

研究简报

杜氏盐藻光系统 反应中心 *psaB* 基因 cDNA 克隆及系统进化分析

鲁照明 刘红涛 臧卫东 李 杰 薛乐勋

(郑州大学细胞生物教研室, 郑州 450052)

PHYLOGENETIC ANALYSIS AND CLONING OF PHOTOSYSTEM REACTOR CENTER *psaB* GENE OF DUNALIELLA SALINA

LU Zhao-Ming, LIU Hong-Tao, ZANG Wei-Dong, LI Jie and XUE Le-Xun

(Laboratory for cell biology, Zhengzhou University, Zhengzhou 450052)

关键词: 杜氏盐藻; A2 亚基; *psaB*; cDNA; 简并引物

Key words: *Dunaliella salina*; A2 subunit; *psaB*; cDNA; Degenerate primer

中图分类号: Q946 文献标识码: A 文章编号: 1000-3207(2005)06-0717-04

杜氏盐藻是一种抗逆性很强的单细胞真核绿藻,能在 0.05~5mol/L 的盐水中生长,繁殖^[1]。杜氏盐藻的突出优点在于培养条件简单,光合自养,抗逆性极佳,这些特性为利用其进行实验提供了便利。本研究通过比较现有已知物种的 *psaB* 基因的氨基酸序列,利用 *psaB* 基因的氨基酸高度保守序列设计一对简并引物,采用 RT-PCR 从杜氏盐藻中克隆了 *psaB* cDNA 片段,为进一步研究杜氏盐藻 A2 亚基的结构与功能以及它的光合机理打下基础,同时通过 *psaB* 基因的进化分析可以更加深刻地了解杜氏盐藻与其他高等植物以及真核藻类之间的亲缘关系。

1 材料与方法

1.1 藻株和菌株 杜氏盐藻 (*Dunaliella salina*, UTEX 1644 Teod) 购自美国德州大学 (The University of Texas, USA), 大肠杆菌 JM109 为本实验室保存。

1.2 主要试剂 RNA 提取试剂 TRIzol 购自 Invitrogen 公司; AMV First strand cDNA synthesis Kit 购自上海生物工程公司; 限制性内切酶、TaqDNA 聚合酶、T4 DNA 连接酶和 pMD18-T 载体均购自宝生物工程 (大连) 有限公司 (TaKaRa); 凝胶回收试剂盒和质粒 DNA 提取试剂盒购自杭州维特洁公司。

1.3 杜氏盐藻细胞的培养 按照 5×10^5 细胞/mL 的接种量接种于 PKS 液体培养基^[2], 于 27 °C 光照条件下培养,光照强

度为 4500Lx, 明暗周期为 12h:12h。

1.4 简并引物的设计 从 GenBank 上搜索莱茵衣藻、*Chlamydomonas moewusii*、*Chlorella vulgaris* 以及 *Mesostigma viride* 的 photosystem P700 chlorophyll A apoprotein A2 亚基 (*psaB*) 基因的氨基酸序列进行比对,找出两段保守的序列: AWQGNFE 和 RGYWQE。然后按照对应的密码子翻译成核苷酸序列,涉及密码子简并性的分别用 N、R、Y 及 X 代替,由此设计的简并引物为:

上游引物: 5' GGN TGG CAR GGN AAY TTY GAR 3'

下游引物: 5' YTC YTG CCA RTA NCC NCX 3'

其中: Y = C/T, R = G/A, X = G/T, N = A/T/C/G, 上述引物由大连宝生物工程有限公司合成。

1.5 杜氏盐藻总 RNA 的提取 取接种 4d 左右的盐藻细胞,计数,调整至大约 1×10^6 细胞/mL,取 1mL,用 TRIzol 试剂提取杜氏盐藻细胞的总 RNA,判断提取的总 RNA 的质量。具体见文献^[3]。

