

文章编号:1000-8551(2018)11-2098-09

# 三角褐指藻 *crtiso* 基因克隆与表达调控研究

管悦琳 龚一富\* 朱帅旗 俞凯 王何瑜 严小军

(宁波大学海洋学院/教育部应用海洋生物技术重点实验室,浙江 宁波 315211)

**摘要:**为探索三角褐指藻岩藻黄素的生物合成与 *crtiso* 基因表达调控的关系,本研究通过转录组测序获得了三角褐指藻 *crtiso* 基因 cDNA 全长序列,并研究了乙酰水杨酸(ASA)、花生四烯酸(AA)、甲基茉莉酸(MeJA)和硫酸铈铵(ACS)4种诱导子不同浓度处理对三角褐指藻 *crtiso* 基因表达的影响。结果表明,三角褐指藻 *crtiso* cDNA 全长 2 116 bp,开放阅读框(ORF)1 902 bp,编码 635 个氨基酸。*crtiso* 蛋白为亲水性不稳定蛋白,相对分子质量 67 803.00 Mr,理论等电点 7.14,蛋白质二级结构中的主要构成元件是  $\alpha$  螺旋、 $\beta$  折叠和无规则卷曲,并存在保守区域和结构域。系统进化树分析表明,三角褐指藻 *crtiso* 蛋白与海虹束毛藻亲缘关系较近。诱导子表达结果表明,ASA、AA、MeJA 和 ACS 均能显著提高三角褐指藻 *crtiso* 基因的表达水平,当 ASA、AA、MeJA 和 ACS 质量浓度分别为  $10\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $0.1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $50\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  和  $0.2\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  时,三角褐指藻 *crtiso* 基因表达量最高。相关性分析表明,三角褐指藻 *crtiso* 基因表达量与岩藻黄素含量呈线性关系,表明三角褐指藻岩藻黄素的生物合成是通过调控 *crtiso* 基因的表达来实现的,本试验结果为进一步研究岩藻黄素的合成代谢提供了重要的依据。

**关键词:**三角褐指藻;类胡萝卜素异构酶;岩藻黄素;基因克隆;表达分析

DOI:10.11869/j.issn.100-8551.2018.11.2098

岩藻黄素(fucoxanthin)是一类天然橘黄色类胡萝卜素,具有多种生物学功能<sup>[1]</sup>。研究发现岩藻黄素能增强神经元抗氧化能力和降低脂质过氧化水平,可能是预防或治疗阿兹海默症的潜在药物<sup>[2]</sup>。同时,岩藻黄素可有效抑制脑胶质瘤细胞 U87 细胞增殖并诱导自噬<sup>[3]</sup>,调控小鼠肝脏胆固醇代谢<sup>[4]</sup>。此外,岩藻黄素不仅可以作为化学保护剂抵抗由植物自身叶绿素的光敏氧化作用引起的毒害作用,同时又具有抗肿瘤<sup>[5]</sup>、抗氧化<sup>[6]</sup>、减肥<sup>[7]</sup>等功效,目前已广泛运用于食用着色剂和保健食品等方面<sup>[8]</sup>。但由于岩藻黄素提取效率低,难以化学合成,国内外生产厂家不多,高纯度产品量少且价格昂贵(含有 98% 岩藻黄素的组分的产品,在市场上售价高达  $1.2\text{ 亿美元}\cdot\text{kg}^{-1}$ ),严重制约其发展<sup>[9]</sup>。因此,近年来越来越多的研究者开始关注岩藻黄素的研究。

提取岩藻黄素的原料,最早主要选择大型海藻,包

括海带(*Laminaria japonica*)、羊栖菜(*Sargassum fusiforme*)和裙带菜(*Undaria pinnatifida*)等<sup>[10]</sup>。但大型海藻不仅养殖成本高、季节性生长,且岩藻黄素含量低等,并不是最适宜的材料。三角褐指藻(*Phaeodactylum tricornutum*)等微藻中也含有岩藻黄素,且具有生长速度快、易于培养和能在生物反应器中可人工调控等优点<sup>[11]</sup>,可作为规模化生产岩藻黄素的理想原材料。

类胡萝卜素异构酶(carotenoid isomerase, CRTISO)是岩藻黄素合成上游途径中催化番茄红素由顺式结构转变为反式结构的异构酶<sup>[12]</sup>。Kato 等<sup>[13]</sup>研究发现柑橘中 *crtiso* 基因的表达下调能促进  $\beta$ -胡萝卜素含量的积累,表明该基因表达量与  $\beta$ -胡萝卜素的代谢相关。李群睿<sup>[14]</sup>发现 *crtiso* 基因的表达在一定程度上促进了玉米种子胚乳积累类胡萝卜素。史艳梅等<sup>[15]</sup>发现 *crtiso* 少量表达可能对烟草中胡萝卜素的积

收稿日期:2017-05-26 接受日期:2017-10-06

基金项目:国家科技部星火计划项目(2015GA701001、2014GA701020),浙江省科技厅重点科技创新团队项目(2012R10029-07、2010R50029),宁波科技攻关项目(2013C10018)

作者简介:管悦琳,女,主要从事藻类生物技术方面研究。E-mail:ghost28@126.com

\*通讯作者:龚一富,男,副教授,主要从事植物次生代谢产物及机理研究。E-mail: gongyifu@nbu.edu.cn

累有促进作用,表明 *crtiso* 基因与类胡萝卜素有一定的相关性。而岩藻黄素作为类胡萝卜素,有关该基因的功能和作用研究较少。目前,在番茄 (*Lycopersicon esculentum*)<sup>[16]</sup>、光合蓝细菌 (*Synechocystis* 6803)<sup>[17-18]</sup>、玉米 (*Zea mays*)<sup>[19]</sup> 与拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*)<sup>[20]</sup> 中已克隆出 *crtiso* 基因,在藻类中仅有周丽亚等<sup>[21]</sup> 已克隆出绿色杜氏藻 *crtiso* 基因的 cDNA 全长,而在三角褐指藻中对该基因尚未有相关研究报道。因此,克隆三角褐指藻中的 *crtiso* 基因有助于研究岩藻黄素生物合成的分子机理及通过代谢工程提高岩藻黄素含量,进一步提供更丰富、更优良的基因资源。

