

## 果糖-1,6-二磷酸醛缩酶和丙糖磷酸异构酶共表达对蓝藻 光合作用效率的影响

康瑞娟<sup>1\*</sup> 施定基<sup>2</sup> 丛 威<sup>1</sup> 马为民<sup>2</sup> 蔡昭铃<sup>1</sup> 欧阳藩<sup>1</sup>

<sup>1</sup>(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)

<sup>2</sup>(中国科学院植物研究所,北京 100093)

**摘 要** 以转高等植物 ALD 和 TPI 基因的鱼腥藻 7120 为对象,研究了 ALD 和 TPI 两个酶表达量对细胞光合固碳效率的影响。考察了初始 pH、NaHCO<sub>3</sub> 浓度和 CO<sub>2</sub> 浓度对转基因藻和野生藻生长、光合活性及无机碳亲和力的影响。结果表明,转基因藻在较高碳源浓度下,其生长速率和光合放氧活性比野生藻有显著的提高,并且可以比野生藻耐受更高的 pH。在含有 2% CO<sub>2</sub> 的空气中,转基因藻对外源无机碳的亲合力比野生藻提高了 4.06 倍。

**关键词** 果糖 1,6-二磷酸醛缩酶, 丙糖磷酸异构酶, 鱼腥藻 7120, 碳同化

**中图分类号** Q786 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3061(2004)06-0851-05

卡尔文循环(Calvin cycle)是光合碳同化的一条最重要的途径。包括一系列复杂的反应,但可简化为 3 个阶段,即羧化阶段、还原阶段和核酮糖-1,5-二磷酸(RuBP)再生阶段。在 RuBP 再生阶段,磷酸二羟丙酮在丙糖磷酸异构酶(Triosephosphate isomerase, TPI)催化下转化为 3-磷酸甘油醛,然后在果糖 1,6-二磷酸醛缩酶(Fructose-1,6-bisphosphate aldolase, ALD)催化下转化为果糖 1,6-二磷酸;ALD 是 Calvin 循环中固定 CO<sub>2</sub> 后的第一个催化由 3C 化合物转化为 6C 化合物的酶,处于第一个分支点上,同时也是控制光合作用速率的重要酶之一<sup>[1,2]</sup>。TPI 在 Calvin 循环中也占有重要地位。ALD 和 TPI 广泛存在于动植物、藻类和微生物细胞中。

Haake<sup>[3,4]</sup>等通过反意抑制表达的手段,发现适度降低胞质 ALD 酶活性后,马铃薯植株叶片的生长和光合作用被部分抑制,细胞内的糖和淀粉水平被改变。胞质 ALD 表达水平的降低导致 RuBP 的急剧减少。研究表明,ALD 对 Calvin 循环中碳代谢流的控制及 RuBP 的再生起关键作用。最近 Monsanto 公司的研究人员利用此原理在转基因植物中大量表达大肠杆菌的 *ald* 基因,使得植物生成淀粉和蔗糖的能力有所提高,从而提高作物产量<sup>[5]</sup>。

采用基因工程的手段,将光合效率较高的高等植物中编码 ALD 和 TPI 酶的基因转入蓝藻中,提高其固定 CO<sub>2</sub> 效率,使之能在较高浓度 CO<sub>2</sub> 条件下通

过强化的光合作用合成较多的生物物质,对于光合碳代谢调控机理的研究有重要的理论意义。

### 1 材料与方法

#### 1.1 实验材料

1.1.1 蓝藻:转 pRL-AT<sub>2</sub> 基因及野生型鱼腥藻 *Anabaena* sp. PCC 7120 均来自中科院植物所。

将高等植物中编码 ALD 和 TPI 这两个酶的基因串连起来,构建含有该串连基因二聚体的穿梭表达载体 pRL-AT<sub>2</sub>,转入鱼腥藻 7120 (*Anabaena* sp. PCC7120)中并成功实现上述基因活性共表达<sup>[6]</sup>。

