



RNA干扰20S蛋白酶体 α 亚基基因对莱茵衣藻油脂代谢的影响

李兴涵, 费小雯, 李亚军, 邓晓东

引用本文:

李兴涵, 费小雯, 李亚军, 等. RNA干扰20S蛋白酶体 α 亚基基因对莱茵衣藻油脂代谢的影响[J]. 热带亚热带植物学报, 2020, 28(4): 329–338.

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.11926/jtsb.4165>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

毛竹APX家族基因鉴定和表达分析

Identification and Expression Analysis of the APX Gene Family in *Phyllostachys edulis*

热带亚热带植物学报. 2020, 28(3): 255–264 <https://doi.org/10.11926/jtsb.4155>

UV-B预处理诱导拟南芥耐旱性的提高

UV-B-induced Drought Tolerance Improvement in *Arabidopsis thaliana*

热带亚热带植物学报. 2020, 28(2): 171–176 <https://doi.org/10.11926/jtsb.4104>

云南木兰科48种野生植物资源的遗传多样性研究

Studies on Genetic Diversity of 48 Wild Species of Magnoliaceae in Yunnan

热带亚热带植物学报. 2020, 28(3): 277–284 <https://doi.org/10.11926/jtsb.4161>

宁前胡内生真菌*Fusarium tricinctum*固体发酵代谢产物研究

Metabolites of *Fusarium tricinctum*, An Endophytic Fungus Isolated from Ningguo *Peucedanum praeruptorum* on Solid Fermentation

热带亚热带植物学报. 2020, 28(2): 203–208 <https://doi.org/10.11926/jtsb.4135>

拟南芥6个突变体热敏感性差异的比较分析

Comparison of Thermo-sensitivity among Six Mutants of *Arabidopsis thaliana*

热带亚热带植物学报. 2020, 28(3): 285–291 <https://doi.org/10.11926/jtsb.4147>

RNA 干扰 20S 蛋白酶体 α 亚基基因对莱茵衣藻油脂代谢的影响

李兴涵¹, 费小雯², 李亚军¹, 邓晓东^{1*}

(1. 中国热带农业科学院热带生物技术研究所, 海南省海洋生物资源功能性成分研究与利用重点实验室, 海口 571101; 2. 海南医学院基础医学与生命科学学院, 海口 571199)

摘要: 为了解 20S 蛋白酶体 α 亚基(20S proteasome alpha subunit A, POA1)基因对莱茵衣藻(*Chlamydomonas reinhardtii*)油脂代谢的调控, 对莱茵衣藻 CC425 在低氮胁迫下的 *CrPOA1* 表达进行了分析, 克隆 *POA1* 同源基因片段, 构建 pMaa7IR/XIR 干扰载体并转化莱茵衣藻 CC425, 对 *CrPOA1* 进行有效沉默, 测定转基因藻株细胞干质量和油脂含量; 克隆全长基因, 构建 *CrPOA1*-GFP 融合表达载体并转化洋葱表皮细胞, 进行亚细胞定位。结果表明, 莱茵衣藻在低氮培养下, *CrPOA1* mRNA 水平比对照(正常培养)显著降低($P < 0.01$), RNAi 转基因藻株 *CrPOA1* mRNA 水平比对照 pMaa7IR/XIR (*maa7*)降低 79.36% ~ 85.35%, 沉默效果较好; RNAi 转基因藻株细胞干质量与对照 *maa7* 无显著差异, 油脂含量比对照 *maa7* 显著降低 6.38% ~ 24.63%, *CrPOA1* 正向调控莱茵衣藻油脂; 亚细胞定位于细胞核。这表明 *CrPOA1* 参与了莱茵衣藻的油脂代谢过程。

关键词: 莱茵衣藻; 20S 蛋白酶体 α 亚基; RNA 干扰; 油脂; 亚细胞定位

doi: 10.11926/jtsb.4165

Effect of RNA Interference 20S Proteasome α Subunit A Gene on Lipid Metabolism in *Chlamydomonas reinhardtii*

LI Xing-han¹, FEI Xiao-wen², LI Ya-jun¹, DENG Xiao-dong^{1*}

(1. Institute of Tropical Bioscience and Biotechnology, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Hainan Provincial Key Laboratory for Functional Components Research and Utilization of Marine Bio-resources, Haikou 571101, China; 2. School of Basic Medicine and Life Science, Hainan Medical College, Haikou 571199, China)

Abstract: To understand the regulation of 20S proteasome α subunit A (POA1) gene on lipid metabolism in *Chlamydomonas reinhardtii*, the expression of *CrPOA1* in *C. reinhardtii* were analyzed by qRT-PCR under low nitrogen conditions. The fragment of *CrPOA1* in *C. reinhardtii* CC245 was cloned, and then was used to construct a *CrPOA1* RNA interference vector and transferred into *C. reinhardtii*. The cell dry weight and lipid content of transgenic algae strains was measured. The CDs sequence was cloned. The fusion expression vector of *CrPOA1*-GFP was constructed and transformed into onion epidermal cells for subcellular localization. The results showed that *CrPOA1* mRNA level of *C. reinhardtii* in low nitrogen culture was significantly decreased than that in normal culture ($P < 0.01$). The *CrPOA1* mRNA level of RNAi transgenic algae was significantly decreased by 79.36% - 85.35%. The cell dry weight of *CrPOA1* RNAi transgenic algae was not significantly different from the

收稿日期: 2019-10-16 接受日期: 2020-01-01

基金项目: 海南省重点科技计划(ZDYF2018124); 农业农村部财政专项资金(NFZX2018); 国家自然科学基金项目(31870344); 中国热带农业科学院基本科研业务费专项资金(19CXTD-32, 1630052018001); 中国热带农业科学院热带生物技术研究所基本科研业务费专项资金(1630052016009)资助

This work was supported by the Program for Key Science and Technology of Hainan Province (Grant No. ZDYF2018124), the Special Program of Ministry of Agriculture and Rural of China (Grant No. NFZX2018), the National Natural Science Foundation of China (Grant No. 31870344), the Special Project for Basic Research of Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences (Grant No. 19CXTD-32, 1630052018001), and the Special Project for Basic Research of Institute of Tropical Biotechnology, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences (Grant No. 1630052016009).

作者简介: 李兴涵(1986-), 男, 硕士, 研究实习员, 主要从事微藻生理生化及开发。E-mail: xingh_li14@163.com

* 通信作者 Corresponding author. E-mail: xiaodong9deng@hotmail.com

control (maa7). The lipid content was significantly decreased by 6.38%–24.63% compared with the control (maa7). The *CrPOA1* might local in nucleus. So, it was suggested that *CrPOA1* could be involved in lipid metabolism of *C. reinhardtii*.

