

# T7 RNA 聚合酶基因表达系统在鱼腥藻 7120 中构建及 hG-CSF 的表达

谢雪晴, 田钰琪, 田敬欢, 宁文艳, 王春梅

北京中医药大学 生命科学学院, 北京 102488

谢雪晴, 田钰琪, 田敬欢, 等. T7 RNA 聚合酶基因表达系统在鱼腥藻 7120 中构建及 hG-CSF 的表达. 生物工程学报, 2020, 36(11): 2467-2477.

Xie XQ, Tian YQ, Tian JH, et al. Construction of T7 RNA polymerase gene expression system in *Anabaena* sp. PCC 7120 for the expression of hG-CSF. Chin J Biotech, 2020, 36(11): 2467-2477.

**摘要:** 外源基因的表达效率低是蓝藻基因工程发展的瓶颈之一, T7 RNA 聚合酶表达系统实现了大肠杆菌中外源基因的高效表达, 蓝藻与大肠杆菌同为革兰氏阴性菌, 具有较高的遗传同源性, 在蓝藻中构建 T7 RNA 聚合酶表达系统有可能提高外源基因在蓝藻中的表达效率。为了在鱼腥藻 7120 中构建 T7 RNA 聚合酶表达系统, 采用重叠延伸 PCR 技术和酶切连接等方法构建能够表达 T7 RNA 聚合酶的定点整合载体 pEASY-T1-F1-TacT7RNAPCmR-F2 以及由 T7 启动子驱动 hG-CSF 基因表达的穿梭表达载体 pRL-T7-hG-CSF; 采用电击转化法将定点整合载体导入野生型鱼腥藻中, 通过三亲接合的方法将穿梭表达载体转入已定点整合 T7 RNA 聚合酶的转基因鱼腥藻中。利用 PCR 技术鉴定外源基因在蓝藻中的存在; RT-PCR 方法检测外源基因在蓝藻中的转录情况; Western blotting 实验检测外源基因在蓝藻中的蛋白表达情况。结果表明两种载体构建成功, T7 RNA 聚合酶基因和 hG-CSF 基因被转入鱼腥藻中, 两个基因均在藻中表达, T7 RNA 聚合酶表达系统在鱼腥藻中构建成功, 与传统蓝藻表达系统相比, 文中在鱼腥藻中构建的 T7 表达系统使 hG-CSF 基因的表达量提高 2 倍。该表达系统将为蓝藻基因工程的应用提供更优的工具, 将促进蓝藻作为底盘细胞在合成生物学等领域的发展。

**关键词:** T7 RNA 聚合酶, T7 启动子, 鱼腥藻 *Anabaena* sp. PCC 7120, 人粒细胞集落刺激因子, 电击转化, 三亲结合

**Received:** March 28, 2020; **Accepted:** July 29, 2020

**Supported by:** Development Fund of Beijing University of Chinese Medicine (No. 2020071420021), National Natural Science Foundation of China (No. 81774014).

**Corresponding author:** Chunmei Wang. Tel: +86-10-53912163; Fax: +86-10-53912158; E-mail: wchunmei@126.com

北京中医药大学发展基金 (No. 2020071420021), 国家自然科学基金 (No. 81774014) 资助。

网络出版时间: 2020-08-12

网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20200810.1706.004.html>

# Construction of T7 RNA polymerase gene expression system in *Anabaena* sp. PCC 7120 for the expression of hG-CSF

Xueqing Xie, Yuqi Tian, Jinghuan Tian, Wenyan Ning, and Chunmei Wang

School of Life Sciences, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 102488, China

**Abstract:** The low expression rate of exogenous genes in cyanobacteria is one of the bottlenecks of cyanobacteria genetic engineering. The T7 RNA polymerase expression system has achieved the efficient expression of exogenous genes in *Escherichia coli*. Cyanobacteria and *E. coli* are both Gram-negative bacteria with high genetic homology. The construction of T7 RNA polymerase expression system in cyanobacteria may improve the expression of foreign genes. In order to construct the T7 RNA polymerase expression system in *Anabaena* sp. PCC 7120, methods such as overlapping extension PCR and digestion-ligation technique were used to construct a site-specific integration vector pEASY-T1-F1-TacT7RNAPCmR-F2 and a shuttle expression vector pRL-T7-hG-CSF. The site-specific integration vector is capable of expressing T7 RNA polymerase, and the shuttle expression vector expresses hG-CSF driven by the T7 promoter. Then we introduced the site-specific integration vector into the wild type cyanobacteria by electroporation and transferred the shuttle expression vector into the site-integrated transgenic cyanobacteria by triparental conjugative transfer. In the end, we identified the presence of foreign genes in cyanobacteria by PCR, tested the transcription level of foreign genes in cyanobacteria by RT-PCR, and detected the protein expression of foreign genes in cyanobacteria by Western blotting. The two vectors were successfully constructed, the T7 RNA polymerase gene and hG-CSF gene were transferred into cyanobacteria well, and both genes were also expressed in cyanobacteria. In summary, the T7 RNA polymerase expression system was successfully constructed in cyanobacteria, and the expression rate of hG-CSF gene was doubled than the traditional cyanobacteria expression systems. This expression system will provide a better tool for the application of cyanobacteria genetic engineering and will promote the development of cyanobacteria as a chassis cell in the fields of synthetic biology in the future.

**Keywords:** T7 RNA polymerase, T7 promoter, *Anabaena* sp. PCC 7120, hG-CSF, electroporation, triparental conjugative transfer

蓝藻 *Cyanobacteria* 也被称为蓝绿藻, 是一种革兰氏染色阴性、无鞭毛、含叶绿素 a 的大型原核生物。蓝藻是合成生物学最具应用潜力的底盘细胞之一。相对于常用的底盘细胞大肠杆菌和酵母菌, 蓝藻具有独特的优势: 蓝藻能够通过光合作用和 Calvin-Benson 循环在仅使用二氧化碳和阳光作为唯一的碳源和能源的条件下生成生物质<sup>[1]</sup>, 并且可以将这些生物质转化为有价值的代谢产物, 这将大大降低合成生物学产业化的成本。另外, 与能进行光合作用的真核藻类和植物相比, 蓝藻在遗传上更简单, 便于进行基因操作<sup>[2]</sup>, 且蓝藻生长速度较快, 在光反应器中培养已接近大肠杆菌的生长速度<sup>[3]</sup>。已有大量的研究实现了基因工程蓝藻的异源生物产品的生物合成<sup>[1]</sup>。然而, 蓝藻在合成生物学领域取得的进展落后于大肠杆菌和酵母

