

蓝藻的一种人工转化系统研究

闵红涛 王业勤

(中国科学院水生生物研究所,武汉 430072)

提 要

本研究用溶菌酶处理 *Synechococcus* PCC6301 细胞诱导人工感受态,并用外源质粒 pBR325 转化受体细胞表达氯霉素抗性,转化频率接近 5×10^{-5} 转化子/细胞。用转化子 DNA 再进行次级转化,转化频率可达 5×10^{-4} 转化子/细胞。这比以前的研究者对同种藻株,用克隆的 DNA、通过生理感受态进行转化得到的转化频率要高。DNA 电泳、次级转化和斑点杂交证明外源质粒通过单交换已经整合到了受体细胞染色体上。这些结果表明,人工转化系统是有效的,并具有可重复性。对于影响转化的一些条件,如 DNA 与细胞保温时间、藻龄、光照或黑暗培养,也同时进行了研究。

关键词 蓝藻,人工转化,质粒

基因转移系统的建立是对蓝藻进行遗传操作的先决条件之一。在蓝藻中,已建立的基因转移系统包括接合作用和 DNA 转化作用。以 DNA 为媒介的转化作用是广泛应用的基因转移系统。

目前在蓝藻转化研究方面应用最多的藻株是 *Synechococcus* PCC7002, 7942 和 *Synechocystis* PCC 6803, 所用的供体 DNA 多为穿梭质粒^[1-3]克隆的 DNA^[4] 或携标记的同种蓝藻的 DNA。拟通过自然转化系统,直接用外源质粒转化蓝藻证明是不成功的或转化频率极低^[4]。

利用人工诱导感受态将异源 DNA 直接导入蓝藻细胞,对于发展缺乏天然感受态藻株的转化作用,并对其进行遗传操作具有重要意义。

本研究以单细胞蓝藻 *Synechococcus* PCC 6301 材料,通过人工诱导感受态,将大肠杆菌质粒转到蓝藻细胞中,建立了一个比较稳定可靠的转化系统。

1 材料和方法

1.1 质粒、菌株和藻种 含质粒 pBR325^[5] 的 *Escherichia coli* HB101 在 37℃下用 LB 培养基培养。

蓝藻 *Synechococcus* PCC 6301, 即 *Anacystis nidulans* UTEX 625^[6] 来自美国德州大学,在 30℃ 下光照培养,用 BG11 培养基。配固体培养基时琼脂与液体培养基分开灭

1993年1月4日收到。

菌^[7]。

1.2 DNA 的提取 *Synechococcus* PCC 6301 细胞总 DNA 按修改了的 Daniell 方法提取^[8], 步骤如下:

离心收集 50ml 细胞培养物, 加 4ml 裂解液 (50mmol/L Tris, 50mmol/L NaCl, 5mmol/L EDTA 和 10% 蔗糖, pH8.5)。加溶菌酶至终浓度 1mg/ml, 在 -35°C 低温冰箱中冻结, 取出后立即放入 37°C 水浴, 再加入溶菌酶使其终浓度达到 2mg/ml。同时加入经过热处理的 RNA 酶 A, 使其终浓度达到 25μg/ml, 保温 1h。加入 4ml 2% Sarkosyl 溶液, 37°C 再保温 45min。用苯酚、苯酚加氯仿、氯仿各抽提两次。最后用 2.5 倍体积乙醇沉淀 DNA。

1.3 透性细胞的制备 接种 10ml 新鲜的 *Synechococcus* PCC 6301 细胞到 100ml BG11 培养基中, 使其 OD₇₃₀ = 0.20, 光照培养过夜。翌日, 离心收集细胞。用 50mmol/L Tes(N-三(羟甲基)甲基-2-氨基乙磺酸)(pH7.3)缓冲液洗涤一次; 再悬浮于 10ml 含 1mmol/L EDTA 和 2mg/ml 溶菌酶的 50mmol/L Tes(pH7.3) 缓冲液中, 置于 100ml 三角瓶中, 放摇床上以 60r/min 速度摇动, 温度控制在 36°C, 同时光照。2h 后, 取 2ml 样品转入 20ml 冰冷的 50mmol/L Tes(pH7.3) 中, 立刻离心。将沉淀重悬于大约 10ml 新鲜 BG11 培养基中, 使溶液 OD₇₃₀ = 0.5(2 × 10⁸ 细胞/ml)。这样制备的透性细胞即可用于转化。

