

高温和红光诱导的鱼腥藻 7120 短藻丝体中 TNF- α 基因表达效率的提高*

欧阳叶新^{1,2,3}, 施定基¹, 钟 晖⁴, 梁承邺², 李振甲⁴, 胡鸿钧³

(1 中国科学院植物研究所, 北京 100093; 2 中国科学院华南植物研究所, 广州 510650;

3 中国科学院武汉植物研究所/武汉植物园, 武汉 430074; 4 中国人民解放军总医院, 北京 100853)

摘 要: 目前解决外源基因在蓝藻中低效表达的主要策略是改进供体 DNA 元件。这项工作尝试改变受体系统生理状态, 研究对外源基因表达效率的影响。以前已经报道用高温(45℃)和红光处理鱼腥藻 7120 (*Anabaena* sp. PCC7120) 可以诱导其形成短藻丝体, 这里报道以此作为受体细胞, 将构建的含重组人肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 基因的穿梭表达载体 pKT-TNF 通过三亲接合转移法进行转化。红光和高温诱导形成的短藻丝体中, TNF- α 基因接合转移效率为在正常营养藻丝中的 5~6 倍, Southern 杂交结果证明 pKT-TNF 已在受体细胞中复制。Western 印迹表明 TNF- α 基因已在受体系统中表达, 放射免疫测定结果显示在短藻丝体中的表达效率提高到在正常营养藻丝中的 4~5 倍。这可能为提高外源基因在丝状蓝藻中的表达效率提供了一条新途径。此外, 研究还分析了人 TNF- α 基因密码子使用偏向性对在鱼腥藻 7120 中表达效率的影响。

关键词: 人肿瘤坏死因子 α 基因; 红光; 高温; 接合转移效率; 表达效率; 鱼腥藻 7120

中图分类号: Q949.22

文献标识码: A

文章编号: 1000-470X (2003)04-0301-07

Elevating Expression of Human Tumor Necrosis Factor Alpha Gene in *Anabaena* sp. PCC7120 Short Filaments Induced by High Temperature and Red Light

OU YANG Ye-Xin^{1,2,3}, SHI Ding-Ji¹, ZHONG Hui⁴, LIANG Cheng-Ye²,
LI Zhen-Jia⁴, HU Hong-Jun³

(1. Institute of Botany, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100093, China;

2 South China Institute of Botany, The Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510650, China;

3 Wuhan Botanical Garden/Wuhan Institute of Botany, The Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430074, China;

4 The General Hospital of Chinese People's Liberation Army, Beijing 100853, China)

Abstract: The strategies for improving the expression efficiency of foreign genes in cyanobacterial hosts are, so far, focusing on modifying donor DNA elements. This work described here was an attempt to physiologically change host systems and see how they affected the expression efficiency of foreign genes in cyanobacteria. Our previous work presented that filamentous cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC7120 cells induced by high temperature and red light can generate short filaments (S-HT and S-RL, respectively) with photosynthetic activities that has the ability to normally differentiate into vegetable filaments. We transferred here a foreign gene (human tumor

收稿日期: 2002-11-27, 修回日期: 2003-01-24.

基金项目: 国家海洋 863 项目资助 (819-04-11); 中国科学院武汉植物研究所所长基金支持。

作者简介: 欧阳叶新 (1965-), 男, 博士。主要从事遗传学和藻类分子生物学研究。现通讯地址: Dept of Biology & Microbiology, University of Wisconsin, Oshkosh 54901 USA.

* 本工作主要在中国科学院植物研究所光合作用中心完成。

necrosis factor- α , hTNF- α) into these short filaments. A shuttle expression vector pKT-TNF harboring human TNF- α gene was constructed and transconjugated into the cells of S-HT, S-RL and the normal vegetative filaments (control) by triparental conjugal mating, respectively. The data showed that the transconjugative efficiencies of pKT-TNFs in the S-HT and S-RL were 500%-600% of those in the control cells. The Southern blotting confirmed TNF- α gene was replicated in transconjugative cells of S-HT, S-RT and control. The Western blotting suggested that pKT-TNFs were expressed in these cells. The radioimmunoassay (RIA) showed expression efficiency of pKT-TNFs in the S-HT and S-RL cells were about 400%-500% of those in the control cells. This might provide a novel potential avenue to improve the expression efficiency of foreign genes in filamentous cyanobacteria. In addition, we also analyzed the effect of genetic code bias of human TNF- α gene on its expression in *A. nabaena* sp. PCC7120.

