

# 钙化裂须蓝细菌 *schetR* 基因 超表达菌株的构建及表型分析\*

胡 璠 王 莉 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** 为研究在不分化异形胞的钙化裂须蓝细菌 *Schizothrix calcicola* 中 *schetR* 基因的功能, 本研究构建由强启动子 *petE* 驱动的 *schetR* 基因的表达质粒, 通过三亲本接合转移的方法将此表达质粒转入模式生物鱼腥蓝细菌 *Anabaena* PCC 7120 的 *hetR* 突变体中进行功能验证。结果显示: 超表达 *schetR* 能够互补鱼腥蓝细菌 *hetR* 突变体的表型, 这说明 *schetR* 能够促进异形胞的发育。

**关键词** 钙化裂须蓝细菌; 鱼腥蓝细菌; 异形胞发育; *hetR*; *schetR* 基因

**中图分类号** Q 939.9 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2010)04-0460-05

早在 31 亿年前, 蓝细菌就作为地球上最古老的几种生物之一诞生了, 它们能摄取原始的还原性大气中的二氧化碳, 通过光合放氧作用使大气中的氧气含量逐渐增加<sup>[1-2]</sup>。部分丝状蓝细菌在漫长的进化过程中, 形成了一种重要的适应性结构专门执行固氮功能, 即异形胞 (heterocyst)<sup>[3]</sup>。目前, 对异形胞发育的研究主要集中于模式生物鱼腥蓝细菌 *Anabaena* PCC7120 在缺氮诱导下的细胞信号转导过程, 该菌株在氮源缺乏的条件下, 5%~10% 的丝状体营养细胞 (vegetative cell) 会分化成异形胞<sup>[4-6]</sup>。

异形胞的分化涉及到很多基因的表达, 其中 *hetR* 基因在蓝细菌异形胞分化的早期具有非常重要的作用。它编码一个 35 ku 的蛋白, 在 GeneBank 中没有找到具有同源性的序列, 也不含有与 DNA 结合的模体, 是一个全新的调控基因。研究发现, *hetR* 突变株 (其编码产物中一个关键的残基 179 位的丝氨酸转换为天冬氨酸) 会导致其丧失分化能力, 不能在缺乏化合态氮的环境条件下形成异形胞进行固氮作用。完整的 *hetR* 基因缺失突变体及点突变株具有同样的表型。在 *hetR* 突变体中, 几乎所有的与异形胞发育相关的基因都不再诱导表达。即使识别最初缺氮信号的 *ntcA* 的表达量也没有明显上升<sup>[7]</sup>。将 *hetR* 基因克隆到复制型载体并转入野生型中, 则会使野生型 *Anabaena* PCC7120 在缺氮

以后分化出多个连续异形胞。*hetR* 在含氮的培养基中转录水平较低, 但在缺氮诱导后转录水平明显上升, 6 h 后转录水平上升了 3 倍<sup>[8]</sup>。另外, HetR 的同源二聚体蛋白是一类新型的 DNA 结合蛋白, 它能通过结合目标基因的 DNA 来调控基因表达水平, 从而影响异形胞的分化<sup>[9]</sup>。

*hetR* 主要存在于能够分化异形胞的蓝细菌中, 它们已知的功能也都是与异形胞的分化相关。近年来有相关研究发现在不产异形胞的丝状蓝细菌的基因组中也存在 *hetR* 的同源基因<sup>[11]</sup>, 但对它们功能的研究报道还很少。钙化裂须蓝细菌是一种未经过基因组测序、不分化异形胞、不进行固氮作用的丝状蓝细菌。华中农业大学农业微生物学国家重点实验室蓝细菌分室对 1 株钙化裂须蓝细菌进行染色体步查, 获得了 1 段该蓝细菌的基因组序列。在这段序列中发现了 *hetR* 基因可能的同源基因并将此基因命名为 *schetR*。钙化裂须蓝细菌并不能进行异形胞分化, 那么这个基因到底有何功能? 它是否与 *Anabaena hetR* 有相似的功能? 它是否也能调控异形胞的发育? 这些问题目前都还不清楚。由于钙化裂须蓝细菌的基因转移系统尚未建立, 本研究在鱼腥蓝细菌 *hetR* 突变体中超表达钙化裂须蓝细菌的 *schetR* 基因, 进行功能互补实验, 希望对这个基因的功能进行确证。

