

## 研究报告

### Research Report

# 一个莱茵衣藻 WD40 蛋白正向调控油脂的积累

于俊梅<sup>1</sup> 李兴涵<sup>2</sup> 费小雯<sup>3</sup> 邓晓东<sup>2\*</sup>

1 海南大学农学院, 海口, 571101; 2 中国热带农业科学院热带生物技术研究所, 农业部热带作物生物技术重点开放实验室, 海口, 571101; 3 海南医学院理学院, 海口, 571101

\* 通讯作者, dengxiaodong@tibb.org.cn

**摘要** WD40 蛋白(WD40-repeats)一般存在于真核生物中, 具有广泛的生理生化功能。本研究以莱茵衣藻一个 WD40 (Cre12.g552900)蛋白为研究对象, 通过遗传转化的方法实现对该基因的敲除和过量表达。转基因藻株检测结果显示 CrWD40 RNAi 转基因藻株油脂含量减少了 11%~24%, 而 CrWD40 过量表达转基因藻株油脂含量增加了 14.3%~75%, 正反两方面实验说明 CrWD40 对油脂积累起到正向调控的作用。

**关键词** WD40 蛋白, 油脂, RNAi, 莱茵衣藻

## A WD40-repeat Protein Positively Regulates the Accumulation of Lipids in *Chlamydomonas reinhardtii*

Yu Junmei<sup>1</sup> Li Xinghan<sup>2</sup> Fei Xiaowen<sup>3</sup> Deng Xiaodong<sup>2\*</sup>

1 College of Agriculture, Hainan University, Haikou, 571101; 2 Institute of Tropical Bioscience and Biotechnology, CATAS, Haikou, 571101; 3 School of Science, Hainan Medical College, Haikou, 571101

\* Corresponding author, dengxiaodong@tibb.org.cn

DOI: 10.13417/j.gab.035.000118

**Abstract** The WD40 repeats protein normally exists in eucaryotic cell, which is involved in many physiology and biochemistry course in the cell. In this work, a WD40-repeats protein (Cre12.g552900) of *Chlamydomonas reinhardtii* was studied by genetic transformations to knock down and over-express the gene. The detection of transgenic strains showed that the lipids of the CrWD40 RNAi transgenic strains decreased from 11% to 24%, while the lipids of the CrWD40 over-expression transgenic strains improved from 14.3% to 75%. The results indicated that CrWD40 might positively regulate the accumulation of lipids in *C. reinhardtii*.

**Keywords** WD40 repeats protein, Lipids, RNAi interference, *Chlamydomonas reinhardtii*

随着人类环保意识的上升, 石油燃料所造成的污染问题越来越受到人类的重视, 绿色能源成为当今研究的一个热点。其中, 利用微藻生产生物柴油具有较大的优势, 目前欧美多国已在此领域投入人力物力, 加大研发力度。

利用微藻来生产生物柴油包括藻株选育、保种和小规模繁殖、规模化养殖、微藻采集、以及藻油和生物柴油生产等多步工艺步骤。其中优良藻种的选育十分重要。本研究工作主要集中于藻种的分离纯化与小规模繁殖上。但微藻的油脂代谢以及代谢调控领域研究基础还很薄弱。莱茵衣藻(*Chlamydomonas*

*reinhardtii*)是单细胞, 带鞭毛且遗传背景较为完善的真核生物, 是研究油脂代谢基因的理想藻株。

WD40 结构域以甘氨酸-组氨酸开始, 色氨酸-天冬氨酸(Trp-Asp, WD)结尾, 该结构域含有约 40 个氨基酸。而含有此结构域的蛋白称作 WD40 蛋白。WD40 蛋白中含有 1~10 个串联的 WD40 结构域(Simon et al., 1991)。WD40 蛋白一般存在于真核生物中, 具有广泛的分子和细胞生物学功能。植物中 WD40 蛋白调控多个发育和生化途径(Neer et al., 1994)。WD40 蛋白为蛋白复合体的组装提供了平台, 介导其他蛋白质互相结合。这些复合体像 G 蛋白、TAFII

