

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20200114001

http://www.yykxjz.cn/

林键章, 王文磊, 徐燕, 许凯, 纪德华, 陈昌生, 谢潮添. 坛紫菜泛素连接酶 *PhCUL1* 基因克隆与功能验证. 渔业科学进展, 2021, 42(1): 193–200

Lin JZ, Wang WL, Xu Y, Xu K, Ji DH, Chen CS, Xie CT. The cDNA cloning and functional verification of the *PhCUL1* gene from *Pyropia haitanensis*. Progress in Fishery Sciences, 2021, 42(1): 193–200

坛紫菜泛素连接酶 *PhCUL1* 基因 克隆与功能验证*

林键章 王文磊 徐 燕 许 凯 纪德华 陈昌生 谢潮添^①

(农业农村部东海海水健康与养殖重点实验室 福建省水产生物育种与健康养殖工程研究中心
集美大学水产学院 厦门 361021)

摘要 高温影响坛紫菜(*Pyropia haitanensis*)的产量和品质,是制约紫菜产业发展的主要因素。前期研究发现,高温胁迫下,坛紫菜泛素蛋白酶体系统相关基因显著上调表达,但其响应高温胁迫的分子功能还未知。本研究通过分子生物学、遗传学等技术手段对坛紫菜 cullin E3 连接酶基因(*PhCUL1*)的功能进行研究。利用 PCR 方法克隆了 *PhCUL1* 基因的全长, *PhCUL1* 全长为 2500 bp, 开放阅读框(ORF)长度为 2481 bp, 该基因存在 1 个 Cullin (407~618 aa)结构域和 1 个 Cullin Nedd8 (754~821 aa)结构域,其中, Cullin Nedd8 结构域为蛋白融合位点。进化树分析显示, *PhCUL1* 在进化上与脐形紫菜(*Porphyra umbilicalis*)有较近的亲缘关系。qRT-PCR 结果显示, *PhCUL1* 基因被高温显著诱导。为进一步阐明 *PhCUL1* 的分子功能,将其转入莱茵衣藻(*Chlamydomonas reinhardtii*)进行功能验证,过表达 *PhCUL1* 株系比野生型更能耐受高温胁迫。同时,在高温 33℃ 下处理 3 h 和 6 h 内,转基因植株的 *PhCUL1* 基因呈上调表达。这初步说明 *PhCUL1* 基因在坛紫菜响应高温胁迫过程中发挥着重要作用,其具体调控机制有待进一步研究。本研究有助于阐明坛紫菜泛素蛋白酶体系统响应高温胁迫的分子机制,为指导耐高温新品种选育提供理论依据。

关键词 高温; 坛紫菜; 泛素连接酶; 莱茵衣藻; 转基因

中图分类号 S968.43+1 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2021)01-0193-08

紫菜是一类具有重要经济价值、营养价值和生态价值的大型海藻,不仅可以食用,还被广泛用作肥料、药物和化学物质的来源(Blouin *et al.*, 2011),而且作为“蓝碳”物种和生物燃料,具有巨大的潜力(Nellemann *et al.*, 2009; Xu *et al.*, 2016)。经估算,大型海藻每年可固定约 173 Tg 的碳,并作为碳供体将 90%固定的碳

输送至深海,其余则埋藏在沿海沉积物中,该估算值超过沿海生境中被子植物的碳埋藏估值(Krause-Jensen *et al.*, 2016、2018),表明大型海藻在固碳方面有着巨大潜力。此外,由于紫菜等大型海藻含有较高的结构多糖和低木质素、不占用耕地等原因,其为生物燃料的优质原料(Ghadiryfar *et al.*, 2016; Sudhakar *et al.*,

* 国家自然科学基金面上项目(31872567; 41806185)、福建省科技重大专项(2019NZ08003)和现代农业产业技术体系(CARS-50)共同资助 [This work was supported by National Natural Science Foundation of China (31872567; 41806185), Fujian Science and Technology Major Project (2019NZ08003), and China Agriculture Research System (CARS-50)]. 林键章, E-mail: 1193546759@qq.com

① 通讯作者: 谢潮添, 教授, E-mail: ctxie@jmu.edu.cn

收稿日期: 2020-01-14, 收修改稿日期: 2020-02-15

2018)。Duarte 等(2017)指出, 养殖海藻全部用于生物燃料生产, 每平方千米养殖海藻每年可减少 1500 t CO₂ 排放。2018 年, 我国栽培紫菜产量超过 201779 t (干重), 占养殖海藻产量的 8.6%, 其中, 以坛紫菜 (*Pyropia haitanensis*) 为主要栽培对象的福建省紫菜产量已超过 74628 t (干重)(中国渔业统计年鉴, 2019), 带来了可观的经济效益和生态效益。

