

海带配子体光捕获蛋白基因 *lhcf6* 的启动子克隆与鉴定

宁 璞,毕燕会,周志刚

(上海海洋大学 水产与生命学院,上海高校水产养殖 E-研究院,上海 201306)

摘要:根据海带配子体光捕获蛋白基因 *lhcf6* 的 cDNA 全长序列(GenBank 登录号:DQ250739)设计引物,利用基因组步移技术克隆得到其在雌、雄配子体中的 5'-侧翼序列,长度分别为 932,901 bp。测序结果比对显示二者相似度为 33.3%,说明该基因在雌、雄配子体中具有不同的上游调控区。网络服务器 PlantCARE 和 Softberry 启动子元件预测结果表明,二者均含有 TATA 框、节律性相关元件 MBS、光反应相关元件 MNF1 和 GAG-motif,其中雌配子体 *lhcf6* 基因 5'-侧翼序列还特有 LHC 基因特征元件 AT-rich 序列,雄配子体特有节律性相关元件 Circadian 元件,这些元件可能与该基因表达受光质、光强、节律性等因素的调控有关。将其与 GFP 报告基因一起构建融合表达载体 pCambia1304-*Flhcf6* 和 pCambia1304-*Mlhcf6*,利用 pCambia1304 作对照,通过电击转化法分别转化莱茵衣藻。激光共聚焦荧光显微镜检测结果显示,含 pCambia1304-*Flhcf6* 和 pCambia1304-*Mlhcf6* 的转基因藻体中 GFP 基因均有表达,说明克隆得到的海带雌、雄配子体 *lhcf6* 基因的 5'-侧翼序列具有启动子功能。

关键词:海带;配子体;*lhcf6*;启动子;GFP

中图分类号:Q78 **文献标识码:**A **文章编号:**1000-7091(2014)01-0062-07

Cloning and Identification of *lhcf6* Gene Promoters from *Saccharina japonica* Gametophytes

NING Pu, BI Yan-hui, ZHOU Zhi-gang

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

Abstract: *lhcf6* gene 5'-flanking sequences were isolated respectively from genomic DNA of female and male gametophytes of *Saccharina japonica* by nested PCR using genomic walking method. The length of the fragments were 932 bp in female and 901 bp in male. Sequence alignment showed a low similarity of 33.3% between the two fragments, indicating this gene had different upstream regulatory region in female and male gametophytes. Cis-elements prediction by web server PlantCARE and Softberry showed both of them contained TATA box, circadian responsive element MBS, as well as light responsive elements MNF1 and GAG-motif. Otherwise, some elements were specific to female or male *lhcf6*, such as LHC gene promoter typical element AT-rich sequence was specific to female and circadian element circadian was specific to male. These elements might take part in the regulation of *lhcf6* expression by light quality, light intensity and circadian. These two 5'-flanking sequences were fused with the reporter gene GFP to construct plant expression vectors, named pCambia1304-*Flhcf6* and pCambia1304-*Mlhcf6*. The recombinant vectors as well as vector pCambia1304 as positive control were transferred to the green alga *Chlamydomonas reinhardtii* by electroporation. GFP was observed under laser confocal fluorescence microscopy. Fluorescence signal was detected in cells containing pCambia1304-*Flhcf6* and pCambia1304-*Mlhcf6* indicating both the two cloned 5'-flanking sequences showed promoter activity.

Key words: *Saccharina japonica*; Gametophytes; *lhcf6* gene; Promoter; Green fluorescent protein

光捕获蛋白复合体(Light-harvesting protein complex, LHC)是一类镶嵌于藻类及高等植物类囊体膜上

收稿日期:2013-06-08

基金项目:国家自然科学基金委员会资助项目(30671627;31201992);国家高技术发展研究计划项目(2012AA10A406);教育部高等学校博士学科点专项基金项目(20060624001);上海高校海洋科学一流学科资助项目

作者简介:宁 璞(1988-),女,山西太原人,在读硕士,主要从事藻类生物技术研究。

通讯作者:周志刚(1964-),男,安徽肥东人,教授,博士生导师,主要从事藻类生物学研究。

以结合天线或辅助色素并为光合作用反应中心捕获与传递光能的蛋白^[1]。在适宜的光照强度下,藻类的 LHC 结合色素并将色素捕获的光能传递并分配至光反应中心以进行光合作用^[1];当光照强度超过光合作用所需的最大光通量时,藻类细胞通过调整 LHC 基因表达量,降低类囊体膜上结合的色素并减少光能的传递,以保护叶绿体避免光抑制所导致的不可修复性损伤^[2];但在光照强度过弱或营养不足等胁迫条件下,增加类囊体膜上光合作用复合体中一些捕光蛋白的量,更有效地参与光能的捕获、传递与贮藏以及其他未知功能以适应变化的环境^[3-5]。据报道^[6],糖海带 (*Saccharina latissima*) 褐藻素-叶绿素 *a/c* 结合的光捕获蛋白 (LHCF) 复合体是由 7 个成员所构成的蛋白家族,海带 (*S. japonica*) *lhcf6* 就属于该家族中的一员^[7]。经实时荧光定量 PCR (Q-RT-PCR) 检测,发现海带 *lhcf6* 在不同光强、光质等条件下甚至在雌、雄配子体之间都存在转录量的差异^[8]。

