

## 利用SSH文库技术分离鉴定常春藤应答甲醛胁迫相关基因

曾智东, 游览, 赵艳, 戚传娇, 李昆志, 陈丽梅\*

昆明理工大学生命科学与技术学院生物工程技术研究中心, 昆明650500

**摘要:** 很多研究结果证实常春藤可以有效吸收气体甲醛, 本研究结果表明常春藤叶片也可以有效吸收液体甲醛, 甲醛吸收量和时间呈指数函数关系。2、4、6 mmol·L<sup>-1</sup>液体甲醛处理均在常春藤叶片内诱发氧化胁迫, 但2 mmol·L<sup>-1</sup>液体甲醛胁迫在常春藤叶片内诱发的氧化胁迫水平较低。此外, 2 mmol·L<sup>-1</sup>液体甲醛胁迫还显著提高了常春藤叶片内可溶性糖和可溶性蛋白的含量, 说明常春藤对2 mmol·L<sup>-1</sup>液体甲醛胁迫的抗性较强。通过构建2 mmol·L<sup>-1</sup>液体甲醛胁迫2~48 h常春藤叶片的正向SSH cDNA文库, 分离鉴定常春藤叶片中的甲醛胁迫应答基因并对甲醛胁迫应答基因进行功能聚类, 结果说明光合作用和代谢相关基因占的比例最大, 表达分析结果证实光合作用和代谢相关基因在2 mmol·L<sup>-1</sup>液体甲醛胁迫的不同阶段被诱导上调表达, 这些基因的上调表达可能和甲醛在常春藤叶片内的代谢脱毒有关。此外, 参与植物对多种生物和非生物胁迫应答的14-3-3蛋白基因(*14-3-3p*)也受2 mmol·L<sup>-1</sup>液体甲醛胁迫的强烈诱导, 该基因的上调表达可能参与甲醛胁迫下常春藤叶片内可溶性蛋白的合成与抗氧化系统活性的调控作用, 是常春藤叶片应答甲醛胁迫的重要基因之一。

**关键词:** 常春藤; 甲醛胁迫应答基因; SSH cDNA文库; 光合作用相关基因; *14-3-3p*基因

## Isolation and Identification of Formaldehyde-Response Genes from Ivy (*Hedera nepalensis* var. *sinensis*) Leaves Using SSH cDNA Library

ZENG Zhi-Dong, YOU Lan, ZHAO Yan, QI Chuan-Jiao, LI Kun-Zhi, CHEN Li-Mei\*

Biotechnology Research Center, College of Life Science and Technology, Kunming University of Science and Technology, Kunming 650500, China

**Abstract:** Many studies have confirmed that ivy (*Hedera nepalensis* var. *sinensis*) can absorb gaseous formaldehyde (HCHO). The results of this study showed that ivy leaves could effectively absorb the liquid HCHO. The relationship between HCHO absorption and time fits the exponential function. Treatments of 2, 4, 6 mmol·L<sup>-1</sup> liquid HCHO all induced oxidative stress in ivy leaves, however, the oxidative stress level in 2 mmol·L<sup>-1</sup> HCHO-stress leaves was relative lower. Moreover, 2 mmol·L<sup>-1</sup> liquid HCHO-stress significantly increased the content of soluble sugar and soluble protein in ivy leaves, indicating that ivy leaves was more resistant to 2 mmol·L<sup>-1</sup> HCHO-stress. By constructing a suppression subtractive hybridization (SSH) cDNA library using ivy leaves treated with 2 mmol·L<sup>-1</sup> liquid HCHO for 2–48 h, the HCHO-responsive genes in ivy leaves were isolated and identified. The function clustering for HCHO-stress responsive genes indicated that photosynthesis- and metabolism-related genes accounted for the two largest proportions. RT-PCR analysis confirmed that the expression of photosynthesis- and metabolism-related genes was induced in different stages of the 2 mmol·L<sup>-1</sup> liquid HCHO-stress period. Up-regulated expression of these genes might be involved in HCHO-metabolism and -detoxification in ivy leaves. Moreover, a *14-3-3p* gene, which is involved in responses to many biotic and abiotic stresses, was strongly induced by 2 mmol·L<sup>-1</sup> liquid HCHO-stress. The up-regulated expression of *14-3-3p* gene might be associated with the synthesis of soluble proteins and the regulation of antioxidant system activity in ivy leaves under HCHO stress. These results suggested that *14-3-3p* gene might be one of the important HCHO stress-response genes.

**Key words:** *Hedera nepalensis* var. *sinensis*; formaldehyde-stress responsive genes; suppression subtractive hybridization (SSH) cDNA library; photosynthesis-related genes; *14-3-3p* gene

甲醛(HCHO)是一种非常重要的工业生产原料, 广泛用于化工行业、建材行业以及纺织行业等生产过程中, 这些行业生产后所排放的废水中含有大量甲醛, 甲醛是一种非常活泼的有毒化合

收稿 2014-01-26 修定 2014-02-25

资助 国家自然科学基金(30970263)。

\* 通讯作者(E-mail: chenlimeikm@126.com; Tel: 0871-65920213)。

物,能与蛋白质、核酸和脂类等生物大分子物质产生非特异反应生成交联物,使这些生物大分子物质失去生物学活性和功能(Feldman 1973)。利用物理或化学等方法治理废水中的甲醛污染成本高且容易造成二次污染(Tryk等2000;陈群玉2008;Fujishima等2000)。利用植物净化甲醛污染的方法具有操作简单、自然、环保的特点,所以这方面的研究在植物学领域受到越来越多学者的重视。

通过甲醛熏蒸实验的研究结果表明观赏植物对甲醛的去除途径主要是通过茎叶吸收,芭蕉(*Musaceae*)、虎尾兰(*Sansevieria trifasciata*)和常春藤(*Hedera nepalensis* var. *sinensis*)等植物单位叶面积去除气体甲醛污染的性能较好(刘艳丽等2008)。Wolverton等(1984)的研究表明一盆常春藤在24 h的处理期内能去除1 m<sup>3</sup>空气污染的90%甲醛。轩秀霞等(2013)的研究证实常春藤叶片吸收的气体H<sup>13</sup>CHO在叶片细胞中可通过C1代谢网络和光合作用同化为<sup>13</sup>CH<sub>3</sub>OH、[5-<sup>13</sup>C]Met、[U-<sup>13</sup>C]Gluc、[U-<sup>13</sup>C]Fruc、[3-<sup>13</sup>C]Ser、[2-<sup>13</sup>C]Gly、[5-<sup>13</sup>C]Arg、[3-<sup>13</sup>C]Ala、[4-<sup>13</sup>C]malate、[3-<sup>13</sup>C]malate及少量的[2-<sup>13</sup>C]Ser和H<sup>13</sup>COOH。

