



坛紫菜有丝分裂阻滞缺陷蛋白 2 基因 (*Ph-mad2*) 的克隆及其在单性生殖过程中的表达

钟晨辉^{1,2}, 宦忠艳², 唐隆晨¹, 陆振², 林琪², 严兴洪^{1*}

(1. 上海海洋大学, 水产种质资源发掘与利用教育部重点实验室, 上海 201306;

2. 福建省水产研究所, 福建省海洋生物增殖与高值化利用重点实验室, 福建 厦门 361013)

摘要: 为探究坛紫菜雌配子体单性生殖过程的细胞二倍化机制, 实验基于坛紫菜雌性配子体的转录组信息, 克隆和分析了坛紫菜的有丝分裂阻滞缺陷蛋白 2(PhMAD2) 基因 (*Ph-mad2*), 同时对其在坛紫菜单性生殖发生过程中处于不同发育时期的细胞中的表达特征进行了初步研究。结果显示, 坛紫菜 *Ph-mad2* 基因的 cDNA 的完整开放阅读框为 672 bp, 编码 223 个氨基酸, 分子量为 23.8 ku。从氨基酸序列比对结果可知, 坛紫菜 PhMAD2 蛋白中所具有的典型的 HORMA 结构域和保守的丝氨酸和苏氨酸磷酸化位点, 均与团藻和莱茵衣藻 MAD2 蛋白相同。系统发育分析表明, 坛紫菜与藻状菌纲的异丝水霉和寄生水霉的亲缘关系最近。实时荧光定量 PCR 检测显示, 与可进行正常有丝分裂的营养细胞相比, 在坛紫菜单性生殖过程中发生细胞二倍化的生殖细胞和单性孢子时期, *Ph-mad2* 基因的表达量显著下降; 但是, 在随后可进行正常有丝分裂的单性孢子萌发体细胞和处于营养生长期的单性孢子体细胞中则表达上调。这一结果暗示 *Ph-mad2* 基因的表达下调可能阻碍了坛紫菜单性生殖初期单倍体细胞进行有丝分裂时纺锤体组装检验点的形成, 在一定程度上致使它们发生了染色体加倍。

关键词: 坛紫菜; 单性生殖; 有丝分裂阻滞缺陷蛋白 2 基因; 基因克隆; 基因表达

中图分类号: Q 786; S 968.43

文献标志码: A

纺锤体组装检验点 (spindle assembly checkpoint, SAC) 是真核生物保证染色体正确分离的重要机制之一, 它监控了纺锤体微管与着丝点之间的连接, 并且促使有丝分裂中姊妹染色单体或减数分裂中同源染色体间张力的形成。当所有的染色体与来自纺锤体两极的微管正确连接, 并排列在赤道板上时, SAC 会失活, 从而解除对细胞从分裂中期转入后期过程的抑制。SAC 受到了一些高度保守的周期蛋白的调控,

如 MAD1(mitotic arrest deficient 1)、MAD2(mitotic arrest deficient 2)、Bub3(budding uninhibited by benzimidazole 3) 和 Mps1(monopolar spindle 1)^[1-2]。有丝分裂阻滞缺陷蛋白 2(MAD2) 的基因编码一个分子量约为 24 ku 的高度保守蛋白, 它首先在酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 中被识别, 是组成细胞有丝分裂纺锤体组装检验点的最重要的关卡 (checkpoint) 蛋白之一, 控制着细胞分裂后期的起始和染色体分离^[2-4]。细胞有丝分裂过

收稿日期: 2020-01-06 修回日期: 2020-04-20

资助项目: 国家重点研发计划 (2018YFD0900606); 现代农业产业技术体系建设专项 (CARS-50); 江苏省科技计划项目 (BE2018335); 浙江省农业 (水产) 新品种选育重大科技专项 (2016C02055-6); 福建省科技计划项目 (2019R1013-8); 厦门市青年创新基金 (3502Z20206001)

第一作者: 钟晨辉 (照片), 从事大型藻类遗传育种研究, E-mail: zhongchenhui@126.com

通信作者: 严兴洪, E-mail: xhyan@shou.edu.cn



程中, MAD2 能够与其他细胞周期蛋白, 如 CDC20 (cell division cycle 20)、Bub3 和 MAD3(mitotic arrest deficient 3) 等形成一个蛋白复合物 MCC(mitotic check-point complex)^[3,5]。研究表明, 仅有尚未连接纺锤体的动粒 (unattached kinetochores) 可以作为激活 MAD2 的催化位点, 从而形成 MCC, 使得活化的 MAD2 或 CDC20/MAD2 能够扩散并抑制后期促进复合物 (anaphase promoting complex, APC) 活性, 导致周期蛋白被泛素化降解 (ubiquitinylation), 从而使姊妹染色单体分离^[3-4, 6-9]。已有研究表明, MAD2 蛋白的表达也可使拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*)^[10-11]、小麦 (*Triticum aestivum*)^[12]和玉米 (*Zea mays*)^[13] 等模式植物在细胞分裂进入后期之前确保分裂中期的完成, 并控制着细胞分裂中期向分裂后期的转化。然而, 真核生物中 *mad2* 基因的表达缺失, 容易产生多倍体和非整倍体细胞^[4, 14-15]。

