

坛紫菜紫外吸收物质类菌孢素氨基酸的世代差异特征

陈虹兆, 张晗晗, 许 凯, 徐 燕, 纪德华, 王文磊, 陈昌生, 谢潮添

(集美大学水产学院, 福建 厦门 361021)

[摘要] 经济海藻坛紫菜 (*Pyropia haitanensis*) 的生活史是异型世代交替的。坛紫菜不同世代所处的紫外辐射 (UVR) 环境差异很大, 有必要研究不同世代在紫外辐射耐受机制方面的差异。以坛紫菜高产品系 Z-61 为材料, 测定并分析了坛紫菜紫外吸收物质的世代差异, 发现紫外吸收物质类菌孢素氨基酸 (MAAs) 在叶状体中的含量是丝状体的 6 倍。还克隆获得了两条 MAAs 合成关键基因的全长序列, 分别命名为 *PharoB-1* 和 *PharoB-2*。通过系统进化树分析显示, *PharoB-1* 和 *PharoB-2* 的编码蛋白分别与微藻和高等植物亲缘关系较近。两条基因在叶状体世代的表达水平均要显著高于丝状体世代, 与坛紫菜 MAAs 含量的世代差异一致, 这种差异可能与坛紫菜不同世代的紫外辐射环境直接相关。

[关键词] 坛紫菜; 紫外吸收物质; 基因克隆; 表达水平定量分析; 世代差异

[中图分类号] S 968.43⁺¹

The Generation Difference of UVR Absorbing Compounds Mycosporine-like Amino Acids (MAAs) of *Pyropia haitanensis*

CHEN Hongzhao, ZHANG Hanhan, XU Kai, XU Yan, JI Dehua, WANG Wenlei,

CHEN Changsheng, XIE Chaotian

(Fisheries College, Jimei University, Xiamen 361021, China)

Abstract: The heteromorphic life history of economic seaweed *Pyropia haitanensis* includes a gametophytic thallus stage and a shell-living conchocelis stage. The ultraviolet radiation (UVR) dosage in the growth environment of thallus is significantly higher than that of conchocelis. This study found that the MAAs content of *P. haitanensis* thalli was higher than that of conchoceli. Two key enzyme genes involved in synthesizing MAAs were cloned and named as *PharoB-1* and *PharoB-2*. The results of this study revealed that the amino acid sequences of *PharoB-1* and *PharoB-2* classified in the same cluster with microalgae and higher plants, respectively. Both *PharoB-1* and *PharoB-2* in thallus stage showed significantly higher expression levels than in that of conchocelis stage. The results of gene expressions are consistent with the physiological performance and could be attributed to that the UVR dosage in the growth environment of thallus is higher than that of conchocelis.

Keywords: *Pyropia haitanensis*; UV-B absorbing compounds; gene cloning; qRT-PCR; generation difference

[收稿日期] 2017-09-15

[修回日期] 2017-11-17

[基金项目] 现代农业产业技术体系建设专项; 福建省科技计划项目 (2017N3016); 福建省自然科学基金项目 (2016J01165); 福建省中青年教育科研项目 (JAT160263); 集美大学李尚大学学科建设基金项目

[作者简介] 陈虹兆 (1993—), 男, 硕士生, 主要从事坛紫菜遗传育种研究。通信作者: 谢潮添 (1977—), 男, 教授, 从事海藻生物技术研究, E-mail: ctxie@jmu.edu.cn。

0 引言

坛紫菜 (*Pyropia haitanensis*) 是一种大型经济海藻, 主产于我国福建省、浙江省和广东省。坛紫菜的生活史是异型世代交替的, 两个世代都具有独立生活能力, 其叶状体世代是单倍体, 附生在中高潮区的岩石; 其丝状体世代是二倍体, 生活在贝壳内部^[1-3]。很多水生生物都受到紫外辐射 (ultraviolet radiation, UVR) 的影响, 海洋中的浮游动物和一些微藻可以调节所处的水深来躲避 UVR, 但坛紫菜等大型海藻不能迁移以避免 UVR 的伤害。因此, 坛紫菜的叶状体天然暴露在紫外辐射之中, 并且随着退潮, 藻体直接暴露在高剂量的 UVR 之下。UVR 可以破坏生物的 DNA, 具有诱导产生活性氧和损伤细胞膜等多种负面影响^[4-5]。紫菜可以通过合成紫外吸收物质来抵御紫外辐射的伤害^[6-9], 但这些研究只关注对叶状体世代的影响。坛紫菜不同世代所处的紫外辐射环境差异巨大, 有必要研究其紫外辐射耐受和调控机制方面的世代差异。

在很多海洋和淡水生物中, 类菌孢素氨基酸 (mycosporine-like amino acids, MAAs) 是最常见的紫外吸收物质 (UV absorbing compounds)^[4]。MAAs 是一类水溶性的含氮色素复合物, 分子量较低, 基本结构是环己烯酮。MAAs 能够与多种氨基酸发生缩合反应, 种类与结合的氨基酸有直接的关系。20 世纪 70 年代, MAAs 首次在真菌中发现, 许多种微藻和大型海藻均含有种类丰富的 MAAs^[7]。MAAs 能吸收紫外波段的范围是 309 ~ 362 nm (主要处于紫外 A (UVA, 315 ~ 400 nm) 波段), 也吸收少量紫外 B (UVB, 280 ~ 315 nm) 波段^[4,7]。文献 [6-8] 报道紫菜等大型海洋红藻含有较高含量的 MAAs, 用于抵御紫外线的伤害作用。

