

鱼腥蓝细菌PCC 7120游离DnaA的增加降低异形胞频率

李静 杨毅玲 张承才

INCREASED FREE DNAA DECREASES THE FREQUENCY OF HETEROCYSTs IN *ANABAENA* SP. PCC 7120

LI Jing, YANG Yi-Ling, ZHANG Cheng-Cai

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.7541/2021.2020.161>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

集胞藻PCC 6803高产精氨酸藻株的紫外诱变选育

CREATION OF HIGH ARGININE PRODUCING STRAIN OF *SYNECHOCYSTIS* SP. PCC 6803 BY UV MUTAGENESIS

水生生物学报. 2018, 42(3): 635–640 <https://doi.org/10.7541/2018.079>

一株红假单胞菌的分离及生理特性研究

ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF A *RHODOPSEUDOMONAS* SP. STRAIN

水生生物学报. 2020, 44(2): 429–437 <https://doi.org/10.7541/2020.052>

独脚金内酯对单针藻油脂积累的影响

EFFECTS OF STRIGOLACTONE ON LIPID ACCUMULATION IN *MONORAPHIDIUM* SP. QLY-1

水生生物学报. 2020, 44(3): 647–654 <https://doi.org/10.7541/2020.079>

棕鞭藻及其培养滤液对铜绿微囊藻生长及生理特性的影响

EFFECTS OF *OCHROMONAS* SP. CULTURE MEDIA FILTRATE ON THE GROWTH AND PHYSIOLOGICAL TRAITS OF *MICROCYSTIS AERUGINOSA*

水生生物学报. 2019, 43(1): 213–218 <https://doi.org/10.7541/2019.026>

褪黑素对单针藻油脂积累的影响

EFFECTS OF MELATONIN ON LIPID ACCUMULATION OF *MONORAPHIDIUM* SP. QLY-1

水生生物学报. 2018, 42(2): 421–427 <https://doi.org/10.7541/2018.054>

黄腐酸对单针藻生长和油脂含量的影响

EFFECT OF FULVIC ACID ON THE GROWTH AND LIPID ACCUMULATION OF OLEAGINOUS MICROALGA *MONORAPHIDIUM* SP. FXY-10

水生生物学报. 2017, 41(2): 437–442 <https://doi.org/10.7541/2017.54>



关注微信公众号，获得更多资讯信息

doi: 10.7541/2021.2020.161

鱼腥蓝细菌PCC 7120游离DnaA的增加降低异形胞频率

李 静^{1,2} 杨毅玲¹ 张承才¹

(1. 中国科学院水生生物研究所, 武汉 430072; 2. 中国科学院大学, 北京 100049)

摘要: 研究在模式生物鱼腥蓝细菌*Anabaena* sp. PCC 7120中, 以DnaA为研究对象, 探究蓝细菌细胞周期中复制起始和异形胞分化之间的关系。结果显示: 在有氮环境中, DnaA蛋白缺失或过表达并不影响细胞增殖和异形胞的分化。在缺氮环境下, DnaA缺失突变株Malr2009的异形胞分化频率(8.57%)与野生型(8.64%)间无显著差别, 且该菌株增殖速率与野生型相比也无显著差异, DnaA蛋白缺失没有影响蓝细菌突变株(Malr2009)的异形胞分化频率和增殖速率。但DnaA蛋白过表达菌株Oalr2009的异形胞分化频率降低了20%, 其在第12天 A_{750} 约为1.2, 细胞增殖速率快于野生型(第12天时 A_{750} 约为0.9), 增殖速率提高了30%。综上结果表明在鱼腥蓝细菌PCC 7120中, 虽然DnaA不是细胞生长过程所必需的, 但在缺氮条件下, 游离DnaA增加会抑制异形胞分化频率。

关键词: 鱼腥蓝细菌PCC 7120; DnaA; DnaA box; *oriC*; 异形胞

中图分类号: Q344⁺.1

文献标识码: A

文章编号: 1000-3207(2021)06-1214-08



鱼腥蓝细菌PCC 7120(*Anabaena* sp. PCC 7120)属于念珠藻目念珠藻科念珠藻属, 是由多个细胞组成的固氮丝状蓝细菌, 在营养充分的环境中, 鱼腥蓝细菌菌丝由营养细胞组成, 24h完成一次细胞增殖, 同时能够利用环境中的化合态氮源, 如硝酸盐和铵盐等, 合成自身所需氨基酸从而保证存活^[1, 2]。当环境中化合态氮源缺乏时, 菌丝上5%—10%的营养细胞在24h内就会分化出一个具有固氮功能的异形胞, 相当于每10—20个营养细胞之间会形成一个异形胞, 用来固定空气中的氮气用于保障菌丝的存活^[3, 4]。这种半规则的排列, 形成2种类型细胞组成的丝状体^[5], 其中营养细胞能够固定CO₂进行光合作用, 异形胞可以进行固氮作用, 这2种不同类型的细胞通过相互的营养物质交换, 可以形成一个简单多细胞的生存模式^[6]。异形胞的分化是已知的最为古老的细胞分化形式之一。有文献报道在*oriC*及*dnaA-oriC-dnaN*附近插入 Ω 片段会改变调控异形胞发育的关键基因*HetN*和*HetR*的转录及翻译, 最终影响异形胞的分化^[7]。*oriC*是DNA复制起始蛋白DnaA的结合位点。前期研究^[8]表明, 在鱼腥蓝细菌

PCC 7120中, 作为细胞周期中DNA复制起始蛋白DnaA参与细胞分化与细胞分裂的调控。DnaA起始复制是通过其结合*oriC*附近的DnaA box, 解链AT富集区开始的。*OriC*和DnaA box的序列相对保守, 在基因组上的位置也有一定的规律性。有些细菌的*oriC*或DnaA box在基因组位置分布上和DNA复制相关的*dnaA*基因的距离较近^[9]。通过分析鱼腥蓝细菌PCC 7120基因组上DnaA box和*dnaA*基因的分布情况, 揭示了在鱼腥蓝细菌PCC 7120中, 染色体上的DnaA box并不是随机分布, DnaA box和*dnaA*处在同一区域^[10]。而且, 鱼腥蓝细菌的多个DnaA box也都在*oriC*区域上^[10]。根据报道, 蓝细菌*oriC*均与*dnaN*紧邻并分布于非编码区, 附近分布有DnaA box, 拷贝数从2个到12个不等。鱼腥蓝细菌*oriC*附近有6个成串分布的DnaA box^[7, 11]。C端与*dnaN*紧邻, N端与*dnaA*基因相邻, 鱼腥蓝细菌是少数几种*oriC*与*dnaA*基因相邻的蓝细菌。

