

杜氏盐藻叶绿体 *atpA* 基因片段的克隆及序列分析

侯桂琴^{1,2}, 刘红涛¹, 潘卫东¹, 薛乐勋^{1,2*}, 姜东亚³

(1. 郑州大学 细胞生物化学研究室, 河南 郑州 450052; 2. 郑州大学 第一附属医院, 河南 郑州 450052; 3. 洛阳市新安县第一高级中学, 河南 洛阳 471000)

摘要: 根据莱茵衣藻、卵形肾藻、普通小球藻等 10 种藻类的 *atpA* 全基因氨基酸高度保守序列, 设计简并引物, 利用 PCR 方法从盐藻叶绿体 DNA 中扩增出约 400bp 的片段, 将该片段连接到 T-vector 上进行序列测定。结果表明, 核苷酸长度为 405bp, 编码 135 个氨基酸。推导的氨基酸序列与莱茵衣藻的同源性为 92%, 普通小球藻 88%, *Mesostigma viride* 87%, 卵形肾藻 86%, *Cyanidioschyzon merolae* 85%。以所克隆的 DNA 片段为探针, 与盐藻叶绿体基因组进行 Southern Blot 杂交结果有明显的杂交信号。据此可推断本实验中所克隆的序列为杜氏盐藻叶绿体 *atpA* 基因片段。该基因序列已被 GenBank 收录, 接受号为 AY435096。

关键词: 杜氏盐藻; 叶绿体; *atpA*; 简并引物

中图分类号: Q943.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2006)05-0474-05

Cloning and characterization of *atpA* gene fragment from the chloroplast of *Dunaliella salina*

HOU Gui-qin^{1,2}, LIU Hong-tao¹, PAN Wei-dong¹,
XUE Le-xun^{1,2*}, JIANG Dong-ya³

(1. Laboratory for Cell Biology, Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, China; 2. The First Affiliated Hospital, Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, China; 3. The First High School of Xin'an County, Luoyang 471000, China)

Abstract: According to conserved motif of the homologous amino acid sequence of ten kinds of algae, a pair of degenerate primers were designed and about 400bp fragment was amplified from the chloroplast of *Dunaliella salina* by PCR technique. The resulting PCR products were inserted into pMD-18 T-vector and sequenced. The results showed that the nucleotide sequence was 405bp which encodes 135 amino acid, and the sequence shared high homology with *atpA*, with identity being 92%, 88%, 87%, 86% and 85% to *Chlamydomonas reinhardtii*, *Chlorella vulgaris*, *Mesostigma viride*, *Nephroselmis olivacea* and *Cyanidioschyzon merolae*, respectively. The cloned fragment was used as a probe, which would be hybridized with chloroplast DNA of *D. salina* by Southern Blotting. Southern Blotting result revealed that there were obvious hybridization signals on cpDNA of *D. salina*. It can be concluded that the cloned sequence is *atpA* gene fragment from the chloroplast of *D. salina*. The *atpA* gene was accepted by GenBank (Accession number: AY435096).

Key words: *Dunaliella salina*; chloroplast; *atpA*; degenerate primer

杜氏盐藻 (*Dunaliella salina*) 是一种无细胞壁的单细胞绿藻, 在分类学上和莱茵衣藻十分相似, 其最突出的一个生理特征就是其惊人的耐盐能力。它

可以在 0.5~5 mol/L 的盐浓度下生长。对于其他恶劣环境条件, 如强酸、强碱、高温、强光照及重金属离子等, 盐藻也有很强的耐受力。另一方面盐藻还

收稿日期: 2005-04-18 修回日期: 2006-02-20

基金项目: 国家自然科学基金(30300208); 河南省医学科技创新人才工程项目(20020021) [Supported by the National Natural Science Foundation of China(30300208); Medical Technology Innovation Project of Henan Province(20020021)]

作者简介: 侯桂琴(1977-), 女, 河南浚县人, 在读博士, 研究方向为生物工程, (E-mail)hougqluo@126.com.

