

DOI:10.13364/j.issn.1672-6510.20180142

甘油激酶基因对三角褐指藻理化性质的影响

高莉, 张志霞, 卿人韦, 马力
(四川大学生命科学学院, 成都 610064)

摘要: 为了探索甘油激酶(glycerol kinase, GK)基因对三角褐指藻(*Phaeodactylum tricorutum*)生长的影响,以 GK 基因过表达藻株、干扰藻株和野生型藻株为研究对象,测定了其生长情况、GK 基因转录水平、GK 活性、脂质含量和金藻昆布多糖等参数.结果显示:转基因藻株的比生长速率与野生型藻株无显著差异;过表达藻株 GKOE1-8、GKOE7-1 的转录水平显著上调,GK 活性增强了 3.55 倍和 2.58 倍,中性油脂含量增加 64.95%和 18.49%,金藻昆布多糖含量增加 50.89%和 42.11%;而干扰藻株 GKRNAi3-1、GKRNAi4-1 的转录水平则显著下调,伴随着 GK 活性降低 52.34%和 6.64%,中性油脂含量减少 26.88%和 16.98%,金藻昆布多糖含量减少 16.99%和 10.62%. 研究结果表明:在三角褐指藻中,过表达甘油激酶基因可以促进中性油脂和金藻昆布多糖等生物活性物质的积累,这为通过基因工程的手段获得产油率高的转基因藻株提供了参考.

关键词: 三角褐指藻; 甘油激酶; 转录水平; 中性油脂; 金藻昆布多糖

中图分类号: Q786 **文献标志码:** A **文章编号:** 1672-6510(2019)05-0029-06

Effect of Glycerol Kinase Gene on Physicochemical Properties of *Phaeodactylum tricorutum*

GAO Li, ZHANG Zhixia, QING Renwei, MA Li

(College of Life Science, Sichuan University, Chengdu 610064, China)

Abstract: In order to know the mechanism of glycerol kinase in *Phaeodactylum tricorutum*, we studied its growth, transcriptional level, enzyme activity, lipid content and chrysolaminarin content. Results showed that the growth rate of transgenic types was not significantly different from that of the control, but the transcriptional level of GK during GKOE1-8 and GKOE7-1 was significantly up-regulated. The activity of GK increased 3.55 times and 2.58 times compared with that of the control, respectively. Neutral lipid content increased by 64.95% and 18.49%. Chrysolaminarin content increased by 50.89% and 42.11%. While the transcriptional level of GKRNAi3-1 and GKRNAi4-1 were significantly down-regulated, the decrease of GK activity was 52.34% and 6.64%, respectively. The content of neutral lipid was reduced by 26.88% and 16.98%, and chrysolaminarin content decreased by 16.99% and 10.62%. The results revealed that overexpression of GK could promote the accumulation of bioactive compounds, such as neutral lipid and chrysolaminarin, and thus provide some reference for obtaining transgenic algae with high lipid through genetic engineering.

Key words: *Phaeodactylum tricorutum*; glycerol kinase; transcriptional level; neutral lipid; chrysolaminarin

由化石燃料的过度消耗而引起的温室效应等环境问题,促进了可再生能源——生物燃料的发展. 微藻生物柴油作为一种非常有潜力代替化石能源的新型燃料^[1-2],因其具有绿色环保等优势,成为现在研究

的热点.

三角褐指藻(*Phaeodactylum tricorutum*)是一种生长快、油脂含量高的海洋模式硅藻^[3],且其全基因组测序^[4]已经完成,这为通过基因工程的方法改造构

收稿日期: 2018-05-10; 修回日期: 2018-07-12

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(40976092); 四川省科技厅应用基金项目(2014JY0171)

