

增殖细胞核抗原基因表达量与中肋骨条藻生长的关系

何闪英¹ 于志刚² 米铁柱³

(1. 浙江工商大学环境科学与工程学院, 杭州 310012; 2. 中国海洋大学化学化工学院, 青岛 266003; 3. 中国海洋大学环境科学与工程学院, 青岛 266003)

摘要: 对中国近海常见的赤潮藻—中肋骨条藻 (*Skeletonema costatum*) 生长相关的分子标记进行了研究, 通过 RT-PCR 和 RACE 技术获得了其 PCNA 基因的部分序列, 首次克隆测序得到了 714bp 的中肋骨条藻细胞色素 *b* (Cytochrome *b*, *Cyt b*) 基因序列。根据得到的 PCNA 与 *Cyt b* 基因序列, 分别建立了检测中肋骨条藻 PCNA 与 *Cyt b* 基因的实时荧光定量 PCR 的标准曲线, 并通过对已知浓度样品的检测证明了所建立标准曲线的准确性。以上述建立的方法为基础, 研究了中肋骨条藻生长率与增殖细胞核抗原基因表达量之间的关系。结果发现, 平均单细胞中 PCNA 表达量在培养的不同阶段变化很大, 且变化趋势与生长率表现出良好的一致性, 说明 PCNA 表达量与细胞分裂密切相关, 体现了其作为细胞增殖指标的潜能; 而 *Cyt b* 基因表达稳定, 表达量变化很小, 说明 *Cyt b* 基因是一个潜在的良好内参基因。基于此, 提出以 PCNA 为目的基因、*Cyt b* 为内参基因, 将 PCNA 基因的相对表达量 (REQ) 作为中肋骨条藻生长率的一个指标, 并建立了实验室条件下 PCNA 相对表达量与中肋骨条藻生长率之间的关系式。

关键词: 中肋骨条藻; 生长率; 荧光定量 PCR; PCNA; *Cyt b*

中图分类号: Q344+.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3207(2009)01-0103-10

研究浮游植物的生态动力学, 阐明赤潮发生的机制, 探索预警、预报乃至防治赤潮的方法已成为摆在海洋学家、生物和生态学家面前的一个极具挑战性的课题。对浮游植物现场生长率等基本生理生态学参数的测定, 是准确估算浮游植物生产力, 研究浮游植物种群变迁, 构建生态动力学模型乃至赤潮预测的基础^[1]。然而对于浮游植物生长率研究目前还缺乏一种准确估算单一类型现场生长率的技术方法, 这严重限制了浮游植物生产率这一参数的应用。

目前生长率的测定方法例如稀释培养法、生物化学指示物法和基于流式细胞仪的细胞周期法会受到培养瓶效应和细胞死亡等因素的影响, 而且, 这些方法提供的是全部浮游植物的生长率, 若要测定单一类型的生长率则需要专门的种类鉴定, 对大量样品测定费时费力, 并且对操作人员要求高; 而基于细胞周期标志物的细胞周期法则避免了培养瓶效应, 并且使得生长率的估算精度不受细胞死亡的影响, 更重要的是, 这种方法可以结合实时荧光定量 PCR (RFQ-PCR)、荧光原位杂交、免疫荧光等分子生物

学技术, 直接获得细胞分数, 其中实时荧光定量 PCR 具有高通量检测的优势。

PCNA 是 DNA 复制与修复机制的必要组成蛋白, 作为 DNA 聚合酶 δ 和 ϵ 的辅助蛋白^[2,3]。PCNA 蛋白质仅存在于处于分裂的细胞内, 当细胞进行基因组复制时, 如真核细胞的 S 期, PCNA 大量表达^[3]。由于与细胞分裂相关, PCNA 被广泛用于肿瘤和癌症发展的预测^[4,5]。PCNA 也与高等植物细胞分裂从 G₀ 或 G₁ 期进入 S 期有关^[6], 由此推理, PCNA 也可以作为研究海洋浮游植物细胞周期和生长速率的一个潜在的有用标记^[7]。于是, Lin *et al.* 将细胞周期标志物 PCNA 基因引入到浮游植物生长率研究中, 研究表明 PCNA 的方法具有巨大潜在应用价值^[8]。

对于杜氏藻 *Dunaliella tertiolecta* 免疫荧光研究发现 PCNA 是表征生长状态的合适标志物, 可以用来估算生长率^[7]。1995 年 Lin *et al.* 首次用 PCNA 免疫荧光技术研究海洋浮游植物自然种群的细胞周期, 联合特征 DNA 序列分析了北大西洋西南部和加

收稿日期: 2008-05-28 修订日期: 2008-10-15

基金项目: 国家自然科学基金项目 40406028; 国家高技术研究发展计划项目 (863) 2001AA635090 资助

通讯作者: 何闪英 (1980-), 女, 浙江人; 讲师, 博士; 主要从事环境生物学研究。Tel 0571-88071024-7005

E-mail heshanying2007@yahoo.com.cn

勒比海域 *Etmodiscus rex* 细胞周期中生命活动的过程,并且粗略估算了生长率^[9]。1998年 Lin *et al.* 鉴定分析了杜氏藻 *Dunaliella tertiolecta* 和球等鞭金藻 *Ischrysis galbana* 的 PCNA 基因^[10]。2001年 Lin 和 Corstjens 研究了颗石藻 *Pleurochrysis carterae* 中的 PCNA, 发现 PCNA 在这种藻处于对数生长期时比处于平稳生长期时表达丰度高^[11]。Lin *et al.* 对实验室培养的杀鱼费氏藻 *P. piscicila* 的进一步研究表明, PCNA 基因的表达在不同的生长时期有着巨大的变化^[12-13]。

基因表达量的研究是生理生态学研究的重要内容,在研究基因表达量变化时,内参基因的使用显得十分重要。细胞色素 *b* (Cytochrome *b*, 简称 *Cyt b*) 是线粒体自身编码的为数不多的功能蛋白之一^[14], 且其基因的结构和功能在线粒体 DNA (mtDNA) 的 13 个蛋白质编码基因中已被了解得最清楚^[15]。*Cyt b* 进化速度适中, 尤其适合种属水平的系统发育关系的研究, 被认为是解决分类及系统进化问题最可信的分子标记之一^[16], 但未见把 *Cyt b* 基因作为内参基因加以使用的报道, 对其是否可以作为内参基因有待于研究。

