

坛紫菜核糖体蛋白 S7 基因的克隆与表达分析

谢潮添, 张元, 陈昌生*, 徐燕, 纪德华

(集美大学水产学院, 福建 厦门 361021)

摘要: 为了研究坛紫菜在高温胁迫条件下的分子应答机制,应用引物退火控制(ACP)技术对耐高温型纯系(Z-61)叶状体在高温胁迫条件下的差异表达基因进行筛选时,获得了一条核糖体蛋白 S7 基因的全长序列,命名为 *Phrps7* (GenBank 登录号:JF719273)。该基因序列全长 702 bp, 包含一个 585 bp 的开放阅读框,其编码 195 个氨基酸的核糖体 S7 蛋白(PhRPS7),蛋白分子式为 $C_{984}H_{1604}N_{294}O_{283}S_2$,由 5 条 α 螺旋,6 个片层及 6 个环状连接组成,与多个物种的 RPS7 蛋白具有较高的序列一致性(>55%)。系统进化树分析表明,PhRPS7 蛋白与真菌的亲缘关系较近,而与其它物种的亲缘关系较远。实时荧光定量 PCR 分析结果表明,*Phrps7* 基因的表达水平与高温胁迫密切相关,在高温胁迫刚开始时(0~6 d),*Phrps7* 基因的表达水平极显著上调,而随着胁迫的继续(>6 d),表达量又有所下调,但仍显著高于胁迫开始前。

关键词: 坛紫菜; 引物退火控制技术; 核糖体蛋白 S7; 克隆; 表达

中图分类号: Q 785; S 917.3

文献标志码: A

坛紫菜(*Porphyra haitanensis*)是我国紫菜人工栽培的两个主要种类之一,原产于福建沿海,是我国特有的暖温带种类,具有生长快、产量高、风味好等特点。自坛紫菜全人工育苗和栽培技术得到解决后,坛紫菜栽培取得了突飞猛进的发展,其产量约占全国紫菜总产量的 80%,成了我国南方沿海水产养殖的拳头项目,创造了可观的经济效益^[1]。近年来,随着全球气候变暖,白露节气过后的持续高温尤其是福建、浙江海域 9 月下旬至 10 月的回暖天气严重影响了坛紫菜壳孢子的采苗和幼苗的附着生长。水温过高致使坛紫菜幼苗烂苗或成菜烂菜、减产,严重威胁着坛紫菜栽培业的持续发展^[2]。因此,研究坛紫菜在高温胁迫条件下的分子应答机制,分离克隆高温胁迫应答相关基因,对于指导后续耐高温品种的选育,保证坛紫菜栽培业的可持续健康发展具有重要的意义。

引物退火控制(annealing control primer, ACP)技术是一种在 DDRT-PCR(mRNA 差异显示技术)基础上发展起来的筛选差异表达基因的新方法,可以较好地消除起始反应的非特异性,并具有假阳性低、重复性好、PCR 产物分布范围广泛、速度快且成本低廉等优点^[3-4],已在哺乳动物和水生动物发育与抗病相关差异表达基因的克隆中得到了广泛应用^[5-8],如 XIE 等^[8]利用该技术在大黄鱼肝脏中筛选出了 3 个差异表达基因,经测序分析得到一个参与机体免疫功能的重要基因。但目前该技术在植物和藻类中尚未见到相关应用。

本研究采用 ACP 技术对坛紫菜耐高温型纯系(Z-61)^[9]在高温胁迫条件下的差异表达基因进行筛选时,获得了一条坛紫菜核糖体蛋白(ribosomal protein) S7 基因的全长序列,在该基因及其编码产物进行序列分析的基础上,进一步采用实时荧光定量 PCR 技术研究了

收稿日期:2011-07-26 修回日期:2011-09-20

资助项目:国家自然科学基金项目(41176151);公益性行业(农业)科研专项(200903030);海洋公益性行业科研专项(201105008, 201105023);福建省杰出青年基金项目(2010J06016);福建省教育厅新世纪优秀人才项目(JA10186)

通讯作者:陈昌生, E-mail: cschen@jmu.edu.cn

该基因在高温胁迫不同时间下的表达水平,以探讨该基因在坛紫菜高温胁迫中的响应机制,为进一步了解坛紫菜的耐高温分子机理、后续坛紫菜的遗传改良和耐高温新品系的选育提供参考。

1 材料与方法

1.1 坛紫菜样品及胁迫处理

供试材料为人工杂交选育获得的耐高温品系 Z-61 的 F₄ 代叶状体^[9],取自福建省坛紫菜种质资源库。

将坛紫菜藻体在正常条件下[温度(21 ± 0.5) °C,光照 2 000 ~ 3 000 lx,昼夜光周期 12 h:12 h,每 3 天更换一次培养液]培养至(15 ± 2) cm 时,选取叶面平滑、色深有光泽、无斑点烂洞的完整藻体置于(30 ± 0.5) °C 的恒温光照培养箱中进行高温胁迫处理(其余培养条件同正常条件)6 d 后作为实验组,以正常温度下培养的藻体为对照组分别提取总 RNA,并逆转录为 cDNA 后用于高温胁迫差异表达基因的筛选。

