

凌善锋,蔡福欢,刘彦文,等. 3.5 mg/L 水杨酸诱导斜生栅藻积累虾青素的分子机理[J]. 江苏农业科学,2016,44(4):287-290.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.04.081

3.5 mg/L 水杨酸诱导斜生栅藻积累虾青素的分子机理

凌善锋,蔡福欢,刘彦文,朱 勇,韩 梁,程 森

(荆楚理工学院生物工程学院,湖北荆门 448000)

摘要:在自然条件下,向对数生长期的斜生栅藻(*Scenedesmus obliquus*)培养液中加入 3.5 mg/L 的水杨酸溶液,进行胁迫培养以诱导藻类细胞内虾青素的合成与积累。在培养过程中,每隔 3 d 对藻液取样制片,然后用显微镜观察其生长状况及细胞形态变化。结果发现:经 3.5 mg/L 水杨酸诱导的藻的形态发生了明显变化,该水杨酸溶液对于斜生栅藻细胞来说是一种逆境胁迫因子,藻细胞内通过积累高达 1.123 mg/g 的虾青素来形成一种自我保护机制。八氢番茄红素脱氢酶(PDS)和 β -胡萝卜素加氧酶(crtO)基因表达水平上调是藻细胞合成虾青素的主要调控机制。随着培养时间增加,藻细胞生物量呈时间依赖性增加(除 15 d 外),最高达 2.08×10^6 个/mL。

关键词:水杨酸;斜生栅藻;形态;生物量;虾青素;分子机制

中图分类号:S917 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2016)04-0287-04

虾青素是类胡萝卜素的含氧衍生物,属于酮式类胡萝卜素,具有增强免疫功能等生理作用,是一种极具应用潜力的次

收稿日期:2015-11-22

基金项目:国家自然科学基金(编号:30671394);药物合成与优化湖北省重点实验室开放基金(编号:OPP2014YB02);湖北省教育厅科学技术研究项目(编号:Q20126101);荆楚理工学院引进博士科研启动经费(编号:2013BK05);湖北省教育厅省属高校青年教师出国留学项目(编号:鄂教外函[2014]59号)。

通信作者简介:凌善锋(1971—),男,浙江富阳人,博士,副教授,主要从事天然虾青素的产业化研究工作。E-mail:shanfeng86@163.com。

生代谢物质,在食品、饲料、化妆品、医药等领域有着广阔的应用前景^[1]。目前虾青素主要用于水产养殖的色素添加剂,售价高达 1 200 万元/t,估计全球每年需求量超过 20 亿美元。天然虾青素的主要生产来源是雨生红球藻提取以及从红法夫酵母菌发酵液中提取,但这些虾青素的产量远不能满足市场需求。斜生栅藻(*Scenedesmus obliquus*)是一种广泛分布于温暖地区的池塘、沟渠及河流中的淡水单细胞绿藻,其生命力强、繁殖快,对环境条件变化反应敏感,是培养虾青素的另一种理想来源^[2]。

藻体内虾青素的生物合成过程主要是由一些关键酶催化

参考文献:

