

文章编号:1000-0615(2012)06-0884-09

DOI: 10.3724/SP.J.1231.2012.27758

## 坛紫菜色素突变体色素基因的表达定量分析

黄惠珍, 谢潮添, 纪德华, 徐 燕, 陈昌生\*

(集美大学水产学院, 福建 厦门 361021)

**摘要:** 以野生型和 6 种不同色泽的坛紫菜色素突变体为材料, 通过实时荧光定量 PCR 技术分析了 4 种主要色素基因(*Cpea*、*Cpca*、*Apcβ*、*Chl.a*)在不同色泽突变体不同生长期(初期、盛期、末期)的相对表达水平。结果表明在不同色泽不同生长期的坛紫菜色素突变体中, 各色素基因表达水平由高到低均为 *Apcβ*>*Cpca*>*Chl.a*>*Cpea*, 且 *Cpea* 基因的表达水平最不稳定, 会随着生长过程发生显著变化, 而 *Cpca*、*Apcβ* 和 *Chl.a* 基因表达水平则相对稳定; 此外, 对色素突变体和野生型藻体中色素基因表达水平和相应色素蛋白含量的线性相关回归分析结果表明二者间没有相关性, 即各色素基因的表达水平与藻体最终显示的颜色无关, 由此推测坛紫菜色素突变的可能机制是色素蛋白合成过程中一些相关调控基因突变所致。

**关键词:** 坛紫菜; 色素突变体; 色素基因; 实时荧光定量 PCR

**中图分类号:** Q 785; S 917

**文献标志码:** A

叶绿素 a(Chlorophyll a, *Chl.a*)、藻红蛋白(Phycocerythrin, PE)、藻蓝蛋白(Phycocyanin, PC)和别藻蓝蛋白(Allophycocyanin, APC)是紫菜进行光合作用的主要捕光色素<sup>[1]</sup>, 其中 *Chl.a*、PE 和 PC 3 种色素的含量和比例决定了紫菜藻体的色泽, 不同含量和比例的组合产生了紫菜不同颜色的突变体<sup>[2]</sup>。最早报道紫菜色素突变体的是三浦沼雄等, 他们从紫菜养殖筏架上获得的条斑紫菜(*Porphyra yezoensis*)色彩嵌合体中分离出了红色型和绿色型突变体<sup>[3]</sup>。随后 Miura<sup>[4-5]</sup>、Migita 等<sup>[6]</sup>和 Niwa 等<sup>[7]</sup>进行了一系列条斑紫菜色素突变体的杂交研究, 获得了一些新型的色素突变体。国内, 许璞等<sup>[8-9]</sup>研究了强诱变剂 N-甲基-N'-硝基-N-亚硝基胍(NG)诱导条斑紫菜壳孢子和叶状体产生色素突变体的效果, 提出了最佳的诱导浓度和诱导时间。严兴洪等通过化学诱变剂诱变获得了 3 个条斑紫菜色素突变体<sup>[10]</sup>, 通过 <sup>60</sup>Co-γ 诱变获得了多个不同颜色的坛紫菜(*P. haitanensis*)和条斑紫菜色素突变体<sup>[11-12]</sup>。徐燕等<sup>[13]</sup>则通过诱变和杂交获得了坛紫菜 7 种不

同颜色的色素突变体, 柳佩娟等<sup>[14]</sup>对其生长和品质性状等进行了初步研究<sup>[13-14]</sup>。Li 等<sup>[15]</sup>通过 NG 诱导丝状体获得了条斑紫菜绿色型突变体。

紫菜色素突变作为紫菜生活中发生的特殊生命现象, 以不同颜色作为标记的遗传分析, 使紫菜遗传学研究取得了长足进展。如 Miura 等<sup>[16]</sup>对条斑紫菜隐性核等位基因控制的研究、Miura 等<sup>[17]</sup>的顺序四分子分析方法在紫菜遗传学上的应用、Mitman 等<sup>[18]</sup>紫菜突变颜色核外遗传分析, 以及 Yan 等<sup>[19]</sup>对坛紫菜减数分裂在生活史中发生位置的研究, Xie 等<sup>[20]</sup>构建的坛紫菜遗传连锁图谱等, 都是在应用色素突变体作为标记的前提下完成的。同时在育种工作中, 色素突变可作为标记性状, 简化良种繁育和杂交筛选过程, 某些具有特殊优良性状的色素突变还为紫菜的遗传育种提供了优秀的种质资源; 此外在基础研究中, 色素突变体还是研究紫菜光合作用和代谢途径等生理过程的理想材料。

尽管紫菜色素突变体已成为藻类学的研究热点, 但由于紫菜色素突变体形成的分子机制比较

收稿日期: 2011-10-05 修回日期: 2012-01-17

资助项目: 国家自然科学基金项目(41176151); 公益性行业(农业)科研专项(200903030); 海洋公益性行业科研专项(201105008,201105023); 福建省杰出青年基金项目(2010J06016); 福建省教育厅新世纪优秀人才项目(JA10186)

通讯作者: 陈昌生, E-mail: cschen@jmu.edu.cn

http://www.scxuebao.cn

复杂, 目前有关紫菜色素突变体色泽分子调控机制研究很少, 已有的研究仅局限在有关色素基因的克隆和原核表达上, 如左正宏等<sup>[21]</sup>和闫国良等<sup>[22-23]</sup>先后克隆了坛紫菜别藻蓝蛋白, 藻红蛋白和藻蓝蛋白的  $\alpha$  亚基、 $\beta$  亚基基因, 并实现了这些基因的原核表达。蔡春尔等<sup>[24]</sup>克隆了条斑紫菜藻红蛋白和藻蓝蛋白的  $\alpha$  亚基、 $\beta$  亚基基因。

