

# 巴氏杜氏藻八氢番茄红素脱氢酶基因的克隆与分析

姜建国<sup>1</sup>, 陈善立<sup>2</sup>, 劳永民<sup>1</sup>

(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:** 八氢番茄红素脱氢酶 (PDS) 是巴氏杜氏藻 (*Dunaliella bardawil*) 类胡萝卜素生物合成途径中的上游关键酶。本研究根据 NCBI 上已发布的巴氏杜氏藻 mRNA 序列 (GenBank: Y14807), 设计特异性引物, 通过基因组步移法及半巢式 PCR 的方法, 获得 PDS 编码区序列。在编码区序列获取过程中, 发现 5' 端编码区有 325 bp 序列与 NCBI 上公布的 cDNA 序列有所不同, 故采用了 5' RACE 技术进行验证, 经过比对发现结果与本实验基因组步移所获得序列相匹配, 推测 NCBI 公布 mRNA 序列的 PDS 与本实验获取的 PDS 可能为同工酶。然后根据获得的序列, 再利用基因组步移 PCR 的方法获得其两端侧翼序列: 启动子和终止子, 并利用生物信息学工具对其进行分析。实验获得的完整 PDS 基因全长 12678 bp, 其中编码区序列长度为 8113 bp, 编码区上游序列 3010 bp, 编码区下游序列 1555 bp, 编码区序列含有 12 个外显子和 11 个内含子。通过生物信息学分析, 发现 PDS 启动子中具有多种转录因子结合位点。

**关键词:** 八氢番茄红素脱氢酶; 巴氏杜氏藻; 基因组步移; 巢式 PCR; 启动子

文章编号: 1673-9078(2013)8-1756-1760

## Cloning of Phytoene Desaturase Gene from *Dunaliella bardawil* and Promoter Activity Analysis

JIANG Jian-guo<sup>1</sup>, CHEN Shan-li<sup>2</sup>, LAO Yong-min<sup>1</sup>

(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:** Phytoene desaturase (PDS) is the upstream key enzyme of carotenoid metabolic process of *Dunaliella bardawil*. According to the mRNA that NCBI published before (GenBank: Y14807), the PDS coding region was obtained through genome walking and nesting PCR. Due to that 325 bp in 5' coding region were not matched with the mRNA published before, 5' RACE was used to validate the 5' sequences and the final result of 5' RACE was matched with the 5' sequences isolated. The sequence of promoter and terminator were also obtained by genome walking. The full length of PDS gene isolated included 8113 bp coding region (From ATG to TAA), 3010 bp upstream sequence of coding region and 1555 downstream sequence. 12 Exons and 11 introns were found in the cDNA ORF and coding region. Several kinds of transcription factor binding sites were predicted in the promoter of PDS by bioinformatic software.

**Key words:** phytoene desaturase; *Dunaliella bardawil*; genome walking; nested PCR; promoter

类胡萝卜素 (Carotenoids) 呈黄色, 红色或橙红色, 是由异戊二烯为基本单位的萜类化合物, 不溶于水, 溶于脂肪溶剂, 亦称脂色素。类胡萝卜素普遍存在于动物、高等植物、真菌、藻类中, 截止至 2008 年, 发现的类胡萝卜素的种类达到 600 多种。类胡萝卜素具有重要的生物学功能, 如抗氧化, 增强人体免疫系统, 延缓衰老, 抗癌防癌以及预防其他慢性疾病等。

八氢番茄红素脱氢酶 (PDS) 是植物类胡萝卜素代谢途径中的一个关键酶, 调控八氢番茄红素转化为  $\zeta$ -胡萝卜素 (如图 1)。若哒草伏和氟啶酮与 PDS 活性

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

位点结合后, PDS 将失去催化活性, 导致大量的八氢番茄红素积累, 从而影响类胡萝卜素的合成<sup>[1~2]</sup>。

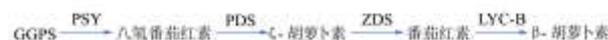


图 1 类胡萝卜素代谢途径

Fig.1 The metabolic pathway of carotenoid

目前, 一些植物以及微藻的 PDS 基因的 cDNA 序列陆续被克隆并研究。在番茄、柑橘、黄花龙胆、金盏菊等花或果实中以类胡萝卜素为主要色素种类的植物中, PDS 基因的表达能促进花和果实中类胡萝卜素的积累<sup>[3]</sup>。Rodrigo MJ 等<sup>[4]</sup>研究甜橙成熟过程中果皮与叶子中的 PDS 基因对类胡萝卜素积累的作用, 发现在果实成熟时, PDS 基因表达量的增加会促进类胡萝卜素的积累。Zhu 等<sup>[5]</sup>研究了杜氏藻 *Dunaliella Salina*

