

条斑紫菜光系统 反应中心蛋白编码 *psbA* 和 *psbD* 的表达分析

陈张帆^{1,2}, 王广策¹

(1. 中国科学院 海洋研究所, 山东 青岛 266071; 2. 中国科学院 研究生院, 北京 100049)

摘要: 从条斑紫菜 (*Porphyra yezoensis* Ueda) 的 3 个不同的生长阶段: 壳孢子、孢子体和配子体中提取总 RNA, 并用相应基因的引物扩增序列, 用荧光定量 PCR 技术检测条斑紫菜 3 个生长阶段中 *psbA* 和 *psbD* 的转录水平变化。结果表明, *psbA* 和 *psbD* 的变化趋势不一致, 并且, 在壳孢子内基因表达量相对较高。这说明在细胞内, D1 蛋白和 D2 蛋白并非同比例合成。壳孢子成熟发育成叶状体的过程要求光合作用提供更多的能量。

关键词: 条斑紫菜 (*Porphyra yezoensis* Ueda); 不同发育阶段; *psbA*; *psbD*; 基因表达

中图分类号: Q945.11

文献标识码: A

文章编号: 1000-3096(2008)07-0052-05

条斑紫菜 (*Porphyra yezoensis* Ueda) 是太平洋西部特有的物种, 也是国内人工栽培的重要种类之一。作为一种经济海藻, 人们对条斑紫菜的生活史研究得较为透彻。其生活史包括二倍丝状孢子体和单倍叶状配子体两个主要的多细胞阶段, 且具有果孢子、壳孢子和单孢子 3 个主要的单细胞阶段。成熟的配子体即叶状体, 雌雄分化并受精, 形成果孢子, 果孢子萌发产生孢子体即丝状体, 丝状体生长成熟后产生壳孢子, 壳孢子经过附着、萌发产生叶状体。在一定条件下, 叶状体能形成单孢子, 单孢子可直接发育成叶状体^[1]。基于条斑紫菜的异型世代交替的生活史, 有人提出将其作为海藻模式生物, 这对海藻的研究有着重要的意义和作用^[2]。

条斑紫菜虽然是真核生物, 但其捕光色素系统与原核生物蓝藻极其相似, 均含有藻胆体^[3]。在其细胞的类囊体膜上同时存在光系统 I (PS_I) 和光系统 II (PS_{II}) 膜蛋白复合体。外周捕光色素系统——藻胆体捕获光能后, 通过内周捕光色素系统——叶绿素 *a*-蛋白质复合物传递给 PS_{II} 反应中心^[4]。PS_{II} 的两个反应中心蛋白, D1 和 D2, 分别由 *psbA* 和 *psbD* 编码。反应中心蛋白结合 P680、去镁叶绿素和质醌等电子转移载体, 将电子由 PS_{II} 传递到 PS_I, 以此产生 ATP 和 NADPH 还原 CO₂ 生成碳水化合物^[5]。因此, 研究条斑紫菜的光系统作用对研究红藻的光系统进化有着重要的意义。

在藻类发育的基础上, 展开光合作用的研究是有意义的。条斑紫菜是很好的研究材料, 其生活史中包含单细胞和多细胞阶段, 并且各个发育阶段的形态特征明显。另外, 每个发育阶段都可在实验室条件下单独培养, 易于取材。虽然紫菜的孢子体和配子体在生长环境、藻体形态、细胞结构和生理特性等方面存在差异^[6], 但都进行光合作用。有关紫菜

光合作用的研究, 国内外已有报道^[7-9]。梁军等^[10]研究了在不同温度、光强和 pH 下, 条斑紫菜孢子体和配子体 PS_{II} 的活性变化。柳葵葵等^[11]对条斑紫菜的孢子体和配子体 PS_{II} 的稳定性进行了研究。然而, 对于其反应中心蛋白的研究较少, 对其基因的研究也未见报道。

本实验选取条斑紫菜的 3 个不同生长发育阶段的壳孢子、孢子体、配子体为材料, 对 *psbA* (编码 D1 蛋白) 和 *psbD* (编码 D2 蛋白) 的表达量进行检测, 研究生长条件不同及细胞形态不同的情况下, *psbA* 和 *psbD* mRNA 转录水平的变化, 以探讨 PS_{II} 的活性在条斑紫菜的不同生长阶段的变化。

