



海带 PEPC 功能区的原核重组表达及功能鉴定

秦天明¹, 金迷娜¹, 方佩佩¹, 毕燕会¹, 周志刚^{1,2*}

(1. 上海海洋大学, 水产种质资源发掘与利用教育部重点实验室, 上海 201306;

2. 上海海洋大学, 国家海洋生物科学国际联合研究中心, 上海 201306)

摘要: 与其他大型海藻一样, 海带同样具备无机碳浓缩机制 (CCM), 以实现高光合作用效率和生产力。胞质磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶 (phosphoenolpyruvate carboxylase, PEPC) 被认为是海带 CCM 的重要组件, 但目前尚没有关于海带胞质 PEPC 相关研究报道。本研究自海带配子体全长转录组数据库中筛选到一条可能位于细胞质的 PEPC 编码基因的 cDNA 全长序列。通过 RT-PCR 方法验证, 获得 *SjPEPC* 基因的 cDNA 全长, 为 3 503 bp, 包含 2 850 bp 的完整开放阅读框、50 bp 的 5'-UTR 和 603 bp 的 3'-UTR。 *SjPEPC* 编码一个含 949 个氨基酸残基的蛋白, 相对分子质量为 104.91 ku, 等电点为 7.31。多序列比对显示 PEPC 的功能位点在不同物种中高度保守, 系统演化及序列结构分析表明 *SjPEPC* 属于细菌型的 PEPC。选取编码 *SjPEPC* 功能区的核苷酸序列, 利用同源重组技术构建了 pET32a-*SjPEPC* 原核表达载体, 经过诱导和纯化, 得到了分子质量大小为 86.3 ku 的重组蛋白 (r*SjPEPC*), 酶活性测定结果显示, r*SjPEPC* 具有催化 PEP 发生羧化的活性, 比活力为 (9.37±0.46) U/mg prot。研究表明, PEPC 在海带无机碳储存中可能具有重要功能。本研究可为进一步解析海带 CCM 提供了分子和生物化学证据。

关键词: 海带; 配子体; 磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶; 原核表达; 酶活性测定

中图分类号: Q 786; S 917.3

文献标志码: A

海带 (*Saccharina japonica*) 隶属褐藻门 (Phaeophyta) 海带目 (Laminariales), 是我国海水养殖业中重要的经济海藻之一, 其养殖总产量居世界首位, 并遥遥领先于其他养殖海藻。这不仅归功于海带的大规模养殖, 更要归功于其单位面积的高产量。自然条件下, 海带等大型褐藻的生产力介于 3 300~11 300 g 干物质/(m²·年); 人工养殖情况下, 其生产力则更高。单位面积的高产量预示着海带具有 C4 植物更高效的光合作用。据 Ross 等^[1] 报道, 海带等大型海藻的光合作用效率为 6%~8%, 远高于陆地植物的 1.8%~2.2%。

海带具有的高光合作用效率以及单位面积的高产量等除了与其具有高 CO₂/O₂ 特异性的红型 RuBisCo 有关外^[2-4], 还与其具有高效的无机碳浓缩机制 (CO₂-concentrating mechanism, CCM) 有关。在这一机制中, 进入细胞的 CO₂ 推测可能借助胞质 CA (或位于细胞膜的 CA) 被快速转换成难以逃逸的 HCO₃⁻, 后者可能在胞质磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶 (phosphoenolpyruvate carboxylase, PEPC) 作用下, 经羧化反应产生草酰乙酸 (OAA) 以储存。可见胞质 PEPC 可能是海带 CCM 的重要组件。PEPC 是一种利用 HCO₃⁻ 将 PEP 进行 β-羧化反应以

收稿日期: 2022-04-27 修回日期: 2022-08-15

资助项目: 国家重点研发计划“蓝色粮仓科技创新”专项 (2018YFD0901500); 国家“双一流”水产学科

第一作者: 秦天明 (照片), 从事藻类分子细胞学研究, E-mail: 691476405@qq.com

通信作者: 周志刚, 从事藻类分子细胞学研究, E-mail: zgzhou@shou.edu.cn



生成 OAA 和无机磷的酶^[5-6], 它几乎存在于所有高等植物, 绿藻、蓝藻、多数的古细菌和非光合细菌中, 但是动物和真菌中不存在。基于 PEPC 基因保守的核苷酸序列, 可以将 PEPC 分成 3 类: PPC-1 (植物型 PEPC)、PPC-2 (细菌型 PEPC) 和 PPC-3^[7]。

目前, 一些大型海藻中^[8-12] 也有 PEPC 的报道。在真江蓠 (*Gracilaria verrucosa*) 和龙须菜 (*Gracilaria lemaneiformis*)^[13] 这两种红藻中, PEPC 的羧化酶活性在发育的枝条中比较高。小型月牙藻 (*Selenastrum minutum*)^[14] 的蛋白分离及凯伦藻属 (*Karenia*)^[15] 物种的转录组数据分析结果显示, 藻体中可能存在 1~4 种不同亚型的 PEPC。假微型海藻 (*Thalassiosira pseudonana*) 的 2 个 PEPC 中, 1 个存在于线粒体, 另 1 个位于质体周质区室 (periplastidal compartment)^[16]。海带中, 已有其具有 PEPC 酶活性的报道^[17], 生物信息学预测结果显示, 海带中的 1 个 PEPC 可能在其线粒体中进行羧化反应^[18], 但海带胞质 PEPC 至今尚无相关报道。在海带全长转录组数据库^[19] 中搜索到 1 个可能定位于细胞质中的 PEPC 基因的 cDNA 序列, 本研究通过 RT-PCR 方法对其进行了验证, 并对其功能区进行了异源表达和酶活性测定。研究结果为揭示 PEPC 在海带无机碳储存中的功能及进一步解析海带 CCM 提供了分子和生物化学证据。

1 材料与方方法

1.1 海带配子体培养

按已报道的方法, 在 PES 培养基中培养海带配子体。营养生长培养条件: 温度为 (17±1) °C、光照强度为 40 μmol photons/(m²·s)、光照周期为 16 : 8 (光照/黑暗)^[20]。利用 Philips 直型荧光灯管

提供白色冷光源。每 2 周更换 1 次培养基。

1.2 RNA 提取和海带 PEPC 基因 cDNA 全长验证

利用 RNAiso 试剂 (TaKaRa) 提取总 RNA。然后利用 DNase I 在 37 °C 对总 RNA 处理 30 min, 以除去基因组 DNA, 再加入 1 μL 25 mmol/L EDTA, 65 °C 处理 10 min 以灭活 DNase I。最后置于 -80 °C 保存备用。

以海带配子体总 RNA 为模板, 利用 Prime Script™ RT 试剂盒 (TaKaRa) 进行 cDNA 第一链合成。10 μL 反应体系由 2 μL 5 × PrimeScript™ 缓冲液、0.5 μL PrimeScript™ RT 酶混合液 I、0.5 μL Oligo dT 引物 (50 μmol/L)、0.5 μL 随机引物 (100 μmol/L)、总 RNA 150 ng 及无 RNase 的 dH₂O 组成。反转录反应在 37 °C 温育 15 min, 然后 85 °C 热激 5 s 以终止反应。反转录产物于 -20 °C 保存。

