

含荧光素酶四膜虫 B2086-LUC 全细胞生物传感器的构建及其对重金属离子的响应

张鹏幸, 许静, 卢剑功, 王伟* (山西大学生物技术研究所, 化学生物学与分子工程教育部重点实验室, 山西太原 030006)

摘要: 为了获得可用于快速检测环境中重金属污染的全细胞生物传感器, 本研究将含有 HA 标签的萤火虫荧光素酶(*LUC*)基因重组到含有四膜虫金属硫蛋白 *MTT1* 启动子和微管蛋白终止子序列的载体 pBX 中, 获得重组质粒 pBX-LUC, 用基因枪粒子轰击法将 pBX-LUC 转化入四膜虫细胞中, 通过同源重组和巴龙霉素抗性筛选, *LUC* 基因整合到四膜虫大核基因组 *MTT1* 位点, 获得含有 *LUC* 基因的细胞株 B2086-LUC. B2086-LUC 对重金属镉和汞的响应敏感, 可检测的最低浓度为 5~10 ng/mL; 对铜和锌的响应较弱, 可检测的最低浓度为 0.5~1 mg/mL. 因此, 四膜虫 B2086-LUC 可作为环境中镉和汞污染快速检测的全细胞生物传感器.

关键词: 萤火虫荧光素酶; 嗜热四膜虫; 镉; 汞; 生物传感器

中图分类号: X131

文献标识码: A

文章编号: 1000-6923(2013)06-1075-06

Construction of whole cell biosensor *Tetrahymena* B2086-LUC containing luciferase and its response to heavy metal ion. ZHANG Peng-xing, XU Jing, LU Jian-gong, WANG Wei* (Key laboratory of Chemical Biology and Molecular Engineering, Ministry of Education, Institute of Biotechnology, Shanxi University, Taiyuan 030006, China). *China Environmental Science*, 2013,33(6): 1075~1080

Abstract: To obtain new whole cell biosensor which can be used for rapidly detecting metal ion pollution in the environment, *Tetrahymena thermophila* was used in this study. Luciferase (*LUC*) gene was recombined into the vector pBX containing *Tetrahymena* Metallothioneins gene *MTT1* promoter and tubulin terminator. Plasmid pBX-LUC was constructed and transformed into *Tetrahymena* strain by particle bombardment. Then, the *LUC* gene replaced the *Tetrahymena* macronuclear *MTT1* gene by homologous recombination under increasing paromomycin. The B2086-LUC strain was obtained. The B2086-LUC strain is sensitively responded to heavy metals cadmium and mercury ion (5 ~ 10 ng/mL) and less sensitive for copper and zinc ion (0.5~1 mg/mL). The results showed genetically engineered whole cell biosensor *Tetrahymena* B2086-LUC strain can be used for rapidly detecting cadmium and mercury pollution in environment.

Key words: luciferase; *Tetrahymena thermophila*; cadmium; mercury; biosensor

环境中的重金属污染不能被微生物有效降解, 并会通过食物链的生物积累作用富集. 几乎所有的重金属都能对生物体产生毒害作用^[1-2]. 对重金属的有效监测是对环境保护和人类健康安全保障的重要手段. 理化监测方法在环境监测中起到重要的作用, 但是这些方法不能区别重金属在生物系统中的有效作用部位和有效评价环境中重金属的生物利用度及遗传毒性. 生物测试和生物传感器克服和补充理化监测的不足, 已发展为评估重金属污染的有效工具. 生物监测既可评价污染物的遗传毒性, 也可针对金属离子的有效

作用部位进行检测. 通过观察斑马鱼胚胎发育, 评价了纳米碳化钨和 1,2,4-三氯苯的水生态毒理效应^[3-4]. 全细胞生物传感器 (Whole Cell Biosensor, WCB) 可以特异性的对金属离子的刺激产生应激, 并将信号放大, 反应灵敏, 监测快速, 已发展为一种重要的生物监测手段^[5].

