

# 微藻基因工程及微藻产品高值化

## MICROALGAL GENE ENGINEERING AND PRODUCT ADVANCEMENT

张学成 杨官品

(青岛海洋大学海洋生命学院 266003)

微藻是一群微型生物的总称,包括众多真核和原核种类。微藻可以直接利用太阳能生产高质量的蛋白质和其他营养物质以及特殊生物活性物质,便于进行大规模培养。实际上微藻养殖和产品开发已经成为新兴生物技术产业。藻粉、长链不饱和脂肪酸、色素蛋白以及藻多糖等在食品、饲料、医药等领域已经得到了广泛应用。但是,能规模养殖的微藻种类少,高价值成分含量低,提纯困难。我国现阶段商业化的微藻产品主要是藻粉等粗制品,进一步开发微藻资源,提高微藻产品价值是当前亟待解决的问题。藻种的选育、养殖方式的选择、培养条件的优化、产品的深加工以及分离提纯工艺的改进等在提高微藻产品价值和微藻产业效益上继续发挥着重要作用<sup>[4]</sup>,但是,这些技术在微藻产品高值化上的应用潜力是有限的。近年来,微藻基因工程研究取得了许多重要进展,在微藻产品高值化上具有广泛的应用前景。在微藻中表达重要的蛋白、多肽甚至次生产物合成酶系,通过分子生物学技术阻断或修饰代谢途径,就能创制具有商业价值的工程藻株和开发高价值微藻产品,推动微藻生物技术产业发展。本文简要综述了微藻基因工程研究进展,展望了基因工程在微藻产品高值化上的应用前景。

### 1 原核微藻基因工程

原核微藻主要是蓝藻(或称蓝细菌)。螺旋藻、鱼腥藻、聚球藻等都是原核微藻。在某些蓝藻中已经建立了比较完善的转基因体系,包括内源质粒衍生的克隆载体、基因导入方法、选择标记、表达调控因子等<sup>[6]</sup>。在蓝藻中可以通过同源重组阻断功能基因<sup>[11]</sup>,也可以通过引入野生型基因对蓝藻突变基因进行功能互补恢复<sup>[17]</sup>,引入新基因或基因群使受体细胞获得新功能<sup>[13]</sup>。把苏云金杆菌毒蛋白基因转移到聚球藻中并获得表达是蓝藻转基因最成功的例子<sup>[16]</sup>。蓝藻

是孑孓的食物,而毒蛋白能抑制其发育从而实现对蚊子及其传播疾病的生物防治。但大量释放重组生物的危险性和目标生物的抗药性使转基因聚球藻的应用受到限制。中国科学家还实现了金属硫蛋白基因在鱼腥藻中的表达,为重金属污染治理提供了一项基因工程手段<sup>[8]</sup>。

螺旋藻是耐碱的多细胞原核微藻,其基因工程研究相当薄弱。自1993年报道可通过随机整合和同源重组实现螺旋藻的转化以来<sup>[15]</sup>,有关螺旋藻转基因的报道甚少。螺旋藻能规模养殖,可直接食用,收获容易,营养价值高,具备优良转基因受体的许多重要特征,但也存在遗传背景认识有限,转基因研究积累少等不利因素。

我们正在建立螺旋藻转基因体系,以便在螺旋藻中表达重要的医用蛋白和多肽,提高螺旋藻的医用价值,为基因工程制药开辟新途径。目前我们已经掌握了螺旋藻单细胞制备和再生技术,建立了抑制螺旋藻细胞内外核酸酶活性的方法。利用电转化,我们实现了质粒 pBR325 在螺旋藻染色体上的随机整合。同时,还利用螺旋藻基因组某些随机片段,构建了同源重组质粒载体,进行了荧光素酶等报告基因在螺旋藻中的表达研究<sup>[2]</sup>。

### 2 真核微藻基因工程

目前已经实现了衣藻细胞核基因组和细胞质基因组(叶绿体和线粒体)的转化,在衣藻中建立了完善的转基因体系,包括基因导入方法、整合途径、选择标记等。实际上衣藻已经成为真核微藻转基因研究的模式材料<sup>[12]</sup>。

