

铁胁迫对微囊藻毒素合成酶McyC和McyI表达的影响

王飞 曾晓丽 张承才

IRON STRESS ON THE EXPRESSION OF MICROCYSTIN SYNTHETASE MCYC AND MCYI

WANG Fei, ZENG Xiao-Li, ZHANG Cheng-Cai

在线阅读 View online: https://doi.org/10.7541/2023.2022.0217

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

草鱼IRE1-like基因的克隆、组织表达及其对微囊藻毒素-LR的响应

CLONING AND TISSUES EXPRESSION OF INOSITOL–REQUIRING ENZYME 1–LIKE (*IRE*1–*LIKE*) GENE IN GRASS CARP AND ITS RESPONSE TO MICROCYSTIN–LR

水生生物学报. 2020, 44(6): 1168-1173 https://doi.org/10.7541/2020.135

草鱼TP53INP1基因的克隆及微囊藻毒素对其表达的影响

MOLECULAR CLONING OF *TP53INP*1 IN GRASS CARP AND ITS EXPRESSION IN RESPONSE TO MICROCYSTINS 水生生物学报. 2021, 45(4): 722-727 https://doi.org/10.7541/2021.2020.101

生长素吲哚乙酸对铜绿微囊藻生理生化及产毒特性的影响

EFFECTS OF IAA ON THE PHYSIOLOGICAL AND TOXIN–PRODUCING CHARACTERISTICS OF *MICROCYSTIS* AERUGINOSA

水生生物学报. 2018, 42(4): 832-838 https://doi.org/10.7541/2018.102

群体和单细胞微囊藻对短期高光胁迫的生理响应

THE PHYSIOLOGICAL RESPONSE OF COLONIAL AND SINGLE–CELLED FORM OF *MICROCYSTIS* TO SHORT–TERM HIGH STRESS

水生生物学报. 2017, 41(2): 443-447 https://doi.org/10.7541/2017.55

铜绿微囊藻对轮虫生命表参数和表型特征的影响

EFFECTS OF *MICROCYSTIS AERUGINOSA* ON THE LIFE–TABLE PARAMETERS AND PHENOTYPIC TRAITS OF ROTIFERS

水生生物学报. 2017, 41(6): 1362-1368 https://doi.org/10.7541/2017.168

草鱼自噬相关基因Beclin1的克隆及其在MC-LR胁迫下的表达特征

CLONING OF *BECLIN*1, AN AUTOPHAGY GENE, AND IT'S EXPRESSION UNDER MICROCYSTIN–LR STRESS IN GRASS CARP (*CTENOPHARYNGODON IDELLA*)

水生生物学报. 2019, 43(3): 479-485 https://doi.org/10.7541/2019.059



关注微信公众号,获得更多资讯信息

doi: 10.7541/2023.2022.0217

铁胁迫对微囊藻毒素合成酶McyC和McyI表达的影响

王 飞^{1,2} 曾晓丽¹ 张承才¹

(1. 中国科学院水生生物研究所, 武汉 430072; 2. 中国科学院大学, 北京 100049)

摘要:为研究微囊藻毒素合成酶基因的蛋白表达水平与环境因子间的关系,文章以位于微囊藻毒素合成基因 簇两个操纵子中的mcyC和mcyI基因为代表,利用制备的高效McyC和McyI多克隆抗体,采用Western Blot技术 检测了铁胁迫对微囊藻毒素合成酶McyC和McyI蛋白表达水平的影响。研究结果表明,在铁胁迫下,铜绿微 囊藻PCC 7806藻细胞内McyC和McyI的蛋白水平变化趋势一致,且与相同条件下藻细胞内毒素的合成产量变 化一致,暗示铁胁迫直接通过影响微囊藻毒素合成酶的表达水平调控毒素的合成。研究为进一步了解微囊藻 毒素的合成机制提供了基础材料。

关键词:微囊藻毒素;	微囊藻毒素	合成基因簇;	铁胁迫;	McyC;	McyI
中图分类号:0178.1:(0344 ⁺ .1	文献标识码:	A	文章编号	5: 1000-3207(2023)07-1036-06

