

# IPP 异构酶基因遗传转化对雨生红球藻 (*Haematococcus pluvialis*) 虾青素含量的影响\*

王娜 林祥志 马瑞娟 闫晋飞

(国家海洋局第三海洋研究所 海洋生物资源综合利用工程技术研究中心 厦门 361005)

**提要** 采用 RT-PCR 技术, 从雨生红球藻(*Haematococcus pluvialis*)中克隆出 IPP 异构酶基因(*ipiHp1*), 构建双元载体 pCAMBIA3300-*egfp-ipiHp1* 和基因枪转化载体 pBlueScript SK<sup>-</sup>-*bar-egfp-ipiHp1*, 利用根癌农杆菌侵染法和基因枪转化法, 将目的基因导入雨生红球藻中, 经过含 50 $\mu$ g/mL 草丁膦 BBM 培养基筛选得到阳性转化子。通过荧光观察报告基因 *egfp* 和 PCR 扩增分析, 证明 *ipiHp1* 基因整合到转化子的基因组中。生物量测定结果表明大部分转化子的生物量与野生型相似。虾青素含量测定发现, 农杆菌侵染法转化的转化子 A3 虾青素含量与野生型相比有显著变化, 平均值达到 16.49mg/g, 与野生型相比提高了 5.16%, 而基因枪转化法转化的转化子虾青素含量与野生型无显著性差异。

**关键词** 虾青素; 雨生红球藻; IPP 异构酶; 遗传转化

**中图分类号** Q943.2

虾青素(astaxanthin)又名虾红素, 化学名称为 3, 3'-二羟基-4, 4'-二酮基- $\beta$ ,  $\beta'$ -胡萝卜素, 是一种脂溶性红色类胡萝卜素。虾青素具有增强机体免疫力, 预防心血管疾病和癌症, 防止皮肤衰老, 维护视觉及中枢神经系统健康等多种生理功能(Gradelet *et al*, 1997; Jyonouchi *et al*, 1995; Murillo, 1992; Tanaka *et al*, 1994)。虾青素分为化学合成虾青素及天然虾青素, 但化学合成的虾青素在结构、功能、应用及安全性等方面均较天然虾青素逊色(Grewe *et al*, 2007)。雨生红球藻(*Haematococcus pluvialis*)是一种淡水单细胞绿藻, 能在强光、氮饥饿等胁迫条件下大量合成并迅速积累虾青素, 其积累量最高可达细胞干重的 4% (Boussiba, 2000), 被认为是天然虾青素的“浓缩品”(Grung *et al*, 1992)。但雨生红球藻生长速度缓慢, 且生物量提高与虾青素积累之间的矛盾也限制了虾青素的规模化生产, 因此通过基因工程手段改造雨生红球藻的生物学特性, 提高其生长速度和虾青素含量具有重要意义。

目前关于雨生红球藻遗传转化的研究报道较少。

根癌农杆菌侵染法操作简单、成本低, 可转化有完整细胞壁的微藻细胞, 获得稳定转化子的效率较高, 遗传稳定性好, 已经成功应用于莱茵衣藻(Kumar *et al*, 2004)、微拟球藻(Cha *et al*, 2011)、杜氏盐藻(Anila *et al*, 2011)、雨生红球藻(Kathiresan *et al*, 2009)等微藻中。基因枪法应用广泛, 无宿主限制, 几乎可以用于所有微藻转化, 且操作简便, 可控度高, 与农杆菌介导法相比不会引入新的细菌造成污染。基因枪法已成功转化了小球藻(Dawson *et al*, 1997)、杜氏盐藻(吕玉民等, 2004)、三角褐指藻(秦松等, 1999)等微藻。

IPP 异构酶(IPI)是雨生红球藻类胡萝卜素合成途径中的一个限速酶(Albrecht *et al*, 1994), 催化异戊烯基焦磷酸(IPP)与其同分异构体二甲基丙烯基焦磷酸(DMAPP)之间可逆的异构化反应(Wouters *et al*, 2003)。IPI 的表达水平直接影响萜类合成五碳前体库的代谢流向, 是下游代谢途径的总开关(Cunningham *et al*, 2000)。因此, 本文克隆出雨生红球藻的 IPP 异构酶基因(*ipiHp1*), 构建了农杆菌转化载体 pCAMBIA3300-*egfp-ipiHp1* 和基因枪转化载体 pBlueScript SK<sup>-</sup>

\* 海洋公益性行业科研专项经费资助, 201305022 号。王娜, E-mail: xmuwangna@163.com

通讯作者: 林祥志, 博士, 研究员, E-mail: xzlin@tiosoa.org

收稿日期: 2012-10-15, 收修改稿日期: 2013-01-23

*bar-egfp-ipiHp1*, 利用根癌农杆菌侵染法和基因枪转化法, 将目的基因导入雨生红球藻中, 为该基因的进一步表达研究及构建富含虾青素的基因工程雨生红球藻株奠定了基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 藻株, 菌株及克隆载体** 实验所用雨生红球藻(*Haematococcus pluvialis*)为本实验室保藏, 采用BBM培养基(Zhuang *et al.*, 2000), 于22℃、20 μmol/(m<sup>2</sup>·s)的光照强度, 以12h/12h的光/暗周期进行静止培养, 每天摇动一次。取薄壁游动细胞离心收集后用于总RNA提取。

根癌农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*) EHA105、大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH5α、克隆载体pBlueScript SK、pAHC25、pEGFP-N1、pCAT3-Control、pCAMBIA3300均由本实验室保藏。

**1.1.2 实验试剂** 植物总RNA快速提取试剂盒, M-MuLV第一链cDNA合成试剂盒, SanPrep柱式质粒小量抽提试剂盒, SanPrep柱式DNA胶回收试剂盒均购自上海生工生物工程公司, 通用基因组DNA提取试剂盒, 限制性内切酶, DNA Marker及Taq DNA聚合酶购自宝生物工程(大连)有限公司, 化学试剂均为国产分析纯, 测序由英潍捷基(上海)有限公司完成。

