

用甲基化修饰法抑制钝顶螺旋藻遗传转化中限制性内切酶对外源质粒的降解

王 迪, 卢永忠, 张学成, 茅云翔, 隋正红

(中国海洋大学 海洋生命学院, 山东 青岛 266003)

摘要: 胞内限制性内切酶降解外源 DNA, 是钝顶螺旋藻/节旋藻(*Spirulina/Arthrospira platensis*)遗传转化的难点之一。通过用 EDTA 螯合 Mg^{2+} 抑制限制性内切酶活性的方法, 对外源质粒进行了甲基化修饰。结果表明, 修饰后的外源质粒可抵抗限制性内切酶 3 h 的降解, 有利于钝顶螺旋藻的遗传转化。

关键词: 钝顶螺旋藻(*Spirulina/Arthrospira platensis*); 限制修饰系统; 甲基化酶

中图分类号: Q291

文献标识码: A

文章编号: 1000-3096 (2007) 03-0001-04

钝顶螺旋藻(*Spirulina/Arthrospira platensis*)属蓝藻门(Cyanophyta)蓝藻纲(Cyanophyceae)颤藻目(Oscillatoriales)颤藻科(Oscillatoriaceae), 是一种丝状多细胞蓝藻, 具有很高的营养价值。它的蛋白质质量分数高达 60%~70%, 含有人体必需的 8 种氨基酸; 脂肪酸质量分数为 4.9%~5.7%; 各类维生素的含量十分丰富, 例如硫胺素、核黄素; 各种矿物质的含量也很高^[1]。可以说, 到目前为止还没有其它生物的营养价值能与其媲美。和其它微藻相比, 螺旋藻的细胞壁很薄, 厚度只有 40~60 nm, 而且是由肽聚糖组成易被降解, 其消化吸收率可达 86%^[2]。螺旋藻的营养丰富使其具有成为很好的外源基因表达宿主的潜力, 如果能将外源基因转入细胞内, 将大大提高其产品质量。建立螺旋藻遗传转化系统, 不仅可以通过基因工程手段培育出优良的藻种, 而且可以将螺旋藻作为生物反应器表达外源物质, 提高螺旋藻产品的价值。

目前, 建立稳定的螺旋藻遗传转化体系还有一定障碍, 螺旋藻具有很高的胞内限制性内切酶活性, 限制性内切酶降解外源 DNA 是导致遗传转化失败的重要原因之一^[3]。王高歌^[4]研究了 7 个品系螺旋藻, 认为它们均具有很高的胞内限制性内切酶活性。Kauamura 报道了某品系钝顶螺旋藻具有 3 种限制性内切酶, 其中一种识别序列为 GGCC, 仅此酶足以使

外源基因转化效率降至可检测范围以外。

甲基化酶与限制性内切酶共同组成限制修饰系统(restriction-modification systems), 两者通常成对出现, 具有相同的 DNA 识别位点, 限制性内切酶专门降解外源 DNA, 甲基化酶使自身 DNA 甲基化, 从而不被限制性内切酶切割。该系统在原核生物中普遍存在, 在保护细胞免受外源 DNA 侵入方面具有重要作用^[5]。甲基化酶分为两类, 一类为保持型 DNA 甲基化酶(maintenance DNA methylase), 以半甲基化的单链 DNA 为底物, 产生全部甲基化的双链 DNA, 可确保体内特异甲基化方式的保持性遗传。一类为从头作用型 DNA 甲基化酶(de novo DNA methylase), 作用于非甲基化的 DNA 链, 产生甲基化的 DNA 链。甲基化酶以 S-腺苷酰甲硫氨酸为甲基供体, 以 DNA 中胞嘧啶和腺嘌呤为甲基受体, 反应对 DNA 的要求有种属专一性和序列专一性。目前, 研究者已经注意到了螺旋藻限制性内切酶对外源质粒的降解作用, 但还

收稿日期: 2005-07-20; 修回日期: 2006-01-20

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30471317)

作者简介: 王迪(1979-), 女, 辽宁盘锦人, 硕士, 研究方向: 藻类分子遗传学; 张学成, 通讯作者, E-mail: xc Zhang@ouc.edu.cn

