

钝顶螺旋藻部分原生质体 及单细胞的制备与培养*

秦松 王希华 童顺 曾呈奎

(中国科学院海洋研究所, 青岛 266071)

摘要 于1992年1月—1994年4月, 进行超声波处理方法制备钝顶螺旋藻部分原生质体以作为基因工程受体, 以及制备单细胞用于固体平板克隆化培养的研究。研究表明: 超声波以20kHz频率、15W功率作用30s, 可使藻丝体断裂成 15.0 ± 1.6 个细胞长度; 延长作用时间, 至2—6个细胞长度时, 细胞壁结构遭到破坏, 形成部分原生质体; 继续作用, 可形成少量原生质体和大量单细胞。断裂藻丝体、部分原生质体、单细胞以及原生质体均可涂布于固体培养基上再生或生长。以一定密度涂布单细胞与原生质体, 能够形成彼此分开的单个克隆, 可用于筛选及遗传分析。本文提供了一种节省溶菌酶的制备螺旋藻透性体的方法, 超声波作用于外源基因的导入, 而涂布培养利于进一步的筛选和形成克隆。

关键词 钝顶螺旋藻 单细胞 透性体 克隆 原生质体

钝顶螺旋藻是一种丝状蓝藻, 经济价值很高。“七五”攻关以来, 我国的螺旋藻研究和开发已全面开展, 正在向大规模生产应用的方向发展。品种改良为大面积生产的首要问题, 迫切需要耐低温和低重碳酸盐品系, 以扩大养殖的地理范围和降低生产成本。作者一方面开展了分子遗传学基础研究 (Qin et al., 1993)¹⁾, 同时开展了遗传转化的有关研究。制备透性体和单细胞克隆是遗传转化和遗传选择的技术基础。周金鑫等²⁾用溶菌酶制备了钝顶螺旋藻细胞球形体并再生藻丝体, 彭国宏等³⁾用机械与酶相结合的方法制备了钝顶螺旋藻圆形原生质球并再生藻丝体。本文报道利用超声波制备钝顶螺旋藻透性体和单克隆的研究结果。

1 材料与方 法

1.1 材料及培养方法 钝顶螺旋藻 (*Spirulina platensis*) S₆ 藻株由本所谭桂英副教授

* 博士论文一部分。秦松, 男, 出生于1968年5月, 博士。

张学成、谭桂英二位教授提出宝贵意见, 周汉秋先生协助摄影, 谨志谢忱。

收稿日期: 1994年5月9日, 接受日期: 1994年7月6日。

1) Qin, S. et al., 1994, Molecular cloning and expression of the allophycocyanin gene from *Spirulina platensis*. (in press)

2) 周金鑫等, 1993, 螺旋藻细胞球形体的制备和再生培养研究, 中国生物工程学会成立大会论文摘要集, 316。

3) 彭国宏等, 1994, 螺旋藻原生质球的分离、培养和再生, 中国科学院海洋研究所实验海洋生物学开放实验室研究年报, pp. 139。

授惠赠,在 Zarrouk 培养基 (Zarrouk, 1966)¹⁾ 中,于 $30^{\circ} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$, 3 000lx (12h/12h) 培养。同样条件下进行固体平板培养。

1.2 超声波处理 采用美国 Cole Parmer 公司超声波匀浆器 (Ultrasonic Homogenizer), 输出功率为 15W, 频率为 20kHz。取处于生长指数期的藻丝体, 摇匀后计数(藻丝体/ml)。对照及处理各组, 均从中吸出 1ml, 至 1.5ml Eppendorf 离心管中。置管于冰浴中, 以消除热作用影响, 伸入超声波匀浆器探头 1cm, 并使之居中不接触管壁。处理时间依次为 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30s 与 60s。处理完毕后立即计数(藻丝体/ml), 并随机测量 20 根藻丝体长度, 根据每个细胞长度(施定基等, 1991) 计算每根藻丝体细胞的个数。

