

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2011.01234

南极冰藻 *Chlamydomonas* sp. ICE-L S-腺苷同型半胱氨酸水解酶基因的克隆及其生物信息学分析

王金慧, 丁燊, 简纪常, 吴灶和

广东海洋大学 水产学院; 广东省水产经济动物病原生物学及流行病学重点实验室, 广东 湛江, 524025

摘要: S-腺苷同型半胱氨酸水解酶(S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase, SAHH)是一种细胞内广泛存在的酶, 在调节生物体转甲基化反应中占据重要地位。本研究通过 RT-PCR 及 RACE-PCR 技术克隆了南极冰藻(*Chlamydomonas* sp. ICE-L)S-腺苷同型半胱氨酸水解酶全序列, 命名为 ICE-LSAHH。ICE-LSAHH 全长 1 844 bp, 包括 5'非编码区 36 bp, 3'非编码区 344 bp, 含有一个较长的 poly(A)尾。开放阅读框 1 461 bp, 编码 487 个氨基酸。根据推导的氨基酸序列预测其分子量为 53.0 kD, 理论等电点为 5.16。SignalP 3.0、TMHMM Server v. 2.0、NetNGlyc 1.0 和 NetPhos 2.0 预测结果显示, ICE-LSAHH 蛋白不存在信号肽与跨膜区, 含有 1 个 N-糖基化位点及 23 个磷酸化位点。利用 ClustalX 2.0 及 MEGA 5.0 软件, 以邻位相连法对南极冰藻及其他物种 SAHH 构建系统进化树, 结果显示, ICE-LSAHH 与杜氏盐藻(*Dunaliella salina*)、莱茵衣藻(*Chlamydomonas reinhardtii*)、小球藻(*Chlorella variabilis*) 等有较近亲缘关系。利用 SWISS-MODEL 程序和 PyMOL Viewer 软件成功模拟了 ICE-LSAHH 蛋白亚基的三维结构, 该结构包括 20 个 α -螺旋和 12 个 β -折叠, 且存在 3 个结构域: N 端底物结合域、NAD 结合域和 C 末端。可见, SAHH 基因存在于南极冰藻并进行了有效的表达, 该蛋白定位于细胞质, 进一步证实 SAHH 是一个进化上比较保守的蛋白。

关键词: *Chlamydomonas* sp.; ICE-L; S-腺苷同型半胱氨酸水解酶; 克隆; 三维结构; 生物信息学
中图分类号: Q93 文献标志码: A 文章编号: 1005-8737-(2011)06-1234-09

众所周知, S-腺苷蛋氨酸(S-adenosylmethioine, SAM)是细胞内广泛存在的甲基供体^[1]。在特异的转甲基酶作用下, 其甲基可以转移到各种生物受体(如: DNA、RNA、蛋白、磷脂和其他小分子物质)上, 从而形成 S-腺苷同型半胱氨酸(S-adenosylhomocysteine, SAH)。S-腺苷同型半胱氨酸水解酶(S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase, SAHH, EC 3.3.1.1)催化 SAH 水解生成腺苷(adenosine, Ado)和同型半胱氨酸(homocysteine, Hcy)。该反应是可逆的, 体外趋向合成, 体内趋向水解^[2-3]。可见 SAHH 在调节生物体转甲基化反应中占据着重要地位, 它的活性取决于 SAM 与 SAH

的比率, SAHH 活性的抑制将导致细胞内 SAH 的堆积, 对转甲基反应产生反馈性抑制作用, 从而可以在各种水平上影响基因表达的效率^[4-7]。

SAHH 广泛存在于动物、植物、真菌及其他微生物体内, 由 4 个化学性质、功能都相同的亚基组成。亚基的分子量为 45 ~ 55 kD, 每个亚基含有一分子紧密结合的辅酶(NAD⁺)^[8-9]。SAHH 是一种进化上相对保守的蛋白^[10], 其氨基酸序列具有较高的同源性, 如鼠源 SAHH 与人类 SAHH 一致性高达 97 %^[11]。

该酶在各种生物的生长发育、繁殖和代谢等生理过程中, 具有重要的作用。目前对 SAHH 基

收稿日期: 2011-03-26; 修订日期: 2011-07-05.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(40876102); 广东省自然科学基金资助项目(S2011010005885).

作者简介: 王金慧(1986-), 女, 硕士研究生, 研究方向为海洋微生物学与病害防治. E-mail: heidi_hedy@163.com

通信作者: 丁燊, 博士, 教授, 主要研究方向为海洋微生物学与病害防治. E-mail: dingy@gdou.edu.cn

因的研究,多集中在其介导 DNA 甲基化机理及其与疾病的相关性研究,并已从多种微生物体内(如古硫化细菌^[8, 12]、酵母菌^[13]、枯氏锥虫^[14]等)克隆了 SAHH 的基因全长。由于 SAM 是生物合成多胺和乙烯的前体,因此其与植物的抗逆性有一定的关系,SAHH 在抗逆反应中也具有重要地位。Sharma^[15]等研究发现,遏蓝菜(*Thlaspi arvense*)的 SAHH 基因参与抗低温胁迫调节;草菇在低温处理时,SAHH 及 SAHH 同源基因的 mRNA 含量会迅速增加^[16-17],与低温适应呈正相关。Masuta^[18]等在烟草中表达 SAHH 基因研究植物抗病毒反应时,发现可以提高烟草的抗病毒能力。由于南极独特的地理和气候特征,形成了一个干燥、酷寒、强辐射、高盐度和低光照的自然环境,南极冰藻具备了相应独特的生理、生化和分子机制,以适应极端的环境^[19-20]。SAHH 作为一种抗逆相关酶,在南极冰藻的极端环境适应尤其是低温适应中也应具有较为重要的地位,但到目前为止,关于南极冰藻 SAHH 的研究尚未见相关报道。本研究拟通过 RT-PCR、RACE-PCR 等技术,从南极冰藻 *Chlamydomonas* sp. ICE-L 中克隆 SAHH 基因 cDNA 全序列,并对其序列特征、亚基结构等进行具体分析。以期了解南极冰藻 SAHH 基因的结构、功能与特性,期望通过后续更深入的研究能够从 SAHH 的角度阐明南极冰藻对极端环境的适应机制;并可以有效地保护和利用南极低温酶基因资源,为转 SAHH 基因抗逆性遗传育种奠定基础,具有较重要的理论与应用价值。

