

# 龙须菜藻红蛋白亚基基因的克隆及监测\*

## CLONING AND DETECTING OF SUBUNIT GENE OF PHYCOCYANIN OF *Gracilaria kermaniformis*

隋正红<sup>1</sup> 张学成<sup>1</sup> 孔杰<sup>2</sup>

(<sup>1</sup> 青岛海洋大学生命学院 266003)

(<sup>2</sup> 中国水产科学研究院黄海水产研究所 青岛 266071)

关键词 龙须菜,藻红蛋白,基因

龙须菜 (*Gracilaria kermaniformis*) 是红藻门江篱属中一种重要的产琼红藻,具有巨大的潜在经济价值。红藻以藻胆蛋白为捕光色素<sup>[1]</sup>,藻胆蛋白主要由藻红蛋白 (phycoerythrin, PE)、藻蓝蛋白 (phycocyanin, Pc) 和别藻蓝蛋白 (allophycocyanin, APC) 组成。PE 直接产于光合作用,是第一级天线捕光色素,对藻体生理活动有重大影响,PE 还可作为光合生物进化的标志,在实际应用中,由于其优良的荧光特性,被广泛用作标记物质。另外,其光吸收区位于叶绿素 a 不能吸收的蓝绿光区 (498 ~ 565 nm),可利用高等植物不能利用的光能<sup>[2]</sup>,如能通过藻红蛋白基因的导入而将高等植物的光合作用器加以改造,使其光吸收范围扩大,可以更好、更充分地利用光能,将大大地促进高等植物的生长发育,提高农作物的产量。

关于藻红蛋白亚基基因结构的研究,多在原核蓝藻中进行。在真核红藻中,仅见在 *Aglaothamnion*、*Polydiphonia* 和 *Rhodella* 三个属分离出藻红蛋白亚基全基因并进行序列沉淀的文章。对江篱属藻红蛋白基因的研究国内外均未见报道。而这方面的研究对了解藻类光合进化,阐述光和作用机制均有重要意义。

作者根据 Gene Bank 中的藻红蛋白基因序列资料,设计合成了引物,经过 PCR 扩增反映,得到了预期长度的片段,将 PCR 产物用 dT 克隆法插入载体,并进行了检测。

### 1 材料与方 法

#### 1.1 材 料

野生型龙须菜采自青岛湛山湾;材料处理及培

养见文献[3]。引物由中科院海洋所合成;Taq 酶购自中科院微生物研究所,dNTP、蛋白酶 K、pGEM5zf(+) 质粒购自华美生物工程公司,其他药品均为分析纯。

#### 1.2 方 法

1.2.1 DNA 提取 参照 Goff 等 1988 年的方法,略有改动。

取 30 ~ 300 mg 藻体,用蒸馏水洗净。加入大约 700 ~ 1 000  $\mu$ l 提取液 0.5 % SDS, 0.01 mol/L Tris.HCl, 0.1 mol/L EDTA, pH8.0 在 0  $^{\circ}$ C 冰浴中充分研磨后,加蛋白酶 K(终浓度 100  $\mu$ g/ml),在 50  $^{\circ}$ C 水浴简短震荡 3.5 ~ 4 h。15 000 r/min 离心 10 min,取上清液,加等体积的酚抽提,15 000 r/min 离心 10 min,取上清液,再以酚/氯仿/异戊醇(25:24:1)及氯仿抽提,1 500 r/min 离心 10 min,取上清液,加入二倍体积的无水乙醇使 DNA 沉淀,离心,用 70 % 的乙醇洗沉淀两次,干燥后,溶解在 50  $\mu$ l 无菌 TE(10 mol/L Tris, 0.1 mol/L EDTA, pH8.0) 中。-20  $^{\circ}$ C 储存备用。

1.2.2 PCR 扩增条件 50  $\mu$ l 反应体系中加入正反向引物 P1、P2 各 1  $\mu$ mol/L,  $Mg^{2+}$  3  $\mu$ mol/L, Taq 酶 1  $\mu$ l。

循环参数为 95  $^{\circ}$ C 80 s, 52  $^{\circ}$ C 120 s, 70  $^{\circ}$ C 80 s, 30 循环,最后于 72  $^{\circ}$ C 充分延伸 10 min。

