



## 集胞藻 PCC 6803 中丝氨酸/苏氨酸激酶 SpkC 对高温胁迫的响应

赵佳琳<sup>1,2</sup>, 陈军<sup>1</sup>, 崔玉琳<sup>1</sup>, 于淑贤<sup>1</sup>, 陈高<sup>3,4</sup>, 秦松<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>中国科学院烟台海岸带研究所, 山东 烟台 264003

<sup>2</sup>中国科学院大学, 北京 100049

<sup>3</sup>山东省农业科学院生物技术研究中心, 山东 济南 250100

<sup>4</sup>山东省作物遗传改良与生态生理重点实验室, 山东 济南 250100

**摘要:** 丝氨酸/苏氨酸激酶是蓝藻感知和转导外界刺激的重要元件, 但至今蓝藻中很多丝氨酸/苏氨酸激酶的功能尚属未知。【目的】研究集胞藻 PCC 6803 中的丝氨酸/苏氨酸激酶 SpkC 是否参与对高温胁迫的响应。【方法】本研究采用同源重组的方法构建 *spkC* 基因完全敲除突变株, 检测突变株与野生株在高温胁迫下的生长状况、色素组成, 并对高温胁迫下叶绿素荧光参数差异进行分析, 比较光合系统 II 活性差异。此外, 通过测定生长速率来判断高温胁迫后藻株的恢复情况。【结果】经过 42 °C 高温胁迫后, 与野生株相比, 突变株  $\Delta spkC$  生长减缓, 光合色素(叶绿素、类胡萝卜素和藻胆色素)的含量降低; 45 °C 高温胁迫下突变株  $\Delta spkC$  的光合系统 II 活性下降幅度更大; 经过 5 d 42 °C 高温处理后, 突变株生长几乎停滞, 存活率较野生株明显降低。【结论】集胞藻 PCC 6803 中 *spkC* 基因的缺失导致突变株对高温胁迫响应出现缺陷, 提示丝氨酸/苏氨酸激酶 SpkC 参与响应高温胁迫。

**关键词:** 集胞藻 PCC 6803, 丝氨酸/苏氨酸激酶 SpkC, 高温胁迫

蓝藻是一种能够进行光合作用的低等原核生物, 起源于距今三十多亿年前<sup>[1]</sup>。蓝藻具有复杂的外界信号感知和转导系统, 能够适应不同的极端环境, 如强光、高温、低温等极端环境<sup>[2-3]</sup>。蓝藻信号转导基本过程主要为: 当外界环境发生变化时, 其通过感受器感知外来的环境胁迫信号; 信

号转导分子将信号传递给下游的相关基因, 以调节自身的转录、翻译等过程, 从而合成特异性的蛋白质和酶, 调节自身的生长代谢; 最终对外界环境信号作出反应, 以适应外界环境变化。蓝藻信号转导系统主要包括二元信号转导系统和丝氨酸/苏氨酸激酶<sup>[4]</sup>。

基金项目: 国家自然科学基金(41406192, 41176144, 41376139); 国家重点研发计划(2016YFF0202304); 烟台市科技计划(2016JHZB007)

\*通信作者。Tel: +86-535-2109089; E-mail: sqin@yic.ac.cn

收稿日期: 2017-11-07; 修回日期: 2018-01-24; 网络出版日期: 2018-03-07

集胞藻 PCC 6803 是蓝藻中的模式生物, 生长速率快、培养条件简单<sup>[5]</sup>; 具有天然的转化系统, 便于遗传操作和突变株的构建; 遗传背景清晰, 是第一个完成全基因组测序的蓝藻<sup>[6]</sup>。集胞藻 PCC 6803 的基因组中共预测编码丝氨酸/苏氨酸激酶基因 12 个, 其中 7 个属于 Pkn2 亚族型(*spkA*、*spkB*、*spkC*、*spkD*、*spkE*、*spkF*、*spkG*), 5 个属于 ABC1 型(*spkH*、*spkI*、*spkJ*、*spkK*、*spkL*)<sup>[7]</sup>。研究表明, 所有的丝氨酸/苏氨酸激酶都包括 250–300 个氨基酸保守区域, 并通过磷酸化作用实现功能, 对于集胞藻感知外界逆境传递信号具有重要作用<sup>[8]</sup>。不同丝氨酸/苏氨酸激酶在集胞藻信号转导、生理调节等方面发挥着不同作用。Zorina 等<sup>[8]</sup>发现, *spkC*、*spkF*、*spkK* 基因的敲除使热激蛋白 GroES 在高温胁迫条件下无法磷酸化, 表明 SpkC、SpkF、SpkK 可能共同参与高温胁迫的响应过程; 已有研究证明 SpkE 参与了冷胁迫的响应<sup>[9]</sup>; 此外, 本实验室的前期工作表明 SpkG 参与高盐胁迫信号的响应<sup>[10]</sup>。

SpkC 具有自磷酸化和磷酸化底物的蛋白激酶活性, 是一种重要的丝氨酸/苏氨酸激酶<sup>[11]</sup>, 但目前对于其功能研究较少。本课题组在前期的工作初步表明 SpkC 可能对高温胁迫有响应<sup>[12]</sup>。因此, 本文利用同源重组的方法在集胞藻 PCC 6803 中完全敲除 SpkC 编码基因 *slr0599*, 从而构建突变株  $\Delta$ spkC, 并通过检测高温胁迫下生长速率、色素含量、光合系统 II 活性, 以及高温恢复阶段的藻株的存活情况等生理表型变化, 以期探讨 SpkC 在集胞藻 PCC 6803 适应高温胁迫过程中发挥的作用, 为完善高温胁迫下蓝藻信号转导网络提供基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌株和质粒:** 野生型集胞藻 PCC 6803 (*Synechocystis* sp. PCC 6803) 购自中国科学院淡水藻种库, 藻种编号 FACHB-898; 大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DH5 $\alpha$ , 质粒 pEGFP-N1、pUC18 均由本实验室保存。

