

三角褐指藻磷酸甘油酸变位酶基因可能侧翼序列的筛选、克隆以及序列测定*

王广策 孙海宝 曾呈奎

(中国科学院海洋研究所 青岛 266071)

提要 采用 RT-PCR 的方法从酵母中成功地得到了磷酸甘油酸变位酶的 cDNA 基因, 分别用 ^{32}P 和地高辛-ddUTP 标记以用作探针。以 ^{32}P 标记的探针筛选三角褐指藻基因组文库, 获得了 4kb 的阳性 DNA 片段; 进一步分析发现, 该 4kb 片段的真正阳性区域是位于片段端部的 306bp 的序列, 因此认为该序列为三角褐指藻磷酸甘油酸变位酶基因的侧翼部分。克隆该 306bp 的 DNA 片段, 并且测定其序列。结果表明, 该 306bp 的 DNA 片段包含两个同向重复序列, 每个重复序列的大小为 116bp, 在每个重复序列中均含有 GGTTCATGT 区域, 这与一般常见的真核基因 5' 端的 CAAT box 有相似之处。

关键词 三角褐指藻, 基因组文库, 磷酸甘油酸变位酶基因, 侧翼序列

中图分类号 Q789

糖酵解过程存在于几乎所有类型的细胞(包括真核细胞和原核细胞)(Cerff, 1995)。一般认为, 在真核细胞中, 糖酵解主要发生在胞质(cytosol)中, 经过很多步骤的酶促反应使葡萄糖分解为丙酮酸; 终产物丙酮酸再进入线粒体中作为起始物参与三羧酸循环, 产生大量的高能分子 ATP, 供细胞生长发育之需(王广策等, 2001a)。正因为它的普遍性和重要性, 糖酵解途径所涉及的酶, 尤其是编码这些酶的基因, 已经广泛应用于细胞生长发育以及生物分子进化方面的研究(Liaud *et al.*, 2000)。磷酸甘油酸变位酶(phosphoglycerate mutase)是糖酵解过程中的一个酶, 主要催化 3-磷酸甘油酸转化为 2-磷酸甘油酸。磷酸甘油酸变位酶种类具有多样性, 现在已经发现的主要类型有: (1) 酶的活性需要 2, 3-二磷酸甘油酸作为辅助因子(cofactor), 这种酶主要存在于脊椎动物和酵母中; (2) 不需要 2, 3-二磷酸甘油酸作为辅助因子, 但需要镁离子, 主要存在于杆菌中; (3) 不需要任何辅助因子, 主要存在于高等植物和无脊椎动物中; (4) 主要催化 2, 3-二磷酸甘油酸的形成(Fothergill-Gilmore *et al.*, 1993)。磷酸甘油酸变位酶的多样性和编码这种酶基因序列的多变性使之成为研究生物多样性和分子进化的重要对象。尽管如此, 对编码这种酶的基因表达调控研究却很少。

海洋微藻是海洋的初级生产力, 是维持海洋生态平衡的关键。海洋微藻中富含许多营养物质, 例如不饱和脂肪酸(李荷芳等, 1999) 以及藻胆蛋白(王广策等, 1998, 2001b) 等,

* 国家自然科学基金资助项目, 30170499 号; 中国科学院创新课题资助, L008 号。王广策, 男, 出生于 1965 年 12 月, 博士, 研究员, E-mail: gewang@ms. qdio. ac. cn

收稿日期: 2001-07-31, 收修改稿日期: 2001-12-20

因此研究与开发海洋微藻意义重大。本研究从海洋单细胞硅藻——三角褐指藻(*Phaeodactylum tricornerutum*)的基因组文库中筛选和克隆了潜在的磷酸甘油酸变位酶基因的调控序列,并完成该片段的序列测定。

1 材料与方法

1.1 化学试剂

实验所用的化学药品均为 MERK 公司产品,PCR 引物为德国 METABION 公司合成。

1.2 三角褐指藻基因组文库的获得

三角褐指藻基因组文库为德国布伦瑞克大学(Universitaet Braunschweig) Cerff 教授惠赠,构建基因组文库的载体为 Charon λ 噬菌体,基因组 DNA 用 Sau3AI 酶切消化后补平,连接于载体中。经测定该文库的滴度为 1.7×10^7 pfu。

