

学校编码：10384

分类号_____密级_____

学号：21620121152387

UDC _____

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

铜绿微囊藻 (*Microcystis aeruginosa*) PCC
7806 中 mrpC 基因的正义反义调控及 mrpC
基因敲除的初步研究

The sense and antisense regulation of mrpC gene in
Microcystis aeruginosa PCC 7806 and construction of mrpC
gene knockout vector

吴艳红

指导教师姓名：章军 副教授

专 业 名 称：微生物学

论文提交日期：2015 年 4 月

论文答辩时间：2015 年 5 月

学位授予日期：2015 年 5 月

答辩委员会主席：_____

评 阅 人：_____

2015 年 5 月

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈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其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为()课题(组)的研究成果,获得()课题(组)经费或实验室的资助,在()实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

（ ） 1.经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，
于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

（ ） 2.不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月 日

目录

摘要.....	V
Abstract.....	VI
一、前言.....	1
1.1 铜绿微囊藻 (<i>Microcystis aeruginosa</i>) PCC 7806 的概述.....	1
1.1.1 蓝细菌及铜绿微囊藻 (<i>Microcystis aeruginosa</i>) 的简介及其研究现状 ..	1
1.1.2 MrpC 蛋白的发现及功能.....	2
1.2 蓝藻的遗传操作.....	3
1.2.1 工程载体	3
1.2.2 蓝藻 PCC 780 外源基因转化的方法.....	4
1.2.3 反义 RNA 调控技术.....	6
1.2.4 几种常见的基因敲除的方法	6
1.3 研究的目的是与意义.....	9
二、材料与方法	11
2.1 材料.....	11
2.2 方法.....	17
三、结果与分析	31
3.1 铜绿微囊藻 mrpC 基因的正反义调控	31
3.1.1 正反义载体的构建:	31
3.1.2 三亲接合转化铜绿微囊藻 (<i>Microcystis aeruginosa</i>) PCC 7806.....	33
3.1.3 转化藻株基因水平鉴定	35
3.1.4 转化藻悬浮特性的研究	35
3.1.5 转化藻 MrpC 蛋白的表达检测.....	39
3.2 mrpC 基因同源重组整合载体的构建.....	40
3.2.1 mrpC 上游 (M1)、下游 (M2) 同源序列的克隆及基因整合载体的构建.....	40
3.2.2 重组质粒的酶切验证	44
3.2.3 同源重组载体 pSK-M1-Kan-M2 的电击转化	45

3.3 通过 CRISPR-Cas9 技术构建铜绿微囊藻 mrpC 基因敲除载体.....	46
四、讨论	49
4.1 正义、反义调控对铜绿微囊藻 (<i>Microcystis aeruginosa</i>) PCC 7806 MrpC 蛋白表达和细胞悬浮的影响.....	49
4.2 利用同源重组载体和 CRISPR-Cas9 技术对蓝藻进行基因敲除.....	50
五、总结与展望	52
六、致谢.....	53
参考文献	54

Table of Contents

Abstract in Chinese	V
Abstract in English	VI
1 Introduction	1
1.1 M. aeruginosa (<i>Microcystis aeruginosa</i>) PCC 7806 overview	1
1.1.1 Cyanobacteria and <i>Microcystis aeruginosa</i> introduction and research status	1
1.1.2 MrpC discovery and its function.....	2
1.2 Genetic manipulation of <i>Microcystis aeruginosa</i>	3
1.2.1 Engineering vector	3
1.2.2 The methods of transformed exogenous gene into <i>Microcystis aeruginosa</i> PCC7806.....	4
1.2.3 Antisense RNA regulation technology.....	6
1.2.4 Several methods of gene knockout	6
1.3 The purpose and significance of this study	9
2 Materials and Methods	11
2.1 Materials	11
2.2 Methods	17
3 Results and analysis	31
3.1 The study of sense and antisense mrpC gene	31
3.1.1 Construction of sense and antisense vectors	31
3.1.2 Triparental mating transfer <i>Microcystis aeruginosa</i>	33
3.1.3 Genome identified of transformed <i>Microcystis</i>	35
3.1.4 The study of transformed <i>Microcystis</i> suspension properties.....	35
3.1.5 The detected of MrpC protein in transformed <i>Microcystis</i>	39
3.2 Construction of mrpC homologous integration vector	40
3.2.1 Cloning mrpC upstream (M1)and downstream (M2), and gene homologous sequences integrated vector.....	40
3.2.2 Recombinant plasmid digested verification.....	44

