

鱼腥蓝细菌 PCC 7120 中 *sigC* 突变体的构建和表型分析

苏波 陈雯莉 王莉

华中农业大学农业微生物学国家重点实验室, 武汉 430070

摘要 为明确鱼腥蓝细菌 PCC 7120 中 *sigC*(*all1692*)基因与异形胞分化的关系,通过同源重组构建了 *sigC* 的缺失突变体 M*sigC* 和互补菌株,对其进行表型分析。结果表明,在缺乏化合态氮源时,M*sigC* 的异形胞分化频率显著低于野生型,而在互补菌株 C*sigC* 中,异源表达的 *sigC* 可以互补突变体异形胞分化频率降低的表型。表明 *sigC* 参与异形胞分化的调控。

关键词 鱼腥蓝细菌 PCC 7120; *sigC*; 异形胞分化

中图分类号 Q 939.9 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2015)03-0046-05

鱼腥蓝细菌 PCC 7120 是一种丝状蓝细菌^[1-2],具有生物固氮的功能。在环境中缺乏化合态氮源时,鱼腥蓝细菌 PCC 7120 将分化出一类专一行使生物固氮功能的细胞——异形胞(heterocyst)。异形胞在菌丝体上的分布呈现出一定的规律性,大约每隔 10~20 个营养细胞就会分化出一个异形胞^[3]。从形态上看,异形胞明显比营养细胞大,且成熟的异形胞两端会聚集藻青素颗粒,形成极点;从功能上看,异形胞负责执行生物固氮,营养细胞负责固定 CO₂,2 种细胞之间进行物质交换,异形胞为营养细胞提供氮源,营养细胞为异形胞提供碳源,两者共同维持菌丝体在缺氮条件下的生存^[4-5]。

异形胞的分化是一个复杂的调控过程,涉及到大量基因的表达调控。在异形胞分化的调控网络中,在分化前期发挥重要作用的基因有 *ntcA* 和 *hetR*。*NtcA* 蛋白是参与氮代谢调节的全局性调控因子,可以与许多异形胞分化有关基因的启动子区域结合^[6],对这些基因的表达进行调控^[7]。*HetR* 是在异形胞分化和模式形成中发挥重要作用的调控因子^[8],也可以与某些基因的启动子区域发生特异性结合^[9-10]。*hetR* 基因缺失突变体不能分化形成异形胞,而 *hetR* 基因的超量表达会导致在氮源缺乏的条件下形成连续的异形胞,甚至在硝酸盐存在的条件下也可以促使异形胞的分化^[11]。

Sigma 因子是原核生物 RNA 聚合酶(RNA polymerase)的一个组成亚基。它的作用是协助 RNA 聚合酶与模板链上的启动子区域进行专一性的识别与结合,极大地提高 RNA 聚合酶对 DNA 启动子区的特异性结合^[12]。在鱼腥蓝细菌 PCC 7120 中,Sigma 因子通常被分为三类^[13]。第一类是 SigA,该因子负责一些看家基因启动子的转录,是维持细胞生存的必需 Sigma 因子;第二类包括 SigB、SigC、SigD、SigE 等,这类 Sigma 因子在分子结构上与第一类很相似,但对细胞生存来说是非必需的;第三类包括 SigF、SigG、SigI 和 SigJ,这类 Sigma 因子在分子结构上不同于前两类,它们主要在胁迫条件下参与一些基因的转录调控^[14-15]。

已有研究表明,在鱼腥蓝细菌 PCC 7120 中,当培养环境中缺乏氮源时,*sigC* 在异形胞分化的早期被诱导表达^[16],由此暗示 *sigC* 因子可能参与蓝细菌异形胞分化的调控。本研究通过同源重组得到 *sigC* 的缺失突变体,对其进行表型观察,旨在确定 *sigC* 是否参与异形胞的发育调控。

1 材料与方法

1.1 菌株和质粒

鱼腥蓝细菌(*Anabaena* PCC 7120)、大肠杆菌(*Escherichia coli*)、质粒 pRL25T 和 pRL271 均

收稿日期: 2014-05-22

基金项目: 国家自然科学基金项目(31170048)

