

铜绿微囊藻生物钟蛋白 KaiC 的自激活活性和自身相互作用研究

王 靖, 徐 虹, 李 珣, 郑锦乾, 王立红

(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, 福建 厦门 361005)

摘 要: 通过 PCR 扩增了铜绿微囊藻的生物钟主控基因 KaiC, 并将其分别克隆到酵母双杂交系统的诱饵质粒 pGBKT7 和猎物质粒 pGADT7 中, 然后将重组质粒 pGBKT7-kaiC/pGADT7-kaiC 和 pGBKT7-kaiC/pGADT7 分别共转化酵母菌 AH109 培养缺陷生长和 β -半乳糖苷酶印迹检测表明, KaiC 蛋白不具有毒性不会影响酵母细胞的生长, 也不具有自激活活性, 不会激活报告基因的表达, 并且 KaiC 蛋白自身存在较强的相互作用。诱饵质粒 pGBKT7-kaiC 可用于从基因组文库中筛选 KaiC 的相互作用蛋白。

关键词: 铜绿微囊藻; 钟蛋白 KaiC; 酵母双杂交

中图分类号: Q58.065 文献标识码: A 文章编号: 1007-6336(2008)01-0067-04

Studies on self-activation and self-interaction of circadian clock protein KaiC of *Microcystis aeruginosa* in yeast two hybridization

WANG Jing XU Hong LIXun ZHENG Jin-qian WANG Li-hong

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

Abstract A clock system is universal among cyanobacteria. In this study, the clock gene kaiC was cloned from *Microcystis aeruginosa* by PCR. Through the study of the function and finding its interacting protein, the kaiC gene in *Microcystis aeruginosa* was subcloned into the bait vector pGBKT7 and prey vector pGADT7 of yeast two-hybrid system. After being verified by sequencing, the recombinant plasmids pGBKT7-kaiC/pGADT7-kaiC and pGBKT7-kaiC/pGADT7 were co-transferred into yeast strain AH109 by polyethylene glycol/lithium acetate method respectively and its expression products were assayed whether it can affect the growth of yeast cells and activate the reporter (β -galactosidase) genes. The transformed cells were selected on SD dropout medium lacking tryptophan, leucine, histidine and adenine at 30°C for 3~4 days. The β -galactosidase filter assay shows that KaiC protein was not toxic to AH109 and could not activate the reporter gene. The results also demonstrated homotypic interaction of KaiC in transformed yeast cells that expressed two types of fusion proteins. The constructed plasmid pGBKT7-kaiC may serve as bait vector of yeast two hybrid GAL4 system to fish KaiC interaction protein from genomic library of *Microcystis aeruginosa*.

Key words *Microcystis aeruginosa*; clock protein KaiC; yeast two hybridization

蓝藻是具有昼夜节律的最简单生物, 它的固氮作用、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^[1-7]。第一个蓝藻生物钟基因 kai 已从 *Synechococcus* sp. PCC7942 中克隆, 该基因是一个基因簇, 由三个基因 kaiA、kaiB、kaiC 以单一拷贝成簇排列, 它们的表达产物

Kai 蛋白组成蓝藻生物钟的核心——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体的形成和解聚来决定中央振荡器的时相, 而 KaiC 的磷酸化状态则受到 KaiA 和 KaiB 的调节^[8-16]。

铜绿微囊藻是水华赤潮的主要藻种之一, 在其生

* 收稿日期: 2007-03-16 修订日期: 2007-06-14

基金项目: 国家自然科学基金

作者简介: 王 靖 (1983-), 男, 福建省三明市人, 硕士生, 研究方向藻类生理与分子生物学。

通讯作者: 徐 虹, xuhongxm@sohu.com, 0592-2182570

理代谢长期研究的基础上,我们发现其光合作用和细胞分裂具有明显的昼夜节律性,这种节律性受到生物钟的控制。为了研究其钟控节律的产生机制,我们通过染色体步移法从铜绿微囊藻的基因组中克隆了生物钟基因簇 *kaABC* (GenBank accession number DQ156152)。为了研究 *KaC* 蛋白计时机制以及计时信号的输出方式和途径,我们拟以铜绿微囊藻 *kaC* 基因为诱饵,希望通过酵母双杂交系统来钓取与 *KaC* 相互作用的蛋白,研究其功能,以得到计时信号产生和输出的相关信息,为了解蓝藻昼夜节律产生的分子机制奠定基础。

