

巴氏杜氏藻番茄红素 β -环化酶基因的克隆及其启动子的活性分析

姜建国¹, 陆燕², 劳永民³

(1. 华南理工大学轻工与食品学院, 广东广州 510006) (2. 华南理工大学生物科学与工程学院, 广东广州 510006)

摘要: 杜氏盐藻是迄今为止工业化生产 β -胡萝卜素最成功的经济微藻之一, 番茄红素 β -环化酶(LycB)是催化番茄红素合成 β -胡萝卜素的关键酶。本研究根据实验室克隆得到的LycB的cDNA序列, 通过分析其保守序列设计引物, 通过分段克隆PCR及基因组步移的方法, 克隆获得几乎完整的LycB基因组序列。测序结果表明, 克隆到的该部分LycB基因组序列含有5863 bp, 由11个外显子和10个内含子组成。再通过基因组步移的方法, 获得LycB基因启动子和终止子序列。其中, 5'端上游序列长度为2566 bp, 3'端下游序列长度为818 bp。采用PlantPAN在线启动子预测工具进行分析, 结果表明, 该基因启动子含有一些顺式作用元件如光响应元件、盐响应元件等, 表明巴氏杜氏藻LycB基因的表达可能受到光照及盐浓度等因素的调控。

关键词: 巴氏杜氏藻; 番茄红素 β -环化酶(LycB)基因; 启动子; 终止子

文章编号: 1673-9078(2013)7-1496-1500

Cloning of Lycopene β -Cyclase Gene and Activity Analysis of its Promoter from *Dunaliella bardawil*

JIANG Jian-guo¹, LU Yan², LAO Yong-min³

(1. College of Light Industry and Food Sciences, South China University of Technology, Guangzhou 510006, China)

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

Abstract: The unicellular green alga *Dunaliella bardawil* has been successfully used for natural production of β -carotene. Lycopene β -cyclase (LycB) is one of the key enzymes for the synthesis of β -carotene, which can catalyze lycopene to form β -carotene. In this research, based on the full-length sequence of LycB cDNA of *D. bardawil* previously cloned by our group, primers were designed and genomic sequence of LycB were isolated by analysis of the conserved region of LycB gene from other species in database and by using the approach of PCR with genome walking techniques. Sequence results showed that nearly full-length of LycB genomic sequence of 5863 bp was achieved, which included 11 exons and 10 introns. Then, two sets of primers were designed according to the LycB genomic sequence. The promoter and terminator of LycB were obtained using genome walking techniques. Based on the analysis of PlantPAN, some cis-acting elements such as light-induced responsive element and salt-induced responsive element were predicted in promoter sequence, implying that the LycB gene expression may be regulated by light and salt.

Key words: *Dunaliella bardawil*; Lycopene β -cyclase (LycB); promoter; terminator

β -胡萝卜素是一种典型的类胡萝卜素, 具有抗脂质过氧化损伤及提高免疫的能力, 对某些慢性病的治疗效果非常显著, 是人体不可缺少的重要化合物, 已广泛应用于医药、保健品及动物饲料等生产, 越来越受到研究人员的重视。

巴氏杜氏藻(*Dunaliella bardawil*), 简称盐藻, 是商业生产 β -胡萝卜素的最成功的微藻之一, 在适当的条件下, 能大量积累 β -胡萝卜素, 最高可达到细胞

干重的14%^[1], 远远高于其它生物体内的含量。

巴氏杜氏藻体内 β -胡萝卜素的积累, 与代谢途径中的酶是密切相关的, 究其根本原因, 是由代谢途径中的关键酶基因决定的。通过控制这些关键酶基因的分子生物学应用操作, 是一种正向调控手段。如Steinbrenner和Sandmann(2006)研究发现, 通过PSY过量表达可显著提高藻类中的类胡萝卜素含量^[2]。因此, 克隆巴氏杜氏藻体类胡萝卜素代谢途径中的关键酶基因意义是非常重大的, 本实验室之前已克隆PSY(八氢番茄红素合成酶)及PSY^[3](八氢番茄红素合成酶), ZDS^[4](ζ -胡萝卜素脱氢酶)等基因, 并进行

收稿日期: 2013-03-25

基金项目: 国家自然科学基金项目(31171631)

