

# 钝顶螺旋藻基因组质粒文库的构建及其在获得功能基因上的应用

田 李<sup>1,2</sup>, 张晓雯<sup>1,2</sup>, 秦 松<sup>1</sup>

(1. 中国科学院 海洋研究所, 山东 青岛 266071; 2. 中国科学院 研究生院, 北京 100039)

**摘要:** 利用改良的 SDS 法提取钝顶螺旋藻基因组 DNA, 经 *Sau3AI* 酶切, 回收 1~2 kb 大小的片段, 与 *Bam*HI (*Sau3AI* 的同尾酶) 酶切并去磷酸化后的 pBR322 质粒载体相连接, 转入大肠杆菌 (*Escherichia coli*) Top10 细胞, 构建了螺旋藻基因组质粒文库。根据 pBR322 载体上多克隆位点两侧序列设计锚定引物, 根据丝状蓝藻丝氨酸/苏氨酸激酶 (STK) 保守序列设计简并引物, 以螺旋藻质粒文库为模板, “巢式”扩增出了 STK 基因部分序列。螺旋藻基因组质粒文库的构建为功能基因研究提供了极大方便。

**关键词:** 螺旋藻 (*Spirulina*); 质粒文库; STK; 克隆  
**中图分类号:** Q959 **文献标识码:** A

**文章编号:** 1000-3096(2008)06-0055-06

螺旋藻 (*Spirulina*) 是一类丝状不形成异型胞的蓝藻, 因含有藻胆蛋白、多糖、胡萝卜素等多种生物活性物质而受到广泛关注<sup>[1]</sup>。作者构建了螺旋藻基因组 DNA 的质粒文库, 为进行螺旋藻功能基因的克隆提供了方便。丝氨酸/苏氨酸激酶 (Serine/Threonine Protein Kinases, STK) 系统, 是一类信号转导系统。在蓝藻中, 这一系统通过感知外界信号, 对外界环境因子产生应答, 从而对蓝藻的生存和生长产生重要影响<sup>[2]</sup>。张晓雯等<sup>[3]</sup>对已测序蓝藻中的 STK 系统进行了详细的分析, 发现从单细胞蓝藻到丝状蓝藻的进化历程中, STK 系统的基因数目出现了快速增长, 这有可能和丝状蓝藻较为复杂的生活环境有关。螺旋藻作为一类丝状蓝藻, 常分布于湖泊、池塘和半咸水中, 生活环境复杂<sup>[1]</sup>。研究螺旋藻中的 STK 系统, 对螺旋藻培养条件的优化和螺旋藻品种改良将会产生积极的作用。作者通过构建质粒文库和基于文库的基因组步移技术, 得到了螺旋藻 STK 基因的部分序列。并且通过生物信息学分析, 研究了其进化特点。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

钝顶螺旋藻由本实验室保存, 培养光照条件为 2 000 lx, 光暗周期为: 12 h/12 h, 培养温度 23 ± 1。用 Zarrouk 培养基培养螺旋藻至 A<sub>560nm</sub> 为 0.6~0.8。筛绢过滤收集藻体, T-A 克隆载体 pBS-T 为天根公司产品; pBR322 载体, 为本实验室保存。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 螺旋藻 DNA 的提取

按茅云翔等<sup>[4]</sup>的方法提取 DNA。

#### 1.2.2 螺旋藻质粒文库的构建

##### 1.2.2.1 最适酶切条件的确定及特定长度基因组 DNA 片段的制备

在 20 μL 酶切体系中分别加入酶单位梯度量 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8 U 的 *Sau3AI* 切割基因组, 摸索合适的酶切条件, 以得到长度 (1~2 kb) 合适的基因组片段。然后, 以此酶量大量酶切基因组 DNA。琼脂糖电泳, 将酶切产物按分子质量大小区分开来, 切下 1~2 kb 基因组片段对应的胶条, 用小量胶回收试剂盒 (Fastagen 公司) 回收。

##### 1.2.2.2 pBR322 质粒的 *Bam*HI 酶切及去磷酸化处理

将 pBR322 质粒在 37 用 *Bam*HI 充分酶切 4 h, 并用 CIAP 去除 5 端磷酸。

##### 1.2.2.3 连接及 CaCl<sub>2</sub> 法转化大肠杆菌构建基因组质粒文库

基因组 DNA 与质粒的连接采用 10 μL 连接体系: 1~2 kb 基因组 DNA 片段 7 μL, 酶切并去磷酸化后的质粒载体 1 μL, T4 连接酶 1 μL, T4 连接 buffer 1 μL。

