

绿色杜氏藻 *GGR* 基因生物信息学分析及表达研究

张 燕, 龚一富*, 景丹丹, 朱帅旗, 俞 凯

(宁波大学 海洋学院, 浙江 宁波 315211)

摘要: 采用 Illumina HiSeqTM 2000 高通量测序方法获得绿色杜氏藻 *GGR* 基因(GenBank 序号: KX100480) cDNA 全长序列, 研究了甲基茉莉酸(MeJA)对绿色杜氏藻 *GGR* 基因表达的影响. 测序结果表明, 绿色杜氏藻 *GGR* 基因 cDNA 全长 2 356 bp, 开放阅读框 1 539 bp, 编码 512 个氨基酸, 分子量为 52.296 1 kDa, 理论等电点为 6.54. 序列分析结果表明, 该蛋白具有保守的 ChIP 结构域, 为可溶性蛋白, 具有跨膜区域, 无信号肽. TargetP 1.1 Server 预测结果表明, 该蛋白可能定位于线粒体. 系统进化树结果表明, 绿色杜氏藻 *GGR* 蛋白较其他植物的 *GGR* 蛋白亲缘关系较远. RT-PCR 结果表明, 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ MeJA 可显著地提升绿色杜氏藻 *GGR* 基因的表达($P<0.01$). 同时, 绿色杜氏藻叶绿素和类胡萝卜素含量达到最高, 说明 *GGR* 基因与绿色杜氏藻叶绿素和类胡萝卜素的合成存在一定关系.

关键词: 绿色杜氏藻; *GGR*; 甲基茉莉酸; 叶绿素; 类胡萝卜素

中图分类号: Q786

文献标志码: A

文章编号: 1001-5132 (2017) 01-0035-07

绿色杜氏藻(*Dnaliella viridis*)是一种单细胞无细胞壁的绿藻^[1], 藻体中含有丰富的萜类化合物. 已有的研究表明, 植物体中萜类物质合成有两条途径, 即甲羟戊酸途径(Mevalonate pathway, MVA)和甘油醛-3-磷酸/丙酮酸途径(Glyceraldehyde-3-phosphate/pyruvate pathway, MEP). 在 MEP 合成途径中, 牻牛儿基牻牛儿基二磷酸(Geranylgeranyl pyrophosphate, GGPP)作为类胡萝卜素和叶绿素合成的前体物质. 一方面, 牻牛儿基牻牛儿基二磷酸在牻牛儿基牻牛儿基二磷酸还原酶(Geranylgeranyl reductase, *GGR*)作用下还原为植基焦磷酸(PhyPP), 然后与脱植基叶绿素酯化合成植基叶绿素^[2-3]. 另一方面, 牻牛儿基牻牛儿基二磷酸在八氢番茄红素合成酶(Phytoene desaturase, *PDS*)的作用下合成八氢番茄红素, 进一步参与类胡萝卜素的合成^[4-5]. 因此 *GGR* 被认为是叶绿素合成中关键酶之一^[6-8]. Tanaka 等^[6]研究表明, 抑制烟草中 *GGR* 基因的表达活性, 烟草的生长速率、叶绿素和生育酚含量均

明显降低. Zhou 等^[7]研究表明, 大米中 *GGR* 基因突变使大米叶片变黄, 叶片中的叶绿素含量降低 50%, 这与文献[8]的研究结果一致. 迄今为止, 已在拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)^[9]、大米(*Oryza sativa*)^[7-8]、烟草(*Nicotiana tabacum*)^[10]、橄榄(*Olea europaea*)^[11]和桃子(*Prunus persica*)^[12]等高等植物中克隆出 *GGR* 基因, 但是在藻类尤其在绿色杜氏藻中关于 *GGR* 基因的克隆以及 *GGR* 基因的表达对其叶绿素和类胡萝卜素积累是否有影响, 尚未见报道.

本实验采用 Illumina HiSeqTM 2000 高通量测序方法获得绿色杜氏藻 *GGR* 基因 cDNA 全长序列^[13], 对其序列结构和功能特征进行了生物信息学分析. 并研究了 MeJA 对绿色杜氏藻叶绿素和类胡萝卜素含量的影响以及 *GGR* 基因的表达差异, 为进一步研究叶绿素和类胡萝卜素的合成机制以及 *GGR* 基因在叶绿素和类胡萝卜素合成中的作用提供理论依据.

收稿日期: 2016-04-24.

宁波大学学报(理工版)网址: <http://journal.lg.nbu.edu.cn/>

基金项目: 浙江省科技厅重点科技创新团队项目 (2012R10029-07, 2010R50029); 宁波市科技攻关项目 (2013C10018); 浙江省大学生科技创新活动计划暨新苗人才计划项目 (2014R405050); 宁波大学优秀学位论文培育基金 (py2014020).

