

## 解毒酶基因在蓝藻中的克隆与表达

闫艳春<sup>1</sup> 乔传令<sup>2</sup> 张 媛<sup>3</sup>

<sup>1</sup>(山东农业大学遗传研究所 泰安 271018)

<sup>2</sup>(中国科学院动物研究所 北京 100080)

<sup>3</sup>(北京大学生命科学院 北京 100871)

**摘 要** 用抗性库蚊酯酶基因 B1 的 cDNA 片段插入质粒 pRL-439 中的强启动子之后,再与穿梭表达载体 pDC-8 相连构建成大肠杆菌-蓝藻穿梭表达载体 pDC-B1,然后通过三亲接合转移法将 pDC-B1 转入蓝藻 *Synechococcus sp.* PCC7942 中,经新霉素筛选获遗传稳定的转基因藻株,纯化单藻落在液体中扩大培养,提取蓝藻质粒, Southern 杂交确证 B1cDNA 已转入受体细胞,用酯酶的特异性底物  $\beta$ -乙酸萘酯( $\beta$ -NA)检测 B1 的表达,转基因藻对  $\beta$ -NA 的降解明显高于野生藻,证明酯酶 B1 基因在转基因藻中得到表达。

**关键词** 解毒酶基因 转基因藻 单细胞集球藻 接合转移 表达

中图分类号 Q815 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2000)01-0042-04

蓝藻(Cyanobacteria)属光合原核生物<sup>[1]</sup>。近年来,蓝藻的基因工程取得了一些可喜的成果,如把芽孢杆菌的杀虫毒素基因导入蓝藻中试图以此工程藻对水体蚊虫进行生物防治<sup>[2~4]</sup>;把脂肪酸脱饱和基因(*desA*)导入冷敏感的藻株使其增加抗寒性<sup>[5]</sup>;把小鼠金属硫蛋白 mMT-1cDNA 导入丝状体蓝藻鱼腥藻(*Anabaena* 7120)<sup>[6]</sup>,用于富集水中的重金属;把人肿瘤坏死因子基因(TNF)导入鱼腥藻 7120(中科院植物研究所刘丰龙硕士论文),试图开辟用蓝藻进行基因工程制药的新途径。

本研究以单细胞集球藻 *Synechococcus sp.* PCC7942 为材料,将抗性尖音库蚊五带亚种(*Culex pipiens quinquefasciatus*)的酯酶 B1 基因<sup>[7]</sup>克隆到其中,以期获得高效表达的工程藻。经特异性酯酶活性分析可知,已得到高效表达解毒酶基因的工程藻 *Synechococcus sp.* PCC7942。

### 1 材料和方法

#### 1.1 材料

**1.1.1 细菌与质粒**:大肠杆菌 HB101,转化受体菌,大肠杆菌质粒 pRL-439,抗性标记为 Amp<sup>r</sup>,多克隆位点接受 B1-cDNA 的插入;大肠杆菌质粒 pDC-8,抗性标记为 Km<sup>r</sup>,多克隆位点接受 pRL-B1 的插

入,大肠杆菌质粒 RP4 + pRL542,三亲接合必需组份,大肠杆菌质粒 pUC-B1,抗性标记为 Amp<sup>r</sup>,含目的基因。

**1.1.2 蓝藻材料和培养条件**:实验材料 *Synechococcus sp.* PCC7942(以下简称 S. 7942)为单细胞集球藻,属原核光合生物。它的两大优点是易转化和兼性异养<sup>[8]</sup>。7942 野生株和突变工程株液体培养用 BG-11 培养基<sup>[9]</sup>,由 40W 日光灯提供光照,光照强度  $50\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ,连续无菌通气提供搅拌,恒温 30℃。固体平板培养仍用 BG-11 培养基,1.5% 琼脂粉,光照与温度条件同液体的培养。

