

# 转 hTNF- $\alpha$ 基因聚球藻培养条件的初步研究

汪晶<sup>1,2</sup>, 康瑞娟<sup>1</sup>, 谭天伟<sup>2</sup>, 蔡昭铃<sup>1</sup>, 丛威<sup>1</sup>

(1. 中国科学院过程工程研究所生化工程国家重点实验室, 北京 100080; 2. 北京化工大学化工系, 北京 100029)

**摘要:**以转 hTNF- $\alpha$  基因聚球藻 7002 为对象, 在摇瓶培养下对其生长条件进行了初步研究. 结果表明, 当光照强度为 100  $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$  时, 藻细胞生长速率最大; 35°C 为其最佳培养温度; 氯化钠浓度为 12~24 g/L 时生长良好, 最适浓度为 24 g/L; 转 hTNF- $\alpha$  基因的聚球藻 7002 能利用铵盐和硝酸盐为氮源, 其中硝酸盐对其生长最有利, 硝酸钠最适浓度为 1 g/L; 加入有机碳源可以显著促进藻细胞生长, 其中 5 g/L 的蔗糖对其促进作用最明显.

**关键词:**转基因聚球藻 7002; 培养条件; 人肿瘤坏死因子- $\alpha$

中图分类号: Q938 文献标识码: A 文章编号: 1009-606X(2004)02-0136-05

## 1 前言

人肿瘤坏死因子- $\alpha$  (human tumor necrosis factor  $\alpha$ , hTNF- $\alpha$ ) 是由激活的巨噬细胞产生的一种多功能蛋白质细胞因子, 由 3 个分子量为 17 kDa 的非糖蛋白单体构成. 它具有直接杀死或抑制肿瘤细胞的功能, 是很有希望的天然抗癌因子<sup>[1]</sup>. 但由于其静脉注射毒副作用较大, 至今还停留在临床实验阶段<sup>[2]</sup>.

蓝藻是一类能进行光合放氧作用的原核生物, 由于具有结构简单、易于遗传操作、含蛋白酶较少、通常不含内毒素、产物不形成包含物等特点, 逐渐成为基因工程中的重要表达宿主<sup>[3]</sup>. 中国科学院植物研究所已成功构建了一系列的转基因蓝藻, 其中转 hTNF- $\alpha$  基因聚球藻 7002 有望开发成为口服抗肿瘤药物而具有广阔的应用前景<sup>[4]</sup>.

由于外源基因的转入, 增加了藻的代谢负荷, 藻生长缓慢, 转基因藻的规模培养技术成为其产业化的关键<sup>[5]</sup>. Takahashi 等<sup>[6]</sup>通过改变营养条件的方法使转聚 3-羟基丁酸酯(PHB)聚球藻 7942 的 PHB 产量达到细胞干重的 25%. 国内有厦门大学的转人源胸腺肽 $\alpha$ 基因聚球藻 7942、华中理工大学的转小鼠金属硫蛋白基因集胞藻 6803 等条件培养的报道<sup>[7,8]</sup>, 但目前尚未有转 hTNF- $\alpha$  基因聚球藻 7002 培养条件的相关报道. 因此研究转 hTNF- $\alpha$  基因聚球藻 7002 的生长条件对缩短其生长代时、提高生长速率、实现高密度培养十分重要.

本工作在摇瓶实验中考察了光照强度、温度、盐浓度等基本环境因子及氮源、碳源等营养源对转 hTNF- $\alpha$  基因聚球藻 7002 生长的影响, 以期对其高密度培养条件作初步探索.

## 2 材料和方法

### 2.1 实验材料与主要试剂、仪器

蓝藻细胞株: 转 hTNF- $\alpha$  基因聚球藻 7002 (transgenic *Synechococcus* sp. PCC7002 with hTNF- $\alpha$  gene) 由中国科学院植物研究所提供.

主要试剂: 无水葡萄糖、蔗糖、氯化钠、硝酸钠、氯化铵均购自北京化学试剂商店; N-乙酰葡萄糖胺(NAG, 青岛海马生物科技有限公司), 硫酸链霉素(华北制药股份有限公司), 氨苄青霉素

(华北制药股份有限公司).

仪器:HZQ-QG 旋转摇床(哈尔滨东联电子技术开发有限公司),721-B 型分光光度计(上海光学仪器厂),FGH-1 型光合有效辐射计(北京师范大学光学仪器厂),上皿电子天平(上海精密科学仪器有限公司).

