

镉结合蛋白 CADR 在莱茵衣藻细胞表面的展示及应用

廖谭聪^{1,2}, 叶莲^{1,2}, 林轶文^{1,2}, 龙欢^{1,2}, 张宝龙³, 黄开耀^{1,2*}

1 中国科学院水生生物研究所 中国科学院藻类生物学重点实验室, 湖北 武汉 430072

2 中国科学院大学, 北京 100049

3 江汉大学 生命科学学院, 湖北 武汉 430056

廖谭聪, 叶莲, 林轶文, 龙欢, 张宝龙, 黄开耀. 镉结合蛋白 CADR 在莱茵衣藻细胞表面的展示及应用[J]. 生物工程学报, 2024, 40(10): 3689-3704.

LIAO Tancong, YE Lian, LIN Yiwen, LONG Huan, ZHANG Baolong, HUANG Kaiyao. Surface display and application of cadmium-binding protein CADR on the cell wall of *Chlamydomonas reinhardtii*[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(10): 3689-3704.

摘要: 在检测和修复环境中重金属如镉污染时, 藻类被证实具有作为高效生物吸附材料的潜力。本研究旨在利用细胞表面展示技术在莱茵衣藻细胞壁表达镉结合蛋白 CADR, 提高衣藻对镉的吸附性能。首先, 采用 golden gate 技术构建转化载体 PET-X-CADR, 通过细胞壁蛋白 GP1 将 CADR 锚定至细胞壁。同时利用融合标签 YFP 的荧光信号进行高通量筛选, 得到 3 株 CADR 蛋白高表达且定位于细胞壁的工程藻株。生理实验结果表明, 细胞壁展示 CADR 蛋白并不影响工程藻株在低于 200 $\mu\text{mol/L}$ 镉浓度下的生长; 在 200 $\mu\text{mol/L}$ 镉浓度下, CADR 工程藻株的生长速度是野生型的 3 倍, 表明 CADR 工程藻株对镉有更高的耐受性。运用配子型裂解酶 GLE 处理藻细胞分离野生型和工程藻株细胞壁, 并比较其中镉的含量, 结果显示工程藻株的细胞壁对镉吸附能力提升 33%。本研究为利用藻类治理环境中镉污染特别是从环境中回收重金属提供了新的思路。

关键词: 生物吸附; 镉胁迫; golden gate; 细胞表面展示

资助项目: 国家重点研发计划(2020YFA0907400, 2018YFA0902500)

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (2020YFA0907400, 2018YFA0902500).

*Corresponding author. E-mail: huangky@ihb.ac.cn

Received: 2024-01-31; Accepted: 2024-04-22

Surface display and application of cadmium-binding protein CADR on the cell wall of *Chlamydomonas reinhardtii*

LIAO Tancong^{1,2}, YE Lian^{1,2}, LIN Yiwen^{1,2}, LONG Huan^{1,2}, ZHANG Baolong³, HUANG Kaiyao^{1,2*}

1 Key Laboratory of Algal Biology, Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072, Hubei, China

2 University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

3 School of Life Sciences, Jiangnan University, Wuhan 430056, Hubei, China

Abstract: Algae has been proven to have the potential to be efficient biosorbents in the detection and remediation of heavy metal pollution such as cadmium in the environment. This study aims to enhance the cadmium adsorption capacity of *Chlamydomonas reinhardtii* by expressing the cadmium-binding protein CADR on the cell wall by the surface display technology. Firstly, the golden gate technique was employed to construct the transformation vector PET-X-CADR, which anchored CADR to the cell wall with the cell wall protein GP1. The high-throughput screening with the fluorescence signal of the fusion tag YFP resulted in three engineered algal strains with high expression of CADR on the cell wall. Physiological experiments demonstrated that the CADR displayed on the cell wall did not affect the growth of the engineered algal strains exposed to cadmium with the concentration below 200 $\mu\text{mol/L}$. In the presence of 200 $\mu\text{mol/L}$ cadmium, the growth rates of CADR-engineered algal strains were three times as that of the wild-type, indicating stronger tolerance of the CADR-engineered algae to cadmium. The protein lyase GLE released during the mating of *Chlamydomonas* was used to isolate the cell walls of wild-type and engineered strains, the cadmium content of which was compared. The results showed that the cell wall of the engineered strain exhibited an increase of 33% in cadmium adsorption capacity. This study gives insights into the application of algae in the management of cadmium pollution in the environment, especially in the recycling of heavy metals from the environment.

Keywords: bioadsorption; cadmium stress; golden gate; surface display

近年来,工业和制造业的不断发展造成了严重的重金属污染。在我国的城市土壤中,镉(cadmium, Cd)含量 20 年内增长了 3 倍,成为 8 种重金属(Cd、Pb、Zn、Cu、Hg、Cr、Ni 和 As)中累积指数最高的元素^[1]。Cd 在电镀、化肥制造、金属冶炼、煤炭生产、汽车制造等现代工业中发挥关键作用,导致产生了大量含 Cd 废水,在环境中广泛分布^[2]。Cd 的存在不仅会

改变植物的生长和光合作用,还通过食物链传递造成动物的脂质过氧化、肾脏和肺部损伤,甚至危害人类的免疫系统和神经系统,带来致癌、致突变和致畸风险^[3-4]。因此,迫切需要采取措施治理 Cd 污染。

目前治理环境中的重金属污染技术主要包括物理^[5-7]、化学^[8-10]和生物方法^[11-13]。传统的物理化学方法,如沉淀、离子交换、吸附和膜

过滤等, 尽管在一定程度上取得成效, 但修复成本昂贵, 并且不适合处理含有复杂成分的大量废水。相比之下, 生物修复方法因其环境友好性和可持续性而备受关注。生物修复涵盖了生物吸附、生物氧化还原和微生物降解等多种方式^[14], 其中生物吸附以其高效、可逆、经济、环保等优点而引人注目^[15-16]。真菌、细菌、藻类等是常被用于治理 Cd 污染的生物吸附剂^[17-18], 其细胞表面存在特殊的结构, 可以吸附重金属离子, 从而减少周围环境中的重金属离子浓度。例如, 革兰氏阳性菌细胞壁肽聚糖、磷壁酸中的阴离子官能团, 以及革兰氏阴性菌细胞壁肽聚糖、磷脂和脂多糖中的阴离子官能团是细胞壁和金属结合的主要成分^[19]。Chakravarty 等^[20]研究表明革兰氏阴性共生嗜酸菌 H8 的细胞壁阴离子官能团对 Cd^{2+} 具有强吸附能力。藻类具有对重金属的耐受性、自养和异养生长的能力、光合作用能力、植物螯合肽表达和基因操纵的潜力等优良特性, 且表面积体积比大, 成为选择性去除和浓缩重金属的理想材料^[21]。藻类生物吸附作为一种高效、安全、经济地去除废水中潜在有毒元素的方法, 已被证明比其他生物物质(真菌、细菌)具有更高的金属吸附量^[18,22]。此外, 从生物吸附利用率的数据来看, 藻类作为生物吸附材料比真菌和细菌高 84.6%^[23]。

即使生物修复具有上述诸多优点, 但在实际应用中仍存在诸多问题。究其原因, 微生物作为生物吸附剂存在不具特异性、耐受性和吸附性局限、无法循环回收利用的问题, 限制了生物修复的实际应用^[24]。细胞表面展示技术是一种利用基因工程手段实现外源蛋白在细胞表面表达的新型技术, 在酶工程、疫苗开发、生物修复等领域广泛应用。细胞表面展示特异性重金属结合蛋白能够作为进一步提高生物吸附能力的可行性方法^[24]。CADR 来源于恶臭假单

胞菌(*Pseudomonas putida*)汞响应转录调控因子(mercuric-responsive transcriptional regulator, MerR)家族, 具有调节自身转录和 CadA (一种 Cd 外排 P 型 ATP 酶)转录的功能, 是迄今为止报道的最具特异性的天然镉结合蛋白之一^[25]。CADR 含有 147 个氨基酸, 分为 DNA 结合结构域、金属结合结构域和耦合结构域 3 个结构域, 并包含 2 个 Cd 结合位点: 富含硫代氨基酸的位点 I 和富含组氨酸的位点 II^[26]。CADR 蛋白对 Cd 的敏感性和特异性识别使其发展成为 Cd 传感器^[27-28]。Tao 等和 Liu 等^[24,29]在酵母细胞壁和大肠杆菌的细胞表面成功展示 CADR, 并观察到 Cd 最大吸附量分别增加了 0.51 mg/g 和 1.2 $\mu\text{mol/g}$, 对 Cd 的吸收和耐受性增强。然而, 关于藻类中 CADR 结合蛋白表面展示的研究尚未见报道。

