

冈村枝管藻叶绿体 *psbA* 基因的克隆及序列分析

朱清华¹, 张学成², 李玉晖³

(1. 德州学院 生物系, 山东 德州 253023; 2. 中国海洋大学 海洋生命学院, 山东 青岛 266003; 3. 合肥学院 生物与环境工程系, 安徽 合肥 230022)

摘要: *psbA* 基因编码光合系统 II 反应中心的 D1 蛋白, 是叶绿体基因组中一个重要的光调控基因。根据网管藻 (*Dictyosiphon foeniculaceus*)、腕藻 (*Myelophycus simplex*)、粗粒藻 (*Asperococcus fistulosus*)、索藻 (*Chordaria flagelliformis*)、点叶藻 (*Punctaria latifolia*)、水云 (*Ectocarpus siliculosus*)、铁钉菜 (*Ishige okamurae*)、绳藻 (*Colpomenia sinuosa*)、网膜藻 (*Hydroclathrus clathratus*)、幅叶藻 (*Petalonia fascia*) 等 10 种藻类的 *psbA* 基因高度保守序列, 设计引物, 利用 PCR 方法从冈村枝管藻 (*Cladosiphon okamuranus*) 基因组 DNA 中扩增出约 750 bp 的片段, 将该片段连接到 pMD18-T 载体上进行序列测定。结果表明: 片段长度为 737 bp, 推导的 245 个氨基酸序列与网管藻、腕藻、粗粒藻、索藻、点叶藻、水云、铁钉菜、绳藻、网膜藻、幅叶藻的 D1 蛋白相对应的氨基酸序列的同源性均高于 96%。该基因序列已被 GenBank 收录, 登录号为 EU332142。

关键词: 冈村枝管藻 (*Cladosiphon okamuranus*); PCR 扩增; *psbA* 基因; 序列分析

中图分类号: Q178.53; Q7

文献标识码: A

文章编号: 1000-3096(2009)09-0020-05

冈村枝管藻 (*Cladosiphon okamuranus*) 产于日本的冲绳和汤加等地^[1], 属褐藻门 (Phaeophyta), 索藻科 (Chordariaceae), 藻体有大量分枝, 呈柔软的丝状, 褐色或深褐色, 长 20~50 cm, 直径 3.0~4.0 mm, 有藻腥味。因为从该藻中提取的多糖具有抗凝血^[2]、抗肿瘤^[3~5]、抗病毒^[6]等生物活性, 因此该藻在日本是最畅销的保健食品之一。

关于枝管藻, 20 世纪 70 年代, 日本学者就其生态和生活史方面进行了研究^[7,8]。自 2004 年以来, 国内学者试图将其引入中国, 并在生理^[9~11]和形态结构^[12]方面进行了深入研究。2007 年, 日本学者克隆了枝管藻的编码核酮糖 1,5-二磷酸羧化加氧酶大亚基基因 (*rbcL* 基因)、核糖体 DNA 序列和它的内转录间隔区序列^[13]。然而, 枝管藻的其他基因则未见报道。

psbA 基因是高等植物和藻类叶绿体基因组中的一个重要光调控基因, 其编码产物 32 ku 的 D1 蛋白是光系统 II 反应中心的 2 个核心蛋白之一, 在光合作用中介导电子传递。在不同植物之间, *psbA* 基因具有高度同源性^[14]。作者以冈村枝管藻为材料, 克隆了叶绿体基因 *psbA* 序列并对序列进行了分析, 以期对枝管藻的分子生物学研究提供方法。

1 材料与方 法

1.1 材料

冈村枝管藻孢子体取自日本冲绳岛。

1.2 方法

1.2.1 藻丝的培养和收集

冈村枝管藻孢子体接种在 250 mL 三角瓶中培养, 培养基为 Nori, 培养条件为: 温度 23℃, 光照强度 30 μmol/(m²·s), 光周期为 12 L/12 D。20 d 后瓶

