

集胞藻 ORFs 侧翼序列的 PCR 扩增和定向基因插入失活策略

徐旭东 孔任秋 刘珂 王江新 宁德刚

(中国科学院水生生物研究所, 武汉 430072)

摘要: 针对集胞藻 PCC6803 的 1927 个待定编码基因进行了两侧序列的 PCR 扩增。4 个亚株基因组在 *sll0267-sll0268-sll0269* 区域的 PCR 扩增产物与 Kazusa DNA 数据存在差异。以叶绿素合成基因 *chlH* 和 *chlL* 为例, 显示三片段连接 PCR 产物可有效用于集胞藻 6803 基因组定向插入失活。

关键词: 集胞藻 6803; PCR; 基因插入失活

中图分类号: Q949.22 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3207(2001)06-0544-07

蓝藻, 或称蓝细菌, 是一类光合原核生物。除藻胆体捕光天线外, 在光合系统结构和光合产氧过程方面, 蓝藻与植物叶绿体十分相似。集胞藻 (*Synechocystis* sp.) PCC6803 (以下称集胞藻 6803) 是一种单细胞蓝藻, 可被外源 DNA 自然转化, 可利用葡萄糖营养生长^[1], 已被广泛应用于有关光合作用的分子生物学研究, 其全基因组序列于 1996 年公布^[2]。如果能够系统揭示这一简单生物模式全部基因的功能, 将可能在分子水平全面阐释蓝藻细胞的生命活动和对水环境的适应方式, 并为植物遗传育种提供基因资源^[3]。在功能基因组学的诸多方法中, 定向基因插入失活是最为有效的方法之一。在集胞藻 6803 的 3168 个开放阅读框 (ORF) 中有 2185 个在测序完成时功能未知或不明确。作者拟对其中 1927 个 ORFs 进行插入失活研究, 以弄清其功能, 并着重寻找那些影响其光合自养生活的基因, 其中一些必然涉及类囊体膜的发生、光合系统的装配等重要过程, 为理解蓝藻和植物叶绿体生命活动的许多重要方面奠定基础。本文报道有关集胞藻 6803 功能基因组学研究的第一部分, 包括对未知功能 ORFs 侧翼序列的 PCR 扩增和定向插入失活策略。

1 材料和方法

1.1 藻株培养方法 集胞藻 6803 分别来源于: a. American Type Culture Collection (ATCC), 由美国密西根州立大学 DOE 植物实验室 Peter Wolk 教授提供, 该藻株在本文中称为 *Synechocystis* 6803 W; b. 密西根州立大学 DOE 植物实验室 Lee MacIntosh 实验室, 由

收稿日期: 2001-07-10; 修訂日期: 2001-07-21

基金项目: 中国科学院“百人计划”资助项目

作者简介: 徐旭东(1967—), 男, 安徽肥东人; 研究员, 博士; 从事藻类分子生物学研究。余立红、明珍平、狄利俊、郭海涛、冯勃等参加了 PCR 扩增工作, 特此致谢

虞剑平博士提供,称 *Synechocystis* 6803 Y; c. 北京大学生命科学学院赵进东教授,称 *Synechocystis* 6803 Z; d. 中国科学院植物研究所施定基教授,称 *Synechocystis* 6803 S。以上藻株均以 BG11 液体培养基于 30℃ 静置培养,光照强度 $50\mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 。

1.2 集胞藻 6803 总 DNA 的提取和转化方法 总 DNA 的提取过程和转化方法见另文描述^[6]。

1.3 PCR 方法 本文所示结果中涉及的 PCR 引物列于表 2。

1.3.1 一级 PCR 共 $50\mu\text{L}$ 反应体积中含有 $10\text{mmol/L Tris. Cl (pH8.3)}$, 50mmol/L KCl , 1.5mmol/L MgCl_2 , 各引物约 100pmoles , $200\mu\text{mol/L dNTPs}$, 约 $0.1\mu\text{g}$ 集胞藻总 DNA 和 $2\mu\text{L Taq DNA 聚合酶 (BioStar International, Canada)}$ 。PCR 反应经历 30 个循环: $94^\circ\text{C}, 1\text{min}; 60^\circ\text{C}, 1\text{min}; 72^\circ\text{C}, 1\text{min}$, 最后在 72°C 延伸 4min 。

