

集胞藻 PCC6803 中 S2P 蛋白酶 SII0528 参与铵盐胁迫响应的重要性

刘小芳, 陈谷, 林诗琪, 许白雪

(华南理工大学食品科学与工程学院, 广东广州 510640)

摘要: SII0528 是集胞藻 PCC6803 中四个二位蛋白酶(site-2-protease, S2P)之一。本研究主要比较了三株集胞藻(编码基因 *sII0528* 过表达的藻株 OE0528, 编码基因 *sII0528* 敲除的缺失藻株 $\Delta sII0528$, 以及野生型藻株)在不同氯化铵浓度下的生长表型。结果显示, 缺失藻株 $\Delta sII0528$ 对 120 mM 的氯化铵比野生型更敏感, 光合系统损伤严重。在 180 mM 氯化铵下野生型株的生长受到抑制, 而过表达藻株 OE0528 的生长优于野生型, 更耐受高浓度铵盐, 其光合系统色素藻蓝蛋白和叶绿素等的损伤程度低于野生型。可见, SII0528 在集胞藻 PCC6803 适应铵盐胁迫中发挥重要的作用, 可能参与了铵盐胁迫的快速响应, 并直接或间接介导高铵盐浓度下集胞藻对光合系统的保护或修复机制。本研究首次揭示了 S2P 蛋白酶微藻具有一定的铵盐胁迫响应作用, 相关结果对于深入探究微藻对铵盐的响应机制及提高微藻对铵盐的耐受性和利用率具有重要的意义。

关键词: 铵盐胁迫; 集胞藻 PCC 6803; 二位蛋白酶

文章编号: 1673-9078(2018)10-29-37

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2018.10.005

Importance of the S2P Protease SII0528 of *Synechocystis* sp. PCC6803 to Ammonium Stress Tolerance

LIU Xiao-fang, CHEN Gu, LIN Shi-qi, XU Bai-xue

(School of Food Science and Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

Abstract: SII0528 is one of the site-2-protease (S2P) in *Synechocystis* sp. PCC 6803. In the work, the growth of three mutants of *Synechocystis* (the mutant overexpressed with OE0528 of the *sII0528* gene, the $\Delta sII0528$ - knockout mutant, and the wild type) was compared under different concentrations of ammonium chloride. The results indicated that the knockout mutant $\Delta sII0528$ was more sensitive to 120 mM ammonium chloride than the wild type, with the photosynthetic system damaged more seriously; at 180 mM ammonium chloride, the growth of wild type was inhibited, while the *sII0528*-overexpressed mutant OE0528 grew well, which showed higher toleration to the high concentration of ammonium, and better protection for the photosystem pigment phycocyanin and chlorophyll than the wild type. All the results suggested that SII0528 plays an important role in the acclimation to ammonium stress in *Synechocystis* sp. PCC6803, probably through protected or recovered the photosystems under ammonium stress directly or indirectly. This is the first report to unveil the importance of S2P protease in ammonium stress of cyanobacteria, thus providing the base for the research of acclimation to ammonium stress and improvement of ammonium tolerance and utilization in microalgae in the future.

Key words: ammonium stress; *Synechocystis* sp. PCC6803; site-2-protease

随着现代工业和农业的快速发展,大量的污水排放以及肥料重施,造成废水中氮的含量剧增。近几十年来,我国地表水和地下水中氮的浓度不断增加,例如 1980 年到 2010 年,我国每年的氮沉积量增加 60%^[1,2]。氮过量影响生态环境稳定和农业效益,处理

收稿日期: 2018-03-20

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(31270085)

作者简介: 刘小芳(1991-),女,硕士,研究方向:藻类功能基因

通讯作者: 陈谷(1973-),女,博士,教授,研究方向:主要从事功能基因组研究

废水成为重要的工作。微藻不但可以用于新型能源的开发,也可以应用于处理工农业废水^[3]。微藻可以利用废水中各种形式的氮源,如铵盐或硝酸根;但是微藻的生长对铵盐浓度较敏感,处理废水过程中过高浓度的铵会抑制微藻的生长。研究微藻在铵盐中的生长,探索微生物适应高浓度 $\text{NH}_4^+/\text{NH}_3$ 的机制,将为未来提高微藻对铵盐的耐受奠定基础。研究拟南芥中 *EGY1* 突变导致的铵敏感突变株 *amsol* 对铵盐胁迫的响应机制,揭示参与铵胁迫响应的基因中 90% 的基因调控都依赖于 *EGY1*^[4]。*EGY1* 是拟南芥 S2P 蛋白酶编

码基因之一,故本研究探讨集胞藻中的 S2P 蛋白酶基因 *sl10528* 是否参与集胞藻对铵盐胁迫的响应。

集胞藻 PCC6803 (*Synechocystis* sp. PCC6803) 属蓝藻门色球藻目集胞藻属,它通过二分裂方式增殖,培养周期短,既可光合自养、混养还可异养。类似绿色植物,集胞藻 PCC6803 有两个光合作用系统,光系统 I (PS I) 和光系统 II (PS II)。由于集胞藻 PCC6803 独特的生理特征,以及测序完全等特点,已成为研究光合作用、胁迫响应等的模式生物,也作为工程菌应用于新型能源的开发^[5,6]。S2P 家族蛋白酶存在于从细菌到人类的大多数物种,不同物种间的 S2P 蛋白酶都具有保守的催化基序^[7],S2P 蛋白酶介导的调节膜内蛋白水解机制被认为是潜在的外界信号接收传导机制。在大肠杆菌等原核细菌中,当机体受到刺激时,S1P 和 S2P 蛋白酶连续剪切抗 σ 因子,释放 EFC σ 因子,EFC σ 因子结合 RNA 聚合酶中心酶,转录表达相应的蛋白以适应刺激^[8]。集胞藻 PCC6803 中有四个 S2P 蛋白酶 S110862、Slr0643、S110528、Slr1821。通过敲除基因 *slr0643* 并研究该缺失藻株 Δ *slr0643*,发现 Slr0643 参与酸胁迫响应机制^[9]。基因 *sl10862* 的敲除导致缺失藻株 Δ *sl10862* 在高温和氧化胁迫响应中表现出缺陷,说明 S110862 参与调控高温和氧化胁迫响应^[10]。应用实时荧光定量 PCR 技术 (RT-qPCR) 研究集胞藻基因 *sl10528* 在不同胁迫下的表达谱,以及对 *sl10528* 敲除的缺失藻株 Δ *sl10528* 进行各种胁迫响应实验,都表明 S110528 参与多种胁迫包括盐、渗透压、高光等^[11,12]。而敲除 *slr1821* 的缺失藻株 Δ *slr1821* 在热胁迫响应研究中揭示了 Slr1821 对热胁迫响应机制起着重要作用^[13]。