第一作者: 张燕 (1991-), 女, 山东菏泽人, 在读硕士研究生, 主要研究方向: 藻类分子生物学. E-mail: 15005412101@163.com

*通信作者: 龚一富 (1973-), 男, 重庆人, 博士/副教授, 主要研究方向: 植物分子生物学. E-mail: gongyifu@163.com

1 材料与方法

1.1 藻种与试剂

绿色杜氏藻藻种由宁波大学海洋生物工程重点实验室微藻室提供,用3号培养基^[14]培养。TaKaRa RNAiso plus kit、反转试剂盒 PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser、SYBR® Premix Ex Taq™ II (Perfect Real Time)购自大连宝生物公司,其他常用试剂购自国药集团化学试剂有限公司。

1.2 绿色杜氏藻培养方法及处理

绿色杜氏藻的培养条件参照文献^[14]。将对数期的绿色杜氏藻以1:10的比例接种至500 mL的锥形瓶中,每瓶200 mL培养基,培养温度(25±1)℃,光照强度4 000 lx,光暗周期(12 h:12 h),每天定时摇瓶3次。培养2 d后,加入MeJA母液。MeJA的最终浓度梯度为0、100、200、500、1 000 μmol·L⁻¹,每个浓度设置3个平行组,培养至平台期(10 d)取样,测定叶绿素和类胡萝卜素含量。

1.3 绿色杜氏藻 GGR 蛋白的生物信息学分析

采用Illumina HiSeq™ 2000高通量测序方法获得绿色杜氏藻转录组数据。绿色杜氏藻 GGR 基因全长序列通过分析本实验中绿色杜氏藻转录组获得,分析方法参考文献^[13]。

将获得的 GGR 基因序列在 NCBI (National Center for Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 网站上查找开放阅读框(Open Reading Frame, ORF)^[15]。利用 NCBI 数据库中的 Blast 将目的基因的核苷酸序列与数据库中的核苷酸序列进行比对和相似性搜索;利用 MEGA 6.0 软件的邻位归并法(NJ法)构建系统进化树,并进行氨基酸、核酸序列比对;利用 NCBI 数据库中的 CDD 工具对 GGR 蛋白的结构域和功能元件进行鉴定;利用在线工具和相关软件(<http://www.expasy.org>)预测 GGR 蛋白的疏水性/亲水性、等电点、二级结构和分子量;利用 MOTIF SCAN 分析蛋白的磷酸化及糖基化位点;利用 SPOMA 预测绿色杜氏藻 GGR 蛋白的二级结构;利用 TargetP 1.1 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/>)预测 GGR 蛋白在细胞内的定位;利用 SignalP 4.1 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)在线软件分析蛋白质信号肽序列。

1.4 绿色杜氏藻叶绿素、类胡萝卜素含量的提取与测定

取处理10 d的绿色杜氏藻藻液10 mL,4 000 r·min⁻¹,4℃离心10 min,弃上清,向沉淀中加入适量的95%乙醇,避光抽提,离心取上清,重复2~3次,直至藻体变白,合并上清,定容至25 mL。在紫外—可见分光光度计上测定665、649、470 nm的吸光度。根据 Jenson 公式换算出叶绿素及类胡萝卜素含量^[16]。

1.5 绿色杜氏藻 GGR 基因表达分析

利用 Primer Premier 5.0 软件,根据 GGR 基因序列设计定量引物(GGR-F:5'-CGGGCTTGCCCTA CCTTG-3',GGR-R:5'-TGTGCCGTCGTGAGGTGT-3')和 β-action 内参基因引物(β-action F: 5'-CCTG G AAACGCTTGAATAAAT-3', β-action R: 5'-TAGTT TTTGTCCAGAGC CGAG-3')。委托上海生工生物工程股份有限公司合成。

按照 RNAiso plus (TaKaRa, 大连)法提取经不同浓度甲基茉莉酸处理24 h后的绿色杜氏藻(对数期)总 RNA。按照 PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser (TaKaRa, 大连)说明书反转得到 cDNA,于-20℃保存。在 Realplex4 型定量 PCR 仪(Eppendorf, German)上对 GGR 基因和内参基因 Action 进行实时定量 PCR (qRT-PCR)检测,反应体系:2×SYBR Mix (TaKaRa, 大连)10 μL,上下游引物(10 μmol·L⁻¹)各0.8 μL, cDNA 2 μL, ddH₂O 补至总体积20 μL。PCR 反应程序为:94℃预变性3 min;94℃30 s,52℃30 s,72℃20 s,40个循环数;72℃,10 min。每个处理重复3次。根据 2^{-ΔΔCt} 方法对定量数据进行分析,利用 SPSS 软件对数据进行单因素显著性分析和 Dunacan 多重性比较。

