

腐生型眼虫 *Astasia longa* 两种 TIM 同工酶 cDNA 的克隆和分析 *

申 望^{1,2} 文建凡^{1**} 孙桂玲^{1,2} 董锦润¹

1. 中国科学院昆明动物研究所细胞与分子进化重点实验室 昆明 650223

2. 中国科学院研究生院 北京 100039

摘 要 利用 3-RACE 和 5-RACE 技术, 从腐生型眼虫长变胞藻 (*Astasia longa*) 克隆了磷酸丙糖异构酶 (TIM) 的两个同工酶 cDNA 全序列。分析表明: 它们分别编码定位于细胞质的胞质型 TIM (cTIM) 和定位于质体的质体型 TIM (pTIM); 后者的 N 端具有引导该酶定位到质体中去的典型“前导序列”。根据这些事实我们推测腐生型眼虫 *A. longa* 质体中可能存在功能性的 TIM, 并进一步认为该质体可能不只是一般意义上的“叶绿体退化的残迹”, 而仍是一种至少有 TIM 参与其代谢活动的功能性细胞器 [动物学报 50 (3): 414 - 419, 2004]。

关键词 腐生型眼虫 *Astasia longa* 磷酸丙糖异构酶 质体

Cloning and analysis of two triosephosphate isomerases (TIM) cDNA of saprophytic euglenoid *Astasia longa* *

SHEN Wang^{1,2}, WEN Jian-Fan^{1**}, SUN Gui-Ling^{1,2}, DON G Jin Run¹

1. Key Laboratory of Cellular and Molecular Evolution, Kunming Institute of Zoology, The Chinese Academy of Sciences, Kunming 650223

2. Graduate School of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039

Abstract *Astasia longa* is a colourless, nonphotosynthetic flagellate protist that is phylogenetically related to *E. gracilis*, a photoautotrophic euglenoid. It does not have chloroplasts but plastids. Its plastid genome has lost most photosynthetic-related genes, and is only half in size of the chloroplast genome of *E. gracilis*. In this study, two cDNAs, encoding the isoenzymes of triose phosphate isomerases (TIM), were cloned and sequenced from *A. longa* by 3-RACE and 5-RACE. Both of them have a polyA sequence in the 3' terminal and a spliced leader sequence (SL-sequence, which is a hallmark of englenoids matured mRNA) in the 5' terminal. These means we have got two complete cDNA (mRNA) sequences. The two sequences are different in length, one is 857 bp and the other 1 273 bp (both without polyA sequence). Sequence alignment showed that the two deduced amino acid sequences were closely homologous to known TIMs from other species (for example, to *Arabidopsis thaliana* cytoplasmic TIM, amino acid identities are 61% and 55%, respectively), and had the common active site amino acids and important sequence motifs which are conserved in other known TIMs. All of these proved that the two sequences are cDNAs of two TIM isoenzymes. Comparison of the two deduced amino acid sequences indicated that one of them has a longer N-terminal. Analyses of the longer N-terminal sequence by SignalP, ChloroP and DAS showed that it contained a signal peptide, a transit peptide and two hydrophobic domains, which resembled the bipartite leader sequence structure of chloroplast proteins encoded by nuclear genes in *E. gracilis*. Thus, the TIM with the bipartite leader sequence must target to plastids, and is a plastid TIM (pTIM), and the other TIM without a leader sequence must target to cytoplasm, and is a cytoplasmic TIM (cTIM). According to these, we argue that the plastid of *A. longa* might not just be a “chloroplast vestige” but a functional organelle related to TIM at least [Acta Zoologica Sinica 50 (3): 414 - 419, 2004].

