

集胞藻 PCC6803 中 ORF sll0260 对于维持基本生命活动的必要作用

罗 泉^{1,2} 徐旭东¹

(1. 中国科学院水生生物研究所, 淡水生态与生物技术国家重点实验室, 武汉 430072; 2. 中国科学院研究生院, 北京 100049)

摘要: 集胞藻 (*Synechocystis* sp.) 6803 的未知功能基因中有很多是细胞的基本生命活动所需要的, 这些基因插入失活往往会导致细胞死亡, 因而得不到分离完全的突变株, 难以进行遗传学研究。构建突变株以铜离子调控的启动子 P_{petE} 来控制此类未知功能基因的表达则可能获得完全分离。构建 P_{petE} -sll0260 突变株并对 sll0260 必要作用进行研究。在完全分离的突变株中, 去除铜离子可关闭 sll0260 的表达。此时, 突变株生长受到严重抑制, 色素含量大为降低, 类囊体膜结构破坏, 光合作用消失, 呼吸能力下降。这些结果表明该基因对于维持集胞藻 6803 的基本生命活动来说是必需的。亚细胞定位研究显示 sll0260 编码一个膜蛋白, 位于质膜和外膜混合物中。Sll0260 可能作为某些离子的转运蛋白起作用, 或者直接与类囊体膜的发生过程相关。

关键词: 集胞藻 6803; sll0260; P_{petE} ; 膜蛋白

中图分类号: Q344⁺.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3207(2009)05-0789-06

蓝藻又称蓝细菌, 是一类能够进行植物型产氧光合作用的原核生物, 被认为是高等植物和真核藻类叶绿体的祖先。与一般革兰氏阴性菌所不同的是, 蓝藻细胞内具有高度分化的内膜系统——类囊体膜, 它是细胞能量传导的重要场所。集胞藻 (*Synechocystis* sp.) PCC6803 (以下简称集胞藻 6803) 是一类单细胞非固氮蓝藻, 生活在淡水中, 既可以自养生长, 也可以利用葡萄糖异养生长。它具有天然的 DNA 转化系统, 全基因组序列于 1996 年公布^[1], 是基因工程和光合作用分子生物学研究中的重要模式。在其 3264 个开放阅读框中 (ORF)^[2], 有 2185 个在测序完成时功能未知或不明确。在对这些基因功能的研究中发现, 很多基因不能获得完全分离的突变株。推测这些基因参与细胞基本生命活动, 其功能丧失可导致细胞死亡。本实验室曾使用启动子 P_{petE} 建立一个受铜离子调控的表达平台^[3], 可在铜离子存在的条件下获得某些必需基因的突变株, 之后通过关闭基因表达研究其表型。相似性搜索显示 ORF sll0260 的编码产物可能具有类似于 Mg^{2+} / Co^{2+} 离子转运蛋白的区域, 但相似性较低。本文利用该平台观察到, 在该基因被关闭的条件下, 藻细胞色素丧失、光合和呼吸能力下降或丧失、类囊体膜结

构严重受损, 表明该基因对于维持集胞藻 6803 基本生命活动来说是必需的。

1 材料与方法

1.1 藻株、培养和转化 集胞藻 6803 由美国密歇根州立大学已故教授 McIntosh L 提供, 在液体 BG11 培养基中, (30 ± 2)、 $30 \mu E/m^2 \cdot s$ 光照的条件下静置培养。在用 P_{petE} 启动子来调控基因表达的实验中, 所有溶液均用 $18.2 m\Omega \cdot cm$ 的去离子水 (Millipore) 配制, 并根据需要配制含有或缺乏铜离子的 BG11 培养基, 同时添加 5 mmol/L 葡萄糖, 实验中均使用塑料器皿。缺铜培养 DRHB2307 突变株时, 藻细胞先以 $A_{730} = 0.05$ 接种至缺铜培养基中生长 7 d, 离心收集细胞, 用缺铜培养基洗涤一次后, 再按 $A_{730} = 0.1$ 接种至新的缺铜培养基中。测试生长曲线时 A_{730} 值为三次结果的平均值 $\pm$ 标准误。用于膜分离纯化的藻细胞, 其培养按照 Norling, et al.^[4] 的描述进行。集胞藻 6803 的转化按照 Williams^[5] 的方法进行。

