

doi: 103969/j.issn.0490-6756.2017.01.029

同源重组敲除三角褐指藻基因的研究

郭婷, 代易颖, 陈孔翔, 高莉, 张克亚, 曹志远, 王冠儒, 兰利琼, 卿人伟

(四川大学生命科学学院, 成都 610064)

摘要: 为探索应用基因敲除技术研究三角褐指藻基因功能的研究体系, 本文以三角褐指藻甘油激酶基因作为靶基因, 构建了同源重组基因敲除载体, 利用微弹轰击法将该载体成功转化至三角褐指藻中, 经 $100\mu\text{g}/\text{mL}$ Zeocin 筛选和 PCR 验证获得了 34 个阳性转基因藻株; 并进一步对三角褐指藻甘油激酶基因敲除转基因藻株的甘油激酶表达量和生长两方面进行分析, 结果显示胞外甘油兼养不影响转基因藻细胞生长, 甘油激酶不表达或表达量降低. 本文通过构建敲除载体, 完成了遗传转化, 筛选获得阳性转基因藻, 并进一步研究了转基因藻的性状, 最终建立了应用同源重组基因敲除技术靶向研究三角褐指藻基因功能的研究体系.

关键词: 三角褐指藻; 同源重组; 基因敲除; 甘油激酶

中图分类号: Q786 **文献标识码:** A **文章编号:** 0490-6756(2017)01-0173-05

The research of gene knockout via homologous recombination in *Phaeodactylum tricornutum*

GUO Ting, DAI Yi-Ying, CHEN Kong-Xiang, GAO Li, ZHANG Ke-Ya, CAO Zhi-Yuan,
WANG Guan-Ru, LAN Li-Qiong, QING Ren-Wei

(College of Life Sciences, Sichuan University, Chengdu 610064, China)

Abstract: This paper aimed at exploring a knockout system for further gene function research in *P. tricornutum*. The gene encoding glycerol kinase was selected as a target gene in *P. tricornutum*, constructed the homologous recombination vector for *P. tricornutum*, and using particle bombardment successfully converted the homologous recombination vector to wild type *P. tricornutum* by particle bombardment. After screened on the f/2 solid medium which contain Zeocin (final concentration $100\mu\text{g}/\text{mL}$) and identified the strains by PCR, 34 transformations were obtained. The analysis of cell growth showed that extracellular glycerin had no effect on the cell growth of the transformants. Detected by western blot, the results presented that the expression of glycerol kinase were repressed or reduced in the transformants. This research explored a system for application of gene knockout technology in researching gene function in *P. tricornutum*, via constructed a gene knockout vector, transformed the vector to the algae cell, screened and identified the knockout algae strains, and studied the characteristics of knockout algae strains.

Keywords: *P. tricornutum*; Homologous recombination; Gene knockout; Glycerol kinase

收稿日期: 2015-05-14

基金项目: 国家自然科学基金(40976092); 四川省科技厅项目(2014JY0171); 四川省电科院项目(13H1138)

作者简介: 郭婷(1990-), 女, 湖南益阳人, 硕士研究生, 现从事微藻生物能源相关研究. E-mail: 525626236@qq.com

通讯作者: 卿人伟. E-mail: qingrw@scu.edu.cn

1 引言

微藻与高等植物相比,具有分布广泛,生长速度快,产油率高,不需要占用耕地等优点,而且很多种藻可以在废水或盐水中养殖^[1]. 因此,利用微藻生产生物柴油成了一大研究热点. 然而天然藻种一般不拥有生产生物燃料所需的所有特质,传统的生理生化方法已经满足不了藻类改造的技术需求,这就需要分子生物学技术来改良优化藻种. 随着藻类学的不断发展,已有很多先进的生物技术应用到藻类学研究中. 近年来,已有很多科学家开始利用分子手段构建优良藻种^[2-5].

三角褐指藻(*Phaeodactylum tricornutum*)是一种海洋硅藻,属于硅藻门,羽纹纲,褐指藻目,褐指藻科,褐指藻属. 三角褐指藻生长迅速,生命周期短,指数生长期末开始积累甘油三酯(TAGs),油脂积累量可以达到细胞干重的 20~30%^[6],是目前最受关注的能源藻种之一,也是海洋硅藻研究的模式藻种. 三角褐指藻全基因组测序工作已完成^[7],并建立起了有效的遗传转化方法^[8],这就为我们的研究提供了便利的条件.

