

学校编码: 10384
学号: B200034004

分类号 _____ 密级 _____
UDC _____

厦 门 大 学
博 士 学 位 论 文

坛紫菜转蜚素基因研究

Study on *tachyplestin* Transfer into *Porphyra haitanensis*

Chang et Zheng

赵 扬

指导教师姓名: 郑微云 教授

陈奕欣 教授

专业名称: 环境科学

论文提交日期: 2005年11月

论文答辩时间: 2005年12月

学位授予日期:

答辩委员会主席: 李少菁 教授

评 阅 人: 李永祺 教授

陈昌生 教授

黄邦钦 教授

2005年11月

厦门大学学位论文原创性声明

兹提交的学位论文，是本人在导师指导下独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考的其他个人或集体的研究成果，均在文中以明确方式标明。本人依法享有和承担由此论文而产生的权利和责任。

声明人（签名）：

2005 年 12 月 9 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人完全了解厦门大学有关保留、使用学位论文的规定。厦门大学有权保留并向国家主管部门或其指定机构送交论文的纸质版和电子版，有权将学位论文用于非赢利目的的少量复制并允许论文进入学校图书馆被查阅，有权将学位论文的内容编入有关数据库进行检索，有权将学位论文的标题和摘要汇编出版。保密的学位论文在解密后适用本规定。

本学位论文属于

- 1、保密（ ），在 年解密后适用本授权书。
- 2、不保密（）

（请在以上相应括号内打“√”）

作者签名：

日期：2005年12月9日

导师签名：

日期：2005年12月9日

摘要

本研究对坛紫菜转基因育种涉及的下述三个方面进行了系统研究:坛紫菜转基因受体系统;GUS 基因在坛紫菜叶状体体细胞内的瞬时表达;鲎素基因转化坛紫菜叶状体体细胞。研究结果具体如下。

(1) 坛紫菜转基因受体系统研究。本研究比较了源自银口凹螺、朝鲜花冠小月螺及杂色鲍的海藻解壁酶中琼胶酶、木聚糖酶、纤维素酶的比活力,研究结果表明,银口凹螺和朝鲜花冠小月螺较之杂色鲍更适合作为应用于紫菜等红藻的海藻解壁酶的酶源生物;本研究结果表明,细胞密度、光照强度、培养液比重对坛紫菜叶状体体细胞的发育分化具有显著影响;本研究结果表明,体细胞对氯霉素很敏感,表明氯霉素可作为筛选坛紫菜转基因植株的有效选择压力。

(2) GUS 基因在坛紫菜叶状体体细胞内的瞬时表达研究。以电穿孔法将质粒 pBI221 导入坛紫菜叶状体体细胞内,组织化学检测结果表明,电击培养 72 h、6 d 的转化组体细胞内 GUS 基因进行了瞬时表达,表达效率分别为 1.1×10^{-6} 、 1.3×10^{-6} ;荧光分光光度检测表明,电击培养 2 d—5 d 的转化组体细胞的 GUS 比活力都显著大于对照组的,表明 GUS 基因进行了瞬时表达。上述结果表明,本研究建立的坛紫菜叶状体体细胞外源基因转化体系是有效的。

(3) 鲎素基因转化坛紫菜叶状体体细胞研究。本研究构建了鲎素 I 基因同源重组表达载体,利用电穿孔法将其导入坛紫菜叶状体体细胞。通过 PCR、PCR-Southern 杂交、Southern 杂交等分子生物学检测方法对导入后的植株进行检测,结果表明鲎素 I 基因已成功整合到基因组内。本研究首次将鲎素 I 基因成功转入并整合到坛紫菜体细胞基因组内,Northern 点杂交检测结果进一步表明鲎素 I 基因在 RNA 水平得以表达。本研究推进了紫菜转基因抗病育种的进展,并为紫菜转基因生物反应器的研究工作提供了可资借鉴的基础资料。此外,本研究结果还表明,以坛紫菜 18S rDNA 的 460bp、1200bp 的序列分别作为外源基因 3' 端和 5' 端同源重组序列,同时以家蚕的 MARs 序列作为增强表达序列,有利于鲎素 I 基因在坛紫菜叶状体体细胞内的转化、整合、表达。本研究构建的鲎素基因同源重组表达载体可用于相关大型海藻的转基因研究中。

关键词:坛紫菜;鲎素;转基因

Abstract

The three contents involved in *Porphyra haitanensis* transgenic breeding were studied systemically: *P. haitanensis* transgenic receptor system; GUS gene transient expression within the *P. haitanensis* thallus somatic cells; The research of *tachyplestin I* transfer into *P. haitanensis* cells. Results of the study as below.