转录因子和 E3 泛素连接酶。已报道人类 WDR5 可以识别并结合到 H3 的 N 末端, WDR5 可以促进组蛋白 H3 赖氨酸 4 (H3K4) 甲基化 (Couture et al., 2006; Han et al., 2006)。拟南芥基因组共有 269 个 *WD40* 基因, 在酵母、果蝇和人类中都存在同源基因 (van Nocker and Ludwig, 2003)。莱茵衣藻中通过以拟南芥基因为源序列进行同源搜索, 发现共有 100 个 *WD40* 蛋白同源基因, 其中 Cre12.g552900 在莱茵衣藻缺氮培养时, mRNA 水平显著降低。由于衣藻在缺氮培养时油脂积累显著上升, 该基因的下调表达, 是否与油脂积累具有相关性, 带着这个疑问, 我们通过构建该基因 RNAi 干扰载体, 以及构建该基因以 CAMV 35S 为启动子的过量表达载体, 同时对该蛋白进行亚细胞定位, 以下是研究结果。

## 1 结果与分析

### 1.1 *CrWD40* 基因生物信息学分析

本研究涉及的莱茵衣藻 *WD40* 蛋白在 JGI 基因组数据库中的 local name 为 Cre12.g552900, NCBI GenBank 的登录号为 ABG33844。*CrWD40* 基因全长 1 044 bp, 编码 347 个氨基酸残基的蛋白质, 具有 7 个重复 *WD40* 结构域, 分子式为  $C_{834}H_{1292}N_{226}O_{256}S_8$ , 分子量为 37 211.5 pI 为 6.94, 稳定系数为 22.74, 属稳定蛋白质, 脂肪系数 90.49, 属亲水性蛋白质, 无跨膜结构区, 通过 Euk-mPLoc2.0 预测的亚细胞定位于细胞质。

MEGA6.0 对 *CrWD40* 聚类分析显示: *CrWD40* 与团藻 *WD40* 蛋白同源基因的同源率为 100%, 与拟南芥、酿酒酵母、和水稻 *WD40* 蛋白关系较近 (图 1)。

### 1.2 *CrWD40* RNAi 干扰载体的构建

通过 Triol 法从培养至对数生长期的莱茵衣藻

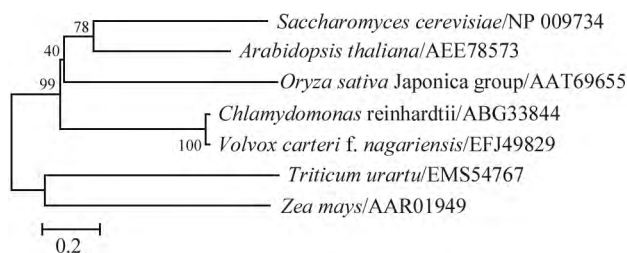


图 1 莱茵衣藻 *CrWD40* 与酵母, 拟南芥, 水稻, 团藻, 小麦, 玉米 *CrWD40* 同源基因聚类分析

Figure 1 Clustering analysis of *CrWD40* orthologous genes in *C. Reinhardtii*, *A. thaliana*, *O. sativa*, *V. nagariensis*, *T. urartu*, and *Z. mays*

CC425 中提取总 RNA, 将得到的 RNA 反转录成 cDNA, 以此 CDNA 为模板进行扩增, 得到 *CrWD40* 基因干涉片段序列 (图 2A)。*CrWD40* 正反向片段连接中间载体 T282 *EcoR* 酶切鉴定 (图 2B)。正反向片段连接干涉载体 pMaa7 IR/XIR, 用 *EcoR* 对得到充足重组载体进行酶切鉴定 (图 2C)。将构建完成的载体命名为 *CrWD40*-RNAi。

### 1.3 *CrWD40* RNAi 干扰载体转化莱茵衣藻 CC425 及转基因藻株检测

通过生物量曲线表明, 与空白载体的转基因藻株相比较, *CrWD40*-RNAi 转基因藻株细胞的生长较对照缓慢 (图 3A)。通过油脂曲线表明, 相对于空白载体的转基因藻株, *CrWD40* RNAi 转基因藻株体内油脂含量明显显著下降, 降幅范围为 11%~24% (第 4 天) (图 3B), 说明 *WD40* 基因对莱茵衣藻体内油脂积累起着正向调控的作用。共聚焦显微镜检测结果也明确显示 *CrWD40* 转基因藻株油脂含量下降 (图 3C)。为了检测上述 *CrWD40* 干涉载体对莱茵衣藻 CC425 体内目标基因的沉默效果, 本实验采用实时荧光定量 PCR 方法检测 *CrWD40* 转基因藻株中 *CrWD40* mRNA 的表达丰度 (Livak and Schmittgen, 2001) (图 3D)。结果显示, *CrWD40* RNAi 转基因藻株与对照 CC425 和 pMaa7 IR/XIR 转基因藻株比较, mRNA 丰度显著下降, 降幅为 85%~89%, 说明 *CrWD40* 被有效沉默。