1.2 DNA 操作 集胞藻 6803 的基因组 DNA 按徐旭东等^[6] 描述的方法提取。DNA 重组按 Molecular Cloning^[7] 描述的方法进行。

收稿日期: 2008-05-13; 修订日期: 2009-01-13

基金项目: 国家自然科学基金重点项目 (30330030); 中国科学院知识创新工程方向性项目 (KSCX2-SW-332) 资助

作者简介: 罗泉 (1982—), 男, 汉族, 湖北咸宁人; 硕士研究生; 主要从事藻类遗传学研究。E-mail: luquan@qibebt.ac.cn

通讯作者: 徐旭东, E-mail: xuxu@ihb.ac.cn

表达质粒构建:以 *sll0260exp-1* 和 *sll0260exp-2* 作为引物(表 1),集胞藻 6803 基因组为模板,进行 PCR 扩增,用 *Taq* DNA 聚合酶在所得片段末端加上 dATP 后克隆到 T 载体中,测序无误后,再用 *Nhe*I 和 *Xho*I 从质粒上切下目的片段,连接到以同样酶切过的 pET-21b 载体上,最终得到表达质粒 pHB2284。

用于转化蓝藻的质粒构建:分别以引物对 *sll0260-1/2* 和 *sll0260-3/4* 为引物(表 1),集胞藻 6803 基因组为模板,PCR 扩增得到上游片段 *sll0260-12* 和下游片段 *sll0260-34*。将以上两片段分别克隆到 T 载体中,得到质粒 pHB2275 和 pHB2277。用 *Hinc* II 和 *Xba*I 从 pHB2275 上切下上游片段 *sll0260-12*,以 T4 DNA 聚合酶补平末端后,插入到以 *Bam*HI 酶切并补平的质粒 pHB1524^[31]中,得到质粒 pHB2300。再用 *Hinc* II 和 *Kpn*I 酶切 pHB2300,回收酶切得到约 3.27 kb 的片段,补平末端后连接到以 *Pst*I 酶切并补平的 pHB2277 中,最终得到用于转化集胞藻 6803 的质粒 pHB2307。

表 1 PCR 引物及序列

Tab. 1 Nucleotide sequences of primers used for PCR

引物 Primer	序列 (5'→3') Sequence
<i>sll0260exp-1</i>	AGCTAGCGCAGAGCAAGAAATGGTGG
<i>sll0260exp-2</i>	ACTTCGAGCTCCGTTGTAGAAATCCTCCG
<i>sll0260-1</i>	GACTGCGGGAAACGACGGACA
<i>sll0260-2</i>	AGTGGGGAGTGCTGACGACAAAC
<i>sll0260-3</i>	GCCTACCGGATTCTATCCCT
<i>sll0260-4</i>	TCCA GACTA TCCCTACCCAC

注:带下划线的序列代表引入的酶切位点 *Nhe*I 或 *Xho*I

Note: Underlined sequences are restriction sites for *Nhe*I or *Xho*I

1.3 原核表达、抗体制备 将 pHB2284 转化至 *E. coli* BL21 (DE3),以 IPTG 诱导过量表达 C 端带有 6 个组氨酸标记的融合蛋白 *Sll0260*,用 Ni-NTA 亲和层析柱 (Novagen) 纯化。纯化的蛋白样品通过 SDS-PAGE 分开后,在胶块上切下目的蛋白带,补充少许生理盐水进行研磨,将所得到的蛋白胶粒免疫家兔,制备多克隆抗体。

1.4 膜的分离纯化及免疫印迹 离心收集藻细胞,将其悬浮至 20 mmol/L、pH7.8 的磷酸钾缓冲液中。用玻璃珠 (150—212 μm, Sigma) 破碎藻细胞,离心

去除玻璃珠及细胞残渣。取上清液超速离心沉淀为总膜组分。类囊体膜的分离纯化按照 Norling, *et al.*^[41]介绍的“双相法”进行,略有修改。即将得到的总膜在 6.6% 的两相分配体系 (6.6% w/w Dextran T-500, 6.6% w/w PEG3350, 0.25 mol/L 蔗糖, 5 mmol/L、pH7.8 磷酸钾) 中进行分配,收集下相溶液,进行新一轮 6.6% 的两相分配。重复操作 5 次后,将最终得到的下相溶液超速离心,沉淀为粗提的类囊体膜。再将膜沉淀进行蔗糖梯度分离,收集 38%—42% 的组分,超速离心得到类囊体膜沉淀。质膜和外膜的分离纯化按照改进的“双相法”^[48]进行,略有修改。即将得到的总膜先进行蔗糖梯度分离,收集 38%—42% 的组分,再进行两相分配,收集上相溶液。这样,经过 2 次 7.0% 和 3 次 7.4% 的两相分配后,最终得到的上相溶液超速离心后得到质膜和外膜混合物的沉淀。