1.1.2 试剂:各种试剂均为市售品。

#### 1.2 实验方法

1.2.1 培养基:在含氮的 BG-11 培养基<sup>[7]</sup>中添加 20mmol/L HEPES-NaOH 缓冲液(pH7.5),使得加入 NaHCO<sub>3</sub> 或 CO<sub>2</sub> 后,培养液的 pH 能够维持在适宜的范围。

1.2.2 摇床培养:在培养基中接种野生型及转基因的 *Anabaena* sp. PCC 7120,置于摇床上照光培养。温度 28~30℃,光强为 70μmol·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup>。液体培养时转速为 130r/min。转基因藻在培养基中加入 50μg/mL 的新霉素。

1.2.3 光反应器培养:反应器为自制的内环流式气升光生物反应器,总体积为 2.5 L,工作体积为 2.0 L,材质为耐热耐压的硅硼玻璃,可进行高温高压灭菌。

收稿日期:2004-05-08, 修回日期:2004-07-23。

\* 通讯作者。 Tel:86-10-82627074; Fax:86-10-62561822; E-mail: rjkang@home.ipe.ac.cn

罐体下部的夹套中可通入恒温水以维持培养温度。3 个反应器为一组,放置在控制箱内,由安装在罐体前后的光源板提供光照,每块光源板上横向平行排列着 6 支日光灯管(18W, National, 北京),光强为  $100 (\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1})$ 。通气量和  $\text{CO}_2$  浓度通过气体流量计控制,  $\text{CO}_2$  与空气定量混合后,由孔径为  $0.2 \mu\text{m}$  的空气过滤器(PALL 公司)除菌后通过进气管进入罐内。将 2.5L 气升式反应器(含 2L 培养液)在高压蒸汽灭菌锅中高温灭菌,冷却至室温,在超净台内将 150mL 种液倒入,并加入终浓度均为  $50 \mu\text{g/mL}$  的新霉素。

**1.2.4 细胞生长:**藻细胞的生长通过定时取样后测定其在 750nm 波长下的光吸收值定量反映藻细胞生物量的增加。

### 1.3 光合放氧测定

光合放氧与呼吸速率是用 Clark 型氧电极(Hansatech Ltd., U. K.)测定的。电极的反应室为 2mL 的密闭系统,其温度由 DC-1015 低温恒温槽(宁波海曙天恒仪器厂)通过循环水控制。光源为红色发光二极管,光强由电极自带的专用软件控制,通过 ORT1 型光量子计标定。

### 1.4 叶绿素浓度<sup>[8]</sup>

离心收集藻细胞,加入 3mL 甲醇,混匀后  $4^\circ\text{C}$  浸泡 6~14h, 4000r/min, 离心 10min, 取上清,测定  $A_{665}$  值。根据公式:  $\text{Chl} (\mu\text{g/mL}) = 13.9 \times A_{665}$ , 计算样品中叶绿素 a 的含量。

### 1.5 光合作用对无机碳的响应

离心收集不同培养条件下对数生长期的细胞,用无碳的 50mmol/L Tris-HCl 缓冲液(充氮气 30min 以上)洗 3 次后重新悬浮。枯竭藻细胞内储存的无机碳后,用氧电极在  $28^\circ\text{C}$ 、 $200 (\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1})$  光强下,测定各种无机碳浓度下藻细胞的光合作用速率<sup>[6]</sup>。实验数据以方程  $V = V_{\max} \times [S] / (K_m + [S])$  进行计算,得到参数  $V_{\max}$  和  $K_m$ , 其中,  $V_{\max}$  为无机碳饱和的光合速率;  $K_m$  为光合速率达到一半时所需的无机碳浓度。