莱茵衣藻是一种真核单细胞绿藻, 广泛分布于环境中, 其细胞壁富含阴离子羧酸基团, 对于 Hg^{2+} 、 Cd^{2+} 和 Pb^{2+} 具有强吸附能力, 可作为有效的重金属去除剂^[30]。莱茵衣藻的生长周期短, 倍增时间仅为 8-12 h, 可以在固体和液体培养基中生长^[31]。衣藻的遗传操作体系成熟, 不仅拥有电转化、基因枪、玻璃珠转化等多种转化方式, 还有大量可供选择的标签和诱导表达载体, 可以快速筛选获得基因工程藻株^[32]。莱茵衣藻的细胞壁由 5 层富含羟基脯氨酸的糖蛋白排列组成^[33], 其中在 W6 层结构主要由富含羟基脯氨酸的糖蛋白 1 (hydroxyproline-rich glycoprotein 1, GP1) 蛋白组成, 它位于细胞壁的外侧, 结构相其他层更为疏松^[34]。最近有研究表明, Molino 等^[35]利用 GP1 蛋白将 mVenus 和 mCherry 荧光蛋白锚定到衣藻细胞壁上, 成功在莱茵衣藻中建立了细胞壁表面展示技术。另外, 莱茵衣藻的细胞壁可以被增殖过程中产生的营养型裂解酶(vegetative lytic enzyme, VLE)

或者正配子和负配子交配过程中产生的配子型裂解酶(gamete lytic enzyme, GLE)降解,并在短时间内可再生^[36-39],利用这一特点可以不断获取衣藻的细胞壁,使莱茵衣藻有潜力作为一种绿色可持续的生物吸附剂。本研究运用 golden gate 技术构建衣藻表面展示镉结合蛋白 CADR 的转化载体,利用融合的荧光蛋白报告基因快速对工程藻株筛选和鉴定,成功获得了在衣藻细胞壁上表达 CADR 蛋白的工程藻株。工程藻株 CADR3 展现出对 Cd 更强的耐受性和吸附性,并运用 GLE 蛋白回收细胞壁富集的 Cd,为利用微藻生物修复环境中 Cd 污染提供了理论基础。

1 材料与amp;方法

1.1 实验藻株和培养条件

实验中所用藻株 CC-125 来源于 *Chlamydomonas* Resource Center (<https://www.chlamycollection.org/>),而藻株 CADR1、CADR2、CADR3 则通过野生型藻株 CC-125 电转化获得。藻株在三乙酸磷酸酯(tris-acetate-phosphate, TAP)^[40]培养基中正常培养,光照强度为 30 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$,转速为 120 r/min,恒温 22 $^{\circ}\text{C}$ 。为避免与 TAP 培养基中的磷酸盐形成 Cd-P 复合物,在添加 Cd 条件下,培养基使用 β -甘油磷酸盐替代 TAP 培养基中的磷酸盐,即 TAgP 培养基^[41]。培养过程所用玻璃器皿使用前均在 6 mol/L 盐酸中浸泡过夜,然后用 Milli-Q 水洗涤 5 次。

1.2 载体构建

根据 NCBI 中 GP1 的氨基酸序列(GenBank 登录号:AAG45420.1)、CADR 的氨基酸序列(GenBank 登录号:WP_016502101.1)、来源于 SAD1p 蛋白^[42]的 SP7 分泌信号肽序列(MTLRLAQLALA TLGVLLLV LAPMPALS)进行基因合成,其对应的基因序列经密码子优化后交由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。*ARpro* 启动子、*YFP*

荧光蛋白、*AphVIII*抗性基因、*RBCS2-T*终止子基因则以实验室保存载体为模板通过 PCR 方式获得,所用引物如表 1 所示。运用 golden gate 技术将各片段组合构建于重组质粒 PET-X-CADR (图 1A)^[43]。构建过程中连接产物转入大肠杆菌感受态中,在抗性平板上挑选白色阳性菌株,提取其质粒,交由生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序。

1.3 电转化

质粒在电转化前用 *Xba* I 和 *Eco*R I 双酶切,获得 *ARpro-SP7-cadr-GPI-YFP-RBCS2-T-ARpro-AphVIII-RBCS2-T* 线性化片段。250 μL 浓度为 1×10^8 cells/mL 的藻细胞与 200 ng 线性化片段混合冰上预冷 10 min 后进行电转化^[44]。电转仪参数设置为电压 600 V,电阻 1 575 Ω ,电容为 50 μF 。用 1 mL 洗涤淀粉(TAP+60 mmol/L 山梨糖醇+0.4% PEG 6000+20%淀粉)重悬后,将细胞均匀涂布于含有 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 巴龙霉素(Sigma)的 TAP 平板上,并在光照下培养至生长出转化子。

1.4 转化子筛选

转化子转接至 96 孔板培养 3 d,多功能微孔板检测系统(molecular devices)参数设置为激发波长 514 nm,发射波长设置为 540 nm 检测 YFP 蛋白荧光信号,并通过激发波长 430 nm,发射波长设置为 670 nm 检测叶绿素荧光(chlorophyll, Chl)信号进行细胞均一化。转化子的 YFP 蛋白荧光信号由相对荧光值(relative fluorescence unit, RFU) (YFP/Chl)表示。

1.5 藻落 PCR

取 200 μL 对数期藻细胞,离心去除上清。沉淀加入 50 μL 5% Chelex 100 (BIO-RAD),98 $^{\circ}\text{C}$ 处理 15 min,离心取 2 μL 上清即为粗提基因组模板。PCR 体系(50 μL): KOD 缓冲液 5 μL 、2 mmol/L dNTPs 5 μL 、25 mmol/L

表 1 本研究所用的引物
Table 1 Primers used in this study

Primer name	Primer sequence (5'→3')	Size (bp)
ARpro-F	AGCGTGGGTCTCGggetGCTGAGGCTTGACATGATTGGTGC	41
ARpro-R	GTGCTGGGTCTCAcateCTGCAAATGGAAACGGCGACG	38
SP7-F	AGCGTGGGTCTCGgatgATGACACTGAGGCTGGCACAATT	40
SP7-R	GTGCTGGGTCTCAgccaTTGAGAGCGCGGGCATG	35
CadR-F	AGCGTGGGTCTCGaatgGCATGAAGATCGGCGAGCTGGC	39
CadR-R	GTGCTGGGTCTCAacctGTGGCCGTGGCTGCG	32
GP1-F	AGCGTGGGTCTCGaggtCGGGCGGCGGCAGCG	32
GP1-R	GTGCTGGGTCTCAgctaTTCTTCAGGTTGAGGCCGACCG	39
YFP-F	AGCGTGGGTCTCTaataGCGGCGCCTCCGGCCAG	34
YFP-R	CTCCATTTACACGGAGCCTAGTCAGTCACTTGTACAGCTCGTCCATGCCG	50
RBCS2-T-F	GCGCTCGTTGATCTGAGCCTTG	22
RBCS2-T-R	GTGCTGGGTCTCGGAGGGCTTCAAATACGCCAGCCCCG	38
AphVIII-F	AGCGTGGGTCTCGgatgATGGACGATGCGTTGCGTGCA	38
AphVIII-R	GTGCTGGGTCTCAgctaTCAGAAGAAGACTCGTCCAACAGC	39
JYJD-F	ATGACACTGAGGCTGGCACAATTG	24
JYJD-R	GTTGAAGATACCGCCAGGTACACACTG	27

The 4 bp sequence of lowercase letters indicates the fusion site of the *Bsa* I.

MgSO₄ 3 μL、KOD 酶 1 μL、10 ng/μL 模板 DNA 2 μL、10 μmol/L 引物 JYJD-F 1.5 μL、10 μmol/L 引物 JYJD-R 1.5 μL，最后加 ddH₂O 补足至 50 μL。PCR 反应条件：94 °C 预变性 4 min；94 °C 变性 40 s，60 °C 退火 30 s，68 °C 延伸 60 s，30 个循环；最后 68 °C 再延伸 4 min。PCR 产物通过琼脂糖凝胶电泳检验并回收由生工生物工程(上海)股份有限公司完成测序。

1.6 细胞荧光定位

黄色荧光 YFP 蛋白及叶绿素 Chl 信号由 Leica TCS SP8 STED 超高分辨共聚焦显微镜观察，激发和发射参数设置：YFP 为 512/525–560 nm；Chl 为 488/563–570 nm。

1.7 免疫蛋白印迹

参考 Hu 等^[45]方法提取衣藻完整细胞蛋白进行免疫印迹(Western blotting)检测。取等量 CC-125、CADR1、CADR2、CADR3 细胞用 GLE 蛋白室温轻柔摇晃 30 min，离心后的无色上清即为裂解的细胞壁蛋白组分。将获得的蛋白加

入 Loading buffer 煮沸 10 min，用于 Western blotting 检测。研究中所用一抗是 GFP 抗体 (Roche)，稀释比例为 1:500；α-tubulin 抗体 (Sigma)，稀释比例为 1:50 000；二抗为 HRP 标记羊抗鼠 IgG (Abmart)，稀释比例为 1:5 000。

