

蛋白核小球藻核酮糖-1,5-二磷酸羧化/加氧酶小亚基部分基因序列的克隆与分析

孙 雪, 马 斌, 周成旭

(宁波大学 海洋生物工程重点实验室, 浙江 宁波 315211)

摘要:以单细胞绿藻蛋白核小球藻 (*Chlorella pyrenoidosa*) (藻株编号为 NMB1uh015-1) 为实验材料, 利用几种绿藻中的核酮糖-1,5-二磷酸羧化/加氧酶 (Rubisco) 的小亚基 (rbcS) 的保守序列, 设计简并引物, 克隆到 rbcS 的一条 cDNA (245 bp) 和 3 条 DNA 序列 (其编号为 CP1、CP2 和 CP3, 长度依次为 1 425 bp、810 bp、705 bp)。序列比较结果表明, 该蛋白核小球藻 rbcS cDNA 核苷酸序列与普通小球藻 (*C. vulgaris*)、杜氏藻 (*Dunaliella tertiolecta*) (rbcS1 和 rbcS2) 及蛋白核小球藻“太阳小球藻”株的相似性依次为 93%、92% (91%) 和 90%, 而其编码的氨基酸序列与杜氏藻相似性最高 (80%); 3 条 rbcS DNA 序列与绿藻及高等植物 rbcS 部分序列表现了较高的同源性, 其中 2 条 DNA (CP2 和 CP3) 部分区段同源性很高。实验结果表明扩增得到的 cDNA 和 DNA 序列为蛋白核小球藻 rbcS 基因。

关键词:蛋白核小球藻 (*Chlorella pyrenoidosa*); 小亚基 (rbcS); 克隆; 同源性

中图分类号: Q781

文献标识码: A

文章编号: 1000-3096(2008)03-0040-04

核酮糖-1,5-二磷酸羧化/加氧酶 (ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase, 简称为 Rubisco) 广泛存在于绿色植物、藻类和某些光合细菌中, 是重要的光合作用限速酶。该酶具有催化 CO₂ 的固定和二磷酸核酮糖加氧反应的双重功能, 是自然界中丰度最大、植物体内含量最高的可溶性蛋白之一。常见的 Rubisco 全酶由 8 个大亚基 (rbcL) 和 8 个小亚基 (rbcS) 组成, 其中大亚基主要起固定 CO₂ 的催化作用, 而小亚基则起着影响酶的催化效率, 以及 CO₂/O₂ 的专一性结构区域的作用^[1]。近年来, rbcS 基因的结构、功能、基因表达和启动子活性等方面的研究报道很多^[2-4], 已经成为植物光合作用和基因工程研究的热点。在单细胞绿藻中, 杜氏藻 (*Dunaliella tertiolecta*)、微绿球藻 (*Nannochloris bacillaris*) 和莱茵衣藻 (*Chlamydomonas reinhardtii*) 已有关于 rbcS 的种类、cDNA 和 DNA 全序列的研究报道^[5-7]。而小球藻的相关报道极少, GenBank 数据库中仅收录了 2 条 rbcS 的 cDNA 序列。

小球藻是一种具有重要经济价值的单细胞绿藻, 已广泛应用于保健食品、水产养殖饲料和医药、食品等领域。小球藻光合效率高, 在光合作用机理、跨膜转运机理等研究方面已成为一种很好的模式藻^[8]。对小球藻光合作用酶 Rubisco 的基因序列进行研究, 有利于从分子水平了解绿藻的光合代谢途径和机理, 以及光合作用进化规律、叶绿体发育等理论问题。已有研究表明小亚基可能是基因工程改进 Rubisco 催化效率的具有成效的靶点^[9]。因此, 本研

