

# 转基因鱼腥藻中 hTNF- $\alpha$ 基因表达与光合作用间的相关性研究

## Studies on Relationship Between the Expression of hTNF- $\alpha$ Gene and Photosynthesis in *Anabaena* sp. IB02

李 爽<sup>1</sup> 张芑芑<sup>2</sup> 冉 亮<sup>2</sup> 施定基<sup>1,2\*</sup> 宋东辉<sup>1</sup> 赵兴贵<sup>1</sup> 邓元告<sup>1</sup> 张越男<sup>1</sup> 王昌禄<sup>3</sup>  
LI Shuang<sup>1</sup>, ZHANG Peng-Peng<sup>2</sup>, RAN Liang<sup>2</sup>, SHI Ding-Ji<sup>1,2\*</sup>, SONG Dong-Hui<sup>1</sup>, ZHAO Xing-Gui<sup>1</sup>,  
DENG Yuan-Gao<sup>1</sup>, ZHANG Yue-Nan<sup>1</sup> and WANG Chang-Lu<sup>3</sup>

1 天津科技大学海洋科学与工程学院,天津 300457

2 中国科学院植物研究所,北京 100093

3 天津科技大学食品工程与生物技术学院,天津 300457

1 College of Marine Science and Engineering, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China

2 Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100093, China

3 College of Food Engineering and Biotechnology, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China

**摘 要** 分析了培养光强对转基因鱼腥藻生长和 hTNF- $\alpha$  基因表达的影响,以及转基因鱼腥藻 IB02 的光合放氧活性、光系统 I 及光系统 II 活性。发现光强对转基因鱼腥藻 IB02 的生长和 hTNF- $\alpha$  基因表达都有促进;hTNF- $\alpha$  基因在鱼腥藻中的表达率与真正光合、光系统 I 和光系统 II 活性存在一定的联系。hTNF- $\alpha$  基因表达同时对宿主的光合放氧特性也产生了显著的影响,与正对照相比转基因藻光呼吸速率增强 68%,饱和点降低 66%,说明转基因鱼腥藻的代谢负荷增加,并在低光强下生长比野生型快。

**关键词** 转基因鱼腥藻 IB02,光合作用,基因表达

中图分类号 Q945.11 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2006)04-0609-04

**Abstract** The effects of illumination on growth of *Anabaena* sp. IB02 and hTNF- $\alpha$  expression were studied. Photosynthetic activity, PS I and PS II activity of *Anabaena* sp. IB02 were assayed. Illumination enhanced the growth of *Anabaena* sp. IB02 and hTNF- $\alpha$  expression. Some relations were observed between hTNF- $\alpha$  expression and true photosynthesis activity, PS I, PS II activity of *Anabaena* sp. IB02. Significant differences of the photosynthetic activity of host were detected simultaneously when hTNF- $\alpha$  expressed: the respiration rate increased( + 68%), the light saturation point descended( - 66%), all these suggested that the metabolic charge of host were increased and grow faster than wild type under low illumination.

**Key words** transgenic *Anabaena* sp. IB02, photosynthesis, gene expression

蓝藻又名蓝细菌,是一类营放氧光合作用的原核生物。随着近年来分子生物学的发展,蓝藻成为继大肠杆菌和酵母之后的新一代转外源基因的微生物表达宿主,受到了广泛重视<sup>[1]</sup>。

能否用转基因蓝藻成功地制备药物主要取决于两个因素:目的基因的表达效率和转基因蓝藻的生长速率(或光合活性)。我们研究集体从 1994 年起就选择人肿瘤坏死因子- $\alpha$ (简称 hTNF- $\alpha$ )为目的基

Received: December 29, 2005; Accepted: May 31, 2006.

This work was supported by a grant from Key Technologies R&D Program of Tianjin Municipal Science and Technology Commission (No. 3015080).

\* Corresponding author. Tel: 86-22-60601101; E-mail: zyanoshi@126.com

天津市科委科技攻关重点项目(No. 3015080)

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

因,这不仅由于它是一种十分有前景的抗癌药<sup>[2]</sup>,而且在临床上对病人作静脉或皮下注射处理时用量很低<sup>[3]</sup>,即使制成口服剂,剂量也很小,十分适合目前外源基因在蓝藻中表达不高的实际情况<sup>[1]</sup>。我们从1996年构建转hTNF- $\alpha$ 基因鱼腥藻初步成功后<sup>[4]</sup>,观测到转基因藻(称*Anabaena* sp. IB01)的生长比野生细胞只低10%左右(未发表)。