然而, 近年来, 随着全球气候变暖, 温度成为限制紫菜产业发展的主要因素(陈伟洲等, 2015; Wang *et al.*, 2018)。尽管一些坛紫菜耐高温品系(Z-26、Z-61 和 ZS-1)已广泛栽培(Chen *et al.*, 2008; Yan *et al.*, 2010), 但有关坛紫菜的耐高温机制仍然知之甚少。因此, 阐明坛紫菜的耐高温机制对耐高温品系的选育具有重要意义。目前, 对于坛紫菜耐高温机制的研究主要集中在比较组学分析, 例如, Wang 等(2018)比较了 Z-61 和野生型坛紫菜的转录组, 发现 Z-61 可以通过更为积极的转录调节抵御高温环境。Shi 等(2017)使用 iTRAQ 技术在坛紫菜中鉴定了 151 种应激反应蛋白, 其中, 参与清除未折叠蛋白或变性蛋白的泛素蛋白酶体系统在坛紫菜应答高温胁迫过程中显著上调表达, 但其具体功能有待进一步验证。

泛素蛋白酶体系统是最重要的胁迫响应系统之一, 通过降解受损或多余的蛋白质来维持细胞中蛋白质的平衡。泛素化过程由 3 种酶介导: E1(泛素激活酶, UBA); E2(泛素结合酶, UBC); E3(泛素连接酶)(Zhang *et al.*, 2015)。其中, E3 连接酶识别配体蛋白并决定蛋白质降解的高特异性, 因此, 在泛素化过程中起关键作用。许多研究表明, E3 是植物响应非生物胁迫的“调节剂”, 甚至单个 E3 可以调节植物响应多重非生物胁迫(Moin *et al.*, 2019)。Cullin-RING 连接酶是真核生物中被广泛研究的多亚基 E3 连接酶, 在植物中有 3 种类型: CUL1、CUL3a/b 和 CUL4 (Stone, 2014)。CUL3 可以促进 DREB2A 的降解来提高拟南芥(*Arabidopsis*)的耐热性(Morimoto *et al.*, 2017)。此外, 水稻 Cullin 家族基因在应对非生物胁迫时呈现上调表达的趋势(Moin *et al.*, 2019)。以上结果说明, Cullin E3 连接酶可能在植物响应非生物胁迫中发挥重要作用。本实验室在前期研究中发现, 坛紫菜的 CUL1 基因也积极响应高温胁迫(Wang *et al.*, 2018), 但其具体功能有待进一步实验验证。

由于坛紫菜的特殊结构及缺乏启动子和转化方法等问题, 目前尚未在坛紫菜中建立一套稳定的遗传操作体系, 对这些候选基因和蛋白的功能还不明确。莱茵衣藻(*Chlamydomonas reinhardtii*)作为一种真核单细胞绿藻, 被广泛用于验证基因的功能和基本的生

物学进程。同时, 随着基因工程技术的发展, 已开发出一些可应用于莱茵衣藻的遗传操作技术, 包括核转化、叶绿体和线粒体转化系统(Dejtsakdi *et al.*, 2016)。到目前为止, 许多异源基因已在莱茵衣藻中成功表达, 包括微藻 *Chlorella zofingiensis* (Cordero *et al.*, 2011)和大型海藻 *Porphyra seriata* (Kim *et al.*, 2011)。Jin 等(2017)成功将甘紫菜(*Pyropia tenera*)HSP19.3 转入莱茵衣藻, 并证实了其在耐热方面的作用。以上结果表明, 莱茵衣藻可能是表达坛紫菜基因的良好载体。因此, 本研究将坛紫菜的 *PhCUL1* 基因转入莱茵衣藻进行耐热性分析, 探究坛紫菜泛素连接酶 (*PhCUL1*)在抗高温中的作用, 为坛紫菜耐高温品系的选育提供基因信息。

1 材料与方 法

1.1 实验材料培养

本实验所选用的坛紫菜耐高温品系 Z-61 由集美大学坛紫菜种质改良和应用实验室选育和纯化。培养条件: 温度(21±1)°C, 光照强度 50~60 μmol/(m²·s), 光周期 12 L : 12 D, 每 2 d 更换 1 次新鲜的 Provasoli's enrichment solution (PES)培养液, 并充气培养。培养藻体长度至 15 cm 左右时, 选取表面光滑、无破损、无扭曲的健康藻体进行后续实验。

莱茵衣藻细胞壁缺失株系“CC-400 cw15 mt+”被用于 *PhCUL1* 转基因功能验证。莱茵衣藻细胞在 Tris-acetate-phosphate (TAP)培养液中培养: 温度 25°C, 光照强度 50 μmol/(m²·s), 光周期 14 L : 10 D。每隔 2 h 轻摇 1 次培养液, 防止细胞贴壁生长。

1.2 总 RNA 的分离纯化和 cDNA 的合成

采用 E.Z.N.A 植物 RNA 提取试剂盒(OMEGA, 德国)提取坛紫菜和莱茵衣藻的总 RNA。使用 1%凝胶电泳检测所提取总 RNA 的完整性, 并在紫外分光光度计上分别测定 OD_{260 nm} 和 OD_{280 nm} 值, 计算出 RNA 的浓度, 判断其纯度。

用于实时荧光定量 PCR 分析的 cDNA 用 PrimeScript RT reagent kit (TaKaRa)进行反转录, 合成的 cDNA 稀释 10 倍备用。

1.3 坛紫菜 *PhCUL1* 基因的全长克隆

根据坛紫菜转录组的注释结果, 筛选出一条注释结果为脐形紫菜(*Porphyra umbilicalis*) CUL1 的 Unigene0010232。根据序列设计 1 对扩全长引物(正向引物加 *Kpn* I 酶切位点序列, 反向引物加 *Xba* I 酶

