

利用 real-time RT-PCR 研究大型蚤对铜绿微囊藻毒素合成基因转录水平影响*

宋瑞峰^{1,2}, 王国祥¹, 徐 瑶^{1,2}, 邵继海², 王中杰², 刘 洋², 李仁辉^{2**}

(1: 南京师范大学地理科学学院, 江苏省环境演变与生态建设重点实验室, 南京 210046)

(2: 中国科学院水生生物研究所, 武汉 430072)

摘 要: 近年来关于浮游动物与微囊藻相互作用的研究逐渐被关注, 其中有的研究认为浮游动物能够诱导产毒细胞毒素含量的变化. 微囊藻毒素是由微囊藻毒素合成基因编码翻译的, 目前关于浮游动物对微囊藻毒素合成基因相对表达的影响并无报道, 本文首次通过实时定量逆转录 PCR 方法研究铜绿微囊藻 PCC7806 产毒相关基因 *mcyB* 和 *mcyD* 在大型蚤胁迫下相对表达变化. 结果显示微囊藻 *mcyB*、*mcyD* 基因相对表达均有上调, 表明铜绿微囊藻 PCC7806 通过上调产毒基因的转录水平达到对大型蚤的诱导防御, 从而为浮游动物与微囊藻相互作用研究提供新的依据.

关键词: real-time RT-PCR; 微囊藻产毒基因; 大型蚤; 诱导防御

Transcriptional response of microcystin biosynthesis gene cluster of *Microcystis aeruginosa* PCC7806 under *Daphnia* stress using real-time RT-PCR technique

SONG Ruifeng^{1,2}, WANG Guoxiang¹, XU Yao^{1,2}, SHAO Jihai², WANG Zhongjie², LIU Yang² & LI Renhui²

(1: *Jiangsu Key Laboratory of Environmental Change and Ecological Construction, College of Geographical Science, Nanjing Normal University, Nanjing 210046, P. R. China*)

(2: *Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072, P. R. China*)

Abstract: Recently the interactions between zooplankton and *Microcystis* species have been concerned. Some studies have revealed that zooplankton can induce the change of toxin production in *Microcystis*. Microcystins (mcys) are cyclic heptapeptides, synthesized via a mixed polyketide synthase/nonribosomal peptide synthetase system encoded by microcystin synthetase gene (*mcy*) operon, however no studies were conducted to elucidate the effect of zooplankton on the gene expressions of *mcy* genes. The present paper studied the effect of *Daphnia* upon the transcriptional regulation of genes responsible for microcystin synthesis in *Microcystis aeruginosa* PCC7806 using the real-time RT-PCR for the first time. Both *mcyB* and *mcyD* transcript levels increased under the grazing stress of *Daphnia*, and it is speculated that the increase of *mcy* gene clusters transcription was the induced defense of *Microcystis aeruginosa* PCC7806 against *Daphnia* stress.

Keywords: real-time RT-PCR; *mcy* gene clusters; *Daphnia*; induced defence

富营养化水体中微囊藻等蓝藻形成的水华现象已成为全世界日益关注的环境问题. 微囊藻毒素的产生和释放是蓝藻水华的主要危害之一, 包括微囊藻毒素对水生生物如鱼类和浮游动物的毒性作用^[1-3]. 蓝藻与浮游动物间相互作用逐渐成为近年来研究的热点. 由于蓝藻的一些特征包括形态的变化, 营养成分的不适以及毒素的产生等限制了浮游动物的捕食, 特别是微囊藻毒素等次级代谢产物会对浮游动物产生毒害作用^[4]. 反之蓝藻在浮游动物捕食压力下也会通过形态的变化如诱导群体的形成来适应环境压力而生存^[5]. 更值得注意的是, Jang 等的实验证明在浮游动物直接或间接刺激下, 微囊藻产生毒素的能力呈上升趋势

* 国家水专项太湖课题 (2009ZX07101 - 013 - 02) 和中国科学院百人计划项目 (082303 - 1 - 501) 联合资助. 2010 - 11 - 05 收稿; 2011 - 11 - 25 收修改稿. 宋瑞峰, 女, 1984 年生, 硕士研究生; E-mail: winterfeng@sogou.com.