基因敲除是基因功能研究和基因调控最重要的技术手段之一. 利用同源重组进行靶向基因敲除是最经典,也是最普遍的方法. 目前来说,因为藻类群体的特殊性,利用基因敲除进行功能基因研究的实例并不多^[9,10],但是对于藻类基因功能和藻种改良优化的研究来说这是一项非常重要的技术. 目前,在三角褐指藻中还没有同源重组基因敲除的相关报道.

甘油激酶能够催化甘油转化成 3-磷酸甘油,使甘油进入三角褐指藻碳同化或分解代谢途径. 同时它也是一个限速酶,因此影响着细胞对甘油利用的速度^[11]. 早在上世纪,就已经对大肠杆菌的甘油激酶基因序列、蛋白性质进行了较深入的研究^[12,13]. 而本实验室相关研究表明,三角褐指藻甘油激酶基因 ORF 大小为 2079bp,编码 692 个氨基酸,无内含子^[14]. 根据已有报道,我们预测三角褐指藻甘油激酶基因敲除不会使藻细胞致死,因此本研究选择三角褐指藻甘油激酶基因作为靶基因,构建同源重组基因敲除载体,对三角褐指藻基因敲除体系进行探索.

2 材料与方法

2.1 材料

2.1.1 藻种及培养条件 三角褐指藻(*Phaeodactylum tricornutum*)来自中国海洋大学微藻种质库,编号为 MACC/B288. 培养基为盐度 3‰的

人工海水 f/2^[15]. 培养条件:温度 22℃,光照强度 2500lx,光暗周期 12h : 12h.

2.1.2 菌株与载体 克隆载体为 pMD19-T(TaKaRa);表达载体为 pPhaT1(Genebank Accession No. AF219942);宿主为 *E. coli* DH5 α (Invitrogen).

2.1.3 试剂和仪器 PCR 相关试剂及限制性内切酶(TaKaRa);琼脂糖凝胶回收试剂盒、质粒小量抽提试剂盒等(Sangon);测序、甘油激酶抗体(BGI);引物合成(上海百力格);基因枪转化仪器及相关耗材(Bio-Rad);Zeocin(Invitrogen);植物总蛋白提取试剂盒(上海生工);二抗(Boster Immunoleader);Pro-light HRP 化学发光检测试剂(TIANGEN);其它试剂(成都科隆试剂有限公司).

2.2 方法

2.2.1 三角褐指藻甘油激酶基因敲除载体的构建

根据三角褐指藻基因组数据库和三角褐指藻甘油激酶基因研究结果^[14]进行引物设计. pPhaT1 载体用 *Xho* I 单酶切,去掉 *fcpB* 启动子、*sh ble* 基因及其后面的 *fcpA* 终止子部分,剩余载体部分自连,命名为 pPhaT1'. 以三角褐指藻 DNA 为模板,用引物 PtrGKHRDNHind 和 PtrGKHRDCXho(表 1)扩增从甘油激酶基因第 1492 bp 至甘油激酶基因下游第 541 bp 的下游同源片段;用引物 PtrGKHRUNNde 和 PtrGKHRUCSal(表 1)扩增从甘油激酶基因上游第 634 bp 至甘油激酶基因第 675 bp 的上游同源片段;用引物 PtrNRSTOPE-coR 和 PtrNRSTOPHind(表 1)扩增硝酸还原酶(NR)基因的终止子片段. 以 pPhaT1 质粒为模板,用引物 PtrGKHRZeoUSal 和 PtrGKHRZeoT-GAEcoR(表 1)扩增 pPhaT1 质粒中的 *fcpB* 启动子和 *sh ble* 基因片段. NR 基因的终止子片段和 *fcpB* 启动子和 *sh ble* 基因片段用 *Eco*RV 和 *Hind* III 双酶切在 PMD-19T 载体上进行连接,测序后重组片段用 *Hind* III 和 *Sal* I 双酶切,下游同源片段用 *Hind* III 和 *Xho* I 双酶切,上游同源片段用 *Nde* I 和 *Sal* I 双酶切,依次将这三个片段连接至 pPhaT1',完成重组质粒 PUZND 的构建. 用 *Xho* I 和 *Nde* I 双酶切对 PUZND 进行验证.