Key words: *Chlamydomonas reinhardtii*; 20S proteasome α subunit A; RNA interference; Lipid; Subcellular localization

随着全球经济与科技的不断发展,人类对石油等化石燃料的需求不断增加,造成全球气候变暖、环境污染等问题日趋严重,寻求更加安全,更加环保的能源已经成为各国关注的焦点^[1]。生物柴油的生产主要是通过动植物油脂与甲醇(或乙醇)经过酯交换反应得到的脂肪酸甲酯或者脂肪酸乙酯,是有望替代石油的可再生清洁能源^[2]。微藻因其生长速度快,生长周期短,含油量高,不占用耕地等优点,在生产生物柴油方面有着无法比拟的优越性^[3]。

微藻生物柴油研究的热点是“产油微藻的筛选”、“微藻油高产策略”、“缺氮诱导微藻油脂”。目前,提高微藻产油率的方法主要有优化微藻的培养条件^[4]、改变微藻的培养方式^[5]、微藻诱变^[6]和基因工程技术定向改造微藻代谢途径^[7],有研究表明对微藻细胞内的一些代谢关键酶基因进行改造可以促进细胞内油脂的积累^[8–10],因此对微藻油脂合成及调控机理研究,对基因改造微藻具有重要的意义。

生物体内蛋白质降解的主要途径除了溶酶体途径,还有泛素-蛋白酶体途径(ubiquitin-proteasome pathway, UPP)。UPP 水解过程由蛋白泛素化和蛋白质水解两部分组成。26S 蛋白酶体是真核细胞内降解泛素化底物的一个 ATP 依赖型水解复合体,是细胞内蛋白质水解的主要部位。在结构上可以分为 20S 核心颗粒(core protease, CP)和 19S 调节颗粒(regulatory particle, RP),CP 是 26S 蛋白酶体的水解中心,由两个外环 α 和两个内环 β 堆叠而成的一个空心圆柱体样结构,每层环由 7 个亚基组成,CP 圆柱体空心结构中心的 2 个 β 环是其活性位点,含有胰蛋白酶、糜蛋白酶和谷氨酰胺样肽水解活性,能够使大多数肽键断裂^[11]。研究证实蛋白酶体与多种疾病有密切的关系,其可以通过水解,间接调控细胞分裂、细胞凋亡、信号转导,以及蛋白跨膜定位^[12–14]。

大量文献报道,在能源和碳源充足的情况下,逆境条件诱导微藻油脂的积累,其中这些条件有营养元素的缺乏,例如氮、硫、磷、铁、硅等,温度升高等^[15–17]。其中缺氮诱导中性脂积累最为显著。

其主要原因是氮是酶、膜等细胞大分子的重要组成部分,氮胁迫会影响细胞的分裂和增值,同时营养缺陷促使非脂类物质向脂类转化、微藻油脂积累。微藻的三酰甘油(TAG)途径与高等植物十分相似^[18],可以为微藻的初始研究提供了一个相对成熟的代谢通路框架,但是微藻作为单细胞生物和高等植物有很大的区别,其次在藻细胞中也存在很多的旁路代谢途径^[18–19],对于微藻油脂合成及调控相关基因的挖掘对于揭示微藻油脂代谢网络具有重要意义。因此,本实验室通过莱茵衣藻(*Chlamydomonas reinhardtii*)氮胁迫基因数字表达谱挖掘筛选油脂代谢调控相关的基因,莱茵衣藻在缺氮培养下 *CrPOA1* mRNA 水平大幅度降低^[20],而莱茵衣藻在缺氮诱导下中性油脂积累增加,莱茵衣藻 *POA1* 基因表达的异常是否与油脂的积累有关?本试验通过 RNAi 干扰技术和亚细胞定位技术研究 *POA1* 与莱茵衣藻油脂积累之间的关系,为高产油微藻基因工程改造提供科学证据。

1 材料和方法

1.1 材料

试验藻株 莱茵衣藻 (*Chlamydomonas reinhardtii*)细胞壁缺失型藻株 CC425 购于中国科学院水生生物研究所;培养条件:24℃,光照强度 110 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$,用 Tris-Acetate-Phosphate (TAP)固体培养基继代培养,液体培养时采用 50 mL Sueoka 高盐培养基(HSM),在 24℃,光照强度 110 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 下 200 r/min 振荡培养。大肠杆菌 DH5 α (本实验室保存)用于载体构建,采用 LB 培养基于 37℃,220 r/min 下振荡培养。

抗生素终浓度 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 氨苄青霉素(ampicillin); 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 硫酸卡那霉素(kanamycin monosulfate); 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 巴龙霉素(paromomycin); 5 mmol/L 5-氟吲哚(5-fluoroindol); 1.5 mmol/L L-色氨酸; 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 尼罗红(nile red)。

载体 RNAi 干扰载体 pMaa7/XIR (美国

Duke 大学衣藻中心)、pT282 载体(本实验室构建)、pMD18-T [宝生物工程(大连)有限公司]。

试剂和试剂盒 M-MLV 反转录酶、荧光定量试剂、限制性内切酶均购置于宝生物工程(大连)有限公司; 总 RNA 提取试剂(Trizol)、Taq DNA 聚合酶、T4 DNA 连接酶、PCR 产物纯化试剂盒、质粒小量抽提试剂盒、胶回收试剂盒等均购自生工生物工程(上海)股份有限公司。

1.2 莱茵衣藻缺氮培养下 *CrPOA1* 表达分析

莱茵衣藻培养至对数生长期, 于 $3\ 500\times g$ 下离心 5 min 收集藻细胞, HSM-N 培养基洗藻细胞 3 次, 重新悬浮后接种于 HSM-N 培养基连续培养 4 d, 取样液氮速冻研磨后按照 Trizol 总 RNA 抽提试剂盒抽提总 RNA。按照 MMLV 反转录试剂盒合成 cDNA。按照 SYBR[®]Premix Ex Taq[™] II 试剂盒说明书进行基因表达量检测。以莱茵衣藻 18S rRNA 基因作为内参基因, 采用 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 法进行相对定量计算, 采用 SPSS 22.0 进行显著性分析, 用 Origin 2019 64bit 作图。

1.3 *CrPOA1* 基因扩增和 RNAi 载体构建

将莱茵衣藻 CC425 接种到 50 mL TAP 培养基, 培养 2~3 d 至对数生长期, 于 $3\ 500\times g$ 下离心 5 min 收集藻细胞, 莱茵衣藻总 RNA 的抽提参照改良 Trizol 法^[21]。参照 M-MLV 反转录试剂盒合成 cDNA。根据 Phytozome *Chlamydomonas reinhardtii* V5.5 数据库公布的 *CrPOA1* (*Cre17.g705400*) 序列, 设计干涉片段的特异性引物, 以 cDNA 为模板, PCR 扩增

干涉片段。插入 pMD18-T 载体, 得到载体 pMD-*CrPOA1*。RNAi 载体构建参照李兴涵等^[22]的方法, 分别用 *Hind* III/*Bam* H I 和 *Xba* I/*Sal* I 双酶切质粒 pMD-*CrPOA1*, 得到 *CrPOA1* 正向片段和反向片段, 先将正向片段插入 pT282 载体 *Hind* III/*Bam* H I 位点, 再将反向片段插入含有正向片段的 pT282 载体, 到含有 *CrPOA1* 正反片段的 pT282 载体。*Eco*R I 酶切含有 *CrPOA1* 正反片段的 pT282 载体, 回收产物连接 *Eco*R I 酶切并去磷酸化的 pMaa7IR/*XIR* 载体, 得到 *CrPOA1* RNAi 干涉载体 Maa7IR/*CrPOA1*IR。

