

海藻基因工程进展(II)*

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)

*

2 海洋真核藻类基因工程

真核藻类遗传转化研究开始于 80 年代, 1982 年 Rochaix 与 Dillewijn 报道了首例淡水单细胞绿藻——莱茵衣藻 *Chlamydomonas reinhardtii* 的遗传转化, 选用壁缺失突变和精氨酸依赖突变株, 使来自酵母的精氨酸基因获得了整合表达的效果。其后, *C. reinhardtii* 广泛应用于分子遗传学与基因工程的研究, 目前已成为唯一的染色体、叶绿体、线粒体 3 套基因组均能遗传转化的植物^[11]。海洋真核藻类基因工程的研究起步更晚, 但发展很快, 由于几种大型海藻已实现规模化栽培并形成产业, 因此, 作为第一步是在经济藻类中人工开展建立模式转化系统的研究, 逐步建立海藻表达系统。目前, 海洋真核藻类基因工程已取得开创性的突破, 其开发潜力与应用前景正被人们所看好。

2.1 基因的研究

80 年代以来, 对真核藻类质体基因组的结构、功能、起源和进化进行了比较深入系统的研究。先绘制限制性内切酶图谱, 再用异源探针定位基因, 目前已在多种海洋真核藻类中开展了质体基因组图谱绘制工作(见表 2)。通过图谱的比较从而研究质体的起源与进化, 也为有用基因的分离与克隆奠定了基础。

另外, 围绕基因的分离、克隆、测序以及表达调控的研究, 已在多种海洋真核藻类中得以开展。Apt^[6]等克隆了能在三角褐指藻(海洋硅藻) *Phaeodactylum tricorutum* 的 *fcp* 基因(编码捕光色素蛋白)得到该基因的启动子区图谱, 找到转录的 3'末端区, 还发现了该基因的密码子偏向性规律。研究显示, *fcp* 中没有内含子, 推测缺失内含子的外源基因会更容易得到表达。目前, 利用上述启动子进行遗传转化的工作正在进行。

随着海洋真核藻类遗传转化取得突破, 藻类基因的应用研究也在深入开展。现已在海洋真核藻类基因

工程中投入应用的藻类基因有两种(见表 3)。*acc1* 基因是海洋硅藻 *Cyclotella cryptica* 中控制脂类合成的限制酶, 其高效表达可促进脂类的积累, 同时其活性可被 Si 元素含量与蛋白合成抑制剂所调控。依靠 *acc1* 基因自身的调控区(启动子与终止子)构建载体, 引入多拷贝的 *acc1* 基因以使其在 *C. cryptica* 中高效表达, 可以在硅藻体内进行生物燃料的生产^[10]。Qin 等从钝顶螺旋藻 *Spirulina platensis* 等 4 种蓝藻中克隆了别藻蓝蛋白基因 *apcAB* 并进行了全序列测定^[16]。以融合蛋白的方式在大肠杆菌中获得了高效表达, 表达产物经初步试验证明其对小鼠 S₁₈₀ 肉瘤有显著的抑制作用^①。以海带为廉价高效反应器, 生产 APC 蛋白及其他活性物质的系统目前正在构建。

2.2 海洋真核藻类基因工程载体构建与基因转移方法的探索

80 年代末, 各国学者借鉴高等植物基因工程已取得的成就, 在海洋真核藻类的研究中, 开展了一系列卓有成效的工作(见表 4)。

目前, 外源基因的直接导入法如电击穿孔、基因枪轰击等是大型海藻基因工程主要的转化手段, 而载体则大多数是来自于高等植物基因工程, 如 pBI121, pBI221, pCAT-Control, pSV-LacZ 等。结果表明, CaMV35S, SV40 与 NOS 启动子在大型海藻中具有通用性, 可被大型海藻的转录系统识别^[3, 12, 15]。CaMV35S 于高等植物中表现出的细胞、组织和发育阶段的表达特异性, 在海带中同样得到证实^[3, 15]。pBI221(CaMV35S-GUS 基因)质粒可以在海带假根中表达, 但在叶状体、雌配子体及孤雌海带中检测不到 GUS 活性。在海洋硅藻 *C. cryptica* 中则有新的发