甲基茉莉酸 (methyl jasmonate, MeJA)、乙酰水杨酸 (acetylsalicylic acid, ASA)、花生四烯酸 (arachidonic acid, AA)、硫酸铈铵 (ammonium cerous sulfate, ACS) 等是广泛存在于植物体内的生长调节物质,在细胞工程中常作为诱导子<sup>[22]</sup>。姜晶等<sup>[23]</sup> 利用 ASA 对番茄苗期进行胁迫处理,发现 ASA 可通过调节蔗糖代谢相关酶基因的表达而影响相关酶活性发生变化。董霞等<sup>[24]</sup> 研究发现 ASA 能诱导烟草 *grps* 基因上调表达。Gong 等<sup>[25]</sup> 发现银杏 *dxs* 基因的表达受外源诱导子水杨酸 (salicylic acid, SA) 和 AA 的诱导。吴文华等<sup>[26]</sup> 研究发现 MeJA 作为诱导子影响水稻的光合作用。周丽亚等<sup>[21]</sup> 发现,随着 AA、ASA 浓度的升高,类胡萝卜素含量大致呈逐渐升高的趋势。王丽丽等<sup>[27]</sup> 研究表明,MeJA、AA、ACS 3 种诱导子均能显著促进雨生红球藻中次生代谢产物虾青素的合成。上述研究表明,一些外界环境的刺激会诱导植物部分代谢相关基因的过量表达,促进相应代谢产物的积累,推测原因可能是外界环境胁迫促进植物启动防御机制,产生一系列信号分子作用于部分关键基因,从而促进相关抗逆基因的表达。利用诱导子诱导基因表达和代谢产物积累的特性,可探究植物代谢调控的机理。因此,本试验利用不同浓度的 MeJA、AA、ASA 和 ACS 等诱导子处理三角褐指藻,研究诱导子对三角褐指藻 *crtiso* 基因转录差异的影响,旨在为探明诱导子对三角褐指藻岩藻黄素积累的分子机制提供基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 三角褐指藻的培养与处理

三角褐指藻由宁波大学海洋学院海洋生物工程重点实验室提供。三角褐指藻的培养参照叶丽等<sup>[28]</sup>、朱帅旗等<sup>[29]</sup> 的方法。培养 2 d 后,分别用不同浓度梯度的 MeJA、AA、ASA 和 ACS 处理三角褐指藻,每处理设

3 次重复。MeJA 浓度分别为 0、50、100、200、500、1 000  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ; AA 浓度分别为 0、10、25、50、100  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ; ASA 浓度分别为 0、0.1、0.5、2.5、12.5、62.5、312.5  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ; ACS 浓度分别为 0、0.2、0.4、0.8、1.6  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。培养至第 7 天时,三角褐指藻达到对数生长期,离心收集藻体,用于岩藻黄素含量测定。

在同等培养条件下,培养三角褐指藻至第 6 天,用同等浓度梯度的 4 种诱导子处理藻体 24 h,收集藻体用于 RT-qPCR 研究,参照朱帅旗等<sup>[29]</sup> 的方法。

### 1.2 三角褐指藻总 RNA 的提取及基因序列的获得

分别取处于对数生长期三角褐指藻藻液 80 mL, 4℃ 条件下, 5 000  $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 10 min 后,根据植物总 RNA 提取试剂盒 (北京奥莱博生物技术有限公司) 操作说明提取三角褐指藻总 RNA。利用反转录试剂盒 (TaKaRa, 大连) 将 RNA 反转录成 cDNA,并于 -20℃ 条件下保存备用。利用 qPCR 绝对定量构建文库的摩尔浓度,质检合格的文库进行上机测序。将总 RNA 进行转录组测序,通过分析获得三角褐指藻 *crtiso* cDNA 全长序列<sup>[30]</sup>,并设计引物 (F: 5'-GGTCCTACCTATCTGTTAATCGG-3', R: 5'-CACTTTCCAAAGCAATGTTCT-3') 进行 PCR 扩增,回收测序加以验证。

### 1.3 三角褐指藻 *crtiso* 基因生物信息学分析

使用 DNAMAN 5.0 对三角褐指藻 *crtiso* 基因全长进行分析,在 NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>) 查找该序列的开放阅读框 (open reading frame, ORF),并用 Vector NTI 7.1 对三角褐指藻 *crtiso* 基因进行多序列比对。通过 ProtParam (<http://web.expasy.org/cgi-bin/protparam/protparam>) 在线软件,对三角褐指藻 *crtiso* 蛋白的氨基酸序列基本特征进行在线分析。通过 ProtScale (<http://web.expasy.org/cgi-bin/protscale/>) 在线软件,对三角褐指藻 *crtiso* 蛋白编码的氨基酸序列的疏水性/亲水性进行预测。通过 CBS (<http://www.cbs.dtu.dk/services>)、Predictprotein (<https://www.predictprotein.org>)、COILS (<http://www.ch.embnet.org/>) 与 TM pred (<http://www.ch.embnet.org/>) 在线软件,对三角褐指藻 *crtiso* 蛋白进行亚细胞定位预测并进行综合分析。通过 SWISS-Model (<http://swissmodel.expasy.org/interactive>) 在线软件,对 *crtiso* 蛋白空间结构进行预测。通过 CBS 网站预测信号肽、转运肽及其跨膜结构域,使用 ExPASy 网站在线分析其等电点、分子量。利用 ClustalX 和 MEGA5.0 软件对三角褐指藻构建系统进化树,进化树所用物种详见表 1。

表 1 进化树所用物种

Table 1 The species used for evolutionary tree		
中文名 Chinese name	学名 Scientific name	GenBank 序列号 GenBank ID
三角褐指藻	<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	EEC46339.1
海虹束毛藻	<i>Trichodesmium erythraeum</i>	WP_011614184.1
单胞菌藻	<i>Lyngbya aestuarii</i>	WP_023065417.1
蓝细菌	<i>Cyanobacteria</i>	WP_039724644.1
番茄	<i>Solanum lycopersicum</i>	Q8S4R4
拟南芥	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Q9M9Y8
胡萝卜	<i>Daucus carota</i>	Q2VEX9
玉米	<i>Zea mays</i>	AC071189
水稻	<i>Oryza sativa</i>	BAF28490
枸杞	<i>Lycium chinense</i>	AIZ50714.1
柑橘	<i>Citrus maxima</i>	AJT59423.1

1.4 三角褐指藻 crtiso 基因表达调控研究

以  $\beta$ -actin 基因为参照模板 (Factin:5'-CGTGACTTGACGGACTACCTG-3', Ractin:5'-TAGTTTTGTCCAGAGCCGAG-3') 设计引物, 合成本试验获得的三角褐指藻 crtiso cDNA 序列的定量引物 (引物序列由上海生工生物工程有限公司合成, Fertiso:5'-TTTTCGTCCTTTAGTTCGTTGTAG-3', Rertiso:5'-AGATGATGTGACAGCCGAGC-3')。反应体系: SYBR® Premix Ex TaqTM (2 ×) 10  $\mu$ L, 上下游引物 (10  $\mu$ mol · L<sup>-1</sup>) 各 0.8  $\mu$ L, cDNA 模板 2  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 6.4  $\mu$ L。反应程序: 94℃ 预变性 3 min; 94℃ 变性 30 s, 58℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 20 s, 40 个循环; 72℃ 终延伸 10 min, 16℃ 保存。根据不同处理的三角褐指藻 crtiso 转录水平结果, 运用 2<sup>- $\Delta\Delta C_t$</sup>  法<sup>[31]</sup> 进行数据分析, 并使用 t 检验, 当  $P < 0.05$  时, 显著差异; 当  $P < 0.01$  时, 差异极显著。

