

集胞藻 PCC 6803 中 II 型 RNA 结合蛋白对于脂肪酸组成的效应

唐靖, 谈晓明, 徐旭东*

中国科学院水生生物研究所淡水生态与生物技术国家重点实验室, 武汉 430072

* 联系人, E-mail: xux@ihb.ac.cn

2009-11-13 收稿, 2010-01-14 接受

国家自然科学基金(30825003)、国家重点基础研究发展计划(2008CB418001)和中国科学院知识创新工程方向性项目(KZCX1-YW-14-1)资助

摘要 在集胞藻 PCC6803 中, II 型 RNA 结合蛋白基因 *rbp3* 在温度下降时仅有轻微上调. 与野生型相比, *rbp3* 突变株中膜脂多不饱和脂肪酸(PUFA)总量显著减少. 但是, PUFA 的减少并未达到影响其在低温下生长的程度. 突变株中的脂肪酸脱饱和酶基因 *desA*, *desB* 和 *desD*, 以及在 15℃ 生长所需要的基因 *ccr-1* 的 mRNA 显著减少, 而 *rbp1* (RNA 结合蛋白 1) 和 *crhR* (RNA 解旋酶轻链) 的 mRNA 不受影响. 因而, Rbp3 可直接或间接地影响某些基因的 mRNA 水平.

关键词

Rbp3

脂肪酸组成

des 基因

集胞藻

RRM (RNA-recognition motif) 类型的 RNA 结合蛋白(Rbps)可参与许多转录后调控过程^[1]. 蓝藻的 Rbps 均含有单个 RRM 区域, 有的具有 1 个短的 C-端富含甘氨酸的区域, 称 I 型; 有的不具有 C-端区域, 称 II 型^[2,3]. I 型 Rbps 基因在冷胁迫下迅速诱导表达, 而 II 型 Rbps 基因通常不诱导或仅有轻微诱导^[2-4]. 多变鱼腥藻(*Anabaena variabilis*)的 *rbpA* 突变株在从 38℃ 转入 22℃ 时诱导早期异形胞分化, 显示 RNA 结合蛋白对于保持正确的基因表达的作用^[2]. 聚球藻(*Synechococcus* sp.) PCC7942 的 *rbp1* 突变株在低温下比野生型生长差^[5]. 鱼腥藻的 RbpA 和聚球藻的 Rbp1 都属于 I 型 RNA 结合蛋白. 已报道的 II 型 RNA 结合蛋白有聚球藻的 Rbp2^[3,5]、鱼腥藻的 RbpD^[2,6]、鱼腥藻和颤藻(*Oscillatoria* sp.)的 RbpG^[6]. 聚球藻的 *rbp2* 基因被插入失活并不影响在低温下的生长^[5]. 至今, 尚无蓝藻 II 型 Rbps 对于基因表达水平影响的报道.

蓝藻中有 4 种脂肪酸脱饱和酶基因, 即 *desA*, *desB*, *desC* (在某些种包括 *desC1* 和 *desC2*) 以及 *desD*^[7,8]. 在集胞藻 PCC 6803 (以下称集胞藻 6803) 中, *desA*, *desB*

和 *desD* 在光照的条件下受低温诱导^[9]. 这 4 种脂肪酸脱饱和酶分别在 18 碳脂肪酸的 $\Delta 6$, $\Delta 9$, $\Delta 12$ 和 $\omega 3$ 位置引入不饱和键, 增加脂肪酸脱饱和酶基因的表达可恢复膜脂在低温下的流动性^[7,10]. *desA* 的失活可显著削弱集胞藻 6803 在 20℃ 的生长, 而 *desB* 和 *desD* 失活不发生影响^[11]. 在低温下的生长依赖于膜脂中 C18:2, C18:3 和 C18:4 脂肪酸总百分比^[11].

本文提供的证据显示, 在集胞藻 (*Synechocystis* sp.) 6803 中, II 型 RNA 结合蛋白 Rbp3 是保持较高脂肪酸不饱和度所需要的. 与此相应, *desA*, *desB* 和 *desD* 的 mRNA 水平在该种蓝藻的 *rbp3* 突变株中也显著减少.