甲醛是有毒的化合物,利用活体植物清除环境中污染甲醛时,植物也受到环境中甲醛的胁迫,因为植物吸收甲醛的能力不仅与其代谢能力有关,还和其应答甲醛胁迫的机理有关。常春藤是常绿藤本植物,对环境适应能力很强,所以常用作环境绿化植物。为了在转录水平上了解常春藤应答甲醛胁迫的机理,本研究应用抑制消减杂交(suppression subtractive hybridization, SSH)技术分离鉴定常春藤叶片受甲醛胁迫调控基因,从而为常春藤在治理甲醛污染中的应用提供理论依据。

## 材料与amp;方法

### 1 实验材料

选用温室中培养的盆栽常春藤[*Hedera nepalensis* var. *sinensis* (Tobl.) Rehd.]作为实验材料,植株在恒温25 ℃、光照12 h/黑暗12 h的环境中生长6个月后备用。

### 2 检测方法

#### 2.1 常春藤叶片吸收液体HCHO能力的检测

从盆栽常春藤植株上摘取叶片后剪切成1 cm×1 cm左右的小块,称1 g新鲜叶片用升汞消毒,

然后分别置于2、4和6 mmol·L<sup>-1</sup> 100 mL的甲醛处理液(含5 mmol·L<sup>-1</sup> KHCO<sub>3</sub>, 0.1% MES)中,同时以不加叶片的相同甲醛溶液为对照(CK)检测甲醛的挥发程度。处理样品均置于23 ℃、有持续光照的组培室中摇床振荡(100 r·min<sup>-1</sup>)培养,在处理的不同时间点(0、12、24、36、48、60、72 h)用Nash (1953)法测定处理液中残留甲醛的含量。溶液剩余甲醛含量=处理液中残留甲醛的含量/处理液起始的甲醛含量×100%; CK中甲醛挥发的量=处理液起始的甲醛含量-CK中溶液剩余甲醛含量; 叶片吸收甲醛含量=(处理液起始的甲醛含量-溶液剩余甲醛百分比-CK中甲醛挥发的量)/处理液起始的甲醛含量×100%。

#### 2.2 可溶性糖和可溶性蛋白含量测定

常春藤叶片(1 g)消毒后分别置于2、4和6 mmol·L<sup>-1</sup> 100 mL的甲醛处理液中处理0 h(对照)和48 h,在液氮中磨碎后用Tirs-HCl缓冲液(1 mol·L<sup>-1</sup>, pH 7.5)抽提,离心收集上清,根据Yemm和Willis (1954)的方法测定可溶性糖含量;用蛋白抽提缓冲液[Tris-HCl (pH 8.0) 50 mmol·L<sup>-1</sup>, 10%甘油,β-巯基乙醇10 mmol·L<sup>-1</sup>, PMSF 1 mmol·L<sup>-1</sup>, EDTA 2 mmol·L<sup>-1</sup>, 10%不溶性PVP]提取可溶性蛋白,采用Bradford法测定蛋白质浓度。

#### 2.3 过氧化氢(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)、丙二醛(MDA)和羰基化蛋白质(PC)含量测定

常春藤叶片的处理同2.1节,处理后的叶片在液氮中磨碎后用Tirs-HCl缓冲液(1 mol·L<sup>-1</sup>, pH 7.5)抽提,离心收集上清。MDA和PC含量的测定参考Gurel等(2005)的方法; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>含量的测定参考Gay和Gebicki (2003)的方法。

#### 2.4 数据统计分析

所有的生理生化指标分析均进行3次生物学重复。用SPSS软件对所得数据进行统计学分析和差异显著性分析,不同字母代表同期处理与对照间在P<0.05水平上存在显著性的差异,棒线表示标准差(n=3)。

### 3 SSH cDNA文库的构建及克隆的鉴定

#### 3.1 总RNA的提取和mRNA的分离

常春藤叶片(1 g)消毒后置于2 mmol·L<sup>-1</sup>甲醛处理液(100 mL)中分别处理0(对照)、2、4、12、24和48 h,然后在液氮中磨碎,用Trizol试剂(宝生物,日本)提取总RNA。总RNA溶解于DEPC处理

水中, 然后用DNase I (Promega)处理彻底去除基因组DNA, 用苯酚/氯仿抽提纯化总RNA样品, 最后用乙醇沉淀后重新溶于DEPC处理水中。用琼脂糖凝胶电泳和酶标仪检测RNA的质量和浓度, mRNA的分离用基因公司的mRNA分离试剂盒(Oligotex mRNA Midi Kit), 操作按产品说明书进行。分离到的mRNA用琼脂糖凝胶电泳检测质量, 确认没有核糖体RNA污染后用于SSH cDNA文库的构建。

### 3.2 SSH cDNA文库的构建

利用Clontech公司的PCR-Select™ cDNA Subtraction Kit构建SSH cDNA文库。将分离纯化后的mRNA样品逆转录成cDNA, cDNA第一链的合成用AMV逆转录酶, 第二链的合成用*E. coli*的DNA聚合酶I。以甲醛处理叶片提取的RNA逆转录产生的双链cDNA (dscDNA)为实验方(tester), 以无甲醛处理(0 h处理样品)的对照样品提取的RNA逆转录产生的双链cDNA为驱动方(driver)。纯化实验方和驱动方cDNA, 然后用*RsaI*完全酶切, 将酶切后的实验方cDNA一分为二, 分别连接不同的接

头(接头1和接头2R)。连接反应结束后将实验方cDNA与过量驱动方cDNA进行两轮分子杂交。杂交产物稀释后, 接着进行两轮特异PCR。对PCR产物进行T/A克隆, 转化大肠杆菌后挑选1 000个阳性克隆组成SSH cDNA文库。

### 3.3 文库克隆的鉴定和测序分析

用接头引物1和接头引物2R进行PCR扩增SSH cDNA文库中每个克隆的插入片段, 分析克隆插入片段的有无及片段的大小。挑选插入片段大于300 bp的克隆进行单向测序, 分析测序结果, 去除序列相同的克隆获得单一的EST序列。序列通过BLASTN比对后评分高于40的确定为功能已知的EST序列, 与NCBI上所有数据库均没有相似序列的EST被确为功能未知的EST序列, 所有EST序列上传GenBank获得各基因在基因库的登录号。

