

从第九届国际光合作用大会看藻类 分子遗传学发展趋势*

秦 松

(中国科学院海洋研究所, 青岛 266071)

提要 根据1992年8月30日—9月4日在日本名古屋召开的第九届国际光合作用大会上交流的以藻类为材料的研究论文, 综述了分子遗传学方面的研究成果。认为这些成果体现了光合作用研究的最新进展, 蕴含着一定的应用前景; 表明藻类分子遗传学不仅是藻类学研究领域的带头学科, 而且已经活跃在光合作用等重大生物学问题研究的前沿; 反映了藻类分子遗传学向解决生物学重大问题和推动藻类资源开发方向发展的趋势。

关键词 藻类 光合作用 分子遗传学 基因工程

第九届国际光合作用大会于1992年8月30日—9月4日在日本名古屋召开。有1000多位专家、学者参加。这次会议反映的特点之一, 正如大会组委会主席 Murata 指出的那样, “自上届会议以来光合作用研究借助于分子生物学手段而得到突飞猛进的发展”。

藻类光合作用一直是光合作用研究的热点之一。在916篇摘要中, 180篇系研究藻类方面的, 其中59篇为分子遗传学研究。本文对会议上所交流的有关藻类分子遗传学方面的最新成果予以综述。

1 基因结构与功能研究日趋深入

1.1 天线色素系统 利用基因克隆、定序、定位诱变 (site-directed mutagenesis) 等分子遗传学方法, 研究藻类天线色素系统, 对其结构与功能有了较深入的了解。Bryant 等¹⁾ 研究了海洋蓝藻 *Synechococcus* PCC 7002 (*Agmenellum quadruplicatum*) 藻胆体的12条多肽, 分别由 *cpcA, B, C, D*; *apcA, B, C, D, E, F* 与 *pet H* 编码。插入突变研究发现, *apc D* 直接与光能在藻胆体→光系统 I (PSI) 以及 PSI, PSII 之间的传递有关, *apc F* 对于供给 PS II 足够的光能是不可缺少的。Hirano 等从嗜热蓝藻细长聚球藻 (*S. elongata*) 中克隆了藻蓝蛋白操纵子并进行了序列测定, 发现其由9个基因组成, 顺序为 5'-*cpcB—A—C—D—E—F—G1—G2—G4—3'*。 *cpc B, A* 编码发色团多肽, *C, D* 编码连接棒多肽, *G1, 2, 4* 编码棒—核连接多肽, 没有检测到 *cpc E, F* 的编码产物。Shen 等 (美国) 将蓝藻 *Synechocystis* PCC 6803 编码连接藻胆体与类囊体膜的天线蛋白的基

* 中国科学院院长基金特别支持项目。

收稿日期: 1993年1月3日, 接受日期: 1993年5月29日。

1) 本文所引文献均系 *Photosyn. Res.*, **34**(1):1—244 中的, 为此在每个被引用者之后不一一附加年代。

因 *apcE* 部分被红霉素抗性基因置换造成定位突变, 突变株藻蓝蛋白/叶绿素比率降低, 光自养速率降至 1/5—1/6。荧光发射光谱显示, 在 77K, 595nm 激发下别藻蓝蛋白-B 685nm 激发谱征消失, 但(别)藻蓝蛋白峰仍存在。

PCR (多聚酶链式反应) 技术已被用于光合作用研究中。作者等根据藻胆蛋白很可能来源于同一祖先基因这一推测, 根据 *Synechococcus* PCC 6301 别藻蓝蛋白基因序列资料设计引物, 扩增了 *S. PCC 7002* 及钝顶螺旋藻 (*Spirulina platensis*) 两种蓝藻的同源基因, 为光合分子结构和进化研究探索了新途径。蓝藻藻胆蛋白中必需氨基酸含量较高, 又具有高效表达机制, 其基因可用于农作物蛋白质性状的改良中, 具有广阔的应用前景。