**1.1.2 主要试剂:** 植物基因组提取试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司; SanPrep 柱式质粒 DNA 小量抽提试剂盒购自生工生物工程(上海)股份有限公司; KOD-plus 购自东洋纺(上海)生物科技有限公司; 限制性核酸内切酶 *EcoR* I、*Hind* III, T4 DNA ligase 购自 Thermo Scientific 公司; 氨苄青霉素、卡那霉素为 Sigma 公司产品, TaKaRa Ex Taq、DNA 分子标准量 marker 均购自大连宝生物工程有限公司, 实验所用引物由北京睿博兴科生物技术有限公司合成。

**1.1.3 引物:** 根据 NCBI 中基因序列, 用 Primer 5.0 软件设计引物, 表 1 为本研究中所用引物。

### 1.2 藻种培养方法

使用 BG11 培养基培养集胞藻 PCC 6803, 培养条件为 30 °C, 50  $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ , 连续光照静置培养。BG11 固体培养基中包含 0.3% 硫代硫酸钠、 $8 \times 10^{-3}$  mol/L TES (pH 8.2)、 $5 \times 10^{-3}$  mol/L 葡萄糖、2% 琼脂。通过向 BG11 培养基中添加硫酸卡那霉素, 筛选突变株。

### 1.3 $\Delta$ spkC 突变株的构建

**1.3.1 同源重组载体的构建:** 基因 *spkC* 的完全敲除载体构建示意图如图 1 所示。本实验采用融合 PCR 法构建基因敲除片段, 即用含有卡那霉素抗性基因片段来取代目的基因 *spkC*。通过 PCR

表 1. 本研究中使用的引物  
Table 1. Oligonucleotide sequences used in this study

Primers	Primer sequences (5'→3')	Restriction site
spkCUP-F1	GTAAAACGACGGCCAGTGCCAAGCTTTCCTTTCTCTGCCATGGTG	<i>Hind</i> III
spkCUP-R1	GTTCTTTCCGCCTCAGAGCAATGCCCTATGCTCCTA	
spkC-F2	TGCTCTGAGGCGGAAAGAAC	
spkC-R2	ATCCTCAGAAGAACTCGTCA	
spkCDN-F3	TGACGAGTTCTTCTGAGGATTTATACTAAGAATAGA	
spkCDN-R3	ACAGCTATGACCATGATTACGAATTCACCTGGTTTAAACCTTTTTTC	<i>EcoR</i> I
spkC-F1	ATGGTTACCCCACTCAAACCT	
spkC-R1	CTAATTTTGCTCGGGGTC	
spkC-kan-F1	ATCCCAAACATTTTTTGCAACT	
spkC-kan-R1	TTGCCTCCTTTGTGACCACC	
0599-R1	ATCCCAAACATTTTTTGCAACT	
0599-F1	TTGCCTCCTTTGTGACCACC	

的方法用 spkCUP-F1/spkCUP-R1、spkC-FDN3/spkCDN-R3 引物分别扩增基因,得到 *spkC* 上游同源臂和 *spkC* 下游同源臂片段(上下游 1000 bp 基因片段),用 spkC-F2/spkC-R2 引物扩增 pEGFP-N1 质粒,得到卡那霉素抗性基因。将上述 3 个产物回收后作为模板,以 spkCUP-F1/spkCDN-R3 为引物扩增,得到全长片段 spkC-kan。将全长产物 spkC-kan 和载体 pUC18 分别用 *EcoR* I、*Hind* III 进行酶切,将产物纯化回收后,用 T4 连接酶连接后转化至大肠杆菌 DH5 $\alpha$ ,经 PCR 验证,引物见表 1。50  $\mu$ g/mL 卡那霉素和 50  $\mu$ g/mL 氨苄青霉素筛选后将阳性克隆送至生工生物工程(上海)股份有限公司测序。

**1.3.2 集胞藻的转化:** 参照 Williams<sup>[13]</sup>的方法,将生长至对数期的集胞藻离心收集,用新鲜 BG11 培养基悬浮藻细胞至藻细胞  $OD_{730}$  值为 2.5 左右。加入含目的片段的质粒 10  $\mu$ g,低光照温育 6 h。随后在含有卡那霉素抗性(50  $\mu$ g/mL)的 BG11 固体培养基上进行涂布筛选,并在 30  $^{\circ}$ C、50  $\mu$ mol/(m<sup>2</sup>·s) 连续光照条件下培养。待阳性转化子出现后,逐

步增加平板上的抗生素浓度,进行传代培养,并最终获得完全基因敲除的集胞藻 6803 突变株  $\Delta$ spkC。针对 *spkC* 基因、*kan<sup>R</sup>* 基因和整个同源重组片段分别设计上、下游引物,并在同源臂(L)上游 700 bp 及同源臂(R)下游 540 bp 处设计引物,通过 PCR 扩增及测序进行检测,引物见表 1。

#### 1.4 生长曲线的测定

取处于对数生长期( $OD_{730}=0.6-0.8$ )的集胞藻,调节初始接种浓度  $OD_{730}$  值为 0.1,每 24 h 取样 1 次,用普析 Tu-1810 紫外分光光度计测定  $OD_{730}$  值,绘制生长曲线。实验组和对照组各设置 3 个平行。

#### 1.5 全细胞吸收光谱测定

用普析 Tu-1810 紫外分光光度计进行波长扫描,扫描范围为 400–800 nm,扫描速度为快速。测量前,先用 BG11 培养基进行基线校正,测量时取 3 mL 藻液进行检测。以波长为横坐标,以对应的  $OD$  值为纵坐标作图绘制全细胞吸收光谱图。各样品的全细胞吸收光谱图以 730 nm 处的  $OD$  值进行归一化处理。

