

植物生长调节剂对转基因鱼腥藻7120生长与外源基因表达的影响

刘志伟^{1,*} 张晨¹ 侯雨文¹ 郭勇²

¹嘉应学院生物系, 梅州 514015; ²华南理工大学食品与生物工程学院, 广州 510640

提要 适宜浓度的IBA、6-BA、赤霉素和氯化胆碱均促进转基因鱼腥藻7120生长, 提高其生物量, 不影响外源基因表达, 但从总体上讲高浓度植物生长调节剂则抑制藻细胞生长, 降低外源基因表达水平。这些植物生长调节剂混合施用促进转基因鱼腥藻生长效果不如单一因子好, 外源基因表达水平也略有下降。

关键词 植物生长调节剂; 转基因鱼腥藻7120; 生长; 外源基因表达

Effect of Plant Growth Substances on Growth and Exogenous Gene Expression of Recombinant *Anabaena* sp. PCC7120

LIU Zhi-Wei^{1,*}, ZHANG Chen¹, HOU Yu-Wen¹, GUO Yong²

¹Department of Biology, Jiaying College, Meizhou 514015; ²College of Food Engineering and Biotechnology, South China University of Technology, Guangzhou 510640

Abstract Appropriate concentration of indole-3-butyric acid (IBA), 6-benzyladenine (6-BA), gibberelic acid (GA₃) and choline chloride (CC) could promote cell growth of recombinant *Anabaena* sp. PCC7120, and had no effect on exogenous gene expression. The high concentration of IBA, 6-BA, GA₃ and CC would restrain cell growth and reduce exogenous gene expression. When IBA, 6-BA, GA₃ and CC were added to medium together, the promotion to cell growth was weaker than the action of anyone plant growth substances, and exogenous gene expression level was reduced slightly.

Key words plant growth substances; recombinant *Anabaena* sp. PCC7120; growth; exogenous gene expression

近年来, 分子遗传学和基因工程研究证实, 大肠杆菌的载体和启动子往往可以适用于蓝藻, 尤其是单细胞蓝藻的转基因, 从而促进了蓝藻基因工程较快发展, 蓝藻已成为基因工程中越来越重要的实验材料。鱼腥藻是藻类分子生物学的模式藻种, 有多种外源基因已在鱼腥藻中成功表达^[1], 但尚未见转基因鱼腥藻高效培养方面的报道。另外, 王捷和郭勇^[2]用三亲结合转移方式将 α 型人肿瘤坏死因子(TNF- α)基因转入鱼腥藻7120中并得到表达, 这为多肽药物生产开创了一种新的实用的表达系统。我们在转基因鱼腥藻摇瓶培养中曾观察到藻的生长除了需要合适营养源外, 一些生长因子也有较大影响^[3,4]。本文探讨植物生长调节剂吲哚丁酸(IBA)、6-苄基腺嘌呤(6-BA)、赤霉素(GA₃)和氯化胆碱(CC)对转基因鱼腥藻生长和外源基因表达的影响, 以期寻找高效培养转基因鱼腥藻的方法。

材料与方 法

转基因鱼腥藻7120(*Anabaena* sp. PCC7120)由

华南理工大学生化实验室保藏。基本培养基为含25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 新霉素的BG-11培养液^[5], 混养时加9 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 蔗糖、2.25 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 硝酸钠, 根据实验需要还添加一定量的植物生长调节剂。120 $^{\circ}\text{C}$ 湿热灭菌20 min。接种量5%, 光照度1000 lx, 光暗周期12 h/12 h, 25 $^{\circ}\text{C}$, 100 mL锥形瓶装50 mL培养液, 旋转式摇床转速150 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 。每种浓度植物生长调节剂重复3次, 以不加生长调节剂作对照, 用 t 检验法检验其显著性。生物量测定用干重法和比浊法^[3]。可溶性蛋白含量测定用考马斯亮蓝法^[6], TNF- α 表达量测定用SDS-PAGE, 图谱以凝胶成像系统扫描, 得到TNF占可溶性蛋白的百分含量。