1.6 RT-PCR 扩增杜氏盐藻 *psaB* 基因的 cDNA 片段 以提取的杜氏盐藻总 RNA 为模板,根据 AMV First strand cDNA synthesis Kit 的说明,用 AMV 反转录酶合成 cDNA 第一链,以此为模板,用合成的简并引物,进行 RT-PCR 扩增 *psaB* 基因 cDNA 片段。反应体系如下: 10 × PCR Buffer 5μL、引物各 1μL (50μmol/μL)、Taq 酶 0.5μL (5U/μL)、dNTP 4μL (10mol/μL)、模

收稿日期: 2005-05-17; 修订日期: 2005-09-20

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30270031, 30300208); 河南省医学科技创新人才工程项目 (2001006) 资助

作者简介: 鲁照明 (1966—), 男, 汉族, 河南原阳人; 博士, 从事分子生物学研究

通讯作者: 薛乐勋, xuelx @371.net

板 cDNA 1 μ L、H₂O 37.5 μ L,总反应体积 50 μ L。反应程序为 95 预变性 1min,然后按下列循环参数进行扩增反应:94 30s,50 30s,72 90s,经 30 个循环后,72 10min,以确保新生链延伸完全。反应结束后,经 1%的琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物。

1.7 杜氏盐藻 *psaB* 基因 cDNA 片段的测序分析和序列比对

用凝胶回收试剂盒回收目的 PCR 产物,利用 T-A 克隆方法亚克隆到 pMD18-T 载体(全长 2.69kb)上,转化感受态大肠杆菌 JM109,用含 Amp、X-gal 和 IPTG 的 LB 平板进行筛选,挑取阳性菌落提取质粒 DNA,用 pMD18-T 载体上的多克隆位点两侧的 EcoR 和 Sal 进行双酶切鉴定。感受态细菌的制备、连接、质粒 DNA 的提取、DNA 的酶切鉴定等,参见文献^[4]。含有目的插入片段的阳性菌落由大连宝生物工程有限公司测序。测序结果所得的数据与 GenBank 上其他物种的 *psaB* 基因序列进行序列比对,用 BLAST 进行同源性分析。

1.8 杜氏盐藻 *psaB* 基因的系统进化分析

将杜氏盐藻

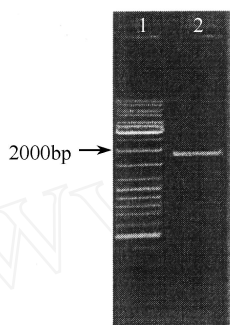


图 1 RT-PCR 扩增杜氏盐藻 *psaB* cDNA 序列的电泳结果

1. 分子量标记:Sangon GeneRuler™ DNA Ladder mix;
2. RT-PCR 扩增的 cDNA 片段

Fig. 1 Agarose electrophoresis of RT-PCR product of *D. salina* *psaB* cDNA

1. molecular size marker:Sangon GeneRuler™ DNA Ladder mix;
2. cDNA fragment amplified by RT-PCR

2.2 杜氏盐藻 *psaB* 基因推导的氨基酸序列的同源性及密码子偏爱性分析

随机挑取数个阳性克隆进行酶切鉴定,含有正确插入片段(约 1.8kb)(图 2)的质粒进行测序分析。此 cDNA 片段核苷酸序列长为 1815 个碱基(GenBank 收录号为 AY820754),其推导的氨基酸序列包含 605 个氨基酸残基,所得片段长度与理论值相符。氨基酸序列比对分析表明,杜氏盐藻与下列物种的同源性依次为:*Chlamydomonas reinhardtii* 92%,*Chlamydomonas moewusii* 91%,*Chlorella vulgaris* 86%,*Mesostigma viride* 85%,*Physcomitrella patens subsp. Patens* 85%,*Nephroselmis olivacea* 84%。此外,*psaB* 序列密码子偏爱性分析表明:杜氏盐藻 *psaB* 基因第三位密码子 A 和 T 的组成分别为 35.7%和 39.17%,而 G 和 C 分别为 7.27%和 17.85%,也就是说 *psaB* 基因密码子大多为 NNA 和 NNT 组成。

2.3 杜氏盐藻 *psaB* 基因氨基酸序列的系统进化分析

为了更进一步弄清杜氏盐藻和绿藻门其他种类的亲缘

psaB 基因的部分编码序列以及从 GenBank 中获取的绿藻门 49 个不同种的 *psaB* 氨基酸序列,按 CLUSTAL-1.81Raindy 格式进行存储,将存储的序列输入到 CLUSTAL-1.81Raindy 软件进行序列比对,最后用 TreeView (Win32) 1.6.6. 中文版进行系统进化树构建。

