

海带 *CRY-DASH* 基因的克隆与转录表达分析

李璐^{1,2,3,4}, 张朋艳^{1,2,3,4}, 姚建亭^{1,2,3}, 段德麟^{1,2,3}

(1. 中国科学院海洋研究所, 山东 青岛 266071; 2. 中国科学院实验海洋生物学重点实验室, 山东 青岛 266071; 3. 青岛海洋科学与技术试点国家实验室实验海洋生物学与生物技术实验室, 山东 青岛 266071; 4. 中国科学院大学, 北京 100049)

摘要: 利用 cDNA 末端快速克隆(RACE)技术, 获得海带(*Saccharina japonica*) *CRY-DASH* 基因(*SjCRY-DASH*)全长序列, 结构分析发现, 其 ORF 区长 1779 bp, 编码 592 个氨基酸。进行氨基酸同源序列比对, 其与其他藻类和高等植物间存在两个重要辅基 MTHF 和 FAD 结合的保守域。通过不同光质照射诱导海带幼孢子体, 发现蓝光、白光诱导 1 h 后, 均能使 *SjCRY-DASH* 转录水平上升, 且 *SjCRY-DASH* 对蓝光的响应更强烈。本研究结果为研究大型褐藻-海带 *CRY-DASH* 受光诱导调控功能打下基础。

关键词: 蓝光; 海带(*Saccharina japonica*); *CRY-DASH* 基因; 孢子体

中图分类号: S917.3 文献标识码: A 文章编号: 1000-3096(2019)04-0001-07

DOI: 10.11759/hyxx20170222003

蓝光(350~500 nm)易穿透海水^[1], 其对生活在潮下带的褐黄藻类有更明显的诱导效应。海带(*Saccharina japonica*)是生活在潮下带弱光环境中的大型褐藻, 蓝光为其吸收的主要光谱。以往研究报道, 蓝光能调控和诱导海带的生长及繁殖^[2-3], 但其调控的分子机制鲜有报道。

隐花色素/光裂解酶家族(cryptochrome/photolyase family, CPF)是一类广泛存在的能被蓝光诱导激活的蛋白家族。光裂解酶能修复由紫外线引起的 DNA 损伤, 其催化主要依赖于 350~500 nm 的蓝光诱导^[4-5]。隐花色素是与光裂解酶同源的蓝光受体, 尽管与光裂解酶结构相似, 但其丧失了修复损伤 DNA 的能力, 而在调控生物钟^[6]、引发植物光形态建成^[7]等方面有重要作用。

CRY-DASH(Cryptochrome-*Drosophila*, *Arabidopsis*, *Synechocystis*, Human)是 CPF 家族的新成员。目前, 人们已经明确 *CRY-DASH* 具有修复损伤 DNA 中环嘧啶酮二聚体(cyclobutane pyrimidine dimer, CPD)的功能。拟南芥中属于 *CRY-DASH* 家族的 *CRY3* 晶体结构已被解析, 晶体结构和生化分析均表明 *CRY-DASH* 能修复 ssDNA 和 dsDNA 环形结构中的 CPD^[8-9]。真菌(*Phycomyces blakesleeanus*)中已证明 *CRY-DASH* 修复 ssDNA 和 dsDNA 中的 CPD 效率一致^[10]。

尽管在高等植物中人们对 *CRY-DASH* 光修复功能有所了解, 但还缺乏证实其具有调控功能的直接

证据。Brudler 和 Kleine 等通过生化方法证实这类蛋白可与未损伤的 DNA 结合, 由于在体外均未发现 *CRY-DASH* 的光裂解酶活性, 其认为 *CRY-DASH* 与 DNA 的结合是与信号转导有关^[11-12]。

本研究针对海带中 *CRY-DASH* 基因进行了克隆与分析, 通过对获得的序列与其它藻类等的系统比较分析, 并探究不同光质诱导下 *CRY-DASH* 的响应, 为解析 *CRY-DASH* 是否具备光受体功能, 探讨其是否受蓝光介导对海带孢子体早期发育起作用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料处理

海带孢子体采自山东高绿水产有限公司俚岛海域的海带养殖筏架上, 选择海带“中科 2 号”幼孢子体(长 15~25 cm)数棵。采集后的幼孢子体运回实验室, 用灭菌冷却海水冲洗几次除去附生杂藻, 置于

