

人肿瘤坏死因子- α 基因对鱼腥藻 7120 的光活性的影响*

彭国宏 陈贝 施定基¹ 张海霞 曾呈奎

(中国科学院海洋研究所 青岛 266071; ¹中国科学院植物研究所 北京 100093)

摘要 藻类分子生物学和基因工程的发展已使外源基因能在蓝藻中表达,这就有可能分析外源基因对光合作用的影响。本研究采用两种转化系统所得的转基因蓝藻(*Anabaena* sp. PCC 7120) 1(To1)、2(To2)及野生藻(Wo)测定其生长曲线表明,它们的生长速度比较接近,转基因藻略微缓慢,生物量也偏少。用氧电极测定转基因藻的饱和光强与野生藻接近,为 $480 \mu\text{Em}^{-2} \text{s}^{-1}$,最大放氧量为 $355 \text{ mol O}_2/\text{mg Chl. h}$ 。吸收光谱测定结果表明转基因藻与野生藻的色素组成一致,均含有叶绿素 a、类胡萝卜素和藻蓝蛋白等,但 To2 的藻胆蛋白含量高于野生藻。低温荧光发射光谱测定表明,外源基因的导入及表达促进了转基因藻中藻蓝蛋白的合成,改变了光能在两个光系统之间的分配,特别是由藻胆蛋白吸收的光能向光系统 I 的传递受阻,不同的转化系统中所得的转基因藻中表现程度亦有差异。

关键词 人肿瘤坏死因子(hTNF- α), 生长曲线, 荧光发射光谱, 吸收光谱

20年来各国学者应用 DNA 重组技术对于光合器中本身存在的基因及有关元件进行探索、改造,已大大加深了对光合作用机理的了解,也大大加强了对光能吸收、传递、转化和储存的调控^[1-4]。近年来,人们已开始能把外源基因导入光合细胞,这为研究光合作用提供了新手段、新思路。

人肿瘤坏死因子(h-TNF- α)由激发的单核巨噬细胞产生,只存在于人类和哺乳动物中。它是一种多功能的细胞因子,对人体多种组织器官产生生物学效应。其中最引人注意的是对肿瘤细胞有选择性、广谱性的直接杀伤作用^[5]。近年来,刘凤龙等在国内外首次将 hTNF- α 基因转入鱼腥藻(*Anabaena* sp. 7120)并证明了表达产物具有生物学活性^[6]。为了规模培养转基因鱼腥藻,制备抗癌药物,必须首先了解转基因藻的光合和生长特性,即阐明转入外源基因后对鱼腥藻的光合和生长发生了什么影响。本文报道了用两种载体转化的鱼腥藻 7120 与野生型细胞在光合、生长和细胞形态上的观察。

1 材料与方法

1.1 实验材料 蓝藻为野生型鱼腥藻 7120(Wo) (*Anabaena* sp. PCC 7120) 及其转基因藻 1(To1) 和 2(To2) 培养在 BG-11-N 培养液中,于 30℃ 光照温箱内,全光照,光强为

* 国家 863 海洋生物高技术青年基金项目资助
1999-09-01 收到; 1999-09-14 修回

$60\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$.

1.2 生长曲线测定 野生藻和转 I 基因藻接种到新鲜的培养后, 尽量以恒定的振荡速度和光照接着. 从接入起每隔 24h 取样, 检测 750nm 波长处的光吸收值(OD 750).

1.3 光合放氧活性测定 用 Hanstech DW/1 型氧电极测定转基因藻与野生藻的光合放氧活性. 用氧电极测定蓝藻光下放氧及暗中吸氧, 并与叶绿素 a 总量相比, 得出蓝藻的净光合活性和呼吸活性.

计算公式: $O\mu\text{mol}/\text{mgChl}\cdot\text{h} = SXv(\text{ml})/D(\text{cm})XH(\text{cm}/\text{hr}(t))X1/\text{Chla}(\text{mg})$
 S 为温度 24℃, 水中的饱和溶氧 $0.267\mu\text{mol}/\text{mL}^{[7]}$.

1.4 吸收光谱的测定 在室温下, 分别取野生型与转基因藻培养物振荡混匀后, 用日本岛津 UV-3000 型双波长双光束分光光度计在 360-720nm 范围内做扫描吸收光谱.

1.5 低温荧光发射光谱测定 分别取野生型与转基因藻培养物振荡混匀后, 加入到低温管中, 在氮中用日立 F-4500 低温荧光光度计测在 436nm 和 580nm 激发光下的荧光发射光谱^[8].

