

抑制螺旋藻胞内核酸酶活性的研究*

柯珍恋 徐虹 章军**

(厦门大学生命科学学院 细胞生物学与肿瘤细胞工程教育部重点实验室 厦门 361005)

提要 螺旋藻细胞内较高的胞内核酸酶活性是外源基因转化螺旋藻的主要障碍。以供体质粒 pEUTISI 为酶消化底物,通过多种方法处理螺旋藻细胞,然后检测其胞内核酸酶粗提液对 pEUTISI 的降解作用,结果表明,2 mmol/L 以上的 EDTA 处理 16 h 或无 Mg^{2+} 螺旋藻培养基培养 72 h 以上,都可使处于对数生长期的螺旋藻胞内核酸酶活性显著降低;低于 28 ℃ (如 24 ℃) 培养也可降低螺旋藻的胞内核酸酶活性。根据实验结果,建议在螺旋藻转化前 72 h 开始低温、无 Mg^{2+} 培养,转化前 16 h 提高培养基中 EDTA 的浓度至 2 mmol/L,就能获得胞内核酸酶活性极低的受体藻,有利于外源基因的转化。

关键词 螺旋藻,胞内核酸酶,低温培养,EDTA 处理,无 Mg^{2+} 培养

中图分类号 Q949.22 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3096(2003)01-0034-04

螺旋藻是众所周知的优良天然营养源,由于其基因组结构简单便于遗传操作、对外源蛋白的耐受性高、繁殖迅速、再生快、培养条件简单、成本低廉等诸多优点而使其成为极具潜力的基因工程受体藻。但是,尽管有不少研究者在螺旋藻基因工程方面开展了大量的工作,进行了不懈的努力,但其进展依然缓慢。其主要原因目前尚不很清楚,但许多研究者认为,螺旋藻细胞内存在丰富的高活性核酸酶,能阻止外源 DNA 的转入和整合。对螺旋藻来说,这是一种自我保护机制,能防止外源 DNA 的侵入。但对研究者而言,这却成了螺旋藻基因转化的一个巨大障碍^[1]。要成功建立螺旋藻的转化与表达体系,实现外源基因在螺旋藻中的稳定和高效表达,就必须克服螺旋藻胞内高活性核酸酶的障碍。Cao 等^[2]和茅云翔等^[3]先后报道用无 Mg^{2+} 的 Zarrouk 培养基培养螺旋藻或用 EDTA 处理等方法,均能大大降低其胞内和胞外 DNAase 活性。本实验室也通过对多种处理条件的探索,发现适当的处理,如低温、无 Mg^{2+} 的 Zarrouk 培养基培养或 EDTA 处理等,均可降低螺旋藻对供体质粒 pEUTISI 的降解作用,从而使外源基因的转化障碍得以克服,为以后利用该质粒对螺旋藻的转化奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 材料

螺旋藻 (*Spirulina platensis*) 厦门大学生命科学学院程兆第教授提供;

质粒 pEUTISI 由本实验室构建;
培养基 Zarrouk medium^[4]。

1.2 方 法

1.2.1 螺旋藻的培养 在 28 ℃,光照强度为 3 000 lx 的条件下培养。

1.2.2 胞内核酸酶活性的检测方法 螺旋藻胞内核酸酶粗提液的制备:取 4 mL 螺旋藻藻液,低速离心 (4 000 r/min, 10 min),收集,用不含 EDTA 的 Zarrouk 培养基洗涤 2 次(以排除胞外酶活性的影响),重悬藻体于 1 mL 无 EDTA 的 Zarrouk 培养基中,冰浴超声波破碎藻体(输出功率 47.5 W,约 60 s),离心,取上清液备用。

酶切检测胞内核酸酶活性:取上面制备的螺旋藻胞内酶粗提液 20 μ L,加入 300 ng pEUTISI,混匀,28 ℃ 温浴 2 h 后,电泳检测。

1.2.3 抑制螺旋藻胞内核酸酶活性的方法

EDTA 处理:取对数生长期的螺旋藻藻液,加入 EDTA,使其终浓度分别为 0.5,1,2,5,10 mmol/L,正常培养条件下培养 8 h 后,按上述方法检测胞内核酸酶活性。