1.2 光系统 I Golbeck 的报告指出, 近年来蓝藻、绿藻和高等植物光系统 I 组成研究取得进展的一个原因, 就是分子遗传学手段的应用。从会议交流的论文来看, 定位诱变技术已被广泛用于光系统 I 结构与功能研究, 使得有关细节愈来愈清楚。Kim 等将氯霉素乙酰转移酶基因 (CAT) 插入 *S. PCC psaB*, 并转化 *S. PCC 6803*, 造成霰弹突变 (cartridge mutagenesis), 许多抗氯霉素的突变株 PSI 功能缺陷。一些突变株不呈蓝绿色, 而呈蓝、绿、橄榄、黄、桔色。吸收光谱和低温荧光光谱显示, 叶绿素、类胡萝卜素和(或)藻蓝蛋白含量很低。Mehari 等将 *S. PCC 7002* Psa C 蛋白 Gly 37 突变为 Iys, 并在 *E. coli* 中表达, 在 Psa D 存在下; 组装入 P₇₀₀-F_x 核心后, ESR (电子自旋共振) 并未显示真核生物的谱征, 提示 PsaC 氨基酸差异并非是 F_A, F_B g 值的决定因素。Nyhus 等将新霉素抗性基因插入多变鱼腥藻 (*Anabaena variabilis*) ATCC 29413 *psaA, B* 中, 造成突变, 突变株由于叶绿素含量降低而显蓝色。电子传递实验表明, PSI 活性丧失而 PS II 保持活性; PsaC, D, E, F, L 蛋白消失。与叶绿素结合的 PsaA 减少, 提示插入发生在 *psaA* 下游。Warren 等进行了 PSI 的体内定位诱变, 造成 *S. PCC 6803* Psa B 的 Leu522, Leu532 (与 PsaA 和 PsaB 的链合有关) 以及 F_x 的配体 Cys 565 单氨基酸突变。突变株能在 5mol/L 葡萄糖培养基中、黑暗(光照 5min/d)/光激发异养生长条件下大量生长。除少数外, 能检测到 PSI 的组装。Leu 突变株类囊体及纯化复合物 ESR 谱显示野生型特征。低温 ESR 表明, Fe-S 中心 F_A, F_B 存在, 但室温下背景反应的动力学值改变。Mannan 等定位诱变 *A. 29413 psa C* 产生 PSI 缺陷株, 依赖果糖生长。PS I, PS II 某些电子反应水平不低, 但检测不到整条传递链的活性。尽管类囊体膜上没有 Psa C 及与其相连的 Fe-S 中心, 但 PS I 仍能稳定组装。突变株对光极敏感。Shen 等 (部分已列入本文 1.1) 将氯霉素抗性基因置换 *psaA, B* 操纵子, 使得 *S. PCC 6803* 突变株能在葡萄糖存在下生长在黑暗(光照 5min/d) 或连续弱光 [2μE/(cm²·s)] 中。Takahashi 等, 通过直接转化莱茵衣藻 (*Chlamydomonas reinhardtii*) 叶绿体从而将突变引入叶绿体基因组, 使两个 Fe-S 中心 F_A, F_B 之一失活, 突变株不能光自养生长, PSI 缺陷。

1.3 光系统 II 分子遗传学手段为光合分子结构与功能研究之间架设了桥梁, 使得光系统 II 研究呈现空前繁荣的局面。Diner 等定位诱变了 *S. PCC 6803* D₁ 蛋白基因, 产生了两类突变株。第一类, D₁-Asp 170 发生突变的 11 株藻放氧活性从接近野生型到完全丧失。Mn²⁺ 还原核心复合物 Z⁺ 的 K_m 值变化范围为从野生型的 1μm 增至 60μm。

