

小鼠金属硫蛋白在聚胞藻中的金属诱导表达与纯化

郭祥学* 赵 晖 施定基¹ 徐旭东² 茹炳根**

(北京大学生命科学学院生物化学及分子生物学系 蛋白质工程及植物基因工程国家重点实验室 北京 100871)

(中国科学院植物研究所光合作用研究室 北京 100093)¹

(美国密执安州立大学植物学国家实验室 密执安州 48824-1312, 美国)²

摘 要 应用蓝藻类金属硫蛋白基因启动子(*smt* O-P)的金属诱导性,在单细胞的聚胞藻 PCC 6803 中表达小鼠金属硫蛋白结构基因(mMT-1 cDNA)。在大肠杆菌 HB 101 中构建含有 *smt* O-P 和 mMT-1 cDNA 的穿梭表达载体 pKT-MRE,经质粒转移,链霉素筛选, Southern 和 Western 杂交分析鉴定得稳定的转基因工程藻落。同时,做小批量锌诱导表达,并纯化了外源蛋白,5L 培养液含鲜藻重 5.0g,得到 3.5mg mMT-1;转基因藻在高金属浓度下的耐受性测定表明,外源基因的表达提高了蓝藻对金属离子的抗性,约为野生藻的 2 倍。

关键词 聚胞藻 PCC 6803,小鼠金属硫蛋白-1, *smt* O-P 区域,金属抗性,转基因蓝藻
学科分类号 Q78

蓝藻是具有光合放氧能力的原核微生物,分布广泛,在较恶劣的生存环境如干旱、高盐、重金属或有机物污染等区域发挥着生命的先驱作用。1957 年, Margoshes 和 Vallee 等在马肾里发现哺乳动物金属硫蛋白(Metallothionein, MT)后^[1], 1972 年, Maclean 在蓝藻中也发现了类似的金属结合硫肽^[2], 1979~1988 年, Olafson 等对此做了进一步研究,正式命名为蓝藻 MT。但是,这种原核 MT 的金属结合能力只有哺乳动物 MT 一半左右,且偏爱于结合 Zn^{2+} , 而哺乳动物 MT 的 α -结构域对于重金属污染性质严重的 Cd^{2+} 的结合能力远大于 Zn^{2+} ^[3]; 1993 年, Huckle 等在聚球藻中分离出蓝藻 MT 基因^[4]; 同时, Gupta 等研究了其启动区域 *smt* O-P 的金属诱导性质和作用机制。认为:① *smt* O-P 是一个金属诱导启动子, Zn^{2+} 最具有诱导效应;② 金属离子以锌指蛋白形式作用于 *smt* O-P 的 MAC(Metal associated complex)区域,调控 *smt* 基因的转录^[5]。

本文工作把结合重金属离子能力很强的哺乳动物小鼠 MT-1 基因(mMT-1 cDNA)与蓝藻 *smt* O-P 构成金属调控表达单元(Metal regulated element, MRE), 导入聚胞藻 PCC6803 中,进行金属诱导表达和纯化 mMT-1,并检测了转基因对于提高蓝藻金属离子耐受能力的作用,为藻类基因工程制药进行了有益的探索。

本研究得到国家 863 生物高技术项目基金资助(No. 863-103-21-09)。

* 现在地址:北京市朝阳区大屯路 15 号蛋白质工程室 100101。

** 联系人。Tel:(010)62751842。

收稿日期:1997-07-02,修回日期:1998-02-29。

1 材料与方 法

1.1 材料与试剂

质粒 pBX-MT 由美国华盛顿大学 R.D.Palmiter 教授赠送;质粒 pRL-439 和 pKT210 均由美国密执安州立大学 P.C.Wolk 教授赠送;启动子 *smt* O-P 为化学合成并经测序验证的 117bp 的 DNA 片段;所用的酶为美国 Promega 公司产品,抗生素为德国 Serva 公司产品,地高辛标记 Southern 试剂盒为德国宝灵曼公司产品。

聚胞藻 PCC 6803 在 26℃,光照(光强为 3000lx)并振荡(转速小于 120r/min)条件下培养于 BG-11 液体培养基中^[6],保种每隔 15d 换新鲜培养基,繁殖培养每隔 7d 换新鲜培养基。

