

CO₂ 对转基因聚球藻 7942 生长、表达等的影响

朱 筠¹ 李元广¹ 叶 勤¹ 魏晓东¹ 章 军²

(1. 华东理工大学海洋生化工程研究所; 生物反应器工程国家重点实验室, 上海 200237;

2. 厦门大学生命科学院, 厦门 361005)

摘要: 研究了不同浓度 CO₂ 对转基因聚球藻 7942 生长、胸腺素 α1 表达和光合作用的影响, 结果表明: 不同浓度的 CO₂ 对藻细胞指数生长期的比生长速率没有明显的影响, 通入空气与 5% CO₂ 空气对藻细胞线性生长速率和最终藻细胞浓度影响也不显著; 高浓度 CO₂ 会减少 NO₃⁻ 的吸收, 提高硝酸还原酶的活性, 这表明 NO₃⁻ 的吸收与还原是不偶联的。低浓度 CO₂ 对藻细胞的生化组成和胸腺素 α1 表达没有影响。而高浓度的 CO₂ 明显降低可溶性蛋白及光合色素叶绿素 a、类胡萝卜素和藻蓝蛋白的含量, 胸腺素 α1 含量也显著降低。不同 CO₂ 浓度培养的藻细胞 P-I 曲线表明, 不同浓度的 CO₂ 对藻细胞的光合作用效率没有明显的影响, 但生长在高浓度 CO₂ 中藻细胞的最大光合速率明显增加。

关键词: 转基因聚球藻 7942; CO₂; 胸腺素 α1; 生长; 光合作用; 分批培养

中图分类号: Q949.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3207(2004)04-0361-06

蓝藻是一类结构简单的光合原核生物, 其分布广泛、适应性强、培养成本低且生长迅速, 兼具微生物和植物的特点, 是理想的转基因模式生物, 已越来越引起人们的重视。近二十年来, 蓝藻基因工程发展迅速, 已有一些外源基因在蓝藻中获得表达, 如小鼠金属硫蛋白-1 (mMT-1), 人源胸腺素 α1、人表皮生长因子 (hEGF) 等, 利用转基因蓝藻生产高价值的目的蛋白成为可能^[1], 因此对转基因蓝藻培养技术的研究变得越来越重要。

CO₂ 作为光合作用的底物, 温度较高的情况下在培养液中的溶解度较低, 因此在微藻大规模培养过程中, 不断地向培养液中通入高浓度的 CO₂, 一方面为微藻的生长提供足够的碳源, 另一方面维持培养液的 pH^[2]。Nobutaka 等^[3] 在小球藻培养液中通入含高浓度 CO₂ 的空气, 使小球藻的生长速度明显加快。林惠民等研究发现在培养液中通入含 2.5% CO₂ 的空气时, 盐泽螺旋藻世代时间明显缩短^[4]。许多研究者表明, 在培养液中通入高浓度的 CO₂ 会影响藻细胞无机碳利用的机制, 如降低碳酸酐酶的活性和对无机碳的亲合力, 抑制 HCO₃⁻ 的利用^[5]。

同时许多研究表明, 不同的 CO₂ 的浓度还会影响藻细胞的生化组成^[6-8]。有关 CO₂ 浓度对蓝藻的影响报道较少, 而且主要集中于螺旋藻的研究^[9, 10], 而对转基因微藻生长、光合作用及外源基因表达的影响更是未见报道。本文就不同浓度 CO₂ 对转入源胸腺素 α1 (Ta1) 基因聚球藻 7942 (*Synechococcus* sp. PCC7942), 又名 *Anacystis nidulans* R2) 生长、Ta1 表达及光合作用的影响进行了研究, 以期为该转基因蓝藻的高密度培养工艺优化奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料 转 Ta1 基因聚球藻 7942 由厦门大学生命科学院构建并提供^[11]。Ta1 基因由 cpcB2A2 启动子控制, 在红光下可诱导表达。转 Ta1 基因聚球藻 7942 培养采用改进后的 BG-11 培养基 (g/L): NaNO₃ 1.5, MgSO₄·7H₂O 0.075, CaCl₂·2H₂O 0.036, K₂HPO₄·3H₂O 0.070, Na₂CO₃ 7.36, 柠檬酸 0.006, 柠檬酸铁铵 0.006, EDTA 0.002, 25mg 硫酸卡那霉素以及 1mL/L A-5 微量元素储液。A-5 微量元素储液组

