

长石莼(缘管浒苔)(*Ulva linza*) *rbcL* 全长基因的克隆与序列分析*

应成琦^{1,2} 蔡春尔¹ 尹顺吉¹ 徐 韧³ LIN Sen-Jie⁴
周志刚¹ 马家海¹ 何培民¹

(1. 上海海洋大学 农业部水产种质资源与养殖生态重点开放实验室 上海 201306; 2. 中国水产科学研究院东海水产研究所 中国水产科学研究院盐碱地渔业工程技术中心 上海 200090; 3. 国家海洋局东海环境监测中心 上海 200137; 4. Department of Marine Sciences, University of Connecticut, Groton, CT 06340, USA)

提要 克隆分离了长石莼(缘管浒苔)光合作用第一关键酶 Rubisco 大亚基全长基因(*rbcL*)。首先应用 PCR 和 RT-PCR 方法扩增 *rbcL* 大片段 DNA 序列和大片段 cDNA 序列, 结果表明, 获得的 2 个克隆序列完全相同, 该 *rbcL* 大片段基因不存在内含子。其次应用基因步移方法分别对 *rbcL* 基因的 5' 上游未知序列和 3' 下游未知序列进行扩增, 在此基础上, 将 3 个片段序列进行拼接, 获得了 *rbcL* 全长基因序列(NCBI 登陆号: DQ813497)。序列全长 2124bp, 其中编码区序列长 1425bp, 为单外显子基因, 编码 474 个氨基酸; 5' 非翻译区序列长 225bp, 转录起始位点为位于翻译起始密码子 ATG 上游第 47 个核苷酸 G, 在距离转录起始位点-9bp—48bp 的范围内有推测的类似原核生物的启动子序列(-10 区: TAAAT、-35 区: TTGAAA); 3' 非翻译区序列长 474bp, 在距离转译终止密码子 TAA 下游 54—98bp 处有一段较长的回文序列, 可形成一个 22bp 的茎结构。密码子偏好性分析结果表明, 长石莼(缘管浒苔)*rbcL* 基因偏向使用第三位核苷酸碱基为 A 和 T 的密码子。

关键词 *rbcL*, 长石莼(缘管浒苔), 全长序列, 基因步移

中图分类号 Q953

核酮糖 1,5-二磷酸羧化酶/加氧酶(Ribulose 1,5-Bisphosphate Carboxylase/Oxygenase, E.C.4.1.1.39, 简称 Rubisco)是光合作用还原和光合氧化二个连锁循环的交叉点, 为调节光合作用和光呼吸、决定净光合速率的第一关键酶(何培民等, 2005)。在高等植物和绿藻中, Rubisco 由 8 个大亚基(叶绿体 DNA 编码)及 8 个小亚基(核基因编码)组成, 编码大、小亚基的基因分别简称为 *rbcL*、*rbcS* 基因(Shinozaki *et al.*, 1982)。McIntosh 等(1980)首次克隆到玉米叶绿体 *rbcL* 基因并测序, 随后菠菜和烟草 *rbcL* 基因也被克隆和测序, 迄今已测得 1500 余种植物 *rbcL* 基因的序列(Olmstead *et al.*, 1994)。Rubisco 表达与活性直接与植

物光合速率、生长速度及产量具有重要关系, 而一直为世界研究热点(何培民等, 2005; Shinozaki *et al.*, 1982)。

2007 年和 2008 年, 在我国青岛等地黄海沿岸暴发浒苔灾害现象, 其漂浮种类主要为大型绿藻浒苔(丁兰平等, 2009)。浒苔为世界沿海分布的常见大型经济海藻, 其味道清香独特, 且具有降低胆固醇等药用价值(林文庭, 2007), 已作为药材收录在《中华本草》中(邱德文等, 2006), 日本、韩国以及我国南部海区已大规模栽培。浒苔藻体生长很快, 其日相对生长率可高达 50%(张寒野等, 2006), 已成为紫菜栽培生产中强劲敌藻, 但同时具有快速吸收氮磷改善水质

* 国家自然科学基金项目, 30371101 号; 教育部博士点基金资助项目, 2006—2007; 上海市优秀学科带头人计划项目, 08XD14037 号; 上海科委“长三角联合攻关”项目, 062358101 号; 上海市教委优势(重点)学科资助项目, S30701 号。应成琦, 硕士, E-mail: ycq_0212119@163.com