在以 *KaC* 为诱饵进行大规模筛库之前,首先要检测 *KaC* 是否会抑制酵母菌的生长,是否具有自激活活性。本文构建了 *KaC* 的酵母双杂交质粒并进行了自激活活性和自身相互作用检测。

1 材料与方法

1.1 藻种

铜绿微囊藻 *Microcystis aeruginosa* PCC7820, 购自中科院水生生物研究所。

1.2 质粒和菌株

pMD18-T 载体购自大连宝生物工程有限公司; 大肠杆菌 DH5 α 由本实验室保种; 酵母双杂交系统为 Clontech 公司产品, 包括酵母菌株 AH109 诱饵质粒 pGBKT7-AD 质粒 pGADT7 对照质粒 pGBKT7-53 pGBKT7-lam, pGADT7-T。

1.3 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) 和四缺陷型酵母合成培养基 (SD/-Leu/-Trp/-His/-Ade)。

1.4 铜绿微囊藻染色体 DNA 的提取

参照 Smoker 等^[17]的方法进行。

1.5 *kaC* 基因的扩增

以铜绿微囊藻染色体 DNA 为模板, 用引物 P1: 5'-CATATGACTCAATCTAACTCTAATAGC-3' 和 P2 5'-GAATTCCGATTATTCATCG-3' (上海博亚生物技术有限公司合成) 进行扩增。反应液为 50 μ L 含有 1 \times PCR 缓冲液, 200 μ mol/L dNTP, 1.5 mmol/L MgCl₂, 0.6 μ mol/L 引物, 50 ng 模板 DNA, 2.5U Taq 酶。扩增条件为 94 $^{\circ}$ C 预变性 7 min 然后 94 $^{\circ}$ C 1 min 60 $^{\circ}$ C 60 s 72 $^{\circ}$ C 2 min 35 个循环, 最后于 72 $^{\circ}$ C 保温 10 min。扩增产物经 0.8% 的琼脂糖凝胶电泳检测。

1.6 质粒的构建

将 PCR 扩增的 *kaC* 基因插入 pMD18-T 载体中, 经测序证明序列正确后, 用 NdeI/EcoRI 双酶切含扩增片段的 pMD18-T 载体, 经琼脂糖凝胶电泳后胶回收 1.5 kb 大小的 *kaC* 片段, 分别连接到经同样双酶切的 pGBKT7(含

DNA 结合结构域) 和 pGADT7(含转录激活结构域) 质粒中, 通过测序确保插入的 *kaC* 基因与质粒的阅读框架一致。

1.7 酵母感受态细胞的制备

接种酵母菌株 AH109 单菌落至 1 mL YPDA 培养液中, 振荡混匀后转入 10 mL YPDA 培养液中 30 $^{\circ}$ C 培养过夜 ($OD_{600} > 1.5$); 将过夜培养物转入 100 mL YPDA 培养液中 ($OD_{600} = 0.2 \sim 0.3$), 30 $^{\circ}$ C 摇培 3 h ($OD_{600} = 0.5$), 以 4000 r/min 离心收集菌体; 用 30 mL 无菌水重悬洗涤菌体一次, 4000 r/min 离心收集菌体; 将菌体重悬在 1 mL 1 \times TE/LiAc 溶液中, 可立即转化或于 4 $^{\circ}$ C 保存。

1.8 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 0.6 mL PEG/LiAc 溶液, 混匀后于 30 $^{\circ}$ C 摇培 30 min 加入 70 μ L DM SO, 混匀, 于 42 $^{\circ}$ C 热击 15 min, 冰浴 1~2 min, 15000 r/min 离心 5 s 弃上清, 菌体用 0.5 mL YPDA 重悬, 取 100 μ L 转化混合物涂布合适的缺陷培养基平板, 30 $^{\circ}$ C 培养 4~6 d 至出现转化菌落。

