

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
55 (4) :510 - 517; 4 April 2015
ISSN 0001 - 6209; CN 11 - 1995/Q
http://journals.im.ac.cn/actamicrocn
doi: 10.13343/j.cnki.wsxb.20140302

基于同源重组的裂殖壶菌遗传转化体系的构建及验证

庄小燕, 陈胜兰, 纪晓俊, 徐娴, 任路静*

南京工业大学, 生物与制药工程学院, 江苏 南京 211816

摘要:【目的】裂殖壶菌是一种能高效生产 DHA 的海洋真菌; 基因工程技术已经成功应用在微生物改造和代谢机理研究中, 利用基因工程技术对裂殖壶菌进行改造首先需要构建适合裂殖壶菌的遗传转化体系; 【方法】本文利用电转化的方法将含有 18S rDNA 同源重组片段的 *ble* 基因导入裂殖壶菌中, 通过 zeocin 抗性平板筛选出阳性菌株, 并设计 *ble* 基因引物, 以裂殖壶菌基因组为模板, 进行 PCR 验证 *ble* 基因是否成功结合到裂殖壶菌染色体上。【结果】筛选获得的抗性菌株基因组上确实 PCR 出 *ble* 基因片段, 对改造菌株与原始菌株进行发酵培养, 发现改造后菌株在生物量、油脂含量、DHA 含量及脂肪酸分布等方面和原始菌株基本一致。【结论】抗性基因的插入不会影响菌株的正常代谢, 该体系的构建为后续其他外源基因导入奠定基础。

关键词: 裂殖壶菌, 18S rDNA, *ble* 基因, 同源重组

中图分类号: Q786 文章编号: 0001-6209(2015)04-0510-08

DHA 属于 ω -3 系列不饱和脂肪酸, 系统命名为全顺 Δ 4, 7, 10, 13, 16, 19. 二十二碳六烯酸 (doeosaehaenoie acid)。DHA 是大脑和视网膜组织中细胞膜的组成成分, 在脑细胞形成的过程中, 对婴儿大脑正常发育和成人脑功能的正常发挥着有着非常重要的作用, 具有增强视力^[1]、预防高血压^[2]、抗炎、抗癌等功效。目前 DHA 的主要来源分为两种^[3], 传统方法是从深海鱼类中获得, 由于环境污染、鱼类资源紧缺和生产成本过高, 传统方法生产的 DHA 无法满足市场需求, 因此通过微生物发酵生产 DHA 的新型模式受到人们越来越多的关注。

裂殖壶菌是一种高产 DHA 的海洋真菌, 因其生长速率快, 发酵产生的油脂中不饱和脂肪酸成分简单, DHA 含量高而成为研究的热点^[4]。随着基因工

程技术的兴起和发展, 利用基因改造来改变获得优良品种的技术得到了广泛的应用, 一方面可以改变菌株的生理特性, 比如 Mishra^[5] 用含有温度敏感肌醇等位基因突变菌株的 DNA 来处理肌醇缺陷型菌株得到了温度敏感转化菌株, Keishi Sakaguchi^[6] 通过敲除 *T. aureum* ATCC 34304 的 Δ 5 去饱和酶提高 C20:3n-6 和 C20:4n-3 的含量; 另一方面可以探讨生物体内的合成机理, 如 Takanori Matsuda 等^[7] 借助同源重组的方法通过敲除 *T. aureum* ATCC 34304 中的 Δ 12 去饱和酶, 验证了在 *T. aureum* ATCC 34304 中存在两种不饱和脂肪酸合成途径, Jinfei Yan 等^[8] 通过过表达乙酰辅酶 A 合成酶提高了 *Schizochytrium* 的生物量和油脂含量。

裂殖壶菌主要通过 PKS 和 FAS 两种途径来分

基金项目: 国家“863 计划”(2014AA021701); 国家自然科学基金(21306085); 江苏省自然科学基金(BK2012424); 高等学校博士学科点专项科研基金(20133221120008)

* 通信作者。Tel/Fax: +86-25-58139386; E-mail: renlujing@njtech.edu.cn

作者简介: 庄小燕(1990-), 女, 福建泉州人, 硕士研究生, 研究方向为微生物学。E-mail: zhuang_xiaoyan@njtech.edu.cn

