【生物工程 / Bioengineering】

3 个基因共调控下莱茵衣藻的转录组分析

黄 瑛, 李小连, 殷剑波, 林永祺, 彭小波, 贾 彬

深圳大学生命与海洋科学学院, 深圳市海洋生物资源与生态环境科学重点实验室,
广东省海洋藻类生物工程技术研究中心, 广东深圳 518060

摘 要: 为研究多基因调控下微藻油脂合成调控的分子机制, 对 *acs2-cis1-dof* 基因共调控的莱茵衣藻藻株 DLC 进行转录组测序及分析, 获得 749 个差异表达基因. 通过京都基因与基因组百科全书 (Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG) 聚类分析发现, 有 51 个差异表达基因参与碳水化合物代谢, 15 个差异表达基因参与脂质代谢, 差异基因主要富集在甘油酯代谢、脂肪酸降解、糖酵解及糖异生、淀粉和蔗糖代谢等通路中. 采用 BODIPY 505/515 荧光染色法检测发现, 热激后莱茵衣藻藻株 DLC 细胞内的甘油三酯质量较野生型提高了 193%, 通过检测吸光度发现藻细胞的淀粉质量降低了 45%, 说明基因共调控不仅增强了脂质合成代谢, 还使得糖代谢中的碳流重新定向. 研究作为探究基因共调控下脂质合成代谢的分子机理以及微藻产油基因工程提供理论参考.

关键词: 基因工程; 生物信息学; 转录组; *acs2* 基因; *cis1* 基因; DOF 转录因子; 脂质生物合成; 莱茵衣藻
中图分类号: Q946 **文献标志码:** A **doi:** 10.3724/SP.J.1249.2021.02194

Transcriptome analysis of *Chlamydomonas reinhardtii* under the co-regulation of three genes

HUANG Ying, LI Xiaolian, YIN Jianbo, LIN Yongqi,
PENG Xiaobo, and JIA Bin

College of Life Sciences and Oceanography, Shenzhen Key Laboratory of Marine Bioresources and Ecology, Guangdong Technology
Research Center for Marine Algal Bioengineering, Shenzhen University, Shenzhen 518060, Guangdong Province, P. R. China

Abstract: In order to study the regulatory roles of multiple genes in microalgal lipid metabolism, a *Chlamydomonas reinhardtii* strain DLC is constructed with overexpression of DOF transcription regulator and silencing of *acs2* and *cis1*. Transcriptome sequencing and analysis are conducted and 749 differentially expressed genes (DEGs) are identified. According to the result of KEGG (Kyoto encyclopedia of genes and genomes) classification, 51 and 15 DEGs are involved in carbohydrate metabolism and lipid metabolism respectively. These DEGs mainly play key roles in glyceride metabolism, fatty acid degradation, glycolysis/gluconeogenesis and starch and sucrose metabolism. In addition, triacylglycerol (TAG) and starch content are analyzed by BODIPY505/515 fluorescence analysis and absorbance detection, which shows that intracellular TAG increases by 193% as compared with wild-type, while starch content decreases by 45%. These results further indicate that the co-regulation of the three genes not only enhances

Received: 2020-09-23; **Accepted:** 2020-12-08

Foundation: National Natural Science Foundation of China (31870343); Basic Research and Applied Basic Research Foundation of Guangdong Province (2020A1515010352); Shenzhen Basic Research Foundation (JCYJ20170818095134434, JCYJ20180305125327627)

Corresponding author: Associate professor HUANG Ying. E-mail: huangy@szu.edu.cn

Citation: HUANG Ying, LI Xiaolian, YIN Jianbo, et al. Transcriptome analysis of *Chlamydomonas reinhardtii* under the co-regulation of three genes [J]. Journal of Shenzhen University Science and Engineering, 2021, 38(2): 194-200. (in Chinese)

the lipid anabolism, but also reorients the carbon flux in the saccharide metabolism. The research reveals the molecular mechanism of lipid overproduction under co-regulation of three genes and provides a theoretical reference for the genetic engineering of microalgae lipid production.

