

DOI: 10.3724/SP.J.1005.2013.00233

沉默 *lycB* 基因对雨生红球藻类胡萝卜素合成代谢的影响

龚文芳, 路立京, 刘鑫, 陈喜文, 陈德富

南开大学生命科学学院分子遗传学实验室, 天津 300071

摘要: 雨生红球藻是一种淡水浮游单细胞绿藻, 逆境条件下可积累大量的类胡萝卜素。番茄红素是类胡萝卜素中的一种, 是类胡萝卜素合成代谢中的一个重要中间产物。番茄红素 β -环化酶(LycB)是催化番茄红素形成 β -胡萝卜素的关键酶。文章以杜氏盐藻 *lycB* 基因为干扰序列, 构建了含卡那霉素与阿特拉津双抗性的 RNAi 载体 p1301-BS-RNAi。将其电转化进雨生红球藻细胞, 经抗性筛选、基因组 PCR 及 RT-PCR 筛选, 获得了 16 个独立的干扰株系。选取生长良好的 7 个进行高光诱导, 发现其番茄红素含量增加了 99.4%, β -胡萝卜素含量减少了 48.4%, 即通过异源的 *lycB*-RNAi 基因沉默可抑制番茄红素向 β -胡萝卜素的转化。对比分析发现, 番茄红素增加量仅是 β -胡萝卜素减少量的 5%, 表明因 *lycB*-RNAi 抑制而产生的番茄红素的 95%又被其他通路转换成了其他代谢产物, 因此要实现雨生红球藻番茄红素含量的大幅增长, 需协同调控其他代谢通路。

关键词: 雨生红球藻; 番茄红素 β -环化酶; RNAi; 番茄红素; 代谢通路

Effect of silencing *lycB* gene on the carotenoid synthesis in *Haematococcus pluvialis*

GONG Wen-Fang, LU Li-Jing, LIU Xin, CHEN Xi-Wen, CHEN De-Fu

Laboratory of Molecular Genetics, College of Life Sciences, Nankai University, Tianjin 300071, China

Abstract: *Haematococcus pluvialis* is a freshwater planktonic single-cell microalgae. It will accumulate high amount of carotenoids under unfavorable environmental conditions. As one of carotenoids, lycopene is an important intermediate in the carotenoid biosynthesis pathway. Lycopene β -cyclase (LycB) is the key enzyme that catalyzes the circularization of lycopene to form β -carotene. In this study, we constructed a p1301-BS-RNAi vector using *lycB* from *Dunaliella salina* as the interference sequence with kanamycin and atrazine resistance marker, and then transformed it into *H. pluvialis* by electroporation. Sixteen independent transgenic lines were obtained after resistance selection, genome PCR, and RT-PCR analyses. Seven well-grown lines were selected to determine the contents of carotenoids by HPLC analysis after inducing by high light. The lycopene content in these lines was increased by 99.4% while the β -carotene content was decreased by 48.4%, indicating that the interference by heterogenous *lycB* could inhibit the conversion of lycopene into β -carotene. The amount of increase in lycopene was only 5% of the amount of decrease in β -carotene, indicating that 95% of the decreased

收稿日期: 2012-09-25; 修回日期: 2012-11-15

基金项目: 海洋公益性行业科研专项(编号: 200805044)和国家自然科学基金项目(编号: 31070717)资助

作者简介: 龚文芳, 在读博士生, 研究方向: 分子遗传学。Tel: 022-23500133; E-mail: gwf018@yahoo.com.cn

通讯作者: 陈德富, 教授, 博士生导师, 研究方向: 分子遗传学。E-mail: chendefu@nankai.edu.cn

网络出版时间: 2012-11-21 9:26:42

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1913.R.20121121.0926.002.html>

β -carotene was converted into other metabolites. Therefore, in order to largely increase the lycopene content in *H. pluvialis*, it is necessary to coordinatively regulate other metabolic pathways.

Keywords: *Haematococcus pluvialis*; lycopene- β -cyclase; RNAi; lycopene; metabolic pathway

雨生红球藻属绿藻门(Chlorophyta)、绿藻纲(Chlorophyceae)、团藻目(Volvocales)、红球藻科(Haematococcaceae)、红球藻属(*Haematococcus*), 是一种淡水浮游单细胞绿藻, 细胞内虾青素的含量可达干重的 2% ~ 4%, 被认为是自然界中虾青素含量最高的生物之一^[1]。雨生红球藻虾青素合成途径的第一步反应是由八氢番茄红素合成酶完成的, 催化两分子的牻牛儿基牻牛儿基焦磷酸缩合成 40 碳的八氢番茄红素, 然后在八氢番茄红素去饱和酶和 ζ -胡萝卜素去饱和酶的催化下, 经过 4 步脱氢反应形成番茄红素, 再在番茄红素 β -环化酶(LycB)的作用下, 进一步环化成 β -胡萝卜素, 再经过羟基化、酮基化, 最后形成虾青素^[2]。雨生红球藻合成虾青素时并不一定需要光, 异养条件下合成速度较慢^[3], 光照则诱导虾青素的大量积累^[4]。

