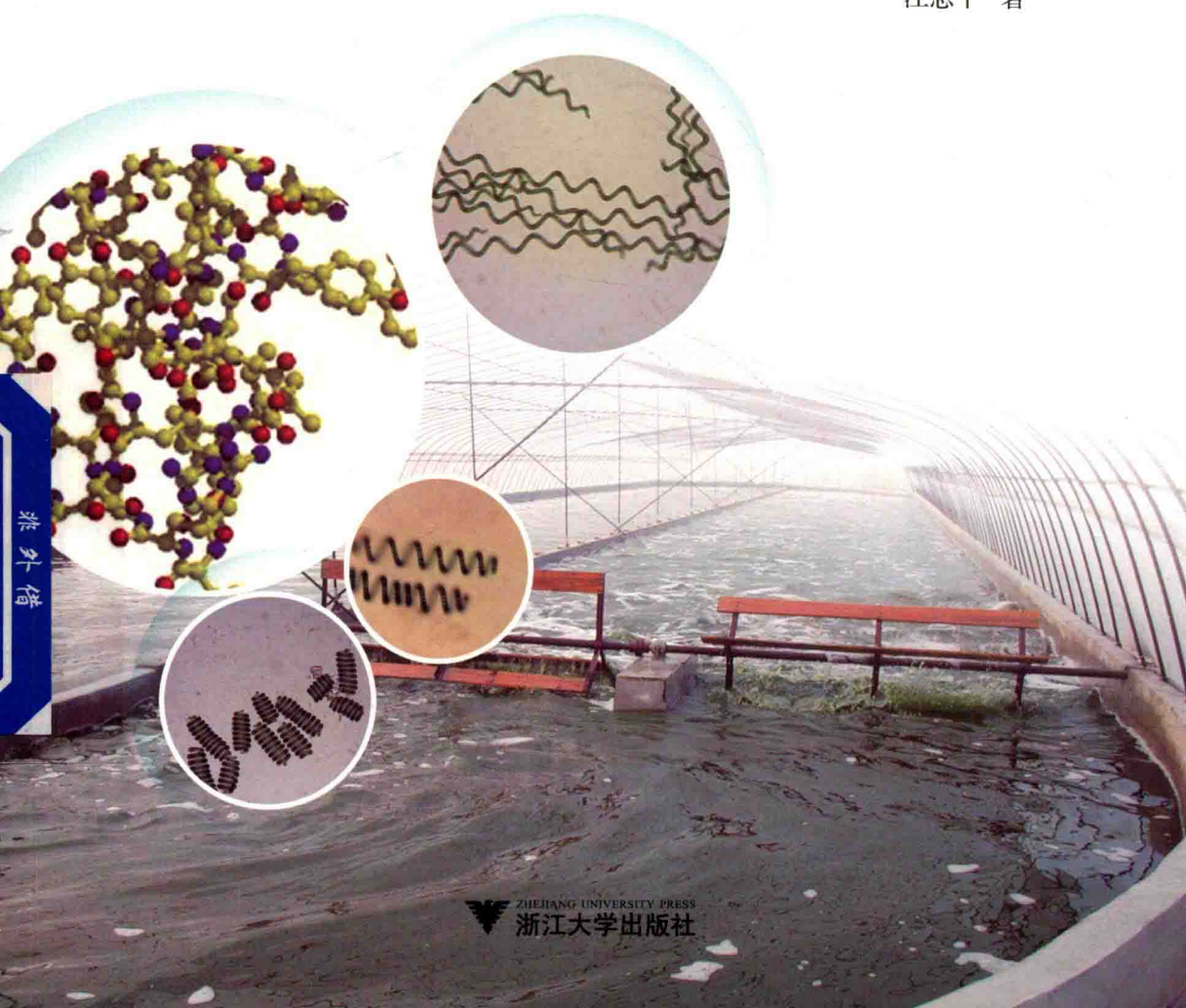


螺旋藻

多糖高产新技术

New technology of high yield polysaccharide in *Spirulina (Arthrospira)*

汪志平 著



非外借

螺旋藻多糖高产新技术

汪志平 著

浙江大学出版社

图书在版编目 (C I P) 数据

螺旋藻多糖高产新技术 / 汪志平著. -- 杭州: 浙江大学出版社, 2018. 9

ISBN 978-7-308-16268-5

I. ①螺… II. ①汪… III. ①螺旋藻属—藻类养殖
IV. ①S968. 4

中国版本图书馆CIP数据核字(2016)第233511号

螺旋藻多糖高产新技术

汪志平 著

责任编辑 季 峥 (really@zju.edu.cn)

