

蓝细菌 ORF469 的分子克隆和 缺失突变工程株的构建

吴庆余

(清华大学生物科学与技术系 北京 100084)

Wim. F. J. Vermaas

(Department of Botany, Arizona State University, Tempe AZ 85287, USA)

摘要 PCR 扩增了蓝细菌 *Synechocystis* sp. PCC 6803 的 ORF469 (编码 469 个氨基酸的开放阅读框), 进一步以 pUC118 为载体将其克隆到 *E. coli* 中, 构建了 pOQ2 质粒。通过 DNA 体外重组, 以红霉素抗性基因取代部分克隆化 ORF469 片段, 又构建了缺失 ORF469 片段 (保留部分上游和下游序列) 的 pOQ22 质粒。用 pOQ22 质粒转化 *Synechocystis* sp. PCC 6803 野生株细胞, 获 ORF469 缺失突变工程株, 它在红霉素抗性培养基上生长正常。对缺失突变工程株 DNA 的 PCR 和 Southern blot 分析证明, *Synechocystis* sp. PCC 6803 的 ORF469 已被删除。色素测定结果揭示 *Synechocystis* sp. PCC 6803 中 ORF469 表达产物控制细胞内不依赖光的叶绿素生物合成。

关键词 ORF469 分子克隆, 缺失突变, 不依赖光的叶绿素生物合成

蓝细菌 (Cyanobacteria) 属光合原核生物^[1]。利用苔类植物叶绿体 DNA 为探针, 对单细胞球状蓝细菌 *Synechocystis* sp. PCC 6803 的 DNA 检测和测序, 揭示在其 *frxc* 基因下游有一编码 469 个氨基酸残基蛋白质的开放阅读框, 该开放阅读框被定义为 ORF469^[2]。Fujita *et al.*^[3]。对另一种丝状蓝细菌 *Plectonema boryanum* 的分析证明, *frxc* 基因与 *Plectonema boryanum* 细胞中叶绿素的生物合成相关。本文报道利用基因克隆与 DNA 重组技术首次构建了 PCC6803 ORF469 缺失突变工程株, 并初步分析了 ORF469 在细胞中的功能。实验结果对于利用原核蓝细菌 *Synechocystis* sp. PCC6803 研究重要植物基因的结构、功能和叶绿素的生物合成与光系统的装配等具有重要意义。

1 材料与方 法

1.1 细菌与质粒

大肠杆菌 DH10B, 转化受体菌; 大肠杆菌质粒 pUC118, 抗性标记为 Amp^r, 多克隆位点接受 ORF469 插入; 大肠杆菌质粒 pRL425, 抗性标记为 Er^r 和 Cat^r, 由美国 UC-Riverside 的 Rick Debus 教授提供, 该质粒由美国 Michigan State University 的 Jeff Elhai 教授构建^[4], 本实验中用以提供红霉素抗性标记 (Er^r)。

1.2 蓝细菌材料和培养条件

美国能源部基金 (DE-FG02-89ER 14031) 和中国国家杰出青年科学基金课题。
本文于 1995 年 1 月 3 日收到。

实验材料 *Synechocystis* sp. PCC 6803 (以下简称 *S.* 6803) 为单细胞球状蓝细菌, 属原核光合生物, 该光合菌两大优点是易转化和兼性异养^[5~7]。6803 野生株和突变工程株液体培养用 BG-11 培养基^[8], 并另添加 5 mmol/L 葡萄糖。由 40W 日光灯提供连续光照, 光照强度 $50\mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, 连续无菌通气提供搅拌, 恒温 30℃。作色素分析时另设立黑暗培养组, 按文献 [9] 提供光活化。固体平板培养仍用 BG-11 培养基, 添加 5mmol/L 葡萄糖, 1.5% 琼脂粉, 0.3% 硫代硫酸钠和 10mmol/L TES-KOH 缓冲液, 光照与温度条件同液体培养。

1.3 蓝细菌染色体 DNA 制备和 *E. coli* 质粒提取分离

S. 6803 染色体 DNA 的制备按 Williams 方法^[10]进行, *E. coli* 质粒 (pOQ2 和 pOQ22) 的提取分离用微量法^[11]。

1.4 目的基因扩增

以 *S.* 6803 染色体 DNA 为模板, 按 *S.* 6803 中 ORF469 上游与下游核苷酸顺序^[2]合成寡核苷酸为引物, 用 PCR 反应扩增 ORF469^[11]。反应温度程序为 (94℃, 4min) × 1, (94℃ 1min, 54℃ 2min, 72℃ 3min) × 30。

