Fe³⁺胁迫对假微型海链藻中性脂累积及DGAT表达的影响

蒋 瑜, 严小军, 朱 鹏, 周成旭, 周迎松

(宁波大学 应用海洋生物技术教育部重点实验室, 浙江 宁波 315211)

摘要: 二酰甘油酰基转移酶(DGAT)是脂类合成途径中的关键酶,其表达水平的高低影响着脂类含量的 高低。微量元素 Fe³⁺对于微藻的生长不可或缺,且影响着微藻中油脂的累积。本实验以假微型海链藻 (*Thalassiosira pseudonana*)为研究对象,分析了铁限制(0.000 03mmol/L)和高铁胁迫(0.3 mmol/L)2 种 Fe³⁺胁迫条件下,不同种群生长期中性脂累积及二酰甘油酰基转移酶(DGAT)的基因表达受到的影响。 结果显示: 铁限制条件下, 微藻种群生长及其中性脂的合成受到抑制, *DGAT* 的表达量下降; 高铁胁迫 条件下,高浓度 Fe³⁺可促进中性脂合成与 DGAT 的表达,但抑制微藻种群生长。因此,富铁条件下更利 于总脂的收集。

关键词: 假微型海链藻(Thalassiosira pseudonana); Fe³⁺; 中性脂; 二酰甘油酰基转移酶
 中图分类号: Q946 文献标识码: A 文章编号: 1000-3096(2013)03-0087-08

随着全球能源消耗量的不断上升,石油产量急 剧日益萎缩下降,能源短缺的危机越发严重。生物柴 油由于其良好的环保性及安全性,作为一种新的可 再生能源逐渐受到关注。生物柴油主要以中性脂为 原料,用甲醇或乙醇在催化剂作用下经酯交换制备 而成^[1]。目前用于提取中性脂的原料主要为植物油 脂、少量动物油脂及部分微藻,其中微藻具有油脂含 量高、生长周期短、不与农作物争地等明显优势。 中性脂在微藻中主要以三酰甘油的形式存在^[2],因 此,跟踪研究微藻生长过程中三酰甘油合成途径中 关键酶的表达变化及其影响因素,对于进一步了解 其产油条件,提高其中性脂含量,降低生物柴油生 产成本,有着十分重要的意义。

二酰甘油酰基转移酶(diacylgycerol acyltransferase,DGAT)是催化三酰甘油合成途径的最后一步, 也是该途径的限速酶^[2]。其表达水平的高低影响着最 终三酰甘油的含量。DGAT 广泛存在于动植物中,到 目前为止共发现3类*DGAT*基因家族,分别为*DGAT*1、 *DGAT2*和*DGAT3*^[3-6]。*DGAT*1基因家族只存在于动物 和植物中^[4,7-9]。*DGAT2*基因家族的成员在动物、植物 和酵母中都存在^[9-12],并且与 *DGAT*1基因家族没有明 显的相关性。*DGAT*3基因目前只在花生中发现,其蛋 白序列与上面两种 *DGAT* 家族同源性很低,但是具有 类似 *DGAT* 蛋白功能基因序列^[5]。在微藻中目前已发现 *DGAT*1 和 *DGAT*2 两类基因家族,并均在脂类缺陷型的酿酒酵母中成功验证功能^[13-14]。

影响微藻生长及油脂积累的因素很多,主要包括光照、营养盐中的离子含量、CO₂等^[15-16]。研究表明光照等因素对于某些微藻的脂肪酸累积无明显促进作用^[17]。而对 N、P 离子的研究表明,营养盐中 N 浓度对脂肪酸的组成有一定的影响,不同属的藻株 经过处理之后其饱和脂肪酸和不饱和脂肪酸比例有所不同^[18]。作为许多微藻生长过程中必须的微量元素 Fe³⁺,其浓度的高低对微藻生长以及油脂的累积 有着重要的影响。研究发现 Fe³⁺的浓度对微藻的生 长及油脂积累也有明显的促进作用^[19-20]。