1 材料和方法

1.1 细胞培养和材料采集

1.1.1 条斑紫菜壳孢子的采集

条斑紫菜壳孢子于 9 月中下旬采自江苏省海安县养殖场, 离心收集, 保存于 -80 °C 冰箱中。

1.1.2 条斑紫菜孢子体的培养

条斑紫菜孢子体培养于 PES 海水培养基中, 培养光照为 1 000 lx, 培养温度为 20 ± 2 °C, 通气培养。

1.1.3 条斑紫菜配子体的采集

条斑紫菜配子体由江苏省海洋水产研究所提供,

收稿日期: 2008-04-25; 修回日期: 2008-05-05

基金项目: 国家科技支撑计划项目 (2006BAD09A04); 国家 863 计划项目 (2006AA10A413)

作者简介: 陈张帆 (1985-), 女, 上海人, 硕士, 研究方向为藻类遗传与发育, 电话: 0532-82898575, E-mail: chenzhangfan@ms.qdio.ac.cn; 王广策, 通讯作者, 研究员, 博士, 电话: 0532-82898574, E-mail: gcwang@ms.qdio.ac.cn

使用前将阴干的紫菜静置于 PES 海水培养基中,复苏 24 h 后用于实验。

1.2 方法

1.2.1 RNA 提取

RNA 根据 Trizol Reagent (Invitrogen) 的说明书提取。称取 100 mg 材料,用液氮研磨,加入 1 mL Trizol 试剂,在室温下放置 10 min 后离心,12 000 g, 4 ℃,10 min,取上清液。在上清液中加入 200 μL 氯仿,振荡 15 s,在室温下静置 2~3 min,离心,12 000 g, 4 ℃,15 min,取上清液。在上清液中加入 500 μL 预冷的异丙醇,在室温下静置 10 min,离心,12 000 g, 4 ℃,10 min。在沉淀中加入 1 mL 预冷的 75%乙醇洗涤沉淀,离心,7 500 g,4 ℃,5 min。可以重复洗涤一遍。加入适量的 DEPC 水溶解 RNA,置于 -80 ℃ 保存。电泳检测。

表 1 荧光定量 PCR 引物

Tab. 1 Real-time quantitative PCR primers

基因名称	序列号	引物	引物序列(5' 3')	扩增序列长度(bp)
18S rRNA	A Y131005	正向引物	CGACCGTTTACTGTGAA G	160
		反向引物	GACAATGAAA TACGAATGCC	
<i>psbA</i>	A P006715	正向引物	GATTCGTTTTTCGCTTGTTCAC	272
		反向引物	TGGATTTCCGTTGCTTTTACTG	
<i>psbD</i>	A P006715	正向引物	ACCA GCGA GTAAAACCTCCTTGA	259
		反向引物	GACGATTGGCTAAATA GA GACCGA	

1.2.4 荧光定量 PCR

25 μL 反应体系中包含 SYBR-Green mix (TOYOBO) 12.5 μL,正向引物(5 μmol/L)0.5 μL,反向引物(5 μmol/L)0.5 μL,模板 2.5 μL,超纯水补足 25 μL。每个样品均重复 3 管,每次设空白对照,在 Bio-Rad IQ5 荧光 PCR 仪上进行扩增和实时检测。反应条件:94 预变性 3 min;94 变性 15 s,58 退火 40 s,72 延伸 30 s,35 个循环;72 延伸 5 min。反应结束后,进行 PCR 产物的熔解曲线分析:从 58 到 95,每循环上升 0.5,持续信号采集 30 s,共 75 个循环。

1.2.5 数据分析

根据 CT 法^[13],将每份样品进行归一化处理,即每份 cDNA 中的目的基因除以看家基因的量。归一化后选取 $T=0$ 时刻的目的基因量作为基准,其他时刻目的基因的量与选取的基准量值进行倍比分析。计算 *psbA* 和 *psbD* 的相对表达差异,两两比较用 *t* 检验。

2 结果

2.1 RNA 的提取

图 1 中可以看出, RNA 中均有 18S 与 28S rRNA

1.2.2 cDNA 的合成

根据 RNA 的浓度,加入适量的 RQ1 RNase-Free DNase (Promega) 消化总 RNA 中的基因组 DNA,37 反应 30 min,加入 1 μL Stop Solution,65 反应 10 min,终止消化反应。根据 MMLV 逆转录酶(Promega)的说明书,用随机引物将 RNA 反转录合成 cDNA,cDNA 稀释 1 000 倍作为 PCR 的模版。