1.5 ORF469 片段的基因克隆

用低熔点琼脂糖凝胶电泳回收酶切目的基因片段 ORF469 (PCR 产物) 和 pUC118, 在 T4DNA 连接酶作用下将 ORF469 连入 pUC118 载体多克隆位点, 用高压电穿孔法转化大肠杆菌 DH10B。在生色底物 X-gal 平板上筛选无 α 互补能力的白色菌落, 微量法制备质粒 DNA 作限制性酶切分析, 以证实 ORF469 被克隆到 pUC118 载体上。

1.6 重组质粒的构建

以红霉素抗性基因 (Er, 来源于 pRL425) 取代部分克隆化 ORF469 片段的重组质粒 (构建方法同 1.5), 但不同限制性酶切 (pOQ₂ 用 Sty I; pRL425 用 EcoRV 和 Xba I) 后, 用 Klenow 片段作末端补平后再连接, 用 Er 抗性平皿筛选携带重组质粒的克隆, 微量法制备克隆化重组质粒 DNA 并作限制酶切分析。

1.7 蓝细菌细胞的转化和突变工程株的筛选

被 Er 抗性基因取代部分克隆化 ORF469 片段的重组质粒对 *S.* 6803 野生型细胞的转化详见文献 [12], 用含红霉素 (30 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 的平皿对缺失 ORF469 片段的突变工程株进行筛选, 再转入含红霉素 (30 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 的液体培养基中培养。

1.8 突变工程株染色体 DNA 分析

分别用 PCR 和 Southern blot 方法作突变工程株染色体 DNA 分析, PCR 法仍用原初扩增 ORF469 时的引物, 分别以野生株和突变工程株 DNA 为模板, 反应温度同 1.4。Southern blot 分析按文献 [11] 进行, 将插入 ORF469 的 pUC118 质粒在 Sac I 位点处切开作为模板, 用 PCR 方法合成带 ³²P-ATP 的 ORF469 片段为 DNA 分子杂交探针。

1.9 生长测定和叶绿素 a 分析

S. 6803 野生株和突变工程株在含红霉素 (30 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 和不含红霉素的培养液中的生长曲线用光密度法 ($\lambda=730\text{nm}$) 测定, 取 3 次测定的平均值 (误差均小于 2%)。光照和黑暗条件下生长的野生株和突变工程株细胞分别用 100% 甲醇提取色素, 叶绿素 a 浓度的测定按文献 [13] 进行, 取 3 次测定的平均值 (误差均小于 5%)。

本实验所有药品和试剂由美国 Sigma 公司和 New England Biolabs 公司提供。

2 实验结果

2.1 PCR 扩增 ORF469 片段

为了准确扩增并对比检测 ORF469 片段, 根据 *S. 6803 frxc* 基因和 ORF469DNA 顺序^[2]设计合成了 P1, P2, P3, P4 四段寡核苷酸引物 (见图版 I-A)。四种引物的序列如下:

P1: 5'TACTAATTTCTGCAGAGCTCTGCCA3' P2: 5'TTACCAATAGGATCCTGGCGACGA3'
P3: 5'TCGTCGCCAGGATCCTATTGGTAA3' P4: 5'TAAGGATACAGAGCTCCATTACCGT3'

为了在扩增片段中引入合适的限制酶位点, 便于下一步 DNA 的切割与连接, 在设计核苷酸合成四种引物时人为地改变了其中一个核苷酸 (上述序列中划线的核苷酸)。如 P3 将原序列中的 C 改成 G 以产生 BamH I 位点, P4 原序列中的 T 改成 C 以形成 Sac I 位点。3种 PCR 扩增产物琼脂糖凝胶电泳分析如图版 I-B 所示, 证明 PCR 扩增实验达到设计要求 (图版 I-B 照片中最前端的带为多余的引物片段)。

2.2 目的基因克隆、检测和重组质粒构建及检测结果

将 PCR 扩增的 2.0kb ORF469 片段和 pUC118 分别用 BamH I 和 Sac I 切割、再连接、转化 *E. coli*, 获克隆化 ORF469 质粒——5.2kb 的 pOQ2 (图1)。对构建的 pOQ2 分别用 Pst I +EcoR I 和 Sty I 限制性酶切和琼脂糖凝胶电泳分析 (图版 I-C), 证明了 pOQ2 质粒的结构 (照片中最前端为 RNA 带)。