**1.1.3 引物设计与合成** 根据Sun等(1998)报道的雨生红球藻*ipiHp1*的cDNA序列(GenBank登录号: AF082325.1), 设计了一对特异性引物:

*ipiHp1*-F: GCGCCCGGGATGCTTCGTTTCGTTGCTCAGAGGCTCA;

*ipiHp1*-R: GCGGAGCTCTCACGCTTCGTTGATGTGATGCACCGTTC。

上下游引物分别带Sma I和Sac I酶切位点(下划线部分)。

载体构建引物如下:

*egfp*引物

*egfp*-F: GCGAAGCTTATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTCA

*egfp*-R: GGCTCTAGATTACTTGTACAGCTCGTCCATGCCGAGAG

Ubi-*ipiHp1*-NOS农杆菌构建引物

Ubi-F: CCATGATTACGAATTCTGCAGCGTGA CCCGGTCGTGCC

Ubi-R: GTAAGAGCTCGAATCCCCGATCTAGTAACATAGATGAC

引物均由上海生工生物工程有限公司合成。

### 1.2 方法

**1.2.1 雨生红球藻*ipiHp1*基因的克隆** 取100mL的藻液于5000r/min 4℃离心5min, 去上清。藻细胞经0.1% DEPC灭菌水洗涤两次, 用液氮研成粉末, 按植物总RNA快速抽提试剂盒使用说明书提取雨生红球藻总RNA。使用M-MuLV第一链cDNA合成试剂盒进行反转录, 合成cDNA第一链, 以cDNA第一链为模板, 以引物*ipiHp1*-F/*ipiHp1*-R进行PCR扩增。用Sma I和Sac I双酶切目的片段, 连入用相同酶切的pBluescript SK, 得到重组质粒pSK-*ipiHp1*, 将其送至英潍捷基(上海)有限公司进行DNA序列的测定。

测序结果发现克隆的*ipiHp1*基因在160位有一个碱基突变, 为保证IPP异构酶结构不发生变化以致失去活性等, 得到*ipiHp1*基因的原始序列, 利用定点突变技术, 将*ipiHp1*基因160位碱基突变为C, 测序正确用于转化载体的构建。

**1.2.2 农杆菌转化载体pCAMBIA3300-*egfp-ipiHp1*的构建** 用Sma I和Sac I双酶切载体pSK-*ipiHp1*, 回收*ipiHp1*基因片段并将其与用相同酶切的质粒pAHC25相连, 得到重组质粒pAHC25-*ipiHp1*, 该质粒含有以Ubiquitin为启动子、NOS为终止子的*ipiHp1*基因表达盒。

选用*egfp*作为报告基因, 以引物*egfp*-F/*egfp*-R从pEGFP-N1中克隆出*egfp*基因, 测序正确后经Hind III和Xba I双酶切, 回收*egfp*基因片段将其与用相同酶切的质粒pCAT3-Control相连, 得到重组质粒pCAT3-Control-*egfp*, 该质粒含有以SV40为启动子、SV40 poly A为终止子及SV40增强子的*egfp*基因表达盒。

农杆菌转化的载体框架选用pCAMBIA3300。用Sac I和BamH I双酶切pCAT3-Control-EGFP, 回收EGFP表达盒(SV40 promoter-*egfp*-SV40 polyA-SV40 enhancer), 将此表达盒与质粒pCAMBIA3300(Sac I和BamH I双酶切)相连, 得到质粒pCAMBIA3300-*egfp*。采用不依赖于连接反应的克隆方法(LIC, ligation-independent cloning), 以引物Ubi-F/Ubi-R从pAHC25-*ipiHp1*中克隆出*ipiHp1*表达盒(Ubiquitin-*ipiHp1*-NOS), 将此表达盒连入质粒pCAMBIA3300-*egfp*中, 获得农杆菌转化载体pCAMBIA3300-*egfp-ipiHp1*, 该载体含有目的基因*ipiHp1*表达盒, 报告基因*egfp*表达盒及质粒本身的筛选基因*bar*表达盒。将构建好的载体pCAMBIA3300-*egfp-ipiHp1*送英潍捷基(上海)有限公司进行DNA序列的测定。

### 1.2.3 基因枪转化载体 pBlueScript SK *-bar-egfp-*ipiHp1** 的构建

基因枪转化的载体框架选用 pBlueScript SK。从质粒 pCAMBIA3300 中克隆出以 CaMV 35S 为启动子, Poly A 为终止子的筛选基因 *bar* 表达盒, 利用已经构建好的报告基因 *egfp* 表达盒、目的基因 *ipiHp1* 表达盒, 构建基因枪转化载体 pBlueScript SK *-bar-egfp-*ipiHp1**, 将构建好的载体送英潍捷基(上海)有限公司进行 DNA 序列的测定。

### 1.2.4 根癌农杆菌介导雨生红球藻的转化

根癌农杆菌 EHA105 于 28℃ 摇床培养至 OD<sub>600</sub> 为 0.5, 离心收集菌体制备感受态。将含有 *ipiHp1* 基因的质粒 pCAMBIA3300-*egfp-*ipiHp1** 通过热激法转入根癌农杆菌 EHA105, 在含 50g/mL 卡那霉素、50μg/mL 利福平的 TYNG 平板(蛋白胨 10g/L, 酵母膏 5g/L, NaCl 5g/L, MgSO<sub>4</sub> 0.2g/L)上筛选阳性转化子。

挑取单个转化子于 5mL TYNG 培养液中(含 50 μg/mL 卡那霉素、50μg/mL 利福平), 28℃、200r/min 培养 24h 左右, 接 5mL 菌液于 50mL TYNG 培养液中培养至 OD<sub>600</sub> 为 0.4—0.5, 加入 100μmol/L 乙酰丁香酮诱导, 培养至 OD<sub>600</sub> 为 0.6—0.8 左右。离心收集菌体, 用 BBM 培养基洗涤菌体两遍, 将菌体重悬于 5mL 5.8mmol/L NaNO<sub>3</sub> 的 BBM 培养基中备用。