1.2.3 引物设计

根据荧光定量 PCR 的引物设计原则^[12],利用 primer premier 5.0 引物设计软件设计 18S rRNA、*psbA*、*psbD* 基因的特异性引物(表 1)。基因序列来自 GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov)。为了确保引物的特异性,在每一个 PCR 反应之后进行熔解曲线分析,曲线若为单一峰表明此 PCR 反应具有特异性。

的条带,略有拖尾的现象。孢子体的总 RNA 提取量较配子体多。RNA 和标准分子质量的上样量均为 2 μL。

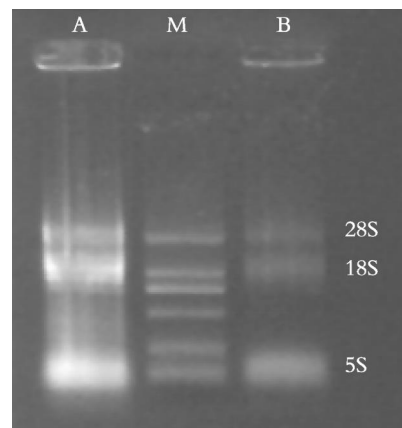


图 1 条斑紫菜总 RNA 琼脂糖凝胶电泳图谱

Fig. 1 The agarose gel electrophoresis of RNA extracted from *P. yezoensis*

M. DL2000; A. 孢子体 RNA; B. 配子体 RNA

M. DL2000; A. RNA from sporophytes of *P. yezoensis*; B. RNA from gametophytes of *P. yezoensis*

2.2 引物的特异性检验

三对引物的特异性由熔解曲线检验。在图 2 中,纵坐标为荧光信号对熔解温度取微分,横坐标为熔解温度。18SrRNA, *psbA*, *psbD* 基因的产物均只有单峰,且单一峰值出现在 83~87 范围内,这表明没有引物二聚体或其他非特异性扩增,三对引物均可用于基因表达量检测。

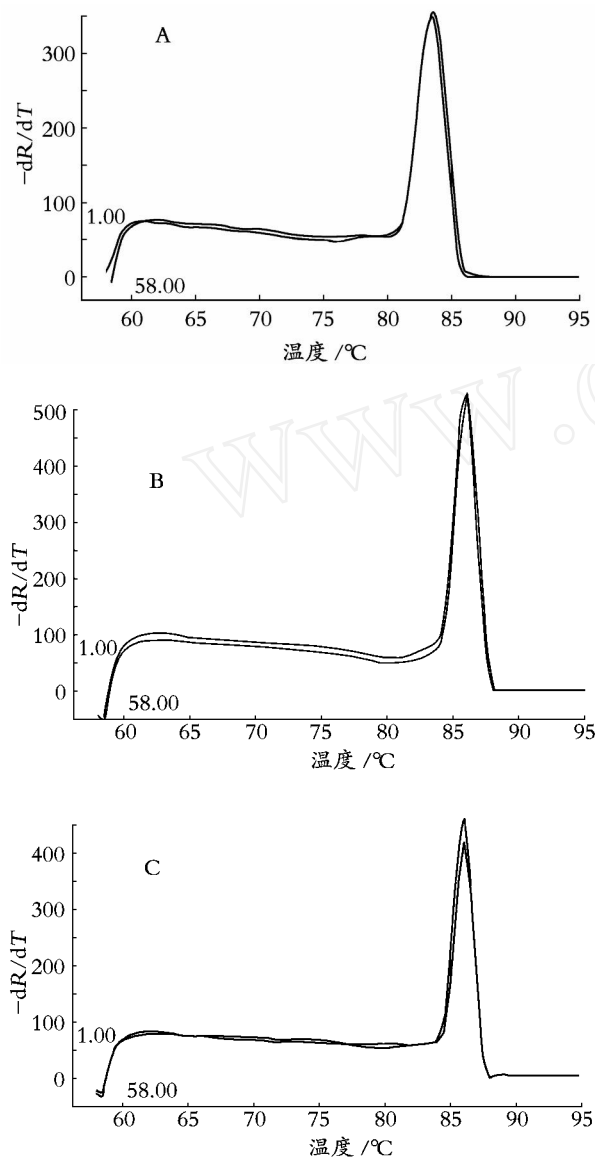


图 2 PCR 产物熔解曲线

Fig. 2 The melt curve of PCR product
A. 18S rRNA 产物; B. *psbA* 产物; C. *psbD* 产物
A. 18S rRNA; B. *psbA*; C. *psbD*