1.3 磷酸甘油酸变位酶基因探针的制备

选用酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)的磷酸甘油酸变位酶 cDNA 基因作为探针。

1.3.1 用 RT-PCR 法合成探针 酵母 mRNA 的分离参照文献(Mueller *et al.*, 1994),以寡聚腺苷酸(Oligo dT)作为引物,用逆转录酶催化合成第一链 cDNA,以此作为模板进行 PCR 反应。

在 NCBI 服务器(<http://www.ncbi.nih.gov>)上获得酵母的磷酸甘油酸变位酶的 mRNA 序列,序列的数据库入口号码为 X58789。根据获得的 mRNA 序列设计 PCR 引物,上游引物为 5'-CCGAATTGACACGGTCAATCCGAATG-3',下游引物为 5'-CCGAATTCCTTACCTTG-GTTGGG-3'。PCR 的反应条件为:反应缓冲液 10mmol/L Tris-HCl, pH= 8.3, 47.5mmol/L KCl, 2.2mmol/L MgCl₂, 0.4mmol/L dNTP's; 变性 94℃, 75s; 复性 72℃, 75s; 延伸 55℃, 120s; 共 35 个循环。

1.3.2 PCR 产物的克隆 上述的 PCR 产物用酚-氯仿抽提,2 倍冷乙醇沉淀,离心去上清,沉淀溶解后用 *EcoRI* 酶切,然后用电泳的方法纯化目的 DNA 片段。质粒 pBluescript II SK+ 也用 *EcoRI* 酶切,然后用牛小肠碱性磷酸酶(CIP)去磷酸化。牛小肠碱性磷酸酶(CIP)试剂盒购自 Biolabs 公司,CIP 去磷酸化的操作方法参照试剂盒的说明书。用 T4 DNA 连接酶,将纯化的 PCR 产物与经过去磷酸化后的 pBluescript II SK+ 质粒连接,连接液转化 XL1Blue 菌株的感受态细胞,涂布于含有 IPTG 和 X-gal 的 LB 平板,具体步骤参照萨姆布鲁克等(1989)。

1.3.3 探针的标记 将克隆在 pBluescript II SK+ 质粒上酵母磷酸甘油酸变位酶 cDNA 基因用 *EcoRI* 酶切,用电泳的方法纯化目的 DNA 片段(探针)。然后用两种方法标记探针:(1)采取随机寡聚核苷酸引物法用 ³²P-dCTP 标记上述基因(Feiberg *et al.*, 1984),标记的放射性探针用经过灭菌的 Sephadex G-50 纯化;(2)以地高辛-ddUTP 标记,地高辛-ddUTP 标记试剂盒购自 Bioehringer Mannheim Biochemica 公司,标记方法参照试剂盒的说明书。

1.4 三角褐指藻基因组文库的筛选

三角褐指藻基因组文库用大肠杆菌 XL1-Blue MRF⁻ 菌株铺噬菌斑,用 ³²P 标记的探针筛选 8×10^6 个噬菌斑。将固定有嗜菌斑的硝化纤维素杂交膜浸入含有标记探针杂交液中,于 52℃ 孵育过夜。杂交液的组成为:6 × SSPE (1 × SSPE: 150mmol/L NaCl, 10mmol/L

NaH₂PO₄·1H₂O, 1mmol/L EDTA, pH=7.4), 0.1% SDS, 0.2% PVP 和 0.2% Ficoll。然后在 52℃下, 分别用 6×SSPE(含 0.1% SDS) 和 2×SSPE(含 0.1% SDS) 缓冲液清洗杂交膜, 进行放射自显影(王广策等, 2001b)。得到的阳性嗜菌斑再用标记的探针多次筛选以获得单个嗜菌斑。

1.5 筛选得到的基因组文库中目的 DNA 片段的亚克隆

将筛选得到的阳性噬菌体扩增后, 按萨姆布鲁克等(1989)的方法提取噬菌体 DNA、用 *EcoRI* 酶切后电泳和 Southern 转移, 转移得到的硝酸纤维素膜与用 ³²P 标记的探针杂交, 方法与 1.4 同。获得的阳性 DNA 片段亚克隆至 pBluescript II SK+ 质粒上。为了得到亚克隆在 pBluescript II SK+ 中的外源 DNA 片段的真正阳性区域, 进一步用不同的限制性内切酶酶切此重组质粒, Southern 转移, 得到硝酸纤维素膜用地高辛-ddUTP 标记的探针杂交, 杂交以及酶标反应的方法参照地高辛-ddUTP 标记试剂盒的说明书。将得到的真正阳性区域再次亚克隆至 pBluescript II SK+ 质粒中。