收稿日期: 2009-05-15; 修回日期: 2009-12-21

\* 国家自然科学基金项目 (30670046) 资助

\*\* 通讯作者. E-mail: wlchen@mail.hzau.edu.cn

胡 璠, 女, 1984 年生, 硕士研究生. 研究方向: 蓝细菌分子生物学. E-mail: hufanhzau@gmail.com

## 1 材料与方法

### 1.1 材 料

野生型鱼腥蓝细菌(*Anabaena* PCC7120)、鱼腥蓝细菌 *hetR* 突变体 216 和大肠杆菌 TG1 为笔者所在实验室保存,钙化裂须蓝细菌(*Schizothrix calcicola*)FACHB 404 由中国科学院典型培养物保藏委员会淡水藻种库(FACHB)提供,大肠杆菌 HB101/pRL623 和 J53/RP4 由 Wolk C P 先生(MSU-DOE Plant Research Laboratory, Michigan State University)惠赠。质粒 pBluescript SK-petE(载体 pBluescript SK 中插入了 *petE* 启动子)和 pRL25T 为笔者所在实验室保存。

DNA 回收试剂盒购自 Axygen 公司。T4 DNA 连接酶和限制性内切酶 *Xho*I、*Bam*HI 等均购自 TaKaRa 公司。KOD plus 酶购自 Toyoba 公司。

### 1.2 质粒构建

引物由北京奥科生物技术有限责任公司合成,引物 P1 (5'-GGGAATTCATATGACAAA -TGACCTAGATCTGA -3') 和 P2 (5'-CCGGCTCGAGTTGACGCTATCTTTCCGACAGT -3')用于扩增 *schetR* 的 ORF 序列。*schetR* 的克隆是以钙化裂须蓝细菌 FACHB 404 的总 DNA 作为模板进行 PCR,引物使用 P1、P2 扩增出不带有自身启动子的 *schetR* 的完整 ORF 序列,将 PCR 产物用 *Nde*I 和 *Xho*I 进行酶切,再通过这 2 个酶切位点连接到带有强启动子 *petE* 的载体 pBluescript SK-petE 上,获得质粒 pSK-petEschetR。质粒 pSK-petEschetR 与 pRL25T 分别经 *Bam*HI 和 *Xho*I 双酶切后,将带有 *petE* 启动子的 *schetR* 基因片段与 pRL25T 连接,获得最终表达质粒 pRL25T-petEschetR。pRL25T 是一复制载体,它可以在鱼腥蓝细菌中自主复制。

### 1.3 菌株的培养和接合转移

制备 HB101/pRL623 感受态细胞,转化所构建的目标质粒,得到三亲本之一的供体细菌。在终质量浓度为 25  $\mu$ g/mL 氯霉素和 50  $\mu$ g/mL 卡那霉素的 LB 培养基中,培养 20 mL 供体细菌。同时在终质量浓度为 100  $\mu$ g/mL 氨苄青霉素的 LB 培养基中,培养足够的接合细菌 J53/RP4。两者可过夜培养或先预培养一夜再活化至对数生长期。鱼腥蓝细菌 PCC7120 因生长周期长需提早培养,以确保三亲本杂交实验时,蓝细菌处于对数生长期。等量混合已培养好的供体菌以及接合菌,5 000 r/min 离心

4 min,去上清,用未加抗生素的 LB 培养基洗 1 次后,再悬浮在一定量的 LB 培养基中,同时 5 000 r/min 离心 4 min 收集处于对数生长期的鱼腥蓝细菌,弃上清。在平板上加入鱼腥蓝细菌和 150  $\mu$ L 供体菌和接合菌的混合液。在超净工作台上放置 2 h,其间不要关掉照明灯。然后均匀地涂开,放置光照培养箱中培养。涂布均匀的平板培养 24 h 后,在培养基中加筛选抗生素。等平板上长出单菌落后,挑出单菌落在新鲜的含抗生素平板上扩大培养。

