



河北大学
HEBEI UNIVERSITY

密 级:

分 类 号:

学校代码: 10075

学 号: 20212017007

硕士学位论文

水杨酸及 PIF3 对异养佐夫色球藻虾青素积累的调控机制

学 位 申 请 人: 张欣玮

指 导 教 师: 张继泉 教授

张昭 教授

专业学位类别: 生物与医药硕士

专业学位领域:

院 系 名 称: 生命科学学院

答 辩 日 期: 二〇二四年五月

Classified Index:

CODE:10075

U.D.C.:

No. 20217017007

Thesis for the Degree of Master

Regulatory mechanisms of salicylic acid and PIF3 on astaxanthin accumulation in the heterotrophic *Chromochloris zofingiensis*

Candidate: Xinwei Zhang

Supervisor: Professor Jiquan Zhang

Professor Zhao Zhang

Category of Professional Degree: Master of Biology and Medicine

Field of Professional Degree:

College: School of Life Sciences

Date of Oral Defense: May, 2024

摘要

天然虾青素作为 FDA 认可并推荐的食物营养成分，正逐渐受到青睐。目前天然虾青素主要来源于自养培养的雨生红球藻，但其生长速度慢、细胞密度低等问题限制着生产效率，导致虾青素价格昂贵、市场缺口巨大。佐夫色球藻（*Chromochloris zofingiensis*）可利用葡萄糖发酵生产虾青素，具有极大的工业化潜力，但其发酵细胞虾青素含量仍有待提高。通常采用的非生物胁迫诱导虾青素积累的方式往往会导致氧化应激和生长速度降低。植物激素作为一种化学诱导剂，可影响微藻生长、代谢和活性氧水平，但对异养培养的佐夫色球藻的影响未知。高等植物中光调控转录因子 PIF 可调控类胡萝卜素的合成，但其在微藻中的功能未被研究。本课题计划筛选可促进异养佐夫色球藻虾青素积累的植物激素，并通过转录组分析调控机制，然后克隆并验证佐夫色球藻中 PIF 基因的功能，最终阐明植物激素及相关转录因子对异养佐夫色球藻虾青素积累的调控机制。

研究结果显示，七种植物激素（生长素（IAA）、赤霉素（GA3）、细胞分裂素（CK）、脱落酸（ABA）、水杨酸（SA）、油菜素内酯（BR）、胺鲜酯（DA-6））中，SA 的添加能有效促进异养佐夫色球藻细胞的生长并提高虾青素和总脂肪酸（TFA）的产量。佐夫色球藻在 50 μM 、100 μM 和 500 μM 的 SA 诱导下，细胞数分别比对照组提高 4.9%、11.4% 和 13.5%，而干重的趋势却与细胞数相反，分别比对照组提高 25.3%、23.5%、14.7%，说明较低浓度的 SA 更倾向于促进佐夫色球藻内含物的积累，而较高浓度的 SA 更倾向于促进细胞分裂。进一步研究表明，在 100 μM 的 SA 处理下，佐夫色球藻的虾青素和总脂肪酸产率最高，与对照相比分别提高 97.2% 和 43%，而活性氧（ROS）水平却降低了 62.8%，说明 ROS 的提高并非微藻次级代谢产物积累的必要因素。

比较转录组分析表明，差异表达基因（DEGs）有 3,505 个，对这些 DEGs 进行富集分析，共富集到 20 种不同的通路，其中与脂肪酸代谢、碳和氮代谢及氨基酸代谢相关的途径显著富集，表明 SA 会影响佐夫色球藻内蛋白质、脂质和淀粉的代谢，同时也富集到了可能与活性氧有关的过氧化物酶体。此外，SA 对虾青素合成的促进作用是由虾青素合成途径中 β -胡萝卜素-4-酮醇酶（BKT）的上调引起的，且通过下调超氧化物

歧化酶（SOD）、过氧化氢酶（CAT）及谷胱甘肽还原酶（GR）等抗氧化酶的表达，降低胞内活性氧水平。加权基因共表达网络分析显示，ABC 转运蛋白和 *gtf2b-like* 转录因子是潜在的关键调控因子。此外 SA 的添加可使 4 个具有螺旋-环-螺旋（bHLH）结构的负调控转录因子 PIF 显著下调。说明这些转录因子可能在 SA 调控的虾青素积累过程中起到重要作用。

最后，本课题成功克隆出 PIF3 转录因子，该转录因子的基因编码区包含 1,188 个核苷酸，编码 395 个氨基酸，具有 bHLH 和 ACT 两个保守结构域，可共同调控佐夫色球藻的代谢过程。通过镍柱层析纯化及凝胶迁移率实验表明，PIF3 可直接与虾青素合成关键基因八氢番茄红素合成酶（PSY）启动子上的 G-box 结合，调控虾青素的合成。

综上，本研究在不引起活性氧水平升高的情况下，为促进异养佐夫色球藻的细胞生长及虾青素的积累提供了一种可行的方法，且初步鉴定转录因子 PIF3 对虾青素合成基因的潜在调控作用，为提高佐夫色球藻虾青素的合成提供理论基础及改造靶点。

关键词 佐夫色球藻 虾青素 植物激素 水杨酸 转录因子 PIF3

Abstract

Natural astaxanthin is gaining popularity as an FDA-approved and recommended nutritional component of food. Currently, natural astaxanthin is mainly derived from autotrophic cultured *Haematococcus pluvialis*, but its slow growth rate, low cell density and other problems limit the production efficiency, resulting in expensive astaxanthin and a huge market gap. *Chromochloris zofingiensis* can be used for the fermentation production of astaxanthin using glucose, which has great potential for industrialisation, but the astaxanthin content of its fermented cells still needs to be improved. The usual abiotic stresses employed to induce astaxanthin accumulation often result in oxidative stress and reduced growth rates. Phytohormones, as a type of chemical inducer, can affect microalgal growth, metabolism and reactive oxygen species levels, but the effect on heterotrophic cultivation of *C. zofingiensis* is unknown. The light-regulated transcription factor PIF in higher plants regulates carotenoid synthesis, but its function in microalgae has not been investigated. This study plans to screen phytohormones that can promote astaxanthin accumulation in heterotrophic *C. zofingiensis*, elucidate the regulatory mechanisms through transcriptome analysis, and then clone and verify the function of the PIF gene in *C. zofingiensis*, so as to ultimately clarify the regulatory mechanisms of phytohormones and related transcription factors on astaxanthin accumulation in heterotrophic *C. zofingiensis*.

The results of the study showed that among the seven phytohormones (indole-3-acetic acid (IAA), gibberellic acid (GA3), cytokinin (CK), abscisic acid (ABA), salicylic acid (SA), brassinosteroid (BR), and diethyl aminoethyl hexanoate (DA-6)), the addition of salicylic acid can effectively promote the growth of heterotrophic *C. zofingiensis* cells and increase the production of astaxanthin and total fatty acids (TFA). The cell number of *C. zofingiensis* induced by 50 μM , 100 μM and 500 μM salicylic acid increased by 4.9%, 11.4% and 13.5% compared with the control, whereas the trend of the dry weight was opposite to that of the cell number, which increased by 25.3%, 23.5% and 14.7%, respectively, compared with the control. This indicates that lower concentrations of salicylic acid tend to promote the accumulation of intracellular substances in *C. zofingiensis*, while higher concentrations of salicylic acid preferred to promote cell division. Further research revealed that under treatment with 100 μM salicylic acid, *C. zofingiensis* exhibited the highest astaxanthin and

total fatty acid productivity, which increased 97.2% and 43%, respectively, compared with the control, whereas the ROS level decreased by 62.8%, suggesting that the increase in ROS is not essential for the accumulation of microalgal secondary metabolites.

Comparative transcriptome analysis indicated that there are 3,505 differentially expressed genes (DEGs). Enrichment analysis of these DEGs revealed enrichment in 20 different pathways, notably related to fatty acid metabolism, carbon and nitrogen metabolism, and amino acid metabolism, suggesting that salicylic acid may affect the metabolism of proteins, lipids, and starch in *C. zofingiensis*, while also enriching in peroxisomes possibly related to reactive oxygen species. Additionally, the promotion of astaxanthin synthesis by salicylic acid is attributed to the upregulation of β -carotene-4-ketolase (BKT) in the astaxanthin biosynthesis pathway, along with the downregulation of antioxidant enzymes such as superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), and glutathione reductase (GR), leading to reduced intracellular levels of reactive oxygen species. Weighted gene co-expression network analysis revealed that ABC transporters and gtf2b-like transcription factors are potential key regulatory factors. In addition, the addition of salicylic acid can significantly downregulate four basic helix-loop-helix (bHLH) negative regulatory transcription factors PIF with a helix-loop-helix structure. This suggests that these transcription factors may play an important role in the regulation of astaxanthin accumulation by salicylic acid.

Finally, this study successfully cloned the PIF3 transcription factor, which contains 1,188 nucleotides in the gene coding region, encoding 395 amino acids. It has two conserved domains, bHLH and ACT, which jointly regulate the metabolic processes of *C. zofingiensis*. Nickel column chromatography purification and gel mobility shift assay show that PIF3 can directly bind to the G-box on the promoter of the key gene phytoene synthase (PSY) involved in astaxanthin biosynthesis, regulating astaxanthin synthesis.

In conclusion, this study provides a feasible method to promote cell growth and astaxanthin accumulation in heterotrophic *C. zofingiensis* without causing an increase in the level of reactive oxygen species, and preliminarily identifies the potential regulatory role of the transcription factor PIF3 on astaxanthin synthesis genes, which will provide a theoretical basis and a target for modification to improve astaxanthin synthesis in *C. zofingiensis*.

Keywords *Chromochloris zofingiensis* Astaxanthin Phytohormones Salicylic acid Transcription factor PIF3

目 录

第一章 绪论.....	1
1.1 虾青素概述.....	1
1.1.1 虾青素的化学结构.....	1
1.1.2 虾青素的生物学功能.....	2
1.1.3 虾青素的生产研究现状.....	3
1.2 佐夫色球藻.....	4
1.2.1 佐夫色球藻简述及生物学特征.....	4
1.2.2 佐夫色球藻的培养方式.....	4
1.2.3 佐夫色球藻虾青素合成途径.....	5
1.2.4 佐夫色球藻的研究现状.....	6
1.3 植物激素对微藻虾青素的影响	6
1.3.1 植物激素	6
1.3.2 植物激素对微藻虾青素合成的调控.....	7
1.4 转录因子调控虾青素合成的研究进展	7
1.4.1 PIF 转录因子的结构	7
1.4.2 PIF 转录因子对类胡萝卜素合成的调控.....	8
1.5 本文的研究目的、意义及主要研究内容	9
1.5.1 研究目的及意义.....	9
1.5.2 主要研究内容.....	9
第二章 外源植物激素对佐夫色球藻生长及虾青素等次级代谢产物合成的影响	11
2.1 引言.....	11
2.2 材料与方法.....	11
2.2.1 藻种获取及培养.....	11
2.2.2 实验试剂与仪器.....	12
2.2.3 分析测定方法.....	13
2.3 结果与讨论.....	15
2.3.1 不同植物激素对佐夫色球藻生长的影响	15
2.3.2 不同植物激素对佐夫色球藻虾青素含量的影响	16
2.3.3 不同植物激素对佐夫色球藻脂肪酸含量的影响	18
2.4 本章小结.....	20
第三章 外源水杨酸对佐夫色球藻生长及虾青素等次级代谢产物合成的影响	22
3.1 引言.....	22

3.2 材料与方法.....	22
3.2.1 藻种获取及培养.....	22
3.2.2 实验试剂与仪器.....	22
3.2.3 分析测定方法.....	24
3.3 结果与讨论.....	25
3.3.1 不同浓度水杨酸对佐夫色球藻生长及活性氧水平的影响 ..	25
3.3.2 不同浓度水杨酸对佐夫色球藻类胡萝卜素含量的影响	26
3.3.3 不同浓度水杨酸对佐夫色球藻脂肪酸含量的影响	28
3.4 本章小结.....	30
第四章 外源水杨酸对佐夫色球藻虾青素积累的转录组学分析及机制	31
4.1 引言.....	31
4.2 材料与方法.....	31
4.2.1 实验试剂与仪器.....	31
4.2.2 转录组测序及基因表达分析.....	32
4.3 结果与讨论.....	33
4.3.1 转录组测序样本质量检测与分析.....	33
4.3.2 虾青素合成途径相关基因表达分析.....	36
4.3.3 脂肪酸合成途径相关基因表达分析.....	37
4.3.4 抗氧化酶相关基因表达分析.....	40
4.3.5 基因共表达网络分析(WGCNA).....	41
4.3.6 转录因子 PIF 在水杨酸处理后的表达水平变化.....	42
4.3.7 RT-qPCR 验证	43
4.4 本章小结.....	44
第五章 转录因子 PIF 的克隆及功能验证	46
5.1 引言.....	46
5.2 材料与方法.....	46
5.2.1 实验试剂与仪器.....	46
5.2.2 基因克隆.....	48
5.2.3 表达载体构建.....	50
5.2.4 蛋白表达及纯化.....	50
5.2.5 功能验证.....	52
5.3 结果与讨论.....	55
5.3.1 佐夫色球藻 PIF 基因序列与蛋白序列信息.....	55
5.3.2 PIF 基因克隆	56
5.3.3 重组表达载体载体构建、PIF3 蛋白表达及纯化.....	57
5.3.4 凝胶迁移率实验证明 PIF3 与 G-box 结合	59
5.4 本章小结.....	60

第六章 结论与展望	61
6.1 结论	61
6.2 创新点	61
6.3 展望	62
参考文献	63

第一章 绪论

1.1 虾青素概述

1.1.1 虾青素的化学结构

虾青素，是一种萜烯类不饱和化合物，属于酮式类胡萝卜素，化学名为 3, 3'-二羟基-4, 4'-二酮基- β , β' -胡萝卜素^[1]。由共轭双键将四个异戊二烯单元连接，两端再连接两个异戊二烯组成的六元环构成特殊的化学结构^[2]。虾青素分子中的长共轭双键、羟基和末端不饱和酮，构成 α -羟基酮。这些特殊的结构使虾青素具有活泼的电子效应，能够与自由基进行复杂的电子交互。

此外，虾青素有三种立体异构体，如图 1-1 所示，分别为：一对对映异构体（3R, 3'R-和 3S, 3'S-虾青素）和一个光学上无活性的中性形式（3R, 3'S-虾青素），其中，3S, 3'S-虾青素是自然界中最丰富的异构体，此外，不同的生物体以不同的立体异构比例产生虾青素^[3,4]。合成虾青素的立体异构体包括 3S, 3'S、3R, 3'S、3R, 3'R，以 1: 2: 1 的比例生成^[5]。

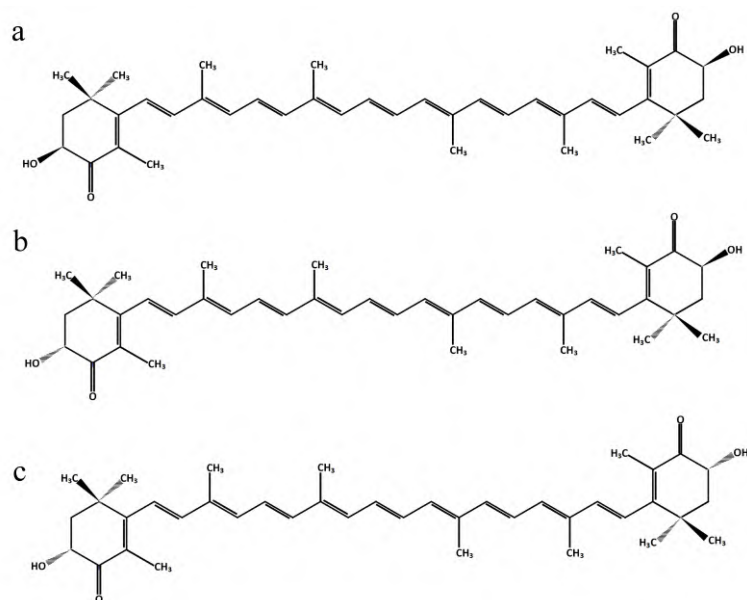


图 1-1 虾青素的三种立体异构体

Figure 1-1 Three stereoisomers of astaxanthin

注：a 为左旋（3S, 3'S）构型的虾青素；b 为右旋（3R, 3'R）构型的虾青素；c 为内消旋（3R, 3'S）构型的虾青素。

1.1.2 虾青素的生物学功能

虾青素是一种具有多种生物学功能的类胡萝卜素，其抗氧化活性是最主要的功能。虾青素作为单线态氧的强淬灭剂，如图 1-2 所示，通过直接向自由基提供电子，清除自由基，且其中心非极性区域含有共轭键，允许分子将自由基（高能电子）运出细胞内部并沿着其碳链，充当电子的“避雷针”，直到被细胞膜外的其他抗氧化剂（如维生素 C）中和^[6]。虾青素的抗氧化活性比其他类胡萝卜素（叶黄素、番茄红素、 β -胡萝卜素和 α -胡萝卜素）更显著^[7]，使其在医药、制药和食品工业中被认为具有关键作用^[8]。

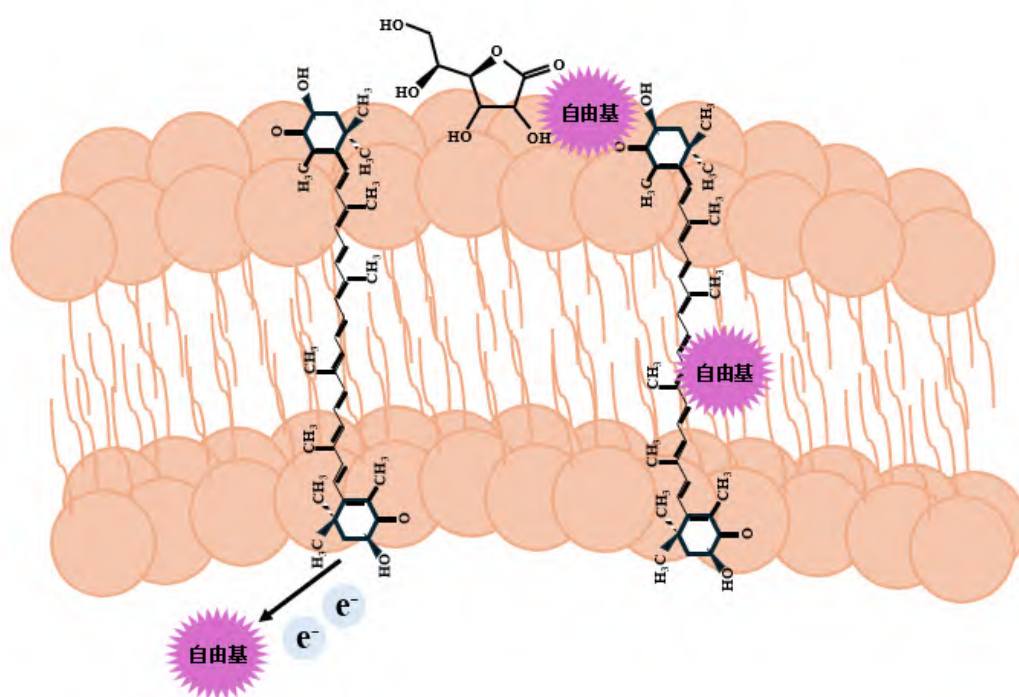


图 1-2 虾青素抗氧化机制图解
Figure 1-2 Illustration of the antioxidant mechanism of astaxanthin

虾青素除抗氧化功能外，还具有抗炎、抗癌、增强机体免疫及预防心脑血管疾病等功能，这些功能均基于虾青素的抗氧化功能。虾青素的抗炎功能是通过抑制紫外线诱导的炎症细胞因子释放，进而抑制角质细胞中炎症细胞因子的表达^[9]。虾青素的抗癌作用是通过抑制对细胞的氧化损伤来减少诱变和癌症发生，例如虾青素通过减少紫外线 B（UVB）辐射引起的氧化 DNA 损伤，抑制多胺代谢，阻止细胞增殖和癌变的进程，

降低皮肤鳞状细胞癌的发生^[10]。虾青素还可避免免疫细胞因其细胞膜中丰富的多不饱和脂肪酸（PUFA）而造成的自由基损伤，进而增强机体免疫力^[11]。研究表明，虾青素也可用作潜在的治疗剂来对抗动脉粥样硬化性心脑血管疾病^[12]。实验结果显示，虾青素在动物模型中对心肌缺血再灌注具有保护作用，能减小心肌梗死面积，并提高心肌救助效果^[13]。虾青素的这些功能使其广泛应用于功能性食品、医药、化妆品及饲料等领域。

1.1.3 虾青素的生产研究现状

虾青素主要来源于天然提取和化学合成两种方式。化学合成的虾青素是三种异构体的混合物，稳定性较差。而天然虾青素 95%以上以酯的形式存在，更好吸收，抗氧化性能更好，越来越受到人们青睐^[14]。

天然提取的虾青素主要来源于酵母、海产废弃物及藻类等水生生物。其中酵母中提取的虾青素含量低、以游离的 3R, 3'R 形式存在^[15]，抗氧化、抗衰老等生物活性低于 3S, 3'S 构型的虾青素^[16]。且海产废弃物来源的虾青素杂质较多、含量低^[17]。而微藻中虾青素的含量明显高于酵母和海产废弃物^[18,19]，因此目前市场上的天然虾青素主要来源于微藻。其中雨生红球藻的虾青素含量最高可达干重的 4%，已应用于工业化生产^[20]，但它生长相对缓慢，生物量产量低，容易受到其他快速生长的生物体的污染^[21-23]，且虾青素的诱导和积累需要极高的光照，阻碍了其商业应用^[24,25]。因此，天然虾青素的价格（15,000 美元/公斤）远高于人工虾青素的价格（1,000 美元/公斤）^[26]。

研究发现佐夫色球藻作为天然虾青素最有潜力的生产者，其生长速度快，对污染和不利环境的敏感性低，且可在葡萄糖为唯一碳源和能源的异养条件下积累虾青素，被认为是大规模生产虾青素的潜在替代宿主^[27,28]，但其虾青素含量还有待提高，因此越来越多的研究致力于寻找促进佐夫色球藻虾青素积累的方法。目前利用佐夫色球藻生产虾青素的相关研究在：培养条件、化学诱导剂对虾青素积累的影响^[29,30]；廉价培养基的利用、发酵和两步法培养等工程应用方面的尝试；组学手段培养条件、化学诱导剂对虾青素积累的影响^[31]探究虾青素积累机制^[32-35]等方面取得了一定进展，但仍未解决发酵细胞虾青素含量低这一最大瓶颈问题。

1.2 佐夫色球藻

1.2.1 佐夫色球藻简述及生物学特征

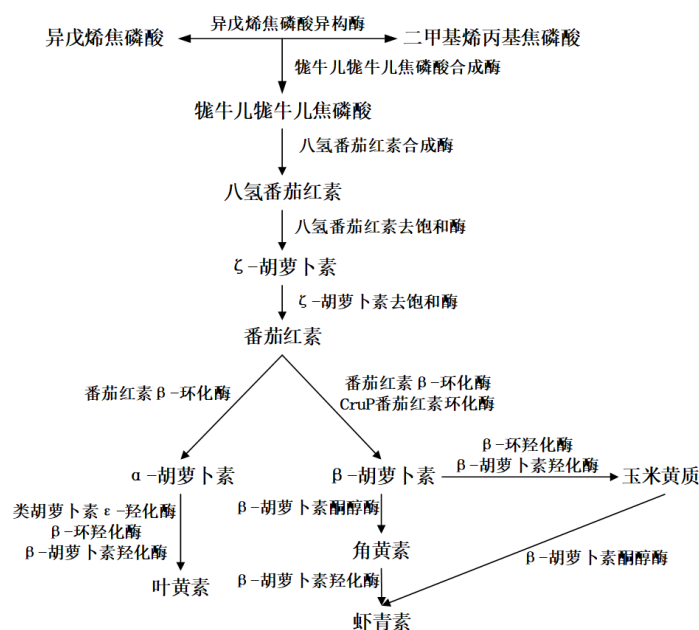
佐夫色球藻是一种绿色真核微藻，属于绿藻门、小球藻科，具有球形细胞，没有鞭毛，以单细胞或群体形式存在^[36]。其生命周期通常可分为生长、成熟和分裂三个阶段，具有较强的环境适应性，能够在不同的光照、温度、盐度和营养条件下生长繁殖。佐夫色球藻的组成受光照、温度、盐度、营养物质可用性等因素的调控，这些因素可影响其生长速率和生产力。佐夫色球藻可在不同条件下积累大量有价值的类胡萝卜素和脂质^[37]，潜力巨大。以上特征使得它在生物技术、水产养殖和污水处理等领域具有广泛的应用前景。