1.3.2 三片段连接 PCR 在一级反应中产生的某基因侧翼片段,如 chlH-u 和 chlH-d,或 chlL-u 和 chlL-d,各以 T_4 DNA 聚合酶在室温下补平后以 0.8% 低熔点琼脂糖分离。体积约 $30 - 50\mu\text{L}$ 的胶块在 60°C 熔化后直接用于连接。连接反应包括两侧片段 DNA 各 $2\mu\text{L}$, 约 $1\mu\text{g PvuII 切割的 C.K2}^{\text{[5]}}$, 于 $16 - 20^\circ\text{C}$ 反应 16h 。取 $2\mu\text{L}$ 连接液用于二级 PCR 反应,对于 chlH 基因,引物用 chlH-1 和 chlH-4; 对于 chlL 基因,引物用 chlL-1 和 chlL-4。PCR 反应条件为: $94^\circ\text{C}, 1\text{min}; 50^\circ\text{C}, 1\text{min}; 72^\circ\text{C}, 4\text{min}$; 共 30 个循环。

1.4 DNA 重组 质粒 pRL446 系含卡那霉素 (Km) 抗性基因的 C.K2 片段克隆于 pUC18/19 质粒 L.EHEI 接头的 XbaI 位点^[5]。C.K2 片段可根据需要用 BamHI、EcoRI、PvuII 等限制酶切下。本实验所使用的限制性内切酶、连接酶来源于 New England Biolabs 和华美生物工程公司。 T_4 DNA 聚合酶来源于 Promega 公司。DNA 重组依照标准方法进行。PCR 产物的纯化借助于 BioStar International, Canada 玻璃奶试剂盒。PCR 片段经 T_4 DNA 聚合酶处理克隆于 PvuII 酶切的 pUC19。

1.5 吸收光谱分析 从 400 到 800nm 波长范围的整细胞吸收光谱以 UV-1601 分光光度计 (Shimadzu) 扫描获得。设置空白参照和对样品扫描时使光束穿过比色杯毛玻璃面以减少散射光带来的影响。

2 结果和讨论

2.1 集胞藻 6803 基因组规模 ORF 侧翼序列的 PCR 扩增

2.1.1 四个来源的亚株 集胞藻 6803 基因组中存在 99 个插入因子序列,其中 26 个可能仍具有转座功能^[2],故不同实验室保藏的藻株可能存在差异。为确切使用具有完好表型的藻种,收集了四个来源的集胞藻 6803,发现它们的表型各不相同(表 1)。6803W 亚株来源于 ATCC,6803Y 系衍生自 6803W 的葡萄糖耐受株^[1]。近期有报道指出,来源于 ATCC 的藻株及其葡萄糖耐受株 Ser/Thr 蛋白激酶基因 spkA 发生突变,失去爬行能力^[6],与作者的观察相一致。6803S 已失去在黑暗条件下异养生长能力。6803Z 亚株具有 LAHG 异养生长、向光爬行和被外源 DNA 转化等全部已知特性,故被用于进一步研究工作。

2.1.2 ORF 侧翼序列的 PCR 扩增 集胞藻 6803 全基因组序列和基因组织情况见网址 <http://www.kazusa.or.jp/cyano/cyano.html>。针对选定的 1927 个待定编码基因,设计了 4652 个引物以扩增各基因两侧序列。由于基因组中 ORFs 紧密排列,以位于两基因相邻末端

表 1 集胞藻 6803 亚株来源和表型

Tab. 1 Sources and phenotypes of substrains of *Synechocystis* 6803

亚株 Substrains	在 BG11 平板生长 Growth on BG11 plate	光激活异养生长 LAHC	向光运动 Phototactic movement	天然转化系统 Natural transformation
6803W	No	Yes	/	/
6803Y	Yes	Yes	No	Yes
6803S	Yes	No	No	Yes
6803Z	Yes	Yes	Yes	Yes

