

单交换法构建鱼腥蓝细菌 *ftsZ* 的 *gfp* 原位标记菌株

牛天彩 胡 胜 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 利用单交换法将 *gfp* 整合到鱼腥蓝细菌 PCC 7120 基因组上, 构建 *ftsZ-gfp* 的翻译融合菌株, 并观察了 FtsZ 蛋白的亚细胞定位。结果表明: 通过同源重组, *gfp* 与基因组中唯一完整的 *ftsZ* 融合, 既保证了 *ftsZ* 基因的正常表达又能准确反映 *ftsZ* 蛋白的亚细胞定位, 并且实验周期短、操作方便, 是研究蛋白质亚细胞定位的一种简单有效的方法。

关键词 鱼腥蓝细菌 PCC 7120; 单交换; FtsZ; GFP

中图分类号 Q 93-31 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2016)06-0030-07

FtsZ 是参与细胞分裂的一个关键蛋白, 在细胞的中间位置聚合形成环状结构。1980 年 Lutkenhaus 等^[1]在大肠杆菌中发现该蛋白, 并命名为 FtsZ (the filamenting temperature-sensitive mutant Z)。研究发现, FtsZ 的同源蛋白几乎存在于所有的原核生物中, 包括古菌中的一些种类^[2-3]。其三维结构与真核生物中的微管蛋白类似^[4-6], 是一个高度保守的蛋白。在细胞分裂过程中, FtsZ 通过水解 GTP 在细胞的中间位置聚集形成环状结构, 称为 Z-ring^[7-8]。随着 FtsZ 的聚合, Z-ring 募集一系列与细胞分裂相关的蛋白形成分裂复合体, 从而启动细胞的分裂^[9-10]。

鱼腥蓝细菌 PCC 7120 (*Anabaena* sp. strain PCC 7120) 是由多个细胞组成的丝状蓝细菌, 属于念珠藻目念珠藻科念珠藻属^[11]。在化合氮源贫瘠的条件下, 每 10~20 个营养细胞就会分化一个具有固氮功能的异形胞, 是研究细胞分化和多细胞形成的模式生物^[12-13]。其全基因组测序已经在 2001 年完成^[14], 包括一个完整的环状染色体组 (6 413 771 bp) 以及 6 个大小不一的质粒, 分别为 pCC 7120 α (408 101 bp)、pCC 7120 β (186 614 bp)、pCC 7120 γ (101 965 bp)、pCC 7120 δ (55 414 bp)、pCC 7120 ϵ (40 340 bp) 以及 pCC 7120 ζ (5 584 bp)。

蛋白质的亚细胞定位是研究其生理功能的重要依据, 也是细胞生物学研究的中心问题。目前研究

蛋白质定位的方法主要包括免疫荧光观察^[15]以及荧光菌株的构建等^[16-17], 其中 GFP 原位标记菌株的构建是目前使用的最直观方便的方法^[18]。在鱼腥蓝细菌的蛋白质亚细胞定位相关研究中, 根据鱼腥蓝细菌 PCC 7120 基因组特点, GFP 融合菌株的构建主要利用复制型载体或整合型载体^[16]。其中, 利用整合型载体可以将 *gfp* 整合到染色体上^[17]或者细胞内的大质粒上。这些方法虽然满足了一些功能基因的研究需要, 但是也存在很多问题。复制型载体的使用会导致目标基因的拷贝数不可控, 从而导致荧光堆积或者不足, 以至于不能准确反映蛋白的亚细胞定位和调控水平。此外, 若基因表达水平升高, 会导致目标蛋白大量表达进而可能影响菌株的正常表型^[19]。而利用整合型质粒进行目标基因的 *gfp* 标记, 通常需要通过基因的双交换来完成, 这样就增加了菌株构建和筛选的难度, 推迟实验进度。

本研究设计了一种利用单交换构建功能基因 *gfp* 原位标记菌株的方法, 将 *gfp* 整合到鱼腥蓝细菌 PCC 7120 基因组上, 构建 *ftsZ-gfp* 的翻译融合菌株, 并观察 FtsZ 蛋白的亚细胞定位, 分析其时空表达, 以期通过这种单交换法, 能够简单易行地构建蓝细菌原位融合菌株, 为准确研究蓝细菌基因的功能、表达模式和亚细胞定位等创造便利条件。