究以小球藻属的蛋白核小球藻 (*Chlorella pyrenoidosa*) 为实验材料, 根据相关绿藻 rbcS 核苷酸保守序列设计引物, 克隆了该小球藻 rbcS 的 cDNA 和 DNA 部分序列, 以期获得 rbcS 基因全序列, 进而为蛋白核小球藻 rbcS 结构的阐明和功能的解释提供资料。

1 材料与方法

1.1 蛋白核小球藻

蛋白核小球藻来自宁波大学海洋生物工程实验室, 编号为 NMB1uh015-1。培养条件为 MAV3 号海水培养基, 温度为 25℃, 光强为 2 000 lx, 光暗周期为 12L/12D。

1.2 试剂与引物

UNIQ-10 柱式细菌 RNA 抽提试剂盒、UNIQ-10 柱式细菌基因组 DNA 抽提试剂盒、AMV 第一链 cDNA 合成试剂盒、PCR 试剂等均购自上海生工生物工程有限公司; 大肠杆菌 (*Escherichia coli*) JM109 菌株购自北京微生物研究所; 载体 pMD18-T 购自大连宝生物工程有限公司; PCR 产物回收试剂盒 BioSpin

收稿日期: 2007-06-18; 修回日期: 2007-09-22

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30700610); 浙江省教育厅项目 (20040899); 宁波市自然科学基金项目 (2006A610084)

作者简介: 孙雪 (1974-), 女, 山东烟台人, 副研究员, 博士, 研究方向: 藻类分子生物学, 电话: 0574-87600170, E-mail: sunxue@nbu.edu.cn

Gel Extraction kit 购自杭州昊天生物技术有限公司;引物 RF:5-GT(G/C/T) TGGN(A/C/G)(G/C/T) CC(C/G)(G/A/T) T(G/C/T) (A/G) AC AAC AAG-3 ,RR:5-GTGCA(G/T/A) CC(G/A) AACAT(G/T) GG(C/G) AG(C/T) TT-3 ,均由上海生工生物工程有限公司合成。

1.3 RNA 的提取、第 1 链 cDNA 的合成和 PCR 扩增

取 15 mL 对数生长期的藻细胞,6 000 r/min 离心 8 min 收集藻体。按试剂盒操作提取藻细胞总 RNA。电泳检测 RNA 质量后立即进行反转录反应,然后以此 cDNA 作为模板进行 PCR 扩增(Perkin Elmer 9600 PCR 仪)。PCR 总反应体积为 20 μ L,其中模板为 1 μ L,MgCl₂ 为 1.5 mmol/L,dNTP 为 0.2 mmol/L,引物为 0.2 μ mol/L,Taq 酶 1 单位。PCR 扩增程序为 94 预变性 5 min,接着按 94 变性 50 s,48 复性 1 min,72 延伸 1 min 的程序进行 30 个循环。循环结束后,72 延伸 8 min。将 PCR 产物在质量分数为 1.2%琼脂糖凝胶上电泳,紫外透射分析仪上测定结果。

1.4 DNA 的提取与 PCR 扩增

取 1.0 mL 对数生长期的藻细胞,6 000 r/min 离心 8 min,收集藻体。按试剂盒说明提取藻细胞 DNA,用 30 μ L 缓冲液洗脱 DNA。PCR 扩增反应总体积为 20 μ L,其中模板 DNA 为 2 μ L,MgCl₂ 为 1.5 mmol/L,dNTP 为 0.2 mmol/L,引物为 0.2 μ mol/L,Taq 酶 1 单位。PCR 扩增程序为 94 预变性 5 min,然后按 94 变性 50 s,52 复性 1 min,72 延伸 1 min 的程序进行 30 个循环,循环结束后 72 延伸 8 min。然后,将 PCR 产物在 1.0%琼脂糖凝胶上电泳,在紫外透射分析仪上测定结果。