- [1] Li W T, Liao X L, Yu X M, et al. Isolation and characterization of polymorphic microsatellites in a sex-reversal fish, rice field eel (*Monopterus albus*) [J]. Molecular Ecology Notes, 2007, 7(4): 705-707.
- [2] Chu Z J, Wu Y X, Gong S Y, et al. Effects of estradiol valerate on steroid hormones and sex reversal of female rice field eel, *Monopterus albus* (Zuiew) [J]. Journal of the World Aquaculture Society, 2011, 42(1): 96-104.
- [3] 阮国良,刘家芳,杨代勤. 间歇性禁食对黄鳝生长、消化酶活性及血液生化指标的影响[J]. 水产学报, 2013, 37(7): 1058-1065.
- [4] 周永灿,邢玉娜,冯全英. 鱼类血细胞研究进展[J]. 海南大学学报:自然科学版, 2003, 21(2): 171-176.
- [5] 高泽霞,王卫民. 鱼类外周血红细胞研究进展[J]. 水利渔业, 2008, 28(2): 1-3.
- [6] 李富乐,贺建香,陈 晨,等. 洞庭湖区黄鳝血细胞的分类与计数[J]. 内陆水产, 2008(1): 39-40.
- [7] 陈其才,严定友,吴政星. 生理学实验[M]. 北京:科学出版社, 1995.
- [8] 铁槐茂,石 丹,银 龙,等. 瓦氏黄颡鱼血液生理指标与外周血细胞组成及显微结构[J]. 四川农业大学学报, 2015, 33(1): 78-83.
- [9] 陈晓耘. 饥饿对南方鲇幼鱼血液的影响[J]. 西南农业大学学报, 2000, 22(2): 167-169, 176.
- [10] 张桂蓉,严安生,高玉芹,等. 饥饿对异育银鲫几项血液指标的影响[J]. 水利渔业, 2003, 23(1): 9-10.
- [11] 胡一中,程宏毅,王鸿艳. 饥饿对月鳢几项血液指标的影响[J]. 生物学杂志, 2009(1): 81-83.
- [12] 陈惠群,杨文鸽. 饥饿对鳊鲈某些血液指标的影响[J]. 水产养殖, 2002, 20(5): 32-33.
- [13] 钱霞霞,陈惠群,孙江飞. 饥饿对养殖鲈鱼血液生理生化指标的影响[J]. 中国水产科学, 2002, 9(2): 133-137.
- [14] 封功能,杨文平,王爱民,等. 饥饿胁迫对鲤形体、体成分及血液生理指标的影响[J]. 上海海洋大学学报, 2011, 20(6): 814-819.
- [15] 周爱国,王 超,梁日深,等. 饥饿胁迫对杂交鳢血液指标的影响[J]. 水产养殖, 2012, 33(7): 23-26.
- [16] 郑桂红,陈思如. 饥饿对乌鳢血液生理生化指标的影响[J]. 江苏农业科学, 2012, 40(2): 186-188.
- [17] 李 霞,周宝祥,王茂林. 饥饿对红鳍东方鲀免疫细胞功能的影响[J]. 大连水产学院学报, 2006, 21(4): 297-300.

完成的,一般有异戊二烯焦磷酸异构酶(IPI)、八氢番茄红素合成酶(Psy)、番茄红素-β-环化酶(LYC)、β-胡萝卜素羟化酶(crtR-b)、八氢番茄红素脱氢酶(PDS)、胡萝卜素脱氢酶(ZDS)、β-胡萝卜素酮化酶(BKT)和β-胡萝卜素加氧酶(crtO)等^[3-5]。例如,PDS和ZDS催化无色的八氢番茄红素转化成红色的番茄红素,crtO催化β-胡萝卜素形成虾青素的部分氧化反应。但是,缺乏藻体内虾青素合成的分子调控机理的研究使得虾青素大规模商业应用受到限制。为了更好地理解虾青素生物合成的酶基因调控机理,近年来,学者们运用荧光定量PCR来研究所测定的类胡萝卜素基因表达和虾青素的积累之间的关系,Gao等从分子水平分析得到,25 mg/L 水杨酸(SA)诱导条件下雨生红球藻中虾青素的生物合成主要是通过 *ipi-1*、*ipi-2*、*psy*、*crtR-B*、*bkt*、*crtO* 基因在翻译水平和 *lyc* 在翻译后水平的上调实现的,*pds* 同时在翻译和翻译后 2 个水平的上调实现。而且,*ipi*、*crtO*、*bkt* 基因的 5'上游侧翼序列中可能包含水杨酸(SA)调控相关的顺式反应元件 TCA-element(水杨酸反应元件),这意味着水杨酸作为虾青素合成的有效调控子刺激形成虾青素^[6]。茉莉酮酸甲酯和赤霉素诱导开启了 3 种 *bkt* 基因的表达,并且学者们在该基因的 5 侧翼序列中识别出了顺式作用元件,因此形成了虾青素生物合成调控网络的分子信号^[7]。在氮缺乏和强光等胁迫条件下,雨生红球藻体中 *pds* 基因表达水平明显上调^[8]。最近的研究表明,在 0.17 mol/L 盐诱导 10 d 后,雨生红球藻 QLD 株产生 17.7 mg/g 干质量虾青素,其主要原因是 *ipi-1*、*ipi-2*、*psy*、*lyc*、*bkt2*、*crtR-B*、*crtO* 共 7 个虾青素的生物合成基因上调,其中前 5 个酶基因上调更明显,即:由酶 IPI 催化丙酮酸盐形成二甲基丙烯焦磷酸,由 PSY 催化牻牛儿焦磷酸合成四十碳的八氢番茄红素,由 LYC 催化番茄红素环化形成β-胡萝卜素,由 BKT 催化β-胡萝卜素形成虾青素的部分氧化反应的酶促反应能力均得到明显加强^[9]。

