

doi: 10.7541/2021.2019.207

多变鱼腥藻ATCC 29413基因的一步插入失活

雷棋琴^{1,2} 戴水玲¹ 黄任衡¹ 高宏¹ 徐旭东¹ 孔任秋¹

(1. 中国科学院水生生物研究所中国科学院藻类生物学重点实验室, 武汉 430072; 2. 中国科学院大学, 北京 100049)

摘要: 多变鱼腥藻ATCC 29413有潜力发展为异养生长产异形胞蓝藻的研究模式种, 但由于细胞内的限制-修饰系统等原因, 其基因转移效率极低。研究克隆了该藻株的两个甲基化酶(M. Ava I 和M. Avr II)基因 *ava_3181* 和 *ava_4359*, 构建了辅助质粒pHB6088, 对运载体进行甲基化保护以避免被细胞中的限制酶切割。以 *ava_1237* 和 *ava_4412* 基因为例, 研究证明利用该辅助质粒和接合转移系统可通过双交换对多变鱼腥藻ATCC 29413的基因实现一步插入失活。

关键词: 多变鱼腥藻ATCC 29413; 接合转移; 辅助质粒; 甲基化酶基因; 基因插入失活

中图分类号: Q173 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3207(2021)01-0048-06



多变鱼腥藻(*Anabaena variabilis*) ATCC 29413 是一种淡水丝状蓝藻, 在缺氮条件下藻丝中一些间隔分布的营养细胞分化为异形胞进行固氮; 在干旱等极端环境下还可以分化形成厚壁孢子。该藻株不仅可以利用光合作用进行自养生长, 也能利用果糖作为碳源和能源在完全黑暗条件下异养生长; 其最适生长温度为30℃, 但在40℃高温条件下生长状态良好, 属于中等嗜热型藻^[1]。利用丝状蓝藻的接合转移系统, 多变鱼腥藻ATCC 29413高温衍生株可以进行遗传操作, 利用同源重组得到特定基因的突变株^[2-6]。

具有异养生长能力的蓝藻依靠单糖或双糖作为碳源^[7-10], 在光合作用、光合膜的发生等有关基因被失活时仍然能够生长, 为研究这些基因的功能提供了便利; 作为光合细胞工厂, 用于生产各种高价值化学品和生物燃料, 也具有一定优势^[11]。然而, 多变鱼腥藻ATCC 29413的接合转移效率很低, 影响了研究工作的开展。我们对该藻株已发表的基因组序列进行分析发现, 其含有两套II型限制修饰系统, 包括Ava I/M. Ava I 和Avr II/M. Avr II。这两种限制酶的存在可切断进入细胞的外源DNA, 妨碍接合子的形成。过去所用的丝状蓝藻接合转移系统中的辅助质粒pRL623上缺少甲基化酶M. Avr II 基因, 可能与难以构建多变鱼腥藻突变株有关^[12, 13]。

为了克服藻株的限制酶对外源DNA的破坏, 本研究克隆了该藻株自身的两个甲基化酶基因, 构建了新的辅助质粒。利用该质粒对多变鱼腥藻ATCC 29413两个基因进行了插入失活, 均实现了一步获得同源双交换子, 比通常在丝状蓝藻敲除基因节省一半时间。

1 材料与方法

1.1 藻种、菌种及培养方法

多变鱼腥藻ATCC 29413高温衍生株由美国南达科塔州州立大学周阮宝教授惠赠。藻株接种在稀释8倍的AA液体培养基(AA/8)^[14]或BG-11固体培养基^[15]生长, 接合转移时固体培养基中添加5 mmol/L的果糖, 突变藻株的培养基中补加10 μg/mL的红霉素(Em)。在(30±1)℃、30 μE/(m²·s)持续光照条件下静置培养, 通过测定 A_{730} 来监测其生长, 待藻细胞到达对数期时用于实验。大肠杆菌(*Escherichia coli*)在37℃的LB培养基中培养, 含有质粒的大肠杆菌根据所带抗性基因补加50 μg/mL壮观霉素(Sp)、氨苄青霉素(Ap)、卡那霉素(Km)、10 μg/mL的氯霉素(Cm)或10 μg/mL四环素(Tc)。

1.2 蓝藻基因组提取和PCR反应

蓝藻基因组提取和PCR反应参照文献^[16], 引物合成和序列分析在武汉天一辉远生物科技有限

收稿日期: 2019-09-24; 修订日期: 2020-03-16

基金项目: 现代农业产业技术体系专项资金(CARS-50)资助 [Supported by the China Agriculture Research System (CARS-50)]