微囊藻常见于各种淡水中, 偶见于海水或盐水 水域^[1]; 细胞多呈蓝绿色, 形态成圆形或椭圆形, 胞 内含有核糖体(Ribosome)、糖原颗粒(Glycogen granule)、多聚磷酸体(Polyphosphate body)、羧酶体 (Carboxysome)、脂滴、结构颗粒和伪空胞(Gas vesicle)等^[2]。微囊藻在富营养化水体中大量繁殖, 在水面形成绿色团块的现象被称为微囊藻水华。 微囊藻水华是暴发频率最高且影响范围最广的蓝 藻水华^[3], 常见于我国各大中型富营养化湖泊, 如滇 池、太湖和巢湖等。另外, 微囊藻水华也暴发于其 他流速较缓的淡水水体及沿海海湾中^[4]。

微囊藻毒素主要是由微囊藻等蓝藻产生,是一种环七肽肝毒素,化学结构式是环[D-丙氨酸(D-Ala)-L-R1-赤-β-甲基-D-异天冬氨酸(β-Me-Asp)-L-R2-Adda-D-谷氨酸(Glu)-N-甲基脱氢丙氨(Mdha)], 其中Adda活性基团处于5号位,是微囊藻毒素生物 活性和毒性表达所必需的基团^[5];2号、4号位的 R1和R2均为可变L型氨基酸;3号位的β-Me-Asp和 7号位的Mdha是微囊藻毒素中主要的甲基化修饰 和去甲基化修饰氨基酸位点;除此之外,七肽化合 物中还包括1号位D型丙氨酸和6号位谷氨酸。至今 已发现的微囊藻毒素异构体有200多种^[6],主要差异 是R1和R2位点氨基酸不同^[7]。 微囊藻分为产毒株和无毒株,其产毒与否主要 由其遗传特征决定;通过比较产毒藻株与无毒株间 的基因差异,以及比较插入或缺失突变相关基因等 突变株合成微囊藻毒素的能力,Dittmann等^[8]发现 产毒微囊藻主要包含合成微囊藻毒素的基因簇。 微囊藻毒素合成基因簇全长55 kb,包含10个开放阅 读框,由两个方向相反的操纵子调节基因转录。其 中*mcyD/E/F/G/H/I/J*操纵子主要编码聚酮合酶、非 核糖体肽合成酶、甲基转移酶、消旋酶和脱氢酶 (McyI)等,负责微囊藻毒素活性基团Adda的合成; 而*mcyA/B/C*操纵子负责编码McyA、McyB和McyC 三个非核糖体肽合成酶,主要完成其他位点氨基酸 的加入及七肽的环化^[7,19]。

大量研究表明微囊藻毒素在细胞内的含量并 不恒定,其合成效率和产量受多种环境因素的影响, 包括温度、光照、营养元素和微量元素等^[9]。在相 对较高温度的一定范围内,某些微囊藻菌株胞内微 囊藻毒素的含量显著高于高温和低温环境中的相 同菌株,环境温度变化可能会影响实验藻株基因的 表达,导致微囊藻细胞出现生长差异,从而影响了 微囊藻毒素的合成^[10]。缺铁可能会导致微囊藻对 数生长期胞内微囊藻毒素含量升高^[11],而调控铁元 素吸收的转录调节因子铁吸收调节蛋白(Ferric up-

收稿日期: 2022-05-17;修订日期: 2022-08-26

通信作者:张承才,研究员,博士生导师; E-mail: cczhang@ihb.ac.cn



基金项目: 国家重点研发计划(2018YFA0903100)资助 [Supported by the National Key R & D Program of China (2018YFA0903100)] 作者简介: 王飞(1994—), 男, 硕士研究生; 研究方向为藻类生长与发育。E-mail: Flyme2017@163.com