1.3 目的基因克隆

基于海带全长转录^[19] 中筛到的一条 *SjPEPC* 基因的 cDNA 全长序列设计引物 (表 1), 用于序列验证。以 cDNA 第一链为模板进行 PCR 反应。

25 μL 反应体系包括 10 × PCR 缓冲液 2.5 μL, dNTP (2.5 mmol/L) 2 μL, Mg²⁺ (25 mmol/L) 1.5 μL, *Taq* 酶 (5 U/μL) 0.25 μL, 正向引物 (25 μmol/L) 1 μL, 反向引物 (25 μmol/L) 1 μL, 模板 1 μL, 灭菌双蒸水 15.75 μL。PCR 反应条件为 95 °C 预变性 5 min; 35 个循环包括 95 °C 变性 30 s, 退火 30 s, 72 °C 延伸; 72 °C 延伸 10 min (表 1)。PCR 产物经胶回收后连入 pMD19-T 载体中, 然后转染宿主菌大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DH5α [天根生化科技 (北京) 有限公司], 蓝白斑筛选阳性克隆, 进行菌落 PCR 检测, 然后进行测序鉴定。

表 1 本研究所采用的引物及其序列

Tab. 1 Primers employed in the present research and their sequences

引物名称 primer	引物序列 sequence (5' to 3')	退火温度/°C annealing temperature	目的片段大小/bp length	延伸时间 extending time
PEPC-F1	CAGCCTGTGTTGCGCATTCC	60	2751	2 min 50 s
PEPC-R1	ATGGAACCGCCCTCTAACATC			
PEPC-F2	CATTCTGCACCGCTTCGTAACG	61	721	50 s
PEPC-R2	TCGCACTTCTGTCTTACCCT			
PEPC-F3	AGTCCTTCACTAGCTTGTTCGTCC	59	230	20 s
PEPC-R3	GCCGAGCGTCTTAACATCCTT			

1.4 生物信息学分析

鉴于大肠杆菌和玉米 (*Zea mays*) PEPC 的 X 射线晶体衍射结构已有报道, 且通过定点突变确认了其活性位点。本研究从 PDB (<https://www.rcsb.org/>) 数据库下载大肠杆菌、玉米 PEPC 氨基酸序列, 与 SjPEPC 一起利用 ClustalX1.8 软件^[21] 进行氨基酸序列比对, 利用 GeneDoc 软件^[22] 进行保守区分析。利用 SignalP 3.0 软件^[23] 预测 SjPEPC 的信号肽。

将海带 SjPEPC 蛋白序列提交英国伦敦大学理工学院生物信息学小组维护的 3D-PSSM 服务器^[24], 运用 1D-3D 序列剖面图并结合二级结构进行蛋白折叠识别和预测, 得到海带 SjPEPC 的 3D 结构。大肠杆菌和玉米 PEPC 单体结构来自 PDB 数据库 (<https://www.rcsb.org/>)。使用 PyMOL 软件^[25] 利用 SjPEPC 的 PDB 数据构建 SjPEPC 的 3D 结构, 根据大肠杆菌和玉米 PEPC 酶活性相关位点的空间位置, 模拟海带 SjPEPC 中相应氨基酸的空间位置。

利用 NCBI 中 Blastp 工具搜索和下载 SjPEPC 的同源序列, 然后对不同物种的 PEPC 氨基酸序列于 ClustalX 1.8 软件^[21] 中进行多序列比对, 最后利用 MEGA 11 邻接法构建系统进化树。

1.5 海带 SjPEPC 原核表达载体的构建和鉴定

为进一步研究海带 SjPEPC 是否为功能蛋白, 实验拟对其功能区进行了原核表达。以 *SjPEPC* cDNA 全长序列为模板, 设计引物 TC-F: 5'-**agatct**CAGCCTGTGTTGCGCATTC-3' 和 TC-R: 5'-**ttcgaa**GGCGGAGATAGGGATGGAAACCCCA-3', 加粗字母为 *Bgl* II 和 *Bst* B I 酶切位点, 目的产物大小为 1929 bp。以 cDNA 第一链为模板, 进行 PCR, 反应程序同“目的基因克隆”, 其中退火温度为 62.5 °C。PCR 产物经胶回收后连入 pMD19-T 载体中, 然后转染宿主菌大肠杆菌 DH5 α [天根生化科技(北京)有限公司], 蓝白斑筛选阳性克隆, 进行菌落 PCR 检测, 并测序鉴定。

利用质粒提取试剂盒 [天根生化科技(北京)有限公司] 提取 pMD19T-*SjPEPC* 重组质粒。将原核表达质粒 pET-32a 和重组质粒 pMD19T-*SjPEPC* 分别用 *Bgl* II 和 *Bst* B I (Thermo 公司) 酶切, 胶回收后通过 T4 连接酶 (TaKaRa) 16 °C 连接过夜, 获得重组表达质粒 pET32a-*SjPEPC*, 利用热激法转入大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞, 蓝白斑筛选阳性

克隆, 菌落 PCR 检测后进行插入片段测序。利用热激法将测序正确并经双酶切验证的 pET32a-*SjPEPC* 转化大肠杆菌 BL21(DE3) 感受态宿主细胞, 得到转基因株 pET32a-*SjPEPC*/BL21。将测序正确的菌液与 20% 的甘油以 1 : 1 (体积比) 的比例混匀, 于 -80 °C 冰箱保存。以 pET-32a 空载作为阴性对照。

1.6 SjPEPC 重组蛋白的诱导表达与纯化

将携带重组表达质粒 pET32a-PEPC 和空载 pET-32a 的菌液分别接种于含 Amp 的 LB 液体培养基中, 活化后放大培养至菌液的 OD₆₀₀ 为 0.6~0.8, 添加终浓度为 1.0 mmol/L 的异丙基- β -D-硫代半乳糖苷 (IPTG), 37 °C 下 180 r/min 诱导表达 4 h, 收集菌体。取 1 mL 菌液分装于 1.5 mL 离心管中, 离心 5 min, 沉淀用 PBS (pH 值 7.4) 悬浮。采用冻融法破碎菌体后, 4 °C 条件下 20 000 r/min 离心 10 min, 分别收集上清液和沉淀, 沉淀用 PBS 重悬。取未诱导菌体裂解液、诱导菌体裂解液、上清液、沉淀重悬液各 20 μ L, 按 1 : 1 比例加入 2 \times 聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 上样缓冲液, 水浴煮沸 10 min, 进行 12% SDS-PAGE 电泳。聚丙烯酰胺胶采用考马斯亮蓝法进行染色。

经 SDS-PAGE 检测, 发现上清液和沉淀中均出现目的蛋白的条带。将上清液抽滤后, 按照 AKTA pure 层析系统和 His trap HP 1 mL 蛋白亲和层析纯化预装柱 (Cytiva 公司) 的说明书, 用含不同浓度咪唑的缓冲液 (20、50、100、200 和 500 mmol/L) 洗脱以纯化 pET32a-*SjPEPC* 重组蛋白, SDS-PAGE 检测含有目的蛋白的洗脱液。

