

雨生红球藻 β -胡萝卜素羟化酶基因的克隆与序列分析

郑凯静 胡章立 黎双飞 雷安平 王潮岗

(深圳大学生命科学学院, 深圳市微生物基因工程重点实验室, 深圳 518060)

摘要: 利用 RT-PCR 技术, 从雨生红球藻(*Haematococcus pluvialis* 34-1n) 总 RNA 中扩增出 β -胡萝卜素羟化酶基因 cDNA 序列, 将此序列克隆于 pMD 18-T simple Vector 上, 经过序列测定, 表明该基因的开放阅读框为 879bp, 编码 292 个氨基酸, 与雨生红球藻(*H. pluvialis* Flotow NIES-144) β -胡萝卜素羟化酶基因氨基酸序列相比, 其在编码氨基酸的第 33 位有一个氨基酸的缺失。在 15、31、49 和 56 位上的氨基酸也存在差异。多序列比对分析表明, 雨生红球藻与莱茵藻的亲缘关系较近, 与其他高等植物以及细菌的亲缘关系相对较远。

关键词: 雨生红球藻; β -胡萝卜素羟化酶; 虾青素

中图分类号: Q291 文献标识码: A 文章编号: 1000-3207(2007)05-0666-05

虾青素(3, 3'-二羟基-4, 4'-二酮基- β , β' -胡萝卜素)是一种天然的红色类胡萝卜素。它具有抗氧化、抗癌、保护心血管和作为着色剂等方面的重要作用^[1]。人类和多数动物自身不能合成虾青素, 必须从食物中摄取。从甲壳类动物的壳中提取虾青素、利用雨生红球藻(*Haematococcus pluvialis*) 和发夫酵母来大规模生产虾青素, 也存在着种种困难^[2]。人工合成的虾青素不但价格昂贵, 而且在结构、功能、应用及安全性等方面与天然虾青素存在着显著差异^[3]。通过克隆虾青素合成关键酶基因, 并将其导入其他物种中, 通过转基因生物生产天然虾青素是一种有效的途径。 β -胡萝卜素羟化酶(β carotene hydroxylase, CRT-R-B) 是雨生红球藻虾青素生物合成途径中的关键酶之一, 此酶能够将 β -胡萝卜素转变成玉米黄质, 也能将角黄质催化成为虾青素。1999年, Harmut Linden 最早从单细胞绿藻雨生红球藻中分离得到 *crtR-B* 基因, 并将其与嗜夏孢欧文氏菌 β -胡萝卜素基因簇以及雨生红球藻的 *bkt* (β -胡萝卜素加氧酶) 基因共同转入大肠杆菌中, 合成了虾青素^[4], 也有天然虾青素在聚球藻(*Synechococcus*)^[5] 和烟草^[6] 中生物合成的相关报道。雨生红球藻不同品系间 *crtR-B* 基因的差异及不同物种间 *crtR-B* 基因同源性分析还未见报道。本文拟从雨生红球藻 34-1n

品系中分离得到 *crtR-B* 基因, 并对其序列分析, 比较不同雨生红球藻品系以及其他物种中 β -胡萝卜素羟化酶基因的差异。

1 材料与方法

1.1 实验材料 雨生红球藻 34-1n 购自德国的 the Culture Collection of the University of Göttingen。克隆载体 pMD18-T Simple Vector, 购自 TaKaRa 生物(大连)有限公司。大肠杆菌 JM109 为本实验室保存菌种。

1.2 实验试剂 TRIzol 试剂购自 Invitrogen 公司。TaKaRa PCR (AMV) Kit ver 3.0、DNA 聚合酶 LA Taq、限制性内切酶 *Nhe* I 和 *Sal* I 以及均购自 TaKaRa 生物(大连)有限公司。DNA Extraction kit 购自晶美生物工程有限公司。测序由上海博亚生物技术有限公司完成。

1.3 引物设计与合成 根据 GenBank 登录的已知 β -胡萝卜素羟化酶基因(GI: 5852869), 设计了一对特异性引物 P^{*}(+) 与 P^{*}(-)。引物序列如下: 上游引物: P^{*}(+) 5'-CTAGCTAGCTCATTTGCTG CTAG-CACGATGCTGTG-3', 下游引物: P^{*}(-) 5'-ACGCGTGGACTTCCGCACCCTACCGCTTGGAG-3'。上下游引物分别带 *Nhe* I 和 *Sal* I 位点(下划线部分)。

