

## 巴夫杜氏藻 1,5-二磷酸核酮糖羧化酶/ 加氧酶小亚基基因的克隆和分析

尚常花, 朱顺妮, 袁振宏, 吕鹏梅, 王忠铭\*

(中国科学院广州能源研究所, 可再生能源与天然气水合物重点实验室, 广东 广州 510640)

**摘要:** 1,5-二磷酸核酮糖羧化酶/加氧酶(Rubisco)是光合作用中的一个关键酶,其小亚基 *rbcS* 具有调控羧化反应催化效率和影响该酶对二氧化碳/氧气底物特异性的功能。从巴夫杜氏藻中克隆 *rbcS* 基因及其 5'-上游序列,并对基因及 5'-上游序列进行了分析。根据已知 *rbcS* 基因保守核苷酸序列设计引物,分别克隆到 1 841 bp 的 DNA 和 380 bp 的 cDNA 序列。以此为基础,使用染色体步移(Genome walking)和 cDNA 末端快速扩增(RACE)技术,获得了 799 bp 的 5'端 DNA 序列和 500 bp 的 3'端 cDNA 序列。序列分析发现,巴夫杜氏藻 *rbcS* DNA 全长为 2 031 bp(不包括 476 bp 5'-上游序列),cDNA 全长包括 570 bp 开放读码框(GenBank 登录号:HQ315783)和 294 bp 3'端非翻译区。5'-上游序列区域存在一系列预测的顺式作用元件。该研究旨在为后继的 *rbcS* 基因的功能和表达研究、Rubisco 的遗传改造奠定基础。同时,*rbcS* 启动子因其可驱动基因高效表达而引起广泛关注,因此获得的 *rbcS* 5'-上游序列经验证和优化后,可用于在嗜盐微藻中驱动转基因的高效表达以及完善微藻转化系统。

**关键词:** 巴夫杜氏藻; 基因克隆; 5'-上游序列分析; *rbcS*; 1,5-二磷酸核酮糖羧化酶/加氧酶

**中图分类号:** Q 786; S 917

**文献标识码:** A

杜氏藻(*Dunaliella*)又称盐藻,隶属于绿藻门、绿藻纲、团藻目、盐藻科,是一种重要的经济微藻。杜氏藻含有丰富的油脂、 $\beta$ -胡萝卜素、蛋白质、多糖等,因此在保健品、饵料与饲料、生物柴油等方面具有巨大的应用潜力。杜氏藻抗逆性很强,可以在 0.05~5 mol/L 的盐水中生长繁殖,在户外培养条件下不容易受到污染。

Rubisco(EC 4.1.1.39)是光合作用过程中催化 CO<sub>2</sub> 固定的关键酶,影响植物的净光合速率<sup>[1-2]</sup>,进而影响到植物的生物量。因此,研究 Rubisco 具有重要的理论意义和应用价值。在绿藻和植物中,Rubisco 由 8 个大亚基(*rbcL*)和 8 个小亚基(*rbcS*)组成,是含量最丰富的一种可溶性蛋白质<sup>[3]</sup>。*rbcL* 主要起催化作用,*rbcS* 具有调控 Rubisco 活性和影响 Rubisco 与 CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub> 特异性结

合的功能<sup>[4]</sup>,通过 *rbcS* 基因的超量表达对 Rubisco 进行遗传改造来增强光合作用进而提高植物生物量成为一个新的研究方向。近年来,关于 *rbcS* 基因转运肽、启动子活性、超量表达等方面的研究成为热点<sup>[5-6]</sup>。另外,在转基因研究中,*rbcS* 的启动子作为高效表达的调控元件应用也较多<sup>[7]</sup>。与植物相比较,对绿藻 *rbcS* 的研究非常少,关于 *rbcS* 启动子的研究则更少。具有重要研究和应用价值的杜氏藻中,仅有盐生杜氏藻(*Dunaliella salina*)和 *Dunaliella tertiolecta* 的 *rbcS* 基因被克隆,其它杜氏藻重要物种的 *rbcS* 序列未见报道,这阻碍了对杜氏藻光合作用的充分研究和利用。

