

根癌农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*) 介导培育富含叶黄素的基因工程小球藻 (*Chlorella vulgaris*)的研究*

马瑞娟 林祥志

(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)

摘要 采用基因克隆技术构建二元载体 pCAMBIA2301-*idi*, 通过电转转入农杆菌 LBA4404 中。利用根癌农杆菌介导的转化方法, 将 pCAMBIA2301-*idi* 质粒的 T-DNA 区转入小球藻, 以 G418 抗性基因(*NPT*)作为筛选标记, 筛选出阳性转化子。通过 PCR 扩增表明 *idi* 基因和 *NPT* 基因已经整合到小球藻基因组中。测定转化子的生物量, 结果表明大部分转化子的生物量与野生型相似。测定转化子小球藻干粉的叶黄素含量, 发现转化子叶黄素含量最高达到 0.84mg/g, 与野生型相比提高了 30.95%。进一步分析藻液中叶黄素的产量, 发现转化子的叶黄素产量最高达到 1.98mg/L, 比野生型提高了 36.77%。

关键词 小球藻, 农杆菌, 遗传转化, *idi* 基因, 叶黄素

中图分类号 Q943.2

叶黄素是一种含氧类胡萝卜素, 其在生物体内起着十分重要的作用。叶黄素具有抗氧化活性, 能够预防癌症(孙震等, 2005)、心血管疾病(Dwyer *et al.*, 2001)和年龄相关黄斑变性(Carpentier *et al.*, 2009)等疾病。此外, 作为一种天然色素, 叶黄素可作为食品、医药和保健品的色素添加剂(吴正云等, 2010)。目前, 叶黄素主要来源于万寿菊, 然而由于劳动力和土地成本提高, 从万寿菊获取叶黄素受到一定限制(Fernandez-Sevilla *et al.*, 2010)。小球藻中含有丰富的叶黄素, 而且小球藻具有生长速度快、可异养培养、易于进行规模化培养和藻种改良的优点, 利用小球藻合成叶黄素越来越受人们的关注。

目前, 应用于小球藻转基因的方法有电转化法(Wang *et al.*, 2007; Chen *et al.*, 2001; Chow *et al.*, 1999)、基因枪法(Dawson *et al.*, 1997)、PEG-CaCl₂介导的转化方法(Kim *et al.*, 2002)和根癌农杆菌介导转化的方法(Cha *et al.*, 2012)。其中, 根癌农杆菌介导的转化方法具有方法简单、成本低, 能够将大片段 DNA 转

入细胞的转录活性区, 且以低拷贝的形式整合和重组等特点。Cha 等(2012)已经建立了根癌农杆菌介导小球藻 *Chlorella vulgaris* 转化的体系, 并研究了影响转化的因素。此外, 根癌农杆菌介导的转化方法已经成功应用于衣藻(Kumar *et al.*, 2004)、雨生红球藻(Kathiresan *et al.*, 2009)、杜氏盐藻(Anila *et al.*, 2011)、裂壶藻(Cheng *et al.*, 2012)和微拟球藻(Cha *et al.*, 2011)等微藻中。

异戊烯焦磷酸(IPP)和二甲基丙烯基焦磷酸(DMAPP)是叶黄素合成的最初前体(高政权等, 2009)。IPP 异构酶催化 IPP 和 DMAPP 之间的转化, 其在叶黄素的合成中起着重要作用。本实验利用根癌农杆菌介导的转化方法介导大肠杆菌 IPP 异构酶基因(*idi*)转化小球藻, 以促进小球藻叶黄素的合成。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 藻株、菌株和质粒 小球藻(*Chlorella vul-*

* 海洋公益性行业科研专项经费资助, 2010418020 号。马瑞娟, E-mail: maruijuan87@126.com

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

收稿日期: 2012-06-16, 收修改稿日期: 2012-09-02

garis)、农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)LBA4404、大肠杆菌(*Escherichia coli*)DH5 α 、质粒 pCAMBIA 2301 均由本实验室保藏。

1.1.2 试剂 抗生素(G418、利福平、链霉素、卡那霉素、氨基青霉素、头孢霉素)、乙酰丁香酮(AS)、蜗牛酶和纤维素酶购自上海生工生物工程公司,限制性内切酶购自宝生物工程(大连)有限公司,质粒提取试剂盒和胶回收试剂盒购自北京百泰克生物技术有限公司,其他化学试剂均为国产分析纯。

