

文章编号 :1673-1689(2007)01-0111-05

原壳小球藻中不依赖于光的原叶绿素酸酯 还原酶基因的克隆与分析

施春雷^{1 2}, 史贤明^{1 2}

(1. 上海交通大学 农业与生物学院食品科学与工程系, 上海 201101 2. 华中农业大学 农业微生物国家重点实验室, 湖北 武汉 430070)

摘 要 :从原壳小球藻 CS-41(*Chlorella protothecoides* CS-41)中分离到了不依赖于光的原叶绿素酸酯还原酶(LIPOR) 3 个亚基的编码基因——*chlL*、*chlN* 和 *chlB*。通过测序和序列比对分析,发现这 3 个基因与普通小球藻 C-27 (*Chlorella vulgaris* C-27)相关基因高度同源, 同源性高达 99% 以上, 其中 *chlL* 基因有内含子, 与有关 *C. vulgaris* C-27 的报道相吻合。

关键词 :原壳小球藻 ;原叶绿素酸酯 ;叶绿素酸酯还原酶

中图分类号 :Q 55

文献标识码 :A

Cloning and Analysis of Three Genes Encoding the Subunits of Light-Independent Protochlorophyllide Reductase in *Chlorella protothecoides* CS-41

SHI Chun-lei^{1 2}, SHI Xian-ming^{1 2}

(1. Department of Food Science and Technology, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 201101, China ; 2. National Key Laboratory of Agricultural Microbiology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

Abstract :The three complete LIPOR genes, *chlL*, *chlN* and *chlB*, were PCR-cloned from the green alga *Chlorella protothecoides* CS-41 (CSIRO), and these chloroplast genes showed very high identity (> 99%) with the corresponding genes in *Chlorella vulgaris* C-27 chloroplast according to the results of sequencing and sequence alignment. It was demonstrated that the *chlL* gene contained an intron as *C. vulgaris* C-27 chloroplast did.

Key words :*Chlorella protothecoides* CS-41 ; protochlorophyllide ; LIPOR

原叶绿素酸酯(Protochlorophyllide)是叶绿素和菌绿素生物合成途径中关键的中间产物。在原叶绿素酸酯还原为叶绿素酸酯这一关键步骤(D 环的还原)有 2 条途径,即依赖于光的合成途径(光反应)和不依赖于光的合成途径(暗反应)。在光合生

物中,已知有 2 种酶催化原叶绿素酸酯 D 环双键的还原进而形成叶绿素酸酯 a^[1],一个是依赖于光的原叶绿素酸酯氧化还原酶(Light-dependent protochlorophyllide oxidoreductase, POR, EC 1.3.1.33),它在 NADPH 的辅助下,当底物(原叶绿素酸酯)吸

收稿日期 2006-03-28.

作者简介:施春雷(1977-),女,湖北襄樊人,生物医学工程博士研究生。

通讯作者:史贤明(1961-),男,湖北坚利人,教授,博导,主要从事食品安全及食品微生物研究。Email :xmshi@sjtu.

万方数据

收光能时促进双键的还原,由于它需要光,在开花植物(被子植物)依赖于光的显绿过程中起到了关键的作用^[2];另一个是不依赖于光的(暗反应)原叶绿素酸酯还原酶(Light-independent protochlorophyllide oxidoreductase, LIPOR),这种酶不需要光就能催化原叶绿素酸酯的还原。低等的光合细菌只含有后一种酶^[3],而蓝细菌、藻类、蕨类、苔藓、地衣和裸子植物同时具有这 2 种酶,被子植物则只具有依赖于光的还原酶^[4]。由于暗反应酶的存在,光合细菌、藻类、裸子植物等都能在无光条件下合成菌绿素或叶绿素,而被子植物因缺乏这种酶必须在光照条件下才能进行叶绿素的合成。

近几年,通过分子生物学手段分析各种能够进行叶绿素无光合成的生物,包括细菌、藻类和植物,发现了参与这一反应的 LIPOR 酶是由 3 个基因共同编码的,分别为 *chlL*、*chlN* 和 *chlB*。目前,针对 LIPOR 酶及其基因的研究集中在紫色细菌、蓝细菌和衣藻上,而对能够进行高密度异养培养并作为叶绿素源的小球藻^[5]却罕有研究。作者所在的实验室已经建立了一种小球藻异养培养体系,最大生物量可达 120 g/L,并且培养出的小球藻含有相当高的叶绿素含量。这证明小球藻不仅是一种规模化培养的材料,还是研究叶绿素无光合成机理的理想材料。因此作者对小球藻 LIPOR 3 个亚基的基因进行了克隆和序列分析,旨在揭示小球藻中这 3 个基因的特征。