中肋骨条藻又是我国近海常见的赤潮生物, 在胶州湾已记录的 40 余种赤潮生物中, 中肋骨条藻是主要优势种之一^[17]。1987. 06. 30—07. 14 长江口外海域发生约为 1000 km² 中肋骨条藻赤潮, 使当地生态系统受到严重影响。2003 年中肋骨条藻在上海沿海爆发赤潮 8 次, 受害面积达 2280 km², 广东沿海 14 次, 面积达 650 km²。据报道, 以中肋骨条藻为优势种的水华可导致大西洋大马哈鱼的鱼鳃损害而最终死亡。中肋骨条藻作为世界沿岸广泛分布种有很多报道, 但对于其形成赤潮的过程报道很少^[18-19]。王桂兰等通过对 1990 年 6 月发生于长江口的一次中肋骨条藻赤潮监测发现, 不同阶段中肋骨条藻的细胞浓度差别明显, 而且在赤潮前后, 海区内藻类的多样性具有很大差异, 中肋骨条藻的密度急剧上升, 其他藻类数量迅速减少, 种群结构变得很简单, 并认为藻类密度和种群结构的动态变化对赤潮的预报具有重要价值^[20]。因此, 及时、准确、快速地检测中肋骨条藻赤潮, 了解其在养殖区的动态, 当其数量增加时及时控制, 这对海洋养殖业具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 藻类培养 中肋骨条藻 (*Skeletonema costatum*) 由中国海洋大学海洋生命学院提供。在实验室中用常规的 F/2 培养基培养至对数生长期, 培养条件: 光照: 黑暗周期为 12h: 12h, 光照强度为 66 $\mu\text{mol photons}/\text{m}^2 \cdot \text{s}$, 培养温度为 22—25℃。

1.2 中肋骨条藻 PCNA 与 *Cyt b* 基因的克隆

1.2.1 RT-PCR 收集约 10⁷ 中肋骨条藻细胞, 按照 TRIzol 试剂操作说明 (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) 提取总 RNA, 溶解于 50 μL DEPC 水, 取 1 μL 用 Imprim-RT Reverse Transcriptase (Promega, Madison, WI, USA) 进行反转录, 反转录体系为 20 μL , 以 oligo-d(T)₁₈ 为引物。取 1 μL cDNA 用 *Ex Taq* 聚合酶 (Takara, Japan) 进行 PCR 扩增, 扩增引物使用 Primer Premier 5.0 设计。PCNA 基因的扩增引物 (f_p 5-CAGTCTCGGGTTCAATGCGG-3', r_p 5-GGATACTCCACCACCAAGGC-3'); 反应体系为 50 μL : 0.4 $\mu\text{mol/L}$ 引物, 1 \times *Taq* 聚合酶缓冲液, 1.5 mmol/L MgCl₂, dATP, dGTP, dTTP, dCTP 各 0.2 mmol/L, 0.5U *Taq* DNA 聚合酶, cDNA 1 μL template 反应程序为 94℃ 5 min, 30 个循环 (94℃ 30 s, 55℃ 30 s, 72℃ 1 min), 72℃ 7 min。*Cyt b* 基因扩增引物根据从 GenBank 数据库中获得的中肋骨条藻同科的伪矮海链藻 (*Thalassiosira pseudonana*) 的 *Cyt b* 基因序列设计, 引物序列为 (f_p 5-ATACGCTTGGAGTTTGGGTCTTC T-3', r_p 5-ATGAGCCGGAGT-TGACATAGGATCT-3), 反应体系同 PCNA; 反应程序: 94℃ 8 min, 35 个循环 (94℃ 45 s, 52℃ 45 s, 72℃ 1 min), 72℃ 5 min。扩增片段用 pMD18-T 载体 (Takara, Japan) 克隆, 并送上海生物工程有限公司测序 (ABI 3730 capillary sequencer)。

1.2.2 PCNA 3'RACE 根据 RT-PCR 得到的 PCNA 序列 (1.2.1 section), 设计了 4 条 3'RACE 引物 (f_p 1: AAGGAAGGTGTCGGTCTCAGT; Adaptor dT: GACTCGAGTCGA CGAATTC AATTTTTTTTTTTTTTTT; Adaptor GACTCGAGTCGACGAATTC A; f_p 2: TGAGAAGGAGGAGGAACGTGTTATG)。取 1 μL 中肋骨条藻 RNA 用引物 Adaptor dT 进行反转录。得到的 cDNA 用 *Ex Taq* 聚合酶以及引物 Adaptor Adaptor dT 和 f_p 1 进行 PCR 扩增。反应程序: 94℃ 5 min, 25 个循环 (94℃ 30 s, 50℃ 30 s, 72℃ 1 min), 72℃ 10 min。

PCR 产物稀释 50 倍, 取 1 μL 用 *Ex Taq* 聚合酶以及引物 Adaptor 和 f_p 2 进行扩增。程序为: 94℃ 5 min, 35 个循环 (94℃ 30 s, 50℃ 30 s, 72℃ 1 min), 72℃ 10 min。扩增片段克隆后进行测序。

1.3 PCNA 与 *Cyt b* 基因质粒标准品制备 在过

夜 LB平板上挑取白色克隆单菌落,置于 2mL LB培养基(含 100 μ g/mL氨苄青霉素)中,于 37℃摇床上过夜培养。1000r/min 离心 1min 弃上清,沉淀加入预冷的悬浮缓冲液(50mmol/L Tris-HCl pH 8.0 10mmol/L EDTA, 20 μ g RNaseA)悬浮细胞。加 100 μ L裂解液(200mmol/L NaOH, 1% SDS),室温轻轻混匀,加入中和缓冲液(3mol/L potassium acetate pH 5.5) 120 μ L以及酚/氯仿/异戊醇溶液,室温轻轻混匀 3min, 10000r/min离心 3min,移上清至新管。加 200 μ L异戊醇沉淀 DNA, 12000r/min离心 10min 弃上清,用 70%乙醇洗涤,干燥后加 40 μ L 无菌水溶解。

质粒经酶切鉴定后用核酸蛋白分析仪(Beckman DU 640)测定 260nm 下的吸光度(OD),并计算质粒的浓度计算公式:质粒浓度(copies/mL) = (OD 值 $\times 50 \times 6.02 \times 10^{23}$) / (碱基数 $\times 660$)。测得的 PCNA 质粒浓度为 1×10^8 copies/ μ L,用无菌水 10倍梯度稀释至 1×10^2 copies/ μ L, Cyt b 质粒浓度为 2×10^8 copies/ μ L,用无菌水 10倍梯度稀释至 2×10^1 copies/ μ L,获得的标准品在 -80℃下保存。