1.1.3 培养基 小球藻培养基(FC 培养基): 葡萄糖 10g/L, 胰蛋白胨 2g/L, 牛肉浸膏 1g/L, 酵母浸膏 1g/L, FeSO₄·7H₂O 2mg/L; LB 培养基: 蛋白胨 10g/L, 酵母膏 5g/L, NaCl 10g/L; TYNG 培养基: 蛋白胨 10g/L, 酵母膏 5g/L, NaCl 5g/L, MgSO₄·7H₂O 0.2g/L; IM 培养基见文献(Bundock *et al.*, 1995; Hooykaas *et al.*, 1979)。

1.2 方法

1.2.1 载体的构建 从大肠杆菌 DH5 的基因组中克隆得到 *idi* 基因, 将其连接到 T 载体(Takara)并进行测序。在 pBluescript II SK 质粒上构建以 CAMV35S 为启动子, CYC1 为终止子的 *idi* 基因表达模块。以 *Hind* 和 *Bam*H 双酶切下该表达模块, 并将其连接到含有 *NPT* 基因的 pCAMBIA2301 质粒的多克隆位点, 构建二元载体 pCAMBIA2301-*idi*。

1.2.2 根癌农杆菌介导小球藻的转化 根癌农杆菌 LBA4404 于 28℃ 摇床培养至 OD₆₀₀ 为 0.6—0.8, 离心收集菌体制备电转感受态(Shen *et al.*, 1989)。将含有 *idi* 基因的质粒 pCAMBIA2301-*idi* 通过电击法转入根癌农杆菌 LBA4404, 在含 50 μ g/ml 卡那霉素、50 μ g/ml 利福平和 100 μ g/ml 链霉素的 TYNG 平板上筛选阳性转化子。

挑取单个转化子于 5ml TYNG 培养液中(含 50 μ g/ml 卡那霉素、50 μ g/ml 利福平和 100 μ g/ml 链霉素), 28℃、200r/min 培养 24h 左右, 接 5ml 菌液于 50ml TYNG 培养液中培养至 OD₆₀₀ 为 0.6—0.8。离心收集菌体, 在 IM 培养基中培养 1h, 然后用 4—5ml IM 培养基重悬菌体。10ml IM 培养基(含 0.2mol/L KCl、150 μ mol/L AS 和 50 μ g/ml 卡那霉素)中加入 500 μ l 菌液, 预培养 4—5h。

小球藻于 50ml FC 培养基中, 28℃、180r/min 摇床培养至对数期。离心收集藻体, 预冷的无菌水洗涤一遍后, 用 20ml 预处理剂(50mmol/L EDTA、25mmol/L DTT, pH 5.8、20mmol/L 磷酸盐缓冲液配制)

重悬, 28℃ 摇床预处理 30min。0.2mol/L KCl 洗涤一遍后, 加入 10ml 酶处理液(2%蜗牛酶, 2%纤维素酶, 0.2mol/L KCl), 28℃ 摇床酶解 14h。

离心收集原生质体, 含 0.2mol/L KCl 的 IM 培养基洗一遍后, 用 2ml 含 0.2mol/L KCl 的 IM 培养基重悬。取 200 μ l 原生质体, 加入含根癌农杆菌的 10ml 的 IM 培养基中, 25℃ 摇床共培养 24h。离心将沉淀重悬于 500 μ l 含有 0.2mol/L KCl 的 IM 培养基中, 涂布于含 450 μ g/ml G418、300 μ g/ml 氨基青霉素、300 μ g/ml 头孢霉素和 0.2mol/L KCl 的 FC 培养基中, 28℃ 生化培养箱培养至转化子长出。转化子接于不含抗生素的液体 FC 培养基中, 长出后在筛选培养基上划线, 能够生长的即为阳性转化子。

1.2.3 小球藻转化子的 PCR 鉴定 设计引物 *idi*-F: 5'-ATGCAAACGGAACACGTC-3'; *idi*-R: 5'-TTATTT AAGCTGGGTAAATGC-3'; *NPT II*-F: 5'-TCACTGAA GCGGGAAGGGACT-3'; *NPT II*-R: 5'-GCGGCGAT ACCGTAAAGCAC-3'。