紫外辐射增强可导致活性氧含量增加, 而 MAAs 还具有清除活性氧的功能。Matsui 等^[10]在念珠藻的研究中发现 MAAs 能清除活性氧自由基。高温胁迫诱使柱状珊瑚 (*Stylophora pistillata*) 活性氧自由基含量增加, 但过氧化物酶系统的水平没有发生显著变化, 而一种具有抗氧化功能的 MAAs 的含量却增加了近 20 倍^[11]。生物通过莽草酸途径合成 MAAs, 其关键步骤是 7-磷酸景天庚酮糖在 3-脱氢奎宁酸合酶 (DHQS) 的催化下生成 MAAs 的前体 3-脱氢奎宁酸^[7,12]。因此 DHQS 被认为是 MAAs 合成过程中的关键酶, 而其编码基因 *aroB* 基因是合成 MAAs 的关键基因。DHQS 的编码基因 *aroB* 在多种微藻中已被成功克隆, 如鱼腥藻、蓝藻等^[13-14]。但坛紫菜相关基因的克隆还未见报道。本研究的目的是要在坛紫菜转录组学的基础上, 对坛紫菜的 *aroB* 基因进行全长克隆, 并通过实时荧光定量 PCR 技术 (qPCR) 测定该基因在不同世代的表达特征, 为进一步解析坛紫菜的紫外辐射耐受和调控机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 藻株来源和培养

实验选用的坛紫菜品系为 Z-61, 由集美大学选育。丝状体来源于坛紫菜种质资源库。取少量丝状体经 29 °C 促熟后, 在 21 °C 下充气促放壳孢子, 然后萌发成叶状体。叶状体和丝状体均为充气培养, 培养温度 21 °C, 光照强度 50 ~ 60 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$, 光照周期 12 L: 12 D, 每 3 天更换 1 次培养基。培养基为营养盐加富的天然海水, 营养盐浓度参考 Provasoli's enrichment solution (PES)。均设置 3 个生物学重复。

1.2 MAAs 相对含量测定

MAAs 的提取方法参考文献 [15-16], 本研究稍有优化。先将藻体经液氮速冻后, 转移至 -80 °C 冰箱中低温冻干 36 h, 粉碎至 40 目。然后, 加入 25% (体积分数) 甲醇, 在 60 °C 水浴锅中温育 15 min。冷却至室温后, 以 8000 r/min 冷冻离心 15 min。恢复至室温后, 在紫外分光光度计上测定 250 ~ 800 nm 之间的吸收, 其吸收峰位于 333 nm 处。样品的总蛋白含量用试剂盒测定。每个梯度处理样品均设置 3 个生物学重复, 2 个技术重复。

MAAs 浓度的计算公式: $C_{\text{MAAs}} = A/(\varepsilon \cdot C_{\text{pr}})$, 其中 A 为 333 nm 下的吸光度值, ε 为消光系数

4 mL/ (km · mg), C_{pr} 为样品的总蛋白含量。

1.3 引物及其序列

本研究中基因的全长克隆、验证、阳性克隆筛选及基因表达水平定量分析所采用的引物序列设计如表 1 所示, 引物由大连宝生物工程有限公司合成。

表 1 实验中所用引物的名称和序列
Tab.1 Name and sequence of primers used in the present study

用途 Purpose	基因 Gene	引物序列 Sequence(5′ - 3′)
荧光定量 PCR qPCR	<i>PharoB</i> -1	qF:CAAGCGTTGCGTGGCGGTTGTGGAT qR:ACTCGGCAACCCCTTCAGGTCCACTA
	<i>PharoB</i> -2	qF:GTGGCCGACTATGGTACAGG qR:ACGCTTCCATGATCGTCTCC
内参基因 Internal control	UBC	UBCF:TCACAACGAGGATTTACCACC UBCR:GAGGAGCACCTTGGAAACG
全长验证 Head to toe	<i>PharoB</i> -1	HT-F:CTGAGCAATACTGTAGTACTTGGTG HT-R:TACGCGAGCAATCTAAACAGA
	<i>PharoB</i> -2	HT-F:GATGGCGGCGTTTGCATC HT-R:TAGAGGGCGAAGGGTATGGC
PCR	<i>PharoB</i> -1	PF:GAGTGGCTGCTACACAATGACCCT PR:CATAGTAATGTGCGTAGTTGACCT
	<i>PharoB</i> -2	PF:CGCCGTTGCGTTGTCTC PR:TCAGTCTTCACCCGTCCAC
RACE	<i>PharoB</i> -1	RUPM-5′:CCTCCAGTGCCTCAAACAGGGTATG RNUP-5′:GAGGGTCATTGTGTAGCAGCCACTC RUPM-3′:CATAGTAATGTGCGTAGTTGACC RNUP-3′:CCGACAAGGTCAACTACGCACATTA
	<i>PharoB</i> -2	RUPM-5′:CGTACGCAGCAAGGATGTTTTCGGC RNUP-5′:ACTTCGTTTGATAAGGGTTGAATCCAG RUPM-3′:GGATTCAACCCCTTATCAAACGAAGTGG RNUP-3′:CCGCCGAAAACATCCTTGCTGCGTA
阳性克隆筛选 Validate of positive clone	M13-47	M13F:CGCCAGGGTTTTCCAGTCACGAC RV-M:GAGCGGATAACAATTCACACAGG

1.4 总 RNA 的提取及质量检测

收集坛紫菜藻体 0.1 g, 吸干表面水分, 在液氮中研磨后, 用 E. Z. N. A 植物 RNA 提取试剂盒 (OMEGA, 德国) 提取总 RNA。经凝胶电泳检查提取的总 RNA 的完整性, 并在紫外分光光度计上分别测定 260 nm 和 280 nm 处的吸光值, 根据测定结果计算 RNA 的浓度, 判断核酸和蛋白质的污染情况。

1.5 基因的全长克隆及验证

根据坛紫菜转录组数据库 Unigene 的注释结果, 选取注释结果为 3 - 脱氢奎宁酸羧化酶/O - 甲基转移酶基因的 Unigene0013975 作为 *PharoB* - 1 基因全长克隆的核心序列, 选取注释结果为 3 - 脱氢奎宁酸羧化酶基因的 Unigene0010955 作为 *PharoB* - 2 基因全长克隆的核心序列。测序后, 根据获得的 5′和 3′序列与核心序列的重叠区, 用 DNAMAN 5.2.2 (Lynnon BioSoft) 拼接, 获得两条基因的全长序列。然后, 根据拼接的全长序列, 设计 head to toe 引物, 以 RACE 扩增时获得的 cDNA 为模板, 进行普通 PCR 扩增, 将扩增产物进行切胶回收、转化和测序, 并将测序结果与拼接结果进行比对, 以验证全长克隆的正确性。