苏波,硕士研究生。研究方向: 蓝细菌分子生物学。E-mail: 47wuhansubo@126.com

通信作者: 王莉,博士,副教授。研究方向: 蓝细菌分子生物学。E-mail: wangli@mail.hzau.edu.cn

为华中农业大学农业微生物学国家重点实验室保存。

1.2 菌株的培养

所有大肠杆菌在 LB 培养基中培养,培养条件:37 °C 恒温,180~200 r/min,抗生素使用的质量浓度为:Kan(卡那霉素)50 μg/mL,Sp(壮观霉素)100 μg/mL,Cm(氯霉素)25 μg/mL;鱼腥蓝细菌 PCC 7120 在 BG11 或 BG110 培养基中培养,培养条件为:30 °C 恒温,150 r/min,连续光照(4.0 J/(m²·s)),抗生素使用的质量浓度为:Neo(新霉素)75~100 μg/mL,Sp 5~10 μg/mL,Sm(链霉素)5~10 μg/mL。

1.3 分子生物学试剂

PCR 用的 *Taq* 聚合酶主要购自 Shenergy 公司,高保真 KOD-*plus* 聚合酶主要购自 Toyobo 公司;PCR 引物合成和 DNA 序列测序工作主要在北京奥科鼎盛生物科技有限公司和南京金斯瑞生物科技有限公司两家公司完成;质粒小量提取所用的试剂盒,胶回收、PCR 纯化所用的试剂盒购自武汉 MicroLab 公司。

1.4 质粒的构建

在构建 *sigC* 基因缺失突变体时,利用引物 1692UpF(5'-AAAACTGCAGCAA-TTAGCCGGTG-GTGAAC-3') 和 1692UpR (5'-TTTCCCGGGG-GATCCATGTTG-CTGGCATAAGATCG-3') 扩增得到 *sigC* 基因外的上游区段,引物 1692DwF(5'-CAT-GGATCCCCGGGAAAACTCCGCAACCC-3') 和 1692DwR (5'-CCG-CTCGAGGGTAAATCGTT-GAAAGGC-TG-3') 扩增得到 *sigC* 基因外的下游区段。将扩增得到的上、下游片段利用重叠延伸法进行扩增,获得长度为 1 575 bp 的 1692Up-Dw 片段。再将 1692Up-Dw 片段通过 *Pst* I 和 *Xho* I 连接至 pRL271 整合载体,获得质粒 pRL271-1692Up-Dw。最后将 Sp/Sm 抗性片段 Ω(Omega)插入质粒

pRL271-1692Up-Dw 的 *Bam*H I 位点,获得质粒 pRL271-1692Up-Ω-Dw。通过接合转移将质粒 pRL271-1692Up-Ω-Dw 转入野生型鱼腥蓝细菌 PCC 7120 中,发生同源重组获得 *sigC* 基因缺失突变体 M*sigC*。

在构建由 *sigC* 自身启动子驱动的互补质粒时,利用引物 1692Up (5'-CATGGA-TCCCCCGGAA-AAACTCCGCAACCC-3') 和 1692Dw (5'-CAAC-CGCTCGAG-GATGAGTTTCTCCGTGACCA-3') 进行 PCR 扩增得到含有 *sigC* 启动子和全部编码区段的 *P_{sigC}-sigC* 片段,将该片段通过 *Bam*H I 和 *Xho* I 连接到 pRL25T 穿梭载体上,获得质粒 pRL25TP-*sigC*。