切位点序列, 便于后续实验) PhCUL1F 和 PhCUL1R (表 1), PCR 扩增 *PhCUL1* 基因的保守序列, 预期长度为 2481 bp; 扩增体系为 25 μ l: 2×Mix 12.5 μ l, ddH₂O 9.5 μ l, 每条引物 0.5 μ l, cDNA 模板 2 μ l。PCR

扩增程序: 95℃ 变性 5 min; 95℃ 40 s; 62℃ 30 s; 72℃ 2 min 30 s, 35 个循环; 72℃, 延伸 10 min。将扩增产物割胶回收、转化和测序, 验证全长克隆的正确性。

表 1 实验用到的引物名称和序列

Tab.1 Primers and sequences used in this experiment

用途 Purpose	引物 Primer	物种 Species	序列 Sequence
PCR 扩增	PhCUL1F	<i>P. haitanensis</i>	CCGGTACCATGGAGAGCGGGTTCAAGC
	PhCUL1R		GGTCTAGATCACGCGAGGTACTCG
实时荧光定量 PCR qRT-PCR	PhCUL1QF	<i>P. haitanensis</i> / <i>C. reinhardtii</i>	TTGGTCACTTCTTGCTTTGGGG
	PhCUL1QR		GCTCAGCGGTAGAAGACTTTCC
内参 Internal control	UBCF	<i>P. haitanensis</i>	TCACAACGAGGATTTACCACC
	UBCR		GAGGAGCACCTTGGAAACG
内参 Internal control	TubulinQF	<i>C. reinhardtii</i>	CTCGCTTCGCTTTGACGGTG
	TubulinQR		CGTGGTACGCCTTCTCGGC

1.4 *PhCUL1* 基因的生物信息学分析

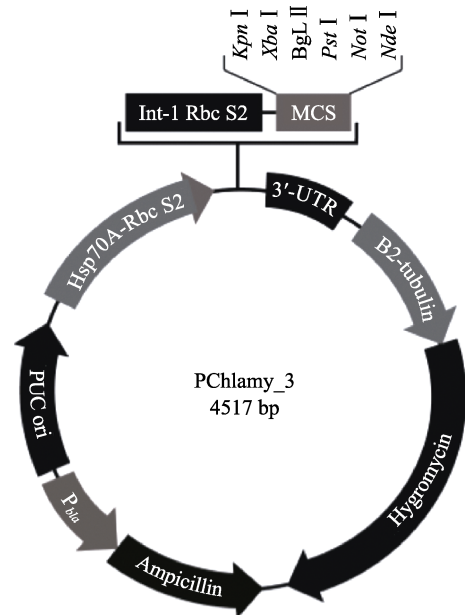
使用在线软件 NCBI(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) 分析 *PhCUL1* 基因核苷酸序列, 推导氨基酸序列和开放阅读框(ORF)。通过 SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>)来识别保守结构域。使用 MEGA6 软件的 Neighbor-Joining 法构建 *PhCUL1* 系统进化树。

1.5 *PhCUL1* 衣藻表达载体构建

使用 *Kpn* I 和 *Xba* I 内切酶双酶切目的基因和衣藻表达载体 V3, 载体图谱见图 1。酶切体系: 目的基因 2 μ g, 10×M 缓冲液 3 μ l, *Kpn* I 内切酶 1 μ l, *Xba* I 内切酶 1 μ l, 用 ddH₂O 补足体系。V3 载体 1 μ g, 10×M 缓冲液 2 μ l, *Kpn* I 内切酶 1 μ l, *Xba* I 内切酶 1 μ l, 用 ddH₂O 补足体系。酶切程序: 37℃, 140 min, 65℃, 10 min。将酶切后的基因和 V3 载体 16℃ 过夜连接, 转化和涂板。挑取阳性菌落进行 PCR 验证, 获得含有目的基因的 V3 衣藻表达载体。

1.6 莱茵衣藻核转化

莱茵衣藻核转化采用“玻璃珠转化法”。莱茵衣藻“CC-400 cw15 mt+”在 TAP 培养液中培养至对数生长期(细胞数约为 2×10⁶ 个), 室温 6000 r/min 离心 5 min, 弃上清液, 倒置 1 min。用 300 μ l TAP 培养液重悬细胞, 加入到含 300 mg 灭菌并烘干的玻璃珠的 2 ml 离心管中, 再加入 0.1 ml 20% PEG 6000, 2 μ g 线性重组载体, 5 μ l 鲑鱼精 DNA。置于漩涡振荡器上震荡 30 s, 停歇 30 s, 重复 2 次。把混合液加入到 40 ml 新鲜 TAP 培养液, 在 100 r/min 摇床过夜培养。室温 6000 r/min 收集细胞, 去上清液, 用 400 μ l TAP 培养



