

Slr0351 的表达及其在 *Synechocystis* sp. PCC 6803 中功能的初步研究

马 琼^{1,2*}, 郑小江^{1,2}, 赵开弘³, 周 明³, 王胜鹏⁴

(1. 湖北民族学院生物资源保护与利用湖北省重点实验室,湖北 恩施 445000;

2. 湖北民族学院生物科学与技术学院,湖北 恩施 445000;

3. 华中农业大学农业微生物学国家重点实验室,湖北 武汉 430070;

4. 湖北省农业科学院果树茶叶研究所,湖北 武汉 430071)

摘要: Slr0351 是 *Synechocystis* sp. PCC 6803 中的未知功能蛋白,其同源蛋白广泛存在于各种蓝藻和铁硫杆菌中。为了确定 Slr0351 的性质,构建了表达质粒 pET-slr0351,并在 *E. coli* 中表达 Slr0351。在无氧条件下采用亲和层析纯化方法获得了 Slr0351,无氧条件下 Slr0351 呈棕红色,在 460 nm 处有[2Fe-2S]铁硫簇的特征吸收峰,棕红色 Slr0351 对氧气敏感,能被连二亚硫酸钠还原,由此表明 Slr0351 为铁硫蛋白。为了获知 slr0351 的功能,基于基因同源重组交换的原理,利用 Kana 抗性片段替换 slr0351,将 *Synechocystis* sp. PCC 6803 中的 slr0351 基因缺失,构建了 Δ slr0351 突变体。利用紫外-可见吸收光谱仪扫描了 Δ slr0351 与野生型 *Synechocystis* sp. PCC 6803(WT)的吸收光谱,发现正常光照条件下 Δ slr0351 的叶绿素 a 仅为 WT 的 68.8%,slr0351 的缺失使蓝藻中叶绿素 a 含量降低。比较了藻细胞在缺乏不同营养元素和不同光照条件下的生长速率差异,与 WT 相比, Δ slr0351 具有如下特征:(1)对缺 Fe 和缺 S 胁迫条件更敏感;(2)在弱光照条件下 Δ slr0351 的光能利用效率和生长速率更低,该现象与 Δ slr0351 中叶绿素 a 含量的降低有关。

关键词: 蓝藻; *Synechocystis* sp. PCC 6803; Slr0351; 铁硫蛋白

中图分类号: Q 753; S 917.3

文献标志码: A

集胞藻 *Synechocystis* sp. PCC 6803 为单细胞蓝藻,细胞结构简单,遗传背景清楚,具有外源 DNA 自然转化性质,能与外源基因进行高频同源重组。Slr0351 是 *Synechocystis* sp. PCC 6803 中的未知功能蛋白^[1],利用 Slr0351 的氨基酸序列在 NCBI 上进行同源性搜索,发现其同源蛋白广泛存在于各种蓝藻和铁硫杆菌中,且 Slr0351 与念珠海绵杆菌 WGA-A3 中的琥珀酸脱氢酶铁硫蛋白 SdhB 亚基的同源性高达 38%,SdhB 亚基作为琥珀酸脱氢酶的主要组成部分,其铁硫簇中心通过参与脱氢和电子传递过程,影响细胞的呼吸作用。

铁硫蛋白基于铁硫簇具备优异的电子传递功

能,在许多生命活动过程中扮演着重要角色,生物体中主要的铁硫蛋白包括呼吸链复合体(I、II、III)、光合作用中的光系统 I 以及铁氧还蛋白^[2]。铁硫簇既可在生物体内合成,也可在体外进行人工组装。铁硫蛋白在体外对氧特别敏感,容易发生不可逆氧化失活。在厌氧条件下,体外添加适当浓度的 $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ 和 S^{2-} ,可以有效地把铁硫簇人工组装到辅基蛋白中形成铁硫蛋白^[2-3]。

本研究利用分子生物学的方法,构建了表达质粒 pET-slr0351,并在 *E. coli* BL21 中表达 Slr0351,在无氧条件下利用镍柱亲和层析纯化 Slr0351,分析了无氧条件下铁硫蛋白 Slr0351 的吸收光谱性

收稿日期:2014-06-09 修回日期:2014-10-10

资助项目:湖北省自然科学基金面上项目(2014CFB400);国家自然科学基金(31070743,31400586);湖北民族学院科技创新团队项目(MY2014T005);湖北民族学院博士科研启动基金项目(MY2013B013);湖北民族学院林学省级重点学科

通信作者:马 琼,E-mail:maqiong110@126.com

质。利用同源重组交换技术构建了 $\Delta slr0351$ 突变体,研究了 $\Delta slr0351$ 与野生型 *Synechocystis* sp. PCC 6803 (Wild Type, 简称 WT) 的吸收光谱性质。比较了不同营养元素缺乏条件下或不同光照条件下藻细胞的生长速率差异,从而确定 *slr0351* 在 *Synechocystis* sp. PCC 6803 中的功能。