### 3.4 RT-PCR分析

从功能聚类基因中随机选择部分基因, 以18S rRNA为内参用RT-PCR进行基因表达谱分析, PCR反应使用的引物序列及其扩增产物的长度如表1所示。RT-PCR分析用的春藤叶片(1 g)消毒后置于

表1 RT-PCR用引物序列

Table 1 Primer sequences of RT-PCR analysis

基因名称	正向引物序列(5'→3')	反向引物序列(5'→3')	扩增片段大小/bp
<i>18S</i>	GGGCTATGCTCGTTGCTG	CTGCCTTCCTTGGATGTGGT	204
<i>LHC</i>	CAGGTGCTGCAAGAGGTT	TGAAATCAGAAGGTGGC	260
<i>Lhca1</i>	GTTGGCAAGTTCTTTCTC	TCTACCCTGTTCTGTGATT	210
<i>Lhcb5</i>	TTTTCAACAGGTCCTTCTC	GTTGTTCTTCTTGGTGGC	224
<i>Bcp</i>	CAAGGAAATTAGCAGCAT	GAGTCAGCCAATAAAGCA	387
<i>Ooep</i>	TTGTTGCAGCCACAGTTT	CACTTTGACTTGGGGTA	212
<i>Cab4</i>	CCCACCGAAGAGGCTAAA	TTCCTGCGGAATGAGTA	194
<i>ICL</i>	AGGTATGCCAATGAGAC	TACCCATTCCCTTCTGT	236
<i>PETP</i>	GTGCAACGACAGAGGAG	TAAAGACCCGTGGACCTG	240
<i>Por1</i>	GGCTGCATTGCCACAACA	CCTCCGTGCCTTCTCCA	247
<i>Ri5pe</i>	CAAACGGCAACTGCTACA	CGGGCAGGTGCTTTATTG	244
<i>Dxps</i>	ATTGGAGGATTGGCTCT	TGACAAGGTGAAGGCTGT	214
<i>Pcb</i>	CTTGTAAGTGCTTTCTCA	GATGACGGTTCATTAGTTTT	222
<i>Mofad</i>	TGGGTTTCTGTCTGAT	TCACTTCGCATTGTTTC	404
<i>14-3-3p</i>	TGAAAGGGCCTGCCACCT	CCACGCCACTTACTCTGC	220
<i>PAL2</i>	CGGAGGCATTCCACTGAC	ACAACCTCAGCAGCCGAGG	180

*LHC*: lihg-t-harvesting complex protein (捕光复合体); *Lhca1*: chlorophyll a/b-binding protein (叶绿素a/b结合蛋白-Lhca1); *Lhcb5*: chloroplast pigment-binding protein CP26 (叶绿体色素结合蛋白CP26); *Bcp*: biotin carboxyl carrier protein of acetyl-CoA carboxylase (乙酰辅酶A羧化酶-生物素羧基载体蛋白); *Ooep*: oxygen-evolving enhancer protein 2 (放氧增强蛋白2); *Cab4*: light-harvesting chlorophyll a/b-binding protein (叶绿体A/B结合蛋白-Cab4); *ICL*: isocitrate lyase (异柠檬酸裂解酶); *PETP*: photosynthetic electron transfer-like protein (光合电子转运蛋白); *Por1*: NADPH-protochlorophyllide oxidoreductase (NADPH-原叶绿素氧化还原酶); *Ri5pe*: ribulose-5-phosphate epimerase (核酮糖-5-磷酸异构酶); *Dxps*: 1-deoxyxylulose-5-phosphate synthase (1-脱氧木酮糖-5-磷酸合成酶); *Pcb*: mRNA for plastocyanin b (质体蓝素b); *Mofad*: microsomal omega-6 fatty acid desaturase ( $\omega$ -6-脂肪酸去饱和酶); *14-3-3p*: 14-3-3 like protein; *PAL2*: phenylalanine ammonia-lyase 2 (苯基丙氨酸解氨酶2)。



2 mmol·L<sup>-1</sup>甲醛处理液(100 mL)中分别处理0 (对照)、2、4、12、24、48 h, 处理结束后用Trizol试剂提取总RNA, 通过凝胶电泳检测RNA的质量合格后测定RNA的浓度, 从各RNA样品中取4 μg的份量, 用M-MLV Reverse Transcriptase (Promega公司)反转录合成cDNA。PCR反应使用*Taq* DNA聚合酶(天根公司), 在20 μL反应体系中含有1×PCR缓冲液、200 μmol·L<sup>-1</sup>的dNTP、0.15 μmol·L<sup>-1</sup>的上游引物和下游引物, 1 U的*Taq*聚合酶和等量的第一链cDNA模板, 用水补足至20 μL。

## 实验结果

### 1 常春藤叶片对液体甲醛的吸收能力

之前的很多研究证实常春藤能有效吸收气体甲醛(安雪等2010), 为了考查常春藤叶片对液体甲醛的吸收能力, 用2、4和6 mmol·L<sup>-1</sup>甲醛溶液处理常春藤叶片。通过检测处理液中残留甲醛的含量(IVY2、IVY4、IVY6)和不加叶片的对照处理液(CK2、CK4、CK6)中甲醛的挥发量(图1-A)来测定2、4和6 mmol·L<sup>-1</sup>处理液中常春藤叶片对甲醛的吸收能力。结果说明2 mmol·L<sup>-1</sup> (低浓度)甲醛溶液用常春藤叶片处理72 h时, 处理液中剩余甲醛的浓度几乎为0 (图1-A), 而在对照样品中甲醛浓度几乎和处理前一样(图1-A), 这说明常春藤叶片能完全吸收低浓度处理液中的甲醛。在高浓度(4和6 mmol·L<sup>-1</sup>)甲醛溶液中加入常春藤叶片处理72 h时,

4和6 mmol·L<sup>-1</sup>处理液中剩余甲醛的含量分别为17.2%和37.4%, 说明常春藤叶片未能完全吸收处理液中的甲醛, 以上结果说明常春藤叶片吸收低浓度甲醛的效率好于高浓度甲醛溶液。2 mmol·L<sup>-1</sup>甲醛处理72 h后常春藤叶片并没有出现损伤症状且叶片状态仍然维持正常, 而常春藤叶片经过高浓度甲醛(4和6 mmol·L<sup>-1</sup>)处理72 h后叶片边缘出现明显的褐化现象, 说明较高浓度的甲醛胁迫对常春藤叶片造成一定程度的损伤, 从而影响了其甲醛吸收能力。