1 材料与方法

(i) 藻株、培养条件、脂肪酸组成及荧光素酶活力测定. 集胞藻 6803 来自本所赵进东研究员, 在温度 30℃、光强 $30 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 的条件下以 BG11 培养基进行摇床培养, 在混养培养时培养基中另外添加 5 mmol/L 葡萄糖. 对于蓝藻转化子的培养, 根据需要在培养基中添加浓度为 5, 20 或 $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ 的红

英文版见: Tang Q, Tan X M, Xu X D. Effects of a type-II RNA-binding protein on fatty acid composition in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Chinese Sci Bull*, 2010, 55, doi: 10.1007/s11434-010-3254-9

霉素、卡那霉素或壮观霉素。脂肪酸组成及萤光素酶活力的测定按照文献[12]报道的方法进行,所测数据为3次独立实验结果的平均值。

(ii) 质粒及突变株的构建. 分子生物学操作按标准方法进行,所用的工具酶按照说明书上的建议使用,PCR产物克隆后利用DNA测序确认无误,实验所用的PCR引物见表1。

构建用于在大肠杆菌(*Escherichia coli*)中表达 *Rbp1* 的质粒 pHB2540: 以 slr0193-a3 和 slr0193-a4 为引物,利用PCR扩增 *rbp3* 基因,将PCR产物克隆到 pMD18-T (TaKaRa)中,得到重组质粒 pHB2494,利用 *Nde* I 和 *Xho* I 双酶切从 pHB2494 上切下含有 *rbp3* 的片段,克隆到 pET21b 的 *Nde* I 和 *Xho* I 之间,得到

重组质粒 pHB2540。

构建用于在集胞藻 6803 中敲除 *rbp3* 的质粒 pHB2547 和 pHB3175: 利用引物 slr0193-k1 和 slr0193-k2 扩增含有 *rbp3* 5'端及上游序列,PCR产物克隆到 pMD18-T 中,得到质粒 pHB2495. 利用 *Xho* I 从 pHB576^[13]上切下 *Sp*^r 片段,克隆到 pHB2495 的 *Xho* I 位点,得到质粒 pHB2534. 同时利用引物 slr0193-k3 和 slr0193-k4 扩增含有 *rbp3* 基因 3'端及下游序列,PCR产物克隆到 pMD18-T 中,得到质粒 pHB2496. 利用 *Pvu* II 将含有 *rbp3* 基因及 *Sp*^r 的片段从 pHB2534 上切下,克隆到 pHB2496 的 *Sma* I 位点,得到质粒 pHB2547,该质粒中 *rbp3* 的上下游序列同向,中间夹着 *Sp*^r 基因. 利用 *Xba* I 从 pRL446^[13]上切下 *Km*^r 片