责任校对 张 鸽

排 版 杭州兴邦电子印务有限公司

封面设计 林 智

出版发行 浙江大学出版社

(杭州市天目山路148号 邮政编码310007)

(网址: <http://www.zjupress.com>)

印 刷 绍兴市越生彩印有限公司

开 本 710mm×1000mm 1/16

印 张 12.25

字 数 192千

版 次 2018年9月第1版 2018年9月第1次印刷

书 号 ISBN 978-7-308-16268-5

定 价 49.00元

版权所有 翻印必究 印装差错 负责调换

浙江大学出版社市场运营中心联系方式: 0571-88925591; <http://zjdxcbstmall.com>

序

螺旋藻 *Spirulina* (节旋藻 *Arthrospira*) 是 20 世纪 70 年代以来, 国内外备受关注、研发不断深入、当前产业化规模最大的经济微藻。螺旋藻作为食品新资源, 已被联合国粮农组织 (FAO) 和世界卫生组织 (WHO) 分别誉为“21 世纪最理想的食品”和“人类 21 世纪最佳保健品”。随着国内外螺旋藻研究工作的日益深入, 其应用领域已从当初的营养食品和医药保健品, 扩大到饲料、精细化工产品、环境治理和新能源开发等领域, 展现了广阔的应用前景。

该书编著者及其团队, 自 20 世纪 90 年代以来一直致力于将核技术与相关生物技术应用于螺旋藻种质创新和开发利用等研究, 在建立较系统、完善的螺旋藻诱变育种理论与技术方法的基础上, 先后育成了高产多糖等一系列品性兼优的螺旋藻新品系, 并将其成功用于生物手性逆变、植物高光效机理等重大科学问题研究, 以及螺旋藻产业转型升级、提质增效等生产实践。特别是在以种质创新为突破口, 解决普通螺旋藻品种(系)多糖因含量低而严重制约其产业化应用这一难题上, 做了开创性的探索与实践。这不仅有力推进了螺旋藻研究及其产业的发展, 而且构筑了核技术与微藻生物技术交叉融合创新的成功典范。

糖类是生物体内担负着重要结构与功能的生物分子, 目前人们对其的认识仍可谓“冰山一角”。但随着近年来“糖生物学”(Glycobiology)、“糖科学与技术”(Glycoscience and glycotchnology)、“糖工程”(Glycotchnology)、“糖生物工程”(Glycobiotechnology)、“糖组学”(Glycomics)等新兴学科的诞生与发展, 相信糖类研究与开发应用, 必将会在 21 世纪崭露头角。该书介绍了有关

螺旋藻高产多糖种质创新、培植模式、制备工艺等方面原创性工作,对推进生物糖类的应用具有一定的指导作用。

希望该书的出版发行,对推动螺旋藻及糖类等研发,能起到事半功倍的作用。愿螺旋藻为人类的生存与健康做出更大的贡献!

中国科学院院士

陈子元

2017年8月

前 言

螺旋藻 *Spirulina* (节旋藻 *Arthrospira*) 是一种喜温、喜光、生长于高盐碱水域、光合放氧的原核丝状蓝藻。自世界第一个螺旋藻大规模培植基地于1974年在墨西哥塔克斯科科湖 (Texcoco Lake) 建成之后,螺旋藻很快风靡全球,并形成了庞大的产业,使螺旋藻成为当前国内外研究与开发利用规模最大的经济微藻。组成与结构独特的多糖,是螺旋藻中重要的生物活性成分,对癌症、艾滋病、肝炎等多种疾病具有明显的预防和辅助治疗作用。但因生产上所用的普通螺旋藻品种(系)的多糖含量普遍较低($\leq 5\%$),且受培植环境的影响也较大,致使螺旋藻多糖的提取率低、制备成本高、难以产业化。