1.6 基因的生物信息学分析

利用 NCBI 的 BlastN 程序对克隆得到的全长基因序列进行序列同源性检测。用 ORF Finder 软件分析基因的开放阅读框（ORF）和所编码的氨基酸序列。用 PROSITE、InterProScan 和 PrediSi 查找基因序列的保守位点和信号肽序列。用 Clustal X 进行氨基酸多重序列比对，并用 MEGA 6.0 软件构建系统进化树。

1.7 实时荧光定量 PCR

根据基因序列设计 qPCR 正反向引物，以 UBC 基因作为内参，分析两条基因在不同世代的表达差异。提取的总 RNA 按 PrimeScript RT reagent kit（TaKaRa，大连）的说明书进行操作。荧光定量 PCR 扩增在 ABI7300 型定量 PCR 仪上进行。以 10 × 梯度稀释的 cDNA 为模板进行定量 PCR 扩增，制作标准曲线。每次反应都设置阴性对照和无模板对照，每个反应设 3 个平行复孔。

1.8 数据分析

采用 *t*-test 分析数据的差异比较均值： $P>0.05$ 为差异不显著； $P<0.05$ 为差异显著。

2 结果

2.1 不同生活史世代间 MAAs 含量测定分析

坛紫菜叶状体世代的 MAAs 含量显著高于丝状体世代，约为丝状体世代的 6 倍（见图 1）。

2.2 坛紫菜紫外吸收物质相关基因的全长克隆

从坛紫菜转录组数据库中筛选出各相关基因的核心序列，采用普通 PCR 和 5'/3'RACE 相结合的方法，克隆基因的全长。序列经过测序和拼接后，最终获得 2 条基因的全长，一是坛紫菜 3-脱氢奎宁酸羧化酶/O-甲基转移酶基因（*PharoB-1*），另一是 3-脱氢奎宁酸羧化酶基因（*PharoB-2*），这些序列均已提交至 Genbank 数据库中，结果如表 2 所示。

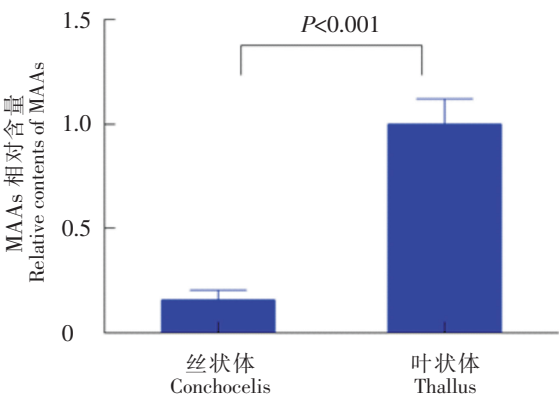


图 1 坛紫菜丝状体和叶状体中 MAAs 的含量
Fig. 1 The MAAs content in conchocelis and thallus of *P. haitanensis*

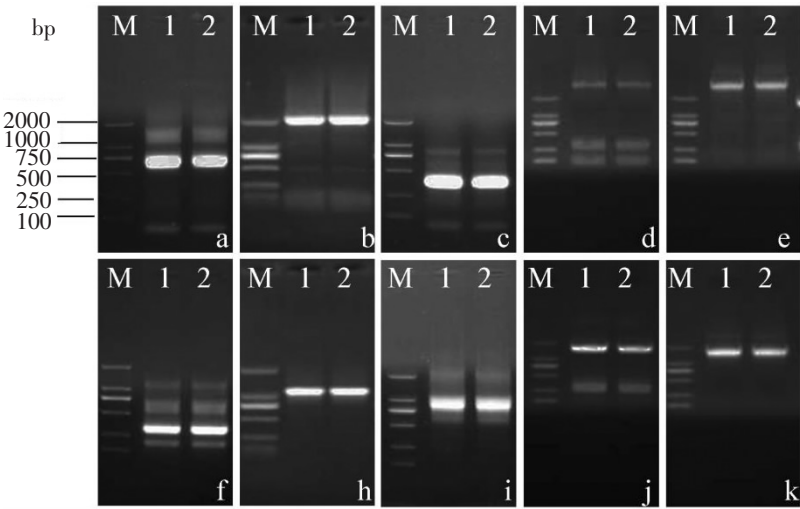
表 2 坛紫菜 MAAs 合成基因的克隆
Tab. 2 The genes related to MAAs synthesis of *P. haitanensis*

基因 Gene	Unigene ID	氨基酸个数 Number of amino acids	分子量/ku Molecular weight	等电点 pI	收录号 Genbank
<i>PharoB-1</i>	Unigene0013975	882	95.72	5.40	KT380133
<i>PharoB-2</i>	Unigene0010955	479	49.30	5.89	KT581951

2.3 MAAs 合成相关基因的生物信息学分析

基因 *PharoB-1* 的克隆以 Unigene0013975 为基础，经过普通 PCR 扩增获得了 1900 bp 的序列，然后以之为核心序列设计了 4 个特异引物来克隆 *PharoB-1* 的部分 cDNA。用 SMART RACE 技术获得了 5'端 780 bp 的 cDNA 片段（见图 2a）和 3'端 315 bp 的 cDNA 片段（见图 2c）。将以上 3 个片段拼接，获得了全长为 3003 bp 的 cDNA 片段。为了验证 *PharoB-1* 的全长，分别以 cDNA 和 gDNA 为模板，用一对 head to toe 引物来扩增 *PharoB-1*。扩增结果包括了 1 条 3003 bp 的片段（见图 2d，图 2e），其与克隆序列长度一致。全长序列已经提交给 GenBank，收录号为 KT380133。基因 *PharoB-2* 的克隆以坛紫菜 Unigene001095 序列作为核心序列，设计普通 PCR 引物扩增中间片段，得到 1 条长度为 1049 bp 的序列。根据所得序列，设计特异性引物进行 RACE 扩增和测序，获得 1 条长度为 303 bp 的 5'-末端序列（见图 2f）和 1 条长度为 838 bp 的 3'-末端序列（见图 2i）。对两条末端序列和中间片段进行拼接，获得了 1 条长度为 1496 bp 的全长序列，经过全长序列验证（见图 2j）和 Blast 比对，确认其为坛紫菜的 *aroB*

