

• 生物技术与方法 •

拟南芥 Leafy Cotyledon 2 的表达提高了小球藻 *Chlorella sorokiniana* 的油脂含量

刘长斌, 佟少明, 张文蕾, 侯和胜

辽宁师范大学 辽宁省植物生物工程重点实验室, 辽宁 大连 116000

刘长斌, 佟少明, 张文蕾, 等. 拟南芥 Leafy Cotyledon 2 的表达提高了小球藻 *Chlorella sorokiniana* 的油脂含量. 生物工程学报, 2017, 33(6): 1037-1045.

Liu CB, Tong SM, Zhang WL, et al. Expression of Leafy Cotyledon 2 from *Arabidopsis* increased the content of lipid in *Chlorella sorokiniana*. Chin J Biotech, 2017, 33(6): 1037-1045.

摘要: 油脂含量是影响微藻产业化生产生物柴油的因素之一。基因工程的方法是培育高产藻株的一个重要手段。Leafy Cotyledon 2 (LEC2) 在拟南芥中是调节种子成熟及油脂积累的重要转录因子, 在藻类植物中尚无相关的报道。本研究从拟南芥中获取 *LEC2* 基因, 构建表达载体 pCIMBIA1300-35s-GFP-ATLEC2, 通过基因枪介导法转入小球藻 *C. sorokiniana*。经过 PCR、RT-PCR、Western blotting 分析, 筛选出一株转 *ATLEC2* 基因藻株。对总脂肪酸含量的分析发现, 转 *ATLEC2* 基因藻株的脂肪酸含量比原始藻株提高了 1 倍且没有明显影响生长。以上结果表明, *ATLEC2* 能促进小球藻油脂的积累。

关键词: 小球藻, 转录因子, Leafy Cotyledon 2, 油脂

Expression of Leafy Cotyledon 2 from *Arabidopsis* increased the content of lipid in *Chlorella sorokiniana*

Changbin Liu, Shaoming Tong, Wenlei Zhang, and Hesheng Hou

Liaoning Key Laboratory of Plant Biotechnology, Liaoning Normal University, Dalian 116000, Liaoning, China

Abstract: The low lipid content is one of the major bottlenecks to realize the industrialization of the algae biodiesel. Improvement of lipid content through global regulation to get high-yield generating algae is a good strategy. Leafy

Received: November 30, 2016; **Accepted:** April 11, 2017

Corresponding authors: Changbin Liu. Tel: +86-411-86323869; E-mail: 316093032@qq.com

Hesheng Hou. Tel: +86-411-82159112; E-mail: hesheng_hou@126.com

网络出版时间: 2017-05-03

网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20170503.1653.005.html>

Cotyledon 2 (LEC2) is an important transcription factor for seed maturation and oil accumulation in Arabidopsis. However, there are few reports regarding adoption of LEC2 for lipid accumulation until now. In this study, LEC2 from Arabidopsis was cloned into the plant expression vector pCIMBIA1300 and transformed into *C. sorokiniana* through particle bombardment. One recombinant was screened by PCR, RT-PCR and Western blot analyses. Compared with the wild type one, the total lipid content in the recombinant increased one fold, which did not show effect on cell growth, indicating that LEC2 can efficiently enhance the lipid accumulation in *C. sorokiniana*.

Keywords: *Chlorella*, transcription factor, Leafy Cotyledon 2, lipid

随着全球经济的发展,世界范围内的能源需求日益增加,传统化石能源的开发和利用面临着严峻的形势,能源危机是全球面临的关键问题^[1]。能源危机以及环境恶化使可再生生物柴油引起了越来越多的关注。为了生物柴油的可持续生产,迫切需要开发一种可持续的替代原料^[2]。富油微藻是生产生物柴油非常有利的原料,因为微藻的生长不需要大规模的农业用地,并且能通过固定二氧化碳改善空气质量。然而,微藻生物柴油的高生产成本阻碍了其商业化生产^[2-3]。通过增加藻细胞中的油脂含量降低成本是解决途径,基因工程的方法培育高产油藻株是最重要的手段之一^[4-5]。