### 1.4 鱼腥蓝细菌突变株的缺氮诱导

接种蓝细菌于 20 mL 的 BG11 培养基中,加入相应抗生素,活化 3 d 至 *D* 值为 0.4 左右;用 1.5 mL 离心管收集菌体,去上清,再用 BG110 洗 3~4 次,再把收集的菌体转入新的 BG110 培养基中,28  $^{\circ}$ C,3.5 J/( $m^2 \cdot s$ )下连续光照,静置培养;在缺氮诱导 24 h 时采集少量菌液样本,用甲醛(储存时体积分数:30%;最终体积分数:15%)进行固定保存;制备装片,取 3~4  $\mu$ L 菌体于载玻片上,混合等体积 50% 的甘油,盖上盖玻片,在显微镜下镜检。

### 1.5 序列分析

通过美国国家生物信息中心(National Center of Biological Information,网址: <http://ncbi.nlm.nih.gov>)以及 Cyanobase 网站(<http://genome.kazusa.or.jp/cyanobase/>)进行 BLASTP 分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 SchetR 氨基酸序列的分析

将 *schetR* 的 DNA 序列翻译成蛋白质序列,与鱼腥蓝细菌 *Anabaena* sp. PCC7120 的 *HetR* 蛋白质序列(以 ORF 的蛋白质序列进行分析)做 BLASTP 分析,结果见图 1。结果显示,钙化裂须蓝细菌 *SchetR* 与鱼腥蓝细菌 *HetR* 的蛋白质序列相似性很高;表明 *schetR* 与鱼腥蓝细菌的 *hetR* 可能为同源基因。

### 2.2 schetR 基因超表达菌株的构建

以钙化裂须蓝细菌的总 DNA 作模板进行 PCR,长度为 932 bp。构建强启动子驱动下的 *schetR* 表达质粒的流程见图 2,每一步质粒的构建均经酶切验证后再进行下一步操作,获得最终质粒 pRL25T-petEschetR。该质粒的酶切验证结果见图 3,由于钙化裂须蓝细菌的基因转移系统尚未构建,将 pRL25T-petEschetR 通过接合转移的方法转入到鱼腥蓝细菌 *hetR* 突变体中进行功能互补实验,获

```

>lcl|7851 unnamed protein product
Length=284

Score = 458 bits (1178), Expect = 6e-134, Method: Compositional matrix adjust
Identities = 225/283 (79%), Positives = 250/283 (88%), Gaps = 0/283 (0%)

Query 16 MDQIMLYLAF SAMRTSGHRHGAF L DAAATAAKCAIYMTYLEQGGNLRMTGHLHHEPKRV 75
MDQIMLYLAF SAMRT GHRHGAF L DAAATAAKCAIYMTYLEQ N+RMTGHLHH+EPKRV
Sbjct 1 MDQIMLYLAF SAMRTGGHRHGAF L DAAATAAKCAIYMTYLEQGGNLRMTGHLHHEPKRV 60

Query 76 KIIVEEVRQALMEGKLLKTLGSQEPRYL IQFPYVWMEQYWPWIPGRSRIPGTSLSLSEEKRO 135
K IVEEVRQAL EGKLLK LGSQEPRYL IQ PYVWMEQYWPW PGRSR+PGTSLTSEEKRO
Sbjct 61 KAIVEEVRQALTEGKLLKMLGSQEPRYL IQLPYVWMEQYWPWQPGRSRVPGTSLTSEEKRO 120

Query 136 IEHKLPSNLDPDAQLVTSFEFLELIEFLHKRSQEDLPPEHRMELSEALAEHIKRRLLYSGT 195
IE KLP+NLDPDAQL+ SF+FLELIEFL+ RQEDLPPE RM LSEALAEHIKRRLLYSGT
Sbjct 121 IEQKLPNNLDPDAQLINSFQFLELIEFLNTRSQEDLPPEQRMPLSEALAEHIKRRLLYSGT 180

Query 196 VTRIDSPWGMPPFYALTRPFYAPADDQERTYIMVEDTARYFRMMKDWAEKRPNAMRALEEL 255
VTRI+SPWGMPPFYALTR Y+P D +ER Y+M+EDTAR+ER+M+DWA++ MR LEEEL
Sbjct 181 VTRIESPWGMPPFYALTRASYSPEDQEEERAYVMIEDTARFFRLMQDWAEREDQVMRVLEEL 240

Query 256 DVPPERWDEAMQELDEIIRTWADKYHQVGGIPMILQMVFGRKE 298
D+P +R +A+ ELDEI+R WAD+YHQ GG P ++QMVFGE E
Sbjct 241 DIPDDRVRDAI ELDEILRNWADRYHQEGGKPFVVMVFGE 283

```

Query 为鱼腥蓝细菌 *hetR* 基因的 ORF 序列, Subject 为 SchetR 的蛋白质序列。Query is ORF of *hetR* in *Anabaena* PCC7120, Subject is SchetR in *Schizothrix calcicola*.