1.2 穿梭表达载体构建

用 pRL439 质粒连接上 *smt* O-P 区域和 mMT-1 cDNA 片段形成 pRL-MRE,再与 pKT210 相连构成能在大肠杆菌和蓝藻中穿梭表达的载体 pKT-MRE。以上操作均按分子克隆手册中通用方法^[7],质粒克隆与扩增均在大肠杆菌 HB101 中进行。

1.3 转移、筛选与 Southern 杂交鉴定^[7]

20ml 蓝藻在对数生长后期离心(3000r/min, 10min, 25℃)收集并洗涤后悬浮于体积尽可能小的 BG-11 培养基中。分别取 1 μ l 的 1, 10, 100 和 1000 倍稀释的蓝藻细胞悬浮液与 200ng 穿梭表达质粒 DNA 黑暗中培养 6h 后,均匀涂布在无菌 NC 膜上,贴于含 0.8% 琼脂的 BG-11 固体培养基表面光照培养 3d 后,依次每隔 3d 转移到 5, 15, 25 μ mol/L 链霉素(Sm)的培养基上进行筛选培养。挑出 Sm 阳性藻落在含 25 μ mol/L Sm 的 BG-11 中振荡(120r/min)培养 7d 后,提取质粒 DNA^[8]并经 BamHI-Bgl II 消化后,做 Southern 转移,探针杂交及显色。

1.4 金属诱导表达和 SDS-PAGE^[7]

在 50 μ mol/L Zn²⁺ 诱导下处于对数生长中期的蓝藻细胞,经离心洗涤后,重悬于 0.1mol/L Tris-HCl, pH8.0(含 20mmol/L DTT),冰水浴超声破碎(15s \times 6),离心(15000r/min, 4℃, 30min)取上清作为原液。一部分原液在沸水中保温 3~5min,冰浴 30min 后离心取上清,与原液一起进行 SDS-PAGE(5% 浓缩胶, 15% 分离胶),恒压 90V, 45min 后转为恒压 120V,电泳 2.5h。

1.5 外源蛋白的小批量表达与纯化

100ml 藻种在 Sm(25 μ mol/L)筛选条件下培养 3d 后,转入 5L 新鲜 BG-11 培养液中再培养 6~8d,同时加入 ZnCl₂ 溶液至 Zn²⁺ 终浓度为 50mmol/L。离心收集、洗涤及破碎蓝藻细胞,取上清(条件同 1.4),经凝胶过滤和离子交换层析纯化,锌原子吸收和氨基酸组成测定等鉴定得到表达的外源 mMT-1^[1]。

1.6 转基因蓝藻在金属离子环境中生长曲线测定

一种转为粗略的计算蓝藻活细胞数的方法是测叶绿素 a 的可见光吸收值 OD₆₆₅ (OD₆₆₅ \times 4.5 \times 10⁶=细胞数/ml),本实验中直接取 OD₆₆₅ 值做为生长状态中活细胞数目指标,做不同金属浓度的蓝藻 OD₆₆₅-时间生长曲线,并与野生型做比较。

2 结 果

2.1 穿梭表达载体的构建

金属诱导启动子 *smt* O-P 具有典型的原核启动子结构(详见文献[4, 5])。实验中把 pBX-MT 上 mMT-1 结构基因(Bgl II --BamH I 片段)与 *smt* O-P 相连接构成在蓝藻中可金属诱导表达的单元(MRE), pKT210 上的 RSF1010 帮助载体对蓝藻转移和在蓝藻中复制^[8]。从而构建了一个在大肠杆菌和蓝藻中可转移、复制和调控的 mMT-1 金属诱导表达载体 pKT-MRE(图 1)。