(1) Study on *P. haitanensis* transgenic receptor system. Firstly, special activities of three enzymes of cell wall lytic enzymes for seaweed from three species of Gastropoda were compared, the result indicates that *Chlorostoma argyrostoma* and *Lunella coronata coreensis* are more suitable as sources of cell wall lytic enzymes for seaweed for red algae as *P. haitanensis* than *Haliotis diversicolor*; Secondly, result shows that cell density, illumination intensity and specific gravity have a significant effect on the development and differentiation of *P. haitanensis* thallus somatic cells; Thirdly, result shows that *P. haitanensis* thallus somatic cells are sensitive to chloromycetin, this indicates that chloromycetin is an effective selective pressure for transgenic *P. haitanensis*.

(2) Study on *gus* transient expression within *P. haitanensis* thallus somatic cells. Plasmid pBI221 was transformed into thallus somatic cells with the method of electroporation, result of histochemical assay shows that *gus* expressed transiently within the cells cultured for 72 h and 6 d, expression efficiency were 1.1×10^{-6} and 1.3×10^{-6} respectively; Result of quantitative enzyme assay shows that special activities of GUS extracted from transformed cells cultured for 2 d-5 d were all higher than those of controls significantly, this indicates that *gus* expressed transiently. The results above indicate that exogenous gene transformation system of *P. haitanensis* thallus somatic cells is effective.

(3) Study on *tachyplestin I* transfer into *P. haitanensis* cells. Recombination vector pSV40-HR-MAR-tachyplestin I was constructed and transformed into *P. haitanensis* cells with the method of electroporation. Integration of *tachyplestin I* was confirmed with the molecular analysis methods of PCR, PCR-Southern blotting and Southern blotting. *tachyplestin I* was transformed successfully into *P. haitanensis* cells for the first time and integrated, result of Northern dot blotting shows that *tachyplestin I* expressed at the level of RNA. Thus, study on transgenic *Porphyra* with disease resistance is boosted, and the data are useful for the research of transgenic *Porphyra* bioreactor. Furthermore, the results above indicate that the strategy is useful for transformation, integration and expression of *tachyplestin I* within *P. haitanensis* cells, sequences of 460bp, 1200bp of *P. haitanensis* 18S rDNA are adopted respectively as 3' and 5' end sequences of homologous recombination, at the same time, MARs of silkworm is adopted as expression enhancement sequence. Finally, recombination vector of *tachyplestin I* can be applied in the interrelated research of transgenic large seaweed.

Key words: *Porphyra haitanensis*; tachyplestin; transgene

目 录

第一章 前言	1
1.1 海藻解壁酶的研究	2
1.1.1 大型海藻原生质体、单离体细胞制备方法	2
1.1.2 海藻解壁酶性质	3
1.2 紫菜叶状体体细胞发育分化及其应用研究	5
1.2.1 紫菜叶状体体细胞发育分化研究进展	5
1.2.2 紫菜育种、育苗简介	8
1.2.3 叶状体体细胞工程育苗	8
1.2.4 叶状体体细胞工程育种	9
1.3 GUS 报告基因在转基因植物研究中的应用	11
1.3.1 GUS 报告基因简介	11
1.3.2 GUS 基因在外源基因载体研究中的应用	11
1.3.3 GUS 基因在转基因体系研究中的应用	13
1.3.4 GUS 基因在转基因植物安全性研究中的应用	14
1.3.5 GUS 基因在抗病虫转基因植物研究中的应用	14
1.4 多肽抗生素研究进展	15
1.4.1 多肽抗生素简介	15
1.4.2 多肽抗生素的类型	16
1.4.3 多肽抗生素的作用机制	19
1.4.4 转多肽抗生素基因植物研究进展	22
1.5 本研究的目 的、内容与意义	24
第二章 材料与方 法	27
2.1 材料	27
2.2 方 法	33
2.3 数据统计与分析	48