的一对引物扩增的 PCR 产物实际上可为二者共用,故基因数和引物数的比例实际上是 1:2.414。引物长度绝大多数为 20 碱基,一对引物之间距离一般在 500bp 左右。全部引物将另设网页公布。根据基因排列关系,引物被分为 411 组,每组中引物按序号命名,如 247 组中第一个引物称 Gp247-1。与之相应,以 Gp247-1 和 Gp247-2 扩增的 PCR 产物称 Gp247-1/2。图 1 作为 PCR 扩增反应的一个例证,显示产物大小情况。表 2 列出与图 1、图 2 和图 4 相关的引物序列。在所有 PCR 产物中发现有 4 个在基因组中相邻的片段大小与 Kazusa 基因组数据不吻合。根据基因组数据预测值 Gp247-1/2,3/4,5/6,7/8(*sll0267-sll0268-sll0269* 区域)应分别为 543bp,513bp,849bp 和 813bp,但 PCR 产物实际大小各自约为 800bp,900bp,580bp 和 560bp。为确证这一差异不是由于 6803Z 亚株的变异造成的,作者以 6803W,6803Y,6803S 和 6803Z 四个亚株 DNA 分别进行了 PCR 扩增,均获得相同大小的 PCR 产物(图 2)。Okamoto 等人曾比较了 Kazusa DNA 研究所用于序列测定的藻株(称 Kazusa 亚株)和巴斯德研究所藻种库(PCC)6803 原种以及两个葡萄糖耐受亚株,发现 Kazusa 亚株中插入因子 ISY203 的拷贝数和分布情况与其他亚株完全不同^[7]。这一报道显示 6803 亚株之间存在遗传上的差异。Gp247-1/2,3/4,5/6,7/8 四个片段大小与基因组数据

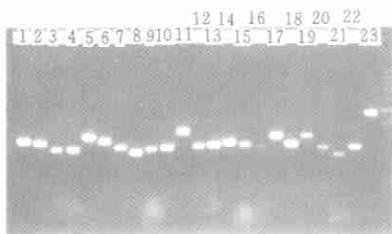


图 1 集胞藻 PCC6803 待定编码基因两侧序列 PCR 扩增产物电泳图谱一例。1~23, PCR 产物 Gp281-1/2, 3/4, 5/6, 7/8; Gp282-1/2, 3/4, 5/6; Gp283-1/2, 3/4, 5/6, 7/8, 9/10, 11/12, 13/14, 15/16, 17/18; Gp284-1/2, 3/4; Gp285-1/2, 3/4, 5/6; Gp286-1/2, 3/4。PCR 引物见表 2

Fig. 1 One of electrophoretograms of the PCR products for flanking sequences of potential protein-coding genes in the genome of *Synechocystis* 6803. Lanes 1~23, PCR products Gp281-1/2, 3/4, 5/6, 7/8; Gp282-1/2, 3/4, 5/6; Gp283-1/2, 3/4, 5/6, 7/8, 9/10, 11/12, 13/14, 15/16, 17/18; Gp284-1/2, 3/4; Gp285-1/2, 3/4, 5/6; Gp286-1/2, 3/4. The primers are listed in Tab. 2



图 2 *sll0267*, *sll0268* 和 *sll0269* 侧翼序列 PCR 扩增产物。1~4, 5~8, 9~12, 13~16, 分别是用集胞藻 6803W, 6803Y, 6803Z, 6803S 亚株 DNA 扩增的 4 组 Gp247-1/2, 3/4, 5/6, 7/8

Fig. 2 PCR products for the flanking sequences of *sll0267*, *sll0268* and *sll0269*. 1~4, 5~8, 9~12 and 13~16, 4 groups of PCR products Gp247-1/2, 3/4, 5/6, 7/8, amplified using DNA from substrains 6803W, 6803Y, 6803Z and 6803S as templates respectively

