

集胞藻 PCC6803 基因 *ssl1690* 缺失突变株的构建

陈思礼, 镇 慧

(中南民族大学 生命科学学院, 武汉 430074)

摘 要 使用 BLAST 软件对聚球藻 PCC7002 的裂合酶基因 *cpcT* 进行了同源搜索分析, 在集胞藻 PCC6803 中获取了相似程度达 68% 的同源基因 *ssl1690*. 为进一步探讨 *ssl1690* 功能, 构建了同源缺失突变载体, 将其转入蓝藻细胞中, 筛选得到基因缺失突变株, 并将基因缺失突变株培养于 BG11 液体培养基中, 观察了其生长情况和表型变化. 结果表明: 基因缺失突变株与野生株相比, 生长有所延迟, 有漂白现象. 通过分离和比较 SDS-PAGE 电泳突变株与野生株的藻胆体蛋白, 发现缺失株存在藻胆体组分蛋白的缺失. 故认为集胞藻 PCC6803 *ssl1690* 基因功能与光合作用有关, 其所编码的蛋白对藻蓝蛋白正常的体内生物合成具有重要作用.

关键词 集胞藻 PCC6803; 同源重组; 缺失突变; 漂白现象

中图分类号 Q784 A 文献标识码 A 文章编号 1672-4321(2013)01-0028-04

Construction of Deletion Mutant Strain of Gene *ssl1690* from *Synechocystis* sp. PCC6803

Chen Sili, Zhen Hui

(College of Life Science, South-Central University for Nationalities, Wuhan 430074, China)

Abstract Gene *ssl1690* was obtained by BLAST comparison from *Synechocystis* sp. PCC6803 that is 68% homologous to lyase gene *cpcT*. To study the biological function of *ssl1690*, homologous knock-out mutation vector was constructed and transferred into *Synechocystis* sp. PCC6803. Then the *ssl1690* knock-out mutant strain was screened out through the resistance molecular marker and the growth condition and cultivating phenotype changes of mutant strain contrasted with wild strain was observed. The results indicated that deletion mutant strain grew more slowly than wild type strain and displayed bleaching phenomenon. Isolation and SDS-PAGE electrophoresis of phycobiliprotein in wild type and deletion mutant showed that deletion mutant exhibited constitutive loss of phycobilisomes. All above suggested *ssl1690* gene of *Synechocystis* sp. PCC6803 was related to photosynthesis and encoded protein may play an important role in normal biosynthesis in phycocyanin *in vivo*.

Keywords *Synechocystis* sp. PCC6803; homologous recombination; deletion mutant; bleaching phenomenon

藻胆蛋白是存在于蓝藻、红藻和隐藻中的一类同源蛋白家族. 藻胆蛋白在体内生物合成的最后一步为色素基团与脱辅基藻胆蛋白的连接而成. 在蓝藻细胞内, 藻胆蛋白的某些位点与色素基团的连接是自发的, 这位点本身具有裂合酶的功能, 而某些位

点上藻胆色素与脱辅基藻胆蛋白的正确连接需要特异的裂合酶来催化完成. 研究发现藻红蓝蛋白裂合酶 PecE、PecF 能够组装成异源二聚体, 行使胆蛋白裂合酶的催化功能, 催化藻胆蛋白 β 亚基 153 位半胱氨酸残基与藻胆色素的连接, PecE 和 PecF 通过

收稿日期 2012-12-10

作者简介 陈思礼(1955-) 男, 教授, 研究方向: 分子病原生物学, E-mail: sili.chen@163.com

基金项目 国家自然科学基金资助项目(31001099/C190101); 中央高校自然科学基金资助项目(CJS12003); 中南民族大学微生物与生物转化重点实验室资助项目(XJS09002)

使藻蓝色素 PCB 异构化形成 PVB 使之与脱辅基蛋白 PecA 连接^[1]. Zhao 经研究首次在鱼腥藻 PCC7120 中发现了与藻蓝蛋白 β 亚基合成相关的类裂合酶 CpeS, 它能够催化 β 亚基 Cys-153 与色素基团的结合^[2]. 另一种特异催化藻蓝蛋白 β 亚基合成的蛋白 CpcT 也在聚球藻 PCC7002 中发现^[3].

采用 BLAST 软件同源性搜索, 在集胞藻 PCC6803 基因组中我们发现与 *cpcT* 具有同源性的基因 *ssl1690*. 本实验利用分子生物学手段, 构建出 *ssl1690* 基因缺失体, 通过观察基因缺失株的表型, 预测基因功能.