1.8 生长参数检测

使用 CdCl₂ 储备液(100 mmol/L, Sigma-Aldrich)制备不同 CdCl₂ 浓度(0–240 μmol/L)的 TAgP 液体培养基。细胞培养至对数期后，重新转接至含有 CdCl₂ 的 TAgP 培养基，起始细胞浓度为 1×10⁵ cells/mL。多功能微孔板检测系统(molecular devices)测量细胞在 680 nm、665 nm、652 nm 下的吸光度值。总叶绿素的浓度根据公式(1)计算^[46]。

$$C_{a+b} (\mu\text{g/mL}) = 1.44 OD_{665} + 24.93 OD_{652} \quad (1)$$

细胞浓度由细胞计数仪(Beckman Coulter)测定，PSII 最大光化学量子产量 Fv/Fm 值由 Phyto-PAM (Walz)测定。以上实验均设置 3 个实验重复，结果以平均值±标准差($\bar{x} \pm s$)表示。

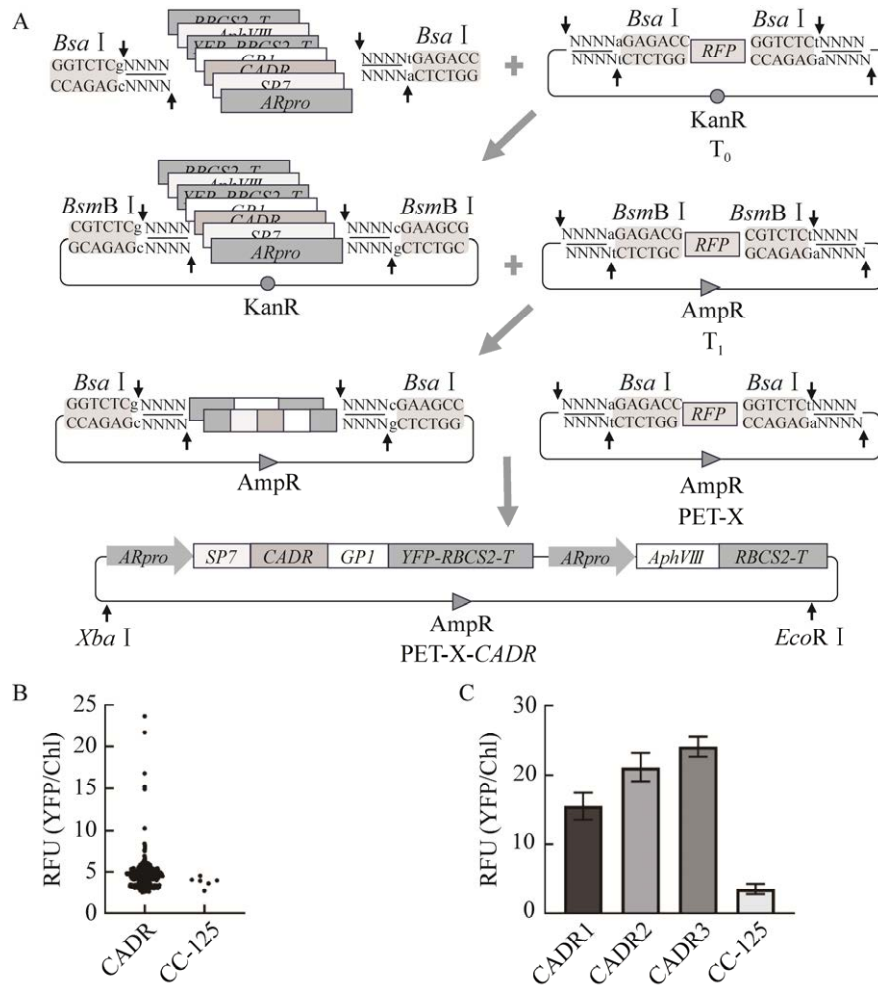


图 1 细胞表面展示镉结合蛋白 Cadr 载体构建和藻株筛选 A: 细胞表面展示镉结合蛋白 CADR 载体构建示意图. *ARpro*、*SP7*、*CADR*、*GP1*、*AphVIII*、*YFP-RBCS2-T*、*RBCS2-T* 为载体的不同基因元件. RFP 为红色筛选标记, 若基因片段成功替换 RFP, 转化的单克隆为白色, 否则为红色. T_0 为具有卡那霉素抗性(KanR)的 0 级载体, T_1 为具有氨苄青霉素抗性(AmpR)的 1 级载体, PET-X 为具有 AmpR 的衣藻细胞核转化载体, PET-X-CADR 为成功构建的含有目的元件的细胞核转化载体. B: 不同转化子中的 YFP 蛋白荧光强度比较. CADR 表示的是筛选的 300 个转化子, CC-125 表示 6 个重复阴性对照. C: 三株转化子与 CC-125 RFU 值的比较

Figure 1 Vector construction and screening of algal strains displaying cadmium-binding protein CADR on cell surface. A: Schematic of vector construction displaying cadmium-binding protein CADR on cell surface. *ARpro*, *SP7*, *CADR*, *GP1*, *AphVIII*, *YFP-RBCS2-T*, *RBCS2-T* were different genetic elements of the vector. RFP was a red screening marker. If the gene fragment successfully replaced RFP, the transformed monoclonal clone turned white. Otherwise, it's red. T_0 was the level 0 vector with kanamycin resistance (KanR), T_1 was the level 1 vector with ampicillin resistance (AmpR), PET-X was the nuclear transformation vector with AmpR, Pet-X-CADR was the successfully constructed nuclear transformation vector containing the target element. B: Comparison of YFP protein fluorescence intensity in different transformants. CADR represents 300 screened inverters and CC-125 represents 6 repeated negative controls. C: Comparison of the RFU value of three strains and CC-125.

1.9 Cd 含量的测定

取 5 mL 对数期细胞, 3 000×g 离心 3 min 去除上清, 用 50 mL Milli-Q H₂O 洗涤 4 次, 离心收集沉淀。细胞沉淀中加入 286 μL 的 70% HNO₃, 在室温下孵育 24 h 后, 65 °C 孵育 2 h, 然后加入 Milli-Q 水, 使总体积达到 10 mL^[47]。等量细胞沉淀用 500 μL GLE 室温轻柔摇晃 30 min, 离心分别收集沉淀(去除细胞壁后剩余的细胞组分)和上清(细胞壁组分)。沉淀处理方式同上所述。微波消解仪 MAR56 (CEM) 处理上清液, 最后加入 Milli-Q 定容至 10 mL^[48]。使用电感耦合等离子体质谱(PerkinElmer)检测完整细胞、去除细胞壁细胞、细胞壁中 Cd 浓度。以上实验均设置 3 个实验重复, 结果以平均值±标准差表示。运用 SPSS 25.0 软件对数据进行方差分析和显著性检验, 数据的差异显著性检验采用独立样本 *t* 检验, *: *P*<0.05; **: *P*<0.01; n.s.: 无显著性差异。

2 结果与分析

2.1 细胞表面展示镉结合蛋白 CADR 的藻株的筛选和鉴定

本研究采用 golden gate 技术构建 CADR 基因的表达载体, 获得衣藻细胞壁表达镉结合蛋白 CADR 的藻株。该载体含有分泌信号肽 SP7 和细胞壁锚定蛋白 GP1, 用于引导 CADR 锚定至细胞壁上^[35], 同时含有黄色荧光蛋白 YFP, 用于快速筛选阳性克隆。具体构建步骤如下: 首先扩增 *ARpro*、*CADR* 和 *RBCS2-T* 等多个启动子、目的基因和终止子元件, 使元件两端含有 Type IIs 型限制性内切酶 *Bsa* I 的酶切位点。接着使用 *Bsa* I 和 T4 DNA 连接酶将目的基因片段与 0 级载体(T₀, 含 *Bsa* I 酶切位点)边切边连, 替换原载体的红色筛选标记 RFU, 成功制备含有启动子、目的基因和终止子等元件的 0 级

载体库。然后使用 Type IIs 型限制性内切酶 *Bsm*B I 和 T4 DNA 连接酶, 将各 0 级载体与 1 级载体(T₁, 含 *Bsm*B I 酶切位点)边切边连, 形成两个 T₁ 载体(*ARpro*-SP7-*CADR*-GP1-YFP-*RBCS2-T*, *ARpro*-AphVIII-*RBCS2-T*), 最终将 T₁ 载体串联形成重组质粒 PET-X-*CADR* (图 1A)。

将 PET-X-*CADR* 载体线性化后, 电转至衣藻 CC-125 藻株。利用阳性藻株具有 YFP 荧光蛋白信号的特点, 使用酶标仪对转化后的藻株进行高通量筛选, 初步将 RFU 值大于 10 作为筛选标准, 从 300 个转化子中筛选得到 6 个阳性转化子, 阳性率为 2% (图 1B)。接着选取 RFU 值最高的 3 株转化子(图 1C), 命名为 CADR1、CADR2 和 CADR3, 分别从基因、蛋白和荧光检测 3 个方面对其进一步验证。基因层面上, 在 *SP7* 的 N 端和 *GP1* 的 N 端位点设计引物, 预期阳性转化子经藻落 PCR 后能扩增出大小为 914 bp 的条带。结果表明, 3 株转化子均能正确扩增出目的条带, 而阴性对照 CC-125 中扩增不到(图 2A)。蛋白层面上, 利用 GLE 对衣藻细胞壁的降解作用^[33], 提取细胞壁组分(图 2B)。接着用 anti-YFP 抗体分别对 3 株转化子的完整细胞和细胞壁进行 Western blotting 检测。结果表明, 3 株转化子的完整细胞和细胞壁中均能检测到 SP7::CADR::GP1::YFP 融合蛋白的 YFP 信号, 大小为 25 kDa (图 2C), 且 CADR3 中信号最强, 与酶标仪检测的结果一致(图 1C)。为了更直观地检测细胞壁上 YFP 荧光信号, 采用超高分辨共聚焦显微镜观察 CADR1、CADR2、CADR3 活体细胞。结果显示, CADR1、CADR2、CADR3 细胞外围形成了完整的一圈 YFP 信号(图 2C), 进一步说明了 CADR::YFP 融合蛋白定位于衣藻细胞壁上。综上, 我们成功在 CC-125 细胞壁上表达 CADR 蛋白, 制备出细胞表面展示的工程藻株。