1 材料与方法

1.1 藻种及其培养方法

原壳小球藻(*Chlorella protothecoides*)CS-41 购自澳大利亚 CSIRO 微藻研究中心,普通小球藻(*Chlorella vulgaris*)C-27 由日本静冈大学吉永光一教授惠赠。原壳小球藻的培养采用改良式 Basal 培养基^[6],普通小球藻的培养采用 M-4NA 培养基^[7]。培养条件为温度 28 ℃,光照强度 4 000 lux,转速 150 r/min,培养时间 7 d。

1.2 小球藻叶绿体 DNA 的提取

小球藻叶绿体 DNA 的提取采用改良的 Kolodner 法^[8]。

1.3 引物设计与合成

在 GenBank 中获得普通小球藻 C-27 的叶绿体基因组序列(序列号为 AB001684),找到对应的 *chlL*、*chlN* 和 *chlB* 序列。通过 Clustal W 软件对 GenBank 中相关的同源序列进行分析,找到保守区段,利用 Primer 5.0 在保守区段设计引物,上游引物

5'端引入 Sac I 酶切位点(GAG CTC),下游引物的 5'端引入 BamH I 酶切位点(GGA TCC),如表 1 所示。

表 1 高保真 PCR 引物
Tab.1 High fidelity PCR primers

靶基因	引物(5'-3')
<i>chlL</i>	LPLF : CTT GAG CTC ATA TGA AAT TAG CTG TCT ATG GGA AA
	PLR : CTT GGA TCC TTA GAC TAA AAT AAA ATC TAA TTC ACT AGC
<i>chlN</i>	NPNF : CTT GAG CTC ATA TGA CAA ACT CAA AAT TAA CC
	PNR : CTT GGA TCC TTA CAT TTT AAC TAG TTG ATT CCA
<i>chlB</i>	PBF : CTT GAG CTC ATA TGA AAT TAG CTT ATT GGA TGT
	PBR : CTT GGA TCC TTA TGC TCC TAC GGC TTC T

1.4 LIPOR 基因的高保真 PCR 扩增

以提取的原壳小球藻 CS-41 叶绿体 DNA 为模板,用合成的 PLF-PLR,PNF-PNR 和 PBF-PBR 引物对分别进行高保真 PCR 扩增,Pyrobest DNA Polymerase 购自 TaKaRa 公司。PCR 反应条件为 95 ℃ 预变性 4 min,进行 PCR 扩增(94 ℃ 1 min,50 ℃ 1 min,72 ℃ 2 min),经 30 个循环后,72 ℃ 延伸 10 min。取 4 μL 反应液在 1 g/dL 琼脂糖凝胶上电泳,检测扩增结果。以普通小球藻 C-27 的叶绿体 DNA 扩增产物作为阳性对照,以无菌去离子水扩增产物作为阴性对照。

1.5 克隆质粒的构建

PCR 产物 *chlL*、*chlN* 和 *chlB* 通过 SacI 和 BamHI 酶切,分别连接到 Sac I 和 BamH I 酶切的 pBlue-script SK⁺ 载体上,构建 pBL、pBN 和 pBB 3 个重组质粒。将连接好的 3 个质粒分别转化到大肠杆菌(*E. coli*)JTG1 感受态细胞中,转化细胞涂在含有 200 μg/mL IPTG 和 30 μg/mL X-gal 的 LB 琼脂固体培养基(Amp⁺)上,培养 9 h 后得到蓝白斑菌落,挑选白色菌落在 LB 液体培养基中培养过夜,提纯质粒后进行 SacI 和 BamHI 酶切验证,同时挑取白色菌落直接作为模板加入到 PCR 反应管中,以 M13 通用引物进行菌落 PCR 验证。

1.6 DNA 测序及序列分析

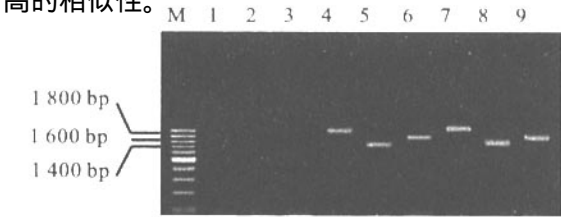
采用 T₃ 和 T₇ 测序引物对克隆质粒 pBL、pBN 和 pBB 在 ABI Model 377 自动测序仪上进行测序,具体操作由生工公司完成,得到相应的 *chlL*、*chlN* 和 *chlB* 基因全序列后送至 GenBank 进行 Blastn 分

