

研究简报

P_{psbA} 驱动的类金属硫蛋白基因 $smtA$ 在鱼腥藻的表达和镉离子抗性的提高

狄利俊^{1,2} 徐旭东^{1,2} 孔任秋

(1. 中国科学院水生生物研究所, 武汉 430072; 2. 中国科学院研究生院, 北京 100039)

P_{psbA} -DRIVEN EXPRESSION OF MT-LIKE PROTEIN GENE $smtA$ IN ANABAENA AND INCREASE IN TOLERANCE TO Cd²⁺

DI Li Jun^{1,2}, XU Xu Dong^{1,2} and KONG Ren Qiu

(1. Institute of Hydrobiology, The Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072; 2. The Graduate School of the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039)

关键词: 鱼腥藻; $smtA$; 镉离子; 基因转移

Key words: Anabaena; $smtA$; Cd²⁺; Gene transfer

中图分类号: Q78 文献标识码: A 文章编号: 1000-3207(2003)-05-0551-03

金属硫蛋白(Metallothionein, 简称 MT)是一类富含半胱氨酸、具有很强金属结合能力的小分子量蛋白。MT 广泛存在于生物界, 包括动物、植物和微生物, 其中哺乳动物和人的 MT 结合金属能力最强。MT 可通过其半胱氨酸的巯基与某些金属(尤其是镉、汞和锌)特异而稳定地结合^[1]。在蓝藻中也存在一种具有多核巯基簇的金属结合多肽, 称作类金属硫蛋白, 其金属离子结合能力只有高等哺乳动物 MT 的一半左右。通过对聚球藻(*Synechococcus* sp.)中的类金属硫蛋白氨基酸序列和已知真核生物如蟹、海胆、人和酵母的 MT 氨基酸序列比较, 同源率低于 20%^[2]。在聚球藻 PCC7942 和 PCC6301 中 MT 基因 $smtA$ 受 $smtB$ 的调控, 在 Zn²⁺ 等重金属离子存在时诱导表达^[3,4]。在大肠杆菌中用融合蛋白方式表达蓝藻类金属硫蛋白可将其对 Zn²⁺ 等金属离子耐受力提高 3 倍^[5]。本研究将来源于聚球藻 PCC7942 的 $smtA$ 基因装置 P_{psbA} 强启动子导入丝状固氮蓝藻表达, 证明对于自身抗金属离子能力较低的种类可显著提高其抗性。

1 材料和方法

1.1 藻株和培养条件 *Anacystis nidulans* R2 (*Synechococcus* sp.)

PCC7942), *Anabaena* sp. PCC7120, *Anabaena* sp. FACHB171, *Anabaena* sp. FACHB595, *Anabaena* sp. FACHB709, *Anabaena* sp. FACHB318 和 *Anabaena* sp. FACHB583 来自中国科学院水生生物研究所藻种库。蓝藻以 BG11 培养液在 28—30℃ 和光照条件下(-30 μE/m²/s)静置培养, 含 pHB177 的蓝藻在培养液中加 20 μg/mL 新霉素(Nm)。为检测蓝藻对重金属离子抗性, 在固体 BG11 培养基中加入一系列浓度的 Cd²⁺, 将生长于对数期的蓝藻悬液少许均匀涂布到平板上, 光照培养。

1.2 DNA 操作 DNA 重组按标准的分子生物学方法操作^[6]。蓝藻 DNA 提取按文献[7]描述的方法进行。以 *Anacystis nidulans* R2 的总 DNA 为模板 PCR 扩增 $smtA$ 基因片段, 引物序列 (5' > 3') 是 tggatccaaaggatgttgtca 和 tggatctagcaggaaacagtgtga。PCR 反应条件为: 94℃ 变性 5min, 然后按 94℃ 变性 1min、60℃ 退火 1min、72℃ 延伸 1min, 循环 30 次, 最后在 72℃ 延伸 5min。

1.3 蓝藻接合转移 基本按 Elhai et al. 所描述的方法^[8]进行, 略有修改。在大肠杆菌和蓝藻混合之前, 将驱动质粒 pRL443、辅助质粒 pRL623 和含有 $smtA$ 的 pHB177 通过在三抗平板交叉划线导入同一细胞中, 再用含有三种质粒的 *E. coli* HB101(pRL443+ pRL623+ pHB177)与蓝藻进行接合转移。经

收稿日期: 2003-02-17; 修订日期: 2003-02-26

基金项目: 中国科学院回国留学人员择优基金资助

作者简介: 狄利俊(1979—), 男, 内蒙古人, 硕士研究生

通讯作者: 孔任秋, Email: kongr@ihb.ac.cn

两个星期的培养, 将长出的接合子挑取到含 Nm 的 BG 11 液体培养基中培养。

2 结果和讨论

携带有 *smtA* 基因的接合转移质粒构建过程如图 1 所示。首先通过 PCR 方法扩增 *Anabaena* sp. R2 的 *smtA* 基因^[3], 得到一条约 200bp 的 DNA 带。由于引物中分别设计有 BamHI 和 EcoRI 酶切位点, 以这两种酶切割回收的 PCR 片段可直接克隆到 pUC19 载体中。由此得到质粒 pHB146, 其酶切鉴定结果见图 2A。对 pHB146 中 *smtA* 基因片段测序证明没有氨基酸置换发生。用 BamHI 和 EcoRI 将 *smtA* 从 pHB146 中切出并克隆到 pRL439^[9] 中, 位置恰好在启动子 *P_{psbA}* 下游, 获