1.5 三角褐指藻岩藻黄素含量的测定

培养至第 6 天, 分别取不同处理的 80 mL 三角褐指藻藻液, 在 4℃ 下, 52 000 × g 离心 10 min, 弃上清液收集藻体, 冷冻干燥 2 d 后称重。干燥后的藻体研磨至粉末状, 分别用 1 mL 无水乙醇重悬成藻液, 4℃ 静置 1 h, 然后于 4℃ 条件下 52 000 × g 离心 10 min, 取 1 mL 上清液过 0.22  $\mu$ m 滤膜, 4℃ 保存备用。参照刘浩等<sup>[32]</sup> 的方法对岩藻黄素含量进行测定, 采用高效液相色谱法 (high performance liquid chromatography, HPLC) 得到岩藻黄素积峰面积, 根据回归曲线得出各组三角褐指藻总细胞的岩藻黄素含量。

2 结果与分析

2.1 三角褐指藻 crtiso 基因序列分析

经转录组测序分析, 获得三角褐指藻 crtiso 基因 (GeneBank 登录号: XP\_002182438.1) cDNA 全长序列, 三角褐指藻 crtiso 基因 cDNA 全长为 2 116 bp, ORF 为 1 902 bp, 编码 635 个氨基酸。在氨基酸第 530 号位到第 534 号位存在与异戊二烯基二磷酸合酶有同源性的保守区域; 第 114 号位到第 165 号位存在和 CRTI、原卟啉原氧化还原酶、单胺氧化酶共享的扩展的 FAD 结合结构域 (图 1)。

2.2 三角褐指藻 crtiso 蛋白的生物信息学分析

对三角褐指藻 crtiso 蛋白的氨基酸序列基本特征进行在线分析, 结果表明, 三角褐指藻 crtiso 蛋白分子式为 C<sub>2982</sub>H<sub>4750</sub>N<sub>852</sub>O<sub>910</sub>S<sub>22</sub>, 共 9 516 个原子, 相对分子质量为 67 803.00 Mr, 理论等电点为 7.14。在该蛋白中含量最多的氨基酸为 Ala, 占 10.7%, 含量最少为 Trp 和 Met, 不含 Ply 与 Sec。正电荷残基 (Arg + Lys) 总数为 66, 负电荷残基 (Asp + Glu) 总数为 66, 预测不稳定指数为 40.91, 脂肪系数为 87.95, 推测该蛋白质为不稳定蛋白。对三角褐指藻 crtiso 蛋白编码的氨基酸序列的疏水性/亲水性预测结果表明, 第 193 位 Gly 亲水性最强, 分值为 -3.033; 第 111 位 Ala 疏水性最强, 分值为 2.322。亲水性的总平均值为 -0.101, 预测该蛋白为亲水性蛋白。由图 2、图 3 可知, 三角褐指藻 crtiso 蛋白无信号肽, 无跨膜区域和卷曲螺旋和 TM-螺旋 (长度介于 17 ~ 33 之间)。crtiso 蛋白质中无规则卷曲比例最高, 约占 34.49%,  $\alpha$ -螺旋约占 31.50%, 延长链与  $\beta$ -转角比例最低, 分别约占 23.31% 和 10.71%。

2.3 三角褐指藻 crtiso 蛋白系统进化树分析

在 NCBI 数据库中, 选取含有 crtiso 的 11 个物种, 将其 crtiso 氨基酸序列进行相似性搜索和比对, 并对 11 个不同物种的 crtiso 构建进化树 (ClustalX 1.81 和 MEGA6.0 软件)。进化树分析结果表明, 11 个不同物种的 crtiso 蛋白总体分为两支, 第一支是藻类、蓝细菌和玉米, 除玉米外均为低等生物; 第二支是番茄、拟南芥、胡萝卜等, 均为高等植物。其中, 海虹束毛藻与三角褐指藻 crtiso 蛋白亲缘关系相近, 其同源性为 53%, 单胞菌藻和蓝细菌均为 39%。在与高等植物的比较中, 三角褐指藻与水稻同源性最高, 同源系数为 32%。表明本研究克隆的 crtiso 蛋白属于藻类 crtiso 家族 (图 4)。