Leafy Cotyledon 2 (LEC2) 属于 B3 家族转录因子,是种子成熟及油脂积累的主要调节器^[6],在拟南芥^[7-9]、烟草^[10]、蓖麻^[11]等植物中过量表达 LEC2 都能促进油脂的积累。目前关于 LEC2 调节机理的研究多集中在陆生植物中,而在产油微藻中尚未见报道。本研究将来自拟南芥的 LEC2 基因 (*AtLEC2*) 通过基因枪法转到小球藻中并获得稳定表达。通过总脂肪酸含量的分析发现,转 *AtLEC2* 基因藻株的总脂肪酸含量与原始藻株相比提高了一倍多,表明 *AtLEC2* 能促进小球藻油脂的积累。

1 材料与方法

1.1 材料

本实验采用的藻种 *Chlorella sorokiniana* 为

我实验室自主筛选藻种。培养所用培养基为 BG11 培养基。植物双表达载体 pCIMBIA1300-35s-GFP 购自转导生物实验室 (武汉)。

1.2 方法

1.2.1 拟南芥 LEC2 植物表达载体 pCIMBIA1300-35s-GFP-ATLEC2 的构建

以拟南芥 LEC2 mRNA 序列 (GenBank No. NM_102595.2) 为模板设计引物 (Forward 5'-GGGTACCATGGATAACTTCTTACCCTT-3'; Reverse 5'-GCTCTAGACCACCACTCAAAGTC GTTAA-3'), 引物的两端分别添加 *Kpn* I 和 *Xba* I 酶切位点 (下划线部分), 送生工生物工程 (上海) 股份有限公司合成。利用 Trizol 提取试剂盒 (生工) 和第一链 cDNA 合成试剂盒 (生工) 按说明提取拟南芥总 RNA 并反转录为 cDNA, 并以此为模板扩增得 1 089 bp 产物, 并将其连接至 PMD18-T 载体上。扩增程序为: 98 °C 预变性 5 min; 98 °C 变性 30 s, 60 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 1 min, 共 30 个循环; 72 °C 延伸 5 min, 4 °C 保存。以 *Kpn* I 和 *Xba* I 双酶切 PMD18-ATLEC2 质粒, 回收 ATLEC2 片段与经 *Kpn* I 和 *Xba* I 酶切后的植物双表达载体 pCIMBIA1300-35s-GFP 进行体外连接, 构建表达载体 pCIMBIA1300-35s-GFP-ATLEC2 并转入大肠杆菌 DH5 α 。

1.2.2 小球藻的培养及潮霉素抗性检测

小球藻接种到含 100 mL BG11 培养基的三

角瓶中, 25 °C、40 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ 光强下培养, 光暗周期为 12 h/12 h。参考王逸云等^[12-14]的研究, 取培养至对数期的小球藻均匀涂布在含潮霉素的固体 BG11 平板上, 潮霉素的浓度分别为: 0、5、10、15、20 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 按上述培养条件培养 14 d, 观察藻落生长情况。

1.2.3 基因枪转化 *C. sorokiniana*

基因枪转化参考 Talebi^[15]、Liu^[16]等操作, 具体操作如下:

C. sorokiniana 样品的准备。将对数生长期的 *C. sorokiniana* 离心收集后平铺在灭菌的 0.2 μm 硝酸纤维素膜上, 并置于琼脂糖平板上吸收水分。

微弹载体制备。取直径 0.6 μm 金粉 50 mg, 无水乙醇洗涤后加入 1 mL ddH₂O, 制成 50 mg/mL 的金粉混合液。取 50 μL 金粉混合液, 依次加入 5 μL pCIMBIA1300-35s-GFP-ATLEC2 质粒 (1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$), 50 μL CaCl₂ (2.5 mol/L)、20 μL 0.1 mol/L 的亚精胺, 振荡混匀, 室温孵育 10 min, 10 000 r/min 离心 10 s, 去上清。70%乙醇洗涤 1 次, 无水乙醇洗涤 2 次, 再用 50 μL 无水乙醇重悬。取 10 μL 混悬均匀的金粉置于载体膜上, 晾干。

基因枪转化。组装载体膜、可裂膜、钢丝网, 含 *C. sorokiniana* 的琼脂糖平板置于下层托盘中, 调整托盘与载体膜距离为 6 cm, 1 100 psi 压力轰击。轰击后的藻细胞转移到新鲜的 BG11 培养基中, 25 °C 暗培养 24 h。