1.4 转化 在 1ml 透性细胞中加 1μg 供体 DNA, 放入 50ml 三角瓶中, 在 30°C 光照培养箱中保温, 然后在不同时间取样涂平板, 以 10 倍递度进行稀释, 计算单位体积转化子的数目。转化子以下述任意一种方法进行筛选。

1. 在涂到含抗生素 [氨苄青霉素 (Ap) 0.5μg/ml], 氯霉素 (Cm) 5μg/ml] 的固体培养基之前, 先将与 DNA 保温过一段时间的透性细胞接种到含一半浓度抗生素的液体培养基中培养 2—3d。

2. 先涂在不含抗生素的 20ml 固体培养基上, 培养 24h, 再用刮铲撬起固体培养基, 在其底部加入 400μl 抗生素水溶液, 使抗生素溶液慢慢渗透到固体培养基中, 并达到最终所需要的抗生素浓度^[9]。

1.5 斑点杂交 pBR322 经 Sau3A 降解, 用 α-³²P-dCTP 通过随机引物合成法进行标记。其余步骤详见参考文献^[10]。

2 结果及分析

2.1 外源质粒 pBR325 转化 *Synechococcus* PCC 6301 及影响条件

2.1.1 保温时间 按材料和方法中所述进行转化。以未经溶菌酶处理的细胞为对照, 计算存活率。让受体细胞与供体 DNA 接触不同的时间, 计算不同时间下的转化频率。结果如下:

未经溶菌酶处理的细胞每毫升所含藻落形成单位 (CFU) 为: 2.2 × 10⁸ (CFU/ml)
处理细胞为: 1.0 × 10⁸ (CFU/ml)

$$\text{则经过处理的细胞的存活率} = \frac{1.0 \times 10^8}{2.2 \times 10^8} = 46\%$$

表 1 保温时间和转化频率的关系

Tab. 1 The relationship between incubation time and transformation frequency

保温时间(小时) Incubation time(h)	1	6	18	28	38	48
转化子 (CFU/ml) Transformants	13	27	1100	4700	1400	31
转化频率 Transformation frequency	1.3×10^{-7}	2.7×10^{-7}	1.1×10^{-5}	4.7×10^{-5}	1.4×10^{-5}	1.3×10^{-7}
lg 转化频率 lg Transformation frequency	7.11	7.43	5.41	5.67	5.15	7.49

DNA 与受体细胞接触时间、每毫升转化子的 CFU 以及转化频率之间的关系如表 1(其中转化频率以每毫升转化子的 CFU 除以每毫升处理细胞的 CFU 表示)。

由上述结果可以看出,要获得较高的转化频率,必须使受体细胞和 DNA 有较长的共同保温时间(18h 以上)。接触时间为 28h 时,转化频率最高。但时间过长(超过 38h 时),转化频率也会下降。

2.1.2 藻龄 用不同生长时期的 *Synechococcus* PCC 6301 进行转化, DNA 与受体细胞接触时间为 28h, 观察藻龄对转化频率的影响。结果如表 2 所示。可见,用 pBR325 转化 *Synechococcus* PCC 6301, 藻龄对转化效率的影响不大(最大相差 2 倍)。

表 2 不同藻龄的蓝藻的转化频率

Tab. 2 Transformation frequencies of the cyanobacteria at different ages

藻龄(天) Cell age (d)	0	0.5	1	2	3.5
OD730	0.20	0.25	0.35	0.45	0.55
转化频率 Transformation frequency		2.1×10^{-5}	5.1×10^{-5}	4.5×10^{-5}	1.7×10^{-5}

2.1.3 紫外辐照及光暗条件 转化方法不变,只是在加 DNA 前,先将受体细胞在紫外灯下辐照 40s,观察紫外辐照对转化频率的影响(表 3)。与表 1 对照可以看出,转化频率没多大变化。说明在本实验中紫外辐照对转化效率的影响很弱。

表 3 紫外照射对转化频率的影响

Tab. 3 The effect of UV treatment on transformation frequency

保温时间(小时) Incubation time (h)	18	28	38
转化频率 Transformation frequency	1.2×10^{-5}	4.8×10^{-5}	1.3×10^{-5}

