

研究论文

DOI: 10.12211/2096-8280.2026-038

高效镉转化嗜热四膜虫的理性设计和构建

胡凯康¹, 赵曙慧^{1, 2}, 张晶¹, 熊杰¹, 缪炜¹, 涂家薇¹(¹ 中国科学院水生生物研究所, 武汉 430072; ² 中国科学院大学, 北京 100049)

摘要: 有毒金属镉 (Cd) 污染严重威胁生态环境与人体健康。利用微生物将镉从高生物有效性的离子态 (Cd^{2+}) 转化成低生物有效性的硫化物 (CdS) 是减轻环境中镉污染的重要策略。近年来, 环境合成生物学的发展使得基于嗜热四膜虫 (*Tetrahymena thermophila*) 等特色底盘生物构建镉污染修复体系成为可能。本研究通过对嗜热四膜虫镉感知、结合与转化三个功能模块的理性设计, 构建了高效的镉转化嗜热四膜虫。在感知方面, 利用 *MTT1* 基因的镉诱导启动子 (pMTT1) 作为镉响应传感器, 驱动下游功能基因在镉胁迫下的过表达。在结合方面, 通过敲降内源性 *MTT1* 解除对胞内 Cd^{2+} 的结合, 释放 Cd^{2+} 作为转化底物。在转化方面, 通过同源重组将 *MTT1* 编码区置换为反向转硫途径关键酶基因 *TiCBS1*, 增强半胱氨酸合成与内源性 H_2S 生成, 加速 Cd^{2+} 向低毒、稳定的 CdS 转化。该设计通过基因改造, 同步实现了镉感知响应、结合解除与转化增强。所得工程株 EC_{50} 较 *MTT1* 敲降株提升 252.6%。在 5 mg/L Cd^{2+} 处理下, 24 h Cd^{2+} 镉去除率和转化率分别高达 94.7% 和 91.6%。本研究构建的高效镉转化嗜热四膜虫为基于微生物的镉污染修复提供了新策略。

关键词: 嗜热四膜虫; 镉; 生物矿化; 合成生物学; 底盘细胞

中图分类号: Q789 文献标志码: A

Rational Design and Construction of a High-Efficiency Cadmium-Converting *Tetrahymena thermophila* Strain

HU Kaikang¹, ZHAO Shuhui^{1, 2}, ZHANG Jing¹, XIONG Jie¹, MIAO Wei¹, TU Jiawei¹

(¹Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072, Hubei, China; ²University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract: Toxic metal cadmium (Cd) pollution poses a serious threat to ecological environments and human health, and efficient, green bioremediation technologies are therefore urgently needed. The construction of efficient cadmium biomineralization systems via synthetic biology is regarded as an important direction for future Cd remediation. *Tetrahymena thermophila* can be easily cultured, its genetic manipulation is well-established, and it is naturally endowed with the capacities for Cd sensing, accumulation, and conversion. Cd^{2+} can be efficiently removed from water,

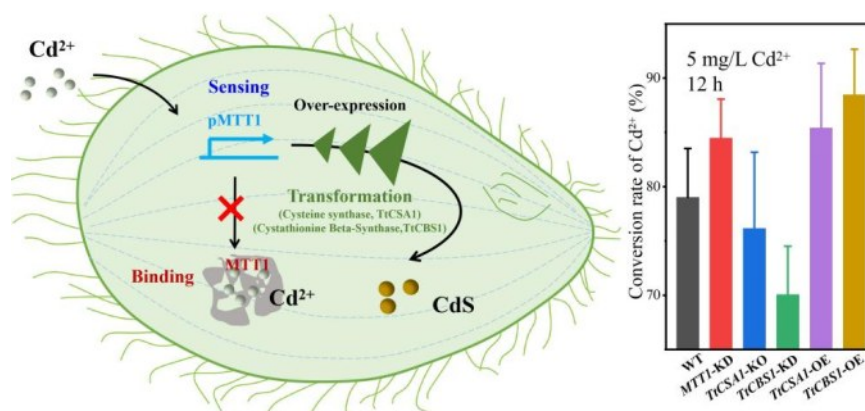
收稿日期: 2026-05-01 修回日期: 2026-06-17

基金项目: 国家重点研发计划项目 (2020YFA0907400)

引用本文: 胡凯康, 赵曙慧, 张晶, 熊杰, 缪炜, 涂家薇. 高效镉转化嗜热四膜虫的理性设计和构建[J]. 合成生物学, 2026, 7. DOI: 10.12211/2096-8280.2026-038

Citation: HU Kaikang, ZHAO Shuhui, ZHANG Jing, XIONG Jie, MIAO Wei, TU Jiawei. Rational Design and Construction of a High-Efficiency Cadmium-Converting *Tetrahymena thermophila* Strain[J]. Synthetic Biology Journal, 2026, 7. DOI: 10.12211/2096-8280.2026-038

accumulated intracellularly, and converted into less toxic CdS. Consequently, *T. thermophila* can be used as a synthetic biology chassis for the construction of "Cd-conversion" cell strains. To construct a high-efficiency cadmium biomineralization system based on this chassis, the functions and efficiencies of its key genes involved in cadmium mineralization must first be evaluated, after which rational design can be conducted accordingly. In this study, the functions of three key genes involved in Cd²⁺ conversion during Cd²⁺ removal and transformation by *T. thermophila* were examined, namely *MTT1* encoding the cadmium-binding protein metallothionein, *TiCSA1* encoding cysteine synthase (a key enzyme in the de novo cysteine biosynthesis pathway), and *TiCBS1* encoding cystathionine-β-synthase (a key enzyme in the reverse transsulfuration pathway). The results showed that although the Cd²⁺ tolerance (EC₅₀) of the cells was reduced by 74.8% by *MTT1* knockdown, the Cd²⁺ removal rate and conversion rate were significantly enhanced (reaching as high as 98.7% and 88.1%, respectively, at 5 mg/L Cd²⁺). The reason may be that after the binding of MTT1 protein to Cd²⁺ is relieved, the bound Cd²⁺ is released and then enters the CdS conversion process as a reaction substrate. Cd²⁺ removal was not affected by knockdown or knockout of *TiCBS1* and *TiCSA1*, but CdS conversion efficiency was significantly decreased, with a greater reduction being observed for *TiCBS1* (13.8%) than for *TiCSA1* (5.4%) relative to the wild type. Based on these findings, the *MTT1* coding region was replaced with *TiCBS1* or *TiCSA1* via homologous recombination, so that endogenous *MTT1* was knocked down while overexpression of *TiCBS1* or *TiCSA1* was concurrently achieved, and "Cd-conversion" cell strains based on the *T. thermophila* synthetic biology chassis were constructed. Among them, the EC₅₀ of the *MTT1* knockdown combined with *TiCBS1* overexpression strain was increased by 252.6% compared with the *MTT1* knockdown strain, and a conversion rate of up to 91.6% could be reached at 5 mg/L Cd²⁺. Through a single genetic modification, Cd²⁺ sensing response, substrate release, and conversion enhancement were simultaneously achieved by this design, and a cell strain with high efficiency in removing and converting Cd²⁺ from water was ultimately obtained. The feasibility of *T. thermophila* as a programmable chassis for toxic metal remediation is validated in this study, and a new strategy for synthetic biology-driven environmental bioremediation is provided.



Keywords: *Tetrahymena thermophila*; cadmium; biomineralization; synthetic biology; chassis cell

有毒金属镉（Cd）因其高毒性、持久性、显著的生物累积性成为全球关注的重要环境污染物之一。开展针对镉污染环境的高效、经济且生态友好的修复技术研究，已成为当前环境科学领域

的迫切任务^[1-2]。镉的毒性与其存在形态关系密切。在一般的自然环境中，镉主要以Cd²⁺离子形态与其他物质形成络合物或沉淀存在，其中离子态Cd²⁺及其可溶性络合物在环境中容易迁移和被生物吸

收,是危害生态环境和人类健康最主要的来源^[3]。微生物修复镉污染环境的主要机制包括生物积累、生物吸附和生物矿化三大类,其中生物矿化因能将可溶性 Cd^{2+} 转化为稳定的固相矿物,从而显著降低其生物可利用性和环境迁移能力^[4-5]。通过合成生物学手段,构建高效的镉转化生物体系是未来镉污染治理的重要方向^[6-7]。

近年来,环境合成生物学的发展,使得基于原生动四膜虫等特色底盘生物构建镉污染修复的生物体系成为可能。嗜热四膜虫(*Tetrahymena thermophila*, *T. thermophila*)是一种单细胞纤毛虫,具有易于培养、遗传操作体系成熟等优势,常被用作毒理学研究的模式生物与表达体系^[8-10]。已有研究证实,嗜热四膜虫能够高效去除水体中的 Cd^{2+} 并富集在细胞内,且具备将 Cd^{2+} 转化为低毒CdS颗粒的天然能力^[11]。因此,嗜热四膜虫可视为开发环境生物修复系统的理想合成生物学底盘。以嗜热四膜虫为底盘构建高效镉转化细胞株,需首先对其天然镉富集与转化网络中的关键基因元件进行功能解析与效率评价,理解其作用机制并筛选高效元件,进而基于上述认知开展理性设计与组装。

在镉响应与结合方面,嗜热四膜虫的金属硫蛋白(Metallothionein, MTs)具有重要功能^[12-14]。嗜热四膜虫基因组中*MTT1*基因的启动子可对 Cd^{2+} 做出灵敏响应,上调*MTT1*蛋白表达水平,增强其对 Cd^{2+} 的螯合作用^[15-16],进而缓解镉对细胞的毒性效应。前期研究表明,嗜热四膜虫敲除*MTT1*基因后,其对 Cd^{2+} 的耐受性大幅降低,但对水中 Cd^{2+} 的去除能力反而增强^[17],这提示*MTT1*可能不仅直接结合 Cd^{2+} ,还可能负向调控其他镉富集或转化过程。

在镉矿化方面,半胱氨酸合成对嗜热四膜虫镉解毒起到重要作用^[18]。半胱氨酸可直接与 Cd^{2+} 螯合解毒,也可作为谷胱甘肽前体间接参与 Cd^{2+} 的螯合并维持细胞氧化还原稳态,以及作为内源性 H_2S 的主要前体驱动CdS矿化^[19-22]。Lv等在嗜热四膜虫中鉴定出胱硫醚- β -合成酶(cystathionine β -synthase, CBS)基因*TtCBS1*(TTHERM_00558300),CBS是反向转硫途径的关键酶,可催化丝氨酸与同型半胱氨酸缩合生成胱硫醚,后者再由胱硫醚- γ -裂解

