表达 *lac* 和 *glk* 基因的蓝藻的异养生长

余利红[1,2] 郭厚良[2] 徐旭东[1]
(1. 中国科学院水生生物研究所,武汉 430072; 2. 武汉大学生命科学学院,武汉 430072)

摘要:将来自 *Brucella abortus* 的葡萄糖激酶基因 *glk* 和大肠杆菌乳糖操纵子基因 *lacZYA* 装置于蓝藻 *glnA* 启动子下游,以广宿主质粒导入 3 种蓝藻。基因的表达通过 β-半乳糖苷酶和葡糖激酶活性测定得到确证。基因工程藻株均获得了利用乳糖异养生长的能力。集胞藻 6803 转基因株可在光照加 DCMU 的条件下利用乳糖生长,而鱼腥藻转基因株依赖乳糖可在完全黑暗条件下生长,并可在黑暗或加 DCMU 条件下诱导产生异形胞。

关键词: *lac*; *glk*; 蓝藻; 异养生长
中图分类号: Q949.22 **文献标识码**: A **文章编号**: 1000-3207(2002)04-0363-07

蓝藻是一类光合放氧的原核生物,除利用 CO_2 作为碳源外,约有一半种类还能吸收利用碳水化合物[1]。其中少数种可在完全黑暗条件下依靠碳水化合物异养生长,但多数种仍需要光能或光照激活。如念珠藻(*Nostoc* sp.)ATCC 29133 利用蔗糖生长不需任何光照,而集胞藻(*Synechocystis* sp.)PCC6803 每天需要接受一个短时光照(~5min.)才能够依靠葡萄糖在黑暗中生长[2]。蓝藻能否利用碳水化合物主要被归因于是否具有活跃的转运能力[1]。如集胞藻 6803 吸收利用葡萄糖依赖于一个单基因编码的运载体蛋白[3]。

具有异养生活能力和遗传操作系统的蓝藻在光合作用、光合膜的发生等研究中起重要作用。依靠碳水化合物,这些蓝藻在光合基因被插入失活或定点突变时仍然能够生长。八十年代以来,集胞藻(*Synechocystis* sp.)PCC6803 业已发展成为研究光合系统的模式种。但是,该种至今不能以转座子进行随机插入诱变,其异养生长不能完全脱离光照,对于寻找未知的光合作用相关基因有不足之处。可在完全黑暗条件下异养生长的念珠藻 ATCC 29133 转座子诱变效率较低[4]。相反,鱼腥藻(*Anabaena* sp.)PCC 7120 具有高效的基因转移和转座子诱变系统[5,6],但在黑暗或加 DCMU 的条件下不能异养生长或生长十分缓慢。如果能用遗传改造的方法使之获得异养生长能力,将可能建立光合作用相关研究的新模式种。

乳糖操纵子的三个结构基因 *LacZ*、*Y*、*A* 各决定了一种酶,分别为 β-半乳糖苷酶,β-半

收稿日期: 2001-04-28; **修订日期**: 2001-07-05
基金项目: 中国科学院"百人计划"; 生物领域创新青年科学家小组资助项目
作者简介: 余利红(1975—),女,河南省焦作市人;现在中国科学院水生生物所工作。该文 pRL 系列质粒由徐旭东在密西根州立大学 C·P·Wolk 教授实验室构建
通讯作者: 徐旭东, Email: xux@ihb.ac.cn

(C)1994-2023 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http:/

乳糖苷透过酶,β-半乳糖苷转乙酰酶。β-半乳糖苷酶是一种裂解 β-半乳糖苷键的专一性酶,能将乳糖水解成葡萄糖和半乳糖;β-半乳糖苷透过酶使 β-半乳糖苷能透过细胞膜进入细胞内;β-半乳糖苷转乙酰酶在乳糖代谢中作用不明[7]。可以设想,如果在蓝藻表达大肠杆菌 *lac* 基因,使之吸收乳糖分子并在细胞内转化为葡萄糖和半乳糖;同时,表达葡萄糖激酶基因(*glk*),将葡萄糖转化为 6-P-葡萄糖,进入三羧酸循环,为细胞所利用。如此,蓝藻应获得利用乳糖生长的能力。基于这一思路,分别在单细胞和丝状固氮蓝藻表达 *lac* 基因,使之获得了利用乳糖异养生长的能力,并观察到两类蓝藻异养生长方式的差异。