Key words Saprophytic euglenoid, *Astasia longa*, Triosephosphate isomerase, Plastid

2003-12-26 收稿, 2004-04-20 接受

* 中国科学院生物特支费 (STZ-00-23)、中国科学院知识创新工程重要方向 (KSCX2-SW-101C) 和云南省中青年学术和技术带头人培养经费 (2000 YP19) 资助项目 [This research was funded by the grants from Chinese Academy of Sciences (No. STZ-00-23, KSCX2-SW-101C) and Yunnan Province (No. 2000 YP19)]

** 通讯作者 (Corresponding author). E-mail: wenjf@mail.kiz.ac.cn

© 2004 动物学报 Acta Zoologica Sinica

磷酸丙糖异构酶 (Triosephosphate isomerase, 简称 TIM) 是一个广泛存在于原核生物和真核生物中的糖酵解酶。在糖酵解代谢途径中催化磷酸二羟丙酮 (DHAP) 与 3-磷酸甘油醛 (G-3-P) 之间的相互转化, 并在光合作用、糖异生等代谢途径中也催化同一反应。已有大量的原细菌、真细菌和真核生物 TIM 的研究报导。除少数特例外 (Liaud et al., 2000), 活性 TIM 通常是由两个相同单体构成的同型二聚体。单体 TIM 肽链长一般约为 250 个氨基酸残基。尽管不同来源的 TIM 在氨基酸序列上存在差异, 但它们都拥有共同保守的活性中心氨基酸和一些对维持 TIM 结构和功能具有重要作用的序列模体 (motif), 且在三级结构上都具有保守的典型“TIM 桶”结构 (Alvarez et al., 1998)。参与细胞质中糖酵解途径的 TIM 称为胞质型 TIM (cTIM), 而在光合真核生物 (如绿色植物和光合眼虫如纤细眼虫 *Euglena gracilis* 等) 中, 除 cTIM 外, 还有一个定位于叶绿体、参与卡尔文循环的 TIM 同工酶即叶绿体型 TIM (cpTIM)。

大量的证据, 如叶绿体形态、光合色素成分 (chlorophyll a/b)、叶绿体基因组分析及其它分子生物学证据 (如 *psbA*、*rbcL*、*rbcS* 等) (Gibbs, 1981; Morden et al., 1992; Martin et al., 1998), 都表明光合眼虫的叶绿体来源于二次共生的绿藻 (Chlorophyte) 的叶绿体, 即非光合作用的眼虫祖先吞噬了绿藻, 经过不断演化, 最后该绿藻细胞仅剩下叶绿体和叶绿体双层膜外的一层吞噬泡膜 (或内质网膜), 从而形成了绿色眼虫类的具有三层膜的叶绿体 (Gibbs, 1981)。那么不具叶绿体的非光合的腐生眼虫又是怎样的情形呢? 形态及分子方面的证据都表明腐生型眼虫 *Astasia longa* 与光合型眼虫亲缘关系较近, 是由后者经叶绿体退化成无光合作用的质体而来 (Pringsheim, 1942; Gockel and Hachtel, 2000)。因此一般认为 *A. longa* 的质体与光合型眼虫如 *E. gracilis* 的叶绿体是同源的, 是一种“退化了的叶绿体残迹”。从已测定的基因组来看也支持这一观点。如: *A. longa* 质体 DNA 只有 73 kb, 仅相当于 *E. gracilis* 叶绿体 DNA (143 kb) 的一半, 且基因删减严重, 仅保留了少数基因 (如叶绿体 DNA 编码的光合作用相关蛋白, 除 *rbcL* 基因外, 其它都已完全丢失), *A. longa* 质体也就失去了光合作用的功能 (Gockel and Hachtel, 2000)。在其它一些生物中, 有的细胞器也被认为是由叶绿体退化而来的质体, 如寄生

原虫 *Plasmodium* 和 *Toxoplasma* (二者都属于 Apicomplexan) 细胞中的 apicoplast。Apicoplast 失去了光合作用功能, 但还继续参与脂肪酸的合成 (McFadden and Roos, 1999)。而 *A. longa* 的质体在失去了光合作用之后是否也像 apicoplast 一样还存在其它功能呢? 在这方面的研究迄今很少。只是有报道表明其基因组还存在有编码一些功能蛋白及一些与转录和翻译有关的基因 (Siemeister and Hachtel, 1990; Gockel and Hachtel, 2000)。

