

藻类基因工程研究进展及展望

ADVANCES AND PROSPECTS IN THE RESEARCH OF ALGAL GENE

陈颖 赵世民 孙勇如

(中国科学院遗传研究所 北京 100101)

近年来,藻类分子遗传学的发展,不仅为光合、固氮、渗透调节等基本生命现象和生理过程的机理研究提供了有利手段,也为藻类的基因工程奠定了基础。通过DNA重组技术培育具有高蛋白、低脂肪、耐盐、抗病等优良特性的藻类新品种,以及实现藻类天然产物的基因工程生产已成为藻类基因工程研究的两大目标。

原核的蓝藻(Cyanobacterium),因其结构和遗传复杂性同革兰氏阴性菌相似,并且有独立的遗传结构—质粒和天然转化与重组系统,为开展基因工程研究带来了诸多便利条件。真核藻类(Eukaryotic algae)基因工程起步较晚,但已取得重要突破。单细胞绿藻莱茵衣藻(*Chlamydomonas reinhardtii*)已成为叶绿体、线粒体与染色体三套基因组均能遗传转化的植物。红藻(Red algae)质粒的发现,为红藻基因工程提供了潜在的载体。大型藻类基因工程的研究方兴未艾,对其遗传转化模式的建立进行了有利探索。

总之,藻类基因工程作为生物技术领域中年轻的分支,虽刚刚起步,但已展现出了十分广阔的发展前景和应用潜力。

1 质粒及载体系统的研究进展

1.1 蓝藻

自从Asato 1973年发现蓝藻质粒以来,已在50余株单细胞及丝状蓝藻中证明了质粒的存在,大约是被检测藻株的一半。蓝藻中所含质粒数目1~10个不等,分子量在1~80 MD(百万道尔顿)之间,尽管已检测到一些质粒体内、体外转录和翻译的产物,如Gruber等(1987)已检测到*Anabaena nidulans* R2的内源质粒PANS编码的30 kD的蛋白;Schwabe等(1990)将铜锈微囊藻*Microcystis aeruginosa*的内源质粒

pMA₁插入pUC18中构成载体pCMA₁,转化*Escherichia coli* X984,发现在其中新合成了两个多肽产物,分别为50kD和43kD^[7],但迄今未找到蓝藻质粒编码功能的直接证据。

研究表明,不同藻系的不同质粒或同一藻系的不同质粒具有同源序列,推测可能含有与细菌质粒相类似的可转移元件,并且该序列可能在专一性自养型原核生物的生态学和进化过程中起到一定作用。

迄今构建成功的蓝藻质粒载体都是嵌入细菌遗传标记的重组质粒,能在细菌和蓝藻中复制,称为穿梭载体(Shuttle vector)。Honde1等(1980)将带有Tn901(*E. coli*质粒转座子)和Ap^r的大肠杆菌质粒pRI46插入*Synechococcus* PCC7942内源质粒pUH24中,第一次获得了带Ap^r标记的杂种质粒pCH1及其衍生物pUC1。1981年Kuhlemier等将pUC1与pACYC184融合,首次获得了“双向质粒”—穿梭质粒pUC104和pUC105,能在*E. coli*和蓝藻中复制。此后,通过改善载体克隆潜力,又相继构建了许多双向质粒,如pUC29、pUC303、pLS103、pSG111、pPLANB2和pCB4、pXB7、pKBX、pAQE、pUF12、pUF311以及在此基础上发展的宿主载体系统pFCLV7-*Synechocystis* 6803(SUF311)等,并大大提高了转化效率。

为检测外源基因的表达,又相继构建了检测基因表达的质粒,即在穿梭载体中插入报告基因(Reporter gene),如荧光素酶(Luciferase)基因,氯霉素乙酰转移酶(CAT)基因, β -半乳糖苷酶(GUS)基因等,以酶活性显示目的基因的表达和确定启动子的作用。Schmetterer等(1986)构建了含有luc基因的质粒载体pRL305, pRL17a。中国科学院水生生物研究所徐旭