系统, 除了缺少安全稳定的基因组改造方法, 获得的藻株稳定性和可控性不足等原因以外, 可供选择的高效外源基因表达系统较少也是重要因素<sup>[4]</sup>。蓝藻外源基因表达体系最早由 Peter Wolk 实验室建立<sup>[5]</sup>, 他们以蓝藻内源质粒为蓝本, 与大肠杆菌质粒相结合, 构建了可以同时在大肠杆菌和蓝藻中表达目的基因的穿梭表达载体。这套体系虽然经过多方改进, 包括启动子<sup>[6-7]</sup>、SD 序列<sup>[8]</sup>、核糖开关<sup>[9]</sup>等, 外源蛋白表达量仅能达到可溶性蛋白的 1%–15%<sup>[10-11]</sup>, 而大肠杆菌的 pET 表达系统外源蛋白表达量达到 30%–70%。pET 表达系统由整合了 T7 RNA 聚合酶的大肠杆菌和含有 T7 启动子的质粒组成。T7 RNA 聚合酶具有如下特性<sup>[12]</sup>: (1) 与多亚基细菌 RNA 聚合酶相比, 它是一种单亚基酶; (2) 较高的生产力; (3) 对 T7 启

动子的高度特异性；(4) 不受辅助转录因子的影响；(5) 具有产生长转录本的能力；(6) 与细菌转录终止位点明显不同，仅通过 I 类和 II 类终止信号终止。这些特性使得 T7 RNA 聚合酶表达系统在大肠杆菌中实现了外源基因的高表达，同时具有作为一种简单、高效、特异性强的转录系统在不同生物体中应用的潜力。借助病毒基因是目前实现大肠杆菌和哺乳动物细胞高表达效率的策略，由于没有找到蓝藻自身的噬菌体，使得此策略无法在蓝藻中应用。

蓝藻属于革兰氏阴性菌，与大肠杆菌相似性较高。鱼腥藻 7120 与大肠杆菌基因组序列同源性 77.91%，本课题组尝试借用大肠杆菌的 pET 表达系统思路，首先将 T7 RNA 聚合酶通过同源重组整合到鱼腥藻 7120 中，然后将 T7 启动子构建到表达载体 pRL489 中，以人粒细胞集落刺激因子 (Human granulocyte colony-stimulating factor, hG-CSF) 作为报告基因，构建蓝藻的 T7 表达体系。本课题组已于 2014 年将 T7 RNA 聚合酶整合到鱼腥藻 PCC7120 中，2015 年有研究者在集胞藻 PCC6803 中构建了 T7 表达系统<sup>[13]</sup>。重组人粒细胞集落刺激因子是在大肠杆菌中表达最成功的几个重组蛋白药物之一，虽然其本身为糖蛋白，但无糖基的蛋白多肽基本保持了 G-CSF 的生物活性，且分子量较小，比较适合用原核生物来表达<sup>[14]</sup>。首个大肠杆菌表达的 rh G-CSF 药物由美国 FDA 于 1991 年批准上市。根据国家食品药品监督管理局网站 2017 年 1 月数据，中国陆续有 18 家制药企业获生产 rhG-CSF。前期本实验室已经实现 rhG-CSF 在蓝藻中表达<sup>[7]</sup>，因此，此文中用其作为报告基因对构建的表达系统进行研究。

## 1 材料与方法

### 1.1 质粒与菌株

运载质粒 pRL-489 由美国密歇根大学 Peter Wolk 教授惠赠；pUC-G-CSF 质粒由施定基课题组惠赠；pGEX 质粒、pHSG398 质粒、辅助质粒

pRL-58 和接合质粒 RP4 均由北京中医药大学生物制药系实验室保存，大肠杆菌 *E. coli* BL21(DE3)、野生型鱼腥藻 7120 与转 pRL-tac-GCSF 鱼腥藻同由该实验室保存。

### 1.2 主要试剂

*Bam*H I、*Eco*R I、*Hind* III 等限制性内切酶和 T4 DNA 连接酶购自纽英伦生物公司；PCR 扩增酶、RT-PCR 试剂盒、PrimeScript™ 1st Strand cDNA Synthesis kit 试剂盒购自 TaKaRa 公司；氯霉素、卡那霉素等抗生素及引物合成与测序来自生工生物工程（上海）股份有限公司；质粒小量提取试剂盒、超纯 RNA 提取试剂盒、琼脂糖凝胶回收试剂盒、核酸 Marker、小鼠抗聚组氨酸单克隆抗体、 $\beta$ -actin 鼠单克隆抗体、兔抗人 G-CSF 单抗、辣根过氧化物酶标记山羊抗鼠 IgG、羊抗兔 IgG 等购自北京拜尔迪；其他化学试剂均为国产分析纯。

### 1.3 Tac-T7 RNAP-CmR 基因片段的获得

Tac-T7 RNAP-CmR 通过重叠 PCR 获得<sup>[15]</sup>。分别以 pGEX 质粒、BL21(DE3) 基因组 DNA、pHSG398 质粒为模板，扩增 Tac 启动子基因、T7 RNA 聚合酶基因以及氯霉素抗性基因（引物见表 1），其中 T7 RNA 聚合酶基因首先通过一次引物重叠延伸 PCR 在 C 端添加 6×His tag 序列，将上述片段等量加入作为模板，通过重叠延伸 PCR 扩增出 Tac-T7 RNAP-CmR 片段，经 TA 克隆，获得 pEASY-T1-Tac-T7 RNAP-CmR 载体。

### 1.4 定点整合载体的构建

定点整合载体通过酶切连接的方法获得<sup>[16]</sup>。CTAB 法提取鱼腥藻基因组 DNA 为模板<sup>[17]</sup>，分别以引物对 pF1-F/R、pF2-F/R 进行 PCR，扩增得到同源臂 F1、F2 片段，TA 克隆后获得克隆载体 pMD19-T-F1、pEASY-T3-F2，克隆载体经测序鉴定正确后待用。使用 *Hind* III 与 *Sac* I 双酶切 pEASY-T1-Tac-T7 RNAP-CmR 与 pMD19-T-F1 克隆载体，分别回收 7 517 bp 与 1 143 bp 条带，T4

表 1 重叠延伸 PCR 引物序列

Table 1 The sequence of the overlapping PCR primers

Primer name	Sequence (5'-3')	Size (bp)
pTacF	gagctgttgacaattaatcatcgct	26
pTacR	GTTAATCGTGTTCATctgttctctgtgaaattgttatccg	42
pT7RNAP-F	tcacacaggaacagATGAACACGATTAACATCGCTAAGAACG	43
pT7RNAP-R	TTACGCGAACGCGAAGTCC	19
pT7RNAP (His)-R	gaagtgatcttccgtTTAATGGTGATGGTGATGATGCGC	39
pCmR-F	CACCATCACCATTAAacggaagatcacttcgcagaataataaatc	46
pCmR-R	ttacgccccgccctg	15

All capital letters in the sequences indicate specific binding sequence, and lowercase letters represent 30 bp homologous sequence.