take regulator, FurA)可以与*mcy*基因启动子区域结合表明FurA可能与缺铁条件下细胞内毒素含量增加有关^[12]。

目前,主要通过直接检测藻细胞内微囊藻毒素 的含量或间接检测微囊藻毒素合成基因的转录水 平可以反映胞内微囊藻毒素的合成效率。然而,微 囊藻毒素的合成效率理论上是直接由相应合成酶 的量及催化速率共同决定。在不同环境条件下,编 码微囊藻毒素合成酶的基因转录水平变化是否与 其蛋白水平的变化一致还不清楚。本研究从微囊 藻毒素合成基因簇的两个操纵子中分别选取mcyC 基因和mcyI基因作为代表,对它们进行克隆构建原 核表达菌株,制备高纯度的McyC和McyI蛋白和高 效的多克隆抗体,采用Western Blot技术检测铜绿 微囊藻PCC 7806微囊藻毒素合成酶McyC和McyI 在铁胁迫条件下的表达情况,以期为研究微囊藻毒 素合成机制及合成调控机制提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 实验菌株和培养条件

铜绿微囊藻PCC 7806(*Microcystis aeruginosa* PCC 7806)来自中国科学院淡水藻种库。菌株培养 于BG11培养基,恒温30℃,转速180 r/min,光照强度 设定为50—100 µmol/(m²·s)。摇瓶培养至第3天,离 心收集藻细胞(离心力2000×g,室温2min),并用缺铁 BG11培养基漂洗2次,等量接种于缺铁BG11培养基 中,恒温30℃,转速180 r/min,光照强度设定为光强 50—100 µmol/(m²·s),分别培养1d、3d、5d和7d。*E. coli* BL21为宿主用于异源蛋白表达。将设计质粒导 入*E. coli* BL21中,接种于LB液体培养基并在37℃恒 温下培养,再进行低温(16℃)诱导表达。

1.2 实验所用主要分子生物学试剂

本研究中所使用的限制性核酸内切酶及DNA 连接酶均购自TaKaRa公司; Phanta 高保真DNA聚 合酶购自诺唯赞生物科技有限公司; Taq DNA 聚合 酶、Bradford 显色试剂、蛋白胶快速显色液、小 样质粒抽提试剂盒、PCR 产物纯化及胶回收试剂 盒购自武汉川流生物科技有限公司;金牌MIX 高保 真DNA聚合酶购自武汉擎科; PCR 引物由南京金 斯瑞有限公司合成, DNA 序列测序主要由北京铂 尚生物技术有限公司完成;多克隆抗体由武汉戴安 生物技术有限公司制备。

1.3 质粒构建

pET28a表达载体是1个基于T7噬菌体RNA聚 合酶-启动子系统,携带His-Tag的常用质粒载体,通 过在ATG前面的Nde I 位点上插入目的蛋白的基因 序列,转入大肠杆菌BL21中即可获得带有His-Tag 的融合蛋白,以便于纯化高浓度目的蛋白。本研究 主要以铜绿微囊藻PCC 7806基因组DNA为模板, 设计对应引物(PmcyCF1F: 5'-AGGAGATATACCAT GATCAACTTACCACAATCTGACTC-3', Pmcy CF3168R: 5'-TGGTGGTGGTGATGCTCTT GAGCATAGATAATATAATCGCTTAATTCG-3', PmcyIF2734: 5'-TGGTGGTGGTGATGATGAAAA AGATTCCACGCCTCCGGATT-3', PmcyIR3741: 5'-AGGAGATATACCATGACTACTACTTCACC AAAAACTCTGAC-3'),扩增mcyC和mcyI基因片段, 通过一步克隆法连入pET28a表达载体,构建异源表 达质粒。

1.4 重组蛋白表达

挑取pET28a的重组表达质粒转化大肠杆菌 BL21后所得到的转化子,转接到含对应抗生素的 LB液体培养基中,在37℃条件下振荡培养6—8h或 过夜活化。然后将活化后的培养物按1/50或1/100 比例,接种到含抗生素的250 mL液体LB培养基中 进行扩大培养,在37℃条件下培养约4—5h后,OD 值达到0.6—0.8,加入250 µL IPTG(0.5 mol/L),16℃ 条件下诱导20—24h,离心收集大肠杆菌细胞,菌体 可以在-20℃或-80℃低温下保存备用。