另有对鱼腥蓝细菌PCC 7120的研究发现, *dnaA*缺失突变体的细胞生长和DNA复制与野生型相比没有明显差别^[12], 鱼腥蓝细菌与真核生物染色

收稿日期: 2020-07-22; 修订日期: 2020-10-18

基金项目: 中国科学院院级科研项目(QYZDJ-SSW-SMC016)资助 [Supported by the College-Level Scientific Research Project of Chinese Academy of Sciences (QYZDJ-SSW-SMC016)]

作者简介: 李静(1993—), 女, 硕士研究生; 研究方向为藻类生长与发育。E-mail: lijing02125@163.com

通信作者: 张承才, 研究员, 博士生导师; E-mail: cczhang@ihb.ac.cn

体复制类似, 均含有多个复制起点且不同步起始复制^[13-15]。*dnaA*对于鱼腥蓝细菌 DNA的复制及细胞生长来说都不是必需的^[12]。*dnaA*的缺失不影响鱼腥蓝细菌PCC 7120的DNA复制和细胞生长, 这说明一些非共生蓝细菌谱系在多样化进程中丧失了对DnaA的功能依赖^[12]。

由上述可知, 尽管*dnaA*对鱼腥蓝细菌PCC 7120的DNA复制和细胞生长来说并不重要, 但其对异形胞分化有重要作用, 迄今为止, 其作用机理尚不明确, 本研究针对该问题, 拟以鱼腥蓝细菌PCC 7120为对象展开研究, 旨在进一步探究细胞周期和异形胞分化之间的关系。

1 材料与方法

1.1 实验材料

大肠杆菌DH5 α 、HB101(pRL623)和J53(RP4)均由本实验室保存; 鱼腥蓝细菌PCC 7120由本实验室保存; 质粒pCT、pCint2和pSfgfp-Sp均由本实验室构建或保存; 质粒pRL271 Ω oriC和pRL271 Ω dnaAN均从华中农业大学农业微生物学国家重点实验室蓝细菌室获得。

1.2 实验引物

本研究所用引物(表 1)由南京金斯瑞生物科技有限公司合成, DNA序列测序由铂尚生物技术有限公司及武汉擎科生物有限公司完成。鱼腥蓝细菌基因序列信息来自cyanobase (<http://genome.microbedb.jp/cyanobase>)。

1.3 培养基配方及培养条件

本实验主要涉及大肠杆菌和鱼腥蓝细菌的培养。

大肠杆菌于LB液体培养基37℃, 180 r/min或固体(1.5%)培养基37℃下培养。LB液体培养基配方(1 L): 蛋白胨10 g, 酵母粉5 g, 氯化钠10 g。若为固体培养基, 则在液体培养基的基础上添加1.5%的琼脂条或琼脂粉; 121℃, 101.53 kPa灭菌30min^[11]。大肠杆菌在培养时涉及的抗生素使用浓度为: Ampicillin(氨苄青霉素), 100 μ g/mL; Kanamycin(卡那霉素), 50 μ g/mL; Chloramphenicol(氯霉素), 25 μ g/mL; Spectinomycin(壮观霉素), 100 μ g/mL。

鱼腥蓝细菌通常于硝酸盐培养基BG11或缺氮培养基BG11₀中培养, BG11₀用于异形胞的诱导。液体培养条件为30℃, 120 r/min, 500—3000 lx连续光照培养; 固体(1.2%)培养条件为30℃, 500—3000 lx连续光照培养。BG11培养基配方(1L): NaNO₃ 1.5 g, K₂HPO₄ 0.04 g, MgSO₄·7H₂O 0.075 g, CaCl₂·2H₂O 0.036 g, Citric acid 0.006 g, Ferric ammonium citrate 0.006 g, EDTANa₂ 0.001 g, Na₂CO₃ 0.02 g, A5(Trace

表 1 实验中所用主要引物

Tab. 1 Primers used in this study

引物名称 Primer name	序列Sequence (5'—3')
P1	GGTAACAACAAGATGATGATGGAAATGCC CATTGAC
P2	CTCCAGATCCACCTCATGGTTTTCGAGAAC GGCTAT
P3	CATCTTGTGTACCTCCTTAGCA
P4	GGTGGATCTGGAGGTAGTGGTTCTGGTGGT GGTAGCAC
P5	GCAGAAATTCGATATCTAGATCCGTGAGGG TTGCCATCTG
P6	AGCGCTACCGACGCTAGTGCTTTACACCT TTGCTGCTAATC
P7	ACCGGATCATCAGTACTCCCTGATCATAAA AATTCGACGTTTC
P8	CGCAACGTTGTGCCATTGTCGGCGTTCAA TGGTCAC
P9	AGCACTAGCGTCGGTAGCGCT
P10	GGGAGTACTGATGATCCGGT
1-up	ACGGTTTACAAGCATAAAGCGATCCTAAA GCCTGTGAAATTAAC
1-dw	GTGGTGGTGGTCTTAGGTATGTTGGCG CATGAGAT
2-dw	GTTAGCAGCCGGATCTCAG
3-up	GCAGAAATTCGATATCTAGATCTGCACAGT GTTGATAGGAATA
3-dw	GATGTTTAACTTTGTTTTAGGGCGACT
4-up	CCGCGCGGCAGCCATTCATCACAGCTATTC GTAACG
4-dw	GTGGTGGTGGTGGTCTAATTGAAGCGAGGC TGTGG

mental solution)1 mL。其中A5(Trace mental solution)配方(1L): H₃BO₃ 2.86 g, MnCl₂·4H₂O 1.86 g, ZnSO₄·7H₂O 0.22 g, Na₂MoO₄·2H₂O 0.39 g, CuSO₄·5H₂O 0.08 g, Co(NO₃)₂·6H₂O 0.05 g。BG11₀培养基与BG11培养基配方相仿, 只是在BG11₀培养基中不添加NaNO₃。若为固体培养基, 则需添加1.2%的琼脂粉^[11], 121℃、101.53 kPa灭菌30min。鱼腥蓝细菌在培养时涉及的抗生素使用浓度为: Neomycin(新霉素), 100 μ g/mL; Spectinomycin(壮观霉素), 5 μ g/mL; Streptomycin(链霉素), 2.5 μ g/mL。