第三章 结果与分析	49
3.1 坛紫菜转基因受体叶状体单离体细胞制备工具酶海藻解壁酶活力比较	49
3.1.1 三种螺类来源的海藻解壁酶比活力比较	49
3.1.2 三种螺类来源的海藻解壁酶实际酶解效果比较	49
3.2 培养条件对坛紫菜转基因受体叶状体体细胞发育分化的影响	50
3.2.1 细胞密度对坛紫菜叶状体体细胞发育分化的影响	50
3.2.2 光照强度对坛紫菜叶状体体细胞发育分化的影响	53
3.2.3 培养液比重对坛紫菜叶状体体细胞发育分化的影响	57
3.3 坛紫菜转基因受体叶状体体细胞抗生素敏感性的研究	60
3.3.1 坛紫菜叶状体体细胞对氨苄青霉素的敏感性研究	60
3.3.2 坛紫菜叶状体体细胞对氯霉素的敏感性研究	63
3.4 GUS 基因瞬时表达研究	65
3.4.1 GUS 基因瞬时表达的组织化学检测	65
3.4.2 GUS 基因瞬时表达的荧光分光检测	65
3.5 同源重组载体 pSV40-HR-MAR-tachypletin I 的构建	66
3.5.1 同源重组载体 pSV40-HR-MAR-tachypletin I 的 PCR 验证	66
3.5.2 同源重组载体 pSV40-HR-MAR-tachypletin I 的酶切验证	67
3.5.3 同源重组载体 pSV40-HR-MAR-tachypletin I 的正连验证	68
3.5.4 同源重组载体 pSV40-HR-MAR-tachypletin I 的测序	68
3.6 转螯素基因 <i>tachypletin I</i> 坛紫菜细胞的检测	69
3.6.1 转基因坛紫菜细胞基因组 PCR 检测	69
3.6.2 转基因坛紫菜细胞基因组 PCR-Southern 杂交检测	70
3.6.3 转基因坛紫菜细胞基因组 Southern 杂交检测	71
3.6.4 转基因坛紫菜细胞 RNA 水平检测	71
第四章 讨论	72
4.1 海藻解壁酶活力比较	72
4.2 培养条件对坛紫菜转基因受体叶状体体细胞发育分化的影响	73
4.2.1 细胞密度对坛紫菜叶状体体细胞发育分化的影响	73
4.2.2 光照强度对坛紫菜叶状体体细胞发育分化的影响	74

4.2.3 培养液比重对坛紫菜叶状体体细胞发育分化的影响	76
4.3 坛紫菜转基因受体叶状体体细胞抗生素敏感性的研究	79
4.3.1 坛紫菜叶状体体细胞对氨苄青霉素敏感性的研究	79
4.3.2 坛紫菜叶状体体细胞对氯霉素敏感性的研究	80
4.4 GUS 基因瞬时表达研究	81
4.4.1 GUS 基因在大型海藻转基因研究中的应用	81
4.4.2 GUS 基因表达效率的影响因素	82
4.5 螯素基因 <i>tachyplestin I</i> 转化坛紫菜叶状体体细胞的研究	83
4.5.1 紫菜栽培业病害威胁的解决途径	83
4.5.2 螯素基因同源重组表达载体的构建策略	83
4.5.3 转螯素基因坛紫菜细胞的分子生物学检测	84
结 语	87
参 考 文 献	89
缩 略 词 对 照 表	106
在 学 期 间 的 成 果	108
致 谢	110