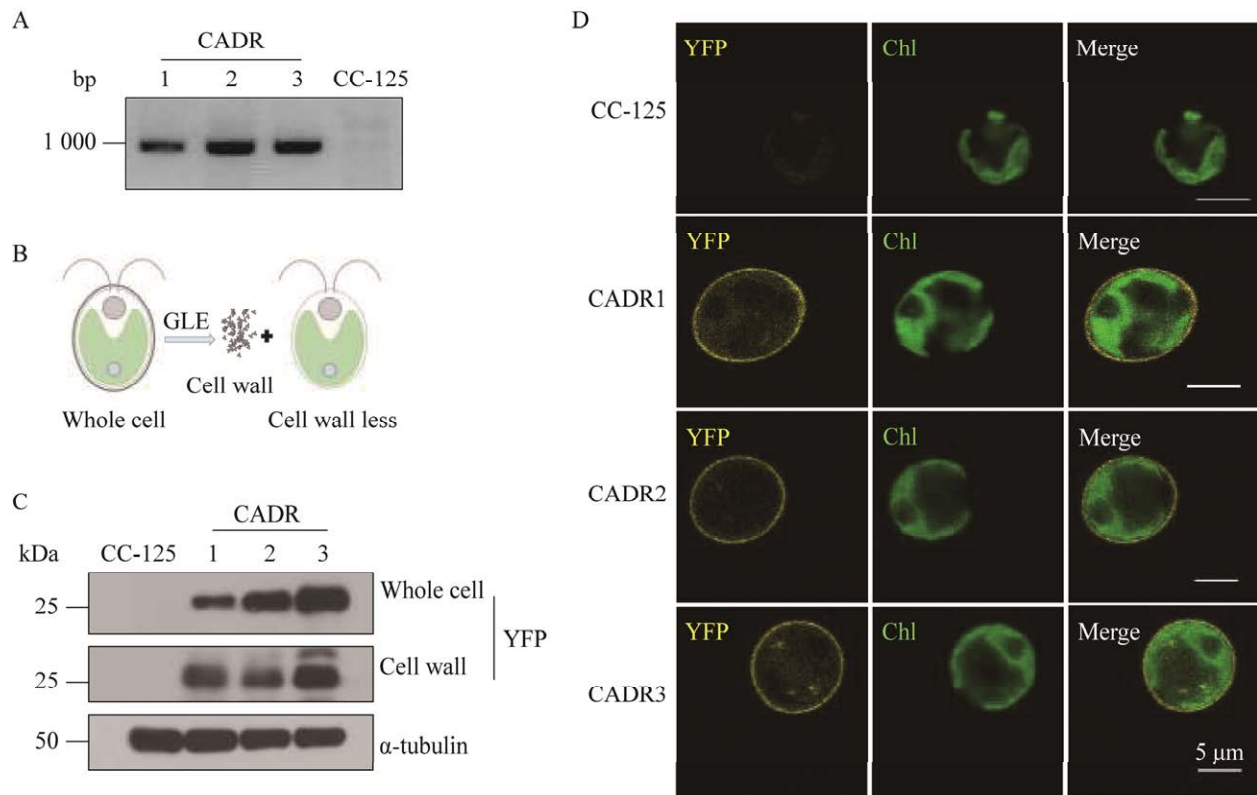


图 2 细胞表面展示镉结合蛋白 CADR 藻株的鉴定 A: 藻落 PCR 检测外源基因 *CADR* 整合在转化子基因组中. B: GLE 蛋白处理完整细胞形成细胞壁组分和去细胞壁细胞组分示意图. C: 免疫印迹检测 CADR::YFP 融合蛋白的表达. 融合蛋白大小为 25 kDa. α -tubulin 作为蛋白上样量对照, 大小为 50 kDa. D: 共聚焦显微镜检测 CADR::YFP 融合蛋白定位信号. YFP 表示细胞在 512/525–560 nm 处荧光信号; Chl 表示细胞在 488/563–570 nm 下荧光信号; Merge 表示 YFP 和叶绿素信号的叠加. 标尺=5 μ m

Figure 2 Identification of algal strains displaying cadmium-binding protein CADR on the cell surface. A: Algal colony PCR was employed to detect the integration of exogenous CADR in the transformer genome. B: Schematic diagram of whole cell with GLE protein to form cell wall components and cell wall less components. C: Western blotting was used to detect the expression of 25 kDa CADR::YFP fusion protein. 50 kDa α -tubulin was used as a loading control. D: Confocal microscopy was used to visualize the localization signal of CADR::YFP fusion protein. YFP represents the fluorescence signal of cells at 512/525–560 nm; Chl represents the fluorescence signal of cells at 488/563–570 nm; Merge represents the superimposed signals of YFP and chlorophyll. Scale bar=5 μ m.

2.2 细胞表面展示 CADR 对莱茵衣藻生长的影响

为了探究在细胞表面展示 CADR 后是否影响莱茵衣藻的正常生长, 随机选择 CADR3 藻株, 检测其生长速率和光合作用等生理指标. 结果表明 CADR3 藻株和野生型 CC-125 藻株的生长状态一致(图 3A), 且均在培养 3 d 后进入平台

期, 最大细胞浓度为 8.27×10^6 cells/mL. 两个藻株的 PSII 最大光化学量子产量 F_v/F_m 值无显著差异, 均在 0.64–0.72 的范围内(图 3C). 与之对应, 叶绿素(a+b)的含量也无显著差异, 在 $2.4\text{--}3.1 \mu\text{g}/10^6$ cells 的范围内(图 3D). 各项参数均不存在差异, 说明细胞表面展示 CADR 不影响莱茵衣藻的正常生长.

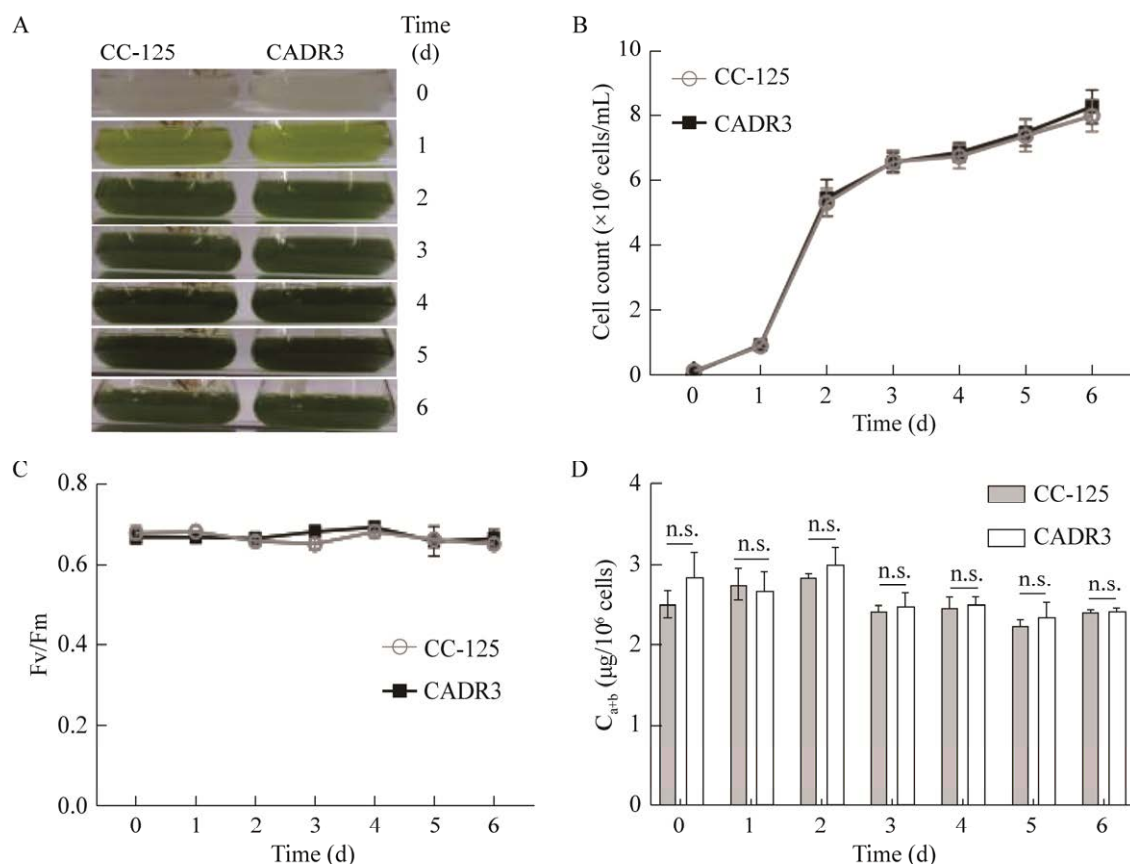


图3 细胞表面展示 CADR 不影响莱茵衣藻的生长 A: 细胞表面展示 CADR 藻株和 CC-125 野生型在三角瓶中的生长比较. B: 细胞表面展示 CADR 藻株和 CC-125 野生型的生长曲线. C: 细胞表面展示 CADR 藻株和 CC-125 野生型 PSII 效率(Fv/Fm)的比较. D: 细胞表面展示 CADR 藻株和 CC-125 野生型叶绿素(a+b)含量的比较. n.s.无显著性差异($P>0.05$)