1 材料和方法

1.1 藻种、菌株和培养 集胞藻 PCC6803 由北京大学赵进东教授提供,来源于美国宾夕法尼亚州立大学 Don Bryant 教授。鱼腥藻(*Anabaena* sp.)PCC 7120 和鱼腥藻(*Anabaena* sp.) FACHB 709 由中国科学院水生生物所藻种库提供。*E. coli* DH10B、*E. coli* HB101 (pRL443+pRL623)来源于美国密西根州立大学 Peter Wolk 教授。蓝藻在温度为 28±1℃,光强 50—100 μE/m²/s 的条件下于 BG11 液体培养基中静置培养。测试蓝藻光激活异养生长时用 5 μE/m²/s 的弱光,每天光照 15 min;或加 5 μmol/L DCMU 在 50—100 μE/m²/s 光强下生长。测试完全黑暗异养生长时用铝铂纸严密包裹培养瓶。葡萄糖,或乳糖,或其他待试糖源在培养基中的终浓度为 5 m mol/L。所用藻株和转基因藻经 BG11 加葡萄糖或乳糖、LB 培养基等检查无细菌污染。

1.2 质粒和载体构建 携 *glnA* 启动子的质粒 pAM658[8]由德克萨斯 A&M 大学 J. Golden 教授提供;携 *Brucella abortus* 葡萄糖激酶(*glk*)基因[9]的 pRE103 由俄克拉荷马州立大学 R.C.Essenberg 教授提供;质粒 pRL59HE[10]、pRL598[11]和 pBR322::Tn5*lac* 来自于密西根州立大学 Peter Wolk 教授。其中,pBR322::Tn 5*lac* 由 Tn5*lac*[12]转座插入 pBR322 四环素抗性基因 BamHI 和 SalI 位点之间获得。大肠杆菌的转化和 DNA 重组依常规方法进行。限制性内切酶,连接酶等购自 New England Biolabs。

1.3 接合转移和转基因藻的筛选 按文献[5]进行,略有修改。通过接合转移,将驱动质粒 pRL443、辅助质粒 pRL623 和载体质粒 pRL2224 引入同一大肠杆菌菌株 DH10B。用 *E. coli* DH10B(pRL443+pRL623+pRL2224)与蓝藻进行接合转移。其中 pRL623 对于鱼腥藻基因转移是必需的,而对于集胞藻 6803 并非需要,但也无妨碍。筛选接合子的 BG11 平板中加 10 μg/mL 红霉素,而在液体 BG11 中加 5 μg/mL 红霉素。

1.4 斑点杂交 DNA 探针标记、点尼龙膜、变性、中和、固定以及预杂交、杂交、漂洗、用 NBT/BCIP 底物显色等均按 Boehringer Mannheim 公司试剂盒提供的方法进行。

1.5 酶活性测定 β-半乳糖苷酶活性的测定参照文献[13]进行,修改后用于蓝藻。收集 4 mL 生长对数中期的蓝藻,2 mL 用于测细胞浓度,另外 2 mL 离心后用于酶活性的测定。将收集的蓝藻重悬于 1 mL 缓冲液 Z 中,加入 50 μL 0.1%SDS 和 50 μL 氯仿,充分混合,加入 200 μL 4mg/ml ONPG,30℃温育 20 min,加入 500μL 1 mol/L 碳酸钠终止反应,离心取上清,用分光光度计测 420 nm 处的吸光度。按公式 $SA_{\beta\text{-gal}}=1000\times OD_{420nm}/[$反应时间(min) * 藻悬液体积(mL) * $OD_{600nm}]$计算酶活性,以 Miller 单位计。葡萄糖激酶活性的测定参照文献[14]进行,以 nmol/min/mg 蛋白计。