收稿日期: 2016-05-13

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31570048)

牛天彩, 硕士研究生. 研究方向: 蓝细菌分子生物学. E-mail: jianiul5@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

1 材料与方法

1.1 实验材料

鱼腥蓝细菌 PCC 7120 (*Anabaena* sp. strain PCC 7120), 大肠杆菌 DH5 α 、HB101 (pRL623)、J53(RP4)为农业微生物学国家重点实验室保存, FG-W(Neo^r, pRL25T-*ftsZ*TLF-*gfp* 转化鱼腥蓝细菌 PCC 7120)、oeFG-W (Neo^r, pRL25T-P_{petE}-*ftsZ*-*egfp* 转化鱼腥蓝细菌 PCC 7120), 277FG-W (Sp^r Sm^r, pRL277-*alr*3858-*egfp* 转化鱼腥蓝细菌 PCC 7120, 将 *ftsZ*-*gfp* 原位整合到其基因组上)为本研究构建的菌株。

1.2 质粒构建

引物合成及 DNA 测序均由南京金斯瑞生物科技有限公司完成。

1)质粒 pRL25T-P_{petE}-*ftsZ*-*gfp* 的构建。以野生型鱼腥蓝细菌 PCC 7120 总 DNA 为模板,通过引物 E-*ftsZ*-up (CCGGAATTCATGACACTTGATAATAACCAAGAG) 和 P-*ftsZ*-dn (TTC-CAATGCATTGGCTGCAGATTTTGGGTGG-TCGCCG) 扩增得到 *ftsZ* ORF 片段,然后利用 *Eco*R I 和 *Pst* I 酶切位点将目标基因克隆到质粒 pSKP_{petE}*egfp* 中,获得质粒 pSKP_{petE}*ftsZegfp*,最后通过 *Bam*H I 和 *Xho* I 酶切位点将 P_{petE}*ftsZegfp* 片段整合到载体 pRL25T 上,最终得到 pRL25T-P_{petE}-*ftsZ*-*egfp* 质粒。

2)质粒 pRL277-*alr*3858-*egfp* 的构建。以质粒 PSKP_{petE}*egfp* 为模板,通过引物 L-EGFP-S(CCTTGAGCTCTCTAGACTTGAAATGGTGAGCAAGGGC) 和 L-EGFP-A (CCTTCTCGAGTTACTTGTA-CAGCTCGTCCATGCCG) 扩增得到 Linker(TCTA-GACTTGAA)及 *egfp* 片段,然后利用核酸内切酶位点 *Sca* I 和 *Xho* I 将其插入到整合载体 pRL277 (笔者所在实验室保存)上得到 pRL277-*egfp*;接着使用引物 Sense-*alr*3858C + 1 I (CCTTCTG-CAGACACTTGATAATAACCAAGAGC) 和 Anti-*alr*3858C + 1260 (CCTTGAGCTCATTGTTGGGTGGTCCGCTCTCTGA) 扩增得到 *ftsZ* (*alr*3858)的 ORF 片段,利用核酸内切酶位点 *Pst* I 和 *Sca* I 将其插入到上一步得到的载体 pRL277-*egfp* 上,得到 pRL277-*alr*3858-*egfp* 质粒。

1.3 菌株的构建(三亲本接合转移)

将构建的目标质粒转入 HB101(pRL623)感受

态细胞中,得到三亲本之一的供体细菌。然后将其接种至 LB 培养基中,同时培养 30 mL 的接合细菌 J53(RP4),待两者均培养至对数生长期后期 ($D_{600\text{ nm}} \approx 0.8$)时收菌,用新鲜无抗 LB 培养基洗涤 3 次,然后与鱼腥蓝细菌 PCC 7120 混合摇匀,置于透光性较好的离心管中,静置培养在光照培养箱中。4 h 后,取下层沉淀的菌液均匀涂开,放置在光照培养箱中继续培养 18 h,之后通过在培养基中添加筛选抗生素,筛选目标菌株。待平板上长出单菌落后,将其接种至新鲜的含相应抗生素的平板上扩大培养。其中鱼腥蓝细菌 PCC 7120 因生长周期长需提前 2 d 左右培养,以确保进行三亲本杂交实验时,蓝细菌处于对数生长期 ($D_{750\text{ nm}} \approx 0.5$)。