1.2.4 阳性藻株的筛选

将暗培养后的藻液涂布到含潮霉素的 BG11 平板上, 按 1.2.2 培养条件培养 2 周, 挑选单藻落接种到三角瓶中进行传代培养。利用 PlantZol 试剂盒 (北京全式金生物技术有限公司) 提取基因组 DNA, 并以此为模板, 以 1.2.1 中合成的引物进行目的基因的 PCR 鉴定, 以质

粒 pCIMBIA1300-35s-GFP-ATLEC2 为阳性对照, 原始 *C. sorokiniana* 为阴性对照, 扩增产物用 1.5%琼脂糖凝胶电泳检测。

1.2.5 转 ATLEC2 基因小球藻的 RT-PCR 鉴定

取对数生长期的阳性藻株, 用 Trizol 提取试剂盒和第一链 cDNA 合成试剂盒按说明提取总 RNA 并合成第一链 cDNA, 并以此为模板进行 RT-PCR 分析, 扩增程序如 1.2.1, 1.5%琼脂糖凝胶电泳检测扩增结果。

1.2.6 转 ATLEC2 小球藻 Western blotting 鉴定

对 RT-PCR 鉴定为阳性的转基因藻株提取蛋白, 进行 SDS-PAGE, 转膜, 并用 5%脱脂奶粉封闭; 加入 1:1 000 稀释的一抗 (β -Tubulin 和 anti-GFP), 4 °C 过夜孵育; TBST 洗涤干净后加入 1:1 000 稀释的二抗 (Goat Anti-Mouse IgG 抗体) 室温孵育 1 h, TBST 洗涤; 碧云天 BeyoECL Star kit 显色, 常规显影定影, 检测 GFP 融合蛋白的表达情况。

1.2.7 转 ATLEC2 基因小球藻脂肪酸组成及含量分析

将小球藻培养至指数生长末期, 氮胁迫培养 7 d 后采收, 80 °C 烘干至恒重得藻粉。将藻粉送科标技术 (青岛) 研发中心检测脂肪酸组成。

样品处理: 取 100 mg 样品加入到 15 mL 离心管中, 陆续加入 2 mL 5%盐酸甲醇溶液, 3 mL 氯仿甲醇溶液 (体积比 1:1), 100 μL 十九烷酸甲酯内标。85 °C 水浴锅中水浴 1 h, 水浴完成后, 等温度降到室温, 在离心管中加入 1 mL 正己烷, 振荡萃取 2 min 之后, 静置 1 h, 等待分层。取上清液 100 μL , 用正己烷定容到 1 mL。0.45 μm 滤膜过膜后上机测试。

色谱条件: 公司所用色谱柱为 TG-5MS (30 m \times 0.25 mm \times 0.25 μm); 升温程序为 80 °C 保

持 1 min, 以 10 °C/min 的速率升温至 200 °C, 继续以 5 °C/min 的速率升温至 250 °C, 最后以 2 °C/min 的速率升到 270 °C, 保持 3 min; 进样口温度 290 °C; 载气流速 1.2 mL/min, 不分流进样, 开阀时间 1 min。

质谱条件: 离子源温度 280 °C, 传输线温度 280 °C, 溶剂延迟时间 5.00 min, 扫描范围 30–400 Da, 离子源为 EI 源 70 eV。

1.2.8 转基因藻株光合及生长状况分析

将转基因藻株与原始对照藻株接种到新鲜的培养基中, 连续培养 8 d, 每天取样计数绘制生长曲线; 隔天取样, 稀释藻浓度在 200 µg/L, 对样品进行暗适应 20 min^[17], 利用 Multi-Color-PAM 测量叶绿素荧光参数。参考文献[18-19]方法以 440 nm LED 测量光测量小球藻光系统 II (PS II) 的最大量子产量 (Fv/Fm)。用 440 nm 的光及每 30 s 一个光强梯度测定 Y(II) 光响应曲线。

2 结果与分析

2.1 小球藻 *C. sorokiniana* 对潮霉素的敏感性

本实验所用的 *C. sorokiniana* 对潮霉素具有较强的敏感性, 在培养至第 7 天时, 除潮霉素含量为 15 µg/mL 和 20 µg/mL 的平板上均有藻落长出, 继续培养 1 周后, 15 µg/mL 和 20 µg/mL 的平板上仍没有藻落生长, 与王逸云^[13]、周琨^[14]及陈颖等^[12]的报道有较大差异, 可能是小球藻不同种间对潮霉素的差异较大, 同时培养基成分也影响了小球藻的抗性。本实验选择 15 µg/mL 用于后期转 *ATLEC2* 基因小球藻 *C. sorokiniana* 的筛选。

