

文章编号: 1674-5566(2017)05-0641-10

DOI:10.12024/jsou.20161201915

莱茵衣藻“细菌型”*pepc2* 基因叶绿体表达及其对油脂蛋白质含量的影响

冯思豫¹, 施定基^{1,2}, 贾晓会¹, 朱嘉诚¹, 米华玲³, 贾睿¹, 何培民¹

(1. 上海海洋大学 水产与生命学院, 上海 201306; 2. 中国科学院植物研究所, 北京 100093; 3. 中国科学院上海生命科学研究院植物生理生态研究所, 上海 200032)

摘要: 磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶(Phosphoenolpyruvate carboxylase, PEPC, EC 4.1.1.31)在植物碳代谢中有重要作用,高等植物中 PEPC 可以调控蛋白质和脂肪酸含量,但是对绿藻 PEPC 的研究还较少。莱茵衣藻是绿藻中的模式生物,其基因工程中外源基因的转化以叶绿体转化效率最高,为了提高外源蛋白表达和获得高产油莱茵衣藻,利用叶绿体转化法能进一步提高表达效率。因此,本研究首先克隆了莱茵衣藻“细菌型”PEPCCS I (conserved sequence I) 的 639 bp,构建了 pASapI-reve-Crpepc2 和 pASapI-forw-Crpepc2 正反向叶绿体表达载体,并用基因枪法转化莱茵衣藻 cc-400 获得了空质粒型,正向型和反向型转基因藻株。其次,应用 RT-qPCR 方法检测 Crpepc2 的相对表达量,结果表明反向型 Crpepc2 的表达量减少了 89.97%,而正向型增加了 201.16%。最后,检测了总蛋白和脂质含量的变化,正向型突变株的总蛋白增加了 37.03%;而反向型突变株的脂质含量增加了 70.32%,且饱和脂肪酸含量明显增加。以上结果证明莱茵衣藻“细菌型”PEPC 的叶绿体表达不仅可以进一步提高蛋白质与脂肪酸含量,也可为今后外源蛋白的表达和高产油工程藻的应用做贡献。

关键词: 莱茵衣藻; 磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶(PEPC); 叶绿体表达; RT-qPCR; 脂肪酸; 蛋白质

中图分类号: Q 785 **文献标志码:** A

磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶(PEPC)广泛存在于 C₃、C₄、景天科(CAM)植物、真核藻、蓝藻、细菌、古生菌中,但不存在于动物和真菌中^[1]。PEPC 在植物碳代谢中起重要作用,在辅因子 HCO³⁻ 和 Mg²⁺ 协同下,可以催化 PEP 发生不可逆的 β-羧化反应,生成无机磷酸(Pi)和草酰乙酸(OAA)^[2]。2003 年,对 *pepc* 基因的研究有了突破性的进展,研究者发现 PEPC 有两种类型,其中一种 *pepc* 基因与细菌有高度的相似性,被称为细菌型 PEPC (BTPC),另一种存在于 C₃、C₄、CAM 植物中的 PEPCs 被划分为植物型 PEPC (PTPC)^[3]。

目前为止,PEPC 的研究已经进行了十几年,且大多数研究集中于高等植物,尽管从 1996 年开始,一些绿藻的 PEPC 已经被证实^[4-7],但对于绿

藻 PEPC 的研究还较少,尤其是 BTPC 的研究。莱茵衣藻(*Chlamydomonas reinhardtii*)是一种单细胞绿藻,其结构简单,易培养、生长快,且对其遗传和转化机制研究比较清楚^[8],用它来探索细菌型 PEPC 更具优势。自 2005 年以来,对莱茵衣藻 PEPC (CrPEPC)的研究有了一系列有意义的发现。MAMEDOV 等发现莱茵衣藻的植物型 PEPC 是由 *pepc1* 基因编码,而细菌型 PEPC 是由 *pepc2* 基因编码的,不仅如此,Crpepc2 比 Crpepc1 结构更复杂,并且催化活性更强,对 PEP 有更高亲和力^[9-11]。侯李君等通过抑制大肠杆菌 PEPC 酶的表达,获得了含油量更高的工程菌株^[12],贾晓会等用反义 RNA 法抑制 *pepc* 表达,获得了高产油工程蓝藻^[13],DENG 等已经证明莱茵衣藻 *pepc* 基因的表达跟油脂含量呈负相关^[14-15]。

收稿日期: 2016-12-05 修回日期: 2017-05-12

基金项目: 国家高技术研究发展计划(2009AA064401)

作者简介: 冯思豫(1993—),女,硕士研究生,研究方向莱茵衣藻生理、生化。E-mail:806694095@qq.com

通信作者: 何培民,E-mail:pmhe@shou.edu.cn

已经有科学家对莱茵衣藻 *pepc* 基因的核表达进行了研究,也取得了一些结果,但外源基因导入衣藻后较难获得稳定有效的表达,外源基因会出现“基因沉默”问题,或是在基因、蛋白水平受到阻遏,所以寻找一种更好的表达方式是必要的。莱茵衣藻是至今唯一可成功进行叶绿体、线粒体和细胞核 3 套基因组转化的绿藻,虽然衣藻叶绿体转化起步比细胞核晚,但在构建叶绿体表达载体时,外源基因表达盒的前后分别连接着衣藻叶绿体基因组的同源片断,当载体进入叶绿体后,同源片断与受体基因组相应的片断发生同源重组,外源基因被整合到叶绿体的特定位点,随叶绿体基因复制和遗传,可以消除核转化的“位置效应”造成对基因表达的不利影响,实现高效表达。除此之外,根据叶绿体的原核性,叶绿体转化法还能够表达原核蛋白,真核蛋白,并对蛋白质进行加工^[16];根据莱茵衣藻光合作用是非必需的,在培养基中减少碳源如乙酸,可以研究光合作用缺陷突变株,或者在黑暗条件下研究非自养突变株,光照条件下混合营养突变株^[17];莱茵衣藻叶绿素合成是非光依赖性的,在黑暗条件下利用碳源也可以充分光合作用,这点可以帮助研究对光敏感的无光活性突变株,而在陆生植物中是很难做到的^[18]。大量研究表明,叶绿体基因工程生产的大多数蛋白质可完成二硫键交联、正确折叠等翻译后修饰,具有正确的空间构象和生物活性^[19]。因此本实验克隆了莱茵衣藻“细菌型”保守序列 I 中 *pepc* 基因的部分片段 (*Crpepc2*),构建了 *Crpepc2* 基因正反向叶绿体表达载体 pASap I -reve-*Crpepc2* 和 pASap I -forw-*Crpepc2*,利用基因枪法转入莱茵衣藻中,获得 *Crpepc2* 基因表达上下调的藻株,一方面利用叶绿体表达的高效性调控 *Crpepc2* 表达,另一方面为筛选外源蛋白表达载体和含油量高的藻株奠定基础。

