DOI:10.16213/j.cnki.scjas.2011.10.011
河南农业科学,2011,40(10):111-114
Journal of Henan Agricultural Sciences

条斑紫菜半胱氨酸合成酶基因表达对重金属铅胁迫的响应

周向红[1,2],李信书[2],阎斌伦[1],易乐飞[1,2],王 萍[2*]
(1.淮海工学院 江苏省海洋生物技术重点实验室,江苏 连云港 222005;2.淮海工学院 海洋学院,江苏 连云港 222005)

摘要:为了研究条斑紫菜的重金属解毒机制,分别采用 Pb^{2+} 1、4、7、10mg/L 对条斑紫菜叶状体进行短期铅胁迫,同时,用 10mg/L 的 Pb^{2+} 对叶状体进行持续铅胁迫,胁迫处理后提取总 RNA 并采用实时荧光定量 PCR 技术检测条斑紫菜半胱氨酸合成酶基因(*PyCSaseB*)的表达变化。结果显示,铅胁迫能迅速且显著诱导 *PyCSaseB* 的表达。短期铅胁迫试验中,随着 Pb^{2+} 质量浓度的升高,*PyCSaseB* 的表达量呈先上升而后下降的趋势,在 7mg/L Pb^{2+} 胁迫下,*PyCSaseB* 的表达量最高,是未处理样品的 2.73 倍。持续铅胁迫试验中,在前 6h 内随着处理时间的增加,*PyCSaseB* 的表达逐步上升,在 6h 时 *PyCSaseB* 的表达量最高,是未处理样品的 3.71 倍;在 8~12h 内 *PyCSaseB* 的表达量一直在较高水平波动。铅胁迫诱导 *PyCSaseB* 表达,说明 *PyCSaseB* 参与了条斑紫菜叶状体的重金属解毒过程。

关键词:条斑紫菜;半胱氨酸合成酶;基因表达;铅胁迫
中图分类号:Q94 文献标识码:A 文章编号:1004-3268(2011)10-0111-04

Response of Cysteine Synthase Gene Expression to Lead Stress in *Porphyra yezoensis* Ueda

ZHOU Xiang-hong[1,2], LI Xin-shu[2], YAN Bin-lun[1], YI Le-fei[1,2], WANG Ping[2*]
(1. Jiangsu Key Laboratory of Marine Biotechnology, Huaihai Institute of Technology, Lianyungang 222005, China;
2. School of Marine Science & Technology, Huaihai Institute of Technology, Lianyungang 222005, China)

Abstract: To investigate the mechanism of heavy metal detoxification in intertidal red alga *Porphyra yezoensis* Udea, the expression of cysteine synthase gene (*PyCSaseB*) in *P. yezoensis* thalli responding to lead stress was examined. Thalli were subjected to seawater treatment with different concentration of lead(1, 4, 7, 10mg/L Pb^{2+}) for 2h, and then subjected to seawater treatment with 10mg/L Pb^{2+} for 12h. Then total RNA was extracted from thalli, and the relative mRNA levels of *PyCSaseB* were examined using real-time fluorescence quantitative PCR. The result showed lead stress could rapidly and significantly induce the expression of *PyCSaseB* in *P. yezoensis* thalli. In the treatment of short term lead stress, the expression of *PyCSaseB* was induced under 1mg/L Pb^{2+} stress, reached its peak under 7mg/L Pb^{2+} stress, and then fall. The relative mRNA level of *PyCSaseB* under 7mg/L Pb^{2+} stress was 2.73-fold higher than untreated sample. In the treatment of continuous lead stress, during the first 6h the expression of *PyCSaseB* increased gradually, and reached its peak at 6h. The relative mRNA level of *PyCSaseB* at 6h was 3.71-fold higher than untreated sample. From 8h to 12h, the expression of *PyCSaseB* fluctuated at a high level.