表1 蓝藻藻株和引物^{a)}

藻株, 引物	特征描述和引物序列	来源或涉及基因
藻株		
集胞藻 PCC 6803	野生型	赵进东研究员提供
DRHB2263 [*]	<i>Sp</i> ^r , <i>desB</i> : <i>luxAB</i> - <i>Sp</i> ^r , 以 pHB2263 转化集胞藻 6803	本研究
DRHB2547	<i>Sp</i> ^r , Δ <i>rbp3</i> / <i>Sp</i> ^r , 以 pHB2547 转化集胞藻 6803	本研究
DRHB2547/DRHB2830	<i>Cm</i> ^r <i>Em</i> ^r <i>Sp</i> ^r , 以野生型 <i>rbp3</i> 互补 Δ <i>rbp3</i> / <i>Sp</i> ^r , 即以 pHB2830 转化 DRHB2547	本研究
DRHB3175	<i>Km</i> ^r , Δ <i>rbp3</i> / <i>Km</i> ^r , 以 pHB3175 转化集胞藻 6803	本研究
DRHB3175/DRHB2263	<i>Km</i> ^r <i>Sp</i> ^r , Δ <i>rbp3</i> / <i>Km</i> ^r <i>desB</i> : <i>luxAB</i> - <i>Sp</i> ^r , 以 pHB2263 转化 DRHB3175	本研究
引物(5'→3')		
crhR-1 [†]	CTTTGCCCTACCTTTGATG	<i>crhR</i>
crhR-2 [†]	GGCTTCCTTGAGTTGTTCC	
desA-1 [†]	CAACGGTAACGCCAGCA	<i>desA</i>
desA-2 [†]	CAAACAGGAAGACAACGGCA	
desB-1 [†]	CGACACCGACGAAAGTTGG	<i>desB</i>
desB-2 [†]	CTTGATGGCTTCAGTCGCC	
slI1141-1	CTTGATGGCTTCAGTCGCC	
slI1141-2	CTGCTCAAGGGTTTGGATGA	
slI1242-1 [†]	CTAGTGGGTCGGAAGGTTT	<i>ccr-1</i>
slI1242-2 [†]	CTGAGTAACTGGGCTGGTTC	
desD-1 [†]	AACCAACGGGTGGATGCCT	<i>desD</i>
desD-2 [†]	AGAGCCAGAGGTAAGCCGA	
slI0517-1 [†]	TCTCATATGTCAATTATGTAGGCAACCTGTCC	<i>rbp1</i>
slI0517-2 [†]	TTTCTCGAGTGGTGGAACGCGCGAA	
slr0193-a3	TTTCATATGTCCATTCTCTCTACGTCGGTAA	<i>rbp3</i>
slr0193-a4	AAACTCGAGAGGAAAACCTGTGGACCTACT	
slr0193-k1	CGGACTTCACCACTATTTACGA	
slr0193-k2	GAGACGAATGGACATGATCTAAATACCT	
slr0193-k3	CAGTAGGTCCACAGGTTTTC	
slr0193-k4	AACTCCGCTGGGTTGGTAA	
slr0193-c	CTGGCTCTGATGTTGGCT	
slr0193-4	AAACTCGAGAGGAAAACCTGTGGACCTACT	
rnpB-1 [†]	GTTAGGGAGGGAGTTGCGG	<i>rnpB</i>
rnpB-2 [†]	AAGAGAGTTAGTCGTAAGCCG	

a) Ap, 氨苄青霉素; Cm, 氯霉素; Em, 红霉素; Km, 卡那霉素; Sp, 壮观霉素. *, DRHB 后缀号码代表以相应号码的 pHB 质粒转化集胞藻获得的双交换子. †, 用于以 PCR 合成 Northern blot 杂交探针的引物

段, 将 Km^r 片段克隆到 pHB2547 中, 以 Km^r 取代原质粒中的 Sp^r , 得到质粒 pHB3175.

构建用于互补 *rbp3* 突变株 DRHB2547 的质粒 pHB2830: 利用引物 slr0193-c 和 slr0193-4 进行 PCR 扩增含有 *rbp3* 基因的片段, 克隆到 pMD18-T 中, 得到重组质粒 pHB2822. 利用 *Xba* I 从 pHB598^[14] 上切下含有 C.CE2 的片段, 克隆到质粒 pHB2822 的 *Xba* I 位点, 得到质粒 pHB2825. 将含有 *rbp3*-C.CE2 的片段用 *Kpn* I 和 *Hind* III 双酶切切下后补平, 和经过 *Eco* R I 酶切并补平的 pKW1188^[15] 相连, 得到质粒 pHB2830.

用于检测 *desB* 启动子活性的质粒 pHB2263 的构建: 利用引物 slII1141-1 和 slII1141-2 PCR 扩增含有 *desB* 启动子的片段, 克隆到 pMD18-T 中, 得到质粒 pHB512. 将含有 *luxAB*- Sp^r 的片段用 *Sma* I 从 pRL58^[16] 上切下, 克隆到质粒 pHB512 中 *desB* 基因的 *Bal* I 位点, 得到重组质粒 pHB2263.

利用表 1 中所列的质粒通过转化得到 *Synechocystis* 的各种突变株, 转化方法按照 Williams 等人^[15] 所述方法进行, 利用 PCR 的方法对突变株的基因分离情况进行检测.