用来源于 pRL425 的红霉素抗性基因 (Er) 取代部分克隆化 ORF469 片段的重组质粒构建过程中 (图1), 由于 pRL425 的 Er 基因上游和下游没有与 ORF469 相同的酶切位点, pOQ₂ 用 Sty I 酶切, pRL425 用 EcoRV 和 Xba I 酶切, 不同限制性酶切后来自 pOQ₂ 的 4.0kb 大片段和来自 pRL425 的 1.5kb 的 Er 片段先用大肠杆菌 Klenow 片段制备平末端, 然后再连接, 因此便产生 Er 基因顺式和反式两种不同方向连入的重组质粒 pOQ22A 和 pOQ22B。两种重组质粒都缺失了 1.2kb ORF469DNA, 同时插入了 Er 基因 (图1)。用红霉素平板筛选出抗性的 *E. coli* 克隆所制备的质粒, 分别用 EcoR I 和 BamH I +Hpa I 切割, 得到两种不同琼脂糖凝胶电泳谱图 (图版 II-D): 顺方向 Er 基因的 pOQ22A 被 EcoR I 切割得 2.0 和 3.5kb 条带, 被 BamH I +Hpa I 切割得 1.4 和 4.1kb 条带; 但反方向 Er 基因的 pOQ22B 被 EcoR I 切割则得到 0.5 和 5.0kb 条带, 被 BamH I +Hpa I 切割则得 0.6 和 4.9kb 条带, 实验结果与 pOQ22A 和 pOQ22B 两种重组质粒的物理图相吻合。(图版 II-D 中样品电泳前加入 RNase 降解 RNA, 照片中最前端的 RNA 带消失)。

2.3 重组质粒对野生型 *S. 6803* 细胞的转化和缺失突变工程株的获得

S. 6803 野生型细胞悬液经离心浓缩使 OD₇₃₀ 为 2.5, 在无菌试管中每 0.4ml 细胞悬液加入 8 μ l pOQ22A 质粒 DNA, 混合均匀后静置 3h, 再缓慢震荡 6h, 将细胞涂布于不含红霉素的 BG-11 培养基 (含 5mmol/L 葡萄糖) 平板上, 为了便于细胞转移, 平板上铺一层孔径为 0.4 μ m 的醋酸纤维滤膜, 静置培养 24h 后, 先让转化子中的红霉素抗性基因表达, 然后再将蓝细菌细胞连同滤膜转移到含红霉素的平板上, 继续培养。另准备一组对照实验, 即野生型细胞悬液加入 8 μ l 去离子水, 不加 pOQ22A, 其他操作与条件均与实验组

