集胞藻 PCC6803 光激活异养生长必需基因 s110886 的研究

刘朝莹[1,2]　徐旭东[1]　孔任秋[1]
(1. 中国科学院水生生物研究所,武汉　430072; 2. 中国科学院研究生院,北京　100049)

摘要:集胞藻 PCC6803 能够在微弱、短时光刺激的条件下利用葡萄糖进行异养生长,称为光激活异养生长(LAHG)。从其随机插入诱变文库中,筛选到 3 个不能进行光激活异养生长的突变株,通过反向 PCR 和测序确定突变基因全部为 *s110886*。将 *s110886* 克隆到表达载体 pET21-b,在大肠杆菌 BL21(DE3)诱导表达,并对产物进行了纯化。用 Western 印迹法研究 *s110886* 在集胞藻 PCC6803 的表达情况,发现在完全黑暗和光照情况下,其表达水平几乎没有差异,并证明其编码产物分布于膜上。因此,*s110886* 是一个编码膜蛋白的不受光调控的 LAHG 基因。

关键词:集胞藻 PCC6803;光激活异养生长;*s110886*;表达
中图分类号:S943.2　　**文献标识码**:A　　**文章编号**:1000-3207(2006)04-0375-05

集胞藻(*Synechocystis* sp.)PCC6803(以下简称集胞藻 6803)是一种单细胞蓝藻,能进行放氧型光合作用,具天然的 DNA 转化系统,全基因组序列测定于 1996 年完成,是广泛用于光合作用和蓝藻生物学研究的重要模式[1]。

除自养生长外,集胞藻 6803 也可以利用葡萄糖在黑暗条件下进行异养生长,但必需每天接受 5min 的短时光照,称为光激活异养生长(LAHG)[2]。LAHG 是一个感应蓝光的过程,有效波长在 400—500nm,峰值为 450nm,所需最低光强在 0.5μE·m^{-2}·s^{-1}以下。显然,短时的弱光对集胞藻 6803 只是一种环境信号,调节细胞异养代谢,而完全不足以支持光合作用。因此,LAHG 至少有两个基本的生命过程:光信号的感受/传导和异养生长的激活。孔任秋等曾报道 *s110886* 对于 LAHG 是必需的[3]。*s110886* 的产物预测含有 3 个 TPR 序列,并且是一个膜蛋白。TPR 序列是一个含有 34 个氨基酸残基具有α螺旋结构的保守序列,常以串联排列的方式存在于各种不同的蛋白中,数目可以从 3 到 16 个甚至更多,可参与介导蛋白间相互作用和信号传导[4,5]。为探明 *s110886* 蛋白本身是否受光信号调控,本研究对该蛋白进行了表达、纯化和兔抗血清制备,并以 Western 印迹法检查了它在集胞藻 6803 的表达和分布。

1　材料与方法

1.1　藻株、培养和转化　集胞藻 6803 由北京大学赵进东教授提供,在液体 BG-11 培养基、30±2 ℃和 40—50μE·m^{-2}·s^{-1}光照下静置培养。有卡那霉素抗性片段的藻株在培养时加 10μg/mL 卡那霉素(Km)。进行 LAHG 时,补加 5mmol/L 葡萄糖,置暗盒中,每天光照 5min。光异养生长除加 5μmol/L 葡萄糖外,还添加 5μmol/L DCMU 抑制光合作用。使用 pKW1188 质粒[6]转化集胞藻 6803 获得的 Km 抗性转化子作为野生型对照,其生长特性与集胞藻 6803 本身没有差别,记作 wt-1188。在准备 *s110886* 表达研究的样品时,将生长至 OD_{730} = 0.5—0.6 的集胞藻 6803 转至暗盒中培养 4d,达到 OD_{730} = 1.2 左右收集藻细胞,再给以 5min,30min, 2h, 8h 和 24h 的光照处理,之后立即加入 50μg/mL 红霉素和 5μmol/L DCMU。集胞藻 6803 的转化按 Williams 描述的方法[6]进行。

1.2　随机插入诱变和突变株筛选　以 Km 抗性基因片段 C. K2 对集胞藻 6803 的随机插入诱变和突变株的筛选与本实验室以前报道的方法[3]相似,但随机插入位点为 Hae Ⅲ和 Alu Ⅰ,即在构建二级诱变文库时分别用 Hae Ⅲ和 Alu Ⅰ对一级文库质粒 DNA