这类突变影响到 Mn 中心组装的前期。第二类,发生在 D_1 -His 332, D_1 -Asp342, 还包括 D_1 -Ser345Pro, D_1 -Ala344 (缺失)突变株,表现出很低的 K_m 值,推测可能影响 Mn 中心组装后期。Salih 等研究发现, *S. 6803* 中 *psb A* 有 3 个拷贝,一个拷贝不表达,另两个之间同源性很高,表达效率也很高。他们研究了体外定位诱变造成的 D_1 降解及其与 Mn 中心结合特性的改变。Burnap 等研究了 *S. PCC 6803* PS II Mn 稳定蛋白 (MSP) 基因高度保守区的定位突变,包括二硫桥破坏突变株 (如 C 20 S) 以及 N-末端结合区突变株 (如 D 9 N) 的表型效应。尽管 mRNA 量正常,但 MSP 停止积累。热光谱 TL 表明, C 20 S 与 D 9 N 同 *psb O* 删除突变株一样,放 O_2 减少而 S_2 稳定性增加。D 9 K 对 MSP 积累无影响,但对 H_2O 分解酶性质略有影响; D 195 N 对 MSP 积累无影响,但 TL 和放 O_2 特性介于删除突变型与野生型之间。Boernre 等研究了 D_1 的 Asp-170 对 PSII Mn 中心组装及稳定性的影响。DN 170 D_1 , DE 170 D_1 是 *S. PCC 6803* D_1 定位诱变 (Asp-170 被 Asn, Glu 置换) 突变株。前者光自养生长停止,与 PS II 特异结合的 Mn 减少 60%, 类囊体膜上能被羟胺还原的 Mn 减少 80%。有证据表明, 残基 Mn 并不迅速还原 Z^+ 。后者能维持光自养生长,但 Mn 复合物功能紊乱。Shukla 等研究指出, *S. PCC 6803* 细胞色素 *b559* 定位失活导致类囊体膜上 D_2 减少,而 D_1 , CP 47, CP 43 及 Mn 稳定蛋白的量都积累到显著水平,这提示 *b559* 在 PSII 中作用非同一般。他们还发现, *b559* α 亚基的腔暴露的 C-末端结构域 (domain) 与 PSII 参与的水氧化过程有关。Arg 68 突变为 Leu 的突变株放氧速率降低,对光的敏感性增强,但 PSII 浓度与野生型无显著差别。Barber 研究了位于 *S. PCC 6803* 细胞色素 Cyt-*b6f* 复合物基因 (*pet A, C*) 上游的 *psbH*。单顺反子的 *psbH*, 双顺反子的 *pet CA* 转录,分别起始于与 *E. coli* S^{70} 启动子有某些相似性的区域。通过霰弹诱变获得了 *psbH* 缺陷突变株,快速原位互补实验表明, *Psb H* 蛋白对有活性的 PSII 组装并非绝对必需。因为突变株能光自养生长,但速率降低,分析表明可能主要由于 $Q_A \rightarrow Q_B$ 电子流传递减弱造成。一个芬兰、瑞典合作研究小组,利用定位诱变研究了 *S. PCC 6803* D_1 的需光降解 (light dependent degradation)。跨膜螺旋 4 和 5 之间环上的两个区域可能与之有关,称为有害序列 (PEST-like sequence), 推定切除区位于其 C-末端。在有害序列中设计了一个突变株,在切除区设计了两个突变株,均能光自养生长。后两株 D_1 的电泳速度比野生型 D_1 的快。荧光弛豫动力学 (fluorescent relaxation kinetics) 研究提示, 一个切除区突变株电子,从 Q_A 到 PQ 库传递速度明显减慢。Yu 等(美国)对 *S. PCC 6803* D_2 基因定位突变株研究结果表明, D_2 的反转加快,以致 5min 脉冲标记检测不到。突变导致大部分 D_1 不稳定 (半寿命 < 5 min), 这可能与新合成的 D_1/D_2 复合物需要与辅助因子 Mn 结合有关。在 D_1 加速降解的突变株中,用脉冲标记和 Western 杂交检测到一种寿命很短的 D_1 前体,此系首次在蓝藻中发现。

Synechocystis 与 *Synechococcus* 两属蓝藻已成为光合基因研究最常用的材料。Motoki 等克隆了 *S. elongata* MSP 蛋白基因 *psb O* 并测定了序列。其转译产物由 272 个氨基酸组成,包括 26 个氨基酸的信号肽和 246 个氨基酸的成熟 MSP。第 19 和第 44 位的两个 Cys 非常保守。与其它 MSP 不同之处在于,第 231 和 234 位为 His。成熟 MSP 与其它蓝藻同源率为 55%—63%,与高等植物之间为 45%—48%。