Key words: hTNF- α gene; Red light; High temperature; Transconjugative efficiency; Expression efficiency; *A. nabaena* sp. PCC7120

迄今, 外源基因已经在一些模式蓝藻中表达成功^[1], 为利用转基因蓝藻进行生物防治^[2-4]、解决环境污染问题^[5-8]和制备基因工程药物^[9, 10]等带来了广阔前景。然而, 外源基因在蓝藻中表达效率不高, 限制了蓝藻基因工程在实际中的应用。真核基因在原核的光合蓝藻中的转化和表达与多种因素有关, 为提高外源基因在蓝藻中的转化和表达效率, 通常多采用改进供体 DNA 元件^[3, 4, 7-9, 11], 但很少有涉及改善受体细胞本身的报道^[12]。

人肿瘤坏死因子是迄今发现能直接杀死肿瘤细胞的一类细胞因子, 有希望发展成为新的抗癌药物。丝状蓝藻鱼腥藻 7120 (*A. nabaena* sp. PCC7120) 是一类多细胞原核生物, 其细胞之间排列紧密, 细胞外被胶质鞘^[13]。我们推测外源基因在鱼腥藻 7120 中的转化和表达除与供体 DNA 相关外, 可能也与其不同生理状态有关。为了验证其可能性, 我们尝试改变鱼腥藻 7120 生理状态检测是否能改善外源基因转化和表达。光和温度是蓝藻较为敏感的外界环境因子, 红光和高温诱导可引起蓝藻的结构和生理变化^[14]。我们以前曾报道高温(45℃)和红光可以诱导鱼腥藻 7120 形成具有光合特性的短藻丝体^[15], 本研究报导以这些短藻丝体作为外源基因转化的受体, 一定程度上提高了外源基因的转化和表达效率, 这可能为外源基因在其它蓝藻中的转化和表达效率提供借鉴, 也可能成为改善外源基因在丝状蓝藻中表达效率的新途径。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 蓝藻品系、大肠杆菌和质粒

藻 7120 野生型 (*A. nabaena* sp. PCC7120) 来自法国巴斯德研究所; *E. coli* HB 101 由中国科学院植物研究所光合作用实验室保存; 质粒 pKT210, pRL 528 (辅助质粒) 和 RP₄ (接合质粒) 由美国密执安州立大学国家植物学实验室 Wolk CP 教授赠送, pRL-TC (含 TNF- α 基因) 由中国科学院植物研究所光合作用实验室构建^[10]。

1.1.2 培养基和培养条件 *E. coli* 于 LB (Luria Bertani) 培养基中 37℃ 振荡培养。丝状蓝藻鱼腥藻 7120 采用 BG-11 (无氮) 培养基^[13], 置于 Gallekamp 光照控温旋转培养箱中培养, 转速为 120 r/min, 培养温度 (28 ± 2)℃, 光照强度约为 80 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 。实验所用抗生素浓度如下: 氨苄青霉素 (Amp), 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$; 链霉素 (Sm), 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$; 四环素 (Tc), 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$; 氯霉素 (Cm), 85 $\mu\text{g}/\text{mL}$; 卡那霉素 (Km), 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

1.1.3 试剂 各种限制性内切酶和 T₄ DNA 连接酶分别购自 Boehringer 公司和 Promega 公司, 抗生素为 Sigma 公司分装产品, 放射性同位素标记系统 (Prime-a-gene[®] Labelling system) 购自 Promega 公司, 尼龙膜为 Millipore 公司产品。

1.2 方法

1.2.1 高温和红光诱导鱼腥藻 7120 形成短藻丝体 参照文献 [12, 15], 在红光强度为 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 下处理 24 h; 高温处理选用 45℃, 其他条件同正常培养条件。短藻丝体 (长度约 3~20 个细胞) 通过差速离心而纯化, 以此作为外源基因转化受体。正常细胞及短藻丝体细胞数均采用血细胞计数法进行计数。