## 2.2 实验方法

### 2.2.1 摇床培养

配制 Medium A 培养基<sup>[9]</sup>,分装在 250 ml 三角瓶中,瓶口覆盖无菌通气封口膜,每瓶装 150 ml,高温灭菌后静置至少 8 h,否则藻细胞会由于缺乏 CO<sub>2</sub> 而死亡.使用时,在超净台上分别加入终浓度均为 50  $\mu\text{g/ml}$  的氨苄青霉素和硫酸链霉素(抗生素选择从而保证转基因藻的纯培养),再将 10 ml 种液接入,在摇床上振荡培养,温度 35 $^{\circ}\text{C}$ ,转速 120 r/min,日光灯提供光照,平均光强为 100  $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ .在分别考察光强、温度、盐浓度、营养源(氮源、有机碳源)对藻生长的影响时,采用单因素分析法,并在下 1 个单因素实验中采用上 1 个实验的优化结果.

### 2.3 分析检测

藻细胞生长测定:培养过程中定时取样,测定其在 750 nm 波长下的光吸收值 OD<sub>750</sub>,反映藻细胞生物量的增加;但当藻液的 OD<sub>750</sub> 超过线性范围时,需将其稀释后再进行测量.转基因聚球藻 OD<sub>750</sub> 与细胞干重  $Y$  的关系如下: $Y=0.5598\text{OD}_{750}$  (g/L).

比生长速率测定:根据藻细胞生长数据,采用最小二乘法,线性回归求斜率.

## 3 实验结果

### 3.1 环境因子对转基因聚球藻生长的影响

#### 3.1.1 光照强度对转基因聚球藻生长的影响

光是光合自养微藻最重要的环境因子,它不仅是其进行光合作用的基本能量来源,同时也影响微藻的结构和功能等生理特性<sup>[10]</sup>.实验考察了不同光强下转基因聚球藻的生长情况,结果见图 1.由图可见,光照强度对转基因聚球藻的生长有明显影响,当光强低于 100  $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ 时,其生长速率及细胞密度均随光强增加而增加,当光强继续增大至 140  $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ 时,藻细胞生长表现出一定程度的抑制,由此可见,转基因聚球藻生长的最适光强为 100  $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ .在实验过程中还发现,不同光强下转基因聚球藻呈现的颜色有所不同,强光下[光强 $>60$   $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ ]为黄绿色,弱光下[30  $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ ]为蓝绿色.这是因为蓝藻含有叶绿素 a、类胡萝卜素、藻胆色素等 3 大色素,这些色素的含量可因光的强度或光的波长不同而改变,强光下转基因藻呈现黄绿色,是由于参与光保护机制的类胡萝卜素的增多所致,称之为色素的补偿作用<sup>[11]</sup>.因此可认为转基因聚球藻颜色的变化是由于光强的不同引起的.

#### 3.1.2 培养温度对转基因聚球藻生长的影响

温度是影响藻类所有代谢活动的一个主要因子,它对藻细胞生长的影响主要是通过改变酶促反应速率实现的.在低于最适温度时,升高温度可提高酶的活性,从而促进细胞生长<sup>[12]</sup>.在一定的温度范围内,随着温度的增加,转基因聚球藻生长速率相应提高,但如果温度升为 39 $^{\circ}\text{C}$ 时,细胞会死亡(数据未附).因此实验设立 3 个温度条件 25, 30, 35 $^{\circ}\text{C}$  考察其生长情况,结果如图 2 所示.由图可见,3 种温度条件下,转基因聚球藻经过不同的延滞期,开始快速生长,35 $^{\circ}\text{C}$  下的比生长速率为 0.350  $\text{d}^{-1}$ ,高于 30 $^{\circ}\text{C}$  下的 0.321  $\text{d}^{-1}$  及 25 $^{\circ}\text{C}$  下的 0.276  $\text{d}^{-1}$ ,终细胞密度也最高,达 0.72 g/L.由此可见 35 $^{\circ}\text{C}$  是转基因聚球藻生长的最佳温度.

