

铜绿微囊藻 *Microcystis aeruginosa* PCC7820 生物钟基因的克隆及其蛋白相互作用分析^①

徐 虹^② 郑锦乾 吴韩志

(厦门大学生命科学学院细胞生物学与肿瘤细胞工程教育部重点实验室 厦门 361005)

摘 要 为了深入研究铜绿微囊藻生物钟调控的分子机制,根据蓝藻钟基因的同源序列设计合成了简并引物,通过 PCR 和染色体步行的方法获得了铜绿微藻 *Microcystis aeruginosa* PCC7820 的生物钟基因簇 *kaiABC*。*kaiA* 基因全长 873bp,编码一个由 290 $\alpha\alpha$ 组成,分子量大小为 33.3kDa 的蛋白;*kaiB* 基因全长 315bp,编码分子量大小为 11.8kDa 的蛋白;*kaiC* 基因全长 1563 bp,编码蛋白分子量大小为 58.3kDa。Kai 蛋白间的相互作用是昼夜节律计时产生的重要过程,利用酵母双杂交系统检测了三种 Kai 蛋白间的相互作用,结果表明 KaiA、KaiB 和 KaiC 蛋白自身及 KaiA 与 KaiC、KaiB 与 KaiC 之间都能发生明显的相互作用,而 KaiB 和 KaiA 之间没有检测到相互作用。

关键词 铜绿微囊藻,生物钟基因,染色体步移,酵母双杂交

0 引 言

蓝藻是具有昼夜节律的最简单生物,其固氮作用、呼吸作用、光合作用、氨基酸吸收、细胞分裂以及基因表达等生理代谢过程都受到生物钟的调控,具有昼夜节律性^[1,2]。Kondo 等最早对蓝藻生物钟进行了遗传研究,他们通过 EMS 突变和荧光素酶检测体系获得了聚球藻 *Synechococcus* sp. PCC7942 的许多生物钟突变体^[3-5]。通过对这些钟突变体的研究,克隆了第一个蓝藻生物钟基因 *kaiABC*,该基因是一个基因簇,由 *kaiA*、*kaiB* 和 *kaiC* 三个基因构成。这三个基因是维持聚球藻生理节律所必需的,缺失任何一个都会扰乱正常的昼夜节律,它们的突变能导致聚球藻正常生物钟周期(24~25h)的缩短(16h)或延长(60h),甚至节律的消失^[6]。它们的表达产物 Kai 蛋白构成了生物钟的核心——中央振荡器,其中 KaiC 蛋白的磷酸化状态是中央振荡器产生周期性振荡的关键,它通过引发多聚钟蛋白复合物(也称周期体,periodosome)的定时形成和解聚来决定中央振荡器的时相,产生生物钟的昼夜计时信号,而 KaiC 的磷酸化状态则受到 KaiA 和 KaiB 的正、负调节^[7,8]。铜绿微囊藻(*Microcystis aeruginosa*)属于蓝藻门微囊藻属,是水华的主要藻种之一,造成的生

态污染和危害很大,因此对其生长、代谢和生理进行研究,找出其内在规律,将有助于水华藻的生长动力学研究。有研究报道铜绿微囊藻的光合基因 *psbA* 的表达^[9]和微囊藻毒素的合成^[10]呈现明显的昼夜节律,可能受到生物钟的调控。而我们也通过反复多次实验发现,*Microcystis aeruginosa* PCC7820 的光合作用、ATP 代谢和细胞分裂等生理活动也具有明显的昼夜节律,表现为受生物钟调控的特性^[11]。因此,我们认为在 *M. aeruginosa* PCC7820 中也存在类似 *Synechococcus* PCC 7942 的生物钟。

为深入研究铜绿微囊藻生理代谢的生物钟调控机制,我们根据已知的蓝藻 *kai* 基因序列设计合成简并引物并扩增出了 *M. aeruginosa* PCC7820 的 *kai* 基因部分保守序列,然后通过染色体步移和序列拼接最终获得了 *M. aeruginosa* PCC7820 的生物钟基因簇 *kaiABC*,并利用酵母双杂交系统检测了三种 Kai 蛋白间的相互作用,这些研究将有助于铜绿微囊藻钟控调节机制的揭示。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 藻种和菌种:铜绿微囊藻 *Microcystis aerugi-*

① 国家自然科学基金(40306024)和福建省高等学校新世纪优秀人才支持计划资助项目。

② 女,1973 年生,副教授;研究方向:藻类生理与分子生物学;联系人,E-mail: xuhongxm@sohu.com
(收稿日期:2007-11-27)

nosa PCC7820 购自中科院水生生物研究所;大肠杆菌 *E. coli* DH5 α 由本实验室保存;酵母双杂交系统为 Clontech 公司产品,包括酵母菌株 AH109,质粒 pGBKT7、pGADT7、pGBKT7-53、pGBKT7-lam 和 pGADT7-T。