1 材料与方法

1.1 材料

大肠杆菌 TG1 和克隆载体 pBluescript SK(+) 质粒为本实验室保存. 集胞藻 PCC6803 (*Synechococcus* sp. PCC6803) 购于中科院水生生物研究所淡水藻种库 (FACHB). PCR 反应所需试剂, DNA 凝胶回收试剂盒, 限制性内切酶, T4DNA 连接酶等均购自北京天根生化科技有限公司.

1.2 缺失体载体的构建

缺失体载体的构建是将 *ssl1690* 在基因组两侧序列克隆至 pBluescript SK(+) 载体中, 并通过酶切、连接将抗性基因卡那霉素插入到上下游同源臂间.

基因组的提取: 采用超声破碎法提取总 DNA. 离心收集对数期蓝藻细胞, 重悬于 CTAB 中, 利用超声波破碎细胞, 再加入蛋白酶 K, 37°C 恒温水浴 1 h 后, 使用酚氯仿法^[4]提取总 DNA.

上下游同源臂的克隆: 根据集胞藻 PCC6803 基因组信息和 *ssl1690* 的遗传图谱, 设计上下游同源序列的 PCR 引物: P1、P2、P3、P4 (见表 1), 以提取的集胞藻 PCC6803 基因组为模板进行 PCR 扩增. 扩增采用梯度 PCR 反应, 程序为: 94°C 5 min 预变性; 94°C 30 s, 65 ~ 50°C (每循环降 0.5°C) 1 min, 72°C 1 min 循环 30 次; 94°C 30 s, 50°C 1 min, 72°C 1 min 循环 15 次; 72°C 延伸 10 min. 扩增后回收 PCR 产物, 用限制性内切酶消化后将其连入同样酶切过的 pBluescript SK(+) 质粒, 构建重组质粒 pBlue-L-R. 将重组质粒转化到大肠杆菌 TG1 中, 筛选阳性克隆, 抽质粒后送南京金斯瑞公司测序验证.

卡那霉素抗性基因的插入: 利用 PCR 的方法, 将卡那霉素抗性基因从 Pet-28a(+) 质粒中获取, 上

下游引物为 K1, K2 (见表 1), 回收、酶切后, 连接至同样酶切处理过的 pBlue-L-R 重组载体上, 得到 pBlue-L-kan-R 重组载体.

表 1 引物序列

Tab. 1 Sequence of primers

引物	序列
P1	AACTGCAGAGCTAAGCTAGGAGAGCATCAGTATC
P2	CCAAGCTT CAGGTAATTTTACCGCATTAGTTGAC
P3	CCAAGCTTGAAATGAGCGTTAAAACCACTGCTATC
P4	CCGCTCGAGCAGTGCCATGTTAGCTTCCTGGGTTTC
K1	CCAAGCTTGACGCTCAGTGAACGAAAA
K2	CCAAGCTTACCCCTATTTGATTTTCT

1.3 集胞藻的自然转化

参考文献 [5], 将集胞藻 PCC6803 培养至对数生长期时, 收集集胞藻细胞, 用新鲜的 BG11 培养基重悬, 使细胞浓度约 7×10^8 , 取 100 μ L 重悬细胞于离心管中, 加入重组质粒 pBlue-L-kan-R 的溶解液 30 μ L, 使质粒 DNA 的终浓度不少于 50 μ g/mL. 将此混合液 25°C 温育 6 h 后涂布于含卡那霉素的 BG11 平板上, 30°C 连续光照下诱导转化, 挑取单菌落扩大培养后鉴定.

1.4 突变株的表型观察

将突变株接种于 BG11 液体培养基中培养, 自接种当日起, 每 12 h 测 1 次活细胞生物量, 并以野生型为对照, 观察其生长状态.

1.5 SDS-PAGE 电泳

运用超声方法提取藻胆体^[6], 进行 SDS-PAGE 电泳检测, 分析突变株的藻胆体表达情况.

