

doi: 10.7541/2016.49

小球藻细胞壁缺陷型突变体的筛选及转化系统的建立

王亚丽^{1,2} 徐泽东³ 蒋思婧³ 黄开耀¹

(1. 中国科学院水生生物研究所, 中国科学院藻类生物学重点实验室, 武汉 430072; 2. 中国科学院大学, 北京 100049; 3. 湖北大学生命科学学院, 武汉 430062)

摘要: 由于高效、稳定遗传转化系统的缺乏, 小球藻遗传改良以及油脂代谢机理的研究等工作难以进行。研究旨在通过筛选获得小球藻*Chlorella vulgaris*细胞壁缺陷型突变体, 在此基础上建立其转化系统。首先通过紫外诱变获得小球藻*Chlorella vulgaris*的突变体库, 基于细胞壁缺陷型突变体在1% Triton X-100处理后叶绿素会释放到上清中的原理, 利用酶标仪高通量地从约4000个突变体中筛选获得10株细胞壁缺陷的小球藻。同时以小球藻内源性 β -tubulin的启动子和终止子作为启动子和终止子, 以AphVIII (*Aminoglycoside 3'-Phosphotransferase type VIII*)作为报告基因构建了转化载体pHK203。通过优化电转缓冲液组分和电击参数, 确定了细胞壁缺陷型突变体CWD-3的最佳转化条件, 即2 μ g pHK203, ddH₂O作为电转缓冲液, 1500 V, 525 Ω , 50 μ F的电击条件下, 转化效率可达到40个转化子/ μ g DNA。研究为小球藻*Chlorella vulgaris*的油脂代谢通路和遗传改良提供了技术基础, 同时由于可降低破壁成本, 筛选获得的细胞壁缺陷型突变体适于工业化生产小球藻藻粉。

关键词: 小球藻; 转化; 细胞壁缺陷; 生物柴油

中图分类号: Q813.5 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3207(2016)02-0370-08

小球藻*Chlorella*指一类单细胞无鞭毛真核绿藻^[1], 长久以来被用作研究光合作用机制和二氧化碳同化机制的模式生物^[2], 并且是食品添加剂和营养保健品的优质来源, 在全球多个公司实现了商业化生产^[3, 4]。近年来, 微藻生物柴油被认为是一种很有潜力的替代能源^[5]。筛选高产油小球藻^[6]和优化小球藻产油条件^[7, 8]的研究不断涌现, 推动小球藻作为生产生物柴油的生物反应器。但是, 稳定、高效的转化方法的缺乏, 严重制约了对小球藻油脂代谢机理的研究和其遗传改良。

构建小球藻转化系统的努力一直没有停止。小球藻坚实的细胞壁是转化成功的重要障碍。一种方法是通过酶解法弱化细胞壁或者制备原生质体来促进转化成功, Jarvis等^[9]通过原生质体法在*Chlorella ellipsoidea*中首次实现了外源基因萤火虫荧光蛋白的瞬时表达。Maruyama等^[10]通过电转化原生质体的方式实现了GUS (β -葡萄糖醛酸酶)基

因在*Chlorella saccharophila*中的瞬时表达。而后Liu等^[11]报道了通过原生质体法实现了GUS基因在*Chlorella ellipsoidea*中的稳定表达。在细胞壁完整的小球藻中利用电转化的方法转入外源基因也有陆续报道, 如Chow等^[12]和Wang等^[13]先后在*Chlorella vulgaris*和*Chlorella sp.*中实现了GUS (β -葡萄糖醛酸酶)的瞬时表达, 而Chen等^[14]和Bai等^[15]报道了在*Chlorella ellipsoidea*中NP-1(兔脑中性肽-1)基因的瞬时表达, 但是其采用的电转化电压高达6—9 kV, 而这可能会提高藻细胞的死亡率。其他转化方法, 如基因枪法成功将硝酸还原酶基因转化入*Chlorella saccharophila*硝酸还原酶缺陷型突变体中, 实现了其回复突变^[16], 但是这种方法需要昂贵且复杂的设备, 并且不易掌握。

通过酶解法弱化细胞壁来促进转化的方法存在转化效率不稳定的缺陷, 因而未见后续报道。另外, 上述研究都采用外源性的CaMV35S (Cauli-

收稿日期: 2015-04-27; 修订日期: 2015-09-14

基金项目: 国家开发投资公司资助项目 [Supported by State Development & Investment Corporation (SDIC)]

作者简介: 王亚丽(1990—), 女, 湖北襄阳人; 硕士; 主要从事微藻生物技术研究。E-mail: wangyali199011@163.com

通信作者: 黄开耀, E-mail: huangk@ihb.ac.cn; 蒋思婧, E-mail: jiangsijing@hubu.edu.cn

flower Mosaic Virus 35S)启动子^[10, 12-14]或Ubi- Ω (Ubiquitin- Ω)启动子^[11, 14, 15]来控制转基因的表达, 然而有研究表明, 内源性启动子驱动基因表达的效率要高于外源性启动子^[17]。 β -tubulin是一种保守的微管蛋白, 其启动子的高驱动效率在*Marssonina brunnea*^[18]、*Physcomitrella patens*^[19]、*Volvox*^[20]中都被证实。本研究针对以上两点, 希望筛选获得小球藻细胞壁缺陷型突变体, 同时利用小球藻内源性 β -tubulin的启动子来构建转化载体, 在球藻*Chlorella vulgaris*中建立高效、稳定的转化系统。