收稿日期: 2005-11-18; 修订日期: 2007-02-08

基金项目: 广东省自然科学基金项目(5010492, 011743) 深圳市科技计划项目资助

作者简介: 郑凯静(1980-), 女, 汉族, 广东省梅州市人; 硕士研究生; 主要从事天然虾青素生物合成相关基因的克隆与表达调控研究。

E-mail: zkjjeny@tom.com

引物由上海博亚生物技术有限公司合成。

1.4 雨生红球藻的培养和诱导 参照张惠如等人^[7]的雨生红球藻培养条件进行雨生红球藻 34-1n 的培养。将雨生红球藻 34-1n 接种于液体 BBM 培养基中, 于 22 °C, 1000—1500 lx 连续光照条件下培养。为了诱导 β -胡萝卜素羟化酶基因的表达, 当细胞生长至对数期, 分别加入硫酸亚铁和醋酸钠至终浓度 450 μ mol/L 和 45 mmol/L, 再经 6000 lx 连续光照 8h。

1.5 雨生红球藻总 RNA 的提取 取 30 mL 的藻液于 5000 r/min 4 °C 离心 5min, 去上清。藻细胞经 0.1% DEPC 灭菌水洗涤两次, 然后按 Trizol Reagent 使用说明书提取雨生红球藻总 RNA。

1.6 雨生红球藻 *crtR-B* 基因的 RT-PCR 扩增 cDNA 的合成采用 TaKaRa AMV ver 3.0 试剂盒, 操作均按照说明书。反转录完成后, 在 PCR 管中加入 cDNA 10 μ L、10 \times LA PCR 缓冲液 5 μ L、2.5 mmol/L 的 dNTP Mixture 8 μ L、P⁺ (+)、P⁻ (-) 各 1 μ L, 最后加 ddH₂O 至总体积 50 μ L 进行 PCR 反应。PCR 反应条件如下: 95 °C 变性 3 min, 97 °C, 40 s; 53 °C, 1min; 72 °C, 90 s, 4 个循环; 95 °C, 45 s; 56 °C, 1min; 72 °C, 90 s, 29 个循环; 72 °C 延伸 10 min。PCR 反应完成后,

取 10 μ L 样品进行 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.7 雨生红球藻 *crtR-B* 基因的克隆、鉴定及序列分析 采用 DNA Extraction kit 胶回收试剂盒将 PCR 产物进行切胶回收。PCR 产物与 T 载体于 16 °C 连接过夜后转入大肠杆菌 JM109 中, 再将菌液铺于含氨苄青霉素的 LB 平板上, 12—16h 观察克隆的生长情况。将克隆挑取于含氨苄青霉素的 LB 液体培养基中过夜培养, 采用碱裂解法提取克隆质粒, 进行 PCR 鉴定和酶切鉴定。选取阳性克隆送上海博亚生物技术有限公司测序, 并对所测的序列进行分析。

2 结果

2.1 雨生红球藻 *crtR-B* cDNA 的分离

以经过诱导的雨生红球藻总 RNA 为模板, 进行 RT-PCR 扩增。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 可观察到在 Marker 947bp 与 831bp 之间有一 906bp 大小的片段(图 1), 这就是雨生红球藻 34-1n *crtR-B* 基因片段。

2.2 雨生红球藻 *crtR-B* cDNA 序列分析

将 RT-PCR 扩增的 *crtR-B* cDNA 片段克隆到 pMD 18-T simple Vector, 形成重组质粒, 并通过 PCR 鉴定和酶切鉴定(图 2, 3)。

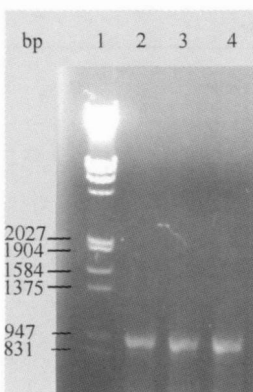


图 1 雨生红球藻 *crtR-B* 基因 RT-PCR 产物电泳
Fig. 1 Agarose gel of RT-PCR products of *H. pluvialis crtR-B* gene cDNA

1, DNA/*Hind* III/*Eco*R IV Marker; 2, 2,4 RT-PCR 产物
1, DNA/*Hind* III/*Eco*R IV Marker; 2, 2,4 Products of RT-PCR

