Ma R J, Lin W J, Chen Y C, *et al*. Application of the CRISPRA technology with ASGARD in *Chlorella sorokiniana* FZU60 [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2026, 50(7): 072617. [马瑞娟, 林文槿, 陈煜成, 等. 结合ASGARD的CRISPRa技术在索罗金小球藻FZU60中的应用 [J]. 水生生物学报, 2026, 50(7): 072617.]

# 结合ASGARD的CRISPRa技术在索罗金小球藻FZU60中的应用

马瑞娟[1] 林文槿[2] 陈煜成[2] 张春晓[1] 王 玲[1] 鲁康乐[1]
宋 凯[1] 李学山[1] 谢友坪[2]

(1. 集美大学水产学院, 海水养殖生物育种全国重点实验室, 厦门 361021; 2. 福州大学, 福建省海产品废弃物综合利用工程技术研究中心, 福州市海产品高值化利用行业技术创新中心, 福州 350108)

**摘要:** 为建立索罗金小球藻(*Chlorella sorokiniana*) FZU60的高效遗传转化体系用于分子调控机制研究并提高其高附加值代谢产物的产量, 研究建立了基于CRISPR/dCas9的转录激活系统(CRISPRa), 结合适应性单链向导RNA (sgRNA)辅助调控基因表达(ASGARD)技术, 对基因进行随机激活。抗性筛选结果显示, 600 μg/mL潮霉素B可以抑制藻细胞生长。将构建的连接有高鸟嘌呤含量sgRNA的质粒pLWR-dzCas9-VP64::sgHG进行电击转化, 在潮霉素B抗性平板上经过多轮筛选获得具有稳定抗性且生长较快的转化藻株, PCR和RT-qPCR验证结果显示质粒已经成功转入和表达。进一步分析发现, 异养条件下转化藻株的生物量浓度均高于野生型藻株, 且转化藻株的蛋白质、油脂和色素含量和产量显著提高。其中, 转化藻株V-6的蛋白质含量和产量分别达到了452.83 mg/g和2384.32 mg/L, 与野生型藻株相比分别增长了17.97%和32.82%; 油脂含量和产量高达169.38 mg/g和891.56 mg/L, 与野生型相比提高了23.20%和38.97%; 叶绿素含量与野生型相近, 产量与野生型相比提高了18.44%; 类胡萝卜素含量与野生型无显著性差异, 产量与野生型相比提高了13.57%。因此, 本研究获得的转化藻株具有优异的蛋白质、油脂和色素生产能力。研究结果为索罗金小球藻FZU60基因编辑技术的建立提供了技术支撑, 为提高其高附加值代谢产物的产量提供了重要的理论依据。

**关键词:** CRISPRa; sgRNA; 蛋白质; 油脂; 色素; 索罗金小球藻

**中图分类号:** Q344$^{+}$.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3207(2026)07-072617-11

doi: 10.3724/1000-3207.2026.2026.0024 CSTR: 32229.14.SSSWXB.2026.0024

近年来, 微藻作为一种可持续供应的食品与饲料原料, 已在全球范围内受到广泛关注[1, 2]。微藻可产生多种生物活性物质, 包括蛋白质、多糖、油脂、类胡萝卜素、维生素等, 有益于人类和动物健康[3, 4]。此外, 与植物相比, 微藻具有生长周期较短、光合作用效率高、营养需求低、不与农作物竞争耕地等特点[5]。因此, 微藻已经被应用于保健食品、动物饲料等领域。

索罗金小球藻(*Chlorella sorokiniana*)是绿藻门(Chlorophyta)、绿藻纲(Chlorophyceae)、绿球藻目(Chlorococcale)、小球藻科(Chlorellaceae)、小球藻属(*Chlorella*)的一种单细胞藻类。其生长速度快, 适应能力强, 在自养、兼养和异养条件下均能快速生长[6, 7]。在异养条件下, 索罗金小球藻的最大生物量浓度可达到200 g/L以上, 实现超高密度异养培养[8, 9]。同时, 其富含蛋白质、油脂、类胡萝卜素等多种营养成分[10, 11]。因此, 索罗金小球藻具有重要的商业应用前景。

成簇规律间断短回文重复序列(Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats,

**收稿日期:** 2026-01-20; **修订日期:** 2026-04-01

**基金项目:** 福建省自然科学基金优青项目(2024J09039); 集美大学科研启动经费项目(ZQ2024067)资助 [Supported by the Natural Science Foundation Excellent Young Scientists Fund, Fujian (2024J09039); the Initial Fund for Scientific Research of Jimei University-Natural Science (ZQ2024067)]

**作者简介:** 马瑞娟(1987—), 女, 博士, 副教授; 主要研究方向为微藻生物技术。E-mail: rjma@jmu.edu.cn

**通信作者:** 谢友坪(1986—), 男, 博士, 副研究员; 主要研究方向为微藻生物技术。E-mail: ypxie@fzu.edu.cn

©The Author(s) 2026. This is an open access article under the CC-BY 4.0 License (https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

CRISPR)技术是一种适用范围广、效率高的基因编辑工具[12—14], 已被应用微藻基因工程领域[15]。基于CRISPR/dCas9的转录激活系统(CRISPRa)是1种用于上调基因表达的CRISPR新技术, 其通过将无核酸酶活性的 Cas9 (dCas9)与转录激活结构域(如VP16、VP64、p65)融合表达, 以达到激活目的基因转录的目的[12]。该技术不受靶基因大小影响, 可同时激活不同的基因, 而且脱靶效应低[16]。其在哺乳动物和植物中有较为广泛的应用, 然而在微藻中的应用研究还较少[12]。

索罗金小球藻的基因组DNA中鸟嘌呤-胞嘧啶(GC)含量较高, 可达到碱基数的65%以上[17, 18]。自适应单导辅助调控DNA(Adaptive Single Guide Assisted Regulation DNA, ASGARD)系统通过设计高鸟嘌呤(G)含量的sgRNA, 结合CRISPRa技术, 可对高GC含量生物进行基因的随机激活, 从而筛选获得优良性状的藻株[19]。本研究以高产蛋白质、油脂和色素的索罗金小球藻(*C. sorokiniana*) FZU60为研究对象[20, 21], 基于ASGARD方法设计sgRNA, 并以此构建CRISPRa系统, 以提高其高附加值代谢产物的产量。研究结果可为该藻株的代谢工程研究提供理论依据。

## 1　材料与方法

### 1.1　实验藻株与菌株

本研究所用藻株为索罗金小球藻(*C. sorokiniana*) FZU60, 来源于福州大学福建省海产品废弃物综合利用工程技术研究中心。大肠杆菌DH5α、质粒pET-28a分别购买自上海百赛生物技术有限公司和武汉转导生物技术有限公司。含有质粒pLWR-dzCas9-VP64的大肠杆菌DH5α菌株由台湾成功大学吴意珣教授提供。

### 1.2　索罗金小球藻FZU60的抗性筛选

将索罗金小球藻FZU60接种至100 mL TAP液体培养基[22], 于25℃和光照强度80 μmol/($m^2$·s)条件下培养至细胞密度为$10^7$个/mL。取10 mL藻液在6000 r/min下冷冻离心10min, 用1 mL $ddH_2O$重悬。取100 μL重悬藻液均匀涂布于含有梯度浓度(0、200、400、600、800 μg/mL)潮霉素B(Hyg B)的TAP琼脂平板, 培养7d, 观察藻体的生长情况。