1 材料与方法

1.1 藻种和质粒

实验藻种为莱茵衣藻缺壁突变株 (*Chlamydomonas reinhardtii*, cc-400),衣藻叶绿体表达载体为 pASap I,均购自衣藻资源中心(明尼苏达大学植物生物学系),莱茵衣藻在 TAP 培养液中培养^[17],温度 25 °C,光照 50 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$,

振荡频率 100 r/min。扩增质粒的感受态细胞为 Top10。

1.2 莱茵衣藻 *pepc2* 基因的克隆与正反向叶绿体表达载体的构建

目的基因的克隆:以本实验室之前构建的正向原核表达载体 pET-28a-forw-*pepc2* 为模板,获得目的 *Crpepc2* 部分基因。该模板中的 *Crpepc2* 基因是根据 NCBI 上刊登的莱茵衣藻 *pepc2* mRNA 序列 (AY517643),设计引物 P1: CGATGCTCG GTAGCCTGCTTGACG, P2: TAGGGATCC ACAAC GACTGCTCCACA(下划线分别表示在上游引物中引入的一个 ATG 位点和在下游引物中引入一个 *Bam*H I 位点),再以莱茵衣藻 cDNA 为模板, P1 和 P2 为引物进行 PCR 反应获得,随后构建了正反向原核表达载体^[21]。用 *Bam*H I 酶切 pET-28a-forw-*pepc2*,会产生一条 639 bp 带,且该片段两头带 *Bam*H I 位点,凝胶回收该片段,送至上海生工测序。

叶绿体表达载体的构建:用 *Bam*H I 单酶切 pASap I,凝胶回收酶切片段,用碱性磷酸酶处理回收片段,防止连接实验中的自连现象。用 T4 连接酶连接两头带 *Bam*H I 位点的 *Crpepc2* 和单酶切后的 pASap I,比例 20:1 过夜连接,将连接后的重组质粒转化感受态细胞 Top10,在含氨苄青霉素的 LB 培养基中 38 °C 过夜筛选转化子,液体扩增转化子并提取质粒,用普通 PCR 方法(引物 P1、P2)和 *Pst* I 酶切鉴定连接结果,筛选出 pASap I -forw-*Crpepc2* 和 pASap I -reve-*Crpepc2* 正反向表达载体。

1.3 基因枪转化莱茵衣藻及抗生素筛选

受体细胞的制备:收集 20 mL 对数中期 (OD_{750} 0.8)的莱茵衣藻 cc-400 缺壁突变株,并用 500 μL TAP 重新悬浮藻液,取 200 μL 藻液涂于 TAP 固体培养平板中央(直径 2 cm),置于培养箱中 3~4 d[温度 25 °C,光照 50 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$]。制备包裹的金粉颗粒与基因枪轰击参考文献 [19],本研究制备了 3 种金粉颗粒即 pASap I -forw-*Crpepc2*, pASap I -reve-*Crpepc2* 和 pASap I。

轰击后将平板置于培养箱中弱光培养 3 d 后,用新鲜 TAP 将细胞从培养皿中洗脱下来,重新涂于含氨苄青霉素(50 $\mu\text{g}/\text{mL}$)的培养皿中培养,并逐步提高抗生素浓度至 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$,筛选出转基因藻株,并挑取单藻落进行液体培养。

1.4 RNA 提取,反转录和 RT-qPCR 分析

Trizol(Invitrogen 公司)法提取莱茵衣藻总 RNA,再利用反转录试剂盒(购自天根生化科技有限公司)获得 cDNA,以 cDNA 为模板,用荧光定量试剂 SYBR Green(Kapa 生物有限公司)进行 RT-qPCR(FTC-3000 枫岭生物技术有限公司)定量分析。根据 NCBI 上公布的莱茵衣藻 18S rRNA(EU925397.1)序列用 Primer 5.0 设计引物 P2 (GTTCTTAGTTGGTGGGTTG) 和 P3 (CTGTTATCGCCTCATACTTC)。根据 NCBI 上莱茵衣藻 *pepc2* mRNA(AY517643.1)序列设计引物 P4 (CTGTTATCGCCTCATACTTC) 和 P5 (CTCGGATGCGTTCAATCTTCTT)。基因的相对表达量用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法分析^[20]。

1.5 生长曲线

从接种日开始每天用血球计数板计数,并用分光光度计 UV-1800(SHIMADZU 公司)测量细胞密度 OD₇₅₀。

1.6 总脂与脂肪酸含量的测定

收集野生型和 3 种突变藻株(OD₇₅₀0.8),12 000 r/min 离心 10 min,蒸馏水洗涤两次,用冷冻干燥仪(LGJ-10C, China)制成干燥粉,称取 30~50 mg 干燥粉测量总脂^[21]。

脂肪酸的含量的测定采用如下方法。称取 15 mL 藻粉,加入 1 mL 饱和 KOH-CH₃OH 混匀;在 75 °C 水浴皂化 10 min,吸出上清液重复上述步骤 2 次,合并吸取液;加入约 2 mL 1 mol/L HCl-CH₃OH 溶液,使 pH ≤ 2 并振荡 1 min;于 75 °C 水浴酸化 10 min,冷却至室温;加入 500 μL 正己烷萃取,吸取上层萃取液 4 °C 保存;用液相色谱质谱联用机器(Agilent 19091N-133)分析脂肪酸成分。