1.3 显微及荧光观察 显微观察用 Opton 显微镜。加一滴 VBL 型荧光增白剂(青岛肥皂厂)(0.1% W/V, 溶于 0.7mol/L NaCl 中), 染色 5min, 用 Epifluorescent 物镜, UV 蓝紫 (370nm) 激发荧光, 观察壁的有无。

1.4 涂布培养及观察 将超声波处理 120s 及 180s 的藻液, 均按 10^0-10^{-2} 稀释, 涂布于固体 Zarrouk 培养基平板, 每板涂 0.2ml。用 Opton 解剖镜, 2d 观察一次。另将对照藻液同法涂布观察。

1.5 质粒提取与电泳 按 Qin 等 (1993) 方法。

2 结果与讨论

2.1 超声波对藻丝体的断裂作用 实验结果表明, 在一定条件下, 一定时间内, 藻丝体浓度随作用时间增加而增加, 同时长度随之减短(表 1)(图版 I:1—3)。频率不变, 增大输出功率, 作用强度增强, 表现为藻丝体浓度增加和长度减短的幅度增大。超声波以一定频率、一定输出功率作用一定时间, 可使藻丝体断裂成一定长度。

表 1 超声波对螺旋藻藻丝体的断裂作用(频率: 20kHz)

Tab. 1 Destruction of filaments of *Spirulina platensis* by ultrasonics

处理时间 (s)	0		5		10		20		30		60	
	10	15	10	15	10	15	10	15	10	15	10	15
藻丝体浓度 ($10^4/\text{ml}$)	30	30	35	40	45	55	50	70	60	80	75	110
藻丝体长度 (细胞个数)	121.4 ± 28.0	135.0 ± 35.0	66.1 ± 13.8	47.0 ± 19.5	27.9 ± 7.8	25.8 ± 12.0	21.1 ± 3.0	19.5 ± 2.8	19.1 ± 2.8	15.0 ± 1.6	17.0 ± 2.0	5.9 ± 2.0

在频率为 20kHz、输出功率为 15W 条件下, 超声波作用 60—90s, 大部分藻丝体为 2—6 个细胞长度时(图版 I:3), 结合荧光观察, 发现细胞壁结构已遭到明显破坏(图版 II:1—2), 有些细胞显示荧光增白剂着壁的白色荧光, 而有些细胞显示叶绿体的自发红色荧光, 说明壁已不存在, 这时的藻丝体为部分原生质体。以 20kHz, 15W 超声波处

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

理钝顶螺旋藻 S_6 及 F_3 品系 30s, 用碱变性去除染色体 DNA, 可得到一条 CCC 型质粒电泳条带 (Qin et al., 1993), 说明在作用 30s、藻丝体长度约为 15 个细胞时, 细胞壁结构即有所破坏, 质粒释放; 如果不用碱变性处理, 直接经异丙醇沉淀和苯酚、氯仿抽提, 电泳结果除显示一条质粒带外, 另有一条弱的染色体带, 说明染色体片断也释放出来。结合荧光观察, 红色荧光不明显(结果未提供), 尚需用更高倍的物镜观察。如果延长处理时间, 即使用碱也不能完全除去染色体带。因此超声波提供了一种断裂丝状蓝藻、提取 DNA 的方法, 节省溶菌酶, 简捷方便, 特别是 CCC 型质粒的得率高 (Qin et al., 1993)。提示在部分原生质体阶段可以导入外源 DNA, 进行遗传转化研究。

目前稳定的丝状蓝藻转化系统尚未建立, 用接合转移的方式引入 DNA (王业勤等, 1992), 超声波处理可能成为丝状蓝藻遗传转化研究的有用方法。

超声波的生物学作用机制比较复杂, 主要是空化作用引起机械力和热作用。在空泡湮灭的过程中, 产生球形冲击波和高温, 甚至产生电离效应和放电, 可能导致空泡周围细胞壁和质膜的击穿或可逆的质膜透性改变(路德明等, 1992; 章力建等, 1991)。本文结果验证了超声波的击断藻丝体和破坏、去除细胞壁的生物学效应。