1.6 叶绿素 a 的含量测定 室温下, 分别取一定体积的野生藻及转基因藻培养物, 3000/min 离心 10min 后, 弃上清. 在藻沉淀中分别加入 1mL 无水甲醇, 振荡均匀后, 置于 4℃ 冰箱内过夜, 次日取出, 同样离心 10min 后, 测上清的 665nm 波长处的光吸收值(OD 665). 按公式: $\text{Chla}(\mu\text{g}/\text{ml}) = 13.9 \times A665$ 可计算叶绿素 a 的含量.

2 结果与讨论

2.1 转基因藻与野生藻的生长曲线的测定

在 750nm 处的光吸收值(OD750)排除了叶绿素、类胡萝卜素和藻胆蛋白等胞内成分自身吸收的干扰, 可以反映藻细胞的浓度变化. 所以, 以时间对 OD750 值作图, 即代表藻的生长曲线.

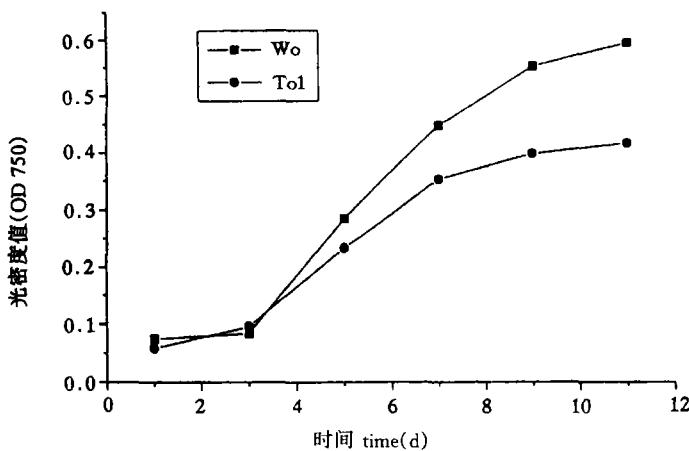


图 1 转 hTNF- α 基因和野生型鱼腥藻的生长曲线

Fig. 1 The growth curves of wild type and transgenic *Anabaena* sp. PCC 7120

从转基因藻和野生藻的生长曲线(图 1)来看, 转基因藻的生长速度慢于野生型藻, 但生长情况良好.

2.3 光合放氧活性

从图 2 可见, 转工因藻和野生型藻在低光强下 7~40% ($22.5\text{--}145\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$) 范围时放氧活性有差异, 野生藻的活性较高, 比转基因藻高出 1~2 倍。在 80~100% ($240\text{--}300\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$) 光照强度时, 两者基本相同, 并都基本达到饱和放氧速率。它们的最大放氧速率: 转基因藻为 $355\mu\text{mol O}_2/\text{mg Chl}\cdot\text{h}$ 和野生藻为 $460\mu\text{mol O}_2/\text{mg Chl}\cdot\text{h}$ 。

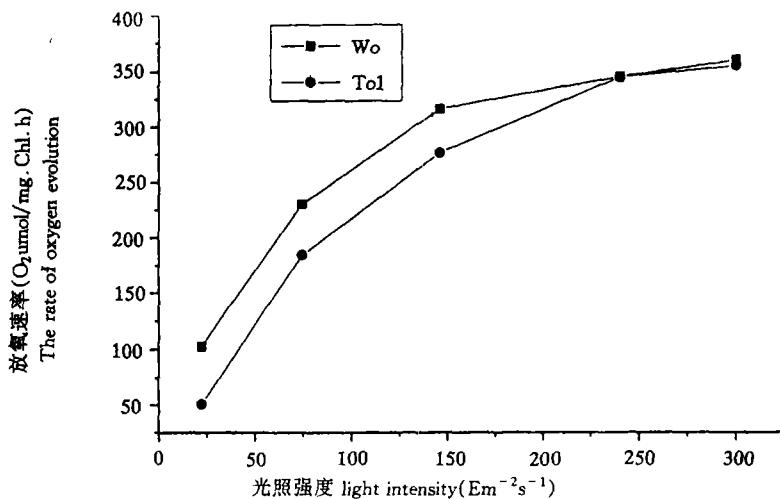


图 2 转基因与野生型鱼腥藻在不同的光照强度下的放氧活性

Fig. 2 The oxygen evolution activity of wild type and transgenic *Anabaena* sp. PCC 7120

