

盐藻分子生物学研究概况

Review on molecular biology of *Dunaliella* sp.

李正华, 江树勋, 蔡桂琴, 陈丽娇

(福州市海洋生物工程研究开发中心, 福建 福州 350026)

中图分类号: Q7

文献标识码: A

文章编号: 1000-3096(2005)06-0069-04

杜氏藻(*Dunaliella* sp.) 又称盐藻, 是一类极端耐盐的单细胞真核绿藻, 属于真绿藻纲、杜氏藻目、杜氏藻科、杜氏藻属^[1]。有些杜氏藻能够耐受环境中 NaCl 浓度在 0.05%~39.4% 之间的变化, 可以在 pH 5.5~9.5 的范围内生存。杜氏藻细胞体内能储存大量的甘油和胡萝卜素等有机化合物, 可通过大量培养杜氏藻来提取 β -胡萝卜素。天然甘油是良好的化妆品基质, 而 β -胡萝卜素是食品添加剂和着色剂, 且具有医疗保健功能; 联合国粮农组织 (FAO) 和世界卫生组织 (WHO) 食品添加剂委员会一致推荐并认定 β -胡萝卜素为 A 类营养色素。从 1993 年起, 我国批准 β -胡萝卜素作为营养强化剂可以加到婴幼儿食品和乳制品中。最近相关文章报道了 β -胡萝卜素还具有防癌、抗癌的功效, 且在医学上的其他方面也有重要应用^[2,3]。因此, 盐藻被认为是一种大有发展前途的经济作物。利用分子生物学手段开展盐藻的研究, 从遗传物质 DNA 的角度直接、充分地了解盐藻的生活习性, 无疑将为更好地开发利用盐藻奠定更科学的基础。本文分四个方面综述了盐藻的分子生物学方面研究概况, 希望能够对盐藻分子生物学研究有一个较为全面的了解以及为其进一步研究起一点促进作用。

目前, 藻类基因工程, 特别是海洋藻类基因工程的研究与应用越来越受到人们的重视。藻类基因工程研究中首先要解决的问题是找出藻类细胞敏感的抗生素, 并选择适当的筛选标志基因。耿德贵等人^[4]研究了杜氏盐藻对链霉素、卡那霉素、潮霉素、G418 和氯霉素等 5 种常用抗生素的敏感性。分别在固体培养基和液体培养基中, 采用梯度法进行单藻的各种抗生素敏感性试验; 最后采用 K-KI 染液染色, 血球计数板计数, 对有关的数据进行了 t -检验。结果表明, 经 4 周培养, 盐藻对链霉素、卡那霉素、潮霉素和 G418 不敏感, 即使浓度高达 600 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时, 也不能抑制盐藻生长; 由于氯霉素的作用机制是干扰细胞内核

糖体的蛋白体合成, 抑制细胞生长并最终导致细胞死亡^[5], 因此盐藻对氯霉素很敏感, 60 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 即可完全抑制固体和液体培养中藻类的生长, 所以氯霉素可作为盐藻基因工程的筛选抗生素, CAT 基因为其阳性筛选标记基因。CAT 基因编码的氯霉素乙酰转移酶可使氯霉素乙酰化而失去活性^[5,6]。

1 RAPD 技术的应用

杜氏藻缺乏纤维素外壁, 其质膜外仅包裹着一层薄而富有弹性的糖蛋白外被, 而且在不同环境中其细胞形态变化较大, 因此难以从形态学上对它们进行分类。张会永等^[7]利用随机扩增多态性 DNA (RAPD) 技术对 7 株杜氏藻, 即: *D. salina*、*D. bardawil*、*D. minuta*、*D. bioculata*、*D. parva*、*D. peircei*、和 *D. primolecta* 进行了遗传多态性分析, 从生物的遗传物质 DNA 入手, 为杜氏藻的鉴定与分类归属问题提供分子生物学借鉴。利用固体培养基进行藻种纯化, 并在单藻菌落的扩大纯培养液中加入庆大霉素使最终浓度达到 0.16 g/L, 以杀死可能伴生的嗜生的嗜盐细菌。以“有”或“无”的方式记录可重复扩增的 DNA 带 (包括强带和弱带)。根据 Nei 和 Li 的方法计算样品间的简单遗传相似系数 I , 利用 NEIGHBOR 程序建立聚类分析树状图。经过 30 个 10 聚随机引物的多态性扩增和筛选, 发现其中 23 个引物 (比例达 76.67%) 可获得清晰的多态性条带。选择其中清晰、重复性良好的 18 个引物再扩增产生 150 条可区分的 DNA 条带。将每个引