作者利用尼罗红染色法^[21-27]对宁波大学 63 株 微 藻 进 行 筛 选, 结 果 显 示, 假 微 型 海 链 藻

收稿日期: 2012-10-23; 修回日期: 201302-28

基金项目: 教育部长江学者与创新团队项目(IRT0734);浙江省重点 基金项目(Z3100565);国家海洋局海洋可再生能源专项资金项目 (GHME2001SW02);国家自然科学基金项目(40906080);海洋藻类资 源高效开发利用创新团队项目(2011B81007)

作者简介: 蒋瑜(1987-), 女, 浙江舟山人, 硕士研究生, 主要从事微 藻生物柴油的分子研究, 电话: 13958221704, E-mail: lovepolaris4318@126.com; 朱鹏, 通信作者, 电话: 0574-87600458, E-mail: zhupeng@nbu.edu.cn

(*Thalassiosira pseudonana*)的中性脂含量最高^[28]。为 了进一步了解假微型海链藻中性脂累积变化与微量 元素 Fe³⁺的相关性。本实验在营养盐中加入 3 种不 同浓度的 Fe³⁺,在跟踪假微型海链藻中性脂积累的 同时,对不同生长阶段中性脂合成的关键酶——二 酰甘油酰基转移酶(DGAT)进行实时荧光定量分析。 以期了解 Fe³⁺对假微型海链藻生产中性脂的影响特 征,为今后假微型海链藻产油条件的优化及转基因 调控提供基础的理论依据。

1 材料和方法

- 1.1 材料
- 1.1.1 藻种

假微型海链藻(T. pseudonana)取自宁波大学微藻种质库。

1.1.2 培养液

基于 NBM3#培养液)^[29]中的 Fe³⁺浓度, 分别降

表1 假微型海链藻营养盐母液配方

Tab. 1 Composition of T. pseudonana culture fluid

低为原来的 1/100 和提高 100 倍, 获取铁限制和高铁 胁迫实验组。3 组不同 Fe³⁺浓度的营养盐母液见表 1, 分别标记为 G1、G2(对照组)和 G3。将 3 组母液 按照 1 1000 的比例经海水稀释后用于假微型海链 藻的培养。

1.2 方法

1.2.1 微藻的培养

采用 NBM3#培养液^[29]并按照1 1000 的比例经 海水稀释后用于假微型海链藻的培养。静止培养使 其细胞数达到指数期,收集处于指数期的假微型海 链藻进行离心,得到的 100 mg 藻泥,重新悬浮于缺 铁的培养液中,饥饿培养两天后用于接种。初始接种 密度为 10^5 个/mL,水体体积 4 000 mL,于 5 000 mL 三角瓶中,在盐度 25~30,温度 20°C,光照强度为 3 500 lx, 12 h:12 h 的光暗比条件下培养,每个实验 组并设置 3 个平行。

- composition of report	womana cantare mara			
组成	G1(mol/L)	G2(mol/L, 对照组)	G3(mol/L)	
KNO3	1	1	1	
KH ₂ PO ₄	0.073	0.073	0.073	
EDTA-Na ₂	0.0054	0.054	0.54	
$C_6H_5O_7Fe \cdot 5H_2O$	0.00003	0.003	0.3	
$MnSO_4$	0.0033	0.0033	0.0033	
VB_1	1.8 × 10 ⁻⁵	1.8×10^{-5}	1.8×10^{-5}	
VB ₁₂	3.7×10^{-8}	3.7×10^{-8}	3.7×10^{-8}	
Na ₂ SiO ₃	0.016	0.016	0.016	

1.2.2 中性脂动态积累过程的检测

在培养的 20 d 中, 采用尼罗红染色法跟踪假微 型海链藻中性脂的累积变化: 取 96 孔荧光板, 每孔 加入 200 μL 藻液和 1μL 尼罗红染液(上海杰美基因医 药科技有限公司, 中国), 充分混匀后 30℃染色 10 min, 用酶标仪(Thermo Scientific Varioskan Flash, 美国)检测 530 nm 光激发下 580 nm 处的荧光强度, 扣除未染色藻液在该波长处的荧光强度, 样品设 3 个重复。使用血球计数板分别测定 200 μL 藻液中藻 细胞的总数, 样品设 3 个重复。以单个藻细胞内的荧 光强度来表征单个藻细胞内中性脂的含量^[24-28]。

