

生物工程

基因组改组技术快速提高拟微绿球藻油脂含量

刘红全, 袁莎, 卢雨欣, 潘艺华, 杨海燕, 龙寒, 禰金彩, 何秀苗

(广西民族大学海洋与生物技术学院, 广西多糖材料与改性重点实验室(培育基地), 微生物与植物资源利用广西高校重点实验室, 南宁 530007)

摘要:以拟微绿球藻(*Nannochloropsis oculata*)为原始藻株, 经过紫外线和甲基磺酸乙酯分别诱变处理, 获得5株油脂含量有所提高的出发藻株。以PEG作为融合剂, 对获得的5株出发藻株进行两轮递进式原生质体融合, 筛选到遗传稳定的改组藻株F2N2和F2N4, 其油脂含量分别达到55.32%与57.75%, 较原始藻株分别提高了69.07%与76.50%。对拟微绿球藻的原始藻株和改组藻株的油脂脂肪酸组成及含量进行分析, 结果表明改组前后拟微绿球藻的油脂脂肪酸组成变化不大, 但脂肪酸含量有较大差别。

关键词:基因组改组; 拟微绿球藻; 油脂含量

中图分类号: Q81; TK6

文献标识码: A

文章编号: 1003-7969(2018)02-0115-05

Genome shuffling for rapid improvement of lipid content of *Nannochloropsis oculata*LIU Hongquan, YUAN Sha, LU Yuxin, PAN Yihua, YANG Haiyan,
LONG Han, XUAN Jincai, HE Xiumiao

(Guangxi Colleges and Universities Key Laboratory of Utilization of Microbial and Botanical Resources, Guangxi Key Laboratory Cultivation Base for Polysaccharide Materials and Modification, College of Ocean and Biotechnology, Guangxi University for Nationalities, Nanning 530007, China)

Abstract: *Nannochloropsis oculata* as original strain was mutated by UV-light and EMS separately, and five mutant strains with high lipid content were selected. Two rounds of genome shuffling were carried out with the five mutant strains to mediate protoplasts fusion using PEG as fusogen. Finally, the *Nannochloropsis oculata* F2N2 and F2N4 were selected, and their lipid contents were 55.32% and 57.75%, respectively, higher than the original strain by 69.07% and 76.50%. Compared with the original strain in the same batch, the fatty acid composition of the *Nannochloropsis oculata* F2N2 lipid and F2N4 lipid didn't change a lot, but there was a big gap among fatty acid content.

Key words: genome shuffling; *Nannochloropsis oculata*; lipid content

微藻油脂是合成生物柴油的良好原料, 是理想的可再生能源。目前, 限制微藻产业化的主要障碍是养殖效率远低于理论预期, 成本较高。成本主要来自于大规模培养的过程和收获加工的制备过

程^[1-2]。为进一步降低成本, 需要获得产油率更高的藻株, 使油脂达到最大程度富集。藻类育种目前多采用杂交育种、随机突变方法和基因定向诱变筛选技术^[3]。但这些方法或是存在周期长、操作技术繁杂的缺点, 或是在连续多次诱变过后, 易出现性状无法提升的“疲劳效应”。基因组改组的育种方式可以有效解决上述缺陷, 为育种改良提供了一种全新的策略。2002年, Maxygen公司利用基因组改组技术快速提高细菌表型和提高乳杆菌耐酸性的研究文章, 引起了生物工业界的广泛关注^[4-5]。这一技术是分子定向进化在全基因组水平上的延伸, 将改

收稿日期: 2017-06-02; 修回日期: 2017-11-13

基金项目: 国家自然科学基金(30960215); 广西自然科学基金(桂科青0728019); 广西民族大学相思潮青年学者创新团队资助项目

作者简介: 刘红全(1975), 男, 副教授, 博士, 主要从事生物化学及遗传学的教学和科研工作(E-mail) lhongquan@163.com。

组的对象从单个基因扩展到整个基因组。与其他分子育种技术相比,基因组改组技术不需要昂贵的仪器设备,花费少,操作简单,具有强大的生命力。基因组改组技术已有一些成功应用的报道^[6-8]。拟微绿球藻生长速度快,油脂含量高,脂肪酸组成简单,是微藻生物柴油理想藻种之一。因此,本研究拟采用基因组改组技术提高拟微绿球藻的油脂含量。