Key words: genetic engineering; bioinformatics; transcriptome; *acs2* gene; *cis1* gene; DOF transcription regulator; lipid biosynthesis; *Chlamydomonas reinhardtii*

三酰甘油 (triacylglycerol, TAG) 是自然界中脂肪的主要成分, 其基本组成单位为脂肪酸 (fatty acid, FA), 是生物柴油、食用油等油制品的组成成分. TAG 的生物合成通路包括脂肪酸的合成途径及肯尼迪途径 (Kennedy pathway)^[1]. 同时, TAG 和 FA 的分解代谢产物也为脂肪的合成提供乙酰辅酶 A. 此外, 脂肪代谢还与糖类和蛋白质的代谢通过乙酰辅酶 A、丙酮酸等中间代谢产物建立了紧密的联系, 形成复杂的碳氮代谢网络. 目前, 单基因调控下提高工程藻株脂肪积累的研究已取得一定的进展, 长链酰基辅酶 A 合成酶 (long-chain acyl-CoA synthetase, LACS) 参与 FA 的合成、活化与 β -氧化, 沉默 *cracs2* 基因后莱茵衣藻细胞内的 TAG 质量较野生型提高了 55%^[2]. 在三羧酸循环中, 草酰乙酸和乙酰辅酶 A 在柠檬酸合酶 (citrate synthase, CIS) 的作用下形成柠檬酸, 是关键的节点反应. 有研究表明, *cis* 的沉默使得莱茵衣藻的 TAG 增加了 169.5%^[3]. DOF (deoxyribonucleic acid binding with one finger) 转录因子介导植物的种子萌发和碳氮代谢等代谢过程, 在莱茵衣藻中过表达 DOF 转录因子后, 胞内总脂肪酸的含量为 126.01 $\mu\text{g}/\text{mg}$, 提高了 23.24%^[4]. 但关于构建多基因工程藻株以提高脂肪含量的报道较少, 且对于碳氮代谢网络中的脂肪合成调控机制有待深入研究.

莱茵衣藻 (*Chlamydomonas reinhardtii*, *C. reinhardtii*) 为光合微藻中的模式生物, 具有光合效率高、繁殖速度快、易于培养等优势, 适合于构建高产脂质的工程藻株. 转录组测序技术是揭示基因调控网络的有效手段^[5-6], 莱茵衣藻的脂质代谢网络错综复杂, 且缺乏与调控机制相关的转录组信息, 这有碍于相关基因的功能挖掘. 本研究对 3 基因共调控下的莱茵衣藻藻株 DLC (沉默 *acs2* 和 *cis1* 基因, 且过表达 DOF 转录因子) 进行了转录组测序以及差异表达基因 (differentially expressed genes, DEGs) 分析, 进一步揭示多基因调控网络下莱茵衣藻脂质合成调控的分子机制, 为提高微藻脂质产量的基因调控工程提供理论基础.

1 实 验

1.1 材料与培养条件

莱茵衣藻 *C. reinhardtii* CC849 购自美国衣藻资源中心. *C. reinhardtii* DLC 藻株^[7] 来自深圳大学生命与海洋科学学院实验室, 转入了含 *acs2-cis1* 反向重复片段的 pmaa7/XIR 沉默载体, 以及含 *dof* 表达片段 (受 *RBCS2-HSP70A* 热激启动子调控) 的 pJD 表达载体. 大肠杆菌 (*Escherichia coli*, *E. coli*) Trans1-T1 Phage Resistant 化学感受态细胞购自北京全式金生物技术有限公司.