同时,另取一组(15 ± 2) cm 的完整藻体置于(30 ± 0.5) °C 的恒温光照培养箱中分别进行高温胁迫处理(其余培养条件同正常条件)0、3、6 和 9 d 后,提取总 RNA,并逆转录为 cDNA 后用于基因表达水平的实时荧光定量 PCR 分析。每个处理组设置 3 个平行。

1.2 总 RNA 的分离纯化

收集坛紫菜藻体 1 g,经滤纸吸干和液氮研磨后,采用 EASYspin 植物 RNA 快速提取试剂盒(艾德莱生物技术有限公司,北京)提取各样品的总 RNA。

1.3 差异表达基因筛选与克隆

逆转录合成 cDNA 第一条链 分别在两个 0.5 mL 的 PCR 管中加入如下反应组分:1 ~ 3 μg 总 RNA,10 μmol/L 的 dT-RSL 引物(序列为 5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTTTTTTTTT-TTTTTTTTTTTT-3')2 μL,加无 RNA 酶双蒸水至总体积 12 μL,混合均匀后 70 °C 孵育 2 min,再在冰上冷却 2 min。接着向两个 PCR 管中分别继续加入如下反应组分:5 × RT Buffer 4 μL,10 mmol/L dNTP 1 μL,20 mmol/L DTT 2 μL,200 U/μL 逆转录酶 1 μL,混合均匀后 42 °C 孵育 90 min,再 94 °C 变性 2 min。合成的对照组和实验组

的 cDNA 第一条链分别用无 DNA 酶双蒸水稀释相应倍数后,放置于 -20 °C 冰箱中备用。

ACP 技术筛选差异表达基因 分别在两个 0.5 mL 的 PCR 管中,加入 20 μL 如下反应体系:10 × PCR Buffer 2 μL,10 mmol/L dNTP 0.4 μL,10 μmol/L dT-RSL 1 μL,10 μmol/L RSL7 随机引物(序列为 5'-AAGCAGTGCTATCAACGCAGAGTIIIICTGCGGATCG-3')1 μL,5 U/μL *Taq* DNA 聚合酶 0.1 μL,cDNA(对照组或实验组)1 μL,加双蒸水至总体积 20 μL。

PCR 扩增程序为 94 °C 预变性 5 min,50 °C 3 min,72 °C 2 min,1 个循环;94 °C 40 s,65 °C 40 s,72 °C 40 s,35 个循环;72 °C 5 min。

PCR 扩增后,分别取对照组或实验组扩增产物 7 μL,采用 1.2% 的琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 扩增产物。

目的片段切胶回收、转化及测序 采用琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒(中科瑞泰生物技术有限公司,北京)回收差异片段。将回收产物同 pMD-18T 载体(TaKaRa)连接后转化至感受态细胞 *E. coli* DH5α 中,经蓝白斑筛选和 M13 引物阳性克隆验证后,将阳性克隆扩大培养,并采用 MiniBEST Plasmid Purification 试剂盒提取质粒 DNA(TaKaRa,大连)后送往大连宝生物工程有限公司测序。

1.4 坛紫菜 *Phrps7* 基因及其编码产物的序列分析

对所获得的基因序列应用 Blastn 程序进行同源性检测,并采用相关生物信息学软件进行开放阅读框和多重序列比对分析,最后应用在线程序分别对 *Phrps7* 基因编码蛋白的全长序列进行一、二和三级结构预测分析。

1.5 坛紫菜 *Phrps7* 基因的系统进化分析

从 GenBank 数据库中选取毛果杨(*Populus trichocarpa*, ABK93856.1)、大豆(*Glycine max*, ACU15827.1)、苜蓿(*Medicago truncatula*, ACJ86037.1)、蓖麻(*Ricinus communis*, XP002533703.1)4 种高等植物;小立碗藓(*Physcomitrella patens*, XP001771200.1)1 种苔藓植物;双色蜡菇(*Laccaria bicolor*, XP001887038.1)、黑松露(*Tuber melanosporum*, XP002837796.1)2 种真菌和莱茵衣藻(*Chlamydomonas reinhardtii*, XP001702342.1)、团藻(*Volvox*

carteri, XP002948038. 1)、细小微单胞藻 (*Micromonas pusilla*, XP003056818. 1) 3种低等藻类共 10 个物种的核糖体蛋白 S7 序列, 采用 MEGA 5.03 软件根据邻接法 (Neighbor-Joining, NJ) 构建核糖体蛋白 S7 的系统发育树, 分析时所用参数均为软件默认值, 并采用 Bootstrapping 法对所构建的系统发育树进行评估。

