

## 环境污染物对斑马鱼早期胚胎转座子转录活性的影响

高波, 陈才, 张丽, 沈丹, 王赛赛,  
陈伟, 王伟, 产舒恒, 宋成义\*

(扬州大学动物科学与技术学院, 江苏扬州 225009)

**摘要:** 转座子在生物基因组中占据重要的组成部分, 是基因组中可移动和扩展的重要元件, 其转座活性受外界环境因子调控。为了探讨环境应激对基因组转座子表达活性的影响, 用环境污染物二噁英(TCDD)和重金属 $\text{Cu}^{2+}$ 或 $\text{Cd}^{2+}$ 处理斑马鱼早期胚胎, 通过荧光定量PCR(qRT-PCR)比较处理前后9种结构完整的转座子转录活性变化, 这9种转座子分别是DNA转座子Tc1家族的Tc-a、Tc-b、Tc-c、Tc-d、Tc-e, 反转录转座子病毒家族ZB-ERV-1、ZB-ERV-2、反转录转座子LINE家族L1-323和L1-21。结果发现, TCDD使8个转座子转录活性明显下调, 1个转座子显著上调;  $\text{Cu}^{2+}$ 导致7个转座子上调, 2个显著下调;  $\text{Cd}^{2+}$ 导致6个转座子上调, 3个显著下调。研究表明, 斑马鱼转座子转录活性受环境因素影响显著, 环境胁迫可能是转座子活性变化的原因之一。本研究对了解和评估环境因子对鱼类转座子活性的影响作用具有重要的意义, 为进一步研究生物基因组的进化机制提供参考。

**关键词:** 斑马鱼; 转座子; 污染物; 转录活性

**中图分类号:** Q 784; S 917.4

**文献标志码:** A

转座子是一类具有迁移特性的可移动遗传因子, 又称转座因子(transposable element, TE)属于散在重复序列的一种, 是染色体上可移位和自主复制的基本单位, 其本质是具有不同结构和换位机制的移动基因序列<sup>[1]</sup>。转座子曾被认为是基因组上“垃圾序列”, 然而越来越多的研究表明, 转座子对宿主基因组的进化、基因结构、染色体重组及基因活性的调节等很多领域都有着重要作用<sup>[2-3]</sup>。

通过生物信息学分析发现, 在基因组长期进化过程中, 虽然大量转座子已发生突变, 失去转座活性, 但基因组中仍存在着活性转座子。生物很可能通过基因组上的这些活性转座子实现基因组对环境变化的响应, 即环境变化影响转座子活性, 调控转座的发生, 进而产生新的变异, 适应新的外界环境<sup>[4]</sup>。植物转座子的

表达活性受表观遗传学和环境因素影响。逆境胁迫条件下表观遗传变化是引起植物转座子活性变异的重要机制<sup>[5]</sup>。紫外线和 $\gamma$ 射线会导致玉米中的转座子更为活跃, 籽粒产生更多的斑点, 组培再生之后, 斑点依然出现, 说明环境胁迫可影响转座子转座活性<sup>[6]</sup>。那么逆境胁迫对动物转座子活性有无影响, 目前未见相关报道。

斑马鱼(*Danio rerio*)因其强繁殖力、体外受精, 易饲养、胚胎透明以及可以直接观察胚胎早期发育等特点而成为重要的模式动物, 被广泛地用于分子生物学研究等领域。我们前期利用生物信息学方法对9种硬骨鱼基因组的转座子成份进行了注释, 进行了物种间比较分析, 并挖掘出潜在的9个活性转座子。为了探讨动物转座子和环境因子的互作效应, 本实验以前期分析获得的活性转座子为实验对象, 将斑马鱼早

收稿日期: 2016-08-30 修回日期: 2016-10-30

资助项目: 国家自然科学基金(31671313); 江苏省优势学科专项

通信作者: 宋成义, E-mail: cysong@yzu.edu.cn

期胚胎暴露于二噁英(TCDD)和重金属, 检测各种转座子对环境胁迫下表达活性的变化。这了解转座子的环境适应性进化及基因组进化具有重要的意义。

## 1 材料与方 法

### 1.1 实验材料

荧光定量PCR试剂盒FastFire qPCR PreMix (SYBR Green)、反转录试剂盒FastQuant RT Kit (含gDNase)购自天根生物有限公司; 总RNA提取试剂Trizol购自Invitrogen公司; TCDD、DMSO购自Sigma; CuSO<sub>4</sub>、CdCl<sub>2</sub>购自国药; 其他试剂为国产分析纯级。斑马鱼为Tuebingen品系, 购自国家斑马鱼资源中心, 饲养条件为14 h : 10 h明暗交替, 温度27~28 °C。