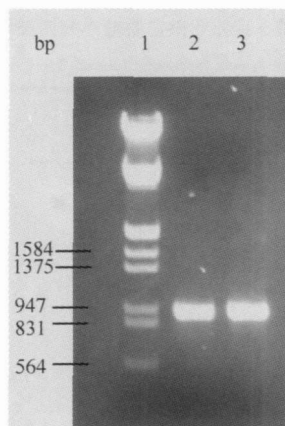


图 2 质粒的 PCR 鉴定

Fig. 2 Identification of plasmid by PCR
1, DNA/*Hind* III/*Eco*R IV Marker; 2, 3, 重组质粒 PCR 产物
1, DNA/*Hind* III/*Eco*R IV Marker; 2, 3, Products of plasmid

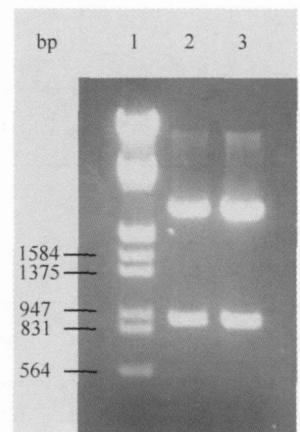


图 3 质粒的酶切鉴定

Fig. 3 Identification of plasmid digested by *Nhe*I and *Sal*I
1, DNA/*Hind* III/*Eco*R IV Marker; 2, 3, 重组质粒酶切结果
1, DNA/*Hind* III/*Eco*R IV Marker; 2, 3, Plasmid digested by *Nhe*I/*Sal*I

对 PCR 和酶切鉴定为阳性的重组质粒进行序列测定, 分析结果表明, 插入 T 载体的基因片段为 906bp, 包含一个 879bp 的开放阅读框, 共编码 292

个氨基酸。将序列与 GenBank 登录的雨生红球藻 β -胡萝卜素羟化酶基因序列进行比较, 发现序列与已知序列基本一致, 表明克隆的基因就是雨生红

球藻β胡萝卜素羟化酶基因。该基因与NCBI上的雨生红球藻Flotow NIES-144β胡萝卜素羟化酶基因相比,在编码氨基酸的33位有一个氨基酸的缺失。我们的推导序列的15位为缬氨酸,31位为精

氨酸,49位为亮氨酸,57位为丙氨酸,而已发表序列的15位为异亮氨酸,31位为谷氨酰胺,49位和57位上的氨基酸都是缬氨酸。氨基酸序列比较结果见图4。

34-1n	1		MLSKLQSI SVKARRTELARDITRPKVCL	28
Flotow NIES-144	1	TFHKPVSGASALPHIGPPPHLHRSFAATT	MLSKLQSI SVKARRTELARDITRPKVCL	57
34-1n	29	HARR-SLVRLRVAAPQTEEA	WGTVQAAGVGEHSADVALQQLDRAIAERRARRKREQ	84
Flotow NIES-144	58	HAQRCSLVRLRVAAPQTEEA	WGTVQAAGVGEHSADVALQQLDRAIAERRARRKREQ	114
34-1n	85	LSYQAAAIAASIGVSGIAIFATYLRFAMHMTVGGAVPWGEVAGTLLLVVGGALGMEM		141
Flotow NIES-144	115	LSYQAAAIAASIGVSGIAIFATYLRFAMHMTVGGAVPWGEVAGTLLLVVGGALGMEM		171
		H---H	H---H	
34-1n	142	YARYAHKAIWHESPLGWLLHKSHHTPRTGPFPEANDLFAIINGLPAMLLCTFGFWLPN		198
Flotow NIES-144	172	YARYAHKAIWHESPLGWLLHKSHHTPRTGPFPEANDLFAIINGLPAMLLCTFGFWLPN		228
		H---H	H---H	
34-1n	199	VLGAACFGAGLGITLYGMAYMFVHDGLVHRRFPPTGPIAGLPYMKRLTVAHQLHHS GK		255
Flotow NIES-144	229	VLGAACFGAGLGITLYGMAYMFVHDGLVHRRFPPTGPIAGLPYMKRLTVAHQLHHS GK		285
34-1n	256	YGGAPWGMFLGPQELQHIPGAAEEVERLVLELDWSKR		292
Flotow NIES-144	286	YGGAPWGMFLGPQELQHIPGAAEEVERLVLELDWSKR		322

图4 雨生红球藻(34-1n)β胡萝卜素羟化酶基因的推导氨基酸序列与雨生红球藻(Flotow NIES-144)β胡萝卜素羟化酶基因的氨基酸序列比对结果

Fig 4 Deduced amino acid sequence alignment of the *H. pluvialis* (34-1n) β carotene hydroxylase with the known *H. pluvialis* (Flotow NIES-144) β carotene hydroxylase