根据各处理液起始的甲醛含量、没有加叶片的对照处理液中甲醛的挥发量和处理液中残留甲醛的含量(图1-A), 计算各个时间点常春藤叶片对液体甲醛的吸收量制作吸收曲线(图1-B), 结果说明甲醛吸收量和时间呈指数函数关系。在2 mmol·L<sup>-1</sup>甲醛处理液中, 常春藤叶片在0~24 h内吸收HCHO平均速率为15.3 μmol·L<sup>-1</sup>·g<sup>-1</sup>(FW)·h<sup>-1</sup>, 在24~48 h内甲醛吸收平均速率降低为9.37 μmol·L<sup>-1</sup>·g<sup>-1</sup>(FW)·h<sup>-1</sup>; 在4和6 mmol·L<sup>-1</sup>处理液中, 常春藤叶片在0~24 h内HCHO的吸收速率分别为23.7和31.9 μmol·L<sup>-1</sup>·g<sup>-1</sup>(FW)·h<sup>-1</sup>, 在24~48 h内吸收速率分别降低为15.2和10.5 μmol·L<sup>-1</sup>·g<sup>-1</sup>(FW)·h<sup>-1</sup>。

### 2 液体甲醛胁迫对常春藤叶片中可溶性糖和可溶性蛋白含量的影响

可溶性糖是光合作用的直接产物, 植物在受到逆境胁迫时体内积累的很多有毒物质的脱毒需

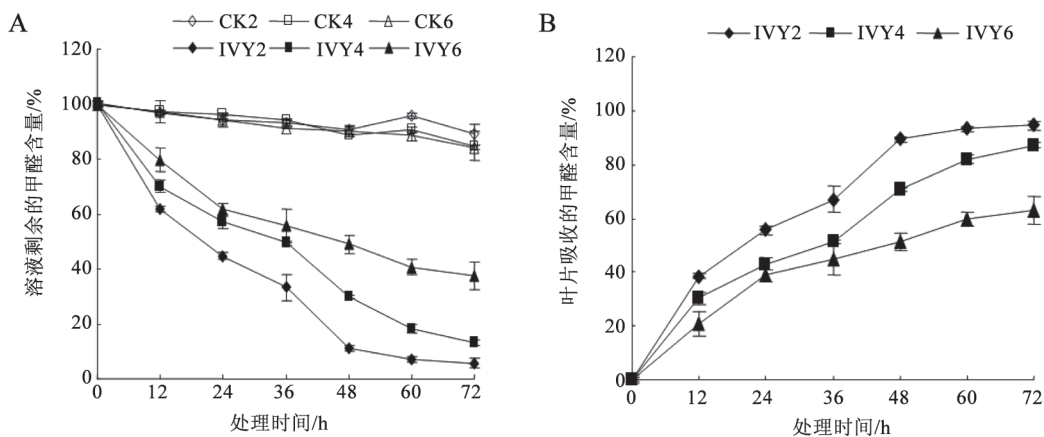


图1 常春藤叶片对不同浓度液体甲醛的吸收

Fig.1 Absorption of different HCHO concentrations by ivy leaves

A: 用常春藤叶片处理2 mmol·L<sup>-1</sup> (IVY2)、4 mmol·L<sup>-1</sup> (IVY4)和6 mmol·L<sup>-1</sup> (IVY6)甲醛溶液后剩余甲醛的含量, 其中CK2、CK4和CK6分别为未加叶片的空白对照(用来监测甲醛的挥发情况); B: 常春藤叶片对2 mmol·L<sup>-1</sup> (IVY2)、4 mmol·L<sup>-1</sup> (IVY4)和6 mmol·L<sup>-1</sup> (IVY6)液体甲醛的吸收含量。

要糖基化修饰, 所以通过增加可溶性糖的合成可以提高植物对逆境胁迫的抗性。分析2、4和6 mmol·L<sup>-1</sup>液体甲醛胁迫48 h常春藤叶片中可溶性糖的含量(图2-A), 结果说明低浓度(2 mmol·L<sup>-1</sup>)液体甲醛胁迫48 h, 常春藤叶片可溶性糖含量上升了24%, 4 mmol·L<sup>-1</sup>液体甲醛处理常春藤叶片48 h后其可溶性糖含量上升了26%, 说明在2和4 mmol·L<sup>-1</sup>液体甲醛胁迫48 h后, 常春藤叶片可能通过提高可溶性糖的积累来增加其对甲醛胁迫的抗性。高浓度(6 mmol·L<sup>-1</sup>)液体甲醛胁迫48 h后常春藤叶片内的可溶性糖含量仅上升了14%, 说明高浓度甲醛的胁迫可能影响了常春藤叶片内可溶性糖的合成, 因此减少可溶性糖的积累。

提高抗逆境相关可溶性蛋白的积累量也是提高植物抗逆能力的一个途径。分析2、4和6 mmol·L<sup>-1</sup>液体甲醛胁迫48 h常春藤叶片中可溶性蛋白的含量(图2-B), 结果说明通过低浓度(2 mmol·L<sup>-1</sup>)液体甲醛处理常春藤叶片48 h, 其可溶性蛋白含量上升37%, 而经过高浓度(4、6 mmol·L<sup>-1</sup>)液体甲醛处理的常春藤叶片48 h, 其可溶性蛋白含量仅上升了9%和6%。这些结果说明在低浓度液体甲醛胁迫下, 常春藤叶片内可溶性蛋白的积累可能也是提高其抗甲醛胁迫能力的一个组成部分; 高浓度液体甲醛的胁迫可能也影响了常春藤叶片内可溶性蛋白的合成, 因此减少可溶性蛋白的积累。

### 3 液体甲醛胁迫对常春藤叶片氧化胁迫相关生理特性的影响

MDA变化反映膜脂过氧化程度, PC变化反映蛋白质受氧化损伤的程度, 而H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>含量的变化是衡量植物体内内氧化胁迫水平的重要指标。分析2、4和6 mmol·L<sup>-1</sup>液体甲醛胁迫48 h常春藤叶片中H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>(图3-A)、MDA(图3-B)和PC(图3-C)的含量, 结果说明与没有甲醛胁迫时的对照(0 h处理)相比, 常春藤叶片中H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>和MDA含量均随着甲醛处理的浓度的增加而显著上升, 2、4和6 mmol·L<sup>-1</sup>液体甲醛处理常春藤叶片中H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>的含量分别增加39.97%、70.78%、85.1%; MDA的含量分别增加104.7%、137.16%、176.06%。2和4 mmol·L<sup>-1</sup>液体甲醛处理常春藤叶片中PC含量增加的幅度约为51.51%、50.53%, 而6 mmol·L<sup>-1</sup>液体甲醛处理常春藤叶片中PC含量上升幅度比2和4 mmol·L<sup>-1</sup>的大, 约为61.75%。这些结果说明2、4和6 mmol·L<sup>-1</sup>液体甲醛胁迫均在常春藤叶片内诱发了氧化胁迫, 随着甲醛浓度的增加, 叶片内氧化胁迫的水平呈上升趋势。

