集胞藻 PCC6803 铜离子诱导表达平台的构建

高　宏[1,2]　唐　蜻[1,2]　徐旭东[1]

(1. 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;
2. 中国科学院研究生院, 北京　100049)

摘要: 在集胞藻 PCC6803 中, 基因敲除是研究基因功能的最直接有效的方法, 但是对于某些生存必需的基因则无法通过这种方法获得突变株。为研究集胞藻 PCC6803 中此类基因的功能, 在其基因组中构建了一个 *petE* 基因启动子 (*PpetE*) 控制的铜离子诱导表达的平台。将集胞藻 *PpetE* 装配在 *lacZ* 报告基因的上游, 通过同源双交换整合到这种蓝藻的基因组中。通过调节培养基中铜离子的浓度发现, *lacZ* 的表达能够人为控制。特别是当铜离子浓度在 6—400 nmol/L 范围时, LacZ 活力随铜离子浓度增加呈 S 型增长关系。利用这个铜离子诱导表达平台, 可以控制某些必需基因的表达: 提供铜离子维持细胞生存; 而撤去铜离子时则关闭基因的表达, 可以观察其对生命活动的影响。

关键词: 集胞藻; *PpetE*; *lacZ*; 铜离子
中图分类号: Q344　　文献标识码: A　　文章编号: 1000-3207(2007)02-0240-05

蓝藻是一类能进行放氧型光合作用的原核生物, 广泛分布在地球上各类型水体和一些陆生环境, 是海洋和内陆水体中最重要的原初生产者。越来越多的研究表明, 蓝藻适应外界环境的变化主要是通过调节基因表达来实现的。利用不同的启动子探测载体, 已经发现很多基因能被环境因子(如光、温度、营养成分等) 调控表达。譬如, 蓝藻光合基因 *petE* 的表达受铜离子的诱导[1]。其产物 PetE 是光合电子传递链和呼吸电子传递链中的一个电子载体, 它能将电子从细胞色素 b_6f 复合物传递到光系统 I。研究表明, PetE 的表达受铜离子浓度的调节: 当培养基中含有足够铜离子时 *petE* 基因诱导表达, 而当缺少铜离子时, *petE* 基因被关闭, 此时另一个铁离子诱导表达的蛋白 PetJ 代替 PetE 发挥电子传递体的功能[2]。利用 *petE* 基因的启动子可以进行基因功能的研究。如在鱼腥藻 (*Anabaena* sp.) PCC7120 用 *petE* 启动子调控 *hetR* 的表达, 随着铜离子浓度的增加, 异形胞发生频率也逐渐增加, 导致成簇异形胞的形成, 表明 *hetR* 是启动异形胞分化的基因[3]。*patS* 基因调节异形胞图式的形成。用 *petE* 启动子调节 *patS* 表达水平, 随着铜离子浓度的逐渐增加, 异形胞发生逐渐被抑制, 证明 *patS* 产物通过抑制其他营养细胞的分化形成异形胞间隔分布的图式[4]。

集胞藻 (*Synechocystis* sp.) PCC6803 是一种单细胞蓝藻, 它具有天然的 DNA 转化系统, 既能进行光合自养生长, 又能利用葡萄糖进行异养生长, 是研究光合作用相关过程的良好模式生物, 其全基因组序列已经于 1996 年公布[5]。采用基因敲除的方法研究其基因功能已获得很大成功, 但是对于某些涉及其基本生命活动的基因, 往往很难直接通过基因敲除的方法得到完全分离的突变株。为此, 我们利用集胞藻 *petE* 基因的启动子, 在其基因组中构建了一个铜离子诱导表达的平台。以 *lacZ* 作为报告基因, 证明铜离子能有效诱导 *lacZ* 表达, 该平台将能够用于在集胞藻中研究某些必需基因的功能。

1　材料与方法

1.1　菌株(藻株)、质粒和培养　集胞藻 PCC6803 由北京大学赵进东教授提供, 在 BG11 培养液中, 28—30 ℃和光照条件下(30 μE/m²·s) 静置培养, 基因组中插入有 Ω-*PpetE*-*lacZ* 的藻株 (集胞藻 PCC6803:: Ω-*PpetE*-*lacZ*), 在培养液中另外含有 10 μg/mL 的壮观

收稿日期: 2005-05-25; 修订日期: 2006-06-27
基金项目: 国家自然科学基金重点项目(30330030); 中国科学院知识创新工程方向性项目(KSCX-2-SW-332) 资助
作者简介: 高宏, 男, 湖北监利人; 在职博士生; E-mail: gaoh@ihb.ac.cn
通讯作者: 徐旭东, E-mail: xux@ihb.ac.cn