本研究从腐生型眼虫 *A. longa* 中克隆出了 TIM 的两种同工酶基因的 cDNA 全序列, 对它们进行了序列分析并在此基础上对其质体的功能进行了探讨。

1 材料与方法

1.1 材料及培养

腐生型眼虫 *A. longa* (中国科学院武汉水生生物所施之新教授惠赠) 于 PolyA 培养基 (1 000 ml 蒸馏水中含酵母抽提物 1.0 g、醋酸钠 2.0 g 和胰蛋白胨 1.0 g) 中, 室温自然光照培养。

1.2 总 RNA 的提取

使用上海生工 UNIQ-10 柱式 Trizol 总 RNA 抽提试剂盒, 按试剂盒使用说明操作。

1.3 3-RACE

使用 TaKaRa RNA PCR Kit (AMV) Ver. 2.1 试剂盒, 按试剂盒使用说明操作。有义链 PCR 引物 P3 (5'-GGAACTGGAAATGCAATGG-3', 根据已报道的真核生物 TIM 的 N 端保守区: GNWKCNG 设计); 无义链引物 M₁₃ Primer M₄ 和逆转录引物 Oligo dT-Adaptor Primer 为试剂盒自带。PCR 总反应体积为 100 μ l, 反应条件为: 94 变性 1 min, 58 退火 1 min, 72 延伸 1 min, 40 个循环后, 72 后延伸 10 min。

1.4 5-RACE

使用 TaKaRa 5-Full RACE Core Set 试剂盒, 按试剂盒使用说明操作。根据 3-RACE 测得的 TIM 同工酶基因 3 端保守序列设计 5-RACE 通用逆转录引物 Rt (5'-TCCTGCATCCTTGAT-3') 和一个 PCR 通用有义链引物 Ps3 (5'-TGGTGCTTCACTGGCGA-3'); 针对两种 TIM 同工酶基因分别设计了有义链引物: Ps1 (5'-GGAGTTGCATTCCAGAACTG-3'), Ps2 (5'-GGTGCA-GAACTGTTGGATTG-3'); 无义链引物: Pn1 (5'-GGGTGGTGCAACAACAA-3'), Pn2 (5'-AC-

CTCAACA TCA GCATC-3)。用引物 Ps1/ Pn1 对 Rt 逆转录产物做第一次 PCR 后,再用引物 Ps3/ Pn1 做第二次 PCR,扩增 *A. longa* 两个 TIM 同工酶基因之一的 5 端序列;用引物 Ps2/ Pn2 对 Rt 逆转录产物做第一次 PCR,引物 Ps3/ Pn2 做第二次 PCR,扩增另一个的 5 端序列。

1.5 PCR 产物的克隆测序

PCR 产物用 1.5% - 2.0% 的琼脂糖凝胶电泳,割取目的胶带用胶回收试剂盒(上海华舜公司)进行回收纯化。回收的 PCR 产物与 pMD 18-T Vector (TaKaRa 公司)连接,转化 JM109 (TaKaRa 公司)感受态细胞。质粒回收用 UNIQ-10 柱式质粒小量抽提试剂盒(上海生工)。对每个 PCR 产物都挑 5 个克隆子、正反链双向测序以保证序列的准确性,测序采用 BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Kits 在 ABI3100 全自动测序仪上进行测序 (Perkin-Elmer 公司)。

1.6 序列分析

核酸序列的编辑、翻译和排序比对均使用 DNASTAR 软件包 (DNASTAR, Inc. 1996)。同源序列的搜索在 NCBI BLAST 服务器上进行 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>)。分别使用 SignalP (Nielsen et al., 1997)、ChloroP (Emanuelsson et al., 1999) 和 DAS (Cserzo et al., 1997) 分析 *A. longa* 质体型 TIM (pTIM) 的信号肽、导肽和跨膜疏水区。

2 结 果

2.1 *A. longa* cTIM 和 pTIM 基因 cDNA 序列的克隆和分析

3-RACE 后获得约 800 bp 和 900 bp 的两条预期目的带(依次称它们为 A 序列和 B 序列)。将它们克隆测序后分析显示:3 端均具 polyA 序列,终止密码子分别为 TAA 和 TGA,但在 polyA 序列和终止密码子之间未见有加尾信号 AATAAA;二者的 3 端非翻译区分别为 58 bp 和 171 bp。将编码区部分翻译成氨基酸序列后在 NCBI BLAST 服务器上搜索同源序列,命中的都是 TIM。且初步的序列比对显示二者均具有一些 TIM 的典型序列特征(如高度保守的位点)。这些说明所获得的两序列都应该是 TIM 基因所编码 mRNA 的 3 端 cDNA 序列。