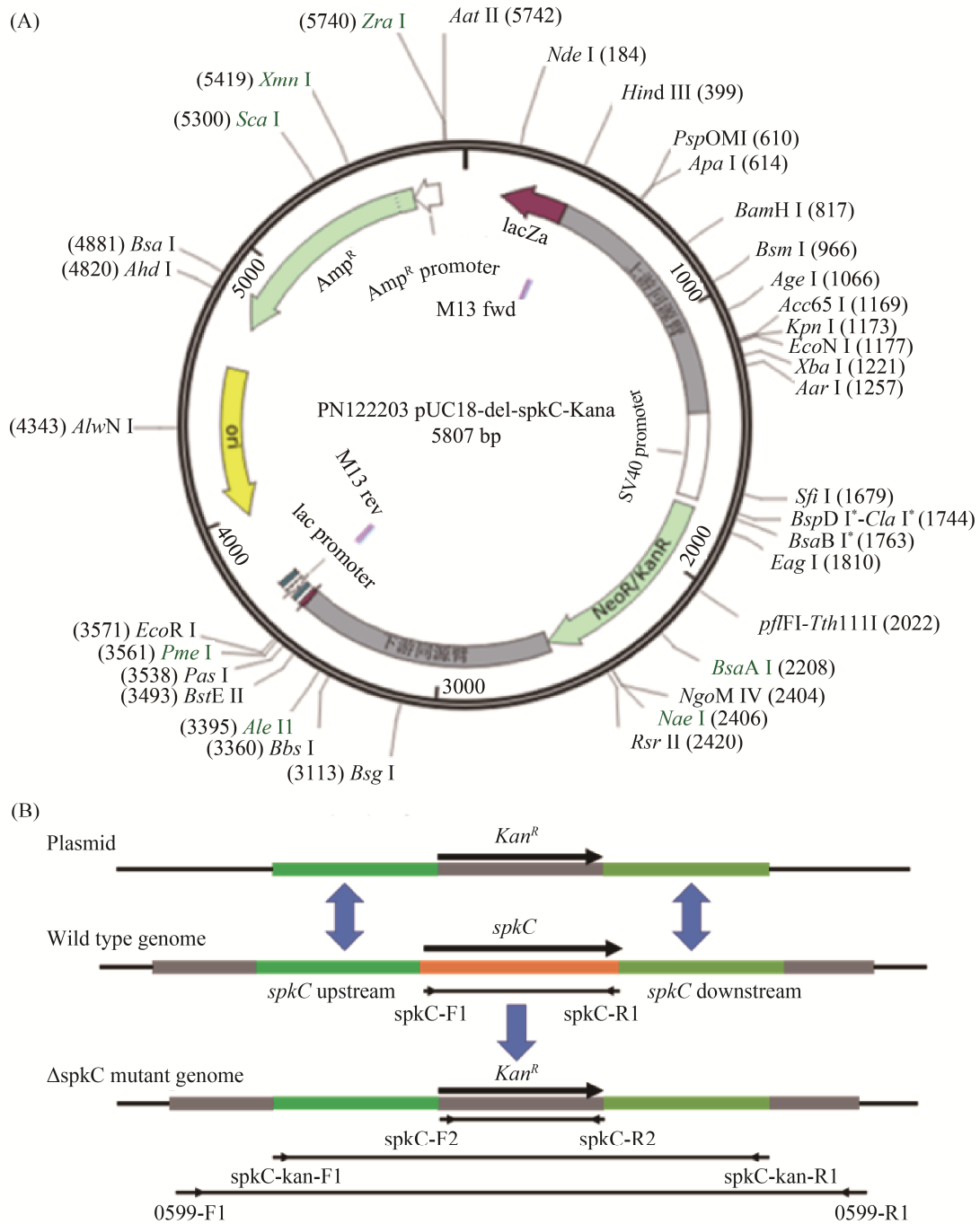


图 1.  $\Delta$ spkC 突变株构建

Figure 1. Construction of  $\Delta$ spkC mutant. A: Construction of the *spkC* homologous recombination vector; B: Schematic representation of the constructs used to generate  $\Delta$ spkC mutant.

### 1.6 高温胁迫处理

生长曲线和全细胞吸收测量时, 高温胁迫处理条件为 42 °C 水浴, 50  $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$  连续光照静

置培养; 叶绿素荧光参数测定时, 高温胁迫温度为 45 °C, 处理时间为 30、60、90、120、150 min。每个时间点设置 3 个平行。

## 1.7 叶绿素荧光参数的测量

叶绿素荧光参数用水下调制荧光仪 Diving-PAM 进行测定。测量时, 取处于对数期( $OD_{730}=0.6$ )的藻液, 先将集胞藻 PCC 6803 进行 2 min 暗处理, 实际光量子产量(Yield)和反映光合系统 II(PSII)的最大量子产量的  $F_v/F_m$  可直接读出, 其中标准测量光强为  $0.15 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ , 饱和脉冲为  $5640 \mu\text{E}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 。

## 1.8 藻株存活情况检测

将初始  $OD_{730}$  值为 0.1 的藻液, 分别在  $42^\circ\text{C}$  下高温处理 1 d 和 5 d 后, 调节  $OD_{730}=0.1$ , 放置于正常培养条件下培养, 每 24 h 测定  $OD_{730}$ , 绘制生长曲线。

## 2 结果和分析

### 2.1 突变株的构建和鉴定

PCR 验证突变株基因的敲除情况, 分别检测野生株和突变株基因组 DNA 中是否存在  $kan^R$  基因、 $spkC$  基因、整个同源交换片段  $spkC\text{-}kan$ , 以及克隆自同源臂(L)上游 700 bp 至同源臂(R)下游 540 bp 的大片段, 检测外源序列是否进行同源重组。结果如图 2 所示。

使用  $kan^R$  基因、 $spkC$  基因、整个同源交换片段  $spkC\text{-}kan$  的引物, 以及在同源臂(L)上游 700 bp 至同源臂(R)下游 540 bp 片段处设计的引物对藻株进行鉴定, 引物序列见表 1。电泳图表明突变株中存在  $kan^R$  抗性基因, 而  $spkC$  基因条带消失。此外, 对整个同源交换片段  $spkC\text{-}kan$  及同源臂(L)上游 700 bp 至同源臂(R)下游 540 bp 片段进行测序的结果表明,  $kan^R$  抗性基因已经替换  $spkC$  基因, 验证了 PCR 的检验结果。以上结果表明  $spkC$  基因完全敲除, 突变株  $\Delta spkC$  已构建成功。