1.2.3 低熔点琼胶糖法回收特异 PCR 产物<sup>[4]</sup>

1.2.4 dT 载体构建与 PCR 产物连接

\* 国家自然科学基金资助项目 39670405 号。

收稿日期:1998-08-25;修回日期:1999-04-27



以 *ECOR* V 酶切载体 pGEM5zf(+), 酶切完全后, 沉淀质粒, 溶解于 10  $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O 中, 取 3  $\mu$ g 加入 dTTP2 mmol/L、Taq 酶 3~4  $\mu$ l, 10xPCR 缓冲液, 在 70  $\mu$ l 反应体积中, 70  $^{\circ}$ C 反应 2 h, 加 T 于平末端, 反应完成以后以酚-氯仿抽提, 乙醇沉淀 dT 载体, 在 10  $\mu$ l 连接体系中加入 10x 连接缓冲液, dT 载体 200 ng, PCR 产物 500 ng 及 T<sub>4</sub>DNA 连接酶 6 Weiss 单位, 16  $^{\circ}$ C 反应过夜。

1.2.5 质粒转化、细菌培养、质粒提取见文献 [4]。

## 2 结果与讨论

### 2.1 DNA 的提取

结果见图 1, 以蛋白酶 K 法提取的 DNA 有很好的完整性, “拖带”(smear) 区域少, 这是保证有效扩增的必要条件。DNA 多集中于 23K 处, 但实际上其分子量不止 23K, 这是由于制备凝胶孔径原因, 超过凝胶分离范围后的分子量指示便不准确了。经 260 nm 紫外吸收测定 DNA 的含量约 30  $\mu$ g/g 藻湿重。据 Pedro 1992 年报道藻类 DNA 的提取是在液氮中进行的, 这样可以充分破碎细胞, 释放 DNA, 又能抑制细胞内源性 DNA 酶的活性。由于条件所限, 改用 0  $^{\circ}$ C 冰浴的充分研磨, 也可起到相同的作用。在此藻体 DNA 提取方法中, 加入蛋白酶 K 后的震荡非常重要, 这样既能使

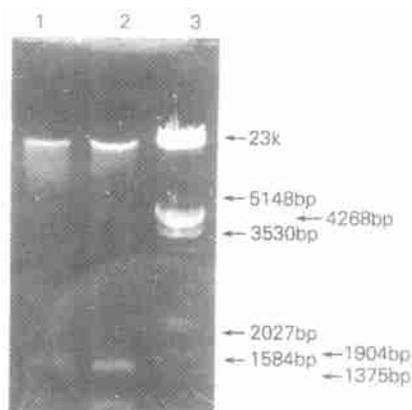


图 1 蛋白酶 K 提取龙须菜 DNA  
1, 2: 龙须菜 DNA, 3:  $\lambda$ DNA/ EcoRI + HindIII

酶充分作用又可加快作用速度。需注意的是最后 DNA 的溶解, 溶解 TE 中 EDTA 的浓度不要超过 0.1

mmol/L, 否则会在 PCR 反应体系中带入过多 EDTA 而抑制 Taq 酶活性, 必要时可用双蒸水溶解。

在操作过程中, 要注意动作要轻, 尤其是抽提时, 不要剧烈震荡, 以防止对 DNA 大分子的机械剪切, 破坏其分子完整性。

### 2.2 PCR 反应

结果见图 2, 作者得到了专一的扩增条带, 扩增产物的分子量约为 710 bp 左右, 与估计的分子量大小一致。有关核红藻 PE 基因序列的资料较少, 仅有仙菜 (*Aglaotha nriion*)、多管藻 (*Polysiphonia*) 和紫球藻 (*Rhodella*) 三种藻的基因序列, 且与龙须菜不同属。这三个序列的保守性较高, 根据这仅有的三个序列合成了引物得到了扩增, 而且分子量的大小与预期相近, 说明真核红藻 PE 序列是很保守的。

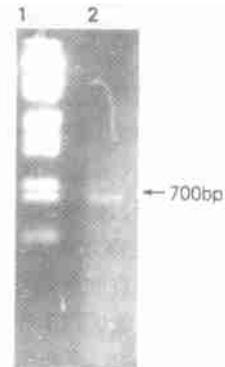


图 2 PCR 扩增结果

1: 扩增产物 2:  $\lambda$ DNA/ EcoRI + HindIII

在这种基因克隆性质的 PCR 反应中, 特别要注意扩增循环中的退火温度, 应尽可能地高, 如作者的反应中, 引物的  $T_m$  值为 58~60  $^{\circ}$ C, 采用了超过 50  $^{\circ}$ C 的复性温度, 只有这样才能保证 PCR 产物的专一性。否则, 若用较低的复性温度, 即使得到与估计分子量大小相近的 PCR 产物, 也不能有十分的把握, 这是特异产物。

