

氯霉素对集胞蓝细菌 PCC 6803 细胞中羧酶体数目及其相关蛋白丰度的影响

李松柏 支瑶 李盼 汪方奎 陈雯莉

华中农业大学农业微生物学国家重点实验室, 武汉 430070

摘要 羧酶体是由致密的外壳蛋白包裹着核酮糖-1,5-二磷酸羧化酶/氧化酶和碳酸酐酶形成的细胞内蛋白质小体,是蓝细菌二氧化碳固定的场所。为解析羧酶体在不同培养条件下的功能,本研究构建了原核表达载体 pET28a-CcmK2,并在大肠杆菌 BL21(DE3)中诱导表达带有组氨酸标签的 CcmK2 重组蛋白,制备了其多克隆抗体,探讨了不同质量浓度氯霉素对细胞内羧酶体数目和羧酶体相关蛋白丰度的影响。首先,确定了不同质量浓度的氯霉素对集胞蓝细菌 PCC 6803 生长的影响,发现 5.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 氯霉素能够完全抑制菌株的生长,但是可以维持菌株存活。随后,探讨了集胞蓝细菌在葡萄糖异养和光合自养转换过程中,氯霉素对细胞内羧酶体数目及羧酶体相关蛋白的影响。结果显示:氯霉素的加入抑制了细胞内羧酶体数目对环境碳源的响应;同时,Western blot 检测发现 5.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 氯霉素能够抑制细胞内新的羧酶体外壳蛋白 CcmK2 的合成。这些结果表明,氯霉素可能通过抑制羧酶体外壳蛋白的合成来干扰细胞内羧酶体的形成,细胞内羧酶体对环境碳源的响应存在复杂的调控机制。

关键词 集胞蓝细菌 PCC 6803; 羧酶体; 氯霉素; 二氧化碳浓缩机制

中图分类号 Q 93-33 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2018)01-0007-05

蓝细菌是一种重要的全球光合自养生物,海洋蓝细菌和其他浮游植物光合产量占全球初级生产力的近 50%,而拥有如此庞大的光合作用产量离不开对 CO_2 的高效固定。在漫长的大气环境变化过程中,地球 CO_2 浓度降低, O_2 浓度升高,蓝细菌应对环境碳源变化作出反应的机制一直以来都具有重大的理论意义和应用价值^[1]。

当外界 CO_2 浓度很高时,蓝细菌细胞对无机碳源的运输能力降低,碳酸酐酶活性降低或者消失;而当生长在低 CO_2 浓度环境中时,会诱导菌株产生特殊的 CO_2 吸收机制,即二氧化碳浓缩机制(CO_2 concentrating mechanism, CCM)^[2]。CCM 是蓝细菌为适应地球大气环境中二氧化碳浓度下降、氧气浓度上升而进化出的高效无机碳源固定系统,主要包括碳转运子、羧酶体以及调节系统^[3-4]。作为 CCM 核心组件的羧酶体是蓝细菌为克服细胞外 CO_2 浓度低、 O_2 副反应的竞争以及固定酶 RuBisCO 催化活性效率低的不足,演变出的各种高效碳源固定途

径的微体化策略的产物^[2,5]。然而羧酶体如何能够感受外界环境碳源的变化来增强或减弱碳源的吸收的调控机制,至今仍不清楚。已知氯霉素是一种翻译抑制剂,通过扩散进入细菌细胞内,可逆地与核糖体 50S 亚基结合,阻止了氨基酰 tRNA 与 50S 亚基 A 位点的结合,从而抑制肽链的延伸,阻止细菌蛋白质合成^[6]。

本研究通过一系列氯霉素抑制实验,探讨氯霉素对细胞内羧酶体数目和羧酶体相关蛋白丰度的影响,旨在揭示当羧酶体响应环境碳源改变时,其数量变化的内在调控机制。

1 材料与方法

1.1 正常光照下菌株生长曲线的测定

供试菌株集胞蓝细菌 PCC 6803 的野生型 WT^[7]由华中农业大学农业微生物学国家重点实验室蓝细菌分室保存^[8],而羧酶体荧光标记菌株 CcmK2-EGFP 和 RbcL-EGFP 由汪方奎博士构建。

收稿日期: 2017-05-17

基金项目: 国家自然科学基金项目(31570048);中央高校基本科研业务费专项(2014PY003)

