

海带 *cbbX* 基因序列特征及在雌、雄配子体之间的差异表达

石微微¹, 王丽丽^{1,2}, 陈晶¹, 欧阳珑玲¹, 周志刚^{1*}

(1. 上海海洋大学农业部水产种质资源与利用重点开放实验室, 上海市高校水产养殖学 E-研究院, 上海 201306;

2. 国家海洋局海洋环境监测中心, 辽宁 大连 116023)

摘要:根据海带雄配子体抑制消减 cDNA 文库中筛选出的克隆 18 序列设计基因特异性引物, 利用 cDNA 末端快速扩增技术 (rapid amplification of cDNA ends, RACE), 克隆了一条长 2 087 bp 的 cDNA 序列 (GenBank 登陆号: EF490312), 其中开放阅读框 1 275 bp, 5' - 非翻译区 (untranslated region, UTR) 长 118 bp, 3' - UTR 长 694 bp 且具有明显的 polyA 尾巴。蛋白同源搜索显示, 它编码的蛋白与 *Guillardia theta* 这种隐藻核型体编码的 CbbX 蛋白 (GenBank 登录号: CAB65663) 具有 66% 同源性。推测的海带配子体 *cbbX* 基因编码一个含有 424 个氨基酸的前体蛋白, 前 19 个氨基酸为信号肽序列。酶切后的成熟蛋白由 405 个氨基酸组成, 分子量为 45.26 ku, 等电点为 5.28。海带配子体 *cbbX* 基因被 8 个内含子隔离开, 它们的剪切位点都遵循“GT-AG”规则。无论在 cDNA 或者 DNA 序列上, 雌、雄配子体 *cbbX* 基因都没有差异。自编码蛋白的第 184 位 Gly 开始, 具有一个典型的 Walker ATP-结合 motif。通过与其它物种共 14 个 CbbX 蛋白序列构建的 neighbor-joining 系统演化树可知, 它与隐藻核型体及红藻核基因组编码的蛋白聚成一类, 而区别于叶绿体编码蛋白。因此, 推测该克隆的海带配子体 *cbbX* 基因可能是由核基因组编码的。荧光定量 PCR (Q-RT-PCR) 结果证实, *cbbX* 基因在海带雄配子体的表达量明显高于雌配子体的, 且在雌、雄配子体之间存在不同的日转录图谱。实验为海带配子体 *cbbX* 这个差异表达基因的功能研究和亚细胞定位奠定了基础。

关键词:海带; 配子体; *cbbX* 基因; 核苷酸序列; 转录

中图分类号: Q 75; S 917

文献标识码: A

海带 (*Laminaria japonica* Aresch) 隶属褐藻门 (Phaeophyta)、海带目 (Laminariales), 是我国海水养殖业中一种重要的经济藻类。根据 FAO 统计数据^[1], 2004 年我国生产的海带占全球海带总养殖产量的 88.6%, 居世界首位。海带生活史具有大型孢子体和微型配子体的异型世代交替。海带孢子体为雌雄同体, 成熟时, 其带片上的孢子囊母细胞经过减数分裂产生并释放出游动孢子, 后者在生长环境适宜时, 因遗传物质的不同而发育成雌、雄配子体。

史西志等^[2]以海带雌、雄配子体无性繁殖系为材料, 并利用抑制消减杂交 (suppression

subtractive hybridization, SSH) 方法构建了海带雄配子体抑制消减 cDNA 文库, 通过 Southern 点杂交, 发现一个阳性克隆 18 (长 396 bp), 但在 Blastn 搜索后未见同源序列。

本研究利用 cDNA 末端快速扩增技术 (rapid amplification of cDNA ends, RACE), 克隆该未知功能基因的 cDNA 及 DNA 序列, 运用生物信息学分析其序列特征并对其编码蛋白进行结构和功能预测, 同时还利用荧光定量 PCR (quantitative real-time PCR, Q-RT-PCR) 探讨该基因在海带雌、雄配子体之间的差异表达规律, 为该基因的亚细胞定位及其功能研究等奠定基础。

收稿日期: 2009-05-10 修回日期: 2009-07-21

资助项目: 国家自然科学基金项目 (30471328, 30671627); 上海市教育委员会海洋生物学重点学科资助项目 (J50701)

通讯作者: 周志刚, Tel: 021-61900424, E-mail: zgzhou@shou.edu.cn

1 材料与方法

1.1 海带配子体培养

海带雌(RF ♀ 22)、雄(RF ♂ 40)配子体无性繁殖体系,按已报道的方法^[3]在 PES 培养基^[4]中培养。培养的温度为(17 ± 1) °C、光照强度为 2 000 lx 和光周期为光照 16 h: 黑暗 8 h。

1.2 海带雌、雄配子体 *cbbX* 基因 cDNA 全长序列克隆

离心收集海带雌、雄配子体,利用 TRIzol (Invitrogen 公司)法提取总 RNA。利用 RACE,按照 SMART™ RACE cDNA 扩增试剂盒(Clontech 公司)说明书,应用降落 PCR 进行雄配子体 *cbbX* 基因 cDNA 片段的克隆。

反转录合成 5'-RACE 和 3'-RACE 的 cDNA。10 μL 反应体系包括总 RNA 1 μL,5'-(或 3'-)RACE CDS 引物 1 μL,SMART II A Oligo 1 μL,加无菌水至终体积 5 μL,70 °C 温育 2 min,冰上冷却 2 min。

然后加入 5 × 第一链缓冲液 2 μL,DTT 1 μL,dNTPs(Promega 公司)1 μL,MMLV 反转录酶 1 μL,42 °C 反应 1.5 h,100 μL tricine-EDTA 缓冲液稀释,72 °C 反应 7 min。