** 通讯作者; E-mail: reli@ihb.ac.cn.

势^[6-7]. 对于微囊藻的这种诱导防御现象, Van Gremberghe 等的研究表明微囊藻在浮游动物压力下的各种响应是不定的, 并且不同的藻种有差别^[8]. 对于这样一个有趣而又有所争论的问题, 解决的方法除了需要使用更多不同区域的不同微囊藻藻种来进一步验证外, 在毒素产生能力变化的测定上除了使用经典的 HPLC 法和 ELISA 法, 也可以探索其它的方法. 随着现代分子生物技术的发展, 微囊藻毒素的合成相关基因 *mcy* 簇已被解明^[9], 所以利用检测毒素基因的表达量来测定微囊藻的产毒能力是本文主要目的. 本实验在国内外首次通过实时定量逆转录 PCR (Real-time RT-PCR) 方法研究铜绿微囊藻在有大型蚤胁迫条件下产毒相关基因 *mcyB* 和 *mcyD* 的表达水平, 从产毒基因表达的水平进一步揭示微囊藻在面对大型蚤胁迫时的响应机制. Real-time RT-PCR 是一种十分成熟的用于定量研究生物体内 mRNA 的技术, 它主要用于精确定量生物体内低拷贝目的基因片段的逆转录水平^[10]. 与传统定量方法相比, Real-time RT-PCR 分析 mRNA 具有更高灵敏度、更大测定范围、高通量且结果精确等优点.

1 材料与方 法

1.1 枝角类及藻种的来源与培养

试验选用大型蚤 (*Daphnia magna*) 由中国预防医学科学院提供, 于温度 $25 \pm 1^\circ\text{C}$, 光强 $30 \mu\text{mol photons}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$, 光暗周期 12h:12h (L:D) 的恒温光照培养箱中进行单个体“克隆”培养. 培养用水为经活性炭过滤的自来水, 再经曝气充氧并静置 24h, 所用饵料为处于指数生长期 (约 10^5 cell/ml) 的斜生栅藻 (*Scenedesmus obliquus*), 每天更换培养水. 挑选出同母体、同龄期、健康的后代, 培养 5d 用于实验. 试验选用的铜绿微囊藻 (*Microcystis aeruginosa* PCC7806) 及喂养枝角类的斜生栅藻 (*S. obliquus*) 均由中国科学院水生生物研究所淡水藻种库提供, 藻株用 CT 完全培养基培养, 培养条件同上. 将铜绿微囊藻进行扩大培养达指数生长期用于实验.

1.2 试验设置

向 1000ml 三角瓶中添加铜绿微囊藻培养液 600ml, 接种后的 OD_{680} 值为 0.032 ($1.91 \times 10^5 \text{ cells/ml}$), 再向其中投加 60 只龄期为 5d 的大型蚤, 使大型蚤的终浓度为 100 ind./L. 对照为空白处理, 每个处理 3 个平行. 实验持续 5d, 每隔 24h 取样一次, 用于测定 OD_{680} 及富集 RNA 提取所用的藻液. 另外, 在 250ml 三角瓶中设置同上相同浓度的微囊藻及大型蚤, 最终体积定为 100ml, 用于观测大型蚤存活率, 设 3 个平行. 每天检测大型蚤的存活率, 当对大型蚤实施持续刺激 30s 仍没有任何活动, 视为死亡.

1.3 RNA 提取

取 1000ml 三角瓶中藻液于 12000 r/min 离心 5min 弃上清, 依微囊藻密度不同, 实验期间富集对照组微囊藻体积第 1-5d 依次为 60, 50, 40, 30, 20ml, 富集实验组微囊藻体积依次为 60, 50, 50, 50, 40ml. 将富集的细胞重悬于 Trizol 试剂 (Invitrogen, USA), 液氮冻溶 3 次后用 mini-beadbeater 破碎细胞, 每个样品破碎 4 次, 每次 20s, 转速 4600 r/min . 然后按 Trizol 试剂说明书的操作步骤提取铜绿微囊藻 PCC7806 总 RNA.