收稿日期: 2002-12-16; 修订日期: 2003-10-30

基金项目: 国家海洋 863 基金项目(819-Q01); 上海市科技启明星计划项目及上海市重点学科部分资助

作者简介: 朱筠(1971—), 男, 江西高安人, 博士, 从事生化工程研究

通讯作者: 李元广, E-mail: ygli@ecust.edu.cn

成(g/L): H_3BO_3 2.86, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 1.81, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.222, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.039, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.079, $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.0492。

在 1.5L 气升式光生物反应器中培养转 Ta1 基因聚球藻 7942, 反应器装液量为 1L。光照由套于气升式光生物反应器外 3 支环形冷白荧光灯管 (Philips, 22W) 提供, 入射光强为 $142 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 培养温度保持在 30℃, 通气量为 0.5L/min。培养过程中培养液的 pH 用稀盐酸控制, 使其不超过 9.5。

低浓度 (< 0.0001%) CO_2 空气的获得^[8]: 空气在进入反应器之前用 5mol/L NaOH 溶液将 CO_2 吸收。高浓度 CO_2 空气: 在空气中混入 5% CO_2 气体。

1.2 藻细胞生长 藻体浓度测定采用浊度法, 测定波长 730nm 处藻液的光密度 (OD_{730}), 由标准曲线计算: $X(\text{g/L}) = 0.423 \times \text{OD}_{730}$ ($R^2 = 0.996$)。指数生长期藻细胞的比生长速率通过以下等式进行计算: $\mu = (\ln \text{DW}_t - \ln \text{DW}_0) / (t - t_0)$, 式中 t 与 t_0 为培养时间, DW_0 为 t_0 时细胞干重, DW_t 为 t 时细胞干重; 线性生长速率根据细胞浓度与培养时间之间的线性回归求得。

1.3 细胞组成的生化分析 细胞组成的生化分析采用的是培养 3d 后的藻细胞。叶绿素 a 与类胡萝卜素含量按文献报道方法^[12]。藻可溶性蛋白与藻胆蛋白含量测定: 离心收集细胞, 用磷酸缓冲液重新悬浮, 采用超声波进行破碎, 离心, 上清液中可溶性蛋白含量采用考马斯亮蓝法测定^[13], 藻蓝蛋白含量采用文献^[14]报道的方法。硝酸还原酶测定采用磺胺比色法^[15], 藻细胞反应 1h 产生 $1 \mu\text{mol NO}_2^-$ 定义为 1 个硝酸还原酶活力单位, 硝酸还原酶比活力单位干藻细胞的硝酸还原酶活力单位。所有的生化分析实验重复 3 次。

1.4 硝酸根的测定及细胞对氮的得率 ($Y_{X/N}$) 计算

硝酸根的测定采用酚二磺酸分光光度法^[16]。 $Y_{X/N} = (\text{DW}_t - \text{DW}_0) / (N_0 - N_t)$, 式中 DW_0 , DW_t 分别为培养开始和培养结束时细胞干重; N_0 , N_t 分别为培养开始和培养结束时藻液中的 N 含量。

1.5 诱导条件及 Ta1 的测定 取 20mL 培养 3d 的藻细胞于带夹套玻璃瓶中进行诱导, 诱导时 pH 调节至 9.5 左右, 用恒温水浴经夹套循环控温 30℃, 通气并采用磁力搅拌进行混合, 搅拌转速为 150r/min, 用光强为 3000lx 红光诱导 3h。离心, 弃上清液, 加入包被液重新悬浮藻体, 用超声波破碎, 离心取上清液, 上清液中 Ta1 含量采用 ELISA 法进行测定^[17],

Ta1 含量测定重复 3 次。

1.6 光合与呼吸作用 取一定量培养 3d 的藻液离心, 所得藻细胞用新鲜培养基悬浮, 藻液密度稀释至 $\text{OD}_{730} 0.6$ 。光合速率通过利用 Clark 型氧电极测定氧的释放进行计算, 测定在反应槽中进行, 温度控制为 30℃。光源由带有碘钨灯的投影仪提供, 光强通过调节光源与反应槽之间的距离来控制。呼吸作用是在测定光合放氧之前进行, 采用黑布遮盖反应槽, 测定氧的消耗^[18]。测定重复 3 次, 所得数据平均值采用 Webb 等^[19]提出的方程进行拟合。