的 PDS 基因, 通过 PCR 和 cDNA 末端快速扩增的方法, 获得 PDS 基因的全长 cDNA, 长度为 2198 bp, 其中预测开发阅读框 1752 bp, 编码 583 个氨基酸的多肽, 推测的分子量为 64.889 kDa。

巴氏杜氏藻 (*Dunaliella bardawil*) 简称巴氏藻, 是商业生产  $\beta$ -胡萝卜素的主要微生物之一, 能在强光照, 高盐度, 低营养的条件下积累  $\beta$ -胡萝卜素, 可达到细胞干重的 14%。而本实验室一直致力于研究巴氏藻类胡萝卜素代谢途的各种酶基因的克隆以及对其代谢调控机理的研究。本实验以巴氏藻为研究对象, 利用 NCBI 上已发布的巴氏杜氏藻 mRNA 序列 (GenBank:Y14807) 克隆 PDS 编码区序列, 进而再利用基因组步移克隆获得启动子和终止子, 最后利用生物信息学工具分析 PDS 基因, 包括 PDS 基因编码区序列的组成、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。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 藻种

巴氏杜氏藻 (*Dunaliella bardawil*) 购于中国科学院水生生物研究所 (武汉), 由本实验室保存。盐藻的培养参照 Ben-Amotz<sup>[6]</sup>和周世水<sup>[7]</sup>的方法。

#### 1.1.2 菌种与载体

宿主菌为大肠杆菌 *E. coli* GT-116, 由实验室保存; 克隆载体为 PCR 2.1 vector 购自 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 购自 TaKaRa 公司; 胶回收试剂盒 E.Z.N.A.™ Gel Extraction Kit, RNA 提取试剂盒 E.Z.N.A.™ Total RNA Kit II, 质粒提取试剂盒 E.Z.N.A.™ Plasmid Mini Kit 购自 Omega 公司; TA 克隆载体 PCR 2.1 Vector 购自 Invitrogen 公司; 5'RACE 试剂盒 SMARTer™ RACE cDNA Amplification Kit 购自 Clontech 公司。

### 1.2 PDS 编码区序列的获得

PDS 编码区序列由外显子和内含子组成, 其获得主要通过基因组步移法及半巢式 PCR。染色体步移技术 (Genome Walking) 是一种重要的分子生物学研究技术, 使用这种技术可以有效获取与已知序列相邻的未知序列, 主要应用于启动子与终止子的克隆、步移

获得新物种中基因的非保守区域、鉴定 T-DNA 或转座子的插入位点、染色体测序工作中的空隙填补, 从而获得完整的基因组序列等方面<sup>[8]</sup>。

本实验中, 先根据 cDNA 3'端 TAA 前 100 bp 设计三个引物 1GWSP1、1GWSP2、1GWSP3 (见表 1), 从 3'端往 5'端进行基因组步移 PCR, 并进行商业测序。接着, 以之前测序获得的序列作为模板再次设计引物进行基因组步移, 逐步获得编码区序列。

NCBI 搜索与杜氏盐藻亲缘性较近的物种, 利用 clustalX 软件比对它们的 PDS 氨基酸序列, 可以获知一些保守区域。根据这些保守的氨基酸序列找出对应的 cDNA 序列, 可避免设计的引物跨过内含子, 在本实验中根据这种方法设计得上游引物 3BSP, 并根据通过步移法获得的 3'端编码区序列设计得下游引物 3BAP1、3BAP2, 进行半巢式 PCR。

最后将获得序列进行拼接从而得到完整的 PDS 基因编码区序列。

表 1 获得编码区序列的引物设计

Table 1 Primer design for getting the coding sequence

引物名	引物序列
1GWSP1	5'-AACACCTCTCAGCCAGTTTAGGA-3'
1GWSP2	5'-AGAACCAAGGGAAGGTGACTGC-3'
1GWSP3	5'-AAGGTGACTGCCTCGGTCAACACT-3'
2GWSP1	5'-AGACAAGAGCAAGCCCAATCT-3'
2GWSP2	5'-GCCTCAGGGGCTTCAAAGGTCACA-3'
2GWSP3	5'-CTCAGGGGCTTCAAAGGTCACAGGA-3'
3BSP	5'-AGGGCACATGCTCAGACACT-3'
3BAP1	5'-CGGACTAAGTTGCTCCAATCTC-3'
3BAP2	5'-GGTCTCAGAGTCTGGGATGGT-3'
4GWSP1	5'-GTGAATGTCTGCCTCATCTG-3'
4GWSP2	5'-CTTGTCGGCAGATATTGGAAGGC-3'
4GWSP3	5'-ATGTTGGGGTAAGCACCAAAGAAG-3'

