

鱼腥蓝细菌 PCC 7120 *all3555* 基因超表达 和缺失突变体的构建及表型

李之萌 王 莉 陈雯莉

华中农业大学农业微生物学国家重点实验室, 武汉 430070

摘要 在鱼腥蓝细菌 PCC 7120 中, *all3555* 是一个乙酰羟酸合成酶的编码基因, 为研究该基因在鱼腥蓝细菌 PCC 7120 的生长和环境适应过程中的作用, 构建了该基因的超表达和缺失突变菌株, 结果显示该基因缺失后鱼腥蓝细菌 PCC 7120 仍可继续生长, 但对 NaCl 胁迫的敏感性有一定程度提高, 而超表达该基因则会提高鱼腥蓝细菌 PCC 7120 对氧化胁迫和 NaCl 胁迫的抗性, 表明 *all3555* 对鱼腥蓝细菌 PCC 7120 的正常生长影响较小, 但对菌株的抗氧化胁迫和抗 NaCl 胁迫等有重要作用。

关键词 鱼腥蓝细菌; 乙酰羟酸合成酶; *all3555*; 氧化胁迫; NaCl 胁迫; 基因超表达; 缺失突变体

中图分类号 Q 785 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2013)06-0021-06

支链氨基酸在生物的蛋白质合成中具有重要作用, 当其缺乏时将导致蛋白质合成停止, 进而造成动植物和微生物的生长受损甚至死亡。乙酰羟酸合成酶 (acetohydroxyacid synthase, AHAS, EC 2. 2. 1. 6, 曾用名 EC 4. 1. 3. 18) 在支链氨基酸 (缬氨酸, 亮氨酸和异亮氨酸) 合成代谢中扮演着重要角色, 其催化合成途径中的第一步反应。焦磷酸硫胺素 (TPP) 和黄素腺嘌呤二核苷酸 (FAD) 作为 AHAS 的辅助因子在其催化反应中非常关键, 镁离子也对其催化活性有着重要影响。同时反应生成的乙酰乳酸通过乙酰乳酸脱羧酶 (ALDC) 的催化可以进一步生成 3-羟基丁酮 (acetoin)。

在集胞蓝细菌 PCC 6803 和聚球蓝细菌 PCC 7942 中编码 AHAS 基因的功能已经通过异源互补大肠杆菌营养缺陷型突变株得到证实^[1-2]。同时合成途径下游的乙酰羟酸还原异构酶 (AHAIR) 也在集胞蓝细菌 PCC 6803 中得到确认^[3]。在鱼腥蓝细菌 PCC 7120^[4] 中, 有 4 个基因编码 AHAS 同工酶: *all0427* (acetolactate synthase large subunit, *ilvB*)、*all3555* (acetolactate synthase, *ilvB*)、*all4613* (acetohydroxy acid synthase, *ilvG*) 和 *alr4627* (acetolactate synthase small subunit, *ilvN*), 其中 *all3555* 与集胞蓝细菌 PCC 6803 中的基因 *sll1981* 具有很高

的同源性^[5-6]。之前的研究^[7] 表明, *sll1981* 主要在对数生长末期和稳定期大量表达, 受到 pH 的调控, 可能影响集胞蓝细菌 PCC 6803 对于环境的适应能力。为探讨该基因在鱼腥蓝细菌 PCC 7120 的生长和环境适应过程中的作用, 本研究构建了该基因的超表达和缺失突变菌株, 并就 *all3555* 基因缺失和超表达对菌株抗胁迫能力的影响进行了分析。

1 材料与方 法

1.1 材 料

野生型鱼腥蓝细菌 (*Anabaena* PCC 7120) 和大肠杆菌 TG1 为笔者所在实验室保藏, 大肠杆菌 HB101/pRL528 和 J53/RP4 由 Wolk C P 先生 (MSU-DOE Plant Research Laboratory, Michigan State University) 惠赠。质粒 pBluescript SK-和 pRL25c-PpetE (pRL25c 质粒中插入了 *petE* 启动子) 为笔者所在实验室保藏, 质粒 pRL271 由 Wolk C P 先生惠赠。