1 材料与方法

1.1 藻株和培养条件

小球藻*Chlorella vulgaris* UTEX 265来自美国德克萨斯州立大学藻种库, 在本研究中作为野生型藻株。培养基是在Bristol solution^[21]的基础上添加1%的Tryptone (Oxoid, 英国), 称为Bristol-T培养基, 配方见表1。固体培养基在液体Bristol-T基础上添加1.5%琼脂粉(Bio-sharp, 日本)。筛选培养基在固体培养基的基础上添加10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 巴龙霉素(Sigma, USA)。培养条件为22 $^{\circ}\text{C}$, 50 $\mu\text{E}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 连续光照, 120 r/min震荡培养。

1.2 生长曲线绘制

以不同时间点的细胞浓度数据来绘制生长曲线。设置初始接种浓度为 5×10^5 个/mL。每天定时取藻液, 使用血细胞计数板进行计数。做三次生物学重复。

1.3 紫外诱变获得突变体库

取对数生长期的藻液, 将其浓度调整为 4×10^6 个/mL, 终体积为4 mL, 使用自制紫外诱变仪(两支15 W紫外灯管, 辐射距离9 cm), 在不同的辐射时长下进行紫外诱变, 辐射时长设定为0、60s、75s、90s、105s和120s, 辐射完毕后, 将培养皿中的藻液混匀, 各取100 μL 涂布于Bristol-T固体平板上。在单克隆

长出之后, 计数各个辐射时长的平板上长出的单克隆数目。以0时的存活率为100%, 将60s、75s、90s、105s和120s这5个辐射时长下的平板上的单克隆数目除以0的平板上的单克隆数目, 计算得到各个辐射时长下的致死率。进行3次生物学重复。根据致死率绘制紫外诱变致死曲线。找到致死率为90%—95%的最佳辐射时间。按照最佳辐射时间进行紫外诱变获得突变体库。

1.4 细胞壁缺陷型突变体筛选

将紫外诱变后获得的突变体接种于96孔细胞培养板(NEST, 中国)中, 置于光下120 r/min震荡培养2d。用排枪将藻液充分混匀, 取50 μL 加入到96孔黑色酶标板(Greiner Bio-One, 德国)中, 在多功能酶标仪(Molecular Devices, 美国)中设置激发光为430 nm, 发射光为670 nm, 测定藻液的荧光值, 记作A1。向藻液中加入等体积的1%TritonX-100, 于室温反应1h。3000 $\times g$, 5min离心后, 小心吸取50 μL 上清至新的96孔黑色酶标板中, 在同样设置下测荧光值, 记作A2。计算A2/A1。根据突变体与野生型A2/A1的值的大小来筛选细胞壁缺陷型突变体。

1.5 巴龙霉素耐受性测定

取对数生长期的藻液, 将其浓度调整为 5×10^6 个/mL或者 2×10^6 个/mL, 吹打混匀后, 分别吸取10 μL 垂直滴在含有不同浓度巴龙霉素的Bristol-T固体平板上。待其吹干后, 将平板置于藻房暗光处放置2h, 然后取出置于光下培养。7d后观察平板上藻斑的生长情况。

1.6 载体构建

pHK203是在本实验室载体pKS-AphVIII-Lox的基础上将它的启动子和终止子分别换成小球藻*Chlorella vulgaris*的 β -tubulin的启动子和终止子构建而来。 β -tubulin的启动子和终止子都是通过PCR扩增获得, 引物分别为 β -tubulin-pF、 β -tubulin-pR和 β -tubulin-uF、 β -tubulin-uR, 引物序列见表2。将载体用*Xho* I 和*Sac* I 酶切, 借助片段与载体的同源序列, 通过双片段无酶克隆的方式^[22]将启动子片段连接到载体上; 再将重组载体用*Bam*H I 和*Kpn* I 酶切, 通过双片段无酶克隆的方式将终止子片段连接到重组载体上。

1.7 电转化方法

3000 $\times g$, 5min离心收集 3×10^7 个对数生长期的细胞。将细胞用新鲜Bristol-T培养基洗涤一次后, 用电转缓冲液重悬, 加入2 μg pHK203, 混匀, 于冰上前处理15min。将细胞悬液转移至电极杯中, 在电转仪(BTX, ECM 630, 美国)中进行电击, 电击后置于冰上后处理15min。吸出细胞悬液, 转移到装

表1 Bristol-T培养基配方
Tab. 1 Composition of Bristol-T medium

成分Component	用量Amount (ml/L)	母液浓度Concentration of Stock Solution (g/200 mL dH ₂ O)	终浓度Final Concentration (mmol/L)
NaNO ₃	1	50	2.94
CaCl ₂ ·2H ₂ O	1	1	0.17
MgSO ₄ ·7H ₂ O	1	15	0.30
K ₂ HPO ₄	1	15	0.43
KH ₂ PO ₄	1	35	1.29
NaCl	1	5	0.43
Tryptone	1	—	—

表 2 本研究中所用的引物
Tab. 2 Primers used in the current study

引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence (5'-3')	用途 Purpose
β -tubulin-pF	<u>ggcgcaattgg</u> agctcgcggccaagcaactgcactcac	扩增 β -tubulin启动子
β -tubulin-pR	<u>cgatcacaagctc</u> gagtttagctgccgtctgatccccg	扩增 β -tubulin启动子
β -tubulin-uF	<u>gtggacgttgg</u> atccgcaactcgcgccccaagg	扩增 β -tubulin终止子
β -tubulin-uR	<u>aacaaaagctgg</u> tacgtctcctcgcggcttcaatca	扩增 β -tubulin终止子
AphVIII-F	tgcactcggggctcggtatc	扩增AphVIII和测序
AphVIII-R	accacgcgacgcaacccta	扩增AphVIII和测序