利用三羟甲基氨基甲烷醋酸盐-磷酸培养基, 将藻株于 25 $^{\circ}\text{C}$ 、100 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 光照强度条件下培养. 待培养至对数期, 于水浴锅中 40 $^{\circ}\text{C}$ 热激 30 min, 室温下恢复 1 h 后提取总核糖核酸 (ribonucleic acid, RNA) 以进行转录组测序. 样品组包括无热激处理工程藻株 (DLC)、野生型藻株 (WT)、热激处理工程藻株 (HDLC) 及热激处理野生型藻株 (HWT), 各组分别设置 3 个生物学重复. 待继续培养至第 6 天进行 TAG 及淀粉的检测.

1.2 TAG 含量的检测

BODIPY 505/515 为油脂荧光染料, 其与藻细胞内的脂滴结合后在激光照射下发绿色荧光, 故荧光强度的高低直接反映胞内 TAG 的含量, 检测过程为: ① 取 1.5 mL 的藻液, 于 5 000 r/min 离心 5 min 回收藻细胞; ② 用磷酸缓冲盐溶液 (phosphate buffer saline, PBS) (0.01 mol/L) 冲洗 2~3 遍后, 4 000 r/min 离心 2 min; ③ 通过血球计数板计数, 用 PBS 将体系稀释至 $2 \times 10^6 \sim 6 \times 10^6/\text{mL}$; ④ 取 980 μL 的稀释藻液至流式细胞仪 (BD Bioscience) 的细胞管中, 再取 20 μL 含 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ BODIPY 505/515 染液 (Thermo Fisher Scientific) 的二甲基亚砜 (dimethyl sulfoxide, DMSO) 溶液加入; ⑤ 以不加染液的藻液为阴性对照, 在异硫氰荧光素 (fluorescein isothiocyanate, FITC) 通道中, 激发光 480 nm、发射光 510 nm 下对 1×10^5 个细胞进行荧光值读数.

1.3 淀粉含量的测定

① 取 5 mL 藻液离心 (12 000 r/min, 10 min),

弃上清; ② 取 700 μL 经淀粉提取试剂盒 (Solarbio) 提取后的提取液, 加入 100 μL 蒸馏水稀释 8 倍; ③ 标准曲线的制作: 采用酶标仪分别检测 0.2、0.1、0.05、0.025、0.012 5、0.006 25、0.003 125 及 0.001 56 mg/mL 的葡萄糖标准溶液在 620 nm 处的吸光度; 以标准溶液的质量浓度为横坐标, 以吸光度值为纵坐标, 绘制标准曲线, 据此得到线性函数方程; ④ 在样品测量前先检测标准品以校正: 混合 0.2 mL 标准品溶液与 1 mL 淀粉提取剂, 95 $^{\circ}\text{C}$ 下水浴加热 10 min, 待冷却后以同体积蒸馏水的吸光度为空白对照值, 分别测定标准品的吸光度, 并与据标准曲线函数计算出的葡萄糖浓度进行比较校准; ⑤ 测定各组样品提取液在 620 nm 处的吸光度, 将依照标准曲线函数计算所得的淀粉质量浓度 ρ 值 (单位: mg/mL) 代入式 (1), 即可计算出各样品 (鲜质量) 中的淀粉质量分数 w (单位: mg/g)。

$$w = \rho V n / m \quad (1)$$

其中, V 为稀释后淀粉提取液的体积 (单位: mL); m 为样品藻细胞的鲜质量 (单位: g); n 为稀释倍数。

1.4 总 RNA 的提取与转录组数据的获取

利用 RNAiso Plus (Takara) 试剂盒提取各组样品的总 RNA, 经超微量分光光度计 (Nanodrop 2000, Thermo Fisher Scientific) 测定 RNA 浓度和纯度, 以及质量浓度为 10 g/L 的非变性琼脂糖凝胶电泳检验 RNA 的质量后, 构建互补核糖核酸 (complementary deoxyribonucleic acid, cDNA) 文库, 并委托华大基因测序, 每个样品组分别进行 3 次重复测序。

