

学校编码: 10384

分类号: 密级

学号: B200026008

UDC

博士学位论文

蓝藻表达系统的优化及

转胸腺素 α_1 基因螺旋藻的构建与安全评价

Improvement of expression system of cyanobacteria &

Construction of transgenic $T\alpha_1$ *Spirulina platensis* and its safety evaluation

章 军

厦门大学生命科学学院

指导教师: 徐 洵 教授, 院士

厦门大学, 国家海洋局第三海洋研究所

申请学位级别: 博士 专业名称: 动物学

论文提交日期 2006.12 论文答辩日期 2007.1

学位授予单位、日期: 厦门大学 2007

答辩委员会主席: _____

评阅人: _____

2006 年 12 月

目 录

中文摘要	I
Abstract.....	III
第一部分 前言.....	1
一. 蓝藻简介	
1.1 蓝藻基因组测序及基因克隆.....	1
1.2 蓝藻作为新型生物反应器的特点及优势.....	3
二. 蓝藻基因工程表达系统	
2.1 基因转化途径.....	4
2.2 蓝藻穿梭质粒载体系统.....	7
2.3 基因整合平台系统是蓝藻转基因的理想途径.....	10
2.4 基因表达系统优化.....	13
三. 螺旋藻基因工程进展.....	19
四. 目的基因简介.....	23
五. 转基因生物安全评价.....	25
六. 本论文研究目的和意义.....	28
第二部分 蓝藻表达系统的优化	
第一章 蓝藻热休克诱导外源基因高效表达系统的构建	
材料.....	29
方法.....	31
结果与分析	
一. 表达载体的构建和鉴定.....	37
二. 外源基因的热诱导表达及检测.....	37
讨论.....	39
小结.....	40
第二章 蓝藻穿梭质粒表达系统的构建	
材料.....	41
方法.....	43
结果与分析	

一. 穿梭质粒的构建及鉴定.....	47
二. 重组质粒自然转化 <i>Synechococcus</i> sp.PCC7942.....	49
三. 转化藻株的 Southern-blot 鉴定.....	49
四. 转化藻株胞内蛋白的 SDS-PAGE 凝胶电泳分析.....	49
五. 转化藻的 Western-blot 鉴定.....	50
六. 穿梭表达质粒的传代稳定性和拷贝数.....	51
讨论.....	52
小结.....	54
第三章 蓝藻基因整合平台系统的构建	
材料.....	55
方法.....	56
结果与分析	
一. 定点整合靶位的克隆.....	62
二. 整合平台供体质粒 pEUTISI 和 pEUTR 的构建.....	62
三. 蓝藻的自然转化和转化藻株的筛选.....	62
四. 转化藻株的 SDS-PAGE 和 Western 印迹鉴定.....	64
五. 转化藻株 Southern 杂交分析.....	65
六. 外源基因的定点整合对转化藻株的影响.....	65
七. 随机整合平台系统的构建.....	70
讨论.....	70
小结.....	73
第三部分 转基因螺旋藻的构建与安全评价	
第一章 转基因螺旋藻的构建	
材料.....	74
方法.....	76
结果与分析	
一. 螺旋藻定位整合同源重组质粒的构建.....	87
二. 转化与筛选钝顶螺旋藻.....	89
三. PCR 鉴定转化藻.....	90

四. ELISA 检测转基因藻中胸腺素 $\alpha 1$ 的表达量.....	90
五. HPLC 检测转基因藻中胸腺素 $\alpha 1$ 的表达量.....	90
六. Southern blot 鉴定转化藻.....	91
七. SDS-PAGE 检测及 Western 杂交验证转化藻 T4 藻粉的表达.....	92
八. 转化藻的生理及形态上的改变.....	93
九. 转基因螺旋藻作为饲料添加剂用于鳗鱼苗养殖试验.....	95
讨论.....	97
小结.....	101
第二章 转基因螺旋藻的安全性评价	
一. 重组螺旋藻的遗传稳定性试验.....	102
二. 重组螺旋藻与野生螺旋藻的竞争实验.....	103
三. 目的基因拷贝数的检测.....	105
四. 检测目的基因或转基因微生物向环境中的转移情况.....	105
五. 稳定性、生存竞争性、适应能力等的综合评价报告.....	108
总结与展望.....	109
参考文献.....	110
致谢.....	122
附件.....	123