作者简介: 雷棋琴 (1992—), 女, 硕士研究生; 研究方向为水生生物学。E-mail: 819211967@qq.com

通信作者: 孔任秋, E-mail: kongr@ihb.ac.cn

公司进行。

1.3 质粒的构建

DNA重组按Molecular Cloning^[18]描述的方法进行。限制性内切酶、连接酶、质粒pMD18-T购自大连宝生物工程有限公司。质粒pHB518(GenBank 登录号EF688562.1)和pHB576(GenBank 登录号EF688561.1)是本实验室前期构建的载体。pDS4101^[2]、pRL443^[2]、pRL623^[13]、pRL277(GenBank 登录号L05082.1)和pACYC184(GenBank 登录号X06403.1)由美国密歇根州立大学Peter Wolk教授惠赠。

辅助质粒的构建 根据多变鱼腥藻ATCC 29413限制酶的甲基化酶基因M. *Ava*I和M. *Avr*II(*ava*_3181和*ava*_4359)的DNA序列设计两对引物(表1), 两个基因的上游引物序列在ATG前7个碱基设计典型核糖体结合位点AGGAGG, M. *Avr*II基因的上游引物设计上终止密码子用于终止插入载体pACYC184上四环素抗性基因的翻译。以野生型多变鱼腥藻ATCC 29413基因组为模板, 以引物M. *Ava*I p-1/p-2和M. *Avr*II p-1/p-2分别进行PCR扩增, 得到大小为1.45 kb的M. *Ava*I基因和1.28 kb的M. *Avr*II基因, 经过纯化连接到pMD18-T载体上, 转化*E. coli* DH10B, 得到质粒pHB6065和pHB6067, 感受态菌制作方法参照文献[19]。将质粒pHB6065用*Bam*H I 酶切补平后再用*Sph*I 酶切, 琼脂糖电泳回收1.45 kb的M. *Ava*I片段, 同时将质粒pHB6067用*Sal*I 酶切补平后再用*Sph*I 酶切, 回收线性化4 kb大小带M. *Avr*II的载体片段。将目的片段与载体连接后转化感受态*E. coli* DH10B, 得质粒pHB6087; 将pHB6087质粒上2.7 kb的*Bam*H I (补平)和*Sal*I 双酶切片段(含有M. *Ava*I和M. *Avr*II)克隆到质粒pACYC184的*Eco*RV和*Sal*I 双酶切位点, 得到辅助质粒pHB6088。所有构建的质粒经PCR检测和测序验证无误。

用于基因插入失活的运载质粒的构建 根据已公布的基因*ava*_1237和*ava*_4412序列发现两基因大小分别为1.42和0.48 kb。为了便于同源交换, 在每个基因两侧分别设计了两对引物(表1), 以多变鱼腥藻基因组DNA为模板, 利用引物*ava*_1237 p-1/p-2扩增出基因*ava*_1237上游0.71 kb的片段, 以引物*ava*_1237 p-3/p-4扩增出基因*ava*_1237下游0.70 kb的片段, 将两片段分别克隆到质粒pHB518和pHB576的*Eam*1105 I 位点, 同时删除了以上两个质粒上的氯霉素抗性基因(*Cm*^r)得到质粒pHB5225和pHB5235, 用*Not*I 酶切pHB5235, 插入从pHB5225中用*Not*I 酶切回收的约2.7 kb片段(含有*ava*_1237上游片段+*Em*^r); 通过PCR鉴定, 选择上下

游片段方向一致的克隆, 得到质粒pHB5245; 用*Pvu*II 酶切pHB5245, 回收约3.7 kb片段(含有*ava*_1237上游片段+*Em*^r+*ava*_1237下游片段), 将其插入到pRL277质粒*Pst*I 位点(*Pst*I 酶切并补平)得到运载质粒pHB5255。

同样的以多变鱼腥藻基因组DNA为模板, 利用引物*ava*_4412 p-1/p-2扩增出基因*ava*_4412上游0.69 kb的片段, 以引物*ava*_4412 p-3/p-4扩增出基因*ava*_4412下游0.86 kb的片段, 将两片段分别克隆到质粒pHB518和pHB576的*Eam*1105 I 位点, 同时删除了以上两个质粒上的氯霉素抗性基因得到质粒pHB5231和pHB5241; 用*Sse*8387 I 酶切pHB5241, 插入从pHB5231中用*Sse*8387 I 酶切并回收的约2.6 kb片段(含有*ava*_4412上游片段+*Em*^r); 通过PCR鉴定, 选择上下游片段方向一致的克隆, 得到质粒pHB5251; 用*Pvu*II 酶切pHB5251, 回收约3.7 kb片段(含有

