

通过同源重组在聚球藻 7002 中表达小鼠金属硫蛋白-I 的初步研究*

周杰¹⁾ 罗娜¹⁾ 宁叶¹⁾ 施定基²⁾ 俞梅敏¹⁾ 茹炳根¹⁾**

(¹⁾ 北京大学生命科学院, 蛋白质工程及植物基因工程国家重点实验室, 北京 100871

(²⁾ 中国科学院植物研究所, 北京 100093)

摘要 用 PCR 方法从海洋单细胞蓝藻聚球藻 7002 (*Synechococcus* sp. PCC 7002) 基因组 DNA 中扩增得到藻蓝蛋白 β 亚基基因 (*cpc β*) 的上游序列 (Pcpc β), 及编码谷氨酰胺合成酶的 *glnA* 基因片段. 以 Pcpc β 作为启动子、以 *glnA* 基因片段作为整合平台, 构建含有小鼠金属硫蛋白-I (mMT-I) cDNA 的同源整合表达载体 pKGC-MT. 通过自然转化法将整合表达载体导入聚球藻 7002 中, 经氨苄青霉素筛选, 得到遗传性状稳定的转基因藻. PCR 检测证明 mMT-I 基因已整合到蓝藻基因组 DNA 上; 蛋白质印迹表明 mMT-I 已在蓝藻中表达; ELISA 结果显示 mMT-I 在蓝藻中的表达量约为 800 $\mu\text{g/g}$.

关键词 小鼠金属硫蛋白-I, 启动子 Pcpc β , *glnA* 整合平台, 聚球藻 7002, 同源重组

学科分类号 Q789

随着蓝藻分子生物学的发展, 以及利用生物反应器快速、大规模培养蓝藻的成功, 使具有结构简单、培养成本低、不含内毒素等优点的蓝藻成为理想的外源基因表达宿主.

金属硫蛋白 (MT) 是一类富含半胱氨酸的低分子质量金属结合蛋白, 它普遍存在于生物界, 其中以哺乳动物 MT-I 的金属结合能力最强^[1]. 国内外已有多篇关于在蓝藻^[2~6] 和高等植物^[7] 中表达 MT-I 及其突变体以用于治理环境中重金属污染的报道. 但由于外源基因在蓝藻中的表达量不够理想, 限制了这些转基因蓝藻的应用.

为提高外源基因 mMT-I 在蓝藻中的表达量, 本文做如下探索: a. 以蓝藻内源启动子 Pcpc β 代替外源启动子 PpsbA. 本室和 Chungjatupornchai^[8] 曾用 PpsbA 作为启动子, 分别在蓝藻中表达 mMT-I 及其突变体和蚊幼虫毒蛋白, 表达量都不够理想. 而在聚球藻 7002 中, 藻蓝蛋白占其可溶性蛋白质总量的 40%^[9], 因此推测编码藻蓝蛋白的 *cpc β* 基因的启动子 Pcpc β 会有很强的启动功能. 同时, Murphy 等^[10] 曾用 Pcpc β 在聚球藻 7002 中融合表达蚊幼虫毒蛋白, 表达量在原有基础上有所提高, 但融合表达对蚊幼虫毒蛋白的功能有影响. 因此, 本文试图从聚球藻 7002 基因组 DNA 中调出启动子 Pcpc β , 并用该启动子在聚球藻 7002 中以非融合形式表达 mMT-I, 以提高 mMT-I 在蓝藻中的表达量; b. 以聚球藻 7002 中编码谷氨酰胺合成酶 (GS) 的 *glnA* 基因片段作为整合平台, 代替 *psbB*. 要使目的基因通过同源重组交换整合到宿

