

网络出版时间:2016-05-03 14:05

DOI:10.13207/j.cnki.jnwafu.2016.06.022

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/61.1390.S.20160503.1405.044.html>

# 鱼腥藻 PCC 7120 基因 *alr0267* 敲除及其功能的初步研究

曹必溥<sup>a</sup>, 傅雪琳<sup>b</sup>, 蔡晓丹<sup>a</sup>, 何平<sup>a</sup>

(华南农业大学<sup>a</sup> 生命科学学院 广东省农业生物蛋白质功能与调控重点实验室, <sup>b</sup> 农学院, 广东 广州 510642)

**[摘要]** 【目的】敲除鱼腥藻 PCC 7120 的 *alr0267* 基因, 并对其功能进行初步研究。【方法】克隆获得鱼腥藻 PCC 7120 *alr0267* 基因部分片段, 通过构建敲除载体, 使其与目的基因发生单交换同源重组, 从而将鱼腥藻 PCC 7120 中的 *alr0267* 基因敲除, 并对敲除体进行纯化和 PCR 鉴定, 然后对 *alr0267* 敲除体和野生型固氮异形胞进行形态观察和统计, 同时采用实时荧光定量 PCR, 在培养不同时间(0, 3, 8, 24 h 和 10 d)检测野生型和 *alr0267* 基因敲除体中与异形胞功能相关基因 *all0813*、*all2736*、*alr2887* 的相对表达量。【结果】鱼腥藻 PCC 7120 *alr0267* 基因被成功敲除; 在缺氮条件下培养 6~12 d, 敲除体异形胞营养细胞数的均值明显少于野生型; 实时定量 PCR 分析表明, 野生型中 *all0813*、*all2736*、*alr2887* 基因表达量均在培养 24 h 达到最大, 敲除体中这 3 个基因最大相对表达量的出现时间均有所延迟。【结论】*alr0267* 基因敲除导致异形胞分化频率增加, 同时影响异形胞的正常发育。

**[关键词]** 鱼腥藻 PCC 7120; *alr0267* 基因; 异形胞; 单交换同源重组; 实时荧光定量 PCR

**[中图分类号]** Q943.2

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1671-9387(2016)06-0157-10

## Inactivation and functions of gene *alr0267* in cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC 7120

CAO Bi-pu<sup>a</sup>, FU Xue-lin<sup>b</sup>, CAI Xiao-dan<sup>a</sup>, HE Ping<sup>a</sup>

(<sup>a</sup> Guangdong Provincial Key Laboratory of Protein Function and Regulation in Agricultural Organisms, College of Life Sciences, <sup>b</sup> College of Agriculture, South China Agricultural University, Guangzhou, Guangdong 510642, China)

**Abstract:** 【Objective】The gene *alr0267* was knocked out in *Anabaena* sp. PCC 7120 and its function was studied preliminarily. 【Method】The fragment of *alr0267* gene of *Anabaena* sp. PCC 7120 was cloned and knock-out vector was constructed. The *alr0267* gene was inactivated by single-crossover homologous integration. The mutant of *alr0267* gene was purified and identified by PCR. Then, the morphology of nitrogen-fixing heterocyst from both the mutant and wild-type was observed and counted. The relative expression of related genes *all0813*, *all2736* and *alr2887* in wild-type and the mutant were measured at different incubation times (0, 3, 8, 24 h and 10 d) using real-time PCR. 【Result】The *alr0267* gene of *Anabaena* sp. PCC 7120 was inactivated successfully. After 6–12 days nitrogen-absent culturing, the average number of vegetative cells in heterocysts of mutant was significantly less than that in wild-type. The maximum relative expressions of *all0813*, *all2736*, and *alr2887* in the wild-type were detected by real-time PCR 24 h after nitrogen-absent culturing while the time was delayed in the mutant. 【Conclusion】The inactivation of

**[收稿日期]** 2014-10-24

**[基金项目]** 广东省自然科学基金项目(S2013010013184); 公益性行业(农业)科研专项(201003021); 国家自然科学基金项目(50977041)

**[作者简介]** 曹必溥(1988—), 男, 湖南泸溪人, 硕士, 主要从事蛋白质、酶学与酶工程研究。E-mail: caobipu@163.com

**[通信作者]** 何平(1967—), 男, 安徽枞阳人, 副教授, 博士, 硕士生导师, 主要从事蛋白质、酶学与酶工程研究。E-mail: phe@scau.edu.cn

*alr0267* gene increased the frequency of heterocyst and affected the development of heterocyst.

**Key words:** *Anabaena* sp. PCC 7120; *alr0267* gene; heterocyst; single-crossover homologous integration; real-time PCR

鱼腥藻 PCC 7120 (*Anabaena* sp. PCC 7120) 是一种能固氮的丝状蓝藻,其在缺氮环境下,沿着丝体每隔一定数量的营养细胞即可分化出一个固氮细胞,此固氮细胞被称作异形胞。当鱼腥藻 PCC 7120 被置于缺氮环境中时,细胞内的  $\alpha$ -酮戊二酸开始积累<sup>[1-2]</sup>,即使在加氮环境下,人为地增加蓝藻细胞内的  $\alpha$ -酮戊二酸也能诱导异形胞的形成<sup>[1]</sup>。NtcA 和 HetR 是异形胞形成的主要调节因子, NtcA 能诱导 *ntcA* 表达,也能诱导 *hetR* 的表达<sup>[3]</sup>;当  $\alpha$ -酮戊二酸大量存在时, NtcA 结合 DNA 的能力明显增强<sup>[4]</sup>。HetR 是一种带有 DNA 结合位点的自我降解蛋白酶<sup>[5-6]</sup>,其主要功能是促进 NtcA 的进一步富集,对 *hetR* 进行敲除后,蓝藻细胞不能形成异形胞,但当其过量表达时,异形胞出现的频率明显升高<sup>[7-8]</sup>。

异形胞的糖脂层具有阻止氧气渗入的作用,其对异形胞行使固氮功能具有重要作用<sup>[9]</sup>。虽然对糖脂层和多糖层合成有关的酶<sup>[10-12]</sup>已有了解,但对糖脂被转运到外膜的过程和机制却并不清楚。研究者一致认为,ABC 型转运蛋白是异形胞糖脂层形成过程中所必需的一种转运蛋白<sup>[13-14]</sup>。大肠杆菌中的 TolC 是一个贯穿细胞周质空间而连接内外膜的通道蛋白,参与着毒素分泌和药物的外排<sup>[15]</sup>。Moslavac 等<sup>[16]</sup>曾在异形胞的外膜中鉴定出与大肠杆菌 TolC 相似的异形胞糖脂沉淀蛋白 D(HgdD),将 *hgdD* 敲除后,异形胞不能形成糖脂层<sup>[17]</sup>。Moslavac<sup>[18]</sup>推测鱼腥藻 PCC 7120 TolC(Alr2887)的膜外结合底物可能为 All2736 和 Alr0267,但其在鱼腥藻 PCC 7120 外膜蛋白中检测到了 All2736 与 Alr2887 (HgdD)组成的复合蛋白,且 All2736 是 Alr2887 膜外结合底物的可能性更大<sup>[19]</sup>。Black 等<sup>[20]</sup>通过化学诱变发现基因 *hglK*(*all0813*)与异形胞糖脂层形成相关,但并不参与糖脂的合成,其主要功能是将糖脂定位在膜外。Staron 等<sup>[21]</sup>将 *devBCA* 操纵子或 *tolC*(*hgdD*)敲除后,发现异形胞都不能形成糖脂层,经过蛋白质的相互作用,发现 DevBCA 和 TolC 组合成了一种由 ATP 驱动的外排泵,负责将糖脂运输到膜外。本实验室曾对鱼腥藻 PCC 7120 的胞外蛋白进行了研究,对比加氮和缺氮条件下胞外蛋白的差异,发现 Alr0267 是缺氮条件下所独有的高丰度蛋白。本研究采用单交换同源重组方法敲除