免疫印迹按照 Molecular Cloning^[7]的描述进行。将分离得到的集胞藻 6803 膜蛋白和可溶性蛋白经过 12% 的 SDS-PAGE^[11]分离,然后电转移至硝酸纤维素膜 (Millipore) 上进行抗体结合、洗脱和显色反应。

1.5 光合放氧和呼吸耗氧能力测定 光合放氧及呼吸耗氧能力测定按文献 [10, 11] 描述的方法进行,稍有改动。离心收集藻细胞,重悬于 BG11 培养基中,调整到细胞浊度 (A_{730}) 约为 1.0 (叶绿素 *a* 浓度约为 5 μg/mL)。样品在 Chlorolab 2 型氧电极 (Hansatech, UK) 上以 2000 μE/m² · s 的饱和光强进行测定,温度为 30℃。叶绿素按 Amon, *et al.* 报道以甲醇提取^[12]。实验数据为三次结果的平均值 ± 标准误。

1.6 电子显微镜观察和细胞全光谱扫描 对藻细胞样品的固定、脱水、包埋、超薄切片、染色等步骤参照有关文献 [13] 进行。样品用 JEM-1230 透射电子显微镜观察 (JEOL, Ltd. Japan)。图象用 1K × 1K CCD 记录。对藻细胞的全光谱扫描在 Shimadzu UV-2450 分光光度计上进行,待测样品调节至相同细胞密度,扫描波长为 400—800 nm。

2 结果

2.1 DRHB2307 (*P_{petE}-sll0260*) 突变株的构建和 *P_{petE}* 对 *sll0260* 表达的调控

为了研究 *sll0260* 基因的功能和对藻细胞的作用,作者利用 *petE* 基因的启动子 *P_{petE}* 来调控该基因的表达。*P_{petE}* 是一个受铜离子调控的启动子,在

BG11培养基中含有 320 nmol/L 铜离子浓度情况下, P_{petE} 能启动基因的转录表达;而当缺乏铜离子时,该启动子被关闭,基因不再转录表达。

以质粒 pHB2307 (图 1A) 转化野生型集胞藻 6803, 得到双交换突变株 DRHB2307 (图 1B)。在该突变株中, P_{petE} 整合在 *sI0260* 上游, 代替其自身的启动子 (P_{sI0260}) 来控制该基因的转录表达。为保证背景转录活性不影响 P_{petE} 的调控, 我们在其上游装置了带有终止转录结构的 Ω 片段。PCR 检测结果显示 (图 1C), 突变株中只有 4.08 kb 的 PCR 带, 没有 1.68 kb 的野生型带, 说明已分离完全。将突变株分别在含有和缺乏铜离子的培养基中培养 (图 1D), 发现在缺乏铜离子时, *sI0260* 不表达, 而在含铜培养基中, *sI0260* 获得表达。可见利用 P_{petE} 有效地实现了铜离子对 *sI0260* 基因的调控表达。

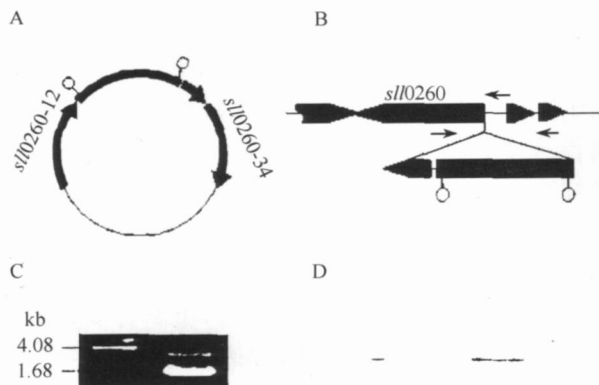


图 1 集胞藻 6803 DRHB2307 突变株的构建和铜离子对 *sI0260* 表达的调控

Fig. 1 Construction of *Synechocystis* 6803 mutant DRHB2307 and regulation of the expression of *sI0260* by cupric ion

