

无类囊体蓝藻 *Gloeobacter violaceus* 基于广宿主质粒的遗传转移系统*

郭海涛 徐旭东**

中国科学院水生生物研究所, 武汉 430072

摘要 无类囊体蓝藻 *Gloeobacter violaceus* 的细胞有厚胶质鞘包裹并形成群体, 难以进行遗传操作. 用注射器反复吸打的方法将胶质鞘剥落, 得到大量单个细胞, 通过接合转移将外源广宿主质粒 pKT210 转入 *G. violaceus*. 用斑点杂交方法以及对质粒进行酶切图谱分析, 均证实外源质粒 pKT210 确已导入 *G. violaceus* 并稳定复制, 未发生结构上的变化. 从 *G. violaceus* 提取的 pKT210 可转化 *mcr* 和 *mrr* 基因缺陷的大肠杆菌 DH10B 却不能转化 *mcr*⁺ *mrr*⁺ 菌株 DH5 α , 表明 *G. violaceus* 中可能存在甲基化酶系统.

关键词 *G. violaceus* 接合转移 pKT210

Gloeobacter violaceus 系 Rippka 等于 1974 年分离纯化的一种具有特殊细胞结构的光合自养蓝藻^[1], 其藻细胞呈杆状, 具有蓝藻典型的色素组成和藻红蛋白, 但叶绿素含量比其他蓝藻低 3~4 倍, 所以呈特殊的堇菜色, 在自然状态下细胞有胶质鞘包被并聚集形成群体. *G. violaceus* 代表着蓝藻演化的一个侧支, 其细胞结构最大的特点是没有其他蓝藻或植物叶绿体的类囊体膜结构, 藻胆体和光合复合器均位于细胞质膜, 并由细胞膜行使光合作用功能^[2]. 因这一特点, 该藻对于类囊体膜发生和建成这一重要生物学问题显示出特殊的研究价值. 日本 Kazusa DNA 研究所近期将公布其全基因组序列 (<http://www.kazusa.or.jp/cyano/cyano.html>). 然而, 对于该种蓝藻目前尚无任何基因转移系统报道, 严重阻碍了这一特殊细胞模式的遗传学研究.

迄今为止, 在蓝藻中广泛应用的基因转移方法包括: 自然转化^[3]、电转化^[4]和接合转移^[5]. 其中接合转移是在接合质粒介导下通过细胞间接触而进行的 DNA 转移. 它是目前蓝藻中应用较广的一种基因转移方法, 一般多用于丝状蓝藻, 但在单细胞蓝藻中也有成功报道^[6,7]. *G. violaceus* 的胶质鞘包被构成外源基因进入细胞的天然屏障. 本研究通过

机械处理去除胶质鞘, 之后以接合转移的方法将外源质粒 pKT210^[8] 转入 *G. violaceus*, 建立了稳定的基因转移系统. 该质粒复制子来源于广宿主质粒 RSF1010, 在接合质粒 RP4 的驱动下可转移到许多革兰氏阴性菌, 包括某些蓝藻.

1 材料与方法

1.1 质粒、菌株及藻种

本研究中所用质粒 pKT210, pRL443, pDS4101 和 pRL623 均由美国密歇根州立大学 DOE 植物学实验室 Wolk 教授提供. *Gloeobacter violaceus* ATCC 29082 (PCC 7421) 来源于美国 ATCC 保藏库, 通过机械处理和平板划线法获得无细菌污染的纯藻株.