收稿日期: 2003-04-21; 修回日期: 2003-10-20

基金项目: 福建省科委农业计划项目 (2000Z104); 福州市科委项目 (2002350102000510)

作者简介: 李正华 (1975-), 助理工程师, 从事海洋藻类研究开发, 通信地址: 福州市仓山区浦下路 105 号, 350026

物中迁移率相同的带视为同源位点,遗传相似系数计算分析得到的杜氏藻属部分种的聚类分析图表明:*D. salina*、*D. bardaxil*、*D. minuta* 聚为一类,*D. bioculata*、*D. parva*、*D. peircei*、和 *D. primolecta* 为另一类。

2 盐藻基因组 DNA 文库、cDNA 文库的构建

杨志勇等^[8]以 Lambda FIX R II 为载体构建了盐藻的基因组文库。文库包含了 1.1×10^6 个重组子,插入片段平均大小为 18 kb 左右,含插入片段的频率为 100%。该文库的容量约为盐藻单倍体基因组的 200 倍。周冀明等^[9]采用 Lambda 置换型载体 EMBL3 构建了盐藻基因组文库,文库大小为 1.8×10^4 个重组子,插入片段大小为 10~20 kb; 并采用 L-ambdagt10 载体构建了盐藻 cDNA 文库,文库大小为 10^6 个重组子,插入片段平均长度大于 1 kb^[9]。

3 基因相关的克隆

要从盐藻中克隆出感兴趣的基因,首先要知道该基因的全部或部分相近序列,或知道与感兴趣基因功能相似的已知基因的保守序列,制成探针,从已建立的 cDNA 文库或基因组文库中筛选出目的基因。克隆出的目的基因还要进行鉴定,如序列比较、杂交分析、转化试验和产物定位等^[10,11]。周冀明等^[12]从盐藻基因组文库中获得 3 个 3-磷酸甘油脱氢酶基因的阳性克隆,采用斑点杂交证实原位杂交的真实性。又根据果蝇、兔和鼠编码其 3-磷酸甘油脱氢酶基因的辅酶 NAD 的结合功能区保守序列,设计一对引物,大小分别为 21 bp 和 18 bp。经 PCR 扩增得到与果蝇相同的 290 bp 特异扩增片段,并以该片段为探针,采用缺口平移系统标记原位杂交,从盐藻 cDNA 文库中获得 36 个 3-磷酸甘油脱氢酶基因的阳性克隆^[9]。谈峥等^[13]在盐生盐藻 cDNA 文库和基因组文库中对肌动蛋白基因进行了筛选,结果得到了一个 cDNA 克隆和 2 个基因克隆,并进一步从基因克隆中克隆出该基因的 5' 上游片段,检索结果表明,所得到的 cDNA 为盐生盐藻的肌动蛋白基因。

土壤盐渍化是当今世界普遍关注的问题之一。在中国 1 亿 hm^2 的耕地中,就有约 660 万 hm^2 盐渍化的土壤。由于 Na^+ 大量涌入细胞会造成电化学梯度的急速改变,同时渗透胁迫导致水分缺乏,所以大多数的树木和农作物对盐度非常敏感。有的植物种内不同个

体耐盐程度有差异,因此,可以利用这些植物中与耐盐相关的基因来提高盐敏感作物的耐盐性。从盐藻中提取与耐盐相关的基因有其优势,盐藻是最耐盐的真核生物,没有细胞壁,有利于外源基因转化及转基因产物的提取。张晓宁等^[14]为获得高渗透胁迫下特异表达的基因,以抑制消减杂交 (SSH) 法及差式库法的筛选对盐藻在高渗透胁迫下特异表达基因片段进行了克隆。藻体进行二次胁迫,以酚法提取总 RNA,分别回收正向和反向消减 cDNA 的 PCR 产物,经酶切去除接头, DIG DNA Labelling 标记之,拣出第一轮筛选中与正向探针杂交信号明显强于反向杂交信号的克隆,PCR 扩增插入片段后,进行第二轮筛选。再次挑出正向杂交信号明显强于反向杂交信号的克隆,测序结果输入 Gene Bank 进行同源搜索,比较长期 (1 周, LS) 及短期 (16 h, SS) NaCl 胁迫条件下基因表达情况。长期 (1 周, LS) 和短期 (16 h, SS) 各克隆到 2 个特异表达片段。但通过测序及在 Gene Bank 中进行同源搜索,均未有可靠的同源性结果。因此初步认为,以上得到的 4 个 cDNA 可能是新基因或此片段不在保守区内。