1.4 PCNA 与 Cyt b 基因 RFQ-PCR 检测方法的建立 根据测得的序列,用软件 Primer Premier 5.0 分别设计了 PCNA 基因和 Cyt b 基因 RFQ-PCR 检测的 TaqMan 探针与引物,探针 5'端用 FAM 标记,3'端用 TAMRA 标记(Invitrogen 公司,上海)。在 ABI 7500 荧光定量仪(Applied Biosystems Incorporated 美国)上进行荧光定量 PCR 反应,体系为:双蒸水 8.5 μ L, $2 \times$ TaqMan[®] Universal PCR Master Mix 12.5 μ L, 正反向引物(10 μ mol/L)各 1 μ L, TaqMan 探针(10mmol/L) 1 μ L, 模板 1 μ L; PCR 程序: 52℃ 2min, 95℃ 10min, 95℃ 15s, 60℃ 1min, 40个循环。每个质粒稀释浓度做三个平行样。以质粒浓度对数值为横坐标,以实时 RFQ-PCR 中相应的 C_T 值为纵坐标,绘制标准曲线。

为验证标准曲线的准确性,取质粒样品稀释到某一浓度,分别制备中肋骨条藻 PCNA 质粒样品 a、b 和 Cyt b 质粒样品 c、d 且分别取 1 μ L 样品作为模板进行 RFQ-PCR 扩增,同时对质粒标准品进行扩增,与用得到的标准曲线推算此质粒样品的浓度,与已知的浓度进行比较。

1.5 RNA 提取和逆转录体系稳定性检验 收集指数生长期的藻,液氮充分研磨后,取 100mg 每份样

品,共 6 份,分别进行 RNA 提取和反转录,用 1 μ L cDNA 同时进行 RFQ-PCR 扩增,以得到的 6 个 C_T 值的相对标准偏差确定体系的稳定性。

1.6 不同生长阶段 PCNA 表达量的检测 在 1.5L 锥形瓶中培养中肋骨条藻,接种密度为 1.2×10^3 cells/mL,每天进行镜检(Olympus Hamburg Germany)计数,收集处于指数生长期、稳定期、衰亡期的藻样品各一份(样品 A、B、C),计算样品藻细胞,如上所述提取 RNA,进行 RT-PCR 得到样品 cDNA,取 1 μ L cDNA 进行 RFQ-PCR 扩增。通过 RFQ-PCR 标准曲线计算每微升 cDNA 中的 PCNA 拷贝数,则可计算得单位细胞中 PCNA 的平均拷贝数: [(PCNA copies/ μ L cDNA) \times (20 μ L cDNA/ μ L RNA) \times 50 μ L RNA] / (细胞数)。

1.7 中肋骨条藻生长率与 PCNA 基因相对表达量的关系 为研究中肋骨条藻生长率与 PCNA 基因表达量之间的关系,用 3L 锥形瓶培养中肋骨条藻,第一组接种密度为 4.0×10^2 cells/mL,进行连续 4 周的中肋骨条藻培养,从培养第 3 天起隔天收集样品;由于在第一组实验中发现藻在指数增长期生长很快,PCNA 表达量变化很大,而平台期以后变化则很小,因此设置第二组补充实验:进行 2 周的中肋骨条藻培养,接种密度为 1.3×10^2 cells/mL,重点研究指数增长期中生长率与 PCNA 基因表达量之间的关系,并加密取样频率。每份藻样品的细胞数都约为 2.0×10^7 个。

藻样品进行 RNA 提取和反转录后,用 RFQ-PCR 扩增每个样品的 PCNA 和 Cyt b 基因,以 Cyt b 基因为内参基因,考察 PCNA 基因表达量的变化。以得到的 C_T 值推算平均单细胞中基因的表达量,为使 REQ 值处于 0—10 的范围,使表述简单化,按以下公式计算 PCNA 相对表达量 REQ: $REQ = \lg(PCNA \text{ 基因表达量} / Cyt b \text{ 基因表达量}) + 10$ 。

2 结果

2.1 PCNA 与 Cyt b 基因序列

RT-PCR 后得到 522 bp PCNA 扩增片段,其序列与已报道的中肋骨条藻 PCNA 序列(GenBank AY173027)相似性为 98%。通过 3'RACE 扩增,得到了 786 bp 的 PCNA 扩增片段,其序列(图 1)。测得 Cyt b 基因的 714bp 序列已提交至 NCBI(EF079088)。

TTGGGTAGATTTTGAGTGTGCCGGAATGATGACATTATTACGCTGAAGGCGGAGGATGAT 60bp
GGGGATGCGTTGACGATGATGTTTGAGAGTCCGAATGGGGATCGCATTGCTGACTTTGAA 120bp
CTGAAACTCATGGACATAGACAGTGAACAACCTCGGAATCCCAGAAACTGACTACAAATGC 180bp
ACTATCCAGATGCCCTCAGGCGAATTC AACGTATTATCCGTGACATGCAAGTTCTCGGA 240bp
GACACAGCCACCATCTCCTGTACAAAGGAAGGTGTCGGTTCTCAGTATCAGGAGATCTT 300bp
GGTACAGGAAATGTCCTCGTTCGTCAAAACAGCTCTCATGAGAAGGAGGAGGAACGTGT 360bp
ATGATTGAAATGCAAGAACCTGTGGAATTGACCTTTGCGTTGAGGTACCTCAACTTCTTT 420bp
ACCAAGGCTACTAGTTTGGGAGGTACAGTGATTTTGTCATGAGTCCTGAGGTGCCTGTG 480bp
GTGGTGGAGTATCCCATCGGGGAGACTGGATACATTAAATACTATTTGGCACCCAAGATT 540bp
GATGAGGATGAAGAGTAAATGATTGAGTGGGGACACCCAGGGTGTGTGACAAGAATAA 600bp
TGAAAATATATTATATGTTGGAATGATTGAGAGGGCGTTACTTGTGTTTCGGATGATCAT 660bp
GGTTTGATATGCACGAAGCCATCATACCCAGTATTCTTTCTTAGTCTAAATTTTATA 720bp
CTTAGCTTTTAAATGACTGTTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAATTGAATTCGTCGACT 780bp
CGAGTC 786bp

图 1 中肋骨条藻 PCNA 基因 RT-PCR 和 3'RACE 测序结果 (下划线为 RT-PCR 测序结果, 阴影为 3'RACE 测序结果补上的部分)

Fig 1 Sequence of *S. costatum* PCNA (The fragment with underline was the fragment got by RT-PCR, the fragment of shadow was complemented by 3' RACE)

