

# 海藻原生质体融合及杂交技术的研究进展\*

## REVIEW ON PROTOPLAST FUSION AND HYBRIDIZATION OF MARINE ALGAE

林学政 沈继红 李光友

(国家海洋局第一海洋研究所海洋生物活性物质重点实验室 青岛 266061)

关键词 海藻,原生质体,融合与杂交技术

根据藻类细胞脱壁程度的不同, Adamich 将脱壁后的藻细胞分为原生质体 (Protoplast) 和原生质球 (Spheroplast)。原生质体是指质膜外的细胞壁和包被层全部除去而保持其余细胞组分的任何基因型的藻细胞;原生质球是指细胞壁被全部或部分除去,仍保持质膜外包被层的含全部细胞内组分的部分。当细胞壁去除后,原生质体具有以下特征:(1)无细胞壁障碍,可对膜、细胞器进行基础研究,同时可进行遗传操作。(2)具有全能性,能在人工条件控制下,进行大量快速繁殖。(3)可诱导融合,形成杂种细胞,为体细胞杂交提供实验材料。细胞杂交是指用人工的方法把分离的不同品种或不同种的原生质体诱导融合成杂合细胞,再经离体培养,诱导分化出完整植株的整个过程,以及研究其亲代、子代的性状表现等有关理论和实际问题。原生质体融合使任何两种海藻细胞进行杂交成为可能,为各种海藻的遗传型,有效地培育具有各种优良性状的海藻新品种开辟了一条新途径。本文就海藻原生质体的制备与再生、融合与杂交等问题予以综合评述,以期利用该技术改良海藻提供参考。

### 1 海藻原生质体的制备及培养技术

海藻原生质体的制备方法有机械法、微生物酶解法和酶法。其中机械法由于原生质体得率太低,费时费力,目前已很少使用。微生物酶解法是利用海洋细菌与藻体共培养过程中释放出来的特殊酶,把海藻细胞壁分解掉从而得到原生质体,这实际也是酶法。由于酶法是特定的酶水解藻细胞壁,具有很强的专一性,同时酶解的条件十分温和,在细胞能够承受的范围之内,所以对细胞无伤害,而且酶法效率高,从而能

获得大量的有活力的原生质体。

用于原生质体制备的酶类,大约有两种来源:

(1) 微生物来源的海藻解壁酶。如从假单胞菌 (*Pseudomonas* sp.)<sup>[5]</sup>、产气单胞菌 (*Aeromonas* sp.)、弧菌 (*Vibrio* sp.)、埃氏交替单胞菌 (*Alteromonas espejana*)<sup>[1]</sup> 的发酵液或培养液中提取粗酶,这种粗酶可用于分离原生质体。微生物来源的海藻解壁酶有:琼胶酶、褐藻酸酶、卡拉胶酶、甘露聚糖酶、木聚糖酶、紫菜聚糖酶<sup>[2]</sup>。

(2) 动物来源的海藻解壁酶。如查向东等<sup>[3]</sup>从海兔 (*Aplysia vaccaria*) 中提取褐藻酸酶,从疣鲍 (*Haliotis tuberculata*) 中提取鲍酶; Mzuka 等 1992 年从紫海胆 (*Anthodanus cmissipina*) 提取海胆酶。韩宝芹等<sup>[2]</sup>研究了 14 种无脊椎动物消化酶液对海藻的解壁作用,最终从滩栖螺、石鳖和笠贝中制备出海螺酶 III、石鳖酶和笠贝酶,并研究了这 3 种酶对 4 种绿藻、7 种红藻和 3 种褐藻细胞的解壁作用。

目前用于制备原生质体的酶类,如纤维素酶、半纤维素酶、果胶酶、崩溃酶、离析酶等,已有商品出售。

海洋藻类的细胞操作可以追溯到 50 年代末期, Fushs 利用丝状体蓝藻 (*Oscillatoria aeneo*) 制备得到原生质体。到 70 年代后期,其他种类的海藻原生质体的制备也获得了成功。如 Kobayashi 用机械法挤压出羽藻 (*Brnopsis maxima*) 的原生质体; Beniner 用 0.5% Cellulysin (含纤维素酶和半纤维素酶) 酶解得到小球

\* 国家 863 青年基金资助项目 863-819-Q17 号。

收稿日期:2000-04-28;修回日期:2000-05-16

藻(*Chlorella vulgaris*)的原生质体;Milner等用酶法分离到肠浒藻(*Enteromorpha intestinales*)原生质体,但未能再生出植株;Saga和Sakai分离到海带(*Laminaria japonica*)、巨藻(*Macrocystis pyrifera*)和马尾藻(*Sargassum muticum*)的原生质体,并把巨藻和马尾藻的原生质体培养成株;Cheney获得江蓠(*Gelidium tikvahiae*)的原生质体,目前已培养成株;周一红、王素娟获得鹧鸪菜(*Caloglossa leprieurii*)的原生质体并培养成株;Kloareg等已研究成功了从Laminariales和Gracilinales两个目的海藻中大量制备原生质体及其再生成苗的技术;Majjad等1992年从*Laminaria digitata*,*Macrocystis pyrifera*,*Undaria pinnatifida*,*Alaria esculenta*的配子体中获得原生质体并培养成正常的丝状体。查向东等<sup>[3]</sup>利用褐藻胶酶和纤维素酶获得裙带菜配子体原生质体,并经4~5周再生成为与普通配子体大小和形状相同的新的配子体。