在2000年我们改进了鱼腥藻中在翻译水平上表达hTNF- $\alpha$ 基因有关的SD序列,明显提高了hTNF- $\alpha$ 基因的表达效率<sup>[5]</sup>。这种转基因鱼腥藻称为*Anabaena* sp. IB02。我们在检测这种转基因蓝藻的hTNF- $\alpha$ 表达效率和光合作用时发现,当hTNF- $\alpha$ 基因的表达效率提高后,这种转基因鱼腥藻中的光合作用高于野生型细胞,光合活性、光系统I及光系统II活性与hTNF- $\alpha$ 基因的表达之间存在着紧密的相关性。本文报道这些初步观测结果。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 蓝藻品系** 野生型鱼腥藻7120(*Anabaena* sp. PCC 7120)来自法国巴斯德研究所;转基因鱼腥藻IB02来自中国科学院植物研究所光合作用研究中心,由张芑芑等构建<sup>[6]</sup>,构建过程是:将hTNF- $\alpha$ 与长约3.4kb的pMD质粒相连,经EcoRI和KpnI双酶切后将含有hTNF- $\alpha$ 基因的大片段与同样经EcoRI和KpnI双酶切的长约12.4kb的pRL-489大片段相连,并命名为pMD-489-hTNF- $\alpha$ ,pRL-489为其正对照。

**1.1.2 培养基和培养条件**:野生型鱼腥藻7120(wild type)转质粒pRL-489鱼腥藻和转pMD-489-hTNF- $\alpha$ 基因鱼腥藻用不含氮源的BG-11培养基<sup>[7]</sup>培养。正对照和转基因鱼腥藻所用培养基中加入硫酸新霉素(Neomycin Sulfate),50 $\mu$ g/mL;30 $^{\circ}$ C,130r/min在三角瓶中光照振荡培养,光照强度90 $\mu$ mol/(m<sup>2</sup>·s)。

**1.1.3 主要试剂和仪器**:DHZ-032LR型大型光照恒温摇床,购自上海申能博彩生物科技有限公司;Multiskan Ascent型酶标仪购自美国Thermo公司;hTNF- $\alpha$  ELISA检测试剂盒购自深圳晶美生物公司;DW/1型氧电极购自英国Hans Tech公司。

### 1.2 方法

**1.2.1 藻细胞浓度计算**:取一定量藻样,匀浆,在血球计数板上数藻细胞数并计算出样品的细胞浓度。

**1.2.2 转基因鱼腥藻总可溶性蛋白制备<sup>[8]</sup>及检测**:收集鱼腥藻细胞,以重量体积比1:5加入50mmol/L

Tris-HCl缓冲液(pH8.0),洗涤3次反复冻融破碎细胞,离心11000r/min,10min,上清即为总可溶性蛋白粗提液,按Lowry法检测蛋白质浓度<sup>[9]</sup>。

**1.2.3 hTNF- $\alpha$ 检测**:按试剂盒说明书进行操作,采用双抗体夹心酶联免疫法(DAS-ELISA)用酶标仪检测hTNF- $\alpha$ 的含量,按hTNF- $\alpha$ 含量占总可溶蛋白的百分数计算其表达率。

**1.2.4 光强对转基因鱼腥藻生长及hTNF- $\alpha$ 表达量的影响**:在光照强度为0~700 $\mu$ mol/(m<sup>2</sup>·s)范围内,测定对数生长后期的转基因鱼腥藻光合放氧活性(pH8.0,25 $^{\circ}$ C),在5个梯度光强[221、215、142、87、38 $\mu$ mol/(m<sup>2</sup>·s)]下培养24d分别取样,按方法1.2.3测定hTNF- $\alpha$ 表达。

**1.2.5 光系统活性的测定**:培养转基因鱼腥藻、转质粒pRL-489鱼腥藻和野生鱼腥藻的周期为一个月,每3天取一次样,按文献[10]测定在饱和光强下的PSI和PSII放氧活性,并按方法1.2.3测定藻细胞中的hTNF- $\alpha$ 含量。

## 2 结果与讨论

### 2.1 光强对转基因鱼腥藻生长和hTNF-2表达的影响

如图1所示,在本试验条件下,藻生长量和hTNF- $\alpha$ 表达率都随着光强增大而增大,而hTNF- $\alpha$ 表达率在光强200 $\mu$ mol/(m<sup>2</sup>·s)左右趋缓,与藻生长情况并非完全一致,光强为215和221 $\mu$ mol/(m<sup>2</sup>·s)时,藻细胞生物量比光强为38 $\mu$ mol/(m<sup>2</sup>·s)时分别提高170.0%和208.6%,而hTNF- $\alpha$ 表达率仅提高了28.3%和28.7%。这些结果表明hTNF- $\alpha$ 在蓝藻中的表达率不是恒定值,其合成是受光驱动的,可能与光合作用有关。所以,当光强增大到一定程度时单