2 结果与讨论

2.1 RT-PCR 扩增杜氏盐藻 *psaB* 基因的 cDNA 片段及其酶切鉴定

杜氏盐藻总 RNA 经变性凝胶电泳和 OD_{230nm},260nm 以及 280nm 值检测,总 RNA 的提取质量较好,经 RT-PCR 扩增后,琼脂糖凝胶电泳检测在约 1.8kb 处有一明显亮带,与预期目的片段大小一致(图 1)。对重组质粒进行 EcoR + Sal 双酶切鉴定,琼脂糖凝胶电泳检测结果分别发现约 1.8kb 和 2.7kb 处有明显条带,分别与预期的目的条带和载体带大小一致(图 2)。

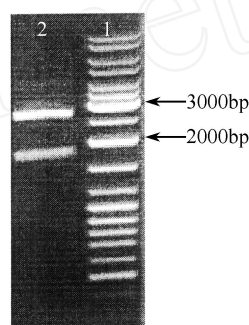


图 2 含有 *psaB* 片段的重组质粒的鉴定电泳结果

1. 分子量标记:Sangon GeneRuler™ DNA Ladder mix;
2. pMD18-T-*psaB* 重组质粒 EcoR + Sal 双酶切结果

Fig. 2 Identification of the recombinant plasmid containing the *psaB* fragment

1. molecular size marker:Sangon GeneRuler™ DNA Ladder mix;
2. pMD18-T-*psaB*/EcoR + Sal

关系,进化分析中的物种全部来自绿藻门中典型的种类,共有 50 个物种,从 GenBank 上获取绿藻门中所有用来分析进化关系的 *psaB* 基因的氨基酸序列,然后通过 CLUSTAL 软件将所有序列进行比对,最后用 TreeView 软件绘制系统进化树。图 3 表明,杜氏盐藻与 *Haematococcaceae* 中的大多数种类亲缘关系最近。

2.4 讨论

杜氏盐藻是一种极其耐盐的特殊逆境生物,但目前对它的遗传背景知之甚少,而且没有基因组文库用来筛选功能基因。简并引物是一类由多种寡核苷酸组成的混合物,彼此之间有一个或数个核苷酸的差异。通过简并引物进行 PCR,可以相对简便的检测一个已知基因家族的新成员,或用来检测物种间的同源基因^[5]。通过比较物种间氨基酸保守序列设计简并引物,用 PCR 的方法筛选同类基因,不失为一种简单可靠的方法^[6]。