李松柏,硕士研究生。研究方向:蓝细菌分子生物学。E-mail: bestfriend_2009@126.com

通信作者: 陈雯莉,博士,教授。研究方向:环境微生物学。E-mail: wlchen@mail.hzau.edu.cn

分别将 3 个菌株活化后接种于新鲜的 100 mL BG11 培养基至 D_{580} 为 0.05 左右, 30 ℃、150 r/min 光照培养。每 12 h 测 1 次 D_{580} , 连续测定 72 h, 绘制正常光照下菌株的生长曲线。

1.2 氯霉素抑制以及去抑制生长测定

将集胞蓝细菌 PCC 6803 的野生型菌株 WT、羧酶体荧光标记菌株 CcmK2-EGFP 和 RbcL-EGFP 各接种于 200 mL BG11 培养基中, 30 ℃ 光照条件下生长至 D_{580} 为 0.3 左右。配制含氯霉素的无菌 BG11 培养基, 加入氯霉素后使其终质量浓度分别为 0、1.25、2.5、5.0、10.0 $\mu\text{g/mL}$, 分装成 10 瓶 (30 mL/瓶), 接种集胞蓝细菌 PCC 6803 的野生型菌株 WT、羧酶体荧光标记菌株 CcmK2-EGFP 和 RbcL-EGFP 后置于光照条件下培养, 生长 72 h, 测量 D_{580} 并观察表型, 再用不含抗生素的无抗 BG11 洗去氯霉素后使供试菌株光照自养生长 72 h 测量 D_{580} 并观察表型。

1.3 不同环境碳源转换下, 氯霉素抑制集胞蓝细菌的表型测定

PCC 6803 野生型菌株 WT、羧酶体荧光标记菌株 CcmK2-EGFP 和 RbcL-EGFP 分别接种于新鲜 200 mL BG11 培养基中, 30 ℃ 光照条件下生长至 D_{580} 为 0.3 左右。加入 0.8 mL 1 mol/L TES、1 mL 30% $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 、0.5 mL 5 mmol/L 葡萄糖于培养基中转入黑暗条件培养, 异养期间每天定时光照 10 min。当菌株葡萄糖光激活异养 8 d 以后, 恢复光合自养生长。同时, 作为实验组, PCC 6803 野生型菌株 WT、羧酶体荧光标记菌株 CcmK2-EGFP 和 RbcL-EGFP 分别转入含氯霉素 (Cm) 终质量浓度为 0、1.25、2.5、5.0、10.0 $\mu\text{g/mL}$ 的培养基中置于光照条件下培养。分别在 6、12、24 h 取样, 然后测定 PCC 6803 野生型菌株 WT、羧酶体荧光标记菌株 CcmK2-EGFP 和 RbcL-EGFP 的 D_{580} , 显微镜下观察菌体形态, 同时进行总蛋白抽提, 对各羧酶体组分蛋白的表达水平进行测定。

2 结果与分析

2.1 菌株正常光照下的生长曲线

为了比较汪方奎博士前期构建的羧酶体荧光菌株与野生型菌株的生长情况, 首先测定了正常光照下 BG11 培养基中 3 个菌株的生长曲线 (图 1), 可以看出在 BG11 培养条件下, 羧酶体荧光标记菌株 CcmK2-EGFP 和 RbcL-EGFP 与 PCC 6803 野生型菌