利用斜生栅藻生产天然虾青素具有诱人的探索前景;但是至今还未见用水杨酸诱导斜生栅藻生产虾青素的尝试。本试验是首次试图利用水杨酸胁迫斜生栅藻培养虾青素,利用荧光定量PCR分析虾青素合成关键酶基因的新颖表达水平谱,并且得出与之紧密相关的虾青素产量,本研究为水杨酸介导的信号网络和虾青素生物合成通路之间的关系提供证据,而且揭示出水杨酸在类胡萝卜素形成中起到的新多功能作用,将为水杨酸在虾青素产业化中的大规模应用提供基础实践知识。

1 材料与方法

1.1 试验材料

水杨酸,斜生栅藻藻种,标准培养液,摄影显微镜,台式高速冷冻离心机,紫外分光光度计,GYB30-6A 高压均质机(上海东华高压均质机厂),超声细胞破碎仪等。

1.2 斜生栅藻的培养

斜生栅藻株购自中国科学院武汉水生生物研究所,每个 250 mL 锥形瓶中加入培养基 150 mL,以及稀释的接种藻液 30 mL。自然光照,强度为 1 000~1 500 lx,35.5℃ 静止培养,直至培养到生长期,然后用 3.5 mg/L 水杨酸进行胁迫培养。

1.3 3.5 mg/L 水杨酸对斜生栅藻生物量的影响试验

每 500 mL 瓶中装 200 mL 藻液,加入水杨酸使终浓度达到 3.5 mg/L 进行培养,共培养 18 d,每隔 3 d 考察 3.5 mg/L 水杨酸对斜生栅藻生物量的影响,以不加水杨酸的相应处理作为对照(表 1),每个培养时间 3 次重复。

表 1 3.5 mg/L 水杨酸的培养时间对斜生栅藻生物量的影响

培养时间(d)	生物量(10 ⁶ 个/mL)
0(对照)	0.90±0.16
3	0.93±0.10
6	1.05±0.08
12	1.09±0.09
15	2.08±0.52
18	1.97±0.53

由表 1 可知,18 d 内,各培养时间的藻细胞生物量均高于对照,说明 3.5 mg/L 水杨酸能够促进斜生栅藻细胞生物量的增加。且随着培养时间增加,藻细胞生物量呈时间依赖性增加(除 15 d 外),培养 15 d 时藻细胞生物量最大,是对照的 2.31 倍,但差异不显著($P>0.05$)。该研究结果对于虾青素生产具有极其重要的意义。

1.4 显微观察

水杨酸胁迫培养后,每隔 3 d 取少量处理的藻细胞在光学显微镜下观察 1 次(按 18 d 计)并拍照,以不加水杨酸的相应处理作为对照,观察藻细胞的形态、颜色变化及细胞聚集情况等。