表1 本文所使用的引物
Tab. 1 Primers used in this study

基因Gene	引物Primer	序列Sequence (5'—3')	用途Purpose
<i>ava</i> _3181	M. <i>Ava</i> I p-1	AGGAGGATATAAAAT	用于扩增基因M. <i>Ava</i> I
	M. <i>Ava</i> I p-2	GACTTCATTTGAGC	
<i>ava</i> _4359	M. <i>Avr</i> II p-1	CTAGGGTTTCTCCAA	用于扩增基因M. <i>Avr</i> II
	M. <i>Avr</i> II p-2	ACATATACAC	
<i>ava</i> _1237	<i>ava</i> _1237 p-1	CGTAACTTAAC	用于构建运载质粒
	<i>ava</i> _1237 p-2	TAAAGGAGGTTAC	
	<i>ava</i> _1237 p-3	GTCATGCAGCTTCCC	
	<i>ava</i> _1237 p-4	TATTTACTGATCCC	
	<i>ava</i> _1237 p-5	CGTAAGCTCCGCAGA	
	<i>ava</i> _1237 p-6	TGCAGCTTCGATATTT	
<i>ava</i> _4412	<i>ava</i> _4412 p-1	GTCCCTAATCCCCAAT	用于构建运载质粒
	<i>ava</i> _4412 p-2	CCCT	
	<i>ava</i> _4412 p-3	GACCCCTGAGACAAT	
	<i>ava</i> _4412 p-4	GAGAGG	
	<i>ava</i> _4412 p-5	GGCAAGCCACCCCAA	
	<i>ava</i> _4412 p-6	CTGCTG	
<i>Em</i> ^r	<i>Em</i> ^r p-1	CCTCCCTGCCAGTCTT	用于突变株检测
	<i>Em</i> ^r p-2	CACG	
<i>Em</i> ^r	<i>Em</i> ^r p-1	GTACCTTGTAGTTCGG	用于突变株检测
	<i>Em</i> ^r p-2	CAGG	
	<i>Em</i> ^r p-3	GAGGTGAGACAACAA	
	<i>Em</i> ^r p-4	GAGATTTC	
	<i>Em</i> ^r p-5	GGGTGCTTGACCTCA	
	<i>Em</i> ^r p-6	TAGAGCCAAAGCCG	
<i>Em</i> ^r	<i>Em</i> ^r p-1	CAGGAG	用于突变株检测
	<i>Em</i> ^r p-2	CGCTGACTCCTTACCT	
	<i>Em</i> ^r p-3	GAGGG	
	<i>Em</i> ^r p-4	GGTCGGTGATTGGT	
	<i>Em</i> ^r p-5	CTAAGC	
	<i>Em</i> ^r p-6	GTTTCTCTCACTGCAA	
<i>Em</i> ^r	<i>Em</i> ^r p-1	TCCACAG	用于突变株检测
	<i>Em</i> ^r p-2	GTAGGGAGCGATCTG	
<i>Em</i> ^r	<i>Em</i> ^r p-1	TGCAGC	用于突变株检测
	<i>Em</i> ^r p-2	TCGGCTCAGGAAAAG	
<i>Em</i> ^r	<i>Em</i> ^r p-1	GCCAT	用于突变株检测
	<i>Em</i> ^r p-2	CCTGCATGTTTTAAGG	
<i>Em</i> ^r	<i>Em</i> ^r p-1	AATTG	用于突变株检测
	<i>Em</i> ^r p-2		

注: 带下划线和带边框部分为添加序列, 用于促进基因表达
Note: Underlined and boxed sequences were added for promotion of gene expression

*ava_4412*上游片段+ Em^r +*ava_4412*下游片段), 将其插入到pRL277质粒*Pst* I 位点(*Pst* I 酶切并补平), 得到运载质粒pHB5261。

1.4 接合转移菌株的构建

在接合转移前需要把几种质粒转入同一个菌株, 其中包括辅助质粒、运载质粒和接合质粒。首先通过转化将辅助质粒和运载质粒转入同一个大肠杆菌细胞*E. coli* DH10B, 然后将含有接合质粒的大肠杆菌细胞与含有辅助质粒和运载质粒的大肠杆菌细胞在含有相应抗生素的LB培养基上交叉划线, 长出的细胞即是含有辅助质粒、运载质粒和接合质粒的菌株。