* 通讯作者, 研究员, 博士生导师, 专业方向为生物工程 (Author for correspondence, E-mail: lxxue@public2.zz.ha.cn)

能大量合成并积累 β -胡萝卜素和甘油。正是盐藻的这些特点,使其在基础理论和实际应用方面都有很高的研究价值。近二十年来,在国内外植物遗传工程研究中,取得了许多核转化的可喜成果,培育出了许多高产、优质和抗逆性强的转基因新品种(Brower等,1999)。但是由于核转化的转基因植物涉及到对环境的安全性问题,因此叶绿体转化引起了人们的重视(Staub等,2000;侯丙凯等,2002)。叶绿体转化具有众多优点:可同时进行多基因转化、表达的原核性、后代遗传稳定、定点整合、不易产生基因沉默及母性遗传和安全性好等(范国昌等,1998)。但是面临一个共同的问题,就是所用载体必须含适于在叶绿体基因组中高效表达的启动子,因此选择理想的启动子是至关重要的。只有选用的启动子在宿主细胞中有转录起始活性,外源基因才有可能顺利地得到转录和表达。采用宿主细胞自身的启动子等调控元件无疑是保证转录起始活性的最直接而有效的方法。研究表明,在莱茵衣藻中 *atpA* 基因(编码叶绿体 ATP 合成酶 α 亚基)簇(包括 *atpA*, *psbI*, *cemA* 和 *atpH* 四个基因)共用一个启动子,这个强启动子位于 *atpA* 基因的上游(Drapier等,1998),它可以作为叶绿体载体表达系统的必要元件。本室曾采用莱茵衣藻叶绿体 *atpA* 基因启动子作为盐藻叶绿体转化系统的启动子,虽然也有转录起始活性,但表达效率不高。若能把盐藻叶绿体自身的 *atpA* 强启动子克隆出来并用于其叶绿体表达载体无疑是最理想的。盐藻与衣藻具有很高的亲缘性,并且除具有衣藻的众多优点外,用盐藻叶绿体作为表达系统还有一个更大的优点:无毒,可直接食用不需纯化,从而降低转基因工程下游纯化的成本。故本研究根据近缘藻类 *atpA* 基因的氨基酸高度保守序列,设计简并引物,用 PCR 方法扩增得到了盐藻叶绿体 *atpA* 部分核苷酸序列(GenBank Accession AY435096),旨在为下一步启动子的克隆和盐藻高效叶绿体表达载体的构建提供理论依据。同时本研究通过设计简并引物,采用 PCR 的方法直接从叶绿体基因组中克隆了 *atpA* 基因片段,这为从叶绿体中克隆某些基因提供了一种快速而简便的途径。

1 材料与方 法

1.1 材料

杜氏盐藻(*Dunaliella salina* D. S. UTEX 1644

Teod)购自美国(The University of Texas),TaqDNA 聚合酶、连接酶和 T-载体购自大连宝生物公司;BamH I、EcoR I、Hind III、IPTG 和 X-gal 购自上海生物工程公司;大肠杆菌 JM109 本室保存;North²South^{*} Direct HRP Labeling and Detection kit 购自 PIERCE 生物公司。

1.2 方法

1.2.1 盐藻细胞的培养 按照 5×10^5 细胞/mL 的接种量接种于 Johnson's 液体培养基,于 26℃ 光照培养,光照强度为 4 500 lx,明暗周期为 12 h : 12 h。

1.2.2 盐藻叶绿体 DNA(ctDNA)的提取 取 10 mL 处于对数生长后期的盐藻培养液,4℃ 5 000 rpm 离心 5 min,取 350 μ L NET(0.1 mol/L NaCl,50 mmol/L EDTA,20 mmol/L Tris-HCl,pH8.0)重悬盐藻细胞沉淀。加 25 μ L ProteinaseK(10 mg/mL),25 μ L 20% SDS 混匀,55℃ 水浴 2 h,置冰上冷却后,加入 200 μ L 5 mol/L KAc,冰上静置 30 min,4℃ 12 000 rpm 离心 10 min;上清液加入等体积酚/氯仿/异戊醇(25 : 24 : 1)抽提两次,再用等体积氯仿抽提一次;水相加入 2 倍体积的无水乙醇,混匀后置于 -70℃ 放置 15 min,4℃ 12 000 rpm 离心 10 min,用 70% 乙醇洗涤沉淀,真空干燥后溶于 30 μ L TE 缓冲液中(图 1)。