1.7 总蛋白

收集莱茵衣藻及其突变株悬浮液(OD₇₅₀0.8)各 5 mL,4 °C,12 000 r/min 离心 10 min;用磷酸缓冲液洗涤两次,加入细胞裂解液,用反复冻融法提取总蛋白;4 °C,12 000 r/min 离心 10 min 上清即为总蛋白,用 Bradford 法测定总蛋白含量^[22],酶标仪(Bio-RadiMark™ Microplate Reader)获得标准曲线,计算出总蛋白量。

1.8 统计学分析

用软件 Excel 和 OriginPro 8 对多次重复实验结果进行分析,结果用 ±SD(标准偏差)校准。

2 结果

2.1 莱茵衣藻 *pepc2* 基因的克隆与正反向叶绿体表达载体的构建

*Bam*H I 酶切 pET-28a-forw-*pepc2* 后片段为 639 bp(图 1),该片段凝胶回收后送公司测序,BLAST 结果显示与 GenBank 中 *Crpepc2* 序列的同源性达到 99%,证明目的片段即为 *Crpepc2* 部分片段。

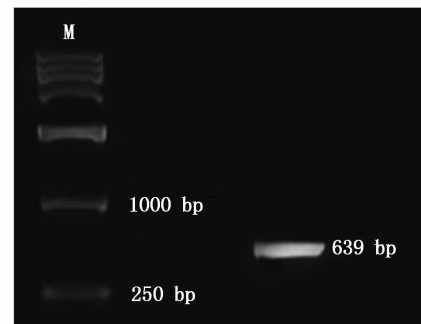


图 1 PCR 扩增产物电泳图

Fig. 1 PCR amplification of *Crpepc2* fragment

Marker:DL15 000(TaKaRa)

Crpepc2 基因正反向叶绿体表达载体(pASap I -forw-*Crpepc2* 和 pASap I -reve-*Crpepc2*)的构建图谱见图 2。

获得重组质粒后,先用普通 PCR(图 3a)鉴定;再用 *Pst* I 酶切鉴定基因的插入及插入方向(图 3b)。用 *Bam*H I 单酶切并连接后会出现正反向连接两种情况,正向连接载体 pASap I -forw-*Crpepc2* 和反向连接载体 pASap I -reve-*Crpepc2*, 所以将 PCR 产物为阳性的载体通过 *Pst* I 酶切鉴定插入方向,正向 pASap I -forw-*Crpepc2* 的酶切产物为:33, 60, 80 和 7 120 bp 四条带;反向 pASap I -reve-*Crpepc2* 的酶切产物为:60, 33, 520, 6 680 bp 四条带。

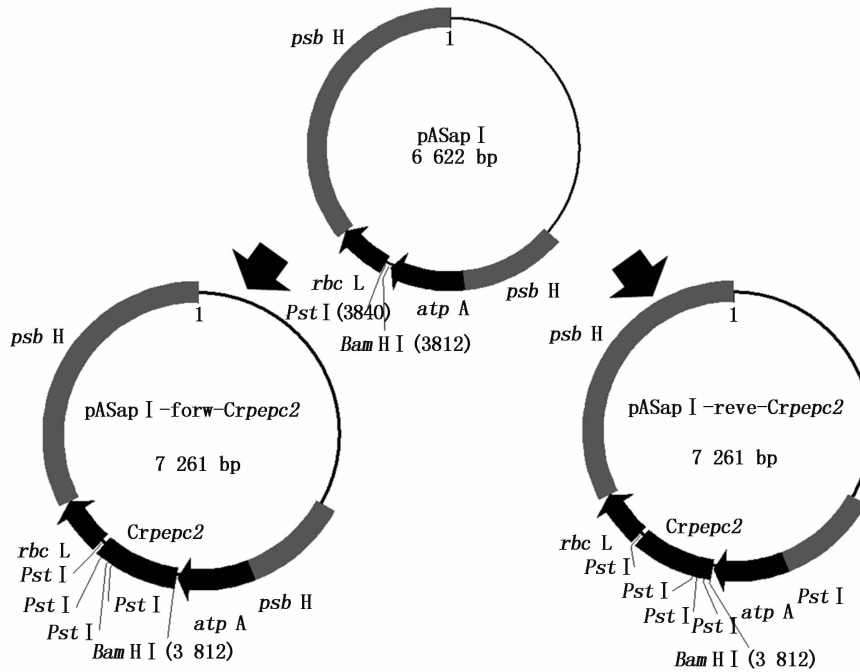


图2 *Crpepc2* 基因正反向叶绿体表达载体 (pASap I-forw-*Crpepc2* 和 pASap I-reve-*Crpepc2*) 构建图谱

Fig. 2 Construction of the forward and reverse recombinant vectors
pASap I-forw-*Crpepc2* and pASap I-reve-*Crpepc2*

