

集胞藻 *PCC6803 priA* 基因的突变体

付娟¹ 徐旭东²

(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 100039)

A *PRI*A MUTANT OF *SYNECHOCYSTIS* SP. PCC 6803

FU Juan¹ and XU Xu-Dong²

(1. Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072;

2. The Graduate School of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039)

关键词: 集胞藻 PCC6803; *priA*; 突变株

Key words: *Synechocystis*; *priA*; Mutant

中图分类号: Q754 文献标识码: A 文章编号: 1000-3207(2008)01-0116-04

目前对蓝藻的高温耐受性研究主要集中在热激蛋白和光系统 II 放氧蛋白复合体的外周蛋白基因,如放氧蛋白复合体的 3 个外周蛋白基因 *psbO*、*psbU* 和 *psbV*^[1-4], 热激蛋白基因 *hspG*^[5] 和 *hsp17*^[6], 而对于是否存在其他耐受高温所需基因尚未进行系统的筛选。集胞藻 (*Synechocystis* sp.) PCC6803 是一种单细胞中温蓝藻,具有天然的外源 DNA 转化系统^[7],其基因组测序已于 1996 年由 Kazusa DNA 研究所完成^[8],是蓝藻分子遗传学研究的模式生物之一。我们构建了集胞藻 6803 的随机插入诱变文库并筛选了高温敏感突变株,试图发现新的高温生长必需基因。在本研究中我们发现 *priA* 基因 3' 端一个突变体对高温敏感。该基因最早在大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 中发现,其产物 PriA 识别并结合到 Φ X174 引发体组装位点的发卡结构上,起始由 PriB、PriC、DnaT 和 DnaB 组成的引发体的组装^[9],还参与依赖 RecA 而不依赖于 DnaA/*oriC* 的染色体 DNA 的复制^[10]。*priA* 在大肠杆菌和枯草杆菌 (*Bacillus subtilis*) 中可以完全敲除,且缺失突变株都表现为生长缓慢、对损害 DNA 的因素(如紫外线)敏感、同源重组下降、菌体呈丝状并诱导 SOS 反应^[11,12]。*priA* 基因 3' 端突变对温度敏感性的影响尚无报道。

1 材料和方法

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 BG11(自养生长)或 BG11+ 5mmol/L 葡萄糖(混养生长)培养基中、30℃或 40℃、光强为 30μE/m²·s 连续光照下用 50mL 三角瓶静置培养。培养突变株时补加 30μg/mL Km,在固体 BG11 平板中补充 1.4% 的琼脂,8mmol/L TES (pH 8.2) 和 0.3% Na₂S₂O₃。

用 pKW1188^[13] 转化集胞藻 6803 获得的 Km 抗性转化子作为 C. K2 插入突变株的野生型对照(记作 wt-1188),该藻株与集胞藻 PCC6803 原藻株在生长和高温耐受性方面没有观察到任何区别。制作生长曲线时,藻细胞在 30℃ 培养,尔后分别接种到 30℃ 和 40℃ 培养,初始 OD₇₃₀ ≈ 0.05,间隔 24h 取样测 OD₇₃₀,所有数据均为 3 次独立培养测试结果平均值。

集胞藻 6803 的转化参照 Williams^[13] 的方法。*sll0270*::C. K2 重构突变株的转化子经过在含 Km 和葡萄糖的 BG11 平板上划线获得单克隆并在液体培养基中培养,直至以特异引物进行 PCR 检测证明分离完全,即野生型拷贝完全消失。

1.2 高温敏感突变株的筛选 集胞藻 6803 的转化和随机插入诱变文库构建参照 Kong *et al.*^[14]。高温敏感突变株的筛选温度为 40℃,混养生长。将集胞藻 6803 突变株文库的克隆分别在 30℃ 和 40℃ 混养培养,经过多轮的筛选,在 30℃ 生长而 40℃ 不能生长,且性状稳定的突变株为高温敏感突变株。