Features of pChlamy_3 Vector

4517 nucleotides	
Hsp70A-Rbc S2 promoter:	70–565
Intron-1 Rbc S2:	574–718
Multiple cloning site:	728–770
3'-UTR:	774–1007
B2-tubulin promoter:	1014–1326
Hygromycin resistance [<i>aph7</i>]:	1327–2637
Ampicillin resistance gene [<i>bla</i>]:	2836–3696 [c]
<i>Bla</i> promoter [<i>P_{bla}</i>]:	3697–3748 [c]
PUC origin:	3794–4467
*[c]: complementary strand	

图 1 衣藻表达载体 V3 图谱

Fig.1 V3 expression vector of *C. reinhardtii*

液重悬细胞, 混匀后倒在 TAP 平板上(含 10 μ g/ml 潮霉素 B), 24℃ 光照培养 7~10 d, 平板上长出单个克隆藻。

1.7 *PhCUL1* 基因表达水平的 qPCR 分析

根据 *PhCUL1* 的序列, 设计 qPCR 正反向引物, 并以 β -tubulin 基因作为内参(表 1), 进行高温下 *PhCUL1* 在莱茵衣藻中的表达水平分析。20 μ l 体系: 10 μ l 2 \times SYBR green Master Mix(TaKaRa, 日本), 0.4 μ l 正反向引物(20 mmol/L), 2 μ l 稀释模板, 0.4 μ l ROX Dye 和 6.8 μ l ddH₂O。扩增程序: 95 $^{\circ}$ C 30 s, 95 $^{\circ}$ C 5 s, 60 $^{\circ}$ C 31 s, 40 个循环。循环结束后, 检查扩增的熔解曲线, 确保扩增的特异性。荧光定量 PCR 扩增在 ABI7300 型定量 PCR 仪(Applied Biosystems, 美国)上进行。

1.8 数据统计分析

所有实验均设置 3 个重复。利用 Excel 和 SPSS

17.0 对实验数据进行统计分析, 并采用单因素方差分析(One-way ANOVA)和最小显著差异法(LSD)比较不同数据组间的差异, $P < 0.05$ 表示存在显著差异, $P < 0.01$ 表示差异极显著。

2 结果

2.1 *PhCUL1* 基因的克隆及序列分析

以坛紫菜 cDNA 为模板, *PhCUL1F/PhCUL1R* 为引物进行扩增, 获得 1 条扩增条带, 长度约为 2500 bp (图 2a)。通过 BLAST 比对发现, 其与 *Porphyra umbilicalis* (GenBank No.: OSX79849.1) 的 cullin-1 基因核酸序列同源性达到 85.14%, 进而推断该片段为 *PhCUL1* 的基因片段。

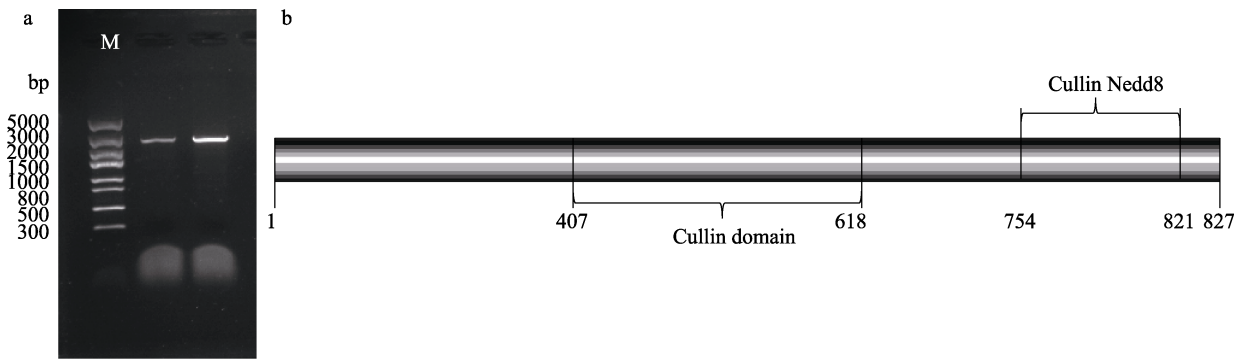


图 2 *PhCUL1* 基因克隆产物凝胶电泳和保守结构域

Fig.2 Agarose electrophoresis of PCR products of *PhCUL1* gene and protein domain analysis of *PhCUL1*

通过 ORF Finder 软件分析发现, *PhCUL1* 基因的 ORF 为 2481 bp, 起始密码子为 ATG, 终止密码子为 TGA, 编码 827 个氨基酸, 预测分子量为 91.34 kDa, 理论等电点为 6.43。通过 SMART 分析其保守结构域, 发现 *PhCUL1* 存在 1 个 Cullin (407~618 aa) 结构域和 1 个 Cullin Nedd8 (754~821 aa) 结构域(图 2b)。

2.2 *PhCUL1* 基因系统进化树分析

为了确定 *PhCUL1* 的系统进化关系, 采用 Neighbor-Joining 法构建了 *PhCUL1* 氨基酸序列系统进化树。进化树结果显示(图 3), *PhCUL1* 与红藻门角叉菜 (*Chondrus crispus*)、龙须菜(*Gracilariopsis chorda*)和脐形紫菜(*Porphyra umbilicalis*)聚为一侧, 而与高等植物明显区分开来, 这说明 *PhCUL1* 基因在红藻门中较为保守。而在红藻门中, *PhCUL1* 与脐形紫菜聚为一支, 这说明 *PhCUL1* 基因在紫菜中较为保守。