1.2.3 简并引物的设计 从 GenBank 上搜索近十种藻类的 *atpA* 全基因所编码的氨基酸序列进行比对,找出两段比较保守的序列,每段包含 6 个氨基酸残基,分别设计简并引物,涉及密码子简并性的分别用 N、R、Y 代替,由此设计的简并引物为:上游引物(primer1):5'GCN GAR TAY TTY ATG TA 3';下游引物(primer2):5'CCN GCN ACY TGY TTC AT3'。其中:Y=嘧啶(C,T),R=嘌呤(G,A),N=任一碱基(A,T,C,G)。上述引物由大连宝生物公司合成。

1.2.4 PCR 扩增盐藻叶绿体 *atpA* 基因片段 以提取的 ctDNA 为模板,利用合成的简并引物,用 PCR 方法扩增 *atpA* 基因片段。扩增反应体系由以下成分组成:10 \times PCR Buffer 5 μ L、上游引物 5 μ L(1 mmol/L)、下游引物 5 μ L(1 mmol/L)、Taq 酶 2.5U、dNTP 4 μ L(10 mmol/L)、模板 DNA 1 μ L、补双蒸水至 50 μ L。反应程序为 95℃ 预变性 1 min,然后按下列循环参数进行扩增反应:94℃ 30 s,40℃ 50 s,72℃ 50 s,经 30 个循环后,72℃ 8 min,以确保链延长完全。反应结束后,1%的琼脂糖凝胶电泳

检测扩增产物。

1.2.5 盐藻叶绿体 *atpA* 基因片段的测序 经 PCR 扩增反应获得的产物,利用 pMD-18T-vector(全长 2.69 kb)为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,后用 *EcoR* I 和 *Hind* III 进行双酶切鉴定,将含有插入片段的重组质粒送上海基康公司测序,测序结果与 GenBank 上其他藻类的 *atpA* 基因片段进行比较。

1.2.6 盐藻叶绿体 *atpA* 基因片段的 Southern Blot 分析 为了确定此基因确实来自盐藻的叶绿体基因组 DNA,将叶绿体基因组分别用 *Bam*H I、*Eco*RV 和 *Hind* III 酶切后电泳,然后把克隆出的 *atpA* 基因片段作为探针,进行 Southern Blot 分析。

2 结果与结论

2.1 PCR 扩增产物

经 PCR 扩增后,电泳检测在约 400 bp 处有一明显亮带,与预期扩增的片段大小一致(图 1)。

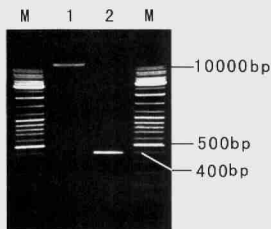


图 1 盐藻叶绿体 DNA 和 PCR 产物

Fig. 1 ctDNA of *D. salina* and the result of PCR

M: DNA 100bp ladder marker; 1: 盐藻叶绿体 DNA(ctDNA of *D. salina*); 2: PCR 产物(the product of PCR)

2.2 盐藻叶绿体 *atpA* 基因的克隆及重组质粒的鉴定

将 PCR 扩增后获得的片段经琼脂糖凝胶回收后与 pMD-18 T-vector 相连进行体外重组和转化,用含 Amp、X-gal 和 IPTG 的 LB 平板筛选,挑取 14 个阳性菌落进行快速 DNA 鉴定,用 *Eco*R I 和 *Hind* III 双酶切,电泳结果表明 1,2,3,4 具有与预测大小一致的插入片段(图 2)。

2.3 克隆 *atpA* 基因片段序列测定结果

样品测序得到一个 405 个核苷酸的序列,由其推导的氨基酸序列有 135 个氨基酸残基,所得片段

长度与理论值相符(GenBank accession number: AY435096)。

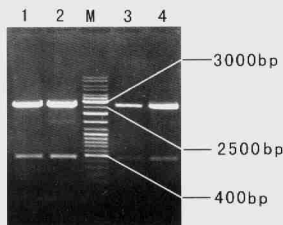


图 2 重组质粒双酶切结果

Fig. 2 The results of plasmid digestion by *Eco*R I and *Hind* III

1,2,3,4: 质粒双酶切结果(the results of plasmid digestion); M: DNA 100bp ladder marker.

