

# 集胞藻 PCC6803 中 S2P 蛋白酶 Slr1821 参与热胁迫响应的研究

陈谷, 李仕良, 刘小芳, 林诗琪, 丁清龙

(华南理工大学食品科学与工程学院, 广东广州 510640)

**摘要:** 随着全球 CO<sub>2</sub> 排放量不断上升, 温室效应日益加剧, 全球气候变暖对农作物生长甚至生态环境的破坏日渐严重, 研究光合自养生物对热胁迫的响应机制有科学意义和应用前景。集胞藻 PCC6803 是一种研究光合作用和非生物胁迫响应等生物过程的模式蓝细菌, 本文通过同源双交换完全敲除集胞藻 PCC6803 的 S2P 蛋白 Slr1821 的编码基因, 构建了缺失突变体 *Δslr1821*, 发现经过高温 44 °C 热处理后, 突变体完全不能生长, 而野生型能够快速恢复热损伤, 揭示 Slr1821 蛋白在热胁迫适应中发挥重要的作用。通过研究藻胆蛋白相对含量和叶绿素含量的变化, 发现该基因缺失抑制了细胞热处理后的光合色素包括藻胆蛋白和叶绿素的重新合成, 为研究光合自养生物适应热胁迫调控机制提供了新的视角和思路。

**关键词:** 温室效应; 热胁迫; 集胞藻 PCC6803; *slr1821*

文章编号: 1673-9078(2017)9-20-27

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2017.9.004

## Exploration of the Involvement of the S2P Protease Slr1821 of *Synechocystis* sp. PCC6803 in Heat Stress Response

CHEN Gu, LI Shi-liang, LIU Xiao-fang, LIN Shi-qi, DING Qing-long

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

**Abstract:** With the rising emission of carbon dioxide(CO<sub>2</sub>), the greenhouse effect is becoming increasingly obvious, and global warming has caused more severe damage to the growth of crops and the ecological environment. Thus, investigation of the response mechanism of photosynthetic autotrophs to heat stress is of scientific significance and has potential applications. *Synechocystis* sp. PCC6803 is a model cyanobacterium used to study photosynthesis and the response to abiotic stress. In this paper, the coding gene of the site-2-protease Slr1821 of *Synechocystis* sp. PCC6803 was knocked out completely by homologous recombination to generate the *Δslr1821* mutant. The results showed that after heat treatment at 44 °C, the *Δslr1821* mutant could not grow at all, whereas the wild-type recovered from thermal damage quickly, indicating that Slr1821 protein played an important role in heat acclimation. Through analysis of changes in the relative content of phycobiliprotein and the content of chlorophyll, the results showed that heat treatment-induced deficiency of *slr1821* inhibited the resynthesis of photosynthetic pigments, including phycobiliprotein and chlorophyll. These findings provide important insights into analysis of the mechanisms through which photosynthetic autotrophs adapt to heat stress.

**Key words:** greenhouse effect; heat stress; *Synechocystis* sp. PCC6803; *slr1821*

自 1750 年来, 全球大气中的 CO<sub>2</sub> 含量提高了 30%, 全球的平均温度也随之上升且在未来有不断升高的趋势<sup>[1,2]</sup>, 有研究显示, 美国加利福尼亚州南部山区有大量植物死亡, 有些灭绝, 另有 9 种植物生长范围海拔上升, 专家认为这一现象或许与全球变暖有关。同时气温上升影响农作物的生长, 严重时甚至抑制农作物生长而影响当地农民的生计, 因此研究光合自养生物对热胁迫的响应机制有科学意义和应用前景。

收稿日期: 2017-03-22

基金项目: 国家自然科学基金委员会面上项目 (31270085)

作者简介: 陈谷 (1973-), 女, 博士, 教授, 主要从事分子生物学研究

蓝细菌又称蓝藻, 是一种起源于 35 亿年前的光合自养原核生物, 被认为是高等植物叶绿体的起源<sup>[3]</sup>, 与高等植物具有类似的光系统 I (PSI) 和光系统 II (PSII)。作为一种古老的生物, 蓝藻分布广泛, 甚至能生活在极端恶劣的环境当中, 如高达 74 °C 的极端温度, 以及盐胁迫当中<sup>[4,5]</sup>, 所以是研究胁迫响应的重要材料。集胞藻 PCC6803 是一种淡水蓝藻, 它具有独特的生理学特征以及具有全部序列信息、基因数少、易于吸收整合外源基因和容易进行分子生物学操作的特点<sup>[6]</sup>, 使得它成为研究能量代谢、光合作用<sup>[7]</sup>、信号传导和非生物胁迫响应<sup>[8]</sup>等生物过程的一种模式生物,

同时也被作为光合自养型基因工程菌应用于新型生物质能源的开发和利用<sup>[9,10]</sup>。

作为研究环境胁迫的模式生物，集胞藻 PCC6803 中有四个 S2P 蛋白酶 (Site-2-Protease, 简称 S2P): Slr0643、Slr0862、Slr0528 和 Slr1821, 它们均含有多个跨膜区域, 通过构建基因敲除突变体进行胁迫响应表型研究, 我们发现 *slr0643* 突变体对弱酸胁迫敏感, *slr0643* 参与弱酸胁迫响应机制<sup>[11]</sup>; *slr0643* 在葡萄糖混养下有重要的作用<sup>[12]</sup>; *slr0528* 对盐胁迫、冷胁迫和渗透胁迫适应非常重要<sup>[13]</sup>, 但是 *slr1821* 参与胁迫响应的作用和机理至今未见报道。本文通过同源双交换的方法完全敲除 *slr1821* 基因, 构建获得 *slr1821* 缺失突变体  $\Delta slr1821$ , 发现该基因在热胁迫条件下发挥重要的作用, 为研究光合自养生物热胁迫适应机制提供了新的视角和思路。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