2 结果

2.1 绿色杜氏藻 GGR 蛋白的理化性质分析

采用 Illumina HiSeq™ 2000 高通量测序方法得到绿色杜氏藻 GGR 基因的 cDNA 全长,经 Bioedit 软件分析表明,绿色杜氏藻 GGR 基因的 cDNA 全长为2 356 bp。利用 ORF finder 分析表明,其3'非编码区(Untranslated Regions, UTR)共731 bp,5'非编码区共86 bp,包含有完整的开放阅读框(ORF)1 539 bp(核苷酸序列位置732-2270)(图1),

```

1   GATGAGCCTGGAGCGCTTCGTGGTCCCAAGTACCTCGGCAAGGAAGCTTGCACTGCCATGAATGCCACACCCAGCTACCATTTTCGATTAC
91  CATCACGATGCAAAATCAGCGCCGAGCAAGAGTACGTCACTCCACCATCTGTGACATCAAACGGGGCACCGCACAAACGTGCTGTAG
181 TTCTGCTGCTCACGCCTCAGTTCTGTTGTTTTGTGCAAGTTCACCTCTACTTTGCTGCACAGGACATGTGTAAATGCTCGCCAGTATTCC
271 AATGTCAAGTGTGCATAGTAGGTGCAAGCCAGAAGGCCAGCATCCTCGTCTGCTTTAAATAGGCAGCTTCATGAGCCCTGATCCAGTCAG
361 TGCACATCAGCTCTAGCCATGAATAAACAGCCAGTGCATGCGGCGCACCAGACTACCATTCTACCAAAACCAAGCTATATTACACCGTA
451 AAGCTAAATATTAGCTAGTATGTGTACGAAACGAAATTCAGAGAGCCTAGGAGTCATACGTGATGTCACTCTTCTCGTGAGTTCTGAG
541 AGAAACAAGCAGCAGCAATATTCAAGGCCGAGGAGCTGCAGCATTGAATGGCATTTCCTGGGACCCCCCTAAACCGGGAATGAGGTC
631 CCTGTGTACACACACCAACGGTGAGGGTCACAGCAGTTTGGCTGTACATGGCTGCGACTGGATTGAGAGGACATAGCGGCAAGGAAC
721 AGGGGCGGCGCAATGCTGCAACCACCCCTGGCAACAAAGCACAGGCGGCTAGCTGCTGCAATGGCGGCTCATGCAATGGGAATTGGTG
1   M R C N H P W Q Q K H R R L A A A M A A H A M G I G
811 GGTGGGCGCGGTAAGGGGTGTGCTCTAGACAACGGTGAGCTTCTCTCGTTGGCCTTGCTGCCAAAGGAGACGTTGATGCCCTTGCCG
27   G W A A V R G V R L D N G E L L L V G L A A K G D V D A L A
901 CTGCGCAGCGCATTGGCGCGCACCAGGCTGCTACGGTCTCCACCAGCAGCTTGACGTCTCCACAGGGGTGCCGGGCAGACTGTCTTG
57   A A Q R I G A H Q A A H G L H Q Q L D V L H R G A G H D C L
991 TAGAGGTAGGAGTCGAAGGTTCATGCGCTGCACGTAGTCGCTCTTGACATCTCCACAAAGCCTCGCGGGCGGGGTGCTGCGGTAGAAC
87   V E V G V E G H A L H V V A L A H L H K G L A G G V A A V E
1081 ACCTTCTGCAGGATGTCCAGCACCTTGTAGGTGGCCAGTACTTGCGGTCCCACTTGTCAGGTAGGTGCGAGGGCGGCCTCGCCAACC
117  H L L Q D V Q H L V G G P V L A V P L V Q V G A Q G G L A N
1171 ATCTTCTTCCCTTGTGCTGGCTGGCCTCCACAATTGCTCCGCGCACATGCGGCCGCTCTTGCTGCAAAGTAGATGCCCTTCCGGAGCAC
147  H L L P L L A G L H N C L R A H A A A L G C K V D A L S G A
1261 TTGGTCACATAGCCAGCGCGTCACCCACAAGAGCGATGCGGCCGCTGATGCGCGGGGGCGGGGTGCTCGGGATGGGGTGGGCTCA
177  L G H I A S G V T H K S D A A A D A A G A G V L G D G V G L
1351 ACGCGGATGATGGAGCCGCCCTCAGTCTTCACGCTGGCGCGGTGCGGGGTGGCTGCTGGTATTGCTTGATGGCCGCTTGTTCAGCACG
207  N A D D G A A L S L H A G A V A G G L L V L L D G R L V Q H
1441 GTGCCGTGCCACAGCCACGTGGTCTACTTGGGAACACCCAGCCGTAGAAGTCTGGGGACACGTCATCACCCACATACATCTCCGCC
237  G A G A H S H V V V L G E H P A V E V W G H V I T H I H L R
1531 AAATCCTGTAGTAGTCCATCTTGTCTCGGGGATGCGGATGCGCTCTGGAAGGCAATGGCGTAGTCGACTCGCCGCGCTCCATCTCC
267  Q I L V V V H L V L G D A D A L L E G N G V V V L A G V H L
1621 TTGGCCACGCGGCTGTTGGCGCCGTCAGCCCGATACCAGGTCCACCTCCATGGACTCGGGCTGCCTACCTTGCCGCTTCTCTATAA
297  L G H A A V G A V S P D H Q V H L H G L G L A Y L A A F L I
1711 GAGTGTAGTGGATGGTGAAGGGGCGTCGCTGCCCTCCTGCTCCATGCGCATGAACAGCCGTTACGAGGTGGCACCCAGGCTCTTG
327  R V V V D G E G A V A A L L L H A H E Q P V Q Q V G T Q A L
1801 GCGCGGTTGCGCAGGTAGTCGTCAAACACCTCACGACGGCACATGCCGATCCACTCTCTCGTTCAAGGTCTTGCCACATCAACCTCA
357  G A V A Q V V V K H L T T A H A D P L L L V Q G L A H I N L
1891 CGGTTGGAGGGAGAGATCATTTTCATCTTAGTGACGCGCGGTCAATGATCTCCATGGGCAGATCGAACTCATCCACCATGCAGATGGGA
387  T V G G R D H F H L S D A P V N D L H G Q I E L I H H A D G
1981 ATAGCACCAACGCAAGGCTTGCAAGTATCCATCTTGCGCTCGATCAGATATGTCTCGCAGCCACCTTGCCAAAGTCTCTGCTGCACAG
417  N S T T A R L A V I H L A L D Q I C L A A T L G Q S L C C T
2071 GCACCAGCGGTCCACCGCGATGACAGCAACCCTAAGAGGCTGTCAAGCACTGCACCGTCTTCACGGCGAGCACCTGCACAGCTGCC
447  G T S G S T A D D S N P K R P V K H C T V L H G E H L H S C
2161 CCGCGCTGCATTTTACCCTGTGGCCTTACCATGGCCGTTGCAAAGCGAGGGCGCACGGGTGTGCCGTGAAAGGCTTCTCTGCAATG
477  P A L H F T P A G L Y H G R C K A R A H G C A A E R L S C N
2251 CGCTGCATAGCCTTCTGTACTGCTTGGCAGCAGCAGCGGGGAAGCAGTAAAGCCTTGCAAGTTGCTCATGGTGAAGGATCAATGCAA
507  A L H S L L *
2341 ATGTGCTAAGGTTTCA