摘 要

以聚球藻 *Synechococcus* sp. PCC7942 作为基因工程受体菌, 构建了热休克诱导的高效表达系统。用 PCR 法扩增并克隆出 *Synechococcus* sp. PCC7942 自身的热休克基因 *groESL* 操纵子的强启动区(240bp), 并紧靠其后组装上泛素(UB)融合的胸腺素 α_1 ($T\alpha_1$)目的基因, 在下游组装有 *rbcS* polyA 终止子。此外, 还组装了一个完整的卡那霉素抗性基因作为筛选标记基因。经转化 *Synechococcus* sp. PCC7942 细胞, 在 42°C 热诱导 30min 后, 目的基因 UB- $T\alpha_1$ 得到较高水平表达, 表达量约占可溶性蛋白的 8.7%。*groESL* 启动子被证明是个高效通用诱导型启动子并可用于蓝藻表达系统中。

利用本实验室构建的含蓝藻 *Plectonema boryanum* 1.5kb 内源小质粒的穿梭质粒 pPRS-1 为出发质粒, 改建成含热诱导启动子、泛素融合的胸腺素 α_1 (UB- $T\alpha_1$) 目的基因、卡那霉素抗性选择标记、*rbcS* 终止子的新的穿梭表达重组质粒 pPREUT。将这种重组质粒转化蓝藻 *Synechococcus* sp. PCC7942, 通过抗性筛选获得了具卡那霉素抗性的转化藻株。转化率约为 2×10^{-6} , 质粒拷贝数约为 80 个。经 Southern-blot 杂交证实, 穿梭表达质粒已转入蓝藻 *Synechococcus* sp. PCC 7942 细胞中; 在 42°C 热诱导 30min 后, 分子量为 11kDa 处出现一条特异蛋白带, 目的基因 UB- $T\alpha_1$ 得到较高水平表达, 表达量约占总可溶性蛋白的 7.5%。通过质粒稳定性检测表明, 当除去选择压力后, 随着宿主蓝藻的繁殖出现质粒丢失现象, 连续培养 72h 时, 质粒含有率会减低 80%以上; 而在卡那霉素抗性的维持下, 穿梭表达重组质粒在宿主蓝藻胞内则具有较好的稳定性。

为了使外源基因高效表达并稳定转化维持在蓝藻细胞染色体中, 可以采用基因整合平台系统。本文选定单胞蓝藻 *Synechococcus* sp. PCC7942 基因组的铁缺乏诱导基因 *isiA* 操纵子和藻蓝蛋白操纵子 *cpc2* 中的右侧片段作为基因整合平台系统的整合靶位, 构建了整合平台系统 pEUTISI 和 pEUTR, 两者均含有完整的表达元件和卡那霉素抗性基因。pEUTISI 和 pEUTR 分别自然转化 *Synechococcus* sp. PCC7942, 通过同源交换, 将 EUT 片段整合到蓝藻 PCC7942 基因组中。Southern blot 证实了转化藻是定点整合。转化藻经热诱导, 进行 Western Blotting 证实 UT 基因已大量表达, 表达量约为可溶性蛋白的 10%和 17%。外源 DNA 整合插入宿主细胞后会导致细胞形态和生理上的改变, 通过 NBT 光化还原和 PAGE 电泳

检测发现转基因藻 *Synechococcus sp.*PCC7942 的 SOD 活性和同工酶谱发生了改变。若外源基因整合在受体细胞染色体 DNA 上, 根据整合位点的不同则能提高或减弱 *Synechococcus sp.*PCC7942 的 SOD 活性, 同时增加同工酶谱带。若外源基因不是整合在染色体上而是以质粒的形式存在, 则只改变 *Synechococcus sp.*PCC7942 SOD 活性而不影响其同工酶谱。随机整合平台系统也可以获得大量的转化子, 但由于插入位点随机, 不可控, 重复性不好, 不大合适用来转化。