1.2.2 DNA 操作方法 大肠杆菌感受态细胞的制备及质粒 DNA 的制备、酶切、连接、转化等均参照

Sam brook 等^[16]的方法。

1.2.3 细菌与蓝藻的接合转移及筛选 参照 Elhai 和 Wolk^[17]的方法, 以 pRL 528 为辅助质粒。

1.2.4 蓝藻质粒的抽提 参照 Engwall 和 Gen-del^[18]的方法。

1.2.5 Southern 杂交鉴定 按 Liu 等^[10]的方法进行。

1.2.6 SDS-PAGE 和 Western 印迹鉴定 离心收集对数生长中期的蓝藻细胞, 经洗涤后重悬于 0.1 mol/L Tris-HCl (pH 8.0, 0.20 mmol/L DTT), 冰水浴中超声波破碎细胞(光学显微镜下镜检细胞破碎程度), 4 离心后取上清液, 加入 SDS-PAGE 上样缓冲液, 沸水浴 1 min, 进行 SDS-PAGE (5% 浓缩胶, 12% 分离胶), 恒压 90 V、2.5 h 后在 4 下进行膜转移(上限 20 V, 30 mA) 16 h, 再进行单克隆抗体杂交及显色反应, 参照 Liu 等^[10]的方法进行。

1.2.7 放射性免疫分析(RIA) 离心收集细胞培养物, 超声波破碎细胞后离心取上清。测试时做不同浓度梯度稀释。采用中国人民解放军总医院生产的 TNF- α 作为标准 TNF 用于 RIA kit 检测。标准 TNF 用¹²⁵I 标记, 测定的有关参数及标准曲线和样品浓度均预先编制程序(详细操作见试剂盒说明)。通过液相竞争法, 在自动 γ 计数器上测定放射活性, 可溶性蛋白质含量测定参考文献[19]。

1.2.8 人 TNF- α 基因密码子偏向性分析 将人 TNF- α 基因序列中的密码子与鱼腥藻 7120 的常用密码子表进行比较, 由北京大学生命科学学院赵进东教授帮助分析。

2 结果和分析

2.1 穿梭表达载体 pKT-TNF 的构建

构建过程见图 1。载体 pKT210 是由广宿主质粒 RSF1010 衍生而来, 能在 *E. coli* 和多种蓝藻中复制^[20], 质粒 pRL-TC 中含有从人的基因文库中克隆的重组 TNF- α cDNA 片段^[10], 并克隆到来源于 *Am aratan hybrid* 叶绿体强启动子 *PpsbA* 下游。质粒 pKT210 和 pRL-TC 均采用 PstI 和 EcoRI 双酶切, 前者得到含 RSF1010 和 Sm 抗性标记(约 8.4 kb)的片段, 后者得到带启动子的目的基因 TNF- α cDNA (约 800 bp) 的片段。经 T₄DNA 连接酶连接后, 分别在含 Cm (85 μ g/mL) 和 Sm (25 μ g/mL) 的 LB 平板上, 筛选仅抗 Sm 而不抗 Cm 的重组转化子, 酶切鉴定证实其重组转化子 pKT-TNF 含有约 800 bp 的目的基因 TNF- α cDNA 片段(图 2)。

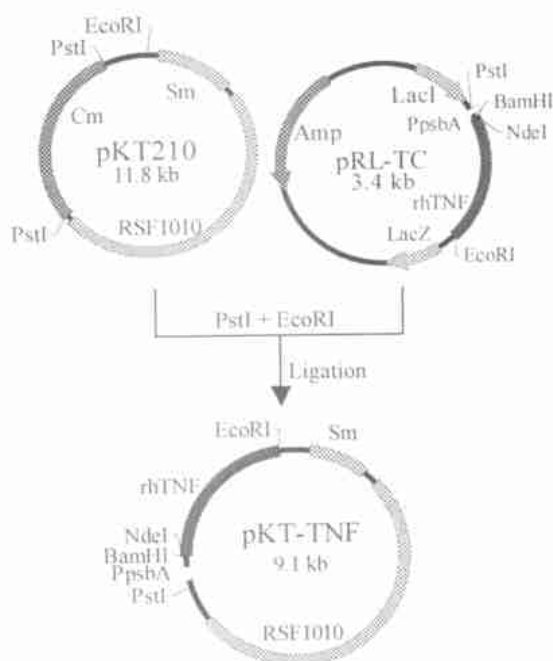
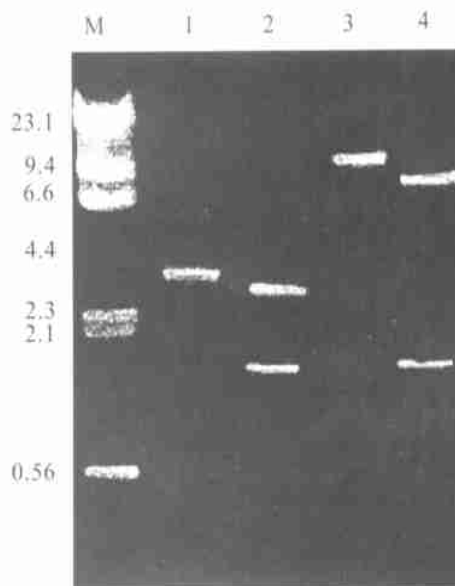