1.1.1.2 培养基

铜绿微囊藻培养使用 BG-11 培养基;酵母菌的继代培养和感受态细胞的制备使用 YPDA 培养基;自激活活性和相互作用研究使用二缺陷型酵母合成培养基(SD/-Leu/-Trp)和三缺陷型酵母合成培养基(SD/-Leu/-Trp/-His)。

1.1.1.3 引物:均由上海生工生物工程技术有限公司合成。

简并引物:

P1: 5'-ACIATGATIGARGGITTGAYGAIAT-3'

P2: 5'-GTRAAIGGRTAYTCIGGYTTCATRTG-3'

染色体步移引物:

U1: 5'-CGGGGAAGCATCGAGAATAA-3'

D1: 5'-GCAGTACGAAGCGGCATCAG-3'

D2: 5'-GACCACGGAACGTATCGAAG-3'

pUC 通用引物:

SO101: 5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3'

B0010: 5'-GTAAAACGACGGCCAGT-3'

接头引物:

接头长链:5'-CGGTAGAATTCCGCAGAACGAC-GGCCAG-3'

接头短链:5'-GATCCTGCGCGTCCAAGACGC-3'

接头引物:5'-CGGTAGAATTCCGCAGAAC-3'

1.2 方法

1.2.1 铜绿微囊染色体的提取

参照 Smoker 等^[12]的方法进行。

1.2.2 *kaiC* 部分保守序列扩增

以提取的铜绿微囊藻 DNA 为模板,用简并引物 P1 和 P2 进行 PCR 扩增,反应参数为 94℃ 预变性 7min;94℃ 45s,52℃ 45s,72℃ 90s,35 循环;72℃ 延伸 7min。扩增产物经电泳检测,4℃ 保存。

1.2.3 上游未知序列扩增

染色体 DNA 经 *Bam*HI 酶切 6h 后进行琼脂糖凝胶电泳,挖胶回收 2~5kb DNA 片段。质粒 pUC19 用 *Bam*HI 酶切后用小牛肠碱性磷酸酶(CIAP)处理,经酚:氯仿抽提以除去 CIAP,无水乙醇-20℃ 沉淀 2h,沉淀物分别经 70%乙醇和无水乙醇漂洗后用 100 μ L 无菌水溶解。将 CIAP 处理的线形载体 pUC19 与回收的染色体 DNA 片段进行过夜连接,连接产物转化

E. coli DH5 α ,经 Amp 平板筛选后,用 LB 培养液洗脱阳性克隆并提取质粒。以混合质粒为模板,染色体步移引物 U1 和载体通用引物 SO101(或 B0010)进行 PCR 扩增。

1.2.4 下游未知序列的扩增

在 10 μ L 反应体系中加入 2 μ L 接头短链,10U T4 Polynucleotide kinase,10mmol/L ATP 1 μ L,37℃ 保温 30min,70℃ 灭活 10min,加入 2 μ L 10X 退火 buffer,2 μ L 接头长链和 6 μ L 无菌水,65℃ 保温 10min,冷却到室温,得到双链接头。用 *Bam*HI 酶切 2 μ g 染色体 DNA 6h,70℃ 灭活 10min。取 2 μ L 接头和 10ng 酶切染色体 DNA,加入 10U T₄ DNA Ligase,16℃ 连接过夜。以连接产物为模板,染色体特异引物 D1 进行线性扩增,PCR 反应参数为 94℃ 预变性 7min;94℃ 45s,55℃ 60s,72℃ 120s,35 循环;72℃ 延伸 7min。取 1 μ L 线性扩增产物为模板,以接头引物和特异引物 D2 进行 PCR 扩增,循环参数为:94℃ 预变性 7min;94℃ 45s,60℃ 60s,72℃ 120s,35 循环;72℃ 延伸 7min。扩增产物用 0.8%的琼脂糖凝胶电泳检测。

1.2.5 酵母双杂交质粒的构建

按分子克隆常规方法构建酵母双杂交的质粒 pGBKT7-*kaiA*、pGBKT7-*kaiB*、pGBKT7-*kaiC* 和 pGADT7-*kaiA*、pGADT7-*kaiB*、pGADT7-*kaiC*^[13,14]。

1.2.6 酵母感受态细胞的制备

接种 AH109 单菌落至 1mL YPD 培养液中,振荡混匀后转入 10mL YPD 培养液中 30℃ 培养过夜(OD₆₀₀ > 1.5);将过夜培养物转入 100mL YPD 培养液中(OD₆₀₀ = 0.2~0.3),30℃ 摇培 3h (OD₆₀₀ = 0.5),以 4000r/min 离心收集菌体;用 30mL 无菌水重悬洗涤菌体一次,4000r/min 离心收集菌体;将菌体重悬在 1mL 1× TE/LiAc 溶液中,可立即转化或于 4℃ 保存。