Table of Contents

Chapter 1 Introduction	1
1.1 Study on the Cell Wall Lytic Enzymes for Seaweed	2
1.1.1 Methods for Preparation of Protoplasts and Separated Somatic Cells of Large Seaweed	2
1.1.2 Character of the Cell Wall Lytic Enzymes for Seaweed	3
1.2 Study on the Development and Differentiation of <i>Porphyra</i> Thallus Somatic Cells	5
1.2.1 Advance in the Research of Development and Differentiation of <i>Porphyra</i> Thallus Somatic Cells	5
1.2.2 Brief Introduction of <i>Porphyra</i> Seeding and Breeding	8
1.2.3 Seeding with the Thallus Somatic Cells Engineering	8
1.2.4 Breeding with the Thallus Somatic Cells Engineering	9
1.3 Application of GUS Reporter Gene in the Research of Transgenic Plant	11
1.3.1 Brief Introduction of GUS Reporter Gene	11
1.3.2 Application of GUS Reporter Gene in the Research of Exogenous Gene Vectors	11
1.3.3 Application of GUS Reporter Gene in the Research of Transgene System	13
1.3.4 Application of GUS Reporter Gene in the Research of Transgene Security	14
1.3.5 Application of GUS Reporter Gene in the Research of Transgenic Plant with Disease and Insect Pest Resistance	14
1.4 Advance in the Research of Peptide Antibiotics	15
1.4.1 Brief Introduction of Peptide Antibiotics	15
1.4.2 Types of Peptide Antibiotics	16
1.4.3 Action Mode of Peptide Antibiotics	19
1.4.4 Advance in the Research of Transgenic Plant with Peptide Antibiotic	

Genes	22
1.5 objectives, Contents and Scientific Significance of the Study	24
Chapter 2 Materials and Methods	27
2.1 Materials	27
2.2 Methods	33
2.3 Data Analysis	48
Chapter 3 Results and Analysis	49
3.1 Comparison on the Activities of Cell Wall Lytic Enzymes for Seaweed from Three Species of Gastropoda	49
3.1.1 Comparison on the Special Activities of Cell Wall Lytic Enzymes for Seaweed from Three Species of Gastropoda	49
3.1.2 Comparison on the Effects of Cell Wall Lytic Enzymes for Seaweed from Three Species of Gastropoda	49
3.2 Effects of Culture Conditions on Development and Differentiation of <i>Porphyra haitanensis</i> Thallus Somatic Cells	50
3.2.1 Effects of Cell Density on Development and Differentiation of <i>P. haitanensis</i> Thallus Somatic Cells	50
3.2.2 Effects of Illumination Intensity on Development and Differentiation of <i>P. haitanensis</i> Thallus Somatic Cells	53
3.2.3 Effects of Specific Gravity on Development and Differentiation of <i>P. haitanensis</i> Thallus Somatic Cells	57
3.3 Antibiotic Sensitivities of <i>P. haitanensis</i> Thallus Somatic Cells	60
3.3.1 Sensitivities of <i>P. haitanensis</i> Thallus Somatic Cells to Ampicillin	60
3.3.2 Sensitivities of <i>P. haitanensis</i> Thallus Somatic Cells to Chloromycetin	63
3.4 Study on <i>gus</i> Transient Expression	65
3.4.1 Histochemical Assays of <i>gus</i> Transient Expression	65

