蔗糖代谢等途径,具体DEGs转录本信息见表2和表3。

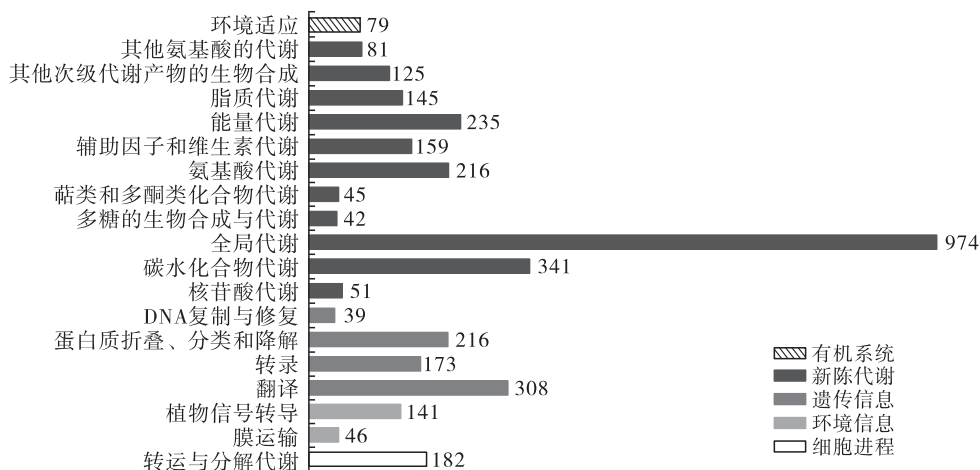


图 5 差异表达基因 KEGG 聚类分析

表 2 微藻 *Ankistrodesmus* sp. HJ12 差异表达基因中参与脂质合成相关的酶

酶简称	酶	ko 编号	EC 编号	转录本数量
甘油磷脂代谢				
GPDI	3-磷酸甘油酯脱氢酶(NAD ⁺)	K00006	1.1.1.8	2
DAD1	磷脂酶 A1	K16818	3.1.1.32	3
LYPLA2	溶血磷脂酶 II	K06130	3.1.1.5	2
GDE1	甘油磷酸二酯酶	K18696	3.1.4.46	2
GPAT3/4	甘油-3-磷酸 O-酰基转移酶 3/4	K13506	2.3.1.15	1
PCYT1	胆碱酯酶-磷酸酯细胞转移酶	K00968	2.7.7.15	1
AGPAT/LPT1	1-酰基-sn-甘油-3-磷酸酰基转移酶	K00655	2.3.1.51	5
PLD1/2	磷脂酶 D1/2	K01115	3.1.4.4	2
BTA1	甜菜碱脂质合成酶	K13621		1
AGXT2L1, ETNPPL	乙醇胺-磷酸酯酶	K14286	4.2.3.2	1
PCYT2	乙醇胺-磷酸胞苷转移酶	K00967	2.7.7.14	4
CDIPT	CDP-二酰基甘油-肌醇 3-磷脂酰转移酶	K00999	2.7.8.11	1
CDS1, CDS2, cdsA	磷脂酰氧基转移酶	K00981	2.7.7.41	2
EPT1	乙醇胺磷酸酯转移酶	K00993	2.7.8.1	1
TAZ	单体心磷脂酰基转移酶	K13511	2.3.1.-	2
三酰甘油的生物合成				
DAK	二羟丙酮激酶	K00863	2.7.1.28, 2.7.1.29, 4.6.1.15	1
GK	甘油激酶	K00864	2.7.1.30	1
MGLL	酰基甘油脂肪酶	K01054	3.1.1.23	2
TAGL	三酰基甘油酯酶	K14674	3.1.1.3, 3.1.1.13, 3.1.1.4, 2.3.1.51	2
DGAT1	二酰基甘油 O-酰基转移酶 1	K11155	2.3.1.20, 2.3.1.75, 2.3.1.76	3
脂肪酸合成				
BCCP	乙酰-CoA 羧化酶生物素羧基载体蛋白	K02160		2
ACACA	乙酰-CoA 羧化酶/生物素羧化酶	K11262	6.4.1.2, 6.3.4.14, 2.1.3.15	1
FASN	脂肪酸合成酶	K00665	2.3.1.85	5
fabD	丙二酰-CoA ACP 转移酶	K00645	2.3.1.39	1
fabF	3-酮脂酰-ACP 合酶 II	K09458	2.3.1.179	2
fabH	3-酮脂酰-ACP 合酶 III	K00648	2.3.1.180	1

