巴氏杜氏藻八氢番茄红素合成酶侧翼调控序列的克隆与分析

唐春晖，劳永民，姜建国

（华南理工大学生物科学与工程学院，广东广州 510006）

摘要：研究表明八氢番茄红素合成酶（PSY）是巴氏杜氏藻（*Dunaliella bardawil*）类胡萝卜素代谢途径中的第一个关键调节酶。本实验采用基于 LA-PCR 的基因组步移法分别设计两组基因特异引物 pSP1-3 及 tSP1-3，克隆巴氏杜氏藻 PSY（DbPSY）的启动子和终止子序列，并利用在线启动子分析软件分析其保守调控序列。最后利用生物信息学方法分析预测 DbPSY 的蛋白质结构。分析结果表明，DbPSY 启动子具有两个保守调控序列：BOXLCOREDCPAL 和 GT1GMSCAM4，其中 BOXLCOREDCPAL 受紫外光诱导，上调下游基因的表达，GT1GMSCAM4 受盐调控，促进下游基因的表达。蛋白结构分析表明，DbPSY 的 N 端在邻近物种间具有较大的多样性。我们推测 DbPSY 的微调与启动子保守序列及蛋白质 N 端序列的多样性相关。

关键词：八氢番茄红素合成酶；巴氏杜氏藻；基因组步移；启动子；保守调控序列

文章篇号：1673-9078(2012)3-270-273

In silico Analysis of Phytoene Synthase and its Promoter Reveals Hints for Regulation Mechanisms of Carotenogenesis in *Duanliella bardawil*

TANG Chun-hui, LAO Yong-min, JIANG Jian-guo

(School of Bioscience and Bioengineering, South China University of Technology, Guangzhou 510006, China)

Abstract: Previous researches showed that phytoene synthase (PSY) is the first regulatory point in carotenogenesis in *Dunaliella bardawil*. In this study, two sets of adjacent gene specific primers (pSP1, pSP2 and pSP3; tSP1, tSP2 and tSP3) were designed and LA PCR-based genomic walking approach was performed for isolation of psy promoter and terminator in *D.bardawil*, respectively; and subsequent analysis of conserved regulatory sequences were conducted by online promoter analysis softwares. Finally, using bioinformatics methods, the protein structure of DbPSY was also predicted. The calculated results found two conserved regulatory sequences in PSY promoter: BOXLCOREDCPAL and GT1GMSCAM4. BOXLCOREDCPAL was induced by UV to up-regulate expression of downstream gene; and GT1GMSCAM4 up-regulates expression of downstream gene induced by NaCl. Protein structure analysis demonstrated low homology of N-terminus between *D. bardawil* and other algae. Therefore we speculated the regulation mechanisms may partly involve in the conserved sequences of psy promoter and the diversity of N-terminus of DbPSY compared to other species.

Key words: phytoene synthase; *Dunaliella bardawil*; genomic walking; promoter; conserved regulatory sequence

巴氏杜氏藻（*Dunaliella bardawil*）简称巴氏藻，是生产 β-胡萝卜素的最佳天然来源之一，至今已有大量关于巴氏藻积累 β-胡萝卜素和八氢番茄红素的研究，发现高强度 UV-A、微碱性、低盐度和适中的 $NaNO_3$ 利于 β-胡萝卜素的大量积累[1,2]；而 UV-B 及其他光漂白化合物可促进八氢番茄红素的合成[3]。然而，这些研究仅局限于生化水平的培养条件优化，并没有探究巴氏藻胡萝卜素积累的分子机制。

杜氏藻属（*Dunaliella*）类胡萝卜素代谢途径是由两个（GGPP）分子通过八氢番茄红素合成酶（PSY）作用合成八氢番茄红素，接着通过四个去饱和反应转换成番茄红素，随后经过两个环化步骤生成 β-胡萝卜素。研究表明，PSY 是控制碳源流向类胡萝卜素合成的第一个关键酶[4,5]。目前，已克隆部分类胡萝卜素代谢基因用于植物和微藻类胡萝卜素生物合成的调控机制研究。然而，这些研究仍局限于分子克隆和表达分析，巴氏藻的 *psy* 基因甚至仅仅进行了克隆。