螺旋藻是一类丝状蓝藻, 含有大量的蛋白质及多种生物学活性物质, 具有较高的营养价值和独特的药理作用, 是众所周知的优良天然营养源。若能以螺旋藻作为基因工程受体藻, 高效表达外源药物基因, 大量生产多肽药物, 获得可供直接口服的转基因螺旋藻, 不仅可免去繁杂昂贵的基因工程下游产物的提纯工艺, 而且螺旋藻所具有的高营养价值加上药物特有的药效必将收到事半功倍的效果, 从而产生巨大的经济效益和社会效益。螺旋藻作为一种新的极富吸引力的基因工程受体藻, 迫切需要完善的基因转移体系。本文采用超声转化(30w, 20s), 降低螺旋藻细胞酶活 (EDTA 处理和低温转化), 用 G418 抗性筛选, 并建立了目的基因串联表达系统, 以 *recA* 为靶位进行同源整合, 从而获得了转化藻株。经 ELISA、HPLC 和 SDS-PAGE 检测表明胸腺素 $T\alpha_1$ 的表达量最高可达可溶性蛋白的 7%, 藻粉中 $T\alpha_1$ 的含量超过 2%。

表达产物胸腺素 α_1 是 28 肽, 具有免疫增强功能。转 $T\alpha_1$ 基因螺旋藻可以作为免疫增强功能饵料添加剂使用, 通过鳗鱼苗的饲喂试验, 证明了该转基因藻确实能提高鳗鱼苗体内的胸腺素含量, 增强抗病力和抗逆性。

转基因螺旋藻的生产应用需要进行安全评价, 通过研究该转基因藻的生理和遗传特征, 证明该藻稳定性强, 安全性高, 因此获得了农业部颁发的转基因生物安全证书 (生产应用) (农基安证字 2006 第 044 号), 这是转基因螺旋藻首次获得安全证书, 意味着这种新的转基因生物被允许进行大规模生产使用, 该藻将首先作为饲料添加剂使用。

关键词: 螺旋藻, 表达系统, 胸腺素, 蓝藻, 安全评价

Abstract

A high level expression system by heat shock induced had been constructed for *Synechococcus* sp. PCC7942. First, the strong promoter (240bp) of heat shock gene groESL operon from *Synechococcus* sp. PCC7942 was cloned by PCR. Then the ubiquitin fused thymosin α_1 gene(UB-T α_1), rbcS polyA terminator were subcloned sequentially in the downstream of groESL promoter. The kanamycin resistance gene, which as the marker gene, was also subcloned into this expression system to obtain the expression vector pEUTMT1. Induced by 42°C heat shock for 30 min, the level of UB-T α_1 protein reached a value of 8.7% of the total soluble protein in the transformants of *Synechococcus* sp. PCC7942. The result of the experiment demonstrates that the heat shock induced high level expression system of *Synechococcus* sp. PCC7942 was constructed successfully. The groESL promoter shows the high effect and universal be used for the expression system of cyanobacteria.

The shuttle expression vector pPREUT was constructed from the plasmid pPRS-1 which containing the endogenous small plasmid (1.5kb) of *Plectonema boryanum*. The recombinant shuttle plasmid pPREUT contained the whole expression elements was directly transformed into *Synechococcus* sp. PCC7942. The Kanamycin resistant transformants were obtained through Kanamycin screening. Southern blotting analysis showed that the shuttle plasmid have been transformed into *Synechococcus* sp. PCC7942. By 42°C incubation for 30 min, the foreign gene UB-T α_1 was expressed efficiently, which reached 7.5% amount of total soluble protein. The plasmid transformed ratio reach 2×10^{-6} , and each cell contain about 80 copies of plasmids. This kind of shuttle plasmid should be maintained by antibiotic. Otherwise these plasmids will be loss more than 80% after 72h.