主染色体 DNA 上, 表达载体上必须有与宿主染色体 DNA 相同源的序列, 即整合平台. 本室曾用蓝藻中编码参与光合作用重要蛋白的 *psbB*^[11] 片段作为整合平台, 通过同源重组在蓝藻中表达 MT 突变体, 表达量虽有所提高, 但转基因藻的生长受到抑制^[4,5]. 而 GS 虽为蓝藻同化代谢中的关键酶, 但在聚球藻 7002 中除了 GS 外, 还有氨甲酰磷酸合成酶可以催化氨的同化作用. 当编码 GS 的 *glnA* 基因发生突变时, 聚球藻 7002 的生长不会受到影响^[12]. 因此, 为不影响转基因藻的生长, 本文试图从聚球藻 7002 基因组 DNA 中扩增到 *glnA* 片段, 并以此作为整合平台, 通过同源重组在聚球藻 7002 中表达 mMT-I.

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

质粒 KS、pBS-MT、大肠杆菌 *Escherichia coli* HB101 取自本实验室. 所用酶为 Biolabs 公司产品, 抗生素为上海生物公司产品, 抗体及显色底物为华美公司产品.

单细胞蓝藻聚球藻 *Synechococcus* sp. PCC 7002 置于光照培养箱中振荡培养, 温度为 29 $^{\circ}\text{C}$ 、光强为 100 $\mu\text{m}^2/\text{s}$ 、振荡频率为 120 r/min、培养液为 Medium A^[12].

* 国家“九五”攻关项目 (96-C02-04-05).

** 通讯联系人.

Tel: 010-62751842, E-mail: Rulab@pku.edu.cn

收稿日期: 2001-07-10, 接受日期: 2001-08-23

1.2 启动子 *Pcp β* 及整合平台 *glnA* 片段的获得

根据聚球藻 7002 基因组 DNA 中藻蓝蛋白 β 亚基基因上游序列^[9] 及 *glnA* 基因序列^[12], 分别设计合成引物. *cp β* 引物: 5'-GGGGTACCATGT-AATGTTTAAATGCCGGCAG-3'; 5'-CCCAAGCT-TCTTCTCCTACTTATATTTTGATGAGTG-3'. *glnA* 引物: 5'-CGGGATCCCATGACCCAGACAG-CAACC-3'; 5'-GCTCTAGACCCACTACCATCGGC-AGTG-3'. 以野生聚球藻 7002 基因组 DNA 为模板, 经 PCR 扩增得到 300 bp 的启动子 *Pcp β* 和 1.4 kb 的 *glnA* 基因片段, 并分别克隆到质粒 KS 中, 经核苷酸序列测定, 证实序列正确.

1.3 自然转化与筛选

收集处于对数生长期的藻, 与表达载体按适当比例混合于培养液中, 静止光照培养 24 h, 涂布于滤膜上, 具体过程参见文献 [13]. 不断提高培养基中氨苄青霉素 (Amp) 浓度来筛选转化子, 挑取转化子单藻落于含有 30 mg/L Amp 的培养液中扩大培养.

1.4 PCR 鉴定转基因聚球藻 7002

按文献 [14] 分别提取野生藻和转 pKGC-MT 聚球藻 7002 的基因组 DNA. 以蓝藻基因组 DNA 为

模板, 以 *mMT-I* 基因两端序列为 5' 端和 3' 端引物, 进行 PCR 扩增. 2% 琼脂糖电泳鉴定扩增产物.

1.5 蛋白质印迹鉴定

按文献 [10] 提供的方法破碎藻细胞, 得藻细胞粗提液, 进行分离胶为 15% 的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE). 蛋白质的转移及膜的染色按文献 [15] 进行. 以兔的 MT 多克隆抗体作为一抗, 辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG 为二抗, 显色底物为二氨基联苯胺 (DAB).

1.6 酶联免疫吸附 (ELISA) 测定

通过竞争法 ELISA 测定外源基因在蓝藻中的表达量. 所用藻细胞粗提液、第一抗体及第二抗体与 1.5 中相同, 显色底物为四甲基联苯胺 (TMB). 具体操作见文献 [16].