根据海带雄配子体抑制消减 cDNA 文库中筛选到的克隆 18 序列^[2],设计基因特异性引物(gene specific primer,GSP): GSP1 5'-GGAAAA ACTGCGGGGAAGCGGATG-3', GSP2 5'-TGG AGGAGTGCCTGGTGTGGGTCG-3'。25 μL 反应体系包括 10 × Advantage 2 PCR 缓冲液 2.5 μL,dNTPs(Promega 公司)0.5 μL,GSP1 引物(5'-RACE)或 GSP2 引物(3'-RACE)0.5 μL、10 × 通用引物混合物 2.5 μL,5'-(或 3'-)RACE cDNA 1.5 μL、50 × Advantage 2 聚合酶混合物 0.5 μL 以及 H₂O 17 μL。PCR 反应条件:94 °C 变性 30 s,72 °C 延伸 150 s,5 个循环;94 °C 变性 30 s,70 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 150 s,5 个循环;94 °C 变性 30 s,68 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 150 s,30 个循环;72 °C 延伸 7 min。

用反转录 PrimeScript™ RT 试剂盒(TaKaRa 公司)进行 cDNA 第一链合成,根据雄配子体 *cbbX* 基因的 cDNA 序列设计一对引物(正向 5'-ACCTCCAGTTTCCTTTTCGTCA-3', 反向 5'-TGCGGCATTATGCGT-3'),然后以合成的 cDNA

第一链为模板进行 RT-PCR 扩增反应以获得海带雌配子体 *cbbX* 基因的 cDNA 序列。RT-PCR 的 25 μL 反应体系包含 16 μL 灭菌双蒸水、2.5 μL 缓冲液、2.5 μL 的 Mg²⁺、0.4 μL 正向引物(25 μmol/L)、0.4 μL 反向引物(25 μmol/L)、2 μL 的 dNTPs(Promega 公司,2.5 mmol/L)及 0.2 μL 的 long Taq 酶(5 U/μL)。反应条件为 95 °C 预变性 5 min,然后 95 °C 变性 30 s,55 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 2 min 进行 35 个循环,最后 72 °C 延伸 10 min。

1.3 海带雌、雄配子体 *cbbX* 基因 DNA 序列克隆

用 CTAB 法^[5]分别从海带雌、雄配子体中提取基因组 DNA。根据 *cbbX* 基因的 cDNA 序列,设计 5 对引物(表 1),利用 PCR 进行 *cbbX* 基因的 DNA 序列片段克隆。PCR 反应条件为 94 °C 预变性 5 min;35 个循环包括 94 °C 变性 30 s,按表 1 温度退火 30 s,72 °C 延伸 1 min;72 °C 延伸 7 min。25 μL 反应体系包括 16 μL 灭菌双蒸水、2.5 μL 缓冲液、2.5 μL 的 Mg²⁺、0.4 μL 正向引物(25 μmol/L)、0.4 μL 反向引物(25 μmol/L)、2 μL 的 dNTPs(Promega 公司,2.5 mmol/L)及 0.2 μL 的 Taq 酶(5 U/μL)。

1.4 PCR 产物的电泳、纯化、克隆与测序

1% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 扩增反应产物。按照 TaKaRa 公司的 DNA 胶回收试剂盒说明书操作步骤回收并纯化 PCR 扩增产物,然后在 16 °C 下与 PMD-19T 载体(TaKaRa 公司)进行 3 ~ 4 h 连接反应,再转化到大肠杆菌(*Escherichia coli*)DH5α 感受态细胞中(申能博彩生物科技有限公司)。最后利用蓝白斑筛选,并将菌落 PCR 鉴定为阳性的克隆送至上海生工生物工程有限公司测序。

1.5 序列分析

利用 NCBI 的 blast server 对获得 *cbbX* 基因的 cDNA 全长序列进行核酸、蛋白质氨基酸序列同源性搜索,并利用 expasy 中工具 ProtParam(<http://www.expasy.org/tools/protparam.html>)在线分析蛋白质氨基酸组成、分子量、等电点。利用 BioEdit 软件分析其疏水性。蛋白质二级与三级结构通过 <http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre/> 在线预测,然后将蛋白质氨基酸序列转换成 PDB 格式文件,最后用 Rasmol 软件打开观看。利用 MEGA 4.0 软件^[6]构建系统演化树。

表 1 用于海带雌、雄配子体 *cbbX* 基因 DNA 序列克隆的引物及其退火温度
 Tab.1 Sequence and annealing temperature of the primers for DNA cloning of *cbbX* gene from the female and male gametophytes of *Laminaria japonica*

引物 primer	序列(5'-3') sequence from 5' to 3'	退火温度(°C) annealing temperature	PCR 产物大小(bp) PCR amplified product
P1	F: CCAGTTTCCTTTTCGTCAGG R: GCTTCCTGTAGTTGCCCTTG	65	350(350) *
P2	F: CAAGGGCAACTACAGGAAGC R: CAGCTTGACGGGAACCAAC	67	258(3310) *
P3	F: GACCTCGTTGGGTGGTTC R: CGGGGATGTACGAGAAGAAA	67	474(2020) *
P4	F: CGACTTCCCAACTACCTG R: GCTGTCAGCATTTTGAGGAT	67	420(1485) *
P5	F: T AGCAGATTGTGCCCTTGCAT R: CATTATGCGTCTCCGCTC	58	571(571) *