*alr0267* 基因,观察鱼腥藻 PCC 7120 野生型和 *alr0267* 基因敲除体细胞形态及异形胞数量的变化,并对异形胞形成相关基因 *all0813*(*hglK*)、*all2736*、*alr2887*(*hgdD*)进行荧光定量 PCR 检测,以期深入了解 *alr0267* 基因的功能提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 菌株 鱼腥藻 PCC 7120 (*Anabaena* sp. PCC 7120)、*Escherichia coli* NEB 10 $\beta$ 、*Escherichia coli* HB 101[pRL623 + pRL443]、*Escherichia coli* NEB 10 $\beta$ [pZR606 (GenBank: KJ500179.1)]菌株,均由美国南达科他州立大学周阮宝教授惠赠。

1.1.2 主要试剂 DNA 凝胶回收试剂盒,购自生工生物工程有限公司;Not I、Sma I 限制性内切酶、高保真 PCR 酶 (PrimeSTAR HS DNA Polymerase)、pMD18-T 载体试剂盒(以下简称“T 载体”)、T4 DNA 连接酶,均购自 TaKaRa 公司;2 $\times$  Taq PCR Master Mix,购自北京康为世纪生物科技有限公司;质粒提取试剂盒、SuperReal PreMix Plus (SYBR Green) 试剂盒、FastQuant RT Kit (With gDNase)试剂盒,均购自天根生化科技有限公司;柱式细菌 RNAout 试剂盒,购自北京天恩泽基因科技有限公司。

### 1.2 方法

1.2.1 鱼腥藻 PCC 7120 的培养条件 使用的基础培养基为 Allen-Arnon 培养基<sup>[22]</sup>(以下简称 AA 培养基),三角瓶所装液体培养基占其注明体积的 30%(如 250 mL 的三角瓶装 75 mL 培养液),培养温度(30 $\pm$ 2)  $^{\circ}$ C,光照强度 5 600 lx(连续光照),摇床转速 110 r/min。后续试验的培养条件如无特殊说明,均与此条件相同。

1.2.2 引物设计 从蓝藻数据库(<http://genome.microbedb.jp/cyanobase/Anabaena>)中下载 *rnpB*、*alr0267*、*all0813*、*all2736*、*alr2887* 基因序列,采用 Oligo7 软件进行引物的设计,具体引物序列见表 1。

1.2.3 *alr0267* 基因片段的克隆 取 10  $\mu$ L 洗涤后的鱼腥藻 PCC 7120 菌液,于 PCR 仪中 95  $^{\circ}$ C 裂解 10 min。取裂解菌液 8  $\mu$ L,加入 5 $\times$  Taq Buffer 5  $\mu$ L, dNTPs(2.5 mmol/L) 2  $\mu$ L,上、下游引物(20

$\mu\text{mol/L}$ 各  $1 \mu\text{L}$ , 无菌水  $8 \mu\text{L}$ , 最后加入高保真 *Taq* 酶( $2.5 \text{ U}/\mu\text{L}$ ) $0.2 \mu\text{L}$ , 混匀。PCR 反应程序为: $95 \text{ }^\circ\text{C}$   $5 \text{ min}$ ; $98 \text{ }^\circ\text{C}$   $10 \text{ s}$ , $55 \text{ }^\circ\text{C}$   $5 \text{ s}$ , $72 \text{ }^\circ\text{C}$   $1 \text{ min}$ ,

$30$  个循环; $72 \text{ }^\circ\text{C}$  延伸  $15 \text{ min}$ ; $10 \text{ }^\circ\text{C}$  保温。用  $1\%$  琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物, 并按 DNA 凝胶回收试剂盒说明进行目的条带的纯化回收。

表 1 研究所用 PCR 引物及其序列和用途

Table 1 Purposes and sequences of PCR primers

引物名称 Primer name	引物序列(5'→3') Sequence	用途 Purpose
HEP43	gcggccgcGTGCTAACCCAAATCCTAATCC	克隆 <i>alr0267</i> Clone <i>alr0267</i>
HEP44	cccgggGCCTGTTGTAGTGTGTTC	
HEP101	ATCAGCATCTTTGGTATCA	<i>alr0267</i> 敲除体的鉴定 Identification of <i>alr0267</i> mutant
HEP102	AAAGGCTTCACTGGTAACG	
HEP103	TCCGTATGTAGCATCACCT	
HEP203	GGAGCAAGGCCGAAGGAAGTAT	检测 <i>rnpB</i> Detect <i>rnpB</i>
HEP204	ATTGCTTTACACGAGGGCGATTA	
HEP207	CAGAAAACCCAGTCTCACCT	检测 <i>all0813</i> Detect <i>all0813</i>
HEP208	ATTCCCATTCCCTTGCTGAGTTT	
HEP209	GTGTGTCGGGTTGCGTAGTGA	检测 <i>all2736</i> Detect <i>all2736</i>
HEP210	GTGATTTGGTAAAGTTGATGGAGGAGT	
HEP211	GCCGGCAAGCATTAGCAACCT	检测 <i>alr2887</i> Detect <i>alr2887</i>
HEP212	GCCCTACGCCGACAGAATAAC	

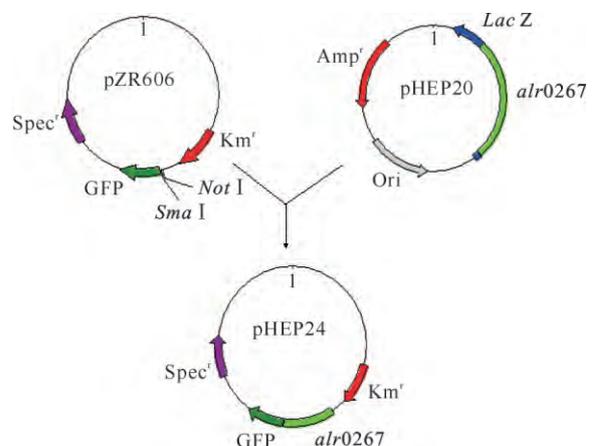
注:“gcggccgc”为 *Not* I 酶切位点,“cccggg”为 *Sma* I 酶切位点。

Note:“gcggccgc” is *Not* I cutting site,“cccggg” is *Sma* I cutting site.