#### 1.2 方法

**1.2.1 重组质粒 pRL-B1 的构建**:用低融点琼脂糖凝胶回收酶切目的片段 B1 和载体 pRL-439,在 T4DNA 连接酶作用下将 B1 连入 pRL-439 的多克隆位点,转化大肠杆菌 HB101,取上述转化菌落用微量法制备质粒 DNA<sup>[10~11]</sup>作限制酶分析,以证实 B1 被克隆到 pRL-439。

**1.2.2 穿梭表达载体质粒 pDC-B1 的构建**:以 pRL-B1 和 pDC-8 构建穿梭表达载体质粒 pDC-B1,此步构建用 Amp<sup>r</sup>(30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ )和 Km<sup>r</sup>(30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ )双抗筛选,其他步骤同 1.2.1。

**1.2.3 三亲接合转移<sup>[12]</sup>**:(1)大肠杆菌的准备:在

接合转移的前一天晚上,在含有相应抗生素的 40mL LB 培养液中,分别接种含穿梭表达质粒的菌种及含接合质粒 RP4 和辅助质粒 pRL542 的菌种,37℃,280 r/min 过夜。7000 r/min 离心 5 min,然后用 10~25 mL 不含抗生素的 LB 培养液重新悬浮细胞,不可剧烈振荡,以免破坏接合菌毛。等体积混合两种菌液,对于每个转移平板所需两种菌液的体积为 10mL + 10mL。离心,弃上清液,以最小体积 LB 重悬大肠杆菌细胞,每个平板用 200 $\mu$ L LB 培养基涂板。

(2) 蓝藻的准备:经绘制蓝藻生长曲线可知,三亲接合转移时藻的生长时间应选生长至 4~5 d 的藻为宜。一般在三亲接合转移的前两天给蓝藻更换培养液。4000 r/min 离心 10min,收集藻细胞。40 mL 培养物可用于几个平板的杂交。用等体积无抗生素的 BG-11 培养液洗涤藻细胞两次,然后以最小体积悬浮细胞。稀释:从 1:10 直至 1:100 作一系列稀释,使终体积为 10 $\mu$ L 或更少。

(3) 接合转移:在不含抗生素的 BG-11 培养基的平板上铺一张无菌滤膜。也可以用 NC 膜,但在用之前必须把去垢剂完全去掉。将 100 $\mu$ L 未稀释和稀释的蓝藻细胞加入 200 $\mu$ L 大肠杆菌混合液中混合均匀,用微量移液器取混合液,从滤膜的一端缓慢地轻涂混合菌液到另一端,使混合液自然渗入平板中。光照条件下,温育滤膜 48h,使蓝藻表达抗性。转移滤膜到含适量新霉素的 BG-11 琼脂板上继续培养约 2 周,有抗性藻落出现。纯化转基因蓝藻:将单藻落转移到含适量新霉素的 BG-11 培养液中。任何单藻落都可能含有大肠杆菌,去除大肠杆菌最简单的方法是在指形管中使菌落悬浮在液体 BG-11 中,加入 0.5mol/L 蔗糖,离心 5min,收集沉淀。也可将整个滤膜转入含抗生素的培养液中,待转基因藻生长稳定后,再接种到含抗生素的 BG-11 琼脂平板上得到单藻落。

**1.2.4 Southern 杂交:** S. 7942 基因组 DNA 的制备按 Goyal<sup>[13]</sup>方法。将适量 S. 7942 基因组 DNA 用 *EcoR* I 于 37℃ 消化过夜,进行 1.0% 琼脂糖凝胶电泳,再将 DNA 转移至 Hyboxd<sup>+</sup> 尼龙膜 (Amersham),烤膜后同标记过的 B1 探针进行杂交。探针为用 [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]dATP 标记、并经 *EcoR* I 酶切、回收抗性库蚊的酯酶基因片段。具体过程参见文献[10~11]。

**1.2.5 转基因藻的酯酶酶活分析<sup>[14]</sup>:** 将在平板上经新霉素抗性筛选的转化子再经含新霉素的 BG-11

培养液扩大培养后,取其 12mL 转基因藻,加入 13mL 磷酸缓冲液,再加入 500 $\mu$ L  $\beta$ -NA,置于摇床进行光照、轻摇使其充分反应。每隔 30min 取上述藻液 2.5mL,加入 0.5mL BLS 溶液,室温静置 15min,测  $OD_{555}$ 。

