

蛋白核小球藻(*Chlorella pyrenoidosa*) Rubisco 活化酶基因的克隆与表达分析*

邓意龙 孙 雪 徐年军 杨 锐

(宁波大学应用海洋生物技术教育部重点实验室 宁波 315211; 宁波大学海洋学院 宁波 315211)

摘要 采用 RACE 技术克隆了单细胞绿藻蛋白核小球藻 820 Rubisco 活化酶基因(*rca*)序列,并用荧光定量 PCR 方法研究了 *rca* 和 Rubisco 小亚基基因(*rbcS*)的表达规律。结果获得了 1703bp 的 *rca* cDNA 序列,包括 66bp 的 5'非翻译区、1242bp 的开放阅读框和 395bp 的 3'非翻译区。序列比较和分析表明该蛋白核小球藻 *rca* 序列与其它绿藻的同源性高达 78%—85%;偏好使用以 G/C/T 结尾的密码子;推测的 RCA 蛋白等电点和分子量分别为 8.44 和 45.71kDa。荧光定量 PCR 结果表明随光照时间增加 *rca* 与 *rbcS* 转录表达逐渐降低;不同盐度处理下 *rbcS* 的 mRNA 量变化不大,而 *rca* 在 37.5 盐度下表达量为 25 盐度的 2.69 倍;1.0—3.0mmol/L 水杨酸处理 *rca* 与 *rbcS* 表达均降低。

关键词 蛋白核小球藻, Rubisco 活化酶基因, *rbcS* 基因, 转录表达

中图分类号 Q93

小球藻(*Chlorella*)属于绿藻门(Chlorophyta)、Trebouxiophyceae 纲、小球藻目(Chlorellales)、小球藻科(Chlorellaceae),在自然界分布广泛。小球藻既能利用光能进行自养生长,也可利用多种有机碳源进行异养生长或混养(叶林超等,2009)。

1,5-二磷酸核酮糖羧化/加氧酶(1,5-bisphosphate ribulose carboxylase/oxygenase, 简称为 Rubisco)是广泛存在于光合生物中的光合作用关键酶(杜翠红等,2010),但该酶的催化效率很低。Rubisco 的活性在体内主要受 Rubisco 活化酶(Rubisco activase, RCA)的调节,因此高等植物中 RCA 的生理生化、结构功能等研究也成为近年来光合作用研究的重要领域之一。

到目前为止,小球藻中 *rca* 基因方面的研究很少,仅见小球藻 *C. variabilis* 中两条类似 *rca* 序列(Blanc *et al.*, 2010)。本文首次从蛋白核小球藻(*C. pyrenoidosa*)中分离并鉴定了其 *rca* 基因序列,并研究了光照时间及盐度、水杨酸对 *rca* 转录水平的影响,结合 Rubisco 小亚基基因(*rbcS*)的转录表达比较了两者的相关性。该研

究对小球藻 Rubisco 活化酶的结构与功能以及调节机制研究提供了参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 藻种 蛋白核小球藻 820,来自宁波大学海洋生物工程重点实验室藻种室,培养基为 MAV3 号海水培养基,培养温度为 25℃,光照强度为 40μmol/(m²·s),光暗周期为 12L/12D。

1.1.2 主要试剂 RNA 提取试剂 Trizol 购自 Invitrogen 公司,5'-full RACE Kit 购自大连宝生物(TaKaRa)工程有限公司,3'-RACE 用 BD SMART RACE cDNA Amplification Kit 来自 Clontech 公司,GenClean 琼脂糖凝胶回收和质粒提取试剂盒购自上海捷瑞生物工程有限公司,转化菌株为大肠杆菌(*E. coli*)DH5⁺,荧光定量用试剂盒 Primescript RT reagent kit with gDNA Eraser 和 SYBR Premix Ex Taq,连接载体 pMD18-T、PCR 试剂和 DL2000 DNA Marker