1.4 实验所用主要分子生物学试剂

本研究中使用限制性核酸内切酶及T₄DNA连接酶均购自TaKaRa公司, 金牌MIX高保真DNA聚合酶购自武汉擎科, Phanta高保真DNA聚合酶购自诺唯赞生物科技有限公司, 质粒抽提试剂盒、基因组抽提试剂盒、PCR产物回收及胶回收试剂盒和RNALater购自武汉川流生物科技有限公司。

1.5 PCR扩增条件及主要质粒构建

pCT-alr2009质粒用于过表达DnaA(由*alr*2009编码)。使用引物P3和P4通过聚合酶链式反应扩增载体pCT, 反应条件为: 94℃预变性5min; 94℃变性30s, 59℃退火30s, 72℃延伸4min, 29个循环; 72℃5min。使用引物P1和P2通过聚合酶链式反应

扩增得到 $alr2009$ 片段,反应条件为:94℃预变性5min;94℃变性30s,55℃退火30s,72℃延伸45s,29个循环;72℃5min。通过同源重组插入到上一步得到的载体,得到质粒pCT- $alr2009$ 。该质粒负责 $alr2009$ 基因的表达,CT启动子指Theophylline riboswitch E(TP,茶碱)和PpetE(Cu^{2+})组成的启动子, $petE$ 启动子启动的强弱受铜离子(Cu^{2+})控制, Cu^{2+} 是启动转录所必需的,riboswitch E调控起始DnaA蛋白的翻译,riboswitch E受茶碱(Tp, Theophylline)的调控,二者共同诱导基因的表达。本实验所用 Cu^{2+} 终浓度为0.25 $\mu\text{mol/L}$,Tp终浓度为1 mmol/L用于DnaA的过表达。

pCint2M- $alr2009$ 质粒用于构建 $dnaA(alr2009)$ 缺失突变体。使用引物P5和P6通过聚合酶链式反应扩增 $Anabaena$ 基因组DNA获得 $alr2009$ 基因上游的1255 bp片段($alr2009UP$),反应条件为:94℃预变性5min;94℃变性30s,55℃退火30s,72℃延伸45s,29个循环;72℃5min。使用引物P7和P8通过聚合酶链式反应扩增 $Anabaena$ 基因组DNA获得由 $alr2009$ 基因第1378位起始的1251 bp片段($alr2009DW$),反应条件为:94℃预变性5min;94℃变性30s,55℃退火30s,72℃延伸45s,29个循环;72℃5min。使用引物P9和P10通过聚合酶链式反应扩增载体pSfgfp-Sp得到Spectinomycin抗性基因片段,反应条件为:94℃预变性5min;94℃变性30s,58℃退火30s,72℃延伸1min,29个循环;72℃5min。将上述3个基因片段通过同源重组连接并插入到pCint2载体的Pst I和Xho I位点之间,得到质粒pCint2M- $alr2009$ 。该质粒中Sp-r两边序列与野生型基因组中 $dnaA(alr2009)$ 基因上游1255 bp片段($alr2009UP$)及下游由该基因1378位起始的1251 bp片段($alr2009DW$)同源,因此可与野生型基因组发生同源重组,从而将壮观霉素基因插入到野生型基因组中,利用Spectinomycin(壮观霉素)和Streptomycin(链霉素)抗性及其5%蔗糖进行筛选获得DnaA缺失突变体。

1.6 鱼腥蓝细菌PCC 7120接合转移(三亲本杂交)

根据实验需要,分别取等体积的处于对数生长期的大肠杆菌HB101/pRL623(pRL623是指HB101自身携带的质粒)、接合菌J53/RP4和鱼腥蓝细菌PCC 7120这3个亲本菌株,6000 r/min,离心3min收集菌体,并用相应的无抗培养基洗涤2次。然后用0.2 mL无抗LB培养基重悬2种大肠杆菌,用0.2 mL无抗的BG11培养基重悬鱼腥蓝细菌^[11];将3个亲本的菌液混合摇匀,转移至无菌的透明度较高的离心管中,在光照培养箱中静置培养4h以上;将静置后的菌液均匀涂布于无抗的BG11固体培养基平板表

面,然后把平板置于光照培养箱中培养^[11]。

抗生素筛选:培养18—24h后,于固体培养基底部加入相应的合适浓度的筛选抗生素稀释液,之后置于光照培养箱继续培养;24h后,翻转平板,使有培养基的血底朝上,继续培养;10—15d左右,观察平板,成功转入重组质粒的鱼腥蓝细菌将会长出相应的单菌落,然后挑取单菌落并转接到含相应抗生素的新鲜固体培养基平板或液体培养基三角瓶中进行扩大培养;验证:抽提菌株的总DNA,PCR验证菌株;验证无误的菌株继续培养,以进行下一步的实验^[11]。

蔗糖筛选:将获得的单菌落转移到含对应抗生素BG11培养基上进行扩大培养(标记好克隆子编号)。再转移至含相应抗生素2 mL液体培养基;收集菌体于2 mL离心管中(1 mL菌液),用超声波处理,将菌丝打断成<10个细胞(显微镜观察),离心去除上清,添加200—400 μL 新鲜培养基,再转移到1—2个含5%蔗糖及对应的抗生素BG11平板,进行双交换突变体的筛选;1—2周后分别挑取5—6个单菌落于新鲜相应抗生素的平板上进行扩大培养,再转移至液体培养,同时对之进行验证。