1.4 培养条件以及培养基配方

大肠杆菌主要使用 LB 培养基培养,液体培养一般在 37 °C、180 r/min 的水平恒温摇床中培养。抗生素使用质量浓度为: Amp 100 $\mu\text{g/mL}$, Kan 50 $\mu\text{g/mL}$, Cm 25 $\mu\text{g/mL}$, Sp 100 $\mu\text{g/mL}$ 。

鱼腥蓝细菌使用硝酸盐培养基 BG11 培养。液体培养一般在 30 °C 恒温光照摇床、120 r/min、光强 50~100 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 的条件下培养。抗生素使用质量浓度为: Neo 150 $\mu\text{g/mL}$, Sp 5 $\mu\text{g/mL}$, Sm 5 $\mu\text{g/mL}$ 。

1.5 显微观察

使用 Nikon Eclipse 80i 荧光显微镜,在 100 \times 油镜下分别观察 FG-W、oeFG-W、277FG-W 的细胞形态及胞内 GFP 荧光信号。

2 结果与分析

2.1 传统荧光菌株的构建及荧光观察

传统的荧光菌株构建是通过复制型质粒 (pRL25T) 将目标基因转入鱼腥蓝细菌中表达。通过此方法,本研究分别构建了菌株 FG-W 和 oeFG-W。其中 FG-W 菌株中的质粒 pRL25T-*ftsZ*TLF-*gfp* 是由自身启动子 P_{ftsZ} 启动目标基因 *ftsZ*-*gfp* 的表达,而 oeFG-W 菌株中的质粒 pRL25T-P_{petE}-*ftsZ*-*egfp* 是由 P_{petE} 启动目标基因的表达。当使用 *ftsZ* 自身启动子启动 *ftsZ*-*gfp* 表达时,荧光信号非常弱,细胞形态也发生了改变 (图 1)。

重组菌株 oeFG-W 由 *petE* 启动子驱动 *ftsZ*-*gfp* 表达。由于 P_{petE} 不受细胞生理水平的调控,当加入 0.1 $\mu\text{mol/L}$ Cu²⁺ 诱导表达时, *ftsZ*-*gfp* 会大

量表达,造成荧光堆积,形成多个明显的荧光点(图 2),因此,也不能正确反映 FtsZ 在细胞间的分布及亚细胞定位。

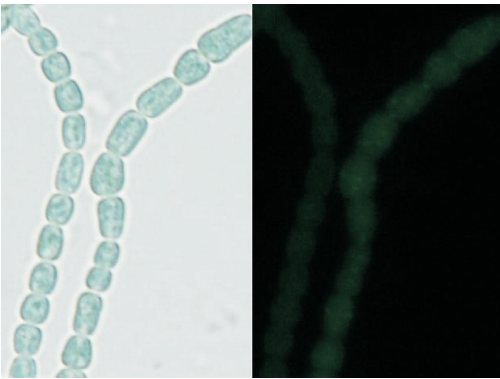


图 1 FG-W 菌株中 FtsZ-GFP 的亚细胞定位
Fig.1 The subcellular localization of FtsZ-GFP in FG-W strain

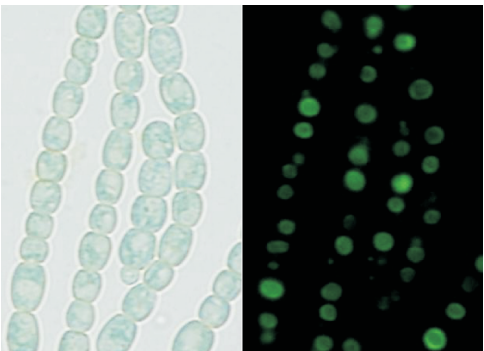


图 2 oeFG-W 菌株中 FtsZ-GFP 的亚细胞定位
Fig.2 The subcellular localization of FtsZ-GFP in oeFG-W strain