壁上附着有大量藻体。刮下藻体, 筛绢过滤收集备用。

1.2.2 总 DNA 的提取

DNA 提取按照 Patway 方法加以改进。取 200 mg 样品置于 1.5 mL 的离心管中, 加 600 μL CTAB 提取缓冲液 (含 2% CTAB, 100 mmol/L Tris-Cl, 1.4 mol/L NaCl, 10 mmol/L EDTA, 2% β-巯基乙醇), 混匀, 于 65℃ 水浴保温 1 h; 加等体积抽提液 (苯酚/氯仿/异戊醇的体积比为 25:24:1), 混匀, 于 4℃、12 500 r/min 离心 10 min; 将上清液转至新的离心管中, 加入 RNase 至终质量浓度 1 mg/L, 在 37℃ 下放置 30 min; 再用抽提液抽提一次, 于 4℃、12 500 r/min 离心 10 min; 水相转至新的离心管中, 加入 0.8 倍体积异丙醇, 室温下放置 10 min, 4℃、12 500 r/min 离心 20 min, 弃上清液; 用 70% 乙醇洗涤 DNA 沉淀两次; 晾干, 将 DNA 溶解于 20 μL TE 缓冲液中。

1.2.3 *psbA* 基因的克隆

根据已提交 GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) 的部分褐藻 *psbA* 基因序列, 人工设计合成一段寡聚核苷酸片段作为引物, 以提取的总 DNA 为模板进行 PCR 扩增。

正向引物 F: 5'-TGGGAAACATTTGCTACTTGG-3';

反向引物 R: 5'-GCCATAGTACTTACACCTA-AAGC-3'

收稿日期: 2008-11-10; 修回日期: 2009-01-12

基金项目: 农业部引进国际先进农业科学技术 (948) 项目 (2003-Z104)
作者简介: 朱清华 (1978-), 女, 山东泰安人, 讲师, 博士, 主要从事藻类研究工作; 张学成, 通信作者, 电话: 0532-82032789, E-mail: xc Zhang@ouc.edu.cn

反应循环条件为:94℃预变性 6 min,94℃变性 60 s,53℃复性 60 s,72℃延伸 60 s,30 个循环,反应最后 72℃延伸 6 min。

目的片段以低熔点琼脂糖法回收,利用 pMD-18T 载体进行体外重组和转化,用含 Amp、X-gal 和 IPTG 的 LB 平板筛选,挑取阳性菌落提质粒。将含有插入片段的重组质粒送上海英骏生物技术有限公司测序。测序结果与 GenBank 上其他藻类的 *psbA* 基因片段进行分析比较。

2 结果

2.1 提取的总 DNA

对提取的基因组 DNA 用 1% 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 大小高于 20 kb,且条带较集中,说明获得了较好质量的基因组 DNA,可用作 PCR 实验。

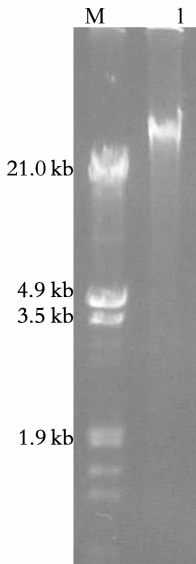


图 1 基因组 DNA 电泳图谱

Fig. 1 Genomic DNA of *Cladosiphon okamuranus*

M: DNA 分子质量标准;1: 基因组 DNA

M: DNA ladder;1: genomic DNA

2.2 PCR 产物序列分析

取 15 μL PCR 反应的产物上样,用 1% 琼脂糖凝胶电泳分析,结果见图 2。在约 750 bp 处获得了一条具有明显特异性的条带,所得到的 DNA 片段大小与预期结果相符。回收该片段后进行 DNA 测序,结果如图 3。在所测序列中,T、C、A、G 的平均含量分别为 34.6%、20.1%、24.5%和 20.8%。A+T 含量为 59.1%,而 G+C 的含量是 40.9%。A+T 的含量明显高于 G+C 的含量,表现出明显的碱基(A+T)组成偏向性。