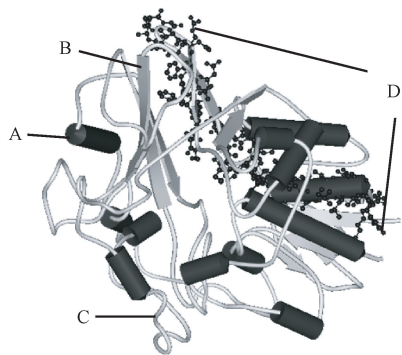
1 GTCTACCTATCTGTTAATCGGTATCTCTGTTGGGGTGGCGAGGCAAAATTAGACAGCAAACTATTGGAAGACTGACATCTGTGTTAC  
91 AGTAAAGCCACCAGCAATTAATTTGGTTACAGTAAGCTGTGATTAACTTGATTTTCCAGACAACTTTGTTGGAGAGCAAAAAAGCCGA  
1 M L V E S K S R  
181 GATGGTAGTCGACCTTCGAGCGTTCCCTCGATACCAAAACACATTCGCTGTCTCTACTAGCAACAACTCTGTGACAGCAAGCAAT  
10 D G S T T S S E S L D T K T H C V C S T S K Q N S V E F A P N  
271 ACTCTGCTGCAATCGCGGCAAGGACACAGTTGATTTGGCTTTGTCTTTTACGTGTGGAGTGGAAATACCACACGACGGCATTTGCACCC  
40 T L L R S R A R H T L I W L V F Y V W E W N T T T A F A P N  
361 TCACCTTCTGCAATTCGACCTTTTCGAGCGTTCGCTGGTTCGCAAGTCAACACATAGTATCGAGTCTAGTTAGCGGTGACAAACGTGAC  
70 S P S R I A A F R A S R G R K L T T S V S S L V S G D K R D  
451 TCGCGCTCCCAAGCAGAGCATCTGGAGAGTGGCAATTAATCGCGCAGGCTGGTGGAGTGTGCGGGGCGTATTTCTTAATACGCTC  
100 C A S P A D D D L V D V A I I G A G L G G L C A G A I I L N T L  
541 TACGGTAAGAGGTGGGTATCTACGAGGCAATTAATTTGGCGAGGCTGTGACACAGCTTTGATCGCGGCGCGCGGAGCGGTGTAAT  
131 Y G K K V G I Y E A H Y L A G G C A H A F D R R A A D G V N  
631 TTACCTTTGATTCGCGCCGACCATCTCTGGGATGCTCAAGTCCACCTTTAATGCCCTACAGCAAGCTTTGGAGCTGTGGGTCAA  
160 F T F D S G P T I L L G C S S P P F F N A L Q V L D A V G Q  
721 AAGAATCCAGAAAGGCAATGAATTCGGGTGAAAGTCAATCTGGGACGGGATGAGTTTACGCGGGCTCACTACACAGCTTTGGGGGA  
190 K N F G K D N E L R W K V I L G R D E F Q R G P L T R F G G  
811 CCCAAAGCCTTGGAGGAGTTCGAAGCGCTACGAGAAGCAACCAAGGATCTTTTGGCTGGCGCAAAATACCTGCCATGGCTATGCGTCCC  
220 P K A L E E F E A L R E A T K D L L A G A K I P A M A M R P  
901 GGTCCAAGTGGCTGGTACCTCATCCGGTATTTTTCGACATCTGGTTACCTTGTCTTCCAGGGATCAAGGCAACGGGAAGCTTTGGG  
250 G P S A L V P L I R Y F S T L V T L L S Q G S K A T G T F A  
991 TCATTTATTCAGCGGCCCAATTCAGTGAACGATCCGTGGCTGCGATCGTGGCTGGATGCTTCGCTTTTCTTATCCGGGCTACCC  
280 S F I D G P N F T V T D P W L R S W L D A L A F S S G L P  
1081 GCTAGTCAACCGCAGCGCCCATGGCGTTTACACTAGTGACATGCAACCGCCCGGTGCGAGCTGGACATTCYCAAGGCGGTATG  
310 A S R T A A A A M A F T L S D M H R P G A A L D P P K G M  
1171 GGAGCAATCGCTGAGGCCCTTGTACGGGAGTACAGCAAGCTTCGAACGGTTCTCAGGTACACTTCGCGCAACTTCGGAAGCAATTCG  
340 G A I A E A L V R G V Q Q G S N G S Q V H L R Q P V E K I D  
1261 TTTAGTGAGGAGCGTACCATCGCTACGGGCTGACGCTACGCAACGGAAGACGGATCTGCTCGGAGGGGTGATATGCAATGCACCA  
370 F S E D G T I A T G L T L R N G R R I L A R E G V I C N A P  
1351 GTTTGGTCCCTGAAGAGCTTACGTCCAACTCGATCCGGAAGCGGAGGAGACTCTCTTGGTGCTTCGATACGCAAGAAAGACCGGC  
400 V W S L K S L R P T R S G E A D E T L L G A C D T A E K T G  
1441 TCCTTTTTCATCTGATTTGGCGCTGGAATCTAGTGGCTGAACCTTGGCAACTTGGAACTCTACTACACTGTGATGGACCAATCGTTA  
430 S F L H L H L A L E S S G L N L D N L E A H Y T V M D R S L  
1531 GGAGGGGATGGTCTCTCGTAAATGGAGTCTTGGAGGACCTTCGCGGAATACCTTAACATGATTGCCGCTTCGAATCTTCGCAAGATTGAC  
460 G G D G S S V N G V L D G P C G I L N M I A V S N P C K I D  
1621 AATAGTCTAGCTCCCGACGGAACCATTTGTGGTACACGCTTACAGCGCCGCAACGAACTTACGAAATTTGGGAGGGGACTAGATGCAAGA  
490 N S L A P D G T I V V H A Y S A G N E P Y E I W E G L D R R  
1711 AGTGACGGGTATATGTGCTTAAAGGAAGCAGGCTGAAGTGTATGGCGCGCTGGGAGAGTATTATCTTGATGGCGCAATCGTGTCT  
520 S D G Y M C L K E D R A E V L W R A V E S I I P D A R N R V  
1801 GTGATTAGTGAGATTGGAATCTCTATCAGCAGCAGGCTTTCTTGAACGACCTAGAGGAACATATGGTAGTGCCACTGAAGACTACCTT  
550 V I S E I G S P I T H E R F L N R P R G T Y G S A T E D Y L  
1891 GCGGACGGTAGTACATCGATCGGGAATTTGCTTTGGCTGGCAGCGGATTTTCCCGGATCGGTTTGGCCGAGTGGCGATCAGCGGG  
580 A D G S T I G N L L A G D G I F P G I G L P A V A I S G  
1981 GCCAGCGAGCGAATGCAATGGTGAAGCTATTAACAGTGGGAATGTCTAGACGAGTGGGCAAAAGCCAAAAGCTATAGTTGAGAAA  
610 A S A A N A M V S V F K Q W E C L D E L G K S Q K L \*  
2071 ATAGCGAGGAAGTGTAAATTTAGAACATTCCTTTGGAAAGTG

注:矩形框:起始密码子;矩形框带\*:终止密码子;下划线:保守序列。

Note: The rectangle for protein initiation. The rectangle with \* for protein termination. The underlined showed conserved domain.

图1 三角褐指藻 *crtsio* cDNA 全长及其推导的氨基酸序列

Fig.1 cDNA full-length and putative amino acid sequence of *crtsio* in *P. tricornutum*



注:A:α-螺旋;B:β-折叠;C:无规则卷曲;  
D:扩展的FAD结合结构域。

Note: A:α-helix. B:β-fold. C:Random coil. D:Represents the extended FAD binding domain.

图2 三角褐指藻 *crtsio* 蛋白空间结构预测图  
Fig.2 Prediction of spatial structure of *crtsio* protein in *P. tricornutum*

2.4 诱导子对三角褐指藻岩藻黄素含量以及 *crtsio* 基因表达水平的影响

由图5可知,不同诱导子处理下,岩藻黄素含量均呈先升高后降低的趋势。当ASA浓度为10 mg·L<sup>-1</sup>,

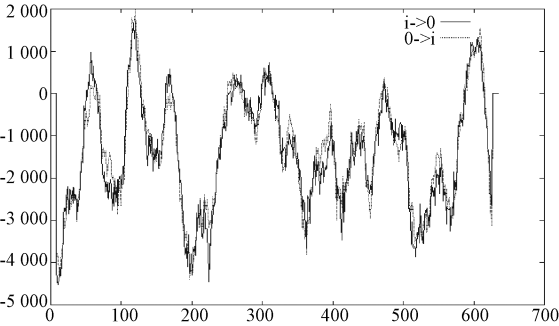


图3 三角褐指藻 *crtsio* 蛋白 TM-螺旋预测图  
Fig.3 Predicted TM-helix of deduced amino acid of *crtsio* protein in *P. tricornutum*

AA浓度为0.1 mg·L<sup>-1</sup>, ACS浓度为0.2 mg·L<sup>-1</sup>, MeJA浓度为200 μmol·L<sup>-1</sup>时,三角褐指藻中岩藻黄素含量最高。

为进一步探究4种诱导子对岩藻黄素含量的诱导机制,对各处理下三角褐指藻 *crtsio* 基因的表达水平进行检测。结果表明,三角褐指藻 *crtsio* 基因的表达水平随MeJA、AA、ACS和ASA浓度的增加基本呈相同的趋势,即先升高后降低。且当岩藻黄素含量最高时,三