高等植物 *LHCA-1* 和 *LHCB-1* 基因的表达主要受转录水平的调控^[9-10],而启动子是该调控的一个重要元件。同一藻体不同 *lhcf* 的表达量可能是由于光捕获蛋白基因启动子的多样性造成的^[11]。Oeltjen 等^[12]推测小环藻 (*Cyclotella cryptica*) *fcp2* 和 *fcp6* 两基因的不同表达可能也是由启动子序列来控制的。那么,海带 *lhcf6* 在雌、雄配子体的差异表达是否也是由它们不同的启动子序列所致? 为此,本研究首先通过基因组步移 (Genome walking) 技术克隆该基因在雌、雄配子体中的 5'-侧翼片段,再通过网络服务器进行调控元件在线预测滞后,将其与绿色荧光蛋白 (Green fluorescent protein, GFP) 报告基因构建融合表达载体,通过电击转化法转化莱茵衣藻 (*Chlamydomonas reinhardtii*),激光共聚焦荧光显微镜检测结果显示所克隆得到的雌、雄配子体 *lhcf6* 的 5'-侧翼片段具有启动子活性,这为进一步进行雌、雄配子体 *lhcf6* 基因启动子活性比较及各调控元件的功能分析奠定基础。

1 材料和方法

1.1 藻类培养

海带雌、雄配子体取自上海海洋大学周志刚老师实验室,采用以前的报道方法培养^[13]在 PES 培养基^[14]中并于温度为 17 °C、光时为 16 h/d 及光照强度为 40 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ 的条件下培养。

莱茵衣藻为细胞壁缺失突变株 CC-3491,由南京大学卢山教授馈赠。于 TAP 培养基^[15]中振荡培

养,光照强度为 70 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$,光周期为光照:黑暗为 12 h:12 h。

1.2 DNA 提取

利用 UNIQ-10 植物基因组抽提试剂盒 (Tiangen 公司) 分别提取海带雌、雄配子体基因组 DNA,保存于 -20 °C 备用。

1.3 *lhcf6* 的 5'-侧翼序列克隆与分析

1.3.1 引物设计 基于海带 *lhcf6* 的 cDNA 全长序列 (GenBank 登录号: DQ250739), 利用软件 Primer Premier (ver. 5.0) 设计基因特异引物 GSP1: 5'-GGT CGTTGATGATGTACGGCTTGTGT-3' 和 GSP2: 5'-CA TCTCCACTTCCAACCTTTCTACACCCAA-3'。

1.3.2 DNA 酶切 取 2.5 μg 海带配子体基因组 DNA, 分别利用内切酶 *Dra* I、*Eco*RV、*Pvu* II 和 *Stu* I 进行酶切。在 37 °C 反应 18 h。利用 0.5% 琼脂糖凝胶电泳检测酶切结果。苯酚: 氯仿 (1:1) 沉淀收集酶切产物, 溶于水, 取 4 μL 按照试剂盒说明书与 Genome Walker Adaptor (Clontech 公司) 连接。连接产物用 TE (10/1, pH 值 7.5) 10 倍稀释至终体积 80 μL , 作为第一次 PCR 模板。

1.3.3 第一次 PCR 以 GSP1 和接头引物 AP1 为引物, 以 1.3.2 中的连接产物为模板进行第一次 PCR。50 μL 的 PCR 反应体系包括 40 μL 灭菌双蒸水、5 μL 10 \times Advantage 2 PCR 缓冲液、1 μL dNTP (各 10 mmol/L)、1 μL AP1 (10 $\mu\text{mol/L}$)、1 μL Advantage 2 聚合酶混合液 (50 \times)、1 μL GSP1 及 1 μL 模板 DNA。PCR 反应条件: 7 个循环包括 94 °C 变性 25 s, 72 °C 退火 3 min; 接着 32 个循环包括 94 °C 变性 25 s, 67 °C 退火 3 min; 最后 67 °C 延伸 10 min。

1.3.4 第二次 PCR 以 GSP2 和接头引物 AP2 为引物, 将第一次 PCR 产物稀释 50 倍作为模板进行第二次 PCR。50 μL 的 PCR 反应体系包括 40 μL 灭菌双蒸水、5 μL 10 \times Advantage 2 PCR 缓冲液、1 μL dNTP (各 10 mmol/L)、1 μL AP2 (10 $\mu\text{mol/L}$)、1 μL Advantage 2 聚合酶混合液 (50 \times)、1 μL GSP2 和 1 μL 模板。PCR 反应条件: 5 个循环包括 94 °C 变性 25 s, 72 °C 退火 3 min; 20 个循环包括 94 °C 变性 25 s, 67 °C 退火 3 min; 最后 67 °C 延伸 7 min。

PCR 产物经胶回收纯化后参照 TA 克隆试剂盒 (TaKaRa 公司) 的说明, 连接到 pMD19T 载体中, 连接反应体系为: 1 μL pMD19-T 载体, 4 μL 经胶回收纯化的 PCR 产物, 5 μL Solution I。反应混合液置于 16 °C 连接过夜。然后转染大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞, 步骤为: 将 10 μL 连接混合液加入 DH5 α 感受态细胞中并混匀, 冰上放置 30 min, 42 °C 热激 90 s,

