

# 坛紫菜磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶基因的克隆与序列分析

张晓娟<sup>1,2</sup>, 王广策<sup>1,3</sup>, 何林文<sup>1,2</sup>, 陈昌生<sup>4</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 100049; 3. 天津科技大学 海洋学院, 天津 100039; 4. 集美大学 渔业学院, 福建 厦门 361020)

**摘要:** 采用同源克隆的方法和 RACE 技术, 从坛紫菜 cDNA 中获得了磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶(PEPC)的序列, 该段序列含 2538 个核苷酸包含一个终止密码子 TAG 和 191 bp 的 3'端非编码区(UTR), 可编码 846 个氨基酸。该段序列中无跨膜结构和信号肽序列, 推导的氨基酸序列中 C 末端第 813 位氨基酸是丙氨酸(A), 表明是一个 C<sub>3</sub>型基因。相似性分析表明, 坛紫菜 PEPC 与其他物种有很高的一致性, 约为 35%~50%。结构分析显示, 该序列具有两个 PEPC 基因保守活性位点和 5 种模式的其他功能位点。进化分析显示, 坛紫菜 PEPC 羧化酶氨基酸序列更接近于 C<sub>3</sub>型, 进化上更为古老。该实验对进一步深入研究坛紫菜 PEPC 羧化酶功能及坛紫菜光合作用、碳代谢等具有重要的参考价值。

**关键词:** 坛紫菜; PEPC 基因; 序列分析; 系统进化分析

中图分类号: Q78

文献标识码: A

文章编号: 1000-3096(2011)04-0070-07

磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶(phosphoenolpyruvate carboxylase, PEPC; EC 4.1.1.31)在二价金属离子 Mg<sup>2+</sup> 或 Mn<sup>2+</sup> 存在下, 能够催化磷酸烯醇式丙酮酸(PEP)与 HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> 反应生成草酰乙酸(OAA)这一不可逆反应<sup>[1]</sup>: PEP+HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>→OAA+Pi。该酶广泛分布在高等植物、藻类、蓝细菌、细菌、原生生物中, 在动物和真菌中尚未发现<sup>[2-4]</sup>。磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶存在于所有的光合生物中, 是光合作用中的关键酶, 主要功能是为三羧酸循环补充四碳酸, 在 C<sub>4</sub> 植物和景天科植物光合代谢途径中扮演着浓缩固定 CO<sub>2</sub><sup>[4-5]</sup>。此外该酶还参与氨基酸代谢中碳骨架的回补、参与种子形成与萌发、果实成熟、植物保卫细胞气孔开闭、豆科植物根瘤固氮过程、维持离子和 pH 值平衡等诸多作用<sup>[6-10]</sup>。

在种族和系统演化进化过程的研究中, 分子特征已经成为一种重要工具。近年来, PEP 羧化酶的全氨基酸序列和全核苷酸序列甚至全序列的一部分能够作为分子遗传标记已为诸多研究者所报道<sup>[3, 6, 11-14]</sup>, PEP 羧化酶的序列特征能够在生物体和代谢途径之间建立系统发生关系。

坛紫菜是我国南方特有的深受亚洲人民欢迎的经济红藻, 也是我国出口创汇的主要农产品之一。它属于原红藻纲(Protofloridae)、红毛菜目(Bangiales), 是一种原始红藻, 具有特殊的生活史和世代交替现象, 包含叶状体(单倍配子体)和丝状体(二倍孢子体),

叶状体在冬春季生长旺盛, 主要分布于潮间带礁石上。丝状体渡夏, 而且钻入贝壳等碳酸钙基质中生长, 主要分布于潮下带, 是一种石内生藻类(endolithic algae)。坛紫菜 pH 值补偿机制高, 具有低的 Km 值, 能利用 HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> 作为光合作用时的碳源, 其低的无机碳补偿点表明坛紫菜具有浓缩碳的作用<sup>[15-16]</sup>。本实验室的 Fan 等<sup>[17]</sup>构建了坛紫菜丝状体(孢子体)的 11000 条 EST, 同时在坛紫菜代谢途径分析中, 主要分析了无机碳的固定途径, 结果发现坛紫菜丝状体阶段可能存在类 C<sub>4</sub> 的固碳途径。本实验克隆了坛紫菜 PEP 羧化酶基因的部分序列, 对其做了系统进化分析, 对进一步深入研究坛紫菜光合作用、碳代谢等具有重要的参考价值, 同时为进一步研究其功能奠定了基础。

## 1 材料与方 法

### 1.1 坛紫菜丝状体的获得

试验中所用的坛紫菜丝状体为本实验室(中国科学院海洋研究所藻类分子生理与发育调控实验室)保

收稿日期: 2010-04-10; 修回日期: 2010-05-20

基金项目: 国家自然科学基金重点项目(30830015); 海洋公益性行业科研专项项目(201105008-2, 201105023-7)