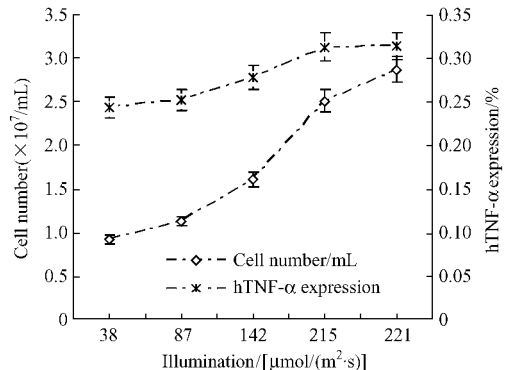


图1 光强对转基因鱼腥藻IB02生长和hTNF- $\alpha$ 表达的影响

Fig.1 The effects of illumination on growth and hTNF- $\alpha$  expression of transgenic *Anabaena* sp. IB02

纯地提高光照对促进 hTNF- $\alpha$  表达不明显。

## 2.2 转基因鱼腥藻的生长曲线

如图 2 所示,在前 20d 时间里,转基因鱼腥藻藻细胞的浓度不断增加,3d 左右的停滞期结束后进入生长期,20d 左右进入生长平稳期,21d 时细胞浓度为  $4.18 \times 10^7$  个/mL,随后细胞开始衰老。

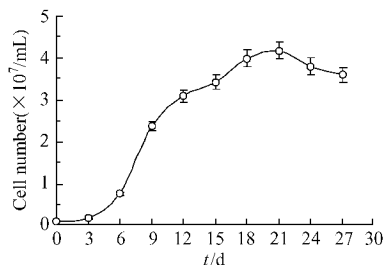


图 2 转基因鱼腥藻 IB02 生长曲线

Fig.2 Growth curve of transgenic *Anabaena* sp. IB02

## 2.3 转基因鱼腥藻中 hTNF- $\alpha$ 表达与真正光合活性之间的关系

用“转基因鱼腥藻的真正光合速率/正对照的光合速率  $\times 100\%$ ”来考察 hTNF- $\alpha$  基因的转入对宿主光合的影响。hTNF- $\alpha$  在转基因鱼腥藻中的表达在生长前 18d 保持比较低的水平,第 21 天时,真正光合出现最低谷时, hTNF- $\alpha$  表达达到了最高峰 0.31% (图 3)。转基因鱼腥藻的光合活性呈波峰-波谷交替出现的趋势,并与相对光合活性表现出相反的变化趋势, hTNF- $\alpha$  基因的转入基本提高了宿主的光合活性。关于为何转基因鱼腥藻的光合速率在整个生长期间发生这样的波动,我们正在作分析,可能转基因细胞对环境 and 代谢变化比较敏感,对外源基因的转入有一个互相调节、逐步适应的过程。

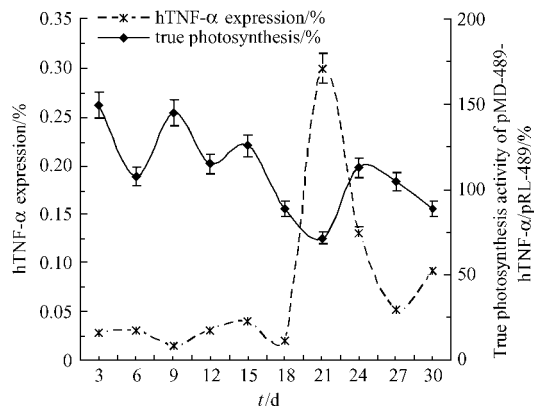


图 3 转基因鱼腥藻 IB02 中 hTNF- $\alpha$  表达与真正光合活性之间的关系

Fig.3 The relationship between hTNF- $\alpha$  expression and true photosynthesis activity of transgenic *Anabaena* sp. IB02

## 2.4 转基因鱼腥藻中 hTNF- $\alpha$ 表达与光系统 I 活性之间的关系

图 4 显示出 hTNF- $\alpha$  表达与转基因鱼腥藻 PS I 光合活性的关系:宿主的 PS I 光合活性呈波峰-波谷交替的趋势,6d 时 PS I 活性为正对照的 2 倍,除了 18d 之外始终保持比正对照高的水平; hTNF- $\alpha$  表达率几乎总与 PS I 光合活性同步处于波峰或波谷;最后 PS I 活性趋向于 100%,即 hTNF- $\alpha$  表达对其活性的影响逐渐变小。