1.4 RNAi 转基因藻株构建

用 HSM 培养基把莱茵衣藻 CC425 培养至对数生长期, 于 $3\ 500\times g$ 下离心 5 min 收集藻细胞, 采用 Glass Beads 的方法^[23]转化莱茵衣藻。转化后将藻株转移至 50 mL 无菌离心管中, 于 24℃ 黑暗温育过夜。在 $3\ 500\times g$ 下离心 5 min 收集藻细胞, 添加 500 μ L TAP 培养基重悬, 涂布于含 L-色氨酸和 paromomycin 的 TAP 固体平板, 吹干后置于光照培养箱中培养 6~8 d。挑取单克隆, 接种到含 5-Fluoroindole 的 TAP 固体平板上复筛。采用 CTAB 法提取基因组 DNA, 根据载体正反向重复序列骨架, 用 Primer 5 设计特异性引物, PCR 扩增, 检测目标片段是否插入莱茵衣藻基因组 DNA 中。选取 CC425、*maa7* 转基因藻株和 3 个 *CrPOA1* RNAi 转基因藻株于 HSM 培养基培养 4 d, Trizol 试剂法提取藻株总 RNA, 反转录成 cDNA, 以 18S rRNA 基因做内参, 分析藻株 *CrPOA1* mRNA 水平。采用 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 法进行相对定量计算, 用 SPSS 22.0 进行显著性分析。

表 1 用于 PCR 扩增的引物

Table 1 Primers for PCR amplification

引物 Primer	序列 Sequence (5'~3')
RT-PCR	R: CCCCCTACTCTATAGTCGAT F: TCGCTGATGATGGTGAGGTA
RNAi	R: GATTTAAATGCCAGAAGGAG F: CGCGGTGAGCGCCGAACGG
18S	R: TCAACTTTCGATGGTAGGATAGTG F: CCGTGTGAGGATTGGTAATTT
FULL	R: CCCCCTACTCTATAGTCGAT F: TCGCTGATGATGGTGAGGTA
PKFULL	R: CATGCCATGGTGCAGGAGGCAGCG F: GGACTAGTATCGCGCTCGCTGATGATGGTGAGGTA

1.5 细胞干质量和油脂含量测定

在 HSM 培养基中将莱茵衣藻 CC425 培养至对数生长期, 于 $3\ 500\times g$ 下离心 5 min 收集藻细胞, 重悬后接种于 6 瓶 1 L 的 HSM 培养基中, 通气光照培养。取不同生长时长的莱茵衣藻 CC425, 用酶标

仪测定 490 nm 处的吸光值(OD), 取 1 L 藻液离心收集, 烘干后称量, 绘制 OD₄₉₀ 与细胞干质量的标准曲线。选取 3 个转基因藻株和 CC425, 接种于 50 mL HSM 培养基, 每天测定 OD₄₉₀, 绘制莱茵衣藻生长曲线。

将三酰甘油标样梯度稀释,用尼罗红染色,测定 575 nm 处的吸光值,绘制 OD₅₇₅ 与三酰甘油浓度的标准曲线,选取 3 个转基因藻株和 CC425,接种于 50 mL HSM 培养基,尼罗红染色后测定 OD₅₇₅,绘制莱茵衣藻油脂积累曲线。取培养 3~4 d 的藻液,用尼罗红染色 10 min,在荧光显微镜下观察藻细胞生长状态及油脂情况。

1.6 CrPOA1-GFP 融合表达载体的构建及亚细胞定位

根据 Phytozome 数据库公布的 *CrPOA1* (Cre17.g705400) 序列设计引物,PCR 扩增全长基因。回收产物,在 *CrPOA1* ORF 两端分别设计含有 *Nco* I 和 *Spe* I 位点的引物,PCR 扩增 *CrPOA1* 全长基因(去除终止密码子),PCR 产物经 *Nco* I 和 *Spe* I 双酶切后连接 pCAMBIA1302,转化大肠杆菌 DH5 α ,得到 *CrPOA1*-GFP 融合表达载体。基因枪法转化洋葱表皮^[24],黑暗培养 16 h 后在激光共聚焦显微镜蓝光 488 nm 激发光下观察 *CrPOA1*-GFP。

2 结果和分析

2.1 莱茵衣藻缺氮培养下 *CrPOA1* 表达分析

从图 1 可见,随着莱茵衣藻 CC425 在 HSM-N 连续培养时间的增加,*CrPOA1* mRNA 水平先升高后降低,与对照 HSM+N 相比,莱茵衣藻在 HSM-N 培养下的 *CrPOA1* mRNA 水平显著降低($P<0.01$),这说明 *CrPOA1* 可以响应低氮胁迫,与本实验室数字表达谱结果一致。

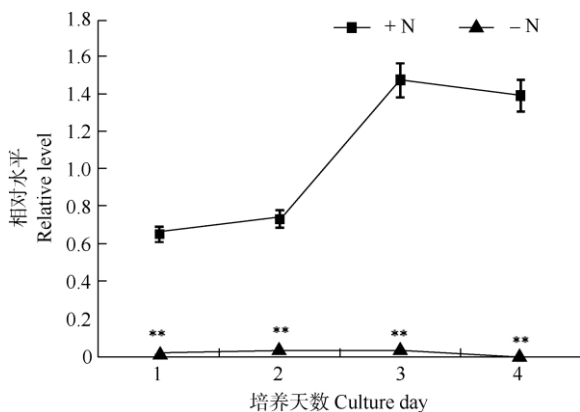


图 1 莱茵衣藻 CC425 在 HSM-N 培养下的 *CrPOA1* mRNA 水平。**: $P<0.01$ 。

Fig. 1 Level of *CrPOA1* mRNA of *Chlamydomonas reinhardtii* CC425 on HSM-N medium. **: $P<0.01$.

2.2 CrPOA1 生物信息学分析

克隆的 *CrPOA1* 基因全长 750 bp,经生物信息学分析,*CrPOA1* 编码含 249 个氨基酸残基的蛋白质,*CrPOA1* 分子式为 C₁₂₃₈H₁₉₄₇N₃₂₉O₃₇₁S₄,分子量 (MW) 为 27.51 kDa,功能预测为 20S 蛋白酶体的 α 亚基(20S proteasome α subunit A, POA1),理论等电点(PI)为 6.87,不稳定系数(II)为 24.91,属稳定蛋白质。脂肪系数 84.10,属亲水性蛋白质,无跨膜结构区,亚细胞定位于细胞核中。

2.3 CrPOA1 干涉片段的扩增

扩增的莱茵衣藻 20S 蛋白酶体 α 亚基同源基因 *POA1* 在 Phytozome 12 *Chlamydomonas reinhardtii* V 5.5 数据库(https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html#!info?alias=Org_Creinhartii) 的登录号为 Cre 17.g705400; GenBank 序列号为 XP_001691723.1。采用 MEGA 6.0 对 *POA1* 进行聚类分析(图 2),结果表明,*CrPOA1* 与已报道的团藻(*Volvox carterif*, XP_002949740)、胸状盘藻(*Gonium pectoral*, KXZ 50916) 的 *POA1* 进化关系较近。DNAMAN 氨基酸同源性分析表明,*CrPOA1* 与团藻和胸状盘藻的 *POA1* 氨基酸同源性分别为 95.60% 和 94.00%。