3.2.3 Electroporation of homologous recombination pSK-M1-Kan-M2 vector	45
3.3 Construction of mrpC knockout vector by CRISPR-cas9 technology...	46
4 Discussion	49
4.1 The regulation of sense and antisense mrpC gene in <i>Microcystis aeruginosa</i> PCC 7806 for MrpC protein	49
4.2 The use of homologous recombination vectors and CRISPR-Cas9 technical in knocking out of <i>cyanobacteria</i>	50
5 Summary and outlook	52
References	54

摘要

众所周知，“水华”是由于水体中氮磷含量过高引起富营养化后，导致湖水中蓝藻过度生长而引起的现象^[1]。水华蓝藻在富营养化的水体中迅速的占据光照、温度、含氧量等最适合生长繁殖的生态表层，而后大量繁殖。这就使得研究蓝藻在水体中的“垂直移动”进而了解水华爆发的机理有重要作用。本论文的研究对象铜绿微囊藻 (*Microcystis aeruginosa*) PCC 7806，它是富营养化湖泊和水库中形成“水华”的典型蓝藻，本实验室前期研究发现铜绿微囊藻 (*Microcystis aeruginosa*) PCC 7806分泌表达产物MrpC蛋白形成长纤丝，在水体中形成网状结构，从而对其在水体中的悬浮产生重要的作用。因而从分子水平上进一步研究其功能，研究MrpC蛋白的表达水平变化对蓝藻的垂直运动的作用和水华形成机制有着重要的作用；本论文主要研究工作有：

(1) 正义反义调控 MrpC: 克隆了正义 mrpC、反义 mrpC 基因，构建正义 mrpC-PRL1383a 载体和反义 mrpC-PRL1383a 载体，通过三亲接合的转化方法将其转入野生铜绿微囊藻 (*Microcystis aeruginosa*) PCC 7806，得到转化藻在含链霉素 (Sm) 和壮观霉素 (Sp) 的 BG-11 平板上筛选，通过转化，成功获得了正义反义转化藻株。通过电镜、试管悬浮、显微观察、western blotting 等实验发现对 MrpC 蛋白确实对藻的悬浮能力有一定作用，其中反义的转化藻能使转化藻细胞聚集并上浮，说明 MrpC 蛋白表达差异可以改变铜绿微囊藻的悬浮状态。

(2) 基因打靶载体的构建: 利用同源重组原理设计实验，克隆了 mrpC 基因上游序列同源臂、mrpC 下游基因序列同源臂以及插入的抗性基因 kan，通过一系列的操作成功构建 mrpC 基因敲除同源重组载体，通过电击转化将构建好的载体转入野生的铜绿微囊藻，并且后续可以在含有 kan 抗性的固体 BG-11 平板上生长，但是液体中没有培养起来。结果表明直接利用同源整合载体的实验不理想，因此采用最新的 CRISP-Cas9 技术构建了 mrpC 基因敲除的载体，进行 mrpC 基因敲除的初步探索。

关键词: 铜绿微囊藻 PCC 7806; MrpC 蛋白; 悬浮; 反义; 基因敲除

Abstract

As we know, "bloom" is due to the high level content of nitrogen and phosphorus caused eutrophication, resulting in excessive growth of algae in the lake ^[1]. Cyanobacteria blooms in eutrophic water quickly growth by occupying light, temperature, oxygen content and the most suitable surface. Thus the study of the mechanism of cyanobacteria in water "vertical movement" will give us further understanding to the water blooms. *Microcystis aeruginosa* PCC 7806 is the typical microorganisms in eutrophication of lakes and reservoirs in the formation of "blooms", Our previous study found *Microcystis aeruginosa* PCC 7806 could secrete MrpC protein, which could form nanofilament network in water thus have an important role in cell suspension. Thus further study on the expression level of MrpC will give us more information on the role of cell vertical movement and the bloom formation mechanism. This study is aim to mrpC genetic operation in *Microcystis aeruginosa* PCC 7806 :

(1) Antisense regulation MrpC: cloning sense mrpC, antisense mrpC gene, construct sense mrpC-pRL1383a vectors and antisense mrpC-pRL1383a vector, then triparental mating transfer the plasmid into wild *Microcystis aeruginosa* PCC 7806, to obtain the transformants on the plate containing streptomycin. By Electron microscope, suspension culture, microscopic observation, western blotting, it was found that MrpC proteins does have a role in the cell colony forming and suspension. The results show that, MrpC protein can promote *Microcystis aeruginosa* cell suspension.