续表 2

酶简称	酶	ko 编号	EC 编号	转录本数量
fabG	3-酮脂酰-ACP 还原酶	K00059	1.1.1.100	3
fabI	烯酰基-酮脂酰-ACP 还原酶 I	K00208	1.3.1.9,1.3.1.10	1
FAB2, SSI2, desA1	酰基-ACP 脱氢酶	K03921	1.14.19.2,1.14.19.11, 1.14.19.26	3
ACSL, fadD	长链酰基-CoA 合成酶	K01897	6.2.1.3	4

表 3 微藻 *Ankistrodesmus* sp. HJ12 差异表达基因中参与碳水化合物合成相关的酶

酶简称	酶	ko 编号	EC 编号	转录本数量
糖酵解与糖异生				
GALM	醛糖 1-聚合酶	K01785	5.1.3.3	2
FBP	果糖 1,6-二磷酸酶 I	K03841	3.1.3.11	4
PFK	6-磷酸果糖激酶 1	K00850	2.7.1.11	1
PFP	二磷酸盐依赖型磷酸果糖激酶	K00895	2.7.1.90	5
ALDO	果糖二磷酸醛缩酶	K01623	4.1.2.13	10
TPI	磷酸丙糖异构酶	K01803	5.3.1.1	2
GAPDH	3-磷酸甘油酯脱氢酶	K00134	1.2.1.12	5
PGK	磷酸甘油酸激酶	K00927	2.7.2.3	2
gpmB	磷酸甘油酯变异酶	K15634	5.4.2.12	2
ENO	烯醇酶	K01689	4.2.1.11	2
pckA	磷酸烯醇丙酮酸羧化酶(ATP)	K01610	4.1.1.49	3
PK	丙酮酸激酶	K00873	2.7.1.40	5
DLAT	丙酮酸脱氢酶	K00627	2.3.1.12	11
PDC	丙酮酸脱羧酶	K01568	4.1.1.1	7
ACSS	乙酰-CoA 合成酶	K01895	6.2.1.1	2
ALDH	醛脱氢酶(NAD ⁺)	K00128	1.2.1.3	4
AKR1A1	醇脱氢酶(NADP ⁺)	K00002	1.1.1.2	4
柠檬酸循环				
pckA	磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶(ATP)	K01610	4.1.1.49	3
MDH1	苹果酸脱氢酶	K00025	1.1.1.37	3
CIS	柠檬酸合成酶	K01647	2.3.3.1	3
ACLY	柠檬酸裂解酶	K01648	2.3.3.8	2
ACO, acnA	乌头酸水合酶	K01681	4.2.1.3	1
IDH1, IDH2, icd	异柠檬酸脱氢酶	K00031	1.1.1.42	3
fumC, FH	延胡索酸水合酶	K01679	4.2.1.2	1
SDHA, SDH1	琥珀酸脱氢酶	K00234	1.3.5.1	4
LSC1	琥珀酰-CoA 合成酶 α 亚基	K01899	6.2.1.4,6.2.1.5	2
DLST, sucB	2-氧戊二酸脱氢酶 E2 成分	K00658	2.3.1.61	2
OGDH, sucA	2-氧戊二酸脱氢酶 E1 成分	K00164	1.2.4.2	5
淀粉和蔗糖代谢				
SPP	蔗糖-6-磷酸酶	K07024	3.1.3.24	1
SPS	蔗糖-磷酸合成酶	K00696	2.4.1.14	1
TPS	6-磷酸海藻糖合成酶	K16055	2.4.1.15,3.1.3.12	1
UGP2	UTP——葡萄糖-1-磷酸尿苷转移酶	K00963	2.7.7.9	1
WAXY	颗粒性淀粉合成酶	K13679	2.4.1.242	3
ENPP	磷酸二酯酶	K01513	3.1.4.1,3.6.1.9	1
α -AMY	α -淀粉酶	K01176	3.2.1.1	9
β -AMY	β -淀粉酶	K01177	3.2.1.2	2