1.2.2 佐夫色球藻的培养方式

佐夫色球藻的培养方式主要包括自养、异养及混养。自养培养是指佐夫色球藻在光照条件下，利用水、二氧化碳和无机盐等无机物质进行光合作用，合成用于生长和生命活动的有机物。自养培养的优点是环境友好、成本低廉。但是，自养培养时的光照强度、光照时间和温度等环境因素对佐夫色球藻的生长有很大影响，同时还需要提供适宜的营养盐和微量元素^[38]。异养培养是指佐夫色球藻在黑暗条件下，通过培养基中的有机碳源（如葡萄糖、半乳糖等）进行生长和代谢。异养培养具有生长速度快、生物量积累高等优点^[39]。然而，异养培养需要使用有机碳源，成本相对较高，并且可能产生环境污染。混养培养是一种结合了自养和异养两种培养方式的代谢机制。混养培养的优点是可以同时利用光能和有机物质进行生产，从而提高佐夫色球藻的生长速度和生物量积累。但是，混养培养也存在一些缺点，如需要同时控制光照、温度、营养盐和有机碳源等多个因素，以确保佐夫色球藻的正常生长。

佐夫色球藻的自养、异养及混养培养方式各有优缺点。在实际应用中，根据具体需求和条件选择合适的培养方式。例如，在光照充足、成本较低的情况下，可以选择自养培养；而为了获得天然虾青素时，通常采用异养培养，因为异养培养可以通过避免光照不足导致的能量不足，实现更快的生长速度、更高的细胞密度和更短的发酵周期^[40]。为了保证佐夫色球藻的正常生长，无论采用哪种方式，都需要严格控制环境因素和操作条件。

如图 1-3 所示, 佐夫色球藻虾青素的合成起始于异戊烯基焦磷酸 (IPP) 和二甲基烯丙基焦磷酸 (DMAPP), 经甲基赤四醇 4-磷酸途径 (MEP) 合成, 在香叶基香叶基焦磷酸合酶 (GGPPS) 的作用下生成香叶基香叶基焦磷酸 (GGPP); 再由关键限速酶 PSY 催化生成八氢番茄红素, 经过八氢番茄红素去饱和酶 (PDS) 和 β -胡萝卜素去饱和酶 (ZDS) 的催化作用, 八氢番茄红素去饱和转变为番茄红素; 生成的番茄红素在番茄红素 β -环化酶 (LCYb) 的催化作用下, 通过进一步化学转化生成 β -胡萝卜素; β -胡萝卜素分别由 BKT 和 β -胡萝卜素羟化酶 (crtZ) 催化合成角黄素和玉米黄质; 最后分别在 crtZ 和 BKT 催化下生成虾青素^[43]。

Figure 1-3 Pathway of astaxanthin biosynthesis in *Chromochloris zofingiensis*

1.2.4 佐夫色球藻的研究现状

近年来, 由于佐夫色球藻具备生长速度快、易于培养、能够在光自养、异养和混养条件下稳定生长以实现高细胞密度^[44]等优点, 使其被认为是生产虾青素和生物柴油最好的替代来源及最有前景的原料, 得到业界广泛的关注^[45]。并且佐夫色球藻遗传背景清晰, 在脂滴中可同时积累虾青素和三酰甘油 (TAG), 使其被视为一种新兴的模式生物, 是虾青素和脂肪酸代谢相关研究的优良载体^[46]。

目前对佐夫色球藻的研究, 强调通过高密度培养技术达到最大的生物量产量, 这是大多数异养发酵技术的主要目的。但一般条件下, 异养细胞中虾青素含量在细胞干重的 0.2% 以下, 与其它微藻或其它营养模式相比, 佐夫色球藻异养发酵下虾青素含量仍有较大提升空间^[47]。培养条件优化、非生物胁迫、添加诱导试剂等是常用的促进微藻次级代谢物积累的方式, 其中非生物胁迫是最常用的方式之一, 包括高光、高盐、缺氮、重金属胁迫等^[48]。不同胁迫条件对佐夫色球藻虾青素和脂肪酸积累的影响及其代谢机制已被充分研究。例如缺氮会影响生长, 同时促进参与虾青素和脂肪酸合成途径的关键酶 PSY、BKT 和乙酰辅酶 A 羧化酶 (ACCase) 的表达水平, 增加虾青素和脂肪酸的积累^[49]。此外, 活性氧水平的提高是胁迫的另一大特征, 通常会使细胞产生氧化应激反应, 进而限制微藻细胞生长, 导致目标产物积累效率降低而生产成本相对提升, 影响微藻产业的发展^[50]。因此, 研究人员一直在寻找不影响生长, 不引起氧化损伤, 同时提高虾青素、脂肪酸等物质积累的办法。

1.3 植物激素对微藻虾青素的影响

1.3.1 植物激素

植物激素是重要的信号分子, 可通过自然产生和人工合成的方式获得^[51]。它们可以在极低浓度下诱导生理效应, 并在植物生长发育和对环境应答等整个生命活动过程中发挥调节作用^[52]。1928 年温特证实了生长素的存在, 是首个被证实存在的植物内源激素, 随后 1934 年郭葛等人从植物中分离出了生长素。此后, 其他植物激素 (赤霉素、细胞分裂素、脱落酸、乙烯等) 陆续被科学家们发现。尽管植物激素为简单的小分子有机化合物, 它们却有着非常复杂、多样的生理效应。例如, 茉莉酸 (JA) 和乙烯 (ET) 不仅可以协作调控植物的生长, 并且能增强植物对腐生性真菌的耐受性。油菜素内酯不仅可以调节细胞的伸长与分裂, 还可以增强植物对环境压力的耐受性^[53]。

1.3.2 植物激素对微藻虾青素合成的调控

已有研究表明, 高等植物的植物激素系统可能是从微藻代谢系统进化而来的^[54], 同时也记录了微藻中的激素活性^[55]以及它们对外源植物激素补充剂的敏感性^[56]。近年来的研究揭示了植物激素如吲哚乙酸 (IAA)、赤霉素 (GA3)、茉莉酸甲酯 (MJ)、茉莉酸 (JA)、脱落酸 (ABA) 和水杨酸 (SA) 等对微藻虾青素合成的影响^[57-60]。植物激素对微藻虾青素合成的影响是多方面的。植物激素可以诱导微藻细胞内与虾青素合成相关的酶基因的表达, 从而提高虾青素的合成。例如, SA 和 JA 可作为虾青素积累过程中的分子信号, 通过促进 PSY、PDS 和 ZDS 等基因的表达, 增加雨生红球藻中虾青素的合成^{[61]10}。植物激素还可以通过调控相关代谢网络促进微藻虾青素的合成。例如, Yu 等人^[62]报道了 0.724 mM SA 可使雨生红球藻中虾青素增加 30%, 并提出 SA 可能通过触发糖酵解过程产生更多的类胡萝卜素前体来诱导虾青素的合成。

可见植物激素可作为诱导剂促进微藻虾青素的合成, 但植物激素在微藻培养中的具体应用方式、浓度、时间等条件, 以及不同激素之间的相互作用和机理, 还需要进一步的研究和探索。此外, 植物激素对微藻的影响也受微藻种类及培养条件的影响。在研究影响效果的同时, 也需要探索其作用机理和最优应用条件, 以实现其在微藻培养中的最大效益。

1.4 转录因子调控虾青素合成的研究进展

1.4.1 PIF 转录因子的结构

PIF 是 bHLH 超家族的成员, 其有一个标志性的 bHLH 结构域, 该结构域由两个不同的区域组成: 15 个氨基酸的碱性区域参与同目标 DNA 的结合、60 个氨基酸的 bHLH 区域参与二聚化。bHLH 因子通过其碱性区域与目标基因启动子区域中的顺式调控元件结合来调控基因的表达。大多数 bHLH 与一种称为 E-box (50-CANNTG-30) 的顺式元件结合。根据中央两个核苷酸的不同, E-box 有不同的类型。PIF1、PIF3 和 PIF4 与一种称为 G-box (50-CACGTG-30) 的 E-box 亚型特异性结合^[63-65]。序列比对显示, PIF 的 N 端区域有一个共同的保守序列基团, 被称为活性光敏色素结合基序 (APB)。定点突变显示, 所有 PIF 中共有的四个不变氨基酸残基 (ELxxxxGQ) 是 APB 基序的关键决定因素。这个基序是与具有生物活性的远红光吸收 Pfr 形式的光敏色素 B (phyB) 结合的充要条件^[66]。PIF 转录因子作为 bHLH 转录因子家族的重要成

员，通过其特定的结构域与 DNA 结合，并与其他蛋白互作，调控植物的生长发育和代谢过程。特别是它们与光敏色素的相互作用，使得 PIF 转录因子在植物光信号转导网络中扮演着关键角色。

1.4.2 PIF 转录因子对类胡萝卜素合成的调控

PIF 转录因子在植物中是一类关键的转录调控因子，主要与光敏色素互作来参与植物的光信号转导过程。它们通过调控下游基因的表达，影响植物的生长、发育以及对环境的响应。类胡萝卜素是一类重要的植物色素，不仅赋予植物鲜艳的颜色，还发挥着抗氧化、保护植物免受光损伤等功能。近年来的研究表明，PIF 转录因子可参与到类胡萝卜素合成的调控中，它通过与类胡萝卜素合成途径中关键酶基因的启动子结合，直接调控这些基因的表达（如图 1-4 a 所示）。例如，PIF1 可直接结合到 PSY 基因的启动子上抑制其编码，进而抑制拟南芥类胡萝卜素的积累^[67]。

此外，PIF 转录因子还可通过与其他转录因子或蛋白质互作，形成复杂的调控网络，间接调控类胡萝卜素的合成。例如，PIF 转录因子可以与光敏色素互作，通过光信号转导途径来调控类胡萝卜素的合成。如图 1-4 b 所示，在光照条件下，光敏色素可以抑制 PIF 转录因子的活性，从而促进类胡萝卜素的合成；而在黑暗条件下，PIF 转录因子的活性增强，抑制类胡萝卜素的合成^[68]。

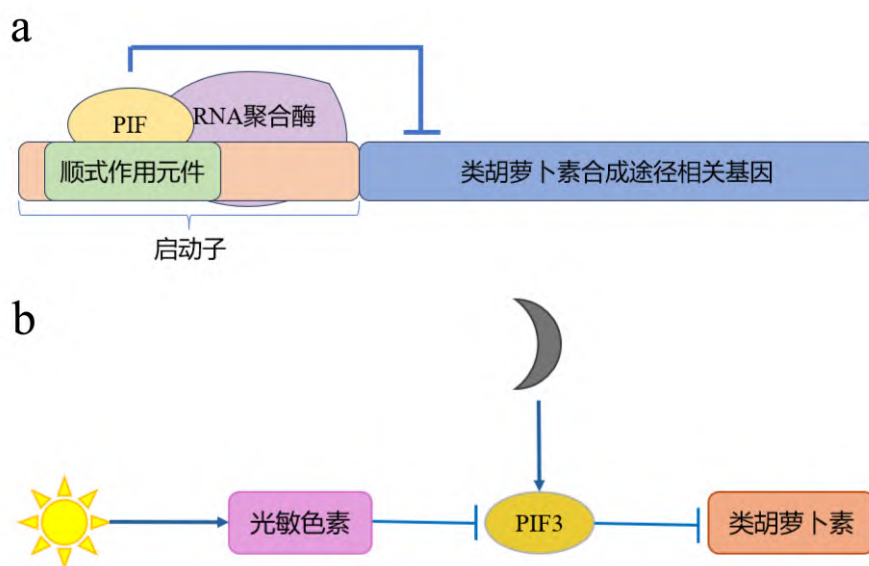


图 1-4 PIF 转录因子调控胡萝卜素合成简图

Figure 1-4 Transcription factor PIF regulates the simplified diagram of carotenoid synthesis

总的来说, PIF 转录因子通过直接和间接的方式调控植物类胡萝卜素的合成, 但对微藻类胡萝卜素合成的影响还未被研究, 由于高等植物的代谢机制研究一直是微藻领域最重要的参考和借鉴, 因此研究转录因子 PIF 对于佐夫色球藻虾青素积累的影响有可能成为促进虾青素积累的新思路和方法。

1.5 本文的研究目的、意义及主要研究内容

1.5.1 研究目的及意义

佐夫色球藻作为可同时生产虾青素和脂肪酸的新兴模式生物, 其虾青素产量还有待提高, 而经常应用的通过非生物胁迫诱导佐夫色球藻虾青素积累的方式, 往往伴随着活性氧水平的提高, 导致细胞产生氧化应激反应, 进而限制藻细胞的生长, 造成虾青素积累效率偏低。目前已有研究证明, 添加外源植物激素可缓解微藻非生物胁迫, 并促进一些次级代谢产物的积累。但关于植物激素在异养培养条件下, 对佐夫色球藻生长以及虾青素和脂肪酸合成的影响机制研究较少。

佐夫色球藻虾青素合成的前体物质 IPP、DMAPP 以及合成途径中的关键限速酶 PSY 均存在于叶绿体等质体中。由于异养培养的佐夫色球藻处于黑暗条件下, 没有光照, 不能进行光合作用, 从而使细胞内叶绿体和叶绿素含量降低, 导致虾青素合成前体减少, 最终影响虾青素的合成。研究表明, 高等植物中转录因子 PIF 可以直接结合至虾青素合成途径中 PSY 启动子的顺式作用元件上, 进而负调控虾青素的合成。由于佐夫色球藻的虾青素合成途径与高等植物相似, 推测转录因子 PIF 在佐夫色球藻虾青素合成过程中也会发挥作用, 具体如何发挥功能还有待研究。

本研究以佐夫色球藻为实验材料, 对其进行异养培养。首先确定微藻中对虾青素合成有影响的植物激素, 并筛选对佐夫色球藻虾青素合成有促进作用的植物激素, 然后进一步测定各种生化指标, 再通过转录组学分析具体调控机制。关于佐夫色球藻中转录因子 PIF 的功能验证, 首先克隆 PIF 基因, 再对其进行表达与纯化, 最后通过凝胶迁移率实验验证其功能。以期异养发酵生产虾青素的培养策略及藻种的分子生物学改造提供理论指导。

1.5.2 主要研究内容

(1) 植物激素对异养培养佐夫色球藻虾青素和脂肪酸含量的影响

① 测定细胞数、干重、虾青素和脂肪酸含量, 确定促进异养佐夫色球藻虾青素和

脂肪酸合成最佳的植物激素。

② 测定细胞数、干重及活性氧水平探究不同浓度的最佳植物激素对异养佐夫色球藻生长及活性氧水平的影响。

③ 测定虾青素及脂肪酸含量探究不同浓度的最佳植物激素对异养佐夫色球藻代谢产物的影响。

④ 通过比较转录组分析最佳植物激素处理下佐夫色球藻主要代谢通路中关键基因的表达差异，以阐明选定植物激素对异养佐夫色球藻具体的影响机制。

(2) 佐夫色球藻中 PIF 转录因子的克隆及功能研究

① 分析选定植物激素处理后 PIF 转录因子的表达水平，判断 PIF 是否会影响虾青素积累。

② 对佐夫色球藻中 PIF 基因序列及蛋白序列进行分析，进一步了解 PIF 转录因子。

③ 对佐夫色球藻中的 PIF 转录因子进行克隆、蛋白表达及凝胶迁移率实验，探索 PIF 转录因子的功能。

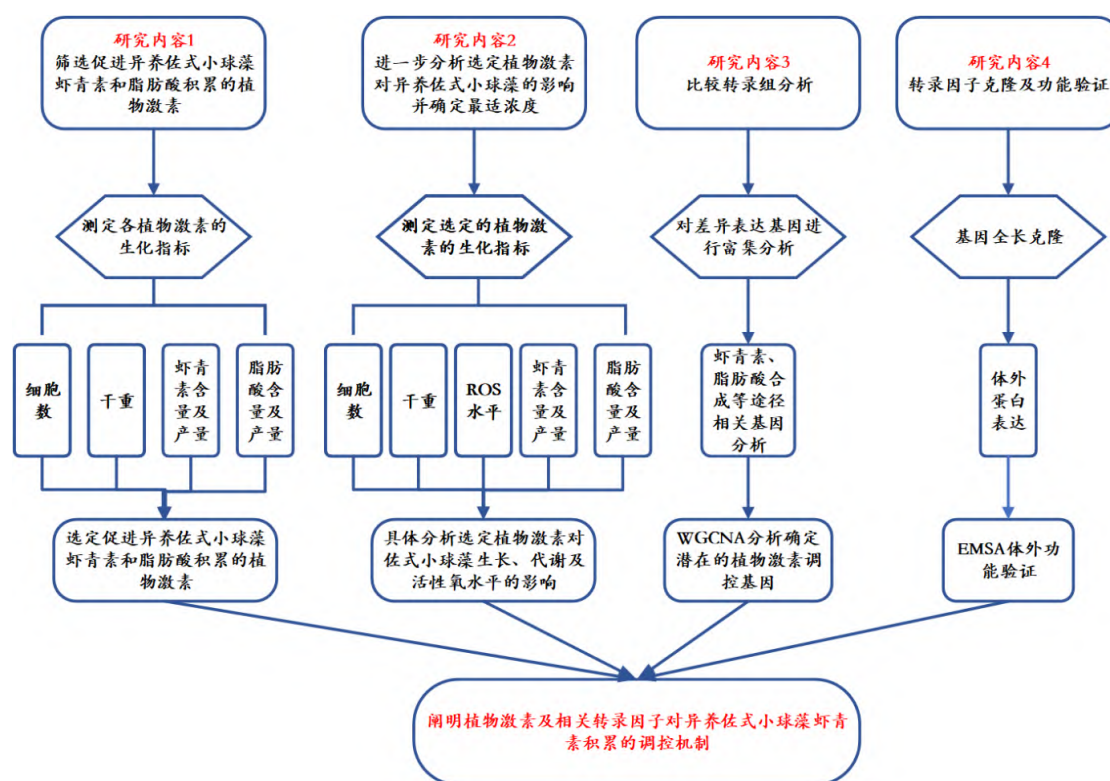


图 1-5 技术路线图

Figure 1-5 Technical roadmap for experimental research

第二章 外源植物激素对佐夫色球藻生长及虾青素等次级代谢产物合成的影响

2.1 引言

佐夫色球藻可同时生产虾青素和脂肪酸，具有可持续、环境友好的特点，成为研究虾青素和脂肪酸时的理想选择，但虾青素和脂肪酸的含量有待提高。由于微藻自养生长速率较慢，混养高密度培养时光照强度难以满足需求，因此异养发酵是更理想的培养方式。研究者通常采用非生物胁迫的方式（如：高光、高盐、缺氮等）促进佐夫色球藻次级代谢产物的合成和积累，但这种方式往往会导致藻细胞产生氧化应激，进而影响藻细胞生长，导致目标代谢产物产率降低。已有研究表明，植物激素可影响微藻的生长和代谢，且可缓解微藻的非生物胁迫。但对于异养佐夫色球藻生长及代谢产物合成的影响还未被研究。

本章节通过选定对微藻生长及代谢有影响的几种植物激素（生长素（IAA）、赤霉素（GA3）、细胞分裂素（CK）、脱落酸（ABA）、水杨酸（SA）、油菜素内酯（BR）、胺鲜酯（DA-6）），测定其对异养佐夫色球藻生长、虾青素和脂肪酸含量的影响，筛选出对异养佐夫色球藻生长及代谢影响最佳的植物激素。

2.2 材料与方法

2.2.1 藻种获取及培养

本研究所用的藻株为佐夫色球藻（*C. zofingiensis*（ATCC30412）），购自美国典型培养物保藏中心（Rockville, MD, USA）。采用的培养基为 Kuhl 培养基，其包含 1.01 g KNO₃；0.62 g NaH₂PO₄·H₂O；0.089 g Na₂HPO₄·2H₂O；0.247 g MgSO₄·7H₂O；14.7 mg CaCl₂·2H₂O；6.95 mg FeSO₄·7H₂O；0.061 mg H₃BO₃；0.169 mg MnSO₄·H₂O；0.287 mg ZnSO₄·7H₂O；0.0025 mg CuSO₄·5H₂O；0.01235 mg (NH₄)₆Mo₇O₂₄·4H₂O，经 121℃，20 分钟高温高压灭菌后可使用。

将原始的细胞保存液以 10%的接种量接种于有 100 mL Kuhl 培养基的 250 mL 摇瓶中进行培养，以 5.5 g/L 葡萄糖为碳源，设定温度为 25℃，转速为 150 rpm，避光培养 4 天。然后将活化好的藻种，按 10%的接种量转接至装有 100 mL 无菌培养基的锥形瓶

中培养 4 天至对数生长期，作为种子液用于后续培养实验。

将二级种子液按 10%的比例分别转接至不同的无菌培养基中，培养基含不同浓度的七种植物激素，各植物激素的浓度设置如下：生长素（IAA）（45 μM 、90 μM ）；赤霉素（GA3）（10 μM 、19 μM ）；细胞分裂素（CK）（2.3 μM 、23 μM ）；脱落酸（ABA）（38 μM 、90 μM ）；水杨酸（SA）（100 μM 、500 μM ）；油菜素内酯（BR）（0.01 μM 、0.42 μM ）；胺鲜酯（DA-6）（10 μM 、100 μM ）。每个处理组设置三组平行，25 $^{\circ}\text{C}$ ，150 rpm，避光培养 3 天后，取样测定相关生化指标。

2.2.2 实验试剂与仪器

（1）实验试剂

本章研究内容所涉及到的实验试剂见表 2-1。

表 2-1 实验所用主要试剂
Table 2-1 Reagents used in the experiment

试剂名称	纯度等级	生产厂家
葡萄糖	分析纯	科密欧
硝酸钾	分析纯	Sigma
磷酸二氢钠单水合物	分析纯	科密欧
磷酸氢二钠二水合物	分析纯	福辰化学
七水硫酸镁	分析纯	福辰化学
二水氯化钙	分析纯	福辰化学
七水硫酸亚铁	分析纯	福辰化学
硼酸	分析纯	福辰化学
硫酸锰	分析纯	福辰化学
七水硫酸锌	分析纯	福辰化学
五水硫酸铜	分析纯	Rgent
四水合钼酸铵	分析纯	福辰化学
生长素	分析纯	阿拉丁
赤霉素	分析纯	阿拉丁
细胞分裂素	分析纯	阿拉丁
脱落酸	分析纯	酷来搏
水杨酸	分析纯	索莱宝
油菜素内酯	分析纯	麦克林
胺鲜酯	分析纯	麦克林
丙酮	色谱纯	科密欧
甲苯	分析纯	科密欧
甲醇	分析纯	科密欧
硫酸	分析纯	大茂
2,6-二叔丁基对甲酚	分析纯	阿拉丁
十七烷酸标品	分析纯	阿拉丁
正己烷	色谱纯	科密欧
氯化钠	分析纯	福辰化学

(2) 实验仪器

本章研究内容所使用实验仪器设备见表 2-2。

表 2-2 实验所用主要仪器
Table 2-2 Instruments used in the experiment

仪器名称	型号	生产厂家
光学显微镜	ECLIPSE Ei R	尼康
电子天平	CX2200ZH	奥豪斯
分析天平	PR124ZH	奥豪斯
台式离心机	TG16-WS	湘仪
小型冷冻离心机	1-14K	Sigma
涡旋振荡器	SCI-FS	SCILOGEX
磁力加热搅拌器	TP-350E	杭州米欧
pH 计	ST2100	奥豪斯
真空干燥箱	DZF-6050	上海欧莱博
鼓风干燥箱	DHG-9070A	上海一恒
电热恒温水浴锅	HWS-12	上海一恒
真空冷冻干燥机	FD-1A-50	上海比朗
水浴氮吹仪	LC-DCY-12SY	力辰
气相色谱仪	7890A	安捷伦
恒温摇床	ZQZY-CGF8	上海知楚
无菌超净工作台	VS-1300L-U	苏净安泰
压力蒸汽灭菌锅	LDZM-80L	上海申安
高效液相色谱仪	E2695	沃特世

2.2.3 分析测定方法

(1) 细胞数的测定

- ① 用二次水清洗血球计数板和盖玻片，并用吸水纸擦干。
- ② 将盖玻片放在血球计数板的计数池上。
- ③ 用移液枪吸取 10 μL 培养 3 天的藻细胞悬液，滴在盖玻片边缘，使悬液充满盖玻片和计数板之间，注意避免产生气泡。
- ④ 静置 1 分钟，使细胞沉降到计数板上。
- ⑤ 在显微镜下观察，计算计数板左上、左下、右上、右下和中央 5 个中方格（每个中方格包含 16 个小方格，共 80 个小方格）内的细胞数。压线细胞按细胞计数规则记录左侧与上侧。
- ⑥ 计数工作完成后，轻轻取下盖玻片，使用二次水仔细冲洗血球计数板。
- ⑦ 计算细胞数，使用下述公式：

$$\text{细胞数/mL} = 80 \text{ 小格内细胞个数} / 80 \times 400 \times 10^4 \times \text{稀释倍数} \quad (2.1)$$