2.2.2 三角褐指藻甘油激酶基因敲除载体的遗传转化和转基因藻筛选鉴定 提取 PUZND 质粒,使其浓度达到 1 μ g/ μ L. 野生型三角褐指藻缺硅培养至对数生长中期,取 5 \times 10⁷ 个藻细胞^[16]进行 PUZND 质粒的遗传转化,微弹轰击方法见参考文献^[17]. 将轰击过的三角褐指藻细胞于 1500 lx 光照强度下连续光照培养 24 h,然后用 f/2 培养液洗脱下来,涂布于含 100

$\mu\text{g}/\text{mL}$ Zeocin^[18] 的 f/2 固体培养基上培养. 待固体培养基上长出单克隆后, 挑取单克隆于含 $100 \mu\text{g}/\text{mL}$ Zeocin 的 f/2 培养液中培养.

为了鉴定敲除结构是否已经整合到了三角褐指藻的基因组中, 我们对挑取的单克隆藻株进行扩大培养, 提取总 DNA 用引物 PtrGKKoU2 和 PtrGKHRZeoTGAEcoR、PtrGKHRZeoUSal 和 PtrGKHRDCXho(表 1) 进行 PCR 验证. 产物用琼

脂糖凝胶电泳检测, 并测序, 与预期序列进行比对, 从而确定敲除结构是否完整地整合到基因组中.

2.2.3 三角褐指藻甘油激酶基因敲除转基因藻生长情况分析 将三角褐指藻甘油激酶基因敲除转基因藻和野生型藻黑暗同步化 20 h, 分别接种一份至普通的 f/2 培养液中培养, 另外接种一份至添加 $100 \text{ mmol}/\text{L}$ 甘油的 f/2 培养液中培养. 每隔 24 h 取样检测 450 nm 处的 OD 值.

表 1 扩增目的片段的引物序列

Tab. 1 The primers used for fragment amplification

引物名称	碱基序列 5'→3'	引物说明
PtrGKHRUNNde PtrGKHRCUSal	GCCATATGCTGACAGCATGAACGCAAGATGTG GCGTCGACGTGATTAGATTTGGTGCCAGTAAGTTGA	扩增上游第 634 bp 至甘油激酶基因第 675 bp 的同源片段, 添加酶切位点 <i>Nde</i> I 和 <i>Sal</i> I
PtrGKHRDNHind PtrGKHRDCXho	GCAAGCTTCTGCCGTTATGGAAACCACATC GCCTCGAGAGAAGTAACTTTCCGCCCTCTT	扩增甘油激酶基因第 1492 bp 至下游第 541 bp 的同源片段, 添加酶切位点 <i>Hind</i> III 和 <i>Xho</i> I
PtrGKHRZeoUSal PtrGKHRZeoTGAEcoR	GCGTCGACACATACCTTCAGCGTCGTCTTCACT GCGATATCTCAGTCTCTGCTCCTCGGCCAC	扩增 <i>fcpB</i> 启动子和 <i>sh ble</i> 基因片段, 添加酶切位点 <i>Sal</i> I 和 <i>EcoR</i> V
PtrNRSTOPEcoR PtrNRSTOPHind	GCGATATCAAGTTCTTGACTGATTGTCATATC GCAAGCTTCTAACGCAGCTTAGACATAAACC	扩增 NR 终止子片段, 添加酶切位点 <i>EcoR</i> V 和 <i>Hind</i> III
PtrGKKoU2	GAACAAGCGAAGGAGTAACCG	扩增上游同源片段至 <i>sh ble</i> 抗性基因片段的上游引物
PtrPcAb2-F2 PtrPcAb2-R2	GAGCTCGCTCAAACATTCAATC CTCGAGTGAAGTGTGTGGAG	扩增抗原片段, 添加酶切位点 <i>Sac</i> I 和 <i>Xho</i> I

注: 下划线标记为添加的酶切位点.

2.2.4 三角褐指藻甘油激酶基因敲除转基因藻甘油激酶表达 Western blot 分析 对三角褐指藻甘油激酶氨基酸序列进行抗原表位预测 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/BepiPred/>). 选择第 533 个氨基酸至第 657 个氨基酸的片段设计抗原. 设计引物 PtrPcAb2-F2 和 PtrPcAb2-R2, 克隆三角褐指藻甘油激酶基因第 1720 bp 至 2094 bp 的片段, 用 *Sac* I 和 *Xho* I 双酶切连接至 PET-32a 上. 重组质粒转化至 *E. coli* BL21 中进行诱导表达. 重组质粒转化菌株用 $1 \text{ mmol}/\text{L}$ 的 IPTG 于 16°C 诱导过夜, 菌液送至 BGI 公司进行抗体制作.