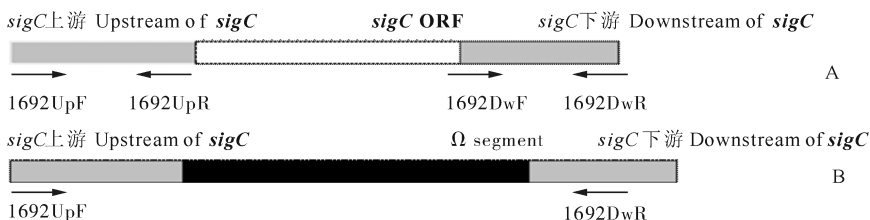
2 结果与分析

2.1 M*sigC* 缺失突变菌株的构建和筛选

为了研究 *sigC* 在异形胞发育过程中的作用,本研究将整合型质粒 pRL271-1692Up-Ω-Dw 通过三亲本杂交转入鱼腥蓝细菌 PCC 7120 中。该质粒上所携带的 *sigC* 上游和下游区段将与染色体上的同源区段之间发生同源重组,从而导致染色体上的 *sigC* 基因被 Ω 抗性片段所替代,获得 *sigC* 缺失突变体 M*sigC*。利用引物 1692UpF 和 1692DwR 对突变体 M*sigC* 进行 PCR 验证(图 1)。野生型菌株 PCR 扩增后获得长度为 2 747 bp 的 DNA 片段。*sigC* 缺失突变菌株由于 1 251 bp 的 *sigC* 基因被 2 056 bp 的抗性片段置换,PCR 扩增获得 3 622 bp 的 DNA 片段。验证结果表明,本研究所筛选得到的菌株为 *sigC* 完全突变株。

2.2 M*sigC* 缺失突变菌株缺氮后的表型观察

在缺乏化合态氮源的条件对突变体 M*sigC* 进行表型观察。结果显示,在氮源缺乏的条件下,野生型可以正常形成异形胞,M*sigC* 也可以开始异形胞的分化,并在缺氮后 24 h 形成成熟的异形胞,但



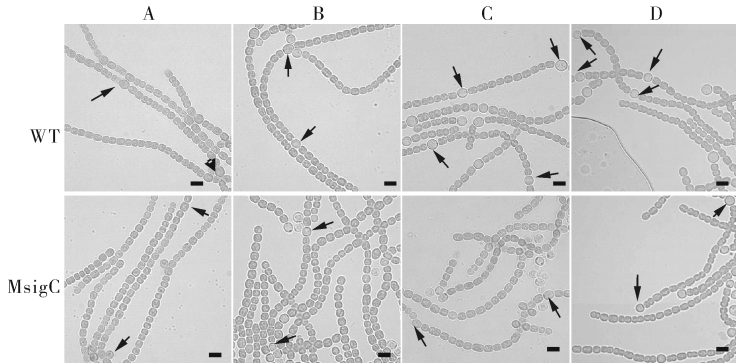
A: 野生型 Wild type; B: M*sigC*.

图 1 PCR 引物设计示意图

Fig. 1 The schematic diagram of the primers

异形胞的数量显著低于野生型,随着缺氮时间的延长, MsigC 中异形胞分化频率会逐渐增加(图 2)。

表明 *sigC* 可能参与鱼腥蓝细菌 PCC 7120 的异形胞分化调控。



A、B、C、D 分别为野生型(WT)和 MsigC 突变菌株在缺氮 24、48、72 和 96 h 的明场显微照片,箭头所指为异形胞,标尺长度为 5 μm 。
A、B、C、D show the bright field images of WT and MsigC at 24, 48, 72 and 96 h after nitrogen step-down. Arrows indicate heterocysts. Scale bars=5 μm .