1 材料与方法

1.1 实验材料

拟微绿球藻(*Nannochloropsis oculata*)购自上海光语公司。将微藻按照 10% 的接种量培养于含 250 mL F/2 培养基的 500 mL 三角瓶中。人工气候箱的培养条件为光照强度 3 500 lx,暗光周期为 12 h/12 h,培养温度为(24 ± 1) °C,每日摇动 3 ~ 4 次。

甲基磺酸乙酯(EMS)、半纤维素酶、崩溃酶等购自美国 Sigma 公司;其他试剂均为分析纯。

再生培养基:向新鲜的 F/2 海水培养基中添加 0.2 mol/L 甘露醇,固体培养基另加 0.8% ~ 1.0% 的琼脂。

1.2 实验方法

1.2.1 候选藻库的建立

取对数生长期的藻液,参照文献分别进行 UV 诱变^[9]和 EMS 诱变^[10],并计算不同处理条件下的致死率。将诱变后的藻液用 F/2 培养基稀释至 10 000 个/mL 藻细胞后涂布于培养基上,置于人工气候箱中培养。待平板上长出均匀的微藻藻落时,用 1 μg/L 的尼罗红喷染,暗培养 24 h 后在荧光显微镜下观察藻类染色情况,挑取荧光强度大的单藻落接种到 F/2 培养基中,扩大培养后,再按照 10% 的接种量于含 250 mL F/2 培养基的 500 mL 三角锥形瓶中培养,待到指数生长末期采用 Blight 等^[11]的方法提取油脂,测定油脂含量,进行复筛。经过诱变筛选及 6 代稳定性验证后,选取油脂含量高的突变株建立基因组改组候选藻库。

1.2.2 原生质体制备

拟微绿球藻原生质体的制备在酶处理液的选择上参照 Chen 等^[11]的方法。取对数生长期的拟微绿球藻 8 000 r/min 离心 10 min,用灭菌的去离子水洗 2 ~ 4 次,以保证细胞表面无盐离子和其他杂质影响原生质体的制备。用无菌 PBS 缓冲液悬浮细胞将藻细胞调整至 2 × 10⁷ 个/mL。调节藻液的 pH,在 pH 为 4.5、5.5 和 6.5 的藻细胞液中加入终质量浓度为 0.04 g/mL 的半纤维素酶和 0.02 g/mL 的崩溃酶溶液,避光在 35 °C 条件下以 150 r/min 轻微振

荡孵育。在酶处理 6 h 后取样,采用低渗爆破法^[12]吸取原生质体悬液,分别用高渗溶液与去离子水悬浮,静置 60 min 后计数,计算原生质体制备情况。确定最适 pH 后,调节藻液的 pH 为最适 pH,加入终质量浓度为 0.04 g/mL 的半纤维素酶和 0.02 g/mL 的崩溃酶溶液,分别在酶解 0.5、1、2、4、6 h 和 8 h 后取样,按下式计算原生质体制备率。

原生质体制备率 = (高渗溶液中细胞数 - 低渗溶液中细胞数) / 高渗溶液中细胞数 × 100%

1.2.3 基因组改组

以候选藻库的藻株作为基因组改组的第一轮藻株,制备原生质体。采用质量浓度为 0.3 g/mL 的 PEG600 进行原生质体融合。融合后的藻液经稀释后涂布于再生培养基平板上,待长出藻落后进行初筛和复筛,所得油脂含量提高的藻株作为下一轮基因组改组的亲本。

1.2.4 遗传稳定性检测

将筛选得到的改组藻株连续转接 6 代,比较第一代与第六代的油脂含量,观察是否能够稳定遗传。

1.2.5 藻株生长曲线的测定与油脂脂肪酸组成分析

将微藻按照 10% 的接种量扩大培养于含 250 mL 培养基的 500 mL 三角锥形瓶中,测定其不同生长时期的 680 nm OD 值。在指数末期收集藻粉冷冻干燥。提取油脂,进行甲酯化处理后,进行气相色谱分析。