⑧ 所有样品一式三份进行。

(2) 细胞干重的测定

① 将实验所用的滤纸烘干，并称重记录。

② 取 5 mL 培养至 3 天的藻液离心去上清。

③ 加二次水重悬后离心去上清。

④ 重复上述步骤。

⑤ 抽滤至提前干燥和称重好的滤纸上。

⑥ 放入真空干燥箱干燥 4 小时将细胞内的水分挥发干后进行称重，烘干前后的重量差即为细胞的干重。所有测试一式三份进行。

(3) 虾青素含量的测定

① 称取 20 mg 培养至第 3 天的冻干藻粉于研钵中充分研磨，使藻细胞破壁。

② 利用色谱级丙酮进行萃取，经过充分震荡后，以 10,000 rpm 的速度在 4℃条件下离心 5 分钟，收集藻渣。

③ 再次使用色谱级丙酮对藻渣进行两次萃取，直至藻渣完全变为无色，之后将三次的丙酮萃取液合并。

④ 利用氮吹仪将萃取液吹干，再将色素充分溶解在 1 mL 的色谱级丙酮中。

⑤ 通过 0.45 μm 孔径的有机相过滤膜，将色素过滤至棕色的样品瓶中。

⑥ 将样品放置在配备有 C18 色谱柱的高效液相色谱仪中，对其进行精确分析，并详细记录出峰时间以及峰面积数据。

⑦ 将样品峰面积带入各类胡萝卜素的标准曲线推导出的回归方程中算出样品浓度，继而算出藻粉样品中各类胡萝卜素含量。所有测试一式三份进行。

(4) 脂肪酸含量的测定

① 称取 20 mg 培养至第 3 天的冻干藻粉置于 5 mL 玻璃瓶中，加入 1 mL 甲苯，2 mL 1%硫酸溶于甲醇（v/v，加 0.05% 2,6-二叔丁基-4-甲基苯酚以防脂质氧化），0.5 mL 十七酸（C17:0，0.1 mg/mL 正己烷）混匀后盖上盖子，85℃甲酯化 2.5 小时，期间每隔 30 分钟震荡一次使样品充分甲酯化。

② 冷却后，加 1 mL 0.75% NaCl 溶液混匀，使水层和有机层分开。

③ 加入 2 mL 色谱级正己烷进行萃取，吸取有机相于离心管中。

④ 用氮吹仪吹干有机相。

⑤ 氮吹后加入 1 mL 色谱级正己烷，混匀后用注射器和滤头过滤至进样瓶中。

⑥ 然后在配备 DB-23 毛细管柱 (30 m×0.25 mm×0.25 μm, Agilent, Santa Clara, CA, USA) 的 Agilent 7890 A 气相色谱仪 (GC) 上分析样品，记录出峰时间和峰面积。

⑦ 根据 C17:0 标品的峰面积计算出脂肪酸含量。所有测试一式三份进行。

(5) 数据统计分析

所有实验均严格遵循生物学重复的原则，确保每个实验至少进行三次。为了更准确地展示实验结果，正文中的图表和表格中的数据均以平均值±标准差 (SD) 的形式呈现。使用 IBM SPSS 统计软件可以快速进行双向重复测量方差分析 (ANOVA)，并对实验误差数据进行可视化，以评估各因素之间的交互作用及其对实验结果的影响。采用邦弗朗尼 (Bonferroni) 方法对计算出的 *P* 值进行校正，确保实验结果的准确性和可靠性。

2.3 结果与讨论

2.3.1 不同植物激素对佐夫色球藻生长的影响

虽然已有研究证明植物激素会对微藻的生长产生影响，但具体表现出促进还是抑制取决于微藻种类、所选植物激素、植物激素浓度及培养条件。因此首先查阅文献确定对微藻生长及代谢有影响的植物激素及浓度，通过测定培养 3 天后佐夫色球藻的细胞数及干重，分析所选植物激素对异养佐夫色球藻生长情况的影响。

图 2-1 显示了异养培养 3 天后，各植物激素处理组的细胞数和干重。从图 2-1 a 可以看出，0.01 μM BR、90 μM ABA、10 μM、100 μM DA-6 以及 2.3 μM CK 处理组的细胞数与对照相比明显减少，分别为 2.14×10^7 个/mL、 2.12×10^7 个/mL、 2.01×10^7 个/mL、 1.73×10^7 个/mL 和 2.33×10^7 个/mL，是对照组的 0.77 倍、0.76 倍、0.72 倍、0.62 倍和 0.83 倍，而 500 μM SA 处理组的细胞数与对照相比明显增多，其余植物激素对佐夫色球藻细胞数没有显著影响。而干重与细胞数的变化趋势有所不同，如图 2-1 b 所示，0.01 μM BR、38 μM ABA、45 μM、90 μM IAA、100 μM DA-6 以及 2.3 μM CK 处理组的干重与对照组相比明显减少，分别比对照组低 30.4%、24.4%、25.8%、54.4%、26.3% 和 27.6%，而 100 μM SA 处理组的干重与对照组相比显著增加。综上所述，IAA、高浓度 DA-6 以及较低浓度的 BR、ABA 和 CK 会抑制佐夫色球藻的生长，而 SA 以及 19

μM GA3 对其生长有促进作用, 值得注意的是, 90 μM ABA 处理组细胞数与对照相比明显降低而干重有所增加, 说明该浓度的 ABA 促进佐夫色球藻细胞内含物的积累。

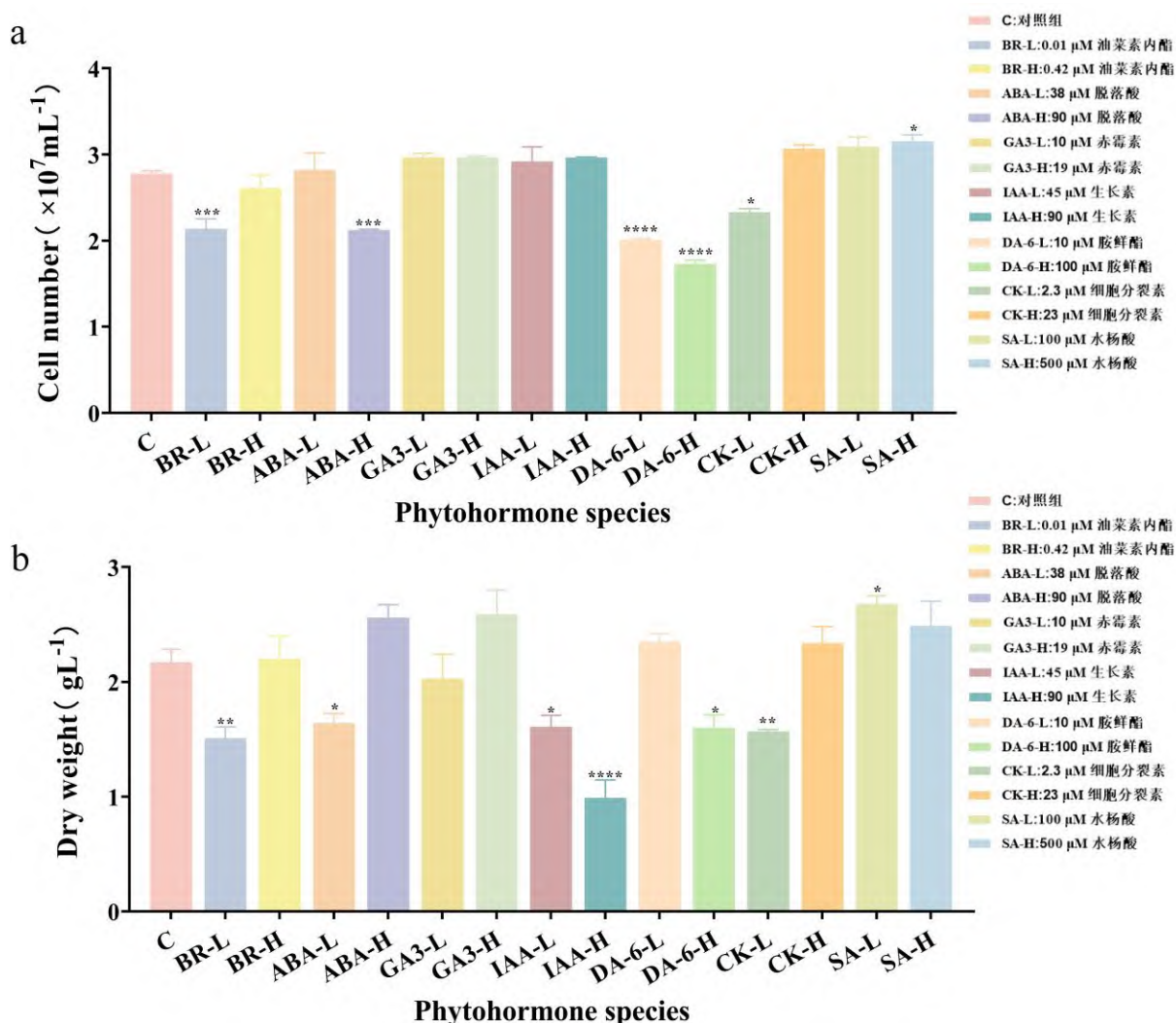


图 2-1 几种植物激素对佐夫色球藻细胞数 (a) 和干重 (b) 的影响

Figure 2-1 Effect of several phytohormones on cell number (a) and dry weight (b) of *Chromochloris zofingiensis*

注: 每个实验进行三个生物学重复, 结果以平均值 $\pm$ SD 表示。数据的统计学意义采用双向重复测量方差分析进行评估; *表示与对照组有显著性差异 ($P \leq 0.05$); **表示与对照组有显著性差异 ($P \leq 0.01$); ***表示与对照组有显著性差异 ($P \leq 0.001$); ****代表与对照组有显著性差异 ($P \leq 0.0001$)。

2.3.2 不同植物激素对佐夫色球藻虾青素含量的影响

佐夫色球藻中的虾青素是一种具有多种生物活性的天然成分, 提高其虾青素含量也是人们致力要解决的问题。关于植物激素对微藻虾青素含量影响的研究已有报道,

但是具体的影响机制和效果因微藻的种类、培养条件等因素而异。

为研究所选的几种植物激素对异养佐夫色球藻细胞虾青素含量的影响，对培养 3 天后各处理组的虾青素含量及产率进行测定，结果如图 2-2 所示。从图 2-2 a 可以看出 SA 能明显促进藻细胞中虾青素的积累，低浓度和高浓度 SA 处理组的虾青素含量分别为对照组的 1.60 倍和 1.56 倍。除高浓度 GA3 处理组的虾青素含量与对照组相比差别不明显外，其余植物激素处理组的虾青素含量均低于对照组。由于各处理组的生长情况不同，因此虾青素产率的变化与含量不同。如图 2-2 b 所示，低浓度和高浓度 SA 以及高浓度 GA3 处理组的虾青素产率与对照组相比明显增多，分别增加 97.2%、79.0%和 15.8%。除高浓度 ABA 和低浓度 GA3 处理组的虾青素产率同处理组差别不明显外，其余处理组的虾青素产率均明显低于对照组。说明不同种及同种不同浓度的植物激素对佐夫色球藻中的虾青素产生不同影响，且更多的植物激素倾向于抑制佐夫色球藻细胞中虾青素的合成，有趣的是，其中外源 SA 的添加不仅有利于虾青素的合成，且使佐夫色球藻更倾向于积累虾青素。

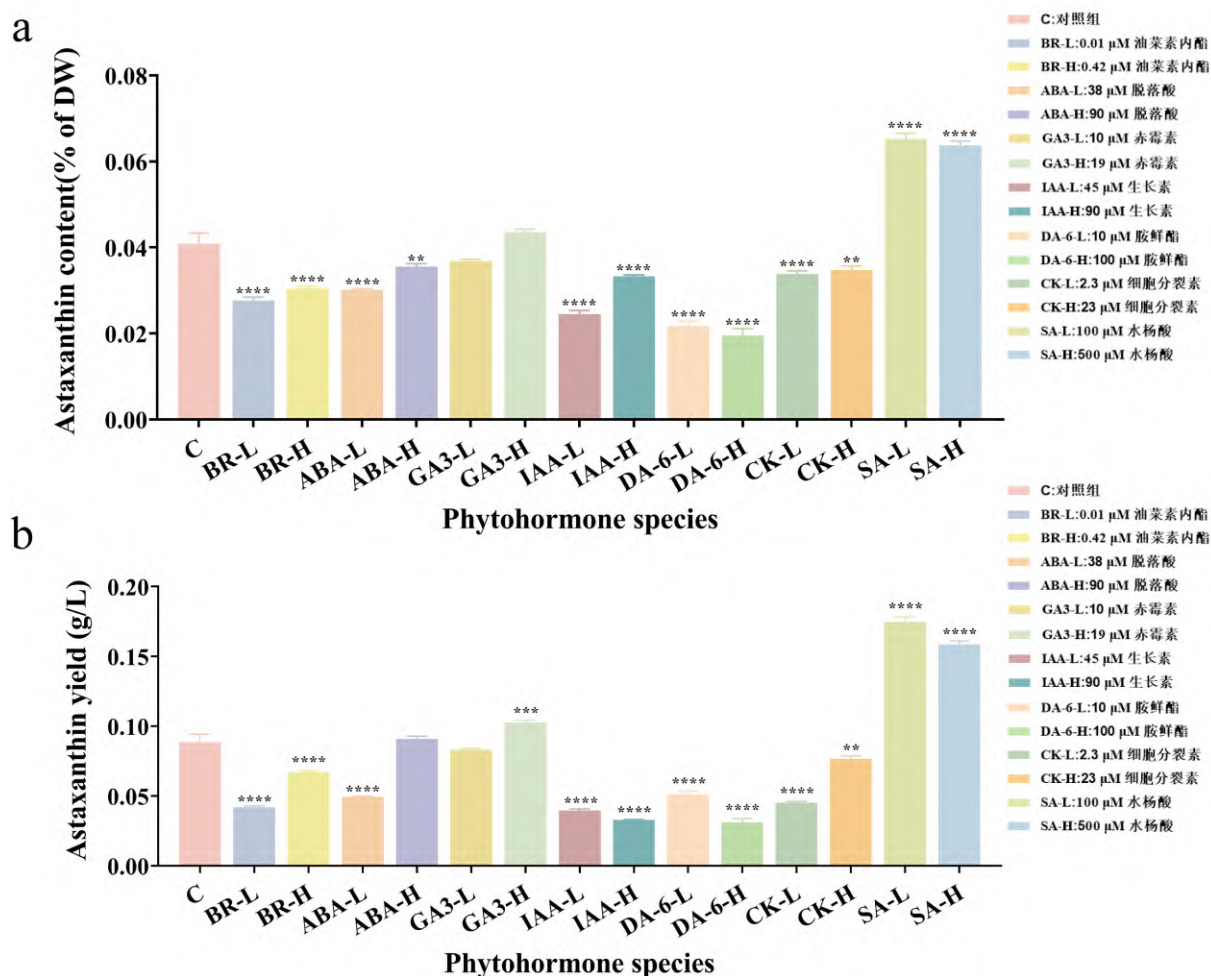


图 2-2 几种植物激素对佐夫色球藻虾青素含量 (a) 和虾青素产率 (b) 的影响
Figure 2-2 Effect of several phytohormones on astaxanthin content (a), and astaxanthin yield (b) of *Chromochloris zofingiensis*

注：每个实验进行三个生物学重复，结果以平均值 $\pm$ SD 表示。数据的统计学意义采用双向重复测量方差分析进行评估；**表示与对照组有显著性差异 ($P \leq 0.01$)；***表示与对照组有显著性差异 ($P \leq 0.001$)；****代表与对照组有显著性差异 ($P \leq 0.0001$)。

2.3.3 不同植物激素对佐夫色球藻脂肪酸含量的影响

佐夫色球藻因为具有同时生产虾青素及脂肪酸的特性而备受关注，因此在寻找促进藻细胞虾青素积累的同时，也关注对其脂肪酸含量的影响，以期找到同时促进两种次级代谢产物积累的最佳方案。所以在测定虾青素含量的同时，对异养培养 3 天后各处理组的脂肪酸含量和产率也进行了测定。

如图 2-3 所示为不同植物激素处理下佐夫色球藻的 TFA 含量以及产率。从图 2-3 a 可以看出 SA 能明显促进佐夫色球藻细胞中 TFA 的积累，0.01 μ M BR 的 TFA 含量为干

重的 16.24%，是对照组的 1.1 倍，对佐夫色球藻细胞中 TFA 的积累也有促进作用，其余植物激素处理组的 TFA 含量与对照相比无明显变化。由于植物激素对佐夫色球藻生长的影响，各植物激素处理组的 TFA 产率变化与含量不同。如图 2-3 b 所示，由于 IAA、高浓度 DA-6 以及较低浓度的 BR、ABA 和 CK 会抑制佐夫色球藻的生长，导致即使 TFA 含量与对照相比变化不明显，但会使 TFA 产率明显降低。虽然 90 μM ABA 和 10 μM DA-6 能显著降低佐夫色球藻细胞数，但由于干重及 TFA 含量均高于对照组，所以导致 TFA 产率增加，TFA 产率分别为 37.87 g/L、36.09 g/L，是对照组的 1.18 倍和 1.13 倍。以上表明，这七种植物激素中除 SA 外，其余植物激素对异养佐夫色球藻中 TFA 的合成没有明显影响，但由于各植物激素对藻细胞生长影响不同，导致各植物激素处理组的 TFA 产率与对照组相比变化明显。值得注意的是，SA 不仅促进佐夫色球藻的生长和 TFA 含量，还会显著增加 TFA 产率。

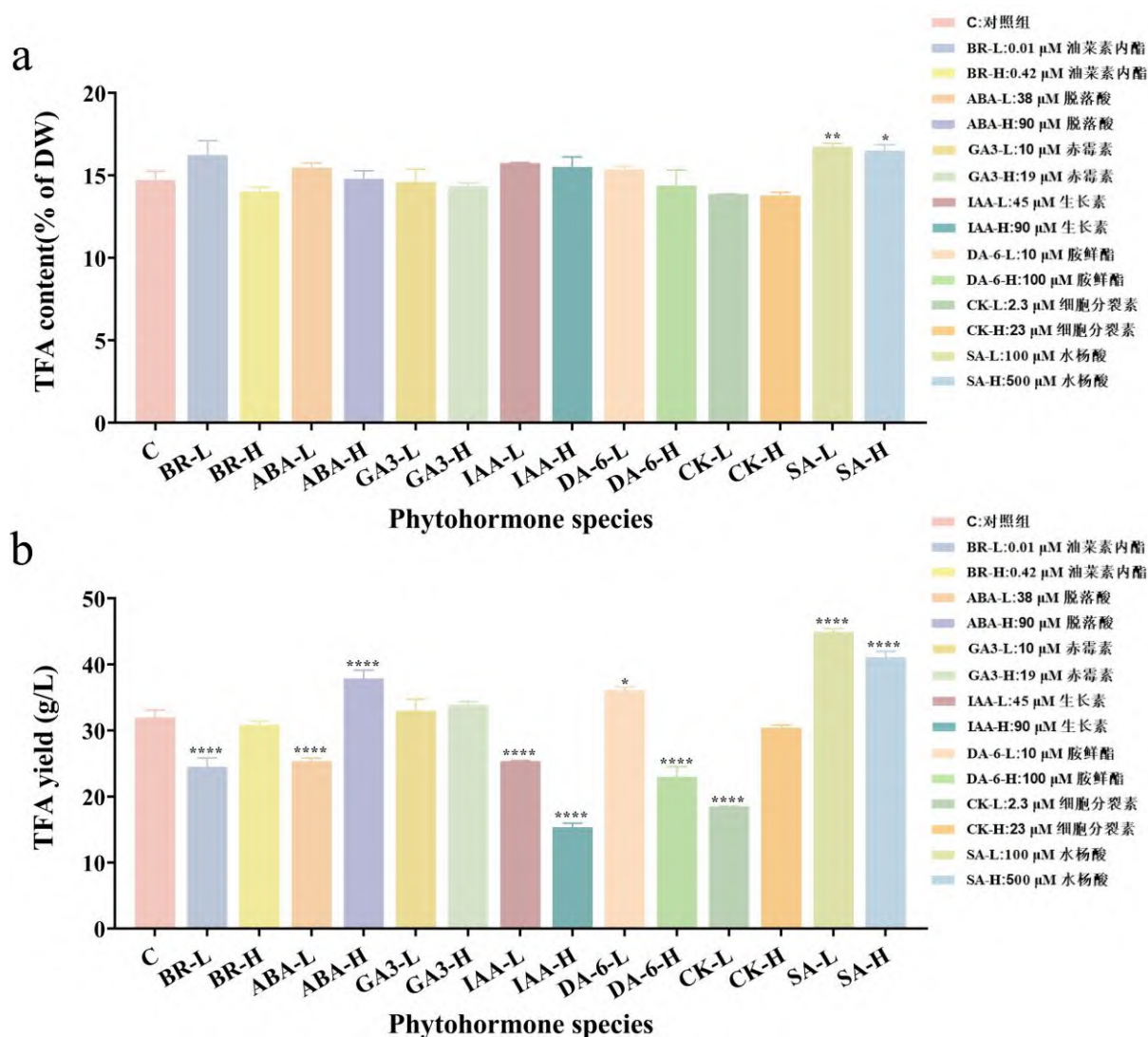


图 2-3 几种植物激素对佐夫色球藻脂肪酸含量 (a) 和脂肪酸产率 (b) 的影响
Figure 2-3 Effect of several phytohormones on TFA content (a), TFA yield (b) of *Chromochloris zofingiensis*

注：每个实验进行三个生物学重复，结果以平均值 $\pm$ SD 表示。数据的统计学意义采用双向重复测量方差分析进行评估；*表示与对照组有显著性差异 ($P \leq 0.05$)；**表示与对照组有显著性差异 ($P \leq 0.01$)；****代表与对照组有显著性差异 ($P \leq 0.0001$)。

2.4 本章小结

本章主要对不同浓度的多种植物激素处理下的异养佐夫色球藻的生化指标进行了测定，包括细胞数、干重、虾青素含量和产率以及脂肪酸含量和产率，以此来筛选促进佐夫色球藻生长和次级代谢产物积累的植物激素。主要结论如下：

(1) 不同植物激素以及同种植物激素的不同浓度对佐夫色球藻的生长、代谢的影

响不同。

(2) 无论是对异养佐夫色球藻生长情况的影响，还是虾青素和脂肪酸积累情况的影响，SA 处理组的效果均最佳。

第三章 外源水杨酸对佐夫色球藻生长及虾青素等次级代谢产物合成的影响

3.1 引言

水杨酸是一种小分子酚类物质，属于新型植物激素，参与植物的开花、光合作用、蒸腾、叶和叶绿体结构的特定变化、离子的吸收与运输等过程^[69]，且在植物的生物与非生物胁迫应答中发挥作用，保护植物免受外界环境的干扰。而 SA 对微藻的研究多是提高微藻在各种非生物胁迫条件下的耐受性及自身抗性，例如，施加外源 SA 可促进低温胁迫下微拟球藻的生长，提高微拟球藻耐高温性能^[70]。目前，关于添加外源 SA 对微藻生长及脂肪酸和虾青素积累情况的研究较少。

本章节对第二章筛选出来的植物激素 SA 进一步研究。为进一步明确 SA 对佐夫色球藻生长以及虾青素与脂肪酸积累的影响，增加 50 μM 和 1,000 μM 两个浓度，但由于 1,000 μM 的 SA 对佐夫色球藻有致死作用，所以后续研究的 SA 浓度为 50 μM 、100 μM 和 500 μM 。通过测定细胞数、干重、活性氧水平、虾青素与脂肪酸的含量来分析不同浓度 SA 对佐夫色球藻生长情况、次级代谢产物积累情况及活性氧水平变化情况的影响。

3.2 材料与方法

3.2.1 藻种获取及培养

藻种来源、培养基及活化步骤同 2.2.1。

将二级种子液按 10% 的比例分别转接至含 50 μM 、100 μM 和 500 μM SA 的 Kuhl 培养基中，每个处理组设置三组平行，25 $^{\circ}\text{C}$ ，150 rpm，避光培养 3 天后，取样测定相关生化指标。

3.2.2 实验试剂与仪器

(1) 实验试剂

本章研究内容所涉及到的实验试剂见表 3-1。

表 3-1 实验所用主要试剂
Table 3-1 Reagents used in the experiment

试剂名称	纯度等级	生产厂家
葡萄糖	分析纯	科密欧

表 3-1 实验所用主要试剂（续）
Table 3-1 Reagents used in the experiment (continued)

试剂名称	纯度等级	生产厂家
硝酸钾	分析纯	科密欧
磷酸二氢钠单水合物	分析纯	科密欧
磷酸氢二钠二水合物	分析纯	福辰化学
七水硫酸镁	分析纯	福辰化学
二水氯化钙	分析纯	福辰化学
七水硫酸亚铁	分析纯	福辰化学
硼酸	分析纯	福辰化学
硫酸锰	分析纯	福辰化学
七水硫酸锌	分析纯	福辰化学
五水硫酸铜	分析纯	Rgent
四水合钼酸铵	分析纯	福辰化学
水杨酸	分析纯	索莱宝
2,7-二氯二氢荧光素二乙酯	分析纯	碧云天
丙酮	色谱纯	科密欧
甲苯	分析纯	科密欧
甲醇	分析纯	科密欧
硫酸	分析纯	大茂
2,6-二叔丁基对甲酚	分析纯	阿拉丁
十七烷酸标品	分析纯	阿拉丁
正己烷	色谱纯	科密欧
氯化钠	分析纯	福辰化学