注：引物中划线部分表示与载体pKS-AphVIII-Lox同源的序列，其中含有酶切位点，适于双片段无酶克隆^[22]

Note: Underlined Sequence is homologous with pKS-AphVIII-Lox, contains enzyme loci and is suitable for seamless enzyme-free cloning^[22]

有20 mL含有60 mmol/L山梨醇(Biosharp, 日本)的Bristol-T培养基的50 mL离心管中, 恢复过夜。3000×g, 5min离心收集细胞, 用500 μ L新鲜的Bristol-T重悬后, 涂布到含有10 μ g/mL巴龙霉素的Bristol-T平板上。暗光放置2h后, 取出置于光下培养。

1.8 PCR验证重组子

将电转化后长出来的单克隆划线于Bristol-T固体培养基上, 3d后挑取适量藻落于24孔板中, 置于光下培养2d, 用于提取基因组。基因组提取方法参照^[16], 优化部分包括将CTAB缓冲液用量减少到200 μ L, 以及加入玻璃珠(Sigma, USA)利于细胞裂解。

PCR扩增AphVIII片段以验证重组子。所用的正向和反向引物分别是AphVIII-F和AphVIII-R (表 2)。PCR程序为: 1, 94 $^{\circ}$ C, 5min; 2, 94 $^{\circ}$ C, 30s; 3, 62 $^{\circ}$ C, 45s; 4, 72 $^{\circ}$ C, 1min; 5, 72 $^{\circ}$ C, 10min, 步骤2—4重复30次。

2 结果

2.1 生长曲线

微藻的生长状态和生长时期对遗传转化成功存在影响^[23], 为了确定*Chlorella vulgaris* UTEX 265的生长特性, 确定其生长的对数期和稳定期, 本研究首先测定了其生长曲线。从测定获得的生长曲线中看出, 在开始培养之后, *Chlorella vulgaris* 迅速进入对数生长期, 在培养7d之后细胞增殖速度开始下降。所以本实验选择以培养4—6d的藻细胞来进行紫外诱变和电转化。

2.2 对巴龙霉素敏感性的测定

AphVIII 编码VIII型氨基糖苷类3'-磷酸转移酶, 使藻株对氨基糖苷类抗生素如巴龙霉素等具有抗性, 是一个高效的重组子报告基因^[24, 25]。本研究采用AphVIII 作为报告基因, 首先需要确定小球藻*Chlorella*

vulgaris UTEX 265对巴龙霉素的耐受性。如图 1所示, 在藻斑形成实验中, 在没有巴龙霉素筛选压力时, 10 μ L 5×10^6 个/mL (C1)或者 2.5×10^6 个/mL (C2)的藻液在7d后即形成深绿色的边缘稍凸起的藻斑。而当施加巴龙霉素筛选压力之后, 从巴龙霉素浓度为2.5 μ g/mL起C1和C2组即开始不能形成藻斑, 但C1组在藻斑边缘处有绿色痕迹, 推测是由于边缘处细胞的堆积造成, 浓度较低的C2组从5 μ g/mL起即完全没有藻落长出。以上实验表明, 巴龙霉素对于小球藻*Chlorella vulgaris* 是一种有效的筛选压力, 同时, 细胞的堆叠会造成上层细胞的“幸存”。本研究为了确保筛选的阳性率, 选择10 μ g/mL巴龙霉素作为筛选压力。

2.3 细胞壁缺陷突变体的筛选

普通小球藻具有坚硬的细胞壁, 主要由坚硬的多聚糖组成^[1], 是电转化成功的一个重要阻碍因素^[26]。因此我们希望获得小球藻无细胞壁突变体, 在其中进行电转化系统的探索。首先通过紫外诱变获得突变体库, 利用自制紫外诱变仪对小球藻*Chlorella vulgaris* UTEX 265进行紫外诱变, 在距离紫外光源垂直距离为9 cm, 细胞浓度为 4×10^6 个/mL时, 测定紫外诱变致死曲线。紫外诱变的致死率在辐射时长为60—90s剧烈升高, 在辐射时长为90s时达到90%的致死率, 而后随着辐射时长的延

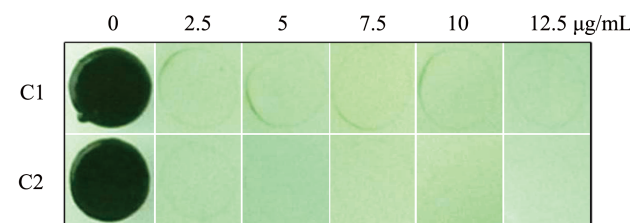


图 1 小球藻*Chlorella vulgaris*对巴龙霉素的耐受性测定
Fig. 1 Sensitivity of *Chlorella vulgaris* to paromomycin

长, 致死率趋于100%。我们选择90s作为制备突变体库时的辐射时长。通过紫外诱变获得了近4000株突变体。

Triton X-100是一种离子型去垢剂, 细胞壁薄弱的藻细胞经过1% Triton X-100处理后会裂解, 释放出叶绿素^[27], 此时离心后测得的上清液的荧光值(A2)与处理前细胞悬液的荧光值(A1)应该相当。基于这个原理, 我们制定了小球藻无细胞壁突变体的筛选流程(图 2), 根据A2/A1的值来筛选细胞壁缺陷型突变体。