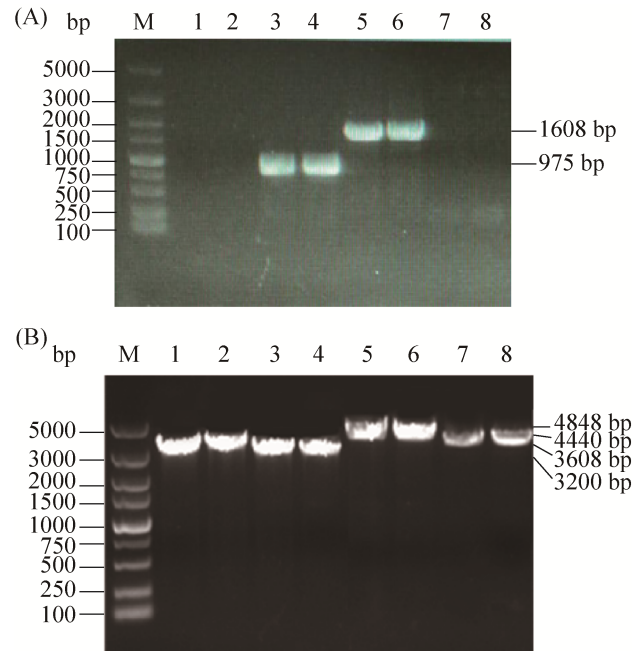


图 2.  $\Delta spkC$  突变株 DNA 水平鉴定

Figure 2. The identification of  $\Delta spkC$  mutant in DNA level. A: PCR analysis of genomic DNA from wild type (lanes 1, 2, 5, 6) and  $\Delta spkC$  (lanes 3, 4, 7, 8) mutant using the primers amplifying the open reading frame of  $spkC$  (lanes 1–4) or the fragment of  $kan^R$  (lanes 5–8). B: PCR analysis of genomic DNA from wild type (lanes 1, 2, 5, 6) and  $\Delta spkC$  (lanes 3, 4, 7, 8) mutant using the primers amplifying the open reading frame of  $spkC\text{-}kan$  or the fragment from 700 bp upstream of homology arm (L) to 540 bp downstream of homology arm (R).

### 2.2 正常培养条件下藻株的生长情况

为了检测  $spkC$  基因敲除是否对藻株的生长产生影响, 本实验检测了突变株与野生株在正常培养条件下的生长情况, 结果显示, 野生株和突变株的生长速率相似(图 3)。另外, 藻株叶绿素 a、藻胆色素、类胡萝卜素特征峰分别为 675 nm、625 nm、485 nm<sup>[14]</sup>, 据此检测处于对数期( $OD_{730}=0.6$ )的野生株和突变株色素的相对含量, 结果显示野生株和突变株的色素含量略有不同(图 4), 但是无显著

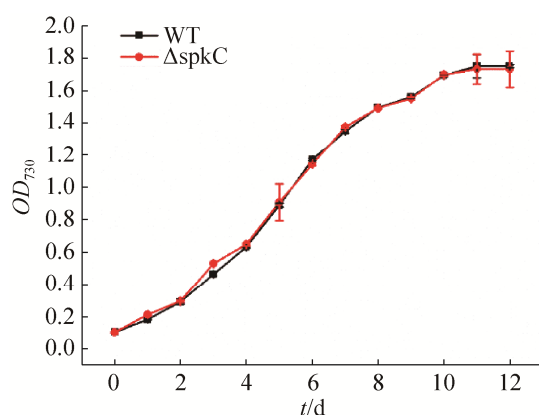


图 3. 正常培养条件下野生株和突变株的生长曲线  
Figure 3. The growth curve of wild strain and  $\Delta spkC$  mutant under normal condition. Error bars indicate standard error of triplicate.

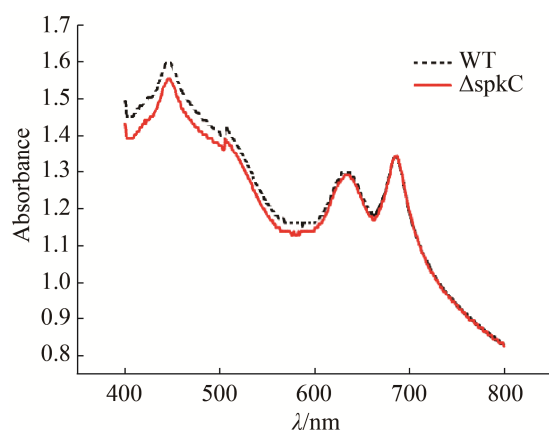


图 4. 处于对数期的藻株的吸收光谱  
Figure 4. The whole cell absorption spectra of wild type and mutant strains at exponential phase.

性差异( $P>0.1$ )。综上所述,藻株的生长情况与色素含量没有明显差别,说明 *spkC* 基因敲除对集胞藻的生长基本没有影响。

## 2.3 高温胁迫下野生株和突变株的表型差异

**2.3.1 高温胁迫(42 °C)下藻株生长情况:** 高温 42 °C 处理后,野生株和突变株的生长速率均减慢(图 5),表明二者均受高温胁迫的影响。突变株

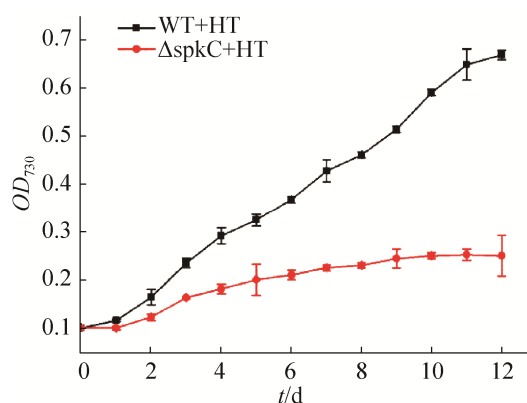


图 5. 高温胁迫(42 °C)下生长曲线  
Figure 5. The growth curve of wild strain and mutant under high temperature stress (42 °C). Error bars indicate standard error of triplicate.