收稿日期:1997年1月29日

东将安装有 pUC9 的 MCS 序列的 CAT 基因重组于穿梭载体 pRL25C 中, 利用 CAT 基因作为报告基因, 构建了 *Anabaena* 启动子探测质粒 pHB10, 可检测外源和内源启动子的表达^①。蓝藻中穿梭载体的构建, 为蓝藻的基因转移奠定了基础。

1.2 真核藻类

目前已对 20 余种红藻进行了研究, 结果表明, 在 14 种红藻中有质粒, 数目一至多个不等。Goff 等(1988)用 Hoehst-CsCl 密度梯度离心法从江蓼等红藻中分离到了共价闭合环状(CCC 型)质粒, 其浮力密度与叶绿体 DNA 相近, 且种间分布差异很大。在红藻 (*Gracilaria lemaneiformis*) 中分离到的两个质粒 GL4.4 和 GL3.5 之间无同源性, 与本身及其他种类红藻核、质体及线粒体基因组均无同源性, 但目前还难以确定这种质粒在细胞中的位置^[8]。江蓼 *Gracilaria chilensis* 中 GC2 (3.8 kb), GC3 (3.4 kb) 两个质粒与核、叶绿体及线粒体 DNA 之间也无同源性, 但与 *G. sordida* 质粒之间有一定同源性^[9], 研究发现 GC2 富含 A-T (75%), 并有一个主要的 ORF 和两个长 290 bp 的, 位于 4 个长串联重复区边缘的反向重复区及 4 个短串联重复区。同时还发现 GC2 具有转录活性^[10]。在细柱硅藻 (*Cylindrotheca fusiformis*) 中定位了两个质粒 pcf1 (4.27 kb) 和 pcf2 (4.08 kb), pcf1 的 ORF218 与 pcf2 的 ORF217 氨基酸同源性为 80%, pcf1 的 ORF482 与 pcf2 的 ORF484 氨基酸同源性为 54%, ORF218/217 与 Tn3 转座子的解体酶氨基酸同源性为 28%~31%, 但这两种质粒均不具转座活性^[11]。

1993 年以来, 秦松等在一些经济藻类如钝顶螺旋藻、真江蓼中也发现了质粒^[1,12]。

真核藻类, 特别是一些经济藻类质粒的发现, 为真核藻类基因工程提供了潜在的载体, 对基因工程的改良具有积极意义。

2 转基因技术的研究

2.1 蓝藻

1970 年 Shestakor 与 Khyen 首次在 *Anacystis nidulans* 中发现了 DNA 的转化作用。迄今已发展了两种向蓝藻导入外源基因的方法: 一种是遗传转化 (Genetic transformation), 目前认为能被转化的蓝藻都是无异形胞分化的单细胞藻株。如 *Synechococcus* PCC7943, 6301, 7942, 7002, 73609 和 *Synechocystis* PCC6714, 6803, 6906 等, 都可在指数生长期有效地吸纳外源 DNA, 而 *Synechocystis* PCC6308 则需用 Ca^{2+} 诱导人工感受态, 才能有效地引入外源基因^[2]。细菌质

粒如 pBR322, pBR325, 转化蓝藻的效率很低, 也需人工诱导感受态。闵红涛(1995)用溶菌酶处理 *Synechococcus* PCC6301 细胞诱导人工感受态, 并用外源质粒 pBR325 转化受体细胞表达氯霉素抗性, 转化频率接近 5×10^{-5} 转化子/细胞, 用转化子 DNA 再进行次级转化, 转化频率可达 5×10^{-4} 转化子/细胞。该方法比以前的研究者对同种藻株、通过生理感受态进行转化得到的转化频率高^[5]。Takeyama 等(1989)将 *Synechococcus* NKBG042902 的 pSY111 质粒与 *E. coli* 的 pUC18 质粒构成穿梭载体 pUSYO2, 用电击法转化 NKBG042902-YG1116 藻株, 在 Ca^{2+} 和 15% 甘油处理下获得高频转化子^[13]。Thiel 等(1989)用电击法转化丝状蓝藻 *Anabaena* M131, 用穿梭载体 pRL6 在高场强、短间隙处理下获得了高的转化频率, 并发现限制性内切酶酶切位点对转化频率的高低具有显著影响, 同一质粒中同一位点修饰比未被修饰的转化率低 100 倍。

