

抑制螺旋藻胞内核酸酶活性的研究

胡晓倩^{1,2} 唐欣昀¹

(1. 安徽农业大学生命科学学院, 合肥 230036; 2. 黄山学院生物系, 黄山 245041)

摘要:有效抑制胞内核酸酶的活性对提高外源 DNA 导入和稳定表达具有重要作用, 本文通过对钝顶螺旋藻 A9、抗刀豆氨酸(CS)突变株 A9c、藻体长直型 A9L 这 3 种藻株胞内核酸酶活性的研究发现, 在培养液中添加 EDTA 或不同温度不同时间处理藻丝体, 都能明显抑制 3 种藻株胞内核酸酶的活性, 并对合适的 EDTA 浓度、合适的处理温度和时间进行了探讨。

关键词:抑制; 螺旋藻; 胞内核酸酶; 酶活; EDTA

中图分类号:Q933 **文献标识码:**A **文章编号:**1000-3207(2007)03-0419-06

螺旋藻营养丰富, 是很理想的外源基因表达受体。外源基因能否在螺旋藻细胞内稳定遗传和表达, 取决于稳定的转化方法和 DNA 重组系统。螺旋藻具有较强活性的胞内核酸酶, 这是螺旋藻基因转化的一个重要障碍, 所以到目前为止还没有建立稳定的转化方法。为了建立螺旋藻稳定的遗传转化体系, 提高外源 DNA 导入和稳定表达的效率, 必须有效抑制胞内核酸酶的活性, 这不仅对螺旋藻本身而且对其他微藻的基因工程研究都具有重要的理论和实际意义。目前在 DNA 提取实验中通过缓冲液中的 EDTA 抑制 DNase 活性而保护 DNA; 李文蓉^[1]等人报道了 EDTA 对绵羊精液中脱氧核糖核酸酶的抑制作用; 茅云翔^[2]和柯珍彦^[3]等人用 EDTA 预培养的方法显著抑制了螺旋藻不同品系藻株的胞内核酸酶活性。本实验发现不仅用合适浓度 EDTA 预培养的方法, 而且用不同温度不同时间处理藻丝体的方法, 均可降低螺旋藻胞内核酸酶的活性, 为螺旋藻的遗传转化奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料 无菌钝顶螺旋藻(*Spirulina platensis*) 品系 A9 藻株、突变型抗刀豆氨酸(L-canavanine s4Lphate, CS) A9c 藻株、A9L (藻体长直型) 藻株均由安徽农业大学生命科学院微生物实验室分离纯化。接种培养 10d 左右在对数生长期时用于实验。培

养条件: 温度 28 ± 2 , 3000lx, Zarouk 培养基溶液^[4]所需试剂及电泳缓冲液所需试剂均为国产分析纯; λ -DNA、 λ -DNA 的 Marker、琼脂糖均为大连宝生物工程公司产品; 质粒 8760(p8760) 由吴龙飞博士惠赠。

1.2 EDTA 处理藻株胞内核酸酶粗提液的提取 在对数生长期用于实验的前两天, 向 50mL 螺旋藻 A9 培养液补加 EDTA (pH8.0) 至终浓度分别为 2mmol/L、4mmol/L、6mmol/L、8mmol/L、10mmol/L, 以不加 EDTA 为对照, 再培养 2d, 参考柯珍彦^[3]等和王高歌^[5]等人的方法: 取各藻株对数生长期的藻液 1.5mL, 6000r/min 离心 5min, 再重复一次后收集藻丝; 用不含 EDTA 的 Zarouk 培养基洗涤藻丝 2 次 (以排除胞外酶活性的影响), 再用含 1.5mol/L NaCl 的 Zarouk 培养基清洗一次, 最后用无菌蒸馏水清洗一次; 将藻丝体置于超低温冷藏柜中反复冻融, 镜检确定细胞破裂率达 98% 以上, 6000r/min 离心 30s, 取上清液的无细胞溶液作为螺旋藻胞内核酸酶的粗提液, 冷藏备用。