作者简介: 张晓娟(1984-), 女, 河南安阳人, 硕士研究生, 研究方向为藻类分子生物学, E-mail: feiyu0217@gmail.com; 王广策, 通信作者, E-mail: gwang@ms.qdio.ac.cn

留藻株, 培养基为海水加富培养基, 培养条件为 18°C, 光强约为 1 800 lux, 光: 暗周期为 12 : 12, 通过过滤法消毒后的空气进行培养, 每周更换 1 次培养基。用蒸馏水冲洗干净后进行提取 RNA。

## 1.2 试剂、试剂盒及仪器

总 RNA 提取采用天根生物公司的 RNAprep pure 试剂盒, cDNA 合成采用 Superscript II® 反转录酶试剂盒 (Invitrogen 公司, USA)。PCR 扩增目的基因片段、DNA 纯化、连接所用试剂盒和载体为 pMD-18T 购自东盛生物公司和 TaKaRa 生物技术有限公司, 菌株为 *E.coli* Top 10。药品均为进口分装或国产分析纯。序列测定委托上海生工生物技术公司完成。

## 1.3 坛紫菜 PCPC 同源序列的克隆

EST 的钓取及组装: 从 <http://est.kazusa.or.jp/en/plant/porphyra/EST/> 上获得了与条斑紫菜 PEP 羧化酶相关的 EST 序列: AU193218、AU193318、AU191558、AU188467、AV430322、AU195387、AU195597、AU192608、AU196318、AU191989、AU191907、AU195415、AU191278、AU192140、AU192294、AU196648、AU191070、AU190685、AV430724、AU192096、AU192037、AV431839、AU194305、AV433323、AU188200<sup>[18-19]</sup>。利用 BioEdit 生物学软件对这些 EST 序列进行拼接, 从中设计 PEPC1 (5'-CTCCAGCATGTCGAATGTAGCG-3') 和 PEPC1 (5'-CCGTCGTGTACGTCTCAAGGGT-3') 一对引物, 以坛紫菜的 cDNA 为模板, 进行 PCR 扩增, PCR 仪器购自德国 Eppendorf 公司。

PCR 反应条件为: 94°C 预变性 5min; 94 变性 30s, 60°C 退火 30s, 72 延伸 2min, 30 个循环; 72°C 延伸 10min; 4°C 保存。

反应体系见表 1。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 目的条带用琼脂糖凝胶纯化试剂盒纯化 (购自北京天根生物公司) 后克隆入 pMD18-T 载体

表 1 PCR 扩增体系

Tab. 1 PCR amplification system

试剂	用量(μL)
Mix	12.5
正向引物(10 μ mol/L)	1.0
反向引物(10 μ mol/L)	1.0
rTaq 酶	0.25
模板(cDNA)	2.25
ddH <sub>2</sub> O	8.0
总体积	25.0

(TaKaRa), 转化到大肠杆菌 Top 10 感受态细胞中, 转化后, 于氨苄 LB 培养基上挑取单克隆培养, 用上述引物再次进行 PCR 扩增, 以进一步验证克隆为阳性, 将阳性克隆送去上海生工生物技术公司采用 ABI3730 自动测序仪测序。

## 1.4 RACE PCR 克隆 PEPC 的 3' 末端

以接头引物 AdapterT(5'-GGCCACGCGTCTCGA-CTAGTAC 1qzT<sub>17-3'</sub>) 引导反转录合成。用通用引物 up(5'-GGCCACGCGTCTCGACTAGTAC-3') 和基于 PEPC 部分序列设计的基因特异引物 E31(5'-GCCG-CCCAAGACTATCAATG-3') 和 E32(5'-TCTACCGC-TTCGTACACCCACT-3'), 采用半巢式 PCR 的方法 (semi-nested PCR) 扩增基因 3' 末端。应用 Touch down 的 PCR 程序: 25 μL 体系 (同表 1); 94°C 预变性 5min; 94°C 变性 30s, 66°C 退火 30s (每一循环降低 0.6°C), 72°C 延伸 1min, 10 个循环; 94°C 变性 30s, 60°C 退火 30s, 72°C 延伸 1min, 25 个循环; 72°C 延伸 10min; 4°C 保存。

PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 目的条带用琼脂糖凝胶纯化试剂盒纯化 (购自北京天根生物公司) 后克隆入 pMD18-T 载体 (TaKaRa, 大连宝生物公司), 转化到大肠杆菌 Top 10 感受态细胞中, 转化后, 于氨苄 LB 培养基上挑取单克隆培养, 用上述引物再次进行 PCR 扩增, 以进一步验证克隆为阳性, 将阳性克隆送去测序。

## 1.5 序列分析

序列同源性对比采用 NCBI 中的 BLAST 软件 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>) 进行; 氨基酸序列分析采用 ExPASy 在线工具 (<http://www.expasy.org/>); 结构域预测采用 Pfam HMM 软件 (<http://pfam.sanger.ac.uk/search>); 信号肽预测采用 SignalP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/signalp/>); TMHMM (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>) 用于寻找跨膜结构; 根据 PROSITE 数据库对坛紫菜 PEP 羧化酶氨基酸序列进行活性位点的分析。重建系统进化树所用的 PEP 羧化酶核苷酸序列通过对 GenBank 的 BLAST 检索获得。重建 PEP 羧化酶的系统进化树时, 选取了 16 个有代表性的序列 (来自不同类群, 如表 2 所示)。