1.6 坛紫菜 *Phrps7* 基因表达水平的定量 RT-PCR 分析

根据 *Phrps7* 基因序列测序结果设计定量 PCR 引物 (rsp7qF: 5'-CTGGCCGATGATGACGA-3', rsp7qR: 5'-CGATGTTGCTGGTGGAAAGA-3'), 以 18S rRNA 引物 (18SF: 5'-AATGTCG-ACAGGGCAAGTCTGGTGAA-3', 18SR: 5'-TA-ACCCGGGCTCCATTAGAGTCTCTGAAG-3') 作为内参, 进行 *Phrps7* 基因在高温胁迫不同时间水平下相对表达量的实时荧光定量 PCR 分析。

提取的各样品总 RNA 按 TaKaRa 公司的 PrimeScript[®] RT reagent kit 说明书进行操作, 以 Oligo(dT) 和 Random 5 mers 为引物进行反转录反应。25 μ L 的反应体系包含: 12.5 μ L 2 \times SYBR[®] Premix Ex Taq[™] II (TaKaRa), 0.2 μ mol/L 引物和 2 μ L 反转录产物。扩增程序为 95 $^{\circ}$ C 变性 1 min; 95 $^{\circ}$ C 10 s, 62 $^{\circ}$ C 30 s, 40 个循环。循环结束后从 55 $^{\circ}$ C 缓慢升温至 95 $^{\circ}$ C, 绘制溶解曲线。荧光定量 PCR 扩增在 ABI7300 型定量 PCR 仪上进行。

以 10 \times 梯度稀释的 cDNA 为模板进行定量 PCR 扩增, 制作 *Phrps7* 基因和内参的标准曲线。每次反应都设置阴性对照和无模板对照, 每个反应设 3 个平行复孔。应用 Excel 和 SPSS 13.0 软件对试验数据进行统计分析, 并采用单因素方差分析 (One-Way ANOVA) 和最小显著差异法 (LSD) 比较不同数据组间的差异, $P < 0.05$ 表示差异显著, $P < 0.01$ 表示极显著差异。

2 结果

2.1 差异表达基因筛选及序列分析

采用 ACP 技术, 在通用引物 dT-RSL 与 20 条 RSL 随机引物组成的 20 对引物组合对坛紫菜叶状体在高温胁迫条件下的差异表达基因进行筛选时, 引物 dT-RSL 与 RSL7 组合在实验组中扩增出

了一条长度约为 700 bp 的特异表达基因片段 (图 1)。该基因片段经切胶回收和转化克隆后测序, 确定其长度为 702 bp, 3' 端含有 28 bp 的 polyA 序列 (图 2)。

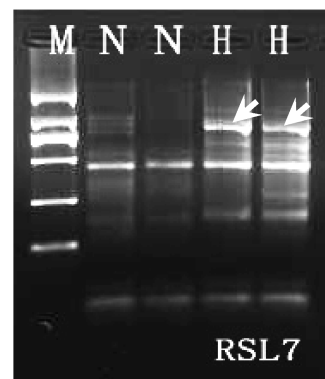


图 1 引物 RSL7 差异表达基因片段筛选电泳图
M. Marker I DNA ladder; N. 对照组, H. 实验组; 箭头. 差异表达基因片段。

Fig. 1 Agarose electrophoresis of differentially expressed gene screening by the primers combination of dT-RSL and RSL7

M. Marker I DNA ladder; N. thalli was cultured under normal temperature; H. thalli was cultured under high temperature for 6 days; Arrow. fragment of differential expression gene.