1.7 蓝藻生长的测定

按适当比例接种以确保藻细胞的接种浓度基本一致, 光照振荡培养, 测藻细胞的 A_{750} 值.

2 实验结果

2.1 整合表达载体 pKGC-MT 的构建

载体具体构建过程如图 1 所示: 将 PCR 扩增

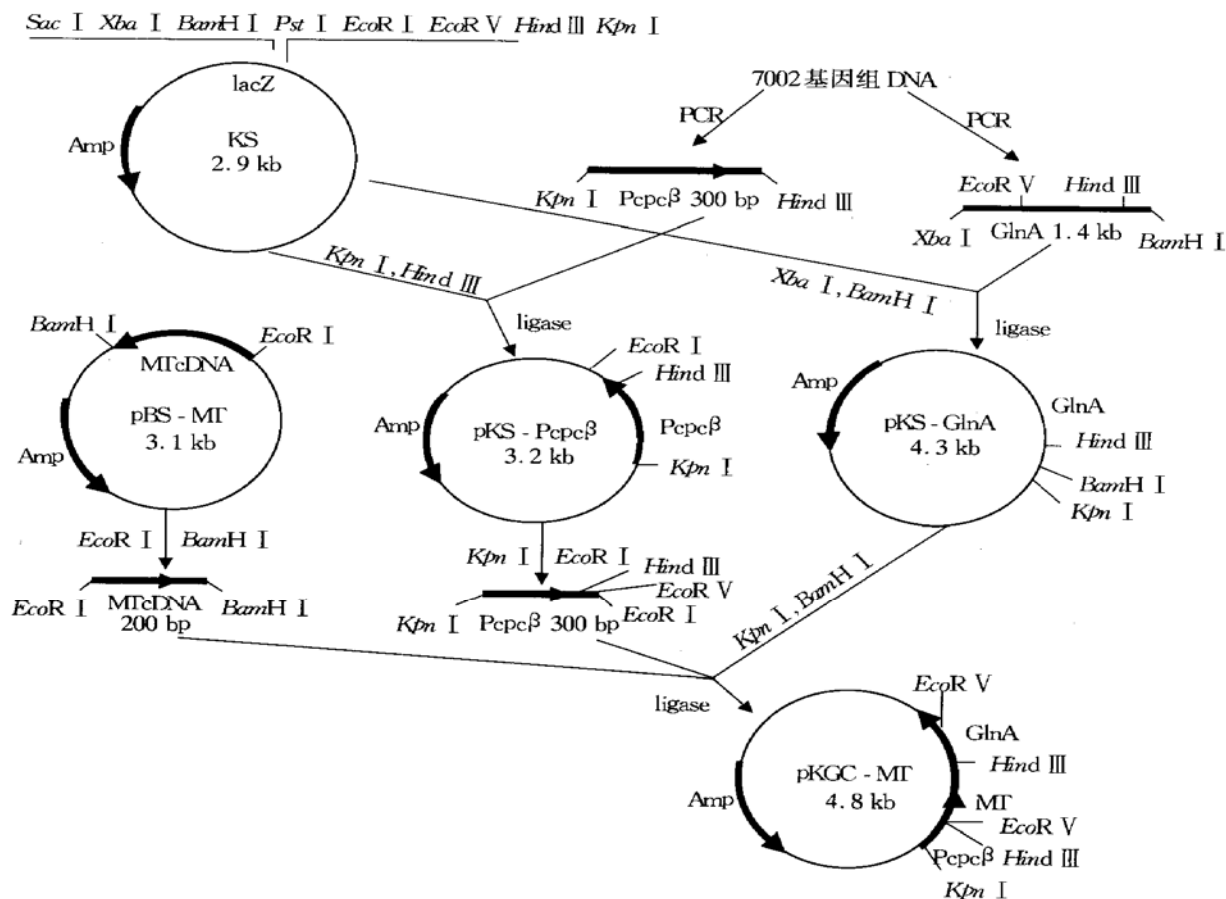


Fig 1 The construction of the integrative expression vector pKGC-MT

得到的 *Pcp* β 片段和 *glnA* 片段分别克隆至质粒 KS 的 *Kpn* I - *Hind* III 位点及 *Bam* H I - *Xba* I 位点, 得 KS-*cpc* β 和 KS-*glnA*. 分别用 *Eco*R I - *Bam* H I 和 *Kpn* I - *Eco*R I 将 *mMT*-I 基因、*Pcp* β 片段从质粒 pBS-MT 和 KS-*cpc* β 切下, 克隆至质粒 KS-*glnA* 的 *Kpn* I - *Bam* H I 位点, 构建成带有整合平台 *glnA* 片段及定向克隆于启动子 *Pcp* β 后的外源基因 *mMT*-I 的整合表达载体 pKGC-MT. 用 *Eco*R V 和 *Hind* III 进行酶切鉴定, 分别切出 900 bp 和 300 bp 片段 (图 2), 与预期得到的片段大小相符, 证明载体构建正确.

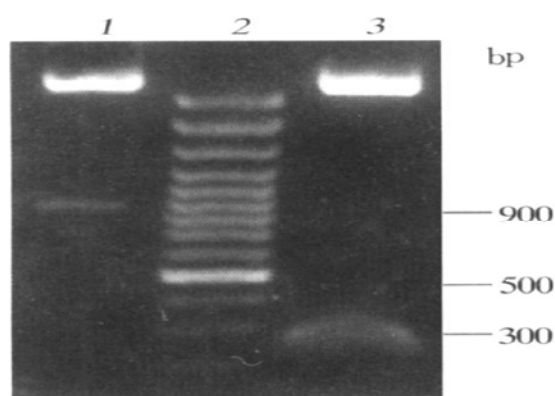


