

^{15}N 稳定同位素标记集胞藻的生物合成研究

赵华梅, 吕宁, 吴振兴, 李正义, 唐静, 贾俊涛*

(山东出入境检验检疫局检验检疫技术中心, 青岛 266000)

摘要: **目的** 建立实验室生物合成 ^{15}N 稳定同位素标记集胞藻的最优培养条件, 并驯化得到高丰度 ^{15}N 集胞藻藻种。**方法** 对培养温度、光照及 pH 值等条件进行优化, 优选出最佳培养工艺。将培养基中的 ^{14}N 氮源替换为 ^{15}N 氮源, 优化配方, 使用同位素质谱仪测量藻体中 ^{15}N 、 ^{14}N 同位素组成。**结果** 实验室培养条件选定为培养温度 25 °C、光照强度 2000 lux、初始 pH 值为 7 时, 集胞藻生长良好。将配方中硝酸钠浓度设定为 1.5 g/L 时, 产品丰度最大。驯化得到高丰度 ^{15}N -集胞藻藻种。**结论** 本试验优化的培养工艺和配方, 适宜 ^{15}N 稳定同位素标记集胞藻生长。得到的藻种产品丰度高, 生产成本低。

关键词: ^{15}N ; 稳定同位素; 集胞藻; 生物合成

Research on biosynthesis of stable isotope ^{15}N labeled *Synechocystis*

ZHAO Hua-Mei, LV Ning, WU Zhen-Xing, LI Zheng-Yi, TANG Jing, JIA Jun-Tao*

(Technical Center of Shandong Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Qingdao 266000, China)

ABSTRACT: Objective To establish the optimal culture conditions of biosynthesis ^{15}N stable isotope labeled *Synechocystis*, and to get high abundance ^{15}N *Synechocystis* sp. strains. **Methods** The culture temperature, shine intensity and pH for *Synechocystis* sp. were studied in this paper. ^{15}N nitrogen was used to replace ^{14}N nitrogen in the medium. Isotope composition of ^{15}N , ^{14}N was measured by isotope ratio mass spectrometer (IRMS). **Results** The optimal medium conditions for *Synechocystis* sp. strain based on BG-11 medium were determined as follows: the NaNO_3 concentration was 1.5 g/L (the rest of the components were the same as BG-11 medium). The optimal culture conditions were as follows: temperature of 25 °C, light intensity of 2000 lux and initial pH of 7 in the room. **Conclusion** This paper built an academic foundation for achieving high density and amplificatory culture of *Synechocystis* sp. PCC6803.

KEY WORDS: ^{15}N ; stable isotope; synechocystis; biosynthesis

基金项目: 国家质检总局科技计划项目(2013IK175, 2011IK223)

Fund: Supported by the Scientific and Technological Project of the General Administration of Quality Supervision, Inspection and Quarantine of the People's Republic of China (2013IK175, 2011IK223)

*通讯作者: 贾俊涛, 高级工程师, 主要研究方向为微生物检测。E-mail: jiajt@tom.com

*Corresponding author: JIA Jun-Tao, Senior Engineer, Technical Center of Shandong Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Qingdao 266000, China. E-mail: jiajt@tom.com

1 引言

蓝藻是一类能够进行植物型产氧光合作用的原核生物, 其适应性强, 兼有植物及细菌的一些特性, 因此又被称为蓝细菌。蓝藻广泛分布在地球上的各类型水体和一些陆生环境, 是水体中最重要的原初生产者。集胞藻(*Synechocystis* sp.) 是一类单细胞非固氮蓝藻, 生活在淡水中, 能进行植物性的光合作用^[1]。由于其遗传操作系统成熟、遗传背景清晰, 因此常被作为一种模式系统而广泛应用于光合作用研究, 同时它也是藻类分子生物学研究的重要对象和藻类基因工程中常用的表达系统。

随着稳定同位素示踪技术的飞速发展, 越来越多的研究者^[2-5]开始利用 ^{15}N 稳定同位素研究藻类。由于 ^{15}N 稳定同位素技术具有灵敏度高、藻类吸收试验时间短、氮吸收的关键过程更清楚等优点, 使得 ^{15}N 示踪技术在藻类代谢、真光层 N 循环等生物、农业及环境科学等领域有着非常重要的意义^[3-5]。