本研究构建了集胞藻 PCC6803 基因 *sl10528* 在光诱导强启动子-基因 *psbA2* 启动子 (P_{psbA2}) 驱动下的过表达藻株 OE0528,并探究比较了不同氯化铵浓度条件下野生型 (wild type, WT)、过表达藻株 OE0528 和缺失藻株 Δ *sl10528* 的生理表型,初步揭示 S2P 蛋白酶 S110528 响应 NH_4^+ 的功能与机理,为后续深入探索微藻对 NH_4^+ 胁迫响应机制打下基础。

1 材料和方法

1.1 实验材料与仪器

实验材料:质粒 pUC118,质粒 pET-30b(+),大肠杆菌 DH10B,限制性内切酶,T4 DNA Ligase,Taq DNA 聚合酶,Primer Star NDA 聚合酶,硫酸卡那霉素,氯霉素,氨基青霉素,BG11 培养基(实验室自配),HEPES, $\text{Na}_2\text{S}_2\text{SO}_3$,三羟甲基甲胺基乙磺酸

(TES),质粒小量提取试剂盒,细菌基因组 DNA 快速提取试剂盒,细菌/细胞 RNA 提取试剂盒,DNA 纯化回收试剂盒,反转录试剂盒,RT-qPCR 试剂盒,氯化铵等。集胞藻 PCC6803 野生型,购自美国标准藻种库。

主要仪器:PCR 仪,核酸电泳仪,冷冻循环水浴锅,干式恒温器,超净工作台,恒温培养箱,台式恒温振荡器,凝胶成像系统,高压灭菌锅,鼓风烘箱,多功能组合摇床,生物安全柜,紫外分光光度计,小型台式离心机,台式冷冻离心机,移液枪等。

1.2 实验方法

1.2.1 重组质粒的构建与鉴定

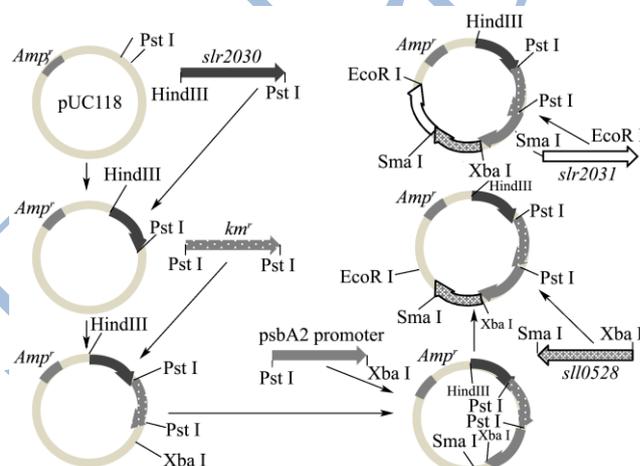


图1 重组质粒 p3031P0K 构建示意图

Fig.1 Schematic diagram of construction program for the recombinant plasmid p3031P0K

以集胞藻 PCC6803 基因组 DNA 为模板,通过 PCR 扩增得到 *slr2030* 和 *slr2031* 片段,*sl10528* 片段,和 *psbA2* 的启动子片段,以 pET-30b (+) 为模板 PCR 扩增得到抗卡那霉素 (km^r) 片段,引物见表 1,引物作用位置见图 2。基因参考序列来自 NCBI 数据库。将获得的基因片段纯化回收后利用限制性内切酶剪切,同时用同样的限制性内切酶剪切载体质粒 pUC118,再用连接酶将目的基因片段和载体质粒按顺序一一连接起来,构建重组质粒 p3031P0K,重组质粒 p3031P0K 构建方案如图 1 所示。构建完成重组质粒后通过 PCR 技术在 DNA 水平验证目的基因片段是否插入质粒。

1.2.2 同源重组质粒转化集胞藻 PCC6803

采用 Williams^[14] 的方法将构建好的重组质粒 p3031P0K 通过同源臂 *slr2030* 和 *slr2031* 同源转化进入集胞藻 PCC6803 野生型。使过表达元件 km^r + 启动子 $P_{psbA2}+sl10528$ 插入到集胞藻基因 *slr2030* 和 *slr2031*

中间的中性位点，方案如图 2 所示。得到转化子后，将转化子在含低浓度硫酸卡那霉素的固体培养基上生长，待长出单藻落，转移到含低浓度硫酸卡那霉素的液体培养基中培养，按此方式逐步提高抗生素浓度并

对过表达藻株传代。期间不断检测 DNA 水平上的中性位点是否被替代，最终得到中性位点被替代的能稳定遗传的过表达藻株 *OE0528*。进而进行基因 *sll0528* 表达水平的验证。

表 1 引物序列

Table 1 Sequences of primers

名称	引物序列 (5'-3')	产物长度/bp
<i>slr2030</i> -L	CCCAAGCTTACTACTACATTACCGGACAAACT	916
<i>slr2030</i> -R	AAAACCTGCAGTCTTCTTGGGGACGAAAACG	
<i>km^r</i> -L	AACTGCAGCTCAGTTCGGTGTAGGTCGTT	1345
<i>km^r</i> -R	AACTGCAGCATTCAAATATGTATCCGCTCA'	
<i>P_{psbA2}</i> -L	AAAACCTGCAGTATCAGAATCCTTGCCAGAT	562
<i>P_{psbA2}</i> -R	TGCTCTAGATTGGTTATAATTCCTTATGTAT	
<i>sll0528</i> -L	TGCTCTAGAATGTTAAGCCTCAGTTTAGGG	1269
<i>sll0528</i> -R	TCCCCCGGGATCCCAATCTTTATGGTTTCC	
<i>slr2031</i> -L	TCCCCCGGGAGGAGTTGGTGGCTAAGTTGT	880
<i>slr2031</i> -R	CCGGAATTCTCCAGGTCGGCATAACATTAC	
3031-1-L	AGCCATTACGAAGACTATCCC	610
3031-1-R	AGCAAAGTTATTCCTTAGCCAC	
3031-2-L	AGGGACTTAGCCCAGTTTCA	1001
3031-2-R	CCCAACAGATCCTGCACTTTA	过表达藻株验证
<i>sll0528</i> -2-L	GGCACAATAACCAAGAACCG	133
<i>sll0528</i> -2-R	GGAAGCCTTTACTGCTGAAGAT	TR-qPCR 验证
<i>rnpB</i> -L	TCGTCGTTTAGCGGAAGAAT	112
<i>rnpB</i> -R	ACGAAATTGCCCACTACCCA	RT-qPCR 验证