1.2.3 总 RNA 提取

分别在第6天、第10天、第16天、第20天取

三角瓶中的假微型海链藻 1000 mL 进行离心, 得到 100 mg 藻泥于 2 mL EP 管中, 参照 Trizol 抽提试剂 (Invitrogen 公司, 美国)说明书进行 RNA 提取, 测定 RNA 的浓度和 A_{260}/A_{280} 的值。

1.2.4 反转录合成 cDNA 第一条链

依据 PrimeScriptTM RT-PCR Kit(TaKaRa 公司, 日本)操作方法:在 RNase Free 的 PCR 管中加入以 下体系:总 RNA 1µg, 5×PrimerScriptTM Buffer 4 µL, Random 6mers 1 µL, Oligo dT Primer 1µL, Primer-ScriptTM RT Enzyme Mix 1µL,加 RNase Free dH₂O 至 20 µL。混匀后在 35 15 min, 85 30 s 条件下 进行逆转录,得到的 cDNA 产物可直接用于 PCR 或 放-20 保存。

1.2.5 引物设计 DGAT 和 18S rRNA 片段的克隆

在 GenBank 中查找已知假微型海链藻 DGAT 基 因和 18S rRNA 的保守序列(XM_002287179.1 和 DQ514880.1),利用 Primer Premier 5.0 设计实时荧光 定量 RT-PCR 引物(表 2), 其中针对 *DGAT* 基因的正 向引物序列命名为 *DGATR*, 反向引物序列命名为 *DGATF*, 针对 18S rRNA 正向引物序列命名为 18SR, 反向引物序列命名为 18SF。

表 2 假微型海链藻 DGAT 和 18S rRNA 的荧光定量 RT-PCR 引物

Tab. 2 H	Fluorescence quantitative	RT-PCR primers	s of genes DGAT	and 18S rRNA ii	n T. pseudonana
----------	---------------------------	-----------------------	-----------------	-----------------	-----------------

引物	基因靶位	序列(5′→3′)
DGATR	DGAT	CTTAGTAACTCAGCCGCCAGGTTC
DGATF	DGAT	AAGGTGAAGTCAGGACGCAACAG
18SR	18S rRNA	ACCTGTTATTGCCGCCATCTTC
18SF	18S rRNA	GCCGTTCTTAGTTGGTGGAGTG

1.2.6 DGAT 荧光定量分析

标准品质粒的制备:利用 PCR 扩增得到 DGAT 和 18S rRNA 的目的基因片段,切胶回收后将其转入 至大肠杆菌感受态细胞。按质粒提取试剂盒(TaKaRa 公司,日本)的操作说明提取质粒,并进行 PCR、酶切 及测序鉴定。用核酸定量仪测定质粒的浓度,并将其 换算成拷贝数,10 倍系列稀释后作为制备标准曲线 的模板。

荧光定量 RT-PCR: 在 Rotor-gene Q (Qiagen Hildenn 公司, 德国)的 36 孔上(36-well Rotor)进行扩 增,反应体系为: SYBR *Premix Ex Taq*[™] (2×)12.5 μ L, 10 μ mol/L 的引物各 1 μ L,标准品质粒或待测样 品 cDNA1 μ L,灭菌蒸馏水 9.5 μ L,总反应体系为 25 μ L,每个样品设置 3 个平行。反应条件:95 预变 性 30 s;95 10 s,58 15 s,72 20 s,40 个循环;72 采集荧光信号;60~95 进行溶解曲线分析。

1.2.7 数据分析方法

采用 SPSS16.0 软件分析种群生长期中单位细胞 中性脂量变化的显著性。

利用荧光定量 PCR 仪的相应分析软件 (Rotor-GeneQ Series Software)对定量实验结果进行 分析。采用比较 2^{- ΔΔCT}法分析假微型海链藻在培养 第6天、第10天、第16天、第20天的 *DGAT* 在细胞中的相对含量:即以 G2 组为对照,以 18S rRNA 作为内参基因相对定量,计算 ΔΔCT 值。 ΔΔCT=(CT 目的基因 - CT 内参基因)实验组 - (CT 目的基因 - CT 内参基因)对照组,以 ΔΔCT 值作为 定量结果进行数据的统计分析,则目的基因的相 对量=2^{- ΔΔCT}。

