



## 蓝藻分子遗传学十年研究进展

王业勤 徐旭东 黎尚豪

(中国科学院水生生物研究所, 武汉 430072)

### ADVANCES IN CYANOBACTERIAL MOLECULAR GENETICS DURING THE LAST DECADE

Wang Yeqin Xu Xudong Li Shanghao

(Institute of Hydrobiology, Academia sinica, Wuhan 430072)

**关键词** 蓝藻, 分子遗传学

**Key words** Cyanobacteria, Molecular genetics

蓝藻遗传学研究始于60年代,其间经历了大约20年的徘徊,随着分子生物学、分子遗传学研究的进展,特别是重组DNA技术的广泛应用,为蓝藻遗传学研究提供了转机 and 新的洞察力,绕过应用经典遗传学技术方法所遇到的困难,另辟新径,直接分离基因,加速了研究工作的步伐<sup>1)</sup>。随着蓝藻本身一些重要而独特的生理特性逐渐为人们所认识,研究者日增,最近十年,蓝藻分子遗传学研究进展迅速<sup>[37]</sup>,不仅在藻类学研究中处于前沿,并且所取得的成果在分子遗传学领域也争得了一席之地。可以预料,本领域的研究进展,对于扩展我们对一些重要的生命过程的认识,及发展藻类和植物遗传工程方面<sup>[12]</sup>,必将产生重要的影响。本文试图概略回顾近十年中蓝藻分子遗传学研究的一些主要进展。

#### (一) 蓝藻的特性及遗传学位置

蓝藻是极为多样性的具植物型放氧光合作用的原核生物,兼具植物及细菌的一些特性,故也称为蓝细菌(cyanobacteria),种类繁多,分布广泛,它们DNA中的GC%为35—71%,反映了遗传上的异质性,但它们的分类状况至今尚未统一。近十年来,它们的植物型放氧光合作用特性,以及其光合膜结构和功能上,蓝藻与真核生物叶绿体的类似性,更引起广泛的兴趣,根据蓝藻与叶绿体的rRNA, tRNA顺序、转录、翻译机制的比较所得结果,支持叶绿体的内共生起源假说。由于蓝藻包含有许多基本的植物功能,它们是

1) 王业勤 1983, 蓝藻遗传学研究的一些进展。淡水生物学科情报 5: 1—4。

1991年4月18日收到。

研究光合作用等过程的理想模型系统。人们期望利用蓝藻研究叶绿体基因功能, 及在蓝藻与叶绿体之间交换重要的生理功能<sup>[45]</sup>。而且一些蓝藻的天然产物具有开发应用潜力, 当前, 藻类生物工程作为一个新兴产业正在兴起。毫无疑问, 蓝藻的遗传操作在未来藻类生物工程的发展中将起关键作用<sup>[13]</sup>。

蓝藻分子遗传学得以迅速发展, 除上述因素外, 还在于(1)蓝藻的结构和遗传复杂性类似于革兰氏阴性细菌;(2)一些蓝藻有天然转化系统和有效重组系统;(3)选用兼性异养蓝藻来建立分离光合作用突变株并对有关基因进行遗传分析, 比利用高等植物方便, 并且可避免植物细胞器基因与核基因相互作用的复杂性;(4)根据密码子使用的偏向性<sup>[7]</sup>, 蓝藻细胞可能是植物重要产物基因表达的宿主, 这都会有助于高等植物的遗传操作。

## (二) 蓝藻质粒及质粒运载体

自 1973 年发现蓝藻质粒以来, 已在 50 余株单细胞及丝状蓝藻中证明了质粒的存在, 大约是被检菌株的一半; 质粒数目从 1—10 个不等, 大小在 1.3kb—130KD 之间, 但也有巨大质粒 400kb—1000kb<sup>[27]</sup>。有些质粒已全部定序, 并用于杂种质粒的构建, 但蓝藻质粒遗传研究的进展是缓慢的, 虽已检测到一些质粒的体内转译的蛋白产物<sup>[36]</sup>, 可惜至今未找到蓝藻质粒编码功能的证据, 均属隐秘性质粒, 无从了解它们在生理、生态和进化上的意义。质粒的去除对细胞表型没有明显影响, 有证据表明, 蓝藻质粒可能在不同种属间转移或含有可转移的元件。

蓝藻质粒尚未发现可识别的遗传标记, 且不能在 *E. coli* 中复制, 显然不能作为克隆运载体。用含 Tn901 的 *E. coli* 质粒转化 *Synechococcus* PCC 7942, 由于 Tn901 插入蓝藻内源质粒, 第一次获得了带 Ap<sup>r</sup> 标记的杂种质粒 pCH1 及衍生质粒 pUC1, 将后者与 pACYC184 融合, 首次获得了双向质粒 pUC104 和 pUC105, 能在 *E. coli* 和蓝藻中复制。其后利用多种单细胞蓝藻质粒与 *E. coli* 质粒如 pBR322 等分别连接, 或导入多接头, 或补充新的选择标记, 改善运载体克隆潜力, 又相继构建了许多双向质粒, 如: pPUC29、pUC303、pLS103、pSG111、pPLANB2 和 pCB4、pXB7、pKBBX、pAQE、pUF12、pUF311 以及在此基础上发展的宿主运载体系统 pFCLV7-*Synechocystis* 6803(SUF311), 大大提高了转化效率<sup>[9,25]</sup>。Wolk 等人构建的 pRL 质粒系列, 含有 pBR322 的复制起点和非受损的 bom 区, 抗性选择标记, 并选择去除了限制酶 *Ava*II 和 *Ava*I 的识别位点。且含有蓝藻质粒的复制起点 (ori), 这类双向质粒可通过接合转移并稳定维持在丝状蓝藻细胞中<sup>[15]</sup>。早期这些基因运载体的构建, 为蓝藻分子遗传学研究奠定了基础。

