

# 鱼腥蓝细菌 PCC 7120 中可控降解系统的构建

王 静 张巨源 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** 鱼腥蓝细菌 PCC 7120 中已有较为成熟的诱导表达系统, 但缺乏可控的蛋白降解系统。本研究基于 *Mesoplasma florum* 中的 Lon 蛋白酶(mf-Lon), 在蓝细菌中建立可诱导的蛋白降解系统, 并通过该系统对关键基因编码产物进行可控降解以研究其生理功能。结果发现降解系统并无预期作用, 需进一步改进。

**关键词** 鱼腥蓝细菌 PCC 7120; 可控蛋白降解系统; mf-Lon 蛋白酶; RNase

**中图分类号** Q 93-33 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2018)01-0017-07

鱼腥蓝细菌 PCC 7120 是一种重要的模式菌株, 在研究中常常需要构建它的各种突变株, 但某些基因的突变是致死性的, 导致很难获得相应的突变菌株, 尤其是缺失突变株, 为了应对这一难题, 本研究基于 *Mesoplasma florum* 中的 Lon 蛋白酶(mf-Lon)在 PCC 7120 中构建可控蛋白降解系统, 其基本原理是 mf-Lon 蛋白酶可特异性降解携带 mf-SsrA 标签的蛋白。将 mf-Lon 编码基因置于严格受控的启动子后同时将蓝细菌中的特定蛋白与 mf-SsrA 标签进行融合表达, 这样当加入诱导剂时, mf-Lon 蛋白酶才开始表达并对融合了 mf-SsrA 的目的蛋白进行降解<sup>[1]</sup>。

Lon 蛋白酶, 也称蛋白酶 La, 首先是在大肠杆菌中被鉴定出来<sup>[2]</sup>。属于 AAA<sup>+</sup>蛋白酶超家族(与多种细胞活性相关的 ATP 酶)的成员, 是一种丝氨酸蛋白酶, 可介导受损伤或错误折叠的蛋白以及短暂调控蛋白的降解, 可调控细菌生长的多种生物学过程, 如可以调节细胞分裂、DNA 复制、基因表达、代谢物合成、细胞分化、孢子形成及某些耐受应答反应等一系列过程<sup>[3-5]</sup>。此外, Lon 蛋白酶与细胞衰老及寿命和多种疾病包括癌症也密切相关<sup>[6]</sup>。

依赖 ATP 的 Lon 蛋白酶水解蛋白质底物主要可分为四步<sup>[7]</sup>: 底物的识别和结合、底物解折叠、底物移位至降解室、肽键切割。Gur 等<sup>[8]</sup>证明 Lon 可特异识别富含芳香残基的肽段和疏水性肽段, Lon 蛋白酶还可以降解携带某些标签的蛋白质, 如可降

解携带 tmRNA 标签的蛋白质<sup>[9]</sup>。研究表明, ATP 依赖的 Lon 蛋白酶在 tmRNA 标记的蛋白降解中起直接作用<sup>[9]</sup>。

Cameron 等<sup>[1]</sup>基于革兰氏阳性细菌 *Mesoplasma florum* 中转移信使 RNA 系统在大肠杆菌中创建了蛋白降解系统, 可提供稳态蛋白水平的独立控制和有针对性的靶向蛋白质的诱导性降解。该蛋白质降解系统是模块化的, 不依赖于宿主的降解系统, 容易转移到不同的细菌, 在多种细菌中起作用。本研究将 mf-Lon 蛋白降解系统转移到 PCC 7120 中, 构建鱼腥蓝细菌可控蛋白质的降解系统, 并利用该系统对关键基因编码产物进行可控降解以研究其生理功能。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

配置 LB 培养基所需的胰蛋白胨和酵母提取物购于安琪酵母股份有限公司。配置 BG11、BG11<sub>0</sub> 培养基及其他试剂所用药品均为分析纯, 购于国药集团。质粒 DNA 的电泳检测, 酶切反应、产物纯化回收及酶连反应等操作参考文献<sup>[10]</sup>以及相应试剂公司提供的试剂使用说明书进行。DNA 片段的回收采用柱式回收试剂盒(上海生物工程有限公司)或乙醇沉淀回收。大肠杆菌质粒 DNA 的抽提采用柱式质粒 DNA 抽提试剂盒操作, 操作过程参照试剂盒使用说明书(武汉川流生物科技有限公司和上海生