霉素和 5mmol/L 的葡萄糖,所有溶液均用去离子水配制,根据需要添加不同浓度的铜离子,所用器皿均为塑料器皿。*E. coli* DH5α 或 GM48 在 37℃ LB 培养基中培养,含有质粒的大肠杆菌菌株加入相应的抗生素(壮观霉素、硫酸卡那霉素、氨苄青霉素工作浓度均为 50μg/mL),质粒 pRL57[6]、pKW1188[7] 由美国密西根州立大学 DOE 植物实验室 Peter Wolk 教授提供,质粒 pHB1180 是由 pKW1188 经 Bgl Ⅱ酶切补平后自环化得到的。

1.2　集胞藻 PCC6803 的转化　按文献介绍的方法[7],集胞藻生长至 OD_{730} 为 0.8 左右后收集,与 DNA 混合,在光照下保温 4h 后涂布到覆盖有硝酸纤维素滤膜的 BG11 平板上,光照一天后将膜转到含有 10μg/mL 的壮观霉素和 5mmol/L 的葡萄糖的 BG11 平板上继续培养至转化子长出,经过液体培养基传代后用 PCR 的方法检测转化子。

1.3　DNA 操作方法　按徐旭东等描述的方法提取集胞藻 PCC6803 的基因组 DNA[8]。DNA 重组按 Molecular Cloning 所描述的方法进行[9]。PCR 反应体系中含 10mmol/L Tris•Cl(pH8.3),50mmol/L KCl,1.5mmol/L $MgCl_2$,引物(表 1)各 100pmol,200μmol/L dNTPs,50ng 模板 DNA,2.5U DNA 聚合酶(Taq/Pfu = 1/1,U/U,MBI)。PCR 反应程序如下:首先是 94℃变性 5min,接下来是 30 个循环反应(94℃变性 1min,60℃复性 1min,72℃延伸 1min),最后是 72℃延伸 10min。PCR 产物用玻璃奶纯化试剂盒(MBI)纯化后,在如下条件进行加"A"反应:50μL 的反应体系中含 10mmol/L Tris•Cl(pH8.3),50mmol/L KCl,1.5mmol/L $MgCl_2$,50μmol/L dATP,0.5μg 纯化的 PCR 产物,2.5U Taq DNA 聚合酶(MBI),在 72℃反应 10min。之后 PCR 产物可克隆于 pMD18-T 中(TaKaRa),克隆均经过测序验证没有突变发生。

1.4　LacZ 活性测定　根据 Miller 描述的方法[10] 略有改动。将集胞藻 PCC6803::Ω-*PpetE-lacZ* 在不含铜离子培养基传两代,然后分别在含有不同浓度铜离子的培养液中生长至对数期,将藻细胞稀释成相同浓度(OD_{730} 约为 1.4)后,各取 1.5mL 藻液,离心收集后用 1mL 的 Z Buffer(60mmol/L Na_2HPO_4,40mmol/L NaH_2PO_4,10mmol/L KCl,1mmol/L $MgSO_4$,40mmol/L β-巯基乙醇)悬浮,依次加入50μL的0.1% SDS、50μL 氯仿和 200μL ONPG(4mg/mL),在 30℃反应 20min 后加入 500μL 的 1mol/L Na_2CO_3 终止反应。反应液于 12000r/min 离心 2min,取上清在 OD_{420} 测吸收值,用不含有藻细胞的反应液作为空白对照,根据公式 Miller= $1000 \times OD_{420}/(1.5mL \times 20min \times OD_{730})$ 计算 LacZ 活力。

2　结　果

2.1　含有 Ω-*PpetE-lacZ* 片段的质粒的构建

以 *E. coli* GM48 DNA 为模板、lacZ-3 和 lacZ-4(表 1)为引物进行 PCR 扩增获得不含启动子区域的 *lacZ* 基因,以集胞藻 PCC6803 DNA 为模板、PpetE-1 和 PpetE-2(表 1)为引物进行 PCR 扩增获得含 *PpetE* 的 DNA 片段,分别克隆到 pMD18-T 中,获得 pHB1505 和 pHB1117。用 *Dra* Ⅲ从 pRL57 上切下 Ω 片段并克隆到经过 *Xba* Ⅳ酶切并补平的 pHB1505 中,得到质粒 pHB1524。用 *Sal* Ⅰ和 *Bam*H Ⅰ双酶切从 pHB1524 上切下含有 Ω-*PpetE* 的片段,补平后克隆到经过 *Bgl* Ⅱ酶切并补平的 pHB1117 中,得到的质粒 pHB1536。用 *Hin*d Ⅲ和 *Kpn* Ⅰ双酶切从质粒 pHB1536 切下含有 Ω-*PpetE-lacZ* 的片段并补平,然后克隆到经过 *Eco*R Ⅰ酶切并补平的质粒 pHB1180 中,得到的重组质粒命名为 pHB1567,结构如图 1。