收稿日期: 2014-06-11; 修回日期: 2014-10-05

别合成饱和脂肪酸和不饱和脂肪酸,通过菌种选育、培养基优化和发酵调控来提高裂殖壶菌中不饱和脂肪酸的含量已经陷入瓶颈^[9],需要对这两个脂肪酸合成途径的关键酶及调控因子进行深入研究,而裂殖壶菌遗传转化体系是研究机理的基础。酵母具有稳定的附加质粒如 2 μ 质粒、Yep 质粒,可以在酵母体内进行稳定的传代复制^[10],由于裂殖壶菌没有稳定的附加质粒,需要将目的基因整合到宿主染色体上,所以本文以裂殖壶菌 18S rDNA 片段作为同源臂,通过电转化法将抗性基因导入裂殖壶菌并整合到染色体上。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌种与质粒:裂殖壶菌 (*Schizochytrium* sp. HX-308),由本实验室自主筛选获得,保藏于中国典型培养物保藏中心 (CCTCC),保藏号 CCTCC M 209059。含有 Zeocin (博来霉素) 抗性基因的 pGAPZ α A 和含有 Ampicilin 抗性基因的 pBluescript II SK,为 Invitrogen 公司产品。

实验中用到的引物序列如下表 1 所示。

表 1. 扩增目的基因的名称及引物序列

Table 1. Primers of target genes

Gene	Primer name	Primer sequence (5'→3')
18Sup	18SupS	GGGTACCCGTAGTCATATGCTTGTCTC
	18SupA	CCTCGAGGATTTACCTCTAGCGAC
18Sdown	18SdownS	CGGATCCGATGCCGACTAGAGATT
	18SdownA	GAGCTCTCCGAGTTTCACTACGGGA
Zeocin	Zeocin-F	GGGATCCCATGTTTCTACTCCTTT
	Zeocin-A	GAATTCTTAAAGCCTTCGAGCGT

1.1.2 培养基:种子培养基、发酵培养基组成参考文献 [11]。

1.2 抗生素的筛选

将菌液接种到 50 mL 的培养基中,30℃ 下 170 r/min 培养 24 h,转接两代,取 1 mL 菌液稀释到适

当浓度,涂布到含有不同抗生素浓度的培养基上避光培养。配制不同的浓度的抗生素(表 2),每个浓度设置 3 个平行样,培养 5 d,计算其致死率。致死率 = (1-处理组菌落数/对照组菌落数) × 100%。

表 2. 六种抗生素的实验浓度梯度

Table 2. Different concentration of six antibiotics

Antibiotics	Different concentration of antibiotics (μ g/mL)						
	1	2	3	4	5	6	7
Cw	0	25	45	65	—	—	—
Amp	0	50	100	300	—	—	—
Kan	0	50	100	300	—	—	—
Zeocin	0	0.5	1	1.5	2	3	4
G418	0	20	40	60	80	100	140
Amphotericin B	0	6	9	12	15	18	21

1.3 外源 DNA 制备

通过真菌 18S rDNA 通用引物 NS1 和 NS8 获得裂殖壶菌的 18S rDNA 片段,将其连接到 T 载体上,该载体为 PMD-48S。根据获得的裂殖壶菌 18S rDNA 序列设计上下游同源臂引物,利用 PMD-48S 为模板分别克隆获得上下游同源臂;借助 *Bam*HI 和 *Eco*RI 酶切位点将带有 Zeocin 抗性基因片段的

pGAPZ a A 和 pBlueScript II SK 载体进行连接,构成新的重组载体 PBS-Zeo。将同源臂与 PBS-Zeo 进行连接获得重组载体 PBS-ZEO-48S。

1.3.1 转化前预处理:取 10 mL 裂殖壶菌菌液放入无菌预冷的 50 mL 聚丙烯管内,在 4℃,5000 r/min 离心 10 min,弃上清,用 10 mL 预冷的无菌水清洗菌体两次,在 4℃,4472 × g 离心 10 min。用 10 mL 预

冷的 1 mol/L 山梨醇溶液将菌体沉淀重悬, 4℃, 5000 r/min 离心 10 min, 重复 1 次。用 10 mL 预冷的 1 mol/L 山梨醇溶液将菌体沉淀重悬。

1.3.2 电转化: 将经过 *SacI* 和 *KpnI* 酶切后得到的目的片段加入 30 μL 预处理后的裂殖壶菌中, 轻轻混匀, 冰浴静置 5 min, 然后转移到冰预冷的电击杯中, 静置 10 min。设置电击参数 0.75 KV, 200 Ω, 50 μF。电击后加入 1 mL 种子培养基, 30℃, 200 r/min 复苏 1 h 后将转化的菌液涂布在含有 1.5 μg/mL 的 Zeocin 平板上, 28℃ 避光培养。

1.3.3 PCR 鉴定抗性基因: 提取转化子的基因组 DNA, 根据博莱霉素抗性基因的序列设计引物进行 PCR 鉴定, PCR 扩增条件为 94℃ 预变性 5 min, 94℃ 30 s, 56℃ 60 s, 72℃ 60 s, 进行 30 个循环, 72℃ 最终延伸 10 min。凝胶电泳检测 Zeocin 基因是否插入裂殖壶菌的基因组 DNA 中。