## 2 结果与讨论

### 2.1 初始 pH 值对细胞生长的影响

将培养基的初始 pH 分别调为 6.5、7.5 和 8.5, 分别接种野生藻和转基因藻,置于摇床上照光培养,每天定时取样,测定其细胞增长,结果见图 1。

结果表明,转基因藻在实验设定的所有 pH 下

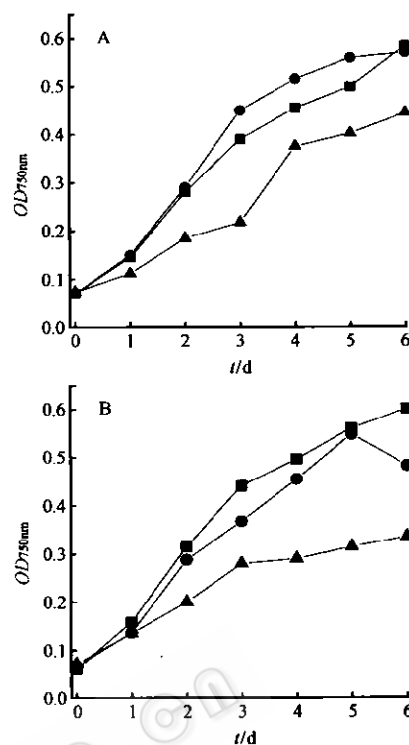


图 1 不同起始 pH 对鱼腥藻 7120 生长的影响

Fig. 1 Growth of transgenic (A) and wild type (B)

*Anabaena* sp. PCC7120 at different initial pH

in Erlenmeyer flasks (■ pH 6.5, ● pH 7.5, ▲ pH 8.5)

均能较好地生长,而野生藻在 pH 8.5 时生长受到较严重的抑制。表明转基因藻比野生藻可耐受更高的 pH 值。这一特性有利于转基因藻对  $\text{NaHCO}_3$  的利用。因为 pH 较高时,水中的无机碳多以  $\text{HCO}_3^-$  形式存在。

### 2.2 $\text{NaHCO}_3$ 浓度对细胞生长的影响

将野生藻和转基因藻分别接入含有 0, 10 和 20 mmol/L  $\text{NaHCO}_3$  的培养基,置于摇床上照光培养,每天定时取样,测定其细胞增长,结果见图 2。

由于在培养基中加入了缓冲液,因此,在整个培养过程中 pH 能够维持在适宜的范围内。由图 2 可见,  $\text{NaHCO}_3$  可以促进藻细胞的生长,但对转基因藻的作用更显著。结合图 1 的结果,可以看出,与野生藻相比,转基因藻具有更强的利用  $\text{NaHCO}_3$  的能力。

### 2.3 $\text{CO}_2$ 浓度对细胞生长的影响

将野生藻和转基因藻分别接入光生物反应器中,分别通入含有 2% 和 3%  $\text{CO}_2$  的无菌空气,通气量为  $0.4 \text{ L/min}$ ,温度恒定在  $28^\circ\text{C}$ ,照光培养,每天定时取样,测定其细胞增长,结果见图 3。

实验结果表明,  $\text{CO}_2$  对藻细胞生长的促进作用更加显著,与文献报道的结论相同<sup>[9]</sup>。这是由于

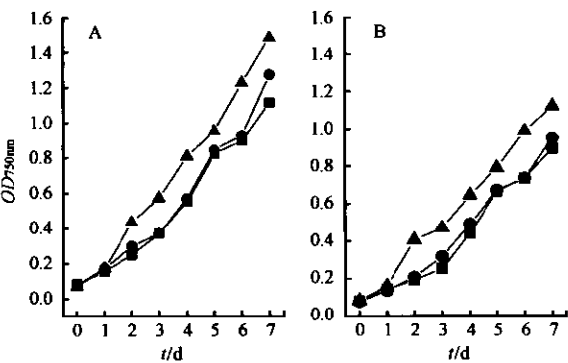


图2  $\text{NaHCO}_3$  浓度对鱼腥藻 7120 生长的影响  
Fig. 2 Growth of transgenic (A) and wild type (B) *Anabaena* sp. PCC7120 under different  $\text{NaHCO}_3$  concentrations in Erlenmeyer flasks  
(■ air, ● 10 mmol/L  $\text{NaHCO}_3$ , ▲ 20 mmol/L  $\text{NaHCO}_3$ )