其后又相继构建了一些新的双向质粒及检测基因表达的质粒, 也就是将编码  $\beta$  半乳糖苷酶或荧光酶基因的 DNA 片段插入双向质粒中, 根据酶活性显示克隆基因的表达、另外利用噬菌体调节信号, 通过漂移温度控制克隆基因表达强度的质粒也已构建<sup>[18]</sup>。最近报道一些启动子探测质粒的构建, 为确定基因转录启动子提供了可能<sup>[17]</sup>。我们将安装有 pUC9 的 MCS 序列的 CAT 基因克隆于 pRL25c 质粒内, 利用 CAT 基因作为克隆启动子的报告基因, 构建了适用于 *Anabaena* 的启动子探测质粒<sup>1)</sup>。

1) 徐旭东, 1991: 博士生研究论文。

### (三) 基因转移系统

蓝藻的遗传重组现象迟至 1968 年才被证实,接着才证明单细胞藻 *Synechococcus* PCC7943 的 DNA 转化作用,至今已发展了两种类型基因转移系统,即转化作用<sup>[34]</sup>和接合转移系统<sup>[39]</sup>。

目前已确认可转化的蓝藻是一些单细胞种类,如 *Synechococcus* PCC7943、6301、7942、7002、73609 和 *Synechocystis* PCC 6714、6308、6803、6906,除 6308 外,它们都有天然转化能力。丝状蓝藻的转化作用,虽有报道<sup>[3]</sup>,但可重复的稳定转化系统尚未确立<sup>1)</sup>,最近证明,电激法 DNA 转化可成功应用于 *Anabaena*<sup>[40]</sup>。

一般认为蓝藻 DNA 转化感受态出现于指数生长期,但没有峰值,当细胞进入静止期、或耗尽氮源,或加 DNA 前预黑暗,转化效率明显降低。有些藻株,经溶菌酶处理,并延长 DNA 保温时间,可提高转化效果。在 DNA 吸收阶段是否需光,不同作者结论不一,或认为光或暗没有影响,或认为黑暗及加光合抑制剂增加转化效率;与之相反,认为黑暗降低效率 10 倍。DNA 转化的剂量效应,依受体细胞种类不同而异,其中 PCC6803、7002、7942 三株是比较理想的受体;并受选择标记性质(如 Sm<sup>r</sup>、Cm<sup>r</sup> 优于 AP<sup>r</sup>),及所用 DNA 种类的影响。饱和 DNA 浓度一般在 1 $\mu$ g/ml 以下,加入 DNA 反应时间 5—30min,但也有反应 18h 者,逐渐增加选择因子浓度有利于转化子抗性表达。转化时 DNA 的结合吸收有竞争,没有专一性,这与革蓝氏阴性菌不同。同源、异源、线性或环状 DNA 均可转化,单链分子不能转化<sup>[33]</sup>。

随着证明外源 DNA 标记在蓝藻细胞中表达及杂种质粒的构建,通过质粒转化的基因转移被广泛研究和应用。(1) 直接利用未修饰的外源质粒转化,如 pBR322, pBR328 等,可将外源标记 DNA 导入蓝藻基因组,但效率很低,且需经过特殊处理受体细胞,如溶菌酶或紫外光处理。我们的结果证实, *Synechococcus* PCC6301 经溶菌酶处理后可直接用 pBR325 等外源质粒转化。(2) 非复制杂种质粒转化,在蓝藻染色体 DNA 片段中插入抗性标记基因并与非复制外源质粒连接后转化,或将染色体 DNA 片段与抗性标记基因连接后转化,通过同源重组作为插入诱变的有效方法(见第七节);或将克隆基因与报告基因(如 LacZ)融合,并与非复制质粒连接,通过转化插入染色体基因组,以检查有关基因的表达<sup>[35]</sup>。转化及重组效率,取决于与同源 DNA 的连接及 DNA 片段的长度<sup>[8]</sup>。(3) 双向杂种质粒转化,产生部分二倍体,用于基因克隆,表达及互补分析,双向质粒能否稳定维持取决于(a) 宿主内切酶作用的可能性,(b) 导入的质粒与宿主内源质粒之间的同源重组<sup>[9]</sup>,(c) 克隆的 DNA 片段与宿主染色体 DNA 的同源重组。报道指出,克隆于 pCB4 质粒的叶绿体基因组文库,转化蓝藻 *Synechococcus* PCC7942 显示不同的转化效率,且质粒稳定性不同,这可能是由于特定的叶绿体 DNA 片段与宿主基因相互作用的结果<sup>[43]</sup>。

由于丝状藻的 DNA 转化系统尚未建立,由 Wolk 等人首先完成的 *Anabaena* 接合转移系统是丝状蓝藻基因转移系统的突破。这个系统要求存在接合质粒(如 RP4)、辅

1) 王业勤,徐旭东,1988: *Anabaena* 氧敏感株的 DNA 转化并外源的 DNA 导入。

863 计划生物技术领域年会论文摘要 p18—19。

助质粒(有识别 *Bom* 位点的 *mob* 基因),及 *pRL* 系双向质粒。这个系统经修改已扩大应用于其他丝状藻如 *Nostoc*, *Calothrix* 及单胞藻 *Synechococcus*<sup>[15]</sup>。这是目前可用于丝状蓝藻唯一有效的基因转移系统。但人们还希望寻找天然在蓝藻和大肠杆菌中都能自主复制且能接合转移质粒作为更方便的克隆运载体。最近报道指出,广宿主的 *IncQ* 质粒 *pkT210* 可能具有这样的潜力。