根据上述所测的 A 和 B 序列,分别设计出用于 5-RACE 的逆转录引物及用于 1st PCR 和 2nd

PCR 的引物组合。经 5-RACE 后,采用根据 A 序列设计的引物对 (Ps1/ Pn1 和 Ps3/ Pn1) 获得了 200 bp 的目的带,采用根据 B 序列设计的引物对 (Ps2/ Pn2 和 Ps3/ Pn2) 获得了 500 bp 的目的带。克隆测序后,根据其重叠的核苷酸序列将其分别拼接为完整的 cDNA 序列(相应地分别称它们为 A 和 B 序列)。分析发现 A 和 B 的 5 端都有与 *E. gracilis* SL 序列 (Spliced Leader sequence) 同源的 SL 序列:5-TCA TTC ACT TTC TGA GTG TCT ATT TTT TTT CG3。(SL 序列是眼虫类核基因编码成熟 mRNA 的特征标志。眼虫类核基因转录的 hnRNA 通过反式剪接作用将 SL-RNA 的 5 端接到其 5 端后形成可翻译的成熟 mRNA。Frantz et al., 2000)。在 SL 序列下游 5 bp 处二者均有起始密码子 (ATG)。在 3 端,正如前述二者均具有 polyA 尾巴。这些事实说明所获得的两个序列都为完整的成熟 mRNA 所对应的 cDNA 全序列。

将由 A 和 B 序列推导出的氨基酸序列在 NCBI Blast 服务器上搜索同源序列,命中的都是 TIM。序列比对显示这两个氨基酸序列与其它物种上已报道的 TIM 有较高的同源性,如与拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) cTIM 的同源性分别达 61% 和 55%;并且,已报导 TIM 的活性中心氨基酸 (Lys12, His96 和 Glu166, 氨基酸编号以拟南芥 cTIM 为准) (Alvarez et al., 1998) 在此两序列的相应位点上(在 A 序列中分别为: Lys12、His96、Glu170; B 序列中分别为 Lys113、His197、Glu269) 都存在;已发现的对维持 TIM 结构和功能起重要作用的保守氨基酸序列模体(如保证底物与活性中心紧密结合的保守序列: 169-WAIGTG 174, 编号以拟南芥 cTIM 为准) 也都在这两个序列中存在(图 1)。

2.2 *A. longa* pTIM 前导序列的分析

使用 SignalP、ChloroP 和 DAS 对由较长的 B 序列所推导出的氨基酸序列的 N 端进行前导序列分析,具体分析结果如下:SignalP 分析显示 N 端前 41 个氨基酸残基为“信号肽序列”,预期的剪切位点在 Ser41 - Gly42 间(图 1);用 ChloroP 将其后的序列再进行分析,结果显示信号肽后的 50 个氨基酸残基区段是“叶绿体导肽序列”(在此即为“质体导肽序列”),预期的导肽切除位点为 Ala92;用“DAS”对整个前导序列进行“跨膜区”的分析,结果表明存在两个跨膜区,一个位于信号肽序列区,另一个位于叶绿体导肽序列区(图 2 中已与