随机挑取 7 个转化子, 以野生型小球藻做对照, 用酚/氯仿法提取基因组 DNA, 以 *idi*-F/*idi*-R 和 *NPT II*-F/*NPT II*-R 引物进行 PCR 扩增鉴定。PCR 反应条件为: 94℃ 预变性 5min, 94℃ 变性 45s, 58℃ 退火 1min, 72℃ 延伸 1min 30s, 运行 32 个循环后, 72℃ 延伸 15min。

1.2.4 小球藻生物量的测定 转化子和野生型小球藻以 5% 的量接种于含有 100ml FC 培养基的 250ml 三角烧瓶中, 28℃、180r/min 摇床培养 5d。8000r/min 离心 10min 收集藻体, 除去上清液, 藻体冷冻干燥后, 称量干重。

1.2.5 小球藻叶黄素的测定 准确称取 0.05g 转化子和野生型小球藻藻粉, 加入 2.5ml 无水乙醇超声破碎 30min(超声功率 70%, 温度 35℃), 后加 1.5ml 20% KOH 超声皂化 10min。用二氯甲烷、蒸馏水各 20ml 萃取, 5000r/min 离心 5min, 弃去上层水相。收集二氯甲烷相, 40℃ 低压旋转蒸发干燥, 提取物用色谱纯甲醇定容至 5ml。稀释 5 倍, 过 0.22 μ m 滤膜后进行 HPLC 检测。

2 结果与分析

2.1 载体的构建

从大肠杆菌 DH5 α 的基因组克隆得到全长 549bp 的 *idi* 基因, 测序结果在 NCBI 上比对正确。pBluescript II SK 质粒上构建了以 CAMV35S 为启动子, CYC1 为终止子的 *idi* 基因表达模块。该表达模块连接到

pCAMBIA2301 质粒的多克隆位点, 构建了二元表达载体 pCAMBIA2301-*idi*(图 1)。经 PCR 扩增和酶切得到预期长度(1420bp)的 *idi* 基因表达模块片段, 证明含有 *idi* 基因的载体 pCAMBIA2301-*idi* 构建成功。

2.2 农杆菌介导的转化

小球藻与根癌农杆菌共培养后涂布于含 450 μ g/ml G418、300 μ g/ml 氨基青霉素、300 μ g/ml 头孢霉素和 0.2mol/L KCl 的 FC 培养基中, 28 $^{\circ}$ C 培养 5—7d 后平板上有藻落长出(图 2a), 而未加农杆菌的对照组无藻落长出(图 2b)。

2.3 小球藻转化子的鉴定

转化子于不含抗生素的液体 FC 培养基中培养, 长出后在筛选培养基上划线, 均能正常生长, 而野生型小球藻不能生长(图 2c), 说明转化子是阳性转化子。

酚/氯仿法提取转化子和野生型小球藻的基因组 DNA, 以 *idi*-F/*idi*-R 和 *NPT II*-F/*NPT II*-R 引物扩增,

转化子的基因组 DNA 均能扩增出 *idi* 基因和 *NPT II* 基因, 而野生型小球藻的基因组 DNA 不能扩增出来(图 3a, b), 说明目的基因已经插入小球藻的基因组中。

2.4 小球藻生物量的测定

图 4 所示为相同培养条件下野生型和转化子生物量。由图 4 可以看出小球藻转化子 I1、I2、I3、I4 和 I5 的生物量与野生型无明显差异, 但 I6 和 I7 的生物量和野生型相比有所降低。说明农杆菌介导 *idi* 基因的转化对大部分小球藻的生长没有显著影响。

2.5 小球藻叶黄素的测定

图 5 所示为每克小球藻干藻粉所含叶黄素的量。从图 5 中可以看出小球藻转化子 I1、I2、I3 和 I4 的叶黄素含量与野生型的差异较大, 其中, I4 的叶黄素含量最高, 达到 0.84mg/g, 与野生型相比提高了 30.95%。而 I5、I6 和 I7 的叶黄素含量则与野生型无明显差异。进一步分析每升藻液中叶黄素的产量, 发