(iii) Northern blot 分析. 利用 TRIzol 试剂盒 (Invitrogen, USA) 从集胞藻 6803 中提取总 RNA, 得到的总 RNA 用无 RNase 的 DNase I 去除 RNA 中的基因组 DNA. 利用针对特定基因的引物(表 1)进行 PCR 扩增得到不同的产物, 利用地高辛-dUTP 进行标记并作为 Northern blot 的杂交探针. 利用试剂盒 DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit I (Roche, USA) 进行 Northern blot 杂交分析. 利用 *rnpB* 作为组成型表达的内标^[17]. 对 3 次独立的 Northern blot 实验结果利用 Image J 1.42q (Wayne Rasband, National Institute of Health, USA) 对杂交带进行定量分析.

(iv) RNA 结合活性的分析. 将 pHB2540(表 1) 导入到 *E. coli* BL21 (DE3), 经 IPTG 诱导后超声波破细胞, 收集含有 Rbp3 的可溶蛋白组分, 利用 HiTrap 肝素柱(Amersham, USA)纯化 Rbp3 蛋白. 按照 Sato^[18] 所述方法进行凝胶过滤实验. 利用 12% SDS-PAGE 分离蛋白并用考马斯亮蓝 R-250 染色观察.

2 结果

2.1 Rbp3 是 II 型 RNA 结合蛋白

在集胞藻 6803 中, *rbp3* 编码一个没有 C-端富甘

氨酸区域的 RNA 结合蛋白. Northern blot 杂交结果显示其转录本大小约 600 nt(图 1(a)). 对 3 次独立实验的 Northern blot 杂交带进行定量分析, 结果表明, 在集胞藻 6803 从 30℃ 转移到 15℃ 时 *rbp3* 的 mRNA 水平有轻微上调(图 1(b)).

为测试所编码的 Rbp3 蛋白的 RNA 结合活性, 在大肠杆菌表达该蛋白, 以肝素柱纯化. RNA 结合活性以凝胶过滤法进行测试(图 1(c)). 在本研究条件下, Rbp3 或者 Rbp3 加双链 DNA 均不能通过 Sephadex G-50 凝胶柱, 而与集胞藻 6803 总 RNA 相混合时, 一些 Rbp3 可从凝胶柱洗脱出来. 因而可以认为, Rbp3 确实具有结合 RNA 的能力. 这些结果显示, 蓝藻中的 Rbp3 确系 II 型 RNA 结合蛋白.

2.2 Rbp3 对于脂肪酸组成的效应

为研究 Rbp3 的功能, 以 *Sp* 抗性基因置换其编码基因, 得到 DRHB2547 突变株($\Delta rbp3/Sp^r$)(图 2, 表 1). *rbp3* 突变株在 30℃ 和 15℃ 生长速率(分别为 1.33 ± 0.06 和 0.45 ± 0.02) 代/d 与野生型(分别为 1.33 ± 0.20 和 0.45 ± 0.04) 代/d 相同. 然而, 与野生型相比, 突