## 2 结果与讨论

### 2.1 序列分析

所克隆的序列长为 2 538 bp, 与原从条斑紫菜

EST 数据库中拼接出的 PEPC 序列片段相似性高达 89.5%。该片段是一个连续的读码框,在阅读框中不存在起始密码子,但还有一个 TAG 终止密码子,191bp 的 3'端非编码区(UTR)和 ploy A 尾巴,编码 846 个氨基酸。3'端非编码区(UTR)没有找到传统的 AAUAAA 的加尾信号,这在其他红藻中也很少有发现,如 *Porphyra yezoensis* 的  $\beta$ -tubulin 基因和 carbonic anhydrase 基因<sup>[20-21]</sup>,以及 *Gracilaria gracilis* 的 galactose1-phosphate uridyl transferase 基因<sup>[22]</sup>。

BLASTx 检索发现所有的同源序列均为磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶(phosphoenolpyruvate carboxylase,

PEPC),且同源性很高。以 Blast 软件对坛紫菜 PEPC 基因氨基酸序列的相似性比对结果表明,PEPC 与被子植物,裸子植物,藻类和细菌均有一定的一致性,如与玉米(*Zea mays*)为 46%,与芦荟(*Aloe arborescens*)为 46%,与水稻(*Oryza sativa Japonica Group*)为 47%,与大肠杆菌的(*Escherichia coli*)为 35%,一致性范围在 35%~50%之间,由于 C<sub>4</sub> 型的 PEPC 的 C 末端第 774 位或附近的一个氨基酸均为丝氨酸(S),而所有 C<sub>3</sub> 或 CAM 型的 PEPC 相应位置均为丙氨酸(A)<sup>[1, 4, 23-24]</sup>,本研究中的 PEPC 在相对应位置为丙氨酸(A),所以不可能是一个 C<sub>4</sub> 型的 PEPC(图 1)。

表 2 构建系统进化树所用序列

Tab. 2 PEPC isoforms used for phylogenetic analysis

物种	类型	序列号	序列出处
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	Chlorophyta (C3)	AY517644	Mamedov et al. (2005)
<i>Micromonas</i> sp.	Chlorophyta (C3)	XM_002499372	Worden et al. (2009)
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	diatom	XM_002180991	Bowler et al. (2008)
<i>Thalassiosira pseudonana</i>	diatom	XM_002288976	Bowler et al. (2008)
<i>Anacystis nidulans</i>	Cyanobacteria	M11198	Katagiri et al. (1985)
<i>Escherichia coli</i>	Bacteria	X05903	Fujita et al. (1984)
<i>Flaveria trinervia</i>	Dicot (C4)	X64143	Hermans & Westhoff (1992)
<i>Flaveria australasica</i>	Dicot (C4)	Z25853	Bauwe (unpublished 1993)
<i>Glycine max</i>	Dicot (C3)	D10717	Sugimoto et al. (1992)
<i>Solanum tuberosum</i>	Dicot (C3)	X67053	Merkelbach et al. (1993)
<i>Aloe arborescens</i>	Monocot CAM	D83052	Honda et al. (1996)
<i>Zea mays</i>	Monocot (C3)	X61489	Kawamura et al. (1992)
<i>Saccharum hybrid</i>	Monocot (C3)	M86661	Henrik et al. (1992)
<i>Zea mays</i>	Monocot (C4)	X15239	Hudspeth and Grula (1989)
<i>Sorghum vulgare</i>	Monocot (C4)	X63756	Crétin et al. (1990)

<i>F. trinervia</i> (C <sub>4</sub> ):	756	-K RKPSGGIESLRAIPWIF	S	WTQTRFHLPPVWLGFGAAF
<i>F. australasica</i> (C <sub>4</sub> ):	756	-K RKPSGGIESLRAIPWIF	S	WTQTRFHLPPVWLGFGAAF
<i>F. pringlei</i> (C <sub>3</sub> ):	756	-K RKPSGGIESLRAIPWIF	A	WTQTRFHLPPVWLGFGAAF
<i>S. tuberosum</i> (C <sub>3</sub> ):	757	-K RKPSGGIESLRAIPWIF	A	WTQTRFHLPPVWLGFGAAF
<i>Z. mays</i> (C <sub>3</sub> ):	758	-K RKPSGGIDSLRAIPWIF	A	WTQTRFHLPPVWLGFGAAF
<i>S. vulgare</i> (C <sub>3</sub> ):	751	-K RKPSGGIESLRAIPWIF	A	WTQTRFHLPPVWLGFGGAF
<i>A. arborescens</i> (CAM):	755	-K RKPSGGIESLRAIPWIF	A	WTQTRFHLPPVWLGFGAAF
<i>W. mirabilis</i> (CAM):	743	-K RKPSGGIESLRAIPWIF	A	WTQTRFHLPPVWLGFGAAF
<i>Z. mays</i> (C <sub>4</sub> ):	762	-K RRPGGGITLRAIPWIF	S	WTQTRFHLPPVWLGVGAAF
<i>S. vulgare</i> (C <sub>4</sub> ):	753	-K RRPGGGITLRAIPWIF	S	WTQTRFHLPPVWLGVGAAF
<i>C. reinhardtii</i> (C <sub>3</sub> ):	760	-SRK-SGGIETLRAIPWIF	A	WTQQLHLPVWLGIGEAL
<i>P. haitanensis</i> :	796	-K RKAGGVETLRAIPWIF	A	WTQTRLHLPVWLGGLTAL

