

文章编号:0254-0096(2020)02-0013-07

氮胁迫下绿球藻 GIEC-38 光合固碳富集油脂机理研究

冯佳¹, 朱顺妮¹, 许瑾¹, 王忠铭¹, 袁振宏^{1,2}

(1. 中国科学院广州能源研究所中科院可再生能源重点实验室广东省新能源和可再生能源研究开发与应用重点实验室, 广州 510640;
2. 生物质能源河南省协同创新中心, 郑州 450002)

摘要: 利用 Illumina 高通量测序对绿球藻 (*Chlorococcum* sp.) GIEC-38 的转录组进行测定, 分析在氮 (N) 胁迫 (无氮源 BG-11) 下产油高的藻株与原始培养条件相比光合固碳富集油脂相关的代谢通路和基因表达情况, 发现在 N 胁迫下藻内有 14817 个基因表达上调、15282 个基因表达下调。光合作用、叶绿素代谢和氮代谢等代谢通路均有明显变化, 代谢途径可能受到一定的抑制进而增加油脂合成途径。对藻株 TAG 代谢重建后发现乙酰辅酶 A 羧化酶等许多与脂类合成相关的基因表达量显著上调, 分布在 TAG 合成中 12 个步骤中, 这些均可促进脂质的合成, 提高细胞的油脂产量。

关键词: 光合作用; 油脂; 基因表达; 微藻; 上调

中图分类号: TK6

文献标志码: A

0 引言

化石能源日渐枯竭及污染问题使得寻找可再生清洁能源迫在眉睫^[1]。微藻光合作用吸收 CO₂ 富集油脂制取高品位生物柴油^[2], 而且可实现 CO₂ 的零排放^[3]、不和食物作物竞争, 成为可再生清洁能源研究的热点^[4]。国内外针对微藻制油的研究表明, 选取天然条件油脂含量较高的藻株加以生长调控是提高细胞油脂含量的有效方法^[5]。本实验室之前的研究中发现绿球藻 GIEC-38 天然条件下油脂含量可达 30%, 而在 N 胁迫下高达 50% 以上并且生长良好^[6]。近年来随着高通量测序 Illumina Truseq™ RNA sample prep Kit (RNA-Seq) 方法的日趋成熟, 对物种转录组进行检测成为微观研究的新手段^[7]。Miller 等^[8]分析了莱茵衣藻缺 N 生长时细胞代谢通路的变化。Boyle 等^[9]也用 RNA-Seq 分析出三酰基转移酶有助于衣藻中 TAG 的累积, 但关于绿球藻的研究却鲜有报道。

在 N 胁迫下并非所有的藻类都会更多富集油脂, 不同藻种存在不同的油脂代谢机理^[10], 因此有必要深入剖析高产油优势藻株-GIEC-38 在 N 胁迫时光合固碳大

量油脂富集的基因表达和代谢通路的变化。本文选用绿球藻 GIEC-38, 利用 RNA-Seq 对在 BG-11 和 N 胁迫下藻株的转录组进行测序, 分析参与脂肪酸合成、延长, 以及 TAG 合成的基因, 考察光合作用、叶绿素代谢和氮代谢等代谢通路的变化, 重建 TAG 的合成途径, 发现与油脂合成相关的基因表达明显增加。

1 实验材料与方法

1.1 藻株及培养基

本实验所用绿球藻 GIEC-38 (*Chlorococcum* sp.) 由中国科学院广州能源研究所生物质能生化转化实验室分离纯化所得。

采用 BG-11 培养基进行培养, 其组成为: NaNO₃ 1500 mg、K₂HPO₄·3H₂O 40 mg、MgSO₄·7H₂O 75 mg、柠檬酸 3 mg、柠檬酸铁铵 3 mg、CaCl₂·2H₂O 36 mg、NaCO₃ 200 mg、MgNa₂EDTA·H₂O 1 mg、微量元素 1 mL 和去离子水 999 mL。

