

盐藻的一种盐诱导碳酸酐酶基因转录起始点的确定及表达载体的构建

柴玉荣, 侯卫红, 王天云, 王 宁, 袁保梅, 王建民, 薛乐勋

(郑州大学 细胞生物学研究室, 河南 郑州 450052)

摘要: 采用 5'RACE 和巢式 PCR 的方法确定盐藻 (*Dunaliella salina*) 一种盐诱导碳酸酐酶基因的转录起始位点, 通过序列分析得出转录起始位点为 A, 从而确定核心启动子及上游调控区的位置。应用巢式 PCR 技术分别扩增盐藻这种碳酸酐酶基因上游调控区的 2 个片段, 长度大约分别为 0.8 和 1.2 kb, 序列经测定无误后分别与带 β -葡萄糖苷酸酶(GUS)报告基因的载体相连接, 经酶切鉴定这两种表达载体构建正确。用基因枪法将这两个载体导入盐藻细胞中, 经染色检测, GUS 基因在转化藻株中得到瞬时表达。

关键词: 盐藻 (*Dunaliella salina*); 碳酸酐酶; 转录起始位点; 启动子; GUS 报告基因

中图分类号: Q78 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3096(2005)04-0026-05

盐藻 (*Dunaliella salina*) 是一种原生质裸露的嗜盐性单细胞海洋绿藻, 是目前所发现的最耐盐的真核生物之一, 能在 0.05 ~ 5 mol/L 的盐水中正常生长繁殖^[1]。该藻的突出优点在于培养条件简单, 光合自养, 抗逆性极佳, 本身无毒, 因此用盐藻作为生物反应器生产口服型疫苗或其他口服型药物, 可以无须纯化即可直接服用, 大大降低生产成本^[2-4]。

对盐藻能在高氯化钠环境中生存的机制研究中, Fisher 等^[5,6]在盐藻细胞质膜中发现了一种盐诱导蛋白质, 研究表明它与小鼠和莱茵衣藻的碳酸酐酶同源, 但与其它碳酸酐酶明显不同的是, 在一个相当大的盐浓度范围下, 盐藻的这种碳酸酐酶仍能保持活性, 并且随培养基中盐浓度增加, 酶活性增强, 说明它是一种新型的极其耐盐的碳酸酐酶^[7]。吕玉民等^[8]克隆了碳酸酐酶基因的 5'端侧翼区, 与筛选标记基因 *bar* 融合, 经初步检测具有启动子活性, 并且 Northern blotting 杂交表明, 随培养基盐浓度的增加, *bar* 的转录本信号增强, 说明这种碳酸酐酶基因的启动子可能是一种渗透诱导型的启动子。作者以盐藻细胞的全长 mRNA 为模板, 用 5'RACE 和巢式 PCR 的方法确定了碳酸酐酶基因的转录起始位点。并扩增碳酸酐酶基因 5'端侧翼区的 2 个不同长度的片段, 与 β -葡萄糖苷酸酶 (β -glucuronidase, GUS) 报告基因融合, 构建盐藻表达载体, 以深入研究这种碳酸酐酶在高渗条件下的表达调控活性。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 藻株和载体

杜氏盐藻 (*Dunaliella salina* UTEX 1644 Teod) 购自美国 (The University of Texas), 载体 pCAMBIA1391 (带有 Gus 报告基因, Gus 前缺乏启动子序列) 由河南省农业科学院苗红梅馈赠, 大肠杆菌 JM109 为作者所在的实验室保存。

1.1.2 主要试剂

RNA 提取试剂 TRIzol 购自 Invitrogen 公司; 限制性内切酶 SalI, SmaI, 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 提取试剂盒均购自杭州维特洁公司; FirstChoice RLM-RACE Kit 购自 Ambion 公司。

1.1.3 引物

参考已知的盐藻碳酸酐酶 mRNA (GenBank 登录号: AF183939) 和盐藻碳酸酐酶基因 (GenBank 登录号: AF541981) 序列设计引物, 引物由上海生工生物工程公司合成。引物的序列见表 1。

