

转胸腺素基因螺旋藻的表达及免疫增强活性研究

章 军¹, 徐 虹¹, 周克夫¹, 刘仁海¹, 朱小明²

(1. 厦门大学生命科学学院, 福建 厦门 361005; 2. 厦门大学海洋与环境学院, 福建 厦门 361005)

摘 要: 胸腺素 α_1 ($T\alpha_1$) 是具有免疫增强作用的28肽, 通过基因工程技术构建获得了转 $T\alpha_1$ 基因螺旋藻, 分别得到了1~4个串联目的基因的表达株, ELISA和HPLC检测结果表明: 最高表达量可达藻细胞可溶性蛋白的7%, 通过饲喂鳊鱼苗试验表明能有效提高鳊鱼苗体内的胸腺素含量, 增强鳊鱼苗的免疫力。免疫增强蓝藻作为鱼类饲料添加剂适口性好, 每公斤饲料适宜添加量为0.5~1.0g, 可望成为水产养殖的新型免疫增强饵料藻。

关键词: 螺旋藻; 转基因; 胸腺素; 免疫增强; 表达

中图分类号: Q 789; S 942.5

文献标识码: A

Expression of Thymosin α_1 ($T\alpha_1$) in spirulina platensis and its function of immunity enhancement as feed additive

ZHANG Jun¹, XU Hong¹, ZHOU Ke-fu¹, LIU Ren-hai¹, ZHU Xiao-ming²

(1. School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen, Fujian 361005, China; 2. College of Oceanography and Environmental Science, Xiamen University, Xiamen, Fujian 361005, China)

Abstract: Thymosin α_1 ($T\alpha_1$) is a 28 amino acid peptide, which as immune system enhancer. It had been expressed and purified in a kind of blue green algae, *Spirulina platensis*. The expression would produce a valuable and cheaper bio-product, because it omitted an expensive purifying process and can be used as an oral medicine or feed additive directly. In this study, A cluster expression system was designed and a gene integration platform system for *Spirulina platensis* was constructed. ELISA and HPLC analysis was used to compare the difference of expression amount among the 1 to 4 $T\alpha_1$ gene cluster in transgenic *Spirulina platensis*. The results showed that the cluster expression was effective and the maximum amount of $T\alpha_1$ reached 7% of total protein. The immunity enhancement by the transgenic *Spirulina platensis* was demonstrated by feeding *Anguilla japonica* as feed additive. $T\alpha_1$ contents in the tested tissues and organs of the black fry increased after fed with transgenic algae. The transgenic immunity-stimulated *Spirulina platensis* was the feasible additive of formulated feed for farming fish and its additive dosages was about 0.5-1.0 g \cdot kg⁻¹.

Key words: *Spirulina platensis*; Transgene; Thymosin α_1 ; Immunity enhancement; Expression

螺旋藻 (*Spirulina* sp.) 为一类丝状蓝藻, 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, 是优良天然营养源, 也是最具开发潜力的海藻之一。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, 获得可供人们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, 而且在营养价值和药效上必将取得事半功倍的效果, 也将产生巨大的经济效益和社会效益。但

以螺旋藻为基因工程受体藻, 迫切需要建立完善的基因转移体系。尽管目前已有不少研究者在螺旋藻基因工程方面做了大量的工作, 但其进展依然缓慢^[1,2]。迄今为止, 仅Toyomizu^[3]、Kawata^[4]等正式报道利用电击和Tn5转座子等方法转化螺旋藻单细胞, 获得了具氯霉素抗性的转化藻株; 茅云翔等^[5]也以氯霉素作为筛选标记, 利用电击转化, 通过同源重组实现了萤火虫荧光素酶基因在螺旋藻中的表达; 徐虹等^[6]在钝顶螺旋藻中表达了 $T\alpha_1$ 基因, 并初

收稿日期: 2005-05-02 初稿; 2005-10-29 修改稿

作者简介: 章军 (1972-), 男, 副教授, 从事基因工程研究。

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30571422)。

步建立了螺旋藻的转基因体系。本研究在这些基础上,进一步研究和改造完善螺旋藻的外源基因表达系统,并做了转基因螺旋藻饲喂鳊鱼苗试验,研究了转基因螺旋藻对鳊鱼苗的免疫力的影响及其水产高效饲料添加剂上的应用。