Figure 3 CADR displayed on cell surface did not affect the growth of *Chlamydomonas reinhardtii*. A: Comparison of the growth between the strain displaying CADR on cell surface (CADR3) and wild-type strain CC-125 in triangular bottle. B: Growth curves of CADR3 strain and CC-125 strain. C: Comparison of the PSII efficiency (Fv/Fm) between CADR3 strain and CC-125 strain. D: Comparison of the contents of chlorophyll (a+b) between CADR3 strain and CC-125 strain. n.s.: The difference between the control group and the experimental group was not significant ($P>0.05$).

2.3 不同 Cd^{2+} 浓度胁迫对 CADR 工程藻株生长速度的影响

为了探究 CADR 工程藻株与 CC-125 藻株对镉胁迫的响应情况,在 TAgP 培养基中分别添加 0、80、120、160、200、240 $\mu\text{mol/L}$ CdCl_2 ,接种对数期的 CADR3 与 CC-125 藻细胞,初始浓度控制为 1.0×10^5 cells/mL,检测其生长速率。结果显示,在 0–160 $\mu\text{mol/L}$ Cd^{2+} 的范围内,两

者的生长没有明显差异。正常条件下, CADR 工程藻株和野生型 CC-125 藻株的平台期 OD_{680} 值能达到 0.86 (图 4A), 80 $\mu\text{mol/L}$ 和 120 $\mu\text{mol/L}$ CdCl_2 处理促进细胞的生长,平台期 OD_{680} 值高达 0.95 (图 4B、4C)。而 160 $\mu\text{mol/L}$ 的 CdCl_2 抑制细胞的生长,在处理 4 d 后进入平台期,最大 OD_{680} 值为 0.77 (图 4D)。值得注意的是,在 200 $\mu\text{mol/L}$ CdCl_2 胁迫条件下 CADR3 藻株的生

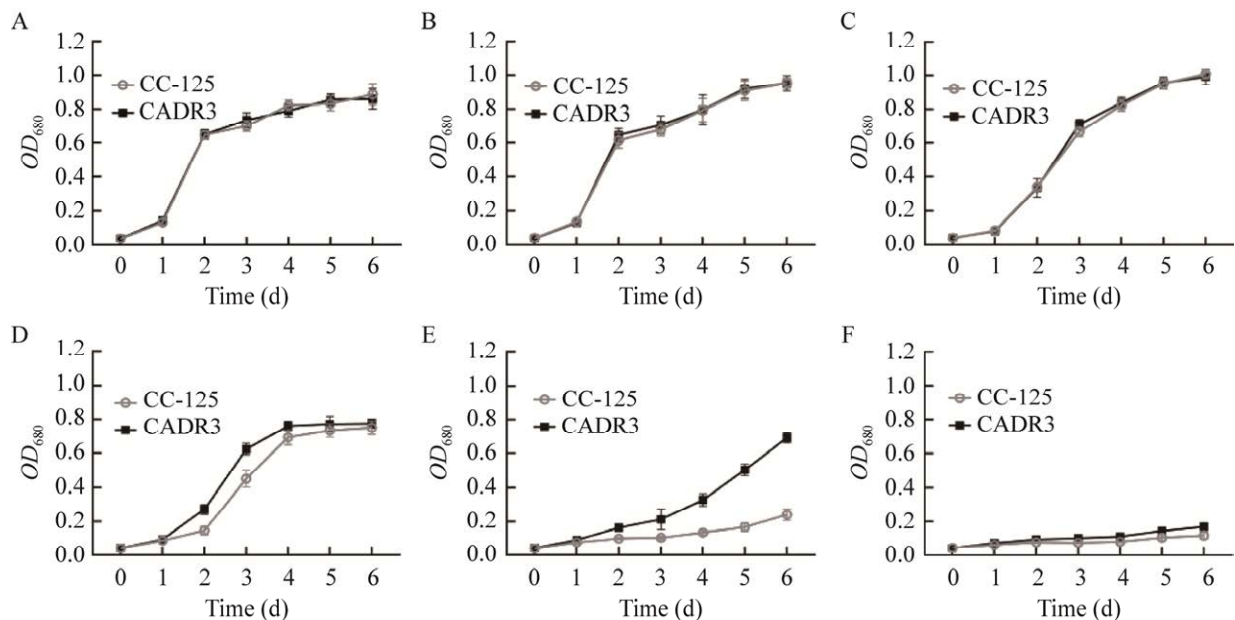


图4 不同 Cd^{2+} 浓度下野生型CC-125与细胞表面展示CADR藻株生长速度的比较 A: $0 \mu\text{mol/L Cd}^{2+}$. B: $80 \mu\text{mol/L Cd}^{2+}$. C: $120 \mu\text{mol/L Cd}^{2+}$. D: $160 \mu\text{mol/L Cd}^{2+}$. E: $200 \mu\text{mol/L Cd}^{2+}$. F: $240 \mu\text{mol/L Cd}^{2+}$
Figure 4 Comparison of growth rates of CADR3 strain and CC-125 strain under different Cd^{2+} concentrations. A: $0 \mu\text{mol/L Cd}^{2+}$. B: $80 \mu\text{mol/L Cd}^{2+}$. C: $120 \mu\text{mol/L Cd}^{2+}$. D: $160 \mu\text{mol/L Cd}^{2+}$. E: $200 \mu\text{mol/L Cd}^{2+}$. F: $240 \mu\text{mol/L Cd}^{2+}$.

长相较于CC-125藻株具有更明显的优势,处理6 d后, OD_{680} 值分别为0.69和0.24(图4E)。进一步提高 Cd^{2+} 胁迫浓度至 $240 \mu\text{mol/L}$ 后,CADR3藻株和CC-125藻株的生长均完全受到抑制,无法生长(图4F)。上述结果表明,低浓度 Cd^{2+} 胁迫条件下,野生型和CADR藻株均能正常生长至平台期,而高浓度 Cd^{2+} 胁迫条件下,在衣藻细胞壁上表达CADR蛋白能显著提高衣藻的生物量。

2.4 细胞表面展示CADR对Cd的耐受性和富集的影响

CADR作为MerR蛋白家族的一员,对Cd的结合有着天然的特异性^[26]。综合上述结果,本研究探究了 $200 \mu\text{mol/L Cd}^{2+}$ 胁迫条件下,CADR工程藻株对Cd耐受能力和富集能力的变化。在耐受性方面,实验结果显示 Cd^{2+} 胁迫下CADR3藻株和CC-125藻株的生长均受到抑制,

但是与野生型CC-125藻株相比,CADR3工程藻株展现出更明显的生长优势(图5A)。在第6天时CADR3藻株的细胞浓度为 $7.47 \times 10^6 \text{ cells/mL}$,而CC-125藻株只有 $2.51 \times 10^6 \text{ cells/mL}$,CADR3藻株的细胞浓度是CC-125藻株的3倍(图5B)。此外, Cd^{2+} 胁迫下野生型CC-125藻株和CADR3工程藻株的叶绿素(a+b)含量和PSII效率(F_v/F_m)均下降(图3和图5),但是两种藻株间无明显差异(图5C、5D)。以上结果说明细胞表面展示CADR增强了藻细胞对 Cd^{2+} 的耐受性并且不影响光合作用能力。

在对Cd的富集性方面,利用GLE处理衣藻,使细胞壁组分去除,分别收集细胞壁组分和去除细胞壁后的剩余细胞组分。通过电感耦合等离子体质谱(inductively coupled plasma-mass spectrometry, ICP-MS)分别检测CADR3藻株和CC-125藻株不同组分中Cd的含量。如图6A