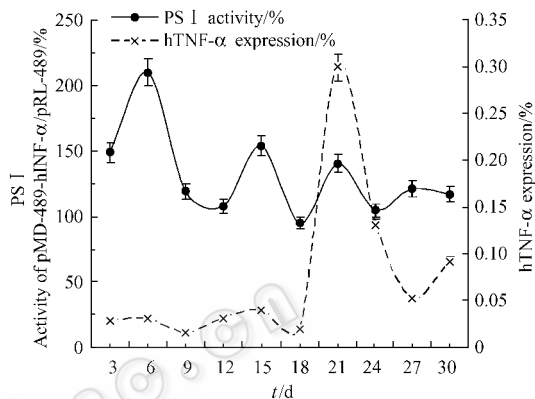


图 4 转基因鱼腥藻 IB02 中 hTNF- $\alpha$  表达与光系统 I 活性之间的关系

Fig.4 The relationship between hTNF- $\alpha$  expression and PS I activity of transgenic *Anabaena* sp. IB02

## 2.5 转基因鱼腥藻中 hTNF- $\alpha$ 表达与光系统 II 活性之间的关系

同真正光合和 PS I 相对光合活性一样,PS II 活性也因 hTNF- $\alpha$  表达而提高(图 5),除 12d 和 21d 以外 PS II 相对活性均  $> 100\%$ ,转基因鱼腥藻细胞的 PS II 相对光合活性与 hTNF- $\alpha$  表达的变化不一致,在

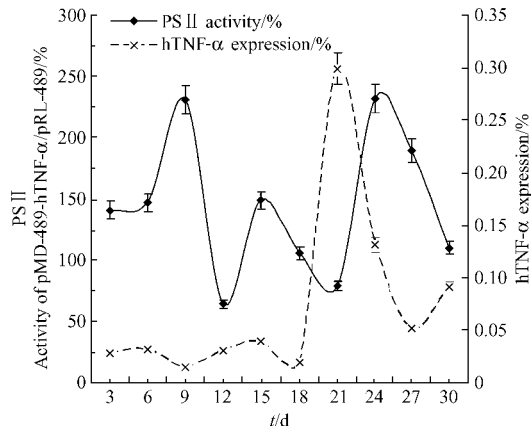


图 5 转基因鱼腥藻 IB02 中 hTNF- $\alpha$  表达与光系统 II 活性之间的关系

Fig.5 The relationship between hTNF- $\alpha$  expression and PS II activity of transgenic *Anabaena* sp. IB02

hTNF- $\alpha$  表达到一个峰值时,PS II 光合活性要迟后 2 ~ 3d 达到一个高峰。

综合图 3、图 4 和图 5 可见,外源基因的表达是受宿主本身的生长和光合作用调控的,宿主的光合作用活性不断地上下波动,很可能是宿主自身不断调节和适应的过程。

### 2.6 hTNF- $\alpha$ 的表达对转基因鱼腥藻光合特性的影响

转 hTNF- $\alpha$  基因鱼腥藻、转质粒 pRL-489 鱼腥藻及野生鱼腥藻 7120 在不同光强时的光合放氧曲线如图 6 所示。转 hTNF- $\alpha$  鱼腥藻光饱和点比野生型和正对照分别低 61% 和 66%(见表 1),在较低光照下就有较高的放氧活性,可见转入 hTNF- $\alpha$  基因提高了宿主细胞对光的敏感性,降低了其对光的需求。这表明由于 hTNF- $\alpha$  基因在鱼腥藻中表达,有利于光信号的高效传导,这种传导机制的变化我们正在作进

一步研究。转入 hTNF- $\alpha$  基因鱼腥藻的呼吸速率明显比野生藻和正对照强(分别增加 89% 和 68%),说明转入 hTNF- $\alpha$  基因加大了宿主细胞的代谢负荷。野生型和正对照的光合放氧能力大致相同,而转入 hTNF- $\alpha$  的鱼腥藻光合放氧稍高。

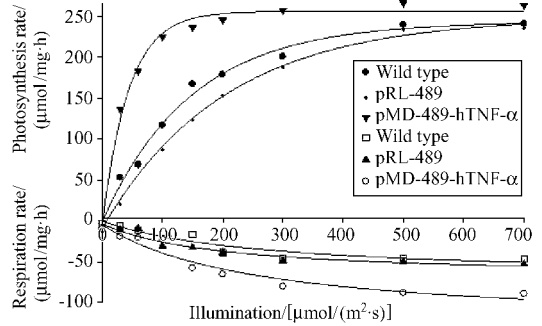


图 6 转基因鱼腥藻 IB02 的光合作用与呼吸作用  
Fig.6 The net photosynthesis activity and respiration activity of transgenic *Anabaena* sp. IB02 responsible to different photon flux density

