

研究简报 ·

文章编号: 1000 - 9957(2004)03 - 0230 - 04

高产 - 胡萝卜素杜氏藻突变株的鉴定与分析

孙福征, 刘广发, 陈启伟, 高亚辉

(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, 福建 厦门 361005)

摘要: 采用紫外辐射诱导巴氏杜氏藻 *Dunaliella bardawil* 突变, 经初筛和复筛, 初步获得一株巴氏杜氏藻的突变株, 对两者从细胞形态特征、-胡萝卜素含量、蛋白质 SDS - PAGE 电泳以及总 DNA 的 RAPD 扩增等方面进行了比较分析。结果表明, 在相同培养条件下, 两者均为卵圆形, 但原种直径仅为突变后藻株直径的 60%, 颜色差异明显; 突变株的 -胡萝卜素含量为原种的 6.2 ~ 15.5 倍; 两者遗传相似系数为 0.868, 与突变株的一般要求相符。鉴于此, 确认其为高产 -胡萝卜素的新突变株, 命名为 *Dunaliella bardawil* variant 4 - 5 Sun & Liu。

关键词: 杜氏藻; 诱变; -胡萝卜素; 遗传相似系数

中图分类号: Q949 **文献标识码:** A

杜氏藻 *Dunaliella* sp. (又称盐藻) 为耐盐单细胞绿藻, 无细胞壁, 易被动物和人消化吸收^[1]。杜氏藻中的某些种类在特定条件下能合成大量的 -胡萝卜素, 藻细胞由绿色转变为橙红色, 是目前已知含 -胡萝卜素最高的生物, 极具开发应用潜力^[2]。-胡萝卜素长期以来被作为维生素 A 的前体和食品着色剂而广泛应用。近来科学家已证明, -胡萝卜素能够淬灭生物氧化过程中产生的自由基, 降低自由基过氧化作用引起的诱变效应, 因此, 具有可贵的抗氧化、延缓衰老、提高免疫力、降低肿瘤和心血管疾病发生率等作用。作者采用紫外辐射诱导杜氏藻突变, 初步获得一株能高产 -胡萝卜素的新品系。该品系可能对杜氏藻的开发利用具有较大的潜在价值。

1 材料和方法

1.1 材料

巴氏杜氏藻 *Dunaliella bardawil* (简称杜氏藻), 是以色列专家 Ben - Amotz 从 Simai 盐湖沼泽中分离得到的, 由以色列 M. Ginzburg 博士赠送, 在厦门大学生命科学学院微藻工程研究所实验室长期保存。杜氏藻培养基为含 1.5 mol/L NaCl 的 Ben - Amotz 人工海水培养基^[3] (简称正常培养基), 加入质量分数为 15% 的琼脂即为其固体培养基。10 聚寡核苷酸随机引物购自上海生工生物工程公司。

1.2 杜氏藻的紫外线诱变及初筛

将培养至指数生长中期的杜氏藻置于 30 W 紫外灯下 15 cm 处, 照射 60 s 后暗光培养 48 h, 然后涂抹在固体培养基上, 光照培养 14 d, 挑选橙黄色藻落, 移到少量正常培养基中培养, 即获得杜氏藻突变株 *Dunaliella bardawil* var. 4 - 5 Sun & Liu (简称突变株)。

1.3 杜氏藻 -胡萝卜素含量的测定

将杜氏藻和各初选突变株分别在正常培养液中光照 (4 000 lx) 培养 24 h 至平衡期 (约需 14 d),

收稿日期: 2004-03-25

基金项目: 福建省科技计划重点项目资助 (2003N653)

作者简介: 孙福征 (1973 -), 男, 硕士生。通讯作者: 刘广发, E-mail: liugfls@xmu.edu.cn

各取 200 mL 离心,藻泥分别接入 75 mL 高盐低氮培养液中(含 NaCl 4.0 mol/L,氮含量为标准培养液的 1/10,以下同),在强光(8 000 lx)下培养 24 h,温度 23~25℃。每天早晚各轻摇培养瓶 1 次,每 2 d 测定 1 次各藻株丙酮提取液的β-胡萝卜素最大吸收峰值(OD₄₅₃吸收值)^[4],对比绘制β-胡萝卜素含量标准曲线图,测定各藻株的β-胡萝卜素含量。平行条件下共设置 3 组,取其平均值。