## 2 结果与讨论

### 2.1 结果

**2.1.1 pRL-B1 的构建:** 将 pUC19-B1、pRL-439 质粒分别用 *EcoR* I 消化,再连接、转化大肠杆菌,获克隆化质粒 4.0kb 的 pRL-B1(图 1)。对构建的正、反向 pRL-Bx 分别用 *Xba* I 和 *Bam* HI 限制酶酶切、琼脂糖凝胶电泳分析(图 2),证明 B1-cDNA 已克隆到载体 pRL-439 中。由图可见,3 个随机重组子中,B 道和 E 道(随机编号为 No. 3)是正向克隆,称为 pRL-B1;C 道和 D 道(随机编号分别是 No. 2 和 No. 1)是反向克隆。以下重组使用正向克隆子 pRL-B1。

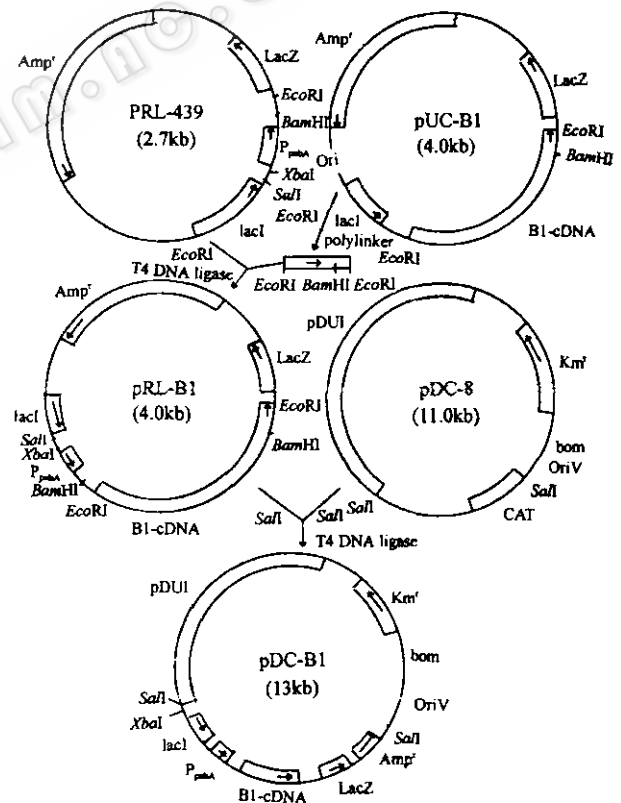


图 1 穿梭表达载体 pDC-B1 的构建

Fig. 1 Construction of shuttle expression vector pDC-B1

**2.1.2 pDC-B1 构建:** 将重组质粒 pRL-B1 和穿梭表达载体质粒 pDC-8 分别用 *Sal* I 消化、再连接、转化大肠杆菌,获克隆化质粒 13.0kb 的 pDC-B1。对穿梭表达载体重组质粒 pDC-B1 用 *Sal* I 进行酶切