得质粒 pHB149, 以 EcoRI 和 SalI 酶切鉴定结果见图 2A。其中 *P_{psbA}* 是来自于植物叶绿体 *psbA* 基因的启动子, 已证明可在蓝藻高效启动基因转录。用 EcoRI 和 SalI 将启动子 *P_{psbA}* 和 *smtA* 基因片段从 pHB149 中切出, 并克隆到载体质粒 pDC8^[10] 中, 获得 pHB177, 酶切鉴定结果见图 2B。

不同种类蓝藻对于重金属离子抗性存在差别, 检查了 *Anabaena* sp. PCC7120, FACHB171, FACHB595, FACHB709 等藻株在含有 1μmol/L, 5μmol/L, 20μmol/L 及 100μmol/L Cd²⁺ 的 BG11 平板上的生长情况, 结果显示 *Anabaena* sp. FACHB171 在 Cd²⁺ 浓度为 20μmol/L 时不能生长, 在 5μmol/L 时可以生长, 而其他藻种在 20μmol/L 仍可以生长, 故 FACHB171 藻株对 Cd²⁺ 较敏感。

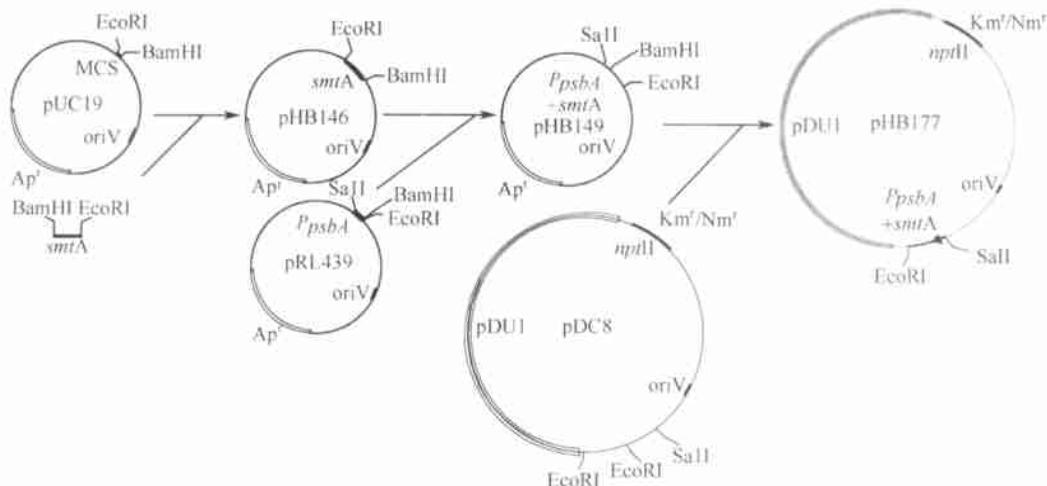


图 1 穿梭质粒 pHB177 的构建过程

Fig. 1 A flow chart for construction of the shuttle plasmid pHB177

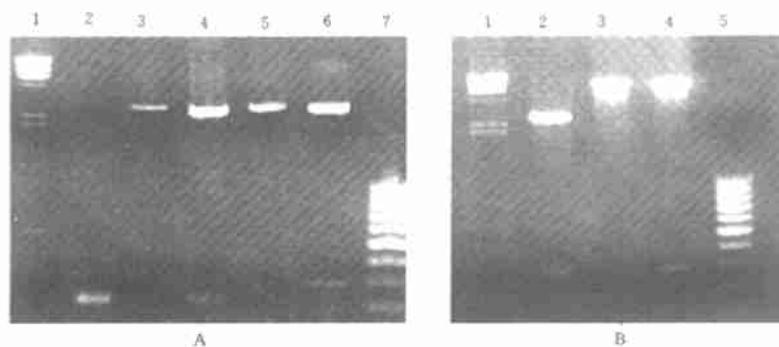


图 2 质粒的酶切鉴定

Fig. 2 Restriction of plasmids

(A) 1. λ + Hind III; 2. the PCR product for *smtA*; 3. pUC19+ EcoRI + BamHI; 4. pHB146+ EcoRI + BamHI; 5. pRL439+ EcoRI + SalI; 6. pHB149+ EcoRI + SalI; 7. 100bp Ladder

(B) 1. λ+ Hind III; 2. pHB149+ EcoRI + SalI; 3. pDC8+ EcoRI + SalI; 4. pHB177+ EcoRI + SalI; 5. 100bp Ladder

