

用质粒进行硅藻细胞遗传转化的研究

周金鑫 齐雨藻 简晨昭*

(暨南大学生物系, 广州)

STUDIES ON TRANSFORMATION OF pRD₁ PLASMID FROM *ESCHERICHIA COLI* INTO DIATOM CELLS

Zhou Jinxin Qi Yuao and Jian Chenzhao*

(Biological Department, Ji-Nan University, Guangzhou)

Key words *Nitzschia* sp., transformation, DNA

用藻类细胞作为受体进行DNA转化研究工作是分子遗传学研究中一个新的领域。在以藻类为材料的研究中, Shchastakov 和 Knyen(1970)^[1]首先在组囊藻(*Anacystis nidulans*)中进行了DNA的转化实验。Herdman 和 Carr (1971)^[2]应用DNA/RNA复合物也在组囊藻中进行了转化重组研究。Herdman (1973)^[3]在进行蓝藻转化实验中观察到伴随转化时发生的突变现象。Devilly 和 Houghton (1977)^[4]应用溶菌酶, 十二烷基磺酸钠(SDS), 氨基水杨酸钠(SLS)溶解藻类细胞壁后抽出的DNA有遗传转化活性, Stevens 和 Porter (1980)^[5]在研究蓝藻 *Agmenellum quadruplicatum* DNA转化时对DNA浓度、受体细胞接触DNA的时间、受体细胞的感受态(Competence), 转化对不同的酶的敏感性以及表型表达等方面的问题进行了详细的研究。Rochaix 等(1982)^[6]首次应用酵母质粒转化缺失细胞壁的来因衣藻(*Chlamydomonas reinhardtii*)精氨酸缺陷型, 并测得转化频率为10⁻⁶/处理细胞。同时, Rochaix 等进一步把酵母质粒(PYEarl 4)的Hid III 2.7kb一段DNA(带有酵母arg 4基因)接到PBR₃₂₂上建立了一个新的pJD₂运载体, 并用pJD₂来分别克隆衣藻细胞的核基因, 叶绿体基因和线粒体基因中的Hid III 和 Mbo I 片段。接着在衣藻中用这些杂种质粒进行了遗传转化实验, 经Southern blot技术证实杂种质粒可以在受体细胞中自主复制。

国内何家莞等(1984)^[7]以空气中能固氮的鱼

腥藻(*Anabaena*) 7120 的DNA转化到在空气中不能固氮的氧敏感突变种(*Anabaena*-1)中, 获得能在空气中固氮的藻株。

以藻类细胞为受体的基因工程研究工作为藻类工程学(Phycotechnology)的发展开辟了重要的新途径(Nonomura, 1980)^[8]。

在分子遗传学研究中一般常用质粒处理(plasmid curing), 质粒的接合转移(Conjunction transfer of plasmids)和遗传转化(Genetic transformation)等方法来研究质粒DNA和染色体DNA在细胞中的作用。本文报道的是作者用遗传转化方法进行的 *E. coli* 的 pRD₁ 质粒对硅藻细胞(*Nitzschia* sp.)的转化的初步研究结果。

材料和方法

菌种和藻种 菌种: *E. coli* JC 5400 带有 pRD₁ 质粒。pRD₁ 质粒是人工构建的大质粒(MW = 101d), 具有抗四环素(Tc)、卡那霉素(Kn)标记基因和固氮基因(Nif)特性。藻种: 硅藻菱形藻的一种(*Nitzschia* sp.)得自中国科学院水生生物研究所藻种室。细胞菱形, 长约 12

* 现在美国俄亥俄大学植物学系

在本工作中承黎尚豪教授热心指导, 在藻类培养方面中国科学院水生生物研究所俞敏娟副研究员也给予了具体热情的帮助, 作者谨致谢忱。

* Present address: Department of Botany, Ohio University, Athens, Ohio U. S. A.