坛紫菜 (*Pyropia haitanensis*) 是栽培在我国南方沿海地区的一种重要的海洋经济红藻, 其生活史包括大型的叶状配子体阶段 ($n=5$) 和微型的丝状孢子体阶段 ($2n=10$)^[16]。坛紫菜的生殖方式既有有性生殖又有单性生殖, 其单倍的雌配子体可以在特定培养条件下, 自发形成二倍的单性生殖孢子体^[17]。坛紫菜的配子体采用有丝分裂进行细胞增殖, 但在一些成熟性细胞 (类果胞) 中, 可以进行自发的染色体加倍而形成二倍化的单性生殖孢子体, 且这些纯合的孢子体也会采用有丝分裂的方式进行营养增殖^[17]。有丝分裂产生的子代细胞与亲代细胞具有相同的倍性。坛紫菜单性生殖过程的染色体自然加倍, 提示着原来配子体营养细胞的有丝分裂细胞周期发生了节律性变化, 但其具体的发生机制还不清楚。为了阐明坛紫菜单性生殖早期发生的染色体自然加倍的机制, 本研究克隆并分析了坛紫菜 *Ph-mad2* 基因的全长 cDNA 序列, 探讨了其在坛紫菜单性生殖过程中不同发育时期的表达特征, 旨在掌握 *Ph-mad2* 对坛紫菜单性生殖早期染色体二倍化的潜在调控作用。

1 材料与方法

1.1 实验材料及培养方法

本研究采用的坛紫菜单性品系为本团队之前所报道的雌性株系^[17], 在室内低温弱光条件下, 以自由丝状体形式将该品系保存在实验室^[18], 编

号为 *Ph-HMC*。室内人工促熟该品系的贝壳丝状体, 将其释放的壳孢子置于 LED 白色灯光下培养, 形成大量的壳孢子幼苗, 继续培养 50 d 后, 这些叶状配子体将出现单性生殖现象^[17]。培养条件: 温度 24 °C, 光照强度 40 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$, 光周期 10L : 14D, 盐度 30, 培养液为 MES 培养液^[19], 每 5 天更换 1 次培养液。

1.2 引物及其序列

实验过程中 *Ph-mad2* 基因的 RACE 扩增和阳性克隆筛选所用引物及其序列见表 1, 引物序列由生工生物工程 (上海) 股份有限公司合成。

1.3 坛紫菜总 RNA 提取

收集营养增殖期的坛紫菜叶状体 0.1 g, 用滤纸吸干表面水分后, 经液氮研磨并按照“TRIzol”方法 (Life technologies, Carlsbad) 提取坛紫菜总 RNA。提取的坛紫菜叶状体总 RNA 经 2% 的琼脂糖凝胶电泳检测其完整性, 并用 Nanodrop® ND-1000 分光光度计 (Lab Tech, Holliston) 测定 $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ 和 $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{230}$ 比值, 只有 $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ 为 1.9~2.1、 $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{230}$ 大于 2.0 时的 RNA 样本才可用于后续的 PCR 实验。

1.4 cDNA 末端快速扩增 (RACE)

从本实验室获得的坛紫菜单性发育的转录组数据库 (GenBank 登录号: SRP222358) 中筛选出一条注释为 *mad2* 的基因片段 (Unigene c111431_g1)。将该序列作为坛紫菜 *Ph-mad2* 基因克隆的核心序列, 设计 3'RACE 和 5'RACE 扩增特异性引物及巢式扩增引物 (表 1)。参照 3'RACE kit 和 5'RACE kit (北京百泰克生物技术有限公司) 的操作流程, 分别进行坛紫菜 *Ph-mad2* 基因的 3' 和 5'RACE 扩增。将含目的基因片段的 PCR 产物纯化回收后, 克隆于 pEASY-T1-Cloning Vector 载体 (北京全式金生物技术有限公司) 中, 转化 *Trans1-T1* 感受态细胞 (北京全式金生物技术有限公司), 在 LB 培养基中过夜培养, 经阳性验证后送至生工生物工程 (上海) 股份有限公司进行测序。

