

杜氏盐藻磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶基因的克隆和分析

张楠楠¹, 潘卫东², 崔玉琳³, 秦松⁴, 薛乐勋¹

(1. 郑州大学 生物工程系 细胞生物研究室, 河南 郑州 450001; 2. 郑州大学基础医学院 微生物学与免疫学教研室, 河南 郑州 450001; 3. 中国科学院 海洋研究所, 山东 青岛 266071; 4. 中国科学院 烟台海岸带研究所, 山东 烟台 264003)

摘要: 为研究杜氏盐藻(*Dunaliella salina*)磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶(phosphoenolpyruvate carboxylase, PEPC)基因的功能, 根据莱茵衣藻(*Chlamydomonas reinhardtii*)、拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)、花生(*Arachis hypogaea*)等真核生物 PEPC 基因高度保守序列, 设计一对简并引物, 通过 RT-PCR 的方法获得杜氏盐藻 PEPC 基因部分序列, 然后采用 RACE 的方法分别克隆到 5'端和 3'端序列, 拼接后得到全长 cDNA, 其长度为 3 523bp, 包含 2 949 bp 的完整开放阅读框, 编码 982 个氨基酸, 相对分子质量为 110 560.5。氨基酸序列与已知物种 PEPC 序列的同源性依次为: *Chlamydomonas reinhardtii* 69%, *Chlorella variabilis* 55%, *Ostreococcus tauri* 50%和 *Ostreococcus lucimarinus* CCE9901 49%, 表明所克隆的序列确为杜氏盐藻 PEPC cDNA 序列。

关键词: 杜氏盐藻(*Dunaliella salina*); 磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶; 基因克隆; 序列分析

中图分类号: Q943.2

文献标识码: A

文章编号: 1000-3096(2011)12-0042-06

磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶(phosphoenolpyruvate carboxylase, PEPC)催化磷酸烯醇式丙酮酸不可逆反应生成磷酸和草酰乙酸, 是光合作用关键酶^[1-2], 存在于所有光合生物中, 同时还参与氨基酸代谢中碳骨架回补作用^[3]。20 世纪 80 年代末, 日本学者杉木^[4]博士发现大豆籽粒蛋白质含量与 PEPC 活性密切相关, 受此启发, 陈锦清等^[5]提出“底物竞争”假说, 认为籽粒的主要储藏物质油脂、蛋白质均来自葡萄糖酵解产物-丙酮酸, 两者之间存在着底物竞争, 底物竞争的平衡点取决于 PEPC 和乙酰辅酶 A 羧化酶(ACCCase)的相对活性。PEPC 催化丙酮酸合成草酰乙酸进入蛋白质代谢; 乙酰辅酶 A 羧化酶催化丙酮酸合成乙酰辅酶 A 进入脂肪代谢。磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶控制油脂和蛋白质生物合成的共同底物磷酸烯醇式丙酮酸的流向, 从而决定蛋白质/油脂含量比例^[6]。

杜氏盐藻(*Dunaliella salina*)是一种抗逆性很强的单细胞真核绿藻, 能在 0.05 ~ 5 mol/L 的盐水中生长、繁殖^[7]。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^[8], 可以大规模开放式培养, 极大地降低培养成本, 因此适合作为高油脂工程藻株。作者通过比较一些已知物种 PEPC 的 cDNA 序列, 设计简并引物, 以杜氏盐藻的 cDNA 为模板, 通

过 RT-PCR 的方法从杜氏盐藻中克隆出 PEPC 的 cDNA 片段, 并利用 RACE 技术首次从杜氏盐藻中克隆了包含 PEPC 基因完整编码区的 cDNA, 通过 BLAST 和 DNAMAN 对该序列分析得到 PEPC 基因及蛋白的相关信息, 为进一步通过抑制 PEPC 基因的表达提高杜氏盐藻的油脂含量打下了基础。

1 材料与方法

1.1 藻株与菌株

杜氏盐藻(*Dunaliella salina*, UTEX-LB-1644)购自美国德州大学(The University of Texas, USA), 大肠杆菌 DH5 α 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 第一链 cDNA 合成试剂盒, 3'-Full RACE Core Set 和 5'-Full RACE Set 均购自上海生工生物工程有限公司; Taq DNA 聚合酶和 pMD18-T 载体均购自宝