1.4 发酵表现数据分析

1.4.1 细胞生物量的测定: 采用干重法测定, 取一定体积的发酵液 (10 mL) 至离心管, 离心 (2862 × g, 5 min), 去离子水洗涤 2 次, 弃上清, 将菌体置于 60℃ 烘箱中烘干至恒重, 计算。生物量以细胞干重表示, 按照公式 1 计算。

$$\text{细胞干重 (g/L)} = \frac{\text{烘干后滤纸总重 (g)} - \text{滤纸净重 (g)}}{\text{发酵液体积 (mL)} / 1000}$$

公式 (1)

1.4.2 油脂含量的测定: 油脂的提取: 量取一定体积的发酵液 (100 mL), 将其在 50℃ 预热, 用 NaOH 将 pH 调至 10 - 12 之间, 按 3‰ (g/L) 的比例添加破壁酶, 50℃ 下搅拌并保温 2 h; 按 1:1:1 (发酵液: 乙醇: 正己烷) (V/V) 比例分别添加乙醇、正己烷, 搅拌、分层、萃取, 连续萃取 2 - 3 次, 取正己烷相, 真空旋转蒸干获取油脂。将烧瓶放在烘箱中 105℃ 烘至恒重, 冷却后称重。油脂含量的计算, 计算公式如 2 所示:

$$\text{油产量 (g/L)} = \frac{\text{烘干后烧瓶重量 (g)} - \text{烧瓶净重 (g)}}{\text{发酵液体积 (mL)} / 1000}$$

公式 (2)

1.4.3 脂肪酸组成的测定: 甲酯化方法: 取 0.5 g 左右油脂, 用正己烷定容至 10 mL; 用移液管移取 1 mL 至 10 mL 容量瓶, 加入 3 mL 0.5 mol/L 的 KOH-甲醇溶液, 于 65℃ 水浴 15 - 20 min, 冷却; 再加入 2 mL BF₃-乙醚-甲醇溶液 (BF₃-乙醚: 甲醇 = 3:7,

V/V), 水浴 65℃, 5 - 10 min, 冷却; 再加饱和 NaCl 溶液、正己烷各 2 mL, 振荡后静置、分层, 取上层至另一个容量瓶中, 用正己烷萃取 2 - 3 次后定容至 10 mL, 取 100 μL 萃取液并加入 100 μL 十九烷酸甲酯 (浓度已知) 溶液混匀, 可用作 DHA 分析。

气相分析条件: 色谱柱: DB-23 (60 m × 0.25 mm × 0.25 μm); 检测器: FID; 载气: 氮气; 分流比: 30/L; 进样口温度: 250℃; 检测器温度: 280℃; 进样量: 1 μL; 升温程序: 初始柱温为 100℃, 先以 25℃/min 的速度升至 196℃, 再以 2℃/min 的速度升至 220℃, 保持 12 min。柱流速: 3.0 mL/min; 尾吹流速: 30 mL/min; 氢气流速: 40 mL/min; 空气流速: 400 mL/min。

2 结果和讨论

2.1 裂殖壶菌抗生素筛选

不同抗生素筛选的结果如图 1 所示, 氯霉素, 氨基青霉素和卡那霉素对裂殖壶菌的生长基本没有影响, 致死率基本保持在 25% 以下, 只有当卡那霉素的浓度达到 300 μg/mL 时, 裂殖壶菌的生长受到一定程度上的抑制, 致死率提高至 44.33%。

裂殖壶菌对 Zeocin 的抗性最为敏感, 在低浓度下就能抑制裂殖壶菌的生长, 并且随着浓度的增加, 其致死率直线上升, 裂殖壶菌在含有 Zeocin 的平板上生长很缓慢, 在 1.5 μg/mL 的浓度下第 5 天仍然没有菌落出现 (图 1), 可见 Zeocin 对裂殖壶菌的抑制效果显著, 并且能长时间保持稳定。李清等^[12]考察了 Zeocin 对 *S. limacinum* 的生长影响, 发现在 2.5 μg/mL 时, Zeocin 能完全抑制 *S. limacinum* 的生长, 相比于该浓度, 本实验中发现更低浓度的 Zeocin 对裂殖壶菌就能达到显著的抑制效果。

低浓度的 G418 对裂殖壶菌生长的抑制作用有限, 在 20 μg/mL 的浓度下, 裂殖壶菌的致死率只能达到 48.16% (图 1), 随着浓度的增加, 其抑制作用越来越显著, 当 G418 的浓度达到 140 μg/mL 时, 才能完全抑制裂殖壶菌的生长, 且到第 5 天仍没有菌落出现 (图 1); 两性霉素 B 对裂殖壶菌的生长抑制效果十分显著, 即使在低浓度下, 也能保证 100% 的致死率, 并且到第 5 天仍然没有菌落出现 (图 1), 可见两性霉素 B 对裂殖壶菌的抑制作用能长期保持稳定。

