

## 螺旋藻的系统分类学及基因工程研究进展\*

ADVANCES IN SYSTEMATICS AND GENE ENGINEERING OF  
*Spirulina*

徐虹 柯珍恋 章军

(厦门大学生命科学学院 361005)

螺旋藻 (*Spirulina*) 是众所周知的优良天然营养源, 因其具有较高的营养价值和独特的药理作用而受到人们的广泛关注。在过去的 20 a 中, 螺旋藻在营养学和药理学方面的研究取得了较大进展, 工业化生产也具有了相当的规模, 但其在分子生物学和基因工程方面的研究却相对滞后。令人欣慰的是, 虽然螺旋藻遗传学和基因工程方面的研究起步较晚, 但世界各地的研究者仍在该领域取得了显著成果。

## 1 螺旋藻系统分类学研究

螺旋藻在分类学上属于蓝藻门, 颤藻目, 颤藻科, 螺旋藻属。这个属的学名是“*Spirulina*”, 取“卷曲”一意, 但有的文献中也写成“*Arthrospira*” (节旋藻), 把这两个属名混用。其实, 关于 *Spirulina* 和 *Arthrospira* 是属于同一个属, 还是分别成为独立的属, 一直存在争议。著名蓝藻分类学家 Geitler 在其所著《蓝藻纲》中, 将这两个属并为一属即 *Spirulina*。以后这种划分一直被广泛应用。但现在研究表明, 虽然二者形态极为相似, 都由单列细胞组成不分枝的丝状体, 都呈有规则的螺旋弯曲, 但其显微形态和细胞亚显微结构仍有差别: 前者细胞横壁不明显, 横壁处不收缢; 后者横壁清晰可见, 有收缢。同时, 二者在基因碱基组成等遗传背景方面也存在较大差异, *Arthrospira* 的 G/C 含量为 44.3%, 而 *Spirulina* 的 G/C 含量可达 53.6%<sup>[1]</sup>。在遗传学研究中, 常以保守性很高的核糖体蛋白和 rRNA 作为可靠的分子分类依据。不同地理起源的螺旋藻, 即使 16s rRNA 完全相同, 16s rRNA 与 23s rRNA 的间隔序列也不一样, 可通过分析它们的基因序列加以区分。Nelissen 等人 1994 年对 *Spirulina* 和 *Arthrospira* 的 16s rRNA 基因序列进行比较考证后, 发现二者关系并不密切, 而 16s 和 23s rRNA 基因之间的插入序列也有所不同, 前者只有 tRNA(Ile) 基因, 后者则包括了 tRNA(Ile) 和 tRNA(Ala) 基因。据此他们认为, *Spirulina* 和 *Arthrospira* 分属于颤藻科不同的属, 它们

是有区别的。根据大量的研究成果, 现在人们普遍认为 *Arthrospira* 应从 *Spirulina* 中独立出来, 自成一属。目前, 国内外广泛用于工厂化生产的钝顶螺旋藻和极大螺旋藻经 Komarek 等人的仔细研究认为, 它们有薄的细胞横壁, 横壁处可见收缢, 应划归节旋藻属, 学名应更改为钝顶节旋藻 (*Arthrospira platensis*) 和极大螺节旋藻 (*Arthrospira maxima*)。但由于螺旋藻这个名称沿用已久, 考虑到应用的方便, 仍暂保留过去的名称<sup>[1]</sup>。

正是由于核糖体蛋白在进化上的高保守性, 螺旋藻的许多核糖体蛋白基因才能根据其他生物相应的已知序列顺利地得到克隆。通过对它们的同源性比较, 可以进一步确证螺旋藻与其他生物的进化关系, 探索螺旋藻的进化地位。Tiboni 等人所在的实验室在这方面做了较深入的工作。他们发现, 螺旋藻的许多核糖体蛋白基因, 如 rps2、tsf 和包括 rps12、rps7、fus、tuf 4 个基因的 str 的操纵子, 在基因序列和排列方式方面与大肠杆菌有很高的同源性; 另外, 螺旋藻 str 操纵子与烟草、玉米等高等植物叶绿体基因同样具有很高的同源性 (表 1)。这一发现为认为叶绿体是由光合自养蓝藻演化而来的内源共生学说提供了一个有力证据。值得一提的是, 螺旋藻另一个核糖体蛋白基因 rps10 的排列方式和大肠杆菌的不同, 但这种排列方式却存在于目前所分析过的所有古生物基因以及 *Cyanophora paradoxa* 内的共生体 (蓝色小体) 中, 作者认为螺旋藻中 rps10 的这种排列方式可能代表一种原始的基因水平。

