DOI: 10.1360/yc-006-1580

利用椭圆小球藻硝酸还原酶缺失突变体为生物反应器表达兔防御素 NP-1 蛋白

张小宇[1,2], 王 鹏[1], 赵世民[1], 李 霞[2], 沈 昕[2], 孙勇如[1], 储成才[1], 王义琴[1]

(1. 中国科学院遗传与发育生物学研究所, 北京 100101; 2. 北京林业大学生物科学与技术学院, 北京 100083)

摘 要: 利用转基因小球藻为生物反应器生产兔防御素 NP-1 蛋白具有重要的应用价值。本研究利用椭圆小球藻(*Chlorella ellipsoidea*)硝酸还原酶(nitrate reductase)缺失突变体为受体, 构建了包含 *NPTII* 基因和硝酸还原酶基因两个筛选标记的兔防御素蛋白表达载体, 采用电激法将目的基因转入椭圆小球藻硝酸还原酶缺失突变体 *nrm*-4, 获得了正确表达防御素蛋白的转基因藻, 从而表明通过硝酸还原酶作为筛选标记基因并结合硝酸还原酶缺失突变体可作为较好的小球藻生物反应器生产模式。

关键词: 椭圆小球藻; 硝酸还原酶缺失突变体; 兔防御素

中图分类号: Q933 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-9772(2006)12-1580-05

Expression of Rabbit Neutrophile Peptide-1 in Nitrate Reductase-deficient Mutant of *Chlorella ellipsoidea*

ZHANG Xiao-Yu[1,2], WANG Peng[1], ZHAO Shi-Min[1], LI Xia[2], SHEN Xin[2], SUN Yong-Ru[1], CHU Cheng-Cai[1], WANG Yi-Qin[1]

(1. *State Key Laboratory of Plant Genomics and National Plant Gene Research Center*, *Institute of Genetics and Developmental Biology*, *Chinese Academy of Sciences*, *Beijing* 100101, *China*; 2. *College of Biological Sciences and Biotechnology*, *Beijing Forestry University*, *Beijing* 100083, *China)*

Abstract: Application of transgenic *Cholrella* as bioreactor to express rabbit neutrophile pepetide-1 (NP-1) shows great practical value. In this paper, an *NP-1* expression vector containing two selective marker genes *NPTII* and nitrate reductase gene was constructed. The *NP-1* gene was transformed into the nitrate reductase-deficient mutant *nrm-4* of *Chlorella ellipsoidea* via electroporation, and the transgenic alga expressed the active NP-1 were obtained.

Key words: *Chlorella ellipsoidea*; nitrate reductase-deficient mutant; rabbit neutrophile peptide-1

小球藻(*Chlorella*)属于绿藻门小球藻属的一种单细胞真核微藻。小球藻体内含有一个杯状叶绿体, 光合效率高, 既可自养生长, 也可异养生长。同时, 由于其含有丰富的蛋白质、氨基酸、不饱和脂肪酸、维生素、矿物质和色素等营养物质, 因而它是一种重要的微藻资源。

目前对于小球藻的研究主要集中在小球藻培养条件的优化, 小球藻体内活性物质的提取等方面,

收稿日期: 2006-03-10; **修回日期:** 2006-05-12

基金项目: 国家十五海洋 863 青年基金项目(编号: 2004AA628010)[Supported by Grant of National Ocean 863 High-Tech Project for Youth (No. 2004AA628010)]

作者简介: 张小宇(1981－), 硕士, 研究方向: 生物化学与分子生物学。E-mail: xiaoyuzh8000@163.com

通讯作者: 王义琴(1973－), 博士, 副研究员, 研究方向: 分子遗传学。E-mail: yqwang@genetics.ac.cn

而对小球藻分子生物学方面的研究，如特定基因的克隆与功能鉴定，外源基因转化和表达等仅有极少的文献报道。Jarivs和Maruyama等将*lac*基因和*GUS*基因采用基因枪转化法和电击转化法导入到*C. ellipsoidea* 和*C. saccharophila* c-211-1a原生质体中，并且检测到外源基因的瞬间表达[1,2]；Dawson[3]利用微粒轰击转化的方法将*C. vulgaris*的硝酸还原酶基因导入到*C. sorokiniana*突变体中，得到了能在含有硝酸盐培养基中生长的藻株，这是关于小球藻中外源基因稳定转化的首例报道。Richard等[4,5]用PEG转化法将人的生长激素基因转入*C. vulgaris* C-27 和 *C. sorokiniana* ATCC-22521 中，研究了随机整合与同源重组对外源基因表达的影响，这是目前关于小球藻中外源基因表达调控的唯一报道。

