

螺旋藻遗传学研究进展

唐 欣 昀

(安徽农业大学生物工程系 合肥 230036)

螺旋藻(*Spirulina*)属原核生物,是一种光合放氧丝状蓝细菌,富含蛋白质及其他营养成分,是人类及动物重要蛋白质潜在来源^[1]。目前国内外正在开展应用研究,但均使用野生菌株,品种改良已成为大面积生产的首要问题。人们目前对该藻认识十分有限,基础研究只限于形态学和生理生化方面,遗传规律了解很少,本文就近十多年来螺旋藻遗传学研究进展作一简要介绍。

1 诱变研究

Riccardi 等^[2]用亚硝基胍处理 *S. platensis*, 用 5 种氨基酸类似物筛选出了 300 多株突变株。根据对氨基酸类似物抗性程度的差异,突变株可分为产生交叉抗性和不产生交叉抗性两类。ET7、AZ8 和 TA35 三株产生交叉抗性突变株向胞外大量分泌苯丙氨酸、脯氨酸和蛋氨酸。原因是合成调节机理发生改变,产生过量氨基酸,降低了对这些氨基酸及其类似物的摄入,导致对后者的抗性^[3]。突变株 AZ1 可能是脯氨酸透性酶发生损伤,降低了对脯氨酸的摄入,胞内只产生过量脯氨酸,因而只抗其类似物铃兰氨酸。这些抗性突变株有两种用途:一是可获得大量氨基酸产物;二是由于脯氨

酸是一种适合的渗透压调节剂,细胞内脯氨酸浓度与细胞对渗透压的耐力正相关^[4],突变株可比野生株耐更高浓度的 NaCl,利用高渗卤水培养螺旋藻时,突变株可能比野生株更适合。

螺旋藻生长受到缬氨酸抑制,原因是异亮氨酸、亮氨酸和缬氨酸三种分枝氨基酸合成共同途径的第一个酶乙酰羟酸合成酶(AHAS)受到缬氨酸的反馈抑制和阻遏,导致亮氨酸饥饿,阻碍蛋白质合成。Riccardi^[5]用正选法获得一些缬氨酸的自发突变株。突变株 DR2 是缬氨酸运输缺陷型,而 DR5 和 DR9 分别是两种不同的缬氨酸介导的 AHAS 表达控制系统改变型。

龚小敏等^[6]用 ⁶⁰Co- γ 射线处理 *S. platensis* 对高光敏感的菌株,获得 2 株抗高光抑制突变株。突变株藻丝体变短,高光合,低呼吸作用,生长速率加快。

2 基因克隆和序列分析

Tiboni 等^[7]分别用 *Chlamydomonas reinhardtii* 叶绿素大亚基基因和大豆叶绿素小亚基基因作探针,在 *E.*

coli 中克隆了 *S. platensis* 光合作用中固定 CO_2 的关键酶核酮糖-1,5-二磷酸羧化酶的大、小两个亚单位基因。Riccardi 等^[8] 用 *Anabaena* *glnA* 基因作探针, 通过异源杂交获得了带有 *S. platensis* 中氮同化关键酶谷氨酰胺合成酶基因 *glnA* 的 DNA 片段, 然后用质粒 pAT153 在 *E. coli* ET8051Δ(*rha*⁻, *glnA*⁻) 中克隆了这个基因。Riccardi 等^[9] 构造了 *S. platensis* 的 λEMBL3 基因文库, 用 *Anabaena* sp. PCC7120 的 AHAS 基因作探针分别克隆到 AHAS 同功酶基因 *ilvX* 和 *ilvW*。 *ilvX* 在无 AHAS 活性的 *E. coli* PS1283 中获得表达, 而 *ilvW* 只能支持微弱的生长。两基因的启动子类似于已知的蓝细菌的启动子, 但两基因的启动子存在差别。 *ilvX* 启动子与 *E. coli* 的相似, 而 *ilvW* 的却不同, 这是两基因在 *E. coli* 中表达程度不同的原因^[10]。 Bini 等^[11] 用 *Nostoc* UCD 7801 的 *leuB* 基因作探针, 在上述 λEMBL3 基因文库中克隆到亮氨酸合成途径(异丙基苹果酸 (IPM) 途径) 中的 β-IPM 脱氢酶基因 *leuB*, 推测的多肽与细菌和酵母的同一酶相似程度在 45% 以上。与细菌不同的是, *S. platensis* *leuB* 基因以单顺反子形式转录, 类似于其他蓝细菌。 *S. platensis* 中存在大量不饱和脂肪酸, 酯酶活性很高。 Salvi 等^[12] 在 *E. coli* HB101 中克隆到酯酶基因, 其编码的多肽的氨基酸顺序与 *Pseudomonas fluorescense* 羧基酯酶(酯酶 II) 相似程度为 31%, 而与很多丝氨酸蛋白酶、脂酶和酯酶分子中间催化位点的 11 个高度保守的氨基酸残基顺序完全一致。