1.7 统计分析 实验数据分析采用 t 检验, 分析软件为 Origin 5.0。

2 结果

2.1 生长

转 Ta1 基因聚球藻 7942 生长进入稳定期之前有两个不同的生长阶段, 0—2d 为指数生长期, 接着为线性生长期。不同浓度的 CO_2 对转 Ta1 基因聚球藻 7942 在 0—2d 指数生长期的比生长速率没有明显影响, 通入空气和高浓度 CO_2 对藻细胞线性生长速率与最大生物量影响不明显。而通入低浓度 CO_2 空气, 由于藻细胞生长所利用的碳源为培养液中的碳酸盐, 随着藻细胞的生长, 碳酸盐不断地被利用, 而且采用 HCl 控制 pH 会引起部分碳酸盐以 CO_2 形式挥发, 使得培养液中的碳源不断地减少并接近枯竭, 因而较早进入稳定期, 藻体密度仅为 1.10g/L (图 1A, 表 1)。

随着藻细胞密度的增加, 氮源不断地被消耗。 CO_2 浓度对转 Ta1 基因聚球藻 7942 氮源利用具有明显的影响, 提高 CO_2 浓度会减少藻细胞对氮源的吸收, 增加藻细胞对氮的得率 $Y_{X/N}$ (图 1B, 表 1)。

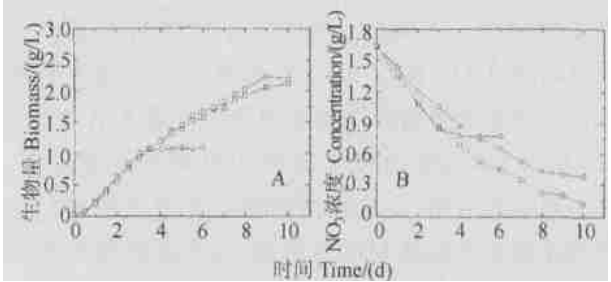


图 1 通入不同 CO_2 浓度空气时转基因聚球藻 7942 生长 (A) 及 NO_3^- 的消耗 (B)

Fig. 1 The growth of transgenic *Synchococcus* sp. PCC7942 (A) and consumption of NO_3^- (B) when supplied with air containing different CO_2

□ normal CO_2 (air) ○ high CO_2 △ low CO_2

表 1 通入不同 CO₂ 浓度空气时转基因聚球藻 7942 比生长速率、最终细胞密度及细胞对氮的得率

Tab. 1 Specific growth rate, biomass and cell yield on consumed nitrogen when the transgenic *Synechococcus* sp. PCC7942 was supplied with air containing different CO₂

	比生长速率(d^{-1})	线性生长速率(g/ d)	生物量(g/ L)	藻细胞对氮的得率(g/ g)
空气	1. 59	0. 21	2. 11	8. 46
高浓度 CO ₂	1. 49	0. 23	2. 23	10. 8
低浓度 CO ₂	1. 59	—	1. 10	7. 71

2.2 对藻细胞生化组成与 Ta1 表达的影响

不同 CO₂ 浓度空气对转 Ta1 基因聚球藻 7942 细胞生化组成与 Ta1 表达的影响见表 2。与通入空气相比,通入低浓度的 CO₂ 对转基因聚球藻 7942 细胞中可溶性蛋白、叶绿素 a、类胡萝卜素、藻蓝蛋白含量及硝酸还原酶的活性没有显著的影响。而通入

高浓度 CO₂ 空气时,藻细胞的可溶性蛋白减少 21. 9%,叶绿素 a、类胡萝卜素与藻蓝蛋白含量也显著降低,但硝酸还原酶的比活性却升高 18%。通入高浓度 CO₂ 空气时,转基因聚球藻 7942 细胞中 Ta1 含量也下降 15. 2%。