酶裂解产生半胱氨酸。该研究工作还鉴定出了其同源蛋白(TTHERM_00239430)基因,经功能研究,证实该蛋白实际为半胱氨酸合酶(cysteine synthase, TtCSA1),参与从头合成途径、催化O-乙酰丝氨酸与 H_2S 反应生成半胱氨酸^[23]。这两种酶均能以半胱氨酸为底物,通过 β -消除或 β -取代反应催化 H_2S 生成^[23]。

综上,嗜热四膜虫天然具备完整的镉响应、结合与转化网络:*MTT1*可以灵敏响应并结合镉,*TtCBS1*和*TtCSA1*则通过调控半胱氨酸合成及内源性 H_2S 生成,推动 Cd^{2+} 向低毒CdS的转化。然而上述关键基因元件在嗜热四膜虫 Cd^{2+} 去除与转化中的具体作用尚无系统研究。本研究首先验证了嗜热四膜虫合成CdS纳米颗粒的能力,进而分别敲除或敲降*MTT1*、*TtCSA1*和*TtCBS1*,系统考察了这三个基因元件对四膜虫富集与转化 Cd^{2+} 能力的影响。在此基础上,本研究以“解析功能、筛选元件、理性组装”为构建线路,基于上述功能解析获得的基因型-表型关系,筛选并组装可增强镉矿化能力的高效元件,利用镉诱导启动子p*MTT1*将其整合于受镉诱导调控的表达框架中,构建功能耦合的高效镉转化嗜热四膜虫。本研究旨在为开发基于原生生物的新型重金属生物修复平台提供可行的设计思路与技术原型,推动合成生物学在环境治理领域的应用。

1 材料和方法

1.1 细胞株及菌株

嗜热四膜虫野生型细胞株SB210(*T. thermophila* SB210)购买于美国康奈尔大学(<https://tetrahymena.vet.cornell.edu/>);大肠杆菌DH5 α 感受态菌株购买于北京擎科生物科技有限公司;载体pneo4以及pCHX、p*MTT1*-neo4由本实验室保存,均具有氨苄抗性。

1.2 嗜热四膜虫培养方法

从嗜热四膜虫SB210大豆保种管中取200 μL 细胞放入装有10 mL SPP培养基(1%蛋白胨,

0.1%酵母提取物, 0.2%葡萄糖, 0.003%柠檬酸铁)的50 mL锥形瓶中, 加入1%的青-链霉素, 在30℃静置培养箱培养1-2 d。取出0.2 mL嗜热四膜虫SB210再次接种到装有50mL SPP中, 加入1%的青-链霉素, 在30℃恒温摇床培养箱中135 r/min培养至对数生长初期 ($2-3 \times 10^5$ cells/mL)。

1.3 敲除及过表达细胞株的构建

1.3.1 敲除载体的构建

首先, 以嗜热四膜虫基因组DNA为模板, 分别扩增待敲除基因(*MTT1*、*TtCSA1*和*TtCBS1*)非翻译区5' UTR和3' UTR各约1 kb的片段。将质粒pneo4和5' UTR片段分别进行Not I和BamH I双酶切, 通过酶切连接得到重组构建质粒pneo4-gene-5' UTR。再次将质粒pneo4-gene-5' UTR或者pCHX和3' UTR片段分别进行Xho I和Kpn I双酶切, 通过酶切连接得到最终的敲除质粒。经测序验证无误后, 用于后续转染实验。敲除质粒构建示意图见附图1, 所使用的引物序列详见附表1。

1.3.2 过表达载体的构建

设计扩增目标基因(*TtCSA1*和*TtCBS1*)编码区的引物, 在其5'端添加与线性化载体末端同源的序列。以嗜热四膜虫基因组DNA为模板, PCR扩增基因。同时, 通过反向PCR扩增pMTT1-neo4载体骨架。纯化扩增获得的基因片段与线性化载体, 使用一步克隆试剂盒(Vazyme)进行连接得到最终的过表达质粒。最后经测序验证插入序列无误, 用于后续转染实验。过表达质粒构建示意图见附图2, 所使用的引物序列详见附表1。

1.3.3 重组细胞株的构建

质粒经酶切纯化后得到线性化载体。将对数期嗜热四膜虫野生型细胞株经饥饿处理18-24 h, 涂布于滤纸, 通过基因枪轰击将线性化的载体转染进四膜虫。转染后细胞在SPP培养基中恢复3 h, 依次加入CdCl₂和巴龙霉素(PM)或者放线菌酮(CHX)。PM浓度梯度为从100μg/mL逐步提升至64 mg/mL, 或者CHX浓度梯度为从15 μg/mL逐步提升至120 μg/mL, CdCl₂浓度由1 μg/mL逐步降至0.1 μg/mL。待细胞在64 mg/mL PM或120 μg/mL CHX中稳定生长后, 挑取单克隆培养后进行验证。敲除细胞株所使用的验证引物序列详见附表2, 过表达细胞株所使用的验证引物序列详见附表3。

1.4 四膜虫细胞株生长曲线的测定

将嗜热四膜虫野生型细胞株及各基因工程细胞株培养至对数生长初期, 以3125 cells/mL的初始密度接种于装有50 mL SPP培养基的250 mL锥形瓶中, 于30℃、135 r/min条件下振荡培养。分别于接种后0、6、12、15、18、21、24、27、30、36、42、48、60、72 h取样200 μL, 采用Beckman计数器测定细胞密度。每个细胞株设置3个重复。所得数据使用GraphPad Prism 10软件计算均值与方差并绘制生长曲线。

1.5 四膜虫细胞株对Cd耐受性的检测

以24 h半数效应浓度(EC₅₀)评估各细胞株对Cd²⁺的耐受性。根据预实验确定的100%和无抑制浓度范围, 设置Cd²⁺浓度梯度(0.2、0.5、1、1.5、

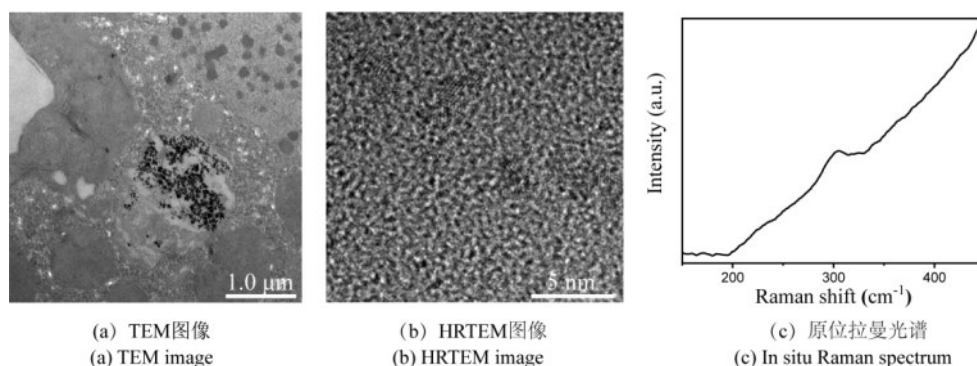


图1 *T. thermophila* SB210合成CdS的表征。

Fig. 1 Characterization of CdS synthesized by *T. thermophila* SB210.

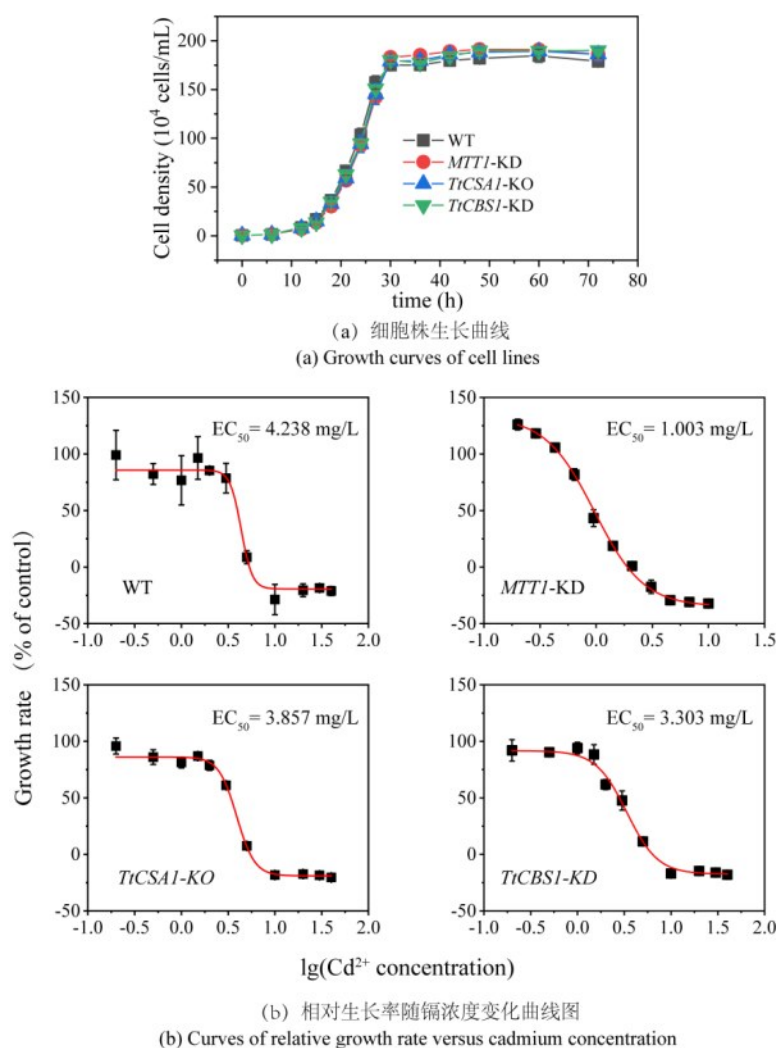


图2 细胞株生长曲线及相对增长率随 Cd^{2+} 浓度的变化曲线图。

Fig. 2 Growth curves of cell lines and curves of relative growth rate as a function of cadmium concentration.