通讯作者: 何培民, 教授, E-mail: pmhe@shou.edu.cn

收稿日期: 2009-08-20, 收修改稿日期: 2009-10-18

等生态修复功能(徐姍楠等, 2006)。它们可以在海中漂浮生长(Santelices *et al*, 1989; Malta *et al*, 1999), 特别是近年来由于海洋富营养化现象越来越严重, 大量繁殖时会引发绿潮灾害(Shimada *et al*, 2003; Hernandez *et al*, 1997; Ohno *et al*, 2001; Morand *et al*, 1996; Fletcher, 1996; Raffaelli *et al*, 1998)。绿潮的形成本身就是大自然对人类活动的一种警示及自我修复作用(徐姍楠等, 2006), 主要由石莼属(*Ulva*)、浒苔属(*Enteromorpha*)、硬毛藻属(*Chaetomorpha*)和刚毛藻属(*Cladophora*)中的一些种类迅速增殖而引起的, 这些增殖的海藻虽能有效吸收海水中的氮磷营养盐, 但一旦过量生长, 便会与其它海藻、海草及浮游植物产生竞争, 使海底沉积物所处的物理、化学环境产生不利的变化, 从而导致底栖动物数量的减少, 进而影响鱼、海鸟以及以鱼、海鸟为食物的捕食者的摄食行为(Raffaelli *et al*, 1998)。亚洲日本的 Hiroshima 海湾和 Hakata 海湾(Shimada *et al*, 2003)、欧洲西班牙的阿尔赫西拉斯湾(Hernandez *et al*, 1997)以及南美智利 Dichato 附近的海域(Ohno *et al*, 2001)都曾受过绿潮的侵袭。

目前国际上已倾向把浒苔归为绿藻门、绿藻纲、石莼目、石莼科、石莼属, 其中缘管浒苔在我国也称为长石莼(*Ulva linza*), 本文沿用中文学名长石莼(缘管浒苔), 并用拉丁学名 *Ulva linza* 称谓。*Ulva linza* 是我国沿海常见的大型绿藻, 也是 2007—2008 年度黄海海域漂浮绿藻种类之一。国外已获得微型绿藻 *Chlamydomonas reinhardtii* 和 *Euglena gracilis* 等 *rbcL* 完整基因序列(Dron *et al*, 1982; Ginrich *et al*, 1985), 但在浒苔等大型绿藻中还未见报道。为此, 作者特选取 *Ulva linza* 为材料, 对其 Rubisco 大亚基全长基因进行了克隆测序和启动子分析, 为今后研究浒苔快速生长分子机制、海洋富营养化生态修复以及绿潮的有效控制等方面研究奠定一定理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料与藻体培养

本实验所用藻类 *Ulva linza* 采自江苏如东吕泗海区。经过清洗去除杂藻后, 在 0.2% KI 溶液内处理 10min, 再用消毒过的自然海水将其冲洗干净, 暂养于室内。经过诱导培养使其放散孢子并形成小苗, 然后在显微镜下分离单个小苗进行单株培养并保存, 编号为 YCQ01—20。选取株系 YCQ19 在光照强度为 35—45 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 、温度为 18 $^{\circ}\text{C}$ 、光周期为 12L: 12D 等条件下充气培养, 每隔 4—5 天更新藻体培养液(何

培民等, 2005)。

1.2 *Ulva linza* 基因组 DNA 与总 RNA 的提取

Ulva linza 基因组 DNA 的提取采用 CTAB 法。取新鲜藻体, 用液氮充分研磨成粉状。分装于 1.5ml 管中, 加入 0.5ml 裂解液(10mmol/L Tris, 100mmol/L EDTA, 1% SDS, 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 蛋白酶 K), 剧烈摇动, 55 $^{\circ}\text{C}$ 温育过夜。具体方法参考(Sambrook *et al*, 1989)。

Ulva linza 总 RNA 的提取采用 Trizol 试剂(Invitrogen, 美国), 提取方法按照其说明书进行。得到的总 RNA 溶于经 DEPC 处理的水中, 放入 -70 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存(Sambrook *et al*, 1989)。

1.3 *Ulva linza rbcL* 部分 DNA 序列与 cDNA 序列的克隆

1.3.1 *Ulva linza rbcL* 部分 DNA 序列的克隆 利用 *rbcL* 基因在进化中高度保守的特点, 根据 GenBank 上已收录的 *Ulva linza* 近缘绿藻 *rbcL* 序列资料(*Ulva linza*- AB097620、*Ulva procera*- AY422562、*Ulva prolifera*- AY422554), 设计一对引物(引物由上海生工生物工程技术有限公司合成):

正向引物 *rbcF1*: 5'-GGTGTAAAAGATTACCG TTTAACTT-3';