* 国家自然科学基金项目资助,30700610 号;浙江省公益性项目,2010C33066 号。邓意龙, E-mail: cbujndx@126.com

通讯作者: 孙 雪, 博士, 副研究员, E-mail: sunxue@nbu.edu.cn

收稿日期: 2010-11-23, 收修改稿日期: 2011-01-26

均购自 TaKaRa 公司。

1.1.3 引物序列 从 GenBank 数据库中搜索莱茵衣藻、小麦、大麦、玉米的 RCA 编码序列, 根据其保守氨基酸序列设计了 4 条简并引物, 其中两条 (PB02 和 PB04) 可扩增出 *rca* 部分 cDNA 序列, 在该部分序列的基础上使用 Primer Premier 5.0 软件来设计 5'-RACE 和 3'-RACE 引物, 所用各引物序列见表 1。

1.2 方法

1.2.1 总 RNA 提取和 *rca* 部分 cDNA 片段扩增

以 5000r/min 离心收集对数期的蛋白核小球藻, 按 Trizol 试剂说明进行总 RNA 的提取。检测总 RNA 质量合格后将其反转录成 cDNA, 然后用简并引物 PB02 和 PB04 进行 PCR 扩增。PCR 循环参数为: 先 94°C 预变性 5min; 接着按 94°C 1min、56°C 1min、72°C 1min 的程序进行 35 个循环; 最后 72°C 延伸 8min。产物回收纯化、连接、转化与重组子检测等按常规分子克隆方法进行, 阳性重组菌送去英潍捷基 (上海) 贸易有限公司测序。

1.2.2 RACE 扩增和 *rca* 全序列的获得 按试剂盒说明分别进行 5'-RACE 和 3'-RACE 扩增, 其序列的克隆方法同 1.2.1。将利用简并引物得到的 *rca* 部分 cDNA 片段与 RACE 方法得到的上、下游片段进行拼接, 再按拼接序列重新设计一对引物 (Q-01 和 Q-05) (表 1), 以验证拼接序列的正确性。

1.2.3 *rca* 全序列分析 用 NCBI/ORF finder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>) 进行开放阅读框 (ORF) 的预测; 用 DNAMAN 软件进行 *rca* 基因的翻译和密码子偏好性分析; 利用 NCBI 中 Blast 工具进行同源性比对; 蛋白质的二级结构预测用 NPSA 的在线工具 http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_server.html 进行; 蛋白质等电点

(pI) 和分子量 (M_w) 预测用 <http://www.expasy.org/tools> 中的 Compute pI/ M_w 工具。

1.2.4 *rca* 与 *rbcS* 转录水平的定量分析 所用荧光定量 PCR 引物见表 1, 18S rDNA 用做内标。将 18S rDNA、*rca* 和 *rbcS* 的荧光定量 PCR 引物扩增序列进行克隆与测序鉴定, 挑选测序鉴定正确插入片段的转化菌落进行重组质粒的抽提。以质粒浓度对数为纵坐标, 以 C_t 值为横坐标绘制 3 条基因的标准曲线。

样品处理: (1) 光照时间。光照开始时取样, 以后每 3h 取一次样。(2) 盐度处理。分别在对数中期 1/2 海水 (盐度为 12.5) 培养小球藻中加入 NaCl 使其终盐度达到 25 和 37.5, 培养 6h 后取样。(3) 水杨酸处理。分别在对数中期小球藻中加入水杨酸母液, 使其终浓度分别为 0、1.0、2.0 和 3.0mmol/L, 培养 6h 后取样。实时荧光定量 (Rotor-Gene 6000 PCR 仪) 反应体系: 12.5 μ l SYBR Premix Ex *Taq*, 正反向引物各 0.5 μ l, 2 μ l cDNA 模板, DEPC 水补足体积至 25 μ l。PCR 循环参数为 95°C 预变性 3min; 然后按 95°C 变性 10s, 55°C 复性 15s, 72°C 延伸 20s 的程序进行 40 个循环。

2 结果与分析

2.1 *rca* 部分 cDNA 片段的获得与分析

提取的两组蛋白核小球藻总 RNA 经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 (图 1A), 可见总 RNA 完整性好, 28S 和 18S 条带清晰, 无基因组 DNA 污染。以该总 RNA 反转录的 cDNA 为模板, 用 PB02 和 PB04 引物进行 PCR 扩增, 得到 cDNA 部分序列约 500bp (电泳结果见图 1B)。测序后该片段长度为 482bp。