1.4 逆转录及 Real-time RT-PCR

提取的总 RNA 先用无 RNA 酶的 DNA 酶 (Promega, USA) 按照试剂说明书的操作步骤进行消化, 消化后的总 RNA 用逆转录试剂盒 (Generay, China) 以随机九引物 p(dN), 逆转录成 cDNA. Real-time RT-PCR 所用引物用软件 Primer Premier 5 进行设计, 基因 *16Srrn* 正向引物序列 (5'-3') 为 GCCGCRAGGTGAACTAA, 反向引物序列 (5'-3') 为 AATCCAAAGACCTTCTCCC; 基因 *mcyB* 正向引物序列为 CCTACCGAGCGCTGGG, 反向引物序列为 GAAAATCCCTAAAGATTCTGAGT; 基因 *mcyD* 正向引物序列为 GGCTGCGTAGCGGTTTCCTT, 反向引物序列为 CGGCTTTATCTCTCAACAGTCTC. Real-time PCR 参考 Pfaffl、Bustin 等的研究方法^[10-12], 并根据本实验所选基因进行调整. Real-time RT-PCR 在 MyiQ™ 5 Real-time RT-PCR 仪 (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) 中进行, 反应体系如下: $10 \mu\text{l}$ Master Mix (SYBR Green, Toyobo, Japan), 正向引物和反向引物各 $0.2 \mu\text{l}$ ($10 \text{ pmol}/\mu\text{l}$), $1 \mu\text{l}$ cDNA, 加 ddH_2O 至终体积 $20 \mu\text{l}$. Real-time RT-PCR 按如下反应条件进行: 95°C , 3min; 95°C , 15s; 57°C , 30s; 72°C , 30s; 40 个循环. *16SrRNA* 基因在不同环境条件下表达都相对稳定^[11,13], 因此选则 *16SrRNA* 基因作为相对定量的内参. 在此反应体系下, *16SrRNA*, *mcyB*, *mcyD* 三个基因的扩增效率均处于 95% - 100% 之间. 基因的表达量用初始循环数 (*Ct*) 来评价, 基因表达的诱导率用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 表

示,其中 $\Delta\Delta C_t = (C_{t, target\ gene} - C_{t, 16Srm})_{stress} - (C_{t, target\ gene} - C_{t, 16Srm})_{control}$.

1.5 数据分析

所有实验数据均用 SPSS 17.0 软件分析, *t*-student 检验用于分析对照样品和处理样品的显著性差异, 显著水平取 $P < 0.05$, 极显著水平取 $P < 0.01$. Pearson 相关系数矩阵用于分析 *mcyB* 与 *mcyD* 基因相对表达量之间的相关性, 极显著水平取 $P < 0.01$.

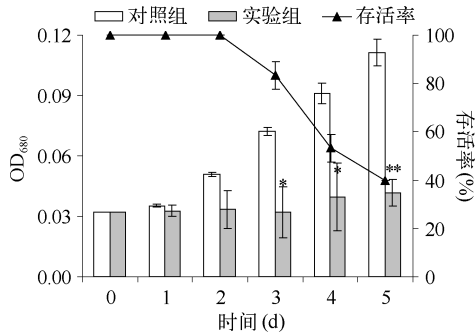


图1 铜绿微囊藻的生长及大型蚤存活率变化 ($n = 3$, * 代表 $P < 0.05$, ** 代表 $P < 0.01$)

Fig. 1 Growth of *M. aeruginosa* PCC7806 and survival rate of *D. magna*

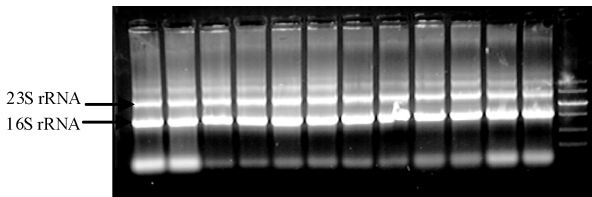


图2 部分实验处理提取的总 RNA 电泳图

Fig. 2 Electrophoretic results of total RNA of part treatments

总 RNA 的提取效果电泳图可以看出 (图 2), 本实验所采用的方法能较好的提取微囊藻实验样品中的总 RNA. 通过 RT-PCR 方法检测大型蚤胁迫影响下铜绿微囊藻 PCC7806 产毒相关基因相对表达量, 结果显示铜绿微囊藻 *mcyB*, *mcyD* 基因相对于对照组表达量总体呈上调趋势. 实验第 2 - 5d *mcyB* 相对表达均显著上调, 且第 2d 和第 5d 为极显著上调, 上调幅度分别为对照的 3.69, 4.20, 7.24, 4.62 倍, 同时 *mcyD* 在第 4d 的相对表达量也有极显著上调, 为对照的 7.95 倍 (图 3), 尽管第 2, 3, 5d 相对表达上调没有达到具有统计意义的显著性水平但也呈上调的趋势. 同时我们发现实验第一天 *mcyB* 相对表达显著下调, 但下调幅度不大, 相对表达量为对照的 39.8%. 通过对 *mcyB*, *mcyD* 基因相对表达量进行的 Pearson 相关系数检测, 得到两者呈极显著的正相关关系, 相关系数为 0.885.