Sanangelantoni 等^[13] 在 *E. coli* 中克隆和分析了 *S. platensis* 的 *spc* 操纵子。该操纵子和 *E. coli* 的一样, 含有两个结构基因, 分别编码核糖体蛋白质 S2 和蛋白质合成延长因子 EF-Ts。 S2 的一级结构和细菌的相似程度达 68%, 而与烟草叶绿体的相似只有 39%。不同 EF-Ts 的比较结果也与此相同。 Tiboni 等^[14, 15] 分别用 *E. coli* str 操纵子中的 *fus*、*tufA*、*rpsL* 和 *rpsG* 基因作探针, 克隆到 *S. platensis* 4 个相应基因。这 4 个基因分别编码蛋白质合成延长因子 EF-G、EF-Tu、核糖体蛋白质 S12 和 S7。和 *E. coli* 中一样, 这 4 个基因位于同一操纵子 str 内, 按照 S12、S7、EF-G、EF-Tu 的顺序排列和转录。用带有 S12 基因的质粒转化 *E. coli* str^r 突变株, 获得了 str^r 转化子, 表明 *S. platensis* *rpsL* 基因在 *E. coli* 中得到表达, 产物被组装进核糖体。 Buttarelli 等^[16] 详细研究了 *S. platensis* 的 str 操纵子特性, 支持 Tiboni 的结

论。他们发现这 4 个基因产物与真细菌、古细菌和叶绿体的基因产物高度相似(81.3%~25.9%), 其相似程度按大小顺序排列为: S12 > EF-Tu > EF-G > S7。就 S12 而言, *S. platensis* 的与 *E. coli* 和叶绿体的相似分别为 73.2% 和 75.8~81.3%, 特别是分子中间与蛋白质翻译的可靠程度及链霉素抗性有关的氨基酸残基顺序几乎不变, 反映了 S12 的高度保守性。最大相似程度发生在 *S. platensis* 基因和叶绿素相应基因之间。稍后 Sanangelantoni 等^[17] 研究表明, 在 *S. platensis* str 操纵子 *tufA* 基因下游还有另外一个编码核糖体蛋白质 S10 的基因, 而在 *E. coli* 等真细菌中, S10 基因和另外一些核糖体蛋白质基因构成 S10 操纵子。 *S. platensis* str 操纵子结构与三类古细菌的操纵子 (*Methanococcus vannielii*, *Sulfolobus acidocaldarius*, *Pyrococcus woesei*) 和 *Cyanophora paradoxa* 中的蓝色共生体 (cyanelles) 的操纵子相同。从以 DNA 序列推测的蛋白质一级结构构建的系统发育树形图上可以看出 *S. platensis* 的 S10 蛋白质与蓝色共生体的最为相似(74%)。因此, 相同的 str 操纵子、*tufA* 和 S10 基因紧密连锁, 类似的 S10 蛋白质这些数据暗示着蓝细菌、叶绿体和蓝色共生体在系统发育上的密切关系, 叶绿体可能来自蓝细菌的“内生化”, 而蓝色共生体是蓝细菌“器官化”的中间阶段^[16, 17]。

3 质粒

Ciferri 等^[18] 检查了不同的 *S. platensis* 和 *S. maxima* 菌株及一些未定名的菌株, 都没有发现质粒和噬菌体。秦松等^[19] 用超声波裂解法从 *S. platensis* S6 和 F3 菌株中分别分离到 2.4kb 和 2.0kb 的 CCC 质粒。分子杂交证明, S6 和 F3 质粒间, 质粒与染色体 DNA 间有同源性, 说明质粒间、质粒与染色体间存在重组的可能性。研究者没有找到适合的限制性内切酶来对该质粒进行深入研究, 也没有发现该质粒功能, 因此和其他蓝细菌质粒一样, *S. platensis* 的质粒仍为隐秘型质粒。

4 原生质体制备

1982 年 Robinson 提出了酶解制备 *S. platensis* 原生质体的方法, 1989 年 Lanfaloni 等^[20] 详细研究了 *S. platensis* 原生质体形成、纯化和再生的条件。他们认为幼年细胞较易用来制备原生质体, 处理前要用 1.5mol/L NaCl 洗涤藻丝, 以去掉藻丝外套鞘, 再用溶菌酶处理, 可获得大量原生质体。另一重要措施是用牛

血清蛋白梯度离心来纯化酶解样品,可获得高纯度原生质体。样品中活性原生质体可达4%~12%,由幼年细胞制得的活性原生质体再生率为40%~70%,老年细胞为10%~40%。因此用Lanfalon方法可获得大量高活性的原生质体,这对进一步的遗传学研究是极为重要的。Priya Sethu等^[21]在甘露醇作稳定剂的磷酸缓冲液(pH6.8)中用溶菌酶处理藻丝28h,再用蔗糖密度梯度离心纯化,获得80%的原生质体。但该方法酶解时间过长,可能对细胞产生毒害作用。该文也没有报道原生质体的再生率。秦松等^[22]用超声波法制备出*S. platensis*大量单细胞和原生质体并再生成功。但该方法所获原生质体率很低,制得的样品可能不利于进一步的遗传学研究。彭国宏等^[23]先用机械法将藻丝打断,用酸性溶液洗去藻丝外鞘套,在稳定剂为0.8mol/L KCl的磷酸缓冲液中,用溶菌酶和果胶酶协同处理2~6h获得大量原生质体,活性率为98%,但该文没有报道再生率。