将 *rca* 部分 cDNA 序列在 NCBI 数据库中进行 blastn 搜索, 结果显示 *rca* 核苷酸序列与莱茵衣藻 *rca* 基因 (GenBank 号 M62962) 的相似性最高为 81%, 与

表 1 实验中所用引物
Tab.1 Primers used in the experiments

引物种类	引物名称	引物序列(5'—3')
<i>rca</i> 部分序列引物	PB02	TNATGWSNKCNGGNGARCTG
	PB04	NARNGCNCCRWAGAARTC
5' RACE 引物	5-225	TTGTGGGACTGTCAGCAATGTTC
	5-459	ACTGCCCTGGGAAAAGCATCTAC
3' RACE 引物	3-202	TGAACATTGCTGACAGTCCCACA
	3-442	ATGCTTTCCCAGGGCAGTCTATC
<i>rca</i> 全序列引物	Q-01	GGAATGGCCCATATCACC
	Q-05	TGATCCTCCAAATAGAAAAG
内标定量 PCR 引物	18S-5	TTGACGGGAAGGGCACCA
	18S-3	CACCACCCATAGAATCAAGAAAGAG
<i>rca</i> 定量 PCR 引物	<i>rca</i> -5	TGCAGCTTCCAGGAGTGT
	<i>rca</i> -3	CGGGTTGGGTCCAGTAG
<i>rbcS</i> 定量 PCR 引物	<i>rbcS</i> -5	GAAGCCTGCTGGCAAGAC
	<i>rbcS</i> -3	GCCGTTGAGGACGATGTAG

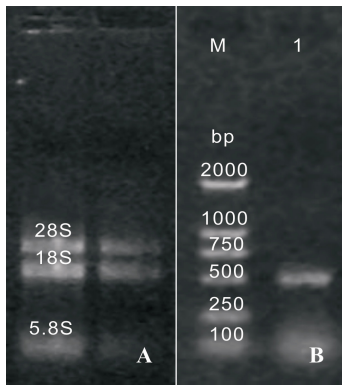


图1 蛋白核小球藻 820 总 RNA 以及 *rca* 部分 cDNA 片段

Fig.1 Total RNAs and partial *rca* cDNA fragment of *C. pyrenoidosa* 820

A. 总 RNA; B. *rca* 部分 cDNA 片段, M 为 DL2000 DNA Marker, 1 为 *rca* 部分 cDNA 片段

结果见图 2A、B)。测序后去掉载体和接头序列后, 5'-RACE 片段和 3'-RACE 片段长度分别为 784bp 和 703bp。将部分 *rca* 片段(482bp)和两端 RACE 片段进行拼接, 得到长为 1703bp 的 *rca* 序列(GenBank 号 JN232380)。在该序列上再设计一对引物(Q-01 和 Q-05)进行 PCR 扩增和测序验证, 结果表明所得拼接序列正确。将该 1703bp 的 *rca* 序列进行分析, 发现其 5' 非翻译区长 66bp, ORF 长 1242bp, 编码 413 个氨基酸, 3' 非翻译区长 395bp, 加尾信号 TGTA 在 1664—1668bp 处, 后面有 poly(A)尾巴。利用 *rca* 全 cDNA 序列验证引物(Q-01 和 Q-05)对蛋白核小球藻 820 DNA 模板进行扩增, 得到长为 2701bp 的 DNA 序列。对该 DNA 序列与 cDNA 序列进行了比对, 发现共有 9 个内含子, 其中 8 个符合 GT/AG 的剪接规则。

将该蛋白核小球藻 *rca* 全 cDNA 序列在 NCBI 数据库中进行 blastx 同源性比对, 结果发现与绿球藻 *Chlorococcum littorale* 的 RCA 蛋白(GenBank 号 CAA71667)的相似性最高为 85%, 与团藻 *Volvox carteri* f. *nagariensis* (EFJ47076)相似性为 79%, 而与莱茵衣藻(AAA33091 或 AAR23425)的相似性为 78%。