2.4 RNAi 载体构建及转基因藻株筛选

按照图 3: A 首先构建含有 *CrPOA1* 正反向干涉片段的 pT282 中间载体,将克隆的 *CrPOA1* 干涉片段(图 3: B)插入 pMD18-T,得到 pMD-*CrPOA1*,通过 *Hind* III、*Bam* H I 双酶切 pMD-*CrPOA1* 得到正向片段,插入 pT282 *Hind* III 和 *Bam* H I 位点,通过 *Xba* I 和 *Sal* I 双酶切 pMD-*CrPOA1* 得到反向片段,插入含正向片段 T282 载体的 *Xba* I 和 *Sal* I 位点,得到含有正反向干涉片段的中间载体 pT282,通过 *Eco* R I 酶切含正反向片段的 pT282 载体获得正反向结构片段,插入 pMaa7IR/*XIR* *Eco* R I 位点,得到 *CrPOA1* 干涉载体 pMaa7IR/*CrPOA1*IR (图 3: C)。

采用玻璃珠转化法转化莱茵衣藻 CC425,转化藻株长出后接种于 5-Fluorindole TAP 培养基进行复筛,提取基因组 DNA,PCR 检测表明 pMaa7IR/*CrPOA1*IR 已经成功整合到莱茵衣藻 CC425 基因组中(图 3: D)。

2.5 转基因藻株的基因表达

CrPOA1 mRNA 水平直接说明了 RNA 干扰的效

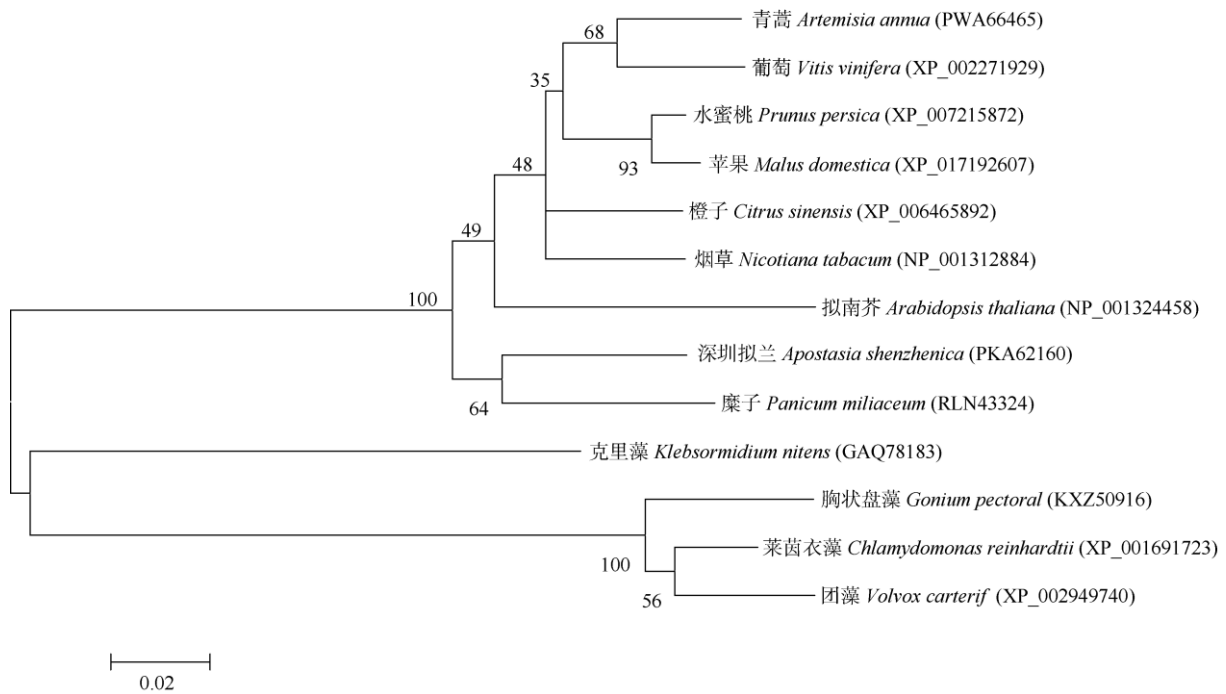


图 2 CrPOA1 与其他物种 POA1 的聚类分析

Fig. 2 Cluster analysis of CrPOA1 and POA1 in other species

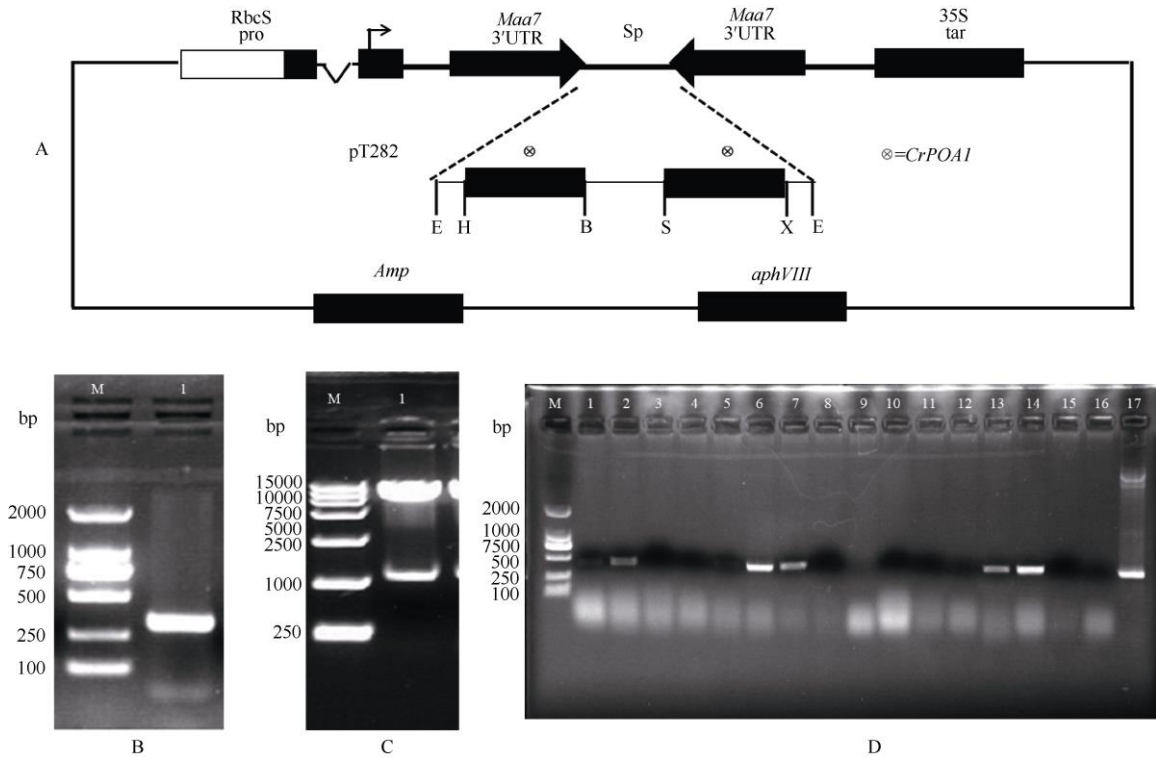


图 3 干涉载体构建和转基因莱茵衣藻筛选。A: pT282 载体和 pMaa7IR/XIR 载体, E: *EcoR* I, H: *Hind* III, B: *Bam*H I, S: *Sal* I, X: *Xba* I; B: M: Marker DL 2000, 1: *CrPOA1* 干涉片段; C: M: Marker DL 15000, 1: pMaa7 IR/*CrPOA1*IR *EcoR* I 酶切; D: M: Marker DL 2000, 1~17: 藻株。

