

海藻基因工程进展(I)*

GENETIC ENGINEERING OF MARINE ALGAE

姜 鹏 秦 松 曾呈奎

(中国科学院海洋研究所 青岛 266071)

* 基因工程最先在淡水藻类中开展,直到 80 年代初,在海洋蓝藻中成功得到了遗传转化的结果,才拉开了海藻基因工程研究的序幕。由于海洋蓝藻的分子生物学特性与海洋真核藻类有着本质的区别,反映在基因工程载体构建、基因转移系统等各个方面,二者也有着显著的不同,因此逐渐形成两个并行发展的领域:海洋蓝藻基因工程与海洋真核藻类基因工程。如今,开发海洋、利用海洋,向海洋要食品、要药物、要能源已成为人们的共识;海藻,尤其是经济种类基因工程研究与开发的潜力正受到越来越多的关注。进入 90 年代,海藻基因工程在海洋蓝藻和海洋真核藻类两个领域均显出蓬勃发展的局面,特别是大型海藻基因工程的可操作性已被证实。本文涉及的海藻(Marine algae),是指海洋性种类和用海水培养基培养的种类。

1 海洋蓝藻基因工程

1.1 蓝藻分子遗传学的发展为基因操作奠定了基础

蓝藻是藻类中最原始的门类,是极为丰富多样的具植物型放氧光合作用的原核生物,兼具植物与细菌的一些特点。蓝藻分子遗传学研究始于 60 年代,由于蓝藻的结构和遗传复杂性类似于革兰氏阴性细菌,部分种类还具有天然转化系统和有效重组系统,使得蓝藻分子遗传学得到迅速发展,在光合作用、生物固氮、植物进化等基础研究中的地位不断上升,目前已成为藻类分子遗传学的前沿,其自身的理论体系和研究手段正趋于成熟。

蓝藻能够进行植物型放氧光合作用,部分含异形胞的种类可行生物固氮,因此,以蓝藻为材料,从分子水平上了解光合、固氮、代谢、分化等生命活动的机制一直是蓝藻分子遗传学的重点,围绕基因工程开展基因克隆、定位、功能分析和表达调控研究成为蓝藻分子遗传学的热点。自 Mazar 等 1980 年从淡水蓝藻 *Anabaena* PCC 7120 基因组中克隆到 *nif H 1* 基因以

来,至今克隆的各类已知功能的蓝藻基因不少于 130 种^[5],而海洋蓝藻基因克隆的工作在其中只占很少的比例。脉冲匀直变角电泳(PHAGE)技术的应用带来基因定位工作的突破。Bancroft 等 1989 年借助于限制酶切、PHAGE 与 Southern 杂交技术,已得到 *Anabaena* PCC 7120 的基因图谱,结果表明,尽管蓝藻基因的组织也采用操纵子的形式,但功能相关的基因并非集中在一处,而是分散于染色体上不同位置。继 *A. PCC 7120* 之后,海洋蓝藻 *Synechococcus* PCC 7002 的染色体物理图谱也已完成。深入开展的基因克隆与基因图谱绘制工作无疑为蓝藻的基因操作奠定了基础。

1.2 蓝藻质粒广泛用于构建基因载体

自 1973 年发现蓝藻质粒以来,已在约 50% 被检单细胞及丝状蓝藻中证明了内源性质粒的存在,质粒数目从 1~10 个不等,大小在 1.3~130 Kb 之间,但只在极少数淡水蓝藻中找到质粒编码功能的证据^[4],一般认为蓝藻质粒属隐秘型质粒。至今蓝藻质粒尚未发现可识别的遗传标记,不能在 *E. coli* 中复制,不能作为克隆载体。用含 Tn901 的 *E. coli* 质粒转化淡水蓝藻 *Synechococcus* PCC 7942,由于 Tn901 插入蓝藻内源质粒,第一次得到带 Ap^r 标记的杂交质粒 pCH1 及衍生质粒 pUC1,将后者与 pCYC184 融合,首次获得了双向质粒 pUC104 和 pUC105,其后,利用多种单细胞蓝藻质粒与 *E. coli* 质粒如 pBR322 等重组,或引入多克隆位点,或补充新的选择标记,改善载体克隆潜力,又相继构建了许多双向质粒。这类嵌有细菌遗传标记的重组质粒,由于在细菌和蓝藻中均能复制、稳定存在和表现选择标记,故被称为穿梭载体(Shuttle vector)。