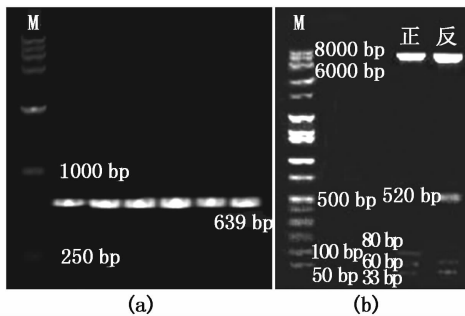


图3 载体 pASap I-forw-*Crpepc2* 和 pASap I-reve-*Crpepc2* 的 PCR 扩增和酶切鉴定

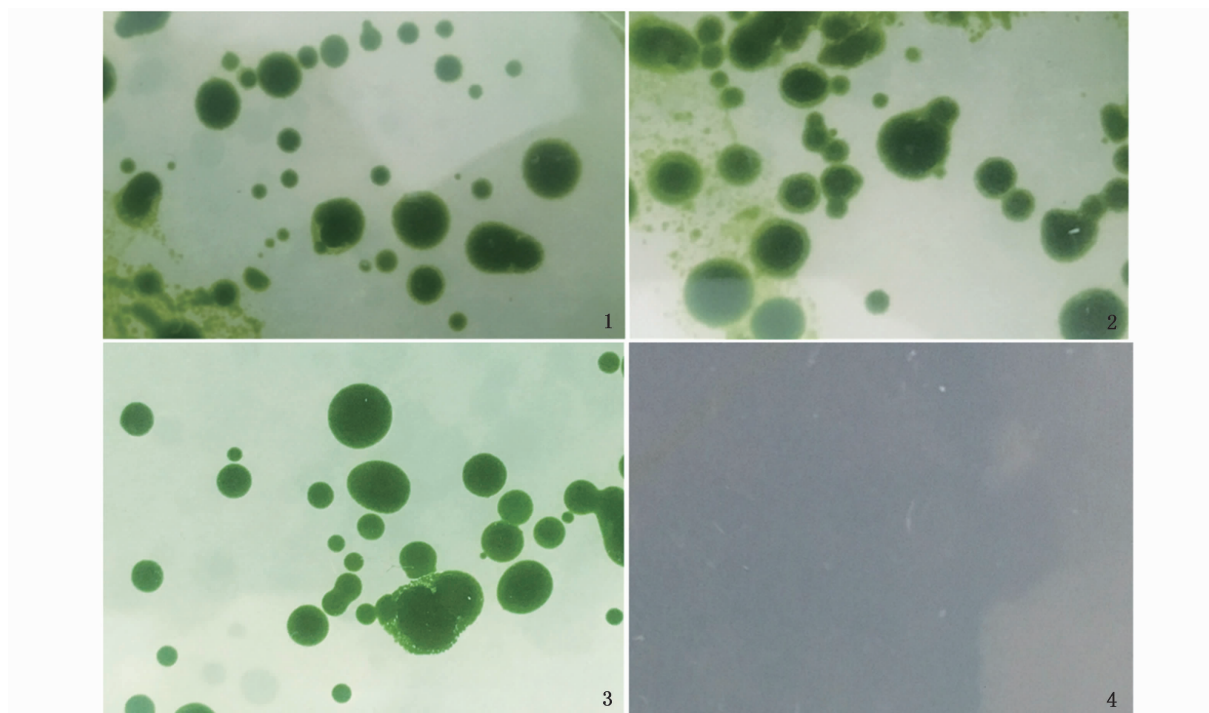
Fig. 3 PCR identification and restriction identification of pASap I-forw-*Crpepc2* and pASap I-reve-*Crpepc2*

(a) *Crpepc2* 基因的 PCR 鉴定结果, M 为 DL15 000; (b) *Pst* I 酶切结果 (反向: pASap I-reve-*Crpepc2*; 正向: pASap I-forw-*Crpepc2*); M 为 Wide-Range DNA Ladder (TaKaRa)

(a) PCR result of *Crpepc2* gene, Marker: DL15 000; (b) Result of *Pst* I restriction enzyme digesting (reverse: pASap I-reve-*Crpepc2*; forward: pASap I-forw-*Crpepc2*); Marker: Wide-Range DNA Ladder (TaKaRa)

2.2 基因枪转化莱茵衣藻及抗生素筛选

利用基因枪法分别将 pASap I (空质粒), pASap I-forw-*Crpepc2* 和 pASap I-reve-*Crpepc2* 转化莱茵衣藻 cc-400, 用含氨基青霉素的固体培养基筛选阳性转化藻株, 每种转化株均有 3 个平板作为平行。转化株培养基中抗生素浓度从 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 增加至 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 该过程中野生型藻株不具有抗性会被杀死, 经过 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 依次递增的抗生素固体培养基初步筛选转化株, 随后还需用液体培养再次筛选, 从抗生素浓度为 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的平板中, 挑取单藻落于 50 mL 锥形瓶中液体培养, 每种转化株均挑取 3 个平板, 每个平板随机挑取 10 个单藻落。培养 5 d 后共筛选到 18 株空质粒型, 20 株正向型和 19 株反向型阳性转化藻株, 将这些纯种转化株重新涂平板保存 (图版)。野生型不具有抗生素抗性, 藻体逐步死亡, 平板涂布培养的野生型在抗生素浓度为 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时可生长; 当抗生素浓度至 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时野生型藻落第 3 天开始泛黄, 第 5 天泛白并死亡。当抗生素浓度提高至 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时, 划线培养的野生型藻株无法生长。



图版 基因枪轰击后,固体培养基筛选突变体莱茵衣藻

Plate After particle bombardment, the screening of mutants in solid medium

1. 正向型突变株氨苄青霉素浓度(150 $\mu\text{g}/\text{mL}$); 2. 空质粒型突变株氨苄青霉素浓度(150 $\mu\text{g}/\text{mL}$); 3. 反向型突变株氨苄青霉素浓度(150 $\mu\text{g}/\text{mL}$); 4. 野生型氨苄青霉素浓度(150 $\mu\text{g}/\text{mL}$)

1. Forward mutant concentration of ampicillin (150 $\mu\text{g}/\text{mL}$); 2. Blank type concentration of ampicillin (150 $\mu\text{g}/\text{mL}$); 3. Reverse mutant concentration of ampicillin (150 $\mu\text{g}/\text{mL}$); 4. Wild type concentration of ampicillin (150 $\mu\text{g}/\text{mL}$)

2.3 RT-qPCR 检测 *Crpepc2* 基因的表达

以莱茵衣藻 18S 为内参基因,利用 RT-qPCR 检测野生型和突变体莱茵衣藻 *pepc2* 基因的相对表达量(图 4a),正向型 *Crpepc2* 的表达量最高,为野生型的 301.16% ($P < 0.01$);反向型 *Crpepc2* 的表达量最低,仅为野生型的 10.03% ($P < 0.01$),空质粒型与野生型相差不大为 98.21% ($P > 0.05$)。

调控 *Crpepc2* 基因表达后,对 *Crpepc1* 基因的影响见图 4b,4 种藻株 *Crpepc1* 的相对表达量相差不大,说明本次调控 *Crpepc2* 基因表达对 *Crpepc1* 基因没有太大影响。