单位体积油脂含量 = $\rho \times \omega$

单位体积油脂产率 = $\rho \times \omega / t$

式中: ρ 为单位体积干藻粉的质量, g/L; ω 为干藻粉的总脂含量; t 为培养时间, d。

气相色谱条件参照文献^[13]:载气为高纯度氮气;柱初温 72 °C,保温 1 min,以 30 °C/min 升温速率升至 150 °C,保持 5 min,以 10 °C/min 升温速率升至 250 °C,保温 5 min;进样口温度 280 °C,流速 30 mL/min,进样量 1 μL。

2 结果与分析

2.1 候选藻库的构建

尼罗红作为一种亲脂类荧光染料,与脂类物质结合后在荧光照射后能发出红色或橙色荧光。通过测定尼罗红染色后的荧光强度能判断其细胞中的油脂含量。将藻液进行尼罗红染色,观察细胞中的荧光强度,筛选出优势藻株。

经过紫外诱变和 EMS 诱变共筛选出 7 株正向突变的诱变藻株,进行遗传稳定性分析,结果见图 1。

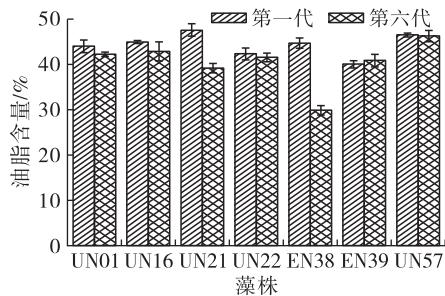


图1 拟微绿球藻高产诱变株遗传稳定性分析

由图1可知,根据SPSS软件分析结果,UN01、UN16、UN22、EN39与EN57这5株拟微绿球藻突变藻株第一代与第六代的油脂含量变化不显著($P > 0.05$),遗传稳定性良好,与拟微绿球藻原始藻株(油脂含量为32.72%)相比,分别提高了34.50%、37.35%、29.45%、22.27%和42.15%。因此,选择这5株诱变株作为拟微绿球藻基因组改组的出发藻株。

2.2 原生质体制备条件的研究

2.2.1 pH对原生质体制备的影响

pH是影响原生质体制备的重要环境因素之一。由于藻种细胞内环境的差异,造成酶溶解细胞壁所需的最适pH也存在差异^[13]。同时,pH过低或过高都会影响到酶的活性,也会对细胞膜的完整性造成影响^[14-16]。pH对拟微绿球藻原生质体制备的影响结果见图2。由图2可知,在pH为5.5时制备的拟微绿球藻的原生质体制备率最高。

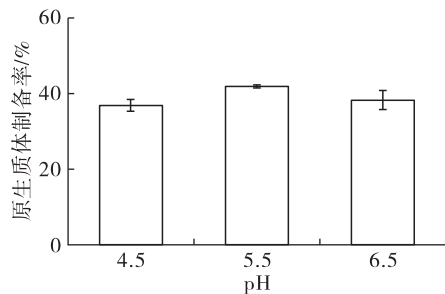


图2 不同pH处理条件下原生质体制备率

2.2.2 酶解时间对原生质体制备的影响

不同的酶解时间是制约原生质体制备率的关键因素。对同一细胞密度的藻细胞,酶解时间过短或过长都会降低原生质体的制备率,因此制备原生质体时必须选取合适的酶解时间。酶解时间对原生质体制备的影响结果见图3。由图3可知,拟微绿球藻在酶解时间2h时原生质体制备率最大。随着酶解时间的延长,原生质体死亡率降低,但过长的酶解时间导致已制备好的原生质体破裂死亡,因此选择2h酶解时间为拟微绿球藻原生质体最佳制备时间。

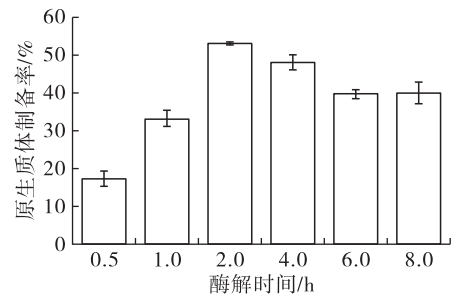


图3 不同酶解时间条件下原生质体制备率

2.3 改组藻株的筛选

以候选藻库中的5株藻株为出发藻株,进行第一轮改组。得到6株油脂含量进一步提升的藻株,结果见图4。由图4可知,经遗传稳定性检测,拟微绿球藻第一轮融合藻株F1N3、F1N4和F1N6的遗传稳定性良好,而另外3株藻株在多次传代后会分离成亲本类型,其优良性状消失。