作者简介: 高莉(1991—),女,山西吕梁人,硕士研究生; 通信作者: 卿人韦,副教授, qingrw@scu.edu.cn

建富油的转基因微藻提供了理论依据。

甘油激酶(glycerol kinase, GK)是生物体内进行甘油摄取和代谢的关键酶,同时也是限速酶^[5-6]。GK可以催化甘油转化为甘油-3-磷酸(G3P)。自从 Lin^[7]首次分离并确定了 GK 的主要结构后,GK 基因的研究受到越来越多的关注。Muto 等^[8]在 *Fistulifera solaris* 中过表达了 GK 基因,导致生物量提高,G3P 水平升高,脂质积累量增加。同样,Yu 等^[9]也提出,在酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)中 GUT1(编码 GK 基因)基因的过表达可以促使 G3P 积累增加,最后导致脂质含量增多。因此,GK 对脂质的生物合成与调控具有重要作用^[10]。三角褐指藻中 GK 的表达量和酶活与三角褐指藻利用甘油的速度密切相关^[3]。

中性油脂主要包括酰基甘油酯(TAGs)和游离脂肪酸,而微藻的中性脂质(主要是 TAGs)是能量的主要来源,现在通常用于生物柴油的生产。金藻昆布多糖是硅藻细胞中主要的储存性碳水化合物^[11],它能为细胞代谢循环提供能量,能转变为其他有机化合物。细胞也可以通过调节对金藻昆布多糖含量的调控而调节细胞的渗透压,稳定细胞结构,以提高对逆境的抵抗。

本研究以甘油激酶基因过表达藻株、干扰藻株和野生型藻株为对象,测定了转基因藻株的生长情况、甘油激酶基因 mRNA 转录水平、甘油激酶活性、脂质含量和金藻昆布多糖含量的变化,探索过表达/干扰甘油激酶基因对三角褐指藻生长代谢的影响,旨在为通过基因工程的手段获得产油率高的转基因藻株提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

藻种:三角褐指藻(*Phaeodactylum tricoratum*)来自于中国海洋大学微藻种质库,编号为 MACC/B288。

载体:干扰载体 PtrGKRNAi-pPhaT1、过表达载体 PtrGKOE-pPhaT1,均为本实验室构建。其中过表达载体主要包含 *fcpA* 启动子、GK 基因的开放阅读框 ORF、*fcpA* 终止子、*fcpB* 启动子、博来霉素抗性基因 *sh ble*、硝酸还原酶终止子;干扰载体主要包含 *fcpA* 启动子、GK 基因约 430 bp 碱基正向序列、内含子、GK 基因约 430 bp 碱基反向序列、*fcpA* 终止子、*fcpB* 启动子、博来霉素抗性基因 *sh ble*、硝酸还原酶终止子。

试剂:PCR 相关试剂, TaKaRa 公司;基因枪转化材料, Bio-Rad 公司;RNA 抽提试剂盒,成都百菲特生物公司;其他试剂均购自成都科隆公司。

f/2 液体培养基:于 100 mL 超纯水中,添加 f/2 培养基母液各 100 μ L, 3 g 海盐(质量分数为 3%),高压灭菌,冷却至室温后添加 100 μ L 维生素母液,即为 f/2 液体培养基。

f/2 固体培养基:于 300 mL 超纯水中,加入琼脂粉 4.8 g、海盐 9 g、f/2 培养基母液各 300 μ L,高压灭菌,冷却至室温后添加 300 μ L 维生素母液,分到每个板中,凝固后封口,4 $^{\circ}$ C 保存。