### 4 液体甲醛胁迫常春藤叶片正向SSH cDNA文库的构建及甲醛胁迫应答基因的功能聚类

在2 mmol·L<sup>-1</sup>液体甲醛胁迫48 h后常春藤叶片内积累的可溶性糖和蛋白比4和6 mmol·L<sup>-1</sup>的大, 此外氧化胁迫相关指标也比较低, 说明2 mmol·L<sup>-1</sup>液体甲醛处理使常春藤叶片受到胁迫程度较低, 叶

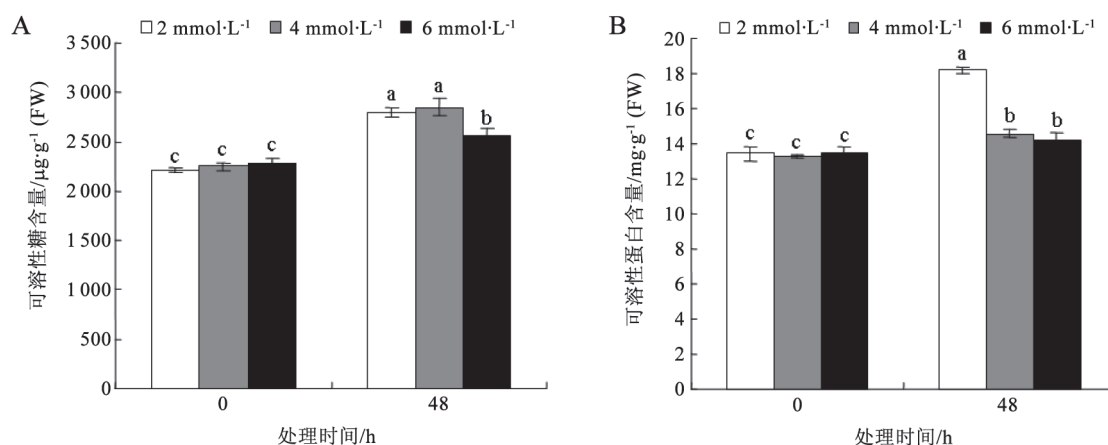


图2 液体甲醛处理对常春藤叶片中可溶性糖含量(A)和可溶性蛋白含量(B)的影响

Fig.2 Effects of HCHO treatment on contents of soluble sugars (A) and soluble proteins (B) in ivy leaves

同一测定项目柱形上不同小写字母表示差异显著( $P < 0.05$ )。

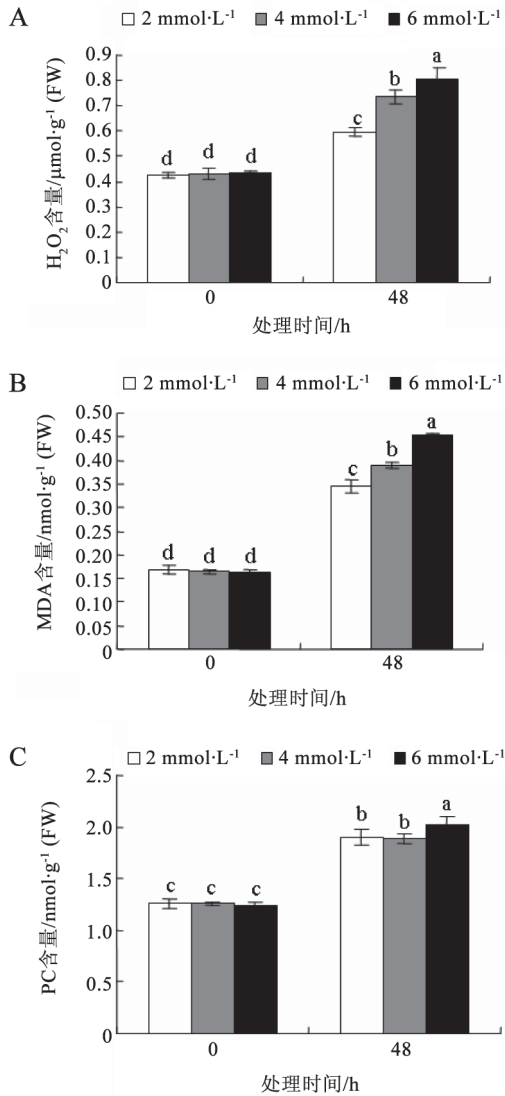


图3 液体甲醛处理对常春藤叶片中H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>含量(A)、MDA含量(B)和PC含量(B)的影响

Fig.3 Effects of HCHO treatment on contents of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (A), MDA (B) and PC (C) in ivy leaves

同一测定项目柱形上不同小写字母表示差异显著( $P < 0.05$ )。

片的健康状态较好并具有较高的甲醛吸收效率,因此利用2 mmol·L<sup>-1</sup>甲醛处理2~48 h的常春藤叶片建立一个正向SSH cDNA文库,分离鉴定常春藤叶片中甲醛胁迫上调的基因。将SSH cDNA文库的1 000个克隆通过菌液PCR验证每个克隆中插入片段的长度,一共得到了238个插入片段大小在300 bp以上的阳性克隆,对这些克隆的插入片段进行测序,序列比对后共得到163条非重复的EST。

测序获得的数据通过BLASTN与NCBI上的非

冗余核苷酸数据库进行比对,为了对所获得的EST进行功能分类,对所获得的EST初步分析具有功能的通过与Uniprot数据库(<http://www.uniprot.org/>)中已知功能的蛋白进行比较,并通过Gene Ontology (<http://www.geneontology.org/>)数据库进行基因注释,在所获得的163条EST中已知功能的EST有94条,未知功能的EST有66条,新EST有3条,分别占本文库总EST的58%、40%和2%。已知功能的94条EST按其蛋白的功能进行聚类共分为8类(图4),在这8类基因中,代谢相关基因、光合作用相关基因以及防御、胁迫与细胞凋亡相关基因占文库功能已知EST的大部分,分别为16%、16%和9%。其次为信号传导与转录、细胞结构与细胞生长、蛋白质代谢、能量代谢以及转运5个部分,分别占功能已知EST的8%、3%、3%、2%和1%。