通过反义基因或RNA干扰等反向调控手段提高植物中类胡萝卜素含量已有一些报道。Rosati等^[5]将 *lycB* 基因的反义片段转入番茄果实中, 发现果实的番茄红素含量增加至 1.79 倍, 同时 β -胡萝卜素含量减少至 0.875 倍。万群等^[6]通过果实特异性番茄红素 β -环化酶基因的RNAi沉默, 使番茄果实的番茄红素含量增加了 1.8 倍。沉默雨生红球藻的 *lycB* 基因, 对其类胡萝卜素代谢将产生怎样的影响, 目前未见报道。为此, 本文构建了杜氏盐藻来源的 *lycB* 基因干扰载体, 将其转入雨生红球藻细胞, 通过抗性筛选和分子鉴定等方法获得了RNA干扰株, 并分析了各干扰株的类胡萝卜素含量变化。本研究理论上为阐明雨生红球藻类胡萝卜素代谢调控机制、实践上为获取其高产番茄红素工程株奠定了基础。

1 材料和方法

1.1 材料

杜氏盐藻(*Dunaliella salina*) Y6 株^[7]、雨生红球藻(*Haematococcus pluvialis*) H1 株^[8]来自本实验室, 培养于宁波海曙赛福实验仪器厂生产的智能人工气

候箱PRX-450C中, 参数设为: 温度 27℃、湿度 75%、光照度 100%、光暗比 16 h/8 h, 光强为 65 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 。杜氏盐藻培养基为DsMG^[7], 雨生红球藻培养基为BBM^[9]。培养过程中不定期(1 次以上/d)用手摇动盛有藻液的三角瓶, 待其生长至对数期(1×10^6 细胞/mL)收集藻体。

大肠杆菌 DH5 α -FT、质粒 pHANNIBAL 和 pBluescript II KS+系本实验室保存。质粒pMD4(含基因 *atzA*-ADP)^[10]、pCAMBIA-1301C由南开大学蔡宝立教授惠赠。

1.2 方法

1.2.1 二元载体 pCAMBIA-1301C 的遗传改造

二元载体pCAMBIA-1301C是雨生红球藻高效表达载体^[8], 但其遗传标记为潮霉素抗性基因(*hpt*), 由于雨生红球藻具潮霉素抗性, 因此不能使用潮霉素进行遗传筛选, 需将其潮霉素抗性基因(*hpt*)替换成阿特拉津氯水解酶基因(*atzA*)以使用阿特拉津来筛选。通过PCR方法扩增 *atzA* 基因, 并在引物设计时加上使 *atzA* 基因高效表达的Kozak序列, 上游引物为 *atzA*-XKAA-F (5'-actcgagtcctctggcgccggcgccgccccacctgcaaccatgcaaacgctcagcatccag-3', 单画线为 *Xho*I 位点, 双画线为Kozak序列), 下游引物为 *atzA*-XAPK-R (5'-actcgaggcgcgcccttaattaacgacagatccggctcgcgccctactctagaggctgcgccaagctg-3', 单画线为 *Xho*I 位点, 双画线为终止子序列)。15 μL PCR体系中含 20 ng pMD4、1.8 pmol每种引物、1.5 μL 10 \times 缓冲液、3 nmol dNTPs和 0.375 U *Ex*[®] *Taq* DNA聚合酶(宝生物工程(大连)有限公司)。扩增条件为: 94℃预变性 5 min; 94℃ 40 s, 56℃复性 32 s, 72℃延伸 140 s, 36 个循环; 72℃再延伸 7 min。电泳回收 1.5 kb片段后, 与 pMD19-T- Simple Vector(宝生物工程(大连)有限公司)在T4 DNA Ligase (MBI Fermentas公司)作用下于 16℃条件下过夜连接, 连接产物转化进DH5 α -FT感受态细胞。PCR、酶切、测序等方法筛选的阳性载体再经 *Xho*I 消化, 所得的 1.5 kb片段与经 *Xho*I 消化

pCambia-1301C 所得的 12.2 kb 片段连接, PCR 方法选取其 *atzA* 插入方向与原 *hpt* 一致的质粒命名为 p1301-*atzA*, 其操作流程参见图 1。

1.2.2 *lycB*-RNAi 片段的获取

待杜氏盐藻 Y6 生长至对数期, 取 3 mL 藻液, 4 000 r/m 离心收集藻体, 用 Total RNA Extractor (Trizol) (Bio Basic Inc 公司) 试剂盒分离其总 RNA, 再通过 SuperScript[®] III Reverse Transcriptase 试剂盒

(Invitrogen 公司) 合成其 cDNAs。

选取杜氏盐藻 *lycB* (EU327876) 区段的 +461 ~ +1098 (638 bp) 序列为 RNAi 靶标, 用引物对 Y6-RNAi-F/Y6-RNAi-R (Y6-RNAi-F, 5'-cctcgagcttagacat atgccccatgatccc-3', 下单划线为 *Xho* 位点, 下双画线为 *Xba* 位点; Y6-RNAi-R, 5'-cgaattcatcgatcttgataccagccactccatg-3', 下单划线为 *EcoR* 位点, 下双画线为 *Cla* 位点) 对 Y6 的 cDNAs 进行 PCR。除模板改为 1 μ L 稀释 10 倍的 cDNAs、72 $^{\circ}$ C 延伸时间缩短