收稿日期: 2017-02-22; 修回日期: 2017-08-06

基金项目: 国家海洋公益性行业科研专项(201405040); 青岛海洋科学与技术国家实验室计划项目(2015ASKJ02)

[Foundation: Ocean Public Welfare Scientific Research Project, No.201405040; Qingdao National Laboratory for Marine Science and Technology, No.2015ASKJ02]

作者简介: 李璐(1990-), 女, 山东青岛人, 硕士研究生, 主要从事海洋生物学研究, 电话, 0532-82898556, E-mail: lilu14@mails.ucas.ac.cn; 段德麟, 通信作者, 研究员, 电话, 0532-82898556, E-mail: dlduan@qdio.ac.cn

10℃黑暗条件下过夜预培养。将海带幼孢子体于黑暗条件下培养 60 h 后,再分别置于蓝光[25 μmol/(m²·s)]、白光[70 μmol/(m²·s)]和红光[40 μmol/(m²·s)]条件下照射 60 min。在照射前、照射 10 min、30 min 和 60 min 时分别取 3 棵海带,锡箔纸包好后置于液氮内速冻,用于后续 RNA 的提取。

1.2 实验方法

1.2.1 cDNA 合成

采用 OMEGA 公司的 RNA 提取试剂盒(Plant RNA Kit),按照有关说明,进行海带总 RNA 的提取。分光光度计(Denovix DS-11)检测 RNA 质量,将高纯度的 RNA(OD_{260/280}=1.8~2.2)用于后续 cDNA 的合成。用于实时定量 PCR 实验的 cDNA 合成使用 TaKaRa 公司 cDNA 合成试剂盒(PrimeScript™ II 1st strand cDNA synthesis kit),用于 5'-cDNA 末端快速克隆(5'-RACE)和 3'-cDNA 末端快速克隆(3'-RACE)实验的 cDNA 合成分别按照相应试剂盒说明书的要求

进行。其中,5'-RACE 试剂盒(SMARTer RACE cDNA Amplification Kit)购自 Clontech 公司,3'-RACE 试剂盒(3'-Full RACE Core Set Ver. 2.0)购自 TaKaRa 公司。

1.2.2 海带 CRY-DASH 基因(*SjCRY-DASH*)扩增

根据本研究组已注册海带受蓝光诱导的转录组信息(注册号 GSE33853)^[13],选取候选目的序列进行同源性比对。为进一步获得 *SjCRY-DASH* 序列全长,用 Primer Premier 5 软件设计 5'-RACE 和 3'-RACE 特异引物(表 1)。根据 RACE 扩增反应体系的要求,分别扩增得到 5'末端和 3'末端,将两段有重叠部分的序列拼接在一起。根据拼接的序列信息,用高保真 DNA 聚合酶扩增 *SjCRY-DASH* 的开放阅读框(open reading frame, ORF),引物使用 CRY-DASH-F 和 CRY-DASH-R(表 1)。将所获目标片段进行胶回收,然后连接于 pMD19-T 载体(TaKaRa 公司),经过转化到感受态细胞 DH5α,通过引物和 PCR 检测分析,获得的阳性克隆送至上海生物工程有限公司测序。

表 1 海带 CRY-DASH 基因扩增及定量 PCR 分析所用引物

Tab. 1 Primers applied for *SjCRY-DASH* amplification and real-time PCR analysis

引物名称	序列(5'-3')	描述
CRY-DASH-5O	CCCCAAGTGGAATATGGAGTTGCCATTC	5'RACE
CRY-DASH-5I	CCCGCCGTCTCGCCCCCTTGAA	5'RACE
CRY-DASH-3O	CAAGGAGGTCTGGGGCAATG	3'RACE
CRY-DASH-3I	CTGCCTTCCGACTTGCCGTT	3'RACE
CRY-DASH-F	CATATGATGGCGAGCTTTTCATCTGA	ORF 扩增
CRY-DASH-R	GAATTCCTAGGAAAAGTCCGAAACG	ORF 扩增
qCRY-DASH-F	AATGGAGGTCGGGAAGTAC	扩增 <i>SjCRY-DASH</i> 的定量 PCR 引物
qCRY-DASH-R	CCCCCAAGTGGAATATGG	扩增 <i>SjCRY-DASH</i> 的定量 PCR 引物
Actin-F	GACGGGTAAGGAAGAACGG	扩增 <i>β-actin</i> 的定量 PCR 引物
Actin-R	GGGACAACCAAAACAAGGGCAGGAT	扩增 <i>β-actin</i> 的定量 PCR 引物