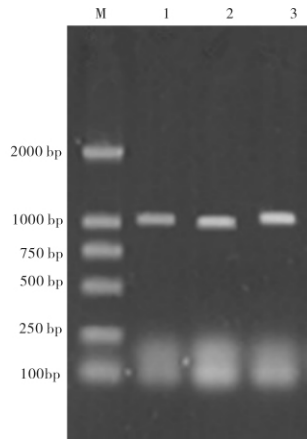
2 实验结果

2.1 PCR 扩增产物电泳图

以集胞藻 PCC6803 基因组 DNA 为模板, 用引物 P1、P2 进行 PCR 扩增, 得到 1 条 1001 bp 的上游同源臂条带, 用引物 P3、P4 进行 PCR 扩增, 得到 1 条 1001 bp 的下游同源臂条带, 用引物 K1、K2 进行 PCR 扩增, 得到 1 条 960 bp 的卡那霉素抗性基因条带. 所得片段电泳结果如图 1 所示.

2.2 突变株

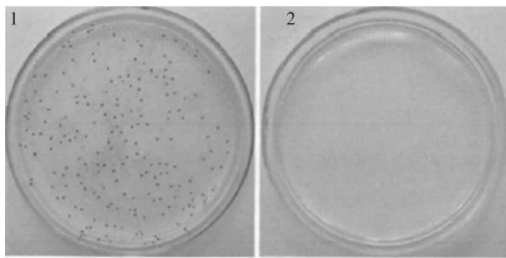
自然转化的和野生型集胞藻 PCC6803 在 BG11 卡那霉素抗性平板上培养后, 其生长情况如图 2 所示. 由图 2 可见, 突变型集胞藻 PCC6803 因含卡那霉素抗性基因, 因此能在平板上生长, 而野生型以及未转化成功的蓝藻藻细胞不能在抗性平板上正常生长.



M: DNA Marker; 1) 上游同源序列;
2) 卡那霉素抗性基因; 3) 下游同源序列

图1 PCR 扩增产物电泳图

Fig.1 Electrophoresis identification of PCR product



1) 阳性平板; 2) 阴性对照

图2 卡那霉素抗性平板的筛选

Fig.2 Kanamycin resistance plate screening

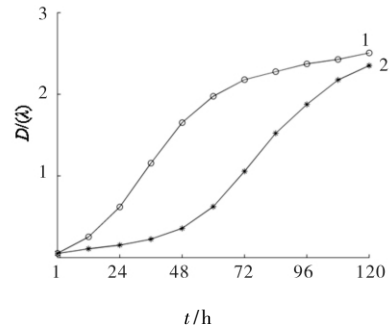
2.3 突变株与野生株生长情况比较

在光照强度为 2000 Lux, 25°C 连续光照下培养, 藻液颜色呈黄绿色, 而野生株的藻液呈深绿色: 说明突变株出现了漂白现象. 而在光照强度为 600 Lux 下连续光照培养, 2 种藻液均出现了漂白现象. 因此推测, *ssl1690* 基因所表达的蛋白与光合作用有关.

在正常培养条件下, 定期取野生株和突变株的藻液测定 OD_{730} 值绘制生长曲线见图 3. 如图 3 所示, 突变型蓝藻的生长速度较野生型蓝藻慢, 生长对数期延迟. 在 BG11 培养基中, 藻类主营异养生活, 在光照充分的情况下, 这种迟缓的生长是光合作用不能正常进行的表现, 推断基因 *ssl1690* 与光合作用有关.

2.4 SDS-PAGE 电泳结果

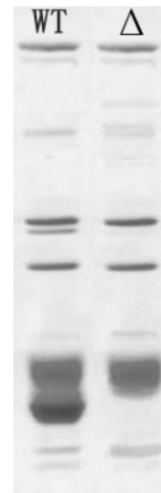
将野生型集胞藻与突变型集胞藻按超声方法提取并分离藻胆体蛋白, 并进行 SDS-PAGE 电泳, 结果如图 4 所示. 从图 4 可见, 突变型的藻胆体组分有所减少, 即突变型的藻胆体蛋白有部分缺失.



1) 野生株; 2) 缺失株

图3 基因缺失突变株与野生型蓝藻生长曲线比较

Fig.3 Comparison of wild type growth curve with deletion mutant strain



WT) 野生型藻胆体蛋白; Δ) 突变型藻胆体蛋白

图4 藻胆体蛋白 SDS-PAGE 电泳图

Fig.4 The SDS-PAGE of phycobiliprotein

3 讨论

为研究 *ssl1690* 基因是否与裂合酶基因 *cpcT* 功能相同或相似, 通过本实验进行了初步探讨.