我们课题组的研究主要集中在以小球藻为生物反应器生产外源蛋白方面。研究认为，以单细胞微藻小球藻作为生物反应器有很多优势，如能够光合自养，培养简单，大规模培养成本低廉等。椭圆小球藻本身含有丰富的营养物质，无内毒素，可以口服，从而省去产物提取纯化的繁琐工艺。采用基因工程的手段利用转基因藻来生产一些需要大量生产而又对原核生物生长不利的物质或表达需要翻译修饰的复杂蛋白，比如防御素蛋白(defensin)，具有很好的应用前景。

防御素是生物体抵御病原体的防御反应过程中产生的一类抗微生物的带正电荷短肽,一般由 29~54 氨基酸组成[6]。目前已发现它不但对细菌、真菌、被膜病毒等有广谱的抑制作用，对某些恶性肿瘤细胞也有毒杀作用[7~11]。广谱的抗性是源于其独特的抑制机理，它靠本身所带的正电荷与带负电荷的微生物细胞膜相互吸附，二聚或多聚的防御素穿膜形成跨膜的离子通道，导致细胞内溶液外渗，从而扰乱了细胞膜的通透性及细胞能量状态，导致细胞膜去极化，呼吸作用受到抑制以及细胞内ATP含量下降，最终导致靶细胞死亡[11,12]；防御素的抗病毒作用则是通过与病毒外壳蛋白结合而导致病毒失去生物活性。正是由于这种特殊的作用机理，目的微生物难以对防御素产生抗性突变，因此防御素被认为是一种新型的抗生素，在临床上具有很高的应用价值，目前已有多种抗菌肽药物进入Ⅱ期和Ⅲ期临床试验[13]。因为防御素对宿主细胞的杀伤作用，所以无法用大肠杆菌和酵母进行表达，而又因为防御素在动物中的含量非常低，直接从动物中提取是操作繁琐而且价格昂贵。因此，用真核微藻小球藻生产兔防御素蛋白具有很好的应用前景。

本研究构建了含有两个筛选标记的兔防御素基因(*NP*-1)表达载体，采用电激的方法将兔防御素蛋白基因(*NP*-1)转化椭圆小球藻(*Chlorella ellipsoidea*)硝酸还原酶功能缺失突变体 *nrm*-4，经过筛选获得了转基因藻并对转基因藻表达的防御素抑菌活性进行了检测，从而为以小球藻硝酸还原酶功能缺失突变体作为新型真核生物反应器的可行性进行了进一步的验证。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 菌株

大肠杆菌 DH5α 为实验室保存。

1.1.2 藻株

椭圆小球藻(*Chlorella ellipsoidea*)购于武汉中国科学院水生生物研究所藻种库。小球藻硝酸还原酶(Nitrate Reductase)功能缺失突变体*nrm*-4 由本实验室通过辐射诱变的方法筛选获得[14]。