图 1 钙化裂须蓝细菌 SchetR 与 鱼腥蓝细菌 HetR 的蛋白质序列的比对

Fig. 1 Alignment of protein SchetR in *Schizothrix calcicola* and HetR in *Anabaena* PCC7120

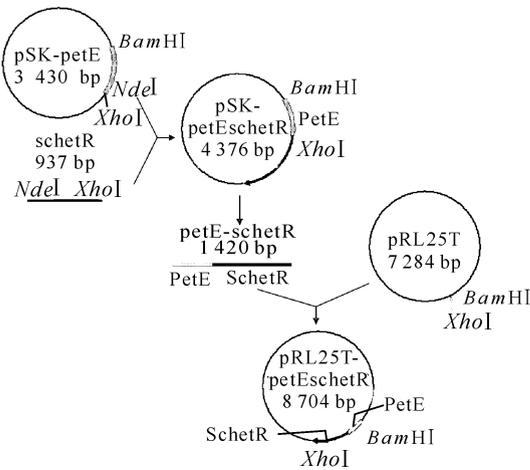
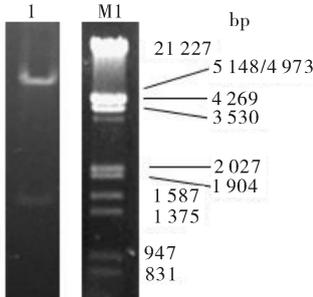


图 2 质粒 pRL25T-petEschetR 构建流程

Fig. 2 A flow chart showing the construction process of pRL25T-petEschetR



1: pRL25T-petEschetR/*Bam*HI-*Xho*I; M1: *Lamda/Eco*RI-*Hind*III.

图 3 质粒 pRL25T-petEschetR 经 *Bam*HI 和 *Xho*I 双酶切的验证结果

Fig. 3 Electrophoresis of plasmid pRL25T-petEschetR digested by *Bam*HI and *Xho*I

得菌株 *hetR* mut/*petE*-*schetR*。在此菌株中, *schetR* 基因在强启动子 *petE* 的驱动下可以超量表达。

### 2.3 转基因鱼腥蓝细菌的表型分析

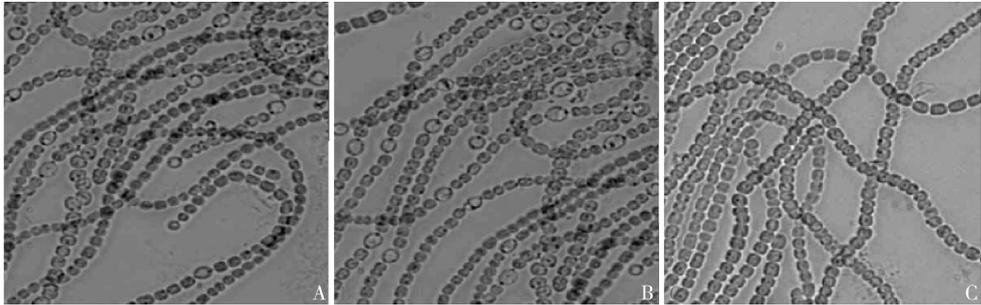
将获得的 *schetR* 超表达菌株 *hetR* mut/*petE*-*schetR* 进行缺氮诱导, 以鱼腥蓝细菌野生型 *Anabaena* PCC7120 及其 *hetR* 突变体为对照, 在缺氮培养 24 h 后取样, 观察它们异形胞发育的情况(图 4)。鱼腥蓝细菌的 *hetR* 编码产生 1 个由 299 个氨基酸组成的蛋白质, 本研究所用的鱼腥蓝细菌 *Anabaena* PCC7120 的 *hetR* 突变体 216 在 *hetR* 基因的 535 位发生突变, 致使野生型 *hetR*179 位的丝氨酸转换为天冬氨酸, 导致 *Anabaena* PCC7120 在缺氮条件下不能正常形成异形胞<sup>[10]</sup>, 但 *schetR* 的超表达菌株 *hetR* mut/*petE*-*schetR*, 即转化了表达质粒 pRL25T-*petEschetR* 的鱼腥蓝细菌 *hetR* 突变体在经缺氮诱导后能够恢复野生型鱼腥蓝细菌的表型, 每隔 10~15 个营养细胞产生 1 个异形胞。说明超表达 *schetR* 可以互补鱼腥蓝细菌 *hetR* 突变体的表型, 异形胞能正常发育; 表明 *schetR* 基因可能行使促进异形胞发育的功能。