2.3 *psbA* 和 *psbD* 的表达变化

如图 3 所示, *psbA* 基因在配子体中表达量最低,在孢子体中的表达量为配子体中的 1.45 倍 ($P < 0.05$)。在壳孢子中, *psbA* 基因的表达量明显升高,为孢子体中的 3.97 倍 ($P < 0.01$),为配子体中的

5.75 倍 ($P < 0.01$),差异极显著。

psbD 基因在孢子体中的表达量最低,在壳孢子中的表达量略有升高,为孢子体中的表达量的 1.77 倍 ($P < 0.05$),差异显著。在配子体中, *psbD* 的表达量最高,为壳孢子中表达量的 1.46 倍 ($P < 0.05$),为孢子体中的表达量的 2.59 倍 ($P < 0.01$),差异极其显著。

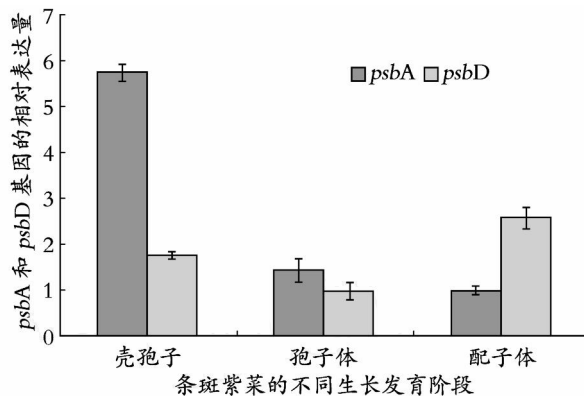


图 3 Real-time PCR 检测条斑紫菜的不同生长发育阶段细胞中 *psbA* 和 *psbD* 基因的表达

Fig. 3 The relative amount of the transcripts of *psbA* and *psbD* in *Porphyra yezoensis* cells collected in different growth phases

3 讨论

紫菜中的多糖、蛋白、多酚等物质的含量较高,易造成核酸降解或是与核酸形成难溶于水的复合物,并且在提取 RNA 的过程中,基因组 DNA 的干扰也较为严重。因此,紫菜的 RNA 提取难度较大^[14]。本实验中,通过 Trizol 法可以得到条斑紫菜的总 RNA。虽然点样孔有少许亮点,说明 RNA 样品中仍混有多糖或蛋白质未去除,但 18S 和 28S rRNA 的条带都较为清楚。不过在孢子体 RNA 样品中,存在少许拖尾降解现象。另外,由于配子体的多糖及蛋白含量较孢子体丰富,因此配子体的 RNA 得率明显较孢子体低。

作为一种可以检测低丰度基因表达的技术,荧光定量 PCR 的方法用于检测条斑紫菜 *psbA* 和 *psbD* 基因在不同生长发育阶段的表达是可行的。SYBR Green 染料法中,染料特异性地渗入 DNA 双链中发生荧光信号^[15],这个信号随着 PCR 产物的增加而增大。因着 SYBR Green 染料非特异结合所有 DNA 双链,在实验中要避免产生非特异性扩增与引物二聚体,以免产生的 C 值,即每个反应管内的荧光信号达到设定的域值时所经历的循环数,较实际的低。在本实验中,每个循环中的 72 延伸 30 s,在这个过程中,荧光信号被采集,实时反映了 PCR 产物

量的增加;熔解曲线对 PCR 产物的特异性进行了分析。相对定量法使用内标基因,对加入的目的基因的模板进行均一化处理,有效消除了各种误差,如细胞数量或材料干重的误差, RNA 提取效率的差异及反转录效率的偏差。为了避免总 RNA 中少量基因组 DNA 对检测带来的影响,本实验中用 Rnase-Free DNase 对提取的总 RNA 进行消化。