2、3、5、10、20、30、40 mg/L)。将生长至对数初期的嗜热四膜虫野生型细胞株及各工程细胞株调整至适宜密度，分装于黑盖瓶中，分别加入不同浓度 Cd^{2+} 工作液（对照组加入等体积灭菌超纯水），终浓度如上所示。测定0 h初始细胞密度后，于 30°C 、135 r/min 条件下培养24 h，再次测定细胞密度，每组设3个平行，计算相对增长率，利用 GraphPad 2021 软件拟合 EC_{50} 值。

相对增长率计算公式如下：

$$\text{相对增长率}(\%) = \frac{(N_{\text{exp}, 24} - N_{\text{exp}, 0})}{(N_{\text{con}, 24} - N_{\text{con}, 0})} * 100\% \quad (1)$$

其中 $N_{\text{exp}, 24}$ 为实验组培养24 h后的细胞密度， $N_{\text{exp}, 0}$ 为实验组0 h的细胞密度， $N_{\text{con}, 24}$ 为对照组培养24 h后的细胞密度， $N_{\text{con}, 0}$ 为对照组0 h的细

胞密度。

1.6 四膜虫细胞株CdS纳米颗粒的表征方法

1.6.1 透射电子显微镜

将 Cd^{2+} 处理后的细胞离心弃上清，用超纯水洗涤3次，重悬后按照已报道的方法制备透射电镜（TEM）超薄切片^[17]。用透射电子显微镜（TEM）观察细胞内纳米颗粒的形态。

1.6.2 拉曼光谱

待测细胞经离心收集、超纯水洗涤后，重悬于水中，滴加至载玻片，晾干后即可上机检测。显微拉曼图像由配备532 nm氩离子激光器和100×物镜的显微拉曼光谱仪采集。

1.7 四膜虫细胞株内CdS含量的检测方法

将处于生长稳定期的嗜热四膜虫野生型细胞株及各工程细胞株用 Tris 缓冲液 (10 mM, pH 7.4) 洗涤两次后重悬于新鲜 SPP 培养基中, 加入 CdCl_2 母液至 Cd^{2+} 终浓度 5 mg/L 或 10 mg/L, 于 30°C、50 r/min 慢摇培养, 按设定时间点收集细胞。收集的细胞经超声破碎 (50% 功率, 10 min) 后, 加入等体积相应浓度的 EDTA-2Na 溶液 (5 mg/L Cd^{2+} 体系加 60 μM , 10 mg/L 体系加 120 μM), 混匀 10 min。取 500 μL 混合液加入配有 50 kDa 超滤膜的 Amicon Ultra-15 超滤管中, 加入 2500 μL 超纯水稀释, 3000 $\times g$ 离心 10 min, 再向上层加入 2000 μL 超纯水重复离心一次, 收集滤液。将原始样品及超滤液分别进行微波消解 (180°C, 15 min), 赶酸后以 2% 硝酸定容, 经 0.22 μm 滤膜过滤后, 采用 ICP-MS 测定总 Cd 含量及游离 Cd^{2+} 含量。根据公式计算 CdS 含量及 Cd 转化率。超滤次数及 EDTA-2Na 浓度经优化后确定最优条件 (超滤 2 次; 5 mg/L Cd^{2+} 体系用 60 μM EDTA-2Na, 10 mg/L 体系用 120 μM)。应用该方法对四膜虫在不同 Cd^{2+} 暴露时间 (0~48 h) 下的 Cd^{2+} 转化率进行了测定。

CdS 含量以及细胞对水中 Cd 的转化率 (C) 的计算公式如下:

$$C_{\text{CdS}} = T_{\text{Cd}} - C_{\text{Cd}^{2+}} \quad (2)$$

$$C(\%) = \left(1 - \frac{C_{\text{Cd}^{2+}}}{T_{\text{Cd}}}\right) * 100 \quad (3)$$

其中 $C_{\text{Cd}^{2+}}$ 为 Cd^{2+} 的浓度 (mg/L), C_{CdS} 为 CdS 的浓度 (mg/L) (以 Cd 计算), T_{Cd} 为总 Cd 的浓度 (mg/L)。

1.8 嗜热四膜虫细胞株 Cd 去除率的检测方法

将嗜热四膜虫野生型细胞株及各基因工程细胞株以 3125 cells/mL 的初始密度接种于含 50 mL SPP 培养基的 250 mL 锥形瓶中, 于 30 °C、135 r/min 条件下培养约 2 天, 获得生长稳定期的细胞。用 Tris 缓冲液 (10 mM, pH 7.4) 洗涤两次后, 以 1.5×10^6 cells/mL 的终密度重悬于新鲜 SPP 中。分别加入 CdCl_2 母液至 Cd^{2+} 终浓度为 5 mg/L 或 10 mg/L, 于 30 °C、50 r/min 慢摇培养。5 mg/L 处理组在 1、3、6、12、24 h 取样, 10 mg/L 处理组在 3、6、

12、24、48 h 取样, 每个时间点设 3 个重复。10000 rpm 离心 5 min 获得上清。将原始样品及上清消解并测量 Cd 含量, 样品消解及含量测定方法同 1.7。

细胞对水中 Cd 的去除率 (R) 的计算公式如下:

$$R(\%) = \frac{C_0 - T_{\text{L}}}{C_0} \times 100 \quad (4)$$

其中 C_0 为 Cd^{2+} 的初始浓度 (mg/L), T_{L} 为不同时间上清液中总 Cd 的浓度 (mg/L)。

2 结果和分析

2.1 细胞内 CdS 纳米颗粒的表征

嗜热四膜虫能高效富集水体中的 Cd^{2+} 。 Cd^{2+} 进入细胞后先与硫醇小分子形成复合物, 再与内源性 H_2S 反应生成低毒、稳定的 CdS 颗粒。为验证 CdS 颗粒是否能在嗜热四膜虫细胞内生成, 将嗜热四膜虫与 5 mg/L Cd^{2+} 孵育 24 h 后, 采用透射电子显微镜 (TEM) 和原位拉曼光谱对其进行表征。透射电子显微镜 (TEM) 可用于观察 CdS 纳米颗粒在嗜热四膜虫细胞内的形态、尺寸及细胞内分布。TEM 图像 [图 1(a)] 显示, 细胞内生成的 CdS 颗粒尺寸不均一, 存在一定程度的聚集, 且大多分布于囊泡内。HRTEM 图像 [图 1(b)] 进一步显示了清晰的晶格条纹, 表明所合成的 CdS 为晶体结构。原位拉曼光谱 [图 1(c)] 在 300 cm^{-1} 处检测到 CdS 的特征峰, 其峰位置与已有文献一致^[24]。以上结果说明, 在与 5 mg/L Cd^{2+} 孵育 24 h 后, 嗜热四膜虫细胞内生成了 CdS 纳米颗粒。

2.2 MTT1、TtCSA1 和 TtCBS1 基因敲降/敲除影响嗜热四膜虫富集与转化 Cd^{2+} 的能力

在药物巴龙霉素或者放线菌酮的作用下获得了 MTT1-KD、TtCSA1-KO 和 TtCBS1-KD 细胞株 [附图 3]。首先进行了各细胞株生长曲线的测定。从结果可知, 各工程细胞株的生长曲线与野生型一致, 呈典型 “S” 型, 对数生长初期密度约为 2×10^5 cells/mL, 平台期密度约 1.8×10^6 cells/mL, 生长

速率无显著差异,表明基因敲除/敲降不影响细胞正常生长[图2(a)].后续实验以对数初期(2×10^5 cells/mL)进行24 h Cd^{2+} 暴露实验测定各细胞株的半数效应浓度(EC_{50})评估其对 Cd^{2+} 的耐受性。结果如图2(b)所示,所有细胞株的相对生长率随 Cd^{2+} 浓度升高均呈典型“S”型抑制曲线。野生型(WT)细胞株的 EC_{50} 为4.328 mg/L。与WT相比,

MTT1-KD 细胞株的 EC_{50} 降至1.003 mg/L(下降76.8%)。*TtCSA1*-KO 和 *TtCBS1*-KD 细胞株的 EC_{50} 为3.857和3.303mg/L,相对野生型分别下降10.88%和23.68%,其中*TtCBS1*敲降比*TtCSA1*敲除使 EC_{50} 降低更多。

基于Cd暴露实验结果,选择5 mg/L(约WT半数效应浓度)和10 mg/L Cd^{2+} (WT全抑制浓度)

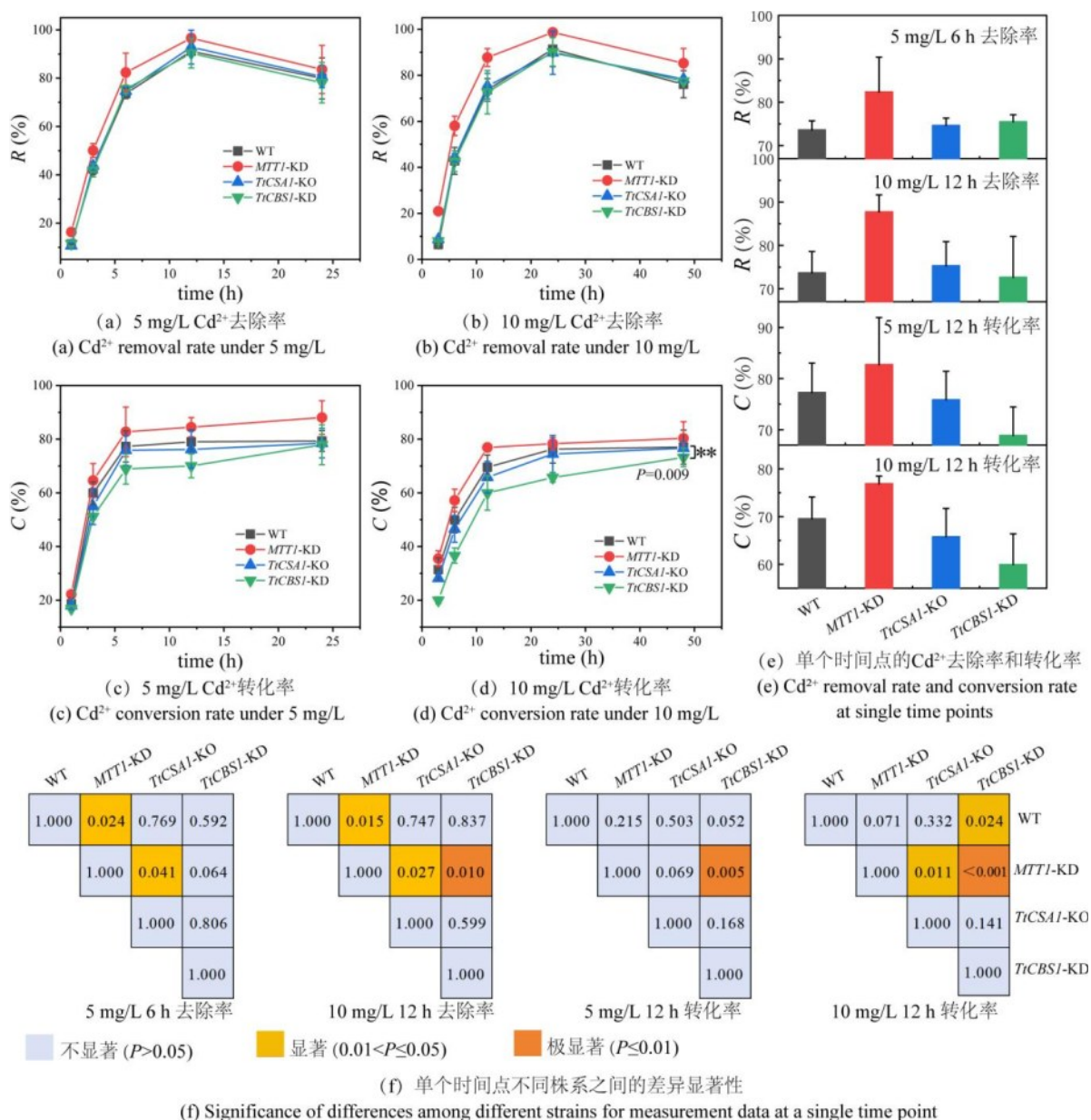


图3 不同细胞株对 Cd^{2+} 的去除率及转化率。(不同细胞株随时间变化去除率/转化率曲线进行重复测量双因素方差分析, **: $P \leq 0.01$ 。不同细胞株在同一时间的 Cd^{2+} 去除率及转化率进行单因素方差分析。)