蓝藻由于具有类似于革兰氏阴性细菌的遗传结构,为分子遗传学研究带来方便。单细胞绿藻莱茵衣藻为单倍体,突变型很多,是分子遗传学研究的又一常用材料。Rochaix 报告了通过其叶绿素基因的定位、诱变、自身转化等技术,研究基因表达与功能。他们将报告基因与 *psb D* 的 5' 或 3' 非转译区构成嵌合基因,并转化 PSII 缺陷突变株,将转化子与原突变株杂交以获得该区功能,发现 *psb D* 5' 端 80 bp 前导序列是其 mRNA 降解的主要位点。同样方法分析两个核基因突变株,证明 *psb C* mRNA 前导序列区在转译开始时很可能受到核基因编码的反式作用因子的作用。Whitelegge 等将 *Chlamydomonas D₁* 第 170 位 Asp 突变为 His, Asn, Thr 或 Pro, 用 PDS100-He 型微粒枪将突变基因导入野生型叶绿体,共转化抗药性标记以供筛选。突变株 *D₁* 表型在一定范围内变化。荧光弛豫动力学分析表明, *D₁* 的 Asp 170 参与 Mn 中心的组装。Erickson 等将莱茵绿藻 *psb A* 缺失突变株 FUD 7 作为体外诱变的 *psb A* 的受体,并共转化一个选择标记。当外源质粒与 FUD 7 删除序列一侧有同源性时,通过单交换该质粒整合入叶绿体基因组,成为异质转化子;一些质粒能在叶绿体中复制但不整合。当外源质粒具有与 FUD7 删除区两端同源的序列时,双交换的结果是突变的 *D₁* 基因 (*psb A*) 插入,成为同质转化子。他们利用这个系统研究了 *D₁* 的定位诱变与放氧的关系,以及 *D₁* 基因内含子区的突变对叶绿体 RNA 剪接的影响。

Orsat 等在纤细裸藻 (*Euglena gracilis*) 叶绿体基因组中连接 Eco E 的 tRNA-Leu(CAA) 基因与 EcoI 的 tRNA-Leu (TAA) 基因的 DNA 片段中,定位了 3 个彼此分开的基因 *ccsA*, *psbD* 与 *psbC*。 *psbD* 长于 10kb, 编码区内有 9 个内含子(最长一个为 3658 bp), *ccsA* 位于 *psbD* 上游,编码一个与光合色素合成有关的蛋白。 *psbC* 长度 ≥ 6.5 kb, 至少有 8 个内含子。

Trebt 通过蓝藻、绿藻 *psb A* 定位诱变确定了 *D₁* 上的很多除草剂结合位点,为传统的除草剂在 *D₁* 三维折叠上的定位提供了依据。

1.4 与色素和脂合成有关的基因 Murata 实验室的 Malakhov 在进行 *S. PCC 6803 des A* 下游 6kb 片段测序后,发现了一个 *c*-型细胞色素基因,位于 *mur F* 与 *rpl I* 之间;推出的氨基酸序列与一些蓝藻、真核藻细胞色素 *c-553* 基因有 32% 的相似性;序列中部分与 *E. gracilis* 线粒体细胞色素 *c* 同源性很高。很可能是编码 105 个氨基酸(成熟蛋白为 74 个氨基酸)的 *cyt M* 基因,仅有一个拷贝。该基因部分被卡那霉素抗性基因置换的突变株能光自养生长。Hirschberg 报告的工作是从蓝藻、(真核)藻类和植物中克隆了八氢蕃茄红素(phytone)合成酶(PYS)基因 *pys*, 及其脱氢酶(PDS)基因 *pds*。筛选了一些抗 norflurazon 或 fluridone 的 *Synechococcus PCC 7942* 藻株,发现 PDS 置换点突变能导致对除草剂的抗性。对 PDS 修饰导致酶动力学值的改变,体内类胡萝卜素合成量减少,提示 PDS 为限速酶。*S. PCC 7942* 中 *pys* 与 *pds* 的过度表达造成细胞内类胡萝卜素含量的增加。Grim 等通过定位诱变确定了 GSA-AT(谷氨酸-1-半醛氨基转移酶)功能,是与吡哆醛形成 Schiff 碱。置换突变株 Met 250 Ile 对神经毒剂加巴枯林的耐受力提高 100 倍。*E. coli* 的 ALA(δ -氨基- γ -酮戊酸)缺陷(Hem A 蛋白基因突变)株被 *Synechocystis* 基因组的一个 4.4kb 片段弥救。该片段具有一个 48 KD 的编码产物(与 *E. coli* Hem A 相似)的基因。他们利用该片段在 *E. coli* 中的过