$\Delta spkC$  在第 6 天的生长几乎停滞,由此推断 *SpkC* 可能与集胞藻适应高温胁迫有关,并在响应高温胁迫中发挥重要作用。

**2.3.2  $\Delta spkC$  突变株在高温胁迫(42 °C)下的全细胞吸收光谱:** 通过比较类胡萝卜素、藻胆色素、叶绿素的含量来分析敲除 *spkC* 基因对集胞藻 PCC 6803 生长的影响(图 6)。高温处理后,野生株和突变株中三种色素的含量均下降,表明高温处理对野生株和突变株的色素合成有抑制作用,并对其生长状态造成影响。第 1 天热处理后,野生株和突变株的三种色素含量均显著下降,并且突变株的色素含量降低幅度相对更大,这表明高温可能对突变株的影响更为显著。高温处理第 2 天,野生株和突变株的色素含量相近。高温处理第 3 天,野生株的色素含量上升,但突变株的色素含量几乎没有变化,表明野生株可能已经开始适应高温环境,而突变株的色素合成则一直受到抑制。综合上述结果,可以推断 *spkC* 编码基因 *slr0599* 可能对集胞藻在高温胁迫适应过程中的色素合成起到调控作用。

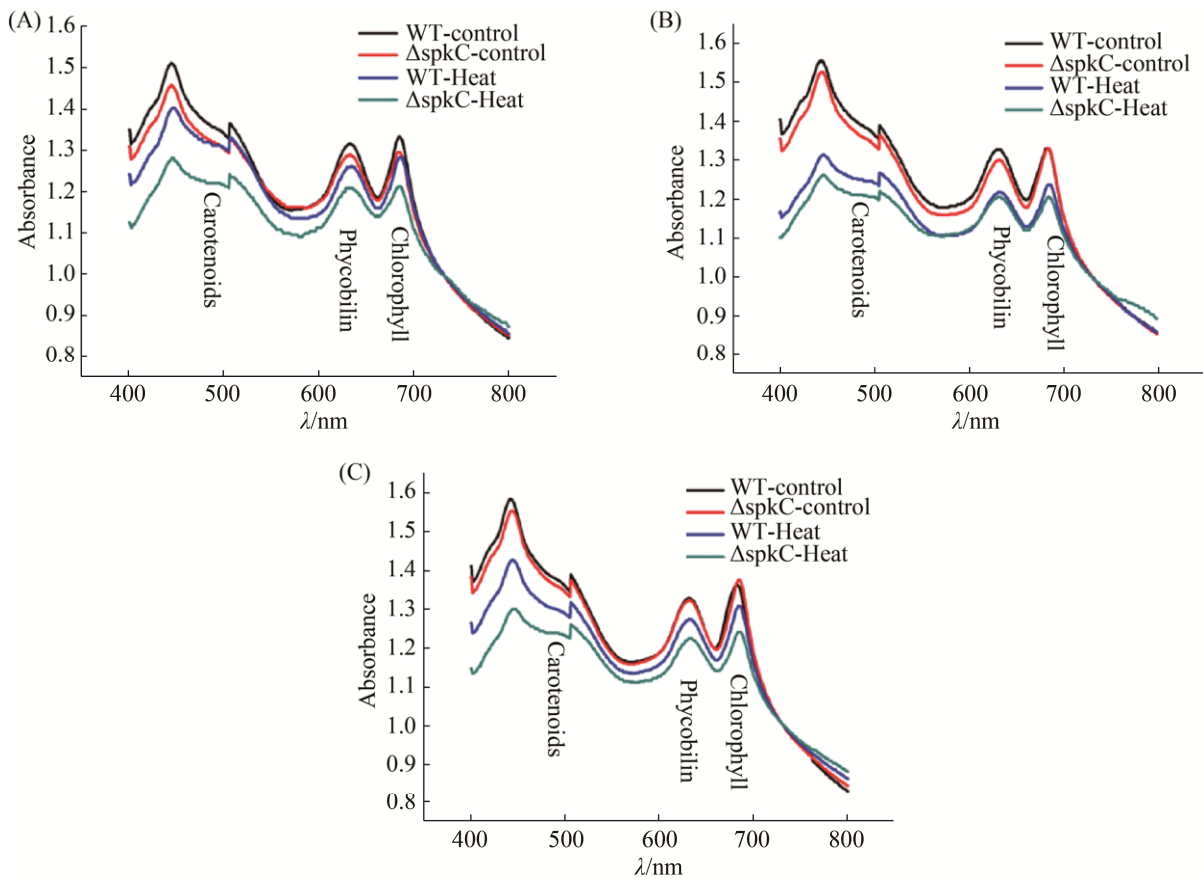


图 6. 野生株和  $\Delta spkC$  突变株在高温胁迫下的全细胞吸收图

Figure 6. The whole cell absorption spectra of wild strain and mutant under high temperature stress. Whole cell absorption spectra was measured after 1 day (A), 2 days (B), 3 days (C) of growth under high temperature.

**2.3.3  $\Delta spkC$  突变株在高温胁迫(45 °C)下叶绿素荧光参数:**  $F_v/F_m$  是 PSII 的最大量子产量, 反映了光合系统 II 的最大活性。一般情况下, PSII 在外界胁迫条件下受损,  $F_v/F_m$  会显著降低<sup>[15]</sup>。YII 是作用光下 PS II 实际光化学效率, 反映了光合作用的能量效率。本研究检测了在高温胁迫下, 藻株叶绿素荧光参数的变化情况(图 7)。在高温胁迫(45 °C)后, 野生株和突变株的  $F_v/F_m$  均下降, 这表明高温对二者的生长均有抑制作用。高温胁迫可能造成了藻株 PS II 的结构破坏, 从而使光合功能降低。在  $F_v/F_m$  变化曲线中, 野生株的  $F_v/F_m$  下降了约 70.5%, 而突变株则下降 88.0%; 与野生株相比, 突变株的  $F_v/F_m$  显著降低( $P < 0.05$ )。在高

温胁迫(45 °C)后, 野生株和突变株的 YII 呈下降趋势, 表明高温抑制野生株和突变株的能量传递效率。在高温胁迫 150 min 后, 野生株 YII 值为突变株的 3 倍, 说明突变株对高温更加敏感; 观察 YII 变化曲线, 二者每个时间点的  $F_v/F_m$  之间的  $P$  值均小于 0.05, 表明突变株  $\Delta spkC$  较 WT 的明显降低。以上结果说明,  $spkC$  基因敲除后, 藻株的光合系统 II 更容易受到高温的影响, 光合能力受损程度较野生株更为严重。