1.2.3 集胞藻 PCC6803 的培养方法

以 OD₇₃₀=0.1 为起始浓度将集胞藻接入液体 BG11 培养基，在光照 25 μmol/(m² s)，温度 29 °C，转速 150 r/min 摇床中连续培养 5 d。液体 BG11 培养基中加入终浓度为 0.02 M 的 HEPES。集胞藻藻落生长于固体 BG11 培养基中。固体 BG11 培养基加入浓度为 0.02 M 的 HEPES，终浓度为 0.3% 的 Na₂S₂O₃ 和终浓度为 8 mM 的 TES。培养过程需加入相应抗生素。

1.2.4 过表达藻株 *OE0528* 在 DNA 水平的鉴定

用试剂盒提取 WT 和过表达藻株 *OE0528* 的基因组 DNA，用表 1 所示过表达藻株验证用引物进行 PCR 扩增，分别扩增中性位点基因序列，或者是插入中性位点的片段，看产物电泳图条带位置与理论值是否一致，来判断过表达元件是否进入到集胞藻 WT 基因组相应位置。

1.2.5 过表达藻株 *OE0528* 在 RNA 水平的验证

用试剂盒分别提取 WT 和过表达藻株 *OE0528* 的 RNA，用 DNase 去除 RNA 中残留的 DNA，再将 RNA 反转录成单链 cDNA，以 cDNA 为模板用 RT-qPCR 验证用引物（表 1 所示）进行 RT-qPCR 扩增，来验证

sll0528 是否得到过表达。采用相对定量法，以 *rnpB* 基因作为内参。基因 *rnpB* 在集胞藻中负责编码 RNase P 的亚基 B，表达量恒定^[15]。得到扩增曲线后统一阈值线得出 C_T 值，将参照基因与目的基因 C_T 值相减得 ΔC_T 值，目的基因表达量=2^{ΔCT}，得到野生型 WT 和过表达藻株 *OE0528* 中 *sll0528* 相对表达量，归一化后进行比较。每个样品做三个平行，每个平行 4 个重复。

1.2.6 集胞藻吸光度值和全细胞吸收值的测定

将 WT 和过表达藻株 *OE0528* 以 OD₇₃₀=0.1 作为起始浓度接入液体 BG11 培养基中，控制胁迫条件，在光照 25 μmol/(m² s)，温度 29 °C，转速 150 r/min 摇床中连续培养 5 d，每 24 h 取样 2 mL 用紫外分光光度计测定 730 nm 处的吸光度值 (A₇₃₀/OD₇₃₀) 或进行全波长扫描，得到数据绘制曲线。每个样品做 3 个平行。

1.2.7 数据统计分析

本文采用 Origin Pro 8.5, SPSS 19.0 等软件处理分析实验数据，得到集胞藻生长曲线图和全细胞吸收图，基因表达量柱状图等。实验重复数均为 3 次，n=3；图中误差线均表示实验结果=均数±标准差 (x̄±SD)。显著性检验采用单因素方差分析，与对照组做比较，

“*”表示 $p < 0.05$ 为显著差异, “***” $p < 0.01$ 为极显著差异。

2 结果和讨论

2.1 重组质粒的构建与鉴定

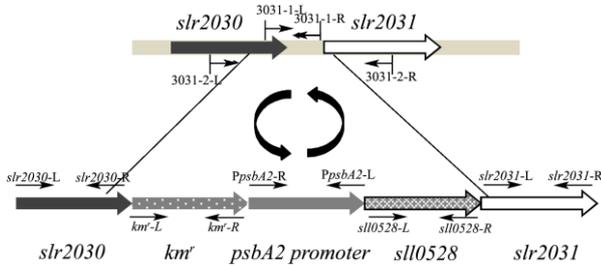


图2 重组质粒 p3031P0K 同源转化入集胞藻示意图

Fig.2 Schematic diagram of recombinant plasmid p3031P0K homologous transformed into *Synechocystis* sp. PCC6803

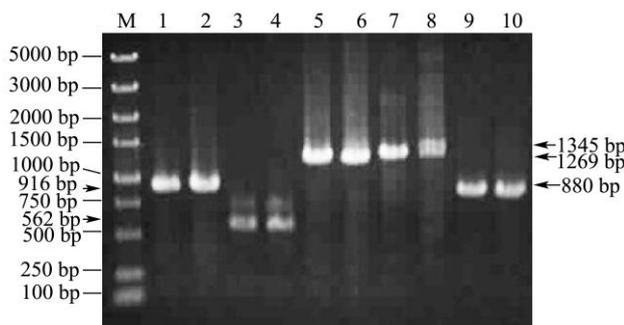


图3 重组质粒鉴定

Fig.3 Identification of the recombinant plasmid

注: 泳道 M: marker, 1, 2: *slr2030* 片段, 3, 4: 启动子 P_{psbA2} , 5, 6: *sll0528*, 7, 8: *kmr*, 9, 10: *slr2031* 片段。其中泳道 1, 3, 5, 9 模板为 WT 基因组, 泳道 7 模板为 pET-30b (+), 泳道 2, 4, 6, 8, 10 模板为重组质粒 p3031P0K。

按图 1 所示方案, 构建好重组质粒 p3031P0K, 质粒插入基因 *slr2030* 片段、*kmr*, 强启动子 P_{psbA2} , 基因 *sll0528* 和基因 *slr2031* 片段。重组质粒构建完成后采用 PCR 鉴定目的基因是否插入到质粒, 所用引物与构建时扩增 5 段目的基因用引物相同, 见表 1, 引物作用位置图 2 所示。以重组质粒和 WT 基因组分别作模板, 扩增基因 *slr2030* 片段、强启动子 P_{psbA2} 、*sll0528*、基因 *slr2031* 片段; 再以重组质粒和 pET-30b (+) 分别作模板, 扩增 *kmr*。产物电泳并分析比较, 结果显示重组质粒中各个片段 PCR 产物与以 WT 基因组、pET-30b (+) 作模板各个片段 PCR 产物电泳后条带位置一致 (图 3)。测定 PCR 产物序列并比对, 结果相同, 说明 5 个目的片段成功插入到载体质粒 pUC118。