反向引物 *rbcR2*: 5'-GTGAATACCACCTGAAGC TACAGG-3'。

以基因组 DNA 为模板, PCR 扩增 *Ulva linza rbcL* 大片段 DNA 序列。PCR 程序为: 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 3min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 30s, 57 $^{\circ}\text{C}$ 30s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 1min 进行 30 个循环; 最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 5min。得到的 PCR 产物送 TaKaRa 公司进行 TA 克隆及测序。

1.3.2 *Ulva linza rbcL* 部分 cDNA 序列的克隆 应用 RT-PCR 方法克隆 *Ulva linza rbcL* 大片段 cDNA 序列。首先采用反转录试剂盒 FIRST STRAND cDNA SYNTHESIS KIT I(Bio Basic Inc, 加拿大)并按照其说明书步骤合成 cDNA。以适量总 RNA 为模板, Oligo (dT)为引物, 合成第一链 cDNA。反转录产物于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

以 cDNA 为模板, 进行 PCR 扩增。引物及 PCR 程序与扩增 *Ulva linza rbcL* 大片段 DNA 序列的引物及 PCR 程序相同。得到的 PCR 产物送 TaKaRa 公司进行 TA 克隆及测序。

1.4 *Ulva linza rbcL* 5'端上游序列与 3'端下游序列的克隆

采用限制性内切酶 XbaI 对 *Ulva linza* 基因组 DNA 酶切, 构建酶切文库。根据基因步移(gene walking)技术原理, 使用 TaKaRa LA PCR *in vitro*

Cloning Kit (TaKaRa)克隆 *rbcL* 5'端上游序列, 利用已知 *Ulva linza rbcL* 部分基因序列在其 5'端附近设计 2 个反向引物:

RbcLR1: 5'-AACCATCAGTCCATACAGTTG-3';

RbcLR2: 5'-CAGTCCATACAGTTGTCCAAG-3';

克隆得到的 PCR 产物送 TaKaRa 公司进行 TA 克隆及测序。

rbcL 3'端下游序列的克隆与 5'端上游序列的克隆相似, 选取 XbaI 酶切文库, 使用 TaKaRa LA PCR *in vitro* Cloning Kit (TaKaRa)克隆 *rbcL* 3'端下游序列, 利用已知 *Ulva linza rbcL* 部分基因序列在其 3'端附近设计 2 个正向引物:

RbcLF1: 5'-GCTCATTCTGTCGTGCTAGTG-3'

RbcLF2: 5'-TGTCGTGCTAGTGGATTATTATTAC-3'

克隆得到的 PCR 产物送 TaKaRa 公司进行 TA 克隆及测序。

1.5 全长基因的获得与密码子偏好性分析

采用分子生物学软件 DNAMAN(LynnonBiosoft 公司, 美国)对三个序列的测序结果进行拼接, 推断 *Ulva linza rbcL* 全长基因序列, 根据得到的基因序列对 5'上游启动子序列及 3'下游转录终止序列进行了预测分析并推断出蛋白质序列。

采用 SMS 软件(<http://www.bioinformatics.org/sms/>)对 *Ulva linza rbcL* 基因的编码区进行密码子偏好性分析。

2 结果与分析

2.1 *Ulva linza* 基因组 DNA 与总 RNA 提取

Ulva linza 基因组 DNA 和总 RNA 电泳结果见图 1。图 1(左)显示提取的 *Ulva linza* 基因组 DNA 完整, 大小略大于 21kb, 图 1(右)清晰显示 28S、18S 及 5.8S RNA 条带, 表明提取的 *Ulva linza* 基因组 DNA 和总 RNA 符合实验要求。

2.2 *Ulva linza rbcL* 大片段 DNA 序列及 cDNA 序列克隆与分析

以 DNA 和 cDNA 为模板分别扩增到一条 *rbcL* 大片段特异条带, 且两个条带大小相同, 均约为 1.2kb(图 2 左)。

分别对这两个 PCR 产物进行 TA 克隆和测序, 结果表明这两个序列大小均为 1101bp。用 DNAMAN 对这两个序列的测序结果进行比对, 发现这两个序列完全相同, 表明克隆得到的 *rbcL* 大片段序列中没有内含子。

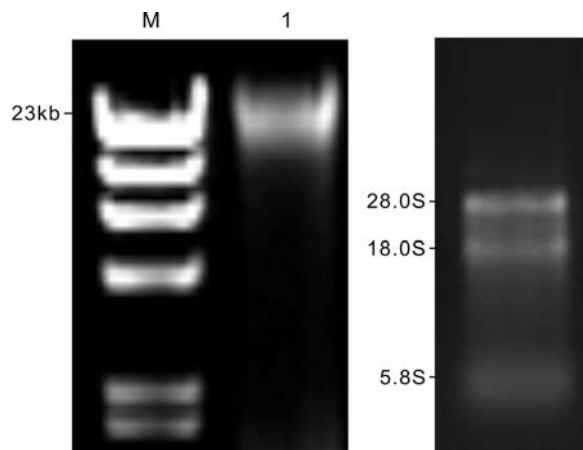


图 1 *U. linza* 基因组 DNA 电泳图谱和总 RNA 电泳图谱

Fig.1 Electrophoresis image of genomic DNA and total RNA extracted from *U. linza*