1.2 主要试剂和仪器

PCR 引物合成和 DNA 序列测定由南京金斯瑞生物科技有限公司完成; *Taq* 酶购自北京庄盟国际生物基因科技有限公司, TA 克隆试剂盒、限制性内切酶以及 T4 连接酶购自 TaKaRa; 质粒抽提试剂

收稿日期: 2012-05-29

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30670046, 30970088) 和中央高校基本科研业务费专项 (2011PY090)

李之萌, 硕士研究生, 研究方向: 蓝细菌分子生物学. E-mail: steven725@sina.com

通讯作者: 陈雯莉, 博士, 教授. 研究方向: 微生物学. E-mail: wlchen@mail.hzau.edu.cn

盒、PCR 及胶回收试剂盒购自麦克莱博公司。

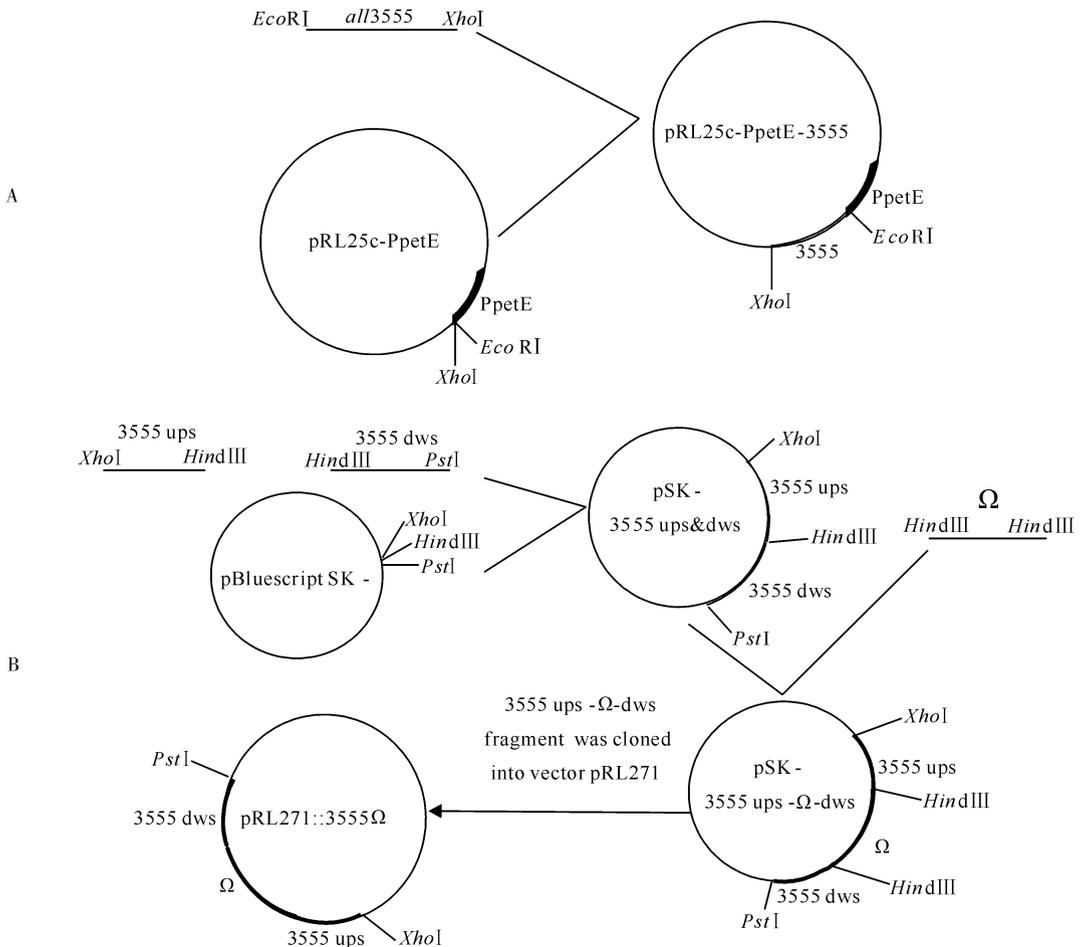
1.3 all3555 超表达质粒的构建

引物由南京金斯瑞科技有限公司合成,引物 P1 (GCCCTCGAGTATTACTAAACAGAACA)、P2 (GCCGAATTCATGAATACAGCAGAACT), 用于扩增 *all3555* 基因的 ORF 序列,引物包含 *EcoR* I 和 *Xho* I 酶切位点。*all3555* 基因克隆的模板为鱼腥蓝细菌 PCC 7120 的总 DNA,引物扩增出的片段为 *all3555* 基因包括启动子在内的完整 ORF,将 PCR 产物用 *EcoR* I 和 *Xho* I 进行酶切,获得含 *EcoR* I 和 *Xho* I 酶切位点的 ORF 片段,将获得的酶切产物与同样经过 *EcoR* I 和 *Xho* I 处理过的 pRL25c-PpetE 连接,最终获得 pRL25c-PpetE-3555 质粒。构建流程如图 1-A 所示,其中 pRL25c 是一种可以在鱼腥蓝细菌 PCC 7120 中自主复制的复制型载体,PpetE 启动子为鱼腥蓝细菌 PCC 7120 中的

一个强启动子。

1.4 all3555 突变体同源重组质粒的构建