### 2.4 转基因鱼腥蓝细菌的分子生物学验证

pRL25T 只是复制载体, 并不整合至蓝细菌 DNA 中, 笔者抽提转基因蓝细菌菌株的总 DNA, 转化 TG1 感受态细胞, 检测长出的单菌落是否存在所转化的质粒。若存在, 则菌株呈阳性。本研究共得到 2 个 *hetR* mut/*petE*-*schetR* 转基因鱼腥蓝细菌菌株。菌株 1 命名为 *hetR* mut/*petE*-*schetR*1, 菌株 2 命名为 *hetR* mut/*petE*-*schetR*2。转化 TG1

后,2个菌株分别挑取3个单菌落,抽提质粒DNA,用 *Bam*HI 与 *Xho*I 双酶切,从这2个菌株中所获得的质粒酶切条带大小和带型与 pRL25T-petEs-*schetR* 相同,说明 pRL25T-petEs*schetR* 已经转入鱼

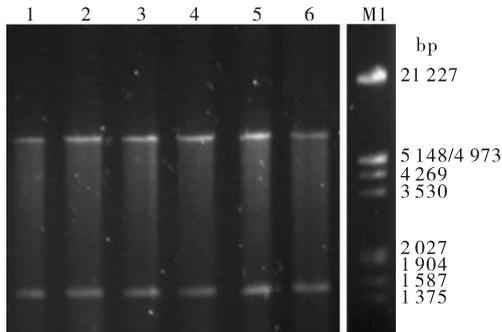
腥蓝细菌 *hetR* 缺失突变体中,酶切结果见图5。因此,转基因鱼腥蓝细菌 *hetR* mut/*petE*-*schetR*1 与 *hetR* mut/*petE*-*schetR*1 呈阳性,这2个菌株都携带所转化的质粒。



A. 野生型 WT Wild-type of *Anabaena* PCC7120; B. WT/*SchetR*; C. *hetR* 突变体 216 *hetR* mutant 216.

图4 超表达 *schetR* 对鱼腥蓝细菌异形胞分化的影响

Fig. 4 The effects of *schetR* over-expression on heterocyst differentiation of *Anabaena*



1~3. *hetR* mut/*petE*-*schetR*1/*Bam*HI-*Xho*I; 4~6. *hetR* mut/*petE*-*schetR*2/*Bam*HI-*Xho*I; M1: *Lambda*/*Eco*RI-*Hind*III.

图5 转基因鱼腥蓝细菌质粒经 *Bam*HI 和 *Xho*I 双酶切的分子生物学验证

Fig. 5 Confirmation of transgenic *Anabaena* strains

### 3 讨论

本研究首先通过生物信息学分析在钙化裂须蓝细菌中发现1个可能的鱼腥蓝细菌 *hetR* 的同源基因 *schetR*,然后构建了 *schetR* 在强启动子驱动下的超表达菌株来研究 *schetR* 的功能。

野生型的鱼腥蓝细菌在缺氮诱导后,每隔10~15个营养细胞会分化出1个异形胞。它们的分布模式很均匀。鱼腥蓝细菌的 *hetR* 能够促进异形胞发育,在野生型鱼腥蓝细菌中超表达其自身的 *hetR* 基因时,缺氮诱导后形成异形胞的频率大大增加,通常会形成多个连续异形胞。而鱼腥蓝细菌 *hetR* 突变体在缺氮诱导后不能观察到异形胞的分化。前期研究中发现鱼腥蓝细菌 *hetR* 突变体中表达自身启动子驱动下的 *schetR* 并不能互补此突变体的表