1.3 不同温度不同时间处理藻株胞内核酸酶粗提液的提取 取对数生长中期的螺旋藻培养液 6mL, 6000r/min 离心 5min, 弃上清液, 用不含 EDTA 的 Zarouk 培养基清洗藻丝 2 次 (以排除胞外核酸酶活性的影响), 再用 1.5mL 不含 EDTA 的 Zarouk 培养基悬浮藻丝体, 置于 45、50、55、60、

收稿日期: 2006-03-29; 修订日期: 2006-12-20

基金项目: 安徽省自然科学基金项目 (99042130) 资助

作者简介: 胡晓倩 (1972—), 女; 硕士, 讲师; 研究方向为生物化学和微生物生理。E-mail: hxq@hsu.edu.cn

通讯作者: 唐欣昀, 教授, 硕导; E-mail: tangxinyun@21cn.com

65 恒温水浴,每一温度分别设置 5min、10min、15min 3 个处理。然后参照 1.2 的方法制备胞内核酸酶的粗提液。

1.4 不同方法处理后的藻株胞内核酸酶酶活研究 取不同方法处理后的藻株胞内核酸酶的粗提液,分别与 λ -DNA 或 p8760 进行酶切消化后,琼脂糖凝胶电泳研究酶活。琼脂糖浓度 0.9%,电泳缓冲液 TAE,处理点样量为 8 μ L,作为对照的 λ -DNA 点样量为 1 μ L,作为对照的 p8760 点样量为 2 μ L, λ -DNA 的 Marker 点样量为 5 μ L。每次点样前将 λ -DNA 的 Marker 在 60 $^{\circ}$ C 水浴中处理 5min,确保标记电泳条带清晰。电泳条件:电压 80V,电泳 70—80min^[6]。

2 实验结果与分析

2.1 EDTA 对 A9 藻株胞内核酸酶活性的影响

从图 1 可以看出:EDTA 处理 2d 后,当 EDTA 浓度为 2mmol/L 时,A9 藻株的胞内核酸酶活性开始被抑制;随着 EDTA 浓度分别为 4mmol/L、6mmol/L、8mmol/L、10mmol/L 时,该藻株胞内核酸酶活性被明显地抑制;当 EDTA 浓度为 10mmol/L 时,该藻株胞内核酸酶活性被抑制得最完全;不加 EDTA 的 A9 藻株的胞内核酸酶,在酶切 3h 以上把 p8760 几乎全部降解。

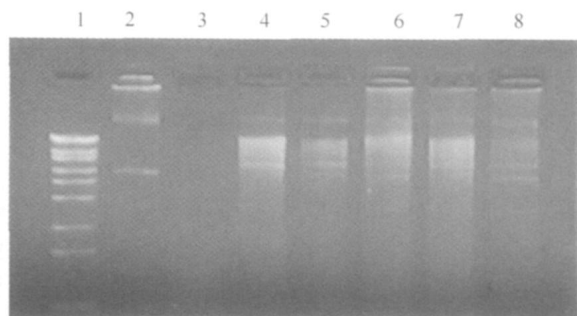


图 1 EDTA 对 A9 藻株胞内核酸酶活性的抑制

Fig. 1 Inhibition of EDTA on intracellular nuclease of A9 strain
1:Marker; 2. p8760; 3—8. 分别用 0、2、4、6、8、10mmol/L EDTA 的酶提取液 37 $^{\circ}$ C 酶切 p8760 3.5h
1:Marker; 2. p8760; 3—8. Enzyme extract adding 0, 2, 4, 6, 8, 10mmol/L EDTA enzymolyzed p8760 for 3.5h

2.2 EDTA 对 A9c 藻株胞内核酸酶活性的影响

从图 2 可以看出:EDTA 处理 2d 后,当 EDTA 浓度为 2mmol/L 时,A9c 藻株的胞内核酸酶活性开始被抑制,随着 EDTA 浓度分别为 4mmol/L、6mmol/L、8mmol/L、10mmol/L 时,该藻株胞内核酸酶活性被抑制,但抑制作用不能得到加强;对照不加 EDTA 的 A9c 藻株的胞内核酸酶,在酶切 3h 时对 p8760 有酶