Fig. 3 Removal and transformation rates of Cd^{2+} by different cell strains. (Repeated measures two-way ANOVA was used to compare the removal/transformation rate curves over time among different cell strains. **: $P < 0.01$. One-way ANOVA was performed on the removal and transformation rates of Cd^{2+} among different cell strains at the same time point.)

用于嗜热四膜虫野生型及工程细胞株的 Cd^{2+} 去除及转化率测量实验。为削弱细胞碎片对 Cd^{2+} 的非特异性吸附,确保游离 Cd^{2+} 的准确测定, Cd^{2+} 转化率测量实验在样品处理中添加了EDTA-2Na进行 Cd^{2+} 的螯合解吸^[25]。考察了不同浓度EDTA-2Na对5 mg/L和10 mg/L Cd^{2+} 处理组镉回收率的影响。结果如附图4所示,无EDTA-2Na时,两组回收率分别为32%和23%;随着EDTA-2Na浓度升高,回收率逐步增加并趋于100%。5 mg/L处理组在60 μM 及以上浓度时回收率达饱和(约100%),10 mg/L处理组在120 μM 及以上浓度时达饱和。因此,后续实验分别选用60 μM 和120 μM EDTA-2Na作为两种 Cd^{2+} 处理条件下的螯合剂。为评估方法的线性,配制了含不同比例 $\text{Cd}^{2+}/\text{CdS}$ 的一系列标准品,经相同处理后测定CdS浓度(以Cd计算)。以预设CdS浓度为横坐标、实测CdS浓度为纵坐标进行线性拟合。结果如附图5所示,5 mg/L和10 mg/L Cd^{2+} 体系的相关系数 R^2 分别为0.9957和0.9964,线性关系良好,证明成功建立了 Cd^{2+} 转化率测量标准曲线。该实验条件被用于后续 Cd^{2+} 转化率测量。

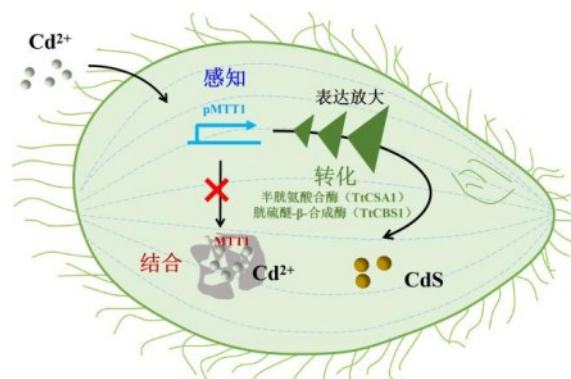
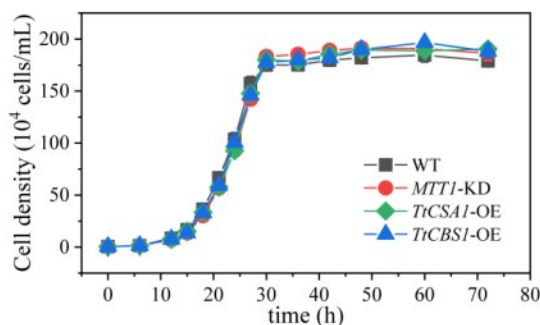


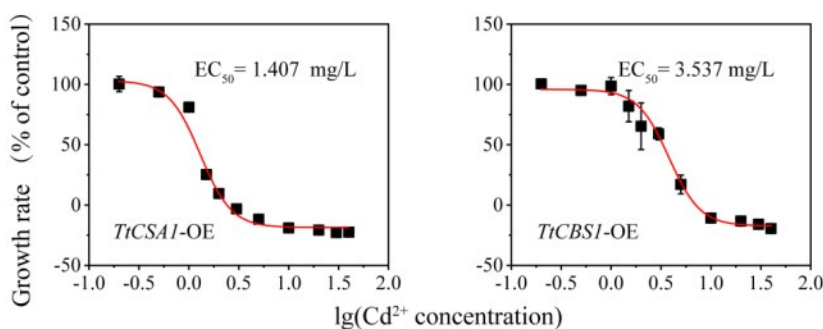
图4 高效镉转化嗜热四膜虫构建。

Fig. 4 Construction of a highefficiency cadmium-converting *T. thermophila* strain.

在生长平台期对各细胞株进行 Cd^{2+} 暴露处理,评价其去除及转化能力。实验结果如图3(a-b)所示,在5 mg/L和10 mg/L Cd^{2+} 处理下, Cd^{2+} 去除均呈时间依赖性:5 mg/L Cd^{2+} 处理时,去除率在6 h内快速上升,12 h达峰值(>90%),其中 MTT1-KD 细胞株去除率最高可达96.6%,之后略有下降;10 mg/L处理时,12 h内快速上升,24 h达峰值(>80%),其中 MTT1-KD 细胞株去除率最高可达



(a) 细胞株生长曲线
(a) Growth curves of cell lines



(b) 相对生长率随镉浓度变化曲线图
(b) Curves of relative growth rate versus cadmium concentration

图5 细胞株生长曲线及相对生长率随 Cd^{2+} 浓度的变化曲线图。

Fig. 5 Growth curves of cell lines and curves of relative growth rate as a function of cadmium concentration.

98.7%，后略有下降。比较各株系 [图3(e)]，*TiCSAI*-KO 和 *TiCBSI*-KD 细胞株的 Cd^{2+} 去除率与 WT 细胞株无显著差异；而 *MTTI*-KD 细胞株在 5 mg/L 和 10 mg/L 处理下去除率在 6 h 和 12 h 相较于 WT 细胞株分别提升了约 15% 和 20%。*TiCSAI* 或 *TiCBSI* 的敲除或敲降与对 Cd^{2+} 去除无明显影响。

同样评估了不同细胞株的 Cd^{2+} 转化率。实验结果如图3(c-d)所示，在 5 mg/L 和 10 mg/L Cd^{2+} 处理下，各细胞株对 Cd^{2+} 的转化同样均呈时间依赖性：5 mg/L 处理下，*MTTI*-KD 细胞株最终转化率稳定在 90% 左右；10 mg/L 处理下，*MTTI*-KD 细胞株稳定在 80% 左右，而 *TiCSAI*-KO 和 *TiCBSI*-KD 细胞株和野生型都分别稳定在约 80% 和 75%。比较各株系 [图3(e)]，*MTTI*-KD 细胞株相较于 WT，12 h 的 Cd^{2+} 转化率上升，*TiCSAI* 或 *TiCBSI* 的敲除或敲降在 12 h 和 WT 细胞株比较均有下降（5 mg/L：3.6% 和 11.3%；10 mg/L：5.4% 和 13.8%）。*TiCSAI*-KO 与野生型相比转化率虽然下降，但并无显著差异。在各细胞株中，无论是单个时间点还是整体趋势，仅有 *TiCBSI*-KD 细胞株在 10 mg/L Cd^{2+} 处理下与 WT 差异显著 [图3(d-f)]。

2.3 高效镉转化嗜热四膜虫的构建和功能验证

上述结果表明，*MTTI* 敲降可增强嗜热四膜虫对 Cd^{2+} 的去除与转化能力。尽管 *TiCSAI* 敲除或 *TiCBSI* 敲降对 Cd^{2+} 去除无明显影响，但 *TiCBSI* 敲降会降低 Cd^{2+} 的转化，其效率与野生型表现出显著差异。基于以上结果，本研究利用嗜热四膜虫 Cd^{2+} 感知的 *MTTI* 启动子诱导 *TiCBSI* 基因的过表达，构建了过表达细胞株。如图4所示，通过重组“感知-结合-转化”线路，从而实现高效镉转化嗜热四膜虫细胞株的构建。

为了进一步解析其功能，*TiCSAI* 过表达细胞株也被同时构建。其构建过程见附图2，过程及 PCR 鉴定结果如附图6所示。对该细胞株进行了生长曲线和 24 h Cd^{2+} 暴露 EC_{50} 的测定。生长曲线和 24 h Cd^{2+} 暴露 EC_{50} 实验结果如图5所示。2株重组细胞株的生长曲线与 WT 细胞株高度相似，其 EC_{50} 值均大于 *MTTI*-KD 细胞株，分别为 1.407 和 3.537 mg/L，其中 *TiCSAI*-OE 细胞株 EC_{50} 值较 *MTTI*-KD 细胞株 (1.003 mg/L) 提升了 40.3%，*TiCBSI*-OE 细胞株

EC_{50} 值较 *MTTI*-KD 细胞株提升了 252.6%。过表达 *TiCBSI* 基因导致嗜热四膜虫镉耐受能力的提升较 *TiCSAI* 更为显著。该结果与敲除 *TiCBSI* 基因对嗜热四膜虫镉耐受能力的影响更大的结果 [图2(b)] 一致。