A. 质粒 pHB2307 结构示意图; B. DRHB2307 突变株染色体结构示意图; C. DRHB2307 突变株的 PCR 检测; D. DRHB2307 突变株中由铜离子调控的 *sI0260* 表达的情况; 和 为 PCR 检测时所用的引物, 分别表示 *sI0260*-1 和 *sI0260*-4 (表 1); Ω 为壮观霉素抗性标记, 片段两侧的茎环结构代表短的反向重复序列, 可终止转录;

WT, 野生型

A. structure of the plasmid pHB2307; B. chromosomal structure of DRHB2307 mutant; C. PCR examination of DRHB2307 mutant; D. copper-regulated expression of *sI0260* in DRHB2307 mutant and represent primers *sI0260*-1 and *sI0260*-4 respectively (Table 1); the Ω cassette is a spectinomycin-resistance marker; stem-loop structures bracketing the Ω cassette are short inverted sequences that terminate transcriptions; WT, wild type

2.2 缺铜培养条件下 DRHB2307 突变株的表型

2.2.1 生长情况和色素变化

将 DRHB2307 突变株在不含铜离子的培养基中培养一代, 以消耗细胞内残存的铜离子, 然后再接

种至新的缺铜培养基中培养, 记作 DRHB2307 - Cu^{2+} 。实验中, 我们设立了两个对照, 一是突变株在含有正常浓度铜离子的 BG11 培养基中培养, 记作 DRHB2307 + Cu^{2+} ; 另一对照为野生型集胞藻 6803 在缺铜条件下培养, 记作 WT- Cu^{2+} 。结果显示, 与对照相比, DRHB2307 - Cu^{2+} 表现出明显的生长缺陷, 其细胞密度在培养第 6 天时达到最大 (A_{730} 值为 1.049), 之后不再增长; 而对照 DRHB2307 + Cu^{2+} 和 WT- Cu^{2+} 在第 6 天时 A_{730} 值分别为 2.503 和 1.868, 之后仍然继续上升 (图 2A)。

在培养过程中, 对照细胞颜色没有显著变化, 而缺铜培养的 DRHB2307 细胞逐渐开始漂白 (数据未显示), 到第 6 天, 细胞已经检测不到叶绿素 a 、藻胆素、类胡萝卜素等特征吸收峰 (图 2B)。

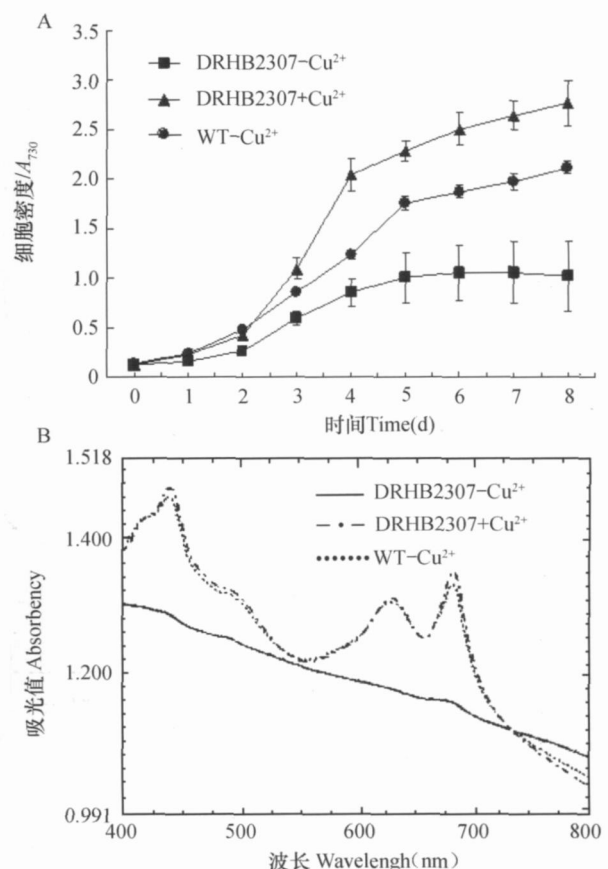


图 2 突变株 DRHB2307 的生长和色素水平受铜离子控制的情况

Fig. 2 Control of growth and pigment levels of mutant DRHB2307 by cupric ion

A. DRHB2307 突变株在缺铜培养条件下的生长情况; B. 缺铜培养至第 6 天时全细胞光谱扫描图显示色素水平

A. Growth of DRHB2307 mutant in copper-free medium; B. Pigment levels as indicated by whole-cell absorption spectra after 6 days of cultivation in copper-free medium

