

转小鼠金属硫蛋白- 基因聚球藻 7002 的生长潜力分析

曾文炉^{1,2*} 赵飞飞¹ 曹照根¹ 茹炳根¹

(1. 北京大学生命科学学院 蛋白质工程及植物基因工程国家重点实验室 北京 100871)
(2. 南开大学环境科学与工程学院 天津市城市生态环境修复与污染防治重点实验室 天津 300071)

摘 要: 以野生聚球藻 7002 为对照, 从室温吸收光谱、光合放氧速率、生长动力学参数以及气升式光生物反应器中的生长特性阐述了转小鼠金属硫蛋白- 基因聚球藻 7002 的生长优势和培养潜力。结果表明: 转 MT 聚球藻室温可见光光谱吸收峰比野生藻略高; 最大净光合速率和饱和光强比野生藻高, 呼吸速率和补偿光强比野生藻低; 转 MT 聚球藻摇瓶培养的最大细胞浓度为野生藻的 1.74 倍, 具有较高的细胞生长速率; 气升式光生物反应器有利于转 MT 基因聚球藻生长潜力的发挥。

关键词: 小鼠金属硫蛋白- , 聚球藻 7002, 氧电极, 吸收光谱, 生长动力学

Preliminary Studies on the Growth Potential of Transgenic *Synechococcus* sp. PCC 7002 with Mouse Metallothionein-I Gene

ZENG Wen-Lu^{1,2*} ZHAO Fei-Fei¹ CAO Zhao-Gen¹ RU Bing-Gen¹

(1. The National Laboratory of Protein Engineering and Plant Genetic Engineering, College of Life Sciences, Peking University, Beijing 100871)
(2. College of Environmental Science and Engineering, Tianjin Key Laboratory of Environmental Remediation and Pollution Control, Nankai University, Tianjin 300071)

Abstract: The growth predominance and culturing potential of transgenic *Synechococcus* sp. PCC 7002 with mouse metallothionein- gene are characterized and expatiated by room temperature absorption spectra, photosynthetic oxygen evolution rate, growth kinetic parameters. The results show that the spectral absorption, maximum net photosynthetic rate and saturated light intensity of transgenic *Synechococcus* sp. PCC 7002 are higher than wild strain, whereas its the respiration rate and compensating light intensity are lower than wild strain. The transgenic cells exhibit a higher growth rate, and the maximum cell concentration is 1.74 times higher than wild ones when cultured in shaking flask. The air lift photobioreactor is suitable for bringing its growth potential into play.

Keywords: Mouse Metallothionein- , *Synechococcus* sp. PCC 7002, Oxygen Electrode, Absorption Spectrum, Growth Kinetics

基金项目: 国家第三十三批博士后科学基金(No.2003033079)

本实验得到的结果, 其知识产权归北京大学所有

* 通讯作者: Tel: 022-66229527; 信箱: zengwl2007@hotmail.com

收稿日期: 2007-04-05; 接受日期: 2007-04-30

金属硫蛋白(Metallothionein, MT)是一类低分子量、富含半胱氨酸的小分子蛋白。自 1957 年被发现以来, 因其具有多种复杂多样的生理活性和功能, 而受到广泛关注。研究表明, 金属硫蛋白在生物体内, 不仅参与必需金属元素如 Zn、Cu 等的储存、运输及代谢^[1], 还具备清除自由基^[2]、抗辐射^[3]、参与激素调节增进机体对外界刺激的应激反应^[4]和重金属解毒作用^[5-6]。尤其值得关注的是, 由于其分子结构的特异性, 金属硫蛋白可特异、稳定、高效地结合多种金属, 尤其是重金属如 Cd^{2+} 、 Hg^{2+} 、 Pb^{2+} 等, 因而具有重要的环保价值。而利用基因工程手段, 将转金属硫蛋白基因转入适应性强、分布广泛的微藻细胞, 将有效地强化微藻对重金属废水的净化潜力, 也为生物工程技术在环境保护上的应用开辟新的思路。

