

学校编码: 10384

密级_____

学号: 22620071152392

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

凤眼莲质膜 Ca^{2+} -ATPase 对重金属胁迫的
分子响应研究

Molecular Responses of Plasma Membrane Ca^{2+} -ATPase of
Eichhornia Crassipes under Heavy Metal Stress

张 甬

指导教师姓名: 王克坚 教 授

李裕红 副教授

专 业 名 称: 环 境 科 学

论文提交日期: 2010 年 9 月

论文答辩时间: 2010 年 9 月

2010 年 9 月

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下，独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果，均在文中以适当方式明确标明，并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范（试行）》。

另外，该学位论文为（）课题（组）的研究成果，获得（）课题（组）经费或实验室的资助，在（）实验室完成。（请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称，未有此项声明内容的，可以不作特别声明。）

声明人（签名）：

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

2. 不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月 日

目 录

摘要.....	I
ABSTRACT.....	III
缩略语表.....	V
第一章 绪论.....	1
第一节 植物PM Ca ²⁺ -ATPase的研究进展.....	1
1 植物Ca ²⁺ -ATPase的类型.....	1
2 植物PM Ca ²⁺ -ATPase的理化特性及功能.....	2
3 植物PM Ca ²⁺ -ATPase的逆境应答及基因克隆.....	4
第二节 相关实验技术.....	5
1 质膜微囊的提取.....	5
2 基因克隆相关技术.....	6
3 荧光实时定量PCR技术.....	8
第三节 本课题的目的意义及研究内容.....	9
1 课题的目的意义.....	9
2 技术路线.....	11
第二章 凤眼莲PM型Ca ²⁺ -ATPase基因中间序列的克隆与分析.....	12
第一节 材料与方法.....	12
1 材料.....	12
2 方法.....	13
第二节 结果与分析.....	18
1 凤眼莲叶总RNA的提取质量鉴定.....	18
2 凤眼莲PM Ca ²⁺ -ATPase基因中间序列的PCR扩增.....	19
3 凤眼莲PM Ca ²⁺ -ATPase基因中间序列的分析.....	20
第三节 讨论.....	21
第三章 凤眼莲PM Ca ²⁺ -ATPase cDNA序列的克隆与分析.....	23

第一节 材料与方法	23
1 材料.....	23
2 方法.....	25
第二节 结果与分析	32
1 凤眼莲叶组织总RNA的提取质量鉴定	32
2 凤眼莲PM Ca ²⁺ -ATPase基因的3'RACE扩增	33
3 凤眼莲PM Ca ²⁺ -ATPase基因的5'RACE扩增	34
4 凤眼莲PM Ca ²⁺ -ATPase基因的cDNA序列的拼接和分析.....	37
第三节 讨论	42
第四章 重金属胁迫对凤眼莲PM Ca²⁺-ATPase活性及质膜氧化还原酶等生理活性的影响研究	44
第一节 材料与方法	44
1 材料.....	44
2 方法.....	45
第二节 结果与分析	47
1 标准曲线的建立.....	47
2 重金属对凤眼莲PM Ca ²⁺ -ATPase活性的影响	50
3 重金属对凤眼莲质膜3种氧化还原酶的影响.....	54
4 重金属对凤眼莲鲜物质量等生长生理指标的影响.....	59
第三节 讨论	60
第五章 重金属胁迫对凤眼莲PM Ca²⁺-ATPase基因表达的诱导研究	62
第一节 材料与方法	62
1 材料.....	62
2 方法.....	63
第二节 结果与分析	67
1 凤眼莲总RNA的提取质量鉴定	67
2 扩增效率分析.....	68
3 凤眼莲PM Ca ²⁺ -ATPase在重金属胁迫下的表达差异分析	69