图 1 穿梭表达载体 pKT-TNF 的构建

Fig 1 The construction of the shuttle expression vector pKT-TNF



M. ADNA digested with EcoRI; 1 pRL-TC digested with EcoRI; 2 pRL-TC digested with EcoRI and PstI; 3 pKT-TNF digested with EcoRI and PstI; 4 pKT-TNF digested with EcoRI

图 2 穿梭表达载体 pKT-TNF 的酶切凝胶电泳图谱

Fig 2 Electrophoresis of the shuttle expression vector pKT-TNF digested with various restriction endonucleases

2.2 鱼腥藻 7120 的接合转移

用红光和高温 (45 $^{\circ}$ C) 诱导 *A. nabaena* sp. PCC7120 所形成的短藻丝体(分别简称为 S-RL 和

S-HT) 作为受体细胞, 将含目的基因的穿梭表达载体 pKT-TNF, 通过三亲接合转移方法转化上述短藻丝体后用 Sm 筛选, 得到阳性转化子, 并计算接合转移效率。结果表明: 无论转基因宿主是正常营养藻丝体细胞(对照), 还是 S-RL 和 S-HT, 都显示出相

同的规律, 即藻菌混合比例不同, 转化效率差别较大, 其中以藻菌比为 1 : 10 时, 接合转移的转化效率最高(见表 1)。另外, 红光和高温诱导鱼腥藻 7120 形成的短藻丝体细胞(S-RL, S-HT)与对照的转化效率相比, 分别提高了近 4~ 5 倍。

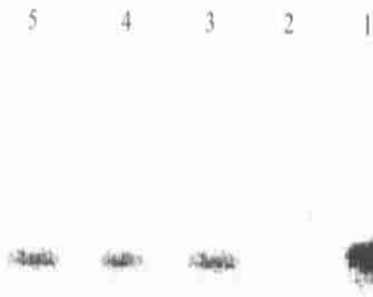
表 1 红光和高温对 pKT-TNF 在鱼腥藻 7120 中转化效率的影响*
Table 1 Effects of red light and high temperature (45 ℃) on the transconjugative efficiency of pKT-TNF in *A. nabaena* sp. PCC7120*

Ratio of Cyanobacterium Bacterium	Transconjugative efficiencies (× 10 ⁻⁵)		
	Control	S-RL	S-HT
1 : 10	1.19 ± 0.15 (100%)	7.08 ± 0.21 (595%)	5.73 ± 0.16 (482%)
1 : 1	0.69 ± 0.12 (100%)	2.12 ± 0.19 (307%)	2.06 ± 0.15 (299%)
10 : 1	0.34 ± 0.11 (100%)	0.87 ± 0.11 (260%)	0.83 ± 0.21 (240%)

* Transconjugative efficiency= The number of transconjugants/the total cell number Control Normal vegetative cells; S-RL. Short filaments induced by red light; S-HT. Short filaments induced by high temperature

2.3 Southern 印迹鉴定

图 3 显示的是 Southern 印迹鉴定结果, 含有人 TNF-α 基因的质粒 pRL-TC 和 pKT-TNF 均表现出明显的印迹信号带, 说明人 TNF-α 基因可以通过接合转移方法转入鱼腥藻 7120 的短藻丝体中。由此可以证实: 含目的基因的穿梭表达质粒 pKT-TNF 在不同处理的鱼腥藻 7120 宿主细胞中接合转移后已复制。由于上样量基本相同, 在质粒 pRL-TC 中的印迹信号比 pKT-TNF 强, 说明前者的含量高, 这似乎与 pRL-TC 属于高拷贝质粒结果一致。因此,



1 pRL-TC (from *E. coli* HB101) digested with EcoRI and BamHI; 2 pKT210 (*E. coli* HB101) digested with EcoRI; 3 pKT-TNF (from transgenic *A. nabaena* sp. PCC7120 in normal vegetative cells) digested with EcoRI and PstI; 4 pKT-TNF (from transgenic *A. nabaena* sp. PCC7120 in S-RL) digested with EcoRI and PstI; 5 pKT-TNF (from transgenic *A. nabaena* sp. PCC7120 in S-HT) digested with EcoRI and PstI