种质资源对农业与生物产业的发展是至关重要的。一个优良新品种的诞生和推广应用,往往会给其产业带来革命性的发展。针对上述难题,编著者及其团队成员自1994年以来,利用核诱变技术与相关生物技术,开展了长期的螺旋藻诱变种质创新与开发利用研究,先后育成了如多糖含量高达30%的螺旋藻新品系、藻丝超长的高产螺旋藻新品系、高产藻胆蛋白的螺旋藻新品系等20余个品性兼优的螺旋藻新品系,并实现大规模培植生产与产业应用。同时,对螺旋藻高产多糖的分子遗传与生理生化基础、营养与环境调控因子、培植模式与制备工艺、抗肿瘤功效,以及在水产与畜禽养殖上的应用等方面,均做了较系统的研究。这为当前国内外螺旋藻产业深入至以高产多糖功能新品系为引领的研发层面,奠定了基础。

本书共分20章。前4章概述了螺旋藻的形态学、分类学、开发利用、种质创新等状况,以及螺旋藻多糖的生物合成、制备技术、生物学活性等研究进

展;第5~18章系统地介绍了基于核诱变技术与相关生物技术,开展螺旋藻诱变种质创新研究所建的理论与技术方法,包括出发品系确立、诱变材料制备、诱变处理、突变体筛选、分子遗传学鉴定等;第19、20章具体介绍了高产多糖螺旋藻新品系的产业化关键技术与应用。

本书可供从事螺旋藻等经济菌藻类、中药材、生物活性多糖等种质创新与研发的科技人员选用,也可作为高等院校生物、农业、医药等专业的参考用书。

本书在编著过程中参考和引用了许多相关文献资料,并编排于书的最后,在此一并向所有文献资料作者致以衷心的感谢。同时,感谢国家自然科学基金项目、国家科技创新基金项目、国家星火计划项目、公益性(农业)行业科研专项、浙江省自然科学基金项目、浙江省科技计划重点项目等,对本书研究与开发工作的宝贵资助。

衷心感谢团队成员徐步进教授、崔海瑞教授、赵小俊老师,以及李晋楠、马美萍、曹学成、刘艳辉、何英俊、李雷斌、杨灵勇、陈晓燕、李雪斌、黄晖、张巧生、潘剑用、董丹丹、谢彦广、王芳、蓝瑾瑾、王景梅、邵斌、刘新颖、于金鑫等同学所做的大量工作。同时,感谢浙江大学原子核农业科学研究所陈子元院士、华跃进所长、叶庆富常务副所长、张勤争教授、谢学民教授、孙锦荷教授、吴美文教授、奚海福副教授等领导老师的指导与帮助。特别感谢浙江大学出版社季峥老师,为本书的出版付出了辛勤的劳动。

由于水平所限,加之时间仓促,书中难免会有许多不足之处,衷心期待各位同仁和读者批评指正。

汪志平

2017年8月22日于华家池

目 录

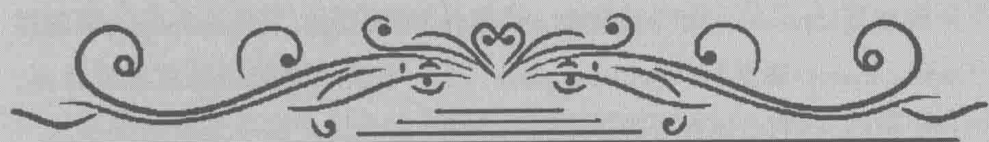
基础篇

- 第1章 螺旋藻的形态学、分类学及开发利用2
- 第2章 螺旋藻种质创新6
- 第3章 多糖的生物合成、制备技术及生物学活性12
- 第4章 螺旋藻多糖的生物学活性功能26

技术与应用篇

- 第5章 螺旋藻藻丝体的分离与纯培养技术32
- 第6章 γ 射线对螺旋藻的辐射生物学效应37
- 第7章 甲基磺酸乙酯对钝顶螺旋藻的诱变生物学效应44
- 第8章 基于蛋白质电泳分析的螺旋藻分类与突变体鉴定技术48
- 第9章 基于RAPD分析的高藻胆蛋白钝顶螺旋藻新品系选育与鉴定58
- 第10章 螺旋藻多糖含量测定方法的建立与优化65
- 第11章 螺旋藻的电离辐射抗性及与多糖含量的关系75
- 第12章 不同基因型螺旋藻品系多糖生物合成特性的比较82
- 第13章 高产多糖螺旋藻新品系Sp-E(HPS)的选育与分子遗传学鉴定95
- 第14章 高产多糖螺旋藻新品系Sp-08A的选育及蛋白质SDS-PAGE鉴定
.....107
- 第15章 Sp-E(HPS)的富硒及硒多糖Se-SPS制备技术112
- 第16章 螺旋藻多糖中硫酸基团含量测定方法的建立与优化118
- 第17章 螺旋藻抗肿瘤多糖ATSPS的制备工艺与技术130
- 第18章 螺旋藻抗肿瘤多糖ATSPS及其标准品的分子表征143