1.5 蛋白HisTag亲和层析初纯化

菌体重悬后使用压力破碎仪破碎大肠杆菌细胞,105 kPa重复4到5次。上清液用0.22 μm孔径滤膜过滤后,与镍-硝基三乙酸(Ni-NTA)琼脂糖珠在冰上振荡孵育2h。用低咪唑缓冲液过柱,洗除未结合蛋白和杂蛋白,高咪唑缓冲液洗脱目的蛋白质。用SDS-PAGE凝胶电泳检测蛋白量及纯度,用BSA标准曲线和Denovix超微量紫外可见分光光度计测定目标蛋白的浓度。

1.6 凝胶过滤层析和离子交换层析再纯化

对使用HisTag亲和层析初纯化的蛋白,浓缩后 依次通过凝胶过滤层析和离子交换层析,获得具有 稳定活性、高纯度和高浓度的目的蛋白。凝胶过 滤层析和离子交换层析均采用GE AKTA Pure蛋白 质分离纯化系统,参照仪器使用说明书(通用电气 医疗系统(中国)有限公司)。

1.7 多克隆抗体制备

多克隆抗体的制备由武汉戴安生物技术有限 公司完成。多克隆抗体储存方法如下:在多克隆抗 体血清中加入Tris-HCl(1 mol/L, pH 8.0)和固体 (NH₄)₂SO₄,并使其完全溶解。混合液室温孵育 30min,离心收集沉淀(4000 r/min, 5min)。沉淀加入 等体积饱和(NH₄)₂SO₄(4 mol/L, pH7.0)溶液使其重 悬, 悬浆液-20℃保存备用。

1.8 铜绿微囊藻总蛋白提取

离心收集微囊藻细胞(OD至0.5), 低温4℃, 转 速6500 r/min, 4min。沉淀重悬, 使用陶瓷珠和Fast prep高速震荡破碎藻细胞, 离心收集上清, 98℃条 件下高温变性15min备用, 并用Bradford显色试剂检 测总蛋白浓度。

1.9 Western Blot

取变性蛋白样品进行SDS-PGAE凝胶电泳后, 转膜至聚偏二氟乙烯(PVDF)膜上。PVDF膜放入 含5%脱脂牛奶的PBS缓冲液进行封闭。经PBS-T缓冲液漂洗后,与1/100的一抗(检测效价时加入 1/1000)孵育2—6h。经漂洗再与二抗孵育,摇床室 温1h。用PBS-T缓冲液充分清洗PVDF膜。用ECL 化学发光试剂显色,并在化学发光仪上检测信号。

2 结果

A kD

250

150

100

70

50

40

35

25

20

2.1 高纯度微囊藻毒素合成酶McyC和McyI的制备

铜绿微囊藻PCC 7806的mcyC基因位于微囊藻 毒素合成基因簇的mcyA/B/C操纵子中,基因全长 3876 bp,编码的蛋白含1292个氨基酸,分子量为 147.7 kD。mcyI基因位于微囊藻毒素合成基因簇的 另一个操纵子mcyD/E/F/G/H/I/J中,基因全长1011 bp, 编码的蛋白含337个氨基酸,分子量为37 kD。实验 构建了mcyC和mcyI的异源表达质粒,并在大肠杆菌 中分别进行重组表达。由于在重组表达蛋白的C末 端均带有His-tag标签,我们利用镍离子亲和层析技 术成功纯化获得McyC和McyI两个目的蛋白(图 1A 和1B),经过亲和层析获得的McyC和McyI蛋白纯度 均低于60%。为了获得纯度高于95%的蛋白用于制 备多克隆抗体,经过亲和层析获得的McyC和McyI

UЛ

蛋白进一步采用凝胶过滤层析和阴离子交换层析 技术去除杂蛋白,最终成功获得3 mg/mL的高纯度 McyC蛋白和McyI蛋白用于动物免疫(图 1C)。

2.2 McyC与McyI多克隆抗体效价鉴定

利用纯化的McyC和McyI蛋白进行多克隆抗体的效价检测,结果显示McyC抗体在抗原蛋白量为5 ng时能看到明显印迹, McyI抗体在抗原蛋白量为1 ng时即能看到明显印迹(图 2)。以上结果表明, McyC抗体和McyI抗体均有较高的抗原检测效率。