利用野生基因能恢复突变基因功能的原理,通过

收稿日期:1999-11-19;修回日期:2000-06-28

功能互补筛选转化子,实现了衣藻的高效转化。向衣藻导入 DNA 的方法有微粒轰击、电穿孔、玻璃珠共震荡和硅碳钎丝穿刺等,其中玻璃珠震荡因其简单、便宜和高转化效率等优势获得广泛应用。将用配子自溶素处理或缺氮培养获得的无壁细胞或无壁突变株细胞与 DNA 和玻璃珠共震荡培养就能获得很高的转化率。衣藻中 DNA 转化的主要机理是随机整合,而同源重组频率极低。质粒随机整合能使功能基因产生插入失活,通过质粒挽救技术可分离相应的功能基因。功能互补或新功能获得将导致衣藻更多基因的分选和功能阐明<sup>[10]</sup>,而酵母人工染色体载体和细菌人工染色体载体在构建微藻基因组文库上的应用将极大地促进通过功能互补或新功能获得分离衣藻结构基因或基因群<sup>[14]</sup>。

衣藻是目前唯一实现了核基因组和叶绿体、线粒体细胞质基因组转化的微藻。基因进入叶绿体后通过同源重组方式整合,能定点失活功能基因。叶绿体基因组有许多拷贝,在选择压存在时,叶绿体将转变成均一的转化子,而当重要基因被失活时,它们又能维持混合状态。线粒体转化还缺少深入细致的机理研究。除衣藻外,团藻、硅藻等真核微藻的转基因也取得了实质性进步<sup>[7]</sup>。我国有关单位开展了小球藻转基因研究,利用 PEG 转化和基因枪等方法已经将 GUS 报告基因导入小球藻并实现瞬时表达,同时证明许多真核基因表达元件可以在小球藻中起作用<sup>[1]</sup>。

### 3 微藻基因工程与微藻产品高值化

原核微藻基因组、真核微藻基因组和质基因组的转化进展迅速。在不远的将来,微藻基因工程不仅将帮助人们更深刻地认识微藻生物学规律,而且将创造出具有商业价值的工程藻株或新品系,推动微藻生物技术产业的发展。

#### 3.1 通过基因工程手段创制微藻新品系

野生型与突变型基因间的功能互补、同源重组产生插入突变阻断功能基因、引入外源基因或酶系基因群使受体获得新功能以及通过同源重组以修饰基因或替换原有基因等技术是操纵微藻基因组的有效手段,它们在微藻中的广泛应用将带来更多基因的分选和功能的阐明,也将使人们能够创制具有商业开发价值的工程藻株或新品系。在微藻中高效表达目的基因、对养殖微藻的代谢途径进行修饰或阻断等基因工程途径将使微藻遗传改良更有效、更具有目的性。

螺旋藻耐碱、盐藻耐盐的特点使得在养殖过程中很容易控制杂藻污染,这也是它们能进行规模养殖的重要条件。如果分离出它们的抗性基因并转移到其他藻种中,就能扩展养殖藻种的数量,使微藻产品更加丰富多样。在没有虾青素和 DHA 合成能力的蓝藻中引入相关酶或酶系,已经使受体细胞获得了相应的合成能力<sup>[11,13]</sup>。通过引入  $\mu 3$  去饱和酶等,可以改良蓝藻不饱和脂肪酸的组成<sup>[9]</sup>。这些研究结果说明基因工程技术在培育微藻新品系中的有效性。

#### 3.2 利用微藻表达医用蛋白

许多医用蛋白微量存在,提取困难,价格昂贵,很难用于社会化的医疗和保健。利用基因工程技术在微生物中表达这些有药用价值的蛋白因子或多肽,已经在细菌系统中取得了巨大的成就,为人类提供了过去无法得到的药物,如人胰岛素、生长激素、干扰素、疫苗等,但表达产物需要纯化,以克服细菌本身的不利影响。小球藻、螺旋藻等能大规模养殖,能直接食用,通过它们高效表达医用蛋白或多肽,并通过口服用于医疗和保健,将能提高微藻药用价值,形成高附加值的微藻生物技术产品,同时也能降低医用蛋白的价格,使有关药物的应用得到普及。

建立螺旋藻转基因表达体系后,我们将在螺旋藻中表达诸如鲑鱼降钙素等外源基因,拓展螺旋藻的药用价值。有关单位也试图在小球藻中高效表达防御素基因,以大量获得这一广谱抗微生物多肽,降低防御素价格<sup>[1]</sup>。