### 1.4 *CrWD40* 在莱茵衣藻中过量表达

*CrWD40* 基因经 PCR 扩增后得到 1 044 bp 的全

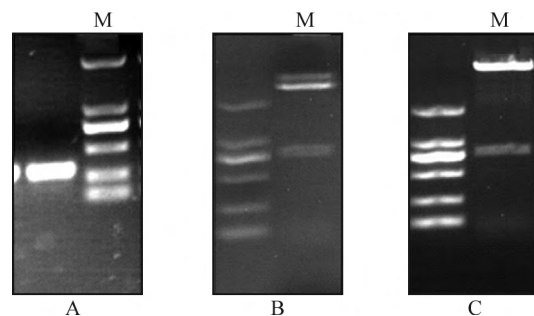


图 2 *CrWD40* RNAi 干涉载体构建

注: M: 2 000 Marker; A: *CrWD40* RNAi 干涉片段 PCR 扩增; B: *CrWD40* 反向重复序列克隆进中间载体酶切鉴定, 中间载体 T282-*CrWD40* 以 *EcoR* 酶切; C: *CrWD40* RNAi 干涉载体构建酶切鉴定, 干涉载体 pMaa7 IR/XIR 以 *EcoR* 酶切

Figure 2 The construction of *CrWD40* RNAi interference vector  
Note: M: 2 000 Marker; A: RNAi fragments amplified by PCR; B: RNAi-t282 intermediate vector *EcoR* digested; C: RNAi-Maa7/XIR interfering vector *EcoR* digested