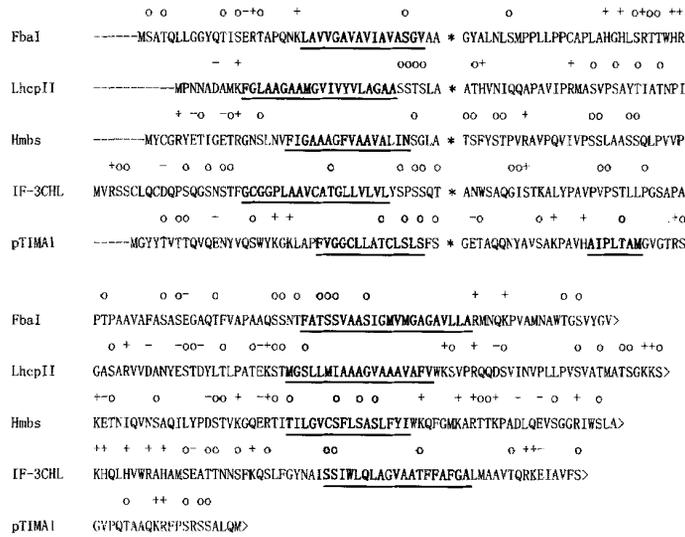


图 2 *A. longa* pTIM 前导序列 (pTIMAI) 与 *E. gracilis* 核基因编码的多个叶绿体蛋白质的前导序列的比较。上标的“+”、“-”、“o”分别示带正电荷的碱性氨基酸、带负电荷的酸性氨基酸及羟基氨基酸；粗体及下划线示疏水区。*E. gracilis* 核基因编码的多个叶绿体蛋白质的缩写及 NCBI nr Protein database 登录号分别为: FbaI, Fructose-1, 6-bisphosphate aldolase (X89786); Lhcp II, light-harvesting complex protein II (U03392); Hmbs, hydroxymethylbilane synthase (X15743); IF-3CHL, chloroplast initiation factor 3 (P36177)。

Fig. 2 Comparison between presequences of *A. longa* pTIM (pTIMAI) and several *E. gracilis* nuclear-encoded chloroplast proteins

Positively charged, negatively charged and hydroxylated amino acids are indicated by “+”, “-” and “o”, respectively. Hydrophobic domains are in bold type and underlined. Presequence abbreviations and accession numbers are as follows: FbaI, Fructose-1, 6-bisphosphate aldolase (X89786); LhcpII, light-harvesting complex protein II (U03392); Hmbs, hydroxymethylbilane synthase (X15743); IF-3CHL, chloroplast initiation factor 3 (P36177).

在导肽之前还含有定位于内质网的信号肽，并且这两个区段都含有各自的疏水跨膜区，即其前导序列是由“双转运肽”组成 (van Dooren et al., 2001)。在我们所获得的两条 cDNA 序列中，B 序列比 A 序列长大约 300 bp，对由前者推导出的氨基酸序列的 N 端分析显示，它同已报道的核基因编码定位到质体或叶绿体中的前导序列一样，具有相似的“双转运肽”结构 (只是两个疏水区之间的序列稍短)。因此我们认为 B 序列是编码质体型 TIM (pTIM) 基因的 cDNA 序列，A 序列是编码胞质型 TIM (cTIM) 基因的 cDNA 序列。

如前言所述，一般认为 *A. longa* 的质体与光合型眼虫如 *E. gracilis* 的叶绿体是同源的，是一种“退化了的叶绿体残迹”。*A. longa* 的质体基因组与 *E. gracilis* 叶绿体基因组相比，也表现出明显的删减。但 Shashidhara et al. (1991) 曾报道 *A. longa* 像 *E. gracilis* 一样，仍然表达一种由核基因编码的定位到叶绿体中的功能蛋白质，即胆色素原脱氨酶 (Porphobilinogen deaminase, 为一种与叶绿素和亚铁血红素合成有关的四吡咯合成酶)。

这提示 *A. longa* 质体可能还在执行与线型四吡咯 (Linear tetrapyrrole) 合成有关的功能。

我们的研究结果显示，*A. longa* 的核基因组不仅表达了胞质型 TIM，还编码了在胞质中合成、然后由前导序列引导进入质体定位于质体中的质体型 TIM (pTIM)。且我们序列分析的结果显示该 pTIM 与其它已报道的 TIM 氨基酸序列的同源性相当高，并具有 TIM 所共有的活性中心氨基酸、重要的保守序列模体。再加上本研究是从该基因转录的 mRNA 出发而获得其 cDNA 序列的，说明该基因是具有转录活性的。这些事实说明 *A. longa* 的 pTIM 可能仍定位于质体并具有活性。因此，我们的研究结果表明腐生眼虫 *A. longa* 的质体除执行与线型四吡咯 (Linear tetrapyrrole) 合成有关的功能外 (Shashidhara et al., 1991)，还可能具有与 TIM 有关的功能。由于 TIM 不仅参与光合作用中的卡尔文循环，还可参与糖异生 (Gluconeogenesis)、戊糖磷酸途径 (Pentose phosphate pathway) 和脂肪酸合成 (Fatty acid synthesis) 等多条代谢途径。因此，我们认为既然 *A. longa* 的质体不再