2.2 转 *ATLEC2* 基因藻株的筛选及 PCR 鉴定

转化后的 *C. sorokiniana* 在含 15 µg/mL 潮

霉素的 BG11 平板上培养 7 d 后有藻落长出, 而原始藻株没有生长, 挑取单藻落转接到 BG11 液体培养基进行传代培养。培养 3 代后提取基因组 DNA 进行 PCR 鉴定, 经琼脂糖凝胶电泳检测, 结果如图 1A, 载体质粒与转化藻株均扩增出 1 089 bp 片段的的目的基因, 而原始藻株没有条带。结果表明目的基因已成功导入宿主细胞, 并获得稳定遗传。

2.3 转基因藻株的 RT-PCR 鉴定

提取转基因藻株总 RNA 进行 RT-PCR 分析, 检测 *ATLEC2* 基因在宿主中的转录情况。结果如图 1B 所示, RT-PCR 扩增出 1 089 bp 片段, 与目的基因大小一致。表明外源基因 *ATLEC2* 在小球藻 *C. sorokiniana* 中已转录表达。

2.4 转 *ATLEC2* 基因藻株的 Western blotting 分析

在构建 pCIMBIA1300-35s-GFP-*ATLEC2* 载

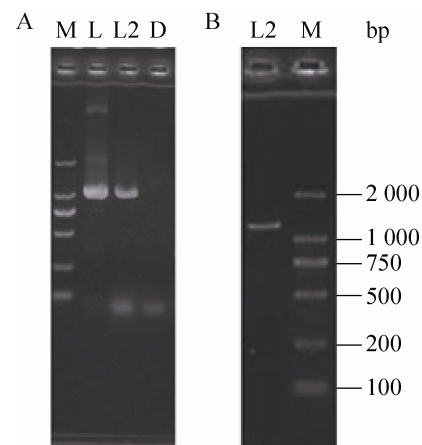


图 1 转基因 *C. sorokiniana* PCR (A) 及 RT-PCR 检测检测 (B)

Fig. 1 PCR (A) and RT-PCR (B) analysis of transgenic *C. sorokiniana*. M: marker DL2000; L: pCIMBIA1300-35s-GFP-*ATLEC2* plasmid L2: transgenic *C. sorokiniana*; D: wild type.

体时 *ATLEC2* 基因与 *gfp* 序列融合, 提取转 *ATLEC2* 基因藻株蛋白, 利用 anti-GFP 作为一抗进行 Western blotting 分析, 结果显示转基因藻株有明显条带, 大小略高于 tubulin, 目测在 60 kDa 左右, 说明 *ATLEC2* 在 *C. sorokiniana* 中翻译表达 (图 2)。

2.5 转 *ATLEC2* 基因小球藻脂肪酸组成及含量分析

将藻粉送科标技术 (青岛) 研发中心检测转 *ATLEC2* 基因小球藻及对照藻脂肪酸组成, 如表 1 所示, 表中数据为 3 次测试的平均值, 根据单因素方差分析, 转基因藻株与对照藻株的总油脂含量差异极显著, L2/D 列表示两者的差异倍数。从检测结果可以看出, 小球藻 *C. sorokiniana*

中脂肪酸的主要成分为十八碳脂肪酸和十六碳脂肪酸, 两者占总脂肪酸的 97%左右; 转基因藻株和对照藻株的总脂肪含量分别为 5.43%和 2.56%, 转基因藻株为对照株的 2 倍多, 说明拟南芥 LEC2 在小球藻 *C. sorokiniana* 中的表达促进了其脂类的积累。

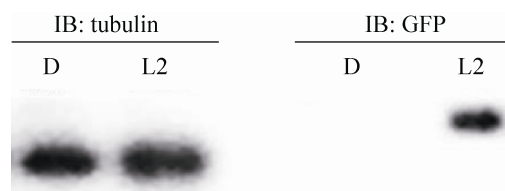


图 2 转基因 *C. sorokiniana* GFP 蛋白的 Western blotting 分析

Fig. 2 Western blotting analysis of GFP protein in transgenic *C. sorokiniana*. L2: *ATLEC2* transgenic *C. sorokiniana*; D: wild type.