第三节 讨论	74
结语	76
参考文献	78
攻读硕士学位期间参与的科研项目及成果	83
致谢	84

厦门大学博硕士论文摘要库

CONTENTS

Abstract in Chinese	I
Abstract in English	III
Lists of abbreviation	V
Chapter 1: Introduction	1
Section 1: Research progress of plant PM Ca²⁺-ATPase	1
1 The type of plant PM Ca ²⁺ -ATPase	1
2 The characteristics and function of plant PM Ca ²⁺ -ATPase	2
3 The stress response and gene clone of plant PM Ca ²⁺ -ATPase	4
Section 2: Relative technology and method	5
1 Isolation of plasma membrane vesicles.....	5
2 Technology about gene clone	6
3 Technology about RealTime PCR	8
Section 3: Purpose and content of studies	9
1 Purpose and Significance	9
2 Technical protocol	11
Chapter 2: Cloning and sequence analysis of mid-sequence of PM Ca²⁺-ATPase of <i>Eichhornia crassipes</i>	12
Section 1: Materials and methods	12
1 Materials.....	12
2 Methods	13
Section 2: Result and analysis	18
1 Isolation of total RNA of <i>Eichhornia crassipes</i>	18
2 PCR amplification of mid-fragment.....	19
3 Sequence analysis of mid-fragment	20
Section 3: Discussion	21

Chapter 3: Cloning and sequence analysis of PM Ca²⁺-ATPase of <i>Eichhornia crassipes</i>	23
Section 1: Materials and methods	23
1 Materials	23
2 Methods	25
Section 2: Result and analysis	32
1 Isolation of total RNA	32
2 3'RACE amplification of cDNA end	33
3 5'RACE amplification of cDNA end	34
4 Sequence assembly and analysis of cDNA sequence	37
Section 3: Discussion	42
Chapter 4: Study of the activities of PM Ca²⁺-ATPase and PM oxidoreductase in <i>Eichhornia crassipes</i> under heavy metal stress	44
Section 1: Materials and methods	44
1 Materials	44
2 Methods	45
Section 2: Result and analysis	47
1 Establishment of calibration curves	47
2 Activity of PM Ca ²⁺ -ATPase	50
3 Activities of three Oxidoreductase	54
4 Effect on physiological characteristic	59
Section 3: Discussion	60
Chapter 5: Study of the PM Ca²⁺-ATPase gene expression in <i>Eichhornia crassipes</i> under heavy metal stress	62
Section 1: Materials and methods	62
1 Materials	62
2 Methods	63
Section 2: Result and analysis	67

CONTENTS

1 Isolation of total RNA	67
2 Analysis of amplify efficiency	68
3 Analysis of differential expression of PM Ca ²⁺ -ATPase gene in <i>Eichhornia crassipes</i> under heavy metal stress	69
Section 3: Discussion	73
Summary	76
References	78
Research projects involved and papers published	83
Acknowledgements	84

摘要

凤眼莲 [*Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms], 属于雨久花科 (*Pontederiaceae*), 凤眼莲属 (*Eichhornia* Kunth), 多年生的水生草本植物。繁殖能力很强, 致河流、湖泊阻塞, 被人们列入恶性入侵杂草之列。但研究表明, 凤眼莲能有效地去除污水中氮、磷等营养元素吸收和富集各种重金属和有毒化合物等, 是一种监测和净化水体环境污染的良好植物材料。目前环境的日益恶化, 重金属污染情况越来越严重。本文从凤眼莲PM Ca^{2+} -ATPase的活性及相关基因表达的变化方面来研究凤眼莲对重金属的耐受及响应, 为我们以后利用凤眼莲的耐污和净化能力提供科学理论基础。

本文在比较了GenBank中已登录的多种植物PM型 Ca^{2+} -ATPase的氨基酸序列和核苷酸序列的基础上, 根据同源保守序列设计简并引物, 通过RT-PCR等技术从凤眼莲叶中扩增出凤眼莲PM Ca^{2+} -ATPase cDNA片段1015bp, GenBank登录接受号为FJ374757。根据此片段序列利用RACE技术, 获得一个长度为3361bp的凤眼莲PM Ca^{2+} -ATPase cDNA片段。经序列分析, 该片段编码区长度为2964bp, 编码的多肽含987个氨基酸, 理论分子量为107kDa, 且具有E1-E2 ATPase区和阳离子转运蛋白的C-端这两个保守区域。将该氨基酸序列进行BLASTp比较, 结果显示其与已知植物PM型 Ca^{2+} -ATPase具有较高的同源性, 其中与水稻的AK121250.1同源性达到79%。说明克隆的cDNA片段为凤眼莲PM型 Ca^{2+} -ATPase基因的片段, GenBank登录接受号为HQ218938。