#### 2.4 高温胁迫(42 °C)恢复阶段藻株的生长情况

将野生株和突变株放置在 42 °C 下分别处理 1 d 和 5 d, 然后调节  $OD_{730}$  至 0.1, 置于正常温度(30 °C)下生长。结果如图 8 所示, 高温处理 1 d

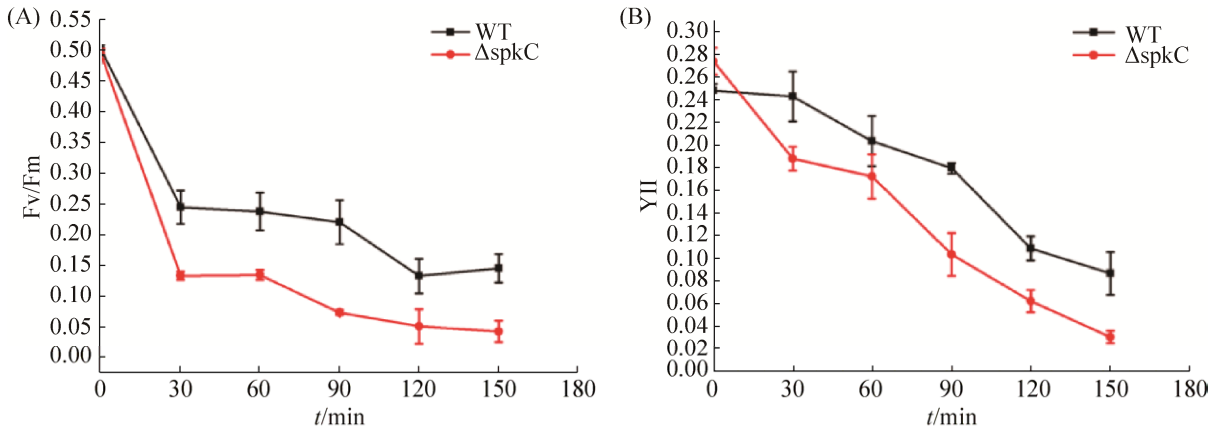


图 7. 高温胁迫下(45 °C)突变株的光合系统 II 活性

Figure 7. PSII activity of wild and mutant strains under high temperature stress (45 °C). A: Maximal photochemical efficiency of photosystem II. Error bars indicate standard error of triplicate. B: Yield. Error bars indicate standard error of triplicate.

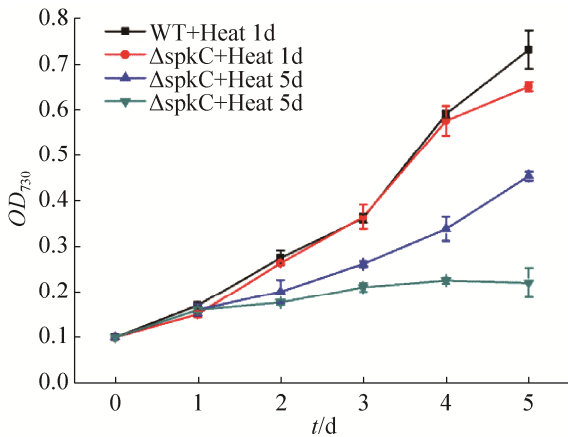


图 8. 高温胁迫(42 °C)恢复后野生株与 ΔspkC 突变株的生长曲线

Figure 8. The growth curve of wild strain and mutant under the recovery. Error bars indicate standard error of triplicate.

后恢复生长, 野生株和突变株的长势没有显著差异; 但是在高温处理 5 d 后, 突变株生长缓慢, 几乎停滞生长, 表明长期的高温对其生长造成了损害。据此推断, *spkC* 基因的缺失会造成藻株对高温的耐受性下降, 并且在正常条件下也无法恢复正常生长。

### 3 讨论

集胞藻 PCC 6803 具有复杂的信号转导网络系统, 能够适应多样的生存环境<sup>[16]</sup>。丝氨酸/苏氨酸激酶被认为是真核生物信号转导网络的重要组成部分, 于 1991 年被发现也存在于原核生物中, 并在原核生物的细胞功能调节中发挥重要作用<sup>[9]</sup>。SpkC 是集胞藻 PCC 6803 中的一种丝氨酸/苏氨酸激酶, 研究其在信号转导中的功能对于完善信号转导调控机制具有重要意义。本研究通过敲除 *spkC* 基因来构建突变株, 并观察基因敲除突变株 ΔspkC 在高温胁迫下的表型, 以此来探究 SpkC 在响应高温信号时的作用。

集胞藻最适生长温度为 30–35 °C, 一般认为温度升高 10 °C 以上, 则藻株受到高温胁迫<sup>[17]</sup>。在 42 °C 高温条件下, 突变株生长速度明显慢于野生株, 表明 ΔspkC 突变株为高温敏感株, 这与实验室之前的研究结果一致<sup>[12]</sup>; 色素是集胞藻类囊体膜的重要组成部分, 是参与光合作用的主要参与者, 光合色素的变化与植物适应环境的能力有



关<sup>[18]</sup>。叶绿素是光能吸收的初始物质，高温会抑制叶绿素的合成，而且由于高温下活性氧大量积累，加速叶绿素分解<sup>[19]</sup>。类胡萝卜素是光合膜的重要成分，其参与了光捕获以及 PII 光合系统复合物的组装，从而使藻株不受外界环境胁迫的影响<sup>[20]</sup>。而藻胆色素的含量变化会导致光合作用中的电子传递链中氧化还原状态的改变<sup>[21]</sup>。在本研究中，我们检测了高温胁迫前 3 天色素的变化情况，发现三种色素含量均在下降，并且基因敲除突变株的色素含量一直下降，而野生株的色素含量则是先下降后上升，表明基因的敲除对色素合成造成严重影响。同时，突变株的光合能力也相应下降，说明其耐受逆境的能力也下降。

光合系统 II 是对热最为敏感的光合作用元件<sup>[22-23]</sup>，叶绿素荧光的变化可以灵敏地反映出逆境对光合作用光反应阶段的影响<sup>[24]</sup>。本研究中对上述两个叶绿素荧光参数进行了研究，并发现在 45 °C 高温处理下， $\Delta\text{spkC}$  的 Fv/Fm 和 YII 显著低于野生株，其光合系统活性严重受损，影响了光合电子传递的过程。该结果与 Tuominen 等<sup>[25]</sup>在研究 SigB 调控高温响应的结果趋势相同，提示 SpkC 在高温响应上可能与 SigB 有相同的作用机制。