1.2.7 转化感受态酵母细胞

取 100 μ L 感受态酵母菌,分别加入待转化质粒各 0.1 μ g 和鲑鱼精 DNA 100 μ g,混匀;加入 0.6mL PEG/LiAc 溶液,混匀后于 30℃ 摇培 30min;加入 70 μ L DMSO,于 42℃ 热击 15min,冰浴 1~2min;15000r/min 离心 5s,弃上清,菌体用 0.5mL YPD 重悬,取 100 μ L 转化混合物涂布合适的缺陷培养基平板,30℃ 培养 4~6 天至出现转化菌落。

1.2.8 HIS3 报告基因的表达检测

挑取酵母菌单克隆划线于 SD/-Leu/-Trp 二缺平板和 SD/-Leu/-Trp/-His/-Ade 四缺平板上,30℃ 培养 10 天,观察酵母菌的生长情况。

1.2.9 LacZ 报告基因的表达检测

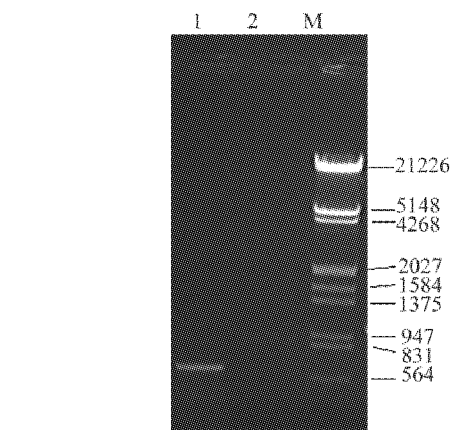
采用 β -半乳糖苷酶印迹法检测 LacZ 报告基因的表达^[13]。

2 结果

2.1 生物钟基因 *kaiABC* 的克隆

2.1.1 简并引物扩增 *kaiC* 基因部分保守序列

通过对已知基因同源序列的比对,发现蓝藻钟基因中 KaiC 的保守性最高,而 KaiA 的变异程度较大,因此我们针对 *kaiC* 的保守区设计合成一对简并引物,以铜绿微囊藻的染色体为模板进行 PCR 扩增,扩增产物经 0.8% 的琼脂糖凝胶电泳检测,结果扩增出一条约 600bp 大小的片段(图 1)。



1. PCR production 2. negative control (without temple DNA) M: λ DNA/*EcoRI* + *Hind* III

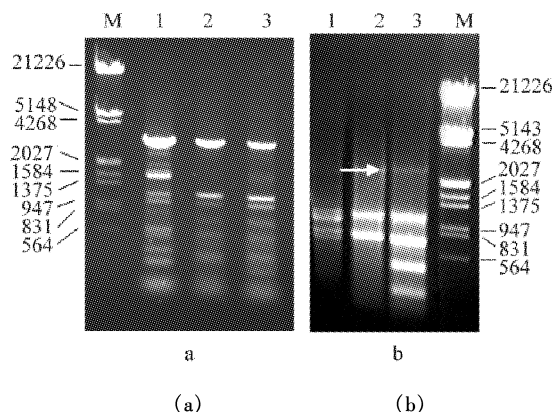
图 1 简并引物扩增检测

将该 PCR 产物连入 pMD18-T 载体后测序,并将所测定的序列在 NCBI 网站进行 blastn 检索,结果显示该序列与 *Cyanothece* sp. PCC 8801, *Synechocystis* sp. PCC 6803, *Nodularia* cf. *spumigena* strain IBASU-DS-13-00, *Nodularia* PCC73104, *Cylindrospermum* PCC7417, *Microcoleus chthonoplastes*, *Nostoc muscorum*, *Thermosynechococcus elongatus*, *Thermosynechococcus vulcanus*, *Synechococcus elongatus* BP-1, *Nostoc linckia*, *Calothrix parietina*, *Xenococcus* PCC7305, *Scytonema* PCC7110 等藻的 *kaiC* 基因有 79% 以上同源性。

为了获得 *kai* 基因簇的全部序列,我们根据所获得的这部分 *kaiC* 基因序列(命名为 *kai600*)分别设计合成了向上扩增和向下扩增的特异引物,希望能从基因组 DNA 中扩出 *kai* 基因簇的完整序列。