本研究在这些已知色素基因序列的基础上, 设计引物, 以管家基因 18S rRNA 为内参, 通过实时荧光定量 PCR 技术(qPCR)检测各色素基因在坛紫菜不同色泽突变体不同生长时期(初期、盛期、末期)的表达情况, 以探究坛紫菜生长过程中色素基因表达的规律及藻体色泽与其色素基因表达水平之间的相关性, 期望能为后续紫菜色泽调控机理的阐明提供基础资料。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

坛紫菜不同色泽的色素突变体(褐绿色、翠绿色、红色、红棕色、橘红色、紫色)均为本实验室通过诱变和杂交选育, 并保存于福建省坛紫菜种质资源库中的纯系丝状体。以选自平潭牛山岛的野生型坛紫菜纯系作为对照。

将各坛紫菜纯系丝状体分别进行促熟、壳孢子分散和幼苗充气培养, 幼苗培养条件: 温度(21±1) °C, 光照强度 50~60  $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ , 昼夜光周期为 12 h : 12 h, 且每 3 天更换一次新鲜培养液。待叶状体长到长度为 3.5~4.5 cm 时, 挑出进行单株培养, 根据实验室已有的各藻体生长性状数据, 结合实际的培养情况, 分别挑选培养相应日龄(表 1)的初期[藻体长度为 (5.0±0.5) cm]、盛期(长度增长率最快的时期)和末期(藻体开始形成果孢子囊或精子囊的时期)藻体进行实验。

### 1.2 实验方法

**坛紫菜总 RNA 分离** 收集相同生长期坛紫菜藻体 0.1 g, 经滤纸吸干和液氮研磨后, 采用 EASYspin 植物 RNA 快速提取试剂盒(艾德莱生物技术有限公司, 北京)提取各样品的总 RNA, 并用紫外分光光度计测定浓度和纯度, 1.5%琼脂糖凝胶电泳检测总 RNA 完整性。

**逆转录** 分别在两个 0.5 mL 的 PCR 管中加入如下反应组分: 2  $\mu\text{g}$  总 RNA, 20  $\mu\text{mol}/\text{L}$  Random Primer 2  $\mu\text{L}$ , 加无 RNA 酶双蒸水至总体积 11  $\mu\text{L}$ , 混合均匀后 70 °C 孵育 2 min, 再在冰上冷却 2 min。接着向两个 PCR 管中分别继续加入如下反应组分: 5×RT buffer 4  $\mu\text{L}$ , 10 mmol/L dNTP 4  $\mu\text{L}$ , 200 U/ $\mu\text{L}$  逆转录酶(PrimeScript<sup>R</sup> Rtase, TaKaRa)1  $\mu\text{L}$ , 混合均匀后 25 °C 孵育 5 min, 再转移至 37 °C 孵育 2.5 h。逆转录合成的 cDNA 置于 -20 °C 冰箱备用。

**引物设计** 根据 GenBank 上已公布的坛紫菜藻红蛋白基因序列(DQ449070)、藻蓝蛋白基因序列(DQ449071)、别藻蓝蛋白基因序列(AY372218)、18S rRNA 基因序列(AB015795)和条斑紫菜叶绿素 a 基因(AP006715)分别设计实时荧光定量 PCR 引物(表 2)。

**引物验证** 对引物进行普通 PCR 扩增, 以验证各引物扩增的特异性和有效性。扩增反应体系为 10×PCR Buffer 2  $\mu\text{L}$ , 10 mmol/L dNTP 1.6  $\mu\text{L}$ , 5 U/ $\mu\text{L}$  Taqase 0.1  $\mu\text{L}$ , ddH<sub>2</sub>O 13.3  $\mu\text{L}$ , cDNA 1  $\mu\text{L}$ 。扩增程序为 94 °C 5 min; 94 °C 1 min, 60 °C 40 s, 72 °C 1 min, 35 个循环; 72 °C 10 min。反应产物由华大基因测序, 采用 BLAST 软件进行序列同源性比较分析。

**qPCR 反应条件** 在 ABI-7300 荧光定量 PCR 仪上使用 SYBR Green I 进行 qPCR 反应, 通

表 1 色素突变体不同生长期藻体的选择标准  
Tab. 1 Selected standard of different growth phases of each pigment mutant

| 种质编号<br>germplasm no. | 色素突变体<br>pigment mutant | 初期(日龄)/d<br>early phase | 盛期(日龄)/d<br>bloom phase | 末期(日龄)/d<br>last phase |
|-----------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|------------------------|
| YSXIII-1              | 野生色 wild                | 1~3                     | 11~13                   | 21~23                  |
| Z-92                  | 褐绿色 breen               | 1~3                     | 16~18                   | 28~30                  |
| Z-103                 | 翠绿色 emerald             | 1~3                     | 11~13                   | 21~23                  |
| Z-71                  | 红色 red                  | 1~3                     | 16~18                   | 26~28                  |
| Z-51                  | 红棕色 red-brown           | 1~3                     | 11~13                   | 21~23                  |
| Z-82                  | 橘红色 nacarat             | 1~3                     | 11~13                   | 21~23                  |
| YBIII                 | 紫色 purple               | 1~3                     | 11~13                   | 21~23                  |

表 2 实时荧光定量 PCR 反应引物  
Tab. 2 Primer sequences for quantitative real-time PCR

| 引物 primer          | 引物序列 (5'-3') primer sequences                            | 预期扩增片段长度/bp predicted size |
|--------------------|--|----------------------------|
| 藻红蛋白 <i>Cpea</i>   | F: TTTGCGTTTGCTCGTGATAGA<br>R: AGCATAGGGCGTTGATAAGGTAA   | 103                        |
| 藻蓝蛋白 <i>Cpca</i>   | F: AACTCAAATGCCTGGTCCAAC<br>R: CCGTTGCACCTACCTAAACA      | 116                        |
| 别藻蓝蛋白 <i>Apeβ</i>  | F: CGTTATGCTGCATGTATTGAGA<br>R: TGCACCAATAGGAACACCTAGAGA | 147                        |
| 叶绿素 a <i>Chl.a</i> | F: GTTTGGGGTAGTGTATCTCCGTCT<br>R: AAGGAAATCTCTCAGCCATCCA | 102                        |
| 18S rRNA           | F: TGGAGGGCAAGTCTGGTGA<br>R: CCGACAATTTAGAAGTGTATGATGG   | 229                        |