同时，本文对藻株在高温胁迫恢复阶段的存活情况进行了分析。在 42 °C 高温处理 1 d 后，藻株存活情况没有出现明显差异。然而在高温胁迫 5 d 后，野生株生长恢复，这与 Sheng 等<sup>[26]</sup>的研究结果相符，即野生株经历 4 d 长期高温胁迫后仍可以恢复生长。突变株  $\Delta\text{spkC}$  高温胁迫恢复阶段生长停滞，表明  $\Delta\text{spkC}$  的藻细胞生存能力下降，而且在基因敲除后耐热性下降。

在本研究中，我们根据生理表型确定了丝氨酸/苏氨酸激酶 SpkC 参与高温胁迫信号的响应。研究结果显示，激酶 SpkC 与色素合成、光合系统

等途径存在调控关系。由此推测，高温胁迫下集胞藻 PCC 6803 中 SpkC 的缺失导致下游靶序列，如光合系统中的相关基因——藻胆蛋白、类胡萝卜素和叶绿素合成基因等高温胁迫响应基因，其表达受到抑制或激酶的缺失使得下游相关蛋白的磷酸化程度受到影响，从而导致藻株对高温胁迫的响应出现缺陷，这也提示我们后续有必要从分子水平上研究 SpkC 与二者之间的调控作用。此外，作为一种可能的温度调控因子，SpkC 可能与热休克蛋白之间也存在调控关系，这些蛋白包括 GroES、GroEL、DnaJ、DnaK、HspA 等，均在集胞藻的热适应上起到重要作用<sup>[3]</sup>。作为蓝藻信号转导系统的一部分，丝氨酸/苏氨酸激酶还可能与其他信号转导系统存在相互作用。如今，研究公认的高温调控因子有组氨酸激酶 Hik34<sup>[27]</sup>、RNA 聚合酶  $\sigma$  因子 SigB 和 SigC<sup>[28]</sup>等，研究 SpkC 与以上几个信号转导因子间的作用，将为揭示丝氨酸/苏氨酸激酶 SpkC 在蓝藻信号转导中调节机制、解析蓝藻信号转导系统间的相互作用提供证据。

## 参 考 文 献

- [1] Rozanov AY, Astafieva MM. The evolution of the Early Precambrian geobiological systems. *Paleontological Journal*, 2009, 43(8): 911-927.
- [2] Rast A, Rengstl B, Heinz S, Klingl A, Nickelsen J. The role of Slr0151, a tetratricopeptide repeat protein from *Synechocystis* sp. PCC 6803, during photosystem II assembly and repair. *Frontiers in Plant Science*, 2016, 7: 605.
- [3] Kobayashi I, Watanabe S, Kanesaki Y, Shimada T, Yoshikawa H, Tanaka K. Conserved two-component Hik34-Rre1 module directly activates heat-stress inducible transcription of major chaperone and other genes in *Synechococcus elongatus* PCC 7942. *Molecular Microbiology*, 2017, 104(2): 260-277.
- [4] Ibrahim IM, Puthiyaveetil S, Allen JF. A two-component regulatory system in transcriptional control of photosystem stoichiometry: redox-dependent and sodium ion-dependent phosphoryl transfer from cyanobacterial histidine kinase Hik2

- to response regulators Rre1 and RppA. *Frontiers in Plant Science*, 2016, 7: 137.
- [5] Anderson SL, McIntosh L. Light-activated heterotrophic growth of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803: a blue-light-requiring process. *Journal of Bacteriology*, 1991, 173(9): 2761–2767.
- [6] Grigorieva G, Shestakov S. Transformation in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. 6803. *FEMS Microbiology Letters*, 1982, 13(4): 367–370.
- [7] Rajagopal L, Vo A, Silvestroni A, Rubens CE. Regulation of purine biosynthesis by a eukaryotic-type kinase in *Streptococcus agalactiae*. *Molecular Microbiology*, 2005, 56(5): 1329–1346.
- [8] Zorina A, Stepanchenko N, Novikova GV, Sinetova M, Panichkin VB, Moshkov IE, Zinchenko VV, Shestakov SV, Suzuki I, Murata N, Los DA. Eukaryotic-like Ser/Thr protein kinases SpkC/F/K are involved in phosphorylation of GroES in the cyanobacterium *Synechocystis*. *DNA Research*, 2011, 18(3): 137–151.
- [9] Zorina AA, Bedbenov VS, Novikova GV, Panichkin VB, Los DA. Involvement of serine/threonine protein kinases in the cold stress response in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803: functional characterization of SpkE protein kinase. *Molecular Biology*, 2014, 48(3): 390–398.
- [10] Liang CW, Zhang XW, Chi XY, Guan XY, Li YX, Qin S, Shao HB. Serine/threonine protein kinase SpkG is a candidate for high salt resistance in the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *PLoS One*, 2011, 6(5): e18718.
- [11] Kamei A, Yuasa T, Geng XX, Ikeuchi M. Biochemical examination of the potential eukaryotic-type protein kinase genes in the complete genome of the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *DNA Research*, 2002, 9(3): 71–78.
- [12] 张晓雯. 蓝藻信号转导系统的比较基因组学分析及重要基因功能的验证. 中国科学院研究生院(海洋研究所)博士学位论文, 2008.
- [13] Williams JGK. Construction of specific mutations in photosystem II photosynthetic reaction center by genetic engineering methods in *Synechocystis* 6803. *Methods in Enzymology*, 1988, 167: 766–778.
- [14] Antal T, Kurkela J, Parikainen M, Kårlund A, Hakkila K, Tyystjärvi E, Tyystjärvi T. Roles of group 2 sigma factors in acclimation of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 to nitrogen deficiency. *Plant and Cell Physiology*, 2016, 57(6): 1309–1318.
- [15] Björkman O, Demmig B. Photon yield of O<sub>2</sub> evolution and chlorophyll fluorescence characteristics at 77 K among vascular plants of diverse origins. *Planta*, 1987, 170(4): 489–504.
- [16] Lei HJ, Chen G, Wang YL, Ding QL, Wei D. Sll0528, a site-2-protease, is critically involved in cold, salt and hyperosmotic stress acclimation of cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *International Journal of Molecular Sciences*, 2014, 15(12): 22678–22693.
- [17] Sinetova MA, Los DA. Lessons from cyanobacterial transcriptomics: universal genes and triggers of stress responses. *Molecular Biology*, 2016, 50(4): 606–614.
- [18] Willekens H, van Camp W, van Montagu M, Inzé D, Langebartels C, Sandermann Jr H. Ozone, sulfur dioxide, and ultraviolet B have similar effects on mRNA accumulation of antioxidant genes in *Nicotiana plumbaginifolia* L. *Plant Physiology*, 1994, 106(3): 1007–1014.
- [19] Allakhverdiev SI, Kreslavski VD, Klimov VV, Los DA, Carpentier R, Mohanty P. Heat stress: an overview of molecular responses in photosynthesis. *Photosynthesis Research*, 2008, 98(1/3): 541–550.
- [20] Zakar T, Herman E, Vajravel S, Kovacs L, Knoppová J, Komenda J, Domonkos I, Kis M, Gombos Z, Laczko-Dobos H. Lipid and carotenoid cooperation-driven adaptation to light and temperature stress in *Synechocystis* sp. PCC6803. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 2017, 1858(5): 337–350.
- [21] Schwarzkopf M, Yoo YC, Hüchelhoven R, Park YM, Proels RK. Cyanobacterial phytochrome2 regulates the heterotrophic metabolism and has a function in the heat and high-light stress response. *Plant Physiology*, 2014, 164(4): 2157–2166.
- [22] Rowland JG, Pang X, Suzuki I, Murata N, Simon WJ, Slabas AR. Identification of components associated with thermal acclimation of photosystem II in *Synechocystis* sp. PCC6803. *PLoS One*, 2010, 5(5): e10511.
- [23] Mamedov M, Hayashi H, Murata N. Effects of glycinebetaine and unsaturation of membrane lipids on heat stability of photosynthetic electron-transport and phosphorylation reactions in *Synechocystis* PCC6803. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1993, 1142(1/2): 1–5.
- [24] Lloyd J, Kriedemann P, Prior L, Grieve A. Citrus leaf fluorescence: water and salt effects. *Acta Horticulturae*, 1986, 175: 333–337.
- [25] Tuominen I, Pollari M, Tyystjärvi E, Tyystjärvi T. The SigB  $\sigma$  factor mediates high-temperature responses in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC6803. *FEBS Letters*, 2006, 580(1): 319–323.
- [26] Sheng J, Kim HW, Badalamenti JP, Zhou C, Sridharakrishnan S, Krajmalnik-Brown R, Rittmann BE, Vannela R. Effects of