表 1 转 *ATLEC2* 基因 *C. sorokiniana* 脂肪酸分析

Table 1 Fatty acid analysis of *ATLEC2* transgenic *C. sorokiniana*

Fatty acid component (mg/kg)	D	L2	L2/D
C14:0 (Myristic)	86.3	220.3	2.6
C15:0 (Pentadecanoic)	42.8	96.1	2.2
C16:0 (Palmitic)	8 592.0	18 217.2	2.1
C17:0 (Margaric)	142.1	394.3	2.8
C17:1(Margaroleic)	205.2	414.1	2.0
C18:0 (Stearic)	1 296.4	2 343.3	1.8
C18:1n9 (Oleic)	706.1	1 245.3	1.8
C18:2n6 (Linoleic)	8 794.0	23 097.3	2.6
C18:3n3 (Linolenic)	5 527.4	7 483.7	1.4
C20:0 (Arachidic)	112.2	417.1	3.7
C20:1 (Eicosenic cis 11)	4.1	10.9	2.7
C20:2 (Eicosadienoic)	20.5	43.0	2.1
C20:3n6 (g-Eicosatrienoic)	13.4	19.1	1.4
C21:0 (Heneicosanoic)	9.8	20.2	2.1
C22:0 (Behenic)	28.4	107.4	3.8
C23:0 (Tricosanoic)	14.8	37.2	2.5
C24:0 (Lignoceric)	42.5	132.3	3.1
Total	25 638	54 298.8	2.1

2.6 转基因藻株光合及生长状况分析

转基因藻株的生长曲线如图 3,转基因藻株与对照藻株的生长曲线非常接近,转基因藻株的细胞密度略高于对照藻株。

Fv/Fm 为 PS II 的最大量子效率,反映植物潜在最大光合能力,植物受到胁迫 (Stress) 时, Fv/Fm 会显著下降^[18],通过对转基因藻株和对照株培养第 2(D2)、4(D4)、6(D6)、8(D8) 天 Fv/Fm 的检测发现,两者之间没有显著差异(图 4)。Y(II)

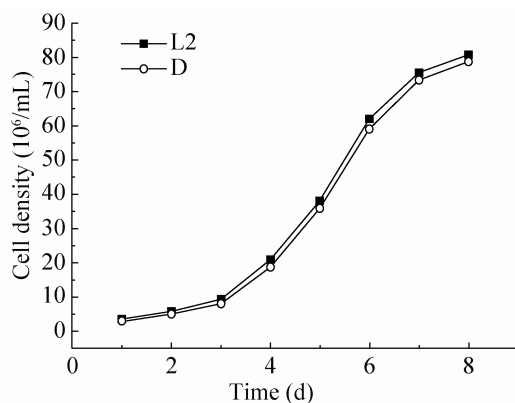


图 3 L2 转基因小球藻与野生株的生长曲线

Fig. 3 Growth curve of transgenic *C. sorokiniana* and wild type. L2: ATLEC2 transgenic *C. sorokiniana*; D: wild type.

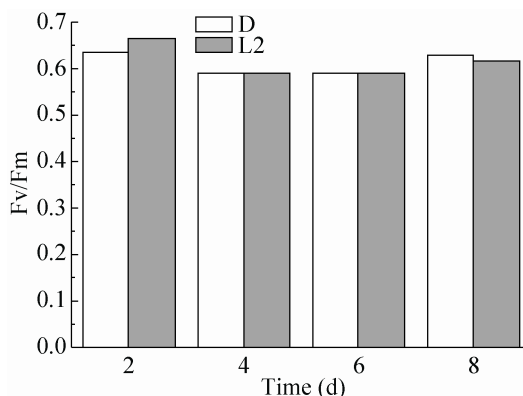


图 4 转基因小球藻及野生藻株最大量子产量检测

Fig. 4 Measurement of PSII maximum quantum yield in transgenic *C. sorokiniana* and wild type. L2: ATLEC2 transgenic *C. sorokiniana*; D: wild type.