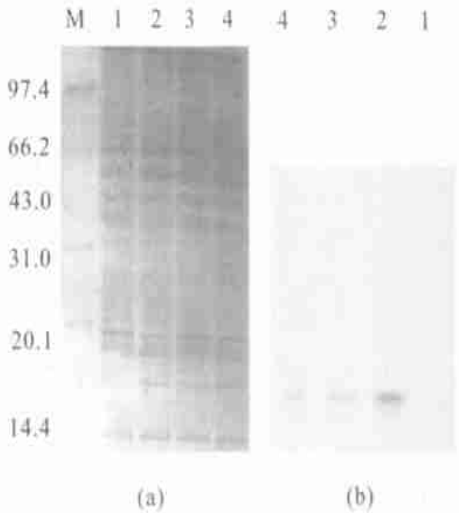
图 3 转 TNF-α 基因鱼腥藻 7120 的 Southern 印迹鉴定

Fig. 3 Southern blotting pattern of transgenic *A. nabaena* sp. PCC7120 obtained using EcoRI/BamHI hTNF fragment from pRL-TC as the probe

供体 DNA 的选择, 特别是质粒 DNA 的拷贝数直接影响了外源基因在宿主中的表达效率, 这支持了目前所得到的结论^[7-9, 11]。

2.4 SDS-PAGE 和 Western 印迹鉴定

如图 4: a 结果显示, 转基因藻鱼腥藻 7120 (Control, S-RL 和 S-HT) 中明显比野生型中多出一条约 17KD 的 特异表达蛋白带, 其分子量大小和位置与 TNF-α 的单体分子量一致。用抗人 TNF-α 单



M. Weight mass standard of protein (kDa); 1 Wild type of *A. nabaena* sp. PCC7120; 2 Control (transgenic *A. nabaena* sp. PCC7120 in normal vegetative cells); 3 S-RL (transgenic *A. nabaena* sp. PCC7120 in S-RL); 4 S-HT (transgenic *A. nabaena* sp. PCC7120 in S-HT)

图 4 转 TNF-α 基因鱼腥藻 7120 的 SDS-PAGE (a) 和 Western 印迹 (b)

Fig. 4 SDS-PAGE (a) and western blotting (b) of transgenic *A. nabaena* sp. PCC7120

克隆抗体(辣根过氧化物酶标记)进行Western 杂交分析(如图 4: b 所示), 结果表明各种转基因藻鱼腥藻 7120 细胞中的特异表达蛋白具有和 TNF-α 单克隆抗体结合的抗原性, 这证明所构建的穿梭表达载体质粒 pKT-TNF 在不同处理的鱼腥藻 7120 细胞(Control, S-RL 和 S-HT)中表达了 TNF-α

2 5 放射性免疫分析

放射免疫分析方法是目前普遍采用的对 TNF-α 含量进行较为精确定量的一种方法, 我们采用此法对转 TNF-α 基因鱼腥藻 7120 中表达的 TNF-α 进行定量。经多次放射免疫分析测定, 确证了 TNF-α 基因在鱼腥藻 7120 中的稳定表达, 结果见表 2。从中可看出, 经红光或高温诱导的短藻丝体作为受体得到的转基因鱼腥藻 7120 细胞中外源基因的表达效率比正常营养藻丝体中的提高了 3~ 4 倍。

表 2 红光和高温对 TNF-α 基因在鱼腥藻 7120 中表达效率的影响

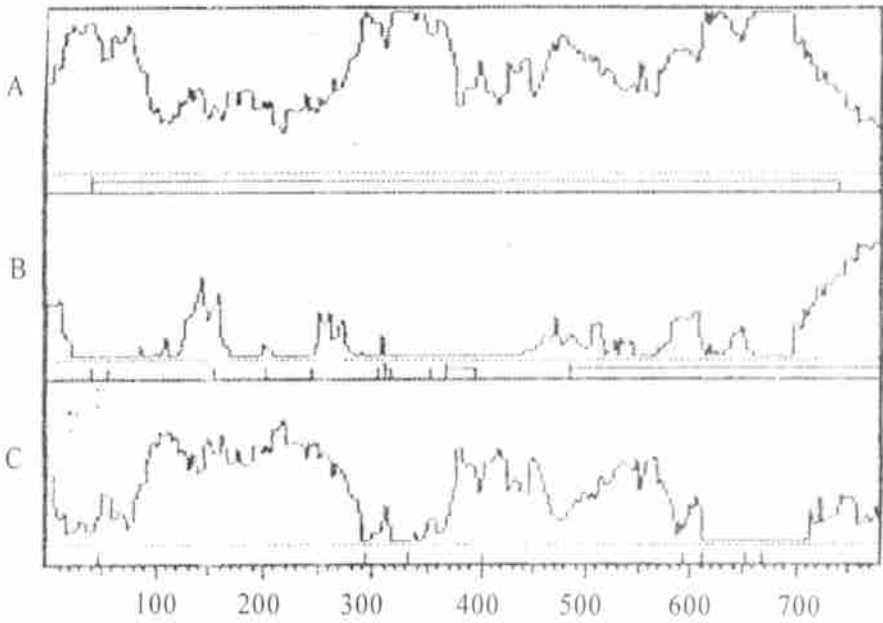
Table 2 Effects of red light and high temperature (45) on the expression efficiencies of TNF-α gene in *A nabaena* sp. PCC7120