1.2.4 PCR 扩增产物的克隆和鉴定 将经纯化回收的目的条带连接到 T 载体上:目的条带  $4.7 \mu\text{L}$ 、T 载体  $0.3 \mu\text{L}$ 、Solution I  $5 \mu\text{L}$ , $16 \text{ }^\circ\text{C}$  连接  $1 \text{ h}$ 。连接产物转化至 *E. coli* NEB  $10\beta$  感受态细胞中,取  $200 \mu\text{L}$  转化后的感受态细胞液涂布在含  $100 \mu\text{g}/\text{mL}$  氨苄西林(Amp)的 LB 固体培养基上, $37 \text{ }^\circ\text{C}$  过夜培养。挑选单菌落于  $40 \mu\text{L}$  无菌水中,充分混匀,取  $10 \mu\text{L}$  菌液于 PCR 仪中  $95 \text{ }^\circ\text{C}$  裂解  $10 \text{ min}$ 。取裂解菌液  $8 \mu\text{L}$ ,加入  $2\times Taq$  PCR Master Mix  $12.5 \mu\text{L}$ ,上、下游引物( $20 \mu\text{mol/L}$ )各  $1 \mu\text{L}$ ,无菌水  $2.5 \mu\text{L}$ ,总体积为  $25 \mu\text{L}$ ,混匀。PCR 反应程序为: $95 \text{ }^\circ\text{C}$   $5 \text{ min}$ ; $95 \text{ }^\circ\text{C}$   $30 \text{ s}$ , $50 \text{ }^\circ\text{C}$   $30 \text{ s}$ , $72 \text{ }^\circ\text{C}$   $55 \text{ s}$ , $30$  个循环; $72 \text{ }^\circ\text{C}$  延伸  $15 \text{ min}$ ; $10 \text{ }^\circ\text{C}$  保温。用  $1\%$  琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物,将能够扩增出预期条带的单菌落接种于  $4 \text{ mL}$  LB 液体培养基(含  $100 \mu\text{g}/\text{mL}$  Amp)中, $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 、 $200 \text{ r}/\text{min}$  摇菌过夜。选取  $2$  个单菌落的菌液送至测序公司进行序列测定,将测序结果与 *alr0267* 基因完全匹配的质粒命名为 pHEP20,将含有 pHEP20 的菌株命名为 *E. coli* NEB  $10\beta$ [pHEP20]。

1.2.5 敲除载体的构建和鉴定 使用质粒提取试剂盒提取 pZR606 和 pHEP20,然后用 *Not* I 和 *Sma* I 分别双酶切,将目的片段连接到酶切后的 pZR606 片段上,构建过程见图 1。双酶切体系为:*Sma* I  $0.2 \mu\text{L}$ ,*Not* I  $0.2 \mu\text{L}$ , $10\times T$  Buffer  $1 \mu\text{L}$ ,体积分数  $0.1\%$  BSA  $2 \mu\text{L}$ ,质粒  $16.5 \mu\text{L}$ ,混匀, $37$

$^\circ\text{C}$  保温  $3 \text{ h}$ 。 $1\%$  琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物,并按 DNA 凝胶回收试剂盒说明进行目的条带的纯化回收。取酶切后的 *alr0267* 片段  $16.5 \mu\text{L}$ 、pZR606 片段  $5 \mu\text{L}$ 、 $10\times T4$  Ligase Buffer  $2.5 \mu\text{L}$ 、T4 DNA 连接酶  $1 \mu\text{L}$ , $16 \text{ }^\circ\text{C}$  连接  $4 \text{ h}$ 。鉴定步骤同 1.2.4,但所用的抗生素为卡那霉素(Km, $50 \mu\text{g}/\text{mL}$ )。选取  $2$  个单菌落的菌液进行测序,将测序结果与 *alr0267* 基因完全匹配的质粒命名为 pHEP24,将含有 pHEP24 的菌株命名为 *E. coli* NEB  $10\beta$  [pHEP24]。

图 1 *alr0267* 基因敲除载体的构建Fig. 1 Construction of knockout vector of *alr0267* gene

1.2.6 *alr0267* 基因的敲除 将 *E. coli* NEB  $10\beta$  [pHEP24]和 *E. coli* HB 101[pRL623+pRL443]等体积混合, $37 \text{ }^\circ\text{C}$  下静置培养  $30 \text{ min}$ 。取混合菌液  $3$

$\mu\text{L}$  点在灭过菌的硝酸纤维膜上,待晾干后,在同一位置加上  $2.5 \mu\text{L}$  经超声处理成单个细胞的鱼腥藻 PCC 7120 菌液,晾干后,再将硝酸纤维膜转移到含体积分数 5% LB、无抗生素且添加氮源的 AA 固体培养基中,倒置,  $28^\circ\text{C}$  弱光培养 24 h。第 2 天将膜转移到含有  $200 \mu\text{g}/\text{mL}$  硫酸新霉素(Nm)且添加氮源的 AA 固体培养基中,正置,在  $4\ 800\sim 5\ 600\ \text{lx}$  (连续光照)光照强度下,  $28^\circ\text{C}$  培养 10 d 左右。以 *E. coli* HB 101[pRL623+pRL443]的菌液代替混合菌液作为对照,其他步骤不变。

1.2.7 *alr0267* 敲除体的纯化及 PCR 鉴定 敲除

载体进入蓝藻细胞后,与目的基因进行单交换同源重组(图 2)。

光照培养 10 d 左右,挑出生长良好的菌落,转移到 AA/8N(AA/8N 培养基表示在 AA 培养基中添加氮源,其他成分均稀释 8 倍)液体培养基(含  $100 \mu\text{g}/\text{mL}$  Nm)中培养 7 d。再用超声波打断菌丝,使其成为单个细胞,于添加氮源的 AA 固体培养基(含  $200 \mu\text{g}/\text{mL}$  Nm)中划线培养。挑出生长良好的单个菌落,通过 PCR 鉴定基因是否敲除完全,如不完全,继续重复上述纯化步骤直至敲除完全。PCR 鉴定原理如图 3 所示。

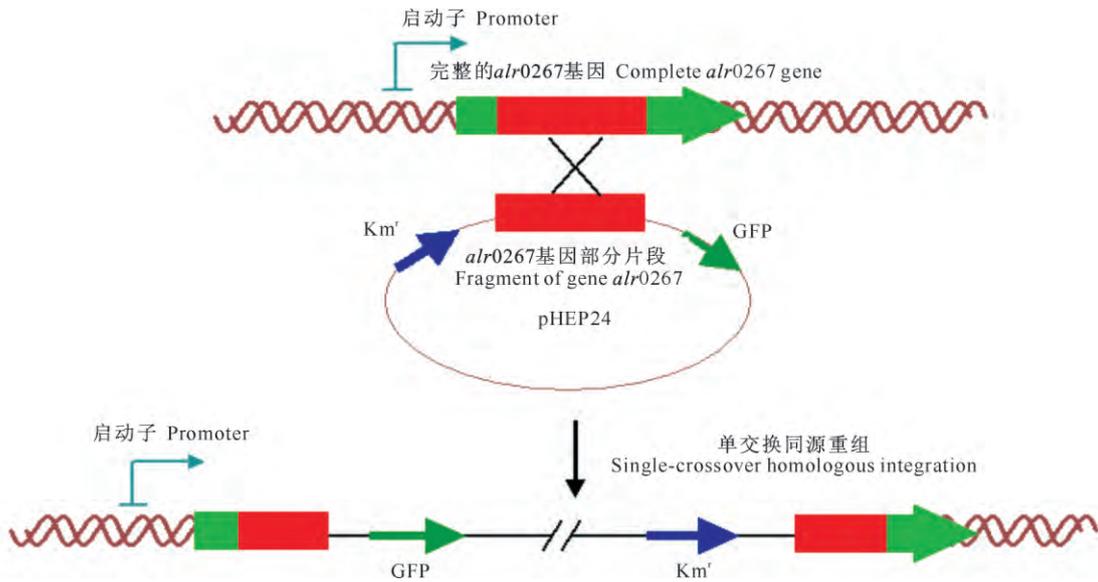


图 2 敲除载体与 *alr0267* 基因的单交换同源重组

Fig. 2 Single-crossover homologous integration of knock-out vector and *alr0267* gene