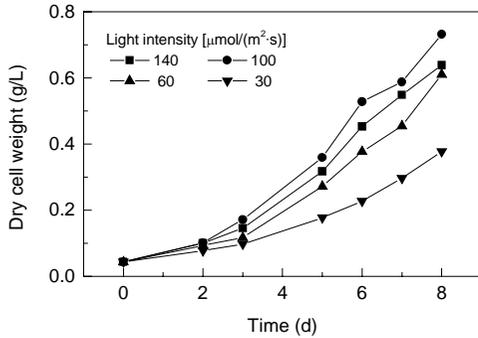


图 1 光照强度对转基因聚球藻生长的影响  
Fig.1 Effect of light intensity on the growth of transgenic *Synechococcus* sp. PCC7002

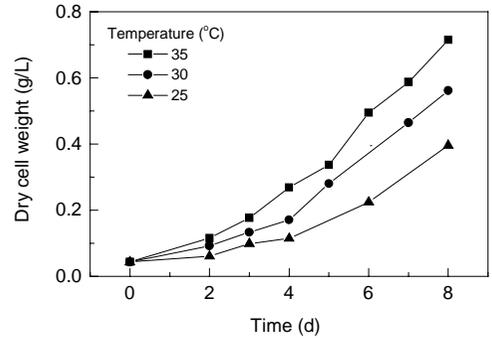


图 2 培养温度对转基因聚球藻生长的影响  
Fig.2 Effect of temperature on the growth of transgenic *Synechococcus* sp. PCC7002

### 3.1.3 NaCl 浓度对细胞生长的影响

聚球藻是一种海洋微藻,其细胞生长要求一定的渗透压,适宜浓度的 NaCl 可以维持细胞内渗透压的平衡,同时影响细胞的生长速率<sup>[13]</sup>. 配制不同 NaCl 浓度的培养基,其它成份维持与标准培养基(Medium A)相同,隔天取样测定转基因聚球藻细胞的生长,结果如图 3 所示. 由图可以看出,转 hTNF- $\alpha$  基因聚球藻 7002 在 12~24 g/L NaCl 浓度下均可较好地生长. 当 NaCl 为最适浓度 24 g/L 时,细胞的平均生长速率为最大,最大细胞密度约为 6 g/L NaCl 浓度时细胞密度的 1.5 倍. 过低或过高的 NaCl 浓度对生长不利.

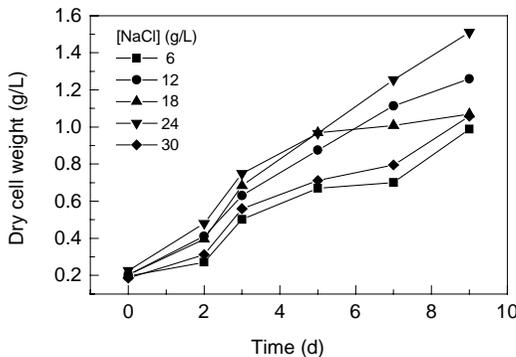


图 3 不同 NaCl 浓度下细胞的生长  
Fig.3 Effect of NaCl concentration on the growth of transgenic *Synechococcus* sp. PCC7002

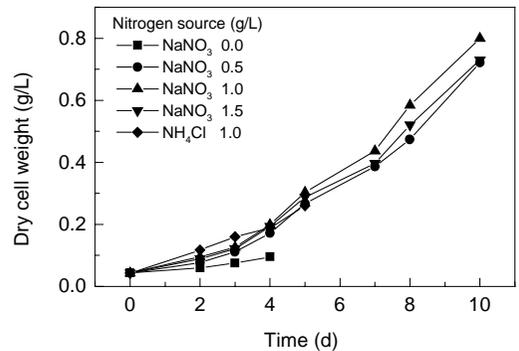


图 4 氮源对转基因聚球藻生长的影响  
Fig.4 Effect of nitrogen source on the growth of transgenic *Synechococcus* sp. PCC7002

## 3.2 营养源的影响

### 3.2.1 氮源对转基因聚球藻生长的影响

氮源对微藻的细胞组成和生长起着十分重要的作用<sup>[14]</sup>. 其它条件不变,改变培养基中无机氮源种类及浓度,考察其对转基因聚球藻生长的影响,结果如图 4 所示. 从图可以看出,当培养液中氮源浓度为 0 时,藻细胞几乎不生长. 添加适量的氮源后,转基因聚球藻生长速率明显提高,铵盐或硝酸盐都可作为氮源被吸收利用. 在生长初期,以  $\text{NH}_4^+$  为氮源的藻细胞明显比以  $\text{NO}_3^-$  为氮源的长得快,但第 4 d 其生长速率下降,并出现枯黄的现象,继而死亡,可能是由于部分铵离子以  $\text{NH}_4\text{OH}$  的形式进入细胞内,使细胞内部 pH 值升高,对细胞产生毒害作用,影响细胞的生长<sup>[15]</sup>,而以  $\text{NO}_3^-$