### 1.3　质粒构建

参考Lin等[19]的方法构建质粒。设计并合成GC含量高达90%的特异性sgRNA (5′-AAGGGGGGGGGGGGGGGGGG-3′), 采用T4多聚核苷酸激酶(Takara 2021S)将合成的单链sgRNA经退火磷酸化形成双链sgRNA。将质粒pLWR-dzCas9-VP64用*Bsa* Ⅰ (Vazyme DD4303)酶切, 用琼脂糖凝胶纯化回收试剂盒(Genebetter DC011)进行胶回收。采用T4连接酶(TaKaRa 2011A)将双链sgRNA与线性化载体(pLWR-dzCas9-VP64)连接, 获得质粒pLWR-dzCas9-VP64::sgHG。以M13-F (5′-CGCCAGGGTTTTCCCAGTCACGAC-3′)为上游引物, 以sgRNA-R为下游引物, 采用DNA 聚合酶(Vazyme, P505)对阳性转化菌株进行PCR扩增。进一步采用质粒提取试剂盒(Trans, EM101)提取质粒, 并采用限制性内切酶*Hin*d Ⅲ (TaKaRa, 1615)进行酶切验证。将质粒送到生工生物工程(上海)股份有限公司测序。

### 1.4　索罗金小球藻FZU60的电击转化

将索罗金小球藻FZU60在TAP液体培养基中培养至细胞密度为$10^7$个/mL, 取10 mL藻液在6000 r/min下冷冻离心10min。用HS培养基冲洗两次, 然后重悬于1 mL $ddH_2O$。取100 μL重悬藻液与5 μg质粒pLWR-dzCas9-VP64::sgHG混合, 转移至预冷的0.2 cm电极杯(Biorad USA)中。根据文献[19, 23]报道, 使用电穿孔仪(Biorad, Gene Pulser XcellTM)在360 V、25 μF、200 Ohm条件下进行电击转化。电击结束后冰浴10min, 转移至10 mL TAP培养基中, 室温条件下暗培养24h。在6000 r/min条件下离心10min收集藻细胞, 采用200 μL TAP培养基重悬, 涂布于含600 μg/mL Hyg B的TAP琼脂平板, 于25℃、光照强度80 μmol/($m^2$·s)条件下培养至单藻落形成。

HS培养基的组成为(g/L): 磷酸盐缓冲液5.0 mL, 浓缩液5.0 mL, 微量元素1.0 mL, 加水定容至1.0 L。其中, 磷酸盐缓冲液的组成为(g/L): $K_2HPO_4$ 288.0, $KH_2PO_4$ 144.0; 浓缩液的组成为(g/L): $NH_4Cl$ 100, $MgSO_4·7H_2O$ 4.0, $CaCl_2·2H_2O$ 2.0; 微量元素的组成为(g/L): EDTA·2Na 50.0, $ZnSO_4·7H_2O$ 22.0, $H_3BO_3$ 11.4, $MnCl_2·4H_2O$ 5.06, $CoCl_2·6H_2O$ 1.61, $CuSO_4·5H_2O$ 1.57, $(NH_4)_6Mo_7O_{24}·4H_2O$ 1.1, $FeSO_4·7H_2O$ 4.99。

### 1.5　转化藻株的筛选与鉴定

挑取14个转化藻株, 划线于含600 μg/mL Hyg B的TAP平板, 在25℃、光照强度80 μmol/($m^2$·s)条件下培养至藻体长出。将藻体接种至100 mL MM培养基[24], 并以野生型索罗金小球藻FZU60为对照, 在30℃、150 r/min条件下避光培养。当藻体长至对数期时, 取15 mL藻液提取基因组DNA, 用于PCR扩增验证。用Premix Taq™ (TaKaRa RR003Q), 以dCAS-F (5′-CTCCGCGTACAACAAGCACC-3′)为上游引物、VP64-R (5′-TAGTCGGGCACATCGTATGGGT-3′)为下游引物进行PCR扩增。同时, 采用质粒

pLWR-dzCas9-VP64::sgHG为阳性对照模板, 以野生型索罗金小球藻FZU60基因组DNA为阴性对照模板, 以确保PCR的准确性。

### 1.6 转化藻株的异养培养

将验证成功的转化藻株按$10^6$个/mL的初始细胞密度接种于100 mL MM培养基中, 培养至对数生长期。随后以同样的细胞密度接种于150 mL MM培养基中, 在30℃、150 r/min条件下进行异养发酵培养。在培养期间, 每隔24h取样测定生物量浓度、葡萄糖和硝酸钠浓度。培养至第5天时, 取剩余藻液在8000 r/min下离心5min, 收集藻泥, 冷冻干燥后于−80℃冰箱保存, 用于测定蛋白质、油脂、碳水化合物、叶绿素和类胡萝卜素含量。

### 1.7 转化藻株的生长和细胞组成分析

转化藻株生物量浓度的测定: 采用分光光度计测定各培养时间藻液在675 nm处的吸光值($A_{675}$), 根据标准曲线($y$=0.3185$x$−0.10067, $R^2$=0.99941)计算生物量浓度。其中, $y$为生物量浓度, $x$为$A_{675}$值。

藻液中剩余葡萄糖浓度的测定: 将待测藻液在10000 r/min下离心10min, 取上清稀释适当浓度, 随后取2 mL稀释液于25 mL比色管中, 加入2 mL DNS试剂。沸水浴5min后立即冰浴冷却, 补水至25 mL, 混匀后测定其在540 nm处的吸光值($A_{540}$)。根据标准曲线($y$=0.76253$x$+0.0185, $R^2$=0.99871)计算葡萄糖浓度。其中, $y$为葡萄糖浓度, $x$为$A_{540}$值。

藻液中剩余硝酸钠浓度的测定: 将待测藻液在10000 r/min下离心10min, 取上清用醋酸纤维素滤膜过滤, 取滤液稀释适当浓度, 测定稀释液在220 nm处的吸光值($A_{220}$)。根据标准曲线($y$=24.17869$x$−0.04924, $R^2$=0.99993)计算硝酸钠浓度。其中, $y$为硝酸钠浓度, $x$为$A_{220}$值。

藻体蛋白质含量的测定: 采用藻类蛋白提取试剂盒(BestBio, BB-3131-1)提取冻干藻体的蛋白质, 随后采用蛋白定量试剂盒(TransGen Biotech, DQ111-01)测定藻体蛋白质含量。

藻体油脂含量的测定: 采用直接转酯化方法[25]测定藻体的油脂组分及含量。

藻体碳水化合物含量的测定: 采用硫酸−苯酚法[26]测定藻体的碳水化合物含量。

藻体类胡萝卜素含量的测定: 准确称取冻干藻粉10 mg至破碎管, 再加入1 mL 60% (*w*/*w*)的氢氧化钾溶液和研磨珠0.5 g, 使用珠磨破碎机破碎12次, 每次1min, 停3min。40℃水浴40min; 冷却至室温, 加入1 mL无水乙醚洗净并转移至15 mL离心管, 反复清洗3次。漩涡振荡30s, 5000 r/min离心1min, 转移上层有机相至棕色瓶, 再向离心管中加入3 mL无水乙醚, 重复上述操作, 直至上层萃取液无色为止。将收集的上层有机相用氮气吹干, 再加入3 mL丙酮振荡重悬样品, 最后用紫外分光光度测定样品于444 nm波长处吸光值($A_{444}$)。根据以下方程计算藻体类胡萝卜素含量[27]: $y$=4.32$x$−0.0439。其中, $y$为类胡萝卜素浓度(mg/L), $x$为$A_{444}$。

藻体叶绿素含量的测定: 采用丙酮法[28]测定藻体的叶绿素含量。准确称取冻干藻粉5 mg至破碎管, 加入1 mL 90% (*v*/*v*)丙酮−水溶液和研磨珠0.5 g破碎7min。将破碎后的样品用1 mL 90% (*v*/*v*)丙酮−水溶液洗净并转移至15 mL离心管, 反复清洗3次; 再加入4 mL 90% (*v*/*v*)丙酮−水溶液使总体积为8 mL, 5000 r/min离心5min, 去上清, 用90% (*v*/*v*)丙酮−水溶液进行适当稀释后, 用分光光度计测定稀释液的$A_{665}$、$A_{645}$和$A_{630}$值。根据以下公式计算叶绿素浓度: Chl.$a$=11.6×$A_{665}$−1.31×$A_{645}$−0.14×$A_{630}$, Chl.$b$=20.7×$A_{645}$−4.34×$A_{665}$−4.42×$A_{630}$。式中, Chl.$a$和Chl.$b$分别为叶绿素$a$和$b$的浓度(mg/L)。