和琼脂糖凝胶电泳分析并经 Southern 杂交分析,得知目的基因(解毒酶基因 B1)已克隆到载体质粒 pDC-8 中。

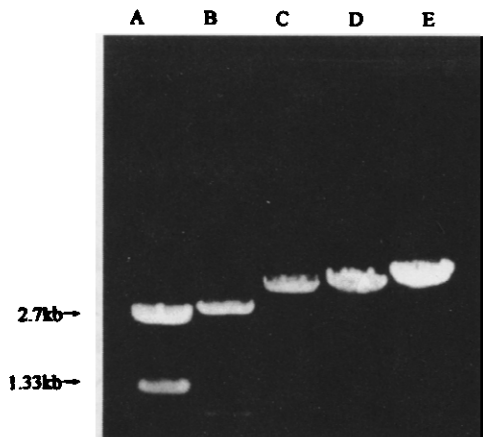


图2 3个重组子 *Bam*HI 酶切后 0.8% 琼脂糖凝胶电泳鉴定正向克隆

Fig.2 Restriction patterns of three recombinant plasmids

DNA's digested by *Bam*HI, *Eco*R I and *Xba* I

A. pUC-B1/*Eco*R I; B No. 3/*Bam*HI; C. No. 2/*Bam*HI;

D. No. 1/*Bam*HI; E. No. 3/*Xba* I

2.1.3 转基因藻的获得及其扩大培养: 将抗新霉素固体板上的单藻落挑入含新霉素的 BG-11 液体培养液中进行扩大培养, 从外观上可见: S. 7942 野生藻(W)发黄, 而且随着培养时间的增加, 野生藻会愈来愈黄直至死去; 而转基因藻(T)会随时间的增加愈来愈绿。

2.1.4 Southern 杂交分析: 经 *Eco*R I 消化的

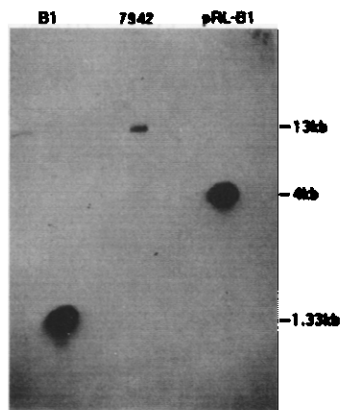


图3 转基因藻质粒的 Southern 杂交分析

Fig.3 Southern analysis of the plasmids in wild and transgenic cyanobacteria

B1: Target gene; W: Wild type;

7942: Transgenic cyanobacteria of PCC7942;

C: contrast; pRL-B1: Recombinant plasmid

S. 7942(W. T. C)进行电泳、转膜后,与 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dATP}$ 标记的 B1 探针杂交,发现在 13kb 处仅有转基因藻 S. 7942 出现明显的杂交信号,而野生藻(W)和对照组(C)均未见任何杂交信号(图3)。

2.1.5 转基因藻脱毒功能的分析: 转基因藻中含有 B1 基因,从理论上分析它对  $\beta\text{-NA}$  应有降解,由图 4 可见,转基因藻较之野生藻和对照藻有高的降解效果,说明解毒酶基因在 S. 7942 中得到表达。

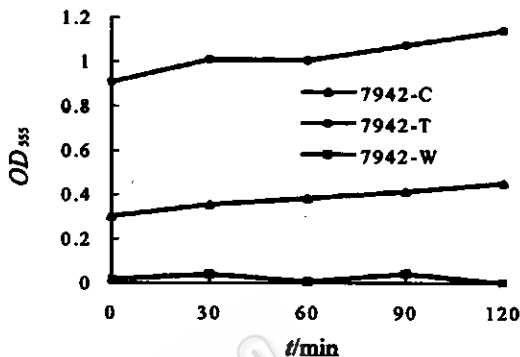


图4 转基因藻脱毒功能的酶活分析

Fig.4 Analysis of detoxification of transgenic cyanobacteria

7942-C: 对照藻; 7942-T: 转基因藻;

7942-W: 野生藻

## 2.2 讨论

蓝藻的结构简单,但却包含了高等植物的许多复杂生化过程,其放氧光合、固氮、分化发育等特征的分子生物学研究,无疑是一个很有吸引力的生物模型。蓝藻的分子生物学研究,近年来有突破性进展,1984年, Wolk 等<sup>[15]</sup>报道了进行接合转移的大肠杆菌-蓝藻穿梭表达载体 pRL 家族的构建,使得蓝藻细胞内基因表达调控研究及外源 DNA 导入的操作简便易行,国内蓝藻的转基因研究有 Xu Xudong 等<sup>[3]</sup>报道的基因工程杀蚊幼虫鱼腥藻的研究,后有金属硫蛋白转入鱼腥藻的报道<sup>[6]</sup>, 本文报道为国内第三例转基因蓝藻,将能分解菊酯类、氨基甲酸酯类、有机磷类等农药的解毒酶基因转入适应力强,分布广泛的蓝藻中,针对环境中的农药污染进行研究,这为生物工程技术在环境保护上的应用开辟了新的方向,为基因工程蓝藻实际应用于农药污染的治理打下了一个坚实的基础。