基因, 命名为 *PharoB-2*。将其与以 gDNA 为模板扩增出的全长序列 (图 2k) 比较, 显示长度均为 1496 bp, 碱基序列没有差异。



说明:M—DL2000 DNA Marker;1 和 2 是生物学重复;a 和 f 分别是 *PharoB-1* 和 *PharoB-2* 的 5'RACE 产物;b 和 h 分别是 *PharoB-1* 和 *PharoB-2* 的 PCR 扩增产物;c 和 i 分别是 *PharoB-1* 和 *PharoB-2* 的 3'RACE 产物;d 和 j 分别是以 gDNA 为模板的 *PharoB-1* 和 *PharoB-2* 的 head-to-toe PCR 产物;e 和 k 分别是以 cDNA 为模板的 *PharoB-1* 和 *PharoB-2* 的 head-to-toe PCR 产物

Notes:M—DL2000 DNA Marker; lanes 1 and 2 are the biological replicates; lanes a and f are the 5'RACE products of *PharoB-1* and *PharoB-2*, respectively; lanes b and h are the PCR products of *PharoB-1* and *PharoB-2*, respectively; lanes c and i are the 3'RACE products of *PharoB-1* and *PharoB-2*, respectively; lanes d and j shows the head-to-toe PCR products of *PharoB-1* and *PharoB-2* by using gDNA as template, respectively; lanes e and k shows the head-to-toe PCR products of *PharoB-1* and *PharoB-2* by using cDNA as template, respectively

图 2 坛紫菜 MAAs 合成基因的全长克隆电泳图

Fig.2 Agarose gel electrophoresis of PCR,RACE or head-to-toe PCR products of *PharoB* genes

利用在线软件 Swiss - Model 对 PhDHQS - 2 氨基酸序列的三级结构进行预测, 结果如图 3 所示。

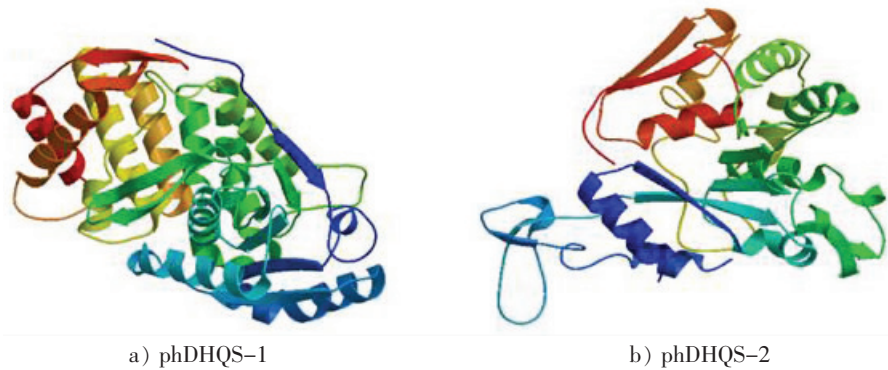
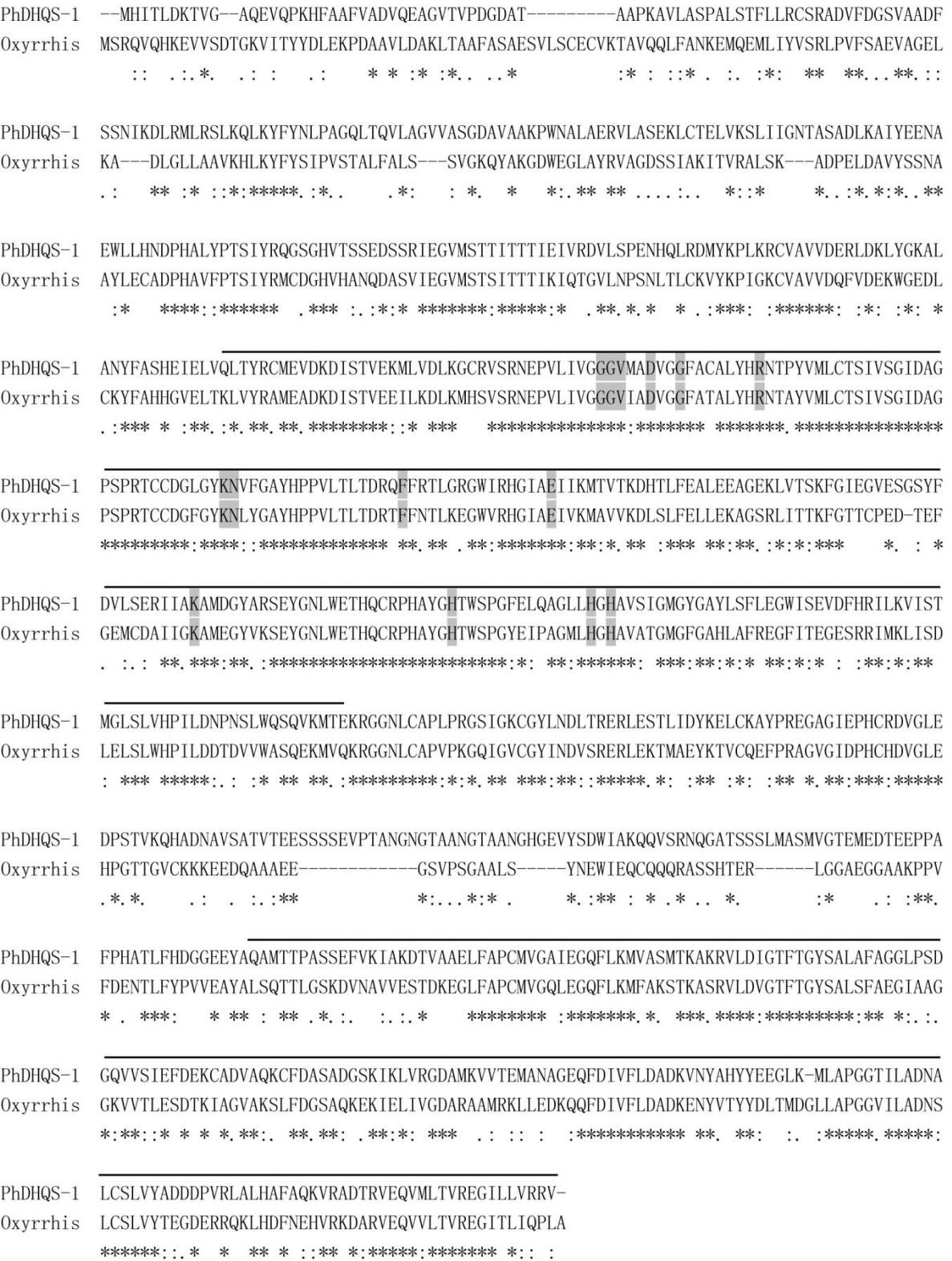