至今,应用于蓝藻遗传转化的供体 DNA 大体可分为三类:第一类是直接利用未修饰的外源质粒,如

* 国家攀登计划 B 专题 PDB6-4-1;国家自然科学基金资助项目 39400076 号。
收稿日期:1997-06-08

pBR322, pBR328 等, 可将外源 DNA 导入蓝藻, 但效率很低, 且对受体需做特殊的处理; 第二类是利用自身染色体或基因组, 通过同源重组作为插入突变的有效方法, 在这方面, 海洋蓝藻 *Synechococcus* PCC 7002

Stevens, 1980 年有过成功尝试, 嵌入 Str^r 标记的染色体片段天然转化成功; 第三类即是穿梭载体。研究结果表明, 穿梭载体是一方便、有效的运载体, 海洋蓝藻的遗传转化也大多采用穿梭载体作为中介(见表 1)。

表 1 部分应用于海洋蓝藻遗传转化的穿梭载体

穿梭载体	宿主系统	标记	文献
pAQE2	<i>Synechococcus</i> PCC 7002- <i>E. coli</i>	Ap^r	Buzby 等, 1983 年
pAQE10	<i>Synechococcus</i> PCC 7002- <i>E. coli</i>	Ap^r, Cm^r	Buzby 等, 1983 年
pAQRM 56	<i>Synechococcus</i> PCC 7002- <i>E. coli</i>	Ap^r, Km^r	Murphy 等, 1992 年
pSU Y02	<i>Synechococcus</i> NKBG 042902- YG1116- <i>E. coli</i>	Ap^r	Matsunaga 等, 1990 年
	<i>Synechococcus</i> NKBG 15041C- <i>E. coli</i>		
	<i>Synechococcus</i> NKBG 15031C- <i>E. coli</i>		
	<i>Synechococcus</i> NKBG 040606B- <i>E. coli</i>		
pSUP1021	<i>Synechococcus</i> NKBG 040607- <i>E. coli</i>	$\text{Km}^r, \text{Cm}^r, \text{Tc}^r$	Sode 等, 1992 年
	<i>Synechococcus</i> NKBG 042902- <i>E. coli</i>		
	<i>Synechocystis</i> 7a- <i>E. coli</i>		
	<i>Pseudanabaena</i> NKBG 040605C- <i>E. coli</i>		

穿梭载体能否在宿主蓝藻中稳定维持取决于多方面的原因: 首先, 蓝藻中存在多种限制性内切酶, 实际上, 已在 *E. coli* 中实现商品化生产的多种限制性内切酶如 Ava I 、 Ava II 等都来源于蓝藻, 解决的办法是利用携有合适的甲基化酶基因的 *E. coli* 宿主, 对穿梭载体的特异位点进行甲基化修饰, 从而改善其在蓝藻中的稳定性。其次, 导入的质粒与宿主质粒之间可能发生同源重组, 因此, 转化前对内源性质粒的清除显得非常必要。Matsunaga 等(1990)对海洋蓝藻 *Synechococcus* NKBG 042902-YG1116 的转化试验中, 用溴化乙锭处理藻株, 清除内源质粒 pSY10 与 pSY09, 得到很好的效果, 而未经处理的藻株, 则不能被转化。

对于海洋蓝藻内源性质粒的研究也逐步深入。值得一提的是, Takeyama 等 1991 年的研究发现海洋蓝藻 *Synechococcus* NKBG 042902 的 pSY10 质粒, 其拷贝数可特异性地被 NaCl 浓度调节。Yang 等 1993 年、Yasukawa 等 1991 年的全序列测定表明, pSY10 含有 7 个开放读码框(ORFs), 其中最大的 ORF-B 与几种细菌质粒的复制区有同源性, 而 pSY10 与宿主中的其他质粒却不具同源性。根据以上发现, 目前利用 pSY10 质粒正在构建一个由盐度调控的基因表达系统。

除了依靠穿梭载体, 人们还试图寻求其他的方法。海洋蓝藻噬菌体早在 1989 年 Bergh 就已报道, 最近, 又分离到一种新的海洋蓝藻噬菌体(m s-1)并对其宿主范围进行了感染试验, 发现 *Synechococcus* NKBG

042902 对它十分敏感^[17]。研究海洋蓝藻的噬菌体转导机制, 发展噬菌体载体系统, 以期在特异性宿主蓝藻中获得外源基因表达, 为构建蓝藻基因工程载体提供了新的思路。