2.2 过表达藻株 OE0528 的构建与鉴定

2.2.1 DNA 水平上鉴定

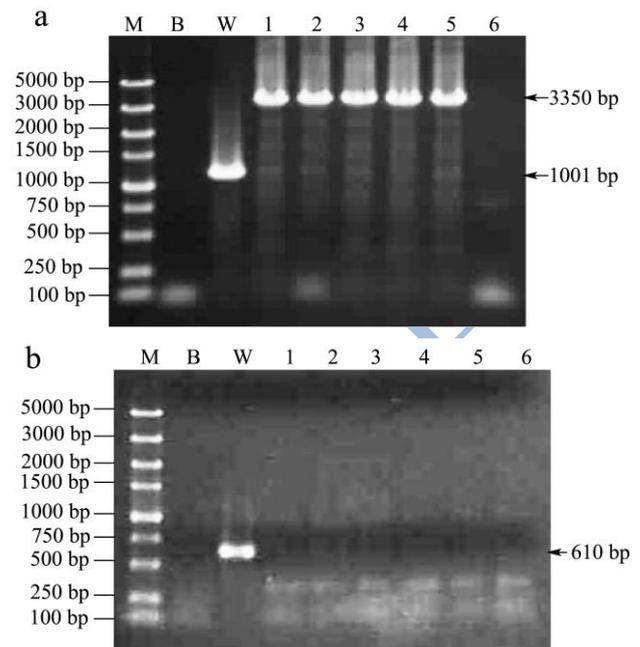


图4 OE0528 在 DNA 水平的鉴定

Fig.4 Identification of the OE0528 at the DNA level

注: a 图为以 3031-2-L, 3031-2-R 为引物扩增产物电泳图, b 图为以 3031-1-L, 3031-1-R 为引物扩增产物电泳图。泳道 M: maker, B: 空白对照, W: 野生型, 1: OE0528-1, 2: OE0528-2, 3: OE0528-3, 4: OE0528-4, 5: OE0528-5, 6: OE0528-6。

按图 2 所示方案, 将构建好的重组质粒 p3031P0K 转化导入集胞藻 PCC6803 野生型基因组, 通过同源重组双交换, 借助同源臂 *slr2030* 和 *slr2031*, 将过表达元件 kmr +启动子 P_{psbA2} +*sll0528* 插入到野生型基因组的 *slr2030* 和 *slr2031* 基因中间, 以期达到过表达基因 *sll0528* 的目的。基因 *slr2030* 和 *slr2031* 中间位置可以用于插入外源基因^[16], 作为中性位点, 故选这两段基因作为同源臂。待筛选到 *sll0528* 过表达藻株 OE0528 后, 提取过表达藻株 DNA, 用引物 3031-2-L, 3031-2-R 和 3031-1-L, 3031-1-R (表 1) PCR 扩增相应片段, 引物作用位置见图 2, 在 DNA 水平验证 *sll0528* 的过表达。结果见图 4。通过不断提高培养基中卡那霉素 (Km) 的浓度, 最终筛选出 6 株独立的 *sll0528* 过表达藻株 OE0528。分别以野生型和 6 株过表达藻株基因组为模板, 用引物 3031-2-L, 3031-2-R 和 3031-1-L, 3031-1-R 进行 PCR 扩增。先以 3031-2-L, 3031-2-R 为引物 PCR 扩增, 野生型扩增结果为 *slr2030* 和 *slr2031* 部分片段和基因间片段, 长度为 1001 bp; 当过表达藻株中 kmr +启动子 P_{psbA2} +*sll0528* 三个片段完全插入到中性位点时, 扩增结果包括 kmr +启动子 P_{psbA2} +*sll0528* 三个片段, 长度为 3350 bp; 当过表达藻株中三个片段未完全取代中性位点片段时, 扩增结果

会出现 3350 bp 和 1001 bp 两条条带。如图 4A 所示,野生型 PCR 扩增条带在 1001 bp 附近, *OE0528-1*、*OE0528-2*、*OE0528-3*、*OE0528-4*、*OE0528-5* 各过表达藻株 PCR 扩增条带在 3350 bp 附近,长度与理论值一致,初步说明 *slI0528* 过表达元件已完全插入 5 株藻株中。但是过表达藻株 *OE0528-6* 扩增结果显示在 3350 bp 附近没有条带,说明过表达藻株 *OE0528-6* 中三个片段没有插入到预期的中性位点,或者可能是引物 3031-2-L 和 3031-2-R 和 *OE0528-6* 基因组的结合位点发生变化导致引物无法正常结合而扩增。

为进一步验证结果,以 3031-1-L, 3031-1-R 为引物进行 PCR 扩增集胞藻 *slr2030* 和 *slr2031* 间中性位点被取代的部分,野生型结果为 *slr2030* 和 *slr2031* 中间部分,长度为 610 bp;过表达藻株中,过表达元件三个片段完全取代中性位点 *slr2030* 和 *slr2031* 中间部分时,扩增结果应当为没有任何条带;三个片段不完全取代中性位点时,扩增结果会有条带于 610 bp 处。结果如图 4B 所示,野生型 PCR 扩增结果电泳后条带在 610 bp 附近,6 株过表达藻株扩增结果都没有条带于 610 bp 处。进一步说明过表达藻株中 *km'*+启动子 $P_{psbA2}+slI0528$ 三个片段完全取代中性位点。这些结果说明 *slI0528* 的过表达元件在藻株 *OE0528-1*、*OE0528-2*、*OE0528-3*、*OE0528-4*、*OE0528-5* 中正确插入预定位置,但这些藻株中基因 *slI0528* 表达量是否高于 WT 仍需要进一步实验证明。

2.2.2 RNA 水平上鉴定

收集 WT 和 6 株过表达藻株 *OE0528* 培养至第 4 d 的藻液,提取 RNA,设计引物 *slI0528-2-L*, *slI0528-2-R* (表 1),通过 RT-qPCR 实验考察过表达藻株中基因 *slI0528* 是否过表达。得到目标基因和参照基因的 C_T 值,用 ΔC_T 值法,算出目标基因的表达量,并计算相对于 WT 基因 *slI0528* 的表达量(图 5)。

图 5a RT-qPCR 扩增曲线中各样品两个基因的扩增曲线相互聚集,图 5b RT-qPCR 溶解曲线中两个基因各自引物的峰值单一,都显示出引物特异性好,实验结果可靠。其中 *OE0528* 和 WT 中的 *mpB* 基因扩增曲线基本重叠,说明 *mpB* 在 *OE0528* 和 WT 表达量恒定,适合作为内参。以 WT 中 *slI0528* 的表达量为 1,过表达藻株 *OE0528-1*、*OE0528-2*、*OE0528-3*、*OE0528-4*、*OE0528-5*、*OE0528-6* 中基因 *slI0528* 相对表达量分别是 12.48、19.93、19.22、25.31、17.37 (图 5c),相对于 WT,过表达藻株中 *slI0528* 表达量明显提高。说明启动子 $P_{psbA2}+slI0528$ 基因片段在过表达藻株 *OE0528* 中成功插入并有效表达。6 株过表达藻株中 *OE0528-4* 基因 *slI0528* 的相对表达量最高。