表 1　PCR 引物及序列(5′>3′)

Tab. 1　Nucleotide sequences of gene-specific primers used for PCR(5′>3′)

引物名称 Primers	序列(5′>3′) Nucleotide sequence
lacZ-3	CTCGAGCAGATCTGACTAACTGAGGAGGATTGCATATGACCATGATTACGGATTCACTG
lacZ-4	TTACTTCTGACACCAAACCAACTGGTAATGGTAGCGACC
PpetE-1	AAGGATTCATAGCGGTTGCC
PpetE-2	GACATACTTCTTGGCGATTGTATC
gp267-9	ACCTCTCCACGCTGAATTAG
gp267-10	TTCCAGGCCACATTGTTGTC

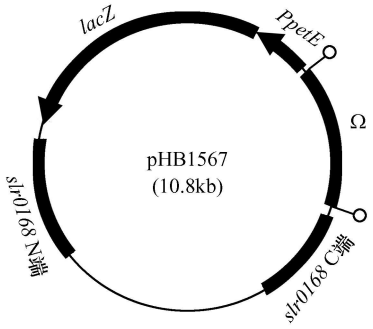


图 1 质粒 pHB1567的结构示意图

Fig. 1 Structure of plasmid pHB1567

Ω片段两侧的茎环结构代表短的反向重复序列,可终止转录

The stem-loop structures bracketing the Ω cassette represent short inverted sequences that terminate transcriptions

2.2 Ω-*PpetE-lacZ* 整合到集胞藻基因组

用含有 Ω-*PpetE-lacZ* 的质粒 pHB1567 转化集胞藻 PCC6803。由于在 Ω-*PpetE-lacZ* 片段的上下游分别携有集胞藻 PCC6803 基因 *slr0168* 的部分序列,通过同源重组, Ω-*PpetE-lacZ* 片段整合到 *slr0168* 基因内,结构如图 2 所示。其中 *PpetE-lacZ* 的方向和 *slr0168* 基因的方向相反,而 Ω 片段两端含有反向重复序列,可以阻止背景转录活性对 *PpetE* 调控的影响。利用 *slr0168* 基因内的两个引物 gp267-9 和 gp267-10(表 1),分别以 *Synechocystis* PCC6803::Ω-*PpetE-lacZ* 和 *Synechocystis* PCC6803 的基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增,结果显示 Ω-*PpetE-lacZ* 正确插入在 *slr0168* 基因中,只能检测到 6kb 左右的 PCR 带,而看不到 0.5kb 左右的野生型带(图 3)。在我们的实验条件下插入 *slr0168* 基因观察不到对集胞藻 PCC6803 造成任何影响。