1.2 培养条件

野生型藻株用 BG-11 培养液, 在 28~30℃ 光照 (10~20 $\mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) 静置培养. 接合子筛选用含 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 链霉素的 BG-11 固体培养基, 在液体中培养时加 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 链霉素和 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 卡那霉素. 大肠杆菌用 LB 培养基在 37℃ 下培养. 转化子筛选所用链霉素、氯霉素终浓度分别为 20 和 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

2003-02-20 收稿, 2003-04-14 收修改稿

* 中国科学院“百人计划”资助项目

** 联系人, E-mail: xux@ihb.ac.cn

1.3 *G. violaceus* 的预处理

取对数生长期的 *G. violaceus*，在无菌条件下用注射器(不加针头)反复吸打，直到约 80% 以上群体变成单细胞。取部分藻细胞，用对多糖层染色的爱尔新蓝染液着色^[9]后在光学显微镜下检查胶质鞘去除情况。

1.4 接合转移

基本程序按 Elhai 等所描述的方法进行^[10]，略作修改。取 50 mL 藻细胞经过预处理去除了胶质鞘，用 BG-11 洗涤两次后重悬于 2.5 mL BG-11 培养液，此时藻细胞浓度为 3.2×10^8 /mL。将含有相关质粒的大肠杆菌和 *G. violaceus* 混合涂布在覆于 BG-11 固体平板的混合纤维素酯滤膜(0.45 μ m)上，光照培养 36 h 后，再将滤膜转至含有 5 μ g/mL 链霉素的 BG-11 平板上筛选接合子。

1.5 DNA 操作方法

G. violaceus DNA 提取除培养条件外按 Xu 等所述方法进行^[11]。细菌质粒的提取、转化和酶切按标准分子生物学方法进行^[12]。

1.6 斑点杂交

用地高辛标记质粒 pKT210 作为杂交探针。所用地高辛标记试剂盒购自德国 Roche 公司，探针标记、杂交和显色按公司提供产品说明进行。

2 结果

2.1 *G. violaceus* 对抗生素敏感性的分析

G. violaceus 对各种常用抗生素的敏感性未见报道，因此在尝试导入外源质粒之前我们首先测试了 *G. violaceus* 在分别含 5 种抗生素的 BG-11 平板上的生长状况。在光照培养 30 d 后观察到：*G. violaceus* 对 50 μ g/mL 的卡那霉素(Km)和 100 μ g/mL 的氯霉素(Cm)表现出抗性，而对 2.5 μ g/mL 的链霉素(Sm)、15 μ g/mL 的氨苄青霉素(Ap)和 1.0 μ g/mL 的红霉素(Em)敏感(表1)。本研究选用

表1 *G. violaceus* 对各种抗生素的敏感性

抗生素	浓度/ μ g·mL ⁻¹									
	0.5	1.0	2.5	5.0	10.0	15.0	20.0	40.0	50.0	100.0
卡那霉素(Km)	+	+	+	+	/	+	/	/	+	/
链霉素(Sm)	+	+	-	-	/	-	/	/	-	/
红霉素(Em)	+	-	-	-	/	-	/	/	-	/
氨苄青霉素(Ap)	+	+	+	+	/	-	/	/	-	/
氯霉素(Cm)	/	+	/	+	+	/	+	+	/	+

“+”表示在该浓度下能生长，“-”表示在该浓度下不能生长，“/”表示未测

5 μ g/mL 的链霉素作为接合子的筛选条件，并选用 50 μ g/mL 的卡那霉素去除接合子中混杂的供体菌。由于藻细胞在液体培养基中更为敏感，接合子转到液体中时将用 2 μ g/mL 的链霉素。