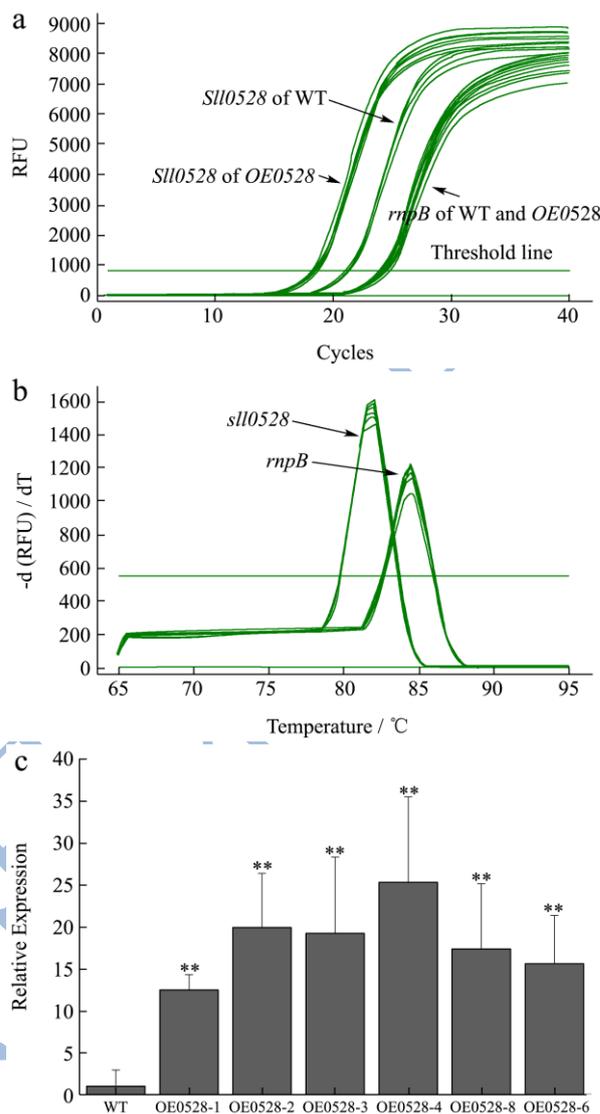


图 5 *OE0528* 在 RNA 水平的鉴定

Fig.5 Identification of the *OE0528* at the RNA level

注: a: RT-qPCR 扩增曲线, b: RT-qPCR 溶解曲线, c: 过表达藻株 *OE0528* 中 *slI0528* 的相对表达量,与 WT 比“*”表示 $p<0.05$, “**”表示 $p<0.01$ 。

2.3 过表达藻株 *OE0528* 的生长曲线

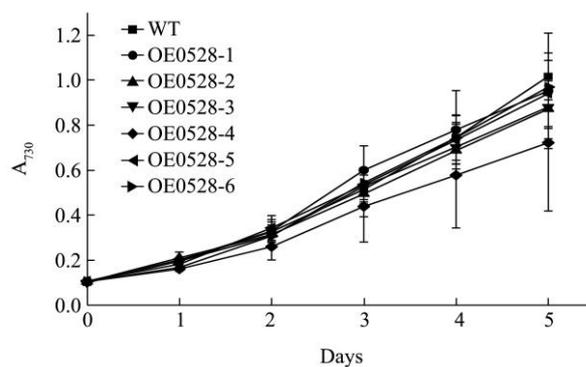


图 6 *OE0528* 的生长曲线

Fig.6 Growth curve of the *OE0528*

为研究 *slI0528* 的过表达对集胞藻 PCC6803 的正常生长是否有影响, 将 6 株过表达藻株 *OE0528* 和 WT 以起始浓度 $OD_{730}=0.1$ 开始, 在正常条件下连续培养 5 d, 并且每 24 h 取样测定 OD_{730} 值, 测得 OD_{730} 值绘制成生长曲线, 如图 6 所示。从图中可以看出, 6 株过表达藻株 *OE0528* 生长曲线和 WT 生长曲线相近, 各过表达藻株分别和 WT 对比进行显著性分析, 所有 $p>0.05$, 无显著性差异。其中 *OE0528-4* 生长速率稍慢, 但 *slI0528* 在 *OE0528-4* 中表达量最高 (图 5b), 是否由于基因 *slI0528* 的高表达导致其生长速率降低, 有待后续验证。后续胁迫实验采用过表达藻株 *OE0528-3*, 后续陈述中将其命名为 *OE0528*。

2.4 缺失藻株 $\Delta slI0528$ 在氯化铵胁迫下的生长情况

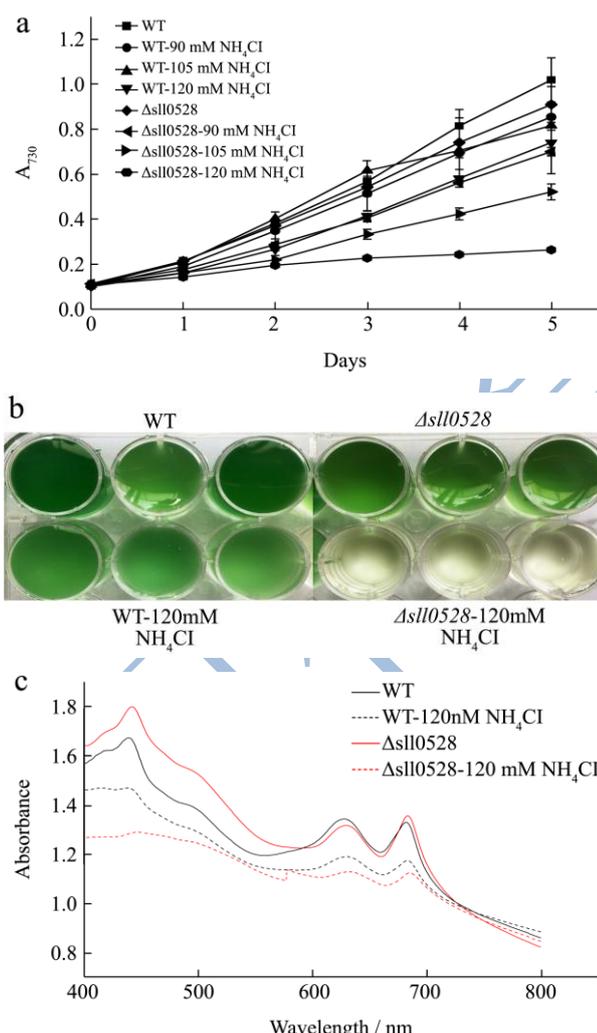


图 7 $\Delta slI0528$ 在氯化铵胁迫下的生长曲线和全细胞吸收图

Fig.7 Growth curve and whole-cell absorption spectra of $\Delta slI0528$ under ammonium chloride stress

注: a: 120 mM 氯化铵条件下 WT 和 $\Delta slI0528$ 的生长曲线

图; b: 120 mM 氯化铵条件下 WT 和 $\Delta slI0528$ 第 5 d 的图片; c: 120 mM 氯化铵条件下 WT 和 $\Delta slI0528$ 第 5 d 的全细胞吸收图。