1.7 SjPEPC 重组蛋白的免疫印迹

鉴于 SjPEPC 是与表达质粒 pET-32a 中的聚 His 标签融合表达的, 因此可以利用商用的抗聚 His 标签的特异性抗体来进行 Western 印迹分析。按照陈晶等^[26] 的方法, 将纯化后的重组蛋白经 SDS-PAGE 后, 恒压 100 V 湿转 1 h 至硝酸纤维素膜, 封闭、洗脱按照标准方法进行, 以抗 His 标签抗体 (上海友科生物科技有限公司, 1 : 6000) 为一抗, 4 °C 孵育过夜, 再以 HRP-山羊抗兔 IgG (1 : 10 000, 上海友科生物科技有限公司) 为二抗, 室温孵育 1 h, 按增强型 HRP-DAB 底物显色试剂盒 [天根生化科技(北京)有限公司] 的说明书显影, 并拍照记录。

1.8 重组 SjPEPC 酶活性测定

鉴于 PEPC 催化 PEP 和 CO₂ 生成 OAA 和

HPO_4^{2-} , OAA 和 NADH 在苹果酸脱氢酶作用下进一步生成苹果酸和 NAD^+ , 因此, 可通过测定 NADH 340 nm 处的减少速率计算 PEPC 的活性。

根据 PEPC 酶活性测定试剂盒说明书(北京索莱宝科技有限公司), 将 0.1 mL 蒸馏水溶液作为空白对照组、0.1 mL 的重组蛋白 (0.672 mg/mL) 作为实验组, 构建 1 mL 反应体系, 包括 500 μL 100 mmol/L Tris- H_2SO_4 缓冲液 (内含 100 mmol/L MgSO_4 , pH 9.2), 100 μL 100 mmol/L NaHCO_3 , 100 μL 5 mmol/L NADH, 100 μL 苹果酸脱氢酶, 100 μL 40 mmol/L PEP, 及 100 μL rSjPEPC 样品或蒸馏水。在反应 10 s 时记录下此时的 OD_{340} , 随后将待测样品取出放入 30 $^\circ\text{C}$ 水浴锅中继续反应 5 min, 测定 OD_{340} 。根据对照组和实验组的 OD_{340} 数值变化差来检测 SjPEPC 的酶活性, 设置 3 个重复。PEPC 比活力 (U/mg prot) 计算公式:

$$\Delta A / (\epsilon \times d) \times 10^9 \times V_{\text{反总}} / (V_{\text{样}} \times \text{Cpr}) / T = (321 \times \Delta A) / \text{Cpr}$$
 式中, ΔA 为测定管吸光值差-空白管吸光值差; ϵ 为 NADH 摩尔消光系数, $6.22 \times 10^3 \text{ L}/(\text{mol} \cdot \text{cm})$; d 为比色皿光径, 1 cm; $V_{\text{反总}}$ 为反应总体系, $1 \times 10^{-3} \text{ L}$; $V_{\text{样}}$ 为反应体系中样本体积, 0.1 mL; Cpr 为样本蛋白浓度, mg/mL; T 为反应时间, 5 min。

2 结果

2.1 海带 *SjPEPC* 基因的 cDNA 全长克隆

以反转录的 cDNA 为模板, 分别利用表 1 的 3 对引物进行扩增, 反应产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 结果显示, 均获得单一符合目的大小的条带, 分别为 2 751、721 和 230 bp (图 1)。PCR 产物经克隆、测序和拼接, 获得海带 *SjPEPC* 基

因 cDNA 全长序列, 长度为 3 503 bp, 包含 2 850 bp 的完整开放阅读框, 50 bp 的 5'-UTR 和 603 bp 的 3'-UTR。

2.2 海带 *SjPEPC* 蛋白序列分析

基因编码一个含 949 个氨基酸残基的蛋白, 相对分子质量为 104.91 ku, 等电点为 7.31。该蛋白含有 121 个带负电荷的氨基酸残基和 121 个带正电荷的氨基酸残基, 其 N 端以甲硫氨酸起始。该蛋白脂肪族指数为 88.78, 疏水性指数为 0.315, 为疏水性蛋白; 另外, 其不稳定性指数为 44.69, 属于不稳定性蛋白。SignalP 预测显示该蛋白不含有跨膜区和信号肽, Cell-PLoc-预测其定位于细胞基质中。已报道的 PEPC 单体分子质量为 95~110 ku, 细菌、维管植物、蓝藻、原生动植物 (如疟疾病原体) 的 PEPC 含有的氨基酸残基个数和分子质量大小分别约为 870 (100 ku)、970 (110 ku)、1 010 (116 ku) 或 1 150 (134 ku); 古细菌的较小 (约 60 ku)^[27]。SjPEPC 的相对分子质量为 104.91 ku, 位于 95~110 ku 之内。

SjPEPC 与大肠杆菌和玉米 PEPC 氨基酸序列相似度分别为 45.47% 和 41.79%(图 2)。尽管这 3 个蛋白之间的相似度不是很高, 但图中显示 PEPC 的功能位点在不同物种中高度保守。基于已报道的大肠杆菌^[28] 和玉米^[29] PEPC 的 X-ray 晶体结构, 这些保守的功能位点包括 PEPC 四聚体形成相关氨基酸 (R496 和 E461)、Asp 结合位点 (R650、K838、R898 和 N947)、 Mn^{2+} 结合位点 (R454、E569、D606、K609 和 R777)、围绕 PEP 的疏水口袋 (W370、L567、M601)、催化反应关键氨基酸 (T188、A189、H190、P191、T192) 和 HCO_3^- 捕获位点 (K766、R767、R768、P769、T770、G771)。

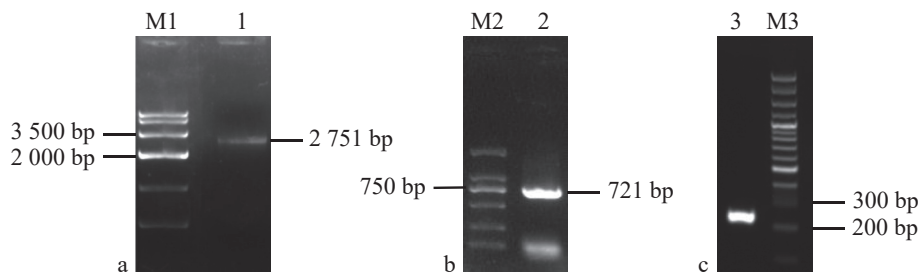


图 1 PCR 产物电泳图

泳道 1~3. PEPC-F1 和 PEPC-R1、PEPC-F2 和 PEPC-R2、PEPC-F3 和 PEPC-R3 引物对的 PCR 扩增产物, M1. DL-2000 分子质量标准; M2. Marker IV 分子质量标准; M3. 3 000 分子质量标准。

Fig. 1 Electrophoresis profiles of PCR products

Line 1-3. PCR products amplified with the primers of PEPC-F1 and PEPC-R1, PEPC-F2 and PEPC-R2, as well as PEPC-F3 and PEPC-R3, respectively; M1. DL-2000 marker, M2. Mark IV marker, M3. 3 000 marker.