1.5 *Ph-mad2* 基因的生物信息学分析

将测序获得的 *Ph-mad2* 基因 3' 和 5' 序列用 DNAMAN 软件进行拼接, 利用 NCBI 数据库的 BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 在线软件进行核苷酸和氨基酸序列同源性检测, 并采用

表 1 实验所用引物及其序列

Tab. 1 Primers and sequences

引物 primers	序列 (5'-3') sequence(5'-3')	用途 purpose
3'RACE GSP5	GTCAACTCGGTGCTCTT CCAGCG	RACE
3'RACE ADAPTOR	AAAAAAAAAAAAAAAAA AGTACTAGTCGACGCGT AAATCACTGCTGGA	
5' <i>mad2</i> GSP1-F	CTCTGGCGATACGGGTT GTTG	
5' <i>mad2</i> GSP2-F	CCTTCTGGTGCCACGT CTGC	
5' <i>mad2</i> GSP3-F	CATGGCCACCGTACG GC	
5' <i>mad2</i> GSP4-R	CCGGATGATGGCCTGG ATCTC	
5' <i>mad2</i> GSP5-R	TCGTTCCACATCAAAC ACC	
5' <i>mad2</i> GSP6-R	TGGTGACGAGCATAGT CAGC	
<i>mad2</i> RT	AACAGAAAATAAGCA AC	
M13F	CGCCAGGTTTTCCAG TCACGAC	阳性克隆筛选
M13R	GAGCGGATAACAATTT CACACAGG	validate positive clone
<i>mad2</i> -F1	CGGGCTGACTATGCTCG TCACC	qPCR
<i>mad2</i> -R1	AACACCCACCGTCCAC CAC	
actin-F	CGAGCTGGACAAGGTC AACA	内参基因
actin-R	ATGAGGGCGAGGAAAC GA	internal reference

ORF Finder (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>) 在线软件分析该基因的开放阅读框 (ORF), 预测所编码的氨基酸序列; 利用 ProtParam Tool 软件分析蛋白质理化性质, 采用 TMHMM Serverv 2.0 软件分析氨基酸跨膜结构域, 采用 TargetP1.1 Server 软件进行氨基酸序列导肽的分析, 采用 SignalP 4.0 Server 软件预测蛋白的信号肽, 利用 Motif Scan 软件分析蛋白质功能结构域; 使用 NPSA (https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/secpred_sopma.pl) 和 SWISS-MODEL (<http://swissmodel.expasy.org/>) 软件分别对 PhMAD2 蛋白的二级结构和三级结构进行预测; 采用 Clustal 软件进行氨基酸多重序列比对, 并采用 MEGA 4.0 软件构建坛紫菜 PhMAD2 蛋白系统进化树, 设置 1000 次 Boots traps, 其他参数均使用默认值。

1.6 *Ph-mad2* 基因 mRNA 在坛紫菜单性生殖不同发育时期的表达分析

对获得的 *Ph-mad2* 基因序列设计荧光定量 PCR 引物和内参基因引物 (表 1)。在 NikonTS

100 倒置显微镜 (Nikon, Japan) 下观察并分别获取坛紫菜单性发育过程 5 个不同发育时期的样本材料: 营养细胞增殖期 VPS(细胞类型为营养细胞)、生殖细胞发育期 RDS(细胞类型为类果胞和类原生质体)、单性孢子发育期 PDS(细胞类型为类果孢子)、单性孢子体形成期 PFS(细胞类型为类果孢子体) 和单性孢子体生长期 PGS(细胞类型为丝状单性孢子体) 的藻体样本 (图版)。营养细胞增殖期的藻体样本从幼嫩叶状体上剪取, 后续发育时期藻体样本按照细胞发育时序, 依次分块切取出来。所有制备的藻体样本分别置于液氮中保存, 用于总 RNA 的提取。采用植物总 RNA 提取试剂盒 [天根生化科技(北京)有限公司] 提取 5 个样本的 RNA。实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 反应体系设置为 10 μ L Fast Start Universal SYBR Master (Roche), 2 μ L 引物和 8 μ L 反转录产物。扩增程序为 95 $^{\circ}$ C 预变性 10 min; 95 $^{\circ}$ C 变性 15 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 25 s, 共 40 个循环, 每次反应设置阴性对照和无模板对照, 每个反应设置 3 个重复。循环结束后从 65 $^{\circ}$ C 缓慢升温至 95 $^{\circ}$ C, 绘制熔解曲线。qRT-PCR 在 BIO-RAD CFX96 型实时荧光定量 PCR 仪 (BIO-RAD, 美国) 上进行。根据 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 计算检测目标基因的相对表达量^[20]。基因相对表达量用平均值 \pm 标准差来表示, 使用 SPSS 19.0 软件进行单因素方差分析 (One-Way ANOVA), $P < 0.05$ 表示差异显著。

