

2011 中技社科技創意獎學金

CTCI Science and Technology Creativity Scholarship

大量表現冰花逆境调控激酶SNF1於小球藻轉殖系的耐鹽能力分析

Analysis of Salt Tolerance in *Chlorella DT* Transforms Overexpressing Ice Plant Stress-related Protein Kinase SNF1

國立清華大學 化學工程所 碩士班一年級 李慈君

指導教授：國立中興大學 生命科學系 顏宏真、簡麗鳳 教授

一、研究重點

全世界即面臨淡水資源短缺的窘境，意即可能有效利用地球上大量的海水，將是一種更積極的開源方式；由近年來的研究及報導可窺小球藻的莫手可熱，舉凡營養保健、水產養殖、環境系統及生物能源皆有其身影。我國位於海洋，台灣海峽地區佔全球市場的51%為全球之冠，但目前以淡水養殖的產量最高，因此本實驗將小球藻*Chlorella DT*，藉由農桿菌(*Agrobacterium tumefaciens*)感染轉殖法，轉入冰花鹽生基因(*Mesembryanthemum crystallinum*)逆境相關鹽生激酶(*sucrose non-fermenting 1 protein kinase gene* (SNF1))，提高其對鹽度的耐受性，期望能改善目前台灣的淡水處理，轉而可開發高產的海水生產及製鹽。進而達到海水資源的有效利用及提升台灣鹽業產品在全球市場的代表性與競爭力。實驗將配合冰花鹽生基因與SNF1基因，PCR偵測配合冰花鹽生基因以及冰花鹽生基因與SNF1的整合，確認小球藻轉殖系的篩選。耐鹽性生長曲線測定發現在高鹽度不含葡萄糖的培養環境下，轉殖系具有較高的鹽度耐受能力，顯示此套基因組可以幫助不耐鹽的小球藻提升其耐鹽能力，本實驗證實利用海水來進行小球藻養殖極具潛力。

二、研究結果

(一) 小球藻轉殖系確立

1. 小球藻轉殖系抗生素hygromycin 測試

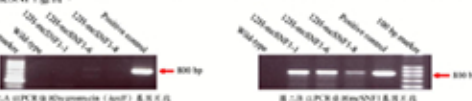
首先經由農桿菌感染後的小球藻以含有抗生素hygromycin (75 µg mL⁻¹)的小球藻培養基，進行12H-mcSNF1轉殖系的篩選(圖一)。



圖一 以抗生素hygromycin (75 µg mL⁻¹)培養，進行轉殖系篩選

2. 轉殖系插入hygromycin (AptII) 及mcSNF1基因確認

以小球藻genomic DNA進行PCR，可獲得预期的800 bp片段(圖二A、圖二B)，於DNA層析確認以小球藻genomic DNA的耐受能力是由AptII序列所提供，且所篩選到的小球藻轉殖系，其內皆帶有mcSNF1基因。



圖二 以PCR分析hygromycin (AptII) 基因存在 (A) 800 bp (B) 800 bp

3. 小球藻轉殖系抗生素SNF1蛋白偵測

利用anti-SNF1 antibody對小球藻蛋白萃取液進行西方墨點分析，轉殖系在60 kD位置亦出現條帶(圖三)，此位置應為冰花SNF1蛋白產生之位置，配合genomic PCR的結果顯示，冰花SNF1基因已插入小球藻基因中，且可以正確的表現出來。



圖三 以Western blot 檢測SNF1小球藻野生型轉殖系蛋白 (A) anti-P60 antibody 檢測P60蛋白，視為loading control (B) anti-SNF1 antibody 檢測SNF1蛋白

(二) 小球藻轉殖系生長曲線測試

1. 小球藻野生型對鹽度生長曲線測試

確認野生型的小球藻不具有在高鹽環境下正常生長的能力，且其生長狀況會隨著鹽度的提高而產生dose-dependent的現象(圖四)。



圖四 小球藻野生型對不同鹽度生長曲線測試 (A) 0 mM NaCl (B) 100 mM NaCl (C) 200 mM NaCl (D) 300 mM NaCl (E) 400 mM NaCl (F) 500 mM NaCl

2. 小球藻轉殖系耐鹽性生長曲線測試

因SNF1蛋白參與糖原的代謝，其活性會受到葡萄糖的抑制(Wilson et al, 1996; Woods et al, 1994)，因此這部分的實驗將分成兩培養基含有添加葡萄糖的對照組(400 mM與500 mM氯化鈉添加)，以及沒有添加葡萄糖的實驗組進行耐受性的觀察。

(1) 400 mM 氯化鈉處理 (w/ glucose)