之后冰上放置 1 min,加入 LB 液体 890 μL 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 振荡培养 1 h。之后将培养好的菌液进行蓝白斑筛选,阳性克隆委托上海生工公司完成测序。

1.3.5 序列分析 利用网络服务器 http://www.fruitfly.org/seq_tools/promoter.html 分析 *lhcf6* 基因 5'-侧翼序列的启动子核心区。利用网络工具 <http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/>^[16] 进行调控元件预测。利用 CLUSTAL W 软件^[17] 对植物启动子库中植物光捕获蛋白启动子核心区,与本试验所获得的启动子核心区进行序列比对,序列相似度通过 BioEdit 软件计算。

1.4 启动子鉴定

1.4.1 *lhcf6* 基因启动子目的片段的双酶切与回收

根据 pCAMBIA1304 二元表达载体中启动 GFP 表达的 CaMV 35S 的位置及其序列特征,用 DNAMAN 软件对 *lhcf6* 的 5'-侧翼序列分析后,确定 *Pst* I (位于多克隆位点处,即 MCS)和 *Nco* I 这 2 个酶切位点(图 1),重新设计带酶切位点的引物。其中,在上游引物的 5'-端加 *Pst* I 酶切位点,下游引物的 3'-端加入 *Nco* I 酶切位点。雌配子体引物序列为 F1:5'-CTGCAGCTGTTTGGTCAAGGTTATTAT-3' 和 F2:5'-CCATGGTTGGGTGTAGAAAGGTTGGAA-3',雄配子体引物序列为 M1:5'-CTGCAGCTGCTATTCTTGGTATGTTGA-3' 和 M2:5'-CCATGGTTGGGTGTAGAAAGGTTGGAA-3'。用引物再次从 5'-侧翼 DNA 片段上 PCR 扩增 *lhcf6* 基因启动子。PCR 反应体系为:1 μL 模板质粒,2 μL dNTP(2.5 mmol/L),1.5 μL Mg^{2+}

(25 mmol/L),2.5 μL 10 \times PCR 缓冲液,0.25 μL *rTaq* 酶(5 U/ μL),上下游引物各 1 μL ,之后加无菌水至总体积为 25 μL 。PCR 反应条件为:95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 3 min;35 个循环包含 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 1 min、退火 45 s,退火温度 F1 和 F2 为 60 $^{\circ}\text{C}$ 、M1 和 M2 为 63 $^{\circ}\text{C}$;72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min,最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 7 min。

PCR 产物经胶回收纯化后按上述方法连接到 pMD19T 载体,构建 pMD19T-*Flhcf6* 和 pMD19T-*Mlhcf6* 载体,之后转染大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞、蓝白斑筛选、测序,以确保选择正确的质粒进行下面的试验。

1.4.2 植物表达载体的构建及鉴定

用 *Pst* I 和 *Nco* I 双酶切 pCAMBIA1304 载体及 pMD19T-*Flhcf6* 和 pMD19T-*Mlhcf6* 载体。反应条件为:酶各 1 μL ,10 \times K 缓冲液 2 μL ,BSA 2 μL ,载体 DNA 6 μL ,加水至 20 μL 。37 $^{\circ}\text{C}$ 酶切 4 h。1% 琼脂糖电泳检测并切胶回收目的片段。将酶切后回收的 PCR 产物及 pCAMBIA1304 载体片段,在 T4 DNA 连接酶作用下 16 $^{\circ}\text{C}$ 连接过夜,构建表达载体 pCAMBIA1304-*Flhcf6* 和 pCAMBIA1304-*Mlhcf6* (图 1)。转化到大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞,用含卡那霉素的 LB 抗性培养基筛选转化子。次日挑选数个单菌落,摇床培养,用碱裂解法提取质粒 DNA,通过 *Pst* I 和 *Nco* I 双酶切鉴定和 PCR 鉴定阳性质粒,将检测正确的转化子质粒送上海生工公司测序。序列确定无误后,培养并保存菌种。

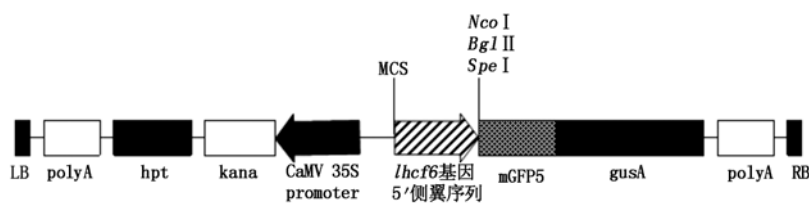


图 1 重组质粒的构建

Fig. 1 Construction of the recombinant plasmid

1.4.3 pCAMBIA1304-*Flhcf6* 和 pCAMBIA1304-*Mlhcf6* 植物表达载体转染莱茵衣藻 采用电击转化法将 2 个重组质粒和空载体转入莱茵衣藻中^[15]。将衣藻放在冰上预冷 15 min,4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下以 12 000 r/min 离心力离心 5 min,用含 40 mmol/L 蔗糖的 TAP 培养基重悬细胞致终浓度为 $1 \times 10^8 \sim 4 \times 10^8$ cell/mL,加入 10% 的 Tween-20。4 mm 厚度的电击杯中加入 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的重组质粒、200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的鲑鱼精和 250 μL 的细胞悬浮液混匀,冰上预冷 5 min。电击程序为:电压 0.72 kV,时间 4 ms。电击结束后迅速加入 1 mL TAP-蔗糖培养基,将细胞液转入 1.5 mL 离