作者简介: 姜建国(1964-), 男, 博士, 教授, 生物化学与分子生物学

了序列分析和功能性验证。

番茄红素的环化反应是藻类体内类胡萝卜素合成的一个重要分支点,番茄红素 β -环化酶(*LycB*)是直接催化番茄红素转化成 β -胡萝卜素的关键酶^[5]。本实验中,以巴氏杜氏藻(*D. bardawil*)为研究对象,利用实验室已经克隆得到的*D. bardawil*的*LycB*基因cDNA序列,对其氨基酸保守序列进行分析,利用*LycB*cDNA保守序列设计引物,并结合染色体步移的方法,克隆*LycB*基因组DNA序列;利用染色体步移技术扩增已知*LycB*编码区序列的侧翼调控序列;利用生物信息学工具分析*LycB*基因,包括*LycB*基因组DNA序列的组成、启动子转录起始位点的预测及其转录因子结合位点的分析等,为研究累积 β -胡萝卜素的特殊机理奠定了分子生物学基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验用的藻种

实验用的巴氏杜氏藻(*Dunaliella bardawil*)购买于中国科学院水生生物研究所(武汉),现由实验室保存,培养于200 mL液体盐藻培养基,26℃,光暗比为14:10的条件下^[6-7]。

1.1.2 克隆用的菌种与载体

克隆用宿主菌为E.coli GT-116,由实验室保存;克隆载体为PCR 2.1 vector,购于Invitrogen公司。

1.1.3 主要试剂及工具酶

基因组提取试剂盒 Universal Genomic DNA Extraction Kit Ver.3.0,基因组步移试剂盒 Genome Walking Kit,连接试剂盒 DNA Ligation Kit Ver.2.0,以及各种PCR Enzymes和DNA Markers(TaKaRa公司);胶回收试剂盒 E.Z.N.A.TM Gel Extraction Kit,核酸纯化试剂盒 E.Z.N.A. Cycle-PureKit、质粒提取试剂盒 E.Z.N.A.TM Plasmid Mini Kit(Omega公司);TA克隆载体 PCR 2.1 Vector(Invitrogen公司);其他的一些常规试剂及药品均为分析纯,购自于广州华鑫化工有限公司等公司。

1.2 实验方法

1.2.1 巴氏杜氏藻基因组的提取

以处于对数生长期的巴氏杜氏藻为材料,提取基因组DNA。具体提取基因组的步骤参照 TaKaRa Universal Genomic DNA Extraction Kit Ver.3.0 试剂盒说明书。

1.2.2 *LycB* 基因组 DNA 的克隆

(1) 引物设计

用 clustalX 软件比对 *LycB* 基因对应的氨基酸序

列,由此得到一些相对保守的区域。并与之前实验室已获得的 *LycB* cDNA 序列进行分析对比,找出对应的保守的cDNA序列,设计引物。实验采用分段PCR的方法,根据保守序列设计的引物先得到编码区的一段序列,然后再根据该项序列和cDNA序列设计引物扩增两端序列,并结合染色体步移的方法,最终获得几乎全长的基因组DNA序列。本实验一共设计了5对引物,克隆得到5段片段,引物设计如表1。

表1 获得编码区序列的引物设计

Table 1 Primer design for getting the coding sequence

片段命名	引物名	引物序列
L1	CR-1S	5'-"CTGCTCCCATCGCAGCAGCCTTAC"-3'
	CR-1A	5'-"GCAAACGCACAGGACAACCTCGC"-3'
L2	CR-2S	5'-"GCCCAAGCCAAGGTCTGGCTGGA"-3'
	CR-2A	5'-"AACAGCATTGTGTCCAGCTCAA"-3'
L3	CR-3S	5'-"GCACCTCCACTGTGACCCT"-3'
	CR-3A	5'-"CTGAGGATCAAACCTATTGAG"-3'
L4	L4-SP1	5'-"GACCTCCGCAAAAAATGGAAGTT"-3'
	L4-SP2	5'-"GCAGGGAAACATCTCAACTTAGGG"-3'
	L4-SP3	5'-"ATGCCTGCCGTCCCTCCAA"-3'
L5	CR-5S	5'-"GGTGACTAAGGTGGAGGATGA"-3'
	CR-5A	5'-"AACAGCATTGTGTCCAGCTCAA"-3'

(2) *LycB* 基因分段 PCR 分应

实验中采用基因分段克隆的方法(表1),即根据cDNA保守序列设计第一对引物,克隆得到基因组DNA序列的一段序列,然后根据该序列和cDNA序列设计引物向两端扩增,并结合基因组步移的方法。本实验共克隆得到5个相互重叠的DNA片段,经拼接后最终得到*LycB*基因组DNA序列。

