

## 集胞藻 6803 光合自养生长突变株的筛选与鉴定

阎春兰 徐旭东

(中国科学院水生生物研究所, 淡水生态与生物技术国家重点实验室, 武汉 430072)

### ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF MUTANTS IMPAIRED IN PHOTOAUTOTROPHIC GROWTH IN *SYNECHOCYSTIS* SP. PCC 6803

YAN Chun-Lan and XU Xu-Dong

(The State Key Laboratory for Freshwater Ecology and Biotechnology, Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072)

关键词: 集胞藻; 随机插入诱变; 光合自养生长; 突变株

Key words *Synechocystis* sp.; Random insertion mutagenesis; Photoautotrophic growth; Mutant

中图分类号: Q813 文献标识码: A 文章编号: 1000-3207(2009)02-0360-03

集胞藻 (*Synechocystis* sp.) PCC6803 (以下称集胞藻 6803) 是一种单细胞蓝藻, 既可进行自养生长, 也可在光合系统失活的情况下利用葡萄糖进行异养生长<sup>[1]</sup>, 具有天然的 DNA 转化系统, 为筛选光合自养生长突变株和基因功能的鉴定提供了便利。其全基因组序列已于 1996 年公布<sup>[2]</sup>, 是进行光合作用分子生物学研究的重要模式生物。在以前的研究中已建立了将抗性基因标记随机插入其基因组获得突变文库的方法, 已成功应用于光激活异养突变株<sup>[3]</sup>、高温敏感突变株<sup>[4]</sup>和寒冷光照突变株<sup>[5]</sup>的筛选。本文进一步对建立突变文库的体系进行了改进, 并用于光合自养突变株筛选。

#### 1 材料与方 法

**1.1 藻株和培养条件** 集胞藻 6803 以 BG-11 在 30℃、30μE/m<sup>2</sup>·s 静置培养, 固体平板补加 1.4% 的琼脂。进行混养培养时在 BG11 中加入终浓度为 5mmol/L 的葡萄糖, 进行异养培养时 BG11 中除加入葡萄糖外, 还补加 5μmol/L 的 DCMU。培养 C. K2 插入获得的突变株时补加 7.5–20μg/mL 卡那霉素 (Km)。转化初期用低浓度 (7.5μg/mL) Km, 之后提高至 20μg/mL 以促使突变株分离完全。进行转化实验时在 BG11 平板中补充 8mmol/L TES (pH 8.2) 和 0.3% Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>。

用 pKW1188<sup>[6]</sup> 转化集胞藻 6803 获得的 Km 抗性株作为

插入突变株的野生型对照, 称为记作 wt-1188。该藻株在生长特性和抗逆性等方面与原藻株无任何差异<sup>[4, 5]</sup>。

**1.2 集胞藻 6803 总 DNA 的提取和转化方法** 集胞藻 6803 总 DNA 按徐旭东等描述的方法<sup>[7]</sup> 提取。转化按照 Williams 描述的方法<sup>[6]</sup> 进行。

**1.3 DNA 重组 分子克隆** 涉及到的操作均按标准方法进行。C. K2 片段来源于质粒 pRL446<sup>[8]</sup>, 可根据需要用 *Bam*HI/*Kpn*I 等限制酶切下。以碱法提取质粒, 并以 PEG 法纯化。*Sau*3AI、*Alu*I 和 *Hae*III 部分酶切均在 4℃ 进行, 在酶切反应开始后间隔若干时间取样, 加 EDTA 终止反应, 电泳检测找出酶切程度符合要求的反应时间。大批量制备部分酶切 DNA, 用透析袋法从琼脂糖凝胶上回收 DNA 片段。在构建基因文库时使用电脉冲转化 *E. coli* DH10B 一级文库插入 C. K2 时使用化学转化法转化 *E. coli* DH5α。LB 平板中氨苄青霉素 (Ap) 和 Km 浓度均为 50μg/mL, 两者共用时浓度各为 25μg/mL。