纤毛类原生动物是单细胞真核生物, 没有细

收稿日期: 2012-11-08

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30770295, 31072000); 教育部科学技术研究重点项目(201026)

* 责任作者, 教授, gene@sxu.edu.cn

胞壁,对环境污染具有很高的敏感性,具有对环境污染更快的响应机制^[6].纤毛类原生动物用于环境污染检测的方式有2种类型:“turn off”和“turn on”^[7].在“turn off”试验中,基于生长速率、发光度、细胞群落的色度等的降低,对细胞活性抑制水平进行检测.嗜热四膜虫突变体生产过剩的黑色素前体成功检测霉菌毒素^[8].在“turn on”试验中,一个可定量的分子报告元件与一个特定的基因启动子连接,当受到环境污染物刺激后,细胞能够做出快速响应^[8-10].金属硫蛋白基因启动子能够对多种重金属做出快速、灵敏的应激反应.在嗜热四膜虫中, *MTT1* 和 *MTT3* 基因的启动子对镉离子的响应敏感, *MTT2* 和 *MTT4* 基因的启动子对铜离子的响应敏感,而 *MTT5* 基因的启动子对汞离子的响应敏感^[11],所以它们能够用于构建不同类型的 WCB.荧光素酶因其容易被检测而广泛的用作报告系统^[5].

本研究为了获得可以快速检测重金属的 WCB,以嗜热四膜虫为材料,构建了一种含有萤火虫荧光素酶基因的重组四膜虫 WCB,并检测了该细胞株对重金属镉、汞、铜和锌的响应.

1 材料和方法

1.1 细胞株和质粒

嗜热四膜虫(*T. thermophila*) B2086 细胞株(美国康奈尔大学 Peter J. Bruns 博士惠赠);质粒 pBX(罗彻斯特大学 Martin A. Gorovsky 教授惠赠),含有 HA 标签、*MTT1* 启动子、微管蛋白终止子及巴龙霉素抗性基因 *neo2*;大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH5 α 为本实验室自行保存, pEASY-T1 Vector 购于全式金公司;质粒 pGL3-control 购自 Promega 公司.

1.2 试剂和仪器

DNA 回收试剂盒(BioFlux 公司);质粒抽提试剂盒(BioOMEGA 公司);*Taq* DNA 聚合酶和核酸分子量标准(北京 TIANGEN 公司);PCR 引物合成和 DNA 序列测定由 TAKARA 公司完成;蛋白胨、酵母提取物、氯化钠和琼脂(上海 Sangon 公司);氨苄青霉素(华美生物工程公司);萤火虫荧光素酶检测试剂盒 E1500(Promega 公司);SPP 培

养基所用示蛋白胨、葡糖糖、酵母提取物、乙二胺四乙酸钠盐(Oxoid 公司);青霉素、链霉素、两性霉素(华北制药公司).anti-HA 抗体(Cali-Bio 公司);HRP 标记二抗(Zymed Lab 公司);SuperSignal 显色液(Pierce 公司);GJ-100 高压气体基因枪(宁波新芝生物科技公司);GloMaxTM 20/20 荧光检测仪(Promega 公司).

1.3 方法

1.3.1 重组质粒 pBX-LUC 的构建 根据克隆载体 pGL3-Control 中 *LUC* 基因(Accession NO. U47296)序列设计引物 LUC-F:5' CGGATCC-ATGGAAGACGCCAAAAACATAAAGAAAGG C 3', LUC-R:5' CGGCGCGCCTCACACGGCGA-TCTTCCGCCCT 3',下划线分别为酶切位点 *Bam*H I 和 *Asc* I. PCR 条件为:94℃ 5min, 94℃ 30s, 50℃ 30s, 72℃ 90s, 30 个循环, 72℃ 延伸 10min. PCR 产物经胶回收后与载体 pEASY-T1 按照合适比例混合, 25℃ 连接 20min, 连接产物转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞, 提取质粒并进行双酶切鉴定, 阳性克隆测序, 测序结果采用 DNA MAN(版本 5.2.2)软件分析.