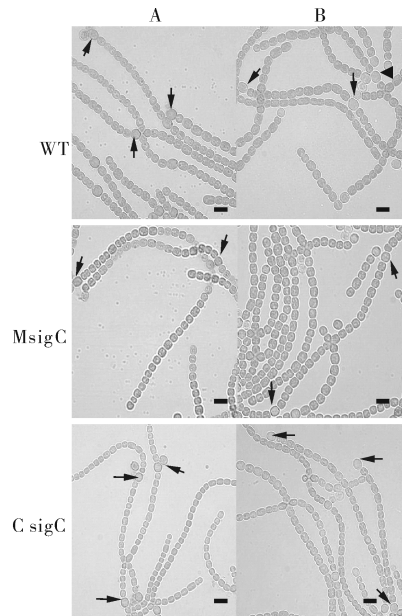
图 2 MsigC 突变体的缺氮表型观察

Fig. 2 The phenotype of MsigC after nitrogen deprivation

2.3 MsigC 互补菌株的表型分析

为了证明 MsigC 中异形胞分化频率的降低是由于 *sigC* 基因的缺失而导致,利用复制性质粒 pRL25T 将受自身启动子驱动的 *sigC* 转入 MsigC 中进行互补实验,获得互补菌株 CsigC。在氮源缺乏 24 h 后, CsigC 可以形成成熟异形胞,而且所形成的成熟异形胞频率显著高于 MsigC。氮源缺乏 48 h 后, CsigC 异形胞分化频率进一步增加,接近于野生型的异形胞分化频率(图 3)。结果显示, *sigC* 基因的异源表达可以一定程度地恢复 MsigC 突变体的异形胞分化频率。由此推测, *sigC* 基因的缺失导致鱼腥蓝细菌异形胞分化频率的降低。

为了进一步确定不同鱼腥蓝细菌 PCC 7120 菌株间异形胞分化频率的差异,分别对野生型菌株(WT)、MsigC 和 CsigC 这三类菌株的相邻异形胞间营养细胞的数量进行统计,以此反映异形胞在菌丝上的分化频率。在氮源缺乏后 24 h,在野生型中异形胞间间隔的平均营养细胞数为 16.8,在 MsigC 中为 20.6,而在 CsigC 中为 18.1。氮源缺乏 48 h 后,在野生型中,异形胞间的平均营养细胞数减少为 13.2,在 MsigC 和 CsigC 中分别降低至 18.4 和 16.1。研究结果表明,随着缺氮诱导时间的延长,3 类菌株的异形胞间隔均逐渐减少,异形胞分化频率逐渐增加,但不论是缺氮后 24 h 还是 48 h, MsigC 中异形胞间的营养细胞间隔数显著高于野生型,而

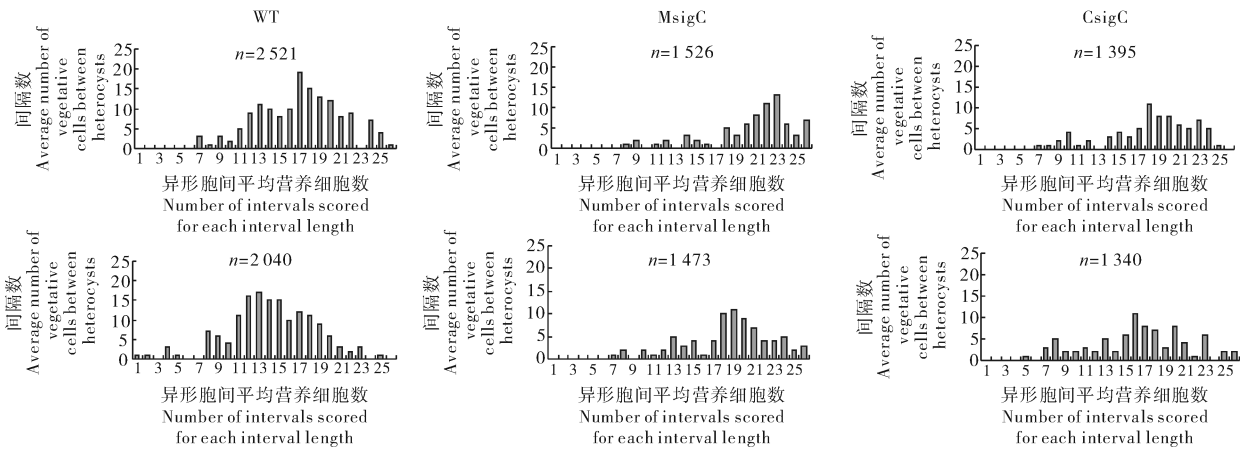


箭头所指为异形胞,标尺长度为 5 μm 。Arrows indicate heterocysts. Scale bars=5 μm .