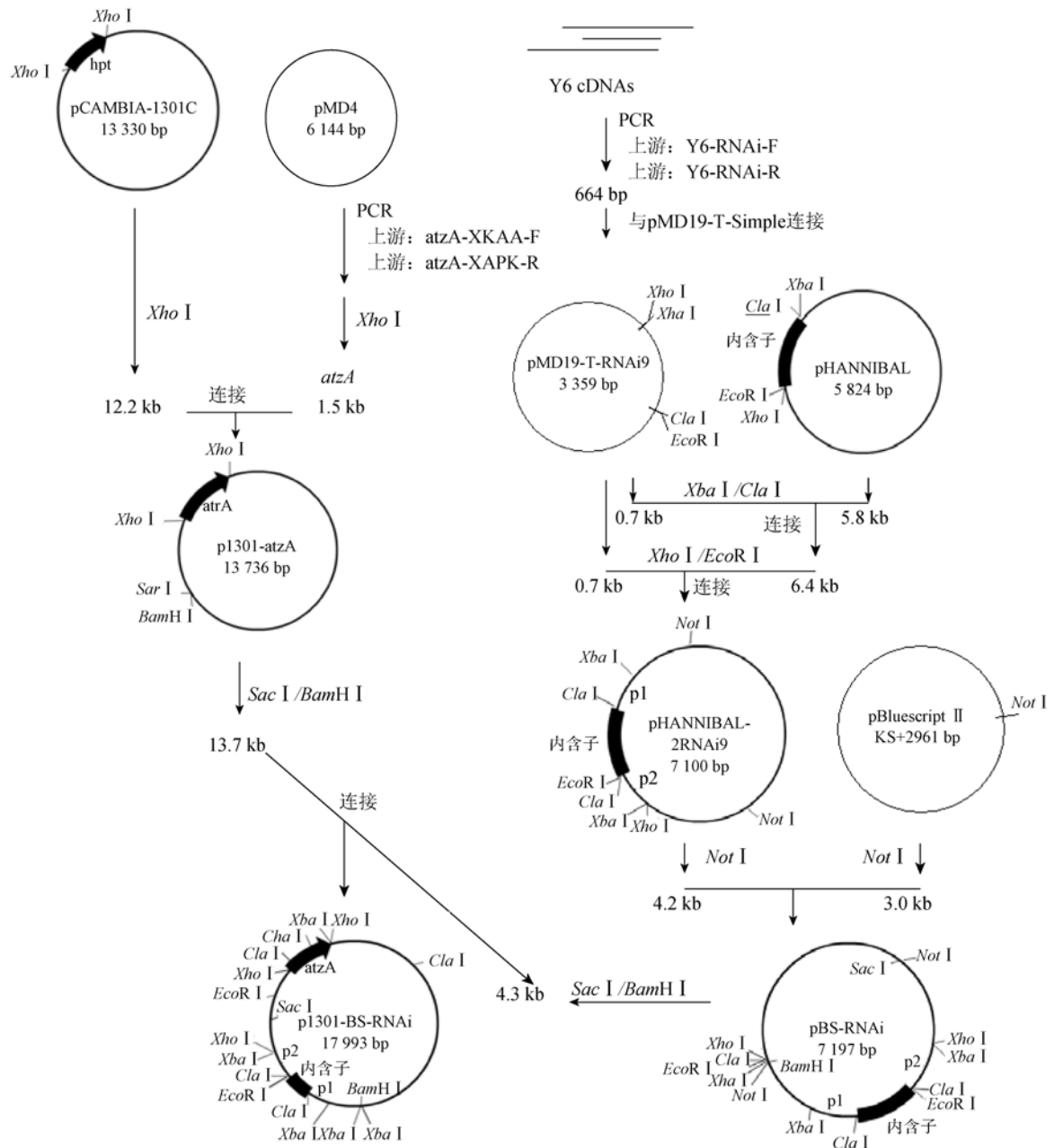


图1 *lycB*-RNAi 表达载体的构建流程

至 60 s 外, 其他 PCR 体系及条件同 *atzA* 的扩增。电泳回收 0.7 kb 片段后, 与 pMD19-T-Simple Vector 在 16℃ 下过夜连接, 连接产物转化进 DH5 α -FT 感受态细胞, PCR、酶切、测序等鉴定的阳性转化子命名为 pMD19-T-RNAi9, 其详细操作流程参见图 1。

1.2.3 *lycB*-RNAi 表达盒的构建

如图 1 所示, 用 *Xba* / *Cla* 酶切质粒 pMD19-T-RNAi9, 电泳回收的 0.7 kb 片段(p1 片段)与经同样限制性内切酶消化的 pHANNIBAL 载体连接。*Xho* / *EcoR* 酶切阳性转化子携带的质粒及 pMD19-T-RNAi9, 16℃ 过夜连接回收的 6.4 kb 及 0.7 kb (p2) 片段, 所得的 *lycB*-RNAi 片段正反向插入到 pHANNIBAL 内含子两侧的质粒命名为 pHANNIBAL-2RNAi9, 该质粒携带的 *lycB*-RNAi 表达盒的结构见图 2。