2.2 中肋骨条藻 PCNA 与 Cytb 基因检测标准曲线的建立

根据基因序列, 分别设计了扩增中肋骨条藻 159bp PCNA 基因和 165bp Cyt b 基因的引物和探针, 其序列 (表 1), 用所设计的探针和引物以及稀释的质粒标准品进行 RFQ-PCR 扩增, 每个稀释度重复

测量 3 次, 各个稀释度 DNA 溶液测得的 C_T 值 (表 2 表 3)。用测得的 C_T 值对细胞密度的对数值作图, 得到检测 PCNA 的方程: $y = -3.055x + 41.093$ 其中 x 为细胞数对数值, y 为 C_T 值, 其回归系数 $r = 0.999$ 得到检测 Cyt b 的方程: $y = -4.0x + 44.96$, $r = 0.997$ 。

表 1 RFQ-PCR 引物与探针序列

Tab. 1 The sequences of the designed RFQ-PCR primers and Taqman probes

序列 Sequence	SG-FQ-PCNA	SG-FQ-Cyt
正向引物 Forward primer	5-AGG TGT CCG GTT CTC AGT ATC AG-3	5-GTG TTG AGC ACA TTA TGC GAG AT-3
反向引物 Reverse primer	5- AGT AGC CTT GGT AAA GAA GTT GAG G-3	5- GAA CGC CTG AGC ATC AAA GTA A-3
Taqman 探针 Taqman probe	5-GTC CTC GTT CGT CAA AAC AGC TCT CA-3	5-TGC AAA TGG TGC TTC AAT GTT CTT CA-3

表 2 PCNA 质粒标准品 RFQ-PCR 检测结果

Tab. 2 The RFQ-PCR results of diluted PCNA plasmid solutions

稀释梯度 Dilution	1: 10 ¹	1: 10 ²	1: 10 ³	1: 10 ⁴	1: 10 ⁵	1: 10 ⁶	1: 10 ⁷
相应 PCNA 拷贝数 Corresponding PCNA copies (Copies/μL cDNA)	1 × 10 ⁸	1 × 10 ⁷	1 × 10 ⁶	1 × 10 ⁵	1 × 10 ⁴	1 × 10 ³	1 × 10 ²
C_T 平均值 ± 标准偏差 Average C_T ± SD	16.68 ± 0.23	19.89 ± 0.44	22.89 ± 0.16	25.51 ± 0.16	28.74 ± 0.12	31.09 ± 0.13	35.46 ± 0.11

表 3 Cyt b 质粒标准品 RFQ-PCR 检测结果
Tab. 3 The RFQ-PCR results of diluted Cyt b plasmid solutions

稀释梯度 Dilution	1: 10 ¹	1: 10 ²	1: 10 ³	1: 10 ⁴	1: 10 ⁵	1: 10 ⁶	1: 10 ⁷
相应 Cyt b 拷贝数 Corresponding PCNA copies (Copies/μL cDNA)	2 × 10 ⁷	2 × 10 ⁶	2 × 10 ⁵	2 × 10 ⁴	2 × 10 ³	2 × 10 ²	2 × 10 ¹
C _T 平均值 ± 标准偏差 Average C _T ± SD	15.96 ± 0.04	18.52 ± 0.03	22.54 ± 0.10	27.46 ± 0.30	31.95 ± 0.23	36.36 ± 0.39	39.16 ± 0.18

2.3 PCNA 与 Cyt b 基因 RFQ-PCR 检测标准曲线的准确性

制备的质粒样品 a、b、c、d 的浓度分别为 4.00 × 10⁵、3.33 × 10³、5.50 × 10⁴、8.25 × 10² copies/μL, 质粒样品与质粒标准品同时进行 RRFQ-PCR, 三次

上样得到样品平均 C_T 值, 用得到的标准曲线推算样品质粒拷贝数, 与已知浓度进行比较, 统计分析表明, 在 P= 0.05 时, RFQ-PCR 推算出的拷贝数与已知拷贝数没有显著性差异, 也表明上述建立的标准曲线是可靠的 (表 4)。

表 4 PCNA 与 Cyt b 质粒样品的 RFQ-PCR 检测结果
Tab. 4 Comparison of the given and measured concentrations of *S. costatum* PCNA and Cyt b plasmid

样品 Sample	C _T 平均值 ± 标准偏差 Average C _T ± SD	RFQ-PCR 推算浓度 Measured concentration (copies/μL)	已知浓度 Given concentration (copies/μL)	t 检验 Analysis of variance (t _{critical} = 4.30 (p = 0.05, n = 3))
a	23.54 ± 0.50	(5.85 ± 2.13) × 10 ⁵	4.00 × 10 ⁵	t = 1.22 < t _{critical}
b	30.61 ± 0.06	(2.70 ± 0.12) × 10 ³	3.33 × 10 ³	t = 2.37 < t _{critical}
c	25.83 ± 0.34	(6.14 ± 1.17) × 10 ⁴	5.50 × 10 ⁴	t = 0.77 < t _{critical}
d	33.41 ± 0.06	(7.71 ± 0.26) × 10 ²	8.25 × 10 ²	t = 2.95 < t _{critical}

2.4 RNA 提取与 RT-PCR 系统的稳定性验证

培养 7d 的藻经液氮研磨后分为 100mg/份, 共 6 份, 通过 RRFQ-PCR 检测到的 C_T 值分别是 24.46、23.64、24.51、24.61、24.41、24.45, 求得 6 个 C_T 值的相对标准偏差为 1.5%。

2.5 不同生长期的中肋骨条藻 PCNA 表达量检测

对培养的中肋骨条藻每天进行细胞密度的计数, 观察培养 3 周的细胞密度变化 (图 2)。培养的

第一周, 中肋骨条藻基本处于指数生长阶段, 第二周基本处于稳定生长期, 而第三周则处于衰亡期。收集样品 A (培养 6d 的藻), 样品 B (培养 11d 的藻), 样品 C (培养 18d 的藻)。根据 RFQ-PCR 得到的 C_T 值计算出不同生长阶段单个藻细胞中 PCNA 的拷贝数 (表 5)。

2.6 PCNA 相对表达量 (REQ) 与生长率 (μ) 的关系
2.6.1 第一组中 PCNA REQ 与 μ 的关系

第一组中收集了 11 个样品, 得到样品平均单细胞中的 PCNA 和 Cyt b 基因表达量 (图 3)。对培养 4 周中的中肋骨条藻细胞密度、藻生长率 μ 以及 REQ 的变化趋势作图 (图 3), 中肋骨条藻的生长率 μ、PCNA 基因表达量以及 REQ 之间有高度一致性, 在藻的指数生长期变化幅度都很大。而 Cyt b 基因表达量变化很小, 表明 Cyt b 基因是一个潜在的良好内参基因。对生长率 μ 与 PCNA REQ 进行线性回归 (图 4), 得到回归方程为 μ = 0.273REQ - 2.02, r = 0.90。