收稿日期: 2010-12-25; 修回日期: 2011-04-12

作者简介: 张楠楠(1986-), 男, 河南洛阳人, 硕士研究生, 研究方向为基因工程, 电话: 0371-66658328, E-mail: cellbiology68@sohu.com; 秦松, 通信作者, E-mail: sqin@yic.ac.cn; 薛乐勋, 通信作者, E-mail: xuelx@zzu.edu.cn

生物(大连)生物工程有限公司(TaKaRa); 凝胶回收试剂盒和质粒DNA提取试剂盒购自杭州维特洁生物公司。

1.3 杜氏盐藻的培养

杜氏盐藻细胞按照 5×10^5 个/mL 的接种量接种在 PKS 液体培养基中^[9], 26℃光照培养, 光照强度为 4 500 lx, 明暗周期各 12 h。

1.4 简并引物的设计

根据 GenBank 上已登录的莱茵衣藻 (*Chlamydomonas reinhardtii*)、拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*)、花生 (*Arachis hypogaea*) 等真核生物 PEPC 基因的 cDNA 序列进行比对分析, 找到两段简并程度较低的引物序列, 正向引物 5'-TGGATGGG(C/T)GG-(C/A/T)GA(C/T)CG-3'; 反向引物: 5'-CC(C/G/A)CC-(C/G/A)GT(G/A)TT(C/G)TGCAT-3', 引物由上海生工生物工程有限公司合成。

1.5 杜氏盐藻总 RNA 的提取

取对数生长期的杜氏盐藻细胞, 用 TRIzol 试剂提取总 RNA。通过 1% 的琼脂糖凝胶电泳判断 RNA 的完整性, 通过测定 A_{260}/A_{280} 判断 RNA 的浓度和纯度。

1.6 PEPC 基因 cDNA 片段的扩增

以提取的盐藻总 RNA 为模板, 根据 AMV 第一链 cDNA 合成试剂盒的说明, 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 PEPC 基因的 cDNA 片段。反应程序为, 94℃预变性 5 min; 94℃ 45 s, 55℃ 30 s, 72℃ 130 s, 30 个循环; 72℃延伸 10 min, 4℃终止。反应结束后, PCR 反应产物经 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测。

1.7 杜氏盐藻 PEPC 基因 cDNA 片段的测序

RT-PCR 产物经凝胶回收试剂盒回收后, 连接到 pMD18-T 载体上, 转化感受态大肠杆菌 DH5 α , 用含有 Amp、X-gal 和 IPTG 的 LB 平板进行筛选, 挑取阳性菌落, 用 pMD18-T 载体两端引物做菌液 PCR 进行鉴定。感受态细菌的制备、连接、质粒 DNA 的提取、菌液 PCR 鉴定等, 参见分子克隆实验指南(第二版)^[10]。含有目的片段的阳性克隆由上海生工生物工程有限公司测序。

1.8 PEPC 基因的 3'RACE 扩增

根据简并引物扩增得到的已知序列, 分别设计 PEPC 的 3'RACE 上游外侧引物: 5'-GGCGACAAA-GGCTACAC-3'和上游内侧引物: 5'-GACCCGAGCA-AAGACCC-3', 提取杜氏盐藻的总 RNA, 按照 3'-Full RACE Core Set 说明进行操作。巢式 PCR 反应产物经 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测。对目的片段进行胶回收后连接于 pMD18-T 载体上, 转化大肠杆菌 DH5 α , 挑取阳性菌落, 菌液 PCR 鉴定正确后由上海生工生物工程有限公司测序。

1.9 PEPC 基因的 5'RACE 扩增和序列分析

根据扩增得到的已知序列, 分别设计 PEPC 的 5'RACE 下游外侧引物: 5'-CCAGAAGTCGGC-GTAGTTGC-3'和下游内侧引物: 5'-GATAGCATGGAAG TAGGCAT TCACA-3', 提取杜氏盐藻的总 RNA, 按照 5'-Full RACE Set 说明进行操作。巢式 PCR 反应产物经连接、转化和测序, 序列通过 Primer Premier 5.0 整理拼接全长, 与 GenBank 上其他物种的 PEPC 序列进行序列比对, 用 BLAST 进行同源性分析, 并用 ORF Finder 进行在线分析开放阅读框以及 DNAMAN 软件分析得到 PEPC 基因及蛋白的相关信息。

