

研究简报

# 钝顶螺旋藻质粒的电镜 观察及杂交研究\*

秦松 童顺 崔武<sup>†</sup> 李亚菲<sup>††</sup> 王希华  
武建秋 吴光耀<sup>†</sup> 张培军 曾呈奎

(中国科学院海洋研究所, 青岛 266071)

(<sup>†</sup>北京大学生物系, 北京 100871)

(<sup>††</sup>中国人民解放军肝病研究所, 北京 100700)

**提要** 于1992年6月—1993年4月, 对钝顶螺旋藻质粒进行透射电镜观察及分子杂交研究。结果表明, 利用单层分子膜展开技术, 能够观察到超螺旋以及闭合环形的质粒图象;  $S_0$  质粒大小的平均值约为 2.0kb, 与电泳检测的结果稍有出入。斑点杂交结果表明, 不同形态藻株  $S_0$ 、 $F_2$ 、 $F_3$  弯与  $F_3$  直质粒之间具有一定同源性, 与染色体 DNA 之间均显示同源性。对钝顶螺旋藻质粒的进一步研究将推动其基因工程育种的开展。

**关键词** 蓝藻 钝顶螺旋藻 质粒

蓝藻是具植物型放氧光合作用的原核生物。一些蓝藻蛋白质含量高, 富含生物活性物质, 利用价值极高; 同时具有类似于革兰氏阴性细菌的独特遗传结构, 因而使其成为分子遗传学研究的理想材料, 近年来广泛应用于光合作用、固氮作用、叶绿体起源及植物进化等重大生物学问题研究中。随着质粒及天然重组转化系统的发现及研究, 蓝藻分子遗传学发展很快, 基因工程蓬勃兴起(秦松, 1993; 秦松等, 1993)。

钝顶螺旋藻是一种高蛋白蓝藻, “七五”攻关以来, 品种改良成为大面积生产的首要问题, 鉴于其分子遗传学研究薄弱, 作者对其有关基因结构与功能进行了研究, 首次从钝顶螺旋藻中分离到质粒(Qin et al., 1993), 并对遗传转化开展了研究。不论从分子遗传学基础研究的角度, 还是从作为基因工程载体应用的角度, 都需对钝顶螺旋藻质粒的来源、功能进行研究。本文报道电镜和杂交研究的新进展。

## 1. 材料与方法

**1.1 藻种** 钝顶螺旋藻 (*Spirulina platensis*)  $S_0$  及  $F_3$  藻株, 于1991年8月由中国科学院海洋研究所谭桂英副教授提供。1992年9月起, 从  $F_3$  中挑出直藻株、弯藻株分别

\* 中国科学院海洋研究所调查研究报告第2338号。中国科学院院长基金部分资助, 中国科学院海洋研究所所长基金资助。博士论文一部分。

收稿日期: 1994年3月16日, 接受日期: 1994年5月4日。

单藻培养, 获单藻藻株  $F_3$  直及  $F_3$  弯。均在 Zarrouk<sup>1)</sup> 培养基中, 于  $30.0 \pm 0.5^\circ\text{C}$ , 3 000 lx(12h/12h) 培养。

**1.2 质粒的提取与观察** 快速少量提取, 采用本实验室改进的碱变性法 (Qin et al., 1993)。大量提取, 根据 Humphreys 等 (1975) CsCl 密度梯度离心法, 略作改进。CsCl 起始密度为  $1.6\text{g}/\text{cm}^3$ , EtBr 终浓度为  $160\mu\text{g}/\text{ml}$ 。Beckman LB80 超速离心机, VTi-65 垂直转头, 于  $50\ 000\text{r}/\text{min}$  离心 24h。质粒样品的透射电镜观察, 对 Kleinschmidt (1968) 单层分子膜展开方法稍作改动。CytC 浓度为  $0.1\text{mg}/\text{ml}$ , 采用铂角度喷镀, 激发电压为  $80\text{kV}$ 。

**1.3 总 DNA 提取** 参考 Smoker 等 (1988) 方法。染色体 DNA 用低熔点琼脂糖胶方法 (Maniatis et al., 1982) 回收。

**1.4 探针标记及斑点杂交** 据 Maniatis 等 (1982), 采用缺口平移法标记  $F_3$  质粒及  $S_6$  质粒  $P^{32}$  探针, 分别与  $S_6, F_3, F_3$  直,  $F_3$  弯质粒, 以及总 DNA、染色体 DNA 进行斑点杂交。质粒点样量为  $2\text{ng}$ , 总 DNA 为  $1\mu\text{g}$ , 染色体 DNA 为  $1\mu\text{g}$ 。