微量元素溶液的主要成分为: 100 mL 蒸馏水中含 H₃BO₃ 286 mg、MnCl₂·4H₂O 181 mg、ZnSO₄·7H₂O 22 mg、

收稿日期: 2017-07-26

基金项目: 国家重点研发计划(2016YFB0601004); 广东省自然科学基金(2016A030312007); 广东省自然科学基金(2015A030310032); 广东省自然科学基金(2016A030313171)

通信作者: 袁振宏(1953—), 男, 博士、研究员, 主要从事生物质能技术的研究开发与管理方面的工作。yuanzh@ms.giec.ac.cn

$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 8 mg, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 39 mg 和 $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 5 mg。

N 胁迫培养时 BG-11 培养基中不添加 NaNO_3 (BG-11_N0), 其余均一致。

1.2 cDNA 文库构建和 Illumina 测序

在微藻生长对数期, 离心收集在 BG-11 和 BG-11_N0 中培养的藻细胞, 用 TRIzol (Invitrogen) 法提取总 RNA^[11]。取浓度 $\geq 200 \text{ ng}/\mu\text{L}$, $\text{OD}_{260/280}$ 介于 1.8~2.2 之间的总 RNA 5 μg , 采用磁珠法分离 mRNA, 片段化, 在逆转录酶的作用下反转合成双链 cDNA 并加入 End Repair Mix 补平, 在 3' 端加碱基 A、连接 index 接头 (TruseqTM RNA sample prep Kit)。通过 PCR 反应扩增 (15 个循环数), 2% 琼脂糖胶回收目的条带 (Certified Low Range Ultra Agarose)。用 TBS380 (Picogreen) 进行定量后在 cBot 上进行桥式扩增, 生成 clusters, 利用 Illumina Hiseq 4000 平台进行 $2 \times 151 \text{ bp}$ 测序。

1.3 序列拼接和注释

由于原始测序数据中会包含测序接头序列、低质量读段、含氮 (N) 比率较高序列及长度过短序列, 严重影响后续组装质量。为保证后续生物信息分析的准确性, 首先对原始测序数据进行过滤, 去除接头序列及低质量序列, 得到高质量的测序数据 (clean data), 然后采用 Trinity de novo assembler (版本号 trinityrnaseq_r20140413) 软件进行序列拼接。使用 BLAST 程序将拼接所得的 unigene 与 GenBank 非冗余蛋白数据库 nr 进行比对 ($E < 1 \times 10^{-5}$), 并选取最佳注释。使用 Blast2Go 软件获得 GO (Gene Ontology) 信息, 按分子功能、细胞组分、生物学过程对序列进行分类。根据 KEGG 注释的基因功能信息, 对基因参与的代谢通路进行分析。

1.4 基因表达差异的分析

以 unigene 集合做为参考数据库, 使用表达统计软件 RSEM 对样品比对获得的 read count 数目进行 FPKM 转换, 进而得到基因的表达水平。通过 edgeR 对 RSEM 统计出的片段数量进行均一化, 并计算基因表达差异。采用的判断标准是表达量变化大于 2 倍, 错误发现率 (FDR) 小于 1%。采用 goatoolsGO 功能对基因和蛋白功能进行限定和描述, 使用 KOBAS 软件对代谢通路显著性富集进行分析, 使用 Fisher 精确检

验进行计算。为控制计算的假阳性率, 采用 BH 进行多重检验 (Bonferroni, Holm, Sidak 和 false discovery rate), 当经过校正的 p 值 ($p_{\text{fdr}} \leq 0.05$) 时, 认为此功能存在显著富集情况。