由生長曲線結果(圖五)得知12H-mcSNF1-1與12H-mcSNF1-6轉殖系在培養初期生長較野生型快速，隨著培養天數的增加，最後轉殖系的生長並不如野生型的快速，顯示冰花SNF1並未提高小球藻在中度鹽度環境下的生長。



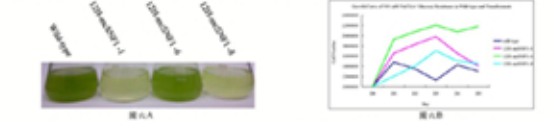
圖五 小球藻野生型及轉殖系於400 mM NaCl (w/ glucose)環境下生長曲線測試 (A) 0 mM NaCl (B) 100 mM NaCl (C) 200 mM NaCl (D) 300 mM NaCl (E) 400 mM NaCl (F) 500 mM NaCl

四、研究心得

一路走來，感謝家人、中興大學生命科學系的師長、學長以及同學的鼓勵及幫助，尤其冰花研究室 顏宏真老師、生物能源研究室 簡麗鳳老師、Lab503的學長姊在課業、實驗室生活上都是最切實的互助型學姊。最後感謝中技社的評審老師們，願意給生物資質的我，這樣的肯定，讓我進入這樣的工業科技殿堂，無疑的是莫大的鼓勵，我也期待自己有一天能將所學應用在最能救世、為全球環境問題略盡綿薄之力。

(2) 500 mM 氯化鈉處理 (w/ glucose)

當環境中鹽度從低於500 mM NaCl (相當於海水的鹽度)時，轉殖系SNF1的三個轉殖系其生長狀況均較野生型好(圖六)，顯示在高鹽環境下，冰花SNF1確實具有提升小球藻耐鹽能力的功效。



圖六 小球藻野生型及轉殖系於500 mM NaCl (w/ glucose)環境下生長曲線測試 (A) 0 mM NaCl (B) 100 mM NaCl (C) 200 mM NaCl (D) 300 mM NaCl (E) 400 mM NaCl (F) 500 mM NaCl

(3) 400 mM 氯化鈉處理 (w/o glucose)

由轉殖系測試得知SNF1的活性，在含有葡萄糖的環境下會被抑制，在葡萄糖缺乏的環境下，活性會大幅上升(Wilson et al, 1996; Woods et al, 1994)，因此不具備葡萄糖的生長環境下，可確認12H-mcSNF1-1、12H-mcSNF1-6與12H-mcSNF1-8此三小球藻轉殖系其對高鹽的耐受性，是否是其所轉入的mcSNF1，由實驗結果(圖七)可發現，在不含葡萄糖且處理400 mM氯化鈉的培養環境下，無論是在生長曲線及整體外觀上皆可得知，小球藻轉殖系其生長較野生型好，代表轉殖系具有較高的耐鹽能力。



圖七 小球藻野生型及轉殖系於400 mM NaCl (w/o glucose)環境下生長曲線測試 (A) 0 mM NaCl (B) 100 mM NaCl (C) 200 mM NaCl (D) 300 mM NaCl (E) 400 mM NaCl (F) 500 mM NaCl

此種鹽度處理方式的細胞對增加量(圖八)，以不再任何環境下的第五天細胞增加數為分母，在鹽度環境下第五天的鹽度細胞增加數為分子，進行比例推算處理後，可明顯看出在500 mM NaCl (w/ glucose) 及 400 mM NaCl (w/o glucose) 的處理下，轉殖系的細胞增加量均較野生型高，也證實小球藻可表現高等植物的SNF1基因，轉殖系具有功能的SNF1蛋白，幫助菌體對抗高鹽環境。

(三) 結論

藉由以上的各項實驗結果，可推測本實驗所篩選到的三個獨立之mcSNF1-小球藻轉殖系其基因內皆有外源之SNF1基因，經由轉殖轉譯作用產生冰花SNF1蛋白，但菌體轉殖方式為隨機插入，使得三個轉殖系其mcSNF1的程度不同；由耐鹽性生長測試發現12H-mcSNF1-1轉殖系具有較高的耐鹽能力，且受環境中糖原含量及鹽分高抑制，並可使用葡萄糖的轉殖系，配合台灣四面環海的大規模災區災情，將可達到水資源的有效利用及提升台灣非常的海水淡化處理，預期台灣的鹽業產品在國際上將更具競爭力及代表性，而台灣也將成為高產的鹽業工廠(圖九)。



圖八 不同鹽度環境下處理第五天的細胞增加量 (A) 0 mM NaCl (B) 100 mM NaCl (C) 200 mM NaCl (D) 300 mM NaCl (E) 400 mM NaCl (F) 500 mM NaCl



圖九 本實驗期望的多元利用型海水淡化系統