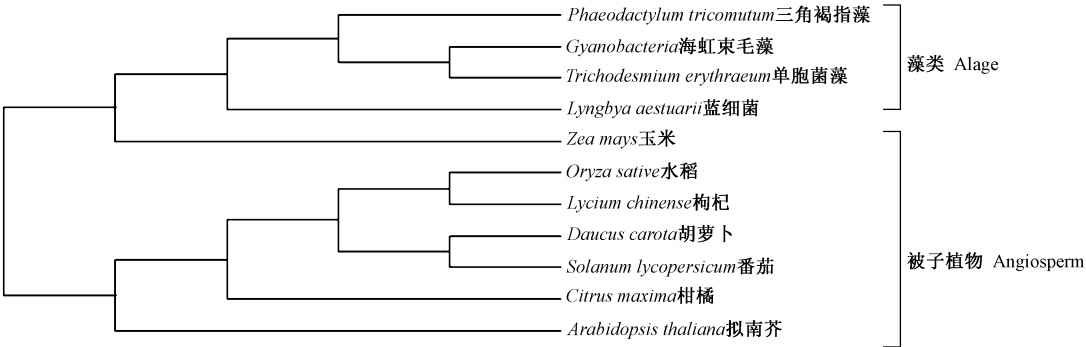


图 4 三角褐指藻 crtiso 蛋白系统进化树

Fig.4 The phylogenetic tree of crtiso protein in *P. tricomutum*

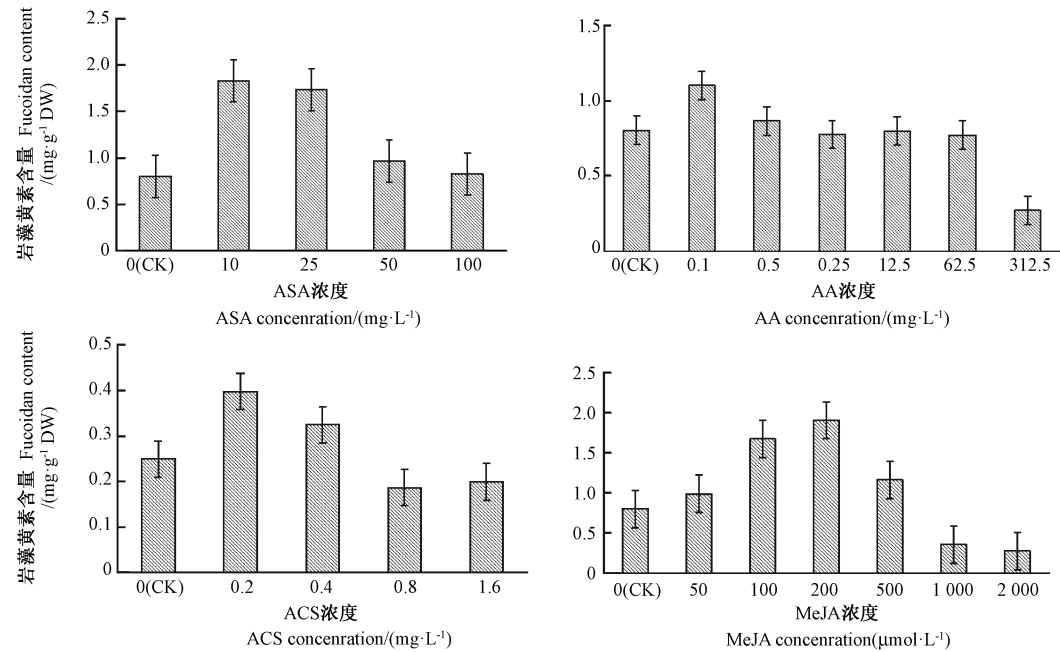


图 5 不同浓度诱导子对三角褐指藻岩藻黄素含量的影响

Fig.5 Effect of different concentration of electors on fucoxanthin content in *P. tricomutum*

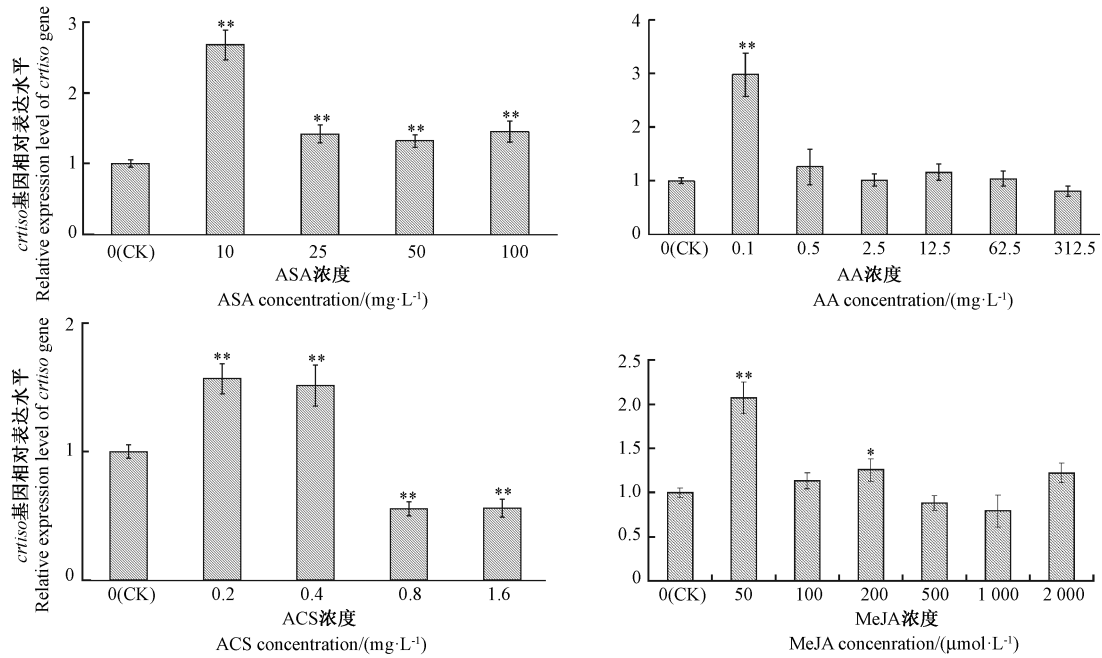
角褐指藻 *crtiso* 基因的表达水平也达到最高。在 10  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  ASA 处理下三角褐指藻 *crtiso* 基因的表达水平约为 CK 的 2.7 倍,在 0.1  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  AA 处理下三角褐指藻 *crtiso* 基因的表达水平约为 CK (0  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 的 3 倍,而在 0.2  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  ACS 处理下表达水平约为 CK 的 1.6 倍。上述表明,在 MeJA、AA、ACS 和 ASA 的处理下,三角褐指藻 *crtiso* 基因的表达显著提高(图 6)。

为更好地研究在同一浓度的同一诱导子处理下,岩藻黄素含量与基因表达量关系,对两组数据进行趋势线  $R^2$  分析。结果表明,在 ACS 处理下岩藻黄素含量与基因表达量呈现出显著 ( $R^2 = 0.9246$ ) 的线性关系;在 AA 和 ASA 处理下,岩藻黄素含量与表达量之

间也存在线性关系;但诱导子 MeJA 对三角褐指藻 *crtiso* 基因的表达水平的影响作用与岩藻黄素的含量变化不存在线性关系。

### 3 讨论

岩藻黄素是一种具有多种生物学功能的类胡萝卜素,朱帅旗等<sup>[30]</sup>以三角褐指藻为研究对象,发现 *crtiso* 基因参与了岩藻黄素的生物合成。本研究通过克隆三角褐指藻中 *crtiso* 基因,利用生物信息学技术对三角褐指藻中的 *crtiso* 基因的核酸及氨基酸序列进行分析,并对其结构和功能进行预测,发现 *crtiso* 蛋白属于藻类



注: \* 表示在 0.05 水平差异显著, \*\* 表示在 0.01 水平差异极显著。

Note: \* indicates significant difference at 0.05 level, \*\* indicates extremely significant difference at 0.01 level.