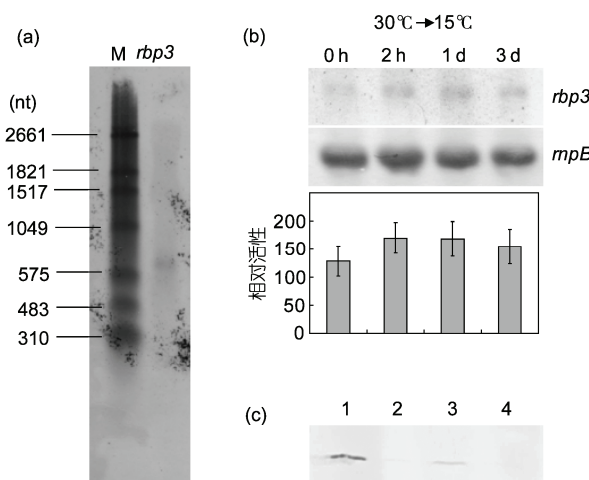


图 1 *rbp3* mRNA 的 Northern blot 分析及其编码产物的 RNA 结合活性的检测

(a) Northern blot 分析测算 *rbp3* mRNA 大小. M, RNA 分子量标记. (b) Northern blot 分析显示从 30℃ 转入 15℃ 时集胞藻 6803 中 *rbp3* mRNA 水平的变化. 对 3 次实验结果中杂交带强度用软件 Image J 1.42q 进行定量. 用 *rnpB* (RNase P 亚单位 B)^[17] 的 mRNA 作为参照. (c) 用凝胶过滤法测试 Rbp3 的 RNA 结合活性并用 SDS-PAGE 检测洗脱蛋白. 泳道 1, Rbp3 (5 μ g); 泳道 2~4, Sephadex G-50 加样 Rbp3 (5 μ g), Rbp3 (5 μ g) + RNA (15 μ g), Rbp3 (5 μ g) + DNA (15 μ g) 的洗脱蛋白. 结合活性测试中使用的 RNA 和 DNA 分别是集胞藻 6803 提取的总 RNA 和 *Hind* III 酶切的 lambda DNA

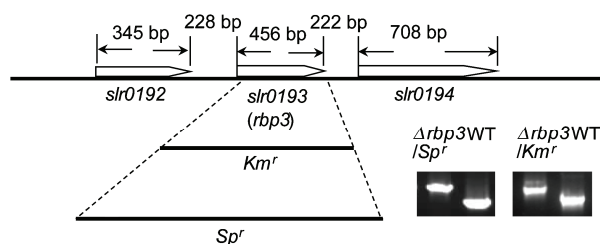


图2 在集胞藻 6803 中以 Km 抗性基因和壮观霉素抗性基因取代 *rbp3*

以引物 slr0193-k1 和 slr0193-k4(表 1)进行 PCR 证实突变株 DRHB2547 ($\Delta rbp3/Sp^r$)和 DRHB3175 ($\Delta rbp3/Km^r$)的完全分离. WT, 野生型

变株的 18 碳多不饱和脂肪酸(PUFA, 包括 18:2, 18:3 和 18:4)在 15℃减少了 11.74%, 在 30℃减少 14.11% (表 2). 野生型在从 30℃转移到 15℃时 PUFA 增加 5.34%. 与此相比, PUFA 在突变株中减少的量是十分显著的.

为了确认 Rbp3 在保持该蓝藻中脂肪酸组成的作用, 将 *rbp3*-C.CE2 整合到突变株中的一处不涉及任何表型的整合平台^[15,19,20], 获得 DRHB2547 DRHB 2830 藻株(表 1). 互补株在 30℃生长速率(1.45±0.06)代/d, 在 15℃生长速率(0.44±0.03)代/d, 与野生型或突变株都几乎没有差别. 但是, 与 *rbp3* 突变株相比, PUFA 在 18 碳脂肪酸中的百分比在 30℃增加了 7.3, 在 15℃增加了 12.81(表 2). 同时, 互补株脂肪酸组成与野生型存在区别, 尤其是在 15℃条件下 C18:4 脂肪酸与野生型相比增加了 2.6 倍. 整合的 *rbp3* 基因部分弥补了突变株的表型, 但完全恢复了在 15℃的 PUFA 总量(表 2).

2.3 Rbp3 对 *desA*, *desB* 和 *desD* mRNA 水平的效应

在集胞藻 6803 转入 15℃时, Northern blot 分析能

检测到 *desA*, *desB* 和 *desD* 的 mRNA 杂交带. 而在 *rbp3* 突变株中, 与 PUFA 含量的下降相一致, 几乎检测不到这些转录本(图 3). 以自养条件或混养条件培养的藻细胞产生相同的结果. 相反, 在集胞藻 6803 中受 15℃处理诱导的 *rbp1*(RNA-结合蛋白 1)和 *crhR* (RNA 解旋酶轻链)基因, 都不受 *rbp3* 的影响(图 3). *rbp1*, *crhR* 和 *des* 基因都在低温适应的早期诱导表达, 而近期由本实验室发现的 *ccr-1* 基因在晚期诱导表达^[12]. *ccr-1* 具有多条 mRNA 杂交带. 在经 15℃处理 6 d 的突变株中, *ccr-1* 的 mRNA 也比野生型削弱. Rbp3 似乎能够选择性地影响某些基因的 mRNA 丰度.