收稿日期: 2004-05-31; 修回日期: 2004-12-06

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30270031); 国家 863 基金项目 (2002AA628050)

作者简介: 柴玉荣 (1976-), 女, 河南郑州人, 在读博士, 研究方向: 藻类基因工程, 电话: 0371-6912873, E-mail: yrchai@163.com; 薛乐勋, 通讯作者, 电话: 0371-6658332, E-mail: lxue@public2.zz.ha.cn

表 1 引物序列

Tab.1 Primers sequence

引物名称	序列(5' - 3')
基因特异外侧引物	CTTGGGACACCGCAAATGGGAC
基因特异内侧引物	GCTCCTCCTTCCTCAGTCTTTGT
5' RACE 外侧引物	GCTGATGGCGATGAATGAACACTG
5' RACE 内侧引物	CGCGGATCCGAACACTGCGTTTGTGCTGGCTTTGATG
5' RACE 接头	GCUGAUGGCGAUGAAUGAACACUGCGUUUGCUGGCCUUUGAUGAAA
CA 5'侧翼区引物 1	TTGGGACACCGCAAATGGGACGGG
CA 5'侧翼区引物 2	ACGTGCTGCCACTTGTCTCTCCAGG
CA 5'侧翼区引物 3	ACTGGAAGAAAGCTCTGCGGCTTG

1.2 方法

1.2.1 转录起始位点的确定

取接种 5d 左右的盐藻细胞, 记数, 调整至大约 1×10^6 细胞/mL, 取 1 mL, 用 TRIzol 试剂提取盐藻细胞的总 RNA。通过变性电泳和测 260nm 的 A 值, 判断提取的总 RNA 的质量。按 5'RACE Kit 操作说明确定碳酸酐酶基因的转录起始位点。首先, 用碱性磷酸酶 CIP 去除总 RNA 中带有游离 5'磷酸根分子(包括 rRNA, tRNA, mRNA 片段以及污染的基因组 DNA)的 5'端磷酸, 然后用烟草焦磷酸酶(Tobacco pyrophosphatase, TAP)除去全长 mRNA 的帽子结构, 暴露出 5'端磷酸基团。上述处理过的 RNA 用 T4 RNA 连接酶与试剂盒里的 RNA 接头相连接, 只有带 5'端磷酸基团, 并且去除帽子结构的 mRNA 能连上 RNA 接头。用随机引物和 M-MLV 逆转录酶逆转录连上接头的 mRNA, 得到 cDNA, 以此为模板, 用基因特异引物和试剂盒里的接头引物分别进行巢式 PCR。第 2 次 PCR 产物经 T/A 克隆到 pMD18-T 载体上, 转化感受态大肠杆菌 JM109, 37°C 过夜培养, 提取质粒。酶切鉴定插入片段, 插入片段大小正确的送上海基康生物工程公司测序。