### 1.8 实时荧光定量PCR(RT-qPCR)

采用Biospin多糖多酚植物总RNA提取试剂盒Biospin Plant Total RNA Extraction Kit (bioflux, BSC65S1)提取转化藻株和野生型的RNA。采用PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser (Perfect Real Time; TaRaKa, RR047A)试剂盒将RNA反转录为cDNA。采用实时荧光定量PCR仪(伯乐, CFX-Connect), 使用荧光染料TB Green® Premix Ex Taq™ II (Tli RNaseH Plus; TaKaRa, RR820A), 以dCas9-VP64-F (5′-CGCAAGAGGTACACAAGCACTA-3′)为上游引物、dCas9-VP64-R (5′-TCTTAGGGCTGCCTGATGACC-3′)为下游引物测定dCas9-VP64的表达量。RT-qPCR方法及基因表达量的计算参考Ma等[29]的方法, 以核糖体蛋白L19基因(*RPL19*)作为内参基因。

### 1.9 数据处理

在转化藻株的培养以及生长和细胞组成分析过程中, 每个处理设置3个生物性重复。使用Origin 2021进行绘图, 采用双尾t检验分析转化藻株与野生型之间的显著性差异, 并采用星号表示转化藻株与野生型相比的显著性差异情况($P$>0.05表示差异不显著, *$P$<0.05表示差异显著, **$P$<0.01表示差异极显著)。

## 2 结果

### 2.1 索罗金小球藻FZU60对Hyg B的抗性

筛选获得索罗金小球藻FZU60转化藻株, 评估其对 Hyg B的抗性。如图 1所示, 在不含Hyg B的

抗性平板上索罗金小球藻FZU60可以正常生长, 在200和400 μg/mL Hyg B的抗性平板上仅有少量藻落长出, 而在600和800 μg/mL Hyg B的抗性平板上未观察到藻落生长。以上结果表明, Hyg B可以抑制索罗金小球藻FZU60的生长, 当浓度达到600 μg/mL以上时, 藻体无法在平板上生长。根据文献报道, 通常采用能够抑制藻细胞生长的较低抗性浓度作为微藻遗传转化的筛选浓度, 浓度过高可能会抑制转化藻细胞的生长[30]。因此, 采用600 μg/mL Hyg B进行后续转化藻株的筛选。

### 2.2　质粒pLWR-dzCas9-VP64::sgHG的构建

将质粒pLWR-dzCas9-VP64经限制性内切酶*Bsa* Ⅰ酶切, 得到去除*SmR*基因及其上下游共1226 bp片段的线性化载体。将sgRNA-F/R经退火磷酸化后得到的20 bp双链DNA片段(sgHG), 并将其连接到上述线性化载体, 得到质粒pLWR-dzCas9-VP64::sgHG (图 2A和2B)。采用引物M13-F/sgRNA-R进行菌液PCR验证, 得到约500 bp的条带(图 2C)。采用*Hin*d Ⅲ进行酶切验证, 得到712和15040 bp的两个条带; 而以质粒pLWR-dzCas9-VP64为对照, 酶切得到1913和15040 bp的两个条带(图 2D)。以上结果表明, 质粒pLWR-dzCas9-VP64::sgHG构建成功。

### 2.3　转化藻株的构建与验证

采用电击转化法将构建的质粒pLWR-dzCas9-VP64::sgHG转入索罗金小球藻FZU60中, 在含有600 μg/mL Hyg B的TAP固体培养基上筛选转化藻株, 对照组以相同的条件转化, 但不添加质粒。如图 3A所示, 未转化质粒的藻体涂平板后无藻落生长, 而转化质粒pLWR-dzCas9-VP64::sgHG的藻体涂平板后出现明显的绿色单藻落(图 3B), 表明质粒已成功转入索罗金小球藻FZU60中。从图 3B中挑选多个单藻落, 与野生型藻株(WT)一起划线于含有600 μg/mL Hyg B的TAP琼脂平板上, 培养3—4d。待转化藻株长出后再次划线于Hyg B抗性平板, 经3轮筛选获得具有稳定抗性的转化藻株。如图 3C所示, 选择的转化藻株在抗性平板能够生长, 而WT无法在该平板上生长, 进一步说明质粒已成功整合到索罗金小球藻FZU60中。选取具有稳定抗性的转化藻株, 接种于MM液体培养基中, 培养7天左右, 分别提取基因组DNA。采用引物dCAS-F/VP64-R进行PCR扩增结果显示, 以质粒pLWR-dzCas9-VP64::sgHG和转化藻株的基因组DNA为模板均扩增出567 bp的条带, 而以WT基因组DNA为模板未扩增出条带(图 3D)。同时, 选取6个具有稳定抗性且在液体培养基中生长较快的转化藻株(V-3、V-4、V-6、V-10、V-11、V-12), 提取RNA, 反转录后进行RT-qPCR验证。结果显示, 6个转化藻株的dCas9-VP64均有表达, 而WT无表达(图 4)。以上结果进一步表明, 质粒pLWR-dzCas9-VP64::sgHG已经转入索罗金小球藻FZU60中且进行了表达。

### 2.4　野生型与转化藻株的异养生长情况对比分析

为了测定野生型(WT)与转化藻株在不同培养时间内的细胞生长以及葡萄糖的消耗情况, 将6个(V-3、V-4、V-6、V-10、V-11、V-12)经PCR和RT-qPCR验证为正确的转化藻株进行异养培养, 以WT为对照, 均设置3个生物学重复。从图 5A可以看出, 所有藻株在第2天后进入指数生长期, 第4天后进入稳定期, 第5天所有藻株的生物量浓度均呈

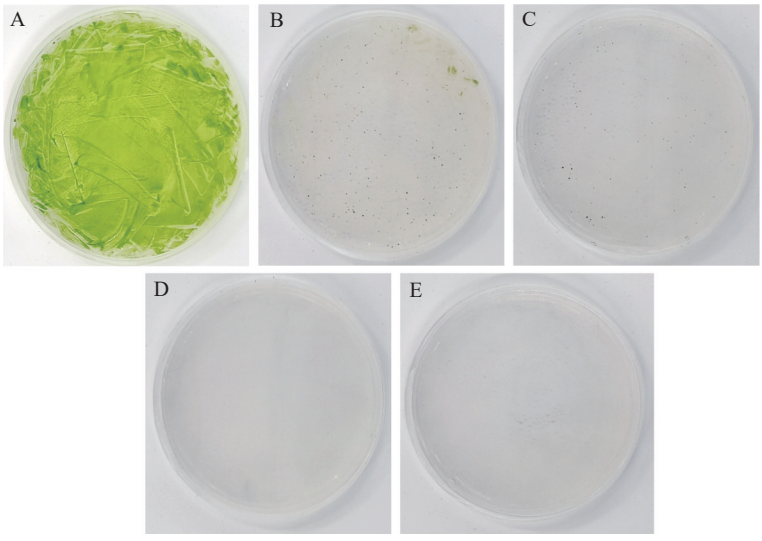



图 1　索罗金小球藻FZU60在不同浓度Hyg B条件下的生长情况

Fig. 1　The growth of *C. sorokiniana* FZU60 under different concentrations of hygromycin B

A. 0; B. 200 μg/mL Hyg B; C. 400 μg/mL Hyg B; D. 600 μg/mL Hyg B; E. 800 μg/mL Hyg B

轻微下降趋势。在指数生长期, WT与转化藻株V-3、V-4、V-6、V-10、V-12的生长速率相近, 但均不及转化藻株V-11。WT与转化藻株V-3、V-4、V-6、V-10、V-11、V-12的生物量浓度均在第4天达到最大值, 分别为5.00、5.59、5.70、5.60、5.60、5.40和5.77 g/L。所有转化藻株的最大生物量均高于WT, 最高为WT的1.15倍。此外, 图 5B显示, 所有藻液中的葡萄糖均在第4天耗尽, 但转化藻株V-11的消耗速率略快于WT和其他转化藻株。以上结果表明, 与WT相比, 转化藻株具有更高的最大生物量浓度, 且转化藻株V-11具有更快的生长速率和碳氮利用速率。