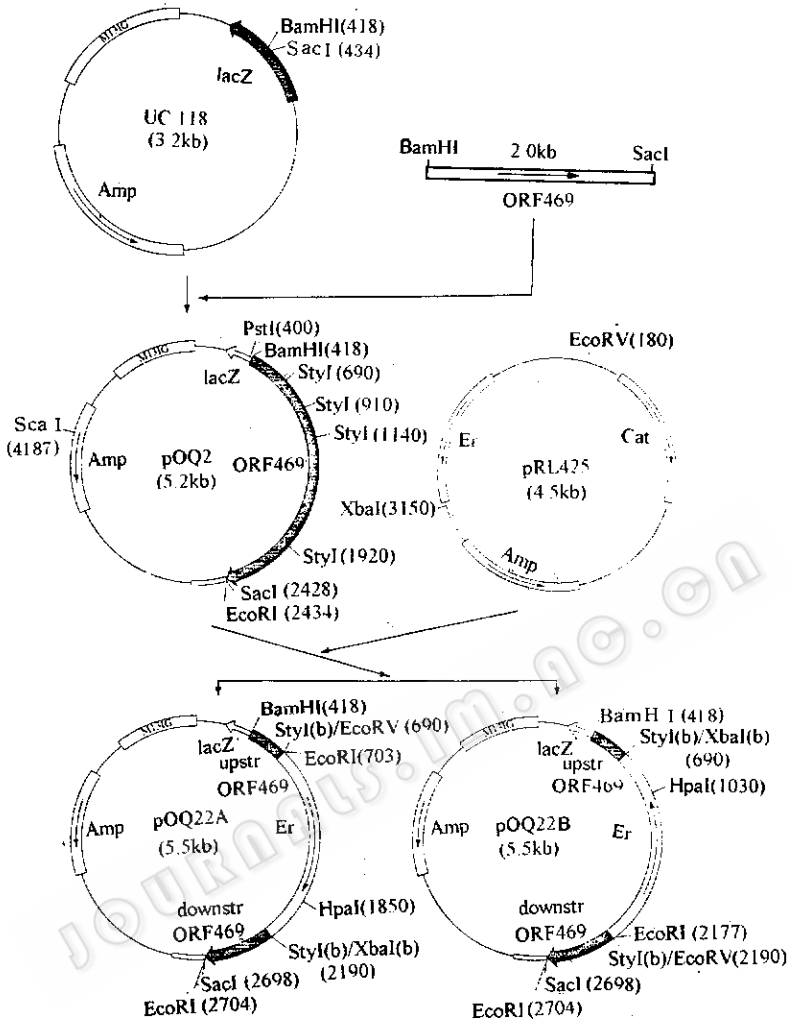


图1 克隆化 ORF469 质粒 pOQ2 的构建和重组质粒 pOQ22 的构建过程

Fig. 1 Construction of cloned ORF469 plasmid pOQ2 and recombinant plasmid pOQ22

相同。14d 后对照组平板蓝细菌细胞全部死亡；实验组平板上大部分未被质粒转化的蓝细菌细胞由于对红霉素敏感也死亡，少量被 pOQ22 A 质粒转化的转化子，由于 ORF469 上游与下游连同 Er 基因通过同源重组整合到细胞染色体中，Er 基因的表达使转化子（突变工程株）具有红霉素抗性，在含红霉素的平板上便出现少量的抗性菌落。经计算，在该实验条件下的转化效率约为 $10^{-4} \sim 10^{-5}$ 。将这些抗性菌落继续接种划线到另一含红霉素的平板上让其继续生长，便获得删除 ORF469 大部分片段的 S. 6803 突变工程株，定名为 ORF469⁻。以野生株 (Wt) 为对照，分别用 PCR 扩增实验和 Southern blot 分子杂交实验对缺失突变工程株 (ORF469⁻) DNA 进行分析验证，结果分别显示于图版 I-C、D 和图版 I-A、B，证实在 S. 6803 的 ORF469 缺失突变工程株中 ORF469 片段已被 Er 基因取代。

2.4 突变工程株细胞生长与叶绿素含量分析

S. 6803 野生株和 ORF469 缺失突变工程株在含红霉素的液体培养基中的生长曲线如

图2所示,反映野生株细胞在含红霉素的液体培养基中完全不能生长(图2a),而缺失突变工程株细胞可正常生长(图2b),而且与野生株细胞和缺失突变工程株细胞在不含红霉素的培养液中的生长(图2c和d)相同,说明ORF469的缺失不影响细胞的正常生长与繁殖功能。

在光照与黑暗条件下培养7d后,*S. 6803*野生株和ORF469缺失突变工程株细胞中的叶绿素浓度(用单细胞密度叶绿素数表示)测定结果列于表1。突变工程株细胞在黑暗条件下生长(状态4)后单位细胞叶绿素浓度比光照条件下(状态3)的浓度低约50倍,比黑暗条件下生长的野生株(状态2)细胞叶绿素浓度低约40倍,*S. 6803*细胞中ORF469的遗传学删除造成其在黑暗条件下叶绿素合成受阻,证明*S. 6803*中ORF469表达产物涉及到黑暗条件下叶绿素生物合成,其功能与*Plectonema boryanum*的frxC相同⁽³⁾。