为氮源的藻细胞则一直生长良好。当  $\text{NaNO}_3$  浓度为 0.5~1.5 g/L 时, 在藻细胞生长前期影响差别很小, 但进入指数生长期后, 0.5 g/L 的  $\text{NaNO}_3$  因无法提供藻细胞生长所需的足够的氮源而使其生长速率减慢, 1.5 g/L 时可能由于氮源浓度过高对藻细胞生长起了某种不利作用, 达到的终细胞密度比 1 g/L  $\text{NaNO}_3$  时的低。在本实验条件下, 1 g/L  $\text{NaNO}_3$  为转基因聚球藻生长的最佳浓度和最佳氮源。

### 3.2.2 有机碳源对转基因聚球藻生长的影响

已有的研究<sup>[16]</sup>表明, 在微藻培养中加入有机碳源可有效地提高生长速率, 降低细胞对光的依赖, 有利于实现微藻的高密度培养。本实验在培养基中分别添加不同浓度的有机碳源(葡萄糖、蔗糖、N-乙酰葡萄糖胺), 比较其对转基因聚球藻生长的影响, 结果见图 5。

由图可见, 转 hTNF- $\alpha$  基因聚球藻具有一定的利用有机碳源的能力。在光自养条件下细胞密度一直较低, 最高仅为 0.3 g/L。添加适量有机碳源后, 藻细胞指数生长期的比生长速率显著增大, 培养密度比光自养条件下也相应提高了 3~6 倍。各种有机碳源对藻细胞起作用的时间不同, 需经过一定时间诱导或激活糖的转运和利用机制, 其对细胞生长的促进作用才明显表现出来<sup>[17]</sup>。在本实验条件下各种有机碳源的最佳浓度分别为: N-乙酰葡萄糖胺 1 g/L, 蔗糖 5 g/L, 葡萄糖 3 g/L, 其中蔗糖和葡萄糖对细胞生长的促进作用最显著。

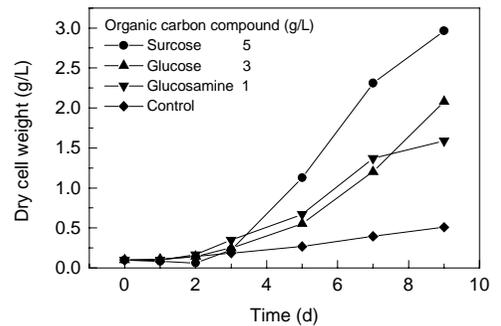


图 5 有机碳源对转基因聚球藻生长的影响  
Fig.5 Effect of organic carbon source on the growth of transgenic *Synechococcus* sp. PCC7002

## 4 结 论

转 hTNF- $\alpha$  基因聚球藻在摇瓶培养条件下的实验结果表明:

- (1) 转基因聚球藻生长的最适光强为  $100 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 。
- (2) 转基因聚球藻的最适生长温度是  $35^\circ\text{C}$ 。
- (3) 转基因聚球藻在  $\text{NaCl}$  浓度为 12~24 g/L 范围内都能较好地生长。
- (4) 对转基因聚球藻生长最有利的氮源为  $\text{NaNO}_3$ , 最佳浓度为 1.0 g/L。
- (5) 转基因聚球藻具有一定的利用有机碳源的能力, 各种有机碳源的最佳浓度分别为: N-乙酰葡萄糖胺 1 g/L, 蔗糖 5 g/L, 葡萄糖 3 g/L, 其中蔗糖和葡萄糖对细胞生长的促进作用最显著。

总之, 优化培养条件是提高转 hTNF- $\alpha$  基因聚球藻生长速率和细胞密度的有效手段, 并为其大规模培养提供了相关依据。

### 参考文献:

- [1] Old L J. Tumor Necrosis Factor (TNF) [J]. *Science*, 1985, 230: 630-632.
- [2] Akajima Y, Dellipizzi A, Mallouh C, et al. Effect of Tumor Necrosis Factor-alpha and Interferon-gamma on the Growth of Human Prostate Cancer Cell Lines [J]. *Urol. Res.*, 1995, 23(4): 205-210.
- [3] Cresswell R C, Rees T A V, Shah N. *Algal and Cyanobacterial Biotechnology* [M]. New York: Long-man Scientific & Technical Wiley, 1989. 239-271.
- [4] Shi D J, Peng G H, Shao N, et al. Development and Prospects in the Preparation of Recombinant Pharmaceuticals by Transgenic Cyanobacteria [A]. *Proc. International Symposium on Marine Biotechnology* [C]. 2000. 340-344.
- [5] 秦松. 中国藻类基因工程研究: 历史、现状和问题. [A]. 刘永定, 范晓, 胡征宇. *中国藻类学研究* [C]. 武汉: 武汉出