Recipient cells*	Contents of TNF-α (μg/mg soluble total protein)
W T	0
Control	1.55 ± 0.26(100%)
S-RL	7.52 ± 0.43(485%)
S-HT	6.29 ± 0.36(406%)

* W.T. Wild type of *A. PCC7120*; Control Transgenic *A. PCC7120* in normal vegetative cells; S-RL. Transgenic *A. PCC7120* in S-RL; S-HT. Transgenic *A. PCC7120* in S-HT.

2 6 密码子偏向性对外源基因表达的影响

将人 TNF-α 基因(cDNA) 序列密码子使用情况与鱼腥藻 7120 常用密码子使用情况进行比较(图5)。



A、B 和 C 代表 TNF-α cDNA 链推测的 3 种不同的读码框
A, B and C represent the TNF-α cDNA strand with three putative different kinds of open reading frame

图 5 遗传密码偏向性对人 TNF-α 基因鱼腥藻 7120 中表达的影响

Fig 5 The effect of genetic code bias of human TNF-α gene on its expression in *A nabaena* sp. PCC7120

其中, A、B 和 C 分别代表 TNF-α 基因编码链的 3 种读码方式(纵轴代表密码子使用频率相似程度, 横轴代表碱基所处位置)。显然, 只有图 A 这种读码方式是正确的转录方式, 其间没有转录终止的现象。另外还可以看出: 人 TNF-α 基因(cDNA) 序列的第 100~ 250 bp 间的密码子与鱼腥藻 7120 密码子存在较大偏向性, 这可能是影响人 TNF-α 基因在鱼腥藻 7120 表达的主要原因。尽管如此, TNF-α 基因在

鱼腥藻 7120 仍能进行有效的表达, 这为利用鱼腥藻 7120 产业化生产人 TNF-α 药物提供了可能性。

3 讨论

3 1 蓝藻生物反应器的特点证明了其广阔的应用潜力

利用植物、动物作为生物反应器生产基因工程产品已有大量报道^[21, 22]。蓝藻作为生物反应器与之

相比较的优势在于其培养简便、生长迅速,生物量大,因而成本低廉;尽管外源基因在蓝藻中的表达效率比在大肠杆菌中表达效率低^[10],但却不象在大肠杆菌中那样形成包涵体,因此无需进行复杂的变性和复性处理,大大简化了下游工程^[10];同时,多数蓝藻中无内毒素,并且有些还含有许多有益的营养成分和一些具有药用价值的物质^[23]。因此,如果提高外源基因在蓝藻中的表达效率,以转基因蓝藻作为一种新型的生物反应器制备口服的基因工程药物具有大肠杆菌、植物和动物等生物反应器无法比拟的优势,因而具有广阔的应用前景。本文的研究正是对提高外源基因在蓝藻中的转化和表达效率的有益尝试。

3.2 鱼腥藻 7120 密码子使用偏向性与 hTNF- α 表达分析证明对受体系统改造仍具潜力

本研究采用的人 TNF- α 基因是从人 cDNA 文库克隆而来,其中部分片段由人工合成,以便提高在大肠杆菌中表达^[10]。对于与大肠杆菌同属原核生物的鱼腥藻 7120 是否也具有促进作用,我们分析了 hTNF- α 基因密码子在鱼腥藻 7120 中的使用情况。结果表明,密码子使用偏向性一定程度上影响了人 TNF- α 基因在鱼腥藻 7120 中的表达。因此,对外源基因直接进行改造不失为最直接、最为有效的方法,但价格过于高昂使得我们考虑对受体系统改造的可能性。同时,密码子分析说明,一定程度上人 TNF- α 基因(cDNA)序列在鱼腥藻 7120 中仍可有效表达,说明对受体系统的改造提高其有效的表达仍具有潜力,从而为利用鱼腥藻 7120 产业化生产人 TNF- α 药物提供了更大的可能性。