过前期实验摸索和比较扩增产物的特异性、溶解曲线和扩增效率等参数,确定各色素基因 qPCR 反应的最优条件:20 μL 的反应体系包括:SYBR<sup>®</sup> Green Real time PCR Master Mix(ToYoBo)10 μL、cDNA 2 μL、10 μmol/L 引物 0.8 μL、ddH<sub>2</sub>O 7.2 μL。采用两步 PCR 法进行扩增,扩增程序为 95 °C 1 min; 95 °C 15 s, 57 °C 1 min, 40 个循环。循环反应结束后先加热到 95 °C 15 s, 然后降至 60 °C 1 min, 再缓慢升温至 95 °C 15 s, 再降至 60 °C 15 s, 记录荧光信号的变化,获得扩增产物的溶解曲线。每个反应设 3 个复孔,并设阴性对照。

**标准曲线的绘制** 在选定的最优 qPCR 条件下,选择 CT 值较小样品的 cDNA 原液为模板,依次稀释 10、100、200、400、800、1 600 倍作为模板,将稀释 10 倍组浓度设为 1,对应模板浓度依次为 1.000 00、0.1000 00、0.050 00、0.025 00、0.012 50、0.006 25,每个反应设 4 个复孔。模板浓度以 2 为底取对数值作为横坐标,荧光信号到达设定的域值时所经历的循环数为纵坐标,分别绘制每对引物 qPCR 扩增的标准曲线。

**坛紫菜色素突变体色素基因表达的 qPCR 分析** 对每个样本进行 qPCR 检测,每组实验均包含 3 个生物学重复,每个生物学重复包括 4 次技术重复。每组实验均设置阴性对照和无模板对照。应用 Pfaffl 建立的数学模型进行相对定量分析,结果以平均值±标准差表示。当计算同一基因在不同样本间表达水平差异时,应用公式(1)<sup>[25]</sup>;当计算同一样本内不同基因表达水平差异时,应用公式(2)。

$$\text{Ratio} = \frac{E_{\text{target}}^{\Delta C_{t, \text{target}}(\text{calibrator-test})}}{E_{\text{ref}}^{\Delta C_{t, \text{ref}}(\text{calibrator-test})}} \quad (1)$$

式中,  $\Delta C_{t, \text{target}}(\text{calibrator-test})$  为对照样本与实验样本的目的基因  $C_t$  值差值;  $\Delta C_{t, \text{ref}}(\text{calibrator-test})$  为对照样本与实验样本的内参基因  $C_t$  值差值,  $E_{\text{target}}$ 、 $E_{\text{ref}}$  分

别为目的基因和内参基因的扩增效率。

$$\text{Ratio} = \frac{E_{(\text{target, calibrator})}^{C_{t(\text{target, calibrator})}}}{E_{(\text{target, test})}^{C_{t(\text{target, test})}} \cdot E_{\text{ref}}^{\Delta C_{t, \text{ref}}(\text{calibrator-test})}} \quad (2)$$

式中,  $C_{t(\text{target, calibrator})}$  为对照目的基因  $C_t$  值;  $C_{t(\text{target, test})}$  为实验目的基因  $C_t$  值;  $\Delta C_{t, \text{ref}}(\text{calibrator-test})$  为对照与实验的内参基因  $C_t$  值差值,  $E_{(\text{target, calibrator})}$ 、 $E_{(\text{target, test})}$ 、 $E_{\text{ref}}$  分别为对照目的基因、实验目的基因和内参基因的扩增效率。

应用 Excel 和 SPSS13.0 软件对试验数据进行统计分析,并采用单因变量多因素(不同色泽、不同时期)方差分析和最小显著差异法(LSD)比较不同样品数据间的差异,  $P < 0.05$  表示差异显著,  $P < 0.01$  表示差异极显著。同时采用 Excel 软件对各色素突变体中色素基因的表达水平和相应色素蛋白含量进行线性相关回归分析。

## 2 结果

### 2.1 引物特异性及有效性检测

以逆转录获得的 cDNA 为模板,进行普通 PCR 扩增,以检测所设计 qPCR 引物的特异性和有效性。PCR 扩增结果如图 1 所示,由图中可以看出各引物均扩增出了一条符合预期片段大小的特异性条带。将各引物的扩增产物直接进行测序,测序结果经与 GenBank 中的相应序列比对,结果发现所克隆序列与坛紫菜相应序列同源性均在 99% 以上,而与条斑紫菜相应序列的同源性也在 96% 以上。由此说明所设计的 qPCR 引物是特异和有效的。

### 2.2 各色素基因 qPCR 扩增曲线,溶解曲线和标准曲线

各色素基因 qPCR 扩增曲线符合“S”形指数增长曲线,目的基因与内参基因的动力学曲线整体平行性好,基线平整且无明显上扬趋势,指数区明显,斜率大且固定。溶解曲线显示各扩增产物均为

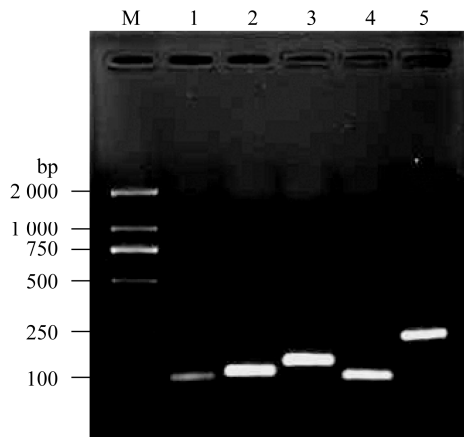


图 1 qPCR 引物 PCR 扩增产物电泳图  
 Fig. 1 Agarose electrophoresis of PCR amplification with qPCR primers  
 M. DL2000 DNA Marker; 1. *Cpeα*; 2. *Cpcα*; 3. *Apcβ*; 4. *Chl.a*; 5. 18S rRNA