2.1.2 保守序列上游未知序列的扩增

在对 *kai* 保守片段上游未知序列的扩增上我们采取了将酶切后的染色体 DNA 插入到质粒载体,然后用保守序列的特异引物 U1 和质粒通用引物(SO101 或 B0010)来扩增未知序列的方法。结果用两组引物在不同退火温度下扩增出的条带数量和片段大小都不完全相同,即扩增的重复性和特异性较差(图 2)。



a: 特异引物 U1 和载体引物 SO101 的 PCR 扩增结果

b: 特异引物 U1 和载体引物 B0010 的 PCR 扩增结果

M: λ DNA/*EcoRI* + *Hind* III Marker

1-3:退火温度分别为 50℃, 60℃, 55℃ 时引物 U1 和载体引物的 PCR 扩增结果

图 2 *kai600* 上游序列的扩增

我们将两组引物所扩增的 DNA 片段分别连入 T-vector 测序,结果表明,许多片段都是载体单引物(SO101 或 B0010)或 U1 单引物非特异性扩增的结果。经过多次扩增和克隆测序,我们得到了一个插入了约 2800bp 扩增片段的克隆(图 2),其测出的核苷酸序列 3'端与 *kai600* 的 5'端有 214bp 重叠,可确定为 *kai600* 的上游序列,命名为 *kai-up*。对 *kai-up* 进行阅读框分析,发现该序列共包含了 4 个较大的阅读框(其中阅读框 1、2 为完整的阅读框,阅读框 3、4 为不完整的阅读框)(图 3)。将每个阅读框所推导的氨基酸序列在 NCBI 网站进行 Blastp 比对,结果表明,正链上的阅读框 1、阅读框 2 和阅读框 3 编码的氨基酸序列分别与多种蓝藻的 KaiA、KaiB、KaiC 蛋白的氨基酸序列具有很高的同源性,而负链上的阅读框 4 编码的则是一种功能还不确定的蓝藻蛋白。根据比对结果可知,我们克隆获得的 *kai-up* 片段含有 *kaiA* 和 *kaiB* 完整序列以及 *kaiC* 的上游序列。

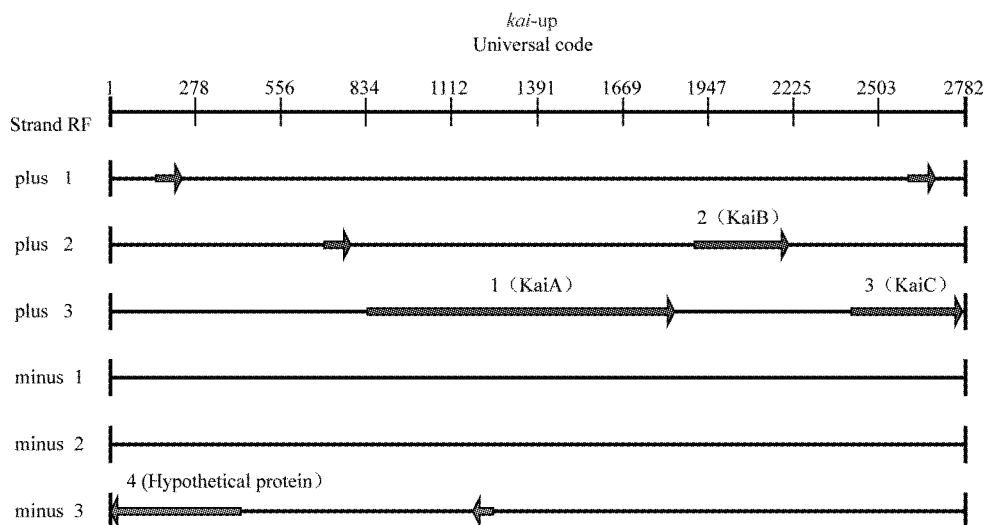


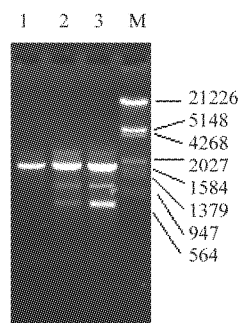
图 3 *kai-up* 阅读框分析

2.1.3 保守序列下游未知序列的扩增

由于在扩增上游未知序列时我们发现,依赖载体连接的扩增方法存在载体连接效率低或载体引物单引物扩增的问题,这无形中就大大增加了后续克隆分析的工作量,阻碍了实验进程。因此,在对下游未知序列的扩增上,我们则采用了将酶切后的 DNA 连上接头,然后用已知序列的特异引物和接头引物扩增未知序列的方法。由于接头引物处于接头的两个分叉单链上,序列与接头一样,只有与特异引物引导合成了接头的互补序列后,接头引物才能退火参与扩增,因而该方法能大大减少由接头引物单引物扩增而造成的干扰。