2.3 *PhCUL1* 基因在高温胁迫下的差异表达变化

为了研究坛紫菜 *PhCUL1* 对高温胁迫的响应, 本

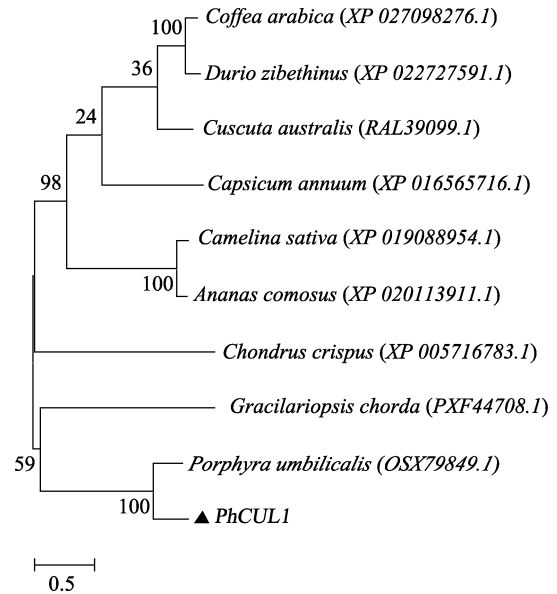


图 3 采用 NJ 法构建的基于 *PhCUL1* 基因所编码氨基酸序列的系统进化树

Fig.3 Phylogenetic tree based on *PhCUL1* amino acid sequences by NJ method

研究采用荧光定量 PCR 技术检测 *PhCUL1* 基因在高温 31℃ 处理不同时间水平(0、3、6、12 和 24 h)下的相对表达水平变化。结果显示(图 4), 高温对 *PhCUL1* 基因表达水平有显著影响, 高温处理 3 h, *PhCUL1* 的表达量是 0 h 的 11 倍; 高温处理 6 h 和 12 h, 表达水平较之于高温处理 3 h 有所下降, 但显著高于 0 h, 其表达量分别是 0 h 的 5.1 倍和 8.0 倍。高温处理 24 h 后, *PhCUL1* 的表达量达到最高值, 是 0 h 的 16.9 倍。

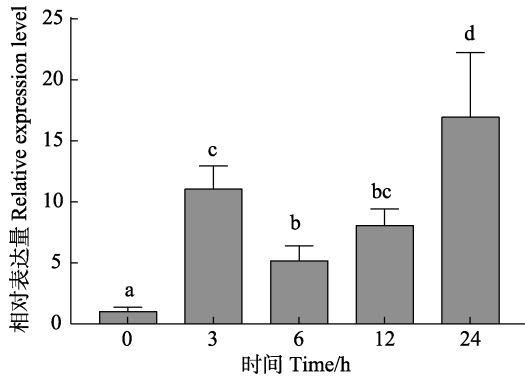


图 4 坛紫菜 *PhCUL1* 基因在高温 31℃ 胁迫过程中相对表达变化

Fig.4 The relative expression of *PhCUL1* gene in *P. haitanensis* under 31°C treatment

不具有相同字母上标的数据间差异显著($P < 0.05$), 下同 Bar of each column with different small letters mean significant difference ($P < 0.05$). The same as below

2.4 转 *PhCUL1* 莱茵衣藻阳性克隆子的筛选

随机挑选 8 个潮霉素 B 抗性品系的衣藻, 提取 DNA, 使用 *PhCUL1* 特异引物(表 1)进行 PCR 验证。琼脂糖凝胶电泳结果显示, 所有挑选出的衣藻都检测到阳性 PCR 产物, 但在野生型品系中未发现阳性克隆, 表明 *PhCUL1* 基因已成功转入衣藻基因组(图 5)。选择第 4 个转基因品系(T4)进行后续功能分析。

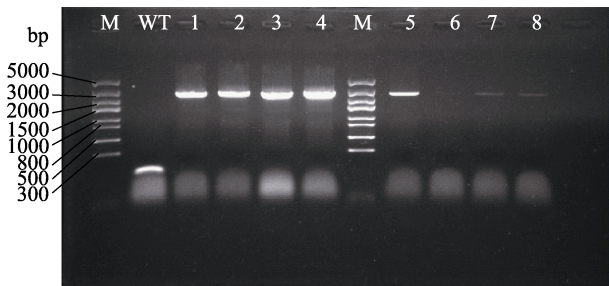


图 5 *PhCUL1* 的转基因验证

Fig.5 Transgenic verification of *PhCUL1*

2.5 转 *PhCUL1* 衣藻对高温胁迫的耐受性分析

为了研究转基因衣藻对高温胁迫的耐受程度, 在

33℃ 下培养野生型和转基因衣藻 36 h, 每天观察其生物量(图 6), 并测定其在 750 nm 的吸光度(表 2)。结果显示, 高温 33℃ 胁迫 12 h 后, 转基因衣藻(T4)的生物量高于野生型衣藻(WT)。高温 33℃ 胁迫 36 h 后, 转基因衣藻(T4)的生物量明显高于野生型衣藻(WT)。相应的 $OD_{750\text{ nm}}$ 也与此结果吻合(表 2)。