图 3 坛紫菜蛋白质 DHQS 的三级结构预测图

Fig.3 The three-dimensional structure of deduced DHQS protein of *P. haitanensis*

PharoB-1 所编码蛋白为 DHQS 和 O - 转甲基酶 (O - MT) 的聚合酶即 PhDHQS - OMT, 所以选择同样有该聚合蛋白的海洋尖尾藻进行多重比对分析 (结果见图 4)。

ORF finder 分析显示 *PharoB-1* cDNA 包括位于 5'端的 275 bp 的非翻译区和 3'端的 79 bp 的非翻译区, 以及 2649 bp 的开放阅读框 (ORF)。这个 ORF 编码 1 条 882 个氨基酸的蛋白多肽, 其分子量为 95.72 ku。基因编码的蛋白序列含有 47 个磷酸化位点, 其中丝氨酸 28 个, 苏氨酸 11 个, 酪氨酸 8 个。



说明:阴影为 DHQS 酶活性位点;上划线为保守功能域;* 和:分别表示一致性和相似性氨基酸残基

Notes:The amino acid sites which indicated with gray background are the active sites of DHQS,the conservative functional domins are indicated with uplines ; asterisks (*) and colons (:) indicate identical and similar amino acid residues, respectively

图 4 PhDHQS-1 蛋白氨基酸序列的多重序列比对

Fig. 4 Multi-alignment of amino acid sequence of PhDHQS-1

Predictprotein 程序预测 *PharoB* - 1 所编码蛋白的二级结构中构成螺旋、片层和环状的氨基酸残基分别占总氨基酸残基的比例为 39. 23%、16. 44% 和 44. 33% (见图 2a)。采用 ORF Finder 软件对 *PharoB* - 2 基因序列进行分析发现, 该基因序列 2 ~ 1441 个碱基为完整的 ORF, 可编码包含 479 个氨基酸, 分子量为 49. 30 ku。基因编码的蛋白包含 18 个磷酸化位点, 其中丝氨酸 8 个, 苏氨酸 10 个。Predictprotein 程序预测 *PharoB* - 2 所编码蛋白的二级结构中构成螺旋、片层和环状的氨基酸残基分别占总氨基酸残基的比例为 37. 37%、20. 25% 和 42. 38%。

如图 4 所示, 坛紫菜中 PhDHQS - 1 与海洋尖尾藻中的蛋白序列相似度较高。两序列中均含有两个不同的保守功能域(单/双上划线部分), DHQS 保守功能域在前, O - MT 在后, 且 DHQS 酶中均有若干个活性位点, 用阴影标出。DHQS 蛋白氨基酸序列的多重序列比对结果表明, 所克隆的 *PharoB* - 2 基因属于 DHQS 基因家族, 且与棉属植物中 DHQS 蛋白具有相同的保守结构域, 序列相似性较高(见图 5)。

PhDHQS-2	MAAFASPGWAAATISLRVVSPSRPWCNGERHLPAAALSRRRRRCVVSVATIGATSSHDADPAPTLPRTPALRTVATRAAK
Gossypium	MASLSS-----ASVSLVRTPTHLPCFRSNHGKQVSLN--RYSKTKTTHLSINSSLRMCISIAASDSPLSTSMYELSS---K
	::: *::*..:.*..*.:*:*.:.:*:::: :.*.*:..: ::: *
PhDHQS-2	TYWVQPLSNEVATAALEAGFSTLVFGSAEEAAP--YRRLARFDALLSPEGLGNGGVYRMTADDGTVTGAADGVSAAGDRL
Gossypium	KVWIWTENSQVMTAAVERGWDTIFSSQNQGLANEWSSKVKDLKIWFVSYYVTWTTDRNEIALIDPLFIKEGEIFDNAGERV
	.*:..:.*:***:*:*:*:*:*::.. :::.. :::* .. .::* ***:
PhDHQS-2	GAHFGRIDTPERQTEAMSLAGREPLVVMDDTHRGGVDDEAARSAAAAGVDAASDRPWWIIPAENILAAAYQSATALVAVAGC
Gossypium	ATIF-QVSTPSELKKLHPEAHNVENVIDLDD-----WQVIPAENIVAEEFQGSKTTVFVAVSKS
	::*:*::**.. .. .*:* ***:* *:
PhDHQS-2	PDDAATLLATLEVGVAGVILRTRSVGDVAALALRDR-AEGGAAEDLQPAIVTSVRTAGVDRVCVDTASPLRADEGLLVGS
Gossypium	PAEAQLFLEALEHGLGGVVLKVEVVKAVLDLKEYFNRRNEVHNRLSLTKATITQVHAVGMGRVCVDLCSLMRPGEGLLVGS
	: *: *:***:*:*:*:*:*.. * * * :* * * * *:*:*.***:*:*:*:*:*:*:*:
PhDHQS-2	ASQALFLVLSEAAACAYVPSRPFVRNAGVPVHSYVLTPGGRTRYLAELRAGDEVCVVDVLGHVRTATVGRVKITERRPLVLVAV
Gossypium	FARGFLFVHSECLESSYIASRPFVRNAGVPVHAYVATPGGKTSYLSSELKAGKEIVVDQTKIRTAIVGRVKIETRPLILVEA
	::.*** **.. :*.***:***:***:*** ** ***:* **:*:*:*:* ** ** *:*** *** * ***:*
PhDHQS-2	ELGG--VPSRVLQNAETVRLGALPAEEAARAGGVADYGTGVAVSALAVGDVVAVRSDTFARHVGMATIEETIMEA
Gossypium	KIDANDQTVYSILLQTAETVALVCPHEGNRMQK-----TVIPVTSLKAGDEVLLRLQGGAHTGIEIKEFIVEN
	::.. .. *:*:*:*:* * .. : * *:*:*.*** * *: ***:* *:*** *