1 材料和方法

1.1 藻种来源及培养方法

南极冰藻 *Chlamydomonas* sp. ICE-L 由国家海洋局第一海洋研究所海洋生物活性物质重点实验室惠赠。*Chlamydomonas* sp. ICE-L 的培养液采用 Provasoli 培养基^[21],于三角瓶中培养。放在可控温光照的培养箱中,培养温度 6~8℃,光强为 1300~1900 lx,光照周期为 12 h 光/12 h 暗。不充气,每天摇动 3~4 次,每隔 14 d 以 20%为接种量,将藻体转移到新的培养基中以维持细胞的对数生

长。南极冰藻培养所需的海水采自湛江海域,盐度约为 33。

1.2 其他试验材料

RNA 提取试剂 TRIZOL[®] Reagent 购自 Invitrogen 公司,5'/3' RACE Kit 购自罗氏公司,dNTPs、ExTaq 酶、rTaq 酶及 Reverse Transcriptase M-MLV(Rnase H-)购自 TaKaRa 公司。

大肠杆菌 DH5 α 由广东省水产经济动物病原生物学及流行病学重点实验室保存。

1.3 南极冰藻 *Chlamydomonas* sp. ICE-L 总 RNA 的提取

按 TRIZOL[®] Reagent 试剂的操作程序稍加改动,具体步骤如下:用 1.5 mL 无 RNA 酶 EP 管离心收集对数期藻细胞,10 000 r/min 离心 5 min,4℃;弃上清,加 100 μ L Trizol,用组织匀浆器研磨充分,补加 900 μ L Trizol,剧烈震荡 30 s,冰上放置 5 min 使细胞充分裂解;加入 200 μ L 氯仿,剧烈震荡 30 s,冰上静置 5 min,缓加 200 μ L 3 mol·L⁻¹ NaAc,静置 2 min,12 000 r/min 离心 15 min,4℃;取上清液加入 500 μ L Cl(氯仿:异戊醇=24:1),充分混匀,12 000 r/min 离心 15 min,4℃;取上清液加入 500 μ L 异丙醇,充分混匀,-20℃ 沉淀 1 h;12 000 r/min 离心 10 min,4℃,弃上清液,75%乙醇洗涤 1~2 次;室温晾干并吸出管壁水分,加 20 μ L RNAfree H₂O 溶解 RNA,-80℃ 保存。1.0%琼脂糖凝胶电泳检测。

1.4 引物设计

从 NCBI 下载已报道的 S-腺苷同型半胱氨酸水解酶基因的氨基酸序列并进行序列比对,根据其保守区设计简并引物 P1。以 P1 为上游引物,3'PCR 锚定引物为下游引物进行 3'RACE-PCR 扩增。根据 3'RACE 获得的 3'端 cDNA 序列,应用 Primer Premier 5.0 及 Oligo 6.0 软件设计 3 条基因特异性引物(分别命名为 GSP1、GSP2、GSP3),进行 5'RACE-PCR 扩增。基因克隆所用引物见表 1。

1.5 RT-PCR 及 RACE-PCR

采用 Reverse Transcriptase M-MLV(Rnase H-)和 3'adapter 引物进行 3'RACE cDNA 一链的合成,体系为 20 μ L,操作按照 M-MLV 说明书进行。PCR

表 1 ICE-LSAHH 基因克隆所需引物
Tab. 1 Primers used in the cloning of ICE-LSAHH gene

PCR	引物 primer	序列 (5'-3') sequence(5'-3')
3'RT	3'adapter	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACT(30)VN
5'RT	5'oligoT-anchor	GACCACGCGTATCGATGTCGACT(16)
3'Race	P1	STTYTGRTYGTYYAAYGTTGC
3'Race	3'PCR anchor	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT
5'Race	GSP1	CCAACATCTCCATAGCCAGCA
5'Race	GSP2	AACTTGACTTGGTGACAG
5'Race	GSP3	ACAATCTTCAACTCAGCG
5'Race	5'- anchor primer	GACCACGCGTATCGATGTCGAC

注: Y: C/T, S: G/C, R: A/G.
Note: Y: C/T, S: G/C, R: A/G.

扩增反应体系为 50 μ L, 按照 touchdown PCR 分别设计程序(94 5 min; 94 60 s, 50 60 s, 72 60 s, 5 cycles; 94 60 s, 48 60 s, 72 60 s, 5 cycles; 94 60 s, 45 60 s, 72 60 s, 25 cycles; 72 10 min); 采用 5'/3' RACE Kit, 2ed Generation(Roche, Mannheim, Germany)试剂盒, 按照试剂盒的步骤进行 5'Race-PCR, 其中反转录-纯化-加 A 尾整个过程连续完成, 以防止 5'Race cDNA 一链的降解。PCR 产物在 120 V 电压下经 1.0 %琼脂糖凝胶电泳检测, 使用 Agarose Gel DNA Purification Kit Ver.2.0(TaKaRa, Tokyo, Japan)试剂盒切胶回收。

1.6 PCR 产物的分子克隆及测序

按照说明书操作步骤, 将 PCR 产物连接到 pMD18-T 载体(TaKaRa)上, 然后转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞, 在含 IPTG/X-Gal 的 Amp⁺/LB 平板上进行筛选, 挑取阳性克隆送至深圳华大基因科技有限公司测序。