1.2.3 序列分析

使用 ORF finder 软件预测所获 cDNA 序列的 ORF,并将 ORF 序列翻译为氨基酸序列。氨基酸序列的分子量与等电点预测利用 ProtParam^[14] 软件完成。使用 DNAMAN 6.0 软件将 *SjCRY-DASH* 分别与已知的 5 种藻类和高等植物 CRY-DASH 氨基酸序列进行多序列比对,预测 *SjCRY-DASH* 功能。为比较与其他物种中 CPF 家族成员的进化关系,从 GenBank 数据库中获得不同物种的 21 个 CPF 家族成员的氨基酸序列,利用 MEGA 6.0^[15] 软件将其与 *SjCRY-DASH* 序列进行比对,选用邻接法(NJ)设置重复 1000 次,构建 *SjCRY-DASH* 及相关的系统发育树。

使用 SWISS-MODEL 软件,以拟南芥中已解析的 CRY-DASH 晶体结构为参照,预测海带中 CRY-DASH 三维结构。

1.2.4 实时定量 PCR 分析

为探究 *SjCRY-DASH* 对不同光质诱导的响应,利用实时定量 PCR 方法,分析了其在不同光质诱导下的转录情况。目的基因扩增使用特异性引物 qCRY-DASH-F 和 qCRY-DASH-R(表 1),内参基因选用 *β-actin*。扩增酶使用 TaKaRa 公司的 SYBR Premix Ex Taq II,扩增程序如下:95℃预变性 30 s;95℃变性 5 s,60℃退火延伸 30 s,40 个循环。用 2^{-ΔΔCt} 法^[16] 计算目的基因的相对表达量。

2 实验结果

2.1 *SjCRY-DASH* 基因克隆

基于转录组数据中注释为隐花色素/光裂解酶的 unigene, 以海带幼孢子体提取 RNA 反转成的 cDNA

为模版, 从低丰度转录本中快速扩增 cDNA 的 3'和 5'末端, 最后从两个有相互重叠序列的 3'和 5'-RACE 产物中获得全长 cDNA。根据 Blastx 比对, 得到 *SjCRY-DASH* cDNA 全长。用高保真酶扩增 ORF 区进行进一步验证, 凝胶电泳检测显示清晰条带(图 1)。