本研究根据已有 *rbcS* 序列设计特异引物,扩增得到了巴夫杜氏藻(*Dunaliella parva*)的部分序

收稿日期:2010-11-19 修回日期:2011-02-25

资助项目:广东省中国科学院全面战略合作项目(2010A090100010);科技部“十二五”支撑计划(2011BAD14B03);中国科学院可再生能源与天然气水合物重点实验室基金(y107j6)

通讯作者:王忠铭,E-mail:wangzm@ms.giec.ac.cn

列。以此为基础,分别利用 RACE 和染色体步移技术(Genome walking)成功获得了巴夫杜氏藻 *rbcS* 的全长 cDNA、DNA 和 5' -上游序列。该工作为以后 *rbcS* 基因的功能、超量表达研究和对 Rubisco 的遗传改造奠定了基础。同时,获得的 *rbcS* 5' -上游序列经过验证和优化实验后可用于驱动 *rbcS* 及其它重要目的基因在杜氏藻中的高效表达。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**藻种** 巴夫杜氏藻 FACHB-815 购自中国科学院典型培养物保藏委员会淡水藻种库,接种于 Dunaliella medium 培养基中,温度为 25 °C,光照强度为 2 000 lx。

**试剂** Taq 酶、pMD 20-T 载体、T<sub>4</sub> DNA Ligase、Genome Walking Kit、RNA 提取试剂 RNAiso Plus reagent、反转录酶 PrimeScript Reverse Transcriptase、琼脂糖凝胶回收试剂盒、3'-Full RACE Core Set Ver. 2.0 kit 均购自大连宝生物公司。

**引物序列** 根据 GenBank 数据库中 *D. salina* 和 *D. tertiolecta* *rbcS* 基因的保守核苷酸序列设计了一对特异引物(*D. p-rbcS*(s1)和 *D. p-rbcS*(a1))扩增 *rbcS* 部分基因组和 cDNA 序列。5' Genome walking 和 3'-RACE 引物根据试剂盒的使用说明设计,各引物序列见表 1。

表 1 巴夫杜氏藻 *rbcS* 基因扩增用引物  
Tab. 1 Primers used for amplification of *rbcS* gene from *D. parva*

引物 primer	序列(5'→3') sequence
<i>D. p-rbcS</i> (s1)	AACCAGATGATGGTGTGG
<i>D. p-rbcS</i> (a1)	CGCTGCACCAGGAAAGAG
Race-wai	CGACAACCGTTACTGGACC
Race-nei	CCCAGGTGCTGATGGAGAT
<i>DprbcS</i> (sp1)	AACAACACGCACTGCTCCGCTCCC
<i>DprbcS</i> (sp2)	TGCGGGTGAGCAAGTGAAGAGTA
<i>DprbcS</i> (sp3)	AGCAGCACAGGAGGGCAAGCAC
<i>DprbcS</i> -N	ATGGCCGCTCTCATTGCGAAG
<i>DprbcS</i> -C	TTAGTAGCCGCCACAGAGCG
<i>rbcS</i> (qs)	ACATGCACGCACGCACACAC
<i>rbcS</i> (qa)	TGTGACTGGTTGTGTGTGTG

### 1.2 基因组 DNA 的提取和 *rbcS* 基因部分基因组 DNA 序列的扩增

12 000 r/min 离心 2 min 收集对数生长期藻细胞,再按 CTAB 法提取基因组 DNA<sup>[8]</sup>。以基因组 DNA 为模板,*D. p-rbcS*(s1)和 *D. p-rbcS*(a1)为引物,PCR 扩增 *rbcS* 基因的部分 DNA 序列。反应程序为 94 °C 预变性 3 min;94 °C 30 s,55 °C 30 s,72 °C 2 min,30 个循环;最后在 72 °C 延伸 5 min。PCR 产物回收纯化、连接、转化与重组子检测均按常规的分子生物学实验方法进行。阳性重组子送上海英骏生物技术公司测序。