考察 *slI0528* 基因对集胞藻响应铵盐胁迫的功能与作用, 首先利用之前构建的敲除 *slI0528* 缺失藻株 $\Delta slI0528$ 进行氯化铵胁迫实验。 $\Delta slI0528$ 构建采用同源重组双交换, 用氯霉素抗性基因 *cm^r* 替换集胞藻 PCC6803 中的 *slI0528*, 达到完全敲除 *slI0528* 目的^[12]。WT 和 $\Delta slI0528$ 分别在终浓度 0 mM、90 mM、105 mM、120 mM 的氯化铵, 正常温度光照转速条件下, 连续培养 5 d, 绘制生长曲线 (图 7a), 并于第 5 d 测定全细胞吸收值 (图 7c)。从图 7a 中可以看出, WT 在 90 mM、105 mM 浓度氯化铵下生长曲线和未加氯化铵下差异不大, WT 生长并没有受到太多影响, 在 120 mM 浓度氯化铵条件下, WT 生长速率稍微减弱。说明 WT 能适应低浓度氯化铵, 在高浓度氯化铵下生长会稍微受影响。而 $\Delta slI0528$ 的生长速率随着氯化铵浓度增加明显变慢, 在 120 mM 浓度氯化铵下生长速率为 $OD_{730} 0.02/d$ 。说明 $\Delta slI0528$ 对铵盐生长环境敏感, 随着氯化铵浓度增加生长趋势明显变缓。对比 WT 和缺失藻株 $\Delta slI0528$, 缺失基因 *slI0528* 的 $\Delta slI0528$ 对铵盐环境表现较为敏感, 说明基因 *slI0528* 在适应铵盐环境起着重要作用。

比较 WT 和缺失藻株 $\Delta slI0528$ 在 120 mM 氯化铵条件下培养至第 5 d 的藻液颜色 (图 7b), 缺失藻株 $\Delta slI0528$ 接近透明无色, 和 WT 相比几乎没有生长, 说明基因 *slI0528* 对集胞藻适应铵盐胁迫必不可少。WT 加氯化铵条件和未加氯化铵相比颜色略浅, 表明 120 mM 氯化铵对 WT 生长有一定影响。

进一步观察 WT 和 $\Delta slI0528$ 在 120 mM 氯化铵条件下培养至第 5 d 的全细胞吸收图 (图 7c)。集胞藻 PCC6803 在全细胞吸收光谱中有三个特征峰, 类胡萝卜素: 500 nm~550 nm, 藻蓝蛋白: 600 nm~650 nm, 叶绿素: 680 nm, 藻蓝蛋白和叶绿素分别是藻胆体和光合系统的重要组成部分, 藻胆体作为天线系统和光合系统相互作用推动光合作用的进行^[17], 所以藻蓝蛋白和叶绿素的含量与光合作用呈正相关。图中可以看到, 120 mM 氯化铵下第 5 d, WT 的叶绿素和藻蓝蛋白峰值高于缺失藻株 $\Delta slI0528$, 提示 WT 优于缺失藻株 $\Delta slI0528$ 的光合系统功能, 部分解释了 WT 在 120 mM 氯化铵条件下能生长, 而 $\Delta slI0528$ 几乎不能生长。说明基因 *slI0528* 对集胞藻 PCC6803 适应铵盐胁迫的重要作用, 它的缺失导致缺失藻株 $\Delta slI0528$ 在 120 mM 氯化铵条件下几乎不生长。

同时 WT 在氯化铵条件下的叶绿素和藻蓝蛋白峰值明显低于其未加铵盐条件下, 和 WT 在 120 mM 氯

化铵条件下生长速率慢于 WT 未加铵盐的现象相符。

2.5 过表达藻株 *OE0528* 在氯化铵胁迫下的生长情况

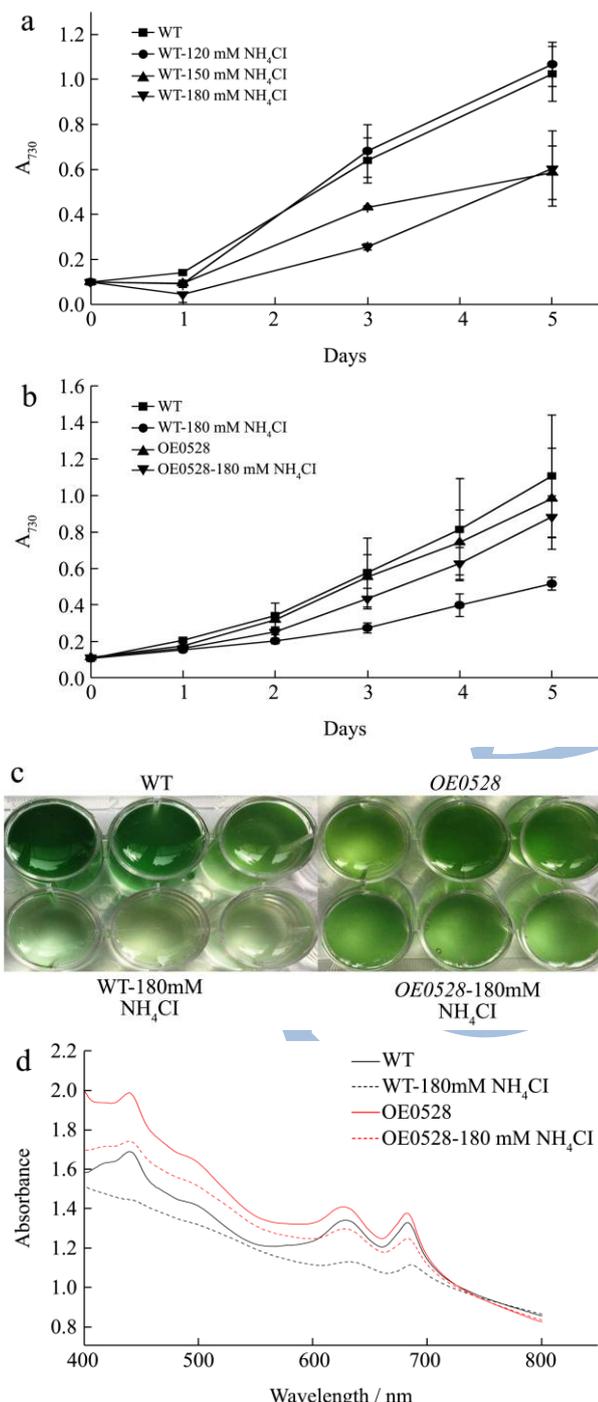


图8 *OE0528* 在氯化铵胁迫下的生长曲线和全细胞吸收图
Fig.8 Growth curve and whole-cell absorption spectra of *OE0528* under ammonium chloride stress