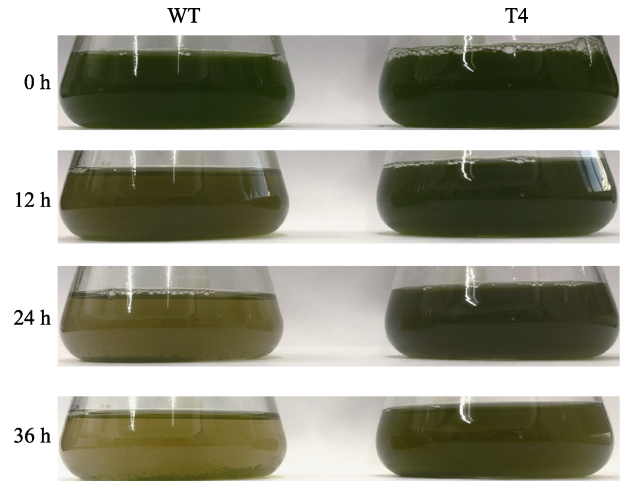


图 6 高温 33℃ 胁迫下衣藻的生物量变化

Fig.6 Biomass of *C. reinhardtii* under 33°C treatment

表 2 高温 33℃ 胁迫下衣藻浓度的变化

Tab.2 Concentration of *C. reinhardtii* under 33°C heat stress

时间 Time(h)	WT($OD_{750\text{ nm}}$)	T4($OD_{750\text{ nm}}$)
0	0.381	0.388
12	0.144	0.204 ^a
24	0.072	0.180 ^a
36	0.060	0.165 ^a

2.6 *PhCUL1* 基因在莱茵衣藻中的差异表达变化

高温 33℃ 胁迫 1~6 h 后, *PhCUL1* 基因的表达水平显著升高($P < 0.05$)(图 7), 且在胁迫 3 h 时, 基

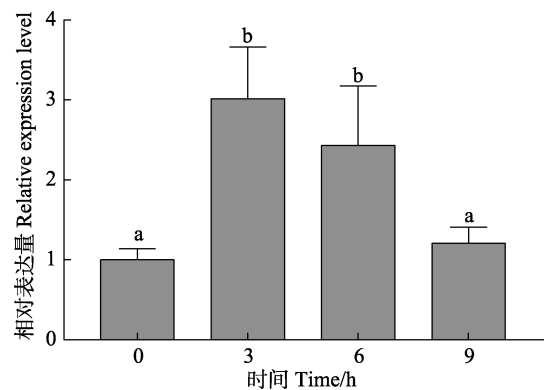


图 7 高温 33℃ 胁迫下 *PhCUL1* 基因在莱茵衣藻中的相对表达水平

Fig.7 The relative expression level of *PhCUL1* gene in *C. reinhardtii* under 33°C treatment

因的表达水平最高,约为对照组的3倍。胁迫9 h后, *PhCUL1* 表达水平下降,与对照组无显著差异。

3 讨论

温度是影响紫菜产业发展的一个主要因素。近年来,频繁出现的秋季高温回暖天气严重影响了坛紫菜栽培工作的有序开展,水温过高导致坛紫菜幼苗或成菜发生病烂,造成严重减产(陈玉婷等,2015)。进一步研究坛紫菜的耐高温机理对于快速选育耐高温品系具有重要的理论意义。前期研究已证实,泛素系统在响应高温、高盐和干旱等非生物胁迫中扮演着重要角色(Zhang *et al.*, 2015)。其中,E3连接酶因其决定靶蛋白的特异性而被广泛研究。Cullin-RING E3连接酶是真核生物中一个被充分研究的基因家族,Cullin蛋白一般含有1~3个结构域(Moin *et al.*, 2019)。本研究克隆获得的坛紫菜 *PhCUL1* 基因含有2个保守结构域,407~618位点是cullin结构域,754~821位点是Cullin Nedd8结构域。其中,Nedd8结构域是蛋白融合位点,它能赋予cullin E3泛素连接酶活性(Hori *et al.*, 1999),表明 *PhCUL1* 也可能具有泛素连接酶活性,Nedd8是 *PhCUL1* 介导泛素连接酶活性的体现。

已有大量文献报道和证据表明,cullin家族基因可以积极响应非生物胁迫。例如,Moin等(2019)在研究水稻的逆境胁迫表达谱时发现,水稻cullin家族基因在多种逆境胁迫下上调表达。本研究也分析了坛紫菜 *PhCUL1* 基因在高温胁迫下的表达模式。研究结果显示,在高温31℃胁迫下, *PhCUL1* 基因在不同时间点均呈现上调表达趋势;高温胁迫3 h时, *PhCUL1* 基因的表达量是0 h的11倍,说明 *PhCUL1* 基因对高温胁迫反应非常迅速,短时间内可以大量积累表达;随着胁迫时间的延长, *PhCUL1* 基因的表达量有所下调,但仍然高于0 h,高温胁迫6 h和12 h的 *PhCUL1* 基因表达量分别是0 h的5.1倍和8.0倍;当胁迫时间持续到24 h时, *PhCUL1* 仍然处于高表达状态,其表达量是0 h的16.9倍。以上结果表明, *PhCUL1* 在高温胁迫过程中均上调表达,可能是坛紫菜响应高温胁迫的一个关键基因,但具体功能需进一步验证。