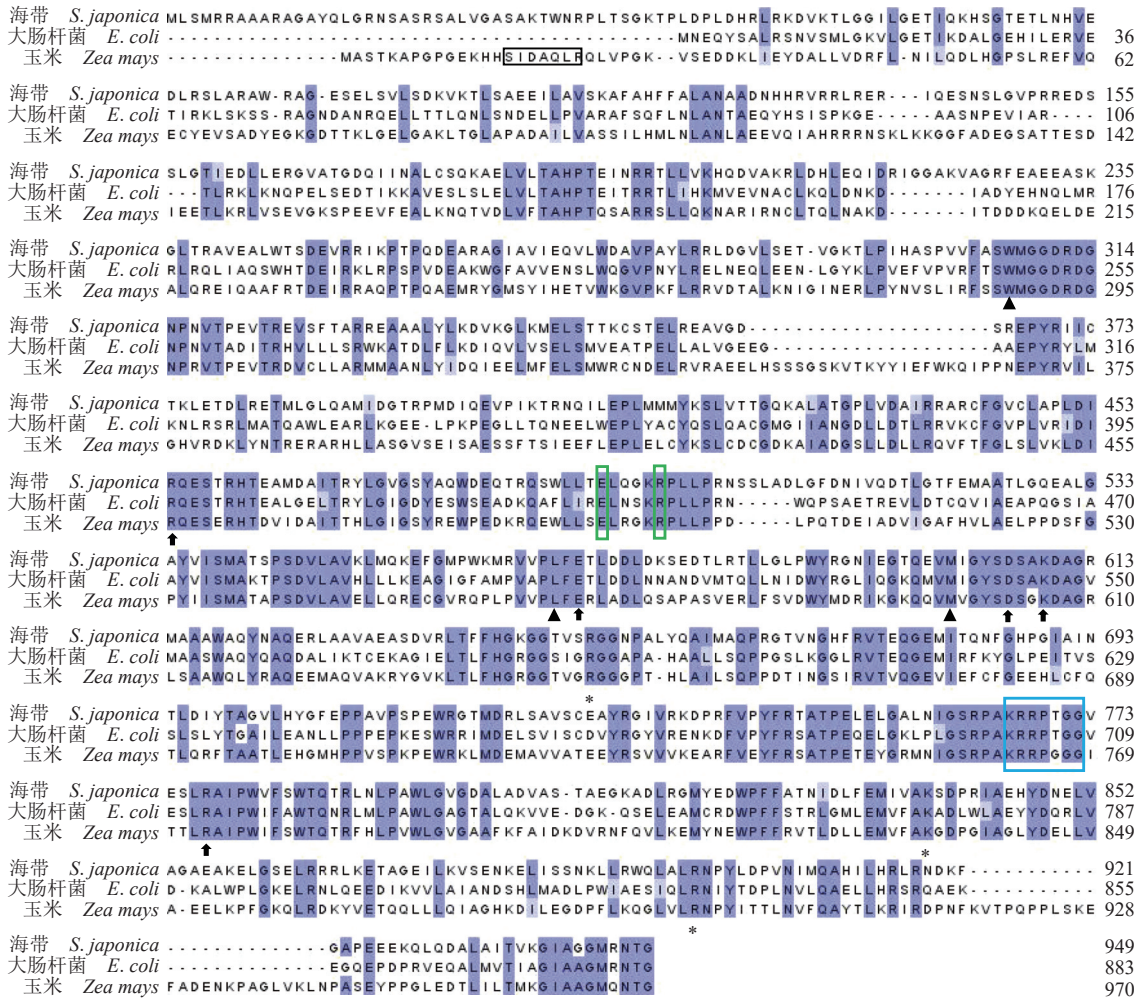


图 2 海带、大肠杆菌和玉米 PEPC 氨基酸序列比对

绿色框. PEPC 单体间连接位点, *. 天冬氨酸结合位点, 箭头. Mn²⁺结合位点, 黑色三角. 围绕底物 PEP 周围的疏水口袋, 蓝色方框. 碳酸氢根捕获位点.

Fig. 2 Amino acid sequence alignment of PEPCs from *S. japonica*, *E. coli* and *Z. mays*

Green boxes. amino acids responsible for the formation of dimer of PEPCs, asterisks. asp binding sites, arrows. Mn²⁺ binding sites, black triangle. amino acids forming hydrophobic pocket around the substrate PEP, blue boxes. bicarbonate binding sites.

此外, 根据 PEPC 蛋白 N 末端是否存在一个保守的-SIDAQL-基序以及 C-末端四肽为 QNTG 序列还是 R/KNTG, 可以判断 PEPC 是细菌型还是植物型^[30-31]。海带、大肠杆菌和玉米 PEPC 氨基酸序列比对结果显示, SjPEPC 和大肠杆菌 PEPC 的 N 末端均不存在这个保守基序, 且 C-末端均为 RNTG 序列, 可以推断其为细菌型 PEPC。

2.3 海带 SjPEPC 蛋白结构分析

图 3 是利用 Swiss-Model 和 PyMOL 基于同源建模获得的海带 SjPEPC 的三维结构图, 其活性位点的注释是基于大肠杆菌 PEPC 的 3D 结构和通过定点突变鉴定的活性位点^[32]。图 3-a 为 SjPEPC 的同源四聚体, SjPEPC 单体的 R496 与相邻单体的 E461 侧链间形成离子对 (图 3-b), 促进单体间紧密结合形成二聚体, 然后再由二聚体形成四聚体。基于 SjPEPC 二级结构预测, 其单体包含 14 个 β-折叠和约 41 个 α-螺旋 (图 3-c), 其中形成 α-螺旋的多肽占 60.59%, 而形成 β-折叠的仅占 6.32%。图 3-d 展示了变构抑制剂 Asp 的结合位点, 其中 R650 为催化必需残基, 该位点在所有 PEPC 中高度保守, 且所在肽段固定为 GRGGXXGRGG (XX=TV、SI 或 SV), 海带 SjPEPC 此处的肽段有所不同, 为 GKGGTVSR⁶⁵⁰GG, XX 与玉米的 PEPC 一样为 TV, 下划线的残基表示与大肠杆菌 PEPC 和玉米 PEPC 相应位置处不同的残基 (图 2)。Mn²⁺结合位点即为 PEPC 的催化位点, Mn²⁺与 PEPC 活性位点 E569、D606 羧基的氧原子结合, 从而在 β-

此外, 根据 PEPC 蛋白 N 末端是否存在一个保守的-SIDAQL-基序以及 C-末端四肽为 QNTG 序列还是 R/KNTG, 可以判断 PEPC 是细菌型还是植物型^[30-31]。海带、大肠杆菌和玉米 PEPC 氨基酸序列比对结果显示, SjPEPC 和大肠杆菌 PEPC 的 N 末端均不存在这个保守基序, 且 C-末端均为 RNTG 序列, 可以推断其为细菌型 PEPC。