图 6 不同浓度诱导子对三角褐指藻类岩藻黄素表达量的影响

Fig.6 Effect of different concentrations of different treatments on the expression in *P. tricomumtum*

*crtiso* 家族,在藻类中与海虹束毛藻亲缘关系最近,在高等植物中与玉米亲缘关系最近。李群睿<sup>[14]</sup>研究表明,玉米 *crtiso1* 能将 7,9,7',9' - 四顺式 - 番茄红素(前番茄红素)转换为全反式番茄红素;*crtiso* 基因是高等植物类胡萝卜素合成途径中的关键基因之一,并且能催化多反式番茄红素向多顺式番茄红素的转变,参与类胡萝卜素脱氢的过程<sup>[33-35]</sup>。本研究结果表明,*crtiso* 基因在三角褐指藻中也可能具有相同的作用。前人通过对 *crtiso* 的三级蛋白结构预测分析,发现 *crtiso* 具有与 CRTI 类似的扩展的 FAD 结合结构域<sup>[36]</sup>,并与原卟啉原氧化还原酶和单胺氧化酶同源<sup>[37]</sup>。Moise 等<sup>[38]</sup>研究发现 CRTI 中首先描述的扩展的 FAD 结合结构域与哺乳动物酶视黄醇饱和酶同源,其催化脱辅酶 - 视黄醇的双键饱和和以产生 (13R) - 全反式 - 13,14 - 二氢赖氨酸,并需要还原性黄素腺嘌呤二核苷酸和还原型辅酶 II 进行水解,表明 *crtiso* 是一种还原性黄素腺嘌呤二核苷酸依赖性蛋白,其需要减少辅因子和氧化还原体系的活性。作用于类似底物的 *crtiso*,去饱和酶和饱和酶的序列相似性与具有共轭双键的类异戊二烯的顺式反式异构化机制一致,涉及饱和顺式键,随后双键旋转和去饱和<sup>[39]</sup>。研究表明,*crtiso* 通过异构化分子一端的 7 号碳和 9 号碳顺式键,催化一个两步反应依次识别一个类似类胡萝卜素分子的一端,同

时,该蛋白还存在和异戊二烯基二磷酸合酶有同源性的保守区域<sup>[40-41]</sup>。因此,阐明 *crtiso* 在类胡萝卜素合成中的调控机理,为研究 *crtiso* 与三角褐指藻中岩藻黄素含量的关系奠定了基础。

本试验研究 4 种诱导子不同浓度处理下,三角褐指藻中岩藻黄素含量和 *crtiso* 表达量的关系,发现岩藻黄素含量和 *crtiso* 表达量均随着诱导子浓度的增加,呈现先上升后下降的趋势。ASA、AA 和 ACS 这 3 种诱导子对喜树<sup>[42]</sup>、红豆杉<sup>[43]</sup> 和西洋参<sup>[44]</sup> 诱导次生代谢产物关键基因的研究表明,在适宜浓度下,这 3 种诱导子均能使二萜类次生代谢产物含量升高,表明诱导子可以诱导部分关键基因表达上调。朱帅旗等<sup>[30]</sup> 利用 ACS 处理三角褐指藻以研究岩藻黄素合成相关基因表达的情况,发现 *chyb*、*pds* 和 *crtiso* 等与次生代谢相关基因表达量均呈先上升后下降的趋势。王名雪<sup>[45]</sup> 利用 SA 诱导长春花,发现其茉莉酸合成途径中的关键酶表达量随着 SA 浓度的增加呈先上升后下降的趋势。申培林<sup>[46]</sup> 利用 ASA 诱导烟草,发现烟草中的 11 个类胡萝卜素合成关键基因中 *dxs*、*dxr* 等关键基因表达量的变化均呈先上升后下降趋势,与本试验结果一致。综上,随着诱导子 ASA、AA、ACS 浓度升高,植物次生代谢产物及其关键基因的表达均先上升后下降,这可能是因为,首先在低浓度诱导子的处理下,诱导子充分与

植物细胞膜表面的受体结合,使细胞发生一系列生理生化反应,从而提高基因的表达量<sup>[47]</sup>;此外,在较高浓度下,诱导子可能胁迫了植物细胞以抑制细胞进行相关生理生化反应,从而抑制基因的表达。推测也可能是高浓度诱导子直接对植物细胞的生长造成影响,细胞对诱导子细胞对于诱导子作用产生负反馈调节应答,使细胞的正常生长代谢机制遭到破坏,甚至引起了细胞死亡。本试验中4种诱导子在不同浓度处理诱导下,*crtiso*的表达水平随着ASA、AA、ACS浓度的变化呈相同的趋势,且当岩藻黄素含量达到峰值时,*crtiso*基因的表达水平也达到最高,二者存在线性关系,表明*crtiso*基因是ASA、AA、ACS调控三角褐指藻岩藻黄素积累的主要基因之一。

本试验结果表明,MeJA对*crtiso*基因的表达水平与岩藻黄素的含量变化的影响不一致。Bertrand<sup>[48]</sup>研究发现,岩藻黄素的合成通路是一个十分复杂的代谢网络,涉及到多个基因参与,如*pds*、*pys*、*zds*和*lcyb*等。章丽等<sup>[49]</sup>认为诱导子MeJA促进绿色杜氏藻类胡萝卜素的积累可能是通过诱导合成途径中相关基因的表达来实现的。因此,推测MeJA并非通过*crtiso*基因调控岩藻黄素的积累,且诱导子在调控代谢方面对不同基因产生的作用效果存在差异。