表 2 不同 CO₂ 浓度空气对转基因聚球藻 7942 生化组成与 Ta1 含量的影响*

Tab. 2 Cell biochemical compositions and Ta1 content of transgenic *Synechococcus* sp. PCC7942 when supplied with air containing different CO₂

	低浓度 CO ₂	空气	高浓度 CO ₂
可溶性蛋白 (mg/ g. dcw)	328±6. 5 ^a	315±4. 9 ^a	246±10. 4 ^b
叶绿素 a(mg/ g. dcw)	21. 9±0. 5 ^a	22. 1±0. 6 ^a	16. 3±0. 5 ^b
类胡萝卜素 (mg/ g. dcw)	4. 8±0. 4 ^a	4. 8±0. 2 ^a	3. 7±0. 3 ^b
藻蓝蛋白 (mg/ g. dcw)	127±8. 2 ^a	125±6. 7 ^a	96±3. 4 ^b
硝酸还原酶活性 (u/g. dcw)	24. 9±0. 3 ^a	24. 5±0. 5 ^a	28. 9±0. 2 ^b
Ta1 含量(mg/ g. dcw)	3. 44±0. 21 ^a	3. 35±0. 19 ^a	2. 84±0. 24 ^b

* 实验重复 3 次(平均值±SD), 每行中不同的上标 a、b 表示具有显著性差异(*P* < 0. 05)。

2.3 呼吸与光合速率

通入不同 CO₂ 浓度空气时藻细胞的 P-I 曲线及参数见图 2 和表 3。不同浓度 CO₂ 对转基因聚球藻 7942 光合和呼吸作用具有较明显的影响,在低浓

度 CO₂ 和空气中藻细胞暗呼吸速率基本一致,而高浓度 CO₂ 下暗呼吸速率有所增加,CO₂ 浓度对 P-I 曲线的初始斜率 α(即光合作用效率)没有影响,但随着 CO₂ 浓度的提高,藻细胞最大光合速率(*P*_{max}) 和光合作用半饱和光强(*I*_{0. 5}) 都明显提高。

3 讨论

不同 CO₂ 浓度对转 Ta1 基因聚球藻 7942 比生长速率没有明显影响;通入空气与含 5% CO₂ 的空气对藻细胞的最终生物量也影响不大;但在通入低浓度 CO₂ 的空气时,由于碳源的限制,藻细胞的最终生物量较低。Yamada 等在培养聚球藻 7942 过程中通入含 5% —30% CO₂ 的空气,结果表明高浓度的 CO₂ 对其生长没有影响^[20]。目前研究普遍认为,CO₂ 只有增加对氮源吸收,才能促进植物体的生长^[9]。在本研究中,CO₂ 浓度的提高减少了藻细胞对 NO₃⁻ 吸收,这可能就是高浓度的 CO₂ 没有提高转基因聚球藻 7942 比生长速率的原因^[9]。

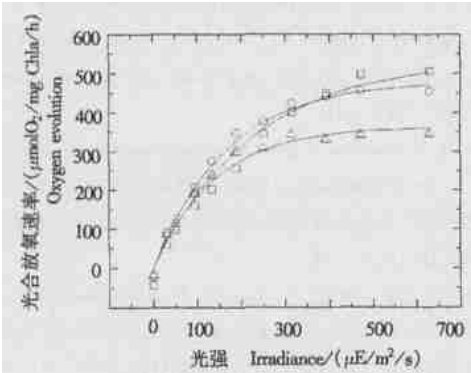


图 2 不同 CO₂ 浓度条件下藻细胞 P-I 曲线(散点为实测值,实线为回归曲线)

Fig. 2 Photosynthesis vs. irradiance curves (P-I) of transgenic *Synechococcus* sp. PCC7942 grown under various CO₂ concentrations (Scatter point: experimental results; Solid line: simulated results)

□ High CO₂; ○ Normal CO₂; △ Low CO₂

表 3 不同 CO₂ 浓度下藻细胞暗呼吸与光合参数的比较

Tab. 3 Dark respiration rates and photosynthetic parameters for cells cultured with different CO₂ concentrations