北京大学生命科学学院蛋白质工程及植物基因工程国家重点实验室经过多年的研究, 已相继构建得到了类型多样、用途各异的转金属硫蛋白基因蓝藻^[7-11]。但在将其应用于实际的重金属废水处理之前, 除需考察其对重金属的净化效能外, 还需研究其生长和培养潜力, 以及大规模产业化高密度培养的可能。

由于外源基因的转入, 藻细胞的代谢负荷增加, 往往导致其生长特性发生改变。目前国内外在这方面的研究主要涉及外源基因本身对藻细胞生长习性的影响, 或环境条件(如营养物, 光强)对转基因藻类基因表达产物的影响^[12-14]。而有关转小鼠金属硫蛋白- 基因(mMT-)聚球藻 7002 的报道不多^[15]。本文以野生聚球藻 7002 为对照, 从室温吸收光谱、光合放氧以及生长动力学特性等方面阐述和表征转小鼠金属硫蛋白- 基因聚球藻 7002 的生长和培养潜力, 以期为后续的优化培养和产业化应用提供依据。

1 材料与方法

1.1 藻种

实验所用的转小鼠金属硫蛋白基因(mMT-I)聚球藻 7002 (*Synechococcus* sp. PCC 7002)由北京大学生命科学学院蛋白质工程及植物基因工程国家重点实验室构建得到^[15]。

1.2 培养基及培养条件

培养基采用 Medium A^[16]。

摇瓶培养: 根据不同实验的设计要求, 将适量的对数期藻种细胞接种到 250 mL 三角瓶, 置于恒温光照摇床(型号 HZQ-R, 哈尔滨东联电子技术开发

有限公司)中培养, 条件为 150 r/min, 30 ℃, 光强 $60.5 \mu\text{mol photon m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 。每隔 24 h 取样测定细胞浓度, 直至生长达到稳定期。

光生物反应器培养: 在自制的 2.0 L 内循环气升式光生物反应器进行。实验条件为: 取处于指数生长期的藻种细胞接种, 接种量以初始 OD 值达到 0.02~0.05 为宜。采用 Medium A 培养基, 培养液体积 1.5 L, 反应器表面光强 $96.7 \mu\text{mol photon m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 温度控制在 30 ± 1 ℃, 循环气体(空气)流量为 20 L/h。每隔 24 h 取样测定细胞浓度, 直至生长达到稳定期。

1.3 细胞生物量浓度

细胞生物量浓度以光密度值(OD_{750})表示。测定方法: 待测定藻液经离心或过滤后, 以新鲜培养液补充至相同体积。然后以新鲜培养液作对照, 测定藻液在 750 nm 处的吸光值 OD_{750} 。

1.4 藻细胞室温可见光吸收光谱

将不同培养条件下的对数生长期藻细胞样品调成大致相同的浓度, 利用 752 型分光光度计在室温下扫描测定在不同波长(λ)下的光吸收(OD_{λ}), 计算相对吸收值 $R(OD_{\lambda}/OD_{750})$ 。

1.5 光强

光强(I)由 FGH-1 光合有效辐射计测定, 也可测定出照度值后将其换算为光辐射能流值(张浩嫻. 光辐射照度在反应器中的分布及光质对黄花蒿发根培养生产青蒿素影响的研究. 北京: 中国科学院化工冶金研究所硕士学位论文, 1998, 23-65)。

$$1 \frac{\text{W}}{\text{m}^2} \approx 5 \frac{\mu\text{mol photon}}{\text{m}^2 \cdot \text{s}} \approx 250 \text{Lux}$$

1.6 藻细胞光合和放氧速率

利用氧电极法(DW2/2 型, 英国 Hansatech 公司), 数据记录由 OxyLab 程序完成, 测定方法同王军^[17]。

2 结果与讨论

2.1 野生藻和转 MT 聚球藻细胞的室温可见光光谱

野生和转 MT 聚球藻 *Synechococcus* sp. PCC 7002 的室温可见光吸收光谱见图 1。从图中可见三个明显的吸收峰, 分别对应于叶绿素 a (440 nm, 680 nm)和藻胆色素(630 nm), 另有 2 个较弱的小肩峰, 对应于类胡萝卜素(490 nm)和藻红素(575 nm)。聚球藻在被导入其他外源基因(如肿瘤坏死因子- α)后, 其室温可见光光谱的表现与此类似(康瑞娟等. 外源基因对聚球藻 7002 光合作用的影响. 昆明: 中国藻类学会第十一次学术讨论会论文摘要集, 2001)。