将含有 *smtA* 基因的 pHB177 通过接合转移导入以上各藻株均得到具有 Nm 抗性的接合子。通过平板培养检查其对 Cd²⁺ 的抗性, 发现只有 *Anabaena* sp. FACHB171 (pHB177) 较含空载体 pDC8 或不含 pDC8 的野生型藻抗 Cd²⁺ 的能力获得显

著提高, 可在含 15μmol/L Cd²⁺ 的平板上生长; 其他藻株可能由于本身抗性较高, 过量表达 *smtA* 基因不能显示明显差异。在完全相同的条件下分别测量 *Anabaena* sp. FACHB171 (pHB177) 和野生型 FACHB171 藻株的生长曲线, 结果如图 3

所示。在不同的 Cd²⁺ 浓度条件下, 过量表达 *smtA* 基因的 FACHB171 均表现出了一定的生长优势。特别是在 Cd²⁺ 浓度达到 14 μmol/L 的时候, 野生型 FACHB171 不能生长, 但 FACHB171(pHB177) 却能够生长, 反映出转基因藻相对于野

生型藻的 Cd²⁺ 抗性有显著提高。同时注意到 FACHB171 (pHB177) 在 30 μE/m/s 的光照强度下比在 10 μE/m/s 光照条件下对 Cd²⁺ 抗性要高。

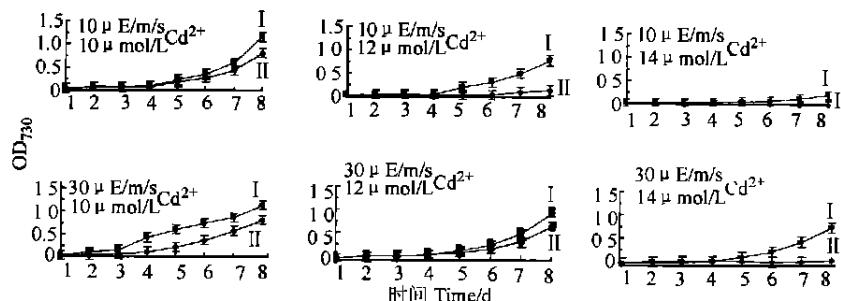


图 3 鱼腥藻 FACHB171(pHB177) 对镉离子的抗性

Fig. 3 The resistance of *Anabaena* sp. FA CHB171 t(pHB177) to Cd²⁺

(I) FACHB171 (pHB177) 的生长曲线 The growth curve for FACHB171; (II) FACHB171 的生长曲线 The growth curve for FACHB171 (pHB177)

参考文献:

- [1] Vallee B L. Introduction to metallothionein [J]. *Methods Enzymol*, 1991, **205**: 3—7
- [2] Olafson R W, Occubbin W D, Kay C M. Primary and secondary structure analysis of a unique prokaryotic metallothionein from a *Synechococcus* sp. cyanobacterium [J]. *J Biochem.*, 1988, **251**: 691—699
- [3] Huckle J W, Morby A P, Turner J S, et al. Isolation of a prokaryotic metallothionein locus and analysis of transcriptional control by trace metal ions [J]. *Mol. Microbiol*, 1993, **7**: 177—187
- [4] Gupta A, Morby A P, Turner J S, et al. Deletion within the metallothionein locus of Cd tolerant *Synechococcus* PCC6301 involving a highly iterated palindrome (HIP1) [J]. *Mol. Microbiol*, 1993, **7**: 189—195
- [5] Shi J G, Lindsay W Y, Huckle J W, et al. Cyanobacterial metallothionein gene expressed in *Escherichia coli*: metal binding properties of the expressed protein [J]. *FEBS Letter*, 1992, **303**: 159—163
- [6] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed. [M]. New York: Cold Spring Harbor Laboratory press, 1989
- [7] Xu Xudong, Wang Yeqin, Li Shanghao. Construction of biphasic CAT promoter probe vector shuttling between *Anabaena* (bluegreen algae) and *Escherichia coli* [J]. *Journal of Graduate School, Academia Sinica*, 1993, **10**: 203—209. [徐旭东, 王业勤, 黎尚豪. 鱼腥藻——大肠杆菌启动子 CAT 探测载体的构建. 中国科学院研究生院学报, 1993, **10**: 203—209]
- [8] Elhai J, Wolk C P. Conjugal transfer of DNA to cyanobacteria [J]. *Methods Enzymol.*, 1988, **167**: 747—754
- [9] Elhai J. Strong and regulated promoters in the cyanobacterium *Anabaena* PCC 7120 [J]. *FEMS Microbiol. Lett.*, 1993, **114**: 179—184
- [10] Xu X, Kong R, Hu Y. Studies on genetically engineered larvicidal cyanobacterium. [J]. *Chinese Journal of Vectorial Biology and Control*, 1993, **4**: 244—247. [徐旭东, 孔任秋, 胡玉祥. 基因工程杀蚊幼虫蓝藻的研究. 中国媒介生物学及控制杂志, 1993, **4**: 244—247]