收稿日期: 2017-05-27

基金项目: 国家自然科学基金项目(31570048); 中央高校基本科研业务费专项(2014PY003)

王 静, 硕士研究生, 研究方向: 蓝细菌分子生物学. E-mail: jingwdu@163.com

通信作者: 陈雯莉, 博士, 教授, 研究方向: 环境微生物. E-mail: wlchen@mail.hzau.edu.cn

物工程有限公司)。鱼腥蓝细菌 PCC 7120 基因组 DNA 的抽提采用柱式基因组 DNA 抽提试剂盒,具体操作过程参照试剂盒使用说明书(武汉川流生物科技有限公司和上海生物工程有限公司)。

## 1.2 菌株的培养及诱导

1) 菌株的培养。大肠杆菌主要使用 LB 液体或固体培养基进行培养,液体培养置于 37 ℃、180 r/min 的水平恒温摇床中培养,而固体平板置于 37 ℃ 的恒温培养箱中培养。鱼腥蓝细菌 PCC 7120 通常在 BG11 或 BG11<sub>0</sub> (缺氮培养基) 中培养,液体培养于 30 ℃ 恒温、150 r/min、光强 50~100  $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$  的条件下摇床培养,固体平板在 30 ℃ 恒温光照培养箱中培养。具有不同抗性的菌株培养时需添加适宜浓度的相应抗生素。

2) 菌株的诱导。培养菌株至对数期 ( $D_{750} \approx 0.5$ ),加入相应浓度的诱导剂进行诱导,一定时间后取样,荧光显微观察菌株表型及检测目的蛋白含量。需要进行缺氮诱导的菌株 (*alr2339* 基因相关突变株) 培养至对数期,缺氮诱导即用缺氮培养基洗菌后将诱导剂加入到 BG11<sub>0</sub> 培养基进行培养,培养一定时间取样,荧光显微观察菌株表型及检测其目的蛋白含量。

## 1.3 荧光显微观察

将上述样品取样 2 mL 至离心管中,6 000 r/min 离心 2 min,弃上清,收集菌体。使用 Nikon Eclipse 80i 荧光显微镜,在 100× 油镜下观察菌株细胞分布及细胞形态。每样品分别观察 3 个以上的视野并拍照,每个视野包括白光照片和红色荧光照片。使用 WT 菌株和相应单突变株作为负对照。

## 1.4 Western blot 检测目的蛋白的含量

抽提蓝细菌总蛋白,采用 Bradford 方法测定蛋白浓度。根据测定的浓度,调节上样量保证各样品的上样量基本一致,进行 SDS-PAGE 凝胶电泳,用于 Western blot 检测,经转膜仪转膜,脱脂奶粉封闭,PBS-T 洗膜、一抗杂交,洗膜、二抗杂交,洗膜,最后用化学发光分析仪检测硝酸纤维素膜上的杂交信号。