1.2.4 *lycB*-RNAi 表达载体 p1301-BS-RNAi 的构建

植物双元载体 p1301-*atzA* 序列上有 3 个 *Not* 酶切位点, 无法通过 pHANNIBAL 推荐的 *Not* 酶切将其上的 *lycB*-RNAi 表达盒转移至 1301-*atzA* 多克隆位点。为此, 本研究如图 1 所示, 先用 *Not* 酶切 pHANNIBAL-2RNAi9 获取 4.2 kb 的 *lycB*-RNAi 表达盒片段, 连接到经 *Not* 酶切的 pBluescript II KS+ 上, 再用 *Sac* / *Bam*H 双酶切该中间载体及 p1301-*atzA*, 16℃ 过夜连接回收的 4.3 kb 和 13.7 kb, 筛选含卡那霉素及阿特拉津双抗的 *lycB*-RNAi 表达载体 p1301-BS-RNAi。

1.2.5 *lycB*-RNAi 表达盒转化雨生红球藻及转基因株系的筛选

雨生红球藻感受态细胞的制备及遗传转化方法参照王绘砖等^[8]。从含 0.2 mg/L 阿特拉津(该浓度是 2 \times 液体致死临界浓度)的 BBM 固体培养基上挑选生长良好的单藻落, 转接至 BBM 培养液中, 培养 21 d 后按 CTAB 法提取其基因组 DNA, 用引物对 *atzA*-5/*atzA*-8 (*atzA*-5: 5'-cagatcagatcatcgtgcacg-3'; *atzA*-8:

5'-acgcgtcgacctagaggtgcgccaagc-3') 筛选含 *atzA* 的转化子, 再用引物对 Y6-RNAi-F/Y6-RNAi-R 筛选含 *lycB*-RNAi 表达盒的转化子, 不同的双阳性转化株分别用不同的数字来命名, 如 1、2 等。阳性转化株划线转接至 BBM 固体平板上进一步分离单藻落, 扩大培养后提取其总 RNA, 并反转录成 cDNA, 再用引物对 *atzA*-5/*atzA*-8 和 F416/R1193 (F416: 5'-ggcattggcccaa caactac-3'; R1193: 5'-cgcccaacatgcgtgacatc-3') 对其进行 RT-PCR 筛选, 筛选 *atzA* 表达、*lycB* 不表达的藻株为 *lycB*-RNAi 干扰株, 干扰株在原名称的基础上再追加“-数字”来命名, 如 6-10、7-6 等。

1.2.6 雨生红球藻 *lycB*-RNAi 干扰株的高光诱导及类胡萝卜素含量分析

在 20 mL BBM 培养液中培养 *lycB*-RNAi 干扰株至对数生长期(细胞密度约为 1.0×10^6 个/mL), 4 000 r/min 离心 5 min 收集的藻体再转接到 20 mL BBM 培养液中, 高光下(光强为 $150 \mu\text{mol}/\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$, 光暗比为 24 h/0 h)培养 7 d (藻液变橙红色), 再离心(4 000 r/min, 5 min)收集藻体, 称重后用丙酮研磨并定容至 1.5 mL, 黑暗下-20℃ 萃取其类胡萝卜素, 2 h 后离心(4℃, 6 000 r/min, 10 min), 上清经 0.22 μm 滤膜过滤后注入高压液相色谱仪(美国 CoMetro 公司的 CoM 6000 HPLC Pressure Liquid Delivery System), 分析其类胡萝卜素含量及组成。色谱柱为 Comatex C18 (5 μm , $\Phi 4.6 \times 250$ mm)。流动相 A 为乙腈(天津市江天化工技术有限公司)与水的混合液(9:1, v/v); 流动相 B 为乙酸乙酯(廊坊兴科化工有限公司)。洗脱条件: 二元线性梯度, 流动相 B 在 0~16 min 内, 由 0 升至 60%, 16~30 min, 保持在 60%, 30~35 min 升至 100%; 进样量为 10 μL , 流速为 1 mL/min, 柱温为 30℃, 检测器波长范围为 502 nm, 番茄红素保留时间为 16 min, β -胡萝卜素保留时间为 19 min。

1.2.7 数据处理

类胡萝卜素含量分析实验设 3 次重复, 用软件

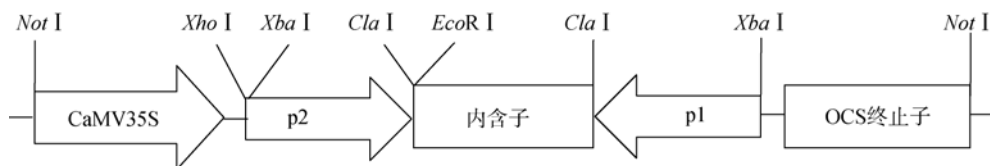


图 2 *lycB*-RNAi 表达盒的结构

SPSS 11.0 对其进行显著性差异分析。不同株系间的两两比较, 用“One-Way ANOVA 的 S-N-K”组件来完成, 显著性水平设 0.05, 字母相同者为差异不显著, 字母不同者为差异显著, a 值最大, b 值次之, c 值最小。干扰株与 H1 之间的差异分析用“Independent-Samples T Test”组件来完成, 置信区间设 95%, * 为差异显著, sig. 为其双尾近似 *P* 值。

2 结果与分析

2.1 *lycB*-RNAi 表达盒转化雨生红球藻及转化株系的筛选

干扰载体 p1301-BS-RNAi 转化的雨生红球藻细胞在含阿特拉津的 BBM 固体培养基上培养 30 ~ 45 d 后, 出现单藻落(图 3)。随机挑取 228 个单藻落, 转接到盛有 BBM 培养液的 24 孔板中, 21 d 后用 CTAB 法提取其基因组 DNA, 用引物对 *atzA*-5/*atzA*-8 筛选含 *atzA* 的转化株, 再用引物对 Y6-RNAi-F/Y6-RNAi-R 筛选含 *lycB*-RNAi 的转化株, 共获得 41 个