分别对 pEASY-T1-LUC 和载体 pBX 进行 *Bam*H I 酶切和 *Asc* I 双酶切, 回收酶切产物中的目的片段 *LUC* 和目的载体, 按比例混合后用 T4 DNA 连接酶 16℃ 过夜连接, 连接产物转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞, 在含氨苄霉素的 LB 固体培养基 37℃ 过夜培养, 挑取单菌落在 LB 液体培养基中培养, 提取质粒 *Bam*H I 和 *Xho* I 酶切鉴定.

1.3.2 嗜热四膜虫的培养及饥饿 嗜热四膜虫 B2086 培养在 50mL SPP 培养液中, 生长条件为 30℃, 180r/min 振荡培养;当四膜虫生长至对数生长期($2.0 \times 10^5 \sim 5.0 \times 10^5$ 个/mL)时, 10mmol/L Tris-HCl(pH7.4)洗涤 1 次, 并于 50mL 10mmol/L Tris-HCl(pH7.4)中饥饿 18~24h.

1.3.3 四膜虫 B2086-LUC 的构建及鉴定 构建好的中间载体 pBX-LUC 用 *Xho* I 酶切线性化, 并用乙醇纯化浓缩后, 包裹在金颗粒上, 通过 GJ-1000 基因枪转入饥饿 18~24h 的嗜热四膜虫 B2086 中^[12-13], 4h 后加入巴龙霉素(终浓度为 100 μ g/mL)和 CdCl₂(终浓度为 0.5 μ g/mL), 分装到

96 孔板中,30℃恒温培养 3d 后,逐步增加巴龙霉素浓度, *LUC* 基因重组入 *MTT1* 位点并逐步取代 *MTT1* 基因(图 1)。

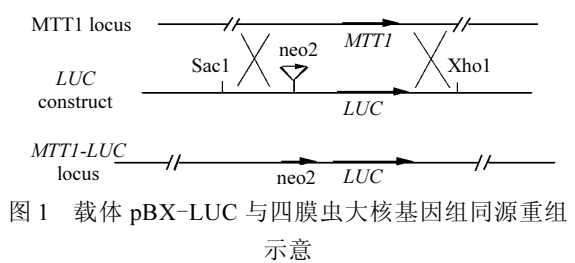


图 1 载体 pBX-LUC 与四膜虫大核基因组同源重组示意

提取嗜热四膜虫基因组,设计引物 MTT1F: 5' GCTACGTGATTCACGATTTATGCAATG 3', MTT1R: 5' CGAAACTGATTTTATGCAATTAT GAATTAC 3', PCR 扩增鉴定基因的重组效果。

1.3.4 HA-LUC 蛋白的免疫印迹法分析 PCR 鉴定 *LUC* 正确重组的四膜虫细胞在含 0, 0.1μg/mL 镉的 SPP 培养基中培养至浓度为 (2~3)×10⁵ 个/mL.收集样品 2×10⁴ 个细胞并加入 5×SDS-PAGE 上样缓冲液(5% β-巯基乙醇, 50% 甘油,10% SDS 和 250mmol/L Tris-HCl, pH6.8)后金属浴 95℃加热 5min.将样品在 10% SDS-PAGE 凝胶电泳后电转移至 PVDF 膜,5%脱脂奶粉室温封闭 2h,1:500 稀释的 anti-HA 抗体 4℃孵育过夜,1:500 稀释的 HRP 标记的二抗室温孵育 1h.经 SuperSignal 化学发光底物显色液显色 3min 后检测。