2.4 生长曲线

调控莱茵衣藻 *pepc2* 基因的表达后,其生长状况见图 5。细胞计数法可以直观地反映出藻株的生长状况。起始接种浓度 OD_{750} 0.03,第 4 天进入对数生长期,细胞数目在 7 天左右达到峰值(图 5a)。对比调控 *Crpepc2* 基因表达后莱茵衣藻野生型和突变株生长状况发现,3 种突变体的生

长状况并没有被抑制,反向型生物量最高,第 7 天可以达 24 750 ind/mL。 OD_{750} 细胞浓度也有相同的趋势,第 4 天进入对数生长期,第 7 天之后 OD_{750} 的值开始趋于稳定。

2.5 总蛋白质

图 6 是莱茵衣藻总蛋白含量,野生型的总蛋白为 441.82 $\mu\text{g}/\text{mL}$;空质粒型总蛋白含量为 432.73 $\mu\text{g}/\text{mL}$;空质粒型的蛋白质含量与野生型并无显著性差异 ($P > 0.05$);正向型含量为 605.45 $\mu\text{g}/\text{mL}$,比野生型增加了 37.03% ($P < 0.01$);反向型含量为 314.55 $\mu\text{g}/\text{mL}$,比野生型减少了 28.81% ($P < 0.01$)。

2.6 油脂和脂肪酸含量

4 种藻株的油脂含量见图 7a。野生型油脂含量为 20.62%;空质粒型油脂含量为 24.5%,比野生型增加了 18.82% ($P > 0.05$);正向型油脂含量为 18.98%,比野生型减少了 7.95% ($P > 0.05$);反向型油脂含量为 35.12%,比野生型增加了 70.32% ($P < 0.01$)。脂肪酸含量变化见图

7b,反向型脂肪酸含量明显增加,其中 C16:0 增加了 43.34% ($P < 0.01$);C16:1 增加了 46.53% ($P < 0.01$);C16:2 增加了 38.53% ($P < 0.01$);C18:1 增加了 61.08% ($P < 0.01$);C18:2 增加了 63.97% ($P < 0.01$);C18:3 增加了 70.19% ($P < 0.01$);正向型突变株 C16:1 减少了 59.10% ($P < 0.01$)。

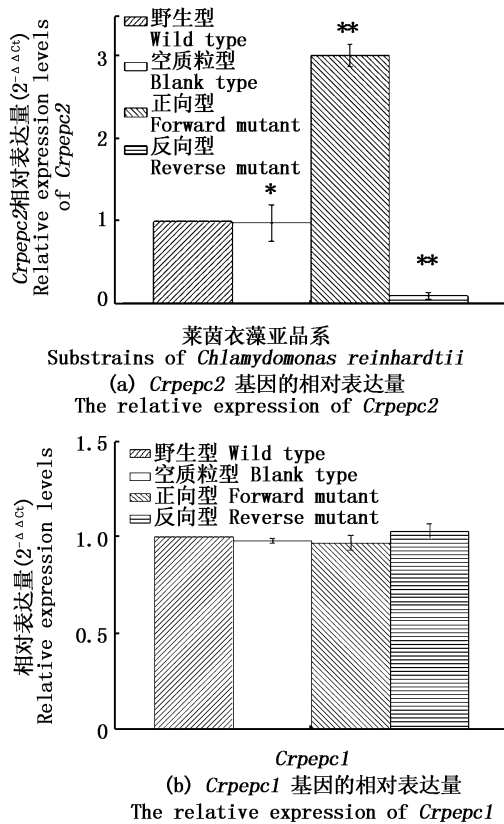


图4 调控莱茵衣藻 *pepc2* 基因表达后, *pepc* 基因的相对表达量

Fig. 4 After regulating the *pepc2* expression of *Chlamydomonas reinhardtii* cc-400, the *Crpepc* expression of wild type and mutants determined by RT-qPCR

误差棒是根据 3 次重复实验得出平均值 (\pm SD), 图 5-7 同
The bar graphs represented the mean data of relative gene expressions and standard deviations of three biological replicates (\pm SD), the same in fig. 5-7

3 讨论

PEPC 位于 C 代谢的关键位置,它催化磷酸烯醇式丙酮酸(PEP)生成草酰乙酸(OAA),随后进入三羧酸循环(TCA),乙酰辅酶 A 羧化酶(ACCCase)是脂肪酸代谢中的限速酶,ACCCase 与 PEPC 竞争相同的底物 PEP,以此来决定碳代谢^[28]。虽然 PEPC 并非是脂质代谢中的直接关联酶,但是根据陈锦清等提出的“底物竞争说”^[29],丙酮酸是 PEPC 和 ACCCase 酶共同竞争底物,如果抑制 PEPCase 的表达,则有利于碳代谢合成脂肪酸。目前已经有学者发现 PEPC 表达量与油脂含量呈反比,DENG 等在 2011 年和 2014 年用基因敲除法抑制 *Crpepc1* 与 *Crpepc2* 基因的表达,结果均发现油脂含量提高,但基因敲除方法太强烈,基因敲除后对莱茵衣藻的生长影响未见报道^[14-15]。本实验室在陈锦清等^[29-30]的启发下用正反载体法在蓝藻^[13]、衣藻^[22]中探究 *pepc* 基因表达与其代谢产物的关系,该方法已经相对成熟,故本研究用正反载体法调控 *Crpepc2* 基因表达,克隆了莱茵衣藻 *pepc2* 部分片段 639 bp,该片段位于莱茵衣藻“细菌型”PEPC 的保守序列 I,该区域可催化草酰乙酸的合成,且包含一个活性位点(H)^[9]。构建了正反向和空质粒型叶绿体表达载体,探究 PEPC 表达对莱茵衣藻蛋白质油脂代谢产物的影响。