章力建等(1991)通过超声波处理将 GUS 基因导入完整的烟草叶片细胞中, 获得瞬间表达; 经选择培养基筛选获得转基因植株, 稳定转化率达 22.3%, 建立了高效转化系统。本文结果可能提供一种有效的丝状藻转化方法。

值得指出的是藻丝体长度, 作者从谭桂英处引入的 S_6 品系经培养比其本人报道(谭桂英等, 1993)的藻丝体长度大为缩短(图版 I:1), 照片上的短的藻丝体为刚断裂生殖产生的。从图版 I:2 看到一根比其余藻丝体长出一倍的藻丝体, 这是由于超声波作用的不均匀性造成的。在 20kHz, 15W 作用 90s 时, 单个球形细胞(图版 I:4)约占 55.6%; 作用 120s, 约占 72.7%; 作用 180s, 约占 91.7%。荧光增白剂染色观察, 绝大部分为发白色荧光的球形细胞(图版 II:4), 少数为原生质体(图版 II:3), 这时已完全脱去细胞壁, 但数量不多, 可能由于渗透压不合适造成原生质体破裂, 有待改进后细究。

以 10^{-2} 稀释 120s 及 180s 处理的藻丝体, 大约每只平板(直径 9cm)上 6 000—10 000 个原生质体或单细胞, 涂布培养约 60d 后形成能在解剖镜($\times 25$)下观察得到的彼此分开的单根藻丝体(图版 I:5), 大部分藻丝体由一个原生质体或单细胞再生, 具有遗传匀质性, 为一个克隆。而直接涂布不经超声波处理的藻丝体, 经培养则形成彼此缠绕的藻落(图版 I:6)。断裂藻丝体, 特别是 60—90s 处理的部分原生质体, 以适当密度稀释、涂布, 培养后亦可长成彼此分开的藻丝体。如选用适当的选择培养基, 可用于遗传筛选。Wolk 等(1973)曾用超声波的方法将丝状蓝藻鱼腥藻断裂成大约一个细胞长短, 经涂布培养成为肉眼可见的彼此分开的藻落。本实验并未发现藻丝体克隆在平板上的断裂、迁移现象, 因而无法形成肉眼可见的克隆。Wolk 等(1973)据此发展了一种影印方法以用于遗传分析。作者可用解剖镜下挑出单根藻丝体克隆的方法, 选择具有特定遗传类型的品系, 既可用于自发突变、人工诱变的研究, 亦可用于转基因蓝藻的筛选。

参 考 文 献

王业勤、徐旭东、黎尚豪, 1991, 蓝藻分子遗传学十年研究进展, 水生生物学报, 15(4): 356—367。

- 施定基、王起华,1991,几种海洋蓝细菌的形态和光合作用特性的比较研究,中国科学院海洋研究所实验海洋生物学开放研究实验室研究年报,1: 58—66。
- 章力建等,1991,超声波法直接导入外源基因: 高效烟草转化系统的建立,中国农业科学,24(2): 83—89。
- 路德明、张中南、夏翀,1992,超声波对盐藻的破碎作用,青岛海洋大学学报,22(3): 18—22。
- 谭桂英、周百成,1993,钝顶螺旋藻优良品系 S₄ 的生长特性及光合特性的研究,海洋学报,15(3): 88—93。
- Qin, S. et al., 1993, Isolation of plasmid from the blue-green alga *Spirulina platensis*, *Chin. J. Oceanol. Limnol.*,11(3): 285—288.
- Wolk, C. P., Wojciuch, E., 1973, Simple methods for plating single vegetative cells of, and for replating, filamentous blue-green algae, *Arch. Mikrobiol.*, 91:91—95.