从近4000株突变体中, 筛选获得10株A2/A1值显著高于野生型的突变体, 分别命名为CWD-1至CWD-10。如图 3所示, 野生型的A2/A1值在0.08左右, 而10株突变体的A2/A1值在1左右, 证明细胞壁相对于野生型发生了弱化, 经过1% Triton X-100处理后发生了裂解释放出了叶绿素。

在10个细胞壁缺陷型突变体中, CWD-3的A2/A1值最高, 显示其细胞壁缺陷程度可能最高。为了排除其细胞壁缺陷的同时发生生长障碍, 因此本研究对其生长速度进行了测定。如图 4所示, CWD-3的生长趋势与野生型类似, 同时生长速度相较于野生型反而有所提高。所以CWD-3不存在生长问题, 方便用于后续转化系统的建立, 同时表明其可能具有工业化生产藻粉, 减少破壁等成本的潜力。

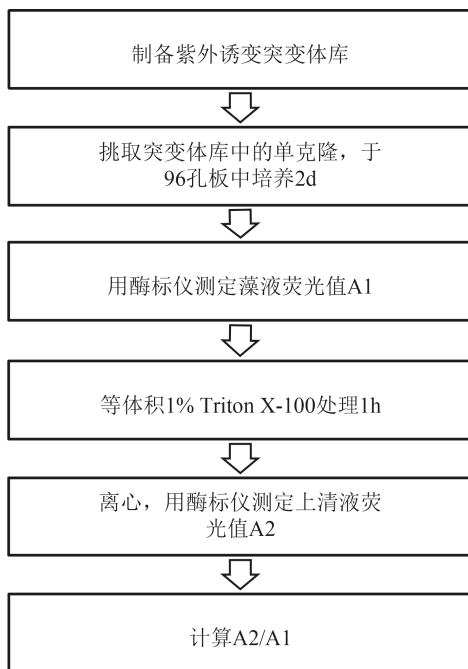


图2 *Chlorella vulgaris*无细胞壁突变体的筛选流程

Fig. 2 The screening procedure for cell wall-less mutants in *Chlorella vulgaris*

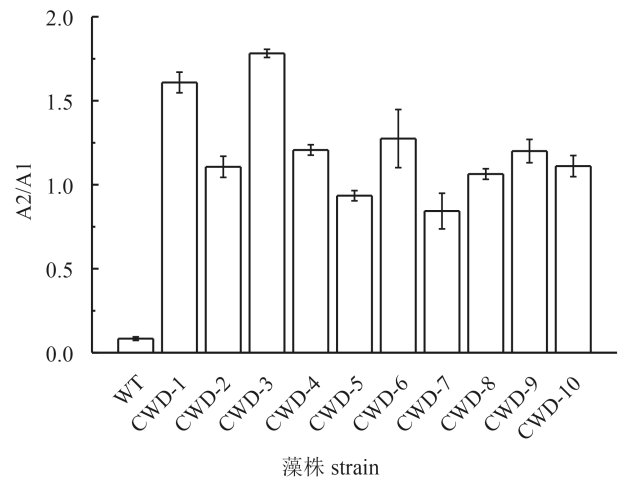


图3 小球藻*Chlorella vulgaris*细胞壁缺陷型突变体

Fig. 3 Cell wall-defective mutants of *Chlorella vulgaris*

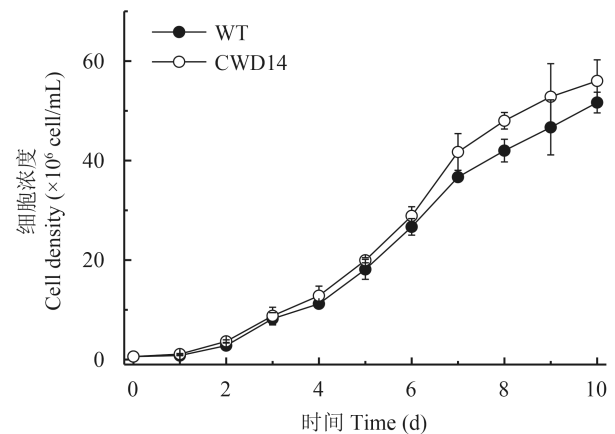


图4 小球藻*Chlorella vulgaris*细胞壁缺陷型突变体CWD-3生长速度与野生型对比

Fig. 4 The growth curve of cell wall-defective mutant CWD-3 and WT

2.4 电转化系统的建立

转化载体pHK203的示意图和酶切验证图(图 5)。pHK203总长度为6941 bp, β -tubulin启动子长度为2077 bp, 3'-UTR长度为1083 bp, *AphVIII*长度为885 bp, 在 β -tubulin启动子距离5'端777 bp处存在一个Sac I酶切位点。酶切验证的结果符合预期。这说明我们成功构建了转化载体。

为了研究脉冲时间和电转缓冲液的成分的关系, 获得合适的脉冲时间, 我们设计了不同的电转缓冲液(表 3), 按照电转化方法, 在电转仪参数设定为1500 V, 525 Ω , 50 μ F条件下, 测定其脉冲时间。

从图 6可以看出, 缓冲液的组分对于脉冲时间有很大影响。由Buffer 1到Buffer 4, 在其他成分保持一致的情况下, 随着电转缓冲液中NaCl浓度降低, 脉冲时间逐渐延长。脉冲时间在电转缓冲液中