# 2 结果与分析

## 2.1 突变株的构建

拟构建的可控蛋白降解系统包括 mf-Lon 蛋白和融合 mf-SsrA 标签的蛋白底物两部分。为使外源蛋白酶能够诱导表达,采用 pRL25T 复制型载体

构建此突变体。为使目的基因分别融合 mf-SsrA 标签共表达,采用 pRL271 整合型载体来构建相应突变体。

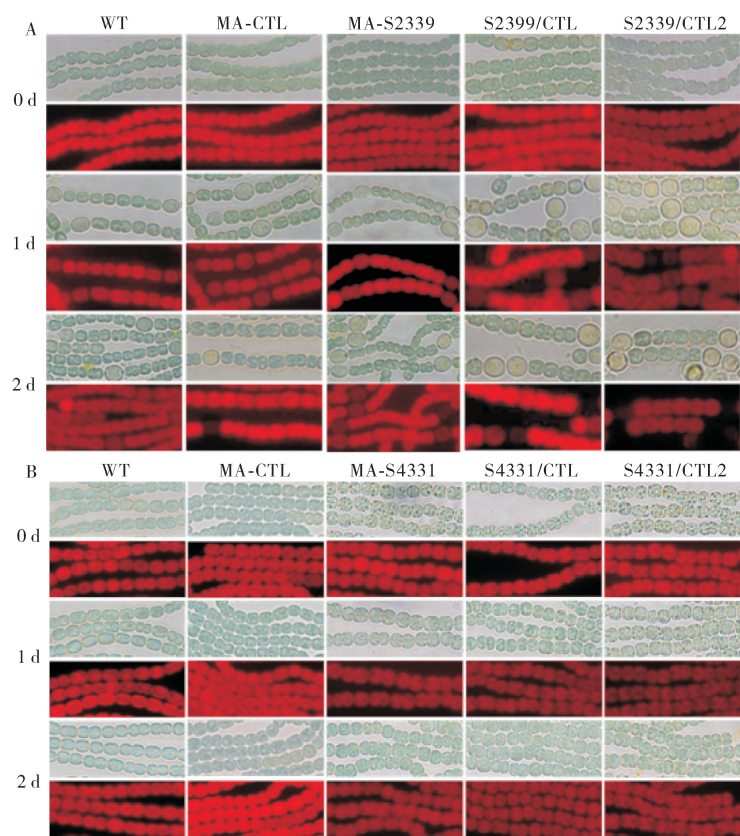
1) pRL25T 复制型载体构建突变体。利用 pRL25T 复制型载体构建 PCT-Lon 质粒和 PCT-Lon2 质粒,将外源蛋白酶基因 *mf-Lon* 及 *mf-Lon2* 分别置于诱导启动子之后,使外源蛋白酶能够诱导表达。其中,*mf-Lon* 是根据 *Mesoplasma flo-rum* 中 Lon 蛋白酶核苷酸序列进行物种特异性和密码子偏爱性的优化后的序列;*mf-Lon2* 是在大肠杆菌中得到验证可用的 *mf-Lon* 片段,为方便区分,命名为 *mf-Lon2*<sup>[1]</sup>。

2) pRL271 整合型载体构建突变体。将 PCC 7120 中特定基因分别融合 mf-SsrA 标签共表达,即可使其受到诱导而进行降解,这样就可以对这些蛋白质的表达进行质量控制。选取异形胞发育相关基因 *alr2339* (编码 HetR)、细胞分裂相关基因 *alr3858* (编码 FtsZ)、RNase 降解复合体相关基因 *alr4331* (编码 RNaseE) 和 *all4396* (编码 PNPase) 进行研究。为使目的蛋白与 mf-SsrA 标签融合表达,利用 pRL271 整合型载体构建 pAlr2339-ssrA、pAlr3858-ssrA、pAlr4331-ssrA 和 pAll4396-ssrA 质粒,三亲本分别转入 PCC 7120 获得相应突变株 MA-S2339、MA-S3858、MA-S4331 和 MA-S4396。

将 mf-Lon 及 mf-Lon2 质粒分别转入 MA-S2339、MA-S3858、MA-S4331 和 MA-S4396 菌株中,获得 S2339/CTL、S2339/CTL2、S3858/CTL、S3858/CTL2、S4331/CTL、S4331/CTL2、S4396/CTL 和 S4396/CTL2 等菌株,即可使这些基因受到诱导剂的诱导而进行降解,由于对选取的基因功能研究得比较成熟,可以根据菌株表型观察检测降解系统的可用性,也可通过 Western blot 检测目的基因的含量。

## 2.2 降解系统可用性的验证

1) 双突变株表型的荧光显微观察。用 2 mmol/L 茶碱和 1  $\mu\text{mol}/\text{L}$   $\text{Cu}^{2+}$  诱导双突变菌株,同时以 WT 型和相应单突变菌株作为负对照,分别置于摇床光照培养一定时间后取样,荧光显微镜观察突变株表型。以目的基因 *alr2339* 和 *alr4331* 为例,*alr2339* 基因编码的 HetR 蛋白参与异形胞的发育调控,需同时进行缺氮诱导才有相应表型。与 *alr2339* 相关的菌株表型见图 1A,与 *alr4331* 相关的菌株表型见图 1B。



A:S2339/CTL 及 S2339/CTL2 菌株的荧光显微观察结果；B:S4331/CTL 及 S4331/CTL2 菌株的荧光显微观察结果。A:Fluorescence microscopy images of S2339/CTL and S2339/CTL2 strains;B:Fluorescence microscopy images of S4331/CTL and S4331/CTL2 strains.