切作用。

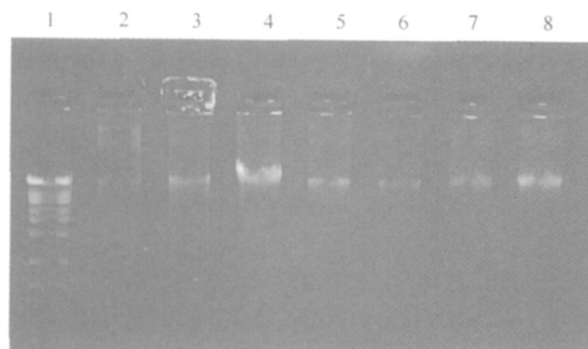


图 2 EDTA 对 A9c 藻株胞内核酸酶活性的抑制(37 $^{\circ}$ C, 3h)

Fig. 2 Inhibition of EDTA on intracellular nuclease of A9c strain
1. Marker; 2. p8760; 3—8. 分别用 0、2、4、6、8、10mmol/L EDTA 的酶提取液 37 $^{\circ}$ C 酶切 p8760 3h(图 3 同) 1. Marker; 2. p8760; 3—8. Enzyme extract adding 0, 2, 4, 6, 8, 10 mmol/L EDTA enzymolyzed p8760 for 3h(the same as Fig. 3)

2.3 EDTA 对 A9L 藻株胞内核酸酶活性的影响

从图 3 可以看出:EDTA 处理 2d 后,当 EDTA 浓度为 2mmol/L 时,A9L 藻株的胞内核酸酶活性开始被明显抑制;随着 EDTA 浓度分别为 4mmol/L、6mmol/L、8mmol/L、10mmol/L 的升高,A9L 藻株胞内核酸酶活性被抑制逐渐增强;当 EDTA 浓度为 10mmol/L 时,A9L 藻株胞内核酸酶活性被抑制最明显;不加 EDTA 的 A9L 藻株的胞内核酸酶,在酶切 3h 以上把 p8760 几乎全部降解。

2.4 不同温度不同时间处理对 A9 藻株胞内核酸酶活性的影响

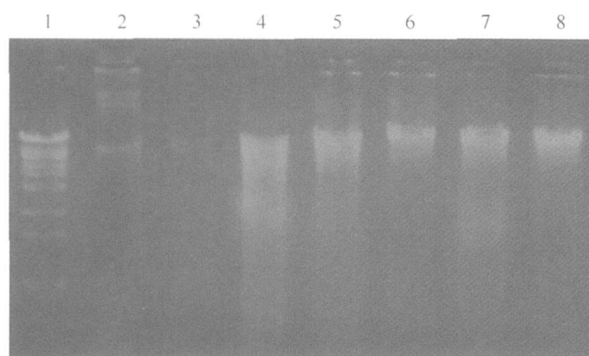


图 3 EDTA 对 A9L 藻株胞内核酸酶活性的抑制

Fig. 3 Inhibition of EDTA on intracellular nuclease of A9L strain

从图 4 可以看出:在 45 $^{\circ}$ C 条件下处理藻丝体 5min、10min,对 A9 藻株胞内核酸酶的活性无影响,可以把 p8760 全部降解;当处理时间延长至 15min 时,A9 藻株胞内核酸酶的活性开始被抑制;50 $^{\circ}$ C 处理藻丝体 5—10min 时,A9 藻株胞内核酸酶的活性

被抑制但很弱,可以把 p8760 大部分降解;50 处理藻丝体 15min 和 55 处理藻丝体 5—15min 时, A9 藻株胞内核酸酶的活性被较明显地抑制;当温度在 60、65 时处理藻丝体, A9 藻株胞内核酸酶的活性就被很明显地抑制。在 45 和 50 下处理时间的长短对 A9 藻株胞内核酸酶活性有显著影响,而当温度 ≥ 55 时,处理时间的长短不再是影响 A9 藻株胞内核酸酶活性的主要因素。对于

A9 藻株,45 是一个既不影响其生理活性又能明显使其胞内核酸酶失活的最适宜温度。在实验中发现,45、50 处理 5—15min 和 55 处理 5min 后,提取的藻丝体的颜色呈现对数生长中期正常的蓝绿色,但 45 处理 5—10min 其胞内核酸酶的活性不能被抑制,而 45 处理 15min 或 50 处理 5min,其胞内核酸酶活性被抑制但不会导致细胞死亡。