本实验拟采用生物合成的工艺路线, 对集胞藻的氮原子用稳定同位素 ^{15}N 取代, 形成具有示踪剂功能的集胞藻, 以用于光合作用、分子生物学和基因工程等方面的研究。

2 材料和方法

2.1 藻种

集胞藻(*Synechocystis* sp.)PCC6803 由中国科学院水生生物研究所淡水藻种库提供。

2.2 培养基

BG-11 培养基: NaNO_3 1.5 g/L, K_2HPO_4 0.04 g/L, Na_2CO_3 0.02 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.075 g/L, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.036 g/L, EDTANa_2 0.001 g/L, 柠檬酸 0.006 g/L 以及 1 mL A-5 微量元素储液。

A-5 微量元素储液组成: H_3BO_3 2.86 g/L, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 1.86 g/L, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.22 g/L, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.39 g/L, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.08 g/L。

2.3 培养条件

取一定量的集胞藻 PCC6803 藻液, 以 3200 r/min 的速度离心 5 min, 去掉上清液后用无氮培养基洗涤, 再次离心去上清液, 如此重复 2 次, 接种于装有培养液的三角瓶中。

本实验设计温度、光照和 pH 值 3 种培养条件的

试验, 测定不同条件下集胞藻的生长情况。

条件 A: 温度。A1: 20 °C; A2: 25 °C; A3: 30 °C。
条件 B: 光照强度。B1: 2000 lux; B2: 2500 lux; B3: 3000 lux。
条件 C: pH 值。C1: 7; C2: 8; C3: 9。

每组条件 2 样品平行。培养时间为 7 d, 每天取样进行吸光值测定, 并记录藻体颜色。在紫外分光光度计 730 nm 处测定吸光值, 按式(1)计算比生产率:

$$SGR = \frac{(\lg N_t - \lg N_0) \times 100\%}{t} \quad (1)$$

其中, SGR 为比生产率; N_t 为培养 t 天后 OD 值; N_0 为初始 OD 值; t 为培养时间。

2.4 ^{15}N -集胞藻的培养

将培养基中的氮源替换为高丰度的 ^{15}N 氮源, 进行集胞藻的培养, 其他条件和天然丰度氮源的集胞藻培养相同。进行高丰度 ^{15}N -集胞藻藻种的逐步富集培养, 驯化出高丰度 ^{15}N -集胞藻藻种。

将配方中硝酸钠浓度定为 1.5 g/L、2.0 g/L 和 3.0 g/L, 其他条件相同, 使用 250 mL 三角瓶进行培养, 培养体积为 150 mL, 2 样品平行。培养时间为 7 d, 每天取样, 取样体积 5 mL。每天对样品进行吸光值测定, 并记录藻体颜色。在紫外分光光度计 730 nm 处测定吸光值。计算比生产率。

2.5 指标测试部分

2.5.1 仪器、试剂

DELTA V 型同位素比质谱(美国 Thermo Fisher Scientific 公司), Flash 2000 HT 型元素分析仪与主机 DELTA V 联机, 配连续流装置 ConFlo IV, 构成 EA-IRMS 系统在线测定固体样品 ^{15}N 、 ^{14}N 同位素组成。

所用标准物质为 USGS40($\delta^{15}\text{N} = -4.42 \pm 0.06\%$, 氮元素含量为 9.52%)。

2.5.2 实验理论基础

在大气中, ^{15}N 作为一种较稳定的同位素存在, 其丰度是稳定而均匀的, 平均丰度 0.3663%, 被认为是 ^{15}N 标准同位素丰度。在自然界中, 动植物以及环境中 ^{15}N 原子丰度与 0.3663% 的差异非常小, 为了放大差异便于比较和研究, 通常以样品中的 ^{15}N 的相对比值($\delta^{15}\text{N}$)表示其丰度。其计算公式为式(2):

$$\delta^{15}\text{N} = \frac{R_{\text{smp}} - R_{\text{st}}}{R_{\text{st}}} \times 1000 \quad (2)$$

其中, $\delta^{15}\text{N}$ 为样品中的 ^{15}N 的相对比值; R_{smp} 为样品中 ^{15}N 与 ^{14}N 的丰度之比; R_{st} 为大气中 ^{15}N 与