2.3 雨生红球藻 *ctR-B* 基因同源性分析

从NCBI中选取高等植物、藻类和细菌的β胡萝卜素羟化酶基因作为参考,应用DNAstar软件对这些物种的β胡萝卜素羟化酶基因的核苷酸、氨基酸

序列与本研究获得的基因核苷酸、氨基酸序列进行同源性分析。氨基酸序列同源性分析结果见表1。在对核苷酸同源性分析的基础上绘制了各物种间β胡萝卜素羟化酶基因的系统发育树图(图5)。

表1 β胡萝卜素羟化酶氨基酸序列同源性分析结果

Tab. 1 Percentage of amino acid sequence identity for β carotene hydroxylase genes

β-carotene hydroxylase	<i>H. p</i>	34-1n	<i>A. sp</i>	<i>A. t</i>	<i>B. p</i>	<i>C. a</i>	<i>C. r</i>	<i>C. m</i>	<i>C. s</i>	<i>E. u</i>	<i>H. p</i> Flotow	<i>N. p</i>	<i>O. s</i>	<i>T. e</i>
<i>H. p</i> 34-1n														
<i>A. sp</i>		35.3												
<i>A. t</i>		41.3	30.4											
<i>B. r</i>		41.4	31.1	89.4										
<i>C. a</i>		41.1	30.4	59.8	62.4									
<i>C. r</i>		49.0	32.1	42.4	42.5	41.5								
<i>C. m</i>		43.9	30.4	65.4	66.8	67.0	42.2							
<i>C. s</i>		40.9	28.8	55.9	57.1	55.7	40.7	58.5						
<i>E. u</i>		38.6	56.8	32.9	32.3	31.0	39.5	32.9	26.9					
<i>H. p</i> Flotow		98.6	35.3	41.1	41.2	41.3	49.1	43.8	41.1	38.6				
<i>N. p</i>		40.6	30.9	61.5	61.8	56.8	41.6	61.1	57.9	33.3	40.1			
<i>O. s</i>		44.2	31.5	61.4	63.1	60.6	44.0	66.9	61.5	34.0	43.6	64.9		
<i>T. e</i>		41.3	29.6	67.9	68.6	60.8	42.4	63.8	54.5	32.1	41.1	62.6	63.2	

表中各物种β胡萝卜素羟化酶基因在GenBank中的登录号分别为:产碱菌(*A. sp*): D58442; 拟南芥(*A. t*): NM-118702; 芸苔(*B. r*): AY545229; 辣椒(*C. a*): Y09225.; 莱茵衣藻(*C. r*): AY860819; 柑桔(*C. m*): DQ002893; 番红花(*C. s*): AY579207; 欧文氏菌(*E. u*): D90087; 雨生红球藻(*H. p* Flotow NIES-144): AF162276; 水仙(*N. p*): AJ278882; 水稻(*O. s*): NM-197521; 万寿菊(*T. e*): AF251018

The GenBank accession numbers of β-carotene hydroxylase genes included in the table: *Alcaligenes sp*: D58422; *Arabidopsis thaliana*: NM-118702; *Brassica rapa*: AY545229; *Capsicum. annuum*: Y09225; *Chlamydomonas reinhardtii*: AY860819; *Citrus maxima*: DQ002893; *Crocus sativus*: AY579207; *Ervinia urelovora*: D90