(C)1994-2023 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http:/

2　结果

2.1　质粒的构建

以 BamHI＋HindIII 从 pRE103 切下并纯化含葡萄糖激酶(*glk*)基因的片段,克隆于 pUC 19 BamHI-HindIII 位点,得到 pRL2208。将含 *glnA* 启动子的 XbaI-PstI 片段(来自 pAM 658)克隆于 pRL2208 *glk* 基因上游 XbaI-PstI 位点,得到 pRL2209。以 PstI 从 pRL598 切下含 Cm^rEm^r基因片段插入 pRL2209 *glnA* 启动子上游 PstI 位点,得到 pRL2210。该质粒中 Cm^rEm^r-P_{glnA}-*glk* 结构位于一个 SphI 片段中。

pBR322::Tn5*lac* 携有无启动子的 *trp*-*lac* 融合结构,其中含 *lacZYA* 基因,下游是一个 *npt*(Km^r)基因。以 BamHI-SalI 切下 *lacZYA*-*npt* 片段,克隆入广宿主质粒 pRL59HE BamHI-SalI 位点,得到 pRL2218。以 BamHI 酶切的 pRL2218 再以 T4 DNA 聚合酶补平,与 SphI 酶切并同样补平的 Cm^rEm^r-P_{glnA}-*glk* 片段(自 pRL2210)连接,得到 pRL2224。该质粒有卡那霉素、氨苄青霉素、氯霉素和红霉素抗性基因,在蓝藻细胞中用红霉素抗性作为选择标记;P_{glnA}、*glk* 和 *lac ZYA* 同向,形成 P_{glnA}-*glk*-*lacZYA* 转录融合结构。将 pRL2210 中 Cm^rEm^r-P_{glnA}-*glk* 片段以 HindIII-SacI 切下、克隆于 pRL59HE,得到不含 *lacZYA* 的 pRL2211。图 1 示质粒 pRL2244 和 pRL2211 相关部分结构。

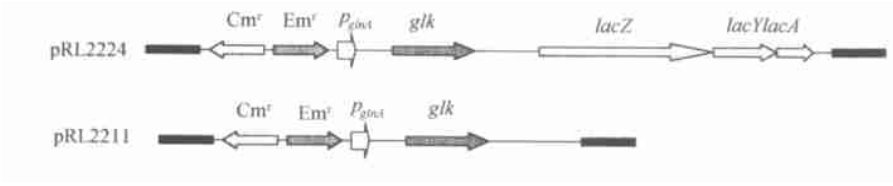

图 1　质粒 pRL2211 和 pRL2224 的相关结构示意图

Fig. 1　Maps of relevant structure of the plasmids pRL2211 and pRL2224

2.2　*lac* 和 *glk* 基因导入蓝藻

将外源基因导入集胞藻 PCC6803,一般采用转化的方法[15];导入鱼腥藻 PCC7120 和鱼腥藻 FACHB 709[16]则使用接合转移法。由于 pRL2211 和 pRL2224 质粒较大,对 3 藻种均采用接合转移导入 *lac* 基因。在含 10 μg/mL 红霉素的固体培养基上筛选 10 d 左右,观察到转 pRL2211 和转 pRL2224 的平板上长出密集的藻落;而野生藻在红霉素的选择压力下已完全变黄、死亡。将抗性藻落转到含 5 μg/mL 红霉素的 BG11 液体培养基中继续生长,并连续转接到新的培养液中。在这种条件下,大肠杆菌最终饥饿致死并被消除。

从加红霉素培养基中生长的转基因藻提取总 DNA,转化大肠杆菌细胞,筛选获得卡那霉素抗性转化子。而野生藻的总 DNA 样品转化时未能得到抗性菌落。从这些大肠杆菌转化子提取的质粒与原有的质粒经 EcoRI＋EcoRV 限制酶切比较,带谱完全一致(图 2)。

用地高辛标记的 pRL2211 或 pRL2224 与野生藻和转基因藻的 DNA 样品进行斑点杂交,结果显示,野生藻(1)为阴性,而转基因藻(2)和细菌质粒对照(3)呈阳性(图 3)。以上结果证明 pRL2211 和 pRL2224 确已导入蓝藻,并且质粒酶切图谱未有变化。