第19章 Sp-E(HPS)的产业化关键技术与应用	148
第20章 高产多糖螺旋藻温度配套型品系的选育与开发利用	158
参考文献	169
索引	189



基础篇



第1章 螺旋藻的形态学、分类学及开发利用

1 螺旋藻的形态学与分类学

螺旋藻(*Spirulina*)和节旋藻(*Arthrospira*)均属蓝藻门(Cyanophyta)颤藻目(Oscillatoriales)颤藻科(Oscillatoriaceae),是一种光合放氧的原核丝状微藻。因历史原因,这两个属在分类学上存有混淆^[1,2]。

1827年, Turpin从淡水样品中首次分离到螺旋藻(*Spirulina Turpin*)^[3]。到了1844年, Wittrock和Nordstedt等又报道了一种螺旋形的、细胞内具隔膜(Septa)的蓝藻,并命名为*Spirulina jenneri platensis*^[1,2]。而Stizenberger^[4]将这种具有隔膜的、呈螺旋形结构的蓝藻重新命名为节旋藻(*Arthrospira*)。Gomont^[5]肯定了Stizenberger的研究,并根据光学显微镜下隔膜是否可见而将该类群划分成节旋藻属(*Arthrospira* Stizenberger)和螺旋藻属(*Spirulina* Turpin),前者隔膜可见,而后者不可见。但Geitler^[6]认为螺旋藻属也存在隔膜,只是由于藻丝直径非常小而难以观察到,因此将两个属合并为螺旋藻属,下设节旋藻亚属。Geitler的观点曾长期为学术界所接受,“钝顶螺旋藻”(*Spirulina platensis*)和“极大螺旋藻”(*Spirulina maxima*)等名称长期被使用并影响至今^[7,8]。

值得注意的是,已有诸多研究表明,国内外在工厂化生产与商业化应用的藻种,事实上均属节旋藻,而非螺旋藻^[9,10]。这一由历史原因造成螺旋藻和节旋藻两个属之间在分类学上的混乱与分歧,严重影响着它们的科学研究与产业化进程。目前,国内外较为普遍的观点是在产品和产业上因习惯原因仍用“螺旋藻”,或者在“螺旋藻”后加括号,内注“节旋藻”,即螺旋藻(节旋藻);但在学术研究中则应采用已被广大学者普遍接受的“节旋藻”这一属名^[8,12]。



本书除涉及有关分类学内容外,所述的“螺旋藻”实际上是指应用于产业化研发的“节旋藻”。

螺旋藻是一种由多细胞联结而成、不分枝的单列丝状蓝藻,正常生长条件下,藻丝体为墨绿色,呈疏松或紧密的、有规则的螺旋形或波浪形^[12,13]。螺旋藻细胞壁由胶质鞘覆盖,胶质鞘包被细胞及整个丝状体。扫描透射电镜观察显示,螺旋藻的细胞壁由四层结构组成:最外层(L-IV)被认为类似于革兰氏阴性菌细胞壁;第三层(L-III)可能是螺旋状缠绕着藻丝轴的纤维蛋白原;第二层(L-II)为肽聚糖层;最内层(L-I)为纤丝层,第二层与最内层共同形成分隔细胞的横隔膜。该隔膜部分折叠。折叠的数量与螺距成反比,折叠越多,螺距越小,反之亦然^[1,14]。