#### (四) 基因克隆和基因图的制定

自 1980 年从 *Anabaena* PCC7120 基因组中克隆到 *nif H1* 基因以来,到 1990 年,克隆的各类已知功能的蓝藻基因达 130 多种(表 1)。其中的 70% 是编码光合器复合体的。此外,通过核苷酸序列分析,还识别出一些未确定基因产物的阅读框(ORF)。蓝藻基因克隆与识别主要有 7 种方法。(1)利用异源 DNA 探针杂交从基因文库中识别目的基因;(2)根据已知的氨基酸顺序选取最保守的一段,人工合成寡核苷酸探针杂交筛选;(3)利用标记抗体从表达基因文库中筛选目的基因;(4)标记 RNA 探针与 DNA 杂交;(5)标记(转座子或抗性基因)援救克隆;(6)突变株直接互补法;(7)DNA 序列分析寻找 ORF<sup>[12,25]</sup>。

基因的克隆给制定蓝藻基因图提供了可能。由于在蓝藻中无可用的噬菌体转导或染色体接合转移系统,故基因组结构的研究局限于限制酶切图谱定位。早先利用染色体步查技术将 *Anabaena variabilis* 960 个克隆的 *cosmids* 文库分为 40 个连锁族,并把一些基因定位于这些连锁族内<sup>[24]</sup>。但是这一技术制完整的基因图是困难的,因为有一些染色体片段可能无法在 *E. coli* 宿主中克隆,这样在 *cosmids* 连锁族之间形成空缺。

导致基因定位工作真正突破的是大片段染色体操作的脉冲匀直变角场电泳(PHOGE)的应用。选择一些在 *Anabaena* PCC 7120 染色体上仅有极少识别位点的限制酶对染色体完全酶切并作 PHOGE 和 Southern 杂交,从而作成基因组的大尺度物理图谱,并将 30 个基因探针定位于该限制酶图谱上<sup>[4]</sup>,结果表明,尽管蓝藻基因也以操纵子形式组织,但功能相关的基因并非集中在一处,而是分散于染色体上不同位置。编码光系统 I、光系统 II 复合体的基因及异形胞包被结构相关的基因等皆如此。而且表明,*Anabaena* 的基因图与叶绿体染色体基因图在排列顺序上明显不同。

除 *Anabaena* 以外,据报道最近单胞藻 *Synechococcus* PCC7002 染色体物理图谱也已完成(Cyanonews(1990) vol.6 no.3.)。

#### (五) 重复序列和动态 DNA

*Calothrix sp.* PCC 7601 基因组中存在三类短的串联重复序列(STRR)<sup>[30]</sup>。它们皆由 7 个核苷酸顺序串联重复组成,每次串联约有 3—11 个重复序列。基因组中 STRR 达 100 拷贝以上。进一步调查 24 株蓝藻,发现仅在有异形胞分化的丝状藻才具有这种重复顺序。

另一类低拷贝重复顺序即是普遍存在于原核生物中的插入因子(IS)。*Calothrix sp.* PCC7601 株色素自发变异频率极高,即与 IS 的活动有关。选择有代表性的两突变株作基因图谱和表达研究,发现其中一株系一个具有典型插入因子序列的 1.4kb DNA 插入

表 1 (Tab.1) 藍藻克隆基因  
(Cloned cyanobacterial genes)

藻株 (Strains)	克隆基因 (Cloned genes)	藻株 (Strains)	克隆基因 (Cloned genes)
<i>Synechococcus</i> sp. PCC 6301	apc A,B,C atp A,B,C,D,E,F cpc A,B fus gln B-like pet F ppc psa D,E psb I rbc L,S rrn A,B trn A trn I rps 7,12 tuf	<i>Phormidium laminosum</i>  <i>Pseudanabaena</i> sp. PCC 7409  <i>Spirulina platensis</i> C <sub>1</sub>	psa D,E glt rpl 10,12  9kDa (PSII)  apc A,B cpc A <sub>1</sub> A <sub>2</sub> B,B cpe A,B, nif H,D,K  fus gin rbc L,S rps 2,7,12 tsf tuf
<i>Synechococcus</i> sp. PCC 6715	rrn(5s)	<i>Anabaena cylindrica</i>	soh
<i>Synechococcus</i> sp. PCC 6716	soh	<i>Anabaena variabilis</i>	ava IMR pet F ppc prc A rec A
<i>Synechococcus</i> sp. PCC 7002	apc A,B,C,D aqu IMR arg E cpc A,B,C,D,E,F leu B, psa A,B psb A <sub>1</sub> ,A <sub>2</sub> ,B,C,D <sub>1</sub> ,D <sub>2</sub> ,E,F rec A rbc L	<i>Anabaena</i> sp. PCC 7120	als atp A,B,C,D,E E,G,H,I cpc A,B,C,D,E, F,G fdx H gln A het A,B IS AI,AII,AIII, AIV nif B,D,H,H,K,S pet F,F psb A,A,A,A rbc L,S trx xis A
<i>Synechococcus</i> sp. PCC 7942	cbp A cpc A,B fus glg B gnd gro ES, EL irp A met F nar A,B,C ntc A pet F <sub>1</sub> ,G,I phr psb A <sub>1</sub> ,A <sub>2</sub> ,A <sub>3</sub> ,C <sub>2</sub> ,D <sub>1</sub> ,D <sub>2</sub> psb I rec A sod B thi I trx M tuf	<i>Calothrix</i> sp. PCC 7601	apc A,A,B,C,D,E cpc A,A,A,B,B, B,D,E,F,H, I,L,M cpe A,B,C,D gvp A,A,C,D IS 701,702 psb A,A thr B
<i>Synechococcus</i> sp. PCC 6701	cpc A,B	<i>Nostoc</i> sp. PCC 7801	leu B
<i>Synechococcus</i> sp. PCC 6714	crt I	<i>Nostoc</i> sp. PCC 7906	pet A,B,C,D
<i>Synechococcus vulcanus</i>	psa C	<i>Nostoc</i> sp. PCC 8009	apc A,B,E
<i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803	des A psb A <sub>1</sub> ,A <sub>2</sub> ,A <sub>3</sub> ,B,C D,D,E,F,G H,I,J,K psb I	<i>Nostoc commune</i>	ipg nif H,D
		<i>Chlorogloeopsis</i> sp. PCC 6912	IS rbc L,S