在凤眼莲 PM Ca^{2+} -ATPase 对重金属胁迫的响应研究方面, 通过超高速差速离心水双相法获得高纯度质膜微囊, PM Ca^{2+} -ATPase 酶活测定实验表明, 在系列梯度浓度 Pb^{2+} 胁迫下, 随着 Pb^{2+} 浓度的提升, 凤眼莲根部 PM Ca^{2+} -ATPase 活性呈现先下降后升高的趋势, 而凤眼莲叶组织的 PM Ca^{2+} -ATPase 的活性则是先升高后降低; 在 Pb^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Cd^{2+} 单一与复合胁迫实验结果表明, 0.5mmol/L Zn^{2+} 与 0.1mmol/L Pb^{2+} 对 PM Ca^{2+} -ATPase 活性的作用关系存在拮抗作用; 而 Cd^{2+} 与 Zn^{2+} 在对 PM Ca^{2+} -ATPase 活性作用时, 之间表现出协同作用, 且 Zn^{2+} 在与低浓度的 Cd^{2+} 对凤眼莲进行复合胁迫时, 协同作用更加明显; 而在 20d 胁迫时, Pb^{2+} 和 Cd^{2+} 对 PM Ca^{2+} -ATPase 活性的作用关系也表现出拮抗作用。

在凤眼莲生长和其他生理指标对重金属胁迫的响应方面, Cd^{2+} 、 Zn^{2+} 单一和复合胁迫对凤眼莲根质膜NADH氧化酶、 $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ 还原酶及EDTA- Fe^{3+} 还原酶活性的影响效应有明显的差异。 Cd^{2+} - Zn^{2+} 复合胁迫对凤眼莲根质膜3种氧化还原酶活性的影响效应因作用时间和胁迫浓度的不同而有一定的差异, 在胁迫20h时, Cd^{2+} 与 Zn^{2+} 之间对凤眼莲根质膜3种氧化还原酶活性的作用关系较复杂, 因胁迫浓度的不同表现出协同或拮抗的关系; 胁迫20d时, Cd^{2+} 与 Zn^{2+} 对凤眼莲根质膜3种氧化还原酶活性的复合影响表现出明显的拮抗关系。研究结果显示, Cd^{2+} - Zn^{2+} 对凤眼莲根质膜氧化还原酶的复合作用效应与 Cd^{2+} 、 Zn^{2+} 的浓度比例及胁迫时间均相关。

相同的重金属处理方式下, 以 18S 为内参基因, 采用荧光 PCR 相对定量法, 检测 PM Ca^{2+} -ATPase 的基因表达情况。结果显示, 在系列梯度浓度 Pb^{2+} 胁迫下, 6h 时, 凤眼莲叶组织 PM Ca^{2+} -ATPase 对 Pb^{2+} 胁迫的浓度不敏感, 各浓度 Pb^{2+} 对 PM Ca^{2+} -ATPase 表达量的影响差异不大; 而在根组织中, 高浓度 Pb^{2+} 会诱导 PM Ca^{2+} -ATPase 基因的表达; 6d 时, 叶和根组织中 PM Ca^{2+} -ATPase 对 Pb^{2+} 浓度的敏感度不一致。在 Pb^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Cd^{2+} 的单一与复合胁迫下, 凤眼莲根组织 PM Ca^{2+} -ATPase 基本被抑制, 但在 0.5mmol/L Zn^{2+} 、0.05mmol/L Cd^{2+} + 5mmol/L Zn^{2+} 这两组的 PM Ca^{2+} -ATPase 反而受到强烈诱导, Zn^{2+} 的加入对 Pb^{2+} 作用于凤眼莲 PM Ca^{2+} -ATPase 活性的影响, 随 Zn^{2+} 的浓度不同而改变。

关键词:PM Ca^{2+} -ATPase; 凤眼莲; 克隆; 重金属胁迫; 荧光定量 PCR

Abstract

Eichhornia crassipes, belonging to *Eichhornia* Kunth, *Pontederiaceae*, is a perennial aquatic herb. *E. crassipes* with strong reproductive ability, which can easily disrupt waterways, is considered one of malignant invasive plants. But the research indicates that nutrient elements (N, P), heavy metal and toxic compounds can be efficiently removed from sewage by *Eichhornia crassipes*. The study of tolerance and response of *Eichhornia crassipes* to heavy metal, can provide a scientific basis for further study and exploitation of its purifying capacity.