根据克隆基因的核苷酸序列, 利用 Blastn 与 NCBI 数据库中已知序列进行的同源性比较发现, 该基因序列与多个物种的核糖体 S7 基因序列有约 80% 的同源性, 由此初步推断所克隆的特异表达基因片段为坛紫菜核糖体蛋白 S7 基因序列, 命名为 *Phrps7* (图 2)。采用 ORF Finder 程序分析发现该基因序列从第 36 个碱基开始至第 623 个碱基为完整的开放阅读框 (open reading frame, ORF), 其余为非编码序列, 可编码 195 个氨基酸 (图 2), 进一步将 ORF 转换而成的氨基酸序列在 NCBI 数据库中进行 Blastp 比对, 结果与核苷酸序列比对结果相同, 为核糖体蛋白 S7 的完整氨基酸序列。图 3 为 PhRPS7 氨基酸序列同其他物种相应氨基酸序列的多重序列比对结果, PhRPS7 序列与莱茵衣藻, 毛果杨, 大豆, 小立碗蕨和双色蜡菇的 RPS7 序列同源性分别为 57.8%, 54.5%, 54.5%, 57.3% 和 56.7%, 表明来自不同物种的 RPS7 蛋白具有较高的序列保守性。将序列提交至 GenBank 数据库中, 登录号为 JF719273。

```

1  ggggccatcgaacctgtagaagctaggcctttgcgaa
36  atggcactctctta ccgcaagaagctctccaaggccaagggccag
   M A L S Y R K K L S K A K G Q
81  aacgctgaccccttgagcagtcctgtgccagggctctcctacgac
   N A D P L E Q S V A Q A L Y D
126 ctggagcacagctcgagcgcacctgaagcagacctccgtcacctt
   L E H S S S D L K H D L R H L
171 aacatcactgggtgcccaaggagatcgatgttctgtgggaaagaag
   N I T G A K E I D V A G G K K
216 gccgctgctgtgtactgcccctcaggcagctgaacaactaccac
   A V A V Y V P F R Q L N N Y H
261 aagatccaggcccgtctgtggccacgagcttgagaagaagttcagc
   K I Q A R L V H E L E K K F S
306 ggaaagcaggctcgtcatcctcgggccagcggcgtatcctccagaag
   G K Q V V I I G Q R R I L Q K
351 cctggcaggaacaaccgctcgccccaccagaagcgccccccacagc
   P G R N N R V A H Q K R P H S
396 cgcaccttgaccgctgtccacgaggccatcctcgaggacaccgctc
   R T L T A V H E A I L E D T V
441 taccccgcgcagagatcgttggcaagcgcctcagggttcaggaccgac
   Y P A E I V G K R L R F R T D
486 ggctccaagctggccaaggtctctcctcgacaagaaggaccagcag
   G S K L A K V F L D K K D Q Q
531 agcatggaggacaagctcgacacctctccgctgtgtacaagacc
   S M E D K L D T F S A V Y K T
576 ctgactggcaaggaggctgttccagcttccagaacgtgaggggtg taa
   L T G K E A V F S F Q N V R V *
624 gaatggtgtctggcgatatacgaacaccgagtaatacttgggtgtg
674 aaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa
    
```

图 2 坛紫菜核糖体蛋白 S7 基因核苷酸序列及预测的氨基酸序列

atg 为起始密码子, taa 为终止密码子。

Fig. 2 Nucleotide and deduced amino acid sequence of ribosomal protein S7 of *P. haitanensis*

atg is the initiation codon, taa is the termination codon.

	1	10	20	30	40	50	60
<i>P. trichocarpa</i>	MFTTK	KKIQKDKDA	EETEFETVAQAALFDLLENTSS	ELKTLDKDFHNS	AVQIDVA	GNRK	IAVIIYV
<i>G.max</i>	MYTSR	KKIHKDKDA	EETEFETVAQAALFDLLENTSS	ELKTLDKDFHNS	AVQIDVA	GNRK	IAVIIYV
<i>P. patens</i>	MSFTAR	KKIQKDKGQ	EETEFETVAQAALFDLLENTSS	ELKTLDKDFHNS	AVQIDVA	GNRK	IAVIIYV
<i>C. reinhardtii</i>	MVSARS	KKIIVKERGQ	EETEFETVAQAALFDLLENTSS	ELKTLDKDFHNS	AVQIDVA	GNRK	IAVIIYV
<i>P. haitanensis</i>	MALSYR	KKLISKAKGNAD	EETEFETVAQAALFDLLENTSS	ELKTLDKDFHNS	AVQIDVA	GNRK	IAVIIYV
<i>L. bicolor</i>	MSVNS	KLIRLTANAPTTC	EETEFETVAQAALFDLLENTSS	ELKTLDKDFHNS	AVQIDVA	GNRK	IAVIIYV

	70	80	90	100	110	120	130
<i>P. trichocarpa</i>	PYRLRKAAYR	TIHLRLVRE	ELEKKFSGKD	VVLIATRR	IVRFPK	KGS	AVQ...RPGSR
<i>G.max</i>	PFRRLRKAAYR	TIHLRLVRE	ELEKKFSGKD	VVLIATRR	IVRFPK	KGS	AVQ...RPRTR
<i>P. patens</i>	PYRLRKAAYR	TIHLRLVRE	ELEKKFSGKD	VVLIATRR	IVRFPK	KGS	AVQ...RPRSR
<i>C. reinhardtii</i>	PYRLRKAAYR	TIHLRLVRE	ELEKKFSGKD	VVLIATRR	IVRFPK	KGS	AVQ...RPRSR
<i>P. haitanensis</i>	PFRQLNNYH	TIQARLVRE	ELEKKFSGKD	VVLIATRR	IVRFPK	KGS	AVQ...RPRSR
<i>L. bicolor</i>	PVPQLKAFH	KVQQRLTR	ELEKKFSGKD	VVLIATRR	IVRFPK	KGS	AVQ...RPRSR