2.3 *rca* 序列的分析

2.3.1 *rca* 基因密码子偏好性分析 在蛋白质编码

高等植物拟南芥(M55449)和 水稻(E576577)相似性分别为 76%和 75%。以上 比对结果表明所得 序列为小球藻的 *rca* 基因。

2.2 *rca* 的 RACE 结果与分析

在上述已克隆 482bp 的 *rca* 部分 cDNA 片段基础上, 用 5'-RACE 和 3'-RACE 的方法扩增得到了蛋白核小球藻 820 的 *rca* 基因 5'端 和 3'端序列(电泳结

过程中, 某一物种或 基因通常倾向于使用 一种或几种特定的同 义密码子, 这种现象 称为密码子偏好性。

表 2 显示了蛋白核小 球藻 820 的 *rca* 基因 中特定密码子出现的 次数。从表 2 中可以 看出, 由唯一密码子 决定的氨基酸除了 Met(M)和 Trp(W)本 身只有一个密码子之 外, 还有 2 个氨基酸 在该 *rca* 基因中只出 现一种密码子, 它们 分别是 Cys(C)和

His(H); 由 6 个密码子编码的 3 种氨基酸中, Ser(S)偏好使用 TCC 密码子(35.7%), Arg(R)偏好使用 CGC (42.9%), 而 Leu(L)则使用 CTG 较多(40.7%)。在小球藻 820 *rca* 基因中具有两种以上同义密码子的氨基酸 偏好使用以 G/C/T 为结尾的密码子, 在密码子的第 3 位 C、G、T 的使用频率分别为 32.4%、31.2%和 28.0%, 明显高于 A 的使用频率(8.4%), 说明小球藻 *rca* 基因 偏好使用 NNC、NNG、NNT 型的密码子。而叶绿体 编码基因如 Rubisco 大亚基基因(*rbcL*)的密码子偏向 使用第 3 位碱基为 A 和 T 的密码子。

2.3.2 RCA 氨基酸序列分析 根据软件预测 RCA 蛋白质的二级结构中 α 螺旋(α -helix)占了 37.77%, 伸展链(β -extend strand)占了 10.17%, 随机卷曲(random coil)占了 50.36%, 其余未确定序列占 1.69%。对编码 蛋白质进行等电点(pI)和分子量(M_w)预测, 得到的理 论值分别是 8.44 和 45.71kDa。

RCA 具有 ATPase 活性, 这是因为 RCA 含有“P- 环”序列。将蛋白核小球藻 820 的 *rca* 编码序列推导 成相应的氨基酸序列, 作者找到了 P-环的两段保守 序列分别为 A 区(WGGKGGQGKT)和 B 区(GRMCS- LFINDLD)(Shen *et al*, 1992; 宋扬, 2007¹⁾)。再与从 NCBI 上查找的不同植物 RCA 氨基酸序列进行比较,

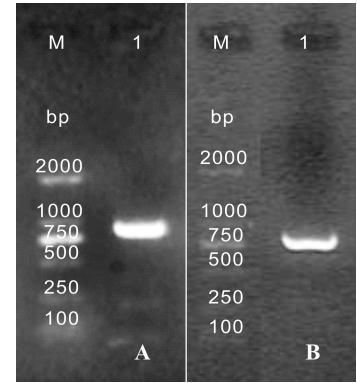


图2 蛋白核小球藻 820 *rca* 5'-RACE 和 3'-RACE 产物

Fig.2 5'-RACE and 3'-RACE products of *rca* gene in *C. pyrenoidosa* 820

A. 1 为 5'-RACE 产物; B. 1 为 3'-RACE 产物; M 为 DL2000 DNA Marker

1) 宋 扬, 2007. 马铃薯 Rubisco 活化酶基因组织特异性启动子的克隆及功能鉴定. 北京: 中国农业科学院硕士学位论文, 2—3

表 2 蛋白核小球藻 820 *rca* 密码子使用偏好性
Tab.2 Codon usage bias of the *rca* gene in *C. pyrenoidosa* 820