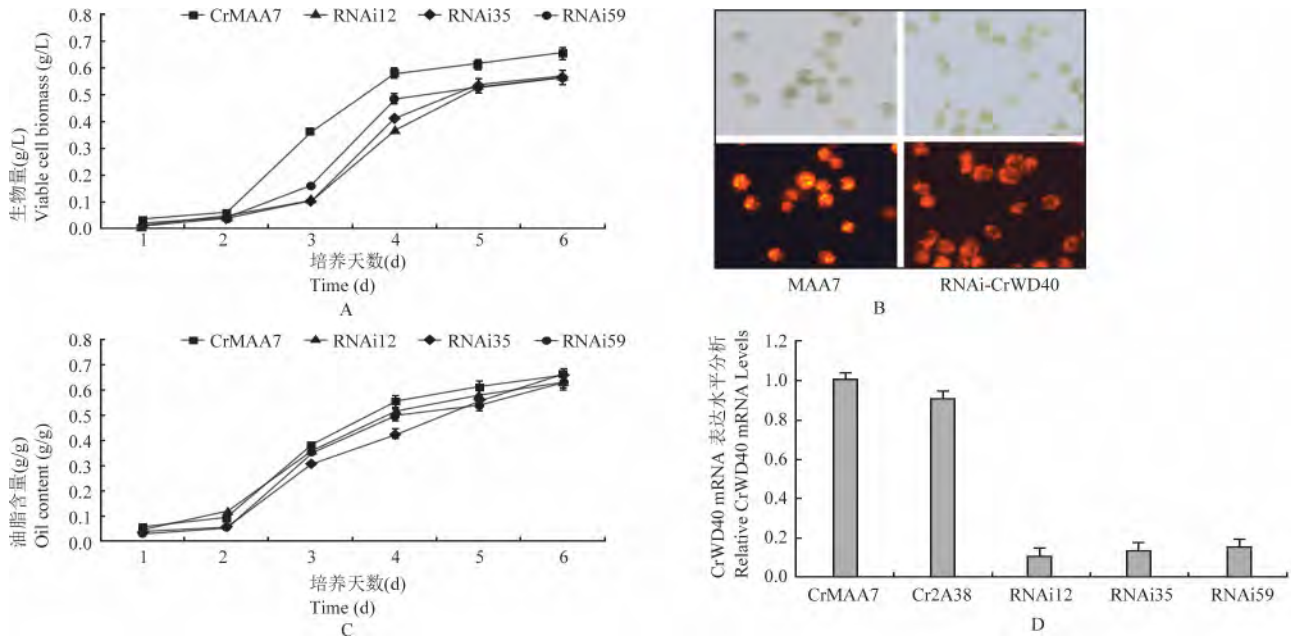


图3 *CrWD40* RNAi 转基因藻株检测

注: A: *CrWD40* RNAi 转基因藻株 12, 35, 59 生长较对照缓慢; B: *CrWD40* RNAi 转基因藻株 12, 35, 59 油脂含量较对照显著下降, 降幅为 11%~24%; C: 显微镜检显示 *CrWD40* RNAi 转基因藻株油脂含量下降(图中亮色部分为油滴); D: *CrWD40* RNAi 转基因藻株 mRNA 丰度显著下降; 实验数据利用 SPSS 软件做统计学分析, 显著( $p < 0.05$ )和极显著( $p < 0.01$ )以 \* 和 \*\* 表示

Figure 3 The detection of *CrWD40* RNAi transgenic algae

Note: A: 12, 35, 59 transformants of *CrWD40* growth speed had decreased; B: Oil content of transformants 12, 35, 59 had decreased 11%~24%; C: Took pictures through fluorescence microscope and it was obvious that the oil content had decreased; D: Results showed that interference effect of *CrWD40* was obvious; Using SPSS statistical software to perform statistical analysis; Results was indicated as \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , respectively

长片段。测序后与 JGI 莱茵衣藻数据库中的序列比对同源率为 100%。该片段经酶切后克隆进表达载体 pCAMBIA1302。采用玻璃珠法转化莱茵衣藻 CC425。转基因藻株经 PCR 鉴定后确认有目标基因插入。转基因藻株生物量检测结果显示, 与对照(pCAMBIA1302 转基因藻株)相比, *CrWD40* 过量表达转基因藻株生物量增加了 16.3%~25.6% (图 4A)。转基因藻株油脂含量检测结果显示, 与对照相比, *CrWD40* 过量表达转基因藻株第四天油脂含量增加了 14.3%~75% (图 4B)。此实验结果与通过 RNAi 测得的实验结果可以互补验证, *CrWD40* 基因促进莱茵衣藻油脂的积累。显微观察结果也证明了转基因藻株油脂含量增加(图 4C)。转基因藻株 *CrWD40* mRNA 的丰度检测结果显示, *CrWD40* RNAi 转基因藻株与对照比较, mRNA 丰度提高了 770%~850% (图 4D), 说明 *CrWD40* 基因过量表达。

## 2 讨论

WD40 蛋白家族的功能范畴非常广泛, 而且它具有一定的选择性, 在不同的生理生化过程中与不

同的蛋白质相互作用而发挥作用(Ullah et al., 2003; Baudry et al., 2004; Dixon et al., 2005; Ramsay and Glover, 2005)。目前尚未见到 WD40 家族蛋白调控油脂代谢的报道, 本研究通过对莱茵衣藻 WD40 家族中一个基因 Cre12.g552900 进行基因敲除和基因过量表达的遗传学实验, 结果显示 *CrWD40* 正向调控油脂积累。目前微藻油脂代谢调控是近期研究的热点。但报道的基因主要集中在油脂合成途径中的关键酶, 如二酰甘油酰基转移酶(DGAT) (Deng et al., 2012)、磷脂酸磷酸酶(PAP) (Deng et al., 2013)、磷脂二酯酰甘油酰基转移酶(PDAT)等。它们在微藻油脂合成中起着重要的作用, 但有关调节基因报道较少。目前, 在莱茵衣藻 JGI 数据库 WD40 家族蛋白有多达 100 个, 这些基因无疑参与了藻细胞的各种生理生化功能, 而同源基因是否都在油脂代谢中发挥功能, 目前的报道是 WD40 蛋白通过与 MYB 蛋白和 bHLH 蛋白形成复合体的方式起到调控作用, 所以我们下一步的工作是通过酵母双杂交技术找出与 *CrWD40* 相互作用、共同调节油脂代谢的 MYB 和 bHLH 蛋白。为调节微藻油脂改良、转基因良种培育