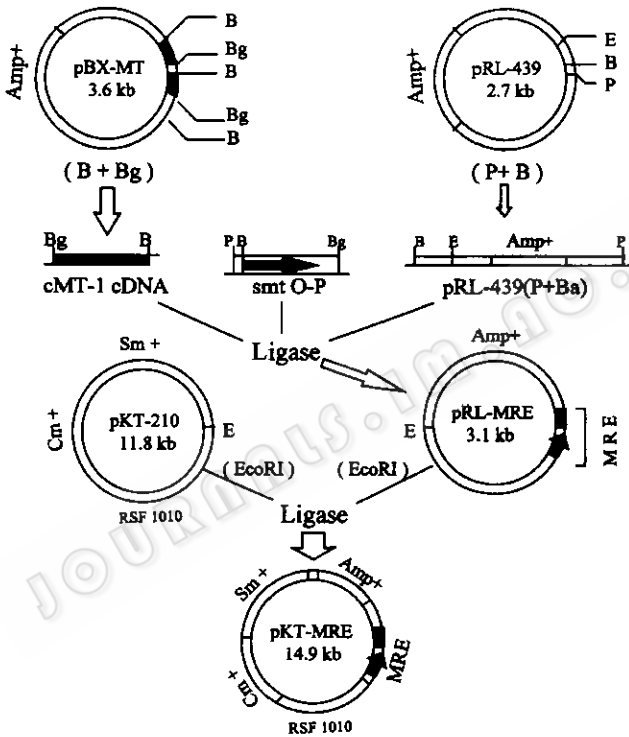


图 1 穿梭表达载体 pKT-MRE 的构建

Fig. 1 Shuttle expression vector pKT-MRE construction

穿梭表达载体 pKT-MRE 有 15kb 连接效率很低,需严格控制好片段质量和比例,且不容易转化蓝藻细胞。在大肠杆菌中具有 Amp^+ & Cm^+ 抗性,而在蓝藻中 Sm^+ 抗性更为敏感。外源基因 mMT-1 cDNA(Bgl II -BamH I 片段, ~300bp),有开放读码框 183bp,编码 61 个氨基酸的小鼠金属硫蛋白,它有比蓝藻类金属硫蛋白更高的金属结合能力,尤其是其 α -结构域对于重金属 Cd 的选择性结合能力的稳定性远大于后者^[3]。

2.2 转基因蓝藻的获得

对载体暗吸收后的蓝藻细胞被均匀涂布于含有系列浓度的链霉素的 BG-11 固体培养基上培养约 15d 后,得到平均每板 4 个阳性藻落;分别转入液体培养基中,逐步拉大体积和抗生素浓度,培养到一定数量,最后得到两个生长状态较好的转基因藻,做 Southern

杂交鉴定(图 2)。

由于蓝藻基因工程研究起步较晚^[9,10],目前单细胞蓝藻的转基因用得最多的是直接吸收转化法^[11]。但是,聚胞藻 PCC 6803 蓝藻表面有一层胶质粘层,大大地降低了转化效率,较好的处理方式是选择对数生长中期的蓝藻做转化。另外,蓝藻本身就有几种质粒^[12],做 Southern 鉴定时定量很难准确,试验结果表明上样量较明显地偏大,条带较宽。

