

杜氏藻与大肠杆菌跨界融合初探^①

刘广发 楼士林 李庆顺 赖瑞卿

(厦门大学生物学系, 361005)

收稿日期 1991年10月14日

关键词 杜氏藻, 大肠杆菌, 融合

提要 以链霉蛋白酶制得了杜氏藻(嗜盐单胞绿藻)的原生质体。采用聚乙二醇(PEG)-钙离子法将它们与大肠杆菌(含氯霉素乙酰转移酶基因质粒)的球1,20,1状体进行融合。“融合子”酷似杜氏藻。它们对氯霉素抗性的显著提高寓示了大肠杆菌的质粒已转移到“融合子”细胞中;而且,“融合子”的蛋白质组分与杜氏藻和大肠杆菌相比已发生了较明显的变化。

杜氏藻(*Dunaliella* sp.)为真核单胞绿藻,生活于海水或盐湖中,因而国内常称之为盐藻。这些藻生长于高盐度的环境中时,能在胞内合成并积累大量的甘油^[6]。此外,该藻富含蛋白质,有些种尚能产生占藻干重10%以上的β-胡萝卜素,所以国内外不少实验室、养殖场已大量培养杜氏藻当饵料或用于提取上述物质。^[1,9]由于杜氏藻天然地不具纤维素细胞壁,仅由蛋白质-多糖组成其胞膜外的柔软包被^[4],因而经过适当的处理,它们可能成为植物界中接受外来遗传信息的良好受体。本研究即是以细胞融合为手段导入外源基因的一次尝试。

1 材料与方方法

1.1 生物材料

杜氏藻,代号C₃₆,青岛海洋大学微藻研究室提供,以文献[5]的培养基培养。

大肠杆菌(*E. coli* P₃₅S-CAT'),代号P₃₅,原种由美国Cornell大学引进,其中的质粒带有氯霉素乙酰转移酶基因;培养于CB培养基。上述两种培养基作固体培养时都添加1.5%的琼脂粉。

1.2 测定对氯霉素(C_m)的抗性

配制含系列C_m浓度的杜氏藻固体培养基,表面点接C₃₆,25℃,3 000 lx培养14d后观测藻落生长情况。

① 本文工作得到国家自然科学基金的资助;本校电镜室倪子锦,吴乔等在电镜样品的制备与观察上给予大力支持,一并致谢。

P_{35} 经活化后接于液体培养基中,37℃,120r/min 培养至 OD_{600} 达 0.6~0.7,加 C_m 达终浓度 250×10^{-6} ,继续培养过夜。分别于加 C_m 前及培养过夜后取样,接种于含各种 C_m 浓度的固体培养基上,37℃培养 48h,观测菌落生长情况。

1.3 原生质体及球状体的制备

参照文献[4]的方法,改用 0.5mol/L 山梨醇和 5mmol/L HEPES, pH7.5 为缓冲液,以 400 μ g/ml 链霉蛋白酶 26℃处理杜氏藻 1h,不时轻轻摆动。按文献[2]进行电镜样品的制备、观察。

在长颈漏斗的下端套接乳胶管,末端夹紧,注满杜氏藻培养液。用黑纸密封漏斗下段及乳胶管。酶处理后的 C_{36} 藻悬液经离心洗涤后,移入该漏斗中。在暗房中以 60W 白炽灯从距漏斗 80cm 处侧面照光 4h 后,用穿刺法从乳胶管末段取样。观测鞭毛脱落的原生质体的百分数。

把纯化的 C_{36} 原生质体移入原培养液,25℃ 2 000 lx 培养 24h 后计算已长出双鞭毛的杜氏藻的百分数。

参照文献[7]的方法制备 P_{35} 的球状体,保存于高渗缓冲液中,置 4℃,12h 内使用。

1.4 融合与分析

吸取 C_{36} 原生质体及 P_{35} 球状体,使二者的比例约为 1:1~500,采用 PEG-钙离子法^[3,8]进行融合处理,取样进行光学及电子显微镜观察。以杜氏藻培养液进行洗涤。弱光(800~1 000 lx)培养 48h 后离心,将沉淀物分别接种于含系列 C_m 的固体杜氏藻培养基上,3 000 lx 培养 14d 后观测结果。

上述各项工作都在无菌条件下进行。

“融合子”的蛋白电泳分析将中选“融合子”挑出,和 C_{36} 同时分别扩大培养。离心,用 0.5mol/L 蔗糖洗涤二次。将藻沉淀悬浮于 0.1mol/L Tris-HCl, pH7.8 的缓冲液中。冰浴中用超声波破碎,再置 30℃水浴浸提 30min,离心得蛋白粗提液。分别加入 SDS 及 β -巯基乙醇至终浓度 0.5%和 1%,混匀,置 45℃水浴 1h。电流 20mA,电压 40~60V 进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳。用美国产 DU-8B 型紫外可见分光光度计对电泳胶板进行扫描,比较它们蛋白组成的异同。