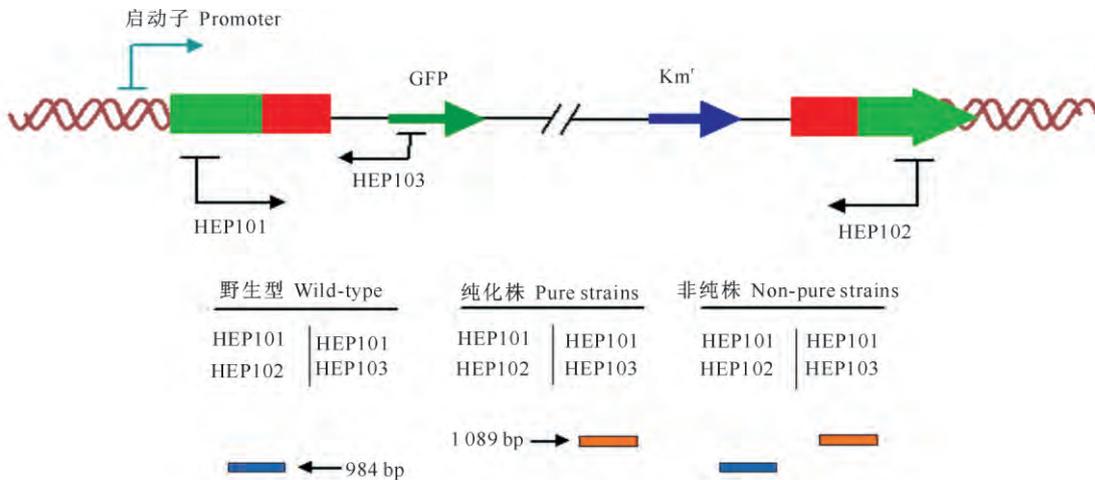


图 3 鱼腥藻 PCC7120 *alr0267* 基因敲除体的 PCR 鉴定原理示意图

引物 HEP101/102 预期扩增条带大小为 984 bp;引物 HEP101/103 预期扩增条带大小为 1 089 bp

Fig. 3 PCR verification of *Anabaena* sp. 7120 *alr0267* gene mutant

Expected size of the product of primer HEP101/102 is 984 bp;the product of primer HEP101/103 is 1 089 bp

在原基因非同源区重新设计 PCR 引物,即引物 对 HEP101/102,以设计好的 HEP101 为上游引物,

在 pZR606 中设计对应的下游引物(HEP103),组成新的引物对 HEP101/103。使用引物对 HEP101/102 进行 PCR 时,野生型和非纯株(存在一些单细胞目的基因未被敲除的蓝藻菌株)能扩增出特异性条带,而纯化株(所有单细胞的目的基因均被敲除的蓝藻菌株)却无相应条带;使用引物对 HEP101/103 进行 PCR 时,纯化株和非纯株都能扩增出特异性条带,而野生型却无相应条带。当采用 2 对引物同时 PCR 时,如果是纯化株,那么只有引物对 HEP101/103 能扩增出条带,如果是非纯株则 2 个引物对都能扩增出条带。PCR 反应体系同 1.2.4,PCR 反应程序为:95 °C 5 min;95 °C 30 s,50 °C 30 s,72 °C 65 s,30 个循环;72 °C 延伸 15 min;10 °C 保温。

1.2.8 *alr0267* 基因敲除体与野生型细胞形态的观察 将鱼腥藻 PCC7120 *alr0267* 敲除体(以  $\Delta alr0267$  表示)与野生型一同置于 AA/8 培养基(在 AA 培养基不添加氮源,其他成分均稀释 8 倍)中培养,一共培养 12 d,每隔 24 h 于超净台中取 1 mL 菌液,低速离心,去上清,用去离子水悬浮沉淀,然后用荧光显微镜观察异形胞的分化和发育,统计异形胞之间营养细胞的个数。

1.2.9 基因表达的 Real-time PCR 检测 将鱼腥藻 PCC 7120 野生型与  $\Delta alr0267$  分别置于加氮与缺氮培养基中培养,培养时间为 0,3,8,24 h 和 10 d。使用柱式细菌 RNAout 试剂盒提取蓝藻 RNA,用 FastQuant RT Kit(With gDNase)试剂盒进行 cDNA 的合成,SuperReal PreMix Plus(SYBR Green)试剂盒进行 *all0813*、*all2736*、*alr2887* 基因实时荧光定量分析,每个样品均重复检测 3 次。取已稀释 10 倍的 cDNA 模板 1  $\mu$ L,加入 RNase-free ddH<sub>2</sub>O 9  $\mu$ L,正、反向引物(20  $\mu$ mol/L)各 0.3  $\mu$ L,2 $\times$ Supper Real PreMix Plus 10  $\mu$ L,混匀。PCR 反应程序为:95 °C 15 min;95 °C 10 s,55 °C 20 s,72 °C 15 s,50 个循环;溶解曲线分析条件:起始温度 62 °C,终止温度 95 °C,升温率为 0.5 °C/5 s。本研究以 *rnpB*<sup>[23]</sup> 为内参基因,采用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法分析缺氮培养

条件下样品中的目的基因相对于加氮条件下的表达量。

### 1.3 数据处理

使用 SPSS 软件对试验数据进行 *t* 检验。

## 2 结果与分析

### 2.1 *alr0267* 基因部分片段的克隆

采用引物 HEP43/44 进行 PCR 扩增,扩增出的条带大小为 750~1 000 bp,与预期大小(834 bp)相符(图 4)。

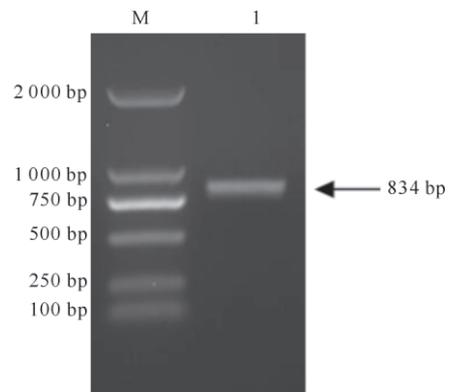


图 4 鱼腥藻 PCC 7120 *alr0267* 基因部分片段的 PCR 扩增

M. DNA Marker;1. *alr0267* 部分克隆片段

Fig. 4 PCR amplification of *Anabaena* sp. 7120 *alr0267* gene fragment

M. DNA Marker;1. DNA fragment of *alr0267*

### 2.2 *alr0267* 克隆片段及其敲除载体的鉴定

将连接到 T 载体的转化子进行菌落 PCR 检测,结果(图 5)显示,所挑取的 10 个单菌落都扩增出了预期条带(834 bp);选取 2 个扩增出预期条带的转化子进行测序,发现测序结果与 *alr0267* 基因的比对结果完全匹配(文中未列出)。将连接到 pZR606 的转化子进行菌落 PCR 检测,结果(图 6)显示,所挑取的 6 个单菌落都扩增出了预期条带(834 bp);选取 2 个扩增出预期条带的转化子进行测序,发现测序结果与 *alr0267* 基因的比对结果也完全匹配(文中未列出)。