作者根据 GenBank 上登录的莱茵衣藻(*Chlamydomonas*

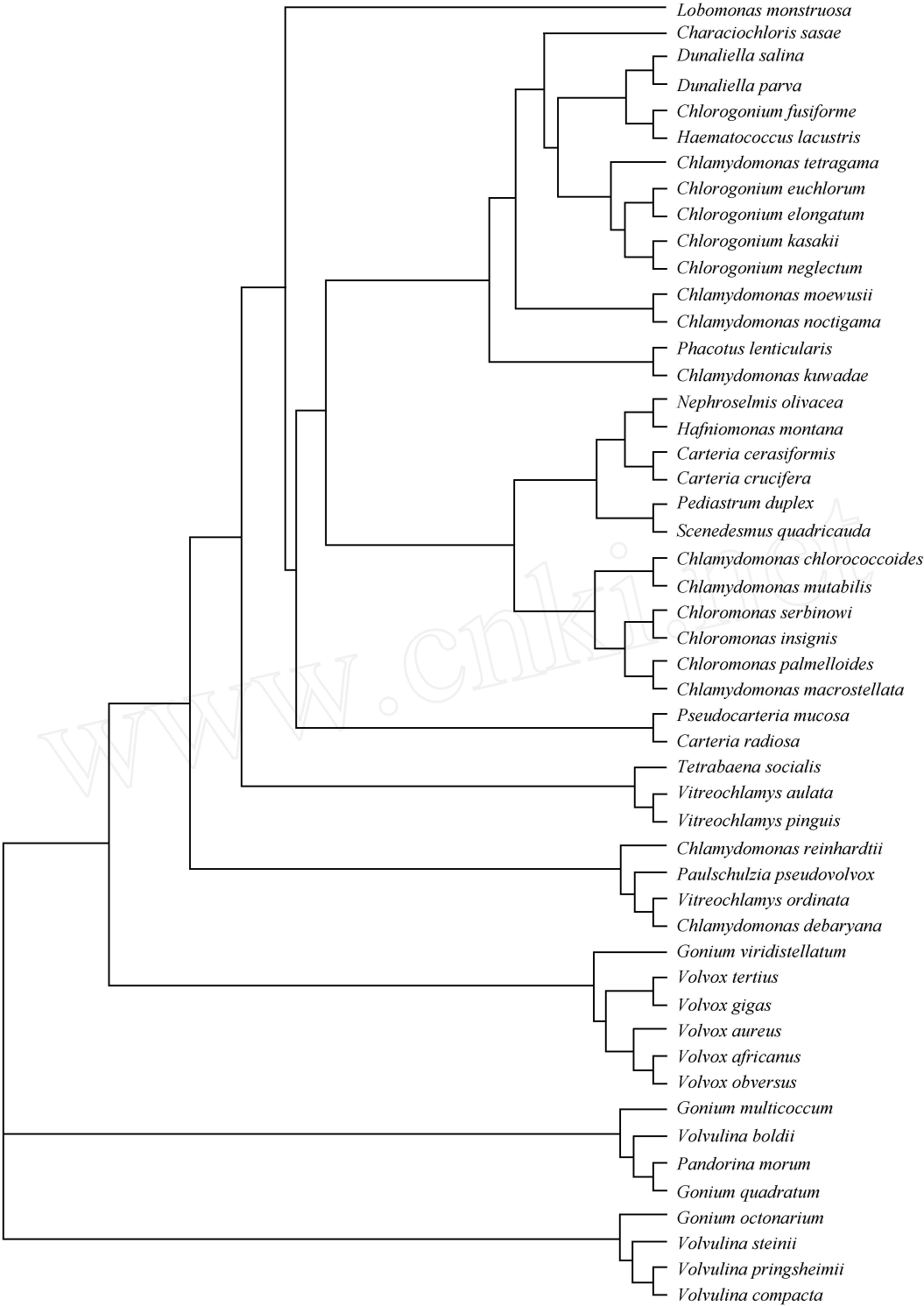


图 3 绿藻门 *psaB* 基因的系统进化树

Fig. 3 Phylogenetic chart of *psaB* in the Chlorophyta

reinhardtii)、*Chlamydomonas moewusii* 及 *Chlorella vulgaris* 等真核生物的光系统 反应中心蛋白 *psaB* 基因的氨基酸序列,比较筛选出高度保守、并且核苷酸简并程度较低的区域 AWQCNFE 和 RGYWQE,设计简并引物,进行 RT-PCR,以获得杜氏盐藻的 *psaB* 基因信息。根据 BLAST 分析结果,本实验所得的核苷酸

序列转化成氨基酸序列后,其与 *Chlamydomonas reinhardtii*, *Chlamydomonas moewusii*, *Chlorella vulgaris*, *Mesostigma viride*, *Physcomitrella patens* subsp. *Patens*, *Nephroselmis olivacea* 的 *psaB* 基因氨基酸序列的同源性分别为 92 %、91 %、86 %、85 %、85 %和 84 %,从而推断该片段为杜氏盐藻的 *psaB* cDNA 片段。另

外,目前发现大多数叶绿体基因存在高频率的 NNA 和 NNT,也就是第三位密码子 A 和 T 的含量较高^[7],作者对 *psaB* 序列密码子偏爱性分析表明:杜氏盐藻 *psaB* 基因第三位密码子富含 A 和 T 碱基(A35.7%,T39.17%),而 G 和 C 分别为:7.27%和 17.85%,这一结果与大多数叶绿体基因组第三位密码子富含 AT 碱基的结果相一致^[7]。