图 1 不同菌株的荧光显微观察结果

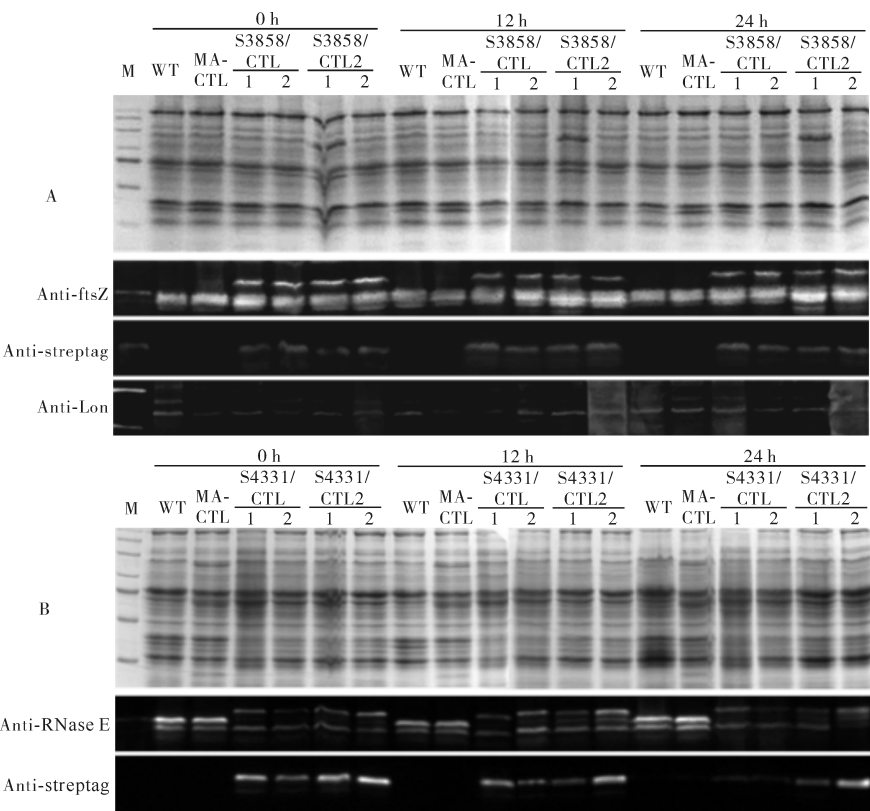
Fig.1 Fluorescence microscopy images of the different strains

通过观察发现,对菌株进行诱导几乎不影响其表型。WT 菌株诱导后异形胞频率与未诱导时相似(未显示);MA-CTL 菌株中异形胞频率与 WT 菌株相似;而菌株 MA-S2339、S2339/CTL 和 S2339/CTL2 异形胞发育与 WT 相比,频率升高,且 S2339/CTL 菌株和 S2339/CTL2 菌株细胞略微增大。因为 HetR 是异形胞发育正调控因子,当 *alr2339* 基因融合 *mf-SsrA* 标签表达时,HetR 蛋白不但没有降解,其含量反而有所升高,推测标签的表达增加了目标蛋白的稳定性,且降解系统并没有发挥其降解作用。同理,WT 菌株、MA-CTL 菌株、MA-S4331 菌株、S4331/CTL 菌株和 S4331/CTL2 菌株经诱导后表型均相似,推测降解系统并不起作用。后续直接用 Western blot 检测目的蛋白的含量来检测降解系统的可用性。

2)Western blot 检测目的蛋白的含量。将菌株抽取总蛋白样品进行 Western blot 检测。在进行质粒构建时,为方便 Western blot 检测,在 *mf-SsrA* 标签上加上 Streptag 的标签,通过目的蛋白抗体和

Anti-Streptag 抗体检测目的蛋白的含量。用 Anti-Lon 抗体可检测外源蛋白酶的表达量。所用的二抗均为羊抗兔抗体。与 *alr3858* 相关突变株结果见图 2A,与 *alr4331* 相关突变株结果见图 2B。

WT、MA-CTL 菌株均有相应基因蛋白大小的条带,而在 S3858/CTL、S3858/CTL2、S4331/CTL 和 S4331/CTL2 双突变株中,除了与 WT 中基因蛋白相同的条带(为了便于区分,以下称野生型条带),还有 1 条比该目的基因蛋白略大,应该是标签融合表达的结果,其中野生型条带存在可能有以下原因:菌体不纯或标签脱落,但通过抽取菌株总 DNA,在基因水平进行验证时显示菌株为纯突变株(结果未显示)。由于 *mf-SsrA* 标签上携带 twin-Streptag 标签,所以用抗体 anti-Streptag 检测时,会检测到比野生型条带较大的条带,结果与用目的基因抗体检测总蛋白一致。用蛋白酶抗体检测菌株总蛋白,无目的条带,说明外源蛋白酶 *mf-Lon* 及 *mf-Lon2* 并没有表达,据此推测降解系统不起作用的原因可能是外源蛋白酶并没有表达,改进系统进一步检测。



A:*alr3858* 基因相关突变株的 Western blot 结果; B:*alr4331* 基因相关突变株的 Western blot 结果。A:Western blot of *alr3858* gene-related mutants; B:Western blot of *alr4331* gene-related mutants.