(2) 实验仪器

本章研究内容所涉及到的实验仪器见表 3-2。

表 3-2 实验所用主要仪器
Table 3-2 Instruments used in the experiment

仪器名称	型号	生产厂家
光学显微镜	ECLIPSE Ei R	尼康
电子天平	CX2200ZH	奥豪斯
分析天平	PR124ZH	奥豪斯
台式离心机	TG16-WS	湘仪
小型冷冻离心机	1-14K	Sigma
涡旋振荡器	SCI-FS	SCILOGEX
磁力加热搅拌器	TP-350E	杭州米欧
pH 计	ST2100	奥豪斯
真空干燥箱	DZF-6050	上海欧莱博
鼓风干燥箱	DHG-9070A	上海一恒
电热恒温水浴锅	HWS-12	上海一恒
真空冷冻干燥机	FD-1A-50	上海比朗
水浴氮吹仪	LC-DCY-12SY	力辰
气相色谱仪	7890A	安捷伦
恒温摇床	ZQZY-CGF8	上海知楚
无菌超净工作台	VS-1300L-U	苏净安泰

表 3-2 实验所用主要仪器（续）
Table 3-2 Instruments used in the experiment (continued)

仪器名称	型号	生产厂家
压力蒸汽灭菌锅	LDZM-80L	上海申安
高效液相色谱仪	E2695	沃特世
多功能酶标仪	Spark	Tecan

3.2.3 分析测定方法

（1）细胞数的测定

实验方法同 2.2.3（1）。

（2）细胞干重的测定

实验方法同 2.2.3（2）。

（3）活性氧水平的测定

① 利用 ROS 测定试剂盒（碧云天，中国）测定细胞中的活性氧水平。

② 分别在 0、12、24 和 72 小时取 1 mL 待测藻液，12,000 rpm 离心 3 分钟收集藻体，去上清。

③ 藻体重悬至 200 μ L 含 10 μ M 2,7-二氯二氢荧光素二乙酯（DCFH-DA）的新鲜 Kuhl 培养基中。

④ 充分混匀后将样品在 25°C 避光孵育 20 分钟，期间每隔 5 分钟震荡一次。

⑤ 随后 12,000 rpm 离心 3 分钟收集藻体。

⑥ 将藻体重悬至 1 mL 新鲜的 Kuhl 培养基中，12,000 rpm，3 分钟，去上清，重复三次。

⑦ 最后将藻体重悬在新鲜的 Kuhl 在培养基中，在 485 nm 激发光下，测定 520 nm 处的吸光值。所有测试一式三份进行。

（4）虾青素含量的测定

实验方法同 2.2.3（3）。

（5）脂肪酸含量的测定

实验方法同 2.2.3（4）。

（6）数据统计分析

数据分析方法同 2.2.3（5）。

3.3 结果与讨论

3.3.1 不同浓度水杨酸对佐夫色球藻生长及活性氧水平的影响

为进一步研究不同浓度 SA 对佐夫色球藻生长情况的影响, 分别测定佐夫色球藻异养培养第 3 天的细胞数和干重。如图 3-1 a 所示, 50-500 μM 的 SA 浓度均可促进佐夫色球藻的生长, 50 μM 、100 μM 和 500 μM 的 SA 处理组细胞数为 2.91×10^7 个/mL、 3.09×10^7 个/mL、 3.15×10^7 个/mL 分别为对照组的 1.05 倍、1.11 倍和 1.17 倍。从细胞数的结果可以看出, 随着 SA 浓度的增加对佐夫色球藻细胞数的促进作用增强。干重与细胞数量的变化趋势不同, 如图 3-1 b 所示, 在 50 μM 、100 μM 和 500 μM SA 处理下, 干重分别为 2.72 g/L、2.68 g/L、2.49 g/L, 比对照组高 25.3%、23.5%、14.7%。表明低浓度 SA 对佐夫色球藻干重的影响高于高浓度。综上所述, 施加外源 SA 会影响佐夫色球藻的生长, 表现出促进作用, 并且低浓度的 SA 处理组更能促进佐夫色球藻细胞内含物的积累。类似的, Czerpak 报道了 100 μM 的 SA 可使自养佐夫色球藻的细胞数在第 12 天增加至对照组的 1.4 倍^[71]。Fu 也报道了 50 $\mu\text{g/L}$ 的 SA 可使绿藻的细胞密度增加大约 25%^[72]。

为研究 SA 对佐夫色球藻活性氧的影响, 分别测定不同浓度 SA 处理组在 0、12、24 和 72 小时的活性氧水平。如图 3-1 c 所示, 12 小时之后, SA 处理组的活性氧水平均低于对照组, 且在 72 小时活性氧水平变化最为明显, 50 μM 、100 μM 和 500 μM SA 处理下的活性氧水平分别比对照组低 52.4%、62.8%、64.8%。已有研究表明, 施加外源 SA 会引起活性氧的水平降低^[73], 这与我们的研究结果一致。表明, SA 不会引起佐夫色球藻细胞氧化损伤, 并且会促进生长。

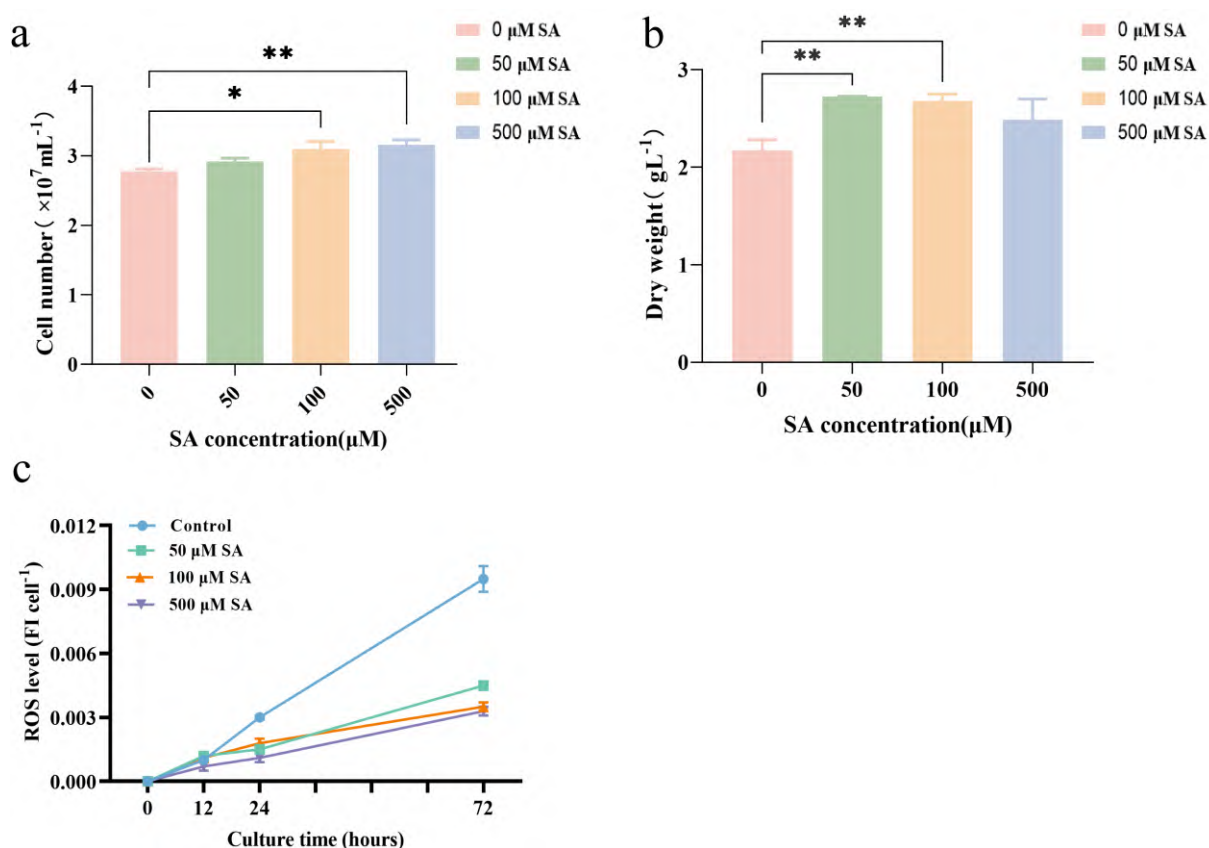


图 3-1 不同浓度水杨酸（50 μM 、100 μM 和 500 μM ）对佐夫色球藻细胞数（a）、干重（b）和活性氧水平（c）的影响

Figure 3-1 The effect of various concentrations (50 μM 、100 μM and 500 μM) of salicylic acid on cell number (a), dry weight (b) and ROS level (c) in *Chromochloris zofingensis*

注：每个实验进行三个生物学重复，结果以平均值 $\pm$ SD 表示。数据的统计学意义采用双向重复测量方差分析进行评估；*表示与对照组相比差异显著（ $P \leq 0.05$ ）；**表示与对照组相比差异显著（ $P \leq 0.01$ ）。

3.3.2 不同浓度水杨酸对佐夫色球藻类胡萝卜素含量的影响

虾青素是类胡萝卜素的一种，属于次级类胡萝卜素，具有更强的抗氧化能力，是类胡萝卜素合成的最终产物之一。为了研究不同浓度 SA 处理下佐夫色球藻虾青素含量变化，对培养至第 3 天的各处理组进行类胡萝卜素含量和产率测定。如图 3-2 a 所示，与对照组相比，施加外源 SA 导致次级类胡萝卜素（包括虾青素和金盏花黄质）含量显著增加，所以使总类胡萝卜素含量明显增加。从图 3-2 b-c 可以看出 50 μM 、100 μM 和 500 μM SA 处理组的虾青素含量及产率均明显高于对照组，其产率分别为 0.151 g/L、0.175 g/L、0.158 g/L，比对照组高 70.5%、97.2%、79.0%。说明 SA 可影响佐夫色球藻细胞中虾青素的积累，并促进虾青素的合成。从图 3-2 a-c 可以看出 50 μM 、100 μM 和

500 μM SA 处理组对类胡萝卜素含量的影响不存在浓度依赖。

与本研究类似,在拟南芥中,SA 可增加类胡萝卜素的含量^[74];并且在雨生红球藻和蛋白核小球藻中施加 SA 均可使类胡萝卜素含量增加^[75,76]。在本研究中,不同浓度的 SA 导致总类胡萝卜素含量总体增加,尤其是次级类胡萝卜素的含量。由于初次类胡萝卜素含量变化不明显,且 β -胡萝卜素是虾青素合成的上游物质,推测 SA 使 β -胡萝卜素倾向于合成虾青素。以往的研究表明,活性氧在虾青素合成中起着至关重要的调节作用。活性氧可促进佐夫色球藻异养细胞和雨生红球藻光自养细胞中虾青素的积累^[77]。然而,在本实验中,SA 引起的活性氧的减少反而促进了虾青素的积累。这说明 SA 对佐夫色球藻虾青素合成的促进作用不受活性氧的调控。

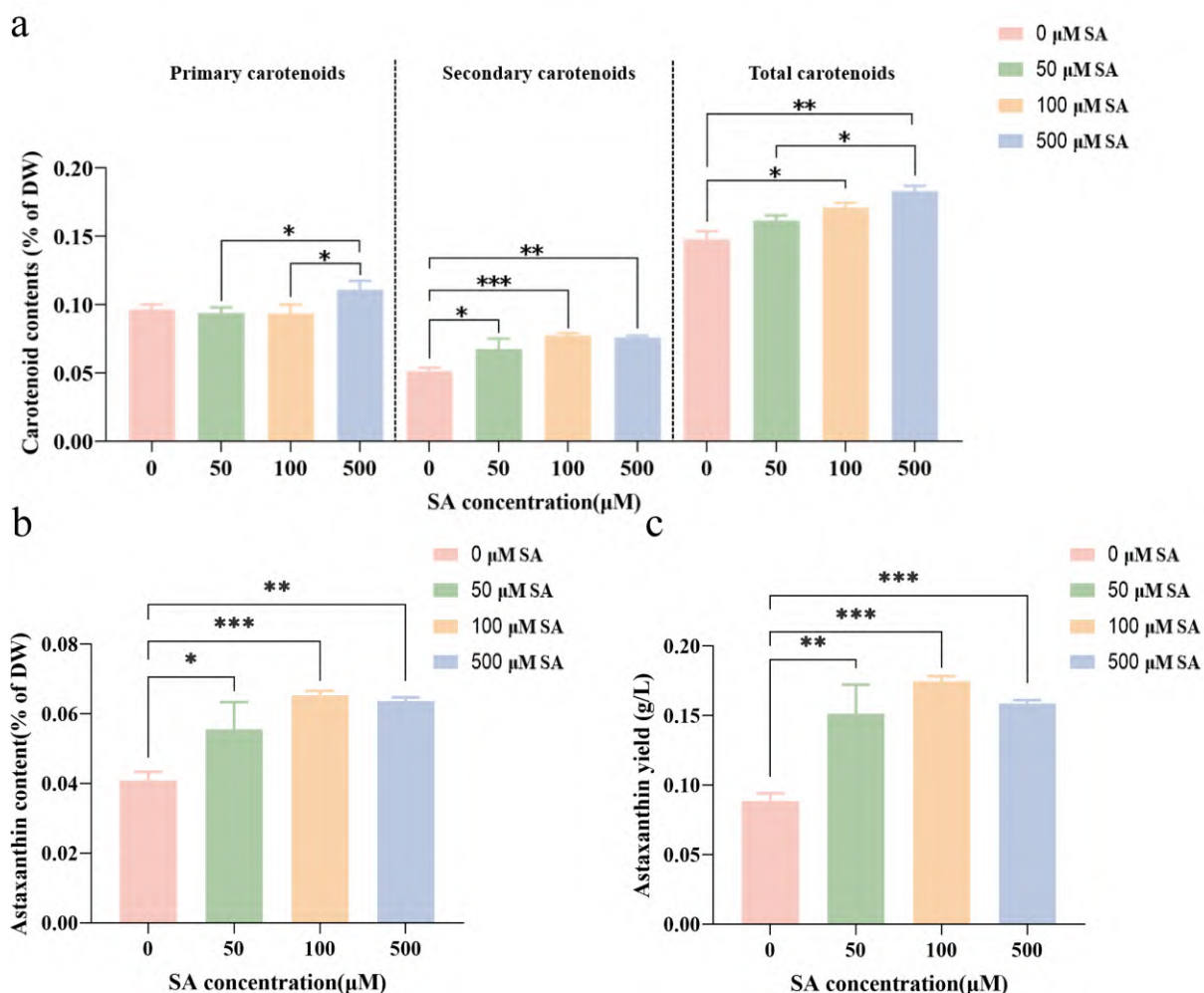


图 3-2 不同浓度水杨酸 (50 μM 、100 μM 和 500 μM) 对佐夫色球藻类胡萝卜素含量 (a)、虾青素含量 (b) 和虾青素产率 (c) 的影响

Figure 3-2 The effect of different concentrations (50 μM , 100 μM and 500 μM) of salicylic acid on carotenoid content (a), astaxanthin content (b) and astaxanthin yield (c) in *Chromochloris zofingiensis*
注：每个实验进行三个生物学重复，结果以平均值 $\pm$ SD 表示。数据的统计学意义采用双向重复测量方差分析进行评估；*表示与对照组有显著差异 ($P \leq 0.05$)；**表示与对照组有显著差异 ($P \leq 0.01$)；***表示与对照组有显著差异 ($P \leq 0.001$)。

3.3.3 不同浓度水杨酸对佐夫色球藻脂肪酸含量的影响

为进一步研究不同浓度 SA 对佐夫色球藻脂肪酸含量的影响，对各 SA 处理组的 TFA 含量和产率进行测定。结果如图 3-3 a 所示，50 μM 、100 μM 和 500 μM SA 处理组的 TFA 含量分别是干重的 16.49%、16.75%、16.51%，是对照组的 1.12 倍、1.14 倍、1.12 倍。说明，50-500 μM 的 SA 均可促进佐夫色球藻细胞中 TFA 的积累，且 100 μM 的 SA 浓度下 TFA 含量最高。TFA 产率与含量变化相似，如图 3-3 b 所示，50 μM 、100 μM 和 500 μM SA 处理组的 TFA 产率分别比对照组增加了 42.9%、43.0%、30.9%。以上结果说明，SA 不仅促进佐夫色球藻细胞中脂肪酸的积累，而且使其更倾向合成脂肪酸，100 μM SA 处理组对脂肪酸合成和积累的促进效果最佳。一些研究表明，通常在胁迫条件下（高光强、高盐度、缺氮等）才会促进微藻脂肪酸的积累，但会导致细胞氧化损伤，不利于微藻的生长，引起脂肪酸积累效率偏低，生产成本较高，例如 Yang 等人的研究表明高盐胁迫会显著增加微藻脂肪酸的积累，但同时也会抑制微藻的生长^[78]。India 等研究表明高温高盐耦合以及缺氮高盐耦合均会使杜氏盐藻总脂含量增加，但造成生物量降低^[79]。与之相反，本实验添加外源 SA 可以在不影响甚至促进佐夫色球藻生长的情况下（如图 3-1）促进脂肪酸的合成和积累。

不同浓度的 SA 处理不仅会影响脂肪酸的积累，还会引起佐夫色球藻脂肪酸谱的变化。如表 3-3 所示，添加外源 SA 能显著提高脂肪酸中 C18:1 的比例，同时显著降低脂肪酸中 C18:3 的比例。当 SA 浓度增加到 500 μM 时，C18:1 在脂肪酸中的含量从 30.11% 增加到 33.04%，而 C18:3 在脂肪酸中的含量则从 12.01% 下降到 10.38%。从饱和脂肪酸（SFAs）、单不饱和脂肪酸（MUFAs）和多不饱和脂肪酸（PUFAs）含量的变化可以看出，当 SA 浓度增加到 500 μM 时，MUFAs 的占比从 30.11% 增加到 33.04%。然而，SFAs 和 PUFAs 的比例略有下降。这表明，SA 主要是通过影响 MUFAs 来促进佐夫色球藻体内脂肪酸的积累。

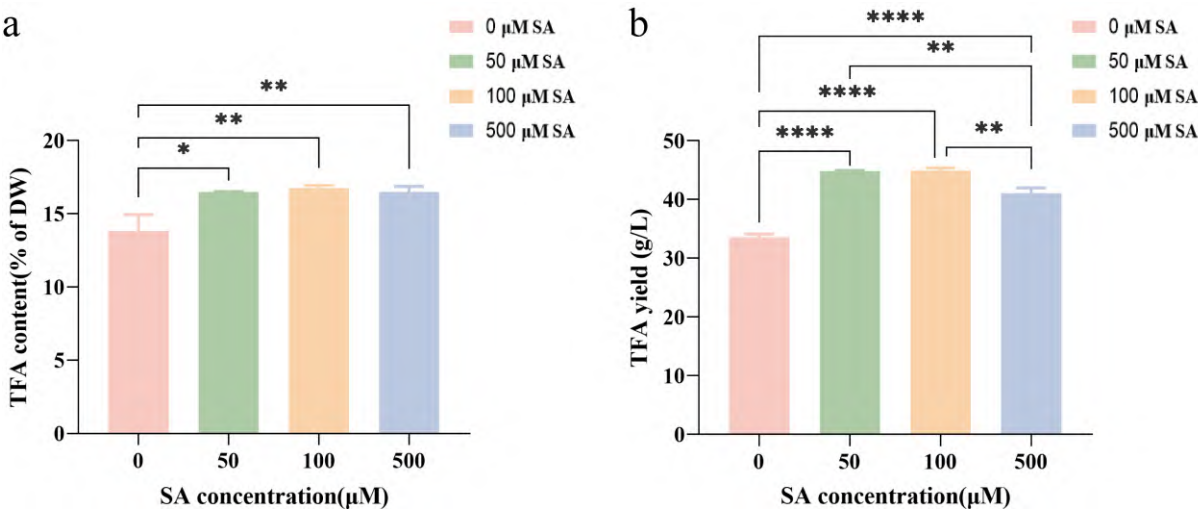


图 3-3 不同浓度水杨酸（50 μM、100 μM 和 500 μM）对佐夫色球藻脂肪酸含量（a）和脂肪酸产率（b）的影响

Figure 3-3 The effect of different concentrations (50 μM, 100 μM and 500 μM) of salicylic acid on TFA content (a) and TFA yield (b) in *Chromochloris zofingiensis*
注：每个实验进行三个生物学重复，结果以平均值 ± SD 表示。数据的统计学意义采用双向重复测量方差分析进行评估；*表示与对照组有显著差异（ $P \leq 0.05$ ）；**表示与对照组有显著差异（ $P \leq 0.01$ ）；****代表与对照组有显著差异（ $P \leq 0.0001$ ）。

表 3-3 不同浓度水杨酸（50 μM、100 μM 和 500 μM）对佐夫色球藻脂肪酸组分（占总脂肪酸（TFA）的百分比）的影响
Table 3-3 The percentage of fatty acid profiles (% of total fatty acid (TFA)) with different concentrations (50 μM, 100 μM and 500 μM) of salicylic acid in *Chromochloris zofingiensis*

Fatty Acid	Control	50 μM SA	100 μM SA	500 μM SA
C16:0	23.56±0.03	22.73±0.14*	22.68±0.06*	22.44±0.30*
C16:3	2.05±0.08	2.28±0.10	2.07±0.07	2.01±0.03
C16:4	2.21±0.08	2.20±0.03	2.18±0.03	2.44±0.06*
C18:1	30.11±0.13	32.61±0.14*	32.82±0.18*	33.04±0.15*
C18:2	28.91±0.12	28.83±0.06	28.89±0.12*	28.92±0.09*
C18:3	12.01±0.13	10.53±0.06*	10.57±0.17*	10.38±0.07*
C18:4	1.16±0.25	0.81±0.03	0.79±0.02	0.78±0.01
SFAs	23.56±0.03	22.73±0.14*	22.68±0.06*	22.44±0.30*
MUFAs	30.11±0.13	32.61±0.14*	32.82±0.18*	33.04±0.15*
PUFAs	46.33±0.16	44.65±0.28	44.50±0.23*	44.52±0.16*

注：表格中 C16:0 为棕榈酸；C16:3 为十六碳三烯酸；C16:4 为十六碳四烯酸；C18:1 为油酸；C18:2 为亚油酸；C18:3 为亚麻酸；C18:4 为十八碳四烯酸；SFAs 表示饱和脂肪酸占总脂肪酸（TFA）比例的总和；MUFAs 表示单不饱和脂肪酸占总脂肪酸（TFA）比例的总和；PUFAs 表示多不饱和脂肪酸占总脂肪酸（TFA）比例的总和。*表示与对照组有明显差异（ $P \leq 0.05$ ）。

3.4 本章小结

本章主要在不同浓度 SA 的培养条件下，测定异养佐夫色球藻的细胞数、干重、虾青素及脂肪酸含量，以进一步探究当 SA 浓度不同时对藻细胞生长及代谢的影响。同时测定了活性氧水平的变化，用来研究 SA 处理下佐夫色球藻的生长和次级代谢产物的积累是否与活性氧水平的变化有关。主要结论如下：

（1）SA 对佐夫色球藻的生长起促进作用，且较低浓度 SA 倾向于促进藻细胞内含物的积累，而较高浓度 SA 倾向于促进细胞分裂。

（2）SA 促进佐夫色球藻虾青素与脂肪酸的合成和积累，且最适 SA 浓度为 100 μM 。

（3）SA 不会引起佐夫色球藻细胞氧化损伤，并且对佐夫色球藻虾青素和脂肪酸合成的促进作用不受活性氧的调控。

第四章 外源水杨酸对佐夫色球藻虾青素积累的转录组学分析及机制

4.1 引言

基因表达的变化直接影响细胞的代谢途径。当某个基因的表达量增加时，它编码的酶或蛋白质也会增加，这可能导致相关代谢产物的增加。反之，如果基因表达减少，相关代谢产物的生成也会减少。转录组分析通过测定特定时间点或条件下细胞或组织中的所有 RNA 分子，揭示基因的表达模式。在转录组学分析中，可识别转录本的数量和类型，揭示基因表达的调控机制，发现新的基因和 RNA 种类，以及研究基因在生物学过程中的功能和调控机制。因此，转录组学分析基因表达的变化为我们提供了窗口，帮助我们理解代谢途径中相关基因调控代谢产物生成的过程，能够更深入地理解细胞的生化过程和机制。

在本章的研究中选用对佐夫色球藻虾青素和脂肪酸含量影响最大的 SA 浓度：100 μM 。处理组分别在培养至 24、48、72 小时取样进行比较转录组分析，阐明 SA 影响佐夫色球藻虾青素和脂肪酸积累的潜在调控机制。

4.2 材料与方法

4.2.1 实验试剂与仪器

(1) 实验试剂

本章研究内容所涉及到的实验试剂见表 4-1。

表 4-1 实验所用主要试剂
Table 4-1 Reagents used in the experiment

试剂名称	等级纯度	生产厂家
RNAiso Plus	分析纯	Takara
氯仿	分析纯	科密欧
无水乙醇	分析纯	福辰化学
DEPC 水	分析纯	赛默飞
琼脂糖	分析纯	索莱宝
异丙醇	分析纯	科密欧
TB Green Premix Ex Taq TM II	分析纯	Takara
PrimeScript TM IV 1st strand cDNA	分析纯	Takara
丙醇	色谱纯	Fisher

表 4-1 实验所用主要试剂（续）

Table 4-1 Reagents used in the experiment (continued)