2 结果

2.1 杜氏盐藻总 RNA 的提取结果

提取的杜氏盐藻总 RNA, 经琼脂糖凝胶电泳检测提取的总 RNA 质量及完整性均较好。提取的杜氏盐藻总 RNA 28 S 和 18 S 2 条带清楚, A_{260}/A_{280} 的比值为 1.8 ~ 2.0, 提示无蛋白和基因组 DNA 污染, 完全适合下一步的 RT-PCR 反应。

2.2 RT-PCR 扩增的杜氏盐藻 PEPC 基因 cDNA 片段

以 cDNA 为模板, 利用简并引物进行 PCR 扩增, 约 2 000 bp 处可见较弱的扩增条带, 与预期目的片段大小一致 (图 1)。将产物连接到 pMD18-T 载体上, 经过转化筛选, 菌液 PCR 检测, 可以清晰地看到条带 (图 2)。

2.3 杜氏盐藻 PEPC 基因 3'和 5'序列的扩增

经过巢式 PCR, 得到 3'片段长度约为 600 bp

(图3), 5'片段长度约为1 000 bp(图4), 胶回收后连接于pMD18-T载体上, 经过转化筛选测序, 3'RACE获得序列长度为541 bp, 5'RACE获得序列长度为1 032 bp。

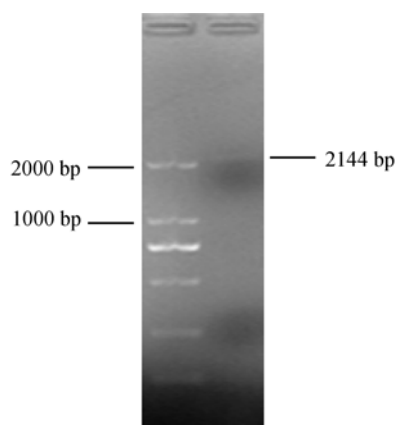


图1 杜氏盐藻 PEPC 基因 cDNA 片段

Fig. 1 PEPC cDNA fragment from *Dunaliella salina*

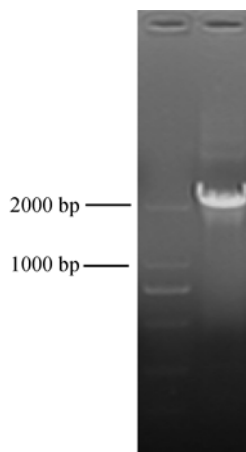


图2 含盐藻 PEPC 序列的重组质粒的菌液 PCR 扩增

Fig. 2 Amplification of PEPC cDNA from pMD-PEPC by Bacteria Liquid PCR

2.4 杜氏盐藻 PEPC 基因序列分析

根据所获得的中间片段、3'端和5'端序列拼接出杜氏盐藻 PEPC 基因的全长 cDNA 序列。该基因 cDNA 序列全长 3 523 bp, 包含 2 949 bp 的完整开放阅读框, 编码 982 个氨基酸, 另外 5'非编码区

(5'-UTR)序列长 138 bp, 3'非编码区(3'-UTR)序列长 436 bp。BLAST 结果显示获得 PEPC 氨基酸序列具有已知 PEPC 相似的 Ppc 结构域(图5)。通过 DNAMAN 软件对该序列分析得到 PEPC 蛋白的相关信息, 其蛋白质的相对分子质量为 110560.5, 等电点为 6.94, 其中含量较高的氨基酸是 Leu(11.97%), Arg(9.24%), Glu(7.46%), Val(6.12%); 跨膜结构分

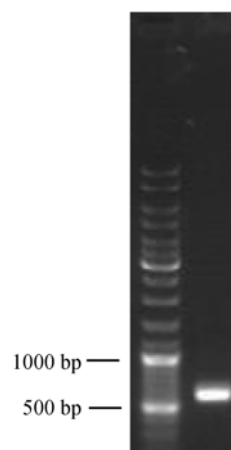


图3 巢式 PCR 扩增杜氏盐藻 PEPC 基因 3'下游序列

Fig. 3 Amplification of the 3' downstream sequence of *Dunaliella salina* PEPC gene by nested PCR