```

加下划线的为起始密码子, 下划线加*的为终止密码子, 线框标出 NADP 结合位点

图 1 绿色杜氏藻 *GGR* 基因全长及编码氨基酸序列

编码 512 个氨基酸。图 1 中线框标出的为 NADP 结合位点。经 ProtParam 软件在线分析, 其中酸性氨基酸(K+R)共 26 个, 碱性氨基酸(D+E)共 37 个。疏水性氨基酸(A、I、F、L、W、V)占 47.3%, 亲水性氨基酸(N、C、Q、S、T、Y)占 14.7%。该蛋白质的分子式为 $C_{2305}H_{3712}N_{712}O_{651}S_{15}$, 总原子个数 7 395,

推导蛋白质的相对分子质量为 52 296.1 Da, 理论等电点(pI)为 6.54, 不稳定系数(II)为 19.93, 该蛋白被归类为稳定蛋白。脂溶性系数为 120.10, 在波长 280 nm 处的吸光度为 20 230。

2.2 绿色杜氏藻 *GGR* 蛋白的结构分析

利用 ProtScale 软件对绿色杜氏藻 *GGR* 蛋白的

亲水性进行分析,结果如图2所示。

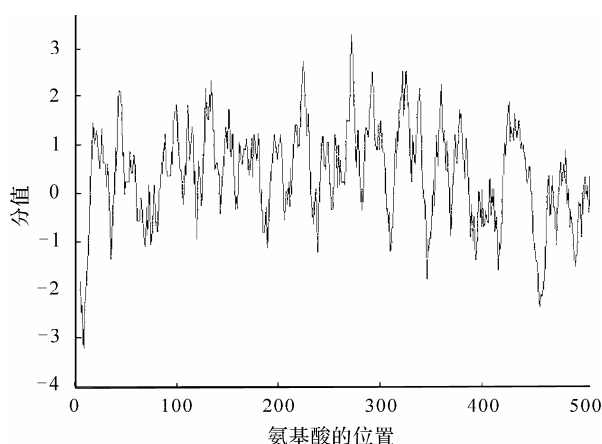


图2 绿色杜氏藻 GGR 蛋白的亲(疏)水性

从图2可知,该蛋白具两亲性,但总体为疏水性蛋白(平均疏水系数 -0.601)。经SOSUI在线分析显示GGR蛋白为可溶性蛋白。SignalP在线分析预测值为 0.343 ,明显小于阈值 0.500 ,所以GGR蛋白不存在信号肽。经TargetP 1.1 Server预测,GGR蛋白在细胞内定位于线粒体的可能性为 0.833 ,是分泌蛋白的可能性为 0.098 ,是其他蛋白的可能性为 0.082 ,所以其最有可能定位于线粒体上。TMHMM在线软件分析结果如图3所示。从图3可知,GGR蛋白在1~12处存在跨膜结构域。NCBI CDD工具对GGR蛋白保守结构域预测显示,该蛋白具有ChIP功能域,属于NADB-Rossmann超家族。通过SOPMA在线软件预测绿色杜氏藻GGR蛋白的二级结构,发现绿色杜氏藻GGR蛋白二级结构中 α -螺旋占主导地位,占 45.12% ,其次为延伸链、无规则卷曲和 β -转角结构,各占 22.66% 、 21.88% 和 10.35% 。根据MOTIF SCAN分析,该蛋白含