1.7 生物信息学分析

利用 NCBI(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)在线工具, 进行序列同源性比对和相似性分析; 利用 DNAMAN Version7.0(Lynnon Biosoft, USA)软件对序列进行拼接; 采用 GENETYX 7.0(Software Development co., Ltd)和 ORF Finder 在线分析软件推导其氨基酸序列、预测其分子量计算值(Mw)和理论等电点(pI)并确定其开放阅读框(ORF); 使用 Clustal X2.0 及 MEGA 5.0 软件, 以邻位相连法(neighbor-joining)^[22] 构建系统进化树。通过在线分析软件 SignalP 3.0 (<http://www.cbs.dtu>

<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)、TMHMM Server v. 2.0(<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>)、NetNGlyc 1.0(<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>) 和 NetPhos 2.0(<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>), 分别预测蛋白质分子的信号肽、跨膜区、N-糖基化位点及磷酸化位点。利用在线软件 InterProScan Sequence Search (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/InterProScan/>)进行蛋白质分子功能域预测。亚细胞初步定位分析通过在线分析软件 TargetP 1.1(<http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/>)和 WoLF PSORT(<http://wolfsort.org/>)进行预测。利用软件 ClustalX2 和 DNAMAN Version7.0 进行氨基酸同源比对分析。利用 ExPASy 服务器的 SWISS-MODEL^[23](<http://www.swissmodel.expasy.org/>)程序进行建模并通过 3D 结构分析软件 PyMOL Viewer 进行分析。

2 结果与分析

2.1 ICE-LSAHH 基因的全长克隆

根据 SAHH 同源保守序列设计简并引物 P1 进行 3'RACE, PCR 扩增后得到 1 290 bp 的 3'端 cDNA 序列。根据所得 3'端序列, 设计 3 条基因特异性引物 GSP1、GSP2 和 GSP3 进行 5'RACE, 经过两轮 PCR 扩增获得 574 bp 的 ICE-LSAHH 基因 5'端 cDNA 序列; 采用 DNAMAN 7.0 软件对 3'和 5'端序列进行拼接, 得到长度为 1 844 bp 的基因全序列, 将其命名为 ICE-LSAHH(图 1)。GenBank 登录号为: HM748326。

2.2 ICE-LSAHH 基因的序列分析

ICE-LSAHH 基因包括 5'非编码区 36 bp、开放阅读框(ORF)、3'非编码区 344 bp 和一个较长的 poly(A)尾。其中 ORF 1 461 bp, 编码氨基酸 487 个(图 1)。根据推导的氨基酸序列预测其分子量(Mw)为 53.0 kD, 理论等电点(pI)为 5.16。

以 SignalP 3.0 Server 程序对 ICE-LSAHH 基因所推导的氨基酸序列进行 N 端信号肽结构的预测, 未发现信号肽序列; TMHMM Server v. 2.0

预测发现该蛋白不存在跨膜区。亚细胞初步定位分析, 显示 ICE-LSAHH 可能来源于细胞质。NetNGlyc 1.0 预测仅发现 1 个 N-糖基化位点, 位于第 233 个氨基酸处(²³³NDSV); NetPhos 2.0 预测发现共有 23 个磷酸化位点, 包括 9 个丝氨酸磷酸化位点、7 个苏氨酸磷酸化位点和 7 个酪氨酸磷酸化位点, 表明磷酸化是该蛋白翻译后修饰的主要方式之一^[5]。对 ICE-LSAHH 蛋白功能域预测分析, 发现该蛋白存在两个 SAHH 基因标志序列: SAHH

```

1  cttttactttaattgctagccccagcaattgccaaagATGTCTTCCGCTATGTGCCACCATC 60
                                     M S S A M C T I
61  GATAAGGCTACCACGGCCGTGAGTACAAGTCAAGGACCTGGCCGAGGCCGACTTCGGT 120
   D K A T T G R E Y K V K D L A E A D F G
121 CGCCTTGAGCTGGAGATGGCTGAGCCGAGATGCCTGGACTCATGTCTGCCGCACTGAG 180
   R L E L E M A E A E M P G L M S C R T E
181 TTCGGTCTTCTCAGCCTCTGAAGGGACCATGATCACTGGATCTCTGCACATGACCATC 240
   F G P S Q P L K G A M I T G S L H M T I
241 CAGACCGGTGTCCTTATTGAGACTTGGTTGCCCTGGTGTGAGGTCGCGTGGTGCAGC 300
   Q T G V L I E T L V A L G A E V R W C S
301 TGCAACATTTCTCCACTCAGGACCAGCTGCCGCCCATTGCCCGCAGCCTTGCCT 360
   C N I F S T Q D H A A A A I A R D A C A
361 GTCTTTGCCCTGGAAGGGTGAGACCTGGGAGTACTGGTGGTGCCTGAGCAGGCCCTG 420
   V F A W K G E T L E E Y W W C T E Q A L
421 AACTGCGCTGAGGTAACGGACCTAACATCATCGTTGACGATGGAGGTGACGCCACCTC 480
   N W P E G N G P N I I V D D G G D A T L
481 CTCATCCACGAGGGTAAGAAGGCTGAGGACCTGTACGAGAAGGATGGAACTCTCCCGAC 540
   L I H E G K K A E D L Y E K D G T L P D
541 CCTCCAGCACTGACAACGCTGAGTTGAGATTGTGCTTACTATCATCAGGACGGACTC 600
   P S S T D N A E L K I V L T I I R D G L
601 CCCAAGGATGGTTCGAAGTGAACAGGATGGCCAAAGCACCTGGTGGTGTCTGAGGAG 660
   P K D G S K W N R M A K H L V G V S E E
661 ACCACCCTGCTGTAAGCGCTTGTATGAGATGCAGGCCGCTGGATCCCTCTGTTCCTCC 720
   T T T G V K R L Y E M Q A A G S L L F P
721 GGCATCAACGCTCAACGACTCTGTACCAAGTCAAAGTTTGACAACGCTGACGGTTGCCGC 780
   A I N V N D S V T K S K F D N V Y G C R
781 CACTCCCTCCCTGATGCATCATGCGCGCTACCGATGTCATGATTGCTGGAAGTTGCC 840
   H S L P D G I M R A T D V M I A G K V A
841 TTCATTGCTGGCTATGAGATGTTGGAAGGGTTACAGCAGCGCCTAAAGGCTGCTGGT 900
   F I A G Y G D V G K G S A S A L K A A G
901 GCCCGTGCATCATCGGTGAGATTGATCCATCTGTGCTCTCCAGGCTGCCATGGAGGT 960
   A R V I I G E I D P I C A L Q A A M E G
961 TATGAGATCGCCCCATTGAGGACTGTGTCACTACACTGACATCTTCAATCAACCACT 1020
   Y E I A P I E D C V T Y T D I F I T T T
1021 GGCAACAAGGACATCATCGTTGACCACATGGCCAAGTGAAGAACAACGCCATCGTT 1080
   G N K D I I M V D H M A K M K N N A I V
1081 GGAACATAGGACATTCGATAACAGGATCGCATGGCTGGTGTGACGGCTTCCTGGA 1140
   G N I G H F D N E I D M A G V Y G F P G
1141 ATCAAGAGGAGAACATCAAGCCTCAGTGTGACCGCTTCATCTCCCTGATGGACATGGT 1200
   I K R Q N I K P Q C D R F I F P D G H G
1201 GTCATATTGGCTGAGGGCGCTGCTGAACTGGGATGCGCCACGGGACATCCTTCT 1260
   V I I L A E G R L L N L G C A T G H P S
1261 TTCGTATGTCTTGTCTTACCAACCAGTTATCGCCAGCTTGTGTTGGAACGAG 1320
   F V M S C S F T N Q V I A Q L E L W N E
1321 CGCTCCACTGGCCGCTACGAGAACAAGGTGTATGTCTCCCAAGCACCTGGATGAGAAG 1380
   R S T G R Y E N K V Y V L P K H L D E K
1381 GTTGCCACCTCCATCGACAAGCTGGTGTGCAAGTGACCAAGCTTTCACCTGAGCAG 1440
   V A T L H L D K L G C K L T K L S P E Q
1441 GTCGATACATTAACGTGCCCATCGGAGGCCCTACAAGCCGCAACTACCGCTACTAG 1500
   A A Y I N V P I G G P Y K P A N Y R Y *
1501 atgtgcttagatgtagtctatagtttaggttgcaagtgatgcaactgaagtggcaact 1560
1561 tttgtattttgagtgagccctgctagtgtcttttgcacagaagcttggagcaatgg 1620
1621 ggaggagtcgtttgttttcacgttttgatgtgtaagtgatattatgggatcccgag 1680
1681 ttcacttttagcagagcttgcattcatgctgcgtatcgcgactttttacatagtgtg 1740
1741 agtgtgttattatgttttttatgggttcaatgagatttgggtgcatgtaacaatcg 1800
1801 gaagttaaaaaaaaagaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa 1844
    
```