辅助质粒pHB6088转化到*E. coli* DH10B(pDS4101)细胞中, 得到菌株*E. coli* DH10B(pDS4101+pHB6088)。再将两个运载质粒pHB5255和pHB5261分别转化到感受态细胞*E. coli* DH10B(pDS4101+ pHB6088)中, 得到含3种质粒的菌株*E. coli* DH10B(pDS4101+ pHB6088+运载质粒)。用接种环将上述含3个质粒的菌株与*E. coli* HB101(pRL443)在含有Ap、Cm、Sp、和Tc四种抗性的固体LB平板上交叉划线, 质粒pRL443自主转移到含3质粒的菌株中, 得到含4种质粒的菌株*E. coli* DH10B(pDS4101+pHB6088+运载质粒+pRL443)。另外将辅助质粒pRL623转化到含有运载质粒的细胞中, 然后再与含有pRL443的菌株细胞交叉划线, 在三抗培养基(Cm、Sp和Tc)上筛选含有pRL623、运载质粒和pRL443的大肠杆菌细胞, 得到*E. coli* DH10B(pRL623 +运载质粒+pRL443)。

1.5 接合转移和突变株的筛选

接合转移方法参照文献[2]采用两个途径进行, 分别用菌株*E. coli* DH10B(pDS4101+pHB6088+运载质粒+pRL443)和菌株*E. coli* DH10B(pRL623+运载质粒+pRL443)与多变鱼腥藻ATCC 29413进行接合转移, 按比例取50 mL对数生长期藻细胞(A_{730} 为0.4)和25 mL大肠杆菌接合转移细胞(A_{600} 为0.6), 先将藻和菌分别用无抗的培养基洗3遍, 再将藻和菌分别浓缩为1 mL, 藻菌混合液涂于带硝酸纤维素滤膜的无抗BG11平板(添加5% LB), 每个BG11平板涂100—200 μ L的藻菌混合液, 恢复一天后再从滤膜上洗下藻菌混合物, 1800 r/min离心收集藻细胞后, 将其涂于添加红霉素和5 mmol/L果糖的固体BG11平板上等待接合子长出。长出的接合子在含红霉素的BG11平板上划线培养, 待长出来之后转入红霉素抗性的30 mL AA/8液体培养基, 根据不同的基因设计检测引物, 传代分离纯化后提取野生型和接合子基因组DNA做PCR检测。

2 结果

2.1 用于甲基化保护的辅助质粒

辅助质粒的构建流程如下(图1): 将多变鱼腥藻ATCC 29413中限制酶(*Ava* I 和*Avr* II)的甲基化酶基因*ava_3181*(*M. Ava* I)和*ava_4359*(*M. Avr* II)分别克隆到pMD18-T载体上, 得到质粒pHB6065和pHB6067。然后将质粒pHB6065上的*M. Ava* I 基因以相同方向克隆到pHB6067质粒*M. Avr* II 基因下游

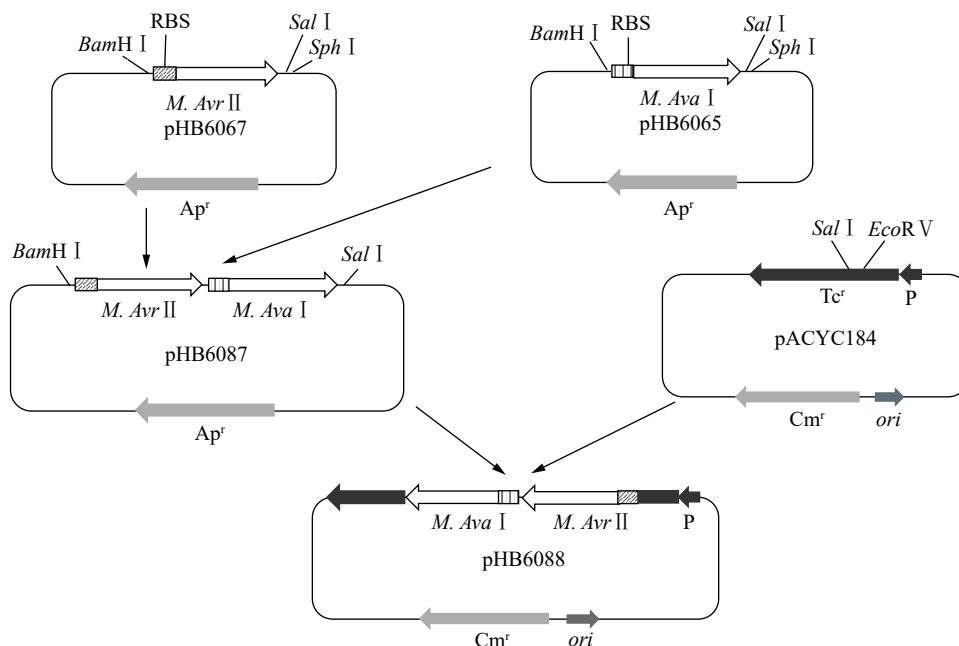


图1 辅助质粒构建流程图

Fig. 1 Schematic diagram of construction of the helper plasmid

得到pHB6087。最后将串联的*M. Ava I*和*M. Avr II*插入到质粒pACYC184四环素抗性基因中间, 得到辅助质粒pHB6088。pHB6088利用四环素抗性基因的启动子来驱动*M. Avr II*和*M. Ava I*的转录(图1), 基因*M. Avr II*上游设计带有终止密码子(Stop codon)和核糖体结合位点(RBS), Stop codon用于终止Tc^r上游序列的翻译, RBS为大肠杆菌典型核糖体结合位点(AGGAGG)。