### 1.3 总 RNA 的提取和 *rbcS* 基因部分 cDNA 序列的扩增

向处于对数生长期藻细胞中加入 RNAiso Plus reagent,提取总 RNA。取 1 μg RNA 使用 oligo(dT)<sub>17</sub>引物和反转录酶 PrimeScript Reverse Transcriptase 进行反转录反应生成 cDNA。以 cDNA 为模板,*D. p-rbcS*(s1)和 *D. p-rbcS*(a1)为引物,PCR 扩增 *rbcS* 基因的部分 cDNA 序列。反应程序为 94 °C 预变性 3 min;94 °C 30 s,55 °C 30 s,72 °C 30 s,30 个循环;最后在 72 °C 延伸 5 min。

### 1.4 *rbcS* 基因的 5' Genome walking 和 3'-RACE 扩增

利用已获得的 *D. parva rbcS* 的部分 DNA 和 cDNA 序列,表 1 中的 5' Genome walking 基因特异性引物[*DprbcS*(sp1)、*DprbcS*(sp2)和 *DprbcS*(sp3)]和 3'-RACE 基因特异性引物,按试剂盒的说明分别进行 5' Genome walking 和 3'-RACE 扩增。

### 1.5 *rbcS* 基因全长及 5' -上游序列的获得和分析

将得到的 *D. parva rbcS* 的部分 DNA 和 cDNA 序列与 5' Genome walking 和 3'-RACE 扩增获得的上下游序列进行拼接。根据拼接序列,设计扩增 DNA 和 cDNA 全长的引物(*DprbcS*-N 和 *DprbcS*-C)以及扩增 5' -上游序列的引物[*rbcS*(qs)和 *rbcS*(qa)],来验证拼接序列的正确性。用 NCBI Blastx 软件进行 *rbcS* 基因的同源性比对。

## 2 结果

### 2.1 *rbcS* 部分基因组 DNA 与 cDNA 序列的获得与分析

以 *D. p-rbcS*(s1)和 *D. p-rbcS*(a1)为引物,通过 PCR 扩增获得了 1 841 bp DNA 和 380 bp

cDNA。利用 Blast x 软件分析获得的序列,结果显示:*D. parva rbcS* cDNA 序列与 *D. salina rbcS* 的相似性最高,为 97%,与 *D. tertiolecta*、*Haematococcus pluvialis* 的相似性分别为 84%、76%。表明所获得的部分序列是 *rbcS* 基因的序列。

## 2.2 *rbcS* 的 5' Genome walking 和 3'-RACE 结果与分析

根据已获得的 *rbcS* 部分序列,用 5' Genome walking 和 3'-RACE 的方法扩增得到了 *rbcS* 的 DNA5'端和 cDNA3'端序列,大小分别为 799 bp 和 500 bp。分析获得的 DNA5'端序列时,发现了

位于起始密码子上游长 476 bp 的 5' - 上游序列。分析获得的 3'-RACE cDNA 序列时,发现了 294 bp 的 3'非翻译区序列和 15 bp 的 poly A 序列,表明获得了完整的 *rbcS* 3'端 cDNA。