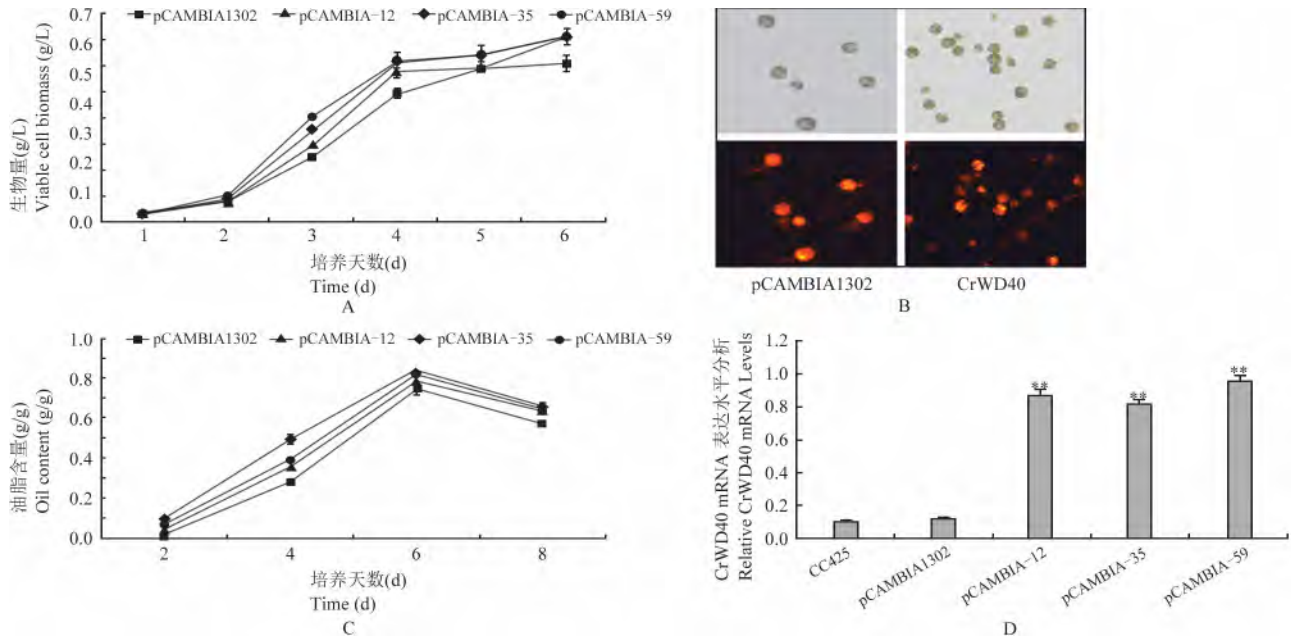


图4 *CrWD40* 基因过表达藻株积累

注: A: *CrWD40* 过量表达转基因藻株 27, 43, 86 生长较对照迅速; B: *CrWD40* 过量表达转基因藻株 27, 43, 86 油脂含量较对照显著升高, 升幅为 14.3%~75%; C: 显微镜检显示 *CrWD40* 过量表达转基因藻株油脂含量增加(图中亮色部分为油滴); D: *CrWD40* 过量表达转基因藻株 27, 43, 86 mRNA 丰度增加了 770%~850%; 实验数据利用 SPSS 软件做统计学分析, 显著( $p < 0.05$ )和极显著( $p < 0.01$ )以 \* 和 \*\* 表示

Figure 4 The detection of *CrWD40* overexpression transgenic algae

Note: A: The 27, 43, 86 overexpression transformants of *CrWD40* growth speed had increased; B: Oil content of overexpression transformants 27, 43, 86 had increased 14.3%~75%; C: Took pictures through fluorescence microscope and it was obvious that the oil content has increased; D: Results showed that overexpression of *CrWD40* was obvious; Using SPSS statistical software to perform statistical analysis; Results was indicated as \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , respectively

实践中打下基础。

### 3 材料与方法

#### 3.1 藻株菌株及培养条件

莱茵衣藻 CC425 购自美国杜克大学, 将 CC425 藻株接到 HSM 液体培养基中(培养条件为 200 r/min, 温度 24°C, 光照强度为  $110 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ )培养至对数生长期。T282 载体由本实验室自己合成, 干涉载体 pMaa7/XIR 购于 Duke 大学。

#### 3.2 *WD40* 基因生物信息学分析

莱茵衣藻 *WD40* 基因多序列比对和聚类分析利用 ClustalX 2.1 和 MEGA6 软件完成。MAPK 蛋白分子量及等电点的预测通过 EXPASY pI/Mw 完成 ([http://web.expasy.org/compute\\_pi/](http://web.expasy.org/compute_pi/)); 蛋白结构分析通过 SMART 完成, 并利用 Euk-mPLoc2.0 (<http://www.csbio.sjtu.edu.cn/bioinf/euk-multi-2/>) 进行莱茵衣藻 *WD40* 基因亚细胞定位分析。