续表 1

als	乙酰乳酸合成酶	gnd	6-PG 脱氢酶	psb	光系统 II 复合体
apc	别藻蓝蛋白	gro	伴侣蛋白	prc	需钙蛋白酶
aqlMR	aql 甲基化酶	gvp	伪空胞蛋白	rbc	核酮糖二碳酸羧化酶
arg	精氨酸合成酶	het	异形胞特异表达基因	rec	DNA 同源重组酶
atp	ATP 酶	ipg	磷酸吡啶水解酶	rpl	核糖体大亚基蛋白
avalMR	AvaI 甲基化酶	irp	铁调膜蛋白	rps	核糖体小亚基蛋白
cbp	胡萝卜素结合蛋白	IS	插入因子	rrn	核糖体 RNA
cpc	藻蓝蛋白	leu	亮氨酸合成酶	sod	超氧化物歧化酶
cpe	藻红蛋白	met	甲硫氨酸合成酶	soh	可溶性氢酶
crt	植烯脱氢酶	nar	硝酸还原酶	thi	硫胺素合成酶
des	脂肪酸脱饱和酶	nif	固氮酶	thr	苏氨酸合成酶
fdx	铁氧还蛋白	ntc	氮同化调节蛋白	trn	tRNA
fus	延伸因子 EF-G	pet	光合电子传递体	trx	硫氧还蛋白
glg	分岐酶	phr	光修复酶	tsf	延伸因子 EF-Ts
gln	谷酰胺合成酶	ppc	PEP 羧化酶	tuf	延伸因子 EF-Tu
glt	葡萄糖转移蛋白	psa	光系统 I 复合体	xis	剪切酶

cpcF 基因,导致藻胆体失去棒状结构,PC $\alpha$  亚基失去发色团,且 cpe 基因完全不转录。另一株系 1.1kb 长的一段 IS 插入 cpc-B2A2H2I2D2 操纵子上游,导致藻胆蛋白含量全面下降。它们分别命名为 IS701 和 IS702<sup>[29]</sup>。

除 *Calothrix* 外,在 *Anabaena* sp. PCC7120, M-131 等株也发现了插入因子结构。尤其是 *Chlorogloeopsis fritschii* 在 rbc 基因附近一插入因子序列与 *E. coli* 的 IS<sub>2</sub> 十分吻合,推测自然界发生过 *E. coli* 与蓝藻的接合转移。

更有意思的是 *Anabaena* 异形胞发育过程中基因组的动态变化。营养细胞分化为异形胞后,异形胞基因组 nif 基因丛内部和附近发生了 DNA 重排。nifD 基因内有一 11kb 因子脱落,并以环状形式存在,不扩增也不降解。该因子两端有同向的两段 11 碱基对的序列<sup>[21]</sup>。这一重排不仅发生在异形胞分化过程中,还可以发生在 *E. coli* 克隆中。将 mini-Mu-lac 转座子转座到克隆于 pBR322 的该 11kb 因子内,当重排反应发生时, lac 基因从克隆中消失。这样发现有 0.3% 的细胞中可发生重排反应。作 DNA 序列分析,在该因子近 nifk- 端识别出一个 1135 bp. 的 ORF,推测为剪切基因。定向插入失活 xisA 基因后,异形胞发育照常,但 11kb 因子不发生脱落,同时失去固氮能力。除了这一重排反应外,在 nif S/V 与 rbc L, S 基因之间还发生了一个 55kb DNA 因子的脱落事件。以染色体步查技术证明该 DNA 脱落后也以环状存在。并与 nif S/V 转录有关<sup>[22]</sup>。但是两个重排因子末端识别顺序不同,且可以人为地使二者不相伴发生,故必然有另一种剪切酶识别第二个重排片段末端顺序。另一藻株 *Anabaena variabilis* 在异形胞发育时同样发生 11kb 因子的重排,而无 55kb 因子的重排。

对 11kb 因子内 xis A 附近序列分析发现了四个 ORF,其中 ORF<sub>3</sub> 与 Cyt P-450 同源性很高;而 ORF<sub>2</sub> 是最为保守的<sup>[27]</sup>。但其真正功能有待进一步研究。

#### (六) 基因表达调控的研究

与其它光合生物类似,蓝藻中也存在受光调节的基因,其表达受光质或光强的调节。

*Calothrix* sp. PCC 7601 在红光条件下,藻胆体棒状部分藻红蛋白消失,藻体显蓝色;在绿光条件下则藻蓝蛋白消失,藻体显红色,称“补色适应”。研究表明,藻胆蛋白有 7 个操纵子,其中 3 个编码藻蓝蛋白,它们是 *cpc1*:*cpcB1A1EF*,*cpc2*:*cpcB2A2H2I2D2*,*cpc3*:*cpcB3A3H3I3D3*; 1 个藻红蛋白操纵子 *cpeBA-orf*; 3 个 *apc* 操纵子。*apc* 及 *cpc1* 的转录不受光质的影响,而 *cpc2* 仅在红光中转录,*cpe* 仅在绿光中转录<sup>[38]</sup>。不同的是,*cpc3* 操纵子并不受光质影响,而在缺硫条件下转录。

光系统 II 复合体中 *psbA* 基因受光强调控。如单细胞的 *Synechococcus* PCC 7942 *psbA* 有 3 个拷贝 *psbAI*、*II*、*III*,编码不同型的  $D_1$  蛋白,在通常光照条件下,*psbAI* 基因比 *psbAII* 的转录水平高 500 倍,比 *psbAIII* 高 50 倍。并且 *psbAI* 的表达随光强减弱而增加,而 *psbAII*、*III* 仅在光照接近  $600 \mu E \cdot m^{-2} \cdot S^{-1}$  的情况下才有较可观的表达产物<sup>[6,35]</sup>。