### 1.2 实验方法

**胚胎收集** 选用6~10月龄Tuebingen品系的成年斑马鱼, 收卵前一天, 将雄鱼 : 雌鱼数量比1 : 2放于繁殖盒中, 次日移去隔板, 雌雄鱼即开始追逐交配产卵, 10 min后收集发育正常的受精卵进行暴露试验。

**TCDD暴露** 将50枚2 hpf (hours post-fertilization)阶段斑马鱼胚胎置于含5 nmol/L TCDD E3培养液中, 暴露2 h后, 换正常E3培养液继续培养至72 hpf, 同时设0.01% DMSO为溶剂对照组, 每组3个重复, 每个重复50枚胚胎。实验在相同条件下重复3次。胚胎培养于直径为94 mm培养皿, 温度(27±1.5) °C, 14 h光照/10 h黑暗, 每24 h更换一次新鲜的培养液。

**重金属暴露** 将1 hpf (hours post-fertilization)阶段斑马鱼胚胎暴露于5 μmol/L Cu<sup>2+</sup>或20 μmol/L Cd<sup>2+</sup>, 暴露24 h后, 换正常E3培养液继续培养至72 hpf。同时设置空白对照组, 每组3个重复, 每个重复50枚胚胎。实验在同样的条件下重复3次。胚胎培养于直径为94 mm培养皿, 温度(26±1.5) °C, 14 h光照 : 10 h黑暗, 每24 h更换一次新鲜的培养液。

**RNA提取** 分别收集处理组和对照组72 hpf胚胎, 液氮中速冻, -70 °C冻存。每组取30枚胚胎, 根据试剂说明书, 使用Trizol提取总RNA, 琼脂糖凝胶电泳检测RNA质量, 核酸浓度测定测定RNA浓度和纯度, -70 °C冻存备用。

**引物设计** 首先通过生物信息学方法鉴别各种转座子序列, 选择其中结构完整, 具有完整开放阅读框, 且在基因组中以多拷贝形式存在的9个转座子(Tc-a、Tc-b、Tc-c、Tc-d、Tc-e、ZB-ERV1、ZB-ERV2、L1-323、L2-21)作为检测对象, 根据每个转座子开放阅读框序列利用Primer premier 5软件设计引物, 同时根据斑马鱼延伸因子EF-1序列设计引物作为内参。引物由上海英潍捷基贸易有限公司合成(表1)。

表 1 qRT-PCR引物序列

Tab. 1 Primer sequences for qRT-PCR

基因 gene	引物序列(5'-3') primer sequences	产物大小/bp product size
Tc-a	F: GGTTGTTCTCTGCAAGGG	191
	R: TTGAGCCACTCTTGTGTC	
Tc-b	F: CTCACAAAGCAGGAGAAGGC	209
	R: GACCCATCGTGCAGTCAAAC	
Tc-c	F: TGCTGAATGTTCTGTGAGC	185
	R: TGCGAGGTCTTCCTGAAGTT	
Tc-d	F: GCTGCGAACAATCCAAAT	178
	R: CACTTCTCCGGCTGTCTC	
Tc-e	F: GCTGCGAACAATCCAAAT	190
	R: TGGGTCATTATCATGCTGGA	
ZB-ERV1	F: TGGGAAGATAGGACAGGGGA	165
	R: GTGGATGAAATGGCGAGTCC	
ZB-ERV2	F: TCGTTCACCTTCTGTGCCTT	167
	R: AGGCCCTCTCTGACTACTGA	
L1-323	F: CCCAGTCTGTCTTCTCTGT	199
	R: GCCTCAAAGACAAACAGCCA	
L2-21	F: TGAGAACACCAGTGAGCAGT	229
	R: CCACATACGCTCAGCTTTCC	
EF-1	F: GATGCACCACGAGTCTCTGA	158
	R: TGATGACCTGAGCGTTGAAG	