1.2 方法

1.2.1 三角褐指藻的遗传转化和转基因藻株鉴定

分别将干扰载体 PtrGKRNAi-pPhaT1 和过表达载体 PtrGKOE-pPhaT1 转化至大肠杆菌(*E. coli*)DH5 α 中,阳性克隆进行菌液 PCR 验证和测序验证,然后扩大培养提取质粒,使其浓度均达到 1 μ g/ μ L。将野生型三角褐指藻接种至灭菌的 f/2 液体培养基中,置于温度为 22 $^{\circ}$ C、光照度为 2 500 lx、光/暗周期为 12 h/12 h 条件下培养;取指数生长期细胞约 5×10^7 个,涂布于 f/2 固体培养基的平板中央,用 PDS-1000/He System 型基因枪(Bio-Rad 公司)进行遗传转化,选择压力参数为 1 350 psi(9 308.25 kPa)。将轰击过的平板正置光照度为 1 500 lx 的条件下连续光照培养 24 h,然后用 f/2 培养液洗脱下来,均匀涂布于含有 100 μ g/mL Zeocin 的 f/2 固体培养基平板中,倒置光照培养(2 500 lx, 22 $^{\circ}$ C)。约 4 周后,挑取单克隆于 f/2 液体培养基(含 100 μ g/mL Zeocin)中,并扩大培养,提取转基因藻株的基因组 DNA,并通过 PCR 鉴定,测序验证。

过表达藻株鉴定引物为 GKOE-F: 5'-TTGAC TGCAAGATCAGCTGGCCTAG-3', GKOE-R: 5'-GG CAGATTTCCGCAATGCCGAAAG-3'。干扰藻株鉴定引物为 GKRNAi-F: 5'-GCGTTCGACCGTGTGT GGGATCAGACTTTGGTTAAC-3', GKRNAi-R: 5'-AGGGTACTTTCTTAATCTGAAG CT-3'。

1.2.2 生长曲线绘制及生物量测定

将指数生长期的甘油激酶基因过表达藻株、干扰藻株和野生型藻株接种至 100 mL f/2 液体培养基中,其中转基因藻株的培养基中添加 100 μ g/mL Zeocin,起始接种浓度为 2×10^5 mL⁻¹,光照度为 2 500 lx,光/暗周期为 12 h/12 h。每隔 24 h 取样检测 450 nm 处的吸光度,并用血球计数板计数,绘制生长曲线,按照式(1)计算比生长速率(μ),并比较转基因藻株与野

生型藻株的比生长速率.

$$\mu = \frac{\ln N_t - \ln N_0}{t} \quad (1)$$

式中: N_0 为初始的细胞 A_{450} ; N_t 为第 t 天的细胞 A_{450} ; t 为培养时间, d.

1.2.3 甘油激酶转录水平的测定

提取指数生长期藻株 RNA, 反转录成 cDNA, 用 CFX Connect™ 型实时荧光定量 PCR 仪 (Bio-Rad 公司), 以 18S 基因为内参基因^[12], 检测不同藻株之间甘油激酶基因的表达情况.

1.2.4 甘油激酶活性的测定

为研究甘油激酶的活性是否受甘油激酶基因转录水平的影响, 本实验根据经典的 Trinder 方法^[13] (偶联终点比色法) 改进后对甘油激酶的活性进行了检测. 其原理^[3]是在温度为 22 °C、pH 为 9.5 的条件下, 甘油激酶可以催化甘油, 反应生成 3-磷酸甘油; 3-磷酸甘油被 3-磷酸甘油氧化酶氧化生成 H_2O_2 和二羟基丙酮; H_2O_2 、4-氨基安替比林和苯酚在过氧化物酶的催化下生成粉红色醌亚胺类化合物, 该物质在 545 nm 处具有较高的吸收峰, 并且在一定浓度范围内随甘油激酶的浓度和活力的增加而增加.

酶活力单位 (U) 的定义是: 每分钟催化生成 1 mmol/L H_2O_2 所需要的酶量定义为一个酶活力单位. 酶活性 (U/mL) 按照式 (2) 计算.

$$\text{酶活性} = \frac{\Delta A_{545} \times V_t \times df}{t \times 13.3 \times 0.5 \times 1.0 \times V_s} \quad (2)$$

式中: ΔA_{545} 为样品在 545 nm 处反应前后吸光度的变化量; t 为反应时间, 单位为 min; V_t 为总体积, 240 μ L; V_s 为样品体积, 20 μ L; df 为样品稀释倍数; 13.3 是指在测定条件下醌亚胺类化合物的毫摩尔消光系数; 0.5 是指 1 mol H_2O_2 可以生成 0.5 mol 醌亚胺类化合物; 1.0 为比色皿直径.