Key words: *Porphyra yezoensis* Ueda; Cysteine synthase; Gene expression; Lead stress

收稿日期:2011-05-20
基金项目:江苏省海洋生物技术重点实验室开放课题(2008HS004);淮海工学院自然科学研究项目(2010150023)
作者简介:周向红(1977),女,广西钦州人,实验师,硕士,主要从事生物化学与分子生物学教学与研究。
E-mail:zxh309309@yahoo.com.cn
*通讯作者:王 萍(1957),女,吉林长春人,教授,博士,主要从事植物基因工程与分子生物学研究。
E-mail:y-pwang@yahoo.com.cn

?1994-2015 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

条斑紫菜(*Porphyra yezoensis* Ueda)是红藻门的大型经济海藻,味道鲜美、营养丰富,由其加工成的海苔广受欢迎。条斑紫菜还是药用海藻,具有多种药用和保健功能[1]。中国、韩国和日本已经形成了相当规模的紫菜栽培与加工产业以及消费市场。但是,条斑紫菜的养殖环境不容乐观,2009 年度的渤海和东海区海洋环境公报显示,海洋环境污染形势严峻,部分近岸海域污染较重并且重金属铅超标。铅是有毒元素,目前尚未发现其有何生物学功能;铅容易被植物吸收和积累,过量的铅会导致植物的生理和生化过程以及超微结构受到损伤,并最终抑制植物生长,甚至导致死亡[2]。铅还会通过食物链在整个生态系统中传递,并最终危及人类健康。因此,研究条斑紫菜在铅污染下的解毒机制以及减少条斑紫菜的铅积累量具有重要的现实意义。

半胱氨酸合成酶(cysteine synthase, CSase)的主要生理功能是与丝氨酸乙酰转移酶(serine acetyltransferase)一起参与半胱氨酸的生物合成,首先丝氨酸乙酰转移酶催化丝氨酸与乙酰辅酶 A 生成 O-乙酰丝氨酸(O-acetylserine),然后 CSase 催化 O-乙酰丝氨酸和无机硫化物生成半胱氨酸[3]。已有研究表明,CSase 参与了重金属的解毒过程。拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)[4]、芦苇(*Phragmites australis*)[5]和香蒲(*Typha latifolia*)[5]的 CSase 受到镉胁迫的诱导表达,而且超表达 CSase 的转基因拟南芥[4]和烟草(*Nicotiana tabacum*)[6]能耐受更高浓度的重金属胁迫。

目前已报道了条斑紫菜叶绿体型半胱氨酸合成酶(PyCSase B)的基因与序列特征[3],但在条斑紫菜叶状体(thalli)中 PyCSase B 与重金属解毒之间的关系未见报道。因此,为了探索条斑紫菜叶状体的解毒机制及相关调控过程,采用实时荧光定量 PCR(real-time fluorescence quantitative PCR)技术分析了铅胁迫下 *PyCSase B* 的响应。

1 材料和方法

1.1 条斑紫菜叶状体采集与胁迫处理

条斑紫菜叶状体于 2010 年 2-3 月从连云港海区采集,并于实验室内模拟采集地海水环境充气培养 7d。盐度维持在 28‰左右,温度设定为 10 ℃,光照强度为 40 μmol/(m^2 · s),光周期为 12 D/12 L,每天更换海水和营养盐。将健康叶状体分别转移至含 Pb^{2+} 质量浓度为 0、1、4、7、10 mg/L 的海水中进行短期铅胁迫,处理 2 h 后取样。另将健康叶状体转移至含 Pb^{2+} 质量浓度为 10 mg/L 的海水中进行持续铅胁迫,处理 0、2、4、6、8、10、12 h 后取样。每个胁迫处理都设 3 个重复。

1.2 条斑紫菜总 RNA 的分离纯化

参照 TRIZOL 试剂(Invitrogen)操作说明,抽提叶状体总 RNA,接着使用 DNaseⅠ(Fermentas)对总 RNA 进行处理,以去除残留的基因组 DNA。通过非变性琼脂糖凝胶电泳和核酸蛋白定量仪(Bio Rad)检测 RNA 质量。

1.3 定量 PCR 引物设计

根据已克隆的 *PyCSase B* 基因序列[7]设计定量 PCR 引物,正向引物:5′-TCTCGTCGGCAGACAGCATTG-3′,反向引物:5′-AACAGGGCGGAGGTCAGGTAG-3′,预期扩增产物长 187bp。参照文献[7]的方法,选用 18S rRNA 作内参,正向引物:5′-TGCCAGCACTGCGTTCTTACC-3′,反向引物:5′-AGCCTTCCGACCCAGGACTATC-3′,预期扩增产物长 163bp。所有引物均由生工生物工程(上海)有限公司合成。