	140	150	160	170	180	190
<i>P. trichocarpa</i>	PAEIVGKR	IRYRIDGSKI	SKIFLDP	KEENNT	EYKLE	SFAGV
<i>G.max</i>	PAEIVGKR	IRYRIDGSKI	IMKVFLLD	KEENNT	EYKLE	SFAGV
<i>P. patens</i>	PSEIVGKR	IRYRLDGSRI	MVYLLD	KEENNT	EYKLE	SFAGV
<i>C. reinhardtii</i>	PTEIVGKR	IRYRLDGSKI	LKVHLLD	PKDRNST	EYKLE	SFAGV
<i>P. haitanensis</i>	PAEIVGKR	IRFRTDGSKLA	KVFLDKK	DQSMEDK	LDTSA	VYKTL
<i>L. bicolor</i>	PTEIVGKR	IRVAVDGSKL	LKVLLD	SKD	ATSLEYK	LDSSES

图 3 核糖体蛋白 S7 氨基酸序列的多重序列比对

Fig. 3 Multiple sequence alignment of ribosomal protein S7 based on amino acid sequences

2.2 坛紫菜 *Phrps7* 基因编码蛋白分析

采用 ExPASy Proteomics Tools 程序分析坛紫菜 *Phrps7* 基因的编码产物,预测该基因编码蛋白质包含 195 个氨基酸,分子式为 $C_{984}H_{1604}N_{294}O_{283}S_2$,分子量为 22 145.4,理论等电点为 9.99,负电荷氨基酸残基(Asp + Glu)总数为 21,正电荷氨基酸残基(Arg + Lys)总数为 36,不稳定系数为 37.43,脂肪系数为 88.00,总平均疏水度为 -0.594,表明该蛋白质稳定,亲水性强,易溶于水溶液中。PredictProtein 程序预测该蛋白的二级结构中构成螺旋(H)、片层(E)和环状(L)的氨基酸残基占总氨基酸比例分别为 38.46%、21.54%与 40.00%,不含有细胞核定位信号。利用在线软件 Swiss-Model 对坛紫菜核糖体蛋白 S7 氨基酸序列的三级空间结构进行预测,结果如图 4 所示,该蛋白由 5 条螺旋,6 个片层及 6 个环状连接组成。

2.3 坛紫菜 PhRPS7 蛋白的系统进化分析

为进一步明确坛紫菜 PhRPS7 蛋白与其他物种已报道 RPS7 蛋白的同源关系及在整个 RPS7 蛋白家族中的分类地位,将 PhRPS7 蛋白序列与其他 10 个物种的 RPS7 蛋白序列进行系统进化分析,并构建了这 11 个物种 RPS7 蛋白序列的系

统进化树(图 5)。由图中可知,这些 RPS7 蛋白按照高等植物、苔藓植物、低等藻类和真菌分别聚为一个簇群,PhRPS7 蛋白为单独一支,先与真菌进行聚类构成一簇群,再和其它物种相聚,说明 PhRPS7 蛋白与真菌 RPS7 蛋白的亲缘关系更近,而与其他物种的亲缘关系较远。