让受体细胞和 DNA 在黑暗下保温,观察黑暗保温不同时间对存活率及转化频率的影响。从表 4 可见,转化频率没有多大变化,而存活率随着黑暗保温时间的延长而降低。这说明透性细胞的恢复与光照有关。

表 4 暗保温时间对存活率及转化频率的影响

Tab. 4 The result of dark incubation on the viability and transformation frequency

暗保温时间(小时) Dark incubation time (h)	18	28	38
转化频率 Transformation frequency	1.0×10^{-5}	4.5×10^{-5}	1.2×10^{-5}
存活率 Viability	37%	26%	15%

2.1.4 不同抗性标记选择 用 pBR325 转化 *Synechococcus* PCC 6301, 分别筛选 Cm^r 和 Ap^r 转化子, 实验共做了两次, 结果如表 5 所示, 即以 Cm^r 作筛选标记时, 转化频率较高, 重复性较好。

表 5 不同筛选标记下的转化频率

Tab. 5 Transformation frequencies under different selective markers

保温时间(小时) Incubation time (h)		18	28	38
以 Cm ^r 转化子计算的转化频率 Transformation frequency Calculated from the number of Cm ^r transformants	1	1.2×10^{-5}	4.5×10^{-5}	1.3×10^{-5}
	2	1.1×10^{-5}	4.4×10^{-5}	1.3×10^{-5}
以 Ap ^r 转化子计算的转化频率 Transformation frequency Calculated from the number of Ap ^r transformants	1	0.8×10^{-5}	3.3×10^{-5}	0.9×10^{-5}
	2	0.5×10^{-5}	2.7×10^{-5}	0.7×10^{-5}

2.1.5 冻融处理 在用溶菌酶处理 *Synechococcus* PCC 6301 细胞时, 加一个冻融的过程, 即先加入溶菌酶至终浓度 1mg/ml, 将细胞悬液放入低温冰箱约 10min, 冻结后取出立即放入 37°C 水浴, 融化后再加溶菌酶至终浓度 2mg/ml。以后的步骤相同。结果发现, 加一个冻融过程, 使转化频率有所提高(表 6)。

表 6 冻融处理对转化频率的提高

Tab. 6 Increased transformation frequency by an additional freeze-thaw

保温时间(小时) Incubation time (h)	18	28	38
转化频率 Transformation frequency	1.8×10^{-5}	6.3×10^{-5}	2.1×10^{-5}

2.2 转化子的分析

2.2.1 转化子质粒分析 取 17 个 Cm^r 转化子和 3 个野生型藻落进行扩大培养, 分别提取这 20 瓶培养物的 DNA。将 17 个 Cm^r 转化子的 DNA 与用相同方法提取的野生型 *Synechococcus* PCC 6301 的 DNA 一起电泳, 结果未发现新的质粒带。再用转化子 DNA 分别转化大肠杆菌 HB101, 结果均未得到 Cm^r 的阳性转化子。这说明 pBR325 在蓝藻细胞中不是以复制子的形式存在的, 可能是整合到染色体上复制和表达的。

2.2.2 次级转化 用转化子 DNA 转化野生型 *Synechococcus* PCC 6301, 即进行次级



品中有 5 个显示杂交阴性，可能就是因为只整合上了编码 Cm^r 的那段基因，用 pBR322 探针杂交不上的缘故。

3 讨论

通过人工感受态，利用外源质粒直接转化单细胞蓝藻的实验，Daniell 和 McFadden 已经做过^[9]，但他们用的是 pBR322，以 Ap^r 为筛选标记。考虑到决定 Ap^r 的 β -内酰胺酶可以分泌到细胞外，可使抗性藻落周围出现假阳性藻落，作者用了外源质粒 pBR325，利用它编码的 Cm^r 作为筛选标记。决定 Cm^r 的氯霉素乙酰转移酶是不能分泌到细胞外的，因此得到的结果更加可靠。