首先, 利用 PCR 的方法将 *ssl1690* 基因的两侧序列克隆到 pBluescript SK (+) 质粒载体上, 并将卡那霉素抗性基因插入到两侧序列之间, 得到同源重组质粒载体 (pBlue-L-kan-R). 运用此方法成功构建出 *ssl1690* 同源缺失突变载体, 且所得的同源重组载体较大, 保证了其在转入蓝藻细胞时更易发生同源重组, 产生双交换^[7], 从而在一定程度上保证了基因敲除的成功性. 其次, 利用集胞藻 PCC6803 在自然条件下能较高的吸收外源 DNA, 将同源重组载体通过自然转化的方法得到突变株. 一般而言, 在对数期的蓝藻细胞更易吸收外源 DNA, 环状的 DNA 比链状 DNA 更易发生转化, 此外, 适当提高浓度或

延迟 DNA 与藻液的混合时间也能促进转化效率的提高^[6,8,9,10]。

本实验发现,所得到的集胞藻 PCC6803 缺失突变株出现的漂白现象,与蓝藻藻细胞的生长环境无关。研究表明,在 *cpcT* 基因缺失的突变株中藻胆蛋白的合成受阻。*cpcT* 能催化藻胆色素与藻胆蛋白上的 Cys-153 结合,而此位点上藻胆素的缺失可能导致 β 亚基无法与 α 亚基正常结合,使藻胆体不能正常组装。 β 153 生色基团在藻胆体上位于外部边缘处,其主要功能是吸收光能并把能量传递到作为终受体的 β 82 为生色基团上^[2,11]。本实验蓝藻细胞在表型上出现漂白现象是由于 β 153 位上的生色基团未与脱辅基藻胆蛋白正常结合,使藻蓝蛋白不能正常装配,进一步使藻胆体的生物合成受阻所致。

针对藻胆蛋白裂合酶的研究,目前已经发现 *cpcT*、*cpeT*、*cpcE* 及 *cpcF* 等基因均有裂合酶功能,而藻蓝蛋白作为重要光合作用元件,了解并掌握其生物合成机制,为研究光合作用机制和蓝藻细胞生理打下了基础,并对蓝藻引发的水华治理有重要的指导意义。

参 考 文 献

- [1] Fairchild C D, Glazer A N. Oligomeric structure, enzyme kinetics and substrate specificity of the phycocyanin alpha subunit phycocyanobilin lyase [J]. J Biol Chem, 1994, 269(12): 8686-8694.
- [2] Zhao K H, Su P, Li J, et al. Chromophore attachment to phycobiliprotein beta-subunits: phycocyanobilin: cysteine-beta84 phycobiliprotein lyase activity of CpeS-like protein from Anabaena Sp. PCC7120 [J]. J Biol Chem, 2006, 281(13): 8573-8581.
- [3] Shen G, Saunée N A, Williams S R, et al. Identification and characterization of a new class of bilin lyase: the *cpcT* gene encodes a bilin lyase responsible for attachment of phycocyanobilin to Cys-153 on the beta-subunit of phycocyanin in *Synechococcus* sp. PCC 7002 [J]. J Biol Chem, 2006, 281(26): 17768-17778.
- [4] Yuping Cai, Peter Wolk C. Use of a conditionally lethal gene in *Anabaena* sp. strain PCC7120 to select for double recombinants and to entrap insertion sequences [J]. J Bacteriol, 1990, 172(6): 3138-3145.
- [5] Williams J G K. Construction of specific mutations in photosystem II photosynthetic reaction center by genetic engineering method in *Synechocystis* 6803 [J]. Methods Enzymol, 1988, 167: 766-778.
- [6] 路德明, 郭玉红, 张学政, 等. 超声方法提取藻胆体 [J]. 应用声学, 1997(1): 47-48.
- [7] Tatebayashi K, Kato J, Ikeda H. Structural analyses of DNA fragments integrated by illegitimate recombination in *Schizosaccharomyces pombe* [J]. Mol Gen Genet, 1994, 244(2): 111-119.
- [8] Vioque A. Transformation of cyanobacteria [J]. Adv Exp Med Biol, 2007, 616: 12-22.
- [9] 魏兰珍, 马为民, 王全喜, 等. 蓝藻基因转移系统的选择与建立 [J]. 中国生物工程杂志, 2004, 24(1): 18-22.
- [10] 宋凌云, 施定基, 宁叶. 用同源重组法将人肝金属硫蛋白突变体 $\beta\beta$ 基因整合在集胞藻 6803 中表达 [J]. 植物学报: 英文版, 2001, 43(4): 399-404.
- [11] Maccoll R. Cyanobacterial Phycobilisomes [J]. J Struct Chem, 1998, 124(2/3): 311-334.