1 材料与方 法

1.1 材 料

钝顶螺旋藻 (*Spirulina platensis*); $T\alpha_1$ 基因的串联表达载体:质粒pKRET4(本实验室构建^[7,8],图1),其中含有热诱导启动子(groESL)、4个胸腺素 α_1 ($T\alpha_1$)基因串联(人工合成)、rbcS poly(A)终止子、nptII选择标记基因、同源片段R(recA基因);构建的pKRET1、pKRET2、pKRET3质粒[只有目的基因($T\alpha_1$)的拷贝数不同,分别是1~3个 $T\alpha_1$ 串联]。

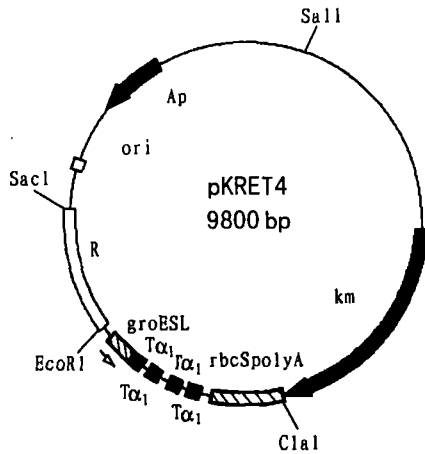


图1 质粒pKRET4示意图

Fig. 1 Sketch map of plasmids pKRET4

1.2 方 法

1.2.1 螺旋藻培养 将钝顶螺旋藻接种于Zarrouk培养基中,在温度为28℃,光照强度为3 000 lx的条件下培养。

1.2.2 超声波转化钝顶螺旋藻 转化前,钝顶螺旋藻在24℃、3 000 lx条件下培养至 $OD_{550}=0.2\sim 0.3$;取10 ml藻液,加入EDTA,使其终浓度为 $2\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$,继续培养16~20 h后,低速离心($4\ 000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 、10 min),收集藻细胞,浓缩藻细胞于原1/10体积的新鲜Zarrouk培养基中,分装成2管(每管约0.5 ml);将一支装有藻液的Eppendorf管置于冰水浴中,进行超声波处理(输出功率为30 W,20

s),使藻丝断裂为5~10个细胞,立即加入2~3 μg 重组质粒,混匀,冰浴0.5~1.0 h;另一管进行相同的超声处理,但不加质粒,作为空白对照;分别将两管藻液转入2 ml的Zarrouk液体培养基中,避光孵育过夜。

1.2.3 螺旋藻转化子的筛选 将上述孵育过夜的藻液涂布于覆盖在Zarrouk固体培养基的Millipore滤膜($\varnothing 9\text{ cm}$,孔径 $0.45\ \mu\text{m}$)上,在正常生长条件下培养24 h;然后转移滤膜至含抗生素(G418, $20\ \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$)的Zarrouk固体培养基上,约10~12 d后转化板上出现藻落,挑取生长良好的藻落移入10 ml Zarrouk液体培养基中(含抗生素G418, $20\ \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$),扩大培养。

1.2.4 转化藻株的PCR检测 PCR扩增转化藻染色体DNA,检测外源基因是否整合到藻细胞染色体上。扩增引物:引物1,热诱导启动子groESL的部分互补序列,5'-TCGCGAGCTCGACAACCTGTC-3';引物2, rbcS poly(A)的部分互补序列,5'-GGGTCGACTAGTTTTCTGCTTCTTCAAC-3'。反应程序:94℃预变性5 min,然后94℃、45 s,55℃、45 s,72℃、45 s进行30次循环,最后72℃延伸3 min。扩增产物以2%的琼脂糖凝胶电泳进行检测。

1.2.5 表达产物的ELISA检测 经42℃热诱导40 min的转 $T\alpha_1$ 基因螺旋藻,提取总蛋白并进行适当的处理,以野生藻作为阴性对照,用考马斯亮蓝G-250方法检测藻总蛋白含量,分别以 $10\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、 $20\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、 $25\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的蛋白浓度量包被酶标板,一抗按1:200,二抗按1:800比例进行ELISA检测分析。 $T\alpha_1$ 的抗血清由本实验室制备^[9]。

1.2.6 鳊鱼养殖试验及其体内 $T\alpha_1$ 的检测 试验分3组,分别为不添加免疫增强蓝藻(I组,对照)、每公斤饲料添加0.5 g免疫增强蓝藻(II组)和每公斤饲料添加2.5 g免疫增强蓝藻(III组)。每组养殖鳊鱼(黑仔鳊)1 000尾。饲养15 d后,各组分别取20尾黑仔鳊用于测 $T\alpha_1$ 含量。具体方法:鳊鱼称重,尾静脉取血加抗凝剂,解剖鳊鱼,分别取出心脏、肝脏、肾脏,并切取一点肌肉,立即投入液氮中速冻,储存在-20℃冰箱中备用;各组织称重,按每克加入10 ml的 $0.5\ \text{mol}\cdot\text{L}^{-1}\ \text{HClO}_4$ 匀浆,匀浆液在0℃、3 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心10 min,取上清液,用 $1\ \text{mol}\cdot\text{L}^{-1}\ \text{NaOH}$ 调上清液的pH值,pH值平衡后在4℃振荡60 min以上,在0℃、20 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心30 min,取上清液,采用酶联免疫吸附法检测 $T\alpha_1$