没有从甲基化酶的角度解决这一问题。作者通过查阅文献发现, 甲基化酶反应不需要 Mg^{2+} , 而限制性内切酶反应则需要 Mg^{2+} , 所以作者提取了螺旋藻细胞粗提液, 并加入 EDTA 抑制限制性内切酶活性, 对外源质粒进行了甲基化修饰的研究, 这也是国内外首次使用该方法抑制限制性内切酶对外源质粒的降解。

1 材料与方法

1.1 材料

钝顶螺旋藻(*Spirulina platensis*)341 由本实验室培养, 培养温度为 $25\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$, 光照强度为 $2500\sim 3000\text{ lx}$, 光暗周期 L:D 为 12 h: 12 h, 培养基为 Zarrouk 培养基。

外源质粒 pId112 由本实验室构建。

1.2 试剂

S-腺苷酰甲硫氨酸(SAM)购自美国 Sigma 公司, 其它试剂为国产分析纯。

1.3 方法

1.3.1 螺旋藻细胞粗提液制备

过滤收集藻丝, 用灭菌蒸馏水冲洗去除培养基。将 0.5 g 藻丝均匀混于 3 mL 提取缓冲液中, 提取缓冲液成分为, Tris - HCl 20 mmol/L pH8.0, NaCl 20

mmol/L, EDTA 2 mmol/L, β -巯基乙醇 10 mmol/L, PMSF 1 mmol/L, 甘油 10%。4 $^{\circ}\text{C}$ 浸泡过夜(以下操作均在 4 $^{\circ}\text{C}$ 进行)。超声破碎 90 s, 振幅为 30%, 时间间隔为 2:1。将破碎液 12 000 r/min 离心 60 min 去除细胞碎片。取上清, 缓慢加入 10% 硫酸链霉素至终浓度为 1%, 搅拌均匀, 静置 60 min, 12 000 r/min 离心 60 min。上清即为细胞粗提液。

1.3.2 蛋白质浓度测定

蛋白质浓度测定按照 Bradford^[6]的方法。

1.3.3 质粒提取

按照文献[7]中碱解法进行小量提取。

1.3.4 EDTA 浓度确定

按表 1 配成各组反应液, 37 $^{\circ}\text{C}$ 温浴 5 min。向实验组 1, 2, 3 和阴性对照各组中加入外源质粒 5 μg , 37 $^{\circ}\text{C}$ 反应 30 min, 向阳性对照中加入外源质粒 5 μg , 对各组反应液酚/氯仿抽提, 乙醇沉淀过夜。12 000 r/min 离心 10 min, 将沉淀溶于 20 μL ddH₂O 中, 电泳观察。5 $\times$ 反应缓冲液的成分为, Tris - HCl 50 mmol/L, NaCl 100 mmol/L, DTT 5 mmol/L。

表 1 EDTA 浓度实验各组成成分

Tab. 1 Compositions of EDTA concentration experiments

组别	20g/L 细胞初提液 (μL)	500mmol/L EDTA (μL)	5 $\times$ 反应缓冲液 (μL)	H ₂ O (μL)
阳性对照	20	0	20	60
阴性对照	20	0	20	60
实验组 1	20	2	20	58
实验组 2	20	4	20	56
实验组 3	20	10	20	50

1.3.5 螺旋藻甲基化酶对外源质粒的修饰及限制性内切酶酶切检验

按表 2 配制各组甲基化反应液, 5 $\times$ 甲基化反应缓冲液成分为, Tris - HCl 50 mmol/L, NaCl 100 mmol/L,

表 2 甲基化实验各组成成分

Tab. 2 Compositions of methylation experiments

组别	20 g/L 细胞初提液 (μL)	5 $\times$ 甲基化反应缓冲液 (μL)	400 $\mu\text{mol/L}$ SAM (μL)	0.1%BSA (μL)	H ₂ O (μL)
阳性对照	40	40	0	20	95
阴性对照	40	40	0	20	95
实验组	40	40	40	20	55

EDTA 50 mmol/L, DTT 5 mmol/L, 37 °C 反应 5 min。向各组反应液加入外源质粒 5 μ L(1g/L), 37 °C 反应过夜。酚/氯仿抽提, 乙醇沉淀过夜。12 000 r/min 离心 10 min。将沉淀溶于 20 μ LddH₂O 中。