#### 3.3 利用转基因微藻提高海洋生物活性物质产量

近年来,在藻类中已经发现了能抗癌、抗微生物、抑制 HIV、抗病毒因子和生物毒素等生物活性物质<sup>[3,5,6]</sup>。中国科学家还在螺旋藻和小球藻等微藻中鉴定出能促进动物细胞生长的类激素因子,扩展了激素的概念和来源。然而,这些生物活性物质一般天然产量甚微,提取困难,不可能直接利用。微藻基因工程为提高这些物质的产量提供了技术前提。如果是蛋白类因子,可以在具有转基因体系的真核或原核微藻中高效表达,大量获得这些因子,提供给市场。如果是次生代谢产物,有可能把它们合成酶系全部导入微藻受体,并高效合成这些产物。

利用细菌体系提高海洋生物活性物质产量是有效的,但细菌体系有限,真核基因在细菌体系中的表达还有一些理论和技术问题有待研究。从原核微藻到



原核微藻, 从原核微藻到真核微藻叶绿体或线粒体, 从真核微藻到真核微藻以及从真核生物到真核微藻, 由于亲缘关系较近, 实现基因转移和表达相对要容易得多。因此, 微藻转基因体系的建立将是开发海洋生物活性物质的重要技术手段之一。有些微藻和细菌能合成 PUFA, 一旦从中分离出 PUFA 合成基因体系, 就能把它们转移到容易养殖的微藻中高效表达。例如, 人们已经把一种海洋细菌的 PUFA 合成酶基因群导入到蓝藻中并获得了表达<sup>[13]</sup>。

#### 参考文献

- 1 陈颖, 李文彬, 孙勇如, 生物工程进展, 1998, 18: 12 ~ 16
- 2 茅云翔, 王高歌, 张宝红等. 青岛海洋大学学报, 2000, 30 (2) II: 13 ~ 18
- 3 张士瑾, 马军英, 范晓. 海洋生物技术原理和应用. 北京: 海洋出版社, 1997. 1 ~
- 4 张学成, 魏东. 藻种改良及遗传工程. 见: 陈峰, 姜悦编. 微藻生物技术. 北京: 中国轻工业出版社, 1999. 276 ~ 316
- 5 曾呈奎, 相建海. 海洋生物技术. 济南: 山东科学技术出版社, 1998. 1 ~
- 6 Apt K. E. & P. W. Behrens. *J. Phycol.*, 1999, 35: 215 ~ 226
- 7 Apt K. F., P. G. Kroth-Pancic & A. R. Grossman. *Mol. Gen. Genet.*, 1996, 252: 572 ~ 579
- 8 Chen Z., R. Li, X. Guo *et al.*. Genetic engineering of metallothionein in cyanobacteria. In: Shu, H. S. & R. R. Colwell. Proceedings of the International Symposium on Progress and Prospect of Marine Biotechnology. Beijing: China Ocean Press, 1999. 322 ~ 330
- 9 Dunahay T. G., F. F. Jarvis, S. S. Dais *et al.*. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 1996, 58: 223 ~ 231
- 10 Funke R. P., J. I. Kovar & D. P. Weeks. *Plant Physiol.*, 1997, 114: 237 ~ 244
- 11 Harker M. & J. Hirschberg. *FEBS Letters*, 1997, 404: 129 ~ 134
- 12 Stevens D. R. & S. Purton. *J. Phycol.*, 1997, 33: 713 ~ 722
- 13 Takeyama H., D. Takeda K. Yazawa *et al.*. 1997, *Microbiology*, 143: 2 725 ~ 2 731
- 14 Vashishtha M., G. Segil & J. L. Hall. *Genomics*, 1996, 36: 4 459 ~ 4 667
- 15 Vonshak A.. *Spirulina platensis (Arthrospira)*. London: Taylor & Francis Ltd., 1997. 1 ~
- 16 Xiaoqiang W., S. J. Vennison, L. Huirong *et al.*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1997, 63: 4 971 ~ 4 975
- 17 Yashiro K., T. Shakamoto & M. Ohmori. *Plant Molecular Biology*, 1996, 31: 175 ~ 181

(本文编辑:张培新)