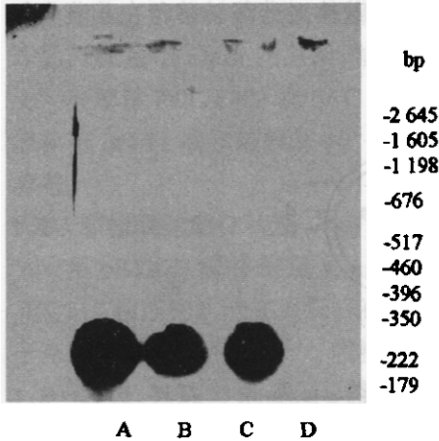


图 2 转基因蓝藻 Southern 杂交鉴定

Fig. 2 Southern hybridization of transgenic cyanobacteria

A. pBX-MT; B. Sample 1;
C. Sample 2; D. Wild Type

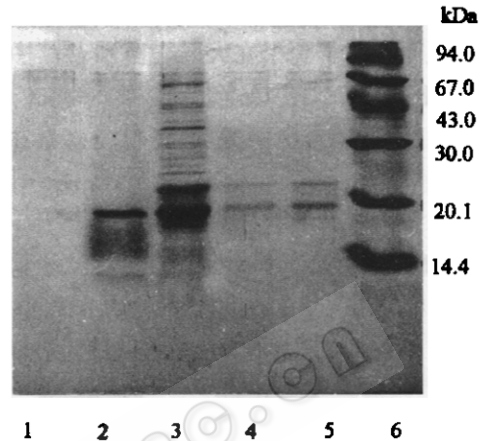


图 3 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳

Fig. 3 SDS-PAGE of cyanobacterial extract

1. Heat-denatured wild type; 2. mMT-1 standard;
3. Sample; 4, 5. Heat-denatured samples; 6. Protein
MW marker

2.3 表达产物 SDS-PAGE

如图 3 所示结果显示:热变性后的样 1 几乎没有条带;样 4 和样 5 与标准 mMT-1(样 2)出现条带情况相类似,在约 10kDa, 20kDa 及 16kDa 附近均有条带,并且有大小为 26.5kDa 的条带;样 3 则几乎都有以上的条带。由于金属硫蛋白和类金属硫蛋白均有一定的耐热性,3~5min 沸水浴使绝大部分杂蛋白变性沉淀,从而表现出来的均为 mMT-1 或蓝藻本身的原核 MT(cMT-like);但 mMT-1 和 cMT-like 的 SDS-PAGE 行为差别不太大,前者单体表现分子量为 10kDa,后者为 9.0kDa 左右^[13]。而且,由于金属硫蛋白的分子形状的特异,mMT-1 在 SDS-PAGE 中出现单体(10kDa)和双体(20kDa)^[11],cMT-like 则表现为单体(8.75kDa)和三体(26.5kDa)^[13]。在 SDS-PAGE 中差别不明显,只有在优化条件后的离子交换层析进一步纯化中,由于二者疏水性差异才能把他们分开^[3]。

2.4 外源蛋白的纯化和鉴定

外源蛋白在 50mmol/L 的 Zn^{2+} 诱导下得到表达,细胞提取液进行凝胶过滤(图 4),取其峰 2 再做离子交换层析(图 5)纯化;同时,对离子交换层析中含锌原子吸收的各个洗脱峰做氨基酸组成,原子吸收和光吸收值分析(表 1)鉴定认为,图 5 中峰 1 与哺乳动物 MT 的高金属含量,光吸收值之比($OD_{254}:OD_{280}$ 为 3~4 之间)和氨基酸组成(30% 以上的半胱氨酸含量,没有芳香族氨基酸,较多的亲水性氨基酸)等性质均相符合,因此认为是表达的外源蛋白 mMT-1;其它的两个含金属峰是蓝藻 MT-like(本实验室待发表资料)。实验结

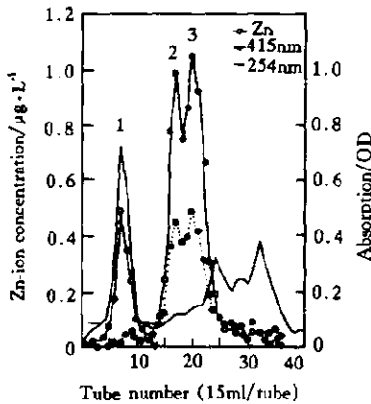


图4 转基因蓝藻表达产物凝胶过滤层析
Fig.4 Gel Filtration of cyanobacterial extract

Medium. Sephacryl S-100; Column. $\phi 2.0 \times 100$ cm; Buffer. 0.01mol/L Tris-HCl, pH8.0; Flow rate. 1ml/min

果表明:5L 体积的培养液中收集到藻湿重 5.0g(干重约为 0.5g), 纯化后的 mMT-1 约 3.5mg; 而且, 由于对实验中的纯化条件进行了优化, 使得 mMT-1 与蓝藻本身疏水性较强的原核类金属硫蛋白洗脱时间差异程度较大。

原液体积为 10ml, 其锌原子吸收为 $1.62\mu\text{g/L}$, 原液 10 倍稀释后其 $\text{OD}_{280\text{nm}}$ 为 1.054, 根据几种方法计算蛋白质表达效率: (1) 根据图 5 峰 1 的 $\text{OD}_{254\text{nm}}$ 计算 mMT-1 占总蛋白含量的 2.5%; 峰 1 的锌原子吸收值计算出 mMT-1 占总锌含量的 11.5%; (2) 在实验中, 纯化后 mMT-1 约 3.5mg, 按 0.5g 蓝藻干重计算占 0.7%, 如果考虑到细胞壁的份量(1/3 左右)及破碎率(只有 75% 左右)等因素, 估计产率在 1.5% 以上。

2.5 转基因蓝藻对金属生理抗性的提高

实验结果(图 6)显示, 转基因蓝藻在含有 100mmol/L Zn^{2+} 的 BG-11 培养液中能以稍低的速率正常生长, 而野生型蓝藻能正常生长的最大 Zn^{2+} 浓度为 $50\mu\text{mol/L}$, 说明外源基因的表达, 提高了蓝藻对于金属离子将近 1 倍的耐受能力。数据表明, 较低浓度金属离子(50mmol/L Zn^{2+})的生存压力可以被蓝藻通过本身的 MT-like 来抵消掉; 在较高浓度金属离子(100 和 150mmol/L Zn^{2+})生存压力则需要外源 mMT-1 基因在蓝藻中表达才能耐