3.4.2	Quantitative Enzyme Assays of <i>gus</i> Transient Expression	65
3.5	Construction of Recombination Vector pSV40-HR-MAR-tachyplexin I	66
3.5.1	Confirmation with PCR of Recombination Vector pSV40-HR-MAR-tachyplexin I	66
3.5.2	Confirmation with Restriction Analysis of Recombination Vector pSV40-HR-MAR-tachyplexin I	67
3.5.3	Confirmation of Inserted Direction of Recombination Vector pSV40-HR-MAR-tachyplexin I	68
3.5.4	Sequencing of Recombination Vector pSV40-HR-MAR-tachyplexin I ...	68
3.6	Analysis of Transgenic <i>P. haitanensis</i> Cells with <i>tachyplexin I</i> ...	69
3.6.1	Analysis with PCR of Transgenic <i>P. haitanensis</i> Genome	69
3.6.2	Analysis with PCR-Southern Blotting of Transgenic <i>P. haitanensis</i> Genome	70
3.6.3	Analysis with Southern Blotting of Transgenic <i>P. haitanensis</i> Genome	71
3.6.4	Analysis in RNA Level of Transgenic <i>P. haitanensis</i>	71
Chapter 4	Discussion	72
4.1	Comparison on the Activities of Cell Wall Lytic Enzymes for Seaweed from Three Species of Gastropoda	72
4.2	Effects of Culture Conditions on Development and Differentiation of <i>P. haitanensis</i> Thallus Somatic Cells	73
4.2.1	Effects of Cell Density on Development and Differentiation of <i>P.</i> <i>haitanensis</i> Thallus Somatic Cells	73
4.2.2	Effects of Illumination Intensity on Development and Differentiation of <i>P. haitanensis</i> Thallus Somatic Cells	74
4.2.3	Effects of Specific Gravity on Development and Differentiation of <i>P. haitanensis</i> Thallus Somatic Cells	76

4.3 Antibiotic Sensitivities of <i>P. haitanensis</i> Thallus Somatic Cells	79
4.3.1 Sensitivities of <i>P. haitanensis</i> Thallus Somatic Cells to Ampicillin	79
4.3.2 Sensitivities of <i>P. haitanensis</i> Thallus Somatic Cells to Chloromycetin	80
4.4 Study on <i>gus</i> Transient Expression	81
4.4.1 Applications of <i>gus</i> in the Research of Transgenic Large Seaweed ..	81
4.4.2 Effect factors on the <i>gus</i> Expression efficiency	82
4.5 Study on Transgenic <i>P. haitanensis</i> Cells with <i>tachyplestin I</i> ..	83
4.5.1 Solution to Disease Imperilment for <i>Porphyra</i> Growth	83
4.5.2 Construction Strategy for Recombination Vector of <i>tachyplestin I</i> ..	83
4.5.3 Molecular analysis of transgenic <i>P. haitanensis</i> Cells	84
Conclusions and Perspectives	87
References	89
Abbreviations	106
Published Articles and Productions	108
Acknowledgements	110

厦门大学博硕士学位论文摘要库

第一章 前言

大型海藻种类很多，主要包括褐藻门的海带 (*Laminaria japonica*)、鹿角菜 (*Pelvetia siliguosa*)、马尾藻 (*Sargassum* spp.) 和裙带菜 (*Undaria pinnatifida*)，红藻门的紫菜 (*Porphyra* spp.)、石花菜 (*Gelidium amansii*) 以及绿藻门的石莼 (*Ulva lactuca*) 等。大型海藻的用途主要包括食用、动物饲料、提取生物活性物质 (药用、保健、化妆)、化工原料 (琼胶、卡拉胶、褐藻胶，碘、甘露醇等) 等；此外，包括大型海藻在内的海洋藻类在全球气候调控及环境修复方面也发挥着重要作用。迄今，人工栽培的经济海藻主要包括 10 多属 20 多种，海藻栽培业、加工业、制药业全球总产值达 30 亿美元以上。我国海藻栽培已有几百年的历史，目前，海藻年产量达到 1.22×10^6 t (干重)，占世界海藻年产量的 70%。迄今，我国商品化海藻栽培种类有 10 属 12 种，产量名列前茅的有紫菜属、海带属、裙带菜属、江蓠属 4 属 6 种 (纪明侯，1997；曾呈奎，1999；张学成等，2005)。

紫菜营养丰富，干品蛋白质含量达 40% 以上，富含维生素 (尤其是维生素 B₁、B₂、B₁₂)，微量元素含量也很丰富，此外，干品粗纤维含量为 29%~35%。我国沿海人民食用紫菜已有上千年的历史，紫菜的栽培生产始于 300 年之前，虽然真正意义上的紫菜人工育苗栽培只有几十年的时间，但如今我国紫菜年产量居世界首位，我国紫菜年产量 (按国际标准换算) 2003 年达到 182 亿张 (≈ 3 g/张)，其中，条斑紫菜 (*P. yezoensis* Ueda) 22 亿张，坛紫菜 (*P. haitanensis* Chang et Zheng) 折合干重为 4.8×10^4 t。紫菜已成为世界上人工海藻栽培业中年产值最大的经济海藻，中国、日本、韩国的紫菜初级加工品年产值超过 20 亿美元 (曾呈奎，1999；张学成等，2005)。