不同地域或不同生长环境下的螺旋藻形态相差较大。如钝顶螺旋藻的细胞直径为 $3.5\sim 11\mu\text{m}$,螺旋直径为 $20\sim 100\mu\text{m}$ 。其中,多数藻丝体的螺旋比较规律、均匀,但也有中间紧凑而两端稀疏的;有些藻丝体的螺距短而紧密;有些则很松弛,整条藻丝体不过 $2\sim 4$ 个螺旋;有些甚至呈直线状^[2,15]。即使是在相同的生长环境下,螺旋藻的形态也不尽相同。早在1931年,Rich在观察肯尼亚一个盐湖中的螺旋藻时,就发现多种形态的螺旋藻同时存在于湖中;Geitler^[16]进一步指出这些不同形态的螺旋藻可能都属于同一个种。Bai等^[17]曾描述了三种典型的螺旋藻形态,并指出这三种形态不是孤立存在的,它们会因光照强度和营养浓度的改变而从一种形态转变为另一种形态。另据报道,当培养温度升高和光照强度增强时,螺旋藻螺距可以变小;而在光密度很低的情况下,螺距可以很长,超过 $100\mu\text{m}$ ^[18]。已有研究表明,正常的螺旋藻藻株与直线形变异藻株在超微结构、生理生化以及遗传特征等方面都存在差异,而且直线形变异藻株在特定条件下会恢复到原来正常的螺旋形态^[19]。Mühling等^[20]在观察36株螺旋藻形态学特征时发现,当培养温度从 30°C 提高到 $32\sim 34^{\circ}\text{C}$,并持续培养7d,有3株螺旋藻的螺旋形态发生逆转,从右手螺旋变为左手螺旋,其中有1株螺旋藻在正常的培养条件下连续继代培养一年以后,螺旋形态也发生逆转。同时,他们还发现剧烈的振荡培养也能使螺旋方向改变。

此外,张学成等^[21]和崔海瑞等^[22]采用不同浓度的化学诱变剂甲基磺酸乙酯来处理钝顶螺旋藻,发现藻丝体加长,螺旋数增多,并出现了多种形态的藻丝体。胡天赐等^[23]、汪志平等^[24,25]、周光正^[26]、陈必链等^[27]发现, γ 射线、红外线、紫外线、激光等辐射也均可导致螺旋藻的正常形态发生较大的变异。这些研究结果表明,螺旋藻的螺旋形或波浪形的特征形态,在自发或诱发条件下均会发生改变。不仅许多实验研究报道过螺旋藻形态变异的现象,在国内外的规模化工厂化培植实践中,随着培育条件的变化,藻丝体形态也呈多种变化^[28]。综上所述,螺旋藻形态的多形性是一种普遍现象,这给以形态学特征为主要依据的经典分类方法带来了困难,进而严重影响了螺旋藻的种质鉴定和保存,并制约着螺旋藻产业的进一步发展。因此,寻求并建立能有效区分该类群属、种、品系水平的标记就显得尤为迫切。

近年来,国内外已从脂肪酸组成^[29,30]、蛋白质组成^[13]等生理生化水平对螺旋藻的分类与鉴定做了一些有意义的探索。Nelissen等^[9]、茅云翔等^[8]、Ballot等^[31]将有“生物进化分子钟”之称的16S rRNA基因序列用于该类群分类与鉴定,为纠正学术界长期以来有关该类群分类观点,重新将螺旋藻和节旋藻划分开来奠定了分子遗传学基础。但需要进一步指出的是,越来越多的研究表明,16S rRNA基因序列更适合用于属间的分类,而在属内种间或品系间的水平,16S rRNA基因序列则过于保守^[9,32,33]。Scheldeman等^[34]和Baurain等^[35]尝试将16S~23S rRNA转录间隔区(ITS)序列用于不同地域分布的螺旋藻间的分类研究,发现16S~23S rRNA ITS序列变异程度比16S rRNA基因序列的高,比较适合用于属内种间的分类。此外,李晋楠等^[36]建立了基于RAPD(Randomly Amplified Polymorphic DNA,随机扩增多态性DNA)分子标记技术的螺旋藻分类与种质鉴定方法;杨灵勇等^[37]和Zhou等^[38]建立了基于藻胆蛋白棒状连接蛋白cpcHID操纵子序列的节旋藻品系分类与鉴定技术。

2 螺旋藻的开发利用

人类食用螺旋藻的历史可追溯到1521年。但直到1967年,比利时植物学家Leonard和Compere^[39]在非洲乍得湖和墨西哥塔克斯科科湖对螺旋藻的



重新发现以及对其化学组成的首次报道,才引起全球性的关注,从此揭开了螺旋藻大规模生产和商业化开发的序幕。到目前为止,国内外已发现该属至少有钝顶螺旋藻(*Spirulina platensis*)、极大螺旋藻(*Spirulina maxima*)、巨型螺旋藻(*Spirulina major*)、盐泽螺旋藻(*Spirulina subsalsa*)和椭圆螺旋藻(*Spirulina fusiformis*)等38个种。它们大多生长于淡水或盐碱水中,仅有4种生长于海洋中^[2,15,41]。当前国内外研究得较深入、并已大规模商业化生产与开发的主要为钝顶螺旋藻和极大螺旋藻2个种^[2,39,41,42]。

