

耐盐基因转化蓝藻 *Synechococcus* sp. PCC 7942 研究*

刘广发** 张会永 楼士林 周克夫

(厦门大学 细胞生物学与肿瘤细胞工程教育部重点实验室 361005)

提要 将从极端耐盐的假单胞杆菌中克隆得到的 3 个基因,即转录调控因子基因、NADH 脱氢酶 II 基因和磷酸甘油磷酸酯酶基因转入淡水蓝藻 *Synechococcus* sp. PCC 7942 中,使受体藻对 NaCl 的耐受性从低于 2.5% 显著提高至 4.5%,进一步证明了这 3 个基因确实与生物的耐盐性密切相关。本实验为进一步培育耐盐经济作物奠定了基础。

关键词 蓝藻(*Synechococcus* sp. PCC 7942), 耐盐基因, 转基因

蓝藻又称蓝细菌,是一类光合自养的原核生物,其中不少蓝藻还能固氮。因此即使在十分贫瘠的沙丘或岩石表面,只要有少许水分,蓝藻就能生长,它们往往充当了生态环境中极其重要的初级演替先锋植物的角色。最近作者从极端耐盐的假单胞杆菌中克隆得到了 3 个与高耐盐性有关的基因,它们使被转化的大肠杆菌的耐盐性提高了 33%。本文表明,将上述 3 个基因转入蓝藻中,同样使蓝藻的耐盐水平显著上升,再一次确认了它们的功能。

1 材料与方法

1.1 淡水蓝藻 *Synechococcus* sp. PCC 7942 (简称 7942)

由中国科学院武汉水生生物研究所提供。

1.2 重组质粒和试剂

重组质粒 pZYR 由本实验室构建和保存,其中包括从极端耐盐的假单胞杆菌中克隆的已被证明与耐盐性有关的转录调控因子基因、NADH 脱氢酶 II 基因及磷酸甘油磷酸酯酶基因(另文待发)。蓝藻 7942 基因整合平台系统由本实验室构建^[8,9]。限制性核酸内切酶购自华美生物工程公司和大连宝生物公司,小量质粒抽提试剂盒、凝胶回收试剂盒购自华粤公司, DIG 引物标记和检测试剂盒 I 为 Boehringer Mannheim 公司产品,其他试剂为进口或国产分析纯试剂。

1.3 重组质粒 pZYR 转化蓝藻 *Synechococcus* sp. PCC 7942

在最适条件下培养蓝藻 7942 至 OD₇₃₀ 为 0.25 ~ 0.35,离心收集藻细胞,参照 Golden 1984 年的方法转化蓝藻 7942。

1.4 转基因耐盐蓝藻的筛选

重组质粒 pZYR 转化蓝藻 7942 后,将转化藻与对照分别涂布于 Millipore 滤膜上,先在不含 NaCl 的 BG11 固体培养基上恢复培养 24 h,然后转移滤膜至含 NaCl 3.0% 的 BG11 固体培养基上进行筛选培养。2 周后,待滤膜上出现蓝色单藻落,再将它们在 BG11 液体培养基中培养至对数生长期后期,涂布于含系列 NaCl 的培养基上进行最高耐盐性测试。

1.5 随机引物标记重组质粒 pZYR 和 Southern 杂交

将重组质粒 pZYR 用 BamH I 完全酶切,电泳后回收纯化其中的外源 4.2 kb DNA 片段。取 1 μg 该片段作为 PCR 模板溶于少量无菌水中,沸水浴 10 min,在冰浴中快速冷却,加 4 μl DIG High Primer,混匀并短暂离心;37℃ 温育 20 h;65℃ 热处理 10 min 终止标记反应。按参考文献[2]进行蓝藻总 DNA 的 Southern 转移、标记引物的杂交和显色。