质粒 pUC118、pET30b(+), 大肠杆菌 DH10B, 集

胞藻 PCC6803 野生型, BG11 培养基, 硫酸卡那霉素, 质粒提取试剂盒 (东盛生物), DNA 提取试剂盒, 细胞/细菌 RNA 提取试剂盒。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 集胞藻培养方法

将集胞藻 PCC6803 按 OD<sub>730</sub> 为 0.1 左右接种于 BG11 培养基中培养, 光照培养箱条件为 29 °C, 25 μmol/(m<sup>2</sup>·s) 连续光照和 150 r/min。平板筛选突变株时, 固体培养基需添加硫代硫酸钠储液至终浓度 0.3%、添加 TES(pH 8.2) 至终浓度 8 mM, 以及 2% 琼脂和相应浓度的硫酸卡那霉素。大肠杆菌 DH10B 于 LB 培养基中 37 °C 培养。

#### 1.2.2 同源重组质粒的构建方法

通过 PCR 的方法从集胞藻 PCC6803 基因组 DNA 中获取目的基因 *slr1821* 左右同源臂, 从 pET30b(+) 质粒中扩增获得抗生素卡那霉素的基因, 参考序列来自 NCBI 数据库。质粒构建和鉴定所用引物见表 1, 以及对应的位置见图 1。

表 1 引物序列

Table 1. Sequences of primers

名称	引物序列 (5' → 3')	产物长度
<i>slr1821</i> -Le-L	CCCAAGCTTGTCTAAGCCAGCAATCCA	584 bp
<i>slr1821</i> -Le-R	ACGCGTCGACCAAATCCTAAGGCAAAGC	
<i>slr1821</i> -Re-L	CGCGGATCCAGCATTAACTCGCTGTG	599 bp
<i>slr1821</i> -Re-R	CCGGAATTCGTAGGGTCAATAACTCTTCCA	
Kana-Le	ACGCGTCGACACTACGGCTACTAGAAAGG	1200 bp
Kana-Re	CGCGGATCC ATTCAGGTGGCACTTTT	
<i>slr1821</i> -del-L	TTTGCTTACTTTCTCCTGATTG	822 bp
<i>slr1821</i> -del-R	TCCGTTGCCCGTTGTTTTTTAC	
<i>mpB</i> -f	GAGTTAGGGAGGGAGTTGCG	405 bp
<i>mpB</i> -r	GTGCAGGATGACGGAGAAAT	

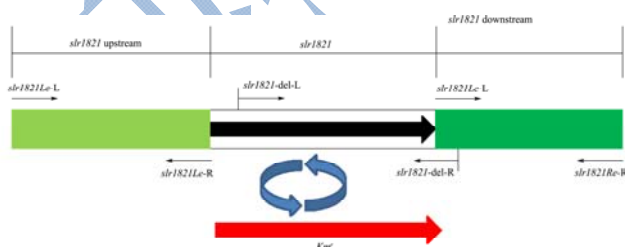


图 1 *slr1821* 基因及其上下游序列的位置

Fig. 1 Location of the *slr1821* gene and its upstream and downstream sequences

### 1.2.3 集胞藻的转化方法

参照 Williams<sup>[14]</sup> 的方法, 把构建好的质粒

pUC118-Re-Le-Km<sup>r</sup> 转化到野生型集胞藻中从而获得转化子。转化子在低浓度 Kana 抗生素的 BG11 平板上长出来后, 转入到低浓度抗生素的 BG11 液体培养基中培养, 并每次传代中逐步提高抗生素浓度, 直到通过 DNA 水平以及 RNA 水平的鉴定证明集胞藻中的 *slr1821* 基因被完全敲除。

### 1.2.4 $\Delta slr1821$ 突变体藻的 DNA 水平上的鉴定方法

用东盛生物有限公司的 DNA 提取试剂盒提取分别提取野生型和突变体藻的基因组 DNA, 用 PCR 来鉴定目的基因是否插入以及鉴定敲除基因是否被完全敲除。

### 1.2.5 *Δslr1821* 突变体在 RNA 水平上的鉴定

用东盛生物有限公司的细胞/细菌 RNA 提取试剂盒提取突变体藻的总 RNA，然后用 Takara 公司的 DNaseI 进行去 DNA，并采用酚/氯仿抽提法去除残留的 DNaseI，最后将 mRNA 反转录为 cDNA，然后用 PCR 对 *slr1821* 是否有表达进行鉴定。

### 1.2.6 细胞数的测定

取 OD<sub>730</sub> 为 1 左右的藻液，按 0.1 的梯度稀释，准确测定每个样品对应的 OD<sub>730</sub>，通过 BD Accuri™ C6 流式细胞仪测定每 mL 样品中所含的藻细胞数目，上机前样品需稀释 50 倍，测得结果为 N cells/μL，每毫升样品中藻细胞数为：C (cells/mL) = N × 50 × 1000。分别以野生型和突变体的 OD<sub>730</sub> 值为横坐标，以 C 为纵坐标绘制散点图并获得他们的线性关系，确定细胞数与 OD 值的相关性。