同样在生长平台期对各重组细胞株进行 Cd^{2+} 暴露处理，评价其去除及转化能力。实验结果如图6所示。*TiCSAI*-OE 和 *TiCBSI*-OE 细胞株对 Cd^{2+} 的去除率高于 WT，但与 *MTTI*-KD 细胞株没有明显差异 [图6(a-b, e-f)]。该结果显示 Cd^{2+} 的去除率仅受 *MTTI* 敲除/敲降影响。在 Cd^{2+} 转化率方面，实验结果如图6(c-f)所示。比较各株系，在 5 mg/L Cd^{2+} 处理 24 h 条件下，*TiCBSI*-OE 具有最高的 Cd^{2+} 转化率，为 91.6%。*TiCSAI*-OE 和 *TiCBSI*-OE 细胞株的 Cd^{2+} 转化率相对于 WT 都有显著增加。三株工程株之间，*MTTI*-KD 和 *TiCSAI*-OE 无明显差异。*TiCBSI*-OE 略高于 *MTTI*-KD 和 *TiCSAI*-OE。在 10 mg/L Cd^{2+} 处理 12 h 条件下，*TiCSAI*-OE 和 *TiCBSI*-OE 细胞株的转化率相较于 WT 细胞株分别提升了 9% 和 17.1%。但仅 *TiCBSI*-OE 细胞株在 5 mg/L 和 10 mg/L Cd^{2+} 处理下与 WT 表现出显著单时间点差异，且仅在 10 mg/L Cd^{2+} 处理下表现整体组间差异 [图6(d-f)]。

3 讨论与结论

本研究首先通过构建嗜热四膜虫 *MTTI* 敲降、*TiCSAI*/*TiCBSI* 敲除/敲降细胞株，系统解析了这三个基因在镉去除与转化中的差异化功能。并进一步基于合成生物学理性设计，构建了高效镉转化的嗜热四膜虫系统。

生长曲线显示，嗜热四膜虫 *MTTI* 敲降、*TiCSAI*/*TiCBSI* 敲除/敲降细胞株的生长趋势均与野生型一致，表明上述基因敲除/敲降后未影响细胞的生长。 Cd^{2+} 耐受性 (EC_{50}) 测试结果表明，*MTTI* 敲降使 EC_{50} 下降了 76.8%，但该细胞株的 Cd^{2+} 去除率（在 5 和 10 mg/L Cd^{2+} 处理下最高分别达 96.6% 和 98.7%）和转化率（在 5 和 10 mg/L Cd^{2+} 处理下最高分别达 88.1% 和 80.3%）高于野生型。其机制可能如下：*MTTI* 蛋白已被证实具备极强的 Cd^{2+} 结合能力，可结合多达 16 个 Cd^{2+} 离子，形成独特的

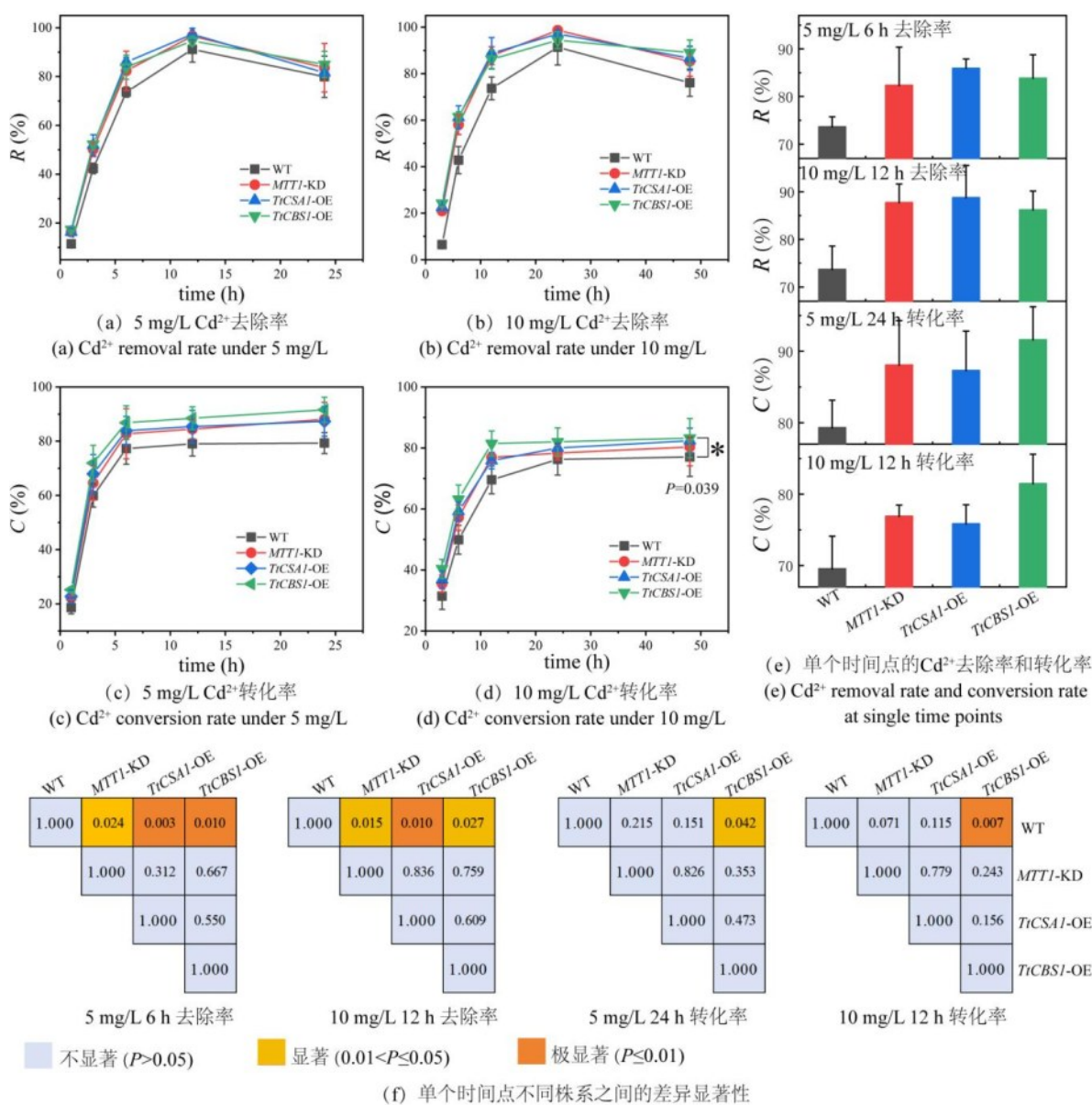


图6 不同细胞株对Cd²⁺的去除率及转化率。(不同细胞株随时间变化去除率/转化率曲线进行重复测量双因素方差分析, *: $P \leq 0.05$ 。不同细胞株在同一时间的Cd²⁺去除率及转化率进行单因素方差分析。)

Fig. 6 Removal and transformation rates of Cd²⁺ by different cell strains. (Repeated measures two-way ANOVA was used to compare the removal/transformation rate curves over time among different cell strains. *: $P < 0.05$. One-way ANOVA was performed on the removal and transformation rates of Cd²⁺ among different cell strains at the same time point.)

Cd₁₆-MTT1 络合物, 而且结合稳定性非常高^[16]。MTT1 虽赋予了细胞强大的 Cd²⁺ 解毒能力, 但也将大量 Cd²⁺ 固定在 MTT1 蛋白中, 使其难以进入 CdS 矿化途径。敲降 *MTT1* 后, 细胞内游离 Cd²⁺ 增加, 虽导致生长抑制 (EC_{50} 下降), 却使更多 Cd²⁺ 得以作为反应底物进入 CdS 转化过程, 最终表现为更高的 Cd²⁺ 去除与转化率。已有研究显示, 嗜热四膜虫在 MTT1 的编码区被绿色荧光蛋白取代之后, 对

培养体系中 Hg²⁺ 和 Cd²⁺ 的去除效率均显著提高^[17], 与本研究结果一致。

敲除或敲降 *TtCSA1* 和 *TtCBS1* 细胞株的 EC_{50} 相较于野生型分别下降 10.88% 和 23.68%, 降幅均远小于 *MTT1* 敲降细胞株。进一步比较 *TtCSA1* 和 *TtCBS1* 的作用, 二者敲除/敲降对 Cd²⁺ 去除无显著影响, 但 Cd²⁺ 转化率均有降低, 且 *TtCBS1* 敲降的降低幅度 (11.3%~13.8%) 大于 *TtCSA1* 敲除

(3.6%~5.4%), 与野生型表现出显著差异。上述结果表明, *MTTI* 对嗜热四膜虫 Cd^{2+} 耐受性、去除能力和转化能力均有影响。已有研究显示, *TiCBSI* 在镉胁迫下表达上调, 且其重组蛋白可在体外以半胱氨酸和 Cd^{2+} 为底物催化 CdS 量子点的合成^[26-27]。与本研究 *TiCBSI* 敲降细胞株降低了 CdS 转化率的表型一致, 表明 *TiCBSI* 在体内同样参与 CdS 矿化过程。在本实验条件下, *TiCBSI* 的敲降特异性地影响了 Cd^{2+} 向 CdS 的转化, 而未对 Cd^{2+} 去除产生可检测的影响。相比之下, *TiCSAI* 敲除对 Cd^{2+} 的去除与转化均无显著影响。其原因可能在于嗜热四膜虫中 *TiCBSI* 发挥着更主导的作用, 且 *TiCSAI* 缺失后其功能可被 *TiCBSI* 及半胱氨酸合成网络中的其他同工酶所代偿。

基于以上结果, 本研究利用镉诱导型启动子 pMTT1 驱动 *TiCBSI* 基因过表达, 重组“感知-结合-转化”线路, 成功构建了高效镉转化嗜热四膜虫细胞株。如图4所示, 这一设计实现了双重效果: 一方面, 敲除 *MTTI* 解除了金属硫蛋白对胞内 Cd^{2+} 的结合, 增加了游离 Cd^{2+} , 为 CdS 生成提供了充足的底物; 另一方面, pMTT1 启动子镉特异性响应使 *TiCBSI* 在镉污染环境被高效诱导表达, 从而加强细胞内半胱氨酸合成和内源性 H_2S 的产生, 加速 Cd^{2+} 向低毒、稳定的 CdS 转化。

功能测试表明, 过表达 *TiCBSI* 可使 EC_{50} 提高至 3.537 mg/L, 相较 *MTTI* 敲降株提升 252.6%, 而过表达 *TiCSAI* 的提高幅度较小, 仅提升 40.3%。此外, 敲降/敲除 *MTTI* 的细胞株(包括过表达细胞株)均表现出相似的 Cd^{2+} 去除率提升(15%~20%)。在 Cd^{2+} 转化率方面, 过表达 *TiCSAI* 相较 *MTTI* 敲降株无明显提升, 而过表达 *TiCBSI* 转化率高于 *MTTI* 敲降株。上述过表达实验的结果与前述敲除/敲降功能解析的结论相互印证, 进一步支持 *TiCBSI* (反向转硫途径关键酶) 在嗜热四膜虫镉矿化通路中更为关键, 其功能难以被 *TiCSAI* (从头合成途径关键酶) 替代。在本实验条件下, *TiCSAI* 的敲除和过表达对嗜热四膜虫的 Cd^{2+} 去除和转化能力都几乎无显著影响。*TiCBSI*-KD 和 *TiCBSI*-OE 细胞株在 10 mg/L Cd^{2+} 处理下的整个转化过程与野生型表现出显著差异, 其他细胞株差异不显著。