注: * 括号内的数据是 PCR 产物的实际大小

Notes: * The numeral in parentheses means the PCR amplified products in size

1.6 荧光定量 PCR(Q-RT-PCR)

为了避免光周期以及暗呼吸所释放的 CO_2 对该基因表达产生可能的影响,改用连续光照按上述方法来培养海带雌、雄配子体,自 08:00 开始每 4 个小时收集样品,至次日 08:00 结束采样,液氮研磨,利用 TRIzol 试剂(Invitrogen 公司)提取总 RNA,于 -80°C 超低温冰箱保存备用。用反转录 PrimeScriptTM RT 试剂盒(TaKaRa 公司)按上述步骤进行 cDNA 第一链合成。在 iCycler iQ5 (Bio-Rad 公司)上完成 Q-RT-PCR 反应。20 μL 反应体系包括 10.5 μL SYBR ScriptTM (TaKaRa 公司)、1 μL (5 $\mu\text{mol/L}$) 正向引物、1 μL (5 $\mu\text{mol/L}$) 反向引物及 2 μL 上述合成的 cDNA 第一链。95 $^\circ\text{C}$ 预变性 15 s 后进行 40 个循环,包括 95 $^\circ\text{C}$ 变性 15 s、58.9 $^\circ\text{C}$ 退火并延伸 1 min。1% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物特异性。*cbbX* 基因的正向引物为 5'-CGACTTCCCAACTACCTGA-3',反向引物为 5'-CTTGGCGTTGGAGAAGAAAGGG-3';以海带的 18S rRNA 基因(GenBank 登录号:EU293553)为管家基因,根据其编码序列设计的正向引物为 5'-TCGGACGGTTTTGTGGTG-3',反向引物为 5'-CCTTCCTTGGATGTGGTAGCC-3'。同一个样品重复三个反应,用 $2^{-\Delta\text{Ct}}$ 来表示基因的相对转录量,其中 ΔCt = 目标基因扩增的 Ct 值-内参 18S rRNA 基因 Ct 值,结果为 3 个反应的平均值 \pm 标准差。用 *t* 检验来进行差异显著性分析。

2 结果

2.1 海带雌、雄配子体 *cbbX* 基因克隆与序列特征

利用 RACE 方法,经 PCR 扩增、克隆与测序,分别获得一条长度为 1 713 bp 5'-末端和 601 bp 3'-末端产物(图 1),将它们与原雄配子体 cDNA 抑制消减文库中的克隆 18^[2] 拼接,得到一条长 2 087 bp 的 cDNA 序列(GenBank 登录号:EF490312)。其中开放阅读框长 1 275 bp,5'-非翻译区(untranslated region,UTR)长 118 bp,3'-UTR 长 694 bp 并具有明显的 polyA 尾巴。该序列编码一个含 424 个氨基酸的前体蛋白,其中前 19 个氨基酸为信号肽序列,信号肽酶切位点在 19 Ala 与 20 Phe 之间。酶切后,预测的成熟蛋白

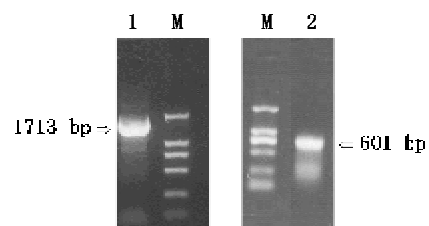


图 1 利用 RACE 方法进行 5'-与 3'-末端扩增产物的电泳图

M: DL-2000 分子量标准;1 泳道:5'-末端扩增产物;2 泳道:3'-末端扩增产物

Fig. 1 Electrophoresis patterns of amplified products of 5'- and 3'-ends by RACE

M: DL-2000 marker; Lane 1: amplified product of 5'-end; Lane 2: amplified product of 3'-end

为一个具有 405 个氨基酸所组成的多肽,它的分子量为 45.26 ku,等电点为 5.28。经 Blastn 搜索,没有发现同源的序列;但经过 Blastp 搜索时,发现该基因编码蛋白与 *Guillardia theta* 这种隐藻核型体编码的 CbbX 蛋白(GenBank 登录号: CAB65663)具有 66% 同源性。

根据雄配子体 *cbbX* 基因的 cDNA 序列设计引物,经过 PCR 扩增、克隆与测序,自海带雌配子体中得到预期大小为 2040 bp 的目的条带 cDNA 序列,通过比对发现它与雄配子体 *cbbX* 基因相应部分的 cDNA 序列完全一致。因此可以说,雌、雄配子体 *cbbX* 基因在 cDNA 序列上没有差异。

根据海带雄配子体 *cbbX* 基因的 cDNA 序列设计引物,以雄配子体基因组 DNA 为模板进行扩增,手工拼接后获得该基因的 DNA 序列(GenBank 登录号: GQ202219),长 7 517 bp。将

其与 cDNA 序列进行比对,可知海带雄配子体 *cbbX* 基因存在 8 个内含子(图 2),自起始密码子 ATG 始,它们分别位于第 231 与 232 位(长 936 bp)、第 357 与 358 位(长 2 171 bp)、第 492 与 493 位(长 1 020 bp)、第 700 与 701 位(长 347 bp)、第 857 与 858 位(长 237 bp)、第 1 010 与 1 011 位(长 307 bp)、第 1 079 位与 1 080 位(长 235 bp)以及第 1 179 与 1 180 位(190 bp)之间。这也间接地表明了该基因的转录需经过复杂的剪接过程。通过序列分析可知,这些内含子剪接位点都遵循“GT-AG”规则。整个基因组 DNA 序列中,AT 和 GC 的含量各占 50%,推测该克隆的 *cbbX* 基因可能是由核基因组编码的。