### 2.5 野生型与转化藻株的细胞组成对比分析

为明确野生型WT与转化藻株间的差异, 测定了其蛋白质、碳水化合物、油脂和色素含量。图 6A显示, 培养5d后, 转化藻株V-3、V-4、V-6、V-10、V-11、V-12的蛋白质含量均显著高于野生型WT (383.84 mg/g), 其中转化藻株V-6和V-11的蛋白

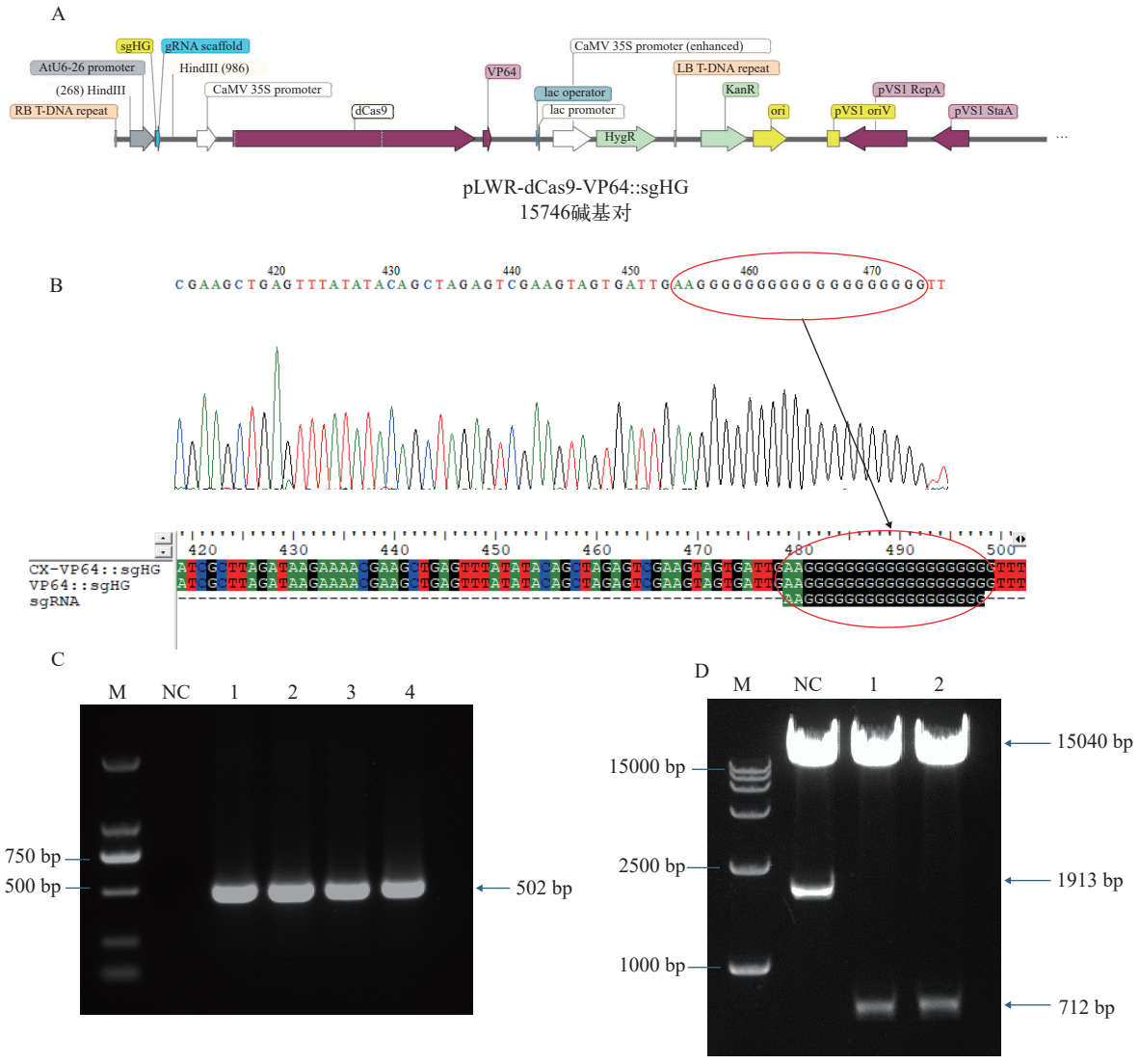



图 2 质粒pLWR-dzCas9-VP64::sgHG的构建

Fig. 2 Construction of the plasmid pLWR-dzCas9-VP64::sgHG

A. 质粒pLWR-dzCas9-VP64::sgHG的图谱; B. 序列比对结果; C. 菌液PCR验证结果(M. 2000 DNA Marker; NC. 以质粒pLWR-dzCas9-VP64为模板扩增结果; 1—4. 以转化菌株为模板扩增结果); D. 酶切验证结果(M. 15000 DNA Marker; PC. 质粒pLWR-dzCas9-VP64酶切结果; 1—2. 重组质粒pLWR-dzCas9-VP64::sgHG酶切结果)

A. Map of plasmid pLWR-dzCas9-VP64::sgHG; B. Sequence alignment results; C. Results of PCR verification of bacterial culture (M. 2000 DNA Marker; NC. The amplification result using the plasmid pLWR-dzCas9-VP64 as a template; 1—4. The amplification result using transformed bacterial strain); D. Results of restriction enzyme digestion verification (M. 15000 DNA Marker; PC. The results of restriction enzyme digestion of plasmid pLWR-dzCas9-VP64; 1—2. The results of restriction enzyme digestion of plasmid pLWR-dzCas9-VP64::sgHG)

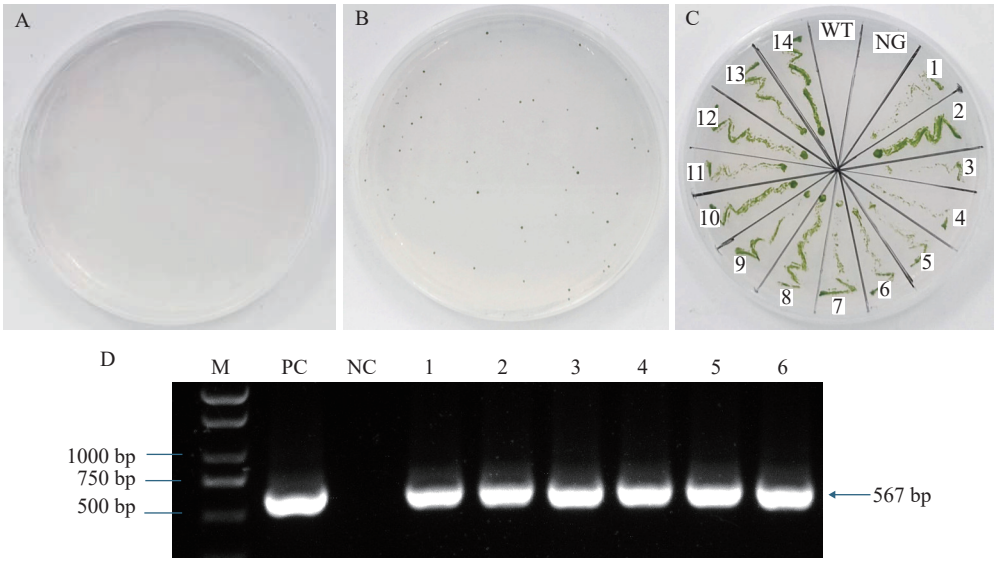



图 3　转化藻株的构建与PCR验证

Fig. 3　Construction and PCR validation of transformed algal strains

A. 未加质粒转化的藻体涂布培养结果; B. 质粒pLWR-dzCas9-VP64::sgHG转化的藻体涂布培养结果; C. 转化藻落平板划线培养结果(WT. 野生型索罗金小球藻FZU60; NG. 水; 1—14. 转化藻株); D. 转化藻株的PCR验证结果[M. 2000 DNA Marker; PC. 以质粒pLWR-dzCas9-VP64::sgHG为模板扩增结果; NC 以野生型索罗金小球藻FZU60基因组DNA为模板扩增结果; 1—6. 以转化藻株(V-3、V-4、V-6、V-10、V-11、V-12)基因组DNA为模板扩增结果]