1.9 HIS3 和 ADE2 报告基因的表达检测

挑取酵母菌单克隆划线于 SD/-Leu/-Trp 二缺陷平板和 SD/-Leu/-Trp/-His/-Ade 四缺陷平板上, 30 $^{\circ}$ C 培养 10 d 观察酵母菌的生长情况。

1.10 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。将平板上的菌落影印到 Whatman 滤纸上, 将滤纸(菌落面朝上)在液氮中冷冻 30 s 室温解冻以裂解菌体。将滤纸印有菌落面朝上放在另一张同样大小浸有 Z 缓冲液 (X-gal (Na₂HPO₄·7H₂O, 16.1 g/L; NaH₂PO₄·H₂O, 5.5 g/L; KCl 0.75 g/L; MgSO₄·7H₂O, 0.246 g/L, pH 7.0 X-gal 0.3 g/L; β -巯基乙醇, 0.3%) 的滤纸上, 避免气泡, 30 $^{\circ}$ C 温育 30 min 至 8 h 观察颜色变化。

2 结果与讨论

2.1 *kaC* 基因的扩增

以铜绿微囊藻染色体 DNA 为模板, 用根据 *kaC* 序列设计合成的引物 P1 和 P2 进行 PCR 扩增, 扩增产物经 0.8% 的琼脂糖凝胶电泳检测, 可见扩增出一条与预期大小一致的 1.5 kb 的 DNA 片段 (图 1)。

2.2 重组质粒 pGBKT7-*kaC* 和 pGADT7-*kaC* 酶切分析

将 PCR 扩增的 *kaC* 片段分别克隆到 pGBKT7 和 pGADT7 质粒中, 重组质粒 pGBKT7-*kaC* 和 pGADT7-*kaC* 分别用 HindIII 单酶切和 NdeI/EcoRI 双酶切鉴定, 鉴定结果表明重组质粒构建正确, 含有 1.5 kb 大小的 *kaC* 片段 (图 2.3)。为了确保 *kaC* 的正确表达, 我们对重组质粒 pGBKT7-*kaC* 和 pGADT7-*kaC* 进行测序, 测序结果表明 *kaC* 阅读框分别与质粒 pGBKT7 的 DNA 结合结构域及 pGADT7 的转录激活结构域的阅读框架完全一致。



图 1 kaiC 基因 PCR 扩增产物电泳
Fig. 1 Agarose gel electrophoresis analysis for PCR of kaiC gene
M: λ DNA/HindIII + EcoRI marker;
1. negative control (without DNA template)
2. PCR product

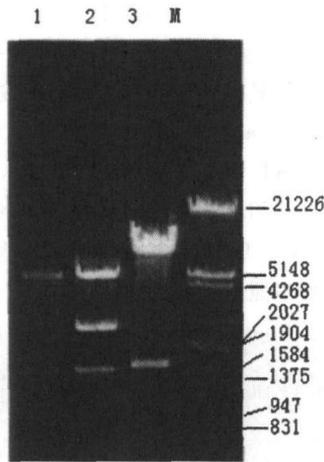


图 2 重组质粒 pGBKT7-kaiC 的酶切鉴定
Fig. 2 Restriction endonuclease analysis of recombinant plasmid pGBKT7-kaiC
M: λ DNA/HindIII + EcoRI marker;
1. pGBKT7/ HindIII (control)
2. pGBKT7-kaiC/HindIII
3. pGBKT7-kaiC/NdeI + EcoRI

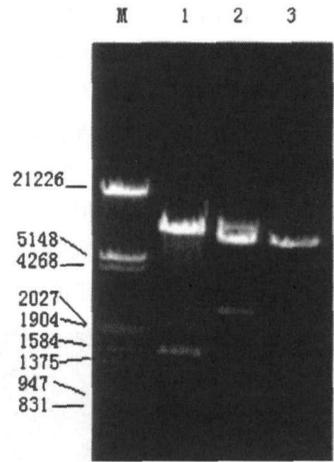


图 3 重组质粒 pGADT7-kaiC 的酶切鉴定
Fig. 3 Restriction endonuclease analysis of recombinant plasmid pGADT7-kaiC
M: λ DNA/HindIII + EcoRI marker;
1. pGADT7-kaiC/NdeI + EcoRI
2. pGADT7-kaiC/HindIII
3. pGADT7/HindIII (control)