氨基酸-密码子	数目	氨基酸-密码子	数目	氨基酸-密码子	数目	氨基酸-密码子	数目
Ala(A)-GCA	1	Glu(E)-GAA	4	Gly(G)-GGA	8	Val(V)-GTA	2
Ala(A)-GCT	15	Asp(D)-GAT	16	Gly(G)-GGT	13	Val(V)-GTT	4
Ala(A)-GCC	12	Asp(D)-GAC	12	Gly(G)-GGC	15	Val(V)-GTC	2
Ala(A)-GCG	5	Glu(E)-GAG	16	Gly(G)-GGG	4	Val(V)-GTG	16
Pro(P)-CCA	4	Gln(Q)-CAA	3	Arg(R)-CGA	0	Leu(L)-CTA	2
Pro(P)-CCT	5	His(H)-CAT	3	Arg(R)-CGT	8	Leu(L)-CTT	5
Pro(P)-CCC	7	His(H)-CAC	0	Arg(R)-CGC	12	Leu(L)-CTC	3
Pro(P)-CCG	0	Gln(Q)-CAG	16	Arg(R)-CGG	2	Leu(L)-CTG	11
Thr(T)-ACA	1	Lys(K)-AAA	4	Arg(R)-AGA	2	Ile(I)-ATA	0
Thr(T)-ACT	11	Asn(N)-AAT	12	Ser(S)-AGT	2	Ile(I)-ATT	8
Thr(T)-ACC	2	Asn(N)-AAC	11	Ser(S)-AGC	6	Ile(I)-ATC	16
Thr(T)-ACG	3	Lys(K)-AAG	19	Arg(R)-AGG	4	Met(M)-ATG	23
Ser(S)-TCA	3	TAA	0	TGA	0	Leu(L)-TTA	1
Ser(S)-TCT	7	Tyr(Y)-TAT	6	Cys(C)-TGT	0	Phe(F)-TTT	1
Ser(S)-TCC	10	Tyr(Y)-TAC	7	Cys(C)-TGC	5	Phe(F)-TTC	14
Ser(S)-TCG	0	TAG	1	Trp(W)-TGG	4	Leu(L)-TTG	5

注: 数字表示在小球藻 *rca* 基因中, 密码子在每个氨基酸中出现的次数

发现在 A 区的第 9 位, 藻类如衣藻(AAR23425)、团藻(EFJ47076)、绿球藻(CAA71667)多采用羟基类的苏氨酸(T), 而高等植物如小麦(AAF71272)、大麦(AAA62703)、玉米(NP_001104921)多采用羟基类的丝氨酸(S)。在 B 区的第 5 位, 藻类一般采用丝氨酸(S), 上面提到的 3 种高等植物采用半胱氨酸(C); B 区第 2 位在衣藻和本文的小球藻中采用精氨酸(R), 而绿球藻和团藻则使用赖氨酸(K), 3 种高等植物也用赖氨酸(K); 而 B 区第 4 位除了玉米用丝氨酸(S)外, 其它 6 种均使用半胱氨酸(C)。

2.4 *rca* 与 *rbcS* 的转录表达分析

首先制作荧光定量 PCR 标准曲线, 分别用插入 18S rDNA 内标和 *rca*、*rbcS* 基因的重组质粒为模板, 得到 3 种基因的标准曲线依次为 $Y = -3.304 \times \lg(X) + 36.494$ 、 $Y = -3.311 \times \lg(X) + 37.583$ 和 $Y = -3.355 \times \lg(X) + 38.258$, 各曲线的相关系数达到 0.998—0.999, 扩增效率在 99.0%—101.1%之间。说明 3 条基因扩增效率相近且特异性高。

利用荧光定量 PCR 方法分析了光周期内不同光照时间、不同盐度和不同水杨酸浓度处理下 *rca* 与 *rbcS* 转录表达的变化。从图 3A 可以看出, 在一个光周期中, *rca* 与 *rbcS* 表达量基本随时间而呈下降的趋势, 只有在 20:30 时 *rca* 表达量又略有回升(起始表达量的 0.45 倍), 高于 17:30(起始表达量的 0.33 倍)。图