心管中,在 25 $^{\circ}\text{C}$ 以 140 r/min 的转速振荡培养 1 h。然后用淀粉包埋,将液体涂于含 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 潮霉素的 TAP-0.5% 琼脂糖平板上。将平板置于 25 $^{\circ}\text{C}$ 且光照强度为 70 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 的光照培养箱中培养 5~7 d。挑取平板上的衣藻,放入 TAP 液体培养基中培养。

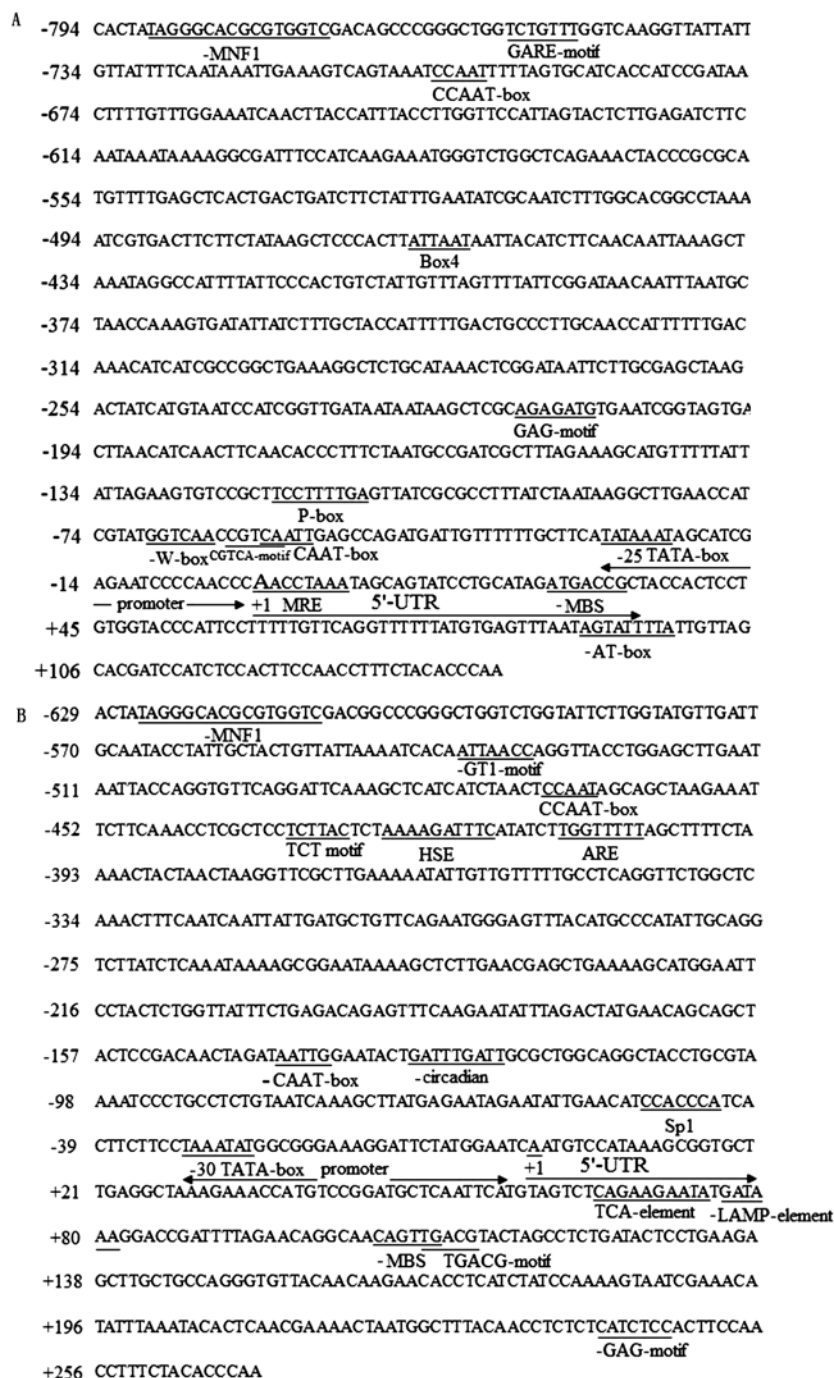
1.4.4 激光共聚焦荧光显微镜观察 利用激光共聚焦荧光显微镜(Leica 公司 TCS SP2 型号)在 485 nm 激发光下检测莱茵衣藻细胞中 GFP 的绿色荧光信号,在 650 nm 激发光下检测细胞内叶绿体自发荧光信号,明场下观察其细胞形态。