* 国家 863 计划资助项目 8190403 号;福建省自然科学基金资助项目 B0210001 号

第一作者:柯珍恋,出生于 1976 年,硕士生,研究方向为植物生理学。

** 通讯作者:Email jzhang@jingxian.xmu.edu.cn

收稿日期:2001-09-24;修回日期:2001-12-28

无 Mg^{2+} 培养基处理: 取对数生长期的螺旋藻藻液, 低速离心 (4 000 r/min, 10 min) 收集, 重悬于不含 $MgSO_4$ 的 Zarrouk 培养基中, 分别培养 24, 48, 72 h 后取 4 mL 藻液检测螺旋藻胞内核酸酶活性。

低温处理: 按 10% 接种量接种对数生长期的螺旋藻 3 组, 分别置于 24, 26, 28 °C 培养, 藻体生长至对数生长期时检测螺旋藻胞内核酸酶活性。

2 结果与分析

2.1 螺旋藻胞内核酸酶活性的检测

从图 1 可以看出, 未经任何处理的钝顶螺旋藻胞内核酸酶粗提液对供体质粒 pEUTISI 有明显的降解作用, 如用这样的藻细胞作为受体进行转化, 外源基因极易被其核酸酶降解, 不可能在细胞质中稳定存在和表达。早期的实验中, 用正常培养条件下、未经任何预处理的螺旋藻作为转化受体材料, 分别探索了包括自然转化、超声转化和电击转化在内的多种转化方法, 都不能获得成功, 这也说明, 螺旋藻胞内核酸酶对供体质粒的降解是螺旋藻难以转入外源基因的一个重要原因。除了使用质粒 pEUTISI 外, 作者还使用了其它几种与 pEUTISI 质粒 DNA 序列差异显著的质粒如 pEUTR、pAH、pKR 等作了相同的检测, 均得到类似的被降解的结果 (数据未列出)。

2.2 EDTA 对螺旋藻胞内核酸酶的抑制作用



图 1 螺旋藻胞内核酸酶对转化供体质粒 pEUTISI 的降解作用

Fig. 1 Digestion of pEUTISI by endocellular nuclease in *Spirulina platensis*

1. 质粒 pEUTISI 对照, 28 °C 温浴 2 h; 2. pEUTISI 与螺旋藻胞内核酸酶粗提液混合, 28 °C 温浴 2 h。

Lane 1: (control) 2 μ L pEUTISI + 18 μ L ddH₂O; Lane 2: 2 μ L pEUTISI + 18 μ L endocellular nuclease solution, Both 1 and 2 were incubated at 28 °C for 2 h

由于 EDTA 是一种很强的金属螯合剂, 对生物体内需金属离子的酶 (如核酸酶) 活性具有普遍的抑制效应, 所以本文设计了一组含不同浓度 EDTA 的培养液对螺旋藻进行预处理。实验结果表明, 1 mmol/L 的 EDTA 处理 16 h 就可对螺旋藻的胞内核酸酶活性起到较强的抑制作用, 随浓度的增加 EDTA 的抑制作用加强 (图 2A); 当 EDTA 处理时间延长至 24 h 时, 1 mmol/L 以上浓度的 EDTA 能完全抑制胞内核酸酶对质粒的降解作用 (图 2B); 而 0.5 mmol/L 的 EDTA 无论是对螺旋藻处理 16 h 还是 24 h 均不能抑制其胞内核酸酶的活性。另外, 在作者的后续实验中发现, 高浓度的 EDTA 会影响螺旋藻转化后的生长状况, 使藻体生长变缓, 颜色发黄, 故建议一般不使用过高浓度的 EDTA 处理用于转化的受体螺旋藻。

2.3 无镁培养基处理对螺旋藻胞内核酸酶的抑制作用

将正常培养条件下生长到对数期的螺旋藻转入不含镁的 Zarrouk 培养基中继续培养, 结果发现, 培养基中 Mg^{2+} 的缺乏, 使胞内核酸酶对供体 DNA 的降解作用受到明显的影响。取在此培养基中培养 24 h 的螺旋藻检测其胞内核酸酶活性, 发现质粒仍被降解; 培养时间延长到 48 h 时, 胞内核酸酶活性降低, 质粒降解不完全; 培养 72 h 后, 大部分的质粒 DNA 没有被降解, 仍保持完整, 说明螺旋藻在无 Mg^{2+} 培养 72 h 后其胞内核酸酶的活性已经大大降低 (图 3)。