1.5 虾青素提取、含量测定

利用新型的高压均质破壁和虾头壳内源酶辅助提取虾青素相结合的方法提取虾青素,具体如下:藻种预处理、高压均质按照陈兴才等的方法^[10]并进行了优化,GYB30-6A 高压均质机进行高压均质破壁的条件为:28℃,42 MPa,循环 3 次;虾头中的内源酶丰富,有活性很高的水解酶系,能有效地解离出虾青素,利用姜森等的方法^[11]获得内源酶粗酶,51℃、pH 值 4.2 条件下酶解 2 h 进行辅助提取,提取后采用高政权等的方法^[3]测定虾青素含量,共 3 次重复。

1.6 荧光定量 PCR 分析

按照 Gao 等的方法^[9]并作改进,具体如下:mRNA 用 SVRNA 抽提试剂盒(Promega,USA)按照说明书进行提取,RNA 的浓度用 NanoDrop@ND-1000(NanoDrop,USA)测定,cDNA 在 20 μL 体系中用 SuperScript III 第一链合成试剂盒进行合成。用作扩增特异基因(虾青素生物合成路线中的酶)的引物根据 NCBI 数据库或库中的同源序列用 Primer Premier 5.0 合成,如表 2 所示。qRT-PCR 产物用自动移液器移到 384 孔的板上,在 ABI StepOne Plus System (Applied Biosystems,USA)中用 SYBR 荧光绿进行定量,*act* 作为内标基因。每个 PCR 反应包括 5 μL SYBR 荧光绿、1 μL 的引物复合物(包括正向和反向,浓度为 5 μmol/L)、4 μL cDNA、2 μL PCR 反应缓冲液(含 Mg²⁺)、0.3 μL Taq DNA 聚合酶(Promega 公司)、0.3 μL dNTP(浓度为 15 mmol/L)、超纯水。qRT-PCR 的扩增条件如下:95℃ 3 min;95℃ 5 s,退火 30 s(退火温度如表 2),72℃ 15 s,42 个循环。同一个样品同一个基因的 qRT-PCR 试验重复 3 次。

表 2 用作 qRT-PCR 的特异引物和退火温度

引物序列(5'→3')	退火温度(℃)
psyF:CGTGAGACTGCAGAATCAATTGGGG;psyR:CCAATTGATTCTGCAGTCTCACGAA	62
pdsF:AAACTCGCGGTCATTGCTCAAGCGG;pdsR:GCGCCTTGACCAATGACCGCGAGTT	66
lycF:TCCTGTACAAAACGGCAATCATGTT;lycR:AGTAGCTGCTCCGGGCACTGCACA	62
ertR-bF:TCATTGCTGCTACCACGATGCTGT;ertR-bR:ACAGCATCGTGTAGCAGCAAATGA	66
bktF:CCATACTCTACATCATACATTGTTC;bktR:GAACAATGTATGATGTAGAGTATGG	55
ipi-1F:ACGCATATCCCCCGCTGAACCTCG;ipi-1R:ATGCTCCTGAGCTTAAACTGGAGGTC	63
ipi-2F:GCCCCGCGGCACTCCGATGACG;ipi-2R:GCGGACTTCACGCGGGGAAATGC	61
ertOF:GGCTGCTGTGAGGTCAGTGGGT;ertOR:CTGACCCAACGACCATCACCCACTG	70
zdsF:GTGCTTGACATTGCGACACTTGCCC;zdsR:GTGGGCAAGTCTGCGAATGTCAAGC	65
actF:TGCCGAGCGTGAAATTGTGAGG;actR:CGTGAATGCCAGCAGCTCCA	55

注:psy 为八氢番茄红素合成酶基因;pds 为八氢番茄红素脱氢酶基因;lyc 为番茄红素-β-环化酶基因;ertR-b 为 β-胡萝卜素羟化酶基因;bkt 为 β-胡萝卜素酮化酶基因;ipi 为异戊二烯焦磷酸异构酶基因;ertO 为 β-胡萝卜素加氧酶基因;zds 为胡萝卜素脱氢酶基因。