2.3 铜绿微囊藻PCC 7806 McyC与McyI多克隆抗 体的免疫鉴定

为证实McyC和McyI的血清抗体确实可用于检测铜绿微囊藻PCC 7806中相应功能酶表达水平,首先对在正常条件下培养至对数生长期的细胞总蛋白进行免疫印迹检测。Western Blot检测结果显示,McyC抗体能够检测出一条约150 kD的条带,McyI抗体能够检测出一条约37 kD的条带,均与预期蛋白大小一致(图 3A和图 3B)。除此之外,将McyC抗体与过量异源表达的McyC蛋白混合孵育后,再用于Western Blot检测时不能检测到总蛋白中McyC的信号(图 3C)。以上研究结果共同表明,McyC和McyI多克隆血清抗体具有一定的特异性,能有效用于铜绿微囊藻PCC 7806中相应功能酶表达水平的检测。

2.4 铁胁迫对铜绿微囊藻PCC 7806 McyC 和McyI 蛋白表达的影响

Western Blot结果表明,随着缺铁时间延长,藻 细胞中McyC蛋白的表达量在缺铁1d时保持稳定, 缺铁3d时蛋白量开始下降,并维持下降趋势,到第 7天时McyC蛋白量相对铁胁迫处理前降低了约 90%(图4)。而与之不同的是,随着缺铁培养时间的

E2









A. McyC蛋白(148 kD)初纯化; B. McyI蛋白(37 kD)初纯化; C. 高纯度McyC(泳道1)和McyI(泳道2); M. marker; UI. 诱导前细胞总蛋白; FL. 流穿液; P. 去上清后的细胞沉淀; W20. 含20 mmol/L咪唑缓冲液洗杂; E1—E2. 洗脱蛋白

A. SDS-PAGE of initial purification for McyC (148 kD) by affinity coloum; B. SDS-PAGE of initial purification for McyI by affinity coloum and McyI proteins (37 kD); C. McyC (lane 1) and McyI (lane 2) for antibody preparation; M. Marker; UI. un-induced; FL. Filtration; P. pellet; W20. wash by buffer contain 20 mmol/L imidazole; E1—E2. elution by buffer contain 250 mmol/L imidazole

增加,藻细胞中McyI蛋白的量在缺铁1d时有明显增加,并在后续的4d中一直维持该蛋白水平,直到第 7天陡然下降,且相对铁胁迫处理前降低了约80%。

3 讨论

微囊藻毒素给人类带来了严重健康和环境问题;其合成过程与常规肽类大分子不同,主要通过 混合聚酮合酶和非核糖体肽合成酶两个酶系统催 化合成,约有10个酶共同参与^[8]。编码微囊藻毒素 合成酶的各基因在染色体上成串组成*mcy*基因簇, 并只由两个启动子双向调控各基因的表达,保证了 微囊藻毒素各合成酶间的高效协调,为微囊藻毒素 的高效合成奠定基础。目前关于微囊藻毒素的研 究主要集中于毒素快速检测及毒素对其他生物生 理活动的影响等方面,微囊藻毒素的合成机理及调 控毒素合成的相关机制研究较少。这主要是因为, 一方面微囊藻遗传操作技术的限制使得很难获得 相关突变体用于遗传学分析;另一方面微囊藻毒素 核心合成酶(如: McyA/B/C/D/E/G)分子量大,结构







图中1、5、10、50、100和200分别表示1、5、10、50、100和 200 ng抗原蛋白

1, 5, 10, 50, 100 and 200 indicate 1, 5, 10, 50, 100 and 200 ng antigen protein, respectively

域多,很难获得相应的全长蛋白用于生理生化分析。本研究利用低温诱导表达手段,成功在异源表达系统中表达出可溶性McyC全长蛋白(含4个结构域,148 kD),并通过优化纯化步骤使得蛋白纯度可达95%以上,为后续研究该蛋白酶的催化机制提供了基础,也为其他微囊藻毒素核心合成酶蛋白样品的制备提供了参考。