2.4 *atpA* 基因片段的序列同源性分析

将测序结果与 5 种近缘藻类的叶绿体 *atpA* 基因进行 BLAST 分析。结果显示,本研究克隆到的基因序列片段与莱茵衣藻(*Chlamydomonas reinhardtii*)、普通小球藻(*Chlorella vulgaris*)、*Mesostigma viride*、卵形肾藻(*Nephroselmis olivacea*)和 *Cyanidioschyzon merolae* 叶绿体 *atpA* 基因氨基酸序列的同源性分别为 92%、88%、87%、86% 和 85%。

图 3 显示,杜氏盐藻叶绿体 *atpA* 基因序列测序结果转换成氨基酸后与近源藻类 *atpA* 基因片段氨基酸序列的同源性比较。

氨基酸序列同源性分析表明,本实验克隆的基因序列为盐藻叶绿体 *atpA* 基因。

2.5 Southern Blot 分析结果

用克隆出的 *atpA* 基因片段作为探针与盐藻 ctDNA 的杂交,结果见图 4。

从图 4 可以看出,加 marker 的泳道没有杂交信号,而加 ctDNA 的其他三个泳道均有明显的杂交信号,这说明本实验所克隆的 *atpA* 基因片段来自盐藻 ctDNA。

3 讨论

简并引物实际上是一类由多种寡核苷酸组成的混合物,彼此之间仅有一个或数个核苷酸的差异。它可以用来检测一个已知基因家族的新成员,或用来检测种间的同源基因(萨母布鲁克等,1992)。由

于目前对盐藻研究很少,其很多有用基因还不被人知,至今尚未克隆出盐藻 *atpA* 基因,故没有现成的序列可供参考。另一方面,盐藻尽管与其他藻类(如衣藻)有较近的亲缘关系,但即使编码的氨基酸一样时,它们对密码子的偏好性也有一定的差异。而设

计成简并引物就可克服这些问题,使实验成功的机会大大增加。而简并引物的成功应用取决于确定 PCR 效率与特异性的最佳平衡条件(Fietto 等, 2002)。我们根据 GenBank 上几种与杜氏盐藻亲缘关系较近的藻类的叶绿体 *atpA* 基因序列,比较筛

Dunaliella	AEYFMYTGRPTLVYDDLKQATAYREMSLLLRPPGREAYPGDVFYIHSRLLERAALKN
Chlamydomonas	AEYFMYTGRPTLTIYDDLKQQAQAYREMSLLLRPPGREAYPGDVFYLSRLLERAALKN
Chlorella	AEYFMYTGRHTLVIYDDLTKQAQAYREMSLLLRPPGREAYPGDVFYLSRLLERAALKN
Mesostigma	AEFFMYSGRHTLVIYDDLKQQAQAYREMSLLLRPPGREAYPGDVFYLSRLLERAALKS
Nephroselmis	AEYFMYSGRHTLVIYDDLKQQAQAYREMSLLLRPPGREAYPGDVFYLSRLLERAALKS
Cyanidioschyzon	AEHFMYGGKATLVIYDDLTKQAQAYRMSLLLRPPGREAYPGDVFYLSRLLERAALKN
Dunaliella	SELGEGSMTALPIVETQEGDVSAYIPTNVI SIDGGIFLSSGLFNSGLRPA INVG I SVSR
Chlamydomonas	NALGEGSMTALPIVETQEGDVSAYIPTNVI SIDGGIFLAAGL FNSGLRPA INVG I SVSR
Chlorella	DKLGSGSMTALP VVETQEGDVSAYIPTNVI SIDGGIFLSADIFNAGIRPA INVG I SVSR
Mesostigma	NALGEGSMTALPI ETQAGDVAAYIPTNVI SIDGGIFLSADIFNAGIRPA INVG I SVSR
Nephroselmis	DALGEGSMTALPVI ETQGGDVSAYIPTNVI SIDGGIFLSADIFNAGIRPA INVG I SVSR
Cyanidioschyzon	KELGGGSMTALPIVETQAGDVSAYIPTNVI SIDGGIFLSSDLFNAIRPA INVG I SVSR
Dunaliella	VGSSAQYKAMKQVAG
Chlamydomonas	VGSSAAQPKAMKQVAG
Chlorella	VGSSAAQPKAMKQVAG
Mesostigma	VGSSAAQIKAMKQVAG
Nephroselmis	VGSSAAQYKAMKQVAG
Cyanidioschyzon	VGSSAAQIKSMKKVAG