1.6 转基因耐盐蓝藻的双向蛋白电泳

将接种在 BG11 培养基中的转化藻和野生藻培养至对数生长期后期,离心收集藻细胞;加适量丙酮抽提藻细胞色素和脂类,离心,去上清,丙酮挥发后得藻

* 厦门市科委科技发展计划资助项目 350222000104 号。

** 通讯联系人

第一作者:刘广发,出生于 1949 年,副教授,研究方向:分子遗传学。电话:0592-2181001

收稿日期:2001-10-11;修回日期:2002-02-03

蛋白干粉。加入裂解缓冲液溶解藻蛋白,10 000 r/min 离心 2 min,取上清上样。参照 Rippka 的方法^[7]进行第一向盘状等电聚焦凝胶电泳(IEF),上样量为每管 0.5 mg 藻蛋白,电泳后测定凝胶条各段 pH 值;藻蛋白第二向 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)按文献^[4]进行。其中浓缩胶浓度为 4%,分离胶浓度为 12%;电泳结束后,用考马斯亮蓝 R250 染色,凝胶成像系统观察记录。

1.7 测定转化蓝藻的生长曲线^[6]

将筛选得到的转化藻株在 BG11 液体培养基中培养至对数生长期,按 0.5% 的接种量分别接种于 BG11 及含系列 NaCl 浓度的 BG11 培养基,每组均以野生蓝藻 7942 作为对照,30 ℃,正常光照培养;每隔 2 d,测其 OD₇₃₀值,连续测 10 d,记录各组数据。

2 结果

2.1 重组质粒转入蓝藻的证明

以重组质粒 pZYR 为模板制备探针、Southern 转膜、杂交和显色后,结果见图 1。图中显示经多代转接的转化藻与阳性对照 pZYR 均出现杂交信号,而未转化对照藻株无杂交信号,从而说明 4.2 kb 外源 DNA 片段已经整合至蓝藻基因组中。



图 1 重组质粒 pZYR 转化蓝藻的 Southern 杂交分析

Fig.1 Southern hybridization analysis of *Synechococcus* sp. PCC 7942 transferred by reconstruction pZYR

1. 耐盐转基因蓝藻总 DNA; 2. 重组质粒 pZYR; 3. 未转化蓝藻总 DNA。

2.2 转化藻株与野生藻株总蛋白双向电泳比较

蛋白质双向电泳分析发现(图 2),转化藻株中至

少出现了 3 个特异表达的新蛋白(图中箭头所指处),分别命名为 P₁, P₂ 和 P₃。其中 P₁ 的分子量最小,约为 25 kD,等电点约为 5.5; P₂ 的分子量约为 37 kD,等电点约为 9.0; P₃ 的分子量约为 56 kD,等电点约为 7.5,它们分别与推测的被转入的第一、第三和第二个基因转录、翻译的蛋白质的分子量基本一致。因此,这 3 个蛋白可能是转入蓝藻 7942 中的外源 4.2 kb DNA 片段的表达产物。

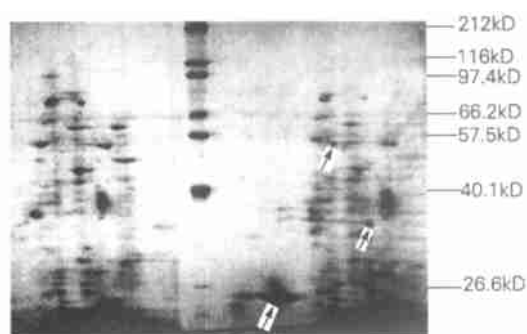


图 2 转化藻和野生藻细胞总蛋白双向电泳图谱

Fig.2 Two dimensional electrophoresis of total protein of the wildtype and transformant *Synechococcus* sp. PCC 7942 cells 中间泳道为高分子量蛋白 marker;左边为野生藻总蛋白电泳图谱;右边为转化藻总蛋白电泳图谱

2.3 蓝藻 *Synechococcus* sp. PCC 7942 转化前后耐盐水平测定

重组质粒 pZYR 转化蓝藻 *Synechococcus* sp. PCC 7942 后,测定表明,转化子的耐盐能力提高了约 80% (表 1)。

由表 1 可见,野生蓝藻 *Synechococcus* sp. PCC 7942 对 NaCl 的耐受水平低于 2.5%,而经重组质粒 pZYR 转化后该藻在 NaCl 浓度达到 4.5% 的 BG11 培养基中还能生长。将转化藻进行连续继代培养,发现它的耐盐性能稳定。因此可以初步认为,转化藻株出现的较高耐盐性是由于 pZYR 转化蓝藻经过同源重组将 4.2 kb 外源片段整合于蓝藻基因组的缘故。