2.2 GFP 单交换荧光菌株的构建

以整合型质粒 pRL277 为起始载体,构建翻译融合质粒 pRL277-*alr3858-egfp*,用于观察 FtsZ 蛋白的亚细胞定位,构建流程如图 3 所示。首先扩增

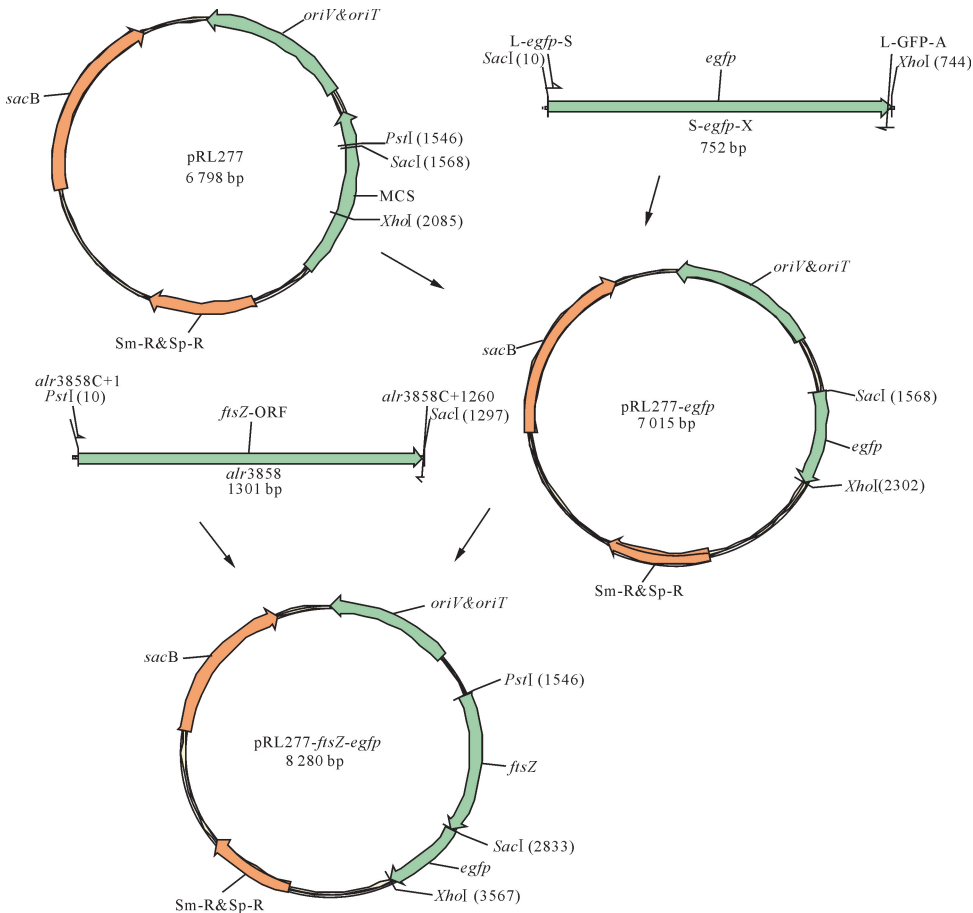


图 3 质粒 pRL277-*alr3858-egfp* 的构建流程
Fig.3 Construction process of pRL277-*alr3858-egfp*

得到 Linker 及 *egfp* 片段,通过核酸内切酶 *Sca* I 和 *Xho* I 插入至整合载体 pRL277 中得到 pRL277-*egfp*;然后利用引物 Sense-*alr3858C*+1 和 Anti-*alr3858C*+1260 扩增 *ftsZ* 片段(ATG 下游 4~

1 284 bp),通过核酸内切酶 *Pst* I 和 *Sca* I 将其插入到载体 pRL277-*egfp* 中,得到 pRL277-*alr3858-egfp* 质粒。

将构建的质粒通过三亲本接合转移转入鱼腥蓝细菌 PCC 7120 中,然后经过同源交换将 *ftsZ-gfp* 整合到鱼腥蓝细菌 PCC 7120 基因组的 *ftsZ* 上,得到菌株 277FG-W,具体交换过程如图 4 所示。在

