

Cu, Zn 和 Cd 对 5 种单细胞藻的酶基因表达调控的研究*

苏秀榕¹ 费志清² 裴鲁青² Paul K. Chien³

(宁波大学¹ 生命科学与生物工程学院;² 海洋生物工程重点实验室 315211)

(³ Department of Biology, University of San Francisco, 2130 Fulton Street San Francisco, CA 94117-1080 USA)

提要 报道了在 Cu^{2+} 、 Cd^{2+} 和 Zn^{2+} 的毒害作用下, 三角褐指藻 (*Phaeodactylum tricinctum* Bohlin), 湛江叉鞭藻 (*Isochrysis zhanjiangensis* Hu & Lui), 绿色巴夫藻 (*Patinoia viridis* Tseng Chen et Zhang), 青岛大扁藻 (*Platymonas helgolandica* var. *Tsingtaoensis* Tseng et T.J.Chang), 小球藻 (*Chlorella* sp.) 等单细胞藻的苹果酸脱氢酶发生了明显的变化。其中, 不同种类重金属离子对该酶的基因表达作用不同, 即使是同种离子但浓度不同, 这种作用也不同。一般情况下高离子浓度抑制了酶基因的表达。低离子浓度促进了表达。但也有例外, 如 Cd^{2+} (24.53 $\mu\text{g}/\text{ml}$)、 Zn^{2+} (24.31, 16.21 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 促进三角褐指藻 MDH1 座位等位基因的表达量; Cd^{2+} (24.53, 12.26 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 促进小球藻 MDH1 座位等位基因的表达量。由此可推出, 重金属离子可以干扰等位基因的表达, 并在等位酶的活性上表现出来。

关键词 无机离子, 单细胞藻类, 苹果酸脱氢酶, 基因表达调控

三角褐指藻 (*Phaeodactylum tricinctum* Bohlin), 湛江叉鞭藻 (*Isochrysis zhanjiangensis* Hu & Lui), 绿色巴夫藻 (*Patinoia viridis* Tseng Chen et Zhang), 青岛大扁藻 (*Platymonas helgolandica* var. *Tsingtaoensis* Tseng et T.J.Chang), 小球藻 (*Chlorella* sp.) 等单细胞藻类, 是滤食性动物的饵料。由于目前海水中各种有害物质 (包括 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 和 Cd^{2+} 等重金属) 的存在, 这些浮游生物种群数量和质量已大大降低。许多生态调查均表明这些滤食性动物的饵料正在大量的消失, 这也是目前人工海水养殖动物死亡的原因之一。实验证明: Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 和 Cd^{2+} 对单细胞藻类的超微结构造成了不同程度的破坏, 其中类囊体受害最严重^[2,3]; 这 3 种离子也抑制藻类细胞的生长繁殖及光色素的形成^[4]。任何生物的代谢都与酶相关, 愈是关键代谢调控酶与外界环境关系愈密切。苹果酸脱氢酶是糖代谢的调控酶之一, 也是单细胞藻类生长发育所必需的酶, 它对外界的变化较敏感。因此以它作为一种遗传标记。等位酶是 Prakash 等 1969 年提出的, 他们把同一基因位点的不同等位基因所编码的一种酶的不同形式叫做等位酶 (Allzyme), 把它从广义的“同工酶”的概念中区分了出来。从此对酶基因的表达产物——酶谱的遗传分析具有了更深的意义。由于酶谱是基因表达的产物, DNA 分子水平上的变化 (等位基因位点的变化) 就

会在酶谱上体现出^[5]。本文首次从基因水平报道了 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 和 Cd^{2+} 对 5 种单细胞藻类的苹果酸脱氢酶的调控效应, 进一步揭示了重金属对生态环境的毒害作用。

1 材料与方 法

1.1 材料

本实验所用 5 种单细胞藻类由辽宁省海洋水产研究所提供, CuSO_4 、 ZnSO_4 、 CdCl_2 等化学试剂均为分析纯, 购于大连市化学试剂公司。

1.2 方法

(1) 藻类细胞培养: CuSO_4 、 ZnSO_4 、 CdCl_2 溶液均用无菌水配制。根据 5 种单细胞藻类在 3 种离子中的生长曲线, 确定了离子浓度^[4]。用液体稀释法, 用无菌海水 (加 1% 营养盐) 将上述 3 种液体稀释成不同浓