Fig. 2 Identification of vector pKGC-MT

1: pKGC-MT/*Eco*R V; 2: 100 bp DNA ladder;
3: pKGC-MT/*Hind* III.

2.2 转基因藻的鉴定

2.2.1 *mMT*-I 基因在蓝藻基因组 DNA 上的整合: 从 PCR 扩增结果 (图 3) 可以看出, 只有在含有整合表达载体 pKGC-MT 的转基因蓝藻基因组 DNA 中可以扩增得到与 *mMT*-I 基因大小相一致的 200 bp 片段, 而野生藻中没有. 这说明外源基因 *mMT*-I 已整合在蓝藻基因组 DNA 上.

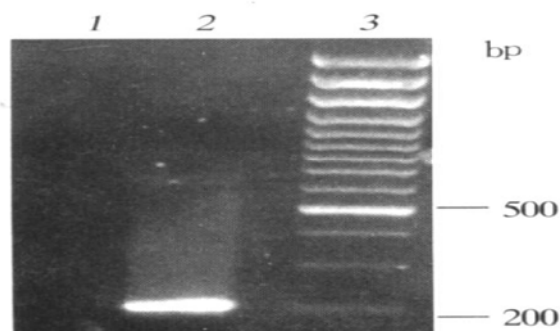


Fig. 3 PCR of *Synechococcus* sp. PCC 7002

1: wild type; 2: transgenic strain with pKGC-MT;
3: 100 bp DNA ladder.

2.2.2 *mMT*-I 基因在聚球藻 7002 中的表达: 从

蛋白质印迹显色结果 (图 4) 可以看到, 转 *mMT*-I 基因藻与标准 MT 对应的泳道有抗原、抗体结合的印迹带, 而转化有空载体 KS-*glnA* 的和野生藻则没有, 这证明了 *mMT*-I 基因在蓝藻中的表达. 由于 MT 分子中富含半胱氨酸而易于聚合成二聚体或多聚体^[1], 因此, 转基因藻粗提液中的 MT 及标准 MT 以聚合体形式 (14 ku 为二聚体分子量) 存在属正常现象.