2.3 HIS3 和 ADE2 报告基因的表达检测

将自激活检测质粒 pGBKT7-kaiC + pGADT7空载体、自身作用检测质粒 pGBKT7-kaiC + pGADT7-kaiC 分别共转化酵母菌株 AH 109, 以 pGBKT7-53 + pGADT7-T 的共转化组为阳性对照 (p53 和 large T-antigen 存在相互作用), pGBKT7-Lam + pGADT7-T 的共转化组为阴性对照 (Lam in C 与 large T-antigen 不发生相互作用), 转化产物分别涂布于 SD /Leu /T_{rp} 二缺培养基平板和 SD /Leu /T_{rp} /H is /A de 四缺平板。由于酵母菌 AH 109 的基因型为 t_{rp}⁻ leu⁻ h is⁻ ade⁻, 报告基因为 his3, ade2 和 lacZ, 而报告基因只有在完整 GAL4 发挥转录活性的情况下才表达, 所以在缺乏 T_{rp}, Leu, H is 和 A de 这四种成分的缺陷培养基平板上 AH109 不能生长。而质粒 pGBKT7 含有 t_{rp} 基因, pGADT7 含有 leu 基因, 所以含有这两种质粒的酵母菌能

在 SD /Leu /T_{rp} 二缺培养基平板生长。结果表明, 30C 培养 4~ 6 d 后, 四组转化酵母菌均能在 SD /Leu /T_{rp} 二缺培养基平板生长 (图 4A), 这说明四组共转化都获成功, 每组酵母菌中均含有所转化的两种质粒, 且融合表达的 KaiC 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 /T_{rp} /H is /A de 四缺平板上只有阳性对照转化组和自身作用检测组 (pGBKT7-kaiC + pGADT7-kaiC) 有酵母菌生长, 而自激活检测组 (pGBKT7-kaiC + pGADT7空载体) 不能在四缺平板上生长 (图 4B), 这说明 KaiC 不具有自激活活性, 不能激活酵母菌 AH 109 的 his3 和 ade2 基因的转录, 因而不能在四缺平板上生长; 而 KaiC 自身由于能发生相互作用从而激活了报告基因 his3 和 ade2 的转录, 因此能在 SD /Leu /T_{rp} /H is /A de 四缺平板上生长。

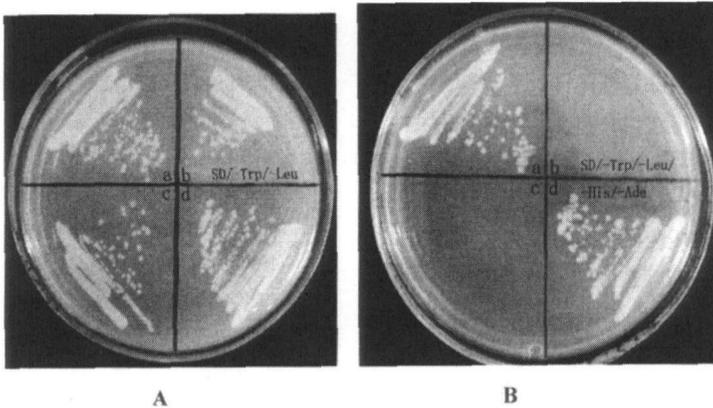


图 4 转化酵母菌在不同营养缺陷的 SD 平板上的培养结果

Fig. 4 Culture of transformed yeast cell on SD medium with different nutritional deficiency

A. SD /T_{rp} /Leu plate; B. SD /T_{rp} /Leu /H is /A de plate

a. pGBKT7-53 + pGADT7-T (positive control); b. pGBKT7-Lam + pGADT7-T (negative control); c. pGBKT7-KaiC + pGADT7; d. pGBKT7-KaiC + pGADT7-KaiC