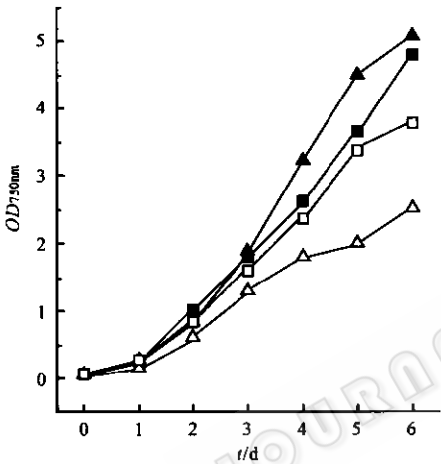


图3 不同  $\text{CO}_2$  浓度对转基因藻和野生藻生长的影响  
Fig. 3 Growth of transgenic (solid symbol) and wild type (open symbol) *Anabaena* sp. PCC7120 under different  $\text{CO}_2$  concentrations in an airlift photobioreactor  
(■ □, 2%  $\text{CO}_2$  enriched air; ▲ △, 3%  $\text{CO}_2$  enriched air)

$\text{CO}_2$  泵的  $K_m$  约为  $0.4 \sim 0.6 \mu\text{mol/L}$ , 最大转运速率约  $400 \sim 700 (\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1})$ , 而  $\text{HCO}_3^-$  泵的  $K_m$  约为  $15 \sim 80 \mu\text{mol/L}$ , 最大转运速率约  $220 (\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1})$ 。对  $\text{HCO}_3^-$  的利用需要消耗等量的  $\text{H}^+$  或排出等量的  $\text{OH}^-$ , 因而比利用  $\text{CO}_2$  需要消耗更多的能量, 这可能是蓝藻偏好吸收  $\text{CO}_2$  的原因。

转基因藻的生长速率和细胞密度随  $\text{CO}_2$  浓度的升高而增加, 但对于野生藻, 较高的  $\text{CO}_2$  浓度 (3%) 对藻细胞的生长产生了不利的影响。通过比较不同  $\text{CO}_2$  浓度对藻细胞生长的影响, 确定了 3%  $\text{CO}_2$  为较适宜的浓度, 在此条件下, 转基因藻的培养密度比空气中提高了 3.74 倍, 而野生藻仅提高了 1.2 倍。在高碳下培养的细胞密度比野生藻提高约

1 倍。  
2.4  $\text{CO}_2$  浓度对光合活性的影响  
将野生藻和转基因藻在分别通入空气和含有 3%  $\text{CO}_2$  空气的光生物反应器中培养, 取对数生长期的细胞, 用氧电极测定其光合作用活性, 结果见图 4。

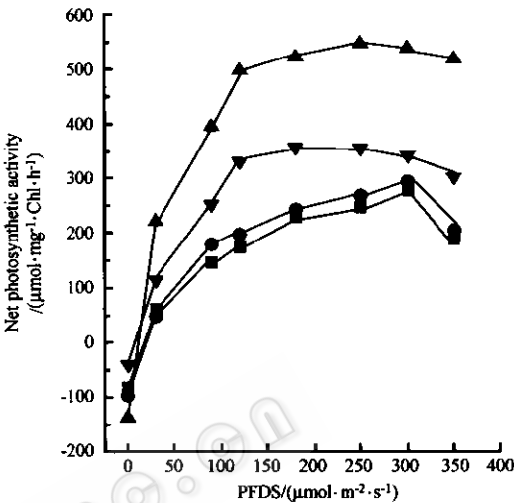


图4 不同  $\text{CO}_2$  浓度对转基因藻和野生藻光合活性的影响  
Fig. 4 Photosynthetic activities of transgenic and wild type *Anabaena* sp. PCC7120 under air and 3%  $\text{CO}_2$  enriched air aeration  
(■ transgenic cells in air ● wild type cells in air, ▲ transgenic cells in elevated  $\text{CO}_2$ ; ▼ wild type in elevated  $\text{CO}_2$ )

由图 4 可见, 在空气中转基因藻和野生藻的光合放氧几乎相同, 但在添加 3%  $\text{CO}_2$  条件下, 转基因藻的光合放氧速率比野生藻提高了 70%。