为 PSII 有效量子产量,表示 PSII 的实际光合效率,是光合性能最主要的指示器之一^[18],对转基因藻株和对照株培养第 2、4、6、8 天的 Y(II) 光响应曲线分析(图 5)可看出,第 4 天两者的光曲线几乎完全重合,第 2、6、8 天转基因藻株 Y(II) 的光曲线略高,但是两者没有明显差异。

通过对转基因藻株生长曲线及光合参数的比较表明,在本实验培养条件下转基因藻株的生长及光合性能没有出现显著变化。

3 讨论

通过基因工程改造的方法获得高产藻株是微藻生物柴油产业化的重要途径。目前主要是通过油脂代谢路径上相关酶的基因的操作提高微藻中的油脂含量,例如,Xue 等^[4]通过超表达苹果酸脱氢酶增加了蛋白核小球藻 *Chlorella pyrenoidosa* 的油脂积累;Trentacostea 等^[19]通过敲除一个多功能的脂肪酶/磷脂酶/酰基转移酶增加了假微型海链藻 *Thalassiosira pseudonana* 中油脂的积累;Niu 等^[20]在三角褐指藻 *Phaeodactylum tricorutum* 中超表达酯酰辅酶 A:二酰基甘油酰基转移酶促进了其油脂的合成;Fan 等^[21]在 *C. pyrenoidosa* 中超表达来自拟南芥的 NAD(H) 激酶,使细胞内的油脂含量增加了 110.4%。相较于对某个酶单一基因的改造,转录因子的调节更有优势,Zhang 等^[22]将大豆转录因子 GmDof4 转入小球藻 *Chlorella ellipsoidea* 中,使其油脂含量由 46.4%提高到 52.9%;Shang 等^[23]从巴夫杜氏藻 *Dunaliella parva* 中鉴定出了转录因子 Wri1, Wri1 是调节植物脂肪酸及甘油三酯 (TAG) 合成的重要转录因子,并且发现 Wri1 的表达受氮胁迫诱导。微藻的油脂积累涉