1.1.3 质粒

pBin-NrPro-NP1(含有以硝酸还原酶启动子启动的 *NP*-1 基因表达框)、pSK-NR(含有硝酸还原酶基因表达框)质粒为实验室保存。

1.1.4 藻种培养基

参照文献[14]中的椭圆小球藻硝酸还原酶功能缺失突变体*nrm*-4 的培养基。

1.2 实验方法

1.2.1 防御素真核表达载体 pBin-NR-09-NP1 的构建

将 pBin-NrPro-NP1 质粒用 *Hind* Ⅲ内切酶单切，琼脂糖凝胶电泳回收 10.5 kb 大小的载体片段；用同样的酶单切 pSK-NR 质粒，回收 4 kb 左右的硝酸还原酶表达框 Nr pro-NR-NOS ter 片段，然后与载体片段 4℃连接过夜，连接产物转化大肠杆菌 DH5α，在含有 50 μg/mL 卡那霉素的 LB 培养基上 37℃倒置培养过夜，对长出的抗性菌落提质粒酶切鉴定，能够得到 4 kb 左右大小片段的质粒即为所要构建的双选择标记的真核表达载体，命名为 pBin-NR-09-NP1(图 1)。完整基因表达框插入到载体中，无须鉴定插入片段的正反方向。

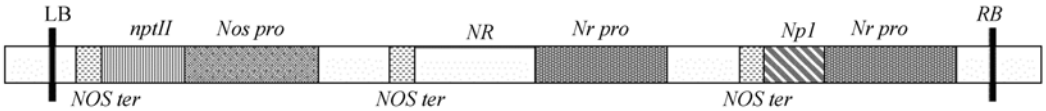

图 1 含有双筛选标记的兔防御素表达载体 pBin-NR-09-NP1 结构示意图

Fig. 1 The construct of rabbit neutrophile peptide-1 expression vector pBin-NR-09-NP1

LB: Left border; *NOS ter*: Terminator of *nos* synthase gene; *Nr pro*: The promoter of the nitrate reductase gene; RB: Right border.

1.2.2 椭圆小球藻细胞的转化

参照文献[14]中的方法，培养突变体*nrm*-4 至适宜的生长状态，离心收集藻细胞后进行高渗处理，采用相同的电激转化条件进行电激，将电激后小球藻细胞涂于含 30 mg/L G_{418}和 10 mmol/L NO_3^-的固体培养基中培养，约 4~6 周后检测平板上长出的藻落。

1.2.3 小球藻转化子的鉴定

1.2.3.1 转基因小球藻总DNA的提取 挑取平板上的单藻落细胞接种于 15 mg/L G_{418}液体培养基中培养 2 周(浓度达到约为 1×10^8个/mL)，1 000 r/min离心 10 min收集藻细胞，在液氮中将细胞磨碎。参照文献[17]中的方法提取小球藻总DNA，保存于-20℃备用。

1.2.3.2 转基因小球藻的 PCR 检测 以转基因藻基因组 DNA 做模板，分别进行 *NPTII* 基因和 *NP*-1 基因的 PCR 扩增，检测外源基因是否整合到基因组中。*NPTII* 基因的 PCR 引物为正向 NPTII f: (5′GGC-GATACCGTAAAGCACGA3′)和反向 NPTII r(5′TCC-GGTGCCCTGAATGAACT3′)，可以扩增出约 580 bp 的片段。

NP-1 基因的PCR引物为正向NPf (5′-AAGCTTATGGTGGTCTGTGCGTGCAGACG-3′) 和反向 NPr: (5′-GGGAGAGCTCAGTAGTCCAAACATGT-3′),可以扩增出约 200 bp 的 DNA 片段。

1.2.3.3 基因小球藻总蛋白抑菌活性的鉴定

(1) 转基因小球藻可溶性总蛋白的提取

离心收集对数生长期(浓度约为 1×10^8个/mL)的转基因藻细胞，用 3 倍体积的磷酸缓冲溶液PBS将藻细胞悬浮，超声破碎 30 s，4℃ 12 000 r/min离心 10 min,上清即为小球藻可溶性总蛋白。

(2) 转基因小球藻可溶性总蛋白的抑菌活性检测

将在适宜条件下培养的大肠杆菌均匀涂布于LB固体培养基上，待表面液体消失后，用无菌打孔器在培养基上做点样孔，吸取 200 μL 小球藻可溶性总蛋白提取液加入孔中，同时设置对照(即未转化的突变体 *nrm*-4 总蛋白提取液)，于 37℃温箱中培养过夜，观察有无抑菌圈产生。