引物由南京金斯瑞科技有限公司合成,利用引物 P3 (GCCCTCGAG TTACTCAAACACGCATCG)、P4 (GCCAAGCTT TATTTGCGAAAGAGTC)和 P5 (GCAAGCTTAGTATTTTAGTTTGTGGT)、P6 (TAACTGCAG ACCGCAAACCTGGCTAAAC) 分别扩增出 *all3555* ORF 外的上下游片段,上游片段包含 *Xho* I 和 *Hind* III 酶切位点,下游片段包含 *Hind* III 和 *Pst* I 酶切位点,PCR 扩增时的模板为鱼腥蓝细菌 PCC 7120 的总 DNA。将 PCR 扩增产物连接到载体,得到阳性克隆之后,再插入来自 pPH45 Ω 经 *Hind* III 酶切得到的具有壮观霉素抗性的 Ω 片段。将整个片段(包括上游片段、 Ω 片段和下游片段)用 *Xho* I 和 *Pst* I 双酶切,酶切产物与同样经过 *Xho* I 和 *Pst* I 酶处理的 pRL271 质粒连接,最终获得整合



A: pRL25c-PpetE-3555 构建 A flow chart showing the construction process of pRL25c-PpetE-3555; B: pRL271::3555 Ω 构建 A flow chart showing the construction process of pRL271::3555 Ω .

图 1 pRL25c-PpetE-3555 和 pRL271::3555 Ω 的质粒构建流程

Fig. 1 The flow chart showing the construction process of pRL25c-PpetE-3555 and pRL271::3555 Ω

质粒 pRL271::3555 Ω , 构建流程如图 1-B 所示。pRL271 是一种整合型载体, 可通过同源重组将克隆基因整合到蓝细菌染色体中。

1.5 菌株的培养和接合转移

鱼腥蓝细菌 PCC 7120 在 30 °C、150 r/min 连续光照条件下培养, 培养时使用的基础培养基为 BG11 培养基, 为 NO₃⁻ 氮源; 超表达菌株培养时, 在 BG11 培养基中添加终质量浓度为 100 μ g/mL 的新霉素(Neo); 突变体菌株培养时, 在 BG11 培养基中添加终质量浓度为 5 μ g/mL 的壮观霉素(Sp)和终质量浓度为 5 μ g/mL 的链霉素(Sm)。大肠杆菌所使用的培养基为 LB 培养基, 培养温度 37 °C; 试验中各类抗生素的终质量浓度为: 氨苄青霉素(Amp) 100 μ g/mL, 壮观霉素(Sp) 100 μ g/mL, 氯霉素(Cm) 25 μ g/mL, 卡那霉素(Kan) 50 μ g/mL。参照文献[8]中的方法, 通过接合转移将质粒从大肠杆菌转入鱼腥蓝细菌 PCC 7120。