2.2.2 亚细胞结构及光合放氧、呼吸耗氧能力

蓝藻细胞内存在着进行光合作用的内膜系统-类囊体膜,多数的细胞色素都存在于类囊体膜上。电镜观察发现,与胞内具有清晰规则类囊体膜的野生型细胞相比,突变株细胞中类囊体膜含量明显减少,且丧失层状排列的有序结构(图 3A)。由于类囊体膜是蓝藻细胞光合作用的唯一场所和呼吸作用

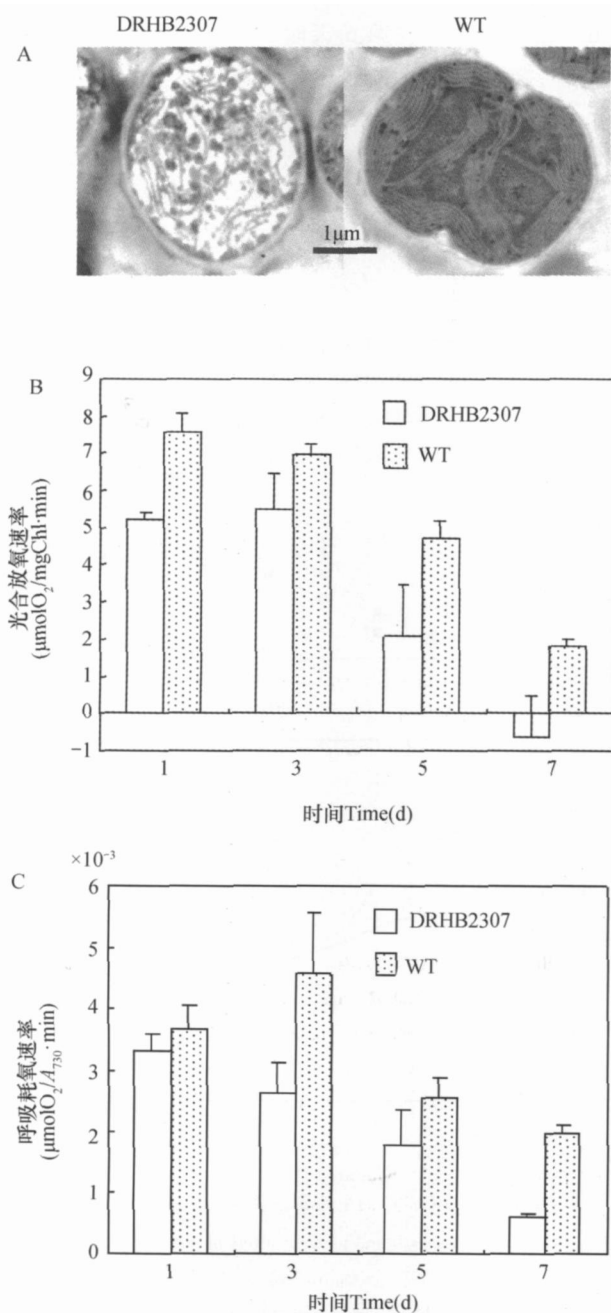


图 3 集胞藻 6803 野生型和突变株在缺铜培养条件下的亚细胞结构 (A) 及光合 (B)、呼吸 (C) 作用能力

Fig. 3 Subcellular structure (A), photosynthesis (B) and respiration (C) of the wild type and mutant strains of *Synechocystis* 6803 cultured in copper-free medium

的重要场所,其结构的破坏必然会对细胞的光合、呼吸作用产生影响。结果显示(图 3B、C),当细胞中已检测不到光合色素时(培养第 7 天),突变株的光合放氧速率降低到 $-0.6 \mu\text{mol O}_2/\text{mgChl} \cdot \text{min}$,表明完全丧失光合作用能力。负值是由于此时细胞仍存在一定呼吸作用。呼吸作用速率此时也降到了 $0.6 \times 10^{-3} \mu\text{mol O}_2/A_{730} \cdot \text{min}$,仅为第 1 天水平的 18.6%。在相同条件下,野生型的光合放氧速率为 $1.85 \mu\text{mol O}_2/\text{mgChl} \cdot \text{min}$,仍然有第 1 天水平的 24.3%,其呼吸耗氧速率 $2.0 \times 10^{-3} \mu\text{mol O}_2/A_{730} \cdot \text{min}$,为第 1 天水平的 53.5%。这些结果说明, *slh260* 基因的关闭,无论是对集胞藻 6803 的光合作用能力,还是呼吸作用能力都产生了严重的影响,尤其对光合作用的影响更为显著。