## 4 结论

本研究利用转录组测序获得三角褐指藻*crtiso*基因cDNA全长序列,进行生物信息学分析,并研究不同诱导子处理后该基因的表达差异与岩藻黄素含量的变化。结果表明,不同诱导子处理后,*crtiso*基因表达量和盐藻黄素含量均随着处理浓度升高呈先升高后降低的趋势。当AA、ASA、ACS质量浓度分别为0.1、10、0.2 mg·L<sup>-1</sup>时,*crtiso*表达量和岩藻黄素含量均达到最高,其中ACS处理下的基因表达量与岩藻黄素含量存在的线性关系尤为显著,但MeJA基因表达量与岩藻黄素含量之间不存在线性关系,表明在三角褐指藻中*crtiso*基因确为岩藻黄素合成的关键基因,且显著受到诱导子ASA、AA、ACS的调控,但MeJA不是通过*crtiso*基因来实现调控代谢。本研究为进一步深入研究三角褐指藻中岩藻黄素代谢网络及相关基因调控机制奠定了一定的理论基础。

## 参考文献:

- [1] 陈国栋, 燕燕, 宋晶. 岩藻黄素的生物活性及应用研究进展[J]. 河北渔业, 2009(8): 50-52
- [2] Zhao X, Zhang S P, An C N, Zhang H N, Sun Y, Li Y M. Neuroprotective effect of fucoxanthin on  $\beta$ -amyloid-induced cell death[J]. Journal of Chinese Pharmaceutical Sciences, 2015, 24(7): 467-474
- [3] 刘钰呈, 孙移坤, 戴宜武. 岩藻黄素对脑胶质瘤细胞U87增殖及自噬的影响[J]. 山东医药, 2016, 56(15): 4-7
- [4] 王添娇. 褐藻岩藻黄素对胆固醇代谢的调控作用研究[D]. 大连: 大连海洋大学, 2015
- [5] 徐戎, 张悦, 王倩, 曾繁典. 昆布有效成分岩藻黄质对人体7种肿瘤细胞增殖与凋亡的影响[J]. 中药药理与临床, 2009, 4(9): 21-24
- [6] Iwasaki S. *In vivo* antioxidant activity of fucoxanthin on obese/diabetes KK-ay mice[J]. Food & Nutrition Sciences, 2012, 3(11): 1491-1499
- [7] Yu R X, Hu X M, Xu S Q, Jiang Z J, Yang W. Effects of fucoxanthin on proliferation and apoptosis in human gastric adenocarcinoma MGC-803 cells via JAK/STAT signal pathway[J]. European Journal of Pharmacology, 2011, 657(1/3): 10-19
- [8] Maeda H, Hosokawa M, Sashima T, Murakami-Funayama K, Miyashita K. Anti-obesity and anti-diabetic effects of fucoxanthin on diet-induced obesity conditions in a murine model[J]. Molecular Medicine Reports, 2009, 2(6): 897-902
- [9] 张文源, 高保燕, 雷学青, 吴洁, 张成武. 岩藻黄素的理化与生物学特性、制备技术及其生理活性研究进展[J]. 中国海洋药物, 2015, 34(3): 81-95
- [10] 彭娟, 邓夏青, 敖钰舒, 袁建平. 岩藻黄素抗肥胖和抗糖尿病病理性研究进展[J]. 现代食品科技, 2015, 31(9): 314-325
- [11] 臧正蓉, 解修俊, 赵佩佩, 郇丽, 黄爱优, 张宝玉. 温度和光照对三角褐指藻的生长及岩藻黄素含量的影响[J]. 海洋科学, 2015, 39(7): 1-6
- [12] Breitenbach J, Sandmann G.  $\zeta$ -Carotene cis isomers as products and substrates in the plant poly-cis carotenoid biosynthetic pathway to lycopene[J]. Planta, 2005, 220(5): 785-793
- [13] Kato M, Ikoma Y, Matsumoto H. Accumulation of carotenoids and expression of carotenoid biosynthetic genes during maturation in citrus fruit[J]. Plant Physiology, 2004, 134(2): 824-837
- [14] 李群睿. 玉米类胡萝卜素异构酶和番茄红素 $\epsilon$ -环化酶基因的克隆与鉴定[D]. 长春: 东北师范大学, 2010
- [15] 史艳梅, 王燃, 杨军, 罗朝鹏, 李锋, 武明珠. 烟草类胡萝卜素异构酶基因的克隆及功能研究[J]. 中国烟草学报, 2014, 20(6): 138-143
- [16] Isaacson T, Hirschberg J. Cloning of tangerine from tomato reveals a carotenoid isomerase essential for the production of beta-carotene and xanthophylls in plants[J]. Plant Cell, 2002, 14(2): 333-342
- [17] Breitenbach J, Braun G, Steiger S, Sandmann G. Chromatographic performance on a C30-bonded stationary phase of monohydroxycarotenoids with variable chain length or degree of desaturation and of lycopene isomers synthesized by various carotene desaturases[J]. Journal of Chromatography, 2001, 936(1/2): 59-69
- [18] Masamoto K, Wada H, Kaneko T, Takaichi S. Identification of a gene required for cis-to-trans carotene isomerization in