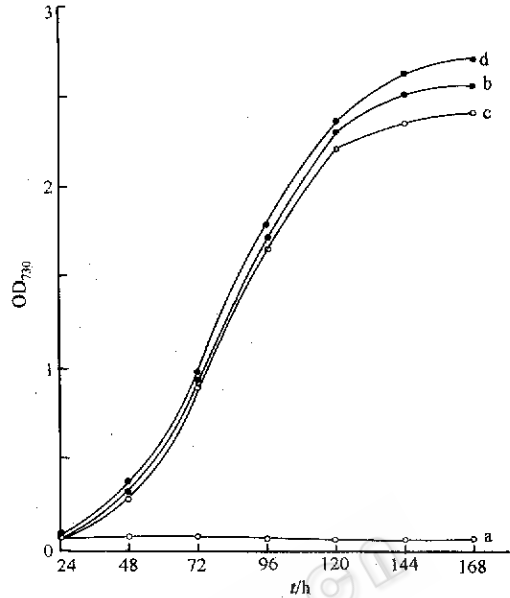


图2 *Synechocystis 6803*野生株和ORF469缺失突变工程株的生长曲线

Fig. 2 Cell growth curves of wild type and ORF469⁻ mutant

- a. Wild type in the medium with erythromycin;
b. ORF469⁻ mutant in the medium with erythromycin;
c. Wild type in the medium without erythromycin;
d. ORF469⁻ mutant in the medium without erythromycin.

表1 光照与黑暗条件下的野生株与缺失突变工程株细胞叶绿素含量对比

Table 1 Comparison of chlorophyll content in wild type cells and in ORF469⁻ mutant cells in light and in dark

Cell sample	Chlorophyll content/ $\mu\text{g} \cdot (\text{OD}_{730})^{-1}$	
	Growth in light	Growth in dark
Wt	(status 1) 4.22	(status 2) 3.34
ORF469 ⁻	(status 3) 4.22	(status 4) 0.08

3 讨 论

用高等植物如烟草等为材料进行植物分子生物学和植物基因工程研究已有很多报道,但对于利用单细胞原核蓝细菌为材料进行这方面的研究其优势尚未被充分重视。利用蓝细菌*S. 6803*开展植物分子生物学与基因工程研究有许多显著优点:它属于原核生物,染色体DNA没有内含子;球状单细胞生物,对于遗传学操作极为有利;按照植物演化内共生学说,单细胞蓝细菌涉及高等植物叶绿体起源和演化,而且蓝细菌细胞光合器与高

等植物一样,存在光系统 I 和光系统 II,蓝细菌还有许多与高等植物细胞相同的基因和代谢反应,其许多研究结果同样可阐明高等植物的分子生物学原理如基因的结构、功能、调控等;尤其重要的是,S. 6803还有两个更为独特的优点:(1)易转化。外源 DNA 易于通过同源重组整合到其染色体 DNA 中^[12],无论外源 DNA 是线状的还是环状的,在正常细胞培养条件下 S. 6803 被转化的效率都很高,也不需要细胞作任何处理,如制备感受态、损伤细胞壁、高压电穿孔法转化、使用基因枪等;(2)兼性异养。可利用葡萄糖等有机碳源进行异养生长^[6],兼性异养特性对于光合作用和光合色素相关基因突变工程株的构建和研究是至关重要的,因为,如果它不能兼性异养,与光合自养代谢相关基因的操作便可能使细胞致死,使研究无法进行。某些其他单细胞藻类如小球藻等也可在有机碳源中进行异养生长^[14],但外源 DNA 却难以对其进行转化。

S. 6803 ORF469 缺失突变工程株的成功构建还有以下重要意义和作用:(1)证实在光合蓝细菌生物中确实存在着两条叶绿素的合成途径:即依赖于光的合成途径和不依赖于光的合成途径,具体涉及到叶绿素合成途径的关键步骤——原叶绿素酸酯(Protochlorophyllide)还原成叶绿素酸酯(Chlorophyllide)^[15,16],ORF469 表达产物参与不依赖于光的原叶绿素酸酯 D 环的还原反应。(2)删除了 S. 6803 细胞中 ORF469 虽然阻断了它不依赖于光的叶绿素合成途径,但在有光照条件下,ORF469 缺失突变工程株还可通过依赖于光的途径合成叶绿素(表1,状态3),野生株在黑暗条件下也能单独利用不依赖于光的途径合成叶绿素(表1,状态2)以满足两个光系统的需要。两种状态菌株如此便构成了两种叶绿素合成途径的比较系统,利用这一比较系统可进一步研究各途径叶绿素的合成特征,合成速率的控制因素和机理等。(3)在 S. 6803 的 ORF 缺失突变工程株中,由于其丧失了黑暗中叶绿素的合成能力,光照就变成了叶绿素合成唯一的调控“开关”。操纵这一“开关”便可控制细胞中叶绿素从有到无,再从无到有,如此进一步研究叶绿素参与光系统 I 和光系统 II 的装配,叶绿素合成与光系统色素蛋白如 D₁、D₂、psaA、psaB、CP43、CP47 等的相互作用,叶绿素逐渐消失和逐渐出现过程对光合膜超微结构的影响等。