* 国家攀登计划 B 专题 PDB6-4-1 号; 国家自然科学基金资助项目 39400076 号。

① 秦松等。海带及螺旋藻的基因工程研究。见: 关美君。第四次中国海洋湖沼药物学术开发研讨会论文集。青岛: 中国药学会海洋药物专业委员会中国海洋湖沼学会药物学分会, 1994。106~107
收稿日期: 1997-06-08

现, 单独转化 pCaMVNED(CaMV35S-*npII*) 质粒得不到新霉素类似物 G-418 抗性转化株, 而将 pDO432 (CaMV35S-*luc*) 与 pACCNPT5.1 (*acc1* 调控区-*npII*) 质粒联合转化, 在 G-418 抗性藻株中则能检测到

荧光素酶活性, 这说明, 尽管外源启动子 CaMV35S 能被硅藻识别及利用, 但其驱动选择标记基因表达的效率远不足于克服选择压力, 要想得到能够高效表达的硅藻基因工程载体, 同源的启动子序列是必需的^[7]。

表 2 海藻质体遗传图谱研究概况

门 类		文 献	
红藻门	条斑紫菜	<i>Porphyra yezoensis</i>	Shi ji, M. S., 1991
	脐形紫菜	<i>P. umbilicalis</i>	Reith, M., 1993
	紫菜	<i>P. purpurea</i>	Reith, M. 等, 1993
褐藻门	网地藻	<i>Dictyota dichotoma</i>	Kuhse, M. 等, 1987
	间囊藻	<i>Pyraliella littoralis</i>	秦松等, 1996
硅藻门	格氏圆筛藻	<i>Coscinodiscus granii</i>	秦松等, 1996
绿藻门	刺松藻	<i>Codium fragile</i>	秦松等, 1996

表 3 已在海洋真核藻类基因工程中得到应用的藻类基因

来源	基因及编码功能	受体	载体	文献
海洋硅藻	<i>acc1</i> ACCase	<i>C. cryptica</i>	<i>acc1</i> 启动子- <i>npIII</i> -	Jarvis, EE. 等, 1996
<i>Cyclotella cryptica</i>	(乙酰辅酶 A 羧化酶)		<i>acc1</i> 终止子	Roessler, P. G. 等, 1993
蓝藻	<i>apcAB</i>	<i>Laminaria japonica</i>	SV40 启动子-	Qin, S. 等, 1996
<i>Spirulina platensis</i>	别藻蓝蛋白		<i>cat-apcAB</i>	Qin, S. 等, 1996

表 4 海洋真核藻类遗传转化研究概况

	受 体	载体 (启动子)	方法	效果	文献
红藻门	麒麟菜 <i>Eucheuma</i> sp.	CaMV35S-GUS/nos-GUS	基因枪	瞬间表达	Cheney, D. P. 等, 1992
	坛紫菜 <i>Porphyra haitanensis</i>	pBI121	电击法	瞬间表达	Wang, S. J. 等, 1994.
	<i>P. minima</i>	pBI121/pBI1221	电击法	瞬间表达	Kubler, JE. 等, 1994
	原生质体	CaMV35S-GUS			
褐藻门	海带 <i>Laminaria japonica</i>	pBI221	基因枪	瞬间表达	秦松等, 1994
	组织切块 裙带菜 <i>Undaria pinnatifida</i>	CaMV35S-GUS			
	组织切块 海带 <i>L. japonica</i>	pSV- <i>lacZ</i>	基因枪	稳定表达	Qin, S. 等, 1996
	雌配子体	SV40- <i>lacZ</i> Ap ^r			
	海带 <i>L. japonica</i>	pCAT-Control			
雌配子体	SV40- <i>cat</i> Ap ^r	基因枪	稳定表达	Qin, S. 等, 1996	
硅藻门	<i>Cyclotella cryptica</i>	<i>acc1</i> 启动子- <i>npIII</i> - <i>acc1</i> 终止子	基因枪	稳定表达	Dunahay, TG. 等, 1995
	<i>Navicula saprophila</i>	<i>acc1</i> 启动子- <i>npIII</i> - <i>acc1</i> 终止子	基因枪	稳定表达	Dunahay, TG. 等, 1995
绿藻门	伞藻 <i>Acetabularia</i> sp.	SV40/pSV2neo	微注射	稳定表达	Neuhaus, G. 等, 1986