将雨生红球藻按 1:10 的比例接种于 100mL BBM 培养基中, 于 22℃, 20—50μmol/(m<sup>2</sup>·s) (12h 12h 光/暗周期)培养至对数期(约 5 天)。22℃, 2700r/min 离心 5min 收集藻体, BBM 培养基洗涤藻体两次。用预处理剂(20mmol/L pH 5.8 磷酸钠缓冲液+25mmol/L DTT 配制)处理藻体 30min。预冷的无菌水洗涤藻体一遍, 4℃, 2700r/min 离心, BBM 洗涤藻体一遍。将藻体重悬于 10mL 5.8 mmol/L NaNO<sub>3</sub> 的 BBM 培养基中备用。

在 9cm 的培养皿中加入 4mL 的雨生红球藻藻液, 1mL 的根癌农杆菌菌液, 22℃, 20—50μmol/(m<sup>2</sup>·s)全光照培养 48h。将培养皿中的共培养液转移到 50mL 离心管中, 4℃, 1000r/min, 离心 5min 收集藻细胞, 用含有 500μg/mL 头孢噻肟钠, 200μg/mL 棒酸钾, 100μg/mL 氨基青霉素的新鲜 BBM 培养基洗涤藻体三遍。将藻细胞重悬于 1mL 含有抗生素的 BBM 培养基中, 密度约为 10<sup>7</sup> 左右, 取 500μL 涂布于含 500μg/mL 头孢噻肟钠, 200μg/mL 棒酸钾, 100μg/mL 氨基青霉素及 50μg/mL 草丁膦的固体 BBM 平板上, 22℃, 20—50μmol/(m<sup>2</sup>·s)(12h 12h 光/暗周期)倒置培养三周至长出单个克隆, 挑取转化子进行鉴定。同时, 以未与农杆菌共培养的雨生红球藻做阴性对照, 将

其涂布于筛选培养基。

### 1.2.5 基因枪法转化雨生红球藻

基因枪子弹的制作参照 Heiser 等(1992)的方法。收集对数生长期的雨生红球藻游动薄壁细胞, 用 PBS 缓冲液洗涤细胞, 将约 1×10<sup>6</sup> 个藻细胞均匀地分布在直径为 1.5cm 的无菌三层滤纸上, 放置在 BBM 固体培养基平板上, 进行基因枪转化。轰击参数为样品室真空度 6.1×10<sup>3</sup> Pa, 可裂膜 450 psi (pound per square inch), 受体与阻挡网间距 6cm。轰击后立即将雨生红球藻转入液体培养基, 20℃ 黑暗过夜恢复培养, 转入 12h 12h 光/暗周期, 20μmol/(m<sup>2</sup>·s)光照强度, 静止培养。48h 后在含有 5mg/L 草丁膦和 50mg/L Ampicillin 的液体培养基进行初步筛选, 静置培养数日后, 取上层悬浮的雨生藻, 涂在含有草丁膦(50mg/L)和氨基青霉素(100mg/L)的 BBM 平板, 22℃, 20—50μmol/(m<sup>2</sup>·s) (12h 12h 光/暗周期)倒置培养 3 周至长出单个克隆, 挑取转化子进行鉴定。

### 1.2.6 雨生红球藻转化子的鉴定

挑取转化子加一滴 BBM 培养基制成临时装片, 在荧光显微镜下观察, 用不同的激发光观察是否有 EGFP 荧光。

根据 *bar* 抗性基因以及 Ubi-*ipiHp1* 的片段设计引物:

*bar*-F: 5'-GCATGAGCCCAGAACGACGCCCGG CCGAC-3';

*bar*-R: 5'-GGTCAAATCTCGGTGACGGGCAGG ACCGGA-3';

Ubi 验证-F: 5'-CTATTCATATGCTCTAACCTTGA GTACCTATCTA-3';

Ubi 验证-R: 5'-GCTCATCCTGCGACTGCCCGC CTGCCAGGTGCTT-3';

挑取野生型与转化株雨生红球藻于 10mL BBM 培养基中进行培养, 利用 Universal Genomic DNA Extraction Kit (Takara)提取基因组 DNA, 以引物 *bar*-F/*bar*-R 和 Ubi 验证-F/Ubi 验证-R 进行 PCR 扩增鉴定。

### 1.2.7 雨生红球藻生物量及虾青素含量的测定

雨生红球藻培养至稳定期时, 取 10ml 培养液, 于 5000r/min 离心 10min, 藻细胞用去离子水洗一次, 转入称量瓶中, 于 80℃ 烘 2h 至衡重后进行称量。

取稳定期前期的雨生红球藻细胞培养液, 22℃, 2700r/min 离心 10min, 用缺氮的 BBM 培养基(即不加 NaNO<sub>3</sub>)重悬, 22℃ 全光照培养 4 周诱导虾青素合成, 光照强度约为 140—280μmol/(m<sup>2</sup>·s)。离心收集藻体, 冷冻干燥。在离心管中加入 25mg 雨生红球藻藻粉, 3g 石英砂和 5mL DMSO, 45—50℃ 温浴 30min, 每隔

10min 涡旋振荡 15s。4℃, 4000r/min 离心 5min, 得到上清液和沉淀物质, 转移上清液至 50mL 容量瓶; 在沉淀物质加入 5mL 丙酮, 涡旋振荡 30s, 4℃, 4000r/min 离心 5min, 转移上清液至 50mL 容量瓶, 丙酮抽提至少 3 次至上清液基本无色(吸光值小于 0.05), 用丙酮定容至 50mL, 吸取 5—7mL 于离心管中, 4℃, 4000r/min 离心除去颗粒物。在 474nm 波长下测定最大吸光值, 以丙酮作空白对照。如果吸光值大于 1.25, 则必须对样品用丙酮稀释后再测, 稀释比例一般为 1/7。虾青素含量计算公式为:

$$C_{x.c} = A_{474} \times V \times f \times 10 / 2500$$

$$C = C_{x.c} \times 1000 \times 80\% / m$$

式中,  $C$  为虾青素含量(mg/g 藻粉);  $C_{x.c}$  为总类胡萝卜素含量(mg);  $A_{474}$  为于波长 474nm 处 1cm 比色皿测得的吸光值;  $V$  为原提取液体积(mL);  $f$  为稀释因子;  $m$  为藻粉的质量(mg)。