### 1.2.7 藻胆蛋白相对含量测定

根据 Sakuragi<sup>[15]</sup>等文献报道的方法，测量集胞藻 PCC6803 中藻胆蛋白相对含量。取待测藻液离心去上清，用 pH=7.0、25 mM HEPES 缓冲液重悬藻泥，使藻液 OD<sub>730</sub> 约为 0.5，并用分光光度计测量此时加热前藻液 (unheated) 在 730 nm 和 635 nm 下的 OD 值，取 3 mL 重悬后的藻液，100 °C 温浴 2 min，冷却至室温，测量加热后藻液 (heated) 在 730 nm 和 635 nm 下的 OD 值。PBP 相对含量计算公式如下：

$$\text{PBP 的相对含量} = (\Delta\text{OD}_{635} - \Delta\text{OD}_{730}) / \text{OD}_{730, \text{unheated}}$$

$$\Delta\text{OD} = \text{OD}_{\text{unheated}} - \text{OD}_{\text{heated}}$$

### 1.2.8 叶绿素含量测定

取 10 mL 待测藻液，测量其 OD<sub>730</sub>，离心去上清，加入 600 μL 甲醇并用陶瓷珠破碎后，加入 4 mL 的甲醇振荡 30 min 萃取叶绿素。然后 8000 r 离心 5 min，取上清于比色皿中，在紫外分光光度计下测定 OD<sub>665.2</sub> 和 OD<sub>652.4</sub>，每个样品三个平行。叶绿素含量的计算公式为：Ca(μg/mL) = 16.72A<sub>665.2</sub> - 9.16A<sub>652.4</sub>，每个细胞中叶绿素的含量为 Ca × 4.6 / 10 / C (C 为对应 OD<sub>730</sub> 值每 mL 所含有的细胞数)。

## 2 结果与讨论

### 2.1 集胞藻突变体的构建和鉴定

#### 2.1.1 pUC118-Re-Le-*Km<sup>r</sup>* 重组质粒的构建

本实验采用同源双交换法来构建重组质粒，具体方案如图 2 所示：从集胞藻 PCC6803 基因组 DNA 中 PCR 扩增得到 *slr1821* 上游同源臂 (*slr1821* upstream)，以限制性内切酶 Hind III 和 Sal I 为酶切位点，将 *slr1821* upstream 连接到 pUC118 载体上，获得

pUC118-Re 质粒；从集胞藻 PCC6803 基因组 DNA 中 PCR 扩增得到 *slr1821* 下游同源臂 (*slr1821* downstream)，以限制性内切酶 BamH I 和 EcoR I 为酶切位点，将 *slr1821* downstream 连接到 pUC118-Re 载体上，获得 pUC118-Re-Le 质粒；从 pET-30b 中扩增得到卡那霉素抗性基因 (*Km<sup>r</sup>*)，以限制性内切酶 Sal I 和 BamH I 为酶切位点，将其连接到 pUC118-Re-Le 质粒上获得 pUC118-Re-Le-*Km<sup>r</sup>*。

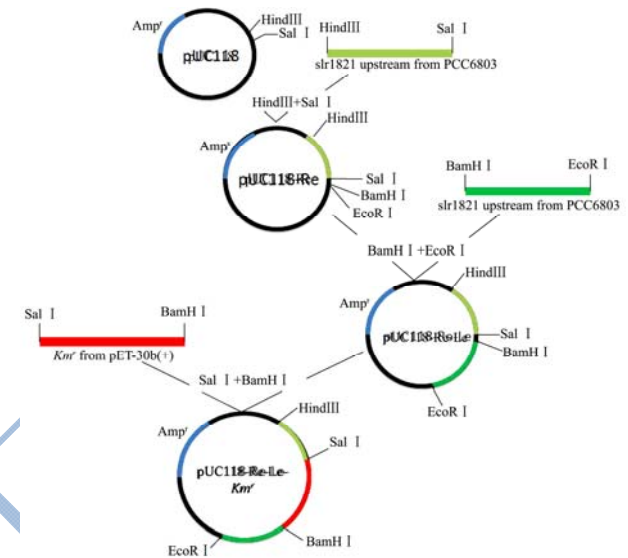


图 2 同源双交换质粒的构建方案示意图

Fig.2 Schematic diagram of the construction program for the homologous double crossover plasmid

#### 2.1.2 DNA 水平鉴定

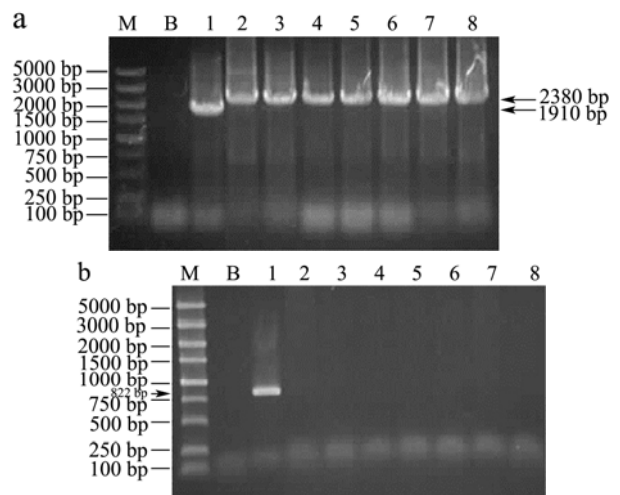


图 3 *Δslr1821* 突变体 DNA 水平鉴定

Fig.3 Identification of the *Aslr1821* mutant at the DNA level

注：a 图为以 *slr1821Le-L* 和 *slr1821Re-R* 为引物扩增的产物；b 图为以 *slr1821-del-L* 和 *slr1821-del-R* 为引物的扩增产物；M, marker; B, 空白对照；1, 野生型；2, 质粒；3, *Aslr1821-1*；4, *Aslr1821-2*；5, *Aslr1821-3*；6, *Aslr1821-4*；7, *Aslr1821-5*；8, *Aslr1821-6*。