### 2.3 产物的回收

将 710 bp 带用低熔点琼脂糖法回收, 虽然得到的是单一的扩增条带, 还是应该纯化产物; 如果不是单一的扩增条带, 则更应该回收分子量在某一范围内的条带。

熔点琼脂糖法是比较好的 DNA 回收方法, 回收率比较高。在紫外灯下切出含 DNA 条带胶条时, 应使不含 DNA 的胶区尽可能少, 否则在以后的抽提过程



中,琼脂会吸附一部分 DNA,使回收产率下降。

而在最后的溶解回收产物时,应用小体积,以提高 DNA 浓度,在反应中,将 250  $\mu$ l PCR 扩增的回收产物溶解在 10  $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O 中,估计 DNA 浓度高于 0.1  $\mu$ g/ $\mu$ l,这样才能有较多的扩增片段连接到载体上。

#### 2.4 dT 载体构建及产物连接

粒载体 pGEM5zf(+) 以 ECOR V 酶切以产生平末端,然后在 Taq 酶作用下产生 dT 载体,结果见图 3,由结果可见,未酶切质粒由于是超螺旋,迁移率大,在酶切后变成线状分子,移动速度变慢,dT 载体的分子量与原线状载体分子量差不多。

DNA 片段与载体的连接可有多种形式,其中包括平末端的连接,但其效率较低,尤其是理论上应该是平末端的 PCR 产物与平末端载体的连接更低,究其原因是在于,Taq 酶有在 PCR 产物的末端优先添加 A 的性质,因而发展了 dT 载体技术,即在产生的平末端载体后加 T,则正可起类似粘端连接的作用,据 Marchuk 1990 年报道连接效率极大地提高了。

在实验中采取了这种连接方式,得到了较高的连接效率,平均达到 20%,即在每 5 个转化菌落中就有一个是连接了外源 DNA 片段的转化子。因而这是一种比较有效的克隆 PCR 产物的新方法,值得推广应用。

另外在连接反应中,需注意连接反应的体积,作者采取了 10  $\mu$ l 连接体积,并采用 DNA 片段量大大超过 dT 载体量的反应条件,这样才能使 DNA 片段有最大的可能连接到载体上。

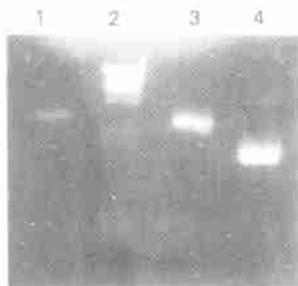


图 3 dT 载体的构建

1: dT 载体, 2:  $\lambda$ DNA/ Hind III, 3: 酶切后 pGEM5zf(+), 4: 未酶切 pGEM5zf(+).

#### 2.5 检测

将连接产物转化入感受态的 JM109,在加了氨苄青霉素、Xgal、IPTG 的培养基上进行选择,由于  $\alpha$ -互补作用,白色菌斑便有可能为重组子。总共得到了 3 个白斑菌落,对它们进行扩增培养提取质粒后,与空载体一起电泳,发现它们的分子量的确增大了,估计是插入了外源片段,作者又用 PCR 方法进行了检测,结果见图 4,由图 4 可见,3 个白色菌落中的两个在同样的扩增条件下得到了单一扩增,且分子量大小与原基因组扩增得到的相同,而空载体没有得到扩增。进一步测序结果也说明我们得到了重组子,有关序列测定及分析将另文报道。

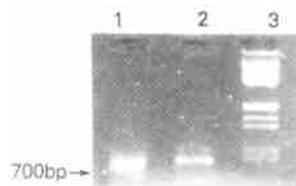


图 4 PCR 扩增检测重组子

1, 2: 重组质粒子的 PCR 扩增, 3:  $\lambda$ DNA/ EcoRI + Hind III.

### 3 结论

本文报告了从龙须菜克隆藻红蛋白亚基基因的操作过程。据红藻藻红蛋白亚基基因保守序列合成引物,PCR 扩增,以 dT 载体法克隆回收的产物,并用 PCR 方法检测假定重组子,证实这是一种可行的克隆基因方法。

#### 参考文献

- 1 曾呈奎、周百成. 进化论选集. 北京: 科学出版社, 1983. 34 ~ 43
- 2 张学成等. 青岛海洋大学学报, 1996, 26: 318 ~ 326
- 3 金冬燕等译. J. 萨姆布鲁克等著. 分子克隆. 北京: 科学出版社, 1992. 16 ~ 322
- 4 Geider, R. J. et al. . Algal Photosynthesis. New York: Chapman and Hall, 1992. 125 ~ 156

(本文编辑: 张培新)