莱茵衣藻基因工程中外源基因的转化以叶绿体转化效率最高,利用叶绿体的原核性,使得转入的外源基因通过母系遗传直接传递给子代,转化子能稳定遗传^[26]。叶绿体表达有很多优点,但用叶绿体表达法调控 PEPC 的表达国内外均未报道,因此本研究用莱茵衣藻叶绿体表达质粒 pASap I,启动子 *atp A*,上下游同源片段 *psb H*,构建了叶绿体表达载体 pASap I -forw-*Crpepc2* 和 pASap I -reve-*Crpepc2* 并转化莱茵衣藻 cc-400,对比 *Crpepc2* 基因过表达突变株(正向),抑制表达突变株(反向)与野生型、空质粒型在生理生化方面的异同,结果发现,除 PEPCase 活性表达和生长特性外,还有两个特点:反向型油脂含量提高了;正向型蛋白质含量提高。

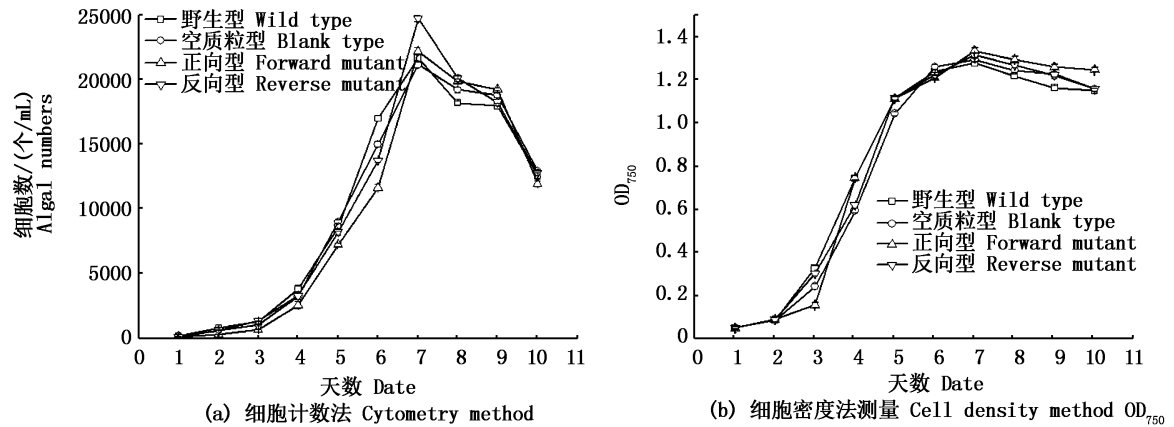


图 5 调控莱茵衣藻 *pepc2* 基因表达后,4 种藻株的生长状况
 Fig.5 After regulating the *pepc2* expression of *Chlamydomonas reinhardtii* cc-400, the growth of wild type and mutants

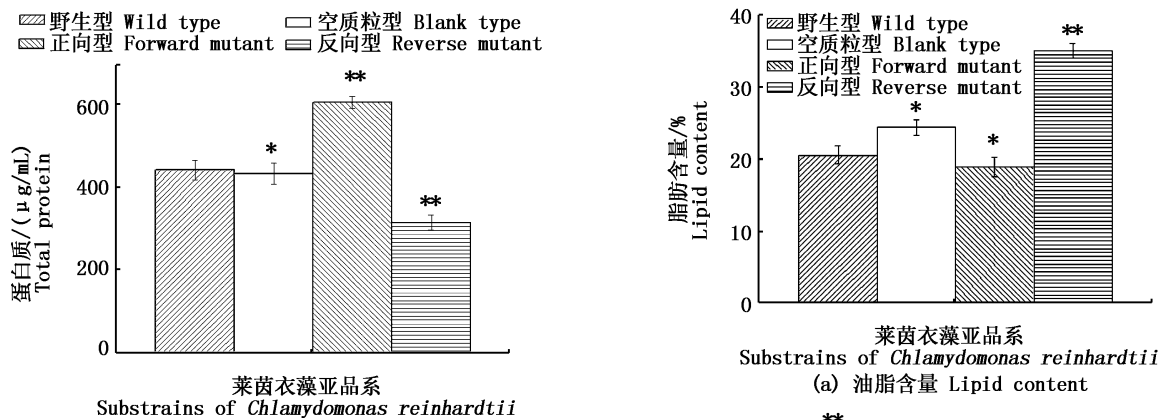


图 6 调控莱茵衣藻 *pepc2* 基因表达后, 4 种藻株总蛋白含量

Fig.6 After regulating the *pepc2* expression of *Chlamydomonas reinhardtii* cc-400, the total protein of wild type and mutants

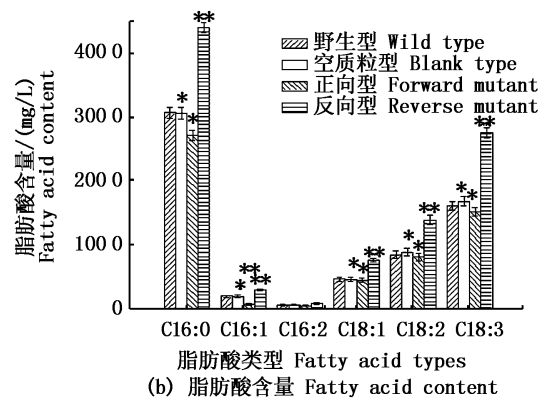


图 7 调控莱茵衣藻 *pepc2* 基因表达后, 4 种藻株的油脂含量与脂肪酸含量

Fig.7 After regulating the *pepc2* expression of *Chlamydomonas reinhardtii* cc-400, the lipid content of wild type and mutants

本实验发现莱茵衣藻 *Crpepc2* 基因的表达式被调控,PEPC 酶活性也被调控,但并没有影响转基因藻株的正常生长,也证明了正反向表达载体法的可行性。正向突变株有较高的 PEPCase 活性,促进了蛋白质的积累,在高等植物中也有这样的先例,表达了谷氨酸棒状杆菌 PEPC 的转基因种子中,PEPC 催化 PEP 补缺反应的增强导致光合产物糖和淀粉流向游离氨基酸的合成,导致转基因种子中蛋白质含量提高了 20%^[31],但在莱茵衣藻中是首次被证明。反向突变株 PEPCase 活性被抑制促进了油脂的生物合成,用反义基因法抑制欧洲油菜的 PEPCase 活性,导致共同底物 PEP 流向脂质积累^[32],DENG 等抑制 *Crpepc2* 基因