(2) Gene targeting vector: According to the the principles of homologous recombination, cloned upstream and downstream of the mrpC sequence, added kan resistance gene to construction mrpC homologous integration vector, transformed by electroporation, and selected by Kan, some transformants may growth on solid BG-11 plate, while the liquid BG-11 did not find any transformants. The results show that

the direct use of homologous integration vectors is not ideal, so we choose the most recent technology of CRISP-Cas9 to help constructing knockout vector in *Microcystis aeruginosa* PCC 7806.

Keywords: *Microcystis aeruginosa* PCC 7806; MrpC protein; suspension; antisense; knockout

厦门大学博硕士论文摘要库

一、前言

1.1 铜绿微囊藻 (*Microcystis aeruginosa*) PCC 7806 的概述

1.1.1 蓝细菌及铜绿微囊藻 (*Microcystis aeruginosa*) 的简介及其研究现状

蓝藻别名蓝细菌 (*Cyanobacteria*)，也叫蓝绿藻，是最早发现的光合放氧原核生物，具有光合作用、固氮作用、放氢作用等多种功能。化石记载蓝藻在地球上存在了大约约35亿年^[2, 3]，有150个属，2000多个种。已经发现蓝藻适合生长在各种生态系统，从水生环境到干旱荒漠土壤，从南极冷水域到地热环境蓝藻都已经适应生存^[4, 5]，在这些极端环境下，蓝藻已经适应了各种生存条件，包括氧气，温度，盐度和pH值，这就使得蓝藻具有种类繁多、分布广泛、形态多样、适应性强的特点，蓝藻的代谢多样性也体现了它生存条件的多样性^[6]。铜绿微囊藻 (*Microcystis aeruginosa*) 是蓝细菌中的一种，和原核的大肠杆菌类似被一同划分为原核生物界。蓝藻属蓝藻门分为两纲：色球藻纲和藻殖段纲。色球藻纲藻体为单细胞体或群体；藻殖段纲藻体为丝状体，有藻殖段。铜绿微囊藻，蓝藻门，蓝藻纲，色球藻目，色球藻科，微囊藻属^[7]。幼植物体为球形或长圆形的实心群体，后长成为网络状的中空囊体状，随后由于不断扩展，囊体破坏而形成网状胶群体。群体胶被透明无色。细胞球形或近球形，直径3-7um，蓝绿色，一般具伪空胞。多生长湖泊、水库中，在春季夏季生长旺盛繁殖迅速，经常爆发水华。爆发水化时，水面常有蓝绿或黄绿色的浮膜^[8]。

作为最古老和最丰富的光合生物，蓝藻发挥着重要的生物地球化学作用，与人类生活密切相关，可以将光转化为二氧化碳和水，为人类提供最基本的能源^[9-11]。铜绿微囊藻是我国湖泊、水库生态系统爆发水华进而产生危害的主要微生物^[12]。近年来环境问题是人们讨论的热门话题，其中藻类引起的水污染问题越来越引起人们的注意^[13]。在国内国外，相当多的因为富营养化而引起水华发生的水体中，铜绿微囊藻 (*Microcystis aeruginosa*) PCC7806 是发生水华的藻类中占有绝对的优势的藻类^[14, 15]。因此国内外研究专家们对铜绿微囊藻做了许多的工作^[16]。蓝藻在湖泊中疯长引起的“水华”影响着人们的生产生活，主要是因为蓝藻造成水体缺氧，使得其他生物缺氧窒息而死；另外就是，经研究表明大部分蓝

藻是有毒的，这是因为它们可以产生一种环状结构的多肽^[17, 18]，其中铜绿微囊藻代谢产生一种叫做微囊藻毒素的肝毒素^[19, 20]，我国目前发生的“水华”都是由这种产生微囊藻毒素的铜绿微囊藻引起^[21, 22]。微囊藻毒素是一种肝毒素^[23]，约有 50 多种异构体，有的为一种多肽类物质，有时为一种环状多肽。分子量为：654 或者 19400。其中毒性最大的是 M-LR。