1.6 DNA 序列的测定

采用双脱氧核苷酸链终止法, 应用 5' 端荧光标记的引物, 使用 A. L. F DNA 测序仪 (Pharmacia) 将亚克隆在质粒 pBlueScript II-SK+ 上的 DNA 片段测序。具体的测序步骤参照 Pharmacia 公司的测序试剂盒 (AutoReadIM Sequencing Kit) 的说明书。

2 结果与讨论

2.1 酵母磷酸甘油酸变位酶 cDNA 基因

以提取的酵母 RNA 为模板, 用 RT-PCR 方法扩增的 DNA 片段的大小为 0.7kb 左右, 与从 NCBI 服务器上获得的酵母磷酸甘油酸变位酶的 mRNA 序列的大小 (727bp) 相符; 用 *EcoRI* 酶切 pBluescript II SK+ 的重组质粒, 发现外源 DNA 片段的大小也为 0.7kb; 同时, 选择外源 DNA 没有酶切位点而质粒 DNA 仅有一个酶切位点的 *EcoR V* 酶切重组质粒, 在电泳图谱上仅有一条带, 分子量为 3.7kb 左右(图 1)。这表明外源 DNA 的克隆是成功的。

为了更进一步确定所克隆的 DNA 片段是酵母磷酸甘油酸变位酶 cDNA 基因, 进行序列测定, 结果表明外源 DNA 的序列与参考的序列完全一致(图 2), 说明所克隆的 0.7kb 左右的 DNA 片段就是目的基因。

2.2 从三角褐指藻基因组文库中获得阳性噬菌斑的分离与克隆

用 ³²P 标记的酵母磷酸甘油酸变位酶 cDNA 基因探针从三角褐指藻基因组文库的 7.5 × 10⁶ 个噬菌斑中得到 6 个阳性噬菌斑, 提取阳性斑的 DNA, 用 *EcoR I* 酶切, 然后电泳, 电泳图谱共有 5 条带, 其中分子量最大的带是 λ噬菌体载体, 其他的 4 条带为外源 DNA 的带, 分

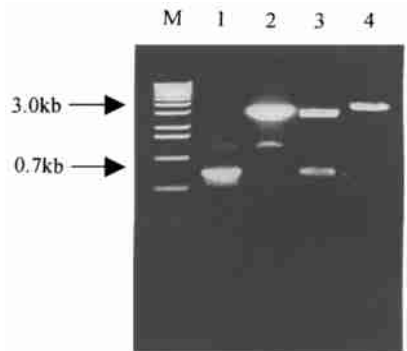


图 1 用 RT-PCR 扩增的酵母磷酸甘油酸变位酶 cDNA 基因的电泳图片

Fig.1 Electrophoresis of the cDNA gene of phosphoglycerate mutase from *Saccharomyces cerevisiae* amplified by RT-PCR

M: 分子量标准(自上而下的碱基对大小分别为: 12216、11198、10180、9162、8144、7126、6108、5090、4072、3054、2036、1636、1018、506、517 等)