图 3 WT、MsigC 和 CsigC 三类菌株在缺氮 24 h(A) 和 48 h(B) 的显微图片

Fig. 3 The bright field images of WT, MsigC and CsigC at 24 h(A) or 48 h(B) after nitrogen step-down

CsigC 中异形胞间的营养细胞间隔数虽然也较野生型高,却显著低于 MsigC,在 CsigC 中由于 *sigC* 的缺失降低的异形胞分化频率一定程度上得到了异源表达的 *sigC* 的补偿。



上: 缺氮 24 h 时, WT、MsigC 和 CsigC 异形胞间的平均营养细胞数分别为 16.8、20.6 和 18.1 After nitrogen step-down 24 h, the average number of vegetative cells between heterocysts was 16.8 for wide type, 20.6 for MsigC, 18.1 for CsigC (upper three pictures); 下: 缺氮 48 h 时, WT、MsigC 和 CsigC 异形胞间的平均营养细胞数分别为 13.2、18.4 和 16.1 After nitrogen step-down 48 h, the average number of vegetative cells between heterocysts was 13.2 for wide type, 18.4 for MsigC, 16.1 for CsigC (lower three pictures).

图 4 异形胞间营养细胞间隔数的统计 (n 为细胞总数)

Fig. 4 The number of vegetative cells between heterocysts (n stand for cell numbrs)

3 讨论

在鱼腥蓝细菌 PCC 7120 中, 异形胞分化过程的调控是一个由多基因构成的复杂的调控网络。在异形胞分化过程中大量基因的表达发生改变^[17], 其中 *sigC*、*sigG* 和 *sigE* 分别在缺氮诱导的早期、中期和晚期表达, 由此暗示这些 Sigma 因子可能在异形胞分化的不同阶段参与调控^[16]。为了明确 *sigC* 与异形胞分化的关系, 本研究分别构建了 *sigC* 的缺失突变体和互补菌株, 在氮源缺乏条件下对这些菌株进行表型观察。结果显示, *sigC* 的缺失突变体中异形胞的分化频率显著降低, 这种由于 *sigC* 的缺失而导致的异形胞分化频率的缺陷在互补菌株 CsigC 中得到弥补。由此证实, *sigC* 参与异形胞分化的调控, *sigC* 的缺失将导致异形胞分化频率的降低。但 *sigC* 调控异形胞发育的机制目前并不明确。

Mella-herrera 等^[18] 通过使用 Northern、qRT-PCR 等实验证明 *sigE* 参与了异形胞分化的调控, 并对 *nifH* 等异形胞晚期基因的表达进行调控, *sigE* 的缺失导致异形胞分化的延迟, 而本研究显示 *sigC* 基因的缺失也只是降低了异形胞分化的频率。由此表明, 异形胞分化特异基因的表达可能受到多个 Sigma 因子的共同调控, 或者不同的 Sigma 因子间存在功能冗余, 一个 Sigma 因子的缺失可能会得

到其他 Sigma 因子一定程度的补偿, 以维持菌丝体在缺氮条件下的生存。

参 考 文 献

- [1] WOLK C P, ERNST A, ELHAI J. Heterocyst metabolism and development[M]//BRYANT D A. The molecular biology of cyanobacteria. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1994: 769-823.
- [2] 李之萌, 王莉, 陈雯莉. 鱼腥蓝细菌 PCC 7120 all3555 基因超表达和缺失突变体的构建及表型[J]. 华中农业大学学报, 2013, 32(6): 21-26.
- [3] KUMAR K, MELLA-HERRERA R A, GOLDEN J W. Cyanobacterial heterocysts[J/OL]. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2010, 2: a000315. <http://dx.doi.org/10.1101/cshperspect.a000315>.
- [4] ZHANG C C, LAURENT S, SAKR S, et al. Heterocyst differentiation and pattern formation in cyanobacteria: a chorus of signals[J]. Mol Microbiol, 2006, 59: 367-375.
- [5] GOLDEN J W, YOON H S. Heterocyst development in *Anabaena*[J]. Curr Opin Microbiol, 2003, 6: 557-563.
- [6] HERRERO A, MURO-PASTOR A M, VALLADARES A, et al. Cellular differentiation and the NtcA transcription factor in filamentous cyanobacteria[J]. FEMS Microbiol Rev, 2004, 28: 469-487.
- [7] VAZQUEZ-BERMEDEZ M F, HERRERO A, FLORES E. 2-Oxoglutarate increases the binding affinity of the NtcA (nitrogen control) transcription factor for the *Synechococcus glnA* promoter[J]. FEBS Lett, 2002, 512: 71-74.