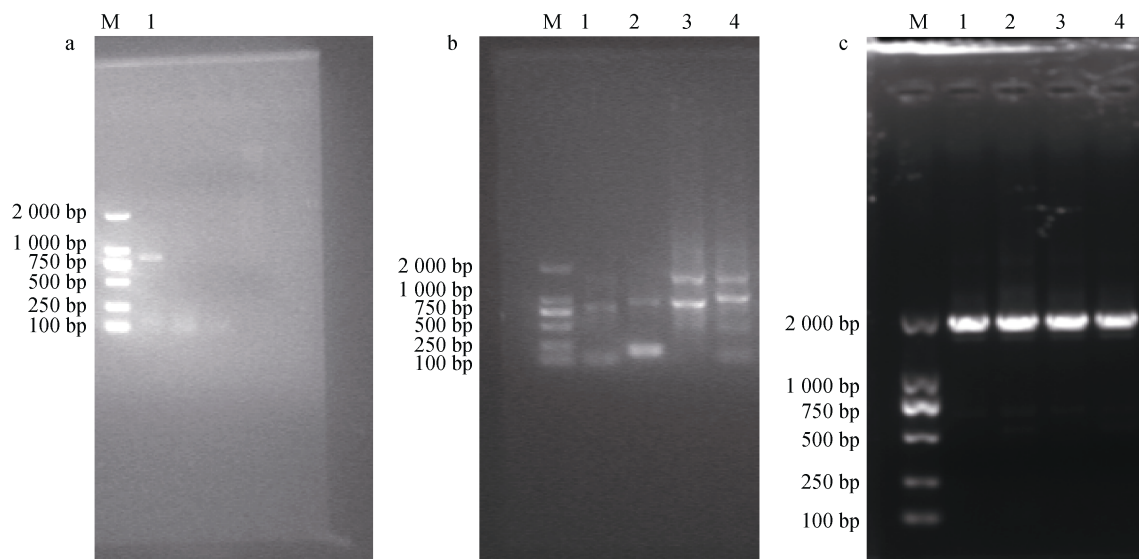


图 1 PCR 扩增产物电泳检测

Fig. 1 Electrophoresis of PCR products

a: 3'-RACE 扩增结果, 1 是扩增得到的 3'末端; b: 5'-RACE 扩增结果, 1—4 分别是用不同的引物组合扩增得到的 5'末端; c: ORF 扩增结果

2.2 序列分析

通过序列拼接获得 *SjCRY-DASH* 的 cDNA 序列, 其中 ORF 长 1779 bp, 编码 592 个氨基酸, 5'-非翻译区(5'-UTR)和 3'-非翻译区(3'-UTR)分别长 122 bp 和 459 bp。经预测, 其编码的氨基酸序列分子量约为 63.8 u, 等电点为 9.30。将该蛋白序列与其他藻类及高等植物的 CRY-DASH 进行 BLAST 比对, 其与三角褐脂藻 (*Phaeodactylum tricornutum*)、颤藻 (*Oscillatoriales cyanobacterium*)、聚球藻 (*Synechococcus* sp.)、长囊水云 (*Ectocarpus siliculosus*) 和拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 的同源性达到 37%~68%。尽管 CRY-DASH 蛋白序列在不同物种中的同源性不高, 但其结构相似度很高。海带中与捕光因子 MTHF 作用的氨基酸残基和其他物种中基本一致, 包括 Glu-144, Glu-145, Phe-374, Glu-448, Tyr-454(图 2)。海带中与 FAD 作用的残基同其他物种亦具有很强的保守性, 这些残基分别是 Trp-389、Trp-441 和 Trp-464(图 2)。

对 *SjCRY-DASH* 和其他物种的隐花色素/光裂解

酶成员进行系统进化分析(图 3), 结果显示, 所获序列归于 CRY-DASH 家族, 但其与脊椎动物 CRY-DASH 的亲缘性比光合作用生物的亲缘性更近。

三维结构预测表明, *SjCRY-DASH* 与已解析的拟南芥 CRY-DASH 晶体结构^[17]极为相似, N 末端均为 α/β domain, C 末端均为 α domain(图 4)。

2.3 光质对 *SjCRY-DASH* 转录的影响

利用不同光质(蓝光、白光和红光)诱导海带幼孢子体, 发现 *SjCRY-DASH* 在蓝光和白光诱导 1 h 内表达水平明显升高。*SjCRY-DASH* 对于蓝光诱导有很强的响应, 在 10, 30 和 60 min 时表达水平分别是起始的 3.68 倍, 5.89 倍和 6.10 倍。白光诱导 10, 30 和 60 min 时, 转录水平分别增加至起始的 1.58 倍, 2.12 倍和 6.54 倍。尽管二者在 60 min 时转录水平相近, 但 10 min 和 30 min 时蓝光诱导下转录本上升更显著, 这说明 *SjCRY-DASH* 对蓝光的响应更为明显。而红光诱导不同时间下的转录水平基本一致, 表明其对 *SjCRY-DASH* 诱导无明显作用(图 5)。