图 1 部分 C<sub>3</sub>, C<sub>4</sub> 植物 PEPC 氨基酸部分序列的比较

Fig. 1 Partial sequence alignment of amino acid residues of PEPC from some C<sub>3</sub> and C<sub>4</sub> plants

Pfam HMM 软件分析显示氨基酸序列中的第 130 至第 841 个氨基酸之间为 PEP 羧化酶的结构域;信号肽预测 SignalP 和 TMHMM 在线软件分析显示该段序列既没有信号肽序列,也没有跨膜结构。

根据 PROSITE 数据库分析,其氨基酸序列含有两个大的 PEP 羧化酶活性位点,分别为 PS00781 (VLTAHPTQAVRR)和 PS00393(VMVGYSDSGKDGG),另外还含有 4 种模式的其他功能位点,分别为:依赖

TCCAGCATGTGGAATGTAGCGAACATTGCCAGTACGTGCATCGCATCCGGCGGCGTCTTATGAGCGTGGGGAAGGTCTATGCTC  
 S S M S N V A N I A E Y V H R I R R R R S Y E R G E G A M L  
 ACCCATACGTCCGTGGACGAGGTGTTGCGTGACCTTGTCAAGAAGGGGCACTCCCGGAGGAGATTACGCGGTCTTAAGTCGACAGACA  
 T H T S V D E V L R D L V K K G H S P E E I H A V L K S Q T  
 GTGGAGATGGTGTACGGCTACCCGACGACGAGGTGTCAGGCGGTGCTCCTGTCTAAGCTGCATCACATTGCGGACATCCTGTTGGAC  
 V E M V L T A H P T Q A V R R S L L S K L H H I A D I L L D  
 CTCCACGATAAGGCGCTGACGCCAACGAGCGGATGACCTCATCCTTCGACTGGGCGCCACCTCCGCTCGCTGGCGCACGGACGAA  
 L H D K A L T P N E R D D L I L R L G A H L R S L W R T D E  
 GTCCGGCGCACCAAGCCGACTCCGACTGATGAGGCTCGCAACATCCTCCAGGTATTGAGCACACTGTGTGGACGCGGTTCCCGTCTTT  
 V R R T K P T P T D E A R N I L Q V I E H T V W D A V P V F  
 GTGCGTGACAGAACAGGCCCTGCAGCGACACAATGCCAGGTGCTGCCGCTCGACGCGGCGCTCTTCTCTTTTCTCGTGGCGCGG  
 V R D T N K A L Q R H N A E V L P L D A R L F L F S S W A G  
 GGTGACCGGACGCCAACCCGTTGTGACGCGCAGGTGACACGGAAGCGGTGGCGGTCAACCGGTACCGCGCGCGGTGTTGACCTG  
 G D R D G N P F V T P Q V T R E A V A V N R Y R A A V L Y L  
 ATGGAGATTGAACACCTACTCTTTGACATGTGCGTGCATATGGATCAGATGAGCTCCGGGCGTACAACGCGGCACTGCGAAGGCAGAG  
 M E I E H L L F D M S V H Y G S D E L R A Y N A A L Q K A E  
 GATGCCAAGACCAAGCGGCTGACGCGGGAAGGCCAACCTCAAGTACAAGGAGTTTGGAAACAGTCCCGCCACGGAGCCGTACCGG  
 D A K T K T A D A G K A N L K Y K E F W N H V P P T E P Y R  
 GTGCTGTCTCACCTGCGGACCGCATGGCCGCCACCCGCGACCACTGTGAGGCGCAACTGTGCGGGTCTCCGCCACCATCGACGACG  
 V L L S H L R D R M A A T R D H C E A Q L S G S P P P S T T  
 GCTGCGCGTGTGTTGAGGCGTCTGAGCTTCTGAGCGGCTGATGGTGTGATGACCGCTCTTTGGTTGACAGGGCGATGACCTGCTGTCT  
 A A P F V E A S E L L E P L M V M H R S L V D Q G D D L L A  
 GGCCTATCATGGACCTGGTTGCGAGGTTGACGCGTGGGGTGCACACTAGTGAAGCTGGACATTCGCCAGGAGGGGAGCAGCACAG  
 G P I M D L V A R V H A F G L T L V K L D I R Q E G E Q H T  
 CAGGCCATGTACGCCATCACTGAATTGTGCGTCTGGGCTCGTACGCGGACTGGGATGAGGCCAAGCGGATGGAGTCACTGACCTGCTCCTG  
 Q A M S A I T E F V G L G S Y A D W D E A K R M E Y L T S L  