2 结果与分析

2.1 防御素真核表达载体 pBin-NR-09-NP1 的构建

挑取 4 个平板上长出的菌落过夜培养，碱法小提质粒 DNA，进行酶切鉴定。其中有两个质粒 *Hin*d Ⅲ单酶切显示能够切出 4 kb 左右大小的片段，表明该质粒是连接正确的 pBin-NR-09-NP1 质粒载体。DNA 测序分析表明基因序列完全正确。

2.2 电激转化椭圆小球藻硝酸还原酶功能缺失突变体 *nrm*-4

涂布在固体培养基上的转化小球藻，经G_{418}筛选，6 周左右可看到藻落的长出的藻落通过固体培养保存藻系，在含有G_{418} 15 mg/L的液体培养基中扩大繁殖。

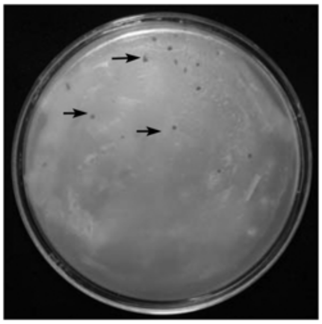

图 2 电激转化椭圆小球藻硝酸还原酶功能缺失突变体得到的抗G_{418}的藻落

Fig. 2 Genetcin 418 (G418) resistant colonies of *C. ellipsoidea* nitrate reductase-deficient mutant *nrm*-4 transformed by electroporation

2.3 转基因小球藻的 PCR 检测

CTAB 法提取小球藻总 DNA，分别进行 *NPTII* 基因和 *NP*-1 基因的 PCR 扩增，检测外源基因是否整合到基因组中。在总共得到的 34 个转基因藻落中，扩增 *NPTII* 基因检测阳性藻落有 10 个，*NP-1* 基因检

测阳性藻落有 9 个, 其中两者均呈阳性的藻落有 2 个, 编号分别是 13, 31。

2.4　转基因小球藻蛋白粗提液的抑菌活性检测

将 *NPTII* 基因和 *NP-1* 基因扩增呈阳性的两个藻株 13 和 31, 扩繁后分别提取总蛋白粗提液, 进行了体外抑菌检测, 以非转基因藻 *nrm*-4 做为对照。其中 31 号转基因小球藻总蛋白提取液能够明显抑制被检测的大肠杆菌的生长, 点样孔周围产生明显的抑菌斑, 而在对照周围则没有抑菌斑出现。该结果表明: *NP-1* 基因不但已经稳定整合到小球藻基因组中, 而且能够正确表达, 赋予转基因小球藻对大肠杆菌的抑制作用(图 3)。

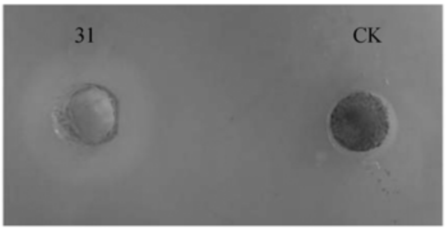

图 3　转基因小球藻粗蛋白提取液对大肠杆菌 DH5α的抑菌效果

31: 转基因阳性藻株; CK: *nrm*-4。

Fig. 3　The antibiosis of the transgenic *C. ellipsiodea* crude protein to *E. coli* DH5α

31: The positive transformant *nrm*-4; CK: *nrm*-4.

3　讨　论

提高外源基因表达效率的一个有效措施就是采用受体细胞内源的启动子启动外源基因的表达。我们实验室已经分离出椭圆小球藻硝酸还原酶的启动子[18]; 李霞等的实验结果表明, 椭圆小球藻硝酸还原酶基因ATG起始密码子上游 1 kb左右的启动子序列活性最强(未发表), 命名为NR pro。本次实验就是将该NR pro启动子与*NP-1* 基因串联构建表达载体, 转化椭圆小球藻, 提高外源基因在椭圆小球藻中的表达效率。