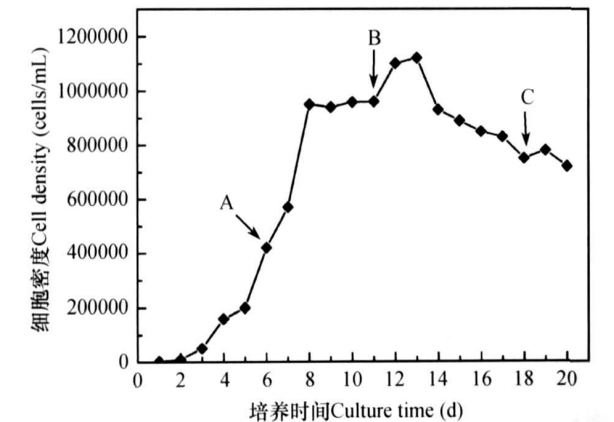


图 2 培养的中肋骨条藻细胞密度随时间的变化
Fig. 2 Growth curve of *S. costatum* in culture

表 5 不同培养阶段样品的 RFQ-PCR结果及平均单细胞中 PCNA拷贝数的变化
Tab.5 Results ofRFQ-PCR for samples and the calclated PCNA copies/cell in different grow th states

样品	生长率	细胞数	C_T	PCNA拷贝数
Sample	Growth rate (μ^e) (/d)	Cell number		PCNA copies(Copies /cell)
A	0.742	1.26×10^7	23.48	46.200
B	0.002	9.60×10^6	28.99	0.950
C	-0.104	3.75×10^7	31.40	0.040

* $\mu = (\ln X_1 - \ln X_2) / (T1 - T2)$, X_1 : T1时间细胞密度, X_2 : T2时间细胞密度^[21]
* $\mu = (\ln X_1 - \ln X_2) / (T1 - T2)$, X_1 : the cell density of T1; X_2 : the cell density of T2^[21]

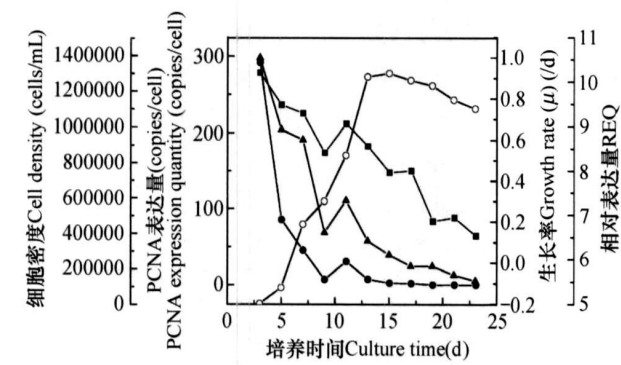


图 3 第一组中藻细胞 PCNA 与 Cyt b 基因表达量的变化
Fig.3 The variation of the PCNA and Cyt b expression in group1
○:细胞密度;▲:生长率;●:PCNA 表达量;■:REQ;下同
○: cell density, ▲: growth rate, ●: the expression amount of PCNA gene, ■: REQ; The same as follows

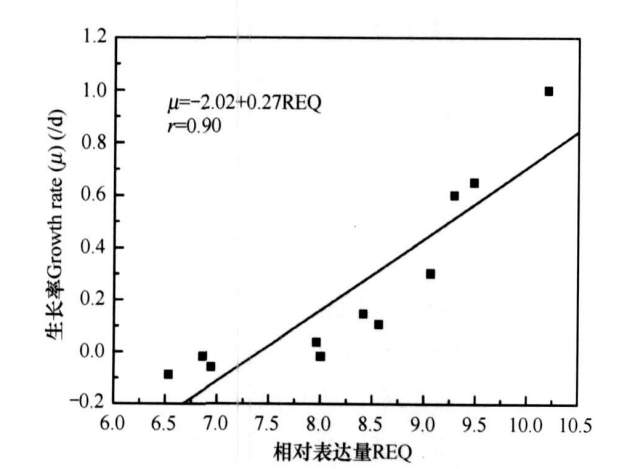


图 4 第一组中藻细胞 PCNA REQ 与生长率(μ)的关系
Fig.4 The relation between the REQ and the μ in group 1

2.6.2 第二组中 PCNA REQ与 μ 的关系

第二组中收集了 14个样品,得到样品平均单细胞中的 PCNA和 Cyt b基因表达量(图 5)。对培养 2 周中的中肋骨条藻细胞密度、藻生长率 μ以及 REQ 的变化趋势作图,显示了他们的高度一致性。同时, Cyt b基因表达量变化很小。对 14个样品的生长率

μ与 PCNA REQ进行线性回归(图 6),得到回归方程为 $\mu = 0.375REQ - 2.79$, $r = 0.97$ 。

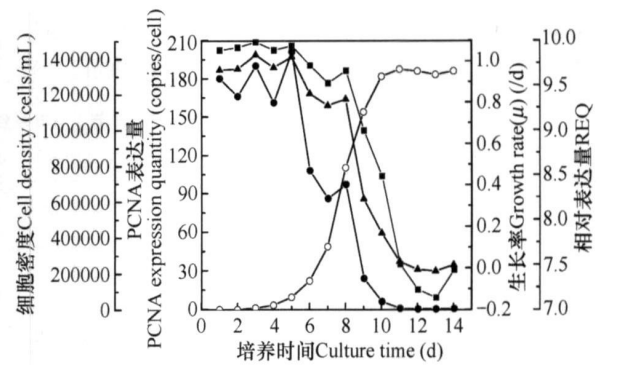


图 5 第二组中藻细胞 PCNA 与 Cyt b 基因表达量的变化
Fig.5 The variation of the PCNA and Cyt b expression in group 2

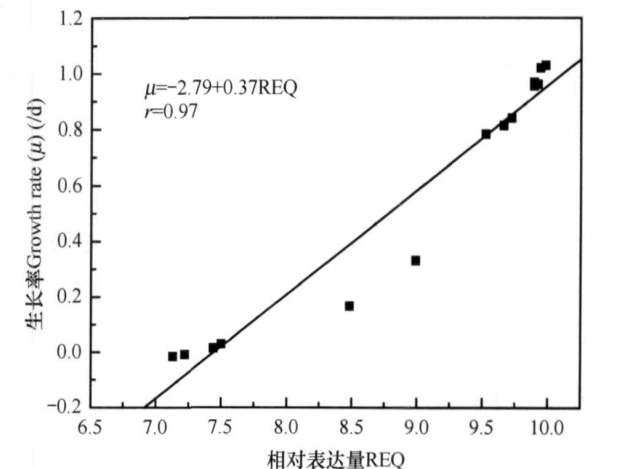


图 6 第二组中藻细胞 PCNA REQ 与生长率(μ)的关系
Fig.6 The relation between the REQ and the μ in group2