2.3 膜的分离纯化及 *Slh260* 的亚细胞定位

蓝藻有三种膜,分别为外膜、质膜和类囊体膜。NrtA(硝酸根转运体亚基)为质膜特异性蛋白^[14, 15], CP47(PS 叶绿素 *a* 结合蛋白)为类囊体膜特异性蛋白^[16], Toc75 为外膜特异性蛋白^[17]。应用这 3 种特征蛋白的抗体,作者检查了所分离膜组分的纯度,发现在分离的类囊体膜组分中(图 4A 左)只有 CP47 信号出现,说明类囊体膜纯度高;而分离得到的质膜和外膜混合组分(图 4A 右)中尚有少量类囊体膜污染。

Slh260 预测是有 448 个氨基酸残基的蛋白,在藻细胞中大小约为 53kD。疏水性分析显示 *Slh260*

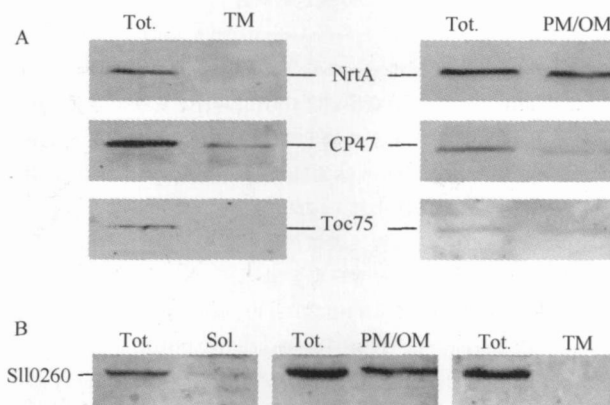


图 4 用免疫印迹法检测集胞藻 6803 各膜组分的纯度 (A) 并对 *Slh260* 进行亚细胞定位 (B)

Fig. 4 Detection of the purity of membrane fractions of *Synechocystis* 6803 (A) and subcellular localization of *Slh260* (B) by Western blotting
Tot, 总膜; TM, 类囊体膜组分; PM/OM, 质膜和外膜组分; Sol, 可溶性组分
Tot, total membranes; TM, thylakoid membrane fraction; PM/OM, plasma membrane / outer membrane fraction; Sol, soluble fraction

有多个强的跨膜区段,很可能是一个整合在膜上的蛋白。以 Western blot对该蛋白进行亚细胞定位(图 4B),发现 *sl0260*在总膜组分及质膜外膜混合物中有很强的杂交信号,而在可溶性组分中的信号非常微弱,在纯的类囊体膜上没有任何杂交信号。这些结果说明,*sl0260*是一个膜蛋白,定位于质膜或外膜上,而在类囊体膜上几乎不存在。

3 讨 论

本实验室曾以 *lacZ*基因显示在集胞藻 6803中 P_{petE} 能有效的控制目的基因的转录表达^[3]。在本研究中,作者利用这一平台研究 *sl0260*基因的必要作用。在有铜的培养基中 P_{petE} -*sl0260* 突变株 DRHB2307得到完全分离。检测在含铜和不含铜的培养基中突变株细胞内 *sl0260*蛋白的变化,结果表明 P_{petE} 确实有效地控制了 *sl0260*的表达,在无铜的情况下检测不到 *sl0260*蛋白。

在蓝藻和其他原核生物中,功能相关的基因往往成簇存在、共同转录。*sl0260*的上下游基因与其方向相反,因此 P_{petE} 不会影响下游基因的表达。在 P_{petE} 上游装置有 Ω 抗性基因片段,可终止转录。但在加铜情况下突变株表型与野生型无差别,因此,突变株在缺铜情况下的表型也必然与上游基因表达是否受影响无关。