2 结果与分析

2.1 显微观察

显微观察得到:对照组(不加水杨酸)细胞两端尖细变椭,并且以 4 个或 2 个为群体的形式存在(图 1-1)。3.5 mg/L 水杨酸培养 3 d 后,藻细胞形态变化较明显(图 1-2)。3.5 mg/L 处理组培养 6 d 后,观察细胞形态,细胞变大变圆甚至出现不规则形状,并有微红色出现(图 1-3),说明虾青素开始逐渐在斜生栅藻细胞中积累。培养 9 d 后,原本

的青绿色细胞逐渐变淡,最后转为微红色,同时藻类数量明显增多,细胞的形态也由两端尖细逐渐膨胀、变圆甚至有不规则形态(图 1-4);而且,以 4 个细胞的群体形式存在的细胞群体解散,分为单个细胞。3.5 mg/L 水杨酸培养 12 d 后,培养液中藻细胞内有明显的红色,推测虾青素积累在增加(图 1-5)。培养 15 d 后,细胞继续胀大变椭、变红,一些细胞开始聚堆,而且细胞内红色明显加深(图 1-6)。培养 18 d 后,细胞中虾青素的积累少量增加,仍然是 3.5 mg/L 培养液中藻细胞内红色积累最多,但细胞出现了自溶现象(图 1-7)。

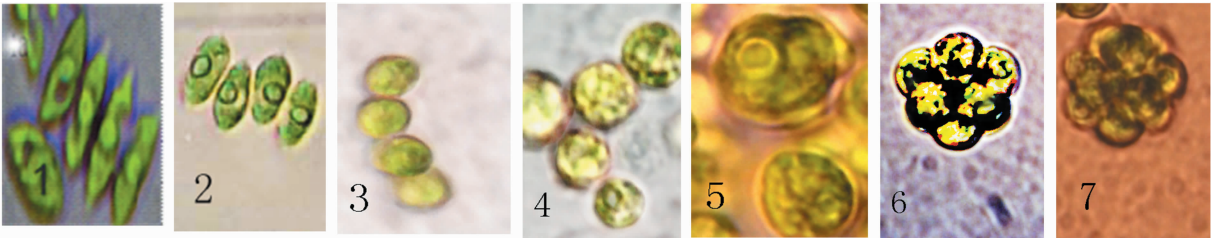


图1 斜生栅藻在350 mL/L水杨酸胁迫培养下的显微形态变化图(400×)

2.2 虾青素含量测定

在 3.5 mg/L 水杨酸胁迫培养组,随着藻细胞培养时间的延长(除了 15 d),虾青素的积累量在逐渐增加。方差分析表明,12、15、18 d 斜生栅藻体内虾青素含量与对照相比有显著差异($P < 0.05$)(图 2)。

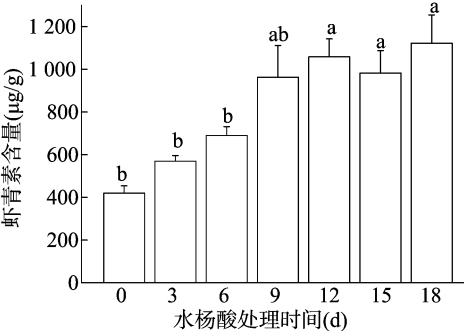


图2 斜生栅藻在水杨酸胁迫培养下虾青素的含量变化

2.3 荧光定量 PCR 分析

与虾青素含量相对应,荧光定量 PCR 分析表明:15、18 d 斜生栅藻体内虾青素合成基因 *pds* 和 *crtO* 的表达水平与对照

相比有显著差异($P < 0.05$),12 d 后 *crtO* 和 18 d 后 *ipi* 基因表达水平与对照相比都有显著差异($P < 0.05$)(图 3)。图 4 分析表明:*bkt* 和 *psy* 基因表达水平随着水杨酸处理呈现时间依赖性地增加。