将黑暗同步化 20 h 的三角褐指藻甘油激酶基因敲除转基因藻和野生型藻分别接种至添加 $100 \text{ mmol}/\text{L}$ 甘油的 f/2 培养液中培养, 第 8d 收集藻细胞, 沉淀用 PBS 洗两遍, 提取总蛋白. 根据制作的 BSA 标准曲线测定蛋白浓度, 取等量的蛋白溶液上样, 用 10% 的凝胶进行 SDS-PAGE. 含蛋白的凝胶 200 mA 恒流冰浴转膜 2 h, 5% 脱脂奶粉封闭 1.5 h. 于 4000 倍稀释的甘油激酶抗体中孵育 1.5 h, TBST 清洗 $3 \times 10 \text{ min}$. 于 10000 倍稀释的

二抗中孵育 1 h, TBST 清洗 $2 \times 10 \text{ min}$, TBS 清洗 $2 \times 10 \text{ min}$. 曝光拍照.

3 结果与分析

3.1 三角褐指藻甘油激酶基因敲除载体的构建

对 PUZND 质粒用 *Xho* I 和 *Nde* I 双酶切, 凝胶电泳结果出现了约 3.5 kb 的条带, 这与上游同源片段、*fcpB* 启动子、*sh ble* 基因、NR 终止子和下游同源片段的总长度一致. 这表明三角褐指藻甘油激酶基因敲除载体已经构建完成.

3.2 三角褐指藻甘油激酶基因敲除载体的遗传转化和阳性克隆的筛选鉴定

构建好的 PUZND 质粒遗传转化三角褐指藻之后, 在含有 $100 \mu\text{g}/\text{mL}$ Zeocin 的 f/2 固体培养基上长出了单克隆藻株, 说明 *sh ble* 基因片段已经整合到三角褐指藻基因组中, 并使得三角褐指藻具有 Zeocin 抗性. 以单克隆藻株 DNA 为模板, 用引物 PtrGKKoU2 和 PtrGKHRZeoTGAEcoR、PtrGKHRZeoUSal 和 PtrGKHRDCXho 进行特异 PCR 验证, 鉴定到了 34 个阳性克隆. 随机挑选 3

个阳性克隆 PCR 验证产物进行测序,测序比对结果也显示与预期结构序列一致,说明敲除结构已完整的整合到三角褐指藻基因组中(图 1)。

3.3 生长情况分析

三角褐指藻甘油激酶基因敲除转基因藻和野生型藻在 f/2 培养液和添加 100 mmol/L 甘油的 f/2 培养液中的生长情况见图 2。在 f/2 培养液正常培养情况下,转基因藻与野生型藻的生长情况没有差异,说明甘油激酶基因敲除对生长没有影响。在添加 100 mmol/L 甘油的 f/2 培养液中,转基因

藻与野生型藻在接种后的前 5d 生长没有差异,这可能是因为在该光照、温度和营养培养条件下,转基因藻与野生型藻在培养初期细胞分裂速度都已经达到极限水平,因而培养液中有无甘油对两种藻的生长没有影响。而第 6d 开始野生型藻比转基因藻生长快,可能是因为光照、温度或营养条件已经无法满足藻细胞以最快的速度进行分裂,只有加甘油培养的野生型藻能够利用甘油作为外源碳源进行兼养,继续维持较快的分裂生长速度。这间接说明三角褐指藻甘油激酶基因敲除成功。

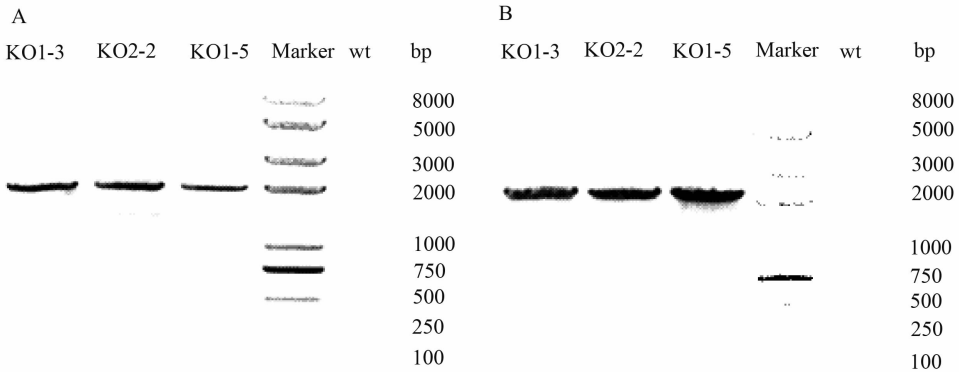


图 1 甘油激酶基因敲除结构阳性克隆鉴定

A: 鉴定上游同源序列至 *sh ble* 基因 DNA 片段; B: 鉴定 *fcpB* 启动子至下游同源序列 DNA 片段

Fig. 1 Identification of the positive clones of glycerol kinase gene knockout

A: The identification of DNA fragments for the upstream homologous sequence to *sh ble*; B: The identification of DNA fragments for *fcpB* promoter to the downstream homologous sequence