 CTCTCTTCAAGCGGCCACTATCCACGCGGTTTGTGCCGAGTCCGCCAAGCGCGGACGCTGCTGGACACGTTTGGACATTGGC  
 L S S K R P L I P R G F V P E S A K A A D V L D T F E T I A  
 GACATGGCCCGGAGGCCCTCGGCGGATGTGGTGTGATGCTTACCCCATCCGACGTGCTGTTGGTGCCTCTCTGACAGGGAG  
 D M G R E A L G A Y V V S M C F T P S D V L L V A F L Q R E  
 TACGCTACCTCTGTTGACAGCCAGCCCTCCGTTGTTGCGGCTGCTTGTGAGACAATCGCGCTCGAGTCTGCTCCACGACGCTGAAC  
 Y A T S V D S Q P L R V V P L L E T I G A L Q S C S T L N  
 ACGCTCTTTCGCGACCGTGGTATGCCAGTACCTGTCCGACCACTTGTACAATGTGAGGAGGTGATGGTGGGCTACTCGGACTCGGGC  
 T L F A H P W Y R Q Y L S D H F D N V Q E V M V G Y S D S G  
 AAGGACGGTGGCCGCTGACGCTGTCATGGGAGCTTTACAAGGCACAGGAG GCGATGGTGGCGATTGCCGAGGAACATGGCGTTTGCTC  
K D G G R L T S A W E L Y K A Q E A M V A I A E E H G V C L  
 CGCTTCTCCACGCGCGTGGTGGACCCGTCGGCCGTTGGTGGCCCGCAGCACCTTGCATTCTGTGCGAGCCGCCAAGACTATCAAT  
 R F F H G R G G T V G R G G G P Q H L A I L S Q P P K T I N  
 GGGTACCTCCGGTGACCATCCAGGGGAAGTGTGAGGACGAGCTTGGTCTGCGGGCGTGGCAGCCGACCCCTTGAGACGTACAG  
 G Y L R V T I Q G E V M E Q D F G L A G L A T R T L Y T  
 ACGGCTGTGCTAAGCGGACCTGGCGTGGTGTCCGTCAGCCGAGTGGCGGACAGTATGGACGGGCTCTCTACCCTCTGATC  
 T A V L K A D L A S V V S V K P E W R T V M D G L S T A S Y  
 ACCCACTACCACGATAGTGCATGAGGAGCCCGATTGTGCGAGTACTCCGCTTGTCAACACCGGAGCAGGAGCTGGGCTGCTCAAC  
 T H Y R R I V H E E P R F V E Y F R F A T P E Q E L G L L N  
 ATTGGCTCCCGTCTCCAGAAGCGCAAGGTGGCGGTGTCGAGACGCTCCGCGCATCCCTGGATCTTGCATGGACGACGACCGGCTG  
 I G S R L Q K R K A G G V E T L R A I P W I F A W T Q T R L  
 CATCTGCCGTGTGGCTGGCTGGCACCCCTCGCCGCGGAGTGGCAGGAGATGGGACGATCCGCGACATGTACAAGGAGTGG  
 H L P V W L G L G T A L A G A S A D E M G T I R D M Y K E W  
 CCCTTCTCAAGTCTTCTTACCTGATTGAGATGGTGTGGCCAAGGCGGACGCCAGAGCTCGGGCACTACGACTCGGAGCTGGT  
 P F F K S F F D L I E M V L A K A D A Q T S A H Y D S E L V  
 CCTGAGGAGTGCAGTCTTGGTGGCAGCTGCGGAGCTGCTGTGTCGCTCATCTCGCGGTGCTCGACACGACGGGCGCGGCGAG  
 P E E L Q S F G A E L R E L L C G V I S A V L D T T G A R Q  
 CTGCTGACAAGGACCGGTGCAGAAGCGGGGATCAACACGCGGGGAGTGGACGCTGCCGCTCAACCTGGTGCAGGTGGAGCCCTC  
 L L D K D P V Q K R A I N T R R E W T L P L N L V Q V E A L  
 CGCCGCAAGCGGAGCTACTACCAAGGGGACACGGTGGCAGCGGCTGTTGGACGCGCTGCTATTTCGATGAAGGGGATTAGCAGC  
 R R K R E L L T K G D T V P T A L V D A L V I S M K G I S S  
 GCGCCCGAAGACGGGCTAGGGCGGCTCCCGCGCCCTCCCGCACTTCTCTCTTCCACAGCCACATCACGGGGTGTGCGC  
 A P Q N T G \*  
 GCGCTGTGAGAACTCTTTTCTTTTCTGCTTGTCTGCTGCCGTTCCGCTGTCGCTTTCGGGTTGACCAGTCTACCATAGGCTTTTA  
 CCATGTTTCTGTAAAAA