预测值的差异进一步证明 Kazusa 亚株与其他亚株之间还有更多的自发突变,可能包括插入因子的转座和其他形式的 DNA 重排。当然也不能排除测序过程中存在个别误差。将对该区域重新进行序列分析以弄清 6803 原种基因组实际情况。

表 2 引物序列

Tab. 2 Sequences of primers

Gp247 - 1	GTAGGGTTAGAATTGCCTT	Gp247 - 2	ACAGAGCATTTAACCGTG
Gp247 - 3	TCGCTAAATTCCAAACCGT	Gp247 - 4	CCGAGGATTTGCCACAAC
Gp247 - 5	TCTTATTGCTGGCCATGTC	Gp247 - 6	CTACGGCTCAGCCCTGGAACA
Gp247 - 7	CTGCCTCGCTTCCATATCCA	Gp247 - 8	CCATCGGTACACTATCTAAC
Gp281 - 1	GTGATAAGTTAACCCACT	Gp281 - 2	TGAACTAGCGATTACACC
Gp281 - 3	GTAGCGTGTAGCCATTATCA	Gp281 - 4	TTAGCCCCAAAATCCTAGTCT
Gp281 - 5	CTCATTAGGTTAGCTTGAA	Gp281 - 6	TTATCAAACCGAGTTGTTGG
Gp281 - 7	TTCTTGTGACCCATGAA	Gp281 - 8	CTTGGACTAATGGAGATTGCT
Gp282 - 1	CACATTGGGTATTAGCAGTC	Gp282 - 2	ACAACCTAGCTGCCGCTT
Gp282 - 3	TGTCACCGAGACCAACTAAC	Gp282 - 4	TCTGGTTAGGTTGCTGTTG
Gp282 - 5	GATGTGCCCTGGACTCTAC	Gp282 - 6	TTACAAAGGTTGATGCGAGG
Gp283 - 1	TCGTTACGACGGCTTAGTGG	Gp283 - 2	GCTCATGGCAAGTCACAG
Gp283 - 3	GAAGCCTTGGTAATAGTAGA	Gp283 - 4	TGATGGCTGATACTACTGCT
Gp283 - 5	TCGCCGTTGCCAGACAGCC	Gp283 - 6	CCATTATGAAACCGCGAAC
Gp283 - 7	GGTACTGATTTCAGGAACAA	Gp283 - 8	GTCCAGGATGAAGCTAGCCA
Gp283 - 9	TCGTCGGATAAACTCTGTTG	Gp283 - 10	CATCGGTGTTGATTGAGT
Gp283 - 11	GGTCGCTGCCATGCCAACTT	Gp283 - 12	AACCATCCATTGCTATCGG
Gp283 - 13	TTCCGCCAACAGCTTATACT	Gp283 - 14	GGCGGTGAAACCATGGCTT
Gp283 - 15	CTGTGCTCAAAGACTGTCTC	Gp283 - 16	AGCCATTGACAATGCCGTGG
Gp283 - 17	CCAGGTGAATATCAGAAA	Gp283 - 18	TCGTTCCCTGGTGAATGAAG
Gp284 - 1	GGATITGAGAACCTTGGCGG	Gp284 - 2	CCTGTGACCTCTACGTTG
Gp284 - 3	GTGGAGCCGAGGATAGAAA	Gp284 - 4	GGATCGACATGATCAACGAA
Gp285 - 1	TCTCCCGCTGAGCAATGTT	Gp285 - 2	CCTGCTCCAAGACGGATT
Gp285 - 3	GGCTACTCGTTATTCGAAG	Gp285 - 4	AACCTGCTGTTGAGATAG
Gp285 - 5	AATCCCTCGGTACGTTGA	Gp285 - 6	ACCACTGGTGGCACCTGGA
Gp286 - 1	GGTGGTATCCACGTATGGCA	Gp286 - 2	TGAGCTATGTCCTACTT
Gp286 - 3	CCTAACGTAGTCATCAGCAA	Gp286 - 4	CCAGATCCAACAGGCTGACT
chlH - 1	GGCGAATGTTGTTGCGT	chlH - 2	CATATAAGTGGTCTCTCCT
chlH - 3	ATCCTGAACAAAGATATAGG	chlH - 4	GTATCAAAGTCTGATCTT
chlL - 1	CTCAGCGACCTCCATCTACC	chlL - 2	GTGTCAGTGTCAAGGGAGTT
chlL - 3	TCGGGATCTATTCAAGTTGCT	chlL - 4	AACTGGGCAGAAATGTCCTCC