<http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn>

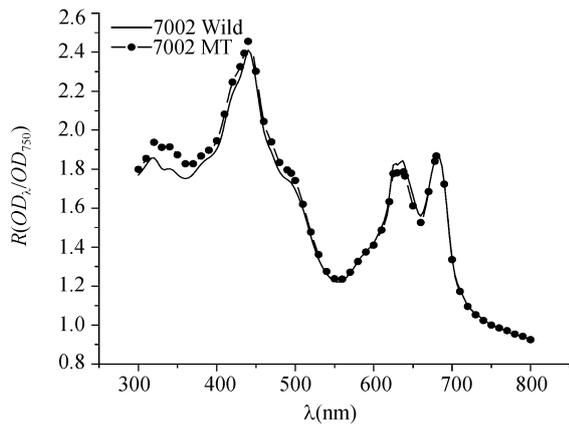


图 1 野生和转 MT 聚球藻 7002 细胞的光自养室温可见光谱

Fig. 1 Absorption spectra of wild and transgenic *Synechococcus* sp. PCC 7002 cells at room temperature

此外,从图中可以看出,转 MT 聚球藻在三个峰值处的光吸收比野生藻略高,这与所导入的是一个与光合作用有关的基因这一事实相符合,同时也预示着转 MT 聚球藻细胞的捕光效能和生长将可能优于野生藻。

2.2 野生藻和转 MT 聚球藻细胞的光合放氧速率

利用氧电极测得野生藻和转 MT 藻细胞的光合放氧曲线如图 2 所示。结果表明,转 MT 聚球藻的光合放氧速率大于野生藻。拟合得到的光合放氧速率动力学参数(表 1)也表明,转 MT 聚球藻的最大净光合速率(P_m)和饱和光强(I_k)均比野生藻高,而呼吸速率(R_d)和补偿光强(I_c)却比野生藻低,这再次证明转 MT 聚球藻具有比野生藻更优越的生长潜力。

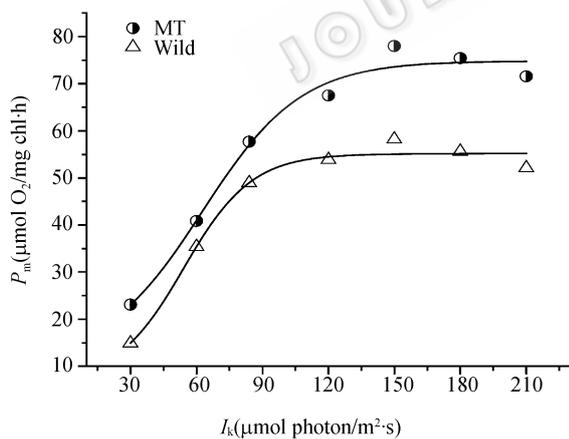


图 2 野生和转 MT 聚球藻的光合放氧活力

Fig. 2 Photosynthetic oxygen evolution rate of wild and transgenic *Synechococcus* sp. PCC 7002

2.3 野生藻和转 MT 聚球藻的摇瓶生长特性比较

利用摇瓶,将野生和转 MT 聚球藻 *Synechococcus* sp. PCC 7002 在同样条件下(Medium

表 1 聚球藻在 Medium A 中生长其光合作用参数
Table 1 Photosynthetic parameters of wild and transgenic *Synechococcus* sp. PCC 7002

Parameters	MT	Wild
$P_m \left(\frac{\mu\text{mol O}_2}{\text{mg chl} \cdot \text{h}} \right)$	84.070	77.928
$R_d \left(\frac{\mu\text{mol O}_2}{\text{mg chl} \cdot \text{h}} \right)$	6.752	21.942
$I_k \left(\frac{\mu\text{mol photon}}{\text{m}^2 \cdot \text{s}} \right)$	92.018	76.178
$I_c \left(\frac{\mu\text{mol photon}}{\text{m}^2 \cdot \text{s}} \right)$	6.841	16.737