2.2 pKT210 通过接合转移导入 *G. violaceus*

在 *G. violaceus* 中未检测到小质粒，故尝试利用广宿主质粒 pKT210 进行接合转移实验。pKT210 带有链霉素抗性标记和 RSF1010 复制区域，可在 RP4 或其衍生质粒(如 pRL443)的驱动下进行细胞间的转移。细胞为多层胶质鞘包裹，阻碍了大肠杆菌与藻细胞的接触。我们曾尝试用提高培养液中 EDTA 的方法削弱胶质鞘^[11]，但对于这种藻未收到显著效果；超声处理也未能去除胶质鞘。使用注射器反复吸打的方法能够将约 80% 以上的群体打散成单个细胞，在显微镜下观察证明去除了胶质鞘结构，适合进行接合转移(图1)。接合转移实验设以下 3 类组合：(1) *E. coli* HB101 (pRL443 + pRL623) + *E. coli* DH10B (pKT210) + *G. violaceus*；(2) *E. coli* HB101 (pRL443) + *E. coli* DH10B (pDS4101) + *E. coli* DH10B (pKT210) + *G. violaceus*；(3) 对照组 (i) *E. coli* HB101 (pRL443 + pRL623) + *G. violaceus*，(ii) *E. coli* HB101 (pRL443) + *G. violaceus*，(iii) *E. coli* HB101 (pDS4101) + *G. violaceus*，(iv) *E. coli* DH10B (pKT210) + *G. violaceus*。其中辅助质粒 pRL623 和 pDS4101 对于 pKT210 的接合转移并非必需，在以上组合中使用这两种质粒是为了测试 pRL623 携带的甲基化酶基因^[10]是否可提高接合转移效率。按以上组合与大肠杆菌混合的藻细胞在含有 5 μ g/mL 链霉素的 BG-11 培养基上培养 30~40 d 后，结果发现：对照组中没有或仅有个别藻落形成，而实验组(1)，(2)中均有较多接合子长出(表2)。两组组合接合转移效率有一定差异，分别是 1.67×10^{-5} 和 4.63×10^{-6} 接合子/受体细胞。

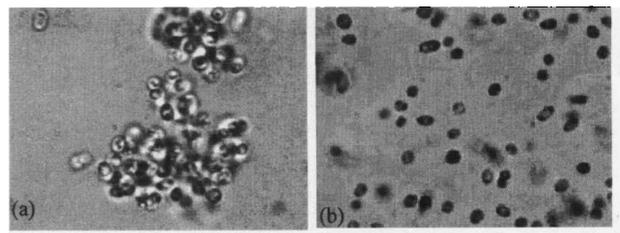


图1 *G. violaceus* 机械处理效果的观察

(a)未经处理的藻细胞；(b)经注射器吸打的藻细胞

表2 pKT210 通过接合转移导入 *G. violaceus*

组合情况 ^a	接合子数/平板	效率 (接合子/受体细胞)
(1)	267	1.67×10^{-5}
(2)	74	4.63×10^{-6}
(3)	i	0
	ii	0
	iii	0
	iv	0

a 数据来源于两次独立实验的平均结果, 其中(1)和(2)组合各有20个平板, (3)中每一对照组各有4个平板

2.3 从 *G. violaceus* 转化子提取 pKT210 并转回 *E. coli*

为证实 pKT210 已转入 *G. violaceus*, 将若干接合子分别接种到含链霉素的液体 BG-11 培养基中. 在相同的培养条件下, 野生型 *G. violaceus* 经 20~30 d 培养后变白死亡, 而接合子单克隆能够生长. 转接到含卡那霉素和链霉素的培养液中继续培养以去除混杂的供体细菌, 直至经 BG-11 洗涤再涂 LB 平板检查证实供体菌已完全去除. 提取 *G. violaceus* 接合子质粒 DNA 分别转化 *E. coli* DH5 α 和 *E. coli* DH10B. 前者无转化子长出, 而后者转化效率高达 2.2×10^3 转化子/ μ gDNA. 用野生型 *G. violaceus* DNA 转化 *E. coli* DH5 α 和 *E. coli* DH10B 未得到转化子. 从大肠杆菌提取的 pKT210 转化 *E. coli* DH5 α 和 *E. coli* DH10B 作为对照, 前者转化效率 4.8×10^5 转化子/ μ gDNA, 后者转化效率达到 4.3×10^5 转化子/ μ gDNA, 并无明显差别.