同样自海带雌配子体中也获得 *cbbX* 基因的 DNA 序列,发现它与雄配子体 *cbbX* 基因在 DNA 序列上没有差异。

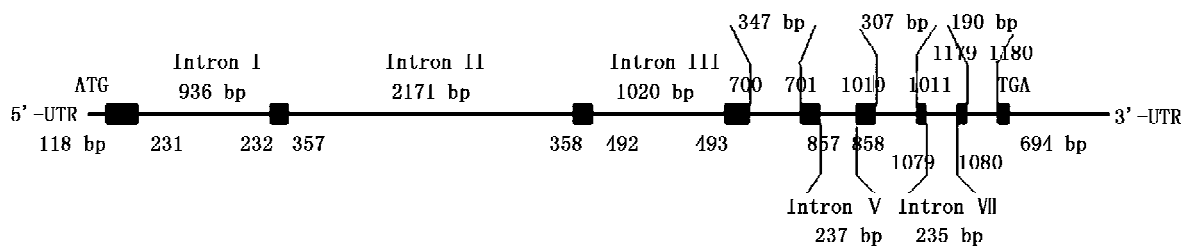


图 2 海带配子体 *cbbX* 基因的结构示意图

Fig. 2 Structure scheme of *cbbX* gene from *Laminaria japonica* gametophytes

2.2 海带配子体 *cbbX* 基因的生物信息学分析

推测的氨基酸组成分析结果显示,海带配子体 CbbX 前体蛋白富含 Ala (11.3%)、Leu (8.3%) 和 Asp (8.0%),且疏水性氨基酸 (Ala、Val、Leu、Ile、Met、Phe、Trp、Pro、Tyr) 含量较高,约占 48.1%。表明该蛋白具有较强的疏水性,可能为膜结合蛋白。

海带配子体 CbbX 前体蛋白二级结构预测结果显示,该蛋白可能含有 11 个 α -螺旋,分别位于 5 Ala-9 Leu、57 Pro-71 Lys、82 Glu-90 Ala、148 Pro-158 Ala、190 Lys-201 Leu、230 Pro-238 Lys、265 Ser-271 Asn、316 Thr-326 Met、338 Ala-347 Glu、359 Arg-376 Val 以及 402 Asp-409 Glu 之间。蛋白质三级结构预测显示,在其核心区有 4 个明显的 α -螺旋,大约位于 155 Gln-166 Arg、190 Lys-200 Ile、222 Gly-234 Glu 以及 315 Leu-330 Leu 之间;另有 5 个 β -折叠片,约位于 179 His-184 Gly、

211 His-216 Thr、242 Gly-248 Glu、283 Thr-288 Lys 以及 306 Gly-311 Phe 之间,呈平行方向排列,且每一个 β -折叠片与一段 α -螺旋相连接,呈现出“螺旋-折叠-螺旋”的特点,这对稳定蛋白质的空间结构及其功能等起着重要作用。

与红藻门、硅藻门以及隐藻门(表 2)等其他藻类叶绿体、核形体及核编码的 CbbX 蛋白序列比对发现(图 3),AAA ATP 酶结构域的保守性较强,其中有 73 个氨基酸完全相同,且在 186 Pro-193 Val、216 Thr-224 Tyr、226 Gly-232 Thr、247 Asp-253 Tyr 及 266 Ile-270 Leu 处有 5~9 个氨基酸呈连续分布,而其两端为多变区。在海带配子体 CbbX 蛋白的推测氨基酸序列中,从第 184 位 Gly 开始,具有一个典型的 Walker ATP-结合 motif (GXXPGTGKT)(图 3);但编码海带配子体 CbbX 蛋白的另一个 Walker ATP-结合 motif (VLFIDE) 不明显,自 243 位 Ile 开始,被 ILLVDE 取代。

表 2 不同藻类含 AAA ATP 酶结构域的 CbbX 蛋白
Tab. 2 CbbX proteins containing the structure domain of AAA ATPase

蛋白序列号 accession number	物种 species	所属门 phylum	AAA ATP 酶结构域 AAA ATPase domain
EF490312	海带 (<i>Laminaria japonica</i>)	褐藻门 Phaeophyta	176-315 (100%) **
CAB65663	<i>Guillardia theta</i> (nm) *	隐藻门 Cryptophyta	129-268 (66%)
AAC35641	<i>Guillardia theta</i> (ch) *	隐藻门 Cryptophyta	64-203 (53%)
ABD51943	盐生红胞藻 (<i>Rhodomonas salina</i>) (nm)	隐藻门 Cryptophyta	149-288 (65%)
Q9MS99	<i>Galdieria sulphuraria</i>	红藻门 Rhodophyta	75-214 (51%)
AAT79747	细基江蓠 (<i>Gracilaria tenuistipitata</i>)	红藻门 Rhodophyta	77-216 (53%)
P51228	<i>Porphyra purpurea</i>	红藻门 Rhodophyta	69-208 (56%)
Q1XDQ9	条斑紫菜 (<i>Porphyra yezoensis</i>)	红藻门 Rhodophyta	68-207 (56%)
Q9TLY2	<i>Cyanidium caldarium</i>	红藻门 Rhodophyta	72-211 (55%)
Q22025	<i>Cyanidioschyzon merolae</i> (ch)	红藻门 Rhodophyta	65-204 (52%)
Fujita 等 ^[7]	<i>Cyanidioschyzon merolae</i> (nuc) *	红藻门 Rhodophyta	159-297 (63%)
P49826	<i>Odontella sinensis</i>	硅藻门 Bacillariophyta	63-202 (52%)
BAD15120	赤潮异弯藻 (<i>Heterosigma akashiwo</i>)	黄藻门 Xanthophyta	69-208 (55%)
EAQ74791	聚球藻 (<i>Synechococcus</i> sp.)	蓝藻门 Cyanophyta	81-220 (60%)