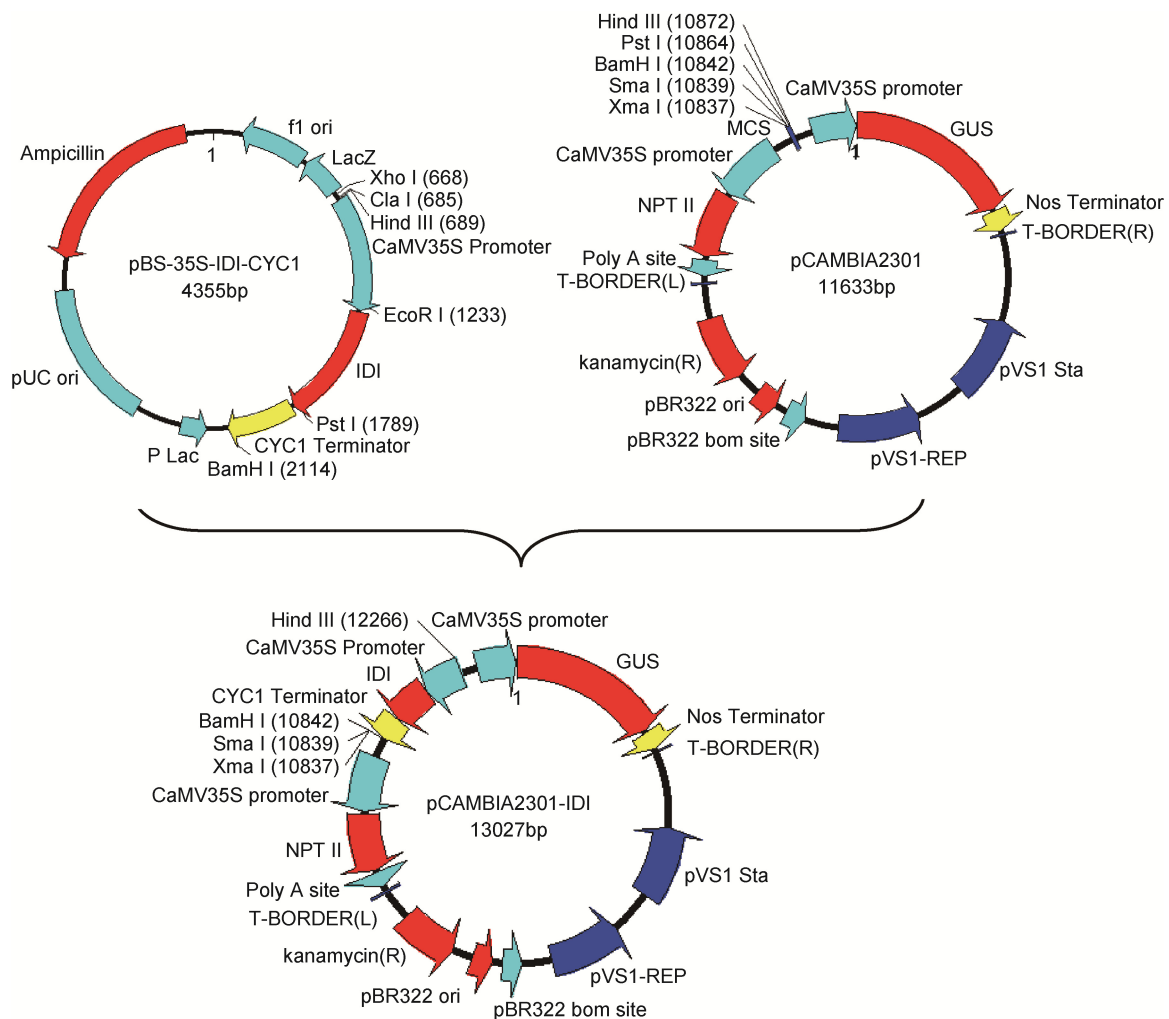


图 1 二元载体 pCAMBIA2301-*idi* 的构建

Fig.1 Construction of binary vector pCAMBIA2301-*idi*

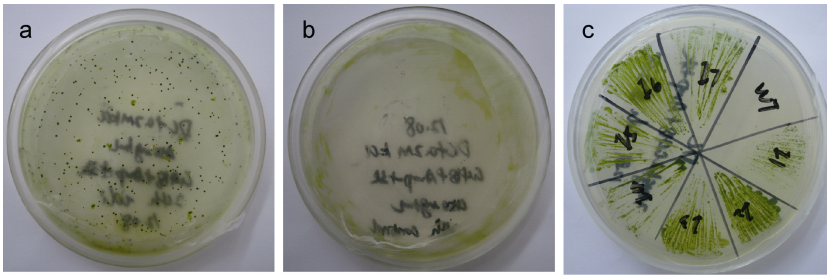


图2 根癌农杆菌介导小球藻转化阳性克隆筛选

Fig.2 Screening positive clone of *A. tumefaciens*-mediated transformation of *C. vulgaris*