巴氏藻类胡萝卜素代谢的调控是多水平的交互作用过程，包括 DNA 水平、RNA 水平及蛋白质水平[9]。我们推测，环境胁迫因子与 DbPSY 的调控序列相互作用，确切地说，与 PSY 启动子保守调控基序及部分关键氨基酸序列相互作用。本实验采用基于 LA-PCR 的基因组步移克隆得到 DbPSY 的启动子和终止子，

收稿日期：2011-12-02

并利用几种生物信息学软件预测并分析其调控序列，最后根据氨基酸序列预测 DbPSY 的蛋白质结构并进行系统发育进化分析，试图从 DNA 及蛋白质水平上研究 DbPSY 的分子调控机理。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 藻种

巴氏杜氏藻（*Dunaliella bardavil*）购于中国科学院水生生物研究所（武汉），由本实验室保存。用 2.0 M NaCl 培养基，26 ℃液体下培养，光暗比 14:10。

1.1.2 菌种与载体

大肠杆菌宿主 GT116 由实验室保存。克隆载体 pCR 2.1 购自 Invitrogen 公司。

1.1.3 主要工具酶及试剂

基因组提取试剂盒 Universal Genomic DNA Extraction Kit Ver.3.0，RT-PCR 试剂盒 RNA PCR Kit (AMV) Ver.3.0，基因组步移 Genome Walking Kit 及各种 PCR Enzymes 和 DNA Markers 购自 TaKaRa 公司；RNA 提取试剂盒 E.Z.N.A.^{TM} Total RNA Kit II、胶回收试剂盒 E.Z.N.A.^{TM} Gel Extraction Kit 为 Omega 公司产品。

1.2 PSY cDNA 序列验证

根据 NCBI 登陆的 DbPSY mRNA 序列（GenBank：EU328287.1）设计两对重叠 PCR 引物，验证基因组步移模板序列（表 1）。

表 1 本实验所用引物

Table 1 Primers used in this study

Procedure	Primer	Primer sequence
PCR	Dbpsy-F	ATGGCACAGCGAACAGCAACTTCCTCCTCCTCCTCTCCTAGCATCA
	Dbpsy-inR	GCCTGAGGCGTGATCTTTGA
	Dbpsy-inF	GCATCAAAGATCACGCCTCAG
	Dbpsy-R	TTATTTGTTCTTGGGCACCAAG
Genomic walking	pSP1	CGAGGTAGAAGGTCTTGGCGTA
	pSP2	GGCACTGACTGAGCGGTCTTTA
	pSP3	CTGCTCTGCGACTACCATTCCT
	tSP1	AATGCCCAAAGCAGAAGACAGG
	tSP2	CACACTACCCTTGGTGATGTCTTG
	tSP3	AGACTGGCTGCCGTTTCCTGAT
Sequence validation	Ptest For	AACAATGCCACCAATACC
	Ttest Rev	CGACGGATGACTGATTACGC

注：Dbpsy-inR 和 Dbpsy-inF 重叠 PCR 引物，重叠部分用粗斜体表示。

利用 E.Z.N.A.^{TM} Total RNA Kit II 试剂盒从 6 mL 处于对数生长期的藻液中提取总 RNA，然后根据 RNA PCR Kit（AMV）ver.3.0 操作说明，以 Oligo dT-Adaptor Primer 为引物，反转录生成 cDNA 第一条链，分别以两对引物（Dbpsy-F 和 Dbpsy-inR；Dbpsy-inF 和 Dbpsy-R）进行 PCR。反应条件如下：95 ℃，5 min；94 ℃，45 s，60℃，45 s，72 ℃，1 min，进行 35 个循环。所得片段与 pMD19 T 载体连接，转化大肠杆菌 GT116 感受态，菌落 PCR，挑取阳性克隆送商业测序。