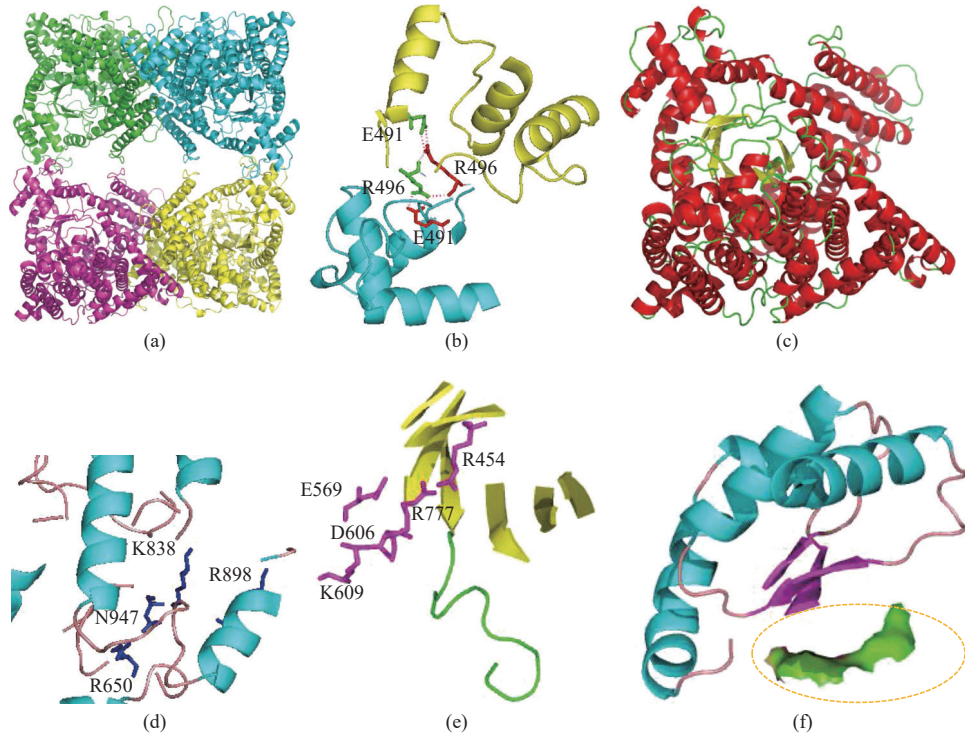


图3 SjPEPC的三级结构

(a) SjPEPC的双“二聚体”结构, (b) 单体间形成的离子对, (c) SjPEPC单体, (d) Asp结合位点, (e) Mn^{2+} 结合位点, (f) 围底物PEP的疏水袋, 虚线黄色圆圈示一个疏水口袋。

Fig. 3 Modeling of 3D structure of SjPEPC

(a) overall “dimer-of-dimers” structure of SjPEPC, (b) intersubunit ion pairing between R496 and E461, (c) monomer of SjPEPC, (d) Asp binding site, (e) Mn^{2+} binding domain at active site, (f) hydrophobic pocket around the PEP substrate, the dashed yellow circle in F indicates a hydrophobic pocket.

折叠的C端形成PEP-结合域, 然后直接与底物PEP结合(图3-e)。图3-f展示了与 CO_2 结合相关的疏水口袋。

2.4 海带SjPEPC系统演化分析

本研究比较了4种藻类[绿藻(Chlorophyta)、淡色藻(Ochrophyta)、红藻(Rhodophyta)和隐藻(Cryptophyta)]、变形菌和古细菌的PEPC的序列, 构建了系统演化树。绿藻和高等植物PEPC兼具植物型-PEPC(PTPC)和细菌型-PCPC(BTPC), 红藻只具有PTPCs, 然而淡色藻和变形菌只具有BTPCs(图4)。古细菌和隐藻不具备典型的C-端四肽, 因此无法归为已知的亚型。与“RNA提取和海带PEPC基因cDNA全长验证”中序列分析结果一致, 海带SjPEPC属于BTPC。

系统演化分析说明, PEPC基因广泛分布在藻类和高等植物中, 且很可能起源于非蓝藻祖先。在严格一致树中, 首先分出来的是古细菌PEPC, 然后依次是变形菌BTPCs支、淡色藻BTPCs支、维管植物BTPCs支、隐藻支和一个包括绿藻和红

藻PTPCs支。这种拓扑结构说明BTPCs发生的时间可能较PTPCs早, 而后者可能起源于BTPC的同源基因。PEPC的这种系统演化规律与Chi等^[33]报道的一致。

2.5 SjPEPC功能区的原核表达与酶活性鉴定

SjPEPC原核表达载体的构建与转化 根据已克隆的SjPEPC基因cDNA序列全长和同源重组的方法, 选取带有所有活性位点的643个氨基酸序列设计带酶切位点的引物, 以提取的海带配子体总RNA反转录后的cDNA为模板进行PCR扩增。电泳图中在接近2000bp处可见一条特异性条带, 与预测的1929bp大小一致, 说明已通过PCR扩增出包含酶切位点的目的条带(图5)。将获得的PCR产物纯化后与双酶切后的pET-32a质粒进行同源重组连接, 最后导入大肠杆菌BL21中通过菌液PCR进行验证, 结果证明已成功构建了原核表达菌株(图5, 泳道3)。

SjPEPC的诱导表达、纯化和免疫印迹检测 将pET32a-PEPC转化大肠杆菌, 获得转基

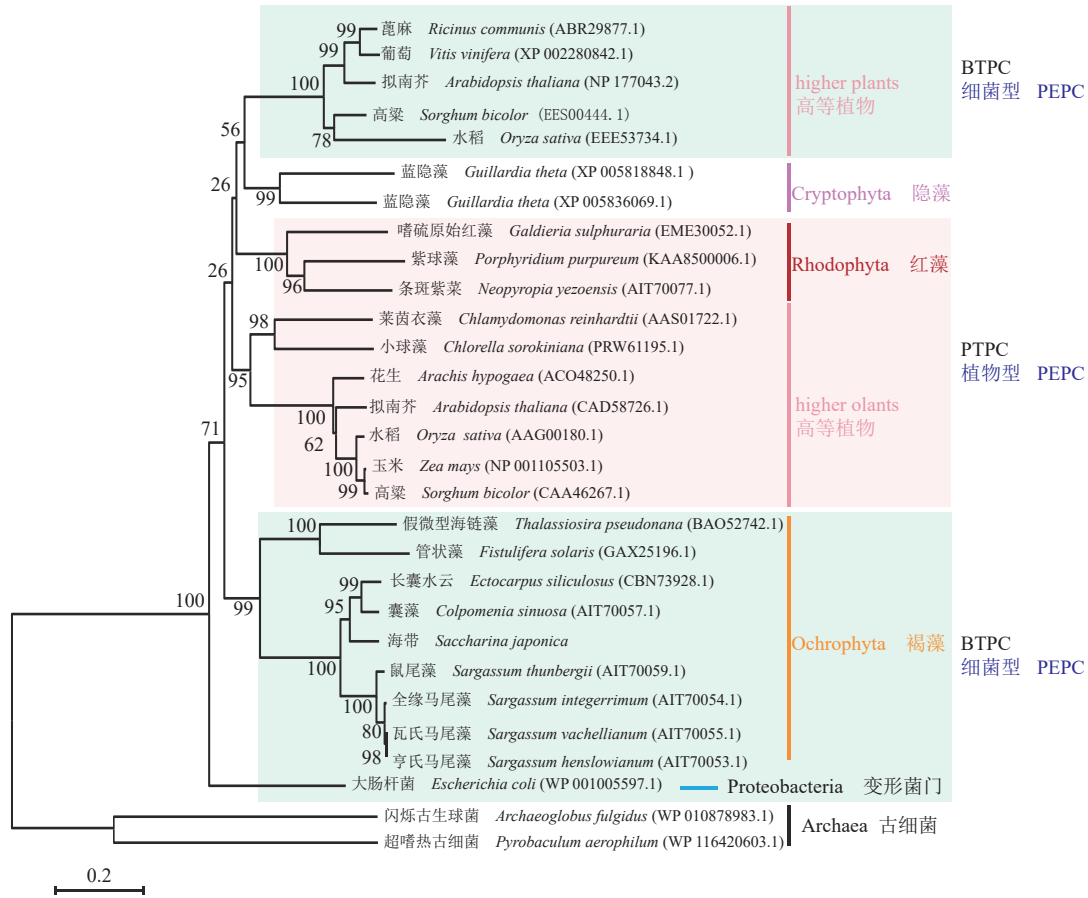


图 4 基于 PEPC 蛋白氨基酸序列所构建的 NJ 聚类图

Fig. 4 Neighbour-joining phylogenetic tree inferred from the deduced amino acid sequences of PEPC from the selected species