Fig. 3 Construction of *CrPOA1* RNAi interference vector and screening of transgenic *Chlamydomonas reinhardtii*. A: pT282 vector and pMaa7IR/XIR vector, E: *EcoR* I, H: *Hind* III, B: M: Marker DL 2000, 1: Interference fragment of *CrPOA1*; C: M: Marker DL 15000, 1: C: Digestion pMaa7 IR/*CrPOA1*IR by *EcoR* I; D: M: Marker DL2000, 1~17: Algal strains.

果, 从图 4 可见, 3 个 RNAi 转基因藻株 RNAi-1、RNAi-2 和 RNAi-3 的 *CrPOA1* mRNA 水平比对照 *maa7* 显著降低, 分别降低了 85.35%、84.214% 和 79.36%, 均达极显著差异 ($P < 0.01$), 说明 RNAi 载体对 *CrPOA1* 沉默效果良好。

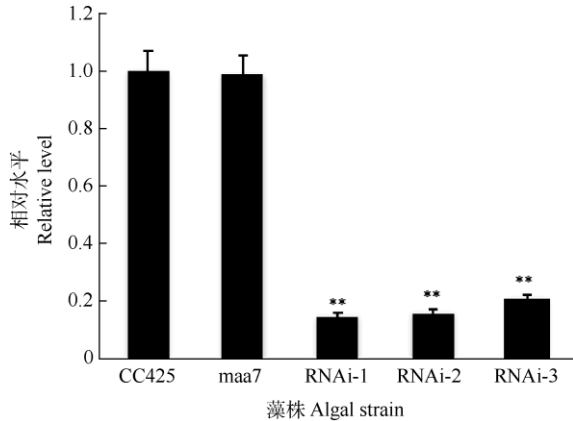


图 4 转基因藻株的 *CrPOA1* mRNA 水平. **: $P < 0.01$ 。

Fig. 4 *CrPOA1* mRNA level of transgenic alga. **: $P < 0.01$.

2.6 转基因藻株细胞干质量和油脂含量

从图 5 可见, 连续培养 7 d 的 *CrPOA1* RNAi 转基因藻株细胞干质量随培养时间的延长而增加, 第 1~2 天增加缓慢, 第 3~5 天增加迅速, 第 6 天趋于稳定, 符合微生物培养生长的“S”型曲线, 与对照 *maa7* 相比无显著差异。随着培养时间的延长, 细胞内油脂逐渐积累, *CrPOA1* RNAi 转基因藻株的油脂积累比对照 *maa7* 缓慢, 培养 3~5 d 与对照的差异达显著水平 ($P < 0.05$), 转基因藻株培养第 5 天的油脂含量达最大值, 比对照下降了 6.38%~24.63%, 这说明 *CrPOA1* 对莱茵衣藻油脂积累具有促进作用。莱茵衣藻在连续培养过程中, 随着油脂的积累, 先形成小油体, 油体数目逐渐增加, 体积增大, 然后, 小油体融合形成大油体。培养 5 d 的转基因藻细胞, 经尼罗红染色 10 min 后在荧光显微下观察, 对照 *maa7* 藻细胞中有大量油体存在, 而 RNAi 转基因藻细胞内油体数量较少 (图 6)。

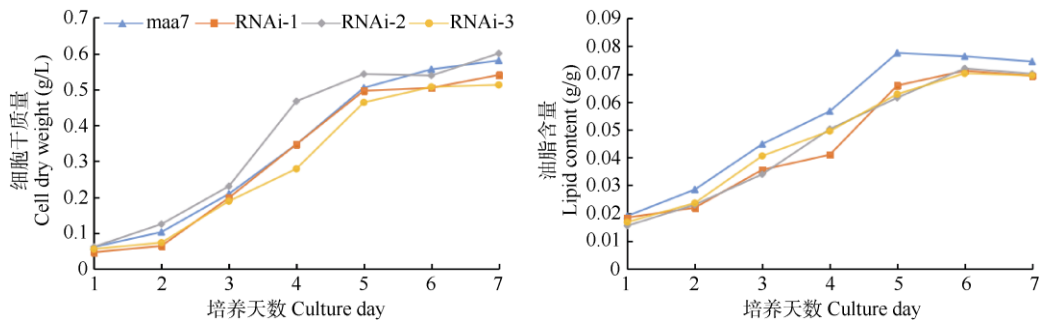


图 5 *CrPOA1* RNAi 转基因藻株的细胞干质量和油脂含量

Fig. 5 Cell dry weight and lipid content of *CrPOA1* RNAi transgenic strains

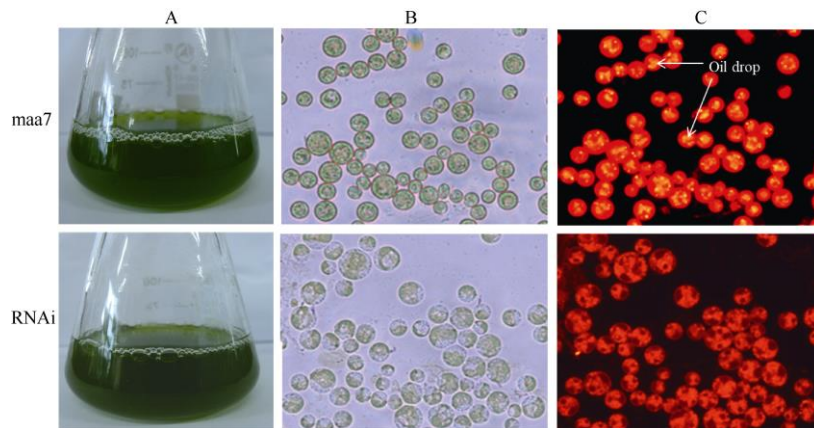


图 6 *CrPOA1* RNAi 转基因藻株培养和显微镜检。A: 培养状态; B: 明场(40×10); B: 暗场(荧光 40×10); 棕黄色代表油体。

Fig. 6 *CrPOA1* RNAi transgenic algae after cultured 5 days under microscope. A: Culture state; B: Bright field (40×10); C: Dark field (fluorescence 40×10);

Yellow was oil drop.