* 同美国旧金山大学生物学系合作项目。

第一作者: 苏秀榕, 出生于 1956 年, 研究方向: 生物化学、生物工程制药。现有研究课题“单细胞藻类的工厂化生产技术”; “抗肿瘤新药——复合多糖的研究”; “利用海藻制备抗肿瘤、降血压新药。原单位为辽宁师范大学海洋资源所。

E-mail: suxiurong@163.net

收稿日期: 2000-07-04; 修回日期: 2000-11-20

度, (Cd^{2+} : 24.53, 12.26, 6.13 $\mu g/ml$; Cu^{2+} : 15.28, 10.18, 5.09 $\mu g/ml$; Zn^{2+} : 24.31, 16.21, 8.11 $\mu g/ml$)。对照组不加任何离子, 利用电感等离子光谱仪(美国 PLASMA-8PEC) 检测离子浓度。接等量的藻种, 浓度为: 三角褐指藻(2.7×10^6 个/ ml)、湛江叉鞭(5.6×10^6 个/ ml)、绿色巴夫藻(2.7×10^6 个/ ml)、青岛大扁藻(3.4×10^6 个/ ml)、小球藻(3.2×10^7 个/ ml)。自然光照(1 000 ~ 2 000 Lx), 一次性培养 20 d^[6]。

(2) 酶液提取: 将上述培养的单细胞藻 5 000 r/min, 室温离心 5 min, 沉淀用冷无菌水洗 3 次, 离心, 向沉淀中按 1:1 加入 PBS(pH=7.2), 在冰浴下研磨或用超声波破碎, 10 000 r/min, 4 $^{\circ}C$ 离心 10 min, 上清液加 2 μl 溴酚蓝甘油备用^[5]。

(3) 利用 Abdul . Kader 1997 年的 BCA 方法检测上清液中的蛋白质含量, 并用 PBS 缓冲液将样品稀释成等蛋白含量。

(4) 电泳参照文献[1]。

(5) 酶染色参照 Kephart, 1990; Michad, 1993 年的方法略加改动。

2 结果

苹果酸脱氢酶(Malate dehydrogenase)是多肽酶, 在 5 种单细胞藻类中的表型各异。而且同一种藻类在不同离子、同种离子不同浓度的培养液中基因的表达量不同。

2.1 三角褐指藻

有两个基因座位, MDH1 有 3 个等位基因 a, b, c, 高浓度的 Cd^{2+} (24.53 $\mu g/ml$) 使 b, c 基因的表达量明显高于对照组, 并抑制 a 基因的表达; Zn^{2+} (24.31, 16.21 $\mu g/ml$) 促进了 b 基因的表达, Zn^{2+} 的浓度同 b 基因的表达量呈负相关; Cu^{2+} 浓度为 15.28 $\mu g/ml$ 抑制了 a, b 基因的表达, c 基因仅在高 Cd^{2+} (24.53 $\mu g/ml$)、 Cu^{2+} (15.28 $\mu g/ml$) 存在时才表达; MDH2 有两个等位基因 a, b, 除了 Zn^{2+} (16.21, 8.11 $\mu g/ml$), 酶的表达量

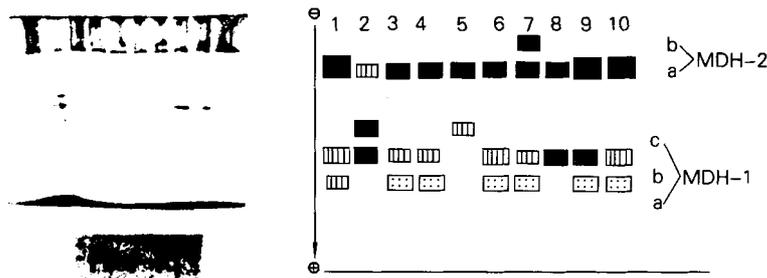


图 1 三角褐指藻的苹果酸脱氢酶的照片扫描和模式

Fig.1 The diagrams of photo scanning and zymograms of malate dehydrogenase in *Phaeodactylum tricornutum*