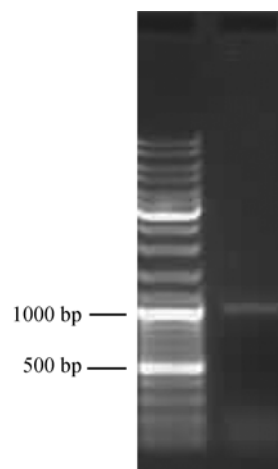


图4 巢式 PCR 扩增杜氏盐藻 PEPC 基因 5'上游序列

Fig. 4 Amplification of the 5'upstream sequence of *Dunaliella salina* PEPC gene by nested PCR

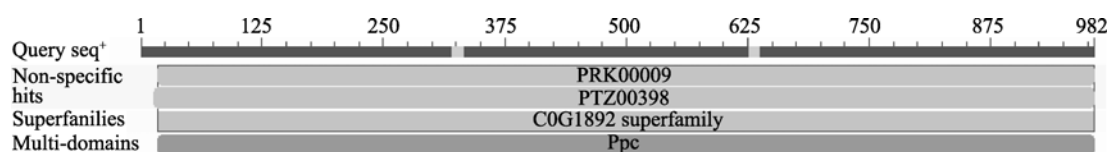


图5 杜氏盐藻 PEPC 推测的功能结构域

Fig. 5 Putative functional domains of PEPC from *Dunaliella salina*

析表明该蛋白不包含跨膜结构域; pH7 时, 蛋白质电荷为 - 0.81, 推测该蛋白可能是的水溶性蛋白。

2.5 杜氏盐藻 PEPC 基因的同源性分析

将推导杜氏盐藻 PEPC 的 982 个氨基酸与已知物种

PEPC 序列进行同源性分析(图 6)。结果依次为: *Chlamydomonas reinhardtii* 69%, *Chlorella variabilis* 55%, *Ostreococcus tauri* 50% 和 *Ostreococcus lucimarinus* CCE9901 49%。