1.6 菌株的筛选

将含有外源片段的 pRL25c 通过接合转移转入鱼腥蓝细菌后, 以 100 μ g/mL 的 Neo 筛选含有外源质粒的转化子。待平板上有单菌落长出后, 将单菌落扩大培养, 提取总 DNA, 利用总 DNA 转化大肠杆菌 TG1, 将得到的大肠杆菌单菌落扩大培养, 抽提质粒, 酶切验证质粒是否为 pRL25c-PpetE-3555。

将含有外源片段的 pRL271 通过接合转移转入鱼腥蓝细菌后, 以 5 μ g/mL 的 Sp 和 5 μ g/mL 的 Sm 筛选转入外源质粒的转化子。利用 pRL271 上所携带的蔗糖致死基因 *sacB*, 将转化子多次传代后涂布于含有 5% 蔗糖的 Sp、Sm 双抗平板上, 筛选双交换突变株。待平板上有单菌落长出后, 将单菌落扩大培养, 抽提总 DNA, 以野生型为模板, 利用引物 P3 和 P6 进行 PCR, 验证突变株。

1.7 甲基紫精胁迫诱导

活化培养蓝细菌至对数生长期, 接种至新鲜无抗 BG11 的液体培养基, $D_{750\text{nm}} \approx 0.1$ 。每瓶 30 mL 菌液等量分装至 50 mL 小三角瓶中振荡培养, 分别加入终浓度为 0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 和 1.2 μ mol/L 的甲基紫精(MV), 每个浓度进行 3 次独立重复, 温度、光照及转速等培养条件不变。

1.8 NaCl 胁迫诱导

活化培养蓝细菌细胞至对数生长期, 离心收集细胞, 将其接种至新鲜无抗含不同浓度 NaCl 的

BG11 液体培养基中, $D_{750\text{nm}} \approx 0.1$ 时, 每瓶 30 mL 等量分装至 50 mL 小三角瓶中液体振荡培养。培养基中的 NaCl 的浓度分别为 0、0.1 和 0.3 mol/L, 每个浓度 3 个重复, 温度、光照及转速等培养条件不变。

1.9 生长曲线的测定

经过活化培养后, 将处于对数生长期的蓝细菌菌液调至 $D_{750\text{nm}} \approx 0.1$ 进行培养, 每 24 h 取样 2 mL, 用分光光度计测定 $D_{750\text{nm}}$, 收集数据后绘制生长曲线。

2 结果与分析

2.1 *all3555* 基因超表达菌株的构建

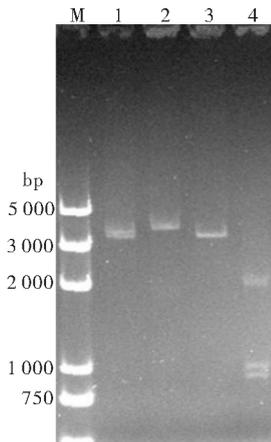
以野生型鱼腥蓝细菌 PCC 7120 为模板, PCR 扩增 *all3555* 基因的 ORF, 长度为 1 667 bp, 构建的最终质粒为 pRL25c-PpetE-3555(图 1-A)。通过三亲本接合转移的方法, 将该质粒转入野生型鱼腥蓝细菌 PCC 7120, 以 100 μ g/mL 的 Neo 筛选含有外源质粒的转化子, 最终通过验证得到 *all3555* 基因的超表达菌株 OE3555, 该菌株在生长过程中可以超量表达 *all3555* 基因。

2.2 *all3555* 基因突变株的构建

以野生型鱼腥蓝细菌 PCC 7120 为模板, PCR 扩增 *all3555* 基因 ORF 外的上下游片段, 上游片段长度为 1 002 bp, 下游片段长度为 999 bp, 按照流程图(图 1-B) 构建质粒, 最终构建成质粒 pRL271::3555 Ω , 其中每一步均有酶切验证。通过三亲本接合转移的方法, 将该质粒转入野生型鱼腥蓝细菌 PCC 7120, 以 5 μ g/mL 的 Sp 和 5 μ g/mL 的 Sm 筛选转入外源质粒的转化子。利用 pRL271 上所携带的蔗糖致死基因 *sacB*, 将转化子多次传代后涂布于含有 5% 蔗糖的 Sp、Sm 双抗平板上, 筛选双交换突变株, 最终通过检测引物 P3 和 P6 的 PCR 扩增产物(图 2), 验证得到 *all3555* 基因的缺失突变株 M3555, 该菌株在生长过程中没有 *all3555* 基因的表达。