对细胞壁的酶解过程有人也作了研究。如Yamada等1982年利用透射显微技术和扫描显微技术对小球藻(*Chlorella ellipsoidea*)酶解过程中的细胞超微结构作了研究,试图解释藻细胞能形成原生质体以及阐述细胞壁结构和细胞稳定性之间的关系。

对影响酶解效果的各种因素也作了研究。王素娟等<sup>[4]</sup>通过羊栖菜(*Sargassum fusciprume*)原生质体的分离和培养,明确了原生质体酶解的内在因素和外在此条件,诸如酶溶剂的种类与浓度、酶及其组成、酶解温度及pH、采收时间及采用部位等。Reddy等1989年比较了各种食品酶及粗酶对*Ulva pertusa*,*U. fasciata*和*U. conglobata*的酶解效果,并发现原生质体在同一条件下再生,呈现两种再生模式:一部分原生质体在细胞壁再生后正常分裂形成藻株,另一部分原生质体在细胞壁再生后先转化为生殖细胞,产生许多游动的孢子,然后再萌发生成正常藻株。

以上成果的取得是与分离方法的建立分不开的。蓝藻细胞壁含有粘肽,因而可以用溶菌酶消化的方法制备蓝藻的原生质体。绿藻细胞壁含有纤维素,其原生质体的制备是在Takebe用酶解法获得烟草叶肉细胞原生质体。微藻原生质体分离成功,为80年代大型海藻原生质体分离和培养研究工作奠定了基础。

## 2 海藻原生质体融合与杂交技术

在原生质体分离过程中,有些相邻的原生质体

会自发地彼此融合而形成同核体,但这种自发的细胞融合在体细胞杂交中并没有实际意义。为实现不同来源的原生质体的诱导融合,一般需要一种适当的融合剂,如NaNO<sub>3</sub>、高pH-高钙离子和聚乙二醇等,它们都曾得到了广泛的应用。电融合技术自建立以来发展很快,目前已被广泛地应用。尽管目前的融合效率已有很大提高,但仍避免不了同一亲本的原生质体之间相互融合以及多个原生质体融合在一起的情况。真正两亲本之间的一比一融合的效率仍然很低。Schweiger将电融合与微培养技术结合起来,建立了单细胞融合体系是近年来最突出的进展。这种方法是将异源的两个原生质体移至微滴融合液中,用直径为50 μm的白金电极在倒置显微镜下进行显微操作,然后将细胞移到覆盖有矿物油的微滴培养基中(每滴约50 nl)培养。这套微培养、融合系统与电子计算机控制的马达联系起来,大大提高了操作速度,成为非常有前途的技术体系。它不仅是融合方法上的改进,也基本上解决了融合细胞的选择问题。

细胞融合和细胞杂交技术,使存在很大差异的细胞质和染色体的重组成为可能。近年来无论是采用化学融合法还是电融合法,陆生植物的细胞融合已取得了很大成功,使用常规方法难以实现的育种成为可能。该技术具有很大的潜在应用前景,在海洋大型藻类细胞融合方面已有报道,如Fugita等1990年,Dai等1993年报道的聚乙二醇(PEG)介导的化学融合;Mzuka等1992、1993年报道的电融合;Chen等1995年报道了电融合介导的两种*Porphyra*(*P. linearis*和*P. miniata*)间的细胞融合;Dai等1993年报道了PEG介导的两种*Porphyra*的种间细胞融合。张大力用纤维素酶(Onozuka R10)制备出袋礁膜(*Mnostenoma angustacava*)和长石莼(*Ulva linza*)的原生质体,然后经PEG诱导融合得异质融合子,培养成细胞团,外观象礁膜。

微藻细胞融合的研究从70年代开始,研究者首先利用某些微藻的缺壁变种进行细胞融合的研究。一些研究者利用盐藻和紫球藻等的原生质体进行了细胞种内和种间的杂交融合研究,并获得了成功。在日本曾有小球藻种内细胞融合的成功报道,并申请了专利。Sivan等1995年用紫球藻的低藻蛋白突变体与绿色突变体进行原生质体融合,得到8个呈红色的融合子,说明融合子具有藻红蛋白缺失的互补作用。融合子的藻胆蛋白和叶绿素含量均比突变体亲本高,接