2.2 用于基因敲除的运载质粒

基因*ava_1237*的侧翼同源序列0.71和0.7 kb分别克隆到质粒pHB518和pHB576得到质粒pHB5225和pHB5235, 再将pHB5225的上游侧翼同源序列连同Em^r切下连接到pHB5235上得到质粒pHB5245, 质粒pHB5245上的两个侧翼同源序列和Em^r切下连到载体pRL277上得到运载质粒pHB5255。

基因*ava_4412*的侧翼同源序列0.69和0.86 kb分别克隆到质粒pHB518和pHB576得到质粒pHB5231和pHB5241, 再将质粒pHB5231的上游侧翼同源序列和Em^r切下连接到pHB5241上得到质粒pHB5251, 质粒pHB5251上的两个侧翼同源序列和Em^r切下连到载体pRL277上得到运载质粒pHB5261。

运载质粒pHB5255含有基因*ava_1237*上下游两侧分别约有0.7 kb的序列, 其基因中间142 bp的序列被Em抗性基因置换, 用于*ava_1237*基因失活研究; 另一个运载质粒pHB5261含有*ava_4412*上游0.69 kb和下游0.86 kb序列, 其基因中间126 bp的序列被Em抗性基因置换, 用于*ava_4412*基因失活研究。两个运载质粒上面还含有位点和用于双交换筛选的蔗糖致死基因(*sacB*)及壮观霉素抗性基因(*Sp^r*)。

2.3 基因的一步插入失活

本研究构建了两种接合转移菌株*E. coli* DH10B (pDS4101+pHB6088+运载质粒+pRL443)和*E. coli* DH10B(pRL623+运载质粒+pRL443)。pDS4101提供接合转移所需的Mob蛋白; pHB6088含有多变鱼腥藻两个甲基化酶基因(*M. Ava I*和*M. Avr II*), 对运载质粒特定位点进行甲基化保护; pRL623上有来源于其他微生物的三种甲基化酶基因(*M. Ava I*、*M. Eco47 II*和*M. EcoT22 I*)和Mob蛋白基因; 接合质粒pRL443, 具有自主转移特性并提供接合所需的性纤毛, 质粒上的*tra*基因从编码的蛋白能驱动运载质粒从*E. coli*到藻细胞的接合转移; 运载质粒含位点, 克隆有本研究将要敲除的基因的上下游同源序列和插入其间的红霉素抗性基因。

将以上菌株分别与多变鱼腥藻ATCC 29413进行接合转移后, 在添加果糖和红霉素的BG11平板

上筛选。7—14d后, 利用含有辅助质粒pHB6088的菌株进行的接合转移平板开始长出接合子, 每组都长出20个左右的接合子, 而利用含有辅助质粒pRL623的菌株进行接合转移的平板没有接合子长出。将接合子划线到添加果糖和红霉素的BG11固体平板培养, 长出的藻落再接种到添加果糖和红霉素的AA/8液体培养基中传两代。提取基因组DNA, 在基因组与运载质粒同源序列的上下游两侧和红霉素抗性基因内部设计引物(表1), 进行PCR检测与比较。这两个突变株分别随机检测了2个(*ava_1237*)和4个接合子(*ava_4412*), 都显示发生了同源双交换, 而不是单交换(图2), 也就是省略了在丝状蓝藻构建基因敲除突变株要先获得单交换株的传统实验步骤。图2中泳道3和4都显示获得了基因*ava_1237*的双交换突变, 但泳道3检测的接合子突变尚未完全分离(蓝藻基因组有多拷贝, 该接合子仍有野生型拷贝); 泳道7和9是基因*ava_4412*完全分离的双交换突变株, 泳道8和10是未完全分离的突变株; 泳道1、2和5、6是两个基因的野生型对照。图3为同源双交换示意图。