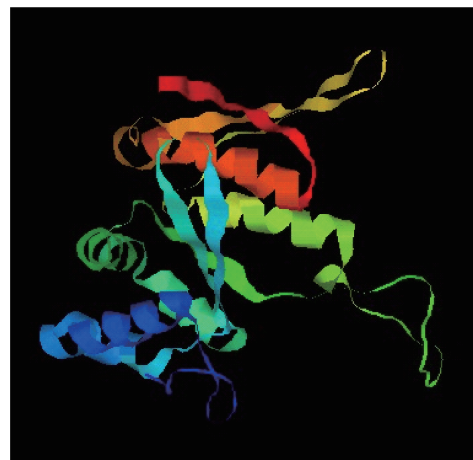


图 4 坛紫菜核糖体蛋白 S7 的三级结构

Fig. 4 Three dimension structure of ribosomal protein S7 of *P. haitanensis*

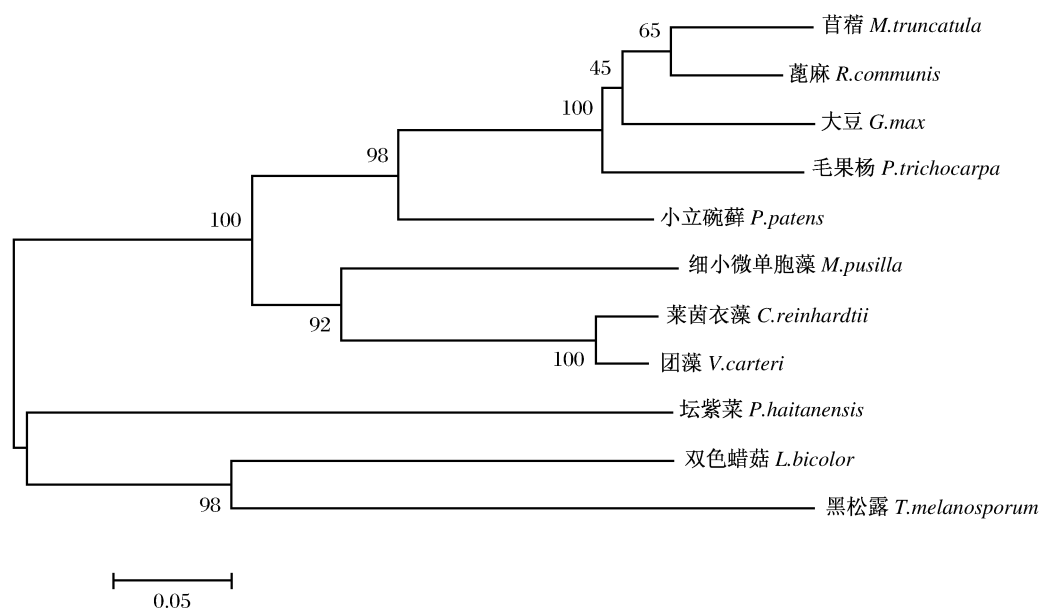


图 5 基于氨基酸序列构建的核糖体蛋白 S7 系统进化树

Fig. 5 Phylogenetic tree of ribosomal protein S7 based on amino acid sequence

2.4 坛紫菜 *Phrps7* 基因表达水平的实时荧光定量 PCR 分析

坛紫菜 *Phrps7* 基因和内参的实时荧光定量

PCR 扩增曲线基线平整,指数区明显,斜率大且固定,溶解曲线显示扩增产物均为单一的特异峰,阴性对照和无模板对照均无扩增,3 个平行复孔

扩增结果重复性良好,说明扩增体系和反应条件良好,无非特异性扩增,定量结果准确可靠。如图 6 所示,坛紫菜 Z-61 F₄ 叶状体在 30 °C 高温胁迫的早中期(0 ~ 6 d), *Phrps7* 基因的相对表达量极显著升高 ($P < 0.01$),但随着胁迫时间的继续延长 (>6 d),相对表达量又发生显著下降 ($P < 0.05$),但胁迫处理 9 d 的相对表达量仍显著高于 ($P < 0.05$) 胁迫 3 d 的相对表达量。说明在高温胁迫条件下, *Phrps7* 基因的表达水平会随胁迫时间而发生显著的动态变化。结合图 1 差异表达基因的筛选结果和图 6 的实时荧光定量 PCR 分析结果,可初步推断 *Phrps7* 基因可能与坛紫菜高温胁迫应答密切相关。

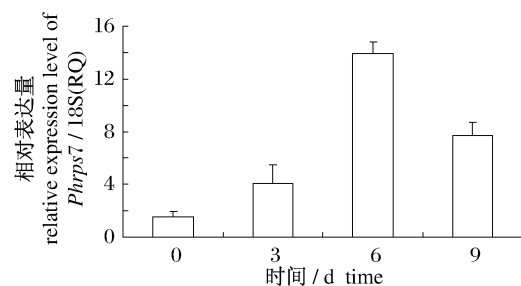


图 6 *Phrps7* 基因在高温胁迫不同时间水平下的相对表达情况

Fig. 6 Relative expression level of *Phrps7*/18S gene under high temperature stress for different days

3 讨论

3.1 *Phrps7* 基因与逆境胁迫的相关性

在长期的进化过程中,植物通过不断发生的遗传变异和自然选择,发展出了一整套应对环境的适应机制,当植物遭受逆境胁迫时,为了生存于这种胁迫环境,就会启动一系列的生理响应过程以抵抗环境的胁迫作用,这其中涉及基因的表达调控、生理状态的改变甚至表型变化等一系列的过程。紫菜也不例外,张元等^[2]在高温胁迫下坛紫菜的生理响应中发现耐高温型坛紫菜在高温胁迫条件下能同时启动抗氧化系统和渗透压调节系统以抵御高温胁迫的伤害。王孟强^[10]利用基因芯片技术研究了条斑紫菜在不同失水水平下的基因表达谱变化,发现在条斑紫菜配子体的整个失水过程中,大约有 8.74% ~ 11.09% 的基因上调。周向红等^[11]等的研究结果也表明在低温、高温、低盐以及失水胁迫条件下都会引起条斑紫菜 *HSP90* 基因表达水平的

显著变化。本研究通过 ACP 技术从正常和高温胁迫条件下培养的坛紫菜耐高温型纯系(Z-61)叶状体中筛选出了一条差异表达基因片段,经同源性比对确认其为核糖体蛋白 S7 基因的全长序列,编码含 195 个氨基酸的核糖体蛋白 S7。