综上, 本研究通过利用 pMTT1 启动子作为镉响应传感器过表达关键酶基因, 通过敲降 *MTTI* 解除细胞内 Cd^{2+} 与 *MTTI* 蛋白的结合以释放转化底物、通过过表达反向转硫途径关键酶基因 *TiCBSI* 提高转化效率, 成功构建了兼具高效 Cd^{2+} 去除和转化能力的镉转化嗜热四膜虫 *TiCBSI*-OE 细胞株。在 5 mg/L Cd^{2+} 处理下, 其最高去除率为 94.7%, 最高转化效率为 91.6%。本研究为开发基于原生生物的重金属生物修复平台提供了设计思路与技术原型, 未来需进一步优化 *TiCBSI*-OE 株基因替代程度, 结合转录组/代谢流分析揭示调控网络, 并推动该体系向实际应用转化。

致谢: 本研究使用的显微拉曼光谱仪、透射电子显微镜和 ICP-MS 得到了中国科学院水生生物研究所分析测试中心的技术支持。

参 考 文 献

- [1] DAVIDOVA S, MILUSHEV V, SATCHANSKA G. The mechanisms of cadmium toxicity in living organisms[J]. *Toxics*, 2024, 12(12): 875.
- [2] SATTAR S, YAHYA M, ASLAM S, et al. Environmental occurrence, hazards, and remediation strategies for the removal of cadmium from the polluted environment[J]. *Results in Engineering*, 2025, 25: 104322.
- [3] KUBIER A, WILKIN R T, PICHLER T. Cadmium in soils and groundwater: A review[J]. *Applied Geochemistry*, 2019, 108: 104388.
- [4] TANG H Y, XIANG G H, XIAO W, et al. Microbial mediated remediation of heavy metals toxicity: mechanisms and future prospects[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2024, 15: 1420408.
- [5] MALLICK S, PRADHAN T, DAS S. Bacterial biomineralization of heavy metals and its influencing factors for metal bioremediation[J]. *Journal of Environmental Management*, 2025, 373: 123977.
- [6] SATTAYAWAT P, YUNUS I S, NOIRUNGSEE N, et al. Synthetic biology-based approaches for microalgal bio-removal of heavy metals from wastewater effluents[J]. *Frontiers in Environmental Science*, 2021, 9: 778260.
- [7] THAI TD, LIM W, NA D. Synthetic bacteria for the detection and bioremediation of heavy metals[J]. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. 2023; 11: 1178680.
- [8] RUEHLE M D, ORIAS E, PEARSON C G. *Tetrahymena* as a unicellular model eukaryote: Genetic and genomic tools[J]. *Genetics*, 2016, 203(2): 649-665.
- [9] MAURYA R, PANDEY A K. Importance of protozoa *Tetrahymena* in toxicological studies: A review[J]. *Science of*

- the Total Environment, 2020, 741: 140058.
- [10] XIONG W, WEI W, HE M, et al. Construction of *Tetrahymena* strains with highly active arsenic methyltransferase genes for arsenic detoxification in aquatic environments[J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2024, 275: 116258.
- [11] TU J W, LI T, GAO Z H, et al. Construction of CdS-*Tetrahymena thermophila* hybrid system by efficient cadmium adsorption for dye removal under light irradiation[J]. Journal of Hazardous Materials, 2022, 439: 129683.
- [12] DE FRANCISCO P, MARTÍN-GONZÁLEZ A, TURKEWITZ A P, et al. Extreme metal adapted, knockout and knockdown strains reveal a coordinated gene expression among different *Tetrahymena thermophila* metallothionein isoforms[J]. PLoS ONE, 2017, 12(12): e0189076.
- [13] 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, 2002, 99(6): 3734-3739.
- [14] YANG R Q, ROSHANI D, GAO B Y, et al. Metallothionein: A comprehensive review of its classification, structure, biological functions, and applications[J]. Antioxidants, 2024, 13(7): 825.
- [15] BOLDRIN F, SANTOVITO G, GAERTIG J, et al. Metallothionein gene from *Tetrahymena thermophila* with a copper-inducible-repressible promoter[J]. Eukaryotic Cell, 2006, 5(2): 422-425.
- [16] WANG Q, XU J, CHAI Y, et al. Functional comparison of metallothioneins MTT1 and MTT2 from *Tetrahymena thermophila*[J]. Archives of Biochemistry and Biophysics, 2011, 509(2): 170-176.
- [17] ZHAO S H, HU K K, XIONG J, et al. Simultaneous removal and optical determination of mercury ions by constructing fluorescent recombinant *T. thermophila* SB210 strains[J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2025, 298: 118325.
- [18] LEI W L, LIU J, ZHANG W Y, et al. Photocatalytic degradation of methylene blue by CdS quantum dots biosynthesized by cysteine synthetase TtCsa1 from *Tetrahymena thermophila*[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2025, 305: 141166.
- [19] GILL S S, TUTEJA N. Cadmium stress tolerance in crop plants: Probing the role of sulfur[J]. Plant Signaling & Behavior, 2011, 6(2): 215-222.
- [20] MENDOZA-CÓZATL D, LOZA-TAVERA H, HERNÁNDEZ-NAVARRO A, et al. Sulfur assimilation and glutathione metabolism under cadmium stress in yeast, protists and plants [J]. FEMS Microbiology Reviews, 2005, 29(4): 653-671.
- [21] WANG C L, MARATUKULA P D, LUM A M, et al. Metabolic engineering of an aerobic sulfate reduction pathway and its application to precipitation of cadmium on the cell surface[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2000, 66(10): 4497-4502.
- [22] LV H, HU L, XU J, et al. Identification and functional analysis of the mitochondrial cysteine synthase TtCsa2 from *Tetrahymena thermophila*[J]. Journal of Cellular Biochemistry, 2021, 122(12): 1817-1831.
- [23] LV H, XU J, BO T, et al. Characterization of cystathionine β -synthase TtCbs1 and cysteine synthase TtCsa1 involved in cysteine biosynthesis in *Tetrahymena thermophila*[J]. Journal of Eukaryotic Microbiology, 2021, 68(2): e12834.
- [24] ZEIRI L, PATLA I, ACHARYA S, et al. Raman spectroscopy of ultranarrow CdS nanostructures[J]. The Journal of Physical Chemistry C, 2007, 111(32): 11843-11848.
- [25] 罗晓暄, 魏群, 廖运生, 等. 活性微藻对镉去除及其解吸剂的优选研究[J]. 水处理技术, 2021, 47(03): 12-15.
- LUO X X, WEI Q, LIAO Y S, et al. The study of cadmium (Cd) removal by living algae with optimal selection of Cd desorption reagents in wastewater treatment[J]. Technology of Water Treatment, 2021, 47(03): 12-15.
- [26] LEI W, LIU J, XU J, et al. Cystathionine β -synthase TtCbs1 from *Tetrahymena thermophila* catalyzes the synthesis of CdS quantum dots for methyl orange decolorization [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2025, 91(10): e01255-25
- [27] LV H, XU J, BO T, et al. Comparative transcriptome analysis uncovers roles of hydrogen sulfide for alleviating cadmium toxicity in *Tetrahymena thermophila* [J]. BMC Genomics, 2021, 22: 21.



通讯作者: 缪炜(1974—),男,研究员,博士,博士生导师。研究方向为原生动物的分类和生物系统学、原生动物的性状和功能演化及生态适应机制解析,以及原动物合成生物学模型和关键生物技术。