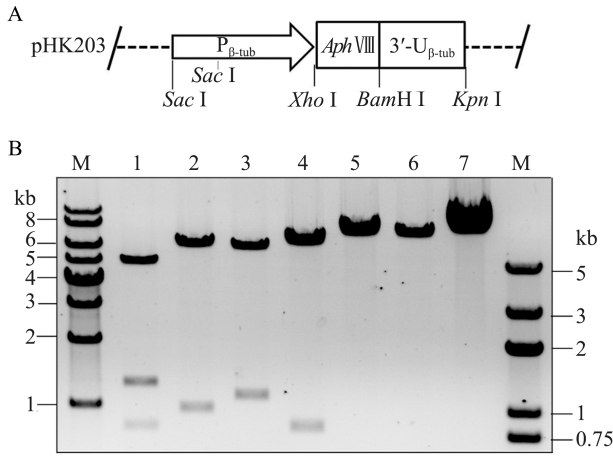


图5 pHK203示意图和酶切验证图谱

Fig. 5 Diagram of pHK203 and confirmation of restriction enzyme digestion

(A)载体示意图 $P_{\beta\text{-tub}}$, promoter of $\beta\text{-tubulin}$; $3'\text{-U}_{\beta\text{-tub}}$, 3'-UTR of $\beta\text{-tubulin}$. (B)载体酶切验证 1. *Sac* I, *Xho* I 双酶切, 2. *Xho* I, *Bam* H I 双酶切; 3. *Bam* H I, *Kpn* I 双酶切; 4—7 *Sac* I, *Xho* I, *Bam* H I, *Kpn* I 分别单酶切

表3 本研究所用的电转缓冲液的组分

Tab. 3 Component of electroporation buffer used in this study

电转缓冲液名称 Buffer name	电转缓冲液成分 Buffer content
Buffer 1	Bristol, 60 mmol/L 山梨醇, 375 mmol/L NaCl
Buffer 2	Bristol, 60 mmol/L 山梨醇, 50 mmol/L NaCl
Buffer 3	Bristol, 60 mmol/L 山梨醇, 15 mmol/L NaCl
Buffer 4	Bristol, 60 mmol/L 山梨醇
Buffer 5	ddH ₂ O
Buffer 6	500 mmol/L 山梨醇, 500 mmol/L HEPES
Buffer 7	100 mmol/L 山梨醇, 10 mmol/L HEPES

没有离子成分, 仅存在ddH₂O或者山梨醇和HEPES等非离子物质时, 稳定在22ms左右。

在本研究中, 主要尝试从电击参数和电转缓冲液组分两部分来优化电转化系统, 提高转化效率。从表4中可以看出, 同样以Buffer 1 (Bristol, 60 mmol/L 山梨醇, 375 mmol/L NaCl)作为电转缓冲液时, 提高电转仪的电阻和电容设置, 电转效率有了较大提高。值得注意的是, 当提高电阻和电容时, 脉冲时间也提高了, 由430 μs 左右提高到了620 μs 左右, 同时, 在电击过程中出现了电火花, 引起了爆杯。而当以Buffer 5 (ddH₂O)作为电转缓冲液, 当提高电转仪的电阻时, 脉冲时间由22 ms左右提高到了29 ms左右, 但是转化效率反而有所下降。当以Buffer 7 (100 mmol/L山梨醇, 10 mmol/L HEPES)作为电转缓冲液时, 转化效率与以Buffer 5 (ddH₂O)作

为电转缓冲液时的转化效率基本一致。

在1500 V, 525 Ω , 50 μF 条件下, 以500 μL ddH₂O作为电转缓冲液, 以pHK203为转化载体电转化CWD-3, 在涂布巴龙霉素平板后约7—10d, 单克隆逐渐长出。理论上这些克隆具有巴龙霉素抗性, 应该成功转入了载体DNA。为了进一步确认, 我们从平板上挑取1/3区域范围内的单克隆, 抽提总DNA, 然后用PCR扩增*AphVIII*片段, 并将扩增出来的DNA回收纯化, 测序, 与*AphVIII*序列进行比对。如图7c所示, 待检测的13株藻有6株扩增得到833 bp的*AphVIII*片段, 并且经过测序证实其序列正确。以上结果表明, 本研究成功建立了小球藻电转化系统, 将外源DNA转入到了小球藻细胞中。

3 讨论

转化系统的建立对于现代微藻生物技术的发展非常重要。由于稳定转化系统的缺乏, 小球藻的淀粉和油脂等代谢通路的研究, 以及通过基因工程的手段获得优良高产油藻株的研究等, 都进展缓

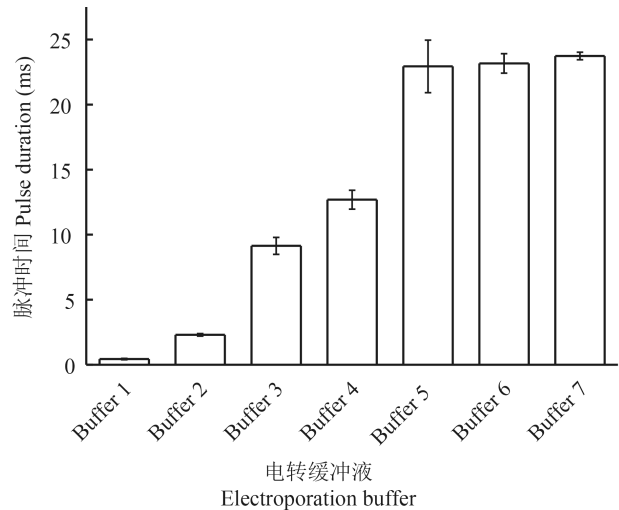


图6 脉冲时间与电转缓冲液组分的关系

Fig. 6 The relationship between pulse duration and components of electroporation buffer