以上二类多拷贝基因(基因家族)表达情况表明各拷贝的功能有所分工,从而更好地适应环境条件的变化。

在丝状固氮蓝藻中,固氮作用是异形胞分化紧密联系在一起的。氮饥饿导致异形胞分化,固氮酶基因脱阻遏;以及 *cpc*、*apc*、*rbc* 等基因表达下降,以至在成熟异形胞中这些基因的产物消失。利用突变株弥救法,已克隆到参与异形胞发育调控的基因。当该基因克隆于穿梭质粒并转移至 *Anabaena* 时,异形胞发育不受铵氮抑制。(Cyanonews (1990). vol6. No.2) *nif* 基因除受环境因子调节外,直接受异形胞发育的调节。*nif* S/V 基因不仅在异形胞发育晚期 55kb 重排因子脱落后才发生转录,*nif* HDK 的启动子装置于荧光酶基因前同样发现仅在异形胞内表达;而转移至不产异形胞的突变株时,微氧条件下,荧光酶也仅在相当于异形胞位置的细胞表达<sup>[16]</sup>。

蓝藻基因转录调控机理目前有几种看法。第一,基因表达的转换与不同的  $\sigma$  因子有关。分离纯化的 *Anabaena* 营养细胞 RNA 聚合酶在体外转录系统中只能识别 *E. coli* 型启动子;Gln 基因前方兼有 *E. coli* 型和 *nif* 型启动子,在营养细胞中二者可识别转录,而在除去铵氮时仅从 *nif* 型启动子转录。第二,存在阻遏蛋白类调节因子,在启动子下游有识别位点。*Anabaena* 的 *xisA* 基因启动子后一段 170bp 的序列即担负阻遏其启动子在营养细胞中转录的功能,并有 5 核苷酸重复序列可为一种蛋白特异识别结合,可能就是阻遏调控顺序<sup>[11]</sup>。第三,存在基因表达激活因子。单细胞藻 *Synechococcus* PCC 7942 *ntcA* 基因突变失活则导致硝酸还原酶、亚硝酸还原酶、谷酰胺合成酶、甲基氨转移活性等氮代谢功能丧失。这种多效性表明 *ntcA* 产物可能是氮代谢基因的正调控因子<sup>[12]</sup>。第四,基因组超螺旋状态调控基因的转录。氧对固氮酶基因表达的调控就可能通过拓扑酶调节基因组超螺旋状态实现<sup>[20]</sup>。

转录调控是蓝藻基因调控的重要方式。*recA*、伴侣蛋白、铁氧还蛋白和黄素蛋白、铁调控蛋白等编码基因的转录直接受环境因子的调控。

除转录水平的调控外,也存在转录后调控。具补色适应的 *Calothrix* 7601 和 *Synechococcus* 6701 二者 *cpe* 启动子部位有保守识别序列,故它们在绿光质条件下转录水平接近,但细胞内藻红蛋白量却相差较大,可能就是转录后调控的结果。更有趣的是 *Calothrix* 7601 *gvp* 操纵子内有一 0.4kb 的反向转录本,与正向的三个转录本可互补结合,称

反义 RNA。可能在结合成双链 RNA 后, 利于特殊降解双链 RNA 的酶的快速作用<sup>[14]</sup>。另外, *cpc*<sub>3</sub> 操纵子编码的产物在翻译后 N-端 Met 被切去, 则属于翻译后修饰。

### (七) 蓝藻的诱变及基因功能分析

蓝藻通过传统方法诱变产生的遗传变异已有不少报道, 已分离鉴定了许多突变株, 大致分为 8 个大类型。不过除抗性突变株外, 一般诱变效率都较低, 且已分离的突变株, 从生化上做了明确鉴定的不多<sup>[1,2]</sup>。传统方法诱变蓝藻遇到的困难, 除一些技术上的原因外, 可能与它们基因组的多拷贝性质有关, 这阻碍了隐性突变在缺少正向选择压力下的表达, 且突变不易稳定。

近年来, 已发展了蓝藻染色体遗传工程, 诱变分离突变株, 并对有关基因功能进行分析或基因克隆<sup>[23]</sup>。一些单细胞蓝藻能进行 DNA 转化, 并已证明外源 DNA 能稳定整合于蓝藻染色体上, 这就便于通过随机插入诱变或定向诱变修饰蓝藻基因组, 而获得各种类型的突变株, 例如, 将 *Cm*<sup>r</sup> 或 *Km*<sup>r</sup> DNA 片段连接于宿主染色体 DNA 片段, 通过转化同源重组, 研究了随机克隆抗生素抗性基因至蓝藻基因组所产生的插入突变, 并分离了光合作用突变株<sup>[8]</sup>, 他们解释这种整合转化机制包括(1)基因置换的同源重组为主要类型;(2)单交换附加重组;(3)不正常重组。这种插入诱变可作为一种替代转座子诱变的方法。转座子诱变虽已应用于一些蓝藻, 并分离了少数突变株, 但应用效果不佳。在此基础上, 一个随机插入诱变并直接克隆有关基因的方法已建立, 即通过构建插入突变文库, 转化选择双交换重组子, 克隆失活基因, 再转化选择单交换附加重组子, 其 DNA 经适当酶切便可克隆有关基因, 此方法可作为一种基因标签技术使用<sup>[5]</sup>。