E-mail: miaowei@ihb.ac.cn



共同通讯作者: 涂家薇(1991—),女,助理研究员,博士。研究方向为及原动物合成生物学模型和关键生物技术。

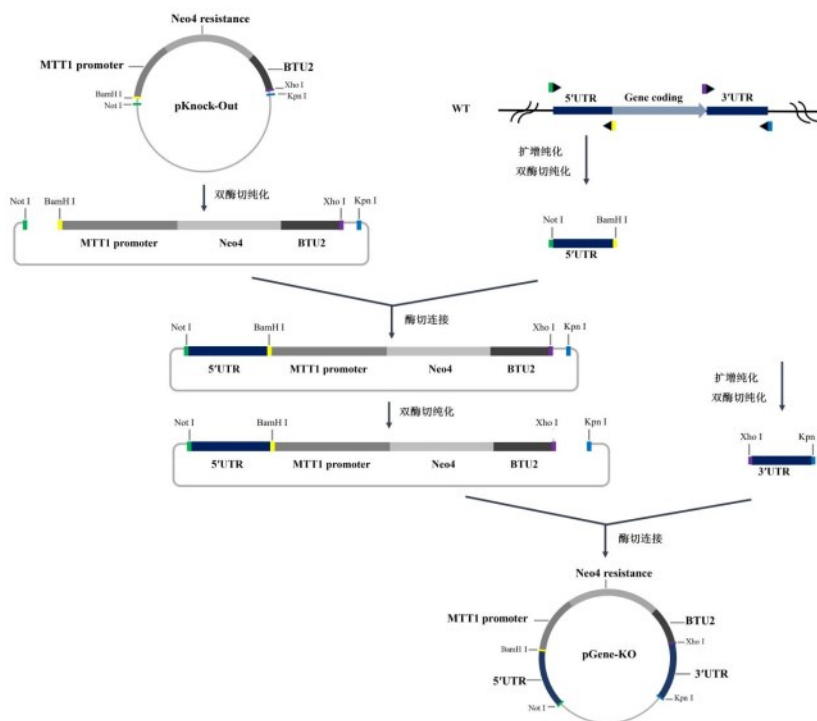
E-mail: tujiawei@ihb.ac.cn



第一作者: 胡凯(2001—),男,硕士研究生。研究方向为原动物毒理学和合成生物学模型。

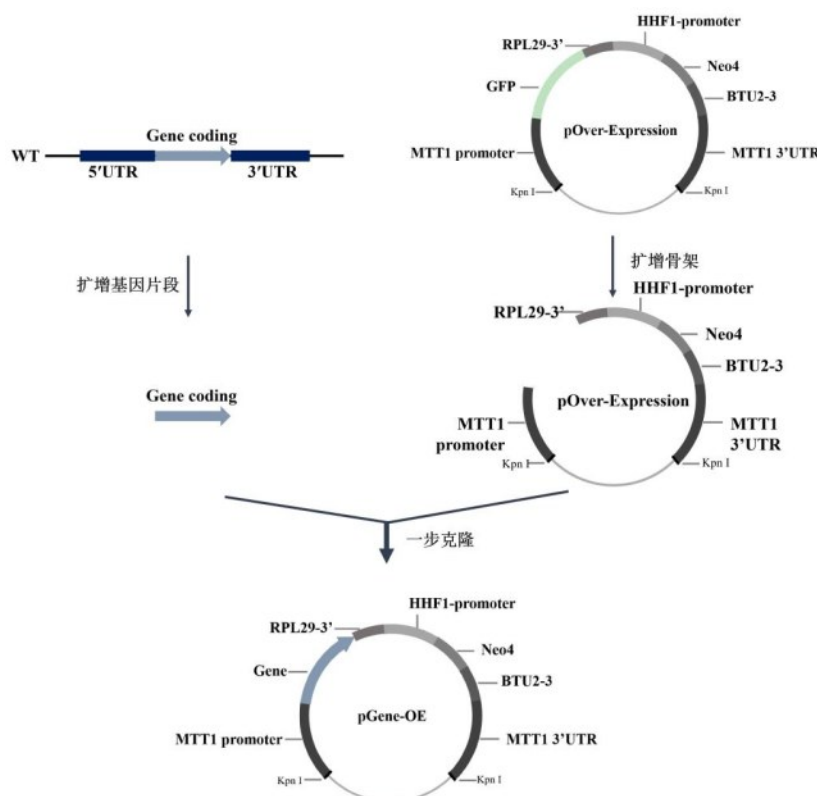
E-mail: hkk13849555647@163.com

附录



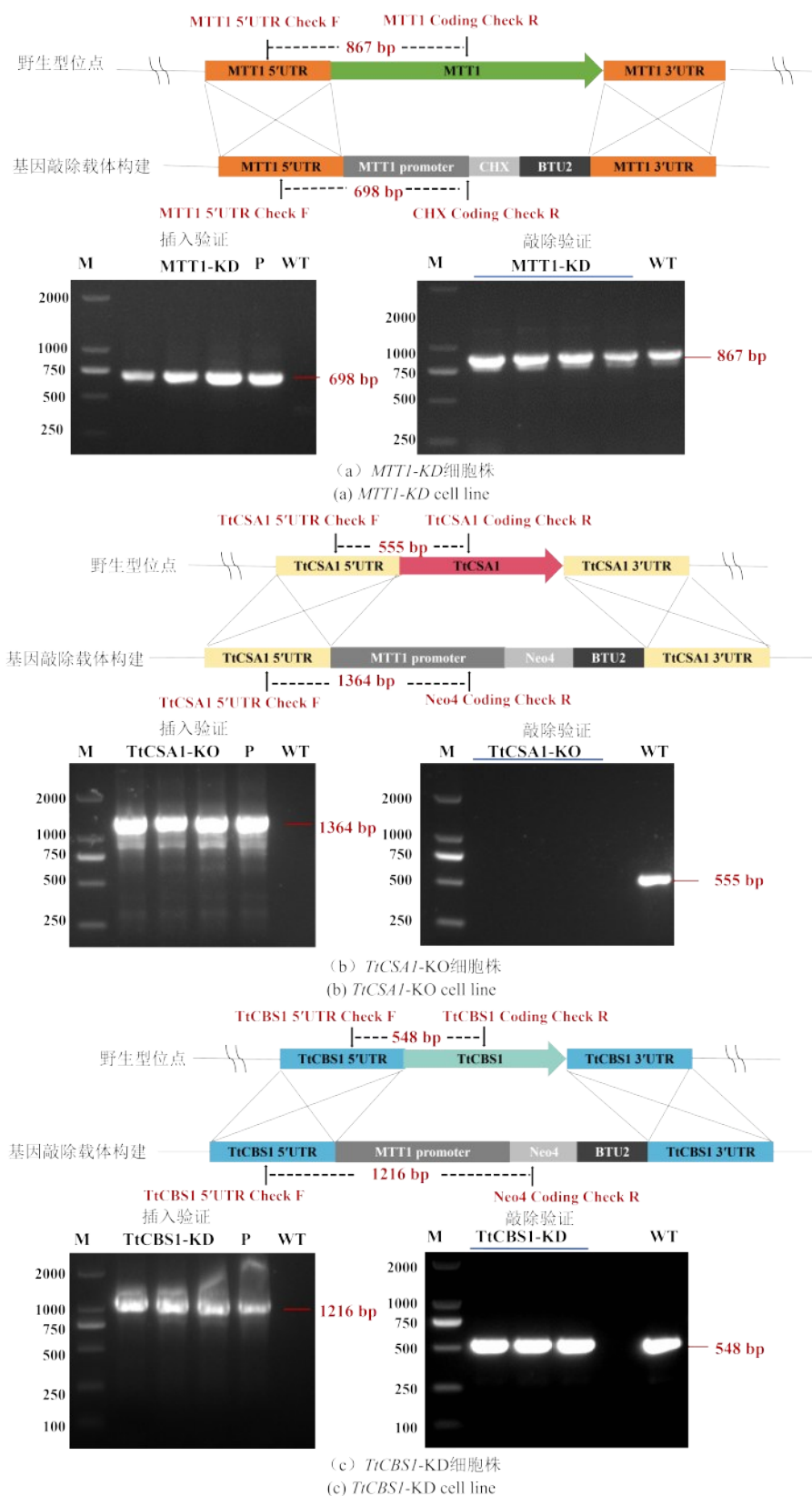
附图 1 敲除质粒构建示意图

Supplementary Fig. S1 Schematic diagram of knockout plasmid construction



附图 2 过表达质粒构建示意图

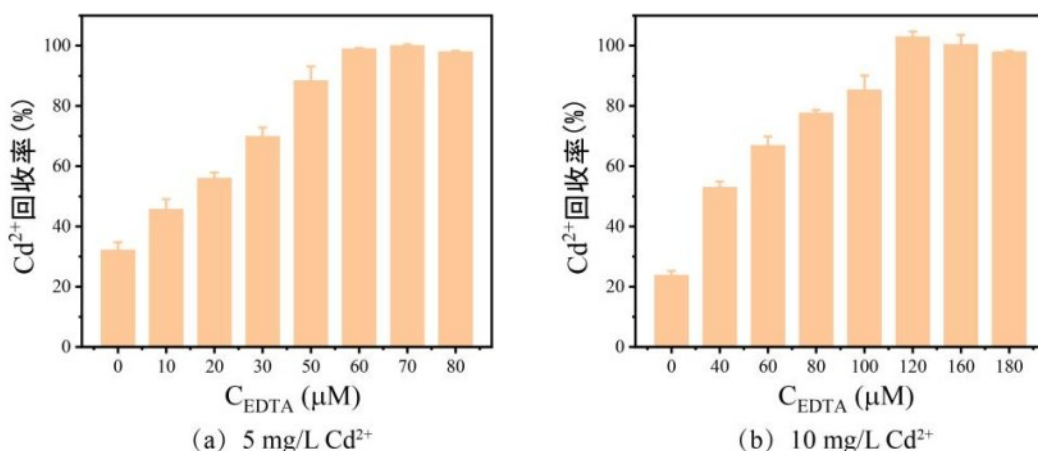
Supplementary Fig. S2 Schematic diagram of overexpression plasmid construction



附图3 细胞株同源重组示意图及鉴定结果胶图。

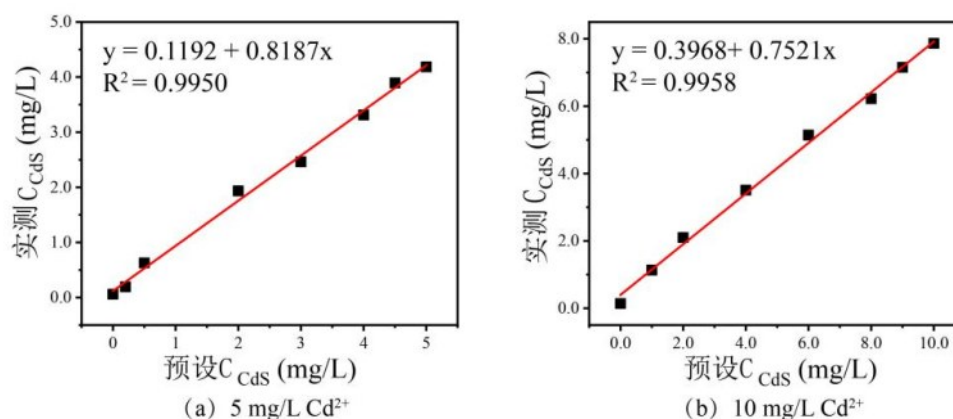
Supplementary Fig. S3 Schematic diagram of homologous recombination and identification results of cell lines (gel images)

为验证敲除效果，分别针对 *MTT1*、*TtCSA1* 和 *TtCBS1* 基因设计特异性引物进行 PCR 鉴定。以 *TtCSA1* 为例，使用 5'UTR 与 Neo4 引物扩增抗性插入片段（1364 bp），同时在野生型中无条带；使用 5'UTR 与编码区引物扩增 *TtCSA1* 基因片段（555 bp），在敲除株中条带消失。PCR 电泳结果如图 2 所示，尽管 *MTT1*-KD 和 *TtCBS1*-KD 细胞株能够扩增出抗性片段（698 bp 和 1216bp），但 *MTT1* 和 *TtCBS1* 特异性条带（867bp 和 548bp）依旧存在，证明获得的是 *MTT1*-KD 和 *TtCBS1*-KD 细胞株（图 2(a)和(c)）。选取敲降程度较高的 *MTT1*-KD 和 *TtCBS1*-KD 细胞株用于后续实验。*TtCSA1*-KO 细胞株成功扩增出抗性片段，且 *TtCSA1* 特异性条带完全消失，表明 *TtCSA1* 基因已被成功敲除（图 2(b)）。



