

转 MT-like 基因衣藻 的重金属结合能力与抗性特征分析^{*}

胡章立 邢 苗^{**} 吴玉荷 涂 欢^{***}

(深圳大学生命科学学院, 深圳 518060)

提 要 通过对转 MT-like 基因衣藻和其野生品系的比较分析,发现转基因藻株对重金属镉和铜的结合能力及抗性均有大幅提高。在重金属结合能力方面,低浓度(5 ~ 10 $\mu\text{mol/L}$)的镉溶液中,转基因藻重金属结合量是野生株的 1.5 倍左右,而相对高浓度(30 ~ 50 $\mu\text{mol/L}$)的镉溶液中,由于重金属对藻细胞的毒害作用,使两者的差异不明显。在重金属铜和镉的抗性方面,转基因藻表现出明显高于野生藻株的抗性特征。用转基因藻去处理含铜的工业废水,结果发现转基因藻的处理效率可以提高 10% 以上。这说明 DNA 重组技术对提高藻类的废水处理效率方面具有较大的潜力。

关键词 DNA 重组 莱茵衣藻 废水处理

分类号 X703

随着现代工业的不断发展,重金属已成为非常严重且普遍存在的环境污染物。它不能象其它环境污染物一样通过分子降解的方式从环境中消失,只能通过一定的途径从环境中分离。通常用于分离废水中重金属的方法诸如化学沉淀法,离子交换树脂分离法等不仅成本较高,而且在分离过程中会产生的大量废物,造成二次污染。虽然大多数微生物(诸如细菌、酵母等)都能结合重金属,但微藻以其独特的结构及生理特性决定了它在废水处理工程中的特殊作用,特别是真核绿藻能够选择性地分离浓缩有毒重金属元素,在这一过程中并不产生额外的污染^[1,2]。通过对影响微藻废水处理效率的诸多因素进行大量分析,发现藻类与重金属的结合能力是影响污水处理效率的第一限制因子。如何提高藻类与重金属的结合能力?目前,大都集中在从藻种库和重金属污染水体中分离出重金属结合能力强的藻种或藻类新品系,但由于受藻类资源等方面的限制,要找到重金属结合能力大幅提高的新品种是非常困难的。而 DNA 重组技术为构建高重金属结合能力的藻类新品系提供了全新而可行的途径。衣藻由于其遗传背景相对较清楚,被研究者称为“光合酵母”,在重金属废水处理方面的作用已得到证明^[3]。MT-like 基因是从紫羊茅中分离出的一种金属硫蛋白基因,通过构建衣藻外源基因表达系统,并使 MT-like 基因在该系统中高效表达,筛选出了转基因衣藻新品系^[4]。本研究将对这些新品系的重金属结合能力和抗性特征进行较详细的分析。

^{*} 广东省自然科学基金(011743)和深圳市科技局基金联合资助。

收稿日期 2002-04-15;收到修改稿日期 2002-06-25。胡章立,男,1964 年生,博士,副教授。

^{**} 通讯作者。

^{***} 现在深圳市科学技术局工作。

1 材料与方法

1.1 藻种

Chlamydomonas reinhardtii cc-849 由美国 *Chlamydomonas* Genetic Center of Duke University 提供 转 MT-like 基因藻株 Tr20B2、Tr20B1 和 Tr10A 由作者在香港城市大学做博士后研究期间构建^[4]。

1.2 藻细胞培养

藻细胞生长培养基采用 TAP 培养基,基本组分如下:25mL 4× Beijerinck 盐(每 1L 中含 16g NH_4Cl , 2g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 4g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), 1mL 1mol/L (K) PO_4 pH 7.0, 加入适量微量元素,用冰醋酸调 pH 至 7.0,并加水到 1L 体积。

1.3 藻细胞重金属结合能力分析

取已知生物量的对数期藻细胞,悬浮于含有不同浓度金属离子的水溶液,置于光照摇床上,摇动频率为 100 转/min,光照强度为中 167 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$,温度为 25 $^\circ\text{C}$,处理时间为 5min ~ 2h 不等。处理前后水溶液中重金属浓度采用 SHIMADZU AA-680/G V-5 型原子吸收光谱测定。

1.4 藻细胞重金属抗性测定

藻细胞的重金属抗性测定采用两种途径,一方面将藻细胞接种在含不同浓度重金属的平板培养基中,观察藻细胞的生长情况;另一方面将藻细胞接种到一定重金属含量的培养基中,测定其生长曲线。