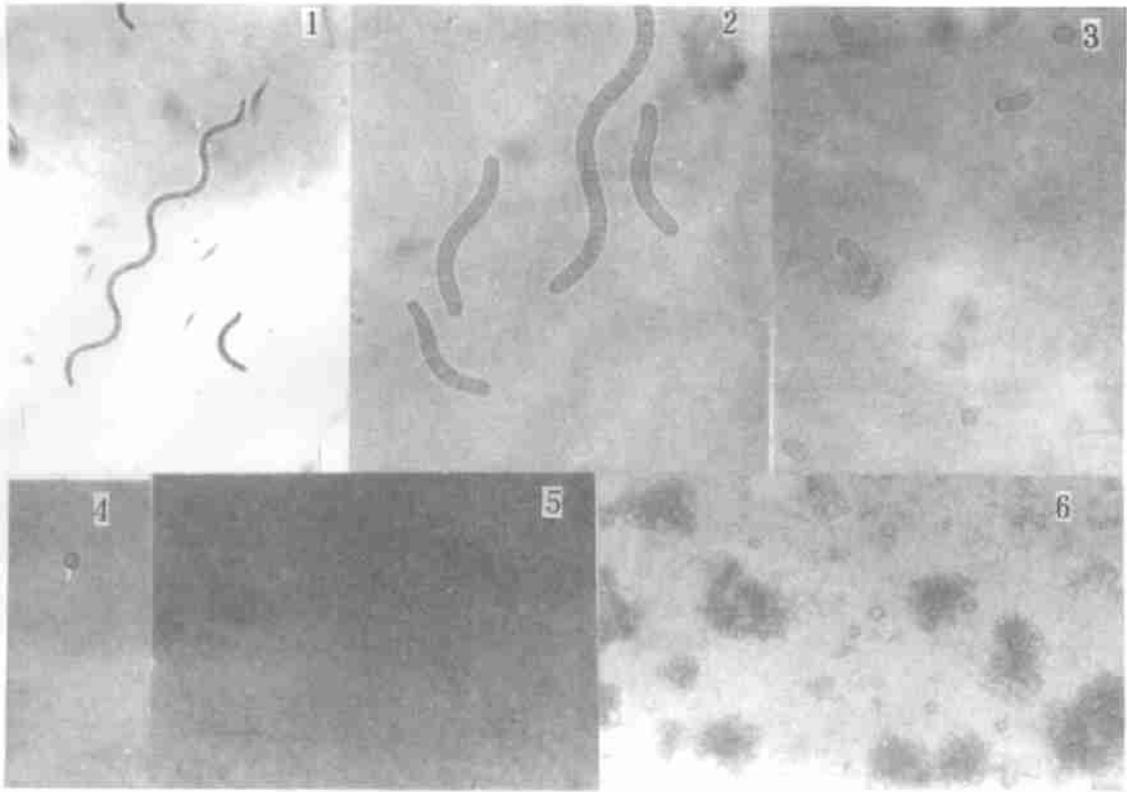
ISOLATION AND CULTURE OF PERMEAPLASTS AND SINGLE CELLS FROM *SPIRULINA PLATENSIS*

Qin Song, Wang Xihua, Tong Shun, Zeng Chengkui (C. K. Tseng)
(*Institute of Oceanology, Academia Sinica, Qingdao 266071*)

ABSTRACT

Jan., 1992 to April, 1994 studies carried out on isolation of spheroplasts for gene introduction and single cell for plating showed: 1. filaments of *Spirulina platensis* can be broken by ultrasonics into disired average length fragments; 2. when the length was 2—6 cells, cell walls were partially removed and permeaplasts were formed; 3. with prolonged treatment few protoplasts and many single cells appeared; 4. fragments single cells and protoplasts can regenerate or grow by plating on solid medium; 5. plating single cells and protoplasts after dilution may be a useful method for cloning and selection. The results, suggesting a lysozyme-saving method for permeaplast preparation, indicate that ultrasonics is helpful for gene introduction, and that plating is good for genetic analysis and cloning of filamentous algae.