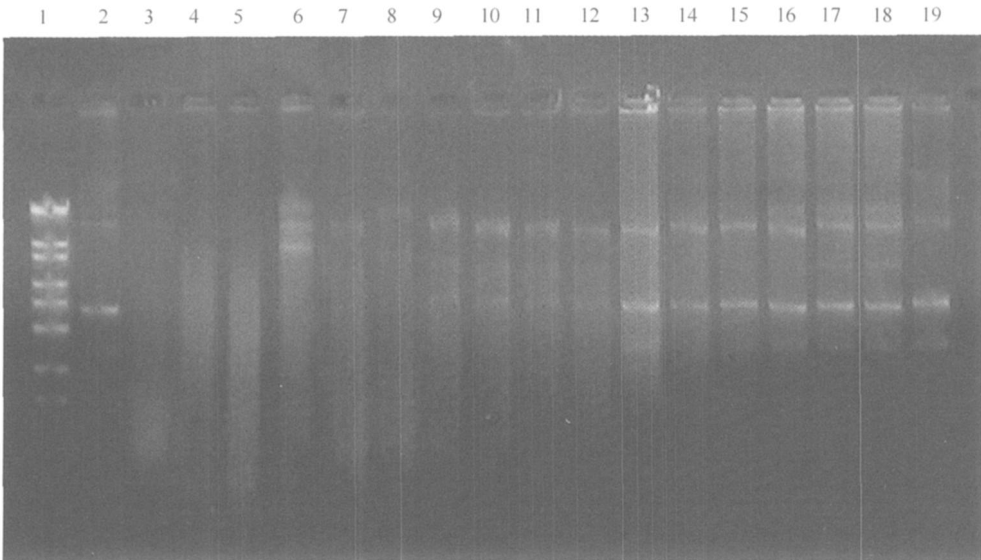


图 4 温度对 A9 藻株胞内核酸酶活性的抑制

Fig. 4 Inhibition of temperature on intracellular nuclease of A9 strain

1. Marker; 2. 19. p8760; 3. 37 酶切 p8760 3h; 4—6. 45 处理 5min、10min、15min 后 37 酶切 p8760 3h; 7—9. 50 处理 5min、10min、15min 后 37 酶切 p8760 3h; 10—12. 55 处理 5min、10min、15min 后 37 酶切 p8760 3h; 13—15. 60 处理 5min、10min、15min 后 37 酶切 p8760 3h; 16—18. 65 处理 5min、10min、15min 后 37 酶切 p8760 3h

1. Marker; 2. 19. p8760; 3. Enzyme extract enzymolyzed p8760 for 3h at 37 ; 4—6. Enzyme extract dealing with the filament for 5 min, 10min, 15min at 45 enzymolyzed p8760 for 3h at 37 ; 7—9. Enzyme extract dealing with the filament for 5min, 10min, 15min at 50 enzymolyzed p8760 for 3h at 37 ; 10—12. Enzyme extract dealing with the filament for 5min, 10min, 15min, at 55 enzymolyzed p8760 for 3h at 37 ; 13—15. Enzyme extract dealing with the filament for 5min, 10min, 15min at 60 enzymolyzed p8760 for 3h at 37 ; 16—18. Enzyme extract dealing with the filament for 5min, 10min, 15min at 65 enzymolyzed p8760 for 3h at 37

2.5 不同温度不同时间处理对 A9c 藻株胞内核酸酶活性的影响

从图 5 可以看出:在 45 条件下处理藻丝体 5min、10min 对 A9c 藻株胞内核酸酶的活性基本无影响,与未进行温度处理状态下的 A9c 藻株胞内核酸酶的活性相当,可将 λ -DNA 酶切降解;当处理时间延长至 15min 时, A9c 藻株胞内核酸酶的活性开始被抑制;50 处理藻丝体 5—15min 时, A9c 藻株胞内核酸酶的活性被抑制但不是很明显;55 处理藻丝体 10min 时, A9c 藻株胞内核酸酶的活性开始被非常明显地抑制,随温度的升高抑制作用越明显;当温度在 60、65 时处理藻丝体即使 5min, A9c 藻株胞内