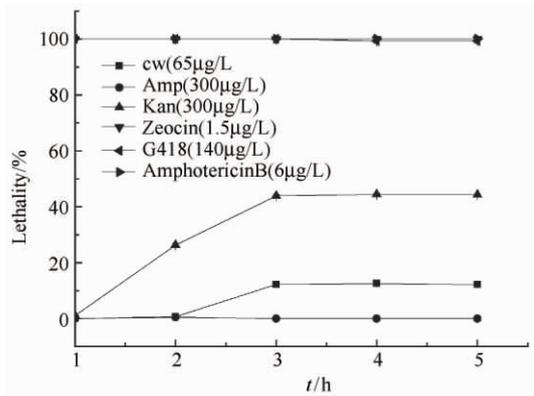


图 1. 不同浓度抗生素对裂殖壶菌致死率的影响

Figure 1. Effect of different antibiotic concentrations on lethality of *Schizochytrium* sp. .

通过以上实验数据可知,6种抗生素中,氯霉素、卡那霉素和氨苄青霉素对裂殖壶菌的生长基本没有影响,不能作为其抗性筛选的试剂。Zeocin, G418和两性霉素B对裂殖壶菌的生长抑制明显,低

浓度即可达到显著抑制的效果,可作为裂殖壶菌的抗性筛选试剂,考虑到Zeocin抗性基因 ble 已经成功的应用在一些真菌表达体系的载体构建如酵母等^[13],使用较成熟,所以本文选择Zeocin作为裂殖壶菌遗传转化体系的抗性筛选试剂。

2.2 外源DNA的制备

2.2.1 重组载体PBS-Zeo-18S的构建:由于裂殖壶菌没有稳定的附加质粒,所以外源基因需要与宿主发生同源重组,将基因片段整合到宿主的染色体上才能稳定表达,因此需要构建适合裂殖壶菌的重组载体PBS-ZEO-18S,构建思路如图2。首先利用真菌18S rDNA通用引物得到裂殖壶菌的18S rDNA序列(图3-C),然后根据该序列设计上游及下游同源臂引物,从而得到18S rDNA同源臂,接着将18S rDNA同源臂(图3-D, E)连接到载体PBS-Zeo(图3-B)上,最后借助同源重组技术使得抗性基因在裂殖壶菌体内进行表达。如图3-G所示,18S rDNA的上