度表达,分析其将活化谷氨酸还原为 GSA 的能力。Fujita 等从固氮蓝藻鲍氏织线藻 (*Plectonema boryanum*) 中克隆了与 *frx C* 同源的基因及其下游的 ORF 467, 并进行了序列测定。*frxC* 是苔类叶绿体 DNA 中编码与固氮酶 Fe-蛋白同源蛋白的基因。将卡那霉素抗性基因插入 *frx C* 及 ORF 467 的功能区造成突变,突变株在光照下能够正常生长;但在黑暗中不能合成叶绿素,而积累一种叶绿素的前体 PChlide。这提示蓝藻 *frx C* 及 ORF 467 编码蛋白的功能为在不需光的条件下还原 PChlide。

Nikulina 等研究了莱茵绿藻不含叶绿素 *b* 及新叶黄素的突变株 *cbn-1* 的回复突变。在 N-甲基-N-硝基-N-亚硝基胍处理下,部分 *cbn-1* 回复突变。大部分回复突变株叶绿素 *b*、新叶黄素的含量同野生型无差别。遗传分析表明,色素重合成与核基因抑制子有关。以上研究使人们加深了对脂类与色素合成过程的了解。

1.5 碳利用 人们研究最多的是 1,5-二磷酸核酮糖羧化加氧酶 (Rubisco) 基因。此酶在叶绿体中的含量很高,效率很低。Andrews 报告的工作是将 *S. 6301* Rubisco 大亚基第 65 位的 Thr 突变为 Val, 导致羧化效率降至 1/100, CO₂/O₂ 系数降至 1/2.5, 其它副反应产物也发生改变。原因是 Thr 的羟基 O 正好与连接底物 C-1 上的磷酸两个 O 原子之一形成氢键,还与催化必需氨基酸 lys 334 的 ε-氨基 N 形成氢键以维持一定构型。Fujiwara 等从海洋附鞭藻 (*Pleurochrysis carterae*) 中分离了 *rbc L* 与 *rbc S*, 二者在质体 DNA 中相邻,其氨基酸序列与有色藻 (chromophytic algae)、红藻及化能自养细菌 *Alcaligenes eutrophus* 具同源性,而与蓝藻、绿藻和高等植物之间同源性较低。二者共转录,部分转录本在 *rbc L* 3' 端剪切。将细胞转入黑暗 6h, mRNA 量与连续光照下相同,提示 mRNA 能在黑暗中合成并(或)保持稳定。Weil 等研究了 *E. gracilis* 合成 Rubisco 小亚基 (SSU) 的 4.3kb mRNA, 它编码一个 150KD 的多聚肽前体(由一个大的 15KD 过渡蛋白、8 个相互之间通过十肽相连的成熟小亚基组成)。研究发现,SSU mRNA 的 26bp 前导序列并非由 *rbc S* 编码,而由另一个多基因家族的基因编码,并通过反式剪接机制接到 SSU 前 mRNA 上。SSU mRNA 的成熟还涉及一种共剪接机制以剪去 *rbc S* 的内含子。该藻许多胞质 mRNA 有类似的前导序列,推测其它核编码基因可能具有相同的剪接机制。