由于以PCR随机检查的6个接合子全部为双交换株, 本实验室敲除其他基因获得的几十个接合子也均为双交换株, 我们推测以该遗传操作系统获得

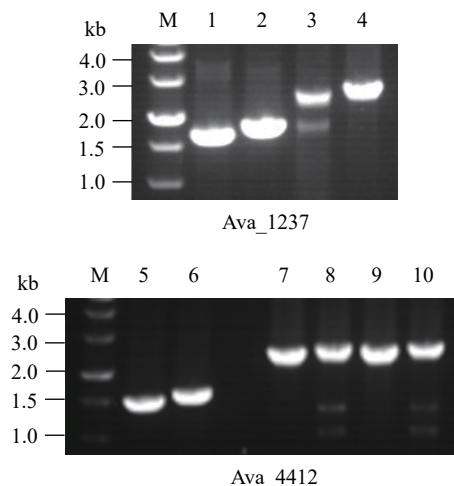


图2 突变株PCR检测结果

Fig. 2 PCR examination of mutants

M. 1 kb DNA分子量标准; 1. 野生型(引物为*ava_1237* p-1/p-4); 2. 野生型(引物为*ava_1237* p-5/p-6); 3、4. *Δava_1237*-1—2(引物为*ava_1237* p-5/p-6); 5. 野生型(引物为*ava_4412* p-1/p-4); 6. 野生型(引物为*ava_4412* p-5/p-6); 7—10. *Δava_4412*-1—4(引物为*ava_4412* p-5/p-6)

M. 1 kb DNA marker; 1. wt (primers *ava_1237* p-1/p-4); 2. wt (primers *ava_1237* p-5/p-6); 3, 4. *Δava_1237*-1—2 (primers *ava_1237* p-5/p-6); 5. wt (primers *ava_4412* p-1/p-4); 6. wt (primers *ava_4412* p-5/p-6); 7—10. *Δava_4412*-1—4 (primers *ava_4412* p-5/p-6)

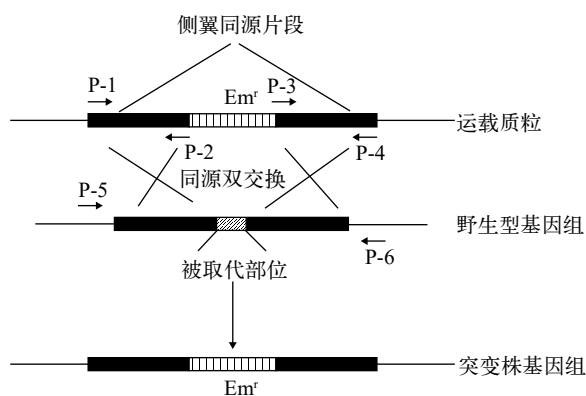


图3 同源双交换示意图

Fig. 3 Schematic diagram of homologous double crossover

的全部或绝大多数接合子均直接发生双交换。因此,可按所得到的抗性接合子数除以藻细胞数计算通过接合转移敲除基因的效率。结果显示,用辅助质粒pHB6088进行接合转移,获得基因 ava_4412 插入失活突变株的效率约为 4.95×10^{-8} ,基因 ava_1237 插入失活的效率约为 4.09×10^{-8} ,而以pRL623作为辅助质粒进行接合转移未得到接合子。

3 讨论

在丝状蓝藻中,通常利用接合转移的方法来开展遗传操作^[2],但接合转移仅提供一个外源DNA导入藻细胞的途径,DNA进入后能否在细胞内复制或整合还受多种因素的影响,尤其是藻株的限制修饰系统(R-M系统)^[12]。为了克服限制酶对外源DNA的降解,采用较多的方法是在导入蓝藻之前对DNA进行甲基化修饰从而逃脱蓝藻限制酶的切割^[20]。因此在辅助质粒上可克隆藻株的甲基化酶基因,在大肠杆菌对运载质粒进行甲基化保护,从而提高接合转移的效率。比如用于鱼腥藻PCC 7120接合转移的辅助质粒pRL623上就有三种甲基化酶基因(*M. Ava I*、*M. Eco47 II*和*M. EcoT22 I*),针对其三种限制酶(*Ava I*、*Ava II*和*Ava III*)进行甲基化保护,极大地提高了接合转移效率^[13]。本研究发现,应用丝状蓝藻辅助质粒pRL623在对多变鱼腥藻ATCC 29413接合转移时得不到接合子,通过克隆多变鱼腥藻ATCC 29413基因组中的两个甲基化酶基因(ava_3181 和 ava_4359),构建辅助质粒pHB6088,结果获得了接合子,相对而言在一定程度上促进了遗传操作的成功。此外,利用这个接合转移系统和辅助质粒pHB6088,我们又进行了19个未知功能基因敲除或失活并获得了成功。因此,辅助质粒pHB6088比pRL623更有利于对多变鱼腥藻ATCC 29413进行遗传操作。