1986年1月8日收到。

微米。具片状色素体，对 Tc 和 Kn 均为敏感型，不能在无氮培养基上生长。

培养方法 *E. coli* JC 5400 采用肉汤培养基 (LB) 培养，固体培养基另加 2% 琼脂。液体培养用小瓶通气及摇瓶培养。培养温度为 37℃，时间约 12—16 小时。硅藻采用水生硅 1 号培养基(中国科学院水生所，1975)^[1]。固体培养基另加 2% 琼脂(国产琼脂)。藻种接入培养基后在室温人工光照下培养。夏天采用 14 小时光照 10 小时无光照交替培养 (L:D = 14:10)，冬天采用全光照培养，培养温度的幅度为 25—30℃。

pRD₁ 质粒制备 *E. coli* JC 5400 细菌在 37℃、LB 液体培养基通气培养 12—16 小时后 (O.D. = 0.5—0.7)，用离心法收集细菌。用 TE 缓冲液 (50 毫 mol Tris-HCl, 10 毫 mol EDTA, pH8.0) 洗涤菌体(或用 NaCl 溶液洗涤菌体)，再用 STE 缓冲液 (15% 蔗糖, 50 毫 mol Tris-HCl, 50 毫 mol EDTA, pH8.5) 制成细菌悬浮液，立即加入新鲜配制的溶菌酶 (5 毫克/毫升) 至终浓度为 0.2 微克/毫升。放冰浴 10 分钟后离心 (6 K rpm) 取上清液，上清液用等体积的重蒸酚 (TE 饱和, pH8.0) 抽提二次，取水相部分，再加入等体积的氯仿脱酚，经减压去氯仿后，加二倍体积的冰冷乙醇 (95%)

放冰箱 (-20℃) 过夜，次日经 8 K rpm 离心收集沉淀，把沉淀溶于 SSC 缓冲液中 (0.15 mol, NaCl, 0.015 mol 柠檬酸钠)。

硅藻细胞遗传转化步骤 硅藻细胞预处理：在超净工作台上收集琼脂平板上生长的硅藻细胞(平均长度 12 微米左右)，用 0.01 mol NaCl (及用培养液或无菌水效果相同) 洗涤一次后加入 0.5 倍体积的 0.1 mol CaCl₂ 在冰浴中放置 60 分钟，4 K rpm 离心去上清液，再加入 0.1 倍体积的冰冷 0.1 mol CaCl₂ 在冰浴中再放置 5 分钟后立即用 pRD₁ 转化。转化：在上述经 CaCl₂ 处理的硅藻细胞悬浮液中加入 0.5 倍体积 SSC 的 pRD₁ 质粒溶液，再加入 10 微升溶菌酶液 (5 毫克/毫升) 在冰浴中放置 2 小时后即将硅藻细胞涂布在含有 Tc (25 微克/毫升) 和 Kn (20 微克/毫升) 的固体水生硅 1 号培养基上和无氮培养基上(水生硅 1 号减 NH₄NO₃ 和土壤浸出液)，在夏季 L:D = 14:10 冬季为全光照，室温下(夏季最高达 30℃，冬季最低达 25℃) 培养 5—6 天后，挑出最先生长的较小的硅藻细胞群，经扩大培养后抽提质粒 DNA。

从转化的硅藻细胞中抽提质粒 DNA 从硅藻细胞中抽提 DNA 的方法基本上同于上述方

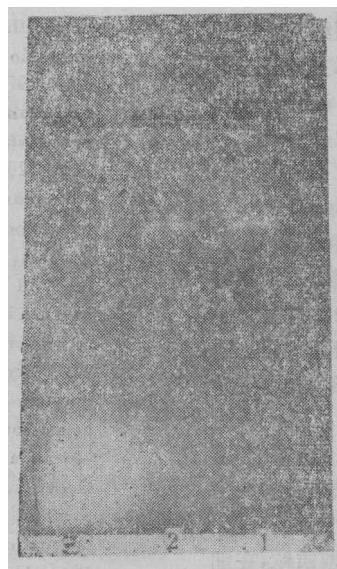


图 1 琼脂糖凝胶电泳

1 *E. coli* JC 5400 中提取的 pRD₁ 质粒样品；2 从硅藻转化子中提取的质粒样品；
3 非转化子硅藻中提取的样品

法,但由于硅藻具有硅质化的细胞壁,因此在加溶菌酶和 SDS 后再在 50—60℃ 水浴中温育 5 分钟,以提高溶菌酶的活性和 SDS 的作用效率促使硅藻细胞壁溶解,然后按常规法从硅藻破壁液中抽提质粒 DNA。

电泳 电泳采用 0.9% 琼脂糖凝胶和 Tris-NaAc 缓冲液(40 毫 mol Tris-HCl, 20 毫 mol NaAc, 2 毫 mol EDTA, pH8.3), 调制水平凝胶板后,每孔加样品液 15 微升。电泳时凝胶板浸没在缓冲液中,电流为 40mA。电泳后用溴化乙锭染色(0.5 微克/毫升)30 分钟。在波长 234nm 紫外灯下观察并照相(图 1)。