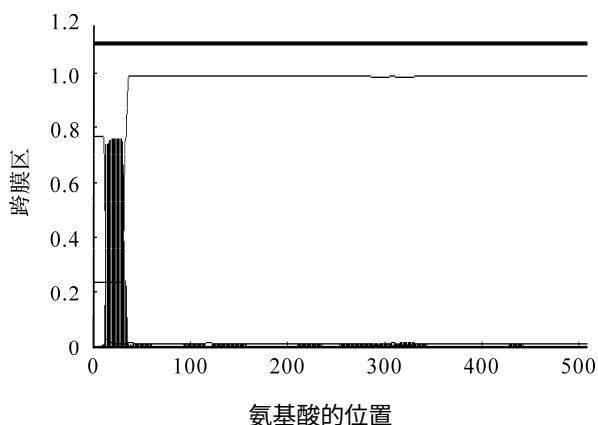


图3 GGR 蛋白的跨膜区域预测

有2个天冬酰胺糖基化位点,2个蛋白激酶C磷酸化位点、1个亮氨酸拉链位点、1个肌酸激酶2位点和14个N-豆蔻酰化位点。

2.3 绿色杜氏藻 GGR 蛋白的生物进化分析

利用NCBI网站下载不同物种的GGR蛋白序列,将绿色杜氏藻GGR氨基酸序列与莱茵衣藻(*Chlamydomonas reinhardtii*, XM_001690196.1)、小球藻(*Chlorella variabilis*, XM_005851378.1)、团藻(*Volvox carteri f. Nagariensis*, XM_002958127.1)、玉米(*Oryza sativa*, AK108809.1)等GGR氨基酸序列,利用MEGA6.0软件的邻位归并法(NJ法)构建系统进化树,结果如图4所示。从图4可知,不同物种的GGR蛋白的整个系统进化树分为2支,其中芝麻、油橄榄、烟草和碧桃等高等植物的亲缘关系较近,聚为一大支。莱茵衣藻、小球藻和四片藻等藻类的GGR蛋白聚为另一支。但在藻类分支中,绿色杜氏藻GGR蛋白与其他藻类分开,成为独立的一簇,说明绿色杜氏藻GGR蛋白与其他的亲缘关系较远。

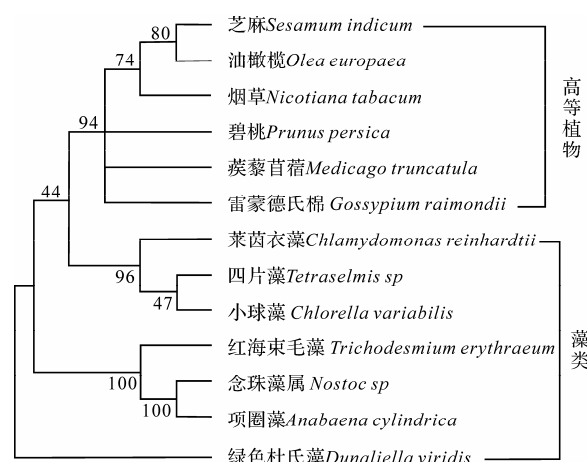


图4 绿色杜氏藻 GGR 蛋白与其他物种
GGR 蛋白分子进化树

2.4 绿色杜氏藻叶绿素、类胡萝卜素含量的测定及 GGR 基因表达分析

用不同浓度甲基茉莉酸处理绿色杜氏藻的GGR基因表达,RT-PCR检测结果如图5所示。从图5可知,随着甲基茉莉酸浓度的升高,绿色杜氏藻GGR基因的表达整体上呈现先增后减的趋势,100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 甲基茉莉酸处理下GGR基因的表达最高。单因素方差分析结果表明,经100、200、500 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 甲基茉莉酸处理的绿色杜氏藻中GGR基

因的表达水平存在极显著差异($P < 0.01$).