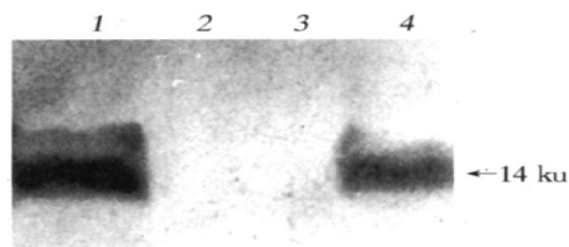


Fig. 4 Western blotting of *Synechococcus* sp. PCC 7002

1: standard MT; 2: cyanobacterium transformed with KS-*glnA*;
3: wild type; 4: cyanobacterium transformed with pKGC-MT.

2.3 *mMT*-I 在蓝藻中表达量的测定

竞争法 ELISA 的原理为液相中的 MT 与孔壁中包被的固相 MT 相互竞争液相中的 MT 抗体, 液相中 MT 越多, 则与固相 MT 结合的抗体越少, 显色也就越浅. 设液相中 MT 含量为 0 时的显色为 100%, 以液相中含不同浓度 MT 时的显色百分比为纵坐标, 以液相中 MT 含量为横坐标, 得标准曲线 $y = -0.038x + 93.9$, $r^2 = 0.98$. 根据标准曲线, 计算得 *mMT*-I 在聚球藻 7002 中的表达量约为 800 μ g/g.

2.4 转基因藻的生长

从藻的生长曲线 (图 5) 中可以看出, 野生藻在含有 Amp 的培养液中不能生长, 而分别带有载

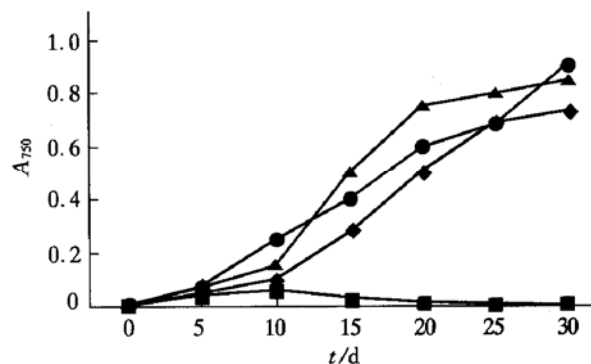


Fig. 5 Growth curve of *Synechococcus* sp. PCC 7002

◆—◆: wild type in medium A; ●—●: strain with pKGC-MT in Amp medium; ▲—▲: strain with KS-*glnA* in Amp medium; ■—■: wild type in Amp medium.

体 pKGC-MT 和空载体 KS-glnA 的转基因藻均能在含有 Amp 的培养液中生长, 这表明载体上的 Amp 抗性基因已在蓝藻中表达, 使转基因藻具有 Amp 抗性. 同时, 从生长曲线中还可以看出, 与野生藻在正常培养条件下的生长相比, 转 *mMT-I* 基因与转空载体的转基因藻的生长没有被抑制, 相反, 有加快的趋势. 这说明以 *glnA* 作为整合平台没有影响转基因聚球藻的生长.

3 讨 论

目前, 外源基因在蓝藻中表达主要有两种方式: 以独立质粒形式存在或通过同源重组整合到基因组 DNA 上. 前者应用比较广泛, 但有外源基因容易丢失、表达量偏低等问题^[2,3]; 而利用同源重组方法, 则可以增加外源基因稳定性、提高表达量^[4,5]. 但使用同源重组必须要有适宜的整合平台将外源基因整合到蓝藻染色体上, 同时转基因藻的生长又不会因为外源基因的整合而受到抑制. 本室曾用的整合平台 *psbB* 就有使转基因藻生长受到抑制的问题^[4,5]. 因此, 在本工作中我们从蓝藻基因组 DNA 中克隆了 *glnA* 基因片段作为整合平台. 实验结果表明, 通过整合平台 *glnA*, 外源基因 *mMT-I* 已被整合到蓝藻基因组 DNA 上, 并且转基因藻的生长不但没有被抑制, 反而受到促进. 这也进一步证明了文献 [12, 17] 中关于 GS 不是聚球藻 7002 生长所必需的观点. 但 *glnA* 基因突变对聚球藻 7002 生长产生促进作用的机理还不清楚.