3B 为不同盐度处理对 *rca* 与 *rbcS* 表达的影响, 可见 3 个不同盐度处理对 *rbcS* 表达量影响不明显, 只是随盐度增加而略有升高; 而 *rca* 在通常海水盐度(25)时表达量设为 1.00, 低盐(12.5)和高盐(37.5)时表达量分别是 25 盐度的 1.12 倍和 2.69 倍, 可见在高盐浓度胁迫时 *rca* 的表达量增加明显。不同浓度水杨酸处理 6h 后 *rca* 与 *rbcS* 基因的表达情况见图 3C, 可见不同浓度的水杨酸(1.0—3.0mmol/L)对 *rca* 与 *rbcS* 的表达均有一定的抑制作用。其中 3 种浓度水杨酸处理后 *rca* 基因表达量降为不添加水杨酸的 0.41—0.62 倍, *rbcS* 基因的表达量降为不添加水杨酸的 0.49—0.63 倍。

3 讨论

Rubisco 活化酶(RCA)是一种核基因编码的叶绿体蛋白, 人们利用 Rubisco 活化酶抗体已在许多植物和其它光合生物中发现 Rubisco 活化酶的存在, 这说明依赖于 RCA 的 Rubisco 活性调节机制广泛存在于光合生物中。目前已在多种作物中通过诱变和转基因方法开展 RCA 的功能研究(Sage *et al.*, 2008), 也有人认为 RCA 是一种分子伴侣(Spreitzer *et al.*, 2002)。Rubisco 活化酶在碳浓缩机制(Burey *et al.*, 2007), 以及高温和重金属胁迫下有提高光合作用效率的作用(Kumar *et al.*, 2009; Ma *et al.*, 2008)。虽然 RCA 本身不是三磷酸腺苷酶(ATPase), 但具有 ATPase 活性, 这是

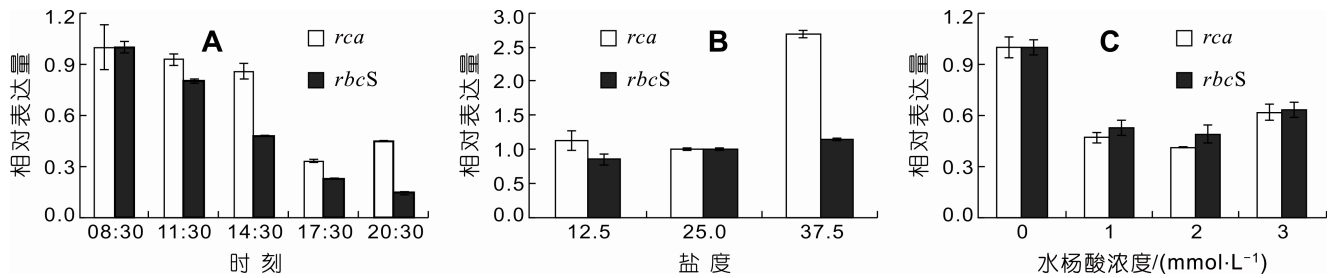


图3 不同光照时间(A)、盐度(B)、水杨酸浓度(C)对蛋白核小球藻 820 *rca* 和 *rbcS* 表达的影响

Fig.3 The effects of different light duration time, salinity and salicylic acid concentrations on the expression of *rca* and *rbcS* genes in *C. pyrenoidosa* 820

因为 RCA 的两种亚基均含有“P-环”序列, P-环是许多 ATPase 具有的核苷酸结合序列。Rubisco 的活化需要其大亚基催化位点附近的 Lys 残基的氨甲酰化, 这个过程依赖于 ATP 并由 Rubisco 活化酶介导。在 ATP 水解过程中, Rubisco 活化酶促使各种磷酸糖抑制物从 Rubisco 上解离下来, 恢复 Rubisco 活性(韩鹰等, 2000)。

研究表明, 大量光合作用相关基因受光照和生物钟节律的调控(Xu *et al.*, 2001)。光和生物钟对 *rbcS* 基因表达调控的研究也有大量报道, 但结果并不一致(Piechulla, 1993)。*rca* 基因也受光和生物钟的调控, 如 Liu 等(1996)发现拟南芥中 *rca* 启动子中有光响应和生物钟调控序列。本研究表明小球藻的 *rca* 与 *rbcS* 基因的表达也受生物钟的调控, 如开始光照(8:30)时, *rca* 与 *rbcS* 的表达量最高, 随光照持续时间延长其表达量逐渐下降, 但两者的变化规律并不完全一致, 如 20:30 时 *rca* 表达量又略有回升。一般来说, Rubisco 小亚基的活性部分被 RCA 所调控(Spreitzer, 1999), 但是 Rubisco 亚基和 Rubisco 活化酶的转录水平表达并不总是一致(Leitao *et al.*, 2007)。