左图: 基因组 DNA 电泳图谱, 右图: 总 RNA 电泳图谱。M: 标准 Marker; 1: *U. linza* 基因组 DNA

用该序列在 NCBI 上进行 BLAST 同源性搜索, 结果表明: 所得相似基因均为 *rbcL* 基因且与多个石莼科和浒苔属的近缘绿藻叶绿体 *rbcL* 基因序列高度同源, 同源性为 95%—99%。可以初步断定克隆得到的该序列为 *Ulva linza rbcL* 基因序列。

2.3 *Ulva linza rbcL* 5'端上游序列及 *rbcL* 3'端下游序列的克隆与分析

使用 TaKaRa LA PCR *in vitro* Cloning Kit (TaKaRa)克隆 *rbcL* 5'端上游序列, 得到一个略小于 500bp 的特异的扩增条带(图 2 右)。PCR 产物经 TA 克隆并测序, 最终获得 *rbcL* 5'端上游序列 474bp。

使用 TaKaRa LA PCR *in vitro* Cloning Kit (TaKaRa)克隆 *rbcL* 3'端下游序列, 获得一个约 1100bp

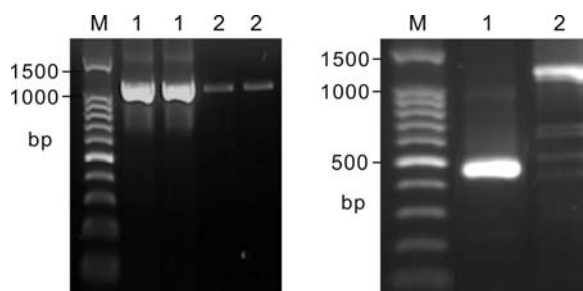


图 2 部分 *rbcL* 基因 DNA 和 cDNA 的 PCR 产物电泳图谱(左)

以及 5'上游序列和 3'下游序列 PCR 扩增产物电泳图谱(右)

Fig.2 Electrophoresis image of PCR amplified partial *rbcL* DNA product and cDNA product (left), and PCR amplification products of 5' upstream sequence and 3' downstream sequence (right)

M: 标准 Marker。左图: 1 为 *U. linza* 部分 *rbcL* 基因 DNA 的 PCR 产物, 2 为 *rbcL* 基因 cDNA 的 PCR 产物。右图: 1 为 5'上游序列的 PCR 产物; 2 为 3'下游序列的 PCR 产物

性。在 *Ulva linza rbcL* 基因中(表 1), 密码子第三位核苷酸碱基为 A 和 T 的密码子 1/1000 值相加达到 835.8, 由此可见在 *Ulva linza rbcL* 基因中密码子第三位碱基使用偏向 A 和 T。此外, 在 *Ulva linza rbcL* 基因中 GGT、GAA、GCT、ATT、TTA 及 CGT 使用频率较高, 其各自的 1/1000 值均超过 50, 而编码 Gly 的 GGG, 编码 Val 的 GTG、GTC, 编码 Arg 的 AGG、AGA、CGG、CGC, 编码 Lys 的 AAG, 编码 Ile 的 ATA、ATC, 编码 Thr 的 ACC, 编码 Leu 的 TTG、CTG、CTA、CTC

和编码 Pro 的 CCC 在该基因序列中没有出现(表 1)。

3 讨论

rbcL 基因是与光合作用调控有关的基因, 该基因编码蛋白 Rubisco 为光合作用第一关键酶, 对植物光合速率及生长速度具有重要作用。因此, *rbcL* 基因备受人们的关注。本文报道的 *Ulva linza rbcL* 基因全序列是大型石莼科海藻中第一个被克隆分离的完整的 *rbcL* 基因序列。本文除了得到了 *Ulva linza rbcL*