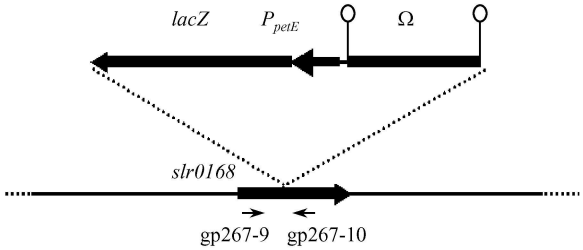


图 2 *Synechocystis* PCC6803::Ω-*PpetE-lacZ* 的染色体结构示意图

Fig. 2 Chromosome structure of *Synechocystis* PCC6803::Ω-*PpetE-lacZ*

gp267-9/10是用于检测同源整合的PCR引物

gp267-9/10 are the PCR primers for examining the homologous double crossovers

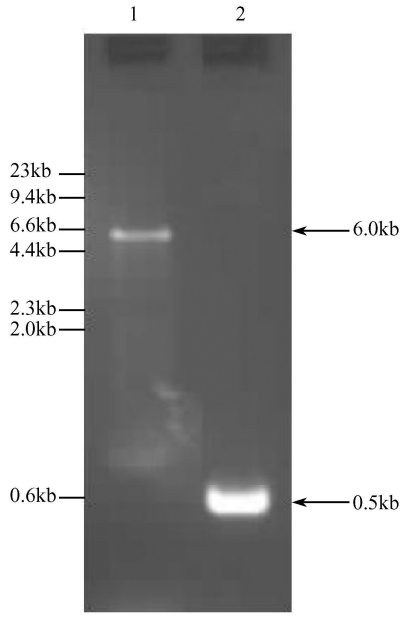


图 3 PCR 检测 Ω-*PpetE-lacZ* 片段在集胞藻 PCC6803 基因组中的整合

Fig. 3 PCR examination of *Synechocystis* PCC6803::Ω-*PpetE-lacZ*

1. 集胞藻 PCC6803::Ω-*PpetE-lacZ*; 2. 集胞藻 PCC6803

1. *Synechocystis* PCC6803::Ω-*PpetE-lacZ*; 2. *Synechocystis* PCC6803

2.3 *PpetE* 驱动的 *lacZ* 在集胞藻 PCC6803 中的诱导表达

将 *Synechocystis* PCC6803::Ω-*PpetE-lacZ* 先在不含有铜离子培养液中传两代,消耗掉藻细胞内残留的铜离子,然后在培养基中添加不同浓度的铜离子,

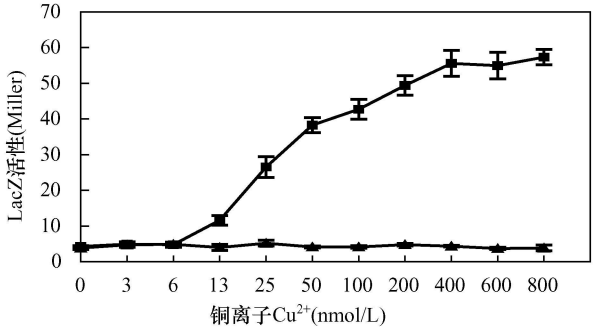


图 4 铜离子诱导 *lacZ* 在集胞藻 PCC6803 中的表达

Fig. 4 Copper-induced expression of *lacZ* in *Synechocystis* PCC6803

(▲)和(■)分别代表集胞藻 PCC6803 和集胞藻 PCC6803::Ω-*PpetE-lacZ*。所有的数值为三个测试结果的平均值

(▲) and (■) represent *Synechocystis* PCC6803 and *Synechocystis* PCC6803::Ω-*PpetE-lacZ* respectively. All of the data are means of triplicate determinations

测量 LacZ 的活力。发现当铜离子的浓度在 6nmol/L 或更低时, LacZ 几乎不表达或表达量很低, 和野生型的本底值相同(Miller 值约为 4); 当铜离子浓度在 6—400nmol/L 的范围时, LacZ 活力随铜离子浓度升高而增加, Miller 值最高可达到 60 左右。表明在此浓度范围内, 铜离子显著诱导 *lacZ* 的表达。而当铜离子的浓度超过 400nmol/L 时, LacZ 活力不再有明显的提高(图 4)。培养基中铜离子浓度过高在一定程度上还会影响集胞藻的生长。

3　讨　论

在蓝藻中常见的报告基因有 *lacZ*, *cat*, *gfp*, *luxAB* 等, 我们选择了 *lacZ* 基因作为报告基因, 其优点是本底表达量低、测试简单无需特殊仪器、不受细胞内 ATP 供应影响。我们也曾尝试 *gfp*, 但不能定量, 并且不够灵敏。

有文献报道集胞藻 PCC6803 *petE* 基因的启动子区域可能位于起始密码子上游-16 至-38 Nt. 处[11], 我们在实验中选择克隆了基因上游 440bp 的区域, 这样确保包含有整个启动子区域。多年来 pKW1188 质粒[7] 被用作集胞藻 PCC6803 的通用整合平台, 证明在将外源基因插入集胞藻后对生理功能没有影响。我们经过测序发现该整合位点在 ORF *slr0168* 内(徐旭东, 未发表)。为保证背景转录活性不影响 *PpetE* 的调控, 我们在其上游装置了带有终止转录结构的 Ω 片段, 并且选择插入方向与 *slr0168* 相反, 结果显示这些策略确实把背景值降到了几乎检测不到的水平。

将集胞藻 PCC6803:: Ω-*PpetE-lacZ* 首次转入不含有铜离子的培养基的时候, 依然可以检测到一定的 LacZ 活性(Miller 值约为 8), 我们推测藻细胞本身所含铜离子可能存在影响。通过在不含铜离子的培养基中传两代, LacZ 活性降低到了很低的水平。在测试铜离子对 *lacZ* 调控的实验中, 我们发现当铜离子浓度在 0—6nmol/L 或大于 400nmol/L 的范围时, *lacZ* 不能被诱导表达或表达水平高但调控幅度很小, 只有在 6nmol/L 至 400nmol/L 范围内 *lacZ* 才发生明显的调控, 1992 年 Zhang L 等利用 Western blot 检测发现 300nmol/L 铜离子浓度能诱导 *petE* 的表达, 这和我们的实验结果相符[12], 但是我们的方法显然灵敏度更高而且方便。我们还检查了不带启动子的 *lacZ* 基因, 只检测到很低的 LacZ 活性 (Miller 值小于 10), 而且铜离子浓度的变化不对其表达有任何调控作用(结果未附)。这些结果显示铜离子诱导表达平台的构建是成功的。