收稿日期:2005-05-25;**修订日期**:2005-06-27
基金项目:中国科学院创新领域前沿项目和海洋所开放实验室的支持
作者简介:刘朝莹(1978—),女,海南海口人,硕士研究生
通讯作者:孔任秋,kongr@ihb.ac.cn

进行部分酶切,并与 Km 抗性标记基因相连接。

1.3 PCR DNA 的提取按徐旭东等描述的方法进行[7]。以 0886-1(5′-AGAATTCCGCAACGGAAAGCCC-CATTC)和 0886-2(5′-CAAGCTTGTCTAGGGCACTGAT-CACACTG)为引物、集胞藻 6803 总 DNA 为模板,进行 PCR 扩增。50μL PCR 反应体系包括 10mmol/L Tris. Cl (pH 8.3), 50mM KCl, 1.5mmol/L $MgCl_2$,引物各 100pmol, 50mmol/L dNTPs, 0.1μg 总 DNA,2U Taq DNA 聚合酶(晶养生物公司)。反应过程为 94 ℃,5min,之后 30 个循环:90 ℃,1min-60 ℃, 1min-72 ℃, 1min, 最后为 72 ℃延伸 10min。反向 PCR:突变株 DNA 用 Sau3A Ⅰ酶切后进行自环化连接,再作为模板用引物 CK2-15(5′-TTGAGACACAACGTGGCT)和 CK2-16 (5′-ACTGGCAGAGCATTACGCTG) 进行 PCR,产物用 CK2-15 测序,在 Cyanobase 数据库搜索。

1.4 DNA 重组 PCR 产物经 1%琼脂糖凝胶回收后用玻璃奶试剂盒纯化(晶美生物公司),连接到载体 pMD18-T 中,得到重组质粒 pHB1481。再以 Hind Ⅲ和 EcoR Ⅰ切下该基因片段,克隆到用同样两种酶消化的 pET-21b (Invitrogen 公司)上,得到重组质粒 pHB1482。

1.5 原核表达和蛋白纯化 将 pHB1482 导入 *E. coli* BL21(DE3),用终浓度为 1mmol/L 的 TPTG 诱导基因表达。收集菌体,用 STET(8%蔗糖,5% TritonX-100, 50mmol/L EDTA,50mmol/L Tris. Cl, pH8.0)重悬。用超声破碎细胞,经 12,000r/min 离心 3min,分别将上清和沉淀进行 SDS-PAGE 电泳。蛋白的纯化使用 His-bind purification kit (Novagen 公司)。层析柱中 His-bind 树脂的平衡液包括 6mL ddH_2O,10mL Charge buffer (50mmol/L $NiSO_4$), 6mL Binding Buffer (0.5mol/L NaCl, 20mmol/L Tris. Cl, 5mmol/L 咪唑, pH 7.9)。将树脂平衡好后,把蛋白样品缓慢加入层析柱,先后用 20mL Binding Buffer 和 15mL wash Buffer (0.5M NaCl, 60mmol/L 咪唑, 20mmol/L Tris. Cl, pH 7.9)洗柱子,最后加入 Elute Buffer (1mol/L 咪唑, 0.5mol/L NaCl, 20mmol/L Tris. Cl, pH 7.9)洗脱目的蛋白,洗脱液用 1.5mL 离心管收集。

1.6 总膜和可溶性蛋白的制备 藻细胞以 6000r/min 离心 8min 收集,加入 40mmol/L Tris. Cl (pH 8.0)和 1mmol/L PMSF 重悬,在冰水浴中超声破碎。再以 6000r/min 离心 10min 去除细胞残渣。取上清继续以 30,000r/min (Beckman, Ti90 转子)离心 30min,沉淀为总膜,上清即为可溶性蛋白。总膜用 0.25mol/L 蔗糖和 5mmol/L 磷酸钾(pH 7.8)重悬;可溶性蛋白溶液用等体积的提取液(含 10%TCA 和 0.07%β-巯基乙醇的丙酮)混匀,于 -20 ℃放置 1h 以上,离心去上清,用洗涤液(含 0.07%β-巯基乙醇的丙酮)洗两次,晾干。加入 SDS 上样缓冲液,煮沸 10min,以 12,000r/min离心 10min,上清为总膜蛋白。

1.7 SDS-PAGE 按 Molecular Cloning[8]描述的方法进行。将以上总膜或可溶性蛋白与 SDS 上样缓冲液混合后煮沸 10min,经 12,000r/min 离心 10min,进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶(12%)电泳(120V,1h)。电泳结束后以考马斯亮蓝 R250 染色 4h,并以甲醇-冰乙酸脱色。