#### 3.3 莱茵衣藻 CC425 总 RNA 的提取及反转录

莱茵衣藻 CC425 按照 Trizol 的方法提取总 RNA。取 OD<sub>260/280</sub> 在 1.8~2.0 之间的样品进行 RNA 纯化(沙伟等, 2015)。按照 TaKaRa 公司 cDNA 合成说明书将 RNA 反转录为 cDNA (Li et al., 2012)。

#### 3.4 莱茵衣藻 *WD40* 基因片段的克隆

根据 JGI 上公布的 *CrWD40* Cre12.g552900 编码区序列, 设计特异性引物如下, 5'-GGGACTGACTC GCAAGAAAG-3', 5'-AGCGTTGACCTCCGTCCTA T-3' 进行 PCR 扩增, 获得目标片段。

#### 3.5 *CrWD40* RNAi 干扰载体的构建

以 *Hind* 和 *Bam*H 双酶切得到 *CrWD40* 正向片段与以 *Xba* 和 *Sal* 双酶切得到 *CrWD40* 反向片段通过载体 T282 进行连接, 然后将正向片段通过 *Eco*R 酶切回收并将回收片段与表达载体 pMaa7IR/XIR 进行连接, 得到莱茵衣藻 *WD40* 干涉载体 *CrWD40* RNAi。

### 3.6 *CrWD40* 全长基因克隆及过量表达载体构建

提取莱茵衣藻总 RNA, 反转录成 cDNA, 以此为模板, ATTTTTCAGCCATGTCA/CTCACAGGCCAA TGACCT 为引物, 扩增 *CrWD40* 基因全长。回收扩增的目标条带, 克隆进 pMD18-T 载体, 酶切鉴定的阳性克隆, 送上海生工生物公司测序。设计两端带有酶切位点的引物, CATGCCATGGTGTCTCAGCG GAAG TGGCGA (*Nco*) /GGACTAGTTCACAGGCCAATG ACCTTC (*Spe*) 扩增 *CrWD40* 全长基因, 回收 PCR 产物, 以 *Nco* 和 *Spe* 双酶切 PCR 产物, 克隆进 pCAMBIA1302 载体中。

### 3.7 莱茵衣藻转化

采用玻璃珠法(Kindle, 1990), 将 pCAMBIA1302 载体转入莱茵衣藻 CC425 体内, 然后涂布于 TAP 固体培养基(5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  paromomycin; 过量表达潮霉素 B (10  $\mu\text{g}/\text{L}$ ) 上培养至莱茵衣藻生长。挑取单克隆, 对其进行细胞生物量、细胞体内油脂含量和 *WD40* 基因表达丰度检测。

### 3.8 莱茵衣藻体内油脂含量的测定

实验中油脂含量的测定采用的是酸水解法(马帅等, 2010; 国家标准 GB\_T 5009.6-2003)。

### 作者贡献

李兴涵和于俊梅是本研究的实验设计和实验研究的执行人; 于俊梅和李兴涵完成数据分析, 论文初稿的写作; 费小雯参与实验设计, 实验结果分析; 邓晓东是项目的构思者及负责人, 指导实验设计, 数据分析, 论文写作与修改。全体作者都阅读并同意最终的文本。

### 致谢

本研究由海南省重大科技专项(ZDZX2013023-1-27)、海南省自然科学基金(313077, 314117)、海南省工程技术研究中心专项(GCZX2012004, GCZX2013004)和中央级公益性科研院所基本科研业务费(ITBB2015ZD07, ITBB2015ZD03)共同资助。

### 参考文献

Baudry A., Heim M.A., Dubreucq B., Caboche M., Weishaar B., and Lepiniec L., 2004, TT2, TT8, and TTGI synergistically specify the expression of BANYULS and proanthocyanidin bio synthesis in *Arabidopsis thaliana*,