In order to express Ta1 gene in high level with stable, we construct two kinds of donor plasmids pEUTR and pEUTISI that can be integrated into the chromosomal DNA of *Synechococcus* sp. PCC7942, which called the integration platform system. Donor DNA include whole expression elements and marker gene(Kanamycin

resistance gene, km^r). Donor plasmids pEUTR and pEUTISI are directly transformed into *Synechococcus* sp. PCC7942 respectively. Southern blotting analysis showed that foreign gene had been inserted into the target site of homology gene. The expression product of UB-T α 1 gene is examined by Western blotting analysis. And the UB-T α 1 expression amount reach more than 10% of the total soluble protein. Homology integration system may lead to the physiological change of the host cell. The activity and the isoenzyme of superoxide dismutase (SOD) could be the scale of this influence. And the scale in three types of transgenic *Synechococcus* sp.PCC7942 were analysed by photoreduction of NBT and PAGE electrophoresis. The results showed that introduction of exogenous DNA does change the activities and numbers of SOD isoenzyme bands. If exogenous gene were integrated into chromosomal DNA of host cell, it can enhance and reduce enzyme activity and add isoenzyme bands of SOD in transformed *Synechococcus* sp.PCC7942. But if exogenous genes existed in shuttle plasmid and not integrated into chromosome of host cell, it can enhance activity of SOD, but does not change the number of SOD isoenzyme band. Random integration system can also be used to obtain the transformants. But this kind of system cannot be controlled and repeated.

In these years, rapid progresses have been made on genetic engineering of other cyanobacteria. But *Spirulina platensis* is extremely hostile to foreign gene transformation. *Spirulina platensis* is a blue green algae known as safe and natural food. Expression of T α ₁ in *Spirulina platensis* will produce a valuable and more cheap bio-product, because it omit the expensive purifying process and can be used as a oral medicine or food additive directly. Thus *Spirulina platensis* is a attractive host system for gene engineering.

An efficient way to introduce foreign genes into the chromosome of *Spirulina platensis*: Transformed by sonication (30w, 20s). Then grow in 24°C, combined with 2mmol/L EDTA treatment for 16-20 hours. Selected by 20 μ g/ml G418 antibiotic.

In this study, we designed a cluster expression system and constructed a gene intergration platform system for *Spirulina platensis*. ELISA and HPLC analysis was

used to compare the expression amount difference among the 1 to 4 T α_1 gene cluster in transgenic *Spirulina platensis*. The data shows that the cluster expression is effect and the maximum amount of reach 7% of total protein. SDS-PAGE and Western blot show that T α_1 reach more than 2% amount of algae powder. Ultrasonic transformation, gene cluster expression system and gene integration platform system for *Spirulina platensis* are efficient.

Thymosin α_1 is a kind of immune enhancer, only 28 peptide, 3000 dalton. It occurs and has function on vertebrate, including human and fish etc. Function: improve the immune ability of body; immunostimulants. The immune enhancer activity of the transgenic *Spirulina platensis* was demonstrated by feeding japonica eel as additive fodder. T α_1 contents in the mensurated tissues and organs of the black fry increased after fed with transgenic algae. The immunostimulated transgenic *Spirulina platensis* is the feasible additive of copulated feed for the rare aquacultured fish.

This kind of transgenic *Spirulina platensis* should be evaluated its safety, including the environment safety and food safety. By means of test the culture and the character of gene stable of transgenic algae, this transgenic *Spirulina platensis* shows safety in the environment. Finally, this transgenic organism obtain the safety certificate from Ministry of Agriculture of the P.R.China. This is the first transgenic safety certificate to *Spirulina platensis*, which mean this transgenic *Spirulina platensis* can be applied in large scale.

Spirulina platensis, as the new receptor of gene-transforming system and the bioreactor shows merits of microbe and plants concurrent, has bright future. *Spirulina platensis* transgene system can be used in other useful protein expression. T α_1 transgenic *Spirulina* can be the immune enhancer in aquaculture fodder additive.

Keywords: *Spirulina Platensis*, Expression System, Thymosin A1, Cyanobacteria, Safety Evaluation.