A. Plating culture results of algae transformed without plasmid; B. Plating culture results of algae transformed with plasmid pLWR-dzCas9-VP64::sgHG; C. Culture results of streaking transformed algal colonies on plates (WT: Wild-type *C. sorokiniana* FZU60; Control: Water; 1—14. Transformed algal strains); D. PCR verification results of the transformed algal strains [M. 2000 DNA Marker; PC. PCR amplification result using plasmid pLWR-dzCas9-VP64::sgHG as a template; NC. PCR amplification result using wild-type *C. sorokiniana* FZU60 genomic DNA as a template; 1—9. PCR amplification results using genomic DNA of transformed algal strains (V-3, V-4, V-6, V-7, V-10, V-11, V-12, V-13) as templates]

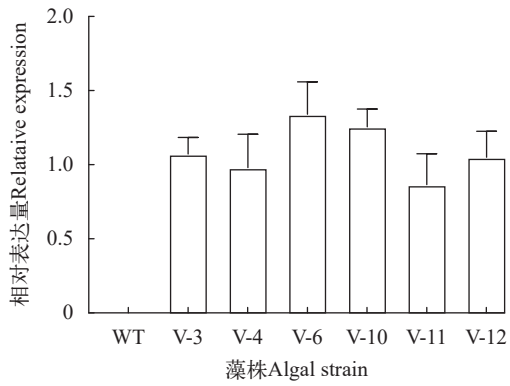



图 4　转化藻株的RT-qPCR验证dCas9-VP64的表达

Fig. 4　RT-qPCR validation of the dCas9-VP64 expression in transformed algal strains

质含量分别达到了452.83和446.39 mg/g, 与WT相比分别增长了17.97%和16.29%。转化藻株V-3、V-4、V-6的油脂含量均显著高于WT (137.48 mg/g), 其中转化藻株V-6的油脂含量高达169.38 mg/g, 与WT相比提高了23.20%, 而转化藻株V-10、V-11、V-12的油脂含量与WT相比没有显著差异。与蛋白质和油脂含量相反, 转化藻株的碳水化合物含量均显著低于WT (308.03 mg/g), 其中转化藻株V-10的碳水化合物含量最低, 仅为269.29 mg/g, 与WT相比降低了12.58%。如图 6B所示, 与WT相比, 转化藻株V-4的叶绿素*a*含量提高2.89%, 达27.39 mg/g, 而V-12的叶绿素*b*显著降低。其余转化藻株的叶绿素*a*、叶绿素*b*和类胡萝卜素含量与WT无显著变化, 含量分别在2.66%—2.77%、0.75%—0.85%和0.64%—0.66%。

蛋白质、碳水化合物、油脂和色素产量由其在藻细胞中的含量与生物量浓度的乘积计算而得, 能够反映藻细胞对这些代谢产物的生产能力。如表 1所示, 与WT相比, 6个转化藻株的蛋白质产量均显著提高, 其中转化藻株V-6的蛋白质产量最高, 提高了32.82%。转化藻株V-3、V-4、V-6、V-11的油脂含量显著高于WT, 分别提高了28.06%、36.52%、38.97%和22.79%。除转化藻株V-12外, 其余5个转化藻株的叶绿素产量和WT相比显著提高, 其中V-6的叶绿素产量最高, 提高了18.44%。此外, 6个转化藻株的类胡萝卜素产量均显著高于WT, 分别提高了12.43%、15.72%、13.57%、14.14%、8.60%和15.25%。由此可见, 转化藻株的蛋白质、油脂、叶

绿素和类胡萝卜素产量和WT相比均有显著提高, 其中V-6具有更高的生产上述高附加值代谢产物的能力。

## 3 讨论

### 3.1 索罗金小球藻FZU60对Hyg B的耐受性与其他藻株存在差异

索罗金小球藻具有生长速度快, 蛋白质、油脂和类胡萝卜素等营养成分含量高, 可进行自养、兼养和异养培养等特点, 具有重要的开发应用前景[10]。目前, 已经报道的索罗金小球藻有多种不同藻株, 其生长特性、营养成分含量、基因序列均存在差异[18]。本研究采用的索罗金小球藻FZU60从福建沿海地区分离获得[31], 其高产蛋白质、油脂和色素[20, 21], 且可进行高密度异养培养[24]。因此, 构建索罗金小球藻FZU60的遗传转化体系对于其规模化生产具有重要意义。

构建微藻的遗传转化体系首先要明确其筛选标记。本研究发现索罗金小球藻FZU60对Hyg B具有一定的耐受性, 在400 μg/mL Hyg B的TAP培养基平板上仍有少量藻落长出, 需要较高浓度的Hyg B (600 μg/mL)才能抑制其生长(图 1)。据文献报道, 在TAP培养基平板上加入低于100 μg/mL Hyg B即可抑制其他索罗金小球藻藻株的生长, 用于遗传转化的抗性筛选[19, 32]。由此可见, 不同索罗金小球藻藻株对Hyg B具有不同的耐受性。