2.2 定向基因“敲除”策略

2.2.1 用于基因置换的 PCR 产物 传统基因插入失活的方法往往依赖于两步以上的质粒构建过程,包括合适的限制性内切酶位点插入抗性基因标记。近期有人提出以两步 PCR 法获得插有抗性标记的线性 DNA 并成功用于大肠杆菌和集胞藻 6803 某些基因的插

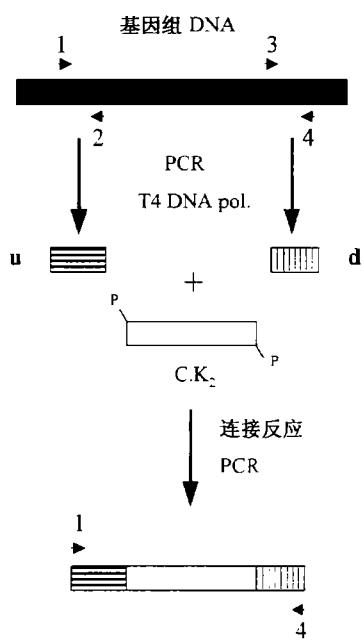


图 3 三片段连接 PCR 示意图。1,2 和 3,4 分别代表基因上游和下游侧翼序列 PCR 引物；u 和 d 分别代表上游和下游 PCR 产物
Fig.3 A Schematic diagram for 3-piece-ligation PCR. 1,2 and 3,4 stand for the PCR primers for the upstream and downstream flanking sequences of a gene respectively; u and d stand for the upstream and downstream PCR products respectively

2.2.2 以 C.K2 定向置换基因 用含有 $chlL-u\{C.K2\}chlL-d$ 和 $chlH-u\{C.K2\}chlH-d$ 的 PCR 反应液直接转化集胞藻 6803, 获得 Km 抗性转化子。由于蓝藻基因组在细胞内有多个拷贝, 转化子中仍存在未发生置换的野生型基因组。为纯化突变株, 将转化子在含 Km、葡萄糖、DCMU 的 BG11 平板上划线, 并在含相同成分的培养液中转接培养。 $chlL$ 突变株经过平板上和液体培养基中一轮筛选即完全去除了野生型拷贝。如图 4A 所示, 2.3Kb 的野生型带已被 3.0Kb 的 $chlL-u\{C.K2\}chlL-d$ 所置换。而 $chlH$ 突变株的纯化过程比较困难。经过一年的反复筛选, 仍可见一条与野生型相当的弱带(图 4B)。在叶绿素合成途径^[10]中, 从卟啉环开始, 第一步反应为镁离子络合反应, 催化该反应的镁络合酶(Mg-chelatase)即由 $chlH$ 、 $chlI$ 和 $chlD$ 共同编码; 而 $chlL$ 和 $chlB$ 、 $chlN$ 共同编码不依赖于光的原叶绿素酸酯还原酶。此外, 还有一个依赖于光的还原酶 POR。在 $chlL$ 失活的情况下集胞藻 6803 失去在黑暗中合成叶绿素的能力, 但可在光照条件下, 经 POR 途径合成叶绿素^[11]。作者检查了二突变株的全细胞吸收光谱, 证明 C.K2 置换导致 $chlL$ 突变株在黑暗条件下叶绿素合成终止, 但 $chlH$ 突变株却继续合成叶绿素(图 5); 在光照条件下, 两者均合成叶绿素(结果未附)。 $chlH$ 可能对于集胞藻 6803 不可缺失, 故突变株分离不完全、叶绿素继续合成, 或者基因组另外存在一个未知的催化镁离子络合的途径。