21 世纪以来，由于全基因组测序技术的发展，随着越来越多生物的全基因组测序完成，各种蓝藻全基因组的测序也相继完成，基因工程分子生物学成为当下的研究热点，这就加快了蓝藻分子生物学与遗传学的研究进程。由于基因操作技术如：插入失活、基因打靶、蛋白质组学、转录调控功能组件的系统分析以及生物信息学的发展加快等使得蓝藻的分子生物学与基因工程已经逐步进入了基因组和后基因组学的研究时代^[24]。互联网技术的发展以及蓝藻基因数据库的建立也让我们能够尽快的了解到国际国内研究的最新数据，这在进一步推动蓝藻个基因研究的发展进展方面起到非常有意义的作用。各种基因操作技术随着时代的发展也相应的更加成熟起来，这就为我们进一步研究蓝藻提供了相对良好的技术手段。

1.1.2 MrpC 蛋白的发现及功能

本实验室在实验中发现长期培养的铜绿微囊藻 7806 在换了新鲜 BG-11 培养基后表现下沉，培养几周后又重新悬浮的奇怪现象，通过一系列的研究发现是铜绿微囊藻自身分泌的一种蛋白 MrpC 是其中的关键所在：一定浓度的 MrpC 能使藻细胞重新悬浮^[25]，说明该蛋白和细胞悬浮有关。

MrpC (microcystin-related protein C) 即微囊藻毒素相关蛋白 C，它是一个 O 侧链糖基化的蛋白。它存在两种形态，一种游离于培养液中，主要是随着藻细胞的生长而分泌，大小为 14KD；另外一种主要吸附于细胞表面和内部，大小为 17KD；MrpC 最早是由 Zilliges^[26]等发现与鉴定的，但其功能未知。他们发现将铜绿微囊藻的 *mcyB* 基因突变则会导致 MrpC 蛋白的过量表达，从而使得藻细胞聚集；通过 western blotting 等免疫手段检测 MrpC 均为糖蛋白。纯的 MrpC 为白色易溶于水和 PBS，不容易于有机溶剂，和所有蛋白一样重金属可使其变性，30 r/min 转速室温测定 1 mg/ml 的 MrpC 其表观粘度为 6 mPa.S^[27]。

传统的悬浮理论认为铜绿微囊藻的悬浮是由藻细胞的生理进行调控的,如通过气囊、光照、细胞彭压以及细胞成分的改变来达到控制藻细胞的垂直移动;气囊的大小、结构和数量都会影响气体进出细胞,改变细胞的密度而为细胞提供浮力,对藻的悬浮能力至关重要;光照可以影响藻细胞的光合作用,通过昼夜的交替来改变蓝藻在水体中存在的生态表层;细胞彭压随着光合作用的增强使得其中的代谢产物增加或者离子浓度真高导致细胞内产生空泡进而影响其悬浮力^[28];细胞中糖类物质的积累会使细胞下沉^[29]。

本实验室前期工作表明用不同的离心力处理藻细胞发现离心力对藻细胞的气囊有一定的破坏,但是将经过离心的藻细胞能重悬在长期培养的去藻培养物中,藻细胞悬浮良好说明气囊并不是完全调控藻细胞悬浮的主要原因,随后又进行了一系列实验如培养基的盐浓度、细胞彭压等的研究,发现 MrpC 对藻的悬浮特性有一定的调控作用。进一步电镜观察到 MrpC 蛋白呈纤维状,在水体中能形成纳米网状结构。因而,我们提出新的理论:藻细胞悬浮可能主要是由 MrpC 蛋白纤维决定的。铜绿微囊藻在生长的过程中会分泌 MrpC 蛋白,并且随着培养时间的延长铜绿微囊藻分泌的 MrpC 蛋白也逐渐增多,从而使藻细胞悬浮良好。不同的 MrpC 浓度对换了新鲜 BG-11 培养基后的重悬有不同的效果,浓度越高悬浮效果越明显。为了进一步证明 MrpC 的悬浮功能,本论文将进行其基因表达调控的研究,比如正义反义调控技术和基因敲除技术。

1.2 蓝藻的遗传操作

1.2.1 工程载体

蓝藻在地球上最先出现,并且进化出了各种独特的性状:有单细胞的、多细胞的、有丝状的,螺旋状的,异形胞固氮的,有通过同化作用固氮的等等^[30]。大量文献都表明蓝藻已经获得全基因组的测序^[31],这就为我们在不同的领域使用蓝藻作为研究材料进行研究提供了良好的条件,在基因工程的研究方面蓝藻可作为很好的基因工程受体系统^[32]。有许多案例证明外源基因在蓝藻里的转化成功,对于蓝藻的工程载体来说将有望于使用到生产生活的各个方面, Van den H 等学者很早就构建克隆载体并且在蓝藻表达成功^[33]。随后,同源重组的载体构建也逐步开始进行,大量资料显示目前用于蓝藻模式生物的工程载体常见的有三