收稿日期: 2007-09-10; 修回日期: 2007-12-10

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30671065); 中国科学院知识创新工程项目 (KSCX2-YW-G-002, KZCX2-YW-209)

作者简介: 田李 (1984-), 男, 硕士研究生, 主要从事藻类分子生物学研究, 电话: 0532-82898863, E-mail: tianli@ms.qdio.ac.cn; 秦松, 通讯作者, 电话: 0532-82898500, E-mail: sqin@ms.qdio.ac.cn

大肠杆菌感受态细胞的制备与转化等操作参考分子克隆实验指南<sup>[5]</sup>,即用螺旋藻 DNA 部分酶切产物与 pBR322 质粒酶切并脱磷酸化后连接的产物进行转化大肠杆菌。

#### 1.2.2.4 阳性转化子的鉴定

将转化后的大肠杆菌涂平板培养过夜后,随机挑取 8 个单菌落,转接于盛有 1 mL 含氨苄青霉素 LB 液体培养基的 EP 管中,37 °C 摇床培养 6 h 后,取 1 μL 作 PCR 模板。用根据 pBR322 质粒 *Bam*HI 酶切位点两侧序列(并非紧靠 *Bam*HI 酶切位点,而是离它有 20~30 bp 的距离,这是后面设计“巢式”PCR 引物的需要)设计的引物 AP1, AP2, 进行阳性转化子的 PCR 检测。AP1 和 AP2 的引物序列分别为:

AP1: A GCCACTA TCGACTACGCGA

AP2: A TCGGTGA TGTCGGCGA TAT

PCR 反应程序为 94 °C 预变性 5 min, 94 °C 变性 1 min, 59 °C 退火 1 min, 72 °C 延伸 1 min, 循环次数为 29 次, 72 °C 再延伸 10 min。

#### 1.2.3 STK 基因部分序列的获得

##### 1.2.3.1 STK 简并引物的设计

根据 NCBI 数据库里公布的其他丝状蓝藻泡沫节球藻 (*Nodularia spumigena*)、红海束毛藻 (*Trichodesmium erythraeum*)、鱼腥藻 (*Anabaena variabilis*)、念珠藻 (*Nostoc* sp. PCC7120) 的 STK 基因序列,利用 ClustalX 对上述序列进行比对,根据比对出来的保守序列(对应于 STK 蛋白的 VIb 保守域)<sup>[6]</sup>设计一条简并引物 TGG(A/T)TTAA TATC(T/C)C(T/G)(A/G)TG。

##### 1.2.3.2 第一次 PCR

用简并引物和 AP1, AP2 分别构成一对引物,以质粒文库为模板,进行第一次 PCR, PCR 程序为: 94 °C 预变性 5 min, 94 °C 变性 1 min, 60 °C 退火 1 min, 72 °C 延伸 1 min, 循环次数为 29 次, 72 °C 再延伸 10 min。将得到的 PCR 产物稀释 50 倍,用作巢式 PCR 的模板。

##### 1.2.3.3 巢式 PCR

根据 pBR322 的质粒序列,分别在 AP1 与 *Bam*HI 和 AP2 与 *Bam*HI 之间设计两条引物,命名为 AP3, AP4。用简并引物和 AP3, AP4 分别构成一对引物,以第一次 PCR 产物 50 倍稀释物为模板,巢式 PCR 得到部分 STK 序列。AP3 和 AP4 的序列分别为:

AP3: TCA TGGCGACCACACCCGTC

AP4: A GGCGCCA GCA ACCGCACCT

PCR 程序为: 94 °C 预变性 5 min, 94 °C 变性 1 min, 62 °C 退火 1 min, 72 °C 延伸 1 min, 循环次数为 29 次, 72 °C 再延伸 10 min。

##### 1.2.3.4 PCR 产物的检测与回收

取 15 μL PCR 反应产物,以 1% 琼脂糖凝胶电泳进行分析和回收;目的 DNA 片段的胶回收参阅 Fastagen 公司的小量胶回收试剂盒说明书;凝胶的制备和操作参考分子克隆实验指南<sup>[5]</sup>。