2 结果与讨论

2.1 转录组测序、拼接和注释

将对数生长期的在 BG-11 和 BG-11_N0 中培养的绿球藻 GIEC-38 测序产生的原始数据经过除杂、去冗余和质控后, 分别获得 79593640 和 69176164 条 100bp 长的序列。通过 BLASTx 算法在非冗余蛋白库中进行搜索比对、Blast2GO 软件得到的 GO 信息分类、COG 蛋白直系同源簇数据库对转录本进行功能分类以及 KEGG 富集注释对比后发现, 2 种培养条件下藻细胞差异表达的转录本数量为 74605, 共 65984 个基因得到注释。其中相比于 BG-11 培养下, N 胁迫使得藻细胞内有 14817 个基因表达上调、15282 个基因表达下调, 分布在细胞的生物过程 (Biological process)、细胞组分 (Cellular component) 和分子功能 (Molecular function) 3 个模块共 41 个功能注释, 这些表达差异的基因可能会促进细胞朝着油脂代谢的途径进行, 使得在 N 胁迫下培养细胞油脂含量增加到 50% 以上。

2.2 与油脂合成相关的基因

在微藻细胞中, 脂类的合成通路与模式生物莱茵衣藻 *Chlamydomonas reinhardtii* 以及高等植物都相似^[12]。对 GIEC-38 藻细胞中脂肪酸合成途径中相关转录基因进行鉴定, 通过 KEGG 富集注释列表 (表 1), 获得 134 个表达显著的转录本。脂肪酸的合成被认为是通过调节酰基链的供需平衡来控制脂质合成的关键物质^[13], 是从乙酰辅酶 A 羧化酶 (EC 6.4.1.2) 发生羧化作用形成丙二酰辅酶 A 反应开始的, 丙二酰基转移到酰基载体蛋白 (ACP) 中, 成为脂肪酸合成酶 (FASN) 的一个亚基。这种多酶复合物凝聚成丙二酰-ACP 催化了脂肪酸的延长。最后 ACP-硫脂酶 (Fat, EC 3.1.2.14) 切断了 16 碳链和 18 碳链的脂肪酸酰基链, 释放出脂肪酸^[14]。所有这些酶均在藻株 GIEC-38 中存在, 并且均超过一个转录本。在真核生物中能量的储存主要以 TAG 的形式存在, 特定的培养条件下微藻会富集大量油脂, 其中 TAG 是最主要的存在形式^[15], 所以 TAG 的合成代谢与总脂产量密切相关。

表 1 绿球藻 GIEC-38 转录本中识别的参与脂类生物合成的编码酶基因

Table 1 Identified genes encoding enzymes involved in lipid biosynthesis in *Chlorococcum* sp. GIEC-38 transcriptome