众多研究与实践表明,螺旋藻不仅富含蛋白质(占细胞干重的60%~70%)等丰富的营养成分,而且所含的 β -胡萝卜素、不饱和脂肪酸(如 γ -亚麻酸)、多糖等多种生物活性物质^[7,29,43~45],对癌症、艾滋病、肝炎、糖尿病、高血脂等多种疾病具有明显的预防和辅助治疗作用^[42,46,47],因而被誉为“21世纪最理想的食品”和“人类21世纪最佳保健品”。30多年来,随着国内外螺旋藻研究工作的日益深入,其应用领域已从当初的作为营养食品和医药保健品扩大到饲料^[48~50]、系列化妆品^[51]、精细化工产品^[52],以及环境治理和新能源开发利用^[53~55]等方面,展现出广阔的应用前景。

此外,随着螺旋藻商业开发规模的不断扩大和产业化水平的逐渐提高,螺旋藻基础研究也在快速发展,并极大地推动着螺旋藻产业的进一步发展。螺旋藻虽然是原核生物,在细胞水平上具有类似于革兰氏阴性菌独特的遗传结构,却是目前光能利用率最高的生物之一(光能利用率高达18%~24%)^[56]。同时,多数螺旋藻喜高温(32~45℃)、高碱(pH8.5~10.5)和高盐环境,能在高盐碱湖泊等不适合其他生物生存的极端环境下良好生长^[42];某些螺旋藻品系具有很强的辐射抗性, γ 射线辐射致死剂量达6kGy以上^[25]。正是基于上述诸多特殊性,近年来螺旋藻已被广泛应用于光合作用、生物手性、植物进化、叶绿体起源及抗逆机理等重大生物学问题的研究^[2,57~61]。

第2章 螺旋藻种质创新

种质资源对农业与生物产业的发展是至关重要的。一个优良新品种的诞生和推广应用往往会给其产业带来革命性的发展。螺旋藻产业作为一项新兴的生物产业,必须不断涌现生产上急需的优良新品种(系),才能为其提供新的发展机遇。高产优质螺旋藻新品种的选育,是当前国内外螺旋藻领域的重大研究课题之一,也是螺旋藻产业竞争的焦点之一。目前,螺旋藻新品系的选育方法主要有自然分离与驯化技术、原生质球(Spheroplast)的制备与再生技术、基因工程技术及诱发突变技术等。

1 自然分离与驯化技术

自然分离与驯化技术简单易行,但因藻株发生变异的概率较小,育种进程一般较慢。吴伯堂等^[62]从淡水原种中分离筛选出钝顶螺旋藻优良品系SCS,该种经过海水驯化后,能在自然海水培养基中生长,具有适应高温和强光等生理特性。谭桂英等^[63]通过逐级稀释法获得了不同形态大小的6株藻株,其中1株个体大、上浮性好、生长速度快、蛋白质含量高,并经海水驯化后能在海水中良好生长。Vonshak等^[64]分离出3株钝顶螺旋藻,它们对高光强有良好的适应性,有望成为耐高光强的高产藻株。在螺旋藻产业化培植初期,国内外所用的藻种基本上为通过自然分离与驯化方法获得。

2 原生质球的制备与再生技术

植物原生质体(Protoplast)是遗传操作的有力工具,是育种工作中利用基因工程和诱发突变等现代高新技术对种质进行遗传改良的理想材料。其中,制备高质量且具再生能力的螺旋藻原生质球,对开展螺旋藻的分子遗传学和