将酶切的染色体 DNA 片段加上接头,以加了接头的染色体 DNA 为模板,用引物 D1 进行线性扩增,然后以 D1 的线性扩增产物为模板,引物 D2 和接头引物共延伸出四条带,约 1600bp 的带在不同退火温度下都较稳定,而 700 bp、1100bp 和 2300bp 的带在高温退火时扩增较弱,可能是非特异扩增产物(图 4)。

我们将四条带都分别挖胶回收后进行克隆测序,结果证实 1600bp 的带 5'端与 *kai600* 的 3'端有 150bp 重叠,这说明延伸的序列是与 *kai600* 相邻的下游序列,命名为 *kai-down*。将该序列进行 Blastn 比对,结果显示该序列与 *Synechococcus* sp. PCC 7002、*Synechococcus elongatus*、*Cyanothece* sp. PCC 8801、*Thermosynechococcus vulcanus*、*Nostoc cycadae* 和 *Acaryochloris marina* 等蓝藻的 *kaiC* 下游序列同源性高达 80% 以上,而推导的氨基酸序列同源性则高达 90% 以上。



M: λDNA/*EcoRI* + *Hind* III

1,2,3: 引物 D2 和接头引物的扩增产物(退火温度分别为 .60℃、55℃和 50℃)

图 4 *kai600* 下游序列的扩增

2.2 基因 *kaiABC* 序列分析

将扩增出的 *kai600*、*kai-down* 和 *kai-up* DNA 片段进行序列拼接,得到了包含 *kaiA*、*kaiB* 和 *kaiC* 基因在内的完整 *kaiABC* 基因簇 (Genbank accession number: DQ156152)。

根据阅读框分析可知, *Microcystis aeruginosa* PCC7820 的 *kaiA* 基因由 873 bp 组成,编码的 KaiA 蛋白由 290 个氨基酸组成,分子量为 33.3kDa, pI = 4.60; *kaiB* 基因由 315 bp 组成,编码的 KaiB 蛋白由 104 个氨基酸组成,分子量为 11.8kDa, pI = 6.88; *kaiC* 基因由 1563 bp 组成,编码的 KaiC 蛋白由 520 个氨基酸组成,分子量大小为 58.3kDa, pI = 6.22。

对三种 Kai 蛋白的氨基酸序列分别进行分析,结果在 KaiA 和 KaiB 蛋白中除了发现几种激酶的磷酸化位点外,再没有发现其它的保守基序。而 KaiC 蛋白则发现由 N-端和 C-端两个相似的结构域构成,

在这两个结构域中对称的分布着以下几种保守的氨基酸序列:(1) 在 47-54(GtsgtGKT)和 289-296(Gatgt-GKT)位上各具有一个能结合 ATP 的 Walker's A 基序(或 P-Loop motif);(2) 在 142-147(lvsID)、375-379(riaID)位上各具有一个不完整的 Walker's B 基序;(3) 在 78 和 319 位上分别具有 ATP 结合蛋白所必需的羧化谷氨酰胺残基⁷⁸E 和³¹⁹E;(4) 在 N-端的 69-72(DypG)和 112-115(DpeG)位上还具有两个 GTPase 保守的 DXXG 基序。另外,与 KaiC 高度磷酸化的特性保持一致的是,在 KaiC 蛋白中还发现了多种激酶的磷酸化位点,其中包括 9 个酪蛋白激酶 II(casein kinase II, CKII)的磷酸化位点、5 个蛋白激酶 C(protein kinase C, PKC)的磷酸化位点和 1 个 cAMP/cGMP 依赖型蛋白激酶的磷酸化位点。保守结构域搜索表明,KaiC 蛋白与细菌重组酶和解旋酶具有高度同源性,可能属于 RecA/DnaB 超家族成员。