1.3 基因组步移克隆 DbPSY 启动子和终止子

根据 PSY 的基因组序列（GenBank：EU328288.1）设计两组基因特异引物：pSP1、pSP2、pSP3 和 tSP1、tSP2、tSP3 分别克隆 *psy* 启动子与终止子。基因组提取按照产品说明使用 Universal Genomic DNA Extraction Kit Ver.3.0。利用 Genomic Walking Kit 进行基因组步移，分别获取 DbPSY 的启动子和终止子，初始巢式 PCR 产物稀释 100 倍作为后续巢式 PCR 模板，其他操作参照试剂说明书。并分别用 Ptest For、pSP3 及 tSP3、Ttest Rev 验证得到的疑似启动子和终止子序列。所得序列用序列分析软件 Blast Software（http://www.ncbi.nlm.nih.Gov/blast）、启动子结构预测软件 PlantPAN（http://plantpan.mbc.nctu.edu.tw/）、转录调控起始位点（TSS）CorePromoter program（http://rulai.cshl.org/tools/genefinder/CPROMOTER/）、终止子扫描程序 Poly（A）Signal Miner（http://dnafsminer.bic.nus.edu.sg/）和 RibEx（http://132.248.32.45/cgi-bin/ribex.cgi）进行分析。

1.4 生物信息学分析及系统发育树构建

NCBI 保守结构域搜索工具 CDD（http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi）分析 DbPSY 保守结构域，3D-JIGSAW（http://bmm.cancerresearchuk.org/~3djigsaw/）绘制 3D

结构模型，利用 Clustal X 1.83 软件对邻近物种 PSY 进行多重序列比对分析，使用 MEGA 4.0.2.软件并采用邻接法进行系统发育进化树构建。

2 结果分析

2.1 DbPSY 全长 cDNA 序列的克隆和分析

NCBI 上收录的 *psy* 序列至今仍未被验证序列正确性，因此进行基因组步移前需对序列进行验证，利用重叠引物：Dbpsy-F/inR 和 Dbpsy-inF/R，进行 RT-PCR 分别得到 555 bp 和 741 bp 序列，测序并拼接后得到完整的 DbPSY 序列，与 NCBI 收录的序列一致（GenBank：EU328287.1），间接确证步移模板（GenBank：EU328288.1）的正确性（如图 1a）。

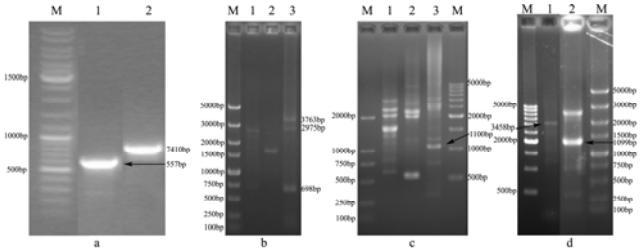


图 1 分离巴氏藻 psy 启动子与终止子

Fig.1 Isolation of promoter and terminator of psy gene in D. bardawil

2.2 DbPSY 启动子和终止子的克隆

从第三次巢式 PCR 中回收到 3 条启动子候选片段（图 1b）。序列分析发现 3763 bp 片段与 2975 bp 片段均与 DbPSY 已知序列 5’端存在 130 bp 的重叠，并且 3763 bp 片段包含 2975 bp 片段。同理，终止子步移得到的 1154 bp 片段（图 1c）与已知 DbPSY 3’端存在 184 bp 的重叠区域。琼脂糖凝胶电泳及测序结果进一步确证得到的疑似启动子和终止子序列（图 1d）。以上结果表明获得的序列分别是 DbPSY 的上游和下游 UTR 序列。

2.3 DbPSY 启动子和终止子的生物信息学分析

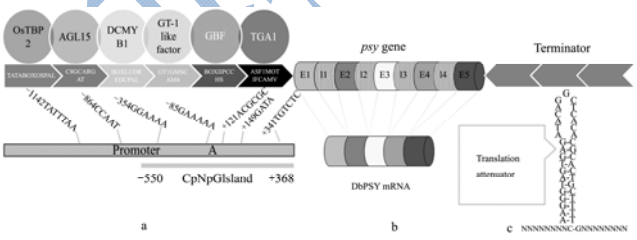


图 2 包含启动子与终止子的 psy 全长基因结构

Fig.2 Structure of full-length genomic DNA of *psy* including promoter and terminator

NCBI blast 序列分析证实所得序列 5’端和 3’端与 psy 基因具有高度的同源性；CorePromoter 检测到转录起始位点在 ATG 上游-370 位点，如图 2a 中“A”所示。