5 问题和展望

经过十多年的研究,人们对螺旋藻遗传机制有了初步了解,由于只有少数小组参与研究,进展缓慢。用传统方法诱变蓝细菌已有不少报道,获得了一些突变株,不过除抗性突变株外,一般诱变率都很低^[24]。原因之一可能是细胞内基因组多拷贝,阻碍了隐性突变在缺少正向选择压力下的表达,二是藻丝内多细胞,紧密接触,诱变剂处理后野生型和突变型(营养缺陷型)细胞间可能产生互养或互补作用,这两种原因都影响到营养缺陷型的筛选。由于在螺旋藻中没有筛选到合适的营养缺陷型突变株,不同小组使用异源DNA(DNA片断、质粒、转导质粒等)进行的转化试验均未成功(文献18,个人通讯),一些小组均已放弃这方面研究,转向基因克隆,意欲构建螺旋藻完整的基因图谱^[16,18]。显然,达此目的后再进行遗传育种研究将旷日持久、耗费巨大。因此要想在这一领域获得长足进展,可能要另辟捷径,获得稳定的营养缺陷型或其他带有可用于进一步研究的遗传标记的突变株,结合原生质体和基因克隆技术,研究转化条件,才可尽快把遗传学基础研究应用于育种学领域。

参 考 文 献

- [1] Ciferri O, Tiboni O. *Ann Rev Microbiol*, 1985, 39: 503~526.
- [2] Riccardi G, Sora S, Ciferri O. *J Bacteriol*, 1981, 147(3): 1002~1007.
- [3] Riccardi G, Sanangelantoni A M, Carbonera D, *et al.* *FEMS Microbiol Lett*, 1981, 12: 333~336.
- [4] Riccardi G, Cella R, Camerino G, *et al.* *Plant Cell Physiol*, 1983, 24(6):1073~1078.
- [5] Riccardi G, De Rossi E, Milano A, *et al.* *FEMS Microbiol Lett*, 1988, 49:19~23.
- [6] 龚小敏,胡鸿钧. *武汉植物学研究*, 1996, 14(1): 58~66.
- [7] Tiboni O, Di Pasquale G, Ciferri O. *Biochim Biophys Acta*, 1984, 783: 258~264.
- [8] Riccardi G, De Rossi E, Della Valle G, *et al.* *Plant Mol Biol*, 1985, 4:133~136.
- [9] Riccardi G, De Rossi E, Milano A, *et al.* *Arch Microbiol*, 1991, 155:360~365.
- [10] Milano A, De Rossi E, Zanaria E, *et al.* *J Gen Microbiol*, 1992, 138:1399~1408.
- [11] Bini F, De Rossi E, Barbierato L, *et al.* *J Gen Microbiol*, 1992, 138:493~498.
- [12] Salvi S, Trinei M, Lanfalon L, *et al.* *Mol Gen Genet*, 1994, 243:124~126.
- [13] Sanangelantoni A M, Calogero R C, Buttarelli F R, *et al.* *FEMS Microbiol Lett*, 1990, 66:141~146.
- [14] Tiboni O, Di Pasquale G, Ciferri O. *J Bacteriol*, 1984, 159:407~409.
- [15] Tiboni O, Di Pasquale G. *Biochim Biophys Acta*, 1987, 908:113~122.
- [16] Buttarelli F R, Calogero R A, Tiboni O, *et al.* *Mol Gen Genet*, 1989, 217:97~104.
- [17] Sanangelantoni A M, Tiboni O. *J Gen Microbiol*, 1993, 139:2579~2584.
- [18] Ciferri O, Tiboni O, Riccardi G, *et al.* *Bulletin de l'Institut océanographique, Monaco*, 1993, n°spécial 12: 25~29.
- [19] 秦松,董顺,崔武,等. *海洋与湖沼*, 1994, 25(5): 560~563.
- [20] Lanfalon L, Grifantini R, Petris A, *et al.* *FEMS Microbiol Lett*, (1989), 59:141~146.
- [21] Priya Sethu K M, Prabha T N, venkataraman L V. *Lett in Appl Microbiol*, 1994, 18:241~244.
- [22] 秦松,王希华,董顺,等. *海洋与湖沼*, 1995, 26(1):109~112.
- [23] 彭国宏,施定基,费修绶,等. *植物学报*, 1996, 38(11):861~866.
- [24] 王业勤,徐旭东,黎尚豪. *水生生物学报*, 1991, 15(4): 356~367.