a. 实验组: 小球藻与农杆菌共培养, 有藻落长出; b. 对照组: 小球藻未与农杆菌共培养, 无藻落长出; c. 转化子于筛选平板进一步鉴定

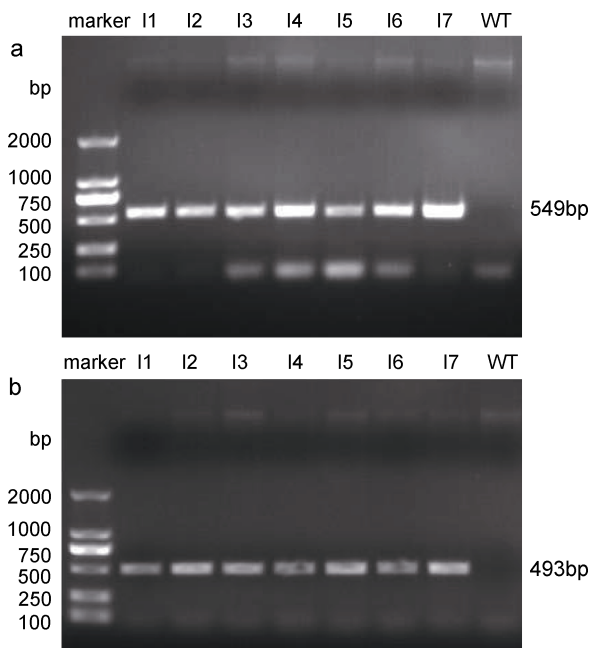


图3 PCR 扩增鉴定转化子

Fig.3 PCR amplification to identify transformants
a. PCR 扩增 *idi* 基因; b. PCR 扩增 *NPT II* 基因

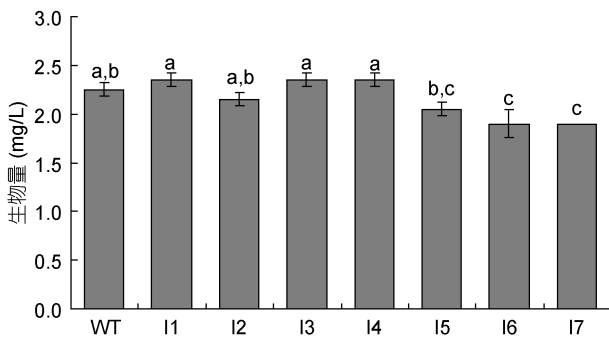


图4 小球藻转化子和野生型的生物量

Fig.4 Biomass of *C. vulgaris* transformants and wide type strain
注: 数据柱上方不同字母表示差异显著($P < 0.05$)。

图5、图6同

现 I1、I3 和 I4 的叶黄素产量相对于野生型有一定提高, 其中 I4 的叶黄素产量最高, 达到 1.98mg/L, 比野生型提高了 36.77%。I2、I5 和 I7 的叶黄素产量和野生型无明显差异, 而 I6 的叶黄素产量相对于野生型则有所降低(图 6)。

3 讨论

目前, 叶黄素的生物合成途径已经基本阐明, 一些关键酶基因已经分离出来, 利用基因工程技术提高微藻的叶黄素含量也取得了一定进展。

Cordero 等(2011)将小球藻的八氢番茄红素合成酶基因(*PSY*)克隆出来并转入莱茵衣藻中, 使衣藻细胞中八氢番茄红素合成酶过量表达, 结果发现转化子叶黄素的含量提高了 2.2 倍。Huang 等(2006)克隆了小球藻 *Chlorella zofingiensis* 的八氢番茄红素脱氢酶基因(*PDS*), 并使其成功在大肠杆菌中表达。但是利用基因工程技术改造小球藻以提高叶黄素含量方面的研究还未见报道, 本实验克隆了大肠杆菌的 IPP 异构酶基因(*idi*)并将其转入小球藻中, 发现叶黄素的含量和产量得到提高。