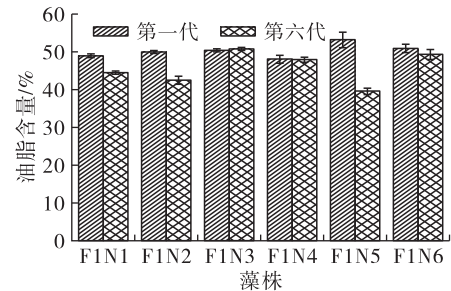


图4 拟微绿球藻第一轮高产优质藻株遗传稳定性分析

以第一轮改组获得的3株菌株为出发藻株进行第二轮基因组改组,结果获得6株油脂含量有所提高藻株,结果见图5。由图5可知,F2N5、F2N6的油脂含量较高,分别为65.11%和67.66%,其次是F2N1、F2N3和F2N4,油脂含量分别为56.90%、57.76%和57.85%,最后为F2N2,油脂含量为53.53%。

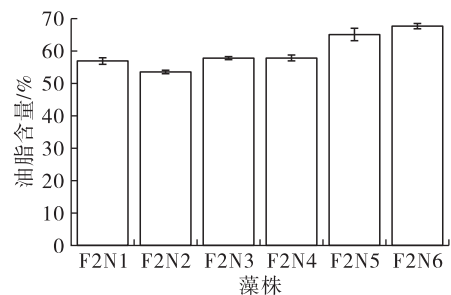


图5 拟微绿球藻第二轮改组筛选结果

2.4 基因组改组菌的遗传稳定性分析

将拟微绿球藻的第二轮改组之后的藻株进行连续传代培养,在指数生长期末期离心提取油脂并测定油脂含量,检测其遗传稳定性,结果见图6。

由图6可知,拟微绿球藻第二轮融合藻株F2N2和F2N4的遗传稳定性良好,油脂含量分别达到55.32%和57.75%,而F2N1、F2N3、F2N5和F2N6

则在多次传代后分离成亲本类型,其优良性状消失。

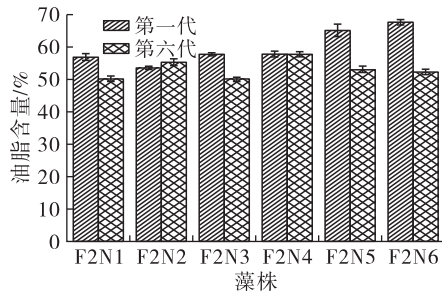


图6 拟微绿球藻第二轮高产优质藻株遗传稳定性分析

2.5 藻株生长曲线、单位体积油脂含量、单位体积油脂产率的测定(见图7~图9)

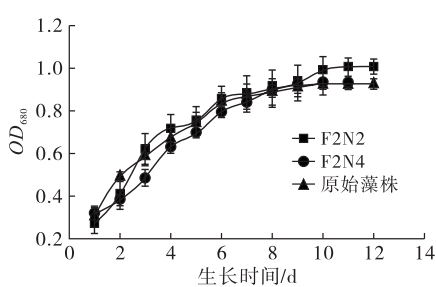


图7 拟微绿球藻改组和原始藻株的生长曲线

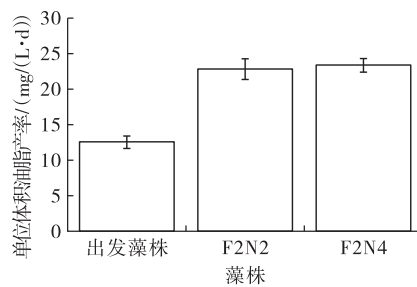


图8 拟微绿球藻出发藻株与F2N2、F2N4的单位体积油脂产率

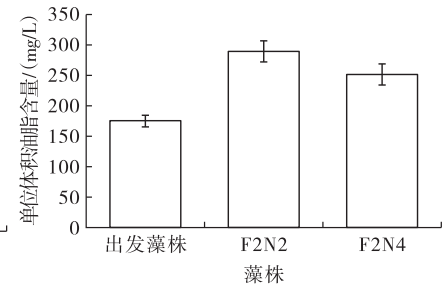


图9 拟微绿球藻出发藻株和F2N2、F2N4的单位体积油脂含量

2.6 油脂脂肪酸组成分析(见图10)