致 谢 大部实验工作在美国 Arizona 州立大学完成,Dr. Scott Bingham 协助完成寡核苷酸引物的合成,Dr. Rick Debus 提供 pRL425 质粒,谨致谢意。

参 考 文 献

- (1) Carr N G, Whitton B A. *The Biology of Cyanobacteria*, Blackwell Scientific Publications, Oxford 1982, 1~20.
- (2) Ogura Y, Takemura M, Yamato K *et al.* *Biosci Biochem*, 1992, 56 (5): 788~793.
- (3) Fujita Y, Takahashi Y, Chuganji M *et al.* *Plant Cell Physiol*, 1992, 33: 81~92.
- (4) Elhai J, Wolk C R. *Gene*, 1988, 68: 119~138.
- (5) Vermaas W F J. *Annu Rev Plant Physiol. Plant Mol Biol*, 1993, 44: 457~481.
- (6) Vermaas W F J, Williams J G K, Arntzen C J. *Plant Mol Biol*, 1987, 8: 317~326.
- (7) Shen G, Vermaas W F J. *J Biol Chem*, 1994, 269: 13904~13910.
- (8) Rippka R, Deruelles J, Waterbury J B *et al.* *J Gen Microbiol*, 1979, 111: 1~61.
- (9) Anderson S L, McIntosh L. *J Bacteriol*, 1991, 173: 2761~2767.
- (10) Williams J G K. *Methods Enzymol*, 1988, 167: 766~778.

- [11] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning*, 2nd, Cold Spring Harbor Lab., New York, 1989.
- [12] Vermaas W F J, Carpenter S, Bunch C. In: Singhal G S eds, *Photosynthesis, Molecular Biology and Bioenergetics*, Narosa, New Delhi, 1989, 21~35.
- [13] MacKinney G. *J Biol Chem*, 1941, **140**: 315~322.
- [14] 吴庆余, 殷实, 盛国英等. *中国科学 (B辑)*, 1993, **23** (4): 421~429.
- [15] Senge M O. *Photochem Photobiol*, 1993, **57**: 189~206.
- [16] Griffiths W T. In: Scheer H ed, *Chlorophyll*, CRC Press, Boca Raton, 1991, 433~449.

Molecular Cloning and Deletion-mutant Construction of ORF469 in Cyanobacterium (*Synechocystis sp.*) PCC 6803