析,找到相关的近似序列,再利用 Clustal W 软件对这些近似序列进行同源性比对分析。

2 结果与讨论

2.1 LIPOR 基因的高保真扩增

利用 PLF-PLR、PNF-PNR 和 PBF-PBR 引物,以原壳小球藻 CS-41 的叶绿体 DNA 为模板进行高保真扩增,得到的产物大小分别为 1 800 bp、1 300 bp 和 1 500 bp 左右(如图 2 中 7、8、9 泳道所示);同时,这 3 套引物也可以从普通小球藻 C-27 叶绿体 DNA 中扩增出相应大小的产物(如图 2 中 4、5、6 泳道所示)。根据普通小球藻 C-27 叶绿体基因组测序的结果,其 *chlL*、*chlN* 和 *chlB* 基因大小分别为 1 854 bp、1 308 bp 和 1 533 bp(序列号为 AB001684),这说明扩增结果与预期相符。而且同样的引物能够扩增出相同大小的产物,证明两个藻株的原叶绿素酸酯无光还原系统在组成上具有很高的相似性。



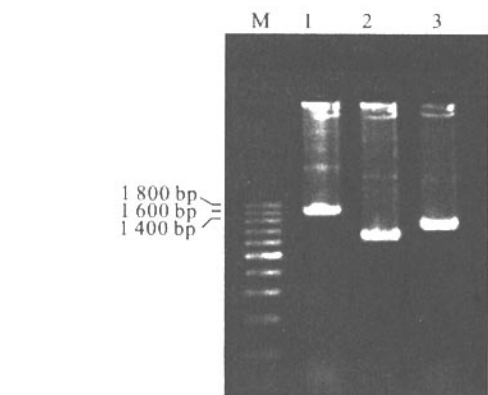
M 200 bp DNA ladder marker(Sangon); 1 2 3 水作为模板的阴性对照 4 5 6 普通小球藻 C-27 的 *chlL*、*chlN* 和 *chlB* 基因扩增产物 7 8 9 原壳小球藻的 *chlL*、*chlN* 和 *chlB* 基因扩增产物

图 1 3 个 LIPOR 基因高保真扩增产物的电泳图
Fig. 1 The electrophoresis of high fidelity PCR products of the three LIPOR genes

2.2 pBL/ pBN/ pBB 质粒构建

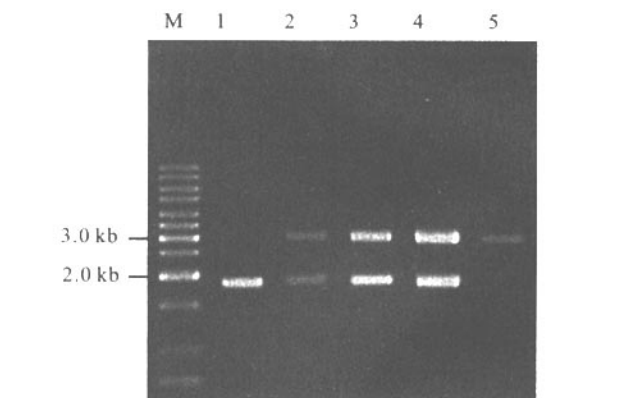
高保真 PCR 的产物通过 *Sac*I-BamHI 酶切后连接到克隆质粒 pBluescript SK⁺ 相应的多克隆位点上,酶连产物成功转化大肠杆菌 TG1 后,在含有 IPTG 和 X-gal 的 Amp 抗性平板上长出的转化子由于 α -互补效应会呈现蓝白斑差异。其中含有重组质粒的细胞长出的菌落为白色,而含有空白质粒的菌落为蓝色。为进一步筛选带有 LIPOR 基因的阳性转化子,需要挑取大量白色菌落同时进行菌落 PCR 和重组质粒的双酶切验证。如图 3 所示,菌落 PCR 能够得到与插入的 LIPOR 基因大小类似产物的菌落为阳性转化子;如图 4 所示,从白色菌落培养物中抽提的质粒经 *Sac*I-BamHI 双酶切后能够同时得到线性载体大小条带和 LIPOR 基因大小条带的为阳性转化子。通过这两步分析,可以确保筛选

到含有所需重组质粒的阳性转化子。



M 200 bp DNA ladder marker(Sangon); 1 含 pBL 的阳性转化子 2 含 pBN 的阳性转化子 3 含 pBB 的阳性转化子
图 2 重组质粒 pBL/pBN/pBB 阳性转化子的菌落 PCR 验证