1.4 杜氏藻的形态观察

将各藻株在高盐低氮培养液中强光(8 000 lx)培养 14 d, Olympus CH30 显微镜下观察、拍照。

1.5 蛋白质 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)

取正常培养液和高盐低氮培养液中生长至平衡期的杜氏藻和突变株离心,提取蛋白质进行 SDS-PAGE 电泳^[5]。分离胶的浓度为 12%,浓缩胶的浓度为 5%。电泳结束后用考马斯亮蓝 R₂₅₀ 染色,脱色,扫描记录。

1.6 RAPD 扩增

杜氏藻和突变株的总 DNA 提取及 RAPD 扩增参照肖顺元等^[6]的方法。RAPD 扩增条件为:94℃ 下解链 1 min,36℃ 下退火 1 min,72℃ 下延伸 2 min。40 个循环后 72℃ 下保温 7 min。

2 结果与分析

2.1 巴氏杜氏藻的形态变化

将杜氏藻和突变株的两株藻在高盐低氮培养液中培养(强光下),经统计观察,两者均为卵圆形,但颜色差异明显,杜氏藻呈黄绿色稍偏黄,突变株呈橙黄色,且杜氏藻的直径约为突变株直径的 60%(图 1)。连续 20 个批次的培养、测试,突变性状保持稳定。

2.2 杜氏藻和突变株β-胡萝卜素含量的比较

杜氏藻和突变株在正常培养基中生长时,藻液的颜色已经出现差别。将它们分别转入有利于β-胡萝卜素生成的高盐低氮培养液中,经 22 d 强光培养,杜氏藻的β-胡萝卜素含量没有明显变化,其质量分数始终为干重的 0.4%~0.5%,而突变株的却增加了 1 倍,达到藻干重的 6.20%(表 1)。

表 1 高盐低氮培养液中杜氏藻与突变株的β-胡萝卜素含量

Tab.1 Content of β-carotene in *Dunaliella bardawil* and its variant 4-5 Sun & Liu cultivated in high salt and low nitrogen medium w/ % (干重)

| 培养天数/d | 杜氏藻突变株 | 杜氏藻 |
|--------|--------|------|
| 0 | 3.04 | 0.49 |
| 4 | 3.39 | 0.47 |
| 8 | 4.17 | 0.47 |
| 12 | 4.57 | 0.50 |
| 16 | 5.22 | 0.41 |
| 20 | 6.02 | 0.48 |
| 22 | 6.20 | 0.40 |

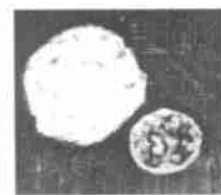


图 1 杜氏藻及其突变株的细胞形态比较 (×1600,左为突变株,右为杜氏藻)

Fig.1 Morphological comparison between *Dunaliella bardawil* and its variant 4-5 Sun & Liu

2.3 杜氏藻与突变株的蛋白质 SDS-PAGE 电泳分析

如图 2 所示,正常培养液培养的杜氏藻,含有相对分子质量大约为 23 000、37 000 的蛋白质,突变株没有;突变株的电泳图谱上,在相对分子质量约 33 000 处新见 1 条带,但杜氏藻反而缺失(箭头指处)。此外,在相对分子质量 31 000 处,突变株有一表达量大的深带,而杜氏藻的带相应很浅;相反,相对分子质量为 29 000、36 000 及 58 000 处,突变株的蛋白带染色较浅,而杜氏藻的带却染色深。在高盐培养液中,两者蛋白电泳图谱差异更为显著。

2.4 RAPD 扩增结果

两藻株随机引物扩增结果见表 2。从所用的 25 条随机引物中遴选条带清晰、重复性良好的 12 条引物进行正式扩增，共检测出 152 个位点，这些 DNA 条带的分子量大小为 200 ~ 3000 b，其中 7 条引物扩增出差异常带。如引物 S₂₇₇ 扩增图谱中 (图 3) 1.3 kb 处，突变株比杜氏藻多一条带 (箭头指处)，引物 S₂₇₅ 扩增图谱中 (图 4) 1.5、1.9 kb 处，突变株比杜氏藻各多出一条带 (箭头指处)。