核糖体是生物细胞内重要的细胞器,在细胞内通过解码 mRNAs,然后与 tRNA 一起合成相应的蛋白质。许多核糖体蛋白既具有结构上的功能,同时又是蛋白质翻译过程中必不可少的调控因子^[12]。植物在遭受逆境胁迫时,体内的一些代谢过程会发生变化,如优化蛋白质合成体系的翻译能力,加快相关基因的合成,从而适应环境的改变,以抵抗逆境胁迫的伤害。GUY 等^[13]在菠菜低温处理的实验中就证实了“植物在低温锻炼过程中基因表达会发生改变并有新的蛋白质合成”的假说,并通过进一步的研究发现,植物在新蛋白质合成的同时会通过活化抗氧化系统及积累小分子抗性物质等来缓解逆境对植物造成的机械损伤和生理伤害,从而提高植物的抗性^[14]。细胞在遭受逆境胁迫时要提高蛋白质的合成效率,就得制造更多核糖体,而核糖体基因的转录调节可以控制转录的起始水平,调节 RNA 聚合酶和启动基因间的相互作用^[15]。真核生物核糖体蛋白 S7 位于 40S 小亚基的表面,所处区域被认为可能与蛋白质合成启动因子 eIF-3 交联^[16]。因此,核糖体蛋白 S7 基因的表达水平可能与蛋白合成相关,进而通过调节逆境相关蛋白合成而与逆境胁迫相关。胡薇^[17]对黑木相思对寒胁迫诱导差异基因表达的研究中发现在寒胁迫下涉及蛋白质代谢的 S7 表达水平显著上调。而 THOMAS 等^[18]的研究结果表明,当黑麦幼苗遭受低温胁迫时,黑麦核糖体蛋白 *Scrps7* 基因的表达量急剧降低,以后逐渐回升,当胁迫持续到 30 d 后其表达量恢复到胁迫前的水平,从而维持低温胁迫下黑麦幼苗的正常生长,但对其变化机制的了解并不彻底。本研究中,坛紫菜 *Phrps7* 基因的表达水平也与逆境胁迫密切相关,坛紫菜叶状体在遭受高温胁迫时, *Phrps7* 基因的表达水平先极显著升高(0 ~ 6 d)(图 5),而后 (>6 d)表达量又有所下降,但仍显著高于胁迫开始前。胁迫早中期,表达量的极显著上调可能与坛紫菜刚开始遭受高温胁迫时,需要启动合成更多的蛋白质以抵御高温胁迫的伤害有关,而随后表达量又发生下调的可能原因是基因表达调控的核心系统遭受高温钝化所致,其确切

原因有待于进一步研究。

3.2 坛紫菜 PhRPS7 蛋白的系统进化分析

在 RPS7 蛋白的进化分析中,坛紫菜 PhRPS7 蛋白单独为一支,先与真菌聚类构成一簇群后,再与其它物种相聚,说明坛紫菜 PhRPS7 蛋白与真菌 RPS7 蛋白的亲缘关系更近,而与其他物种的亲缘关系较远。关于真菌与藻类的起源和演化目前主要有两种理论:另一种是起源多元论,认为真菌来自藻类,藻类因丧失色素而从自养变成异养,生理的变化引起了形态的改变,一些真菌直接由红藻演化而来。另一种是鞭毛生物起源论,认为绝大多数真菌和藻类都起源于一种原始水生生物——鞭毛生物,单细胞,具一至数根鞭毛,有的有叶绿素和其他色素,有的无色素,具色素的演化为藻类,无色素的演化为菌类^[19]。两种理论都说明真菌和藻类在进化上存在特别关联。RPS7 又是一种进化上较为保守的蛋白质^[20],因此本研究得出的 PhRPS7 蛋白与真菌 RPS7 蛋白亲缘关系更近的结果具有一定的合理性。

参考文献:

- [1] BLOUIN N A, BRODIE J A, GROSSMAN A C, *et al.* *Porphyra*: a marine crop shaped by stress [J]. *Trends in Plant Science*, 2010, 16(1) : 29 - 37.
- [2] 张元,谢潮添,陈昌生,等. 高温胁迫下坛紫菜叶状体的生理响应 [J]. *水产学报*, 2011, 35(3) : 379 - 386.
- [3] 谢芳靖,张子平,林鹏,等. 引物退火控制技术在差异表达基因克隆中的应用 [J]. *海洋科学*, 2007, 31(5) : 70 - 75.
- [4] KIM Y J, KWAK C I, GU Y Y, *et al.* Annealing control primer system for identification of differentially expressed genes on agarose gels [J]. *Biology Techniques*, 2004, 36(3) : 424 - 428.
- [5] HWANG K C, CUI X S, PARK S P, *et al.* Identification of differentially regulated genes in bovine blasto-cysts using an annealing control primer system [J]. *Molecular Reproduction and Development*, 2004, 69(1) : 43 - 51.
- [6] CUI X S, SHIN M R, LEE K A, *et al.* Identification of differentially expressed genes in murine embryos at the blastocyst stage using annealing control primer system [J]. *Molecular Reproduction and Development*, 2005, 70(3) : 278 - 287.
- [7] LEE H Y, CUI X S, LEE K A, *et al.* Annealing control primer system identifies differentially expressed genes in blastocyst stage porcine parthenotes [J]. *Zygote*, 2006, 14(1) : 71 - 80.
- [8] XIE F J, ZHANG Z P, LIN P, *et al.* Identification of immune responsible fibrinogen beta chain in the liver of large yellow croaker using a modified annealing control primer system [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2009, 27(2) : 202 - 209.
- [9] 陈昌生,纪德华,谢潮添,等. 坛紫菜耐高温品系选育及经济性状的初步研究 [J]. *海洋学报*, 2008, 30(5) : 100 - 106.
- [10] 王孟强. 条斑紫菜功能基因组特性与抗逆相关基因表达分析 [D]. 青岛:中国海洋大学, 2007.
- [11] 周向红,李信书,王萍,等. 条斑紫菜 HSP90 基因的克隆与表达分析 [J]. *水产学报*, 2010, 34(12) : 1844 - 1852.
- [12] WOOL I G. The structure and function of Eukaryotic ribosomes [J]. *Annual Review of Biochemistry*, 1979, 48: 719 - 754.
- [13] GUY C L, HASKELL D, YELENO S G. Changes in freezing tolerance and polypeptide content of spinach and citrus at 5 °C [J]. *Cryobiology*, 1988, 25(3) : 264 - 271.
- [14] GUY C L. Cold acclimation and freezing stress tolerance: Role of protein metabolism [J]. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 1990, 41: 187 - 223.
- [15] 白应林. 核糖体基因表达的调节 [J]. *遗传*, 1986, 8(3) : 3 - 9.
- [16] XU W Y, HUANG F S, ZHANG J R, *et al.* cDNA cloning of ribosomal protein S7 from *Anopheles dirus* [J]. *Immunological*, 2001, 17: 400 - 401.
- [17] 胡薇. 黑木相思遗传多样性及寒胁迫诱导差异表达基因的研究 [D]. 福州:福建农林大学, 2010.
- [18] THOMAS B, MICHAEL U, JURGEN F. cDNA cloning of cytoplasmic ribosomal protein S7 of winter rye and its expression in low-temperature-treated leaves [J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2000, 1492: 276 - 279.
- [19] 戴芳澜. 真菌的形态和分类 [M]. 北京:科学出版社, 1987: 8 - 9.
- [20] 顾至敏,王建飞,黄骥,等. 水稻胞质核糖体蛋白基因 OsRPS7 的克隆与测序分析 [J]. *遗传*, 2004, 26(2) : 181 - 185.

Molecular cloning and expression analysis of ribosomal protein S7 gene from *Porphyra haitanensis*

XIE Chao-tian, ZHANG Yuan, CHEN Chang-sheng*, XU Yan, JI De-hua
(College of Fisheries, Jimei University, Xiamen 361021, China)

Abstract: *Porphyra haitanensis* is an economically important marine crop in southern China. To study the molecular mechanism of high temperature tolerance in *P. haitanensis*, the technology of annealing control primer (ACP) was used to screen the differentially expressed genes in F₄ generation gametophytic blades of a high temperature tolerance line Z-61. The primer combination of dT-RSL and RSL7 amplified one differentially expressed gene fragment. After sequence analysis, the gene fragment was proved to be the full length sequence of ribosomal protein S7 gene, and then it was named *Phrps7* (accession number JF719273). The *Phrps7* gene of 702 bp contains an open reading frame of 585 bp encoding a PhRPS7 protein of 195 amino acid. The PhRPS7 protein assembled by 5 helix, 6 sheet and 6 cycle shared high sequence identity with RPS7 proteins from other organisms (>55%), and its molecular formula was C₉₈₄H₁₆₀₄N₂₉₄O₂₈₃S₂. Phylogenetic analysis showed that the PhRPS7 protein has closer relation with RPS7 proteins from epiphyte than those from other organisms. The results of real-time quantitative PCR indicated that the expressed level of *Phrps7* has high relationship with high temperature stress. At the beginning of high temperature stress (0–6 d), the expression of *Phrps7* gene was up-regulated significantly, but at the later stage of high temperature stress (>6 d), the expression of *Phrps7* gene was down-regulated, however, it was still higher than that at the beginning.

Key words: *Porphyra haitanensis*; annealing control primer (ACP); ribosomal protein S7; cloning; expression

Corresponding author: CHEN Chang-sheng. E-mail: cschen@jmu.edu.cn