经过抗生素多轮筛选培养后, 一共获得 6 株独立的  $\Delta slr1821$  突变体藻。以  $slr1821$ -Le-L 和  $slr1821$ -Re-R 为引物 PCR 扩增, 当  $slr1821$  未被敲除时, 扩增结果为  $slr1821$  基因及其上下游序列, 长度为 1910 bp; 当  $slr1821$  被完全敲除时, 扩增结果包含  $slr1821$  upstream、 $Km^r$  和  $slr1821$  downstream, 长度为 2380 bp; 当部分被敲除时, 则会同时出现 1910 bp 和 2380 bp 两条条带, 扩增片段的琼脂糖电泳图见图 3a。如图所示, 各突变体的扩增片段只有在 2380 bp 附近的一条条带, 且长度与理论长度一致, 初步证明 6 株藻中的  $slr1821$  基因被完全敲除。以  $slr1821$ -del-L 和  $slr1821$ -del-R 为引物 PCR 扩增, 扩增结果为被敲除  $slr1821$  的那部分基因, 长度为 822 bp, 若未完全敲除, 则会有扩增条带, 扩增片段的琼脂糖电泳图见图 3b。从图中可知, 相比野生型在 822 bp 位置上清晰的条带, 构建好的质粒和 6 株突变体的 PCR 产物均不含有  $slr1821$  基因片段, 说明这 6 个突变体的  $slr1821$  基因在 DNA 水平上可以确定被完全敲除。

### 2.1.3 RNA 水平鉴定

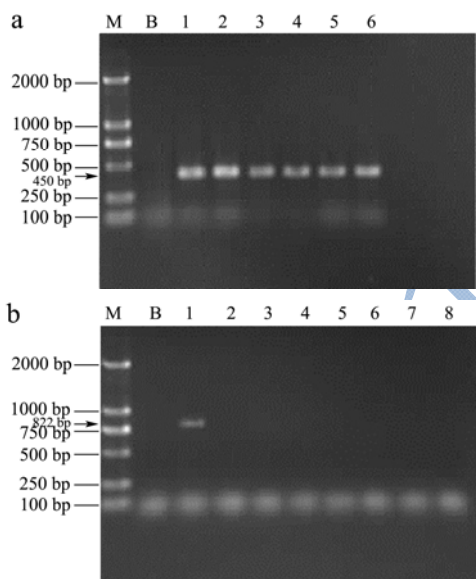


图 4  $\Delta slr1821$  突变体 RNA 水平鉴定

Fig.4 Identification of the  $\Delta slr1821$  mutant at the RNA level

注: a 图为以  $rnpB$ -r 和  $rnpB$ -f 为引物的 PCR 产物的电泳图; M 表示 marker; B 表示空白对照; 1.  $\Delta slr1821$ -1; 2.  $\Delta slr1821$ -2; 3.  $\Delta slr1821$ -3; 4.  $\Delta slr1821$ -4; 5.  $\Delta slr1821$ -5; 6.  $\Delta slr1821$ -6。b 图为以  $slr1821$ Le-L 和  $slr1821$ Re-R 为引物的 PCR 产物的电泳图; M 表示 marker; B 表示空白对照; 1. 野生型; 2. 质粒; 3.  $\Delta slr1821$ -1; 4.  $\Delta slr1821$ -2; 5.  $\Delta slr1821$ -3; 6.  $\Delta slr1821$ -4; 7.  $\Delta slr1821$ -5; 8.  $\Delta slr1821$ -6。

$rnpB$  基因是集胞藻 PCC6803 内恒定表达的基因, 负责编码 RNase P 的亚基 B<sup>[16]</sup>, 常用作内参基因。以内参基因引物  $rnpB$ -r 和  $rnpB$ -f 以及  $slr1821$ -del-L 和

$slr1821$ -del-R 为引物进行 PCR, PCR 产物的琼脂糖电泳图如图 4。从 a 图可以看出, 以  $rnpB$ -r 和  $rnpB$ -f 为引物扩增得到一条 405 bp 的条带, 与理论值一致, 说明各突变体 mRNA 逆转录成功。从 b 图看出, 当以  $slr1821$ -Le-L 和  $slr1821$ -Re-R 进行 PCR 时, 在 822 bp 处, 只有野生型有单一条带, 其余各泳道均无条带。说明了各突变体的 RNA 中不存在  $slr1821$  基因的 mRNA, 由此在 RNA 水平上证明了  $slr1821$  基因被完全敲除。

### 2.2 各突变体的生长曲线

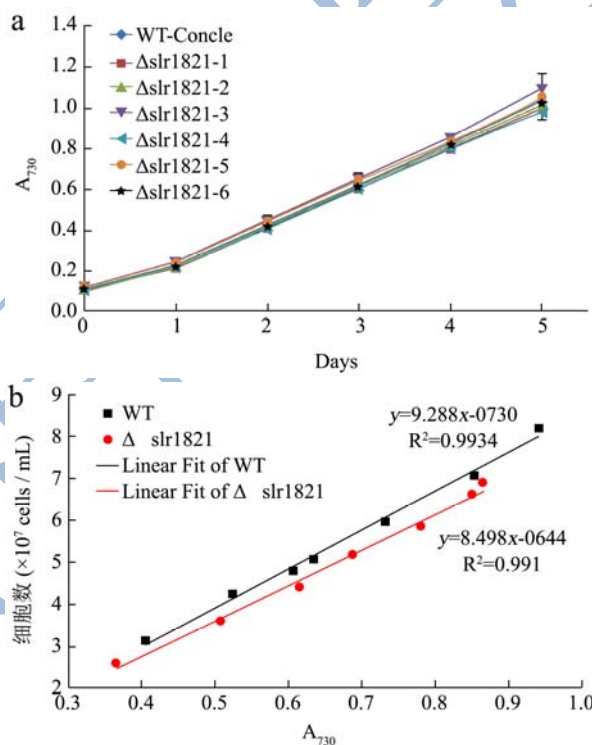


图 5  $\Delta slr1821$  突变体的生长曲线及其与细胞数相关性

Fig.5 Growth curve of the  $\Delta slr1821$  mutant and its correlation with cell number