盐胁迫是一种普遍存在的非生物因素, 可以影响到质膜的组分、透性、运输、离子流等, 导致细胞膜的正常功能受损, 进而使细胞的代谢及生理功能受到不同程度的破坏。盐度可以影响到许多盐诱导蛋白的表达变化, 而 RCA 蛋白也是一种盐诱导蛋白(Lee *et al.*, 2011)。*rca* 和 *rbcS* 基因在转录水平上同样受盐度的影响, 如耐盐物种胡杨(*Populus euphratica*) 在盐度胁迫下 RCA 转录水平显著上调(Gu *et al.*, 2004), 大豆 *rbcS* 基因的转录表达受不同浓度 NaCl 的影响(贺超英等, 2001)。本文结果表明 *rca* 在转录水平上也受盐度的影响, 低盐(12.5)和中盐(25)处理下两者的表达量差别不大, 而高盐浓度(37.5)下 *rca* 基

因的表达是 25 盐度表达量的 2.69 倍。但 *rbcS* 的表达变化与 *rca* 并不一致, 其表达量只是随盐度升高而略有增加。

水杨酸是苯丙氨酸代谢途径的中间产物, 属肉桂酸衍生物, 也是生物体内广泛存在的一种小分子酚类物质, 参与植物体内对抗干旱、重金属、盐碱等抗逆性活动(Popova *et al.*, 2009; Sawada *et al.*, 2008)。水杨酸可以诱导大豆 *rbcS* 基因表达(贺超英等, 2001), 而王友如(2010)发现浮萍中一新 *rbcS* 基因的启动子中含有水杨酸等植物激素的顺式作用元件。但 *rca* 基因受水杨酸调控的报道很少见。本研究中不同浓度水杨酸对小球藻 *rca* 和 *rbcS* 基因表达均表现出一定的抑制作用, 1.0—3.0mmol/L 水杨酸处理后两种基因表达量降为不添加水杨酸的 0.41—0.63 倍, 但水杨酸对 *rca* 基因抑制的机理尚不清楚。

参 考 文 献

- 王友如, 2010. 浮萍中一个新 *rbcS* 基因启动子的克隆及分析. 分子植物育种, 8(1): 41—44
- 叶林超, 叶均安, 徐国忠等, 2009. 动物蛋白酶解物与无机氮、磷源的组合对小球藻 *Chlorella vulgaris* 生长和生化指标的影响. 海洋与湖沼, 40(2): 176—180
- 杜翠红, 刘静雯, 周集体, 2010. 沼泽红假单胞菌 (*Rhodospseudomonas palustris*)核酮糖-1,5-二磷酸羧化酶/氧化酶基因克隆及其在大肠杆菌中的表达. 海洋与湖沼, 41(3): 315—321
- 贺超英, 王伟权, 东方阳等, 2001. 大豆 1,5-二磷酸核酮糖羧化酶小亚基基因的转录表达分析. 科学通报, 46(16): 1375—1380
- 韩鹰, 陈刚, 王忠, 2000. Rubisco 活化酶的研究进展. 植物学通报, 17(4): 306—311
- Blanc G, Duncan G, Agarkova I *et al.*, 2010. The *Chlorella variabilis* NC64A genome reveals adaptation to photosymbiosis, coevolution with viruses, and cryptic sex. Plant Cell, 22(9): 2943—2955