3.3 鱼腥藻 7120 短藻丝体对人 TNF- α 基因接合转移效率和表达效率的影响

丝状蓝藻鱼腥藻 7120 作为模式生物表达了一些有用的外源基因^[3,4,10],以及尝试提高外源基因表达效率的报道^[7-9,11],但涉及改善受体细胞本身的报道不多^[12]。由于其细胞外有胶质鞘^[13],我们推测可能会影响外源基因的接合转移效率。近来有实验证明超声波处理鱼腥藻 7120 营养藻丝,可改变细胞膜的通透性,提高外源基因接合转移效率^[12],但超声波处理对鱼腥藻 7120 藻丝体的机械损伤较大,操作处理重复性较差,而且需要过夜静置恢复^[12]。本研究利用红光和高温诱导鱼腥藻 7120 形成的具有光合作用活性的短藻丝体^[15],首次作为外源基因的转化受体,结果一定程度上增加了外源基因的接合转移效率。由于红光和高温诱导可引起蓝藻的细胞膜

和细胞超微结构变化和相应的生理变化^[14],因此我们推测这可能同超声波处理有类似的改变细胞膜的通透性机制,从而提高了外源基因的接合转移或转化效率。另外,红光和高温(45℃)处理比超声波处理温和,对藻的机械损伤较小,无需过夜静置恢复,可重复性高,在处理后可立即进行基因转移。因此,此法不失为一种较为理想的增加丝状蓝藻的接合转移或转化效率的方法。

有趣的是,高温和红光诱导短藻丝体的形成发生在接合转移试验之前,为何在接合转化子培养形成正常营养藻丝体后仍能增加人 TNF- α 基因,其机理尚不清楚。有文献报道,高温和红光均可诱导丝状蓝藻发育形成藻殖段(Homogonium)^[21,22]。在丝状蓝藻眉藻(*Calothrix*)藻殖段形成过程中,红光因影响了质体醌库的氧化还原,从而影响了光合作用和呼吸作用的电子传递^[24];而高温则可能使一种抑制藻殖段分化的其化学本质尚不清楚的物质失活从而引发藻殖段的形成^[25]。但鱼腥藻 7120 是一种实验室培养品系,据认为缺失了丝状蓝藻发育形成藻殖段这一机制^[13]。鱼腥藻 7120 本身是否存在或保留有藻殖段相关基因片段,或发育形成藻殖段的机制是否在长期实验室驯化培养过程中丢失或部分丧失,仍是个谜。而我们用红光和高温对鱼腥藻 7120 的处理是否与在眉藻等其它丝状蓝藻中诱导藻殖段形成机理类似,从而影响了转基因鱼腥藻的光合作用和呼吸作用以及其它代谢过程,尚待进一步证实。另外,外源基因在宿主中表达势必增加宿主系统的代谢负荷,红光和高温处理是否间接调控了这种代谢的平衡均也有待于进一步研究。

致谢: Southern 印迹实验在中国科学院遗传与发育生物学研究所植物发育分子生物学实验室完成,感谢陈凡博士和吴乃虎教授提供方便及无私的帮助!北京大学生命科学学院赵进东教授帮助分析了人 TNF- α 基因序列中的密码子偏向性,特此致谢!

参考文献:

- [1] Thiel T. Genetic analysis of cyanobacteria [A]. In: Bryant D A. ed. *Molecular Biology of Cyanobacteria* [M]. The Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 1994. 581-611.
- [2] Tandeau de Marsac N, Torre F, Szulmajster J. Expression of the larvicidal gene of *Bacillus sphaericus* 1593M in the cyanobacterium *Anacystis nidulans* R2 [J]. *Mol Gen Genet*, 1987, 209: 396-398.
- [3] Xu X D, Kong R Q, Hu Y X. High larvicidal activity