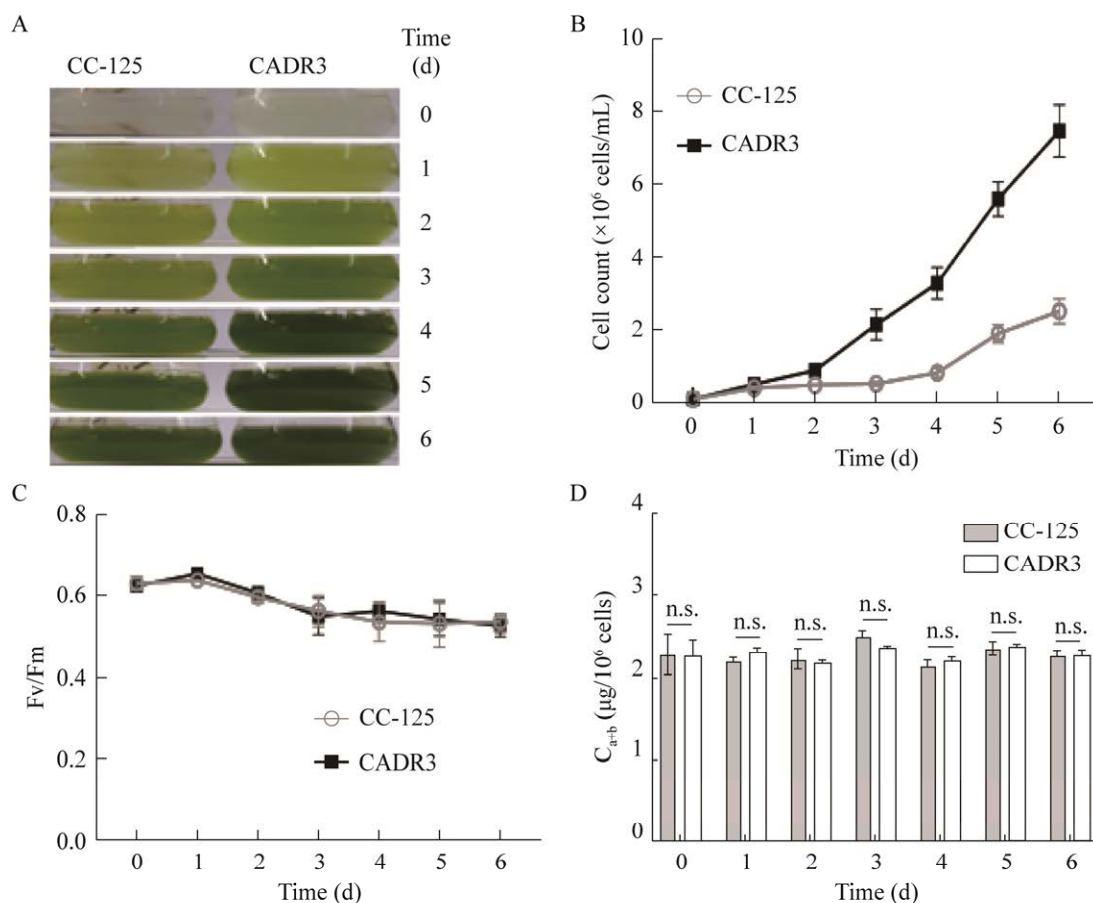


图 5 Cd^{2+} 胁迫下, 表面展示 CADR 增强衣藻对镉的耐受能力 A: 细胞表面展示 CADR 藻株和 CC-125 野生型在三角瓶中的生长比较. B: 细胞表面展示 CADR 藻株和 CC-125 野生型的生长曲线. C: 细胞表面展示 CADR 藻株和 CC-125 野生型 PSII 效率(Fv/Fm)的比较. D: 细胞表面展示 CADR 藻株和 CC-125 野生型叶绿素(a+b)含量的比较. n.s.无显著性差异($P>0.05$).

Figure 5 CADR displayed on cell surface increased the cadmium tolerance of *Chlamydomonas reinhardtii* under Cd^{2+} stress. A: Comparison of the growth between CADR3 strain and CC-125 strain in triangular bottle. B: Growth curves of CADR3 strain and CC-125 strain. C: Comparison of the PSII efficiency (Fv/Fm) between CADR3 strain and CC-125 strain. D: Comparison of the contents of chlorophyll (a+b) between CADR3 strain and CC-125 strain. n.s.: Not significant ($P>0.05$).

所示, CADR3 藻株完整细胞中的 Cd 含量为 15.95×10^9 atoms/cell, 而 CC-125 藻株完整细胞中的 Cd 含量为 10.26×10^9 atoms/cell。CADR3 藻株细胞壁组分中的 Cd 含量为 6.15×10^9 atoms/cell, 占完整细胞的 38.5%; CC-125 藻株细胞壁组分中的 Cd 含量为 2.98×10^9 atoms/cell, 占完整细胞的 29.0%。CADR3 藻株细胞壁对 Cd 的吸附量是 CC-125 藻

株的 2 倍, 具有极显著差异($P<0.01$)。在去除细胞壁的细胞组分中, CC-125 藻株的 Cd 含量与 CADR3 藻株相比, 无显著性差异。以上结果说明细胞表面展示 CADR 增强了衣藻细胞壁吸附 Cd 的能力, 进而增强了衣藻对 Cd 的耐受能力, 并不改变细胞内 Cd 元素的含量。此外, 通过 GLE 酶解方式处理衣藻细胞壁, 可用于细胞壁中 Cd 的收集。

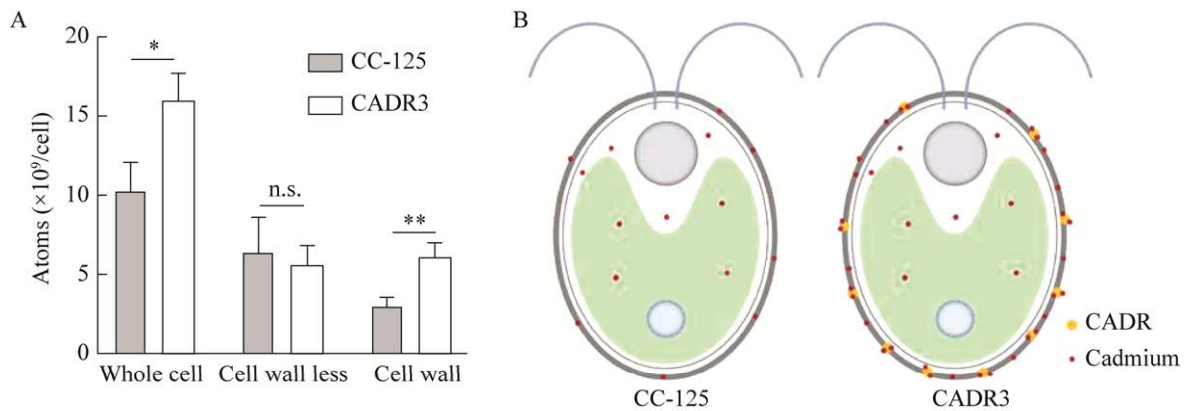


图6 Cd^{2+} 胁迫下表面展示CADR增强衣藻对镉的吸收能力 A: 完整细胞藻、去细胞壁细胞和细胞壁组分中Cd的含量. B: Cd在野生型CC-125与细胞表面展示CADR藻株中分布模式图. *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; n.s.无显著性差异($P > 0.05$)

Figure 6 CADR displayed on cell surface enhanced the cadmium uptake of *Chlamydomonas reinhardtii* under Cd^{2+} stress. A: The cadmium content in whole cell algae, algae removed cell wall and cell wall components. B: Schematic diagram of cadmium distribution in CC-125 strain and the strain displaying CADR on cell surface. *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; n.s.: Not significant ($P > 0.05$).

3 讨论与结论

随着现代工业的不断发展,日益严重的 Cd^{2+} 污染成为不容忽视的问题。大量物理化学方法、生物修复等措施被用来改善这一现状,比如,离子交换法,化学沉淀法和微生物吸附。但传统物理化学方法成本高,易造成二次污染^[49],生物修复则在金属耐受和吸附局限、无法循环利用等方面有待改进^[24]。莱茵衣藻具有经济安全、绿色自养、遗传操作性强、细胞壁可降解回收等优点,可作为治理 Cd^{2+} 污染的理想吸附剂^[37,50]。因此,利用莱茵衣藻作为生物修复的材料极具应用价值。

本研究在 Molino 等^[35]初步建立的衣藻表面展示系统的基础上进行改进,首先,运用 golden gate 技术快速构建转化载体 PET-X-CADR。目前关于细胞表面展示的研究中,无论是细菌、酵母还是衣藻等其他模式生物,载体构建过程均采用的是传统的酶切酶连技术,主要通过 type II 型酶将目的基因和载体酶切,再利用 T4

连接酶将回收的片段与载体连接,形成重组质粒^[24,29,35]。但表面展示载体往往含有多个片段,包括启动子、信号肽、目的基因、锚定基因、筛选标记等。这对 type II 型酶的选择、载体构建的成本和时间都有巨大的挑战。Golden gate 是一种有别于传统酶切酶连的技术,利用 type II s 型酶进行酶切。该酶的识别区域与切割区域不在同一序列,与 T4 连接酶联用可以同时酶切酶连,短时间内完成载体构建。并且通过设计特定的切割序列只需 *Bsa* I 和 *BsmB* I 两种 type II s 型酶便能快速实现多片段和多层级的载体组装^[43],这项技术在表面展示载体构建中具有明显的优势。本研究构建的包含 *ARpro*、*SP7*、*RBCS2-T* 等元件的 T_0 载体库,可为后续利用衣藻进行细胞表面展示提供有力工具。