2.4 限制性酶切图谱分析及斑点杂交结果

将从 *G. violaceus* 转回 *E. coli* 所得质粒 DNA 和原 pKT210 分别用 *Nco* I 或 *Pst* I + *Eco*RV 酶切分析, 结果观察到: 从 *G. violaceus* 回收的质粒 DNA 酶切图谱与原 pKT210 完全一样, 表明转入 *G. violaceus* 中的 pKT210 未发生结构上的变化(图2). 用地高辛标记质粒 pKT210 作为探针对野生型 *G. violaceus* 总 DNA 样品及 *G. violaceus* 接合子总 DNA 样品进行斑点杂交, 结果前者呈阴性, 后者呈阳性(图3). Southern 杂交结果也证明 pKT210 确已转入 *G. violaceus*(结果未附).

3 讨论

G. violaceus 遗传转移系统的建立面临着多方面的困难: (1)具有胶质鞘结构, 构成了外源 DNA 进入的物理屏障^[13]; (2)主要以群体形式存在, 在固体平板上形成藻落效率低; (3)生长缓慢, 其平

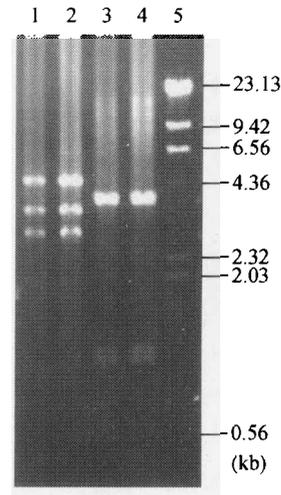


图2 从 *G. violaceus* 回收的 pKT210 和原 pKT210 酶切图谱的比较

1. 从 *G. violaceus* 提取 pKT210 转化 *E. coli* DH10B 所得转化子质粒 DNA 以 *Pst* I + *Eco*RV 酶切; 2. 原 pKT210 以 *Pst* I + *Eco*RV 酶切; 3. 从 *G. violaceus* 回收的 pKT210 以 *Nco* I 酶切; 4. 原 pKT210 以 *Nco* I 酶切; 5. DNA 标志

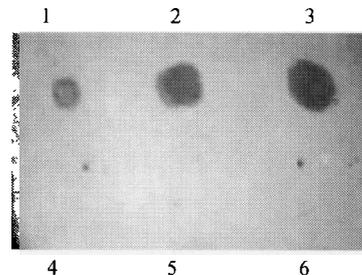


图3 用质粒 pKT210 作为探针的斑点杂交

1~3 分别约为 50, 100, 200 ng *G. violaceus* 接合子总 DNA;
4~6 分别约为 50, 100, 200 ng *G. violaceus* 野生型总 DNA

均代时为 73 h. 为去除 *G. violaceus* 的胶质鞘我们尝试了提高培养基中的 EDTA 浓度和超声波处理等方法均未能解决这一问题. 最后我们用注射器吸打将 80% 的群体处理成单细胞, 同时胶质鞘也被去除. 藻细胞在 BG-11 平板上植板率得到提高, 也使得大肠杆菌与藻细胞的接触成为可能. 值得注意的是该藻胶质鞘的再生能力比较强, 经过以上处理的藻细胞应立即用于接合转移. 本研究成功地将广宿主质粒 pKT210 导入 *G. violaceus*, 获得接合子, 并证明回收到的 pKT210 结构上未发生变化, 显示 RSF1010 复制子也能够在此 *G. violaceus* 中复制, 这是 *G. violaceus* 遗传转移系统的首例报道, 为这一特殊研究模式的基因操作打开了一扇大门.

目前能够进行基因转移的蓝藻为数不多, 主要

集中在几个属的少数模式种。接合转移的方法最初是应用于丝状蓝藻, 后来在一些单细胞蓝藻中也得到应用。在蓝藻细胞中往往存在限制性内切酶, 可削弱接合转移效率或完全阻止接合子的形成。在本研究中第(1)类与第(2)类组合所得接合转移效率有所不同, 经 t 检验存在显著差异 ($p < 0.01$)。但由于两者接合转移效率仅有 3~4 倍的差距, 这一结果并不一定意味着 *G. violaceus* 中存在某种限制酶以及 pRL623 所编码的甲基化酶起到保护作用。