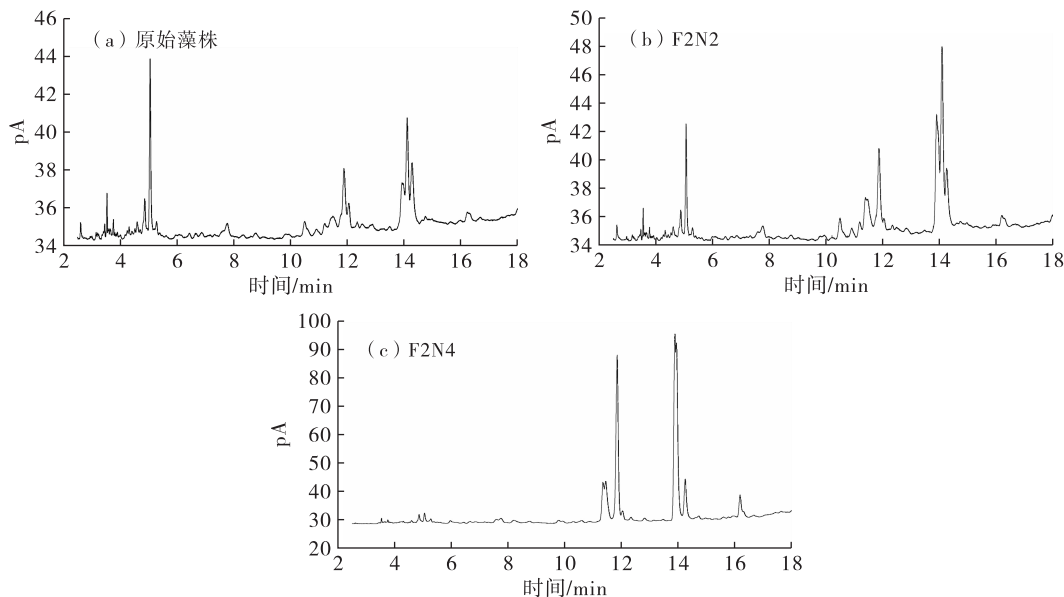


图10 拟微绿球藻原始藻株(a)与改组藻株F2N2(b)、F2N4(c)的气相色谱图

由图10可以看出,改组前后的藻株气相色谱图的峰形以及出峰时间没有变化,说明改组前后的拟微绿球藻的油脂脂肪酸组成没有变化。由于改组前后气相色谱图的峰高有差异,说明改组藻株和原始藻株油脂的脂肪酸含量有很大变化。

3 讨论

利用基因组改组技术获得高产油脂的拟微绿球

藻藻株的关键是富油微藻筛选方法,本研究采用了多种诱变方式结合尼罗红荧光染色法对微藻进行初步产油鉴定,从而获得了大量的正向突变库。

基因组改组的核心是原生质体融合,海藻基因工程发展缓慢主要是因为其原生质体的制备不能通过高等植物标准的制备方法获得。最初采用机械法制备原生质体,制备出的原生质体产量低、活性差,

后来酶解法逐渐取代该法。自 Nagata 用烟草原生质体培育出可再生植株,植物原生质体的培育研究便广泛兴起^[17]。拟微绿球藻的细胞壁绝大多数是纤维素,酶解之后得到 98% 的葡萄糖,可以用纤维素酶和多糖降解酶酶解细胞壁从而获得原生质体^[18]。

原生质体在自然环境下也会发生融合现象,但融合率很低。为了提高原生质体融合率,本研究采用 PEG 融合法诱导原生质体融合。该方法具有容易制备和操作的特点,缺点是处理时间和诱导液的浓度等不易掌握,且易形成多元融合物^[19]。本研究采用质量浓度为 0.3 g/mL 的 PEG,处理时间 30 min,之后用高 Ca^{2+} 、高 pH 洗涤液促进原生质体融合。