表 1 转基因鱼腥藻的光合及呼吸特性

Table 1 Photosynthetic oxygen production by transgenic *Anabaena* cells

Sample	True photosynthesis [ $\mu\text{mol}(\text{mg}\cdot\text{h})^{-1}$ ]	Net photosynthesis [ $\mu\text{mol}(\text{mg}\cdot\text{h})^{-1}$ ]	Respiration [ $\mu\text{mol}(\text{mg}\cdot\text{h})^{-1}$ ]	Light saturation point[ $\mu\text{mol}(\text{m}^2\cdot\text{s})^{-1}$ ]	Light compensation point[ $\mu\text{mol}(\text{m}^2\cdot\text{s})^{-1}$ ]
pMD-489-hTNF $\alpha$	361	272	89	160	7
pRL-489	289	236	53	470	10
Wild type	288	241	47	420	5

从上述结果可得到如下结论 (1)光因子既促进了转基因鱼腥藻的生长,又提高了细胞中 hTNF- $\alpha$  的表达 (2)转基因鱼腥藻中 hTNF- $\alpha$  的表达与生长时期不完全是正相关关系,hTNF- $\alpha$  表达量在 30d 生长期中出现三个峰,第一峰和第三峰的出现正好与光合速率下降相关 (3)转基因鱼腥藻中 hTNF- $\alpha$  的表达与 PSI 活性变化几乎是正相关的 (4)转基因鱼腥藻中 hTNF- $\alpha$  表达峰的出现早于 PSII 活性峰 (5)转基因鱼腥藻光饱和时的最高光合速率比野生型细胞高 25%,而在低光强处[ $60\mu\text{mol}(\text{m}^2\cdot\text{s})^{-1}$ ]可高达 170%。转基因鱼腥藻在较低光强下就能产生比较高的光合活性,避免了光反应器中培养大量藻细胞导致光衰减的缺陷,十分有利于转基因鱼腥藻在反应器中高密度培养。

上述这些结论目前尚未见有报道。hTNF- $\alpha$  是人和哺乳动物中的细胞因子,在蓝藻这种古老的光合原核生物中表达,为什么与光合作用有这样的相互调控作用,我们正在做进一步探索。

### REFERENCES(参考文献)

[ 1 ] Shi DJ(施定基),Zhang WJ(张文俊),Deng YQ(邓元告) et al.

Some evolvement of cyanobacteria gene engineering. *China Medicina Informilo J* (中国医学通讯杂志),2005, 1(10): 74 - 78

[ 2 ] Wu WK(吴梧桐),Ding XS(丁锡申),Liu JK(刘景晶). Genetic Engineering Pharmacy Research & Clinics(in Chinese), Beijing: the People's Medical publishing House, 1996 pp.7 - 19

[ 3 ] Zhan ZC(詹正嵩). Secure and reasonable application in clinic of cytokines. Beijing: Chemical Industry Press 2005

[ 4 ] Liu FL, Zhang HB, Shi DJ et al. Construction of shuttle, expression vector of human tumor necrosis factor(hTNF- $\alpha$ ) gene and its expression in a cyanobacterium, *Anabaena* sp. PCC 7120. *Science in China(C)*, 1999, 42(1): 25 - 33.

[ 5 ] Shi DJ(施定基),Ran L(冉亮),Li Y(李艳) et al. Effective expression kit of filamentous cyanobacteria and the plasmid with the expression kit. 00132268.2000-11-14

[ 6 ] Zhang PX(张芾芾). Effective expression of human tumor necrosis factor in *Anabaena* sp. PCC 7120 and its influence on photosynthesis of the host. Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, 2001, pp.63 - 65

[ 7 ] Richard W, Castenhol Z. Culturing methods for cyanobacteria. *Methods Enzymol*, 1988, 3: 68 - 95

[ 8 ] Shi DJ(施定基),Ye X(叶欣),Zhong H(钟晖) et al. Expression of TNF- $\alpha$  gene in *Anabaena* sp. PCC 7120 and purification of its product by affinity chromatography. *Acta Botanica Sinica* (植物学报), 2001, 43(1): 46 - 50

[ 9 ] Wang JZ(汪家政),Fan M(范明). The Protein Technic Handbook. Beijing: Science Press 2000

[ 10 ] Shi DJ, Wang QH, Xu L. Absorption and transfer of light energy in *Anabaena Azollae*. *Bot. Collected Papers*, 1983, 1: 207 - 215