1.7 鱼腥蓝细菌异形胞的缺氮诱导

将鱼腥蓝细菌于BG11液体培养基中培养至对数生长期($A_{750}=0.4—0.5$),6000 r/min离心2min收集菌体;加入BG11₀液体培养基重悬菌体,6000 r/min离心2min,收集菌体;重复上述步骤1次;6000 r/min离心2min,用移液器尽量除去上清培养基;加入适量BG11₀培养基重悬菌体;将菌体转移至适宜大小的三角瓶中,添加适量BG11₀培养基后置于光照摇床中培养;24h以后镜检是否有异形胞的分化^[11]。实验过程中应做好三组平行试验。

1.8 显微镜观察

蓝细菌和0.5%的Alcian blue染色混合,放置1min左右进行阿尔新蓝染色,利用Olympus BX41显微镜对鱼腥蓝细菌细胞形态进行观察,主要步骤为取0.2—0.5 mL细胞培养液至离心管中,静置,待其自然沉降;吸取离心管底部3—5 μL 细胞液,滴于载玻片中央;将盖玻片置于载玻片上方,轻压,赶出气泡;将制作好的切片置于显微镜载物台中央;低倍镜寻找合适视野,根据实验需要转换为相应的高倍镜,每转换一次需重新对焦一次;根据实验需要切换视野或滤镜通道,观察并记录图像^[11]。

2 结果

2.1 $dnaA$ 缺失突变体、过表达株的构建及含DnaA box基因序列在基因组中的插入

起始蛋白DnaA在细胞周期中起复制起始作用,

DnaA浓度的改变与细胞周期的变动紧密相连。为了探究DnaA浓度对鱼腥蓝细菌PCC 7120的细胞生长及异形胞发育的影响, 构建了*dnaA*基因(*alr2009*)缺失突变体以及DnaA过表达株。同时作为对照, 通过改变DnaA box位点数量, 也可相应地改变游离DnaA的量。通过在鱼腥蓝细菌染色体中插入含有DnaA box的*oriC*片段及*dnaA-oriC-dnaN*片段来实现对DnaA浓度的改变。

通过三亲本杂交的方式将构建好的pCT-*alr2009*(图 1A)转入野生型鱼腥蓝细菌PCC 7120中, 获得DnaA过表达株Oalr2009。同时也构建了pCint 2M-*alr2009*质粒(图 1B), 通过三亲本杂交的方式将构建好的整合型载体pCint2M-*alr2009*转入野生型鱼腥蓝细菌PCC 7120中, 通过筛选获得DnaA缺失突变体Malr2009。

利用引物1-up和1-dw及1-up和2-dw分别对抗性筛选得到的Oalr2009进行PCR验证(图 2A)。WT菌株作为对照无法扩增出目的片段, 过表达菌株中利用引物1-up和1-dw可扩增获得目的片段1787 bp, 同时换用引物1-up和2-dw进行PCR扩增, 也可获得目的片段, 大小应为2117 bp。结果表明, 筛选得到的3株Oalr2009菌株均为超表达菌株。

之后利用引物3-up和3-dw及4-up和4-dw分别对筛选得到的Malr2009克隆进行PCR验证(图 2B)。当使用3-up和3-dw引物时, WT菌株因不含Sp-r片段所以无法扩增出片段, 缺失突变菌株中由于*alr2009*基因片段被Sp-r片段置换, 因此PCR扩增后片段大小为1800 bp。当使用4-up和4-dw引物时(图 2C), WT菌株因为含有*alr2009*基因片段, 因此PCR扩增后的片段大小为861 bp, 缺失突变菌株中由于*alr2009*基因片段被Sp-r片段置换, 因此PCR扩增后无产物。检测结果显示, 筛选得到的3个Malr2009菌株均可扩增得到预期的1800 bp的DNA片段, 而且没有扩增出野生型DNA片段, 所以这3个菌株为完全分离的Malr2009双交换突变菌株。

作为对照, 在将含有DnaA box的*oriC*片段或*dnaA-oriC-dnaN*片段插入到基因组的实验中, 将pRL271 Ω oriC和pRL271 Ω dnaAN载体通过三亲本杂交的方法, 转入野生型鱼腥蓝细菌PCC 7120中, 利用壮观霉素可以筛选到单菌落。将pRL271 Ω oriC转入鱼腥蓝细菌PCC 7120后得到的突变体MoriC, 将pRL271 Ω dnaAN转入鱼腥蓝细菌PCC 7120后得到突变体MdnaAN, 用于后续的实验作为对照。

2.2 MoriC、MdnaAN、Oalr2009和Malr2009株的异形胞分化

为了探究DnaA是否参与异形胞的发育调控,

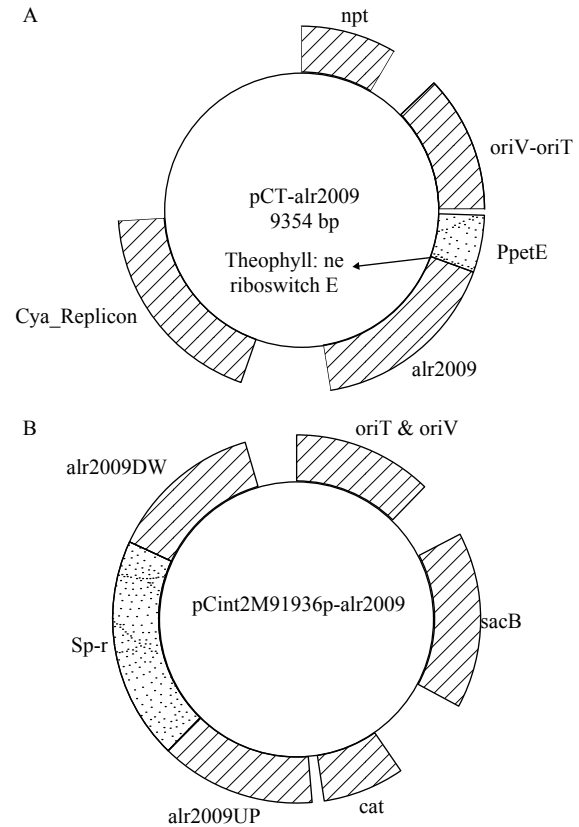


图 1 pCT-*alr2009*(A)和pCint2M-*alr2009*(B)载体示意图

Fig. 1 The vector map of pCT-*alr2009* (A) and pCint2M-*alr2009* (B)