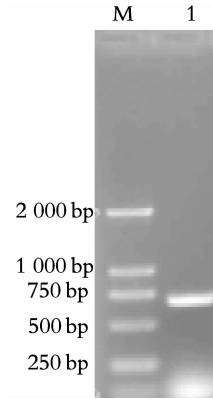


图 2 冈村枝管藻 *psbA* 基因片段的扩增

Fig. 2 Amplification of *psbA* gene fragment from *Cladosiphon okamuranus*

M: DNA 分子质量标准;1: PCR 产物

M: DNA ladder (DL2000);1: Product of PCR

根据测序结果推测出该基因片段编码 245 个氨基酸,氨基酸序列与网管藻(GenBank 编号: AY528828)、髯藻(GenBank 编号: AY528837)、粗粒藻(GenBank 编号: AY528825)、索藻(GenBank 编号: AY528826)、点叶藻(GenBank 编号: AY528833)、水云(GenBank 编号: AY528834)、铁钉菜(GenBank 编号: AY528832)、绳藻(GenBank 编号: AY528835)、网膜藻(GenBank 编号: AY528836)以及幅叶藻(GenBank 编号: AY528838)的叶绿体 *psbA* 基因编码的相应氨基酸序列相似(图 4),同源性均高于 96%。同时也表明克隆成功。该基因片段序列已在 GenBank 登录,登录号为 EU332142。

```

ATCCCTACGTTATTAACAGCAGCTTCTTGTAACATCATCGCTTTTATCGCAGCTCCGCCTGTA    63
GATATTGATGGTATCCGTGAGCCTGTAGCTGGATCTTTATTATACGGTAACAACATCATCAGT    126
GGTGCTGTTATACCTAGTTCAAACGCAATCGGTATTCACCTTACCCAATTTGGGAAGCTGCT    189
TCAATTGAAGAGTGGTTATACAACGGTGGTCCCTTACCAATTAATCGTATTCCATTTCTTAATT    252
GGTGTGCTTGTGGATGGGTCGTGAATGGAACTTAGCTACCGTTAGGTATGCGTCCCTTG      315
ATTTTCGTAGCATTCTCTGCTCCAGTAGCAGCAGCATCTGCAGTATTCTTAGTTTACCCTATC    378
GGTCAAGTAGTTTCTCTGATGGTATGCCATTAGGTATTTCTGGTACGTATAACTTCATGATC    441
GTTTCCAAGCTGAACATAACATATTAATGCACCCATTCCATATGGCTGGTGTGCTGGTGTGTA    504
AACGGTGGTTCATTATTCAGTGCATGCACGGATCTTTAGTAACTTCAAGTTAATTTCGTGAA    567
ACAAGCGAAGTTGAATCTGTTAACTACGGTTACAAATTCGGACAAGAAGAAGAACTTACTAC    630
ATCGTAGCTGCTCATGGTTACTTTGGTCGTTTAATTTTCCAATATGCTAGTTTCAACAACTCT    693
AGAGCTTACATTTCTTCCTTGCAGCATGGCCTGTAGTTGGGAT                        737
    
```

图 3 冈村枝管藻 *psbA* 基因部分序列

Fig. 3 Partial *psbA* gene sequence of *Cladosiphon okamuranus*

从肽链氨基酸序列比对结果可以看出,245 个氨基酸序列中只有 10 个发生了变化,其氨基酸变异率为 4.08%。在发生变化的 10 个氨基酸中,其中第 8 位(A-T)、第 89 位(W-Y)、第 143 位(F-Y)、第 169

位(N-F) 是非极性与极性氨基酸之间的变异,变异较大;第 11 位(N-Y)、第 66 位(E-D)、第 190 位(T-Q)、第 210 位(N-Y)是极性氨基酸之间的变异;第 54 位(I-V)、第 65 位(I-V)是非极性氨基酸之间的变异。