第二种转基因方法是接合转移 (Conjugation)。它是丝状蓝藻基因转化的有效系统, 但需先构建含有目的基因、*E. coli* 质粒复制起点及转移起点 (oriT) 和选择标记的杂交质粒, 转化含有辅助质粒 (有识别 oriT 的基因) 的 *E. coli* 菌株, 再通过接合引入一个 Incp 接合质粒 (具有编码接合装置的基因), 使 3 种质粒位于同一宿主, 然后与受体藻株混合, 通过抗生素筛选获得抗性藻落。辅助质粒、接合质粒由于无法复制或整合而逐渐丢失^[14]。该方法类似于农杆菌介导的三亲交配法。Wolk 等(1984)首先建立了 *Anabaena* 等的接合转移系统, 该系统由接合质粒 RP-4, 辅助质粒 (有识别 Bom 位点的 mob 基因) 及 pRL 系双向质粒构成。

Wada 等(1992)用从 *Synechocystis* PCC6803 中分离的 *desA* (脂肪酸脱饱和酶) 基因转化其野生型和突变株, 并得到表达^[15]。目前已将芽孢杆菌的杀幼蚊毒基因, 小鼠的金属硫蛋白-I 的 cDNA^[4] 以及来自人的超氧化物歧化酶 (SOD) 基因在蓝藻中得到了表达。同时, 蓝藻中的一些基因也已在细菌、真菌中得到了表达, 如与光合作用有关的藻蓝蛋白、Rubisco 基因及一些与固氮作用、氨基酸合成有关的基因。中国科学院海洋研究所秦松等, 正与日本国立研究院合作, 进行螺旋藻和海带基因工程的研究, 期望用大型藻类作为廉价高效生物反应器, 来表达从钝顶螺旋藻中克隆的别藻蓝蛋白基因。目前转化方法、再生途径、选择标记都已找到^[16], 并申请了专利 (申请号: 96120235.1)。

① 徐旭东, 1991, 博士学位论文, 中国科学院水生生物研究所。

2.2 单细胞绿藻

衣藻是单倍体绿藻, 突变型较多, 因此是分子遗传学和基因工程研究的理想材料。1982年 Rochaix 用携带有酵母 *arg4* 位点和复制起点的酵母质粒成功地转化了一个缺壁嗜精氨酸(具 *Arg7* 位点突变)的藻株, 得到了能在不加精氨酸的培养基上生长的转化藻株, 但转化频率很低^[28]。Leung(1989)用 SV40 启动子, APH 基因(产生对 Ap, Kar, neo 及 G418 的抗性)和 2 μ m 长的酵母复制起点作为异源复制子, 构成 pSV2neo 2 μ m 质粒转化缺壁的衣藻突变体, 得到了抗新霉素类似物 G-418 的转化藻株^[29]。Boynton 等(1988, 1990), New men 等(1990), Harris(1991)连续报道了该小组用基因枪轰击技术把带有野生型叶绿体 DNA 片段导入距细胞膜很近的莱茵衣藻杯状叶绿体中, 使发生 25 kb 删除突变的叶绿体基因组恢复原长度和功能^[17, 18]。

莱茵衣藻目前已成为唯一的染色体、叶绿体和线粒体三套基因组均能遗传转化的植物^[19]。染色体转化最为有效、最简便的方法为玻璃珠研磨法^[20], 但必须选用细胞壁缺失突变株或选用配子自溶素(*gamete autolysin*)消化去壁。由于莱茵衣藻密码子使用的偏向性, 使得外源基因在其中的表达效率不高, 因此以内源基因做为转化后的筛选标记则是有效且可靠的方法。如用从野生型中克隆的基因转化突变株, 通过营养缺陷、光合作用缺陷等进行筛选。Karen 和 Kindle(1990)利用玻璃珠研磨法, 将莱茵衣藻野生型中硝酸还原酶基因转入到含有 *nit1-305* 的突变藻株中, 以硝酸为唯一氮源进行筛选, 获得了 10^3 转化体/ μ g DNA 的高频转化率^[21]。Hall 等(1993)采用玻璃珠研磨法, 将含有 NPT-II 和 NOS 启动子的 pGA482 转化莱茵衣藻硝酸还原酶突变株, 用双选择标记筛选, 硝酸盐筛选的转化子中 52% 对卡那霉素具有抗性^[22]。Karen 和 Kindle(1990)将莱茵衣藻中的 OEE₁ 基因, 利用基因枪法导入 OEE 缺失突变株中, 获得了能进行光合作用, 并能够在乙酸缺失条件下生长的藻株。进一步的杂交分析表明转化体光合能力的恢复并不是由于突变基因的恢复, 而是由于外源基因的表达^[23]。