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人完全了解厦门大学有关保留、使用学位论文的规定。厦门大学有权保留并向国家主管部门或其指定机构送交论文的纸质版和电子版，有权将学位论文用于非赢利目的的少量复制并允许论文进入学校图书馆被查阅，有权将学位论文的内容编入有关数据库进行检索，有权将学位论文的标题和摘要汇编出版。保密的学位论文在解密后适用本规定。

本学位论文属于

1、保密（），在 三 年解密后适用本授权书。

2、不保密（）

（请在以上相应括号内打“”）

作者签名： 章 军 日期：2007年01月25日

导师签名： 徐 洵 日期：2007年01月25日

厦门大学学位论文原创性声明

本人郑重声明：所呈交的学位论文，是本人在导师的指导下，独立进行研究工作所取得的成果。除文中已经注明引用的内容外，本论文不含任何其他个人已经发表或撰写过的作品成果。对本文的研究作出重要贡献的个人和集体，均已在文中以明确方式标明。本人完全意识到本声明的法律结果由本人承担。

学位论文作者签名：章军

日期： 2007 年 1 月 25 日

第一部分 前言

一 蓝藻简介

蓝藻是藻类中最古老、最原始的门类。其细胞结构与细菌类同，无细胞核及双层膜结构的细胞器，染色体 DNA 裸露，细胞壁结构为 G^- ，因此又被称为蓝细菌 (cyanobacterium)；但它们的光合系统类似于真核藻类及高等植物，含叶绿素 a(缺叶绿素 b)和藻胆色素，具光系统 I (PS I)和光系统 II (PS II)，能进行光解水放氧的高等植物类型的光合作用，因此也称蓝绿藻 (blue green algae)。

蓝藻约 150 属，2,000 余种，广泛分布于地球上的各个角落，从两极到赤道，从高山到海洋，从干旱的沙漠到高温泉水，到处都有它们的踪迹。蓝藻不仅能光合放氧，在地球大气从还原型向氧化型的转化中扮演着重要角色，而且上百种蓝藻具自生固氮的能力，是开拓不毛之地的先行者。有些蓝藻具放氢特性，可供开发清洁的能源。有些蓝藻富含蛋白质，是天然食物和饲料的蛋白资源。此外，有的蓝藻还能净化污水，可用来治理水体污染。随着它们基因组的研究和基因技术的发展，蓝藻的潜能必将得到更多的认识和提高。由于蓝藻在细胞结构、代谢、遗传和进化等方面表现出独特的性质，多年来被广泛应用于研究光合作用、固氮作用、叶绿体起源及植物分子进化等重大生物学问题。特别是近年来，随着基因工程的兴起及对蓝藻分子生物学的深入研究，开发蓝藻作为基因工程的受体系统生产特殊物质（比如多肽药物或光合色素和分子氢），或生物降解水体中的有机污染，或控制蚊虫等，引起了生物工作者的兴趣和重视，研究进展迅速。

1.1 蓝藻基因组测序及基因克隆

蓝藻来自于远古时代，带有整套光合放氧基因簇，是植物光合作用的鼻祖，另外由于蓝藻能在各种自然环境中生存以及植物细胞叶绿体的蓝藻内共生起源学说，因此从进化的角度很值得研究。近年来，随着蓝藻基因的不断克隆和基因组大规模测序，这些基本问题将得以解决。

自 1980 年 Mazur 等人从淡水蓝藻 *Anabaena* sp. PCC 7120 基因组中克隆到 *nif* H1(固氮酶)基因以来，截至 2006 年底，Genbank 上收入的各类蓝藻基因纪录已达 65793 个，测序的核酸序列达 26350 个，全基因组测序的蓝藻（含内源质粒）数已达 66 个（<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=Genome&cmd=search&term=cyanobacteria>）。

其中，聚胞藻 *Synechocystis* sp. PCC6803 是单胞非固氮淡水蓝藻，由于它同时具有自养和异养的能力，而且遗传操作简单，成为蓝藻中的模式生物。1996 年，日本科学家