按表 3 配制各组限制性内切酶酶切反应液。5 $\times$ 酶

切反应缓冲液的成分为, Tris - HCl 50 mmol/L, NaCl 100 mmol/L, MgCl₂ 100 mmol/L, DTT 5 mmol/L。37 °C 反应 60 min。向阳性对照组中加入甲基化修饰外源质粒 20 μ L。酚/氯仿抽提。乙醇沉淀过夜。12 000 r/min 离心 10 min。将沉淀溶于 10 μ LddH₂O 中, 电泳观察。

表 3 限制性内切酶酶切实验各组分

Tab. 3 Compositions of restriction endonuclease digestion experiments

组别	20g/L 细胞初提液 (μ L)	甲基化修饰外源质粒 (μ L)	5 $\times$ 酶切反应缓冲液 (μ L)	0.1%BSA (μ L)	H ₂ O (μ L)
阳性对照	40	0	40	20	80
阴性对照	40	20	40	20	80
实验组	40	20	40	20	80

2 结果

2.1 EDTA 对限制性内切酶的抑制作用

由图 1 可知, 3 组实验组外源质粒的量与阳性对照组的完全一致, 而阴性对照组的则被部分酶切。说明 10,20,50 mmol/L EDTA 均可完全抑制限制性内切酶的活性。在下面的实验中, 作者采用了 10 mmol/L EDTA。

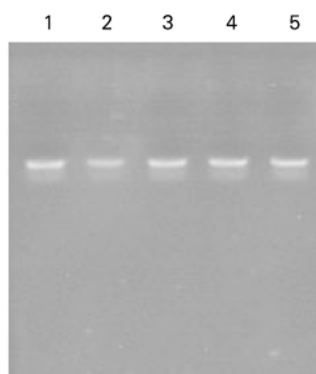


图 1 EDTA 对限制性内切酶的影响

Fig.1 Effects of EDTA on restriction endonuclease

1.阳性对照; 2.阴性对照; 3.10 mmol/L EDTA 组; 4.20 mmol/L EDTA 组; 5.50mmol/L EDTA 组

1. positive control; 2. negative control; 3. 10 mmol/L EDTA group;

4. 20 mmol/L EDTA group; 5. 50 mmol/L EDTA group

2.2 甲基化酶对外源质粒的修饰作用

由图 2 可知, 修饰后的外源质粒在酶切 1 h 后有

大部分保持完整, 而阴性对照组则完全被酶切。由图 3 可知, 修饰后的外源质粒酶切 3 h 后全部被降解。

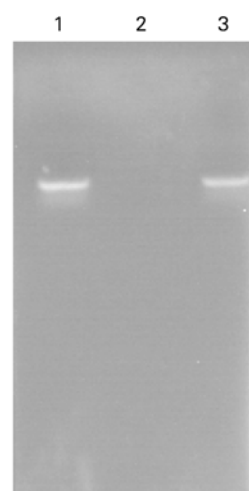


图 2 限制性内切酶降解 1h 的甲基化外源质粒

Fig.2 Methylated foreign plasmids digested by restriction endonuclease for 1 h

1.阳性对照; 2.阴性对照; 3.实验组

1. positive control; 2. negative control; 3. experimental group

3 讨论

限制性系统可降低 DNA 接合转移或电激转化的效率^[8]。Brunk 和 Navas 用电激法转化四膜虫 (*Tetrahymena thermophila*) 时发现, 细胞释放大量的核酸酶明显降低了转化效率。在鱼腥藻 PCC7120

转化实验中,供体 DNA 上一个限制性内切酶的位点不甲基化,转化效率就降低为原来的 1/6~1/16。Thiel 等转化鱼腥藻 M131 时发现,用修饰过的穿梭载体 pRL6 比不修饰的转化效率要高 100 倍。