图 2 Western blot 检测突变菌株中目的基因的表达量

Fig.2 Analysis the expression level of the target gene in mutant strain by Western blot

2.3 降解系统改进及可用性检测

采用单诱导型启动子 *petE* 诱导外源基因表达, 构建 pPpetE-Lon 和 pPpetE-Lon2 质粒, 三亲本转入野生型菌株获得单突变株 MA-CL 和 MA-CL2, 同时构建双突变株 S2339/CL、S2339/CL2、S3858/CL、S3858/CL2、S4331/CL、S4331/CL2、S4396/CL 和 S4396/CL2, 采用荧光显微观察表型和蛋白水平检测降解系统的可用性。

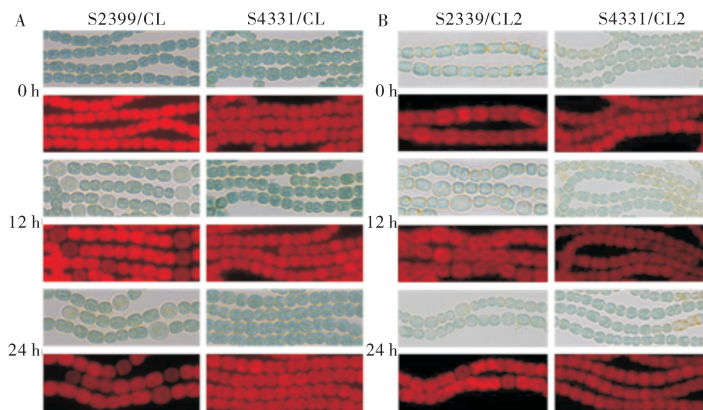
以目的基因 *alr2339* 和 *alr4331* 为例, 用 1  $\mu$ mol/L  $\text{Cu}^{2+}$  对菌株进行诱导, S2339/CL 和 S4331/CL 突变株表型的荧光观察结果见图 3A, S2339/CL2 和 S4331/CL2 菌株的结果见图 3B。S2339/CL 和 S2339/CL2 菌株在诱导后仍有异形胞形成, 且频率不降低, 反而有增高的趋势, 说明 HetR 蛋白不降解。同理, S4331/CL 和 S4331/CL2 菌株诱导后表型均与诱导前相似, 说明 RNase E 不降解。降解系统不起作用, 可能还是诱导剂浓度较低, 不足以诱导蛋白酶的表达或表达量过低。

增加诱导剂的浓度对 S2339/CL 和 S4331/CL

菌株进行诱导, 表型(图 4)观察结果显示, S2339/CL 菌株在不同浓度诱导剂诱导后仍有异形胞形成, 说明其 HetR 蛋白并无降解。S4331/CL 菌株在不同浓度诱导剂诱导后表型均与野生型相似, 说明 RNase E 也未降解。野生型菌株在提高  $\text{Cu}^{2+}$  浓度进行诱导时, 细胞会发生形变, 细胞变大且分裂不均一(未显示)。而突变株并不受  $\text{Cu}^{2+}$  浓度的影响, 推测突变株可能对  $\text{Cu}^{2+}$  产生了较强的耐受性。显微观察结果表明, 降解系统并没有起到降解作用, 推测原因仍为外源蛋白酶不表达。

2.4 降解系统进一步改进及可用性检测

改用诱导效率较高的 *nirA* 启动子与 Riboswitch 联合使用, 重新构建 PCE-Lon 和 PCE-Lon2 质粒, 三亲本转入野生型菌株获得单突变株 MA-CEL 和 MA-CEL2, 同时构建双突变株 S2339/CEL、S2339/CEL2、S3858/CEL、S3858/CEL2、S4331/CEL、S4331/CEL2、S4396/CEL 和 S4396/CEL2, 进行菌株表型的荧光显微观察和蛋白水平的



A:S2339/CL 和 S4331/CL 菌株荧光显微观察结果；B:S2339/CL2 和 S4331/CL2 菌株荧光显微观察结果。A:Fluorescence microscopy images of S2339/CL and S4331/CL strains;B:Fluorescence microscopy images of S2339/CL2 and S4331/CL2 strains.