1.8 Western blot 按照 Molecular Cloning[8]描述的方法进行。蛋白电泳结束后,在转移缓冲液(39mmol/L 甘氨酸,48mmol/L Tris. Cl, 20%甲醇)中将蛋白转到尼龙膜上(80V,1h),经丽春红染色验证转膜效果。之后在 TBS 溶液(150mmol/L NaCl, 50mmol/L Tris. Cl, pH 7.5)中漂洗 3 次,每次 15min。用封闭液(含 5% W/V 脱脂奶粉的 TBS 溶液)进行封闭,再与一抗反应液(含 1‰兔抗血清和 3%带有 *E. coli* BL21(pET21-b)总蛋白的 TBS 溶液)反应 1h,用 TBST 溶液(含 1‰吐温 20 的 TBS 溶液)洗 3 次,再与二抗反应液(2‰山羊抗兔抗体偶联碱性磷酸酶,TBS 溶液)反应 1h,用 TBST 溶液洗 3 次,最后在 NBT/BCIP 显色工作液中反应 5—10min。二抗和显色试剂盒购自华美生物公司。蛋白定量按照 Bradford 法进行[9]。

2 结果

2.1 LAHG 突变株的筛选和 s110886⁻ 在四种不同条件下的生长情况

以卡那霉素(Km)抗性基因随机插入集胞藻 6803 基因组的 Hae Ⅲ和 Alu Ⅰ位点中,将约 6000 个转化子转到 96 孔板中培养,分别在光照和 LAHG 条件下培养。经过筛选,得到可能的 LAHG 突变株 68 个。再将这 68 株转到试管中进一步检查,确认得到突变株 3 个(编号为 42A5,42B12,42C8)。通过反向 PCR 和测序确认插入突变都发生在 *s110886* 基因 666-669Nt. 的 Hae Ⅲ(GGCC)位点。检查突变株在不同条件下的生长情况,作者观察到,在自养、混养、光异养生长条件下,突变株和野生型的表型几乎完全一致,而在光激活异养生长条件下完全不能生长(图 1),证明 *s110886* 是集胞藻 6803 光激活异养生长所必需的基因。

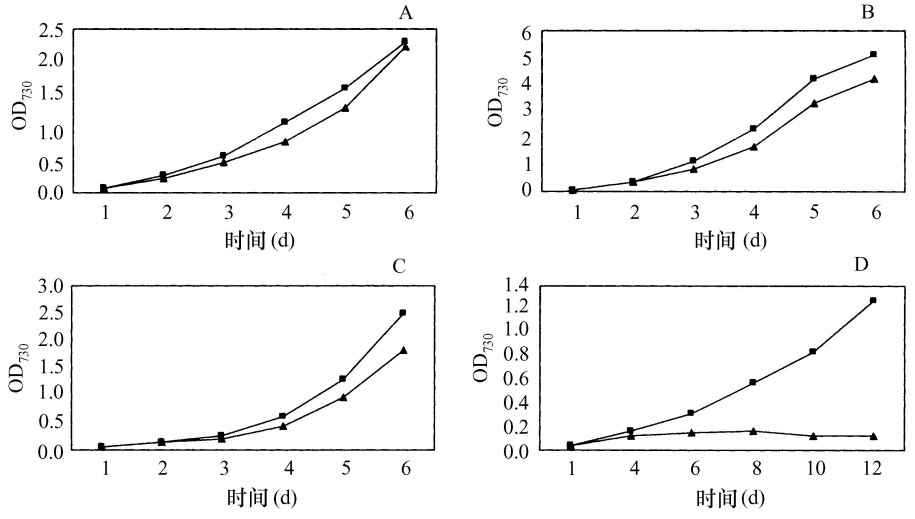


图 1　突变株 42A5(*s110886*⁻)在不同条件下的生长情况。■野生型;▲42A5 突变株。(A) 自养生长;(B) 混养生长;(C) 光异养生长;(D) 光激活异养生长

Fig. 1　Growth of mutant 42A5 under different conditions. ■wild type; ▲mutant 42A5. (A) autotrophic growth; (B) heterotrophic growth; (C) photoheterotrophic growth; (D) LAHG