注: * nm 指核形体, ch 指叶绿体, nuc 指核。* * 括号内的数据是相似性, 以海带为 100% 来计算

Notes: * nm represents nucleomorph, ch means chloroplast, and nuc stands for nucleus. * * the numeral in parentheses means the identity with *Laminaria japonica* CbbX sequence as a reference

2.3 基于 CbbX 蛋白质序列的系统演化分析

CbbX 蛋白在进化中主要分为两支(图 4)。叶绿体编码的聚成一支, 它们的祖先很显然与蓝藻存在着姐妹关系(自举值为 100); 在这一支中, 尽管赤潮异弯藻 (*Heterosigma akashiwo*) 和 *Odontella sinensis* 这种硅藻区别于其它物种的 CbbX 蛋白, 但这些物种仍以高的自举值(99)与其它叶绿体编码的蛋白聚成一类, 展现了叶绿体基因组在遗传演化中的保守性。核形体及核基因组编码的聚类成另一支, 海带配子体 CbbX 蛋白就是其中的一员, 并与隐藻门有着较高的自举值(93)。

2.4 cbbX 基因在雌、雄配子体之间的差异表达分析

当在连续光照条件下培养, 海带雌、雄配子体 *cbbX* 基因在一天内的相对转录量结果(图 5)显示, 在任一给定的时间, *cbbX* 基因在雄配子体的相对转录量都比雌配子体中的高, 且差异显著或极显著(除次日 04:00 之外); 雌、雄配子体在 12:00 及 16:00 都有一个转录峰, 但雄配子体在 20:00 点还有一个非常显著的表达峰。结果表明 *cbbX* 确实是一个差异表达的基因, 暗示它在雌、雄配子体中的转录可能还存在着不同的生物节律性。

3 讨论

Tabita 等^[8] 建议对光合作用中卡尔文循环

(Calvin 或 Calvin-Benson-Bassham cycle) 途径的酶基因使用统一术语, 用 *cbb* 表示编码与该循环相关或推测可能相关的酶或产物以及在转录表达中起调节作用的基因。在 *Guillardia theta* 这种隐藻中, 发现两个编码 CbbX 蛋白的基因, 一个位于核形体基因组中, 另一个位于叶绿体基因组中, 但它们的产物 CbbX 蛋白都定位于叶绿体中从而行使其功能^[8]。该藻核形体编码的 CbbX 蛋白氨基酸与质体编码的具有 56% 同源性, 后者被认为参与核酮糖-1,5-二磷酸羧化酶/加氧酶 (RuBisCo) 表达, 由 LysR 型转录调节因子调控^[8]。Meijer 等^[9] 也发现, 在 β -紫色细菌中, *cbbX* (原名 *cfxQ*) 为 RuBisCo 表达所必需。

在海带雄配子体抑制消减 cDNA 文库的基础上, 我们首次从褐藻门的物种中克隆到 *cbbX* 基因的 cDNA 及 DNA 全长序列, 经过 Blastp 搜索, 发现该基因编码蛋白与 *Guillardia theta* 核形体编码的 CbbX 蛋白 (GenBank 登录号: CAB65663) 具有 66% 同源性。推测该基因编码蛋白具有 CbbX 蛋白所具有的典型 AAA ATP 酶结构域, 并拥有一个极端保守的 Walker ATP-结合 motif (图 3)。通过系统演化树(图 4)的分析, 可知自海带配子体中克隆到的这个 *cbbX* 基因与隐藻门的核形体编码蛋白及红藻核基因编码蛋白具有更近的亲缘关系。但经过信号肽酶切位点预测, 它不像 *Cyanidioschyzon merolae* 这种单细胞红藻核基因所

编码的 *CbbX* 蛋白具有一个由 94 个氨基酸组成的信号肽^[7],而只有一个由 19 个氨基酸组成的信号肽;同时海带 *cbbX* 基因还缺少另一个典型的 Walker ATP-结合 motif 及 EF 手臂 Ca²⁺ 结合位