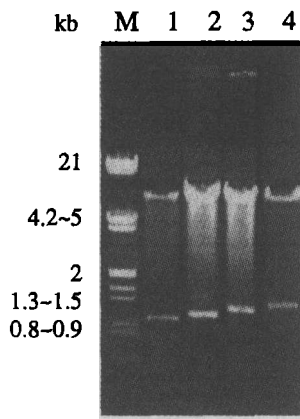
的含量。

1.2.7 表达产物的HPLC定量检测 离心收集藻体, 42℃诱导45 min。冻融破碎藻细胞, 6 000 r·min⁻¹离心10 min取上清液, 测蛋白含量。80℃作用15 min, 10 000 r·min⁻¹离心, 取上清液。加2倍体积的丙酮, 置-20℃下60 min以上。10 000 r·min⁻¹离心10 min, 取沉淀, 加100 μl水溶解, 10 000 r·min⁻¹离心10 min, 取上清液加乙腈稀释成含40%乙腈浓度备用, 再用0.22 μm的微孔滤膜过滤样品。采用C₁₈柱, 柱温: 室温; 流动相: 40%乙腈水; 流速为1 ml·min⁻¹; 检测波长为214 nm和280 nm; 进样量为10 μl。用内标法定量。

2 结果与分析

2.1 钝顶螺旋藻表达载体的构建

为了提高表达量, 我们构建了钝顶螺旋藻串联表达系列载体pKRET1~pKRET4, 各载体的目的基因T_{α1}的拷贝数分别是1~4个, 质粒pKRET1~pKRET4的酶切电泳分析结果(图2)表明, 含有目的基因的酶切小片段大小呈0.1 kb递增排列, 从1.0 kb到1.3 kb。说明了各质粒大小的差别正好是目的基因T_{α1}拷贝数的不同。



M: λ/HindIII Marker; 1: pKRET1/EcoRI+ClaI; 2: pKRET2/EcoRI+ClaI; 3: pKRET3/EcoRI+ClaI; 4: pKRET4/EcoRI+ClaI

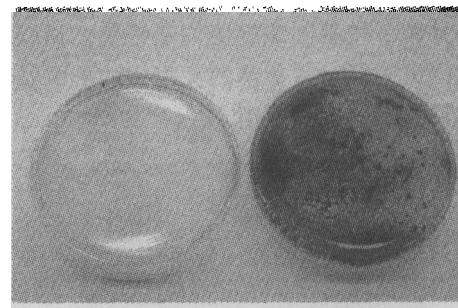
图2 质粒pKRET1~pKRET4的酶切鉴定

Fig.2 Digestion analysis of plasmid vector pKRET1~pKRET4

2.2 超声波法转化钝顶螺旋藻结果

超声波法转化钝顶螺旋藻, 并在含有抗生素(G418, 20 μg·ml⁻¹)的Zarrouk固体培养基上筛选转化子。10 d后, 发现G418抗性板上长出绿色的藻

落, 而未加供体质粒的对照板没有藻落出现(图3)。



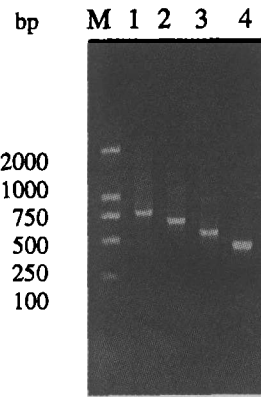
对照组(CK) 转基因藻

图3 转化藻的筛选

Fig.3 Selection of transgenic algae

2.3 转化藻株的PCR鉴定结果

从转化平板上挑取单藻落扩大培养, 生长到对数期时提取染色体, 用引物1和引物2扩增野生藻和转化藻的染色体DNA, PCR产物用2%琼脂糖凝胶电泳检测。结果表明, 转化藻染色体依次扩增出4条0.5~0.8 kb大小的DNA片段, 大小刚好符合目的基因的大小(图4)。据此初步判断, 目的基因已经整合到钝顶螺旋藻的染色体中, 转化获得成功。