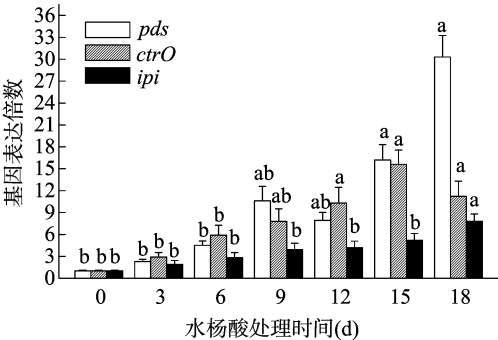


图3 斜生栅藻在水杨酸胁迫培养下虾青素合成基因的荧光定量PCR分析(一)

3 结论与讨论

近些年来,虾青素一直是国际学术界的研究热点之一。学者们从雨生红球藻、甲壳类等生物中提取虾青素已经取得

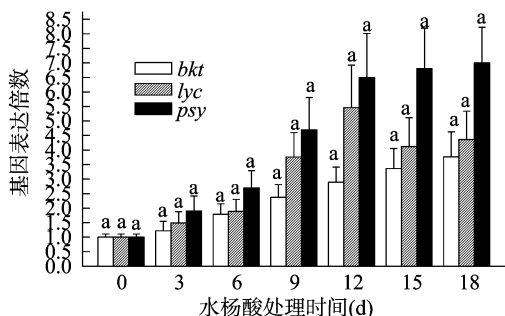


图4 斜生栅藻在水杨酸胁迫培养下虾青素合成基因的荧光定量PCR分析(二)

一些较好的研究成果^[4-5]。自从2008年Qin等发现斜生栅藻能在逆境胁迫条件下迅速合成和积累虾青素以来^[2],斜生栅藻可能就是下一个天然虾青素产业化的热点藻类。水杨酸作为一种新的植物内源激素,它不仅能调节植物的一些生长发育过程,而且是一种能够激活植物一系列防御防卫反应的重要内源信号分子,藻体内可能存在虾青素合成基因调控相关的水杨酸反应元件^[3]。学者们研究了水杨酸对雨生红球藻抗氧化系统的影响,发现500 μmol/L水杨酸使受光线胁迫的雨生红球藻体内的超氧化物歧化酶和抗坏血酸过氧化物酶活性分别增加4.5和15.5倍^[12],5.0 mg/L水杨酸能明显促进雨生红球藻积累虾青素,一方面加快虾青积累进程,另一方面虾青素产量显著提高^[3]。近年来,对雨生红球藻中虾青素合成关键酶基因的转录调控机制进行了研究,结果表明,在营养胁迫、光线胁迫等逆境条件下,通过运用荧光定量PCR等技术得出雨生红球藻体内控制虾青素合成的多个关键酶基因如β-胡萝卜素酮基化酶、β-胡萝卜素水解酶、番茄红素-β-环化酶等明显上调^[8,13-14]。一定质量浓度的水杨酸作为一种诱导因子能促进雨生红球藻积累虾青素,水杨酸构筑了虾青素生物合成调控网络的分子信号。从分子水平分析得到,水杨酸诱导了8个类胡萝卜素基因转录水平的表达,其中β-胡萝卜素酮基化酶基因和β-胡萝卜素羟化酶基因表达水平的上调是水杨酸压力胁迫下雨生红球藻大量积累虾青素的原因之一^[6]。在本研究中,八氢番茄红素脱氢酶(PDS)和β-胡萝卜素加氧酶(crtO)的5'上游侧翼序列中可能包含水杨酸调控相关的顺式反应元件即水杨酸反应元件,水杨酸对斜生栅藻中虾青素的积累具有一定影响,推测3.5 mg/L的水杨酸的加入会诱导开启这些作用元件,诱导这2个非关键限速酶基因大量表达,从而明显增加了藻细胞虾青素的积累量,这也是它积累虾青素比雨生红球藻少的原因之一。

综合上述试验结果,分析得出如下3点结论:(1)在3.5 mg/L水杨酸胁迫培养下,斜生栅藻的细胞形态出现明显的变化;(2)用3.5 mg/L的水杨酸诱导18 d后斜生栅藻细胞胀大变椭圆且颜色呈红褐色,此时虾青素积累最快、最多、最佳;(3)3.5 mg/L的水杨酸溶液对于斜生栅藻细胞来说是一种逆境胁迫因子,藻细胞内积累高达1.123 mg/g的虾青素来形成一种自我保护机制。