图 3 不同菌株的荧光显微观察结果

Fig.3 Fluorescence microscopy images of the different strains

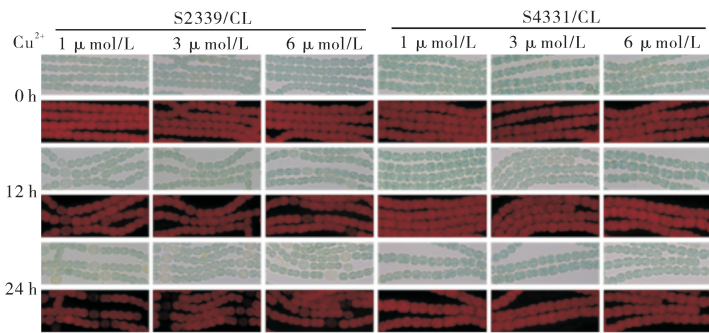


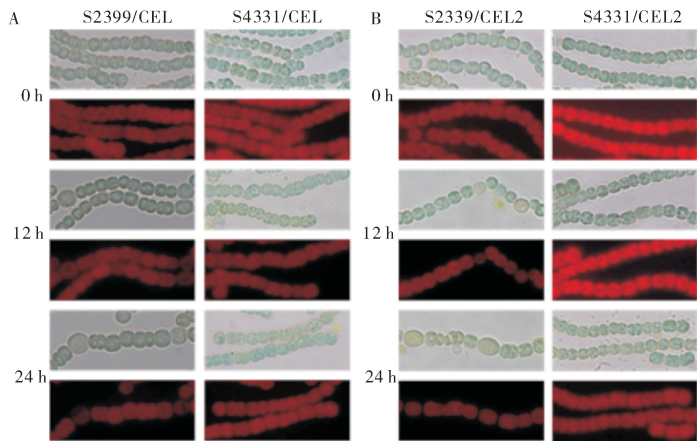
图 4 不同浓度诱导剂诱导突变菌株的荧光显微观察结果

Fig.4 Fluorescence microscopy images of different strains induced with different concentrations of inducers

检测降解系统可用性。

1) 荧光显微观察双突变株表型。以目的基因 *alr2339* 和 *alr4331* 为例, 用 4 mmol/L 茶碱进行诱

导。S2339/CEL 和 S4331/CEL 菌株的荧光显微观察结果见图 5A, S2339/CEL2 和 S4331/CEL2 菌株的荧光结果见图 5B。S2339/CEL 和 S2339/CEL2



A:S2339/CEL 和 S4331/CEL 菌株的荧光显微观察结果；B:S2339/CEL2 和 S4331/CEL2 菌株的荧光显微观察结果。A:Fluorescence microscopy images of S2339/CEL and S4331/CEL strains; B:Fluorescence microscopy images of S2339/CEL2 and S4331/CEL2 strains.

图 5 不同菌株的荧光显微观察结果

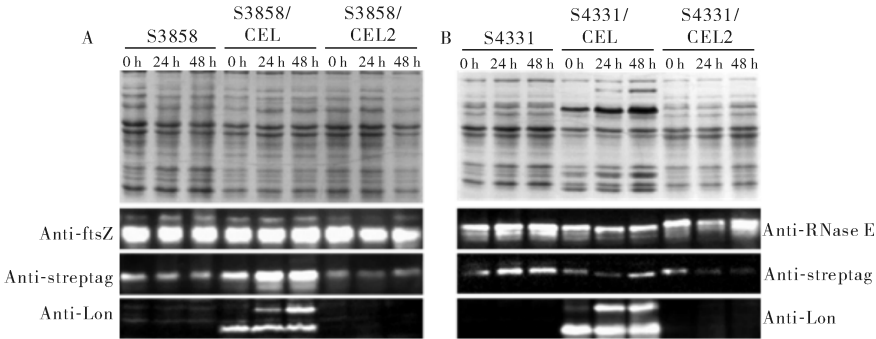
Fig.5 Fluorescence microscopy images of different strains