(3) PCR 产物的回收和测序

采用Omega公司的E.Z.N.A. TM Gel Extraction Kit对PCR产物进行回收和纯化,操作方法参照说明书。将回收得到的目的片段与PCR 2.1 Vector在16℃下进行连接反应,并将连接产物转化E.coli GT116感受态细胞,在含有Amp的LB平板上涂板并进行抗性筛选。挑取单菌落进行菌落PCR来鉴定阳性克隆,经扩大培养后,送给上海英竣公司进行测序。

1.2.3 *LycB* 基因 5' 及 3' 侧翼序列的克隆

采用基因组步移法扩增巴氏杜氏藻*LycB*基因未知的5'和3'侧翼序列。

(1) 步移特异性引物的设计,设计原则和原理参照 TaKaRa Universal Walking Kit 试剂盒说明书。设计的引物参见表2。

表 2 克隆巴氏杜氏藻 *LycB* 基因启动子和终止子所用特异性引物

Table 2 Primers used in Genome Walking for cloning promoter and terminator

克隆序列名称	引物名称	引物序列
启动子	P-SP1	5'-GGATGGTGGCTTCCTATTGGTTTGC-3'
	P-SP2	5'-AAATAAGGGGTCTCTGGCTTCTGC-3'
	P-SP3	5'-CGGAATGCGTCACACTGAGAGG-3'
终止子	T-SP1	5'-TAGGCATCCCAGGTAGGGCACATC-3'
	T-SP2	5'-GAGTGAGCAATCGCTTTCAGTT-3'
	T-SP3	5'-CTCCTGTTGTTGGGTCCGCT-3'

(2) 5'及3'侧翼序列的PCR扩增

以试剂盒提取的巴氏杜氏藻基因组为模板, 采用 P-SP1 和 AP 引物(试剂盒原配的特异性引物)、T-SP1 与 AP 引物分别进行第 1 轮 PCR 反应, 反应体系和反应条件参照说明书。

第 2 轮 PCR 反应: 对第 1 轮反应液进行 50~100 倍的稀释, 采用 P-SP2 和 AP 引物、T-SP2 与 AP 引物进行第 2 轮 PCR 反应。反应体系和反应条件参照说明书。

第 3 轮 PCR 反应: 操作同第 2 轮反应, 采用 P-SP3 和 AP 引物、T-SP3 与 AP 引物进行第 3 轮 PCR 反应。

PCR 产物回收与测序。

1.2.4 序列分析

利用 NCBI 数据库中的 BLAST 在线分析工具对克隆得到的 *LycB* 基因组 DNA 序列及侧翼序列进行同源比对分析。采用在线工具 PlantPAN 对启动子序列进行调控元件的预测与分析。

2 结果与讨论

2.1 基因组的提取结果

基因组的提取结果, 见图 1。

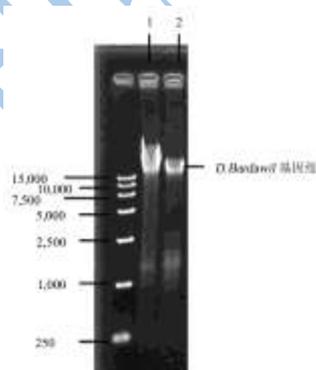


图 1 *D. Bardawil* 基因组 DNA

Fig.1 Genomic DNA of *D. Bardawil*

利用 Takara 基因组提取试剂盒提取杜氏藻基因组

DNA, 结果如图 1, 第 2 道的基因组含量高, 条带单一, 而且非常的清晰, 无明显的拖尾现象。杜氏藻基因组 DNA 的纯度和质量决定了 *LycB* 基因组 DNA 序列及其上、下游序列的克隆。

2.2 *LycB* 基因的拼接和测序

通过分段 PCR 并结合染色体步移的方法克隆得到几乎完整的 *LycB* 基因组 DNA 序列。如图 2 示, 其中红色部分为重叠序列, 通过分段 PCR 共克隆得到 5 段相互重叠的序列。其中, L2、L5 片段的克隆, 根据 clustalx 比对结果, 同时设计了两对引物, 以 *D.bardawil* 基因组为模板, 经过常规 PCR 扩增反应, 分别得到两段序列。L4 片段的克隆, 是根据已克隆得到的 L5 片段为模板设计引物, 通过基因组步移的方法克隆得到的。L1、L3 片段的克隆, 分别根据获得的 L2、L4 片段及保守序列设计引物, 经过常规 PCR 扩增反应分别获得。



