

研究简报

# *P<sub>psbA</sub>* 驱动的金属硫蛋白基因 *smtA* 在鱼腥藻的表达和镉离子抗性的提高

狄利俊<sup>1,2</sup> 徐旭东<sup>1,2</sup> 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<sub>psbA</sub>*-DRIVEN EXPRESSION OF MT-LIKE PROTEIN GENE *smtA* IN *ANABAEANA* AND INCREASE IN TOLERANCE TO Cd<sup>2+</sup>

DI Li Jun<sup>1,2</sup>, XU Xu Dong<sup>1,2</sup> 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*; Cd<sup>2+</sup>; Gene transfer

中图分类号: Q78 文献标识码: A 文章编号: 1000-3207(2003)-05-0551-003

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<sup>[1]</sup>。在蓝藻中也存在一种具有多核硫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。经过对聚球藻(*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%<sup>[2]</sup>。在聚球藻 PCC7942 和 PCC6301 中 MT 基因 *smtA* 受 *smtB* 的调控, 在 Zn<sup>2+</sup> 等重金属离子存在时诱导表达<sup>[3,4]</sup>。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 Zn<sup>2+</sup> 等金属离子耐受力提高 3 倍<sup>[5]</sup>。本研究将来源于聚球藻 PCC7942 的 *smtA* 基因装置 *P<sub>psbA</sub>* 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(−30μE/m<sup>2</sup>/s) 静置培养, 含 pHB177 的蓝藻在培养液中加入 20μg/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 Cd<sup>2+</sup>, 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<sup>[6]</sup>。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 tcggatccaaaggagttgctgtca 和 tggatccagcagggaaacagttga。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<sup>[8]</sup> 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 *Anacystis nidulans* R2 的 *smtA* 基因<sup>[3]</sup>,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<sup>[9]</sup>中,位置恰好在启动子 *P<sub>psbA</sub>* 下游,获

得质粒 pHB149,以 EcoRI 和 SalI 酶切鉴定结果见图 2A。其中 *P<sub>psbA</sub>* 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<sub>psbA</sub>* 和 *smtA* 基因片段从 pHB149 中切出,并克隆到载体质粒 pDC8<sup>[10]</sup>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 Cd<sup>2+</sup> 的 BG11 平板上的生长情况,结果显示 *Anabaena* sp. FACHB171 在 Cd<sup>2+</sup> 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 Cd<sup>2+</sup> 较敏感。

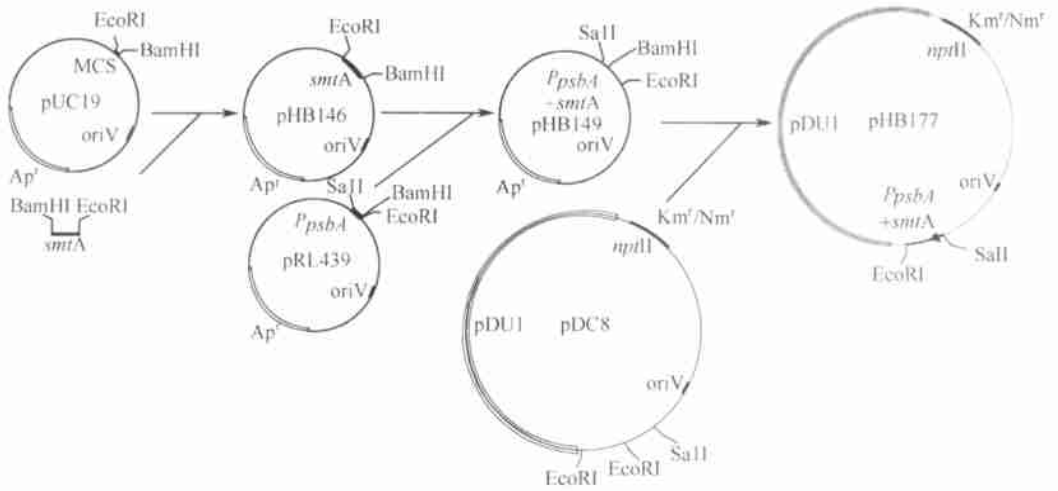


图 1 穿梭质粒 pHB177 的构建过程

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

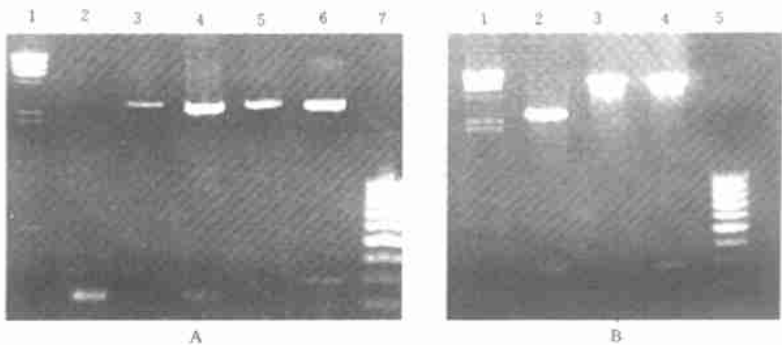


图 2 质粒的酶切鉴定

Fig. 2 Restriction of plasmids

- (A) 1. λ + HindIII; 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+ HindIII; 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 Cd<sup>2+</sup> 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 Cd<sup>2+</sup> 的能力获得显

著提高,可在含 15μmol/L Cd<sup>2+</sup> 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  $Cd^{2+}$  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  $Cd^{2+}$  浓度达到  $14\mu\text{mol/L}$  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  $Cd^{2+}$  抗性有显著提高。同时注意到 FACHB171 (pHB177) 在  $30\mu\text{E/m}^2/\text{s}$  的光照强度下比在  $10\mu\text{E/m}^2/\text{s}$  光照条件下对  $Cd^{2+}$  抗性要高。

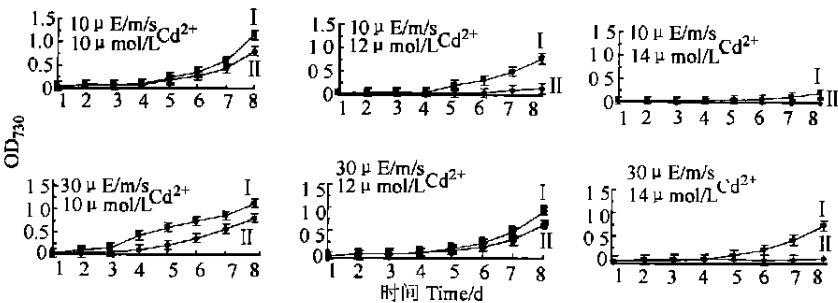


图 3 鱼腥藻 FACHB171 (pHB177) 对镉离子的抗性

Fig. 3 The resistance of *Anabaena* sp. FACHB171 t (pHB177) o  $Cd^{2+}$

( 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, Tumer J S, et al. Deletion within the metallothionein locus of Cd tolerant *Synechococcus* PCC6301 involving a highly iterated palindrome (HIPI) [ 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, Fritish 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 lagae) 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 Vetarial Biology and Control*, 1993, **4**: 244—247. [ 徐旭东, 孔任秋, 胡玉祥. 基因工程杀蚊幼蓝藻的研究. 中国媒介生物学及控制杂志, 1993, **4**: 244—247 ]