结果与讨论

1 植物生长调节剂对转基因鱼腥藻生长的影响

如图1-a所示, IBA在300 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 以内, 对转

收稿 2004-01-30 修定 2004-06-28

资助 广东省自然科学基金项目(980541)。

* E-mail: zhweiliu@vip.sina.com; Tel: 0753-2186623

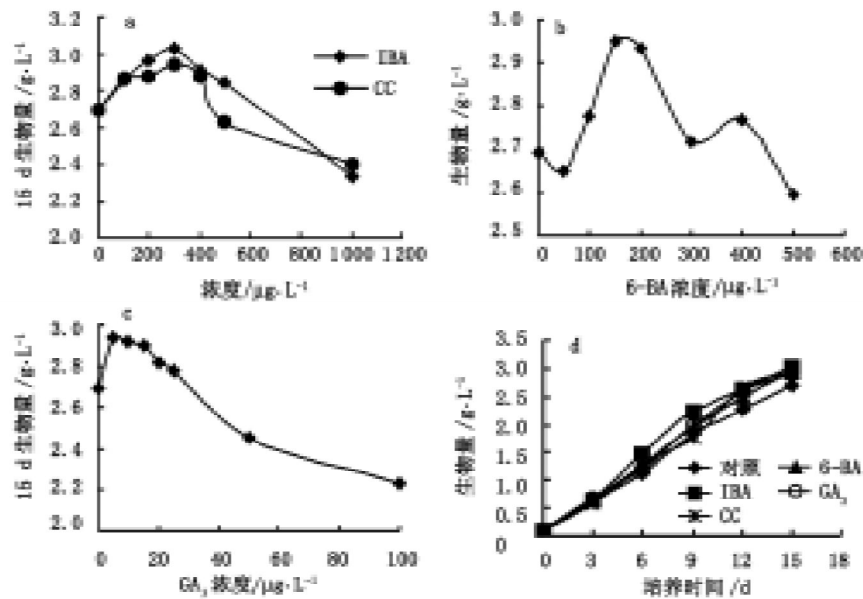


图1 植物生长调节剂对转基因鱼腥藻生长的影响

Fig. 1 Effect of plant growth substances on the growth of recombinant *Anabaena* sp. PCC7120

基因藻生长的促进作用随 IBA 浓度的增加而增强; 大于 300 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 促进作用减弱, 浓度为 1 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 则显著 ($P < 0.05$) 抑制生长。IBA 最适浓度为 300 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, 显著 ($P < 0.05$) 促进藻细胞生长。

与 IBA 相似, 6-BA 的作用在低浓度不显著, 浓度增大时促进作用增强, 150 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时达到最大, 培养 15 d 的生物量增加量比不加 6-BA 的显著 ($P < 0.05$); 浓度大于 300 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 后, 促进作用减弱, 500 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 抑制生长 (图 1-b)。

GA₃ 有促进植物细胞伸长的作用, 这与其增强细胞分裂、促使细胞壁松弛和增加细胞渗透能力有关, GA₃ 还能影响某些特定酶的 mRNA 转录。GA₃ 小于 30 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时有促进作用, 5 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 促进作用最显著 ($P < 0.05$); 浓度达到 50 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时抑制生长, 而且浓度增大, 其抑制作用增强 (图 1-c)。从生长进程 (图 1-d) 看, GA₃ 作用在对数生长末期比较明显, 而根据 GA₃ 的性质, 在中性或微碱性条件下稳定下降, 在碱性溶液中可能是因受中和而失效, 实际培养过程中常见到 pH 较高 (10 左右) 时 GA₃ 稳定。推测可能在培养初期 GA₃ 稳定性未受影响时就已经进入细胞, 因此一直起作用。

CC 是一种小分子胆碱类活性物质, 能改善作物的多种生理活动^[7], 维护生物膜的稳定性^[8]。图 1-a 显示, 浓度低于 400 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 CC 对转基因鱼腥藻生长有促进作用, 各种浓度下的促进效果相近, 300 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的效果最好 ($P < 0.05$); 高浓度的 CC

表1 植物生长调节剂对转基因鱼腥藻外源基因表达的影响
Table 1 Effect of plant growth substances on the exogenous gene expression of recombinant *Anabaena* sp. PCC7120

植物生长调节剂	植物生长调节剂浓度/ $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	可溶性蛋白含量/ $\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ (DW)	TNF表达水平/%
IBA	0	0.2873	21.56
	100	0.2902	22.03
	200	0.2863	21.43
	300	0.2916	21.67
	400	0.2859	21.02
	500	0.2787	20.31
	1 000	0.2606	17.13
6-BA	0	0.2873	21.56
	100	0.2806	21.04
	150	0.2893	21.33
	200	0.2910	20.81
	300	0.2831	19.22
	400	0.2741	18.68
	500	0.2629	19.02
GA ₃	0	0.2873	21.56
	5	0.3001	21.97
	10	0.2972	21.38
	15	0.2942	21.03
	25	0.2811	19.12
	50	0.2776	18.71
CC	0	0.2873	21.56
	100	0.2911	22.08
	200	0.2937	21.43
	300	0.2989	21.29
	400	0.3006	20.86
	500	0.2798	21.01
	1 000	0.2684	19.23