在高等植物中,有关 *psaB* 基因多集中在它与上游的 *psaA* 基因以及下游的 *rps14* 基因共同形成一个操纵子的研究,即形成 *psaA-psaB-rps14* 特殊的操纵子^[8]。该操纵子的启动子(位于 *psaA* 基因上游)具有很强的活性。作者将通过克隆 *psaB* 基因所得的序列信息,通过 5'-RACE 以及基因组步行文库(Genome walking)来进一步克隆得到 *psaA* 及其上游序列,为利用该启动子在转基因盐藻生物反应器中的应用打下基础(待发表),同时可以更好地研究杜氏盐藻光合作用的机理与其生长习性之间的关系。

Nishiyama 和 kato 对五种叶绿体基因进行进化分析时,发现 *psaB* 基因在进化分析中效果最佳^[9],也就是说作者可以根据 *psaB* 序列的信息,分析杜氏盐藻与其他藻类和高等植物的亲缘关系。本实验得到的杜氏盐藻 *psaB* cDNA 片段,其长度达 1815bp,接近全长 2.2kb,基本包括该基因的全部信息,通过构建绿藻门中 *psaB* 基因的系统进化树发现杜氏盐藻与 *Haematococcaceae* 中的大多数种类进化地位最为接近,这一结果与以前很多文献报道的杜氏盐藻与莱茵衣藻进化关系最为接近的结果不同^[10]。这对更进一步澄清杜氏盐藻的遗传背景提供理论依据,为更进一步研究杜氏盐藻的分子机理提供理论依据。

参考文献:

- [1] Avron M, Bein-Altz A. *Dunaliella*: physiology, Biochemistry and Biotechnology [M]. Florida:CRV Press,1992,150
- [2] Fisher M, Pick U, Zamir A. A salt-induced 60-kilodalton plasma membrane protein plays a potential role in the extreme halotolerance of the alga *Dunaliella* [J]. *Plant physiol*,1994,106:1359—1365
- [3] Xie H, Jiang G Z, Lv Y M, et al. Cloning and analysis of nitrate reductase cDNA fragment of *Dunaliella salina* [J]. *Journal of Zhengzhou University*,2004,39(1):6—8[谢华,姜国忠,吕玉民,等.杜氏盐藻硝酸盐还原酶 cDNA 片段的克隆与分析.郑州大学学报,2004,39(1):6—8]
- [4] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2nd ed) [M]. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press,1989
- [5] Fietto J L, de Marco R, Verjovski-Almeida S. Use of degenerate primers and touchdown PCR for construction of cDNA libraries [J]. *Biotechniques*,2002,32:1404—1408
- [6] Jiang G Z, Niu X L, Lv Y M, et al. Cloning and characterization of Hsp70a cDNA fragment of *Dunaliella salina* [J]. *Hereditas*,2003,25(5):573—576[姜国忠,牛向丽,吕玉民等.杜氏盐藻 Hsp70a cDNA 片段的克隆与分析.遗传,2003,25(5):573—576]
- [7] Morton B R. Selection on the codon bias of chloroplast and cyanelle genes in different plant and algal lineages [J]. *J. Mol. Evol*,1998,46:449—459
- [8] Sang-Pin Wu, Ming-Chih Cheng, Shu-Chen Grace Chen. Characterization of a spinach chloroplast sequence-specific DNA-binding factor for photosystem I *psaA* operon promoter [J]. *Physiologia Plantarum*,1999,106:98
- [9] Nishiyama T, Kato M. Molecular phylogenetic analysis among bryophytes and tracheophytes based on combined data of plastid coded genes and the 18S rRNA gene [J]. *Mol. Biol. Evol*,1999,16:1027—1036
- [10] Hou G Q, Wang N, Xie H, et al. Amplification of *atpA* gene fragment from chloroplast of *Dunaliella salina* by PCR [J]. *Journal of Zhengzhou University*,2004,39(1):12—15[侯桂琴,王宁,谢华,等.PCR 法扩增盐藻叶绿体 *atpA* 基因[J].郑州大学学报,2004,39(1):12—15]