名称	描述	转录本数量	KO 编号	EC 编号	
accA	乙酰辅酶 A 羧化酶羧基转移酶亚基 α	1	K01962	6.4.1.2	
accD	乙酰辅酶 A 羧化酶羧基转移酶亚基 β	1	K01963	6.4.1.2	
accB, bccP	乙酰-CoA 羧化酶生物素羧基载体蛋白	1	K02160		
accC	乙酰辅酶 A 羧化酶/生物素羧化酶	2	K01961	6.4.1.2、6.3.4.14	
ACACA	乙酰辅酶 a 羧化酶/生物素羧化酶 I	1	K11262	6.4.1.2、6.3.4.14	
fabD	[酰基载体蛋白] S-丙二酰转移酶	3	K00645	2.3.1.39	
脂肪酸 生物 合成	fabF	3-氧代酰基-[酰基载体蛋白]合酶 II	5	K09458	2.3.1.179
fabH	3-氧代酰基-[酰基载体蛋白]合酶 III	6	K00648	2.3.1.180	
fabG	3-氧代酰基-[酰基载体蛋白]还原酶	5	K00059	1.1.1.100	
fabI	烯酰基-[酰基载体蛋白]还原酶 I	2	K00208	1.3.1.9、1.3.1.10	
fabZ	3-羟酰基-[酰基-载体-蛋白]脱水酶	1	K02372	4.2.1.59	
FASN	脂肪酸合成酶	4	K00665	2.3.1.85	
FATB	脂酰-酰基载体蛋白硫酯酶 B	1	K10781	3.1.2.14、3.1.2.21	
FAB2, SSI2, desA1	酰基-[酰基载体蛋白]脱氢酶	8	K03921	1.14.19.2、1.14.19.11、1.14.19.26	
ACSL, fadD	长链酰基-CoA 合成酶	20	K01897	6.2.1.3	
DES A	酰基-[酰基载体蛋白]去饱和酶	8	K03921	1.14.19.2	
脂肪 酸链 去饱和	SCD, desC	$\Delta 9$ 脂肪酸去饱和酶	6	K00507	1.14.19.1
FAD6	$\Delta 12$ 脂肪酸去饱和酶	7	K10255	1.14.19.-	
FAD2	$\Delta 12$ 脂肪酸去饱和酶	1	K10256	1.14.19.-	
ACOX1, ACOX3	酰基辅酶 A 氧化酶	8	K00232	1.3.3.6	
tesA	酰基辅酶 A 硫酯酶 I	1	K10804	3.1.2.-、3.1.1.5	
KCS	3-酮脂酰-CoA 合成酶	28	K15397	2.3.1.-	
脂肪 酸链 延长	TER, TSC13, CER10	极长链酰辅酶 A 还原酶	1	K10258	1.3.1.93
PHS1, PAS2	3-羟基酰基-CoA 脱水酶	3	K10703	4.2.1.134	
MECR, NRBF1	反式-2-烯酰-CoA 还原酶	9	K07512	1.3.1.38	
PPT	棕榈酰蛋白硫酯酶	1	K01074	3.1.2.22	
KCS	3-酮脂酰-CoA 合成酶	28	K15397	2.3.1.-	

对藻 GIEC-38 细胞中 TAG 合成途径中相关转录基因进行鉴定,通过 KEGG 富集注释获得 11 个表达显著的转录本如表 2 所示。TAG 合成的最后一步是由酰基辅酶 A 构成甘油骨架,游离的脂肪酸链接到辅酶 A 上,然后依次通过辅酶 A 转移到甘油的位置 1、2 上,生成的 1,2-二酰基-sn-甘油-3-磷酸(磷脂酸),后在一特殊的磷酸酶(PP, EC 3.1.3.4)作用下进行去磷酸

化反应生成甘油二酯(DAG),最后第 3 种脂肪酸在二酰基甘油 O-酰基转移酶(DGAT, EC 2.3.1.20)的作用下取代 DAG 上的第 3 个位置形成 TAG。在 GIEC-38 中发现 DGAT 的 3 个转录本。另外还发现了 1 个利用磷脂合成 TAG 的同源基因磷脂:二酰基甘油酰基转移酶(PDAT, EC 2.3.1.158)的转录本。

表 2 绿球藻 GIEC-38 转录本中参与 TAG 合成的基因

Table 2 Identified genes encoding enzymes involved in TAG biosynthesis in *Chlorococcum* sp. GIEC-38 transcriptome

名称	描述	转录本数量	KO 编号	EC 编号
glpK, GK	甘油激酶	3	K00864	2.7.1.30
GPAT3_4, AGPAT6	甘油-3-磷酸 O-酰基转移酶 3/4	1	K13506	2.3.1.15
GPAT	甘油-3-磷酸酰基转移酶	1	K13508	2.3.1.15、2.3.1.198
PP	磷脂酸磷酸酶	2	K15728	3.1.3.4
DGAT	二酰基甘油 O-酰基转移酶	1	K00635	2.3.1.20
DGAT 1	二酰基甘油 O-酰基转移酶 1	2	K11155	2.3.1.20、2.3.1.75、2.3.1.76
PDAT	磷脂:二酰基甘油酰基转移酶	1	K00679	2.3.1.158