经设计 DNA 和 cDNA 全长扩增引物以及 5' - 上游序列扩增引物进行验证,表明 5' - 上游序列及拼接的序列均正确。*D. parva rbcS* cDNA ORF 为 570 bp (GenBank 号 HQ315783) (图 1)。*rbcS* DNA 全长为 2 031 bp,包括 5 个外显子和 4 个内含子,5 个外显子的长度分别为 168、69、96、126 和 111 bp,4 个内含子的长度分别为 245、160、516 和 540 bp。

```

1 ATGGCGCTCTCATTGCGAAGACCGCCCCAGTAGCCACCCCATCAGCGCGGCAGCA
  CCAAGGTGCAGGCGTCCCTGCGCCCTGCGGTGACCCGCCCGCCOCCAAGGCGCAGG
  TCCCCGCCTGCGCGCCAACAGATGATGGTGTGGCAGCCCGTGAACAACAGCAGT
  TCGAGACCTTCTOCTACCTGCCCCCTGACTGCGACCCAGATGCGCAAGCAGGTGGA
  CTACATCGTGGGCAACGGCTGGATTCCCTGCCTGGAGTCTCTGAGGAGTCTACGCCT
  ACGTGGCCAACACCAACACCGTGGCGCTTCGGCCCCGTGTCCAACAACACTACTACGACA
  ACCGTTACTGGACCATGTGGAAGCTGCCATGTTGGCTGCAACGAACCCCGCCAGGT
  GCTGATGGAGATCCAGAAGTCTCCCGCGCCTTCCTGAGGCCTACCAGCGCCTGGTG
  GCCTTOGACACAAGAGGCAAGTGCAGGTCATCTCTTCTGCTGTCAGCGCCCAAG
  AACTCCACTGACTACTGCCATCGACAGCGCTCTGTGGCGGGCTACTAAGCGCCTT
  ACTGTGGGGGGCTTTTTTCTTTATCCGGGGGCATTCATGTGTGTGGCTGGGTGTTAGAA
  GGCTGGGGCTGTGAACTGTCAGTCCAAACCTCATGGCTGCAAATGTGCAGCGATTGCT
  TTCTTTCTGCTGTATGTAATGCAGCCATAGTGCGAGCTGTGCGCGGAATGCGCCAAT
  GTGCAGTGCAGCGCATTGTGCATGTTATGTGCTGTAGGTGTGTGCAGCTTGATGCAGAAT
  AATTCTCTTACTGTTTCTCAACAACATGAAAGGCTTACAAATTCGAAAAAAAAA
872 AAAAAAAAAA

```

图 1 *D. parva rbcS* 基因的全长 cDNA 序列

下划线表示起始密码子 ATG 和终止密码子 TAA,方框表示 poly(A) 结尾信号。

Fig. 1 Full-length cDNA sequence of *rbcS* gene

The underlined sequences indicate initiation codon ATG and termination codon TAA. Box indicates the putative signal of poly(A) tail.

将 *D. parva rbcS* cDNA 全长序列进行 Blast x 同源性比对后,发现与已知 *rbcS* 序列具有广泛的同源性。与 *D. parva rbcS* 相似性比较高的有 *D. salina*、*D. tertiolecta*、*Volvox carteri*,相似性分别为 95%、80%、68%。利用 Clustal W 和 MEGA 4 软件,构建了 *rbcS* 的系统发育树(图 2)。*D. parva rbcS* 与 *D. salina rbcS* 表现出最高的相似性,这符合传统的分类系统。

## 2.3 *rbcS* cDNA 全序列的分析

对 *D. parva rbcS* cDNA 序列进行分析,发现起始密码子附近序列为 ACAATGG,这符合真核生物的 Kozak 保守序列(A/GXXATGG)<sup>[9]</sup>。在 *D. parva rbcS* 的 3'非翻译区发现加尾信号

TGTAA,该信号在 *D. salina rbcS* 中也出现过<sup>[10]</sup>。

高等植物 *rbcS* 序列中通常会出现长度为 16 个氨基酸的一段保守序列,该序列在茶树(*Camellia sinensis*)中是 YYDGRYWTMWKLPFG<sup>[11]</sup>。在 *D. parva rbcS* 的第 113 - 128 位,同样发现了该保守序列 YYDNRYWTMWKLPFG,与茶树保守序列在第 4 个氨基酸有差别,与蛋白核小球藻 F-9 相同<sup>[12]</sup>。使用 ChloroP 1.1 软件对 *D. parva rbcS* 进行分析,发现在其氨基端存在叶绿体转位肽,最可能的切割位点在第 45 位氨基酸 Asn 和第 46 位氨基酸 Gln 之间,这与 Rubisco 小亚基 *rbcS* 由核基因组编码定位于叶绿体中的报道是一致的。使用 NCBI CD-Search 进行分析,发现 *D. parva rbcS* 存在保守的功