电泳酶谱的样品排序: 1: 对照组; 2~4: 加 Cd^{2+} (浓度分别为: 24.53, 12.26, 6.13 $\mu g/ml$); 5~7: 加 Cu^{2+} (浓度分别为: 15.28, 10.18, 5.09 $\mu g/ml$); 8~10: 加 Zn^{2+} (浓度分别为: 24.31, 16.21, 8.11 $\mu g/ml$); ■: 酶带宽而颜色极深; □: 酶带宽而颜色极浅; ○: 酶带窄而颜色极深; △: 酶带窄而颜色极浅; 图 1~5 注释相同。

同对照组相同外, 其他样品的酶表达量都受到不同程度的抑制, 尤以高 Cd^{2+} (24.31 $\mu g/ml$) 最为明显; 同时仅在低浓度的 Cu^{2+} 存在时, b 基因才表达(图 1)。

2.2 湛江叉鞭藻

有 3 个基因座位, MDH1 有两个等位基因 a, b, 在高浓度的 Cd^{2+} , Cu^{2+} 和 Zn^{2+} 作用下两个基因的表达受到抑制, 尤以高 Cu^{2+} 最为明显; MDH2 的 3 个等位基因 a, b, c, 高浓度的 Cd^{2+} , Cu^{2+} 和 Zn^{2+} 抑制 c 基因表达, 其他两个基因表达量也少; MDH3 的基因, 在高浓度的 Cd^{2+} , Cu^{2+} 和 Zn^{2+} 离子作用下, 基因的表达受到明显的抑制(图 2)。

2.3 绿色巴夫藻

有两个座位, 在 MDH1 座位, 高浓度的 Cu^{2+} , Zn^{2+} , 低浓度的 Cd^{2+} 抑制 b 基因的表达, 当 Cu^{2+} 浓度为 10.18, 5.09 $\mu g/ml$ 时 b 基因表达量同对照组相同; 在 MDH2 座位, 除了 Cu^{2+} (10.18, 5.09 $\mu g/ml$) 和 Zn^{2+} 抑制基因的表达量, 适当的金属离子浓度可促进等位基因的表达, 尤以 Cd^{2+} 较明显(图 3)。

2.4 青岛大扁藻

有两个基因座位, MDH1 的两个等位基因 a, b 对 3 种离子较敏感, 高浓度 Cd^{2+} , Cu^{2+} 和 Zn^{2+} 抑制了 a, b 基因的表达量, 尤以 Zn^{2+} 较明显。MDH2 座位的 a, b

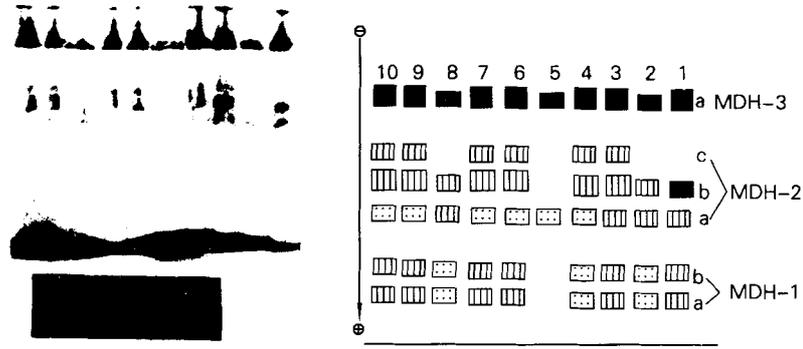


图 2 湛江叉鞭藻的苹果酸脱氢酶照片扫描和模式

Fig.2 The diagrams of photo scanning and zymograms of malate dehydrogenase of *Isochrysis zhanjiangensis*