在缺铜关闭 *sl0260*表达的情况下,突变株逐渐停止生长,色素和光合作用逐渐消失,类囊体膜结构破坏,呼吸能力也显著下降。这些结果表明该基因对于维持集胞藻 6803的基本生命活动来说是必需的。以 *sl0260*氨基酸序列进行 NCB I同源性搜索,发现存在与转运 Mg^{2+}/Co^{2+} 离子的 *CoB/CoC*有相似区段,可能参与离子吸收,但相似性低。以免疫印迹证明 *sl0260*定位于外膜或质膜,而不是类囊体膜,与此假设吻合。如果不能吸收 Mg^{2+}/Co^{2+} 离子,可导致叶绿素和藻胆素不能合成、光合作用终止和类囊体膜破坏,呼吸作用也随之下降。另一方面,*sl0260*也可能并不参与离子转运而直接参与蓝藻类囊体膜的发生过程。譬如,其蛋白产物在质膜上通过某种方式(如膜泡运输)来实现类囊体膜合成的过程。目前有证据显示,类囊体膜可能起源于质膜^[18]。Wesphal, *et al.*^[19]曾在集胞藻 6803中发现, *vipp1*基因的突变株出现类囊体膜结构丧失、光合作用消失的表型,该基因编码产物即位于质膜^[8, 19]或类囊体膜上^[20]。但是, *vipp1*突变株即使丧失类囊体膜仍然具有叶绿素,且还能检测到较高

的呼吸耗氧速率,藻细胞仍能进行异养生长。这一点与 *sl0260*关闭表达带来的效果不同。

本文通过 P_{petE} -*sl0260*突变株的构建和 *sl0260*表达的操纵研究,显示了利用这一系统对必需基因进行遗传操作的可能性。结合生理、生化和细胞学检测手段,应用 P_{petE} 控制表达将有利于揭示某些重要基因的功能。

参考文献:

- [1] <http://bacteria.kazusa.or.jp/cyanobase/Synechocystis/index.html>
- [2] Kaneko T, Nakamura Y, Sasanoto S, *et al* Analysis of four large plasmids harboring in a unicellular cyanobacterium, *Synechocystis* sp. PCC 6803 [J]. *DNA Res*, 2003, **10**: 221—228
- [3] Gao H, Tang Q, Xu X D. Construction of copper-induced gene expression platform in *Synechocystis* sp. PCC6803 [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2007, **31**(2): 240—244 [高宏, 唐靖, 徐旭东. 集胞藻 PCC6803铜离子诱导表达平台的构建. 水生生物学报, 2007, **31**(2): 240—244]
- [4] Norling B, Zak E, Andersson B, *et al* 2D-isolation of pure plasma and thylakoid membranes from the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 [J]. *FEBS Lett*, 1998, **436**: 189—192
- [5] Williams J G K. Construction of specific mutations in the Photosystem photosynthetic reaction center by genetic engineering methods in *Synechocystis* 6803 [J]. *Methods Enzymol*, 1988, **167**: 766—778
- [6] Xu X D, Wang Y Q, Li S H. Construction of biphasic CAT promoter probe vector shuttling between *Anabaena* (blue green algae) and *Escherichia coli* [J]. *Journal of Graduate School, Academic Sinica*, 1993, **10**: 203—209 [徐旭东, 王业勤, 黎尚豪. 鱼腥藻 大肠杆菌 CAT启动子探测载体的构建. 中国科学院研究生院学报, 1993, **10**: 203—209]
- [7] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning: a laboratory manual*, 2nd edition [C]. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press 1989
- [8] Huang F, Pamryd I, Nilsson F, *et al* Proteomics of *Synechocystis* sp. strain PCC6803, identification of plasma membrane proteins [J]. *Molecular & Cellular Proteomics*, 2002, **1**: 956—966
- [9] Laemmli U K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 [J]. *Nature*, 1970, **227**: 680—685
- [10] Shestakov S V, Anbudurai P R, Stanbekova G E, *et al* Molecular cloning and characterization of the *ctpA* gene encoding a carboxyl-terminal processing protease. Analysis of a spontaneous photosystem γ -deficient mutant strain of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC6803 [J]. *J. Biol. Chem.*, 1994, **269**: 19354—19359
- [11] Wilde A, Hartel H, Hubschmann T, *et al* Inactivation of a *Synechocystis* sp. strain PCC6803 gene with homology to conserved chloroplast open reading frame 184 increases the photosystem II to photosystem ratio [J]. *Plant Cell*, 1995, **7**: 649—658