### 1.3 5'RACE 验证 5'端编码区序列

cDNA 末端快速扩增技术 (Rapid amplification of cDNA ends, RACE) 是一种基于 PCR 实现从一段已知序列往两端快速扩增完整 cDNA 的 5'和 3'末端的有效方法<sup>[9]</sup>。

在本实验中经过 Blast 比对, 发现 5'端编码区有 325 bp 序列与 NCBI 上公布的 cDNA 序列有所不同, 故采用了 5'RACE 技术对 5'端序列进行验证。首先采用 Omega 公司供应的 E.Z.N.A.™ Total RNA Kit II 提取巴氏藻总 RNA, 进行反转录, 最后用 SMARTer™ RACE cDNA Amplification Kit 对 cDNA 进行 5'端扩增。

### 1.4 PDS 启动子与终止子的获得

在获得编码区序列之后，同样采用基因组步移的方法分别向两侧扩增编码区序列两端的未知序列：启动子和终止子。设计的引物如表 2 所示。

表 2 获取启动子与终止子的步移引物

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

引物名称	引物序列
P-SP1	5'-CCTCTAGTTCAATCCAAGGTGTTTCAT-3'
启动子 P-SP2	5'-ACAAAGAGCCACAGCCCACTAA-3'
P-SP3	5'-ATTGGTTCAGAAGAGCCGTGAGTCC-3'
终止子 T-SP1	5'-GCTTGCAGCAGGTGGTAGAT-3'
T-SP2	5'-TGTTGACCGAGGCAGTCACCTT-3'
T-SP3	5'-TAAACTGGCTGAGAGGTGTTTCGT-3'

### 1.5 生物信息学分析

PDS 基因 cDNA 开放阅读框分析与核酸翻译: EditSeq; 保守结构域分析: NCBI\_Blastn, NCBI\_CDD (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>); 序列相似性搜索与编码区序列分析: NCBI\_Blast (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>); 多重序列比对: Clustal X 1.8; 启动子转录因子结合位点分析: PlantPAN (<http://plantpan.mbc.nctu.edu.tw/>)。

## 2 结果与讨论

### 2.1 PDS 编码区序列

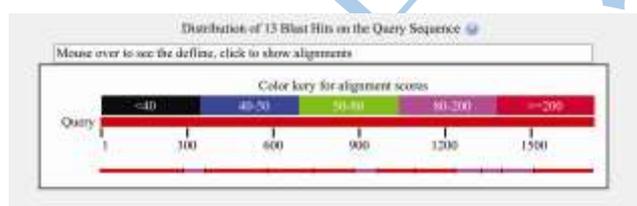


图 2 PDS 基因编码区序列的获得

Fig.2 PDS gene coding region obtained

通过 5 次 PCR 反应得到 5 条核苷酸片段,但是没有得到与 NCBI 上公布的 cDNA 序列 5'端 325 bp 匹配的序列,所以进行了 5'RACE 实验的验证。5'RACE 实验结果显示有包含起始密码子 ATG 的 288 bp 序列与本实验基因组步移法获得的 5'端序列匹配。故将得到的 5 段序列拼接,得到完整的 PDS 基因编码区序列,长度为 8113 bp,并结合 NCBI 公布的 cDNA 序列和 5'RACE 结果进行比对,结果如图 2 所示。