1 材料与方法

1.1 Slr0351 的表达及吸收光谱分析

表达质粒的构建 根据 *slr0351* 核苷酸序列设计克隆引物 P1 和 P2 (表 1), 以 *Synechocystis* sp. PCC 6803 基因组 DNA 为模板, PCR 扩增 *slr0351*, 将 *slr0351* 连接到 pET-30a(+) 表达载体中, 获得表达质粒 pET-*slr0351*。将 pET-*slr0351* 转化 *E. coli* BL21, 在含有卡那霉素抗性的平板上筛选阳性重组子, 利用酶切图谱和核苷酸序列测

序鉴定阳性重组子。

蛋白表达与纯化 将 pET-*slr0351* 转化 *E. coli* BL21, 在含有卡那霉素抗性的平板上筛选转化子, 挑取单克隆于 5 mL 新鲜 LB 培养液中培养至 $OD_{600\text{ nm}}$ 为 0.5 ~ 0.6, 然后转接入 250 mL LB 培养液中, 37 °C 培养至 $OD_{600\text{ nm}}$ 为 0.6 ~ 0.8。加入 1 mmol/L IPTG, 摇床转速为 150 r/min, 低温诱导表达 10 ~ 12 h, 离心, 收集细胞并用蒸馏水洗涤 2 次, 用 Tris-HCl 缓冲液 (5 mmol/L DDT, 50 mmol/L NaCl, 10 mmol/L $MgCl_2$, pH 8.0) 重悬细胞, 加入 100 $\mu\text{mol/L}$ Na_2S 和 $Fe(NH_4)_2(SO_4)_2 \cdot 6H_2O$ [4]。将新鲜细胞破碎, 在厌氧操作箱 (< 4 ppm O_2 , 18 °C) 中采用镍柱亲和层析法纯化蛋白 [5], 纯化蛋白经 SDS-PAGE 鉴定目的蛋白的表达情况, 并利用 Perkin-Elmer Lambda 25 紫外-可见吸收光谱仪测定蛋白质的吸收光谱 [6]。

表 1 构建质粒所用引物

Tab. 1 Primers for construction plasmids

引物 primer	序列 sequences	DNA 片段 DNA fragment
P1	5'TATAGA <u>AATTC</u> GTGGATCCACGGCTCACTTTTGCG 3'	<i>slr0351</i>
P2	5'CGT <u>CTCG</u> AGTTAGCCCGCATTGGTAAATTGCCTAT 3'	
P3	5'ACACTCGAGACAGCACGGACATCACAGATAGC 3'	<i>slr0351</i> 上游同源臂
P4	5'ATCAAGCTTGTGGAGCGATACCGAACT 3'	
P5	5'TATGATATCACCAATGGCGGGCTAAATCGTAAACT 3'	<i>slr0351</i> 下游同源臂
P6	5'ATCGGATCCCTCTGTCTATCAATCTGCATCG 3'	

注:带下划线的碱基序列为酶切位点

Notes: the underlined base sequences as restriction enzyme site

1.2 蓝藻菌株及突变体的构建

Synechocystis sp. PCC 6803 购自中国科学院典型培养物保藏委员会淡水藻种库, 采用同源重组交换技术构建 $\Delta slr0351$ 突变体。为了获知 $\Delta slr0351$ 的表型, 确定 *slr0351* 的功能, 设定野生型 (WT) 和突变体 $\Delta slr0351$ 的培养条件 [7-8]: BG11 培养基, 30 °C, 正常光照 (Medium Light, 简称 ML) 光强 50 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$, CO_2 0.03%, 150 r/min, 弱光 (Low Light, 简称 LL) 光强 10 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$, 强光 (High Light, 简称 HL) 光强 200 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 。BG11 培养基分别缺乏 C、P、N、Fe、S 等元素形成相应的缺乏营养元素培养基。

突变体的构建 以 *slr0351* 为中心, 向上游延伸 970 bp 作为 *slr0351* 的上游同源臂 (upper-stream arm), 向下游延伸 960 bp 作为 *slr0351* 的下游同源臂 (down-stream arm)。在上游同源臂的两

端设计引物 P3 和 P4 (表 1), 在下游同源臂的两端设计引物 P5 和 P6。以 *Synechocystis* sp. PCC 6803 基因组 DNA 为模板, 以 P3 和 P4 为引物, PCR 扩增 *slr0351* 基因的上游同源臂, 将 PCR 产物连接到 pBluescript SK(+) 中, 在含有氨苄青霉素抗性的 LB 平板上筛选 pBlu-上游同源臂。以 P5 和 P6 为引物 (表 1), PCR 扩增 *slr0351* 的下游同源臂, 将下游同源臂连接到已构建成功的 pBlu-上游同源臂中, 获得 pBlu-上游同源臂-下游同源臂, 简称 pBlue-neighboring。然后利用 EcoRV 酶切 pBlu-上游同源臂-下游同源臂, 与同样用 EcoRV 从 pCOLADuet 上切下自带启动子的 Kana (kanamycin resistance gene) 抗性片断连接, 在含有 Kana 抗性的 LB 平板上筛选, 得到 pBlu-上游同源臂-Kana-下游同源臂, 简称 pBlue-neighboring-Kana。将该重组质粒转化 *Synechocystis* sp. PCC 6803, 在含有