根据 Nei & Li^[7] 的方法，计算相关株系间的简单遗传相似系数公式为：

$$I = 2N_{ij} / (N_i + N_j),$$

其中：N_i + N_j 为两样品的总显示带数；N_{ij} 为两样品共有的显示带数。根据表 2 计算得两藻株遗传相似系数 I 为 0.868。突变株与原藻株的蛋白电泳图谱和总 DNA 的 RAPD 分析结果，都具有较高的相似性，表明突变株的确源自杜氏藻；但两者也存在明显的差异。按照 Lane^[8] 的观点以及张会永等^[9] 的研究结果，把突变株称为杜氏藻的变种是合理的。因此，将它命名为 *Dunaliella bardawil* var. 4 - 5 Sun & Liu。

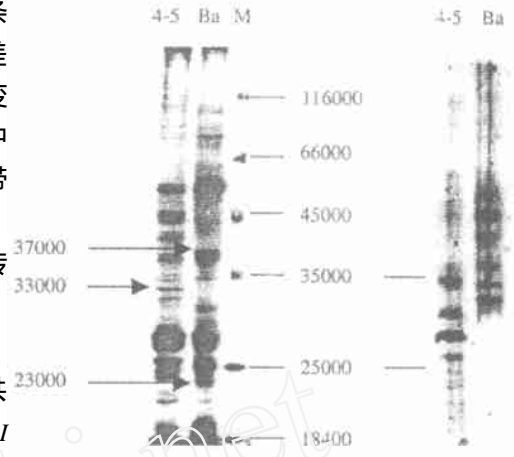


图 2 正常培养液 (a) 与高盐低氮培养液中 (b) 杜氏藻与突变株的蛋白质 SDS - PAGE 图谱
Fig. 2 SDS - PAGE analysis of total protein of *Dunaliella bardawil* and 4 - 5 cultivated in standard medium and low nitrogen medium

表 2 10 聚寡核苷酸随机引物序列及其扩增的结果

Tab. 2 A list of the sequences of primers and the amplification results

| 引物 | 序列 | 总扩增带数 | 共有带数 | 引物 | 序列 | 总扩增带数 | 共有带数 |
|------------------|------------|-------|------|------------------|------------|-------|------|
| S ₂₆₁ | CTCAGTGICC | 14 | 7 | S ₂₇₄ | CTGCTGACCA | 8 | 4 |
| S ₂₆₂ | ACCCGCCCAA | 11 | 4 | S ₂₇₅ | ACACCGGAAC | 13 | 5 |
| S ₂₆₃ | GTCGCGAGTG | 10 | 4 | S ₂₇₇ | GTCCTGGGIT | 14 | 6 |
| S ₂₆₈ | GACTGCCTCT | 10 | 5 | S ₂₇₈ | TTCAGGCAC | 16 | 8 |
| S ₂₆₉ | GTGACCGAGT | 14 | 6 | S ₂₇₉ | CAAAGCACTC | 22 | 9 |
| S ₂₇₂ | TGGCGAAG | 8 | 4 | S ₂₈₃ | ACAGCTGCT | 12 | 4 |
| | | 总计 | | | | 152 | 66 |