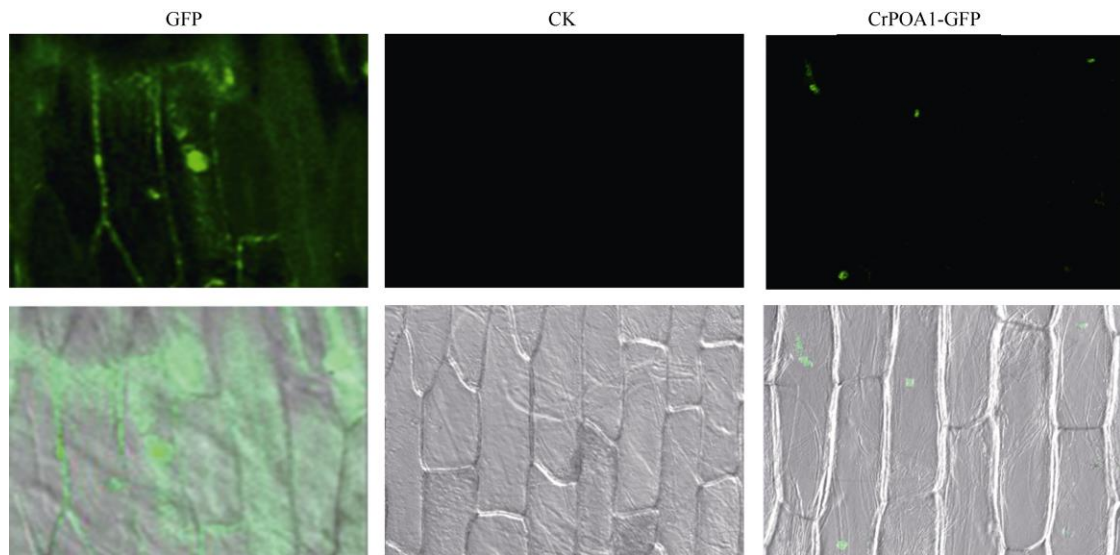


图7 *CrPOAI* 在洋葱表皮中的瞬时表达(40×10)。GFP: pCAMBIA1302; CK: 蒸馏水; *CrPOAI*-GFP: pCAMBIA1302-*CrPOAI*-GFP。

Fig. 7 Transient expression of *CrPOAI* in onion epidermis (40×10). FPG: pCAMBIA1302; CK: Distilled water; *CrPOAI*-GFP: pCAMBIA1302-*CrPOAI*-GFP.

2.7 *CrPOAI*-GFP 在洋葱表皮的瞬时表达

蛋白质的功能与其亚细胞位置有着密切的关系,蛋白质只有被运送到特定的细胞器中,才能发挥正常的生物学功能。洋葱(*Allium cepa*)表皮细胞因遗传背景清晰、便于操作、相对植物蛋白定位准确度高等优点,被广泛用于植物蛋白的亚细胞定位研究。为研究 *CrPOAI* 的亚细胞定位,将构建的 *CrPOAI*-GFP 融合表达载体,用基因枪法转化洋葱表皮细胞,以 pCAMBIA1302 空载体做阳性对照(GFP),以蒸馏水做阴性对照(CK)。从图7可见,阳性对照细胞质和细胞核中都有 GFP 的表达,说明 35S CaMV 启动子能够驱动 GFP 基因的表达,阴性对照细胞核、细胞质都未见绿色荧光,转化 *CrPOAI*-GFP 的细胞核有荧光信号,细胞质未见荧光信号,说明 *CrPOAI*-GFP 位于细胞核中。这与生物信息预测的结果一致。

3 结论和讨论

3.1 *CrPOAI* 对低氮胁迫的响应

UPP 是目前已知最有效、最具可行性的蛋白质降解途径,参与细胞多项生命活动。植物生长发育的诸多方面和胁迫响应等过程都受到该途径的调控^[25]。大量研究报道 UPP 中主要的组成,如 E2 泛素结合酶、E3 泛素连接酶和蛋白酶体等对低氮胁迫等环境胁迫做出响应^[26]。植物在高温、高 pH (pH>7)、低氮、低磷等环境因子胁迫下,UPP 途径加强

以抵抗这些非生物胁迫,NLA 基因(*E3*)在细胞核内与 *AtUBC8* 互作共同调控拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)对氮环境的适应性反应^[27]。本研究结果表明,低氮胁迫下,*CrPOAI* 下调表达,进一步影响了 UPP,导致 UPP 对异常蛋白的降解。

3.2 UPP 参与油脂的代谢调控

UPP 参与藻类等植物的非生物胁迫响应应答。而大量研究表明,大多数微藻在低氮、低硫、低磷、低铁、低硅等和高温、高 pH^[17,28-30]等环境因子胁迫下油脂大幅度增加,以缺氮诱导最为显著。因此,我们判断 UPP 参与莱茵衣藻油脂的代谢调控。目前,UPP 如何参与莱茵衣藻油脂代谢的调控鲜有报道,但是,大量研究报道 UPP 的主要组成成员,如 E2 泛素结合酶、E3 泛素连接酶和蛋白酶体等,参与调控藻类和其他植物的脂类代谢。Fei 等^[31]的研究表明,莱茵衣藻油脂含量和 E2 泛素结合酶基因 *CrUBC2* 存在正相关。Lü 等^[32]研究了 CER9 E3 泛素连接酶调控拟南芥的油脂合成机理,认为 CER9 基因功能缺失突变体 *cer9-2* 的种子含油率比 Col-0 野生型增加了 17%,通过酵母双杂交并筛选出其互作蛋白基因编码内质网溶血磷脂酰基转移酶 LPAT2。Luo 等^[33]研究了 U-box E3 泛素连接酶基因家族,认为有效沉默 *CrPUB5* 和 *CrPUB14* 后莱茵衣藻油脂积累增加了 9.8%~45.0%和 14.4%~61.8%。van Loon 等^[34]的研究表明 E3 泛素连接酶的失活可减轻小鼠饮食诱导的肥胖和代谢功能紊乱。Oliva 等^[35]对注射蛋

白酶体抑制剂 PS-341 的大鼠肝脏进行了芯片分析, 表明 *SREBP-1C* mRNA 表达显著下降, 其下游脂类合成相关酶, 如脂肪酸合成酶(FAS)和乙酰辅酶 A 羧化酶(ACC)活性显著降低, 同时降低了参与三酰甘油(TAG)合成的酰基甘油-3-磷酸酰基转移酶(AGPAT)和二酰甘油酰基转移酶(DGAT)基因的表达。

本研究通过 RNA 干扰技术对 *CrPOA1* 进行沉默, 结果藻细胞油脂的积累降低。*CrPOA1* 沉默必然影响 26S 蛋白酶体的组装, UPP 对异常蛋白的降解作用被大大削弱, 这可能影响油脂合成关键酶基因的表达, 如 FAS、ACC、AGPAT、DGAT^[35]。微藻三酰甘油合成与植物的类似, 大量研究表明通过基因工程的手段降低脂类的分解代谢以及抑制脂类流向蛋白质和碳水化合物, 可以提高油脂的产率^[36]。沉默脂类代谢的酰基 CoA 氧化酶、酰基 CoA 合成酶、肉碱酰基转移酶 I、脂酰基 CoA 脱氢酶基因, 可有效提高藻细胞内脂类的含量^[37]。莱茵衣藻中 ADP-葡萄糖焦磷酸化酶(AGPase)活性丧失, 细胞内淀粉合成受阻, 脂类含量增加 10 倍^[38]。UPP 对异常蛋白质降解的减弱, 也可能引起藻细胞内碳代谢异常, 使藻细胞内碳向淀粉、蛋白质等物质的转化, 从而油脂含量降低。