2.4 耐盐转化藻株与野生藻株在含盐培养基中生长曲线比较

上述耐盐转化藻株和野生藻株在正常培养基及含盐培养基中的生长情况(图 3)。

从图 3 所示的 3 种生长曲线可以看出,在 BG11 培养基中,野生蓝藻和转化蓝藻的生长状况基本一致;随着 NaCl 浓度的增高,野生蓝藻的生长受到越来越

表 1 蓝藻 *Synechococcus* sp. PCC 7942 转化前后对 NaCl 的耐受水平

Tab.1 Levels of NaCl tolerance of the pre-or post-transfected *Synechococcus* sp. PCC7942

藻种	NaCl 浓度 (%)						
	2.0	2.5	3.0	3.5	4.0	4.5	5.0
<i>Synechococcus</i> sp. PCC 7942	+	-	-	-	-	-	-
<i>Synechococcus</i> sp. PCC 7942(转化后)	+++	+++	++	++	+	+	-

+: 生长 - : 不生长。

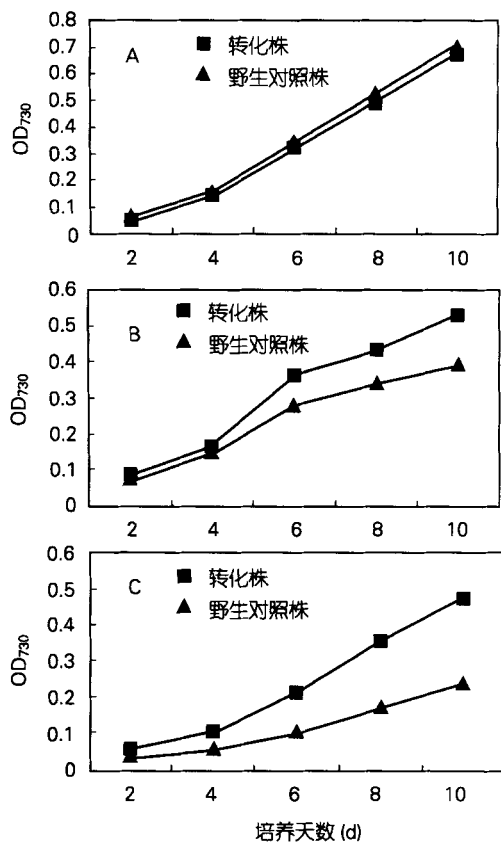


图 3 转化藻株与野生藻株在不同盐度下的生长曲线
Fig.3 Effects of salt stress on the growth rates of the wild-type and the transformant *Synechococcus* sp. PCC 7942 cells
A. 在 BG11 培养基中生长; B. 在 BG11 培养基 + 0.2 mol/L (1.17%) NaCl 中生长; C. 在 BG11 培养基 + 0.375 mol/L (2.19%) NaCl 中生长

越明显的抑制,而转化蓝藻所受的影响则小得多。在含 0.375 mol/L NaCl 的 BG11 培养基中转化藻的生长量比野生藻高 1 倍以上。可见,导入外源 4.2 kb DNA

片段的确与蓝藻 7942 耐盐性提高具有正相关性。

3 讨论

淡水蓝藻 *Synechococcus* sp. PCC 7942 是原核生物,基因组简单。该藻的基因整合平台系统含有该藻基因组中铁缺乏诱导基因 *isiAB* 操纵子同源序列片段,因此在其中插入外源基因,将能使目的基因经同源重组嵌入该藻的基因组中,实现稳定存在和同时表达,从而避免了其他一些不确定因素对本实验结果的影响。在本实验中,转耐盐基因蓝藻 7942 经多次传代仍保持较稳定的强耐盐性也证明了基因整合平台系统是进行基因转移和功能分析的较为理想的工具。

图 2 中 P₁ 蛋白的表达量非常高,这可能是该基因处于强启动子调控之下的缘故。如果能够证明该强启动子的存在并将其克隆,将可能对目的基因的表达具有积极的意义。此外,在野生藻双向电泳图谱中出现的若干个蛋白斑点在转化藻中消失了,这可能是基因整合平台系统插入蓝藻 7942 基因组时恰巧破坏了其中某些非“看家基因”的缘故。