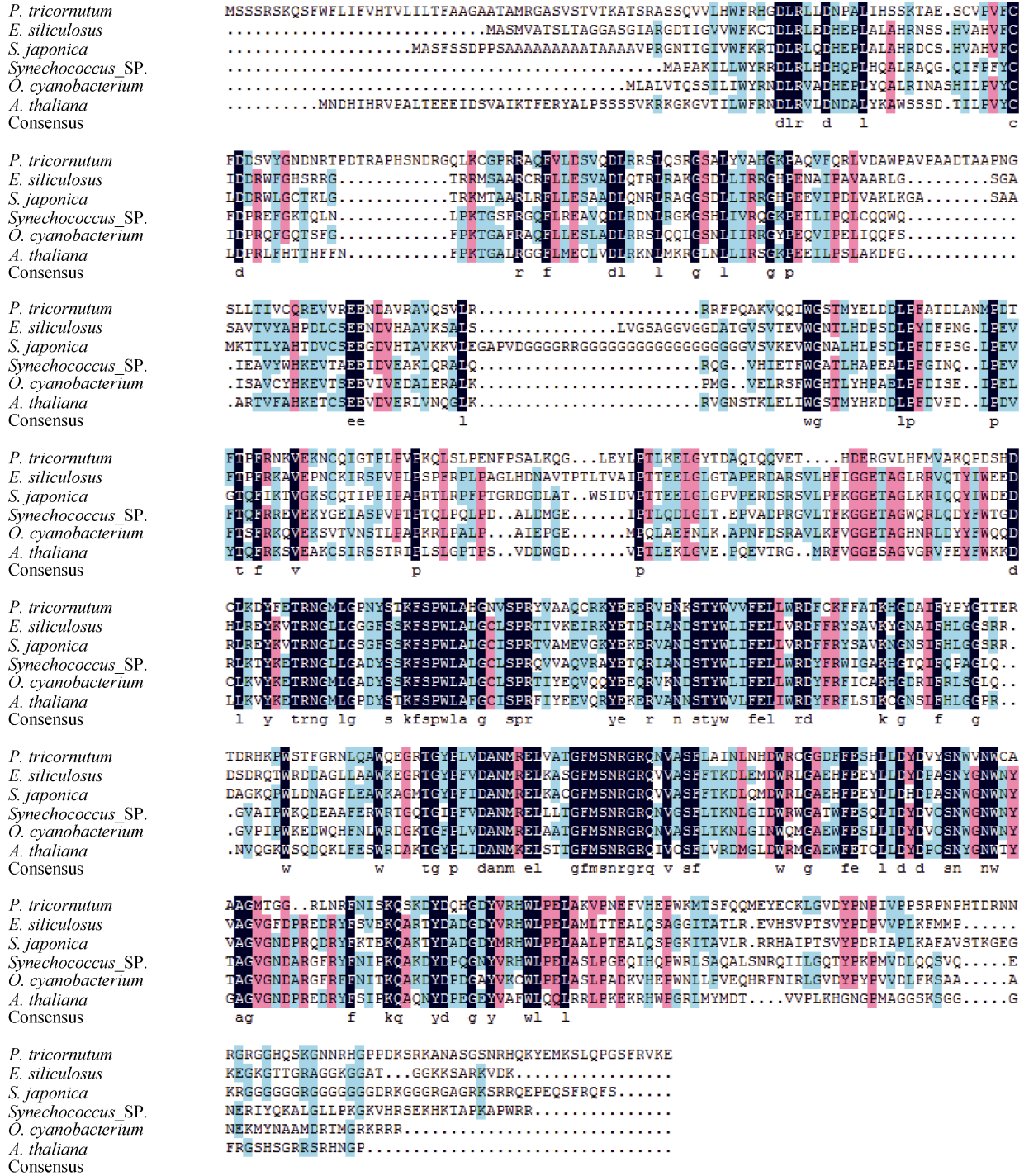


图2 SjCRY-DASH 多序列比对

Fig. 2 Multiple alignment of SjCRY-DASH with other CRY-DASH sequences

▲ 与 MTHF 作用的残基; ◆ 与 FAD 作用的残基

3 讨论

光质对于海带生长和繁殖的影响已有报道, 低温和蓝光均能促进海带配子体排卵^[2]。Lüning^[18]发现糖海带受精过程需要蓝光, 且蓝光含量要大于 17%。

Shi 等^[19]也认为海带雌、雄配子的结合依赖于一定光照强度的蓝光, 且随着蓝光强度的增加而增强。这说明蓝光对于海带的生殖意义重大。蓝光也影响海带的生长。Wang 等^[20]发现, 蓝光能促进海带的形态建成和光合作用, 从而促进海带孢子体的早期发