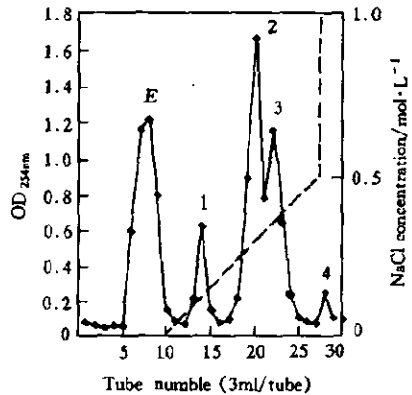


图5 表达产物的离子交换层析纯化

Fig.5 Ion exchange chromatography

Medium. DEAE-Sephacrose F.F.; Column. $\phi 2.0 \times 10$ cm; Buffer. 0.01mol/L Tris-HCl, pH8.0; Gradient. [NaCl]0→0.5mol/L

表1 离子交换层析各峰的组成和含量的分析

Table 1 Analysis of peaks in ion exchange chromatography

	Amino acid numbers per molecule			
	Peak 1	Peak 2	Peak 3	Peak 4
Cys	18.5	9.1	10.4	20
Asx	4.0	6.3	6.3	4
Thr	5.2	5.0	4.0	5
Ser	9.1	4.0	4.0	9
Glx	1.9	3.1	3.2	2
Pro	2.2	3.2	3.1	2
Gly	5.1	7.3	7.4	5
Ala	5.0	6.0	5.4	5
Val	1.8	2.8	3.1	2
Met	1.1	-	-	1
Ile	-	2.1	3.1	-
Leu	-	4.4	3.0	-
Tyr	-	1.6	1.1	-
Phe	-	-	-	-
Lys	7.4	2.1	2.1	7
His	-	2.0	2.2	-
Arg	-	2.0	1.2	-
Total	63.1	61.0	59.4	61

受,而且提高了对环境金属离子的吸收水平。

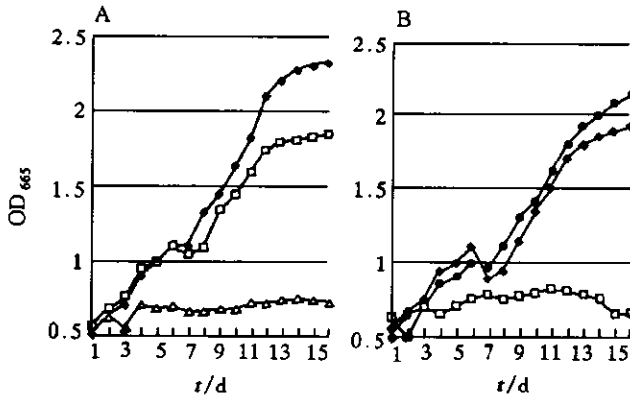


图 6 转基因蓝藻在不同金属离子浓度下的生长曲线

Fig. 6 Growth curves of cyanobacteria under different concentration of metal ion (Z^{2+})

A. Transgenic *Synechocystis* sp. PCC 6803

$Zn^{2+}/mmol \cdot L^{-1}$. —●—50; —□—100; —△—150

B. Wild type as negative control

$Zn^{2+}/mmol \cdot L^{-1}$. —●—25; —◆—50; —□—100.

3 讨 论

本文工作是在纯化了聚球藻 PCC 7942 的 MT-like 之后的进一步研究^[13]。因为我们发现,蓝藻本身的 MT-like 在进化上属于低等金属硫蛋白,相比较哺乳动物的高等 MT 来说,不仅金属结合水平低,而且没有对于重金属污染性质严重的 Cd^{2+} , Pb^{2+} 等结合的选择特异性^[3]。本实验中,把外源 mMT-1 基因导入蓝藻中,并应用在蓝藻中可金属诱导转录和表达的 smt O-P 启动子构成 mMT-1 的金属诱导表达单元,得到了 1.5% 以上的表达产率;同时,把该种蓝藻正常生长下的金属耐受水平由 50mmol/L 提高到 100mmol/L,对环境中的金属离子清除能力最高值由 $0.43\mu g/L$ 提高到 $0.95\mu g/L$,而且,后者是在野生藻所不能生存的离子浓度环境中表现出来的数据。因此,我们认为,外源 mMT-1 基因在蓝藻中金属诱导下得到了较为成功的表达,并提高了表达后蓝藻的对金属离子的生理抗性。由于蓝藻基因工程全部较晚^[13],以上工作在理论研究和清除金属污染、回收贵金属等方面具有一定的意义和应用价值。