1.5 藻细胞生物量的测定

以单位体积内藻细胞叶绿素含量、光密度大小(OD_{663})和细胞干重作为藻细胞的生物量指标。

2 结果

2.1 转基因藻 Tr20B1 和野生藻株 cc-849 对金属镉结合能力比较

取生长到对数期的转基因藻(Tr20B1)和野生藻株(cc-849)两种藻细胞分别悬浮于含有 5 $\mu\text{mol/L}$ 、10 $\mu\text{mol/L}$ 、30 $\mu\text{mol/L}$ 和 50 $\mu\text{mol/L}$ 的金属镉离子的溶液,置于光照摇床上摇动培养 2h,测定藻细胞结合镉离子的量。结果表明,在较低浓度的镉离子溶液(5 ~ 10 $\mu\text{mol/L}$)中,转基因藻重金属结合能力是野生藻株的 1.5 倍左右,而高浓度的镉离子溶液(30 ~ 50 $\mu\text{mol/L}$)中,两者的差异不太明显(图 1,图 2)。

2.2 转基因藻 Tr20B1 和野生株 cc-849 对铜离子抗性的比较

将相同生物量的转基因藻 Tr20B1 和 cc-849 接种到含有 150 $\mu\text{mol/L}$ 铜离子的 TAP 液体培养基中,分别测定其生长曲线。结果表明,转基因藻 Tr20B1 生长较好,其生长速率明显高于 cc-849,这说明通过基因工程操作能够提高藻细胞对重金属的抗性(图 3)。

2.3 转 MT-like 基因藻和野生藻细胞对金属镉抗性特征分析

将三个转基因藻株 Tr20B1、Tr20B2 和 Tr10A 与 cc-849 同时接种到一个含有 600 $\mu\text{mol/L}$ Cd 的固体 TAP 平板培养基上,结果发现 cc-849 因重金属镉毒性而不能在平板中生长,而三个转基因藻株 Tr20B1、Tr20B2 和 Tr10A 在平板中生长状况良好,特别是 Tr20B1 和 Tr20B2 的生长受重金属的影响较少(图 4),这说明它们具有很高的抗性。

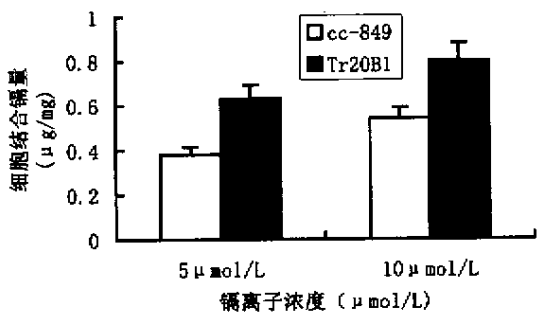


图 1 转基因藻与野生藻在低浓度镉离子溶液中的重金属结合能力比较
Fig.1 Comparison of the heavy metal binding properties between transgenic strain and wild type in low cadmium concentration

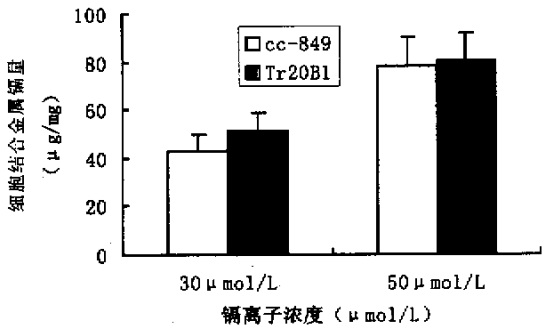


图 2 转基因藻与野生藻在高浓度镉离子溶液中的重金属结合能力比较
Fig.2 The heavy metal binding properties of the transgenic strain and wild type in high cadmium concentration

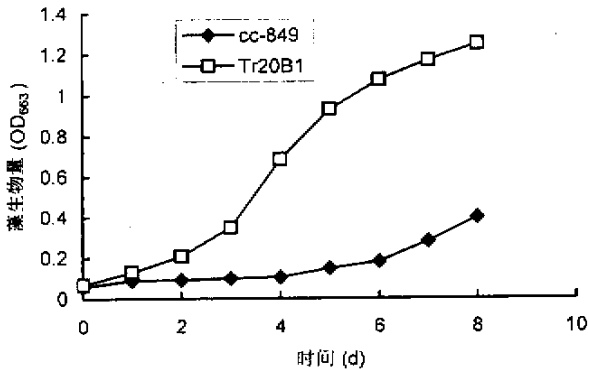


图 3 转基因藻与野生藻株在富含金属铜离子培养基中的生长曲线
Fig.3 The growth curve of transgenic strain and wild type in the medium with high copper concentration

2.4 转 MT-like 基因藻对含重金属铜离子的废水处理效率分析

将相同生物量的转基因藻和野生藻分别放入藻类废水净化系统 ,处理含 15mg/L 铜的废水 ,其重金属去除效率如图 5 示. 转基因藻处理过的废水中 ,90% 以上的铜离子被去除掉 ,而野生藻株的去除效率在 70% ~ 80% 左右(图 5). 表明转基因藻被用于提高生活和工业废水净化效率是有效而且可行的.