Kana 抗性的平板上筛选阳性转化子 $\Delta slr0351$, 利用 PCR 技术鉴定阳性转化子^[9]。

生长曲线的测定 取 WT 及 $\Delta slr0351$ 对数期的藻细胞, 5 000 r/min 离心 2 min, 在无菌条件下用 BG11 培养基和相应的缺乏营养元素培养基洗涤藻细胞 3 次, 按 2% 接种量转接于新鲜 BG11 培养基和相应的缺乏营养元素培养基, 每种培养基做 3 个重复, 置于 30 °C 恒温光照培养箱中培养, 每隔 12 h 取样测定藻液在 730 nm 处的光密度值 $OD_{730\text{ nm}}$ 。

2 结果与分析

2.1 Slr0351 的鉴定及其吸收光谱性质

在 *E. coli* 中表达 Slr0351, 无氧条件下纯化获

得棕红色蛋白质, 棕红色蛋白质经 SDS-PAGE, 检测到了 50 kD 大小的条带(图 1-a), 与 Slr0351 的分子量大小一致。扫描棕红色蛋白质溶液的吸收光谱(图 1-b), Slr0351 在 460 nm 处有明显的吸收峰, 为铁硫簇 [2Fe - 2S] 的特征吸收峰^[10-11], 由此表明 Slr0351 与铁硫簇在厌氧提纯过程中重组成功, Slr0351 为铁硫蛋白。将铁硫蛋白 Slr0351 在空气中放置 3 h 后, 其颜色由棕红色变成无色, 扫描无色蛋白质溶液的吸收光谱, 其在 460 nm 处的吸收峰大大降低。当铁硫蛋白 Slr0351 用连二亚硫酸钠 (5 mmol/L, pH 7.5) 还原, 铁硫蛋白 Slr0351 由红棕色变成无色, 测定还原产物的吸收光谱, 还原产物在 460 nm 处的吸收峰消失。

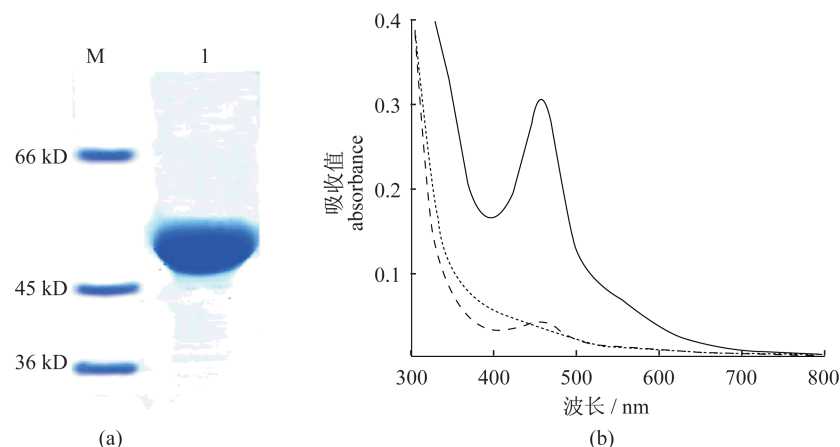


图 1 Slr0351 的 SDS-PAGE 图谱以及吸收光谱

(a) M: 蛋白质分子量标准, 1: Slr0351 蛋白质样品; (b) 铁硫蛋白 Slr0351 (实线)、铁硫蛋白 Slr0351 在空气中放置 3 h 后 (虚线) 以及经 5 mM 连二亚硫酸钠还原后 (点线) 的吸收光谱

Fig. 1 SDS-PAGE and absorption spectra of Slr0351

(a) M: Protein molecular weight marker, 1: Slr0351; (b) Absorption spectra of iron-sulfur protein Slr0351 (solid line), placed in the air for 3 h (dashed line) or reduction with 5 mM sodium dithionite (dotted line)

2.2 $\Delta slr0351$ 突变体的构建

为了缺失集胞藻 PCC 6803 的 *slr0351* 基因, 构建了含有 *slr0351* 上下游同源臂和 Kana 片断的质粒 pBlue-neighboring-Kana。由于 Kana 片断两端均含有 EcoRV 酶切位点, 利用 EcoRV 酶切 pBlue-neighboring-Kana, 酶切产物经琼脂糖凝胶电泳(图 2-a), 泳道中第一条带显示的是 pBlue-neighboring 的大小为 4 830 bp, 第二条带显示的是 Kana 片断的大小为 1 790 bp, 与预期结果相符。

将质粒 pBlue-neighboring-Kana 转化集胞藻 PCC 6803, 在 Kana 抗性平板上筛选阳性转化子,

获得了 *slr0351* 与 Kana 同源交换成功的 $\Delta slr0351$ 突变体, 绘制其同源重组交换原理(图 2-b)。以 $\Delta slr0351$ 或 WT 的基因组 DNA 为模板, 利用 P3 和 P6 为引物进行 PCR, PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳, 第 1 条泳道和第 2 条泳道为 WT 的 PCR 产物, 其 DNA 片段大小为 3 130 bp, 与上游同源臂-*slr0351*-下游同源臂的大小一致; 第 3 条泳道和第 4 条泳道为 $\Delta slr0351$ 的 PCR 产物, 其 DNA 片段大小为 3 720 bp, 与上游同源臂-Kana-下游同源臂的大小一致(图 2-c), 由此表明 *Synechocystis* sp. PCC 6803 中的 *slr0351* 被 Kana 抗性片段替换, $\Delta slr0351$ 构建成功。