其次,本研究在细胞壁锚定蛋白 GP1 的 N 端和 C 端分别融合了 CADR 蛋白和 YFP 标记,利用酶标仪检测 YFP 的 RFU 值来实现高通量筛选,成功获得 CADR 蛋白高表达并定位于衣

藻细胞壁的工程藻株 CADR3 (图 6B)。为了明确衣藻细胞表面展示 CADR 对 Cd 耐受能力和富集能力的改变, 对比了 CADR3 藻株和野生型 CC-125 藻株在高浓度 Cd^{2+} 胁迫(200 $\mu\text{mol/L}$)下的生长情况, 结果表明 CADR3 藻株生长速度是 CC-125 藻株的 3 倍(图 5B), 细胞壁对 Cd^{2+} 的富集是 CC-125 藻株的 2 倍(图 6A), 明显提高了衣藻对 Cd^{2+} 的耐受性。这是首次在衣藻细胞壁表达重金属结合蛋白, 不仅揭示了在衣藻细胞壁上表达功能蛋白仍然具生理效应, 更是拓展了细胞表面展示技术的应用领域, 为莱茵衣藻治理环境中 Cd 污染提供了新的思路。

值得注意的是, 在 Western blotting 检测 CADR::YFP 融合蛋白的表达过程中, 完整细胞蛋白和细胞壁蛋白均只检测到单体 YFP 的大小(25 kDa), 而非 CADR::YFP 融合蛋白的大小(95 kDa) (图 2B), 这与 Molino 等^[35]结果一致。莱茵衣藻细胞壁结构是由多层不溶性的、富含脯氨酸的糖蛋白组成, GLE 和 VLE 对衣藻细胞壁糖蛋白成分具有降解作用, 其中包括 W6B 层结构的 GP1 蛋白^[37,39,51]。在完整细胞蛋白组分中检测到单体 YFP 的原因可能是由于对数期的藻细胞处于快速增殖过程中, 体内产生了大量的 VLE 蛋白, 将不溶性的 CADR::YFP 融合蛋白降解, 产生了单体 YFP 蛋白。而细胞壁蛋白组分检测到单体 YFP 的原因可能因为 GLE 作用于细胞壁上的 CADR::YFP 融合蛋白, 造成 YFP 单体蛋白脱落。此外, ICP-MS 检测结果显示在细胞壁上表达 CADR 蛋白后, 将细胞壁中 Cd 含量所占百分比由 29.0%提升至 38.5%, 增强了细胞对 Cd 的吸附能力。未来可利用衣藻细胞壁被 GLE 脱离后重复再生的特性^[37], 使衣藻循环吸附环境中重金属成为可能, 这对衣藻治理重金属污染有深远的意义。研究中还发现 CADR3 藻株去除细胞壁后细胞内的 Cd 含量略

低于 CC-125 藻株, 可能是因为细胞壁表达 CADR 蛋白将 Cd 更多地结合在细胞壁上, 减少了 Cd^{2+} 吸收至细胞的能力, 这也许是导致 CADR3 藻株展现出在 Cd^{2+} 中生长优势的一个原因。

本研究主要关注了细胞表面展示技术在莱茵衣藻治理 Cd 污染中的应用, 利用镉结合蛋白 CADR 在细胞表面表达来增强衣藻对 Cd 的吸附能力, 但也有一些方面可以进一步改进和深入研究。首先, 可以利用 golden gate 技术快速更换不同重金属结合蛋白, 构建其他重金属结合蛋白展示转化载体, 增强衣藻对环境其他重金属的特异性吸附能力。其次, 可对细胞壁蛋白的结构域进行分析, 探索更高效的锚定蛋白或锚定结构域, 提高细胞壁锚定外源功能蛋白的效率。最后, 本研究的结果主要是对工程藻株的生理特性和重金属吸附性能的测试, 但对于细胞壁相关的基因表达、细胞壁展示 CADR 所激活的细胞内响应的信号通路等方面的机制仍有待探究, 进一步研究有助于揭示更深层次的重金属响应机制。

综上所述, 本研究结合细胞表面展示技术和 golden gate 技术, 成功在莱茵衣藻的细胞壁表达镉结合蛋白 CADR。CADR 蛋白在莱茵衣藻细胞壁表达不但不影响其正常生长, 而且显著提高了对 Cd 的耐受性和吸附能力, 并且通过 GLE 的处理, 富集在衣藻细胞壁上的 Cd 可以被脱离并回收。这使莱茵衣藻在今后治理环境中 Cd 污染等重金属污染领域极具发展潜力, 也是将来细胞表面展示技术发展的理想候选者。

致谢

感谢中国科学院水生生物研究所的周芳老师在共聚焦显微镜实验中提供的技术支持。

REFERENCES

- [1] YUAN XH, XUE ND, HAN ZG. A meta-analysis of heavy metals pollution in farmland and urban soils in China over the past 20 years[J]. *Journal of Environmental Sciences (China)*, 2021, 101: 217-226.
- [2] LIU YZ, XIAO TF, BAVEYE PC, ZHU JM, NING ZP, LI HJ. Potential health risk in areas with high naturally-occurring cadmium background in southwestern China[J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2015, 112: 122-131.
- [3] SATARUG S, GARRETT SH, SENS MA, SENS DA. Cadmium, environmental exposure, and health outcomes[J]. *Environmental Health Perspectives*, 2010, 118(2): 182-190.
- [4] LIU J, QU W, KADIISKA MB. Role of oxidative stress in cadmium toxicity and carcinogenesis[J]. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2009, 238(3): 209-214.
- [5] XU P, ZENG GM, HUANG DL, FENG CL, HU S, ZHAO MH, LAI C, WEI Z, HUANG C, XIE GX, LIU ZF. Use of iron oxide nanomaterials in wastewater treatment: a review[J]. *Science of the Total Environment*, 2012, 424: 1-10.
- [6] REN XY, ZENG GM, TANG L, WANG JJ, WAN J, LIU YN, YU JF, YI H, YE SJ, DENG R. Sorption, transport and biodegradation-an insight into bioavailability of persistent organic pollutants in soil[J]. *Science of the Total Environment*, 2018, 610/611: 1154-1163.
- [7] GONG JL, WANG B, ZENG GM, YANG CP, NIU CG, NIU QY, ZHOU WJ, LIANG Y. Removal of cationic dyes from aqueous solution using magnetic multi-wall carbon nanotube nanocomposite as adsorbent[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2009, 164(2/3): 1517-1522.
- [8] TAN XF, LIU YG, ZENG GM, WANG X, HU XJ, GU YL, YANG ZZ. Application of biochar for the removal of pollutants from aqueous solutions[J]. *Chemosphere*, 2015, 125: 70-85.
- [9] TANG WW, ZENG GM, GONG JL, LIANG J, XU P, ZHANG C, HUANG BB. Impact of humic/fulvic acid on the removal of heavy metals from aqueous solutions using nanomaterials: a review[J]. *Science of the Total Environment*, 2014, 468/469: 1014-1027.
- [10] LONG F, GONG JL, ZENG GM, CHEN L, WANG XY, DENG JH, NIU QY, ZHANG HY, ZHANG XR. Removal of phosphate from aqueous solution by magnetic Fe-Zr binary oxide[J]. *Chemical Engineering Journal*, 2011, 171(2): 448-455.
- [11] YANG CP, CHEN H, ZENG GM, YU GL, LUO SL. Biomass accumulation and control strategies in gas biofiltration[J]. *Biotechnology Advances*, 2010, 28(4): 531-540.
- [12] CHENG Y, HE HJ, YANG CP, ZENG GM, LI X, CHEN H, YU GL. Challenges and solutions for biofiltration of hydrophobic volatile organic compounds[J]. *Biotechnology Advances*, 2016, 34(6): 1091-1102.
- [13] WU HP, LAI C, ZENG GM, LIANG J, CHEN J, XU JJ, DAI J, LI XD, LIU JF, CHEN M, LU LH, HU L, WAN J. The interactions of composting and biochar and their implications for soil amendment and pollution remediation: a review[J]. *Critical Reviews in Biotechnology*, 2017, 37(6): 754-764.
- [14] TRIPATHI S, POLURI KM. Heavy metal detoxification mechanisms by microalgae: insights from transcriptomics analysis[J]. *Environmental Pollution*, 2021, 285: 117443.
- [15] DAVIS TA, VOLESKY B, MUCCI A. A review of the biochemistry of heavy metal biosorption by brown algae[J]. *Water Research*, 2003, 37(18): 4311-4330.
- [16] BILAL M, RASHEED T, SOSA-HERNÁNDEZ JE, RAZA A, NABEEL F, IQBAL HMN. Biosorption: an interplay between marine algae and potentially toxic elements-a review[J]. *Marine Drugs*, 2018, 16(2): 65.
- [17] SVECOVA L, SPANELOVA M, KUBAL M, GUIBAL E. Cadmium, lead and mercury biosorption on waste fungal biomass issued from fermentation industry. I. Equilibrium studies[J]. *Separation and Purification Technology*, 2006, 52(1): 142-153.
- [18] HOLAN ZR, VOLESKY B. Biosorption of lead and nickel by biomass of marine algae[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 1994, 43(11): 1001-1009.
- [19] VIJAYARAGHAVAN K, YUN YS. Bacterial biosorbents and biosorption[J]. *Biotechnology Advances*, 2008, 26(3): 266-291.
- [20] CHAKRAVARTY R, BANERJEE PC. Mechanism of cadmium binding on the cell wall of an acidophilic bacterium[J]. *Bioresource Technology*, 2012, 108: 176-183.
- [21] KUMAR JI, OOMMEN C. Removal of heavy metals