3 讨 论

3.1 中肋骨条藻 PCNA 基因表达量检测方法

荧光定量 PCR 精确量的前提是构建标准品和标准曲线,才能对未知模板进行定量分析,通常以 DNA、RNA、质粒作为标准品。在考察 PCNA 基因表

达量时, 可以用 PCNA 的 mRNA 作为定量标准, 但 RNA 的易降解性会导致标准的不稳定而引起结果的不准确, 因此, 我们用 PCNA 的 cDNA 作为参考标准并将目的片段重组至质粒从而得到稳定的标准品。在样品检测时, 将提取的 RNA 反转录为 cDNA 并与质粒标准品同时进行 RFQ-PCR, 以达到定量目的。大量文献表明, 质粒法制备标准品是一个简便而准确的制备标准品的方法^[22-24], 并且能满足对标准品的长期和大量需求。

本文建立的中肋骨条藻 PCNA 检测方法, 可以准确定量 $10^2 - 10^8$ 个拷贝, 且标准曲线回归系数达 0.999, 稳定性好, 标准曲线的准确性也得到了验证, 且 6 份样品的 C_T 值的相对标准偏差为 1.5%, 证明了 RNA 提取与反转录体系的稳定。因此, 本文建立的中肋骨条藻 PCNA 基因表达量检测方法不仅具有实时荧光定量方法的简便快速, 而且有效可行。

3.2 Cyt b 作为内参基因的可行性

本方法是基于细胞计数和绝对定量 PCNA, 来计算平均单细胞中的 PCNA 表达量, 进而用于估算生长潜能。其结果必然受计数准确性, 以及 RNA 提取效率和反转录效率的影响, 因此, 要准确测定出某时期每个藻细胞中 PCNA 基因的表达量, 提高检测的灵敏度, 就需要一种稳定而高效的 RNA 提取方法和反转录体系。通过内参基因的方法来解决 RNA 提取和反转录稳定性的问题是更具优势的途径^[25-27], 通过 PCNA 与内参基因表达量的相对比值形式来反映不同时期 PCNA 的相对表达量变化, 进一步建立 PCNA 相对表达量与中肋骨条藻生长率之间的关系, 从而为估算中肋骨条藻的生长率提供新的方法。

本研究用 RFQ-PCR 方法通过对培养不同阶段的藻样品进行检测。从图 7 可以看出, 第一组在生长的指数期 (约为培养的第 1—第 13 天)、平稳期 (约为培养的第 13—第 22 天) 和衰亡期 (第 22 天以后), 单细胞中 Cyt b 基因的 mRNA 含量变化很小 (200—274 copies/cell 相对标准偏差为 12%); 第二组实验的结果同样表明 Cyt b 的表达量十分稳定 (单细胞中 Cyt b 基因的 mRNA 含量变化为 194—260 copies/cell 相对标准偏差为 9%), 说明 Cyt b 基因受细胞分裂状态影响不大, 是内参基因的良好选择。

3.3 PCNA 作为细胞分裂增值指标的潜能

从培养 3 周的样品检测的数据看, PCNA 基因表达量在中肋骨条藻培养的不同时期有着明显变化, 培养 6d 时藻处于指数增长期, PCNA 的表达量

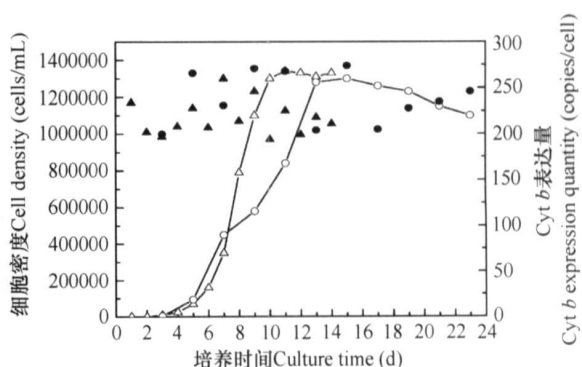


图 7 中肋骨条藻细胞密度及平均单细胞中 Cyt b 表达量随培养时间的变化

Fig. 7 The variation of the cell density of *S. costatum* and the expression of Cyt b

○: 第一组细胞密度; △: 第二组细胞密度; ●: 第一组 Cyt b 表达量; ▲: 第二组 Cyt b 表达量
○: cell density of group 1; △: cell density of group 2; ●: expression amount of Cyt b gene for group 1; ▲: expression amount of Cyt b gene for group 2

处于较高水平 (46.2 copies/cell), 11d 时处于生长平稳期, PCNA 表达量处于较低水平 (0.950 copies/cell), 而 18d 时已处于衰亡期, PCNA 表达量最低 (0.040 copies/cell)。这个结果表明, PCNA 具有检测中肋骨条藻生长潜能的价值。

进一步的实验也证明了平均单细胞中 PCNA 基因表达量在中肋骨条藻培养的不同阶段有着明显变化。第一组中, 在培养初期 (2—5d) 藻细胞密度迅速增加, 处于对数生长期, 生长率较高, 最高达到 1/d 相应的此阶段的平均单细胞中 PCNA 基因表达量也较高, 最高达到 292 copies/cell。随后生长率逐渐变小, PCNA 表达量逐渐降低, 在培养的 9—12d 生长率再次出现一个小的峰值, PCNA 表达量亦有反映, 在培养的后期生长率为 0 或负值, PCNA 表达量亦降到很低范围 (< 0.10 copies/cell)。

从图 5 同样可以看出, 在第二组实验的培养初期 (2—5d) 藻细胞密度迅速增加, 生长率较高, 最高达到 1.03/d, 相应的此阶段的平均单细胞中 PCNA 基因表达量也较高, 最高达到 201 copies/cell。随后生长率逐渐变小, PCNA 表达量也逐渐降低。