表4 转化效率与电转化条件的关系

Tab. 4 The relationship between transformation efficiency and electroporation conditions

电转化条件 No.	电击参数 Electroporation parameters	电转缓冲液 Electroporation buffer	转化效率 Transformation efficiency
1	1500 V, 400 Ω , 25 μF	Buffer 1	9 \pm 3
2	1500 V, 725 Ω , 50 μF	Buffer 1	47 \pm 20
3	1500 V, 525 Ω , 50 μF	Buffer 5	42 \pm 14
4	1500 V, 725 Ω , 50 μF	Buffer 5	12 \pm 7
5	1500 V, 525 Ω , 50 μF	Buffer 7	30 \pm 11

慢。本研究率先尝试筛选小球藻细胞壁缺陷型突变体用于转化系统的建立。建立了细胞壁缺陷型突变体的筛选方法。通过酶标仪检测1% Triton X-100处理前藻液和处理后上清的荧光值的方法, 由于排枪、96孔板和酶标仪的使用, 相比于前人用体式显微镜观察克隆形态^[27], 实现了高通量的细胞壁缺陷型突变体的筛选。从约4000株突变体中获得10株处理前后荧光值比显著高于野生型的突变体, 虽然这10株突变体的克隆形态与野生型没有显著差异, 同时, 与相同数量的莱茵衣藻无细胞壁突变体CW 15在1% Triton X-100处理前后荧光值比(9.5±0.5)相比, 这10株突变体的A2/A1值较小。综合以上结果, 表明我们获得了10株细胞壁存在缺陷的小球藻突变体, 同时, 这种缺陷没有衣藻无细胞壁突变体明显, 但这10株细胞壁缺陷突变体可以减轻电转化时的阻碍, 由于生长速率没有降低, 应用于商业化生产时, 通过降低破壁成本, 可以降低总体生产成本。

本研究率先以小球藻内源性 β -tubulin启动子和终止子构建转化载体, 率先在小球藻中使用巴龙

霉素作为筛选抗生素, 并且用藻斑实验证实了小球藻对于巴龙霉素的敏感性, 确定了10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的筛选浓度。本研究通过对不同电击缓冲液组分的摸索, 发现在相同的电击参数, 电转缓冲液中的离子浓度越高, 则脉冲时间会越短。以 ddH_2O 或者山梨醇、HEPES作为电转缓冲液时, 脉冲时间最高, 达到22ms左右, 而这个脉冲时间被证明足够外源DNA进入到小球藻*Chlorella vulgaris*中, 实现成功转化。Brown等^[28]研究发现, 需要26ms的脉冲时间使外源DNA成功进入莱茵衣藻无细胞壁突变体, 而需要两个26ms的脉冲时间使外源DNA成功进入细胞壁正常莱茵衣藻。使用非离子型电转缓冲液时, 通过提高电阻来提高脉冲时间, 有助于转化效率的提高, 但是, 在电转缓冲液离子强度较大条件下, 提高脉冲时间反而会造成转化效率的下降, 有可能是因为提高了电转化过程中细胞的死亡率^[29]。出于操作安全、简便和节约成本的目的, 则可以选择以 ddH_2O 作为电转缓冲液。通过对不同电转化条件的比较, 证明在以 ddH_2O 作为电转缓冲液, 在1500 V, 525 Ω , 50 μF 电击条件下, 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 环状载体DNA即可以达到相对较高的转化效率。相对于前人的报道^[9-11, 13, 14, 16], 无需经过酶解等步骤弱化细胞壁, 无需使用极高的电压, 并且电转缓冲液成分单一, 简便易行, 节约成本。

Shimogawarra等^[30]研究发现, 在电转化体系中添加鲑精子DNA作为运载DNA可以提高莱茵衣藻的电转化效率, 但Yamano等^[31]证实不加鲑精子DNA能达到同样的转化效率。王等^[23]发现载体线性化可以提高GUS活性。Shimogawarra等^[30]证实电击恢复后涂布平板时, 以玉米淀粉、海藻酸钠、矿物油等包埋藻细胞, 为细胞提供一个保湿的环境, 可以提高转化子的存活率。我们猜测可以通过添加鲑精子DNA作为运载DNA, 线性化载体, 在涂布平板时添加包埋材料等方式可以继续提高小球藻*Chlorella vulgaris*的转化效率。另外, 我们考虑在转化载体pHK203的AphVIII片段后加上GFP等标记, 以方便采用western blot的方式对转化子进行进一步确认。

综上所述, 本研究通过酶标仪测定1% Triton X-100处理前藻液和处理后上清荧光值的方法, 高通量地筛选获得了10株细胞壁缺陷的小球藻突变体。以其中的CWD-3藻株, 通过对电转缓冲液组分和电击参数的摸索, 以2 μg pHK203, 以 ddH_2O 为电转缓冲液, 在1500 V, 525 Ω , 50 μF 电击条件下, 可以得到40个转化子/ μg DNA。该转化系统操作简便、快速。该系统的建立, 为研究小球藻*Chlorella*