**实时荧光定量PCR (qRT-PCR)检测** 以处理组和对照组总RNA为模板, 根据逆转录反应试剂盒说明书, 先用gDNase高效去除基因组DNA, 再用试剂盒提供的FQ-RT引物反转录成cDNA第一链, 经验证无基因组污染后作为相对定量PCR模板。qRT-PCR采用SYBR Green方法, 在Roche荧光定量仪系统中进行。反应体系为20 μL,

包括2×SuperReal PreMix Plus 10 μL, 10 μmol/L正、反向引物各0.6 μL, cDNA第一链1 μL, RNase-Free ddH<sub>2</sub>O补足至20 μL。扩增采用3步法: 预变性95 °C 15 min; 95 °C变性10 s, 60 °C退火20 s, 72 °C延伸20 s, 40个循环; 72 °C终延伸10 min。每个样本设3个平行, 采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 计算各转座子相对表达量。

**统计分析** 运用SPSS 22.0软件进行实验数据的统计, 实验数据以平均数±标准误(mean±SE)表示, 用单因素方差分析(One-Way ANOVA)进行显著差异的计算,  $P<0.05$ 表示差异显著。

## 2 结果

### 2.1 TCDD对斑马鱼胚胎转座子转录活性的影响

为了探讨TCDD对斑马鱼早期发育阶段转座子表达水平的影响, 收集处理组和对照组胚胎, 提取RNA反转录成cDNA, 通过qRT-PCR法检测9个转座子的开放阅读框转录水平。结果表明, 对照组和处理组胚胎发育正常, 无明显外形变化。与对照组相比, TCDD处理组9种转座子转录活性大部分呈现下调趋势, 其中DNA转

座子Tc-a、Tc-b、Tc-c和Tc-e均显著低于对照组( $P<0.05$ ), 而Tc-d与对照组差异不显著(图1)。反转录转座子ZB-ERV-1转录活性显著下调( $P<0.05$ ), ZB-ERV-2显著上调( $P<0.05$ ); L1-323、L2-21略低于对照组, 差异不显著(图2)。

### 2.2 Cu<sup>2+</sup>对转座子转录活性的影响

将0.5 hpf阶段斑马鱼胚胎持续暴露在含5 μm/L CuSO<sub>4</sub> E3培养液中, 24 h后换新鲜的E3溶液继续培养至72 hpf, 分别收集对照组和处理组胚胎, 提取RNA反转录成cDNA, qRT-PCR法检测9个转座子转录水平。结果表明, Cu<sup>2+</sup>处理之后的斑马鱼胚胎的DNA转座子Tc-a、Tc-c和Tc-d呈显著上调上升趋势( $P<0.05$ ), 而Tc-b显著下调( $P<0.05$ )(图3); 反转录转座子中ZB-ERV-2、L1-323和L2-21呈现上调, 但与对照组差异不显著。而ZB-ERV-1显著下调( $P<0.05$ )(图4)。

### 2.3 Cd<sup>2+</sup>对斑马鱼胚胎转座子转录活性的影响

将0.5 hpf阶段斑马鱼胚胎持续暴露在含30 μm/L CdCl<sub>2</sub> E3培养液中, 24 h后换新鲜的E3溶液继续培养至72 hpf, 分别收集对照组和处理组胚胎, 提取RNA反转录成cDNA, qRT-PCR法检测9个转