这些都表明在中肋骨条藻培养过程中, PCNA 的表达量与生长率表现出高度的一致性, 显示出其与细胞分裂的密切关系。

3.4 PCNA 相对表达量计算方法的建立

用建立的 RFQ-PCR 检测样品的 PCNA 和 Cyt b 基因表达量, 以 PCNA 为目的基因, 以 Cyt b 基因为

内参基因。一般地,基因的相对表达量直接以目的基因与内参基因的比值来表示,但在此研究中,由于PCNA表达量变化程度很大,对PCNA和Cyt b表达量的比值取对数可以使表述更为简便,且通过加上一个常数使得计算结果为正值(这里选取常数10),因此我们按以下公式计算PCNA相对表达量:

PCNA的相对表达量 $REQ = \lg[\text{PCNA基因表达量} / \text{Cyt b基因表达量}] + 10$

REQ值越大,则在单位细胞内PCNA基因的相对表达量越多。

计算PCNA相对表达量的方法较单独计算单位细胞内的PCNA表达量可以得到更稳定的结果,这是因为计算单位细胞内的PCNA的方法需要计数细胞密度,一方面计数误差会影响结果的准确性(通常情况下计数误差是较大的);另一方面,对于野外样品,区分不同的种类是一项需要专业人员的工作;更重要的是,单独计算单位细胞内的PCNA的表达量无法避免RNA提取效率与反转录效率对于mRNA表达量检测的影响。而本文建立相对表达量的方法,由于以同为mRNA的Cyt b为内参基因进行归一化,不再需要细胞计数,同时校正了RNA提取效率、反转录效率的影响,从而使得结果更加稳定。

图4与图6显示,REQ值与生长率之间有高度的相关性,因此,本文所建立的检测以Cyt b基因为内参基因的PCNA相对表达量的方法,可望成为一种反映中肋骨条藻增殖潜力的好方法。但需要在更大范围考察不同环境因素(营养盐、光照、温度等)对PCNA表达和生长率关系的影响,进一步修正PCNA表达量与生长率关系模式,并考虑采用多元回归方式,选择更多的影响因子,以最终建立可以用于现场的基于分子生物学技术的估算中肋骨条藻生长率的新方法。经过进一步研究,完全有可能利用PCNA基因相对表达量来估算实际海区中肋骨条藻的现场生长率,从而为中肋骨条藻赤潮预测和研究提供一种全新的方法。

参考文献:

- [1] Fumas M J. In situ growth rates of marine phytoplankton: approaches to measurement: community and species of growth rates [J]. *Journal of Plankton Research*, 1990, **12**: 1117—1151
- [2] Matthews M B, Bernstein R N, Franza B R, *et al*. Identity of the proliferating cell nuclear antigen and cyclin [J]. *Nature*, 1984, **309**: 374—376
- [3] Bravo R, Frank R, Blundell P A, *et al*. Cyclin/PCNA is the auxiliary protein of DNA polymerase [J]. *Nature*, 1987, **326**: 515—517
- [4] Sasaki K, Kurose A, Ishika Y, *et al*. Estimation of S-phase fraction in tumor tissue sections by immunohistochemical staining of PCNA [J]. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 1994, **42**: 957—960
- [5] Lee C S, Redshaw A, and Boag G. A assessment of cell proliferation in human laryngeal cancers using proliferating cell nuclear antigen and K+67 antigen immunostaining [J]. *Cell Vision*, 1995, **2**: 296—300
- [6] Kodama H, Ito M, Ohinishi N, *et al*. Molecular cloning of the gene for plant proliferating cell nuclear antigen and expression of this gene during the cell cycle in synchronized culture of *Catharanthus roseus* cells [J]. *European Journal of Biochemistry*, 1991, **197**: 495—503
- [7] Lin S, Carpenter E J. Growth characteristics of phytoplankton determined by cell cycle proteins: The cell cycle of *Emodius rex* in the southwestern North Atlantic Ocean and Caribbean Sea [J]. *The Journal of Physiology*, 1995, **31**: 778—785
- [8] Lin S, Chang J, Carpenter E J. Detection of proliferating cell nuclear antigen analog in four species of marine phytoplankton [J]. *The Journal of Physiology*, 1994, **30**: 449—456
- [9] Lin S, Carpenter E J. Growth characteristics of phytoplankton determined by cell cycle proteins: The cell cycle of *Emodius rex* in the southwestern North Atlantic Ocean and Caribbean Sea [J]. *The Journal of Physiology*, 1995, **31**: 778—785
- [10] Lin S, Carpenter E J. Detection and preliminary characterization of the PCNA gene in marine phytoplankton [J]. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 1998, **7**: 62—71
- [11] Lin S, Corstjens P L A M. Cloning and differential expression of Proliferating cell nuclear antigen in the Coccolithophorid phytoplankton *Pleurochrysis carterae* [J]. *Journal of Phycology*, 2001, **37**: 31
- [12] Lin S, Zhang H and Dubois A. Low abundance distribution of *Pfiesteria piscicida* in Pacific and Western Atlantic as detected by mtDNA-18S rDNA real-time polymerase chain reaction [J]. *Journal of Plankton Research*, 2006, **28**(7): 667—681
- [13] Zhang H, Hou Y and Lin S. Isolation and characterization of PCNA from the dinoflagellate *Pfiesteria piscicida* [J]. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 2006, **53**: 142—150
- [14] Schowpp B, Breton J and Parot P. Relative orientation of the hemes of the cytochrome *b* complexes from *Rhodobacter* Sp. haeroides, *Rhodospirillum rubrum*, and beef heart mitochondria: A linear dichroism study [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2000, **275**(8): 5284—5290
- [15] Iw in D W, Kocher T D and Wilson A C. Evolution of the cytochrome *b* gene of mammals [J]. *Journal of Molecular Evolution*, 1991, **32**: 128—144
- [16] Zarloya R, Meyer A. Phylogenetic performance mitochondrial protein coding genes in resolving relationship among Vertebrates [J]. *Molecular Biology and Evolution*, 1996, **13**: 933—942
- [17] Guo Y J, Yang Z Y. Phytoplankton. In: Liu R Y (Eds.),