2.3 N 胁迫下 GIEC-38 脂类合成基因的差异表达

对 N 胁迫下 GIEC-38 藻细胞中表达差异显著的基

因 (BG-11_N0) 进行 GO 和 KEGG 富集注释, 发现在 TAG 合成的代谢途径中相关基因的表达发生明显变化 (如表 3 所示)。

表 3 N 胁迫下绿球藻 GIEC-38 与脂类合成相关基因的表达量变化

Table 3 Changes in genes related to lipid biosynthesis in *Chlorococcum* sp. GIEC-38 under nitrogen deficiency stress

转录本	KEGG 基因名称	注释	基因均一化结果_BG_11	基因均一化结果_BG-11_N0	差异倍数 $\log_2 FC$
c17074_g1	accB, bccP	乙酰辅酶 A 羧化酶生物素羧基载体蛋白	104.298	304.445	1.5455
c47579_g1	accC	生物素羧化酶	79.521	155.811	0.9704
c32135_g1	accD	乙酰辅酶 A 羧化酶羧基转移酶亚基 β	57.243	121.131	1.0814
c26249_g1	B3GNT5	半乳糖基转移酶	0.563	3.020	2.4233
c55490_g1	PDAT	磷脂:二酰基甘油酰基转移酶	40.909	121.273	1.5678
c12696_g6	fabF	β -酮脂酰-ACP 合酶 II	11.370	49.897	2.1337
c54753_g1	fabG	β -酮脂酰-ACP 还原酶	31.565	109.512	1.7947
c18049_g1	fabH	3-氧代酰基-[酰基载体蛋白]合酶 III	13.565	22.146	0.7072
c5598_g2	fabI	烯脂酰-ACP 还原酶 I	114.925	206.286	0.8440
c49320_g1	fabZ	3-羟酰基-[酰基-载体-蛋白]脱水酶	44.759	23.496	-0.9298
c17056_g1	FAD6, desA	$\Delta 12$ 脂肪酸去饱和酶	207.020	91.826	-1.1728
c9820_g2	FASN	脂肪酸合成酶	1.565	3.749	1.2603
c26142_g1	KCS	β -酮脂酰-ACP 合酶	0.315	1.341	2.0899
c12246_g3	KCS	β -酮脂酰-ACP 合酶	9.118	18.930	1.0539
c12383_g1	KCS	β -酮脂酰-ACP 合酶	14.240	27.405	0.9445
c55040_g1	KCS	β -酮脂酰-ACP 合酶	47.674	80.055	0.7478
c15452_g2	KCS	β -酮脂酰-ACP 合酶	41.854	24.296	-0.7847
c14580_g2	plsC	1-脂酰甘油-3-磷酸-酰基转移酶 1	2.195	19.205	3.1292
c12049_g1	plsC	1-脂酰甘油-3-磷酸-酰基转移酶 1	16.413	30.985	0.9167

乙酰辅酶 A 羧化酶作为限速酶在 N 胁迫下表达量上升约 3 倍。催化还原反应的 β -酮脂酰-ACP 还原酶

(fabG) 和烯脂酰-ACP 还原酶 I (fabI), 表达量分别是原来的 3.5 倍和 1.8 倍, 同时催化第一步缩合反应的 β -酮

脂酰-ACP 合酶 I (fabF), 表达量上调 4.4 倍。在脂肪酸链延伸的反应中, 起催化作用的酶 β -酮脂酰-ACP 合酶 (KCS) 在 N 胁迫下表达量上调 2 倍以上。合成 TAG 需甘油-3-磷酸-O-酰基转移酶、1-酰基甘油-3-磷酸-O-酰基转移酶 (plsc) 等蛋白酶的参与, 从表 2 的表达量均一化结果可知, N 胁迫下 GIEC-38 中 plsc 表达量是在 BG-11 培养条件下的 8 倍以上, 而 PDAT 的表达量也增加 3 倍, 这些基因表达的变化都推动反应朝油脂合成的方向进行, 使得在 N 胁迫下藻细胞油脂含量大幅增加。