能域 RuBisCO\_small。

#### 2.4 *rbcS* 5' - 上游序列的分析

使用引物 *rbcS*(qs) 和 *rbcS*(qa) 进行 PCR 扩增,获得了 476 bp 的 5' - 上游序列,该序列包含典型的启动子元件 CAAT box(图 3)。此外还发

现了与激素、光照和环境压响应相关的调控元件,包括 ABRE(参与脱落酸响应)、光照响应元件(Box 4、CATT-motif 和 TCCC-motif)、MBS(参与干旱胁迫应答)和 GC-motif(涉及缺氧诱导的增强子类元件)。

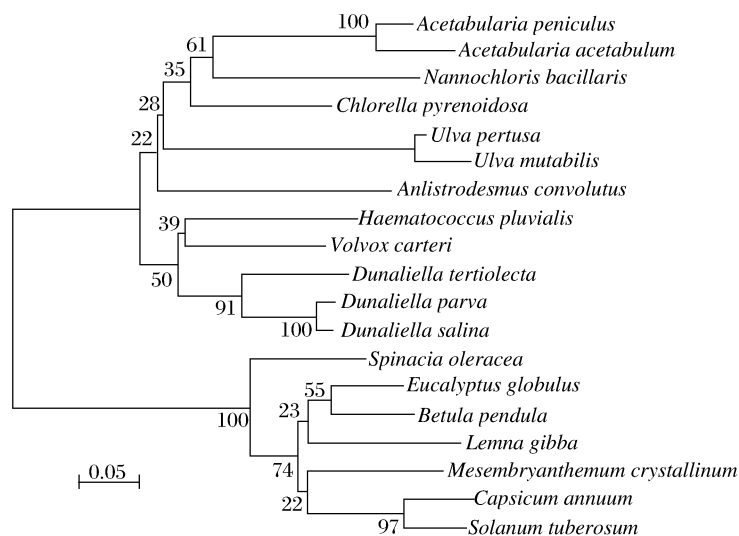


图 2 采用 Neighbor-Joining 方式根据 *rbcS* 氨基酸序列构建的系统进化树

使用 Clustal W 和 MEGA 4 软件构建了系统进化树,节点上的数字表示分支可信度的百分比。

Fig. 2 Phylogenetic analysis of *rbcS* amino acid sequences using the Neighbor-Joining method

Phylogenetic tree was constructed by Clustal W and MEGA 4. Bootstrap values are indicated as percentages at the nodes.

```

-476 ACATGCACGCACGCCACACACACACACACGCACGCACGCACTCACGCTCTTCGCAAAA
      ABRE
CCCCTGCTGCACCGCCCAGCTTCCTTCAGGTGCTGCTCTCTCCGCCAGCTAACGCAGAG
      MBS
GCAGCACCAGCGGCAATGCTCTCCGCAGAACTTGCTGTCTGGCTCTCCCTTTGGGCTT
      CAAT-box TCCC-motif
TCTGCTTGCCGCAGCCTTCAACACTCAGCAATCACGGGCTAGCACACGCTGTGCAGCG
      CAAT-box
CTGACCAGCTGCCCTGCGTGCTACGATTACCAGCCCCAGGCGCCCTGGCCTGCATTG
      CATT-motif
CAAGCTGTGTTTGCCTTGCATCCCCCGTGAGGCCCACTCTGCAAAACACGAGTGAA
      GC-motif
CAGGGACAGGAGCAGGTGCTCAGCCCTACAGGAGGGGTTTGGTTGTTTATGGGAGTTT
GAGCCAAGCCCTCGTCCCACACTCAATTAATTCCTTCTAGCCCCTCCACACACACACA
      Box 4
-12 CAACCAGTCACAATG
      +1