(C)1994-2023 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http:/

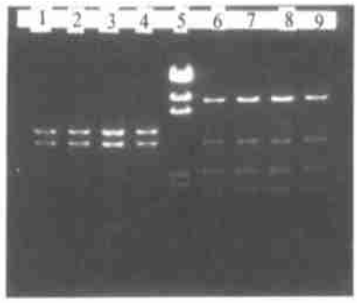

图 2 质粒 DNA 经 EcoRI＋EcoRV 酶切后的凝胶电泳

Fig. 2 Electrophoretogram of EcoRI＋EcoRV double restricted plasmid DNA

1. pRL2211; 2. pRL2211 (从集胞藻 PCC6803 转回大肠杆菌); 3. pRL2211 (从鱼腥藻 PCC7120 转回大肠杆菌); 4. pRL2211 (从鱼腥藻 FACHB709 转回大肠杆菌); 5. λDNA＋Hind Ⅲ; 6. pRL2224; 7. pRL2224 (从集胞藻 PCC6803 转回大肠杆菌); 8. pRL2224; (从鱼腥藻 PCC7120 转回大肠杆菌); 9. pRL2224 (从鱼腥藻 FACHB709 转回大肠杆菌)

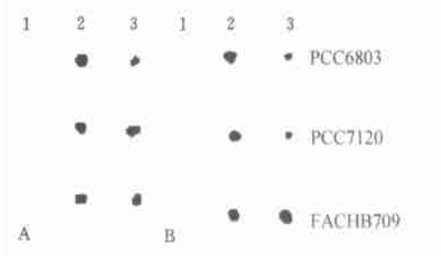

图 3 斑点杂交

Fig. 3 Dot-blotting hybridization

A. 探针为地高辛标记的 pRL2211; DIG-labelled pRL2211 as the probe.

1. 野生藻总 DNA Total DNA of wild type cyanobacteria; 2. 含 pRL2211 蓝藻总 DNA Total DNA of cyanobacteria harboring pRL2211; 3. 质粒 pRL2211 The plasmid pRL2211.

B. 探针为地高辛标记的 pRL2224; DIG-labelled pRL2224 as the probe.

1. 野生藻总 DNA Total DNA of wild type cyanobacteria; 2. 含 pRL2224 蓝藻总 DNA Total DNA of cyanobacteria harboring pRL2224; 3. 质粒 pRL2224 The plasmid pRL2224.

2.3 β-半乳糖苷酶和葡糖激酶活性的测定

分别收集 1 mL 的野生藻、转 pRL2211 和 pRL2224 的蓝藻，测定 β-半乳糖苷酶活性，结果如表 1。表中所列数值为 3 次独立测试平均结果。

表 1 蓝藻 β-半乳糖苷酶活性(Miller 单位)

Tab. 1 β-galactosidase activity in cyanobacteria (Miller units)

质粒 Plasmid / 藻株 Strains	野生型 Wild type	pRL2211	pRL2224
Synechocystis PCC6803	0.33	0.18	55.76
Anabaena PCC7120	0.60	0.37	50.89
Anabaena FACHB709	0.65	0.31	62.07

结果表明，野生藻和转空载体的藻中 β-半乳糖苷酶活性很低，在 1 Miller 单位以下；而在转乳糖操纵子基因的藻中酶活性很高，在 50 Miller 单位以上，差别明显。另外，检测鱼腥藻 PCC7120 葡糖激酶活性(两次独立测试平均结果)发现，转 pRL2224 后酶活为 0.94 nmol/min/mg 蛋白，比野生藻(0.45 nmol/min/mg 蛋白)高出一倍；而转 pRL2211 后酶的活性是 1.47 nmol/min/mg 蛋白，约为野生藻的三倍以上。

2.4 蓝藻的异养生长

分别将野生藻接种到加有葡萄糖、乳糖、蔗糖、半乳糖、果糖、麦芽糖的液体培养基中加 DCMU 照光培养。约两周后，观察到集胞藻 6803 仅在加葡萄糖的培养基中生长，而鱼

(C)1994-2023 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http:/

腥藻 7120 和鱼腥藻 709 未观察到生长。约六周后,可见鱼腥藻 7120 在含蔗糖的培养液中开始有缓慢生长。转 pRL2224 的集胞藻 6803 可在含乳糖和 DCMU 的培养基中光照生长,但在完全黑暗条件下不能生长。含 pRL2211 的集胞藻 6803 与野生藻相同,不能利用乳糖生长。转 pRL2224 的鱼腥藻 7120 和鱼腥藻 709 也获得利用乳糖异养生长能力,而且可在完全黑暗时依靠乳糖生长。以上结果列于表 2。其中"+++"表示在一周内可见显著生长,"++"表示两周内有显著生长,"+"表示三周内有显著生长,"+/−"表示在四周时可观察到生长,"-"表示六周时仍无生长。鱼腥藻利用乳糖的能力还可从异形胞分化的诱导得到映证。野生种鱼腥藻 7120 的异形胞分化需要光合作用支持,加 DCMU 或在黑暗条件下缺氮诱导均不能形成异形胞。但是含 pRL2224 的鱼腥藻 7120 在补充乳糖时缺氮诱导,无论加 DCMU 或置于黑暗中皆产生成熟异形胞。