A 1015bp cDNA segment from the *Eichhornia crassipes* was amplified by degenerate primers which were designed against the conserved regions which were found by the multiple alignment of amino acid sequences and nucleotide acid sequences of several plant PM Ca^{2+} -ATPase in Genbank. Based on the sequence of the cDNA segment, after RACE PCR, the full-length cDNA fragment was 3361bp, gained by overlapping sequences, and the analysis of the sequence indicates that it contains a 2964bp gene coding region, comprising 987 amino acid residues with a calculated molecular mass of 107kDa. The E1-E2 ATPase domain and cation ATPase C-terminal were identified as the conserved domain.

Multiple alignments revealed a high degree of homology between deduced amino acids of and putative PM Ca^{2+} -ATPase of other high plants. The highest identity was found to be 79% similarity with AK121250.1 that of *Oryza sativa*. The result demonstrates that the gene fragment cloned from *E. crassipes* is a putative PM Ca^{2+} -ATPase, and its GenBank accession number is HQ218938.

PM Ca^{2+} -ATPase activity of *E. Crassipes* in response to heavy metal stress was researched. Primarily, the high purity PM vesicles were isolated by differential ultracentrifugation and aqueous two-phase partitioning methods. The result of enzyme assay showed that, under Pb^{2+} gradient concentration, the activity of PM Ca^{2+} -ATPase increased first and then decreased in roots, but reversed in leaves; under Pb^{2+} , Zn^{2+} , Cd^{2+} single and combined stress, there was an antagonistic effect between Zn^{2+} and Pb^{2+} ; there was a synergistic effect between Zn^{2+} and Pb^{2+} , and the effect was

more obvious with the low Cd^{2+} concentration; there also was an antagonistic effect between Pb^{2+} and Cd^{2+} at 20d.

The growth and other physical indicators of *E. Crassipes* in response to heavy metal stress was researched. The results show that the effects of single and combined stress of Cd^{2+} and Zn^{2+} on activities of NADH oxidase, $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ reductase and EDTA-Fe^{3+} reductase in root plasma membranes of *E. crassipes* are obviously various. The effect of combined stress of Cd^{2+} - Zn^{2+} on three oxidoreductases activities in root plasma membranes of *E. crassipes* has a certain difference with different stress time and stress concentrations. When stressed for 20h, the combined effect of Cd^{2+} - Zn^{2+} on three oxidoreductases activities is very complex, which appears synergistic or antagonistic effect with different stress concentrations, while stressed for 20d, the combined effect is an obviously antagonistic effect. It can be concluded that the combined effect of Cd^{2+} - Zn^{2+} on oxidoreductases activities in root plasma membranes of *E. crassipes* is relate to Cd^{2+} or Zn^{2+} concentration proportion and stress time.

Real-time PCR was employed by using 18S as a reference gene to quantify the expression intensity of PM Ca^{2+} -ATPase gene in different heavy metal treatment. The expression level of PM Ca^{2+} -ATPase gene, treated with Pb^{2+} gradient concentration for 6h, was no obviously difference in leaves, but induced by high concentration Pb^{2+} in roots. While stressed for 6d, the sensitivity of PM Ca^{2+} -ATPase to Pb^{2+} concentration was difference between leaves and roots. With Pb^{2+} , Zn^{2+} , Cd^{2+} single and combined stress treatment, PM Ca^{2+} -ATPase activity of roots was strongly inhibited, but expression of PM Ca^{2+} -ATPase gene in 0.5mmol/L Zn^{2+} , 0.05mmol/L Cd^{2+} + 5mmol/L Zn^{2+} treatment was significantly induced, and the effect of Zn^{2+} - Pb^{2+} was very complex, which appears synergistic or antagonistic effect with different Zn^{2+} concentration.