## 2 结果与分析

### 2.1 雨生红球藻 *ipiHp1* 基因的克隆

雨生红球藻中提取的总 RNA 的电泳结果如图 1。由电泳图可以看出, 所提取的总 RNA 中 28S RNA 和 18S RNA 两条带均很清晰, 且 28S RNA 条带较 18S RNA 的亮, 说明提取的总 RNA 没有发生较多的降解, 有较好的完整性, 可用于后续试验。*ipiHp1* 基因的 RT-PCR 扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 扩增出长度约为 0.9kb 的片段(图 2), 与预克隆的目的片段大小一致。

测序结果表明, 克隆获得的 *ipiHp1* 基因全长 918bp, 共编码 305 个氨基酸。将测序结果与 GenBank 公布的雨生红球藻 *ipiHp1* 基因序列(AF082325.1) 进行比较, 同源率为 99% (917/918), 克隆获得的 *ipiHp1* 基因第 160 位碱基是 T, 而 GenBank 公布的 *ipiHp1* 基因是 C, 导致了一个氨基酸的突变(54 位氨基酸由 Arg 突变为 Cys)。为保证 IPP 异构酶结构不发生变化以致失去活性, 对 pSK-*ipiHp1* 进行定点突变, 得到 *ipiHp1* 基因的原始序列(图 3)。测序正确后用于转化载体的构建。

### 2.2 农杆菌转化载体 pCAMBIA3300-*egfp-ipiHp1* 的构建

构建了双元表达载体 pCAMBIA3300-*egfp-ipiHp1*, 该载体含有目的基因 *ipiHp1*

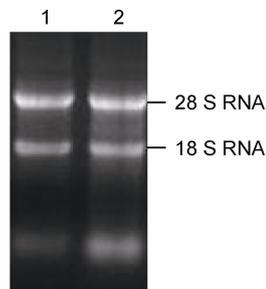


图 1 雨生红球藻总 RNA  
Fig.1 Total RNA of *H. pluvialis*

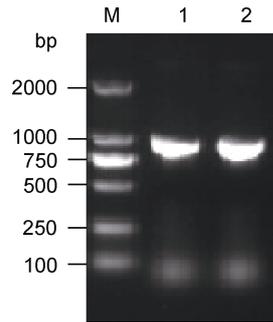


图 2 雨生红球藻 *ipiHp1* 基因 RT-PCR 产物  
Fig.2 RT-PCR products of *H. pluvialis ipiHp1* gene  
M: DL2000 DNA Marker;  
1, 2: *ipiHp1* 基因

表达盒, 报告基因 *egfp* 表达盒及质粒本身的筛选基因 *bar* 表达盒。构建过程如图 4 所示。

### 2.3 基因枪转化载体 pBlueScript SK -*bar-egfp-ipiHp1* 的构建

构建了基因枪转化载体 pBlueScript SK -*bar-egfp-ipiHp1*, 该载体含有 *ipiHp1* 表达模块(Ubiquitin-*ipiHp1*-NOS), 报告基因 *egfp* 表达模块(SV40-*egfp*-Poly A)及筛选基因 *bar* 表达模块(CaMV35S-*bar*-Poly A)。测序结果正确。

### 2.4 根癌农杆菌介导雨生红球藻的转化

雨生红球藻与根癌农杆菌共培养后涂布于筛选培养基中, 22℃, 20—50μmol/(m<sup>2</sup>·s) (12h/12h 光/暗周期) 培养三周后平板上有藻落长出(图 5b), 而未加农杆菌的对照组无藻落长出(图 5a)。

### 2.5 基因枪法转化雨生红球藻

将获得的重组质粒 pBlueScript SK -*bar-egfp-ipiHp1* 用基因枪法转入雨生红球藻内, 经过抗性平板筛选, 得到阳性转化子, 见图 6。

### 2.6 雨生红球藻转化子的鉴定

挑取克隆子加一滴 BBM 培养基制成临时装片, 在荧光显微镜下观察, 用紫外光或蓝光激发观察是否有 EGFP 荧光, 结果表明 *egfp* 基因在雨生红球藻中得到了表达(图 7)。

提取转化子和野生型雨生红球藻的基因组 DNA, 以引物 *bar*-F/*bar*-R 和 Ubi 验证-F/Ubi 验证-R 进行扩增, 转化子的基因组 DNA 均能扩增出 *bar* 基因和