2.4 TAG 生物合成途径的重建

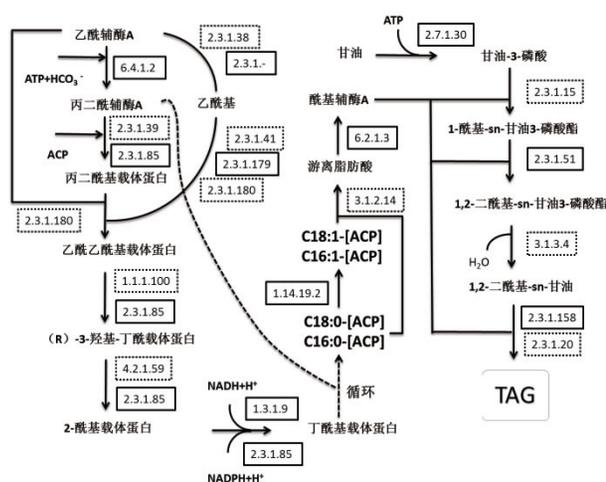
通过对绿球藻 GIEC-38 中转录本、表达谱和基因的测定与注释可重建出藻株 GIEC-38 细胞中 TAG 合成的代谢途径图 1 所示。图 1 中实线方框表示出在 N 胁迫下 GIEC-38 中表达量上调的基因, 这些基因参与了 TAG 合成过程中的 12 个步骤, 而这 12 个步骤表达的增加直接促进脂类的合成, 使细胞的油脂含量增加, 这更直观地揭示了在 N 胁迫下藻细胞油脂富集的微观机理。同时, 在国内外关于基因改造油料作物工程的报道中^[16], 针对脂质合成过程中一些关键酶的改造进行过量表达进而促进油脂富集的研究已小有进展, 但在微藻能源领域中还需更深入的研究^[17]。所以本文对于绿球藻高产油富集能力的微观研究可望为今后改造获得更优势的产油藻株提供微观的机理揭示和理论依据。

表 4 N 胁迫下绿球藻 GIEC-38 细胞中差异明显代谢通路

Table 4 Metabolic pathways up-regulated in *Chlorococcum* sp. GIEC-38 under nitrogen deficiency stress

代谢通路	基因名称 (Id)	样品/背景数	表达显著性差异检验值 (P -Value)
光合作用-天线蛋白	ko00196	19/45	1.81×10^{-13}
核糖体生物合成	ko03008	24/127	2.62×10^{-10}
精氨酸和脯氨酸代谢	ko00330	16/114	8.34×10^{-6}
RNA 聚合酶	ko03020	8/36	0.0001
氮代谢	ko00910	7/43	0.001403
氨基酸的生物合成	ko01230	19/256	0.002722
卟啉和叶绿素代谢	ko00860	9/83	0.003981
光合作用	ko00195	10/110	0.007694

值得注意的是, 光合作用 (包括 ko00196 和 ko00195) 是藻细胞吸收太阳能, 将 CO_2 和水转化为有机物, 为细胞的生命提供碳水化合物同时释放出 O_2 的化学过程。而叶绿素是光合作用中最重要的色素。在 N 胁迫下, 参与 N 代谢途径的基因表达量大部分有所下



图中方框为关键酶的 EC 编号, 实线方框代表在 N 胁迫下绿球藻 GIEC-38 中上调的基因; 虚线方框代表下调的基因

图 1 N 胁迫下绿球藻 GIEC-38 上下调基因 GO 注释分布图

Fig.1 Reconstructed TAG biosynthesis pathway in *Chlorococcum* sp. GIEC-38 based on de novo assembly and annotation