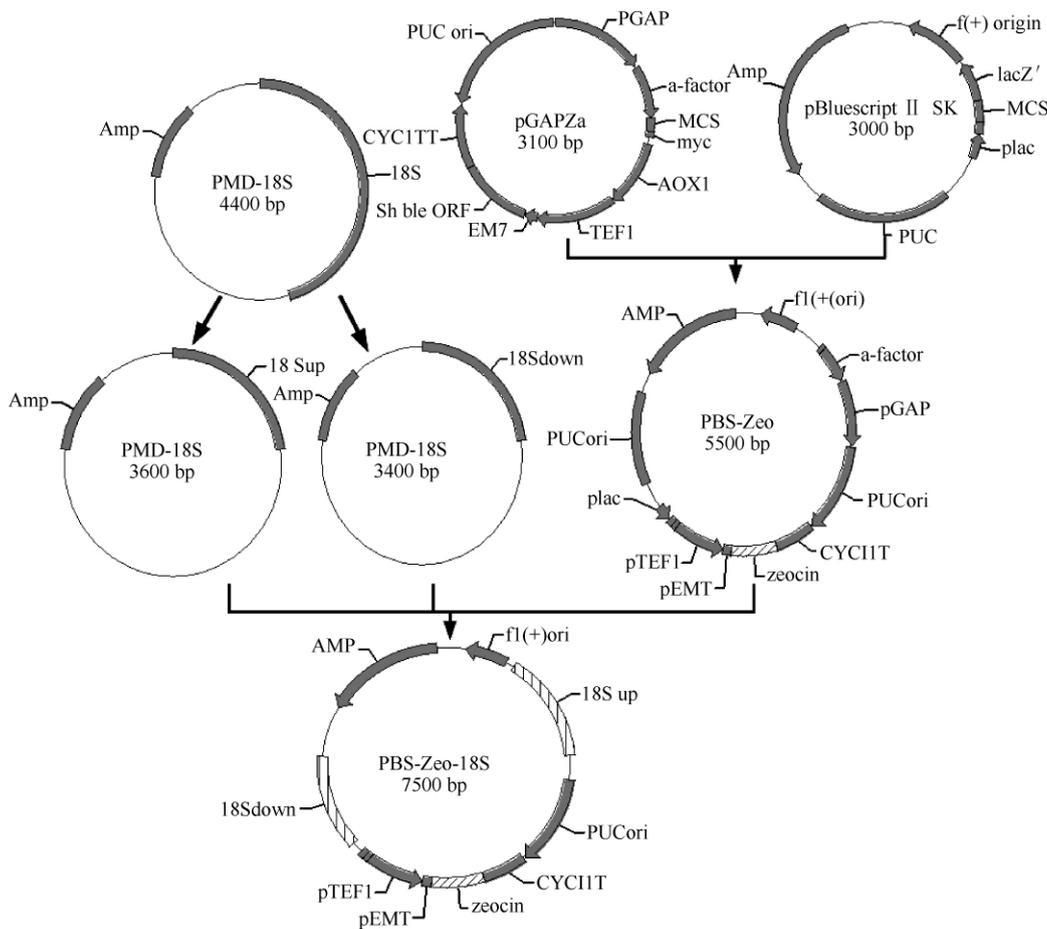


图 2. 重组质粒 PBS-Zeo-18S 构建示意图

Figure 2. Structure of the targeting vector recombinant plasmid pBS-Zeo-18S.

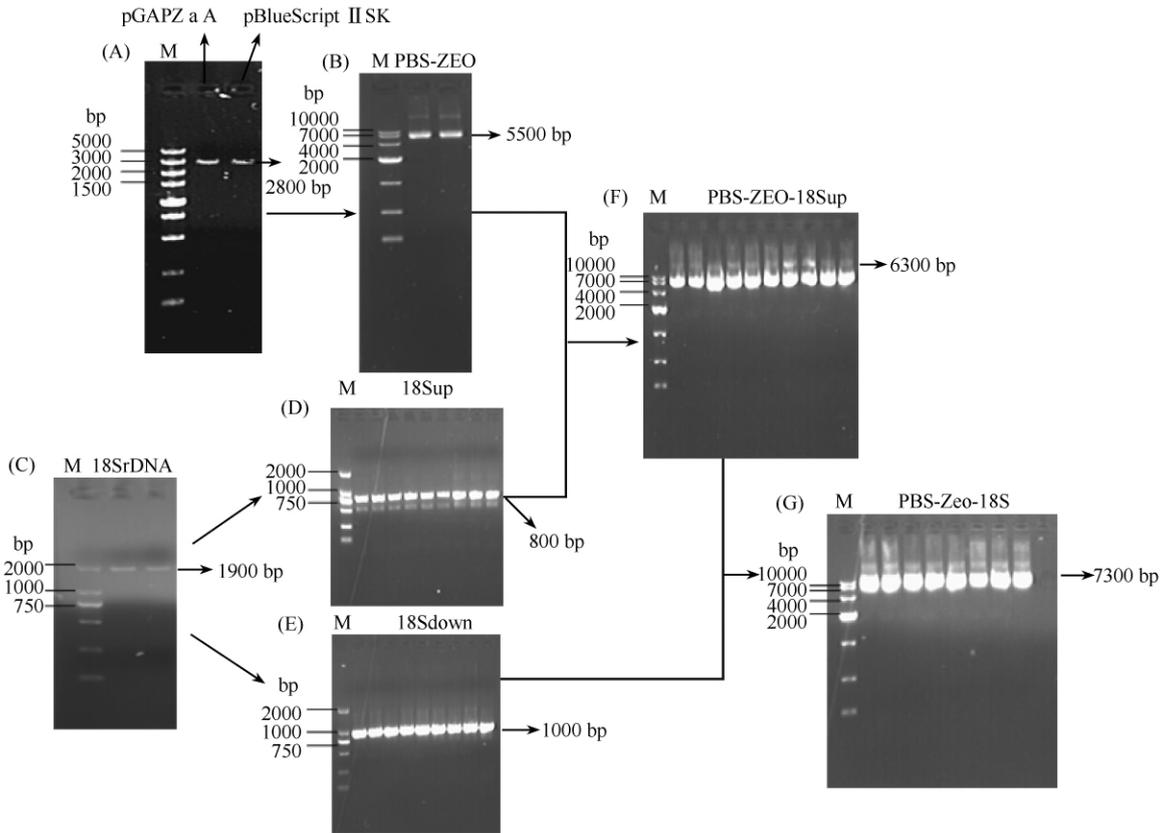


图 3. 重组载体质粒 PBS-Zeo-18S 的琼脂糖凝胶电泳示意图

Figure 3. Agarose gel electrophoresis of recombinant plasmid PBS-Zeo-18S. A: Targeting vector pGAPZ a A and pBlueScript II SK; B: Targeting vector PBS-Zeo; C: 18S rDNA; D: 18S-up homologous recombination; E: 18S-down homologous recombination; F: PBS-Zeo-18S-up homologous recombination; G: Targeting vector PBS-Zeo-18S.