Ogawa 在报告中介绍了 *S. PCC 6803* 无机碳运输缺陷突变株 RKa 与 RKb, 原因是 *ndh B* 与 *ictA/ndh L* 基因分别有缺陷。RKb 不含 *ictA/ndh L* 产物 Ict A, 而野生型有。在突变株 M-55(*ndh B* 失活)、M-ndh C(*ndh C* 失活)与 M-ndh K(*ndh K* 失活)中几乎没有 Ict A, 而且几乎没有无机碳运输活性。加之 Ict A 是 NADH 脱氢酶的亚基之一,提示该酶是 PS I 激发无机碳运输的电子循环的组成部分。

Schwarz 等探讨了 CO₂ 的浓缩机制 (CCM)。Synechococcus 许多基因突变都产生高浓度 CO₂ 需求的表型。对 *rbc* 区突变进行酶谱分析表明,与低浓度 CO₂ 下生长有关的基因是成簇排列的。该表型可能由于许多 CCM 功能减弱造成,如羧化体的改变使 Rubisco 失活,暴露在高浓度 CO₂ 中又重新激活该酶,或 *ndh B* (编码 NAOH 脱氢酶亚基 II) 失活造成积累无机碳的能力降低。Fukuzawa 等,通过对 *S. PCC 7942* 高浓度 CO₂ 需求突变株 C3P-O 进行互补分析,定位了可能编码碳酸酐酶 (CAs) 的基因。其编码产物与叶绿体的 CAs 有同源性(豌豆 22%, 菠菜 22%),与 *E. coli* 同源性为 31%。

这提示蓝藻与植物叶绿体 CAs 可能由共同的原核祖先进化而来。

Omata 研究了 *S. PCC 7942* 的 42 KD 细胞膜蛋白(在碳限制生长条件下合成)基因 *cmp A*, 发现与 *nrt A* (编码蓝藻氮运输系统 4 基因簇 *nrt A—B—C—D* 的第一个基因)有同源性。在其下游测序发现 3 个新基因, 与 *nrt B, C, D* 同源性很高, 因此很可能也编码蓝藻透性酶。

1.6 其他 Murata 作了“适应低温的光利用的分子基础”的报告。从 *S. PCC 6803* 中克隆了脂肪酸脱饱和酶基因, 并进行了中裂突变 (disrupt)。转化子仅含单不饱和脂。通过比较突变株对温度的反应发现, 膜脂的不饱和使其对低温的敏感性降低, 而对高温的敏感性增强。

Sone 等为了探究呼吸作用的起源与进化, 从嗜热蓝藻 *Synechococcus vulcanus* 基因文库中定序了编码细胞色素 *c* 氧化酶亚基 CO1, CO2, CO3 基因, 排列顺序为 5'—CO2—CO1—CO3—3'。与 *Bacillus* 不同的是, 没有发现与 CO2 融合的细胞色素 *c* 的一半。未发现 CO2 下游的 ORF1 及 CO3 下游的 CO4。

据 Shigeoka 的研究, *E. gracilis* 叶绿体中至少有 60 个 II 型和 47 个 III 型内含子。III 型为退化的 II 型内含子, 平均长 101bp, 并最小程度地保留了 II 型的 5' 边界序列, 具有类似结构域 VI 的二级结构。一些内含子中还有内含子(称为 twintron), 已报道的有两类, II 型与 II/III 型。他们报道了 4 个 III 型 twintron (长度为典型 III 型内含子的两倍)。剪切时先切除外部 III 型内含子, 再切除内部 III 型内含子。twintron 形成的内含子插入机制, 可能是基因剪接的另一种机制。

Pancic 等研究了硅藻 *Odontella sinensis* 叶绿体 ATP 酶基因的结构与分布。光合 H⁺-ATPase 的 4 个 F₀ 亚基 (I—IV), 分别由 *atp F, G, H, I* 编码; 5 个 F₁ 亚基 (α—ε), 分别由 *atp A, B, C, D, E* 编码。在蓝藻中分成两个基因簇, 在绿藻和高等植物中 *atp C, D, G* 由核基因编码。该硅藻中仅 *atp C* 由核基因编码, 像蓝藻一样 *atp D, F* 有重叠, *atp F* 无内含子。