A, 150 r/min, 30 , 光强 $65.05 \mu\text{mol photon}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 进行批式培养,得到细胞浓度(OD_{750})随培养时间的变化曲线,如图 3 所示。从中可以看出,在批式培养过程中,转 MT 聚球藻和野生藻所能达到的最大细胞浓度分别为 4.79 和 2.76,前者为后者的 1.74 倍。可见,两者在生长潜力方面确实存在一定差异,这可能与 mMT- 基因的转入改变细胞的生理生化特性有关,具体原因有待进一步分析。

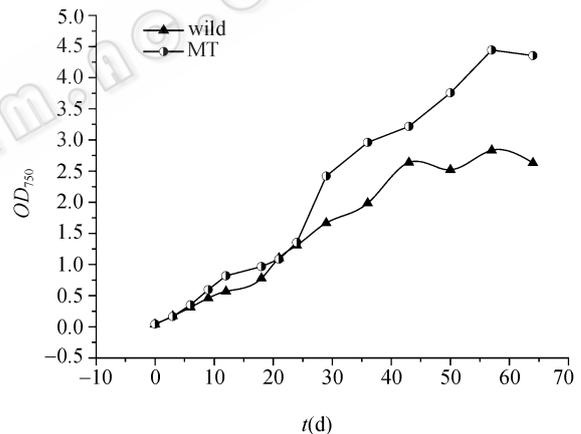


图 3 野生和转 MT 聚球藻细胞浓度随培养时间的变化

Fig. 3 Cell concentration of wild and transgenic *Synechococcus* sp. PCC 7002 as a function of culture time

利用细胞比生长速率的定义,以及 Logistic 方程对细胞浓度实验数据进行拟合,分别得到细胞的生长速率和比生长速率曲线,见图 4 和图 5。可见,不但转 MT 聚球藻的最大细胞生长速率($0.093 OD_{750}/\text{d}$)也比野生藻($0.078 OD_{750}/\text{d}$)高,其比生长速率($0.256/\text{d}$)也比野生藻($0.200/\text{d}$)高,这同样预示着转 MT 聚球藻将比野生藻具有更明显的生长优势。

$$OD_{750}^{MT} = \frac{4.790}{1 + 8.425 \exp^{-0.078(10.961-t)}}$$

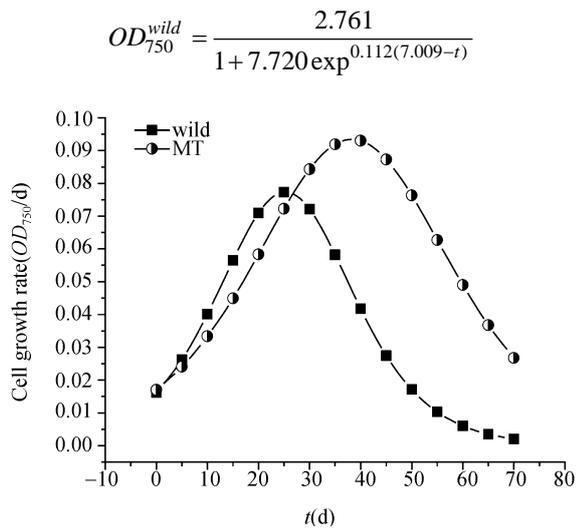


图 4 野生和转 MT 聚球藻细胞生长速率随培养时间的变化

Fig. 4 Cell growth rate of wild and transgenic *Synechococcus* sp. PCC 7002 as a function of culture time

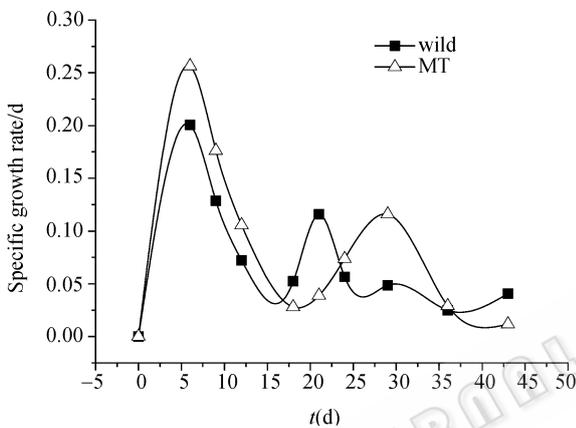


图 5 野生和转 MT 聚球藻细胞比生长速率随培养时间的变化

Fig. 5 Specific growth rate of wild and transgenic *Synechococcus* sp. PCC 7002 as a function of culture time