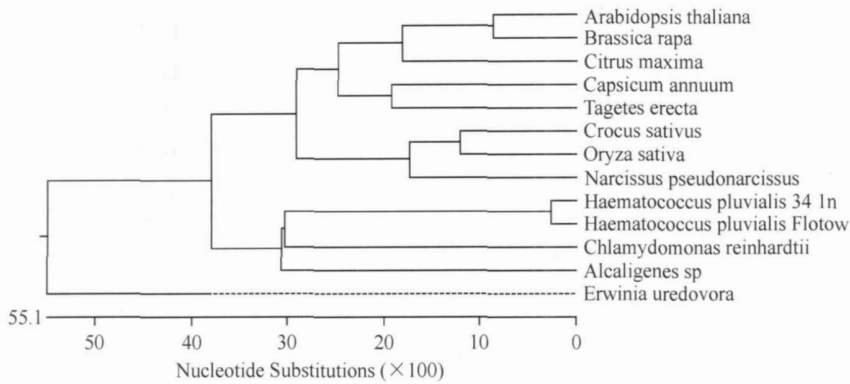


图 5 β -胡萝卜素羟化酶基因核苷酸同源性比较绘制出的系统发育树图

Fig. 5 The phylogenetic tree of β -carotene hydroxylase gene

3 讨论

本实验采用 RT-PCR 技术, 参照 Hamut Linden 发表的序列, 设计了一对特异性引物, 从雨生红球藻 34-1n 总 RNA 中扩增出 *crtR-B* 基因的 cDNA 片段。将此片段克隆于 T 载体上并进行序列测定。序列分析结果表明该基因片段为 906bp, 包含一个 879bp 的开放阅读框, 共编码 292 个氨基酸。序列比对结果表明, 雨生红球藻 34-1n *crtR-B* 基因的推导氨基酸序列与 Hamut Linden 发表的序列相比, 在编码区的 33 位有一个氨基酸的缺失, 在编码区 15、31、48、56 位上的氨基酸也不同。说明本实验克隆到的 *crtR-B* 基因与已知序列存在差异, 原因有可能是因为本实验采用的雨生红球藻 34-1n 与雨生红球藻 Flotow NIES-144 序列属于同一物种的不同品系, 其基因序列具有品系差异性。

采用 DNASTAR 软件, 从 NCBI 中挑取一些高等植物、藻类以及细菌的 β -胡萝卜素羟化酶基因氨基酸序列作为参考进行同源性分析。分析结果表明, 雨生红球藻的 β -胡萝卜素羟化酶基因与产碱菌的氨基酸序列同源性最低, 为 35.3%, 与其他植物的同源性为 40%—44%, 与莱茵衣藻的同源性为 49.0%, 与已知雨生红球藻的 β -胡萝卜素羟化酶基因的同源性为 98.6%。从绘制出的系统发育树图上也可以直观看出: 雨生红球藻与莱茵衣藻的亲缘关系较近, 与其他高等植物以及细菌的亲缘关系较远。Blanca *et al.* 曾经从聚球藻中获得了与细菌去饱和酶基因序列相似的序列, 但其功能却与去饱和酶功能不同, 反而与 β -胡萝卜素加氧酶 (*crtO*) 基因相似^[8]。Cunningham 等人也发现聚球藻中的番茄红素环化酶基

因与细菌的 *CrtY* (番茄红素环化酶) 基因的同源性很低^[9]。拟南芥中的 β -胡萝卜素羟化酶基因与细菌的 β -胡萝卜素羟化酶基因的同源性也仅仅为 31%—37% 左右^[11]。因此, 有的学者推测, 在植物和细菌中的类胡萝卜素合成相关基因存在着明显的差异^[10]。雨生红球藻 Flotow NIES-144 β -胡萝卜素羟化酶基因与原核生物的 β -胡萝卜素羟化酶基因同源性也较低, 为 32%—34%, 与拟南芥和辣椒的同源性相对较高, 为 38%^[4]。虽然高等植物、藻类和细菌中的 β -胡萝卜素羟化酶基因的同源性不高, 但在此基因内部都存在高度保守的组氨酸区域(图 4)。这些组氨酸残基被认为是与 Fe^{2+} 结合的区域, 与 β -胡萝卜素羟化酶的活性息息相关^[12, 13]。

参考文献:

- [1] Li H M, Gao L. Astaxanthin: chemical structure, biological function and Usage [J]. *Fine Chemicals*, 2003, **20**(1): 32—37 [李浩明, 高蓝. 虾青素的结构、功能与应用. 精细化工, 2003, **20**(1): 32—37]
- [2] Qu J. Application and development of astaxanthin [J]. *China Feed-stuff*, 2002, **18**: 19—21 [屈健. 虾青素的开发与应用. 中国饲料, 2002, **18**: 19—21]
- [3] Cai M G, Wang S L, Li W Q, *et al.* Advances in application studies of natural astaxanthin in aquaculture [J]. *Journal of Oceanography in Taiwan Strait*, 2003, **22**(3): 377—385 [蔡明刚, 王杉霖, 李文权, 等. 天然虾青素在水产养殖业中的应用研究进展. 台湾海峡, 2003, **22**(3): 377—385]
- [4] Hamut L. Carotenoid hydroxylase from *Haematococcus pluvialis*: cDNA sequence, regulation and functional complementation [J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1999, **1446**(3): 203—212
- [5] Mark H, Joseph H. Biosynthesis of ketocarotenoids in transgenic cyanobacteria expressing the algal gene for β -C-4 oxygenase, *crtO* [J]. *FEBS Letters*, 1997, **404**: 129—134