铁元素是蓝藻细胞生长代谢所必需的微量元 素之一,也是胞内多种重要酶和复合体完成催化或 合成的辅助因子。低铁或富铁环境能够调节水体 中优势藻种,也能够调节藻类肝毒素合成^[21]。多个 研究团队的研究均表明,短期缺铁时铜绿微囊藻 PCC 7806合成微囊藻毒素的总量明显增加,但随着 缺铁时间延长(>7d), 生长进入平台期后微囊藻毒素 产量显著下降。在缺铁引起的微囊藻毒素基因簇 转录水平的变化上,学者们的观点各不相同。Alexova 等^[11]发现,随着缺铁的发生位于mcyA/B/C操纵子中 的mcvA基因和位于mcvD/E/F/G/H/I/J操纵子中的 mcyH基因的转录水平明显下调,并在细胞进入平 台期后下调倍数显著增加。Sevilla等^[12]发现缺铁 时,位于mcyD/E/F/G/H/I/J操纵子中的mcyD基因的 转录水平先上调,在进入平台期后显著下调。由此 可见,目前毒素合成酶基因转录水平的变化并不能 清楚地反映缺铁条件下毒素产量的变化。

本研究通过实验室制备的McyC和McyI多克隆 抗体,采用Western Blot检测手段,分析铁胁迫不同 时间长度下,铜绿微囊藻细胞内McyC和McyI蛋白 水平的变化时,发现两个蛋白在缺铁前期均有明显 的上调表达,其中McyI蛋白水平上调先于McyC; McyC在缺铁持续至第5天时蛋白水平显著下降,而 McyI在第7天时显著下降。在缺铁条件下,McyC与 McyI蛋白水平的变化趋势与文献报道的微囊藻毒 素合成效率的变化趋势一致;且不论是早期的上调 还是后期的下调,合成酶蛋白水平的变化均早于毒

1

2



图 3 铜绿微囊藻PCC 7806胞内McyC和McyI蛋白免疫印迹检测

Fig. 3 Western blotting for McyC and McyI in Microcystis aeruginosa PCC7806

A. McyC的检测; B. McyI的检测; C. McyC抗原抗体拮抗检测; M. 蛋白marker; 1. 10 ng 重组纯化蛋白; 2. 微囊藻总蛋白

A. McyC; B. McyI; C. McyC antibody-antigen control test; M. protein marker; Line 1. 10 ng McyC protein; Line 2. total protein of *Microcystis*



图 4 铁胁迫对铜绿微囊藻McyC和McyI蛋白表达的影响

Fig. 4 The effect of iron stress on the expression of McyC and McyI in Microcystis aeruginosa

泳道1-5分别为微囊藻缺铁培养0、1d、3d、5d和7d的细胞总 蛋白. M. 蛋白marker; CBB. 考马斯亮蓝染色; C. 大肠杆菌纯化 蛋白对照

Line 1-5 indicate Microcystis culture under iron deficiency in 0, 1d, 3d, 5d and 7d, respectively. M. protein marker; CBB. Coomassie Blue Staining; C. antigen control

素合成量的变化。这表明微囊藻毒素合成酶的表 达水平直接决定了毒素合成的效率,因此通过检测 合成酶蛋白水平的变化能直接推测出胞内毒素产 量的变化趋势。

在本研究中铁胁迫条件下, 微囊藻毒素合成酶 表达水平的变化也充分说明,缺铁前期和后期,微 囊藻采用不同机制调控了微囊藻毒素合成酶的表 达。相关研究表明、微囊藻毒素能作为一种内在信 号分子影响微囊藻的生理特征,并且胞内微囊藻毒 素量增加时可作为对正常条件的诱导防御^[21]。微 囊藻毒素产量的增加有利于微囊藻抵御铁胁迫环 境,然而其具体生理功能未知,目前关于铁元素有 效调控微囊藻毒素合成的研究也仅限于转录调节 因子FurA与mcy基因簇启动子的体外结合研究^[12]。 虽然Alexova等^[11]研究发现缺铁前期微囊藻的转录 因子FurA表达量上调且进入平台期后发生下调,通 过这种转录因子表达的变化建立了铁元素和微囊 藻毒素合成酶表达水平变化的联系,但仍需要进一 步的实验研究阐明其具体的调控机制。除此之外, 还有研究发现,在缺铁后期,微囊藻胞内大多数核 糖体蛋白下调表达, RNA结合蛋白上调表达, 胞内 的能量资源主要用于稳定mRNA转录物或其他形 式的转录后调控,而不是用于合成新蛋白,这也可 能是影响微囊藻毒素合成酶在后期表达水平急剧 下降的原因之一。总的来说,铁元素有效调控微囊 藻毒素合成的机制复杂繁琐,存在多条信号调控路 径相互作用的可能性,进一步深入研究,有助于提 高对微囊藻毒素的认识,也为进一步了解微囊藻毒 素的合成机制提供了基础材料。