2.2　s110886 在 E. coli 的表达和产物的纯化

蛋白结构预测表明 *s110886* 编码的产物前 33 个氨基酸序列很可能是跨膜区。设计引物 0886-1/0886-2,经 PCR 扩增获得 *s110886* 去除该区域的编码序列部分,经过测序验证序列完全正确后,克隆到 pET-21b 在 *E. coli* BL21(DE3)进行表达,融合蛋白预测大小为 32kD。用 IPTG 诱导表达,在 0h, 1h, 2h, 3h 和 4h 分别取样,将总蛋白进行 SDS-PAGE 电泳。结果证明表达了约 32kD 的蛋白,并且表达量随时间延长而增加,在第 4 小时达到最大(图 2A)。诱导表达后的细胞经超声破碎和离心后,对上清和沉淀进行 SDS-PAGE 电泳,显示出在 *E. coli* BL21(DE3)中 S110886 以可溶性蛋白形式存在(图 2B)。由于这样表达的重组蛋白失去了 N-端 33 个氨基酸序列的跨膜区,记作 rS110886N-。

在 rS110886N-的 C 端带有 6 个组氨酸的标签,可与 Ni^{2+} 离子特异性结合。用亲和层析法以 Ni^{2+} 离子层析柱纯化蛋白,洗脱液用离心管收集,每管约 600μL。依次取 15μL 洗脱液上样电泳。图 3 显示前 9 管洗脱液中蛋白情况。在目的蛋白含量很高的情况下,仍然看不到杂蛋白带,证明纯度较高。以纯化的融合蛋白免疫家兔,制备抗血清。

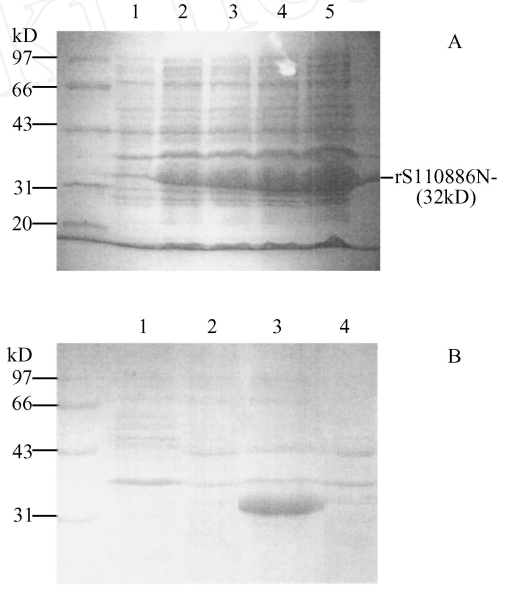


图 2　N-端缺失的 *s110886* (rS110886N-)在 *E. coli* 的表达和产物的存在形式。(A) IPTG 诱导 rS110886N-在 *E. coli* 的表达。1,0h;2,1h;3,2h;4,3h,5,4h。(B) rS110886N-在 *E. coli* 的存在形式。1 和 2 分别是 *E. coli* BL21(DE3)(pET-21b)的上清和沉淀;3 和 4 分别是 *E. coli* BL21(DE3)(pHB1482)的上清和沉淀

Fig. 2　Expression and product form of *s110886* minus N terminus (rS110886N-) in *E. coli*. (A) IPTG-induced expression of rS110886N- in *E. coli*. 1, 0h; 2, 1h; 3, 2h; 4, 3h. 5, 4h. (B) The present form of rS110886N- in *E. coli*. 1 and 2, the supernatant and pellet of *E. coli* BL21(DE3)(pET-21b) respectively; 3 and 4, the supernatant and pellet of *E. coli* BL21(DE3) (pHB1482) respectively

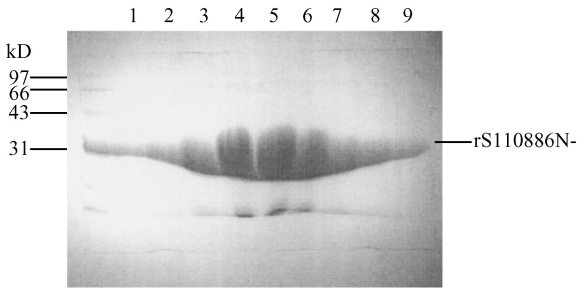


图 3 SDS-PAGE 检查纯化的 rS110886N-。泳道 1—9 依次为收集的第 1—9 管洗脱液

Fig. 3 Examination of purified rS110886N-with SDS-PAGE. Lanes 1 to 9 indicate purged solution of tubes 1 to 9 respectively