##### 1.2.3.5 目的 DNA 片段的连接及转化

大肠杆菌感受态细胞的制备和连接转化等操作,参考分子克隆实验指南<sup>[5]</sup>;按照天根公司的 T-A 克隆载体连接试剂盒的说明书,将酶切 DNA 片段与 pBS-T 质粒载体 16 h 过夜连接;连接后转化已制备好的大肠杆菌感受态细胞,37 °C 培养箱中在含有氨苄的 LB 培养基平板上过夜培养。

##### 1.2.3.6 阳性克隆的筛选与检测

将能在含氨苄 LB 培养基平板上生长的单菌落挑取到 1 mL 含有氨苄的 LB 液体培养基 EP 管里摇床培养 6 h,以此菌液作为 PCR 的模板,进行阳性克隆的检测。PCR 检测使用 T3, T7 通用引物, PCR 程序为 94 °C 预变性 5 min, 94 °C 变性 1 min, 53 °C 退火 1 min, 72 °C 延伸 1 min, 循环次数为 29 次;检测结果均用 1% 琼脂糖凝胶电泳进行分析。

##### 1.2.3.7 测序

将检测结果为阳性的单菌落用甘油保种后,送至国家人类基因组南方中心测序。

#### 1.2.4 系统发育分析

从 NCBI 下载部分丝状蓝藻和单细胞蓝藻的 STK 序列,用 ClustalX<sup>[7]</sup>进行序列比对,用 MEGA<sup>[8]</sup>进行系统发育分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 螺旋藻基因组 DNA 的提取

对提取的基因组 DNA 用 0.7% 琼脂糖凝胶电泳进行分析,结果如图 1 所示。获得的基因组 DNA 大小约为 20 kb,且条带较集中,  $A_{260}/A_{280}$  的比值在 1.80~1.88 之间,说明获得了较好质量的基因组 DNA,可用于质粒文库的构建。

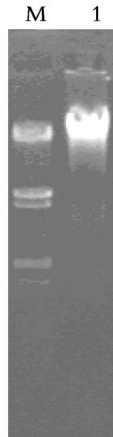


图1 螺旋藻基因组在 0.7%琼脂糖凝胶上的电泳图

Fig. 1 Electrophoresis pattern of total DNA isolated from *Spirulina* on 0.7% agarose gel

M. Lambda DNA/ EcoRI+ HindIII Marker; 1. 提取的螺旋藻基因组  
M. Lambda DNA/ EcoRI+ HindIII Marker; 1. DNA isolated from *Spirulina*

## 2.2 螺旋藻质粒文库的构建

### 2.2.1 基因组 DNA 部分酶切最适 *Sau3A*I 浓度的确定

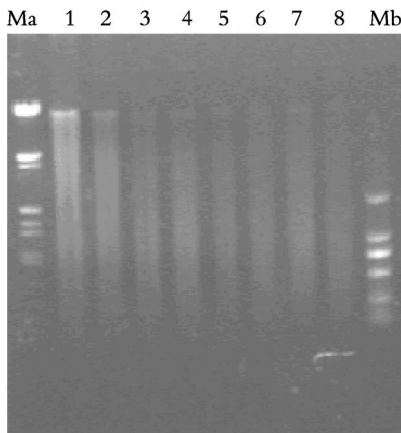


图2 螺旋藻基因组不同酶量 *Sau3A*I 的酶切电泳图

Fig. 2 Electrophoresis pattern of total DNA digested by different units of *Sau3A*I

Ma. Lambda DNA/ EcoRI+ HindIII Marker; Mb. DL2000 Marker; 1~8. 分别用 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8 U 的 *Sau3A*I 切割基因组所得到的片段

Ma. Lambda DNA/ EcoRI+ HindIII Marker; Mb. DL2000 Marker; 1~8. DNA digested by *Sau3A*I, the amounts of enzyme are 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8 U respectively

从图 2 可以看出,第 4 泳道对应的酶量(0.8 U)所切基因组大小在 1~2 kb 之间,符合构建基因组 DNA 质粒文库的要求。用此酶量大量酶切相应质量的基因组,并用胶回收试剂盒回收 1~2 kb 之间的 DNA 片段。

### 2.2.2 克隆载体制备

超螺旋质粒载体 pBR322 的 DNA,经 *Bam*HI 完全消化处理后于 1%琼脂糖凝胶电泳检测显示为一条带,表明超螺旋质粒的 DNA 经 *Bam*HI 酶切后变成了线形 DNA。本实验用牛小肠碱性磷酸酶(CIAP)去除线状 DNA 两端的 5'磷酸基团,防止了载体的自身连接并环化,从而降低了细菌转化时的背景。