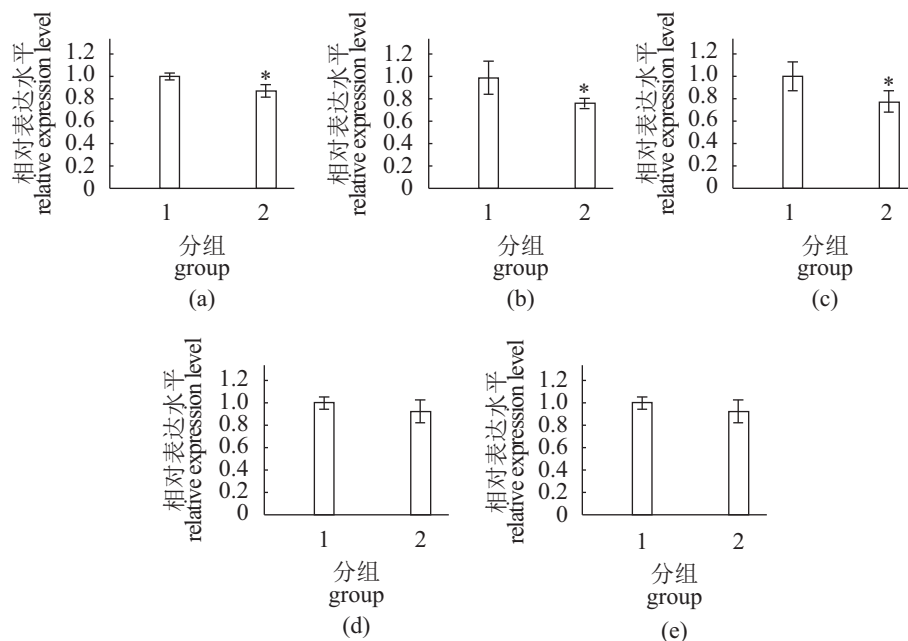


图1 TCDD对斑马鱼胚胎DNA转座子转录活性影响

1. 对照组, 2. 处理组; a、b、c、d、e分别为Tc-a、Tc-b、Tc-c、Tc-d和Tc-e 5个转座子; “\*”表示差异显著( $P<0.05$ )

Fig. 1 Effect of TCDD on the activity of DNA transposons in zebrafish embryos

1. control group, 2. treatment group; a, b, c, d and e represent the 5 transposons, Tc-a, Tc-b, Tc-c, Tc-d and Tc-e; “\*” represent significant difference ( $P<0.05$ )

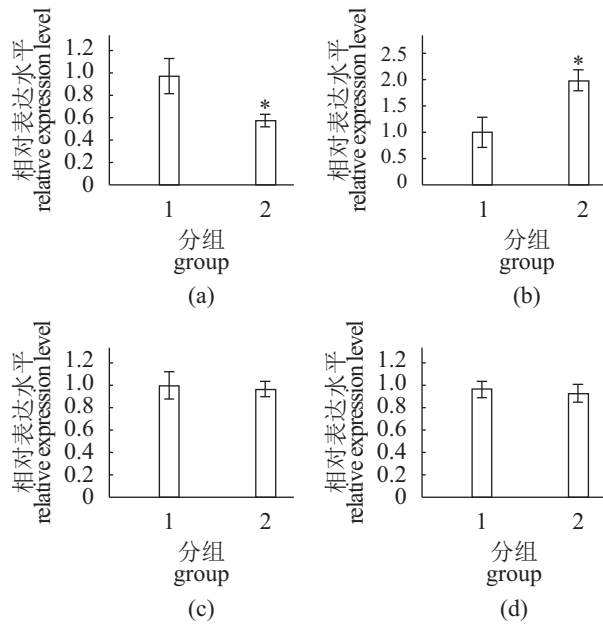


图2 TCDD对斑马鱼胚胎反转录转座子转录活性影响

1. 对照组, 2. 处理组; a、b、c、d分别为ZB-ERV-1、ZB-ERV-2、L1-323、L2-21反转录转座子; “\*”表示差异极显著( $P<0.05$ )

Fig. 2 Effect of TCDD on the activity of retrotransposons on zebrafish embryos

1. control group, 2. treatment group; a, b, c and d represent the retotransposons, ZB-ERV-1, ZB-ERV-2, L1-323 and L2-21; “\*” represent significant difference ( $P<0.05$ )