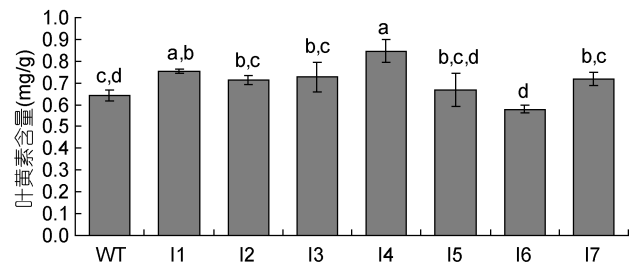


图5 小球藻转化子和野生型的叶黄素含量

Fig.5 Lutein content of *C. vulgaris* transformants and wide type strain

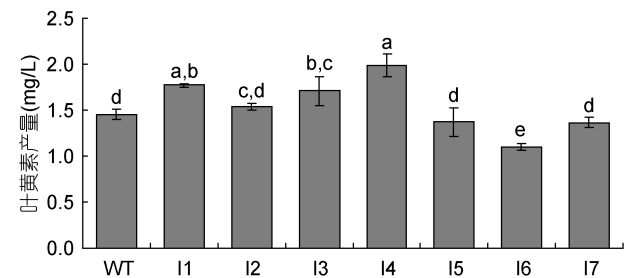


图6 小球藻转化子和野生型的叶黄素产量

Fig.6 Lutein yield of *C. vulgaris* transformants and wide type strain

根癌农杆菌介导的转化方法具有简便、高效和外源基因易于整合等优点,已经广泛应用于植物、动物、真菌以及微藻等生物中。本实验利用根癌农杆菌介导的转化方法将 *idi* 基因转入小球藻中,经 G418 抗性筛选和 PCR 鉴定,目的基因已经整合到小球藻基因组中。通过转化子生物量的测定,发现大部分转化子的生物量与野生型小球藻无明显差异。测定转化子的叶黄素含量,发现转化子的叶黄素含量最高达到 0.84mg/g,与野生型相比提高了 30.95%。进一步分析藻液中的叶黄素产量,发现转化子的叶黄素产量最高达到 1.98mg/L,比野生型提高了 36.77%。以上结果说明,根癌农杆菌介导 *idi* 基因的转入对大部分小球藻的生长没有显著影响,且 *idi* 基因的表达能够提高叶黄素的含量,进而提高叶黄素的产量。但是,作者也发现一些转化子的生物量比野生型降低,而且部分转化子的叶黄素含量没有提高。这可能是由于 T-DNA 随机插入基因组中,插入位点不合适则会使与生长或者叶黄素合成相关基因的活性受到抑制,这与 Cheng 等(2012)的研究结果相似。

利用小球藻生产叶黄素具有良好的发展前景,目前在高产叶黄素藻株的筛选、培养条件优化和提取工艺等方面已经取得了重大进展(吴正云等,2010)。但是,小球藻中叶黄素含量相对偏低,今后应进一步完善小球藻基因工程技术,以期利用基因操作手段提高小球藻叶黄素的含量。