### 2.2.3 连接与转化

将 1~2 kb 的螺旋藻 DNA 片段与经 *Bam*HI 酶切并去磷酸化的质粒相连接,转化至大肠杆菌感受态细胞后,在含有氨苄的 LB 平板培养过夜后,长出单斑。

### 2.2.4 阳性克隆的鉴定

因 pBR322 含有氨苄抗性基因,故阳性克隆能在含有氨苄的 LB 培养基平板上生长,长出的单菌落均可视为阳性克隆,但仍需要进一步做 PCR 检测。如果 1~2 kb 的螺旋藻基因组 DNA 片段插入到 pBR322 的 *Bam*HI 酶切位点,那么通过设计的位于此位点两侧的 AP1, AP2 引物,就可以按预期 PCR 得到 1~2 kb 大小不等的片段。

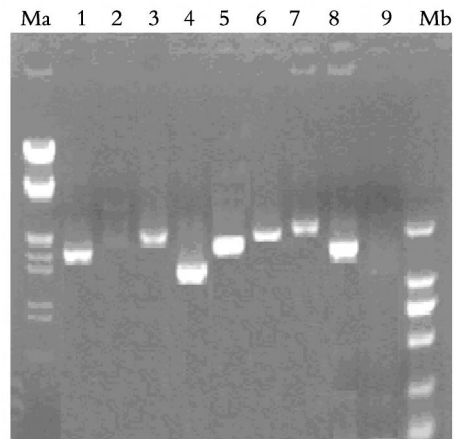


图3 重组子质粒的 PCR 鉴定(引物根据酶切位点两端的质粒序列设计)

Fig. 3 Amplification of DNA fragment inserted into plasmid pBR322

Ma. Lambda DNA/ EcoRI+ HindIII Marker; 1~8. 利用 8 个单斑做模板的 PCR 扩增条带; 9. 阴性对照; Mb. DL2000 Marker

Ma. Lambda DNA/ EcoRI+ HindIII Marker; Mb. DL2000 Marker; 1~8. Amplification of DNA fragment using 8 different colonies in the plate as PCR template; 9. negative control

图 3 为重组子质粒的 PCR 检测结果,由图 3 可见在随机挑选的 8 个单斑中,除第 2 泳道对应的单斑为假阳性外,其余各单斑均为阳性。阳性率为 87.5%,可满足下一步的实验需要。

### 2.3 STK 部分序列的获得

文献认为,STK 基因在进化过程中经历了广泛的分化<sup>[9]</sup>,反映到基因序列,表现出序列的保守性较差。作者对几株丝状蓝藻的 STK 基因序列比对后发现,只有对应于 STK 的第 VIb 保守域<sup>[6]</sup>的基因组序列尚比较保守,因此设计了一条简并引物。质粒文库构建成功之后,相当于给基因组片段的一端加上了锚定引物,可以和仅能设计出的一条简并引物作为 PCR 的一对引物,以质粒文库为模板,进行 PCR 扩增获得功能基因。

用简并引物与 AP1,AP3 引物,经过第一次和巢式 PCR 后得到一条 600 bp 左右的主带(图 4),而用简并引物和 AP2,AP4 经同样的程序 PCR 后却没有明显的主带产生。这一结果的原因可能是由于基因组片段正向或反向插入了质粒,当简并引物和锚定引物退火结合同一条 DNA 链时,就不会有明显条带出现,只有当简并引物与锚定引物退火时结合不同的 DNA 链时,才有可能得到理想的条带。这也是本文分别设计两对锚定引物的原因。

本实验采用巢式 PCR,进一步增强了扩增的特异性,尽可能地避免了假阳性条带的出现。正如图 4 所显示的,第一次 PCR 仅有微弱的主带,并且伴有

smear;而经过巢式 PCR 之后,主带明显清晰。

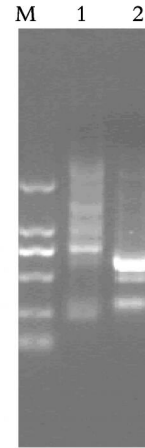


图 4 第一次 PCR 和巢式 PCR 的电泳图

Fig. 4 Primary PCR and secondary PCR at walking up-stream of STK

M. DL2000 Marker; 1. 第一次 PCR 结果; 2. 巢式 PCR 结果  
M. DL2000 Marker; 1. Primary PCR using AP1, degeneracy primer as PCR primers; 2. nested or secondary PCR using AP3, degeneracy primer as PCR primers