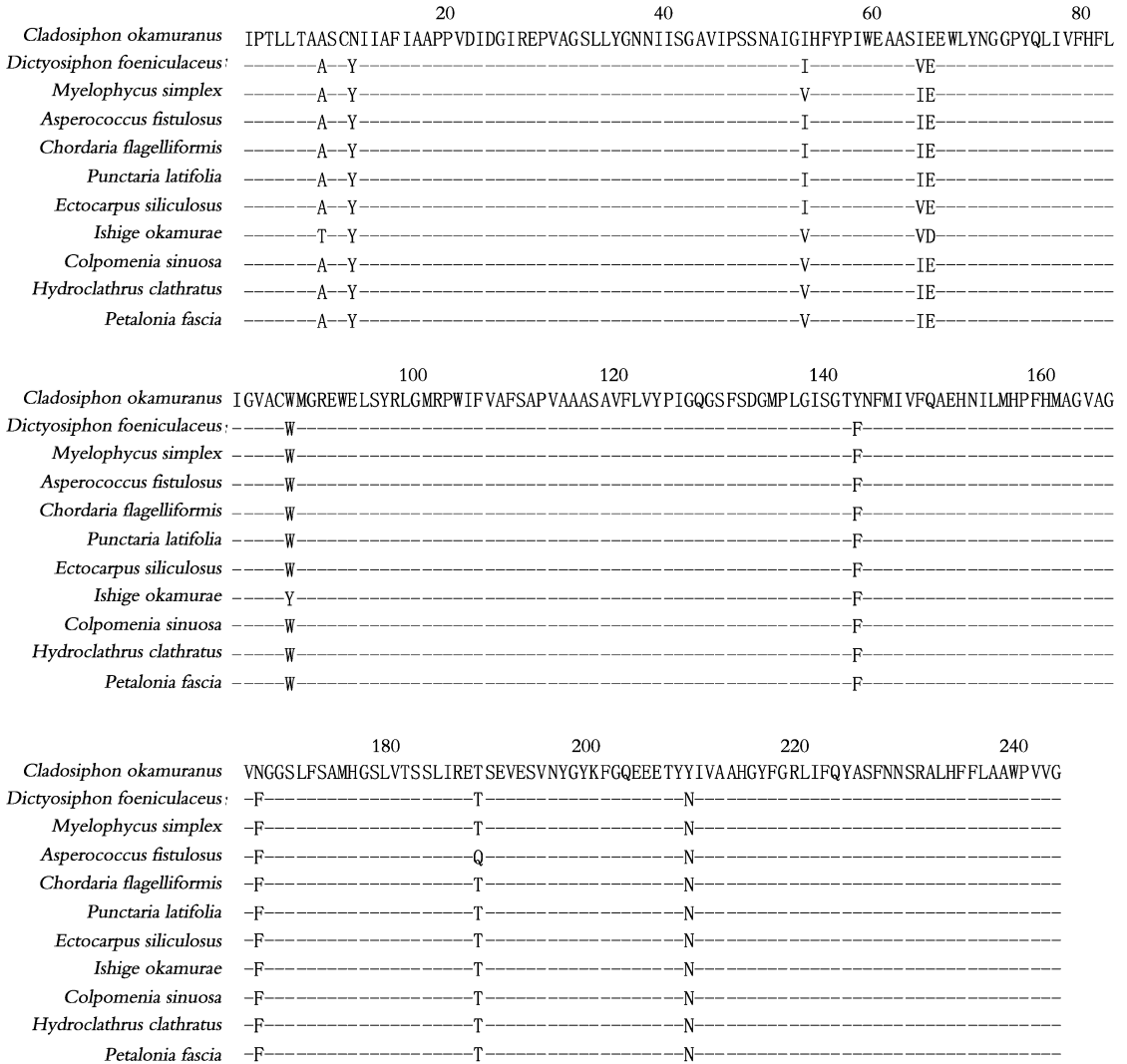


图 4 *psbA* 基因部分推断的氨基酸序列与同源序列的比较

Fig. 4 Comparison between the deduced amino acid sequences and other species

分析枝管藻 *psbA* 基因片段的密码子,发现:第 3 位的 A 和 T 的比率为 69.8%,使用 G 和 C 的比率为 30.2%,二者的差距很大;密码子 GGT、GCT、TTA 和 TTC 的使用频率最高,分别为 21、17、16 和 16 次;而编码 Leu 的 CTC、CTA 和 CTG,编码 Pro 的 CCC,编码 Gln 的 CAG,编码 Arg 的 CGC、CGA 和 CGG,编码 Leu 的 TTG,编码 Ser 的 TCG 和

TCC,编码 Cys 的 TGC,编码 Thr 的 ACC,编码 sn 的 AAT,编码 Lys 的 AAG,编码 Arg 的 AGG,编码 Val 的 GTC 和 GTG,编码 Ala 的 GCC 和 GCG,编码 Asp 的 GAC 和编码 Gly 的 GGC 的密码子和 3 个终止密码子在该序列中均没有出现(表 1)。这些现象说明冈村枝管藻 *psbA* 基因存在明显的密码子使用偏向性问题。