1.5 PCR 产物的回收与克隆

先用 PCR 产物回收试剂盒进行 PCR 产物回收,再将回收后片段与 pMD18-T 载体连接,最后转化感受态 *E. coli* JM109 细菌。挑选菌落进行 PCR 扩增检测重组子。

```

1  GTGTGGAAGCCCGTGAACAACAAGTCTTCGAGACCTTCCTACCTGCCCCCCTTTCCGGCGACCAGATCGCCAGGCAGGTGGACTAC 90
   V W K P V N N K F F E T F S Y L P P L S G D Q I A R Q V D Y
91  ATCGTCTCAACGGCTGGACCCCTTGCCCTTGAGTTGCTGACCCCGACTGCGCCTACGTGAGCAACGACAGCTGCGTGCCTTCGGCAAC 180
   I V L N G W T P C L E F A D P D C A Y V S N D S C V R F G N
181 GTGTCCGTTGGCTACCAGGACAATCGCTACTGGACAATGTGGAAGCTGCCAATCTTTGGTTGCAC 245
   V S V G Y Q D N R Y W T M W K L P M F G C
    
```

图 2 蛋白核小球藻 rbcS cDNA 部分核苷酸序列及推断的氨基酸序列

Fig. 2 The partial nucleotide and deduced amino acid sequences of rbcS cDNA from *Chlorella pyrenoidosa*

1.6 测序与序列分析

将扩增培养后的含插入片段的重组菌落送上海生工生物工程有限公司测序。序列分析软件有 ClustalW 和 BioEdit。

2 结果

2.1 rbcS cDNA 序列比较

以蛋白核小球藻总 RNA 经反转录合成的第 1 链 cDNA 为模板,扩增得到长度约 250 bp 的 rbcS cDNA 部分片段(图 1)。克隆测序后确定其准确长度为 245 bp,该序列的 GenBank 登录号为 EU121232。在 GenBank 数据库中进行 blastn 查询,发现该 rbcS 序列与杜氏藻的 2 条 rbcS 部分序列(约 100 bp)相似性分别为 92%和 91%;而与同属的普通小球藻(*C. vulgaris*)及同种的蛋白核小球藻“太阳小球藻”株部分序列(约 50 bp)的相似性分别为 93%和 90%。将 rbcS 的 cDNA 序列翻译成氨基酸序列(图 2),在 GenBank 数据库中进行 blastx 查询。Blastx 比较结果显示最相似的几种绿藻的登录号和相似性依次为杜氏藻 80%,卡尔团藻(*Volvox cart-eri*)80%,莱茵衣藻 79%,雨生红球藻(*Haematococcus pluvialis*)76%,盐生杜氏藻(*D. salina*)75%,微绿球藻 70%,伞藻(*Acetabularia cliftonii*)70%及蛋白核小球藻“太阳小球藻”株 68%。

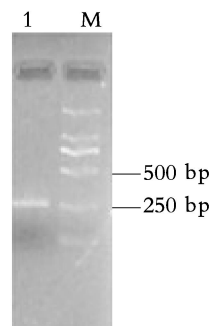


图 1 蛋白核小球藻 rbcS cDNA 片段

Fig. 1 Partial cDNA fragment of rbcS from *Chlorella pyrenoidosa*

M. DL2000 marker; 1. rbcS cDNA

2.2 rbcS DNA 序列分析

以蛋白核小球藻基因组 DNA 为模板,用上述设计的简并引物进行 PCR 扩增,结果在琼脂糖凝胶上可见 3 条亮带(图 3),其中最长一条带接近 1 500 bp,

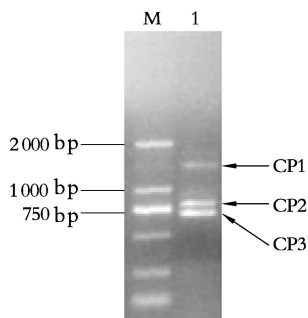


图 3 蛋白核小球藻 rbcS DNA 片段

Fig. 3 Partial DNA fragments of rbcS from *Chlorella*
M. DL2000 marker; 1. rbcS DNA