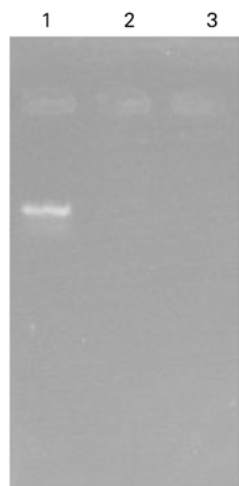


图3 限制性内切酶降解 3 h 的甲基化外源质粒
Fig.3 Methylated foreign plasmids digested by restriction endonuclease for 3 h
1.阳性对照; 2.阴性对照; 3.实验组
1. positive control; 2. negative control; 3. experimental group

在进行螺旋藻遗传转化研究时,茅云翔等^[9]在电激前 4 天向培养基内加入 2 mmol/LEDTA 以抑制限制性内切酶活性,初步建立了转基因体系。厦门大学的一些研究者在超声转化前 16~20 h 向培养基内加入 2 mmol/LEDTA,建立了稳定的遗传转化途径,但藻株在形态上发生了一些变化。EDTA 是一种很强的金属螯合剂,对生物体内的酶均有普遍的抑制作用,如果 EDTA 浓度过高将会影响转化后螺旋藻的状态。尽管螺旋藻胞内的限制性内切酶已有几种被分离纯化并研究了作用方式^[10],但知晓限制性内切酶的作用方式并不能准确确定其对应的甲基化酶修饰方式,这就降低了使用已知的其它物种甲基化酶对外源质粒进行

修饰的可能性。同时,螺旋藻自身的甲基化酶尚未被分离纯化。

由本实验结果可知,外源质粒得到了部分甲基化修饰,修饰后的质粒有利于抵抗限制性内切酶的降解,为外源基因的重组提供更多机会,作者将继续研究用其进行遗传转化的情况。同时,可能由于初提液中蛋白质的成分比较复杂,作者未能对外源质粒进行完全修饰,作者正在考虑能否用该方法对外源质粒进行反复修饰以达到完全甲基化。本实验中所采用的方法,也可能适用于其它物种的限制修饰系统研究。

参考文献:

- [1] Switzer L. *Spirulina*——The world food revolution[M]. Los Angeles CA: Bantam Books, 1980.
- [2] 张学成.螺旋藻——最完美的功能食品[M].青岛: 青岛海洋大学出版社, 1999.
- [3] Vonshak A. *Spirulina platensis (Arthrospira)* [M]. London: Taylor & Francis Ltd, 1997.
- [4] 王高歌.螺旋藻胞外和胞内核酸酶活性研究[J].青岛海洋大学学报, 2001, 31 (6): 883-888.
- [5] 成光杰.限制-修饰系统的克隆研究[J].国外医学分子生物学分册, 1992, 14 (2): 73-76.
- [6] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding[J]. *Analyt Biochem*, 1976, 72:248-254.
- [7] 金冬燕译.分子克隆[M].萨姆布鲁克 J. 第二版.北京: 科学出版社, 1992.19-22.
- [8] Elhai J, Wolk C P. Conjugal transfer of DNA to cyanobacteria [J]. *Methods Enzymol*, 1988, 167:747-754.
- [9] 茅云翔, 王高歌.建立螺旋藻转基因体系初报[J].青岛海洋大学学报, 2000, 30 (2): 13-18.
- [10] Tragut V, Xiao J, Bulina E J. Characterization of DNA restriction-modification systems in *Spirulina platensis* strain pacifica [J]. *Journal of Applied Phycology*, 1995, 7:561-564.

(下转第 8 页)

(上接第 4 页)

Methylating the foreign plasmids on *Spirulina/Arthrospira platensis* transformation to resist the restriction endonuclease digestion

WANG Di , LU Yong-zhong, ZHANG Xue-cheng , MAO Yun-xiang ,SUI Zheng-hong

(College of Marine Life Sciences ,Ocean University of China ,Qingdao 266003,China)

Received:Jul.,20,2005

Key words: *Spirulina/Arthrospira platensis*;restriction-modification systems; methylase

Abstract:The active restriction endonuclease of *Spirulina/Arthrospira platensis* is believed to be the most serious barrier of the foreign gene transformation.With EDTA chelating Mg^{2+} ,we methylate the foreign plasmids by using the crude extracts of cells. Results show that the foreign plasmids can resist the digestion of restriction endonuclease for three hours,and the methylated plasmids are better than unmethylated plasmids for transformation.

(本文编辑:张培新)