277FG-W 菌株中 *ftsZ-gfp* 在自身启动子 P_{ftsZ} 的驱动下自然表达。虽然该菌株的基因组中多了一个拷贝的 *ftsZ* 基因,但其中一个基因由于缺乏启动子将始终保持沉默,不会增加目标基因的表达,因此,重组菌株中 *ftsZ* 的表达水平及模式与野生型的一致。另外,增加的基因片段同时保留了下游基因的启动子等原件,避免了对重组菌株中功能基因的下游基

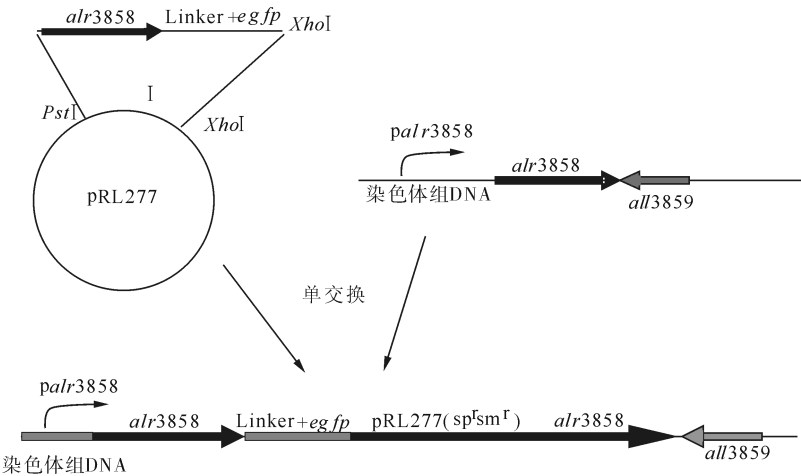


图 4 *ftsZ-gfp* 原位整合到鱼腥蓝细菌 PCC 7120 基因组上示意图

Fig.4 Schematic of *ftsZ-gfp* integrated into *Anabaena* sp. strain PCC 7120 genome *in situ*

因产生影响。由于实验使用的是单交换法,对比构建双交换菌株时需要经过 *sacB* 基因筛选等繁复流程,实验操作大幅简化、周期缩短。

2.3 单交换荧光菌株的观察

鉴于传统荧光菌株构建方法的缺陷,本研究利用单交换的方法构建了 *ftsZ-gfp* 的原位标记菌株,这样既不会增加目标基因的拷贝数,又能准确地反

映目标蛋白的亚细胞定位。

显微镜观察结果显示:277FG-W 菌株中 FtsZ 定位于大多数细胞的中间位置,并在细胞间均匀分布,几乎所有细胞中都能看到清晰的荧光(图 5)。

此外,通过共聚焦显微镜进一步观察了 FtsZ 在细胞内的三维分布,发现其在细胞的中间位置呈现明显的环状结构(图 6)。

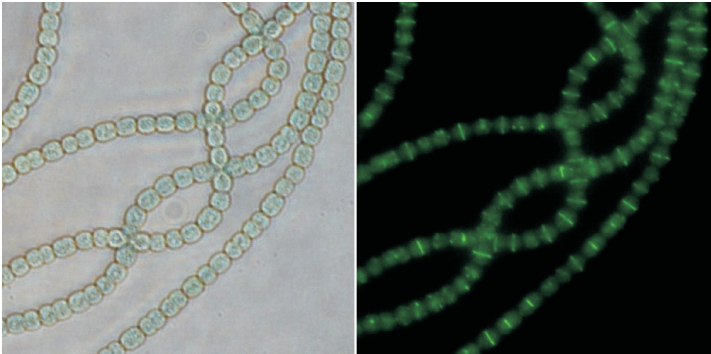


图 5 GFP 单交换荧光菌株 277FG-W 的荧光观察

Fig.5 The subcellular localization of FtsZ-GFP in 277FG-W strain

2.4 异形胞分化过程中 FtsZ 的时空调控

相关研究发现异形胞的分化可能与细胞周期相关^[20-21],在异形胞分化过程中 *ftsZ* 的表达受到细胞内信号分子的严格调控^[22]。本研究利用 277FG-