M: DL2000 Marker; 1: pKRET4转化藻; 2: pKRET3转化藻; 3: pKRET2转化藻; 4: pKRET1转化藻

图4 转化藻的PCR鉴定

Fig.4 Characterization of transgenic algae by PCR

2.4 ELISA检测转基因藻中T_{α1}的表达量

通过纯化抗胸腺素多克隆抗体, 采用ELISA方法检测野生藻和转基因藻中的T_{α1}, 转基因藻OD值比野生藻高3倍以上, 说明T_{α1}在转基因藻中成功表达。

2.5 HPLC检测转基因藻中T_{α1}的表达量

HPLC检测结果表明, 在3~4 min能检测到明

显的特征峰(图5)。T α_1 在选定的浓度范围内具有良好的线性相关性。通过与标准品比较,可得出转基因螺旋藻表达量最高可达藻细胞可溶性蛋白的7%。

2.6 投喂添加免疫增强蓝藻饲料后黑仔鳗 T α_1 含量的变化

分别测定黑仔鳗全血、心脏、肌肉、肝脏及肾脏的T α_1 含量,结果见表2。由表2可知,现场测定与实验室内测定,T α_1 含量的检测结果具有相似性。

表1 转基因螺旋藻SPS4-1表达产物T α_1 的ELISA检测

Table 1 ELISA test of T α_1 in transgenic Spirulina SPS4-1

样品	OD值				平均值 (\bar{x})	$\bar{x}-B$
SPS4-1	1.730	1.913	1.708	1.823	1.7935	1.6425
野生藻(CK)	0.665	0.605	0.690	0.624	0.6460	0.4950
背景(B)	0.159	0.142	0.161	0.143	0.1510	

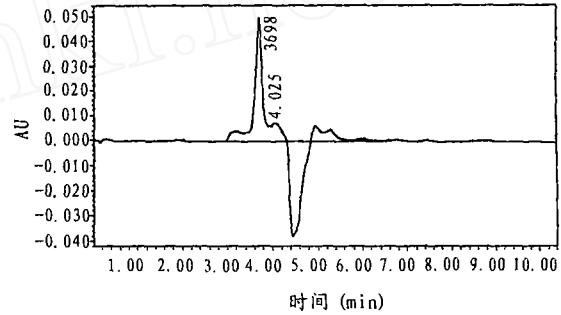
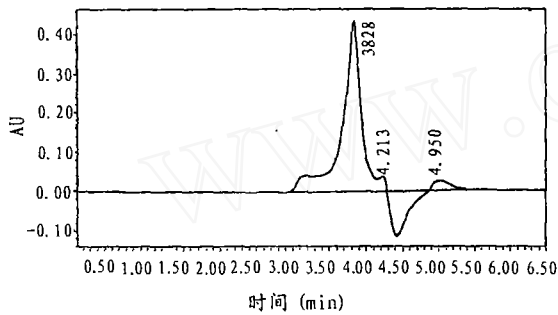


图5 T α_1 的HPLC检测

Fig. 5 T α_1 detected by HPLC

表2 黑仔鳗各组织器官转T α_1 含量测定结果

Table 2 Thymosin α_1 in the tissues and organs of *Anguilla japonica* black fry measured by ELISA

试验地点	样品	I组			II组			III组			与I比 显著性
		平均值	样品数	标准差	平均值	样品数	标准差	平均值	样品数	标准差	
现场	全血	0.6134	7	0.1310	0.9016	7	0.2007	1.1576	7	0.2997	<0.01
	心脏	1.1145	6	0.1490	1.8557	6	0.3275	1.5503	6	0.3474	<0.01
	肌肉	1.7780	6	0.3075	1.7150	6	0.3787	3.4013	6	0.3075	=0.027
	肝脏	0.7878	6	0.1539	1.4653	6	0.2136	1.5537	6	0.1766	<0.01
	肾脏	1.0548	6	0.3083	1.2758	6	0.1283	1.7730	6	0.1948	<0.01
实验室	全血	0.5646	8	0.2193	0.8548	8	0.3306	0.8578	8	0.1842	<0.01
	心脏	0.8211	7	0.1590	1.0627	7	0.3594	0.9799	7	0.3325	<0.01
	肌肉	0.9231	10	0.2072	0.9529	10	0.1556	0.9505	10	0.2371	=0.68
	肝脏	0.7843	7	0.1180	1.3084	7	0.1407	1.1416	7	0.1676	<0.01
	肾脏	0.7389	10	0.1798	1.0581	10	0.2589	1.2317	10	0.4226	<0.01