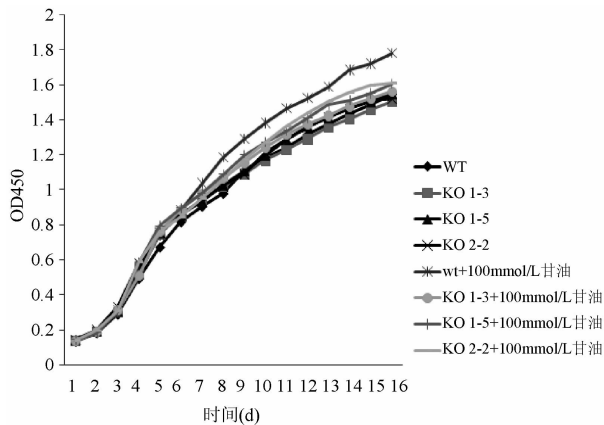


图 2 甘油激酶基因敲除对三角褐指藻生长的影响

Fig. 2 The influence of glycerol kinase gene knockout on the growth of *P. tricornutum*

3.4 甘油激酶表达 Western blot 结果

三角褐指藻甘油激酶基因敲除转基因藻和野生型藻 Western blot 杂交结果显示见图 3。从图 3 中能看到野生型藻有一条很清晰的 70 kD 左右的甘油激酶杂交条带,而转基因藻株 KO1-3 没有条带, KO1-5 和 KO2-2 有非常浅的杂交目的条带,表明

KO1-5 和 KO2-2 藻株有少量甘油激酶表达。这可能是由于三角褐指藻是二倍体藻, KO1-5 和 KO2-2 藻株可能只有一条同源染色体上的甘油激酶基因被敲除。但总的来看,甘油激酶基因敲除已对转基因藻甘油兼养条件下的生长速度产生了明显影响。

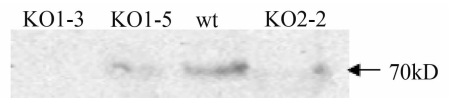


图 3 甘油激酶基因敲除对甘油激酶表达量的影响

Fig. 3 The influence of glycerol kinase gene knockout on the glycerol kinase expression

4 讨论

本研究中我们对三角褐指藻特异性表达载体 pPha-T1 进行了改造,使其适用于三角褐指藻基因敲除研究。为了去除 pPhaT1 载体本身的 Zeocin 抗性,我们用 *Xho* I 单酶切 pPhaT1 载体去掉 *fcpB* 启动子、*sh ble* 基因及其后面的 *fcpA* 终止子部分。上游同源片段的 5'端 *Nde* I 酶切位点选择和下游同源片段的 3'端 *Xho* I 酶切位点的选择,这为了

将 pPha-T1 质粒上的 fcpA 启动子、多克隆位点和 fcpA 终止子都切除掉, 这样就把 pPha-T1 质粒中与三角褐指藻基因组中同源的部分都去除了. 选择 NR 终止子代替原本 pPha-T1 质粒中的 fcpA 终止子, 是为了保证敲除载体中除了上游同源片段、下游同源片段与三角褐指藻基因组发生同源重组之外, 不会出现 fcpB 启动子和 fcpA 终止子与三角褐指藻基因组的同源重组. 这些改造从理论上讲可以很大程度上减小假阳性的发生率.

目前已经开发出几种新型基因打靶技术, 但是在藻类中的应用极少^[10,19], 效果无法把握. 同源重组基因敲除在藻类中的应用较少, 但其操作简单, 效果持久, 能够为我们评估基因功能提供很有说服力的信息. 该方法在单倍体的微拟球藻中也已经成功应用同源重组原理进行基因敲除^[9].