而较短的两条带长度分别在 700 bp 和 800 bp 左右。将这 3 条带按照长度从大到小,依次编号为 CP1、CP2 和 CP3,测序后确定其长度分别为 1 425 bp、810 bp 和 705 bp。

经 blastn 查询,扩增得到的 3 条 rbcS DNA 与高等植物和绿藻 rbcS 同源,但同源性片段都比较短,不超过 70 bp。其中 CP1 与蛋白核小球藻“太阳小球藻”株及莱茵衣藻的相似性最高,均为 97%; CP2 与杜氏藻和蛋白核小球藻“太阳小球藻”株的相似性分别为 95% 和 93%; CP3 与杜氏藻、衣藻 (*Chlamydomonas* sp.) 及微绿球藻的相似性分别为 95%、91% 和 90%。

由于最长的 CP1 序列与 CP2、CP3 比较后同源性很低,只将 CP2 和 CP3 两条带进行了比较。将相差 105 bp 的 CP2 和 CP3 进行对齐,发现这两条序列的同源性很高,在高保守区段相似性高达 98.0% (459 个碱基中仅有 9 个不同),见图 4。

```

CP2 GTGTGGTGGDDCATCAACAACAAGGTAACCATCTAGGCAGCGACTGAATGCVGACGGTTGCCTCTCAGGCTCGCTCACTTGDGAAAAGTTGCAGAACTCAC 100
CP3 -----G..TG...-.G.C. 12

CP2 ATTAATGGAAGTATTATTTCGAAGAATATTGAGACCAGTATATDDGAACTTTTGGAGGTTTCTCCTGTGTGTTTGGDDAGGGGCAGDGTTCCTCGGATCA 200
CP3 ..CG.CAAC.AGG.G.G...GG.GC.GGCGC. T.TTA.G..CA...--...G...TC....AAT..C.....C.A..CAAAC.ACAAATATGTG 102

CP2 GCCTTGCAATGCATCCTTCAAGCTATTTCTATCCATDDDACCTCCAGDGTGAADTTTTCAGTGTCTCACTGAAAATTATTADGTATTGDDGTGCATGCATG 200
CP3 A..AGG..AG..DG..AT.AA...T.GG..ATGC.TTT..AT.T.AT...-...CD..GC..TTG..CCTTA..C.CG..GCC.A...G.TAT.TGGGCTGA. 200

CP2 CTACTTTTGTADCTTAGCDGTTCCCGCACCAGCCGTTCTACATGTGCGCTGCAGTTCCTCGAGACCTTCTDCTACCTGDDDDDDTTTDDGGDGADCA 400
CP3 T.G..GAAG.GCTTG.TC....GTCA.GAA...-..C..G..T---.TTAA..... 295

CP2 GATCGCCAGGCAGGTGGACTACATCGTCTCAACGGTGAGTATAGTTGCTTGAAAGAACAATGTTTGGDDDDTCTDDDAGTDDGTTDDACCTDDATACA 500
CP3 .....T..... 395

CP2 CTGGAGCCTADCTTACACTTCACTGGTCTTTTCTGCAGGCTGGCDDCCTTGCTTGAGTTDGCTGADDDGACTGCGDCTACGTGAGCAACGACAGCT 600
CP3 ..... 495

CP2 GCGTGCCTTCGGCAACGTGTCCGTTGGCTCCAGGTTAGGCGAATCGTTGTDCTGTCTGCADCTGGAATGCTCTAACATTTGGCACTGTTCCTTGG 700
CP3 .....AAC.....C..... 595

CP2 CACAGCGTTCAGTCTGTGAACATTCAGCAATGTTGATGCGTTTGTCTGCTGCTTTTGTCTGCAGACAATCDDTACTGGACAATGTGGAADCTGDDCATGT 800
CP3 TT.....C..... 695

CP2 TCGGATGCAC 810
CP3 .T..... 705
    
```