试剂名称	等级纯度	生产厂家
TAE 缓冲液	分析纯	雷根
GelstainRed™ 核酸染料	分析纯	Uelandy

（2）实验仪器

本章研究内容所涉及到的实验仪器见表 4-2。

表 4-2 实验所用主要仪器

Table 4-2 Instruments used in the experiment

仪器名称	型号	生产厂家
超微量分光光度计	NanoDrop2000	Thermo Fisher Scientific
生物分析仪	Agilent5300	Agilent
PCR 仪	T100 Thermal Cycler	BIO-RAD
测序仪	NovaSeq 6000	Illumina
荧光定量 PCR 仪	CFXTM	Bio-Rad
电泳仪	DYY-7C	北京市六一仪器厂

4.2.2 转录组测序及基因表达分析

（1）总 RNA 提取

① 分别取 50 mL 培养 24、48 和 72 小时的样品离心，用液氮在研钵中迅速将样品研磨至粉末状，然后转移至 1.5 mL 离心管中。

② 室温（15-30℃）下，向样品中加入适量的 RNAiso Plus，静置 5 分钟，在 4℃ 下以 12,000×g 的离心力离心 5 分钟，小心地将上清液转移至新的离心管中。

③ 在上述匀浆裂解液中加入氯仿，其体积为 RNAiso Plus 的 1/5，紧闭离心管盖，充分混合直至溶液变为乳白色。

④ 在室温下静置 5 分钟后，以同样的离心力（12,000×g）和温度（4℃）离心 15 分钟，小心地将上清液转移至另一离心管中。

⑤ 向离心管中的上清液加入异丙醇，其体积为 RNAiso Plus 的 0.5 至 1 倍，随后通过上下颠倒离心管的方式使其充分混合均匀，在室温下静置 10 分钟，以确保溶液充分反应。

⑥ 以 12,000×g 的离心力，在 4℃ 下离心 10 分钟，并小心地倒掉上清液。

⑦ 向离心管中加入与 RNAiso Plus 等体积的 75%乙醇，然后轻轻地通过上下颠倒的方式洗涤离心管的管壁，以确保管壁上的残留物得到有效清洗。

⑧ 在 4℃下, 以 $7,500\times g$ 的离心力离心 5 分钟, 小心地倒掉上清液。

⑨ 打开离心管盖, 让沉淀在室温下自然干燥几分钟, 待沉淀完全干燥后, 加入适量的 RNase-free 水, 使其溶解。

⑩ 利用 Nanodrop2000 和琼脂糖电泳检测所提 RNA 的浓度、纯度及完整性。

(2) cDNA 文库的建立

① 使用带有 Oligo (dT) 的磁珠, 特异性地吸附并分离出带有 PolyA 尾的 mRNA。

② 加入裂解缓冲液使 mRNA 片段化。

③ 在逆转录酶的作用下, 以 mRNA 片段为模板, 反转录合成第一条 cDNA 链。

④ 通过特定步骤合成第二条链, 形成稳定的双链 cDNA 结构。

⑤ 在双链 cDNA 的末端连接上接头, 并经过纯化和片段分选过程, 进一步筛选出合适的片段。

⑥ 对这些分选后的片段进行 PCR 扩增, 并再次进行纯化, 最终得到所需的文库。

(3) 序列比对、差异基因表达分析和功能富集

利用第二代测序技术 Illumina NovaSeq6000 进行上机测序, 首先用 HiSat2 软件将过滤后的数据与佐夫色球藻参考基因组比对, 再将比对后的数据用于转录本组装和表达量计算, 使用 RSEM 软件对基因和转录本的表达水平进行定量分析, 然后利用 DESeq2 软件对数据进行差异表达计算, 当 $DEGseq < 0.001$, 且 $|\log_2FC| \geq 1$ 时, 被视为差异表达基因。此外, 进行 KEGG 和 WGCNA 富集分析, 对差异基因集中所在的功能集、通路集、基因集以及基因和它们之间的关系进行研究。所有测试一式三份进行。

(4) 实时荧光定量 PCR 验证

提取总 RNA, 利用 PrimeScript™ IV 1st strand cDNA 试剂盒 (TaKaRa, Japan) 按照说明进行反转录获得 cDNA。利用 Primer Premier5 软件设计引物。以 cDNA 为模板利用 TB Green Premix Ex Taq™ II 试剂盒 (TaKaRa, Japan) 进行 qPCR 反应。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak 法) 相对定量方法分析基因的表达情况^[80]。

4.3 结果与讨论

4.3.1 转录组测序样本质量检测与分析

为阐明外源 SA 对佐夫色球藻异养培养条件下虾青素和脂肪酸积累的调控机制, 对样品进行转录组分析, 由于 100 μM SA 处理组的虾青素和脂肪酸含量是所有浓度里最

高的，所以分别在 24、48 和 72 小时对 100 μM 的 SA 处理组进行比较转录组分析。通过 RNA-seq 分析，共检测到 14,165 个基因，其中已知基因 13,873 个，新基因 292 个。如图 4-1 a 所示，为验证所有样品三次重复的平行性及不同处理组的差异性进行了主成分分析，主成分分析在平行组表现出高度重复，在实验组表现出明显分离，表明样品平行性良好且不同处理组之间差别明显。总共鉴定 3,505 个差异表达基因 (DEGs)，并且相对于对照组确定了每组中上调和下调的数目 (表 4-3)。其中 72 小时观察到的 DEGs 数量最多 (共 2,962 个基因)，表明细胞代谢发生显著变化，图 4-1 b 的火山图表明 72 小时有 114 个基因明显上调，74 个基因显著下调。为进一步确定引起显著变化的特定代谢途径，进行 KEGG 富集分析。如图 4-1 c 所示，富集了 20 种不同的通路，包括与脂肪酸代谢有关的通路，如脂肪酸伸长、脂肪酸的生物合成和不饱和脂肪酸的生物合成途径；碳和氮代谢相关的通路，如柠檬酸循环、丙酮酸代谢、糖酵解/糖元生成和氮代谢途径；以及氨基酸代谢相关的通路，如色氨酸代谢、酪氨酸代谢、缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸降解以及赖氨酸降解途径。这些途径的富集表明，SA 对佐夫色球藻细胞内蛋白质、脂质和淀粉代谢有显著影响。此外，过氧化物酶体也被富集，这可能与活性氧有关。

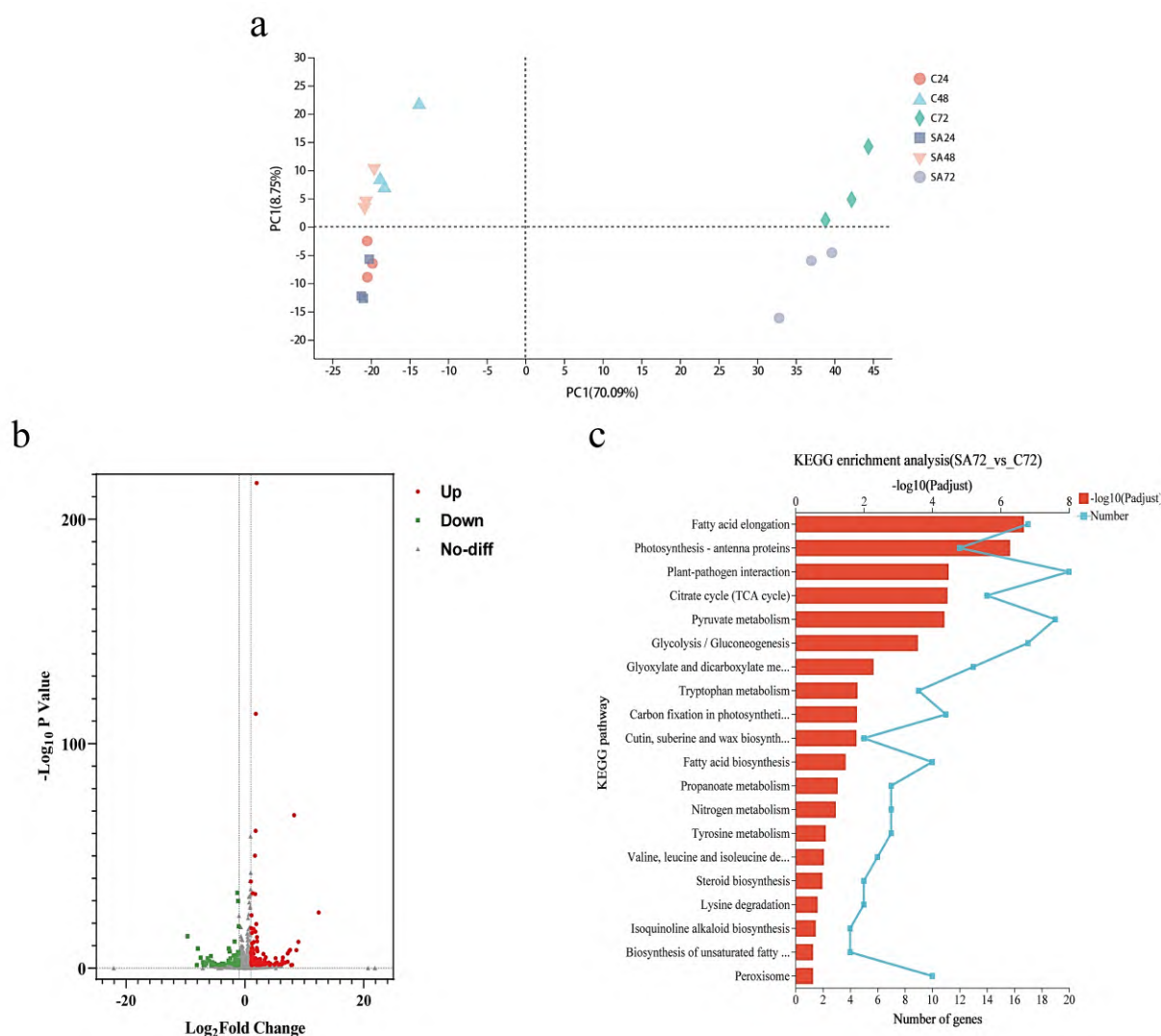


图 4-1 水杨酸处理下的佐夫色球藻主成分分析 (a)、上下调基因的火山图分析 (b) 和 KEGG 富集分析 (c)

Figure 4-1 Principal component analysis (a), volcano plot analysis of up- and down-regulated genes (b) and KEGG enrichment analysis (c) of *Chromochloris zofingiensis* under salicylic acid treatment

注: C24, C48, C72 分别为对照组培养 24、48、72 小时的样本, SA24, SA48, SA72 分别为水杨酸组培养 24、48、72 小时的样本。(b) 图中红色点代表表达量上调的基因, 绿色点代表表达量下调的基因, 灰色点代表表达量无明显变化的基因。

表 4-3 各水杨酸处理组的佐夫色球藻细胞在培养 24、48 和 72 小时后与对照组细胞的差异基因比较
Table 4-3 Differential gene comparison of *Chromochloris zofingiensis* cells from each salicylic acid treatment group with control cells after 24, 48 and 72 hours of culture

Group	Total DEG	Up	Down
SA24_vs_C24	177	111	66
SA48_vs_C48	366	105	261
SA72_vs_C72	2962	1358	1604

注: C24, C48, C72 分别为对照组培养 24、48、72 小时的样本, SA24, SA48, SA72 分别为水杨酸组培养 24、48、72 小时的样本。

4.3.2 虾青素合成途径相关基因表达分析

为研究 SA 是如何影响类胡萝卜素合成的, 在转录水平上进行分析。如图 4-2 所示, 调控虾青素生物合成的基因表达模式是复杂的, 其中从 GGPP 到番茄红素, 从 α -胡萝卜素到叶黄素, 从 β -胡萝卜素到玉米黄质, 从角黄素到虾青素的有关基因表达下调, 而从番茄红素到 α -胡萝卜素和 β -胡萝卜素, 从 β -胡萝卜素到角黄素, 从玉米黄质到虾青素的相关基因表达上调。综上所述, 番茄红素作为初级类胡萝卜素的上游物质, 其生物合成是减少的, 而初级类胡萝卜素到次级类胡萝卜素的通路中, 基因表达既有上调又有下调, 结合初级和次级类胡萝卜素的含量变化, 初次类胡萝卜素含量轻微降低, 而虾青素含量增加, 因此推测 SA 通过调控 BKT 基因的表达, 使 β -胡萝卜素更倾向于合成虾青素, 且通过下调 PSY、PDS 和 ZDS 基因的表达, 减少初级类胡萝卜素的合成。与本研究相反, Gao^{[61]10} 的研究表明添加外源水杨酸会通过上调 PSY、PDS 和 ZDS 基因的表达, 促进雨生红球藻虾青素的合成。可见藻种不同, 水杨酸对虾青素合成途径中相关基因的调控也不同。

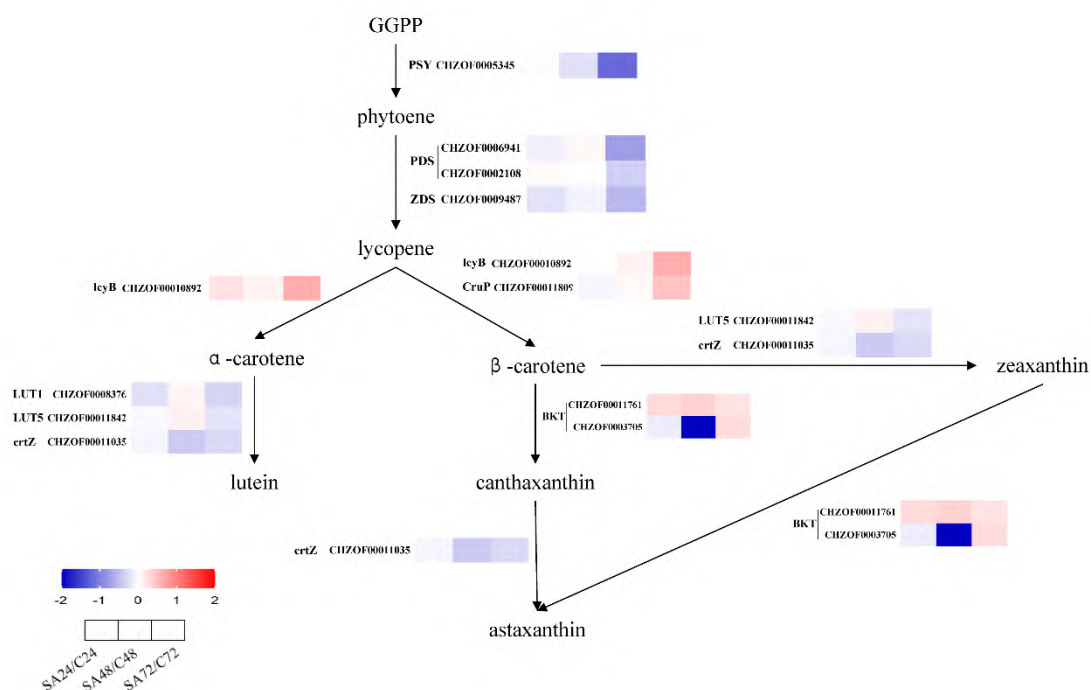


图 4-2 基于转录组分析的佐夫色球藻中参与虾青素合成的基因的表达谱

Figure 4-2 Expression profiles of genes involved in astaxanthin synthesis in *Chromochloris zofingiensis*

based on transcriptomic analyses

注：利用 log2FC 值绘制热图，显示与对照组相比各基因的表达水平，红色表示基因上调，蓝色表示基因下调，*表示与对照组有显著差异， $P \leq 0.05$ 。

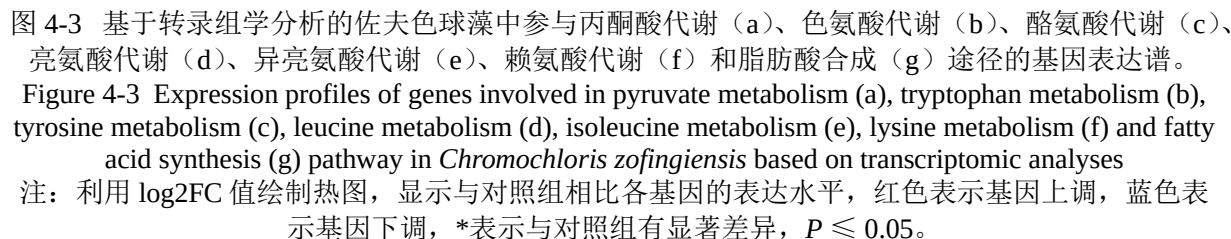
4.3.3 脂肪酸合成途径相关基因表达分析

研究证明，细胞中乙酰辅酶 A 浓度的增加可诱导脂肪酸的积累，因此足够的乙酰辅酶 A 对于佐夫色球藻脂肪酸的合成是重要的^[81]。丙酮酸脱氢酶催化糖酵解产物丙酮酸形成乙酰辅酶 A，从图 4-3 a 中可以看出，几种丙酮酸脱氢酶（PDH）的基因表达在 72 小时大部分上调，与本研究一致，Stao 表明 PDH 在促进莱茵衣藻乙酰辅酶 A 和脂肪酸的积累过程中起关键作用^[82]。

氨基酸是生物体中不可缺少的基本单元，通过氨基酸代谢，生物体可以生成能量、产生废物、合成重要的分子，同时也可以维持细胞内的营养平衡。本研究通过 KEGG 富集到色氨酸、酪氨酸、亮氨酸、异亮氨酸和赖氨酸的分解代谢途径，而这些氨基酸均可通过分解代谢产生乙酰辅酶 A。如图 4-3 b-f 所示，对上述氨基酸分解代谢产生乙酰辅酶 A 途径中涉及到的酶的相关基因表达进行分析。从图中可见相关酶的表达整体上调，其中 72 小时，烯酰基-辅酶 A 水合酶（ECH）、谷草转氨酶（AST）和甲基戊二酰辅酶 A 水合酶（AUH）基因显著上调。ECH 催化巴豆酰-CoA 的水合反应生成（s）-3-羟基丁酰-CoA，然后通过乙酰乙酰-CoA 形成乙酰辅酶 A，在色氨酸、赖氨酸和异亮氨酸的分解代谢过程中起关键作用^[83,84]。AST 作为酪氨酸分解代谢的限速酶，通过催化作用将酪氨酸的氨基部分转移到 α -酮戊二酸上，同时自身发生转变，生成 4-羟苯丙酮酸^[85]。AUH 在亮氨酸降解途径中扮演着至关重要的角色，首先催化 3-甲基戊二酰辅酶 A 发生水化反应，转化为 3-羟基-3-甲基-戊二酰辅酶 A。随后，乙酰-CoA 酰基转移酶进一步参与反应，将上述产物转化为乙酰辅酶 A^[86]。说明 SA 可促进氨基酸分解代谢合成更多的乙酰辅酶 A。

脂肪酸合成始于乙酰辅酶 A，经羧化、酰基转移后生成丙二酰-ACP，以乙酰辅酶 A 和丙二酰-ACP 为底物，在脂肪酸合酶作用下聚合延伸碳链，每延伸一次增加两个碳原子，最终生成 C16 或 C18 脂肪酸。如图 4-3 g 所示，72 小时大多数脂肪酸合成过程中的基因表达均上调，其中 ACCase 和 3-氧代酰基-（酰基载体蛋白）还原酶（fabG）的表达量较高。ACCase 在脂肪酸合成的初始阶段发挥着关键作用，它催化生成丙二酰辅酶 A，这一产物不仅是脂肪酸合成和脂酰链延伸系统等关键代谢反应的基础原料，

还作为脂肪酸合成过程中的限速酶，起到调控整个合成过程的作用。*fabG* 是催化脂肪酸合成中的第一步还原反应的酶，多以 NADPH 为辅酶将 3-酮脂酰 ACP 还原为 3-羟脂酰 ACP，是脂肪酸合成反应中的关键酶。综上所述，表明 SA 是通过调控丙酮酸代谢和氨基酸分解代谢途径中相关酶的表达来促进乙酰辅酶 A 形成，为脂肪酸合成提供足够的前体，且通过促进脂肪酸合成途径中关键酶 ACCase、*fabG* 的表达来进一步促进脂肪酸积累。



4.3.4 抗氧化酶相关基因表达分析

抗氧化酶可将体内过多的活性氧和自由基转化为毒害较低或无毒的物质，以平衡机体内的活性氧含量。超氧化物歧化酶（SOD）是生物体内普遍存在的参与氧代谢的一种含金属酶，广泛分布在微生物、植物和动物体内，主要功能是催化超氧阴离子自由基发生歧化反应，生成氧气和过氧化氢^[87]；过氧化氢酶（CAT）是一种广泛存在于生物体中的酶，主要存在于细胞的过氧化物酶体中，可催化过氧化氢（H₂O₂）分解成氧和水^[88]；谷胱甘肽还原酶（GR）是一种重要的黄素蛋白氧化还原酶，广泛存在于真核和原核生物中，作为谷胱甘肽氧化还原循环的关键酶，在氧化胁迫反应中扮演着清除活性氧的重要角色，对于维持生物体的氧化还原平衡具有关键作用^[89]。为研究活性氧的变化与抗氧化酶的关系，对 SOD、CAT、GR 有关基因的表达进行分析。如图 4-4 所示，几种抗氧化酶的表达绝大部分上调，且与 SOD 表达相关的基因表达量较高，并且在 72 小时显著上调，结合 SA 处理组活性氧水平的变化，表明 SA 通过促进抗氧化酶的表达来调节活性氧水平的，且呈负调控。

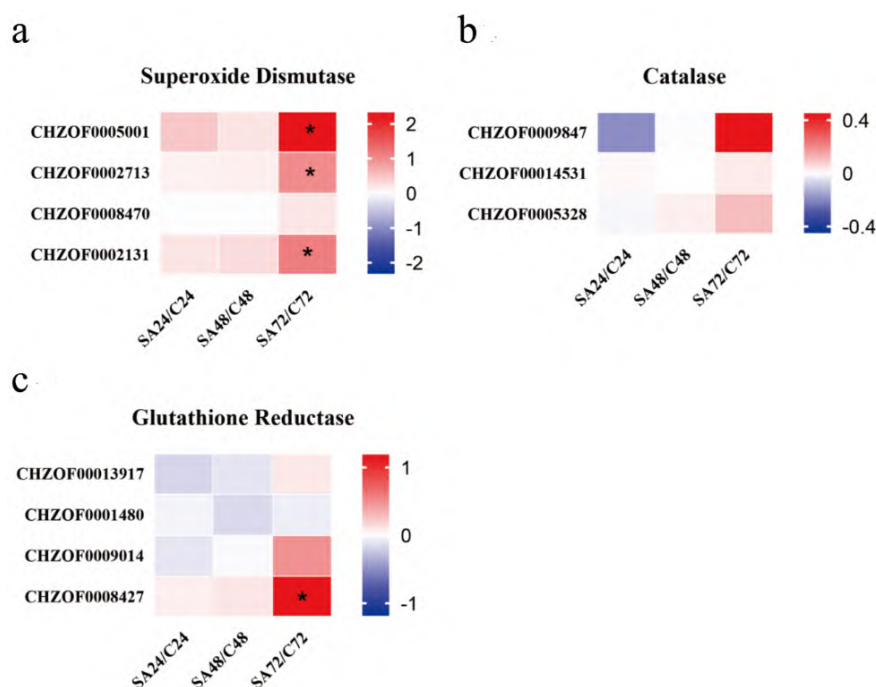


图 4-4 佐夫色球藻抗氧化酶基因的表达谱分析

Figure 4-4 Analysis of the gene expression profiles of antioxidant enzymes in *Chromochloris zofingiensis*

注：利用 log2FC 值绘制热图，显示与对照组相比各基因的表达水平，红色表示基因上调，蓝色表示基因下调，*表示与对照组有显著差异， $P \leq 0.05$ 。

4.3.5 基因共表达网络分析 (WGCNA)

SA 对虾青素和脂质的影响可以通过基因表达的变化来确定,但是还不清楚 SA 通过怎样的途径影响佐夫色球藻细胞中代谢物质的合成。于是进行 WGCNA 分析,该分析通过将具有相似表达模式的基因归并到相应的模块中,进一步探讨这些模块与特定性状或表型之间的相关性。如图 4-5 a 所示,共聚类得到 6 个模块,其中 turquoise 模块所包含的基因数目最多(共 3,346 个),red 模块所包含的基因数目最少(共 135 个)。如图 4-5 b 所示,模块与表型相关性分析显示,红色模块中 SA 处理组与不加 SA 的样品呈正相关,而其他模块没有明显趋势。对红色模块中 135 个基因进行可视化分析,如图 4-5 c 为关联性最强的前 20 个基因,注释到可能与 SA 信号传导相关的 ABC 转运蛋白和 gtf2b-like 转录因子,以及与脂肪酸代谢,氨基酸代谢和抗氧化酶相关的基因。ABC 转运蛋白依赖于 ATP 水解所释放的能量,将物质有效转运至细胞内外,实现跨膜运输的功能,且有研究表明 SA 可快速诱导 ABC 转运蛋白基因的表达,并参与运输^[90]。gtf2b-like 转录因子是 RNA 聚合酶 I 核心因子复合物的组成成分,在转录启动过程中的多个步骤中发挥关键作用。SA 信号传递首先通过 SA 信号传导受体 SA-结合蛋白(SABP)识别并传递 SA 信号,在经转录因子调节下游基因的表达。推测佐夫色球藻中的外源 SA 信号可能通过 ABC 转运蛋白传递到胞内再通过 gtf2b-like 转录因子调节下游基因的表达,但这只是基于组学数据的推测,需要更多的工作来验证。