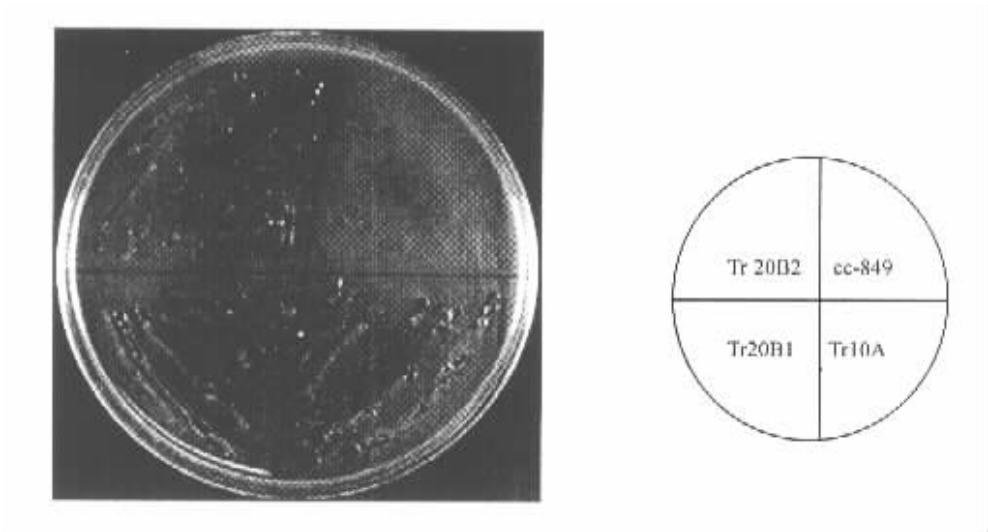


图 4 转基因藻和野生藻对金属镉抗性的比较
(cc-849 是野生株 ,Tr 20B1、Tr 20B2 和 Tr 10A 为转基因藻)

Fig.4 Comparison of the heavy metal tolerance between wild type and transgenic strain

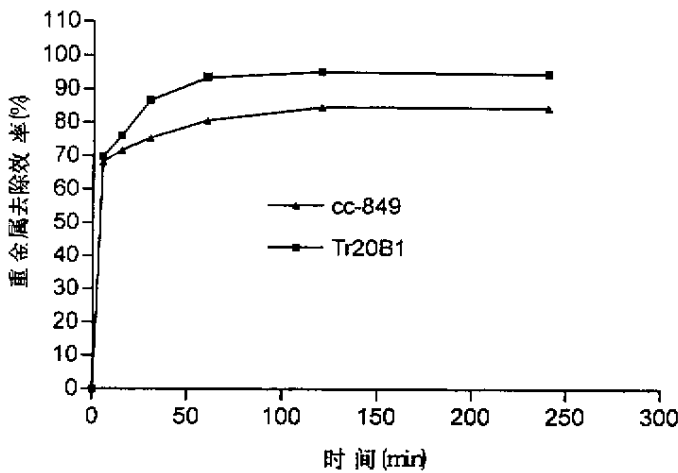


图 5 转基因藻和野生藻对废水中重金属处理效率比较

Fig.5 The heavy metal removal efficiency of wild type and transgenic strain

3 讨论

金属硫蛋白(MT)是一种低分子量且半胱氨酸含量丰富的金属结合蛋白 ,它存在于哺乳

动物、植物及微生物中,多种重金属诸如镉、铜、汞等已经被发现多与 MT 的半胱氨酸基团结合。导入 MT 基因进入有机体能改善其重金属结合能力^[5]。最近有人从高等植物紫羊茅(*Festuca rebr* cv. Merlin)中分离出一种类金属硫蛋白基因(MT-like),将这一基因导入酵母中表达,使酵母的重金属结合能力大大提高^[6]。衣藻是一种生长速率很快的绿藻,被研究者们称为“光合酵母”。衣藻在重金属废水处理方面的作用已得到研究证明^[3],由于目前的研究结果还没有证明在绿藻体内有 MT 的存在^[7],因此,可以设想 MT 基因被整合到绿藻核 DNA 后,将可能大大提高转基因绿藻的重金属结合能力。本研究结果便进一步证实了这一设想(图 1,图 5)。