结果与讨论

1. 从电泳照片来看 (1) 硅藻转化子破壁液抽提物中出现 pRD₁ 质粒带,而非转化子中则没有同位置的质粒带; (2) 在实验中还把转化子破壁液质粒抽提物再次转化 *E. coli* C₆₀₀,在 *E. coli* C₆₀₀ 转化子的质粒抽提物中出现和 pRD₁ 位置相同的质粒带。实验证实 pRD₁ 质粒可以向硅藻细胞转移,但实验未能证实 pRD₁ 质粒上的固氮基因的表达。这也许和受体细胞的氧化还原机构和固氮酶须要防氧保护装置有关。在转化子中是否存在失活的固氮酶? 还需要检测。

2. 转化频率的高低是和受体细胞的感受态密切相关的。因为硅藻细胞有硅质化的细胞壁,我们用低浓度溶菌酶处理后使细胞局部去壁,这将有利于转化时外源 DNA 进入细胞。这样一种处理方法是否促使细胞呈现感受态? 也有待进一步实验证实。

由于经低浓度溶菌酶处理的细胞再用 42℃ 热冲击会导致细胞大量死亡。所以在硅藻转化实验中减去了热冲击程序。这种转化方法是否也适用于其它藻类。还需要继续开展实验。

硅藻细胞的感受态还和细胞的培养条件、硅藻的生理状态有关。这些问题都须在今后的实验中继续积累资料。

在硅藻细胞中抽提 DNA 时,我们采用溶菌酶、SDS 和高温(50—60℃)处理方法也是一种比较合适的抽提硅藻 DNA 的方法。

3. pRD₁ 是原核生物的一种严紧型质粒,在细胞中拷贝数甚少,而且固氮基因的表达还须要其

它相配合的生理生化条件。所以 pRD₁ 质粒能否在真核生物的硅藻细胞中复制和表达功能,则尚须进行深入的研究及转化子继代培养观察。

本实验仅是原核生物固氮基因向藻类细胞转移的一种尝试,还存在着许多尚待继续深入的研究问题,如对 pRD₁ 质粒进行适当的改建使之降低分子量成为宽松型的质粒(文献中已有报道),再在硅藻中移入固氮酶氧失活的防护装置等,因此改进硅藻细胞的培养条件,将有可能为实现硅藻细胞的自生固氮开辟新的途径。

参 考 文 献

- [1] 水生生物研究所藻类研究室藻类应用组, 1975. 淡水硅藻的大量培养。水生生物学集刊, 5(4): 503—512。
- [2] 何家菟、王业勤、黎尚豪, 1984。鱼腥藻(*Anabaena* 7120) DNA 的转化作用。遗传学报, 11(2): 100—105。
- [3] Devilly, C. I. & J. A. Houghton, 1977. A study of genetic transformation in *Gloeo-capsa alpicola*. *Jour. Gen. Microbiol.*, 98:277—280。
- [4] Herdman, M., 1973. Mutation arising during transformation in the blue-green alga *Anacystis nidulans*. *Mol. Gen. Genetics*, 120: 369—370.
- [5] Herdman, M. & N. G. Carr, 1971. Recombination in *Anacystis nidulans* mediated by an extracellular DNA/RNA complex. *Jour. Gen. Microbiol.*, 68: 14.
- [6] ——, 1972. The isolation and characterization of mutant strain of the blue-green alga *Anacystis nidulans*. *Jour. Gen. Microbiol.*, 70: 213—220.
- [7] Nonomura, A. M., 1980. A future of Phycotechnology. MSS.
- [8] Rochaix, J. D. et al., 1982. Chloroplast genes and transformation in *Chlamydomonas*. in O. Ciferri and L. Dure III (ed): Structure and function of plant genomes P. 205—212. Plenum Press.
- [9] Shestakov, S. V. & N. T. Knyen, 1970. Evidence for genetic transformation in the blue-green alga *Amacyctis nidulans*. *Mol. Gen. Genetics*, 107: 352—357.
- [10] Stevens, S. E. and R. D. Porter, 1980. Transformation in *Agmenellum quadruplicatum*. *Proc. Natn. Acad. Sci.*, 77:6052—6056.