A. pCT-*alr2009*是复制型质粒, 由Theophylline riboswitch E和PpetE组成的启动子共同起始*alr2009*的转录; B. pCint2M-*alr2009*是整合型质粒, 可通过*alr2009*的上游和下游同源片段与野生型基因组发生重组

A. pCT-*alr2009* is a replicative plasmid, which can initiate the transcription of *alr2009* by the promoter of theophylline riboswitch E combined with PpetE; B. pCint2M-*alr2009* is an integrative plasmid, the wild type genome can be recombined by upstream and downstream homologous fragments of *alr2009*

对野生型、MoriC、MdnaAN、Malr2009和Oalr2009共5株菌株在氮源缺乏条件时的异形胞发育进行了观察, 并对异形胞频率进行了统计。图 3结果显示, 缺氮培养24h后, 野生型可形成成熟异形胞, 异形胞频率为8.64%。MoriC和MdnaAN也可形成成熟异形胞, 每条菌丝中都可观察到大量异形胞, 异形胞频率分别为11.76%和11.73%, MoriC和MdnaAN的异形胞频率明显高于野生型(表 2)。结果表明, *oriC*和*dnaA-oriC-dnaN*数量均可影响鱼腥蓝细菌PCC 7120的异形胞形成模式。

同时, Malr2009和Oalr2009在缺氮培养24h后也形成成熟的异形胞(图 3), Oalr2009菌丝中只能观察到少量异形胞, 其异形胞频率为6.97%, 低于野生型

(表 2)。Malr2009 的异形胞频率为 8.57%, 与野生型几乎没有差别(表 2)。综上所述, 过表达增加 DnaA 蛋白会影响鱼腥蓝细菌 PCC 7120 的异形胞形成模式, 但是完全敲除 *dnaA* 基因不会影响鱼腥蓝细菌 PCC 7120 的异形胞形成模式。

为了进一步确定 DnaA 对异形胞分化频率的影响, 分别对野生型 WT、MoriC、MdnaAN、Malr2009 和 Oalr2009 这 5 株菌株的相邻异形胞间营养细胞的数目进行统计, 以此反映异形胞在菌丝中的分化模式。图 4 显示, 在氮源缺乏 24h 后, 野生型中异形胞间营养细胞数众数为 10, MoriC 和 MdnaAN 中异形胞间营养细胞众数为 7, 明显低于野生型, 这与 MoriC 和 MdnaAN 异形胞频率明显高于野生型的结果一致(表 2)。Malr2009 的异形胞分化频率与野生型相比无明显差别, 这在异形胞间营养细胞间隔数统计中也可反映出来, Malr2009 异形胞间营养细胞间隔众数为 9, 与野生型非常接近(图 4)。在 Oalr2009 菌株中, 其异形胞间营养细胞间隔数众数为 12, 明显高于野生型(图 4), 这与 Oalr2009 的异形胞频率低于野生型异形胞频率的结果符合(表 2)。

2.3 菌株的生长状况检测

为了探究 DnaA 对鱼腥蓝细菌细胞生长的影响, 在氮源充足和氮源缺乏的条件下, 对野生型 WT、

MoriC、MdnaAN、Malr2009 和 Oalr2009 这 5 株菌株的生长状况进行了检测(图 5)。图 5A 结果显示, 在氮源充足的情况下, MoriC、MdnaAN、Malr2009 和 Oalr2009 的细胞生长状况均与 WT 相似。然而, 在氮源缺乏时(图 5B), MoriC 和 MdnaAN 的细胞生长速度慢于野生型, 它们在第 12 天时, A_{750} 均不到 0.6。Oalr2009 的细胞生长略快于野生型, 其第 12 天时 A_{750} 约为 1.2。Malr2009 的细胞生长速率与野生型无明显差异, 第 12 天时的 A_{750} 均约为 0.9。

3 讨论

细胞周期是指连续分裂细胞从一次细胞分裂结束到下一次细胞分裂结束所经历的过程。在该过程中遗传信息 DNA 精确地复制, 并分配到子代细胞中^[16-18]。在大肠杆菌中, DNA 复制的起始由起始蛋白 DnaA 对 *oriC* 的识别开始, *oriC* 中含多个 DnaA box, 可与 DnaA 结合, 在其他辅助因子的帮助下启动复制^[19-24]。但是本研究的结果(图 3 和表 2)表明 DnaA 缺失突变株 Malr2009 的细胞增殖率没有改变。这个结论与文献报道在鱼腥蓝细菌 PCC 7120 中 DnaA 并不是细胞增殖必需的蛋白^[12]一致。DnaA 对不同蓝细菌的影响各有不同, 在细长聚球藻 *S. elongatus* 中, DnaA 会影响复制起始, 其 *dnaA* 缺