W 菌株,观察了异形胞分化过程中 FtsZ 的时空调控。观察结果显示,FtsZ 环分布在所有正在分裂的营养细胞中,而在诱导 24 h 的成熟异形胞中几乎观察不到清晰的荧光(图 7),说明 FtsZ 蛋白在异形胞

分化过程中受到负调控^[20-21],说明通过此方法构建的荧光菌株不仅能够精确地反映蛋白质的亚细胞定

位,而且还能准确地反映该蛋白在生理过程中受到的时间和空间的调控,因此,是研究蛋白质亚细胞定

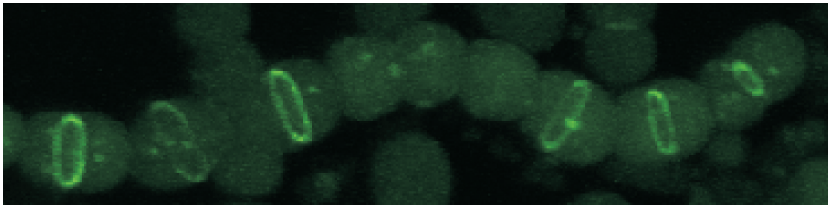
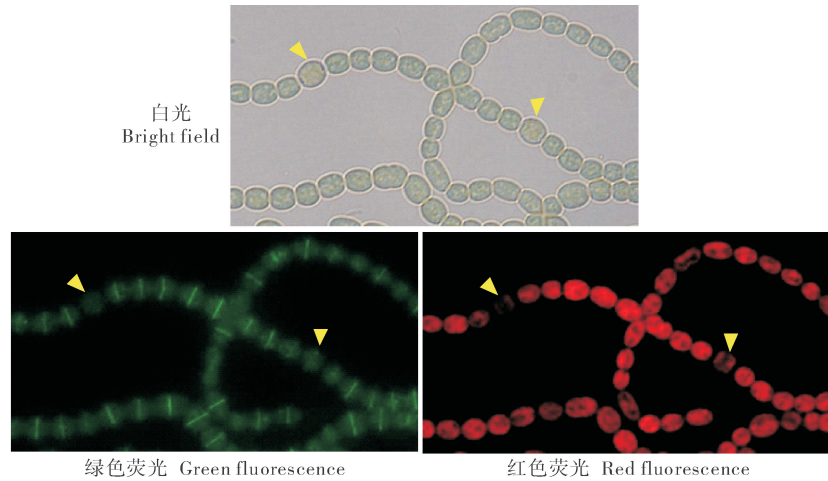


图 6 在鱼腥蓝细菌中 FtsZ-GFP 的亚细胞定位

Fig.6 The subcellular localization of FtsZ-GFP in *Anabaena*



缺氮诱导异形胞分化 24 h 后通过显微镜白光和荧光分别观察丝状体的表型,其中箭头指示的是异形胞。Filaments were visualized under bright-field or fluorescence microscopy after the induction of heterocyst differentiation for 24 h. Arrowheads indicate heterocysts.

图 7 FtsZ 环在异形胞分化过程中的时空调控

Fig.7 Spatiotemporal regulation of FtsZ ring in heterocysts

位和相关调控的一种简单有效的方法。

3 讨 论

鱼腥蓝细菌 PCC 7120 是由多个细胞组成的丝状蓝细菌,在氮源贫瘠的条件下会分化具有固氮功能的异形胞。异形胞是终端分化的细胞,不能再次分裂,因此,研究 FtsZ_{ana} 的亚细胞定位不仅能够揭示该蛋白的功能和作用,还有助于研究细胞分裂和分化之间的关系。在鱼腥蓝细菌的蛋白质亚细胞定位相关研究中,根据鱼腥蓝细菌 PCC 7120 基因组特点,GFP 融合菌株的构建主要利用复制型载体或整合型载体^[16],这些方法虽然满足了一些功能基因的研究需要,但是也存在很多问题。