2 基因表达与调控研究日益受到重视

随着分子遗传学手段的应用, 人们对光合作用研究由静态转向动态, 不仅细致研究基因的结构和功能以探讨光合结构的组装与运转, 而且逐步转向基因的表达与调控研究, 以期深入了解动态调节机制, 打开由基础研究通向实际应用的道路。Grossman 是卡内基研究中心的蓝藻遗传学家, 作了“*S. PCC 7942* 在硫限制生长下的效应”的报告。他们确定了一系列与硫的利用有关的基因, 这些在硫限制生长条件下激活的基因可能参与各种含硫化合物的获取与利用。他们小组的墙报则展出了具有色补充适应作用的丝状蓝藻 *Fremyella diplosiphon* 光调控研究结果。正常调控方式为, 在绿光中藻红蛋白 (PE) 含量高而诱导型藻蓝蛋白 (PCi) 含量低; 红光中正相反。突变株 F_dR1 与 F_dR2 绿光调节方式受锁, 对红光不反应。通过接合转移野生型的基因文库, 得到 F_dR 的互补表型。从互补 DNA 中定位了 *rca C*, 编码产物 Rca C 氨基酸序列与细菌两因子调节系统蛋白极相似。

Suzuki 等研究了硝酸盐利用酶基因的表达及调控。氮抑制 *S. PCC 7942* 硝酸盐还原酶、亚硝酸盐还原酶以及硝酸盐载体的合成, 其基因 *nir A—nrt A, B, C, D—nar B* 成簇

排列,象一个操纵子一样共转录。氨能抑制转录,转录始于 *uir A* 起始密码子上游第 26 个碱基。“-10”启动子区与 *E. coli* 相似,“-35”区与典型的 *E. coli* 启动子无同源性。

Golden 等研究了 *S. PCC 7942* D_1 , D_2 基因的光调节。3 个 *psb A* 编码两种形式的 D_1 蛋白,两个 *psb D* 编码 D_2 蛋白。*psb A II*, *psb A III* 以及 *psb D II* 在 $\leq 125 \mu E / (m^2 \cdot s)$ 光强下低水平表达;光强升至 $\geq 360 \mu E / (m^2 \cdot s)$ 时,表达水平迅速上升,*psb D I* 相对稳定,而 *psb A I* 信息减少最快。*psb A II*, *A III* 及 *D II* 表达增强系由于转录变化所致。发现有蛋白结合于每个 *psb A* 及 *psb D II* 阅读框上游。结合位点区域的删除突变显著降低了 *psb D II* 的表达水平。*psb A II* (*A III*) 启动子+转录起动脉+蛋白结合位点均能启动无启动子的 *lac Z* 报告基因的光调节表达。

Erikson 等研究了 *S. 6803 psb A* 多基因家族的调控,表明 *psb A-1* 不表达,可能是隐秘的。90% 以上的转录本为 *psb A-2*, 其余为 *psb A-3*。比较 5' 非编码区发现,-10 和 -35 区序列与 *E. coli* 相似。*psb A-2* 与 *psb A-3* 的 -35 区相似,-10 区稍有差别。转录起始点分别为 -49 和 -88。*psb A* 转录本在黑暗中稳定,转录伴随一个 0.9kb *psb A-2* 特异降解产物。光合电子传递停止时,光照下也有同样的降解方式。