mRNA 水平的调节可以基于启动子活性或 mRNA

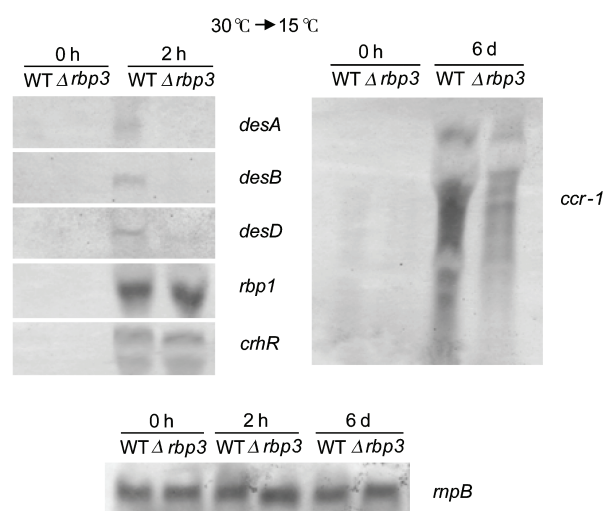


图3 Northern blot 杂交分析 Rbp3 对于脂肪酸脱饱和酶基因 *rbp1*, *crhR* 和 *ccr-1* 的 mRNA 水平的效应

在从 30℃转入 15℃ 2 h 的野生型和 $\Delta rbp3$ 藻株中检测 *desA*, *desB*, *desD*, *rbp1* 和 *crhR* 的 mRNA, 在 15℃处理 6 d 的细胞中检测 *ccr-1* 的 mRNA.

WT, 野生型

表 2 集胞藻 6803 各藻株膜脂中的脂肪酸组成(mol%)^{a)}

脂肪酸	野生型		<i>rbp3</i> 突变株		互补株	
	30℃	15℃	30℃	15℃	30℃	15℃
16:0	52.99±2.24	49.89±0.63	53.26±0.71	51.67±0.81	47.82±4.17	46.41±1.59
16:1(9)	2.83±0.51	3.87±0.31	2.01±0.25	3.93±0.59	2.07±0.27	5.39±0.16
18:0	0.95±0.15	0.81±0.13	1.32±0.07	0.66±0.13	3.08±0.93	2.74±0.43
18:1(9)	7.88±0.49	4.69±1.78	22.12±1.66	14.74±1.27	18.44±2.51	3.65±0.42
18:2(9,12)	18.06±0.49	11.00±0.49	8.70±0.12	5.69±1.16	9.05±0.26	4.38±0.53
18:3(6,9,12)	15.57±1.01	20.29±0.89	11.02±0.50	15.45±0.37	17.67±1.25	23.95±0.40
18:3(9,12,15)	1.11±0.05	6.56±0.50	0.9±0.03	4.79±1.44	1.12±1.36	3.06±0.16
18:4(6,9,12,15)	0.61±0.05	2.89±0.56	0.68±0.1	3.06±1.16	0.75±0.13	10.41±0.06
C18 PUFA	35.40±1.49	40.74±1.22*	21.29±0.69	29.00±1.34	28.59±1.44	41.81±0.88*

a) 各项数值均来自 3 次独立实验测试结果计算出的平均值±标准误. 除 2 个标以*的数值外, 其余在同一温度下的 PUFA 数值均存在显著差异(Duncan's multiple range test, $P = 0.05$).

稳定性或者二者兼有. RNA-结合蛋白一般通过稳定性影响 mRNA 水平^[1]. 为排除 Rbp3 对启动子活性的削弱, 我们以细菌荧光素酶基因 *luxAB* 测试了其中一个基因 *desB* 的转录. 将 *luxAB-Sp^r*^[16] 插入到野生型和另外 1 个 *rbp3* 突变株 DRHB3175(Δ *rbp3*/Km^r, 表 1) 中 *desB* 的 *Bal* I 位点. 在 DRHB3175 中, *rbp3* 被 Km 抗性基因取代. *luxAB-Sp^r* 插入 *desB* 并未影响集胞藻 6803 在 15℃ 的生长. 细菌荧光素酶活性的表达显示, 在从 30℃ 转入 15℃ 时, 在突变株中的表达甚至略高于野生型 (图 4). 因此, *rbp3* 的失活并未削弱 *desB* 的启动子活性.