在产业化实践中,除了对产虾青素的斜生栅藻藻种进行培育^[15]外,可以考虑在诱导初期添加3.5 mg/L的水杨酸溶

液来提高斜生栅藻的饲料用价值。

致谢:本论文在美国费城完成,感谢美国农业部(USDA)东部研究中心(ERRC)John Nghiem研究员的指导和帮助。

参考文献:

- [1] 凌善锋. 天然虾青素产业的发展趋势分析[J]. 生物学通报, 2014,49(1):6-7.
- [2] Qin S, Liu G X, Hu Z Y. The accumulation and metabolism of astaxanthin in *Scenedesmus obliquus* (Chlorophyceae) [J]. Process Biochemistry, 2008, 43: 795-802.
- [3] 高政权, 孟春晓, 刁英英. 施用水杨酸对雨生红球藻中虾青素积累的影响[J]. 水产科学, 2007, 26(7): 377-380.
- [4] Sanchez-Camargo A P, Meireles M, Ferreira A L, et al. Extraction of ω-3 fatty acids and astaxanthin from Brazilian redspotted shrimp waste using supercritical CO₂ ethanol mixtures [J]. The Journal of Supercritical Fluids, 2012, 61(1): 71-77.
- [5] 凌善锋. 雨生红球藻培养基和诱导条件优化[J]. 江苏农业科学, 2013, 41(11): 266-267.
- [6] Gao Z Q, Meng C X, Zhang X W, et al. Induction of salicylic acid (SA) on transcriptional expression of eight carotenoid genes and astaxanthin accumulation in *Haematococcus pluvialis* [J]. Enzyme and Microbial Technology, 2012, 51(4): 225-230.
- [7] Lu Y D, Jiang P, Liu S F, et al. Methyl jasmonate- or gibberellins A3-induced astaxanthin accumulation is associated with up-regulation of transcription of beta-carotene ketolase genes (*bkts*) in microalga *Haematococcus pluvialis* [J]. Bioresource Technology, 2010, 101(16): 6468-6474.
- [8] Vidhyavathi R, Venkatachalam L, Sarada R, et al. Regulation of carotenoid biosynthetic genes expression and carotenoid accumulation in the green alga *Haematococcus pluvialis* under nutrient stress conditions [J]. Journal of Experimental Botany, 2008, 59(6): 1409-1418.
- [9] Gao Z Q, Meng C X, Chen Y C, et al. Comparison of astaxanthin accumulation and biosynthesis gene expression of three *Haematococcus pluvialis* strains upon salinity stress [J]. Journal of Applied Phycology, 2015, 27(5): 1853-1860.
- [10] 陈兴才, 欧阳琴, 黄亚治. 雨生红球藻物理破壁法提取虾青素研究[J]. 中国食品学报, 2007, 7(2): 48-52.
- [11] 姜森, 杨贤庆, 李来好, 等. 内源酶辅助提取虾壳虾青素的研究[J]. 南方水产科学, 2011, 7(2): 55-60.
- [12] Raman V, Ravi S. Effect of salicylic acid and methyl jasmonate on antioxidant systems of *Haematococcus pluvialis* [J]. Acta Physiologiae Plantarum, 2011, 33(3): 1043-1049.
- [13] Jin E, Lee C G, Polle J E. Secondary carotenoid accumulation in *Haematococcus* (Chlorophyceae): Biosynthesis, regulation, and biotechnology [J]. Journal of Microbiology and Biotechnology, 2006, 16(6): 821-831.
- [14] Huang Jun Chao, Chen Feng, Sandmann G. Stress-related differential expression of multiple beta-carotene ketolase genes in the unicellular green alga *Haematococcus pluvialis* [J]. Journal of Biotechnology, 2006, 122(2): 176-185.
- [15] 凌善锋. 产虾青素的斜生栅藻藻种的培育[J]. 湖北农业科学, 2014, 53(2): 283-285.