1.2.5 尼罗红染色测定中性油脂含量

分别收集指数生长期的过表达藻株、干扰藻株和野生型藻株细胞各 2×10^6 个, 4 000 r/min 离心 10 min, PBS 清洗藻细胞, 重复 3 次; 然后用 300 μ L PBS 悬浮, 加入 0.1 mg/mL 尼罗红溶液 (丙酮溶解) 10 μ L, 混匀, 42 °C 暗处反应 10 min; 用 Varioskan Flash 型全波长酶标仪 (美国 Thermo 公司) 在 530 nm 下激发, 发射波长为 575 nm, 检测相对荧光强度^[14].

1.2.6 金藻昆布多糖含量的测定

金藻昆布多糖的提取^[15]: 收集指数生长期的藻液 1 mL, 4 000 r/min 离心 10 min, 收集细胞; 加入 4 mL 0.05 mol/L 的 H_2SO_4 溶液, 迅速涡旋混匀; 然后

于 60 °C 水浴反应 10 min, 并间断混匀; 离心收集上清液, 沉淀中再次加入 4 mL 0.05 mol/L 的 H_2SO_4 溶液; 重复提取 2 次合并上清液, 即为粗提取液.

采用蒽酮比色法^[16]测定金藻昆布多糖的含量: 取 1 mL 粗提取液, 然后加入 5 mL 蒽酮试剂, 充分混匀, 于沸水中煮沸 10 min, 取出冷却至室温后, 检测 620 nm 处的吸光度. 以 620 nm 处吸光度为横坐标 (x), 葡萄糖含量 (μ g/mL) 为纵坐标 (y), 制作葡萄糖标准曲线 ($y = 122.7x + 0.8868$, $R^2 = 0.998$), 并按照式 (3) 计算样品的金藻昆布多糖含量 (μ g/mL).

$$\text{金藻昆布多糖含量} = \frac{\rho \times 3 \times V_0}{V_1} \quad (3)$$

式中: ρ 为由标准曲线计算所得的糖含量, μ g/mL; 3 为粗提取液的稀释倍数; V_0 为粗提取液总体积, mL; V_1 为测定用藻液体积, 1 mL.

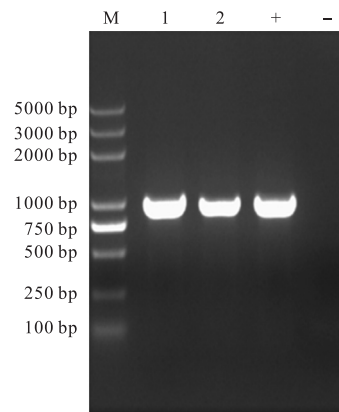
1.3 统计分析

本试验数据均用 GraphPad 软件处理分析. 本实验中将野生型藻株 (WT) 组设置为对照组, 其中 * 表示 $P < 0.05$, ** 表示 $P < 0.01$.

2 结果与分析

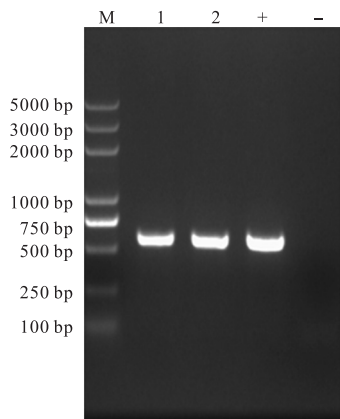
2.1 转基因藻株的鉴定

转基因三角褐指藻的 PCR 鉴定结果如图 1 所示. 为验证目的基因/载体是否已经成功整合到三角褐指藻的基因组中, 通过克隆表达载体上的片段, 采用 pPhaT1 载体靠近插入片段 5' 端的引物和插入 GK 基因片段中的引物进行 PCR 验证. 甘油激酶基因过表达藻株 GKOE1-8 和 GKOE7-1 均有一条 1 000 bp 左右条带, 与过表达载体的结果一致, 则可说明过表达结构已经存在于转基因藻株中.