图 3 杜氏盐藻叶绿体 *atpA* 基因片段氨基酸序列及其同源性比较 (阴影,保守氨基酸;下划线,引物序列)
Fig. 3 Comparison of deduced amino acid sequence of *D. salina* with *Chlamydomonas reinhardtii*, *Chlorella vulgaris*, *Mesostigma viride*, *Nephroselmis olivacea* and *Cyanidioschyzon merolae*, respectively (The shaded areas indicated homologies (>100%))

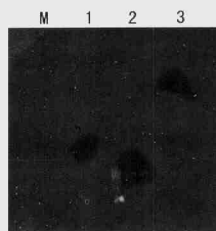


图 4 Southern Blot 分析结果
Fig. 4 The result of Southern Blot

M, DNA 100bp ladder marker; 1, *Bam*H I 酶切后的 ctDNA;
2, *Hind*III 酶切后的 ctDNA; 3, 未酶切的 ctDNA。

选出氨基酸高度保守,并且核苷酸简并程度低的序列 MKQVAG 和 AEYFMY,设计简并引物。此外,在扩增体系中,我们将引物浓度提高到 5 $\mu\text{mol/L}$,

高于常规 PCR 要求引物浓度(0.1~1 $\mu\text{mol/L}$)的 5 倍,并且降低退火温度,取得了比较理想的效果。我们将 PCR 产物克隆到 T 载体上,随机挑取 14 个阳性菌落提质粒,双酶切初步筛选后测序。

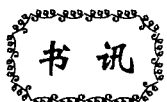
研究表明,莱茵衣藻叶绿体 ATP 合成酶是一种多亚基酶复合物,它包括一个具有五个亚基(α 、 β 、 γ 、 δ 和 ϵ)的亲水复合物(CF_1)和一个具有三个亚基(C I、C II、C III)的疏水复合物(CF_0)。并且在菠菜的 CF_1/CF_0 ATP 合成酶研究中发现 α 、 β 、 ϵ 、C I 和 C III 亚基是在叶绿体中编码并合成,而 γ 、 δ 和 C II 亚基是在胞浆中合成并转运(Jeffrey 等,1986)。本实验通过 Southern Blot 分析又一次证实了 *atpA* 基因来自于叶绿体,由叶绿体编码并合成。这为下一步 *atpA* 基因在盐藻 ctDNA 中的定位及全基因序列测定具有十分重要的指导意义。根据 BLAST 分析结果,本实验所得的核苷酸序列转化氨基酸后,

其氨基酸序列与莱茵衣藻、普通小球藻、*Mesostigma viride*、卵形肾藻和 *Cyanidioschyzon merolae* 叶绿体 *atpA* 基因氨基酸序列的同源性分别为 92%、88%、87%、86% 和 85%，从而推断该片段为盐藻叶绿体 *atpA* 基因片段，并且序列高度保守。利用 DNAtools 分析表明，此序列全部为编码区，不存在内含子。同时通过上述比较发现，盐藻与衣藻 *atpA* 基因的同源性最高，近一步说明二者有亲密的亲缘关系，提示衣藻的研究对转基因盐藻有着重要的参考价值。

atpA 基因在植物叶绿体中表达 ATP 合成酶的 α 亚单位，其在进化过程中有高度的保守性，并且 *atpA* 基因簇(包括 *atpA*、*psbI*、*cemA* 和 *atpH* 四个基因)共用一个强启动子。如果把盐藻本身的这个启动子克隆出来并用于其叶绿体表达载体中，无疑是保证转录起始活性的最直接而有效的方法。本实验所获得的盐藻叶绿体 *atpA* 基因片段，因为太小(405 bp，全基因约为 1.5 kb 左右)，因此不能解释该基因所有信息，但是通过本实验可进一步获得 *atpA* 全基因，为近一步克隆并分析该基因的启动子序列及构建盐藻高效叶绿体表达载体提供理论依据。