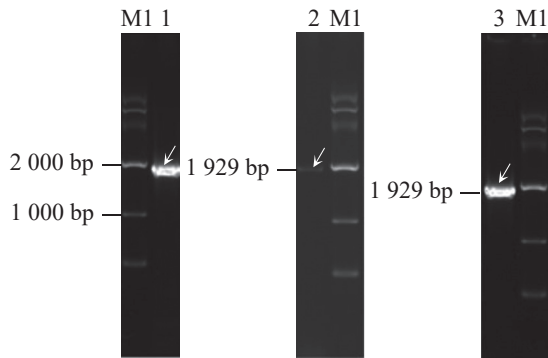


图 5 pET32a-SjPEPC 原核表达载体构建和鉴定

泳道 1. 引物 TC-F 和 TC-R 的扩增产物, 泳道 2. 胶回收产物, 泳道 3. 菌液 PCR 产物, M1. DL-2000 分子质量标准。

Fig. 5 Construction and identification of prokaryotic expression vector pET32a-SjPEPC

line 1. amplified products with primers TC-F and TC-R, line 2. gel recovery of PCR products, line 3. bacterial colony PCR products; M1. DL-2000 marker.

因细胞系。经放大培养并添加 IPTG 诱导培养后, 收集菌体, 反复冻融以破碎细胞, 提取分别得到

上清液和沉淀中的蛋白, 经 SDS-PAGE 电泳, 发现上清液和沉淀中均出现目的蛋白的条带, 其预测分子质量大小为 86.30 ku (图 6-a), 包含 71.18 ku 由目的基因编码的蛋白和 15.12 ku 由表达质粒 pET-32a 中 His 标签及多克隆位点碱基所编码的多肽。利用抗 His-tag 多克隆抗体, 对 SjPEPC 重组蛋白 (recombinant SjPEPC, rSjPEPC) 进行 Western blot 免疫印迹。结果显示, 在目的蛋白大小处出现单一条带, 说明该处的重组蛋白中含有 His 标签; 印迹所对应的分子质量大小约为 86.3 ku, 与目的蛋白的预测分子质量大小相符 (图 6-b), 表明重组表达的就是目的基因 *SjPEPC* 所编码的蛋白。

按照 AKTApure 层析系统和 His trap HP 1 mL 蛋白亲和和层析纯化预装柱 (Cytiva 公司) 的说明书, 用含不同浓度咪唑的缓冲液 (20、50、100、200 和 500 mmol/L) 洗脱以纯化 pET32a-SjPEPC 重组蛋白。经 SDS-PAGE 电泳和染色, 结果显示, 用含 500 mmol/L 咪唑的洗脱缓冲液洗脱下来的蛋白,

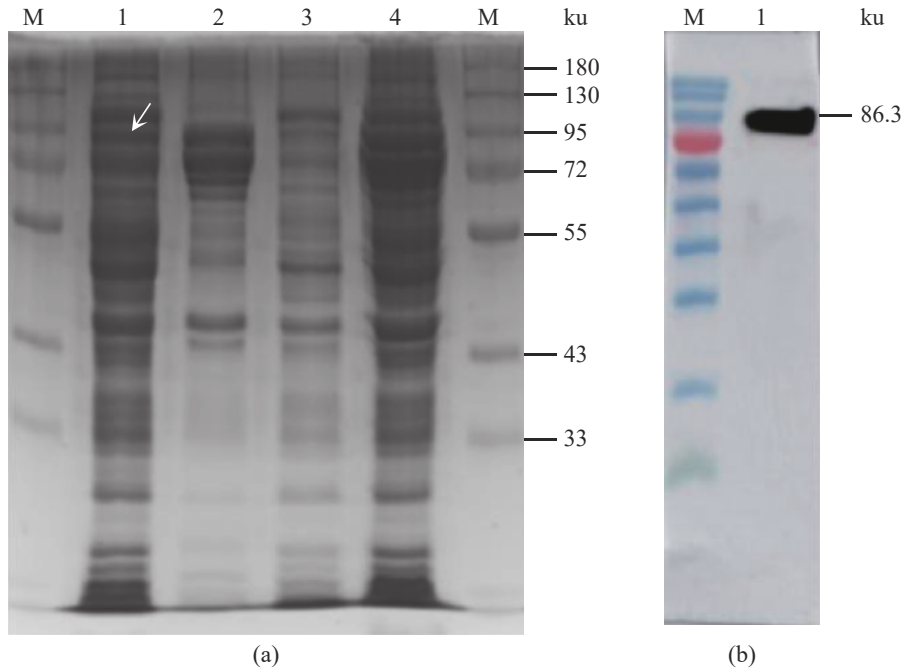


图 6 重组 SjPEPC 的 SDS-PAGE 图谱 (a) 及 Western blot 鉴定 (b)

泳道 1 和 2. 重组菌株的上清液和沉淀部分; 泳道 3. 未经 IPTG 诱导培养的转基因菌株的全菌蛋白; 泳道 4. 经 IPTG 诱导培养的转基因菌株的全菌蛋白; M. 预染蛋白质分子质量标准。

Fig. 6 SDS-PAGE of the recombinant products (a) and Western blot of purified recombinant SjPEPC (b)

Lane 1, 2. the supernatant and precipitation of the transformed bacteria; lane 3. whole bacterial protein of the strains without IPTG induction; lane 4. whole bacterial protein of the strains induced by IPTG, M. Marker.

在目的蛋白大小处出现单一条带 (图 7)。因此, 可以利用含 500 mmol/L 咪唑的洗脱缓冲液来纯化 rSjPEPC。

rSjPEPC 酶活性检测 按照 PEPC 酶活性测定试剂盒 (索莱宝, 美国) 步骤, 设置蒸馏水空

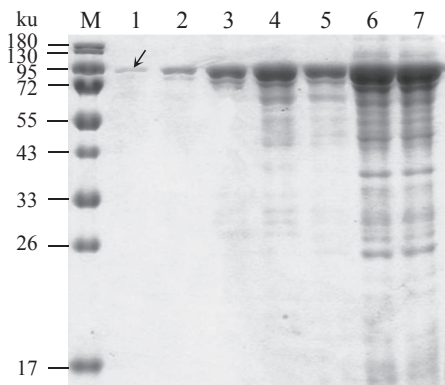


图 7 SjPEPC 纯化产物的 SDS-PAGE 图

泳道 1~5. 500、200、100、50 和 20 mmol/L 咪唑缓冲液洗脱产物, 泳道 6. 流穿, 泳道 7. 重组菌株的上清液。M. 分子质量标准。

Fig. 7 SDS-PAGE of the purified recombinant SjPEPC

Lanes 1-5. the eluted products with a buffer solution containing 500, 200, 100, 50 and 20 mmol/L imidazole, respectively; lane 6. flow through; lane 7. supernatant of the transformed bacteria; M. marker.