### 3.2 索罗金小球藻FZU60的CRISPRa体系构建

相对于微生物、植物和动物, 微藻基因工程的研究仍然较少, 这主要是因为缺少稳定高效的基因编辑技术。CRISPR技术是一种简单高效的基因编

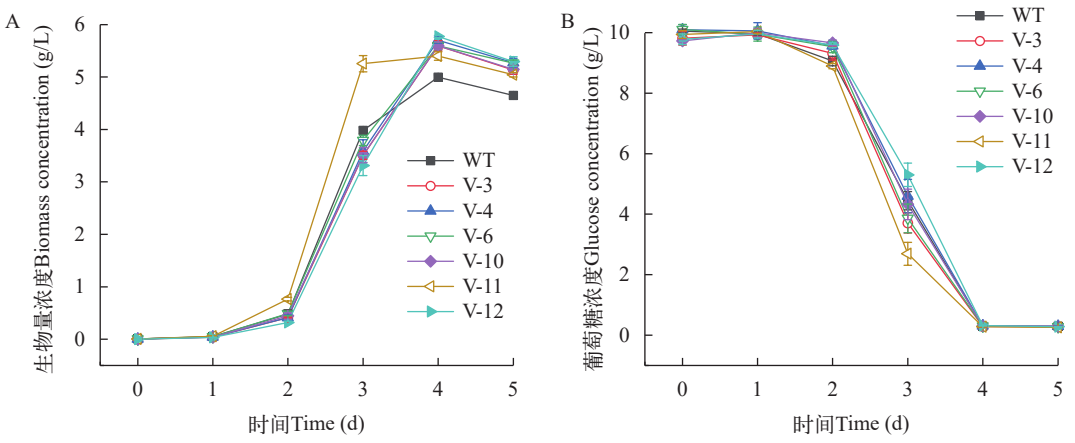



图 5 野生型与转化藻株的异养生长情况

Fig. 5 Heterotrophic growth of the wild type and the transformed algal strains

A. 生物量浓度; B. 葡萄糖浓度

A. Biomass concentration; B. Glucose concentration

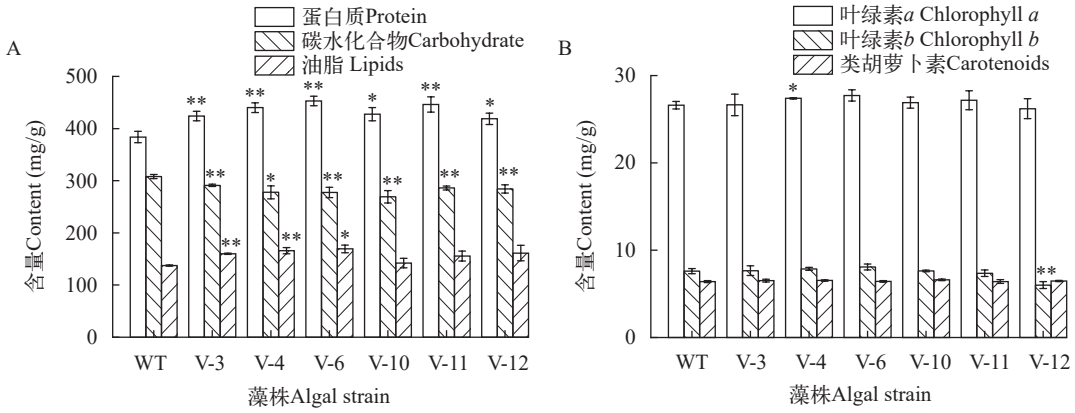



图 6 野生型与转化藻株的细胞组成

Fig. 6 Cellular composition of the wild type and the transformed algal strains

A. 蛋白质、碳水化合物和油脂含量; B. 色素含量; 图中单位(mg/g)表示1 g细胞干物质(DW)中代谢产物的质量(mg); *$P$<0.05, **$P$<0.01

A. Protein, carbohydrate, and lipid content; B. Pigment content; The units (mg/g) in the figure represent the mass (mg) of metabolites per 1 g of cell dry weight (DW); *P<0.05, **$P$<0.01

辑技术, 广泛应用于多种生物中。目前, 已经应用于微藻的CRISPR技术主要有CRISPR/Cas9、CRISPR-Cpf1、CRISPRi和基于Cas-RNP 的CRISPR技术[15]。开发更多有效的CRISPR技术对于提高微藻高附加值代谢产物的产量具有重要意义。CRISPRa技术通过将dCas9与转录激活结构域(如VP16、VP64、p65)融合表达, 以激活目的基因的转录[12, 13]。与传统的CRISPR/Cas9系统相比, CRISPRa技术不受靶基因大小影响, 可同时激活不同的基因[16, 33]。目前, 该技术在植物育种及人类疾病治疗中已经有较为广泛的应用[34, 35]。然而, 其在微藻中的应用较少。Wei等[12]构建了微拟球藻*Nannochloropsis oceanica*的CRISPRa系统, 表明该技术在微藻中应用的可行性。本研究通过设计高G含量的sgRNA, 结合CRISPRa技术, 构建质粒pLWR-dzCas9-VP64::sgHG, 对索罗金小球藻FZU60进行随机激活, 以期筛选获得优良性状的藻株(图 2)。通过电击转化后在Hyg B抗性平板筛选获得了阳性转化藻株, 且PCR和RT-qPCR验证结果显示质粒已经转入藻细胞内且进行了表达(图 3和图 4)。以上结果表明CRISPRa技术可以应用于索罗金小球藻FZU60。Western Blot技术可用于蛋白水平验证外源基因的表达, 从而为CRISPRa系统在索罗金小球藻FZU60中的应用效果提供更为直接的实验证据。然而, 受限于当前实验平台条件及特异性抗体的可获得性等因素, 本研究暂未开展该验证实验。在后续研究中, 我们将建立Western Blot分析方法, 验证目标蛋白表达水平的变化趋势, 以进一步明确CRISPRa介导的基因激活效应。

CRISPR技术的应用通常需要基于基因组序列信息, 然而目前小球藻的基因组序列信息仍然有限。据文献报道, 索罗金小球藻(*C. sorokiniana*) UTEX 1602、1230、1228、1412的基因组中GC含量分别高达64.1%、63.8%、65.3%和64.1%, 因此索罗金小球藻是高GC含量的一类生物, 而且研究发现不同索罗金小球藻藻株之间基因组序列差异很大[17, 18]。本研究采用的索罗金小球藻FZU60的基因组序列尚未报道, 但基于前期的转录组测序结果发现其多数基因序列也具有较高的GC含量[29]。此外, 研究发现, 索罗金小球藻UTEX 1602基因组中20个鸟嘌呤(G)出现的频率很高[19]。基于此, 本研究通过构建含有高G含量sgRNA的质粒pLWR-dzCas9-VP64::sgHG, 对索罗金小球藻FZU60进行转化, 获得的转化藻株生物量浓度明显提升(图 5), 同时蛋白质和油脂含量显著提高(图 6), 说明结合ASGARD的CRISPRa系统能够对索罗金小球藻FZU60的基因的激活表达。以上结果表明, 高G含量sgRNA能够引导蛋白质和油脂合成相关基因进行激活, 使得细胞代谢流从碳水化合物转向蛋白质和油脂的合成, 然而这需要通过测定索罗金小球藻FZU60基因组序列并通过多组学分析来验证。Lin等[19]对另一株索罗金小球藻CS进行基因随机激活, 发现转化藻株的蛋白质含量和野生型相比显著提高, 而油脂含量无显著性差异。由此可见, 不同索罗金小球藻藻株的转化效果存在较大差别, 这可能是其基因组序列差异较大导致的[18]。本研究采用的索罗金小球藻FZU60由本实验室分离获得, 高产蛋白质、油脂和色素[20, 21], 且可在发酵罐中实现高密度异养培养[24, 36], 具有良好的商业应用潜力。本研究建立了索罗金小球藻FZU60的CRISPRa体系, 获得的转化藻株蛋白质和油脂含量得到进一步提升, 为该藻株的规模化培养与产业化应用提供了重要的技术支撑。据报道, CRISPRa技术具有脱靶效应低的优点[16]。本研究获得的转化藻株是否存在脱靶效应仍需通过全基因组测序等技术进一步验证。受限于当前研究经费, 该验证工作尚未开

**表 1　野生型和转化藻株的蛋白质、油脂和色素产量**

Tab. 1　The production of protein, lipid, and pigment in the wild type and the transformed algal strain

| 藻株<br>Algal strain | 蛋白质产量<br>Protein production (mg/L) | 油脂产量<br>Lipid production (mg/L) | 叶绿素产量<br>Chlorophyll production (mg/L) | 类胡萝卜素产量<br>Carotenoid production (mg/L) |
|---|---|---|---|---|
| WT | 1795.19±65.74 | 641.56±0.61 | 159.13±2.52 | 29.77±0.69 |
| V-3 | 2176.71±76.09** | 821.59±19.94** | 176.01±7.98* | 33.47±0.85** |
| V-4 | 2321.21±66.59** | 875.84±32.24** | 185.91±3.77** | 34.45±0.82** |
| V-6 | 2384.32±71.21** | 891.56±32.50** | 188.48±5.74** | 33.81±0.66** |
| V-10 | 2199.28±63.33** | 731.24±46.74 | 177.61±4.22** | 33.98±0.39** |
| V-11 | 2250.17±61.13** | 787.76±45.14* | 174.05±4.83** | 32.33±0.87* |
| V-12 | 2216.31±19.30** | 854.21±93.24 | 170.58±9.45 | 34.31±0.96** |

注: 表中数据为3个重复的平均值; 星号表示转化藻株与野生型相比的显著性差异情况(*$P$<0.05和**$P$<0.01); 表中单位(mg/L)表示1 L藻液中代谢产物的质量(mg)

Note: Data are means of triplicates; The asterisk indicates the significant differences between the transformed algal strain and the wild type (*$P$<0.05 and **$P$<0.01); The units in the table (mg/L) represent the mass (mg) of the metabolites in 1 L of algal solution

展。后续研究将从基因组层面解析索罗金小球藻FZU60及其转化藻株的差异, 以明确本研究建立的CRISPRa体系的脱靶效应。

### 3.3 转化藻株的蛋白质、油脂和色素产量提高

蛋白质是人类重要的营养素, 然而目前全球蛋白质的供应无法满足人类需求, 微藻被视为蛋白质的新兴生产来源[37, 38]。索罗金小球藻可实现高密度异养培养, 生物量浓度超过200 g/L[8, 9]。此外, 其蛋白质含量高, 自养条件下蛋白质含量可达到细胞干重的50%[20], 是优质的蛋白质生产来源。然而, 在异养条件下藻细胞的蛋白质含量(<40%)低于自养培养条件[6, 39]。因此, 提高索罗金小球藻在异养条件下的蛋白质含量具有重要意义。本研究获得的转化藻株在异养培养条件下的生物量浓度和蛋白质含量均显著高于野生型WT, 且蛋白质是主要细胞成分, 其中转化藻株V-6的蛋白质含量达到细胞干重的45% (图 5), 而且其蛋白质产量达到2384.32 mg/L (表 1), 具有优异的蛋白质生产能力。