2.3 *slr0351* 的缺失影响蓝藻中叶绿素 a 和类胡萝卜素的含量

在正常光照条件下培养藻细胞,发现相同 OD_{730 nm} 的藻细胞 $\Delta slr0351$ 的颜色与 WT 相比偏黄(图 3-a)。实验分析了藻细胞、藻细胞经 100% 丙酮萃取脂溶性色素后上清的吸收光谱(图 3-b, c)。 $\Delta slr0351$ 藻细胞中叶绿素 a 的吸收峰稍低于 WT,而类胡萝卜素的吸收峰稍高于 WT(图 3-b)。藻细胞经丙酮萃取后叶绿素 a 和类胡萝卜素的吸收峰均发生了蓝移,叶绿素 a 的吸收峰由 681 nm 蓝移至 663 nm,类胡萝卜素的吸收峰由 498 nm

蓝移至 478 nm; $\Delta slr0351$ 中叶绿素 a 的含量为 7.249 mg/mL,WT 中叶绿素 a 的含量为 10.530 mg/mL, $\Delta slr0351$ 的叶绿素 a 仅为 WT 的 68.8%, $\Delta slr0351$ 中叶绿素 a 的吸收峰明显低于 WT,而 $\Delta slr0351$ 中类胡萝卜素的吸收峰却明显高于 WT(图 3-c)。由此可知,*slr0351* 的缺失使蓝藻中叶绿素 a 含量降低,使类胡萝卜素的含量升高。 $\Delta slr0351$ 和 WT 中叶绿素 a 和类胡萝卜素在藻细胞中的含量不同,也就解释了两种藻细胞颜色的差异(图 3-a)。

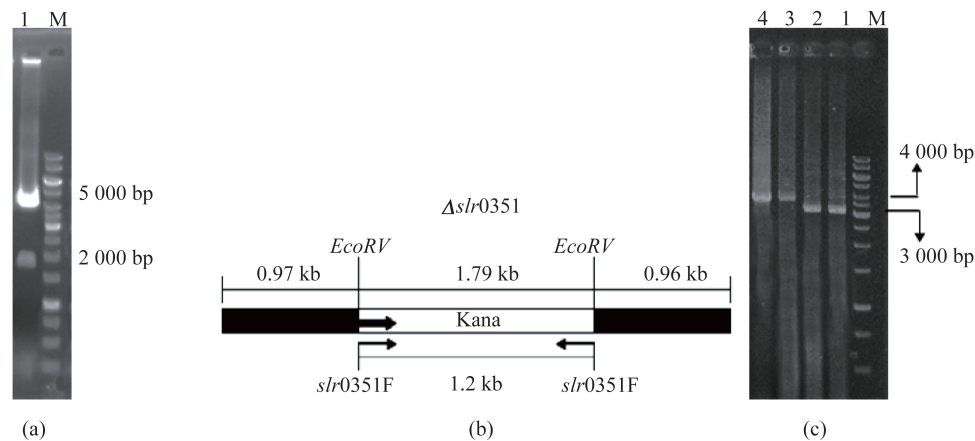


图 2 构建 $\Delta slr0351$ 的琼脂糖凝胶电泳分析

(a) pBlue-neighboring-Kana 的酶切图谱, M: 1 kb DNA 标准; 1: pBlue-neighboring-Kana 酶切产物; (b) $\Delta slr0351$ 构建原理示意图; (c) $\Delta slr0351$ 的 PCR 检测, M: 1 kb DNA 标准; 1 和 2: WT PCR 产物; 3 和 4: $\Delta slr0351$ PCR 产物

Fig. 2 Agarose gel electrophoresis analysis for constructing $\Delta slr0351$

(a) agarose gel electrophoresis of the digested pBlue-neighboring-Kana. M: 1 kb DNA ladder. 1: digested products of pBlue-neighboring-Kana; (b) construction scheme of $\Delta slr0351$; (c) detection of PCR products of $\Delta slr0351$ and WT. M: 1 kb DNA ladder. 1 and 2: PCR products of WT. 3 and 4: PCR products of $\Delta slr0351$