M. marker; 1. 过表达藻株 GKOE1-8; 2. 过表达藻株 GKOE7-1; +. 过表达载体; -. 负对照 (野生型藻株)

(a) 过表达藻株的鉴定



M. marker; 1. 干扰藻株 GKRNAi3-1; 2. 干扰藻株 GKRNAi4-1; +. 干扰载体; -. 负对照(野生型藻株)
(b) 干扰藻株的鉴定

图1 转基因三角褐指藻的鉴定

Fig. 1 Identification of transgenic *Phaeodactylum tricornutum*

干扰藻株 GKRNAi3-1 和 GKRNAi4-1 均有一条 500 bp 左右的条带, 与干扰载体的结果一致, 说明干扰载体已经存在于转基因藻株中, 所以遗传转化成功, 目的片段已经整合进入三角褐指藻基因组中。

2.2 转基因藻株生长情况分析

对三角褐指藻细胞密度与 A_{450} 之间进行线性回归分析(图 2), 得到两者之间的线性关系式为 $y = 150.6x - 2.781$, $R^2 = 0.998$, $P < 0.01$, 回归模型有意义. 这说明三角褐指藻的细胞密度与藻液在 A_{450} 之间呈显著的线性相关, 可以利用藻液在 450 nm 处的吸光度表示三角褐指藻的生长情况。

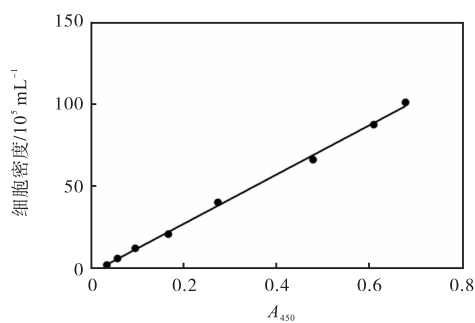


图2 细胞密度与 A_{450} 之间线性关系

Fig. 2 Linear relationship between cell concentration and A_{450}

三角褐指藻生长曲线如图 3 所示. 由图 3 可以看出, 甘油激酶基因过表达藻株和干扰藻株的指数生长期与对照组(WT)一致, 均为 5 d. 通过对比生长速率的比较(图 4), 可以看出转基因藻株的比生长速率与野生型藻株无显著差异, 说明甘油激酶基因的过表达与干扰操作对藻株的生长情况无明显影响。