1.3 突变株的基因定位 集胞藻 6803 及突变株总 DNA 按

收稿日期: 2006-02-09; 修订日期: 2006-12-12

基金项目: 中国科学院知识创新工程重要方向项目(KSCX2-SW-332)资助

作者简介: 付娟(1977-),女,山东桓台人;博士研究生。E-mail: fujian@ihb.ac.cn

通讯作者: 徐旭东, E-mail: xux@ihb.ac.cn

孔任秋等描述的方法提取^[14]。用反向 PCR 方法进行基因定位,具体方法是:以 *Nla* ④完全消化 1μg 突变株总 DNA,以 80μL 反应体系在 16℃ 条件下进行自环化连接 20h,其产物经乙醇沉淀后溶于 10μL 无菌水中。取 2μL 为模板,分别以 CK2-8(5'-CCTCTTCCGACCATCAAGCA-3')/CK2-15(5'-TTGAGACACAACGTGGCT-3'); CK2-16(5'-ACTGGCAGAGCATTACGCTG-3')/CK2-21(5'-TCACCGAGGCAGTTCCATAG-3') 为引物扩增自连产物。PCR 反应如下:50μL PCR 反应体系中含 10mmol/L Tris-Cl(pH8.3),50mmol/L KCl,2.0mmol/L MgCl₂,50μmol/L dNTPs,引物各 100pmol,DNA 模板适量,2U TaqDNA 聚合酶(晶美生物公司),反应经 94℃ 5min,之后按 94℃ 1min,60℃

1min,72℃ 2min 反应 30 个循环,最后 72℃ 延伸 5min。PCR 产物以 0.7% 琼脂糖电泳检测。PCR 产物测序,得到 C.K2 片段两端的序列,在 Kasuza 基因组数据库进行搜索确定其位置(www.kazuza.or.jp/cyano/cyano.html)。

2 结果和讨论

我们以卡那霉素抗性基因随机插入集胞藻 6803 基因组构建了突变子库,经过多轮筛选得到稳定的对高温敏感的突变株,其中一个编号为 2F12。该突变株在 40℃ 混养和自养都不能生长,与野生型有很大的差别(图 1A、B);而在 30℃ 混养和自养生长与野生型相差不大(图 1C、D)。