表 1 *U. linza rbcL* 基因密码子偏好性
Tab.1 Usage rate of codons in *U. linza rbcL* gene

氨基酸	密码子	次数	1/1000	频率	氨基酸	密码子	次数	1/1000	频率
Gly	GGG	0	0	0	Trp	TGG	8	16.84	1
Gly	GGA	10	21.05	0.2	End	TGA	0	0	0
Gly	GGT	39	82.11	0.78	Cys	TGT	9	18.95	1
Gly	GGC	1	2.11	0.02	Cys	TGC	0	0	0
Glu	GAG	2	4.21	0.06	End	TAG	0	0	0
Glu	GAA	29	61.05	0.94	End	TAA	1	2.11	1
Asp	GAT	19	40	0.61	Tyr	TAT	10	21.05	0.56
Asp	GAC	12	25.26	0.39	Tyr	TAC	8	16.84	0.44
Val	GTG	0	0	0	Leu	TTG	0	0	0
Val	GTA	12	25.26	0.46	Leu	TTA	38	80	0.95
Val	GTT	14	29.47	0.54	Phe	TTT	13	27.37	0.62
Val	GTC	0	0	0	Phe	TTC	8	16.84	0.38
Ala	GCG	3	6.32	0.07	Ser	TCG	0	0	0
Ala	GCA	12	25.26	0.26	Ser	TCA	10	21.05	0.56
Ala	GCT	30	63.16	0.65	Ser	TCT	4	8.42	0.22
Ala	GCC	1	2.11	0.02	Ser	TCC	0	0	0
Arg	AGG	0	0	0	Arg	CGG	0	0	0
Arg	AGA	0	0	0	Arg	CGA	3	6.32	0.1
Ser	AGT	4	8.42	0.22	Arg	CGT	26	54.74	0.9
Ser	AGC	0	0	0	Arg	CGC	0	0	0
Lys	AAG	0	0	0	Gln	CAG	2	4.21	0.15
Lys	AAA	21	44.21	1	Gln	CAA	11	23.16	0.85
Asn	AAT	3	6.32	0.25	His	CAT	6	12.63	0.43
Asn	AAC	9	18.95	0.75	His	CAC	8	16.84	0.57
Met	ATG	11	23.16	1	Leu	CTG	0	0	0
Ile	ATA	0	0	0	Leu	CTA	0	0	0
Ile	ATT	24	50.53	1	Leu	CTT	2	4.21	0.05
Ile	ATC	0	0	0	Leu	CTC	0	0	0
Thr	ACG	2	4.21	0.06	Pro	CCG	3	6.32	0.15
Thr	ACA	15	31.58	0.47	Pro	CCA	10	21.05	0.50
Thr	ACT	15	31.58	0.47	Pro	CCT	7	14.74	0.35
Thr	ACC	0	0	0	Pro	CCC	0	0	0

注: 1/1000 值表示在整个序列中该密码子出现次数的千分比

基因完整的 ORF 以外, 还分别获得了该基因 5'端上游及 3'端下游两侧的调控序列。目前在绿藻中, 已有许多关于绿藻叶绿体 *rbcL* 基因序列的报道, 但是这些序列绝大多数都是通过使用通用引物扩增得到的, 只是 *rbcL* 全长基因中的一个大片段; 而另一些已报道的绿藻 *rbcL* 基因全长序列通常只包含完整的编码区序列, 缺少关于 3'和 5'非翻译区的信息, 并且这些测定的全长序列均属于小球藻、裸藻、衣藻等微藻, 在像浒苔这样的大型海藻中, 还没有关于完整的 *rbcL* 序列的报道。

浒苔属海藻具有生存生态幅较宽、生长速率较快的特点(王建伟等, 2007; Dan *et al*, 2003)。对条浒苔(*E. clathrata*)的生长研究实验表明条浒苔的最大日生长率可以达到 92.94% (张寒野等, 2006)。近年来由于海洋富营养化现象越来越严重, 以浒苔和石莼等大型绿藻形成的绿潮发生的频率不断增加, 特别是在 2007 年和 2008 年, 我国青岛等黄海沿海暴发了绿潮现象, 其规模之大且速度之快令人震惊, 并造成了较大灾害。浒苔类海藻较宽的生态幅和较快的生长率为浒苔绿潮的暴发提供了必要的生物学条件。何培民等(2004)曾对条浒苔 Rubisco 初始活性和总活性进行了研究, 发现条浒苔 Rubisco 活化率很高(高达 77.62%), 而紫菜 Rubisco 活化率仅为条浒苔的一半。此外, 何培民等(2004)的研究还表明条浒苔光合作用光补偿点较低, 且具有较高的光合作用速率。由此可见浒苔属海藻生长速率较快、光合作用速率较高可能与其 Rubisco 活化率较高有一定的关系。本文以 *Ulva linza* Rubisco 大亚基基因 *rbcL* 为研究对象, 报道了 *Ulva linza* *rbcL* 基因全序列, 并对序列进行了较为详尽的分析, 为进一步揭示浒苔 Rubisco 高活化率以及快速生长分子机制奠定一定基础。