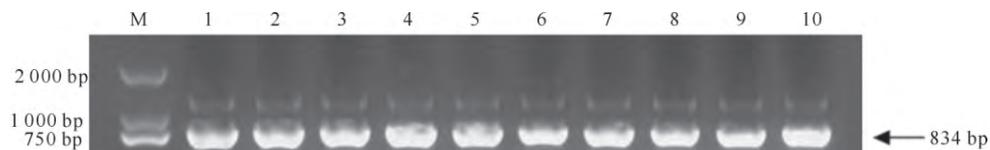


图 5 鱼腥藻 PCC 7120 *alr0267* 基因连接 T 载体后的 PCR 检测

M. DNA Marker;1~10. 连接到 T 载体后的转化子,预期条带大小为 834 bp

Fig. 5 PCR detection of T vector clone of *Anabaena* sp. 7120 *alr0267* gene

M. DNA Marker;1-10. Transformants, the product of PCR was 834 bp

### 2.3 *alr0267* 敲除体的纯化及 PCR 鉴定

将经转化处理的鱼腥藻 PCC 7120 置于添加氮源的 AA 固体培养基(含  $100 \mu\text{g}/\text{mL}$  Nm)中培养 15 d 后,对照组未见蓝藻菌斑,而试验组有蓝藻菌斑形成,表明敲除载体已整合到蓝藻细胞的基因组中,使其获得了抗性(图 7)。纯化 3 次后,经 PCR 鉴定(图

8)发现,野生型采用引物 HEP101/102 能扩增出预期的条带,而采用引物 HEP101/103 却不能扩增出预期的条带;敲除体采用引物 HEP101/102 不能扩增出预期的条带,而采用引物 HEP101/103 却能扩增出预期的条带。综上可知,*alr0267* 基因已被敲除且敲除体已纯化。

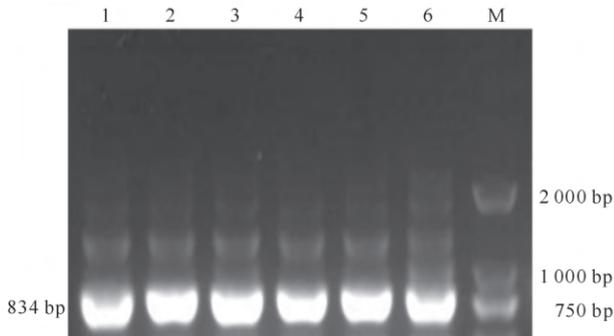


图 6 鱼腥藻 PCC 7120 *alr0267* 基因敲除载体的 PCR 检测

M. DNA Marker; 1~6. 连接 pZR606 的转化子, 预期条带大小为 834 bp

Fig. 6 PCR detection of knockout vector of

*Anabaena* sp. 7120 *alr0267* gene

M. DNA Marker; 1-6. Transformants, the product of PCR was 834 bp

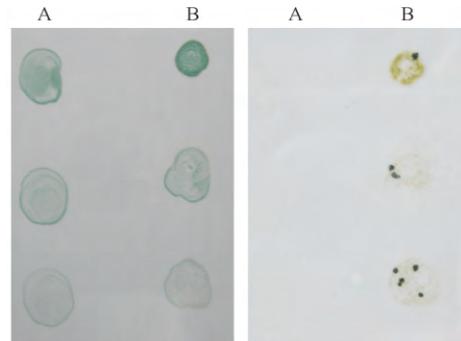


图 7 *alr0267* 基因的敲除

A 为对照组, B 为试验组; 左图为培养起始阶段,

右图为培养 15 d 后; 从上至下顶部为稀释 2 倍的蓝藻菌液, 中部为稀释 4 倍的蓝藻菌液, 底部为稀释 8 倍的蓝藻菌液

Fig. 7 Inactivation of *alr0267* gene

A. Control, B. Experiment group; Left. Initial training phase, Right.

After 15 days; The top of picture was diluted by two times, the middle of picture was diluted by four times, and the bottom of picture was diluted by eight times

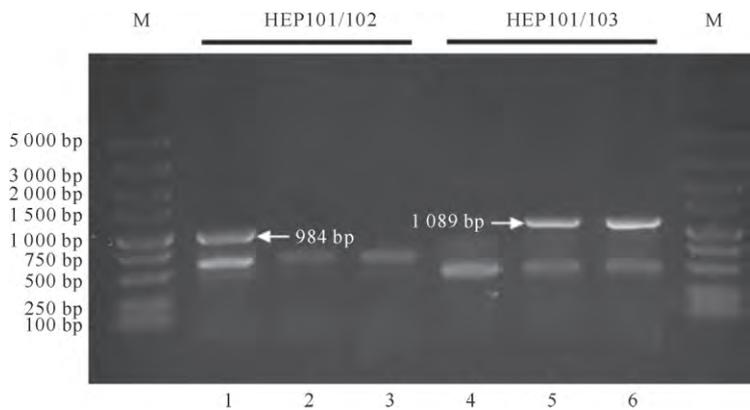


图 8 鱼腥藻 PCC 7120  $\Delta alr0267$  的 PCR 鉴定

M. DNA Marker; 1, 4. 野生型; 2, 5. 敲除体 I; 3, 6. 敲除体 II

Fig. 8 PCR verification of mutant of  $\Delta alr0267$

M. DNA Marker; 1, 4. Wild-type; 2, 5. Mutant I; 3, 6. Mutant II

### 2.4 *alr0267* 基因敲除体与野生型异形胞的观测

鱼腥藻 PCC 7120 的营养细胞需要进行光合作用, 而藻胆蛋白在蓝藻中主要承担着光的吸收, 在蓝色激发光下能发出红色荧光<sup>[9]</sup>。成熟异形胞的主要功能是固氮, 而氧气能抑制固氮酶的活性<sup>[9]</sup>, 故在成熟的异形胞中藻胆蛋白的量很少, 成熟异形胞在蓝

色激发光下所发出的红色荧光很弱甚至观察不到。在缺氮条件下, 蓝藻细胞会降解已有的藻胆蛋白来补充氮源<sup>[9]</sup>, 这会导致营养细胞藻胆蛋白含量下降, 所发的红色荧光将会减弱。从图 9 可见, 在缺氮条件下培养 24 h 后, 野生型鱼腥藻 PCC 7120 的异形胞开始成熟; 野生型与  $\Delta alr0267$  的营养细胞所发的

红色荧光有弱有强,很不均匀,且野生型的异形胞为椭圆形,而  $\Delta alr0267$  的则近似为圆形;野生型的营养细胞比  $\Delta alr0267$  的大, $\Delta alr0267$  的营养细胞较