随着基因工程技术的发展,许多研究人员利用遗传操作手段对E3连接酶的功能进行了验证。Peng等(2019)发现,过表达拟南芥E3连接酶 *AtPUB48* 可以增强拟南芥种子发芽和幼苗生长阶段的耐热性。此外,过表达水稻E3连接酶 *OsHIRP1* 使水稻在高温下具有比对照组更高的萌发率(Kim *et al.*, 2019)。然而,

有关E3连接酶基因在大型海藻抗逆过程中发挥的具体功能尚未发现报道。本研究在莱茵衣藻中转入 *PhCUL1* 基因来研究其耐热功能。qRT-PCR结果显示,高温33℃胁迫下转基因衣藻的 *PhCUL1* 基因显著上调表达,表明该基因能被高温胁迫诱导。生理实验结果显示,在持续的高温胁迫下,转基因衣藻比野生型具有更高的存活率,证明 *PhCUL1* 基因可能通过维持蛋白稳态调控了坛紫菜的耐热过程。当然,一个机体对非生物胁迫的调控机制是非常复杂的,至于 *PhCUL1* 基因是如何在这个复杂的网络中起作用,还有待进一步研究。

4 结论

本研究成功克隆了坛紫菜的泛素连接酶 *PhCUL1* 基因,而且该基因被高温显著诱导。转入 *PhCUL1* 基因的莱茵衣藻也比野生型衣藻具有更强的耐热性,证明了 *PhCUL1* 基因的耐热功能。这为坛紫菜耐高温机制的解析提供了有用的基因信息,也为耐高温品系的培育奠定了理论基础。

参 考 文 献

- Blouin NA, Brodie JA, Grossman AC, *et al.* *Porphyra*: A marine crop shaped by stress. *Trends in Plant Science*, 2011, 16: 29–37
- Chen CS, Ji DH, Xie CT, *et al.* Preliminary study on selecting the high temperature resistance strains and economic traits of *Porphyra haitanensis*. *Acta Oceanologica Sinica*, 2008, 30: 6
- Chen WZ, Xu JB, Wu WT, *et al.* Physiological responses of three species of *Pyropia* thallus to high temperature stress. *Journal of Tropical Oceanography*, 2015, 34(1): 49–55 [陈伟洲, 许俊宾, 吴文婷, 等. 三种紫菜叶状体对高温胁迫的生理响应. *热带海洋学报*, 2015, 34(1): 49–55]
- Chen YT, Xu Y, Ji DH, *et al.* Cloning and expression analysis of two small heat shock protein (sHSP) genes from *Pyropia haitanensis*. *Journal of Fisheries of China*, 2015, 39(2): 182–192 [陈玉婷, 徐燕, 纪德华, 等. 坛紫菜两种小分子热激蛋白(sHSP)基因的克隆及表达特征分析. *水产学报*, 2015, 39(2): 182–192]
- Cordero BF, Couso I, Leon R, *et al.* Enhancement of carotenoids biosynthesis in *Chlamydomonas reinhardtii* by nuclear transformation using a phytoene synthase gene isolated from *Chlorella zofingiensis*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2011, 91: 341–351
- Dejtisakdi W, Miller SM. Overexpression of calvin cycle enzyme fructose 1, 6-bisphosphatase in *Chlamydomonas reinhardtii* has a detrimental effect on growth. *Algal Research*, 2016, 14: 116–126
- Department of Fishery Bureau, Ministry of Agriculture and Rural