续表 3

酶简称	酶	ko 编号	EC 编号	转录本数量
β -GC	β -葡糖苷酶	K01188	3.2.1.21	1
ISA	淀粉异构酶	K01214	3.2.1.68	3
EG	内切葡聚糖酶	K01179	3.2.1.4	1
AGPase	葡萄糖-1-磷酸腺苷转移酶	K00975	2.7.7.27	2
SS	淀粉合成酶	K00703	2.4.1.21	6
GBE1	1,4- α -葡聚糖分支酶	K00700	2.4.1.18	2
malQ	4- α -葡聚糖转移酶	K00705	2.4.1.25	1
PYG	糖原磷酸化酶	K00688	2.4.1.1	1
pgm	葡萄糖磷酸变位酶	K01835	5.4.2.2	2
GPI	葡萄糖-6-磷酸异构酶	K01810	5.3.1.9	3

2.4 脂质与碳水化合物合成相关基因表达量差异性分析

脂质合成受多条代谢途径及多种生物酶共同调节完成。脂质代谢途径和碳水化合物代谢途径中的

中间代谢物发生变化,都会改变生物体内的碳流分配,影响脂质的合成。脂质与碳水化合物合成相关基因表达量变化见表4。

表 4 脂质与碳水化合物合成相关基因表达量变化

代谢途径	基因 ID	酶简称	酶	基因表达量 FPKM			差异倍数 \log_2 FC	
				CK	NT	NT_0	NT vs CK	NT_0 vs CK
脂肪酸合成	CL7795. Contig 1_All	ACACA	乙酰-CoA 羧化酶/生物素羧化酶	0.91	3.33	0.25	1.87	-1.86
淀粉分解代谢	CL517. Contig 6_All	α -AMY	α -淀粉酶	101.64	273.26	47.52	1.43	-1.10
糖酵解	CL7728. Contig 27_All	PDC	丙酮酸脱羧酶	1.60	7.67	0.39	2.26	-2.04
糖酵解	CL1805. Contig 11_All	adh	乙醇脱氢酶	0.55	0.01	1.11	-5.78	1.01
淀粉合成代谢	CL201. Contig 24_All	SS	淀粉合成酶	8.95	20.98	1.76	1.23	-2.35
淀粉合成代谢	CL201. Contig 25_All	SS	淀粉合成酶	4.56	9.04	1.04	0.99	-2.13

由表4可以看出,在氮限制(NT)条件下,脂肪酸合成中的乙酰-CoA 羧化酶(ACACA)的基因表达量是原来(CK)的3.7倍,而无氮源(NT_0)条件下比原来减少了72.5%。淀粉分解代谢途径中 α -淀粉酶(α -AMY)在氮限制时基因表达量是原来的2.7倍,无氮源时比原来减少了53.2%。糖酵解途径中的丙酮酸脱羧酶(PDC)在氮限制时表达量是原来的4.8倍,无氮源时比原来减少了75.6%,乙醇脱氢酶(adh)则分别大幅下降和上调。这些基因表达量的变化与油脂和淀粉含量变化结果相一致(见图3),说明氮限制条件下调控微藻 *Ankistrodesmus* sp. HJ12 油脂积累的主要因素可能是脂肪酸合成途径中 ACACA 的基因表达量上调,促进了脂肪酸的合成反应。在脂肪酸合成中,ACACA 以乙酰-CoA 为底物与碳酸盐反应生成丙二酰-CoA,这是合成脂肪酸的第一步反应,同时也是关键的限速步骤,

ACACA 的基因表达量上调表明有更多的底物乙酰-CoA 产生,促进了脂肪酸的合成。Xie 等^[25]将海洋硅藻 ACACA 的基因导入大肠杆菌中过表达,ACACA 活性提高了1.72倍,甘油三酯(TAG)含量增加了2倍。Klaus 等^[26]将拟南芥中 ACACA 的基因在马铃薯块茎淀粉体中过表达,脂肪酸合成增强,TAG 含量提高了5倍以上。同时,淀粉分解代谢途径中的 α -AMY 的基因表达量上调,淀粉降解过程加强,产生更多的碳源转向脂质的合成。Pick 等^[27]研究杜氏盐藻发现,TAG 合成中的碳有2/3是来自于淀粉,只有1/3是直接来自于CO₂的从头合成。此外,糖酵解途径产生的丙酮酸在无氧条件下经PDC的催化作用生成乙醛,乙醛被adh还原最终生成乙醇^[28],PDC的基因表达量上调,促进了葡萄糖的分解,加快了丙酮酸的代谢循环过程;adh的大幅下调说明产生的丙酮酸可能更倾向于通过有氧代谢