1.3.5 四膜虫 B2086-LUC 对不同重金属的响应 野生型四膜虫和 B2086-LUC 培养在 50 mL SPP 培养液中,生长条件为 30℃,180r/min 振荡培养.当四膜虫生长至对数生长期(2.0×10⁵~5.0×10⁵ 个/mL)时饥饿在 10mmol/L Tris-HCl(pH 7.4)后立即分装 5mL/管,分别用终浓度为 0, 0.001, 0.005, 0.01, 0.05, 0.1, 0.5μg/mL 的 CdCl₂;0, 0.000 5, 0.001, 0.01, 0.05, 0.1, 0.2μg/mL 的 HgSO₄;0, 0.25, 1, 1.25, 2, 2.5, 5mg/mL 的 CuCl₂;0, 0.25, 1, 1.25, 2, 2.5, 5mg/mL 的 ZnSO₄ 诱导 3h.取样后血

球计数板记数 3 次取平均值;每组样品分别取 2×10⁵ 个细胞于灭菌后的 1.5mL EP 管中,平行对照 3 组;8000r/min 离心 5min 后,弃尽上清,加入 200μL 裂解液,重悬混匀;取 100μL 样品于新的 EP 管中,同时加入 100μL 萤火虫荧光素酶底物,荧光检测仪检测并记录荧光值,受试样品 3 次计数取平均值,计算样品组与对照组荧光值的倍数关系,并绘制荧光值变化倍数-受试样品浓度关系。

2 结果

2.1 重组质粒 pBX-LUC 的鉴定

以克隆载体 pGL3-control 为模板,扩增萤火虫荧光素酶基因 *LUC*,琼脂糖凝胶电泳检验,PCR 产物大小与预期相符(图 2A).将 PCR 产物连接到载体 pBX 上,重组质粒 pBX-LUC 经 *Bam*H I 和 *Xho* I 双酶切后,得到大小分别为 7kb 的载体片段和 2.2kb 的含有目的基因 *LUC* 的片段(图 2B),重组质粒 pBX-LUC 的 *LUC* 测序结果与已报道的 *LUC* 基因序列进行比对,确证本研究克隆的 *LUC* 基因序列正确,表明重组质粒 pBX-LUC 构建成功。

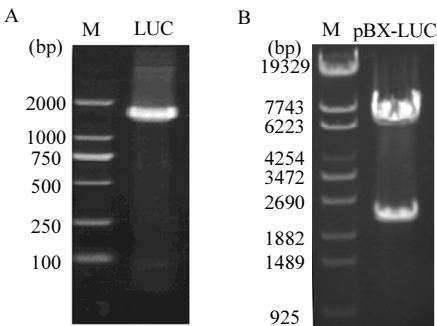


图 2 pBX-LUC 载体的鉴定

Fig.2 Identification of plasmid pBX-LUC

A: *LUC* 基因片段的 PCR 扩增,M 为 DL2000 DNA Marker(TaKaRa);B:pBX-LUC 质粒 *Bam*H I 和 *Xho* I 双酶切,M 为 λ-*Eco*T14 I digest(TaKaRa)

2.2 四膜虫 B2086-LUC 的鉴定

酶切、浓缩的 pBX-LUC 转化四膜虫 B2086 细胞,经同源重组,*LUC* 序列替代大核基因组上 *MTT1* 序列(图 3A),在不断增加的巴龙霉素浓度

下,基因组 *MTT1* 序列被 *LUC* 逐步替代.挑取在 200 μ g/mL 巴龙霉素下存活的 B2086 细胞株单克隆,扩大培养后提取基因组 DNA 进行 PCR 鉴定,阳性细胞株有 2 条扩增产物,750bp 为四膜虫大核基因组 *MTT1* 基因序列,2000bp 为含有 *LUC* 基因序列(图 3A),结果表明 *LUC* 基因序列部分替代了大核 *MTT1* 基因序列,从而证实含有 *LUC* 的重组四膜虫 B2086-*LUC* 构建成功.