说明:上划线为 DHQS 酶的保守功能域;* 和:分别表示一致性和相似性氨基酸残基
Notes:The amino acid sites which indicated with upline are the conservative functional domins of DHQS; asterisks (*) and colons (:) indicate identical and similar amino acid residues, respectively

图 5 PhDHQS-2 蛋白氨基酸序列的多重序列比对

Fig.5 Multi-alignment of amino sequence of PhDHQS-2

2. 4 紫外吸收物质合成相关基因表达的定量分析

与 MAAs 合成相关的基因 *PharoB*, 在不同世代间表达量存在显著差异。其中 *PharoB* - 1 基因在叶状体中表达量约为丝状体中的 300 倍 (见图 6a, $P < 0. 001$), 而 *PharoB* - 2 基因在叶状体世代约为丝状体世代的 4 倍 (见图 6b, $P < 0. 01$)。

2. 5 PhDHQS 蛋白的系统进化分析

构建的系统进化树分为明显的两支: 微藻与高等植物。PhDHQS - 1 (PhDHQS - OMT) 与大多数微藻聚为一支, 而 PhDHQS - 2 与高等植物聚类为另一分支 (见图 7)。说明坛紫菜中两条 DHQS 分属于不同分支, PhDHQS - 1 与微藻类亲缘关系更近, 而 PhDHQS - 2 则与高等植物亲缘关系较近。

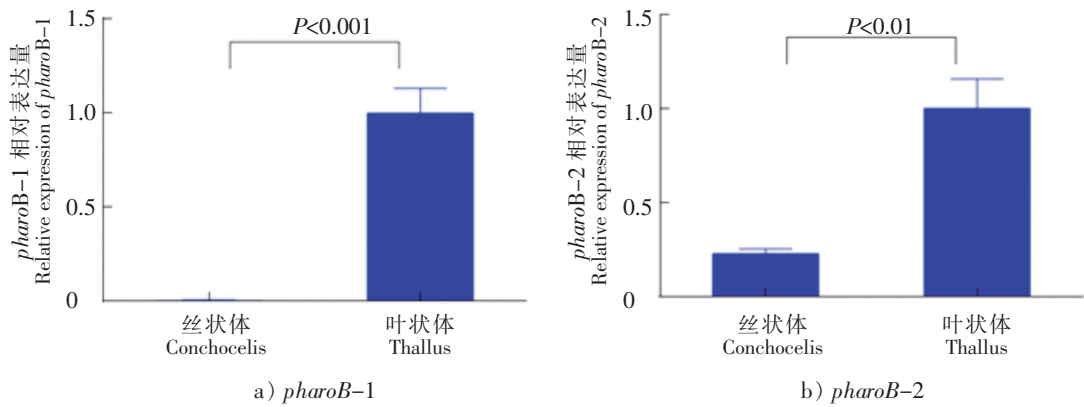


图 6 丝状体和叶状体中 MAAs 合成基因的相对表达情况

Fig.6 The MAAs genes relative expression level in conchocelis and thallus of *P. haitanensis*