2 结果

2.1 Fe³⁺胁迫对假微型海链藻生长影响

本实验以预实验中适宜假微型海链藻生长的铁 离子浓度(0.003 mmol/L)为对照组(G2),设计 G1 铁 限制组(0.00003 mmol/L)和 G3 高铁胁迫组(0.3 mmol/L)。经过 20 d 的连续观测、结果(图 1)显示、3 组实验的生长曲线均是在经过 7d 左右的指数增长后 转入 4~6 d 的平台期, 随后进入衰败期。相对于高铁 胁迫组(G3)的生长速率(0.23 d⁻¹), 铁限制组(G1)和 对照组(G2)的假微型海链藻生长速率大,分别为 0.37 d⁻¹和 0.27 d⁻¹,因此对照组的生长速率最大。铁 限制组在第9天出现最高细胞密度值、为 3.63×10^6 个/mL; 对照组和高铁胁迫组均在第7天出现最高细 胞密度值、分别为: 4.54×10^6 个/mL、 3.26×10^6 个/mL。 3 个实验组的生长期均存在平台期,所不同的是,高 铁胁迫组中假微型海链藻的平台期较短仅仅只持续 4 d 即进入衰败期, 而铁限制组和对照组的平台期则 相对较长、可持续 6~7d。

2.2 Fe³⁺胁迫下假微型海链藻中性脂的动态积累变化

观测铁限制和高铁胁迫等 2 种 Fe³⁺胁迫条件下, 假微型海链藻不同种群生长期中性脂累积受到的影 响,结果如图 1 所示。3 个实验组的假微型海链藻在 种群显著增长的 1~7d 内,中性脂处于累积状态。其 中高铁胁迫对假微型海链藻单个藻细胞内荧光强度 的变化影响显著。而铁限制和对照组适合生长的 Fe³⁺ 浓度对单个藻细胞内荧光强度的变化无显著性影响, 分别维持在 0.76、1.48。在种群生长处于平台期的 8~14 d 内,中性脂的累积维持在较低的状态并没有 显著变化。在种群生长后期的 15~20 d 内,中性脂的 累积量均增加。其中高铁胁迫对单个藻细胞内荧光 强度的变化无显著影响,平均维持在 2.43。而铁限制 和对照组适合生长的 Fe³⁺浓度对单个藻细胞内荧光 强度的变化均影响显著。在铁限制组(G1)中,假微型 海链藻在种群整个生长周期的各个阶段,单个藻细 胞内中性脂的累积相对其他两组均处于偏低的状 态。对照组(G2)中,在假微型海链藻整个生长阶段, 其单个藻细胞内中性脂的累积在前 7d 整体呈下降趋 势,并在第 7 天达到最低值(荧光强度为 0.47)。随后 逐渐上升并在第 16 天达到最高值(荧光强度为 2.69), 之后进入缓慢下降过程。高铁胁迫组(G3)的变化趋势 与对照组(G2)相似,但在第7天后单个藻细胞内的荧 光强度均高于对照组。

Fe³⁺胁迫下假微型海链藻中 DGAT 的 表达分析

DGAT 作为微藻中性脂合成的关键酶, 其基因 的表达水平影响着中性脂的合成。作者利用荧光定 量 PCR 技术对假微型海链藻 DGAT 进行实时定量分 析,结果如图 1 和表 3 所示。3 组实验中, 随着 DGAT 表达量的升高, 单细胞中性脂相应增大。当 DGAT 表达量降低时, 单细胞中性脂也相应减小。其中, 作 者再以对照组(G2)为空白对照, 采用 2^{-△△CT}分析法 分析铁限制条件和高铁胁迫条件下 DGAT 表达量的 变化, 结果如图 2 所示: 高铁胁迫组在第 6d 的表达



Fig. 1 Changes of cell density and FI in single cell of *T. pseudonana* during the growth period of 20 days under Fe³⁺ stress G1. Fe³⁺ 0.00003 mmol/L; G2. Fe³⁺ 0.003 mmol/L; G3: Fe³⁺ 0.3 mmol/L