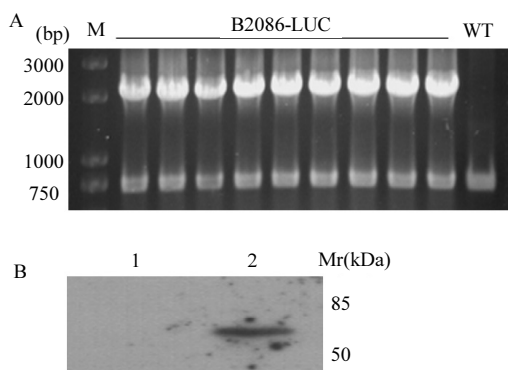


图3 四膜虫 pBX-*LUC* 细胞株的鉴定

Fig.3 Identification of *Tetrahymena* B2086-*LUC* strains

A:四膜虫突变体鉴定,B2086-*LUC*:重组 B2086 基因组 PCR 鉴定;WT:野生型细胞株基因组 PCR 鉴定;M:Trans2K Plus II DNA Marker (全式金);B:Western blot 检测 HA-*LUC* 蛋白的表达,1:野生型细胞株 B2086 的全细胞组分蛋白;2:,B2086-*LUC* 的全细胞组分蛋白

收集 PCR 鉴定为阳性的 B2086-*LUC* 细胞株并提取总蛋白,免疫印迹检测 HA-*LUC* 蛋白的表达,结果显示,HA-*LUC* 蛋白分子量大小约为 62.82kDa,与软件预测分子量大小相符,而在未经重金属诱导的细胞株中没有出现任何特异性条带(图 3B),表明 HA-*LUC* 蛋白在四膜虫细胞内表达.

2.3 四膜虫 B2086-*LUC* 对重金属的监测

荧光素酶基因是一种重要的报告基因,在应激物诱导时表达产生萤火虫荧光素酶,萤火虫荧光素酶可以催化荧光素氧化成氧化荧光素,在荧光素氧化的过程中,会发出生物荧光,然后通过荧光测定仪测定荧光素酶催化释放的生物荧光.重组四膜虫 B2086-*LUC* 对镉诱导的响应浓度范围为:0.001~0.5 μ g/mL,峰值为 19891 倍且对应的浓度为 0.1 μ g/mL(图 4A);对汞诱导的响应范围为:0.0005~0.2 μ g/mL,峰值为 1746 倍且对应的

浓度为 0.05 μ g/mL(图 4B);对铜诱导的响应范围为:0.25~5mg/mL,峰值为 2606 倍且对应的浓度为 2.5mg/mL(图 4C);对锌诱导的响应范围为:0.1~5mg/mL,峰值为 19463 倍且对应的浓度为 2mg/mL(图 4D).结果说明以四膜虫 *MTT1* 基因的启动子启动报告基因萤火虫荧光素酶的表达,可以检测多种应激物的表达,其中对非必需重金属镉、汞最敏感,铜和锌次之.

3 讨论

MT 基因在环境中存在重金属时的可诱导性使其可作为一种良好的报告基因.因此,MTs 被欧盟列入生物标记物并用于环境评估项目中,其中一种途径是直接检测 MT 转录或蛋白表达水平,另一种有效途径是将金属诱导型启动子组装到报告基因前,从而构建一个新的转基因生物用于发挥 WCB 的功能^[14-15].类似于其他生物中,四膜虫暴露在金属环境中时 MT 基因被优先诱导表达^[11,16].嗜热四膜虫金属硫蛋白基因 *MTT1* 启动子能够被多种重金属离子诱导,因此能够作为潜在的环境污染物的应答元件^[9].