1.5 转录组数据的生物信息学分析

1.5.1 原始数据处理及参考基因组比对

文库测序完成后得到原始数据 (raw reads), 通过 SOAP nuke 软件 (v 1.4.0) 进行统计, 并使用软件 Trimmomatic (v 0.36) 进行数据过滤, 排除带有测序接头、未知碱基数量大于 5% 和质量低的数据 (reads), 得到过滤后数据 (clean reads); 利用 HISAT2 软件^[8] (v 2.1.0) 与参考基因组进行比对, 使用 Bowtie2 软件^[9] (v 2.2.5) 与参考基因比对, 采用 RNA-seq by expectation maximization (RSEM) 软件包^[10] (v 1.2.8) 计算基因表达丰度, 并以 FPKM (fragments per kilobase of transcript per million mapped reads) 表示。

1.5.2 差异表达基因的筛选与富集分析

使用华大基因 Dr. Tom 系统进行差异表达基因分析, 设定差异表达倍数 (fold change) ≥ 2 、 Q 值 (校正后的 P 值) ≤ 0.001 , 得到初步的 DEGs; 再进

一步筛选 HWT 藻株中 FPKM 值大于等于 1.5 的 DEGs, 并据京都基因与基因组百科全书 (Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG) 的注释结果及官方分类对 DEGs 进行通路聚类及富集分析。

2 结果与分析

2.1 TAG 及淀粉含量的变化

经 BODIFY 505/515 染色法检测, 发现 DLC 藻株的荧光强度较 WT 藻株升高了 70% (图 1), 且 HDLC 藻株的荧光强度较 HWT 藻株提高了 118%, 说明 3 基因的共调控能促进莱茵衣藻细胞内的 TAG 合成。HDLC 藻株的荧光强度较 DLC 藻株提高了 77%, 且 HDLC 藻株的荧光强度较 WT 藻株提高了 193%, 说明热激诱导进一步增强 *dof* 基因的过表达后, 3 基因的共调控使得莱茵衣藻细胞内的脂质合成进一步显著增强。

** 为 $P < 0.01$, t 检验 ($n = 3$)

图 1 莱茵衣藻内 TAG 含量的变化
Fig. 1 TAG content of *C. reinhardtii*

DLC 与 WT 藻细胞中的淀粉质量分数分别为 122.99 mg/g 和 134.29 mg/g , 二者无显著性差异, 但 HDLC 藻株中的淀粉质量分数比 HWT 藻株的少了 30% (图 2), 而 HDLC 藻株中的脂质质量较高,

* 为 $P < 0.01$, t 检验 ($n = 3$)

图 2 莱茵衣藻内淀粉含量的变化
Fig. 2 Starch content of *C. reinhardtii*

说明 3 基因共调控藻株中的碳流发生了重新定向, 使得糖类合成通路中的代谢物流向脂质合成通路中被利用。

2.2 差异表达基因的统计

将 WT、HWT 和 HDLC 三组藻细胞的转录组信息进行比对. WT 与 HWT、HWT 与 HDLC 两组之间统计得 1 665 个共同的 DEGs, 其中, FPKM 值 ≥ 1.5 的 DEGs 有 749 个, 543 个为上调基因, 206 个为下调基因。

2.3 差异表达基因的 KEGG 聚类与富集分析

差异表达基因的 KEGG pathway 分类结果如图

图3 差异基因的 KEGG 聚类分析

Fig.3 KEGG pathway classification of differentially expressed genes

图4 差异基因在碳水化合物代谢通路中的富集分析

Fig.4 Enrichment analysis of differentially expressed genes in carbohydrate metabolism

由图 5 可见,在脂质代谢过程中,富集在甘油三酯代谢的 DEGs 编码醇脱氢酶等;富集在甘油磷脂代谢的 DEGs 编码溶血磷脂酶 II 和乙醇胺-磷酸胞苷转移酶等;富集在脂肪酸降解的 DEGs 编码乙酰

辅酶 A-乙酰基转移酶和酰基辅酶 A 氧化酶 I 等;还有 DEGs 富集在脂肪酸碳链延伸过程. 通路中富集的关键 DEGs 的分布及其注释信息如表 1, 其中, N 为差异倍数.