2.3 S110886 在集胞藻 6803 中的分布和表达

S110886 预测是一个有 279 个氨基酸残基的膜蛋白,在藻细胞中大小为 31kD。以 Western blot 检测该蛋白在集胞藻 6803 的分布,证明确实位于膜组分,而在可溶蛋白中水平很低。在 *s110886* 突变株中相应位置上没有该蛋白。经过 5min 到 24h 不同时间光照处理后,在集胞藻 6803 膜蛋白中其表达量没有显著变化,显示 S110886 本身在蛋白水平不受光照调控(图 4)。

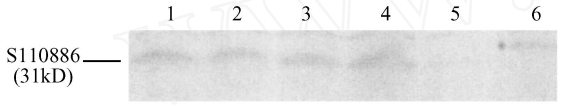


图 4 Western blot 结果。1. 总膜蛋白,黑暗处理;2. 总膜蛋白,光照诱导 5min;3. 总膜蛋白,光照诱导 24h;4. 总膜蛋白,持续光照培养;5. 可溶性蛋白,光照诱导 24h;6. *s110886* 突变株总膜蛋白,持续光照培养

Fig. 4 Western blot analysis. 1. total membrane proteins, darkness; 2. total membrane proteins, light exposure for 5min; 3. total membrane proteins, light exposure for 24hrs; 4. total membrane proteins, growth under continuous illumination; 5. soluble proteins, light exposure for 24h; 6. total membrane proteins of *s110886* mutant, growth under continuous illumination

3 讨论

集胞藻 6803 有两个感应微弱光的反应,即向光运动和光激活异养生长。前者在近几年已得到深入的研究[10],涉及到类光敏色素感受器 TaxDl 蛋白[11],特异的 sigma 因子调控[12],信号传导途径[13]以及第 IV类纤毛合成[14]。而对光激活异养生长机制的研究仅局限于本实验室发现的必需基因 *s110886*[3]。在以前的报道中本实验室将卡那霉素抗性基因随机插入基因组 Sau3A Ⅰ位点,获得了 *s110886* 突变株。本研究中作者将卡那霉素抗性基因随机插入基因组 Hae Ⅲ和 Alu Ⅰ两种位点试图筛选更多的 LAHG 突变株,结果又有 3 个插入在 *s110886* 内,证明该基因在 LAHG 中起重要作用。

根据蛋白结构预测,*s110886* 编码的蛋白(S110886)的 N-端是跨膜区。为避免在大肠杆菌中表达的融合蛋白结合到质膜上,给纯化带来不便,作者通过 PCR 获得去除跨膜区编码序列的 *s110886* DNA 片段,在 *E. coli* BL21(DE3)表达后,证明融合蛋白确实以可溶蛋白形式存在。并且通过 C-端 6-His tag 与 Ni^{2+} 离子层析柱的亲和作用得到了高纯度的目的蛋白,达到了预期的目的。

作者进一步利用 Western blot 证实了 S110886 在集胞藻 6803 中为膜蛋白,但需要对细胞中 3 种膜进行进一步纯化才能够检查分布于哪种膜上。由于每天 5min 的短时光照即可激活集胞藻 PCC6803 的异养生长,在研究 *s110886* 的表达是否受光调控的实际操作中,对于光照时间的严格控制尤为重要。在达到光照时间后,作者使用红霉素即刻阻止蛋白合成,同时注意在离心收集细胞等过程中避免光照,从而使这一问题获得解决。本研究结果显示 S110886 本身的表达水平并不受光照影响,因而是一个稳定存在的 LAHG 必需蛋白。

集胞藻 PCC6803 基因组中共有 43 个组氨酸激酶和 38 个反应调节蛋白[15],其中 *s111629* 可能参与蓝光感应[16]。此外也有人认为 *slr1694* 基因是一个蓝光感受器[17]。S110886 可能通过与光感受器蛋白作用将其感应到的蓝光信号传递下去,与异养代谢或细胞分裂等活动有关的蛋白相作用,激活其异养生长。基因的系统插入失活能提供有关基因功能的最直接的证据。通过对蓝藻光感受体基因逐个插入失活,将可能弄清其中负责 LAHG 的基因。

参考文献:

[1] Bryant D A, The molecular biology of cyanobacteria [C]. Dordrench/Boston/London: Kluwer Academic Publishers. 1994

[2] Anderson S L, McIntosh 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] Kong R, Xu X, Hu Z. A TPR-family membrane protein gene is required for light-activated heterotrophic growth of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 [J]. *FEMS Microbiol Lett*. 2003, **219**: 75—79

[4] Das A K, Cohen P W, Barford D. The structure of the tetratricopeptide repeats of protein phosphatase 5: implications for TPR-mediated protein-protein interactions [J]. *EMBO J*. 1998, **17**: 1192—1199