参考文献:

- Stanier R Y, Cohen-Bazire G. Phototrophic Prokaryotes: [1] The Cyanobacteria [J]. Annual Review of Microbiology, 1977, 31(1): 225.
- Paerl H W, Otten T G. Harmful cyanobacterial blooms: [2] causes, consequences, and controls [J]. Microbial ecology, 2013, 65(4): 995-1010.
- [3] Fristachi A, Sinclair J L, Hall S, et al. Occurrence of cyanobacterial Harmful Algal Blooms Workgroup Report [M]. Cyanobacterial Harmful Algal Blooms: State of the Science and Research Needs. Springer, New York, NY, 2008: 45-103.
- [4] Parra O O, Ugarte E, Mora S, et al. Remarks on a bloom of Microcystis aeruginosa Kützing [J]. Nova Hedwigia, 1980(33): 971-990.
- Tillett D, Dittmann E, Erhard M, et al. Structural organiza-[5] tion of microcystin biosynthesis in Microcystis aeruginosa PCC7806: an integrated peptide-polyketide synthetase system [J]. Chemistry & Biology, 2000, 7(10): 753-764.
- [6] Díez-Quijada L, Prieto A I, Guzmán-Guillén R, et al. Occurrence and toxicity of microcystin congeners other than MC-LR and MC-RR: A review [J]. Food and Chemical Toxicology, 2019(125): 106-132.
- [7] Meyer S, Kehr J C, Mainz A, et al. Biochemical dissection of the natural diversification of microcystin provides lessons for synthetic biology of NRPS [J]. Cell Chemical Biology, 2016, 23(4): 462-471.
- [8] Dittmann E, Wiegand C. Cyanobacterial toxins-occurrence, biosynthesis and impact on human affairs [J]. Molecular Nutrition & Food Research, 2006, 50(1): 7-17.
- [9] Claudia D, Hans-Peter G, Anthony G J. Increasing oxygen radicals and water temperature select for toxic Microcystis sp [J]. PLoS One, 2011, 6(9): e25569.
- [10] van der Westhuizen A J, Eloff J N. Effect of temperature and light on the toxicity and growth of the blue-green alga Microcystis aeruginosa (UV-006) [J]. Planta. 1985 Jan; 163(1): 55-9. doi: 10.1007/BF00395897. PMID: 24249268.
- [11] Alexova R, Fujii M, Birch D, et al. Iron uptake and toxin synthesis in the bloom-forming Microcystis aeruginosa under iron limitation [J]. Environmental Microbiology, 2011, 13(4): 1064-1077.