表 2　蓝藻的异养生长

Tab. 2　Heterotrophic growth of cyanobacteria

藻种 Strains / 生长条件 Growth condition	*Synechocystis* PCC6803			*Anabaena* PCC7120			*Anabaena* FACHB709		
	WT	pRL2211	pRL2224	WT	pRL2211	pRL2224	WT	pRL2211	pRL2224
光照加 DCMU/黑暗 Illumination+DCMU/dark	−	−	−	−	−	−	−	−	−
光照加乳糖加 DCMU Illumination+lactose+DCMU	−	−	+++	−	−	++	−	−	++
黑暗加乳糖 Dark+lactose	−	−	−	−	−	+	−	−	+/−

注:WT 野生型　　Wild type;"+"生长　Growth;"−"不生长　No growth.

3　讨论

通过在蓝藻表达 *glk* 和 *lac* 基因使之具有依赖乳糖异养生长能力,这是利用基因工程方法使蓝藻获得稳定异养生长性状的首例报道。Zhang 等曾在 *Synechococcus* PCC 7942 表达葡萄糖转运蛋白基因获得异养生长能力,但转基因株不稳定,有结果显示该基因的表达对宿主有毒。含 pRL2224 的集胞藻 PCC6803 既可利用葡糖也可利用乳糖进行异养生长,但仍需要光照激活;而含 pRL2224 的鱼腥藻则能够在完全避光的情况下异养生长。丝状固氮蓝藻天然的异养生长种类,如念珠藻 ATCC29133、多变鱼腥藻 ATCC29413 等均不需要光激活。这一现象反映了丝状固氮种类在代谢类型上的某种共同之处。鱼腥藻 PCC7120 具有成熟、高效的基因转移、转座子诱变、报告基因监测表达等遗传操作系统,多年来被用作异形胞发育研究模型,近期已完成全基因组序列分析。通过表达 *glk* 和 *lac* 基因,该种获得了在黑暗或加 DCMU 条件下异养生活能力,有可能将其研究价值向光系统和光合膜的分子遗传学方面扩展。

考虑到鱼腥藻 PCC7120 细胞中葡萄糖激酶活力较低,在表达 *lacZYA* 基因的同时增加了 *glk* 基因。选用鱼腥藻的 *glnA* 启动子,证明在单细胞和丝状固氮蓝藻 *glk-lacZYA* 的表达都是有效的。由于 *glk* 基因 3′端的 SphI 位点位于终止密码子上游两个密码子处,以 SphI 切下 Cm^rEm^r-P_{glnA}-*glk* 片段(自 pRL2210)构建 pRL2224 时;*glk* 基因丢失 3′端两个氨基酸;而该基因在 pRL2211 中未损失任何密码子。这一 3′端的微小区别可能导致含

(C)1994-2025 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http:/

pRL2224 和 pRL2211 鱼腥藻葡糖激酶活性的差异。虽然如此，由 pRL2224 质粒表达的葡糖激酶已经满足了异养生长的需要。除葡萄糖外，乳糖进入蓝藻细胞后被 β-半乳糖苷酶作用还产生半乳糖分子。葡萄糖经葡糖激酶的作用进入代谢循环，而半乳糖的归趋尚不清楚。一种可能是，在己糖激酶的作用下被细胞利用；另一种可能是，由于己糖激酶活力较低，大多半乳糖分子在细胞内形成某种程度的积累。

参考文献：

[1] Carr N G, Whitton B A. The Biology of Cyanobacteria [M]. Oxford London, Edinburgh, Boston, Melbourne: Blackwell Scientific Publications. 1982. 47—85

[2] Anderson S L, Mclntosh L. Light-activated heterotrophic growth of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. Strain PCC 6803: a blue-light-requiring process [J]. *J Bacteriol*, 1991, **173**: 2761—2767