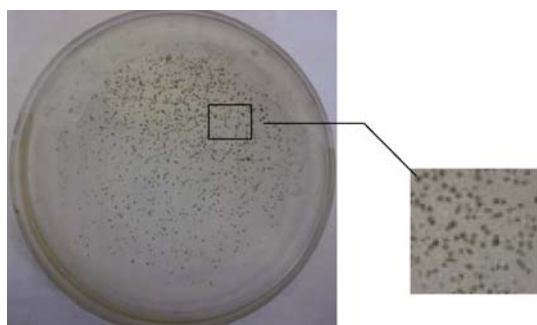


图 3 转 *lycB*-RNAi 表达盒的雨生红球藻的抗性平板培养

(18%)同时含 *atzA* 和 *lycB* 干扰序列的转化株(图 4A)。提取这些株系的总 RNA, 以引物对 F416/R1193、Y6-RNAi-F/Y6-RNAi-R 做 RT-PCR 检测, 发现 41 个中的 16 个(39%)存在 *atzA* 表达、*lycB* 不表达(图 4B)。

2.2 雨生红球藻 *lycB*-RNAi 干扰株的类胡萝卜素含量分析

从 16 个雨生红球藻 *lycB*-RNAi 干扰株系中, 选出 7 个生长良好的株系进行高光诱导, 7 d 后分析其类胡萝卜素含量及组成(图 5 及表 1)。表 1 显示, 与 H1 相比, 干扰株的番茄红素含量均有不同程度的增长, 其中以 6-10、7-6、7-10 和 4-2 尤为明显, 增加量分别达 H1 的 164.5%、146.7%、125.6%和 124.3%, 7 株的平均增加量为 99.4%; 而干扰株的 β -胡萝卜素含量则均有不同程度的减少, 其中以 7-10、6-10 和 4-2 尤为明显, 减少量分别达 H1 的 74.2%、68.3%和 65.5%, 7 株的平均减少量为 48.4%。可以看出, 通过 RNAi 介导的异源 *lycB* 基因沉默, 可有效抑制雨生红球藻中催化番茄红素环化成 β -胡萝卜素的番茄红素环化酶的活性, 致使其 β -胡萝卜素合成途径的中间产物, 即该酶的底物——番茄红素得到了积累。但比较干扰株的番茄红素增加量与 β -胡萝卜素减少量, 发现 7 个干扰株系的番茄红素平均增加量仅是其 β -胡萝卜素平均减少量的 5.0%(介于 2.8% ~ 9.8%), 表明减少的 β -胡萝卜素仅少部分累积成番茄红素, 95%则通过其他通路转化成了其他类型的类胡萝卜素。表 1 也显示, 不同干扰株间的番茄红素含量与 β -胡萝卜素含量存在显著差异, 可能与株系间的

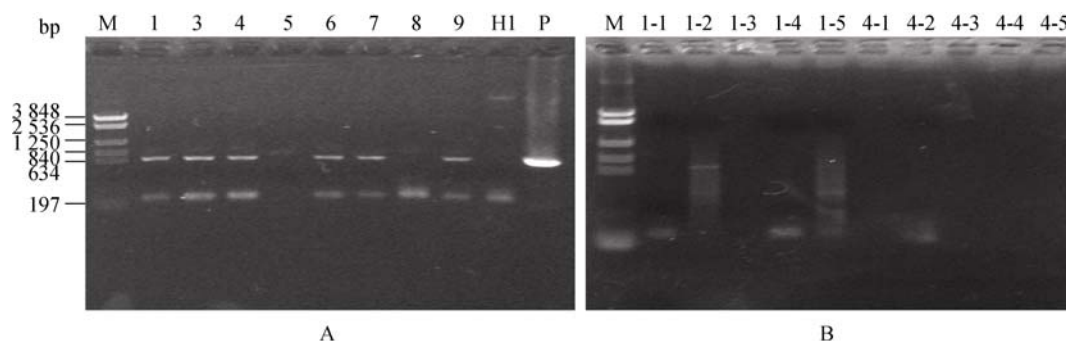


图 4 *lycB*-RNAi 干扰株系的分子筛选

A: 转基因株系的 PCR 筛选, 引物对为 Y6-RNAi-F/Y6-RNAi-R; B: 干扰株系的 RT-PCR 筛选, 引物对为 F416/R1193。M: DNA 相对分子质量标准物 NTKV-3; 数字: 株系; P: 阳性对照(质粒 p1301-BS-RNAi)。