经过作者先前的工作,已经将这 3 个从假单胞杆菌中克隆的基因序列与 GenBank 中的同源序列进行了比较,初步认为这是与耐盐性有关的基因,并分析了从这 3 个基因分别推测的氨基酸序列与相应的多肽(酶)的相似性,再加上转基因蓝藻的蛋白双向电泳图谱中出现的 3 个特异蛋白斑点,由此可以基本认为,应该是这 3 个基因的表达产物使淡水蓝藻 *Synechococcus* sp. PCC 7942 获得了较强的耐盐性状。不过,如果能借助质谱仪将双向电泳中的这 3 个特异蛋白分离出来,并对其进行氨基酸序列测定分析和功能研究,就有可能比较准确地确定这 3 个基因产物的性质。

综上述,作者已经通过转基因的手段获得了耐盐蓝藻。本工作为今后将耐盐基因转入经济作物奠定了良好的实验基础。我国沿海和内陆存在着大片的盐碱

地和盐碱荒滩^[1]。培育耐盐经济作物是我国政府“九五”和“十五”863计划的研究内容之一。耐盐经济作物的成功培育必将为开发利用盐碱地、缓解我国人口与耕地的突出矛盾和淡水紧缺的瓶颈做出重要贡献。

参考文献

- 1 赵可夫、王韶唐主编。作物抗性生理。北京:农业出版社,1990。
- 2 孙士勇、汪洛等译。(Keller G. H. and Manak M. eds)。DNA探针技术。北京:科学出版社,1992。
- 3 Fukuda H.. Heterologous expression of the gene for the ethylene-forming enzyme from *Pseudomonas syringae* in the cyanobacterium *Synechococcus*, *Biotech. Lett.*, 1994,16: 1 ~ 6
- 4 Garrels J. I.. Two dimensional gel electrophoresis of protein, *Methods Enzymol.*, 1983, 100: 411 ~ 423
- 5 Golden S. S. and Sherman L. A.. Optimal conditions for genetic transformation of the cyanobacterium *Anacystis nidulans* R2, *J. Bacteriol.*, 1984,158:36 ~ 42
- 6 Nobuo K., Takashi H. and Yoshito T. *et al.*. Effects of overexpression of *Escherichia coli* and bet genes on the tolerance for salt stress in a freshwater cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC 7942, *Plant Science*, 2000,159: 281 ~ 288
- 7 Rippka R. and Deruelles J.. Genetic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria, *J. Gen. Microbiol.*, 1979,111: 1 ~ 61
- 8 Van der Plas J. and Hegeman H.. Genomic integration system based on pBR322 sequence for the cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC 7942: transfer of genes encoding plastocyanin and ferredoxin, *Gene*, 1990, 95:39 ~ 46
- 9 Zhang J., Wu Q.J. and Lou S.L.. Construction of a new gene integration system for the *Synechococcus* sp. PCC7942, *Chin. J. Oceanol. Limnol.*, 1998, 16(suppl.): 40 ~ 46

STUDIES ON TRANSFORMATION OF SALT-TOLERANT-RELATED GENES TO CYANOBACTERIUM *Synechococcus* sp. PCC 7942

LIU Guang-fa ZHANG Hui-yong LOU Shi-lin ZHOU Ke-fu

(The Key Lab. of Ministry of Edu. for Cell Bio. and Tumor Cell Engineering, School of Life Sci., Xianen University, 361005)

Received: Oct., 11, 2001

Key Words: Cyanobacteria, Salt resistant gene, Transformation

Abstract

Three salt-tolerant-related genes, transcriptional regulator gene, NADH dehydrogenase II gene and phosphoglycolate phosphatase gene, which are cloned from *Pseudomonas xiaomenensis*, a species of halophilic bacterium, have been transferred as a gene cluster to cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC 7942. As a result, the NaCl resistant level of the microorganism has been obviously raised from less than 2.5 % to 4.5 %. It shows that the three genes are close correlative to the ability of salt-resistance. This experiment provides a potential possibility for cultivation of salt-resistant economic plants.

(本文编辑:张培新)