菌株经 4 mmol/L 茶碱诱导后仍有异形胞形成,说明 HetR 蛋白并没有降解。S4331/CEL 和 S4331/CEL2 菌株经诱导后表型无明显变化,说明 RNase E 不降解。由此可见,降解系统并不起作用,采用 Western blot 进一步确认。

2) Western blot 检测目的蛋白的含量。以目的基因 *alr3858* 和 *alr4331* 为例,用 4 mmol/L 茶碱进行诱导。与 *alr3858* 相关突变株结果见图 6A,与

*alr4331* 相关突变株结果见图 6B。

用目标基因的抗体检测总蛋白,S3858、S4331 单突变株和 S3858/CEL、S3858/CEL2、S4331/CEL 和 S4331/CEL2 双突变株中,均存在该目的基因编码的野生型条带,双突变株还存在比该目的蛋白略大的条带,应该是标签融合表达的结果。用抗体 anti-Streptag 检测时,会检测到比野生型条带较大的条带,结果与用目的基因抗体检测总蛋白一致。



A:*alr3858* 基因相关突变株的 Western blot 结果; B:*alr4331* 基因相关突变株的 Western blot 结果。A: Western blot of *alr3858* gene-related mutants; B: Western blot of *alr4331* gene-related mutants.

图 6 Western blot 检测突变菌株中目的基因的表达量

Fig.6 Analysis the expression level of the target gene in mutant strain by Western blot

用蛋白酶抗体检测菌株总蛋白, S3858/CEL 和 S4331/CEL 中外源蛋白酶 mf-Lon 表达,且有 2 条条带,与在大肠杆菌中纯化的结果一致,其中较大的条带理论上与 mf-Lon 蛋白的大小相同,其含量随诱导时间的增加而升高。S3858/CEL2 和 S4331/CEL2 菌株中,外源蛋白酶 mf-Lon2 并没有表达,据此推测未经修饰的原始 mf-Lon 核苷酸在蓝细菌中无法表达,只有根据物种特异性和密码子偏爱性优化过的 mf-Lon 片段才能被表达。

3 讨论

本研究在 *Anabaena* PCC 7120 中实现了对 mf-Lon 蛋白的可控表达,并且成功地将 mf-SsrA 标签与目的蛋白进行了融合。然而,通过表型观察及 Western blot 检测,发现在 mf-Lon 蛋白酶被诱导表达的情况下细胞内目的蛋白的含量并没有明显降低,说明降解系统不起作用,其原因还需进一步分析。

Lon 蛋白酶水解蛋白质底物分多步完成,任何环节都可能影响蛋白质的最终降解,并且由于 Lon 蛋白酶水解蛋白质是 ATP 依赖性的,ATP 得不到顺利供应也会影响蛋白降解<sup>[11]</sup>。影响蛋白降解也

可能有其他多种原因,如某些小分子适配器的存在对降解有影响<sup>[12-14]</sup>。泛素化对蛋白降解也有影响。在蓝细菌中,可能缺乏这些小分子,也可能自身存在其他影响蛋白酶发挥作用的小分子,导致降解过程受阻。如 HetR 定位于壁厚的异形胞中<sup>[15]</sup>,外源蛋白酶在蓝细菌中可能无法进入异形胞因而影响蛋白降解;FtsZ 定位于细胞隔板<sup>[16-17]</sup>,对蛋白酶降解可能不敏感等。此外,也可能是蛋白酶表达量较低导致无法降解目的蛋白,后续可以改用启动效率强的启动子。

携带 mf-SsrA 标签的蛋白质可被内源性 mf-Lon 蛋白酶识别降解,但不会被大肠杆菌 Lon 或 ClpXP 降解,各自 Lon 蛋白酶互不干扰识别相应标签的蛋白质,这一发现给大肠杆菌提供了具有正交功能的蛋白酶和同源降解标签<sup>[8]</sup>,且 *Mesoplasma florum* 中转移信使 RNA 系统构建的降解系统在大肠杆菌中已得到应用<sup>[1]</sup>。蓝细菌 PCC 7120 中也存在 ATP 依赖的 Clp 蛋白酶,但其结构与功能尚不清楚,在蓝细菌 PCC 7120 中构建降解系统受阻,可能与蓝细菌本身的蛋白降解系统相关。