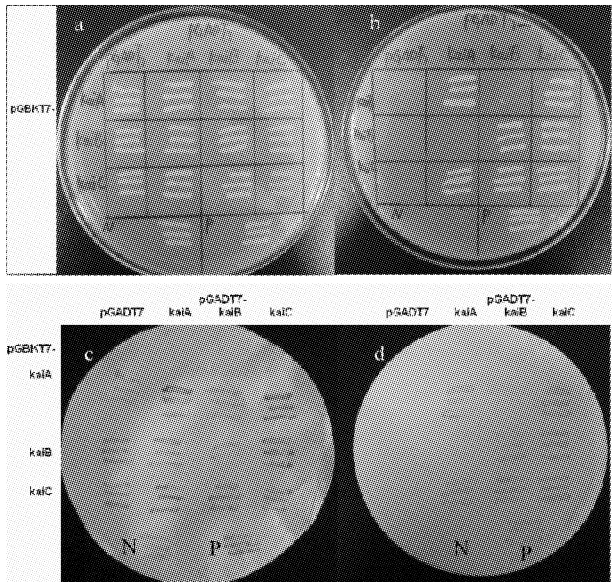
2.3 Kai 蛋白相互作用分析

Kai 蛋白间的相互作用是聚球藻 *Synechococcus*

PCC 7942 生物钟产生计时信号的关键所在,为了检验铜绿微囊藻 KaiA、KaiB、KaiC 三种 Kai 蛋白间是否具有类似的相互作用,我们应用酵母双杂交系统做了如表 1 所示的几组转化检测,并以 pGBKT₇-53 + pGADT₇-T 的共转化组为阳性对照, pGBKT₇-Lam + pGADT₇-T 的共转化组为阴性对照。转化产物分别涂布于 SD/-Leu/-Trp 二缺培养基平板和 SD/-Leu/-Trp/-His 三缺平板。30℃培养 4-6 天后发现,不同转化组的酵母菌均能在 SD/-Leu/-Trp 二缺培养基平板生长(图 5a),这说明所有转化都获成功,每组酵母菌中均含有所转化的两种质粒,且融合表达的 Kai 蛋白对酵母菌不产生毒性,不影响酵母细胞的生长。但在 SD/-Leu/-Trp/-His 三缺平板上除了阳性对照组外,还有 KaiA-KaiA、KaiB-KaiB 及 KaiC-KaiC 自身相互作用检测组(pGBKT₇-kaiA + pGADT₇-kaiA、pGBKT₇-kaiB + pGADT₇-kaiB 和 pGBKT₇-kaiC + pGADT₇-kaiC 三种共转化菌), KaiA-KaiC 异源相互

表 1 Kai 蛋白间相互作用检测的转化组设置

诱饵质粒	猎物质粒			
	自激活检测	相互作用检测		
pGBKT ₇ -kaiA	pGADT ₇	pGADT ₇ -kaiA	pGADT ₇ -kaiB	pGADT ₇ -kaiC
pGBKT ₇ -kaiB	pGADT ₇	pGADT ₇ -kaiA	pGADT ₇ -kaiB	pGADT ₇ -kaiC
pGBKT ₇ -kaiC	pGADT ₇	pGADT ₇ -kaiA	pGADT ₇ -kaiB	pGADT ₇ -kaiC



a. 转化菌在 SD/-Trp-Leu 平板上的生长情况; b. 转化菌在 SD/-Trp-Leu-His 平板上的生长情况; c. SD/-Trp-Leu 平板上生长的转化菌 β -galactosidase 活性分析; d. SD/-Trp-Leu-His 平板上生长的转化菌 β -galactosidase 活性分析; N: negative control; P: positive control

图 5 Kai 蛋白的相互作用分析

作用检测组(即 pGBKT₇-kaiA + pGADT₇-kaiC 和 pGBKT₇-kaiC + pGADT₇-kaiA 两种共转化菌)和 KaiB-KaiC 异源相互作用检测组(即 pGBKT₇-kaiB + pGADT₇-kaiC 和 pGBKT₇-kaiC + pGADT₇-kaiB 两种共转化菌)的转化菌能生长,而自激活检测组(即 pGBKT₇-kaiA + pGADT₇、pGBKT₇-kaiB + pGADT₇、pGBKT₇-kaiC + pGADT₇ 三种转化组)和 KaiA-KaiB 相互作用检测组(pGBKT₇-kaiA + pGADT₇-kaiB 和 pGBKT₇-kaiB + pGADT₇-kaiA)的转化菌则都不能在三缺平板上生长(图 5b),这说明三种 Kai 蛋白都不能激活酵母菌 AH109 的 his3 基因的转录,不具有自激活活性,而 KaiA、KaiB 和 KaiC 三种 Kai 蛋白自身都能发生相互作用,同时 KaiA 和 KaiC、KaiB 和 KaiC 蛋白间也能发生较强的相互作用,但 KaiA 和 KaiB 蛋白间则不存在相互作用。

我们将所有转化菌采用 β -半乳糖苷酶印迹法进行 LacZ 报告基因的表达检测,结果显示,自激活检测组的三组菌落都没有发生颜色改变,而自身相互作用检测组、KaiA-KaiC 相互作用检测组和 KaiB-Ka-

iC 相互作用检测组的菌落都在 X-gal 处理 2h 后分别显蓝色,但 KaiA-KaiB 相互作用检测组的菌落在经 X-gal 处理 8h 后仍呈乳白色没有发生颜色改变(图 5c,d)。这些结果也表明,KaiA、KaiB 和 KaiC 都不具有自激活活性,不能激活 LacZ 报告基因的表达;三种 Kai 蛋白自身以及 KaiA-KaiC 和 KaiB-KaiC 间都存在较强的相互作用,而 KaiA 和 KaiB 蛋白间则未检测到相互作用。