此外,由表2还可知,除肌肉外,其他组织器官I组(对照)的内源T α_1 含量明显比II、III组的低,说明饲喂效果明显,用转胸腺素基因藻喂饲鳗鱼能有效增加其体内的胸腺素含量。各检测组织器官的T α_1 含量以肌肉最高,其次是心脏,全血最低,说明代谢活性相对不旺盛的组织器官如肌肉、心脏会积累较多的T α_1 ,而代谢活性较高组织器官T α_1 含量相

对较低,这可能与胸腺素在鳗鲡特异免疫系统中发生作用方式有关。

3 讨论

螺旋藻因其具有诸多优良品质,而成为倍受人们关注的、极具应用前景和巨大发展潜力的生物反应器。由于螺旋藻具有高活性的核酸酶和限制性内

切酶以及缺乏内源质粒,而使得外源基因只能以整合到染色体上的方式存在^[10]。故我们以recA基因为整合平台构建了螺旋藻同源重组型供体质粒,通过同源片段间的交换重组实现外源基因在螺旋藻染色体上的稳定存在和表达。串联表达载体的基因的串联数与基因表达量成正相关性,Tα₁含量可达藻细胞可溶性蛋白的2%~7%(另文发表)。在对饲养了免疫增强蓝藻的黑仔鳗进行感染试验中,试验黑仔鳗的生长和存活及感染试验结果(另文发表)表明,免疫增强蓝藻提高了试验鱼的免疫能力,增强了试验鱼的抗逆、抗病菌感染能力,并具有一定的促生长作用。免疫增强蓝藻作为鱼类饲料添加剂适口性好,每公斤饲料适宜添加量为0.5~1.0g。

综上所述,通过构建串联表达载体,以recA为整合靶位,使目的基因得以通过同源交换整合到螺旋藻的染色体上稳定存在和表达,取得了螺旋藻转基因研究的突破性进展,通过对鳗鱼苗的喂饲效果表明该转基因螺旋藻能明显提高鳗鱼苗的免疫力,可望进一步开发成为新型免疫增强功能饵料藻^[11]。

参考文献:

- [1] Lou S L, Liu G F, Zhang J. The progress of genetic engineering of cyanobacteria [A]. Cytology, Genetics and Molecular Biology of Algae [M]. Amsterdam: The Netherland SPB Academic Publishing, 1996. 421-439.
- [2] 汪志平, 钱凯先. 螺旋藻遗传育种研究进展 [J]. 微生物学通报, 2000, 27 (4): 288-291.
- [3] Toyomizu M, Suzuki K, Kawata Y, et al. Effective transformation of the cyanobacterium *Spirulina platensis* using electroporation [J]. J Applied Phycology, 2001, 13 (3): 209-214.
- [4] Kawata Y, Yano S, Kojima H, et al. Transformation of *Spirulina platensis* strain C1 (*Arthrospira* sp PCC9438) with Tn5 transposase-transposon DNA-cation liposome complex [J]. Marine Biotechnology, 2004, 6 (4): 355-363.
- [5] 茅云祥, 王高歌, 张宝红, 等. 建立螺旋藻转基因体系初报 [J]. 青岛海洋大学学报, 2000, 30 (2): 13-18.
- [6] 徐虹, 柯珍恋, 章军. 胸腺素 Tα₁ 基因在钝顶螺旋藻 *Spirulina platensis* 中的表达 [J]. 海洋科学, 2001, 25 (9): 14-16.
- [7] 章军, 秦燕, 欧阳青, 等. 蓝藻热休克诱导高效表达系统的构建 [J]. 高技术通讯, 2001, 11 (8): 17-21.
- [8] 章军, 宋新强, 徐虹, 等. 利用同源重组质粒 pUTK 转化蓝藻 *Synechococcus* sp. PCC7942 及胸腺素 α₁ 的表达 [J]. 海洋科学, 2001, 25 (6): 1-3.
- [9] Zhou K F, Zhang J, Chen T S, et al. Preparation and determination of polyclonal antibody to thymosin α₁ [J]. U S Chin J of Microbio and Immu, 2001 (1): 61-64.
- [10] Tragut M, Xiao J, Bulina E J, et al. Characterization of DNA restriction-modification systems in *Spirulina platensis* strain pacifica [J]. J Applied Phycology, 1995 (7): 561-564.
- [11] 周进, 黄捷, 宋晓玲. 免疫增强剂在水产养殖中的应用 [J]. 海洋水产研究, 2003, 24 (4): 70-79.

(责任编辑: 林树文)