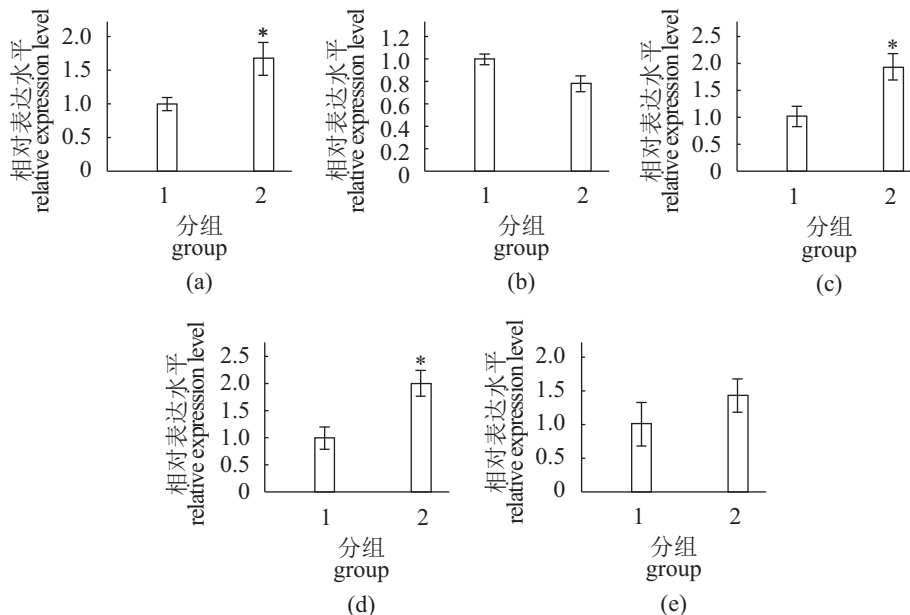


图3  $\text{Cu}^{2+}$ 对斑马鱼胚胎DNA转座子转录活性影响

1. 对照组, 2. 处理组; a、b、c、d、e分别为Tc-a、Tc-b、Tc-c、Tc-d和Tc-e 5个转座子; “\*”表示差异极显著( $P<0.05$ )

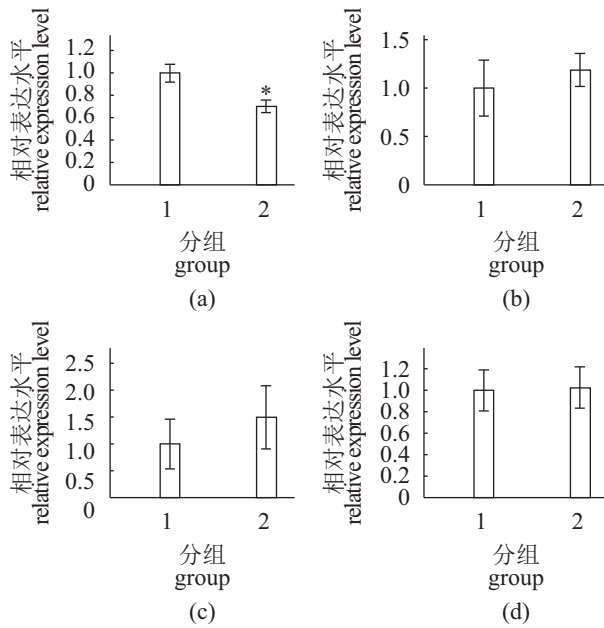
Fig. 3 Effect of  $\text{Cu}^{2+}$  on the activity of DNA transposons in zebrafish embryos

1. control group, 2. treatment group; a, b, c, d and e represent the 5 transposons, Tc-a, Tc-b, Tc-c, Tc-d and Tc-e; “\*” represent significant difference ( $P<0.05$ )

座子转录水平。结果表明,  $\text{Cd}^{2+}$ 处理后, 5个DNA转座子除Tc-b显著下调( $P<0.05$ ), 其余4个均上调, 其中Tc-a、Tc-c和Tc-d与对照差异显著( $P<0.05$ )(图5); 反转录转座子ZB-ERV-2、ZB-ERV-1和L2-21呈现下调, 其中ZB-ERV-1显著下调, 而L1-323显著增强( $P<0.05$ )(图6)。

### 3 讨论

环境适应性进化是生物学领域的热点之一, 生物为了能够适应大自然环境的变化, 需要基因组一直保持一个动态变化平衡的体系, 需要遗传物质不断变化给物种提供进化素材。这种遗传物质的变化形式主要是突变(染色体畸变和基因突变)和转座子迁移导致基因重排, 促进了物种的变异<sup>[7]</sup>。本实验为了探讨环境因素对转座子活性的影响, 选择持久性有机污染物TCDD以及 $\text{Cu}^{2+}$ 和 $\text{Cd}^{2+}$ 对斑马鱼早期胚胎进行环境诱导, 结果表明, 环境变化对9个活性转座子表达水平有显著影响, 不同诱导因素可使转座酶转录水平呈现上调或下调, 提示TCDD可能导致转座活性发生变化, 从而影响斑马鱼基因组的稳定性和基因表达调控。