^{14}N 的丰度之比。R 的定义如式(3):

$$R = \frac{\text{atom}\% \ ^{15}\text{N}}{\text{atom}\% \ ^{14}\text{N}} \quad (3)$$

DELTA V 设备的万用接收杯电阻默认是按照自然界中 $\delta^{15}\text{N}$ 的正常值范围设置的, 测试氮稳定同位素时, 接收 m/z 28 [$^{14}\text{N}^{14}\text{N}$] 和 m/z 29 [$^{14}\text{N}^{15}\text{N}$] 的接收杯的信号放大倍数分别约为 100 倍和 10000 倍。经过本实验方法培养的集胞藻, ^{15}N 丰度极大提高。需要调整接收杯电阻后再进行氮稳定同位素, 且不适合使用 $\delta^{15}\text{N}$ 来表示 ^{15}N 的丰度, 可直接使用 $\text{atom}\% \ ^{15}\text{N}$ 表示其丰度。

2.5.3 实验方法

将样品用锡杯紧密包裹, 通过自动进样器送入 $960\text{ }^{\circ}\text{C}$ 反应炉中, 在高浓度的氧及氦气流中氧化分解, 反应生成混合气体, 其中含氮的氧化物经过还原铜被还原成 N_2 , 形成的混合气体在高纯氦气(99.999%) 的运载下, 经色谱柱分离, 依次通过 Conflo IV 装置整流进入质谱, 测定其氮同位素相对比值、同位素绝度比值以及氮元素含量。测量培养后的集胞藻前应将 m/z 28 和 m/z 29 的接收杯电阻(RC- KOMB INAT)分别更换为 30 G/5 PF 和 300 M/470 PF。

3 结果与讨论

3.1 集胞藻室内培养工艺条件的选择

3.1.1 氮源浓度对藻体生长的影响

营养条件对集胞藻的生长有显著影响, 不同的营养成分及各营养成分的用量和配比, 不仅影响集胞藻的产量和质量, 而且也是决定生产成本的关键因素^[6-9]。BG11 配方是培养集胞藻的通用配方, 其 C、N、P 源用量较大, 不适用于原料昂贵的 ^{15}N 使用。本实验在 BG11 配方的基础上, 去除 BG-11 配方中硝酸钴和氯化铵, 只提供硝酸钠一种氮源, 其他营养元素的用量和配比保持不变, 优化氮源浓度, 考察其对集胞藻生长的影响。

配方中硝酸钠浓度在 $1.5\sim 3.0\text{ g/L}$ 的范围时, 随着氮源浓度的升高, 集胞藻的最终细胞浓度随之降低, 第 7 天时比生产率从 0.179 降至 0.135。以上结果表明高氮源浓度会抑制集胞藻的生长。将配方中硝酸钠浓度设定为 1.5 g/L 时, 藻体生长状况最好, 比生产率最大。

3.1.2 温度、光照强度和 pH 值对藻体生长的影响

温度和光照强度对集胞藻的生长都有极显著的

影响^[10,11]。本实验设计温度、光照和 pH 值 3 种培养条件的试验, 测定不同条件下集胞藻的生长情况。不同培养条件下各集胞藻 OD 值随培养时间的变化曲线如图 1。

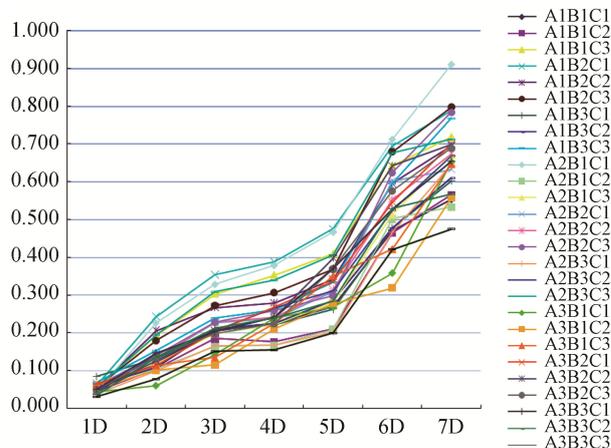


图1 OD值随培养时间的变化曲线
Fig. 1 OD curve with incubation time

从实验结果来看, 最适宜的集胞藻实验室培养条件选定为培养温度 $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、光照强度 2000 lux 、初始 pH 值为 7。