入失活^[8,9]。除引物较长外, 用这种方法进行基因组规模的逐个敲除工作, 每个基因需要 4 条引物, 研究费用将大幅增加。作者设计了三片段连接 PCR 反应, 也涉及两步 PCR, 但克服了引物长的缺点, 并且侧翼片段可由相邻基因共有。图 3 显示以连接 - PCR 法构建基因置换结构的过程。以叶绿素合成基因 $chlL$ 和 $chlH$ 的定向插入为例, 上游 PCR 产物(u)分别记作 $chlL-u$ 和 $chlH-u$, 下游 PCR 产物(d)分别记作 $chlL-d$ 和 $chlH-d$; 相应基因置换结构记作 $chlL-u\{C.K2\}chlL-d$ 和 $chlH-u\{C.K2\}chlH-d$ 。图 4 显示两步 PCR 产物和 C.K2 片段的电泳检测结果。由于合成引物 5' 端没有磷酸基团, 片段 u 或 d 与 $PvuII$ 酶切的 C.K2 之间的连接产物一条链上应有一个缺口。如果 T4 DNA 聚合酶处理未使侧翼片段末端发生碱基丢失, 形成 5' 磷酸基团, 则连接产物中不存在完整的基因置换结构的模板。为探讨这一可能性, 以纯化了 $chlH-u\{C.K2\}chlH-d$ 片段, 克隆于 $PvuII$ 酶切的 pUC19, 并对 C.K2 片段与 $chlH-u$ 和 $chlH-d$ 接头处分别进行了序列分析, 证明并未发生任何碱基丢失。因此, 认为 $chlH-u\{C.K2\}chlH-d$ 完整模板形成于第二级 PCR 早期循环。连接产物中 $chlH-u/C.K2$ 和 $chlH-d/C.K2$ 可能通过退火 - 延伸反应形成 $chlH-u\{C.K2\}chlH-d$ 。

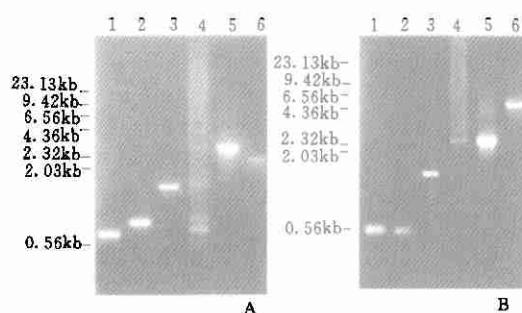


图4 定向基因插入失活。A) 不依赖于光的原叶绿素酸酯还原酶基因 *chlL*; B) 镁离子络合酶基因 *chlH*, 1 和 2, 基因两侧序列 PCR 产物; 3, PvuII 酶切的 C.K2 片段; 4, 三片段连接 PCR 产物; 5 和 6, 以外侧引物分别对突变株和野生型 DNA 进行 PCR 扩增的产物。

Fig.4 Targeted gene disruptions. A) Light-independent proto-chlorophyllide reductase gene *chlL*; B) Magnesium chelatase gene *chlH*. Lanes 1 and 2, PCR products for the two flanking sequences of the genes; lane 3, C.K2 fragment generated by restriction with PvuII; lane 4, the 3-piece-ligation PCR product; lanes 5 and 6, PCR products amplified using two outside primers and DNA from the mutant and wild-type strain as templates respectively

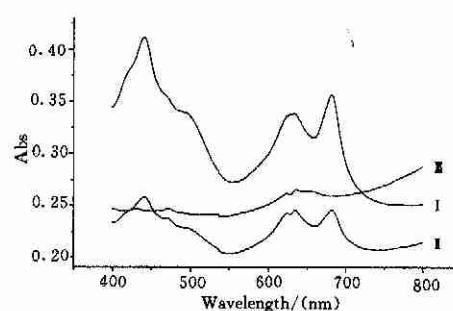


图5 黑暗条件下异养生长的集胞藻 6803 的整细胞吸收光谱。叶绿素吸收峰在约 440nm 和 680nm 处。

I) 野生型; II) *chlH* 突变株; III) *chlL* 突变株

Fig.5 Whole-cell absorption spectra of *Synechocystis* 6803 grown heterotrophically in darkness. Chlorophyll absorbs approximately at 440nm and 680nm. I) Wild type; II) *chlH* mutant; III) *chlL* mutant

