

利用同源重组质粒 pUTK 转化蓝藻 *Synechococcus* sp. PCC7942 及胸腺素 α_1 的表达 *

章 军 宋新强 徐 虹 陈天圣 楼士林

(厦门大学生命科学院,细胞生物学与肿瘤细胞工程教育部重点实验室 361005)

提要 采用本实验室构建的丝状蓝藻 *Calothrix* sp. PCC7601 基因整合平台系统供体质粒 pUTK 转化单胞蓝藻 *Synechococcus* sp. PCC7942, 通过抗性筛选获得了具卡那霉素抗性的转化藻株。经 Southern 杂交证实 pUTK 部分序列已整合到 *Synechococcus* sp. 7942 染色体 DNA 上; 红光诱导后通过蛋白质 SDS-PAGE 电泳, Western blot 证实 pUTK 的胸腺素 α_1 基因得以有效表达, 表达量达到总蛋白的 4.8%。结果表明, 基因整合平台系统供体质粒 pUTK 不仅可转化丝状蓝藻 *Calothrix* sp. PCC7601, 还可转化单胞蓝藻 *Synechococcus* sp. PCC7942。

关键词 蓝藻 *Synechococcus* sp. PCC7942, 同源重组, 胸腺素 α_1 , 表达

蓝藻既是原核生物, 又具植物的光合系统 I 和光合系统 II, 是一种很特殊的生物研究材料。近年来, 随着蓝藻基因工程研究的发展, 已经构建了一些蓝藻穿梭质粒载体与基因整合平台系统^[1]。本实验室已成功构建了蓝藻穿梭表达载体 pPRS-1 及其衍生质粒, 还构建成功了单胞蓝藻 *Synechococcus* sp. PCC7942^[2] 和丝状蓝藻 *Calothrix* sp. PCC7601 的基因整合平台系统 (待发表)。同源重组型质粒载体 pUTK 由本实验室构建, 如图 1) 已成功转化丝状蓝藻 *Calothrix* sp. PCC7601, 该质粒依次组装有 *Calothrix* sp. PCC7601 的藻蓝蛋白 cpc 2 基因两端同源片段 (L 和 R)、cpc 2 启动子 (Promoter)、泛素融合的胸腺素 α_1 (UT) 目的基因、终止子 (rbcS polyA)、卡那霉素抗性筛选基因 (Km)、

白 cpc 2 基因的部分序列, 由于藻蓝蛋白基因的高度保守性, 作者打算同样利用此质粒进行不同蓝藻的基因转移实验, 以检验此质粒的通用性。

本研究以单细胞聚球藻 *Synechococcus* sp. PCC7942 为材料, 将同源重组型质粒 pUTK 导入其中, 以期获得转基因蓝藻。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌种和质粒 重组质粒 pUTK 由本实验室构建, 保存, 大小是 10.8 kb。受体藻株单细胞聚球藻 *Synechococcus* sp. PCC7942 由中科院水生生物研究所提供。

1.1.2 培养基 BG11 培养基配方参见 Rippka R. 1979 年的方法。

1.1.3 主要试剂 限制性内切酶, λ DNA/ EcoR I + Hind III Marker, λ DNA/ Hind III Marker, pBR322/ Hae III Marker, T₄DNA 连接酶, dNTP, Taq DNA 聚合酶等购自上海生工生物工程公司; 尼龙膜为 Millipore 公司产品 (孔径 0.45 μ m); DIG 引物标记和检测试剂盒 I 为 Boehringer Mannheim 公司产品; 蛋白质印迹膜为 Boehringer Mannheim 公司产品; 大鼠抗血清, 酶标兔抗大鼠血清 (辣根过氧化物酶) 均为本实验室制备。

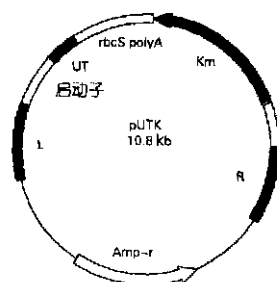


图 1 质粒 pUTK 示意

Fig. 1 Map of plasmid pUTK

pUTK 质粒含有蓝藻 *Calothrix* sp. PCC7601 的藻蓝蛋

* 国家 863 计划资助项目 819-04-03 号。

收稿日期: 2001-01-09; 修回日期: 2001-03-19

1.2 方法

1.2.1 蓝藻 *Synechococcus* sp. PCC7942 的培养
Synechococcus sp. PCC7942 野生株和转化株用 BG11 培养基液体培养,由 40 W 日光灯提供光照,光强为 $50 \mu\text{E} \cdot (\text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1})$,培养温度为 30°C ,经常摇动。固体 BG11 培养基,含 1% 琼脂,光照与温度条件同液体的培养。