3.2 ^{15}N 集胞藻测试数据

取培养前的集胞藻平行测试 $\delta^{15}\text{N}$ 和 $\text{atom}\% \ ^{15}\text{N}$, 再取使用 ^{15}N 替代氮源培养后的集胞藻 6 平行测试 $\text{atom}\% \ ^{15}\text{N}$, 数据见表 1。

表 1 培养前后 $\delta^{15}\text{N}$ 和 $\text{atom}\% \ ^{15}\text{N}$ 值
Table 1 $\delta^{15}\text{N}$ and $\text{atom}\% \ ^{15}\text{N}$ values before and after culture

实验组	培养前		培养后
	$\delta^{15}\text{N}$	$\text{atom}\% \ ^{15}\text{N}$	$\text{atom}\% \ ^{15}\text{N}$
1	20.96	0.37%	98.10%
2	21.12	0.37%	98.30%
3	21.18	0.37%	98.70%
4	20.55	0.37%	97.90%
5	20.88	0.37%	98.20%
6	21.23	0.37%	97.10%

从测得值可以看出, 培养后的集胞藻, ^{15}N 稳定同位素替代率非常高, $\text{atom}\% \ ^{15}\text{N}$ 值从 0.374 % 提高到 97 % 以上。从稳定同位素质谱 m/z 28 [$^{14}\text{N}^{14}\text{N}$] 和 m/z 29 [$^{14}\text{N}^{15}\text{N}$] 质谱图中可以看出(图 2~4), 未调整接收杯

电阻前, 几乎看不到 m/z 28 [$^{14}\text{N}^{15}\text{N}$] 峰。将 m/z 28 和 m/z 29 的接收杯电阻分别更换为 30 G/5 PF 和 300 M/470 PF 后, m/z 29 [$^{14}\text{N}^{15}\text{N}$] 峰明显, 藻种 ^{15}N 稳定同位素替代率高, 丰度高。

4 结 论

在藻类研究中, ^{15}N 稳定同位素技术具有灵敏度高、藻类吸收试验时间短、氮吸收的关键过程更清

楚等优点, 但是 ^{15}N 原料较为昂贵。本试验优化集胞藻实验室生物合成工艺, 选定培养温度 $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、光照强度 2000 lux、初始 pH 值为 7 培养, 将培养基中的氮源替换为高丰度的 ^{15}N 氮源, 将配方中硝酸钠浓度设定为 1.5 g/L, 经过本实验方法培养的集胞藻, ^{15}N 丰度极大提高, 驯化出高丰度 ^{15}N -集胞藻藻种, 形成具有示踪剂功能的集胞藻, 在光合作用、分子生物学和基因工程等方面具有重要的意义。

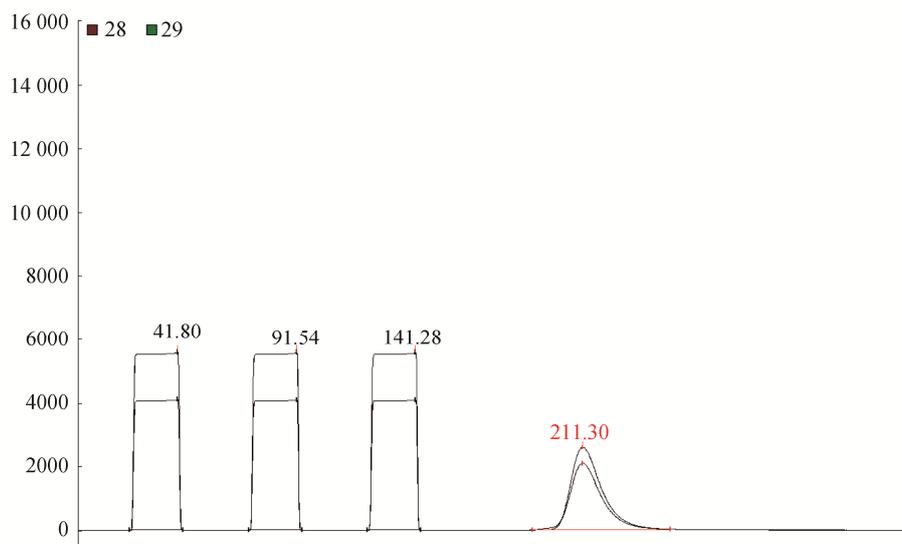


图2 培养前, 集胞藻稳定同位素质谱 m/z 28 [$^{14}\text{N}^{14}\text{N}$] 和 m/z 29 [$^{14}\text{N}^{15}\text{N}$] 质谱图