2.3 *all3555* 超表达菌株和突变菌株的表型分析

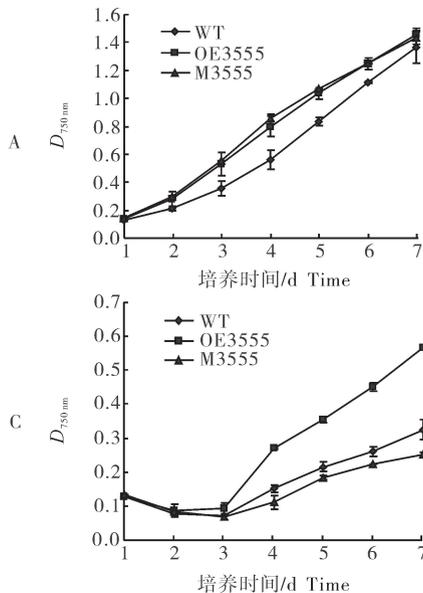
1) 甲基紫精胁迫的表型观察。将获得的 M3555 和 OE3555 菌株, 利用甲基紫精(MV) 进行胁迫诱导, 以野生型鱼腥蓝细菌 PCC 7120 作对照, 观察菌株的生长状况。MV 胁迫多天后, 野生型鱼腥蓝细菌 PCC 7120 和 OE3555 的生长情况(图 3) 表明, 在液体培养基中, 当培养基中 MV 的浓度低于 0.2 μ mol/L 时, OE3555 菌株和野生型菌株都可以正常



M:DL 2000; 1:野生型鱼腥蓝细菌 PCC 7120 总 DNA P3、P6 PCR 扩增条带 PCR with P3,P6 in *Anabaena* PCC 7120; 2 :M3555 菌株总 DNA P3、P6 PCR 扩增条带 PCR with P3,P6 in M3555; 3:野生型鱼腥蓝细菌 PCC 7120 总 DNA P3、P6 PCR 扩增条带经 *Hind*Ⅲ 酶切的产物 PCR Product with P3,P6 in *Anabaena* PCC 7120 digested with *Hind*Ⅲ; 4: M3555 菌株总 DNA P3、P6 PCR 扩增条带经 *Hind*Ⅲ 酶切的产物 PCR Product with P3,P6 in M3555 digested with *Hind*Ⅲ.

图 2 M3555 突变体的验证

Fig.2 The verification of M3555 mutant

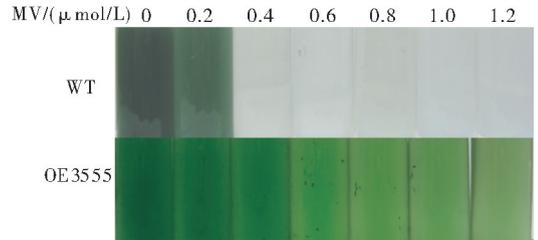


A:0 mol/L NaCl 胁迫条件下 M3555 菌株、OE3555 菌株和野生型鱼腥蓝细菌 PCC 7120 的生长曲线 Growth curves of M3555, OE3555 and *Anabaena* PCC 7120 with 0 mol/L NaCl stress; B:0.1 mol/L NaCl 胁迫条件下 M3555 菌株、OE3555 菌株和野生型鱼腥蓝细菌 PCC 7120 的生长曲线 Growth curves of M3555,OE3555 and *Anabaena* PCC 7120 with 0.1 mol/L NaCl stress; C:0.3 mol/L NaCl 胁迫条件下 M3555 菌株、OE3555 菌株和野生型鱼腥蓝细菌 PCC 7120 的生长曲线 Growth curves of M3555,OE3555 and *Anabaena* PCC 7120 with 0.3 mol/L NaCl stress; D:0.3 mol/L NaCl 胁迫条件 7 天后,M3555 菌株、OE3555 菌株和野生型鱼腥蓝细菌 PCC 7120 的生长情况 The growth status of M3555,OE3555 and *Anabaena* PCC 7120 with 0.3 mol/L NaCl stress after 7 days.