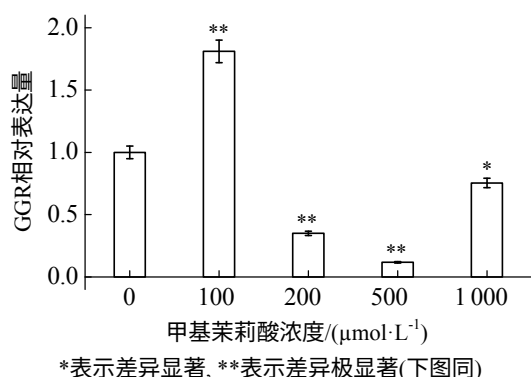


图 5 甲基茉莉酸处理下绿色杜氏藻 *GGR* 基因相对表达
不同浓度甲基茉莉酸对绿色杜氏藻中叶绿素
及类胡萝卜素影响结果如图 6 所示。

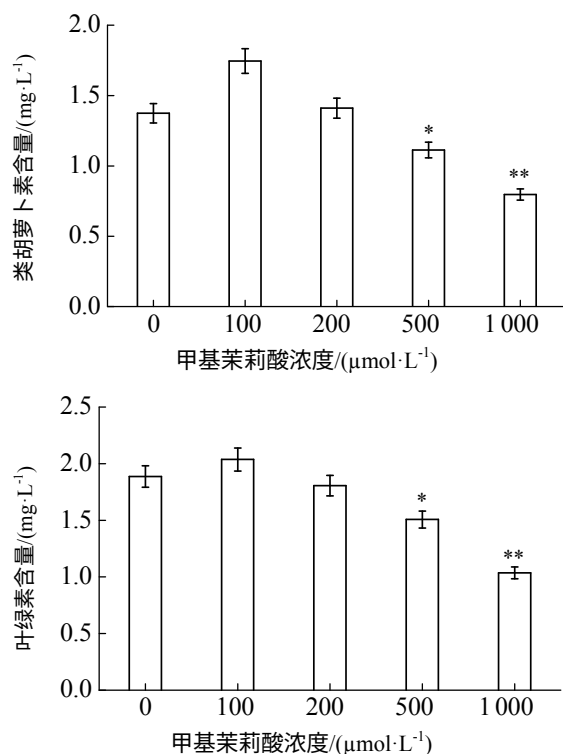


图 6 甲基茉莉酸对绿色杜氏藻叶绿素和
类胡萝卜素含量的影响

从图 6 可以知道, 随着甲基茉莉酸浓度的升高, 绿色杜氏藻单位体积内的叶绿素和类胡萝卜素的含量呈现先增后减的趋势, 而且在 $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 绿色杜氏藻的叶绿素和类胡萝卜素含量均达到最高值. 表明适宜浓度的 MeJA 能够促进叶绿素的合成, 进一步提升绿色杜氏藻光合作用, 增加类胡萝卜素的积累.

3 讨论

采用不同生物信息学软件对绿色杜氏藻 *GGR* 蛋白进行分析, 结果表明, 绿色杜氏藻 *GGR* 蛋白具有典型的 *GGR* 结构域, 又属于 NADB-Rossmann 超家族中的一员, 含有 NADP 结合位点(GXGXXG 结构域), 这些特征与拟南芥^[9]、桃子^[12]和小麦^[17]的 *GGR* 蛋白相似. 另外, 绿色杜氏藻 *GGR* 蛋白不存在信号肽, 定位于线粒体中, 而拟南芥^[9]、橄榄^[11]和桃子^[12]的 *GGR* 蛋白却定位于叶绿体上, 且含有胞质—叶绿体的转运肽, 这可能是因为绿色杜氏藻与高等植物之间进化上存在一定差别. 虽然高等植物在形态和结构上存在较大差异, 但在基因水平上差异不大^[18], *GGR* 蛋白在高等植物中相对保守^[12], 但归属团藻目的绿色杜氏藻在遗传上高度分化, 与其他绿藻和高等植物分离, 形成极为独立的类群^[18].

实验中使用 MeJA 处理绿色杜氏藻, 结果表明, MeJA 对绿色杜氏藻 *GGR* 基因的表达、叶绿素和类胡萝卜素的合成有一定的影响, 在 $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ MeJA 处理下, 绿色杜氏藻 *GGR* 基因表达水平、绿色杜氏藻单位体积内叶绿素和类胡萝卜素的含量都达到最高. 朱颖等^[19]研究表明, 外源 MeJA 在一定浓度范围能够促进盐生杜氏藻 β -胡萝卜素的积累和叶绿素的合成. 其中, 在 $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ MeJA 处理下, 盐生杜氏藻合成 β -胡萝卜素的能力最强. Laskaris 等^[20]的研究表明, 甲基茉莉酮酸酯提高欧洲红豆杉悬浮细胞的紫杉醇含量, 是由于紫杉醇生物合成途径中 GGPPS 的表达增加, 提高了细胞合成紫杉醇的能力. 王鑫威等^[21]认为 MeJA 促进雨生红球藻虾青素的积累主要是通过促进 *DXS* 基因的表达. 所以低浓度下单位体积内叶绿素和类胡萝卜素含量的增加, 可能因为 MeJA 诱导了 *GGR* 基因表达, 增加了叶绿素合成前体植基焦磷酸的积累, 使更多的脱植基叶绿素在叶绿素合成酶的作用下与植基焦磷酸酯化, 生成植基叶绿素^[22], 导致藻体中叶绿素的增加. 在 $200\sim 1000 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ MeJA 处理下, 绿色杜氏藻 *GGR* 基因的表达受抑制, 单位体积内叶绿素和类胡萝卜素含量降低. Choi 等^[23]研究也发现, 高浓度的 MeJA 可以抑制鲟鱼甘油生物碱的积累. 所以在 $200\sim 1000 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ MeJA