把蓝藻 *Synechocystis* sp. PCC6803 的基因组序列全长 3,573,470bp 全部测出。通过软件分析,以及在基因库中进行基因相似性比较,最后共找到 3168 个潜在基因,其中 145 个同已知基因一致,1257 个同已知基因相似,340 个同假设基因相似,另外的 1426 个同基因库中的基因没有明显的相似性。与光合作用有关的基因有 128 个 (Kaneko T, et al.,1997)。聚胞藻 PCC6803 基因组资料在 1997 年正式集中公布,并分成 27 份收录在 DDBJ 里,序号从 D90899~D90915 和 D63999~D64006,以及 D90916, D90917。另外 2002 年他们完成了该藻的基因注释工作,可以在他们建立的蓝藻基因组网站: <http://www.kazusa.or.jp/cyano/> 上查询到有关蓝藻基因组的信息。

2001 年 11 月,鱼腥藻 *Anabaena* sp. PCC 7120 的基因组序列也全部测出。鱼腥藻 PCC7120 是一种丝状固氮蓝藻,其基因组含一个长为 6,413,771bp 染色体和 6 个质粒。染色体上含有 5368 个蛋白编码区,4 套 rRNA 基因,48 个 tRNA 基因,以及 4 个小结构 RNA 基因。蛋白编码区的预测产物有 45%和已知的蛋白序列具相似性,27%的预测产物和假设的蛋白具相似性,剩余的 28%和公共数据库中蛋白没有明显的相似性 (Kaneko T, et al.,2001)。其全基因组信息收录在 Genbank 的序列号为 AP003581~AP003606。

另外,一种嗜热蓝藻 *Thermosynechococcus elongates* BP-1 的基因组全长序列也于 2002 年 8 月全部测出。该嗜热蓝藻全基因组仅一个环状的长 2,593,857bp 的染色体,未发现质粒。有 2475 个蛋白编码区,一套 rRNA 基因,42 个 tRNA 基因。预测编码区表达的蛋白发现:56%的蛋白同已知的蛋白相似,34%的蛋白同假设的蛋白相似,剩下的 10%同公共数据库的资料没有明显的相似性。63%的基因序列和聚胞藻 PCC6803 有明显的相似性,22%是这个藻特有的(Nakamura Y, et al.,2002)。其基因组信息在 Genbank 的序列号为 BA000039。

Gloeobacter violaceus PCC7421 是很特殊的一种单胞蓝藻,它没有内囊体,藻胆体是依附在质膜上,该藻基因组为一环状染色体,长为 4,659,019bp,GC 含量为 62%,没有发现质粒。整个基因组含 4430 蛋白编码区,一套 rRNA 基因,45 个 tRNA 基因。41%的编码基因同已知基因相似,37%同假设基因相似,另外的 22%同已知的基因没有明显的相似性(Nakamura Y, et al.,2003)。其基因组信息在 Genbank 的序列号为 BA000045。

海洋单胞蓝藻原绿球藻属 *Prochlorococcus marinus* SS120 是海洋中最小的光合放氧藻类,它是目前发现具有光合作用物种的最小基因组之一,整个基因组仅 1,751,080bp,环状,GC 含量为 36.4%,有 1884 个蛋白编码区,一个 rRNA 操纵子,40 个 tRNA 基因,

它缺失了其他蓝藻具有的很多基因,如缺失光合作用中的许多基因,缺失编码运动性、趋光性等基因。信号传导和对环境压力的反应组分也大大精简。然而却具有全部的看家基因,如编码氨基酸、核苷、辅因子、以及细胞壁合成的酶都存在(Dufresne A, et al.,2003)。其基因组信息在 Genbank 的序列号为 AE017126,其基因组网站链接 <http://www.sb-roscoff.fr/Phyto/ProSS120/>。另一个更小的具光合作用的基因组是 *Prochlorococcus marinus* MED4(1,657,990bp)。还有 *Prochlorococcus marinus* MIT9313(2,410,873bp) 和 *Synechococcus* sp. WH8102(2,434,428bp) 基因组项目网站链接是 http://www.jgi.doe.gov/JGI_microbial/html/index.html。