图 5 差异基因在脂质代谢通路中的集分析

Fig. 5 Enrichment analysis of differentially expressed genes in lipid metabolism

表 1 脂质及碳水化合物代谢途径中关键差异表达基因的注释

Table 1 Annotations of key DEGs in lipid and carbohydrate metabolism pathways

KEGG 基因	$\ln N$		Q 值(HWT vs	基因 ID	KEGG 通路	描 述
注释名称	HWT vs WT	HDLC vs HWT	HDLC)			
AKR1A1	-2.962	1.234	5.65×10^{-7}	Cre10. g432900. t1. 2	甘油三酯代谢	ADH 醇脱氢酶(NADP^+)
LYPLA2	-2.381	1.429	5.10×10^{-8}	Cre03. g164350. t1. 1	甘油磷脂代谢	溶血磷脂酶 II
PCYT2	-1.184	1.073	1.23×10^{-13}	Cre12. g539000. t1. 2	甘油磷脂代谢	乙醇胺-磷酸胞苷转移酶
atoB	-1.673	1.078	8.88×10^{-9}	Cre02. g146050. t1. 2	脂肪酸降解	乙酰辅酶 A-乙酰基转移酶
ACOX1	-1.221	1.230	2.96×10^{-58}	Cre16. g695100. t1. 1	脂肪酸降解	酰基辅酶 A 氧化酶
ACSS1	-1.651	1.933	1.10×10^{-292}	Cre07. g353450. t1. 2	糖酵解及糖异生	乙酰辅酶 A 合成酶
PK	-2.883	1.402	2.72×10^{-22}	Cre02. g147900. t4. 1	糖酵解及糖异生	丙酮酸激酶
GPI	-1.480	1.317	8.14×10^{-29}	Cre03. g175400. t1. 2	糖酵解及糖异生	葡萄糖-6 磷酸异构酶
E3. 2. 1. 4	-3.093	2.391	3.11×10^{-260}	Cre17. g705300. t1. 2	淀粉和蔗糖代谢	内切葡聚糖酶
E2. 4. 1. 34	5.027	-2.031	1.42×10^{-181}	Cre04. g214650. t1. 1	淀粉和蔗糖代谢	1,3- β -葡聚糖合酶
E3. 1. 1. 11	3.378	-1.433	2.64×10^{-36}	Cre08. g358548. t1. 1	淀粉和蔗糖代谢	果胶酯酶

上述脂质代谢调控网络中关键基因表达水平的变化,进一步表明 3 基因调控下莱茵衣藻细胞内脂质含量的增加,不仅是由于脂质合成代谢的增强,还可能是因为甘油酯和脂肪酸降解等以脂质为起始反应物的途径被弱化. 此外,还可能是由于糖类等其他非脂物质的生物合成途径减弱,使得更多的共同代谢中间物流向脂质合成途径而被充分利用.

3 讨 论

脂质合成代谢中的甘油三酯代谢、甘油磷脂代谢、脂肪酸代谢等途径与糖代谢中的糖酵解、糖异生和淀粉代谢等途径相关联,因此,若其他代谢通路含有生成三磷酸甘油、甘油、乙酰辅酶 A 和脂肪

酸等共同中间代谢产物,则能在一定的调控条件下改变碳流的偏向,促进脂质合成代谢. ACS2 和 CIS1 分别参与脂质合成及糖代谢中的关键反应,而 DOF 转录因子介导碳氮代谢中多通路的调控,则 3 基因的共同调控定能引起其他关键基因表达水平的变化.