### 2.2 PDS 启动子与终止子

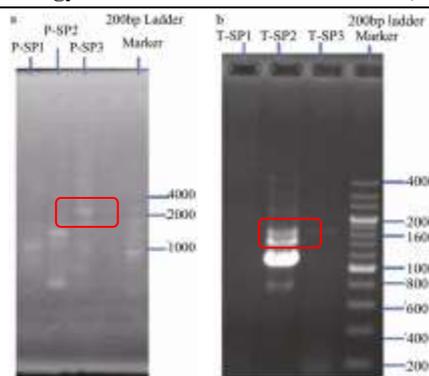


图 3 PDS 启动子与终止子的获得

Fig.3 Promoter and terminator of PDS gene obtained

注: a: 启动子基因组步移; b: 终止子基因组步移。

电泳结果参见图 3, a 图为启动子三条特异引物 PCR 结果, SP3 引物 PCR 得到大小为 3 Kb 左右的核酸片段。测序结果反馈后,经过比对发现有 80 bp 片段与已知序列重叠; b 图为终止子三条特异引物的 PCR 结果, SP2 引物 PCR 得到大小为 1.6 Kb、1.4 Kb、1.1 Kb 左右的核酸片段, SP3 引物 PCR 得到大小为 1.6 Kb 左右核酸片段。胶回收以上 4 条条带并测序,发现 SP3 1.6 Kb 左右条带实为 SP2 1.6Kb 条带的扩增产物,与已知序列存在 35 bp 的重叠区域。

### 2.3 生物信息学分析

#### 2.3.1 PDS 完整基因分析

将获得的 PDS 基因的编码区序列与启动子和终止子序列拼接,获得完整的 *D. bardawil* 的 PDS 基因序列,序列全长 12678 bp,其中包含的编码区序列长度为 8113 bp。扩增得到的起始密码子 ATG 上游序列长度达 3010 bp(包括 34 bp 的 UTR 序列),终止密码子 ATT 下游的序列长度为 1555 bp。将其与 PDS 基因的 cDNA 序列进行比对, PDS 基因的编码区含有 12 个外显子和 11 个内含子。外显子长度为 1725 bp,内含子长度达 6388 bp,约为外显子长度的 3.70 倍。

#### 2.3.2 PDS 基因

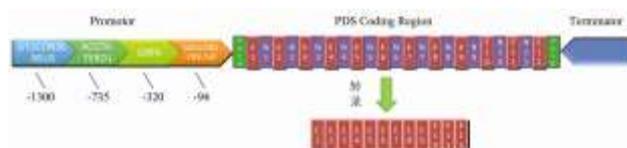


图 4 PDS 全基因结构

Fig.4 The structure of full-length genomic DNA of PDS

选定 6 个物种(拟南芥、大豆、玉米、番茄、小麦及其它),利用 PlantPAN 在线服务器检索 PDS 基因启动子转录因子结合位点。发现 PDS 基因的启动子序列中存在多种调控元件(见图 4),包括与光调控、组织特异性表达有关的 GATA 盒;干旱诱导植物黄化

反应有关的 ACGTATERD1；参与冷胁迫调控的 MYCCONSENSUSAT 等，表 3 中列出了存在的部分

表 3 PDS 基因启动子转录因子结合位点分析结果

Table 3 Binding site analysis of PDS promoter transcription factors

转录因子	特征序列	转录因子描述	物种	参考文献
GATA box	GATA	光调控, 组织特异性表达	拟南芥	10
MYCCONSENSUSAT	CANNTG	冷胁迫调控	拟南芥	11
GT1CONSENSUS	GRWAAW	光调控因子	玉米, 豌豆, 烟草	12
ACGTATERD1	ACGT	干旱诱导黄化表达	拟南芥	13
ANAERO2CONSENSUS	AGCAGC	参与厌氧发酵途径	拟南芥, 玉米	14
MNB1A	AAAGH	Dof 转录因子识别序列	玉米	15
OSE2ROOTNODULE	CTCTT	在根瘤感染细胞中被激活启动子的特异性器官元件共有序列	大豆, 蚕豆	16
SORLIP1AT	GCCAC	超限度光诱导启动子的序列	拟南芥	17
WRKY71OS	TGAC	Amy32b 启动子的元件, 赤霉素信号转导通路的转录阻遏因子	水稻	18

### 3 结论

3.1 巴氏藻 (*Dunaliella bardawil*) 是商业生产 β-胡萝卜素的主要微生物之一, 能在强光照, 高盐度, 低营养的条件下积累 β-胡萝卜素, 可达到细胞干重的 14%。研究巴氏藻类胡萝卜素生物代谢途径及其调控有重要经济意义, 首要前提是分离相关的合成酶基因, 这不仅有助于揭示盐藻自身的 β-胡萝卜素生物合成途径, 还可以将分离得到的功能基因用于类胡萝卜素的基因工程和代谢工程研究。