Wu Qingyu

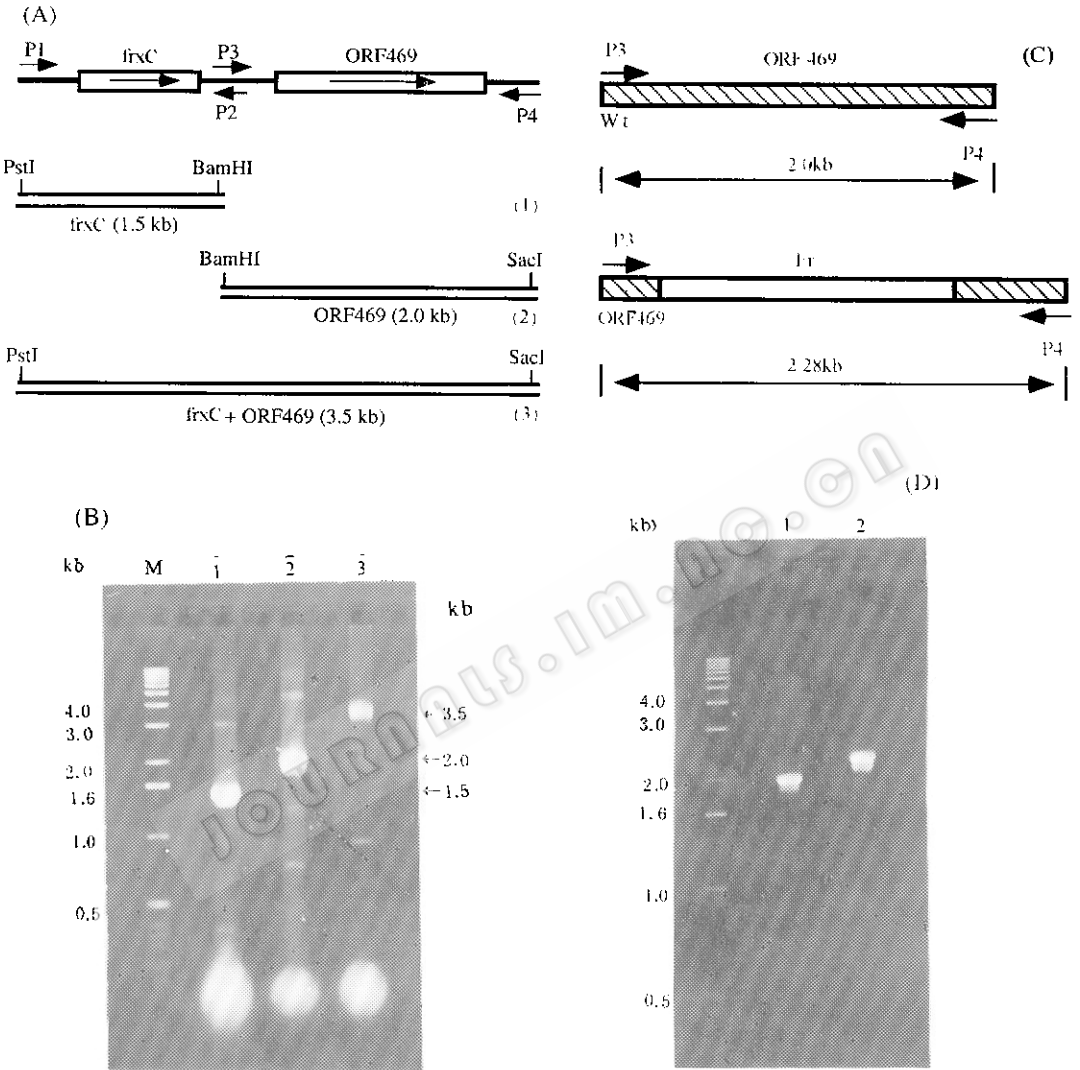
(Department of Biology, Tsinghua University, Beijing 100084)

Wim F. J. Vermaas

(Department of Botany, Arizona State University, Tempe AZ 85287, USA)