此外, 本研究成功地从蓝藻中调出启动子 P_{pcpβ}. 在 P_{pcpβ} 的启动下, 外源基因 *mMT-I* 在蓝藻中的表达量为 800 μg/g, 高于用 P_{psbA} 作为启动子时的表达量^[4,5]. 这说明蓝藻内源启动子 P_{pcpβ} 可以用来启动外源基因在蓝藻中表达, 且其启动功能强于外源启动子 P_{psbA}.

mMT-I 在蓝藻中的表达量虽有所提高, 但与国际上外源基因在蓝藻中表达的最高水平^[18] 相比还有一定的差距. 因此, 在今后的工作中还需要改进: 在表达载体的构建上应考虑插入 SD 序列、终止序列等元件; 在转基因藻的培养上摸索适宜的诱导条件, 充分利用 *cpc* 操纵元启动功能的可诱导性, 来进一步提高外源基因 *mMT-I* 在蓝藻中的表达量.

参 考 文 献

- 1 Vallee B L. Introduction on metallothionein. *Methods Enzymol*, 1991, **205** (1): 3~7
- 2 Ren L, Shi D J, Dai L X, *et al.* Expression of the mouse metallothionein-I gene conferring cadmium resistance in a transgenic cyanobacterium. *FEMS Microbiol Lett*, 1998, **158** (1): 127~132
- 3 Guo X X, Shi D J, Xu X D, *et al.* Metal-induced expressing of mammal metallothionein-I gene in cyanobacteria to promote cadmium-binding preferences. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1999, **52** (6): 0806~0810
- 4 周杰, 施定基, 武宝珩, 等. 人肝金属硫蛋白突变体 β 基因通过同源重组在蓝藻中的克隆与表达. *中国生物化学与分子生物学报*, 1999, **15** (6): 907~911
Zhou J, Shi D J, Wu B G, *et al.* *Chin J Biochem Mol Biol*, 1999, **15** (6): 907~911
- 5 宋凌云, 施定基, 宁叶, 等. 用同源重组法将人肝金属硫蛋白突变体 β 基因整合在集胞藻 6803 中表达. *植物学报*, 2001, **43** (4): 399~404
Song L Y, Shi D J, Ning Y, *et al.* *Acta Bot Sin*, 2001, **43** (4): 399~404
- 6 Erbe J L, Adams A C, Taylor K B, *et al.* Expression of mouse metallothionein in the cyanobacterium *Synechococcus* PCC 7942. *J Ind Microbiol*, 1996, **17** (1): 41~46
- 7 李伟, 张竞, 张晓钰, 等. 转金属硫蛋白 αα 突变体基因的矮牵牛对铅的抗性及其积累的研究. *生物化学与生物物理进展*, 2001, **28** (3): 405~409
Li W, Zhang J, Zhang X Y, *et al.* *Prog Biochem Biophys*, 2001, **28** (3): 405~409
- 8 Chungiatupornchai W. Expression of the mosquitocidal-protein genes of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* and the herbicide-resistance gene bar in *Synechocystis* PCC 6803. *Curr Microbiol*, 1990, **21** (5): 283~288
- 9 Tami J, Pilot J, Lawrence F. Cloning and sequencing of the genes encoding the α and β subunits of C-phycoerythrin from the cyanobacterium *Agmenellum quadruplicatum*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1984, **81** (7): 6983~6987
- 10 Murphy R C, Stevens S E Jr. Cloning and expression of the cryIVD gene of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* in the cyanobacterium *Agmenellum quadruplicatum* PR-6 and its resulting larvicidal activity. *Appl Environ Microbiol*, 1992, **58** (5): 1650~1655
- 11 Vermaas W F J, Williams J G K, Arntzen C J. Sequencing and modification of *psbB*, the gene encoding the CP-47 protein of photosystem II, in the cyanobacterium *Synechocystis* 6803. *Plant Mol Biol*, 1987, **8** (4): 312~326
- 12 Wagner S J, Thomas S P, Kaufman R I, *et al.* The *glnA* gene of the cyanobacterium *Agmenellum quadruplicatum* PR-6 is nonessential for ammonium assimilation. *J Bacteriol*, 1993, **175** (3): 604~612
- 13 Stevens S E Jr, Porter R D. Transformation in *Agmenellum quadruplicatum*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1980, **77** (5): 6052~6056
- 14 Goyal D A. Simplified method for screening and characterization of plasmid DNA in cyanobacteria. *J Microbiol Methods*, 1992, **15** (1): 7~15
- 15 Burnette W N. Western blotting: electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gels to antibody and radiolabeled protein A. *Anal Biochem*, 1981, **112** (2): 195~203
- 16 郑均恒, 茹刚, 茹炳根. 人肝金属硫蛋白分离纯化及酶联免疫吸附检测. *北京大学学报*, 1999, **35** (3): 225~229
Zheng J H, Ru G, Ru B G. *Acta Sci Nat Univ Pekinesis*, 1999, **35** (3): 225~229