1.4 条斑紫菜 *PyCSase B* 的表达检测

反转录反应按 PrimeScript® RT Reagent Kit (TaKaRa)操作说明进行。10 μL 反转录反应体系中包含 2 μL 5× PrimeScript™ Buffer, 0.5 μL PrimeScript™ RT Enzyme Mix Ⅰ, 2.5 mmol/L Oligo dT Primer, 5 mmol/L Random 6 mers 以及 400 ng 总 RNA。反转录反应条件为 37 ℃下反应 15 min, 85 ℃保温 5 s 终止反应。

实时荧光定量 PCR 反应在 IQ5 PCR 仪(Bio-Rad)上进行。25 μL 的反应体系中包含 12.5 μL 2× SYBR® Premix Ex *Taq*™ Ⅱ(TaKaRa)、0.2 μmol/L 定量 PCR 引物和 2 μL 反转录产物。采用两步 PCR 法进行扩增,即首先 95 ℃预变性 1 min,然后进入 45 个循环,每个循环中 95 ℃变性 10 s, 62 ℃延伸 30 s,循环结束后,从 55 ℃缓慢升温到 95 ℃,制备熔解曲线。以 10 倍系列稀释的 cDNA 为模板进行定量 PCR,制作 *PyCSase B* 和内参的标准曲线。每次反应都设置阴性对照和无模板对照,每个反应设 3 个重复孔。

1.5 数据处理

应用 Pfaffl[8]建立的数学模型对定量 PCR 数据进行处理,结果采用均数±标准差表示。采用 SPSS 进行统计分析,组间差异采用单因素方差分析(one-way ANOVA),组间多重比较采用 SNK(Student-Newman-Keuls)检验,$P<0.05$ 表示差异显著。

?1994-2015 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

2　结果与分析

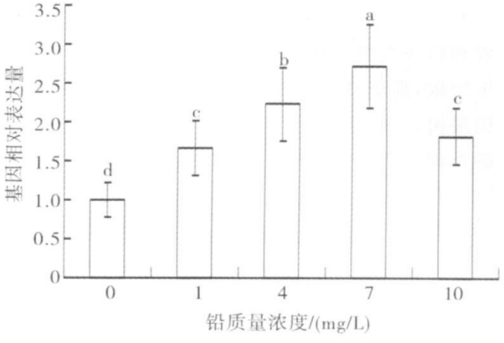
2.1　定量 PCR 体系的质量分析

总 RNA 的纯度和完整性对后续定量 PCR 反应具有较大影响,通常要求总 RNA 中没有明显的蛋白质、多糖、多酚、基因组 DNA 以及酶抑制剂等残留,不被 RNase 或者机械剪切等降解。在本试验中,总 RNA经检测后显示 $A_{260}/A_{280}=1.9\sim2.1$, $A_{260}/A_{230}=2.1\sim2.3$;总 RNA 经电泳后显示出明亮且清晰的 28S 和 18S rRNA 条带,无弥散,无残留。说明抽提的总 RNA 的质量能够满足后续试验要求。

PyCSase B 和内参扩增产物的熔解曲线均呈现单一的特异峰,阴性对照和无模板对照的扩增曲线均呈水平直线,说明设计的定量 PCR 引物特异性高,无引物二聚体及非特异性扩增。*PyCSase B* 和内参标准曲线的斜率分别是 3.54 和 3.31,扩增效率分别是 1.92 和 2.01,相关系数分别是 0.998 和 0.997,重复孔间扩增曲线基本重叠,这些都确保了定量的准确性。

2.2　条斑紫菜 *PyCSase B* 基因的表达分析

不同质量浓度的铅胁迫都能显著诱导条斑紫菜叶状体 *PyCSase B* 基因表达(图 1)。其中在 7 mg/L Pb^{2+} 胁迫下,*PyCSase B* 的表达量最高,是对照的 2.73 倍;在 4 mg/L Pb^{2+} 胁迫下,*PyCSase B* 的表达量其次,是对照的 2.23 倍;1、10 mg/L Pb^{2+} 胁迫下,*PyCSase B* 的表达量相对较低,分别是对照的 1.66 和 1.82 倍。



图中数据表示为平均值±标准差($n=3$),柱形图上的不同字母表示差异显著性($P<0.05$)。下同

图 1　条斑紫菜 ***PyCSase B*** 基因在不同质量浓度铅胁迫下的相对表达量

条斑紫菜叶状体 *PyCSase B* 基因在持续铅胁迫下也被显著诱导表达(图 2)。在胁迫的前 6 h 内 *PyCSase B* 的表达量逐步上升,与对照相比其表达量从 2 h 的 1.82 倍上升到 6 h 的 3.71 倍。在胁迫的 8 h 到 12 h 内 *PyCSase B* 的表达量一直维持在一个较高水平波动,其表达量是对照的 2.67~3.04 倍。