- Affairs. Fishery Production, China fishery statistical yearbook. Beijing: Chinese Agriculture Express, 2019 [农业农村部渔业渔政管理局编制. 中国渔业统计年鉴. 北京: 中国农业出版社, 2019]
- Duarte CM, Wu JP, Xiao X, *et al.* Can seaweed farming play a role in climate change mitigation and adaptation? *Frontiers in Marine Science*, 2017, 4: 100
- Ghadiryfar M, Rosentrater KA, Keyhani A, *et al.* A review of macroalgae production, with potential applications in biofuels and bioenergy. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 2016, 54: 473–481
- Hori T, Osaka F, Chiba T, *et al.* Covalent modification of all members of human cullin family proteins by NEDD8. *Oncogene*, 1999, 18: 6829–6834
- Jin YJ, Yang SW, Im S, *et al.* Overexpression of the small heat shock protein, PtsHSP19.3 from marine red algae, *Pyropia tenera* (Bangiales, Rhodophyta) enhances abiotic stress tolerance in *Chlamydomonas*. *Journal of Plant Biotechnology*, 2017, 44: 287–295
- Kim E, Park HS, Jung Y, *et al.* Identification of the high-temperature response genes from *Porphyra seriata* (Rhodophyta) expression sequence tags and enhancement of heat tolerance of *Chlamydomonas* (Chlorophyta) by expression of the *Porphyra htr2* gene(1). *Journal of Phycology*, 2011, 47: 821–828
- Kim JH, Lim SD, Jang CS. *Oryza sativa* heat-induced RING finger Protein1 (OsHIRP1) positively regulates plant response to heat stress. *Plant Molecular Biology*, 2019, 99: 545–559
- Krause-Jense D, Duarte CM. Substantial role of macroalgae in marine carbon sequestration. *Nature Geoscience*, 2016, 9: 737–742
- Krause-Jense D, Lavery P, Serrano O, *et al.* Sequestration of macroalgal carbon: The elephant in the blue carbon room. *Biology Letters*, 2018, 14: 20180236
- Moin M, Bakshi A, Madhav M, *et al.* Comprehensive expression profiling reveals the possible involvement of cullins in developmental and stress regulation in rice. *Environmental and Experimental Botany*, 2019, 160: 101–111
- Morimoto K, Ohama N, Kidokoro S, *et al.* BPM-CUL3 E3 ligase modulates thermotolerance by facilitating negative regulatory domain-mediated degradation of DREB2A in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2017, 114: 201704189
- Nellemann C, Corcoran E, Duarte CM, *et al.* Blue carbon: The role of healthy oceans in binding carbon: A rapid response assessment. United Nations Environment Programme, GRID-Arendal, Birkeland Trykkeri AS, Norway, 2009
- Peng L, Wan X, Huang K, *et al.* AtPUB48 E3 ligase plays a crucial role in the thermotolerance of *Arabidopsis*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2019, 509: 281–286
- Shi JZ, Chen YT, Xu Y, *et al.* Differential proteomic analysis by iTRAQ reveals the mechanism of *Pyropia haitanensis* responding to high temperature stress. *Scientific Reports*, 2017, 7: 44734
- Stone SL. The role of ubiquitin and the 26S proteasome in plant abiotic stress signaling. *Frontiers in Plant Science*, 2014, 5: 135
- Sudhakar K, Mamat R, Samykano M, *et al.* An overview of marine macroalgae as bioresource. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 2018, 91: 165–179
- Wang WL, Lin YH, Teng F, *et al.* Comparative transcriptome analysis between heat-tolerant and sensitive *Pyropia haitanensis* strains in response to high temperature stress. *Algal Research*, 2018, 29: 104–112
- Xu K, Xu Y, Ji DH, *et al.* Proteomic analysis of the economic seaweed *Pyropia haitanensis* in response to desiccation. *Algal Research*, 2016, 19: 198–206
- Yan XH, Lv F, Liu CJ, *et al.* Selection and characterization of a high-temperature tolerant strain of *Porphyra haitanensis* Chang et Zheng (Bangiales, Rhodophyta). *Journal of Applied Phycology*, 2010, 22: 511–516
- Zhang ZY, Li JH, Liu HH, *et al.* Roles of ubiquitination-mediated protein degradation in plant responses to abiotic stresses. *Environmental and Experimental Botany*, 2015, 114: 92–103

(编辑 冯小花)

The cDNA Cloning and Functional Verification of the *PhCUL1* Gene from *Pyropia haitanensis*

LIN Jianzhang, WANG Wenlei, XU Yan, XU Kai, JI Dehua, CHEN Changsheng, XIE Chaotian^①

(Fisheries College, Jimei University; Key Laboratory of Healthy Mariculture for the East China Sea, Ministry of Agriculture and Rural Affairs; Fujian Engineering Research Center of Aquatic Breeding and Healthy Aquaculture, Xiamen 361021)

Abstract Heat stress affects *Pyropia haitanensis* yield and quality, and is the main factor restricting the development of the *Pyropia* industry. Previous studies found that the genes related to the ubiquitin proteasome system (UPS) of *P. haitanensis* were significantly up-regulated under heat stress; however, its molecular function in response to high temperatures is unknown. Therefore, in this study, the function of the cullin E3 ligase gene (*PhCUL1*) was studied using molecular biology and genetics. The results showed that the full-length cDNA of *PhCUL1* was 2,500 bp, including an open reading frame (ORF) of 2,481 bp. This gene has a Cullin domain (407~618 aa) and a Cullin Nedd8 domain (754~821 aa). The Cullin Nedd8 domain is a protein fusion site that confers *PhCUL1* with E3 ligase activity. Phylogenetic analysis showed that *PhCUL1* was clustered with *P. umbilicalis*. qRT-PCR results showed that the *PhCUL1* gene was significantly induced by high temperature. In addition, a transgenic expression system of *Chlamydomonas reinhardtii* was constructed to verify the function of the *PhCUL1* gene. Transgenic *C. reinhardtii* plants overexpressing *PhCUL1* exhibited obvious tolerance to heat stress. The relative *PhCUL1* expression in *C. reinhardtii* exhibited upregulation within 6 hours. These results indicated that *PhCUL1* plays a crucial role in response to heat stress in *P. haitanensis* and its specific regulatory mechanism needs further study. This study provided a better understanding of the mechanisms of UPS in *P. haitanensis* in response to high temperature and a theoretical basis for the selection of new varieties with high temperature resistance.

Key words High temperature; *Pyropia haitanensis*; Ubiquitin-protein ligase; *Chlamydomonas reinhardtii*; Transgenic

^① Corresponding author: XIE Chaotian, E-mail: ctxie@jmu.edu.cn