近野生型,其中一株 DNA 含量为野生型 DNA 含量 2 倍的稳定二倍体。Tjahjono 1994 年对绿藻 (*Ulothrix closterium*) 的抗抑制物突变体之间进行原生质体融合,所产生的杂交株,类胡萝卜素的形成能力比亲本和野生型高 3 倍。刘广发等 1993 年用链霉菌蛋白酶制得杜氏藻 (*Dunaliella* sp.) 的原生质体,采用聚乙二醇 (PEG) - 钙离子法将它们与大肠杆菌 (含氯霉素乙酰转移酶质粒) 的球状体进行融合。融合体酷似杜氏盐藻。它们对氯霉素 (Cm) 抗性的显著提高暗示了大肠杆菌的质粒已转移到融合体细胞中,而且融合体的蛋白组分与杜氏藻和大肠杆菌相比,已发生了较明显的变化。尽管从融合子对 Cm 抗性之高可推测大肠杆菌的质粒已转入杜氏藻中,但遗憾的是未能从融合子中提取到该质粒,它们对 Cm 的抗性随着传代也逐渐降低。实际上杜氏藻是把比它小得多的大肠杆菌整个吞入细胞内的,大肠杆菌能否存活? 能否复制? 正如线粒体的“内共生学说”那样,这是个令人感兴趣的问题。

对影响细胞融合效率的因素也作了研究。如 Mzuka mi 等 1992 年研究了细胞壁水解酶对 *Porphyra yezoensis* 细胞融合效率的影响。实验结果表明,来自海胆 (*Anthocidaris crassispina*) 和假单胞菌 (*Pseudomonas* sp.) 的粗酶混合物对原生质体电融合的效果最佳;对原生质体存活率的研究结果表明,在细胞壁水解酶处理过程中原生质体的活力极大影响着电融合效率。Mzuka mi 等 1993 年对影响 *Porphyra yezoensis* 细胞融合效率的因素,如渗透压调节剂、二价阳离子、细胞膜消化酶和原生质体的冷冻贮存做了研究,结果表明,甘露糖或山梨糖醇在浓度为 0.6 ~ 0.7 mol/L 时效果最佳,葡萄糖次之;原生质体经链霉菌蛋白酶处理有助于电融合,而经蛋白酶 K、胰蛋白酶、磷脂酶 C 或脂肪酶处理则抑制细胞融合;添加  $10^{-5} \sim 10^{-4}$  mol/L 的  $Ca^{2+}$  能使融合效率提高约 4 倍,  $Sr^{2+}$  和  $Co^{2+}$  也能促进融合,但效果不如  $Ca^{2+}$  明显;原生质体冷冻保存 3 h 融合能力基本保持不变,但在室温时融合能力会逐渐消失。

在我国细胞融合和杂交技术也得到了广泛应用,但大都集中于陆生植物细胞的融合研究方面,在海洋

藻类上只有极少数的报道。戴继勋等用 PEG 融合法对刚分离的坛紫菜和条斑紫菜原生质体进行融合,单个的异质融合体被挑选出来培养,1 周后开始第 1 次分裂,4 周后发育成细胞团,但不能分化出完整的植株。

### 3 海藻原生质体融合与杂交技术目前存在的问题

海藻的原生质体融合与杂交技术虽取得了较大的发展,但也存在着许多问题和困难。虽然细胞融合阶段不存在异种间的任何不亲和性,但在核融合、染色体交换、杂交,以及融合杂种细胞随后的发育过程中,远源物种之间仍存在着严重的不亲和性和排斥性。有时并未发生真正的核融合,两亲本的染色体是相互保守甚至是排斥,它们所带的基因无法在一个细胞中同时表达出来,最终产生了分离。原生质体融合与杂交技术的另一困难是杂种鉴定问题。杂种鉴定往往要从遗传、生化等方面获得有利的证据。所以首选两亲本也应有某些生化或遗传标记,但在自然界带有这类标记的海藻很少,虽可以人工诱导产生突变体,而获得一个真正的突变体不经过几年的时间是无法获得的。体细胞杂交研究目前属于应用基础与基本理论研究的范畴,它涉及核质关系、不亲和性、细胞分裂的控制、植物细胞全能性的机理、遗传物质重组等诸多方面,通过细胞融合获得一个真正核融合的杂种并非易事。

#### 参考文献

- 1 韩宝芹、戴继勋、刘万顺等。海洋学报,1998,20(2):90~95
- 2 韩宝芹、刘万顺、王海等。海洋科学,1997,3:47~49
- 3 查向东 & Klöpper B.。安徽农业大学学报,1996,23(4):602~605
- 4 王素娟、孙云龙、马凌波等。水产学报,1996,20(3):241~249
- 5 Fugita Y. & Mgita S. J. *Phycol.*,1997,35:201~208

(本文编辑:刘珊珊)