## 2 螺旋藻基因克隆研究进展

螺旋藻因其较高的蛋白质含量, 合理的氨基酸组成及含有多种生物活性物质, 而成为最具开发潜力的基因组。但由于遗传学背景及分子生物学基础不足,

\* 国家 863 计划资助项目 819-04-03 号。

收稿日期: 2000-07-02; 修回日期: 2000-08-20

表1 螺旋藻 str 操纵子表达产物与其他生物相应蛋白同源性的比较

| 基因来源  | S12  | S7   | EF-G | EF-Tu |
|---|------|------|------|-------|
| <i>Escherichia coli</i>                     | 73.2 | 52.2 | 57.9 | 69.4  |
| <i>Bacillus stearothermophilus</i>          | 72.8 | 57.1 | /    | /     |
| <i>Micrococcus luteus</i>                   | 71.5 | 48.1 | 57.0 | 63.7  |
| <i>Thermus thermophilus</i>                 | /    | /    | /    | 69.9  |
| <i>Methanococcus pannuelii</i>              | /    | /    | /    | 25.9  |
| <i>Euglena chloroplast</i>                  | 75.8 | 44.9 | /    | 77.5  |
| <i>Nicotiana chloroplast</i>                | 81.3 | 51.5 | /    | /     |
| <i>Marchantia polymorpha</i><br>chloroplast | 79.7 | 52.3 | /    | /     |
| <i>Maize chloroplast</i>                    | 81.3 | 48.7 | /    | /     |

螺旋藻的基因工程研究只能从单基因突破。螺旋藻基因的克隆和功能鉴定主要有以下几种方法：(1) 根据与特定的大肠杆菌突变株功能互补测定。(2) 利用其他生物的同缘 DNA 探针杂交，从基因文库中分离筛选基因。(3) 根据已知的高保守性基因序列设计引物，通过 PCR 扩增目的基因。(4) 通过目的基因自身表达的一些容易筛选或检测的蛋白质来鉴定。

螺旋藻的研究大部分以钝顶螺旋藻为材料，到目前为止，已有 30 余种钝顶螺旋藻的结构基因被鉴定、克隆和测序(表 2)。

随着人们对钝顶螺旋藻遗传背景的逐渐了解和螺旋藻重组系统建立，相信不久钝顶螺旋藻的基因组图谱就能建立起来。这样，人们便能更好地利用其遗传学重组机制，研究螺旋藻基因的调控机理，发展螺旋藻的基因工程。

### 3 螺旋藻的遗传转化研究

螺旋藻作为一种基因转化受体，与大肠杆菌、酵母、植物和动物相比，它除了具有高安全性、高营养性和高药用价值外，还有许多独到之处：(1) 基因组结构简单，除了裸露的染色体 DNA 外，不含叶绿体 DNA 和线粒体 DNA，便于基因分析。(2) 细胞内具有使蛋白质高效表达的机制，能耐受高浓度的单一蛋白，内源蛋白更新速度慢，对外源蛋白质耐受高。(3) 繁殖迅速，再生快，培养条件简单，成本低廉，

只需光、无机盐和适当的温度既能满足生长需要，并且适于静止、连续等多种方式培养。螺旋藻正是以其自身的优势，向人们展示了它作为生物反应器的广阔应用前景和巨大潜力。

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。迄今为止，还未见有外源基因成功转化螺旋藻的报道。其原因除了研究者们公认的，由于螺旋藻基因组自身的完美性和复杂性而对外源基因产生强烈的排斥作用外，还有如下几点：

(1) 螺旋藻细胞内存在多种限制性内切酶，阻止了外源 DNA 的转入和整合。目前已发现螺旋藻细胞中至少存在 4 种限制性核酸内切酶：Spa I、Spa II、Spa III、Spa IV，分别是 Tth111 I、Pva I、Pva II、Hind III 的同裂酶<sup>[1]</sup>，它们在 25~37℃ 均保持较高的内切酶活性。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重要障碍。当外源基因刚转入细胞，还未来得及整合即被内切酶降解，根本无法在细胞内稳定存在和表达。