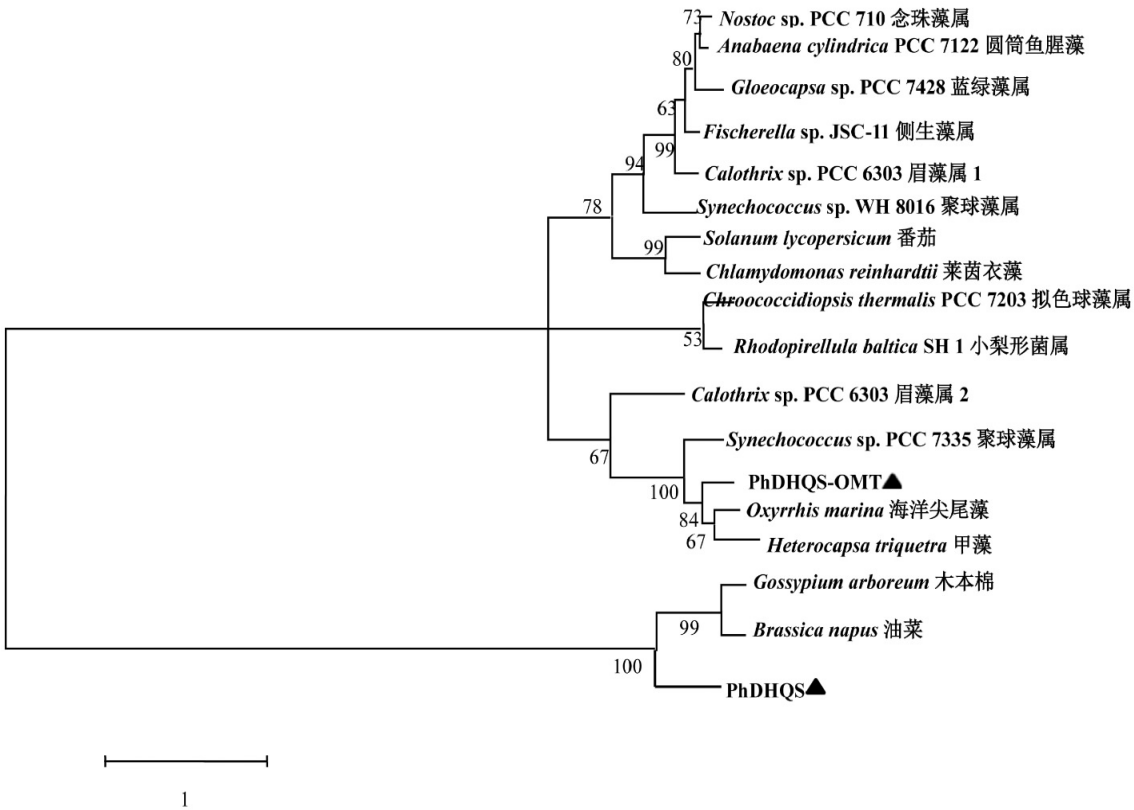


图 7 基于氨基酸序列构建 DHQS 的系统进化树

Fig.7 Phylogenetic tree constructed based on DHQS amino acid sequences

3 讨论

紫外辐射 (UVR) 是太阳辐射的一部分, 因此藻类在利用光能进行光合作用的同时, 不可避免地受到 UVR 的影响。UVR 对各种光合藻类有多方面的伤害作用, 而经济海藻坛紫菜应答 UVR 的机制以及世代差异还不清楚。一些具有游泳能力的微藻可以通过垂直迁移来躲避 UVR 的伤害^[4-5]。而包括坛紫菜在内的大型海藻不能通过迁移以避免辐射伤害, 只能增强其抵御 UVR 伤害的机制。很多生物通过产生紫外吸收物质来抵御 UVR 的伤害。研究表明, 紫菜可以通过合成紫外吸收物质来抵御 UVR 的伤害^[6-8]。紫外吸收物质种类很多, 其中类菌胞素氨基酸 (MAAs) 是最常见的紫外吸收物

质。退潮时,坛紫菜叶状体直接暴露在 UVR 下,而贝壳可以使 UVA 和 UVB 分别衰减约 50% 和 75%^[17]。因此,坛紫菜丝状体世代和叶状体世代所处的 UVR 环境差异巨大。本研究重点关注坛紫菜 MAAs 含量的世代差异,以及相关合成基因的世代表达差异。

本研究发现 MAAs 在叶状体中的含量显著高于丝状体。*PharoB* 是 MAAs 合成的关键基因,叶状体中两条 *PharoB* 基因的表达量也显著高于丝状体。这种差异极可能与坛紫菜不同世代的栖息环境相关。杨顶田等^[15]的研究也发现,藻类通过 MAAs 含量的增加来抵御 UVB,这是长期进化后表现出的适应现象。另外,UVR 会诱导铜绿微囊藻大量合成 MAAs,从而增加其耐受 UVR 的能力^[18]。Corcora 等^[19]研究发现大型海藻受 UVB 影响产生的紫外吸收物质能有效地保护潮间带生态系统内其他生物的生存。然而,过量的 UVB 会导致藻体受到氧化损伤^[5]。牛美英^[20]和应锐等^[21]分别发现麒麟菜和条斑紫菜的 MAAs 提取物具有抗氧化活性。坛紫菜丝状体生长于贝壳中,不仅 UVR 被贝壳减弱,而且可见光也降低了约 40%^[17]。此外,有研究认为 MAAs 合成需要可见光^[22],这可能也是叶状体中 MAAs 含量及 *PharoB* 基因表达量均显著高于丝状体的原因。

在模式生物蓝藻中,DHQS 酶是 MAAs 合成的关键酶^[14]。在经济海藻条斑紫菜的功能基因组研究中,王孟强^[23]研究发现 MAAs 合成过程中的关键酶为 *aroB* 基因编码的 DHQS/O-MT。而坛紫菜与条斑紫菜亲缘关系较近。本研究以转录组测序获得的 DHQS/O-MT unigene 序列作为核心序列,采用普通 PCR 和 RACE 扩增技术成功克隆了 2 条编码坛紫菜 DHQS 酶的基因 *aroB*,分别命名为 *PharoB*-1、*PharoB*-2。通过序列多重比对发现 *PharoB*-1 基因的 ORF 功能结构域中,存在两个酶的编码序列,分别为 DHQS 酶和 O-转甲基酶(O-MT)。而 *PharoB*-2 只编码 DHQS 酶,没有编码 O-MT 的结构域。这导致了系统进化分析显示 2 条 PhDHQS 蛋白分为明显的 2 支,相距较远。2 条 PhDHQS 蛋白分别与微藻和高等植物的亲缘关系更近(见图 7),这也与红藻的进化地位一致。

综上所述,坛紫菜叶状体世代的紫外吸收物质 MAAs 含量明显高于丝状体世代,并且 MAAs 合成的 2 条关键基因的表达与生理数据一致,这种差异来源于对不同世代所处的 UVR 环境的适应。

[参 考 文 献]