参 数	低浓度 CO ₂	空 气	高浓度 CO ₂
暗呼吸速率 (μmolO ₂ / mgChla/ h)	18.2±1.3 ^a	21.8±2.6 ^c	33.6±7.2 ^b
最大光合速率 P _{max} (μmolO ₂ / mgChla/ h)	364.6±14.5 ^a	482.4±9.2 ^b	543.5±13.3 ^c
光合作用半饱和光强 I _{0.5} (μmol/ m ² / S)	97.6±9.8 ^a	115.7±6.5 ^b	160.3±20.3 ^c
光合作用效率α (μmolO ₂ /mgChla/ h/ (μmol/ m ² / s)	2.59±0.14 ^a	2.89±0.21 ^a	2.35±0.37 ^a

注: 实验重复 3 次(平均值±SD), 每行中不同的上标 a, b, c 表示具有显著性差异(P<0.05)。

高浓度的 CO₂ 会引起藻细胞中可溶性蛋白、藻蓝蛋白含量的降低, 这与其他藻类, 如 *Gracilaria tenuistipitata*^[7]、*Porphyr a leucosticta*^[8] 和 *Spirulina platensis*^[10] 在高浓度 CO₂ 条件下的研究结果是一致的。本研究结果表明, 不同浓度的 CO₂ 对转基因聚球藻 7942 的氮源利用有所影响, 高 CO₂ 浓度的空气使藻细胞对氮源的利用减少(图 1B), 细胞对氮的得率升高(表 1), 这必然引起藻细胞中可溶性蛋白和藻蓝蛋白含量的下降。氮源吸收利用的表达调控主要通过调节 NO₃⁻ 进入藻细胞的转运系统和硝酸还原酶的活性来实现^[9]。许多研究表明在蓝藻中硝酸盐吸收利用的主要限速步骤为硝酸盐的转运^[21]。通入高 CO₂ 浓度的空气时转基因聚球藻 7942 藻细胞硝酸还原酶活性会增加(表 2), 这表明硝酸盐利用的减少可能是由于影响了藻细胞的 NO₃⁻ 转运系统, 这同时说明藻细胞生长在高浓度的 CO₂ 中, NO₃⁻ 的吸收与还原是相互不偶联的^[8]。转基因聚球藻 7942 生长在高浓度的 CO₂ 中, 叶绿素 a 及类胡萝卜素等光合色素含量都会减少, 这与 Eley^[6] 发现生长在浓度较低的 CO₂ 中的 *Anacystis* 具有更高的叶绿素含量是一致的。

转基因聚球藻 7942 经红光诱导后, cpcB2A2 启动子迅速启动 Ta1 基因表达。Ta1 的合成需要利用大量的氨基酸, 但由于通入高 CO₂ 浓度的空气降低了转基因聚球藻 7942 细胞对氮源的利用, 减少了可溶性蛋白质, 包括藻蓝蛋白的含量, 从而导致转基因聚球藻 7942 表达过程中细胞可利用的氨基酸含量降低, Ta1 表达量的减少。因此在转基因微藻培养过程中, 还应注意对 CO₂ 添加工艺进行研究, 以避免 CO₂ 通入对外源基因表达产生的负面影响。

藻细胞在内囊体膜上的光合色素包括两种, 一为作用中心色素, 具有光化学活性, 二为聚光色素, 没有光化学活性, 仅具有收集光能的作用, 又称天线色素, 像漏斗一样把光能聚集起来, 传到作用中心色素, 大多数光合色素属于此类。许多研究表明, 适当

减少藻细胞的聚光色素能提高细胞的光合活性。Melis 等研究表明, 含有较少的叶绿素等天线色素 *Dunaliella salina* 细胞表现出高的光合生产力及光量子的利用效率, 每个叶绿素光合生产力为正常色素细胞的 6—7 倍, 大规模培养条件下氧的生产速率为正常色素细胞的 2—3 倍^[18]。Nakajima 和 Ueda 对 *Synechocystis* PCC6714 及 *Chlorella pyrenoidosa* 的光合作用进行了研究, 同样也发现减少藻细胞中光收集色素的含量能显著提高藻细胞的光合活性^[22]。由于通入高 CO₂ 浓度的空气减少了转基因聚球藻 7942 细胞光合色素的含量, 这可能是藻细胞最大光合速率(P_{max}) 获得提高的原因。

参考文献:

[1] Lou S, Zhang J, Wu Q, *et al.* Construction and application of the gene expressing vector for cyanobacterium [J]. *Journal of Xiamen University*, 2001, **40**(2): 586—591. [楼士林, 章军, 吴巧娟, 等. 蓝藻基因表达载体系统的构建和应用[J], 厦门大学学报, 2001, **40**(2): 586—591]

[2] Hu Q, Guterman H, Richmond A. Physiological characteristics of *Spirulina plantensis* (cyanobacteria) cultured at ultrahigh cell densities [J]. *Journal of Phycology*, 1996, **32**: 1066—1073

[3] Nobutaka H, Toshifumi T, Yoshiharu F, *et al.* Tolerance of microalgae to high CO₂ and high temperature [J]. *phytochemistry*. 1992, **31**(10): 3345—3348

[4] Lin H. Comparison of *Spirulina subsalsa* with other *Spirulina* species [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 1991, **15**(1): 27—34. [林惠民. 盐泽螺旋藻与其他螺旋藻的比较研究[J]. 水生生物学报, 1991, **15**(1): 27—34]

[5] Mercado J M, Niell F X, Figueroa F I. Regulation of the mechanism for HCO₃⁻ use by the inorganic carbon concentration in *Porphyr a leucosticta* Thur. [J]. *Planta*, 1997, **201**: 319—325

[6] Eley J H. Effect of CO₂ concentration on the pigmentation in the blue green alga *Anacystis nidulans* [J]. *Plant Cell Physiology*, 1971, **12**: 311—316

[7] Garcir Sánchez M J, Fernández J A, Niell F X. Effect of inorganic carbon supply on the photosynthetic physiology of *Gracilaria tenuistipitata* [J]. *Planta* 1994, **194**: 55—61

[8] Mecardo J M, Javier F, Gordillo L, *et al.* Effects of different levels of CO₂ on photosynthesis and cell components of the red alga *Por-*

- phyra leucosticta* [J]. *Journal of Applied Phycology*, 1999, **11**: 455—461
- [9] Gordillo FJL, Jiménez C, Figueroa F L, Xavier Niell F. Effects of increased atmospheric CO₂ and N supply on photosynthesis, growth and cell composition of the cyanobacterium *Spirulina platensis* (Arthrospira) [J]. *Journal of Applied Phycology*, 1999, **10**: 461—469
- [10] Xia J, Gao K. Effects of high CO₂ concentration on growth and photosynthesis of *Spirulina maxima* [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2001, **25**(5): 471—480. [夏建荣, 高坤山. 高浓度 CO₂ 对极大螺旋藻生长和光合作用的影响[J]. 水生生物学报, 2001, **25**(5): 474—480]
- [11] Zhang J, Song X, Xu H, *et al.* Expression thymosin $\alpha 1$ in *Synechococcus* sp. PCC7942 by homology integration donor plasmid pUTK [J]. *Marine Science*, 2001, **25**(6): 1—3, 34. [章军, 宋新强, 徐虹, 等. 利用同源重组质粒 pUTK 转化蓝藻 *Synechococcus* sp. PCC7942 及胸腺素 $\alpha 1$ 的表达[J]. 海洋科学, 2001, **25**(6): 1—3, 34]
- [12] Marquez FJ, Sasaki K, Kakizono T, Nishio N, Nagai S. Growth characteristics of *Spirulina Platensis* in mixotrophic and heterotrophic conditions [J]. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 1993, **76**(5): 408—410
- [13] Xu X. Experiment and guidance of biochemistry [M]. Beijing: Chinese press of medicine science and technology, 1994, 34—36. [徐秀兰. 生物化学实验与指导[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 1994, 34—36.]
- [14] Hellebust J A, Graigie J S (eds). Handbook of phycological Methods: Physiological & biochemical Methods [M]. London: Cambridge University Press, 1998, 73—75
- [15] Zou Q. Experiment of plant physiology and biochemistry [M]. Beijing: Chinese agriculture press. 1995, 27—29. [邹琦. 植物生理生化实验. 北京: 中国农业出版社, 1995, 27—29]
- [16] Hecht U, Mohr H. Factors controlling nitrate and ammonium accumulation in mustard (*Sinapis alba*) seedlings [J]. *Physiologia plantarum*, 1990, **78**: 379—387
- [17] Zhu D, Chen T, Li Y, *et al.* Establishment and application of indirect ELISA method for thymosin $\alpha 1$ expressed in the transgenic *Synechococcus* sp. PCC7942 [J]. *Marine Science*, 2002, **26**(12): 1—5. [朱笃, 陈天圣, 李元广, 等. 胸腺素 $\alpha 1$ 间接 ELISA 法建立及其在转基因蓝藻中的应用[J]. 海洋科学, 2002, **26**(12): 1—5]
- [18] Melis A, Neidhardt J, Benemann J R. *Dunaliella salina* (Chlorophyta) with small chlorophyll antenna sizes exhibit higher photosynthetic productivities and photon use efficiencies than normally pigmented cells [J]. *Journal of Applied phycology*, 1999, **10**: 515—525
- [19] Hobson P, Fallowfield H. Effect of salinity on photosynthetic activity of *Nodularia spumigena* [J]. *Journal of Applied phycology*, 2001, **13**: 493—499
- [20] Yamada H, Ohkuni N, Kajiwara, S, Ohtaguchi K. CO₂ removal characteristics of *Anacystis nidulans* R₂ in airlift bioreactors [J]. *Energy*, 1997, **22**(2/3): 349—352
- [21] Rodriguez R, Kobayashi M, Omata T, Lara C. Independence of carbon and nitrogen control in the posttranslational regulation of nitrate transport in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. Strain PCC7942 [J]. *FEBS Letters*, 1998, **432**: 207—212
- [22] Nakajima Y, Ueda R. Improvement of photosynthesis in dense microalgal suspension by reduction of light harvesting pigments [J]. *Journal of Applied Phycology*, 1997, **9**: 503—510