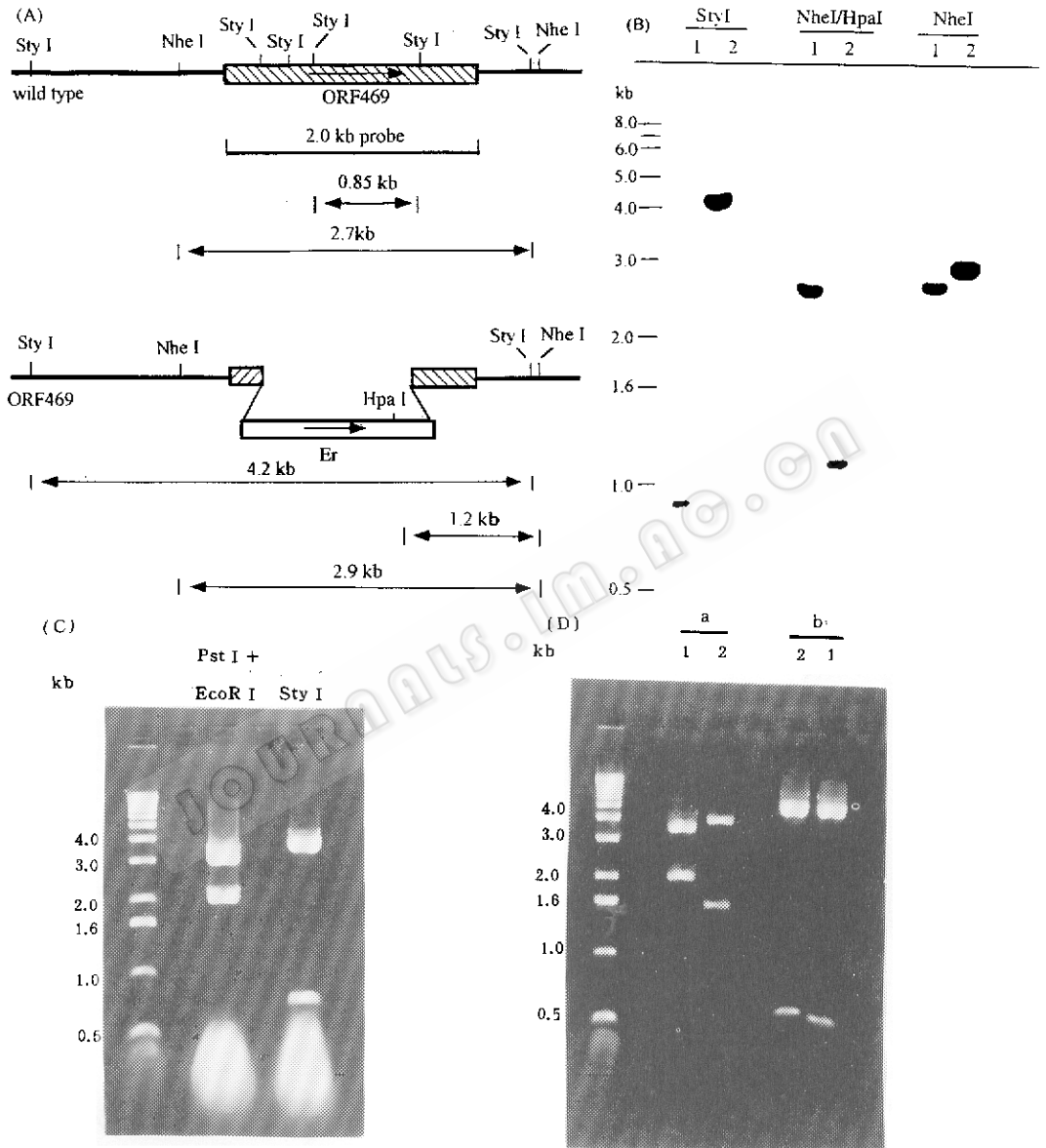
Abstract ORF469 (an open reading frame encoded 469 amino acid residues) in *Synechocystis sp.* PCC 6803 was amplified by PCR. The PCR-amplified ORF469 fragment was cloned in pUC118 to generate the pOQ2 plasmid. Part of fragment within this ORF469 was deleted and replaced by an erythromycin resistance cassette to generate the pOQ22 plasmid. This pOQ22 plasmid was used to transform the *Synechocystis sp.* PCC 6803 wild type strain and the mutant resulting from deletion of ORF469 was obtained. The mutant cells could grow normally in the culture medium with erythromycin. PCR and Southern blot analysis of genomic DNA from the mutant indicated that part of ORF469 fragment had been deleted and replaced by erythromycin resistant cassette. The analysis of pigments showed that the expression product of ORF469 in *Synechocystis sp.* PCC 6803 was involved in light-independent biosynthesis of chlorophyll.

Key words ORF469 cloning, deletion mutant, light-independent biosynthesis of chlorophyll



Electrophoresis of PCR products of ORF469 and its comparison

- A. Physical map of the *frxC* gene and ORF469, primers location and three predicted fragments in PCR.
 B. Agarose gel electrophoresis of three PCR products. lane M; Standard DNA ladder; lane 1; PCR product by P1 and P2 (*frxC*); lane 2; PCR product by P3 and P4 (ORF469); lane 3; PCR product by P1 and P4 (*frxC*-ORF469)
 PCR analysis of genomic DNA from wild type and ORF469⁻ mutant.
 C. Length comparison of predicted PCR products in wild type and ORF469⁻ mutant.
 D. Agarose gel electrophoresis of PCR products with wild type DNA as template (lane 1) and with ORF469⁻ mutant DNA as template (lane 2).



Southern blot analysis of genomic DNA from wild type and ORF469⁻ mutant.

- A. Restriction maps of the ORF469 region in wild type and ORF469⁻ mutant.
 B. Southern blot autoradiogram of digested DNA from wild type (lane 1) and ORF469⁻ mutant (lane 2).
 C. Agarose gel electrophoresis of digested plasmid pOQ2.
 D. Agarose gel electrophoresis of digested plasmid pOQ22A and pOQ22B.
 a. pOQ22A; b. pOQ22B; 1. EcoR I; 2. BamH I + Hpa I.