去除载体与 STK5 上游非编码序列后得到的 STK 部分序列(GenBank 注册号为 EU346751)见图 5。

```

1  ATGAACACCATCTACTGTCTGAACCCAGGCTGTCTCCACCCTAACCCCAGTCATTTCCAA
   M N T I Y C L N P G C L H P N P S H F Q
61  TATTGCCATAGATGTGGTAATAGGTTAATCCTGAAAGAAAGGTATATACCACGCTCAATT
   Y C H R C G N R L I L K E R Y I P R S I
121 TTAGGTCAAGGTAGTTTCTGTGCGACATTCTTAGCTAATGACACAGATTAAGCTTCTCAA
   L G Q G S F C R T F L A N D T D K P S Q
181 CCCTTCTGTGTGATTAACAGTTTTTACCTCAAGCCCAAGGAACAGATACTATTGAAAAC
   P F C V I K Q F L P Q A Q G T D T I E N
241 GCATCCCAGTTATTTGCACAGGAAGCAGAAAGGCTTGAGGAGTTGGGCAAGCATTCTCAA
   A S Q L F A Q E A E R L E E L G K H S Q
301 ATACCTGATTTAATCGCTTATTTTATAGTCAATAATCGACAATATTTGATTCAAGAATTT
   I P D L I A Y F I V N N R Q Y L I Q E F
361 GTCAACGGTGATACCCTAAAAGAGGAGCTTGACCAGAATGGTACTTTCTCAGAACCACAG
   V N G D T L K E E L D Q N G T F S E P Q
421 ATTAGAGAAATCTACTAGAGGTATTAGAAATTTTGGATTTTGTGCATAGTAAGCAGGTA
   I R E I L L E V L E I L D F V H S K Q V
481 ATCCATAGAGATATTAATCCAGAA
   I H R D I N P E
    
```

图 5 螺旋藻 STK5 端 504 bp 基因组序列及其编码的氨基酸序列

Fig. 5 Nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of 5 STK in *Spirulina*

## 2.4 系统发育分析

从部分蓝藻的系统发育树(图6)中可以看到,螺旋藻 STK 基因与丝状蓝藻该基因处于同一分支,亲缘关系最近。丝状蓝藻的 STK 基因自成一个分支,与单细胞蓝藻的 STK 区分开来,这提示 STK 序列的进化有可能推动了蓝藻从单细胞生物进化为多

细胞生物。将 STK 序列构建的系统发育树的拓扑结构与用 16S r DNA 序列构建的系统发育树(结果未显示)的拓扑结构比较后发现,两者明显不同,这说明 STK 在进化过程中经历了广泛的分化<sup>[9]</sup>,并造成了基因树与物种树的不一致。

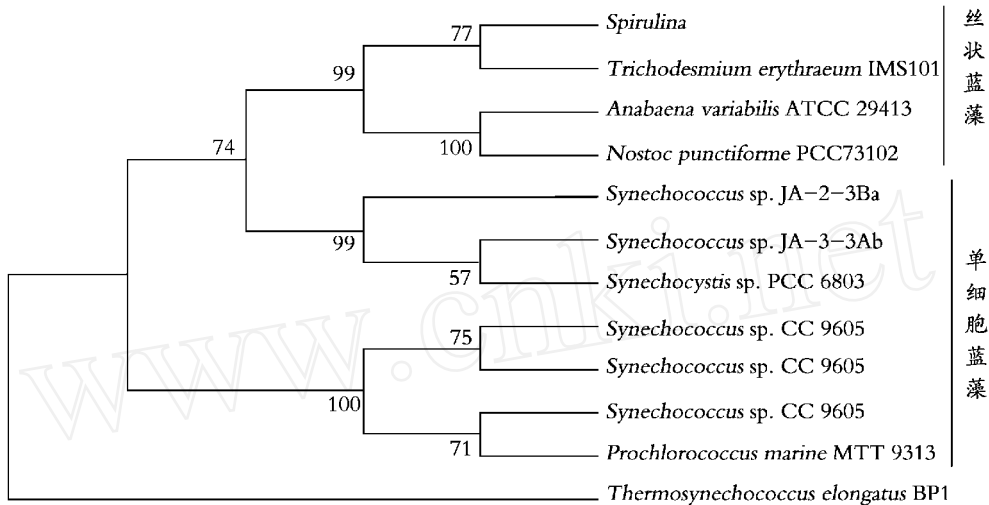


图6 不同蓝藻中 STK 基因的系统发育树

Fig. 6 Phylogenetic trees inferred from STK in different cyanobacteria using NJ method with *Thermosynechococcus elongatus* BP1 as out-group