快速的体积变化和甘油代谢是盐藻应答外界快速渗透压改变的主要机制。但一些蛋白质方面的研究表明,在渗透胁迫后的恢复过程中也有蛋白质合成的参与。张晓宁等首次将抑制消减杂交法 (SSH) 应用于盐藻耐盐方面的研究,并克隆到一些渗透胁迫相关的基因片段^[15]。由于其中果糖-1,6-二磷酸醛缩酶基因编码产物催化的反应与甘油合成途径偶联,因此张晓宁对此基因进行了克隆和表达研究^[16]。通过 RACE 技术克隆到盐藻果糖-1,6-二磷酸醛缩酶 (DsALDP) 的全长 cDNA,并对其序列分析及在 Gene Bank 中进行同源搜索,发现 DsALDP 基因含有所有果糖-1,6-二磷酸醛缩酶基因中的引物特异结合位点,应属于果糖-1,6-二磷酸醛缩酶基因家族,其表达产物能行使正常的果糖-1,6-二磷酸醛缩酶功能,并与植物叶绿体果糖-1,6-二磷酸酯缩酶 (AldP) 基因的一致性为 73%~66%。Northern 杂交结果及醛缩酶活性分析均表明它确为在盐诱导下特异表达。

启动子是基因表达的一个重要元件。要建立某种生物的转化系统或相应的表达载体,首先要有相应的基因启动子用于标记基因的表达或表达单元的建立。张晓宁等^[17]以启动子探测质粒 pECE7 为载体克隆盐藻中具有启动子活性 DNA 片段的研究。采用限制性内切酶 EcoR I 分别消化盐藻基因组 DNA 和质粒

pECE7, 并进行体外重组及转化筛选, 得到一具有启动子活性的 DNA 片段 Ped。经氯霉素抗性进一步筛选, 其大肠杆菌适应氯霉素的最高浓度为 800 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 而不含质粒的 DH5 α 和携带 Pece7 的 DH5 α 对照组在较低的氯霉素浓度 50~100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 下即无法生长。证明此启动子具有较高的活性。Southern 杂交显示此启动子片段确实来自于盐藻基因组, 且其广泛存在于整个基因组中启动盐藻基因的表达。

此外, 盐藻其它几种重要基因也被克隆出来, 如从 cDNA 文库中克隆出了主要叶绿素结合蛋白 (CAB) 基因^[11]、位于基体的钙牵蛋白基因^[10]、碳酸酐酶基因^[18]和转铁蛋白基因^[19]等; 从基因组文库中克隆出了高盐诱导的碳酸酐酶基因、肌动蛋白基因和硝酸还原酶基因等^[8]。

4 转基因

随着藻类转基因研究的逐渐深入, 越来越多的转基因藻类获得了成功。其中, 原核蓝藻基因转化成功的例子较多, 而真核藻类的则相对较少。耿德贵等^[20]利用电激法将 GUS 基因转入杜氏盐藻细胞内进行瞬间表达, 研究了盐藻的生长状态和电激转化条件对转化率的影响, 并比较了 CaMV35S(花椰菜花叶病毒 35S), Ubil(泛素), Ubil— Ω (泛素— Ω 序列)、CaMV35S—Ubil 和 CaMV35S—Ubil— Ω 等 5 种启动子的转化效率。采用的 5 种质粒分别为 pBI221、pUGUS、pU Ω GUS、p35UGUS 和 p35U Ω GUS, 以组织化学染色法和荧光检测法分别检测 GUS 基因的瞬间表达。结果表明, 培养 5 d 的盐藻在 6 kV 的脉冲电压, 0.05 s 的脉冲持续时间和 210 的脉冲次数下电激可获得较高的转化率, 为转化最佳条件。5 种启动子中, Ubil— Ω 启动子能有效地启动外源基因在盐藻细胞中的表达。因此 Ubil— Ω 启动子的转化效率最高, 适合作为外源基因在盐藻细胞中高效表达的启动子。在转化的过程中, 盐藻细胞的生长状态是影响外源基因转化的重要因素, 处于旺盛生长状态的盐藻可获得较高的转化率; 电激条件也是影响外源基因转化的重要因素, 合适的脉冲电压、短的脉冲持续时间和较多的脉冲次数下进行电激可获得较高的转化率。Ubil— Ω 启动子能够获得高的转化率, Ω 序列起翻译增强子作用的机制可能是: (1) 对 mRNA 的降解起保护作用, 防止核酸外切酶和内切酶对 mRNA 的降解, 从而增强表达。(2) Ω 序列可与 80 S 核糖体的 40 S 和 60 S 亚基结