在本研究中，作者的实验结果确证，*Synechococcus* PCC 6301 细胞经溶菌酶处理产生透性细胞后，增加了供体 DNA 进入细胞的机会，可直接利用外源非复制质粒 pBR325 稳定转化，Cm^r 转化子大约为 5×10^{-5} /细胞。这表明该人工转化系统是有效的。根据电泳、斑点杂交、转化子抗性表达分析，判断外源质粒是通过单交换重组整合到受体细胞染色体上的。而且利用 Cm^r 转化子 DNA 进行次级转化，由于同源重组转化效率提高 10 倍以上，进一步证明了外源基因与同源 DNA 片段连接，可以明显提高转化重组效率。此外，Verma 等人报道，用溶菌酶处理方法，对丝状蓝藻 *Nostoc muscorum* 可进行有效的转化^[11]。本研究通过特殊处理 *Anabaena* 7120 细胞后，用外源质粒转化，已获得了初步结果。上述结果表明，对于缺少天然感受态的藻株，通过人工诱导细胞感受态将外源基因与同源 DNA 片段连接，并且进一步改善影响转化效率的有关条件，是可以将外源基因导入这类细胞的。

参 考 文 献

- [1] Friedberg D, Seijffers J. A new hybrid plasmid capable of transforming *E. coli* and *Anacystis nidulans*. *Gene*, 1983, **22**: 267—275.
- [2] Gendel S, Stranus N, Pulleyblank D, Williams J. Shuttle cloning vectors for the cyanobacterium *Anacystis nidulans*. *J. Bacteriol.*, 1983a, **156**: 148—154.
- [3] Gendel S, Straus N, Pulleyblank D, Williams J. A novel shuttle cloning vector for cyanobacterium *Anacystis nidulans*. *FEMS Microbiol Lett*, 1983b, **19**: 291—294.
- [4] Lightfoot D A, Walters D E, Wootten J C. Transformation of the cyanobacterium *Synechococcus* PCC 6301 using cloned DNA. *J. Gen. Microbiol* 1988, **134**: 1509—1514.
- [5] Paulina Balbas et al. Plasmid vector pBR322 and its special-purpose derivatives—a review. *Gene*, 1986, **50**: 3—40.
- [6] Wilmotte A W R, Stam W T. Genetic relationships among cyanobacterial Strains originally designated as “*Anacystis nidulans*” and some other *Synechococcus* strains. *J Gen Microbiol*. 1984, **103**: 2737.
- [7] Tersa Thiel, Judith Bramble, Selena Rogers. Optimum conditions for growth of cyanobacteria on solid media, *FEMS Microbiol Lett*, 1989, **61**: 27—32.
- [8] Daniell H, et al. Amplified expression of ribulose bisphosphate carboxylase/oxygenase in pBR 322-transformants of *Anacystis nidulans*. *Arch Microbiol* 1989, **151**: 59—64.
- [9] Daniell H, Sarojini G, McFadden B A. Transformation of the cyanobacterium *Anacystis nidulans* 6301 with the *Escherichia coli* plasmid pBR322. *Proc Natl Acad Sci U. S.* 1986, **83**: 2546—2550.
- [10] Davis L G, Dibner M D, Battey J F. Basic Methods in Molecular Biology. Elsevier Science Publishing Co. Inc 1986.
- [11] Verma S K, et al. Genetic transformation of glutamine auxotrophy to prototrophy in the cyanobacterium *Nostoc muscorum*. *Arch. Microbiol* 1990, **154**: 414—416.

AN ARTIFICIAL TRANSFORMATION SYSTEM OF CYANOBACTERIA

Min Hongtao and Wang Yeqin

(Institute of Hydrobiology, The Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072)

Abstract

Artificial competence of *Synechococcus* PCC 6301 cells was induced by lysozyme treatment and the cells were transformed to chloramphenicol resistance with foreign plasmid pBR325 at a frequency of approximately 5×10^{-5} or 5×10^{-4} with the transformant DNA. The transformation frequencies were higher than those reported by other workers for the same strain with cloned DNA employing a physiological transformation system. Analyses of DNA electrophoresis, secondary transformation and dot blotting demonstrated that foreign plasmid had integrated into the recipient chromosome by a single crossover event. The results showed that the artificial transformation system was efficient and reproducible. Conditions that affected transformation, such as, incubation time of cells with DNA, age of the cells, light or dark incubation were also studied.

Key words Cyanobacteria, Artificial transformation, Plasmid