1.2.2 自然转化蓝藻 *Synechococcus* sp. PCC7942 及转化子的筛选
蓝藻 *Synechococcus* sp. PCC7942 培养至 OD_{730} 值达 $0.25 \sim 0.35$ 时,取 $15 \sim 20 \text{ ml}$ 离心收集藻细胞,并用 10 ml (10 mmol/l) NaCl 洗涤 1 次,离心浓缩藻细胞于原体积 $1/10$ 的新鲜 BG11 培养基中,加入 $2 \sim 3 \mu\text{g}$ 重组质粒,混匀,室温下避光孵育过夜。孵育后混合藻液涂布于覆盖在 BG11 固体培养基上的 Millipore 滤膜(孔径 $0.45 \mu\text{m}$),室温下光照培养 20 h。将滤膜转移到含适量卡那霉素的固体培养基上继续培养 7~10 d,挑取生长好的藻落移入 2 ml 液体培养基中(含 $10 \sim 15 \mu\text{g/ml}$ 卡那霉素),经常摇动,逐级扩大培养。

1.2.3 Southern 杂交
Synechococcus sp. PCC7942 基因组 DNA 的制备按 Deniell 1989 年的方法。将适量 *Synechococcus* sp. PCC7942 基因组 DNA 用 PstI 37°C 酶切过夜,进行 1.0% 的琼脂糖凝胶电泳,再将 DNA 转移到尼龙膜,烤膜后同标记的 R 探针进行杂交。探针是以同源片段 R 为模板,由地高辛试剂盒制备的。

1.2.4 转基因蓝藻的红光诱导表达
取对数生长后期 OD_{730} 值为 $0.6 \sim 1.0$ 的转基因蓝藻和野生藻各 20 ml ,在波长 660 nm 光强 $50 \mu\text{mol} \cdot (\text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1})$ 的红光照射 90 min 后离心收集藻体,用丙酮按藻体积的 3~4 倍反复抽提 2~3 次,以去除色素,离心去上清,置通风处使丙酮挥发,获得藻粉。藻粉以 $80 \mu\text{l/mg}$ 制样进行常规 SDS-PAGE 电泳检测,凝胶扫描确定重组蛋白的表达量。

1.2.5 表达产物的 Western blot 分析
按常规方法进行,胸腺素 α_1 的抗血清由本实验室制备。

2 结果及分析

2.1 转化藻的获得及其扩大培养

将抗卡那霉素固体板上的单藻落挑入含卡那霉素的 BG11 液体培养基中扩大培养,从外观可见:*Synechococcus* sp. PCC7942 野生藻(W)逐渐发黄,变白,沉淀到瓶底死去;而转化藻(T)则是黄绿色逐渐加

深。

2.2 Southern 杂交分析

用 PstI 分别酶切野生藻和转化藻的染色体 DNA,与地高辛标记的 R 片段的探针进行杂交。从图 2 可看出,转化藻杂交带的位置位于野生藻的后面,表明含有 R 片段的杂交带分子量变大,可见外源基因已整合到野生藻 *Synechococcus* sp. PCC7942 染色体的 R 同源片段上。



图 2 Southern blot 检测

Fig. 2 Southern blot analysis

1. 质粒阳性对照;2. 野生藻株;3. 转化藻株。

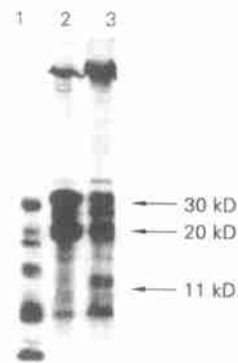


图 3 蛋白的 SDS-PAGE 分析

Fig. 3 Protein SDS-PAGE analysis

1. marker;2. 野生藻株;3. 转化藻株

2.3 转化藻株表达产物的分析鉴定

将野生蓝藻和转基因蓝藻分别进行红光诱导后,分别提取 *Synechococcus* sp. PCC7942 野生藻株和转化藻株的总蛋白进行 SDS-PAGE 分析,电泳结果如图 3,

可以看出转化藻在 11 kD 处多一蛋白带,与预期要表达的融合蛋白 UT(104 个氨基酸)大小相符,经凝胶成像仪分析该蛋白占总蛋白的 4.8%。另外,与野生藻的蛋白图谱比较,转化藻在 20 kD 和 30 kD 位置附近的两条蛋白谱带(此为藻胆体的藻蓝蛋白 $\alpha\beta$ 亚基和连接多肽^[3,4])变浅,这是由于外源基因整合插入聚球藻 *Synechococcus* sp. PCC7942 的 *cpc* 2 相似基因而部分影响了藻胆蛋白基因的正常表达。