下游同源臂成功连接到重组载体 PBS-Zeo 上。

2.2.2 利用 PCR 验证外源基因的导入: 对电转化后的菌体进行培养, 提取裂殖壶菌基因组作为模板, 设计 Zeocin 抗性基因引物进行 PCR 反应, 凝胶电泳检测 Zeocin 基因是否插入裂殖壶菌的染色体中。

外源基因导入结果如图 4 所示, S5 为假阳性菌株, 没有出现条带, S1-S4 和 S6-S9 为改造菌株, PCR 后能够出现抗性基因条带, 说明外源 *ble* 基因已经成功导入裂殖壶菌中, 并且在 18S rDNA 处进行同源重组, S1-S4 出现一条 PCR 条带是由于发生双拷贝插入^[14], 而 S6-S9 PCR 后出现两条条带, 分别在 700 bp 和 1000 bp 的位置, 这可能是抗性基因在裂殖壶菌基因组中发生单拷贝插入的同时也进行了双拷贝插入, 这主要是因为本实验选择在 18S rDNA 处进行同源重组, 而 18S rDNA 在基因组上存在多拷贝, 促使外源基因插入到裂殖壶菌基因组的相应处。相比于插入一侧带有同源序列的片段, 利用替

换形式进行外源基因整合的精确性更高, 而且在进行同源重组位置的两侧不存在直接的重复序列, 使得其在遗传上更为稳定。利用蛋白电泳检测外源 *ble* 基因的表达, 结果如图 5 所示, *ble* 基因蛋白大小为 11.3 kDa, 转化菌株在 6.5 - 14.3 kDa 间出现蛋白条带, 而原始菌株没有蛋白条带出现, 由此可见, 该基因能够在裂殖壶菌中进行表达。

2.3 转化菌株发酵性能考察

对原始菌株和基因改造菌株进行了发酵性能比较, 结果如图 6 和表 3 所示, 基因改造后的菌株糖耗速率与原始菌株相差不大, 在 48 h 菌株的葡萄糖浓度都接近 0 g/L, 可见改造后的菌株生长代谢并未受到显著影响; 原始菌株和改造菌株的最终生物量分别为 54.74 g/L 和 55.34 g/L, 油脂含量分别达到 27.50 g/L 和 25.71 g/L, DHA 的含量达到 9.87 g/L 和 9.02 g/L。脂肪酸的分布如表 3 所示, 原始菌株与改造菌株的脂肪酸含量中, 短链饱和脂肪酸占总

脂肪酸的含量分别为 42.11% 和 42.21%，DHA 占总脂肪酸的含量为 37.80% 和 36.53%。由此可见，抗性基因的导入对裂殖壶菌的生长、油脂合成及脂肪酸组分分布影响不大。

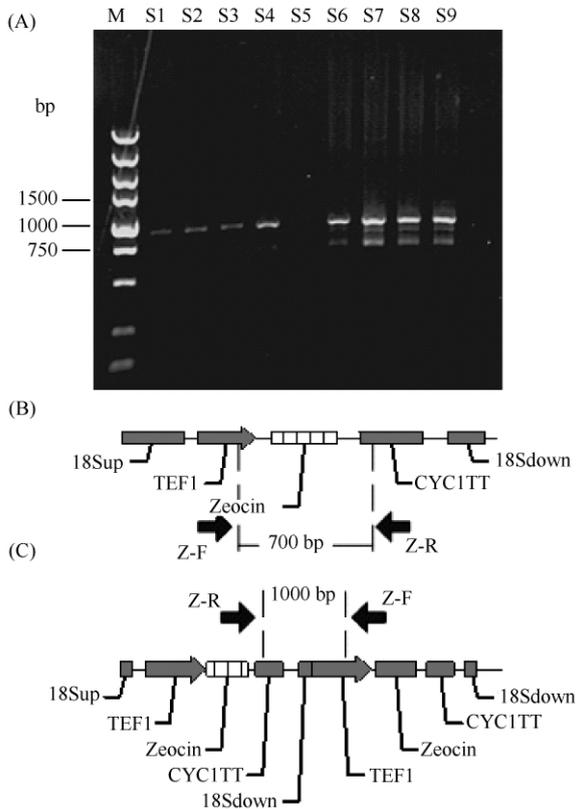


图 4. 外源 *ble* 基因的 PCR 验证

Figure 4. PCR analysis of the *ble* gene incorporation in the transformants. A: PCR analysis of the *ble* gene; B: Schematic diagram of single gene insertion way; C: Schematic diagram of multiple gene insertion way.

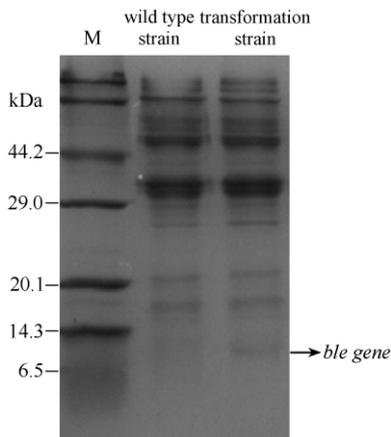


图 5. 外源 *ble* 基因蛋白电泳验证

Figure 5. Protein electrophoresis of the *ble* gene incorporation in the transformants.