在本实验中,用荧光定量 PCR 的技术检测了条斑紫菜 3 个不同的生长阶段中, *psbA* 和 *psbD* 基因的表达量。同为编码 PS 反应中心蛋白的基因, *psbA* 和 *psbD* 基因分别表现出不同的变化趋势,其中, *psbA* 在壳孢子中的表达最丰富,其次是孢子体,配子体中表达最弱; *psbD* 却在配子体中的表达最丰富,其次是壳孢子,以孢子体中的表达为最弱。虽然 D1 蛋白和 D2 蛋白在 PS 反应中心复合物中以同比例装配,但是 *psbA* 和 *psbD* 基因的表达量变化趋势并不同步。Kapoor 等^[16]在水稻的生长发育过程中发现,虽然 *psbA* 和 *psbD* 基因的表达均增大,但是它们的增大倍数不同;在光照条件下生长的水稻,其 *psbA* 和 *psbD* 基因表达量较在黑暗条件下生长的水稻增大不少,但是它们的增大倍数仍存在差异。这说明在细胞内, D1 和 D2 蛋白的合成并非是同比例,这或许与蛋白的功能有关。例如,强光照射下, PS 复合体的损伤主要在于 PS 反应中心 D1 蛋白的降解,而损伤的速率直接与光强有关,因此, D1 蛋白翻译的调控受光强影响^[17]。 PS 复合体的修复包括受损的 D1 蛋白的降解以及新合成的 D1 蛋白的插入^[18,19],而 *psbA* 基因的 mRNA 翻译是 D1 蛋白合成的关键调控步骤^[20~22],所以 *psbA* 基因与 D1 蛋白的降解和合成有关。目前,有关蛋白功能和基因功能的研究都比较少,因此,引起 *psbA* 和 *psbD* 基因的表达量变化趋势不一致的原因还有待进一步研究。

在条斑紫菜的 3 个生长阶段中,壳孢子的 *psbA* 和 *psbD* 基因表达量相对较高。在壳孢子的放散过程中,其 PS 的活性会随时间而增加(实验室未发表数据)。刚放散的壳孢子几乎没有 PS 活性,而在细胞内,色素体模糊,蛋白核分裂^[23],这些形态的变化均表明了壳孢子的光合作用并不完整,而细胞内的储存物质为壳孢子的细胞壁形成和萌发供给能量。在放散了一段时间的壳孢子中,色素体逐渐清晰, PS 活性也逐渐增加,光合作用增强为壳孢子的成熟并发育成叶状体提供能量。因此,有关光合作用的基因集中表达,壳孢子内的 *psbA* 和 *psbD* 基因表达量也就相对较高。

由于条斑紫菜各个发育阶段的生长环境都不相同,对于光合作用基因 *psbA* 和 *psbD* 来说,发育过程

及环境因素,如温度、光照,均可能对它们的表达量变化产生一定的影响。因此,在后期工作中,可以分别着手发育过程及环境因素研究 *psbA* 和 *psbD* 基因的调控。例如,通过测定配子体干出和复水过程中基因的表达,研究干出对光合作用的影响;通过在极大光强或黑暗条件下测定基因的表达,研究光强对某一生长状态下光合作用的影响。另外,也可以通过取在实验室最佳培养条件下培养的孢子体及配子体,研究发育过程对基因的调控。

参考文献:

- [1] 曾呈奎. 经济海藻种质种苗生物学[M]. 济南:山东科学技术出版社,1999. 53.
- [2] Waaland J R, Stiller J W, Cheney D P. Macroalgal candidates for genomics [J]. **Journal of Phycology**, 2004, 40: 26-33.
- [3] Grossman A R, Bhaya D, Apt K E, et al. Light-harvesting complexes in oxygenic photosynthesis: diversity, control and evolution[J]. **Annu Rev Genetics**, 1995, 29:231-238.
- [4] Glazer A N. Light harvesting by phycobilisomes[J]. **Annu Rev Biophys Biophys Chem**, 1985, 14: 47-77.
- [5] Buchanan B B. Biochemistry & Molecular Biology of Plants[M]. Beijing: Science Press, 2000. 586-601.
- [6] Cole K M, Conway E. Phenetic implications of structural feature of the perennating phase in the life history of *Porphyra* and *Bangia* (Bangiophyceae, Rhodophyta) [J]. **Phycologia**, 1975, 14: 239-245.
- [7] Sibbald P R, Vidaver W. Photosystem F mediated regulation of water splitting in the red alga, *Porphyra sanjuanensis* [J]. **Plant Physiol**, 1987, 84(4): 1373-1377.
- [8] 刘力,高尚德. 失水干燥对紫菜光合作用、呼吸作用及生长的影响[J]. 水产学报, 1987, 9(3): 233-239.
- [9] Gao Z Q, Wang G C, Tseng C K. Isolation and characterization of photosystem of *Porphyra yezoensis* Ueda [J]. **Acta Biochim Biophys Sin** (Shanghai), 2004, 36(11): 780-785.
- [10] 梁军,张海霞, Fritsch G, et al. 温度、光强和 pH 对条斑紫菜孢子体和配子体类囊体膜上光系统活性的影响[J]. 海洋科学, 2005, 29(9): 14-18.
- [11] 柳葵葵,张海霞, Linhard V, et al. 条斑紫菜孢子体与配子体光合系统 (PS) 稳定性研究[J]. 海洋科学, 2007, 31(10): 25-28.
- [12] Ferreira I D, Rosário V E, Cravo P V L. Real-time quantitative PCR with SYBR Green I detection for estimating copy numbers of nine drug resistance candidate genes in *Plasmodium falciparum* [J]. **Malaria Journal**, 2006, 5: 1.