注: a 图为  $\Delta slr1821$  突变体的生长曲线; b 图为细胞数与 OD 值的相关性。

为了研究  $slr1821$  基因的敲除是否对集胞藻 PCC6803 正常条件下的生长产生影响, 本实验测定了 6 株突变体在正常条件下自生长的生长曲线。以野生型集胞藻 PCC6803 为对照, 起始接种浓度为  $OD_{730}=0.1$ , 每株藻至少三个平行, 每 24 h 取样测 OD 值, 连续培养 5 d (实验组过去对集胞藻的生长曲线测到平台期均显示, 在对数生长期即 OD 在 0.5~1.0 之间, 突变体与野生型的生长差异最大, 因此本实验测定了前五天的生长情况), 绘制生长曲线图如图 5a。将 6 株突变体与野生型进行差异性分析发现均没有显著性差异,  $p$  值均大于 0.05, 因此在后续实验采用

*Δslr1821-2* 这株突变体并统一命名为 *Δslr1821* 进行在热胁迫下的机理研究。

通过流式细胞仪来测定野生型和突变体 OD 值与细胞数之间的相关性,如图 5b 所示,虽然由于 *slr1821* 的缺失导致在相同的 OD 值下,野生型细胞数比突变体多 10%左右(斜率差值比),但野生型与突变体的 OD 值与细胞数在所测定范围内均呈现线性关系。

### 2.3 *Δslr1821* 突变体在热胁迫下的生长曲线

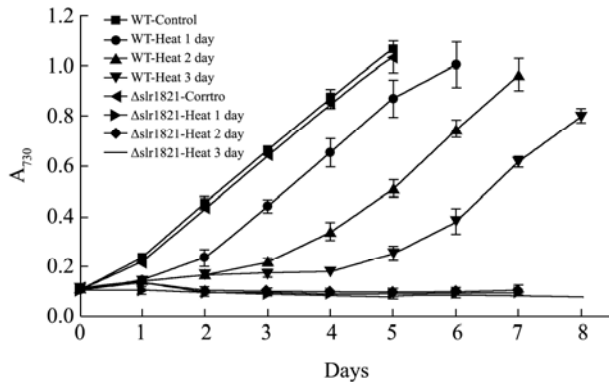


图 6 *Δslr1821* 突变体在热胁迫下的生长曲线

Fig.6 Growth curve of the *Δslr1821* mutant under heat stress conditions

注: Heat 1 day 表示热处理 1 d; Heat 2 days 表示热处理 2 d; Heat 3 days 表示热处理 3 d。

为了探究 *Δslr1821* 突变体在热胁迫条件下的生长状况以及表型分析,以野生型为对照组, *Δslr1821* 突变体为实验组,测定在热胁迫条件下的生长情况,通过参考文献以及预实验确定以 44 °C 为实验温度。按照 0 d、1 d、2 d、3 d 时间进行热处理,测量结果如图 6。从图中可以看到,正常培养条件下,野生型藻和 *Δslr1821* 突变体藻生长速率基本一致。在热处理过程中,野生型藻生长受到严重抑制,每天 OD 只增长 0.04 左右,但热处理后放在正常环境下培养,野生型藻能够迅速恢复到与未热处理组相同的生长速率,说明热处理对野生型生长的影响主要体现在热处理过程中的抑制作用,当热处理结束后,野生型能够迅速恢复热损伤到正常的生长状况而且不影响后续的生长。但从 *Δslr1821* 突变体藻的生长状况来看,1~3 d 的热处理后突变体藻均不能恢复生长。这说明了 *slr1821* 基因在集胞藻 PCC6803 热胁迫适应和热损伤修复中起到了关键的作用。为了更深入的研究 *slr1821* 基因在热胁迫下的机理,接下来的实验采用的条件为:热处理组放置在 44 °C 中培养 1 d,热处理后放置在正常温度下培养。