图 1 南极冰藻 ICE-LSAHH 基因全长 cDNA 序列及其推导的氨基酸序列

终止子以星号表示, 下划线处为 SAHH 两个标志序列, 黑体字母代表 N-糖基化位点, 方框内为 AU 模体。

Fig. 1 Full-length cDNA sequence of ICE-LSAHH gene in *Chlamydomonas* sp. ICE-L and deduced amino acid sequence. The stop codon was showed by an asterisk. The two SAHH signature motifs were underline. The N-glycosylation site was bold. The lower-case letter indicated 5' and 3' UTR. The AU motif was in the box.

标志性序列 1(⁸⁸SCNIFSTQDHAAA¹⁰²) 和 SAHH 标志性序列 2(²⁶⁵GKVAFIAGYGDVVGKGSAS²⁸²)以及一个 NAD 结合位点(²⁴³NV---TG⁴⁰⁵)。

2.3 ICE-LSAHH 基因的同源性及其进化分析

BLAST 分析发现 ICE-LSAHH 与其他物种 SAHH 基因具有较高的同源性, 其一致性为 62%~85%。其中相似性最高的是莱茵衣藻(*Chlamydomonas reinhardtii*) (85%) (XM_001693287)。将 ICE-LSAHH 与其他藻类 SAHH 进行同源比对分析表明, 他们在氨基酸序列上有很高的相似性, 说明 SAHH 是一种进化上较为保守的蛋白(图 2)。将推导的 ICE-LSAHH 氨基酸序列与其他藻类、动植物、微生物等构建系统进化树, 结果显示 SAHH 家族可明显的被分为动物、植物、藻类、细菌四大分支, ICE-LSAHH 与杜氏盐藻(*Dunaliella salina*)(ADJ96635)、莱茵衣藻(XM_001693287)、小球藻 *Chlorella variabilis*(EFN51251)等有较近亲缘关系(图 3)。

2.4 ICE-LSAHH 基因的亚基结构

将 ICE-LSAHH 氨基酸序列提交至 SWISS-MODEL 程序, 自动搜索同源蛋白作模板, 得到 ICE-LSAHH 单亚基三级结构模型。同源蛋白与目标蛋白的一致性为 62%, 因此该模型可信度较高。利用 PyMOL Viewer 软件分析亚基结构, 发现该亚基共有 20 个 α -螺旋和 12 个 β -折叠, 由 3 个结构域组成: 大的 N 端底物结合域(Substrate-binding)、NAD 结合域(NAD-binding domain)和 C 端域(C-terminal)(图 4)。

3 讨论

本研究通过 RT-PCR 及 RACE-PCR 技术成功地克隆了南极冰藻 ICE-L S-腺苷同型半胱氨酸水解酶全序列。ICE-LSAHH 基因全长 1 844 bp, 编码 487 个氨基酸。该基因的成功克隆说明其存在于南极冰藻并进行了表达, 与我们立项时的预期是相符的, 它极可能参与了南极冰藻的极端环境适应性。根据推导的南极冰藻 SAHH 氨基酸序列, 预测其分子量为 53.0 kD, 文献报道其他生物 SAHH 的分子量为 45~55 kD^[9], 分子量与之相符。