## 2 结果与讨论

不论采用 EtBr-CsCl 密度梯度离心法 (图版 I:3), 还是采用本实验室发展的快速简便的超声波-碱变性提取法, 从  $F_3, F_3$  直,  $F_3$  弯藻株提取的质粒大小均相同, 约为  $1.8\text{kb}$ , 而  $S_6$  藻株质粒约为  $2.4\text{kb}$  (电泳作图结果未显示)。另据本文透射电镜研究结果 (图版 I:4, I:5), 取 20 个环形  $S_6$  质粒, 取其长度平均值来估算  $S_6$  质粒的大小, 约为  $2.0\text{kb}$ , 可能由于制膜与转移时伸展或压缩引起误差, 需对  $F_3, F_3$  直与  $F_3$  弯质粒形态观察及长度测算后得出进一步结论。超速离心分离螺旋藻质粒, 需一天多时间, 而采用超声波断裂藻丝体、破壁, 结合碱变性方法去除染色体, 3h 以内即可获得结果, CCC 型质粒得率高, 而且节省溶菌酶, 再次证明了这种方法的优点。 $S_6$  是松弛螺旋的单藻藻株 (Qin et al., 1993),  $F_3$  由大约 1:1 的紧密螺旋 (即  $F_3$  弯, 见图版 I:1) 和直藻突变藻株 (即  $F_3$  直, 见图版 I:2) 组成,  $S_6$  与  $F_3$  质粒大小不同,  $F_3$  直、 $F_3$  弯与  $F_3$  质粒大小相同, 质粒与形态之间关系有待进一步研究。

自从 1973 年 Asato 等首次在蓝藻中发现质粒以来, 人们已陆续在近 50 株蓝藻中检测到质粒, 约占被检藻的 50%。研究表明, 其存在与蓝藻毒性、对金属及药物的抗性无关 (Bose et al., 1990; 李庆顺, 1991)。结合本研究结果, 迄今为止, 仍无其遗传功能的明确证据, 被推测为隐秘型质粒。

从分子杂交结果 (图版 I:6—7) 来看,  $F_3$  与  $F_3$  直、 $F_3$  弯之间质粒具有一定同源性, 而且与  $S_6$  之间亦具有同源性; 质粒与染色体之间具有明显同源性。Hondel (1979) 等根据酶切图谱态型分析, 证明了蓝藻 *Synechococcus* PCC6301, 6307 与 6908 质粒之间具有同源性, 并推测可能存在不同藻株之间质粒转移的机制。Lau 等 (1980) 通过 Southern 杂交方法确定了多种蓝藻质粒的同源区域, 推测这些区域可能含有“转移片段” (transposable genetic element)。本实验提示了钝顶螺旋藻各藻株之间质粒的差异及同源性。与

1) Zarrouk, C., 1966, Contribution al l'Etude d'une Cyanophyce Influence de Divers Facteurs Physiques et Chimiques Surlas Croissance et la Photosynthesis de *Spirulina maxima*, Thesis, Univ. Paris.