2.4 气升式光生物反应器中转 MT 基因聚球藻的生长

为进一步表征和验证转 MT 基因聚球藻的生长优势, 为其产业化培养和工业应用提供依据, 在自制的 2 L 气升式生物反应器中进行了培养实验。结果如图 6a 所示。从图中可以看出, 得益于 ALR 良好的气液传质性能和均匀充分的光照, 转 MT 基因聚球藻的生长明显优于其在三角瓶中的表现, 不但细胞终浓度有所提高, 而且达到稳定期的时间可缩短 1 倍左右。而当向反应器中通入流量为循环气体 1% 的 CO₂ 气体(0.2 L/h)后, 转 MT 基因聚球藻的生长潜力更是得到了较好的发挥, 不但终细胞浓度提高了 48.5%, 而且培养时间缩短 2 倍以上, 见图 6b。

3 结论

本文以野生聚球藻 7002 为对照, 从室温吸收光

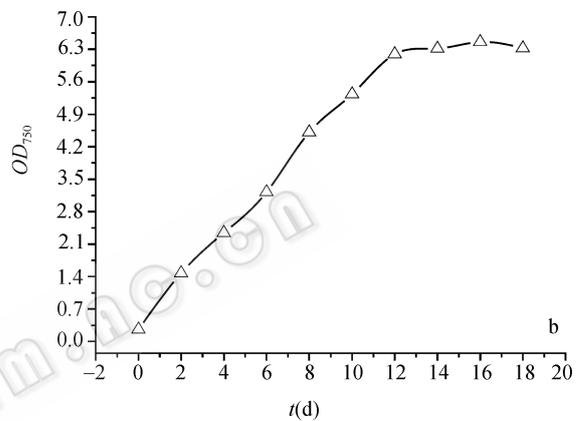
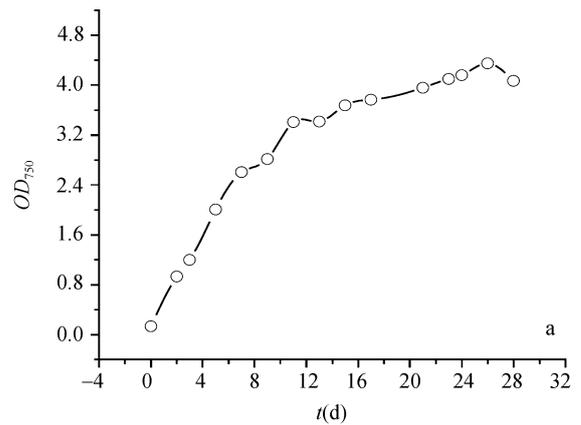


图 6 转 MT 聚球藻在气升式光生物反应器中的生长

Fig. 6 Growth behavior of transgenic *Synechococcus* sp. PCC 7002 in ALR

谱、光合放氧速率、生长动力学参数以及气升式光生物反应器中的生长特性等方面阐述和表征了转小鼠金属硫蛋白- 基因聚球藻 7002 的生长优势和培养潜力。结果如下:

- 转 MT 聚球藻的室温可见光光谱吸收峰比野生藻略高;
- 转 MT 聚球藻的最大净光合速率和饱和光强均比野生藻高, 而呼吸速率和补偿光强比野生藻低;
- 摇瓶批式培养过程中, 转 MT 聚球藻所能达到的最大细胞浓度为野生藻的 1.74 倍, 并且具有较高的细胞生长速率;
- 由于 ALR 良好的气液传质性能和均匀充分的光照, 转 MT 基因聚球藻的生长潜力得到了很好的发挥;
- 与野生藻相比, 转 MT 聚球藻具有较大的生长

<http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn>

优势和潜力,从而为其产业化高密度培养和实际应用提供了可能。但其生理生化机制有待进一步探讨。

- 从实验结果来看,转 MT 藻的培养周期较长,到达稳定期的细胞浓度也不够高。表明在将其投入产业化应用之前,培养基成分和培养工艺的优化不但有必要,而且有较大空间(文章另发)。

致谢 实验过程得到了广东大新的公司的资助,特此致谢!