对于不能通过基因敲除法来研究的基因, 我们可以利用 DNA 重组技术将该基因整合到这个平台上, 通过调节铜离子的浓度, 关闭、部分表达或过量表达该基因, 从而人为地调控该基因, 为了解其在细胞内的生理功能提供直观的证据。

参考文献:

[1] Ghassemian M, Wong B, Ferreira F, *et al*. Cloning, sequencing and transcriptional studies of the genes for cytochrome c-553 and plastocyanin from *Anabaena* sp. PCC 7120 [J]. *Microbiology*, 1994, **140**: 1151—1159

[2] Duran R V, Hervas M, De La Rosa M A, *et al*. The efficient functioning of photosynthesis and respiration in *synechocystis* sp. PCC 6803 strictly requires the presence of either cytochrome c_6 or plastocyanin [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2004, **279**: 7229—7233

[3] Buikema W J, Haselkorn R. Expression of the *Anabaena hetR* gene from a copper-regulated promoter leads to heterocyst differentiation underrepressing conditions [J]. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 2001, **98**: 729—2734

[4] Yoon H S, Golden J W. Heterocyst pattern formation controlled by a diffusible peptide [J]. *Science*, 1998, **282**: 935—938

[5] Http://www.kazusa.or.jp/cyanobase/Synechocystis/index.html

[6] Elhai J, Wolk 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

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

[8] 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-大肠杆菌启动子 CAT 探测载体的构建. 中国科学院研究生院学报, 1993, **10**: 203—209]

[9] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular cloning. A laboratory manual, 2nd ed [M]. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1989

[10] Miller J H. Experiments in molecular genetics [M]. Cold Spring Harbor Press. 1972, 352—355

[11] Briggs L M, Pecoraro V L, McIntosh L. Copper-induced expression, cloning, and regulatory studies of the plastocyanin gene from the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC6803 [J]. *Plant Mol Biol*, 1990, **15**: 633—642

[12] Zhang L, Mcspadden B, Pakrasi H B, *et al*. Copper-mediated regulation of cytochrome c553 and plastocyanin in the *cyanobacterium synechocystis* 6803 [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1992, **267**: 19054—19059

CONSTRUCTION OF COPPER-INDUCED GENE EXPRESSION PLATFORM IN *SYNECHOCYSTIS* SP. PCC6803

GAO Hong[1,2], TANG Qing[1,2] and XU Xu-Dong[1]

(1. *State Key Laboratory of Freshwater Ecology and Biotechnology, Institute of Hydrobiology, the Chinese Academy of Sciences, Wuhan* 430072;
2. *The Graduate School of the Chinese Academy of Sciences, Beijing* 100049)

Abstract: In *Synechocystis* sp. PCC6803, gene knock-out is the most straightforward and effective method to reveal the physiological function of a gene. Nevertheless, insertion mutants could not be generated for those genes essential to survival. In order to elucidate the function of such genes in *Synechocystis* sp. PCC6803, a copper-induced gene expression platform was constructed using the promoter of *petE* (*PpetE*). *PpetE* from *Synechocystis* sp. PCC6803 and the beta-galactosidase gene (*lacZ*) from *E. coli* GM48 were cloned respectively by doing polymerase chain reaction (PCR), and the *PpetE* was positioned upstream of *lacZ*. The *PpetE-lacZ* construct was integrated into the genome of *Synechocystis* sp. PCC6803 via homologous recombinations. The expression of beta-galactosidase gene was found to be controllable by adjusting the concentration of Cu^{2+} in medium. In a range from 6 to 400nmol/L, Cu^{2+} induced the expression of beta-galactosidase in an S-shaped curve, but when the concentration of Cu^{2+} in medium was below 6nmol/L or above 400nmol/L, the activity of beta-galactosidase was either too low to be detected or too high to be regulated. This copper-induced gene expression platform can be used in the control of some indispensable genes in *Synechocystis* sp. PCC6803: cells survived in the presence of Cu^{2+}, so that the physiological effect of a gene could be observed when Cu^{2+} is removed.

Key words: *Synechocystis; PpetE;* PCR; Beta-galactosidase; Cu^{2+}