微藻油脂含量高, 是生物燃料的新型潜在来源, 且富含多不饱和脂肪酸, 具有多种生物活性[40, 41]。本研究筛选获得的转化藻株V-3、V-4和V-6在异养条件下的油脂含量和产量均显著高于WT (图 5和表 1), 显示出更高的油脂生产潜力。此外, 转化藻株V-4的叶绿素a含量较WT显著提高(图 5), 而且除了转化藻株V-12外, 其他5个转化藻株的叶绿素产量显著高于WT (表 1); 6个转化藻株的类胡萝卜素产量均显著高于WT。叶绿素具有抗氧化、抗菌、抗癌、预防神经疾病等功效[42]。类胡萝卜素具有抗氧化、抗炎、保护视力、预防肝纤维化等功效[43, 44]。本研究获得的转化藻株具有优异的蛋白质、油脂、叶绿素和类胡萝卜素生产能力, 可用于同步生产上述高附加值代谢产物。同时, 研究发现, 获得的转化藻株在抗性平板上传代10次后仍能正常生长, 说明其具有良好的遗传稳定性。后续研究需通过发酵罐培养实验, 进一步探讨转化藻株在规模化培养中的应用潜力, 以评估其商业前景。

## 4 结论

本研究采用结合ASGARD的CRISPRa技术对索罗金小球藻FZU60进行基因随机激活, 筛选获得了阳性转化藻株。与野生型相比, 阳性转化藻株的生物量浓度和生长速度显著提高, 蛋白质、油脂、叶绿素和类胡萝卜素产量显著增加。本研究为索罗金小球藻FZU60基因编辑技术的建立提供了技术支撑, 为提高其高附加值代谢产物的产量奠定了理论依据。

(作者声明本文符合出版伦理要求)

**参考文献:**


[1] Ma M, Hu Q. Microalgae as feed sources and feed additives for sustainable aquaculture: Prospects and challenges [J]. *Reviews in Aquaculture*, 2024, **16**(2): 818-835.

[2] Torres-Tiji Y, Fields F J, Mayfield S P. Microalgae as a future food source [J]. *Biotechnology Advances*, 2020(41): 107536.

[3] Liyanaarachchi V C, Premaratne M, Ariyadasa T U, *et al*. Two-stage cultivation of microalgae for production of high-value compounds and biofuels: a review [J]. *Algal Research*, 2021(57): 102353.

[4] Xu J L, Su K R, Zhao A Q, *et al*. Research progress on high-value utilization of microalgae biomass [J]. *Journal of Microbiology*, 2025, **45**(5): 1-14. [许敬亮, 苏柯瑞, 赵安琪, 等. 微藻生物质高值化利用研究进展 [J]. 微生物学杂志, 2025, **45**(5): 1-14.]

[5] Levasseur W, Perré P, Pozzobon V. A review of high value-added molecules production by microalgae in light of the classification [J]. *Biotechnology Advances*, 2020(41): 107545.

[6] Zhu M M, Zhao L, Zhang H, *et al*. Global transcriptional regulation in *Chlorella sorokiniana* during trophic transition from heterotrophic conditions to photoautotrophic conditions [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2021, **45**(3): 473-486. [祝棉棉, 赵亮, 张虎, 等. 索罗金小球藻异养转自养过程中基因表达的全局调控 [J]. 水生生物学报, 2021, **45**(3): 473-486.]

[7] Nair A, Chakraborty S. Synergistic effects between autotrophy and heterotrophy in optimization of mixotrophic cultivation of *Chlorella sorokiniana* in bubble-column photobioreactors [J]. *Algal Research*, 2020(46): 101799.

[8] Xu Q, Hou G, Chen J, *et al*. Heterotrophically ultrahigh-cell-density cultivation of a high protein-yielding unicellular alga *Chlorella* with a novel nitrogen-supply strategy [J]. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 2021(9): 774854.

[9] Jin H, Chuai W, Li K, *et al*. Ultrahigh-cell-density heterotrophic cultivation of the unicellular green alga *Chlorella sorokiniana* for biomass production [J]. *Biotechnology Bioengineering*, 2021, **118**(10): 4138-4151.

[10] Chen W, Gao S, Huang Y, *et al*. Addition of *Chlorella sorokiniana* meal in the diet of juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Influence on fish growth, gut histology, oxidative stress, immune response, and disease resistance against *Aeromonas salmonicida* [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2022(129): 243-250.

[11] Bian T, Gelling S, van der Goot A J, *et al*. *Chlorella sorokiniana*: Exploring the techno-functional properties

of microalgae fractions in a food biorefinery [J]. *Future Foods*, 2025(**12**): 100816.

[12] Wei L, Jiang Z, Liu B. A CRISPR/dCas9-based transcription activated system developed in marine microalga *Nannochloropsis oceanica* [J]. *Aquaculture*, 2022(546): 737064.

[13] Heidersbach A J, Dorighi K M, Gomez J A, *et al*. A versatile, high-efficiency platform for CRISPR-based gene activation [J]. *Nature Communications*, 2023, **14**(1): 902.

[14] Li X, Dong B. CRISPR/Cas9 and its applications in marine organisms [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2017, **41**(1): 244-256. [李响, 董波. CRISPR/Cas9技术及其在海洋生物中的应用现状与展望 [J]. 水生生物学报, 2017, **41**(1): 244-256.]

[15] Cao K, Cui Y, Sun F, *et al*. Metabolic engineering and synthetic biology strategies for producing high-value natural pigments in microalgae [J]. *Biotechnology Advances*, 2023(68): 108236.

[16] Becirovic E. Maybe you can turn me on: CRISPRa-based strategies for therapeutic applications [J]. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2022, **79**(2): 130.

[17] Arriola M B, Velmurugan N, Zhang Y, *et al*. Genome sequences of *Chlorella sorokiniana* UTEX 1602 and *Micractinium conductrix* SAG 241.80: implications to maltose excretion by a green alga [J]. *The Plant Journal*, 2018, **93**(3): 566-586.

[18] Hovde B T, Hanschen E R, Tyler C R S, *et al*. Genomic characterization reveals significant divergence within *Chlorella sorokiniana* (Chlorellales, Trebouxiophyceae) [J]. *Algal Research*, 2018(35): 449-461.

[19] Lin J Y, Lin W R, Ng I S. CRISPRa/i with Adaptive Single Guide Assisted Regulation DNA (ASGARD) mediated control of *Chlorella sorokiniana* to enhance lipid and protein production [J]. *Biotechnology Journal*, 2022, **17**(10): 2100514.

[20] Ma R, Zhang Z, Tang Z, *et al*. Enhancement of co-production of lutein and protein in *Chlorella sorokiniana* FZU60 using different bioprocess operation strategies [J]. *Bioresources and Bioprocessing*, 2021, **8**(1): 82.

[21] Ma R J, Tang Z Z, Zhao X R, *et al*. High-salinity adaptive domestication and characterization of high lutein producing microalgae *Chlorella sorokiniana* FZU60 [J]. *Food and Fermentation Industries*, 2020, **46**(15): 32-38. [马瑞娟, 唐珠珍, 赵旭蕊, 等. 高产叶黄素小球藻(*Chlorella sorokiniana*) FZU60高盐度适应性驯化及表征 [J]. 食品与发酵工业, 2020, **46**(15): 32-38.]

[22] Xu Z, Chen S, Zhang Y, *et al*. Development of novel acetate- and water-soluble fertilizer-based medium for *Chlorella* cultivation [J]. *Bioresource Technology*, 2025(434): 132777.