抑制生长, 生物量明显呈下降趋势, 但浓度增大至 $50 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时转基因藻仍能正常生长, 并不死亡。

2 植物生长调节剂对转基因鱼腥藻外源基因表达的影响

从表1可知, 植物生长调节剂对转基因鱼腥藻外源基因表达有一定的影响。

低浓度 IBA 下的 TNF 表达水平维持在约 22% 的水平, 这时基因表达不受 IBA 影响; 当浓度高于 $300 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 表达水平开始下降, 浓度为 $1\ 000 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, TNF 表达水平显著 ($P<0.05$) 下降, 这可能是 IBA 影响细胞分裂, 导致转基因鱼腥藻重组质粒拷贝数降低造成的。

低浓度 6-BA 对转基因鱼腥藻外源基因的表达影响不大, 但 6-BA 浓度大于 $400 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 后, TNF

表达水平显著 ($P<0.1$) 降低。

从 GA_3 对转基因鱼腥藻 7120 细胞蛋白含量和 TNF 表达水平的影响看, GA_3 低于 $15 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 藻细胞的蛋白质含量和 TNF 表达水平能维持原有水平, 甚至有轻微增加, 但 GA_3 浓度高于 $25 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, TNF 表达水平下降 ($P<0.1$)。

低浓度 CC 对转基因鱼腥藻的 TNF 表达水平几乎没有影响, CC 浓度大于 $1\ 000 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 则显著降低转基因鱼腥藻的 TNF 表达水平 ($P<0.1$)。

3 几种植物生长调节剂的混合对转基因鱼腥藻生长与外源基因表达的影响

将各种植物生长调节剂单一作用的最适浓度 (IBA $300 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、6-BA $300 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 GA_3 $5 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) 混合加入培养基中的结果 (表2) 表明, 不同植物生

表2 植物生长调节剂混合使用对转基因鱼腥藻生长和外源基因表达的影响

Table 2 Effect of mixed plant growth substances on the growth and exogenous gene expression of recombinant *Anabaena* sp. PCC7120

生长调节剂	培养15 d的生物量/ $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	可溶性蛋白含量/ $\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ (DW)	TNF表达水平/%
对照	2.691±0.037	0.2873	21.56
IBA	3.025±0.033	0.2916	21.67
6-BA	2.951±0.031	0.2893	21.33
GA_3	2.933±0.019	0.3001	20.97
CC	2.938±0.026	0.2989	21.29
IBA+6-BA	2.936±0.017	0.2853	20.88
IBA+ GA_3	2.866±0.025	0.2861	21.03
IBA+CC	2.913±0.027	0.2912	20.62
6-BA+ GA_3	2.716±0.043	0.2839	19.83
6-BA+CC	2.847±0.088	0.2879	19.96
GA_3 +CC	2.783±0.045	0.2932	20.13
IBA+6-BA+ GA_3	2.706±0.051	0.2702	18.23
IBA+6-BA+CC	2.907±0.028	0.2831	18.79
IBA+ GA_3 +CC	2.801±0.055	0.2902	19.16
6-BA+ GA_3 +CC	2.753±0.021	0.2852	20.13
IBA+6-BA+ GA_3 +CC	2.712±0.066	0.2678	18.46

长调节剂混合后对转基因鱼腥藻 7120 生长的促进作用减弱, 效应不如单一使用时好, 但不抑制生长。另外, 植物生长调节剂混合不能促进 TNF 表达, 在所用的实验浓度下, TNF 表达水平略有下降。

参考文献

- 张晨, 刘志伟, 郭勇. 藻类基因工程研究进展. 嘉应大学学报, 2001, (6): 97~100
- 王捷, 郭勇. 人肿瘤坏死因子 α 穿梭表达载体的构建. 华南理工大学学报, 1998, 26(4): 82~85
- 刘志伟, 郭勇, 张晨. 碳氮源对转基因鱼腥藻 *Anabaena* sp. PCC 7120 培养的影响. 工业微生物, 2001, 31(2): 23~25
- 张晨, 刘志伟, 郭勇. 环境因子对转基因鱼腥藻培养的影响. 工业微生物, 2002, 32(2): 26~29
- Richard WC. Culturing methods for cyanobacteria. Method Enzymol, 1988, (3): 68~95
- Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem, 1976, 72: 248~254
- 宓容钦, 李锦树, 王洪春. 生物膜组分对膜功能和膜脂相变的调控 III. 磷脂脂质体对玉米根端线粒体 ATP 酶活力的影响. 植物生理学报, 1983, 9: 217~222
- 陈以峰, 周燮. 氯化胆碱对多种逆境下作物膜稳定性的影响. 华北农学报, 1997, 12(2): 54~58