Key word: PM Ca^{2+} -ATPase; Clone; *Eichhornia crassipes*; Heavy Metal Stress; Real-time PCR

缩略语表

缩写	英文名称	中文名称
AmP	Ampicillin	氨苄青霉素
BSA	Bovine serum albumin	牛血清蛋白
BLAST	Basic local alignment search tool	基本局部相似性对比搜索工具
bp	Base pair	碱基对
cDNA	Complementary DNA	互补脱氧核糖核酸
CTAB	Hexadecyl trimethyl ammonium bromide	十六烷基三甲基溴化铵
d	Day	天
DEPC	Diethyl pyrocarbonate	焦碳酸二乙酯
dNTPs	Deoxyribonucleoside triphosphate	脱氧核糖核苷三磷酸
DTT	Dithiothreitol	二硫苏糖醇
EDTA	Ethylenediamine tetraacetic acid	乙二胺四乙酸
h	Hour	小时
kDa	Kilodalton	千道尔顿
LB	Luria-Bertani medium	LB 培养基
min	Minute	分钟
mRNA	Messenger RNA	信使 RNA
NCBI	National centre for biotechnology information	美国国家生物信息中心
ORF	Open reading frame	开放阅读框
PCR	Polymerase chain reaction	聚合酶链式反应
PMSF	Phenylmethanesulfonyl fluoride	苯甲基磺酰氟
PVP	Polyvinylpyrrolidone	聚乙烯吡咯烷酮
RACE	Rapid amplification of cDNA ends	快速扩增 cDNA 末端
RT-PCR	Reverse-transcriptase polymerase chain reaction	反转录-聚合酶链式反应
rpm	Revolutions per minute	转数/分
RQ	Relative quantification	相对定量值
sec	Second	秒
SMART	Switching mechanism at 5' end of RNA transcript	转录本 5' 末端转换机制

第一章 绪论

钙离子 (Ca^{2+}) 做为细胞的第二信使, 调节着细胞内的信号通路, 在生物有机体的生命活动中起着重要的作用, 在调节生物生长、发育、代谢及适应环境中都有作用 (Sanders, 1999)。植物新陈代谢和生长发育除了内在的遗传调控, 还有外在的环境影响, 而对外在环境影响起着感受、传递和响应的, 就是以 Ca^{2+} 和 CaM (钙调素) 为核心的钙信号系统 (Snedden, et al, 2001)。试验证明, Ca^{2+} 信号系统启动的关键就在于胞质中 Ca^{2+} 浓度的改变 (Rudd, et al, 2001)。

随着近年来关于环境压力对生物有机体的影响的研究越来越广泛深入, 有研究表明, 在受到低温、渗透压、机械、光线等环境压力的影响时, 都会首先引起植物细胞内钙离子浓度水平的波动 (Bush, 1995; 章文华, 2000; Plieth, 2001), 继而产生了信号通路。目前为止, 还没有一种信号分子能像 Ca^{2+} 一样具有如此广泛的信使作用, 这使其成为植物对逆境反应机制研究中最为关注的信号分子和热门课题。

Ca^{2+} -ATPase 属于 P 型 ATPase 家族, 直接利用 ATP 驱动离子转运。它每消耗 1 个 ATP 可实现 1~2 个 Ca^{2+} 逆电化学势梯度转运。 Ca^{2+} -ATPase 对 Ca^{2+} 有较高的亲合性 ($K_m=0.1\sim 2\mu\text{mol/L}$), 但容量低 (Bush D S, 1995)。这表明此转运体可精细调节细胞质中的 Ca^{2+} 水平。钙泵有两种存在状态: E1 态 (Ca^{2+} 高亲和态) 和 E2 态 (Ca^{2+} 低亲和态)。E1、E2 通过与 Ca^{2+} 的结合、释放, 进行不同的反应, 伴随其天冬氨酸 (Asp) 的磷酸化而将 ATP 的能量储存入蛋白质中, 并在以后的水解过程中将能量释放出来。

做为 Ca^{2+} 外向转运器, Ca^{2+} -ATPase 在植物中起着重要作用: 第一, 在 Ca^{2+} 完成信使作用后, 将胞质中的 Ca^{2+} 浓度恢复到静息水平, 利于下一次信号的起始; 第二, 将 Ca^{2+} 储存进胞内和胞外的钙库, 同 Ca^{2+} 通道相互作用, 组成一条 Ca^{2+} 供应链, 从而保证细胞 Ca^{2+} 信号的顺利产生、传递和完成 (Klusener, et al, 1995; Harper, et al, 2001; Sanders, et al, 2002); 第三, 将 Ca^{2+} 精确分配到各细胞器中, 从而确保植物细胞各种生化反应的顺利进行 (White, et al, 2003)。