选定 5 个物种（Arabidopsis，Maize，Rice，Tomato 及 other），利用 PlantPAN 在线服务器检索转录因子结合位点。结果表明启动子序列含有多个植物特有的保守基序（图 2a），如+149 位的 GATA 盒。真核生物普遍存在的 CCAAT 盒，CGCG 盒（−344 位，共有序列为 GCGCGC 和+121 位，共有序列为 ACGCGC）。另外还发现一些调控元件，比如位于+341 位，参与 IAA 调控的 AFRAT，其共有序列为 TGTCTC[6]，光调节元件 G 盒（−28 位）和 ASF-1 结合位点（+102 位），等等。值得注意的是，还发现两个不寻常的基序：box-L-like 核心序列（−491 位，又名 BOXLCOREDCPAL，图 2a）和 GT-1 样基序（−85 位及−2606 位）。研究表明，在包括 *Daucus carota* 的众多物种中，紫外光可以促进类胡萝卜素积累[7]，而 *Daucus carota* 类胡萝卜素代谢基因中发现含有受紫外调节的 BOXLCOREDCPAL，因此 *D.bardawil* 可能也具有此类调节功能。GT-1 box（also called GT1GMSCAM4，图 2a）可能与启动子的病原及 NaCl 诱导表达有关[8]。

Signal Miner 和 RibEx 分析均没发现 DbPSY 终止子具有典型 poly A 信号，然而 RibEx 分析发现在 *psy* 的最后一个内含子中存在一个反向的翻译衰减子，位于终止密码子上游 322 bp 处，如图 2c 所示。重新克隆分析终止子结果一样（数据未列出），说明我们没有得到正确的 *psy* 终止子或者 *psy* 本身没有典型的 poly A 信号。

2.4 DBPSY 保守结构域

NCBI 保守结构域分析表明 DbPSY 具有 IPPS 合成酶（trans-Isoprenyl Diphosphate Synthases），该酶包括鲨烯合成酶及八氢番茄红素合成酶，因此 DbPSY 属于 IPPS 家族和 I 型环化酶。具有 6 个保守结构域：底物结合位点、Mg^{2+}结合位点、活性位点残基、催化残基、两个富含天冬氨酸位点（171-DELVD-175，297-DVGED-301）。与鲨烯合成酶不同的是，PSY 催化活性不需要 NADPH。两个富含天冬氨酸基序可能与保守结构域的其他 Tyr、Phe 一起参与缩合反应。

2.5 DbPSY 的同源性分析及系统发育树分析

ClustalX 分析表明，尽管 PSY 的 N 端在物种间变异较大，其 C 端的 Trans_IPPS_HH 结构域却高度保守。BlastP 分析显示 DbPSY 蛋白序列与 *Dunaliella salina* 高度同源，相似度达 87%，一致性达 79%，与 *H. pluvialis* 分别为 69%和 81%，*C. reinhardtii* 分别为 69%和 81%，*A. thaliana* 分别为 55%和 69%。除与蓝细菌的一致性为 40~42%外，DbPSY 与原核生物的相

似性较低。

利用 MEGA 4.0.2 软件采取邻接法（Tamura et al.，2007）绘制系统发育树，PSY 可归为三类，I 类为高等植物，II 类为绿藻属，III 类为细菌，结果与 DNA 序列分析一致，表明绿藻属间 PSY 具有较近的进化亲缘关系。

3 讨论

3.1 环境压力能引起 β-carotene 的大量积累，这预示多种类胡萝卜素的表达调节存在一种共有模式。本文研究发现 DbPSY 启动子中含有与胡萝卜（*Daucus carota*）DcPAL1 启动子保守序列同源的基序 BOXLCOREDCPAL（图 2），在 UV-B 处理的胡萝卜中，该基序参与 DcMYB1 介导的 DcPAL1 上调作用。UV-B 和 norglurzon 可能通过 DbPSY 启动子内的 BOXLCOREDCPAL 诱导 photobleaching。*DbPpsy* 启动子可能受与 photobleaching 作用相似的 UV-B 和 norflurazon 的调节促进类胡萝卜素而不是 β-胡萝卜素的积累。