- [8] BUIKEMA W J, HASELKORN R. Isolation and complementation of nitrogen fixation mutants of the cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120 [J]. J Bacteriol, 1991, 173: 1879-1885.
- [9] ZHOU R, WEI X, JIANG N, et al. Evidence that HetR protein is an unusual serine-type protease [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1998, 95: 4959-4963.
- [10] HUANG X, DONG Y, ZHAO J. HetR homodimer is a DNA binding protein required for heterocyst differentiation, and the DNA-binding activity is inhibited by PatS [J]. Proc Natl Acad Sci, 2004, 101: 4848-4853.
- [11] BUIKEMA W J, HASELKORN R. Expression of the *Anabaena* *hetR* gene from a copper-regulated promoter leads to heterocyst differentiation under repressing conditions [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2001, 98: 2729-2734.
- [12] IMAMURA S, ASAYAMA M. Sigma factors for cyanobacterial transcription [J]. Gene Regul Syst Bio, 2009, 3: 65-87.
- [13] CAMPBELL E A, WESTBLADE L F, DARST S A. Regulation of bacterial RNA polymerase σ factor activity: a structural perspective [J]. Curr Opin Microbiol, 2008, 11: 121-127.
- [14] YOSHIMURA H, OKAMOTO S, TSUMURAYA Y, et al. Group 3 sigma factor gene, *sigJ*, a key regulator of desiccation tolerance, regulates the synthesis of extracellular polysaccharide in cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120 [J]. DNA Res, 2007, 14: 13-24.
- [15] KHUDYAKOV I Y, GOLDEN J W. Identification and inactivation of three group 2 σ factor genes in *Anabaena* sp. strain PCC 7120 [J]. J Bacteriol, 2001, 183: 6667-6675.
- [16] ALDEA M R, MELLA-HERRERA R A, GOLDEN J W. Sigma factor genes *sigC*, *sigE*, and *sigG* are upregulated in heterocysts of the cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120 [J]. J Bacteriol, 2007, 189: 8392-8396.
- [17] EHIRA S, OHMORI M, SATO N. Genome-wide expression analysis of the responses to nitrogen deprivation in the heterocyst-forming cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120 [J]. DNA Res, 2003, 10(3): 97-113.
- [18] MELLA-HERRERA R A, NEUNUEBEL M R, KUMAR K, et al. The *sigE* gene is required for normal expression of heterocyst-specific genes in *Anabaena* sp. strain PCC 7120 [J]. J Bacteriol, 2011, 193: 1823-1832.

Construction and phenotypic analyses of *sigC* mutant in *Anabaena* sp. PCC 7120

SU Bo CHEN Wen-li WANG Li

State Key Laboratory of Agricultural Microbiology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China

Abstract To determine the relationship between *sigC* (*all1692*) and heterocyst development in *Anabaena* sp. PCC 7120, *sigC* mutant named as M*sigC* was constructed by double homologous recombination. Results showed that when combined nitrogen sources became limited in the growth medium, M*sigC* had a pronounced reduction in heterocyst frequency compared to the wild type, while heterocyst frequency was recovered by complementation with the ectopically expressed *sigC* gene in the complement strain C*sigC*. It is indicated that *sigC* is involved in regulating the differentiation of heterocyst.

Key words *Anabaena* sp. PCC7120; *sigC*; heterocyst differentiation

(责任编辑:张志钰)