图 4 NaCl 胁迫条件下 M3555、OE3555 菌株和野生型鱼腥蓝细菌 PCC 7120 的生长情况

Fig.4 The growth conditions of M3555,OE3555 and *Anabaena* PCC 7120 with NaCl stress

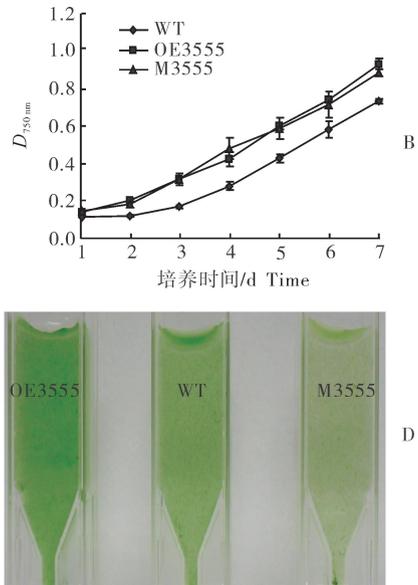
生长;当培养基中的 MV 浓度高于 0.2 $\mu\text{mol/L}$ 时,受到 MV 的胁迫,野生型菌株生长受抑制甚至死亡,而 OE3555 菌株生长虽然也受到一定程度抑制,但仍然可以继续生长,生长速度随着 MV 浓度的升高而降低。M3555 菌株与野生型菌株的生长情况差别不大。



WT 代表野生型鱼腥蓝细菌 PCC 7120,OE3555 代表 *all3555* 超表达菌株;下同 WT stands for *Anabaena* PCC 7120, and OE3555 stands for the *all3555* over-express strain. The same as follows.

图 3 甲基紫精胁迫条件下 OE3555 菌株和野生型鱼腥蓝细菌 PCC 7120 的生长情况

Fig.3 The growth status of OE3555 strain and wild type *Anabaena* PCC 7120 with methyl viologen stress



2) NaCl 胁迫的表型观察。M3555 菌株和 OE3555 菌株 NaCl 胁迫后的生长情况见图 4, 以野生型鱼腥蓝细菌 PCC 7120 作为对照。结果表明: 在液体培养基中, 当培养基中存在一定量的 NaCl 时, M3555、OE3555 和野生型的生长均受到抑制, 并且这种抑制随着 NaCl 浓度的升高而增强; 当 NaCl 的浓度为 0 和 0.1 mol/L 时, 3 种菌的生长情况类似, M3555 和 OE3555 生长状况略好于野生型菌株(图 4-A、B); 当 NaCl 的浓度达到 0.3 mol/L 时, 经过 2 d 的适应调整后, OE3555 菌株的生长情况明显好于其他 2 种菌株, 而 M3555 菌株的生长情况则最差(图 4-C), 且 M3555 菌株色泽较其他 2 种菌株偏黄(图 4-D)。在固体培养基上的试验也得到了类似的结论, 不同的是在固体培养基中, NaCl 的浓度达到 0.1 mol/L 时即可看到 3 种菌株生长状况的差别, OE3555 菌株的生长情况明显好于其他 2 种菌株, 而 M3555 菌株的生长情况则最差; 当固体培养基中的 NaCl 浓度达到 0.3 mol/L 时, 3 种菌株均不生长。

3 讨 论

乙酰羟酸合成酶是维持生物基本生长代谢的重要酶类, 在蓝细菌中存在着多个异源同工酶。这些同工酶不仅参与支链氨基酸的合成过程, 还与多个涉及蓝细菌生存及环境适应的生理过程相关, 在调节细胞内 pH 水平、消除过量的氧自由基以及减少紫外线对细胞伤害等过程中都具有重要作用^[9-10]。