种:

首先,穿梭载体,它是一种可以在两个宿主细胞中都进行复制的载体,这种载体在各方面的研究中都广泛使用,可以在两个宿主之间传送DNA,表明这种载体转化主要是通过三亲接合进行转化外源DNA,而且这种方法方便外可行^[34]。穿梭载体的宿主范围也是相当广泛的,包含了大部分的蓝藻在内^[35]。Kuhlemeier C J等首次通过pUC1与pACy184融合获得了在大肠杆菌和*Synechococcus sp.*PCC 7942中转化效率都很高的双向质粒^[36]。这些质粒通常会在蓝藻细胞中在含有选择标记的环境中随着宿主质粒的复制而复制,但是当环境中的选择压力消失后,它也会随之消失。选择性去除了限制酶*AvaII*和*AvaI*的标记位点,并且含有蓝藻的复制起点的一些穿梭载体,它们可以通过接合转化从大肠杆菌转移进入蓝藻并且在蓝藻细胞中稳定存在^[37-41]。研究蓝藻基因的功能,通过质粒构建穿梭系统仍然是蓝藻转化的主要方法。

其次,整合载体和转座子。将外源基因转入宿主后,外源基因与基因组DNA整合,由于它们并不含蓝藻复制起点所以不能独立存在二十随着染色体的复制而复制。转入宿主后靶基因的同源序列与染色体的同源序列发生交换而将靶基因转入受体藻细胞,这样的载体有pRL271、pRL278等系列^[42]。然而,转座子介导的与染色体组整合也可以将外源基因导入受体蓝藻细胞。无论是天然的还是人工构建的,转座子都已经用于蓝藻基因的诱变研究,转座子载体所带的抗性筛选标记方便了后续的筛选。

最后,噬藻体最早是在蓝藻中发现的。科学家们在研究如何裂解蓝藻时发现了一种病毒即为我们现在所说的噬藻体,它能够同时裂解鞘丝藻(*Lynbya*)、席藻(*Phormidium*)及织线藻(*Plectonema*),因而命名为“LPP”型。之后发现的蓝藻病毒与它不同的是蓝藻病毒在侵染和复制方面的不同。Waterbury 等人用稀释法分离出 50 多株侵染 *Synechococcus* 的噬藻体^[43]。蓝藻病毒虽然也可以作为工程载体来研究蓝藻的基因功能,总体上研究基因功能时用蓝藻病毒的并不是很常见。但是,能够分离并改造出能够适宜于广大蓝藻细胞的噬藻体,将成为研究蓝藻基因功能的一个崭新的方向和可以发展的新领域。