高等植物叶绿体 DNA 的内含子主要在 tRNA 基因中发现, 很少在蛋白质结构基因中发现, 到目前为止, 所有已被测序的高等植物 *rbcL* 基因都是连续的, 即无内含子, 长约 1.4kb (Siemeister *et al*, 1990), 但在绿藻中却发现大量的蛋白质结构基因也存在有内含子。本文报道的 *Ulva linza* *rbcL* 基因全序列的编码区中也没有内含子, 这与已测定的一些绿藻的 *rbcL* 基因有所不同。Kono 等(1991)报道了绿藻 *Bryopsis maxima* 的 *rbcL* 基因全序列, 并发现该序列含有一个 2467bp 的内含子; Ginrich 等(1985)也报道了绿藻 *Euglena gracilis* 含有 9 个内含子, 此外, 在绿藻 *Pleodorina californica* *rbcL* 序列中也发现存在 1320

bp 内含子, *Gonium multicoccum* (Volvocales) *rbcL* 中发现有一个 549bp 内含子和一个 295bp 内含子 (Nozaki *et al*, 2002)。本文报道的 *Ulva linza* *rbcL* 基因编码区为单外显子。

从 *Ulva linza* *rbcL* 基因编码区的密码子偏好性分析结果中可以看出, *Ulva linza* *rbcL* 基因偏向使用第三位核苷酸碱基为 A 和 T 的密码子。这与已报道的绿藻 *Dunaliella salina*、*Chlamydomonas reinhardtii* 和 *Euglena gracilis* 以及其它高等植物的 *rbcL* 基因密码子的偏好性是一致的(Dron *et al*, 1982; Ginrich *et al*, 1985; Chai *et al*, 2007)。有研究表明: 叶绿体基因在核苷酸使用上有偏向性, 其密码子的第三位往往是 A 或者 T(达 69%)。另外, 基因的间隔区(Spacer)中 A、T 含量也比较高, 因而造成高等植物 cp DNA 的密度略高于核 DNA(Nozaki *et al*, 2002)。

人们对 *rbcL* 基因表达调控的研究有着浓厚的兴趣, 因为它的表达受到光的调控, 而且在 C4 植物中其表达是细胞特异性的。不同的 *rbcL* 基因的侧翼区序列的比较分析对于揭示调控其表达的顺式元件有重要作用, *rbcL* 基因启动区的阐明正是通过比较分析这一高度保守的区域, 然后通过叶绿体体外转录体系确定的(Eisermann *et al*, 1990; Gruissem *et al*, 1985; Hanley-Bowdoin, 1989; Manen *et al*, 1994)。目前在绿藻中, 对于 *Chlamydomonas reinhardtii* *rbcL* 基因的启动子研究的比较充分。Klein 等(1992)通过体外转录实验确定了 *Chlamydomonas reinhardtii* 的 *rbcL* 基因启动子序列(-10 区为 TATAATAT, -35 区为 TTTACA)。此外, Kono 等(1991)报道了绿藻 *Bryopsis maxima* 的 *rbcL* 基因全序列, 并推断出启动子序列(-10 区为 TACAAT, -35 区为 TTGGTT)。本文推断的 *Ulva linza* *rbcL* 基因的启动子序列表现出类似原核生物相应启动子元件的结构特征, 与原核生物保守区相比仅相差一个核苷酸(图 3), 与 *Bryopsis maxima* 以及 *Chlamydomonas reinhardtii* 的 *rbcL* 基因启动子序列有一些不同; 此外, *Chlamydomonas reinhardtii* 的 *rbcL* 基因启动子 -10 区为一个 TATAATAT 的回文结构(Klein *et al*, 1992), 而在 *Ulva linza* *rbcL* 基因的启动子序列中未发现这样的序列结构。

迄今为止, 有关叶绿体基因 mRNA 3'非翻译区在基因表达调控中的作用研究, 主要都集中于反向重复序列形成的茎环结构上, 其主要原因在于该结构存在于绝大多数质体基因 mRNA 3'非翻译区中, 并且已有不少研究证明, 它对叶绿体基因表达的调控

具有不可忽视的作用(钟珍萍等, 1995)。*Ulva linza* *rbcL* 基因 3'非翻译区含有一个富含 A 和 T 的回文序列, 可以形成一个 22bp 的茎结构。有研究表明, 衣藻 *rbcL* 基因 3'非翻译区的茎环结构为转录终止子(Dron *et al*, 1982)。在绿藻 *Bryopsis maxima* 的 *rbcL* 基因的 3'非翻译区中也发现了一个 46bp 的回文序列, 并推测为转录终止序列(Kono *et al*, 1991)。作者推测 *Ulva linza* *rbcL* 基因 3'非翻译区的茎结构同样为转录终止序列。然而, 3'反向重复区可能在表达调控上有重要作用, 在一些基因中 3'反向重复区为转录终止子, 但是 Stern 等(1987)报道叶绿体基因的 3'反向重复区却是在 mRNA 的加工和稳定性方面起作用。叶绿体基因 3'末端对基因表达的调控作用正越来越引起人们的注意, 这方面的研究有所进展但仍显初步, 有必要从深度和广度上进一步揭示其调控基因表达的分子机制。