### 2.4 *Δslr1821* 突变体在热胁迫下的全细胞吸收

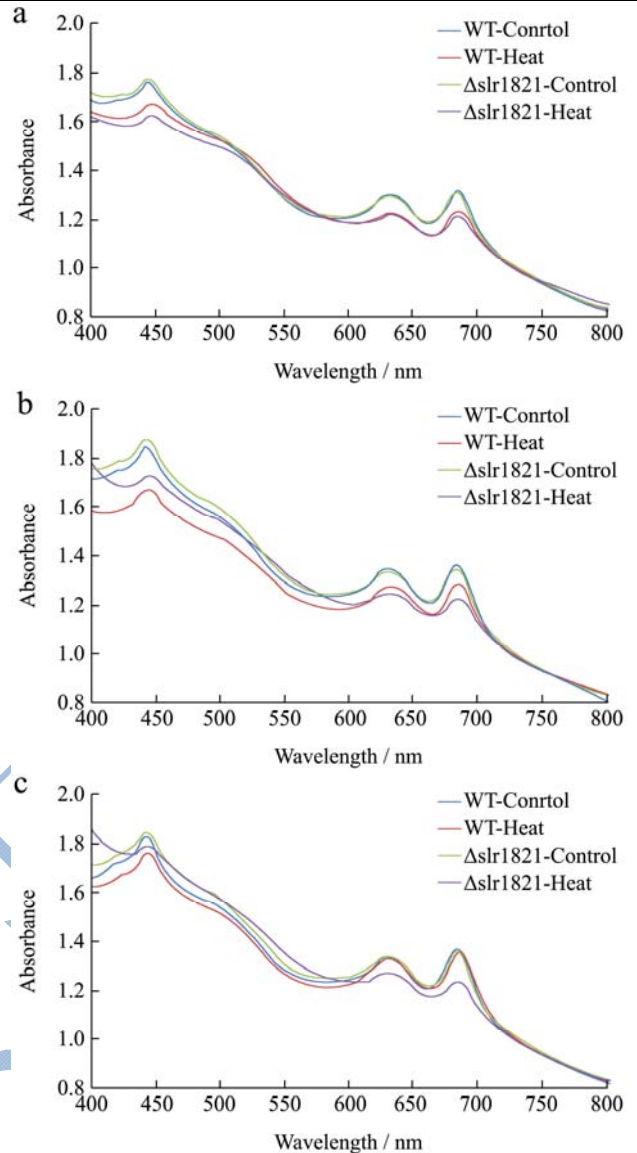


图 7 *Δslr1821* 突变体在热胁迫下的全细胞吸收图

Fig.7 Whole-cell absorption spectra of the *Δslr1821* mutant under heat stress conditions

注: a 图为第 1 d; b 图为第 2 d; c 图为第 3 d。

图 7 为 *Δslr1821* 突变体在热胁迫下前三天的全细胞吸收图,集胞藻全细胞吸收光谱图中有三个特征峰:类胡萝卜素(Carotenoids), 500 nm~550 nm; 藻蓝蛋白(Phycocyanin), 600 nm~650 nm; 叶绿素(Chlorophyll), 680 nm。通常通过比较这三类色素来分析基因的敲除对集胞藻 PCC6803 生长的影响。分别对热处理后(即第 1 d)热处理组和非热处理组的叶绿素峰和藻蓝蛋白峰的峰值进行差异性分析,结果显示 P 值均小于 0.05,表明野生型和突变体在热胁迫下,叶绿素和藻蓝蛋白均显著性降低,且降低幅度基本一致,说明在 44 °C 的热胁迫下,对两者的光合作用产生很大的影响。但从第 2 d 的全细胞吸收图(即热处理后正常条件下生长第 1 d)可以看到,野生型在两个峰都比突变体要高,

甚至在第3 d, 实验组野生型的两个峰已经恢复到与对照组一致的水平, 但突变体的两个峰明显降低, 说明在热处理后, 野生型藻中色素可以恢复到正常水平, 而突变体藻由于 *slr1821* 的缺失导致不能恢复, 结合生长曲线中突变体生长完全停滞, 表明 *slr1821* 基因对集胞藻在热胁迫环境适应过程的色素重新合成起到非常重要的作用。

## 2.5 *Δslr1821* 突变体在热胁迫下藻胆蛋白相对

含量的测定

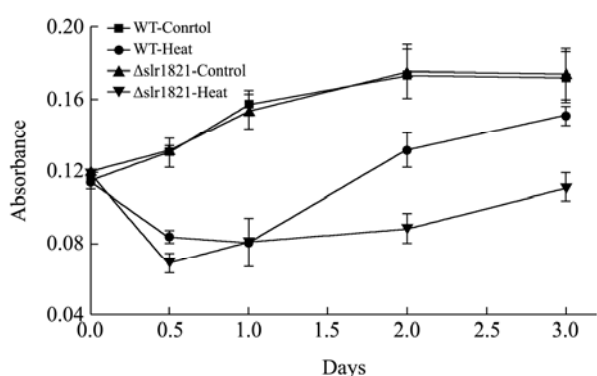


图8  $\Delta slr1821$  突变体中藻胆蛋白相对含量的测定

Fig.8 Determination of the relative content of phycobiliproteins in the  $\Delta slr1821$  mutant

注: PBP 表示藻胆蛋白。

藻胆蛋白是集胞藻中重要的捕光色素蛋白, 研究藻胆蛋白的含量变化可以分析突变体中热胁迫对光合系统的影响。图8为  $\Delta slr1821$  突变体在热胁迫下前三天的藻胆蛋白相对含量的变化图, 从图中可以看到, 非热处理组中的藻胆蛋白含量随着培养时间逐渐上升, 并在2 d后趋于平缓。而热处理12 h后, 藻胆蛋白相对含量快速下降, 且突变体下降速度较野生型快; 经过热处理24 h时, 突变体和野生型的藻胆蛋白含量趋于一致, 表明在44 °C的热条件处理下, 野生型和突变体藻胆蛋白合成受抑制程度相近。在恢复正常条件培养后, 野生型和突变体藻胆蛋白含量均有所上升, 但野生型上升速度明显比突变体快, 说明在热胁迫下, *slr1821* 基因的缺失会抑制集胞藻在热处理后藻胆蛋白的快速恢复, 从而对光合系统造成不可逆的损伤