1.2.2 蓝藻 PCC 780 外源基因转化的方法

第一次将外源基因转入蓝藻细胞是在十九世纪七十年代,并构建重组DNA

建立工程蓝藻^[44]。研究蓝藻的功能最简单的就是基因研究，通过我们使用比较频繁的自然转化、诱导转化、电击转化、接合转化等方法转化外源基因到蓝藻蓝藻受体细胞，研究其形态特性。早在那时候Shestakov和Khyen 等人就发现例如集胞藻6803，聚球藻7942，链球藻7002等一些藻可以通过自然转化将外源DNA导入蓝藻受体细胞^[45, 46]，自然转化是指蓝藻能够在对数生长期不经任何处理在合适的条件下将与它混合的外源DNA直接吸收的方法，这种方法是获得转基因藻最简单的方法。诱导转化主要用于一些在自然的生长状态时每一个生长时期都缺乏天然的感受态状态^[47]的蓝藻。因此就需要通过人为的方法使藻细胞形成感受态将外源DNA转化进入蓝藻细胞^[48]。常用的人工方法有：超声、溶菌酶、EDTA、Ca²⁺处理等，通过这些处理使细胞处于敏感的感受态而进行外源DNA的转化。电击转化是利用高压电脉冲细胞膜使之发生瞬间的可逆穿孔，从而使外源DNA穿过细胞膜进入到受体细胞的方法^[49]，这种方法使得蓝藻的转化范围扩大^[50]。虽然有文献分析电击可使宿主细胞染色体的突变频率上升，而且转化效率也比较低，但是电击转化在藻类基因工程中的运用频率仍在显著增加^[51, 52]，因为基本上所有的蓝藻宿主都能够使用电击来导入外源基因。Thiel(1989)等首次通过电击转化成功地把穿梭表达载体pRL6转入鱼腥藻^[49, 53]。在蓝藻转化方面还有一类应用比较广泛，转化效率高的转方法即接合转化，主要应用于鱼腥藻，也部分使用于铜绿微囊藻，又称三亲接合转化体系 (*Triparental mating*)，是使外源DNA通过细胞接触从一种细胞（通常是大肠杆菌）转入蓝藻的有效系统^[54]。三亲接合转化过程需要三种质粒：含有靶基因、蓝藻复制位点、转移位点 (*oriT*) 和选择性标记的运载质粒 (*cargo plasmid*) 一般是PRL443主要由mob基因产生作用以及识别 *oriT*和mob基因并且和运载质粒处于同一宿主的辅助质粒(*helper plasmid*)一般是PRL623，辅助质粒同时含有M.AvaI、M.Eco47II和M.EcoT22I甲基化酶基因，防止运载质粒被限制性内切酶消化，以提高靶基因的转化效率^[55, 56]还有一种质粒接合质粒(*conjugative plasmid*)，其上有许多含有编码接合装置的基因（如tra），它表达的产物可以将运载质粒转化入受体细胞如RP4^[57, 58]。三种质粒同时处于同一宿主，最后通过筛选标记得到目的藻落^[59]。在此过程中，辅助质粒和接合质粒由于在受体细胞中无法复制或整合而逐渐丢失，运载质粒则因自主复制、与蓝藻细胞染色体整合或与蓝藻细胞的内源质粒发生同源重组而稳定存在，三亲结合

转化最早在 *PCC Synechococcus7942* 中获得成功^[60], 1984 年 Wolk 等建立了鱼腥藻的接合转移系统^[55, 61]。还有一类转化方法: 噬菌体侵染系统, 但是此方法使用的频率不是很高。综合上述蓝藻细胞外源基因的转化方法, 三亲接合靶基因的方法不仅从根本上解决了含有异形胞的丝状蓝藻在转化方面困难的问题, 而且在单细胞蓝藻转化方面其转化效率也有明显改善。

1.2.3 反义 RNA 调控技术

反义RNA技术的应用一直是科学家研究基因调控功能的主要技术, 并且近年来发展为最广泛的研究基因调控功能的一项技术。反义RNA主要指的是在DNA复制、转录、翻译的过程中通过与mRNA或者DNA以及其他RNA互补的RNA分子影响靶向mRNA基因的正常作用, 从而调控基因的功能^[62], 原核生物中普遍存在这种反义RNA分子。构建反义RNA主要通过将编码某一靶向RNA序列的DNA反向克隆于一个载体上^[63], 然后通过将载体导入靶细胞进行作用; 如果根据同样的原理设计反义RNA的反义RNA, 这样便会起到抑制反义RNA的作用从而达到激活某个基因的功能, 而促进其基因的表达^[64]。不管是在真核生物还是原核生物中, 反义RNA作用的机理大致类似, 都是在DNA复制、转录、翻译水平进行作用的; 反义RNA通过与引物的结合来抑制DNA的复制, 从而抑制DNA复制的速率, 真核中主要是由于反义RNA直接影响mRNA前体的拼接; 同样的, 反义RNA也可以与mRNA5'端结合而抑制甚至是阻止转录的进行, 真核生物中mRNA合成后, 要进行转移而反义RNA抑制了这种转移; 在翻译水平上抑制蛋白的表达主要是由于反义RNA可以和mRNA5'互补, 而5'存在起始密码子, 从而直接抑制翻译的起始, 再者, 间接改变mRNA的构象抑制转录, 另外Shine-Dalgarno序列存在于mRNA5'端, 所以直接影响转译真核中通过改变mRNA合成后的修饰来影响后续的翻译过程^[65]。虽然基本上所有的反义RNA的原理大致相似, 但是不同的反义RNA有着不同的作用方式, 而且这些不同的反义RNA最终都能抑制蛋白质的功能^[66]。

通过反义机制起作用的反义RNA都是通过Watson-Crick配对与mRNA、DNA、或者其他RNA分子的结合间接调控mRNA来控制控制基因的功能。随着反义RNA技术的发展, 这项技术将用于开发新的用于基因治疗的技术, 在动植物以及人类等各个领域广泛应用。

Degree papers are in the “[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)”.

Fulltexts 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.