**1.4 突变株基因定位方法** 突变株基因定位采用反向 PCR 方法, 具体做法是: 以 4 碱基的限制性内切酶 *Sau*3AI 或 *Alu*I 完全消化 1μg 突变株 DNA, 以 80μL 反应体系在 16℃ 条件下进行自环化连接 20h, 取 2μL 连接液为模板, 分别以 CK2-8 (5'-CCTCTTCGACCATCAAGCA-3') / CK2-15 (5'-TTGAGACACAACCTGGCT-3'); CK2-16 (5'-ACTGGCAGAGCAT-TACGCTG-3') / CK2-21 (5'-TCACCGAGGCAGTCCATAG-3') 为引物扩增自环化连接产物。扩增产物以玻璃奶试剂盒

收稿日期: 2007-08-21; 修订日期: 2008-12-26

基金项目: 国家自然科学基金 30330030 资助

作者简介: 阎春兰 (1977-), 女, 汉族, 湖北浠水人; 博士生; E-mail: yancl77@yahoo.com.cn

通讯作者: 徐旭东; E-mail: xud@ihb.ac.cn

回收,并分别以 CK2-15、CK2-16为引物测序。对 Kazusa 基因组数据库进行搜索确定其位置 (www.kazusa.or.jp/cyano/cyano.htm)。

## 2 结果与讨论

### 2.1 基因文库和随机插入诱变文库的构建

为将 Km 抗性标记随机插入集胞藻 6803 基因组中,可首先在大肠杆菌中构建其基因组文库,再用 4 碱基限制酶部分酶切该基因文库总质粒 DNA,与携带 Km 抗性标记的 C. K2 片段相连接,建立二级文库。以二级文库总质粒 DNA 转化集胞藻 6803 可获得大量有 Km 抗性标记插入不同基因的突变子。本实验室早期建立的二级文库使用 pUC19 作为载体,并使用 4 碱基限制酶 *Sau* 3A1 对基因文库进行部分酶切,对酶切产物未进行 6 kb 以上片段的回收。虽然也获得了突变株,但是二级文库中存在片段串联,对于突变株中抗性标签的定位带来较大困难。为此,我们改用 *Alu*I 和 *Hae*III 这样的 4 碱基平端限制酶对基因文库进行部分酶切,并回收 6 kb 以上片段。从 pRL446 以 *Kpn*I 酶切取下 C. K2 后用 T4 DNA 聚合酶补平,再与回收的基因文库片段连接。通过这种钝端连接有效地避免了多片段串联。此外,由于 pUC19 中存在 16 个 *Alu*I 和 11 个 *Hae*III 位点,不利于二级文库的构建。故我们按图 1 描述的方式对 pUC19 进行了改造,先后以 *Ssp*I / *Eco*R I 酶切、补平、自环化和 *Nsp*I 酶切、自环化将 pUC19 中 *Ap*<sup>r</sup>、*ori* 以外含 *Alu*I 和 *Hae*III 位点的区域去除,获得 pHB366 作为构建基因文库的载体。

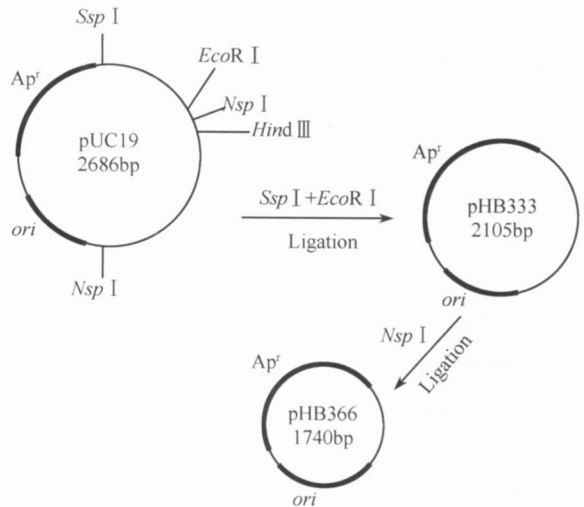


图 1 pHB366 的构建流程

Fig. 1 A flow chart for construction of pHB366

构建集胞藻 6803 的基因组文库共获得约  $5.4 \times 10^4$  个 *Ap*<sup>r</sup> 转化子,有 78% 插入了 4—9kb 的 DNA 片段(图 2)。以 6 kb 计算,该文库对集胞藻 6803 基因组的覆盖率达到了 99.9999%。将集胞藻 6803 基因组文库总质粒 DNA 以 *Alu*I 和 *Hae*III 分别进行部分酶切,根据其中 pHB366 空载体酶切情况作为控制酶切程度的参照。在 pHB366 空载体多数被 *Alu*I 或 *Hae*III 切割一次成线性 DNA 时,可认为其他质粒 DNA 多数也被切割一次。使用 4 碱基限制酶对基因文库总