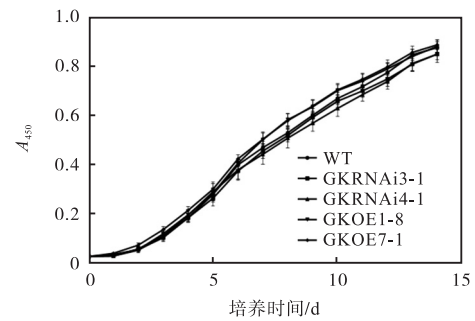


图3 三角褐指藻生长曲线

Fig. 3 Growth curves of *Phaeodactylum tricornutum*

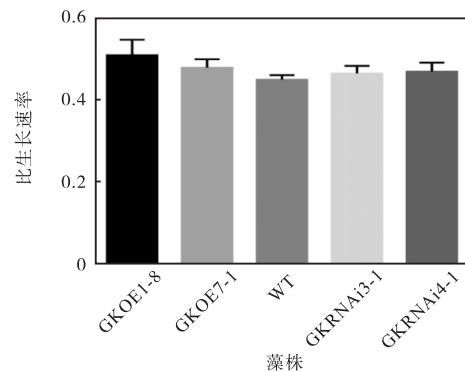


图4 三角褐指藻的比生长速率

Fig. 4 Comparison of specific growth rates of *Phaeodactylum tricornutum*

2.3 三角褐指藻甘油激酶基因转录水平分析

三角褐指藻甘油激酶基因相对表达量分析结果如图 5 所示. 结果以 GK 与 18S 的比值呈现, 对照组(WT)作为参照定为 1。

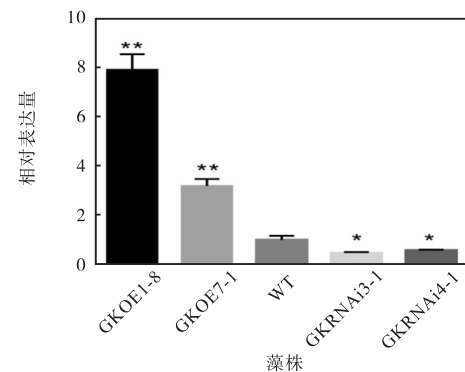


图5 三角褐指藻甘油激酶基因相对表达量分析

Fig. 5 Relative quantification of GK transcripts in *Phaeodactylum tricornutum*

由图 5 可以看出, 过表达藻株 GKOE1-8、GKOE7-1 的转录水平均较野生型藻株极显著($P < 0.01$)上调, 分别是对照组的 7.90 倍和 3.19 倍, 说明过表达 GK 基因时, 可以增强该基因的转录水平. 而甘油激酶干扰藻株 GKRNAi3-1、GKRNAi4-1 的转录

水平均较野生型藻株显著 ($P < 0.05$) 下调, GKRNAi3-1 的转录水平是对照组的 1/2, 下调了 53.34%; GKRNAi4-1 的转录水平是对照组的 3/5, 下调了 42.52%, 说明干扰 GK 基因时, 其转录水平下调。

2.4 甘油激酶活性分析

转基因三角褐指藻甘油激酶活性分析结果如图 6 所示. 过表达藻株的酶活均高于野生型藻株的酶活, 干扰藻株则均低于野生型藻株. 其中过表达藻株 GKOE1-8、GKOE7-1 的酶活分别是野生型藻株的 5.55 倍和 4.58 倍; 干扰藻株 GKRNAi3-1 的酶活比野生型降低了 52.34%, GKRNAi4-1 比野生型降低了 6.64%. 结合图 4 与图 5 分析, 可以发现甘油激酶的活性随着该基因转录水平的上调而增加, 下调而降低。

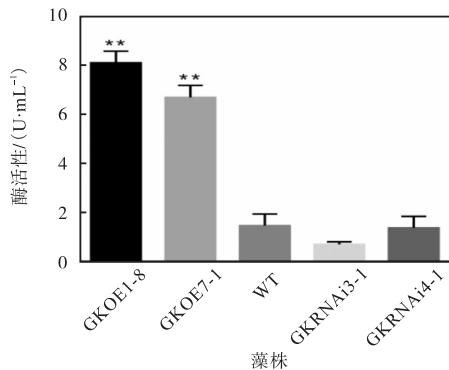


图 6 三角褐指藻甘油激酶活性分析

Fig. 6 GK activity of *Phaeodactylum tricornutum*

2.5 中性油脂含量分析

中性油脂包括酰基甘油酯 (TAGs) 和游离脂肪酸, 是生物柴油生产的主要来源. 中性油脂是由 GK 的催化产物 G3P 通过 Kennedy 途径产生. 三角褐指藻尼罗红染色后的相对荧光强度 (图 7) 可以间接反映中性油脂的积累量. 其中以野生型藻株的荧光值为对照组 (WT), 并将其设置为 1, 过表达藻株的中性油脂含量显著的增加, GKOE1-8 和 GKOE7-1 的相对荧光强度分别为 1.6495 和 1.1849, 较对照组增加了 64.95% 和 18.49%. 干扰藻株 GKRNAi3-1 和 GKRNAi4-1 的相对荧光强度分别为 0.7312 和 0.8302, 较对照组减少了 26.88% 和 16.98%. 这些结果表明过表达甘油激酶基因, 可以促进三角褐指藻细胞内的中性油脂积累, 说明甘油激酶基因在脂质代谢中对脂质的积累调控起促进作用。