DNA 连接酶连接, 连接产物转化 *E. coli* DH5 $\alpha$  感受态细胞, 涂布于氨苄抗性的 LB 琼脂平板, 菌落 PCR 方法筛选阳性克隆, 引物使用 pF1-F/R, 扩大培养阳性克隆, 提取质粒, 质粒命名为 pEASY-T1-F1-TacT7RNAPCmR; *Not* I 单酶切此质粒与 pEASY-T3-F2 质粒, 分别回收 8 690 bp 与 1 175 bp 条带, 连接、转化、菌落鉴定, 引物使用 pCmR-F、pF2-R, 扩大培养阳性克隆, 提取质粒, 质粒命名为 pEASY-T1-F1-TacT7RNAPCmR-F2; 酶切连接流程如图 1 所示。

### 1.5 含 T7 启动子 hG-CSF 基因的扩增

由北京合生基因生物公司通过人工化学方法合成 T7-hG-CSF 基因片段。片段含 19 bp 的 T7 启动子、47 bp 的 T7 终止子、556 bp 的 SD-hG-CSF 基因, 其中 G-CSF 基因序列源于施定基课题组工作<sup>[18]</sup>, 同时对空载体 pRL489 进行酶切位点分析, *Eco*R I 和 *Bam*H I 双酶切可以去掉空载体原有 PpsbA 启动子。首尾分别添加 *Eco*R I 和 *Bam*H I 位点, 合成的全基因长 678 bp, 获得克隆载体 T5-T7-hG-CSF。

### 1.6 穿梭表达载体的构建

穿梭表达载体 pRL-T7-hG-CSF 通过酶切连接的方法获得<sup>[16]</sup>。*Eco*R I 和 *Bam*H I 双酶切 pRL489 与 T5-T7-hG-CSF, 分别回收各自酶切片段, T4 DNA 连接酶 4 °C 连接过夜, 连接产物转化 *E. coli* HB101 感受态细胞, 涂布于卡那抗性的 LB 琼脂平板, 菌落 PCR 筛选阳性克隆, 引物使用 pG-CSF-F、pG-CSF-R, 扩大培养阳性克隆, 提取

质粒经测序验证后保存。

### 1.7 蓝藻的转化与筛选

#### 1.7.1 转 T7 RNA 聚合酶鱼腥藻的构建

采用电击转化法<sup>[19]</sup>。(1) 将等同 10  $\mu$ g 叶绿素 a 当量的对数生长期鱼腥藻细胞悬浮于 1.3 mL 的

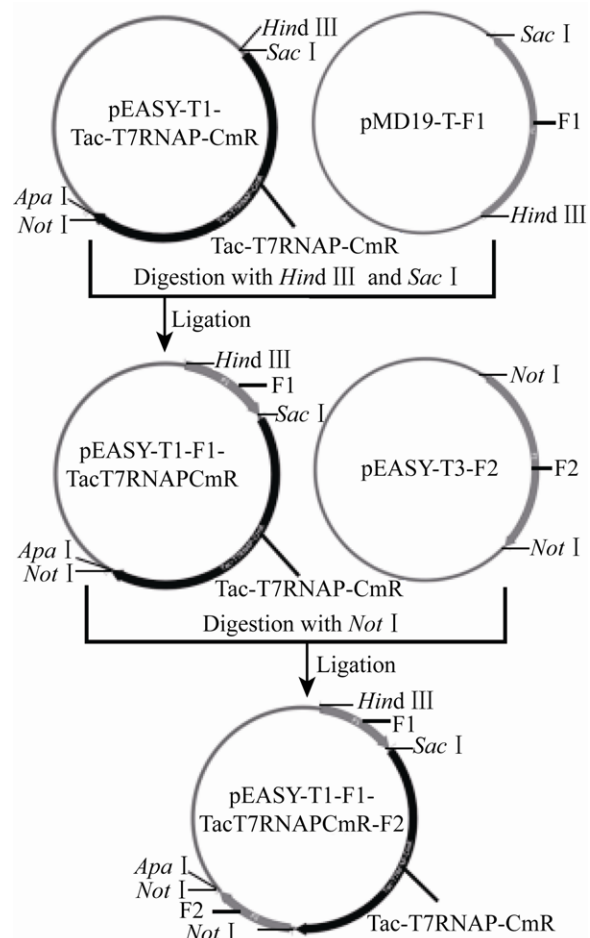


图 1 定点整合载体的构建流程图

Fig. 1 The schematic illustration of constructing the site-specific integration vector.

电穿孔缓冲液中, 该缓冲液含有 10 mmol/L HEPES、50 mmol/L  $\text{CaCl}_2$  和 100 mmol/L LiCl, pH 7.5, 并在 28 °C 光照下培养 1 h。(2) 定点整合载体 pEASY-F1-Tac-T7 RNAP-Cm-F2 进行 *Hind* III 限制性内切酶单酶切, 1% 琼脂糖凝胶电泳, 使用琼脂糖凝胶纯化回收试剂盒回收线性整合载体 DNA。(3) 用 1  $\mu\text{g}$  线性定点整合载体在 1 200 V (6 kV/cm) 电压下, 在电穿孔器中的 3 mL 反应杯中用 5 ms 脉冲进行鱼腥藻的电穿孔。(4) 电穿孔后用等量的 2×BG11 培养基混合, 28 °C 培养 24 h 后将培养物均匀涂布于纤维素酯微孔滤膜, 在含有氯霉素的平板上培养并逐步提高抗生素浓度, 直至转基因藻平板出现阳性克隆而野生藻死亡。