图 2 Fe³⁺胁迫下, 假微型海链藻 DGAT 在培养第 6 天、
 第 10 天、第 16 天、第 20 天的相对定量结果

Fig.2 Relative quantitative results of *DGAT* in *T. pseudonana* on the 6th, 10th, 16th and 20th day under Fe³⁺ stress

以 18S 为内参基因, 以 G2 组为对照, 进行比较 2^{- $\Delta\Delta CT$}法分析 The transcript abundance is normalized to that of 18S rRNA, compared to control G2, using the method of 2^{- $\Delta\Delta CT$} to analyse G1. Fe³⁺ 0.00003 mmol/L; G2. Fe³⁺ 0.003 mmol/L; G3. Fe³⁺ 0.3 mmol/L⁻¹

量略低于对照组, 在第 10d、16d 和 20d 的表达量 均高于对照组; 而铁限制组在第 6 天、第 10 天、 第 16 天和第 20 天的表达量均低于对照组。同时发 现,随着种群生长的变化, 高铁胁迫条件相对于 对照组条件 *DGAT* 的表达差异逐渐增大。综上所述, 低浓度 Fe³⁺限制下抑制假微型海链藻 *DGAT* 的表 达, 而高浓度 Fe³⁺胁迫下促进假微型海链藻 *DGAT* 的表达。

3 讨论

Fe³⁺作为藻类生长的必须物质,在水环境中的 含量影响微藻的生长。研究发现 Fe³⁺的浓度对三角 褐指藻(Phaeodactylum tricornutum)的生长、光合作 用及细胞生化组成有一定的影响^[19]。在培养液中适 当提高 Fe³⁺的浓度对海水小球藻(Chlorella vulgaris) 的油脂积累也有明显的促进作用^[20]。铁蛋白作为呼 吸链和光合作用进行电子传递的重要蛋白质、对 微藻的生长有重要影响。缺铁情况下会影响细胞中 铁蛋白的合成继而影响细胞的生长,而适当增加 营养盐中的铁含量则可促进微藻生长^[30];但当水 环境中铁含量处于过饱和状态时、又会抑制微藻 的生长和光合作用^[31]。根据实验结果表明,在铁限 制和高铁胁迫条件下均不利于假微型海链藻细胞 的增长、因此营养盐中的铁离子浓度对于假微型海 链藻的生长具有重要影响、适当的 Fe³⁺浓度才有利 于种群增长。

假微型海链藻油脂的累积与其本身的生长状态 息息相关。如在 N 限制条件下抑制其生长,但促进 油脂的合成^[32]。Si 对假微型海链藻的细胞壁合成有 促进作用,从而促进细胞的增长^[33]。本实验利用铁限 制和高铁胁迫对假微型海链藻的生长及单细胞内中 性脂累积变化的影响进行研究,结果发现:铁限制 条件下抑制假微型海链藻种群生长及其中性脂的合 成;在高铁胁迫条件下促进中性脂合成,但抑制假 微型海链藻种群生长。

二酰甘油酰基转移酶(diacylgycerol acyltransferase, DGAT)是催化三酰甘油合成途径的最后一步, 也是该途径的限速酶^[2]。拟南芥 DGAT 基因的过量表 达使得 DGAT 酶的活性和脂类含量均得到提高. 其 中脂类含量增加了 10~70% [34]。Zheng 等[35]研究发 现高表达 DGAT1 基因的转基因玉米种子及胚的含油 量、油酸含量明显提高、说明 DGAT1 酶是摧化 TAG 生物合成的关键酶。Zou 等^[13]从假微型海链藻中成 功筛选到 DGAT2 基因并在脂类缺陷型的酿酒酵母 中进行了功能性验证。因此 DGAT 表达水平的高低 影响着最终三酰甘油的含量。本实验通过铁限制和 高铁胁迫下对假微型海链藻 DGAT 的实时定量以及 胞内中性脂含量的研究分析。其结果进一步佐证了 假微型海链藻中DGAT的存在,同时表明DGAT在藻 细胞中的表达水平影响着其中性脂的合成、并指出 铁限制抑制 DGAT 的表达, 而高铁胁迫促进 DGAT 的表达。