1.3 海洋蓝藻基因转移系统

1968 年 Bazin 证实了蓝藻的遗传重组现象, 1970 年 Shestakov 与 Khyen 首次发现 *Synechococcus* PCC 7943 的 DNA 天然转化作用。目前已确认天然转化的蓝藻是不产生异形胞的单细胞种类, 绝大多数属于 *Synechococcus* 与 *Synechocystis* 两个属^[4], 至今已发展了两种类型的基因转移系统, 一种是遗传转化, 包括天然转化、诱导转化和电击穿孔; 另一种是接合转移。以往由于淡水蓝藻在养殖中所处的特殊位置, 遗传转化的研究得以普遍地开展。近年来, 随着海洋生物技术的发展, 已分离到多种具有经济开发潜力的海洋蓝藻, 其中有些种类能够高效地进行光合作用, 有些种类则能产生一些重要的生物物质, 如植物生长调节剂、UV 吸收蛋白复合体、高活性 SOD 与酪氨酸酶抑制剂等等。上述特点吸引了人们将越来越多的注意力投入到海洋蓝藻基因工程的研究, 并已取得一系列成果。

在已进行的天然转化研究当中, *Synechococcus* PCC 7002 与 *Synechococcus* NKBG 042902-YG1116 是仅有的海洋性种类。前者的意义在于首次将穿梭载体应用于海洋蓝藻的天然转化, 并切除了载体上限制酶 Ava I 的识别位点, 从而提高了转化效率。在对后者的

实验中发现,同等条件下,穿梭载体在 *Synechococcus* NKBG 042902-YG1116 中的天然转化效率十倍低于对照组的淡水蓝藻 *Synechococcus* R2-SPc,据推测,为耐受海水渗透压变化而结合于细胞壁上的多糖类物质可能是阻止外源 DNA 转入的主要原因, Matsunaga 等 1990 年利用 Ca^{2+} 处理 1.5 h,中和蓝藻细胞膜的电荷,以促进外源 DNA 与细胞膜的结合与进入,诱导转化的效率比天然转化明显有所提高。

Thiel 等 1989 年将电击法成功应用于淡水丝状蓝藻 *Anabaena*。由于它不要求受体细胞具备天然转化的能力,因此对于海洋蓝藻具有应用潜力。Matsunaga T 等 1990 年已在 *Synechococcus* NKBG 042902-YG1116 中进行了尝试,实验重点放在对最适电压、间隙时间、质粒 DNA 浓度等参数的优化。研究发现,电击法同样适用于海洋蓝藻,且得到转化子的最低电场强度大大低于对照组的淡水蓝藻,不足之处在于转化效率偏低,虽经 CaCl_2 处理后有所提高,但仍需进一步改进。

接合转移是目前可用于淡水丝状蓝藻的有效基因转移方法。Wolk 等 1984 年最先在 *Anabaena* 中取得突破,其后 Chiang 等 1992, Vachhani 等 1993 年又扩大应用于 *Plectonema* 及 *Fremyella* 等其他丝状蓝藻, Marraccini 等 1993 年在淡水单细胞蓝藻中也已获得成功。这个系统需先构建含有 *E. coli* 与蓝藻质粒复制起点、选择标记与转移起点(*oriT*)的穿梭载体,转化含有辅助质粒(携带识别 *oriT* 的基因)的 *E. coli* 菌株,再通过接合引入一个 *IncP* 接合质粒,然后与受体藻株混合,通过抗生素筛选获得抗性藻落。辅助质粒与接合质粒由于无法复制或整合而逐渐丢失,穿梭载体能够复制以独立形式存在,还可能与蓝藻染色体发生同源重组而稳定存在^[8]。Sode 等 1992 年首次利用携带 RP4 特异 *mob* 位点与 *Tn5* 转座子(Km^r)的穿梭载体 pSUP1021 在 *Pseudanabaena*、*Synechococcus*、*Synechocystis* 3 个属共 7 种海洋蓝藻中成功进行了接合转移。以 *Tn5* 的 *Xho* I 片段为探针的斑点杂交结果显示,转化后, *Tn5* 会随机地插入到宿主染色体中整合与表达,使宿主表现对 Km 的抗性,因此,对于转化效率的估计无需考虑 pSUP1021 上是否具有蓝藻质粒的复制起点。同时,为了验证是否非蓝藻质粒能同自主性复制子一样可在海洋蓝藻中复制与稳定存在,一种广谱宿主的载体质粒 pKT230(*IncQ*)首次在海洋蓝藻 *Synechococcus* NKBG 15041C 的接合转移试验中投入应用。以 pKT230 为标记探针的 Southern 杂交分析表明, pKT230 能够在宿主蓝藻中复制并稳定存在,不受宿主限制性内切酶系统的影响,并显示出很高的转化