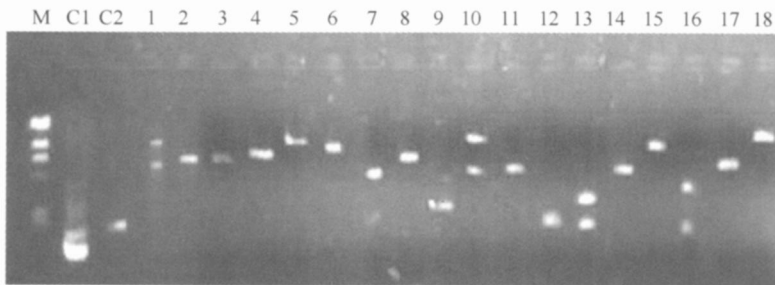


图 2 基因组文库克隆质粒 *Sal*I 酶切产物的电泳分析

Fig. 2 An electrophoretogram of *Sal*I restricted plasmids from the genomic DNA library

M,  $\lambda$ DNA + *Hind* III; C1, pHB366 C2, pHB366 + *Sal* I

质粒 DNA 进行酶切,其识别位点平均间隔约 0.256kb,而两种 4 碱基限制酶则可以把 C. K2 插入机会提高到约每隔 0.13kb 一次,从而覆盖几乎所有的基因。将 *Alu*I 或 *Hae*III 部分酶切的基因文库质粒 DNA 等量混合后,与 *Kpn*I 切割并回收纯化、补平的 C. K2 片段连接,转化 *E. coli* DH 5 $\alpha$ , 构建具有 *Ap*<sup>r</sup> + *Km* 双重抗性二级文库,共  $1.16 \times 10^4$  个克隆。

### 2.2 光合自养突变株的筛选和突变株的基因定位

以二级文库总 DNA 转化集胞藻 6803 共获得约 11000 个 *Km*<sup>r</sup> 转化子,作为突变子文库。突变株的筛选最先在 96 孔细胞培养板或平板上进行。将突变株文库每次拷贝两份,一份在光异养条件下培养,一份在自养条件下培养。选

择在光异养条件下生长,而在自养条件下不生长或变黄的突变株。经过反复检查共得到光合自养生长突变株 26 个。逐个提取 DNA,通过反向 PCR 对突变株进行插入突变定位。结果显示,所有这些突变株中均没有插入其他串联小片段的情况发生,证明采取钝端连接和片段回收的措施有效地避免了片段串联的问题。这些突变株中 92.3% 在突变基因内仅发生一次酶切,7.7% 在基因内发生缺失,但都在 0.5kb 以内。

所有突变株共涉及 11 个基因,均是已知的与光合作用相关基因(表 1),涉及 (1) 光系统 I,如 *ygf*4 与 PS I 组装相关,*menA*、*menC* 和 *menD* 均与 PS I 中的叶绿醌合成相关,

*chlP* 编码的= 牛儿= 牛儿还原酶参与叶绿素合成; (2) 光系统 II, 如叶绿素结合蛋白基因 *psbB*、小分子量蛋白基因 *psbL*、光系统 II 组装蛋白基因 *ycf4* & (3) 藻胆体, 如编码别藻蓝蛋白  $\beta$  亚基的 *apcB*、编码藻胆体与类囊体膜之间的连接肽的 *apE*; (4) Calvin 循环, 如编码果糖-1, 6-景天庚酮糖-1, 7-二磷酸酶的 *fbpL*。由于所获得突变株中被插入的都是已知的光

合作用基因, 直接证明了本研究中筛选体系的有效性。除这些已知功能的蛋白外, 作者最近还筛选到了 1 个编码未知功能蛋白基因的突变株 (未在表 1 列出)。该基因是一个新的光合基因, 可能由于较小, 在过去从分析蛋白产物出发的研究中未被发现。对于 *fbp I* 突变株的生理特点和未知基因的系统研究将另文报道。