育种研究都是至关重要的。

1982年,Robinson等^[65]首先提出了酶解制备钝顶螺旋藻(*S. platensis*)原生质球的方法。1989年,Lanfaloni等^[66]对*S. platensis*原生质球的制备和再生进行了研究。他们先用1.5mol/L的NaCl溶液洗去藻丝表面的外鞘套,然后用溶菌酶进行酶解,再用牛血清蛋白梯度离心法从酶解液中分离出高纯度的原生质球。同时发现幼嫩细胞比老化细胞更适于制备原生质球,由幼嫩细胞制得的活性原生质球的再生率高达40%~70%,而由老化细胞制得的活性原生质球的再生率仅为10%~40%。1994年,Priya等^[67]以甘露醇为渗透稳定剂,在pH6.8的磷酸缓冲液中用溶菌酶酶解藻丝28h,再用蔗糖密度梯度离心获得了原生质球,但对这种原生质球的再生率未做报道,可能是由于在甘露醇中酶解时间太长,受毒害而不一定能再生。1996年,彭国宏等^[68]进一步证明甘露醇和高浓度的NaCl或KCl溶液(1.2mol/L以上,35℃)对螺旋藻均有伤害作用,可导致藻丝体大量断裂,并因在甘露醇浓度为0.5~1.5mol/L、溶菌酶浓度为0.5%~1%(m/V,下同)及pH为6~8的条件下做了多次实验均未能分离出原生质球,而对上述有关螺旋藻原生质球分离的报道产生了怀疑。此后,他们先用机械法将藻丝打断,后用酸性溶液洗去藻丝外层的胶状物(分离原生质球的主要障碍之一),再在渗透稳定剂为0.8mol/L KCl的磷酸缓冲液中,用0.5%溶菌酶和1%果胶酶协同处理2~6h,获得了大量活性高达98%的原生质球,并对它们的光合作用特性做了研究,但也未报道其再生率。此后,郭后良等^[69]进一步建立了更为合适的制备钝顶螺旋藻原生质球的方法:将材料培养4~5d,用500μg/ml青霉素预处理12h,再超声处理1min,转入0.1%溶菌酶的多盐溶液[含NaCl、KNO₃、(NH₄)₂SO₄各0.05mol/L的磷酸盐缓冲液]中,在28℃下酶处理4h后,约有80%的细胞转化为原生质球,形成密集的原生质球群。此外,秦松等^[70]用超声波处理*S. platensis*藻丝制得了原生质球并再生成功,但此法因原生质球的得率太低而难以应用于遗传育种等研究。

总之,国内外在螺旋藻原生质球的制备和再生方面虽然做了一些工作,但到目前为止,尚不能稳定地制备出质量高且具再生能力的螺旋藻原生质球。

3 基因工程技术

基因工程技术是改良和创建生物技术良种的有力武器。有关螺旋藻的基因识别和克隆研究已取得了不少有意义的成果^[71,72]。光合作用过程中固定 CO₂ 的关键酶——核酮糖-1,5-二磷酸羧化酶 (Ribulose-1,5-Bisphosphate Carboxylase) 大亚单位和小亚单位的基因已被成功地从 *S. platensis* 中克隆出来,并在 *E. Coli* 中获得表达。Ge 等^[73]已从螺旋藻中分离出别藻蓝蛋白 (Allophycocyanin) 基因,做了序列分析,并已通过构建融合蛋白的方式实现了在 *E. Coli* 中的高效表达。姜晓杰等^[74]也成功从钝顶螺旋藻中克隆出获得原核高效表达的别藻蓝蛋白 α 和 β 亚基基因。同时,在螺旋藻质粒研究方面也取得了一些进展。Qin 等^[75]已分别从 *S. platensis* S₆和 F₃藻株中分离得到 2.40kb 和 1.78kb 的 CCC(共价闭合环状)质粒。曹学成等^[76]从螺旋藻中提取并纯化出基因组外 DNA。然而,至今还不能像对于高等植物那样,将基因工程这一先进技术应用用于螺旋藻的品种改良,原因主要有三:① 螺旋藻完整的基因图谱尚未构建,对其整个基因组尚缺乏系统认识;② 还没有找到合适的限制性内切酶来对所发现的 CCC 质粒进行深入研究,也未发现该质粒的功能(隐秘型质粒),更未构建出理想的转基因载体;③ 尚不能制备出外源 DNA 易导入且具再生能力的原生质球。因此,利用基因工程技术创建螺旋藻生物技术良种的前景虽然十分诱人,但还需要大量的基础研究工作。

值得庆幸的是,国内外在将外源 DNA 导入螺旋藻细胞的方法上已取得了一些有意义的结果。Zeng 等^[77]分别利用超声波处理和电击法将质粒 pBR325 导入螺旋藻细胞内,并得到了表达。Kumar 等用溶菌酶和 EDTA 处理螺旋藻细胞,制得了能实现外源 DNA 导入且能再生藻丝体的透性体(相对原生质球而言,残留更多的胞壁),并将 pRSFCmLx 质粒导入其中,获得了表达。Hiroyuki 等^[78]发现螺旋藻中存有转座子(Transposable genetic element),并提出了先将外源基因整合到转座子上,再通过转座子的转座作用实现 DNA 重组的新构想。