2 结果与分析

2.1 杜氏藻(C_{36})和大肠杆菌(P_{35})对 C_m 的抗性

对 C_m 的抗性变化是 C_{36} 和 P_{35} 融合的选择标记,它们的原初抗性如表 1 所示。

表 1 杜氏藻和大肠杆菌对氯霉素的抗性

Tab. 1 The resistance to chloramphenicol in *Dunaliella reircei* and *E. coli*(P_{35} S-CAT)

种名	氯霉素浓度($\times 10^{-6}$)								
	0	50	60	70	80	100	150	200	
<i>D. Peircei</i>	++++	++	+	+	-	-	/	/	
<i>E. coli</i>	C_m 诱导的	++++	++++	/	/	/	+++	+++	++
	未诱导的	++++	+++	/	/	/	++	+	+

注:+,各种程度的生长;-:不生长。

由表 1 可见, C_{36} 的致死浓度小于 80×10^{-6} 的 C_m ,而 P_{35} 由于内含质粒上带有氯霉素乙酰转移酶基因,它们对 C_m 的抗性可高达 200×10^{-6} 以上,这就为 P_{35} 中的质粒是否已引进 C_{36} 并在其中表达提供了可检测的方便手段。

2.2 杜氏藻原生质体的制备、纯化及再生

经前述酶处理后,在光学显微镜下可见到约 85%的藻细胞失去了双鞭毛,呈圆至椭圆形状(未示出)。经电镜检查,如图 1 所示,这些细胞的绒毛状糖蛋白外几乎被除净,成了质膜裸露的原生质体。“漏斗单侧照光法”诱导后,获得了纯度为 98%的 C_{36} 原生质体。这些原生质体的 24h 再生率达 88%。

2.3 C_{36} 原生质体与 P_{35} 球状体的融合观察

经上述融合处理,在光学显微镜下可以清楚地看到 C_{36} 之间, P_{35} 之间以及 C_{36} 与 1 至数个 P_{35} 紧密靠拢在一起。由于二者间的大小差别明显,藻菌间的融合易于明辨。整个融合过程持续 0.5~2h。

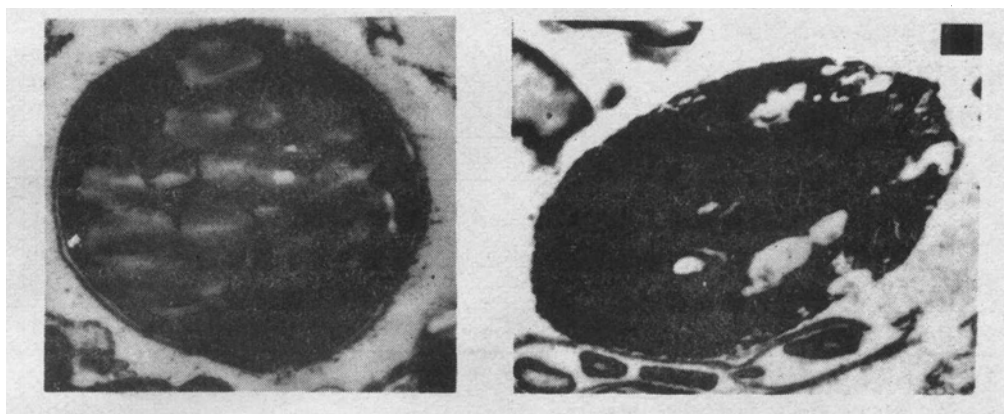


图 1 链霉菌蛋白酶处理前后 *D. peircei* 细胞外被的变化情况($\times 14,000$)

左:*D. peircei* 的横切面,(未酶解),细胞外被密布由糖蛋白组成的纤缘。
右:*D. peircei* 完整的原生质体,细胞的纤缘状包被已被完全除净。

Fig. 1 The change of cell coat of *D. peircei* before and after pronase inducing. ($\times 14,000$)

Left: A transection of *D. peircei*, with the cell coat imbued with fibres of glycoprotein.

Right: A protoplast of *D. peircei*, note that the fibres cell coathad been removed clearly after pronase inducing.