3.2 类胡萝卜素基因中可能也存在与盐和光诱导 β-积累相关的调控区域。*Dbpsy* 启动子中发现两个广泛存在于光调控基因中的 GT-1-like boxes[8]。我们推测 *D.bardawil* 中 GT1CONSENSUS（GAAAAA，position−354）具有介导 TFIIA 和 GT-1-like 因子相互作用的功能：TFIIA 通过 GT1CONSENSUS 与 GT-1-like factors 相互作用而实现光诱导促进 β-胡萝卜素的积累。另外一个 GT-1-like 因子在黑豆中参与 SCaM-4 in 盐诱导的表达调控（图 2，GT1GMSCAM4），因此 DbPSY 启动子中 GT1GMSCAM4 可能具有与黑豆中 GT-1-like 因子底物相似的功能，即调节 psy 基因盐诱导的 β-胡萝卜素的积累。

3.3 为了进一步阐述 DbPSY 的调控机制我们进行了一系列的蛋白信息学水平的分析，蛋白质高级结构分析表明保守的 C 端存在可能的底物结合位点，100aa 至 400aa 为催化活性区域。系统发育树分析发现 DbPSY 与绿藻 PSY 归为一类（图 4）。这些结果暗示绿藻 PSY 可能具有类似的调控机制，且与 C 端保守性密切相关。另外，相似物种蛋白序列分析表明 N 端具有多样性，因此，PSY 的微调机制可能与其 N 端的变异有关。

3.4 巴氏杜氏藻和杜氏盐藻被认为是商业生产 β-胡萝卜素的最佳天然来源，它们在环境压力如高光照、高盐度、低温度、低营养条件下能大量积累 β-胡萝卜素。至今，只有少数直接参与类胡萝卜素代谢的酶得到研究，PSY 便是其中之一，但它在巴氏杜氏藻中的功能机制并未得到深入研究，本文获得 DbPSY 的调控序列进一步解释了 PSY 表达调控和 β-胡萝卜素积累的机制。另外 PSY 蛋白结构分析有利于进一步阐述不同种之间 PSY 调控差异甚至类胡萝卜素代谢途径的差异。在以往研究的基础上，PSY 的调节机制和类胡萝卜素代谢途径的研究从 DNA 水平到转录调控将进一步得到完善，甚至可能发现巴氏杜氏藻 PSY 基因因其调节元件和蛋白结构的特异性而不同于其他绿藻类的一种新的调节机制。

参考文献

[1] Mogedas B. et al. Beta-carotene production enhancement by UV-A radiation in *Dunaliella bardawil* cultivated in laboratory reactors [J]. J Biosci Bioeng, 2009, 108: 47-51

[2] Muthukannan P. et al. In vitro evaluation of β-carotene production in two different strains of *Dunaliella salina Teodoresco* (Chlorophyta) [J]. J Biosci Res, 2010, 1: 83-87

[3] Salvini M. et al. cDNA cloning and expression of the phytoene synthase gene in sunflower [J]. J Plant Phy, 2005, 162: 479-484

[4] Shewmarker C K. et al. Seed specific overexpression of phytoene synthase: increase in carotenoids and other metabolic effects [J]. Plant J, 1999, 20: 401-412

[5] Yan Y. et al. Cloning and sequence analysis of the phytoene synthase gene from a unicellular chlorophyte, *Dunaliella sanlia* [J]. J Agric Food Chem, 2005, 53: 1466-1469

[6] Xue L. et al. Effects of enhanced ultraviolet-B radiation on algae and cyano-bacteria [J]. Crit Rev Microbiol, 2005, 31: 79-89

[7] Salguero A. et al. UV-A mediated induction of carotenoid accumulation in *Dunaliella bardawil* with retention of cell viability [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2005, 66: 506-511

[8] Park H C. et al. Pathogen- and NaCl-induced expression of the SCaM-4 promoter is mediated in part by a GT-1 box that interacts with a GT-1-like tran-scription factor [J]. Plant Physiol, 2004, 135: 2150-2161

[9] Terzaghi W B, Cashmore A R. Light-regulated transcription [J]. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol, 1995, 46: 445-474