2 结果与分析

2.1 海带雌、雄配子体 *lhcf6* 的 5'-侧翼片段的克隆

提取的海带雌、雄配子体基因组 DNA, 分别经 *Dra* I、*Eco*R V、*Pvu* II 和 *Stu* I 这 4 种内切酶酶切, 将其酶切产物与接头连接后, 制备出海带雌、雄配子体基因组文库各 4 个, 用作基因步移第一次 PCR 的模板。然后利用琼脂糖凝胶电泳对第一次

PCR 结果进行检测, 发现只有 *Eco*R V 酶切文库出现扩增条带, 因而舍弃其他无扩增条带的文库。利用具有扩增条带的第一次 PCR 产物作为第二次 PCR 的模板, 克隆得到雌、雄配子体 *lhcf6* 的 5'-侧翼序列。经序列分析, 可知它们的长度分别为 932 bp (GenBank 登录号: EU663626) 和 901 bp (GenBank 登录号: EU663627)。



转录起始位点标为 +1; 预测的调控元件用下划线标注; 元件名称前负号表示该元件位于相应位置的反义链。

The transcription start site is indicated as +1; lined letters are the predicted *cis* elements; elements locate in antisense strand are indicated as each name with -.

图 2 海带雌 (A)、雄 (B) 配子体 *lhcf6* 的 5'-侧翼序列

Fig. 2 5'-flanking sequences of *lhcf6* gene from the female (A) and male (B) gametophytes of *S. japonica*

2.2 *lhcf6* 的 5'-侧翼片段序列的生物信息学分析

通过网络软件 PlantCARE 预测,分别获得了海

带雌、雄配子体 *lhcf6* 的上游调控元件,它们在该基因上的具体位置见图 2,相应的功能见表 1。

表 1 海带雌、雄配子体 *lhcf6* 基因 5'-侧翼序列调控元件分类及功能

Tab. 1 The regulatory elements of 5'-flanking sequences of *lhcf6* genes from the female and male gametophytes of *S. japonica*

类别 Category	元件 Element	功能 Function
共有元件 The common elements	MBS、TATA 框、MNF1、GAG-元件、CAAT-box	TATA 框:RNA 聚合酶结合位点 MBS:生物钟相关元件 MNF1 和 GAG-motif:光反应相关元件(Nagy et al,1988) CAAT-box:启动子元件
<i>Flhcf6</i> * 特有元件 The elements of <i>Flhcf6</i> *	P-box、AT-rich 序列、MRE 和 Box4、GARE、W-box、CGTCA-元件	P-box:赤霉素反应相关元件 AT-rich 序列:LHC 基因特征元件 MRE 和 Box4:光反应相关元件 GARE:赤霉素相关元件 CGTCA-元件:茉莉酸甲酯相关元件
<i>Mlhcf6</i> * 特有元件 The elements of <i>Mlhcf6</i> *	GT1-元件、Circadian 元件、HSE、TCT-元件、Sp1、LAMP 元件、ARE、TCA-元件、TGACG-元件	Circadian 元件:节律性相关元件 HSE 元件:热胁迫响应元件 TCT-motif、Sp1、LAMP 元件、GT1-元件:光反应相关元件 TGACG-元件:茉莉酸甲酯相关元件 TCA-元件:水杨酸相应元件 ARE:厌氧条件感应元件

注: *Flhcf6*. 雌配子体 *lhcf6*; *Mlhcf6*. 雄配子体 *lhcf6*。

Note: *Flhcf6*. *lhcf6* gene of female gametophytes; *Mlhcf6*. *lhcf6* gene of male gametophytes.

2.3 海带雌、雄配子体 *lhcf6* 启动子核心区相似性分析

植物启动子库(PlantProm)中只有 3 个光捕获蛋白启动子核心区序列,分别是烟草(*Nicotiana sylvestris* Spegazzini) *Lhcb1* 基因的启动子(PLPR0288),玉米(*Zea mays* L.) *Cab-m7* 基因的启动子(PLPR0109)和水稻(*Oryza sativa* L.) *cab1R* 基因的

启动子(PLPR0165)。在这 3 个启动子中,只有 PLPR0109 具有 TATA 框。序列比对表明这些序列相似度低(表 2),表明了光捕获蛋白启动子序列的多样性。海带雌、雄配子体 *lhcf6* 的 2 个启动子间的相似度也只有 33.3%,位于光捕获蛋白基因启动子相似度为 24%~53.8%。

表 2 光捕获蛋白基因启动子核心区相似性分析

Tab. 2 Similarity of the core promotor sequences of LHC genes

编号 No.	序列 Sequence						相似性 Similarity					
							PLPR0288	PLPR0109	PLPR0165	<i>Flhcf6</i>	<i>Mlhcf6</i>	
PLPR0288	- - T	TACTTTCTATGT	ATA	ATGAAGCCAGAA	TA	ACTTCAGTTC	ATCACAACTA - - -	1.000	0.339	0.372	0.423	0.392
PLPR0109	- - T	CCGTCGCT TT	A - A	ATACCTTCGTG	CGCCTCCACA	AGTC	ACAGCATCTCAA		1.000	0.538	0.388	0.240
PLPR0165	- - T	CCCGCGCTATTT	A - A	ACTCCCGCGCC	ATCTCCAAC	TCCC	AACTCACACTC - -			1.000	0.442	0.307
<i>Flhcf6</i>	TTT	TTTGCTTCATAT	A - A	ATAGCATCGAGA	ATCCCCAACCC		AACCTAAATA - - -				1.000	0.333
<i>Mlhcf6</i>	- AC	TTCTTCTAAAT	ATG	GCGGGAAGGAT	TTCAT	GGAATC	AATGTCCATA - - -					1.000
		*	*			*						