株生长趋势一致, 没有明显差异, 说明 CcmK2-EGFP、RbcL-EGFP 这 2 个羧酶体荧光标记菌株可用于后续实验。

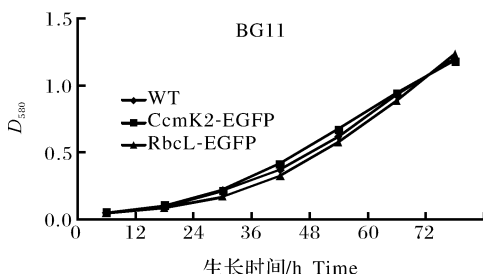


图 1 集胞蓝细菌 PCC 6803 在 BG11 培养基中的光照生长曲线

Fig.1 Phototrophic growth rate of *Synechocystis* PCC 6803 in BG11

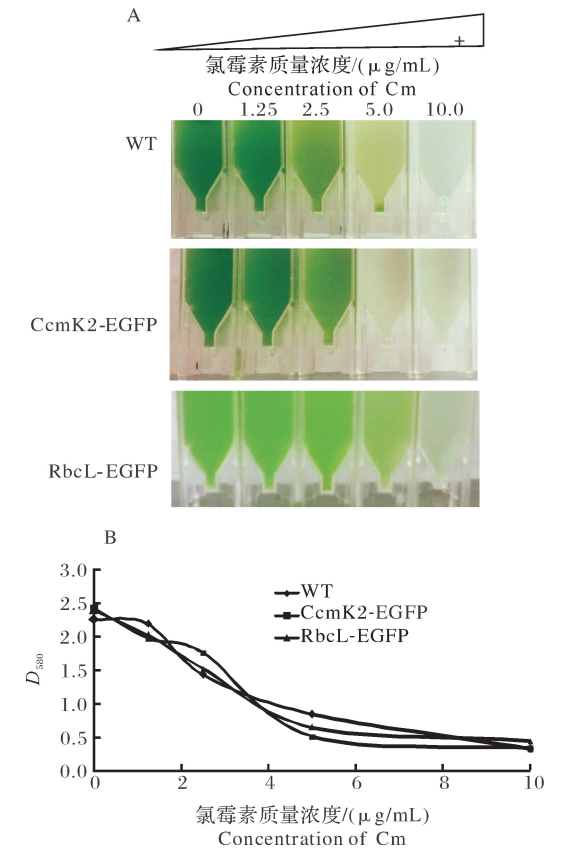
2.2 菌株在氯霉素抑制条件下的生长曲线

首先确定氯霉素对供试菌株的抑制浓度, 分别测试了 WT、CcmK2-EGFP、RbcL-EGFP 等 3 个菌株在质量浓度为 0、1.25、2.5、5.0、10.0 $\mu\text{g/mL}$ 氯霉素存在条件下的生长曲线。3 个菌株在不同质量浓度氯霉素下正常光照生长 3 d 的生长状态 (图 2A) 结果表明, WT 和 CcmK2-EGFP、RbcL-EGFP 菌株的生长状态和菌液颜色在 1.25 与 0 $\mu\text{g/mL}$ 氯霉素时略有不同; 但当氯霉素质量浓度提高到 2.5 $\mu\text{g/mL}$ 时, WT 和 CcmK2-EGFP 菌株均出现颜色明显发黄、生长下降的趋势。当氯霉素质量浓度达到 5.0 $\mu\text{g/mL}$ 时 3 个菌株呈明显黄色, 已基本不再生长。氯霉素质量浓度对菌株生长的抑制曲线测定结果 (图 2B) 也表明, 当氯霉素质量浓度为 5.0 $\mu\text{g/mL}$, 3 个菌株生长停止。

为了进一步确定氯霉素质量浓度为 5.0 $\mu\text{g/mL}$ 时, 3 个菌株是生长受到抑制还是已经死亡, 通过洗涤去除了培养基中的氯霉素, 再观察 3 个菌株的生长, 确认其生长得到恢复, 如图 3 所示。结果表明: 与没有加氯霉素的菌体相比, 洗涤去除氯霉素后 3 个菌株仍然能够生长, 但生长慢一些; 光照生长 72 h 后, D_{580} 从 0.3 升高到 1.0 左右。这从另一个侧面也表明, 在 5.0 $\mu\text{g/mL}$ 氯霉素抑制下, 虽然菌株不能生长但并没有死亡, 只是新蛋白质的合成受到了抑制。

2.3 在氯霉素抑制条件下羧酶体数量的荧光观察

根据笔者所在实验室前期结果, 当集胞蓝细菌在葡萄糖中异养 8 d 后, 细胞内羧酶体数目会减少到 1~2 个; 当恢复光照自养后, 细胞内羧酶体的数



A:不同浓度氯霉素抑制条件下菌株光照生长 3 d 的表型；
B:氯霉素对蓝细菌生长的抑制曲线。A: Phenotype of the strain after 3 day-light growth under different concentrations of chloramphenicol; B: Inhibitory effect of chloramphenicol on the growth of cyanobacteria.