4 小结

作者利用尼罗红染色法跟踪了假微型海链藻在 铁限制条件和高铁胁迫条件下不同种群生长期中性 脂累积受到的影响,研究发现:Fe³⁺对假微型海链藻 的生长及中性脂的累积均有影响。同时作者采用荧 光定量 PCR 技术监测二酰甘油酰基转移酶(DGAT) 的基因表达。研究显示:水环境中高浓度的Fe³⁺促进 假微型海链藻中性脂的累积及 *DGAT* 的表达,但不 利于细胞的生长。而在铁限制的条件下单细胞中性 脂含量下降,*DGAT* 的表达量也相应下降,细胞生长 缓慢。因此,在铁限制条件下不利于假微型海链藻总 脂的收集,只有在富铁条件下才利于总脂的收集, 为今后假微型海链藻产油条件的优化及转基因调控 提供基础的理论依据。

表 3	假微型海镇	连藻 DGAT 在t	语养第 6 天、	第10天、第	16 天、第 20 5	天的相对定	量结果						
Tab. 3	Relative	quantitative r	esults of DG	4T in T. pseudo	nana on the 6	th , 10 th , 16 th	and 20 th day	respectively					
徳	蔥		第6天			第 10 夭			第16天			第 20 夭	
ž	I H	CT 值	拷贝量	相对拷贝量	CT值	拷贝量	相对拷贝量	CT值	拷贝量	相对拷贝量	CT 值	拷贝量	相对拷贝量
ξ	DGAT	25.75 ± 0.70	5.32×10^{3}	1.37×10^{-6}	27.26 ± 1.65	2.53×10^{3}	3.73×10^{-7}	23.84 ± 1.71	3.44×10^{4}	1.14×10^{-5}	24.67 ± 4.72	2.48×10^{4}	8.49×10^{-7}
5	18S	9.56 ± 0.30	3.88×10^{9}		8.81 ± 0.74	$6.79{ imes}10^{9}$		10.05 ± 0.90	3.03×10^{9}		7.76 ± 2.11	2.92×10^{10}	
ç	DGAT	19.97 ± 0.84	4.4×10^{5}	2.02×10^{-5}	23.69 ± 0.93	$2.81{\times}10^4$	1.73×10^{-6}	22.57 ± 2.20	3.09×10^{5}	1.71×10^{-4}	21.61 ± 0.46	1.2×10^5	3.17×10^{-6}
70	18S	7.63 ± 1.16	2.18×10^{10}		8.95 ± 2.53	1.65×10^{10}		12.62 ± 0.40	1.80×10^{9}		6.60 ± 0.30	3.79×10^{10}	
ξ	DGAT	22.15 ± 1.83	1.28×10^{5}	1.52×10^{-5}	22.23 ± 3.42	1.97×10^{5}	1.35×10^{-6}	22.06 ± 3.70	1.51×10^{5}	1.57×10^{-3}	23.18 ± 4.58	3.76×10^{5}	2.07×10^{-4}
ß	18S	9.02 ± 1.46	8.41×10^{9}		8.79 ± 0.61	1.46×10^{11}		14.46 ± 3.41	9.63×10^{7}		10.72 ± 0.72	1.82×10^{9}	
	主: G1. Fe ³⁻	+ 0 mmol/L; G2	. Fe ³⁺ 0.003 n	nmol/L; G3. Fe	³⁺ 0.3 mmol/L								

研究报告 REPORTS

参考文献:

- Chisti Y. Biodiesel from microalgae beats bioethanol[J], Biotechnology, 2008, 26(3): 126-131.
- [2] Settlage S B, Kwanyuen P, Wilson R F. Relation between diacylglycerol acyltransferase activity and oil concentration in soybean[J]. Journal of the American Oil Chemists' Society, 1998, 75(7): 775-781.
- [3] Murphy D J, Mukherjee K D. Acyltransferases in subcellularn fractions of developing seeds of rape(*Brassica napus* L.) [J]. Lipds, 1987, 22(5): 293-298.
- [4] Hobbs D H, Lu C, Hills M J. Cloning of a cDNA encoding diacylglycerol acyltransferase from *Arabidopsis thaliana* and its functional expression[J]. FEBS Letters, 1999, 452(3): 145-149.
- [5] Saha S, Enugutti B, Rajakumari S, et al. Cytosolic triacylglycerol biosynthetic pathway in oil seeds. Molecular cloning and expression of peanut cytosolic diacylglycerol acy1transerase[J].Plant Physiology and Biochemistry, 2006, 141(4): 1533-1543.
- [6] Lehner R, Kuksis A. Biosynthesis of triacylglycerols[J]. Progress in Lipid Research, 1996, 35(2): 169-201.
- Zou J, Wei Y D, Jako C, et al. The Arabidopsis thaliana TAG1 mutant has a mutation in a diacylglycerol acy-Itransferase gene[J]. Plant Journal, 1999, 19(6): 645-653.
- [8] Routaboui J M, Benning C, Bechtold N, et al. The TAG1 locus of *Arabidopsis* encodes for a diacylglycerol acyltransferase[J]. Plant Physiology and Biochemistry, 1999, 37(11): 831-840.
- [9] Cases S, Smith S J, Zheng Y W. Identification of a gene encoding an acylCoA: diacylglycerol acyltransferase, a key enzyme in triacylglycerol synthesis[J]. Proceedings of Nattionl Academy of Sciences, 1998, 95(22): 13018-13023.
- [10] Lung S C, Weselake R J. Diacylglycerol acyltransferase:
 a key mediator of plant triacylglycerol synthesis[J].
 Lipids, 2006, 41(12): 1073-1088.
- [11] Bouvier P, Benveniste P, Oelkersp, et al. Expression in yeast and tobacco of plant cDNAs encoding acyl-CoA:diacylglycerol acyltransferase[J]. European Journal of Biochemistry, 2000, 267(1): 85-96.
- [12] Sandager L, Gustsvsson M H, Stehi U, et al. Storage lipid synthesis is non-essential in yeast[J]. Journal of Biological Chemistry, 2002, 277(8): 6478-6482.

- [13] Zou J, Xu J, Zhen Z. Diacylglycerol acyltransferase 2 genes and proteins encoded thereby from algae[P]. WIPO Patent Application WO, 2009.
- [14] Guiheneuf F, Leu S, Zarka A, et al. Cloning and molecular characterization of a novel acyl-CoA: diacylglycerol acyltransferase 1-like gene (*PtDGAT1*) from the diatom *Phaeodactylum tricornutum*[J]. FEBS Letters, 2011, 278(19): 3651-3666.
- [15] Grim a E M, Perez J A S, Sanchez J L G, et al. EPA from Isochrysis ga Ibana, Growth conditions and productivity[J]. Process Biochemistry, 1992, 27 (5) : 299-305.
- [16] Yongman I W, Ward O P. Growth of and omega-3 fatty acid production by *Phaeodactylum tricornutum* under different culture conditions[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1991, 57(2): 419-425.
- [17] 曹春晖,孙世春,麦康森,等.光照强度对四株海洋 绿藻总脂含量和脂肪酸组成的影响[J]. 生态学报, 2010,30(9):2347-2353.
- [18] 杨凯,王涌,史全良,等.不同质量浓度 NaNO₃ 对 3
 种微藻生长及总脂肪酸含量和组成的影响[J].植物资源与环境学报 2010, 19(1): 43-49.
- [19] 朱明远, 牟学延, 李瑞香, 等.铁对三角褐指藻生长、
 光合作用及生化组成的影响[J].海洋学报, 2000, 22(1):
 110-116.
- [20] 刘志媛, 王广策. 铁促进海水小球藻油脂积累的动态 过程[J].海洋科学,2008,32(11):56-73.
- [21] Greenspan P, Mayer E P, Fowler S D. Nile red:a selective fluorescent stain for intracellular lipid droplets[J]. Journal of Cell Biology, 1985, 100: 965-973.
- [22] Cooksey K E, Guckert J B, Williams S A, et al. Fluorometric determination of the neutral lipid content of microalgal cell using Nile Red[J]. Journal of Microbiological Methods, 1987, 6: 333-345.
- [23] Kimura K, Yamaoka M, Kamisaka Y. Rapid estimation of lipids in oleaginous fungi and yeasts using Nile red fluorescence[J]. Journal of Microbiol Meth, 2004, 56(3): 331-338.
- [24] Alonzo F, Mayzaud P. Spectrofluorometric quantification of neutral and polar lipids in zooplankton using Nile red[J]. Marine Chemistry, 1999, 67: 289-300.
- [25] Lee S J, Yoon B D, Oh H M. Rapid method for the determination of lipid from the green alga *Botryococcus braunii*[J]. Biotechnology Techniques, 1998, 12(7):