ICE-LSAHH 理论等电点(pI)为 5.16, 尽管与其他生物 SAHH 的等电点具有一定差异, 但它们都属于酸性蛋白酶, 其催化机理应该是相似的^[14]。

所有来源的 SAHH 均为同源四聚体, 每个亚基含有 1 分子紧密结合的辅酶(NAD⁺), 并由 3 个结构域组成: 大的 N 端底物结合域或催化域、辅因子结合域或 NAD 结合域和 C 端域^[8]。对 ICE-LSAHH 蛋白功能域预测分析, 也发现该蛋白存在两个 SAHH 基因标志序列, 即 SAHH 标志性序列 1(⁸⁸SCNIFSTQDHAAA¹⁰²) 和 SAHH 标志性序列 2(²⁶⁵GKVAFIAGYGDVVGKGSAS²⁸²), 以及 1 个 NAD 结合位点(²⁴³NV---TG⁴⁰⁵)(图 2)。3D 结构也表明其具有明显的 3 个重要的结构域(图 4)。因此该蛋白符合 SAHH 的一般结构域构成, 进一步证实了南极冰藻 SAHH 基因克隆结果的正确性。Parker^[14]等认为 NAD 结合位点邻近的非保守区, 可能参与酶与辅酶结合的调节, 在图 2 中也发现南极冰藻 SAHH 在 NAD 结合位点之前具有一个显著的非保守区, 其是否参与 SAHH 与辅酶的调节, 有待进一步的探讨。

不同来源的 SAHH 在进化过程中具有较高的保守性, 但不同的 SAHH 在氨基酸在序列上也存在一定的变化^[10-11]。本研究中 BLAST 分析发现, ICE-LSAHH 与其他物种 SAHH 基因具有较高的同源性, 其中与莱茵衣藻的同源性高达 85%; 它们的同源性也如实地表现在相似的空间结构与类似的结构域上(图 4)。与此同时, 其氨基酸序列也不乏变化, 如 NAD 结合位点区至少有 9 个氨基酸残基与其他 SAHH 完全不同(图 2), 这些不同与如上所述等电点、分子量等参数的差异直接相关。可见经氨基酸的同源比对分析进一步证实了 SAHH 是一个进化上比较保守的蛋白, 但 ICE-LSAHH 也具有一定的特殊性, 这种特殊性可能与该酶的极端环境适应相关, 对南极冰藻在极端条件下的正常生活非常重要。正因为 SAHH 的保守性与特殊性, 在构建的系统进化树中, 各物种 SAHH 分类清晰, 符合经典生物学分类结果(图 3)。可见 SAHH 基因的进化与物种进化是一致性的, 考虑到该基因的保守与特殊两方面的特点,