图 2 坛紫菜 PEPC 核苷酸及氨基酸序列

Fig. 2 The nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of PEPC from *Porphyra haitanensis*

于 cAMP 和 cGMP 的蛋白激酶磷酸化位点(cAMP- and cGMP-dependent protein kinase phosphorylation site, PS00004), 蛋白激酶 C 磷酸化位点(Protein kinase C phosphorylation site, PS00005), 酪蛋白激酶磷酸化位点(Casein kinase II phosphorylation site, PS00006)和 N-端十四烷酰化位点(N-myristoylation site, PS00008)。

## 2.2 系统进化分析

多序列比对采用 Clustal X 程序, 采用 Clustal X 程序和 MEGA 4.0 软件, 以邻位相联法(Neighbor-Joining)法来重建, 计算方法重复 1 000 次, 进化距离选择 p 距离(p-distance), 空缺或者缺失(gaps/missing data)的处理采用完全删除(complete deletion), 以此构建的系统进化树如图 3 所示。

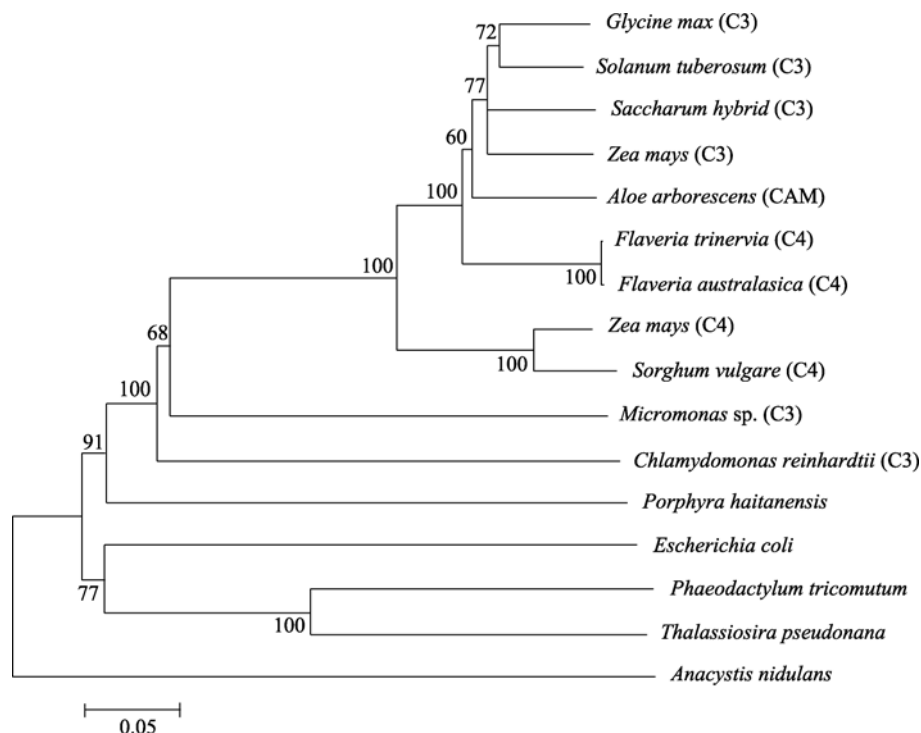


图 3 采用 N-J 法以 Clustal X 和 MRGA4.0 软件构建的系统进化树(计算重复 1000 次)

Fig. 3 Phylogenetic analysis of 17 PEPC isoforms. In this Neighbor-joining consensus tree, numbers on internal branches are percent bootstrap values of 1000 replicates

对 PEP 羧化酶进行进化分析, 同时选取了裸子植物、被子植物、藻类及微生物中的 16 个序列, 结果如图 2 所示。坛紫菜 PEP 羧化酶氨基酸序列以及绿藻中的莱因衣藻 (*C. reinhardtii*) 和绿藻 (*Micromonas* sp.), 都不和其他的聚类。种子植物和裸子植物中的 C<sub>3</sub> 型的 PEP 及 CAM 型的 PEP 聚为一个大的进化支, 虽然种子植物和裸子植物中的 C<sub>4</sub> 型的 PEP 各聚为一支, 但他们的进化距离相当。大肠杆菌与硅藻(*Phaeodactylum tricornutum* 和 *Thalassiosira pseudonana*)聚为同一支, 是与他们之间的进化关系密切相连的, 硅藻中有数百个基因是来自于细菌的<sup>[25]</sup>, 所以他们都可以归为细菌型的 PEP 羧化酶。本系统进化图与 Gehrig 等<sup>[13-14]</sup>1998 年和 2001 年构建的 PEP 羧化酶部分氨基酸序列基本上是一致