在甘油三酯代谢中,醇脱氢酶(alcohol dehydrogenase, ADH)能将甘油氧化为 D-甘油醛,再被甘油脱氢酶催化为甘油. 有研究表明,编码 ADH 及乙酰乙酸脱羧酶等参与乙酰辅酶 A 代谢的基因的共同过表达导致大肠杆菌内的脂肪酸异丙基酯达 203.4 mg/L^[11]. 与 WT 藻细胞相比,ADH 在 HWT 藻细胞中的表达水平下降;而相比于 HWT 藻细胞,ADH 在 HDLC 中表达水平上调,说明 3 基因调控下 ADH 的上调可能导致甘油的增加而增强脂质合成代谢.

在甘油磷脂代谢中,三磷酸甘油是重要的中间产物. 相较 HDLC 藻细胞中溶血磷脂酶 II (lysophospholipase II, LYPLA2) 及乙醇胺-磷酸胞苷转移酶 2 (phosphate cytidylyltransferase 2, PCYT2) 的表达量增加,LYPLA2 以 2-酰基甘油-3-磷酸胆碱为底物,催化生成甘油-3-磷酸胆碱,随后被转化为三磷酸甘油;而 PCYT2 将磷酸乙醇胺转化为 CDP-乙醇胺,产物经接连反应后被转化为三磷酸甘油. WEPY 等^[12]发现 LYPLA1 和 LYPLA2 共同调控神经细胞脂质代谢的平衡,任何一方的活性缺失均会导致溶血磷脂的增加;PAVLOVIC 等^[13]则发现 *pcy2* 的沉默导致小鼠胚胎细胞内磷脂酰乙醇胺合成的提高,使得膜脂增加. 因此,热激后 3 基因的调控下 LP2、PCYT2 的表达上调可能抑制膜脂的合成,使得脂质的生物合成进程偏向三酰甘油的合成.

在脂肪酸降解途径中,乙酰辅酶 A 是由脂肪酸 β -氧化和糖酵解终产物丙酮酸经氧化脱羧产生的,在有机体中的许多代谢过程中发挥着关键的作用. β -氧化的连续周期反应过程中,每一步反应中长链脂肪酸脱去含两个碳原子的碎片而被氧化为逐缩短碳链的脂酰辅酶 A,从而产生乙酰辅酶 A^[14]. 相比 HWT 藻细胞,HDLC 藻细胞中酰基辅酶 A 氧化酶 1 (acyl-CoA oxidase, ACOX1) 和乙酰辅酶 A 乙酰基转移酶 (acyl-CoA acyltransferase, ACAT) 的表达量上调. ACOX1 参与多种酰基辅酶 A 的氧化反应,促进脂肪酸的氧化分解^[15];而 ACAT 催化短链脂肪酸的氧化反应,生成乙酰辅酶 A^[16]. 故而两个基因的上调表达可能一定程度上促进脂肪酸的氧化分解,

加快乙酰辅酶 A 循环流的流动,进而提高脂肪酸合成的中间产物循环效率.

丙酮酸既是糖酵解途径的终产物,也为糖异生途径的起始反应物. 作为乙酰辅酶 A 的合成前体,丙酮酸与脂质合成代谢有着紧密的联系. 在糖酵解及糖异生代谢中,相较于 HWT 藻细胞,HDLC 藻细胞中的葡萄糖-6-磷酸异构酶(glucose-6-phosphatase isomerases, G6PI)、丙酮酸激酶(pyruvate kinase, PK)及乙酰辅酶 A 合成酶(acyl-CoA synthetase, ACS)表达水平更高. G6PI 催化 α -D-6-磷酸葡萄糖和 β -D-6-磷酸葡萄糖间的相互转变,及两者向 β -D-6-磷酸果糖的转变. β -D-6-磷酸果糖继而在相关酶作用下的产物为磷酸烯醇丙酮酸,接而经 PK 产生丙酮酸. 另一方面,乙醇被氧化为乙醛、醋酸后,经 ACS 合成乙酰辅酶 A. 有报道表明,敲除编码 G6PI 的基因后,鼠细胞中甘油酯含量减少,且油脂代谢中的磷脂酸磷酸酶 I 基因也随之出现表达下调^[17];在莱茵衣藻中过表达 ACS2 后,导致叶绿体中碳流向乙酰辅酶 A 合成的方向富集,从而使得三酰甘油含量提高了 2.4 倍^[18]. G6PI、PK 及 ACS 的表达上调可能通过增加丙酮酸、乙酰辅酶 A 的含量以增强脂质合成代谢.