3 讨论

通过简并引物扩增我们得到了 *M. aeruginosa* PCC7820 *kai* 基因簇中 *kaiC* 基因的部分保守序列,为了获得该基因簇的全部完整序列,我们分别采取了利用载体和加接头的 PCR 步行方法来分别扩增所得 *kaiC* 基因保守片段上游和下游的未知序列。利用载体的 PCR 步行方法原理简单,实验设计也较简单,但操作较为繁琐,特异性较低,在扩增上游未知序列时,我们采用了该法,虽然最终也获得了目的序列,但由于载体的连接效率低和单引物扩增现象严重,而导致了产物的特异性低,这就使得整个实验过程工作量大,任务繁重,耗时太长。所以在对下游未知序列扩增时,我们采用了加接头的 PCR 步行方法。在扩增过程中,我们发现单用接头引物扩增 D1 的线性扩增产物,除弱的背景拖带外,未得到任何特

异带纹,说明没有发生接头引物单引物扩增的现象。经线性扩增后,用相同的特异引物加上接头引物进行指数扩增,扩增效果较差,D1 未延伸出任何条带,而用接头引物和 D2 引物则扩增出了 4 条带,其中特异条带在不同退火温度下都较稳定,这说明用加接头的方法从铜绿微囊藻基因组中延伸未知序列时,巢式扩增是必要的。从我们所采用的两种 PCR 步行方法来看,加接头的方法比利用载体的 PCR 步行方法更简便、有效,特异性也更高。

我们将所获得的铜绿微囊藻的 *kai* 基因簇序列在 NCBI 数据库中进行搜索时发现, *kaiA* 只在蓝藻 (Cyanobacteria) 中存在,而 *kaiB* 和 *kaiC* 基因则在蓝藻 (Cyanobacteria)、变形菌 (Proteobacteria)、拟杆菌 (Bacteroidetes) 和绿弯菌 (Chloroflexi) 等原核生物中都有存在,且在已知基因组全序列的蓝藻中 *kaiA* 仅以单拷贝存在,而 *kaiB* 和 *kaiC* 则存在多拷贝现象。在对蓝藻 KaiA、KaiB 和 KaiC 蛋白进行氨基酸序列同源性分析时发现,不同蓝藻间 KaiA 序列同源性较低,种属间差异较大,本实验所克隆的 *Microcystis aeruginosa* PCC 7820 的 KaiA 序列与其它蓝藻间的序列差异可达 40% ~ 70%;而 KaiB 和 KaiC 序列的同源性则较高,种属间序列差异较小, *M. aeruginosa* PCC 7820 的 KaiB 和 KaiC 序列与其它蓝藻的差异低于 20%(表 2)。

表 2 *M. aeruginosa* PCC 7820 与其它蓝藻的 Kai 蛋白氨基酸序列相似性比较

	<i>Microcystis aeruginosa</i> PCC 7820		
	KaiA	KaiB	KaiC
<i>Microcystis aeruginosa</i> PCC 7806	0.99	1	1
<i>Microcystis aeruginosa</i> NIES-843	0.95	1	0.99
<i>Cyanothece</i> sp. ATCC 51142	0.61	0.94	0.89
<i>Nostoc</i> sp. PCC 7120	0.57	0.84	0.82
<i>Crocospaera watsonii</i> WH 8501	0.55	0.95	0.88
<i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803	0.51	0.95	0.90
<i>Anabaena variabilis</i> ATCC 29413	0.51	0.84	0.84
<i>Synechococcus elongatus</i> PCC 7942	0.45	0.87	0.80
<i>Nostoc</i> sp. PCC 9709	0.35	0.85	0.82

通过 PCR 步行的方法我们获得了 *M. aeruginosa* PCC 7820 的生物钟基因簇 *kaiABC*,为将来深入研究生物钟的分子调控机制提供了可能。由于 Kai 蛋白间及 Kai 蛋白与其他蛋白间的相互作用能直接影响周期体的定时组装和解聚,在蓝藻生物钟计时信号的产生过程中发挥着重要的作用,因此研究 Kai

蛋白的相互作用蛋白及其作用机理有助于生物钟计时机制的阐明。而酵母双杂交检测是研究蛋白质相互作用的常用方法,因此我们利用双杂交系统对三种 Kai 蛋白间的相互作用进行了研究,结果表明 KaiA、KaiB 和 KaiC 蛋白自身以及 KaiA-KaiC 和 KaiB-KaiC 间都存在较强的相互作用,而 KaiA 和 KaiB 蛋