染色体之间的同源性提示,质粒间以及质粒和染色体之间具有重组的可能性。这种推测仍需进一步研究。

目前有关酶切工作正在开展,以期构建杂交质粒,导入外源基因,培育优良品种,促进螺旋藻养殖业的进一步发展。

### 参 考 文 献

- 李庆顺,1991,蓝藻的抗药性及其诱导与质粒关系,厦门大学学报(自然科学版),30(2): 198—203。
- 秦松,1993,从第九届国际光合作用大会看藻类分子遗传学发展趋势,海洋与湖沼,24(6): 656—663。
- 秦松、曾呈奎,1993,藻类分子遗传学和基因工程研究,中国海洋科学研究及开发,青岛出版社(青岛),105—108。
- Asato, Y. et al., 1973, Separation of small circular DNA molecules from the blue-green alga *Anacystis nidulans*, *Nature New Biol.*, 244:132—133.
- Bose, S. G. et al., 1990, Plasmid distribution among unicellular and filamentous toxic cyanobacteria, *J. Appl. Phycol.*, 2:131—136.
- Hondel van den, C. A. M. J. J. et al., 1979, Homology of plasmids in strains of unicellular cyanobacteria, *Plasmid.*, 2:323—333.
- Humphreys, G. O. et al., 1975, A simple method for the preparation of large quantities of pure plasmid DNA, *Biochimica et Biophysica Acta*, 383: 457—463.
- Kleinschmidt, A. K., 1968, Monolayer techniques in electron microscopy of nucleic acid molecules, *Methods in Enzymology*, Academic Press (New York), pp. 361—377.
- Lau, R. H. et al., 1980, Cyanobacterial plasmids: their widespread occurrence, and the existence of regions of homology between plasmids in the same and different species, *Mol. Gen. Genet.*, 178:203—211.
- Maniatis, T. et al., 1982, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory (Cold Spring Harbor), pp. 6.30—6.31, 10.6—10.10.
- Qin, S. et al., 1993, Isolation of plasmid from the blue-green alga—*Spirulina platensis*, *Chin. J. Oceanol. Limnol.*, 11(3):285—288.
- Smoker, J. A., Barnum, S., 1988, Rapid small-scale DNA isolation from filamentous cyanobacteria, *FEMS Microbiol. Lett.*, 56:119—122.

## TEM OBSERVATION AND HYBRIDIZATION STUDY OF PLASMID FROM *SPIRULINA PLATENSIS*

Qin Song, Tong Shun, Cui Wu<sup>†</sup>, Li Yafei<sup>††</sup>, Wang Xihua, Wu Jianqiu,  
Wu Guangyao<sup>†</sup>, Zhang Peijun, Zeng Chengkui (C. K. Tseng)  
(*Institute of Oceanology, Academia Sinica, Qingdao 266071*)  
(*†Department of Biology, Beijing University, Beijing 100871*)  
(*††Institute for Liver Diseases, PLA, Beijing 100700*)

### ABSTRACT

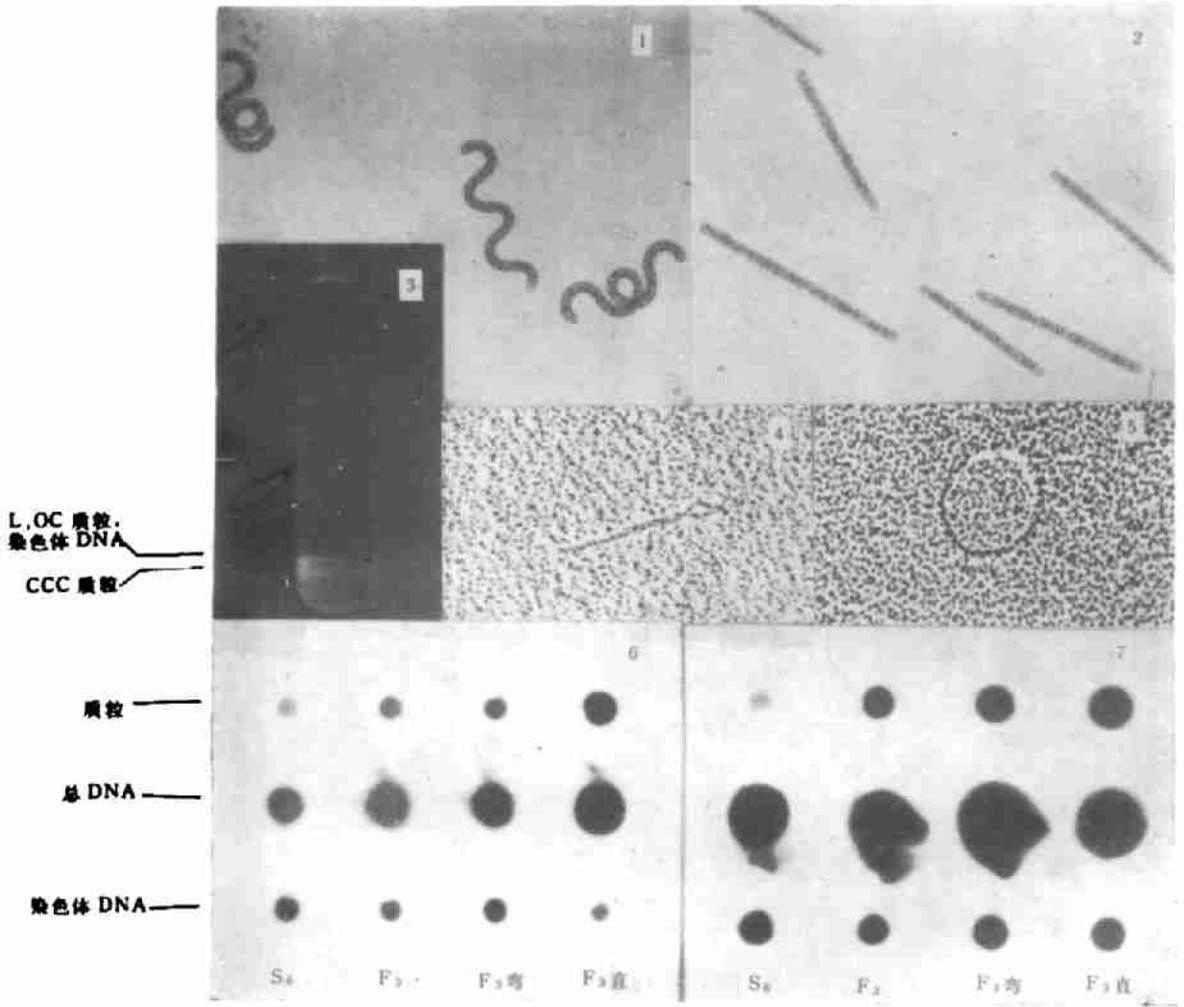
Transmission electron microscopic observation and hybridization study of the plasmid from *Spirulina platensis* were carried out from June, 1992 to April, 1993. Supercoiled and closed circular patterns were observed under a transmission electron microscope. The size of the plasmid from S<sub>6</sub> strain was about 2.0kb, which was slightly different from the result of electrophoresis. Results of dot blotting show that plasmids from strains of S<sub>6</sub>, F<sub>3</sub>, F<sub>3</sub> spiral and F<sub>3</sub> straight differing in form are homologous to each other and are also homologous to chromosomal DNAs.