为短小。缺氮培养 48 h 后,野生型和  $\Delta alr0267$  异形胞的形态趋于相同。

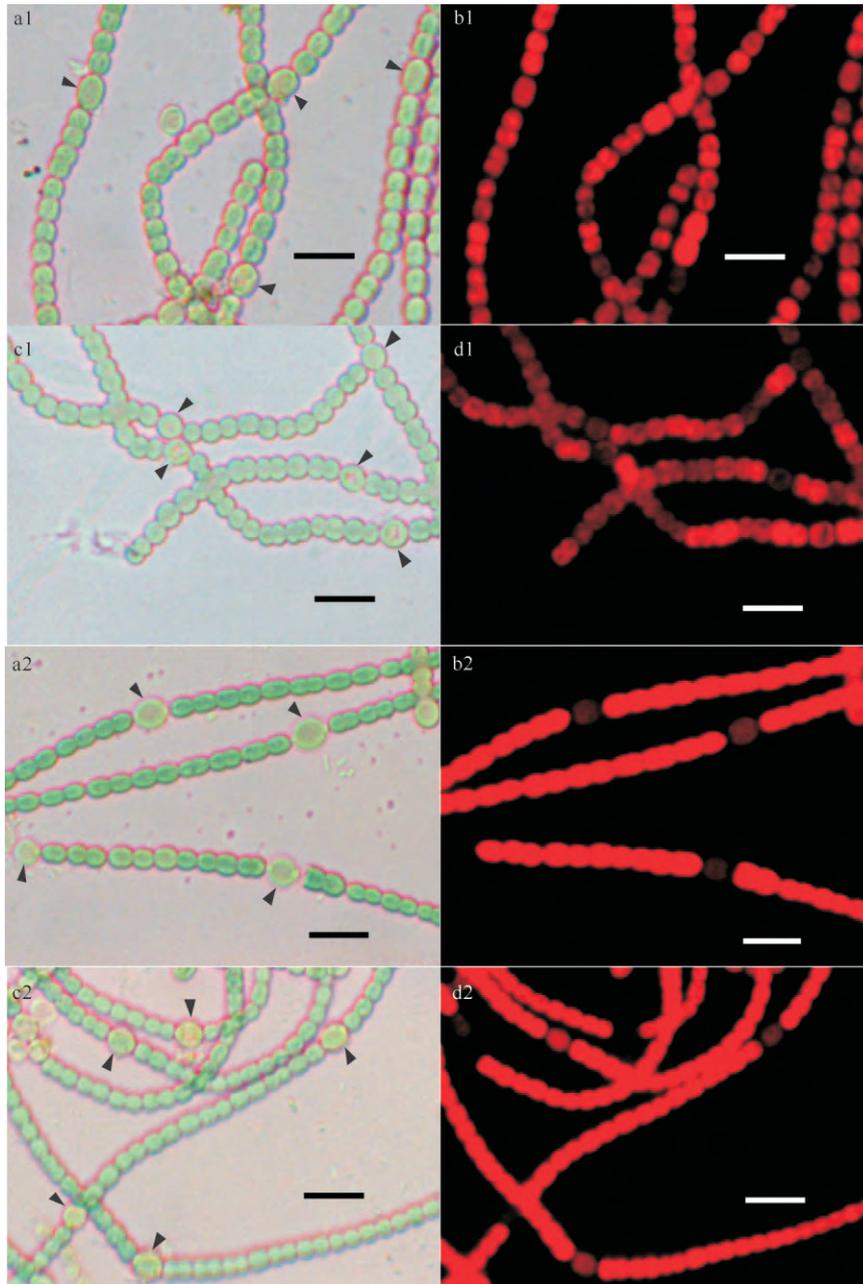


图 9 鱼腥藻 PCC 7120 野生型与  $\Delta alr0267$  缺氮培养后的细胞形态观察

a、b 为野生型;c、d 为  $\Delta alr0267$ ;a、c 在缺氮条件下培养;b、d 在蓝光下激发;  
字母后的数字表示培养时间(d);箭头所指为异形胞;标尺为 10  $\mu\text{m}$

Fig. 9 Cell morphology of wild-type and  $\Delta alr0267$  in nitrogen-absent medium

a and b are wild type,c and d are  $\Delta alr0267$ ;a and c are cultured in nitrogen-absent medium,b and d emit red fluorescence under blue excitation light;The numbers after the letters indicate the culturing days;Arrows indicate heterocyst;The scale bar is 10  $\mu\text{m}$

对鱼腥藻 PCC 7120 野生型和  $\Delta alr0267$  异形胞之间营养细胞数的均值进行 *t* 检验,结果表明,在培养的 1~4 d,二者的差异达极显著水平 ( $P < 0.001$ );5 d 时  $P=0.136$ ,差异不显著;6~12 d 时二

者具有极显著差异 ( $P < 0.001$ )。由表 2 可知,鱼腥藻 PCC 7120 野生型和  $\Delta alr0267$  在缺氮条件下培养 1~4 d,两者异形胞之间营养细胞数的均值差异虽然达到极显著水平,但均值不稳定;5 d 后,营养细胞

数均值的差异越来越明显且很稳定,野生型的均值始终大于  $\Delta alr0267$ 。且培养 5 d 后,  $\Delta alr0267$  异形胞之间营养细胞数的均值增加缓慢,而野生型却还

在不断增加。

上述结果表明,  $alr0267$  基因的敲除影响了异形胞的正常发育。

表 2 鱼腥藻 PCC 7120 野生型与  $\Delta alr0267$  异形胞之间营养细胞数的比较  
Table 2 Comparison of numbers of vegetative cells between heterocysts of *Anabaena* sp. PCC 7120  $\Delta alr0267$  and wild-type

时间/d Time	$\Delta alr0267$			野生型 Wild type			显著性分析 Significance analysis
	平均细胞数 Average number of cells	标准方差 Standard deviation	样本数 Number of samples	平均细胞数 Average number of cells	标准方差 Standard deviation	样本数 Number of samples	
1	13	4	82	19	9	180	***
2	17	6	158	14	6	110	***
3	19	6	153	21	8	135	***
4	16	6	151	24	11	167	***
5	22	8	165	21	8	191	
6	22	8	119	27	10	144	***
7	23	8	105	32	12	122	***
8	24	9	128	32	12	164	***
9	25	8	260	35	14	140	***
10	25	9	198	32	12	164	***
11	26	9	179	36	15	112	***
12	26	9	163	37	16	116	***

注:表中标准方差为平均细胞数的标准方差,样本数为以异形胞为端点的蓝藻菌丝段数;\*\*\*表示  $P < 0.001$ 。

Note: The standard deviation refers to the average number of cells. The number of samples are the number of cyanobacteria segments between the heterocysts; \*\*\* means  $P < 0.001$ .