目前，紫菜栽培面临的主要问题是尚未实现良种化和育苗不稳定 (曾呈奎，1999)。为克服传统育种、育苗技术的缺陷，体细胞工程和基因工程技术已被用于紫菜相关研究中。其中，转基因育种因为具有常规育种技术所无法比拟的一些优点而成为研究热点之一，并已取得一些进展。源自紫菜叶状体的原生质体与单离体细胞为单倍体，其表现型与基因型相同，因而成为紫菜基因工程育种最常用的转基因受体 (姜红霞，汤晓荣，2003)，原生质体与单离体细胞的常用分离方法为海藻解壁酶法；GUS 报告基因是转基因植物研究中常用的报告基因；而多肽

抗生素基因为转基因抗病植物研究中常用的目的外源基因。下面对紫菜转基因育种涉及的海藻解壁酶研究、叶状体体细胞发育分化及其应用研究、GUS 报告基因在转基因植物研究中的应用、多肽抗生素研究等几个方面进行综述。

1.1 海藻解壁酶的研究

1.1.1 大型海藻原生质体、单离体细胞制备方法

紫菜属红藻门 (Rhodophyta) 红毛菜科 (Bangiaceae) 紫菜属 (*Porphyra*), 形态学简单, 叶片分化程度低, 仅由 1 或 2 层细胞构成 (Polne-Fuller and Gibor, 1984)。在大型经济藻类中, 紫菜因形态学相对简单、整体或组织培养容易而最适于开展基因工程研究, 结合原生质体制备、组织培养和外源基因导入三者, 紫菜将成为大型藻类基因表达、转基因植物理论及应用研究的理想模型 (Kubler *et al.*, 1994)。

紫菜叶状体原生质体与单离体细胞为单倍体, 其表现型与基因型相同, 目前已成为紫菜基因工程育种最常用的转基因受体 (姜红霞, 汤晓荣, 2003)。因而, 叶状体原生质体或单离体细胞的制备是紫菜转基因研究的基础, 主要包括机械法和海藻解壁酶法: (1) 机械法。赵焕登等 (1981) 采用机械研磨法分离得到条斑紫菜 (*P. yezoensis*) 叶状体单离营养细胞, 并培养成活。但机械法费时费力、得率少, 并且对细胞壁胶质物含量丰富的褐藻、红藻分离效果较差, 所以目前已很少使用。(2) 海藻解壁酶法, 指用专一性的水解酶即海藻解壁酶去除特殊的细胞壁物质, 由于酶解条件温和, 不易对细胞内部结构产生影响, 对细胞伤害小, 且效率较高、操作简便, 因而得到广泛使用 (王素娟, 1994)。唐延林 (1982) 首次制备并使用海螺消化酶分离培养了圆紫菜 (*P. suborbiculata*) 的单细胞和原生质体。之后, 众多学者采用酶法分离了以下藻类的原生质体: 红藻紫菜属 (朱仁华, 1982; Saga and Sakai, 1984; 王素娟等, 1986; Dai *et al.*, 1993); 褐藻海带属 (*Laminaria*) (Saga and Sakai, 1984)、墨角藻 (Fucaceae) (韩宝芹等, 1997b)、裙带菜 (*Undaria pinnatifida* Suringan) (朱仁华, 1982; 吴少波, 1988; 韩宝芹等, 1998); 绿藻, 如石莼 (*Ulva* spp.) (Fujimura *et al.*, 1989; 陈菊琦, 1990)、浒苔 (*Enteromorpha* spp.)、礁膜 (*Monostroma* spp.) (朱仁华, 1982; 陈菊琦, 1990)、砺菜 (*Ulva conglobata*) (陈菊琦, 1991) 等。

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库