1: 用 RT-PCR 扩增的产物; 2: 质粒 pBluescript SK+ 用 *EcoR I* 酶切; 3: 克隆有酵母磷酸甘油酸变位酶 cDNA 基因的 pBluescript SK+ 质粒用 *EcoR I* 酶切; 4: 重组质粒用 *EcoR V* 单酶切

```

1 AGTTAGACACGGTCAATCCGAATGGAACGAAAAAGAACTTATTCACCGGTTGGGTGATGTTAAATGTCTGCCAAGGGTCAACAAGAAGCCGTAGAGCC 100
101 GGTGAATTTGTTGAAGGAAAAGAAGGTTCTACCCAGAGCTCTTGACACTTCCAAGTTGTCCAGAGCTATCCAAACTGCTAACATTTGCTTTGAAAAAGGCTG 200
201 ACAGATTATGGATTCCAGTCAACAGATCTCTGGAGAITGAACGAAAAGACATTACGGTGACTTACAAGGTAAGGACAAGGCTGAAACCTTTGAAGAAGTTCCG 300
301 TGAAGAAAAATCAACACCTACAGAAGATCCCTTCGATGTTCCACCTCCACCAATCGACGCTTCTCTCCATCTCTCAAAGGGTGATGAAAGATACAAG 400
401 TACGTTGACCCAAATGCTTTGCCAGAACTGAATCTTTGGCTTTGGTCAITTGACAGAITGTTGCCAATACTGGCAAGATGTCATTGCCAAGGACTTGTGTGA 500
501 GTGGTAAGACCGTCAITGATCGCCGCTCACGGTAACTCCCTTGAGAGGTTTGGTTAAGCACTTGGAAAGGTAATCTCTGATGCTGACAITGCTAAGTTGAACAT 600
601 CCCAACTGGTATTTCCATTTGGTCTTCGAAITGGACGAAAACCTGAAGCCATCTAAGCCATCTTACTACTTGGACCCAGAAGCTGCCCGCTGCTGGTGCCGCT 700
701 GCTGTTGCCAACCAAGGTAAGAAATAA 727

```

图 2 克隆的酵母磷酸甘油酸变位酶的 cDNA 基因序列

Fig.2 The phosphoglycerate mutase cDNA gene cloned from *Saccharomyces cerevisiae*

子量分别为6.5kb、4kb、3kb 和 0.7kb 左右(图 3a)。Southern 杂交的结果显示,4kb 左右的 DNA 片段的杂交信号最强,因此将此 4kb 的 DNA 片段克隆质粒 pBlueScript II-SK+ 中(图 3b)。

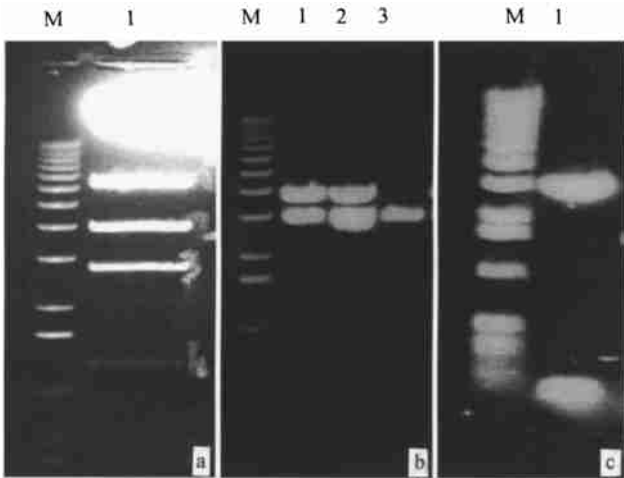


图 3 4kb 阳性 DNA 片段的不同限制酶酶切电泳分析

Fig. 3 Electrophoresis analysis of the 4kb positive DNA fragment to oligest with different restriction enzymes

a. 筛选得到的阳性克隆用 *EcoRI* 酶切(M: 分子量标准; 1 阳性克隆的 *EcoRI* 酶切); b. 克隆所得到的 4kb 阳性片段(M: 分子量标准; 1 和 2: 样品, 其中上面的带为 4kb 阳性片段, 下面的带为载体质粒; 3: 为不带阳性片段的质粒载体); c. 克隆在质粒中的 4kb 阳性片段再用 *EcoRV* 酶切得到(M: 分子量标准; 1: 样品上面的带分子量为 3.0kb, 下面的带为 0.3kb 的片段)

一般磷酸甘油酸变位酶 cDNA 基因的大小为 1kb 左右, 而本研究得到的阳性片段为 4kb 左右, 作者认为有两种可能: (1) 整个三角褐指藻的磷酸甘油酸变位酶基因均位于此 4kb 的 DNA 片段中, 如果这种可能成立, 则该片段应该含有磷酸甘油酸变位酶基因的内含子 (Intron) 序列; (2) 三角褐指藻磷酸甘油酸变位酶基因的部分序列位于此片段中, 也就是说, 该基因的侧翼序列位于此 DNA 片段中。为此, 将带有 4kb 的 DNA 外源片段的重组质粒 pBluescript II SK+ 分别用不同的限制性内切酶酶切, 然后琼脂糖凝胶电泳, Southern 转移, 最后与用地高辛-ddUTP 标记的探针杂交(图 4)。从图 4 可以看出, 用 *EcoRV* 酶切该重组质粒产生两条带, 这两条带的分子量很接近, 大约为 3.5kb 左右, 几乎重叠; 对