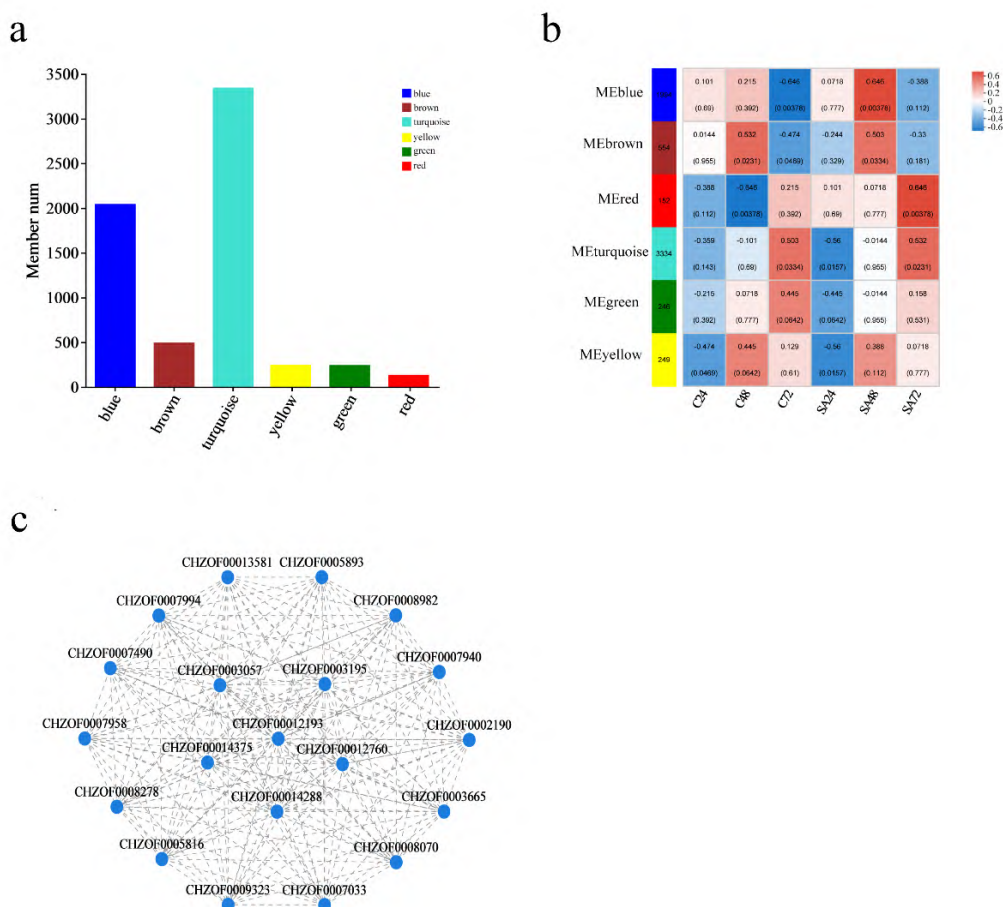


图 4-5 基因共表达网络（WGCNA）具体分析每个聚类模块中的基因数（a）、模块与性状之间的相关性（b）以及可视化分析（c）

Figure 4-5 Gene co-expression network (WGCNA) analysis specifically analysing the number of genes in each clustered module (a), the correlation between the module and the trait (b), and the visualisation analysis (c)

4.3.6 转录因子 PIF 在水杨酸处理后的表达水平变化

由于在高等植物中具有 bHLH 结构域的 PIF 转录因子可直接与虾青素合成途径关键基因 PSY 启动子上的顺式作用元件结合，负调控虾青素的合成^[91]，且佐夫色球藻的虾青素合成途径与高等植物类似，因此为进一步确定佐夫色球藻中虾青素含量变化是否与转录因子 PIF 的表达水平变化有关，对 100 μ M SA 处理后的转录组数据进行深入挖掘。首先利用 PlantTFDB 预测佐夫色球藻基因集中具有 bHLH 结构域的转录因子，如表 4-4 所示，在佐夫色球藻中预测到五个具有 bHLH 结构域的转录因子，其基因 ID 分别为：CHZOF00012691、CHZOF00014080、CHZOF0002856、CHZOF0003441 和

CHZOF0009287。根据基因 ID 在转录组数据中分析经 SA 处理后佐夫色球藻中 PIF 基因的表达水平变化,结果如图 4-6 所示。从图中可以看出几个 PIF 基因的表达整体下调,由于虾青素含量增加,且已有研究证明 PIF 转录因子对类胡萝卜素的合成起负调控作用,所以可以初步推测佐夫色球藻中的转录因子 PIF 可能会影响虾青素的合成,但具体如何发挥作用还需进一步研究。

表 4-4 佐夫色球藻中 bHLH 家族转录因子

Table 4-4 bHLH family transcription factors in *Chromochloris zofingiensis*

转录因子	基因 ID
PIF1	CHZOF00012691
PIF2	CHZOF0003441
PIF3	CHZOF0009287
PIF4	CHZOF0002856
PIF5	CHZOF00014080

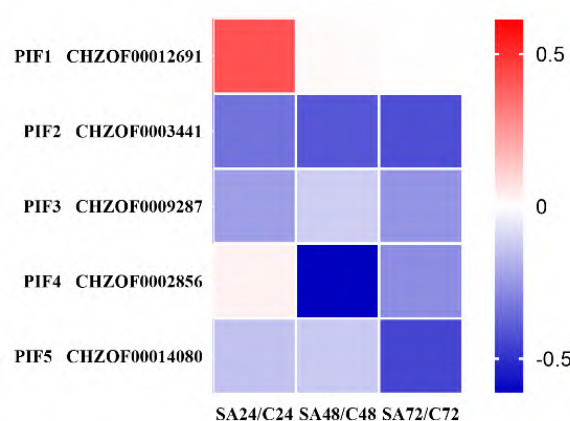


图 4-6 佐夫色球藻中 bHLH 结构域转录因子的表达谱分析

Figure 4-6 Expression profiling of bHLH structural domain transcription factors in *Chromochloris zofingiensis*

注: 利用 $\log_2FC$ 值绘制热图, 显示与对照组相比各基因的表达水平, 红色表示基因上调, 蓝色表示基因下调。

4.3.7 RT-qPCR 验证

为验证转录组数据的可靠性, 随机选取 9 个基因进行 RT-qPCR 验证。这些基因分布于丙酮酸代谢、氨基酸分解代谢、脂肪酸合成以及类胡萝卜素合成等途径中。如图 4-7 所示, 随机选取的 9 个基因的表达水平相对于对照组的变化情况与转录组中变化趋势一致, 因此表明转录组数据的可靠性。

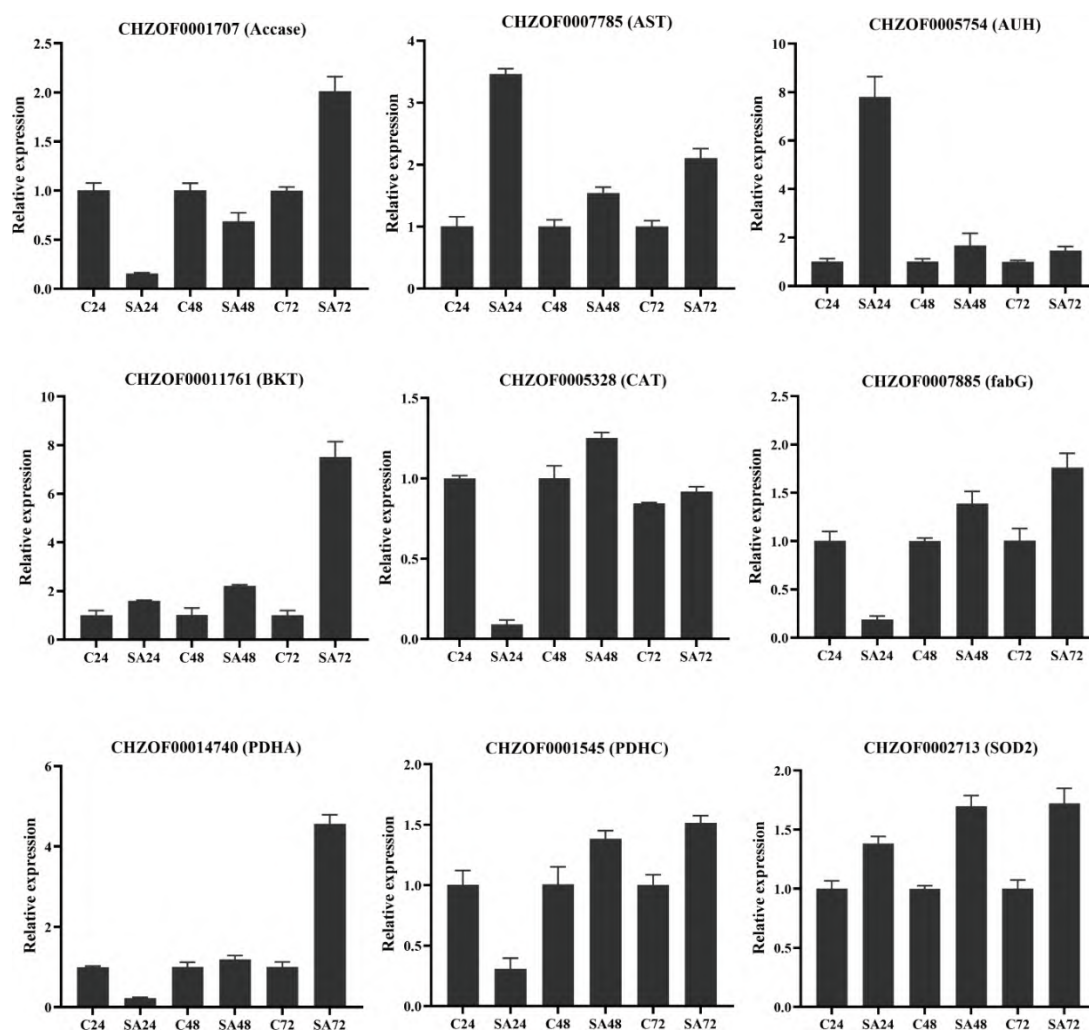


图 4-7 添加水杨酸处理下佐夫色球藻的差异表达基因的 q-PCR 验证

Figure 4-7 q-PCR validation of differentially expressed genes in *Chromochloris zofingiensis* under added salicylic acid treatment

注：每个样本均有三个生物学重复，数据以均数 $\pm$ 标准差 (SD) 表示。Accase：乙酰-CoA 羧化酶；AST：天冬氨酸氨基转移酶；AUH：甲基戊二酰基-CoA 水合酶；BKT： β -胡萝卜素-4-酮醇酶；CAT：过氧化氢酶；fabG：3-氧代酰基-[酰基载体蛋白]还原酶；PDHA：丙酮酸脱氢酶 E1 组份 α 亚基；PDHC：丙酮酸脱氢酶 E2 组份；SOD2：超氧化物歧化酶。

4.4 本章小结

本章在 100 μ M SA 处理下，分别对培养至 24、48 和 72 小时的异养佐夫色球藻进行转录组学分析，通过富集相关代谢途径及分析相关基因的表达水平变化，在基因层面上分析 SA 对佐夫色球藻代谢途径的具体影响。主要结论如下：

(1) SA 通过上调 BKT 的表达，促进 β -胡萝卜素向虾青素的转化。

(2) SA 通过调节代谢途径中相关酶的表达来促进乙酰辅酶 A 的形成, 为脂肪酸合成提供前体, 同时提高关键酶的表达来进一步促进脂肪酸积累。

(3) SA 诱导后, 通过上调抗氧化酶基因的表达, 引起佐夫色球藻活性氧水平的降低。

(4) WGCNA 分析注释到可能与 SA 信号传导相关的 ABC 转运蛋白和 gtf2b-like 转录因子。

(5) 经 SA 诱导后, 佐夫色球藻中具有 bHLH 结构域的 PIF 转录因子表达绝大部分下调, 加之虾青素含量增加, 推测 PIF 转录因子可能是虾青素合成过程中关键调控因子。

第五章 转录因子 PIF 的克隆及功能验证

5.1 引言

转录因子（TF）是一类特殊的蛋白质分子，能够精准地与基因上游的特定序列结合，从而确保目的基因在特定的时间和空间中，以特定的强度进行精确表达。转录因子是基因表达调控的关键元件，通过与特定 DNA 序列的结合直接调控基因转录的起始或者通过与其他蛋白的相互作用，形成转录调控复合物，从而间接调控基因转录。

有研究证明，在高等植物中，PIF 转录因子通过直接与类胡萝卜素合成途径中关键酶的启动子结合来调控基因表达，进而影响类胡萝卜素的合成，例如：VvPIF1 转录因子可直接与葡萄类胡萝卜素合成途径中关键酶 VvPSY1/2 的启动子结合抑制其转录，从而负向调节类胡萝卜素的生物合成^{[91]7,9}。由于佐夫色球藻的类胡萝卜素合成途径与高等植物相似，且在第四章中比较转录组分析表明，SA 诱导佐夫色球藻虾青素积累的同时，具有 bHLH 结构域的 PIF 转录因子表达绝大部分下调，推测转录因子 PIF 在佐夫色球藻类胡萝卜素合成的过程中也会发挥作用，但具体如何发挥作用还有待研究。

为探究 PIF 转录因子在佐夫色球藻中具体的功能，本章对预测出的五个具有 bHLH 结构域的 PIF 转录因子进行克隆，然后对克隆成功的 PIF 基因进行蛋白表达，最后对纯化出来的蛋白进行功能验证。

5.2 材料与方法

5.2.1 实验试剂与仪器

（1）实验试剂

本章研究内容所涉及到的实验试剂见表 5-1。

表 5-1 实验所用主要试剂

Table 5-1 Reagents used in the experiment

试剂名称	等级纯度	生产厂家
RNAiso Plus	分析纯	Takara
氯仿	分析纯	科密欧
无水乙醇	分析纯	福辰化学
DEPC 水	分析纯	赛默飞
琼脂糖	分析纯	索莱宝
异丙醇	分析纯	科密欧
PrimeScript™ RT reagent Kit	分析纯	Takara
Mighty TA-cloning Kit	分析纯	Takara

表 5-1 实验所用主要试剂 (续)

Table 5-1 Reagents used in the experiment (continued)

试剂名称	等级纯度	生产厂家
胶回收试剂盒	分析纯	倍沃医学
质粒小提试剂盒	分析纯	倍沃医学
Flash PCR MasterMix (Dye)	分析纯	康为世纪
DNA Ligation Kit	分析纯	Takara
氨苄青霉素	分析纯	博奥拓达
异丙基- β -D-硫代半乳糖苷	分析纯	赛默飞
5-溴-4-氯-3-吡啶- β -D-半乳糖苷	分析纯	赛默飞
EcoRI 限制性内切酶	分析纯	SibEnzyme
SalI 限制性内切酶	分析纯	SibEnzyme
LB Powder	分析纯	酷来搏
SDS-PAGE 凝胶配置试剂盒	分析纯	碧云天
免脱色考马斯亮蓝	分析纯	万生昊天
蛋白酶抑制剂	分析纯	索莱宝
咪唑	分析纯	碧云天
Tris-Hcl	分析纯	碧云天
氯化钠	分析纯	福辰化学
丙三醇	分析纯	科密欧
β -巯基乙醇	分析纯	索莱宝
G-250	分析纯	索莱宝
磷酸	分析纯	索莱宝
Ni 层析介质	分析纯	博奥龙
Annealing Buffer for DNA Oligos	分析纯	碧云天
化学发光法 EMSA 试剂盒	分析纯	碧云天
TAE 缓冲液	分析纯	雷根
TBE 缓冲液	分析纯	雷根
Tris-甘氨酸电泳缓冲液	分析纯	雷根
Super DNA marker	分析纯	康为世纪
双色预染蛋白 marker	分析纯	雅酶
GelstainRedTM 核酸染料	分析纯	Uelandy

(2) 实验仪器

本章研究内容所涉及到的实验仪器见表 5-2。

表 5-2 实验所用主要仪器

Table 5-2 Instruments used in the experiment

仪器名称	型号	生产厂家
超微量分光光度计	NanoDrop2000	Thermo Fisher Scientific
台式离心机	TG16-WS	湘仪
小型冷冻离心机	1-14K	Sigma
电泳仪	DYY-7C	北京市六一仪器厂
PCR 仪	T100 Thermal Cycler	BIO-RAD
恒温摇床	ZQZY-CGF8	上海知楚
无菌超净工作台	VS-1300L-U	苏净安泰
压力蒸汽灭菌锅	LDZM-80L	上海申安

表 5-2 实验所用主要仪器 (续)

Table 5-2 Instruments used in the experiment (continued)

仪器名称	型号	生产厂家
恒温培养箱	DNP-9082BS-III	新苗
金属浴	MB-1D2	BIOER
照胶仪	WD-9413B	北京市六一仪器厂
超声破碎仪	SN-P900	Skymen
低温超高压细胞破碎仪	JN-10C	JNBIO

5.2.2 基因克隆

(1) 引物设计

利用 Primer Premier5 设计预测出的 5 个 PIF 转录因子的正反向引物。保证 GC 含量在 40-60%，T_m 值在 55-80℃之间，且不会形成发夹结构和引物二聚体。

(2) 提取总 RNA

将 10 mL 微藻种子液接种到 100 mL 加有 5.5 g/L 葡萄糖的 Kuhl 培养基中 (250 mL 锥形瓶)，黑暗条件下，以 150 rpm 的转速摇瓶培养，培养温度为 25℃。经过 4 天的培养，离心收集藻体沉淀，并在液氮保护下将其研磨至粉末状。剩余实验步骤同 4.2.2 (1)。

(3) 反转录

① 按照试剂盒说明书在冰上配置反应体系如图表 5-3:

表 5-3 cDNA 合成反应体系

Table 5-3 Reaction system for cDNA synthesis

试剂	使用量
5 × PrimeScript IV cDNA Synthesis Mix	4 μL
Random 6 mers (50 μM)	≤2 μL
模板 RNA	Total RNA: ≤5 μL
RNase Free dH ₂ O	X μL
Total	20 μL

② 混匀后按照以下条件进行反应:

30℃ 10 分钟

42℃ 10-20 分钟

③ 70℃, 15 分钟使酶失活后, 冰上冷却, 获得 cDNA。

(4) TA 克隆

① 将引物混合并稀释至上下游引物浓度分别为 10 μM。随后用高保真酶扩增目的

基因。PCR 反应体系如表 5-4:

表 5-4 高保真 PCR 反应体系
Table 5-4 High-fidelity PCR reaction system

试剂	使用量
2 × ES Taq MasterMix (Dye)	25 μL
Primer Mix (10 μM)	2 μL
Template DNA	1 μL
ddH ₂ O	Up to 50 μL

② 用 1%琼脂糖凝胶电泳判断基因是否扩增正确。

③ 将目的基因用胶回收试剂盒进行回收，并用 Nanodrop2000 检测浓度。

④ 将上述目的基因进行 T 载体克隆，在微量离心管中配置 DNA 溶液，体系如表 5-5:

表 5-5 T 载体连接体系
Table 5-5 T-carrier linkage systems

试剂	使用量
PMD19-T Vector	1 μL
Insert DNA	0.1 pmol-0.3 pmol
ddH ₂ O	Up to 5 μL

加入等量连接液，于 16℃反应 30 分钟，随后加入至 100 μL DH5α 感受态细胞中，冰中放置 30 分钟后于 42℃加热 45 秒后再在冰中放置 1 分钟。向其中加入 445 μL 无菌 LB 培养基，37℃，200 rpm 振荡培养 60 分钟。最后在含有 x-gal，IPTG，Amp 的 LB 平板上涂板过夜培养，形成单菌落，计数白色，蓝色菌落，并挑选白色进行菌落 PCR 实验。

⑤ 菌落 PCR 检测目的基因是否转入大肠杆菌细胞。体系如表 5-6:

表 5-6 菌落 PCR 体系
Table 5-6 Colony PCR system

试剂	使用量
2 × Flash PCR MasterMix (Dye)	25 μL
Primer Mix (10 μM)	2 μL
Template DNA	2 μL
ddH ₂ O	Up to 50 μL

⑥ 用 1%琼脂糖凝胶电泳判断基因是否扩增正确。

⑦ 取成功的样品于含有 1 μM Amp 的 5 mL LB 培养基中过夜振荡培养，随后用质粒试剂盒提取质粒，最后将质粒送去公司测序。

5.2.3 表达载体构建

(1) 双酶切及胶回收

实验表达载体选用带有 His 和 GST 标签的 pGEX-H-6t-1 质粒, 将表达载体与连接有目的基因的 T 载体分别用 EcoRI 和 SalI 酶进行双酶切实验。将表达载体与目的基因用胶回收试剂盒进行回收, 并用 Nanodrop2000 检测浓度。

(2) 连接转化

将目的基因与表达载体进行连接转化实验。在 1.5 mL EP 管中加入表达载体 1 μ L 与目的基因 4 μ L, 并向上述 DNA 溶液加入 5 μ L 等体积的 Ligation Mix, 充分混匀。将上述体系于 16 $^{\circ}$ C 反应 30 分钟, 随后加入 100 μ L DH5 α 感受态细胞, 冰中放置 30 分钟后于 42 $^{\circ}$ C 加热 45 秒后再在冰中放置 1 分钟。向其中加入 445 μ L LB 培养基, 37 $^{\circ}$ C, 200 rpm 振荡培养 60 分钟后, 在含有 Amp 抗性的 LB 平板上涂板, 过夜培养, 形成单菌落。

(3) 菌落 PCR 验证

菌落 PCR 检测目的基因是否转入大肠杆菌细胞, 用 1% 琼脂糖凝胶电泳判断基因是否扩增正确。步骤同 5.2.2- (4) -⑤。

(4) 质粒提取及送测

取成功的样品于含有 1 μ M Amp 的 5 mL LB 培养基中过夜振荡培养, 随后用质粒试剂盒提取质粒。最后将质粒送去公司测序, 保留比对结果为 100% 的质粒。

5.2.4 蛋白表达及纯化

(1) 转化

- ① 取 2 μ L 重组表达载体加入至 100 μ L BL21 感受态细胞中, 冰浴 30 分钟。
- ② 42 $^{\circ}$ C 加热 45 秒后, 冰中放置 1 分钟。
- ③ 加入 445 μ L 无菌 LB 培养基, 37 $^{\circ}$ C, 200 rpm 振荡培养 60 分钟。
- ④ 用涂布器将样品涂布于含 Amp 抗性的 LB 平板上。
- ⑤ 37 $^{\circ}$ C 倒置培养 12 小时。

(2) 菌落 PCR 验证

实验步骤同 5.2.2- (4) -⑤。

(3) 异丙基- β -D-硫代半乳糖苷 (IPTG) 诱导

- ① 取验证成功的样品于含有 1 μ M Amp 的 5 mL LB 培养基中过夜振荡培养。
- ② 以 1%接种量将 2 mL 菌液于 37°C 扩大培养约 3 小时后达到对数期。
- ③ 于 16°C 摇床中 80 rpm 转速降温 1 小时。
- ④ 培养物用 IPTG 进行诱导：(10 mL 培养物+10 μ L IPTG (1M)，终浓度为 1 mM)，16°C，160 rpm 过夜诱导。

(4) SDS-PAGE 凝胶电泳

- ① 将培养物分别转移至 1.5 mL 离心管中，于 4°C，12,000 rpm 下离心 2 分钟。
- ② 去上清，收集细胞沉淀，加入 60 μ L ddH₂O，重悬。
- ③ 在样品中加入 1/4 体积的蛋白上样缓冲液，混匀。
- ④ 将混合物用沸水浴加热 5-10 分钟，加热结束后，高速离心 5 分钟，上清用于电泳分析。

⑤ SDS-PAGE 凝胶 (1mm) 配置如下表 5-7:

表 5-7 SDS-PAGE 凝胶配置表
Table 5-7 SDS-PAGE gel configurations table

试剂 (下层胶)	使用量	试剂 (上层胶)	使用量
下层胶溶液	2.7 mL	上层胶溶液	0.75 mL
下层胶缓冲液	2.7 mL	上层胶缓冲液	0.75 mL
改良型促凝剂	60 μ L	改良型促凝剂	15 μ L

- ⑥ 取 10 μ L 上清点样，120 V 电泳 45 分钟。
 - ⑦ 切断电源，剥离凝胶至免脱色的考马斯亮蓝染液中染色 15 分钟，观察结果。
- #### (5) 镍柱层析纯化
- ① 取保存的蛋白表达成功的菌种 1 mL 接种到 100 mL LB 培养基 (含 Amp 抗性) 中，37°C 过夜培养。
 - ② 接种大体系 (10 mL 接种 1 L)，37°C，180 rpm 培养 2.5 至 3.5 小时。
 - ③ 于 16°C 摇床中 80 rpm 转速降温 1 小时，每瓶加入 1 mL IPTG (1M)，16°C，160 rpm 过夜培养 19 小时。