- [13] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using Real-time quantitative PCR and the 2^{-CT} method[J]. **Methods**, 2001, 25: 402-408.
- [14] Armbrust E V, Galindo H M. Rapid evolution of a sexual reproduction gene in centric diatoms of the genus *Thalassiosira*[J]. **Appl Environ Microbiol**, 2001, 67(8): 3 501-3 513.
- [15] Higuchi R, Dollinger G, Walsh P S, *et al.* Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences[J]. **Bio Technology**, 1992, 10: 413-417.
- [16] Kapoor S, Maheshwari S C, Tyagi A K. Developmental and light-dependent cues interact to establish steady-state levels of transcripts for photosynthesis-related genes (*psbA*, *psbD*, *psaA* and *rbdL*) in rice (*Oryza sativa* L.) [J]. **Curr Genet**, 1994, 25(4): 362-366.
- [17] Mullet J E. Molecular Biology of Photosynthesis in Higher Plants. In Plant Metabolism[M]. Second Edition. England: Addison Wesley Longman Limited, 1997. 271.
- [18] Aro E M, Virgin I, Andersson B. Photoinhibition of photosystem II: inactive, protein damage and turnover[J]. **Biochim Biophys Acta**, 1993, 1143(1): 113-134.
- [19] Zhang L, Aro E M. Synthesis, membrane insertion and assembly of the chloroplast-encoded D1 protein into photosystem II[J]. **FEBS Letters**, 2002, 512: 13-18.
- [20] Danon A, Mayfield S P. Light regulated translational activators: identification of chloroplast gene specific mRNA binding proteins[J]. **EMBO J**, 1991, 10(13): 3 993-4 001.
- [21] Staub J M, Maliga P. Translation of *psbA* mRNA is regulated by light via the 5'-untranslated region in tobacco plastids[J]. **Plant J**, 1994, 6(4): 547-553.
- [22] Hirose T, Sugiura M. Cis-acting elements and trans-acting factors for accurate translation of chloroplast *psbA* mRNAs: development of an in vitro translation system from tobacco chloroplasts[J]. **EMBO J**, 1996, 15(7): 1 687-1 695.
- [23] 周文君, 李赞, 戴继勋. 条斑紫菜壳孢子超微结构研究[J]. **海洋科学**, 2007, 31(2): 1-4.

Expression analysis of *psbA* and *psbD* genes of *Porphyra yezoensis* in different developmental stages

CHEN Zhang-fan^{1,2}, WANG Guang-ce²

(1. Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China; 2. Graduate University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Received: Apr. , 25, 2008

Key words: *Porphyra yezoensis*; different developmental stages; *psbA*; *psbD*; gene analysis

Abstract: Proteins D1 and D2, respectively encoded by *psbA* and *psbD* genes, comprise the PS II reaction center. They are correlative with PS II activity, which is affected by light intensity and temperature. In this study, transcription changes of *psbA* and *psbD* genes in three different growth phases of *Porphyra yezoensis*-conchospores, sporophytes and gametophytes were determined with real-time PCR. The results showed that *psbA* expression changes were different from *psbD* expression changes, indicating the variation of D1 protein and D2 protein synthesis. Both of the gene expressions were relatively high in conchospores, which may be due to the higher requirement of energy provided by photosynthesis in conchospores than in gametophytes.

(本文编辑:张培新)