我们认为可以将该基因有效地应用于生物的分类与鉴定。

SAHH 不仅在调节生物体转甲基化反应中具有重要作用, 同时在抵抗环境胁迫中也起着关键

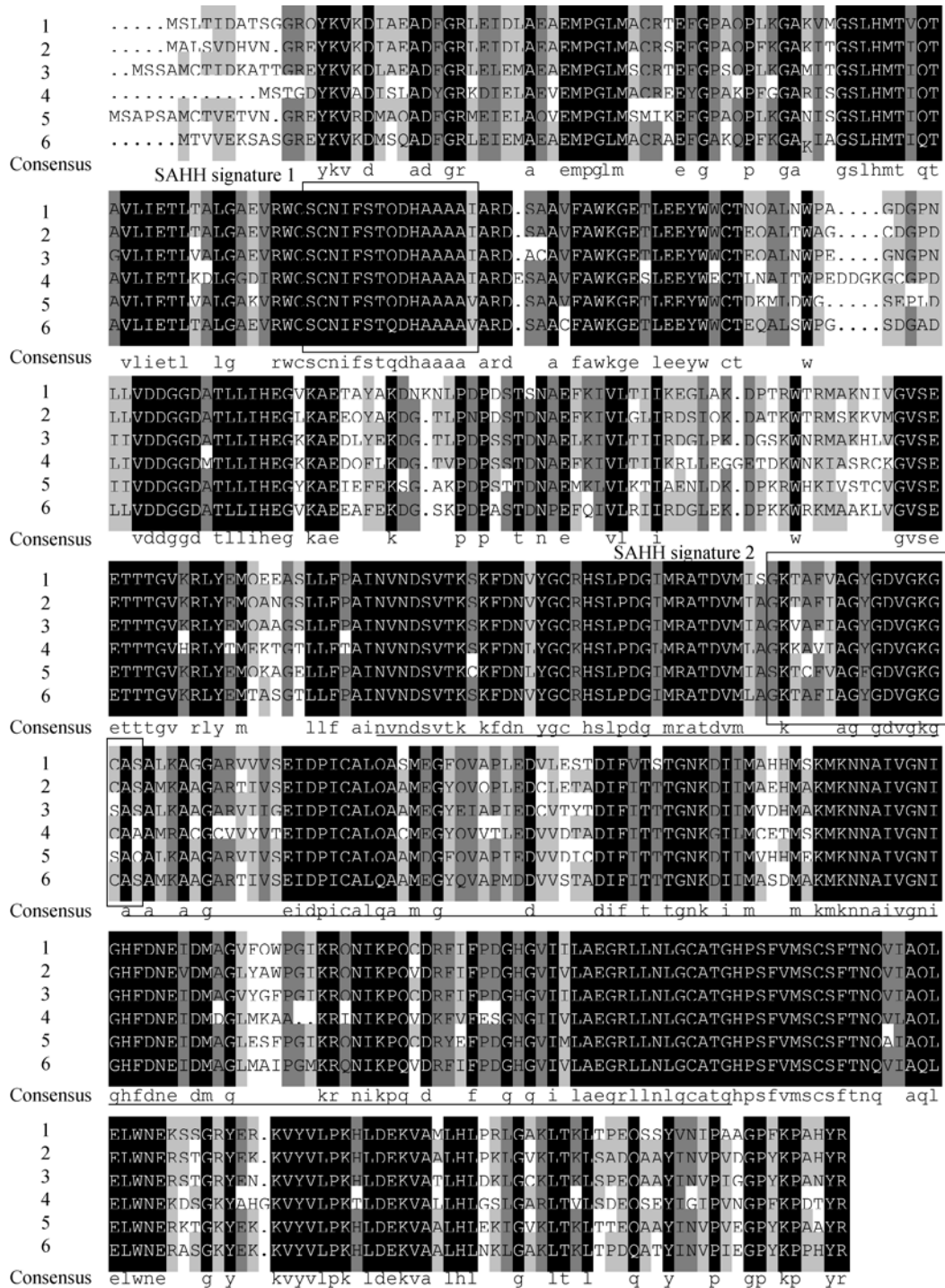


图 2 南极冰藻 ICE-LSAHH 氨基酸与其他物种 SAHH 氨基酸的多序列比对分析

1: 杜氏盐藻, 2: 莱茵衣藻, 3: 南极冰藻, 4: 三角褐指藻, 5: 细小微胞藻, 6: 小球藻

阴影部分表示相同的氨基酸残基, 方框内为两个 SAHH 特征序列, 下划线处为 NAD 结合域。

Fig. 2 Amino acid sequence alignment of ICE-LSAHH in *Chlamydomonas* sp. ICE-L with other SAHHS

1: *Dunaliella salina*(ADJ96635), 2: *Chlamydomonas reinhardtii*(XM_001693287), 3: *Chlamydomonas* sp. ICE-L(HM748326), 4: *Phaeodactylum tricornerutum*(XP_002177758), 5: *Micromonas* sp. RCC299(XP_002505983), 6: *Chlorella variabilis*(EFN51251). Identical residues were shaded. The two SAHH signature motifs were showed in the boxes. The NAD binding domain was underline.

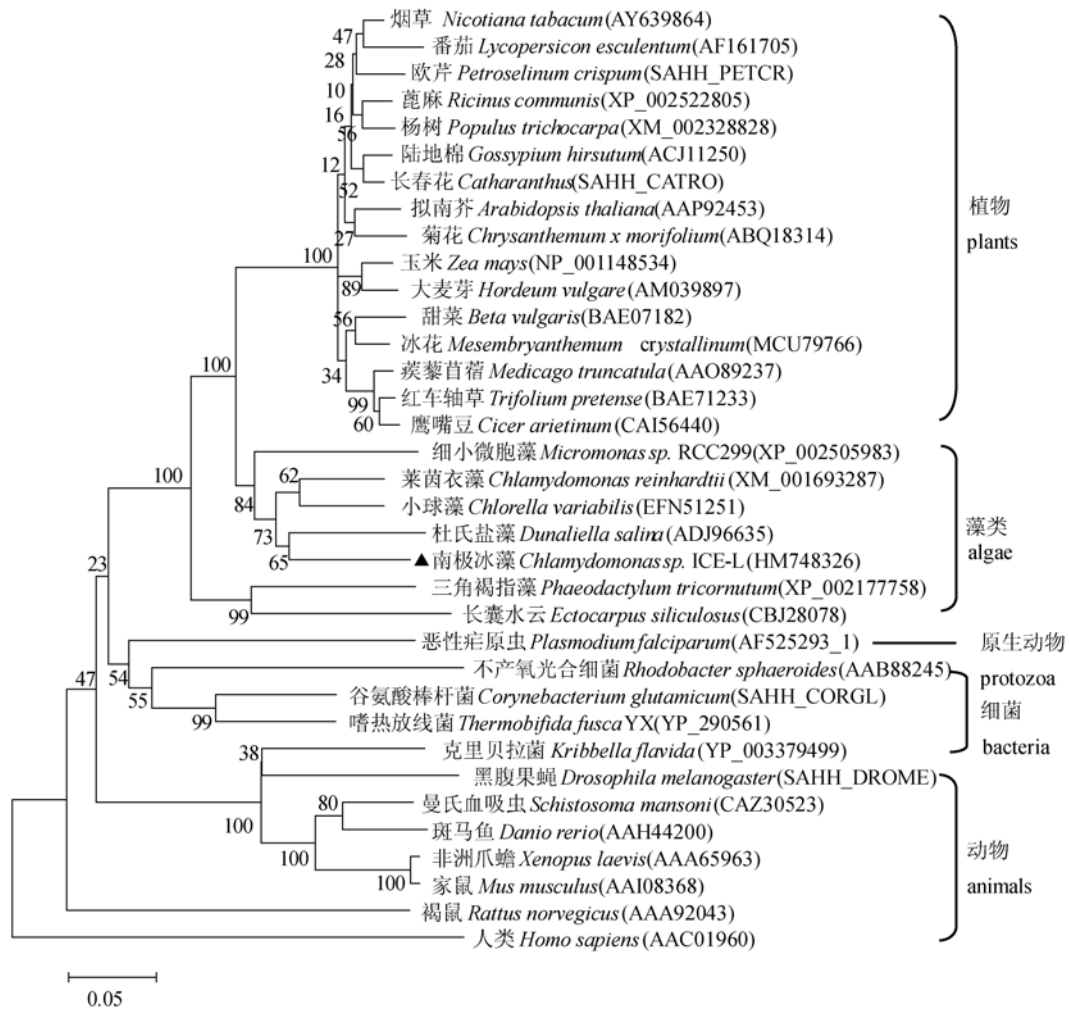


图 3 南极冰藻 ICE-LSAHH 基因系统进化树分析

使用 ClustalX2 和 MEGA 5.0 软件, 采用 Neighbour Joining 法构建该进化树。各节点的数字为 1 000 次自展重复计算值。

Fig. 3 Analysis of molecular phylogenetic tree of ICE-LSAHH in *Chlamydomonas* sp. ICE-L

Amino acid sequence alignment was carried out by Clustal X2. The consensus tree was constructed by neighbor-joining bootstrap using Mega 5.0. Numbers are the bootstrap values for 1 000 trials.