(2) 缺乏良好的重组系统。外源基因要在螺旋藻中稳定存在和表达，必须整合到螺旋藻染色体或内源质粒上，随它们的复制而复制。蓝藻基因工程中常用的表达载体为穿梭质粒和同源重组质粒。穿梭质粒的构建需要内源质粒的复制起始子，同源重组质粒的构建则需要螺旋藻染色体 DNA 或质粒的同源片段，外源基因通过同源片段间的交换重组而定位整合到染色体或内源质粒上。螺旋藻缺乏内源质粒，到目前为

表2 螺旋藻 *Spirulina platensis* 已克隆的部分基因及其功能

| 基因名称                         | 编码功能                                    | 参考文献及作者                |
|------------------------------|---|------------------------|
| Ahs                          | 乙酰羟乙酸合成酶                                | [3]                    |
| apcA, B, C                   | 别藻蓝蛋白 $\alpha, \beta, \gamma$           | 秦松等, 1996。             |
| atpC                         | ATPase $\gamma$ 亚基                      | Steinmann D., 1995.    |
| cpcA, cpcB                   | C-藻蓝蛋白 $\alpha, \beta$ 亚基基因             | Rossi E. D., 1985.     |
| cpc H, I, D                  | C-藻蓝蛋白连接多肽                              | Rossi E. D., 1985.     |
| cycA, cycC                   | cAMPase                                 | [5], Yashiro K., 1996. |
| desA, desC, desD             | $\Delta 12, \Delta 9, \Delta 6$ 脂肪酸脱饱和酶 | [6], [7]               |
| est                          | 23kD 丝氨酸酯酶                              | Salvi S. et al., 1994. |
| gln                          | 谷氨酰胺合成酶                                 | [2]                    |
| leuB                         | $\beta$ -异丙基苹果酸脱氢酶                      | [3]                    |
| pys                          | 八氢番茄红素合成酶                               | [8]                    |
| rbcl., rbcS                  | Rubp 羧化酶大、小亚基                           | [2]                    |
| recA                         | 重组蛋白酶                                   | Vachhani A. K., 1996.  |
| rpaB                         | DNA 结合反应调节因子                            | [9]                    |
| rps 2, rps 7, rps 10, rps 12 | 核糖体小亚基蛋白 S2, S7, S12                    | [2]                    |
| 16S rrn                      | 16S rRNA                                | Nelissen B., 1994.     |
| trn(Ile)-23S rrn             | rRNA(Ile), 23S rRNA                     | Nelissen B., 1994.     |
| tsf, tuf, fus:               | 延伸因子 EF-Ts, EF-Tu, EF-G                 | [2]                    |

止还没有见到关于螺旋藻质粒的报道。本实验室也曾多种方法试图发现和提取螺旋藻质粒,但均未成功。这就使得外源基因难以以质粒的形式存在于螺旋藻中。构建同源重组质粒所选择的同源片段一般为宿主的非看家基因,以免破坏宿主细胞基因的正常表达。但由于目前螺旋藻遗传背景资料相当匮乏,已知的基因较少且均为功能基因,因而同源重组缺乏好的靶位。

(3) 未建立有效的筛选标记系统。螺旋藻对基因工程常用的筛选标记 Km(卡那霉素)、Neo(新霉素)、Ap(氨苄青霉素)等抗生素具有很高的抗性,只对 Hm(潮霉素)、Cm(氯霉素)比较敏感<sup>[10]</sup>。这样,遗传转化中用于筛选转化藻的抗生素就局限于 Hm、Cm,或者只能另辟蹊径。

虽然螺旋藻遗传转化存在种种困难,但也并非不能克服。Cao 等发现用无  $Mg^{2+}$  的 Zarrouk 培养基培养螺旋藻,能大大降低其胞内和胞外 DNAase 活性<sup>[11]</sup>。本实验室的研究结果也表明,采取高浓度 EDTA(1.0 mmol/L 以上)或低温处理螺旋藻,也能显著抑制其胞内 DNAase 活性。虽然螺旋藻遗传转化缺乏行之有效的手段和方法,但秦松等 1996 年,章军<sup>[4]</sup>等用溶菌酶和超声波等方法相继制备了螺旋藻等丝状蓝藻原生质体,为基因转移系统及细胞融合育种研究创造了条件。外源基因能否在螺旋藻细胞内稳定遗传和表达,一直是研究者们关注的问题。要解决这一难题必须建立可靠的 DNA 重组系统。根据蓝藻质粒具同源性的特点,可尝试用其他蓝藻质粒构建螺旋藻的穿梭表达载体。本实验室曾利用织线藻 (*Plectonema boryanum*) 的小质粒 pPRS1 构建的穿梭表达载体成功地转化聚球藻 *Synechococcus* sp. PCC 7942,目前正尝试用该质粒转化螺旋藻。另外,依据同源重组机制,将外源基因整合到染色体上,是使外源基因稳定遗传和表达的最好方式。但该方式的实现还有待于螺旋藻分子遗传学研究的进展,如更多基因的克隆测序及功能的鉴定等。