而模式藻 *Synechococcus* sp. PCC7942 的基因组测序也已完成,正在注释中。深入开展的蓝藻基因组测序与基因图谱绘制工作,十分有利于蓝藻基因的克隆、修饰、功能鉴定和比较研究,无疑为蓝藻的基因操作奠定了基础。

1.2 蓝藻作为新型生物反应器的特点及优势

开发蓝藻作为基因工程受体越来越受到人们的关注。与大肠杆菌、枯草杆菌、酵母及动植物细胞相比,蓝藻作为转基因受体系统和生物反应器,兼具微生物和植物的优点(Tandeau de Marsac N et al,1987; Lou SL et al,1996):

(1) 遗传背景简单,基因组为原核型,除了裸露的染色体 DNA 外,不含叶绿体 DNA 和线粒体 DNA,便于基因分析和检测外源 DNA。

(2) 细胞壁主要由肽聚糖组成,无高等植物坚硬细胞壁的纤维素成分,便于外源 DNA 的转化。

(3) 营光合自养生长,培养条件简单,成本低廉,只需光、CO₂、无机盐和适当的温度就能满足生长需要,并且适于连续、静止等多种方式的培养。

(4) 细胞体积大,能耐受高浓度(总蛋白的 25%)的单一蛋白(而在 *E.coli* 中仅为 5%),内源蛋白质更新速度慢,对外源蛋白质的容受力较高。

(5) 很多种类含有内源质粒,为利用和改造这些质粒构建质粒载体提供了极好的条件。

(6) 蓝藻富含人体和动物所必需的氨基酸和生理活性物质或前体,并且多数是无毒的,是食物及药物的重要来源,为基因工程产物直接食用提供了可能。

总之,由于蓝藻为遗传操作提供了诸多便利条件,进入 90 年代后蓝藻基因工程不断蓬勃发展,成为藻类基因工程中极具生命力的一个领域,有着重大的科学意义和良好的应用前景。

蓝藻作为表达外源基因的受体菌已取得了不少研究成果。现已证明,来自大肠杆菌、枯草杆菌以及人的一些外源基因可以在蓝藻中表达。利用转基因蓝藻生产药物是非常有发展前途的。与微生物和动植物发酵系统相比较,转基因蓝藻是具有巨大潜力的生物反应器,用它可生产蛋白质多肽类、脂类、次生代谢类药物等,可供直接口服,免去繁杂昂贵的基因工程产品纯化的下游技术,能大大的节约生产成本。

我国的海洋 863 计划已开始大力支持转药物基因藻的研究开发工作,目标是构建获得具有某种药物功能的、可供口服的转基因藻。转移表达的目标基因,即药物基因包括胸腺肽、肿瘤抑制因子等,当然,还可以举一反三,如 α -干扰素、脑啡肽、表皮生长因子、促红细胞生长素、生长素、水蛭素等,这些基因都已在植物中得到了表达,同样也可能在蓝藻中表达。

基因工程疫苗也是蓝藻转基因的方向之一。疫苗通常经微生物发酵方法进行生产,尽管生产技术不断改进,由于发酵系统需要严格的培养条件以及复杂的提取过程,疫苗的价格始终比较昂贵。利用转基因植株的可食器官生产抗原以用作口服疫苗是世界上的研究热点,并已在香蕉中试验成功,这提示着转抗原基因蓝藻也同样可获得成功。预计这种成本相对很低的口服疫苗将对经济尚不发达的第三世界国家产生重大影响。另外这种疫苗也非常适合作为禽畜的药物。

蓝藻中多种多样的代谢途径产生了丰富的次生代谢产物,其中许多具药用价值。如许多海洋蓝藻中含有以二十碳五烯酸(EPA)和二十碳六烯酸(DHA)为代表的 $\omega 3$ 高度不饱和脂肪酸,一些藻类的多糖及维生素等。遗憾的是这些次生代谢产物往往在这些蓝藻中的含量不高,提高次生代谢产物的有效方法是利用基因工程手段把编码限速酶或具有调节功能酶的基因导入蓝藻中。