- temperature shifts on growth rate and lipid characteristics of *Synechocystis* sp. PCC6803 in a bench-top photobioreactor. *Bioresource Technology*, 2011, 102(24): 11218–11225.
- [27] Červený J, Sinetova MA, Zavřel T, Los DA. Mechanisms of high temperature resistance of *Synechocystis* sp. PCC 6803: an impact of histidine kinase 34. *Life*, 2015, 5(1): 676–699.
- [28] Koskinen S, Hakkila K, Gunnelius L, Kurkela J, Wada H, Tyystjärvi T. *In vivo* recruitment analysis and a mutant strain without any group 2  $\sigma$  factor reveal roles of different  $\sigma$  factors in cyanobacteria. *Molecular Microbiology*, 2016, 99(1): 43–54.

## Response of serine/threonine protein kinase SpkC to high temperature stress in *Synechocystis* sp. PCC 6803

Jialin Zhao<sup>1,2</sup>, Jun Chen<sup>1</sup>, Yulin Cui<sup>1</sup>, Shuxian Yu<sup>1</sup>, Gao Chen<sup>3,4</sup>, Song Qin<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Yantai Institute of Coastal Zone Research, Chinese Academy of Sciences, Yantai 264003, Shandong Province, China

<sup>2</sup> University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

<sup>3</sup> Biotechnology Research Center, Shandong Academy of Agricultural Sciences, Jinan 250100, Shandong Province, China

<sup>4</sup> Shandong Provincial Key Laboratory of Genetic Improvement, Ecology and Physiology of Crops, Jinan 250100, Shandong Province, China

**Abstract:** Serine/threonine protein kinases play important roles to sense and transduce signal to cope with external environment. However, functions of many serine/threonine protein kinases in cyanobacteria are still unknown. **[Objective]** This study aims to explore whether SpkC in *Synechocystis* sp. PCC 6803 responses to high temperature stress. **[Methods]** We used the homologous recombination method to construct the *spkC* gene knockout mutant ( $\Delta$ spkC), and then compared the growth rate, pigment contents of  $\Delta$ spkC mutant and the wild strain under high temperature stress. In addition, we detected chlorophyll fluorescence under high temperature stress. Recoveries of  $\Delta$ spkC and wild strain from high-temperature stress were determined through measuring the growth rate under normal temperature. **[Results]** Compared with wild type strain,  $\Delta$ spkC mutant grew slower, and the contents of three photosynthetic pigments (chlorophyll, carotenoid and phycobilin) decreased after high temperature stress at 42 °C. The activity of photosynthetic system II in  $\Delta$ spkC decreased more rapidly at 45 °C. What's more,  $\Delta$ spkC strain was not able to recover after high-temperature stress for 5 days; their survival rate was significantly lower than wild-type. **[Conclusion]** The deletion of *spkC* led to severe defect response to high-temperature stress in *Synechocystis* sp. PCC 6803, which suggests that serine/threonine protein kinase SpkC is involved in response processes against high temperature stress.

**Keywords:** *Synechocystis* sp. PCC 6803, serine/threonine protein kinase SpkC, high temperature stress

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (41406192, 41176144, and 41376139), by the National Key Research and Development Program-China (2016YFF0202304) and by the Science and Technology Program of Yantai City (2016JHZB007)

\*Corresponding author. Tel: +86-535-2109089; E-mail: sqin@yic.ac.cn

Received: 7 November 2017; Revised: 24 January 2018; Published online: 7 March 2018