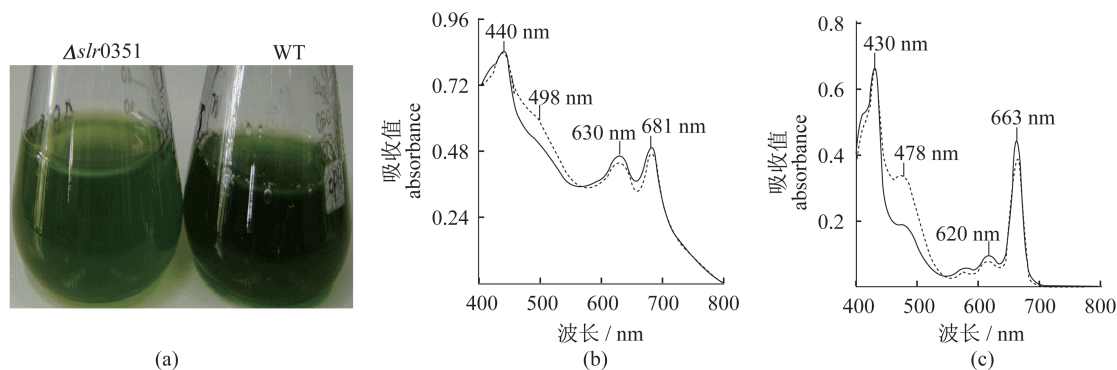


图 3 $\Delta slr0351$ 和 WT 的颜色及其吸收光谱

(a) 藻细胞的颜色; (b) 藻细胞的吸收光谱; (c) 藻细胞经丙酮萃取后的吸收光谱,其中实线为 WT,点线为 $\Delta slr0351$

Fig. 3 The color and absorption spectra of $\Delta slr0351$ and WT

(a) color of *Synechocystis* cells; (b) absorption spectra of *Synechocystis* cells; (c) the supernatant after *Synechocystis* cell extraction with 100% acetone. Solid line: WT; Dotted line: $\Delta slr0351$

2.4 不同营养条件下 WT 和 $\Delta slr0351$ 的生长曲线

在标准 BG11 培养基中 ML 光照条件下, $\Delta slr0351$ 的生长速率稍慢于 WT (图 4-a)。与藻细胞在标准 BG11 中培养相比, 在缺乏 CO_3^{2-} (图 4-b)、缺乏 P (图 4-c) 营养的 BG11 中 $\Delta slr0351$ 生长速率比 WT 更慢, 由此表明在缺失 *slr0351* 的条件下, 藻细胞对培养基中的 C 和 P 元素等大量元素的需求量升高了。值得注意的是在 BG11 缺乏 Fe 元素的情况下, $\Delta slr0351$ 的生长速率明显低于

WT 的生长速率 (图 4-d)。适当浓度的氮营养对蓝藻的生长是十分必要的, 实验结果表明氮营养缺乏对 *Synechocystis* sp. PCC 6803 的生长影响较大 (图 4-e), 有趣的是, 硫缺乏对 *Synechocystis* sp. PCC 6803 生长的影响趋势与氮缺乏类似。在硫缺乏条件下, $\Delta slr0351$ 的最大吸收值仅为 0.27, 而 WT 的最大吸收值达 0.51 (图 4-f)。可见 $\Delta slr0351$ 对缺硫胁迫条件十分敏感, 铁营养缺乏亦对 $\Delta slr0351$ 的生长影响较大, 该现象与 *Slr0351* 为铁硫蛋白有较大关系。