有研究表明在蓝藻细胞中提取的质粒DNA由于被甲基化而不能转化基因型为 $mcrA^+$ 的*E. coli* DH5a^[21],这是由于在一些大肠杆菌株系中含有特异性降解甲基化DNA的限制酶系统^[22,23]。本研究构建的辅助质粒在尝试转入*E. coli* DH5a ($mcr^+ mrr^+$)菌株时无法得到转化子,而转入*E. coli* DH10B ($mcr^- mrr^-$)没有障碍,这也说明辅助质粒上的甲基化酶基因有表达,发挥了甲基化保护作用。

在蓝藻的接合转移中,一般运载质粒进入藻细胞后需要经历单交换和双交换两个过程的筛选^[24],现有文献报道的对多变鱼腥藻ATCC 29413基因敲除的研究也是要先发生单交换^[4-6]。但作者在基因敲除的过程中观察到,多变鱼腥藻ATCC 29413在某种条件下,可一步发生同源双交换,直接跳过单交换筛选得到插入失活突变株,这在一定程度上缩短了获得突变株的周期。通常接合转移效率是依据导入能自主复制的质粒获得接合子的数量来计算的,而本研究导入的是不能复制的质粒,进入细胞后一步发生双交换,所以获得接合子的频次不高。以一步发生双交换的概率来看,本文所构建的接合转移系统效率并不低。

我们对多变鱼腥藻ATCC 29413基因组序列搜索比较发现,该藻株也含有识别和切割特定位置甲基化DNA的Mrr限制系统(由 ava_B0091 基因编码)^[23,25]。推测如果运载质粒上有Mrr识别位点而目的基因侧翼片段和抗性基因上没有,很可能进入藻细胞的DNA质粒被部分切割、线性化,导致基因侧翼片段直接与目标基因进行同源双交换。因此,为了进一步提高该藻株的接合转移效率,构建Mrr限制系统缺陷藻株,消除Mrr限制系统对DNA的影响也是有必要的。

参考文献:

- [1] Thiel T, Pratte B S, Zhong J, *et al.* Complete genome sequence of *Anabaena variabilis* ATCC 29413 [J]. *Standards in Genomic Sciences*, 2014, **9**(3): 562-573.
- [2] Elhai J, Wolk C P. Conjugal transfer of DNA to cyanobacteria [J]. *Methods in Enzymology*, 1988, **167**(83): 747-754.
- [3] Maldener I, Lockau W, Cai Y, *et al.* Calcium-dependent protease of the cyanobacterium *Anabaena*: molecular cloning and expression of the gene in *Escherichia coli*, sequencing and site-directed mutagenesis [J]. *Molecular and General Genetics*, 1991, **225**(1): 113-120.
- [4] Mannan R M, Whitmarsh J, Nyman P, *et al.* B. Directed mutagenesis of an iron-sulfur protein of the photosystem I complex in the filamentous cyanobacterium *Anabaena variabilis* ATCC 29413 [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*, 1991, **88**(22): 10168-10172.
- [5] Happe T, Schutz K, Bohme H. Transcriptional and muta-