点^[7]。因此,该克隆的海带 *cbbX* 基因所编码蛋白到底是由核基因组编码还是由叶绿体基因组编码,有待进一步证实。

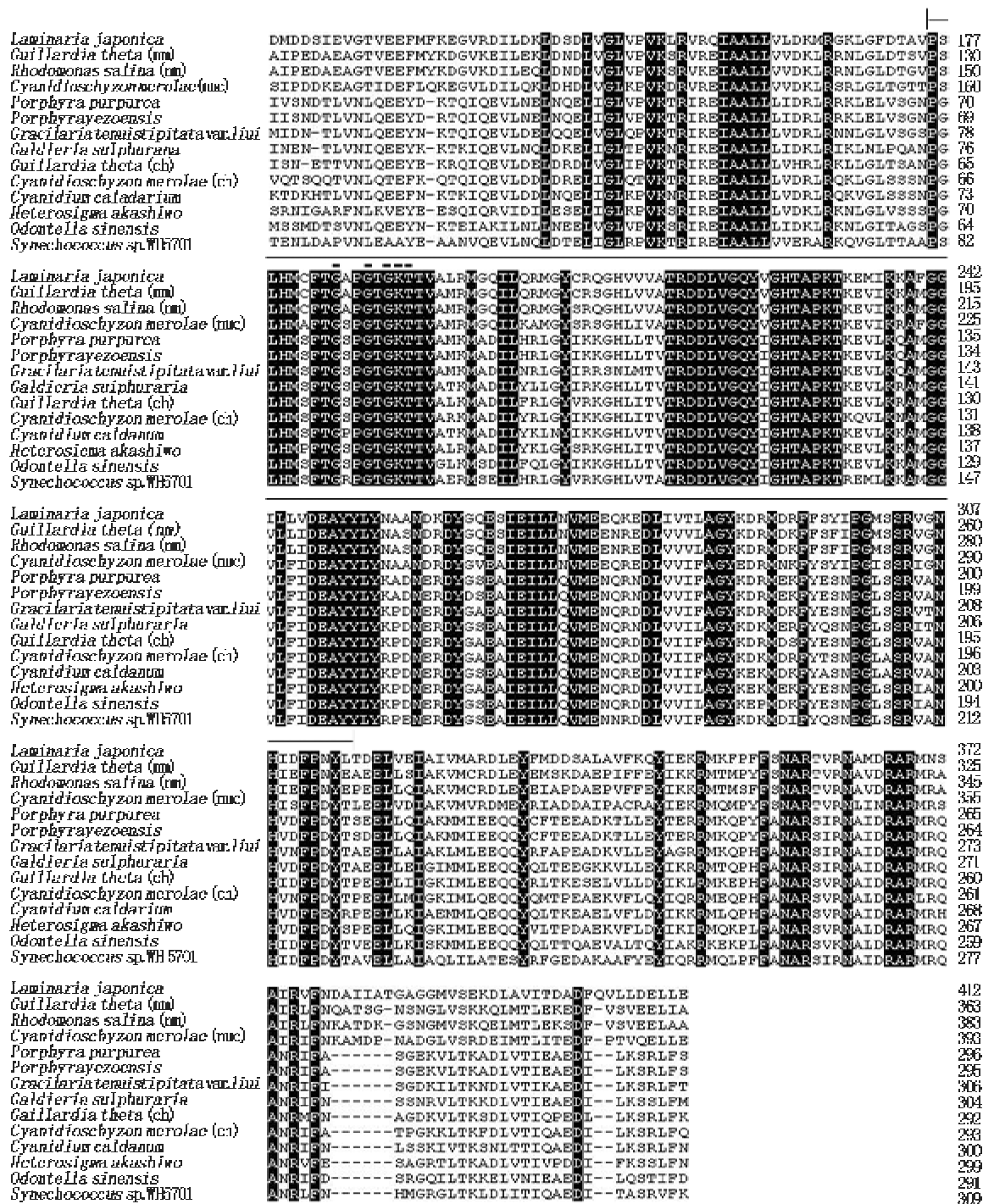


图3 含 AAA ATP 酶结构域的 *CbbX* 蛋白序列比对

完全相同的氨基酸用加黑表示,AAA ATPase 结构域用“|”表示,相同的 ATP 结合位点用粗线条“—”表示

Fig. 3 Alignment of *CbbX* proteins from various algae containing an AAA ATPase structure domain

Identical amino acids are indicated by shaded letters, “|” illustrates AAA ATPase structure domain and “—” shows the ATP-binding sites

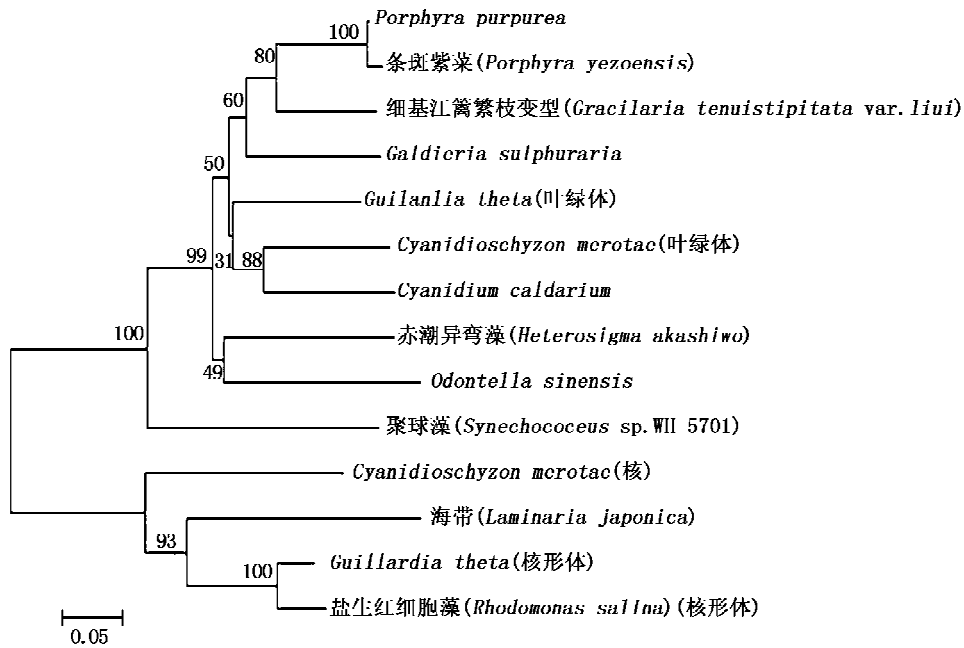


图4 基于 CbbX 蛋白构建的藻类 NJ 系统进化树
节点处的数值为自举值

Fig. 4 Neighbor-joining phylogenetic tree inferred from the amino acid sequences deduced from the nucleotide sequences of *cbbX* genes from several species of algae
Numbers at the nodes are bootstrap values