1.2.2 盐藻碳酸酐酶基因 5'侧翼区序列表达载体的构建

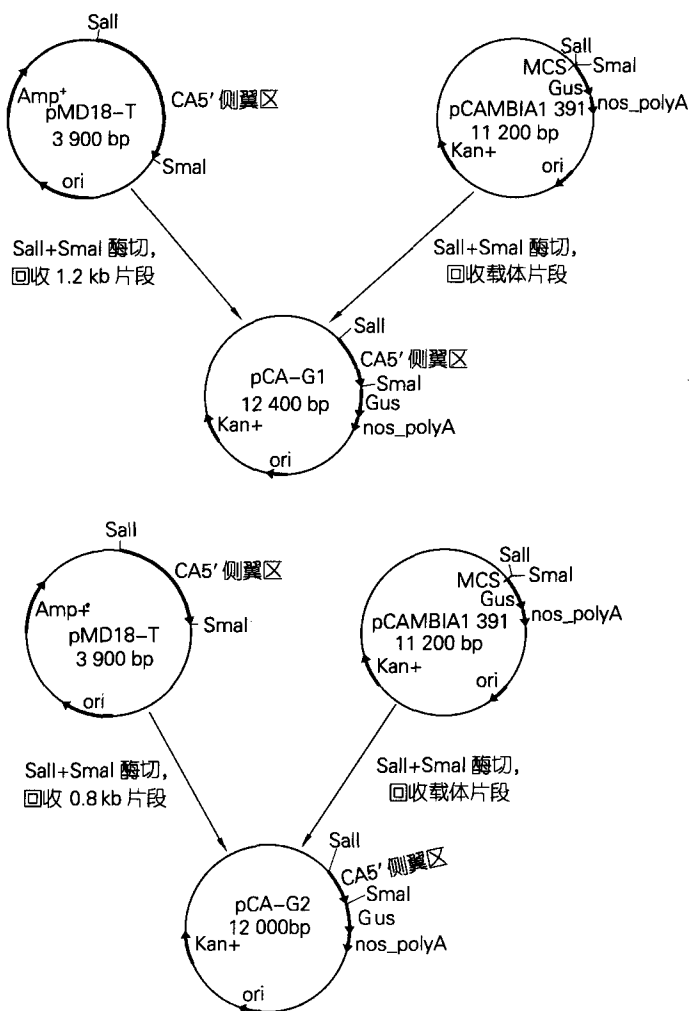


图 1 盐藻碳酸酐酶基因 5'侧翼区融合 Gus 报告基因表达载体的构建

Fig.1 Construction of expression vectors containing *D. salina* CA 5'franking regions and Gus reporter gene

按常规方法提取盐藻基因组 DNA, 根据 GenBank 数据, 设计 3 条基因特异引物 (表 1) 扩增位于盐藻碳酸酐酶基因 ATG 前面的两段侧翼区序列, 2 个 PCR 产物分别克隆到 pMD18-T 载体上, 测序正确后, 用 SalI 和 SmaI 双酶切, 回收 2 个 DNA 片段, 载体 pCambia1391 同样用这 2 种酶双酶切, 回收载体大片段。用 T4 DNA 连接酶 16℃ 过夜连接回收的 DNA 片段和载体 pCambia1391 片段, 转化感受态大肠杆菌 JM109, 37℃ 过夜培养, 提取质粒, 酶切鉴定。载体的构建过程见图 1。

1.2.3 基因法转化盐藻

提取上述 2 个构建正确的表达载体 pCA-G2 和 pCA-G1 的质粒 DNA 各 10μg, 用于转化盐藻。液体培养 5d 的盐藻, 计数, 4000 r/min, 5 min, 离心收集, 取 30μL 藻液约 1×10^6 的细胞滴于 1.5% 琼脂糖固体板上, 按文献 [9] 的基因枪方法进行转化。轰击后, 用 3mL 的液体培养基洗脱, 置于试管中小量培养, 先于暗处恢复 12 h, 再放于正常光照下培养。

1.2.4 转化藻株的 GUS 基因瞬时表达检测

用组织化学染色方法检测 GUS 基因在盐藻中的瞬时表达。转化藻株在正常光照下培养 36 h 后, 离心收集, 经固定, 过夜染色, 在显微镜下观察 GUS 基因的表达情况。同时以野生型盐藻进行平行操作, 做对照, 参照耿德贵等 [10] 的方法进行。

2 结果和讨论

2.1 转录起始位点的确定

用试剂盒提供的接头外侧引物和 CA 基因特异外侧引物进行第一次 PCR 扩增, 得到的 PCR 产物约

GCTGATGGCG ATGAATGAAC ACTGCGTTTG CTGGCTTTGA TGAAAATCG
AAACCAATTC TTTCTTCTCC ATCTTTTCCA TTCATTCACTT CTTCCATCCA CACAAGGACT
GAGGAAGGAG GAGC CCGTCCCAT TGC GGTGTCC CAAG(ATG)

图 3 测序结果与已知序列比较确定转录起始位点

Fig. 3 Confirmation of transcription start site by comparison our sequences with known sequences data

下划线: 5' RACE 接头; 黑框: 转录起始位点; 斜体: 基因特异内侧引物序列 Underline: 5' RACE adapter; Black frame: transcription start site; Italic: gene-specific inner primer