藻类与重金属结合包括两方面的机理:一是被动吸附过程,主要是通过细胞壁组分、胞外多糖等生物多聚物与重金属的结合,这种结合是一个快速过程,它与细胞的代谢活动之间没有直接的联系,而另一部分重金属则通过细胞膜与胞内蛋白质(如金属硫蛋白等)结合,这个过程是一个与藻细胞代谢相联系的耗能过程^[8,9]。本研究发现在低浓度的镉离子存在的情况下,转基因衣藻结合重金属的量是野生藻株的 1.5 倍以上,而在高浓度的镉离子溶液中,两者的差异很小(图 1,图 2),这说明转基因藻重金属结合能力的提高主要是主动耗能吸收能力的增加,而这一过程只有在低浓度的镉溶液中才能表现出来,因为高浓度的重金属溶液中,藻细胞受到重金属的毒害作用,藻细胞与重金属的结合主要是被动结合过程,因此,转基因藻和野生藻株间重金属结合能力的差异不明显。

藻细胞的重金属抗性机理是多方面的,如细胞内含物与重金属的结合、细胞对重金属的外排等^[9]。转基因衣藻的抗性提高主要是因为整合到衣藻基因组中的 MT-like 基因的表达产物类金属硫蛋白与重金属的结合。不同的转基因藻品系 Tr20B1、Tr20B2 和 Tr10A 之间也表现出抗性的差异(图 4),可能是因为三个品系藻细胞内类金属硫蛋白的表达量的差异引起的。

由于藻类细胞在废水处理中的应用前景非常广阔,而从本研究的结果可以看出,DNA 重组技术在藻类中的应用可以改变藻类的重金属抗性和结合能力,这为工业和生活废水中重金属处理效率的提高提供了一个新的思路。在水环境的污染中,除了重金属外,另一类严重的污染物是有机污染,通过重组与有机污染物处理相关的基因(如 P450 等),构建同时处理重金属和有机污染物的基因工程藻株的研究正在进行中。

参 考 文 献

- 1 Hollom Z R, Volwsky B. Biosorption of lead and nickel by biomass of marine algae. *Biotechnology and Bioengineering*, 1994 **43**: 1001 - 1009
- 2 Shigeru M, Akira O. Bioaccumulation and Biotransformation of Arsenic, Antimony, and Bismuth Compounds by Freshwater Algae. In: Wong Y S, Tam N F Y, eds. Wastewater treatment with algae. Berlin Springer-Verlag, 1998: 73 - 88
- 3 Cai X H, Logan T. Application of enkaryotic algae for the treatment of heavy metal contamination in water. *Molecular Biology and Biotechnology*, 1995 (4): 338 - 344
- 4 Hu Z L, Wong Y S. Expression of the metallothionein-like gene from *Festuca rubra* in *Chlamydomonas reinhardtii*. Ninth International Conference on the Cell and Molecular Biology of Chlamydomonas. Amsterdam, 2000
- 5 Zhou J, Goldsbrough P. Structure, organization and expression of the metallothionein gene family in *Arabidopsis*. *Mol Gen Genet*, 1995 **248**: 318 - 328
- 6 麻密, 曾永强, 黄玉山等. 紫羊茅重金属抗性和敏感品种中类金属硫蛋白基因的鉴定及表达初探. 植物学报, 1997, **39**(11): 1078 - 1081

7 Robinson N J. Algal metallothioneins : secondary metabolites and proteins. *Journal of Applied Phycology* ,1989 ,**1** 5 – 18

8 Asku Z. Biosorption of heavy metals by microalgae in batch and continous systems. In : Wang Y S , Tam N F Y , eds. Wasterwater treatment with algae. Berlin Springer-Verlag , 1998 37 – 50

9 Shaw A J. Heavy metal tolerance in plants : evolutionary aspects. Boca Raton :CRC Press , 1990

**The Comparison of Heavy Metal Binding Properties
and Tolerance between Transgenic Strains and Wild Type
in *Chlamydomonas reinhardtii***

HU Zhangli XING Miao WU Yuhe TU Huan
(College of Life Science , Shenzhen University , Shenzhen 518060 ,P. R. China)

Abstract

The Comparison of the heavy metal binding properties and tolerance was studied between wild type and transgenic strains which expressed a foreign MT-like gene from*Festuca rubra* L Merlin in*Chlamydomonas reinhardtii* . The results showed that the cadmium binding capacity of transgenic strain was 1. 5-fold of the wild type in low cadmium concentration(5 – 10 μ mol/L) , however , there was not marked difference of heavy metal binding capacity in high cadmium concentrtrion(30 – 50 μ mol/L). It indicated that the difference of heavy metal binding capacity was from active uptake between transgenic strain and wild type. On the other hand , transgenic strain also showed more higher tolerance than wild type when they were cultured in 150 μ mol/L copper solution medium and 600 μ mol/L cadmium agar medium. Transgenic strain was used to treat wastewater , it could enhance more than 10% of copper removal efficiency than wild type.

Keywords : DNA recombination *Chlamydomonas reinhardtii* ; wastewater treatment