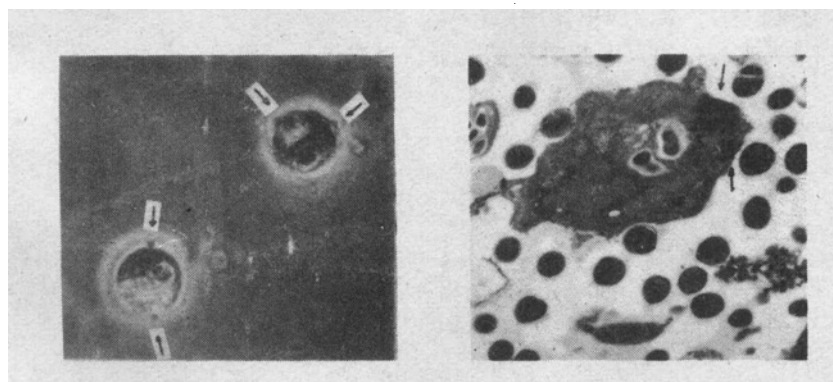


图 2 杜氏藻原生质体与大肠杆菌球状体的融合

左图光学显微镜照片($\times 1,000$),数个大肠杆菌球状体(箭头指处)与杜氏藻原生质体紧紧贴合。

右图电镜照片($\times 7,500$),两个大肠杆菌球状体(箭头指处)已被吞入杜氏藻原生质体中。

Fig. 2 Fusion between the protoplast of *D. peircei* and the spheroplasts of *E. coli*

Left: light micrograph, some spheroplasts of *E. coli* (arrowed) were adhered to *D. peircei* ($\times 1,000$).

Right: electron micrograph, two of the spheroplast of *E. coli* (arrowed) had been inducted into *D. peircei* ($\times 7,500$).

电子显微镜把上述融合过程详细地展现出来。在 PEG 的介导下, P₃₅球状体充分靠近 C₃₆原生质体, 两者的质膜接触后, 随着 C₃₆质膜的内陷, 渐渐把 P₃₅导入胞内。这种现象可以发生在 C₃₆原生质体的各个位点。估计发生于细胞前端的内导作用其成功的可能性较大, 因为杜氏藻的细胞与细胞核都集中在该区域, 细胞的后端是一较大的杯状叶绿体。

2.4 “融合子”某些生物学性质分析

2.4.1 “融合子”的 C_m抗性分析 经融合处理后, 融合液在 C_m浓度高达 150×10⁻⁶的选择培养基上还能长出少数绿色藻落。将这些藻转接于液体培养基, 经镜检它们的外形发现与原 C₃₆没有重大区别。考虑到制备原生质体和球状体及融合过程中使用的药品繁多, 因此设计了表 2 的 3 种对照以考察诸因素对本实验的影响。

表 2 融合子对氯霉素的抗性

Tab. 2 There sistance to C_m in fusants

氯霉素浓度	(×10 ⁻⁶)	0	60	80	100	120	150	180
对照	C ₁	++++	+	-	-	-	-	-
	C ₂	++	+	-	-	-	-	-
	C ₃	++	+	-	-	-	-	-
融合子		++	++	++	+	+	+	-

C₁: 未经任何处理的杜氏藻

C₂: 杜氏藻与大肠杆菌都未经酶处理, 以此进行的“拟融合”

C₃: 杜氏藻原生质体经融合的各个步骤处理, 唯独没加入大肠杆菌球状体

+: 各种程度的生长

-: 不生长

由表 2 可知, 3 种对照都只能在 C_m 为 0 和 60×10⁻⁶的培养基上生长, 可见外因对本实验的影响甚小。因此可以认为, 融合子对 C_m抗性的成倍提高是由于 P₃₅球状所携带的氯霉素乙酰转移酶基因通过融合已转移到真核的 C₃₆细胞中, 且得到了一定的表达。

2.4.2 C₃₆与“融合子”蛋白质电泳图谱比较

由于“融合子”外观酷似 C₃₆, 因此对它们的蛋白组成进行了电泳分析。

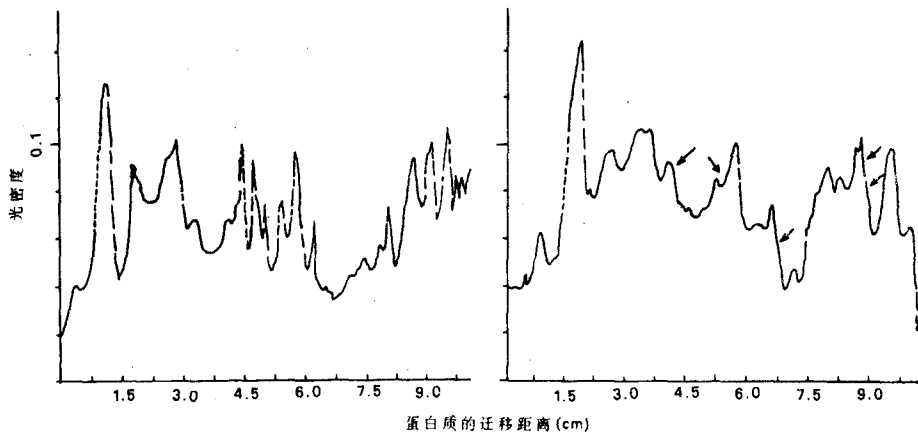


图 3 蛋白质电泳的扫描图谱

左: 杜氏藻 (*D. peircei*); 右: 融合子

Fig. 3 A comparison of scanning proteins electrophero gram between *D. peircei* (left) and fusant (right)