- ④ 5,000 rpm，4°C 离心 8 分钟，加入 50 mL 重悬 Buffer 进行重悬。
- ⑤ 预冷，向样品中加入蛋白酶抑制剂，随后液压破碎。
- ⑥ 超声破碎 (1 L 用 30% 功率，超声 3s 停 6s 共计 5 分钟)，超声后取样为 CE，与 Loading Buffer 混合。

- ⑦ 破碎细胞后于 14,000 rpm, 45 分钟, 4°C 条件下离心, 离心后取上清为 S。
- ⑧ 平衡 Ni 柱, 用重悬缓冲液清洗 Ni 柱后将样品与 Ni 柱混匀, 孵育 30 分钟。
- ⑨ 将样品流通 Ni 柱, 取样为 F, 用 W0 洗脱液清洗 Ni 柱, 至万能染液不变蓝, 取样 W0。
- ⑩ 用不同咪唑浓度洗脱液洗脱蛋白, 至万能染液不变蓝, 取样 W20, W50, W70, W100。最后用 EL 洗脱蛋白取样 EL。所有样品 100°C 加热 10 分钟后于 1,200 rpm 离心 5 分钟, SDS-PAGE 电泳。

5.2.5 功能验证

(1) EMSA 凝胶配置

- ① 按照表 5-8 配方配制 20 mL 4% 的聚丙烯酰胺凝胶。

表 5-8 EMSA 凝胶配置表
Table 5-8 EMSA gel configuration table

试剂	使用量
TBE buffer(10X)	1 mL
重蒸水	16.2 mL
39:1 acrylamide/bisacrylamide(40%,w/v)	2 mL
80% 甘油	625 μ L
10%过硫酸铵(ammonium persulfate)	150 μ L
TEMED	10 μ L

- ② 按上述顺序逐一添加所需试剂, 在添加 TEMED 之前, 确保所有试剂已充分混合均匀, 一旦加入 TEMED, 立即再次进行混合, 然后, 迅速且平稳地将混合液倒入制胶模具中, 避免产生气泡, 轻轻放置梳齿。

(2) EMSA 结合反应

- ① 如表 5-9 设置 EMSA 结合反应:

表 5-9 EMSA 结合反应配置表
Table 5-9 EMSA binding reaction configuration table

试剂 (对照组)	使用量	试剂 (突变组)	使用量	试剂 (实验组)	使用量
Nuclease-Free Water	7 μ L	Nuclease-Free Water	7 μ L	Nuclease-Free Water	5 μ L
EMSA/Gel-Shift 结合缓冲液(5X)	2 μ L	EMSA/Gel-Shift 结合缓冲液(5X)	2 μ L	EMSA/Gel-Shift 结合缓冲液(5X)	2 μ L
细胞核蛋白或纯化的转录因子	0 μ L	细胞核蛋白或纯化的转录因子	0 μ L	细胞核蛋白或纯化的转录因子	2 μ L
标记好的探针	1 μ L	标记好的突变探针	1 μ L	标记好的探针	1 μ L
总体积	10 μ L	总体积	10 μ L	总体积	10 μ L

- ② 按照规定的顺序添加所需的试剂。在添加已标记的探针之前, 确保所有试剂已

完全混合均匀，并在室温（20-25℃）下静置 10 分钟。之后，加入已标记的探针，再次混合均匀，并在相同的室温下继续静置 20 分钟。

③ 加入 1 μL 的 EMSA/Gel-Shift 上样缓冲液（该缓冲液为无色，且浓度为 $10\times$ ），迅速混合均匀后，立即进行上样操作。

（3）电泳

① 使用 $0.5\times\text{TBE}$ 作为电泳液。在预电泳阶段，以每厘米 10 V 的电压进行，持续时间为 10 分钟。

② 将和上样缓冲液混合均匀的样品小心地加入至上样孔内。

③ 以每厘米 10 V 的电压开始正式的电泳过程。在整个电泳过程中，需要密切关注凝胶的温度，确保不超过 30℃。如果观察到温度上升，应适当降低电压以维持适宜的温度。当 EMSA/Gel-Shift 上样缓冲液中的蓝色染料溴酚蓝迁移至凝胶下缘的 1/4 处时，即可停止电泳。

（4）转膜

① 选取一张与 EMSA 胶大小相近或稍大的尼龙膜，剪角作标记。随后，用 $0.5\times\text{TBE}$ 溶液浸泡该尼龙膜，确保浸泡时间不少于 10 分钟。在整个操作过程中，使用镊子轻夹尼龙膜的边角，确保不接触到样品的区域，以保持样品的完整性。

② 选取两张与尼龙膜大小相近或略大的滤纸，并将其完全浸入 $0.5\times\text{TBE}$ 溶液中，使其充分浸湿。

③ 将充分浸泡过的尼龙膜小心放置在一张已浸湿的滤纸上，同时避免尼龙膜与滤纸之间产生气泡，以确保两者之间的贴合度。

④ 谨慎地取出 EMSA 胶，并将其平稳地放置在准备好的尼龙膜上。在此过程中，要确保胶与膜之间不产生任何气泡。

⑤ 小心地将另一张充分浸湿的滤纸平铺在 EMSA 胶上，确保滤纸与胶之间没有任何气泡产生。

⑥ 运用 Western 实验中常用的湿法电转膜技术，选用 $0.5\times\text{TBE}$ 作为转膜介质，以有效转移 EMSA 胶上的探针、蛋白及其复合物至尼龙膜。在电转过程中，设定电流为 380 mA（相当于约 100 V 的电压），并控制转膜时间在 30 至 60 分钟之间。

⑦ 转膜结束后，小心地将尼龙膜取出，并确保样品面朝上放置。接着，将尼龙膜

轻轻平铺在干燥的滤纸上，仔细吸去膜下表面明显的液体。吸取液体后，立刻进行交联操作，防止尼龙膜过度干燥。

（5）交联

使用超净工作台内的紫外灯，距离膜 5-10 厘米左右照射 3-15 分钟。

（6）化学发光法检测生物素标记的探针

① 为有效溶解封闭液和洗涤液，需将其置于 37-50℃的水浴中进行加热。随后，选取一个合适的容器，向其中加入 15 mL 的封闭液，将经过交联处理的含有样品的尼龙膜轻轻放入该容器中。将容器置于水平摇床上，以适中的速度缓慢摇动 15 分钟。

② 在尼龙膜封闭完成后，将原有封闭液倒掉，取 7.5 μ L 的 Streptavidin-HRP Conjugate，加入到 15 mL 新制备的封闭液中，进行 1:2000 的稀释。将稀释后的混合液充分搅拌均匀后，置于水平摇床上，以适中的速度缓慢摇动 15 分钟。

③ 取 25 mL 的 5 倍浓度洗涤液，加入 100 mL 的二次水。将两者充分混合均匀，以配制成总量为 125 mL 的洗涤液。

④ 小心地将尼龙膜转移到另一个装有 15 至 20 mL 的洗涤液的容器中，对尼龙膜进行 1 分钟的漂洗。

⑤ 将洗涤液倒掉，再次加入 15 至 20 mL 的洗涤液。将尼龙膜置于水平摇床上，以缓慢的速度进行洗涤，每次洗涤时间约为 5 分钟。此洗涤步骤需重复四次，确保尼龙膜得到充分的清洗。

⑥ 小心地将尼龙膜转移到另一个容器中，该容器内装有 20 至 25 mL 的检测平衡液。随后，将尼龙膜置于水平摇床上，低速摇动 5 分钟。

⑦ 取 5 mL 的 BeyoECL Moon A 液，加入同等量的 BeyoECL Moon B 液，并充分搅拌使其混合均匀，得到 BeyoECL Moon 工作液。

⑧ 取出尼龙膜，并使用吸水纸轻轻吸去其表面多余的液体，确保膜的样品面朝上，将其平稳地放置在洁净的容器内。

⑨ 在尼龙膜表面均匀地加入步骤⑦中配制好的 BeyoECL Moon 工作液，总量共 10 mL，确保工作液完全覆盖尼龙膜。随后，在室温下静置 1 至 2 分钟。

⑩ 用 WB 化学发光成像仪检测。

5.3 结果与讨论

5.3.1 佐夫色球藻 PIF 基因序列与蛋白序列信息

五个转录因子 PIF1、PIF2、PIF3、PIF4 和 PIF5 的基因编码区分别包含 882、1,410、1,188、1,167 和 1,998 个核苷酸，这些核苷酸按照遗传密码子的规则，分别编码了 293、469、395、388 和 665 个氨基酸。基于氨基酸序列的分子量计算，五个 PIF 转录因子的预测分子量分别约为 32.16、49.8、42.4、40.95 和 69 千道尔顿（kDa）。除了分子量外，蛋白质的等电点（pI）也是其物理性质的重要参数。五个 PIF 转录因子的等电点分别为 5.10、5.36、6.01、7.96 和 6.41，这意味着当 pH 在与等电点相同的环境中，这些蛋白质不带净电荷，这对于理解其在细胞内的稳定性和互作特性具有重要意义。

为深入了解五个 PIF 转录因子的功能和结构特点，利用 NCBI（National Center for Biotechnology Information）的 Conserved Domain 工具对其进行保守结构域分析。分析结果如图 5-1 所示，五个 PIF 转录因子同预测结果相同均具有典型的 bHLH 结构域，bHLH 结构域是许多转录因子中常见的结构特征，它参与 DNA 结合和蛋白质间的相互作用，对于 PIF 转录因子在信号转导中的功能至关重要。除此之外，PIF2 和 PIF3 转录因子还具有 ACT（Armadillo/ β -catenin-like repeats）结构域，ACT 结构域通常与蛋白质间的相互作用和稳定性有关，这表明 PIF2 和 PIF3 可能通过 ACT 结构域与其他蛋白质形成复合物，共同调控佐夫色球藻的代谢过程。

综上所述，五个 PIF 转录因子基因编码的蛋白质具有特定的分子量和等电点，并通过 bHLH 或 ACT 两个保守结构域发挥其在信号转导中的关键作用。这些结构特征为深入研究 PIF 的功能和调控机制提供了重要线索。

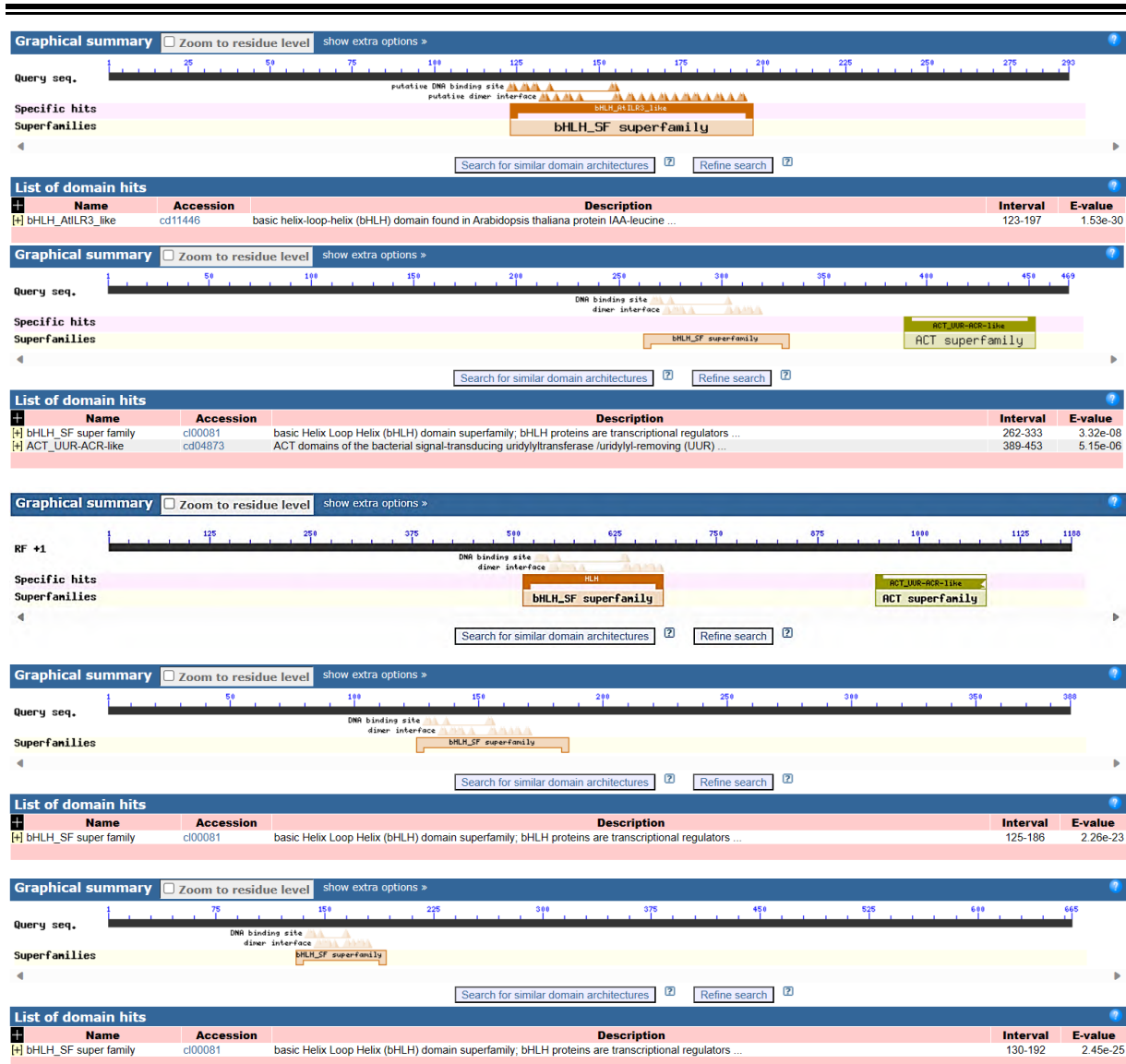


图 5-1 PIF 转录因子氨基酸保守结构域分析

Figure 5-1 Analysis of amino acid conserved structural domains of PIF transcription factors

5.3.2 PIF 基因克隆

通过 Trizo 法提取佐夫色球藻的总 RNA 后，利用 1%琼脂糖凝胶电泳对提取的 RNA 样品的质量进行检测。结果如图 5-2 a 所示，28S 和 18S 的条带清晰可辨，且 28S 的亮度是 18S 的 1.5 倍，这符合高质量 RNA 的特征。同时，通过 Nanodrop2000 检测，A260/A280 的比值约为 2，进一步证实 RNA 的纯净度和完整性，用于后续的反转录反应。

接下来，从佐夫色球藻的转录组数据库中获取这五个 PIF 基因的完整开放阅读框

(ORF) 序列。基于这些序列, 利用 Primer Premier5 设计特异性扩增引物, 并以反转录得到的佐夫色球藻 cDNA 为模板, 通过 PCR 扩增技术进行目的基因的扩增。如图 5-2 b 电泳检测结果显示, 在大约 1,000-2,000 bp 的位置观察到特异性条带, 这与我们预期的目的基因大小相符。

为验证扩增结果的准确性, 对扩增后的序列进行切胶回收、连接 pMD19-T 载体并送测序的步骤。通过 NCBI 的 BLAST 比对分析, 发现只有 PIF3 测序所得序列与转录组数据库中的序列完全一致, 这证明成功克隆得到了 PIF3 转录因子。

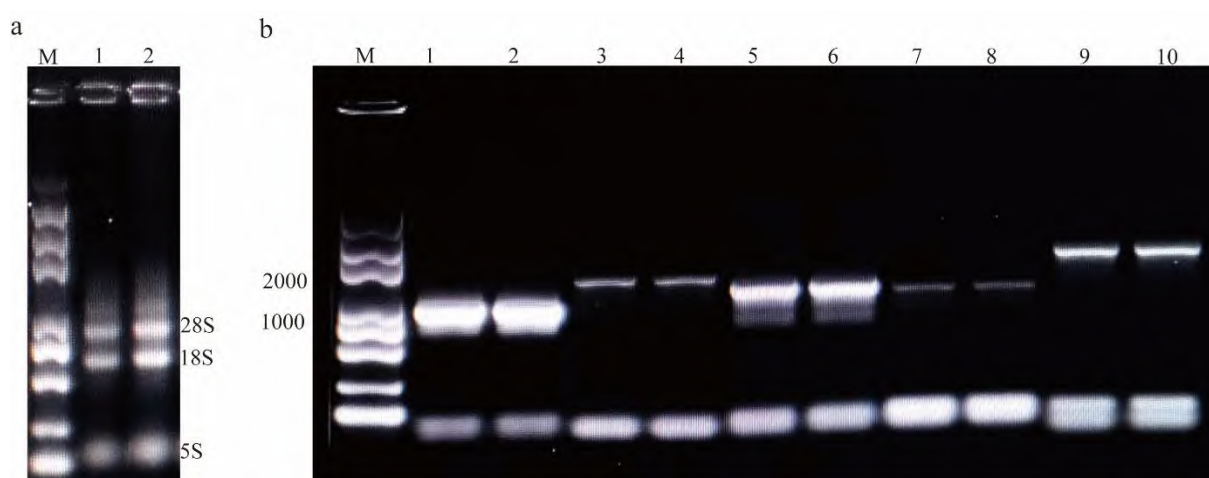


图 5-2 佐夫色球藻 RNA 提取 (a) 及 PIF 基因的 PCR 扩增结果 (b) 图

Figure 5-2 Graph of *Chromochloris zofingiensis* RNA extraction (a) and PCR amplification results of PIF3 gene (b)

注: a 图中各泳道分别代表: M: D2000 Plus DNA marker; 1、2: 佐夫色球藻的 RNA 提取结果, b 图中各泳道分别代表: M: D2000 Plus DNA marker; 1、2: PIF1 基因; 3、4: PIF2 基因; 5、6: PIF3 基因; 7、8: PIF4 基因; 9、10: PIF5 基因。

5.3.3 重组表达载体构建、PIF3 蛋白表达及纯化

对克隆成功的 PIF3 基因进行重组表达载体构建, 利用限制性内切酶 Sal I 和 EcoR I 双酶切重组原核克隆载体 pMD19-T/PIF3 以及原核表达载体 pGEX-H-6t-1 (如图 5-3 a), 将目标片段连接到 pGEX-H-6t-1 后构建原核表达载体 pGEX-H-6t-1/PIF3, 转化大肠杆菌感受态细胞 DH5 α , 经菌落 PCR 检测, 在 1,000 左右发现明亮的特异条带 (如图 5-3 b), 从对应的扩大培养菌液中提取质粒送测, 采用 BLAST 将测序结果与模板序列比对后发现大小一致, 证明 pGEX-H-6t-1/PIF3 表达载体构建成功。

将构建成功的重组表达载体 pGEX-H-6t-1/PIF3 转入大肠杆菌 BL21, 经终浓度 1 mM 的 IPTG 诱导后。取诱导前后样品进行 SDS-PAGE 检测, 结果如图 5-3 c 所示, 含有标签的蛋白分子量在 68 kDa 左右, 与预测的重组蛋白大小一致, 说明 PIF3 蛋白表达成功。

构建原核重组表达载体时所用的 pGEX-H-6t-1 具有 His 标签, 因此可以利用镍柱进行亲和纯化, 高效分离出带有 His 标签的目标蛋白。镍柱中的氯化镍可以与带有 His 标签的蛋白结合, 当样品加载到柱子上时, 带有组氨酸标签的蛋白能够特异地与镍填料结合, 由于咪唑也可与镍结合, 因此, 在实验过程中采用咪唑洗脱液梯度洗脱的方式来去除杂蛋白, 再利用高浓度的咪唑来洗脱目标蛋白, 从而确保其纯度。

PIF3 完成诱导表达后, 收集大肠杆菌菌液并进行低温液压和超声破碎处理, 得到的上清进行镍柱层析纯化, 从图 5-3 c 可以看出目的蛋白在 70 mM、100 mM 和 250 mM 的咪唑缓冲液下洗脱下来, 且条带单一, 证明洗脱纯度较好, 收集洗脱液并低温浓缩得到较高浓度的 PIF3 蛋白, 为后续的实验提供较高质量的样品。

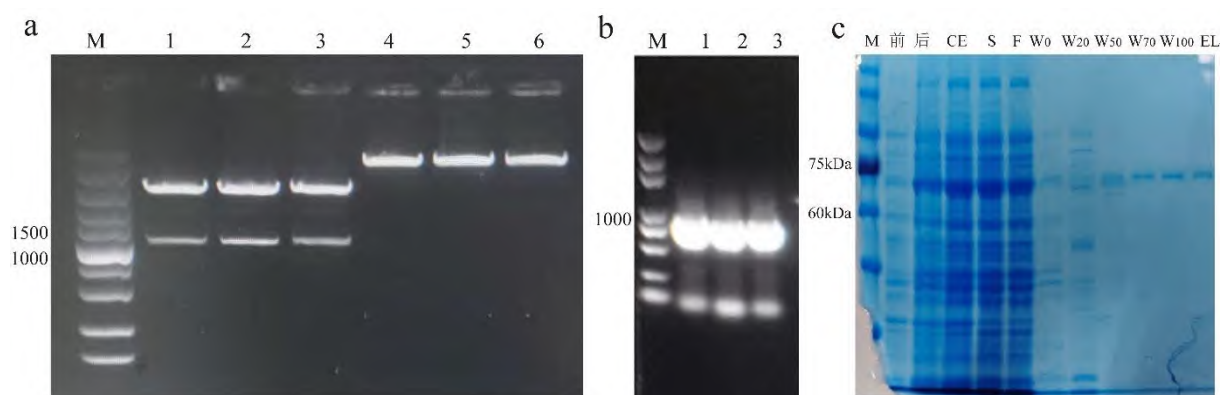


图 5-3 重组原核克隆载体 pMD19-T/PIF3 和原核表达载体 pGEX-H-6t-1 双酶切 (a)、菌落 PCR 扩增结果 (b) 和诱导 PIF3 蛋白表达及纯化的 SDS-PAGE 图 (c)

Figure 5-3 Recombinant prokaryotic cloning vector pMD19-T/PIF3 and prokaryotic expression vector pGEX-H-6t-1 double digestion (a), colony PCR amplification results (b) and SDS-PAGE plots of induced PIF3 protein expression and purification (c)

注: a 图中各泳道分别代表: M: super DNA marker; 1、2、3: 重组原核克隆载体 pMD19-T/PIF3; 4、5、6: 原核表达载体 pGEX-H-6t-1, b 图中各泳道分别代表: M: D2000 Plus DNA marker; 1、2、3: PIF3 基因, c 图中各泳道分别代表: M: 蛋白 marker; 前: IPTG 诱导前; 后: IPTG 诱导后; CE: 超声破碎后全蛋白; S: 离心后上清; F: 挂住后流脱的蛋白; W0: 0 mM 咪唑缓冲液洗脱下的蛋白; W20: 20 mM 咪唑缓冲液洗脱下的蛋白; W50: 50 mM 咪唑缓冲液洗脱下的蛋白; W70: 70 mM 咪唑缓冲液洗脱下的蛋白; W100: 100 mM 咪唑缓冲液洗脱下的蛋白; EL: 250 mM 咪唑缓冲液洗脱下的蛋白。

5.3.4 凝胶迁移率实验证明 PIF3 与 G-box 结合

研究表明,拟南芥中 PIF 可直接与类胡萝卜素合成通路关键基因 PSY 启动子上的 G-box 元件结合从而抑制其表达^[67]。为验证佐夫色球藻中的 PIF3 是否具有相似的功能,利用凝胶迁移率实验进行体外功能验证。凝胶迁移率实验是一种研究蛋白质和 DNA 序列相互结合的技术,当蛋白质与末端标记的核酸探针结合后,在聚丙烯酰胺凝胶电泳中,这种复合物比未结合蛋白质的探针电泳速度要慢,表现为相对滞后。通过比较电泳结果,可以判断特定蛋白是否和特定序列结合。

在佐夫色球藻基因集中利用 KEGG 找到虾青素合成途径中 PSY 的基因 ID,根据基因 ID 获得基因序列,再利用生信手段获得 PSY 启动子序列的前 2,000 bp,进而设计含 G-box 序列(TTCCGGTCTGCAGCACGTGTTGCTGCAAGC)的探针以及含 G-box 突变序列(TTCCGGTCTGCAGATTAGCTTGCTGCAAGC)的突变探针,分别与纯化好的 PIF3 蛋白进行孵育。若蛋白能与 DNA 结合,在凝胶迁移过程中的迁移率会低于游离的探针。如图 5-4 所示,在实验组泳道中可明显的看到迁移较慢的 PIF3 与含有 G-box 序列探针的结合条带和迁移较快的游离探针,而对照组和突变探针组均只能观察到游离探针条带,且实验组的游离探针条带的大小明显小于对照组和突变探针组,进一步说明 PIF3 蛋白可与 G-box 结合。初步验证了佐夫色球藻中的 PIF3 转录因子可直接与顺式作用原件 G-box 结合来调控相关基因的表达。

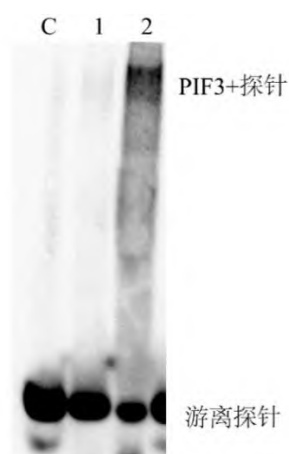


图 5-4 PIF3 转录因子与顺式作用元件结合的凝胶迁移率实验验证

Figure 5-4 Experimental validation of gel mobility of PIF3 transcription factors bound to cis-acting elements