4 结论

以拟微绿球藻突变株 UN01、UN16、UN22、EN39 与 EN57 为出发藻株进行基因组改组,选育出了拟微绿球藻高产油脂藻株 F2N2 与 F2N4,其油脂含量分别达到 55.32% 与 57.75%,较原始藻株分别提高了 69.07% 与 76.50%。

参考文献:

- [1] MIAO X L, QING Y W. Exploitation of biomass renewable energy sources of microalgae[J]. *Renew Energ*, 2003, 21(3):13-16.
- [2] BARCLAY W R, MEAGER K M, ABRIL J R. Heterotrophic production of long chain ω -3 fatty acids utilizing algae and algae-like microorganisms[J]. *J Appl Phycol*, 1994, 6(2):123-129.
- [3] CHISTI Y. Biodiesel from microalgae[J]. *Biotechnol Adv*, 2007, 25(3):294-306.
- [4] ZHANG Y X, PERRY K, VINCI V A, et al. Genome shuffling leads to rapid phenotypic improvement in bacteria[J]. *Nature*, 2002, 415:644-646.
- [5] PATNAIK R, LOUIE S, GAVRILOVIC V, et al. Genome shuffling of *Lactobacillus* for improved acid tolerance[J]. *Nat Biotechnol*, 2002, 20(7):707-712.
- [6] ZHANG G Q, LIN Y P, QI X N, et al. Genome shuffling of the nonconventional yeast *Pichia anomala* for improved sugar alcohol production[J]. *Microb Cell Fact*, 2015, 14(1):112.
- [7] GONG J, ZHENG H J, WU Z J, et al. Genome shuffling: progress and applications for phenotype improvement[J]. *Biotechnol Adv*, 2009, 27(6):996-1005.
- [8] 王灏,王航,孟春,等. 基因组改组技术选育耐高温、耐高乙醇酿酒酵母菌株的研究[J]. *微生物学通报*, 2007, 34(4):705-708.
- [9] 张学成,时艳侠,孟振. 小球藻紫外线诱变及高产藻株筛选[J]. *中国海洋大学学报(自然科学版)*, 2007, 37(5):749-753.
- [10] 刘红全,林小园,潘艺华. 小球藻的甲基磺酸乙酯诱变及产 EPA 的条件研究[J]. *广西植物*, 2016, 36(3):355-360.
- [11] CHEN H L, LI S S, HUANG R, et al. Conditional production of a functional fish growth hormone in the transgenic line of *Nannochloropsis oculata* (Eustigmatophyceae) [J]. *J Phycol*, 2008, 44(3):768-776.
- [12] SIVAN A, MOPPES D V, ARAD S. Protoplast production from the unicellular red alga *Porphyridium* sp. (UTEX 637) by an extracellular bacterial lytic preparation[J]. *Phycologia*, 1992, 31(3/4):253-261.
- [13] LIANG Y, BEARDALL J, HERAUD P. Effects of nitrogen source and UV radiation on the growth, chlorophyll fluorescence and fatty acid composition of *Phaeodactylum tricorutum* and *Chaetoceros muelleri* (Bacillariophyceae) [J]. *J Photoch Photobio B*, 2006, 82(3):161-172.
- [14] TAKEDA H. Sugar composition of the cell wall and the taxonomy of *Chlorella* (Chlorophyceae) [J]. *J Phycol*, 1991, 27(2):224-232.
- [15] ROSEN B H, BERLINER M D, PETRO M J. Protoplast induction in *Chlorella pyrenoidosa* [J]. *Plant Sci*, 1985, 41(1):23-30.
- [16] 马晓磊,张琳,杨官品. 微拟球藻原生质体制备与再生[J]. *海洋科学*, 2012, 36(2):19-23.
- [17] YAMADA T, SAKAGUCHI K. Comparative studies on *Chlorella* cell walls: induction of protoplast formation[J]. *Arch Microbiol*, 1982, 132(1):10-13.
- [18] NAGATA T, TAKEBE I. Plating of isolated tobacco mesophyll protoplasts on agar medium[J]. *Planta*, 1971, 99(1):12-20.
- [19] 王幼平,张莉莉,吴晓霞. 原生质体融合[J]. *生物学通报*, 2009, 44(8):7-9.