2.4 降低螺旋藻培养温度对胞内核酸酶的抑制效应

螺旋藻最适培养温度为 28 °C, 在低于最适温度的培养条件下培养后, 其胞内核酸酶粗提液对质粒的降解程度有所降低 (图 4), 虽然其抑制效果不显著, 但相对于 EDTA 和无镁处理, 降低培养温度是一种较为温和的作用方式。后续的观察发现, EDTA 或无镁培养基处理过度的螺旋藻均在处理后的培养过程中表现出生长不好的状况, 严重时藻细胞出现不同程度的发黄甚至死亡。而降低培养温度, 虽然会使螺旋藻的生长速度减慢, 但藻的生长状态却没有发生较大的改变。

3 讨论

外源基因是否能导入螺旋藻细胞并在其内稳定遗传和表达, 一直是研究者们关注的问题。现在普遍认为, 螺旋藻遗传转化之所以难以成功, 与其胞内高活性核酸酶有关。螺旋藻细胞中所含核酸酶包括高活性的核酸外切酶和种类丰富的限制性内切酶, 其中已

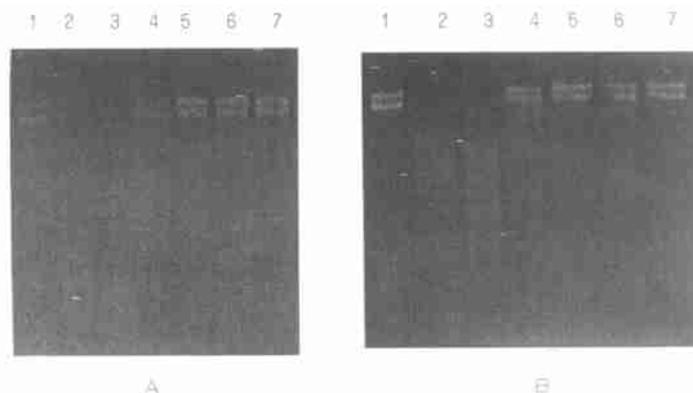


图2 EDTA处理后螺旋藻胞内核酸酶对pEUTISI的降解作用

Fig. 2 Effects of EDTA on the activities of endocellular nuclease in *Spirulina platensis* (pEUTISI as the substrate)

A. EDTA处理螺旋藻16h后,螺旋藻胞内核酸酶对供体质粒pEUTISI的降解情况;B. EDTA处理螺旋藻24h后,螺旋藻胞内核酸酶对供体质粒pEUTISI的降解情况。

1. pEUTISI; 2. 正常培养条件下(含0.2 mmol/L EDTA); 3. 0.5 mmol/L EDTA处理; 4. 1 mmol/L EDTA处理; 5. 2 mmol/L EDTA处理; 6. 5 mmol/L EDTA处理; 7. 10 mmol/L EDTA处理。

(A) treated for 16 h and (B) treated for 24 h. Lane1: (control) 2 μ L pEUTISI; Lane2~7: 2 μ L pEUTISI+18 μ L endocellular nuclease solution from *Spirulina platensis* which have been treated by 0.2, 0.5, 1, 2, 5, 10 mmol/L EDTA respectively



图3 无镁培养后螺旋藻胞内核酸酶对pEUTISI的降解情况

Fig. 3 Effects of Mg^{2+} -free medium on the activities of endocellular nuclease in *Spirulina platensis* (pEUTISI as the substrate).

1. 质粒pEUTISI对照; 2. 正常培养条件; 3. 无镁处理24h; 4. 无镁处理48h; 5. 无镁处理72h

Lane1: (control) 2 μ L pEUTISI; Lane2~5: 2 μ L pEUTISI+18 μ L endocellular nuclease solution from *Spirulina platensis* which have been cultured in Mg^{2+} -free Zarouk medium for 24, 48, 72 h respectively.

图4 不同温度下螺旋藻胞内核酸酶粗提液对pEUTISI的降解情况

Fig. 4 Effects of growing temperature on the activities of endocellular nuclease in *Spirulina platensis* (pEUTISI as the substrate)

1. 质粒pEUTISI对照; 2. 24 培养; 3. 26 培养; 4. 正常培养条件(28)。

Lane1: (control) 2 μ L pEUTISI; Lane2~4: 2 μ L pEUTISI+18 μ L endocellular nuclease solution from *Spirulina platensis* which have been cultured under 24, 26, 28 respectively

经得到鉴定的内切酶就有4种: Spa₁、Spa₂、Spa₃、Spa₄, 它们分别是 Tth111、Pva₁、Pva₂、Hind₃的同裂酶, 在25~37℃均保持较高的内切酶活性^[5]。这些高活性的核酸酶与螺旋藻细胞防御外源DNA入侵, 保护自身基因组稳定性密切相关, 是一种防御性