的。

如前人所述, PEP 羧化酶可以分为四种类型: C<sub>3</sub> 型、C<sub>4</sub> 型, CAM 型及细菌型, C<sub>3</sub> 亚型最先出现, C<sub>4</sub> 和 CAM 亚型被认为是由 C<sub>3</sub> 亚型进化而来, 而且二者分别多次独立起源<sup>[1, 6, 26]</sup>, 本实验构建的系统进化树图很好的诠释了 PEP 的代谢途径与进化关系。

在本图中, 从大的分支上来说, 坛紫菜 PEP 羧化酶氨基酸序列是与绿色植物聚在一支的, 是完全有别于细菌类型的 PEP 羧化酶的一支, 从进化上来看, 坛紫菜 PEP 羧化酶氨基酸序列更接近于 C<sub>3</sub> 型(这在之前的序列分析中也有所体现), 进化上更为古老。红藻最初依据林曼系统分类法归为植物, 但后来归为最古老的真核生物, 关于红藻的进化和起源一直是困扰科学家的一个问题。本进化图中坛紫菜 PEP

羧化酶氨基酸序列的进化可能也与红藻特殊的进化地位有关系。

参考文献:

- [1] Svensson P, Blasing O E, Westhoff P. Evolution of C4 phosphoenolpyruvate carboxylase [J]. Arch Biochem Biophys, 2003, 414: 180-188.
- [2] Lepiniec L, Vidal J, Chollet R, Gadal P, Crétin C. Phosphoenolpyruvate carboxylase: structure, regulation and evolution [J]. Plant Sci, 1994, 99: 111-124.
- [3] Toh H, Kawamura T, Izui K. Molecular evolution of phosphoenolpyruvate carboxylase[J]. Plant Cell Environ, 1994, 17: 31-43.
- [4] Izui K, Matsumura H, Furumoto T, et al. Phosphoenolpyruvate carboxylase: A new era of structural biology [J]. Annu Rev Plant Biol, 2004, 55: 69-84.
- [5] Izui K, Ishijima S, Yamaguchi Y, et al. Cloning and sequence analysis of cDNA encoding active phosphoenolpyruvate carboxylase of the C4-pathway from maize [J]. Nucleic Acids Research, 1986, 14: 1614-1628.
- [6] Lepiniec L, Keryer E, Philippe H, Gadal P, et al. The phosphoenolpyruvate carboxylase gene family of sorghum: Structure, function and molecular evolution [J]. Plant Mol Biol, 1993, 21: 487-502.
- [7] Melzer E, O'Leary M. Anaplerotic fixation by phosphoenolpyruvate carboxylase in C3 plants [J]. Plant Physiol, 1987, 84: 58-60.
- [8] Leegood R C, Osmond C B. The flux of metabolites in C4 and CAM plants. In Plant Physiology, Biochemistry and Molecular Biology, ed. DT Dennis, DH Turpin, Essex: Longman Sci. Tech. 1990, 274-298.
- [9] Vance C P, Gregerson R G, Robinson D L, et al. Primary assimilation of nitrogen in alfalfa nodules: molecular features of the enzymes involved [J]. Plant Sci, 1994, 101: 51-64.
- [10] Outlaw W H Jr. Kinetic properties of guard-cell phosphoenolpyruvate carboxylase [J]. Biochem Physiol Pflanzen, 1990, 186: 317-325.
- [11] Cushman J C, Bohnert H J. Transcriptional activation of CAM genes during development and environmental stress [J]. Ecol Stud, 1996, 114: 135-158.
- [12] Honda H, Okamoto T, Shimada H. Isolation of a cDNA for a phosphoenolpyruvate carboxylase from a monocot CAM-plant, *Aloe arborescens*: Structure and its gene expression [J]. Plant Cell Physiol, 1996, 37: 881-888.
- [13] Gehrig H H, Heute V, Kluge M. Towards a better knowledge of the molecular evolution of phosphoenolpyruvate carboxylase by comparison of partial cDNA sequences [J]. J Mol Evol, 1998a, 46: 107-114.
- [14] Gehrig H H, Heute V, Kluge M. New Partial Sequences of Phosphoenolpyruvate Carboxylase as Molecular Phylogenetic Markers [J]. Molecular Phylogenetics and Evolution, 2001, 20: 262-274.
- [15] 邹定辉, 高冲山. 坛紫菜光合作用对重碳酸盐的利用 [J]. 科学通报, 2002, 47(12): 926-930.
- [16] 骆其君, 裴鲁青, 潘双叶, 等. 坛紫菜自由丝状体对无机碳的利用[J]. 水产学报, 2001, 26(5): 477-480.
- [17] Fan X L, Fang Y J, Hu S N, Wang G C. Generation and analysis of 5318 Expressed Sequenced Tags from the filamentous sporophytes of *Porphyra haitanensis* (Rhodophyta) [J]. J Phycol, 2007, 43: 1287-1294.
- [18] Asamizu E, Nakajima M, Kitade Y, et al. Comparison of RNA Expression Profiles between the Two Generations of *Porphyra yezoensis* (Rhodophyta), Based on Expressed Sequence Tag Frequency Analysis [J]. Journal of Phycology, 2003, 39: 923-930.
- [19] Nikaido I, Asamizu E, Nakajima M, et al. Generation of 10,154 Expressed Sequence Tags from a Leafy Gametophyte of a Marine Red Alga, *Porphyra yezoensis* [J]. DNA Research, 2000, 7: 223-227.
- [20] Gong Q H, Han F, Dai J X, et al. Rapid isolation and sequence analysis of the beta-tubulin gene from *Porphyra yezoensis* (Rhodophyta) [J]. J Appl Phycol, 2005, 17: 1-5.
- [21] Zhang B Y, Yang F, Wang G C, et al. Cloning and quantitative analysis of carbonic anhydrase gene from *Porphyra yezoensis* UEDA [J]. J Phycol, 2009, 45: 290-296.
- [22] Lluisma A O, Ragan M A. Characterization of a galactose-1-phosphate uridyl transferase gene from the marine red algae *Gracilaria gracilis*[J]. Curr Genet, 1998(b), 34: 112-119.
- [23] 张桂芳, 赵明, 丁在松, 等. 稗草磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶(PEPCase) 基因的克隆与分析 [J]. 作物科学, 2005, 31(10): 1365-1369.
- [24] Latzko E, Kelly G J. The many-faceted function of phosphoenolpyruvate carboxylase in C3 plants [J]. Physiol, 1983, 21: 805-815.
- [25] Bowler C, Allen A E, Badger J H, et al. the Phaeodactylum genome reveals the evolutionary history of diatom genomes [J]. Nature, 2008, 456: 239-244.
- [26] Chollet R, Vidal J, O'Leary M H. PHOSPHOENOLPYRUVATE CARBOXYLASE: A Ubiquitous, Highly Regulated Enzyme in Plants [J]. Plant Mol Biol, 1996, 47: 273-298.