2.4 LacZ 报告基因的表达检测

将 SD⁻Leu⁻Trp⁻ 二缺培养基平板和 SD⁻Leu⁻Trp⁻His⁻Ade 四缺平板上的转化菌影印到滤纸上, 经液氮冻融裂解后进行 β-半乳糖苷酶活性检测, 以此来判断 LacZ 基因表达情况。结果表明, 在 SD⁻Leu⁻Trp⁻His⁻Ade 四缺平板上生长的两组转化菌即阳性对照组和自身作用检测组的菌在 30℃ 温育 1 h 后都显蓝色, 而在 SD⁻Leu⁻Trp⁻ 二缺培养基平板生长的四组转化菌, 也只有阳性对照组

和自身作用检测组的菌显蓝色, 而阴性对照组和自激活检测组 (pGBKT7-KaIc + pGADT7) 的菌在 30℃ 温育 8 h 后仍未显蓝色, 这说明它们不具有 β-半乳糖苷酶活性, LacZ 基因没得到表达 (图 5)。因此, 根据 β-半乳糖苷酶活性分析结果可知, KaIc 不具有自激活活性, 不能激活 LacZ 基因表达; 而 KaIc 自身则能发生相互作用, 从而激活报告基因 LacZ 的表达。

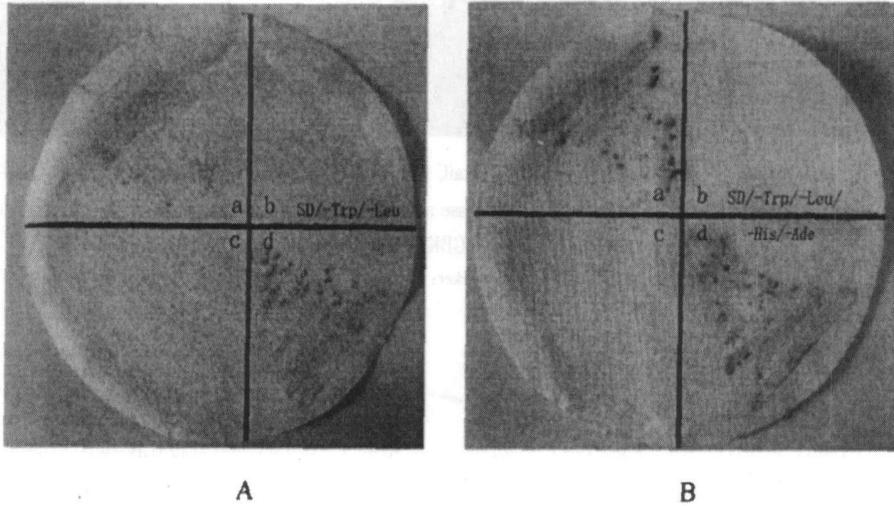


图 5 印迹法检测 LacZ 报告基因活性

Fig 5 Spot assay for activity of the LacZ reporter gene

A. SD⁻Leu⁻Trp⁻ plate; B. SD⁻Leu⁻Trp⁻His⁻Ade plate

a. pGBKT7-53 + pGADT7-T (positive control); b. pGBKT7-Lan + pGADT7-T (negative control); c. pGBKT7-KaIc + pGADT7; d. pGBKT7-KaIc + pGADT7-KaIc

3 结论

酵母双杂交系统主要是用来钓取与已知蛋白直接相互作用分子的一种系统。对于功能未知的蛋白如能钓取到已知蛋白则有助于阐明该蛋白的功能, 而对于功能已知的蛋白如能钓取与之相作用的分子则有助于阐明该蛋白的作用机制。

一般用来作为钓饵的蛋白除了对受体菌没有毒性, 不影响受体菌的生长外, 还要不具有自激活活性, 不会激活报告基因的表达。本实验成功构建了融合有 GAL4 蛋白 BD 结构域与铜绿微囊藻 KaIc 蛋白的重组质粒 pGBKT7-kaIc, 并将重组质粒 pGBKT7-kaIc 和仅含 GAL4 蛋白 AD 结构域的 pGADT7 质粒共转化酵母菌株 AH109, 通过 Leu 和 Trp 的双缺陷营养筛选表明, AD 质粒和含 KaIc 的 BD 质粒均已成功转入受体菌中, KaIc 蛋白对受体菌不具有毒性, 不会影响受体菌的生长。通过 SD⁻Leu⁻Trp⁻His⁻Ade 四缺陷营养筛选和 β-半乳糖苷酶活性检测表明, KaIc 蛋白不具有自激活活性, 不会激活报告基因的表达, 因此能够作为诱饵从文库中钓取与之相互作用的蛋白。