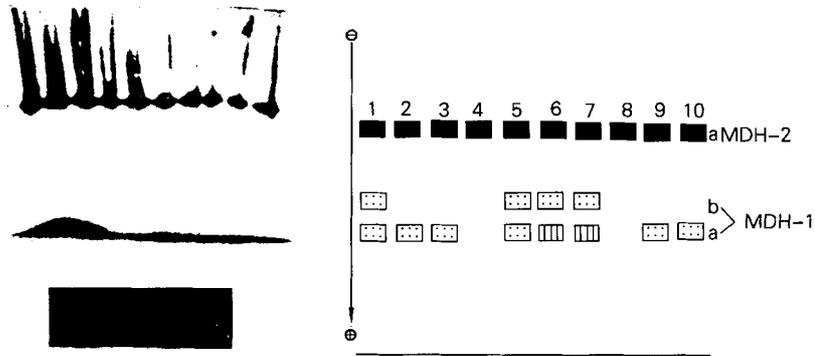


图 3 绿色巴夫藻的苹果酸脱氢酶扫描和模式

Fig.3 The diagrams of photo scanning and zymograms of malate dehydrogenase of *Pavlova viridis*

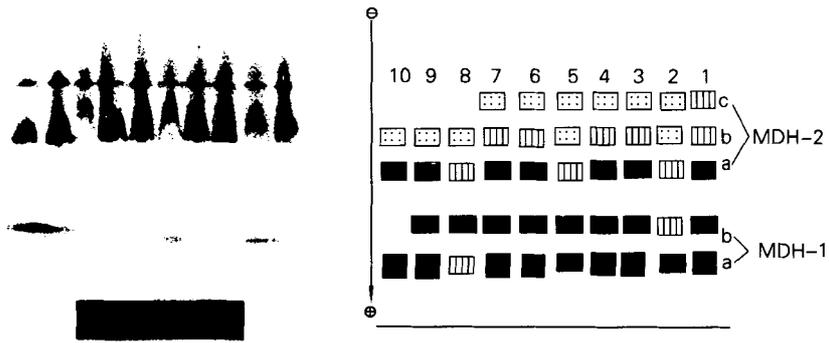


图 4 青岛大扁藻的苹果酸脱氢酶扫描和模式

Fig.4 The diagrams of photo scanning and zymograms of malate dehydrogenase of *Platymonas helgolandica*

基因的表达量同离子浓度呈负相关; 3 种离子明显抑制 c 基因的表达量尤以 Zn^{2+} 最为明显(图 4)。

2.5 小球藻

有两个基因座位, 3 种离子抑制了 MDH1 的 b

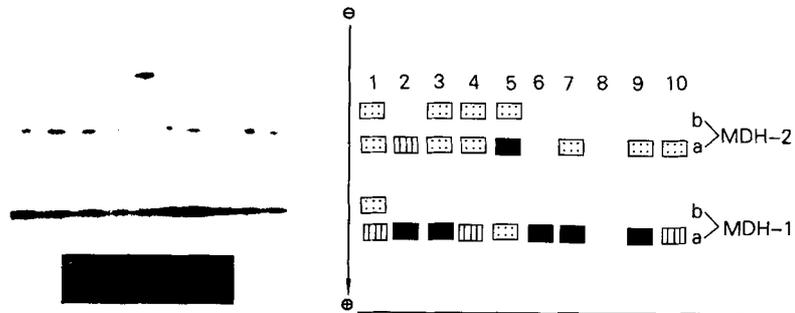


图 5 小球藻的苹果酸脱氢酶扫描和模式

Fig. 5 The diagrams of photo scanning and zymograms of malate dehydrogenase of *Chlorella* sp.

基因表达; Cd^{2+} 离子浓度同 a 基因表达量呈正相关, Cu^{2+} 离子浓度同 a 基因表达呈负相关, 中等离子浓度的 Zn^{2+} 促进 a 基因的表达; 在 MDH2 座位, 高浓度的 Cu^{2+} 可促进 a 基因超量的表达, 高浓度 Zn^{2+} 抑制 a, b 两个基因的表达(图 5)。

3 讨论

(1) 虽然 Cu^{2+} 和 Zn^{2+} 是许多酶的辅基, 适当的剂量可以提高酶的表达量, 促进细胞生长, 但超过一定量时就会产生副作用, 甚至引起死亡。通过研究 Cd^{2+} , Cu^{2+} 和 Zn^{2+} 对三角褐指藻、湛江叉鞭藻、青岛大扁藻、绿色巴夫藻的苹果酸脱氢酶基因的表达量也发现了这一点。