单一的特异峰, *Cpeα*、*Cpcα*、*Apcβ*、*Chl.a* 和 18S rRNA 的 qPCR 扩增特异产物分别在 83.2、81.9、79.7、82.2 和 88.9 °C 达到峰值, 无引物二聚体以及非特异干扰峰存在, 阴性对照和无模板对照均无扩增, 3 个平行复孔扩增结果重复性良好。说明扩增体系和反应条件良好, 无非特异性扩增, 定量结果准确可靠。

各色素基因 qPCR 扩增相对标准曲线如图 3 所示, 由图 3 可以看出各基因 qPCR 扩增标准曲线的相关系数  $R^2$  值都大于 0.99, 说明直线线性好。由标准曲线的线性回归方程得到  $K$  值, 将  $K$  值代入方程  $E=2^{-1/k}-1$ , 即可得到各色素基因引物的扩增效率(表 3)为 0.94~1.18, 符合定量要求。

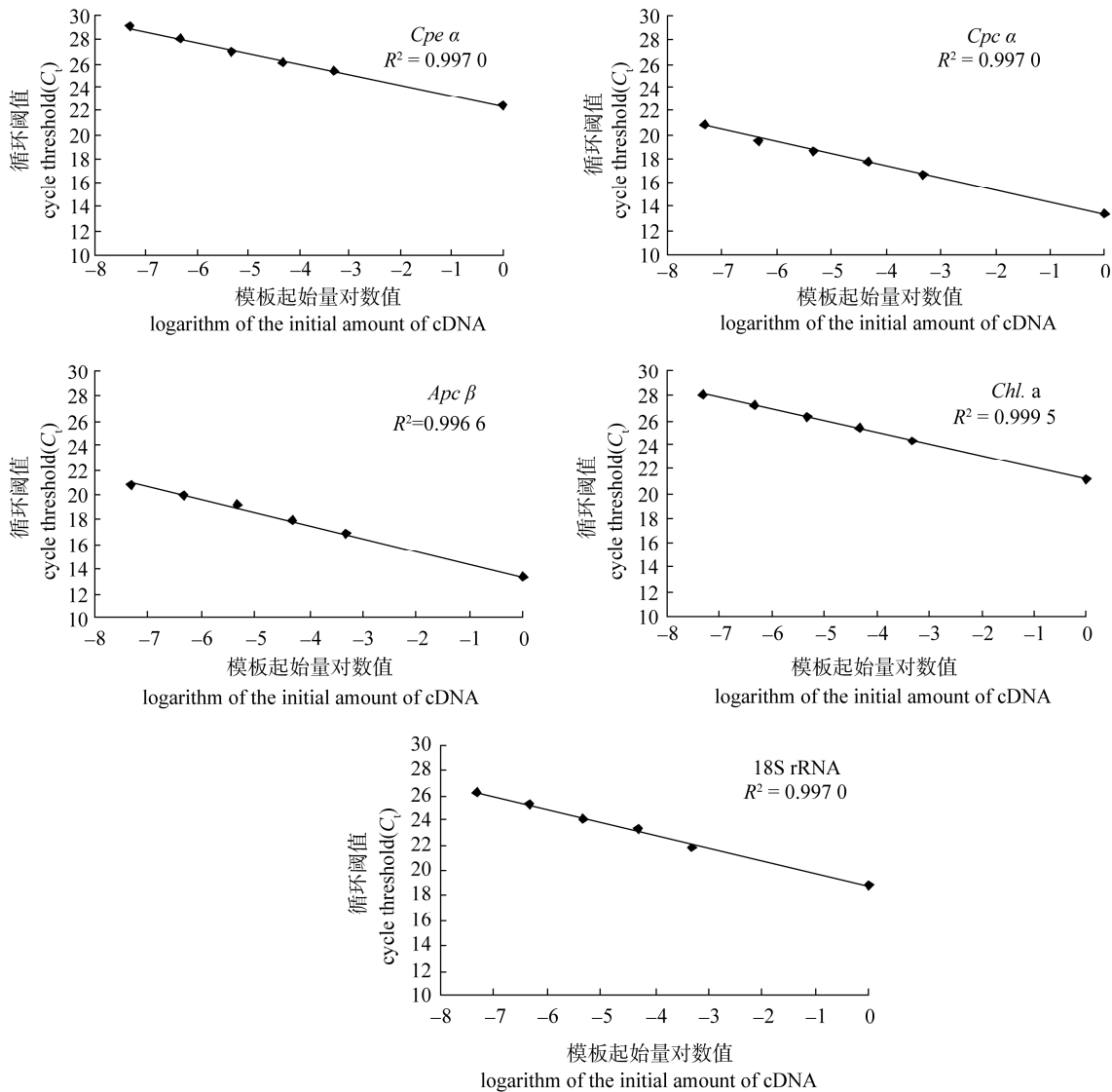


图 2 各色素基因 qPCR 扩增相对标准曲线  
 Fig. 2 Relative standard curves of qPCR of each gene

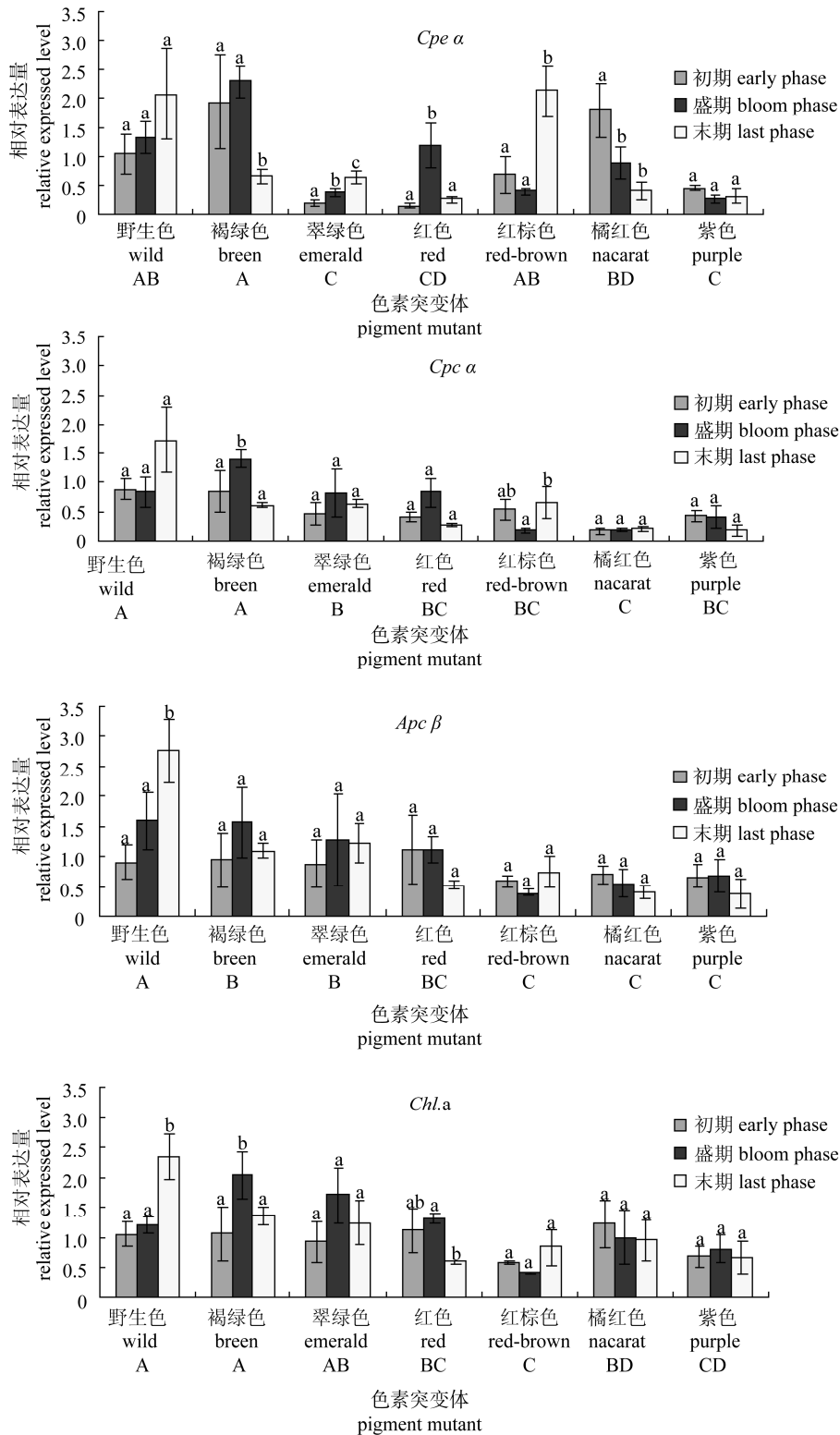


图3 坛紫菜色素基因在不同样品间表达水平差异分析

同一色泽突变体不同生长期间，上标不同小写字母表示差异显著( $P < 0.05$ )，相同小写字母表示差异不显著( $P > 0.05$ )；不同色素突变体间，下标不同大写字母表示差异显著( $P < 0.05$ )，相同小写字母表示差异不显著( $P > 0.05$ )。

Fig. 3 The relative expressed levels of each pigment gene in different samples of *P. haitanensis*

Between the different growth phases in the same pigment mutant, bars with different small letters mean significant differences ( $P < 0.05$ ), and the same small letters mean no significant differences ( $P > 0.05$ ); Between the each pigment mutant, bars with different capital letters mean significant differences ( $P < 0.05$ ), and the same capital letters mean no significant differences ( $P > 0.05$ ).