ds.txt	MARSQDTSSPP.....FNGLRD.....DSSLRATFFKVLSHHH.....PSLAKVDVIYALSQAWT	55
cr.txt	GRTSFRVSQDLRTGPAN.....FLSGLRD.....DSSLRQVFFSILRH...PMLAAKVDVIYALSQAWC	66
cv.txt	MASLT.....PSGSKNGNIGSSVAYE.....VNQALLLEDDGLLRDQFLSVFSSH...POLANKVDVIFALQAAMC	65
ot.txt	MROAVLPDQKSRSMATHGVSHRRQGSFASSEEALKEKATTSYISGRGETKDFNAHDVIEEDALLQTIFFSVVRETTSEEFLAKQGVYDGESEAF	100
ol.txt	MLKAVF.....GDKAKAIT...SHKRTGSLFASSEEALDALARSSVYISGRGETKEFNAHDVIEEDALLRTIIFAVVRETAGDKFLGQLKSVYEASEKFG	95
ds.txt	SNSDIDFELLEKYSSLKPEETILLASSFSHMLNLHNLTEEVNSSQTERAVRLGEVEN.....FVRTTNKSLKLTISVNGYSPEDVYKHLQNRVELVLTAPH	154
cr.txt	TSOSDIDFELLEKYSSLKPEETILLASSFSHMLNLHNLTEEVNSSQIGRAVRLGEMDS.....ITROTINSLKLTITTTNGFTPOOVYDILCSQIVELVLTAPH	165
cv.txt	MEESDSDFEMLEKRIEALPDSEILVSASFQCLNLHNLVTEESITARVKAARLGEVEQ.....ATRTNKSILQRIVSTKGLQPEEIIAALQKQIVGLVLTAPH	164
ot.txt	KTGEPKDFEAMKLLLETMEVDESLOFASAYSNLLNLHNLISEQVANAMEERHRRDDIPRGAKESTNGAIGKILRS.....GKTIEEIIAALSROAVDVLVLTAPH	199
ol.txt	SHDPKDFDAMQAMLETMEVDESLOFASAYSNLLNLHNLISEQVANAMEERHRRDDIPRGAKESTNGAIGKILRA.....GKSTEEIISALAVDVLVLTAPH	194
ds.txt	TQALRASLLKKYAHVRKELDKLHNKRLSPYEKIEIMESITRSYVESAWRTDEIRRKPTIQDEMRGGMTYNSVTIDFVPVFRIRIDTALANLCQPRPLPT	254
cr.txt	TQALRASLLKKYATVRRRELDLHSHKRMSEYKIEITLRAAAVQAARWTDIEIRRSKPTIQDEMRSGLSYFTVIFVVPVFRIRVDTALEKLCQPRPLPD	265
cv.txt	TQATROSLLKKYGEIRHAMDRLHNLRLSNYERLHOLDEIRSNQIGAWRTDEIRRKPSQDESGREGLTYFHETIYSGLPVFLRIRIDTALKNICQPRPLPD	264
ot.txt	TQALRRSMLKAFKVRKELDLQRRFLRSRFERAEDLDEIRSNIAAAWRTDEIRRTTPKQDEMRAGLTYFQQTIDVGTITMRRVDTALANGCGRPLPD	299
ol.txt	TQALRRSMLKSFITIEKLLQRRFLRSRYERAELDEIRSNVSAWRTDEIRRTTPKQDEMRAGLTYFQQTIDVGTITMRRVDTSLANGCGRPLPD	294
ds.txt	HTLRFKGSWMGGDRDGNPVTSETTRDVTIARLEAVNAYHATEKLMFDSLVRWCSPPELLERLAAQVAAAEERVARVSEWRKKRNYADFGPTLPTPEPF	354
cr.txt	RALRFKGSWMGGDRDGNPVTATETTRDVTVILARLEAVNAYVYFQVGEGLMFDLSLWRCSPEMKELERLAAQESRLAARVAERKKRNYDFVAPLPTPEPF	365
cv.txt	ARLRFKGSWMGGDRDGNPVTPTDITRDVIGARLSATTLMTEQVEKLMYELSMWRASPELK.....ARLSRRLOQPANTYDVVFMSENEPF	350
ot.txt	RSIVTFKGSWMGGDRDGNPVTSECTRDVVILARVQGTNFLTSTQKLLPELSMWRQNDTVKRLANDILATSETKNAIFEERKKRNYDFVKAPEHEFY	399
ol.txt	RSIVTFKGSWMGGDRDGNPVTASCTRDVVILARVQGVNLLFRATQRLIFDLSMWRQNDVAKALAKDILENSEIDNFTIFEERKKRNYDFVKAPEHEFY	394
ds.txt	RVVLSHLRDRLYRTREVLFCCLVHPGANVRASLIEHG.TFIDIEELYQPLKLMYDSLSTKDESTANARLLDLIRQVSTFGLGIMIMLDVQESTRHSVEV	453
cr.txt	RVVLAHMRDRLYNTRQVLFQCLITHMSVRGALAEAG.AYVQIDMARPLKLMYDSLSTGDESANARLLDLIRQIRTFGLGMMGLDVQESTRHTHEVM	464
cv.txt	RVVLSVDFARLQRLKDLHFCLEASVNVREALESPAYRDETETLATLRKYDLSLSTGDIHTASSLLDVRQARVFGLLFCKLDIROESVKHTEAM	450
ot.txt	RVVILAMLRDLRYNTRREALQKQVTD.....NYSIDVNDSS.IIATKEEIEYPLVACYESLIEVKDQDANSULLDVIRQVQFGLGLVKLDIROESDRHAAL	496
ol.txt	RVVILAELRDLRYNTRREALQRIADN.....DNIDMNDET.IIRSKDEIFAPLVVYCESLIEVGLAQANAYLLDVIRQVQFGLGLVKLDIROESDRHAAL	491
ds.txt	DAHTIKYLGSGSYEWSEEDORMAFLLQELKGRPLLPFCMEASPDVHEVIATFERVLAELPS.....DSLGAIVISMATASDVLAVVLLQRECGVR...EPLRV	548