553-556.

- [26] Elsey D, Jameson D, Raleigh B, et al. Fluorescent measurement of microalgal neutral lipids[J]. Journal of Microbiological Methods, 2007, 68: 639-642.
- [27] Chen W, Zhang C W, Song L R, et al. A high throughput Nile red method for quantitative measurement of neutral lipids in microalgae[J]. Journal of Microbiological Methods, 2009, 77(1):41-47.
- [28] 王金娜, 严小军, 周成旭, 等.产油微藻的筛选及中 性脂动态积累过程的检测[J].生物物理学报, 2010, 26(5): 225-233.
- [29] 周成旭,马斌,汪飞雄,徐斌,严小军.海洋原甲藻与 三角褐指藻混合培养条件下的种群生长与氮磷营养 盐变化[J].海洋科学,2006,30(12):58-61.
- [30] Greene R M, Geider R J, Falkowski P G, Effects of iron limitation on photosynthesis in a marine diatom[J]. Limnology and Oceanography, 1991, 36(8): 1772-1782.
- [31] 吕秀平,张栩,康瑞娟,等.Fe³⁺对铜绿微囊藻生长 和光合作用的影响[J].北京化工大学学报,2006,33(1):

27-30.

- [32] Yuelu J, Tomomi R. Photosynthetic performance, lipid production and biomass composition in response tonitrogen limitation in marine microalgae[J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2012, 54(1):70-77.
- [33] Groger C, Sumper M, Brunner E. Silicon uptake and metabolism of the marine diatom *Thalassiosira pseu*donana:Solid-state²⁹Si NMR and fluorescence microscopic studies[J].Structural Biology, 2008, 161(1): 55-63.
- [34] Jako C, Kumar A, Wei Y, et al. Seed-specific overexpression of an *arabidopsis* cDNA encoding a diacylglycerol acyltransferase enhances seed oil content and seed weight[J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2001, 126(2): 861-874.
- [35] Zheng P, Allen W B,Roesler K, et al. A phenylalanine in DGAT is a key determinant of oil content and composition in maize[J]. Nature genetics, 2008, 40(3): 367-373.

Influence of iron stress on neural lipid accumulation and DGAT expression in *Thalassiosira pseudonana*

JIANG Yu, YAN Xiao-jun, ZHU Peng, ZHOU Cheng-xu, ZHOU Ying-song

(Key Laboratory of Applied Marine Biotechnology(Ningbo University), Ministry of Education, Ningbo 315211, China)

Received: Oct.,23,2012 **Key words:** *Thalassiosira pseudonana*; Fe³⁺; neutral lipid; DGAT

Abstract: The iron is essential for the growth of microalgae and effects the accumulation of neural lipid in microalgae. Meanwhile, it is well known that during the lipid synthesis in microalgae, diacylgycerol acyltransferase (DGAT) is the crucial enzyme. Expression level of DGAT was related to the content of lipid to some extent. However, there is no report about this issue in *Thalassiosira pseudonana* so far. Herein, we tracked the accumulation of neutral lipid in *T. pseudonana* and detected the expression of DGAT under iron stress. The results showed that the growth, accumulation of neutral lipid and expression of *DGAT* were all restrained under iron-deficiency stress. Under iron-redundancy stress, the accumulation of neutral lipid was facilitated responding to the increasing expression of DGAT, but the growth of *T. pseudonana* was restricted.

(本文编辑:梁德海)