研究发现,复制型载体的使用会导致目标基因的拷贝数不可控,同一个染色体上不同重组子的拷贝数差异显著,由 0.53 到 1 812 不等;此外,由

pRL25T 载体构建的不同克隆所驱动表达的绿色荧光蛋白表型也不同,这种差异与细胞内质粒的相对拷贝数相关^[19]。因此,本研究通过穿梭型质粒构建荧光融合菌株虽然方便、实验周期短,较快地获得了目标菌株 FG-W,但是在使用自身启动子的条件下,荧光较弱且分布不均匀,只有部分细胞或菌丝中有荧光,其原因可能是因为基因组中的目标基因优先表达,从而导致质粒上融合 *gfp* 的基因表达受到抑制。此外,由于质粒上融合基因的导入,导致目标基因的拷贝数增加,以至于影响细胞的表型。而使用 *petE* 启动子驱动目标基因表达的 oeFG-W 菌株中,虽然能够观察到较强的荧光,且荧光在菌丝和细胞间均匀分布,但是 GFP 的大量表达,造成了荧光堆积,形成一个个荧光点,无法正常显示蛋白在细胞内的定位。此外,*petE* 启动子由 Cu²⁺ 诱导表达,其表达量极大地受 Cu²⁺ 浓度的影响,而 FtsZ 的细胞内

含量严重影响细胞的分裂,因此,oeFG-W 菌株的观察结果与 Cu^{2+} 浓度密切相关,不同的实验条件下可能出现不同的实验结果^[21]。

利用整合型载体可以将 *gfp* 整合到细胞内的染色体上^[17]或者大质粒上,与穿梭载体的构建方法相比,这种方法能够稳定表达目的基因,与细胞内部的生理状态基本保持一致,但是这种方法的成功率比较低,较难得到完全的双交换菌株,而且实验周期较长,影响进度。另外,由于大多数双交换菌株的构建是在鱼腥蓝细菌内部的大质粒上完成的,所以与穿梭载体类似,同样会增加基因的拷贝数,影响细胞的表型。

本研究将不含启动子和起始密码子的 *ftsZ* 编码区与 *gfp* 进行翻译融合,然后通过整合型质粒 pRL277 将融合片段转入鱼腥蓝细菌,整合质粒上的 *ftsZ* 编码区与蓝细菌染色体上的 *ftsZ* 编码区发生同源重组,由此将完整的质粒连入蓝细菌的染色体,从而在染色体上完成 *ftsZ* 的 *gfp* 标记。虽然染色体上还具有另一个 *ftsZ* 的部分编码区,但由于该片段没有启动子驱动,同时缺失了起始密码子,因此,不能正常表达、发挥功能。另外,单交换发生在基因编码区的内部,一般不会对下游基因产生影响,因此,所构建的翻译融合菌株接近野生型的遗传背景。与双交换菌株的构建方法相比,单交换菌株筛选简单、实验周期较短,由于发生单交换,菌株的基因组上增加了一段无效的基因片段(pRL277 质粒的碱基序列),虽然目前的研究结果未发现该片段会对菌体产生显著影响,但如何有效地去除该片段仍有待探究。