2.4 转基因蓝藻的光合色素组成的变化

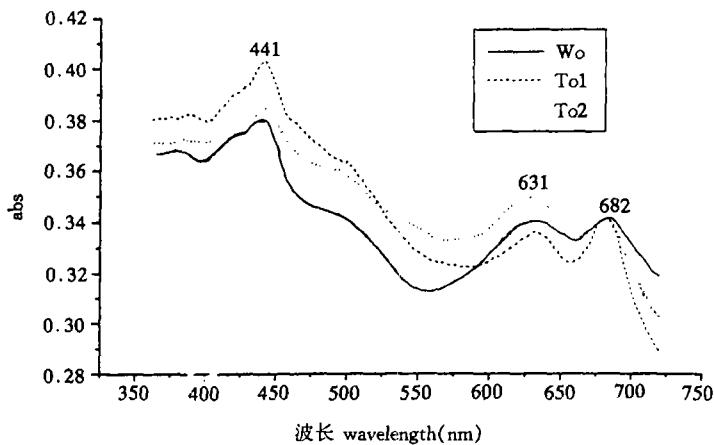


图 3 转基因及野生型鱼腥藻的吸收光谱

Fig. 3 The absorption spectra of wild type and transgenic *Anabaena* sp. PCC 7120

取两种不同转化系统所得的转 TNF- α 基因鱼腥藻, 转基因藻 1 和转基因藻 2 测定并比较其光合色素组成, 结果见图 3。三种藻在 682nm、631nm、510nm 和 441nm 处各有一吸收峰, 分别代表了叶绿素 a(A782、A441)、藻蓝蛋白(A631)和类胡萝卜素(510nm)的吸收。

说明转基因藻的色素组成没发生变化,但从 A631/A682 的相对比值可看出,转基因藻 To2 最高,转基因藻 To1 最低. 说明 TNF 基因的表达在不同的转基因藻中使其藻蓝蛋白的合成发生不同的改变.

2.5 转基因藻的低温荧光发射光谱

图 4 中,三种藻在 694nm 和 732nm 处各有一发射峰,它们分别代表了光系统 II (F694)和光系统 I (F732)的荧光发射. 二者的比值(F694/F732)从图中可以看出是野生种最大,其次是转基因藻 To1,转基因藻 To2 最小. 这表明,野生藻中光能在两个光系统中分配较均衡,而转基因藻中尤其是转基因藻 To2 中光能分配倾向于光系统 I .

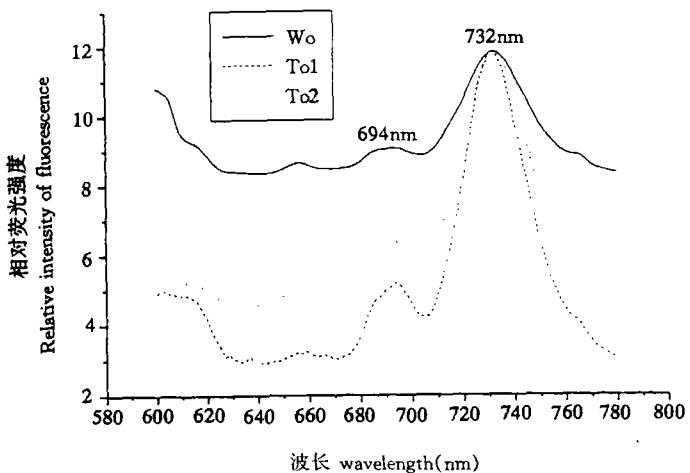


图 4 转基因及野生型鱼腥藻低温(77K)荧光发射光谱(激发光为 436nm)

Fig. 4 The fluorescence spectra at low temperature(77K) of wild type and transgenic *Anabaena* sp. PCC 7120, excited at 436nm.

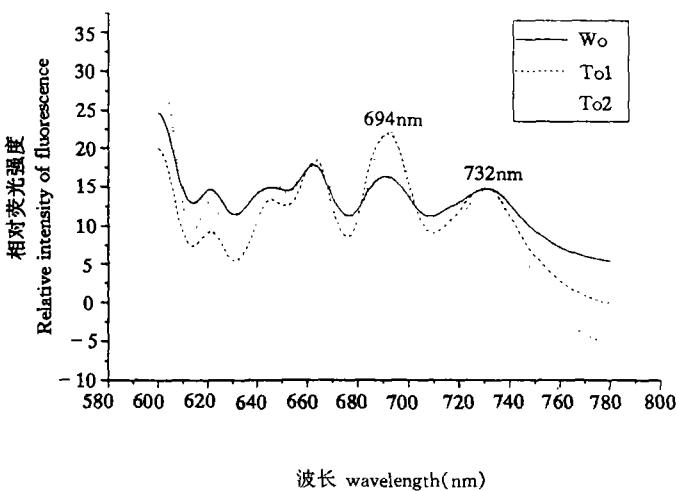


图 5 转基因及野生型鱼腥藻低温(77K)荧光发射光谱(激发光为 580nm)

Fig. 5 The fluorescence spectra at low temperature(77K) of wild type and transgenic *Anabaena* sp. PCC 7120, excited at 580nm.