效率。另外, pKCAT2 质粒(pKT230 中嵌入 CAT 基因)在宿主蓝藻中也有着长期的稳定性。研究表明,接合转移在海洋蓝藻中有着广泛的适用性, *IncQ* 质粒在海洋蓝藻遗传转化研究中有着极大的应用潜力^[18]。

除了上述方法,基因枪也被 Matsunaga 等 1991 年应用于海洋蓝藻的遗传转化研究,其 DNA 载体采用一种细菌磁性粒子(BMPs),直径在 50~100 nm,表面覆盖一层磷酰脂,利用 BMPs, pSUP1021 已成功转化 *Synechococcus* NKBG 15041C,在用 pKCAT2 质粒转化的藻株中, CAT 活性也得到证实^[13]。

1.4 海洋蓝藻基因工程正向应用目标迈进

80 年代以来,海洋蓝藻基因工程的基础研究得到深入与广泛的开展,在此基础之上,围绕人工构建藻类新品种与实现藻类天然产物的基因工程生产两个根本目标,海洋蓝藻基因工程向应用目标也迈出了重要的一步。Bryant 等 1985 年将 *Synechococcus* PCC 7002 的藻蓝蛋白基因在大肠杆菌中得到成功表达,目的基因同样在 *Synechococcus* PCC 7002 中得到稳定转化^[19]。来自芽胞杆菌的杀蚊幼毒素基因 *cryIVD*,通过与宿主本身的 *cpcB* 基因发生融合,天然转化获得成功,借助于 *cpcB* 基因的启动子, *cryIVD* 基因得以高效表达,转化体对蚊幼具有毒性。

参考文献

- 1 武建秋、王希华、秦松等。海洋科学,1995,5: 42~44
- 2 秦松等。海洋与湖沼,1994,25(4): 349~352
- 3 秦松等。海洋与湖沼,1994,25(4): 353~356
- 4 秦松、王希华、曾呈奎。植物遗传转化技术手册。北京:中国科学技术出版社,1994,79~82
- 5 秦松、严小军、曾呈奎。海洋与湖沼,1996,27(1): 103~111
- 6 Apt KE, Bhaya D. and Grossman AR. . *J. Appl. Phycol.* 1994, 6: 225~230
- 7 Dunahay TG., Jarvis EE. and Roessler PG. . *J. Phycol.* ,1995,31: 1004~1012
- 8 Elhai J. . *J. Appl. Phycol.* 1994, 6: 177~186
- 9 Henry EC. and Meints RH. . *J. Appl. Phycol.* 1994, 6: 247~293
- 10 Jarvis EE., Dunahay TG. and Roessler RG., ITIT Symposium on Microalgal Biotechnology, Feb. 15~16, 1996, Osaka, 20~28
- 11 Kindle, K. L., Sodeinde, O. A. . *J. Appl. Phycol.* 1994, 7: 77~84
- 12 Kubler JE., Minocha SC. and Mathieson AC. . *J. Mar.*

- Biotech.*, 1994, 1: 165~ 169
- 13 Matsunaga T, Takeyama H. *J. Appl. Phycol.*, 1995, 7: 77~ 84
- 14 Muro-Pastor AM., Kuritz T. and Flores E. *et al.*, *J. Bact.* 1994, 176: 1 093~ 1 098
- 15 Qin, S *et al.* The Marine Biology of the South China Sea (B. Morton ed.), 1997, 3~ 11
- 16 Qin, S. *et al.*, Sino-Japan Symposium on Algal Genetic Engineering and Bioreactors, Aug. 21 ~ 23, 1997, Qingdao. PP. 8~ 9, 51
- 17 Sode K., Oozeki M. and Asakawa K, *et al.*. *J. Mar. Biotech.* 1994, 1: 189~ 192
- 18 Sode K., Tatara M. and Hatano N. *et al.*. *J. Biotech.* 1994, 33: 243~ 248
- 19 Stevens, SE., Murphy RC. *et al.*. *J. Appl. Phycol.* 1994, 6: 187~ 197

(待续)