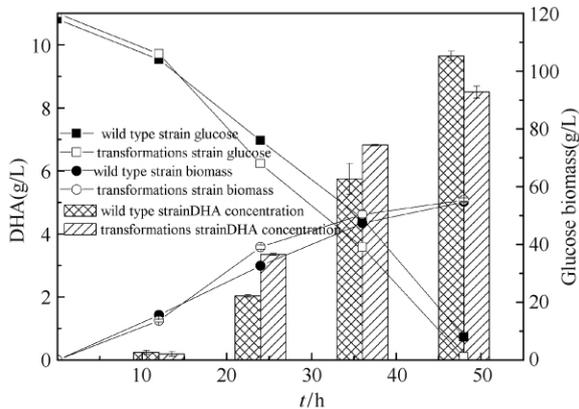


图 6. 改造菌株与原始菌株发酵性能差异

Figure 6. The fermentation results of transformations and wild type strain.

表 3. 原始菌株与改造菌株中各油脂组分脂肪酸组成

Table 3. The fatty acid composition of wild type strain and transformations

The fatty acid	The fatty acid composition/%	wild type strain transformations strain
C14:0	10.62 ± 0.20	10.90 ± 0.38
C15:0	0.72 ± 0.13	0.74 ± 0.09
C16:0	30.62 ± 0.11	29.84 ± 0.21
C18:0	0.15 ± 0.38	0.73 ± 0.31
C18:3n-6	0.24 ± 0.06	0.589 ± 0.34
C20:0	0.16 ± 0.04	0.40 ± 0.11
C20:2	0.23 ± 0.12	0.17 ± 0.06
C20:4n-6	0.48 ± 0.19	0.24 ± 0.10
C20:3n-3	0.33 ± 0.21	0.41 ± 0.22
C20:5	0.76 ± 0.10	0.67 ± 0.33
C22:1	1.05 ± 0.22	0.89 ± 0.31
C22:5n-6	16.83 ± 0.15	17.69 ± 0.41
C22:6	37.80 ± 0.14	36.53 ± 0.50

3 结论

本文考察了不同浓度抗生素对裂殖壶菌生长影响, 选用 1.5 μg/mL 的 Zeocin 作为裂殖壶菌抗性筛选试剂, 利用同源重组技术, 以裂殖壶菌的 18S rDNA 作为同源臂, 将抗性 *ble* 基因连接到裂殖壶菌染色体上进行表达, 发现在裂殖壶菌体内既能进行单拷贝同源重组, 又能进行多拷贝同源重组, 多拷贝同源重组更加稳定, 使得抗性 *ble* 基因更加高效的表达; 通过对原始菌株和改造菌株进行发酵验证比较, 发现改造后菌株的生理形态和发酵性能相比于原始菌株没有较大差异, 说明 *ble* 基因的导入并不