```

图 3 在巴夫杜氏藻 *rbcS* 基因的 5' - 上游序列区域预测的顺式作用元件

翻译起始位点 ATG,其位置定义为 +1,预测的顺式作用元件用下划线标记,名字写在对应的元件下面。

Fig. 3 Predicted cis-acting elements in the 5'-flanking sequence of the *D. parva* *rbcS* gene

The translation start site ATG, was defined as position +1, the predicted cis-acting elements are underlined, and the name is given under its element.

### 3 讨论

本研究从重要的经济微藻 *D. parva* 中克隆到了 *rbcS* 基因的 cDNA 全长、DNA 全长及 5' - 上游序列。同时,本研究尚未进行 *rbcS* 基因超量表达方面的研究,获得的 5' - 上游序列比较短,这都是后继实验要解决的问题。

前人的研究建议通过对 Rubisco 进行遗传改造来增强光合作用进而提高植物生物量<sup>[6]</sup>。通过遗传工程方法来改变 Rubisco 含量已经在一些生物中进行了试验。这些研究包括在 *Flaveria bidentis*<sup>[13]</sup>、水稻<sup>[14]</sup>和烟草<sup>[15]</sup>中转化反义 *rbcS*。在含有反义 *rbcS* 的转基因烟草中,*rbcS* 的 mRNA 水平降低,*rbcL* 的 mRNA 水平不变,但是 *rbcS* 和 *rbcL* 蛋白的总量降低<sup>[16]</sup>。另有研究表明,在含有反义 *rbcS* 的转基因烟草中,烟草的生长被阻滞<sup>[17]</sup>。含反义 *rbcS* 的转基因水稻在 36 Pa CO<sub>2</sub> 的条件下生长,其最终生物量明显低于野生型水稻<sup>[18]</sup>。在含反义 *rbcS* 的转基因水稻中观察到了叶面积比的增加<sup>[18]</sup>,这一现象被认为是对叶面积基础上光合作用减弱在全植株水平的一种补偿现象。然而,关于通过转化正义 *rbcS* 来超量表达 Rubisco 的研究非常少。最近,SUZUKI 等<sup>[19]</sup>将水稻 *rbcS* 基因家族中的一个 *rbcS* 在其自身启动子的控制下转化到水稻的幼嫩叶中。实验结果表明,在含正义 *rbcS* 的转基因水稻中,扩展叶中所有 *rbcS* 的 RNA 水平是对照的两倍,*rbcL* 的 mRNA 水平有轻微的增加,在叶面积基础上 Rubisco 含量增加了 30%<sup>[19]</sup>。然而,与对照植株相比,光饱和的光合作用速率并没有增强。此外,SUZUKI 等<sup>[20]</sup>在水稻中过量表达 *rbcS* 并没有导致光合作用和生长的增强。迄今为止,关于这种现象的原因仍然不清楚。然而,有关在微藻中超量表达 *rbcS* 或者表达反义 *rbcS* 的研究很少。因此,我们的工作有助于将来了解在微藻中 *rbcS* 的遗传改造对光合作用和生长的影响。

*rbcS* 全长 cDNA 的获得为以后 *rbcS* 基因的功能、超量表达研究和对 Rubisco 的遗传改造奠定了基础。获得的 *rbcS* 5' - 上游序列经过验证和缺失实验后可得到优化的长度,用于驱动重要目的基因在杜氏藻中的高效表达。在 *rbcS* 5' - 上游序列区域,发现了一些外部环境响应元件,有助于今后对该 5' - 上游序列进行有效的调控。