Fig. 2 Colony PCR analysis of positive transformants containing pBL/pBN/pBB



M 1.0 kb DNA ladder marker(MBI); 1 *chlL* PCR 扩增产物 2 , 3 白色转化子质粒 *Sac*I-BamHI 酶切产物; 5 pBluescript SK⁺ 经 *Sac*I-BamHI 酶切产物

图 3 重组质粒 pBL 的酶切验证
Fig. 3 *Sac*I-BamHI double digestion analysis of pBL

2.3 序列分析

3 个重组质粒 pBL、pBN 和 pBB 经测序后,剔除载体片段,即为所需的 3 个 LIPOR 基因 *chlL*、*chlN* 和 *chlB* 的序列。将这 3 个基因的全长序列通过 Sequin (<http://www3.ncbi.nlm.nih.gov/Sequin/index.html>) 发送到 GenBank 中,登录号分别为: AY331981(*chlL*)、AY331982(*chlN*)和 AY331983(*chlB*)。这 3 个 LIPOR 基因具有相同序列特征: G + C 含量很低(30% ~ 35%),含有多个 polyA 或 polyT 结构。在 GenBank 中进行 Blastn 分析,结果如表 2 ~ 4 所示,编码 LIPOR 3 个亚基的基因,其同源基因广泛存在于低等的蓝细菌、藻类、苔藓等生物中,其中以普通小球藻 C-27 的同源性最高, E 值(E-

value)为 0。进一步的 Clustal W 比对分析 ,计算出相应的序列同源性/相似性(Identity/Similarity)。其中 ,与普通小球藻 C-27 相应基因的同源性均在 99% 以上 ,只有个别碱基的差异 ,但是并未改变其编码亚基的氨基酸组成(因篇幅所限 ,基因序列未一一列出)。除了普通小球藻以外 ,原壳小球藻叶绿体的 *chlL* 基因与其它同源序列相比 ,序列长度存在很大的差异。究其原因 ,是因为和普通小球藻 C-27 的 *chlL* 基因一样 ,也含有一个大小为 951 bp 的

内含子 ,这是迄今为止 ,叶绿体编码蛋白的基因中发现的第一个内含子^[9]。并且 ,原壳小球藻叶绿体的 *chlL* 基因与普通小球藻的序列相比 ,差异的碱基均属于内含子部分(序列未列出)。此外 ,虽然同属绿藻 ,小球藻的 LIPOR 基因与衣藻的同源性并不比系统发育树上亲缘关系较远的地钱(*Marchantia polymorpha*)高 ,这似乎预示着 LIPOR 系统的进化速率在各物种中的非一致性。

表 2 原壳小球藻叶绿体的 *chlL* 基因在 GenBank 中的 Blastn 结果
Tab. 2 Blastn analysis of *C. protothecoides* CS-41 chloroplast *chlL* gene in GenBank

品 种	Accession No.	片 段	E 值	同源/相似性
<i>C. vulgaris</i> C-27	AB001684	1 479	0. 0	99/100
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	BK000554	278	3e-71	74/80
<i>Marchantia polymorpha</i>	X04465	250	7e-63	79/88
<i>Cyanophora paradoxa</i>	U30821	224	4e-55	75/86
<i>Mesostigma viride</i>	AF166114	214	4e-52	80/89
<i>Nephroselmis olivacea</i>	AF137379	121	4e-24	79/89
<i>Porphyra purpurea</i>	U38804	107	7e-20	79/88
<i>Pinus thunbergii</i>	D17510	90	2e-14	75/86
<i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803	D90916	80	1e-11	68/75
<i>Plectonema boryanum</i>	D00665	68	6e-08	78/88
<i>Nostoc</i> sp. PCC 7120	AP003598	50	0. 013	79/87

表 3 原壳小球藻叶绿体的 *chlN* 基因在 GenBank 中的 Blastn 结果
Tab. 3 Blastn analysis of *C. protothecoides* CS-41 chloroplast *chlN* gene in GenBank

品 种	Accession No.	片 段	E 值	同源/相似性
<i>C. vulgaris</i> C-27	AB001684	2 484	0. 0	99. 9/100
<i>Marchantia polymorpha</i>	X04465	361	2e-96	74/83
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	BK000554	250	5e-63	63/70
<i>Mesostigma viride</i>	AF166114	210	4e-51	80/91
<i>Cyanophora paradoxa</i>	U30821	184	2e-43	67/84
<i>Porphyra purpurea</i>	U38804	119	1e-23	76/84
<i>Nostoc</i> sp. PCC 7120	AP003598	119	1e-23	72/82
<i>Nephroselmis olivacea</i>	AF137379	105	2e-19	69/82
<i>Pinus thunbergii</i>	D17510	103	7e-19	67/80
<i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803	D90916	88	4e-14	71/82
<i>Plectonema boryanum</i>	D12973	90	1e-14	71/82