- carotenogenesis of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 [J]. Plant Cell Physiology, 2001, 42(12): 1398–1402
- [19] Vallabhaneni R, Wurtzel E. Timing and biosynthetic potential for carotenoid accumulation in genetically diverse germplasm of maize [J]. Plant Physiology, 2009, 150(2): 562–572
- [20] Park H, Kreunen S S, Cuttriss A J, Dellapenna, D, Pogson B J. Identification of the carotenoid isomerase provides insight into carotenoid biosynthesis, prolamellar body formation, and photomorphogenesis[J]. Plant Cell, 2002, 14(2): 321–332
- [21] 周丽亚, 龚一富, 朱帅旗, 王何瑜. 绿色杜氏藻类胡萝卜素异构酶(*crtiso*)的基因生物信息学与转录差异研究[J]. 生物学杂志, 2016, 33(6): 15–19
- [22] Wu C H, Murthy H N, Hahn E J. Establishment of adventitious root co-culture of Ginseng and Echinacea for the production of secondary metabolites[J]. Acta Physiologiae Plantarum, 2008, 30(6): 891–896
- [23] 姜晶, 李伟, 李天来. 乙酰水杨酸对盐胁迫下番茄蔗糖代谢关键酶活性与基因表达的影响[J]. 沈阳农业大学学报, 2007, 38(1): 30–34
- [24] 董霞, 李文正, 黄夸克. 水杨酸对烟草 *grps* 基因表达的影响[J]. 吉首大学学报(自然科学版), 2008, 29(2): 86–91
- [25] Gong Y F, Liao Z H, Chen M. Molecular cloning and expression profile analysis of *Ginkgo biloba* DXS gene encoding 1-Deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase, the first committed enzyme of the 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate pathway [J]. Planta Medica, 2006, 72(4): 329–335
- [26] 吴文华, 潘瑞炽. 茉莉酸甲酯对水稻幼苗光合作用的影响[J]. 植物学报, 1998(3): 256–262
- [27] 王丽丽, 李惠咏, 龚一富. 花生四烯酸对雨生红球藻细胞生长和虾青素含量的影响[J]. 水产科学, 2010, 29(3): 142–146
- [28] 叶丽, 蒋霞敏, 毛欣欣. 温、光、盐对三角褐指藻紫外诱变株生长、总脂及脂肪酸的影响[J]. 生态学杂志, 2015, 34(2): 454–462
- [29] 朱帅旗, 龚一富, 杭雨晴, 刘浩. 绿色杜氏藻转录组分析[J]. 遗传, 2015, 37(8): 828–836
- [30] 朱帅旗, 龚一富, 刘浩, 张兵兵, 王何瑜. 硫酸铈铵对三角褐指藻岩藻黄素含量的影响及转录差异研究[J]. 中国稀土学报, 2014, 32(6): 750–757
- [31] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method [J]. Methods, 2001, 25(4): 402–408
- [32] 刘浩, 杭雨晴, 朱帅旗, 王何瑜, 龚一富. 葡萄糖对三角褐指藻生长、岩藻黄素含量及相关基因表达的影响[J]. 中国药理学杂志, 2016, 51(14): 1230–1234
- [33] 陶能国, 张继红. 纽荷兰脐橙 *crtiso* 基因片段的克隆与分析[J]. 吉林农业大学学报, 2008, 30(1): 28–30
- [34] Isaacson T, Hirschberg J. Cloning of tangerine from tomato reveals a carotenoid isomerase essential for the production of beta-carotene and xanthophylls in plants[J]. Plant Cell, 2002, 14(2): 333–42
- [35] Park H, Kreunen S S, Cuttriss A J. Identification of the carotenoid isomerase provides insight into carotenoid biosynthesis, prolamellar body formation and photomorphogenesis[J]. Plant Cell, 2002, 14(2): 321–332
- [36] Kadono T, Kira N, Suzuki K, Iwata O, Ohama T, Okada S. Effect of an introduced phytoene synthase gene expression on carotenoid biosynthesis in the marine diatom *Phaeodactylum tricornutum* [J]. Marine Drugs, 2015, 13(8): 5334–5357
- [37] Dailey T A, Dailey H A. Identification of an FAD superfamily containing protoporphyrinogen oxidases, monoamine oxidases, and phytoene desaturase. expression and characterization of phytoene desaturase of *Myxococcus xanthus* [J]. The Journal of Biological Chemistry, 1998, 273(22): 13658–13662
- [38] Moise A R, Domínguez M, Alvarez S. Stereospecificity of retinol saturase: absolute configuration, synthesis, and biological evaluation of dihydroretinoids[J]. Journal of the American Chemical Society, 2008, 130(4): 1154–1155
- [39] Moise A R, Albabili S, Wurtzel E T. Mechanistic aspects of carotenoid biosynthesis [J]. Chemical Reviews, 2014, 114(1): 164–193
- [40] Fraser P D, Ruiz-Hidalgo M J, Lopez-Matas M A. Carotenoid biosynthesis in wild type and mutant strains of *Mucor circinelloides* [J]. Biochimica Et Biophysica Acta, 1996, 1289(2): 203–208
- [41] Yu Q, Ghisla S, Hirschberg J, Mann V, Beyer P. Plant carotene cis-trans isomerase *crtiso*: a new member of the fadred-dependent flavoproteins catalyzing non-redox reactions[J]. Journal of Biological Chemistry, 2011, 286(10): 8666–8676
- [42] 周宪林. 甲基茉莉酸对喜树中 *hmgS* 基因表达的影响初探[J]. 井冈山医学学报, 2009, 11(6): 13–15
- [43] 苗志奇, 未作君, 元英进. 水杨酸在紫杉醇生物合成中诱导作用的研究[J]. 生物工程学报, 2007, 16(4): 509–513
- [44] 梁莹. 诱导子调控下西洋参发状根皂苷合成相关基因表达研究[D]. 长春: 长春大学, 2014
- [45] 王名雪. 长春花茉莉酸生物合成途径关键酶基因的克隆与表达分析[D]. 上海: 上海交通大学, 2013
- [46] 申培林. 烤烟类萜代谢及关键酶基因表达的基因型差异与调控效应研究[D]. 郑州: 河南农业大学, 2011
- [47] Xiao C Q, Gao H, Chi R A. Progress in the application of elicitors to promote the production of plant secondary metabolites[J]. Natural Product Research & Development, 2004, 16(5): 473–476
- [48] Bertrand M. Carotenoid biosynthesis in diatoms[J]. Photosynthesis Research, 2010, 106(1): 89–102
- [49] 章丽, 龚一富, 刘晓丹, 潘益芳, 刘增美, 朱天艺. 外源 MeJA 胁迫对盐生杜氏藻生理生化特性的影响[J]. 生物学杂志, 2013, 30(3): 38–42



# Cloning and Expression Analysis of Carotenoid Isomerase Gene From *Phaeodactylum tricornutum*

GUAN Yuelin GONG Yifu\* ZHU Shuaiqi YU Kai WANG Heyu YAN Xiaojun

(Key Laboratory of Applied Marine Biotechnology, Ministry of Education/School of Marine Sciences,  
Ningbo University, Ningbo, Zhejiang 315211)

**Abstract:** In order to explore the relationship between the biosynthesis of fucoxanthin and the regulation of *crtiso* gene expression, the full-length cDNA sequence of *crtiso* was obtained by transcriptome sequencing and the effects of acetylsalicylic acid (ASA), arachidonic acid (AA), methyl jasmonate (MeJA) and ammonium ceric sulfate (ACS) on the *crtiso* gene expression of *Phaeodactylum tricornutum* at different concentrations were studied. The results showed that the *crtiso* cDNA was 2 116 bp in length and 1 902 bp in open reading frame (ORF), encoding 635 amino acids. *crtiso* protein is a hydrophilic labile protein, relative molecular mass is 67 803.00 Mr, with the theoretical isoelectric point of 7.14, the main component of protein secondary structure is  $\alpha$ -helix,  $\beta$ -sheet and random curl, with conserved regions and domains. The phylogentic tree analysis indicated that the *crtiso* protein of *Phaeodactylum tricornutum* had a close genetic relationship with *Cyanobacteria*. The results of elicitor expression indicated that ASA, AA, MeJA and ACS could significantly increase the expression level of *crtiso* gene. When the concentration of ASA, AA, MeJA and ACS were 10  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ , 0.1  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ , 50  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  and 0.2  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  respectively, the expression of *crtiso* gene was the highest. Correlation analysis showed that the expression level of *crtiso* gene and the content of fucoxanthin was linear related, indicating that the biosynthesis of fucoxanthin triptolide by regulating *crtiso* gene expression. This study provides an important basis for further studing the synthesis of fucoxanthin in the future.

**Keywords:** *Phaeodactylum tricornutum*, CRITSO, fucoxanthin, genetic cloning, expression analysis

---

## 更正启事

《核农学报》第32卷第10期勘误如下:

目录,“植物诱变育种·农业生物技术”栏目中《紫花苜蓿种质资源萌发期耐盐性鉴定》一文作者“王静 许光 麻冬梅”,改为“王静 许兴 麻冬梅”。