2.5 光合作用对无机碳的响应  
蓝藻细胞光合作用对无机碳 ( $\text{Ci}$ ) 的亲合力是生长条件的函数, 高  $\text{CO}_2$  条件下  $\text{HCO}_3^-$  转运系统受到抑制, 细胞对  $\text{Ci}$  表观亲合力下降, 胞内  $\text{Ci}$  累积能力显著降低<sup>[10-12]</sup>。光合作用的反应速度和  $\text{CO}_2$  的亲合性与底物  $\text{CO}_2$  间的关系, 可以参考酶反应与底物的解释方法 (Michaelis-Menten 公式) 进行解释<sup>[13]</sup>。  
取在不同  $\text{CO}_2$  浓度下生长的处于对数生长期的转基因藻和野生藻细胞, 测定其光合作用速度依赖于无机碳浓度的变化曲线, 求出最大光合作用速度和  $1/2 V_{\max}$  时的无机碳浓度, 以此衡量藻细胞对底物  $\text{CO}_2$  的亲合性。不同  $\text{CO}_2$  浓度下培养的藻细胞对外源无机碳的表观亲和常数列于表 1。

表 1 不同 CO<sub>2</sub> 浓度下培养的转基因藻和野生藻的表现亲和常数 Km(DIC) (μmol·L<sup>-1</sup>)

Table 1 The apparent photosynthetic affinity for external C<sub>i</sub> of transgenic and wild type cells (Km<sub>(DIC)</sub> μmol·L<sup>-1</sup>)

	Transgenic strain	Wild type
Air	5.92	9.67
1% CO <sub>2</sub> -enriched air	8.52	20.13
2% CO <sub>2</sub> -enriched air	9.16	46.36

表 1 的数据表明,与野生藻相比,转基因藻对外源无机碳的亲和力更高。随着 CO<sub>2</sub> 浓度的增加,两种藻细胞对外源无机碳的亲和力都有不同程度的下降,但野生藻的下降更显著。2% CO<sub>2</sub> 培养的野生藻与空气中培养的藻细胞相比,对于外源无机碳的亲和力下降了 3.79 倍,而转基因藻仅下降了 0.55 倍。在空气中转基因藻对无机碳的亲和力比野生藻高 63.34%,而在含有 2% CO<sub>2</sub> 的空气中,则提高了 4.06 倍。

### 3 结论

将高等植物中编码 ALD 和 TPI 两个酶的基因转入蓝藻中,显著增加了蓝藻细胞的光合固碳效率。在较高的 CO<sub>2</sub> 浓度下,转基因藻的生长和光合放氧速率明显高于野生藻,藻细胞对外源无机碳的亲和力有较大幅度的增加,说明 ALD 和 TPI 的过量表达促进 RuBP 的再生,从而提高了藻细胞的光合活性。