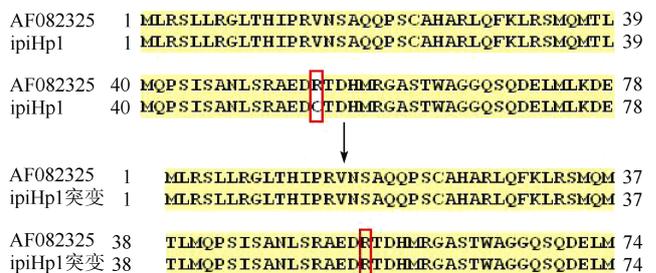


图 3 *ipiHp1* 突变前后氨基酸序列比对

Fig.3 Amino acid sequence alignment of *ipiHp1* before and after mutation

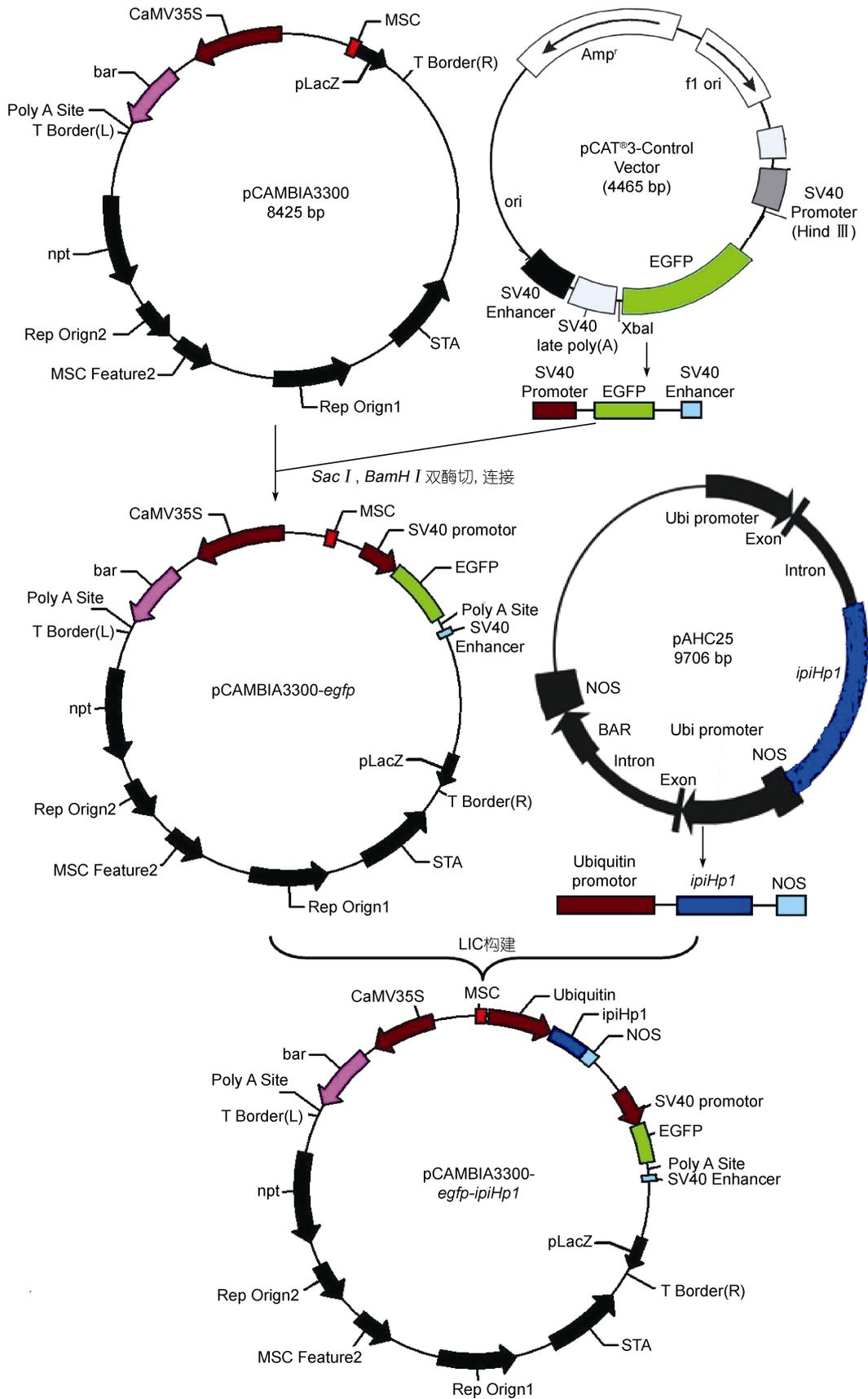


图 4 重组质粒 *pCambia3300-egfp-ipiHp1* 的构建  
Fig.4 Construction of vector *pCambia3300-egfp-ipiHp1*

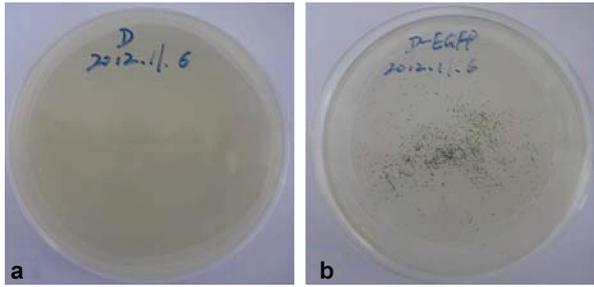


图 5 根癌农杆菌介导雨生红球藻转化阳性克隆筛选  
Fig.5 Screening positive clone of *A. tumefaciens*-mediated transformation of *H. pluvialis*

a. 对照组: 雨生红球藻未与农杆菌共培养, 无藻落长出; b. 实验组: 雨生红球藻与农杆菌共培养, 有藻落长出

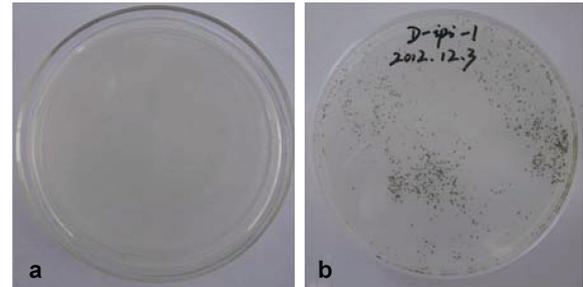


图 6 雨生红球藻基因枪转化阳性转化子的筛选  
Fig.6 Screening of positive clone of particle bombardment of *H. pluvialis*

a. 对照组: 野生雨生红球藻未进行基因枪转化, 无藻落长出; b. 实验组: 基因枪转化雨生红球藻, 有藻落长出

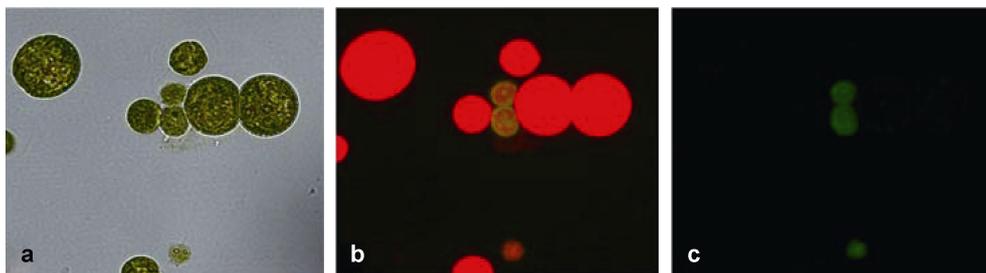


图 7 雨生红球藻阳性转化子荧光显微镜检测

Fig.7 EGFP assay of transformed cells of *H. pluvialis*

a. 雨生红球藻转化细胞(DIC); b. 雨生红球藻转化细胞(UV); c. 雨生红球藻转化细胞(蓝光)