表 1 冈村枝管藻密码子的使用情况

Tab. 1 Codon usage of *psbA*

密码子	氨基酸	简称	数量	密码子	氨基酸	简称	数量	密码子	氨基酸	简称	数量	密码子	氨基酸	简称	数量
TTT	Phe	F	2	CTT	Leu	L	2	ATT	Ile	I	9	GTT	Val	V	8
TTC	Phe	F	16	CTC	Leu	L	0	ATC	Ile	I	12	GTC	Val	V	0
TTA	Leu	L	16	CTA	Leu	L	0	ATA	Ile	I	2	GTA	Val	V	10
TTG	Leu	L	0	CTG	Leu	L	0	ATG	Met	M	7	GTG	Val	V	0
TCT	Ser	S	9	CCT	Pro	P	8	ACT	Thr	T	2	GCT	Ala	A	17
TCC	Ser	S	0	CCC	Pro	P	0	ACC	Thr	T	0	GCC	Ala	A	0
TCA	Ser	S	4	CCA	Pro	P	4	ACA	Thr	T	2	GCA	Ala	A	10
TCG	Ser	S	0	CCG	Pro	P	1	ACG	Thr	T	2	GCG	Ala	A	0
TAT	Tyr	Y	2	CAT	His	H	5	AAT	Asn	N	0	GAT	Asp	D	3
TAC	Tyr	Y	11	CAC	His	H	3	AAC	Asn	N	11	GAC	Asp	D	0
TAA	End		0	CAA	Gln	Q	5	AAA	Lys	K	1	GAA	Gln	E	11
TAG	End		0	CAG	Gln	Q	0	AAG	Lys	K	0	GAG	Glu	E	2
TGT	Cys	C	2	CGT	Arg	R	6	AGT	Ser	S	6	GGT	Gly	G	21
TGC	Cys	C	0	CGC	Arg	R	0	AGC	Ser	S	2	GGC	Gly	G	0
TGA	End		0	CGA	Arg	R	0	AGA	Arg	R	1	GGA	Gly	G	3
TGG	Trp	W	6	CGG	Arg	R	0	AGG	Arg	R	0	GGG	Gly	G	1

3 讨论

高质量的基因组 DNA 的分离提取是开展藻类分子生物学研究的前提。针对枝管藻中蛋白、多糖含量高的问题,作者改良了 CTAB 法:用高盐的提取缓冲液(含 100 mmol/L Tris-Cl, 1.4 mol/L NaCl, 10 mmol/L EDTA)溶解样品中的 DNA;并用一定配比的苯酚、氯仿、异戊醇混合液对粗 DNA 样品液进行反复抽提,能有效地去除蛋白,多糖等物质。获得的基因组 DNA 质量较好,可用于 PCR 扩增。

2007 年,余大为^[15]根据坛紫菜 EST 序列设计引物,对坛紫菜配子体的 RNA 进行 RT-PCR 扩增,得到了 *psbA* 基因的部分序列。由于 *psbA* 序列高度保守,所以国内外学者多采用 PCR 技术直接从基因组中扩增完整或部分 *psbA* 基因。作者采用的也是 PCR 技术,根据与枝管藻同属于水云目的网管藻、腕藻、粗粒藻、索藻等 10 种藻类的 *psbA* 基因的高度保守序列,设计引物,从基因组 DNA 中扩增得到了 *psbA* 的部分序列并进行了相关分析。目前,国内外关于枝管藻的分子生物学研究少有报道,仅有高度保守的 *rbcL* 基因和 rRNA 相关基因被克隆。本文一方面为研究枝管藻 *psbA* 基因的特点及启动子序列提供理论依据,另一方面,也为枝管藻以及其他藻类的分子生物学研究提供了方法和依据。

参考文献:

- [1] 张学成, 郑兰红, 刘素文, 等. 一种新型经济海藻——冈村枝管藻 [J]. 中国海洋大学学报(自然科学版), 2004, **34**(5): 807-810.
- [2] 王静凤, 张学成, 姜国良, 等. 枝管藻多糖的提取及其抗凝血活性的初步研究 [J]. 青岛海洋大学学报, 2003, **33**(1): 75-79.
- [3] 王静凤, 张学成. 枝管藻 (*Cladosiphon okamuranus*) 多糖对荷 S180 小鼠的作用 [J]. 中国海洋药物, 2002, **6**: 16-19.
- [4] Teruya T, Konishi T, Uechi S, *et al.* Anti-proliferative activity of oversulfated fucoidan from commercially cultured *Cladosiphon okamuranus* Tokida in U937 cells [J]. **International Journal of Biological Macromolecules**, 2007, **41**(3): 221-226.
- [5] Haneji K, Matsuda T, Tomita M, *et al.* Fucoidan extracted from *Cladosiphon okamuranus* Tokida induces apoptosis of human t-cell leukemia virus type 1-infected T-cell lines and primary adult T-cell leukemia cells [J]. **Nutrition and Cancer**, 2005, **52**(2): 189-201.
- [6] Shibata H, Iimuro M, Uchiya N, *et al.* Preventive effects of *Cladosiphon* fucoidan against helicobacter pylori infection in *Mongolian gerbils* [J]. **Helicobacter**, 2003, **8**(1): 9-65.
- [7] Shinmura I, Yamanaka K. Studies on the cultivation of