白对照组和 rSjPEPC 实验组。反应 10 s 时实验及空白对照组 3 个重复的 OD₃₄₀ 分别为 0.929、0.986、0.955 和 0.922、0.921、0.967。继续反应 5 min, 实验及空白对照组 3 个重复的 OD₃₄₀ 分别变为 0.907、0.966、0.935 和 0.921、0.920、0.966。经计算, 实验组 3 个重复的 rSjPEPC 比活力分别是 10.03、9.04 和 9.04 U/mg prot, 平均值为 9.37 U/mg prot, 经统计分析, rSjPEPC 的比活力为 (9.37±0.46) U/mg prot (3 次重复试验的平均值标准差), 高于利用该试剂盒测得的天竺葵中 PEPC 的酶活性 (0.122 U/mg); 空白对照组则无 PEPC 酶活性。与已报道其他物种的 PEPC 酶活性相比, 本研究获得的 rSjPEPC 的比活性高于古菌型 PEPC 的比活力 2.1 U/mg^[34], 低于水稻 PEPC 重组蛋白的比活性 20.3 U/mg^[35], 而与从萌发的蓖麻油种子中纯化的 PEPC 的比活性 7.1 U/mg prot^[30] 及纯化的单泛素化 PEPC 的比活性 9.6 U/mg prot^[36] 相近, 表明 rSjPEPC 具有活性, 为功能蛋白。与线粒体中的 PEPC 参与三羧酸循环中间代谢物的回补的功能^[6] 不同, 本研究的 SjPEPC 可能定位于海带细胞质中, 推测其可能具有将细胞质中 HCO₃⁻ 转换为

OAA 以储存的功能。海带中曾有 PEPC 活性的报道, 但值较低^[17], 本研究从分子及生物化学角度为海带中 PEPC 的存在提供了支持和证据, 为进一步通过免疫胶体金技术证实其亚细胞定位奠定了基础。

3 讨论

本研究筛选并验证了一个可能定位于海带配子体细胞质中的 PEPC, 其编码基因的 cDNA 全长为 3 503 bp, 编码一个含 949 个氨基酸残基的蛋白。多序列比对显示 PEPC 的功能位点在不同物种中高度保守, 通过同源建模揭示 SjPEPC 可能以四聚体形式发挥功能, 并具有与大肠杆菌和玉米 PEPC 类似的活性位点空间布局。系统演化及序列结构分析表明, SjPEPC 属于细菌型 PEPC。通过异源表达获得包含 SjPEPC 功能区的重组蛋白, 酶活性测定结果显示其具有催化 PEP 羧化的活性, 为功能蛋白。研究结果为进一步探究该 PEPC 的时空布局及其在海带无机碳储存中的功能奠定了基础, 并为海带 CCM 解析提供了分子和生物化学证据。

(作者声明本文无实际或潜在的利益冲突)

参考文献 (References):

- [1] Ross A B, Jones J M, Kubacki M L, *et al.* Classification of macroalgae as fuel and its thermochemical behaviour[J]. *Bioresource Technology*, 2008, 99(14): 6494-6504.
- [2] Badger M R, Bek E J. Multiple Rubisco forms in proteobacteria: their functional significance in relation to CO₂ acquisition by the CBB cycle[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2008, 59(7): 1525-1541.
- [3] Tabita F R, Satagopan S, Hanson T E, *et al.* Distinct form I, II, III, and IV RuBisCo proteins from the three kingdoms of life provide clues about Rubisco evolution and structure/function relationships[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2008, 59(7): 1515-1524.
- [4] Shao Z R, Liu F L, Li Q Y, *et al.* Characterization of ribulose-1, 5-bisphosphate carboxylase/oxygenase and transcriptional analysis of its related genes in *Saccharina japonica* (Laminariales, Phaeophyta)[J]. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*, 2014, 32(2): 377-389.
- [5] Raven J A. Photosynthetic and non-photosynthetic roles of carbonic anhydrase in algae and cyanobacteria[J]. *Phycologia*, 1995, 34(2): 93-101.
- [6] O 'Leary B, Park J, Plaxton W C. The remarkable diversity of plant PEPC (phosphoenolpyruvate carboxylase): recent insights into the physiological functions and post-translational controls of non-photosynthetic PEPCs[J]. *Biochemical Journal*, 2011, 436(1): 15-34.
- [7] Deng H, Zhang L S, Zhang G Q, *et al.* Evolutionary history of PEPC genes in green plants: Implications for the evolution of CAM in orchids[J]. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 2016, 94: 559-564.
- [8] Akagawa H, Ikawa T, Nisizawa K. The enzyme system for the entrance of ¹⁴CO₂ in the dark CO₂-fixation of brown algae[J]. *Plant and Cell Physiology*, 1972, 13(6): 999-1016.
- [9] Ting I P. Malate dehydrogenase and other enzymes[J]. *Australian Journal of Plant Physiology*, 1976, 3(1): 121-127.
- [10] Beer S, Israel A. Photosynthesis of *Ulva* sp. III. O₂ effects, carboxylase activities, and the CO₂ incorporation pattern[J]. *Plant Physiology*, 1986, 81(3): 937-938.
- [11] Reiskind J B, Bowes G. The role of phosphoenolpyruvate carboxylase in a marine macroalga with C₄-like photosynthetic characteristics[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1991, 88(7): 2883-2887.
- [12] Busch S, Schmid R. Enzymes associated with β-carboxylation in *Ectocarpus siliculosus* (Phaeophyceae): are they involved in net carbon acquisition?[J]. *European Journal of Phycology*, 2001, 36(1): 61-70.
- [13] Wang J G, Sui Z H, Hu Y Y, *et al.* Assessment of photosynthetic performance, carboxylase activities, and ATP content during tetrasporic development in *Gracilaria lemaneiformis* (Gracilariaceae, Rhodophyta)[J]. *Journal of Applied Phycology*, 2016, 28(5): 2939-2952.
- [14] Rivoal J, Dunford R, Plaxton W C, *et al.* Purification and properties of four phosphoenolpyruvate carboxylase isoforms from the green alga *Selenastrum minutum*: Evidence that association of the 102-kDa catalytic subunit with unrelated polypeptides may modify the physical and kinetic properties of the enzyme[J]. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 1996, 332(1): 47-57.
- [15] Ryan D E, Campbell L. Identification and phylogeny of