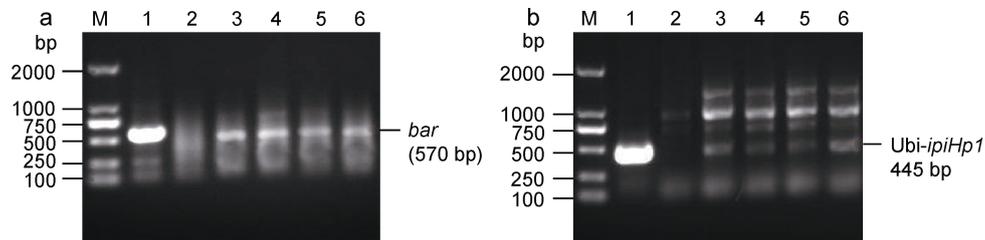


图 8 雨生红球藻转化子的 PCR 鉴定

Fig.8 Identification of transformed cells of *H. pluvialis* by PCR

a. PCR 扩增 *bar* 基因; b. PCR 扩增 *Ubi-ipiHp1*。1 为阳性对照(以质粒 pCambia3300-*egfp-ipiHp1* 为模板扩增), 2 为阴性对照(以野生雨生红球藻基因组 DNA 为模板扩增), 3—6 为实验组(以转化子雨生红球藻基因组 DNA 为模板扩增)

*Ubi-ipiHp1* 基因, 而野生型雨生红球藻的基因组 DNA 不能扩增出来(图 8), 说明目的基因已经插入雨生红球藻的基因组中。

经过鉴定农杆菌转化和基因枪转化得到的雨生红球藻转化子, 结果表明目的基因已经插入雨生红球藻的基因组中。

## 2.7 雨生红球藻生物量的测定

测定相同培养条件下野生型雨生红球藻 WT, 农杆菌侵染得到的雨生红球藻转化子 A1—A6 以及基因枪法转化得到的雨生红球藻转化子 B1—B6 的生物量

(表 1), 利用 GraphPad Prism 5 软件对生物量进行单因素方差分析其差异性。结果表明, 雨生红球藻转化子的生物量与野生型无显著性差异( $P>0.05$ ), 说明农杆菌介导 *ipiHp1* 基因的转化对雨生红球藻的生长没有显著影响。

## 2.8 雨生红球藻虾青素含量的测定

雨生红球藻野生型 WT 与转化子 A1—A6, B1—B6 在相同条件下诱导之后, 测定其虾青素含量(表 2), 利用 GraphPad Prism 5 软件对虾青素含量进行单因素方差分析其差异性。

由表 2 可以看出, 与野生型相比, 农杆菌感染法得到雨生红球藻转化子 A3 虾青素含量有明显上升, A5 有所下降。表 3 通过 Dunnett's Multiple Comparison Test 统计学分析结果表明 A1、A2、A4、A5、A6 的虾青素含量与野生型的无显著差异, 而转化子 A3 的虾青素含量与野生型有显著差异( $P<0.05$ ), 平均值达到 16.49 mg/g, 与野生型(平均值 15.68mg/g)相比提高了 5.16%, 说明 *ipiHpl* 基因的过表达能提高虾青素的含量。

由表 2 可以看出, 与野生型相比, 基因枪转化法得到的雨生红球藻转化子的虾青素含量相差不大, B4

虾青素含量有所上升, B2 有所下降。通过 Dunnett's Multiple Comparison Test 统计学分析(表 4), 结果表明转化子的虾青素含量与野生型的无显著性差异( $P=0.1350>0.05$ )。

### 3 讨论

近年来, 雨生红球藻中虾青素的合成途径已经阐明, 其中的一些关键酶基因也分离出来并取得一定的研究进展。Liang 等(2006)克隆了八氢番茄红素合成酶(PSY)完整的 cDNA 序列, 发现在胁迫条件下

表 1 雨生红球藻转化子和野生型的生物量(g/L)  
Tab.1 Biomass of *H. pluvialis* transformants and wide type (g/L)

农杆菌转化法得到的转化子	A1	A2	A3	A4	A5	A6	WT
生物量	0.83	0.83	0.78	0.84	0.81	0.81	0.81
	0.85	0.79	0.80	0.83	0.82	0.85	0.83
基因枪转化法得到的转化子	B1	B2	B3	B4	B5	B6	WT
生物量	0.84	0.86	0.81	0.84	0.81	0.82	0.84
	0.84	0.84	0.85	0.82	0.81	0.80	0.82

表 2 雨生红球藻转化子和野生型的虾青素含量(mg/g)  
Tab.2 Astaxanthin content of *H. pluvialis* transformants and wide type (mg/g)

农杆菌转化法得到的转化子	A1	A2	A3	A4	A5	A6	WT
虾青素含量	16.32	15.82	16.59	15.87	15.55	15.91	15.76
	15.76	16.06	16.39	15.79	15.15	15.43	15.58
基因枪转化法得到的转化子	B1	B2	B3	B4	B5	B6	WT
虾青素含量	16.34	15.02	15.53	16.40	15.76	15.59	15.73
	15.74	15.68	16.13	16.59	16.12	15.91	15.36

表 3 雨生红球藻野生型和农杆菌感染法转化子虾青素含量的单因素方差分析

Tab.3 One-way analysis of variance of astaxanthin content of *A. tumefaciens*-mediated transformants and wide type of *H. pluvialis*

Dunnett 多重比较试验	平均差	q 值	是否显著( $P<0.05$ )	总结	95%置信区间
WT vs A1	-0.3700	1.5100	No	ns	-1.1860—0.4461
WT vs A2	-0.2700	1.1020	No	ns	-1.0860—0.5461
WT vs A3	-0.8200	3.3470	Yes	*	-1.6360—-0.003881
WT vs A4	-0.1600	0.6530	No	ns	-0.9761—0.6561
WT vs A5	0.3200	1.3060	No	ns	-0.4961—1.1360
WT vs A6	0.0000	0.0000	No	ns	-0.8161—0.8161