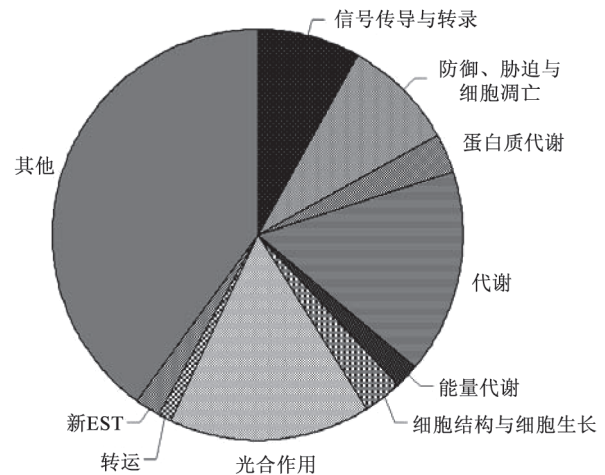


图4 常春藤应答甲醛胁迫相关基因的功能聚类  
Fig.4 Functional clustering of formaldehyde-response genes in ivy leaves

## 5 甲醛胁迫上调的光合作用、代谢、防御、胁迫及细胞凋亡相关基因

在SSH文库鉴定出的甲醛上调基因中,有19个基因与光合作用和叶绿体结构有关,这些基因具体信息如表2所示,其中9个基因包括*LHC*、*Lhca1*、*Lhcb5*等为光系统中捕光复合体结构相关基因。文库中还鉴定出上调的防御、胁迫与细胞凋亡相关基因11个(表2),其中包括广泛参与各种生物和非生物胁迫应答的*14-3-3p*基因以及参与热激应答的两个热激蛋白基因(*GW811154*和*GW-*

表2 常春藤中甲醛胁迫上调表达的应答基因

Table 2 HCHO stress responsive up-regulated expression of genes in ivy

基因功能	GenBank登录号	同源序列	同源相似性/%	E值	同源序列物种	
防御、胁迫和细胞凋亡相关基因	GW811062	胁迫相关蛋白1	87	1.00E-19	五指茄	
	GW811066	半胱氨酸蛋白酶1	83	6.00E-120	美味猕猴桃	
	GW811086	胁迫相关蛋白2	86	2.00E-37	五指茄	
	GW811143	类金属硫因蛋白	79	2.00E-13	葡萄	
	GW811154	热激蛋白82	81	2.00E-76	烟草	
	GW811173	热激蛋白18.1	84	2.00E-14	紫花苜蓿	
	GW811178	病变诱导相关蛋白	75	6.00E-23	拟南芥	
	GW811206	多铜氧化酶	76	4.00E-64	蓖麻	
	GW811100	乙醇脱氢酶	75	2.00E-29	蓖麻	
	GW811126	短链脱氢酶	77	3.00E-27	蓖麻	
	GW811222	<i>14-3-3p</i>	85	5.00E-75	蓖麻	
	代谢相关基因	GW811063	S-腺苷-甲基转移酶	75	1.00E-07	蓖麻
		GW811171	核酮糖-5-磷酸异构酶	86	2.00E-68	蓖麻
		GW811079	1-脱氧-D-木酮糖-5-磷酸合成酶	80	7.00E-88	蓖麻
GW811158		3-酮脂酰-CoA还原酶	75	8.00E-28	蓖麻	
GW811175		1-脱氧木酮糖-5-磷酸合成酶	81	1.00E-76	蓖麻	
GW811204		微粒体 $\omega$ -6脂肪酸脱氢酶	78	4.00E-123	欧芹	
GW811211		苯丙氨酸解氨酶2	84	6.00E-33	烟草属	
GW811195		N-乙酰转移酶	77	2.00E-24	蓖麻	
GW811097		$\Delta^2$ 脂肪酸乙炔酶	90	4.00E-136	常春藤	
光合作用与叶绿体结构相关基因		GW811069	捕光复合体I蛋白( <i>Lhca4</i> )	81	8.00E-87	毛果杨
	GW811071	叶绿素a/b结合蛋白	84	2.00E-75	葡萄	
	GW811076	光捕获叶绿素a/b结合蛋白	99	0	西洋常春藤	
	GW811078	光合放氧复合体23 kDa亚基	87	1.00E-23	菠菜	
	GW811082	光系统I铁氧化还原蛋白结合蛋白	80	4.00E-38	樟子松	
	GW811105	镁原卟啉IX单酯环化酶	88	4.00E-154	蓖麻	
	GW811106	叶绿素a/b结合蛋白	84	6.00E-68	蓖麻	
	GW811108	叶绿体色素结合蛋白CP26	80	4.00E-76	烟草	
	GW811112	光复合体II 6.1 kDa多肽	82	1.00E-57	菠菜	
	GW811116	类金属蛋白酶-FtsH	84	1.00E-89	烟草	
	GW811123	叶绿素a/b结合蛋白	80	3.00E-118	芥菜	
	GW811125	放氧增强蛋白2	76	2.00E-36	蓖麻	
	GW811165	光合电子传递蛋白	100	9.00E-141	人参	
	GW811129	捕光叶绿素a/b结合蛋白质( <i>Cab4</i> )	86	8.00E-53	拟南芥	
	GW811133	捕光叶绿素a/b结合蛋白质	79	2.00E-68	烟草	
	GW811149	光捕获复合体II蛋白( <i>Lhcb5</i> )	80	2.00E-113	毛果杨	
	GW811161	质体蓝素A蛋白	77	2.00E-40	蓖麻	
	GW811167	NADPH:原叶绿素酸酯氧化还原酶( <i>POR1</i> )	88	3.00E-109	胡萝卜	
GW811188	质体蓝素B	74	2.00E-34	小黑杨		

811173)。文库中与代谢相关的基因有9个, 其中包括参与戊糖磷酸途径的*Dxps*和*Ri5pe*; 参与体内酚类化合物合成的*PAL2*以及参与细胞膜合成的*Mofad*。