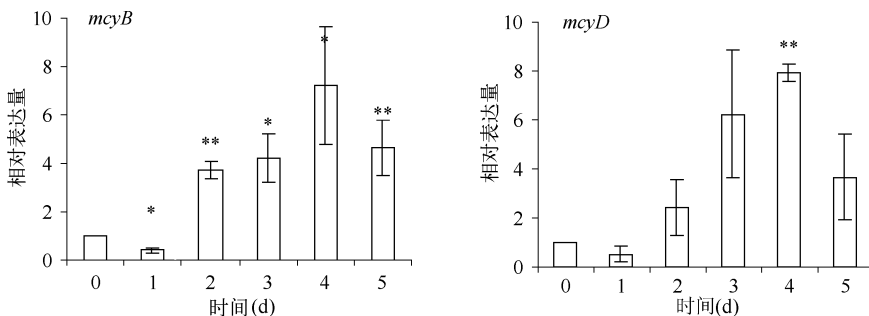


图3 大型蚤胁迫下铜绿微囊藻 *mcyB* 和 *mcyD* 基因表达情况 ($n = 3$, * 代表 $P < 0.05$, ** 代表 $P < 0.01$)

Fig. 3 Relative normalized expressions of *mcyB* and *mcyD* of *M. aeruginosa* under *D. magna* stress

2 实验结果

2.1 大型蚤对铜绿微囊藻的牧食作用

用龄期为 5d 的成体大型蚤进行试验, 观测成体大型蚤对铜绿微囊藻 PCC7806 生长的影响. 对照组的铜绿微囊藻密度增长较快, 第 5d 生物量比初始值增加了 2.48 倍. 实验组的铜绿微囊藻密度增长较慢, 到第 5d 处理组的藻生物量为对照的 37.4%, 比初始值仅仅增加了 30.2%, 而大型蚤的存活率为从开始 2d 的 100% 下降到第 2d 的 40% (图 1).

2.2 大型蚤对铜绿微囊藻 *mcyB*, *mcyD* 相对表达量的影响

总 RNA 的提取效果电泳图可以看出 (图 2), 本实验所采用的方法能较好的提取微囊藻实验样品中的总 RNA. 通过 RT-PCR 方法检测大型蚤胁迫影响下铜绿微囊藻 PCC7806 产毒相关基因相对表达量, 结果显示铜绿微囊藻 *mcyB*, *mcyD* 基因相对于对照组表达量总体呈上调趋势. 实验第 2 - 5d *mcyB* 相对表达均显著上调, 且第 2d 和第 5d 为极显著上调, 上调幅度分别为对照的 3.69, 4.20, 7.24, 4.62 倍, 同时 *mcyD* 在第 4d 的相对表达量也有极显著

3 分析与讨论

水华蓝藻通过进化各种防御机制增加它们存活的机会,在这些诱导防御策略中,包括细胞形态的改变、次级代谢产物释放及群体的形成等^[14]. 本研究结果表明微囊藻产毒相关基因表达变化即为其诱导防御策略之一. 微囊藻毒素合成基因由 55kb 的基因簇组成,包含了 10 个双向转录的开放阅读框,*mcyA-C* 和 *mcyD-J*. *mcyB* 属于 *mcyA-C* 基因簇,编码非核糖体多肽合成酶;*mcyD* 属于 *mcyD-J* 基因簇,编码杂合多酮-非核糖体多肽合成酶,它涉及到 MCs 的特征结构共轭二烯型 β -氨基酸 Adda 的合成,此外 *mcyD* 的表达对于微囊藻毒素的合成也非常重要,如果 *mcyD* 表达翻译失败,导致微囊藻毒素无法合成^[7]. 因此通过对 *mcyB*, *mcyD* 相对表达量的研究可以较好的反应微囊藻产毒基因转录调节情况.

本实验结果显示,铜绿微囊藻在大型蚤胁迫下其密度增加明显缓慢,受到影响. Real-time RT-PCR 结果表明铜绿微囊藻 *mcyB* 和 *mcyD* 基因相对表达量呈显著上调趋势,相关性检验显示两个基因相对表达量呈显著正相关. 虽然 *mcyB* 与 *mcyD* 分处于不同的转录方向,受不同的转录起始位点调控,但在受到大型蚤胁迫的情况下,同时以上调毒素转录水平的方式抵御大型蚤的胁迫,这个结果与 Jang 等的研究结论一致^[6,7]. 当然,本实验只使用了两个模式实验株大型蚤和铜绿微囊藻来研究微囊藻在捕食压力下产毒能力的变化. 这些初步结果还不能完全得出很明确的结论,有些设计还可以更加完善,但是我们更加关注在研究方法上的拓展. 其他相关研究也表明不同环境因子,包括光强^[13,15]、营养盐^[16-17]、痕量金属^[18]及化感物质^[19]等可以对微囊藻产毒及产毒相关基因表达变化产生影响,这也为本研究有关微囊藻的产毒能力在浮游动物胁迫下会反映出“产毒基因表达量的变化”这样的假设提供了一些前提条件和可能,说明微囊藻在受到不同因子影响时产毒基因是可以做出转录水平的调节的.