至于已克隆基因的定向诱变, 在蓝藻基因功能分析方面已广泛应用, 包括基因内的随机插入及单碱基突变。例如, 已定向诱变了光系统 I(PSI) 的 *psaD* 及 *psaE*<sup>[10]</sup> 基因。*pasD* 突变株缺 PSI 反应中心亚单位 II 蛋白, 光自养生长极慢, 表明它对 PSI 功能是必不可少的。*psaII* 突变株缺反应中心亚单位 IV 蛋白, 但亚单位 II 蛋白含量增加, 似乎后者可补偿前者, 表型与野生种无明显差别。光系统 II (PSII) 的 *psbA* 基因有三个(或四个)拷贝, 为一多基因家族, 编码两种形态的 *D*<sub>1</sub> 蛋白。分别插入失活 3 个基因中的 2 个基因, 证明 3 个基因都有功能, 产生 *D*<sub>1</sub> 维持自养生长, 3 个基因全部失活, 突变株不能自养生长, 缺放氧活性, 尽管 PSII 复合物可以装配<sup>[32]</sup>。*psbA* 定向诱变还证明, 蓝藻与高等植物结合除草剂位点结构类似, 抗除草剂是由于 *psbA* 突变。*psbA* 两个单点突变, 在 *D*<sub>1</sub> 蛋白中 phe-211 变为 Ser, 以及 Ala-251 变为 Val, 引起对高光强的敏感<sup>[26]</sup>。*psbD* 有两个拷贝属不同转录单位, 编码一样的 *D*<sub>2</sub> 蛋白, 定向诱变证明, *psbDII* 有功能但非必需, *psbDI* 对存活非必需, 但对最适生长是重要的。单点突变改变 *D*<sub>2</sub> 蛋白的 Tyr-160 为 Phe, 突变株光合生长稍慢, 缺 D + EPR 信号, 证明有机辅因子就是 Tyr-160 残基<sup>[43]</sup>, 并修正了以前定向诱变 His-197 和 His-214 所得结论。*psbB* 定向突变后缺 CP-47 蛋白, CP-43 存在, PSII 可装配, 但没有活性。*psbE* 和 *psbF* 插入诱变封锁了光合电子传递, 证明了 *cyt-b559* 在 PSII 中的功能。编码 PSII 中 Mn 稳定多肽的 *psbI* 失活, 突变株缺 32KDa 多肽, 不能放氧和光合生长。此外, 定点突变证明 *rbcL* 基因 5' 边缘区对 CO<sub>2</sub> 浓度的要求起关键作用<sup>[19]</sup>。编码藻蓝蛋白连接肽的 *cpcC* 基因失活, 细胞中



有一半藻蓝蛋白不能组装进藻胆体,且后者的结构发生了明显改变。*cpcA* 和 *cpcB* 基因突变,细胞中的藻蓝蛋白消失,别藻蓝蛋白量无变化,细胞的世代时间延长 2—7 倍。丝状蓝藻通过接合转移进行定向诱变,一般需在单交换重组子中筛选衍生的双交换重组子。已定向诱变了 *xisA* 基因, *xisA* 失活,封锁了 *nifD* 基因 11kb 元件的切割重排且不能固氮<sup>[20]</sup>。此外还定向诱变了 *nifD* 和 *hetA* 基因,并研究了利用 *sacB* 基因作为正向选择标记。

重组缺陷型 (*Rec<sup>-</sup>*) 藻株对于维持稳定的部分二倍体,用于基因克隆及遗传分析是很重要的。*recA* 基因已克隆定序,但试图通过插入失活诱变分离 *Rec<sup>-</sup>* 的 *Synechococcus*7002 突变株的努力没有获得成功。可能是 *recA* 基因产物对于维持蓝藻细胞的存活是必需的<sup>[31]</sup>。相信此问题不久可以解决。

### (八) 展望

蓝藻分子遗传学研究虽然起步较晚,近 10 年发展令人瞩目。在基因运载体构建、基因克隆、定序、基因转移、表达、功能分析等方面都取得了显著的进展。特别是从最近 3 年发表的论文数量、研究的广度和深度来看,研究步伐又进一步加速了。这为在分子水平上了解蓝藻的放氧光合作用、生物固氮、细胞代谢、细胞分化等重要过程提供了新的可能性,同时又为蓝藻的遗传操作开辟了新的前景。已经证明,来自大肠杆菌,枯草杆菌以及人的一些外源基因可以在蓝藻细胞中表达,例如大肠杆菌谷氨酸脱氢酶基因在蓝藻中表达引起抗铵<sup>[28]</sup>。人超氧化物歧化酶基因在蓝藻中表达减少氧胁迫。这就可能通过引入外源基因,以赋予蓝藻新的遗传特性,或作为重要的天然产物基因表达的宿主。近年来,蓝藻的基因工程研究也已取得了一些可喜的结果。例如,已相继报道,成功地将芽孢杆菌的杀虫毒素基因导入并表达于几种蓝藻细胞中<sup>[41]</sup>。试图日后以此类工程藻株对水体蚊幼进行生物防治,控制疟疾。还有报道说,通过对 *rbcL* 基因的遗传修饰,提高了蓝藻同化二氧化碳的效率。植物的抗寒性是植物的育种目标之一,关于抗寒机理长期争论未有结论。最近已从耐寒藻株中克隆了一个植物型脂肪酸脱饱和基因 (*desA*),并导入冷敏感的藻株中,使之增强了抗寒性<sup>[44]</sup>。这些显然都是蓝藻基因工程向着实用目标的有益尝试。其研究结果对于植物遗传工程必将有所裨益。

此外,已有不少报道证明,蓝藻基因 *rbc*、*cpc*、*psb*、*ppc*、*trx*、*leu*、*glg*、*phr*、*xisA*,可在大肠杆菌或枯草杆菌及链霉菌中表达功能,这样可在新宿主中研究蓝藻特殊基因表达,并且蓝藻的一些重要产物也可借用快速繁殖的微生物大量生产。实际上,来源于蓝藻的限制性内切酶如 *AvaI*、*AvaII* 就是在大肠杆菌中进行商品化生产的。预料,蓝藻天然药物的基因工程将逐步发展。