#### 6 甲醛胁迫应答基因的RT-PCR验证

为了验证SSH文库数据的可靠性, 随机选择了15个基因(表1), 其中包括8个与光合作用相关基

因(*LHC*、*Lhca1*、*Lhcb5*、*Oeep*、*Cab4*、*PETP*、*Por1*和*Pcb*)、6个代谢相关基因(*Bcp*、*ICL*、*Ri5pe*、*Dxps*、*Mofad*和*PAL2*)和一个胁迫应答相关基因(*14-3-3p*)。用RT-PCR分析2 mmol·L<sup>-1</sup>甲醛胁迫0 (对照)、2、4、12、24和48 h常春藤叶片中这些基因的表达情况(图5)。结果表明, 所选的8个与光合作用相关基因均呈现上调表达模式(图



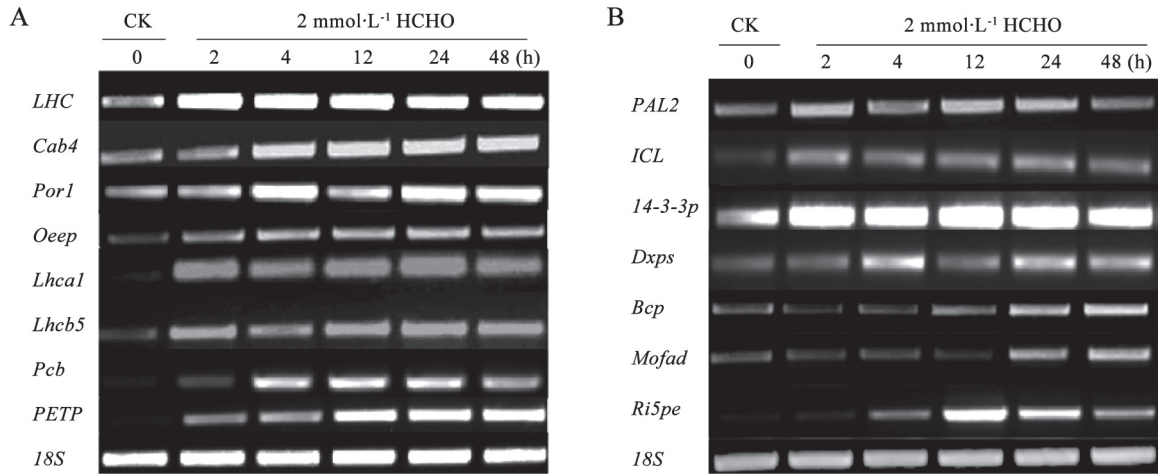


图5 RT-PCR分析光合作用(A)和代谢与防御相关基因(B)在2 mmol·L<sup>-1</sup>液体甲醛处理不同时间的常春藤叶片中的表达情况  
Fig.5 RT-PCR analysis of the expression of the photosynthesis- (A) and metabolism- as well as defense-related genes (B) in ivy leaves exposed to 2 mmol·L<sup>-1</sup> HCHO  
RT-PCR反应程序中除18S rRNA为26个循环外,其他基因均为28个循环。

5-A), 其中有3个基因(*Cab4*、*Por1*和*LHC*)在没有甲醛胁迫的对照样品中表达水平较高, 在甲醛胁迫起始的2 h, 这些基因的表达就受到诱导上调, 此后随着甲醛胁迫时间的延长, 表达水平逐渐上升; 另外的5个基因(*Lhca1*、*Lhcb5*、*Oeep*、*PETP*和*Pcb*)在对照样品中的表达水平较低, 在甲醛胁迫起始的2 h, 这几个基因的表达就受到强烈的诱导, 表达水平迅速升高, 此后随着甲醛胁迫时间的延长, 表达水平仍然呈上升的趋势。所选的4个代谢相关基因和*14-3-3p*基因的表达也都呈现上调表达模式(图5-B), 其中3个基因(*PAL2*、*ICL*和*14-3-3p*)的表达在甲醛胁迫起始的2 h就受到诱导上调, 此后随着甲醛胁迫时间的延长, 表达呈现逐渐上升的模式; 另外的3个基因(*Bcp*、*Mofad*和*Ri5pe*)的表达在甲醛胁迫4~12 h才开始受到诱导, 此后随着甲醛胁迫时间的延长, 表达水平逐渐升高。此外, 和胁迫应答相关的*14-3-3p*基因在没有甲醛胁迫的对照样品中表达水平很高, 在甲醛胁迫起始的2 h, 该基因的表达被强烈诱导, 此后随着甲醛胁迫时间的延长, 表达水平大幅度上升。这些结果证实文库数据的可靠性。

## 讨 论

最近的一些研究结果表明环境中污染的HCHO被植物吸收后可以被氧化为甲酸, 甲酸随后

氧化为CO<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>可以通过光合作用同化为糖类物质, 这些糖类物质还可以进入糖酵解途径和三羧酸循环代谢为有机酸和氨基酸的碳骨架(McNeil等2000; Song等2013; Schmitz等2000; Zeng等2013), 说明光合作用在植物体内甲醛脱毒过程中发挥很重要的作用。轩秀霞等(2013)通过<sup>13</sup>CNMR分析也证实常春藤吸收的甲醛在叶片细胞中也可通过光合作用的卡尔文循环同化为[U-<sup>13</sup>C]Gluc和[U-<sup>13</sup>C]Fruc, 这可能是甲醛胁迫导致其叶片中可溶性糖含量增加的原因之一。与此结果相一致的是在本研究正向SSH cDNA文库中光合作用相关基因占据最大的比例, 说明甲醛胁迫上调常春藤叶片很多光合作用相关基因, RT-PCR分析也验证了光合作用相关基因的表达在甲醛胁迫的不同阶段受到诱导。由此可以推测在甲醛胁迫下, 常春藤叶片可能通过上调很多光合作用相关基因的表达, 使甲醛尽快被同化为糖类物质而增强其对甲醛的脱毒能力, 同时积累的可溶性糖进一步提高常春藤叶片对甲醛胁迫的耐受性。此外在SSH cDNA文库中比例与光合作用相关基因并列的是代谢相关基因, 表达谱分析也验证这些基因的表达受甲醛胁迫的诱导, 这些基因的上调表达可能和常春藤甲醛代谢过程中其他有机酸如[3-<sup>13</sup>C]Ser、[2-<sup>13</sup>C]Gly、[5-<sup>13</sup>C]Arg、[3-<sup>13</sup>C]Ala、[4-<sup>13</sup>C]malate、[3-<sup>13</sup>C]malate等的碳骨架产生有关, 这些产物也是