图 4 Western blot 检测

Fig. 4 Western blot analysis

1. 野生藻株;2. 转化藻株

为了进一步证明在 11 kD 位置所出现的蛋白谱带即为我们表达的目的产物——Ub 融合的胸腺素 α_1 (UT),将转化藻株表达产物进行 Western blot 杂交,蛋白质印迹结果(图 4)表明,上述 11 kD 左右的蛋白带即为所要表达的目的蛋白。

3 讨论

本实验室利用已经构建好的丝状蓝藻 *Calothrix* sp. PCC7601 基因整合平台系统来进行其他蓝藻的转化实验。由于供体质粒 pUTK 没有蓝藻复制子,故其转化蓝藻后不能以质粒的形式存在,只能通过基因同源重组的方式进行基因转移。该质粒外源基因两端分别连接 *Calothrix* sp. PCC7601 *cpc* B2A2 编码区同源片段 L 和 R,由于蓝藻中双交换的几率大于单交换,外

源基因可能通过同源双交换而整合到 *cpc* 2 操纵子区。*Calothrix* sp. PCC7601 的藻胆体有 3 个 *cpc* 操纵子,其中 *cpc* 2 操纵子只有在红光的诱导下才能表达,在正常光照培养条件下极少表达,而不受光调控的 *cpc* 1 操纵子位于 *cpc* 2 操纵子下游约 3.5 kb 处,是看家基因。相对而言,*cpc* 2 操纵子在常规培养时并非生长必需,故作者选择 *cpc* 2 操纵子片段为整合靶位,即使该位点由于重组而被破坏也不会影响蓝藻的正常生长。由于设计的整合同源片段 L 和 R 是 *cpc* 2 操纵子的保守区段,故打算利用此供体质粒 pUTK 转化单细胞聚球藻 *Synechococcus* sp. PCC7942,通过 L 和 R 片段与单细胞聚球藻 *Synechococcus* sp. PCC7942 染色体的相应同源保守区段重组,将外源基因导入蓝藻染色体中。通过抗性筛选,Southern 杂交证明外源质粒已整合到受体蓝藻的染色体上;通过 SDS-PAGE 电泳、Western blot 检测,进一步证明在红光诱导下表达了外源基因胸腺素 α_1 ,转化藻株稳定且表达量达到蓝藻总蛋白的 4.8%。成功转化的结果表明,聚球藻 *Synechococcus* sp. PCC7942 也有与整合片段 L 和 R 同源的保守区段,并且是可以被重组突变的,不会严重影响它的生长。供体质粒 pUTK 不仅能转化丝状蓝藻 *Calothrix* sp. PCC7601,而且能转化单细胞聚球藻 *Synechococcus* sp. PCC7942,是一种较好的通用型供体质粒载体。我们还将利用它进行螺旋藻的转基因研究。

参考文献

- 1 Lou S.L., Zhang J. et al.. The progress of genetic engineering of cyanobacteria. In: Chaudhary B. R. and Araval S. B.. Cytology, Genetics and Molecular Biology of Algae, Amsterdam. The Netherlands: SPB Academic Publishing, 1996. 421 ~ 439
- 2 Zhang Jun, Lou S.L. et al.. Chin. J. Oceanol. Limnol., 1998, 16 (suppl.): 40 ~ 46
- 3 Pandey R, Chauhan S, Singhal G.S. et al.. Current Microbiology 2000, 40: 297 ~ 301
- 4 Sawaki H., Sugiya T. and Omata T.. Plant Cell Physiol., 1998, 39(7): 756 ~ 761

(上接第 3 页)

EXPRESSION OF THYMOSIN α_1 IN *Synechococcus* sp. PCC7942 BY HOMOLOGY INTEGRATION DONOR PLASMID pUTK

ZHANG Jun SONG Xin-qiang XU Hong CHEN Tian-sheng LOU Shi-lin

(School of Life Science, Xi'an University, The Key Laboratory of Ministry of Education for Cell Biology and Tumor Cell Engineering 361005)

Received: Jan. 9, 2001

Key Words: *Synechococcus* sp. PCC7942, Homology integration, Thymosin α_1 , Expression

Abstract

Donor plasmid pUTK constructed for transferring *Calothrix* sp. PCC7601 was introduced into *Synechococcus* sp. PCC7942 by natural transformation. Screened by kanamycin and detected by Southern blot analysis, the transformants which occurred by plasmid homology integration were obtained. Thymosin α_1 was expressed up to 4.8 % of total protein mass by red light inducing, which was tested by SDS-PAGE and confirmed by Western blot. The results showed that the donor plasmid pUTK can be used to transfer not only filament blue-green algae *Calothrix* sp. PCC7601, but also single cell blue-green algae *Synechococcus* sp. PCC7942.

(本文编辑:张培新)