处理下,绿色杜氏藻 *GGR* 基因的表达、叶绿素和类胡萝卜素的合成受抑制,可能是由于 MeJA 对绿色杜氏藻的诱导属于最适浓度型^[24],只有在最适浓度下,基因的表达和次级代谢物的积累才能达到最大值。高浓度下叶绿素含量的降低也可能是由于重度胁迫导致藻体细胞内生理结构改变,叶绿素合成受抑制,降解加快,从而导致叶绿素含量降低^[19]。

4 结论

通过分析绿色杜氏藻转录组获得了绿色杜氏藻 *GGR* 基因的全长序列,并进行生物信息学分析,该基因 ORF 长 1 539 bp,编码 512 个氨基酸。该蛋白具有 ChIP 结构域,属于 NADB-Rossmann 超家族。在 $100\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ MeJA 处理下,绿色杜氏藻 *GGR* 基因表达、叶绿素和类胡萝卜素含量均达到最高,这表明绿色杜氏藻 *GGR* 基因的表达与叶绿素和类胡萝卜素的合成有关。但 *GGR* 基因的表达不一定能直接影响叶绿素和类胡萝卜素的积累,因为叶绿素和类胡萝卜素合成涉及多个反应步骤,要探明其生物合成的分子机制,尚需研究代谢通路中更多相关基因的表达。

参考文献:

- [1] OREN A. The alga *Dunaliella*: Biodiversity, physiology, genomics and biotechnology[J]. *Journal of Phycology*, 2010, 46(1):216-217.
- [2] BOLLIVAR D W, WANG S, ALLEN J P, et al. Molecular genetic analysis of terminal steps in bacteriochlorophyll a biosynthesis: Characterization of a *Rhodobacter capsulatus* strain that synthesizes geranylgeraniol-esterified bacteriochlorophyll a[J]. *Biochemistry*, 1994, 33(43):12763-12768.
- [3] SOLL J, SCHULTZ G, RÜDIGER W, et al. Hydrogenation of geranylgeraniol: Two pathways exist in spinach chloroplasts[J]. *Plant Physiology*, 1983, 71(3): 225-230.
- [4] MARTIN L, CHUNG-SOON I, GROSSMAN A R. Genome-based examination of chlorophyll and carotenoid biosynthesis in *Chlamydomonas reinhardtii*[J]. *Plant Physiology*, 2005, 138(1):490-515.
- [5] MYOUNGRYOUL P, EUNAE C, REHMAN S, et al. Expression of a sesame geranylgeranyl reductase cDNA is induced by light but repressed by abscisic acid and ethylene[J]. *Pakistan Journal of Botany*, 2010, 42(3): 1815-1826.
- [6] TANAKA R, KRUSE E, RUDIGER W B, et al. Reduced activity of geranylgeranyl reductase leads to loss of chlorophyll and tocopherol and to partially geranylgeranylated chlorophyll in transgenic tobacco plants expressing antisense RNA for geranylgeranyl reductase[J]. *Plant Physiology*, 1999, 120(3):695-704.
- [7] ZHOU Y, GONG Z, YANG Z, et al. Mutation of the light-induced yellow leaf 1 gene, which encodes a geranylgeranyl reductase, affects chlorophyll biosynthesis and light sensitivity in rice[EB/OL]. <http://journals.plos.org/plosone/article/asset?id=10.1371/journal.pone.0075299.PDF>.
- [8] WANG P, LI C, WANG Y, et al. Identification of a geranylgeranyl reductase gene for chlorophyll synthesis in rice[J]. *Springerplus*, 2014, 3(1):1-9.
- [9] KELLER Y, BOUVIER F, D'HARLINGUE A, et al. Metabolic compartmentation of plastid prenolipid biosynthesis: Evidence for the involvement of a multi-functional CHLP[J]. *European Journal of Biochemistry*, 1998, 251(1/2):413-417.
- [10] PEUKERT S, GRAY C, TAO J, et al. Design and structure activity relationships of potent and selective inhibitors of undecaprenyl pyrophosphate synthase (GGR): Tetramic, tetronic acids and dihydropyridin-2-ones[J]. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2008, 18(6):1840-1844.
- [11] BRUNO L, CHIAPPETTA A, MUZZALUPO I, et al. Role of geranylgeranyl reductase gene in organ development and stress response in olive (*Olea europaea*) plants[J]. *Functional Plant Biology*, 2009, 36(4):370-381.
- [12] GIANNINO D, CONDELLO E, BRUNO L G, et al. The gene geranylgeranyl reductase of peach (*Prunus persica* L. Batsch) is regulated during leaf development and responds differentially to distinct stress factors[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2004, 55(405):2063-2073.
- [13] 朱帅旗, 龚一富, 杭雨晴, 等. 绿色杜氏藻转录组分析[J]. *遗传*, 2015, 37(8):828-836.
- [14] 王冬梅, 王玮蔚, 孙雪, 等. 一株杜氏藻的分子鉴定与耐盐特性[J]. *植物生理学报*, 2014(3):315- 323.
- [15] 金晓霞, 董延龙, 秦智伟, 等. 黄瓜(*Cucumis stavius* L.) CSEBF1 基因的克隆及其表达特性分析[J]. *中国生物工程杂志*, 2014, 34(3):41-47.
- [16] KANG S M, MIN J Y, KIM Y D, et al. Effects of methyl jasmonate and salicylic acid on the production of bilobalide and ginkgolides in cell cultures of *Ginkgo biloba*[J]. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-*