迄今为止,85%的用于检测重金属的 WCBs 是基于遗传学改造的细菌^[15],而 15%是基于真核生物^[17],分别是酿酒酵母、多形汉逊酵母及四膜虫^[5,18-19].大多数 WCBs 只能响应 2 种或多种金属,而且有些表现出较强的特异性^[20-22].其中以重组酿酒酵母为 WCB 可用于检测样品中的铜污染,最低可检测到 0.5 μ mol/L^[19].以重组多形汉逊酵母为载体的 WCB 主要用于检测环境中的有毒重金属的污染,尤其是镉污染^[18].以四膜虫为载体构建的 WCB 是通过基因重组将萤火虫荧光素酶基因取代 *BTU2* 基因,并利用 *MTT1* 和 *MTT5* 基因启动子的多重响应机制,在生长环境中含有重金属等应激因素时,细胞能够定量检测环境中的污染指数,对非必需重金属(镉,铅,砷和汞)的可检测的最低浓度约为 25~50nmol/L,而必须金属(如铜和锌)的可检测的最低浓度约为 1 μ mol/mL^[5].本研究获得的重组四膜虫细胞株 B2086-*LUC* 对镉、汞也表现出很强的响应,可响应的最低浓度为 5~10ng/mL,与已报道的四膜虫 WCB 的敏感

性相近^[5].但是本研究将 *LUC* 基因取代 *MTT1* 基因,而不是四膜虫生长必需的微管蛋白,一方面削弱了 *MTT1* 原本的解毒反应,另一方面在不破坏四膜虫微管正常发育的情况下,实现重组细胞株对重金属镉和汞的高敏感性.另外 *MTT1* 基因启动子在细胞正常的生理状态下,几乎没有转录产物的出现,而 *MTT2* 和 *MTT4* 在生理状态下有较

高的表达水平,因此 *MTT1* 基因启动子的选择有效的减少了荧光的背景信息. B2086-LUC 细胞株对铜和锌的响应稍弱,说明其对不同重金属的诱导表现出差异,这与 *MTT1* 基因的启动子对不同重金属的敏感性一致.通过多次重复实验证明了 B2086-LUC 细胞株的稳定性及对重金属污染检测结果的可重复性.