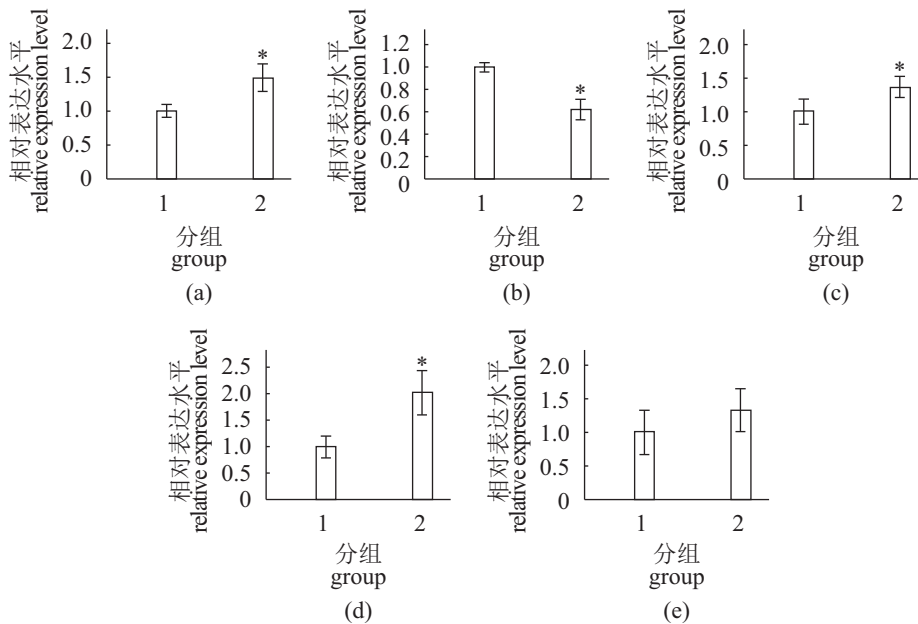
**图 4 Cu<sup>2+</sup>对斑马鱼胚胎反转录转座子转录活性影响**  
 1. 对照组, 2. 处理组; a、b、c、d 分别为 ZB-ERV-1、ZB-ERV-2、L1-323、L2-21 反转录转座子; “\*”表示差异显著 ( $P < 0.05$ )

**Fig. 4 Effect of Cu<sup>2+</sup> on the activity of retrotransposons in zebrafish embryos**

1. control group, 2. treatment group; a, b, c and d represent the retotransposons, ZB-ERV-1, ZB-ERV-2, L1-323 and L2-21; “\*” represent significant difference ( $P < 0.05$ )

研究表明, TCDD对生殖性能影响大, 可导致部分生殖相关的基因被诱导表达或被抑制, 如与发育相关的基因细胞色素P450和环氧合酶基因<sup>[8]</sup>。目前认为TCDD主要是通过激活AHR通路, 进而影响下游功能基因的表达<sup>[9]</sup>, 但基因激活机制并不清楚。本实验将斑马鱼早期胚胎暴露于TCDD, qRT-PCR检测结果表明, 除1种转座子表达上调外, TCDD抑制了其余8种转座子的表达, 提示转座子活性变化可能导致斑马鱼早期发育相关基因的异常表达, 从而影响胚胎发育。

水生系统中Cu<sup>2+</sup>浓度的升高会对鱼类造成一定范围的负面影响, 包括生长缓慢、内分泌紊乱<sup>[10-11]</sup>。高浓度的Cu<sup>2+</sup>是造成自由基水平升高、引起氧化损伤、蛋白功能的改变, 以及基因表达改变的原因<sup>[12]</sup>。而Cd<sup>2+</sup>可造成细胞抗氧化防御系统的破坏、活性氧的诱导、以及DNA修复和DNA甲基化的抑制及改变内分泌系统等<sup>[13]</sup>。本研究将斑马鱼暴露于Cu<sup>2+</sup>溶液中, 9种转座子表达水平整体上调。而Cd<sup>2+</sup>处理导致斑马鱼胚胎DNA转座子表达水平普遍增强, 而RNA转座子表达抑制。上述结果提示Cu<sup>2+</sup>和Cd<sup>2+</sup>可导致转座子活性改变, 而这种改变是否为引起机体损伤