3 讨论

本文报道了 Rbp3 在集胞藻 6803 中对于保持脂肪酸组成的作用. Rbp3 不具有 C-端富甘氨酸区域, 在降温时仅有轻微诱导, 因此是一个典型的 II 型 RNA 结合蛋白. 由于 *rbp3* 的大小为 456 bp, 其下游基因大小 708 bp, 当中间隔 228 bp, 而 *rbp3* 转录本仅约 600 nt, 故 *rbp3* 应不与 *slr0194* 共转录.

在集胞藻 Δ *rbp3* 突变株中, 多不饱和脂肪酸 (PUFA) 总百分含量相对于野生型有显著减少. 而用 *rbp3* 野生型基因恢复了突变株在 15℃ 下的 PUFA 含量, 进一步证实 Rbp3 的作用. 互补株与野生型存在区别可能是由于在平台中插入的 *rbp3* 的表达与野生型株不同. 由于 *rbp3* 仅受温度轻微调控, 该基因在 30℃ 和 15℃ 应显示相似的作用. 与此假设吻合, *rbp3* 突变株在两温度下 18 碳 PUFA 都减少. Rbp3 对于脂肪酸组成的效应可能具有一定的应用价值.

虽然 *rbp3* 突变株的 PUFA 显著减少, 它在 30℃ 和 15℃ 的生长与野生型相同. 聚球藻中的一个 II 型 RNA 结合蛋白基因也不影响在低温下的生长^[5]. 值

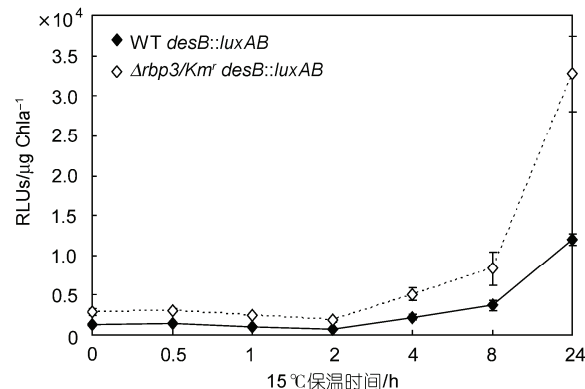


图4 在野生型和 Δ *rbp3*/Km^r突变株中*desB*启动子驱动的细菌荧光素酶基因的表达

RLU, 相对荧光素酶单位. WT, 野生型

得注意的是, *desA* 突变株总 PUFA 发生更大程度的削减, 导致其在低温下生长差^[11]. 对此, 我们的解释是, 集胞藻 6803 在 30℃ 时具有足够高的 PUFA, 即使在 *rbp3* 突变株有所减少, 其脂肪酸不饱和度也仍然足以维持在 15℃ 的生长.

脂肪酸脱饱和酶基因 *desA*, *desB* 和 *desD*, 以及在 15℃ 生长所需要的 *ccr-1* 基因的 mRNA 水平, 都在 *rbp3* 突变株中大大减少, 而 *rbp1* 和 *crhR* 转录本不受影响. 这些结果提示, Rbp3 直接或间接地影响某些基因 mRNA 水平, 尤其是 *desA*, *desB* 和 *desD*, 并影响膜脂不饱和度. 从 *desB* 启动子表达 *luxAB* 显示, RNA 水平降低并非由于对启动子的作用. 一种可能性是, Rbp3 影响某些 mRNA 的稳定性. 由于在 *rbp3* 突变株中 *des* 基因 mRNA 水平被削弱到很低, 我们难以用 Northern blot 杂交分析其降解速率. 将来在突变株和野生型中通过人为驱动 *des* 和 *ccr-1* 基因表达, 有可能测试比较出这些基因转录本的降解速率的差别.