过程氧化脱羧生成乙酰 - CoA, 为脂肪酸合成提供更多的前体物质, 而无氮源条件下 *adh* 大幅上调说明此时无氧代谢过程加强, 更多的淀粉被降解生成葡萄糖, 由糖酵解途径合成乙醇, 需要补充大量储能物质淀粉以应对不良生长环境, 这与图 3 无氮源时淀粉含量大幅提高相一致。李林等^[29]对小球藻的转录组数据分析中, 同样发现了与本实验相同的代谢通路过程。这些影响因素都共同推动着氮限制条件下藻细胞朝向油脂合成反应方向进行, 促进了微藻 *Ankistrodesmus* sp. HJ12 的油脂积累。

由表 4 还可以看出, 淀粉合成代谢途径中的淀粉合成酶(SS)基因表达量在氮限制时是原来的 2 倍以上, 淀粉含量却减少(见图 3)。其原因是淀粉合成一般不受 SS 活性的影响, 而是通过调节葡萄糖 - 1 - 磷酸腺苷转移酶(AGPase)的活性来实现, AGPase 是催化葡萄糖 - 1 - 磷酸(G1P)焦磷酸化生成二磷酸腺苷 - 葡萄糖(ADP - Glc)的关键酶, 而产

物 ADP - Glc 则是淀粉合成的主要原料^[30]。Tang 等^[31]在水稻中分离得到一株 AGPase 突变体, 其淀粉合成途径受到严重抑制。在本研究的 DEGs 转录本分析结果中, 也发现了 2 个编码 AGPase 基因的转录本(见表 3), 该基因表达量的变化是否是导致无氮源时微藻 *Ankistrodesmus* sp. HJ12 淀粉大量积累的主要原因, 还有待进一步深入研究。

2.5 RT - qPCR 验证

为验证转录组分析挖掘得到的 4 个基因差异变化结果的可靠性, 采用 RT - qPCR 进行定量分析, 结果见图 6。由图 6 可知: NT 组较 CK 组, 基因 *ACACA*、 α - *AMY* 和 *PDC* 相对表达量明显提高, 而 NT_0 组较 CK 组这 3 种基因相对表达量出现了下调; 与 CK 组相比, NT 组的基因 *adh* 相对表达量减小, NT_0 组的基因 *adh* 相对表达量则出现了上调。RT - qPCR 定量分析结果与转录组基因差异变化趋势相一致, 说明本次转录组测序结果可信度高。