### 参考文献:

- [ 1 ] EVANS J R. The relationship between carbon-dioxide-limited photosynthetic rate and ribulose-1,5-bisphosphate-carboxylase content in two nuclear-cytoplasm substitution lines of wheat, and the coordination of ribulose-bisphosphate-carboxylation and electron-transport capacities [ J ]. *Planta*, 1986, 167(3):351 - 358.
- [ 2 ] MAKINO A, MAE T, OHIRA K. Differences between wheat and rice in the enzyme properties of ribulose-1, 5-bisphosphate carboxylase/oxygenase and their relationship to photosynthetic gas exchange [ J ]. *Planta*, 1988, 174(1):30 - 38.
- [ 3 ] SPREITZER R J, SALVUCCI M E. RUBISCO: structure, regulatory interactions, and possibilities for a better enzyme [ J ]. *Annu Rev Plant Biol*, 2002, 53: 449 - 475.
- [ 4 ] GENKOV T, MEYER M, GRIFFITHS H, *et al.* Functional hybrid rubisco enzymes with plant small subunits and algal large subunits: engineered *rbcS* cDNA for expression in *Chlamydomonas* [ J ]. *J Biol Chem*, 2010, 285(26):19833 - 19841.
- [ 5 ] SPREITZER R J. Role of the small subunit in ribulose-1, 5-bisphosphate carboxylase/oxygenase [ J ]. *Archives Biochem Biophys*, 2003, 414(2): 141 - 149.
- [ 6 ] PARRY M A, ANDRALOJC P J, MITCHELL R A, *et al.* Manipulation of Rubisco: the amount, activity, function and regulation [ J ]. *J Exp Bot*, 2003, 54(386):1321 - 1333.
- [ 7 ] OUTCHKOUROV N S, PETERS J, DE JONG J, *et al.* The promoter-terminator of chrysanthemum *rbcS1* directs very high expression levels in plants [ J ]. *Planta*, 2003, 216(6):1003 - 1012.
- [ 8 ] SAGHAI-MAROOF M A, SOLIMAN K M, JORGENSEN R A, *et al.* Ribosomal DNA spacer-length polymorphisms in barley: mendelian inheritance, chromosomal location and population dynamics [ J ]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1984, 81(24):8014 - 8018.
- [ 9 ] KOZAK M. Recognition of AUG and alternative initiator codons is augmented by G in position + 4 but is not generally affected by the nucleotides in positions + 5 and + 6 [ J ]. *EMBO J*, 1997, 16(9): 2482 - 2492.
- [ 10 ] 柴玉荣,刘国红,刘红涛,等. 杜氏盐藻 Rubisco 小亚基基因的克隆和分析 [ J ]. *生命科学研究*, 2008, 12(1):29 - 34.