Fig. 2 IRMS spectrum of m/z 28 [$^{14}\text{N}^{14}\text{N}$] and m/z 29 [$^{14}\text{N}^{15}\text{N}$] of *Synechocystis* before incubation

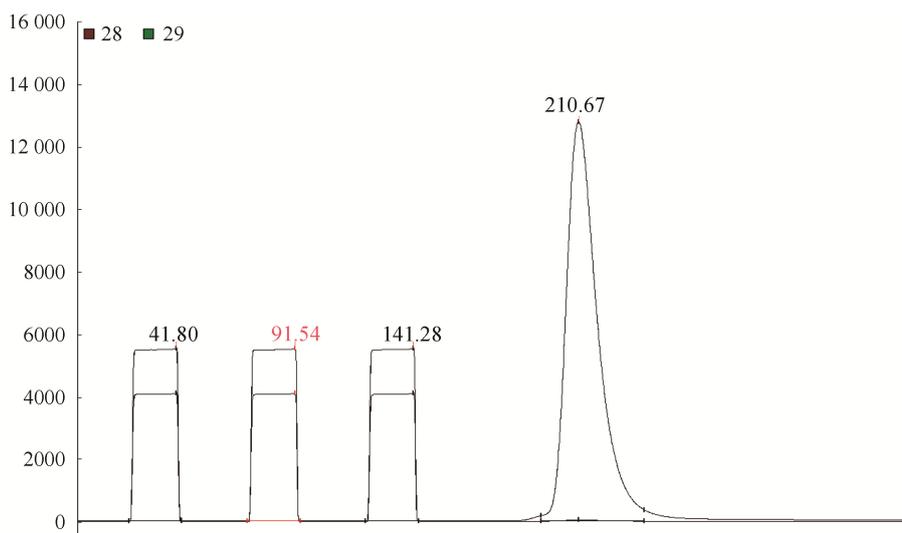


图3 培养后, 未调整接收杯电阻前, 集胞藻稳定同位素质谱 m/z 28 [$^{14}\text{N}^{14}\text{N}$] 和 m/z 29 [$^{14}\text{N}^{15}\text{N}$] 质谱图

Fig. 3 IRMS spectrum of m/z 28 [$^{14}\text{N}^{14}\text{N}$] and m/z 29 [$^{14}\text{N}^{15}\text{N}$] of *Synechocystis* after incubation, unadjusted RC-KOMBINAT

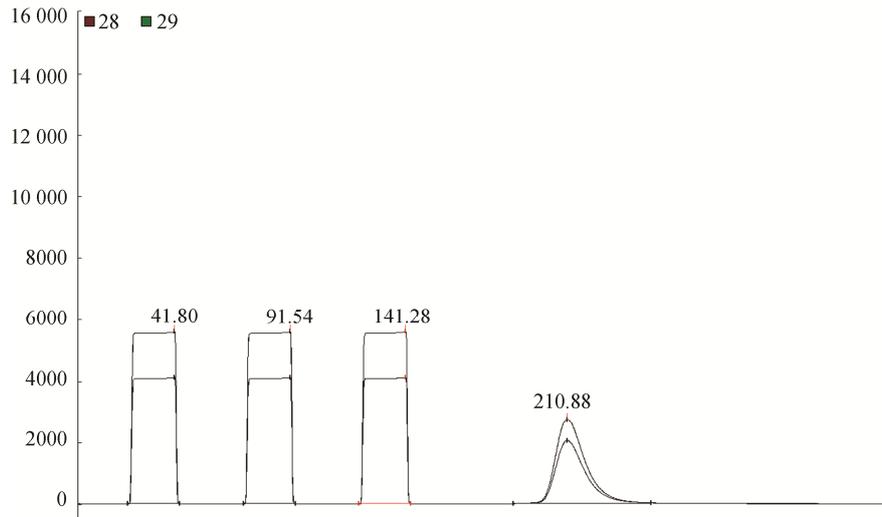


图4 培养后, 调整接收杯电阻后, 集胞藻稳定同位素质谱 m/z 28 $[^{14}\text{N}^{14}\text{N}]$ 和 m/z 29 $[^{14}\text{N}^{15}\text{N}]$ 质谱图