- Burey S C, Poroyko V, Ergen Z N *et al*, 2007. Acclimation to low [CO₂] by an inorganic carbon concentrating mechanism in *Cyanophora paradoxa*. *Plant, Cell and Environment*, 30(11): 1422—1435
- Gu R, Fonseca S, Puskás L G *et al*, 2004. Transcript identification and profiling during salt stress and recovery of *Populus euphratica*. *Tree Physiology*, 24(3): 265—276
- Kumar A, Li C, Portis A R, 2009. *Arabidopsis thaliana* expressing a thermostable chimeric Rubisco activase exhibits enhanced growth and higher rates of photosynthesis at moderately high temperatures. *Photosynthesis Research*, 100(3): 143—153
- Lee D G, Park K W, An J Y *et al*, 2011. Proteomics analysis of salt-induced leaf proteins in two rice germplasms with different salt sensitivity. *Canadian Journal of Plant Science*, 91(2): 337—349
- Leitao L, Maoret J J, Biolley J P, 2007. Changes in PEP Carboxylase, Rubisco and Rubisco activase mRNA levels from maize (*Zea mays*) exposed to a chronic ozone stress. *Biological Research*, 40(2): 137—153
- Liu Z, Taub C C, McClung C R, 1996. Identification of an *Arabidopsis thaliana* ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase activase (RCA) minimal promoter regulated by light and the circadian clock. *Plant Physiology*, 112(1): 43—51
- Ma L, Liu C, Qu C *et al*, 2008. Rubisco activase mRNA expression in spinach: modulation by nanoantase treatment. *Biological Trace Element Research*, 122(2): 168—178
- Piechulla B, 1993. 'Circadian clock' directs the expression of plant genes. *Plant Molecular Biology*, 22(3): 533—542
- Popova L P, Maslenkova L T, Yordanova R Y *et al*, 2009. Exogenous treatment with salicylic acid attenuates cadmium toxicity in pea seedlings. *Plant Physiology and Biochemistry*, 47(3): 224—231
- Sage R F, Way D A, Kubien D S, 2008. Rubisco, Rubisco activase, and global climate change. *Journal of Experimental Botany*, 59(7): 1581—1595
- Sawada H, Shim I S, Usui K *et al*, 2008. Adaptive mechanism of *Echinochloa crus-galli* Beauv. var. *formosensis* Ohwi under salt stress: Effect of salicylic acid on salt sensitivity. *Plant Science*, 174(6): 583—589
- Shen J B, Ogren W L, 1992. Alteration of spinach ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase activities by site-directed mutagenesis. *Plant Physiology*, 99(3): 1201—1207
- Spreitzer R J, 1999. Questions about the complexity of chloroplast ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase. *Photosynthesis Research*, 60(1): 29—42
- Spreitzer R J, Salvucci M E, 2002. RUBISCO: Structure, regulatory interactions, and possibilities for a better enzyme. *Annual Review of Plant Biology*, 53(1): 449—475
- Xu Y, Johnson C H, 2001. A clock- and light-regulated gene that links the circadian oscillator to *LHCB* gene expression. *The Plant Cell*, 13(6): 1411—1425

THE CLONING AND EXPRESSION ANALYSIS OF RUBISCO ACTIVASE GENE IN THE UNICELLULAR GREEN ALGA *CHLORELLA PYRENOIDOSA*

DENG Yi-Long, SUN Xue, XU Nian-Jun, YANG Rui

(Key Laboratory of Applied Marine Biotechnology, Minister of Education, Ningbo, 315211;
School of Marine Sciences, Ningbo University, Ningbo, 315211)

Abstract RACE technology was employed to clone the Rubisco activase gene (*rca*) of the unicellular green alga *Chlorella pyrenoidosa* 820, and the *rca* and *rbcS* (small subunit of Rubisco) expression profiles were investigated by real-time PCR. The obtained 1703bp *rca* cDNA sequence contained a 66bp 5'-untranslated region, a 1242bp open reading frame and a 395bp 3'-untranslated region. Sequence comparison showed that its homology with other green algae reached to 78%—85%. Sequence analysis showed that the *rca* gene preferred to use the codons ended with G or C or T, and the putative isoelectric point and molecular weight was 8.44 and 45.71kDa, respectively. Real-time PCR showed that *rca* and *rbcS* transcription quantities decreased as the light duration time increased. Under different salinity stress, *rbcS* mRNA quantities showed no significant variation, while *rca* mRNA quantities in 37.5 salinity reached to 2.69 fold of those in 25 salinity. The transcriptional expression of *rca* and *rbcS* all decreased after 1.0, 2.0 and 3.0mmol/L salicylic acid treatments.

Key words *Chlorella pyrenoidosa*, Rubisco activase gene, *rbcS* gene, Transcriptional expression