- putative PEPC genes in three toxin-producing *Karenia* (Dinophyta) species[J]. *Journal of Phycology*, 2016, 52(4): 618-625.
- [16] Tanaka R, Kikutani S, Mahardika A, *et al.* Localization of enzymes relating to C₄ organic acid metabolisms in the marine diatom, *Thalassiosira pseudonana*[J]. *Photosynthesis Research*, 2014, 121(2-3): 251-263.
- [17] 徐志明, 姚南瑜, 李建之. 海带中PEP羧激酶性质的研究[J]. *海洋科学*, 1991, 15(2): 41-45.
Xu Z M, Yao N Y, Li J Z. Studies on the activity of PEPCK in *L. japonica*[J]. *Marine Sciences*, 1991, 15(2): 41-45 (in Chinese).
- [18] Shao Z R, Wang W L, Zhang P Y, *et al.* Genome-wide identification of genes involved in carbon fixation in *Saccharina japonica* and responses of putative C₄-related genes to bicarbonate concentration and light intensity[J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2019, 137: 75-83.
- [19] Bi Y H, Li J L, Zhou Z G. Full-length mRNA sequencing in *Saccharina japonica* and identification of carbonic anhydrase genes[J]. *Aquaculture and Fisheries*, 2019, 4(2): 53-60.
- [20] 周志刚, 吴超元. 海带无性繁殖系的形成及孢子体诱导[J]. *生物工程学报*, 1998, 14(1): 109-111.
Zhou Z G, Wu C Y. Clone culture of *Laminaria japonica* and induction of its sporophytes[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 1998, 14(1): 109-111 (in Chinese).
- [21] Chenna R, Sugawara H, Koike T, *et al.* Multiple sequence alignment with the Clustal series of programs[J]. *Nucleic Acids Research*, 2003, 31(13): 3497-3500.
- [22] Nicholas K B, Nicholas H B Jr. GeneDoc: a tool for editing and annotating multiple sequence alignments[Z]. Version 1.1. 004; 1997.
- [23] Bendtsen J D, Nielsen H, von Heijne G, *et al.* Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0[J]. *Journal of Molecular Biology*, 2004, 340(4): 783-795.
- [24] Kelley L A, MacCallum R M, Sternberg M J E. Enhanced genome annotation using structural profiles in the program 3D-PSSM[J]. *Journal of Molecular Biology*, 2000, 299(2): 501-522.
- [25] Schrodinger L L C. The PyMOL molecular graphics system, version 1.3[EB/OL].(2010-06-10)[2020-12-18]. <http://www.pymol.org>.
- [26] 陈晶, 王丽丽, 石微微, 等. 海带配子体中孢子形成相关蛋白(SRP)基因的克隆及其原核表达[J]. *水产学报*, 2010, 34(08): 1165-1173.
Chen J, Wang J J, Shi W W, *et al.* Cloning of *srp* gene from the gametophytes of *Laminaria japonica* and its expression in *Escherichia coli*[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2010, 34(08): 1165-1173 (in Chinese).
- [27] Izui K, Matsumura H, Furumoto T, *et al.* Phosphoenolpyruvate carboxylase: a new era of structural biology [J]. *Annual Review of Plant Biology*, 2004, 55: 69-84.
- [28] Kai Y, Matsumura H, Inoue T, *et al.* Three-dimensional structure of phosphoenolpyruvate carboxylase: a proposed mechanism for allosteric inhibition[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1999, 96(3): 823-828.
- [29] Matsumura H, Xie Y, Shirakata S, *et al.* Crystal structures of C₄ form maize and quaternary complex of *E. coli* phosphoenolpyruvate carboxylases[J]. *Structure*, 2002, 10(12): 1721-1730.
- [30] Ruiz-Ballesta I, Feria A B, Ni H, *et al.* *In vivo* monoubiquitination of anaplerotic phosphoenolpyruvate carboxylase occurs at Lys624 in germinating sorghum seeds[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2014, 65(2): 443-451.
- [31] 王志慧, 童超波, 袁午舟, 等. 四种油料作物中的细菌型PEPC基因的鉴定及在发育种子中的表达[J]. *中国油料作物学报*, 2013, 35(1): 8-16, 23.
Wang Z H, Tong C B, Yuan W Z, *et al.* Bacterial-type PEPC genes identification and expression in developing seeds from four oil crops[J]. *Chinese Journal of Oil Crop Sciences*, 2013, 35(1): 8-16, 23 (in Chinese).
- [32] Kai Y, Matsumura H, Izui K. Phosphoenolpyruvate carboxylase: three-dimensional structure and molecular mechanisms[J]. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2003, 414(2): 170-179.
- [33] Chi S, Wu S X, Yu J, *et al.* Phylogeny of C₄-photosynthesis enzymes based on algal transcriptomic and genomic data supports an archaeal/proteobacterial origin and multiple duplication for most C₄-related genes[J]. *PLoS One*, 2014, 9(10): e110154.
- [34] Ettema T J G, Makarova K S, Jellema G L, *et al.* Identification and functional verification of archaeal-type phosphoenolpyruvate carboxylase, a missing link in archaeal central carbohydrate metabolism[J]. *Journal of China Water and Fishery Society* sponsored by China Society of Fisheries

- Bacteriology*, 2004, 186(22): 7754-7762.
- [35] Yamamoto N, Kubota T, Masumura T, *et al.* Molecular cloning, gene expression and functional expression of a phosphoenolpyruvate carboxylase *Osppc1* in developing rice seeds: implication of involvement in nitrogen accumulation[J]. *Seed Science Research*, 2014, 24(1): 23-36.
- [36] Uhrig R G, She Y M, Leach C A, *et al.* Regulatory monoubiquitination of phosphoenolpyruvate carboxylase in germinating castor oil seeds[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2008, 283(44): 29650-29657.

Expression and identification of phosphoenolpyruvate carboxylase (PEPC) of *Saccharina japonica*

QIN Tianming¹, JIN Mina¹, FANG Peipei¹, BI Yanhui¹, ZHOU Zhigang^{1,2*}

(1. Key Laboratory of Exploration and Utilization of Aquatic Genetic Resources, Ministry of Education, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;

2. International Research Center for Marine Biosciences, Ministry of Science and Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract: Like other macroalgae, *Saccharina japonica* also has CO₂-concentrating mechanism (CCM) to realize high photosynthesis efficiency as well as elevated biomass. Phosphoenolpyruvate carboxylase (PEPC) in the cytoplasm was suggested to be an essential component of CCM. However, there was no report about cytosolic PEPC of *S. japonica*. In this study, the full length cDNA sequence (*SjPEPC*) of a PEPC gene, which might be located in cytoplasm, was screened from the full-length transcriptome of this kelp and was identified by RT-PCR. The full-length cDNA sequence of *SjPEPC* was 3 503 bp in length, consisting of a ORF of 2 850 bp, a 5'-UTR of 50 bp, and a 3'-UTR of 603 bp. It encoded a protein of 949 amino acids with a molecular weight of 104.91 ku, and a pI of 7.31. Multi-sequence alignment showed functional sites of PEPC were highly conserved in the selected species. Both phylogenetic analysis and sequence characterization showed that *SjPEPC* was a bacterial-type PEPC. pET32a-*SjPEPC* was constructed for expressing the recombinant *SjPEPC* harbouring all the enzyme active sites. After being induced by IPTG and purified, r*SjPEPC* with molecular weight of 86.3 ku was obtained. Enzyme activity assay results showed that r*SjPEPC* could catalyze the carboxylation of PEP, and the specific activity was (9.37±0.46) U/mg prot. These findings provide molecular and biochemical data for analysis the role of cytosolic PEPC in the storage of inorganic carbon in *S. japonica*, and furtherly for analysis CCM of this kelp.

Key words: *Saccharina japonica*; gametophytes; phosphoenolpyruvate carboxylase (PEPC); prokaryotic expression; enzyme activity assay

Corresponding author: ZHOU Zhigang. E-mail: zgzhou@shou.edu.cn

Funding projects: National Key R & D Program of China (2018YFD0901500); National "Double First-class" Aquatic Science