cr.txt	DAVTIYGLGSGYASIDEPKRLAFLLGELQGRPLLPFGMDNSPEKVEVVRTILRLSELFG.....DSLGAIVISMATASDVLAVVLLQRECGVR...PALRV	559
cv.txt	DAHTIYGLGSGYKQIDEPKRMDFLVNELTGKRLPLPPDPTPEVADVIGFERMLAQLOT.....DSLGAIVISMATASDVLAVVLLQRECGVN...PMLRV	545
ot.txt	DAVTIYGLGSGYIEWSEEDQKIEWLTSILMSKRLPLFHDLECSADVREVLDTCKTIAHLQOTCPGLGTIVISMATASDVLAVVLLQRECGCEKQVLLRV	596
ol.txt	DAVTIYGLGSGYIEWSEEDQKIEFTIRELESKRLPLPSDLECSDDVREVLDTCKTIAHLQOTCPGALGTIVISMATASDVLAVVLLQRECGCEKQDILLRV	591
ds.txt	VPLFETLDDLNNAPDTCRKLESIDWYRETFKEVQECMIGYSDSGKDAGRLAAAWALYEAQENLVAAASDYNMKLVLFHGRGGTVGRGGGPTILAIRSQA	648
cr.txt	VPLFETLDDLHMAPGTMTTLTGNDWYRGHINQVQECMIGYSDSGKDAGRLAAAWALYETQERLVEAAGCGVRLVLFHGRGGTVGRGGGPTILAIRSOPS	659
cv.txt	VPLFETLDDLHMETAFAROLITNPWYLAHINQQAEMIGYSDSGKDAGRLAAAWALYEVQERLTKVADDFDHMTLFHGRGGTVGRGGGPAHLLAVSQPP	645
ot.txt	APLFFERLDDLNDAPRVLRQLFSVKWYLDHINQFQEVIGYSDSGKDAGRLAAAWALYEQDERVVAAGNEFNAMITLFHGRGGTVGRGGGPAHLLAVSQPP	696
ol.txt	APLFFERLDDLNDAPRVLRQLFSVKWYHDHIAQFQEVIGYSDSGKDAGRLAAAWALYQDERVVAAGKEFDVATLTFHGRGGTVGRGGGPAHLLAVSQPP	691
ds.txt	GTIGCTLRVTVQGEHTEQOFGENEVCFRSLDLYTSAVLEACDPPPAKKEWREMYVLTSSISQNEYENLVRRRPEFVEYVNAVTEVSELGRNLIGSRPA	748
cr.txt	GTINGHLRVTVQGEHTEQOFGEKEVCFRSLDLYTSAVLEAACDPPPAQAQEWRLDLSLATESQDMYRSVYRTPEFYDYKQSTAASELGRNLIGSRPS	759
cv.txt	GTITRGLRVTVQGEHTEQOFGEKESAFHSLDLYTSAVLEATIACTEOPQLIREMADARVSGEAVRAVQEDPREVSVFOSITIVNELGRNLIGSRPA	745
ot.txt	GTIVNGSLRVTVQGEHTEQOFGENEVCFRSLDLYTSAVLEHSLKPKPSHPPDKKARVADRMSEYSCAHYKRTVFEETPEFYVYFAQATPSELGRNLIGSRPA	796
ol.txt	GTIVNGSLRVTVQGEHTEQOFGENEVCFRSLDLYTSAVLEHSLKPKPSHPPDEWRVADRMSEYSCAHYKRTVFEETPEFYVYFAQATPSELGRNLIGSRPA	791
ds.txt	ARGKKGGVEITLRAIPWIFAWTQTRHLPLVWLIGICALHEVLNSGMPMILNDNYNWPFSOGTMDLVKMWAKABARTAVLYDRLVDEKILWGLQDEIRQR	848
cr.txt	SR.KSGGIEITLRAIPWIFAWTQORHLPLVWLIGICALHAAIDKQYGVPLQDNYANWPFESTLIDLVEMLAKADSRLSAFYERITLDSSAPLQQRREL	858
cv.txt	KRRSHGSIDITLRAIPWIFAWTQVRHPLVWLIGICALNSMKAKKQELQDNYNWPFSFVTLIDLVEMLAKADPRVKMVEKALVEPELGLQDELKK	845
ot.txt	KRKPNASVTALRAIPWIFAWTQSRHPLVWLIGISASFKRLLIEEGEQTDRDNYKSWPFPEVITIDLVEMLAKADPVVAVYERALVDPKLDFEASLRGE	896
ol.txt	KRKPSAGVTALRAIPWIFAWTQSRHPLVWLIGISTSFRRLLDEGELETDRDNYKSWPFPEVITIDLVEMLAKADPVVAVYERALVDPKLDFEASLRGE	891
ds.txt	LQSTQAATLVADKSNLGPVSLVPAAPNSTQMTALTALPVSHAMSTPNIDUKICLAPYVAPLILNOCMLKALREYQRTG.....NLPQKGVITINDPETLDL	946
cr.txt	LAKTQQNLIVVRKSVLEGG.....NTSPQSNIPNDEKILRSPYVAPLNLVLAALSOGRLKFRDQ.....GTEINWSDPETLDL	936
cv.txt	FEMAEQSLITVMKRSRLSS.....SSAFQQKICLAPYVAPLNLVLAALSOGRLKFRDQ.....GTEINWSDPETLDL	923
ot.txt	LESIDVILVSEITGLVQPEKTEENA.....NEARRMQKIKKLEKRLNLTITPLNVCVRFLLQARALENE.....EDGKLSMRKVRITTL	981
ol.txt	LESIDVILVSEITGLVQPEKTEENA.....EAVQVHKILAKLHKESLITITPLNVCVRYLTAARALENE.....EDGKLSMQKVRITTL	974
ds.txt	ARDESK...DPQCHPEVSAMVSLITITKIGIAAGMQNTG	982
cr.txt	SDPHKKGEGAAHPEVSAMDQMLITITKIGIAAGMQNTG	974
cv.txt	SGGDSK...HPELAGIEDTMITITKIGIAAGMQNTG	955
ot.txt	EGYFQ....DFNYKCAVNDVILITITKIGIAAGMQNTG	1014
ol.txt	EGYFQ....DYNKYCAVNDVILITITKIGIAAGMQNTG	1007