Fig. 4 IRMS spectrum of m/z 28 $[^{14}\text{N}^{14}\text{N}]$ and m/z 29 $[^{14}\text{N}^{15}\text{N}]$ of *Synechocystis* after incubation, adjusted RC-KOMBINAT

参考文献

- [1] Bryant D. The molecular biology of cyanobacteria [M]. Dordrecht Boston London: Kluwer Academic Publishers, 1994.
- [2] Fujita RM, Wheeler PA, Edwards RL. Metabolic regulation of ammonium uptake by *Ulva rigida* (Chlorophyta): a compartmental analysis of the rate-limiting step for uptake [J]. *J Phycolgy*, 1988, 24(4): 560–566.
- [3] 焦念志, 王荣, 黄庆文. ^{15}N 示踪-离子质谱法测定新生产力的研究[J]. *海洋与湖沼*, 1993, 24(1): 65–71.
Jiao NZ, Wang R, Huang QW. Measurement of new production by ^{15}N trace-ion mass spectrometry method [J]. *Oceanol ET Limnol Sin*, 1993, 24(1): 65–71.
- [4] Waser NA, Harrison PJ, Nielsen B, *et al.* Nitrogen isotope fractionation during the uptake and assimilation of nitrate, nitrite, ammonium, and urea by a marine diatom [J]. *Limnol Oceanogr*, 1998, 43(2): 215–224.
- [5] 田昌玉, 左余宝, 林治安, 等. 氮肥利用率概念与 ^{15}N 示踪测定方法研究进展[J]. *中国农学通报*, 2010, 26(17): 210–213.
Tian CY, ZuoYB, Lin ZA, *et al.* Review the concept of fertilizer nitrogen recovery rate and determination by ^{15}N tracer [J]. *Chin Agr Sci Bull*, 2010, 26(17): 210–213.
- [6] Lomas MW, Glibert PM. Interactions between NH_4^+ and NO_3^- uptake and assimilation: comparison of diatoms and dinoflagellates at several growth temperatures [J]. *Mar Biol*, 1999, 133: 541–551.
- [7] 任征, 杜晓宁, 侯静华, 等. 稳定同位素 ^{15}N 标记螺旋藻的生物合成[J]. *同位素*, 2010, 23(4): 211–215.
Ren Z, Du XN, Hou JH, *et al.* Biosynthesis of stable isotope ^{15}N labeled *Spirulina*[J]. *J Isot*, 2010, 23(4): 211–215.
- [8] Harlin MM, Wheeler PA. Ecological field methods: macroalgae. handbook of phycological methods [M]. New York: Cambridge University Press, 2003.
- [9] 刘保占, 刘瑀, 李颖, 等. 不同氮磷比对海洋赤潮藻碳、氮稳定同位素组成的影响[J]. *水产科学*, 2013, 32(9): 509–515.
Liu BZ, Liu Y, Li Ying, *et al.* Effects of N to P ratio on carbon and nitrogen stable isotope composition of marine red-tide algae [J]. *Fish Sci*, 2013, 32(9): 509–515.
- [10] Hinga KR, Arthur MA, Pilson MEQ, *et al.* Carbon isotope fractionation by marine phytoplankton in culture: the effects of concentration, pH, temperature, and species[J]. *Glob Biogeochem Cy*, 1994, 8(1): 91–102.
- [11] 王永红, 李元广, 施定基, 等. 集胞藻 6803 的混合培养-光照强度和葡萄糖的影响[J]. *生物工程学报*, 2000, 16(2): 193–197.
Wang YH, Li YG, Shi DJ, *et al.* Mixotrophic cultivation of *Synechocystis* sp. 6803: influences of light intensity and glucose [J]. *Chin J Biotechnol*, 2000, 16(2): 193–197.

(责任编辑: 张宏梁)

作者简介



赵华梅, 高级工程师, 主要研究方向为生物毒素检测。

E-mail: lilaczhm@163.com



贾俊涛, 高级工程师, 主要研究方向为微生物检测。

E-mail: jiajt@tom.com