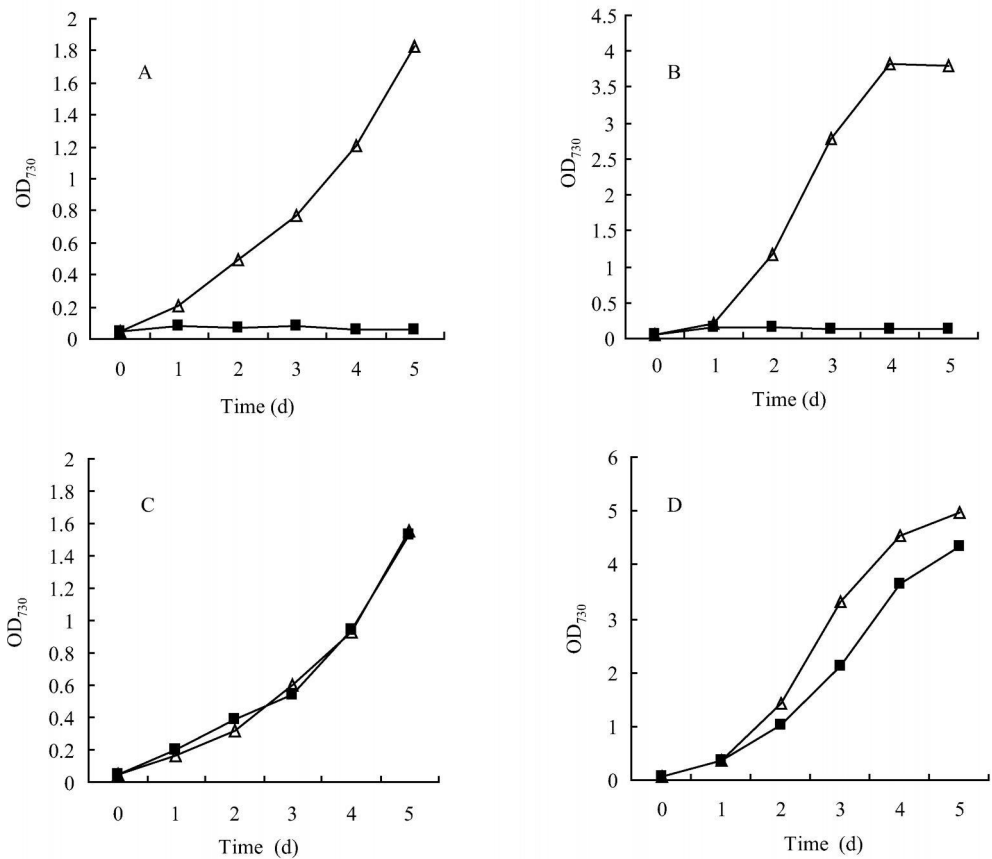


图1 野生型和 2F12 突变株在不同温度下的生长曲线

Fig 1 Growth of the wild type and 2F12 strain at different temperatures

A. 40℃, 自养生长; B. 40℃, 混养生长; C. 30℃, 自养生长; D. 30℃, 混养生长. wt-1188(Δ), 2F12(■)
(A) 40℃, mixotrophic growth; (B) 40℃, photoautotrophic growth; (C) 30℃, mixotrophic growth; (D) 30℃, photoautotrophic growth. wt-1188(Δ), 2F12(■)

提取突变株的总 DNA,用 *Nla* ④完全酶切后进行自连接。根据卡那霉素抗性基因序列设计的两对引物 CK2-8/CK2-15 和 CK2-16/CK2-21 进行反向 PCR,对 PCR 产物进行序列测定,在 Kasuza 基因组数据库搜索发现卡那霉素抗性基因插入在集胞藻 6803 基因 *sl0270* 中的 2398 bp 和 2399 bp 之间。该基因全长 2496 bp,经过 NCBI GenBank Blast 搜索比对显示与 *E. coli* 的 *priA* 基因高度同源(NCBI Blast score= 402, E-value= 3e-110)。其预测产物 PriA 有三类保守序列: D-loop 识

别结构、DNA 解旋酶保守序列(Walker A, Walker B 和 motif VI) 和锌指结构,其中 DNA 解旋酶保守序列都不是必需的,另外两种结构则影响细胞的生长、对紫外线的抵抗能力和正常的形态^[15]。在显微镜下观察到集胞藻 6803 *priA* 突变体与野生型形态相似,呈球形,而大肠杆菌和枯草杆菌 *priA* 突变株细胞呈丝状。本研究获得的 *priA* 突变体抗性基因插入在 3' 端,位于这三类保守结构以外,因而并未影响到在 30℃ 的生长和细胞形态。

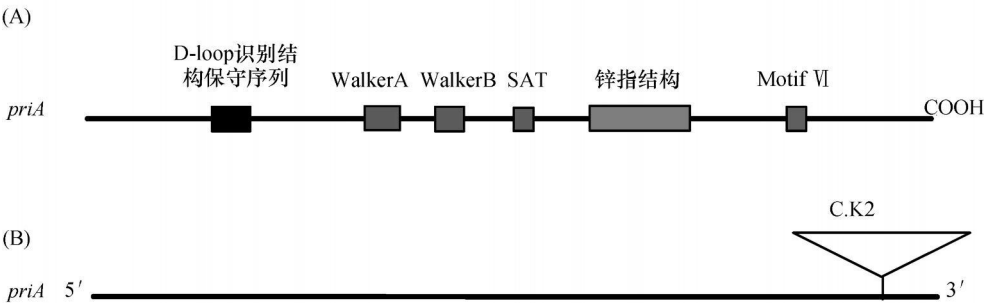


图 2 集胞藻 6803 PriA 蛋白的保守结构 (A) 和 C. K2 在 *priA* (Δ l0270) 基因中插入位置 (B)

Fig. 2 Motifs of PriA in *Synechocystis* PCC6803 (A) and the insertion site of C. K2 in *priA* (Δ l0270) (B)

为进一步证实该突变体的性状确实是由 *priA* 在 3' 端的突变造成的, 我们进行了重构实验以排除第二点突变的可能性。用突变株的基因组 DNA 转化野生型集胞藻 6803 重构 *priA* 突变体。由于蓝藻基因组有多个拷贝, 如果突变基因和野生型基因没有完全分离, 即细胞中混有野生型和发生突变的基因, 则突变型一般得不到表现。将转化子在含 Km 和葡萄糖的 BG11 平板上划线获得单克隆和在液体培养基中培养, 直至以特异引物 Δ l0270-1 和 Δ l0270-2 进行 PCR 检测证明其基因组中 Δ l0270 确已完全被 Δ l0270:: C. K2 代替(图 3)。完全没有野生型 Δ l0270 拷贝的重构突变株显示与 2F12 突变株相同的表型。