展望未来 10 年,随着藻类生物工程产业的兴起,针对提高藻类生物量,天然产品产量,质量,扩大产品应用范围,以及改善加工工艺等方面的遗传操作将会应运而生。此外,发展适合于作为植物重要产物基因表达宿主的工程藻株不久可能也将问世。然而,要实现这些目标,仍有待于基础研究的进展,例如,更多的基因被克隆定序及功能的指定,不同基因在基因组上的定位及基因组完全序列的测定;重组缺陷型藻株的建立;蓝藻质粒功能的确定;基因表达的调控机理及多基因家族在基因表达调控中意义的揭示,植物基因向蓝

藻宿主的转移及功能表达等等。可以预料,在基础研究领域,围绕光合作用基因结构、功能分析及其遗传操作,依然是蓝藻分子遗传学研究的一个热点。其研究结果将使我们对于这一重要的生命过程的分子机理的了解为之一新,并且为有效影响和控制这个过程提供新途径。

我国蓝藻分子遗传学研究还处于起步阶段,与国外相比差距很大,建议加强研究及国际合作交流,这不仅仅是藻类学发展的需要,而且与其他学科的发展是紧密联系在一起的。

### 参 考 文 献

- [1] 王业勤,何家苑,戴玲芬,黎尚豪,1981. 鱼腥藻 (*Anabaena*) 对氧敏感的固氮突变种. 植物学报, 23:288—296.
- [2] 李阳生,王业勤,黎尚豪,1990. 蓝藻色氨酸调节型突变体的筛选和分析. 农业现代化研究,11:47—51.
- [3] 何家苑,王业勤,黎尚豪,1984. 鱼腥藻 7120 的 DNA 转化作用. 遗传学报,11:100—105.
- [4] Bancroft, I., Wolk, C. P. and Oren, E. V. 1989. Physical and genetic maps of the genome of the heterocyst-forming cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120. *J. Bact.*, 171(11): 5940—5948.
- [5] Broedel S. E. Jr. and Wolf R. E. Jr. 1990. Genetic tagging, cloning and DNA sequence of the *Synechococcus* sp. strain PCC 7942 gene (*gnd*) encoding 6-phosphogluconate dehydrogenase. *J. Bact.*, 172: 4023—4031.
- [6] Bustos, S. A., Schaefer, M. R. and Golden, S. S. 1990. Different and rapid responses of four cyanobacterial *psbA* transcripts to changes in light intensity. *J. Bact.*, 172(4): 1998—2004.
- [7] Campbell, W. H. and Gowri, G. 1990. Codon usage in higher plants, green algae, and cyanobacteria. *Plant Physiol.*, 92: 1—11.
- [8] Chauvat, F., Rouet, P., Bottin, H. and Roussac, A. 1989. Mutagenesis by random cloning of an *E. coli* kanamycin resistance gene into the genome of cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6803: selection for mutant defective in photosynthesis. *M. G. G.*, 216: 51—59.
- [9] Chauvat, F., De Vries, L., Van der Ende, A. and Van Arkel, G. A. 1986. A host-vector system for gene cloning in the cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6803. *M. G. G.*, 204: 185—191.
- [10] Chitnis, P. R., Rilly, P. A. and Nelson, N., 1989. Insertional inactivation of the encoding subunit II of photosystem I from the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *J. Biol. Chem.*, 264: 18381—18385.
- [11] Chris J. Chastain, Brusca, J. S., Ramasubramanian, T. S., Wei, T. F. and Golden, J. W., 1990. A sequence specific DNA binding factor (VF1) from *Anabaena* sp. strain PCC 7120 vegetative cells binds to three adjacent sites in the *xisA* upstream region. *J. Bact.*, 172(9): 5044—5051.
- [12] Ciferri, O., Tiboni, O. and Sanangelantone, A. M., 1989. The genetic manipulation of cyanobacteria and its potential uses. In *Algal and cyanobacterial biotechnology*. R. C. Cresswell, T. A. Rees and N. Shah (ed.). Longman scientific and technical, pp. 239—271. New York.
- [13] Craig, R., Reichelt, B. Y. and Reichelt, J. L., 1988. Genetic engineering of micro-algae. In *Micro-algal biotechnology*. M. A. Borowitzka and L. J. Borowitzka (ed.). Cambridge university press, pp. 415—455. Cambridge.
- [14] Csiszar, K., et al., 1987. Transcriptional analysis of the cyanobacterial *gvpABC* operon in differentiated cells: occurrence of an antisense RNA complementary to three overlapping transcripts. *Gene.*, 60(1): 29—37.
- [15] Elhai, J. and Wolk, C. P., 1988. Conjugal transfer of DNA to cyanobacteria. *Methods in Enzymol.*, 167: 747—754.
- [16] Elhai, J. and Wolk, C. P., 1990. Developmental regulation and spatial pattern of expression of the structural genes for nitrogenase in the cyanobacterium *Anabaena*. *EMBO, J.*, 9(10): 3379—3388.
- [17] Ferino, F., and Chauvat, F., 1989. Apromoter probe vector host system for the cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6803. *Gene.*, 84: 257—266.
- [18] Friedberg, D., 1988. Use of reporter genes in cyanobacteria. *Methods in Enzymol.*, 167: 736—747.
- [19] Friedberg, D., Kaplan, A., Ariel, R., Kessel, M., and Seijffers, J., 1989. The 5'-flanking region of the gene encoding the large subunit of ribulose-1, 5-bisphosphate carboxylase/oxygenase is crucial for growth of the cyanobacterium *Synechococcus* PCC 7942 at the level of CO<sub>2</sub> in air. *J. Bact.*, 171: 6069—6076.