- [12] Martin-Luna B, Sevilla E, Hernandez J A, et al. Fur from Microcystis aeruginosa binds in vitro promoter regions of the microcystin biosynthesis gene cluster [J]. Phytochemistry, 2006, 67(9): 876-881.
- [13] Christiansen G, Dittmann E, Ordorika L V, et al. Nonribosomal peptide synthetase genes occur in most cyanobacterial genera as evidenced by their distribution in axenic strains of the PCC [J]. Archives of Microbiology, 2001, 176(6): 452-458.
- [14] Dittmann E, Fewer D P, Neilan B A. Cyanobacterial toxins: biosynthetic routes and evolutionary roots [J]. *FEMS microbiology Reviews*, 2013, 37(1): 23-43.
- [15] Caboche S, Leclère V, Pupin M, et al. Diversity of monomers in nonribosomal peptides: towards the prediction of origin and biological activity [J]. Journal of Bacteriology, 2010, 192(19): 5143-5150.
- [16] Calcott M J, Ackerley D F. Genetic manipulation of nonribosomal peptide synthetases to generate novel bioactive peptide products [J]. *Biotechnology Letters*, 2014, 36(12): 2407-2416.
- [17] Velkov T, Lawen A. Non-ribosomal peptide synthetases as technological platforms for the synthesis of highly modified peptide bioeffectors-cyclosporin synthetase as a complex example [J]. *Biotechnology Annual Review*, 2003(9): 151-197.
- [18] Neilan B A, Dittmann E, Rouhiainen L, et al. Nonribosomal peptide synthesis and toxigenicity of cyanobacteria [J]. Journal of Bacteriology, 1999, 181(13): 4089-4097.
- [19] Pearson L A, Barrow K D, Neilan B A. Characterization of the 2-hydroxy-acid dehydrogenase McyI, encoded within the microcystin biosynthesis gene cluster of *Micro-*

cystis aeruginosa PCC7806 [J]. Journal of Biological Chemistry, 2007, **282**(7): 4681-4692.

- [20] Rueckert A, Cary S C. Use of an armored RNA standard to measure microcystin synthetase E gene expression in toxic *Microcystis* sp. by reverse-transcription QPCR [J]. *Limnology & Oceanography Methods*, 2009, 7(7): 509-520.
- [21] Alexova R, Dang T C, Fujii M, et al. Specific global responses to N and Fe nutrition in toxic and non-toxic Microcystis aeruginosa [J]. Environmental Microbiology, 2016, 18(2): 401-413.
- [22] Stachelhaus T, Mootz H D, Bergendahl V, et al. Peptide bond formation in nonribosomal peptide biosynthesis catalytic role of the condensation domain [J]. Journal of Biological Chemistry, 1998, 273(35): 22773-22781.
- [23] Walls J T, Wyatt K H, Doll J C, et al. Hot and toxic: Temperature regulates microcystin release from cyanobacteria [J]. Science of the Total Environment, 2018(610): 786-795.
- [24] Zilliges Y, Kehr J C, Meissner S, et al. The cyanobacterial hepatotoxin microcystin binds to proteins and increases the fitness of *Microcystis* under oxidative stress conditions [J]. *PLoS One*, 2011, 6(3): e17615.
- [25] Tan X F, Dai Y N, Zhou K, et al. Structure of the adenylation-peptidyl carrier protein didomain of the Microcystis aeruginosa microcystin synthetase McyG [J]. Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography, 2015, 71(4): 873-881.
- [26] Rausch C, Hoof I, Weber T, et al. Phylogenetic analysis of condensation domains in NRPS sheds light on their functional evolution [J]. BMC Evolutionary Biology, 2007, 7(1): 78.

IRON STRESS ON THE EXPRESSION OF MICROCYSTIN SYNTHETASE MCYC AND MCYI

WANG Fei^{1, 2}, ZENG Xiao-Li¹ and ZHANG Cheng-Cai¹

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

Abstract: Microcystin is a class of cyclic hepatotoxin, which poses a great threat to human and animal health. Microcystin synthesis is regulated by a variety of environmental factors, and the synthesis efficiency of microcystin is directly determined by the amount of the corresponding synthetase and the catalytic rate, however, the relationship between protein expression levels of the microcystin synthesis gene cluster and environmental factors is still unclear. In this study, the *mcyC* and *mcyI* genes located in the two operons of the microcystin synthesis gene cluster were selected as representatives, using high-efficiency McyC and McyI polyclonal antibodies, detected the effect of iron stress on microcystin synthetase McyC and McyI protein expression levels by Western Blot. The result indicated that the protein levels of McyC and McyI within *Microcystis aeruginosa* PCC 7806 were consistent with the changes in the synthesis yield of toxins in vivo under iron stress, suggested that iron stress directly regulates the synthesis of the toxin by influencing the expression level of microcystin synthetase. This study provided the basis for further understanding the synthesis mechanism of microcystin.

Key words: Microcystin; Microcystin biosynthesis gene cluster; Iron stress; McyC; McyI