2.5 *all0813*, *all2736*, *alr2887* 基因表达的检测

鱼腥藻 PCC 7120 野生型和  $\Delta alr0267$  在培养

0, 3, 8, 24 h 和 10 d 时, *all0813*, *all2736*, *alr2887* 基因 mRNA 表达的 Real-time PCR 检测结果见图 10。

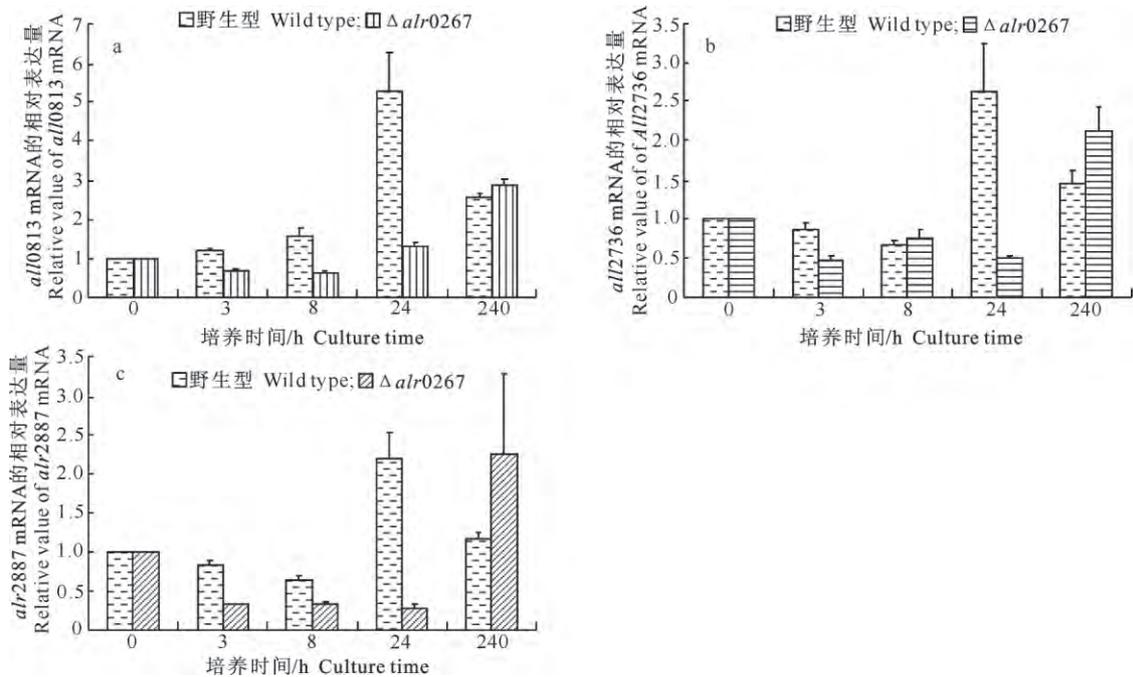


图 10 鱼腥藻 PCC 7120 野生型与  $\Delta alr0267$  中 *all0813*, *all2736*, *alr2887* 基因表达的实时定量分析  
Fig. 10 Real-time quantitative analysis of gene *all0813*, *all2736*, and *alr2887* of wild-type and  $\Delta alr0267$  of *Anabaena* sp. PCC 7120

由图 10-a 可见,鱼腥藻 PCC 7120 野生型的 *all0813* 基因相对表达量于培养 3 h 开始上升,24 h 达到最大;  $\Delta alr0267$  在培养 3, 8 和 24 h 的相对表达

量逐步上升,但均维持在较低水平,于培养 10 d 时达到最大值;24 h 时二者 *all0813* 基因相对表达量的差值达到最大,且  $\Delta alr0267$  的相对表达量极显著

低于野生型( $P < 0.01$ )。

鱼腥藻 PCC 7120 *all2736* 基因和 *alr2887* 基因的相对表达量变化相似(图 10-b, c),在野生型中均以培养 3,8 h 时相对表达量较低,于培养 24 h 达到最大值。在  $\Delta alr0267$  中,培养 3,8 和 24 h 的相对表达量基本没有变化,且均维持在较低水平,于培养 10 d 达到最大值;但二者培养 24 h 时相对表达量的差值最大,且  $\Delta alr0267$  的相对表达量极显著低于野生型( $P < 0.01$ )。

综上所述, *all0813*、*all2736*、*alr2887* 在 PCC 7120 野生型中的最大相对表达量都出现在培养 24 h,而此时  $\Delta alr0267$  中的相对表达量均维持在较低水平,最大相对表达量出现时间明显推后,表明 *alr0267* 的敲除影响了 *all0813*、*all2736*、*alr2887* 的正常表达。

### 3 讨论与结论

Ehira 等<sup>[11]</sup>分析了缺氮条件下鱼腥藻 PCC 7120 基因组的表达情况,将缺氮培养 24 h 内基因的表达分为三大类,即 3,8 和 24 h 表达簇,他发现在缺氮条件下培养 24 h 时,与异形胞糖脂层形成有关的基因 *hglE*、*hglD*、*hglC* 出现高表达。*all0813*、*all2736*、*alr2887* 基因与异形胞糖脂层形成相关<sup>[17-20]</sup>,其中 *alr2887* (HgdD) 作为一种外排泵,参与次生代谢产物的外排以及蓝藻抗药性的形成<sup>[24]</sup>,并参与 *alr0267* 的分泌<sup>[25]</sup>。在缺氮培养条件下,鱼腥藻 PCC 7120 野生型的 *all0813*、*all2736*、*alr2887* 基因均在培养 24 h 时达到最大值,表明其均属于 24 h 表达簇。而在  $\Delta alr0267$  中,由于 *alr0267* 被敲除,*all0813*、*all2736* 和 *alr2887* 最大相对表达量出现时间明显延迟。Paulo 等<sup>[26]</sup>发现,*alr0267* 的突变体不能形成正常的糖脂层,故当 *alr0267* 被敲除时,糖脂层的构建受阻,从而阻遏了与糖脂层形成相关基因 *all0813* (*hglK*)、*all2736* 和 *alr2887* (*hgdD*) 的正常转录与翻译。

本研究结果表明,缺氮培养 6~12 d,异形胞在敲除体中出现的频率明显高于野生型。对 *alr0267* 基因序列进行分析发现,在 *alr0267* 起始密码子上游 58 位点处存在与 NtcA 结合的位点 TGTTN<sub>9</sub>ACA<sup>[27]</sup>,而 NtcA 是异形胞形成的主要调节因子<sup>[3]</sup>。*alr0267* 基因的敲除可能增强了 NtcA 的调节能力,使异形胞出现频率增加。可见 *alr0267* 能影响鱼腥藻 PCC 7120 异形胞的形成频率,且将其敲除后会影响异形胞的正常发育。