注: a: WT 在高浓度氯化铵胁迫下的生长曲线, b: 180 mM 氯化铵条件下 WT 和 *OE0528* 的生长曲线图, c: 180 mM 氯化铵条件下 WT 和 *OE0528* 第 5 d 的图片, d: 180 mM 氯化铵条

件下 WT 和 *OE0528* 第 5 d 的全细胞吸收图。

基因 *slh0528* 的敲除导致缺失藻株 $\Delta slh0528$ 对氯化铵比较敏感, 就此探究过表达藻株 *OE0528* 是否比 WT 更耐受高浓度氯化铵, 故需比较过表达藻株 *OE0528* 和 WT 在高浓度氯化铵条件下的生长情况。首先对 WT 进行高浓度氯化铵培养, 找出 WT 不能耐受的氯化铵浓度。六孔板实验结果显示, 在高浓度氯化铵培养下 WT 生长受阻的现象随铵盐浓度上升而明显加剧 (图 8a), 180 mM 氯化铵对 WT 生长影响大, 第 3 d、第 5 d OD₇₃₀ 值仅为对照组未添加氯化铵的 67% 和 57%。故选用 180 mM 氯化铵来对比过表达藻株 *OE0528* 和 WT 的生长状况。

如图 8b 所示, 180 mM 氯化铵下, 过表达藻株 *OE0528* 生长明显优于 WT, 第三天起与 WT 有显著差异, 第 5 d 时, OD₇₃₀ 为 WT 的 1.72 倍。说明过表达藻株 *OE0528* 相对于 WT 更能耐受高浓度氯化铵, 基因 *slh0528* 的过表达有利于过表达藻株 *OE0528* 适应铵盐胁迫。

图 8c 中, 在 180 mM 氯化铵下培养至第 5 d 的藻液图片显示, WT 颜色浅绿泛白, 透彻清亮, 而过表达藻株 *OE0528* 比 WT 颜色要深得多, 显示正常的深绿色, 提示旺盛的生长。从第 5 d 的全细胞吸收图 (图 8d) 看到, 180 mM 氯化铵下, WT 的叶绿素和藻蓝蛋白峰值明显低于过表达藻株 *OE0528*, 说明在 180 mM 氯化铵条件下 WT 的光合系统严重损伤, 光合作用受到较大影响, 而 *OE0528* 的光合系统却得到保护或进行了修复, 损伤并不明显, 光合作用受到较小影响。这些结果说明, 过表达藻株 *OE0528* 比 WT 更能适应高浓度的氯化铵胁迫, 揭示基因 *slh0528* 在集胞藻 PCC6803 耐受高浓度铵盐胁迫中起重要作用。

NH₄⁺ 作为简单的无机盐形式是植物和藻类的优选氮源, 它被同化掺入碳骨架利用。低浓度的铵被铵/甲基铵转运酶 Amt 摄入, 该酶的活性受氮状态影响^[18], 高浓度铵盐影响生物正常生长。细菌中有两种铵和碳骨架 2-酮戊二酸结合的途径: 直接通过谷氨酸脱氢酶 GDH 或者先后通过谷氨酰胺合成酶 GS 和谷氨酰胺合成酶 GOGAT 的作用。但蓝藻中 GS-GOGAT 循环是铵同化的主要途径^[19]。GDH 缺失的集胞藻 PCC6803 缺失藻株在正常条件下铵的同化不受影响^[20]。蓝藻中存在两种 GS 酶和两种 GOGAT 酶^[21]。有趣的是, 集胞藻 PCC6803 中 GS 酶的作用会因过量铵的摄入而被弱化^[22], 提示过量铵存在时, 机体需要调低铵摄入或铵同化机制以保护正常生长。有研究表明微藻的生长在低生物量密度时对铵更为敏感^[23], 说明铵盐毒性可能与光合系统的捕光能力相关; 研究氨对微藻的抑制

作用,表明高氨引起高 PH 直接影响微藻的光合作用^[24];铵盐对集胞藻的作用位点机制是铵盐促发了 PS II 的放氧复合物(OEC)的光损伤;且铵盐耐受力与位于 PS II 的 *psbA* 多基因家族成员相关^[25,26]。

通过 WT 和 *sll0528* 缺失藻株 $\Delta sll0528$ 在 120 mM 氯化铵条件下培养,观察到 WT 生长稍微受影响,而 $\Delta sll0528$ 几乎不生长,分析培养至第 5 d 的全细胞吸收图,发现 $\Delta sll0528$ 的藻蓝蛋白和叶绿素合成严重受损,表明缺失基因 *sll0528* 的 $\Delta sll0528$ 对铵盐胁迫更敏感。而 WT 和过表达藻株 *OE0528* 在 180 mM 氯化铵条件下培养,观察到 WT 生长受到较严重阻碍,生长速率是对照组未加氯化铵下的一半, *OE0528* 的生长只是稍微受到影响,同样地,分析培养至第 5 d 的全细胞吸收图,发现 180 mM 氯化铵下 *OE0528* 比 WT 的藻蓝蛋白和叶绿素峰值明显更高,推测 *OE0528* 的色素合成途径轻微受损或恢复得较好,说明过表达藻株 *OE0528* 比 WT 更耐受 180 mM 氯化铵。

Sll0528 是集胞藻 PCC6803 四个 S2P 蛋白酶中响应胁迫种类最多、响应上调表达倍数最高的一个^[12],但是它对铵盐胁迫响应的功能与机理是首次被研究。作为调节跨膜信号传导的保守机制, S2P 蛋白酶调控的膜内蛋白水解机制可以在机体受到外界胁迫时,感知信号、传递信号并激活相应基因的表达,以维持机体适应外界环境。

上述对 *sll0528* 缺失藻株 $\Delta sll0528$ 和过表达藻株 *OE0528* 在铵盐胁迫下的研究显示, Sll0528 显然参与了铵盐胁迫的快速响应,可能介导了高铵盐浓度下对光合系统的保护或修复机制。后续进一步的实验将分析 WT, *OE0528*, $\Delta sll0528$ 在氯化铵胁迫下的转录组和代谢组,深入阐明 Sll0528 如何通过膜内蛋白水解机制调控集胞藻适应铵盐胁迫。

3 结论

本文通过构建集胞藻 PCC6803 基因 *sll0528* 过表达藻株 *OE0528*, 和已经构建的 *sll0528* 敲除的缺失藻株 $\Delta sll0528$, 对比野生型, 研究集胞藻 PCC6803 在氯化铵胁迫下的生长表型, 发现 $\Delta sll0528$ 比 WT 对铵盐胁迫更敏感, *OE0528* 则比 WT 更耐受高浓度的铵盐, 表明 Sll0528 在集胞藻 PCC6803 适应铵盐胁迫中发挥重要的作用, 参与了铵盐胁迫的快速响应, 推测 Sll0528 直接或间接介导高铵盐浓度下对光合系统的保护或修复机制。本研究初步揭示集胞藻中 S2P 蛋白酶 Sll0528 对铵盐胁迫的响应作用与机制, 为未来揭示微藻对铵盐的响应机制和提高微藻对铵盐的耐受性和利用率奠定基础。