[23] Lin W-R, Ng I S. Development of CRISPR/Cas9system in *Chlorella vulgaris* FSP-E to enhance lipid accumulation [J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2020(133): 109458.

[24] Xie Y, Zhang Z, Ma R, *et al*. High-cell-density heterotrophic cultivation of microalga *Chlorella sorokiniana* FZU60 for achieving ultra-high lutein production efficiency [J]. *Bioresource Technology*, 2022(365): 128130.

[25] Ma R, Zhao X, Ho S-H, *et al*. Co-production of lutein and fatty acid in microalga *Chlamydomonas* sp. JSC4 in response to different temperatures with gene expression profiles [J]. *Algal Research*, 2020(47): 101821.

[26] Acién F G, Fernández J M, Magán J J, *et al*. Production cost of a real microalgae production plant and strategies to reduce it [J]. *Biotechnology Advances*, 2012, **30**(6): 1344-1353.

[27] Wang W, Han F, Li Y, *et al*. Medium screening and optimization for photoautotrophic culture of *Chlorella pyrenoidosa* with high lipid productivity indoors and outdoors [J]. *Bioresource Technology*, 2014(170): 395-403.

[28] Xie Y, Ho S H, Chen C N, *et al*. Phototrophic cultivation of a thermo-tolerant *Desmodesmus* sp. for lutein production: effects of nitrate concentration, light intensity and fed-batch operation [J]. *Bioresource Technology*, 2013(144): 435-444.

[29] Ma R, Zhang Z, Fang H, *et al*. Unveiling the underlying molecular mechanisms of high lutein production efficiency in *Chlorella sorokiniana* FZU60 under a mixotrophy/photoautotrophy two-stage strategy by transcriptomic, physiological, and biochemical analyses [J]. *Biotechnology for Biofuels and Bioproducts*, 2023, **16**(1): 47.

[30] Kim J S, Lee S, Cho S, *et al*. Inducing heritable genomic deletions in *APT* gene of *Chlorella sorokiniana* using CRISPR/Cas9 [J]. *Algal Research*, 2024(79): 103435.

[31] Xie Y, Li J, Ma R, *et al*. Bioprocess operation strategies with mixotrophy/photoinduction to enhance lutein production of microalga *Chlorella sorokiniana* FZU60 [J]. *Bioresource Technology*, 2019(290): 121798.

[32] Teng C-S, Ng I S. Optimization of 4-aminobutyric acid feeding strategy and clustered regularly interspaced short palindromic repeats activation for enhanced value-added chemicals in halophilic *Chlorella sorokiniana* [J]. *Bioresource Technology*, 2023(387): 129599.

[33] Clark T, Waller M A, Loo L, *et al*. CRISPR activation screens: navigating technologies and applications [J]. *Trends in Biotechnology*, 2024, **42**(8): 1017-1034.

[34] McLaughlin J E, Kue Foka I C, Lawton M A, *et al*. CRISPR activation: identifying and using novel genes for plant disease resistance breeding [J]. *Frontiers in Genome Editing*, 2025(7): 1596600.

[35] Mittas D M, Gavrilov Z, Ucambarlic E, *et al*. CRISPR/Cas-mediated gene activation as a versatile tool for treatment of inherited retinal dystrophies [J].

*Advances in Experimental Medicine and Biology*, 2025(1468): 95-99.

[36] Zhang Z, Cai W, Ma R, *et al*. Two-stage trophic strategy coupled with fed-batch operation for simultaneous enhancement of cell growth and lutein synthesis in *Chlorella sorokiniana* [J]. *Biochemical Engineering Journal*, 2025(215): 109632.

[37] Geada P, Moreira C, Silva M, *et al*. Algal proteins: Production strategies and nutritional and functional properties [J]. *Bioresource Technology*, 2021(332): 125125.

[38] Amorim M L, Soares J, dos Reis Coimbra J S, *et al*. Microalgae proteins: production, separation, isolation, quantification, and application in food and feed [J]. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2021, **61**(12): 1976-2002.

[39] Fan J, Huang J, Li Y, *et al*. Sequential heterotrophy-dilution-photoinduction cultivation for efficient microalgal biomass and lipid production [J]. *Bioresource Technology*, 2012(112): 206-211.

[40] Sharma A K, Jaryal S, Sharma S, *et al*. Biofuels from microalgae: A review on microalgae cultivation, biodiesel production techniques and storage stability [J]. *Processes*, 2025, **13**(2): 488.

[41] Alijani S, Hahn A, Harris W S, *et al*. Bioavailability of EPA and DHA in humans-A comprehensive review [J]. *Progress in Lipid Research*, 2025(97): 101318.

[42] Sun D, Wu S, Li X, *et al*. The structure, functions and potential medicinal effects of chlorophylls derived from microalgae [J]. *Marine Drugs*, 2024, **22**(2): 65.

[43] Chini Zittelli G, Lauceri R, Faraloni C, *et al*. Valuable pigments from microalgae: phycobiliproteins, primary carotenoids, and fucoxanthin [J]. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 2023, **22**(8): 1733-1789.

[44] Rodriguez-Amaya D B, Esquivel P, Meléndez-Martínez A J. Comprehensive update on carotenoid colorants from plants and microalgae: challenges and advances from research laboratories to industry [J]. *Foods*, 2023, **12**(22): 4080.

# APPLICATION OF THE CRISPRA TECHNOLOGY WITH ASGARD IN *CHLORELLA SOROKINIANA* FZU60

MA Rui-Juan[1], LIN Wen-Jin[2], CHEN Yu-Cheng[2], ZHANG Chun-Xiao[1], WANG Ling[1], LU Kang-Le[1], SONG Kai[1], LI Xue-Shan[1] and XIE You-Ping[2]

(1. *State Key Laboratory of Mariculture Breeding*, *Fisheries College of Jimei University*, *Xiamen* 361021, *China*; 2. *Fujian Engineering Research Center for Comprehensive Utilization of Marine Products Waste*, *Fuzhou Industrial Technology Innovation Center for High-Value Utilization of Marine Products*, *Fuzhou University*, *Fuzhou* 350108, *China*)

**Abstract**: To establish an efficient genetic transformation system for investigating molecular regulatory mechanisms and to increase the yield of its high-value-added metabolites in *Chlorella sorokiniana* FZU60, a CRISPR/dCas9-based transcriptional activation system (CRISPRa) was developed and combined with Adaptive Single-guide Assistant Regulatory DNA (ASGARD) to enable random gene activation. Resistance screening indicated that 600 μg/mL hygromycin B effectively inhibited algal cell growth. The constructed plasmid pLWR-dzCas9-VP64::sgHG, which carries a sgRNA with high guanine content, was introduced into algal cells via electroporation. After multiple rounds of screening on hygromycin B-resistant plates, transformed algal strains with stable resistance and rapid growth were obtained. The PCR and RT-qPCR verification results showed that the plasmid had been successfully transferred and expressed. Further analysis revealed that all transformed algal strains achieved higher biomass concentration than the wild type strain under heterotrophic conditions. The content and production of protein, lipid, and pigment of the transformed algal strain were significantly increased. Among them, the protein content and production of the transformed algal strain V-6 reached 452.83 mg/g and 2384.32 mg/L, representing increases of 17.97% and 32.82% over the wild type strain, respectively; lipid content and production were as high as 169.38 mg/g and 891.56 mg/L, which were 23.20% and 38.97% higher than those of the wild type, respectively; chlorophyll content remained similar to that of the wild type, whereas chlorophyll production increased by 18.44%; carotenoid content showed no significant difference from the wild type, while carotenoid production rose by 13.57%. Therefore, the transformed algal strain obtained in this study exhibits excellent capabilities for producing protein, lipid, and pigment. These findings provide technical support for establishing gene-editing techniques in *C. sorokiniana* FZU60 and offer a crucial theoretical basis for enhancing the production of high-value metabolites from this alga.

**Key words**: CRISPRa; sgRNA; Protein; Lipid; Pigment; *Chlorella sorokiniana*