硝酸还原酶(NR)是氮同化过程中的一个重要的酶, 能够将硝酸盐还原为亚硝酸盐, 同时NR还可以以氯酸盐 ClO_3^- 做底物, 还原得到次氯酸盐 ClO_2^-, 次氯酸盐对细胞是有毒害作用的, 积累到一定浓度则导致细胞死亡, 只有NR突变的细胞才可以在含氯酸盐的培养基上存活。根据这样一个特性, 我们筛选出了Co_{60}照射过的, 能够在氯酸盐培养基上生长, 在硝酸盐做唯一氮源的培养基上不能生长的椭圆小球藻硝酸还原酶功能缺失突变体*nrm*-4。椭圆小球藻硝酸还原酶功能缺失突变体*nrm*-4 只能够在铵盐(NH_4^+)作为唯一氮源的培养基上生长, 在硝酸盐(NO_3^-)作为唯一氮源的培养基上不能生长[14]。以该突变体作为转基因受体, 转化结束后在硝酸盐培养基中培养时, 非转化的藻细胞是不能生长的, 只有转基因藻株因为从转化载体上获得了有功能的NR, 可以利用硝酸盐而正常生长。以硝酸盐作为筛选压力筛选转基因藻株, 大大地提高了转基因藻的安全性, 降低了生产的成本, 扩大了椭圆小球藻作为真核生物反应器的应用范围[14]。本次实验为降低假阳性藻株的数目, 在G_{418}和硝酸盐同时存在的培养基上筛选转基因藻株, 在只含有硝酸盐的培养基, 以 NO_3^- 作为唯一筛选压力保存转基因藻株。尽管转基因藻的基因组中整合有抗生素抗性基因, 但是在藻种的保存、继代过程中并没有使用抗生素, 相比传统的使用抗生素保存藻种的方法提高了转基因藻的安全性。

尽管我们成功地得到了阳性的转基因藻, 但是转基因藻的稳定性仍有待于进一步的提高。椭圆小球藻是一种单细胞真核生物, 生长周期仅为 6~8 小时一代[15]。电激转化以后, 外源基因并不是以质粒形式存在, 而是随机插入受体细胞的染色体中, 有丝分裂过程中同源染色体发生重组及交换, 多次分裂后藻细胞后代容易发生外源基因的丢失。莱茵衣藻的转化实验中也有类似报道。Ladygin[19]采用电激的方法转化莱茵衣藻缺壁突变体CW-15, 尽管外源DNA能够在转化藻中稳定存在 350 代, 但是转化藻对于潮霉素的抗性并不稳定。如何使外源基因有效地整合到受体细胞的核基因组并稳定遗传是藻类基因工程研究中需要解决的一个重要问题。

小球藻富含蛋白质、氨基酸、维生素、铁、钙等营养成分, 被认为是极有价值的食品和饲料添加剂的来源[20], 渔业上可以作为鱼虾幼苗的开口饵料。利用椭圆小球藻作为真核受体生产一些具有抗病作用的蛋白, 将转基因藻喂饲鱼虾幼苗, 能够提高幼苗的抗病能力与存活率, 在渔业生产上具有重要的应用价值。本次实验首次采用椭圆小球藻硝酸还原酶功能缺失突变体作为受体, 表达具有广谱抗性的兔防御素蛋白, 为生产更加安全的转基因藻提供了一个值得借鉴的经验。

参 考 文 献(References):

[1] Jarivs E, Brown L M. Transient expression of firefly luciferase in protoplast of the green alga *Chlorella ellipsoidea*. *Curr Genet*, 1991, 19(6): 317~321.[DOI]

[2] Maruyama M, Horakova I, Honda H. Introduction of foreign DNA into *Chlorella saccharophila* by electroporation. *Biotech Tech*, 1994, 8(1): 821~826. [DOI]

[3] Dawson H, Burlingame R, Cannons A C. Stable transformation of *Chlorella*: rescue of nitrate reductase-deficient mutants with the nitrate reductase gene. *Curr Microbiol*, 1997, 35(6): 356~362. [DOI]

[4] Hawkins R I, Nakamura M. Expression of human growth hormone by the eukaryotic alga, *Chlorella*. *Curr Microbiol*, 1999, 38(6): 335~341. [DOI]