三角褐指藻基因功能研究和代谢调控研究是三角褐指藻商业利用的基础, 对其它资源藻类的基础研究也有很大的借鉴意义. 通过本文对构建三角褐指藻甘油激酶基因的敲除载体, 敲除载体的遗传转化和敲除藻株的筛选鉴定, 以及对敲除转基因藻的性状研究等一系列的研究工作, 我们成功探索了应用基因敲除技术研究三角褐指藻基因功能的研究体系, 为三角褐指藻功能基因分析和基因调控研究奠定了基础.

参考文献:

- [1] Patil V, Tran K, Giselrød H R. Towards Sustainable Production of Biofuels from Microalgae[J]. Int J Mol Sci, 2008, 9(7): 1188.
- [2] Rada kovits R, Eduafo P M, Posewitz M C. Genetic engineering of fatty acid chain length in *Phaeodactylum tricorutum*. [J]. Metabolic Engineering, 2011, 13(1):89.
- [3] Dünahay T G, Jarvis E E, Zeiler K G, et al. Genetic engineering of microalgae for fuel production[J]. Appl Biochem Biotechnol, 1992, 34-35(1): 331.
- [4] Chen G, Qu S, Wang Q, et al. Transgenic expression of delta-6 and delta-15 fatty acid desaturases enhances omega-3 polyunsaturated fatty acid accumulation in *Synechocystis* sp. PCC6803 [J]. Biotechnology for Biofuels, 2014, 32(2): 283.
- [5] Deng X, Li Y, Fei X. The mRNA abundance of pepc2 gene is negatively correlated with oil content in *Chlamydomonas reinhardtii* [J]. Biomass & Bioenergy, 2011, 35(5): 1811.
- [6] Chisti Y. Biodiesel from microalgae. [J]. Biotechnology Advances, 2007, 25(3): 294.
- [7] Bowler C, Allen A E, Badger J H, et al. The *Phaeodactylum* genome reveals the evolutionary history of diatom genomes. [J]. Nature, 2008, 456(7219): 239.
- [8] Apt K E, Kroth-Pancic P G, Grossman A. Stable nuclear transformation of the diatom *Phaeodactylum tricorutum*[J]. Mgg Molecular & General Genetics, 1996, 252(5): 572.
- [9] Kilian O, Benemann C S, Niyogi K K, et al. High-efficiency homologous recombination in the oil-producing alga *Nannochloropsis* sp. [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2011, 108(52): 21265.
- [10] Weyman P D, Beerli K, Lefebvre S C, et al. Inactivation of *Phaeodactylum tricorutum* urease gene using transcription activator-like effector nuclease-based targeted mutagenesis[J]. Plant Biotechnol J, 2015, 13(4): 460.
- [11] Zwaig N, Kistler W S, Lin E C. Glycerol kinase, the pacemaker for the dissimilation of glycerol in *Escherichia coli*. [J]. Journal of Bacteriology, 1970, 102(3): 753.
- [12] Hagashi S I, Lin E C. Product induction of glycerol kinase in *Escherichia coli*. [J]. J Mol Biol, 1965, 14.
- [13] Pettigrew D W, Ma D P, Conrad C A, et al. *Escherichia coli* glycerol kinase. Cloning and sequencing of the glpK gene and the primary structure of the enzyme. [J]. J Biol Chem, 1988, 263,(1):135.
- [14] 陈波, 黄龙, 郭婷, 卿人韦. 三角褐指藻甘油兼养条件下甘油激酶的功能研究. 四川大学学报: 自然科学版. 2015, 52(1): 144.
- [15] Guillard R R L. Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates [M]. US: Springer, 1975:29.
- [16] Tanaka Y, Nakatsama D, Harada H, et al. Localization of soluble beta-carbonic anhydrase in the marine diatom *Phaeodactylum tricorutum*. Sorting to the chloroplast and cluster formation on the girdle lamellae. [J]. Plant Physiology, 2005, 138(1): 207.
- [17] 涂丽, 于广欣, 陈波, 等. 二酰基甘油转移酶对三角褐指藻油脂积累及相关环境因子响应的研究[J]. 四川大学学报: 自然科学版, 2012, 49(4): 901.
- [18] Markus L, Lioudmila Z, Kirk E A, et al. In vivo characterization of diatom multipartite plastid targeting signals. [J]. J Cell Sci, 2002, 115(21): 4061.
- [19] Sizova I, Greiner A, Awasthi M, et al. Nuclear gene targeting in *Chlamydomonas* using engineered zinc-finger nucleases[J]. Plant Journal, 2013, 73(5): 873.