型,也没有观察到异形胞的分化(数据未显示)。而在本研究中,*schetR* 在强启动子的驱动下对异形胞的发育产生较明显影响,使鱼腥蓝细菌 *hetR* 突变体呈现出与野生型相似的表型。这可能是由于 *schetR* 自身的启动子不够强,导致它在鱼腥蓝细菌中的表达量不高,所以对鱼腥蓝细菌异形胞的分化及其正常生长没有产生较为显著的影响。而将 *schetR* 自身的启动子替换成较强的启动子 *petE* 时,*schetR* 在鱼腥蓝细菌 *hetR* 突变体中的表达量升高,致使突变体回复至野生型的表型。因此,*schetR* 能够促进异形胞的发育。

本研究可以证实钙化裂须蓝细菌基因组中存在 *hetR* 的同源基因 *schetR*,而且 *schetR* 具有和鱼腥蓝细菌中 *hetR* 相似的功能;钙化裂须蓝细菌不能分化异形胞也不能进行固氮作用,因此,在该蓝细菌中 *hetR* 和 *patS* 同源基因可能还有更深层次的生物学意义。但是,从 *schetR* 能够调控鱼腥蓝细菌异形胞发育这一实验结果来看,它可能还是与氮的调控有关,但其在钙化裂须蓝细菌中行使的具体功能还有待进一步的研究。

### 参 考 文 献

- [1] 陈峰,姜悦. 微藻生物技术[M]. 北京:中国轻工业出版社,1999:3-11.
- [2] 张鹏,王莉,陈雯莉. 蓝细菌中与 PII 蛋白或 NtcA 蛋白相互作用的 PipX 蛋白的生物信息学分析[J]. 华中农业大学学报,2010,29(1):48-54.
- [3] WOLK C P. Heterocyst formation in *Anabaena*[M]// BRUN Y V, SHIMKETS L J. Prokaryotic development. Washington,

- DC: American Society for Microbiology, 2000:83-104.
- [4] GOLDEN J W, YOON H S. Heterocyst development in *Anabaena*[J]. *Curr Opin Microbiol*, 2003, 6:557-563.
- [5] HERRERO A, MURO-PASTOR A M, FLORES E. Nitrogen control in cyanobacteria[J]. *J Bacteriol*, 2001, 183:411-425.
- [6] HERRERO A, MURO-PASTOR A M, FLORES E. Cellular differentiation and the NtcA transcription factor in filamentous cyanobacteria[J]. *FEMS Microbiol Rev*, 2004, 28:469-487.
- [7] MURO-PASTOR A M, FLORES E. Mutual dependence of the expression of the cell differentiation regulatory protein HetR and the global nitrogen regulator NtcA during heterocyst development[J]. *Mol Microbiol*, 2002, 44:1377-1385.
- [8] 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.
- [9] 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 USA*, 2004, 101:4848-4853.
- [10] 张巨源. 蓝细菌基因组比较分析: 异形胞发育进化及 3', 5'-二磷酸核苷酸酶 HalA 的功能研究[D]. 武汉: 华中农业大学生命科学技术学院, 2007.
- [11] BUIKEMA W J, HASELKORN R. Characterization of a gene controlling heterocyst differentiation in the cyanobacterium *Anabaena* 7120[J]. *Genes Dev*, 1991, 5:321-330.

## Construction and Phenotype Analysis of Over-Expression Strain of *Schizothrix schetR* Gene

HU Fan WANG Li CHEN Wen-li

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

**Abstract** To investigate the function of *schetR* gene in a non-heterocystous cyanobacterium, *Schizothrix calcicola*, the *schetR* over-expression vector driven by strong promoter *petE* was constructed and transformed into *hetR* mutant in model strain *Anabaena* PCC 7120. The results showed that the over-expression of *schetR* could complement the phenotype of *Anabaena hetR* mutant. This indicates that *schetR* performs a function of stimulating heterocyst development.

**Key words** *Schizothrix calcicola*; *Anabaena* sp. PCC7120; heterocyst development; *hetR*; *schetR* gene

(责任编辑: 张志钰)