白间则未检测到如 Iwasaki 等(1999)报道的弱相互作用^[15]。另外, KaiA、KaiB 和 KaiC 蛋白都不具有自激活活性,可分别用来从基因组文库中获取与之相互作用的蛋白,用于生物钟的信号传导与网络调控研究。

参考文献

- [1] Kondo T, Ishiura M. The circadian clocks of plant and cyanobacteria. *Trends Plant Sci*, 1999, 4(5):171-176
- [2] Johnson C H, Golden S S. Circadian programs in cyanobacteria: adaptiveness and mechanism. *Annu Rev Microbiol*, 1999, 53: 389-409
- [3] Kondo T, Strayer C A, Kulkarni R D, et al. Circadian rhythm in prokaryotes: Luciferase as a reporter of circadian gene expression in cyanobacteria. *PNAS*, 1993, 90: 5672-5676
- [4] Kondo T, Tsinoremas N F, Golden S S, et al. Circadian clock mutants of cyanobacteria. *Science*, 1994, 266 (18) 1233-1236
- [5] Kondo T, Ishiura M. Circadian rhythm of cyanobacteria: Monitoring the biologicak clocks individual colonies by bioluminescence. *J Bacteriol*, 1994, 176(7):1881-1885
- [6] Ishiura M, Kutsuna S, Aoki S, et al. Expression of a gene cluster *kaiABC* as a circadian feedback process in cyanobacteria. *Science*, 1998, 281(4):1519-1523
- [7] Nakajima M, Imai K, Ito H, et al. Reconstitution of circadian oscillation of cyanobacterial KaiC phosphorylation in vitro. *Science*, 2005, 308:414-415
- [8] Kurosawa G, Aihara K, Iwasa Y. A model for the circadian rhythm of cyanobacteria that maintains oscillation without gene expression. *Biophysical J*, 2006, 91:2015-2023
- [9] Agrawal G K, Asayama M, Shirai M. Light-dependent and rhythmic psb transcripts in homologous/heterologous cyanobacterial cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 1999, 255:47-53
- [10] Bittencourt-Oliveira M C, Kujbida P, Cardoze K H M, et al. A novel rhythm of micro- cystin biosynthesis is described in the cyanobacterium *Microcystis panniformis* Komárek et al. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005(326):687-694
- [11] 徐虹,王靖,赵振坤等. 铜绿微囊藻光合作用的昼夜节律变化. 高技术通讯, 2007, (2):201-205
- [12] Smoker J A, Barnum S R. Rapid small-scale DNA isolation from filamentous cyanobacteria. *FEMS Microbiol Letters*, 1988, 56: 119-122
- [13] 徐虹,郑锦乾,章军等. 铜绿微囊藻生物钟蛋白 KaiA 的自身相互作用研究. 水生生物学报, 2005, 29(5):591-594
- [14] 郑锦乾,徐虹,章军等. 利用酵母双杂交研究铜绿微囊藻生物钟蛋白 KaiB 的自身相互作用. 海洋科学, 2006, 30(8):41-45
- [15] Iwasaki H, Taniguchi Y, Ishiura M, et al. Physical interactions among circadian clock proteins KaiA, KaiB and KaiC in cyanobacteria. *EMBO J*, 1999, 18 (5):1137-1145

Studies on cloning of circadian clock genes and physical interaction among circadian clock proteins in *Microcystis aeruginosa* PCC7820

Xu Hong, Zhen Jinqian, Wu Hanzhi

(The Key Laboratory of Education Ministry for Cell Biology and Tumor Cell Engineering,
School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen 361005)

Abstract

To study the circadian clock genes' regulation and their function in cyanobacteria, the circadian clock gene cluster *kaiABC* was cloned from *Microcystis aeruginosa* PCC7820 by chromosome walking. The *kaiA* gene possesses 873 base pairs and encodes a 33.3-kD protein with 290 amino acid. The *kaiB* (315bp) and *kaiC* genes (1563 bp) encode 11.8-kDa and 58.3-kD proteins, respectively. To study the function of Kai proteins and find their interacting proteins, the clock genes *kaiA*, *kaiB* and *kaiC* were subcloned into the bait vector pGBKT₇ and the prey vector pGADT₇ of the yeast two-hybrid system, respectively. Each of the three Kai proteins was expressed as a fusion with either the DNA-binding protein or the transcriptional activation domain of GAL4. Both the His3 reporter assay on agar medium lacking histidine and the filter assay for β -galactosidase indicated homotypic interactions(KaiA-KaiA, KaiB-KaiB and KaiC-KaiC) and heterotypic interactions (KaiA-KaiC and KaiB-KaiC) in co-transformed yeast cells expressing two fusion protein, but the interaction between KaiA and KaiB was not detected.

Key word: *Microcystis aeruginosa* PCC7820, clock gene, chromosome walking, yeast two hybridization