照与用地高辛-ddUTP 标记的探针杂交的免疫染色图谱, 可以发现, 尽管在凝胶电泳图谱中并没有发现有约 0.3kb 的 DNA 片段, 但在免疫染色图谱上却可以清晰看到在该位置处有一个信号很强的杂交带(图 4b), 而其他部分杂交信号很弱。所以我们认为筛选得到的

这个 4kb 的 DNA 片段并不含有三角褐指藻磷酸甘油酸变位酶的全部基因,只含有该基因的侧翼序列。

2.3 约 0.3kb 的 DNA 片段的序列分析

将这个杂交信号很强的 0.3kb DNA 片段克隆至质粒 pBlue Script II-SK+ 中(图 3c), 然后进行序列测定, 序列测定的结果表明该片段的大小为 306bp (图 5); 在其中的一端除有 *EcoRV* 的位点, 还具有 *EcoRI* 的酶切位点, 表明该序列应该位于 4kb DNA 片段的端部, 因为这个 4kb 是 *EcoRI* 酶切产生的片段, 克隆在质粒上后再用 *EcoRV* 酶切, 因此只有在 4kb 片段的端部才会有 *EcoRI* 的酶切位点。

进一步分析发现, 该序列包括两个同向的重复序列, 每个重复序列的大小为 116bp, 中间间隔 37bp。同时, 还可以发现在两个重复序列中含有

GGTCAATGT 区域, 这与一般常见的真核基因 5' 端的一致序列 GC(T/C) CAATCT (CAAT box) (Joshi, 1987) 相似, 但尚需更多的证据验证。

3 结论

在三角褐指藻中克隆得到 4kb 的 DNA 片段, 序列测定结果表明, 该片段含有磷酸甘油酸变位酶基因的侧翼序列, 进一步分析发现这个 4kb 片段的真正阳性区域是位于片段端部的 306bp 的序列, 该 306bp 的 DNA 片段包含两个同向重复序列, 每个重复序列的大小为 116bp, 在每个重复序列中均含有 GGTCAATGT 区域, 这与一般常见的真核基因 5' 端的 CAAT box 有相似之处。

```

1   ATCGAATTCCACACTGCTGCTGCTGCTGCCGCTACTGCTGTTGCTTCGGTTCGTGCATTGG   60
61  ATCCAACAAGGGCGGTCAATGTGCGGGCCAGACCGAAATCAGCGAGTTTAACGCGAAA   120
121 ATGGGAATCCAAGAGAATGTTGGAGCTTTTGATATCGAATTGCACACTGCTGCTGCTGCT   180
181 GCCGCTACTGCTGTTGCTTCGGTTCGTGCATTGATCCAACAAGGGCGGTCAATGTGCGG   240
241 GGCCAGACCGAAATCAGCGAGTTTAACGCGAAAATGGGATCCAAGAGAATGTTGGAGCT   300
301 TTTGAT   306
    
```

图 5 0.3kb 阳性片段的 DNA 序列

Fig. 5 Sequence of 0.3kb positive DNA fragment
下划线部分表示同向重复序列; 方框表示可能的 CAAT box

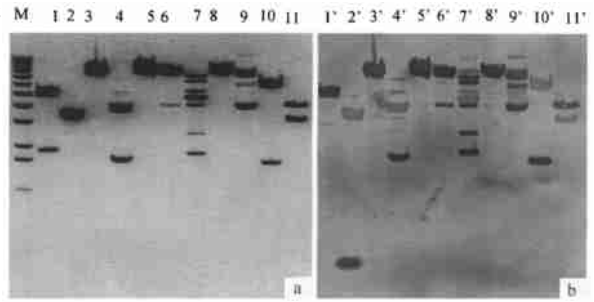


图 4 带有 4kb 阳性 DNA 片段的重组质粒用不同的限制性内切酶酶切的电泳图片以及 Southern blotting 反应的图片

Fig. 4 The recombinant plasmid containing 4kb positive DNA fragment digested with different restriction enzymes

a. 凝胶电泳图谱, 1 到 11 分别为: *BanHI*、*EcoRV*、*HindIII*、*KpnI*、*PstI*、*SacI*、*SalI*、*SmaI*、*XbaI*、*XhoI*、*EcoRI*; b. 免疫染色图谱, 1' 到 11' 分别为 Southern blotting 染色用辣根过氧化物酶