核酸酶的活性就被非常明显地抑制。在 45 和 55 时,处理时间的长短对 A9c 藻株胞内核酸酶活性有显著影响;而当温度 ≥ 60 ,处理时间的长短不再是影响 A9c 藻株胞内核酸酶活性的主要因素。

2.6 不同温度不同时间处理对 A9L 藻株胞内核酸酶活性的影响

从图 6 可以看出:在 45 条件下处理藻丝体 5—15min,对 A9L 藻株胞内核酸酶的活性有促进作用,与未进行温度处理状态下的 A9L 藻株胞内核酸酶的活性相比,对 λ -DNA 酶切降解更完全;50 处理藻丝体 5min 时, A9L 藻株胞内核酸酶的活性开始被抑制但不是很明显;随温度的升高抑制作用越明

显,当温度在 60、65 时处理藻丝体即使 5min, A9L 藻株胞内核酸酶的活性就被明显地抑制。当温度 ≥ 60 时,处理时间的长短不再是影响 A9L 藻株胞内核酸酶活性的主要因素。

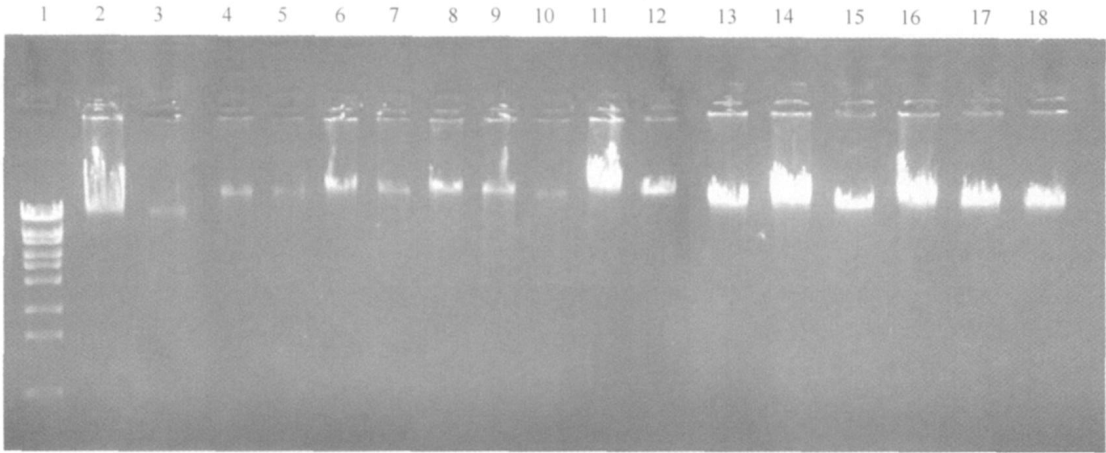


图 5 温度对 A9c 藻株胞内核酸酶活性的抑制

Fig. 5 Inhibition of temperature on intracellular nuclease of A9c strain

1. Marker; 2. λ -DNA; 3. 37 酶切 λ -DNA 3h; 4—6. 45 处理 5min、10min、15min 后 37 酶切 λ -DNA 3h; 7—9. 50 处理 5min、10min、15min 后 37 酶切 λ -DNA 3h; 10—12. 55 处理 5min、10min、15min 后 37 酶切 λ -DNA 3h; 13—15. 60 处理 5min、10min、15min 后 37 酶切 λ -DNA 3h; 16—18. 65 处理 5min、10min、15min 后 37 酶切 λ -DNA 3h(图 6 同)

1. Marker; 2. λ -DNA; 3. Enzyme extract enzymolyzed λ -DNA for 3h at 37 ; 4—6. Enzyme extract dealing with the filament for 5min, 10min, 15min at 45 enzymolyzed λ -DNA for 3h at 37 ; 7—9. Enzyme extract dealing with the filament for 5min, 10min, 15min at 50 enzymolyzed λ -DNA for 3h at 37 ; 10—12. Enzyme extract dealing with the filament for 5min, 10min, 15min at 55 enzymolyzed λ -DNA for 3h at 37 ; 13—15. Enzyme extract dealing with the filament for 5min, 10min, 15min at 60 enzymolyzed λ -DNA for 3h at 37 ; 16—18. Enzyme extract dealing with the filament for 5min, 10min, 15min at 65 enzymolyzed λ -DNA for 3h at 37 (the same as Fig. 6)