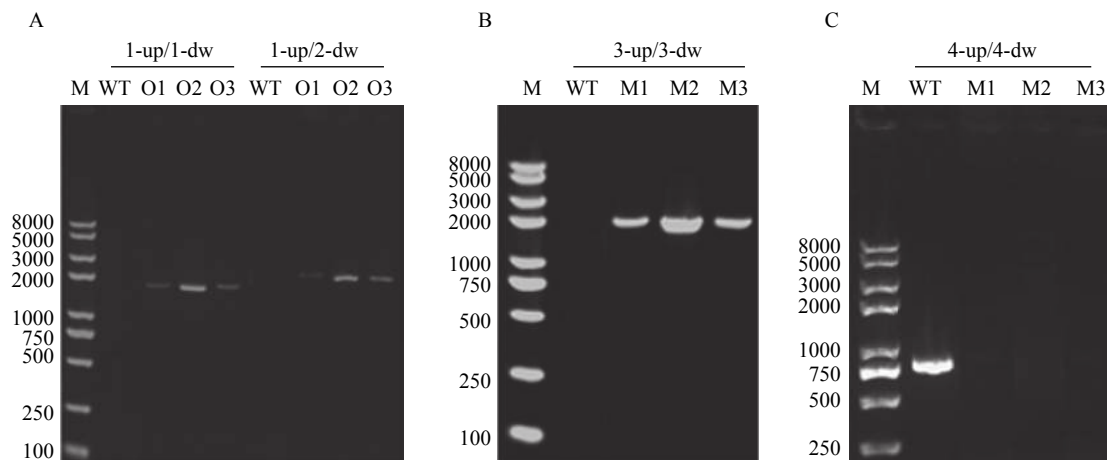


图 2 Oalr2009 和 Malr2009 菌株的 PCR 验证

Fig. 2 The PCR verification of Oalr2009 and Malr2009

WT 表示野生型, O1、O2 和 O3 表示 3 个经过抗性筛选得到的 Oalr2009 单菌落, M1、M2 和 M3 表示 3 个经过抗性筛选得到的 Malr2009 单菌落。A. 利用引物 1-up/1-dw 扩增野生型没有产物, 扩增 3 个 Oalr2009 株均获得目的片段 1787 bp, 利用引物 1-up/2-dw 扩增野生型没有产物, 扩增 3 个 Oalr2009 株均获得目的片段 2117 bp; B. 利用引物 3-up/3-dw 扩增野生型没有产物, 扩增 3 个 Malr2009 菌株均获得目的片段 1800 bp; C. 利用引物 4-up/4-dw 扩增野生型获得目的片段 861 bp, 扩增 3 个 Malr2009 株均没有产物

WT represents wild-type strains, O1, O2 and O3 represent three single Oalr2009 colonies obtained through resistance screening, M1, M2 and M3 represent three single Malr2009 colonies obtained through resistance screening. A. the wild type was amplified with primers 1-up/1-dw and no products were obtained, all the three Oalr2009 strains obtain the target fragment of 1787 bp; wild type was amplified with primers 1-up/2-dw and no products were obtained, all the three Oalr2009 strains obtain the target fragment of 2117 bp; B. the wild type was amplified with primers 3-up/3-dw and no products were produced, the target fragment of 1800 bp was obtained by amplification of the three Malr2009 strains; C. The target fragment 861 bp was obtained by amplification of the wild type with primers 4-up/4-dw, and the three Malr2009 strains were amplified without products

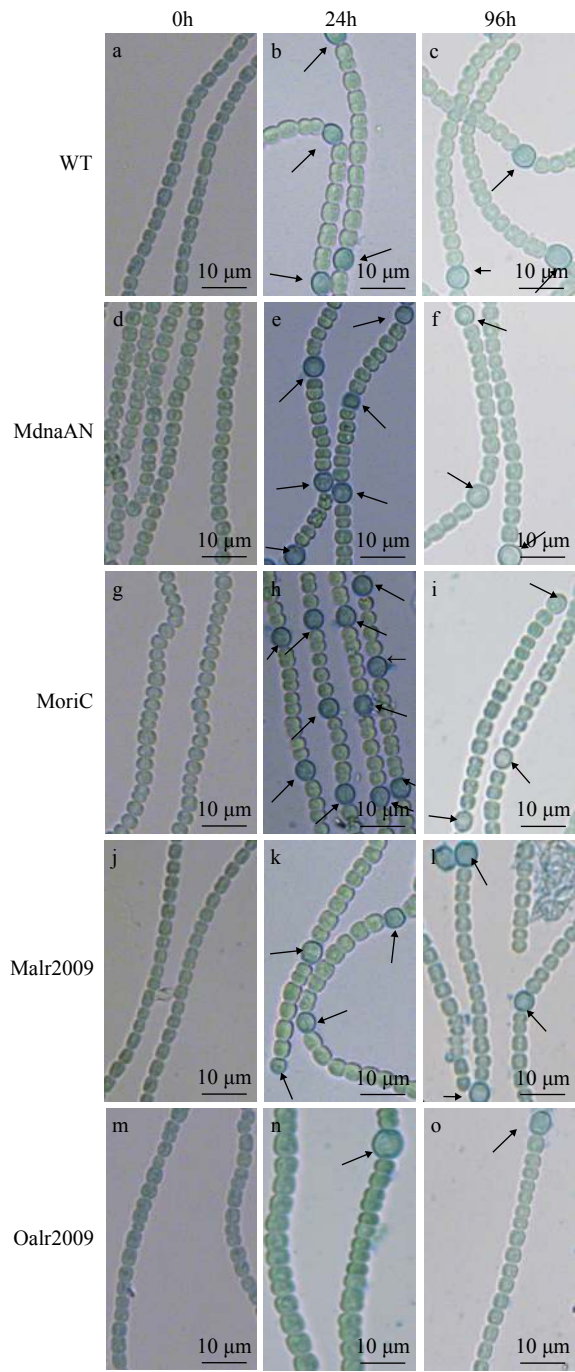


图3 五种菌株的缺氮表型观察

Fig. 3 Phenotypes of the five strains under nitrogen starvation 野生型(a—c)、MdnaAN(d—f)、MoriC (g—i)、Malr2009(j—l)和Oalr2009(m—o)在未被诱导(a, d, g, j, m)及诱导24h(b, e, h, k, n)和诱导96h(c, f, i, l, o)的异形胞显微观察。显微镜观察之前将菌丝用Alcian blue染色, 异形胞用箭头指示出来。显微镜标尺为10 μm

Heterocyst development in the wild type (a—c), MdnaAN (d—f), MoriC (g—i), Malr2009 (j—l) and Oalr2009 (m—o) after 0 induction (a, d, g, j, m), 24h after induction (b, e, h, k, n) or 96h after induction (c, f, i, l, o). Filaments were stained with Alcian blue before microscopic observation. Heterocysts are indicated with arrowheads. Scale bars=10 μm

表 2 缺氮24h后异形胞频率

Tab. 2 Heterocysts frequency after 24h of nitrogen starvation					
指标Index	WT	MoriC	MdnaAN	Malr2009	Oalr2009
异形胞 Heterocyst	280	290	290	385	257
营养细胞 Vegetative cells	2962	2176	2183	4106	3430
异形胞频率 Heterocysts frequency (%)	8.64	11.76	11.73	8.57	6.97