虽然本研究在 *Anabaena* sp. PCC 7120 菌株中构建的降解系统并没有得到预期结果,但这些探索

可为后续对该系统进行改进与优化、最终将其成功应用于蓝细菌合成生物学及基础生物学研究奠定基础。

## 参 考 文 献

- [1] CAMERON D E, COLLINS J J. Tunable protein degradation in bacteria[J]. *Nature biotechnology*, 2014, 32(12): 1276-1281.
- [2] SWAMYK H, GOLDBERG A L. *E. coli* contains eight soluble proteolytic activities, one being ATP dependent[J]. *Nature*, 1981, 292 (5824): 652-654.
- [3] BAKER T A, SAUER R T. ATP-dependent proteases of bacteria; recognition logic and operating principles[J]. *Trends Biochem Sci*, 2006, 31(12): 647-653.
- [4] SAUER R T, BAKER T A. AAA<sup>+</sup> proteases: ATP-fueled machines of protein destruction[J]. *Annu Rev Biochem*, 2011, 80(1): 587-612.
- [5] TSILIBARIS V, MAENHAUTMICHEL G, VAN MELDEREN L. Biological roles of the Lon ATP-dependent protease[J]. *Research in microbiology*, 2006, 157(8): 701-713.
- [6] HARMAN D. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry[J]. *J Gerontol*, 1956, 11(3): 298-300.
- [7] VENKATESH S, LEE J, SINGH K. Multitasking in the mitochondrion by the ATP-dependent Lon protease [J]. *Biochimica et biophysica acta*, 2012, 1823(1): 56-66.
- [8] GUR E, SAUER R T. Recognition of misfolded proteins by Lon, a AAA<sup>+</sup> protease [J]. *Genes & development*, 2008, 22(16): 2267-2277.
- [9] CHOY J S, AUNG L L, KARZAI A W. Lon protease degrades transfer-messenger RNA-tagged proteins [J]. *Journal of bacteriology*, 2007, 189(18): 6564-6571.
- [10] 莎姆布鲁克 J, 拉塞尔 D W. 分子克隆实验指南[M]. 黄培堂, 等, 译. 3 版. 北京: 科学出版社, 2016.
- [11] WATABE S, HARA M, YAMAMOTO M, et al. Activation of mitochondrial ATP-dependent protease by peptides and proteins[J]. *Tohoku J Exp Med*, 2001, 195(3): 153-161.
- [12] FARRELL C M, GROSSMAN A D, SAUER R T. Cytoplasmic degradation of ssrA-tagged proteins[J]. *Molecular microbiology*, 2005, 57(6): 1750-1761.
- [13] DOUGAN D A, REID B G, HORWICH A L, et al. ClpS, a substrate modulator of the ClpAP machine [J]. *Molecular cell*, 2002, 9(3): 673-683.
- [14] LEVCHENKO I, SEIDEL M, SAUER R T, et al. A specificity-enhancing factor for the ClpXP degradation machine [J]. *Science*, 2000, 289(5488): 2354-2356.
- [15] BUIKEMA W J, HASELKORN R. Characterization of a gene controlling heterocyst differentiation in the cyanobacterium *Anabaena* 7120[J]. *Genes Dev*, 1991, 5(2): 321-330.
- [16] 牛天彩, 胡胜, 陈雯莉, 等. 单交换法构建鱼腥蓝细菌 *ftsZ* 的 *gfp* 原位标记菌株[J]. *华中农业大学学报*, 2016, 35(6): 30-36.
- [17] LLUCH-SENAR M, QUEROL E, PINOL J. Cell division in a minimal bacterium in the absence of *ftsZ* [J]. *Molecular microbiology*, 2010, 78(2): 278-289.

## Construction of controllable protein degradation system in *Anabaena* sp. PCC 7120

WANG Jing ZHANG Juyuan WANG Li CHEN Wenli

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

**Abstract** *Anabaena* sp. PCC 7120 is an important model strain in the field of cyanobacteria research. Controlling the expression level of gene is one of the most important ways to investigate gene functions. There are a variety of matured gene induction systems available in cyanobacteria. However, no controllable protein degradation system is available in cyanobacteria yet. This work is based on the protein quality control system in *Mesoplasma florum* and aims to construct an inducible protein degradation system facilitating the investigation of essential genes in *Anabaena* PCC 7120. Results showed that the degradation or decrease of the target proteins was not detected. It is indicated that the constructed system needs to be further improved.

**Keywords** *Anabaena* sp. PCC 7120; controllable protein degradation system; mf-Lon protein; RNase

(责任编辑: 张志钰)