本研究中当 *all3555* 超表达后, 鱼腥蓝细菌 PCC 7120 对于 MV 造成的氧化胁迫和 NaCl 造成的高盐胁迫的抗性都有显著的提高; 而当细胞缺失该基因后, 对于盐胁迫的敏感性则有一定的提高, 说明该基因在鱼腥蓝细菌 PCC 7120 对环境的适应过程中起到了重要作用。在 Maestri 等^[7]的报道中, *all3555* 基因在集胞蓝细菌 PCC 6803 内的同源基因 *sll1981* 主要在对数生长末期和稳定期大量表达, 且受到外部环境 pH 值的调控, 说明该基因可能参与了细胞内 pH 值的调节, 这一定程度上也可以解释 OE3555 菌株对 NaCl 胁迫的抗性提高的原因。当细胞处于高浓度的 Na⁺ 环境中时, 由于 Na/H 泵的原因, 大量 Na⁺ 的向内运输将导致 H⁺ 的外泄, 造成细胞质的碱化, 而 AHAS 的大量表达, 可以使丙酮酸向乙酰乳酸的转化加快, 从而使内部酸化, 缓解外界高浓度 Na⁺ 造成的细胞质碱化所带来的影响。

本试验只是对于 *all3555* 功能的初步探讨, 抗氧化胁迫和抗 NaCl 胁迫的原理处在推测阶段, 具体的机制尚不清楚, 有待于进一步的研究验证。

M3555 菌株的成功筛选说明在鱼腥蓝细菌 PCC7120 中, AHAS 的多个同工酶均会表达, 而缺失其中某一种同工酶对于处在较好生长环境的蓝细菌来说, 支链氨基酸的合成仍可满足其基本需求, 并非是致死的, 这与之前在其他种类蓝细菌中开展的研究及推测相吻合^[11]。

生物信息学分析显示, 蓝细菌中的 AHAS 基本未与其他支链氨基酸合成的相关基因位于同一基因簇, 这可能暗示在蓝细菌中支链氨基酸的合成存在其他的替代途径^[11]。并且在蓝细菌中并不存在 ALDC 同源基因, 这可能说明蓝细菌并不能通过大量合成 acetoin 的途径来调节细胞内丙酮酸含量及碳源的储存, 推测可能的原因是蓝细菌在生长后期的限制因素与一般异养微生物不同, 其主要的限制因素是能量(光能)而非碳源。当然, 目前有关的研究进展还不能完全排除存在 ALDC 同工酶的可能性。

还有一个有趣的现象是, 当在实验室条件下较大体积培养 M3555 时, M3555 菌株不能正常生长, 会很快进入平台期甚至经常出现死亡, 色泽偏黄; 相比野生型鱼腥蓝细菌 PCC 7120, 这种情况下的 M3555 菌株类胡萝卜素含量升高, 藻胆蛋白和叶绿素 a 的含量明显下降。这与其他菌株中 AHAS 表达量不足时的表型相同, 说明多种 AHAS 同工酶对于细胞支链氨基酸的合成代谢的贡献度不同, 且随着环境的不同, 各自的贡献度存在动态调节的过程。另外色素含量的变化说明 M3555 菌株可能对光的敏感性增强, 初步的光敏性试验的结果也显示 OE3555 菌株似乎对高光胁迫的抗性也好于野生型, 而 M3555 高光抗性似乎略差, 这种对高光的敏感性也可能源于高光条件下氧自由基增多造成了氧化胁迫。

本试验主要就鱼腥蓝细菌 PCC 7120 中 *all3555* 基因缺失和超表达对菌株抗胁迫能力的影响进行了初步研究, 关于 *all3555* 基因在细胞内到底参与了哪些生理过程, 怎样发挥作用, 蓝细菌中多个 AHAS 同工酶的具体分工和相互之间的调节配合, 以及可能存在的支链氨基酸合成的替代途径等, 都还需要进一步研究。此外, 目前有关除草剂在植物、非固氮蓝细菌中的作用机制和代谢研究较多, 在