图 2 光照条件下氯霉素对不同菌株生长的抑制
Fig.2 Inhibition of chloramphenicol on the growth of different strains under illumination condition

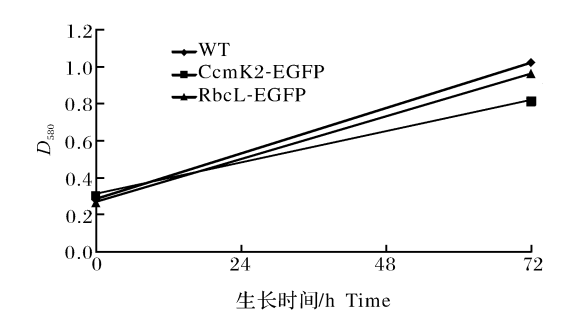


图 3 不同菌株在光照条件下
去除氯霉素抑制后的生长趋势
Fig.3 The growth trend of different strains after removal of chloramphenicol under light condition

量迅速增加并恢复到正常水平。因此,可以确定在环境碳源改变的情况下,羧酶体的数量发生了变化,但此过程中具体的调控机制仍不清楚。笔者在恢复光照自养过程中,加入氯霉素,通过抑制新生蛋白的合成,进一步确认羧酶体数量的增加是否由游离的羧酶体组分蛋白迅速募集组合导致^[8]。如图 4 所示,当不加氯霉素处理时,恢复正常光照自养 6 h 羧酶体就开始增加,24 h 基本恢复到正常光照状态下的数目。当加入终质量浓度 2.5 $\mu\text{g/mL}$ 氯霉素时,恢复光合自养 12 h,分裂完成的细胞已经有 2 个羧酶体;恢复光合自养 24 h 每个细胞仍然能恢复 2~3 个羧酶体;但当加入终质量浓度为 5.0 $\mu\text{g/mL}$ 氯霉素时,即使恢复光照自养生长 24 h,大部分细胞仍仅含 1~2 个羧酶体。

分别统计在氯霉素质量浓度为 0(205 个细胞)和 5.0 $\mu\text{g/mL}$ (218 个细胞)时,光照恢复 24 h 细胞

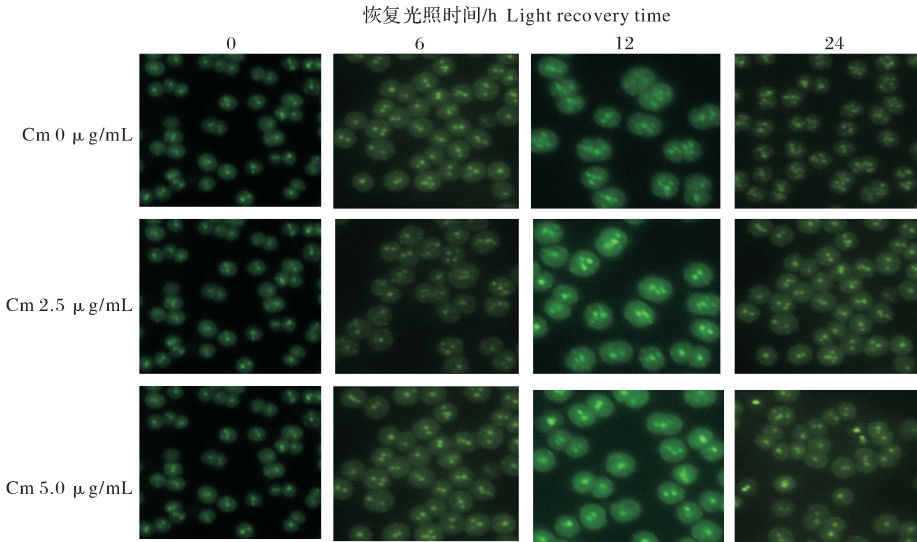


图 4 恢复光照过程中氯霉素抑制条件下羧酶体外壳蛋白 CcmK2 标记菌株的荧光观察
Fig.4 GFP fluorescence of CcmK2-EGFP in light recovery cultivation under Cm inhibition

内含有的羧酶体数量(图 5),结果表明:当培养基中氯霉素质量浓度为 5.0 $\mu\text{g/mL}$ 时,大多数细胞内含有 1~2 个羧酶体;但当不加氯霉素时,细胞绝大多数含有 5 个以上羧酶体,与利用荧光显微镜观察到的羧酶体数目变化结果一致。

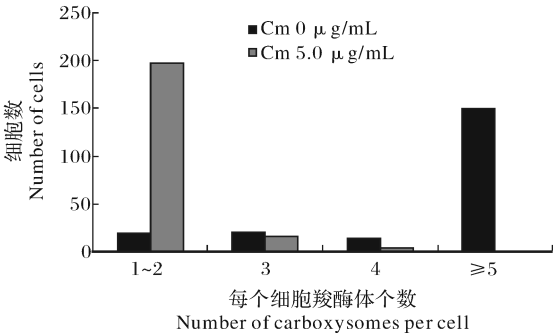
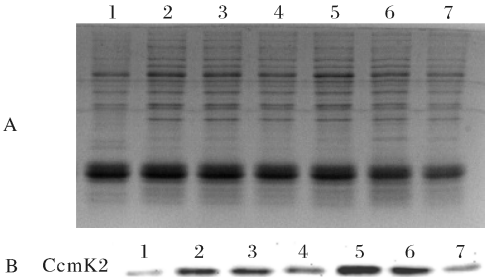