参 考 文 献

- 丁兰平, 栾日孝, 2009. 浒苔(*Enteromorpha prolifera*)的分类鉴定、生境习性及其分布. 海洋与湖沼, 40(1): 68—71
- 王建伟, 阎斌伦, 林阿朋等, 2007. 浒苔(*Enteromorpha prolifera*)生长及孢子释放的生态因子研究. 海洋通报, 26(2): 60—65
- 邱德文, 杜江, 夏同珩, 2006. 中华本草. 北京: 中国古籍出版社: 472
- 何培民, 尹顺吉, 吴庆磊等, 2005. 藻类 CCM 分子生物学研究进展. 海洋科学, 29(3): 71—75
- 何培民, 吴庆磊, 吴维宁等, 2004. 条浒苔蛋白核超微结构和 Rubisco 及其活化酶分子定位. 水产学报, 28(3): 255—260
- 张寒野, 吴望星, 宋丽珍等, 2006. 条浒苔海区试栽培及外界因子对藻体生长影响. 中国水产科学, 13(5): 781—786
- 林文庭, 2007. 浅论浒苔的开发与利用. 中国食物与营养, 9: 23—25
- 钟珍萍, 吴乃虎, 1995. 叶绿体基因 mRNA 3'UTR 的功能. 生物工程进展, 15(2): 18—22
- 徐姗姗, 何培民, 2006. 我国赤潮频发现象分析与海藻栽培生物修复作用. 水产学报, 30(4): 1—9
- Chai Y R, Sun Y, Pan W D *et al*, 2007. Isolation and characterization of *rbcL* gene from *Dunaliella salina*. Life Science Journal, 4(1): 6—12
- Dan A, Hiraoka M, Ohno M *et al*, 2003. Observations on the effect of salinity and photon fluence rate on the induction of sporulation and rhizoid formation in the green alga *Enteromorpha prolifera* (Müller) J. Agardh (Chlorophyta, Ulvales). Fisheries Science, 68: 1182—1188
- Dron M, Rahire M, Rochaix J D, 1982. Sequence of the chloroplast DNA region of *Chlamydomonas reinhardtii* containing the gene of the large subunit of ribulose biphosphate carboxylase and parts of its flanking genes. Journal of Molecular Biology, 162: 775—793
- Eisermann A, Link G, 1990. *In vitro* transcription and DNA binding characteristics of chloroplast and etioplast extracts from mustard indicate differential usage of the *psbA* promoter. EMBO J, 9: 3981—3987
- Fletcher R L, 1996. The occurrence of 'green tides': a review. In: Schramm W, Nienhuis P H ed. Marine benthic vegetation: recent changes and the effects of eutrophication. Springer, Berlin, Germany, 7—43
- Ginrich J C, Hallick R B, 1985. The *Euglena gracilis* chloroplast ribulose-1, 5-bisphosphate carboxylase gene. II. The spliced mRNA and its product. J Biol Chem, 260: 16162—16168
- Gruissem W, Lurawoki G, 1985. Analysis of promoter regions for the spinach chloroplast *rbcL*, *atpH* and *psbA* genes. EMBO J, 4: 3375—3383
- Hanley-Bowdoin L, 1989. Chloroplast promoters. Trends in Biochemical Sciences (TiBS), 12: 67—70
- Hernandez I G, Peralta J L, Perezllorens J J *et al*, 1997. Biomass and dynamics of growth of *Ulva* species in Palmones River Estuary. Journal of Phycology, 33: 764—772
- Klein U, James D, Bogorad L, 1992. Two types of chloroplast gene promoters in *Chlamydomonas reinhardtii*. Proc Natl Acad Sci USA, 89: 3453—3457
- Kono M, Satoh H, Okabe Y, 1991. Nucleotide sequence of the large subunit of the ribulose-1, 5-bisphosphate carboxylase/oxygenase from the green alga *Bryopsis maxima*. Plant Mol Biol, 17: 505—508
- Malta E, Draisma S G A, Kamermans P, 1999. Free-floating *Ulva* in the southwest Netherlands: species or morphotypes? A morphological, molecular and ecological comparison. European Journal of Phycology, 34(4): 443—454
- Manen J F, Savolainen V, Simon P, 1994. The *atpB* and *rbcL* promoters in plastid DNAs of a wide dicot range. J Mol Evol, 1994, 38: 577—582
- McIntosh L, Poulsen C, Bogorad L, 1980. Chloroplast gene sequence for the large subunit of ribulose bisphosphate- carboxylase of maize. Nature, 288: 556—560
- Morand P, Briand X, 1996. Excessive growth of macroalgae: a symptom of environmental disturbance. Botanica Marina, 39: 491—516
- Nozaki H, Takahara M, Nakazawa A *et al*, 2002. Evolution of *rbcL* group IA introns and intron open reading frames within the colonial Volvocales (Chlorophyceae). J Mol Evol, 23: 326—338
- Ohno M, Werlinger C, Shimada S *et al*, 2001. A 'green tide' problem caused by *Enteromorpha* spp. Dichato, Chile. Proceedings of the 17th International Seaweed Symposium, 781—1164
- Olmstead R G, Palmer J D, 1994. Chloroplast DNA systematics: A review of methods and data analysis. Ame J Bot, 81(9): 1205—1224
- Raffaelli D G, Raven J A, Poole L J, 1998. Ecological impact of