RACE 内侧引物序列及 5'RACE 接头序列和碳酸酐酶基因特异内侧引物序列。5'RACE 接头的 3'末端碱基是 AAA, 测序的序列除去 5'RACE 接头已知序列后第一个碱基是 A, 并且基因特异引物和 5'RACE 接头之间的序列与已知的序列完全一致, 故确定盐藻碳酸酐酶基因的转录起始位点是 A, 位于起始密码子 ATG 上游 102 处。

2.2 盐藻碳酸酐酶基因 5'侧翼区序列融合 Gus 报告基因载体的构建

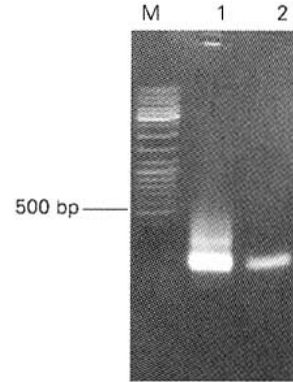


图 2 扩增转录起始位点的巢式 PCR 电泳分析

Fig. 2 Agarose gel electrophoretic analysis of transcription start site from nested PCR

M: 上海生工 GeneRuler™ DNA Ladder; 1: 内侧 PCR 产物; 2: 外侧 PCR 产物

M: 1 Sangon GeneRuler™ DNA Ladder; 1: inner PCR product; 2: outer PCR product

200bp; 以第一次 PCR 产物为模板, 用试剂盒里的接头内侧引物和 CA 基因特异内侧引物进行第 2 次 PCR 扩增, PCR 产物约 150bp, 符合预期结果 (图 2)。

作者用 TRIzol 试剂提取盐藻细胞的总 RNA, 经检测 RNA 的 A 值在 1.7 和 2.0 之间, 符合后续实验要求, 因此第一次 PCR 就扩增出了清晰的目的条带, 第 2 次 PCR 时, 目的条带更加明显。回收第 2 次 PCR 产物, T/A 克隆, 鉴定正确的克隆进行测序。测序结果如图 3 所示。

从图 3 中可以看出, 测得的序列包含正确的 5'

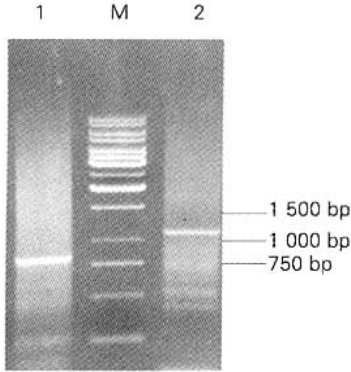


图 4 扩增 CA5'侧翼区片段的电泳

Fig.4 Agarose gel electrophoretic of CA 5'flanking regions
M: 上海生工 1kb ladder marker, 1: 0.8 kb CA 5'侧翼区; 2: 1.2 kb CA 5'侧翼区
M: Sangon 1kb ladder marker, 1: 0.8 kb CA 5'flanking fragment; 2: 1.2 kb CA 5'flanking fragment

菌落, 提取质粒, 用 SalI 和 SmaI 双酶切, 酶切鉴定正确的克隆分别命名为 pCA - G2(含 0.8 kb CA5'侧翼区片段), pCA - G1(含 1.2kb CA5'侧翼区片段)见图 5。

2.3 Gus 在盐藻中的瞬时表达

组织化学染色检测表明, 质粒 pCA - G2, pCA - G1 经基因枪轰击, 成功的导入了盐藻细胞中。染色后在显微镜下观察, 转化的盐藻细胞呈蓝色, 说明 GUS 基因在转化藻中得到表达 (图 6), 而未转化的盐藻细胞则看不到蓝色。