图 2 分段克隆并拼接后获得的 *LycB* 基因组 DNA 序列

Fig.2 Genomic DNA of *LycB*

根据 5 个片段的测序结果对 5 个片段进行拼接, 获得 *LycB* 基因组 DNA 序列。该序列长为 5863 bp, 含有 11 个外显子和 10 个内含子; 经与 cDNA 序列比对后, 其中, 外显子长度为 1585 bp, 内含子长度为 4278 bp。分段克隆得到的基因组 DNA 序列如图 2。

2.3 *LycB* 基因 5'及3'侧翼序列的克隆

(1) 5'侧翼序列的克隆和分析: 经三次 PCR 扩增反应后克隆得到的基因片段大小约为 2.5 bp。如图 3 所示, 第 3 轮 PCR 中, 得到大小分别为 2.8 kb、1.6 kb、1.1 kb, 分别对这三条条带进行切胶回收, 经测序后得知, 1.6 kb、1.1 kb 片段在 2.8 kb 片段上, 而且三条条带均与 *LycB* 基因组 DNA 序列的 5'端均有 108 个碱基的重叠, 正好为与设计特异引物时预测的重叠位置一致。

(2) 3'侧翼序列的克隆和分析: 经三次 PCR 扩增反应后克隆得到的基因片段大小约为 1.0 bp。如图 4 所示, 第 3 轮 PCR 中, AP2-tSP3 引物扩增的 PCR 产物得到两条非常清晰的条带, 预测其大小分别为 1.6 kb 和 1.0 kb。测序后, 经 blast 在线比对发现, 1.0 kb 片段的序列与 *LycB* 基因组 DNA 3'端有 219 个碱基的重叠, 1.0 kb 片段为 *LycB* 基因的 3'下游序列。

(3) 5'上游序列的生物信息学分析

本实验中, 对通过生物信息学在线软件对 *LycB* 基因启动子的转录因子结合位点进行预测和分析, 根据数据库分析显示的结果, 推测该启动子可能具有的

调控元件, 预测启动子的功能, 为后续对启动子功能的验证实验奠定基础。

对 *LycB* 序列进行启动子和顺式作用元件的预测和分析, 在 PlantPAN 在线分析软件序列框中输入 *LycB* 基因 5'侧翼序列, 选定拟南芥、豆、番茄、黄豆、马铃薯、烟草等六个物种及其它作为检索对象 (如图 5), 结果显示, *D. b LycB* 基因启动子含有与光响应元件、盐诱导调控元件, 及与磷酸盐饥饿相应基因上游区域结合位点 P1BS 等。表明巴氏杜氏藻 *LycB* 基因的表达可能受到光照、盐浓度及磷酸盐饥饿等因素的调控。

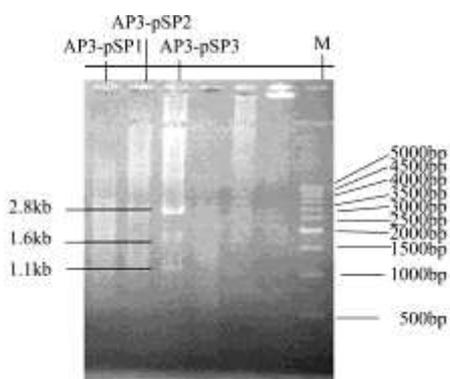


图 3 *D. Bardawil LycB* 基因启动子

Fig.3 Promoter of *D. Bardawil LycB*

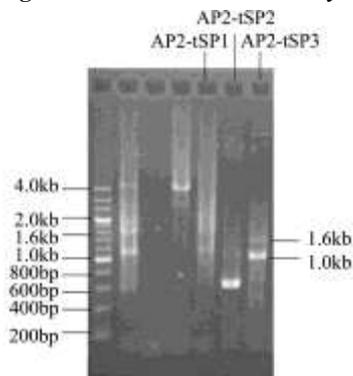


图 4 *D. Bardawil LycB* 基因终止子

Fig. 4 Terminator of *D. Bardawil LycB*

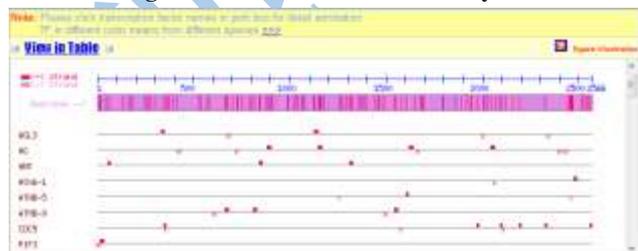


图 5 *LycB* 基因启动子转录因子结合位点分析图

Fig.5 TFBS analysis of promoter of *D. b LycB*

3 结论

3.1 杜氏盐藻在高光照、低温度、低营养条件下可以大量积累 β -胡萝卜素^[8], 最高可达到细胞干重的 14%,

究其原因, 是由其自身特殊的代谢途径决定的。番茄红素环化酶催化番茄红素合成 β -胡萝卜素的关键酶, 番茄红素的环化作用是类胡萝卜素生物合成途径中的一个关键分支点^[9-10], 对盐藻合成胡萝卜素具有重要作用。因此, 克隆番茄红素环化酶基因是非常有意义的。本实验以巴氏杜氏藻为研实验材料, 对 *LycB* cDNA 进行保守序列分析, 通过保守序列设计引物, 并用分段 PCR 的方法并结合染色体步移法, 扩增得到 *LycB* 基因组 DNA 序列。