图 6 推导的杜氏盐藻 PEPC 基因的氨基酸序列同源性比对

Fig. 6 Alignment of the deduced amino acid sequences of PEPC from *Dunaliella salina*

Ds. 杜氏盐藻; Cr. 莱茵衣藻; Cv. 小球藻; Ot. 青绿藻; Ol. 绿色鞭毛藻

Ds. *Dunaliella salina*; Cr. *Chlamydomonas reinhardtii*; Cv. *Chlorella variabilis*; Ot. *Ostreococcus tauri*; Ol. *Ostreococcus lucimarinus* CCE9901

3 讨论

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^[11]。而 RACE 方法可从低丰度的转录本中高效获得目的基因全长序列及包含完整编码区的基因片段, 目前应

用十分广泛^[12]。通过比较物种间 cDNA 保守序列设计简并引物, 用 PCR 的方法筛选同类基因, 并通过 RACE 方法获得 5'端和 3'端序列, 不失为一种获得目的基因全长序列简单可靠的方法。本实验利用上述方法从杜氏盐藻中首次获得了 PEPC 基因全长 3 523 bp, 包含 2 949 bp 的完整开放阅读框, 编码 982 个氨基酸。通过 BLAST 和 DNAMAN 分析, 获知了杜氏盐藻 PEPC 基因及蛋白的部分信息, 为微藻 PEPC 基因的结构和特性研究提供了参考。

杜氏盐藻是一种抗逆性很强的单细胞真核绿藻, 培养条件简单, 光合自养生长, 可以大规模开放式培养^[7-8], 极大地降低培养成本, 适合作为高油脂工程藻株的材料。PEPC 控制磷酸烯醇式丙酮酸的流向, 决定蛋白质/油脂含量比例^[6], 因而在油脂代谢中起关键作用。目前利用 RNAi 技术证明了反义抑制 PEPC 基因的表达能够提高油菜种子的油脂含量^[5]。本实验获得了杜氏盐藻 PEPC 基因完整的编码区序列, 对下一步转基因载体的构建及蛋白表达的研究具有指导作用, 也为进一步通过抑制 PEPC 基因的表达提高杜氏盐藻的油脂含量打下了基础。