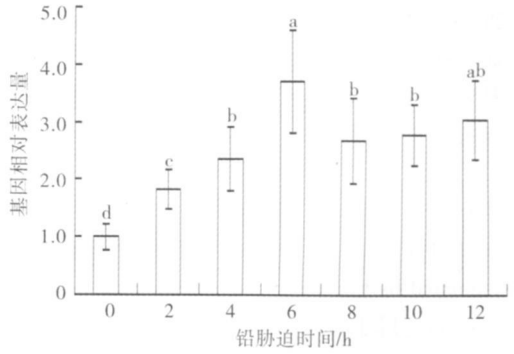


图 2　条斑紫菜 ***PyCSase B*** 基因在不同时间铅胁迫下的相对表达量

3　讨论

最早在高等植物中发现 CSase 被重金属诱导表达,参与重金属解毒[4],随后在莱茵衣藻(*Chlamydomonas reinhardtii*)[9]和栅藻(*Scenedesmus acutus*)[10 11]中也发现 CSase 响应重金属胁迫。本研究结果也显示,*PyCSase B* 能对重金属铅胁迫作出快速响应。虽然大量证据都表明 CSase 参与重金属解毒,但是 CSase 的主要生理功能是合成半胱氨酸,那么它是如何参与解毒的呢?植物在长期进化过程中已经建立起了一系列重金属解毒或适应机制,其中植物络合素(phytochelatin)和谷胱甘肽(glutathione)是最重要的解毒分子,它们能直接与重金属离子共价结合,从而降低重金属离子毒性并促进重金属向液泡或质外体转运[12]。植物络合素和谷胱甘肽都是富含半胱氨酸的小分子肽,它们的合成都需要半胱氨酸起始材料。半胱氨酸含量增加能增加谷胱甘肽的合成[13],而谷胱甘肽又是合成植物络合素起始分子[12]。因此,推测 CSase 的重金属诱导表达是为了给植物络合素和谷胱甘肽提供必要的半胱氨酸,从而间接地参与了重金属的解毒过程。

在不同质量浓度或不同时间铅胁迫下,*PyCSase B* 的表达量在一定范围内随胁迫强度的增加而增加;当胁迫强度继续增大时,*PyCSase B* 的表达量不再上升,而是在较高水平上下波动,这一现象暗示 *PyCSase B* 的转录受负反馈调节机制的控制。虽然 *PyCSase B* 的具体调控机制未知,但是推测 CSase 催化合成的半胱氨酸可能参与了 CSase 的负反馈调控。当然,*PyCSase B* 启动子结构以及具体转录调控机制尚有待于进一步研究。

参考文献:

[1]　顾佳雯,张陆曦,徐红丽,等. 条斑紫菜多糖的分离纯化与抗肿瘤活性[J]. 中国生物工程杂志,2007,184(7):50 54.