2.6 金藻昆布多糖含量分析

金藻昆布多糖作为三角褐指藻细胞内碳的主要存在形式, 可以调节细胞的渗透压, 稳定细胞结构. 三角褐指藻的金藻昆布多糖含量分析结果见图 8。

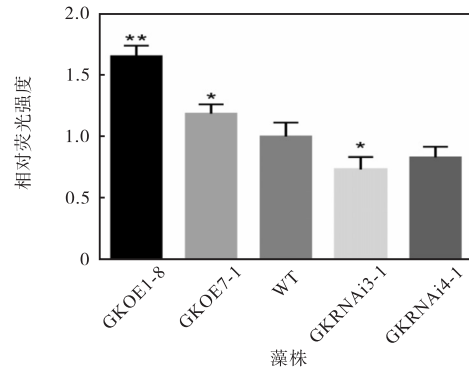


图 7 尼罗红染色的中性油脂的相对荧光强度

Fig. 7 Relative fluorescence intensity of Nile red dyed *Phaeodactylum tricornutum*

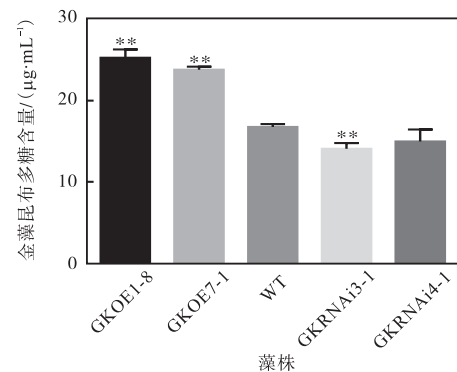


图 8 三角褐指藻金藻昆布多糖含量分析

Fig. 8 Chrysolaminaran content of *Phaeodactylum tricornutum*

将野生型组设置为对照组, 过表达藻株的金藻昆布多糖含量较野生型藻株显著增加, GKOE1-8 和 GKOE7-1 的金藻昆布多糖分别 25.28 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 23.81 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 分别较对照组增加了 50.89% 和 42.11%. 干扰藻株的金藻昆布多糖含量则降低, GKRNAi3-1 和 GKRNAi4-1 的金藻昆布多糖分别为 14.08 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 14.98 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 分别较对照组减少了 16.99% 和 10.62%. 这说明过表达甘油激酶基因可以促进细胞内储存性多糖金藻昆布多糖的积累, 而干扰甘油激酶基因的表达则抑制金藻昆布多糖的积累, 所以甘油激酶基因可能对金藻昆布多糖的积累调控起促进作用。

3 结论

通过对三角褐指藻理化性质的研究, 发现转基因藻株的比生长速率与野生型藻株无显著差异, 说明甘油激酶基因不是三角褐指藻生长的限制因素. 过表达藻株的 GK 基因转录水平显著上调, GK 酶活升

高,中性油脂和金藻昆布多糖含量增加,说明过表达 GK 基因可以增强甘油激酶的活性,导致细胞内 G3P 的积累;G3P 被 G3P 酰基转移酶酰化生成溶血磷脂酸(LPA);再通过 LPA 酰基转移酶将其酰化形成磷脂酸(PA);然后 PA 被 PA 磷酸水解酶去磷酸化,释放甘油二酯;最后甘油二酯被酰化产生甘油三酯(TAGs),从而导致 TAGs 含量增加.因此,三角褐指藻中,甘油激酶基因对脂质代谢起促进作用,可通过调控该基因的表达而调控油脂含量,这为通过基因工程的手段获得产油率高的微藻提供了参考.