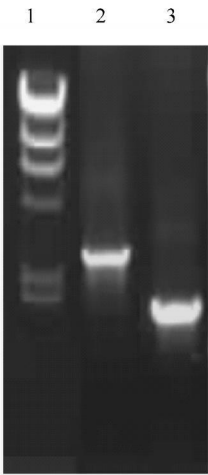


图 3 2F12 重构突变株的 PCR 检测

Fig. 3 PCR detection of the reconstructed mutant 2F12

- (1) λ DNA + Hind III (2) 2F12 重构突变株; (3) 集胞藻 PCC6803
(1) λ DNA + Hind III (2) the re-constructed 2F12 mutant;
(3) *Synechocystis* sp. PCC6803

在 *priA* 下游没有同向基因, 故不存在极性效应, 因而以上实验结果证明高温敏感性状确实是由该基因的 3' 端突变造成的。这一结果显示, 3' 端发生突变的 PriA 蛋白失去在 40℃ 高温下引发 DNA 合成的能力。造成这一表型的机理有待进一步探明, 但这样一个温度敏感型突变体对于蓝藻 DNA 复制和细胞分裂的研究将十分有用。

参考文献:

[1] Nishiyama Y, Hayashi H, Watanabe T, Murata N. Photosynthetic oxygen evolution is stabilized by cytochrome c_{550} against heat inactivation in *Synechococcus* sp. PCC 7002 [J]. *Plant Physiol*, 1994, **105**: 1313—1319
[2] Nishiyama Y, Los D A, Hayashi H, Murata N. Thermal protection of the oxygen-evolving machinery by PsbU, an extrinsic protein of photosystem II, in *Synechococcus* species PCC 7002 [J]. *Plant Physiol*, 1997, **115**: 1473—1480
[3] Nishiyama Y, Los D A, Murata N. PsbU, a protein associated with photosystem II, is required for the acquisition of cellular thermotolerance in *Synechococcus* species PCC 7002 [J]. *Plant Physiol*, 1999, **120**: 301—308
[4] Kimura A, Eaton-Rye J J, Morita E H, et al. Protection of the oxygen-evolving machinery by the extrinsic proteins of photosystem II is essential for development of cellular thermotolerance in *Synechocystis* sp. PCC 6803 [J]. *Plant Cell Physiol*, 2002, **43**: 932—938
[5] Tanaka N, Nakamoto H. HtpG is essential for the thermal stress management in cyanobacteria [J]. *FEBS Lett*, 1999, **458**: 117—123
[6] Turk Z, Goloubinoff P, Horvath I, et al. *Synechocystis* HSP17 is an amphitropic protein that stabilizes heat stressed membranes and binds denatured proteins for subsequent chaperone mediated refolding [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, **98**: 3098—3103
[7] Grigorieva G, Shestakov S. Transformation in the cyanobacterium *Synechocystis* 6803 [J]. *FEMS Microbiol Lett*, 1982, **13**: 367—370
[8] Kaneko T, Sato S, Kotani H, et al. Sequence analysis of the genome of the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. II. Sequence determination of the entire genome and assignment of potential protein-coding regions [J]. *DNA Res*, 1996, **3**: 109—136
[9] Zavitz K H, Marians K J. Dissecting the functional role of PriA protein-catalysed primosome assembly in *Escherichia coli* DNA replication [J]. *Mol Microbiol*, 1991, **5**: 2869—2873
[10] Masai H, Arai Ken-ichi. DnaA- and PriA-dependent primosomes: two distinct replication complexes for replication of *Escherichia coli* chromosome [J]. *Front Biosci*, 1996, **1**: 48—58
[11] Sandler S J, Marians K J. Role of PriA in replication fork reactivation in *Escherichia coli* [J]. *J Bacteriol*, 2000, **182**: 9—13

[12] Polard P, Marsin S, McGovern S, *et al.* Restart of DNA replication in Gram-positive bacteria: functional characterisation of the *Bacillus subtilis* PriA initiator [J]. *Nucl  ic Acids Res* , 2002, **30**: 1593—1605

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

[14] Kong R, Xu X D, Hu Z. A TPB-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

[15] Tanaka T, Taniyama C, Arai K, Masai H. ATPase/helicase motif mutants of *Escherichia coli* PriA protein essential for recombination-dependent DNA replication [J]. *Genes to Cells* , 2003, **8**: 251—261