表 3 各引物扩增效率

| 引物<br>primers | 线性回归方程<br>liner regression equation | 扩增效率<br>amplification efficiency |
|---------------|-------------------------------------|----------------------------------|
| <i>Cpea</i>   | $y = -0.8917x + 22.368$             | 1.18                             |
| <i>Cpca</i>   | $y = -1.0064x + 13.363$             | 0.99                             |
| <i>Apcβ</i>   | $y = -1.0477x + 13.369$             | 0.94                             |
| <i>Chl.a</i>  | $y = -0.9327x + 21.269$             | 1.10                             |
| 18S<br>rRNA   | $y = -1.0215x + 18.762$             | 0.97                             |

### 2.3 坛紫菜色素突变体色素基因表达的 qPCR 分析

同一色素基因在坛紫菜不同样品间表达水平的差异分析 各色素基因的表达量用 18S rRNA 内参进行归一化处理, 再与对照样品(野生色初期藻体相应基因表达量设定为 1, 作为对照进行比较, 得到各色素基因在不同色素突变体不同生长期的相对表达量(图 3)。单因变量多因素方差分析结果表明: (1) 在同一色泽突变体不同生长期, 除 *Cpea* 基因的

表达水平不稳定会随着生长时期不同而发生显著变化外, 其余基因的表达水平基本稳定, 不会发生显著变化。(2) 在不同色泽突变体间, 除红色和紫色突变体, 翠绿色和红色突变体在 4 种色素基因的表达水平上均差异不显著( $P > 0.05$ )外, 其余色泽突变体间各色素基因的表达水平没有明显规律(图 3)。色素基因的表达水平和相应色素蛋白含量线性相关回归分析结果表明二者间没有相关性。