- Ecology and bio-resource in Jiaozhou Bay [M]. Beijing: Science Press, 1992, 136—170 [郭玉洁, 杨则禹. 浮游植物. 见: 刘瑞玉主编. 胶州湾生态学和生物资源. 北京: 科学出版社, 1992, 136—170]
- [18] Pennock J R. Chlorophyll distributions in the Delaware Estuary: regulation by light limitation [J]. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 1985, **21**: 711—725
- [19] Kunino T, Masakazu M, Ken-ichiro H, *et al*. Standing stock and production rate of phytoplankton and a red tide outbreak in a heavily eutrophic embayment: Dokai Bay, Japan [J]. *Marine Pollution Bulletin*, 2001, **42**: 1177—1186
- [20] Wang G L, Huang X Q, Jiang X B, *et al*. Distribution and characteristic of *Skeletonema Costatum* on Changjiang estuary [J]. *Marine Environmental Science*, 1993, **3**: 51—54 [王桂兰, 黄秀清, 蒋晓山, 等. 长江口中肋骨条藻赤潮的分布与特点. 海洋环境科学, 1993, **3**: 51—54]
- [21] Qin X M and Zou J Z. Study on the effects of N, P, Fe-EDTA, Mn on the growth of a red tide dinoflagellate *Scrippsiella trochoidea* [J]. *Oceanologia Et Limnologia Sinica*, 1997, **28**(6): 594—598 [秦晓明, 邹景忠. N, P, Fe-EDTA, Mn对赤潮生物锥状斯氏藻增殖影响的初步研究. 海洋与湖沼, 1997, **28**(6): 594—598]
- [22] Arun K D, M R M ichelle, R K Kurt. Quantitative assay for measuring the Taura syndrome virus and yellow head virus load in shrimp by real-time RT-PCR using SYBR Green chemistry [J]. *Journal of Virological Methods*, 2002, **104**: 69—82
- [23] Jason P T, M Eli and E A Martin. Detection and identification of *Candida* species associated with *Candida* vaginitis by real-time PCR and pyrosequencing [J]. *Molecular and Cellular Probes*, 2005, **19**: 145—152
- [24] Tin J D, E H Janet, A B Seth, *et al*. Andrew. Enumeration of specific bacterial populations in complex intestinal communities using quantitative PCR based on the chaperonin-60 target [J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2006, **64**: 46—62
- [25] Rachel M, B Sharon, C B Brian, *et al*. Determination of changes in mRNA expression in a rat model of neuropathic pain by TaqmanE quantitative RT-PCR [J]. *Molecular Brain Research*, 2001, **90**: 48—56
- [26] Tsuyoshi U, A Javier, S K anane. Rapid quantification of murine endothelin-1 and vasoactive intestinal contractor gene expression levels by a real-time PCR system [J]. *Journal of Biotechnology*, 2000, **84**: 187—192
- [27] Lin B X ie, J Su Y T, *et al*. Effect of high carbohydrate levels of dietary on growth, GK activities and GK mRNA levels in topmouth culter (*Cyprinus carpio* var. *haasi*) [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2008, **32**(1): 48—53 [刘波, 谢骏, 苏永腾, 等. 高碳水化合物日粮对翘嘴红鲌生长、GK及 GK mRNA表达的影响. 水生生物学报, 2008, **32**(1): 48—53]

RELATIONSHIP BETWEEN PROLIFERATING CELL NUCLEAR ANTIGEN GENE EXPRESSION AMOUNT AND GROWTH RATE OF *SKELETONEMA COSTATUM*

HE Shan-Ying¹, YU Zhigang² and MITIE-Zhu³

(1. College of Environmental Science and Engineering, Zhejiang Gongshang University, Hangzhou 310012; 2. College of Chemistry and Chemical Engineering, Ocean University of China, Qingdao 266003; 3. College of Environmental Science and Engineering, Ocean University of China, Qingdao 266003)

Abstract The mensuration of the physiological and ecological parameters such as the in situ growth rate is the basic of understanding the regulation of phytoplankton dynamics, constructing the ecological dynamic models and even forecasting the happening of red tide. While a correctly estimating method of the in situ growth rate is still lack. In recent years, the international research on the molecular markers of the cell cycle has shown that the proliferating cell nuclear antigen (PCNA) is of encouraging potential to study the phytoplankton growth rate, which provides a new visual angle of study the algal growth rate. In this study, *Skeletonema costatum* was taken as the object which was a familiar red tide alga in Chinese coast and its molecular markers about growth rate were studied in this paper. The partial sequence of *S. costatum* proliferating cell nuclear antigen (PCNA) gene was obtained by RT-PCR and 3'-RACE techniques, and a 714bp cytochrome *b* (*Cyt b*) gene fragment of *S. costatum* was cloned for the first time. Based on the cloned sequences, a RFQ-PCR method was developed to detect the *S. costatum* PCNA and *Cyt b* gene respectively and the accuracy of the standard curves was verified. The equation for detecting *S. costatum* PCNA was defined as $y = -3.055x + 41.093$ ($r = 0.999$), where x was the logarithm of the plasmid copy number and y was the C_T values. The equations for *Cyt b* was defined as $y = -4.0x + 44.96$ ($r = 0.997$). The above method was applied to study the relationship between the *S. costatum* growth rate μ (/d) and the average expression quantity of PCNA gene in a single cell. In about 3 weeks' culture, the PCNA gene expression showed distinct changes in the different growth phases and was consistent to the growth rate. The PCNA expression was the

highest in the exponential growth phase (46 200 copies/cell μ = 0.742). The PCNA expression in the stationary phase was lower (0.950 copies/cell μ = 0.002), and reached to the lowest level (0.040 copies/cell μ = - 0.104) in the decline phase. And in group 1 and 2, the expression amount of PCNA gene also had large variation in different culture phases, and the trend was well consistent with the growth rate, all of which suggested that the expression amount of PCNA gene correlated well with the cell division, and the PCNA might be a promising indicator for the *S. costatum* cell proliferation. While the expression amount of Cyt *b* gene had no obvious variation during different culture phases, which indicated that the Cyt *b* was a good potential house-keeping gene. A new formula for enumerating *S. costatum* growth rate in the lab situation was established between the growth rate μ (/d) and the relative expression amount of PCNA gene. In which, the PCNA gene was used as the objective gene, the Cyt *b* gene was used as the house-keeping gene, and the relative expression amount of PCNA gene (REQ) was used as an indicator to the *S. costatum* growth rate, and the formula $REQ = \lg (\text{PCNA expression quantity} / \text{Cyt } b \text{ expression quantity}) + 10$ was used to calculate the PCNA REQ. The results of group 1 and group 2 suggested that the PCNA REQ was well consistent with the growth rate, and their correlation was 0.90 in group 1 and 0.97 in group 2. So the PCNA REQ might be a good method to estimate the growth rate of *S. costatum*. However, more experiment was necessary to show on the different illuminations, temperatures and nutrition conditions and even the spot samples, whether there were good relationship between them all the same. Furthermore, a growth rate (μ) estimation method by PCNA REQ could be established. This research paved a way for using molecular biological methods to enumerating the *S. costatum* in situ growth rate accurately, and which could provide an effective approach to study the red tide algae.

Key words *Skeletonema costatum*; Growth rate; Fluorescent quantitative PCR; PCNA; Cyt *b*