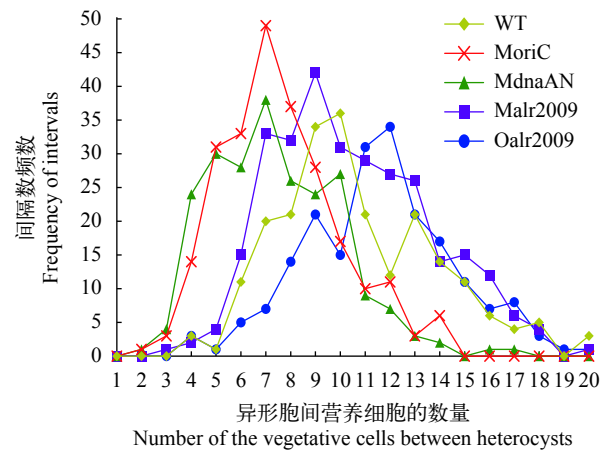


图4 五种菌株异形胞间营养细胞间隔数频数的统计

Fig. 4 Frequency of the number of the vegetative cells between heterocysts in the five strains

失突变体会降低DNA复制频率, 但并不影响细胞生长, 且其在静止期更有生存优势^[12, 25]; 相反, 在系统进化树上与叶绿体亲缘关系更为接近的集胞藻 *Synechocystis*和鱼腥蓝细菌 *Anabaena*中, DNA复制不依赖于DnaA^[12, 26], 这2种蓝细菌的dnaA缺失突变体的细胞生长和DNA复制与野生型相比均没有明显差别。由此可以看出, DnaA对复制过程的影响与系统进化关系可能相对应。有文献报道鱼腥蓝细菌PCC 7120中细胞周期的抑制, 会抑制异形胞的发育^[27]。结合实验结果DnaA的增加会降低异形胞频率, 我们推测在进化上DnaA的功能可能由调控细胞周期进化到调控异形胞频率。在鱼腥蓝细菌PCC 7120中, 虽然DnaA在细胞周期并不是必需的, 但是DnaA:oriC的平衡对异形胞的发育极其重要^[7]。本研究的结果(图3和表2)证明DnaA缺失并不会改变异形胞频率, 但是过表达DnaA会降低异形胞的频率。同时在本研究中通过增加DnaA结合位点oriC来降低细胞中游离的DnaA, 结果同样证明了DnaA的增加会降低异形胞频率。有研究^[7]证明在MoriC和MdnaAN突变中异形胞发育的正调控因子hetR增加导致了异形胞频率增加。因此我们推测通过过表达DnaA减少可用的oriC从而降低异形胞

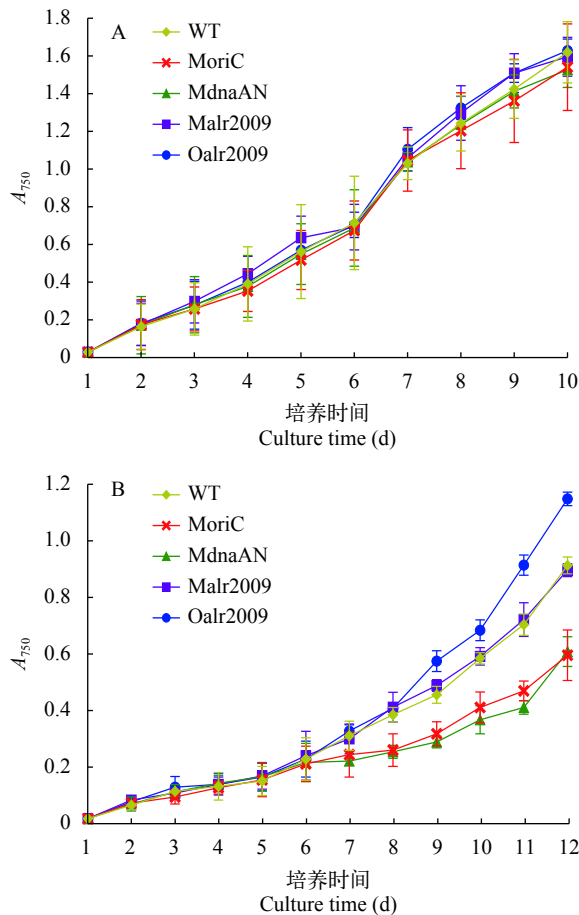


图5 五种菌株分别在供氮(A)和缺氮(B)条件下的生长状况
Fig. 5 Growth curves of the five strains under nitrogen replete (A) and nitrogen starvation (B) conditions

发育的正调控因子 $hetR$, 最终导致在DnaA过表达的突变株Oalr2009异形胞频率降低。

综上, 本研究以DNA复制中的关键蛋白DnaA为切入点, 探究了鱼腥蓝细菌PCC 7120 DnaA与异形胞分化之间的关系, 研究表明, DnaA并不是鱼腥蓝细菌PCC 7120细胞生长过程所必需的, 完全敲除 $dnaA$ 基因对细胞生长无影响, 但在缺氮条件下, 增加游离DnaA的数量会降低异形胞的分化频率。此研究进一步细化并完善了异形胞分化的分子机制, 为DnaA和异形胞分化过程相互关系的研究提供了一定的理论基础, 为蓝细菌的系统进化提供了更多的信息。

参考文献:

[1] Adams D G, Carr N G. Heterocyst differentiation and cell division in the cyanobacterium *Anabaena cylindrica*: effect of high light intensity [J]. *Journal of Cell Science*, 1981, **49**(1): 341-352.
[2] Zhang C C, Laurent S, Sakr S, *et al.* Heterocyst differentia-