基因的表达调控研究已成为分子生物学研究的重要内容, 其中转录水平的调节包括确定基因的转录起始位点及了解附近区域的结构特征^[11]。基因的转录起始点是基因的分子结构特征之一, 有的基因具有多个转录起始点, 可以在不同的环境条件下起不同的作用。一般采用引物延伸的方法确定基因的转录起始点^[12], 此法通常用 RNA 做模板, 以反转录酶完成延伸反应, 涉及同位素标记引物, 放射自显影等。而用 RNA 介导的 cDNA 末端扩增 (RLM - RACE)^[13] 来确定基因的转录起始点则避免了上述烦琐的操作。这种方法在提取总 RNA 后, 先用碱性磷酸酶处理, rRNA, tRNA, 不完整的 mRNA 以及污染的基因组 DNA 的 5'端磷酸将被除去, 而完整的 mRNA 有帽子结构保护其磷酸基团, 故不受影响。随后用 TAP 除去全长 mRNA 的帽子结构, 露出 5'端磷酸基团。再用 T4 RNA 连接酶连接上述处理过的 RNA 和试剂盒的 RNA 接头, 只有带 5'端磷酸根的全长 mRNA 能连上 RNA 接头, 用反转录酶进行反转录, 得到全长 cDNA。以此 cDNA 为模板, 用接头引物和基因特异引物通过巢式 PCR 即可快速得到完整 cDNA 的 5'末端。通过我们的实验, 5'

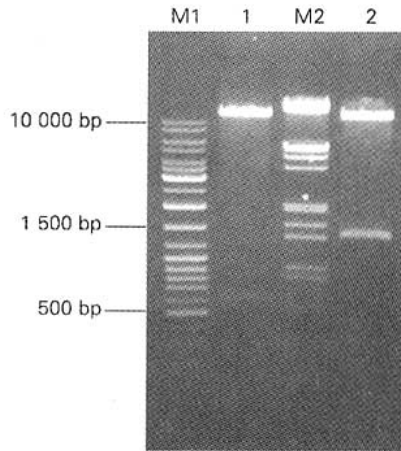


图 5 含 CA5'侧翼区的表达载体电泳

Fig.5 Agarose gel electrophoretic of expression vector containing CA 5'flanking regions

M1: 上海生工 GeneRuler™ DNA Ladder; M2: λDNA/HindIII + EcoRI; 1: pCA - G2/ SalI + SmaI; 2: pCA - G1 / SalI + SmaI
M1: Sangon GeneRuler™ DNA Ladder; M2: λDNA HindIII + EcoRI; 1: pCA - G2/ SalI + SmaI; 2: pCA - G1 / SalI + SmaI

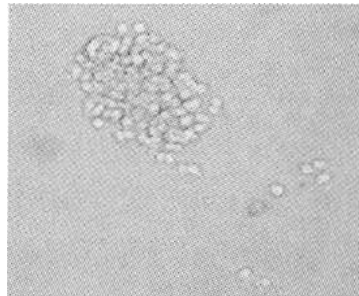


图 6 GUS 基因在盐藻细胞中瞬时表达的组织化学染色

Fig.6 Histochemical analysis of GUS gene transient expression in transformed *D. salina*

RLM - RACE 的测序结果和数据库中序列信息相比较, 可分析得出盐藻盐诱导碳酸酐酶基因的转录起始点是 A。

真核生物基因启动子调控区一般位于基因转录起始位点 + 1 及其近上游区域, 保守的调控元件有 TATAA/TAT/A (TATA - box), GGTCATCT (CAAT - box) 和 GGGCGG (GC - box) 等。但盐藻的这种盐诱导碳酸酐酶基因 5'近上游在约 400bp 内无明显的启动子保守调控元件, - 800bp 内有 TGTG 的串联重复, - 800bp 到 - 1200bp 才出现启动子的保守序列, 如: CAAT - box 和 GC - box 等。所以根据 GenBank 数据设计引物从盐藻基因组 DNA 中克隆碳酸酐酶基因 5'上

游的含 TG 串联重复的约 800bp 的片段和含启动子的保守序列的约 1.2kb 的片段,分别与含 GUS 报告基因的载体融合,期望通过检测报告基因的表达,来分析碳酸酐酶基因这两个上游区域的调控功能。

致谢:本实验在河南省分子医学重点实验室完成,谨致谢意。

参考文献:

- [1] Avron M, Ben-Amotz A. *Dunaliella*: physiology, Biochemistry and Biotechnology[M]. Florida:CRV Press, 1992. 150.
- [2] 李杰,任宏伟,黄洁虹,等. 外源报告基因 EGFP 在盐藻中实现瞬时表达[J]. 中国生物化学与分子生物学报,2003,19(3): 338-342.
- [3] Geng, D G, Y Han, Wang Y Q. *et al.* Construction of a System for the Stable Expression of Foreign Genes in *Dunaliella salina*[J]. *Acta Botanica Sinica*, 2004,46(3): 342-346.
- [4] 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.
- [5] Fisher M, Pick U, Zamir A. A salt-induced 60-kilo-dalton plasma membrane protein plays a potential role in the extreme halotolerance of the alga *Dunaliella*[J]. *Plant Physiol*, 1994,106:1 359-1 365.
- [6] Fisher M, Gokhman I, Pick U, *et al.* A salt-resistant plasma membrane carbonic anhydrase is induced by salt in

- Dunaliella salina*[J]. *J Biol Chem*, 1996,271(30):17 718-17 723.
- [7] Premkumar I, Bageshwar U K, Gokhman I, *et al.* An unusual halotolerant alpha-type carbonic anhydrase from the alga *Dunaliella salina* functionally expressed in *Escherichia coli*[J]. *Protein Expr Purif*, 2003,28(1): 151-157.
- [8] 吕玉民,姜国忠,牛向丽,等. 杜氏盐藻 2 种碳酸酐酶基因 5' 上游的克隆与序列分析[J]. 郑州大学学报, 2004,39(1):1-6.
- [9] 吕玉民,谢华,牛向丽,等. 用基因枪法将 bar 基因导入杜氏盐藻及转基因藻株的检测[J]. 郑州大学学报,2004,39(1):31-35.
- [10] 耿德贵,王义琴,李文彬,等. GUS 基因在杜氏盐藻细胞中的瞬时表达[J]. 高技术通讯,2002,12(2): 35-39.
- [11] 王新楠,宋智刚,吴媛,等. 人肝刺激因子基因 5'-侧翼序列克隆和结构分析[J]. 遗传学报,2003,30(126):1 171-1 176.
- [12] 高继平,郇永忠,王宗阳,等. 水稻 232 蜡质基因转录起始位点的鉴定[J]. 遗传学报,1995,22(6):431-436.
- [13] Liu X, Gorovsky M A. Mapping the 5' and 3' ends of *Tetrahymena Thermophila* mRNAs using RNA ligase mediated amplification of cDNA ends (RLM-RACE)[J]. *Nucl Acid Res*, 1993, 21:4 954-4 960.

Identification of transcription start site of *Dunaliella salina* salt inducible carbonic anhydrase gene and construction of its expression vector

CHAI Yu-rong, HOU Wei-hong, WANG Tian-yun, WANG Ning, YUAN Bao-mei, WANG Jian-min, XUE Le-xun
(Laboratory for Cell Biology, Zhengzhou University, Henan 450052, China)

Received: May, 31, 2004

Key words: *Dunaliella salina*; carbonic anhydrase; transcription start site; promoter; GUS

Abstract: The enzyme activity of carbonic anhydrase (CA) from *Dunaliella salina* can be stimulated by high salinity, so the 5' flanking region of carbonic anhydrase gene can be used as a potential inducible promoter to regulate heterologous gene expression in *D. salina*, an extremely halotolerant alga which would be used as a new type bioreactor to produce valuable materials. To understand and elucidate the regulation of CA, the transcription start site was identified by 5' rapid amplification of cDNA end (5' RACE) and nested PCR. The expression vectors containing two 5' flanking regions of CA and the coding sequence of the *Escherichia coli* beta-glucuronidase (GUS) reporter gene were also constructed. The transcription start site was defined as A. DNA sequence analysis and restriction enzyme digestion revealed that 5' flanking regions of CA were not only identical to those published sequences but also contained in the recombination vectors. The two vectors were then transformed into *D. salina* by gene gun bombardment. Histochemical analysis demonstrated that the GUS reporter gene could be expressed transiently in transformed *D. salina*.

(本文编辑:张培新)