参考文献:

- J. 萨母布鲁克, D. W. 拉塞尔. 2002. 分子克隆实验指南[M]. 第3版. 北京: 科学出版社: 96—105.
- Brower V, Dorey E, Fox J, et al. 1999. Us study shows GM pros[J]. *Nat Biotechnol*, 17: 735—737.
- Drapier D, Suzuki H, Levy H. 1998. The chloroplast *atpA* gene cluster in *Chlamydomonas reinhardtii*; Fuction analysis of polycistronic transcription unit [J]. *Plant Physiol*, 117: 629—641.
- Fan GC(范国昌), Shan S(山松), Qian KX(钱凯先), et al. 1998. Research of genetic transformation in *Chlamydomonas* chloroplast(衣藻叶绿体遗传转化技术的研究)[J]. *Biotech (生物技术)*, 8(2): 1—4.
- Fietto J L, de Marco R, Verjovsk-Almeida S. 2002. Use of degenerate primers and touchdown PCR for construction of cDNA libraries[J]. *Biotech*, 32: 1 404—1 408, 1410—1411.
- Hou BK(侯丙凯), Yu HM(于惠敏), Xia GM(夏光敏). 2002. Expression vector used in chloroplast genetic transformation (用于叶绿体遗传转化的表达载体)[J]. *Hereditas(遗传)*, 24(1): 100—103.
- Jeffrey P, Woessner, Nicholas W, et al. 1986. The sequence of the chloroplast *atpB* gene and its flanking region in *Chlamydomonas reinhardtii*[J]. *Gene*, 44: 17—28.
- Staub J M, Garcia B, Graves J, et al. 2000. High-yield production of a human therapeutic protein in tobacco chloroplasts [J]. *Nat Biotechnol*, 18: 333—338.



《中国长白山观赏植物彩色图志》是由中国工程院陈俊愉院士和中国科学院洪德元院士做序，中国工程院陈俊愉院士主审，中国工程院方智远院士(中国园艺学会理事长)做书评；由吉林人民教育出版社出版；吉林省通化师范学院生物系的周繇教授、朱俊义教授，药学系的于俊林教授及中国科学院植物研究所的徐克学研究员，历经二十五年，完成了迄今为止第一部反映长白山野生观赏植物的大型志书(100万字，550页，生态照片1248张，收录植物104科、332属、609种、42变种、9变型，精装本，大十六开，铜版纸印刷，重3kg)。

全书内容详细全面，章节编排合理，设计新颖科学，根据植物具体的园林用途分为园景树类、行道树类、庭荫树类、垂直绿化类、绿篱类、花坛类、花境类、地被类、水景类、岩生类等。书后还附有精美的观赏植物园林用途和观赏类型汇总表及中文和拉丁文索引，便于广大读者的查阅和使用。

全书科学性强，植物名称鉴定正确、文字严谨，系统翔实介绍了每一种植物的中名、拉丁名、别名、形态特征、生境、分布、园林用途、繁殖方法及主要经济价值等。

全书图片清晰生动(有80余张照片做了《园林》、《中国花卉园艺》、《中草药》、《生物学通报》、《中国野生植物资源》等刊物的封面、封底和中间的插页)，每种观赏植物既有整体景观，又有重要部位的特写镜头。

该书既可作为国内外研究长白山区野生观赏植物的重要参考文献，又可以作为农林院校的教学用书，还可以作为高等植物野外实习的重要参考资料，同时也可供花卉爱好者收藏。

定价: 680元(可开正式发票, 不另加邮费); 联系人: 周繇, 黄杰; 联系地址: 吉林省通化师范学院生物系, 邮编: 134002; 联系电话: 0435-3209685(宅), 0435-3208073(单); 手机: 13843593766, 13943598785; E-mail: bszhouyou@163.com, bszhou@sohu.com; 银行帐号: 2161750010200022664, 户名: 周繇。