致 谢: 单细胞集球藻 S. 7942、大肠杆菌质粒 pRL-439、pDC-8 及 RP4 + pRL542 由中科院植物研究所施定基研究员提供;大肠杆菌质粒 pUC-B1 由法国蒙贝利埃大学 Michel Raymond 教授提供。特此致谢。

## 参 考 文 献

- [ 1 ] Carr N G ,Whitton B A. The Biology of Cyanobacteria ,Blackwall Scientific Publications ,Oxford ,1982 ,1~20
- [ 2 ] Tandeau de Marsac N *et al.* *Mol Gen Genet* ,1987 ,**209** :396~398
- [ 3 ] Xu Xudong ,Kong Renqiu *et al.* *FEMS Microbiol Lett* ,1993 ,**107** :247~250
- [ 4 ] Murphy R C ,Stevens S E Jr. *Appl Environ Microbiol* ,1992 ,**58** :1650~1655
- [ 5 ] Wada H ,Gombos *et al.* *Nature* ,1990 ,**347** :200~203
- [ 6 ] 孙 军 ,金 苹等.生物工程进展 ,1994 ,**14**( 6 ) :39~42
- [ 7 ] Mouches C ,Pauplin Y *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA* ,1990 ,**87** :2574~2578
- [ 8 ] Gaozhong Shen ,Wim F J. *J Biol Chem* ,1994 ,**269**( 19 ) :13904~13910
- [ 9 ] Rippka R ,Deruelles J *et al.* *J Gen Microbiol* ,1979 ,**111** :1~61
- [ 10 ] Sambrook J ,Fritsch E F ,Maniatis T. 分子克隆实验手册 ,北京 :科学出版社 ,1992
- [ 11 ] 卢圣栋.现代分子生物学实验技术 ,北京 :高等教育出版社 ,1993
- [ 12 ] Elhai J ,Wolk C P. *Methods Enzymol* ,1988 ,**167** :747~757
- [ 13 ] Goyal D. *J Microbiol Methods* ,1992 ,**15** :7~15
- [ 14 ] Ellman G L ,Courtney R D *et al.* *Biochem Pharmacol* ,1961 ,**7** :88~95
- [ 15 ] Wolk C P ,Vonshak A *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA* ,1984 ,**81** :1561~1565

## Cloning and Expression of the Detoxifying Gene in Cyanobacteria

YAN Yan-chun<sup>1</sup> QIAO Chuan-ling<sup>2</sup> ZHANG Yuan<sup>3</sup>

<sup>1</sup>( Institute of Genetics ,Shandong Agricultural University ,Taian 271018 )

<sup>2</sup>( Institute of Zoology ,The Chinese Academy of Sciences ,Beijing 100080 )

<sup>3</sup>( College of Life Sciences ,Peking University ,Beijing 100871 )

**Abstract** Plasmid pRL-B1 was constructed from detoxifying gene( called B1 ) of pesticide resistant *Culex* and from plasmid pRL-439 containing the strong promoter PpsbA. *E. coli*-cyanobacteria shuttle expression plasmid pDC-B1 was constructed from shuttle vector pDC-8 and from recombinant plasmid pRL-B1 ,then it was transferred into *Synechococcus sp.* PCC7942 by triparental conjugative transfer. The existence of B1 was detected by Southern analysis and the expression of B1 was confirmed by enzyme activity analysis of detoxification of transgenic cyanobacteria. Experimental results indicated that the transgenic cyanobacteria could degrade  $\beta$ -naphthyl acetate(  $\beta$ -NA ) a specific substrate of esterase. The enzyme activity of transgenic strain was higher than that of the wild type. It may be the first report on transformation of detoxify gene of pesticide resistant *Culex* into *Synechococcus* strain.

**Key words** Detoxifying gene ,*Synechococcus* ,expression ,transgenic cyanobacteria ,conjugative transfer