[5] Ma Q, Whitlock J P Jr. A novel cytoplasmic protein that interacts with the Ah receptor, contains tetratricopeptide repeat motifs, and augments the transcriptional response to 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin [J]. *J Biol Chem*. 1997, **272**: 8878—8884

[6] Williams J G K. Construction of specific mutation in the Potosysterm Ⅱ photosynthetic reaction center by genetic engineering methords 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] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular Cloning: a laboratory manual, 2nd edition [C]. New York: Cold Spring Habor Laboratory Press. 1989

[9] Kruger N J. The Bradford method for protein quantitation. Walker JM. The protein protocols handbook, 2nd edition [C]. New Jersey: Humana Press Inc. 2002. 15—21

[10] Kong R Q, Xu X D, Wang Y Q. Molecular genetics of cyanobactria: the dacade after last review [J]. *ACTA Hydrobibologica Sinica*. 2001, **25**: 620—630 [孔任秋,徐旭东,王业勤. 蓝藻分子遗传学又十年. 水生生物学报. 2001,**25**:620—630]

[11] Bhaya D, Takahashi A, Grossman A R. Light regulation of type Ⅳ pilus-dependent motility by chemosensor-like elements in *Synechocystis* PCC6803 [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001, **98**: 7540—7545

[12] Bhaya D, Watanabe N, Ogawa T, Grossman AR. The role of an alternative sigma factor in motility and pilus formation in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC6803 [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999, **96**: 3188—3193

[13] Terauchi K, Ohmori M. Blue light stimulates cyanobacterial motility via a cAMP signal transduction system [J]. *Mol Microbiol*. 2004, **52**: 303—309

[14] Bhaya D, Bianco NR, Bryant D, Grossman A. Type Ⅳ pilus biogenesis and motility in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC6803 [J]. *Mol Microbiol*. 2000, **37**: 941—951

[15] Mizuno T, Kaneko T, Tabata S. Compilation of all genes encoding bacterial two-component signal transducers in the genome of the cyanobacterium, *Synechocystis* sp. strain PCC6803 [J]. *DNA Res*. 1996, **3**: 407—414

[16] Hitomi K, *et al*. Bacterial cryptochrome and photolyase: characterization of two photolyase-like genes of *Synechocystis* sp. PCC6803 [J]. *Nucleic Acids Res*. 2000. **28**: 2353—2362

[17] Masuda S, Hasegawa K, Ishii A, Ono TA. Light-induced structural changes in putative blue-light receptor with a novel FAD binding fold sensor of blue-light using FAD (BLUF); Slr1694 of *Synechocystis* sp. PCC6803 [J]. *Biochemistry*. 2004, **43**: 5304—5313

STUDIES ON s110886, A GENE ESSENTIAL TO LIGHT-ACTIVATED HETEROTROPHIC GROWTH IN SYNECHOCYSTIS SP. PCC6803

LIU Zhao-Ying[1,2], XU Xu-Dong[1] and KONG Ren-Qiu[1]

(1. *Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan* 430072;
2. *Graduate School of Chinese Academy of Sciences, Beijing* 100049)

Abstract: *Synechocystis* sp. PCC6803 is able to grow on glucose in complete darkness with a daily stimulation of short and weak light, which is called light activated heterotrophic growth (LAHG). By random insertion of a kanamycin-resistance cassette into *Hae* Ⅲ or *Alu* Ⅰ sites of the genome, a mutant library of *Synechocystis* sp. PCC6803 was constructed. From this library, 3 mutants incapable of LAHG but similar to wild type in autotrophic, mixotrophic and phototrophic growth were selected. Inverse PCR and sequence determination showed that all the insertion were at a *Hae* Ⅲ (GGCC, 666-669Nt.) site of *s110886*. *s110886* without its N-terminal trans-membrane encoding sequence was generated by PCR, cloned into pET21b and expressed in *E. coli* BL21 (DE3). The expressed product, found in the soluble fraction, was purified with the assistance of its C-terminal His. Tag and used to prepare the rabbit antiserum against S110886. Western Blot was employed to investigate the presence of S110886 in membrane or soluble protein fraction of the cyanobacterium, and it was found to be a membrane protein. Using total membrane from cells with different periods of light exposure, the expression of *s110886* was examined and found to be non-responsive to illumination. We conclude that *s110886* is essential to LAHG and not induced by light.

Key words: *Synechocystis* sp.; LAHG; *s110886*; Expression