2.5 N 胁迫下 GIEC-38 细胞代谢通路差异分析

对 N 胁迫下 GIEC-38 藻细胞中表达差异显著的基因进行 GO 和 KEGG 代谢通路富集分析, 发现在细胞生长过程中光合作用等代谢通路发生明显变化 (表 4)。这些变化与碳水化合物形成、蛋白质合成以及细胞生长密切相关。

调, 而光合作用和叶绿素代谢中的酶却是有些表达增加有些表达减少, 表明在 N 胁迫下合成碳水化合物和蛋白质的代谢途径可能受到一定抑制, 而碳水化合物和蛋白质代谢途径的抑制增加了细胞中油脂合成途径的增加, 进而促进细胞中脂质的富集。

3 结 论

通过 Illumina 测序平台的 RNA-Seq 方法对在标准 BG-11 培养基培养下的以及在 N 胁迫 BG-11 培养基中获得的油脂含量超过 50% 的藻株的转录组和表达谱进行测序比对发现,参与脂肪酸合成、延长,以及 TAG 合成的一些基因在 N 胁迫下表达量有明显增加,对 TAG 代谢途径进行重建发现表达量上调的基因分布在 TAG 合成过程中的 12 个步骤中,因此促进了细胞油脂的积累,是 N 胁迫下绿球藻 GIEC-38 产油率高的原因,这些数据将丰富微藻制取生物柴油领域的最新知识,可为进一步研究奠定基础。

[参考文献]

- [1] AMARO H M, MACEDO Â C, MALCATA F X. Microalgae: an alternative as sustainable source of biofuels?[J]. Energy, 2012, 44(1): 158-166.
- [2] 杨艳丽. 基于开放池培养的微藻生物柴油经济成本分析[J]. 太阳能学报, 2015, 36(2): 295-304.
YANG Y L. Economic cost analysis of biodiesel from microalgae cultivated open pond[J]. Acta energiae solaris sinica, 2015, 36(2): 295-304.
- [3] 张庭婷, 谢晓敏, 黄震. 中国微藻生物柴油生产潜力分布特征分析[J]. 太阳能学报, 2016, 37(5): 1315-1320.
ZHANG T T, XIE X M, HUANG Z. Characteristics analysis of microalgal biodiesel production potential distribution in China[J]. Acta energiae solaris sinica, 2016, 37(5): 1315-1320.
- [4] 冯佳. 核诱变和盐度驯化硅藻生长富集油脂的机理研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2014.
FENG J. Enrichment of lipids in diatoms mutated by nuclear irradiation and domesticated by high salinity with growth regulation [D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2014.
- [5] HU Q, SOMMERFELD M, JARVIS E, et al. Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances[J]. The plant journal, 2008, 54(4): 621-639.
- [6] 柴鹏, 丰平仲, 王学伟, 等. *Chlorococcum* sp. 混养过程碳氮调控对累积类胡萝卜素和脂肪酸成分影响研究[J]. 中国生物工程杂志, 2015, 35(7): 30-36.
CHAI P, FENG P Z, WANG X W, et al. Effect of carbon and nitrogen combination on the carotenoid and fatty acids accumulation of *Chlorococcum* sp. Under mixotrophic cultivation[J]. China biotechnology, 2015, 35(7): 30-36.
- [7] WANG Z, GERSTEIN M, SNYDER M. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics[J]. Nature reviews genetics, 2009, 10(1): 57-63.
- [8] MILLER R, WU G, DESHPANDE R R, et al. Changes in transcript abundance in *Chlamydomonas reinhardtii* following nitrogen deprivation predict diversion of metabolism[J]. Plant physiology, 2010, 154(4): 1737-1752.
- [9] BOYLE N R, PAGE M D, LIU B, et al. Three acyltransferases and nitrogen-responsive regulator are implicated in nitrogen starvation-induced triacylglycerol accumulation in *Chlamydomonas* [J]. Journal of biological chemistry, 2012, 287(19): 15811-15825.
- [10] SHIFRIN N S, CHISHOLM S W. Phytoplankton lipids: interspecific differences and effects of nitrate, silicate and light-dark cycles[J]. Journal of phycology, 1981, 17(4): 374-384.
- [11] CHENG R L, FENG J, ZHANG B X, et al. Transcriptome and gene expression analysis of an oleaginous diatom under different salinity conditions[J]. Bioenergy research, 2014, 7(1): 192-205.
- [12] RIEKHOF W R, SEARS B B, BENNING C, et al. Annotation of genes involved in glycerolipid biosynthesis in *Chlamydomonas reinhardtii*: discovery of the betaine lipid synthase BTA1Cr[J]. Eukaryotic cell, 2005, 4(2): 242-252.
- [13] OHLROGGE J B, JAWORSKI J G. Regulation of fatty acid synthesis[J]. Annual review of plant physiology and plant molecular biology, 1997, 48(1): 109-136.
- [14] 范金凤, 张姗姗, 于红, 等. CO₂ 对产油微藻 *Scenedesmus dimorphus* 生长和产油特性的影响[J]. 太阳能学报, 2013, 34(6): 1103-1108.
FAN J F, ZHANG S S, YU H, et al. Effects of CO₂ on growth and oil-producing characteristics of microalgae *Scenedesmus dimorphus* [J]. Acta energiae solaris sinica, 2013, 34(6): 1103-1108.
- [15] GUSCHINA I A, HARWOOD J L. Lipids and lipid metabolism in eukaryotic algae[J]. Progress in lipid research, 2006, 45(2): 160-186.
- [16] COURCHESNE N E M M, PARISIEN A, WANG B, et al. Enhancement of lipid production using biochemical, genetic and transcription factor engineering approaches [J]. Journal of biotechnology, 2009, 141(1): 31-41.
- [17] RADAKOVITS R, JINKERSON R E, DARZINS A, et al. Genetic engineering of algae for enhanced