附图4 不同EDTA-2Na浓度处理的镉回收率。

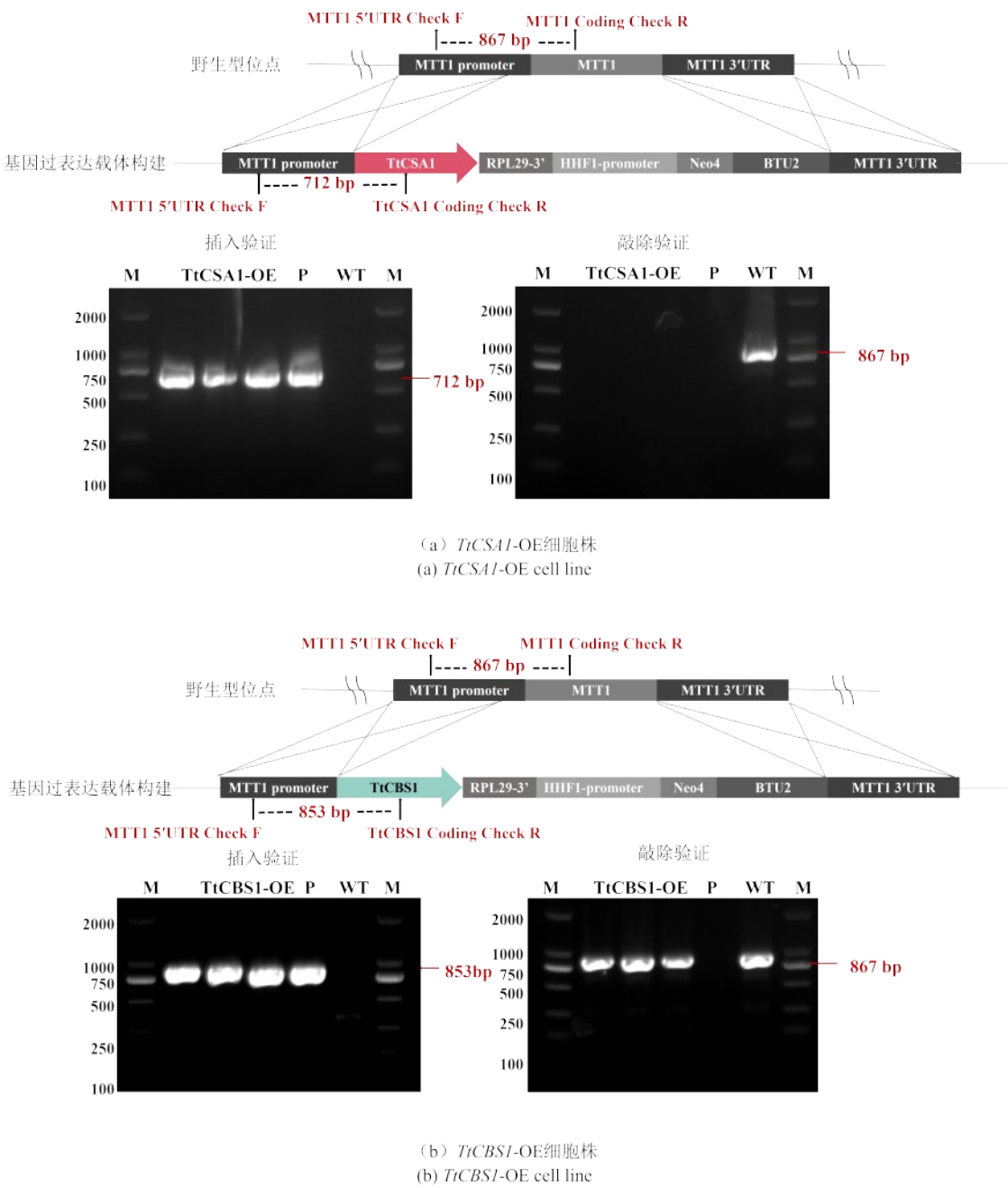
Supplementary Fig.S4 Cadmium recovery rates under different EDTA-2Na concentrations.



附图5 不同 Cd^{2+} 浓度体系的线性拟合曲线。

Supplementary Fig. S5 Linear fitting curves for different Cd^{2+} concentration systems.

通过 KpnI 酶切 p*TtCSA1*-OE 和 p*TtCBS1*-OE 质粒获得线性化载体，采用基因枪转化法将其导入嗜热四膜虫细胞，经巴龙霉素筛选获得 *TtCSA1*-OE 和 *TtCBS1*-OE 细胞株。PCR 鉴定结果显示：对于 *TtCSA1*-OE 株，使用 *MTT1* 5'UTR 与 *CBS1* 编码区引物可扩增出 712 bp 的插入片段，野生型则无此条带，同时使用 *MTT1* 5'UTR 与 *MTT1* 编码区引物检测内源 *MTT1*（867 bp）时条带消失，表明 *MTT1* 已完全敲除且 *TtCSA1* 成功过表达。对于 *TtCBS1*-OE 株，同样可扩增出 853 bp 的插入片段，但内源 *MTT1* 条带未完全消失，提示 *MTT1* 未被完全敲除，*TtCBS1* 仅实现部分过表达，选取敲降程度较高的细胞株用于后续实验。



附图6 细胞株同源重组示意图及鉴定结果胶图。

Supplementary Fig. S6 Schematic diagram of homologous recombination and identification results of cell lines (gel images).

附表 1 质粒构建引物信息

Supplementary Table S1 Primer information for plasmid construction.

引物名称	序列信息(5'-3')	扩增长度 (bp)	备注
MTT1 3'UTR F	CCGCTCGAGCGGAGCTGCTCAAAACATAGCTCA	985	扩增 MTT1 3'UTR
MTT1 3'UTR R	GGGGTACCCCTTTTGTTCATTCTTATCAAATAAATCT		
<i>TiCSA1</i> -Gene-F	TCAATCATTCACTCGAGGTTTCATTATTAAATGCTTCAAGTTGAG	1024	扩增 <i>TiCSA1</i> 基因编码区
<i>TiCSA1</i> -Gene-R	ATACTAAACGTTTAAACAAAATGAGACAAAGAAACGGAG		
<i>TiCSA1</i> -5'UTR-F	ATAAGAATGCGGCCGCTAAACTATTTTTATTTTTATTTTGTTCGAGATGT	1001	扩增 <i>TiCSA1</i> 基因 5'UTR
<i>TiCSA1</i> -5'UTR-R	CGGGATCCCGTTGGATTAGAAATATGTTGTATGATTTAAT		
<i>TiCSA1</i> -3'UTR-F	CCGCTCGAGCGGAAAAAAAAAAAAAAAAATGTTGTGCT	1009	扩增 <i>TiCSA1</i> 基因 3'UTR
<i>TiCSA1</i> -3'UTR-R	GGGGTACCCCTCGCGAGATTACCAAAATTATTGTTT		
<i>TiCBS1</i> -Gene-F	TCAATCATTCACTCGAGGTTTCAATAGAAAGGTAAGAGATCTTAGTTAGT	2079	扩增 <i>TiCBS1</i> 基因编码区
<i>TiCBS1</i> -Gene-R	ATACTAAACGTTTAAACAAAATGTACGCCAGATAAGATCCTAG		
<i>TiCBS1</i> -5'UTR-F	ATAAGAATGCGGCCGCTAAACTATTTTATACATTATCTTGCTTTTCTTTTAT	1009	扩增 <i>TiCBS1</i> 基因 5'UTR
<i>TiCBS1</i> -5'UTR-R	CGGGATCCCGAGTTAGTTATTTATTAAGTTTCTAAATTAGTTT		
<i>TiCBS1</i> -3'UTR-F	CCGCTCGAGCGGTGAAAATATTCAATTATTATAAAATTAATGT	1094	扩增 <i>TiCBS1</i> 基因 3'UTR
<i>TiCBS1</i> -3'UTR-R	GGGGTACCCCTTTTGACATTTTAAACTTGGATG		
pMTT1-neo4-F	AACCTCGAGTGAATGATTGAGGCCCCAACA	6632	扩增质粒 pMTT1-neo4 骨架
pMTT1-neo4-R	TTGTCTCATTTGTTTAAACGTTTAGTAT		

注：虚线表示一步克隆法中与载体识别的同源臂；下划线表示酶切位点及其保护碱基：

附表 2 敲除细胞株验证引物信息

Supplementary Table S2 Primer information for validation of knockout cell lines.

引物名称	序列信息(5'-3')	扩增长度 (bp)	备注
MTT1 5'UTR Check F	AGCTGCTCAAAACATAGCTCA	698	验证是否为 <i>MTT1</i> -KO 细胞株
CHX Coding Check R	GAACCTGAGGGCGACCTTCT		
MTT1 5'UTR Check F	AGCTGCTCAAAACATAGCTCA	867	验证 <i>MTT1</i> 基因敲除情况
MTT1 Coding Check R	TAGCTTTATCACCACAACAACATCCTTATT		
<i>TiCSA1</i> 5'UTR Check F	TTGCCTTTCAATTTGGGTATACTC	1364	验证是否为 <i>TiCSA1</i> -KO 细胞株
Neo4 Coding Check R	AACAGGACGACCTTGAGCAG		
<i>TiCSA1</i> 5'UTR Check F	TTGCCTTTCAATTTGGGTATACTC	555	验证 <i>TiCSA1</i> 基因敲除情况
<i>TiCSA1</i> Coding Check R	GCAGCAACTACAGTCATTCTTTTCT		
<i>TiCBS1</i> 5'UTR Check F	GAAAATTGGAAGCGAGTTGTTTAAAT	1216	验证是否为 <i>TiCBS1</i> -KO 细胞株
<i>TiCBS1</i> Coding Check R	AACAGGACGACCTTGAGCAG		
<i>TiCBS1</i> 5'UTR Check F	GAAAATTGGAAGCGAGTTGTTTAAAT	548	验证 <i>TiCBS1</i> 基因敲除情况
<i>TiCBS1</i> Coding Check R	GCAGCAGCAAGAGATAAACCGATAC		

附表 3 过表达细胞株验证引物信息

Supplementary Table S3 Primer information for validation of overexpression cell lines.

引物名称	序列信息(5'-3')	扩增长度 (bp)	备注
<i>MTT1</i> 5'UTR Check F	AGCTGCTCAAAACATAGCTCA	712	验证是否为 <i>TiCSA1</i> -OE 细胞株
<i>TiCSA1</i> Coding Check R	GCAGCAACTACAGTCATTCTTTTCT		
<i>MTT1</i> 5'UTR Check F	AGCTGCTCAAAACATAGCTCA	853	验证是否为 <i>TiCBS1</i> -OE 细胞株
<i>TiCBS1</i> Coding Check R	GCAGCAGCAAGAGATAAACCGATAC		
<i>MTT1</i> 5'UTR Check F	AGCTGCTCAAAACATAGCTCA	867	验证 <i>MTT1</i> 基因敲除情况
<i>MTT1</i> Coding Check R	TAGCTTTATCACCACAACAACATCCTTATT		