Jarvis 等(1991)进行了萤火虫荧光素酶基因在绿藻椭圆小球藻 *Chlorella ellipsoidea* 中的瞬间表达实验。将装有 CaMV35S 启动子的质粒 pDO432 转化小球藻原生质体后, 7 h 即可检测到荧光素酶的合成, 24 h 时酶活性最高, 4 d 后逐渐丧失^[24]。目前, 单细胞藻类转化还可以用 SV40 及小鼠金属硫蛋白 I 启动子。

2.3 大型藻类

近年来, 大型藻类基因工程也取得了进展, Cheney 等发现 CaMV35S 和 NOS 启动子能驱动 GUS 基因在红藻 *Eucheuma* 瞬间表达^[25], 王素娟(1994)报道了用电击法将 GUS 基因导入红藻坛紫菜原生质体中获得瞬间表达^[26], Kubler 等(1994)也采用电击法将 GUS 基因导入红藻紫菜(*Porphyra miniata*)的原生质体中, 并实现了瞬间表达^[27]。但对于原生质体再生较困难的藻类, 则需选择合适的转化受体, 以提高转化效率和再生频率。不同的受体由于其组织的物理特性、细胞生理状态等方面的不同, 对外源基因吸纳程度也就不同。秦松等(1994)将 pBI221 质粒分别导入海带和裙带菜的叶状体中部叶片、假根及中肋部叶片, 48 h 后, 只在海带假根细胞和裙带菜中肋部叶片细胞中检测到 GUS 基因的表达, 而海带叶片不论轰击一次还是两次, 外观或解剖观察, 均无显色反应; 在裙带菜假根中也未发现转化细胞通过^[6]。转化海带孢子体和配子体发现, 雌配子体是较理想的转化受体, 孢子体由于整体抗性大, 一些未转化细胞与转化细胞不容易分开而产生嵌合体, 从而影响外源基因的表达水平。而由雌配子体通过孤雌生殖产生的再生孢子体遗传性状均一, 产生嵌合体的机率则大大降低^①。^[16]

大型藻类基因工程中亟待解决的问题是选择有效的转基因手段和可利用的基因工程原件。基因枪作为一种转基因手段, 因其转化效率高、转化受体类型广泛等特点, 被认为是大型藻类(特别是原生质体再生困难的藻类)基因转化的有效途径。目前已通过此方法将 CAT、LacZ 等外源基因转入到褐藻海带并得到表达^[16]。研究表明, 目前高等植物基因工程研究中使用最多的启动子 CaMV35S 能被大型藻类的转录系统识别, 可做为藻类基因工程的启动元件^[16, 25-27]。^①此外, SV40 和 NOS 启动子分别使 CAT 和 GUS 基因在海带和红藻麒麟菜中获得瞬间表达^[16, 25]。^①而 Cab 启动子则获得阴性结果^[25]。

大型藻类遗传转化没有现成的选择标记。目前发现海带、裙带菜对高等植物遗传转化中常用的卡那霉素、新霉素等选择性试剂不敏感, 而对氯霉素敏感^[6, 16]。

3 展望

藻类基因工程以藻类分子遗传学研究为基础, 借鉴陆地植物和微生物基因工程中的成功经验, 近几年

① 武建秋、秦松、王希华、曾呈奎, 1997. CAT 基因导入海带幼孢子体后的表达, 海洋与湖沼(待刊)。

发展十分迅速,特别是海带、紫菜、螺旋藻等经济藻类的基因工程研究,对培育优质、高产新品种,发展海洋药物都具有十分重要的意义。由于藻类具有繁殖迅速、再生快、体积相对较小、结构简单等特点,通过基因操作以藻类为廉价的生物反应器,来生产有用产品,特别是来源紧俏,造价昂贵的药物具有潜在的应用前景。