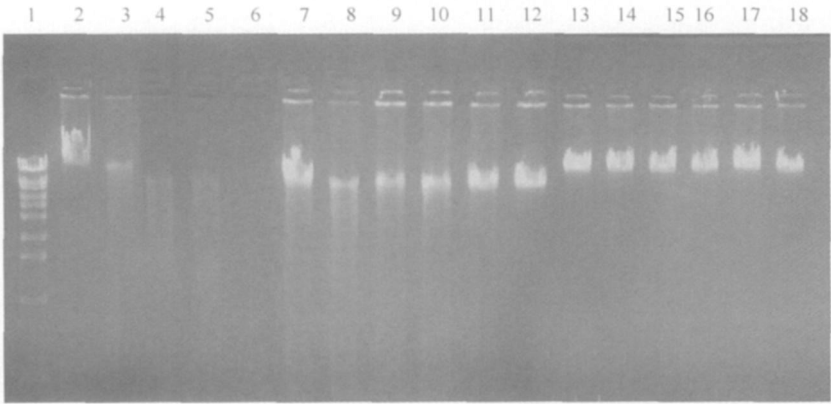


图 6 温度对 A9L 藻株胞内核酸酶活性的抑制

Fig. 6 Inhibition of temperature on intracellular nuclease of A9L strain

1. Marker; 2. λ -DNA; 3. 37 酶切 λ -DNA 3h; 4—6. 45 处理 5min、10min、15min 后 37 酶切 λ -DNA 3h; 7—9. 50 处理 5min、10min、15min 后 37 酶切 λ -DNA 3h; 10—12. 55 处理 5min、10min、15min 后 37 酶切 λ -DNA 3h; 13—15. 60 处理 5min、10min、15min 后 37 酶切 λ -DNA 3h; 16—18. 65 处理 5min、10min、15min 后 37 酶切 λ -DNA 3h

1. Marker; 2. λ -DNA; 3. Enzyme extract enzymolyzed λ -DNA for 3h at 37 ; 4—6. Enzyme extract dealing with the filament for 5min, 10min, 15min at 45 enzymolyzed λ -DNA for 3h at 37 ; 7—9. Enzyme extract dealing with the filament for 5min, 10min, 15min at 50 enzymolyzed λ -DNA for 3h at 37 ; 10—12. Enzyme extract dealing with the filament for 5min, 10min, 15min at 55 enzymolyzed λ -DNA for 3h at 37 ; 13—15. Enzyme extract dealing with the filament for 5min, 10min, 15min at 60 enzymolyzed λ -DNA for 3h at 37 ; 16—18. Enzyme extract dealing with the filament for 5min, 10min, 15min at 65 enzymolyzed λ -DNA for 3h at 37

3 讨 论

3.1 EDTA 对 3 种藻株胞内核酸酶酶活的影响

EDTA 是一种很强的金属螯合剂,能螯合培养液中的微量元素供藻细胞正常生长需要,所以藻细胞在没有 EDTA 时几乎不生长^[7];但高浓度的 EDTA 会影响螺旋藻转化后的生长状况^[8]。在实验中发现 EDTA 在培养液中的终浓度不能过高,过高会导致藻细胞不能正常生长甚至死亡,藻丝体呈现衰败的草黄绿色。核酸酶降解核酸发挥酶活时需要有一定的金属离子作辅基,而 EDTA 通过螯合二价离子特别是 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} ,可以抑制大多数依赖二价离子尤其是 Mg^{2+} 的核酸酶的活性。所以用 EDTA 来抑制螺旋藻胞内核酸酶的活性,最重要的是要选择合适浓度的 EDTA 来处理藻丝体,达到既能抑制胞内核酸酶活性又不影响藻丝体的生长和活性。