以上例证清楚显示三片段 PCR 法可用于集胞藻 6803 的定向基因敲除。除了这一策略以外,作者还以 4 - 碱基限制酶 Sau3A 和 HaeIII 部分酶切的方法,分别将 C.K2 片段随机插入该藻株以 pUC19 构建的基因文库质粒 DNA, 得到共约 40,000 克隆的二级诱变文库^[4]。以某基因两侧的引物,如 *chlL*-1 和 *chlL*-4, 对二级诱变文库混合 DNA 进行 PCR 扩增, 可获得有 C.K2 随机插人在二引物所限定范围内的 DNA 片段(结果未附)。以此 PCR 产物也可实现定向基因敲除。全基因组规模的基因敲除研究将揭示出众多基因在生命活动中的功能。

参考文献:

- [1] Anderson SL, 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 PCC6803. II. Sequence determination of the entire genome and assignment of potential protein-coding regions [J]. *DNA Res* 1996, **3**:109—136
- [3] Shintani D, DellaPenna D. Elevating the vitamin E content of plants through metabolic engineering [J]. *Science*, 1998, **282**: 2098—2100
- [4] 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[J].水生生物学报,2001,25(6): 537—543
- [5] Elhai J, Welk CP. 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
- [6] Karnei A, Yuasa T, Orikawa K, et al. A eukaryotic-type protein kinase, SpkA, is required for normal motility of unicellular

- cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC6803 [J]. *J Bacteriol*, 2001, **183**:1505—1510
- [7] Okamoto S, Ikeuchi M, Ohmori M. Experimental analysis of recently transposed insertion sequences in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC6803 [J]. *DNA Res*, 1999, **6**:265—273
- [8] Murphy KC, Campellone KG, Poteete AR. PCR-mediated gene replacement in *Escherichia coli*. *Gene* [J], 2000, **246**:321—330
- [9] Taroncher-Oldenburg G, Stephanopoulos G. Targeted, PCR-based gene disruption in cyanobacteria: inactivation of the polyhydroxyalcanoic acid synthase genes in *Synechocystis* sp. PCC6803 [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2000, **54**:677—680
- [10] Suzuki JY, Bolivar DW, Bauer CE. Genetic analysis of chlorophyll biosynthesis [J]. *Ann Rev Genet*, 1997, **31**:61—89
- [11] Wu Q, Vermaas WFJ. Light-dependent chlorophyll a biosynthesis upon *chlL* deletion in wild type and photosystem I-less strains of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC6803 [J]. *Plant Mol Biol*, 1995, **29**:933—945

PCR AMPLIFICATIONS OF FLANKING SEQUENCES OF ORFs IN THE GENOME OF *SYNECHOCYSTIS* SP. PCC6803 AND A STRATEGY FOR TARGETED GENE DISRUPTION

XU Xu-dong, KONG Ren-qiu, LIU Ke, WANG Jiang-xin and NING De-gang

(Institute of Hydrobiology, The Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072)

Abstract: The flanking sequences of 1927 potential protein-coding genes of *Synechocystis* sp. PCC6803 were amplified by polymerase chain reactions. The PCR products for the *sll0267-sll0268-sll0269* region in the genomes of 4 substrains were inconsistent with those predicted by Kazusa DNA database. As shown with chlorophyll synthesis genes *chlH* and *chlL* as the examples, products of 3-piece-ligation PCR can be effectively applied to targeted gene disruptions in the genome of *Synechocystis* sp. PCC6803.

Key words: *Synechocystis* 6803; PCR; Gene disruption