- [12] Amon D I, McSwain B D, Tsujimoto H Y, *et al* Photochemical activity and components of membrane preparations from blue-green algae. Coexistence of two photosystems in relation to chlorophyll a and removal of phycocyanin [J]. *Biochim. Biophys. Acta*, 1974, **357**: 231—245
- [13] Spence E, Bailey S, Nenniger A, *et al* A homolog of Albino3/Oxa1 is essential for thylakoid biogenesis in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC6803 [J]. *J. Biol. Chem.*, 2004, **279**: 55792—55800
- [14] Omata T. Structure, function and regulation of the nitrate transport system of the cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC7942 [J]. *Plant Cell Physiol*, 1995, **36**: 207—213
- [15] Huang F, Hedman E, Funk C, *et al* Isolation of outer membrane of *Synechocystis* sp. PCC6803 and its proteomic characterization [J]. *Molecular & Cellular Proteomics*, 2004, **3**: 586—595
- [16] Barber J, and Nield J. Organization of transmembrane helices in photosystem : comparison of plants and cyanobacteria [J]. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.*, 2002, **357**: 1329—1335
- [17] Bolter B, Soll J, Schulz A, *et al* Origin of a chloroplast protein importer [J]. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1998, **95**: 15831—15836
- [18] Zak E. The initial steps of biogenesis of cyanobacterial photosystems occur in plasma membranes [J]. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2001, **98**: 13443—13448
- [19] Westphal S, Heins L, Soll J, *et al* Vipp1 deletion mutant of *Synechocystis*: A connection between bacterial phage shock and thylakoid biogenesis [J]? *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2001, **98**: 4243—4248
- [20] Srivastava R, Pisareva T, *et al* Proteomic studies of the thylakoid membrane of *Synechocystis* sp. PCC6803 [J]. *Proteomics*, 2005, **5**: 4905—4916

THE ESSENTIAL ROLE OF ORF SLL0260 IN MAINTENANCE OF BASIC LIFE ACTIVITIES OF *SYNECHOCYSTIS* SP. PCC6803

LUO Quan^{1,2} and XU Xu-Dong¹

(1. State Key Laboratory of Freshwater Ecology and Biotechnology, Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072;

2. The Graduate School of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049)

Abstract: In the cyanobacterium *Synechocystis* 6803, many genes of unknown function are essential for basic life activities. Insertion inactivation of these genes could lead to loss of viability, and the mutants could not be completely segregated, consequently, genetic studies are hard to perform with these genes. However, to construct mutants expressing these genes from a copper-regulated promoter P_{petE} may result in complete segregation. To find out the physiological effects of the investigated gene, copper may be removed from the medium to turn off the gene expression or adjusted to certain low concentrations to lower the gene expression level. This report presents the construction of the P_{petE} -*sll0260* mutant and the study on the essential role of *sll0260* in *Synechocystis* 6803. Upstream of the P_{petE} promoter was an *omega* cassette with stem-loop structures at both ends to terminate background transcriptions. The mutant was completely segregated in the presence of cupric ion as shown with PCR detection. In the mutant, the expression of *sll0260* was fully turned on in the presence of 320 nmol/L cupric ion, but turned off after removal of cupric ion from the medium. The copper regulation of *sll0260* by P_{petE} was confirmed by Western blot analysis. Upon copper deprivation, the growth of the P_{petE} -*sll0260* strain was seriously inhibited, pigments were greatly reduced, thylakoid membranes were destructed, oxygenic photosynthesis ceased and respiration was remarkably lowered. Under the same conditions, the wild type strain showed almost no change in growth and physiological characters. All these results suggested that *sll0260* should be essential for the maintenance of basic life activities of *Synechocystis* 6803. Based on Western blot analysis, *sll0260*-encoded protein was localized to the total membrane fraction. Further analysis with purified thylakoid membranes and a mixture of cytoplasmic and outer membranes showed that the *sll0260*-encoded membrane protein (Sll0260) was located in either cytoplasmic or outer membrane or both, but not in the thylakoid membranes. The predicted amino acid sequence of Sll0260 showed a low level similarity to certain ion transporters. We proposed that Sll0260 could be involved in ion transport or the biogenesis of thylakoid membranes.

Key words: *Synechocystis* sp. PCC6803; *sll0260*; P_{petE} ; Membrane protein