会影响裂殖壶菌的代谢生长,证实裂殖壶菌的遗传转化体系构建成功,为以后在基因水平上指导裂殖壶菌的生长发酵调控和代谢机理解析奠定了良好的基础。

参考文献

- [1] Giusto NM, Pasquare SJ, Salvador GA, Castagnet PI, Roque ME, de Boschero MGI. Lipid metabolism in vertebrate retinal rod outer segments. *Progress in Lipid Research*, 2000, 39 (4) : 315-391.
- [2] Bell MV, Batty RS, Dick JR, Fretwell K, Navarro JC, Sargent JR. Dietary deficiency of docosahexaenoic acid impairs vision at low light intensities in juvenile herring (*Clupea harengus* L.). *Lipids*, 1995, 30 (5) : 443-449.
- [3] Zhao S. n-6 fatty acid, n-3 fatty acids in the role of tumor and its mechanism. *Archives of Foreign Medical Oncology*, 2004, 31 (2) : 96-99. (in Chinese)
赵崧. n-6 脂肪酸、n-3 脂肪酸在肿瘤发生中的作用及其机制. 国外医学肿瘤学分册, 2004, 31 (2) : 96-99.
- [4] Li J, Ren LJ, Sun GN, Qu L, Huang H. Comparative Metabolomics Analysis of Docosahexaenoic Acid Fermentation Processes by *Schizochytrium* sp. under Different Oxygen Availability Conditions. *Omic: a Journal of Integrative Biology*, 2013, 17 (5) : 269-281.
- [5] Arun KM, Karin K, Doris R, Batt SM, Lee OYC, De S, Frunzke J, Besra GS, Eggeling L. Deletion of manC in *Corynebacterium glutamicum* results in a phospho-myoinositol mannoside and lipoglycan-deficient mutant. *Microbiology*, 2012, 158 (7) : 1908-1917.
- [6] Keishi S, Takanori M, Takumi K, Ohara J, Hamaguchi R, Abe E, Nagano N, Hayashi M, Ueda M, Honda D. Versatile Transformation System That Is Applicable to both Multiple Transgene Expression and Gene Targeting for *Thraustochytrids*. *Applied and Environmental Microbiology*, 2012, 3193-3202.
- [7] Takanori M, Keishi S, Rie H, Kobayashi T, Abe E, Hama Y, Hayashi M, Honda D., Okita Y, Sugimoto S, Okino N, Ito M. Analysis of $\Delta 12$ -fatty acid desaturase function revealed that two distinct pathways are active for the synthesis of PUFAs in *T. aureum* ATCC 34304. *Journal of Lipid Research*, 2012, 53: 1210-1222.
- [8] Yan JF, Cheng RB, Lin XZ, You S, Li K, Rong H, Ma Y. Overexpression of acetyl-CoA synthetase increased the biomass and fatty acid proportion in microalga *Schizochytrium*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2013, 97: 1933-1939.
- [9] Ren LJ, Feng Y, Li J, Qu L, Huang H. Impact of phosphate concentration on docosahexaenoic acid production and related enzyme activities in fermentation of *Schizochytrium* sp. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 2013, 36, 1177-1183.
- [10] Elizabeth AH, Hidetaka S, Junichi T. Enhanced stability of YEp plasmids in lager brewing yeasts is related to lager brewing yeast 2- μ m DNA. *Current Genetics*, 1992, 22: 357-361.
- [11] Qu L, Ji XJ, Ren LJ, Nie ZK, Feng Y, Wu WJ, Ouyang PK, Huang H. Enhancement of docosahexaenoic acid production by *Schizochytrium* sp. using a two-stage oxygen supply control strategy based on oxygen transfer coefficient. *Letters in Applied Microbiology*, 2011, 52: 22-27.
- [12] Li Q, Zang XN, Zhang XC, Xu Y, Lu L. Sensitivities of *Schizochytrium* sp. to seven antibiotics. *Journal of Wuhan University*, 2012, 3 (58) : 275-280. (in Chinese)
李清, 臧晓南, 张学成, 许永, 鹿宁. 裂殖壶菌对 7 种抗生素的敏感性. 武汉大学学报, 2012, 3 (58) : 275-280.
- [13] Yan JY, Zheng XL, Li XY. A novel and robust recombinant *Pichia pastoris* yeast whole cell biocatalyst with intracellular overexpression of a *Thermomyces lanuginosus* lipase: Preparation, characterization and application in biodiesel production. *Bioresource Technology*, 2014, 151, 43-48.
- [14] 尤尼利佛公司. 多拷贝基因在霉菌中的定点整合方法. 中国: 98813762. 3. 2001. 2. 21.

Establishment of genetic transformation system of *Schizochytrium* sp. by homologous recombination

Xiaoyan Zhuang, Shenglan Chen, Xiaojun Ji, Xian Xu, Lujing Ren*

College of Biotechnology and Pharmaceutical Engineering, Nanjing University of Technology, Nanjing 211816, Jiangsu Province, China

Abstract: [Objective] *Schizochytrium* sp. is a marine fungus that can produce DHA efficiently. Genetic engineering has been successfully used in industrial strain improvement and metabolic studies. In order to use genetic engineering to modified *Schizochytrium* sp., we established an genetic transformation system of *Schizochytrium* sp. [Methods] A genetic transformation system of *Schizochytrium* sp. was established by 18S rDNA-targeted homologous recombination. The targeting vector contained a part of 18S rDNA from *Schizochytrium* sp. and the *ble* gene. This targeting vector was transformed into *Schizochytrium* sp. by electroporation and then selected by Zeocin-containing plates. The incorporation of exogenous *ble* gene into the genome of *Schizochytrium* was inspected by PCR amplification. [Results] Fermentation results show that the transformants had similar cell dry weight, lipid yield, DHA content, and composition of other fatty acids to the wild type strain. [Conclusion] Our results show that the introduction of resistance gene did not affect the cell growth and lipid metabolism. This system could be used to introduce new functional genes into *Schizochytrium* sp..

Keywords: *Schizochytrium* sp., 18S rDNA, *ble* gene, homologous recombination

(本文责编: 张晓丽)

Supported by National Programs for High Technology Research and Development of China (2014 AA021701), by the National Natural Science Foundation of China (21306085), by the Jiangsu Province Natural Science Foundation of China (BK2012424) and by the Specialized Research Fund for the Doctoral Program of Higher Education (20133221120008)

* Corresponding author. Tel/Fax: +86-25-58139386; E-mail: renlujing@njtech.edu.cn

Received: 11 June 2014 / Revised: 5 October 2014