注: C: 只加蛋白的对照组; 1: 蛋白和突变探针组; 2: 蛋白和探针组。

5.4 本章小结

本章通过对佐夫色球藻中的 PIF 基因进行克隆、蛋白表达、蛋白纯化及凝胶迁移率实验以了解 PIF 转录因子及其功能，为在基因水平上直接调控虾青素的合成提供依据及参考。主要结论如下：

- （1）利用 TA 克隆成功克隆出佐夫色球藻中的 PIF3 转录因子。
- （2）重组表达蛋白带有 His 标签，利用镍柱亲和层析纯化得到分子量为 42.4 kDa 的 PIF3 蛋白。
- （3）凝胶迁移率实验证明佐夫色球藻中的转录因子 PIF3 会和 PSY 的启动子上的 G-box 序列结合，说明佐夫色球藻中含有 bHLH 结构域的 PIF3 转录因子同高等植物一样会通过直接与顺式作用元件相结合而发挥作用。

第六章 结论与展望

6.1 结论

本研究探究了植物激素及相关转录因子对异养佐夫色球藻虾青素积累的调控机制，主要结论如下：

（1）水杨酸（SA）可在降低异养佐夫色球藻胞内 ROS 水平的同时促进生长及虾青素的积累。

（2）SA 通过促进 BKT 基因的表达和下调 PSY、PDS 和 ZDS 基因的表达来减少初级类胡萝卜素的合成使 β -胡萝卜素更倾向于合成虾青素。同时 SA 会通过促进脂肪酸及前体合成途径中相关基因的表达，来调控佐夫色球藻脂肪酸的合成

（3）佐夫色球藻共有 5 个 bHLH 家族转录因子，其中 4 个在 SA 处理组中明显下调。

（4）PIF3 转录因子可在体外直接与虾青素合成途径中 PSY 启动子上的顺式作用元件 G-box 结合，是潜在的虾青素合成的关键调控基因。

综上所述，我们的研究解析了植物激素及相关转录因子对异养佐夫色球藻虾青素积累的调控机制，为虾青素的生物合成提供理论基础和改造靶点。

6.2 创新点

本研究的创新点如下：

（1）常用的通过非生物胁迫促进佐夫色球藻虾青素积累的方式，通常会引起氧化损伤，影响细胞生长和目标产物产率，为了突破这一弊端发现植物激素可避免非生物胁迫对生物体造成的危害。研究发现 SA 可促进异养佐夫色球藻生长和虾青素积累，且降低活性氧的水平，为异养佐夫色球藻生产虾青素提供了新的方法。这不仅可以提高生产效率，降低成本，还有助于实现可持续发展。

（2）本研究对佐夫色球藻的 PIF3 转录因子进行功能验证，结果表明其同高等植物中 PIF 转录因子具有相似的功能，即可直接与虾青素合成途径中关键基因启动子上的顺式作用元件结合来调控基因表达，进而影响虾青素合成。

6.3 展望

本文聚焦于佐夫色球藻这一研究材料，致力于探索促进异养佐夫色球藻虾青素积累的新方法。通过深入研究，为提升异养佐夫色球藻虾青素积累提供了新的视角和见解。然而，必须指出的是，本课题仍存在一些局限性和不足之处，这需要进一步开展研究，以完善和优化现有的发现与结论。

(1) 本研究结果揭示，外源 SA 能够有效促进异养佐夫色球藻的生长，并显著增加虾青素等次级代谢产物的积累，同时避免氧化应激的产生。基于这一重要发现，有望进一步优化培养条件，实现更高效的生产。值得一提的是，SA 能够降低佐夫色球藻的活性氧水平，这为 SA 与非生物胁迫条件相结合提供了可能性。未来，将深入探究 SA 与非生物胁迫的耦合效应对佐夫色球藻细胞生长和虾青素积累的影响，期望在异养佐夫色球藻的培养和虾青素生产中取得更大的突破。

(2) 本研究成功地克隆了 PIF3 转录因子，并通过体外实验验证了其功能。实验结果显示，PIF3 能够与顺式作用元件 G-box 结合，进而调控相关基因的表达。然而，这仅仅是体外实验的结果，为了更全面、深入地了解 PIF3 在佐夫色球藻中的实际作用，还需要进一步构建含有 PIF3 敲减的突变体。通过这一步骤，有望获得具有高产虾青素特性的突变株，从而为虾青素的生产提供新的思路和方法。

参考文献

- [1] Bjerkeng B., Peisker M., Von Schwanzenberg K., et al. Digestibility and muscle retention of astaxanthin in Atlantic salmon, *Salmo salar*, fed diets with the red yeast *Phaffia rhodozyma* in comparison with synthetic formulated astaxanthin [J]. Aquaculture, 2007, 269(1-4): 476-489.
- [2] 孙协军, 赵爽, 李秀霞, 等. 虾青素的研究进展 [J]. 食品与发酵科技, 2015, 51(5):5.
- [3] Grewe C., Menge S., Griehl C. Enantioselective separation of all-E-astaxanthin and its determination in microbial sources.[J]. Journal of Chromatography A, 2007, 1166(1-2): 97-100.
- [4] Wang C., Armstrong D. W., Chang C. D. Rapid baseline separation of enantiomers and a mesoform of all-trans-astaxanthin, 13-cis-astaxanthin, adonirubin, and adonixanthin in standards and commercial supplements [J]. Journal of Chromatography A, 2008, 1194(2): 172-177.
- [5] Turujman S. A., Wamer W. G., Wei R. R., et al. Rapid liquid chromatographic method to distinguish wild salmon from aquacultured salmon fed synthetic astaxanthin [J]. Journal of Aoac International, 1997, 80(3): 622-632.
- [6] Olaizola M. Commercial production of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis* using 25,000-liter outdoor photobioreactors [J]. Journal of Applied Phycology, 2000, 12(3/5): 499-506.
- [7] Naguib Y M A. Antioxidant activities of astaxanthin and related carotenoids [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2000, 48(4): 1150-1154.
- [8] Guerin M., Huntley M. E., Olaizola M. *Haematococcus* astaxanthin: Applications for human health and nutrition [J]. Trends in Biotechnology, 2003, 21(5): 210-216.
- [9] Terazawa S., Nakajima H., Shingo M., et al. Astaxanthin attenuates the UVB - induced secretion of prostaglandin E 2 and interleukin - 8 in human keratinocytes by interrupting MSK1 phosphorylation in a ROS depletion - independent manner [J]. Experimental Dermatology, 2012, 21(s1): 11-17.
- [10] Dutta S., Kumar S P. J., Banerjee R. A comprehensive review on astaxanthin sources, structure, biochemistry and applications in the cosmetic industry [J]. Algal Research, 2023, 74: 103168.
- [11] Jyonouchi H., Hill R. J., Tomita Y., et al. Studies of immunomodulating actions of carotenoids. I. Effects of β - carotene and astaxanthin on murine lymphocyte functions and cell surface marker expression in in vitro culture system [J]. Nutrition and Cancer, 1991, 16(2): 93-105.
- [12] Kim Y. J, Kim Y. A., Yokozawa T. Protection against oxidative stress, inflammation, and apoptosis of high-glucose-exposed proximal tubular epithelial cells by astaxanthin [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2009, 57(19): 8793-8797.
- [13] Lockwood S. F., Penn M. S., Hazen S. L., et al. The effects of oral Cardax™ (disodium disuccinate astaxanthin) on multiple independent oxidative stress markers in a mouse peritoneal inflammation model: Influence on 5-lipoxygenase in vitro and in vivo [J]. Life Sciences, 2006, 79(2): 162-174.
- [14] Wilawan B., Chan S. S., Ling T. C., et al. Advancement of carotenogenesis of astaxanthin from

- Haematococcus pluvialis*: Recent insight and way forward [J]. *Molecular Biotechnology*, 2024, 66(3): 402-423.
- [15] Basiony M., Ouyang L., Wang D., et al. Optimization of microbial cell factories for astaxanthin production: Biosynthesis and regulations, engineering strategies and fermentation optimization strategies [J]. *Synthetic and Systems Biotechnology*, 2022, 7(2): 689-704.
- [16] Liu X. J., Xie J. T., Zhou L. S., et al. Recent advances in health benefits and bioavailability of dietary astaxanthin and its isomers [J]. *Food Chemistry*, 2023, 404: 134605.
- [17] Šimat V., Rathod N., Čagalj M., et al. Astaxanthin from crustaceans and their byproducts: A bioactive metabolite candidate for therapeutic application [J]. *Marine Drugs*, 2022, 20(3): 206.
- [18] Patel A. K., Tambat V. S., Chen C. W., et al. Recent advancements in astaxanthin production from microalgae: A review [J]. *Bioresource Technology*, 2022, 364: 128030.
- [19] Han D., Li Y., Hu Q. Astaxanthin in microalgae: pathways, functions and biotechnological implications [J]. *Algae*, 2013, 28(2): 131-147.
- [20] Sun T. An alternative route for astaxanthin biosynthesis in green algae [J]. *Plant Physiology*, 2020, 183(3): 812-813.
- [21] Hata N., Ogbonna J. C., Hasegawa Y., et al. Production of astaxanthin by *Haematococcus pluvialis* in a sequential heterotrophic-photoautotrophic culture [J]. *Journal of Applied Phycology*, 2001, 13: 395-402.
- [22] Olaizola M. Commercial production of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis* using 25,000-liter outdoor photobioreactors [J]. *Journal of Applied Phycology*, 2000, 12: 499-506.
- [23] Lorenz R. T., Cysewski G. R. Commercial potential for *Haematococcus* microalgae as a natural source of astaxanthin [J]. *Trends in Biotechnology*, 2000, 18(4): 160-167.
- [24] Imamoglu E., Dalay M. C., Sukan F. V. Influences of different stress media and high light intensities on accumulation of astaxanthin in the green alga *Haematococcus pluvialis* [J]. *New Biotechnology*, 2009, 26(3-4): 199-204.
- [25] Fábregas J., Otero A., Maseda A., et al. Two-stage cultures for the production of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis* [J]. *Journal of Biotechnology*, 2001, 89(1): 65-71.
- [26] Acién F. G., Molina E., Fernández-Sevilla J. M., et al. Economics of microalgae production [M]. *Microalgae-Based Biofuels and Bioproducts*, 2017, 485-503.
- [27] Liu J., Sun Z., Zhong Y., et al. Utilization of cane molasses towards cost-saving astaxanthin production by a *Chlorella zofingiensis* mutant [J]. *Journal of Applied Phycology*, 2013, 25(5): 1447-1456.
- [28] Sun N., Wang Y., Li Y. T., et al. Sugar-based growth, astaxanthin accumulation and carotenogenic transcription of heterotrophic *Chlorella zofingiensis* (Chlorophyta) [J]. *Process Biochemistry*, 2008, 43(11): 1288-1292.
- [29] Chen J., Wei D., Lim P. E. Enhanced coproduction of astaxanthin and lipids by the green microalga *Chromochloris zofingiensis*: Selected phytohormones as positive stimulators [J]. *Bioresource*

- Technology, 2020, 295: 122242.
- [30] Mao X., Wu T., Sun D., et al. Differential responses of the green microalga *Chlorella zofingiensis* to the starvation of various nutrients for oil and astaxanthin production [J]. Bioresource Technology, 2018, 249: 791-798.
- [31] Sun Z., Zhang Y., Sun L., et al. Light elicits astaxanthin biosynthesis and accumulation in the fermented ultrahigh-density *Chlorella zofingiensis* [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2019, 67(19): 5579-5586.
- [32] Roth M. S., Cokus S. J., Gallaher S. D., et al. Chromosome-level genome assembly and transcriptome of the green alga *Chromochloris zofingiensis* illuminates astaxanthin production [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2017, 114(21).
- [33] Roth M. S., Gallaher S. D., Westcott D. J., et al. Regulation of oxygenic photosynthesis during trophic transitions in the green alga *Chromochloris zofingiensis* [J]. The Plant Cell, 2019, 31(3): 579-601.
- [34] Wang X., Wei H., Mao X., et al. Proteomics analysis of lipid droplets from the oleaginous alga *Chromochloris Zofingiensis* reveals novel proteins for lipid metabolism [J]. Genomics, Proteomics and Bioinformatics, 2019, 17(3): 260-272.
- [35] Zhang Y., Shi M., Mao X., et al. Time-resolved carotenoid profiling and transcriptomic analysis reveal mechanism of carotenogenesis for astaxanthin synthesis in the oleaginous green alga *Chromochloris zofingiensis* [J]. Biotechnology for Biofuels, 2019, 12(1): 287.
- [36] Krienitz L., Bock C., Dadheech P. K., et al. Taxonomic reassessment of the genus *Mychonastes* (Chlorophyceae, Chlorophyta) including the description of eight new species [J]. Phycologia, 2011, 50(1): 89-106.
- [37] Sudibyo H., Pradana Y. S., Samudra T. T., et al. Study of cultivation under different colors of light and growth kinetic study of *Chlorella zofingiensis* dñz for biofuel production [J]. Energy Procedia, 2017, 105: 270-276.
- [38] Chowdhary A. K., Kishi M., Toda T. Enhanced growth of *Chromochloris zofingiensis* through the transition of nutritional modes [J]. Algal Research, 2022, 65: 102723.
- [39] Hu J., Nagarajan D., Zhang Q., et al. *Heterotrophic cultivation* of microalgae for pigment production: A review [J]. Biotechnology Advances, 2018, 36(1): 54-67.
- [40] Fang N., Wang C., Liu X., et al. De novo synthesis of astaxanthin: From organisms to genes [J]. Trends in Food Science and Technology, 2019, 92: 162-171.
- [41] Del Campo J. A., Rodriguez H., Moreno J., et al. Accumulation of astaxanthin and lutein in *Chlorella zofingiensis* (Chlorophyta) [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2004, 64(6): 848-854.
- [42] Li Y., Huang J., Sandmann G., et al. High - light and sodium chloride stress differentially regulate the biosynthesis of astaxanthin in *Chlorella zofingiensis* (chlorophyceae) 1 [J]. Journal of Phycology, 2009, 45(3): 635-641.
- [43] Liu J., Sun Z., Gerken H., et al. *Chlorella zofingiensis* as an alternative microalgal producer of astaxanthin: Biology and industrial potential [J]. Marine Drugs, 2014, 12(6): 3487-3515.

- [44] Mulders K J. M., Janssen J. H., Martens D. E., et al. Effect of biomass concentration on secondary carotenoids and triacylglycerol (TAG) accumulation in nitrogen-depleted *Chlorella zofingiensis* [J]. Algal Research, 2014, 6: 8-16.
- [45] Ip P. F., Chen F. Production of astaxanthin by the green microalga *Chlorella zofingiensis* in the dark [J]. Process Biochemistry, 2005, 40(2): 733-738.
- [46] Liu J., Sun Z., Mao X., et al. Multi - omics analysis reveals distinct mechanism of oleaginousness in the emerging model alga *Chromochloris zofingiensis* [J]. The Plant Journal, 2019, 98: 1060-1077.
- [47] Zhang Z., Huang J. J., Sun D., et al. Two-step cultivation for production of astaxanthin in *Chlorella zofingiensis* using a patented energy-free rotating floating photobioreactor (RFP) [J]. Bioresource Technology, 2017, 224: 515-522.
- [48] Ran W., Wang H., Liu Y., et al. Storage of starch and lipids in microalgae: Biosynthesis and manipulation by nutrients [J]. Bioresource Technology, 2019, 291: 121894.
- [49] Fan J., Cui Y., Wan M., et al. Lipid accumulation and biosynthesis genes response of the oleaginous *Chlorella pyrenoidosa* under three nutrition stressors [J]. Biotechnology for Biofuels, 2014, 7(1): 17.
- [50] Salama E. S., Hwang J. H., El-Dalatony M. M., et al. Enhancement of microalgal growth and biocomponent-based transformations for improved biofuel recovery: A review [J]. Bioresource Technology, 2018, 258: 365-375.
- [51] Voß U., Bishopp A., Farcot E., et al. Modelling hormonal response and development [J]. Trends in Plant Science, 2014, 19(5): 311-319.
- [52] Lu Y., Xu J. Phytohormones in microalgae: A new opportunity for microalgal biotechnology? [J]. Trends in Plant Science, 2015, 20(5): 273-282.
- [53] Jan S., Alyemeni M. N., Wijaya L., et al. Interactive effect of 24-epibrassinolide and silicon alleviates cadmium stress via the modulation of antioxidant defense and glyoxalase systems and macronutrient content in *Pisum sativum* L. seedlings [J]. BMC Plant Biology, 2018, 18(1): 146.
- [54] Kenrick P., Crane P. R. The origin and early evolution of plants on land [J]. Nature, 1997, 389(6646): 33-39.
- [55] Jäger K., Ördög V., Barnabás B. Effect of cyanobacterial and microalgal biomass on anther culture response of wheat (*Triticum aestivum* L.) [J]. Acta Agronomica Hungarica, 2005, 53(1): 99-107.
- [56] Stirk W. A. Potential of phytohormones as a strategy to improve microalgae productivity for biotechnological applications [J]. Biotechnology Advances, 2020, 44: 107612.
- [57] Ahmed F., Fanning K., Netzel M., et al. Induced carotenoid accumulation in *Dunaliella salina* and *Tetraselmis suecica* by plant hormones and UV-C radiation [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2015, 99(22): 9407-9416.
- [58] Chen J., Wei D., Lim P. E. Enhanced coproduction of astaxanthin and lipids by the green microalga *Chromochloris zofingiensis*: Selected phytohormones as positive stimulators [J]. Bioresource Technology, 2020, 295: 122242.
- [59] Kozlova T. A., Kartashov A. V., Zadneprovskaya E., et al. Effect of abscisic acid on growth, fatty acid

- profile, and pigment composition of the Chlorophyte *Chlorella (Chromochloris) zofingiensis* and its co-culture microbiome [J]. Life, 2023, 13(2): 452.
- [60] Mansouri H., Ebrahim Nezhad. S. Improvement in biochemical parameters and changes in lipid profile of *Scenedesmus obliquus* by plant growth regulators under mixotrophic condition [J]. Biomass and Bioenergy, 2020, 140: 105708.
- [61] Gao Z., Li Y., Wu G., et al. Transcriptome analysis in *Haematococcus pluvialis*: Astaxanthin induction by salicylic acid (SA) and jasmonic acid (JA) [J]. PLOS ONE, 2015, 10(10): e0140609.
- [62] Yu X., Niu X., Zhang X., et al. Identification and mechanism analysis of chemical modulators enhancing astaxanthin accumulation in *Haematococcus pluvialis* [J]. Algal Research, 2015, 11: 284-293.
- [63] Huq E. PIF4, a phytochrome-interacting bHLH factor, functions as a negative regulator of phytochrome B signaling in Arabidopsis [J]. The EMBO Journal, 2002, 21(10): 2441-2450.
- [64] Huq E., Al-Sady B., Hudson M., et al. PHYTOCHROME-INTERACTING FACTOR 1 is a critical bHLH regulator of chlorophyll biosynthesis [J]. Science, 2004, 305(5692): 1937-1941.
- [65] Martínez-García J. F., Huq E., Quail P. H. Direct targeting of light signals to a promoter element-bound transcription factor [J]. Science, 2000, 288(5467): 859-863.
- [66] Khanna R., Huq E., Kikis E. A., et al. A novel molecular recognition motif necessary for targeting photoactivated phytochrome signaling to specific basic helix-loop-helix transcription factors [W][J]. The Plant Cell, 2004, 16(11): 3033-3044.
- [67] Toledo-Ortiz G., Huq E., Rodríguez-Concepción M. Direct regulation of phytoene synthase gene expression and carotenoid biosynthesis by phytochrome-interacting factors [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2010, 107(25): 11626-11631.
- [68] Llorente B., Martinez-Garcia J. F., Stange C., et al. Illuminating colors: Regulation of carotenoid biosynthesis and accumulation by light [J]. Current Opinion in Plant Biology, 2017, 37: 49-55.
- [69] Vlot A. C., Dempsey D. A., Klessig D. F. Salicylic acid, a multifaceted hormone to combat disease [J]. Annual Review of Phytopathology, 2009, 47(1): 177-206.
- [70] Zhang L., Yang S., Xu J., et al. Application of exogenous salicylic acid on improving high temperature resistance of *Nannochloropsis oceanica* [J]. Aquaculture International, 2020, 28:2235-246.
- [71] Czerpak R., Bajguz A., Gromek M., et al. Activity of salicylic acid on the growth and biochemism of *Chlorella vulgaris* Beijerinck [J]. Acta Physiologiae Plantarum, 2002, 24(1): 45.
- [72] Fu L. Benzoic and salicylic acid are the signaling molecules of *Chlorella* cells for improving cell growth [J]. Chemosphere, 2021, 265: 129084.
- [73] Chandrakar V., Dubey A., Keshavkant S. Modulation of antioxidant enzymes by salicylic acid in arsenic exposed *Glycine max* L. [J]. Journal of soil science and plant nutrition, 2016, 16 (3): 662-676.
- [74] Rao M. V., Paliyath G., Ormrod D. P., et al. Influence of salicylic acid on H₂O₂ production, oxidative stress, and H₂O₂-metabolizing enzymes (salicylic acid-mediated oxidative damage requires H₂O₂) [J]. Plant Physiology, 1997, 115(1): 137-149.

- [75] Du H., Ahmed F., Lin B., et al. The effects of plant growth regulators on cell growth, protein, carotenoid, PUFAs and lipid production of *Chlorella pyrenoidosa* ZF Strain [J]. *Energies*, 2017, 10(11): 1696.
- [76] Yu X., Niu X., Zhang X., et al. Identification and mechanism analysis of chemical modulators enhancing astaxanthin accumulation in *Haematococcus pluvialis* [J]. *Algal Research*, 2015, 11: 284-293.
- [77] Ip P. F., Chen F. Employment of reactive oxygen species to enhance astaxanthin formation in *Chlorella zofingiensis* in heterotrophic culture [J]. *Process Biochemistry*, 2005, 40(11): 3491-3496.
- [78] Yang Z. Y., Gao F., Liu J. Z., et al. Improving sedimentation and lipid production of microalgae in the photobioreactor using saline wastewater [J]. *Bioresource Technology*, 2022, 347: 126392.
- [79] Anitha S., Shah A. R., et al. Modulation of lipid productivity under nitrogen, salinity and temperature stress in microalgae sp. [J]. *Journal of Environmental Biology*, 2018, 39(5): 625-632.
- [80] Livak K. J., Schmittgen T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method [J]. *Methods*, 2001, 25(4): 402-408.
- [81] Li Y., Tian W., Fu Z., et al. Mechanisms of sodium-acetate-induced DHA accumulation in a DHA-producing microalga, *Cryptocodinium* sp. SUN [J]. *Marine Drugs*, 2022, 20(8): 508.
- [82] Sato N., Toyoshima M. Dynamism of metabolic carbon flow of starch and lipids in *Chlamydomonas debaryana* [J]. *Frontiers in Plant Science*, 2021, 12: 646498.
- [83] Mack M., Liesert M., Zschocke J., et al. 3-Methylglutaconyl-CoA hydratase from *Acinetobacter* sp [J]. *Archives of Microbiology*, 2006, 185(4): 297-306.
- [84] Lin Y., Dai Y., Xu W., et al. The growth, lipid accumulation and fatty acid profile analysis by abscisic acid and indol-3-acetic acid induced in *Chlorella* sp. FACHB-8 [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2022, 23(7): 4064.
- [85] Lohr M., Schwender J., Polle J. E. W. Isoprenoid biosynthesis in eukaryotic phototrophs: A spotlight on algae [J]. *Plant Science*, 2012, 185-186: 9-22.
- [86] León R., Couso I., Fernández E. Metabolic engineering of ketocarotenoids biosynthesis in the unicellular microalga *Chlamydomonas reinhardtii* [J]. *Journal of Biotechnology*, 2007, 130(2): 143-152.
- [87] Das K., Roychoudhury A. Reactive oxygen species (ROS) and response of antioxidants as ROS-scavengers during environmental stress in plants [J]. *Frontiers in Environmental Science*, 2014, 2.
- [88] Chen C., Wang C., Liu Z., et al. Variations in physiology and multiple bioactive constituents under salt stress provide insight into the quality evaluation of *apocyni veneti folium* [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2018, 19(10): 3042.
- [89] Rahantaniaina M. S., Li S., Chatel-Innocenti G., et al. Cytosolic and chloroplastic DHARs cooperate in oxidative stress-driven activation of the salicylic acid pathway [J]. *Plant Physiology*, 2017, 174(2): 956-971.
- [90] Eichhorn H. Isolation of a novel ABC-transporter gene from soybean induced by salicylic acid [J].

- Journal of Experimental Botany, 2006, 57(10): 2193-2201.
- [91] Zhuge Y., Sheng H., Zhang M., et al. Grape phytochrome-interacting factor VvPIF1 negatively regulates carotenoid biosynthesis by repressing VvPSY expression [J]. Plant Science, 2023, 331: 111693.