育。在蓝光下海带生长 8 周，其细胞数目和细胞层数明显多于红光下培养的孢子体。隋等^[21]探究了不同

光质对海带配子体生长、发育的影响，发现蓝光对生长、发育的促进作用最大。

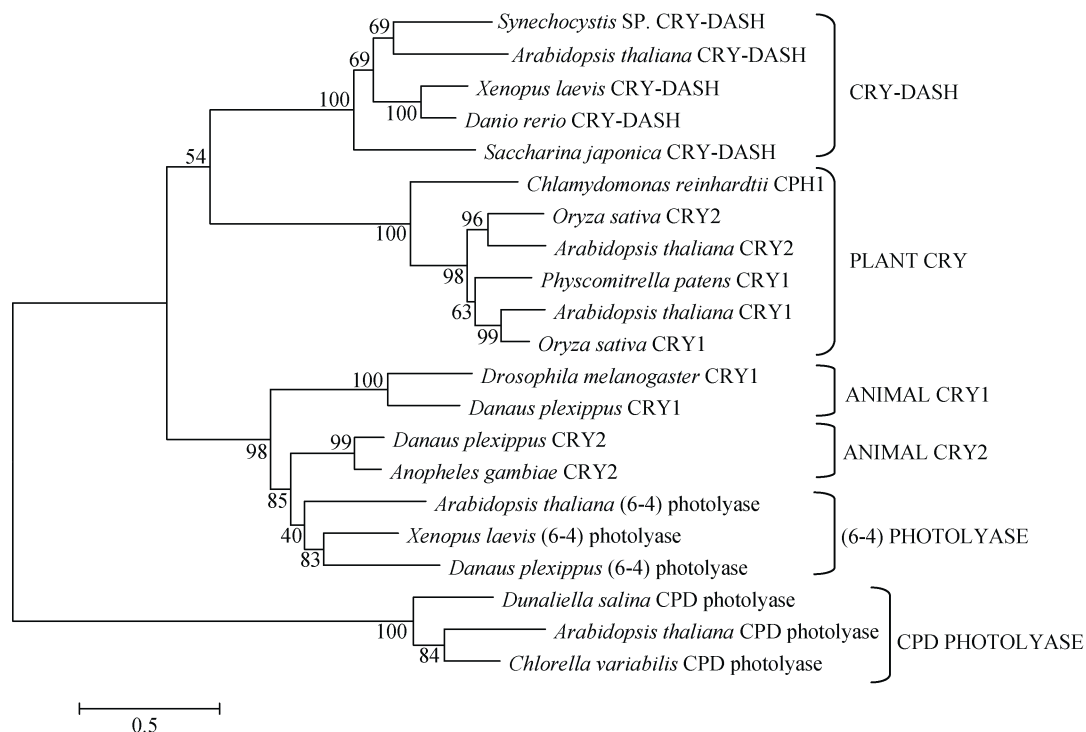


图 3 基于 CRY-DASH 氨基酸序列的系统进化分析

Fig. 3 Phylogenetic analysis of the amino acid sequence of CRY-DASH

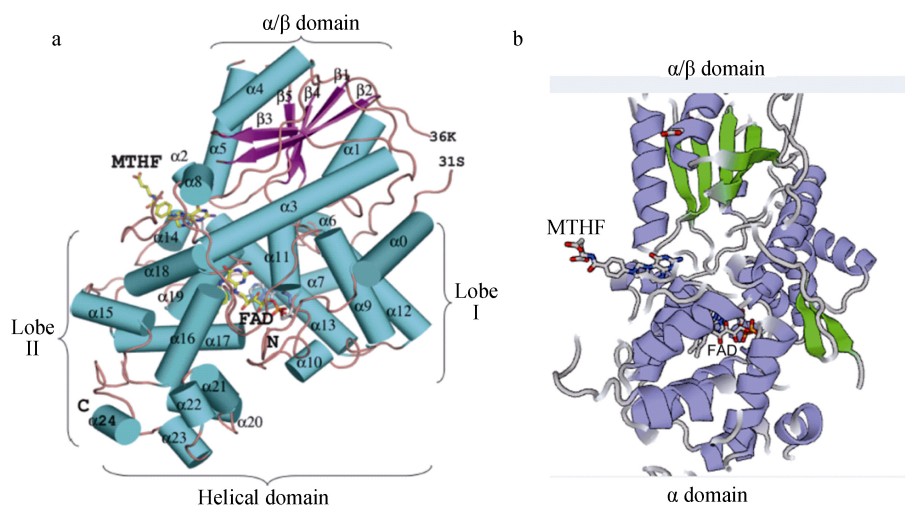


图 4 海带 CRY-DASH 三维结构预测

Fig. 4 Prediction of the spatial structure of CRY-DASH from *S. japonica*

a: 拟南芥 CRY-DASH 三维结构; b: *SjCRY-DASH* 三维结构预测

本研究通过比较不同光质对海带中 *SjCRY-DASH* 的影响，我们发现该基因的转录与蓝光密切相关。蓝光诱导下，*SjCRY-DASH* 在 1 h 内转录水平明显升高，这说明 *SjCRY-DASH* 属于能被蓝光诱导激活的基因