表达后油脂含量增加了 14% ~ 28%^[14],本研究反向突变株油脂含量增加了 70.32%。不仅如此反向突变株的脂肪酸含量也增加了,尤其是 C16-C18 的不饱和脂肪酸,C16-C18 脂肪酸也是生物

柴油的主要成分,目前生物柴油的难点是在生长和含油率中找到平衡点,而反向突变株油脂含量提高且生长迅速,今后可为高产油工程藻做贡献。首先本实验成功构建了莱茵衣藻 *pepc2* 基因的正反向叶绿体表达载体,并通过荧光定量 PCR 方法检测了 *Crpepc2* 的相对表达量,目前还未发现 *Crpepc2* 基因叶绿体表达的相关报道。其次, PEPC 可以调控光合产物的分配,过表达的 PEPC 促进蛋白质的合成,抑制 PEPC 的表达促进脂质的合成,且调控 PEPC 表达,对突变株的生长影响不大。综上所述,莱茵衣藻“细菌型”PEPC 可以调控蛋白质和脂肪酸含量,且不影响藻的生长,反向型突变株脂质含量的提高对构建高产油工程藻是一个突破。

参考文献:

- [1] PATEL H M, KRASZEWSKI J L, MUKHOPADHYAY B. The phosphoenolpyruvate carboxylase from *Methanothermobacter thermoautotrophicus* has a novel structure [J]. *Journal of Bacteriology*, 2004, 186(15): 5129-5137.
- [2] ETTEMA T J G, MAKAROVA K S, JELLEMA G L, et al. Identification and functional verification of archaeal-type phosphoenolpyruvate carboxylase, a missing link in archaeal central carbohydrate metabolism [J]. *Journal of Bacteriology*, 2004, 186(22): 7754-7762.
- [3] SÁNCHEZ R, CEJUDO F J. Identification and expression analysis of a gene encoding a bacterial-type phosphoenolpyruvate carboxylase from *Arabidopsis* and rice [J]. *Plant Physiology*, 2003, 132(2): 949-957.
- [4] RIVOAL J, DUNFORD R, PLAXTON W C, et al. Purification and properties of four phosphoenolpyruvate carboxylase isoforms from the green alga *Selenastrum minutum*: evidence that association of the 102-kDa catalytic subunit with unrelated polypeptides may modify the physical and kinetic properties of the enzyme [J]. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 1996, 332(1): 47-57.
- [5] RIVOAL J, PLAXTON W C, TURPIN D H. Purification and characterization of high- and low-molecular-mass isoforms of phosphoenolpyruvate carboxylase from *Chlamydomonas reinhardtii* [J]. *Biochemical Journal*, 1998, 331(1): 201-209.
- [6] RIVOAL J, TRZOS S, GAGE D A, et al. Two unrelated phosphoenolpyruvate carboxylase polypeptides physically interact in the high molecular mass isoforms of this enzyme in the unicellular green alga *Selenastrum minutum* [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2001, 276(16): 12588-12597.
- [7] RIVOAL J, TURPIN D H, PLAXTON W C. In vitro phosphorylation of phosphoenolpyruvate carboxylase from the green alga *Selenastrum minutum* [J]. *Plant and Cell Physiology*, 2002, 43(7): 785-792.
- [8] MERCHANT S S, PROCHNIK S E, VALLON O, et al. The *Chlamydomonas* genome reveals the evolution of key animal and plant functions [J]. *Science*, 2007, 318(5848): 245-250.
- [9] MAMEDOV T G, MOELLERING E R, CHOLLET R. Identification and expression analysis of two inorganic C- and N-responsive genes encoding novel and distinct molecular forms of eukaryotic phosphoenolpyruvate carboxylase in the green microalga *Chlamydomonas reinhardtii* [J]. *The Plant Journal*, 2005, 42(6): 832-843.
- [10] MAMEDOV T G, CHOLLET R. Discovery of novel phosphoenolpyruvate carboxylase (PEPC) genes and their active polypeptides in the green microalga *Chlamydomonas reinhardtii* [J]. *Proceedings of ANAS (Biological Sciences)*, 2010, 65(5/6): 99-105.
- [11] MOELLERING E R, OUYANG Y X, MAMEDOV T G, et al. The two divergent PEP-carboxylase catalytic subunits in the green microalga *Chlamydomonas reinhardtii* respond reversibly to inorganic-N supply and co-exist in the high-molecular-mass, hetero-oligomeric Class-2 PEPC complex [J]. *FEBS Letters*, 2007, 581(25): 4871-4876.
- [12] 侯李君, 王学魁, 施定基. 蓝藻磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶的生物信息学分析 [J]. *生物技术通报*, 2008(4): 149-154.
- [13] HOU L J, WANG X K, SHI D J. Bioinformatics analysis on phosphoenolpyruvate carboxylase in *Cyanobacteria* [J]. *Biotechnology Bulletin*, 2008(4): 149-154.
- [14] JIA X H, ZHANG P P, SHI D J, et al. Regulation of *pepc* gene expression in *Anabaena* sp. PCC 7120 and its effects on cyclic electron flow around photosystem I and tolerances to environmental stresses [J]. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2015, 57(5): 468-476.
- [15] 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 and Bioenergy*, 2011, 35(5): 1811-1817.
- [16] DENG X D, CAI J J, LI Y J, et al. Expression and knockdown of the *PEPC1* gene affect carbon flux in the biosynthesis of triacylglycerols by the green alga *Chlamydomonas reinhardtii* [J]. *Biotechnology Letters*, 2014, 36(11): 2199-2208.
- [17] MAYFIELD S P, FRANKLIN S E, LERNER R A. Expression and assembly of a fully active antibody in algae [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2003, 100(2): 438-442.
- [18] MERCHANT S S, PROCHNIK S E, VALLON O, et al. The *Chlamydomonas* genome reveals the evolution of key animal and plant functions [J]. *Science*, 2007, 318(5848): 245-250.
- [19] MAUL J E, LILLY J W, CUI L Y, et al. The *Chlamydomonas*