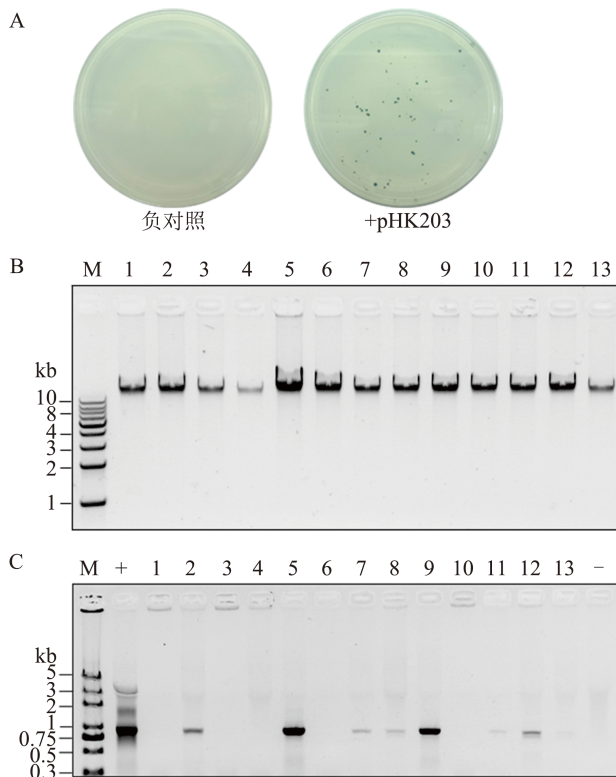


图7 PCR验证阳性转化子

Fig. 7 Confirmation of positive transformants via PCR

A. 电转化后单克隆生长情况, 左边未加质粒, 右边加了pHK203; B. 1—13, 转化子总DNA电泳图; C. PCR扩增AphVIII产物 +, pHK203为模板, 1—13, 转化子总DNA为模板, -, UTEX 265总DNA为模板

*vulgaris*的油脂代谢通路,遗传改良等提供了遗传操作手段。

参考文献:

- [1] Takeda H. Classification of *Chlorella* strains by cell wall sugar composition [J]. *Phytochemistry*, 1988, **27**(12): 3823—3826
- [2] Liu J, Chen F. Biology and Industrial Applications of *Chlorella*: Advances and Prospects [M]. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*. Springer International Publishing Switzerland. 2014, 1—35
- [3] Liu J, Hu Q. *Chlorella*: Industrial Production of Cell Mass and Chemicals [A]. In: Richard A, Hu Q (Eds.), *Handbook of Microalgal Culture: Applied Phycology and Biotechnology* [C]. Oxford: Wiley. 2013, 329—338
- [4] Spolaore P, Joannis-Cassan C, Duran E, et al. Commercial applications of microalgae [J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2006, **101**(2): 87—96
- [5] Jiang J J, Miao F P, Feng D W, et al. Research situation and prospect of microalgae of biodiesel [J]. *Chinese Biotechnology*, 2010, **30**(2): 134—140
- [6] Xu J, Xu X D, Fang X T, et al. Screening and lipid analysis of high oleaginous *Chlorella* species [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2012, **36**(3): 426—432 [徐进, 徐旭东, 方仙桃, 等. 高产油小球藻的筛选及其油脂分析. 水生生物学报, 2012, **36**(3): 426—432]
- [7] Zhu Y P, Song D H, Yang G L. Effects of different nitrogen sources on growth and lipid accumulation of a heterotrophic microalgae-*Chlorella vulgaris* [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2013, **36**(6): 1027—1034 [朱一平, 宋东辉, 杨国兰. 不同氮源对小球藻油脂积累和生物量的影响. 水生生物学报, 2012, **36**(6): 1027—1034]
- [8] Zheng H L, Gao Z, Zhang Q, et al. Effect of inorganic carbon source on lipid production with autotrophic *Chlorella vulgaris* [J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2011, **27**(3): 436—444 [郑洪立, 高振, 张齐, 等. 无机碳源对小球藻自养产油脂的影响. 生物工程学报, 2011, **27**(3): 436—444]
- [9] Jarvis E E, Brown L M. Transient expression of firefly luciferase in protoplasts of the green alga *Chlorella ellipsoidea* [J]. *Current Genetics*, 1991, **19**(4): 317—321
- [10] Maruyama M, Horáková I, Honda H, et al. Introduction of foreign DNA into *Chlorella saccharophila* by electroporation [J]. *Biotechnology Techniques*, 1994, **8**(11): 821—826
- [11] Liu L, Wang Y, Zhang Y, et al. Development of a new method for genetic transformation of the green alga *Chlorella ellipsoidea* [J]. *Molecular Biotechnology*, 2013, **54**(2): 211—219
- [12] Chow K C, Tung W L. Electrotransformation of *Chlorella vulgaris* [J]. *Plant Cell Report*, 1999, **18**(9): 778—780
- [13] Wang C, Wang Y, Su Q, et al. Transient expression of the GUS gene in a unicellular marine green alga, *Chlorella* sp. MACC/C95, via electroporation [J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2007, **12**(2): 180—183
- [14] Chen Y, Wang Y, Sun Y, et al. Highly efficient expression of rabbit neutrophil peptide-1 gene in *Chlorella ellipsoidea* cells [J]. *Current Genetics*, 2001, **39**(5—6): 365—370
- [15] Bai L L, Yin W B, Chen Y H, et al. A new strategy to produce a defensin: stable production of mutated NP-1 in nitrate reductase-deficient *Chlorella ellipsoidea* [J]. *PLoS One*, 2013, **8**(1): 1970
- [16] Dawson H N, Burlingame R, Cannons A C. Stable transformation of *Chlorella*: rescue of nitrate reductase-deficient mutants with the nitrate reductase gene [J]. *Current Microbiology*, 1997, **35**(6): 356—362
- [17] Li J, Qu D J, Liu L L, et al. Comparison of stable expression of foreign genes driven by different promoters in transgenic *Dunaliella salina* [J]. *China Biotechnology*, 2007, **27**(3): 47—53 [李杰, 曲东京, 刘玲玲, 等. 不同启动子驱动下转基因盐藻外源基因的稳定表达. 中国生物工程杂志, 2007, **27**(3): 47—53]
- [18] Jiang C, Cheng X, Cheng Q, et al. High-efficiency transformation of the plant pathogenic fungus *Marssonina brunnea* [J]. *Journal of Plant Pathology*, 2014, **96**(3): 459—464
- [19] Jost W, Link S, Horstmann V, et al. Isolation and characterisation of three moss-derived beta-tubulin promoters suitable for recombinant expression [J]. *Current Genetics*, 2005, **47**(2): 111—120
- [20] Hallmann A, Sumper M. The *Chlorella* hexose/H⁺ symporter is a useful selectable marker and biochemical reagent when expressed in *Volvox* [J]. *Proceeding of the National Academy of Sciences*, 1996, **93**(2): 669—673
- [21] Nichols H. *Handbook of Phycological Methods, Culture Methods and Growth Measurements*. Growth media-freshwater [M]. Cambridge University Press. 1973, 7
- [22] Zhu D, Zhong X, Tan R, et al. High-throughput cloning of human liver complete open reading frames using homologous recombination in *Escherichia coli* [J]. *Analytical Biochemistry*, 2010, **397**(2): 162—167
- [23] Wang C H, Wang Y Y, Su Q, et al. Transient expression of the GUS gene in a unicellular marine green alga, *Chlorella* sp. MACC/C95, via electroporation [J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2007, **12**(2): 180—183
- [24] Sizova I A, Lapina T V, Frolova O N, et al. Stable nuclear transformation of *Chlamydomonas reinhardtii* with a *Streptomyces rimosus* gene as the selective marker [J]. *Gene*, 1996, **181**(S1—2): 13—18
- [25] Sizova I, Fuhrmann M, Hegemann P. A *Streptomyces rimosus* aphVIII gene coding for a new type phosphotransferase provides stable antibiotic resistance to *Chlamydomonas reinhardtii* [J]. *Gene*, 2001, **277**(1—2): 221—229