图 5 中,三种藻在 658nm、594nm 和 732nm 处各有一个发射峰,分别代表了藻胆体(F658)、光系统Ⅱ(F694)和光系统Ⅰ(F732)的荧光发射。从图中可以看出光系统中的能量在野生型藻中分配得较均匀,三个峰型及峰值类似。这说明由藻胆蛋白吸收的光能较多地传递到光系统Ⅰ。而在转基因藻中明显看出分配在藻胆体(捕光色素天线)(F658)和光系统Ⅱ(F694)的能量大于在光系统Ⅰ(F732)中的。这说明 TNF 在鱼腥藻 7120 中的表达影响了光能在光系统间的分配。

上述研究结果说明含有相同外源基因(hTNF- α)的不同载体转入相同的藻细胞后,对于鱼腥藻的光合作用发生了明显的影响,它们均可引起藻胆蛋白合成增加,使藻胆蛋白向光系统Ⅰ的光能传递受阻,光饱和点降低,但影响程度不同。阐明这种差别,无论对选择最适光合条件,满足高速率生长;还是探索光合作用中光能吸收、传递和转化的机理,都有一定的意义。

参 考 文 献

- [1] Zhao J D, Zhou J H, Bryant D A. Energy transfer processes in phycobilisomes as deduced from analyses of mutants of *Synechococcus* sp PCC 7002. *Research in Photosynthesis*, 1992, 1: 25-32
- [2] Andersson B A, Hugh Salter, Barber J. (eds). *Molecular Genetics of Photosynthesis*, London: Oxford University Press, 1996
- [3] Pessarakli M. (ed); *Handbook of Photosynthesis*. Marcel Dekker, New York-Based-Hong Kong, 1997
- [4] Cai Yuping, Steven A, Schwartz H, Alexander N Glazer. Transposon insertion in genes coding for the biosynthesis of structural components of the *Anabaena* sp. Phycobilisome. *Photosynthesis Research*, 1997, 53: 109-120
- [5] 余伟明,焦柄华主编,肿瘤坏死因子及相关细胞毒素.上海:上海科学技术出版社,1990,144-198
- [6] 刘凤龙,张宏斌,旋定基等.人肿瘤坏死因子基因穿梭表达载体的构建和在鱼腥藻 7120 中的表达及活性测定.中国科学(C),1999,129(3):1-8
- [7] Shi Dingji, Brouers M, Hall D O, et al. The effects of immobilization on the biochemical physiological and morphological features of *Anabaena azolla*. *Planta*, 1987, 172(87):298-308
- [8] 旋定基,王起华,许黎.满江红鱼腥藻(*Anabaena azollae*)对光能的吸收和传递.植物学集刊,1983,1:207-215

THE EFFECTS OF HUMAN TUMOR NECROSIS FACTOR GENE ON THE PHOTOSYNTHETIC ACTIVITY OF ANABAENA SP. PCC 7120

Peng Guohong, Chen Bei, Shi Dingji¹, zhang Haixia and Tseng Chengkui

(Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071;

¹Institute of Botany, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100093)

Abstract The foreign genes have expressed in cyanobacteria, since the molecular biology and gene engineering have developed. This make it possible to analyze the effects of foreign gene on the photosynthesis of cyanobacteria cells. Three types of cells, wild type cells of *Anabaena* sp. PCC 7120, and its transgenic cells To1 and To2, which came from two different transforming systems, were used in this work. It showed that the growth rates of transgenic cells were smaller than those of the wild type. The saturation light intensity of transgenic cells was $480\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ which was similar to that of wild type cells. The maximum oxygen evolution rate was about $360\text{umolO}_2/\text{mg Chl}\cdot\text{hr}$. The absorption spectra showed that all of them had the chl a, carotenoid and phycocyanin. The phycocyanin content in one type of transgenic cells (To2) was much higher than that of wild type cell and To1. The low temperature fluorescence emission spectra results displayed that the energy transfer from phycobiliprotein to photosystem I in transgenic cells was decreased, and the effects were also different in two types of transgenic cells.

Key words Tumor necrosis factor- α , Growth curves, Fluorescence emission spectra, Absorption spectra.