图 5 氯霉素抑制条件下光照恢复 24 h 羧酶体恢复情况的细胞数量统计

Fig.5 Number of carboxysomes per cell in light recovery 24 h cultivation under chloramphenicol inhibition

2.4 在氯霉素抑制条件下羧酶体组分蛋白测定结果

氯霉素抑制羧酶体组分蛋白合成的同时也影响了细胞内其他蛋白的合成,进而影响细胞的生长分裂。为了保证检测结果反映的是平均每个细胞内总蛋白中羧酶体组分蛋白所占比例的变化,取样相同细胞数,并且点样时采用相同量的总蛋白,然后进行 Western blot 的检测。如图 6B 所示,当环境碳源改



A: 总蛋白的凝胶定量; B: Western blot 检测结果。泳道 1: 光合自养恢复 0 h; 泳道 2、3、4 分别是 Cm 0、2.5、5.0 $\mu\text{g/mL}$ 时恢复光合自养 6 h; 泳道 5、6、7 分别是 Cm 0、2.5、5.0 $\mu\text{g/mL}$ 时恢复光合自养 24 h。A: The gel electrophoresis of total proteins; B: Western blot analysis of CcmK2. Lane 1: 0 h after conversion to light; Lanes 2-4: 6 h after conversion to light with 0, 2.5 and 5.0 $\mu\text{g/mL}$ Cm respectively; Lanes 5-7: 24 h after conversion to light with 0, 2.5 and 5.0 $\mu\text{g/mL}$ Cm respectively.

图 6 氯霉素抑制野生型光照恢复过程中羧酶体组分蛋白表达量的检测

Fig.6 Protein abundance of WT carboxysome in conversion to light under Cm inhibition

变时,恢复光合自养后,羧酶体组分蛋白 CcmK2 的表达量随着 Cm 抑制浓度的升高而降低,特别是当完全抑制蛋白合成的氯霉素终质量浓度为 5.0 $\mu\text{g/mL}$ 时,恢复光合自养 12 h 和 24 h 的 CcmK2 表达量没有明显增加。这与在相同条件下,羧酶体数量的荧光观察结果是一致的。说明当环境碳源改变时,蛋白质的合成被抑制从而影响羧酶体的组装,这从另一面证明了羧酶体的组装可能是受到转录水平调控,而非简单的蛋白水平的募集合成。同时也说明羧酶体的组装可能是一个非常复杂的过程,受到多个因素的共同调控。

3 讨论

羧酶体是存在于所有蓝细菌中的一类细菌微体,是蓝细菌 CO_2 浓缩机制的核心部分,主要以 RuBP 为底物、在 RuBisCO 的催化下产生 3-PGA,从而实现二氧化碳的固定和利用^[9]。有研究表明,当环境碳源变化时,蓝细菌羧酶体数目也发生改变,这暗示着在碳源变化的过程中羧酶体可能受到了某种机制的调控^[10-11]。

本研究构建了原核表达载体 pET28a-CcmK2,并在大肠杆菌 BL21(DE3)中诱导表达带有组氨酸标签的 CcmK2 重组蛋白,制备了其多克隆抗体,选用氯霉素作为蛋白合成抑制剂,研究了集胞蓝细菌在葡萄糖异养和光合自养转换过程中羧酶体数量的变化,结果显示:在氯霉素终质量浓度为 5.0 $\mu\text{g/mL}$ 时,羧酶体组分蛋白的合成被抑制;没有加入氯霉素的对照组羧酶体数量迅速增加,而实验组的羧酶体数量不再增加;同时利用 Western blot 检测该过程中 CcmK2 蛋白的表达量变化,也印证了羧酶体数量的变化。因此,我们认为:在环境碳源变化过程中,羧酶体蛋白可能是受到其他机制的调控重新翻译合成,而不是简单的自身的蛋白质组分发生募集与解聚。本研究可为进一步揭示蓝细菌羧酶体响应环境碳源变化的具体机制提供科学依据。

参 考 文 献

[1] BURNAP R L, HAGEMANN M, KAPLAN A. Regulation of CO_2 concentrating mechanism in cyanobacteria[J]. Life, 2015, 5(1): 348-371.