图 4 蛋白核小球藻 2 条 rbcS DNA 序列 (CP2 和 CP3) 的对齐

Fig. 4 The alignment of two rbcS DNA sequences of CP2 and CP3 from *Chlorella pyrenoidosa*

3 讨论

3.1 引物的设计

柴玉荣等^[10]根据莱茵衣藻、团藻、玉米等真核生物 Rubisco 的 rbcS 氨基酸高度保守序列: ETR-SYLPP 和 MN KL PMFG,设计了一对简并引物,并

克隆得到盐生杜氏藻 rbcS 部分 209 bp 的 cDNA 片段。而在本研究中,将几种绿藻 rbcS 的氨基酸序列进行对齐,以寻找其保守序列进行引物设计,这几种绿藻包括杜氏藻(2 条)、盐生杜氏藻、卡尔团藻(3 条)、微绿球藻和地中海伞藻,可以找到几段保守性区域。但如果再把普通小球藻加上去,其保守性降

低,很难找到 2 段可用于引物设计的氨基酸保守序列。于是,又将包括普通小球藻在内的几种绿藻 rbcS 的核苷酸序列进行了对齐,找到了可用于引物设计的区段。

本实验利用上述设计的简并引物扩增得到了 rbcS cDNA 部分序列。并且由于这 2 条引物序列间未被内含子隔开,因此也扩增得到了 3 条 rbcS DNA 部分序列。

3.2 小球藻 rbcS 的特性

小球藻 rbcS 编码氨基酸序列与其它单细胞绿藻相比,其同源性很低。从 rbcS 序列长度上来比较,GenBank 收录的唯一 1 条普通小球藻 rbcS(其编码氨基酸数目为 214),比其它单细胞绿藻都要长,如杜氏藻、微绿球藻等的开放读码框在 180~190 aa,而衣藻 rbcS 编码 140 aa。由此可推断,小球藻 rbcS 可能比其它单细胞绿藻更复杂些。

由本实验结果推断,小球藻中可能存在 3 条不同的 rbcS 基因,这一点与其它绿藻中 rbcS 有 2~3 个拷贝数相类似。如微绿球藻中有 3 条 rbcS 序列: NbrbcS1-1、NbrbcS1-2 和 NbrbcS2,其中前 2 条的相似性大,且与 NbrbcS2 相差较远^[5];卡尔团藻中也有 3 条 rbcS 序列: Vc1、Vc2 和 Vc3;而杜氏藻中有 2 条 rbcS 序列^[6];莱茵衣藻中也有 2 条 rbcS 序列^[7]。要进一步确定小球藻中 rbcS 序列的确切数目,可以用本实验克隆到的部分 DNA 或 cDNA 序列,做探针进行 Southern 杂交。

要阐明小球藻的光合作用关键酶 Rubisco 的作用机理和代谢途径等理论问题,需要从分子水平对其基因序列和结构有清晰地认识。本研究利用 rbcS 序列的保守性,设计了一对简并引物,得到了 rbcS 部分 cDNA 和 DNA 序列,下一步的工作是进行 cDNA 和 DNA 的更长序列,一直到 rbcS 完整的编码序列和全长 DNA 序列的获得。然后,用这些全序列进行比较和分析,确定小球藻 rbcS 内含子的数目、内含子/外显子的结构、编码氨基酸序列信息等。目前,本课题组已经开始通过基因组步移的方法,来进行 2 条 rbcS(CP2 和 CP3)上下游未知序列的克隆,

同时 cDNA 完整编码序列的克隆工作也在进行中。

参考文献:

- [1] Spreitzer R J. Role of the small subunit in ribulose-1, 5-bisphosphate carboxylase/oxygenase[J]. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2003, **414**(2): 141-149.
- [2] Chai Y R, Wang Y F, Wang T Y, *et al.* Cloning and prokaryotic expression of rbcS gene from *Dunaliella salina*[J]. *Journal of Sichuan University*, 2005, **42**(4): 818-821.
- [3] Kanevski I, Maliga P, Rhoades D F, *et al.* Plastome engineering of ribulose-1, 5-bisphosphate carboxylase/oxygenase in tobacco to form a sunflower large subunit and tobacco small subunit hybrid[J]. *Plant Physiol*, 1999, **119**(1): 133-141.
- [4] Kovar J L, Zhang J, Funke R P, *et al.* Molecular analysis of the acetolactate synthase gene of *Chlamydomonas reinhardtii* and development of a genetically engineered gene as a dominant selectable marker for genetic transformation[J]. *Plant J*, 2002, **29**(1): 109-117.
- [5] Yamazaki T, Yamamoto M, Sakamoto W, *et al.* Isolation and molecular characterization of rbcS in the unicellular green alga *Nannochloris bacillaris*[J]. *Phycological Research*, 2005, **53**(1): 67-76.
- [6] Walker T L, Becker D K, Collet C. Characterisation of the *Dunaliella tertiolecta* RbcS genes and their promoter activity in *Chlamydomonas reinhardtii*[J]. *Plant Cell Rep*, 2005, **23**(10-11): 727-735.
- [7] Goldschmidt-Clermont M, Rahire M. Sequence, evolution and differential expression of the two genes encoding variant small subunits of ribulose bisphosphate carboxylase/oxygenase in *Chlamydomonas reinhardtii*[J]. *J Mol Biol*, 1986, **191**(3): 421-432.
- [8] 王义琴, 尹良宏, 王鹏, 等. 小球藻的分子生物学研究进展[J]. *遗传*, 2004, **26**(3): 399-402.
- [9] Du Y C, Hong S, Spreitzer R J. RbcS suppressor mutations improve the thermal stability and CO₂/O₂ specificity of rbcL-mutant ribulose-1, 5-bisphosphate carboxylase/oxygenase[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, **97**(26): 14 206-14 211.
- [10] 柴玉荣, 陈华艳, 王天云, 等. 杜氏盐藻 rbcS 基因 cDNA 片段的克隆与序列分析[J]. *郑州大学学报*, 2005, **40**(2): 248-250.

(下转第 48 页)

Cloning and analysis of *rbcS* partial gene sequences from *Chlorella pyrenoidosa*

SUN Xue , MA Bin , ZHOU Cheng-xu

(Marine Biotechnology Laboratory of Ningbo University , Ningbo 315211 , China)

Received Jun. , 18 , 2007

Key words : *Chlorella pyrenoidosa* ; *rbcS* ; cloning ; homology

Abstract : In this paper , the *rbcS* genes from the unicellular green alga *Chlorella pyrenoidosa* NMB1uh015-1 were cloned and analyzed. **Methods :** One pair of degenerate primers specific for *rbcS* was designed according to the conserved *rbcS* nucleotide sequences from other unicellular green algae. Then , one *rbcS* cDNA (245bp) and three DNA (named as CP1 , CP2 and CP3 with length of 1425bp , 810 bp and 705bp , respectively) sequences were PCR amplified , cloned and sequenced from *C. pyrenoidosa* NMB1uh015-1. **Results :** The nucleotide sequence of *rbcS* cDNA was similar to those of *C. vulgaris* , *Dunaliella tertiolecta* and " SUN CHLORELLA " strain of *C. pyrenoidosa* with identities of 93 % , 92 % (91 %) and 90 % , respectively. However , the deduced amino acid of *rbcS* cDNA had the highest identity of 80 % to *D. tertiolecta*. The three *rbcS* DNA sequences showed high homology with those of other green algae and higher plants , of which CP2 sequence shared more similar to CP3 than to CP1. **Conclusion :** The partial *rbcS* sequences from *C. pyrenoidosa* NMB1uh015-1 were obtained.

(本文编辑:康亦兼)