坛紫菜同一样品内不同色素基因表达水平差异分析 各色素基因的表达量先用 18S rRNA 内参进行归一化处理, 再与对照基因(各样品藻体内 *Cpea* 基因的表达量均设为 1)表达量进行比较(表 4)。结果表明, 在同一样品中, 除野生色 *Apcβ* 基因和 *Cpca* 基因表达水平没有显著差异外, 其余各样品各色素基因表达水平由高到低为  $Apcβ > Cpca > Chl.a > Cpea$ 。

表 4 坛紫菜同一色素突变体内各色素基因表达水平差异分析

Tab. 4 The relative expressed levels of each gene in the same pigment mutant of *P. haitanensis*

| 色素突变体<br>pigment mutant | 基因<br>gene   | 初期<br>early phase | 盛期<br>bloom phase | 末期<br>last phase |
|-------------------------|--------------|-------------------|-------------------|------------------|
| 野生色 wild                | <i>Cpea</i>  | 1.00              | 1.00              | 1.00             |
|                         | <i>Cpca</i>  | 8833.82±1653.14   | 6453.71±1918.38   | 8561.24±1461.57  |
|                         | <i>Apcβ</i>  | 8363.82±1000.16   | 11525.19±3195.08  | 13575.95±4737.80 |
|                         | <i>Chl.a</i> | 35.12±5.63        | 30.77±5.82        | 39.85±9.21       |
| 褐绿色 breen               | <i>Cpea</i>  | 1.00              | 1.00              | 1.00             |
|                         | <i>Cpca</i>  | 4495.87±801.67    | 6160.37±709.91    | 9775.67±2458.64  |
|                         | <i>Apcβ</i>  | 4607.24±676.65    | 6342.52±1681.68   | 16451.15±4781.33 |
|                         | <i>Chl.a</i> | 19.11±4.57        | 29.31±2.64        | 71.98±19.25      |
| 翠绿色 emerald             | <i>Cpea</i>  | 1.00              | 1.00              | 1.00             |
|                         | <i>Cpca</i>  | 24163.31±4027.04  | 23302.68±12708.49 | 10438.31±3115.25 |
|                         | <i>Apcβ</i>  | 42242.76±9920.32  | 33174.5±19628.36  | 19142.36±7409.00 |
|                         | <i>Chl.a</i> | 161.04±23.09      | 157.28±50.06      | 69.49±31.22      |
| 红色 red                  | <i>Cpea</i>  | 1.00              | 1.00              | 1.00             |
|                         | <i>Cpca</i>  | 30109.93±10431.07 | 7889.32±3252.78   | 10781.72±1824.00 |
|                         | <i>Apcβ</i>  | 80402.43±49979.73 | 11242.28±4423.09  | 19096.47±4907.82 |
|                         | <i>Chl.a</i> | 283.26±132.63     | 53.84±26.97       | 75.46±10.03      |
| 红棕色 red-brown           | <i>Cpea</i>  | 1.00              | 1.00              | 1.00             |
|                         | <i>Cpca</i>  | 8023.83±926.32    | 4432.22±883.27    | 3053.91±876.40   |
|                         | <i>Apcβ</i>  | 8807.69±2518.11   | 9270.06±944.39    | 3290.49±851.24   |
|                         | <i>Chl.a</i> | 31.93±12.60       | 34.99±5.81        | 12.91±2.63       |
| 橘红色 nacarat             | <i>Cpea</i>  | 1.00              | 1.00              | 1.00             |
|                         | <i>Cpca</i>  | 986.44±477.59     | 2174.34±456.03    | 5456.78±1217.84  |
|                         | <i>Apcβ</i>  | 3781.94±1243.53   | 5789.2±524.24     | 10457.53±3655.16 |
|                         | <i>Chl.a</i> | 22.98±8.79        | 37.29±6.95        | 79.64±8.57       |
| 紫色 purple               | <i>Cpea</i>  | 1.00              | 1.00              | 1.00             |
|                         | <i>Cpca</i>  | 9336.22±1214.34   | 15033.41±3307.69  | 5503.48±464.82   |
|                         | <i>Apcβ</i>  | 13647.56±2947.87  | 23262.58±5536.69  | 10933.9±2423.27  |
|                         | <i>Chl.a</i> | 49.80±7.48        | 101.96±32.93      | 70.08±1.92       |

### 3 讨论

#### 3.1 qPCR 相对定量数据分析方法的选择

近年来, qPCR 技术在生命科学领域得到了广泛的应用, 极大地促进了生命科学领域各个学科的发展, 该技术利用荧光信号实时监测整个 PCR 进程, 从而对未知模板进行绝对和相对定量分析。绝对定量分析中, 标准品的制备是一个必不可少的过程, 目前尚无统一标准, 各个实验室用于生成标准曲线的样品也各不相同, 导致实验结果缺乏可比性<sup>[25]</sup>。而相对定量分析不需要制备标准品, 以内参基因作为标准, 通过数学公式来计算相对表达量, 不受初始样本限制, 操作简单, 应用广泛<sup>[26]</sup>。其中, 比较不同样本中基因表达水平的差异是生物医学研究中的主要应用方式。目前进行基因相对表达水平分析的常用数据分析方法有:  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  法, 相对标准曲线法和 Pfaffl 法<sup>[27]</sup>等。 $2^{-\Delta\Delta C_T}$  法是目前普遍采用的最简便的基因表达分析方法, 但其应用的前提是目的基因和内参基因扩增效率都必须接近 1<sup>[28]</sup>。但在实际的 qPCR 反应中, 由于引物、RNA 模板质量等原因, 扩增效率常常偏离 1, 因此在很大程度上限制了该方法的应用。相对标准曲线法结果较为准确, 可信度高, 但每次定量 PCR 都需要制作标准曲线, 程序繁琐、工作量大<sup>[28]</sup>。本研究中, 样本数较多(7 种色泽藻体, 每种藻体又分为 3 个生长期, 共 21 个样品), 针对每个样品制作相对标准曲线工作量较大, 并且各引物的扩增效率均偏离 1(表 3), 因此,  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  法和相对标准曲线法均不适合于本实验结果的分析。而 Pfaffl 法则将各引物相应的扩增效率代入公式进行计算, 不受内参基因与目的基因引物的扩增效率的影响, 结果更为准确可靠<sup>[25]</sup>。因此本研究选用 Pfaffl 法对坛紫菜色素突变体各色素基因的表达水平进行分析。