机制。但这同时也成为螺旋藻遗传转化的一大障碍。为了实现外源基因在螺旋藻细胞中的稳定转化, 就必须降低其胞内核酸酶活性, 为此作者设计了本实验以便为螺旋藻遗传转化提供相关参数。

本文的研究表明, 在没有对螺旋藻藻体进行任何

处理之前,螺旋藻胞内核酸酶粗提液可以迅速地降解供体质粒,这是外源 DNA 导入螺旋藻细胞并在其内稳定遗传和表达的限制因子。Cao 等^[2]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^[3]。本文通过对多种处理条件的探索,也证明适当的处理,如无 Mg^{2+} 的 Zarrouk 培养基培养、EDTA 或低温预培养等,均可降低螺旋藻对供体质粒的降解作用,从而使外源基因能顺利、稳定地整合到染色体上(另文发表)。基因整合平台系统和穿梭质粒系统是在蓝藻基因工程中应用最多的两类转化系统。在螺旋藻这样高核酸酶活性的受体细胞中,即使对受体藻进行转化前的处理也只能暂时抑制其胞内核酸酶活性,一旦回到正常的培养条件,核酸酶活性不再受抑制而恢复高活性状态。即使穿梭质粒能暂时转入到螺旋藻细胞内,也将由于质粒本身的内切酶位点和外源 DNA 序列而被螺旋藻识别降解,不可能稳定传代;并且在螺旋藻细胞中也未发现有内源质粒的存在,因此,在螺旋藻遗传转化中不宜采用穿梭质粒载体系统。而依据同源重组机

制,将外源基因整合到螺旋藻染色体上,是使外源基因在螺旋藻细胞中稳定遗传和表达的最好方式。综上所述,在外源基因转化螺旋藻的研究中建议采用基因整合平台系统,并在转化前后进行适当物理或化学处理。根据作者的实验结果,在转化前 72 h 开始低温、无 Mg^{2+} 培养,转化前 16 h 提高培养基中 EDTA 的浓度至 2 mmol/L,就能获得胞内核酸酶活性极低的受体藻,从而有利于外源基因的转化。

参考文献

- 1 徐虹,柯珍恋,章军. 螺旋藻的系统分类学及基因工程研究进展. 海洋科学, 2001, 25(9): 14-19
- 2 Cao J, Xu Z, Qu G, et al. Effects of Mg^{2+} on the growth and Dnase activity of *Spirulina platensis*, a cyanobacterium. Bioresource Technol, 1999, 67(3): 287-290
- 3 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, 30(2): 13-18
- 4 Vonshak A, Appendix. In: *Spirulina platensis* (Arthrospira): physiology, cell-biology and biotechnology. Taylor and Francis, USA, 1997, 205-212
- 5 Tragut V, Xiao J, Bulina EJ, et al. Characterization of DNA restriction-modification systems in *Spirulina platensis* strain pacifica. Journal of Applied Phycology, 1995(7): 561-564

REPRESSION OF ENDOCELLULAR NUCLEASE ACTIVITY IN *Spirulina platensis*

KE ZhenLian XU Hong ZHANGJun

(The Key Laboratory of Ministry of Education for Cell Biology and Tumor Cell Engineering, School of Life Science, Xiamen University, Xiamen, 361005)

Received: Sept., 24, 2001

Key Words: *Spirulina platensis*, Endocellular nuclease activity, EDTA treatment, Mg^{2+} -free medium, Lower temperature culture

Abstract

The high activity endocellular nuclease of *Spirulina platensis* is believed to be the most serious barrier to foreign gene transformation. We detected the status of plasmid pEUTISI after incubation with endocellular nuclease extract from *Spirulina platensis*. Results showed that the activity of endocellular nuclease could be efficiently repressed when the *Spirulina platensis* was cultured in the medium of EDTA at the concentration of 2 mmol/L above 16 hours, or cultured in Mg^{2+} -free medium for more than 72 hours. When the *Spirulina platensis* was cultured in lower temperature, such as 24 °C, the enzyme activity also showed a little decrease. By these results, it suggests that *Spirulina platensis* be cultured in Mg^{2+} -free medium at 24 °C for 72 hours, and improve the EDTA concentration to 2 mmol/L for 16 hours ahead of transformation. Then the strain of *Spirulina platensis* contained low activity of endocellular nuclease, which were suitable for transformation, could be obtained.

(本文编辑:张培新)