表 4 原壳小球藻叶绿体的 *chlB* 基因在 GenBank 中的 Blastn 结果

Tab. 4 Blastn analysis of *C. protothecoides* CS-41 chloroplast *chlB* gene in GenBank

品 种	Accession No.	片 段	E 值	同源/相似性
<i>C. vulgaris</i> C-27	AB001684	2 956	0.0	100/100
<i>Mesostigma viride</i>	AF166114	311	2e-81	81/94
<i>Marchantia polymorpha</i>	X04465	260	6e-66	82/93
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	BK000554	232	1e-57	58/68
<i>Porphyra purpurea</i>	U38804	212	1e-51	73/89
<i>Cyanophora paradoxa</i>	U30821	184	2e-43	48/69
<i>Pinus thunbergii</i>	D17510	157	7e-35	72/88
<i>Nostoc</i> sp. PCC 7120	AP003593	84	8e-13	72/91
<i>Nephroselmis olivacea</i>	AF137379	76	2e-10	61/79
<i>Plectonema boryanum</i>	D78208	76	2e-10	74/91
<i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803	D64000	56	2e-04	72/89

3 结 论

本研究中成功克隆出原壳小球藻 CS-41 叶绿体基因组中编码不依赖于光的原叶绿素酸酯还原酶 3 个亚基的 *chlL*、*chlN* 和 *chlB* 基因 ,并进行了序列比

对分析 ,表明这 3 个 LIPOR 基因与完成叶绿体基因组测序的普通小球藻 C-27 中的对应基因高度同源 ,为重组 LIPOR 酶的表达提供了可靠的基因材料 ,并为进一步研究 LIPOR 亚基的结构、生物学功能及其相互之间的作用机制奠定了基础。

参考文献(References):

[1] Suzuki JY ,Bauer CE. A prokaryotic origin for the light-dependent chlorophyll biosynthesis of plants [J]. **Proc Natl Acad Sci USA** ,1995 ,92 :3749 – 3753.

[2] Lebedev N ,Timko MP. Protochlorophyllide oxidoreductase B-catalyzed protochlorophyllide photoreduction in vitro :insight into the mechanism of chlorophyll formation in light-adapted plants [J]. **Proc Natl Acad Sci USA** ,1999 ,96 :9954 – 9959.

[3] Xiong J ,Inoue K ,Bauer CE. Tracking molecular evolution of photosynthesis by characterization of a major photosynthesis gene cluster from *Heliobacillus mobilis*[J]. **Proc Natl Acad Sci USA** ,1998 ,95 :14851 – 14856.

[4] Fujita Y ,Takagi H ,Hase T. Identification of the *chlB* gene and the gene product essential for the light-independent chlorophyll biosynthesis in the cyanobacterium *Plectonema boryanum*[J]. **Plant Cell Physiol** ,1996 ,37 :313 – 323.

[5] Shi X ,Zhang X ,Chen F. Heterotrophic production of biomass and lutein by *Chlorella protothecoides* on various nitrogen sources [J]. **Enzyme Microb Technol** ,2000 ,27 :312 – 318.

[6] Shi XM ,Chen F ,Yuan JP ,et al. Heterotrophic production of lutein by selected *Chlorella strains*[J]. **J Appl Phycol** ,1997 ,9 :445 – 450.

[7] Yoshinaga K ,Ohta T ,Suzuki M. *Chlorella* chloroplast DNA sequence containing a gene for the large subunit of ribulose-1-5-bisphosphate carboxylase/oxygenase and a part of a possible gene for the β' subunit of RNA polymerase[J]. **Plant Mol Biol** ,1988 ,10 :245 – 250.

[8] Kolodner R ,Tewari KK. Molocular size and confirmation of chloroplast deoxyribonucleic acid from pea leaves[J]. **J Biol Chem** ,1972 ,247 :6355 – 6364.

[9] Kapoor M ,Wakasugi T ,Yoshinaga K ,et al. The chloroplast *chlL* gene of the green alga *Chlorella vulgaris* C-27 contains a self-splicing group I intron [J]. **Mol Gen Genet** ,1996 ,250 :655 – 664.

(责任编辑 杨 萌)