第一节 植物 PM Ca^{2+} -ATPase 的研究进展

1 植物Ca²⁺-ATPase的类型

根据Ca²⁺-ATPase蛋白序列的同源性，Axelsen在1998年提出植物细胞Ca²⁺-ATPase属于II A型和II B型两种不同基因家族蛋白质，其中II A型包括ER（Endoplasmic reticulum-type，内质网）型Ca²⁺-ATPase同系物，II B型包括PM（plasma membrane-type，质膜）型Ca²⁺-ATPase同系物（Axelsen, et al, 1998）。ER型和PM型在生化特征方面的差异有三个方面的：一，是否有底物专一性。PM对底物ATP没有专一性，除ATP外，还能以GTP（鸟苷三磷酸）、ITP（次黄苷三磷酸）等为水解底物，而ER类对底物ATP有专一性；二，是否受CaM激活（或者说能否自抑制）。PM受CaM激活，而ER型对CaM不敏感；三，是否被环匹阿尼酸（cyclopiazonic acid, CPA）专性抑制。PM型不被CPA专性抑制，但ER型会被CPA专性抑制。除了以上三点，II A家族没有N-端的自抑制区；而II B型的特征是在N-端具有一个自抑制区，并且在此区域内包含一个CaM结合位点和一个丝氨酸磷酸化位点。它们的催化活性受到胞质Ca²⁺浓度的调控（Evans, et al, 1998; Sze, et al, 2000）。

2 植物PM Ca²⁺-ATPase的结构及理化特性

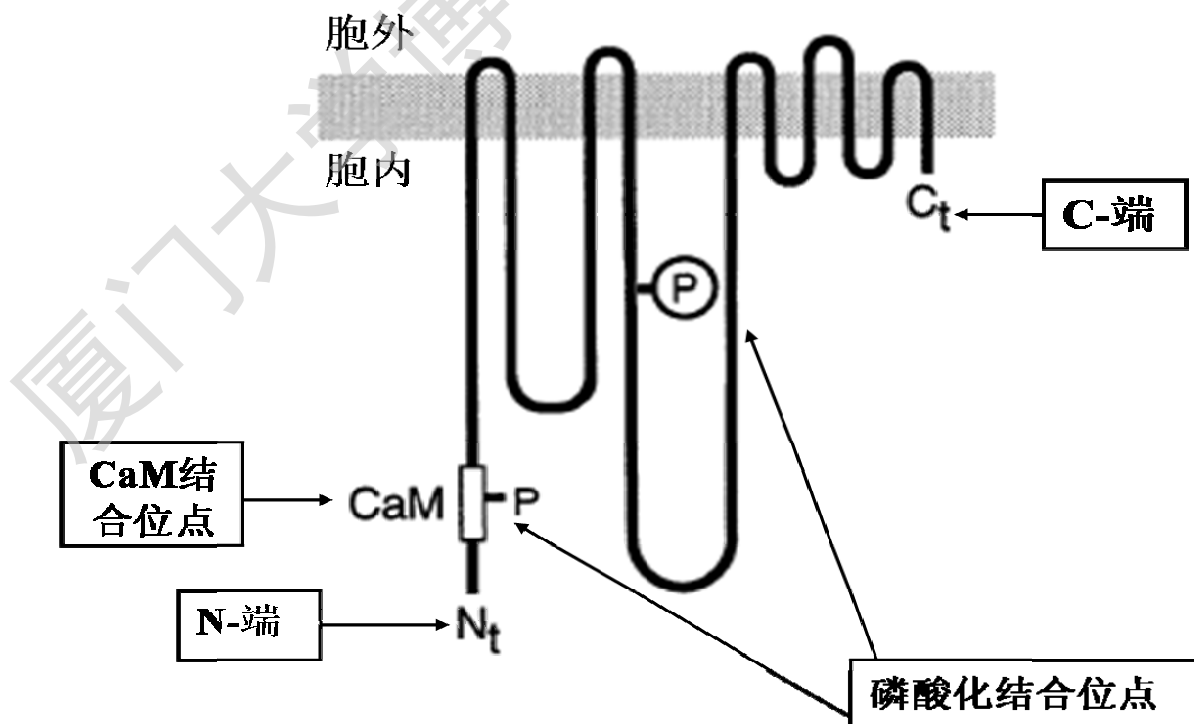


图1-1 植物PM Ca²⁺-ATPase的结构示意图

Fig. 1-1 The structure of plant PM Ca²⁺-ATPase

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库