本研究第一次用 real-time RT-PCR 的方法揭示微囊藻在大型蚤胁迫条件下产毒相关基因表达的响应机制,进一步验证或补充了前人通过化学检测的方法得到的结论,为浮游动物与微囊藻相互作用的研究在方法上提供了更多的选择和空间.

4 参考文献

- [1] Rabergh CMI, Bylund G, Eriksson JE. Histopathological effects of MC-LR, a cyclic peptide toxin from the cyanobacterium (blue-green alga) *Microcystis aeruginosa*, on common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Aquatic Toxicology*, 1991, **20**: 131-146.
- [2] Hanazato T. Interaction between *Microcystis* and cladocera in the highly eutrophic lake Kasumigaura, Japan. *Internationale Revue der Gesamten Hydrobiologie*, 1991, **76**: 21-36.
- [3] Carmichael WW. Cyanobacteria secondary metabolites-the cyanotoxins. *Journal of Applied Microbiology*, 1992, **72**: 445-459.
- [4] Pohnert G, Steinke M, Tollrian R. Chemical cues, defence metabolites and the shaping of pelagic interspecific interactions. *Trends in Ecology and Evolution*, 2007, **22**: 198-204.
- [5] Yang Z, Kong FX, Shi XL *et al.* Morphological response of *Microcystis aeruginosa* to grazing by different sorts of zooplankton. *Hydrobiologia*, 2006, **563**: 225-230.
- [6] Jang MH, Ha K, Joo GJ *et al.* Toxin production of cyanobacteria is increased by exposure to zooplankton. *Freshwater Biology*, 2003, **48**: 1540-1550.
- [7] Jang MH, Ha K, Takamura N. Microcystin production by *Microcystis aeruginosa* exposed to different stages of herbivorous zooplankton. *Toxicon*, 2008, **51**: 882-889.
- [8] Van Gremberghe I, Vanormelingen P, Gucht KVD *et al.* Influence of Daphnia infochemicals on functional traits of *Microcystis* strains (Cyanobacteria). *Hydrobiologia*, 2009, **635**: 147-155.
- [9] Tillett D, Dittmann E, Erhard M *et al.* Structural organization of microcystin biosynthesis in *Microcystis aeruginosa* PCC7806: an integrated peptide-polyketide synthetase system. *Chemical Biology*, 2000, **7**: 753-764.
- [10] Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, 2001, **29**: 2002-2007.
- [11] Bustin SA. Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. *Journal of*

- Molecular Endocrinology*, 2002, **29**: 23-29.
- [12] Huggett J, Dheda K, Bustin S *et al.* Real-time RT-PCR normalization; strategies and considerations. *Genes and Immunity*, 2005, **6**: 279-284.
- [13] Kaebnick M, Neilan BA, Börner T *et al.* Light and the transcriptional response of the microcystin biosynthesis gene cluster. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, **66**: 3387-3392.
- [14] Donk EV. Chemical information transfer in freshwater plankton. *Ecological Informatics*, 2007, **2**: 112-120.
- [15] Kaebnick M, Dittmann E, Börner T *et al.* Multiple alternate transcripts direct the biosynthesis of microcystin, a cyanobacterial nonribosomal peptide. *Applied and Environmental Microbiology*, 2002, **68**: 449-455.
- [16] Sevilla E, Luna BM, Vela L *et al.* Microcystin-LR synthesis as response to nitrogen; transcriptional analysis of the *mcyD* gene in *Microcystis aeruginosa* PCC7806. *Ecotoxicology*, 2010, **19**: 1167-1173.
- [17] Landa AS, Garcia AR, Dominguez EF *et al.* Binding of PhoP to promoters of phosphate-regulated genes in *Streptomyces coelicolor*; identification of PHO boxes. *Molecular Microbiology*, 2005, **56**: 1373-1385.
- [18] Sevilla E, Luna BM, Vela L *et al.* Iron availability affects *mcyD* expression and microcystin-LR synthesis in *Microcystis aeruginosa* PCC7806. *Environmental Microbiology*, 2008, **10**: 2476-2483.
- [19] Shao J, Wu Z, Yu G *et al.* Allelopathic mechanism of pyrogallol to *Microcystis aeruginosa* PCC7806 (Cyanobacteria): From views of gene expression and antioxidant system. *Chemosphere*, 2009, **75**: 924-928.