- Plant, 2009, 42(1):44-49.
- [17] 胡英考, 朱敬, 李雅轩, 等. 小麦牻牛儿苗牻牛儿苗基脱氢酶基因的克隆及电子定位与表达分析[J]. 麦类作物学报, 2010, 30(5):783-788.
- [18] 潘卫东, 张娟, 张贵星, 等. 藻类及陆生高等植物叶绿体 16S rRNA 基因进化谱系及同源性分析[J]. 郑州大学学报(医学版), 2004, 39(1):15-20.
- [19] 朱颖, 王丽丽, 柴芸彬. 茉莉酸甲酯对盐生杜氏藻类胡萝卜素含量的影响[J]. 宁波大学学报(理工版), 2010, 23(1):13-16.
- [20] LASKARIS G, BOUNKHAY M, THEODORIDIS G, et al. Induction of geranylgeranyl diphosphate synthase activity and taxane accumulation in *Taxus baccata* cell cultures after elicitation by methyl jasmonate[J]. Plant Science, 1999, 147(99):1-8.
- [21] 王鑫威, 王丽丽, 龚一富, 等. 茉莉酸甲酯对雨生红球藻虾青素含量和 *dxs* 基因表达的影响[J]. 水产学报, 2011, 35(12):1822-1828.
- [22] SHPILYOV A V, ZINCHENKO V V, SHESTAKOV S V, et al. Inactivation of the geranylgeranyl reductase (*GGR*) gene in the *Cyanobacterium synechocystis* sp. PCC 6803 [J]. Biochimica et Biophysica Acta, 2005, 1706(3):195-203.
- [23] CHOI D, HILDEBRAND D F. Lipid-derived signals that discriminate wound-and pathogen-responsive isoprenoid pathways in plants: Methyl jasmonate and the fungal elicitor arachidonic acid induce different 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase genes and antimicrobial isopren[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1994, 91(6):2329-2333.
- [24] 王和勇, 罗恒, 孙敏. 诱导子在药用植物细胞培养中的应用[J]. 中草药, 2004, 35(8):959-963.

Induced expression and bioinformatic analysis of *GGR* gene in *Dunaliella viridis*

ZHANG Yan, GONG Yi-fu*, JING Dan-dan, ZHU Shuai-qi, YU Kai

(School of Marine Sciences, Ningbo University, Ningbo 315211, China)

Abstract: Geranylgeranyl reductase (*GGR*) is an important enzyme in the upstream of plant tocopherols and chlorophyll biosynthetic pathway. In this study, the full length cDNA of *GGR* gene (GenBank accession number: KX100480) in *Dunaliella viridis* is obtained by HiSeq™ Illumina 2000. Transcriptional levels of *GGR* gene with the treatment of Methyl Jasmonate (MeJA) are examined by Real-Time quantitative PCR (RT-PCR). The results show that the total length of *GGR* gene is 2 356 bp, containing an open reading frame of 1 539 bp encoding 512 amino acids, relative molecular weight is 52.296 1 kD and isoelectric point is 6.54. Bioinformatics prediction reveals that the protein contains a transmembrane domain without signal peptide. TargetP 1.1 Server prediction results suggest that it is located in mitochondria. Phylogenetic tree results indicate that the protein sequence of *GGR* in *D. viridis* is related loosely to other species. RT-PCR result demonstrates that the expression of *GGR* gene in *D. viridis* is promoted under the treatment of low concentration of MeJA and limited in high concentration of MeJA. When treated with 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ MeJA, the expression of *GGR* gene manifests the significant difference in the control group ($P<0.01$). And the content of chlorophyll and carotenoids show the same trend. The result implies that the *GGR* gene is to certain extent correlated with the synthetic of chlorophyll and carotenoids.

Key words: *Dunaliella viridis*; *GGR*; MeJA; chlorophyll; carotenoid

(责任编辑 史小丽)