近年来在哺乳动物的特异细胞如巨噬细胞、嗜中性白血细胞或小肠潘氏细胞中发现了一类新的具微生物抗性的多肽类物质,它对细菌、分枝杆菌、螺旋体、真菌和被膜病毒有广谱的毒杀效应,人们称这一类多肽为防御素。由于微生物对其难以产生抗性,在医药上具有广阔的应用前景。但从哺乳动物的细胞中提取防御素价格极其昂贵,成本很高,从而影响了其在医药上的应用。为解决这一问题,目前我们正开展小球藻基因工程的研究,期望用单细胞绿藻——小球藻作为生物反应器,以大量提取防御素基因的表达产物,使防御素的医药用途得以实现。

我国的藻类资源十分丰富,共有经济海藻 512 种,其中蓝藻 66 种、红藻 226 种、褐藻 103 种,我国的海藻生物技术研究在短短的十几年里从无到有,并取得了较大的进展,开发海洋资源的巨大潜力正在为越来越多的人所认识。随着藻类分子遗传学和基因工程研究的进一步深入,通过生物学家们的共同努力,一场“蓝色革命”必将为我国乃至世界的经济发展做出重要贡献。

参考文献

- [1] 秦松等,1994d. 海洋与湖沼 25(4): 349~ 352.
- [2] 秦松等,1994. 植物遗传转化技术手册. 中国科学技术出版社, 79~ 82.
- [3] 闵继涛等,1995. 水生生物学报 19(3): 227~ 233.
- [4] 孙军等,1994. 生物工程进展 14(6): 39~ 42.
- [5] 秦松等,1994. 海洋与湖沼 24(4): 353~ 357.
- [6] 武建秋、王希华、秦松、曾呈奎,1995. 海洋科学 5: 42~ 45.
- [7] Schwabe, W. et al., 1990. *Curr. Microbiol.* 20: 365-368.
- [8] Goff, L. J. and Coleman, A. W., 1990. *Curr. Genet.* 18: 557-565.
- [9] Villemur, R., 1990. *Curr. Genet.* 18: 251-257.
- [10] Villemur, R., 1990. *Plant Mol. Biol.* 15: 237-243.
- [11] Hildebrand, M. et al., 1992. *Plant Mol. Biol.* 19: 759-770.
- [12] Qin, S. et al., 1993. *Chin. J. Oceanol. Limnol.* 11(3): 285-288.
- [13] Takeyama, H., Takemura, N. and Matsunaga, T., 1989. In *Current Topics in Marine Biotechnology*. Fujii Technology Press Ltd., 159-160.
- [14] Elhai, J., 1994. *J. Appl. Phycol.* 6: 177-186.
- [15] Wada, H., Combs, Z. and Sakamoto, T., 1992. *Plant Cell. Physiol.* 33(5): 535-540.
- [16] Qin, S. et al., 1997. *Asian Marine Sciences* (in press).
- [17] Neumann-Spallart, C. et al., 1991. *Curr. Genet.* 19: 313-315.
- [18] Hovvris, E. et al., 1991. *J. Phycol. Supplement* 27(3): 29.
- [19] Kindle, K. L. and Sodeinde, O. A., 1994. *J. Appl. Phycol.* 6: 231-238.
- [20] Bingham, S. E. and Webber, A. N., 1994. *J. Appl. Phycol.* 6: 239-245.
- [21] Kindle, K. L., 1990. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 87: 1228-1232.
- [22] Hall, L. M. et al., 1993. *Gene* 124(1): 75-81.
- [23] Kindle, K. L. and Mayfield, S. P., 1990. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 87: 2087-2091.
- [24] Jarvis, E. E. and L. M. Brown, 1991. *Curr. Genet.* 19: 317-321.
- [25] Cheney, D. P. et al., 1992. Progress in Protoplast Fusion and Gene Transfer in red alga Abstracts XIVth International Seaweed Symposium, Brittany, France, NO. 061.
- [26] Wang, S. J. et al., 1994. In Abstracts, 5th International Phycological Congress, Qingdao, China, No. 250.
- [27] Kubler, J. E. et al., 1994. *Journal of Marine Biotechnology* 4: 165-169.