综上所述, 本研究为揭示 UPP 对藻类油脂的调控提供了一定的证据, *CrPOA1* 响应低氮胁迫, 其可能是莱茵衣藻在低氮胁迫下通过 UPP 响应来抵抗胁迫。*CrPOA1* 沉默后 UPP 对异常蛋白的降解减弱, 可能引起油脂合成关键酶基因和底物降低, 从而导致藻细胞油脂含量的降低。UPP 对异常蛋白的降低也可能是 *CrPOA1* 参与调控脂类的代谢调控, 促进脂类向糖类、蛋白质等物质的转化, 从而引起藻细胞内油脂的降低。因此, 后续应从 POA1 对莱茵衣藻碳流分配的影响以及 POA1 互做蛋白的筛选等方面开展工作。

参考文献

- [1] ZHANG D H, WANG J Q, LIN Y G, et al. Present situation and future prospect of renewable energy in China [J]. *Renew Sust Energ Rev*, 2017, 76: 865–871. doi: 10.1016/j.rser.2017.03.023.
- [2] USMANOV R A, GABITOV R R, BIKTASHEV S A, et al. Pilot unit for permanent transesterification of vegetable oils in supercritical methanol or ethanol media [J]. *Russ J Phys Chem B*, 2011, 5(8): 1216–1227. doi: 10.1134/S1990793111080112.
- [3] MA C, LIU B F, REN H Y, et al. A review on biodiesel production: Breeding technologies of microalgae containing rich lipid [J]. *Appl Mechan Mat*, 2014, 472: 759–763. doi: 10.4028/www.scientific.net/AMM.472.759.
- [4] GIM G H, RYU J, KIM M J, et al. Effects of carbon source and light intensity on the growth and total lipid production of three microalgae under different culture conditions [J]. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2016, 43(5): 605–616. doi: 10.1007/s10295-016-1741-y.
- [5] JUAN S, KEHOU P. Effects of different culture conditions and growth phases on lipid of microalgae [J]. *Mar Fish Res*, 2004, 25(6): 79–85.
- [6] ANTHONY J, RANGAMARAN V R, GOPAL D, et al. Ultraviolet and 5' fluorodeoxyuridine induced random mutagenesis in *Chlorella vulgaris* and its impact on fatty acid profile: A new insight on lipid-metabolizing genes and structural characterization of related proteins [J]. *Mar Biotechnol*, 2015, 17(1): 66–80. doi: 10.1007/s10126-014-9597-5.
- [7] SUN P P, FAN C M, CHEN Y H, et al. The research advances on microalgae lipid synthesis and regulation by biochemical and genetic engineering [J]. *Mol Plant Breed*, 2017, 15(7): 2628–2635. doi: 10.13271/j.mpb.015.002628.
孙配配, 范成明, 陈宇红, 等. 微藻油脂合成与调控的生化及基因工程研究进展 [J]. *分子植物育种*, 2017, 15(7): 2628–2635. doi: 10.13271/j.mpb.015.002628.
- [8] GUSCHINA I A, HARWOOD J L. Lipids and lipid metabolism in eukaryotic algae [J]. *Prog Lipid Res*, 2006, 45(2): 160–186. doi: 10.1016/j.plipres.2006.01.001.
- [9] DENG X D, LI Y J, FEI X W. The mRNA abundance of *pepc2* gene is negatively correlated with oil content in *Chlamydomonas reinhardtii* [J]. *Biomass Bioenerg*, 2011, 35(5): 1811–1817. doi: 10.1016/j.biombioe.2011.01.005.
- [10] BAURAIN D, DINANT M, COOSEMANS N, et al. Regulation of the alternative oxidase *Aox1* gene in *Chlamydomonas reinhardtii*: Role of the nitrogen source on the expression of a reporter gene under the control of the *Aox1* promoter [J]. *Plant Physiol*, 2003, 131(3): 1418–1430. doi: 10.1104/pp.013409.
- [11] LI Y, LIANG J Y, LIU X L, et al. Research progress on 26S proteasome inhibitors [J]. *Acta Pharm Sin*, 2017, 52(4): 524–530. doi: 10.16438/j.0513-4870.2016-1082.
李媛, 梁俊玉, 刘鑫龙, 等. 26S 蛋白酶体抑制剂研究进展 [J]. *药学报*, 2017, 52(4): 524–530. doi: 10.16438/j.0513-4870.2016-1082.
- [12] LECKER S H, SOLOMON V, MITCH W E, et al. Muscle protein breakdown and the critical role of the ubiquitin-proteasome pathway in normal and disease states [J]. *J Nutr*, 1999, 129(1): 227S–237S. doi: 10.1093/jn/129.1.227s.