- of intact recombinant cyanobacterium *A nabaena* sp. PCC7120 expression Gene 51 and Gene 42 of *B acillus sphaericus* sp. 2297[J]. *FEMS Microbiol lett*, 1993, **107**: 247-250
- [4] Wu X Q, Vennison S J, Liu H R, et al Mosquito larvicidal activity of transgenic *A nabaena* strain sp. PCC 7120 expressing combinations of genes from *B acillus thuringiensis* subsp. *Israelensis* [J]. *Appl Environ Microbiol*, 1997, **63**: 4971-4975
- [5] Kuritz T, Wolk C P. Use of filamentous cyanobacteria for biodegradation of organic pollutants [J]. *Appl Environ Microbiol*, 1995, **61**: 234-238
- [6] Suzuki T, Miyake M, Tokiwa Y, et al A recombinant cyanobacterium that accumulates poly-(hydroxybutyrate) [J]. *Biotech Lett*, 1996, **18**: 1047-1050
- [7] Sun J (孙军), Jin P (金苹), Xu X D (徐旭东), et al The cloning and expression of mouse metallothionein-I cDNA in cyanobacteria [J]. *Chinese Prog Biotech (生物工程进展)*, 1994, **14**: 39-42
- [8] Ren L, Shi D J, Dai J X, et al Expression of the mouse metallothionein-I gene conferring cadmium resistance in a transgenic cyanobacterium [J]. *FEMS Microbiol Lett*, 1998, **158**: 127-132
- [9] Takeshima Y, Takatsugu N, Sugiura M, et al High-level expression of human superoxide dismutase in the cyanobacterium *A nacystis nidulans* 6301 [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, **91**: 9685-9689
- [10] Liu F L, Zhang H B, Shi D J, et al Construction of shuttle expression vector of human tumor necrosis factor alpha (hTNF- α) gene and its expression in a cyanobacterium *A nabaena* sp. PCC7120 [J]. *Science in China (Ser C) (中国科学, C 辑)*, 1999, **42**: 25-33
- [11] Guo X X, Shi D J, Xu X D, et al Metal-induced expressing of mammal metallothionein-I gene in cyanobacteria to promote cadmium-binding preferences [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1999, **52**: 806-810
- [12] Elhai J, Vepriksiy A, Muro-Pastor A M, et al Reduction of conjugal transfer efficiency by three restriction activities of *A nabaena* sp. strain PCC7120 [J]. *J Bacteriol*, 1997, **179**(6): 1998-2005
- [13] Rippka R, Deruelles J, Waterburg J B, et al Generic assignments, strains histories and properties of pure culture of cyanobacteria [J]. *J Gen Microbiol*, 1979, **111**: 1-61
- [14] Campbell D, Houmard J, Tandeau de Marsac N. Electron transport regulate cellular differentiation in the filamentous cyanobacterium *Calothrix* [J]. *Plant Cell*, 1993, **5**: 451-463
- [15] 欧阳叶新, 施定基, 胡鸿钧, 等. 几种因素诱导鱼腥藻 7120 短藻丝体的形成 [J]. *武汉植物学研究*, 2001, **19**(5): 403-408
- [16] Sambrook K J, Fritsh E F, Maniatis S. Molecular cloning: A laboratory Manual [M]. 2nd ed New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 474-494
- [17] Elhai J, Wolk C P. Conjugal transfer of DNA to cyanobacteria [J]. *Method Enzymol*, 1998, **167**: 747-754
- [18] Engwall K S, Gendel S M. A rapid method for identifying plasmids in cyanobacteria [J]. *FEMS Microbiol Lett*, 1993, **114**: 179-184
- [19] Aitken A, Leamonth M. Protein determination by UV Absorption [A]. In: Walker J M. The Protein Protocols Handbook [M]. New Jersey: Human Press Inc 1996. 3-6
- [20] Bagdesarian M, Lurz R, Rüttert B, et al Specific-purpose plasmid cloning vectors, II Broad host range, high copy number, RSF1010-derived vector, and a host-vector system for gene cloning in *Pseudomonas* [J]. *Gene*, 1981, **16**: 237-247
- [21] Kazuya Yoshida, Atsuhiko Shinmyo. Transgene expression systems in plant, a natural bioreactor [J]. *J Biosci Bioeng*, 2000, **90**(4): 353-362
- [22] Smith T J. Commercial exploitation of transgenics [J]. *Biotech Advances*, 1994, **12**(4): 679-686
- [23] Apt K E, Bernhens P W. Commercial Developments in Microalgal Biotechnology [J]. *J Phycol*, 1999, **35**, 215-226
- [24] Campbell D, Houmard J, Tandeau de Marsac N. Electron transport regulates cellular differentiation in the filamentous cyanobacterium *Calothrix* [J]. *Plant cell*, 1993, **5**: 451-463
- [25] Herdman M, Rippka R. Cellular differentiation: Hormogonium and baeocytes [J]. *Method Enzymol*, 1988, **167**: 232-242, 851-853 (addendum).