在淀粉代谢中, α -D-葡萄糖-1-磷酸为重要的代谢中间物质,磷酸葡萄糖变位酶能将其转化为葡萄糖-6-磷酸,即丙酮酸的前体. 相比 HWT 藻株,HDLC 藻株中内切葡聚糖酶(endo-1, 4- β -D-glucanohydrolase, EGA)、葡聚糖合酶(glucan synthase, BGS)和果胶酯酶(pectinesterase, PA)均出现表达下调. PA 促进 ADP-葡萄糖(由 α -D-葡萄糖-1-磷酸转化而来)生成直链淀粉;BGS 利用 α -D-葡萄糖-1-磷酸合成 1, 3- β -D 葡聚糖,继而被转化为 D-葡萄糖;EGA 则利用以 α -D-葡萄糖-1-磷酸为底物合成的纤维素,合成纤维糊精,而后经系列反应产物转变为 D-葡萄糖. 淀粉代谢途径中 3 个关键 DEGs 的下调可能抑制消耗 α -D-葡萄糖-1-磷酸的反应过程,间接等导致丙酮酸含量的增加,从而使得碳流定向于脂质合成代谢.

结 语

沉默 *acs2* 和 *cis1* 基因且过表达 DOF 转录因子的 3 基因共调控重定向碳氮代谢中的碳流流向,增强了脂质合成代谢,为莱茵衣藻脂质合成代谢机制研究提供了理论参考,为研究微藻细胞代谢定向调控

提供方法. 针对以上差异基因富集的代谢通路, 后续将对构建的高油脂藻株进行深入的油脂代谢转运和分泌机制的研究.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (31870343); 广东省基础与应用基础研究基金资助项目 (2020A151010352); 深圳市基础研究计划资助项目 (JCYJ20170818095134434; JCYJ20180305125327627)

作者简介: 黄 瑛 (1976—), 深圳大学副教授、博士. 研究方向: 微藻生物质利用. E-mail: huangy@szu.edu.cn

引 文: 黄 瑛, 李小连, 殷剑波, 等. 3 个基因共调控下莱茵衣藻的转录组分析[J]. 深圳大学学报理工版, 2021, 38(2): 194-200.

参考文献 / References:

- [1] GIBELLINI F, SMITH T K. The Kennedy pathway: de novo synthesis of phosphatidylethanolamine and phosphatidylcholine [J]. IUBMB Life, 2010, 62(6): 414-428.
- [2] JIA Bin, SONG Yanzi, WU Min, et al. Characterization of long-chain acyl-CoA synthetases which stimulate secretion of fatty acids in green algae *Chlamydomonas reinhardtii* [J]. Biotechnology for Biofuels, 2016, 9(1): 184-195.
- [3] DENG Xiaodong, CAI Jiajia, FEI Xiaowen. Effect of the expression and knockdown of citrate synthase gene on carbon flux during triacylglycerol biosynthesis by green algae *Chlamydomonas reinhardtii* [J]. BMC Biochemistry, 2013(14): 38-49.
- [4] JIA Bin, XIE Xinfeng, WU Min, et al. Understanding the functions of endogenous DOF transcript factor in *Chlamydomonas reinhardtii* [J]. Biotechnology for Biofuels, 2019(12): 67-80.
- [5] 胡 浪, 刘烨蓉, 许伟钊, 等. 集胞藻缺氮驯化株的代谢组学分析[J]. 深圳大学学报理工版, 2019, 36(5): 564-569.
HU Lang, LIU Yerong, XU Weizhao, et al. Metabonomics analysis of nitrogen deficiency-generated strains of *Synechocystis* sp. [J]. Journal of Shenzhen University Science and Engineering, 2019, 36(5): 564-569. (in Chinese)
- [6] 娄素琳, 朱秀兰, 曾志勇, 等. 盐藻 microRNAs 高通量测序和生物信息学分析[J]. 深圳大学学报理工版, 2018, 35(4): 331-333.
LOU Sulin, ZHU Xiulan, ZENG Zhiyong, et al. Bioinformatics analysis of *Dunaliella* microRNAs by high-throughput sequencing [J]. Journal of Shenzhen University Science and Engineering, 2018, 35(4): 331-333. (in Chinese)
- [7] 黄 瑛, 殷剑波, 李小连, 等. 莱茵衣藻三基因共调控油脂积累研究[J]. 中南民族大学学报自然科学版, 2020, 39(5): 465-470.
HUANG Ying, YAN Jianbo, LI Xiaolian, et al. Study on the regulation of oil accumulation by three genes of *Chlamydomonas reinhardtii* [J]. Journal of South-Central University for Nationalities Natural Science, 2020, 39(5): 465-470. (in Chinese)
- [8] KIM D, LANGMEAD B, SALZBERG S L. HISAT: a fast spliced aligner with low memory requirements [J]. Nature Methods, 2015, 12(4): 357-360.
- [9] LANGMEAD B, SALZBERG S L. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2 [J]. Nature Methods, 2012, 9(4): 357-359.
- [10] LI Bo, DEWEY C N. RSEM: accurate transcript quantification from RNA-seq data with or without a reference genome [J]. BMC Bioinformatics, 2011, 12(1): 323-339.
- [11] PAN Hong, ZHANG Lihua, LI Xun, et al. Biosynthesis of the fatty acid isopropyl esters by engineered *Escherichia coli* [J]. Enzyme and Microbial Technology, 2017(102): 49-52.
- [12] WEPY J A, GALLIGAN J J, KINGSLEY P J, et al. Lysophospholipases cooperate to mediate lipid homeostasis and lysophospholipid signaling [J]. Journal of Lipid Research, 2019, 60(2): 360-374.
- [13] PAVLOVIC Z, BAKOVIC M. Regulation of phosphatidylethanolamine homeostasis; the critical role of CTP: phosphoethanolamine cytidylyltransferase (Pcyt2) [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2013, 14(2): 2529-2550.
- [14] 徐 靖, 李辉亮, 朱家红, 等. 植物脂肪酸 β -氧化的研究进展[J]. 生物技术通讯, 2008, 19(1): 141-144.
XU Jing, LI Huiliang, ZHU Jiahong, et al. Insights into fatty acids β -oxidation in plant [J]. Letters in Biotechnology, 2008, 19(1): 141-144. (in Chinese)
- [15] MORAIS S, KNOLL-GELLIDA A, ANDRÉ M, et al. Conserved expression of alternative splicing variants of peroxisomal acyl-CoA oxidase 1 in vertebrates and developmental and nutritional regulation in fish [J]. Physiological Genomics, 2007, 28(3): 239-252.
- [16] JENKINS L S, NUNN W D. Genetic and molecular characterization of the genes involved in short-chain fatty acid degradation in *Escherichia coli*: the ato system [J]. Journal of Bacteriology, 1987, 169(1): 42-52.
- [17] HALLER J F, SMITH C, LIU Dalan, et al. Isolation of novel animal cell lines defective in glycerolipid biosynthesis reveals mutations in glucose-6-phosphate isomerase [J]. The Journal of Biological Chemistry, 2010, 285(2): 866-877.
- [18] RENGEL R, SMITH R T, HASLAM R P, et al. Overexpression of acetyl-CoA synthetase (ACS) enhances the biosynthesis of neutral lipids and starch in the green microalga *Chlamydomonas reinhardtii* [J]. Algal Research, 2018(31): 183-193.

【中文责编: 晨 兮; 英文责编: 艾 琳】