- [13] TU Y Q, CHEN C, PAN J R, et al. The ubiquitin proteasome pathway (UPP) in the regulation of cell cycle control and DNA damage repair and its implication in tumorigenesis [J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2012, 5(8): 726–738.
- [14] SHANG F, TAYLOR A. Roles for the ubiquitin-proteasome pathway in protein quality control and signaling in the retina: Implications in the pathogenesis of age-related macular degeneration [J]. *Mol Aspects Med*, 2012, 33(4): 446–466. doi: 10.1016/j.mam.2012.04.001.
- [15] WANG B, LI Y Q, WU N, et al. CO₂ bio-mitigation using microalgae [J]. *Appl Microbiol Biot*, 2008, 79(5): 707–718. doi: 10.1007/s00253-008-1518-y.
- [16] HOLCOMB R E, MASON L J, REARDON K F, et al. Culturing and investigation of stress-induced lipid accumulation in microalgae using a microfluidic device [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2011, 400(1): 245–253. doi: 10.1007/s00216-011-4710-3.
- [17] LONGWORTH J, WU D Y, HUETE-ORTEGA M, et al. Proteome response of *Phaeodactylum tricornutum*, during lipid accumulation induced by nitrogen depletion [J]. *Algal Res*, 2016, 18: 213–224. doi: 10.1016/j.algal.2016.06.015.
- [18] BELLOU S, BAESHEN M N, ELAZZAZY A M, et al. Microalgal lipids biochemistry and biotechnological perspectives [J]. *Biotechnol Adv*, 2014, 32(8): 1476–1493. doi: 10.1016/j.biotechadv.2014.10.003.
- [19] LEE J W, SHIN S Y, KIM H S, et al. Lipid turnover between membrane lipids and neutral lipids via inhibition of diacylglycerol *N,N,N*-trimethylhomoserine synthesis in *Chlamydomonas reinhardtii* [J]. *Algal Res*, 2017, 27: 162–169. doi: 10.1016/j.algal.2017.09.001.
- [20] LI Y J, FEI X W, DENG X D. Digital gene expression profile of *Chlamydomonas reinhardtii* grown under nitrogen starvation [J]. *Chin J Trop Agric*, 2012, 32(11): 66–70. doi: 10.3969/j.issn.1009-2196.2012.11.015.
李亚军, 费小雯, 邓晓东. 莱茵衣藻氮胁迫基因数字表达谱分析 [J]. *热带农业科学*, 2012, 32(11): 66–70. doi: 10.3969/j.issn.1009-2196.2012.11.015.
- [21] LI Y J, FEI X W, DENG X D. Two protocols for total RNA extraction from microalgae [J]. *Chin J Trop Agric*, 2011, 31(5): 24–27. doi: 10.3969/j.issn.1009-2196.2011.05.007.
李亚军, 费小雯, 邓晓东. 2 种微藻总 RNA 提取方法的比较 [J]. *热带农业科学*, 2011, 31(5): 24–27. doi: 10.3969/j.issn.1009-2196.2011.05.007.
- [22] LI X H, FEI X W, DENG X D. Construction of phosphofructokinase RNAi vectors and its impact on lipid accumulation in *Chlamydomonas reinhardtii* [J]. *Guangdong Agric Sci*, 2014, 41(10): 155–159. doi: 10.3969/j.issn.1004-874X.2014.10.035.
李兴涵, 费小雯, 邓晓东. 莱茵衣藻磷酸果糖激酶 RNAi 载体构建及其对莱茵衣藻油脂积累的影响 [J]. *广东农业科学*, 2014, 41(10): 155–159. doi: 10.3969/j.issn.1004-874X.2014.10.035.
- [23] KINDLE K L. High-frequency nuclear transformation of *Chlamydomonas reinhardtii* [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1990, 87(3): 1228–1232. doi: 10.1073/pnas.87.3.1228.
- [24] YU Y F, ZHU X B, GE H M, et al. Subcellular localization of plants based on transient expression of green fluorescent protein [J]. *Jiangsu Agric Sci*, 2014, 42(12): 58–61. doi: 10.15889/j.issn.1002-1302.2014.12.017.
于一帆, 朱小彬, 葛会敏, 等. 基于绿色荧光蛋白瞬时表达的植物亚细胞定位方法 [J]. *江苏农业科学*, 2014, 42(12): 58–61. doi: 10.15889/j.issn.1002-1302.2014.12.017.
- [25] XU D D, SUN F, WANG Y X, et al. Biological function insights into the ubiquitin/26S proteasome pathway in rice [J]. *J Agric Sci Technol*, 2018, 20(1): 25–33. doi: 10.13304/j.nykjdb.2017.0144.
徐丹丹, 孙帆, 王银晓, 等. 泛素/26S 蛋白酶体途径在水稻中的生物学功能研究进展 [J]. *中国农业科技导报*, 2018, 20(1): 25–33. doi: 10.13304/j.nykjdb.2017.0144.
- [26] WANG J L, SHI S Q, JIA L Q, et al. Progress on functions of ubiquitin-conjugating enzyme (E2) in plants [J]. *Biotechnol Bull*, 2010, 20(4): 7–10.
王金利, 史胜青, 贾利强, 等. 植物泛素结合酶 E2 功能研究进展 [J]. *生物技术通报*, 2010, 20(4): 7–10.
- [27] PENG M S, HANNAM C, GU H L, et al. A mutation in *NLA*, which encodes a RING-type ubiquitin ligase, disrupts the adaptability of *Arabidopsis* to nitrogen limitation [J]. *Plant J*, 2007, 50(2): 320–337. doi: 10.1111/j.1365-313X.2007.03050.x.
- [28] HOUNSLOW E, KAPOORE R V, VAIDYANATHAN S, et al. The search for a lipid trigger: The effect of salt stress on the lipid profile of the model microalgal species *Chlamydomonas reinhardtii* for biofuels production [J]. *Curr Biotechnol*, 2016, 5(4): 305–313. doi: 10.2174/2211550105666160322234434.
- [29] CHAISUTYAKORN P, PRAIBOON J, KAEWSURALIKHIT C. The effect of temperature on growth and lipid and fatty acid composition on marine microalgae used for biodiesel production [J]. *J Appl Phycol*, 2018, 30(1): 37–45. doi: 10.1007/s10811-017-1186-3.
- [30] PHILIPPS G, HAPPE T, HEMSCHMEIER A. Nitrogen deprivation results in photosynthetic hydrogen production in *Chlamydomonas reinhardtii* [J]. *Planta*, 2012, 235(4): 729–745. doi: 10.1007/s00425-011-1537-2.
- [31] FEI X W, LI X H, LI P, et al. Involvement of *Chlamydomonas* DNA damage tolerance gene *UBC2* in lipid accumulation [J]. *Algal Res*, 2017, 22: 148–159. doi: 10.1016/j.algal.2016.12.019.

- [32] LÜ S Y, ZHAO H Y, MARAIS D L D, et al. *Arabidopsis ECERI FERUM9* involvement in cuticle formation and maintenance of plant water status [J]. *Plant Physiol*, 2012, 159(3): 930–944. doi: 10.1104/pp.112.198697.
- [33] LUO Q L, LI Y J, WANG W Q, et al. Genome-wide survey and expression analysis of *Chlamydomonas reinhardtii* U-box E3 ubiquitin ligases (CrPUBs) reveal a functional lipid metabolism module [J]. *PLoS One*, 2015, 10(11): e0142996. doi: 10.1371/journal.pone.0122600.
- [34] van LOON N M, OTTENHOFF R, KOOLJMAN S, et al. Inactivation of the E3 ubiquitin ligase IDOL attenuates diet-induced obesity and metabolic dysfunction in mice [J]. *Arterioscle Thrombosis Vascul Biol*, 2018, 38(8): 1785–1795. doi: 10.1161/ATVBAHA.118.311168
- [35] OLIVA J, FRENCH S W, LI J, et al. Proteasome inhibitor treatment reduced fatty acid, triacylglycerol and cholesterol synthesis [J]. *Exp Mol Pathol*, 2012, 93(1): 26–34. doi: 10.1016/j.yexmp.2012.03.006.
- [36] YU W L, ANSARI W, SCHOEPP N G, et al. Modifications of the metabolic pathways of lipid and triacylglycerol production in microalgae [J]. *Microb Cell Fact*, 2011, 10(1): 91. doi: 10.1186/1475-2859-10-91.
- [37] HE S S, WANG Y L, GAO B Y, et al. Biosynthetic pathway of triacylglycerol in microalgae and its latest research progress [J]. *Chin Bull Life Sci*, 2014, 26(9): 979–990. doi: 10.13376/j.cbls/2014141. 何思思, 王元丽, 高保燕, 等. 微藻三酰甘油合成途径及其最新研究进展 [J]. *生命科学*, 2014, 26(9): 979–990. doi: 10.13376/j.cbls/2014141.
- [38] LI Y T, HAN D X, HU G R, et al. *Chlamydomonas* starchless mutant defective in ADP-glucose pyrophosphorylase hyper-accumulates triacylglycerol [J]. *Metab Eng*, 2010, 12(4): 387–391. doi: 10.1016/j.ymben.2010.02.002.