由于小鼠金属硫蛋白的半胱氨酸含量过高(1/3 左右),而且其 RNA 有较多的二级结构不利于翻译^[1],本实验室以前在大肠杆菌、酵母、昆虫细胞里的表达也均在 3% 以下。而上述结果也表明,在正常浓度的金属离子诱导下,蓝藻本身的 MT-like 表达占 80% 以上,而太高浓度的金属离子又不利于蓝藻的正常生长。进一步提高外源基因的表达水平,除修改哺乳动物 MT 基因的密码子以适合原核系统表达外,删除蓝藻本身的 MT-like 基因,使环境的金属压力直接左右于质粒上的 smt O-P 诱导外源基因表达的改造表达宿主也是很重要的一方面。

另外,在丝状体蓝藻中导入哺乳动物 MT 基因的工作也得到了较好的实验结果^[14];把转基因蓝藻应用于自然条件下较大的环境体系中,检测其金属抗性和清除金属污染能力的实验正在进行中。

参 考 文 献

- 1 Vallee B L. Methods in Enzymology, 1991, 205:3~7
- 2 Maclean F I, Lucis O J, Shaikh Z A *et al.* Fed Proc, 1972, 31:699~705
- 3 Olafson R W, Occubbin W D, Kay C M. Biochem J, 1988, 251:691~699
- 4 Huckle J W, Morby A P, Turner J S *et al.* Mol Microbiol, 1993, 7(2):177~187
- 5 Gupta A, Morby A P, Turner J S *et al.* Mol Microbiol, 1993, 7(2):189~195
- 6 Castenholz R W. Bacteriol Rev, 1971, 35:69~95
- 7 萨姆布鲁克等. 分子克隆实验指南, 第二版, 北京:科学出版社, 1993
- 8 Elhai J and Wolk C P. Methods Enzymol, 1988, 167:747~754
- 9 Turner J S, Robinson N J. J Ind Microbiol, 1995, 14(2):119~125
- 10 郭祥学, 施定基, 茹炳根. 生物化学与生物物理进展, 1996, 23(3):237~239
- 11 Golden S S, Sherman L A. J Bacteriology, 1984, 158(1):36~42
- 12 de Marsaie N T, Houmard J. The Cyanobacteria, 1987, 251~302
- 13 郭祥学, 陈正佳, 但春涛等. 生物化学杂志, 1997, 13(6):699~703
- 14 郭祥学, 赵 晖, 施定基等. 植物学报, 1998, 40(4):230~234

Metal-induced Expression of Mouse Metallothionein-1 cDNA in *Synechocystis* sp. PCC 6803

Guo Xiangxue¹ Zhao Hui¹ Shi Dingji¹ Xu Xudong² Ru Binggen¹

(National Lab of Protein Engineering, Department of Biochemistry and

Molecular Biology College of Life Sciences, Peking University, Beijing 100871)

(Lab of Photosynthesis, Institute of Botany, The Chinese Academy of Science, Beijing 100093)¹

(MSU-DOE Plant Research Lab, Michigan State University, Michigan 48824-1312, USA)²

Abstract Cyanobacterium MT-like promoter(*smt* O-P) was used in expression of mMT-1 cDNA in *Synechocystis* sp. PCC 6803 to enhance metalbinding ability and specialty. Shuttle expression vector pKT-MRE was constructed in *E. coli* (HB101), and through triparental conjugated transfer, Streptomycin-screening, Southern and Western blotting analysis, transgenic cyanobacterium clone was acquired. The cultivation and Zn²⁺-inducing of transgenic cyanobacterium were carried on, and the foreign mMT-1 was purified through the improved gel filtration and ion exchange chromatography. About 3.5mg mMT-1 were obtained from 5g wet cyanobacterial cells in 5L culture scale. Cyanobacterial metal-resistance measurement indicated that the expression of foreign mMT-1 enhanced the transgenic cyanobacterial metalresistance to two times than the wild *Synechocystis* sp. PCC 6803

Key words Transgenic cyanobacterium, *Synechocystis* sp. PCC 6803, mouse metallothionein (mMT)-1, *smt* O-P, metal-induced expression