- of astaxanthin production in tobacco flowers [J]. *Nature Biotechnology*, 2000, **18**: 888—892
- [7] Zhuang H R, Shi Q Q, Lu H S, et al. The effect of nutritional stresses on accumulation of astaxanthin in *Haematococcus pluvialis* [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2000, **24**(3): 208—212 [庄惠如, 施巧琴, 卢海声, 等. 营养胁迫对虾青素累积的影响. 水生生物学报, 2000, **24**(3): 208—212]
- [8] Blanca Fernández-González, Gerhard S, Agustín V. A new type of asymmetrically acting β -Carotene Ketolase is required for the synthesis of echinenone in the *Cyanobacterium synechocystis* sp. PCC 6803 [J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 1997, **272**(15): 9728—9733
- [9] Cunningham Jr F X, Sun Z, Chamovitz D, Hirschberg J, Gantt E. Molecular structure and enzymatic function of lycopene cyclase from *Cyanobacterium synechocystis* sp. strain PCC 7942 [J]. *Plant Cell*, 1994, **6**: 1107—1121
- [10] Armstrong G A. Eubacteria show their true colors: genetic of carotenoid pigment biosynthesis from microbes to plants [J]. *J. Bact.*, 1994, **176**: 4795—4802
- [11] Zairen S, Elisabeth G, Francis X, Cunningham Jr F X. Cloning and functional analysis of the β -Carotene hydroxylase of *Arabisopsis thaliana* [J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 1996, **271**(40): 24349—24352
- [12] Florence B, Yves K, Alain d' Harlingue, Bilal C. Xanthophyll biosynthesis: molecular and functional characterization of carotenoid hydroxylases from pepper fruits (*Capsicum annum* L.) [J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1998, **1391**: 320—328
- [13] Fraser P D, Miura Y, Misawa N. In vitro characterization of astaxanthin biosynthetic enzymes [J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 1997, **272**(10): 6128—6135

CLONING AND SEQUENCING OF β -CAROTENE HYDROXYLASE GENE FROM *HAEMATOCOCCUS PLUVIALIS*

ZHENG Kai-Jing, HU Zhang-Li, LI Shuang-Fei, LEI An-Pin and WANG Chao-Gang
(Shenzhen Key Laboratory of Microbial Genetic Engineering, College of Life Sciences, Shenzhen University,
Shenzhen 518060)

Abstract: Astaxanthin (3,3'-dihydroxy- β , β -carotene-4, 4'-dione), belonging to carotenoids, has been shown a series of biological functions including an efficient antioxidant, enhancer of immune responses, an anti-cancer agent, and so on. β -carotene hydroxylase (CRT-R-B) is one of the key enzymes involving in the natural astaxanthin biosynthesis in *H. pluvialis*. *crtR-B* encoding β -carotene hydroxylase which is able to catalyse not only β -carotene to zeaxanthin but also canthaxanthin to astaxanthin. In this paper, *crtR-B* from *H. pluvialis* 34-1n was isolated and differences of *crtR-B* were observed between *H. pluvialis* 34-1n and *H. pluvialis* Flotow NIES-144.

A pair of primers were designed according to β -carotene hydroxylase (GI: 5852869) cDNA sequence in Genbank. Total RNA of *H. pluvialis* 34-1n was extracted and was transcribed. A cDNA fragment of β -carotene hydroxylase gene was amplified by using cDNA as template and was further inserted into pMD 18-T simple Vector. The pMD 18-T simple Vector which contained the cDNA fragment was transformed into *E. coli* JM109 for sequencing.

The sequence analysis revealed that the cDNA fragment contained an opening frame of 879bp encoding 292 amino acids. An amino acid absence was found at the region of 33 compared with the published β -carotene hydroxylase gene and 4 amino acids differences were observed between the cloned gene and the sequence of *H. pluvialis* Flotow NIES-144. Multiple sequence alignment analysis indicated that the percentage identity of amino acid sequences ranged from 35.3% to 98.6%. There were only limited predicted amino acids sequence homologies to β -carotene hydroxylase in *Alcaligenes* sp and *Envinia weddovora*. A higher amino acids homology was shown to the higher plants (40.6%—44.2%). The most significant homology was found between *H. pluvialis* 34-1n and *C. reinhardtii* (49.0%). The identity of *crtR-B* from *H. pluvialis* 34-1n to *H. pluvialis* Flotow NIES-144 was 98.6%.

Key words: *Haematococcus pluvialis*; β -carotene hydroxylase; Astaxanthin