- 17 秦京东, 邵 宁, 施定基, 等. 聚球藻 7942 高效泌氨突变种的获得及其泌氨、谷氨酰胺合成酶活性、光合和生长. 植物学报, 1999, **41** (1): 65~ 70
Qin J D, Shao N, Shi D J, *et al.* Acta Bot Sin, 1999, **41** (1): 65~ 70
- 18 Takeshima Y, Takatsugu N, Sugiura M, *et al.* High-level expression of human superoxide dismutase in the cyanobacterium *Anacystis nidulans* 6301. Proc Natl Acad Sci USA, 1994, **91** (10): 9685~ 9689

Expression of Mouse Metallothionein- I Gene in *Synechococcus* sp. PCC 7002 by Homologous Recombination^{*}

ZHOU Jie¹⁾, LUO Na¹⁾, NING Ye¹⁾, SHI Ding-Ji²⁾, YU Mei-Min¹⁾, RU Bing-Gen

(¹⁾The National Laboratory of Protein Engineering and Plant Genetic Engineering, College of Life Sciences, Peking University, Beijing 100871, China; (²⁾Institute of Botany, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100093, China)

Abstract The 300 bp upstream fragment of *cpc β* gene which encodes the β -subunit of phycocyanin and the 1.4 kb fragment of *glnA* gene encoding glutamine synthetase were obtained by polymerase chain reaction (PCR) from genomic DNA of marine cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC 7002. Then, integrative expression vector pKGC-MT, which contained promoter *Pcpc β* , *mMT- I* gene and integrative platform *glnA*, was constructed and introduced into *Synechococcus* sp. PCC 7002 via natural transformation. Selected by ampicillin, the stable transgenic cyanobacterium was obtained. PCR analysis indicated the integration of *mMT- I* gene in genomic DNA of *Synechococcus* sp. PCC 7002 and Western blotting demonstrated the expression of mMT- I in the cyanobacterium. According to the result of ELISA, the amount of the expressed mMT- I was about 800 μ g/g fresh cells.

Key words mouse metallothionein- I, promoter *Pcpc β* , *glnA* integrative platform, *Synechococcus* sp. PCC 7002, homologous recombination

^{*} This work was supported by a grant from the National "The Ninth Five" Project (96-C02-05).

^{**} Corresponding author. Tel: 86-10-62751842, E-mail: Rulab@pku.edu.cn

Received: July 10, 2001 Accepted: August 23, 2001