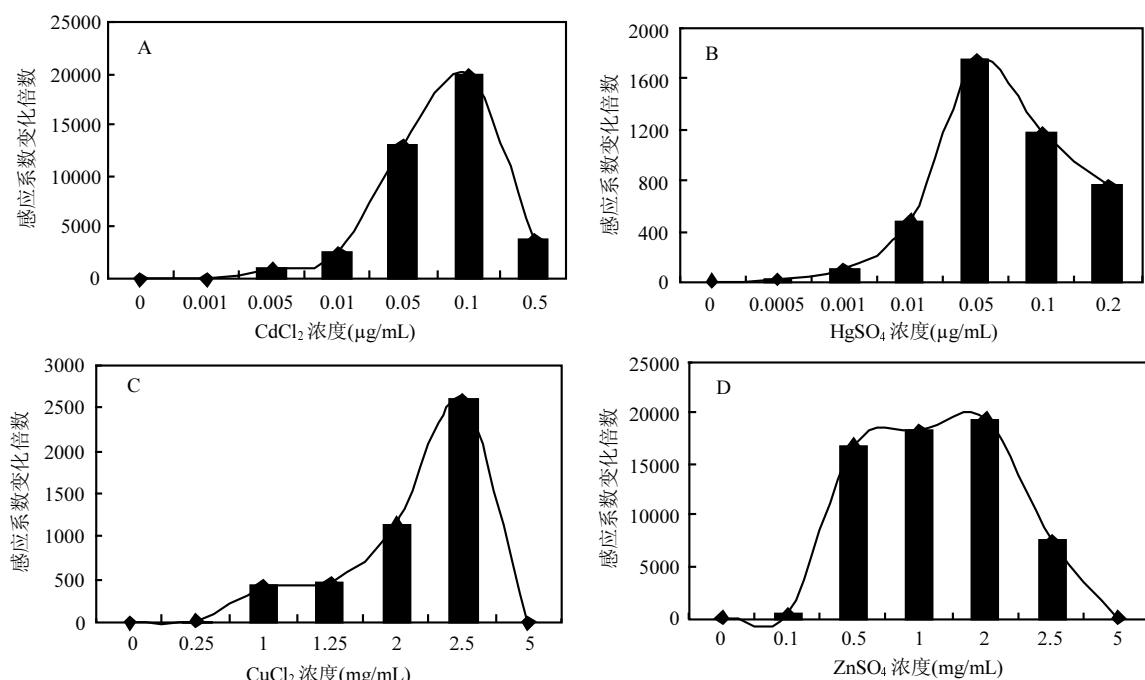


图4 B2086-LUC 四膜虫细胞株对不同重金属离子的响应

Fig.4 The response to different heavy metal ions in *Tetrahymena* B2086-LUC cell

A:四膜虫细胞株 B2086-LUC 对 CdCl₂ 的响应;B:四膜虫细胞株 B2086-LUC 对 HgSO₄ 的响应;C:四膜虫细胞株 B2086-LUC 对 CuCl₂ 的响应;D:四膜虫细胞株 B2086-LUC 对 ZnSO₄ 的响应;每一个数据来源于 3 次重复

获得 WCB 后用于检测环境污染物,除了需要特定的基因外,它还依赖于测定介质和暴露于诱导物中的时间,以及细胞培养参数如培养浓度和生长阶段等因素,因此建立标准化的操作是必需的.本研究中,重组四膜虫 B2086-LUC 培养到对数生长期($2.0 \times 10^5 \sim 5.0 \times 10^5$ 个/mL),饥饿在 10 mmol/L Tris-HCl(pH 7.4)后立即分装,加入不同浓度的不同受测样品诱导 3h,这与已报道的四膜虫 WCB 的检测方法相似^[5].WCB 的一个潜在的缺陷是在检测高毒性的样品时,使细胞丧失生存能力并导致假阴性结果的产生,

这些样品不仅抑制诱导表达,也同时抑制了报告基因的本底表达,本研究通过稀释样品恢复本底和诱导反应,从而实现有效检测.因此,系列稀释诱导的 WCB 的荧光表达不仅可以用于检测高毒性样品引起的假阴性,还可以用于识别潜在的假阳性.本研究中的工程化细胞株基于 *MTT1* 基因的启动子对一些重金属离子(如镉,汞)具有的偏爱性,因而具有特定的监测优势.因此重组萤火虫荧光素酶的四膜虫 B2086-LUC 可望作为一种良好的环境污染监测工具用于环境中镉、汞的快速监测.

4 结论

4.1 重组过表达载体 pBX-LUC 成功构建,其中含有 *LUC* 基因,*MTT1* 基因启动子,HA 标签,*neo2* 抗性基因。

4.2 构建含有 *LUC* 的 WCB 重组四膜虫 B2086-LUC 细胞株,*LUC* 基因部分取代 *MTT1* 基因,在重金属诱导下 *LUC* 蛋白特异表达。

4.3 B2086-LUC 对重金属镉和汞的响应最敏感,可检测的最低浓度为 5~10ng/mL;对铜和锌的响应较弱,可检测的最低浓度为 0.5~1mg/mL。

参考文献:

- [1] Kong I C, Bitton G, Koopman B, et al. Heavy metal toxicity testing in environmental samples [J]. Rev. Environ. Contam. Toxicol., 1995,142:119-147.
- [2] Leonard S S, Harris G K, Shi X. Metal-induced oxidative stress and signal transduction [J]. Free Radic Biol. Med., 2004,37(12): 1921-1942.
- [3] 王利凤,郭风华,杨 卓.纳米碳化钨对斑马鱼胚胎发育的影响 [J]. 中国环境科学, 2012,32(7):1280-1283.
- [4] 杜青平,刘伍香,袁保红,等.1,2,4-三氯苯对斑马鱼生殖和胚胎发育毒性效应 [J]. 中国环境科学, 2012,32(4):736-741.
- [5] Amaro F, Turkewitz A P, Martin-Gonzalez A, et al. Whole-cell biosensors for detection of heavy metal ions in environmental samples based on metallothionein promoters from *Tetrahymena thermophila* [J]. Microb. Biotechnol., 2011,4(4):513-522.
- [6] Gutiérrez J C, Gonzalez A M, Díaz S, et al. Ciliates as a potential source of cellular and molecular biomarkers/biosensors for heavy metal pollution [J]. Eur. J. Protistol., 2003,39(4):461-467.
- [7] Belkin S. Microbial whole-cell sensing systems of environmental pollutants [J]. Curr. Opin. Microbiol., 2003,6(3):206-212.
- [8] Cole E S, Anderson P C, Fulton R B, et al. A proteomics approach to cloning fenestrin from the nuclear exchange junction of *Tetrahymena* [J]. J. Eukaryot Microbiol., 2008,55(4):245-256.
- [9] Shang Y, Song X, Bowen J, et al. A robust inducible-repressible promoter greatly facilitates gene knockouts, conditional expression, and overexpression of homologous and heterologous genes in *Tetrahymena thermophila* [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2002, 99(6):3734-3739.
- [10] Wloga D, Strzyewska-Jowko I, Gaertig J, et al. Septins stabilize mitochondria in *Tetrahymena thermophila* [J]. Eukaryot Cell, 2008, 7(8):1373-1386.
- [11] Diaz S, Amaro F, Rico D, et al. *Tetrahymena* metallothioneins fall into two discrete subfamilies [J]. PLoS One, 2007,2(3):e291.
- [12] Gaertig J, Gu L, Hai B, et al. High frequency vector-mediated transformation and gene replacement in *Tetrahymena* [J]. Nucleic. Acids. Res., 1994,22(24):5391-5398.
- [13] Gaertig J, Kapler G. Transient and stable DNA transformation of *Tetrahymena thermophila* by electroporation [J]. Methods Cell Biol., 2000, 62:485-500.
- [14] Hynninen A, Virta M. Whole-cell bioreporters for the detection of bioavailable metals [J]. Adv. Biochem. Eng. Biotechnol., 2010, 118:31-63.
- [15] Magrisso S, Erel Y, Belkin S. Microbial reporters of metal bioavailability [J]. Microb. Biotechnol., 2008,1(4):320-330.
- [16] Dondero F, Cavaletto M, Ghezzi A R, et al. Biochemical characterization and quantitative gene expression analysis of the multi-stress inducible metallothionein from *Tetrahymena thermophila* [J]. Protist, 2004,155(2):157-168.
- [17] Richard M, Walmsley P K. The Eukaryote Alternative: advantages of using yeasts in place of bacteria in microbial biosensor development [J]. Biotechnol. Bioprocess Eng., 2000,5: 387-394.
- [18] Park J N, Sohn M J, Oh D B, et al. Identification of the cadmium-inducible *Hansenula polymorpha* SEO1 gene promoter by transcriptome analysis and its application to whole-cell heavy-metal detection systems [J]. Appl. Environ. Microbiol., 2007,73(19):5990-6000.
- [19] Ranjit S, Shetty S K D, Liu Y, et al. Fluorescence based sensing system for copper using genetically engineered living yeast cells [J]. Biotechnology and Bioengineering, 2004,88(5):664-670.
- [20] Tom-Petersen A, Hosbond C, Nybroe O. Identification of copper-induced genes in *Pseudomonas fluorescens* and use of a reporter strain to monitor bioavailable copper in soil [J]. FEMS Microbiology Ecology, 2001,38(1):59-67.
- [21] Corbisier P, van der Lelie D, Borremans B, et al. Whole cell- and protein-based biosensors for the detection of bioavailable heavy metals in environmental samples [J]. Analytica Chimica Acta, 1999,387(3):235-244.
- [22] Ivask A, Rolova T, Kahru A. A suite of recombinant luminescent bacterial strains for the quantification of bioavailable heavy metals and toxicity testing [J]. BMC Biotechnol., 2009,9(1):41.

致谢: 重组四膜虫的构建由王清路博士及梁海霞博士协助指导完成,在此表示感谢。

作者简介: 张鹏幸(1987-),女,山西长治人,山西大学硕士研究生,主要从事水环境中重金属污染的毒理学研究。