### REFERENCES (参考文献)

- [1] Iwaki T, Wadano A, Yokota A *et al.* Aldolase, an important enzyme in controlling the ribulose-1,5-bisphosphate regeneration rate in photosynthesis. *Plant Cell Physiol*, 1991, 32:1083-1091
- [2] Knowles JR. Enzyme catalysis: not different, just better. *Nature*, 1991, 350:121-124
- [3] Haake V, Zrenner R, Sonnewald U *et al.* A moderate decrease of plastid aldolase activity inhibits photosynthesis, alters the levels of sugars and starch, and inhibits growth of potato plants. *The Plant Journal*, 1998, 14(2): 147-157
- [4] Haake V, Geiger M, Walch-Liu P *et al.* Changes in aldolase activity in wild-type potato plants are important for acclimation to growth irradiance and carbon dioxide concentration, because plastid aldolase exerts control over the ambient rate of photosynthesis across a range of growth conditions. *The Plant Journal*, 1999, 17(5): 479-489
- [5] Barry GF, Cheikh N, Kishore GM. Expression of fructose 1,6 bisphosphate aldolase in transgenic plants. *Patent Application*, 1998; WO 98/58069
- [6] Ma W, Shi D, Chen H *et al.* The regulation of photosynthesis in the cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC7120 by co-overexpression of *ald*, *tpi* and *fbp* genes from higher plants. In: Fundamental knowledge of photosynthesis leading to improved plant productivity and a balanced global climate. *Proceeding of 13<sup>th</sup> International Congress of Photosynthesis*, 2004, Montréal, Canada
- [7] Castenholz RW. Culturing Methods for Cyanobacteria. In: *Methods in Enzymology*, New York, Academic Press, 1998, 167:63-93
- [8] Marker AMH. The use of acetone and methanol in the estimation of chlorophyll in the presence of phaeophytin. *Freshwater Biol*, 1972, 2:361-385
- [9] Salon C, Mir NA, Calvin DT. Influx and efflux of inorganic carbon in *Synechococcus* UTEX 625. *Plant Cell Environ*, 1996, 19:247-259
- [10] Miller AG, Espie GS, Calvin DT. Physiological aspects of CO<sub>2</sub> and HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> transport by cyanobacteria: a review. *Can J Bot*, 1990, 68: 1291-1302
- [11] Kaplan A, Badger MR, Berry JA. Photosynthesis and intracellular inorganic carbon pool in the blue green alga *Anabaena variabilis*: response to external CO<sub>2</sub> concentration. *Planta*, 1980, 149:219-226
- [12] Badger MR, Andrews TJ. Photosynthesis and inorganic carbon usage by the marine cyanobacterium *Synechococcus* sp. *Plant Physiol*, 1982, 70:517-523
- [13] Gao KS (高坤山). Research techniques and methods in characterizing photosynthetic carbon fixation by algae. *Marine Science* (海洋科学), 1999, 6:37-41

## Regulation on Photosynthetic Efficiency of *Anabaena* sp. PCC7120 by the Co-expression of two Higher Plants Genes ALD and TPI

KANG Rui-Juan<sup>1</sup>\* SHI Ding-Ji<sup>2</sup> CONG Wei<sup>1</sup> MA Wei-Min<sup>2</sup> CAI Zhao-Ling<sup>1</sup> OUYANG Fan<sup>1</sup>

<sup>1</sup> (State Key Laboratory of Biochemical Engineering, Institute of Process Engineering, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China)

<sup>2</sup> (Research Center of Photosynthesis, Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100093, China)

**Abstract** Triosephosphate isomerase (EC 5.3.1.1, TPI) and fructose-1, 6-bisphosphate aldolase (EC 4.1.2.13, ALD) were key enzymes in the Calvin cycle which plays a significant role in regulating the carbon flux through the cycle. For the regulation

Received: 05-08-2004

\* Correspondence author. Tel:86-10-82627074; Fax:86-10-62561822, E-mail: rjkang@home.ipe.ac.cn

of photosynthesis at gene level, the genes encoding ALD and TPI were transferred into filamentous, heterocystour cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC7120, which were from spinach and rice, respectively. The aim of this work was to explore the possibility that photosynthetic carbon fixation in cyanobacteria may be enhanced by increasing the cellular ALD and TPI available for the regeneration of RuBP.

In this study, cells were grown in the BG11 medium supplemented with different concentrations of  $\text{NaHCO}_3$  or  $\text{CO}_2$ . The growth parameters, photosynthesis and the apparent photosynthetic affinity for external inorganic carbon ( $\text{C}_i$ ) under different conditions were measured and compared between transgenic and wild type cells. Transgenic cells grew better than wild type cells under higher initial pH. Both cell growth and photosynthesis activities were improved under elevated  $\text{CO}_2$ , especially for transgenic cells. Under 2%  $\text{CO}_2$  enriched air, the apparent photosynthetic affinity for external  $\text{C}_i$  for transgenic cells was 4.06 times higher than that for wild type cells. These data indicated that the overexpress of foreign ALD and TPI affected the photosynthetic carbon fixation process through the accelerating of carbon flux.

**Key words** Fructose-1, 6-bisphosphate aldolase, Triosephosphate isomerase, *Anabaena* sp. PCC7120, photosynthetic carbon fixation