- [26] Coll J M. Review. Methodologies for transferring DNA into eukaryotic microalgae [J]. *Spanish Journal of Agricultural Research*, 2006, **4**(4): 316—330
- [27] Cesar Fuentes K V-S. Isolation and characterization of a cell wall-defective mutant of *Chlamydomonas monoica* (Chlorophyta) [J]. *Journal of Phychology*, 2003, **39**(6): 1261—1267
- [28] Brown L E, Sprecher S L, Keller L R. Introduction of exogenous DNA into *Chlamydomonas reinhardtii* by electroporation [J]. *Molecular and Cellular Biology*, 1991, **11**(4): 2328—2332
- [29] Novakova J, Izsakova A, Grivalsky T, *et al.* Improved method for high-efficiency electrotransformation of *Escherichia coli* with the large BAC plasmids [J]. *Folia Microbiologica*, 2014, **59**(1): 53—61
- [30] Shimogawara K, Fujiwara S, Grossman A, *et al.* Highefficiency transformation of *Chlamydomonas reinhardtii* by electroporation [J]. *Genetics*, 1998, **148**(4): 1821—1828
- [31] Yamano T, Iguchi H, Fukuzawa H. Rapid transformation of *Chlamydomonas reinhardtii* without cell-wall removal [J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2013, **115**(6): 691—694

SCREENING OF CELL WALL-DEFECTIVE MUTANTS AND CONSTRUCTION OF TRANSFORMATION SYSTEM IN *CHLORELLA VULGARIS*

WANG Ya-Li^{1,2}, XU Ze-Dong³, JIANG Si-Jing³ and HUANG Kai-Yao¹

(1. Key Laboratory of Algal Biology, Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072, China; 2. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China; 3. Hubei University, Wuhan 430062, China)

Abstract: *Chlorella vulgaris* has been widely recognized as a safe food ingredient due to its richness in proteins, vitamins, minerals and short chain poly-unsaturated fatty acid. Recently, *Chlorella vulgaris* was chosen as one of the feedstock for biodiesel because of its high growth rate and high lipid content, but lacking of stable and efficient transformation system has seriously hindered the understanding of lipid metabolism and the development of the genetic engineering. Our aim was to obtain cell wall-defective mutants of *Chlorella vulgaris* and use them to construct an electro-transformation system. Based on the release ability of chlorophyll after treatment of 1% Triton X-100, we set up a high throughput screening method of cell wall-defective mutants and obtained 10 cell wall-defective mutants. In addition, we constructed a transformation vector pHK203 by using endogenous promoter and 3'-UTR of β -tubulin gene and by using *AphVIII* as selective marker. We successfully obtained 40 transformants per μg DNA using plasmid pHK203 and ddH₂O as electroporation buffer with the best electroporation condition of 1500 V, 525 Ω , 50 μF . Our study will benefit the study of lipid metabolism pathway and genetic engineering of *Chlorella vulgaris*.

Key words: *Chlorella vulgaris*; Transformation; Cell wall-defective; Biodiesel