### 1.7.2 转完整 T7 表达体系鱼腥藻的构建

采用三亲接合转移法<sup>[5]</sup>。(1) *E. coli* 的准备: 在含有相应抗生素的 LB 培养液中, 分别接种含穿梭表达载体 pRL-T7-hG-CSF 和辅助质粒的 HB101 菌, 37 °C 过夜培养, 离心收集沉淀, 等体积混合后重悬于 LB 培养液中。(2) 蓝藻的准备: 三亲接合转移前更换新鲜培养液, 离心收集野生藻与含 T7 RNA 聚合酶转基因藻, 洗涤后重悬于 BG11 培养液中, 并作梯度稀释。(3) 接合转移: 将藻细胞与细菌以适当的比例混合均匀, 涂布于纤维酯微孔滤膜上, 先在不含抗生素的培养平板上培养, 然后连膜转移至含卡那霉素或卡那霉素和氯霉素的培养基上继续照光培养, 每周更换一次平板, 并逐步提高抗生素浓度, 直至转基因藻平板出现阳性克隆而野生藻死亡。

### 1.8 转基因鱼腥藻的检测

采用 PCR<sup>[20]</sup>、RT-PCR<sup>[21]</sup>、Western blotting<sup>[22]</sup> 等分子检测的方法进行转基因藻的检测。(1) PCR 检测: CTAB 法提取转基因鱼腥藻基因组 DNA 为模板, 用引物 pT7RNAP-F、pT7RNAP-R 进行 PCR 扩增, 检测转基因鱼腥藻中 T7 RNA 聚合酶基因的存在; SDS 碱裂解法提取转基因鱼腥藻质粒 DNA 为模板, 用引物 pG-CSF-F、pG-CSF-R 进行

PCR 扩增, 检测转基因鱼腥藻中 hG-CSF 基因的存在。(2) RT-PCR 检测: 超纯 RNA 提取试剂盒法提取转基因鱼腥藻 RNA, 使用 TaKaRa 的 PrimeScript<sup>TM</sup> 1st Strand cDNA Synthesis Kit 合成 cDNA。以合成的 cDNA 为模板, 用引物 pT7RNAP-F、pT7RNAP-R 进行 PCR 扩增, 检测转基因鱼腥藻中 T7 RNA 聚合酶基因的转录; 用引物 pG-CSF-F、pG-CSF-R 进行 PCR 扩增, 检测转基因鱼腥藻中 hG-CSF 基因的转录。(3) Western blotting 检测: 在处于对数生长期的鱼腥藻中加入诱导剂 IPTG 至终浓度 0.5 mmol/L, 28 °C、140 r/min 培养 7 d, 离心收集藻细胞并充分洗涤, 将藻细胞重悬于 PBS 缓冲液中反复超声破碎冻融, 离心取上清液; 采用 BCA 法测定上清液蛋白浓度<sup>[23]</sup>。上清液进行 10% SDS-PAGE 分析<sup>[24]</sup>, 用半干转电泳仪电转硝酸纤维素膜, 5% 脱脂奶粉封闭液 4 °C 过夜, 洗膜 3 次, 加入小鼠抗聚组氨酸单克隆抗体 (1 : 5 000), 37 °C 结合 2 h, 洗膜 3 次; 加入 HRP 标记的山羊抗小鼠 IgG 二抗 (1 : 5 000), 37 °C 结合 2 h, 选用全自动化学发光检测仪显色, 检测转基因鱼腥藻中 T7 RNA 聚合酶基因的表达; 上清液进行 12% SDS-PAGE<sup>[24]</sup>, 转膜, 封闭, 洗膜后加入兔抗人 G-CSF 单抗 (1 : 5 000), 37 °C 结合 2 h, 洗膜 3 次; 加入 HRP 标记的羊抗兔 IgG 二抗 (1 : 5 000), 37 °C 结合 2 h, 显色, 检测转基因鱼腥藻中 hG-CSF 基因的表达。蓝藻中外源基因 T7 RNA 聚合酶基因与 hG-CSF 基因表达产物的检测均选用  $\beta$ -actin 作为内参蛋白。

## 2 结果与分析

### 2.1 质粒的构建

#### 2.1.1 Tac-T7 RNAP-CmR 基因片段的获得

由图 2A-C 显示获得了 Tac 启动子基因、T7 RNA 聚合酶基因、氯霉素抗性基因的 PCR 产物, 经重叠延伸 PCR 方法得到 Tac-T7 RNAP-CmR 基因片段, 结果如图 2D 所示。

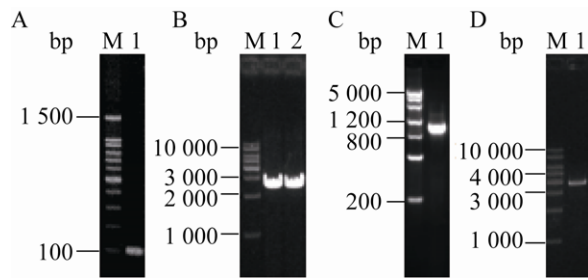


图2 Tac-T7 RNAP-CmR 基因片段的获得

Fig. 2 The acquisition of Tac-T7 RNAP-CmR gene sequences. (A) The acquisition of Tac promoter gene sequence. M: 100 bp DNA ladder; 1: PCR product of Tac promoter. (B) The acquisition of T7 RNA polymerase with 6×His tag gene sequence. M: 1 kb DNA ladder; 1: PCR product of T7 RNA polymerase; 2: PCR product of T7 RNA polymerase with 6×His tag. (C) The acquisition of chloramphenicol resistant gene sequence. M: DNA marker IV; 1: PCR product of chloramphenicol resistant gene. (D) The acquisition of Tac-T7 RNAP-CmR gene sequence. M: 1 kb DNA ladder; 1: gene of Tac-T7 RNAP-CmR by overlap PCR.