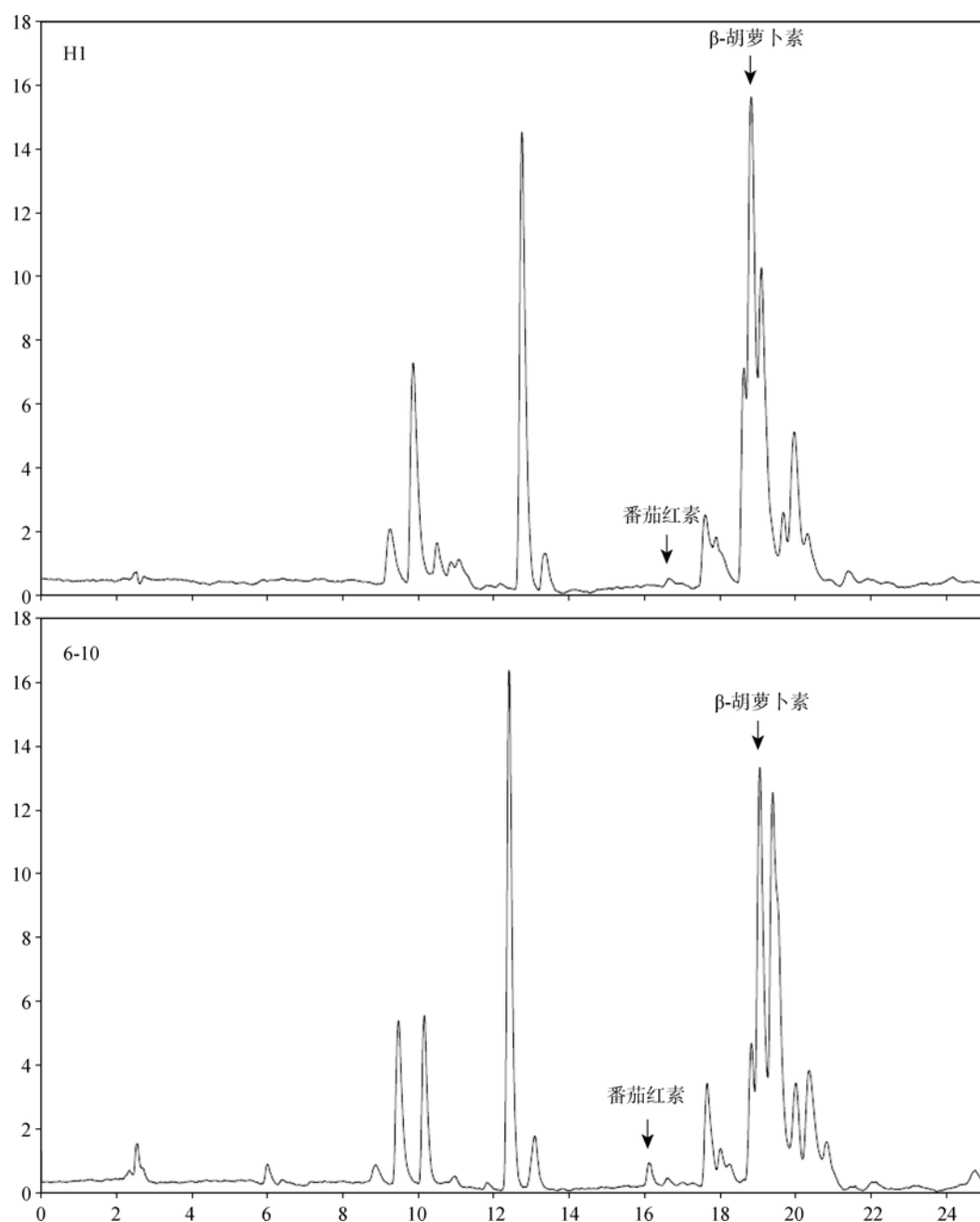


图 5 雨生红球藻类胡萝卜素含量的 HPLC 分析

lycB-RNAi 表达盒的插入位点或拷贝数的不同有关。

3 讨论

番茄红素是类胡萝卜素中的一种,也是许多类胡萝卜素生物合成的中间体^[11],已成为国际上功能性食品和抗癌防癌研究中的一个热点^[12]。过表达 *lycB* 基因可有效增加番茄果实中 β -胡萝卜素含量,降低番茄红素含量^[13],因此 *LycB* 是催化番茄红素

环化成 β -胡萝卜素的关键酶。杜氏盐藻能在适宜条件下合成和积累大量的 β -胡萝卜素,其含量高达细胞干重的 14%^[14]。晏露等^[15]将杜氏盐藻 *lycB* 克隆至表达载体 pACCRT-EIB 中,通过颜色筛选,获得了能稳定合成 β -胡萝卜素的大肠杆菌工程菌,进一步阐明了 *lycB* 功能。通过 BLAST 比对发现,杜氏盐藻 (EU327876) 与雨生红球藻 *lycB* 基因 (AY182008) 的同源性高达 73%,因此本研究可利用杜氏盐藻 *lycB* 基