注: \*表示有显著差异( $P<0.05$ ), ns 表示两组之间没有显著差异

表 4 雨生红球藻野生型和基因枪转化子虾青素含量的单因素方差分析

Tab.4 One-way analysis of variance of astaxanthin content of *H. pluvialis* transformants of particle gun and wide type

Dunnett 多重比较试验	平均差	q 值	是否显著( $P<0.05$ )	总结	95%置信区间
WT vs B1	-0.4950	1.4830	No	ns	-1.6070—0.6171
WT vs B2	0.1950	0.5841	No	ns	-0.9171—1.3070
WT vs B3	-0.2850	0.8536	No	ns	-1.3970—0.8271
WT vs B4	-0.9500	2.8450	No	ns	-2.0620—0.1621
WT vs B5	-0.3950	1.1830	No	ns	-1.5070—0.7171
WT vs B6	-0.2050	0.6140	No	ns	-1.3170—0.9071

其 mRNA 水平稳定上升。Grunewald 等(2000)克隆了八氢番茄红素脱氢酶(PDS)的 cDNA 序列并对该酶进行了细胞定位,发现它只存在于红球藻的叶绿体中,其催化产物必须被运输到细胞质中积累,在胁迫条件下 *pds* 的转录水平上调。Steinbrenner 等(2003)克隆了  $\beta$ -胡萝卜素羟化酶(CRTZ)的部分 cDNA 序列,在胁迫条件下其 mRNA 水平上升。

雨生红球藻虾青素合成途径中第一个关键步骤是 IPP 异构酶催化 IPP 与其同分异构体 DMAPP 之间异构化反应。Sun 等(1998)指出虽然该过程是可逆的反应,但平衡更倾向于生成 DMAPP,该异构化反应是类胡萝卜素合成的限速步骤;Sun 等(1998)从雨生红球藻中分离了 IPP 异构酶的两个 cDNA 克隆,分别为 *ipiHp1* 和 *ipiHp2*,编码大小为 34kDa 和 32.5kDa 的多肽,IPIHp1 较 IPIHp2 多了一段 12-aa 的区域;胁迫条件下两个基因的 mRNA 水平明显上升,在具有类胡萝卜素合成基因簇的大肠杆菌中转入 *ipiHp1*,发现大肠杆菌的类胡萝卜素的积累量增加,推测提高 IPP 异构酶的表达水平可以增加虾青素等类胡萝卜素的合成。但是以提高虾青素产量为目的在雨生红球藻中导入该基因使 IPP 异构酶过表达目前国内外都没有报道。本研究根据已知的 cDNA 序列,克隆了 *ipiHp1* 基因,将带有 *ipiHp1* 基因表达模块的载体转入雨生红球藻内,初步检测了转化株虾青素含量的变化,为构建高产虾青素的基因工程藻株奠定了基础。

由于雨生红球藻尚未实现全基因组测序,外源基因的转化体系的建立也处于研究状态,因此关于雨生红球藻遗传转化的相关研究报道较少。根癌农杆菌介导的转化方法具有可转化有细胞壁的微藻细胞,避免去壁,T-DNA 准确插入宿主基因组中,可较高效率地获得稳定转化子等优点。本研究利用根癌农杆菌介导的转化方法将 *ipiHp1* 基因转入雨生红球藻中,经过含 50 $\mu$ g/mL 草丁膦抗性筛选得到阳性转化子。通过荧光观察报告基因 *egfp* 和 PCR 扩增鉴定,证明 *ipiHp1* 基因已经整合到转化子的基因组中。生物量测定结果表明大部分转化子的生物量与野生型雨生红球藻明显差异。虾青素含量测定发现,农杆菌侵染法转化的转化子 A3 虾青素含量与野生型相比有显著变化,平均值达到 16.49mg/g,与野生型相比提高了 5.16%。结果说明农杆菌介导的转化可以将外源的功能基因转入到雨生红球藻体内,对雨生红球藻的生长及虾青素含量并不产生显著影响,*ipiHp1* 基因的表达对虾青素含量的提高有一定的促进作用。

基因枪法靶受体类型广泛,不需去除细胞壁即可完成转化,无宿主限制,可控度高,与农杆菌介导法相比不会引入新的细菌造成污染,在藻类的遗传转化中已成为一种比较通用的转化方法。本研究构建了基因枪法转化载体 pBlueScript SK  $\beta$ -bar-*egfp-ipiHp1*,利用基因枪法将目的基因 *ipiHp1* 转入雨生红球藻中,筛选获得阳性转化子,经过鉴定目的基因已经插入雨生红球藻的基因组中。测定生物量和虾青素含量,统计结果表明,转化子和野生型雨生红球藻的生物量和虾青素含量均无显著性差异( $P>0.05$ )。实验预测 *ipiHp1* 基因过表达会使虾青素含量有少量提高,结果与预想的结果有出入,分析其原因可能有两点。第一,与大肠杆菌等原核生物不同,雨生红球藻是真核藻类,基因调控比较复杂,虾青素的合成途径也较为复杂,而虾青素含量是一个极其复杂的通路性状,由整个通路中多个基因控制。真核基因系统是一个相互联系、相互影响的有机整体,虾青素含量的提高有赖于涉及虾青素合成的所有基因之间整体协调性的提高。除了极其关键的基因外,单个基因的转化可能不会引起虾青素含量的剧烈变化。这也是农杆菌侵染得到的转化子虾青素含量变化微弱的原因。第二,雨生红球藻生长较为缓慢,从接种至稳定期约需要两周时间,稳定期后进行虾青素的诱导表达约需要四周或更长时间,在这个过程中,转化子的 *ipiHp1* 基因不稳定造成丢失,可能导致转化子的虾青素含量没有显著差异。此外,基因枪法转化的遗传稳定性不够高,也可能造成目的基因的丢失,需要进一步改进方法,提高遗传转化效率和遗传稳定性。