固氮蓝细菌中的相关报道还比较少^[12],深入研究固氮蓝细菌中的除草剂靶标 AHAS 蛋白^[13],有助于进一步了解除草剂的作用机制和代谢途径,促进关于除草剂在水华治理及固氮蓝细菌在大田中的应用等方面的相关工作的进行与开展。

参 考 文 献

- [1] KANEKO T, SATO S, KOTANI H, et al. Sequence analysis of the genome of the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. II. Sequence determination of the entire genome and assignment of potential protein-coding regions[J]. DNA Res, 1996, 3(3): 185-209.
- [2] FREIDBERG D, SEIFFERS J. Molecular characterization of genes coding for wild-type and sulfonyleurea-resistant acetolactate synthase in the cyanobacterium *Synechococcus* PCC7942 [J]. Z Naturforsch, 1990, 45(5): 538-543.
- [3] RIEBLE S, BEALE S I. Structure and expression of a cyanobacterial *ilvC* gene encoding acetoxyacid isomerase[J]. J Bacteriol, 1992, 174(24): 7910-7918.
- [4] 李东霞, 王莉, 陈雯莉. MreB 在鱼腥蓝细菌 PCC 7120 细胞分裂过程中的功能[J]. 华中农业大学学报, 2012, 31(6): 672-678.
- [5] OHMORI M, IKEUCHI M, SATO N. Characterization of genes encoding multi-domain proteins in the genome of the filamentous nitrogen-fixing cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120[J]. DNA Res, 2001, 31, 8(6): 271-284.
- [6] KANEKO T, NAKAMURA Y, WOLK C P. Complete genomic sequence of the filamentous nitrogen-fixing cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120[J]. DNA Res, 2001, 31, 8(5): 205-213.
- [7] MAESTRI O, JOSET F. Regulation by external pH and stationary growth phase of the acetolactate synthase from *Synechocystis* PCC 6803[J]. Mol Microbiol, 2000, 37(4): 828-838.
- [8] ELHAI J, WOLK C P. Conjugal transfer of DNA to cyanobacteria[J]. Methods Enzymol, 1988, 167: 747-754.
- [9] SOULE T, PALMER K, GAO Q J. A comparative genomics approach to understanding the biosynthesis of the sunscreen scytonemin in cyanobacteria [J]. BMC Genomics, 2009, 10: 336.
- [10] 薛红芬, 周妍, 骆昆. AHLs 及其结构类似物对蓝藻紫外防护剂生物合成的影响[J]. 云南民族大学学报, 2009, 18(2): 135-138.
- [11] KOUHEN O M E, JOSET F. Biosynthesis of the branched-chain amino acids in the cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6803: existence of compensatory pathways[J]. Current Microbiology, 2002, 45: 94-98.
- [12] MANSY A E, EL-BESTAWY E. Toxicity and biodegradation of fluometuron by selected cyanobacterial species [J]. World J Microb Biot, 2002, 18: 125-131.
- [13] DUGGLEBY R G, PANG S S. Acetoxyacid synthase[J]. J Biochem Mol Biol, 2000, 33: 1-36.

Construction and phenotypic analysis of over-expression strain and deleted mutant strain of *all3555* in *Anabaena* PCC 7120

LI Zhi-meng WANG Li CHEN Wen-li

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

Abstract To study the function of the *all3555*, an over-expression strain and a deleted mutant strain of *all3555* in *Anabaena* PCC 7120 was constructed. The defected mutant strain was found to grow in usual condition but be more sensitive to NaCl under salt-stress. When *all3555* was over-expressed, the resistance of *Anabaena* PCC 7120 to oxidative stress and NaCl under salt-stress was improved. Results showed that *all3555* almost didn't affect the growth of *Anabaena* PCC 7120 under the normal condition, but it was important for the resistance of *Anabaena* PCC 7120 to oxidative stress and NaCl under the salt-stress.

Key words *Anabaena*; acetoxyacid synthase; *all3555*; oxidative stress; NaCl stress; over-expression of gene; deleted mutant

(责任编辑:张志钰)