图 4 南极冰藻 ICE-LSAHH 亚基三维结构图

图中绿色区域为 NAD 结合域。

Fig. 4 Three-dimensional structure of ICE-LSAHH subunit in *Chlamydomonas* sp. ICE-L. NAD-binding domain was colored green.

的调节作用。已证实十字花科遏蓝菜(*Thlaspi arvense*)的 SAHH 基因参与低温胁迫调节^[15]; 草

菇在低温处理时 SAHH 及 SAHH 同源基因的 mRNA 含量也迅速增加^[16-17], 参与抗低温胁迫。Masuta^[18]等在烟草中过度表达 SAHH 基因可以有效提高烟草的抗病毒能力。SAHH 一方面可以通过核酸的甲基化, 对基因表达进行调控, 影响 mRNA 的成熟, 进而调节各种生理功能; 另一方面它也可以通过蛋白质的甲基化, 参与胁迫适应反应^[24]。本研究成功克隆了南极冰藻 SAHH 基因 cDNA 全长序列, 但其基因产物甲基化调节功能、低温适应机制及其在南极冰藻中的地位等有待更深入的研究。目前我们已成功构建了南极冰藻 SAHH 基因的原核表达载体, 在后续的研究中希

望通过原核表达、基因敲除、荧光定量等技术, 能够深入认识 SAHH 基因及其产物在南极冰藻极端环境适应过程中的地位与作用, 正确分析其甲基化调节途径。故本研究为从 SAHH 角度进一步阐明南极冰藻的极端环境适应机制奠定了基础。

参考文献:

- [1] Tanaka H, Masuta C, Kataoka J, et al. Inducible expression by plant hormones of S-adenosyl-homocysteine hydrolase gene from *Nicotiana tabacum* during early flower bud formation *in vitro*[J]. *Plant Sci*, 1996, 113: 167–174.
- [2] Zhang X Y, Li Y J, Yang X D, et al. Inhibitory effect of epimedium extract on S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase and biomethylation[J]. *Life Sci*, 2005, 78: 180–186.
- [3] Tanaka N, Nakanishi M, Kusakabe Y, et al. Crystal Structure of S-Adenosyl-L-Homocysteine hydrolase from the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*[J]. *J Mol Biol*, 2004, 343: 1007–1017.
- [4] Kloor D, Osswald H. S-Adenosylhomocysteine hydrolase as a target for intracellular adenosine action[J]. *Trends Pharmacol Sci*, 2004, 25: 294–297.
- [5] 余义斌, 朱一超, 张天真, 等. 棉花腺苷高半胱氨酸水解酶 cDNA 的克隆、表达及染色体定位[J]. *作物学报*, 2008, 34(6): 958–964.
- [6] Čtrnáctá V, Fritzlér J M, Šurinová M, et al. Efficacy of S-adenosylhomocysteine hydrolase inhibitors, D-eritadenine and (S)-DHPA, against the growth of *Cryptosporidium parvum in vitro*[J]. *Exp Parasitol*, 2010, 126: 113–116.
- [7] Steere J A, Honek J F. Synthesis and biological activity of novel S-Adenosyl-L-homocysteine hydrolase inhibitors[J]. *Bioorg Med Chem*, 2003, 11: 3229–3236.
- [8] Porcelli M, Fusco S, Inizio T, et al. Expression, purification, and characterization of recombinant S-Adenosylhomocysteine hydrolase from the thermophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus*[J]. *Protein Expression Purif*, 2000, 18: 27–35.
- [9] Belužić R, Čuk M, Pavkov T, et al. S-Adenosyl homocysteine hydrolase(AdoHcyase)deficiency: Enzymatic capabilities of human AdoHcyase are highly effected by changes to codon 89 and its surrounding residues[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2008, 368: 30–36.
- [10] Stepkowski T, Brzeziński K, Legockia A B, et al. Bayesian phylogenetic analysis reveals two-domain topology of S-adenosylhomocysteine hydrolase protein sequences[J]. *Mol Phylogenet Evol*, 2005, 34: 15–28.
- [11] Turner M A, Yang X D, Yin D, et al. Structure and function of S-Adenosylhomocysteine hydrolase[J]. *Cell Biochem Biophys*, 2000, 33: 101–125.
- [12] Porcelli M, Cacciapuoti G, Fusco S, et al. Cloning and sequencing of the gene coding for S-adenosylhomocysteine hydrolase in the thermophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus*[J]. *Gene*, 1996, 177: 17–22.
- [13] Tehlivets O, Hasslacher M, Kohlwein S D. S-Adenosyl-L-homocysteine hydrolase in yeast: key enzyme of methylation metabolism and coordinated regulation with phospholipid synthesis[J]. *FEBS Lett*, 2004, 577: 501–506.
- [14] Parker N B, Yang X D, Hanke J, et al. Trypanosoma cruzi: molecular cloning and characterization of the S-adenosyl homocysteine hydrolase[J]. *Exp Parasitol*, 2003, 105: 149–158.
- [15] Sharma N, Cram D, Huebert T, et al. Exploiting the wild crucifer *Thlaspi arvense* to identify conserved and novel genes expressed during a plant's response to cold stress[J]. *Plant Mol Biol*, 2007, 63: 171–184.
- [16] 孙晓红, 冯爱萍, 陈明杰, 等. 草菇冷诱导相关基因的克隆及序列分析[J]. *菌物学报*, 2006, 25(1): 88–93.
- [17] 汪虹, 陈明杰, 冯爱萍, 等. 草菇 S-腺苷-L-高半胱氨酸水解酶同源基因 *Cor3* 低温条件下的表达变化[J]. *食用菌学报*, 2010, 17(1): 14–16.
- [18] Masuta C, Tanaka H, Uehara K, et al. Broad resistance to plant viruses in transgenic plants conferred by antisense inhibition of a host gene essential in S-adenosylmethionine-dependent transmethylation reactions[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, 92: 6117–6121.
- [19] Ding Y, Miao J L, Wang Q, et al. Effect of Cd on GSH and GSH-related enzymes of *Chlamydomonas* sp. ICE-L existing in Antarctic ice[J]. *J Environ Sci*, 2005, 17(4): 667–671.
- [20] Ding Y, Miao J, Wang Q, et al. Purification and characterization of a psychrophilic glutathione reductase from Antarctic ice microalgae *Chlamydomonas* sp. Strain ICE-L[J]. *Polar Biol*, 2007, 31: 23–30.
- [21] Provasoli L. Media and prospects for the cultivation of marine algae. In: Watanabe A, Hattori R(eds) Culture and collections of algae[J]. *Proc US–Japan Conference Hakone Japan*, 1968: 63–95.
- [22] Wu C L, Mai K S, Zhang W B, et al. Molecular cloning, characterization and mRNA expression of selenium-dependent glutathione peroxidase from abalone *Haliotis discus hannai* Ino in response to dietary selenium, zinc and iron[J]. *Com Biochem Physiol, Part C*, 2010, 152: 121–132.
- [23] Schwede T, Kopp J, Guex N, et al. SWISS-MODEL: an automated protein homology-modeling server[J]. *Nucleic Acids Res*, 2003, 31: 3381–3385.
- [24] Hrycyna C A and Clarke S. Modification of eukaryotic signaling proteins by C-terminal methylation reactions[J]. *Pharmacol Ther*, 1993, 59: 281–300.