[3] Zhang C C, Jeanjean R, Joset F. Obligate phototrophy in cyanobacteria: more than a lack of sugar transport [J]. *FEMS Microbiol Lett*, 1998, **161**: 285—292

[4] Cohen M F, Wallis J G, Campbell E L, et al. Transposon mutagenesis of *Nostoc* sp. Strain ATCC 29133, a cyanobacterium with multiple cellular differentiation alternatives [J]. *Microbiology*, 1994, **140**(Pt 12): 7324—7329

[5] Elhai J, Wolk C P. Conjugal transfer of DNA to cyanobacteria [J]. *Methods Enzymol*, 1988, **167**: 747—754

[6] Wolk C P, Cai Y, Panoff J-M. Use of transposon with luciferase as a reporter to identify environmentally responsive genes in a cyanobacterium [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991. **88**: 5355—5359

[7] Lewin B. Genes VI [M]. Oxford New York, Tokyo: Oxford University Press. 1997

[8] Ramasubramanian T S, Wei T-F, Golden J W. Two *Anabaena* sp. Strain PCC 7120 DNA-binding factors interact with vegetative cell-and heterocyst-specific genes [J]. *J. Bacteriol*, 1994. **176**: 1214—1223

[9] Essenberg R C. Cloning and characterization of the glucokinase gene of *Brucella abortus* 19 and identification of the three other genes [J]. *J Bacteriol*, 1995. **177**: 6297—6300

[10] Khudyakov I, Wolk C P. Evidence that the *hanA* gene coding for HU protein is essential for heterocyst differentiation in, and cyanophage A-4(L) sensitivity of, *Anabaena* sp. Strain PCC 7120 [J]. *J. Bacteriol*, 1996. **178**: 3572—3577

[11] Black T A, Wolk C P. Analysis of a Het-mutation in *Anabaena* sp. Strain PCC 7120 implicates a secondary metabolite in the regulation of heterocyst spacing [J]. *J Bacteriol*, 1994. **176**: 2282—2292

[12] Kroos L, Kaiser D. Construction of Tn5 *lac*, a transposon that fuses *lacZ* expression to exogenous promoters, and its introduction into *Myxococcus xanthus* [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1984. **81**: 5816—5820

[13] Miller J H. Experiments in Molecular Genetics [M]. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1972

[14] Pearce J, Carr N G. The incorporation and metabolism of glucose by *Anabaena variabilis* [J]. *J Gen Microbiol*, 1969, **54**: 451—462

[15] Williams J G. Construction of specific mutations in photosystem II photosynthetic reaction center by genetic engineering methods in *Synechocystis* 6803 [J]. *Methods Enzymol*, 1988. **167**: 766—778

[16] Xu X, Yan G, Kong R, et al. Analysis of expression of the binary toxin genes from *Bacillus sphaericus* in *Anabaena* and the potential in mosquito control [J]. *Curr Microbiol*, 2000. **41**: 352—356

(C)1994-2023 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http:/

HETEROTROPHIC GROWTH OF CYANOBACTERIA EXPRESSING *LAC* AND *GLK* GENES

YU Li-hong[1,2], GUO Hou-liang[2] and XU Xu-dong[1*]

(1. *Institute of Hydrobiology, The Chinese Academy of Sciences, Wuhan* 430072; 2. *College of Life Sciences. Wuhan University, Wuhan* 430072)

Abstract: The glucose kinase gene *glk* from *Brucella abortus* and *lacZYA* genes from *E. coli* were positioned downstream of a cyanobacterial *glnA* promoter, and introduced into three cyanobacterial species in a broad-host-range plasmid. Expression of the exogenous genes was confirmed by assay of β-galactosidase and glucokinase activity. The genetically-engineered cyanobacterial strains acquired capability of heterotrophic growth on lactose. *Synechocystis* sp. PCC 6803 (pRL2224) can grow on lactose in the light with DCMU, while *Anabaena* strains harboring pRL2224 are capable of heterotrophic growth in complete darkness and produce heterocysts upon induction in darkness or in the light with DCMU.

Key words: *lac*; *glk*; Cyanobacteria; Heterotrophic growth

(C)1994-2023 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http:/