## Cloning and analysis of the phosphoenolpyruvate carboxylase gene of *Porphyra haitanensis* (Rhodophyta)

ZHANG Xiao-juan<sup>1, 2</sup>, WANG Guang-ce<sup>1, 3</sup>, HE Lin-wen<sup>1, 2</sup>, CHEN Chang-sheng<sup>4</sup>

(1. Key Laboratory of Experimental Marine Biology, Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China; 2. Graduate School, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China; 3. College of Oceanology, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 100039, China; 4. Fisheries College, Jimei University, Xiamen 361020, China)

Received: Apr., 10, 2010

**Key words:** *Porphyra haitanensis*; phosphoenolpyruvate carboxylase gene; sequence analysis; phylogenetic tree analysis

**Abstract:** Phosphoenolpyruvate carboxylase (PEPC; EC 4.1.1.31) plays an important role in photosynthesis. To get a deeper insight into the PEPC gene of *Porphyra haitanensis* T. J. Chang et B. F. Zheng (Bangiales, Rhodophyta), we cloned a partial-length cDNA by homology cloning and RACE. This sequence includes 2538bp encoding a propeptide of 846 amino acid residues. The deduced polypeptide shows high identities with the PEPC genes ranging from bacteria and unicellular algae to green plant. Phylogenetic tree analysis shows that the PEPC gene from the *Porphyra haitanensis* is a C<sub>3</sub>-like PEPC and more closely related to the ancestral type.

(本文编辑: 康亦兼)

---

(上接第 69 页)

## Synthesis and bioactivity of 3-carbonyl-benzo[d]isothiazol-3(2H)-methyl Benzoates Derivatives

XU Feng-ling<sup>1</sup>, LIN Cun-guo<sup>1</sup>, LIU Xiu-li<sup>2</sup>, XU Wei<sup>3</sup>

(1. Key Laboratory for Marine Corrosion and Protection, Science and Technology for National Defense; Qingdao Branch of Luoyang Ship Material Research Institute, Qingdao 266071, China; 2. Qingdao Petro China Kunlun Natural Gas Utilization Company Limited, Qingdao 266071, China; 3. The Administrative Committee of Qingdao Free Trade Port Zone, Qingdao 266071, China)

Received: Mar., 23, 2010

**Key words:** antifoulant; benzisothiazolone; synthesis; bioactivity

**Abstract:** Novel antifoulants were synthesized and their structures were confirmed by means of MS, elemental analysis, and <sup>1</sup>H NMR. The antimicrobial activity of the compounds on five bacteria, including *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Vibrio alginolyticus*, *Aeromonas hydrophila*, and *Bacillus subtilis* were tested. These compounds showed good antimicrobial activity, especially to *Escherichia coli*. When the compounds concentration were reached 10<sup>-6</sup> g/L the viable cell were reduced by more than 90%. The novel synthesized compounds might be potential microbial inhibitors.

(本文编辑: 康亦兼)