参 考 文 献

- 王广策, 曾呈奎, 1998. 钝顶螺旋藻 *G. 藻蓝蛋白分子内不同基因间能量传递的研究*. 海洋与湖沼, 29(5): 471—476
- 王广策, 曾呈奎, 2001a. *Achlya bisexualis* 丙酮酸激酶基因的筛选、克隆及序列分析. 遗传学报, 28(11): 1068—1076
- 王广策, 曾呈奎, 2001b. 紫球藻两种藻红蛋白特性的比较研究—— γ 亚基在稳定藻红蛋白结构方面的作用. 海洋与湖沼, 32(6): 653—657
- 李荷芳, 周汉秋, 1999. 海洋微藻不饱和脂肪酸组成的比较研究. 海洋与湖沼, 30(1): 34—40
- 萨姆布鲁克 J, 弗里奇 E F, 曼尼阿蒂斯 T 著, 1989. 金冬雁, 黎孟枫, 张 励等译. 1992. 分子克隆实验指南(第二版). 北京: 科学出版社, 222—225
- Cerff R, 1995. The chimeric nature of nuclear genomes and the antiquity of introns as demonstrated by GAPDH gene system. In: Go M, Schimmel P ed. Tracing biological evolution in protein and gene structures. Elsevier, Amsterdam, 205—227
- Feilberg A P, Vogelstein B, 1984. A technique for radiolabelling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. Anal Biochem, 137: 266—270
- Fothergill-Gilmore L A, Michels P A M, 1993. Evolution of glycolysis. Pro Biophy Molec Biol, 259: 105—235
- Joshi C P, 1987. An inspection of the domain between putative TATA box and translation start site in 79 plant genes. Nucleic Acids Res, 25; 15(16): 6643—6653
- Lüüd M F, Lichte C, Apt K *et al*, 2000. Compartment-specific isoforms of TPI and GAPDH are imported into diatom mitochondria as a fusion protein: evidence in favor of a mitochondrial origin of the eukaryotic glycolytic pathway. Mol Biol Evol, 17(2): 213—223
- Mueller S, Rensing S A, Martin W F *et al*, 1994. cDNA cloning of a Sec61 homologue from the cryptomonad alga *Pyrenomonas salina*. Curr Genet, 26: 410—414

SCREENING, CLONING AND SEQUENCING FOR THE PUTATIVE FLANKING REGION OF GENE ENCODING FOR PHOSPHOGLYCERATE MUTASE OF *PHAEODACTYLUM TRICORNUTUM*

WANG Guang-Ce, SUN Hai-Bao, ZENG Cheng-Kui (C. K. Tseng)

(Institute of Oceanology, The Chinese Academy of Sciences, Qingdao, 266071)

Abstract The phosphoglycerate mutase cDNA gene, which is involved in glycolysis and catalyzes the inter-conversion of 3-phosphoglycerate and 2-phosphoglycerate, was obtained with RF-PCR from *Saccharomyces cerevisiae*. The gene was labeled with both radio ^{32}P and DIG-ddUTP as probe to screen the genomic library of *Phaeodactylum tricorutum*. a 4kb positive DNA fragment was discovered from positive clone screened. Further analysis elucidated that the real positive region in the 4kb DNA fragment was 306bp located on the end. Therefore, the 306bp is considered to be flanking region of phosphoglycerate gene from *Phaeodactylum tricorutum*. The 306bp of DNA fragment was cloned into pBluescript SK+ plasmid and sequenced. The sequence result shows that the 306bp include two repeat regions with same direction whose size is 116bp, and GGTTC AATGT region which is similar to CAAT BOX in 5' end of eukaryotic gene.

Key words *Phaeodactylum tricorutum*, Genomic library, Phosphoglycerate mutase gene, Flanking region