biofuel production [J]. Eukaryotic cell, 2010, 9 (4): 486-501.

GENE EXPRESSION RELATED TO PHOTOSYNTHETIC CARBON-SEQUESTRATION AND LIPID ENRICHMENT OF *Chlorococcum* sp. GIEC-38 UNDER NITROGEN DEFICIENCY STRESS

Feng Jia¹, Zhu Shunni¹, Xu Jin¹, Wang Zhongming¹, Yuan Zhenhong^{1,2}

(1. Guangzhou Institute of Energy Conversion, Chinese Academy of Sciences, Key Laboratory of Renewable Energy, Chinese Academy of Sciences, Guangdong Key Laboratory of New and Renewable Energy Research and Development, Guangzhou 510640, China; 2. Collaborative Innovation Centre of Biomass Energy, Zhengzhou 450002, China)

Abstract: The transcriptome and gene expression of *Chlorococcum* sp. GIEC-38 were sequenced by an Illumina sequencing platform-based RNA-Seq approach. The metabolic pathway and gene expression related to photosynthetic carbon-sequestration and lipid enrichment of an original algal strain cultured in BG-11 and BG-11 without nitrogen were analyzed. It was found that 14817 reads of genetic expression were up-regulated and 15282 reads of genetic expression were down-regulated in algae cells under nitrogen deficiency stress. The gene expression levels of metabolic pathways such as photosynthesis, chlorophyll metabolism, and nitrogen metabolism had obvious changes. Gene expression including Acetyl-CoA carboxylase and other important genes involved in 12 steps in lipid synthesis pathway were significantly up-regulated in *Chlorococcum* sp. GIEC-38 under nitrogen deficiency stress after reconstructing TAG biosynthesis pathway. All these changes promoted the synthesis of lipids and increased the lipid productivity of GIEC-38 cells.

Keywords: photosynthesis; lipids; gene expression; microalgae; up-regulated