表 1 雨生红球藻 *lycB*-RNAi 干扰株的类胡萝卜素含量分析

株系	番茄红素			β-胡萝卜素			A/B (%)
	含量(ng/10 ⁶ 个细胞)	比 H1 增加量(A, ng/10 ⁶ 个细胞)	%	含量(ng/10 ⁶ 个细胞)	比 H1 减少量(B, ng/10 ⁶ 个细胞)	%	
H1	11.3±1.5 c	—	—	498.4±113.6 a	—	—	—
7-2	15.6±2.9 bc	4.3±2.9	38.2	369.5±90.2 ab	128.9± 90.2	25.9	3.4
1-4	16.9±4.4 abc	5.6±4.4	49.7	395.3±72.3 ab	103.1±72.3	20.7	5.4
6-8	18.3±0.6 abc	7.0±0.6	61.9	248.7±11.5 ab	249.7±11.5	50.1	2.8
4-2	25.3± 0.8 ab	14.0±0.8	124.3	171.9±94.8 b	326.5±94.8	65.5	4.3
7-10	25.5±1.6 ab	14.2±1.6	125.6	128.8±124.1 b	369.6±124.1	74.2	3.8
7-6	27.9±3.5 ab	16.6±3.5	146.7	328.6±112.6 ab	169.8±112.6	34.1	9.8
6-10	29.9±9.1 a	18.6±9.1	164.5	158.0±27.4 b	340.4±27.4	68.3	5.5
干扰株的总平均值	22.5±6.8 * (sig.=0.035)	11.2±6.8	99.4	257.1±127.5 * (sig.=0.020)	241.3±127.5	48.4	5.0

因构建雨生红球藻 RNAi 载体。实验证明，将含此异源靶标的载体导入雨生红球藻细胞，能干扰雨生红球藻的番茄红素环化酶而对其 β-胡萝卜素合成代谢产生影响。

在不同培养条件下，雨生红球藻积累类胡萝卜素的量不同，主要影响因素有光照强度、盐浓度及营养成分等。在高光胁迫下，雨生红球藻可由绿色变成红色，积累大量虾青素，与虾青素合成有关的八氢番茄红素合成酶、八氢番茄红素脱氢酶、番茄红素环化酶等基因表达均增高^[16]。为了更好地阐明 *LycB* 在雨生红球藻类胡萝卜素代谢中的作用，本研究将雨生红球藻 *lycB*-RNAi 干扰株培养在连续强光条件下使其大量积累类胡萝卜素。研究显示，番茄红素含量增加了 99.4%，β-胡萝卜素含量减少了 48.4%，即，由于 RNA 干扰使得雨生红球藻 *lycB* 基因的表达受到了影响，但减少的β-胡萝卜素仅少数(5%)被累积成番茄红素。分析其原因，可能与番茄红素其他通路的此消彼长有关，这从 *lycB*-RNAi 转化株与 H1 的 HPLC 图谱(图 5)差异也能看出，如β-胡萝卜素附近有一个面积显著增加的峰，虽然尚不能确定其成分，但从其位置推断应为β-胡萝卜素异构体。也就是说，β-胡萝卜素异构体的合成代谢(如α-胡萝卜素途径)得到了加强。因此，通过干扰雨生红球藻 *lycB* 基因的表达尽管可提高番茄红素含量，但效果不会很大，要想大幅度提高番茄红素含量，除干扰 *lycB* 外，还应同时干扰其他代谢通路，这个结论与其他植物相类似。Diretto 等^[17]发现，干扰番茄红素ε-环化酶基

因(*lycE*)并不能显著减少马铃薯的叶黄素含量，因此认为 *LycE* 不是叶黄素合成限速酶，要想大幅降低叶黄素量，需同时干扰其 *LycB* 活性。

除 *LycB*、*LycE* 外，其他植物中还存在其他类型的环化酶。如，辣椒中的辣椒红素合成酶(CCS)有 *LycB* 活性，使得果实由黄色变成了红色^[18~21]。特异存在于番茄成色细胞的成色体特异性番茄红素β-环化酶(*CycB*)能在番茄果实中合成β-胡萝卜素，该 *CycB* 与 CCS 有 86.1% 的同源性^[22]。CCS 和 *CycB* 被认为是 *lycB* 复制过程中形成的直系同源物^[23]。在蓝藻 *Synechocystis* sp. PCC 6803 中，Bautista 等^[24]发现β-玉米胡萝卜素也可作为番茄红素环化酶的底物来合成β-胡萝卜素，是β-胡萝卜素合成途径中的另一重要支路。β-玉米胡萝卜素也存在于其他植物和微藻中^[25]。因此，雨生红球藻 *lycB* 干扰株的番茄红素增加量与β-胡萝卜素减少量的不协调，还与其类胡萝卜素代谢通路的复杂性有关。但目前尚不清楚雨生红球藻细胞内是否存在其他环化酶，也不知其是否还有其他类胡萝卜素合成通路，只有彻底阐明了这些问题才可能真正实现其类胡萝卜素含量的人工调控。

参考文献(References):

[1] 陈兴才, 黄伟光, 欧阳琴. 雨生红球藻培养及虾青素累积条件探讨. 中国食品学报, 2006, 6(4): 41-45. DOI

[2] Grünewald K, Hirschberg J, Hagen C. Ketocarotenoid biosynthesis outside of plastids in unicellular green alga *Haematococcus pluvialis*. *J Biol Chem*, 2001, 276(8):