### 2.1.2 定点整合载体的构建与鉴定

定点整合载体由克隆载体 pMD19-T-F1、pEASY-T3-F2、pEASY-T1-Tac-T7 RNAP-CmR 酶切、连接、筛选获得。图 3A 为 5'同源臂 F1 及 3'

同源臂 F2 的 PCR 结果，其分别来源于鱼腥藻 PCC7120 基因组中 asl2383 和 all2384 之间的非编码序列，长度均为 1 111 bp。图 3B、3C、3D 分别为克隆载体 pMD19-T-F1、pEASY-T3-F2、pEASY-T1-Tac-T7 RNAP-CmR 各自酶切结果。最终获得载体 pEASY-T1-F1-TacT7RNAPCmR-F2 如图 3E 所示，长度为 9 865 bp，为了进一步验证载体的正确性，图 3F 为最终获得定点整合载体经 *Sac* I/*Apa* I 与 *Hind* III/*Apa* I 双酶切结果，酶切结果显示载体构建成功。所有克隆载体经测序鉴定，序列完全正确。

### 2.1.3 穿梭表达载体的构建与鉴定

穿梭表达载体 pRL-T7-hG-CSF 由克隆载体 T5-T7-hG-CSF 与空载体 pRL489 经酶切、连接、筛选获得；提取阳性克隆质粒进行 *Eco*R I/*Bam*H I 双酶切鉴定，在 700 bp 左右获得目的条带，结果如图 4 所示，显示获得正确的载体。

## 2.2 转基因鱼腥藻的筛选与检测

### 2.2.1 转 T7 RNA 聚合酶鱼腥藻的筛选与检测

两周后，含定点整合载体的转基因藻在氯霉素抗性的 BG11 固体培养基上长出单藻落，而野

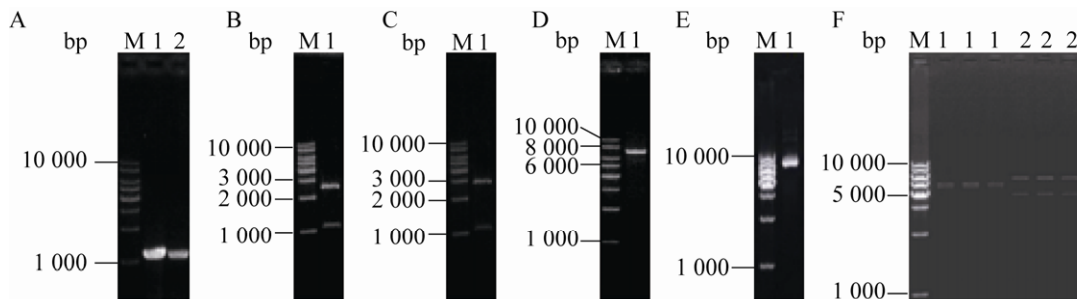
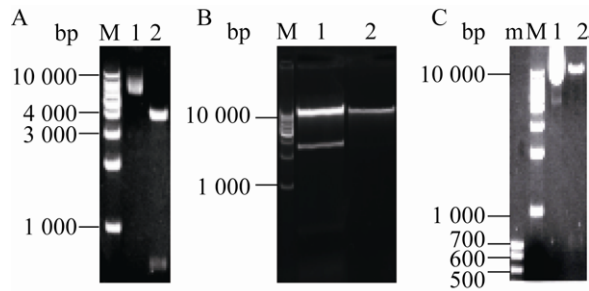


图3 定点整合载体 pEASY-T1-F1-TacT7RNAPCmR-F2 的构建与鉴定

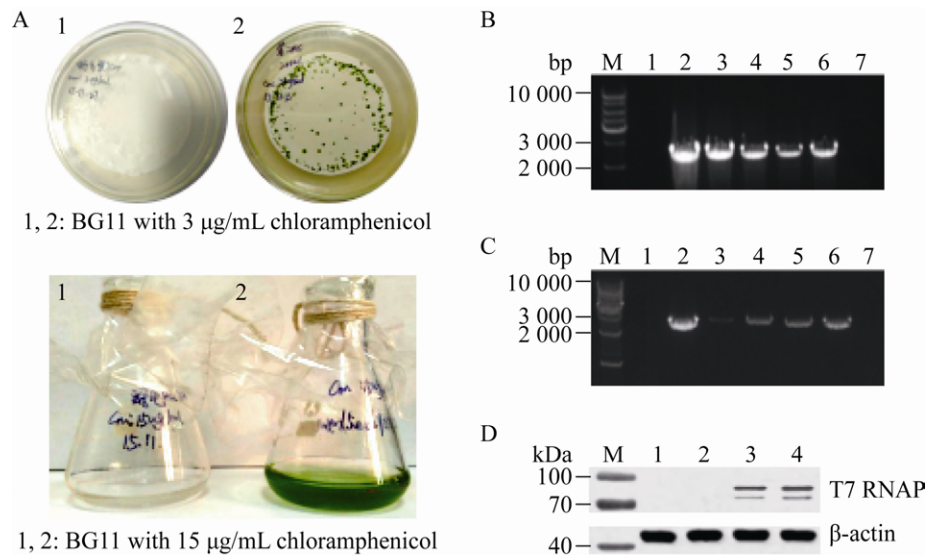
Fig. 3 The construction and identification of the site-specific integration vector pEASY-T1-F1-TacT7RNAPCmR-F2. (A) The acquisition of homologous arms. M: 1 kb DNA ladder; 1: PCR product of homologous arm F1; 2: PCR product of homologous arm F2. (B) The acquisition of homologous arm F1 with restriction enzyme site. M: 1 kb DNA ladder; 1: pMD19-T-F1 digested by *Hind* III and *Sac* I. (C) The acquisition of homologous arm F2 with restriction enzyme site. M: 1 kb DNA ladder; 1: pEASY-T3-F2 digested by *Not* I. (D) The acquisition of the linearized plasmid pEASY-T1-Tac-T7RNAP-CmR. M: 1 kb DNA ladder; 1: pEASY-T1-Tac-T7RNAP-CmR digested by *Hind* III and *Sac* I. (E) The acquisition of the site-specific integration vector pEASY-T1-F1-TacT7RNAPCmR-F2. M: 1 kb DNA ladder; 1: The recombinant plasmid pEASY-T1-F1-TacT7RNAPCmR-F2. (F) The identification of the site-specific integration vector pEASY-T1-F1-TacT7RNAPCmR-F2. M: 1 kb DNA ladder; 1: pEASY-T1-F1-TacT7RNAPCmR-F2 digested by *Sac* I and *Apa* I; 2: pEASY-T1-F1-TacT7RNAPCmR-F2 digested by *Hind* III and *Apa* I.





**图 4** 穿梭表达载体 pRL-T7-hG-CSF 的构建与鉴定  
 Fig. 4 The construction and identification of the shuttle expression vector pRL-T7-hG-CSF. (A) The acquisition of T7-hG-CSF gene fragment with restriction enzyme site. M: 1 kb DNA ladder; 1: T5-T7-hG-CSF; 2: T5-T7-hG-CSF digested by *EcoR* I and *BamH* I. (B) The acquisition of the linearized plasmid pRL489. M: 1 kb DNA ladder; 1: pRL489 digested by *EcoR* I and *BamH* I; 2: pRL489. (C) The acquisition and identification of the shuttle expression vector pRL-T7-hG-CSF. m: 100 bp DNA ladder; M: 1 kb DNA ladder; 1: the recombinant plasmid pRL-T7-hG-CSF; 2: pRL-T7-hG-CSF digested by *EcoR* I and *BamH* I.