具有光合作用, 那么其 *pTIM* 可能参与了光合作用中卡尔文循环以外的某代谢途径。但究竟参与了哪一种代谢过程或者说该质体具体具有哪一种与 TIM 相关的功能还需更深入的工作来揭示。

致 谢 感谢中国科学院武汉水生生物研究所施之新教授和王江新博士惠赠 *A. longa* 虫株和培养方法。

参考文献 (References)

- Alvarez M, Zeelen JP, Mainfroid V, Rentier-Delrue F, Martial JA, Wyns L, Wierenga RK, Maes D, 1998. Triosephosphate isomerase (TIM) of the psychrophilic bacterium *Vibrio marinus*: kinetic and structural properties. *J. Biol. Chem.* 273 (4): 2 199 - 2 206.
- Cserzo M, Wallin E, Simon I, von Heijne G, Elofsson A, 1997. Prediction of transmembrane alpha-helices in procariotic membrane proteins: the dense alignment surface method. *Protein Eng.* 10 (6): 673 - 676.
- Emanuelsson O, Nielsen H, von Heijne G, 1999. ChloroP, a neural network-based method for predicting chloroplast transit peptides and their cleavage sites. *Protein Science* 8 (5): 978 - 984.
- Frantz C, Ebel C, Paulus F, Imbault P, 2000. Characterization of *trans*-splicing in Euglenoids. *Curr. Genet.* 37 (6): 349 - 355.
- Gibbs SP, 1981. The chloroplasts of some algal groups may have evolved from endosymbiotic eukaryotic algae. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 361: 193 - 208.
- Gockel G, Hachtel W, 2000. Complete gene map of the plastid genome of the nonphotosynthetic euglenoid flagellate *Astasia longa*. *Protist* 151 (4): 347 - 351.
- Liaud MF, Lichtle C, Apt K, Martin W, Cerff R, 2000. Compartment-specific isoforms of TPI and GAPDH are imported into diatom mitochondria as a fusion protein: evidence in favor of a mitochondrial origin of the eukaryotic glycolytic pathway. *Mol. Biol. Evol.* 17 (2): 213 - 223.
- Martin W, Stoebe B, Goremykin V, Hapsmann S, Hasegawa M, Kowallik KV, 1998. Gene transfer to the nucleus and the evolution of chloroplasts. *Nature* 393 (6 681): 162 - 165.
- McFadden GI, Roos DS, 1999. Apicomplexan plastids as drug targets. *Trends Microbiol.* 7 (8): 328 - 333.
- Morden CW, Delwiche CF, Kuhse M, Palmer JD, 1992. Gene phylogenies and the endosymbiotic origin of plastids. *Biosystems* 28 (1 - 3): 75 - 90.
- Nielsen H, Engelbrecht J, Brunak S, von Heijne G, 1997. Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. *Protein Engineering* 10 (1): 1 - 6.
- Pringsheim EG, 1942. Contributions to our knowledge of saprotrophic algae and flagellata. *Astasia, Distigma, Menoidium*, and *Rhabdomonas*. *New Phytol.* 41: 171 - 205.
- Shashidhara LS, Smith AG, 1991. Expression and subcellular location of the tetrapyrrole synthesis enzyme porphobilinogen deaminase in light-grown *Euglena gracilis* and three nonchlorophyllous cell lines. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88 (1): 63 - 67.
- Siemeister G, Hachtel W, 1990. Structure and expression of a gene encoding the large subunit of ribulose-1, 5-bisphosphate carboxylase (rbcL) in the colourless euglenoid flagellate *Astasia longa*. *Plant Mol. Biol.* 14 (5): 825 - 833.
- van Dooren GG, Schwartzbach SD, Osafune T, McFadden GI, 2001. Translocation of proteins across the multiple membranes of complex plastids. *Biochim. Biophys. Acta* 1 541 (1 - 2): 34 - 53.