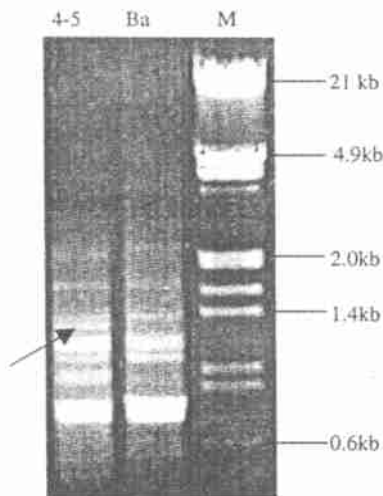


图 3 引物 S₂₇₇ RAPD 扩增图谱

Fig. 3 RAPD profile generated by primers S₂₇₇

注：M—Lambda DNA/ EcoR + Hind

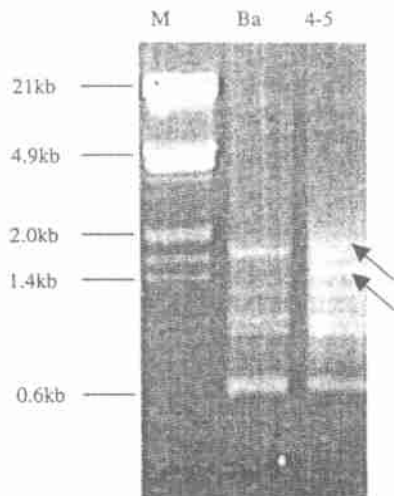


图 4 引物 S₂₇₅ RAPD 扩增图谱

Fig. 4 RAPD profile generated by primers S₂₇₅

3 讨论

通过试验,获得的杜氏藻突变株其-胡萝卜素含量为杜氏藻的15.5倍。该株的建立为大规模养殖杜氏藻、生产天然-胡萝卜素奠定了良好的基础。不过,作为对照株的杜氏藻已经在实验室内保种多年,本试验测定其胞内-胡萝卜素的质量分数仅为干重的0.4%~0.5%,比较低。但根据文献[4]所述,在基本相同的室内培养条件下,杜氏藻的-胡萝卜素的质量分数最高为4.19%(藻干重)。相比之下,尽管文献[4]中的试验条件和本试验难以完全一致,但本试验获得的突变株其-胡萝卜素的质量分数达到6.20%(藻干重),也比文献[4]的杜氏藻高出48%,而且在第22d试验结束时,突变株的-胡萝卜素含量达到最高值,尚存继续升高的可能性。

杜氏藻属低等植物^[10],一旦基因发生突变,由于没有等位基因的遮蔽作用,突变基因比较容易转录和表达。杜氏藻经诱变后获得的突变株显示出高产-胡萝卜素的特征,一方面说明原出发藻株合成-胡萝卜素的水平较低,可能是一种转录水平的调节;另一方面也证明了单倍体生物进行诱变育种具有很大的潜力。此外,尽管突变株在胞内合成并积累占藻干重6.20%的-胡萝卜素,但这还只是在实验室特定条件下的试验结果,如果进一步提高光强或改变试验条件,获得更高产的-胡萝卜素的可能性是存在的。

参考文献:

- [1] 杨雪梅. 培养密度和培养液“老化”对盐藻生长和-胡萝卜素累积的影响[J]. 海洋科学, 1996, 6: 39-43.
- [2] 刘建国, 赵学武, 陈念洪, 等. 胁迫条件下盐藻-胡萝卜素及其异构体累积的研究——盐度的影响[J]. 海洋与湖沼, 1994, 25(1): 71-75.
- [3] BEN A A, KATZ A, ARRON M. Accumulation of -carotene in halotolerant algae: purification and characterization of -carotene rich globules from *Dunaliella* (Chlorophyceae) [J]. J Phycolgy, 1982, 18: 529-537.
- [4] 刘广发, 楼士林, 游兰英, 等. 十种(株)杜氏藻-胡萝卜素的提取及含量比较[J]. 厦门大学学报(自然科学版), 1995, 34(1): 94-98.
- [5] 金冬雁, 黎孟枫译. 分子克隆实验指南: 第2版[M]. 北京: 科学出版社, 1992. 880-886.
- [6] 肖顺元. RAPD分析——鉴定柑橘体细胞杂种的快速方法[J]. 遗传, 1995, 17(4): 40-42.
- [7] NEI M, LI W H. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1979, 76: 5269-5273.
- [8] LANE M A, WANG I R. *Rhododendron albiflorum* Hook (Ericaceae): one taxon or two [J]. Rhodora, 1993, 95: 11-20.
- [9] 张会永, 刘广发, 林慧馨. 杜氏藻种间关系 RAPD 分析[J]. 厦门大学学报(自然科学版), 2001, 40(6): 1289-1294.
- [10] 游兰英, 刘广发, 林建明. 杜氏藻同步化生长及核型分析[J]. 厦门大学学报(自然科学版), 1997, 36(2): 276-281.

Mutation and identification of mutant strain of *Dunaliella bardawil* containing highly in - carotene

SUN Fu-zheng, LIU Guang-fa, CHEN Qi-wei, GAO Ya-hui

(Key Laboratory of the Ministry of Education for Cell Biology and Lumor Cell Engineering, School of Life Science, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

Abstract: A -carotene-riched mutant of *Dunaliella bardawil* by ultraviolet radiation has been identified. The mutant strain was found to be larger in diameter than *D. bardawil* was. The content of -carotene of the mutant strain reached as high as 6.20% of the dry matter and was 6-14 times than the wild-type original one. Furthermore, several new bands of protein (polypeptide) of the mutant was identified by the protein SDS-PAGE, meanwhile some were disappeared. The RAPD test revealed that the genetic similarity between *D. bardawil* and its mutant strain was 0.868, indicating that this is a mutant from *D. bardawil* and designated as *D. bardawil* variant 4-5 Sun & Liu. It may be an excellent strain for the commercial large-scale -carotene production.

Key words: *Dunaliella bardawil*; mutant; -carotene; genetic similarity