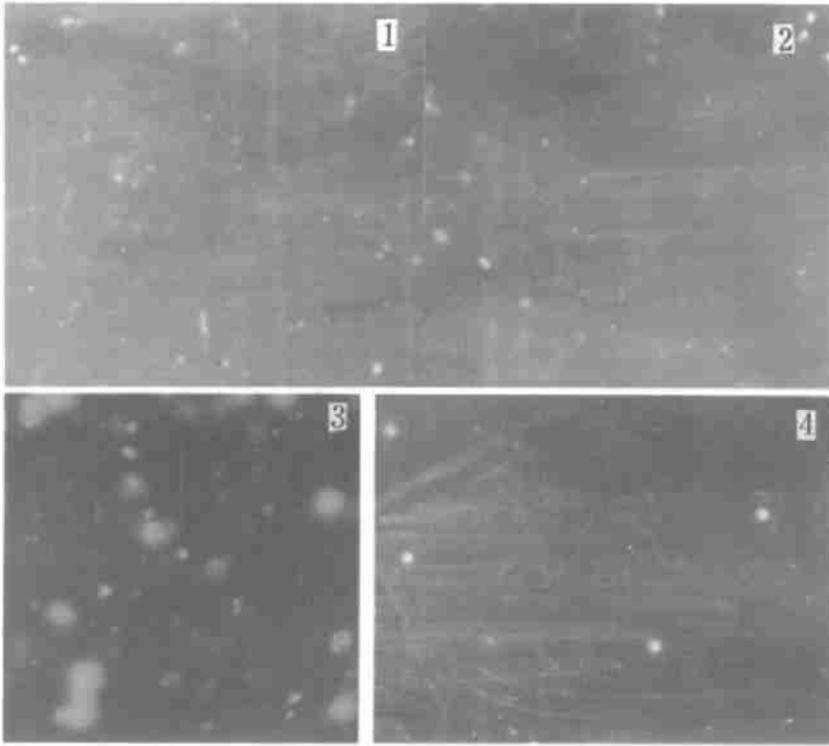
Key words *Spirulina platensis* Single cell Permeaplast Clone
Protoplast



图版 I 钝顶螺旋藻单细胞的制备及涂布培养

Plate I Isolation and plating of single cells of *Spirulina platensis*

1. 钝顶螺旋藻 S_6 品系 (S_6 strain) $\times 100$; 2. 超声波 (20kHz, 15W) 处理 20s (ultrasonic disruption for 20s), $\times 200$; 3. 处理 60s (for 60s), $\times 200$; 4. 作用 90s 后出现的单细胞 (a single cell, after 90s of ultrasonic disruption), $\times 200$; 5. 处理 120s, 涂布培养 60d 后观察 (observed after 60d's plating, originally disrupted by ultrasonics for 120s), $\times 25$; 6. 不经超声波处理的藻丝体直接涂布培养 15d (filaments were plated directly, observed after 15d's culture), $\times 25$



图版 II 钝顶螺旋藻部分原生质体、原生质体的制备 (×160)

Plate II Isolation of permeoplasts and protoplasts from *Spirulina platensis* (VBL stained and UV excited)

1, 2. 荧光增白剂染色的短藻丝体 (超声波处理60s), 显示部分细胞壁已去除 (short fragments, after 60s of ultrasonic disruption); 3. 处理120s后出现的原生质体, 经荧光增白剂染色后显示叶绿体自发红色荧光 (a protoplast, after 120s of disruption); 4. 处理120s后大部分为有壁的单细胞, 经荧光增白剂染色后显示壁的荧光 (many single cells, after 120s of disruption).