表 1 光合自养生长突变株中被抗性基因插入的基因

Tab. 1 Genes inserted by C. K2 cassette in photoautotrophic growth mutants

突变株 Mutants	插入基因 Interrupted gene	基因大小 (bp) / 插入位点 Gene size (bp) / inserted site	基因功能 Gene function
1-A8 1-E10 6-E6 6-E7 6-E11 6-F2	<i>str0335 (apcE)</i>	2691/504 ( <i>HaeIII</i> ) 或 2691/1377 ( <i>HaeIII</i> )	phycobillime core-membrane linker polypeptide
1-B12 5-D6 6-A12 6-B1	<i>str1986 (apcB)</i>	486/168 ( <i>HaeIII</i> ) 或 486/291 ( <i>HaeIII</i> )	allophycocyanin beta subunit
1-D1 1-D2 3-D7 3-D8 3-D12 3-E1	<i>str0906 (psbB)</i>	1524/1222 ( <i>HaeIII</i> ) 或 1524/1360 ( <i>HaeIII</i> )	photosystem II core light harvesting protein
1-E5	<i>sl0603 (menD)</i>	1788/348-847 ( <i>HaeIII</i> )	menaquinone biosynthesis protein menD
2-G8	<i>str2034 (ycf4)</i>	1029/843 ( <i>HaeIII</i> )	photosystem II stability/assembly factor
3-G4	<i>str1518 (menA)</i>	846/48-546 ( <i>HaeIII</i> )	1,4-dihydroxy-2-naphthoic acid penyltransferase
5-A5	<i>smr0007 (psbL)</i>	120/103 ( <i>AclI</i> )	photosystem II PsbL protein
5-C7	<i>sl1091 (chlP)</i>	1224/570 ( <i>HaeIII</i> )	geranylgeranyl hydrogenase
6-H1	<i>sl0226 (ycf4)</i>	567/136 ( <i>AclI</i> )	photosystem I assembly related protein
2053-6 2053-50 2053-56	<i>sl0409 (menC)</i>	963/408 ( <i>AclI</i> )	probable O-succinylbenzoic acid synthase
691-72	<i>str2094 (fbpI)</i>	1038/763 ( <i>HaeIII</i> )	fructose-1, 6-/sedoheptulose-1, 7-bisphosphatase

## 参考文献:

[ 1 ] Anderson S L, McIntosh L. Light-activated heterotrophic growth of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC6803: a blue-light-requiring process [ J ]. *J Bacteriol*, 1991, **173**: 2761-2767

[ 2 ] Kaneko T, Sato S, Kotani H, *et al*. Sequence analysis of the genome of the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. II. Sequence determination of the entire genome and assignment of potential protein-coding regions [ J ]. *DNA Res*, 1996, **3**: 109-136

[ 3 ] Kong R Q, Xu X D, Feng B. Random insertion mutagenesis of *Synechocystis* sp. PCC6803 and selection of LAHG mutants [ J ]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2001, **25**: 537-543 [孔任秋, 徐旭东, 冯勃. 集胞藻的随机插入诱变和光激活异养突变株的筛选. 水生生物学报, 2001, **25**: 537-543]

[ 4 ] Fu J, Xu X. The functional divergence of two *glpP* homologues in *Synechocystis* sp. PCC 6803 [ J ]. *FEMS Microbiol Lett*, 2006, **260**: 201-209

[ 5 ] Yin C, Li W, Du Y, *et al*. Identification of a gene *ccr-1* (*sl1242*), required for chill-light tolerance and growth at 15°C in *Synechocystis* sp. PCC 6803 [ J ]. *Microbiology*, 2007, **153**: 1261-1267

[ 6 ] Williams J G K. Construction of specific mutations in the Photosystem II photosynthetic reaction center by genetic engineering methods in *Synechocystis* 6803 [ J ]. *Methods Enzymol*, 1988, **167**: 766-778

[ 7 ] Xu X D, Wang Y Q, Li S H. Construction of biphasic CAT promoter probe vector shuttling between *Anabaena* (blue-green algae) and *Escherichia coli* [ J ]. *Journal of Graduate School, Academia Sinica*, 1993, **10**: 203-209. [徐旭东, 王业勤, 黎尚豪. 鱼腥藻-大肠杆菌 CAT 启动子探测载体的构建. 中国科学院研究生院学报, 1993, **10**: 203-209]

[ 8 ] Elhai J, Work C P. A versatile class of positive-selection vectors based on the nonviability of palindrome-containing plasmids that allows cloning into long polylinkers [ J ]. *Gene*, 1988, **68**: 119-138