生藻在氯霉素压力下死亡, 将获得的单藻落转移至含有氯霉素的 BG11 液体培养基进行筛选和扩大培养, 经多次不加抗生素继代培养, 再用氯霉素筛选, 转基因藻仍生长良好 (图 5A) 所示, 表明 pEASY-T1-F1-TacT7RNAPCmR-F2 已稳定整合于鱼腥藻基因组。PCR 检测结果如图 5B 所示, 转基因鱼腥藻中含有 T7 RNA 聚合酶基因, 而野生型鱼腥藻没有得到有效扩增, 表明 T7 RNA 聚合酶基因已成功转入鱼腥藻 7120; RT-PCR 检测结果如图 5C 所示, 在转基因鱼腥藻中含有 T7 RNA 聚合酶基因的转录产物, 表明转基因鱼腥藻中 T7 RNA 聚合酶基因已成功转录; 图 5D 为 Western blotting 结果, 在略小于 100 kDa 的位置, 转基因藻诱导组出现明显有异于未诱导组及野生组的条带, 与理论分子量相符, 故可认为 T7 RNA 聚合酶基因已在转基因鱼腥藻中成功表达。



**图 5** 转 T7 RNA 聚合酶鱼腥藻的筛选与检测

Fig. 5 The screening and identification of the transgenic *Anabaena* sp. PCC7120 harboring T7 RNA polymerase. (A) Resistance screening of transgenic algae. 1: *Anabaena* 7120; 2: *Anabaena* 7120 harboring T7 RNA polymerase. (B) PCR identification of transgenic algae. M: 1 kb DNA ladder; 1: negative control; 2: positive control; 3-6: cloned genome from *Anabaena* 7120 harboring T7 RNA polymerase; 7: cloned *Anabaena* 7120 genome. (C) RT-PCR detection of transgenic algae. M: 1 kb DNA ladder; 1: negative control; 2: positive control; 3-6: cloned cDNA from *Anabaena* 7120 harboring T7 RNA polymerase; 7: cloned *Anabaena* 7120 cDNA. (D) Western blotting detection of transgenic algae. M: protein marker; 1: *Anabaena* 7120; 2-4: *Anabaena* 7120 harboring T7 RNA polymerase and 3, 4 with IPTG.

### 2.2.2 转完整 T7 表达体系鱼腥藻的筛选与检测

两周后,经 pRL-T7-hG-CSF 转化的野生藻和含 T7 RNA 聚合酶的转基因藻均在膜上长出菌落,而未加质粒的野生藻在抗生素压力下死亡。将单藻落转移至含有卡那霉素或氯霉素和卡那霉素的 BG11 液体培养基进行筛选和扩大培养,经多次不加抗生素继代培养,再用抗生素筛选,转 pRL-T7-hG-CSF 的鱼腥藻仍生长良好,如图 6A 所示,获得了转 T7-hG-CSF 鱼腥藻与转完整 T7 表达体系鱼腥藻。经 PCR 检测结果如图 6B 所示,在转 T7-hG-CSF 鱼腥藻与转完整 T7 表达体系鱼腥藻中均含有 hG-CSF 基因,而野生藻没有得到有效扩增,表明 hG-CSF 基因已成功转入野生藻与含 T7 RNA 聚合酶的转基因藻;

RT-PCR 检测结果如图 6C 所示,在转 T7-hG-CSF 鱼腥藻与转完整 T7 表达体系鱼腥藻中均含有 hG-CSF 基因的转录产物,结果表明转 T7-hG-CSF 鱼腥藻与转完整 T7 表达体系鱼腥藻中 hG-CSF 基因已成功转录;图 6D 为 Western blotting 结果,在 19 kDa 的位置,转完整 T7 表达体系鱼腥藻 IPTG 诱导组与转 pRL-tac-GCSF 鱼腥藻 IPTG 诱导组异于未诱导组及野生组出现明显条带,同时转 T7-hG-CSF 鱼腥藻组未出现条带。故可认为 hG-CSF 基因已在转完整 T7 表达体系鱼腥藻中成功表达,且表达含量远高于转 T7-hG-CSF 鱼腥藻组,利用 Western blotting 结果经条带灰度值的相对分析,表达量比传统方法提高 2 倍。