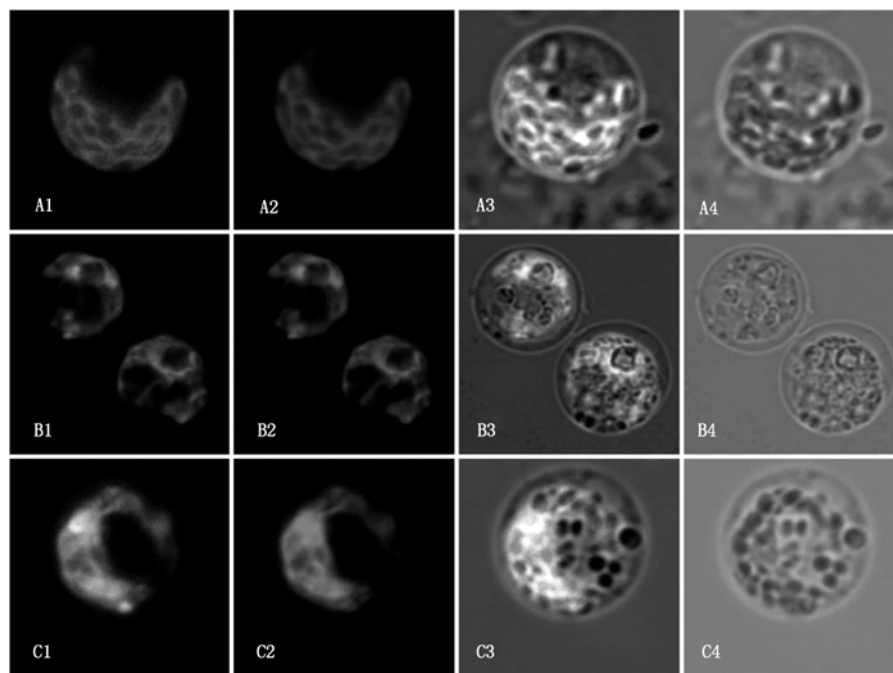
注:*.保守的碱基。

Note:*.Indicated the conserved bases.

2.4 *lhcf6* 启动子的鉴定

利用 pCAMBIA1304 载体上花椰菜花叶病毒(CaMV)35S 启动子两端有多克隆位点这一特性,通过限制性内切酶的酶切反应,将克隆得到的海带雌、雄配子体 *lhcf6* 的 5'-侧翼序列连接到 pCAMBIA1304 载体上,代替了该质粒的 CaMV 35S 启动子序列。从而得到了含有海带雌、雄配子体 *lhcf6* 的 5'-侧翼序列且与 GFP 融合的质粒。通过电击转化将构建好的质粒转入莱茵衣藻中,激光共聚焦显微镜的检测结果显示,在转化携带海带 *lhcf6* 的 5'-侧

翼序列质粒与 pCAMBIA1304 空载体的莱茵衣藻细胞中均能检测出 GFP 的绿色荧光信号,证明了本研究所克隆得到的海带雌、雄配子体 *lhcf6* 的 5'-侧翼序列具有 CaMV 35S 所类似的能启动下游基因表达的功能。该结果与生物信息学分析的结果吻合,可初步推测海带 *lhcf6* 的 5'-2 个侧翼序列含有核心启动子的基本结构,并具有启动子功能。但与转空载体的阳性结果相比较,携带海带 *lhcf6* 的 5'-侧翼序列质粒的荧光信号相对较弱,说明海带雌、雄配子体 *lhcf6* 的启动子活性比 CaMV 35S 的弱。



A1 ~ A4. 转入质粒 pCambia1304-*Flhcf6*; B1 ~ B4. 转入质粒 pCambia1304-*Mlhcf6*; C1 ~ C4. 转入 pCambia1304 空载;
1. 485 nm 激发光下检测 GFP 的绿色荧光信号图; 2. 650 nm 激发光下检测细胞内叶绿体自发红光荧光信号图; 3. 整合图; 4. 明场图。
A1 ~ A4. pCambia1304-*Flhcf6*; B1 ~ B4. pCambia1304-*Mlhcf6*; C1 ~ C4. pCambia1304;
1. Under 485 nm excitation light; 2. Under 650 nm excitation light; 3. Merged; 4. Bright.