- [20] Gallon, J. R. and Chaplin, A. E., 1988. Recent studies on  $N_2$  fixation by non-heterocystous cyanobacteria. In Nitrogen fixation hundred years after. Bothe/de Bruijn/Newton (ed.) pp. 183—188. Gustav. Fisher. Stuttgart., New York.
- [21] Golden, J. W. and Wiest, D. R., 1988. Genome rearrangement and nitrogen fixation blocked by inactivation of *xisA* gene. *Science*, **242**: 1421—1423.
- [22] Golden, J. W., Carrasco, C. D., Mulligan, M. E., Schneider, G. J. and Haselkorn, R., 1988. Deletion of a 55-kilobase-pair DNA element from the chromosome during heterocyst differentiation of *Anabaena* sp. strain PCC 7120. *J. Bact.*, **170**(11): 5034—5041.
- [23] Golden, S. S., 1988. Mutagenesis of cyanobacteria by classical and gene-transfer-based methods. *Meth. Enzymol.*, **167**: 714—727.
- [24] Herrero, A. and Wolk, C. P. 1986. Genetic mapping of the chromosome of the cyanobacterium, *Anabaena variabilis*, proximity of the structural gene for nitrogenase and ribulose-biphosphate carboxylase. *J. Biol. Chem.*, **261**(17): 7748—7754.
- [25] Houmard, S. and Tandeau de Marsac, N., 1988. Cyanobacterial genetic tools: current status. *Meth. Enzymol.*, **167**: 808—847.
- [26] Krupa, E., Oquist, G., and Gustafsson, P., 1990. Photoinhibition and recovery photosynthesis in *psbA* gene-inactivated strains of cyanobacterium *Anacystis nidulans*. *Plant Physiol.*, **93**: 1—6.
- [27] Lammesr, P.J., McLaughlin, S., Papin, S., Trujillo-provincio, C. Ryncarz, A.J., 1990. Developemental regulation of cyanobacterial *nif* genes: nucleotide sequence, open reading frames, and cytochrome P-450 homology of the *Anabaena* sp. PCC7120 *nif D* element. *J. Bact.*, **172**(12): 6981—6990.
- [28] Light foot, D., et al., 1988. Expression of the *E. coli* glutamate dehydrogenase gene in the cyanobacterium *Synechococcus* PCC 6301 causes amonian tolerance. *Plant Mol. Biol.*, **11**(3): 335—344.
- [29] Mazel, D., et al., 1989. DNA inserted sequence modifying phycobiliprotein gene expression in *Calothrix* 7601. In Biological potential of the cyanobacteria. Giraud, G., Thomas, J. C. (ed.) pp. 165—167.
- [30] Mazel, D., Houmard, J., castets, A.M., Tandeau d marsac, N., 1990. Highly repetitive DNA sequence in cyanobacterial genomes. *J. Bact.*, **172**(5): 967—976.
- [31] Murphy, R.C., Gasparich, G.E., Bryant, D.A., and Porter, R.D., 1990. Nucleotide sequence and futher characterization of the *Synechococcus* sp. strain PCC 7002. *recA* gene: complementation of a cyanobacterial *recA* mutant by the *E. coli* *recA* gene. *J. Bact.*, **172**(2): 967—976.
- [32] Nilson, F., Andersson, B., and Jansson, C., 1990. Photosystem II characteristics of a constructed *Synechocystis* 6803 mutant lacking synthesis of the D1 polypeptide. *Plant Mol. Biol.*, **14**: 1051—1054.
- [33] Porter, R. D., 1986. Transformation in cyanobacteria, *Crit. Rev. Microbiol.*, **13**: 111—132.
- [34] Porter, R. D., 1988. DNA transformation. *Methods in Enzymol.*, **167**: 203—712.
- [35] Schaefer, M. R. and Golden, S. S., 1989. Differential expression of members of a cyanobacterial *psbA* gene family in response to light. *J. Bact.*, **171**: 3973—3981.
- [36] Schwabe, W., Hubschman, T., Meixner, M., Weihe, A. and Boerner, T., 1990. Transcription and in vivo expression of a *Microcystis aeruginosa* plasmid. *Current Microbiology*, **20**: 365—368.
- [37] Tandeau de Marsac, N., and Houmard J., 1987. Advances in Cyanobacterial molecular genetics. In The Cyanobacterium P. Fay and C. van Baalen. (ed). Elsevier Press, Amsteralam. p 251—302.
- [38] Tandeau de Marsac, N., Mazel, D., Damerval, T., Guglielmi, G., Capuono, V. and Houmard, J., 1988. Photoregulation of gene expression in the cyanobacterium *Calothrix* sp. PCC7601: light-harvesting complexes and cell differentiation. *Photosynth. Res.*, **18**: 99—132.
- [39] Thiel, T. and Wolk, C. P., 1987. Conjugal transfer of plasmids to cyanobacteria. *Meth. Enzymol.*, **153**: 232—243.
- [40] Thiel, T. and Poo, H., 1989. Transformation of a filamentous cyanobacterium by electroporation. *J. Bact.*, **171**: 5743—5746.
- [41] Vaeck, M. A., et al., 1987. Expression of *Bacillus* endotoxin gene in cyanobacterium and use of the transformants as an insecticide. PCT INT. Appl. Wo 8806631(c1 c12/00)7/9 1988 US Appl. 21405, 04/5 1987 51pp.
- [42] Vega-Palas M. A., Madueno, F., Herrero, A. and Flores, E., 1990: Identification and cloning of a regulatory gene for nitrogen assimilation in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain PCC7942. *J. Bact.*, **172** (2): 643—647.
- [43] Vermaas, W. F. J., Rutherford, A. W. and Hansson, O., 1988. Site directed mutagenesis in photosystem II of the cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6803: Donor D is a tyrosine residue in the D2 protein. *Proc.*

- Natl. Acad. Acad. Sci. USA.*, 85: 8477—8481.
- [44] Wada, H., Gombos, Z., and Murata, N., 1990. Enhancement of chilling tolerance of a cyanobacterium by genetic manipulation of fatty acid desaturation, *Nature.*, 347: 200—203.
- [45] Xiao, W., 1988. Stability of cloned *Brassica napus* chloroplast DNA fragments in the cyanobacterium *Anacystis nidulans* R2. *M. G. G.*, 214: 307312.