参考文献:

- [1] Chollet R, Vidal J, O'Leary M H. Phosphoenolpyruvate carboxylase: a ubiquitous, highly regulated enzyme in plants[J]. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 1996, 47: 273-289.
- [2] Izui K, Matsumura H, Furumoto T, et al. Phosphoenolpyruvate carboxylase: a new era of structural biology[J]. *Annu Rev Plant Biol*, 2004, 55: 67-84.
- [3] Leegood R C, Osmond C B. The flux of metabolites in C4 and CAM plants[C]// D T Dennis, D H Turpin. *Plant Physiology, Biochemistry and Molecular Biology*. UK: Longman Sci Tech Essex, 1990: 274-298.
- [4] Sugimoto T, Tanaka K, Monma M, et al. Phosphoenolpyruvate carboxylase level in soybean seed highly correlates to its contents of protein and lipid[J]. *Agri Bio Chem*, 1989, 53 (3): 885-887.
- [5] 陈锦清, 朗春秀, 胡张华, 等. 反义 PEP 基因调控油菜籽蛋白质/油脂含量比率的研究[J]. *农业生物技术学报*, 1999, 7(4): 316-320.
- [6] 侯李君, 王学魁, 施定基. 蓝藻磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶的生物信息学分析 [J]. *生物技术通报*, 2008, 4: 149-154.
- [7] Avron M, Ben-Amotz A. *Dunaliella: Physiology, Biochemistry and Biotechnology* [M]. Florida: CRV Press, 1992.
- [8] 柴玉荣, 王天云, 薛乐勋. 新型生物反应器-杜氏盐藻研究进展[J]. *中国生物工程杂志*, 2004, 24(2): 30-33.
- [9] 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(4): 1359-1365.
- [10] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular cloning: A laboratory manual*. 2nd ed[M]. NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- [11] Fietto J L, Demarco R, Verjovsk-Almeida S. Use of degenerate primers and touchdown PCR for construction of cDNA libraries[J]. *Biotechniques*, 2002, 32: 1404-1408.
- [12] 王少丽, 盛承发, 乔传令. cDNA 末端快速扩增技术及其应用[J]. *遗传*, 2004, 26 (3): 419-423.

Cloning and analysis of phosphoenolpyruvate carboxylase (PEPC) gene of *Dunaliella salina*

ZHANG Nan-nan¹, PAN Wei-dong², CUI Yu-lin³, QIN Song⁴, XUE Le-xun¹

(1. Laboratory for Cell Biology, Department of Bioengineering, Zhengzhou University, Zhengzhou 450001, China; 2. Department of Immunology and Microbiology, College of Basic Medical Sciences, Zhengzhou University, Zhengzhou 450001, China; 3. Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China; 4. Yantai Institute of Coastal Zone Research, Chinese Academy of Sciences, Yantai 264003, China)

Received: Dec., 25, 2010

Key words: *Dunaliella salina*; PEPC; gene cloning; sequence analysis

Abstract: To investigate the function of phosphoenolpyruvate carboxylase (PEPC) gene of *Dunaliella salina*, a pair of degenerate primers was designed according to the conserved motifs of the PEPC of *Chlamydomonas reinhardtii*, *Arabidopsis thaliana*, and *Arachis hypogaea*. A cDNA fragment was obtained from green alga *Dunaliella salina* through RT-PCR, and then the full length of the cDNA was isolated by 3' and 5'RACE. The isolated cDNA sequence was 3523 bp in length with a 2949 bp coding region that encoded 982 amino acid residues with the predicted relative molecular mass of 110560.5 dalton. In addition, homology analysis showed that PEPC of *D. salina* was highly similar to that of *C. reinhardtii*(69%), *Chlorella variabilis*(55%), *Ostreococcus tauri*(50%), and *O. lucimarinus* CCE9901(49%), suggesting that the cDNA isolated from *Dunaliella salina* was PEPC-encoding.

(本文编辑: 梁德海)