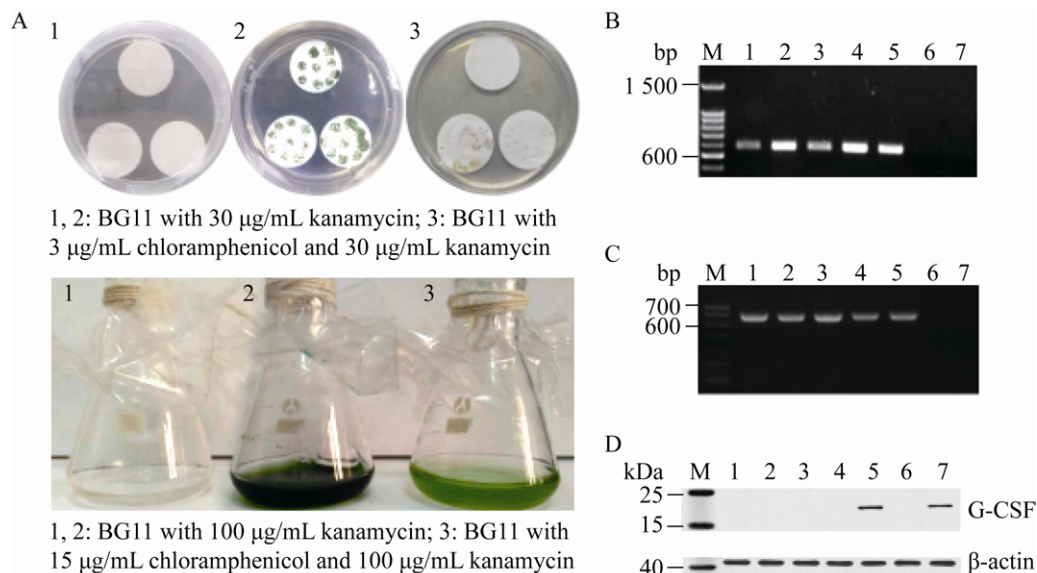


图 6 转完整 T7 表达体系鱼腥藻的筛选与鉴定

Fig. 6 The screening and identification of the transgenic *Anabaena* sp. PCC7120 harboring complete T7 expression system. (A) Resistance screening of transgenic algae. 1: *Anabaena* 7120; 2: *Anabaena* 7120 harboring T7-hG-CSF; 3: *Anabaena* 7120 harboring complete T7 expression system. (B) PCR identification of transgenic algae. M: 100 bp DNA ladder; 1: positive control; 2–3: cloned plasmid from *Anabaena* 7120 harboring T7-hG-CSF; 4–5: cloned plasmid from *Anabaena* 7120 harboring complete T7 expression system; 6: cloned *Anabaena* 7120 genome; 7: negative control. (C) RT-PCR detection of transgenic algae. M: 100 bp DNA ladder; 1: positive control; 2–3: cloned cDNA from *Anabaena* 7120 harboring T7-hG-CSF; 4–5: cloned cDNA from *Anabaena* 7120 harboring complete T7 expression system; 6: cloned *Anabaena* 7120 cDNA; 7: negative control. (D) Western blotting detection of transgenic algae. M: protein marker; 1: *Anabaena* 7120; 2–3: *Anabaena* 7120 harboring T7-hG-CSF and 3 with IPTG; 4–5: *Anabaena* 7120 harboring complete T7 expression system and 5 with IPTG; 6–7: *Anabaena* 7120 harboring pRL-tac-GCSF and 7 with IPTG.



### 3 讨论

蓝藻是藻类中最早能稳定地表达外源基因的种类,从 1970 年报道外源 DNA 可以转化进入蓝藻,1973 年证明蓝藻中含有质粒,1981 年首次在蓝藻中表达外源基因(抗菌素抗性基因)成功,1988 年蓝藻形成稳定的基因转化体系,到 1996 年集胞藻 6803 作为第一个光合生物完成全基因组测序,至今已经有 30 多种外源基因在蓝藻中表达成功,主要用于制备重组药物、治理环境污染、农药生产等方面。然而从外源基因首次表达成功到现在已经快 40 年,至今国内外尚无工业化的产品,蓝藻基因工程仍存在较多问题需要解决<sup>[25]</sup>。Andrew Hitchcock 等提出了 3 个努力方向:(1) 提高无需标记的基因组改造的速度和效率,例如通过优化基于 CRISPR 的技术实现。(2) 开发新的表达外源基因的系统,如制造新的复制穿梭质粒。(3) 对引入的外源基因簇的表达实现更严格的调控,以提高突变藻株的长期稳定性。因此,高效的外源基因表达工具仍然是目前蓝藻基因工程需要研究的重要环节之一。本研究在鱼腥藻 7120 中构建了 T7 RNAP/T7-hG-CSF 表达体系。Jin 等<sup>[26]</sup>曾经将 T7 RNAP/T7 GFP 基因回路成功引入单细胞集胞藻 6803 中,实现了绿色荧光蛋白的高表达。在此我们使用 hG-CSF 重组药物基因作为报告基因,构建了含有 T7 噬菌体转录相关调控原件的表达载体 pRL-T7-hG-CSF,与表达 T7 RNA 聚合酶的定点整合载体 pEASY-T1-F1-TacT7RNAPcmR-F2 组成 T7 RNAP/T7 启动子共表达体系,从而将 T7 RNAP/T7-hG-CSF 引入丝状体鱼腥藻 7120 中,PCR 实验和测序证明了基因整合入蓝藻,RT-PCR 实验证明外源基因实现了转录,蛋白印迹实验结果表明目的蛋白得到翻译和表达,结果证明了 T7 RNAP/T7-hG-CSF 共表达体系可以在鱼腥藻 7120 中正常工作,且有效表达目的基因,与本课题组

前期构建的转 pRL-tac-GCSF 鱼腥藻相比较,经多次实验验证,G-CSF 表达量至少提高了 2 倍。

原核 pET 表达系统也曾被研究用于解决真核表达系统低效的问题,Fuerst 等<sup>[27]</sup>在 HeLa 细胞中构建了基于两种重组痘苗病毒组成的 T7 表达系统,一种含有受痘苗启动子控制的 T7 RNA 聚合酶基因,另一种含有 T7 启动子和终止子调控元件的靶基因,其中感染两种病毒的细胞表达靶基因效率比以前的病毒质粒系统高 14 倍。袁志刚等<sup>[28]</sup>将 T7 RNAP/启动子原核表达系统引入 C2C12、SP2/0、NIH3T3、BALB/c3T3 四种不同来源的真核细胞中,实现了目的基因表达,且在 C2C12 细胞株中,共转染 pCMV-T7pol/pT7IRES-HBs 双质粒的细胞株相比较共转染 pCMV-T7pol/pT7-HBs 双质粒细胞株表达效率提高 4 倍。本研究虽然在蓝藻中实现了 T7 系统表达外源基因,但表达效率相比较其他宿主细胞中 T7 表达体系的应用仍然较低,分析其原因,可能与 T7 RNA 聚合酶的表达量有关。有实验表明<sup>[26]</sup>,使用强启动子驱动 T7 RNA 聚合酶对细胞有毒性甚至致死,但通过融合蛋白降解标签控制藻细胞中 T7 RNA 聚合酶积累的水平后 T7 表达体系正常工作,因此,在后续的改进研究中可以在使用强启动子驱动 T7 RNA 聚合酶表达时,通过添加蛋白降解标签或在 SD 序列前补加核糖开关来控制 T7 RNA 聚合酶的积累或表达。早期研究表明<sup>[29]</sup> T7 启动子中的突变会影响启动子强度,在集胞藻 6803 中<sup>[26]</sup>,4 个 T7 启动子突变体的强度相差 20 倍,所以在鱼腥藻 7120 中研究最适 T7 启动子突变体也非常重要。