## 2.6 $\Delta slr1821$ 突变体在热胁迫下叶绿素含量的

测定

叶绿素是光合系统中一类重要色素, 研究叶绿素含量变化可以分析突变体在热胁迫下对光合系统的影响。

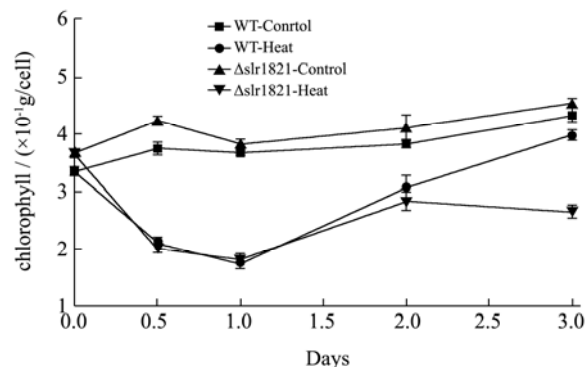


图9  $\Delta slr1821$  突变体中叶绿素含量的测定

Fig.9 Determination of the relative content of chlorophyll in the  $\Delta slr1821$  mutant

图9为  $\Delta slr1821$  突变体在热胁迫下前三天每个细胞的叶绿素含量的变化图, 从图中可以看到, 在热处理1 d内, 野生型和突变体的叶绿素含量均持续下降, 说明热处理会对叶绿素造成破坏。在经过热处理后恢复正常条件培养时, 野生型快速恢复, 经过一天即恢复到热处理前的水平, 经过两天恢复到非热处理的水平; 而突变体恢复较慢, 并在第3 d有进一步下降的趋势, 该结果说明 *slr1821* 基因的缺失抑制集胞藻在热胁迫后叶绿素的恢复, 鉴于叶绿素主要结合在光合系统中, 提示突变体光合系统发生了不可逆的损伤。

目前光合自养生物对热胁迫的响应研究发现热胁迫对光合系统具有抑制作用。已知光合作用膜上的电子传递对温度升高非常敏感<sup>[17-19]</sup>, 在电子传递系统中, 光系统II (PSII)对热敏感, 而且高温可以明显抑制由PSII控制的电子传递<sup>[20]</sup>。虽然相比于PSII, 光系统I (PSI)具有一定的热耐受性, 但也有文献报道热也可以影响PSI的电子传递<sup>[21]</sup>。在野生型热损伤修复的过程中, 藻胆蛋白和叶绿素含量均出现先下降后上升的趋势, 显示野生型光合系统的修复机制对野生型适应热胁迫的重要性。而突变体中藻胆蛋白和叶绿素均无法恢复到正常水平, 提示其重新合成受阻。此外, 热休克是关于环境反应的最广泛研究的系统之一, “热休克蛋白”(也叫热激蛋白)是在蛋白质折叠和降解中起重要作用的伴侣蛋白和相关蛋白酶, 在细胞热适应中起关键作用<sup>[22]</sup>。当生物暴露于高温时, 热休克蛋白(heat shock proteins, HSPs)的瞬时表达可以保护它们免受热损伤, 在热应激期间, 热休克蛋白显著增加, 但在正常生长温度下, 这些蛋白质以低浓度存在<sup>[23,24]</sup>。DNA芯片研究显示, 集胞藻PCC6803在44 °C下孵育20 min下, 一系列热响应蛋白的表达上调, 如 *groESL1*, *groEL2*, *hspG*, *hspA* 和 *clpB1* 被瞬时诱导<sup>[22]</sup>。但是这些热应激基因的表达是怎样受到热调控的, 依然是未解的谜团。

在其它物种如人类细胞、果蝇、酵母和细菌的 S2P 蛋白酶研究发现, S2P 参与级联信号转导, 调控胞外功能  $\sigma$  因子 (Extra cytoplasmic function  $\sigma$  factor, 简称 ECF $\sigma$  因子), 介导对细胞质外诱导信号的响应<sup>[25]</sup>。正常情况下 ECF $\sigma$  因子被抗  $\sigma$  因子所束缚,  $\sigma$  因子的活性被抑制, 导致它所调控的基因簇关闭。当受到胁迫时, 抗  $\sigma$  因子的周质域接收到激活信号, 引起抗  $\sigma$  因子遭到 S1P 和 S2P 的连续剪切, 导致抗  $\sigma$  因子解体, 释放出 ECF $\sigma$  因子, ECF $\sigma$  因子与 RNA 聚合酶核心酶结合, 进而识别激活相应的下游靶基因进行转录表达<sup>[26]</sup>, 从而适应外界胁迫。因此推测, 热胁迫中集胞藻 PCC6803 中 *slr1821* 的缺失抑制了信号转导机制中 S2P 蛋白酶的活性, 可能导致下游靶序列, 如藻胆蛋白和叶绿素合成基因或热休克蛋白编码基因等热胁迫响应基因的表达受到抑制, 而引起突变体在热处理后不能恢复。进一步深入研究 *slr1821* 基因与色素合成基因、热休克蛋白之间的调控关系将有助于揭示 Slr1821 蛋白酶在热胁迫适应和恢复过程中起到的作用和机理。

### 3 结论

本文通过构建 *slr1821* 敲除突变体发现 Slr1821 蛋白在集胞藻 PCC6803 热胁迫后的热损伤修复过程中发挥非常重要的作用。Slr1821 编码基因的缺失使得集胞藻不能适应 44 °C 的热胁迫, 主要表现在细胞热处理后的光合色素包括藻胆蛋白和叶绿素的重新合成受阻, 光合系统损伤不能恢复。进一步深入研究 *slr1821* 基因与色素合成基因、热休克蛋白之间的调控关系将有助于揭示 Slr1821 蛋白酶在热胁迫适应和恢复过程中起到的作用和机理, 有助于揭开蓝藻适应不断变化的外部环境, 在地球上成为生存时间最长的物种的秘密, 并为全球气候变暖的大环境下, 光合生物特别是农作物的适应提供思路 and 参考。