- reinhardtii* plastid chromosome; islands of genes in a sea of repeats[J]. The Plant Cell, 2002, 14(11): 2659-2679.
- [19] 任聪,王丹,杨琳,等. 叶绿体中表达外源蛋白的研究进展[J]. 科技通报, 2012, 28(3): 38-42.
- REN C, WANG D, YANG L, et al. Research advance on foreign protein production in chloroplast [J]. Bulletin of Science and Technology, 2012, 28(3): 38-42.
- [20] HARRIS E H. The chlamydomonas sourcebook. A comprehensive guide to biology and laboratory use [M]. San Diego: Academic Press, 1989: 25-40.
- [21] TIAN Q L, SHI D J, JIA X H, et al. Recombinant expression and functional analysis of a *Chlamydomonas reinhardtii* bacterial-type phosphoenolpyruvate carboxylase gene fragment [J]. Biotechnology Letters, 2014, 36(4): 821-827.
- [22] 田琪琳,施定基,贾晓会,等. “细菌型”*pepc2* 基因反向表达载体构建及在莱茵衣藻中的表达[J]. 上海海洋大学学报, 2013, 22(5): 665-671.
- TIAN Q L, SHI D J, JIA X H, et al. The expression of recombinant vector of reverse “bacterial-type” *pepc2* gene in *Chlamydomonas reinhardtii* [J]. Journal of Shanghai Ocean University, 2013, 22(5): 665-671.
- [23] LIVAK K J, SCHMITTGEN T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the method[J]. Methods, 2001, 25(4): 402-408.
- [24] 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.
- [25] EDELSON P J, DUNCAN R A. 36-Lowry and Bradford assays for protein [M]//ADAMS D. Methods for Studying Mononuclear Phagocytes. San Diego, America: Academic Press, 1981: 337-343, doi: 10.1016/B978-0-12-044220-1.50042-8.
- [26] BARNES D, FRANKLIN S, SCHULTZ J, et al. Contribution of 5'- and 3'-untranslated regions of plastid mRNAs to the expression of *Chlamydomonas reinhardtii* chloroplast genes [J]. Molecular Genetics and Genomics, 2005, 274(6): 625-636.
- [27] SUGIMOTO T, TANAKA K, MONMA M, et al. Phosphoenolpyruvate carboxylase level in soybean seed highly correlates to its contents of protein and lipid [J]. Agricultural and Biological Chemistry, 1989, 53(3): 885-887.
- [28] O'LEARY B, PARK J, PLAXTON W C. The remarkable diversity of plant PEPC (phosphoenolpyruvate carboxylase): recent insights into the physiological functions and post-translational controls of non-photosynthetic PEPCs [J]. Biochemical Journal, 2011, 436(1): 15-34.
- [29] 陈锦清,郎春秀,胡张华,等. 反义 PEP 基因调控油菜籽粒蛋白质/油脂含量比率的研究[J]. 农业生物技术学报, 1999, 7(4): 316-320.
- CHEN J Q, LANG C X, HU Z H, et al. Antisense PEP gene regulates to ratio of protein and lipid content in brassica napus seeds [J]. Journal Of Agricultural Biotechnolgy, 1999, 7(4): 316-320.
- [30] 陈锦清,黄锐之,郎春秀,等. 油菜 PEP 基因的克隆及 PEP 反义基因的构建[J]. 浙江大学学报(农业与生命科学版), 1999, 25(4): 365-367.
- CHEN J Q, HUANG R Z, LANG C X, et al. Molecular cloning and sequencing of the PEP gene from Brassia napus and the construction of the antisense PEP gene [J]. Journal of Zhejiang University (Agriculture & Life Science), 1999, 25(4): 365-367.
- [31] ROLLETSCHKE H, BORISJUK L, RADCHUK R, et al. Seed-specific expression of a bacterial phosphoenolpyruvate carboxylase in *Vicia narbonensis* increases protein content and improves carbon economy [J]. Plant Biotechnology Journal, 2004, 2(3): 211-219.
- [32] 万民熙. 能源微藻筛选及其基因工程基础研究[D]. 长沙: 中南大学, 2012.
- WAN M X. Isolation and the basic study on genetic engineering of microalgae for biofuels [D]. Changsha: Central South University, 2012.

Regulation and expression of bacteria type *pepc2* in *Chlamydomonas reinhardtii* and its effect on protein and lipid content

FENG Siyu¹, SHI Dingji^{1,2}, JIA Xiaohui¹, ZHU Jiacheng¹, MI Hualing³, JIA Rui¹, HE Peimin¹

(1. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 2. Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100093, China; 3. Institute of Plant Physiology and Ecology, Shanghai Institutes for Biological Sciences, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200032, China)

Abstract: Phosphoenolpyruvate carboxylase (PEPC, EC 4.1.1.31) plays an important role in plant carbon metabolism, which can affect protein and lipid metabolism in higher plant, while studies on green alga PEPC are limited. *Chlamydomonas reinhardtii* is the model organism in green alga, and its chloroplast transformation is mature and efficient. In order to get high expression quality of protein and lipid content, chloroplast transformation method could be applied. In this study, the sequence with 639 bp (about 1/7 length) of *C. reinhardtii* CS I was cloned, then *C. reinhardtii* was transformed by the empty plasmid pASapI, vectors pASapI-reve-Crpepc2 and pASapI-forw-Crpepc2, to generate “blank,” “forward,” and “reverse” mutants by particle bombardment, respectively. The relative expression of Crpepc2 were detected with RT-qPCR, it showed that Crpepc2 expression of reverse mutant decreased by 89.97%, and that of forward mutant increased by 201.16%. Mean while the contents of protein and lipid were detected, the data showed that total protein of forward mutant rose by 37.03%, and the lipid content of reverse mutant enhanced by 70.32%, moreover, fatty acid of reverse mutant increased obviously. In conclusion, bacteria type PEPC in *Chlamydomonas reinhardtii* not only can improve protein and lipid content, but also can make contribution to foreign protein expression and high lipid content engineered microalgae.

Key words: *Chlamydomonas reinhardtii*; phosphoenolpyruvate carboxylase (PEPC); chloroplast expression; RT-qPCR; fatty acid; protein