**Key words** Cyanophyte *Spirulina platensis* Plasmid

### 《湖泊科学》征订启事

《湖泊科学》是由中国科学院南京地理与湖泊研究所和中国海洋湖沼学会主办, 科学出版社出版, 国内外公开发行的综合性、前沿性学报级刊物。

本刊刊载的稿件主要反映湖泊(含水库)及其流域的环境演变和资源综合利用的学术成果。刊登湖泊物理、湖水化学、水文气象、沉积地貌、水生生物、水产养殖、生态环境、工程治理和资源开发等方面的论文、简报和综述, 适合从事湖泊、水库研究和管理以及湖泊、水库(如地理、地质、石油、沉积、水产、生物生态、环保、水文、气象等)范围内的科技管理人员及大专院校师生阅读。本刊为季刊, 96页, 定价每期5.5元, 全年22元, 邮发代号28-201, 可通过当地邮局, 或汇款至编辑部订阅(邮编210008), 中国科学院南京地理与湖泊研究所, 帐号为: 南京市工商银行成贤街分理处 2588-04520。



图版 I 钝顶螺旋藻质粒的分离、观察与杂交结果

Plate I Isolation and characterization of the plasmid from *Spirulina platensis*

1.  $F_3$  弯藻株 ( $F_3$  spiral strain)  $\times 150$ ; 2.  $F_3$  直藻株 ( $F_3$  straight strain)  $\times 150$ ; 3. 总 DNA 的 EtBr-CsCl 密度梯度 (EtBr-CsCl gradient of total DNA); 4. 透射电镜下  $S_4$  质粒的超螺旋图像 (a supercoiled plasmid from  $S_4$  strain, under TEM)  $\times 8 \times 10^4$ ; 5.  $S_4$  质粒的环形图像 (a circular plasmid from  $S_4$  strain, under SEM)  $\times 8 \times 10^4$ ; 6. 以  $S_4$  质粒为探针的斑点杂交结果 (dot blotting,  $S_4$  plasmid as probe); 7. 以  $F_3$  质粒为探针的斑点杂交结果 (dot blotting,  $F_3$  plasmid as probe).