- green macroalgal blooms. *Oceanography and Marine Biology: An Annual Review*, 36: 97—125
- Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T, 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 208—212
- Santelices B, Paya I, 1989. Digestion survival of algae: some ecological comparisons between free spores and propagules in felleths. *Journal of Phycology*, 25: 693—699
- Shimada S, Hiraoka M, Nabata S *et al*, 2003. Molecular phylogenetic analyses of the Japanese *Ulva* and *Enteromorpha* (Ulvales, Ulvophyceae), with special reference to the free-floating *Ulva*. *Phycological Research*, 51(2): 99—108
- Shinozaki K, Sugiura M, 1982. The nucleotide sequence of the tobacco chloroplast gene for the large subunit of ribulose-1, 5-bisphosphate carboxylase/oxygenase. *Gene*, 20: 91—102
- Siemeister G, Hachtel W, 1990. Structure and expression of a gene encoding the large subunit of ribulose-1, 5-bisphosphate carboxylase (*rbcL*) in the colourless euglenoid flagellate *Astasia longa*. *Plant Mol Biol*, 14: 825—833
- Stern D B, Gruissem W, 1987. Control of plastid gene expression: 3'inverted repeats act as process and stability elements, but do not terminate transcription. *Cell*, 51: 1145—1157

CLONING AND SEQUENCE ANALYSIS OF THE FULL-LENGTH *rbcL* GENE FROM *ULVA LINZA*

YING Cheng-Qi^{1,2}, CAI Chun-Er¹, YIN Shun-Ji¹, XU Ren³, LIN Sen-Jie⁴,
ZHOU Zhi-Gang¹, MA Jia-Hai¹, HE Pei-Min¹

(1. Aquatic Genetic Resources & Aquacultural Ecology Key Lab of the Ministry of Agriculture, Shanghai Ocean University, Shanghai, 201306; 2. Research Center for Saline Fisheries Technology, East China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Shanghai, 200090; 3. East Sea Department of State Oceanic Administration, People's Republic of China, Shanghai, 200137; 4. Department of Marine Sciences, University of Connecticut, Groton, CT 06340, USA)

Abstract The full-length DNA sequence of Rubisco, the first key enzyme of photosynthesis in *Ulva linza* was cloned. Firstly, partial *rbcL* DNA and cDNA sequence both with 1101bp in size were obtained using PCR and RT-PCR technology, respectively, and both of their PCR products were sequenced and analyzed. The partial *rbcL* DNA sequence was the same as the *rbcL* cDNA sequence, indicating there is no intron in the partial *rbcL* DNA sequence. In addition, gene walking technology was used to clone the 5' upstream sequence and the 3' downstream sequence. The sizes of the cloned sequences at 5' upstream and 3' downstream were 474bp and 1053bp, respectively. Based on these three cloned sequences, a full-length DNA sequence of 2124bp was acquired (NCBI accession number: DQ813497), which includes a coding sequence of 1425bp, encoding 474 amino acids. The 5' upstream sequence is 225bp and includes a putative promoter between -56bp—95bp upstream the ATG codon. The 474bp long downstream sequence contains a long palindrome sequence locating between 54—98bp downstream from the termination codon and being capable of forming a 22bp stem. Codon preference analysis performed with the SMS software indicates that codons with the third base being A or T are in preference in the *rbcL* gene in *Ulva linza*.

Key words *rbcL*, *Ulva linza*, Full-length sequence, Gene walking