参考文献:

- [1] Demirbas A. Biodiesel production from vegetable oils via catalytic and non-catalytic supercritical methanol transesterification methods[J]. *Progress in Energy Combustion Science*, 2005, 31(5): 466–487.
- [2] Nagle N, Lemke P. Production of methyl ester fuel from microalgae[J]. *Applied Biochemistry Biotechnology*, 1990, 24(1): 355–361.
- [3] 陈波,黄龙,郭婷,等.三角褐指藻甘油兼养条件下甘油激酶的功能研究[J]. *四川大学学报:自然科学版*, 2015, 52(1): 144–148.
- [4] Bowler C, Allen A, Badger J, et al. The *Phaeodactylum* genome reveals the evolutionary history of diatom genomes[J]. *Nature*, 2008, 456(7219): 239–244.
- [5] Zwaig N, Kistler W S, Lin E C. Glycerol kinase, the pacemaker for the dissimilation of glycerol in *Escherichia coli*[J]. *Journal of Bacteriology*, 1970, 102(3): 753–759.
- [6] Hayashi S L, Lin E C. Purification and properties of glycerol kinase from *Escherichia coli*[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1967, 242(5): 1030–1035.
- [7] Lin E C. Glycerol dissimilation and its regulation in bacteria[J]. *Annual Review of Microbiology*, 1976, 30(1): 535–538.
- [8] Muto M, Tanaka M, Liang Y, et al. Enhancement of glycerol metabolism in the oleaginous marine diatom *Fistulifera solaris* JPCD DA0580 to improve triacylglycerol productivity[J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2015, 8(1): 4.
- [9] Yu K O, Ju J, Ramzi A B, et al. Development of a *Saccharomyces cerevisiae* strain for increasing the accumulation of triacylglycerol as a microbial oil feedstock for biodiesel production using glycerol as a substrate[J]. *Biotechnology & Bioengineering*, 2013, 110(1): 343–347.
- [10] 樊改丽,赵敖,陈理彬,等.稻瘟病菌中甘油激酶基因在碳源代谢途径中的功能分析[J]. *基因组学与应用生物学*, 2016, 35(10): 2716–2723.
- [11] 张文源,高保燕,李爱芬,等.不同培养条件对三角褐指藻生长及其生物活性成分积累的影响[J]. *海洋科学*, 2016, 40(5): 57–65.
- [12] Lin H Y, Yen S C, Kuo P C, et al. Alkaline phosphatase promoter as an efficient driving element for exogenic recombinant in the marine diatom *Phaeodactylum tricoratum*[J]. *Algal Research*, 2017, 23: 59–65.
- [13] Trinder P. Determination of blood glucose using an oxidase-peroxidase system with a non-carcinogenic chromogen[J]. *Journal of Clinical Pathology*, 1969, 22(2): 158–161.
- [14] Liu Z Y, Wang G C, Zhou B C. Effect of iron on growth and lipid accumulation in *Chlorella vulgaris*[J]. *Bioresource Technology*, 2008, 99(11): 4717–4722.
- [15] Granum E, Myklestad S M. A simple combined method for determination of β -1,3-glucan and cell wall polysaccharides in diatoms[J]. *Hydrobiologia*, 2002, 477(1/2/3): 155–161.
- [16] Osborne D R, Voogt P. Análisis de los nutrientes de los alimentos[J]. *Reproduction Nutrition Developmen*, 1985, 43(5): 136–153.

责任编辑: 郎婧

(上接第 28 页)

- 后抑郁症的比较研究[J]. *实用医药杂志*, 2015, 32(12): 1069–1071.
- [34] Tang W, Zhu Q, Gong X, et al. Cortico-striato-thalamo-cortical circuit abnormalities in obsessive-compulsive disorder: A voxel-based morphometric and fMRI study of the whole brain[J]. *Behavioural Brain Research*, 2016, 313: 17–22.
- [35] White E, Dipaola R S. The double-edged sword of autophagy modulation in cancer[J]. *Clinical Cancer Research*, 2009, 15(17): 5308–5316.

责任编辑: 郎婧