家族。白光诱导 1 h，*SjCRY-DASH* 转录水平亦升高，但升高趋势比蓝光诱导下的缓慢。由于白光中包含多种光质，因此白光影响要弱于蓝光。*SjCRY-DASH* 转录水平在红光处理下维持稳定，表明红光对 *SjCRY-*

DASH 无诱导效应。

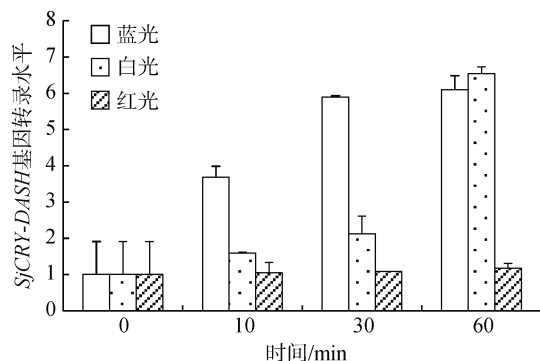


图 5 不同光质对 *SjCRY-DASH* 转录的影响

Fig. 5 Effects of blue, white, and red light on the transcription of *SjCRY-DASH*

CRY-DASH 是否具备信号转导功能尚待探索。Brudler 等^[11]最早认为 CRY-DASH 具有光受体调控功能,其通过对聚球藻的突变株进行分析,发现与野生型相比,一些基因的转录上升,由此得出 CRY-DASH 对转录起抑制作用。另外, Brunelle 等^[22]证实甲藻(*Karenia brevis*)在蓝光介导下可提前进入细胞分裂的 S 期,而红光则无明显作用,且构建的 EST 数据库中找到了蓝光受体中的唯一一位成员 CRY-DASH,据此推断其有可能参与细胞周期调控。

本研究从转录水平印证了海带中 CRY-DASH 在短时间内对蓝光有响应,这为探讨大型褐藻-海带中 CRY-DASH 受光诱导调控功能提供理论依据。

参考文献:

[1] Wolken J J. Photobehavior of marine invertebrates: extraocular photoreception[J]. *Comparative Biochemistry & Physiology Part C Comparative Pharmacology & Toxicology*, 1988, 91: 145-149.

[2] Lüning K, Dring M J. Reproduction induced by blue light in female gametophytes of *Laminaria saccharina*[J]. *Planta*, 1972, 104(3): 252-256.

[3] Lüning K, Dring M J. Reproduction, growth and photosynthesis of gametophytes of *Laminaria saccharina* grown in blue and red light[J]. *Marine Biology*, 1975, 29(3): 195-200.

[4] Sancar A. Structure and function of DNA photolyase and cryptochrome blue-light photoreceptors[J]. *Chemical Reviews*, 2003, 103: 2203-2237.

[5] Brettel K, Byrdin M. Reaction mechanisms of DNA photolyase[J]. *Current Opinion in Structural Biology*, 2010, 20: 693-701.

[6] Cashmore A R. Cryptochromes: Enabling plants and

animals to determine circadian time[J]. *Cell*, 2003, 114: 537-543.

[7] Cashmore A R, Jarillo J A, Wu Yingjie, et al. Cryptochromes: Blue light receptors for plants and animals[J]. *Science*, 1999, 284: 760-765.

[8] Selby C P, Sancar A. A cryptochrome/photolyase class of enzymes with single-stranded DNA-specific photolyase activity[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2006, 103: 17696-17700.

[9] Pokorny R, Klar T, Hennecke U, et al. Recognition and repair of UV lesions in loop structures of duplex DNA by DASH-type cryptochrome[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2008, 105: 21023-21027.

[10] Tagua V G, Pausch M, Eckel M, et al. Fungal cryptochrome with DNA repair activity reveals an early stage in cryptochrome evolution[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2015, 112: 1-6.