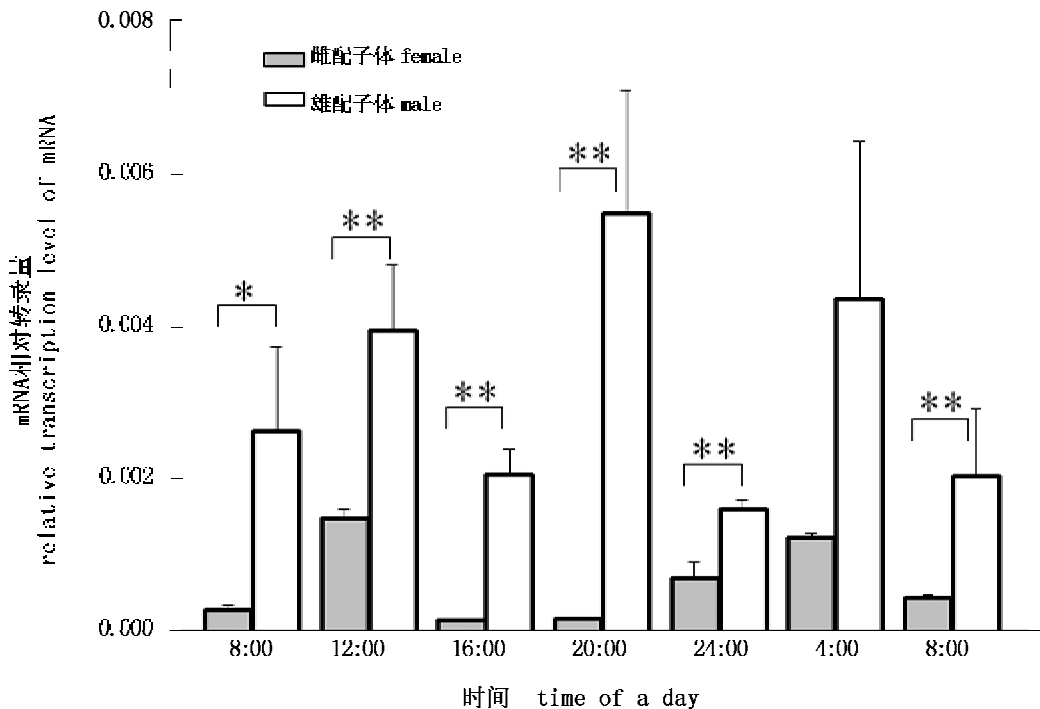


图5 在连续光照条件下, *cbbX* 基因在海带雌、雄配子体中的日转录图谱
在同一时间, 雌、雄配子体之间差异显著 ($P < 0.05$) 用 * 表示, 差异极显著 ($P < 0.01$) 用 ** 表示

Fig. 5 Diurnal transcription pattern of *cbbX* gene from *Laminaria japonica* female and male gametophytes grown under a continuous illumination

There is a significant ($* P < 0.05$) or extremely significant ($** P < 0.01$) difference between female and male gametophytes of *Laminaria japonica* at a given time

Maier 等^[10]在核形体基因组编码的 CbbX 蛋白及 RuBisCo 调控因子的系统演化研究中表明, *Guillardia theta* 核形体基因组编码的 CbbX 蛋白与芽孢杆菌 (*Bacillus* spp.) 中具有阶段特异性的孢子形成因子及其假定蛋白很相近,暗示 *cbbX* 基因的表达也可能随生物体生长发育过程存在阶段特异性。自海带配子体中克隆到的这个 *cbbX* 基因是在海带雄配子体抑制消减 cDNA 文库的基础上,而且通过对该文库所有克隆序列的生物信息学分析,发现在 618 个克隆的 cDNA 文库中,有 21 个克隆的 cDNA 序列编码 CbbX 蛋白^[11]。这也暗示了该克隆的 *cbbX* 基因在海带的雌、雄配子体之间也可能存在着差异表达。Q-RT-PCR 结果(图 5)证实了这个推测,且在连续光照条件下, *cbbX* 基因在雌、雄配子体之间还呈现出不同的日表达谱,暗示了海带配子体 *cbbX* 基因的转录可能还存在着生物节律性。鉴于 *cbbX* 与 RuBisCo 大、小亚基基因在结构与功能上的紧密关系^[12-15]以及 RuBisCo 大、小亚基基因的转录受光^[16]、CO₂^[17]等环境因素的影响,推测海带配子体 *cbbX* 基因的转录还可能随环境条件产生差异表达。从该克隆基因的 cDNA 及 DNA 序列来看,存在着差异表达的原因肯定不是由于核苷酸编码序列所致,因为雌、雄配子体之间的编码序列及基因组序列完全一致。因此推测这种差异表达,可能是由于基因的拷贝数或基因上游的转录调控因子不同或者存在转录后调节所导致的。

参考文献:

- [1] FAO. FAO Yearbook. Fishery Statistics. Aquaculture Production [C]. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, 2006, 98(2): 199.
- [2] 史西志,毕燕会,周志刚. 海带雄性配子体差异表达基因片段的克隆及筛选 [J]. 水产学报, 2005, 29(4): 666-669.
- [3] 周志刚,吴超元. 海带无性繁殖系的形成及孢子体诱导 [J]. 生物工程学报, 1998, 14(1): 109-111.
- [4] Starr R C, Zeikus J A. UTEX-the culture collection of algae at the University of Texas at Austin-1993 list of cultures [J]. J Phycol, 1993, 29(Suppl): 1-106.
- [5] Richards E, Reichardt M, Rogers S. Preparation of genomic DNA from plant tissue [M]//Ausubel F M, Brent R, Kingston R, et al., eds. Current Protocols in Molecular Biology. New York: John Wiley & Sons, Inc., 2003: 2.3.1-2.3.7.
- [6] Tamura K, Dudley J, Nei M, et al. MEGA4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0 [J]. Mol Biol Evol, 2007, 24: 1596-1599.
- [7] Fujita K, Ehira S, Tanaka K, et al. Molecular phylogeny and evolution of the plastid and nuclear encoded *cbbX* genes in the unicellular red alga *Cyanidioschyzon merolae* [J]. Genes Genet Syst, 2008, 83: 127-133.
- [8] Tabita F R, Gibson J L, Bowien B, et al. Uniform designation for genes of the Calvin-Benson-Bassham reductive pentose phosphate pathway of bacteria [J]. FEMS Microbiol Lett, 1992, 99: 107-110.
- [9] Meijer W G, Arnberg A C, Enequist H G, et al. Identification and organization of carbon dioxide fixation genes in *Xanthobacter flavus* H4-14 [J]. Mol Gen Genet, 1991, 225: 320-330.
- [10] Maier U G, Fraunholz M, Zauner S, et al. A nucleomorph-encoded *cbbX* and the phylogeny of RuBisCo regulators [J]. Mol Biol Evol, 2000, 17: 546-533.
- [11] 陆广琴,欧阳珑玲,周志刚. 海带配子体抑制消减 cDNA 文库的生物信息学分析 [J]. 中国水产科学, 2009, 16(2): 221-229.
- [12] Reith M, Munholland J. Complete nucleotide sequence of the *Porphyra purpurea* chloroplast genome [J]. Plant Mol Biol Rep, 1995, 13: 333-335.
- [13] Ohta N. Analysis of a plastid gene cluster reveals a close relationship between *Cyanidioschyzon* and *Cyanidium* [J]. J Plant Res, 1997, 110: 235-245.
- [14] Douglas S E, Penny S L. The plastid genome of the cryptophyte alga, *Guillardia theta*: complete sequence and conserved synteny groups confirm its common ancestry with red algae [J]. J Mol Evol, 1999, 48: 236-244.
- [15] Kowallik K V, Stoebe B, Schaffran I, et al. The chloroplast genome of a chlorophyll *a/c*-containing alga, *Odontella sinensis* [J]. Plant Mol Biol Rep, 1995, 13: 336-342.
- [16] Besford R T, Hand P, Richardson C M, et al. Photoperiod effect on bud burst in *Prunus* is phase dependent: significance for early photosynthetic development [J]. Tree Physiol, 1996, 16: 491-496.

- [17] Gesch R W, Boote K J, Vu J C V, *et al.* Changes in growth CO₂ result in rapid adjustments of ribulose-1, 5-bisphosphate carboxylase/oxygenase small subunit gene expression in expanding and mature leaves of rice [J]. *Plant Physiol*, 1998, 118: 521 – 529.

Characterization and differential expression of *cbbX* gene between female and male gametophytes of *Laminaria japonica*

SHI Wei-wei¹, WANG Li-li^{1,2}, CHEN Jing¹, OUYANG Long-ling¹, ZHOU Zhi-gang^{1*}

(1. Key Laboratory of Genetic Resources and Their Applications in Aquaculture, and Aquaculture E-Institute of Shanghai Municipal Education Commission, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;

2. National Marine Environmental Monitoring Centre, State Oceanic Administration, Dalian 116023, China)

Abstract: With designed gene-specific primers on basis of Clone 18 sequence screened out of a suppressive subtracted cDNA library from the male gametophyte of *Laminaria japonica*, a full length cDNA (GenBank accession No: EF490312) was cloned by use of rapid amplification of cDNA ends (RACE). It was composed of 2087 bp in length including 118 bp 5'-untranslated region (UTR), 694 bp 3'-UTR with poly A at this end and 1 275 bp open reading frame (ORF). Its homology with *Guillardia theta* nucleomorph-encoding CbbX protein (GenBank accession number: CAB65663) reached 66% in peptide sequence. The deduced protein of *L. japonica cbbX* gene contained 424 amino acids with the first 19 ones from N-terminal on constituting a signal peptide. The matured protein was composed of 405 amino acids after endonuclease restriction digestion with a putative molecular weight of 45.26 ku and pI at 5.28. The coding region of *cbbX* gene was interrupted by eight introns with all splicing sites well matching a GT-AG rule. There was no difference between female and male gametophyte *cbbX* genes in their cDNA or DNA sequences. From 184 Gly of the encoded protein, there was a Walker ATP-binding motif. The deduced CbbX from *L. japonica* gametophytes was clustered with cryptophyte nucleomorph- and rhodophyte nucleus-encoding CbbX which was significantly different from the chloroplast-encoding one according to the constructed neighbor-joining phylogenetic tree. It was supposed, therefore, that the cloned *cbbX* gene from *L. japonica* gametophytes was possibly encoded by nucleus genome. The transcription level of *cbbX* gene in male gametophytes was proven significantly higher than that in females by quantitative real-time PCR, and the diurnal transcription patterns were a little different between males and females, both of which confirmed that *cbbX* gene was a differentially expressed one in *L. japonica* gametophytes. This research lays a foundation for the function identification and subcellular location of *cbbX* gene.

Key words: *Laminaria japonica*; gametophyte; *cbbX* gene; nucleotide sequence; transcription

Corresponding author: ZHOU Zhi-gang. E-mail: zgzhou@edu.cn