**图 5 Cd<sup>2+</sup>处理后斑马鱼胚胎DNA转座子转录活性变化**

1. 对照组, 2. 处理组; a、b、c、d、e 分别为 Tc-a、Tc-b、Tc-c、Tc-d 和 Tc-e 5 个转座子; “\*”表示差异显著 ( $P < 0.05$ )

**Fig. 5 Effect of Cd<sup>2+</sup> on the activity of DNA transposons in zebrafish embryos**

1. control group, 2. treatment group; a, b, c, d and e represent the 5 transposons, Tc-a, Tc-b, Tc-c, Tc-d and Tc-e; “\*” represent significant difference ( $P < 0.05$ )

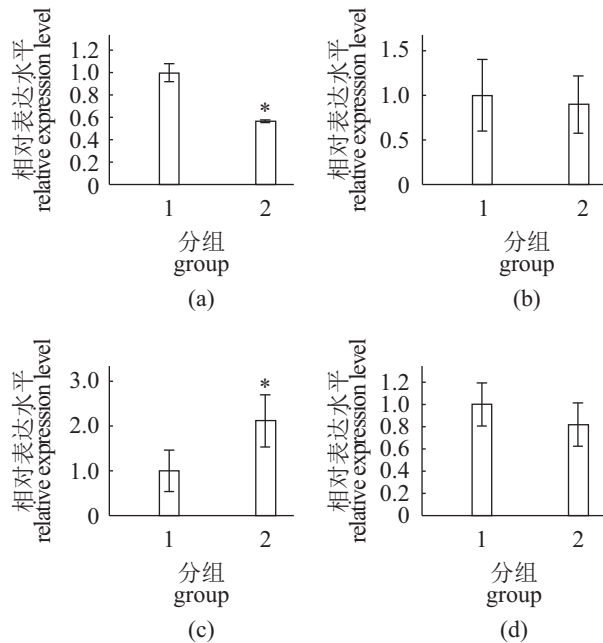


图 6  $\text{Cd}^{2+}$ 处理后斑马鱼胚胎反转录转座子转录活性变化

1. 对照组, 2. 处理组; a、b、c、d 分别为 ZB-ERV-1、ZB-ERV-2、L1-323、L2-21 反转录转座子; “\*”表示差异显著 ( $P < 0.05$ )

**Fig. 6 Effect of  $\text{Cd}^{2+}$  on the activity of retrotransposons in zebrafish embryos**

1. control group, 2. treatment group; a, b, c and d represent the retrotransposons, ZB-ERV-1, ZB-ERV-2, L1-323 and L2-21;

的直接原因, 仍需要进一步验证相关通路上的基因表达变化。

经 TCDD、 $\text{Cu}^{2+}$ 或 $\text{Cd}^{2+}$ 处理后, 本实验中斑马鱼胚胎发育早期转座子表达活性发生变化, 但表现型未见明显异常, 其原因可能在于: 诱导时间较短, 本实验诱导时间仅为 24 h, 如果延长或长期暴露于胁迫环境, 可能会影响早期胚胎及后期幼鱼各组织正常发育; 另外, 转座子表达活性变化, 短期内可能不会造成严重表型缺陷。此外, 生物对环境污染物具有一定的耐受性, 本实验的目的是探讨环境因子对斑马鱼基因水平的影响, 所用 3 种化学物质浓度可能较低, 从而未造成胚胎大量死亡或畸形, 但对转座子的表达水平影响显著, 这反映了低浓度污染物对生物基因组稳定性可能仍具有影响。

**参考文献:**

[1] Okada N. Transfer RNA-like structure of the human Alu family: Implications of its generation mechanism and possible functions[J]. Journal of Molecular Evolution,

1990, 31(6): 500-510.