参 考 文 献

- 孙 震,姚惠源,2005. 叶黄素的抗癌作用及其研究现状. 生物技术通讯, 16(1): 84—86
- 吴正云,史贤明,曾 娟,2010. 微藻生物合成叶黄素的研究进展. 食品科学, 31(01): 268—273
- 高政权,孟春晓,叶乃好,2009. 雨生红球藻中 IPP 异构酶基因表达调控机制的初步研究. 海洋通报, 11(1): 37—42
- Anila N, Chandrashekar Arun, Ravishankar G A *et al*, 2011. Establishment of *Agrobacterium tumefaciens*-mediated genetic transformation in *Dunaliella bardawil*. European Journal of Phycology, 46(1): 36—44
- Bundock P, den Dulk-Ras A, Beijersbergen A *et al*, 1995. Trans-kingdom T-DNA transfer from *Agrobacterium tumefaciens* to *Saccharomyces cerevisiae*. EMBO Journal, 14(13): 3206—3214
- Carpentier S, Knaus M, Suh M, 2009. Associations between lutein, zeaxanthin, and age-related macular degeneration: an overview. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 49(4): 313—326
- 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.. Journal of Microbiological Methods, 84(3): 430—434
- Cha T S, Yee W, Aziz A, 2012. Assessment of factors affecting *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of the unicellular green alga, *Chlorella vulgaris*. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 28(4): 1771—1779
- Chen Y, Wang Y, Sun Y *et al*, 2001. Highly efficient expression of rabbit neutrophil peptide-1 gene in *Chlorella ellipsoidea* cells. Current Genetics, 39(5—6): 365—370
- Cheng R B, Ma R J, Li K *et al*, 2012. *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation of marine microalgae *Schizochytrium*. Microbiological Research, 167(3): 179—186
- Chow K-C, Tung W L, 1999. Electrotransformation of *Chlorella vulgaris*. Plant Cell Reports, 18(9): 778—780
- Cordero B F, Couso I, Leon R *et al*, 2011. Enhancement of carotenoids biosynthesis in *Chlamydomonas reinhardtii* by nuclear transformation using a phytoene synthase gene isolated from *Chlorella zofingiensis*. Applied Microbiology and Biotechnology, 91(2): 341—351
- Dawson H N, Burlingame R, Cannons A C, 1997. Stable transformation of *Chlorella*: rescue of nitrate reductase-deficient mutants with the nitrate reductase gene. Current Microbiology, 35(6): 356—362
- Dwyer J H, Navab M, Dwyer K M *et al*, 2001. Oxygenated carotenoid lutein and progression of early atherosclerosis: the Los Angeles atherosclerosis study. Circulation, 103(24): 2922—2927
- Fernandez-Sevilla J M, Acien Fernandez F G, Molina Grima E, 2010. Biotechnological production of lutein and its applications. Applied Microbiology and Biotechnology, 86(1): 27—40
- Hooykaas P J J, Roobol C, Schilperoort R A, 1979. Regulation of the transfer of Ti-plasmids of *Agrobacterium tumefaciens*. Journal of General Microbiology, 110(1): 99—109
- Huang J C, Wang Y, Sandmann G *et al*, 2006. Isolation and characterization of a carotenoid oxygenase gene from *Chlorella zofingiensis* (Chlorophyta). Applied Microbiology and Biotechnology, 71(4): 473—479
- Kathiresan S, Chandrashekar A, Ravishankar G A *et al*, 2009. *Agrobacterium*-mediated transformation in the green alga *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae, Volvocales). Journal of Phycology, 45(3): 642—649
- Kim D H, Kim Y T, Cho J J *et al*, 2002. Stable integration and functional expression of flounder growth hormone gene in transformed microalga, *Chlorella ellipsoide*. Marine Biotechnology, 4(1): 63—73
- Kumar S V, Misquitta R W, Reddy V S *et al*, 2004. Genetic transformation of the green alga-*Chlamydomonas reinhardtii* by *Agrobacterium tumefaciens*. Plant Science, 166(3): 731—738
- Shen W J, Forde B G, 1989. Efficient transformation of *Agro-*

bacterium spp. by high voltage electroporation. Nucleic Acids Research, 17(20): 83—85
Wang C H, Wang Y Y, Su Q *et al*, 2007. Transient expression of

the GUS gene in a unicellular marine green alga, *Chlorella* sp. MACC/C95, via electroporation. Biotechnology and Bioprocess Engineering, 12(2): 180—183

THE RESEARCH OF *AGROBACTERIUM TUMEFACIENS*-MEDIATED TRANSFORMATION OF GENE ENGINEERING *CHLORELLA VULGARIS* RICH IN LUTEIN

MA Rui-Juan, LIN Xiang-Zhi

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

Abstract In this study, we used gene clone technology to construct binary vector pCAMBIA2301-*idi*, and transferred it into *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 by electroporation. The T-DNA region of pCAMBIA2301-*idi* was introduced into *Chlorella vulgaris* by *A. tumefaciens*-mediated transformation (ATMT), using G418 resistance gene (*NPT*) as selective marker which can be used to screen positive clones. The result of PCR showed that *idi* gene and *NPT* gene were integrated into the genome of *C. vulgaris*. Further analysis found that the majority of the transformants displayed similar biomass compared with the wild type strain. While the highest lutein content of transformants reached 0.84mg/g, increasing by 30.95% compared with that of the wild type strain. And the result of analyzing lutein yield in the algal culture demonstrated that the highest lutein yield of transformants reached 1.98mg/L, increasing by 36.77% compared with that of the wild type strain.

Key words *Chlorella vulgaris*, *Agrobacterium tumefaciens*, Genetic transformation, *idi* gene, Lutein