(2) 植物在一定量的范围内, 有抵御环境中重金属的毒害作用的能力, 通过产生金属硫蛋白 (Metallothionein) 和谷胱甘肽 (Glutathione) 来解毒。但 Wang Changlin 1996 年指出, 超过一定量就会引起中毒。

(3) 通过 MDH 在一定量的 Cu^{2+} , Cd^{2+} 和 Zn^{2+} 的作用下, 基因的表达情况可以确定环境与酶的关系十分密切, 环境可以改变基因的正确表达, 影响酶的活性并制约着代谢过程。良好的生态环境可以使基因正

常表达, 从而使生物健康的生长、生存, 保持地球上的生物多样性, 可改善人类的生存环境和生活质量。因此, 治理环境污染刻不容缓。

参考文献

- 1 李太武, 苏秀榕, 张健等. 中国对虾与日本对虾 6 种同工酶的比较研究, 海洋学报, 1997, 19(2): 85 ~ 88
- 2 苏秀榕, 刘照彬, 迟庆宏等. 从超微结构变化研究 Cu^{2+} , Zn^{2+} , Se^{4+} , Cd^{2+} 对三角褐指藻的毒性效应, 辽宁师范大学学报(自然科学版), 2000, 23(1): 68 ~ 72
- 3 苏秀榕, 刘照彬, 迟庆宏等. 从扁藻超微结构变化研究 Cu^{2+} , Zn^{2+} , Se^{4+} , Cd^{2+} 毒性效应, 水产科学, 2000, 19(1): 1 ~ 9
- 4 苏秀榕, 李太武, Paul K. Chien. Cd^{2+} , Cu^{2+} 和 Zn^{2+} 对种单细胞藻类生长的影响, 水产科学, 1999, 18(1): 3 ~ 5
- 5 王中仁. 植物等位酶分析. 北京: 科学出版社, 1996. 1 ~ 160
- 6 湛江水产学校主编. 海洋饵料培养. 北京: 农业出版社, 1980. 10 ~ 65

辅助参考文献

- Abdul Kader, Hu Liu. Interference of anthracycline derivatives with measurement of proteins with BCA, *Clinical Chemistry*, 1997, 43: 2 201 ~ 2 202

研究报告 *REPORTS*

STUDIES ON THE ENZYME GENE EXPRESSION AND REGULATION WITH Cu^{2+} , Zn^{2+} AND Cd^{2+} IN OF FIVE MICROALDAE

SU Xiu rong¹ FEI Zhi-qing² PEI Lu-qing² Paul K. Chien³

(¹ School of Life Science and Biotechnology, Ningbo University, 315211)

(² Marine Biotechnology Key Lab., Ningbo University, 315211)

(³ Department of Biology, University of San Francisco, 2130 Fulton Street, San Francisco CA94117-1080 USA)

Received: July, 4, 2000

Key Words: Inorganic ion, Microalga, Malate dehydrogenase, Gene expression and regulation

Abstracts

This paper reports the obvious change of the activity of malate dehydrogenase to *Phaeodactylum tricornutum* Bohlin, *Isochrysis zhanjiangensis* Hu & Lui, *Pavlova lutheri* Tseng Chen et zhang, *Platymonas helgolandica* var. *Tsingtaoensis* Tseng et T.J. Chang and *Chlorella* sp. etc. in toxicity of Cu^{2+} , Zn^{2+} and Cd^{2+} solution. There is difference allele expression in different heavy metal ion, and so is the same ion but different concentration. Ordinarily high ion concentration restrains allele expression, low concentration accelerate it. But Cd^{2+} (24.53 $\mu\text{g}/\text{ml}$) and Zn^{2+} (24.31, 16.21 $\mu\text{g}/\text{ml}$) accelerate allele expression in MDH1 of *Phaeodactylum tricornutum*; Cd^{2+} *Isochrysis zhanjiangensis*; Cd^{2+} (24.53, 12.26 $\mu\text{g}/\text{ml}$) accelerates allele expression in MDH1 of *Chlorella* sp.. This shows heavy metal can interfere gene expression, and show allele activity.

(本文编辑:张培新)