- [11] YE A H, JIANG C J, ZHU L, *et al.* Cloning and sequencing of a full-length cDNA encoding the RuBPCase small subunit (RbcS) in tea (*Camellia sinensis*) [J]. *Agric Sci China*, 2009, 8 (2): 161-166.
- [12] 李春燕, 孙雪, 杨锐. 两株蛋白核小球藻 rbcS cDNA 全序列的克隆和分析[J]. *中国水产科学*, 2010, 17(2): 357-362.
- [13] FURBANK R T, CHITTY J A, VON CAEMMERER S, *et al.* Antisense RNA inhibition of RbcS gene expression reduces Rubisco level and photosynthesis in the C<sub>4</sub> plant *Flaveria bidentis*[J]. *Plant Physiol*, 1996, 111(3): 725-734.
- [14] MAKINO A, SHIMADA T, TAKUMI S, *et al.* Does decrease in ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase by antisense rbcS lead to a higher N-use efficiency of photosynthesis under conditions of saturating CO<sub>2</sub> and light in rice plants[J]. *Plant Physiol*, 1997, 114(2): 483-491.
- [15] HUDSON G S, EVANS J R, VON CAEMMERER S, *et al.* Reduction of ribulose-1, 5-bisphosphate carboxylase/oxygenase content by antisense RNA reduces photosynthesis in transgenic tobacco plants [J]. *Plant Physiol*, 1992, 98(1): 294-302.
- [16] RODERMEL S R, ABBOTT M S, BOGORAD L. Nuclear-organelle interactions; nuclear antisense gene inhibits ribulose bisphosphate carboxylase enzyme levels in transformed tobacco plants [J]. *Cell*, 1988, 55(4): 673-681.
- [17] MASLE J, HUDSON G S, BADGER M R. Effects of ambient CO<sub>2</sub> concentration on growth and nitrogen use in tobacco (*Nicotiana tabacum*) plants transformed with an antisense gene to the small subunit of ribulose-1, 5-bisphosphate carboxylase/oxygenase [J]. *Plant Physiol*, 1993, 103(4): 1075-1088.
- [18] MAKINO A, HARADA M, KANEKO K, *et al.* Whole-plant growth and N allocation in transgenic rice plants with decreased content of ribulose-1, 5-bisphosphate carboxylase under different CO<sub>2</sub> partial pressure [J]. *Aust J Plant Physiol*, 2000, 27(1): 1-12.
- [19] SUZUKI Y, OHKUBO M, HATAKEYAMA H, *et al.* Increased Rubisco content in transgenic rice transformed with the 'sense' rbcS gene [J]. *Plant Cell Physiol*, 2007, 48(4): 626-637.
- [20] SUZUKI Y, MIYAMOTO T, YOSHIZAWA R, *et al.* Rubisco content and photosynthesis of leaves at different positions in transgenic rice with an overexpression of RBCS [J]. *Plant Cell Environ*, 2009, 32(4): 417-427.

## Cloning and characterization of a gene encoding small subunit of ribulose-1, 5-bisphosphate carboxylase/oxygenase from *Dunaliella parva*

SHANG Chang-hua, ZHU Shun-ni, YUAN Zhen-hong, LÜ Peng-mei, WANG Zhong-ming\*

(Key Laboratory of Renewable Energy and Natural Gas Hydrate, Guangzhou Institute of Energy Conversion, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510640, China)

**Abstract:** Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (Rubisco) is a key enzyme in photosynthesis, and its small subunit gene *rbcS* can affect the carboxylation catalytic efficiency and CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub> specificity of the enzyme. We cloned and described the *rbcS* gene and promoter from *Dunaliella parva*. Based on the highly conserved nucleotide regions of known *rbcS*, a pair of specific primers were synthesized to amplify 380 bp cDNA and 1 841 bp DNA sequence in *Dunaliella parva*. Then the 5' genomic DNA and 3' cDNA sequences were cloned by Genome walking and rapid amplification of cDNA ends (RACE) technology. Based on the sequences of the 5'- and 3'-termini, primers were synthesized to obtain the full-length genomic DNA and cDNA. The full-length *rbcS* cDNA contained 570 bp open reading frame (ORF) (GenBank accession no. HQ315783), 294 bp of 3' noncoding region. The full-length *rbcS* genomic DNA was 2 031 bp. In addition, a 476 bp promoter was obtained. Similarity analysis revealed that the highest identity was found between *D. parva* and *Dunaliella salina*. The *D. parva* *rbcS* also showed wide similarity with other green algae. This study laid foundation for further research on the function analysis and overexpression of *rbcS* genes, genetic manipulation of Rubisco. In addition, high levels of expression have made the promoter of the *rbcS* gene an attractive candidate to drive expression of transgene. Therefore the *D. parva* *rbcS* promoter after optimization should facilitate the development of transformation system of halotolerant algae and efficient expression of transgene.

**Key words:** *Dunaliella parva*; gene cloning; promoter analysis; *rbcS*; Rubisco

**Corresponding author:** WANG Zhong-ming. E-mail: wangzm@ms.giec.ac.cn