### 参考文献

- [1] Houghton J E T, Ding Y H, Griggs J, et al. Climate change 2001: the scientific basis [M]. Cambridge University Press, 2001
- [2] Sharkey T D. Effects of moderate heat stress on photosynthesis: importance of thylakoid reactions, rubisco deactivation, reactive oxygen species, and thermotolerance provided by isoprene [J]. Plant Cell & Environment, 2005, 28(3): 269-277
- [3] N R-E, H B, S C B, et al. Monophyly of primary photosynthetic eukaryotes: green plants, red algae, and glaucophytes [J]. Current Biology Cb, 2005, 15(14): 1325-1330
- [4] Whitton B A, Potts M. The ecology of cyanobacteria: their diversity in time and space [J]. Ecology of Cyanobacteria Their Diversity in Time & Space, 2000
- [5] Zhang Y, Niu X, Shi M, et al. Identification of a transporter Slr0982 involved in ethanol tolerance in cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC6803 [J]. Frontiers in Microbiology, 2015, 6: 487
- [6] Kufryk G I, Sachet M, Schmetterer G, et al. Transformation of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC6803 as a tool for genetic mapping: optimization of efficiency [J]. Fems Microbiology Letters, 2002, 206(2): 215-229
- [7] Glatz A, Vass I, Los D A, et al. The *Synechocystis* model of stress: from molecular chaperones to membranes [J]. Plant Physiology & Biochemistry, 1999, 37(1): 1-12
- [8] Los D A, Zorina A, Sinetova M, et al. Stress sensors and signal transducers in cyanobacteria [J]. Sensors, 2010, 10(3): 2386-2415
- [9] Savakis P, Hellingwerf K J. Engineering cyanobacteria for direct biofuel production from CO<sub>2</sub> [J]. Current Opinion in Biotechnology, 2015, 33(33): 8-14
- [10] Angermayr S A, Hellingwerf K J. Energy biotechnology with cyanobacteria [J]. Current Opinion in Biotechnology, 2009, 20(3): 257-263
- [11] Zhang X, Chen G, Qin C, et al. Slr0643, an S2P homologue, is essential for acid acclimation in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC6803 [D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2012
- [12] 王玉玲.S2P 蛋白酶在集胞藻 PCC6803 胁迫响应中的功能 [D].广州:华南理工大学,2014  
WANG Yu-ling. Characterization of Site-2-protease in the stress response of Cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC6803 [D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2014
- [13] Lei H, Chen G, Wang Y, et al. Slr0528, a Site-2-Protease, is critically involved in cold, salt and hyperosmotic stress acclimation of Cyanobacterium *synechocystis* sp. PCC6803 [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2014, 15(12): 22678-22693
- [14] Williams J G K. Construction of specific mutations in photosystem II photosynthetic reaction center by genetic engineering methods in *Synechocystis* PCC6803 [J]. Methods Enzymol., 1988, 167: 766-778
- [15] Sakuragi Y, Maeda H, Dellapenna D, et al.  $\alpha$ -tocopherol plays

- a role in photosynthesis and macronutrient homeostasis of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC6803 that is independent of its antioxidant function [J]. *Plant Physiology*, 2006, 141(2): 508
- [16] Huang H 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
- [17] J Berry A, Bjorkman O. Photosynthetic response and adaptation to temperature in higher plants [J]. *Annual Review of Plant Physiology*, 2003, 31(1): 491-543
- [18] Quinn P J, Williams W P. Environmentally induced changes in chloroplast membranes and their effects on photosynthetic function [J]. *Topics in Photosynthesis*, 1985: 373-382
- [19] Thomson A P, Zuckerman S. Mechanisms of the temperature damage and acclimation of the photosynthetic apparatus [J]. *Photobiochemistry & Photobiophysics*, 1986, 12(1-2): 147-155
- [20] Pospíšil P, Tyystjärvi E. Molecular mechanism of high-temperature-induced inhibition of acceptor side of photosystem II [J]. *Photosynthesis Research*, 1999, 62(1): 55-66
- [21] Havaux M, Greppin H, Strasser R J. Functioning of photosystems I and II in pea leaves exposed to heat stress in the presence or absence of light: analysis using *in-vivo* fluorescence, absorbance, oxygen and photoacoustic measurements [J]. *Planta*, 1991, 186(1): 88-98
- [22] Suzuki I, Simon W J, Slabas A R. The heat shock response of *Synechocystis* sp. PCC6803 analysed by transcriptomics and proteomics [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2006, 57(7): 1573
- [23] Parsell, Lindquist D A, Susan. 18 Heat shock proteins and stress tolerance [J]. *Cold Spring Harbor Monograph Archive*, 1994, 26
- [24] Waters E R, Lee G J, Vierling E. Evolution, structure and function of the small heat shock proteins in plants [J]. *Journal of Experimental Botany*, 1996, 47(3): 325-338
- [25] Chen G, Zhang X. New insights into S2P signaling cascades: regulation, variation, and conservation [J]. *Protein Science*, 2010, 19(11): 2015-2030
- [26] M A, S I, S Y, et al. SigC, the group 2 sigma factor of RNA polymerase, contributes to the late-stage gene expression and nitrogen promoter recognition in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC6803 [J]. *Bioscience Biotechnology & Biochemistry*, 2004, 68(3): 477-487