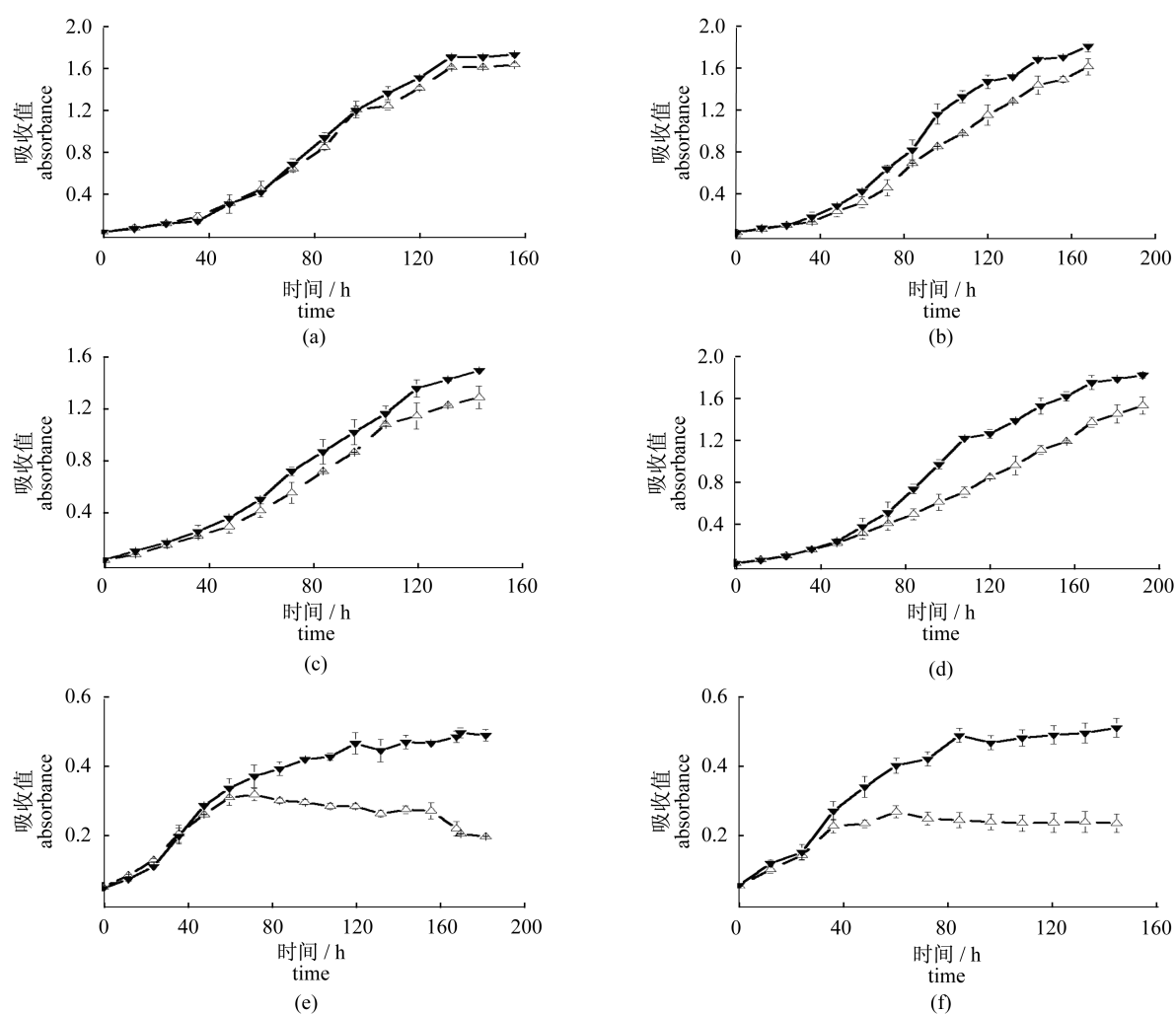


图 4 不同营养条件下 $\Delta slr0351$ 和 WT 的生长曲线

在正常 BG11 培养基 (a)、缺 C (b)、缺 P (c)、缺 Fe (d)、缺 N (e) 和缺 S (f) 元素的 BG11 中 $\Delta slr0351$ 突变体 (Δ) 与 WT (\blacktriangledown) 的生长曲线

Fig. 4 The growth curve of $\Delta slr0351$ and WT in different nutrition conditions

The growth curve of $\Delta slr0351$ (Δ) and WT (\blacktriangledown) in standard BG11 (a), BG11 lacking of carbon (b), phosphorus (c), iron (d), nitrogen (e) and sulfur (f)

2.5 *slr0351* 的缺失影响藻细胞在强、弱光照条件下的光能利用效率

在强光照 (HL) 条件下, $\Delta slr0351$ 与 WT 的生

长速率基本一致 (图 5-a); 在正常光照 (ML) 条件下, $\Delta slr0351$ 的生长速率仅稍慢于 WT (图 4-a); 而在弱光照 (LL) 条件下, $\Delta slr0351$ 的生长速率明

显低于 WT(图 5-b),由此表明 *slr0351* 基因的缺失在强光照条件下不影响藻细胞的光能利用效率,而在弱光照条件下对藻细胞的光能利用效率有较大影响,该现象可能与 $\Delta slr0351$ 中叶绿素 a 含量的降低有关。在 HL 或 ML 条件下,即使 $\Delta slr0351$ 中叶绿素 a 含量降低,但足够的光照条

件使得 $\Delta slr0351$ 的光合营养不受影响或影响较小,因此 $\Delta slr0351$ 的生长速率与 WT 基本一致或稍慢于 WT;但在 LL 条件下,由于光照强度不足,加之 $\Delta slr0351$ 的叶绿素 a 含量降低,使 $\Delta slr0351$ 的光合营养受到较大影响,其生长速率明显低于 WT。

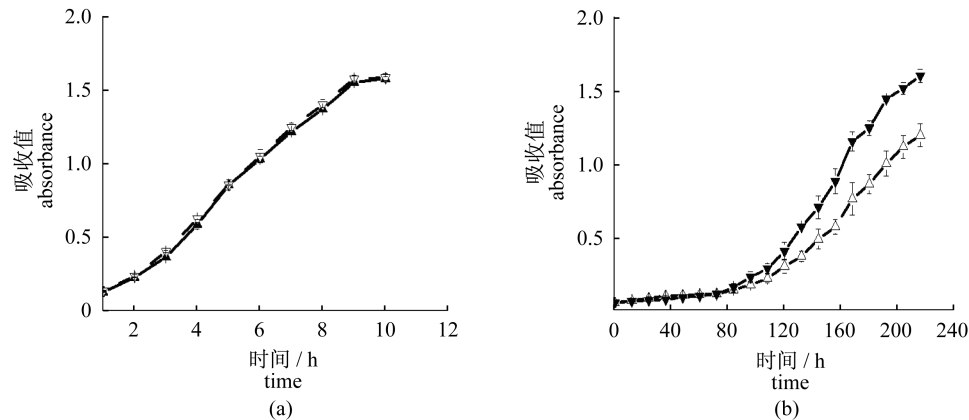


图 5 不同光照条件下 $\Delta slr0351$ 与 WT 的生长曲线

(a)在强光照条件下 $\Delta slr0351$ 突变体(Δ)与 WT(\blacktriangledown)的生长曲线;(b)在弱光照条件下 $\Delta slr0351$ 突变体(Δ)与 WT(\blacktriangledown)的生长曲线

Fig. 5 The growth curve of $\Delta slr0351$ and WT under different light conditions

(a)The growth curve of $\Delta slr0351$ (Δ)and WT (\blacktriangledown) under HL condition; (b)The growth curve of $\Delta slr0351$ (Δ)and WT (\blacktriangledown) under LL condition