### [参考文献]

- [1] Li J H, Laurent S, Konde V, et al. An increase in the level of 2-oxoglutarate promotes heterocyst development in the cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120 [J]. *Microbiology*, 2003, 149(11): 3257-3263.
- [2] Laurent S, Chen H, Bédu S, et al. Non metabolizable analogue of 2-oxoglutarate elicits heterocyst differentiation under repressive conditions in *Anabaena* sp. PCC 7120 [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2005, 102(28): 9907-9912.
- [3] Herrero A, Muro-Pastor A M, Flores E. Nitrogen control in cyanobacteria [J]. *Journal of Bacteriology*, 2001, 183(2): 411-425.
- [4] Vázquez-Bermúdez M F, Herrero A, Flores E. 2-Oxoglutarate increases the binding affinity of the NtcA (nitrogen control) transcription factor for the *Synechococcus* *glnA* promoter [J]. *FEBS Letters*, 2002, 512(1): 71-74.
- [5] Zhou R, Wei X, Jiang N, et al. Evidence that HetR protein is an unusual serine-type protease [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1998, 95(9): 4959-4963.
- [6] Huang X, Dong Y, Zhao J. HetR homodimer is a DNA-binding protein required for heterocyst differentiation, and the DNA-binding activity is inhibited by PatS [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2004, 101(14): 4848-4853.
- [7] Buikema W J, Haselkorn R. Characterization of a gene controlling heterocyst differentiation in the cyanobacterium *Anabaena* 7120 [J]. *Genes & Development*, 1991, 5(2): 321-330.
- [8] Buikema W J, Haselkorn R. Expression of the *Anabaena* *hetR* gene from a copper-regulated promoter leads to heterocyst differentiation under repressing conditions [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2001, 98(5): 2729-2734.
- [9] Bryant D A. *The molecular biology of cyanobacteria* [M]. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1994: 139-216, 769-823.
- [10] Bauer C C, Ramaswamy K S, Endley S, et al. Suppression of heterocyst differentiation in *Anabaena* PCC 7120 by a cosmid carrying wild-type genes encoding enzymes for fatty acid synthesis [J]. *FEMS Microbiology Letters*, 1997, 151(1): 23-30.
- [11] Ehira S, Ohmori M, Sato N. Genome-wide expression analysis of the responses to nitrogen deprivation in the heterocyst-forming cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120 [J]. *DNA Research*, 2003, 10(3): 97-113.
- [12] Fan Q, Huang G, Lechno Yossef S, et al. Clustered genes required for synthesis and deposition of envelope glycolipids in *Anabaena* sp. strain PCC 7120 [J]. *Molecular Microbiology*, 2005, 58(1): 227-243.
- [13] Fiedler G, Arnold M, Hannus S, et al. The DevBCA exporter is essential for envelope formation in heterocysts of the cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120 [J]. *Molecular Microbiology*, 1998, 27(6): 1193-1202.
- [14] Genevrois S, Steeghs L, Roholl P, et al. The Omp85 protein of *Neisseria meningitidis* is required for lipid export to the outer membrane [J]. *The EMBO Journal*, 2003, 22(8): 1780-1789.
- [15] Andersen C, Hughes C, Koronakis V. Chunnel vision [J].

- EMBO Reports, 2000, 1(4): 313-318.
- [16] Moslavac S, Bredemeier R, Mirus O, et al. Proteomic analysis of the outer membrane of *Anabaena* sp. strain PCC 7120 [J]. Journal of Proteome Research, 2005, 4(4): 1330-1338.
- [17] Moslavac S, Nicolaisen K, Mirus O, et al. A TolC-like protein is required for heterocyst development in *Anabaena* sp. strain PCC 7120 [J]. Journal of Bacteriology, 2007, 189(21): 7887-7895.
- [18] Moslavac S. Outer membrane proteins of *Anabaena* sp. strain PCC 7120 [D]. München: Ludwig-Maximilians-Universität, 2007.
- [19] Moslavac S, Reisinger V, Berg M, et al. The proteome of the heterocyst cell wall in *Anabaena* sp. PCC 7120 [J]. Biological Chemistry, 2007, 388(8): 823-830.
- [20] Black K, Buikema W J, Haselkorn R. The *hglK* gene is required for localization of heterocyst-specific glycolipids in the cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120 [J]. Journal of Bacteriology, 1995, 177(22): 6440-6448.
- [21] Staron P, Forchhammer K, Maldener I. Novel ATP-driven pathway of glycolipid export involving TolC protein [J]. Journal of Biological Chemistry, 2011, 286(44): 38202-38210.
- [22] Allen M B, Arnon D I. Studies on nitrogen-fixing blue-green algae: II. The sodium requirement of *Anabaena* cylindrical [J]. Physiologia Plantarum, 1955, 8(3): 653-660.
- [23] Nicolaisen K, Moslavac S, Samborski A, et al. Valdebenito M Alr0397 is an outer membrane transporter for the siderophore schizokinen in *Anabaena* sp. strain PCC 7120 [J]. Journal of Bacteriology, 2008, 190(22): 7500-7507.
- [24] Hahn A, Stevanovic M, Mirus O, et al. The TolC-like protein HgdD of the cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC 7120 is involved in secondary metabolite export and antibiotic resistance [J]. J Biol Chem, 2012, 287: 41126-41138.
- [25] Hahn A, Stevanovic M, Brouwer E, et al. Secretome analysis of *Anabaena* sp. PCC 7120 and the involvement of the TolC-homologue HgdD in protein secretion [J]. Environmental Microbiology, 2015, 17(3): 767-780.
- [26] Paulo O, Filipe P, Catarina C, et al. HesF, an exoprotein required for filament adhesion and aggregation in *Anabaena* sp. PCC 7120 [J]. Environmental Microbiology, 2015, 17(5): 1631-1648.
- [27] Jiang F, Wisén S, Widersten M, et al. Examination of the transcription factor NtcA-binding motif by *in vitro* selection of DNA sequences from a random library [J]. Journal of Molecular Biology, 2000, 301(4): 783-793.

.....

(上接第 156 页)

- [15] Vermeil M, Guermann B, Delage L, et al. A family of RRM-type RNA-binding proteins specific to plant mitochondria [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2002, 99(9): 5866-5871.
- [16] 陈万利, 刘宗旨, 李文华. 植物富含甘氨酸蛋白质 (GRP) 及其基因研究进展 [J]. 东北农业大学学报, 2005, 36(4): 512-519. Chen W L, Liu Z Z, Li W H. Plant RNA binding proteins and its genetic research progress [J]. Journal of Northeast Agricultural University, 2005, 36(4): 512-519. (in Chinese)
- [17] Hanano S, Sugita M, Sugiura M. Isolation of a novel RNA-binding protein and its association with a large ribonucleoprotein particle present in the nucleoplasm of tobacco cells [J]. Plant Molecular Biology, 1996, 31(1): 57-68.
- [18] Van Nocker S, Vierstra R D. Two cDNA from *Arabidopsis thaliana* encode putative RNA-binding proteins containing glycine-rich domains [J]. Plant Molecular Biology, 1993, 21(4): 695-699.
- [19] Kim J S, Jung H J, Lee H J, et al. Glycine-rich RNA-binding protein 7 affects abiotic stress responses by regulating stomata opening and closing in *Arabidopsis thaliana* [J]. The Plant Journal, 2008, 55(3): 455-466.
- [20] Kwak K J, Kim Y O, Kang H. Characterization of transgenic *Arabidopsis* plants overexpressing GR-RBP4 under high salinity, dehydration, or cold stress [J]. Journal of Experimental Botany, 2005, 56(421): 3007-3016.
- [21] Kim J S, Park S, Kwak K J, et al. Cold shock domain proteins and glycine-rich RNA-binding proteins from *Arabidopsis thaliana* can promote the cold adaptation process in *E. coli* [J]. Nucleic Acids Research, 2006, 35(2): 506-516.
- [22] Gao F, Zhou Y J, Zhu W P, et al. Proteomic analysis of cold stress-responsive proteins in *Thellungiella* rosette leaves [J]. Planta, 2009, 230(5): 1033-1046.