Kreps 等曾观察到从蓝藻中提取的质粒 DNA 由于被甲基化不能转化 *mcrA*⁺ 宿主菌 *E. coli* HB101^[6], 在一些 *E. coli* 株系中存在特异性降解甲基化 DNA 的 *Mcr* 及 *Mrr* 限制酶系统。*McrA* 限制酶识别含 5'-C^{me} CGG-3' 序列的 DNA, *McrBC* 限制酶识别含 5'-R^{me} C-序列的 DNA^[14,15], 而 *Mrr* 系统则降解含 N6 甲基化腺嘌呤的 DNA^[16,17]。这些限制系统的存在使得某些被甲基化的质粒 DNA 不能转入 *E. coli* DH5 α (*mcr*⁺ *mrr*⁺)。 *E. coli* DH10B 基因组中 *mcr* 和 *mrr* 基因发生缺失, 故不存在这一障碍。来自 *G. violaceus* 的质粒 DNA 只能转化 DH10B 而不能转化 DH5 α , 显示 *G. violaceus* 中可能存在甲基化酶系统。

参 考 文 献

- 1 Rippka R, et al. A cyanobacterium which lacks thylakoids. Arch Microbiol, 1974, 100: 419
- 2 Guglielmi G, et al. The structure of *Gloeobacter violaceus* and its phycobilisomes. Arch Microbiol, 1981, 129: 181
- 3 Golden S S, et al. Optimal conditions for genetic transformation of the cyanobacterium *Anacystis nidulans* R2. J Bacteriol, 1984, 158: 36
- 4 Thiel T, et al. Transformation of a filamentous cyanobacterium by electroporation. J Bacteriol, 1989, 171: 5743
- 5 Wolk C P, et al. Construction of shuttle vectors capable of conjugative transfer from *Escherichia coli* to nitrogen-fixing filamentous cyanobacteria. Proc Natl Acad Sci USA, 1984, 81: 1561
- 6 Kreps S, et al. Conjugative transfer and autonomous replication of a promiscuous IncQ plasmid in the cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6803. Mol Gen Genet, 1990, 221: 129
- 7 Sode K, et al. Conjugative gene transfer in marine cyanobacteria: *Synechococcus* sp., *Synechocystis* sp. and *Pseudanabaena* sp. Appl Microbiol Biotech, 1992, 37: 369
- 8 Bagdasarian M, et al. Specific-purpose plasmid cloning vectors II. Broad host range, high copy number, RSF1010-derived vectors, and a host-vector system for gene cloning in *Pseudomonas*. Gene, 1981, 16: 237
- 9 Grilli-caiola M, et al. Effect of desiccation on envelope of the cyanobacterium *Chroococcidiopsis* sp. (Chroococcales). Eur J Phycol, 1996, 31: 97.
- 10 Elhai J, et al. Conjugal transfer of DNA to cyanobacteria. Meth Enzymol, 1988, 167: 747
- 11 Xu X, et al. Detection of plasmids in *Gloeocapsa* sp. 589 and *Gloeotheca* sp. G06. Chinese Science Bulletin, 1993, 38: 242
- 12 Maniatis T, et al. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1982
- 13 Schneider S, et al. Cell wall and sheath constituents of the cyanobacterium *Gloeobacter violaceus*. Arch Microbiol, 1991, 156: 312
- 14 Raleigh E A, et al. *Escherichia coli* K-12 restricts DNA containing 5-methylcytosine. Proc Natl Acad Sci USA, 1986, 83: 9070
- 15 Raleigh E A, et al. Organization and function of the *McrBC* genes of *Escherichia coli* K-12. Mol Microbiol, 1992, 6: 1079
- 16 Heitman J, et al. Site-specific methylases induce the SOS DNA repair response in *Escherichia coli*. J Bacteriol, 1987, 169: 3243
- 17 Waite-Rees P A, et al. Characterization and expression of the *Escherichia coli* *Mrr* restriction system. J Bacteriol, 1991, 173: 5207