图 3 GFP 在莱茵衣藻细胞中的表达

Fig. 3 Transient expression of plasmid in *C. reinhardtii*

3 结论与讨论

3.1 *lhcf6* 的 5'-侧翼片段序列的生物信息学分析

启动子核心区预测结果表明, 海带雌、雄配子体 *lhcf6* 的 5'-侧翼序列均含有 TATA 框, 分别位于转录起始位点上游 22, 25 bp 处; 其中雌配子体的为典型的 TATAAAT 序列, 而雄配子体的则为 TAAATAT 序列。表明海带雌、雄配子体 *lhcf6* 具有不同的 5'-侧翼序列和启动子核心区序列, 这可能影响到该基因在雌、雄配子体中的差异表达。然而, TATA-box 在 LHC 基因中并不常见。有报道糖海带—*lhcf* 的 5'-侧翼序列中含有 TATA 盒^[18], 但三角褐指藻所有 FCP 基因的启动子序列均没有明显的 TATA 盒^[19]。

在这 2 个上游调控区中都有一些与光感应有关的元件, 例如雄配子体 *lhcf6* 的 GT1-element 在光诱导基因表达中起到重要作用, 并且广泛存在于很多植物的受光调控的基因启动子区域^[20]; 雌配子体的 AT-rich motif 是与光调控基因表达有关的元件, 在豌豆 (*Pisum sativum*) 和烟草 (*Nicotiana tabacum*) 的 LHC 基因上都有报道^[20], 但是这个元件具体是介导光抑制基因表达还是增强基因表达还有待进一步研究。除光响应元件以外, 海带雌、雄配子体 *lhcf6* 的 5'-侧翼序列中还含有一些共有的具有特殊功能的调控元件。位于 5'-UTR 区域的 MYB 结合位点的功

能是结合时钟蛋白, 从而使藻体内的生物钟对光捕获蛋白基因进行节律性调控^[21]; 雌、雄配子体中的 CCAAT 元件, 特征序列是 CCAAT 并且上游一般都紧连着 ACT, 该调控元件同样出现在很多高等植物的 LHC 基因中, 并且很保守, 具体功能是参与对蓝光的响应^[20]。

结果还表明, 只在海带雄配子体中含有“Circadian”、热胁迫相关的元件 HSE 元件和厌氧条件感应元件 ARE。“Circadian”是一个典型的节律性调控相关元件, 可能在生物钟对 *lhcf6* 调控中起着主要的作用。但是, 高等植物 LHC 基因相对保守的节律性调控相关元件“CAANNNNATC”在海带中却未有发现^[22]。这些特有元件是否与海带雌配子体对环境的要求更为苛刻有关, 还有待进一步的研究。

另外, 在雌、雄配子体 *lhcf6* 的 5'-侧翼序列中还有一些与激素有关的元件, 主要是赤霉素、茉莉酸甲酯和水杨酸, 这些激素调控元件可能与海带配子 *lhcf6* 表达受到发育阶段的调控有一定关系。但是, *lhcf* 如何受这些激素调控, 在配子体生长发育的阶段, 是否存在某种激素调控该基因的表达等问题, 都有待进一步的研究。

3.2 海带雌、雄配子体 *lhcf6* 启动子核心区相似性分析

海带雌、雄配子体 *lhcf6* 具有不同的 5'-侧翼序列, 转莱茵衣藻的试验结果也表明它们具有不同的

启动子序列,这符合 *lhcf* 家族基因启动子具有丰富的多态性这一特征。已知的 4 个三角褐指藻 (*Phaeodactylum tricornutum*) *fcp* 的 5'-侧翼序列,它们之间具有很小的相似性^[23]。拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 的 *lchb1* 的启动子还具有组织特异性^[24]。然而,关于 *lhcf* 侧翼调控区在配子体雌、雄之间存在差异这一现象却是首次报道。这种差异使我们对海带 *lhcf6* 在雌、雄配子体差异表达的分子基础有了进一步的认知。

本研究根据海带配子体 *LHCF6* 基因的 cDNA 全长序列,利用基因组步移技术克隆得到其在雌、雄配子体中的 5'-侧翼序列,通过网络服务器 PlantCARE 和 Softberry 启动子元件预测结果表明,二者均含有核心启动子元件 TATA 框,还含有光反应相关元件 MNF1 和 GAG-motif,节律性相关元件 MBS 等环境相关调控元件。之后将其与 GFP 报告基因融合构建植物表达载体 pCAMBIA1304-*Flhcf6* 和 pCAMBIA1304-*Mlhcf6*,通过电击转化法分别转化莱茵衣藻。激光共聚焦荧光显微镜下检测,结果显示,含 pCAMBIA1304-*Flhcf6* 和 pCAMBIA1304-*Mlhcf6* 的转基因藻体中 GFP 基因均有表达,证明克隆得到的海带雌、雄配子体 *LHCF6* 基因的 5'-侧翼序列含有启动子片段,具有启动下游基因转录的活性,为将来研究该基因启动子不同元件的功能提供技术保障。

参考文献:

- [1] Katoh T, Mimuro M, Takaichi S. Light-harvesting particles isolated from a brown alga, *Dictyota dichotoma*. A supra-molecular assembly of fucoxanthin-chlorophyll-protein complexes [J]. Biochimica et Biophysica Acta, 1989, 976 (2-3): 233-240.
- [2] Durnford G D, Price J A, Mckim S I M. Light-harvesting complex gene expression is controlled by both transcriptional and post-transcriptional mechanisms during photo-acclimation in *Chlamydomonas reinhardtii* [J]. Physiologia Plantarum, 2003, 118 (2): 193-205.
- [3] Eppard M, Krumbein W E, von Haeseler A, et al. Characterization of *fcp4* and *fcp12*, two additional genes encoding light harvesting proteins of *Cyclotella cryptica* (Bacillariophyceae) and phylogenetic analysis of this complex gene family [J]. Plant Biology, 2000, 2 (3): 283-289.
- [4] Dolganov N A M, Bhaya D, Grossman A R. Cyanobacterial protein with similarity to the chlorophyll *a/b* binding proteins of higher plants: evolution and regulation [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1995, 92 (2): 636-640.
- [5] Green B R, Kühlbrandt W. Sequence conservation of light-harvesting and stress-response proteins in relation to the three-dimensional molecular structure of LHC [J]. Photosynthesis Research, 1995, 44 (1-2): 139-148.
- [6] De Martino A, Douady D, Quinet-Szely M, et al. The light-harvesting antenna of brown algae: Highly homologous proteins encoded by a multigene family [J]. European Journal of Biochemistry, 2000, 267 (17): 5540-5549.
- [7] 毕燕会, 周志刚. 海带配子体叶绿素 *a/c* 结合蛋白基因 *lhcf6* 的序列特征与系统发生分析 [J]. 高技术通讯, 2008 (1): 84-90.
- [8] 邹丹燕, 毕燕会, 周志刚. 光对海带雌、雄配子体 *lhcf5* 和 *lhcf6* 基因相对转录量的影响 [J]. 中国水产科学, 2009, 16 (6): 850-858.
- [9] Hwang S, Herrin D L. Control of *lhc* gene transcription by the circadian clock in *Chlamydomonas reinhardtii* [J]. Plant Molecular Biology, 1994, 26 (2): 557-569.
- [10] Jacobshagen S, Kindle K L, Johnson C H. Transcription of *CABII* is regulated by the biological clock in *Chlamydomonas reinhardtii* [J]. Plant Molecular Biology, 1996, 31 (6): 1173-1184.
- [11] Apt K E, Clendennen S K, Powers D A, et al. The gene family encoding the fucoxanthin chlorophyll proteins from the brown alga *Macrocystis pyrifera* [J]. Molecular and General Genetics, 1995, 246 (4): 455-464.
- [12] Oeltjen A, Krumbein W E, Rhiel E. Investigations on transcript sizes, steady state mRNA concentrations and diurnal expression of genes encoding fucoxanthin chlorophyll *a/c* light harvesting polypeptides in the centric diatom *Cyclotella cryptica* [J]. Plant Biology, 2002, 4 (2): 250-257.
- [13] 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.
- [14] Starr R C, Zeikus J A. UTEX-the culture collection of algae at the University of Texas at Austin-1993 list of cultures [J]. Journal of Phycology, 1993, 29 (Suppl): 1-106.
- [15] Shimogawara K, Fujiwara S, Grossman A, et al. High-efficiency transformation of *Chlamydomonas reinhardtii* by electroporation [J]. Genetics, 1998, 148 (4): 1821-1828.
- [16] Lescot M, Déhais P, Thijs G, et al. PlantCARE, a database of plant cis-acting regulatory elements and a portal to tools for in silico analysis of promoter sequences [J]. Nucleic Acids Research, 2002, 30 (1): 325-327.
- [17] Thompson J D, Higgins D G, Gibson T J. CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice [J]. Nucleic Acids Research, 1994, 22 (22): 4673-4680.
- [18] Caron L, Douady D, Quinet-Szely M, et al. Gene structure of a chlorophyll *a/c*-binding protein from a brown alga: Presence of an intron and phylogenetic implications [J]. Journal of Molecular Evolution, 1996, 43 (3): 270-280.
- [19] Bhaya D, Grossman A R. Characterization of gene clusters encoding the fucoxanthin chlorophyll proteins of the diatom *Phaeodactylum tricornutum* [J]. Nucleic Acids Research, 1993, 21 (19): 4458-4466.
- [20] Tyagi A K, Gaur T. Light regulation of nuclear photosynthetic genes in higher plants [J]. Critical Reviews in Plant Sciences, 2003, 22 (5): 417-452.
- [21] Carre I A, Kay S A. Multiple DNA-protein complexes at a circadian-regulated promoter element [J]. Plant Cell, 1995, 7 (12): 2039-2051.
- [22] Piechulla B, Merforth N, Rudolph B. Identification of tomato *Lhc* promoter regions necessary for circadian expression [J]. Plant Molecular Biology, 1998, 38 (4): 655-662.
- [23] 杨淳淋, 崔继哲. 植物细胞外源蛋白亚细胞定位的机制及其应用 [J]. 现代生物医学进展, 2009, 9 (8): 1567-1569.
- [24] Ha S B, An G. Identification of upstream regulatory elements involved in the developmental expression of the *Arabidopsis thaliana* *cab1* gene [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1988, 85 (21): 8017-8021.