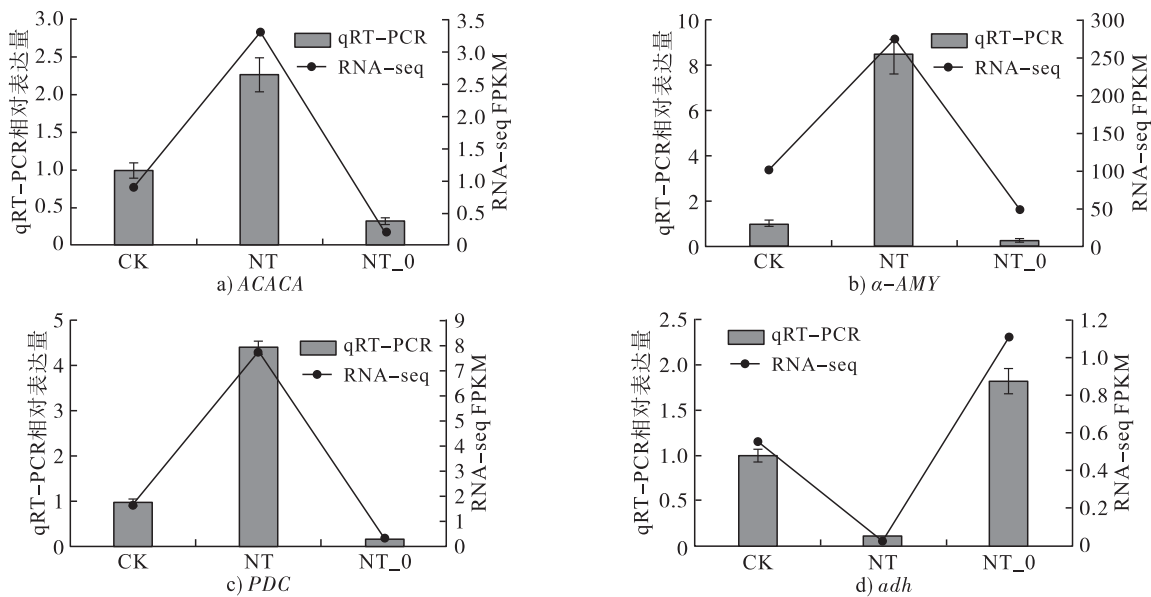


图 6 RT - qPCR 基因相对表达量和 RNA - seq FPKM 变化趋势对比

3 结论

通过对不同氮浓度微藻 *Ankistrodesmus* sp. HJ12 油脂和淀粉含量的测定, 发现氮浓度对其油脂和淀粉积累具有显著影响 ($p < 0.05$), 且油脂与淀粉积累呈负相关关系 ($R = -0.97$)。培养基中无氮源时, 微藻 *Ankistrodesmus* sp. HJ12 淀粉含量最高; 添加氮源时其油脂含量显著高于无氮源条件, 油脂含量最高时的氮浓度为 7.6 mmol/L。比较转录组研究发现, 促进微藻 *Ankistrodesmus* sp. HJ12 油脂积累的主要因素可能是脂肪酸合成途径、糖酵解途径和淀粉分解代谢途径的增强, 为脂肪酸的合成提供了更多的乙酰 - CoA 和碳源, 促进了脂肪酸的合成, 并且

挖掘得到 4 个潜在调控脂质合成代谢的关键基因 *ACACA*、 α - *AMY*、*PDC* 和 *adh*。这些信息为采用基因工程手段提高微藻油脂含量提供了潜在的优质基因资源, 同时也为加快微藻油脂制备生物柴油实现规模化应用增添了新的有利基础。

参考文献:

- [1] CHANG W C, ZHENG H Q, CHEN C N N. Comparative transcriptome analysis reveals a potential photosynthate partitioning mechanism between lipid and starch biosynthetic pathways in green microalgae[J]. *Algal Res*, 2016, 16: 54 - 62.
- [2] 张虎, 温小斌, 王中杰, 等. 一株富含碳水化合物微藻的筛选