#### 3.2 坛紫菜色素突变体与各色素基因表达水平的关系

紫菜的色泽是由其体内含有的 *Chl.a*、PE 和 PC 3 种色素的含量和比例决定的<sup>[2]</sup>。本研究对坛紫菜 6 种色素突变体和 1 种野生型藻体 3 个生长期中 4 种色素基因的表达水平和相应色素蛋白含量的线性相关回归分析结果表明色素基因表达水平与相应的色素蛋白含量没有相关性。此外, 在分析同一样品中各色素基因相对表达水平的差异时发现

各色素基因表达水平由高到低均为 *Apcβ*>*Cpca*>*Chl.a*>*Cpea*, 其中 *Apcβ* 基因的表达量是 *Cpea* 基因表达量的近万倍, 而在坛紫菜各色素突变体不同生长期各色素蛋白含量的测定中却发现除褐绿色、翠绿色外, 其余色素突变体中藻红蛋白含量均显著高于别藻蓝蛋白的含量。这些实验结果都表明坛紫菜色素突变体色素基因的表达水平与最终突变体中各色素蛋白的含量无关, 即色素基因的表达水平与藻体颜色无关。已有的研究结果认为叶绿素 a 和藻胆蛋白含量及所占比例的变化应源于某个基因的突变, 突变基因可直接或间接干扰色素的合成及稳定, 从而改变色素比例, 经由多种途径引起色素变异<sup>[2, 29]</sup>。本研究在验证荧光定量 PCR 的扩增结果时, 发现各色素突变体的色素基因序列基本一致, 序列同源性均在 99% 以上。基因序列基本一致, 而基因表达水平又与最终表达的色素蛋白含量没有相关性, 说明坛紫菜色素基因翻译成色素蛋白的过程受到了未知的复杂机制的调控。根据前人提出的几种植物叶色突变的可能分子机制<sup>[29]</sup>及本研究的结果, 可以推测坛紫菜色素突变的可能原因是色素蛋白合成过程中一些相关调控基因突变所致, 仍待于对紫菜色素合成途径基因表达调控的进一步研究。

高洪峰<sup>[30]</sup>在测定 3 个不同生长发育阶段的北移坛紫菜中各藻胆蛋白的含量时发现坛紫菜生长初期和盛期藻胆蛋白含量较高, 到末期大幅度降低, 降低的幅度为 PE>PC>APC, 并认为出现这种现象的可能原因是 PE 在紫菜藻胆体最外围, 受外界生态环境的影响最大, 随着藻体的老化, 其代谢分解的速度最快; PC 在次外围, 其代谢分解的速度略低于 PE; APC 组成藻胆体的核, 受外界生态环境的影响最小。结合本研究结果则可以进一步得出坛紫菜生长过程中各藻胆蛋白降低的速度可能与基因表达水平正相关, 即基因表达水平越高, 其藻胆蛋白含量在生长过程中就越稳定。此外, 本研究还发现坛紫菜各色素突变体中, 藻红蛋白基因的表达水平最不稳定, 会随着生长过程发生显著变化, 而藻蓝蛋白、别藻蓝蛋白和叶绿素基因的表达水平则相对稳定, 这可能也与基因的表达水平高低有关, 即基因表达水平越高, 在生长过程中, 表达水平就越稳定。