利用蓝藻作为基因工程受体细胞表达外源蛋白质,可在大肠杆菌和枯草杆菌以外另辟新径,为真核基因在原核细胞中的表达启开新的大门。这将有利于综合利用蓝藻,提高开发蓝藻的经济效益。通过基因工程手段以蓝藻作为廉价的生物反应器来生产有用的产品,特别是来源紧缺,造价昂贵的产品具有重大的科学意义和应用前景。

二 蓝藻基因工程表达系统

2.1 基因转化途径

蓝藻的细胞壁结构简单,有利于外源物质的渗入。同时,由于蓝藻染色体 DNA 裸露、便于外源 DNA 整合,因而蓝藻的转化效率较高,转化方法也相对简单。一般来说,海水蓝藻的转化较淡水蓝藻难。Matsunaga 等(1990)的研究发现,海洋蓝藻 *Synechococcus*

NKBG 04902-YG1116 的自然转化效率不足淡水相应种类的 1/10。据推测,这可能是由于藻体在适应海水高渗透势的过程中,在细胞壁上积累大量的多糖物质,从而阻碍了外源 DNA 的转入。单细胞的蓝藻一般可直接用于转化。较早的转化研究用 Ca^{2+} 人工诱导蓝藻细胞的感受态 (Devilly et al.,1977; Stevens et al., 1980), 而现在的研究表明, 绝大多数的蓝藻细胞在各个生长期均处于感受态状态, 单胞藻可直接用于转化。质粒转化丝状蓝藻较难获得遗传上稳定的转化子。研究表明, 把其藻体制成原生质体或半原生质体, 或用超声打断藻体成单细胞或 5-10 个细胞, 有利于蓝藻的转化和筛选。

常用的蓝藻转化方法有以下几种:

(1) 天然转化

天然转化是获得转基因蓝藻的最简单的方法。混合外源 DNA 和受体蓝藻细胞, 在适宜的条件下悬浮培养, 就完成 DNA 的转化。1970 年 Shestakov 与 Khyen 首先在 *Synechococcus* PCC 7943 中发现 DNA 的天然转化作用。目前已确认可天然转化的蓝藻是不产生异形胞的单细胞种类, 绝大多数属于 *Synechococcus* 与 *Synechocystis* 两个属, 如 *Synechococcus* PCC7943、PCC6301、PCC7942、PCC7002、PCC73609、NKBG 042902-YG1116 和 *Synechocystis* PCC6714、PCC6308、PCC6803、PCC6906 等, 除 *Synechocystis* PCC6308 需用 Ca^{2+} 诱导人工感受态外(Devilly CI and Houghton JA, 1977), 其它藻株都能有效地直接吸纳外源 DNA。在已进行的天然转化研究中, *Synechococcus* PCC7002 和 *Synechococcus* NKBG 042902-YG1116 是仅有的海洋性蓝藻, 并且 *Synechococcus* NKBG 042902-YG1116 的天然转化效率不足对照淡水蓝藻的 1/10, 据推测, 这可能是由于藻体适应海水渗透势变化, 在细胞壁上积累大量的多糖物质而阻碍了外源 DNA 的转入 (Matsunaga T et al.,1990)。研究发现, 蓝藻在各生长时期均处于感受状态(Stevens SE Jr et al,1980; Grigorieva GA et al,1982; Golden SS et al,1984), 但通常使用处于对数生长中期到后期的细胞进行转化。转化率与 DNA 浓度和藻细胞同 DNA 共保温的时间有关, 转化过程中遮光或添加光合作用抑制剂可提高转化效率。但至今对蓝藻天然转化的机制仍不甚了解。

(2) 接合转化

用质粒载体直接转化丝状蓝藻不易获得遗传上稳定的转化子。1984 年 Wolk 等人首先在 *Anabaena* 中建立了接合(conjugation)转化系统, 这是丝状蓝藻基因转移系统的突破。该系统由广宿主(broad-host-range)接合型质粒(如 RP4)、辅助质粒(具识别 Bom 位点的 mob 基因)和运载质粒(双向穿梭载体或整合载体)组成。需首先构建含有目的基因、*E.coli*

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库