[2] PRICE G D, BADGER M R, WOODGER F J, et al. Advances in understanding the cyanobacterial CO_2 -concentrating-mechanism (CCM): functional components, C_i transporters, diversi-

- ty, genetic regulation and prospects for engineering into plants [J]. Journal of experimental botany, 2008, 59(7): 1441-1461.
- [3] BUREY S C, FATHI-NEJAD S, POROYKO V, et al. The central body of the cyanelles of *Cyanophora paradoxa*: a eukaryotic carboxysome? [J]. Can J Bot, 2005, 83(7): 758-764.
- [4] CAI F, BERNSTEIN S L, WILSON S C, et al. Production and characterization of synthetic carboxysome shells with incorporated luminal proteins [J]. Plant physiology, 2016, 70(3): 1868-1877.
- [5] RAE B D, LONG B M, BADGER M R, et al. Functions, compositions, and evolution of the two types of carboxysomes; polyhedral microcompartments that facilitate CO₂ fixation in cyanobacteria and some proteobacteria [J]. Microbiol Mol Biol R, 2013, 77(3): 357-379.
- [6] XU Y, MORI T, JOHNSON C H. Circadian clock-protein expression in cyanobacteria: rhythms and phase setting [J]. The EMBO journal, 2000, 19(13): 3349-3357.
- [7] IKEUCHI M. Complete genome sequence of a cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803, the oxygenic photosynthetic prokaryote [J]. Tanpakushitsu kakusan koso protein, nucleic acid, enzyme, 1996, 41(16): 2579-2583.
- [8] 高良春, 张巨源, 王莉, 等. 培养基中几种重要营养元素对 *Anabaena* sp. strain PCC 7120 及 *Synechocystis* sp. strain PCC 6803 生长的影响 [J]. 华中农业大学学报, 2016, 35(6): 17-24.
- [9] MAHALIK J P, BROWN K A, CHENG X L, et al. Theoretical study of the initial stages of self-assembly of a carboxysome's facet [J]. ACS Nano, 2016, 10(6): 5751-5758.
- [10] KUPRIYANOVA E V, SINETOVA M A, CHO S M, et al. CO₂-concentrating mechanism in cyanobacterial photosynthesis: organization, physiological role, and evolutionary origin [J]. Photosynthesis research, 2013, 117(1/2/3): 133-146.
- [11] CHAIJARASPHONG T, NICHOLS R J, KORTRIGHT K E, et al. Programmed ribosomal frameshifting mediates expression of the alpha-carboxysome [J]. J Mol Biol, 2016, 428(1): 153-164.
- [12] CAMERON J C, WILSON S C, BERNSTEIN S L, et al. Biogenesis of a bacterial organelle: the carboxysome assembly pathway [J]. Cell, 2013, 155(5): 1131-1140.

Effects of chloramphenicol on carboxysome number and cellular abundance of CcmK2 in *Synechocystis* sp. PCC 6803

LI Songbai ZHI Yao LI Pan WANG Fangkui CHEN Wenli

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

Abstract Cyanobacteria plays a significant role in the global carbon cycle. As the place for carbon dioxide fixation, carboxysome is a proteinaceous compartment that encapsulates the carbon-fixing enzyme ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase (RuBisCO) and carbonic anhydrase. In this study, the effects of chloramphenicol on carboxysome number and cellular abundance of CcmK2 in *Synechocystis* sp. PCC 6803 were analyzed. A batch of test were performed to study the inhibited effect of chloramphenicol on the growth of *Synechocystis* sp. PCC 6803 and its derivatives. Results showed that 5.0 $\mu\text{g/mL}$ of chloramphenicol inhibited bacterial multiply completely. From heterotrophic status to photoautotrophic growth, the number of carboxysome rapidly increased in 12 h, but the addition of 5.0 $\mu\text{g/mL}$ chloramphenicol inhibited effectively the increase of cellular carboxysome number. Result of Western blot analysis showed that the abundance of the most abundant carboxysome shell protein CcmK2 was inhibited by this antibiotics. It is indicated that chloramphenicol could inhibit novel carboxysome shell protein and disturb the carboxysome formation under different carbon environment. Further studies on carboxysome assembly are needed.

Keywords *Synechocystis* sp. PCC 6803; carboxysome; chloramphenicol; CO₂ concentrating mechanism

(责任编辑: 张志钰)