为了检验我们所构建的诱饵质粒的有效性和 KaIc 蛋白自身间的相互作用, 我们还构建了 GAL4 蛋白 AD 结

构域和 KaIc 融合表达的载体 pGADT7-kaIc, 并将其与诱饵质粒 pGBKT7-kaIc 共转化酵母菌 AH109, 通过 SD⁻Leu⁻Trp⁻His⁻Ade 四缺陷营养筛选和 β-半乳糖苷酶活性检测表明, KaIc 自身能发生较强的相互作用, 我们所构建的诱饵质粒能用于酵母双杂交从基因组文库中钓取与 KaIc 相互作用的蛋白。

参考文献:

- [1] GROBBELAAR N, LIN H Y, HUANG T C. Induction of a n⁺ nitrogen activity rhythm against photosynthesis oxygen [J]. *Curr Microbiol* 1987, 15: 29-33.
- [2] CHEN T H, CHENT L, HUNG L M, *et al*. Circadian rhythm in an ino acid uptake by *Synchococcus* RF-1 [J]. *Plant Physiol* 1991, 97: 55-59.
- [3] CHEN T H, PEN S Y, HUANG T C. Induction of nitrogen-fixing circadian rhythm *Synchococcus* RF-1 by light signals [J]. *Plant Sci* 1993, 92: 179-182.
- [4] HUANG T C, CHEN H M, PEN S Y, *et al*. Biological clock in the prokaryote *Synchococcus* RF-1 [J]. *Planta* 1994, 193: 131-136.
- [5] ROJEK R, HARM S C, HEBELER M, *et al*. Cyclical variations of photosynthetic activity under nitrogen fixing conditions in *Synchococcus* RF-1 [J]. *Arch Microbiol* 1994, 162: 80-84.

(下接第 82 页)

物链初始环节的浮游生物等,保障海洋渔业资源在环境限度内的扩大再生产,为海洋渔业的可持续发展提供尽可能多的劳动对象。要坚决压缩、调整海洋捕捞业,尽可能压缩近海捕捞,加大远洋捕捞业的发展力度。

通过产业结构调整,在加强传统优势产业管理基础上,选取经济增长中心与次增长中心,确定发展的主导产业,紧密结合当地的资源、劳动力等情况,建立一个市-县-镇(乡)纵向联系及各级主导产业经济网络,从而促进整个区域经济平稳发展。

4 小 结

盐城、连云港、南通三市逐步培育成经济增长中心,形成各具特色和规模的经济区,有利于扩大江苏海洋经济的整体规模,提高经济效益,而且有利于缩小江苏沿海区域与苏南的经济差距,由于多年的地区不均衡发展策略,客观上造成了苏南与沿海地区的巨大差距,苏南在现代化的外向型工业企业经济推动下,经济发展日益高速化,形成江苏省经济增长极,而该增长极以其巨大的极化作用形成规模经济,而其外部则产生规模不经济,所以沿海区域不能再坐等苏南等发达地区的经济辐射,而要自力更生,利用自身的海涂资源、港航资源等优势,培育自己的经济增长极,来联合带动江苏沿海区域的经济的发展。

参考文献:

- [1] 曹忠祥,任东明,王文瑞,等. 区域海洋经济发展的结构性演进特征分析 [J], 人文地理, 2005 6: 29-34
 - [2] 周起业,刘再兴. 区域经济学 [M]. 北京: 中国人民大学出版社, 1999 126-133.
 - [3] 崔功豪. 区域分析与规划 [M]. 北京: 高等教育出版社, 2004.
 - [4] 曾德超. 增长极理论对中国区域经济发展的启示 [J]. 经济与经济管理研究, 2005 12: 10-16
 - [5] 江苏省统计局. 江苏统计年鉴 2004 [Z]. 北京: 中国统计出版社, 2004
 - [6] 江苏省统计局. 江苏统计年鉴 2003 [EB/OL]. [http //www.jssb.gov.cn/szlj/tjnj/2000/jsnj01/ym01.htm](http://www.jssb.gov.cn/szlj/tjnj/2000/jsnj01/ym01.htm), 2004/11/6
 - [7] 江苏省统计局. 江苏统计年鉴 2002 [EB/OL]. [http //www.jssb.gov.cn/szlj/tjnj/2000/jsnj01/ym01.htm](http://www.jssb.gov.cn/szlj/tjnj/2000/jsnj01/ym01.htm), 2003/7/11.
 - [8] 江苏省统计局. 江苏统计年鉴 2001 [EB/OL]. [http //www.jssb.gov.cn/szlj/tjnj/2000/jsnj01/ym01.htm](http://www.jssb.gov.cn/szlj/tjnj/2000/jsnj01/ym01.htm), 2003/7/11.
 - [9] 江苏省统计局. 江苏统计年鉴 2000 [EB/OL]. [http //www.jssb.gov.cn/szlj/tjnj/2000/jsnj01/ym01.htm](http://www.jssb.gov.cn/szlj/tjnj/2000/jsnj01/ym01.htm), 2003/7/11.
 - [10] 国家海洋局. 中国海洋经济统计公报 (年报) [EB/OL]. [http //wde-d.coi.gov.cn/hygb/hyjj/](http://wde-d.coi.gov.cn/hygb/hyjj/), 2005/2/25
 - [11] 盐城统计局. 盐城统计年鉴 2001, 北京: 中国统计出版社, 2001.
 - [12] 中共连云港市委市级工委. 连云港港口情况 [EB/OL]. [http //www.jgjc.gov.cn/zhuanti/newss](http://www.jgjc.gov.cn/zhuanti/newss) 2006/10/30.
-
- (上接第 70 页)
- [6] JHNSON CH, GOLDEN S S C. Circadian programs in cyanobacteria: adaptiveness and mechanism [J]. Annu Rev Microbiol 1999 53: 389-409
 - [7] DIFTY JL, WILLIAMS S B, GOLDEN S S. Cyanobacterial circadian time mechanism [J]. Annu Rev Genet 2003 37: 513-543
 - [8] SHIURA M, KUTSUNA S, AOKI S, *et al*. Expression of a clock gene cluster *kaABC* as a circadian feedback process in cyanobacteria [J]. Science, 1998 281: 1519-1523
 - [9] NISHIWAKI T, WASAKI H, SHIURA M, *et al*. Nucleotide binding and autophosphorylation of clock protein *KaC* as a circadian timing process of cyanobacteria [J]. PNAS 2000 97: 495-499.
 - [10] 孔任秋,徐旭东,王业勤. 蓝藻分子遗传学又十年 [J]. 水生生物学报, 2001, 25(6): 620-630
 - [11] WASAKI H, NISHIWAKI T, KITAYAMA Y, *et al*. *KaA*-stimulated *KaC* phosphorylation in circadian timing loops in cyanobacteria [J]. PNAS 2002, 99(24): 15788-15793.
 - [12] HAYASHI F, SUZUKI H, WASE R, *et al*. ATP-induced hexameric ring structure of the cyanobacterial circadian clock protein *KaC* [J]. Genes to Cells 2003, 8: 287-296.
 - [13] KITAYAMA Y, WASAKI H, NISHIWAKI T, *et al*. *KaB* functions as an attenuator of *KaC* phosphorylation in the cyanobacterial circadian clock system [J]. EMBO J 2003, 22 (9): 2127-2134
 - [14] 徐虹,章军. 蓝藻生物钟分子机制研究进展 [J]. 海洋科学, 2004, 28(7): 61-66.
 - [15] MAIK, NISHIEAKIT, KONDO T, *et al*. Circadian rhythm in the synthesis and degradation of master clock protein *KaC* in Cyanobacteria [J]. J Biol Chem, 2004 279 (35): 36534-36539
 - [16] NISHIWAKI T, SATOMIY, NAKAJIMAM, *et al*. Role of *KaC* phosphorylation in the circadian clock system of *Synchococcus elongatus* PCC7942 [J]. PNAS, 2004, 101(38): 13927-13932.
 - [17] SMOKER JA, BARNUM S R. Rapid small-scale DNA isolation from filamentous cyanobacteria [J]. FEMS Microbiol Lett 1988 56: 119-122