## 参考文献:

- [1] 隋正红, 张学成. 藻红蛋白研究进展[J]. 海洋科学, 1998, (4): 24-27.
- [2] 张海波, 侯和胜. 紫菜色素突变体研究进展[J]. 生物技术通讯, 2007, 18(2): 353-356.
- [3] 王素娟. 海藻生物技术[M]. 上海: 科学技术出版社, 1994: 72.
- [4] Miura A. Color variants and heredity of color in *Porphyra*[J]. Iden (Heredity), 1978, 32(8): 11-16.
- [5] Miura A. Genetic analysis of variant color types of light red, light green and light yellow phenotypes of *Porphyra yezoensis* (Rhodophyta, Bangiaceae) [M].// Hara H, (ed). Origin and evolution of diversity in plant and plant communities. Tokyo: Academia Scientific Book Inc., 1985, 270-284.
- [6] Migita S, Fugita Y. Studies on the color mutant types of *Porphyra yezoensis* Ueda, and their experimental culture[J]. Bulletin of the Faculty of Fisheries, 1983, 54: 55-60.
- [7] Niwa K, Miura A, Shin J, *et al.* Characterization and genetic analysis of the violet type pigmentation mutant of *Porphyra yezoensis* Ueda (Bangiales, Rhodophyta)[J]. Journal of Korean Society Phycology, 1993, 8(2): 217-230.
- [8] 许璞, 费修缙, 张学成, 等. 紫菜色素突变体诱导的研究——I. NG 对紫菜壳孢子诱变的效果及遗传分析[J]. 海洋通报, 2002, 21(5): 19-25.
- [9] 许璞, 费修缙, 张学成, 等. 紫菜色素突变体诱导的研究——II. NG 对紫菜叶状体诱变的效果及遗传分析[J]. 海洋通报, 2003, 22(1): 24-29.
- [10] 严兴洪, 田中次郎, 有贺佑胜. 条斑紫菜色彩突变体的诱导、分离和特性分析[J]. 水产学报, 2000, 24(5): 221-228.
- [11] 严兴洪, 梁志强, 宋武林, 等. 坛紫菜人工色素突变体的诱变与分离[J]. 水产学报, 2005, 29(2): 166-170.
- [12] 严兴洪, 张淑娟, 黄林彬.  $^{60}\text{Co-}\gamma$  射线对条斑紫菜 (*Porphyra yezoensis*) 的诱变效果与色素突变体分离[J]. 海洋与湖沼, 2009, 40(1): 56-62.
- [13] 徐燕, 谢潮添, 纪德华, 等. 坛紫菜品系间杂交分离色素突变体及其特性的初步研究[J]. 中国水产科学, 2007, 14(3): 466-472.
- [14] 柳佩娟, 谢潮添, 陈昌生, 等. 坛紫菜不同色素突变体的初步研究[J]. 海洋水产研究, 2008, 29(4): 78-83.
- [15] Li Y X, Wang G C, Xu P, *et al.* Induction and characterization of green pigmentation mutant in *Porphyra yezoensis* Ueda[J]. Aquaculture, 2008, 282(1-4): 117-123.
- [16] Miura A, Kunifuji Y. Genetic analysis of the pigmentation types in the seaweed Susabi-nori *Porphyra yezoensis*[J]. Iden (Heredity), 1980, 34(9): 14-20.
- [17] Miura A, Ohme T M. Mendelian inheritance of pigmentation mutant types in *Porphyra yezoensis* (Bangiaceae, Rhodophyta) [J]. Japanese Journal of phycology, 1994, 42: 83.
- [18] Mitman G G, van der Meer J P. Meiosis, blade development, and sex determination in *Porphyra purpurea* (Rhodophyta) [J]. Journal of Phycology, 1994, 30(1): 147-159.
- [19] Yan X H, Li L, Aruga Y. Genetic analysis of the position of meiosis in *Porphyra haitanensis* Chang et Zheng (Bangiales, Rhodophyta) [J]. Journal of Applied Phycology, 2005, 17(6): 467-473.
- [20] Xie C T, Chen C S, Xu Y, *et al.* Construction of a genetic linkage map for *Porphyra haitanensis* (Bangiales, Rhodophyta) Based on sequence-related amplified polymorphism and simple sequence repeat markers[J]. Journal of Phycology, 2010, 46(4): 780-787.
- [21] 左正宏, 邓元告, 陈奕欣, 等. 坛紫菜别藻蓝蛋白  $\alpha$ ,  $\beta$  亚基基因的克隆和序列分析[J]. 海洋学报, 2005, 27(2): 148-153.
- [22] 闫国良, 杨听林, 徐双悦, 等. 坛紫菜藻红蛋白  $\alpha$ ,  $\beta$  亚基基因的克隆和序列分析[J]. 海洋学报, 2007, 29(2): 167-172.
- [23] 闫国良. 坛紫菜藻红蛋白和藻蓝蛋白主要亚基基因的克隆及其蛋白表达与纯化的初步研究[D]. 厦门: 厦门大学, 2007.
- [24] 蔡春尔, 贾睿, 李春霞, 等. 条斑紫菜藻红、藻蓝蛋白  $\alpha$  和  $\beta$  亚基基因序列测定及分析[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2011, 27(1): 62-68.
- [25] Whelan J A, Russell N B, Whelan M A. A method for the absolute quantification of cDNA using real-time PCR[J]. Journal of Immunological Methods, 2003, 278(1-2): 261-269.
- [26] Nolan T, Hands R E, Bustin S A. Quantification of mRNA using real-time RT-PCR[J]. Nature Protocols, 2006, 1(3): 1559-1582.
- [27] Yuan J S, Reed A, Chen F, *et al.* Statistical analysis of real-time PCR data[J]. BMC Bioinformatics, 2006, 7: 85.
- [28] Yuan J S, Wang D, Stewart C, *et al.* Statistical methods for efficiency adjusted real-time PCR quantification[J]. Biotechnol Journal, 2008, 3(1): 112-123.
- [29] 何冰, 刘玲珑, 张文伟, 等. 植物叶色突变体[J]. 植物生理学通讯, 2006, 42(1): 1-9.
- [30] 高洪峰. 不同生长期坛紫菜中藻胆蛋白的含量变化[J]. 海洋与湖沼, 1993, 24(6): 645-648.



## Quantitative analysis of pigment gene expression in pigment mutants of *Porphyra haitanensis*

HUANG Hui-zhen, XIE Chao-tian, JI De-hua, XU Yan, CHEN Chang-sheng\*

(College of Fisheries, Jimei University, Xiamen 361021, China)

**Abstract:** Phycoerythrin (PE), phycocyanin (PC), allophycocyanin (APC), and chlorophyll a (*Chl.a*) are the four major photosynthetic pigments of *Porphyra haitanensis*. Their contents and ratio determine the blade color of *Porphyra*. In this study, the relative expressed levels of four pigment genes (*Cpea*, *Cpca*, *Apcβ*, and *Chl.a*) in different growth phases (early phase, bloom phase, and final phase) were determined using quantitative real-time PCR (qPCR) in one wild line and six pigment mutant lines of *P. haitanensis*. In all the lines, the relative expression levels of the four pigment genes were in the sequence: *Apcβ*>*Cpca*>*Chl.a*>*Cpea*. The expressed level of *Cpea* varied significantly in the different phases in all the lines; however, the expressions of *Cpca*, *Apcβ*, and *Chl.a* were stable in all phases in all lines. Furthermore, liner correlation and regression analysis indicated that the expression levels of the pigment genes had no relation to the pigment protein contents in any of the lines. In other words, the expression levels of the four pigment genes had no relation to the differences in blade color among the *Porphyra* lines. Based on these results, we speculate that the pigment mutation of *P. haitanensis* was induced by mutations in genes that affect the synthesis of the pigment proteins.

**Key words:** *Porphyra haitanensis*; pigment mutant; pigment gene; quantitative real-time PCR

**Corresponding author:** CHEN Chang-sheng. E-mail: cschen@jmu.edu.cn