tion and pattern formation in cyanobacteria: a chorus of signals [J]. *Molecular Microbiology*, 2006, **59**(2): 367-375.
[3] Golden J W, Yoon H S. Heterocyst development in *Anabaena* [J]. *Current Opinion in Microbiology*, 2003, **6**(6): 557-563.
[4] Kumar K, Mella-Herrera R A, Golden J W. Cyanobacterial heterocysts [J]. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2010, **2**(4): a000315.
[5] Muro-Pastor A M, Hess W R. Heterocyst differentiation: from single mutants to global approaches [J]. *Trends in Microbiology*, 2012, **20**(11): 548-557.
[6] Meeks J C, Elhai J. Regulation of cellular differentiation in filamentous cyanobacteria in free-living and plant-associated symbiotic growth states [J]. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2002, **66**(1): 94-121.
[7] Zhou Y, Chen W L, Wang L, *et al.* Identification of the *oriC* region and its influence on heterocyst development in the filamentous cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120 [J]. *Microbiology*, 2011, **157**(7): 1910-1919.
[8] Ozaki S, Fujimitsu K, Kurumizaka H, *et al.* The DnaA homolog of the hyperthermophilic eubacterium *Thermotoga maritima* forms an open complex with a minimal 149-bp origin region in an ATP-dependent manner [J]. *Genes to Cells*, 2006, **11**(4): 425-438.
[9] Marczyński G T, Shapiro L. Control of chromosome replication in *Caulobacter crescentus* [J]. *Annual Review of Microbiology*, 2002, **56**(1): 625-656.
[10] Mackiewicz P, Zakrzewska-Czerwinska J, Zawilak A, *et al.* Where does bacterial replication start? Rules for predicting the *oriC* region [J]. *Nucleic Acids Research*, 2004, **32**(13): 3781-3791.
[11] Hu S. Research on coordination mechanism between cell cycle and heterocyst differentiation in *Anabaena* sp. strain PCC 7120 [D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2015: 24-26. [胡胜. 鱼腥蓝细菌PCC7120细胞周期与异形胞分化之间协调机制研究 [D]. 武汉: 华中农业大学, 2015: 24-26.]
[12] Ohbayashi R, Watanabe I S, Ehira S, *et al.* Diversification of DnaA dependency for DNA replication in cyanobacterial evolution [J]. *The ISME Journal*, 2015, **10**(5): 1113-1121.
[13] Ohbayashi R, Nakamachi A, Hatakeyama T S, *et al.* Coordination of polyploid chromosome replication with cell size and growth in a *Cyanobacterium* [J]. *Microbiology*, 2019, **10**(2): e00510-e00519.
[14] Watanabe S, Ohbayashi R, Kanesaki Y, *et al.* Intensive DNA replication and metabolism during the lag phase in Cyanobacteria [J]. *PLoS One*, 2015, **10**(9): e0136800.
[15] Watanabe S, Ohbayashi R, Shiwa Y, *et al.* Light-dependent and asynchronous replication of cyanobacterial multi-copy chromosomes [J]. *Molecular Microbiology*, 2012, **83**(4): 856-865.

- [16] Fukushima S, Itaya M, Kato H, *et al.* Reassessment of the *in vivo* functions of DNA polymerase I and RNase H in bacterial cell growth [J]. *Journal of Bacteriology*, 2007, **189**(23): 8575-8583.
- [17] William D D, Garry W B. Coupling the initiation of chromosome replication to cell size in *Escherichia coli* [J]. *Current Opinion of Microbiology*, 2003, **6**(2): 146-150.
- [18] Yoshikawa H, Haas M. On the regulation of the initiation of DNA replication in bacteria [J]. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 1968(33): 843-855.
- [19] Shereda R D, Kozlov A G, Lohman T M, *et al.* SSB as an organizer/mobilizer of genome maintenance complexes [J]. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 2008, **43**(5): 289-318.
- [20] Fekete R A, Venkova-Canova T, Park K, *et al.* IHF-dependent activation of P1 plasmid origin by *dnaA* [J]. *Molecular Microbiology*, 2006, **62**(6): 1739-1751.
- [21] Felczak M M, Simmons L A, Kaguni J M. An essential tryptophan of *Escherichia coli* DnaA protein functions in oligomerization at the *E. coli* replication origin [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2005, **280**(26): 24627-24633.
- [22] Kurokawa K, Nishida S, Emoto A, *et al.* Replication cycle-coordinated change of the adenine nucleotide-bound forms of DnaA protein in *Escherichia coli* [J]. *The EMBO Journal*, 1999, **18**(23): 6642-6652.
- [23] Schaper S, Messer W. Interaction of the initiator protein DnaA of *Escherichia coli* with its DNA target [J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 1995, **270**(29): 17622-17626.
- [24] Fuller R S, Funnell B E, Kornberg A. The *dnaA* protein complex with the *E. coli* chromosomal replication origin (*oriC*) and other DNA sites [J]. *Cell*, 1984, **38**(3): 889-900.
- [25] Chen A H, Afonso B, Silver P A, *et al.* Spatial and temporal organization of chromosome duplication and segregation in the cyanobacterium *Synechococcus elongatus* PCC 7942 [J]. *PLoS One*, 2012, **7**(10): e0047837.
- [26] Richter S, Hagemann M, Messer W. Transcriptional analysis and mutation of a *dnaA*-like gene in *Synechocystis* sp. strain PCC 6803 [J]. *Journal of Bacteriology*, 1998, **180**(18): 4946-4949.
- [27] Sakr S, Jeanjean R, Zhang C C, *et al.* Inhibition of cell division suppresses heterocyst development in *Anabaena* sp. strain PCC 7120 [J]. *Journal of Bacteriology*, 2006, **188**(4): 1396-1404.

INCREASED FREE DNAA DECREASES THE FREQUENCY OF HETEROCYSTS IN ANABAENA SP. PCC 7120

LI Jing^{1,2}, YANG Yi-Ling¹ and ZHANG Cheng-Cai¹

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

2. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract: This study investigated the role of DnaA in the relationship between cell cycle and heterocyst differentiation using *Anabaena* PCC 7120 as the model organism. When providing combined nitrogen, deletion or overexpression of DnaA did not affect cyanobacterial proliferation and heterocyst differentiation. Upon deprivation of combined nitrogen, DnaA deletion (Malr2009) showed no difference in heterocyst frequency (8.57%) compared with the wild type (8.64%) at 24h, and the proliferation rate of Malr2009 was similar to the wild type. DnaA deletion did not affect cyanobacterial frequency of heterocysts or proliferation rate, but the overexpression of DnaA protein (Oalr2009) reduced the frequency of heterocysts by 20% compared with wild type, and increased the cell proliferation rate by 30% with about 1.2 at the 12th day, higher than that of the wild type (about 0.9 at the 12th day). In conclusion, although DnaA is not necessary for the growth of *Anabaena* sp. PCC 7120 cells, but under deprivation of combined nitrogen, the increased free DnaA inhibited the frequency of heterocysts.

Key words: *Anabaena* sp. PCC 7120; DnaA; DnaA box; *oriC*; Heterocyst