## 参 考 文 献

- Albrecht M, Sandmann G, 1994. Light-stimulated carotenoid biosynthesis during transformation of maize etioplasts is regulated by increased activity of isopentenyl pyrophosphate isomerase. *Plant Physiol*, 105: 529—534
- Anila N, Chandrashekhara Arun, Ravishankara G A, 2011. Establishment of *Agrobacterium tumefaciens*-mediated genetic transformation in *Dunaliella bardawil*. *European Journal of Phycology*, 46(1): 36—44
- Boussiba S, 2000. Carotenogenesis in the green alga *Haematococcus pluvialis*: Cellular physiology and stress response. *Physiol Plantarum*, 108: 111—117
- Cha T S, Chen C F, Yee W *et al*, 2011. Cinnamic acid, coumarin and vanillin: Alternative phenolic compounds for efficient *Agrobacterium*-mediated transformation of the unicellular green alga, *Nannochloropsis* sp.. *J Microbiol Methods*, 84: 430—434
- Cunningham F X Jr, Gantt E, 2000. Identification of multi-gene

- families encoding isopentenyl diphosphate isomerase in plants by heterologous complementation in *Escherichia coli*. *Plant Cell Physiol*, 41: 119—123
- Gradelet S, Astorg P, Le Bon A M *et al*, 1997. Modulation of aflatoxin B1 carcinogenicity, genotoxicity and metabolism in rat liver by dietary carotenoids: evidence for a protective effect of CYP1A inducers. *Cancer Lett*, 114: 221—223
- Grewe C, Menge S, Griehl C, 2007. Enantioselective separation of all-E-astaxanthin and its determination in microbial sources. *J Chromatogr A*, 1166: 97—100
- Grunewald K, Eckert M, Hirschberg J *et al*, 2000. Phytoene desaturase is localized exclusively in the chloroplast and up-regulated at the mRNA level during accumulation of secondary carotenoids in *Haematococcus pluvialis* (Volvocales, chlorophyceae). *Plant Physiol*, 122: 1261—1268
- Grung M, Dsouza F M L, Borowitzka M *et al*, 1992. Algal carotenoids. 51. secondary carotenoids. 2. *Haematococcus-Pluvialis* aplanospores as a source of (3s, 3's)-astaxanthin esters. *Journal of Applied Phycology*, 4: 165—171
- Heiser R C, Nemetz S T, 1992. Cardiolite vials and the microwave boiling procedure. *J Nucl Med*, 33: 468
- Jyonouchi H, Sun S, Tomita Y *et al*, 1995. Astaxanthin, a carotenoid without vitamin A activity, augments antibody responses in cultures including T-helper cell clones and suboptimal doses of antigen. *J Nutr*, 125: 2483—2492
- Kathiresan S, Chandrashekar A, Ravishankar G A, 2009. *Agrobacterium*-mediated transformation in the green alga *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae, Volvocales). *Journal of Phycology*, 45(3): 642—649
- Kumar S V, Misquitta R W, Reddy V S *et al*, 2004. Genetic transformation of the green alga *Chlamydomonas reinhardtii* by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Sci*, 166: 731—738
- Liang C, Qin S, 2006. Molecular cloning and characterization of phytoene synthase gene from a unicellular green alga *Haematococcus pluvialis*. *Progress in Biochemistry and Biophysics*, 33(9): 854—860
- Murillo E, 1992. Hypercholesterolemic effect of canthaxanthin and astaxanthin in rats. *Arch Latinoam Nutr*, 42: 409—413
- Steinbrenner J, Linden H, 2003. Light induction of carotenoid biosynthesis genes in the green alga *Haematococcus pluvialis*: regulation by photosynthetic redox control. *Plant Mol Biol*, 52: 343—356
- Sun Z, Cunningham Jr F X, Gantt E, 1998. Differential expression of two isopentenyl pyrophosphate isomerases and enhanced carotenoid accumulation in a unicellular chlorophyte. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95: 11482—11488
- Tanaka T, Morishita Y, Suzui M *et al*, 1994. Chemoprevention of mouse urinary bladder carcinogenesis by the naturally occurring carotenoid astaxanthin. *Carcinogenesis*, 15: 15—19
- Wouters J, Oudjama Y, Ghosh S *et al*, 2003. Structure and mechanism of action of isopentenylpyrophosphate-dimethylallylpyrophosphate isomerase. *J Am Chem Soc*, 125: 3198—3199
- Zhuang H R, Shi Q Q, 2000. The effect of nutritional stresses on accumulation of astaxanthin in *Haematococcus pluvialis*. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 24(3): 208—212

## THE EFFECTS OF GENETIC TRANSFORMATION OF ISOPENTENYL DIPHOSPHATE ISOMERASE GENE ON THE ASTAXANTHIN CONTENT OF *HAEMATOCOCCUS PLUVIALIS*

WANG Na, LIN Xiang-Zhi, MA Rui-Juan, YAN Jin-Fei

(Engineering Research Center of Marine Biological Resource Comprehensive Utilization, Third Institute of Oceanography, State Oceanic Administration, Xiamen, 361005)

**Abstract** Isopentenyl diphosphate isomerase gene (*ipiHp1*) is a key enzyme gene for biosynthesis of astaxanthin in *Haematococcus pluvialis*. In this study, the *ipiHp1* gene fragment was amplified by RT-PCR. We constructed a binary vector pCAMBIA3300-*egfp-ipiHp1* and an expression vector pBlueScript SK<sup>-</sup>-*bar-egfp-ipiHp1* for particle gun. The target gene was introduced into *H. pluvialis* by *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation and particle. The transformants was selected and maintained in the BBM agar plates containing 50μg/mL Basta. The EGFP fluorescence assay and PCR analysis indicated that *ipiHp1* gene was integrated into genomic DNA of the *H. pluvialis*. The majority of the transformants displayed similar biomass comparing with the wild type strain. Astaxanthin content detection found that the *A. tumefaciens*-mediated transformant strain A3 had significant difference comparing with the wild type strain ( $P < 0.05$ ). The average reached to 16.49mg/g, compared to wild type increased by 5.16%. The statistical analysis also showed that there was no significant difference ( $P > 0.05$ ) between particle gun transformants and wild-type strains in the variation of astaxanthin content.

**Key words** astaxanthin; *Haematococcus pluvialis*; isopentenyl diphosphate isomerase (IPI); genetic transformation