3.2 除此之外, 利用染色体步移的方法可以有效获取与已知序列相邻的未知序列, 本实验设计特异引物, 分别克隆到 *LycB* 基因的 5'端上游及 3'端下游的侧翼序列。但是, 为了进一步了解 *LycB* 基因启动子的活性和功能, 我们需要确定转录起始位点的具体位置, 我们可以在接下来的实验中, 通过引物延伸实验进一步确定转录起始位点。

3.3 实验还通过在线生物信息学软件对其上游序列进行预测和分析, 发现该区域中含有某些顺式作用元件, 如我们推测的杜氏巴氏藻中的 GT1GMSCAM4 (GRWAAW, position-1367), 有相关报道^[11]在黄豆另一个 GT-1-like 因子参与 SCaM-4 in 盐诱导的表达调控, 因此启动子中的 GT1GMSCAM4 在巴氏杜氏藻中参与调节盐诱导 β -胡萝卜素的积累。为今后进一步研究启动子的活性和功能、及盐调控 β -胡萝卜素的机理奠定了基础。

参考文献

- [1] Lamers PP, Janssen M, Vos RCH, et al. Exploring and exploiting carotenoid accumulation in *Dunaliella salina* for cell-factory applications [J]. Trends in Biotechnology, 2008, 26: 631-638
- [2] Steinbrenner J, Sandmann G. Transformation of the green alga haematococcus pluvialis with a phytoene desaturase for accelerated astaxanthin biosynthesis, Applied and Environmental Microbiology [J]. 2006, 72: 7477-7484
- [3] Gabriela T O, Enamul H, Manuel R C. Direct regulation of phytoene synthase gene expression and carotenoid biosynthesis by phytochrome-interacting factors [J]. Proceeding of the National Academy of Sciences, 2010, 107(25): 11626-11631
- [4] Zhu Y H, Jiang J G, Yan Y, et al. Isolation and Characterization of Phytoene Desaturase cDNA Involved in the β -carotene Biosynthetic pathway in *Dunaliella salina*[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry [J]. 2005, 53: 5593-5597

- [5] 晏露,姜建国,刘冠楠,等.盐藻番茄红素 β -环化酶全长 cDNA 的克隆及结构分析[J].现代食品科技, 2010, 26(3): 218-221
Yan L, Jiang J G, Liu G N, et al. Cloning and Structure Analysis of the Full Length cDNA of Lycopene β -Cyclase from *Dunaliella salina* [J]. Modern Food Science and Technology, 2010, 26(3): 218-221
- [6] Ben-Amotz A, Avron M. The biotechnology of cultivating the halotolerant alga *Dunaliella* [J]. Trends Biotechnol, 2002, 18: 257-263
- [7] 周世水,姜建国,林炜铁,等.盐藻生长及其 β -胡萝卜素累积的作用因子和最适条件探讨[J].食品与发酵工业, 2002, 28(11): 1-3
Zhou S S, Jiang J G, Lin W T, et al. Discuss of Factor and Optimum Condition of *Dunaliella salina* for Growth and beta-carotene accumulation [J]. Food and Fermentation Industries, 2002, 28(11): 1-3
- [8] Raja R, Hemaiswarya S, Rengasamy R. Exploitation of *Dunaliella* for beta-carotene production [J]. Applied Microbiology Biotechnology. 2007, 74: 517-523
- [9] Christopher I, Cazzonelli B J, Pogson. Source to sink: regulation of carotenoid biosynthesis in plants [J]. Trends in Plant Science, 2010, 5(15): 266-274
- [10] Sandmann G. Molecular evolution of carotenoid biosynthesis from bacteria to plants [J]. Physiologia plantarum, 2002, 116: 431-440
- [11] Michael E, Ruckle L D, Burgoon L A, et al. Plastids are major regulators of light signaling in *Arabidopsis* [J]. Plant Physiology, 2012, 1(159): 366-390