- 版社, 2001. 223–236.
- [6] Tkahashi H, Mouake M, Tokiwa Y, et al. Improved Accumulation of Poly-3-hydroxybutyrate by a Recombinant Cyanobacterium [J]. *Biotechnol. Lett.*, 1998, 20(2): 183–186.
- [7] 汪琨, 马荣水, 徐惠娟, 等. 转入源胸腺肽  $\alpha$  基因聚球藻 7942 及野生藻的培养 [J]. *工业微生物*, 2002, 32(4): 15–19.
- [8] 王淑璠, 施定基, 张嗣良, 等. 转小鼠金属硫蛋白基因集胞藻 6803 及其野生藻培养 [J]. *华东理工大学学报*, 2000, 126(1): 48–52.
- [9] Stevens S E Jr, Patterson C O P, Myers J. The Production of Hydrogen Peroxide by Blue-green Algae: A Survey [J]. *J. Phycol.*, 1973, 9: 427–430.
- [10] Van Liere L, Walsby A E. Interactions of Cyanobacteria with Light [A]. Carr N G, Whitton B A. *The Biology of Cyanobacteria* [C]. Berkeley: University of California Press, 1982. 9–47.
- [11] Gantt E. Phycobilisomes [J]. *Annu. Rev. Plant Physiol.*, 1981, 32: 327–347.
- [12] Goldman J C, Carpenter E J. A Kinetic Approach to the Effect of Temperature on Algal Growth [J]. *Limnol. Oceanogr.*, 1974, 19: 756–766.
- [13] Borowitzka L J. Osmoregulation in Blue-Green Algae [A]. Round P E, Chapman O J. *Progress in Phycological Research* [C]. Amsterdam: Elsevier Biomedical Press, 1986, 4: 243–256.
- [14] Flores E, Herrero A. Assimilatory Nitrogen Metabolism and Its Regulation [A]. Bryant D A. *The Molecular Biology of Cyanobacteria* [C]. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1994. 489–517.
- [15] 华汝成. 单细胞蓝藻的培养和利用 [M]. 北京: 农业出版社, 1982. 56–59.
- [16] 王永红. 集胞藻 6803 封闭式光生物反应器混合营养培养及其生理学研究 [D]. 上海: 华东理工大学, 2000. 23–30.
- [17] Pelroy R A, Rippka R, Stanier R Y. Metabolism of Glucose by Unicellular Blue-Green Algae [J]. *Arch. Microbiol.*, 1972, 87: 303–322.

## Preliminary Investigation on the Culture Conditions of Transgenic *Synechococcus* sp. PCC7002 with hTNF- $\alpha$ Gene

WANG Jing<sup>1,2</sup>, KANG Rui-juan<sup>1</sup>, TAN Tian-wei<sup>2</sup>, CAI Zhao-ling<sup>1</sup>, CONG Wei<sup>1</sup>

(1. State Key Lab. Biochem. Eng., Inst. Process Eng., Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China;

2. Department of Chemical Engineering, Beijing University of Chemical Technology, Beijing 100029, China)

**Abstract:** Light, temperature, NaCl concentration, nitrogen source, organic carbon source are important factors affecting the growth of transgenic *Synechococcus* sp. PCC7002 with hTNF- $\alpha$  gene. The growth of transgenic *Synechococcus* sp. PCC7002 was saturated at the level of 100  $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$  light intensity. The optimal temperature for cultivation was 35°C. The range of NaCl concentration suitable to cell growth was from 12 g/L to 24 g/L, and the optimal was 24 g/L. Transgenic *Synechococcus* sp. PCC7002 could use ammonium or nitrate for its nutritional requirement, but nitrate was the preferred nitrogen source and the optimal concentration was 1 g/L  $\text{NaNO}_3$ . Several organic carbon compounds such as sucrose, glucose, glucosamine were tested. It was shown that organic carbon source promoted the cell growth apparently and 5 g/L sucrose was proved to be the most suitable.

**Key words:** transgenic *Synechococcus* sp. PCC7002; cultivation condition; hTNF- $\alpha$