- 6023–6029. DOI
- [3] Dragoş N, Bercea V, Bica A, Drugă B, Nicoară A, Coman C. Astaxanthin production from a new strain of *Haematococcus pluvialis* grown in batch culture. *Ann RSCB*, 2010, XV(2): 353–361. DOI
- [4] Collins AM, Jones HDT, Han DX, Hu Q, Beechem TE, Timlin JA. Carotenoid distribution in living cells of *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae). *PLoS One*, 2011, 6(9): e24302. DOI
- [5] Rosati C, Aquilani R, Dharmapuri S, Pallara P, Marusic C, Tavazza R, Bouvier F, Camara B, Giuliano G. Metabolic engineering of beta-carotene and lycopene content in tomato fruit. *Plant J*, 2000, 24(3): 413–419. DOI
- [6] 万群, 张兴国, 宋明. 果实特异性RNAi介导的Lcy基因沉默来增加番茄中番茄红素的含量. 生物工程学报, 2007, 23(3): 429–433. DOI
- [7] 牟春林, 陈喜文, 侯召丽, 王绘砖, 陈德富, 辛乃宏, 郭连城, 张俊杰. 工业生产β-胡萝卜素杜氏藻的分离及种属鉴定. 盐业与化工, 2009, 38(4): 25–30. DOI
- [8] 王绘砖, 陈喜文, 郝晓华, 陈德富. 利用雨生红球藻表达系统高通量筛选活力提高的阿特拉津氯水解酶突变子. 生物工程学报, 2011, 27(4): 620–628. DOI
- [9] 刘健晖, 李爱芬. 雨生红球藻在不同培养基的生长比较. 生态科学, 2006, 25(2): 113–115, 121. DOI
- [10] de Souza ML, Wackett LP, Boundy-Mills KL, Mandelbaum RT, Sadowsky MJ. Cloning, characterization, and expression of a gene region from *Pseudomonas* sp. strain ADP involved in the dechlorination of atrazine. *Appl Environ Microbiol*, 1995, 61(9): 3373–3378. DOI
- [11] Farré G, Bai C, Twyman RM, Capell T, Christou P, Zhu CF. Nutritious crops producing multiple carotenoids—a metabolic balancing act. *Trends Plant Sci*, 2011, 16(10): 532–540. DOI
- [12] Kelkel M, Schumacher M, Dicato M, Diederich M. Antioxidant and anti-proliferative properties of lycopene. *Free Radic Res*, 2011, 45(8): 925–940. DOI
- [13] Ronen G, Carmel-Goren L, Zamir D, Hirschberg J. An alternative pathway to β-carotene formation in plant chromoplasts discovered by map-based cloning of *beta* and *old-gold* color mutations in tomato. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97(20): 11102–11107. DOI
- [14] 张学成, 孟振, 时艳侠, 王培磊. 光照、温度和营养盐对三株盐生杜氏藻生长和色素积累的影响. 中国海洋大学学报(自然科学版), 2006, 36(5): 754–762. DOI
- [15] 晏露, 姜建国, 刘冠楠, 陈倩, 朱跃辉. 盐藻番茄红素β-环化酶全长cDNA的克隆及结构分析. 现代食品科技, 2010, 26(3): 218–221. DOI
- [16] Steinbrenner J, Linden H. Light induction of carotenoid biosynthesis genes in the green alga *Haematococcus pluvialis*: regulation by photosynthetic redox control. *Plant Mol Biol*, 2003, 52(2): 343–356. DOI
- [17] Diretto G, Tavazza R, Welsch R, Pizzichini D, Mourgues F, Papacchioli V, Beyer P, Giuliano G. Metabolic engineering of potato tuber carotenoids through tuber-specific silencing of lycopene epsilon cyclase. *BMC Plant Biol*, 2006, 6: 13. DOI
- [18] Pecker I, Gabbay R, Cunningham FX Jr, Hirschberg J. Cloning and characterization of the cDNA for lycopene β-cyclase from tomato reveals decrease in its expression during fruit ripening. *Plant Mol Biol*, 1996, 30(4): 807–819. DOI
- [19] Cunningham FX Jr, Pogson B, Sun Z, McDonald KA, DellaPenna D, Gantt E. Functional analysis of the beta and epsilon lycopene cyclase enzymes of *Arabidopsis* reveals a mechanism for control of cyclic carotenoid formation. *Plant Cell*, 1996, 8(9): 1613–1626. DOI
- [20] Huguency P, Badillo A, Chen HC, Klein A, Hirschberg J, Camara B, Kuntz M. Metabolism of cyclic carotenoids: a model for the alteration of this biosynthetic pathway in *Capsicum annuum* chromoplasts. *Plant J*, 1995, 8(3): 417–424. DOI
- [21] Bouvier F, d'Harlingue A, Camara B. Molecular analysis of carotenoid cyclase inhibition. *Arch Biochem Biophys*, 1997, 346(1): 53–64. DOI
- [22] Bouvier F, D'harlingue A, Backhaus RA, Kumagai MH, Camara B. Identification of neoxanthin synthase as a carotenoid cyclase paralog. *Eur J Biochem*, 2000, 267(21): 6346–6352. DOI
- [23] Hirschberg J. Carotenoid biosynthesis in flowering plants. *Curr Opin Plant Biol*, 2001, 4(3): 210–218. DOI
- [24] Bautista JA, Tracewell CA, Schlodder E, Cunningham FX Jr, Brudvig GW, Diner BA. Construction and characterization of genetically modified *Synechocystis* sp. PCC 6803 photosystem II core complexes containing carotenoids with shorter pi-conjugation than beta-carotene. *J Biol Chem*, 2005, 280(46): 38839–38850. DOI
- [25] Cunningham FX Jr, Sun Z, Chamovitz D, Hirschberg J, Gantt E. Molecular structure and enzymatic function of lycopene cyclase from the cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain PCC7942. *Plant Cell*, 1994, 6(8): 1107–1121. DOI