The Plant Journal, 39(3): 366-380

- Couture J.F., Collazo E., and Trievel R.C., 2006, Molecular recognition of histone H3 by the WD40 protein WDR5, Nature Structural & Molecular Biology, 13(8): 698-703
- Deng X.D., Cai J.J., and Fei X.W., 2013, Involvement of phosphatidate phosphatase in the biosynthesis of triacylglycerols in *Chlamydomonas reinhardtii*, Journal of Zhejiang University. Science B 14(12): 1121-1131
- Deng X.D., Gu B., Li Y.J., Hu X.W., Guo J.C., and Fei X.W., 2012, The roles of acyl-CoA: diacylglycerol acyltransferase 2 genes in the biosynthesis of triacylglycerols by the green algae *Chlamydomonas reinhardtii*, Molecular Plant, 5(4): 945-947
- Dixon R.A., Xie D.Y., and Sharma S.B., 2005, Proanthocyanidins-a final frontier in flavonoid research? New Phytologist, 165(1): 9-28
- Han Z., Guo L., Wang H., Shen Y., Deng X.W., and Chai J., 2006, Structural basis for the specific recognition of methylated histone H3 lysine 4 by the WD-40 protein WDR5, Molecular Cell, 22(1): 137-144
- Kindle K.L., 1990, High-frequency nuclear transformation of *Chlamydomonas reinhardtii*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87(3): 1228-1232
- Li Y.J., Fei X.W., and Deng X.D., 2012, Novel molecular insights into nitrogen starvation-induced triacylglycerols accumulation revealed by differential gene expression analysis in green algae *Micractinium pusillum*, Biomass and Bioenergy, 42: 199-211
- Livak K.J., and Schmittgen T.D., 2001, Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-Delta Delta C(T)</sup> Method, Methods, 25(4): 402-408
- Ma S., Fu L.L., Wang M., Hu X.W., Tan D.G., and Zhang J.M., 2010, Comparison of extraction methods of crude fat from microalgae, Zhongguo Youzhi (Chinese Lipids), 35(5): 77-79 (马帅, 付莉莉, 汪萌, 胡小文, 谭德冠, 张家明, 2010, 从微藻中提取粗脂的方法比较, 中国油脂, 35(5): 77-79)
- Neer E.J., Schmidt C.J., Nambudripad R., and Smith T.F., 1994, The ancient regulatory-protein family of WD-repeat proteins, Nature, 371(6495): 297-300
- Ramsay N.A., and Glover B.J., 2005, MYB-bHLH-WD40 protein complex and the evolution of cellular diversity, Trends in Plant Science, 10(2): 63-70
- Sha W., Suo L., Zhang M.J., Zhang C.L., and Zhou B., 2015, Cloning and expression analysis of MYB transcription factor gene *RcMYB* from *Racomitrium canescens*, Jiyinzhexue Yu Yingyong Shengwuxue (Genomics and Applied Biology), 34(4): 792-796 (沙伟, 索荔, 张梅娟, 张春蕾, 周伯, 2015, 砂藓 MYB 转录因子基因 *RcMYB* 的克隆

及表达分析, 基因组学与应用生物学, 34(4): 792-796)

Simon M.I., Strathmann M.P., and Gautam N., 1991, Diversity of G proteins in signal transduction, *Science*, 252 (5007): 802-808

Ullah H., Chen J.G., Temple B., Boyes D.C., Alonso J.M., Davis K.R., Ecker J.R., and Jones A.M., 2003, The be-

ta-subunit of the *Arabidopsis* G protein negatively regulates auxin-induced cell division and affects multiple developmental processes, *The Plant Cell*, 15(2): 393-409

Van Nocker S., and Ludwig P., 2003, The WD-repeat protein superfamily in *Arabidopsis*: conservation and divergence in structure and function, *BMC Genomics*, 4(1): 50

\*\*\*\*\*

## Bioscience Methods (BM)



Bioscience Methods (ISSN 1925-1920) is an open access, peer reviewed journal published online by BioPublisher. The journal publishes all the latest and outstanding research articles, letters and reviews in all areas of bioscience, the range of topics including (but are not limited to) technology review, technique know-how, lab tool, statistical software and known technology modification. Case studies on technologies for gene discovery and function validation as well as genetic transformation. The standard article processing charges (APC) collected by BioPublisher is 1 200 CAD per article. Authors from low-income countries and areas or having financial difficulties can apply the discount for APC upon submission, and if the authors are qualified to be waived they don't necessarily pay the APCs. We do not want

fees to prevent the publication of worthy work.

Email: [edit@bm.biopublisher.ca](mailto:edit@bm.biopublisher.ca)

Web: <http://bm.biopublisher.ca>