3.2 实验重点研究巴氏藻类胡萝卜素生物合成途径中的一个关键酶-PDS 的基因。实验中利用 NCBI 上已发布的巴氏藻 mRNA 序列设计引物克隆 PDS 编码区序列, 进而再利用基因组步移克隆获得启动子和终止子, 最终获得的 PDS 序列总长为 12678 bp, 最后利用生物信息学工具分析 PDS 基因, 包括 PDS 基因编码区序列的组成及其转录因子结合位点的分析, 发现 PDS 基因的启动子序列中可能存在多种调控元件, 包括与光调控、组织特异性表达有关的 GATA 盒; 干旱诱导植物黄化反应有关的 ACGTATERD1。

### 参考文献

[1] Sandmann G, Mitchell G. In vitro inhibition studies of phytoene desaturase by bleaching ketomorpholine derivatives [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2001, 49(1): 138-141

[2] Simkin A J, Laboure A M, Kuntz M, et al. Comparison of

carotenoid content, gene expression and enzyme levels in tomato (*Lycopersicon esculentum*) leaves [J]. Zeitschrift fuer Naturforschung, 2003, 58(5-6): 371-380

[3] Sun Z R, Cunningham Jr F X, Gantt E. Differential expression of two isopentenyl pyrophosphate isomerases and enhanced carotenoid accumulation in a unicellular chlorophyte [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1998, 95(19): 11482-11488

[4] Rodrigo M J, Marcos J F, Zacarias L. Biochemical and molecular analysis of carotenoid biosynthesis in flavedo of orange (*Citrus sinensis* L.) during fruit development and maturation [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2004, 52: 6724-6731

[5] Zhu Y H, Jiang J G, Yan Y, et al. Isolation and characterization of phytoene desaturase cDNA involved in the beta-carotene biosynthetic pathway in *Dunaliella salina* [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2005, 53 (14): 5593-5597

[6] Ben-Amotz A, Avron M. The biotechnology of cultivating the halotolerant alga *Dunaliella* [J]. Trends in Biotechnology, 2002, 18(6): 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. Discussion 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] 刘博,苏乔,汤敏谦,等.应用于染色体步移的 PCR 扩增技术的研究进展[J].遗传,2006,28(5):587-595
- Liu B, Su Q, Tang M Q. The progress of genome-walking technology [J]. Hereditas, 2006, 28(5): 587-595
- [9] 沈元月.RACE 技术研究进展与展望[J].生物技术通报, 2008,1:131-134
- Shen Y Y. The progress and trends of RACE technology [J]. Biotechnology Bulletin, 2008, 1:131-134
- [10] Lam E, Chua N H. ASF-2: A factor that binds to the cauliflower mosaic virus 35S promoter and a conserved GATA motif in cab promoters [J]. Plant Cell, 1989, 1: 1147-1156
- [11] Abe H, Urao T, Ito T, et al. Arabidopsis AtMYC2 (bHLH) and AtMYB2 (MYB) function as transcriptional activators in abscisic acid signaling [J]. Plant Cell, 2003, 15(1):63-78.
- [12] Terzaghi W B, Cashmore A R. Light-Regulated Transcription [J]. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology, 1995, 46: 445-474
- [13] Simpson S D, Nakashima K, Narusaka Y, et al. Two different novel cis-acting elements of *erd1*, a *clpA* homologous Arabidopsis gene function in induction by dehydration stress and dark-induced senescence [J]. The Plant Journal, 2003, 33: 259-270
- [14] Mohanty B, Krishnan S P, Swarup S, Bajic VB. Detection and preliminary analysis of motifs in promoters of anaerobically induced genes of different plant species [J]. Annals of Botany, 2005, 96(4):669-681
- [15] Yanagisawa S, Schmidt R J. Diversity and similarity among recognition sequences of Dof transcription factors [J]. Plant, 1999, 17(2): 209-214
- [16] Vieweg M F, Frühling M, Quandt H J. The promoter of the *Vicia faba* L. leghemoglobin gene *VfLb29* is specifically activated in the infected cells of root nodules and in the arbuscule-containing cells of mycorrhizal roots from different legume and nonlegume plants [J]. Molecular Plant-Microbe Interactions, 2004, 17(1):62-69.
- [17] Hudson M E, Quail PH. Identification of promoter motifs involved in the network of phytochrome A-regulated gene expression by combined analysis of genomic sequence and microarray data [J]. Plant Physiology, 2003, 133(4): 1605-1616
- [18] Zhang Z L, Xie Z, Zou X. A rice WRKY gene encodes a transcriptional repressor of the gibberellin signaling pathway in aleurone cells [J]. Plant Physiology, 2004, 134(4): 1500-1513