参 考 文 献

- [1] LUTKENHAUS J F, WOLF-WATZ H, DONACHIE W D. Organization of genes in the *ftsA-envA* region of the *Escherichia coli* genetic map and identification of a new *fts* locus (*ftsZ*) [J]. J Bacteriol, 1980, 142(2): 615-620.
- [2] WANG X, LUTKENHAUS J. FtsZ ring: the eubacterial division apparatus conserved in archaeobacteria [J]. Mol Microbiol, 1996, 21(2): 313-319.
- [3] MARGOLIN W, WANG R, KUMAR M. Isolation of an *ftsZ* homolog from the archaeobacterium *Halobacterium salinarum*: implications for the evolution of FtsZ and tubulin [J]. J Bacteriol, 1996, 178(5): 1320-1327.
- [4] ERICKSON H P. FtsZ, a tubulin homologue in prokaryote cell division [J]. Trends Cell Biol, 1997, 7(9): 362-367.
- [5] NOGALES E, DOWNING K H, AMOS L A, et al. Tubulin and FtsZ form a distinct family of GTPases [J]. Nat Struct Biol, 1998, 5(6): 451-458.
- [6] LÖWE J, AMOS L A. Crystal structure of the bacterial cell-division protein FtsZ [J]. Nature, 1998, 391(6663): 203-206.
- [7] GLASS J I, LEFKOWITZ E J, GLASS J S, et al. The complete sequence of the mucosal pathogen *Ureaplasma urealyticum* [J]. Nature, 2000, 407(6805): 757-762.
- [8] LLUCH-SENAR M, QUEROL E, PIÑOL J. Cell division in a minimal bacterium in the absence of *ftsZ* [J]. Mol Microbiol, 2010, 78(2): 278-289.
- [9] MARGOLIN W. FtsZ and the division of prokaryotic cells and organelles [J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2005, 6(11): 862-871.
- [10] LUTKENHAUS J, PICHOFF S, DU S. Bacterial cytokinesis: from Z ring to divisome [J]. Cytoskeleton, 2012, 69(10): 778-790.
- [11] 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(2): 367-375.
- [12] MURO-PASTOR A M, HESS W R. Heterocyst differentiation: from single mutants to global approaches [J]. Trends Microbiol, 2012, 20(11): 548-557.
- [13] 苏波, 陈雯莉, 王莉. 鱼腥蓝细菌 PCC 7120 中 *sigC* 突变体的构建和表型分析 [J]. 华中农业大学学报, 2015, 34(3): 46-50.
- [14] KANEKO T Y, NAKAMURA C P, WOLK T, et al. Complete genomic sequence of the filamentous nitrogen-fixing cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120 [J]. DNA research, 2001, 8(5): 205-213.
- [15] RAMOS-LEÓN F, MARISCAL V, FRIAS J E, et al. Divisome-dependent subcellular localization of cell-cell joining protein SepJ in the filamentous cyanobacterium *Anabaena* [J]. Mol Microbiol, 2015, 96(3): 566-580.
- [16] RISSER D D, CALLAHAN S M. Genetic and cytological evidence that heterocyst patterning is regulated by inhibitor gradients that promote activator decay [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2009, 106(47): 19884-19888.
- [17] RIVERS O S, VIDEAU P, CALLAHAN S M. Mutation of *sepJ* reduces the intercellular signal range of a hetN-dependent paracrine signal, but not of a patS-dependent signal, in the filamentous cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120 [J]. Mol Microbiol, 2014, 94(6): 1260-1271.
- [18] 李东霞, 王莉, 陈雯莉. MreB 在鱼腥蓝细菌 PCC 7120 细胞分裂过程中的功能 [J]. 华中农业大学学报, 2012, 31(6): 672-678.
- [19] YANG Y, HUANG X Z, WANG L, et al. Phenotypic variation caused by variation in the relative copy number of pDU1-based plasmids expressing the GAF domain of Pkn41 or Pkn42 in *Anabaena* sp. PCC 7120 [J]. Res Microbiol, 2013, 164(2): 127-135.
- [20] SAKR S, JEANJEAN R, ZHANG C C, et al. Inhibition of cell division suppresses heterocyst development in *Anabaena* sp. strain PCC 7120 [J]. J Bacteriol, 2006, 188(4): 1396-1404.

[21] SAKR S, THYSSEN M, DENIS M, et al. Relationship among several key cell cycle events in the developmental cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120[J]. J Bacteriol, 2006, 188(16): 5958-5965.

[22] KUHN I, PENG L, BEDU S, et al. Developmental regulation of the cell division protein FtsZ in *Anabaena* sp. strain PCC 7120, a cyanobacterium capable of terminal differentiation[J]. J Bacteriol, 2000, 182(16): 4640-4643.

Constructing the *ftsZ-gfp* fusion in the genome of *Anabaena* sp. strain PCC 7120 by single-crossover recombination

NIU Tiancai HU Sheng CHEN Wenli WANG Li

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

Abstract A *ftsZ-gfp* fusion strain was constructed to observe the subcellular localization of FtsZ, in which the *ftsZ-gfp* was integrated into genome *in situ* by single-crossover recombination. The results showed that this method guaranteed the normal expression of the gene and accurately reflected the subcellular localization of the protein. It is a simple and effective method for studying the subcellular localization of proteins.

Keywords *Anabaena* sp. strain PCC 7120; single-crossover recombination; FtsZ; GFP

(责任编辑:张志钰)