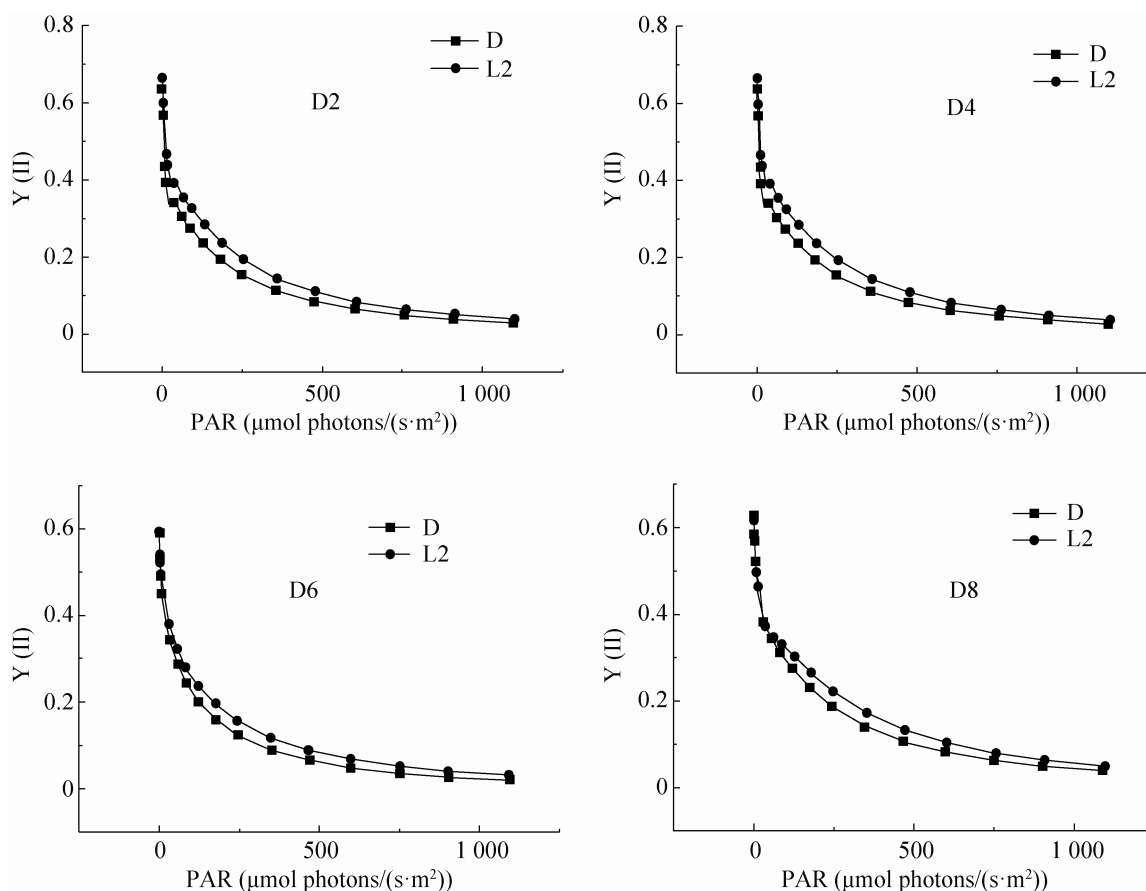


图 5 转基因小球藻及野生藻株的 Y(II) 典型光响应曲线检测

Fig. 5 Measurements of Typical Light Curves of PS II quantum yields Y(II) in transgenic *C. sorokiniana* and Wild type. L2: ATLEC2 transgenic *C. sorokiniana*; D: wild type.

及糖酵解、脂肪酸合成、TAG 的合成等多条代谢途径^[24], LEC2 能上调编码参与脂肪酸及 TAG 合成相关酶的基因的表达,同时还提高了其他转录因子的表达^[25],具有级联放大效应。

本研究从拟南芥中获取 *LEC2* 基因,并通过基因枪介导转化小球藻 *C. sorokiniana* 经 PCR、RT-PCR 及 Western blotting 分析, *ATLEC2* 基因成功转入 *C. sorokiniana* 中并获得稳定表达。通过对原始对照藻株及转 *ATLEC2* 基因藻株的总脂肪酸含量分析,原始藻株和转 *ATLEC2* 基因藻株脂肪酸含量分别为 2.56%和 5.43%;与原始

藻株相比,转 *ATLEC2* 基因藻株的脂肪酸含量提高了 1 倍;通过对转基因藻株及野生藻株生长曲线及光合参数的比较表明在本实验培养条件下转 *ATLEC2* 基因对小球藻 *C. sorokiniana* 的生长及光合没有显著影响。以上结果说明在小球藻 *C. sorokiniana* 中,拟南芥转录因子 LEC2 促进了藻体内油脂的生物合成,关于调控机理本实验室正在研究中。