- [2] Doolittle W F, Sapienza C. Selfish genes, the phenotype paradigm and genome evolution[J]. Nature, 1980, 284(5757): 601-603.
- [3] Mandaokar A, Kumar V D, Amway M, *et al.* Microarray and differential display identify genes involved in jasmonate-dependent anther development[J]. Plant Molecular Biology, 2003, 52(4): 775-786.
- [4] Biémont C, Vieira C. Genetics: Junk DNA as an evolutionary force[J]. Nature, 2006, 443(7111): 521-524.
- [5] Vongs A, Kakutani T, Martienssen R A, *et al.* Arabidopsis thaliana DNA methylation mutants[J]. Science, 1993, 260(5116): 1926-1938.
- [6] Feschotte C, Jiang N, Wessler S R. Plant transposable elements: Where genetics meets genomics[J]. Nature Reviews Genetics, 2002, 3(5): 329-341.
- [7] Feschotte C, Pritham E J. DNA transposons and the evolution of eukaryotic genomes[J]. Annual Review of Genetics, 2007, 41: 331-368.
- [8] Goldstone J V, Jönsson M E, Behrendt L, *et al.* Cytochrome P450 1D1: A novel CYP1A-related gene that is not transcriptionally activated by PCB126 or TCDD[J]. Archives of Biochemistry and Biophysics, 2009, 482: 7-16.
- [9] Mandal P K. Dioxin: A review of its environmental effects and its aryl hydrocarbon receptor biology[J]. Journal of Comparative Physiology B, 2005, 175(4): 221-230.
- [10] Ricard A C, Daniel C, Anderson P, *et al.* Effects of subchronic exposure to cadmium chloride on endocrine and metabolic functions in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*[J]. Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 1998, 34(4): 377-381.
- [11] Lurén D J, McDonald D G. Acclimation to copper by rainbow trout, *Salmo gairdneri*: Biochemistry[J]. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 1987, 44(1): 99-104.
- [12] Tapiero H, Townsend D M, Tew K D. Trace elements in human physiology and pathology[J]. Biomedicine & Pharmacotherapy, 2003, 57(9): 386-398.
- [13] 吕景才, 宋晓阳, 王凡, 等. 镉污染对鲢抗氧化防御系统影响研究[J]. 西南农业大学学报, 2002, 24(6): 491-505.
- Lv J C, Song X Y, Wang F, *et al.* The effects of cadmium pollution on the antioxidant defense system of *Aristichthus nobilis*[J]. Journal of Southwest Agricultural University, 2002, 24(6): 491-505(in Chinese).

## Effects of environmental pollutants on transcription activity of transposons during the early embryonic development of zebrafish (*Danio rerio*)

GAO Bo, CHEN Cai, ZHANG Li, SHEN Dan, WANG Saisai,  
CHEN Wei, WANG Wei, CHAN Shuheng, SONG Chengyi\*

(College of Animal Science and Technology, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China)

**Abstract:** Transposons are movable and extended elements, they are important parts in genome and can affect the genome evolution. Transposable activity is usually regulated by environmental factors. To discuss the influence of environmental stress on the activity of transposons, the zebrafish embryos at early stage were exposed to TCDD,  $\text{Cu}^{2+}$  and  $\text{Cd}^{2+}$  for two hours, respectively. Then the embryos were cultured in normal medium until 72 hpf. The total RNA of embryos were extracted and transcribed into cDNA by reverse transcription. Then the transcription activity of 9 transposons with complete gene structures after exposure were compared with that before by real-time quantity fluorescent PCR. The 9 transposons included 5 DNA transposons (Tc-a, Tc-b, Tc-c, Tc-d and Tc-e) and 4 retrotransposons (ZB-ERV-1, ZB-ERV-2, 2 L1-323 and L1-21). The results showed that the transcription activity of 8 transposons treated with TCDD obviously decreased, and that of one significantly increased; the transcription activity of 7 transposons treated with  $\text{Cu}^{2+}$  obviously increased, and that of 2 were significantly decreased; the transcription activity of 6 transposons treated with  $\text{Cd}^{2+}$  obviously increased, and that of 3 significantly decreased. Those results suggested that environment factors can significantly affect transposons expression activity, and environment stress could be the important reason for the variation of transposon activity. Those data play a very important role in evaluating and understanding the effect of environment factors on fish genome and transposon activity, and provide reference for further research on biology genome evolutionary mechanism.

**Key words:** *Danio rerio*; transposon; environment pollutants; transcription activity

**Corresponding author:** SONG Chengyi. E-mail: cysong@yzu.edu.cn

**Funding projects:** Natural Science Foundation of China (31671313); Priority Academic Program Development of Jiangsu Higher Education Institutions