参考文献

- [1] Liu X, Zhang Y, Han W, et al. Enhanced nitrogen deposition over China [J]. Nature, 2013, 494(7438): 459-462
- [2] Zhu Z L, Chen D L. Nitrogen fertilizer use in China - contributions to food production, impacts on the environment and best management strategies [J]. Nutrient Cycling in Agroecosystems, 2002, 63(2-3): 117-127
- [3] Prajapati S K, Kaushik P, Malik A, et al. Phycoremediation coupled production of algal biomass, harvesting and anaerobic digestion: Possibilities and challenges [J]. Biotechnology Advances, 2013, 31(8): 1408-1425
- [4] Li B, Li Q, Xiong L, et al. Arabidopsis plastid AMOS1/EGY1 integrates abscisic acid signaling to regulate global gene expression response to ammonium stress [J]. Plant Physiology, 2012, 160(4): 2040-2051
- [5] Savakis P, Hellingwerf K J. Engineering cyanobacteria for direct biofuel production from CO₂ [J]. Current Opinion in Biotechnology, 2015, 33(33): 8-14
- [6] Angermayr S A, Hellingwerf K J, Lindblad P, et al. Energy biotechnology with cyanobacteria [J]. Current Opinion in Biotechnology, 2009, 20(3): 257-263
- [7] Chen G, Zhang X. New insights into S2P signaling cascades: regulation, variation, and conservation [J]. Protein Science, 2010, 19(11): 2015-2030
- [8] Raivio T L, Silhavy T J. Periplasmic stress and ECF sigma factors [J]. Annual Review of microbiology, 2001, 55: 591-624
- [9] Zhang X, Chen G, Qin C, et al. Slr0643, an S2P homologue, is essential for acid acclimation in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 [J]. Microbiology, 2012, 158 (Pt_11): 2765-2780
- [10] 曾小琳, 闻盼盼, 陈谷. 集胞藻 PCC6803 中 S2P 同源蛋白基因 *sll0862* 缺失突变株对热胁迫与氧化胁迫的响应[J]. 微生物学报, 2012, 52(5): 594-601
ZENG Xiao-lin, WEN Pan-pan, CHEN Gu. Stress response of *synechocystis sll0862* mutant to heat shock and oxidative stress [J]. Modern Food Science and Technology, 2012, 52(5): 594-601
- [11] 陈谷, 王玉玲. 集胞藻 6803 中 S2P 同源基因 *sll0528* 在多种胁迫下的表达谱分析[J]. 现代食品科技, 2014, 9: 44-48
CHEN Gu, WANG Yu-ling. Expression profile of S2P homologs gene Sll0528 in *Synechocystis* sp. PCC 6803 under multiple stress conditions [J]. Modern Food Science and Technology, 2014, 9: 44-48
- [12] Lei H, Chen G, Wang Y, et al. Sll0528, a site-2-protease, is

- critically involved in cold, salt and hyperosmotic stress acclimation of cyanobacterium *synechocystis* sp. PCC 6803 [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2014, 15(12): 22678-22693
- [13] 陈谷,李仕良,刘小芳,等.集胞藻 PCC6803 中 S2P 蛋白酶 Slr1821 参与热胁迫响应的研究[J].现代食品科技,2017,9:20-27
- CHEN Gu, LI Shi-liang, LIU Xiao-fang, et al. Exploration of the involvement of the S2P protease Slr1821 of *Synechocystis* sp. PCC 6803 in heat stress response [J]. Modern Food Science and Technology, 2017, 9: 20-27
- [14] Williams J G K. Construction of specific mutations in photosystem II photosynthetic reaction center by genetic engineering methods in *Synechocystis* 6803 [J]. Methods Enzymol, 1988, 167: 766-778
- [15] Huang H, Camsund D, Lindblad P, et al. Design and characterization of molecular tools for a synthetic biology approach towards developing cyanobacterial biotechnology [J]. Nucleic Acids Research, 2010, 38(8): 2577-2593
- [16] Osanai T, Oikawa A, Azuma M, et al. Genetic engineering of group 2 σ factor SigE widely activates expressions of sugar catabolic genes in *synechocystis* species PCC 6803 [J]. Journal of Biological Chemistry, 2011, 286(35): 30962-30971
- [17] Bald D, Kruij J, Rögner M. Supramolecular architecture of cyanobacterial thylakoid membranes: How is the phycobilisome connected with the photosystems. [J]. Photosynthesis Research, 1996, 49(2): 103-118
- [18] Wirén N V, Merrick M. Regulation and function of ammonium carriers in bacteria, fungi, and plants [M]. Molecular Mechanisms Controlling Transmembrane Transport. Springer Berlin Heidelberg, 2004
- [19] Stewart W D, Rowell P. Effects of L-methionine-DL-sulphoximine on the assimilation of newly fixed NH₃, acetylene reduction and heterocyst production in *Anabaena cylindrica* [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 1975, 65(3): 846-856
- [20] Chavez S, Lucena J M, Reyes J C, et al. The presence of glutamate dehydrogenase is a selective advantage for the cyanobacterium *synechocystis* sp. strain PCC 6803 under nonexponential growth conditions [J]. Journal of Bacteriology, 1999, 181(3): 808-813
- [21] Florencio F J, Garcia-Dominguez M, Martin-Figueroa E, et al. Ammonium assimilation in cyanobacteria. The regulation of the GS-GOGAT pathway [M]. Garab G, 1998
- [22] Reyes J C, Florencio F J. A novel mechanism of glutamine synthetase inactivation by ammonium in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. Involvement of an inactivating protein [J]. Febs Letters, 1995, 367(1): 45
- [23] Markou G, Vandamme D, Muylaert K. Ammonia inhibition on *Arthrospira platensis* in relation to the initial biomass density and pH [J]. Bioresource Technology, 2014, 166: 259-265
- [24] Abeliovich A, Azov Y. Toxicity of ammonia to algae in sewage oxidation ponds [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1976, 31(6): 801-806
- [25] Drath M, Kloft N, Batschauer A, et al. Ammonia triggers photodamage of photosystem II in the cyanobacterium *synechocystis* sp. Strain PCC 6803 [J]. Plant Physiology, 2008, 147(1): 206-215
- [26] Dai G, Qiu B, Forchhammer K. Ammonium tolerance in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803 and the role of the psbA multigene family [J]. Plant, Cell & Environment, 2014, 37(4): 840-851