Heifetz 等进行了影响 PSII D_1 合成与功能的叶绿体基因的定位诱变。过量的光能造成 D_1 合成→成熟→光损伤→降解→重合成循环的平衡丧失,使光伤害的速率超过 D_1 的更新速率。通过自身转化将定位诱变的 *psb A* 及影响 D_1 表达的 *Str^r* (链霉素抗性), *Spe^r* (壮观霉素抗性) 16srRNA 突变引入野生型 *Chlamydomonas*。16s 转化子在强光 [$600 \mu mol / (m^2 \cdot s)$] 下 $D_1^{35}S$ 掺入率降低 60%, 同时光伤害率增强,最大光合速率及量子效率降低 $\leq 50\%$, 与野生型相比光自养生长率降低 40%。而在弱光 [$90 \mu mol / (m^2 \cdot s)$] 下表现正常的光合作用。 D_1 的酮/除草剂结合位点突变同样造成强光下而不是弱光下光合作用的减弱。

Lebedeva 等发现,2-脱氧-D-葡萄糖能降低 *Synechocystis* 总 RNA 水平,其中 *psb D* 比与光合作用无关的 *des A* 转录水平下降得快。Asayama 等从蓝藻铜锈微囊藻 (*Microcystis aeruginosa*) K-81 中克隆了 *rpo D 1* 并进行了序列测定,其氨基酸序列显示了与 Sigma 因子广泛的同源性。推知的启动子区域 AT 丰富,具有一个固定的 DNA 弯曲,其上游是 GC 丰富区。

LaRoche 等发现,在强光→弱光(1/10)变换中 *cab* mRNA 量迅速增加,复合物增大,提出 *cab* 表达在强光下受到抑制。他们还发现,绿藻杜氏藻 (*Dunaliella tertiolecta*) *cab* 家族分化程度高于高等植物。Los 等发现,绿藻盐藻 (*D. salina*) 的一个叶绿体 DNA 片段 (2 350 bp) 克隆于 *E. coli* 中,导致质粒拷贝数增加 4—5 倍。该片段 5' 端 1 250 bp 可能是转录的终止子。沿 5'→3' 方向克隆则复制终止,反之非然。这个片段在 *S. PCC 7942* 中能保持转录活性。

3 结语

藻类分子遗传学的发展促进了光合作用这一重大生物学问题研究,藻类基因→光合分子的反向生物学是主要研究思想。同时蕴含着一定的应用前景,利用基因工程手段培育优良品种,提高光合效率,已成为进一步的目标。藻类分子遗传学正向解决生物学基础

理论问题和推动藻类资源开发方向发展。

参 考 文 献

Abstracts, IXth International Congress on Photosynthesis, August 30—September 4, 1992, Nagoya, Japan, *Photosyn. Res.*, **34**(1):1—244.

THE IXth INTERNATIONAL CONGRESS ON PHOTOSYNTHESIS REFLECTED THE TREND OF ALGAL MOLECULAR GENETICS

Qin Song

(*Institute of Oceanology, Academia Sinica, Qingdao 266071*)

ABSTRACT

The IXth International Congress on Photosynthesis organized by the International Photosynthesis Committee was held in Nagoya, Japan, on August 30—September 4, 1992. It was stressed by the chairperson, N. Murata that since the VIIIth Congress, the rapid development of photosynthesis was particularly based on molecular biology. Of 918 abstracts submitted, 180 deal with algal studies, 59 of which were molecular genetic researches.

The unique light-harvesting structure, relatively simple genetic composition and the special status in plant evolution make algae ideal material for photosynthesis research. The significant progress over the last several years in algal photosynthesis research is mainly due to employment of molecular methods, such as gene cloning, sequencing, restriction enzyme analysis, complementary analysis, site-directed mutagenesis, transformation, etc. Algal molecular genetics is not only the leading branch of algal research now, but also one of the most active fields of photosynthesis research.

Our poster reported the isolation of allophycocyanin genes from *Spirulina platensis* and two other blue-green algal species using PCR amplification. These genes are now being sequenced for elucidating evolutionary lines of photosynthesis molecules and will be used further as purpose gene for algal genetic manipulation. PCR techniques may offer new potential for isolation of genes of conservative photosynthetic molecules.

In the present paper, the author reviews algal molecular work presented at this congress, and attempts to reflect the trend of algal molecular genetic research, which in our view, is to serve both fundamental biology study and the needs of algal resource exploitation.

Key words Algae Photosynthesis Molecular genetics Genetic engineering