对于实验用 3 种藻株,2mmol/L EDTA 的浓度是一个既不影响其生理活性又能明显抑制其胞内核酸酶活性的最适宜浓度。在实验中发现,加入 EDTA 后再培养 2d,当 EDTA 浓度分别为 6mmol/L、8mmol/L 和 10mmol/L 时,培养液中藻丝体的颜色呈现对数生长后期的草黄绿色,说明此时螺旋藻部分细胞已不能正常生长或生长缓慢;而当 EDTA 浓度为 2mmol/L、4mmol/L 时,其培养液中藻丝体的颜色呈现对数生长中期正常的蓝绿色,但为了保证受体螺旋藻转化后的正常生长,一般不使用较高浓度的 EDTA 处理要用于转化的螺旋藻^[3]。对于螺旋藻 S_6 和 F_{3-3} 品系藻株,2mmol/L EDTA 是最适宜浓度^[5];对于 S_{6-11} 品系藻株,10mmol/L EDTA 仍然不能抑制其胞内核酸酶的活性^[5];可见不同品系的藻株需要不同浓度的 EDTA 来抑制其胞内核酸酶的活性。

3.2 不同温度不同时间处理对 3 种藻株胞内核酸酶酶活的影响

一般生物体内的活性酶的反应温度在 28—37℃,低温时酶的活性还存在但会受到抑制,柯珍恋等人^[3]实验发现低于 28℃ 培养可降低螺旋藻胞内核酸酶活性。

在温度处理中,适合的温度和合适的处理时间是主要因素。在本实验中,对于 A9 藻株、A9c 藻株,45℃ 处理 15min 是一个既不影响其生理活性又能明显使其胞内核酸酶失活的最适宜温度和时间,此时提取的藻丝体的颜色呈现正常的蓝绿色;对于 A9L 藻株,50℃ 处理藻丝体 5min 是一个既不影响其生理活性又能明显使其胞内核酸酶失活的最适宜温度和

时间,此时提取的藻丝体的颜色呈现对数生长中期正常的蓝绿色;对于 3 种藻株 60、65℃ 处理 5min 后,提取的藻丝体的颜色都呈现对数生长后期衰败的草黄绿色,这可能是因为高温不仅使胞内核酸酶失活而且使藻丝体的部分细胞死亡。对于螺旋藻 S_{6-4} 品系藻株,温度要高达 65℃ 才没有胞内核酸酶的活性但此温度会导致螺旋藻细胞死亡^[5]。可见不同品系的藻株需要不同的最适温度和最适时间来抑制其胞内核酸酶的活性。

螺旋藻具有胞外和胞内核酸酶,相对于胞外核酸酶,胞内核酸酶活性很强,能迅速降解外源 DNA,这是导致遗传转化失败的最重要原因^[5]。Cao 等^[9]发现用无 Mg^{2+} 的 Zarrouk 培养基培养螺旋藻,能大大降低其胞内和胞外 DNAase 活性;茅云翔等人^[2]用 EDTA 预培养的方法显著抑制了螺旋藻胞内核酸酶活性,并通过电激转化法实现了氯霉素抗性基因在螺旋藻细胞内的表达;从本实验数据可以初步看出,未做任何处理的实验用 3 种藻株胞内核酸酶粗提液可以迅速地酶切 λ -DNA 和质粒 8760,这是将外源 DNA 导入螺旋藻细胞并稳定遗传和表达的限制因子;如采用 2mmol/L EDTA 可明显地抑制 3 种藻株胞内核酸酶的活性;或 45℃ 处理 15min 可抑制 A9 藻株、A9c 藻株胞内核酸酶的活性、50℃ 处理 5min 可抑制 A9L 藻株胞内核酸酶的活性,从而有利于外源基因在其细胞内的转化和整合表达。

参考文献:

- [1] Li W R, Wu J, Shi H C, et al. Inhibition effects of EDTA on DNase in sheep's seminal plasma [J]. *Grass-feeding Livestock*, 1999, 102(1): 27—30 [李文蓉,武坚,史洪才,等. EDTA 对绵羊精液中脱氧核糖核酸酶的抑制作用. 草食家畜, 1999, 102(1): 27—30]
- [2] Mao Y X, Wang G G, Zhang B H, et al. A preliminary Report on Trans-genic Expressions System for *Spirulina platensis* [J]. *Journal of Ocean University of Qingdao*, 2000, 4(2): 13—18 [茅云翔,王高歌,张宝红,等. 建立螺旋藻转基因体系初报. 青岛海洋大学学报, 2000, 4(2): 13—18]
- [3] Ke Z L, Xu H, Zhang J. Repression of endocellular nuclease activity in *Spirulina platensis* [J]. *Marine Sciences*, 2003, 27(1): 34—37 [柯珍恋,徐虹,章军. 抑制螺旋藻胞内核酸酶活性的研究. 海洋科学, 2003, 27(1): 34—37]
- [4] Vonshak A. *Spirulina platensis* (Anthrospira): physiology, cell-biology and biotechnology [A]. Taylor and Francis, USA, 1997, 205—212
- [5] Wang G G, Yang G P, Mao Y X, et al. Reserch on extracellular and intracellular nuclease activity of *Spirulina* [J]. *Journal of Ocean University of Qingdao*, 2001, 31(6): 883—888 [王高歌,杨官品,茅云翔,等. 螺旋藻胞外和胞内核酸酶活性研究. 青岛海洋大

- 学学报, 2001, 31(6):883—888]
- [6] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular clone: A laboratory manual (Second Edition) [M]. Beijing: BIOS Scientific Publishers Limited. 1999 [萨姆布鲁克 J, 弗里奇 EF, 曼尼阿蒂斯 T. 分子克隆实验指南(第二版). 北京: 科学出版社. 1999]
- [7] Jang Y. The Axenic purification and reserch of biologic characteristic of *Heterosigma akashiwo* (Hada) [D]. Thesis for Master of Science, AnHui Agricultural University, 2005 [江艳. 无菌赤潮异弯藻的分离及生物学特性研究. 硕士学位论文, 安徽农业大学, 2005]
- [8] Ke Z L. Building up the transformation and wxpression system to *Spirulina platensis* [D]. Thesis for Master of Science, XiaMen University, 2001 [柯珍恋. 钝顶螺旋藻转化与表达系统的建立. 硕士学位论文, 厦门大学, 2001]
- [9] Cao J, Xu Z, Qiu G, et al. Effects of Mg^{2+} on the growth and DNAase activity of *Spirulina platensis*, a cyanobacterium [J]. *Bioresource Technol*, 1999, 67(3):287—290

RESEARCH ON INHIBITING INTRACELLULAR NUCLEASE ACTIVITY IN SPIRULINA PLATENSIS

HU Xiao-Qian^{1,2}, TANG Xin-Yun¹

(1. Life Sciences School of AnHui Agricultural University, Hefei 230036; 2. Biology Department of Huangshan University, Huangshan 245041)

Abstract: Effectively inhibiting intracellular nuclease activity plays a key role in the enhancement of integrating exogenous DNA and stable expression. By research on intracellular nuclease activity in three strains, that is, A9 strain, A9c strain (mutant anti-L-canavanine sulphate) and A9L strain (elongated strain), it was found that intracellular nuclease activity could be inhibited by adding ethylene diamine tetraacetic acid in the culture media or being treated for variant timing at variant temperature, but proper consistency of ethylene diamine tetraacetic acid and appropriate temperature and time were key factors to keep the three strains being normal physiological status. The intracellular nuclease activity in A9 strain and A9c strain was obviously inhibited with 2mmol/L EDTA or with the treatment for the filament at 45 for 15 min. With this treatment A9 and A9c filament appeared to be in normal physiological state. As for A9L strain, 2mmol/L EDTA or dealing with filament at 50 for 5 min obviously inhibited the intracellular nuclease activity, and the treatment could let the filament still in its normal physiological state. By the fundamental and comparative study of the intracellular nuclease activity in different strains, we could come to the conclusion that *S. platensis* A9 strain, A9c strain and A9L strain may be served as receptors for genetic transformation, some proper methods could be used to inhibit the intracellular nuclease activity, and the technique might help the integration and expression of the exogenous gene in *Spirulina*.

Key words: Inhibit; *Spirulina platensis*; Intracellular nuclease; Enzyme activity; Ethylene diamine tetraacetic acid