合, 提供了 mRNA 与 80 S 核糖体结合式装配位点序列 AUU。(3) 由于 mRNA 翻译可被 5' 末端前导中的二级结构明显减弱, 而 TMV Ω 序列和起始因子的相互作用在某种程度上降低了 mRNA 二级结构的稳定性, 有利于 40 S 启动复合物的移动, 从而增强翻译作用。

采用盐藻作为外源基因表达系统有许多的优点, 如盐藻没有细胞壁, 有利于转化和破碎; 具有 2 根鞭毛, 可游动, 培养时不需要摇床摇动; 培养时只需要无机盐, 不需要有机物, 且培养液含有高浓度的 NaCl, 不需要灭菌, 不易污染微生物、其他杂藻和食藻动物; 饱和盐水中, 细胞逐渐变黄, 最后形成休眠孢子, 具有厚的细胞壁, 有利于藻种的保存; 单细胞, 不存在不同组织基因的差别表达而导致的外源基因沉默现象等。

海洋中的藻类资源十分丰富, 人们已能认识并利用的并不多, 许多未知的藻类需要人们去开发。近年来藻类生物技术发展的主要趋势之一就是海洋藻类基因工程。盐藻中富含甘油和 β -胡萝卜素, 具有重要的经济价值。但盐藻中的分子生物水平上的研究还较为薄弱和缺乏。为了进一步提高盐藻的甘油和 β -胡萝卜素的质量和产量, 还得依靠基因工程技术来改良盐藻的品种。

参考文献:

- [1] 赵学武. 养殖盐藻生产 β -胡萝卜素的研究概况[J]. 海洋药物, 1996, 3: 48-53.
- [2] 刘建国, 魏小丽. β -胡萝卜素在医学上的应用研究[J]. 海洋科学, 1994, 2: 33-36.
- [3] 顾学裘, 张永恒. β -胡萝卜素具有防癌功效的机制[J]. 哈尔滨医科大学学报, 1996, 30(4): 403-404.
- [4] 耿德贵, 王义琴, 李文彬, 等. 杜氏盐藻基因工程选择标记的研究[J]. 生物技术, 2001, 11(5): 1-2.
- [5] 黄健, 唐学玺, 宫相忠, 等. 海洋微藻基因工程的选择标志[J]. 植物学报, 2000, 42(8): 841-844.
- [6] 陈颖, 李文彬, 张利明, 等. 小球藻对 5 种常用基因工程抗生素敏感性研究[J]. 海洋与湖沼, 1999, 30(5): 500-505.
- [7] 张会永, 刘广发, 林慧馨, 等. 杜氏藻种间关系 RAPD 分析[J]. 厦门大学学报(自然科学版), 2001, 40(6): 1289-1294.
- [8] 杨志勇, 张庆琪, 焦新义, 等. 盐藻基因组 DNA 文库的构建[J]. 植物生理学报, 2000, 26(1): 75-78.
- [9] 周冀明, 白林含. 盐藻磷酸甘油脱氢酶基因 cDNA 文库的构建[J]. 四川大学学报(自科版), 1997, 34(6): 839-842.