目前, 依靠海洋真核藻类中发现的质粒, 构建真核海藻基因工程载体, 成为另一研究焦点。至今国外已对 20 余种红藻进行了研究, 在 13 种红藻中发现了质粒, 秦松等^[2]在我国的经济种类真江蕨 *Gracilaria*

asiatica 中也证实了质粒的存在。另外, 海洋硅藻中也陆续有质粒发现。人们期待着改造内源性质粒, 构建基因工程载体的工作能有所突破。从褐藻中分离的病毒也同样引起人们的兴趣, 侵染褐藻的双链 DNA 病

毒是最大和最复杂的病毒之一,可定向整合于藻类染色体,其基因组在 150~ 330 kb 之间,适于插入大片段的外源 DNA^[9]。对于病毒 DNA 的深入了解以及整合机制的揭示,将为海藻基因工程的载体构建提供新的思路。

2.3 建立海藻表达系统

目前大型海藻基因工程正从建立模式转化系统走向建立海藻表达系统。Kubler 等利用 pBI121/221 (CaMV35S-GUS 基因)质粒电击法转化紫菜原生质体获得瞬间表达^[12],转化后原生质体可以再生,但适合于红藻的阳性选择标记基因的缺乏阻碍了稳定转化结果的获得。

与红藻相比,模式表达系统的建立在海洋硅藻与褐藻中已有了良好的开端,应用前景广阔。

海洋硅藻对海洋初级生产力有很大贡献,在海洋生态动力学中占有重要地位,同时,极具多样性的海洋硅藻本身所具有的一些优良特性也不断被发掘,海洋硅藻资源已被认为是下个世纪饵料、天然药物与能源的巨大宝库。目前,利用硅藻本身的调控序列(启动子与终止子),*np tII* 在底栖与浮游海洋硅藻中都已得到稳定表达^[7]。对于主攻研究的 *Cyclotella cryptica*,其分子遗传学背景了解得较为清晰,室外规模养殖的技术也已过关,利用基因工程技术,向其中引入多拷贝的 *acc1* 基因并高效表达,将为能源物质的生物转化开创崭新的局面。

同样,褐藻的模式表达系统的研究,在中国科学院海洋研究所等单位的努力下,最近几年也取得了突

破性进展。目前,我国已建成世界上规模宏大的海带育苗栽培业,海带每公顷产干品可达 30 t 以上,是一种稳产、高产的优良经济海藻,这为将海带开发成为廉价高效的生物反应器、生产蛋白与药物奠定了一定的基础。同时,海带也存在其种质上的弱点:蛋白质与必需氨基酸含量偏低,对于这些问题,传统的育种方法难以解决,而通过基因工程育种,则为改善海带种质引入了有效的解决手段。研究发现,海带对卡那霉素不敏感而对氯霉素敏感,并已证明氯霉素是适合海带转化体筛选的选择压力^[1]。用基因枪将 pSV40-CAT 质粒导入海带雌配子体中,通过氯霉素筛选获得了孤雌生殖抗性海带,证明 CAT 基因是海带基因工程的有效选择标记基因,SV40 是除 CaMV35S 外又一个适合于海带遗传转化的启动子元件^[15]。根据以上发现,海带模式转化系统得以初步确立,即在目前海带原生质体再生植株尚未成功、组织培养再生植株效率低的情况下,以海带雌配子体为受体,用基因枪转化,以 *cat* 作为选择标记基因,经孤雌生殖与氯霉素筛选,得到再生纯系转基因海带。目前已获得转外源基因植株并申请了专利^①。进一步的工作是利用转基因海带生产具有抗肿瘤活性的别藻蓝蛋白,真正带动海带基因工程向应用性目标迈进。

参考文献[1~ 16]见本刊 1998 年第 2 期 29~ 30 页。

① 秦松、王希华、李新萍、姜鹏、曾呈奎,1996。生产转基因海带的方法。专利申请号:96120235.1。