Molecular cloning and bioinformatics analysis of the S-adenosyl homocysteine hydrolase(SAHH)gene in the Antarctic ice alga *Chlamydomonas* sp. ICE-L (*Chlamydomonadales*, *Chlamydomonas*)

WANG Jinhui, DING Yu, JIAN Jichang, WU Zaohe

Fisheries College, Guangdong Ocean University; Guangdong Provincial Key Laboratory of Pathogenic Biology and Epidemiology for Aquatic Economic Animals, Zhanjiang, Guangdong 524025, China

Abstract: S-Adenosyl-L-methionine(SAM)is the most common methyl donor in a multitude of cellular methylation reactions. Numerous methyltransferases transfer the methyl group from SAM to their respective biological acceptors, forming S-adenosyl-L-homocysteine(SAH). SAH is hydrolyzed to adenosine and L-homocysteine by S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase(SAHH, EC 3.3.1.1). SAHH is an essential enzyme in all living cells, and has been explored as a potential drug target for many bacteria and parasites. The inhibition of SAHH activity can result in the accumulation of SAH and reduce the S-adenosylmethionine(SAM):SAH ratio in cells. In that case, SAHH can act as a potent feedback inhibitor, blocking the SAM-dependent methylation that is required for the metabolism of a wide variety of biological compounds such as nucleic acids, proteins, phospholipids, and other small molecules. SAHH is found in animals, plants, fungi, and other microorganisms. Antarctic ice microalgae with special characteristics to withstand the extreme environment characterized by low temperatures and ice, high levels of dissolved oxygen, and strong seasonal changes in light intensity have been investigated in recent years. To further understand the intrinsic mechanisms by which the Antarctic sea ice alga *Chlamydomonas* sp. ICE-L responds to ecological and environmental factors, we cloned and analyzed its SAHH. A cDNA encoding S-adenosyl homocysteine hydrolase(designated as ICE-LSAHH)was cloned from this alga by RT-PCR and RACE-PCR methods. The ICE-LSAHH full-length cDNA sequence was 1844 bp, including a 5'-terminal untranslated region(UTR)of 36 bp, a 3'-terminal UTR of 344 bp with a poly(A)tail, and an open reading frame(ORF)of 1461 bp encoding a polypeptide of 487 amino acids. The predicted molecular weight(MW)of ICE-LSAHH was 53 kD with an estimated pI of 5.16. Using SignalP 3.0 and TMHMM Server v. 2.0 software, it was predicted that the ICE-LSAHH protein did not contain a signal peptide or a transmembranous region, suggesting that it is not a secretory protein. To further analyze the evolutionary relationship among SAHH enzymes, a molecular phylogenetic tree was constructed using ClustalX 2.0 and Mega 5.0 software. The reliability of branching was tested by bootstrap re-sampling(1 000 pseudo-replicates). In the phylogenetic tree, members of the SAHH protein formed clear subgroups of plants, animals, algae, and bacteria. The *Chlamydomonas* sp. ICE-LSAHH evolved in parallel with those from *Dunaliella salina*, *Chlamydomonas reinhardtii*, and *Chlorella variabilis*. Sequence analysis with the BLAST algorithm showed that the ICE-LSAHH gene shared 62%–85% sequence identity with other SAHHS. The highest sequence identity was 85% with the SAHH gene of *C. reinhardtii*. Amino acid sequence alignment between ICE-LSAHH and other SAHHS showed that the ICE-LSAHH protein exhibited high sequence homology with other SAHHS. The three-dimensional structure of ICE-LGPx was determined using SWISS-MODEL workspace and PyMOL Viewer software. The 3D molecular model showed that the ICE-LSAHH subunit has 12 β -sheets and 20 α -helices, and consists of three domains: a substrate-binding domain, an NAD-binding domain, and a C-terminal domain. In conclusion, SAHH is a conserved protein that is found in the cytoplasm of the ice alga *Chlamydomonas* sp. ICE-L.

Key words: *Chlamydomonas* sp.; ICE-L; S-Adenosyl homocysteine hydrolase; cloning; 3D molecular modeling; bioinformatics

Corresponding author: DING Yu. E-mail: dingyu@gdou.edu.cn