从图 3 的图谱对照看出, C₃₆与“融合子”的主要蛋白组成是一致的, 因而它们在形态上没有很大的区别。但“融合子”的蛋白电泳图谱至少比 C₃₆多了 5 个吸收峰(箭头指处); 同时 C₃₆的某些吸收峰在“融合子”中消失了。上述结果进一步证明, 杜氏藻与大肠杆菌跨界间的融合确已发生, 大肠杆菌的少数基因组已嵌入到杜氏藻的单倍性染色体中。该“融合子”经 1 年多 20 多次的传代培养, 它们的遗传性质已较稳定。

3 讨论

我们的工作首次获得了杜氏藻的原生质体, 估计制取同属其他杜氏藻的原生质体也是可以做到的。本工作为该属绿藻的遗传学研究创造了有利的条件。

在已有的 9 种(株)杜氏藻中, *D. peircei* 的核酸内的酶活性最低, 以紫外线对其进行诱变亦行之有效(未发表), 因此本文选择它作为外源基因的受体。虽然从“融合子”对 C_m抗性之高可推测 *E. coli* 的质粒已转入杜氏藻中, 但遗憾的是未能从“融合子”中提取到该质粒, 它们对 C_m的抗性随着传代也逐次降低。估计该质粒虽然能被引入杜氏藻并在其中部分表达, 但难以复制。随着藻细胞的分裂、增殖, 该质粒在每个藻细胞中的拷贝数直线下降, 最终难以检测到。

图 3 所示的“融合子”比 C₃₆多出的 5 条带中, 至少有 2~3 条可以在 P₃₅₄的蛋白电泳图谱(未示出)中找到对应的吸收峰, 即它们可能来自 P₃₅。同理推测, P₃₅的某些 DNA 电段插入到 C₃₆的染色体组的时候, 可能使 C₃₆的一些为较次要的蛋白质(如糖蛋白外被)编码的基因被插入失活, “融合子”也就比原来的 C₃₆少了几个蛋白吸收峰。

最后, 在图 2 的电镜照片中, 杜氏藻实际上是把比它小得多的大肠杆菌整个吞入细胞内的。大肠杆菌能否在杜氏藻中存活? 能否复制它自己? 正如线粒体的“内共生学说”那样, 这是一个令人感兴趣的问题。

参考文献

- [1] 赵学武, 1986. 海洋药物 3, 48~53.
- [2] 汪德耀主编, 1981. 细胞生物学实验指导. 人民教育出版社, 261~297.
- [3] 李向辉, 1988. 植物遗传操作技术. 科学出版社, 177~194.
- [4] Chardard R., 1987. *Cryptogamie Algologie*, 8(3): 173-189.
- [5] Ben-Amotz A. et al., 1974. *Plant Physiol.*, 53: 628-631.
- [6] Ginzburg M., 1987. *Advances in Botanical Research*, 14: 93-183.
- [7] Rozanne M. et al., 1983. *Methods in Enzymology*, Academic Press, New York, 101: 402.
- [8] Gleba Y. Y. et al., 1984. *Protoplast Fusion*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 20-27.
- [9] Ben-Amotz A. et al., 1982. *Bioscience Research*, Plenum Press, 207-214.

A RESEARCH ON INTERKINGDOM PROTOPLAST FUSION BETWEEN GREEN ALGA *DUNALIELLA* AND *E. COLI*

Liu Guangfa, Lou Shilin, Li Qingshun and Lai Ruiqing

(Biology Department of Xiamen University, 361005)

Received: Oct. 14, 1991

Key Words: *Dunaliella peircei*, *E. coli*, Fusion

Abstract

True protoplasts of the halophilic green alga *Dunaliella peircei* proven by electron micrograph were induced by treatment with pronase. They were fused with the spheroplasts of *E. coli* harboring P_{35S}-CAT plasmids by polyethylene glycol (PEG) and calcium cations and then allowed to regenerate on selection media. Some *Dunaliella*-like clones were isolated from the media with acquired resistance to chloramphenicol appears to be the result of a genetic transfer from the plasmids harbored in *E. coli*. Moreover the composition of proteins extracted from the fusant were fairly different from either *D. peircei* or *E. coli*.