- 和分子鉴定[J]. 植物科学学报, 2014, 32(6):645-654.
- [3] HUERLIMANN R, STEINIG E J, LOXTON H, et al. The effect of nitrogen limitation on acetyl - CoA carboxylase expression and fatty acid content in *Chromera velia* and *Isochrysis aff. galbana* (TISO) [J]. *Gene*, 2014, 543(2):204-211.
- [4] BREUER G, LAMERS P P, MARTENS D E, et al. Effect of light intensity, pH, and temperature on triacylglycerol (TAG) accumulation induced by nitrogen starvation in *Scenedesmus obliquus* [J]. *Bioresour Technol*, 2013, 143(6):1-9.
- [5] LI X B, MOELLERLING E R, LIU B S, et al. A galactoglycerolipid lipase is required for triacylglycerol accumulation and survival following nitrogen deprivation in *Chlamydomonas reinhardtii* [J]. *Plant Cell*, 2012, 24(11):4670-4686.
- [6] 吴桂秀, 黄罗冬, 高保燕, 等. 不同氮源及其浓度对标志链带藻合成淀粉和油脂的影响[J]. 微生物学报, 2016, 56(7):1168-1177.
- [7] 刘冰颖. 基于葡萄糖浓度变化对小球藻 G32 进行淀粉和油脂含量以及转录组分析[D]. 杭州: 浙江大学, 2018.
- [8] 张立杰. 利用海水培养淡水藻高效生产油脂的工艺及机制[D]. 济南: 山东大学, 2019.
- [9] 张磊. 胁迫条件下蛋白核小球藻胞内活性氧介导油脂生物合成的机制研究[D]. 重庆: 重庆大学, 2019.
- [10] 王盛林, 赵震宇, 刘平怀. 10 种热带富油微藻生物量、总脂含量及脂肪酸组成分析[J]. 中国油脂, 2017, 42(8):93-97.
- [11] 潘孝妍, 陈长鸿, 王秀海, 等. 不同营养条件对微藻 *Ankistrodesmus* sp. CJ09 生长和油脂积累的影响[J]. 中国油脂, 2020, 45(3):135-139.
- [12] 伍松翠. 三角褐指藻对不同浓度 CO₂ 的生理响应及其固碳机制[D]. 山东 青岛: 中国科学院研究生院(海洋研究所), 2016.
- [13] 张雪. 氮饥饿条件下小球藻 (*Chlorella* sp.) 油脂代谢研究及转录组分析[D]. 杭州: 浙江大学, 2018.
- [14] GRABHERR M G, HAAS B J, YASSOUR M, et al. Full-length transcriptome assembly from RNA-seq data without a reference genome [J]. *Nat Biotechnol*, 2011, 29(7):644-652.
- [15] LANGMEAD B, SALZBERG S L. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2 [J]. *Nat Methods*, 2012, 9(4):357-359.
- [16] DEWEY C N, LI B. RSEM: accurate transcript quantification from RNA-seq data with or without a reference genome [J/OL]. *BMC Bioinformatics*, 2011, 12(1):323 [2021-10-29]. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-12-323>.
- [17] 罗宁, 张森, 刘平怀. 氮、磷对热带海洋富油微藻 *Desmodesmus* sp. WC08 生长及油脂积累的影响[J]. 食品工业科技, 2016, 37(4):223-227.
- [18] SRINIVASAN R, MAGESWARI A, SUBRAMANIAN P, et al. Bicarbonate supplementation enhances growth and biochemical composition of *Dunaliella salina* V-101 by reducing oxidative stress induced during macronutrient deficit conditions [J/OL]. *Sci Rep*, 2018, 8(1):6972 [2021-10-29]. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-25417-5>.
- [19] 黄伟, 朱顺妮, 王忠铭, 等. 氮缺乏条件下小球藻碳水化合物与脂肪酸的合成规律研究[J]. 太阳能学报, 2014, 35(12):2559-2564.
- [20] 李喜明, 赵永腾, 余旭亚. 褪黑素调控氮胁迫下单针藻中油脂积累的影响[J]. 食品与发酵工业, 2019, 45(2):39-44.
- [21] 李涛, 许瑾, 吴华莲, 等. 不同氮浓度对一株产油绿球藻生长、脂类积累及脂肪酸分布的影响[J]. 生物技术通报, 2018, 34(5):154-162.
- [22] 冯迪娜, 艾江宁, 刘亚男, 等. 含氮类培养基对海洋微藻 *Isochrysis zhanjiangensis* 油脂与碳水化合物积累的影响[J]. 中国生物工程杂志, 2011, 31(10):29-34.
- [23] 姚长洪, 褚亚东. 微藻淀粉积累调控研究进展[J]. 科技广场, 2017(9):15-20.
- [24] ZHU S N, WANG Y J, HUANG W, et al. Enhanced accumulation of carbohydrate and starch in *Chlorella zofingiensis* induced by nitrogen starvation [J]. *Appl Biochem Biotechnol*, 2014, 174:2435-2445.
- [25] XIE W H, PANG F, NIU Y F, et al. Functional characterization of an ACCase subunit from the diatom *Phaeodactylum tricornutum* expressed in *Escherichia coli* [J]. *Biotechnol Appl Biochem*, 2013, 60(3):330-335.
- [26] KLAUS D, OHLROGGE J B, NEUHAUS H E, et al. Increased fatty acid production in potato by engineering of acetyl-CoA carboxylase [J]. *Planta*, 2004, 219(3):389-396.
- [27] PICK U, AVIDAN O. Triacylglycerol is produced from starch and polar lipids in the green alga *Dunaliella tertiolecta* [J]. *J Exp Bot*, 2017, 68(17):4939-4950.
- [28] 栾国栋, 吕雪峰. 蓝藻光驱固碳合成乙醇技术的发展回顾和未来展望[J]. 生物产业技术, 2018(4):68-73.
- [29] 李林, 王钦宏, 杨海麟, 等. 微藻 (*Chlorella sorokiniana*) 的转录组分析: 油脂生物合成相关的途径解析和基因挖掘[J]. 微生物学报, 2014, 54(9):1010-1021.
- [30] 刘军立, 红凌. 基于转录组数据分析杜氏盐藻能量代谢途径[J]. 武汉大学学报(理学版), 2018, 64(1):85-94.
- [31] TANG X J, PENG C, ZHANG J, et al. ADP-glucose pyrophosphorylase large subunit 2 is essential for storage substance accumulation and subunit interactions in rice endosperm [J]. *Plant Sci*, 2016, 249:70-83.