甲醛脱毒的结果, 所以代谢相关基因的上调表达也是提高常春藤对甲醛耐受性的一个组成部分。

14-3-3p是植物中一种很重要的调控蛋白, 14-3-3p的表达参与植物对很多非生物和生物胁迫的应答过程(Sottocornola等2006)。Schoonheim等(2007)的研究结果表明在大麦叶片14-3-3p的结合蛋白中有核糖体结合蛋白、蛋白质翻译的起始因子6和延伸因子1等, 说明14-3-3p参与蛋白质合成的调控(Schoonheim等2007)。14-3-3p基因的过量表达还可以增强转基因植物对多种非生物胁迫的抗性, 如用*CaMV* 35S启动子驱动番茄14-3-3p基因*TFT7*在拟南芥中的过量表达, 提高了转基因植物的耐盐性(Xu和Shi 2006); 用35S启动子控制拟南芥*GF14λ*基因在棉花中的过量表达提高转基因棉花对干旱的抗性(Sun等2011), 在过量表达14-3-3p基因的转基因水稻中发现14-3-3p通过增加某些干旱胁迫应答基因的表达来增加转基因水稻的抗旱能力(Chen等2006)。此外, 在马铃薯中过量表达14-3-3p基因提高了转基因植株的抗氧化活性, 14-3-3p表达受抑制的转基因植物中抗氧化活性降低(Lukaszewicz等2002)。本研究结果说明14-3-3p的表达受到2 mmol·L<sup>-1</sup>甲醛胁迫的强烈诱导, 在2 mmol·L<sup>-1</sup>甲醛胁迫常春藤叶片中可溶性蛋白积累明显增加, 且其氧化胁迫水平较低, 这说明14-3-3p的上调表达可能参与甲醛胁迫下常春藤叶片中可溶性蛋白合成和抗氧化系统活性的调控, 由此可见该基因的上调表达可能在提高常春藤叶片对甲醛胁迫的抗性中发挥重要作用。

## 参考文献

- 安雪, 李霞, 潘会堂, 罗竞男, 张启翔(2010). 16种室内观赏植物对甲醛净化效果及生理生化变化. 生态环境学报, 19 (2): 379~384
- 陈群玉(2008). 室内甲醛污染的来源及控制技术. 资源与人居环境, (6): 59~61
- 刘艳丽, 陈能场, 周建民, 徐胜光(2008). 观赏植物净化室内空气中甲醛的研究进展. 工业催化, 16 (9): 6~11
- 轩秀霞, 肖素勤, 游览, 陈丽梅(2013). 常春藤代谢气体甲醛中间产物及甲醛胁迫下叶片相关生理特性变化分析. 生命科学研究, 17 (2): 125~135
- Chen F, Li Q, Sun L, He Z (2006). The rice 14-3-3 gene family and its involvement in responses to biotic and abiotic stress. DNA Res, 13 (2): 53~63
- Feldman MY (1973). Reactions of nucleic acids and nucleoproteins with formaldehyde. Prog Nucleic Acid Res Mol Biol, 13: 1~49
- Fujishima A, Rao TN, Tryk DA (2000). Titanium dioxide photocatalysis. J Photochem Photobiol, 1 (1): 1~21
- Gay CA, Gebicki JM (2003). Measurement of protein and lipid hydroperoxides in biological systems by the ferric-xylenol orange method. Anal Biochem, 315 (1): 29~35
- Gurel A, Coskun O, Armutcu F, Kanter M, Ozen OA (2005). Vitamin E against oxidative damage caused by formaldehyde in frontal cortex and hippocampus: biochemical and histological studies. J Chem Neuroanat, 29 (3): 173~178
- Lukaszewicz M, Matysiak-Kata I, Aksamit A, Oszmiański J, Szopa J (2002). 14-3-3 Protein regulation of the antioxidant capacity of transgenic potato tubers. Plant Sci, 163 (1): 125~130
- McNeil SD, Nuccio ML, Rhodes D, Shachar-Hill Y, Hanson AD (2000). Radiotracer and computer modeling evidence that phospho-base methylation is the main route of choline synthesis in tobacco. Plant Physiol, 123 (1): 371~380
- Nash T (1953). The colorimetric estimation of formaldehyde by means of the Hantzsch reaction. Biochem J, 55 (3): 416~421
- Schmitz H, Hilgers U, Weidner M (2000). Assimilation and metabolism of formaldehyde by leaves appear unlikely to be of value for indoor air purification. New Phytol, 147 (2): 307~315
- Schoonheim PJ, Sinnige MP, Casaretto JA, Veiga H, Bunney TD, Quatrano RS, de Boer AH (2007). A comprehensive analysis of the 14-3-3 interactome in barley leaves using a complementary proteomics and two-hybrid approach. Plant Physiol, 143 (2): 670~683
- Song ZB, Xiao SQ, You L, Wang SS, Tan H, Li KZ, Chen LM (2013). C1 metabolism and the Calvin cycle function simultaneously and independently during HCHO metabolism and detoxification in *Arabidopsis thaliana* treated with HCHO solutions. Plant Cell Environ, 36 (8): 1490~1506
- Sottocornola B, Visconti S, Orsi S, Gazzarrini S, Giacometti S, Olivari C, Camoni L, Aducci P, Marra M, Abenavoli A et al (2006). The potassium channel KAT1 is activated by plant and animal 14-3-3 proteins. J Biol Chem, 281 (47): 35735~35741
- Sun G, Xie F, Zhang B (2011). Transcriptome-wide identification and stress properties of the 14-3-3 gene family in cotton (*Gossypium hirsutum* L.). Funct Integr Genomics, 11 (4): 627~636
- Tryk DA, Fujishima A, Honda K (2000). Recent topics in photoelectrochemistry: achievements and future prospects. Electrochim Acta, 45 (15): 2363~2376
- Wolverton BC, McDonald RC, Watkins EA (1984). Foliage plants for removing indoor air pollution from energy-efficient homes. Econ Bot, 38 (2): 224~228
- Xu WF, Shi WM (2006). Expression profiling of the 14-3-3 gene family in response to salt stress and potassium and iron deficiencies in young tomato (*Solanum lycopersicum*) roots: analysis by real-time RT-PCR. Ann Bot, 98 (5): 965~974
- Yemm EW, Willis AJ (1954). The estimation of carbohydrates in plant extracts by anthrone. Biochem J, 57 (3): 508~514
- Zeng ZD, Qi CJ, Chen Q, Li KZ, Chen LM (2013). Absorption and metabolism of formaldehyde in solutions by detached banana leaves. J Biosci Bioeng, DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiosc.2013.10.017>