REFERENCES

- [1] Chisti Y. Biodiesel from microalgae. *Biotechnol*

- Adv, 2007, 25(3): 294–306.
- [2] Wu XD, Ruan RS, Du ZY, et al. Current status and prospects of biodiesel production from microalgae. *Energies*, 2012, 5(12): 2667–2682.
- [3] Jambo SA, Abdulla R, Azhar SHM, et al. A review on third generation bioethanol feedstock. *Renew Sust Energy Rev*, 2016, 65: 756–769.
- [4] Xue J, Wang L, Zhang L, et al. The pivotal role of malic enzyme in enhancing oil accumulation in green microalga *Chlorella pyrenoidosa*. *Microb Cell Fact*, 2016, 15: 120.
- [5] Guarnieri MT, Nag A, Yang SH, et al. Proteomic analysis of *Chlorella vulgaris*: potential targets for enhanced lipid accumulation. *J Proteomics*, 2013, 93: 245–253.
- [6] Mendoza MS, Dubreucq B, Miquel M, et al. LEAFY COTYLEDON 2 activation is sufficient to trigger the accumulation of oil and seed specific mRNAs in *Arabidopsis* leaves. *FEBS Lett*, 2005, 579(21): 4666–4670.
- [7] Angeles-Núñez JG, Tiessen A. Mutation of the transcription factor LEAFY COTYLEDON 2 alters the chemical composition of *Arabidopsis* seeds, decreasing oil and protein content, while maintaining high levels of starch and sucrose in mature seeds. *J Plant Physiol*, 2011, 168(16): 1891–1900.
- [8] Kim HU, Lee KR, Jung SJ, et al. Senescence-inducible LEC2 enhances triacylglycerol accumulation in leaves without negatively affecting plant growth. *Plant Biotechnol J*, 2015, 13(9): 1346–1359.
- [9] Andrianov V, Borisjuk N, Pogrebnyak N, et al. Tobacco as a production platform for biofuel: overexpression of *Arabidopsis* *DGAT* and *LEC2* genes increases accumulation and shifts the composition of lipids in green biomass. *Plant Biotechnol J*, 2010, 8(3): 277–287.
- [10] Nookaraju A, Pandey SK, Fujino T, et al. Enhanced accumulation of fatty acids and triacylglycerols in transgenic tobacco stems for enhanced bioenergy production. *Plant Cell Rep*, 2014, 33(7): 1041–1052.
- [11] Kim HU, Jung SJ, Lee KR, et al. Ectopic overexpression of castor bean LEAFY COTYLEDON2 (LEC2) in *Arabidopsis* triggers the expression of genes that encode regulators of seed maturation and oil body proteins in vegetative tissues. *FEBS Open Bio*, 2013, 4: 25–32.
- [12] Chen Y, Li WB, Zhang LM, et al. Study on sensitivities of *Chlorella ellipsoidea* to 5 antibiotics in genetic engineering. *Oceanol et Limnol Sin*, 1999, 30(5): 500–505 (in Chinese).
陈颖, 李文彬, 张利明, 等. 小球藻对5种常用基因工程抗生素的敏感性研究. *海洋与湖沼*, 1999, 30(5): 500–505.
- [13] Wang YY, Wang CH. Study of selectable markers in genetic engineering of *Chlorella* sp. *J Dalian Univ Technol*, 2007, 47(4): 509–514 (in Chinese).
王逸云, 王长海. 小球藻基因工程选择标记研究. *大连理工大学学报*, 2007, 47(4): 509–514.
- [14] Zhou K, Lu QN, Yue M. Establishment of sterile culture system of *Chlorella pyrenoidosa*. *J Anhui Agric Sci*, 2015, 43(19): 14–17 (in Chinese).
周琨, 卢其能, 岳明. 蛋白核小球藻无菌培养体系的建立. *安徽农业科学*, 2015, 43(19): 14–17.
- [15] Talebi AF, Tohidfar M, Tabatabaei M, et al. Genetic manipulation, a feasible tool to enhance unique characteristic of *Chlorella vulgaris* as a feedstock for biodiesel production. *Mol Biol Rep*, 2013, 40(7): 4421–4428.
- [16] Liu J, Sun Z, Gerken H, et al. Genetic engineering of the green alga *Chlorella zofingiensis*: a modified norflurazon-resistant phytoene desaturase gene as a dominant selectable marker. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2014, 98(11): 5069–5079.
- [17] Shin WS, Lee B, Jeong BR, et al. Truncated light-harvesting chlorophyll antenna size in *Chlorella vulgaris* improves biomass productivity. *J Appl Phycol*, 2016, 28(6): 3193–3202.
- [18] Lin L, Feng C, Li QY, et al. Effects of electrolysis by low-amperage electric current on the chlorophyll fluorescence characteristics of *Microcystis aeruginosa*. *Environ Sci Pollut Res Int*,

- 2015, 22(19): 14932–14939.
- [19] Trentacostea EM, Shrestha RP, Smitha SR, et al. Metabolic engineering of lipid catabolism increases microalgal lipid accumulation without compromising growth. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, 110(49): 19748–19753.
- [20] Niu YF, Zhang MH, Li DW, et al. Improvement of neutral lipid and polyunsaturated fatty acid biosynthesis by overexpressing a type 2 diacylglycerol acyltransferase in marine diatom *Phaeodactylum tricorutum*. *Mar Drugs*, 2013, 11(11): 4558–4569.
- [21] Fan JH, Ning K, Zeng XW, et al. Genomic foundation of starch-to-lipid switch in oleaginous *Chlorella* spp.. *Plant Physiol*, 2015, 169(4): 2444.
- [22] Zhang JH, Hao Q, Bai LL, et al. Overexpression of the soybean transcription factor GmDof4 significantly enhances the lipid content of *Chlorella ellipsoidea*. *Biotechnol Biofuels*, 2014, 7(1): 128.
- [23] Shang CH, Bi GC, Yuan ZH, et al. Discovery of genes for production of biofuels through transcriptome sequencing of *Dunaliella parva*. *Algal Res*, 2016, 13: 318–326.
- [24] Li L, Zhang GQ, Wang QH. *De novo* transcriptomic analysis of *Chlorella sorokiniana* reveals differential genes expression in photosynthetic carbon fixation and lipid production. *BMC Microbiol*, 2016, 16: 223.
- [25] Baud S, Mendoza MS, To A, et al. WRINKLED1 specifies the regulatory action of LEAFY COTYLEDON2 towards fatty acid metabolism during seed maturation in *Arabidopsis*. *Plant J*, 2007, 50(5): 825–838.

(本文责编 郝丽芳)