参考文献

- Albà M M, Pagès M. Plant proteins containing the RNA-recognition motif. *Trends Plant Sci*, 1998, 3: 15—21
- Maruyama K, Sato N, Ohta N. Conservation of structure and cold-regulation of RNA-binding proteins in cyanobacteria: Probable convergent evolution with eukaryotic glycine-rich RNA-binding proteins. *Nucleic Acids Res*, 1999, 27: 2029—2036
- Sugita M, Sugiura M. The existence of eukaryotic ribonucleoprotein consensus sequence-type RNA-binding proteins in a prokaryote, *Synechococcus* 6301. *Nucleic Acids Res*, 1994, 22: 25—31
- Sato N, Wada A. Disruption analysis of the gene for a cold-regulated RNA-binding protein, *rbpA1*, in *Anabaena*: Cold-induced initiation of the heterocyst differentiation pathway. *Plant Cell Physiol*, 1996, 37: 1150—1160
- Sugita C, Mutsuda M, Sugiura M, et al. Targeted deletion of genes for eukaryotic RNA-binding proteins, Rbp1 and Rbp2, in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain PCC 7942: Rbp1 is indispensable for cell growth at low temperatures. *FEMS Microbiol Lett*, 1999, 176: 155—161

- 6 Ehira S, Hamano T, Hayashida T, et al. Conserved temperature-dependent expression of RNA-binding proteins in cyanobacteria with different temperature optima. *FEMS Microbiol Lett*, 2003, 225: 137—142
- 7 Murata N, Wada H. Acyl-lipid desaturases and their importance in the tolerance and acclimation to cold of cyanobacteria. *Biochem J*, 1995, 308: 1—8
- 8 Sakamoto T, Murata N. Regulation of desaturation of fatty acids and its role in tolerance to cold and salt stress. *Curr Opin Microbiol*, 2002, 5: 208—210
- 9 Kis M, Zsiros O, Farkas T, et al. Light-induced expression of fatty acid desaturase genes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95: 4209—4214
- 10 Chintalapati SK, Prakash JSS, Gupta P, et al. A novel Delta9 acyl-lipid desaturase, DesC2, from cyanobacteria acts on fatty acids esterified to the *sn*-2 position of glycerolipids. *Biochem J*, 2006, 398: 207—214
- 11 Tasaka Y, Gombos Z, Nishiyama Y, et al. Targeted mutagenesis of acyl-lipid desaturases in *Synechocystis*: evidence for the important roles of polyunsaturated membrane lipids in growth, respiration and photosynthesis. *EMBO J*, 1996, 15: 6416—6425
- 12 Yin C, Li W, Du Y, et al. Identification of a gene, *ccr-1* (*sll1242*), required for chill-light tolerance and growth at 15°C in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Microbiology*, 2007, 153: 1261—1267
- 13 Zhang W, Du Y, Khudyakov I, et al. A gene cluster that regulates both heterocyst differentiation and pattern formation in *Anabaena* sp. strain PCC 7120. *Mol Microbiol*, 2007, 66: 1429—1443
- 14 Elhai J, Wolk C P. A versatile class of positive-selection vectors based on the nonviability of palindrome-containing plasmids that allows the cloning into long polylinkers. *Gene*, 1988, 68: 119—138
- 15 Williams J G K. Construction of specific mutations in photosystem II photosynthetic reaction center by engineering methods in *Synechocystis* 6803. *Methods Enzymol*, 1988, 167: 766—778
- 16 Black T A, Wolk C P. Spatial expression and autoregulation of *hetR*, a gene involved in the control of heterocyst development in *Anabaena*. *Mol Microbiol*, 1993, 9: 77—84
- 17 Vioque A. Analysis of the gene encoding the RNA subunit of ribonuclease P from cyanobacteria. *Nucleic Acids Res*, 1992, 20: 6331—6337
- 18 Sato N. A family of cold-regulated RNA-binding protein genes in cyanobacterium *Anabaena variabilis* M3. *Nucleic Acids Res*, 1995, 23: 2161—2167
- 19 Kunert A, Hagemann M, Erdmann N. Construction of promoter probe vectors for *Synechocystis* sp. PCC 6803 using the light-emitting reporter systems Gfp and LuxAB. *J Microbiol Methods*, 2000, 41: 185—194
- 20 Gao H, Xu X. Depletion of Vipp1 in *Synechocystis* sp. PCC 6803 affects photosynthetic activity prior to the loss of thylakoid membranes. *FEMS Microbiol Lett*, 2009, 292: 63—70