- tional analysis of the uptake hydrogenase of the filamentous cyanobacterium *Anabaena variabilis* ATCC 29413 [J]. *Journal of Bacteriology*, 2000, **182**(6): 1624-1631.
- [6] Chen K, Xu X, Gu L, *et al.* Simultaneous gene inactivation and promoter reporting in cyanobacteria [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2015, **99**(4): 1779-1793.
- [7] Wolk C P, Shaffer P W. Heterotrophic micro- and macro-cultures of a nitrogen-fixing cyanobacterium [J]. *Archives of Microbiology*, 1976, **110**(2-3): 145-147.
- [8] Yu L H, Guo H L, Xu X D. Heterotrophic growth of cyanobacteria expressing *lac* and *glk* genes [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2002, **26**(4): 363-369. [余利红, 郭厚良, 徐旭东. 表达*lac*和*glk*基因的蓝藻的异养生长 [J]. *水生生物学报*, 2002, **26**(4): 363-369.]
- [9] Ungerer J L, Pratte B S, Thiel T. Regulation of fructose transport and its effect on fructose toxicity in *Anabaena* spp. [J]. *Journal of Bacteriology*, 2008, **190**(24): 8115-8125.
- [10] Schmetterer G, Valladares A, Pils D, *et al.* The *coxBAC* operon encodes a cytochrome c oxidase required for heterotrophic growth in the cyanobacterium *Anabaena variabilis* strain ATCC 29413 [J]. *Journal of Bacteriology*, 2001, **183**(21): 6429-6434.
- [11] Varman A M, Xiao Y, Pakrasi H B, *et al.* strain PCC 6803 for isobutanol production [J]. *Applied Environmental Microbiology*, 2013, **79**(3): 908-914.
- [12] Herrero A, Elhai J, Hohn B, *et al.* Infrequent cleavage of cloned *Anabaena variabilis* DNA by restriction endonucleases from *A. variabilis* [J]. *Journal of Bacteriology*, 1984, **160**(2): 781-784.
- [13] Elhai J, Veprikitsky A, Muro-Pastor A M, *et al.* Reduction of conjugal transfer efficiency by three restriction activities of *Anabaena* sp. strain PCC 7120 [J]. *Journal of Bacteriology*, 1997, **179**(6): 1998-2005.
- [14] Allen M B, Arnon D I. Studies on nitrogen-fixing blue-green algae. I. growth and nitrogen fixation by *Anabaena cylindrica* Lemm [J]. *Plant Physiology*, 1955, **30**(4): 366-372.
- [15] Stainer R Y, Kunisawa R, Mandel M, *et al.* Purification and properties of unicellular blue-green algae (order *Chlorococcales*) [J]. *Bacteriology Reviews*, 1971, **35**(2): 171-205.
- [16] Gao H. Establishment of a copper-regulated gene expression platform and a novel insertional mutagenesis method in *Synechocystis* sp. PCC 6803 [D]. Wuhan: Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, 2007: 30-31. [高宏. 集胞藻PCC 6803铜离子调控表达平台和新型插入突变方法的建立 [D]. 武汉: 中国科学院水生生物研究所, 2007: 30-31.]
- [17] Inoue H, Nojima H, Okayama H. High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids [J]. *Gene*, 1990, **96**(1): 23-28.
- [18] Russell D W, Sambrook J. Molecular Cloning: A Laboratory Manual [M]. Cold Spring Harbor, 2001: 1-161.
- [19] Wolk C P, Cai Y, Cardemil L, *et al.* Isolation and complementation of mutants of *Anabaena* sp. strain PCC 7120 unable to grow aerobically on dinitrogen [J]. *Journal of Bacteriology*, 1988, **170**(3): 1239-1244.
- [20] Zhang G, Wang W, Deng A, *et al.* A mimicking-of-DNA-methylation-patterns pipeline for overcoming the restriction barrier of bacteria [J]. *PLoS Genetics*, 2012, **8**(9): 987-1002.
- [21] Kreps S, Ferino F, Mosrin C, *et al.* Conjugative transfer and autonomous replication of a promiscuous IncQ plasmid in the cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6803 [J]. *Molecular and General Genetics*, 1990, **221**(1): 129-133.
- [22] Raleigh E A. Organization and function of the *mcrBC* genes of *Escherichia coli* K-12 [J]. *Molecular Microbiology*, 2010, **6**(9): 1079-1086.
- [23] Waite-Rees P A, Keating C J, Moran L S, *et al.* Characterization and expression of the *Escherichia coli* Mrr restriction system [J]. *Journal of Bacteriology*, 1991, **173**(16): 5207-5219.
- [24] Cai Y P, Wolk C P. Use of a conditionally lethal gene in *Anabaena* sp. strain PCC 7120 to select for double recombinants and to entrap insertion sequences [J]. *Journal of Bacteriology*, 1990, **172**(6): 3138-3145.
- [25] Bourges A, Torres M. O E, Ghosh A, *et al.* Pressure induced SOS response in *Escherichia coli*, involves Mrr restriction endonuclease [J]. *Biophysical Journal*, 2017, **112**(3): 572a-573a.

ONE-STEP GENE INTERRUPTION IN *ANABAENA VARIABILIS* ATCC 29413

LEI Qi-Qin^{1,2}, JI Shui-Ling¹, HUANG Ren-Heng¹, GAO Hong¹, XU Xu-Dong¹ and KONG Ren-Qiu¹

(1. Key Laboratory of Algal Biology, Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072, China; 2. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract: There is the potential for *Anabaena variabilis* ATCC29413 to be developed into a model strain for studies of heterocyst-forming cyanobacteria that can grow heterotrophically. However, partially due to the restriction-modification systems in cells, the efficiency of gene transfer into this strain is extremely low. To this end, we cloned the two methylase genes, *ava_3181* (M. AvaI) and *ava_4359* (M. AvrII), of *A. variabilis* ATCC 29413 and constructed the helper plasmid pHB6088 to protect cargo plasmids from cleavage by restriction enzymes. Taking *ava_1237* and *ava_4412* as the examples, this study showed that conjugation with this helper plasmid can allow genes to be interrupted in one step through homologous recombination in *A. variabilis* ATCC 29413.

Key words: *Anabaena variabilis* ATCC 29413; Conjugation; Helper plasmid; Methylase genes; Gene interruption