- by biosorption using freshwater alga *Spirogyra hyalina*[J]. *Journal of Environmental Biology*, 2012, 33(1): 27-31.
- [22] GONZÁLEZ F, ROMERA E, BALLESTER A, BLÁZQUEZ ML, MUÑOZ JÁ, GARCÍA-BALBOA C. Algal biosorption and biosorbents[M]//Kotrba P, Mackova M, Macek T. *Microbial Biosorption of Metals*. Dordrecht: Springer, 2011: 159-178.
- [23] KANCHANA S, JEYANTHI J, KATHIRAVAN R, SUGANYA K. Biosorption of heavy metals using algae: a review[J]. *International Journal of Pharma Medicine and Biological Sciences*, 2014, 3(2): 1.
- [24] TAO HC, LI PS, LIU QS, SU J, QIU GY, LI ZG. Surface-engineered *Saccharomyces cerevisiae* cells displaying redesigned CadR for enhancement of adsorption of cadmium (II)[J]. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 2016, 91(6): 1889-1895.
- [25] LEE SW, GLICKMANN E, COOKSEY DA. Chromosomal locus for cadmium resistance in *Pseudomonas putida* consisting of a cadmium-transporting ATPase and a MerR family response regulator[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2001, 67(4): 1437-1444.
- [26] LIU XC, HU QY, YANG JM, HUANG SQ, WEI TB, CHEN WZ, HE YF, WANG D, LIU ZJ, WANG K, GAN JH, CHEN H. Selective cadmium regulation mediated by a cooperative binding mechanism in CadR[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2019, 116(41): 20398-20403.
- [27] WU CH, LE D, MULCHANDANI A, CHEN W. Optimization of a whole-cell cadmium sensor with a toggle gene circuit[J]. *Biotechnology Progress*, 2009, 25(3): 898-903.
- [28] CHIU TY, CHEN PH, CHANG CL, YANG DM. Live-cell dynamic sensing of Cd²⁺ with a FRET-based indicator[J]. *PLoS One*, 2013, 8(6): e65853.
- [29] LIU Q, YUAN F, LIANG Y, LI Z. Cadmium adsorption by *E. coli* with surface displayed CadR[J]. *RSC Advances*, 2015, 5(21): 16089-16092.
- [30] TÜZÜN İ, BAYRAMOĞLU G, YALÇIN E, BAŞARAN G, ÇELİK G, ARICA MY. Equilibrium and kinetic studies on biosorption of Hg(II), Cd(II) and Pb(II) ions onto microalgae *Chlamydomonas reinhardtii*[J]. *Journal of Environmental Management*, 2005, 77(2): 85-92.
- [31] BLABY IK, BLABY-HAAS CE, TOURASSE N, HOMEFY, LOPEZ D, AKSOY M, GROSSMAN A, UMEN J, DUTCHER S, PORTER M, KING S, WITMAN GB, STANKE M, HARRIS EH, GOODSTEIN D, GRIMWOOD J, SCHMUTZ J, VALLON O, MERCHANT SS, PROCHNIK S. The *Chlamydomonas* genome project: a decade on[J]. *Trends in Plant Science*, 2014, 19(10): 672-680.
- [32] TRAN NT, KALDENHOFF R. Achievements and challenges of genetic engineering of the model green alga *Chlamydomonas reinhardtii*[J]. *Algal Research*, 2020, 50: 101986.
- [33] GOODENOUGH UW, HEUSER JE. The *Chlamydomonas* cell wall and its constituent glycoproteins analyzed by the quick-freeze, deep-etch technique[J]. *The Journal of Cell Biology*, 1985, 101(4): 1550-1568.
- [34] GOODENOUGH UW, HEUSER JE. Molecular organization of cell-wall crystals from *Chlamydomonas reinhardtii* and *Volvox carteri*[J]. *Journal of Cell Science*, 1988, 90(4): 717-733.
- [35] MOLINO JVD, CARPINE R, GADEMANN K, MAYFIELD S, SIEBER S. Development of a cell surface display system in *Chlamydomonas reinhardtii*[J]. *Algal Research*, 2022, 61: 102570.
- [36] ROBINSON DG, SCHLÖSSER UG. Cell wall regeneration by protoplasts of *Chlamydomonas*[J]. *Planta*, 1978, 141(1): 83-92.
- [37] KINDLE KL. High-frequency nuclear transformation of *Chlamydomonas reinhardtii*[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1990, 87(3): 1228-1232.
- [38] ADAIR WS, APT KE. Cell wall regeneration in *Chlamydomonas*: accumulation of mRNAs encoding cell wall hydroxyproline-rich glycoproteins[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1990, 87(19): 7355-7359.
- [39] MATSUDA Y, KOSEKI M, SHIMADA T, SAITO T. Purification and characterization of a vegetative lytic enzyme responsible for liberation of daughter cells during the proliferation of *Chlamydomonas reinhardtii*[J]. *Plant & Cell Physiology*, 1995, 36(4): 681-689.
- [40] GORMAN DS, LEVINE RP. Cytochrome f and plastocyanin: their sequence in the photosynthetic electron transport chain of *Chlamydomonas reinhardtii*[J].

- Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1965, 54(6): 1665-1669.
- [41] WEBSTER RE, DEAN AP, PITTMAN JK. Cadmium exposure and phosphorus limitation increases metal content in the freshwater *Alga Chlamydomonas reinhardtii*[J]. Environmental Science & Technology, 2011, 45(17): 7489-7496.
- [42] MOLINO JVD, de CARVALHO JCM, MAYFIELD SP. Comparison of secretory signal peptides for heterologous protein expression in microalgae: expanding the secretion portfolio for *Chlamydomonas reinhardtii*[J]. PLoS One, 2018, 13(2): e0192433.
- [43] GUO YK, DONG JK, ZHOU T, AUXILLOS J, LI TY, ZHANG WM, WANG LH, SHEN Y, LUO YS, ZHENG YJ, LIN JW, CHEN GQ, WU QY, CAI YZ, DAI JB. YeastFab: the design and construction of standard biological parts for metabolic engineering in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Nucleic Acids Research, 2015, 43(13): e88.
- [44] SHIMOGAWARA K, FUJIWARA S, GROSSMAN A, USUDA H. High-efficiency transformation of *Chlamydomonas reinhardtii* by electroporation[J]. Genetics, 1998, 148(4): 1821-1828.
- [45] HU JL, DENG X, SHAO N, WANG GH, HUANG KY. Rapid construction and screening of artificial microRNA systems in *Chlamydomonas reinhardtii*[J]. The Plant Journal: for Cell and Molecular Biology, 2014, 79(6): 1052-1064.
- [46] SCHOEFS B, DARKO E, RODERMEL S. Photosynthetic pigments, photosynthesis and plastid ultrastructure in RbcS antisense DNA mutants of tobacco (*Nicotiana tabacum*)[J]. Zeitschrift Fur Naturforschung C, Journal of Biosciences, 2001, 56(11/12): 1067-1074.
- [47] SCHMOLLINGER S, CHEN S, STRENKERT D, HUI C, RALLE M, MERCHANT SS. Single-cell visualization and quantification of trace metals in *Chlamydomonas* lysosome-related organelles[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2021, 118(16): e2026811118.
- [48] CHEN LY, SHEN M, MA AD, HAN WL. Investigation of trace element content in the seeds, pulp, and peel of Mashui oranges using microwave digestion and ICP-MS analysis[J]. Biological Trace Element Research, 2018, 182(1): 152-158.
- [49] 铁文周, 农小芳, 赵伊, 梁康, 黄雪娇. 微生物除 Mn(II)机制及影响因素研究进展[J]. 生物工程学报, 2022, 38(1): 14-25.
- TIE WZ, NONG XF, ZHAO Y, LIANG K, HUANG XJ. The mechanism of microbial removal of Mn(II) and its influencing factors: a review[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2022, 38(1): 14-25 (in Chinese).
- [50] YNALVEZ R, GONZALEZ-CANTU H, VAZQUEZ-CANO E. Comparison of cell size, chlorophyll fluorescence and cadmium (Cd²⁺) bioaccumulation between wild-type and mutant strains of *Chlamydomonas reinhardtii* upon exposure to Cd₂[J]. F1000Research, 2021, 10: 806.
- [51] VOIGT J, FRANK R, WÖSTEMEYER J. The chaotrope-soluble glycoprotein GP1 is a constituent of the insoluble glycoprotein framework of the *Chlamydomonas* cell wall[J]. FEMS Microbiology Letters, 2009, 291(2): 209-215.

(本文责编 郝丽芳)