EFFECT OF CO₂ CONCENTRATIONS ON GROWTH, THYMOSIN α1 EXPRESSION AND PHOTOSYNTHESIS OF TRANSGENIC *SYNECHOCOCCUS* SP. PCC7942

ZHU DU¹, LI Yuarr Guang¹, YE Qin¹, WEI Xiao-Dong¹ and ZHANG Jun²

(1. Institute of Marine Bioprocess Engineering State Key Laboratory of Bioreactor Engineering, East China University of Science and Technology, Shanghai, 200237; 2. School of Life Science Xiamen University, Xiamen 361005)

Abstract: In recent years, genetic engineering of cyanobacterium has been developed to produce important chemicals, especially pharmaceuticals. The unicellular cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC7942 is an obligate photoautotrophic blue-green alga and a transformable strain that can be used as an effective host in genetic manipulation. There have been numerous studies on the expression of exogenous proteins in *Synechococcus* sp. PCC7942. In order to explore the possibility of protein pharmaceutical production with transgenic microalgae, Zhang et al cloned the human thymosin α1 gene that was expressed as a fusion protein with ubiquitin in *Synechococcus* sp. PCC7942. High cell density culture of transgenic *Synechococcus* sp. PCC7942 with high expression level is very critical to its application, but few papers have been published on this aspect. In this paper, the transgenic *Synechococcus* sp. PCC7942 was batch-cultured in 1.5 L air-lift photobioreactors, and effects of CO₂ concentrations on the growth, thymosin α1 expression and photosynthesis of the transgenic *Synechococcus* sp. PCC7942 were investigated. The specific growth rate of the alga cells during exponential growth phase was not significantly affected by CO₂ concentrations; biomass and linear growth rate of transgenic *Synechococcus* sp. PCC7942 under normal CO₂ and high CO₂ concentrations were only slight difference. High CO₂ level reduced NO₃⁻ assimilation and increased nitrate reductase activity, which indicated that reduction and assimilation of nitrate were uncoupled. Low CO₂ level did not affect cell biochemical composition and thymosin α1 expression; however, the contents of soluble protein, chlorophyll a, carotenoids and phycocyanin of the transgenic alga cells grown under high CO₂ level were significantly diminished, the thymosin α1 content was also markedly reduced at high CO₂ level. On the basis of P-I curves, no difference was observed in photosynthetic efficiency; however, maximum photosynthetic rate was markedly improved by high CO₂ level.

Key words: Transgenic *Synechococcus* sp. PCC7942; CO₂; Growth; Thymosin α1; Photosynthesis; Batch culture