?1994-2015 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

[2] Sharma P, Dubey R S. Lead toxicity in plants[J]. Brazilian Journal of Plant Physiology, 2005, 17(1): 35-52.
[3] 易乐飞, 王萍, 周向红, 等. 条斑紫菜半胱氨酸合成酶基因的电子克隆与分析[J]. 中国水产科学, 2009, 16(4): 518-524.
[4] Domínguez-Solís J R, Gutiérrez-Alcalá G, Romero L C, *et al*. The cytosolic O-acetylserine(thiol)lyase gene is regulated by heavy metals and can function in cadmium tolerance[J]. Journal of Biological Chemistry, 2001, 276(12): 9297-9302.
[5] Fediuc E, Lips S H, Erdei L. O-acetylserine (thiol) lyase activity in *Phragmites* and *Typha* plants under cadmium and NaCl stress conditions and the involvement of ABA in the stress response[J]. Journal of Plant Physiology, 2005, 162(8): 865-872.
[6] Kawashima C G, Noji M, Nakamura M, *et al*. Heavy metal tolerance of transgenic tobacco plants over-expressing cysteine synthase[J]. Biotechnology Letters, 2004, 26(2): 153-157.
[7] 周向红, 李信书, 王萍, 等. 条斑紫菜 HSP90 基因的克隆与表达分析[J]. 水产学报, 2010, 34(12): 1844-1852.
[8] Pfaffl M W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR[J]. Nucleic Acids Research, 2001, 29(9): 45.
[9] Domínguez M J, Gutiérrez F, León R, *et al*. Cadmium increases the activity levels of glutamate dehydrogenase and cysteine synthase in *Chlamydomonas reinhardtii*[J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2003, 41(9): 828-832.
[10] Gorbi G, Zanni C, Corradi M G. Sulfur starvation and chromium tolerance in *Scenedesmus acutus*: A possible link between metal tolerance and the regulation of sulfur uptake/assimilation processes[J]. Aquatic Toxicology, 2007, 84(4): 457-464.
[11] Torricelli E, Gorbi G, Pawlik-Skowronska B, *et al*. Cadmium tolerance, cysteine and thiol peptide levels in wild type and chromium tolerant strains of *Scenedesmus acutus* (Chlorophyceae)[J]. Aquatic Toxicology, 2004, 68(4): 315-323.
[12] Yadav S K. Heavy metals toxicity in plants: An overview on the role of glutathione and phytochelatins in heavy metal stress tolerance of plants[J]. South African Journal of Botany, 2010, 76(2): 167-179.
[13] Noji M, Saito M, Nakamura M, *et al*. Cysteine synthase overexpression in tobacco confers tolerance to sulfur-containing environmental pollutants[J]. Plant Physiology, 2001, 126(3): 973-980.

(上接第 107 页)

[2] 符增坤, 成国良. 浙北地区翠冠梨大棚栽培技术[J]. 现代农业科技, 2011(8): 107, 111.
[3] 马根深, 严伟东, 刘建灵, 等. 套袋和农药剂型对翠冠梨果面发生锈果的影响[J]. 落叶果树, 2005(2): 11-12.
[4] 章恒毅. 优质梨套袋技术[J]. 现代农业科技, 2010(12): 134, 136.
[5] 李丽梅, 陈凤敏, 关军锋, 等. 预冷对黄冠梨贮藏品质和果皮褐变的影响[J]. 华北农学报, 2008, 23(6): 156-160.
[6] 邱志庚, 左俊峰. 翠冠梨不同套袋法实验初报[J]. 江西园艺, 2004(1): 4-5.
[7] 沈德绪. 果树育种学[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2000.
[8] 孙钧. 浙江省梨业发展现状与对策探讨[J]. 柑橘与亚热带果树信息, 2005, 21(2): 11-13.
[9] 曹玉芬, 刘凤之, 胡红菊, 等. 梨种质资源描述规范与数据标准[M]. 北京: 中国农业出版社, 2006: 31-34.
[10] 李先明, 伊华林, 秦仲麒, 等. 不同时期套袋对鄂梨 2 号果实品质的影响[J]. 果树学报, 2008, 25(6): 924-927.
[11] 张治安, 陈展宇. 植物生理学实验技术[M]. 长春: 吉林大学出版社, 2008: 212-214.
[12] 孙群, 胡景江. 植物生理学研究技术[M]. 杨凌: 西北农林科技大学出版社, 2006(8): 172-174.
[13] 王少敏, 高华君, 张骁兵. 梨果实套袋研究进展[J]. 中国果树, 2002(6): 47-50.
[14] 景卓琳. 不同纸质套袋对翠冠梨的外观质量的影响[J]. 内蒙古农业科技, 2005(7): 177-178.
[15] 许卫明, 翁克政, 徐富荣, 等. 翠冠梨果实套袋效应初探[J]. 浙江林业科技, 2002, 22(5): 67-68.
[16] 蔺经, 李晓刚, 杨青松, 等. 两种套袋方式对翠冠梨果实品质、农药残留及贮藏的影响[J]. 江苏农业学报, 2009, 25(1): 174-176.
[17] 徐凯, 丁保文. 套袋对翠冠梨果实品质的影响[J]. 中国林副特产, 2006(4): 14-15.
[18] 张振铭, 张绍铃, 乔勇进, 等. 不同果袋对砀山酥梨果实品质的影响[J]. 果树学报, 2006, 23(4): 510-514.
[19] 陈敬宜, 辛贺明, 王彦敏. 梨果实袋光温特性及鸭梨套袋研究[J]. 中国果树, 2000(3): 6-9.

?1994-2015 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net