参 考 文 献

- [1] Pillet S, Fournier M, Bouquegneau JM, *et al.* Modulation by zinc and estradiol of metallothionein levels in grey seal peripheral blood leukocytes. *Comparative Biochemistry and Physiology-Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 2000, **126**(Supplement 1): S120
- [2] Haase, Hajo, Maret. *et al.* A differential assay for the reduced and oxidized states of metallothionein and thionein. *Analytical Biochemistry*, 2004, **333**(1): 19–26
- [3] Cols, Neus, Romero-Isart. *et al.* Binding of Excess Cadmium() to Cd7-metallothionein from Recombinant Mouse Zn7-metallothionein I. UV-VIS Absorption and Circular Dichroism Studies and Theoretical Location Approach by Surface Accessibility Analysis. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 1997, **68**(3): 157–166
- [4] Sarkar, Sagartirtha, Duttagupta. *et al.* Effects of heavy metals on population growth and metallothionein gene expression in the mosquito *Culex quinquefasciatus*, from Calcutta, India. *Environmental Pollution*, 2004, **127**(2): 183–193
- [5] Sterenborg L, van Gestel CAM, van Straalen NM. Metallothionein in different non-tolerant and metal-tolerant populations of the springtail *Orchesella cincta*. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 2000, **126**(Supplement 1): S140
- [6] Tallkvist J, Yoshioka M, Oskarsson A. Metallothionein expression in the mammary glands of mice—Effects of cadmium. *Toxicology Letters*, 2003, **144**(Supplement 1): s137
- [7] Li Ren, Dingji Shi, Jixun Dai, *et al.* Expression of the mouse metallothionein-I gene conferring cadmium resistance in a transgenic cyanobacterium. *FEMS Microbiology Letters*, 1998, **158**(1): 127–132
- [8] Guo XX, Shi DJ, Xu XD, *et al.* Metal-induced expressing of mammal Metallothionein-I gene in cyanobacteria to promote cadmium-binding preferences. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1999, **52**(6): 806–810
- [9] Chen Z, Ren L, Shao Q, *et al.* Expression of Mammalian Metallothionein-I Gene in Cyanobacteria to Enhance Heavy Metal Resistance. *Marine Pollution Bulletin*, 1999, **39**: 155–158
- [10] ZHOU Jie, HAO Fu-Ying, SHI Ding-Ji, *et al.* Expression of Mouse MT-I as a Fusion Protein in *Anabaena* sp. PCC 7120. *Acta Botanica Sinica*, 2003, **45**(1): 98–101
- [11] 茹炳根, 曾文炉. 转金属硫蛋白(Metallothionein)基因微藻的研究. 中国海洋生化学术会议论文荟萃集. 北京: 科学出版社, 2004
- [12] Takahashi H, Mouake M, Tokiwa Y. Improved Accumulation of Poly-3-hydroxybutyrate by a Recombinant Cyanobacterium. *Biotechnology Letter*, 1998, **20**(2): 183–186
- [13] 罗娜, 宁叶, 施定基, 等. 人尿激酶原基因在聚球藻 7002 中的克隆和表达. *植物学报*, 2000, **42**(9): 931–935
- [14] 汪晶, 康瑞娟, 施定基, 等. 有机碳源对转 hTNF- α 基因聚球藻生长和光合作用的影响. *植物生理与分子生物学学报*. 2003, **29**(5): 405–408
- [15] 周杰, 罗娜, 宁叶, 等. 通过同源重组在聚球藻 7002 中表达小鼠金属硫蛋白- 的初步研究. *生物化学与生物物理进展*, 2002, **29**(1): 149–153
- [16] Casteholz RW. Culturing methods for cyanobacteria. in: *Methods in Enzymology*. London: Academic Press, 1988, **167**(1): 63–93
- [17] 王军, 杨素玲, 丛威, 等. 营养条件对产烃葡萄藻生长的影响. *过程工程学报*, 2003, **3**(2): 141–145