#### 4 螺旋藻基因工程研究展望

综上所述,螺旋藻基因工程的研究任重而道远,要在该领域取得较大进展和突破,仍需广大研究者的不断努力。目前,螺旋藻基因工程的研究主要面临两大任务:

(1) 加强螺旋藻分子遗传学的研究,分离克隆更多的基因,完成基因组全序列的测定和功能鉴定,以加强对其遗传背景和重组机理的了解,获取更多的优质基因。螺旋藻本身就是很有价值的基因库,其优质基因转入其他生物(如植物和其他海藻)中,可望显著提高其他生物的品质和抗逆性,如将螺旋藻的脂肪酸脱饱和酶基因转入植物,可能提高植物的抗寒性。另

外,以其他生物作为反应器可大量生产螺旋藻的一些生物活性物质和重要产物。如秦松等 1996 年把钝顶螺旋藻的别藻蓝蛋白转入大肠杆菌,获得了高效表达、具生物学活性的基因工程产物。加强螺旋藻分子遗传学的研究还可为螺旋藻遗传转化的研究提供理论基础和依据。

(2) 加强螺旋藻基因工程的研究。通过 DNA 重组技术,将外源基因转入螺旋藻,有目的地改良藻种品质,培育更优质、高产的藻株;或利用螺旋藻作为高效廉价的生物反应器大量生产一些生物活性物质或昂贵的药物,如胰岛素、干扰素、白细胞介素、胸腺素等,这对于开发利用螺旋藻食品资源和发展可供口服的海洋药物都有着极为重要的意义。

当前,我国的 863 计划已开始大力支持转药物基因藻的研究开发工作,目标是构建获得具有某种药物功能的、可供口服的转基因藻。作者所在的实验室正在进行人胸腺素  $\alpha 1$  基因在蓝藻中的高效表达研究,该项目是 863 计划的项目之一(项目号:819-04-03)。目前转化系统已建立起来,构建了高效表达载体,成功地筛选到了转基因蓝藻,并检测到了胸腺素  $\alpha 1$  的表达,表达量高达蓝藻可溶性蛋白的 18%。现在采用的转化藻株是聚球藻 *Synechococcus* sp. PCC7942,也希望利用螺旋藻作为受体蓝藻,使外源药物基因在其中高效表达,以大量生产多肽药物,若能选育出可口服的、培养简单、营养价值高、含有特定药物基因的螺旋藻。

#### 参考文献

- 1 陈峰,姜悦. 微藻生物技术. 北京:中国轻工业出版社,1999. 6~10
- 2 陈颖,李文彬,孙勇如. 植物学通报,1999,16(4):321~331
- 3 李乐农,郭宝江. 生命的化学,1998,18(3):32~34
- 4 章军,徐虹,楼士林等. 厦门大学学报(自然科学版). 2000,39(3):381~385
- 5 Kasahara M., Yashiro K., Sakimoto T. et al. . *Plant Cell Physiol.*, 1997,38(7): 828~836
- 6 Deshniun P., Pathoon K. et al. . *FEMS Microbiology Letters*, 2000,84(2):207~213
- 7 Murata N., Deshniun P., Tasaka Y. . Biosynthesis of Gamma-linolenic Acid in the Cyanobacterium *Spirulina platensis*. In: Huang Y., Milles DE(eds). *Gamma-linolenic acid, Metabolism and its roles in nutrition and medicine*. Champaign Illinois: AOC Press, 1996. 22~32
- 8 Kawata Y., Yano S., Kojima H. . *Current Microbiology*, 1998,37(4): 289~291
- 9 Ashby M. K., Mullineaux, C. W. . *FEMS Microbiol. Lett.*, 1999,181(2):253~260
- 10 Cao J., Xu Z., Qiu G. et al. . *Bioresource Technology*, 1999,70(1): 89~93
- 11 Cao J., Xu Z., Qiu, G. et al. . *Bioresource Technol.*, 1999,67(3):287~290

(本文编辑:张培新)