[11] Brudler R, Hitomi K, Daiyasu H, et al. Identification of a new cryptochrome class: Structure, function, and evolution[J]. *Molecular Cell*, 2003, 11: 59-67.

[12] Kleine T, Lockhart P, Batschauer A. An arabidopsis protein closely related to synechocystis cryptochrome is targeted to organelles[J]. *The Plant Journal*, 2003, 35: 93-103.

[13] Deng Yunyan, Yao Jianting, Wang Xiuliang, et al. Transcriptome sequencing and comparative analysis of *Saccharina japonica* (Laminariales, Phaeophyceae) under blue light induction[J]. *Plos One*, 2012, 7(6): e39704.

[14] Gasteiger E, Hoogland C, Gattiker A, et al. Protein identification and analysis tools on the Expasy Server [C]//Walker J. *The Proteomics Protocols Handbook*. Totowa, NJ: Humana Press, 2005: 571-607.

[15] Tamura K, Dudley J, Nei M, et al. MEGA4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2007, 24: 1596-1599.

[16] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C(T)}$ method[J]. *Methods*, 2001, 25: 402-408.

[17] Huang Yihua, Baxter R, Smith B S, et al. Crystal structure of cryptochrome 3 from *Arabidopsis thaliana* and its implications for photolyase activity[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2006, 103: 17701-17706.

[18] Lüning K. Critical levels of light and temperature regulating the gametogenesis of three laminaria species (Phaeophyceae)[J]. *Journal of Phycology*, 1980, 16(1): 1-15.

[19] Shi Cuijuan, Kataoka H, Duan D L. Effects of blue light on gametophyte development of *Laminaria japonica* (Laminariales, Phaeophyta)[J]. *Chinese Journal*

- of Oceanology and Limnology, 2005, 23(3): 323-329.
- [20] Wang Wenjun, Sun Xiutao, Wang Feijiu. Effect of blue light on early sporophyte development of *Saccharina japonica* (Phaeophyta)[J]. Marine Biology, 2010, 157: 1811-1817.
- [21] 隋晓伟, 任伟, 闫文华, 等. 光质对海带配子体生长发育影响的研究[J]. 海洋科学, 2011, 35(4): 33-36.
Sui Xiaowei, Ren Wei, Yan Wenhua, et al. Effects of light qualities on growth and development of *Saccharina japonica* gametophytes[J]. Marine Sciences, 2011, 35(4): 33-36.
- [22] Brunelle S A, Hazard E S, Sotka E E, et al. Characterization of a dinoflagellate cryptochrome blue-light receptor with a possible role in circadian control of the cell cycle[J]. Journal of Phycology, 2007, 43: 509-518.

Cloning and transcriptional analysis of *CRY-DASH* from *Saccharina japonica* (Laminariales, Phaeophyceae)

LI Lu^{1, 2, 3, 4}, ZHANG Peng-yan^{1, 2, 3, 4}, YAO Jian-ting^{1, 2, 3}, DUAN De-lin^{1, 2, 3}

(1. Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China; 2. CAS Key Laboratory of Experimental Marine Biology, Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China; 3. Marine Biology and Biotechnology Laboratory, Pilot National Laboratory for Marine Science and Technology (Qingdao), Qingdao 266071, China; 4. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Received: Feb. 20, 2017

Key words: blue light; *Saccharina japonica*; CRY-DASH; sporophytes

Abstract: In the present work, we characterized the full-length cDNA of *CRY-DASH* from *Saccharina japonica* (designated as *SjCRY-DASH*) using the rapid amplification of cDNA ends technique. The open reading frame length of *SjCRY-DASH* was 1779 bp, and the gene encoded a protein of 592 amino acids. Using multiple alignments of protein sequences, conserved residues interacting with two crucial cofactors, MTHF and FAD, were detected between *SjCRY-DASH* and several DASH-type proteins of other algae and higher plants. Juvenile sporophytes were induced by light of different wavelengths. Both blue and white light upregulated the transcriptional level of *SjCRY-DASH* within 1 h, although the gene showed stronger responses to blue light than to white light. Our results lay a foundation for future studies on light induction and regulation by *CRY-DASH* of *S. japonica*.

(本文编辑: 张培新)