- [1] 马家海,蔡守清. 条斑紫菜的栽培与加工 [M]. 北京:科学出版社,1996.
- [2] BLOUIN N A, BRODIE J A, GROSSMAN A C, et al. *Porphyra*: a marine crop shaped by stress [J]. Trends in Plant Science, 2011, 16(1): 29-37. DOI:10.1016/j.tplants.2010.10.004.
- [3] XIE C, BING L, YAN X, et al. Characterization of the global transcriptome for *Pyropia haitanensis* (Bangiales, Rhodophyta) and development of cSSR markers [J]. BMC Genomics, 2013, 14(1): 73-83. DOI:10.1186/1471-2164-14-107.
- [4] HÄDER D P, HELBLING E W, WILLIAMSON C E, et al. Effects of UV radiation on aquatic ecosystems and interactions with climate change [J]. Photochemical & Photobiological Sciences, 2011, 10(2): 242-260. DOI:10.1039/c0pp90045a.
- [5] HÄDER D P, KUMAR H, SMITH R, et al. Effects of solar UV radiation on aquatic ecosystems and interactions with climate change [J]. Photochemical & Photobiological Sciences, 2007, 6(3): 267-285. DOI:10.1039/b700020k.
- [6] MISONOU T, SAITOH J, OSHIBA S, et al. UV-absorbing substance in the red alga *Porphyra yezoensis* (Bangiales, Rhodophyta) block thymine photodimer production [J]. Marine Biotechnology, 2003, 5(2): 194-200. DOI:10.1007/s10126-002-0065-2.
- [7] SHICK J M, DUNLAP W C. Mycosporine-like amino acids and related gadusols: biosynthesis, accumulation, and UV-protective functions in aquatic organisms [J]. Annual Review of Physiology, 2002, 64(1): 223-262. DOI:10.1146/annurev.physiol.64.081501.155802.
- [8] CONDE F R, CHURIO M S, PREVITALI C M. The photoprotector mechanism of mycosporine-like amino acids: excited-state properties and photostability of porphyra-334 in aqueous solution [J]. Journal of Photochemistry & Photobiology B Biology, 2000, 56(2/3): 139-144. DOI:10.1016/S1011-1344(00)00066-X.

- [9] NAVARRO N P, MANSILLA A, FIGUEROA F L, et al. Short-term effects of solar UV radiation and NO_3^- supply on the accumulation of mycosporine-like amino acids in *Pyropia columbina* (Bangiales, Rhodophyta) under spring ozone depletion in the sub-Antarctic region, Chile [J]. *Botanica Marina*, 2014, 57(1): 9-20. DOI:10.1515/bot-2013-0090.
- [10] MATSUI K, NAZIFI E, KUNITA S, et al. Novel glycosylated mycosporine-like amino acids with radical scavenging activity from the cyanobacterium *Nostoc commune* [J]. *Journal of Photochemistry & Photobiology B Biology*, 2011, 105(1): 81-89. DOI:10.1016/j.jphotobiol.2011.07.003.
- [11] YAKOVLEVA I, BHAGOOI R, TAKEMURA A, et al. Differential susceptibility to oxidative stress of two scleractinian corals: antioxidant functioning of mycosporine-glycine [J]. *Comparative Biochemistry & Physiology Part B Biochemistry & Molecular Biology*, 2005, 139(4): 721-730. DOI:10.1016/j.cbpc.2004.08.016.
- [12] BALSUS E P, WALSH C T. The genetic and molecular basis for sunscreen biosynthesis in cyanobacteria [J]. *Science*, 2010, 329(5999): 1653-1656. DOI:10.1126/science.1193637.
- [13] BROWNE N, DONOVAN F, MURRAY P, et al. Cyanobacteria as bio-factories for production of UV-screening compounds [J]. *OA Biotechnology*, 2014, 3(1): 1-7.
- [14] SINGH S P, HÄDER D P, SINHA R P. Bioinformatics evidence for the transfer of mycosporine-like amino acid core (4-deoxygadusol) synthesizing gene from cyanobacteria to dinoflagellates and an attempt to mutate the same gene (YP_324358) in *Anabaena variabilis* PCC 7937 [J]. *Gene*, 2012, 500(2): 155-163.
- [15] 杨顶田, 陈伟民, 张运林, 等. 太湖梅梁湾水体中紫外线状况及藻体内 MAAs 的检测 [J]. *武汉植物学研究*, 2004(3): 264-268. DOI:10.3969/j.issn.2095-0837.2004.03.014.
- [16] 洪灯. 大气 CO_2 浓度升高和 UV-B 增强对普通念珠藻生长和光合作用影响的研究 [D]. 武汉: 华中农业大学, 2011. DOI:10.7666/d.Y2004415.
- [17] 姜红霞. 贝壳内层钙质为坛紫菜丝状体抵御紫外辐射提供保护作用 [C] //江苏省科协. 苏州市自然科学优秀学术论文汇编 (2008—2009): 医药卫生科技. 苏州: [出版者不详], 2010: 5.
- [18] 叶凯雄, 刘康, 詹领. 紫外辐射对铜绿微囊藻中类菌孢素氨基酸 (MAAs) 的诱导效应 [J]. *氨基酸和生物资源*, 2008(1): 25-28. DOI:10.14188/j.ajsh.2008.01.003.
- [19] Ó CORCORA T, DAVENPORT J, JANSEN M A K. The copepod *Tigriopus brevicornis* (OF Müller, 1776) gains UV protection by feeding on UV-acclimated algae [J]. *Journal of Crustacean Biology*, 2016, 36(5): 658-660. DOI:10.1163/1937240X-00002462.
- [20] 牛美英. 麒麟菜中类菌孢素氨基酸 (MAAs) 的提取、纯化、鉴定及抗氧化活性研究 [D]. 青岛: 中国海洋大学, 2014.
- [21] 应锐, 张朝辉, 段筱杉, 等. 紫菜中类菌孢素氨基酸抗氧化活性研究 [J]. *中国海洋药物*, 2017, 36(2): 47-54. DOI:10.13400/j.cnki.cjmd.2017.02.008.
- [22] SINHA R P, KLISCH M, HÄDER D-P. Induction of a mycosporine-like amino acid (MAA) in the rice-field cyanobacterium *Anabaena* sp. by UV irradiation [J]. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 1999, 52(1): 59-64. DOI:10.1016/S1011-1344(99)00103-7.
- [23] 王孟强. 条斑紫菜功能基因组特性与抗逆相关基因表达分析 [D]. 青岛: 中国海洋大学, 2007. DOI:10.7666/d.y1112147.

(责任编辑 朱雪莲 英文审校 黄力行)