- an edible brown alga, *Cladosiphon okamuranus* III Development of zoospore from plurilocular sporangium [J]. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*, 1974, **40** (9): 1 213-1 222.
- [8] Shinmura I. Yamanaka K. Studies on the cultivation of an edible brown alga, *Cladosiphon okamuranus* IV. Development of zoospore from unilocular sporangium [J]. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*, 1975, **41**(12): 1 229-1 235.
- [9] Zhu Q H, Zhang X C, Xu D, *et al.* Plurispore development of *Cladosiphon okamuranus*, Tokida (chordariaceae, phaeophyta) [J]. *Bangladesh Journal of Botany*, 2007, **36**(2): 157-162.
- [10] 朱清华, 张学成, 王连胜, 等. 温度、盐度和 pH 对冈村枝管藻中性游孢子附着及生长发育的影响 [J]. 中国海洋大学学报, 2007, **37**(4) : 615-620.
- [11] 梁泽丰, 梁丽, 马家海. 冈村枝管藻中性孢子的发育过程 [J]. 海洋渔业, 2006, **28**(2): 89-93.
- [12] 朱清华, 张学成, 时艳侠, 等. 冈村枝管藻孢子体的形态和超微结构 [J]. 武汉大学学报(理学版), 2007, **53**(6): 731-736.
- [13] Ajisaka T, Kim S H, Uwai S, *et al.* *Cladosiphon umezakii* sp. nov. (Ectocarpales, Phaeophyceae) from Japan [J]. *Phycological Research*, 2007, **55**(3), 193-202.
- [14] Hirose T, Sugiura M. Cis-acting elements and trans-acting factors for accurate translation of chloroplast *psbA* mRNAs: development of an in vitro translation system from tobacco chloroplasts [J]. *The EMBO Journal*, 1996, **15** (7): 1 687-1 695.
- [15] 余大为, 张海波, 王月, 等. 坛紫菜叶绿体 *psaA* 基因片段的序列分析 [J]. 水产科学, 2007, **26**(5): 289-291.

Cloning and sequence analysis of *psbA* gene fragment from the chloroplast of *Cladosiphon okamuranus*

ZHU Qing-hua¹, ZHANG Xue-cheng², LI Yu-hui³

(1. Biology Department, Dezhou University, Dezhou 253023, China; 2. College of Marine Life Science, Ocean University of China, Qingdao 266003, China; 3. Department of Biological and Environmental Engineering, Hefei University, Hefei 230022, China)

Received: Nov. , 10, 2008

Key words: *Cladosiphon okamuranus*; polymerase chain reaction; *psbA*; sequencing analysis

Abstract: According to conserved motif of the homologous nucleotide sequence of *psbA* of ten kinds of algae, a pair of primers were designed and about 750 bp fragment was amplified from the genome of *Cladosiphon okamuranus*. The resulting PCR products were inserted into pMD18-T vector and sequenced. The results showed that the nucleotide sequence was 737 bp and the sequence shared high homology with identity above 96% to the *psbA* of *Dictyosiphon foeniculaceus*, *Myelophycus simplex*, *Asperococcus fistulosus*, *Chordaria flagelliformis*, *Punctaria latifolia*, *Ectocarpus siliculosus*, *Ishige okamurae*, *Colpomenia sinuosa*, *Hydroclathrus clathratus* and *Petalonia fascia*. The *psbA* gene was accepted by GenBank (Accession number: EU332142). 245 amino acids were deduced from 737 bp nucleotide. Analyzing the codon usage of *psbA*, we found that there were problems of degenerate and preference of codon usage.

(本文编辑:张培新)