3 讨论

利用分子生物学的方法和技术,构建了铁硫蛋白基因 *slr0351* 的表达质粒 pET-*slr0351*,并在 *E. coli* BL21 中成功表达了 Slr0351。在无氧条件下纯化 Slr0351,将 Slr0351 与 S^{2-} 、 Fe^{2+}/Fe^{3+} 在体外重组,获得了重组 [2Fe - 2S] 的铁硫蛋白 Slr0351。利用抗氧化剂连二亚硫酸钠还原铁硫蛋白^[13-14],Slr0351 在 460 nm 处的特征吸收峰消失,进一步证明了铁硫蛋白 Slr0351 在 O_2 存在时不稳定,该现象与大肠杆菌琥珀酸脱氢酶铁硫蛋白 SdhB 亚基对氧气敏感现象类似^[12-13]。

为了进一步研究 Slr0351 的功能,利用 DNA 同源重组技术,以 Kana 基因替换 *Synechocystis* sp. PCC 6803 中 *slr0351* 基因,获得了 $\Delta slr0351$ 突变体。蓝藻的颜色主要由藻细胞中的叶绿素 a、藻胆色素和类胡萝卜素所决定,它们吸收不同波长的可见光,均有特定的吸收峰^[14],叶绿素 a 呈绿色,类胡萝卜素多为橘黄色或橙色。与 WT 相比, $\Delta slr0351$ 中叶绿素 a 含量降低,类胡萝卜素含

量升高,也就解释了 $\Delta slr0351$ 颜色偏黄的原因。利用缺营养元素培养基培养藻细胞,发现 $\Delta slr0351$ 对铁胁迫和硫胁迫十分敏感,该现象与 Slr0351 为铁硫蛋白有较大关系。叶绿素 a 是蓝藻捕获光能的主要光合色素,藻胆色素和类胡萝卜素也起着捕获光能的作用^[15-16]。在正常光照、弱光照和强光照条件下培养藻细胞,发现 *slr0351* 基因的缺失明显降低了弱光照条件下 *Synechocystis* sp. PCC 6803 的光能利用效率,这一点与 $\Delta slr0351$ 中叶绿素 a 含量的降低有关。研究报道^[17-18]大肠杆菌琥珀酸脱氢酶的铁硫蛋白 SdhB 亚基的突变会引起基因功能的紊乱,进而影响细胞呼吸作用,使细胞过早衰老^[19-20]。由此可以推断 *slr0351* 基因的缺失不仅影响藻细胞的光合作用过程,还可能对呼吸作用造成影响,其功能有待进一步深入研究。

集胞藻 PCC 6803 是引起淡水水华的藻种之一,属于混合营养型微生物,既能进行异养生长,又能利用光能进行自养生长。一旦光照和营养条件适宜,就会大量生长繁殖,形成水华。本实验研

究了影响集胞藻 PCC 6803 光能利用效率的铁硫蛋白基因 *slr0351* 的性质和功能,为蓝藻基因功能的分子生物学研究提供基础,同时也为控制淡水水体中蓝藻的过度生长、防治蓝藻水华污染提供依据。

参考文献:

- [1] Sato S, Shimoda Y, Muraki A, *et al.* A Large-scale protein-protein interaction analysis in *Synechocystis* sp. PCC 6803 [J]. DNA Research, 2007, 14 (5) : 207 - 216.
- [2] Imsande J. Iron-sulfur clusters: Formation, perturbation, and physiological functions [J]. Plant Physiology and Biochemistry, 1999, 37(2) : 87 - 97.
- [3] Gerber J, Lill R. Biogenesis of iron-sulfur proteins in eukaryotes: components, mechanism and pathology [J]. Mitochondrion, 2002, 2(1 - 2) : 71 - 86.
- [4] Garland S A, Hoff K, Vickery L E, *et al.* Saccharomyces cerevisiae ISU1 and ISU2: members of a well-conserved gene Family for iron-sulfur cluster assembly [J]. Journal of Molecular Biology, 1999, 294(4) : 897 - 907.
- [5] Le'on S, Touraine B, Briat J F, *et al.* Mitochondrial localization of Arabidopsis thaliana Isu Fe - S scaffold proteins [J]. FEBS Letters, 2005, 579 (9) : 1930 - 1934.
- [6] Duschene K S, Broderick J B. The antiviral protein viperin is a radical SAM enzyme [J]. FEBS Letters, 2010, 584(6) : 1263 - 1267.
- [7] Zhang J, Sun Y F, Zhao K H, *et al.* Identification of amino acid residues essential to the activity of lyase CpcT1 from *Nostoc* sp. PCC7120 [J]. Gene, 2012, 511(1) : 88 - 95.
- [8] Zhang J, Wu X J, Wang Z B, *et al.* Fused-gene approach to photoswitchable and fluorescent biliproteins [J]. Angewandte Chemie International Edition, 2010, 49(32) : 5456 - 5458.
- [9] Wang X, Dong L L, Zhang C X, *et al.* Sll1466, a glycosyl transferase homolog involved in global cellular regulation and high-light tolerance of *Synechocystis* PCC 6803 [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2011, 408 (4) : 674 - 679.
- [10] Brindley A A, Zajicek R, Warren M J, *et al.* NirJ, a radical SAM family member of the d1 heme biogenesis cluster [J]. FEBS Letters, 2010, 584(11) : 2461 - 2466.
- [11] Lill R, Dutkiewicz R, Elsässer H P, *et al.* Mechanisms of iron-sulfur protein maturation in mitochondria, cytosol and nucleus of eukaryotes [J]. Biochimica et Biophysica Acta, 2006, 1763 (7) : 652 - 667.
- [12] Hewitson K S, Baldwin J E, Shaw N M, *et al.* Mutagenesis of the proposed iron-sulfur cluster binding ligands in *Escherichia coli* biotin synthase [J]. FEBS Letters, 2000, 466(2 - 3) : 372 - 376.
- [13] Kurihara T, Mihara H, Kato S, *et al.* Assembly of iron-sulfur clusters mediated by cysteine desulfurases, IscS, CsdB and CSD, from *Escherichia coli* [J]. Biochimica et Biophysica Acta, 2003, 1647 (1 - 2) : 303 - 309.
- [14] Richaud C, Zabulon G, Joder A, *et al.* Nitrogen or sulfur starvation differentially affects phycobilisome degradation and expression of the nblA gene in *Synechocystis* strain PCC 6803. Journal of Bacteriology [J], 2011, 183(10) : 2989 - 2994.
- [15] Pietsch D, Staiger D, Pistorius E K, *et al.* Characterization of the putative iron sulfur protein IdiC (ORF5) in *Synechococcus elongatus* PCC 7942 [J]. Photosynthesis Research, 2007, 94 (1) : 91 - 108.
- [16] Laudenbach D E, Grossman A R. Characterization and mutagenesis of sulfur-regulated genes in a Cyanobacterium: Evidence for function in sulfate transport [J]. Journal of Bacteriology, 1991, 173(9) : 2739 - 2750.
- [17] Wang T, Shen G, Balasubramanian R, *et al.* The sufR gene (sll0088 in *Synechocystis* sp. strain PCC 6803) functions as a repressor of the sufBCDS operon in iron-sulfur cluster biogenesis in cyanobacteria [J]. Journal of Bacteriology, 2004, 186(4) : 956 - 67.
- [18] Tu C J, Shrage J, Burnap R L, *et al.* Consequences of a deletion in dspA on transcript accumulation in *Synechocystis* sp. Strain PCC 6803 [J]. Journal of Bacteriology, 2004, 186(12) : 3889 - 3902.
- [19] Seki A, Nakano T, Takahashi H, *et al.* Light-responsive transcriptional regulation of the suf promoters involved in cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 Fe - S cluster biogenesis [J]. FEBS Letters, 2006, 580(21) : 5044 - 5048.
- [20] Tang K, Zeng X L, Yang Y, *et al.* A minimal phycobilisome: Fusion and chromophorylation of the truncated core-membrane linker and phycocyanin [J]. Biochimica et Biophysica Acta, 2012, 1817(7) : 1030 - 1036.

Expression and preliminary function analysis of Slr0351 in *Synechocystis* sp. PCC 6803

MA Qiong^{1,2*}, ZHENG Xiaojiang^{1,2}, ZHAO Kaihong³, ZHOU Ming³, WANG Shengpeng⁴

(1. Key Laboratory of Biologic Resources Protection and Utilization of Hubei Province, Hubei University for Nationalities, Enshi 445000, China;

2. Biological Scientific and Technical College, Hubei University for Nationalities, Enshi 445000, China;

3. State Key Laboratory of Agricultural Microbiology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China;

4. Institute of Fruit & Tea, Hubei Academy of Agricultural Science, Wuhan 430071, China)

Abstract: Slr0351 is an unknown protein and its homologs exist widely in many cyanobacteria and iron-sulfur bacteria. We constructed pET-*slr0351* and expressed Slr0351 successfully in *E. coli* BL21. Using affinity chromatography purification, we obtained purified Slr0351. Under anaerobic conditions, Slr0351 was brown and had absorption peak at 460 nm, which was the characteristic absorption peak of 2Fe – 2S cluster. The brown Slr0351 is sensitive to oxygen and could be reduced with sodium dithionite, showing that Slr0351 was iron-sulfur protein. By homologous double-crossover, *slr0351* was replaced by Kana, resulting in the knockout mutant of *Synechocystis* sp. PCC 6803, Δ *slr0351*. Via scanning the absorption spectra of Δ *slr0351* and WT with ultraviolet-visible spectrometer, we found that chlorophyll a content of Δ *slr0351* is only 68.8% that of WT under the medium light condition. The depletion of *slr0351* reducing the content of chlorophyll a in *Synechocystis* cells. Compared the growth rate of cyanobacteria under different culture conditions, Δ *slr0351* showed the following changes compared to the wild type: (1) more sensitive to sulfur and iron starvation; (2) lower efficiency of light utilization and lower growth rate under LL conditions, which is related to the lower content of chlorophyll a in Δ *slr0351*. This paper is beneficial to gene function research of Cyanobacteria, and provides a certain reference value for the treatment of Cyanobacteria bloom and pollution in freshwater.

Key words: cyanobacteria; *Synechocystis* sp. PCC 6803; Slr0351; iron-sulfur protein

Corresponding author: MA Qiong. E-mail: maqiong110@126.com