- [10] Ko J H, Kim J Y, Lee S H. Molecular cloning and characterization of a cDNA encoding calt - mation from *Dunaliella salina* [J]. **Plant Cell Physiol**, 1999, 40(4): 457 - 461.
- [11] Long J F, Wang S Y, Nelson N. Cloning and nucleotide sequence analysis of genes coding for the major chlorophyll-binding protein of the moss *Physcomitrella patens* and the halotolerant alga *Dunaliella salina* [J]. **Gene**, 1989, 76: 299 - 312.
- [12] 周冀明, 詹萍. 盐藻 3-磷酸甘油脱氢酶基因克隆 [J]. 四川大学学报(自科版), 1997, 34(1): 106 - 110.
- [13] 谈峥, 杨志勇. 盐生盐藻肌动蛋白基因及其 5' 上游片段的克隆 [J]. 上海交通大学学报, 2001, 35 (7): 1057 - 1061.
- [14] 张晓宁, 张亚兰, 万由衷, 等. 盐胁迫下盐藻特异表达基因片段的克隆 [J]. 复旦学报(自然科学版), 2001, 40(5): 500 - 503.
- [15] Zhang X N, Qu Z C, Wan Y Z, et al. Application of suppression subtractive hybridization (SSH) to cloning differentially expressed cDNA in *Dunaliella salina* (chlorophyte) under hyperosmotic shock [J]. **Plant. Mol Rep**, 2002, 20: 49 - 57.
- [16] 张晓宁, 陈火英, 王昊, 等. NaCl 诱导表达的盐藻果糖-1, 6-二磷酸醛缩酶基因克隆及原核表达 [J]. 复旦学报(自然科学版), 2002, 41(5): 593 - 595.
- [17] 张晓宁, 王昊, 陈火英. 盐藻启动子活性片段的克隆及序列分析 [J]. 复旦学报(自然科学版), 2002, 41(2): 227 - 229.
- [18] Fisher M, Gokhman I, Pick U, Jamir A. A salt-resistant plasma membrane carbonic anhydrase is induced by salt in *Dunaliella salina* [J]. **J Bio Chem**, 1996, 271: 17718 - 17723.
- [19] Fisher M, Gokhman I, Pick U, Jamir A. A structurally novel transferring-like protein accumulates in the plasma membrane of the unicellular green alga *Dunaliella salina* grown in high salinities [J]. **J Biol Chem**, 1997, 272: 1565 - 1570.
- [20] 耿德贵, 王义琴, 李文彬, 等. GUS 基因在杜氏盐藻细胞中的瞬间表达 [J]. 高技术通讯, 2002, 12(2): 35 - 39.

(本文编辑:张培新)

(上接第 59 页)

- [61] Semina H J. The size of phytoplankton cells in the Pacific Ocean [J]. **Int Rev Gesamten Hydrobiol**, 1972, 57: 177 - 205.
- [62] Parsons T R, Takahashi M. Environmental control of phytoplankton cell size [J]. **Limnology and Oceanography**, 1973, 18 (4): 511 - 515.
- [63] Garde K, Cailliau C. The impact of UV-B radiation and different PAR intensities on growth, uptake of ^{14}C , excretion of DOC, cell volume, and pigmentation in the marine prymnesiophyte, *Emiliana huxleyi* [J]. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, 2000, 247: 99 - 112.
- [64] Beardall J, Morris I. The concept of light intensity adaptation in marine phytoplankton: some experiments with *Phaeodactylum tricorutum* [J]. **Mar Biol (Berl)**, 1976, 37: 377 - 387.
- [65] Montagnes D J S, Franklin D J. Effect of temperature on diatom volume, growth rate, and carbon and nitrogen content: Reconsidering some paradigms [J]. **Limnol Oceanogr**, 2001, 46 (8): 2008 - 2018.
- [66] Tukai Z, Bohdanowicz J. Diesel-fuel-oil induced morphological changes in some *Scenedesmus* species (Chlorococcales) [J]. **Arch Hydrobiol (Suppl)**, 1995, 108 (77): 83 - 94.
- [67] Andrea B, James H B. Oceans under the microscope [J]. **Nature**, 2002, 419: 128 - 129.
- [68] Li W K W. Macroecological patterns of phytoplankton in the northwestern North Atlantic Ocean [J]. **Nature**, 2002, 419: 154 - 157.
- [69] Herbert E A, Carol B, Thomas D B. An algal assay method for determination of copper complexation capacities of natural waters [J]. **Bull Environ Contam Toxicol**, 1983, 30: 448 - 455.
- [70] Kaladharan P. Inhibition of primary production as induced by heavy metal ions on phytoplankton population of Cochin [J]. **Indian J Fish**, 1990, 37 (1): 51 - 54.
- [71] Mason R P, Reinfelder J R, Morel F M M. Uptake, toxicity, and trophic transfer of mercury in a coastal diatom [J]. **Environmental Science and Technology**, 1996, 30 (6): 1835 - 1845.

(本文编辑:张培新)