目前,蓝藻虽然已开发大量遗传工具用于表达外源基因,但其表达效率与经典底盘细胞大肠杆菌相比还有很大差距,在新的蓝藻遗传工具开发方面仍需加强研究力度。

## REFERENCES

- [1] Knoot CJ, Ungerer JL, Wangikar PP, et al. *Cyanobacteria*: promising biocatalysts for sustainable chemical production. *J Biol Chem*, 2018, 293(14): 5044–5052.
- [2] Gimpel JA, Henríquez V, Mayfield SP. In metabolic engineering of eukaryotic microalgae: potential and challenges come with great diversity. *Front Microbiol*, 2015, 6: 1376.
- [3] Eriksen NT. The technology of microalgal culturing. *Biotechnol Lett*, 2008, 30(9): 1525–1536.
- [4] Hitchcock A, Hunter CN, Canniffe DP. Progress and challenges in engineering cyanobacteria as chassis for light-driven biotechnology. *Microb Biotechnol*, 2020, 13(2): 363–367.
- [5] Elhai J, Wolk CP. Conjugal transfer of DNA to cyanobacteria. *Method Enzymol*, 1988, 167: 747–754.
- [6] Guo ZH. Effects on the foreign *egfp* gene regulated by promoter in cyanobacteria[D]. Shanghai: Shanghai Normal University, 2010 (in Chinese). 郭正红. 启动子对蓝藻中外源 *egfp* 基因表达的影响[D]. 上海: 上海师范大学, 2010.
- [7] Ning WY, Wu XM, Wang CM, et al. Efficiency comparison of promoters Ptac & PsbA driving hG-CSF expression in *Anabaena* sp. PCC 7120. *J Microbiol*, 2014, 34(3): 36–41 (in Chinese). 宁文艳, 吴先敏, 王春梅, 等. 启动子 Ptac 与 PsbA 在鱼腥藻 7120 中表达 hG-CSF 的效率比较. *微生物学杂志*, 2014, 34(3): 36–41.
- [8] Liu D, Pakrasi HB. Exploring native genetic elements as plug-in tools for synthetic biology in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Microb Cell Fact*, 2018, 17(1): 48.
- [9] Pérez AA, Liu ZF, Rodionov DA, et al. Complementation of cobalamin auxotrophy in *Synechococcus* sp. strain PCC 7002 and validation of a putative cobalamin riboswitch *in vivo*. *J Bacteriol*, 2016, 198(19): 2743–2752.
- [10] Zhou J, Zhang HF, Meng HK, et al. Discovery of a super-strong promoter enables efficient production of heterologous proteins in cyanobacteria. *Sci Rep*, 2015, 4(1): 4500.
- [11] Till P, Toepel J, Bühler B, et al. Regulatory systems for gene expression control in cyanobacteria. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2020, 104(5): 1977–1991.
- [12] Wang WY, Li YWB, Wang YQ, et al. Bacteriophage T7 transcription system: an enabling tool in synthetic biology. *Biotechnol Adv*, 2018, 36(8): 2129–2137.
- [13] Laura G. T7-CYANO-Production and development of a *Synechocystis* strain useful for inducible membrane protein expression and controlled antisense RNA synthesis[D]. Italy: University of Padua, 2015.
- [14] Oheda M, Hase S, Ono M, et al. Structures of the sugar chains of recombinant human granulocyte-colony-stimulating factor produced by Chinese hamster ovary cells. *J Biochem*, 1988, 103(3): 544–546.
- [15] Horton RM, Hunt HD, Ho SN, et al. Engineering hybrid genes without the use of restriction enzymes: gene splicing by overlap extension. *Gene*, 1989, 77(1): 61–68.
- [16] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989: 93–97.
- [17] Cai YP, Wolk CP. Use of a conditionally lethal gene in *Anabaena* sp. strain PCC 7120 to select for double recombinants and to entrap insertion sequences. *J Bacteriol*, 1990, 172: 3138–3145.
- [18] Li QY, Shi DJ, Chen CL, et al. Cloning of the gene encoding the recombinant human granulocyte colony-stimulating factor in *Anabaena*. *Acta Bot Boreal-Occident Sin*, 2005, 35(7): 1389–1394 (in Chinese). 李清艳, 施定基, 陈翠丽, 等. 重组人粒细胞集落刺激因子(rhG-CSF)基因在鱼腥藻中的克隆. *西北植物学报*, 2005, 25(7): 1389–1394.
- [19] Ravindran CRM, Suguna S, Shanmugasundaram S. Electroporation as a tool to transfer the plasmid pRL489 in *Oscillatoria* MKU 277. *J Microbiol*

- Meth, 2006, 66(1): 174–176.
- [20] Saiki RK, Scharf S, Faloona F, et al. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*, 1985, 230(4732): 1350–1354.
- [21] Chelly J, Kaplan JC, Maire P, et al. Transcription of the dystrophin gene in human muscle and non-muscle tissues. *Nature*, 1988, 333(6176): 858–860.
- [22] Renart J, Reiser J, Stark GR. Transfer of proteins from gels to diazobenzyloxymethyl-paper and detection with antisera: a method for studying antibody specificity and antigen structure. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1979, 76(7): 3116–3120.
- [23] Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem*, 1985, 150(1): 76–85.
- [24] Shapiro AL, Viñuela E, Maizel Jr JV. Molecular weight estimation of polypeptide chains by electrophoresis in SDS-polyacrylamide gels. *Biochem Biophys Res Commun*, 1967, 28(5): 815–820.
- [25] Hitchcock A, Hunter CN, Canniffe DP. Progress and challenges in engineering cyanobacteria as chassis for light-driven biotechnology. *Microb Biotechnol*, 2020, 13(2): 363–367.
- [26] Jin HJ, Lindblad P, Bhaya D. Building an inducible T7 RNA polymerase/T7 promoter circuit in *Synechocystis* sp. PCC6803. *ACS Synth Biol*, 2019, 8(4): 655–660.
- [27] Fuerst TR, Ear PL, Moss B. Use of a hybrid vaccinia virus-T7 RNA polymerase system for expression of target genes. *Cell Mol Biol*, 1987, 7(7): 2538–2544.
- [28] Yuan ZG, Zhang JP, Chu YW, et al. Expression of target gene in eukaryotic cells driven by prokaryotic T7 promoter and its RNA polymerase. *Chin J Biotech*, 2005, 21(2): 182–186 (in Chinese).  
袁志刚, 张进平, 储以微, 等. 原核表达系统 T7RNA 聚合酶/启动子在真核细胞中表达目的基因的实验研究. *生物工程学报*, 2005, 21(2): 182–186.
- [29] Bandwar RP, Jia YP, Stano NM, et al. Kinetic and thermodynamic basis of promoter strength: multiple steps of transcription initiation by T7 RNA polymerase are modulated by the promoter sequence. *Biochemistry*, 2002, 41(11): 3586–3595.

(本文责编 陈宏宇)