[5] Piers K L, Brown M H, Hancock R E. Recombinant DNA procedures for producing small antimicrobial cationic peptides in bacteria. *Gene*, 1993, 134(1): 7~13. [DOI]

[6] Lehrer R I, Ganz T, Selsted M E. Defensins: endogenous antibiotic peptides of animal cells. *Cell*, 1991, 64(2): 229~230. [DOI]

[7] Selsted M E, Miller C W, Novotny M J, Morris W L, Koeffler H P. Molecular analysis of myeloperoxidase deficiency shows heterogeneous patterns of the complete deficiency state manifested at the genomic, mRNA, and protein levels. *Blood*, 1993, 82(4): 1317~1322.

[8] Murphy C J, Foster B A, Mannis M J, Selsted M E, Reid T W. Defensins are mitogenic for epithelial cells and fibroblasts. *J Cell Physiol*, 1993, 155(2): 408~413. [DOI]

[9] Lichtenstein A, Ganz T, Selsted M E, Lehrer R I. In vitro tumor cell cytolysis mediated by peptide defensins of human and rabbit granulocytes. *Blood*, 1986, 68(6): 1407~1410.

[10] Ganz T, Selsted M E, Szklarek D, Harwig S S, Daher K, Bainton D F, Lehrer R I. Defensins. Natural peptide antibiotics of human neutrophils. *J Clin Invest*, 1985, 76(4): 1427~1435.

[11] Fujii G, Selsted M E, Eisenberg D. Defensins promote fusion and lysis of negatively charged membranes. *Protein Sci*, 1993, 2(8): 1301~1312.

[12] Hill C P, Yee J, Selsted M E, Eisenberg D. Crystal structure of defensin HNP-3, an amphiphilic dimer: mechanisms of membrane permeabilization. *Science*, 1991, 251(5000): 1481~1485. [DOI]

[13] SUN Jie, Qi Ke-Zong. Function and application of animal defensins. *Prog Vet Med*, 2005, 26(9): 24~28.
孙 洁, 祁克宗. 动物防御素功能及其应用. 动物医学进展, 2005, 26(9)24~28

[14] Wang Y Q, Chen Y, Sun Y R. Isolation and characterization of a nitrate reductase deficient mutant of *Chlorella ellipsoidea* (Chlorophyta). *J Appl Phycol*, 2005, 17(2): 281~286. [DOI]

[15] Li L, Wang J X, Zhao X F, Kang C J, Liu N, Xiang J H, Li F H, Sueda S, Kond H. High level expression, purification, and characterization of the shrimp antimicrobial peptide, Ch-penaeidin, in Pichia pastoris. *Protein Expres Purif*, 2005, 39(2): 144~151. [DOI]

[16] WANG Yi-Qin, YIN Liang-Hong, WANG Peng, ZHANG Li-Ming, SUN Yong-Ru. Progress on *Chlorella* in the area of molecular biology. *Hereditas* (Beijing), 2004, 26(3): 399~402.
王义琴, 尹良宏, 王 鹏, 张丽明, 孙勇如. 小球藻分子生物学进展 遗传, 2004, 26(3): 399~402.

[17] Chen Y, Wang Y, Sun Y, Zhang L, Li W. Highly efficient expression of rabbit neutrophil peptide-1 gene in *Chlorella ellipsoidea* cells. *Curr Genet*, 2001, 39(5): 365~370. [DOI]

[18] Wang P, Li W B, Wang Y Q, Sun Y R. Rapid isolation and functional analysis of promoter sequences of the nitrate reductase gene from *Chlorella ellipsoidea*. *J Appl Phycol*, 2004, 16(3): 11~16. [DOI]

[19] Ladygin V G. An efficient way for obtaining transformants of *Chlamydomonas reinhardtii* by electroporation. *Biofizika*, 2004, 49(4): 700~704.

[20] Bricknell I, Dalmo R A. The use of immunostimulants in fish larval aquaculture. *Fish Shellfish Immunol*, 2005, 19(5): 457~472. [DOI]