## 3 讨论

本文构建了螺旋藻的质粒文库,这不仅为本实验室螺旋藻基因组计划打下了基础,而且为克隆螺旋藻基因提供了方便。5'端编码区的测定常规是通过 5' RACE<sup>[10]</sup>获得的,但由于 RNA 易降解,因此存在一定的技术难度。通过质粒文库和 PCR 手段,可实现在 DNA 水平上对其 5'端的获得。这也是利用了原核生物不存在内含子,所测基因组序列即其编码序列的特点,所以此方法对原核生物是有效的。另外,获得 5'端的另一种常规方法是用试剂盒进行 Genome Walker<sup>[11]</sup>,但由于试剂盒价格偏高,限制了其应用,而本文采用的方法,仅使用了分子生物学中最常规的试剂和仪器就可得到 5'端,所以不失为一种经济的方法。

有关螺旋藻 STK 基因 3'末端的获得和 STK 蛋白的表达及功能验证,作者正在进行实验研究,并将另文发表。

### 参考文献:

[1] Zhang X C. Large scale cultivation of *Spirulina* in Chi-

na, today and tomorrow [J]. **Biosystem Studies**, 1998, 1(2): 66-73.

[2] Zhang C C. Bacterial signaling involving eukaryotic-type protein kinases [J]. **Mol Microbiol**, 1996, 20: 9-15.

[3] Zhang Xiaowen, Zhao Fangqing, Guan Xiangyu, *et al.* Genome-wide survey of putative serine/threonine protein kinases in Cyanobacteria [J]. **BMC Genomics**, 2007, 8: 395.

[4] 茅云翔,张宝红,杨官品,等. 节旋藻(螺旋藻)高分子量 DNA 的两种制备方法 [J]. **海洋科学**, 2003, 27(2): 32-36.

[5] 萨姆布鲁克,拉塞尔. 分子克隆实验指南 [M]. 第三版. 黄培堂译. 北京:科学出版社,2002.

[6] Hanks S K, Hunter T. The eukaryotic protein kinase super family: kinase (catalytic) domain structure and classification [J]. **FASEB J**, 1995, 9: 576-596.

[7] Thompson J D, Higgins D G, Gibson T J, *et al.* Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice [J]. **Nucleic Acids Res**, 1994, 22: 4 673-4 680.

[8] Kumar S, Tamura K, Nei M. MEGA3: Integrated

- software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment [J]. **Brief Bioinform**, 2004, 5: 150-163.
- [9] Dufresne A, Garczarek L, Partensky F. Accelerated evolution associated with genome reduction in a free-living prokaryote [J]. **Genome Biol**, 2005, 6: R14.
- [10] Brain C S. Revolution in rapid amplification of cDNA ends: new strategies for polymerase chain reaction cloning of full length cDNA ends [J]. **Analytical Biochemistry**, 1995, 22: 227-255.
- [11] Barnes W M. PCR amplification of up to 35 kb DNA with high fidelity and high yield from bacteriophage templates [J]. 1994, **Proc Natl Acad Sci**, 91: 2 216-2 220.

## Construction of DNA library of *Spirulina* and its application in cloning genes

TIAN Li<sup>1,2</sup>, ZHANG Xiao-wen<sup>1,2</sup>, QIN Song<sup>1</sup>

(1. Key Laboratory of Experimental Marine Biology, Institute of Oceanology, the Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China; 2. Graduate University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

**Received:** Sep. , 10, 2007

**Key words:** *Spirulina*; genomic library; STK; clone

**Abstract:** The genomic DNA isolated from *Spirulina* was digested by *Sau3AI*. The DNA fragments with length of 1 ~ 2 kb were cloned into plasmid vector pBR322 which was previously digested with *Bam*HI and dephosphorylated with calf alkaline phosphatase. The recombinant plasmid was transformed into *Escherichia coli* Top10 competent cells and the genomic library was constructed. Using the anchor primer and degenerated primer, we obtain 5' end of STK in *Spirulina* from this genomic library.