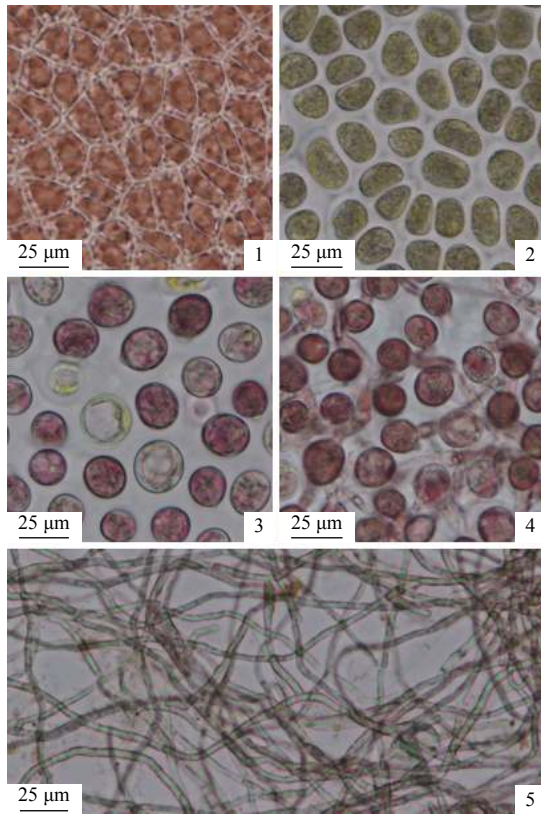
2 结果

2.1 *Ph-mad2* 基因的 RACE 扩增及序列分析

本研究通过 3'RACE 和 5'RACE 扩增, 获得一条长度约 678 bp 的 3'-末端序列 (图 1-a) 和一条长度约 600 bp 的 5'末端序列 (图 1-b)。根据两条序列的重叠区, 采用 DNAMAN 软件进行全长序列的拼接, 获得一条长度为 1 086 bp 的全长序列。经 ORF Finder 软件分析, 该序列包含 1 个 672 bp 的完整 ORF、70bp 的 3'UTR 区、17bp 的 polyA 结构及 328 bp 的 5'UTR (GenBank 登录号: MN586850)。序列的起始密码子 ATG 位于第 328~330 位, 终止密码子为 TGA (图 2), 编码 223 个氨基酸。

2.2 坛紫菜 *Ph-mad2* 基因编码蛋白分析

ExPASy ProtParam 程序一级结构分析, 结果表明坛紫菜 *Ph-mad2* 基因编码的蛋白质由 223 个氨基酸组成, 分子式为 $C_{1057}H_{1677}N_{281}O_{331}S_5$, 分



图版 坛紫菜雌配子体进行单性生殖时处于不同发育时期的细胞形态发生

1. 配子体营养细胞增殖期 (VPS), 营养细胞含星状色素体;
2. 生殖细胞发育期 (RDS), 类果胞色素体呈弥散状且颜色变浅;
3. 单性孢子发育期 (PDS), 类果孢子呈现褐红色, 色素体中央变红;
4. 单性孢子体形成期 (PFS), 出现单向极性的类果孢子萌发体;
5. 单性孢子体生长期 (PGS), 营养藻丝增殖生长

Plate Morphogenesis of cells during different developmental stages of parthenogenesis in female gametophyte of *P. haitanensis*

1. vegetative cell proliferation stage (VPS), showing vegetative cell with multiple stellate chromatophores;
2. reproductive cell development stage (RDS), showing carpogonium-like cells or protoplasts with dispersed chromatophores;
3. parthenospore development stage (PDS), exhibiting brownish red carpospore-like cells with dispersed chromatophores similar to carpospores;
4. parthenosporophyte formation stage (PFS), exhibiting carpospore-like cells became unipolar and germinated to form carpospore-like germlings;
5. parthenosporophyte growth stage (PGS), exhibiting filamentous parthenosporophytes underwent vegetative growth

子量约为 23.8 ku, 理论等电点为 4.77, 负电荷氨基酸残基 (Asp+Glu) 总数为 28, 正电荷氨基酸残基 (Arg+Lys) 总数为 17, 不稳定系数为 50.05, 脂肪系数为 94.17, 总平均疏水度为 0.172, 说明坛紫菜 PhMAD2 性质不稳定, 不易溶于水。SignalP 4.0 软件分析表明 PhMAD2 不含信号肽序列, TMHMM 软件预测 PhMAD2 不存在跨膜结构域。

<https://www.china-fishery.cn>

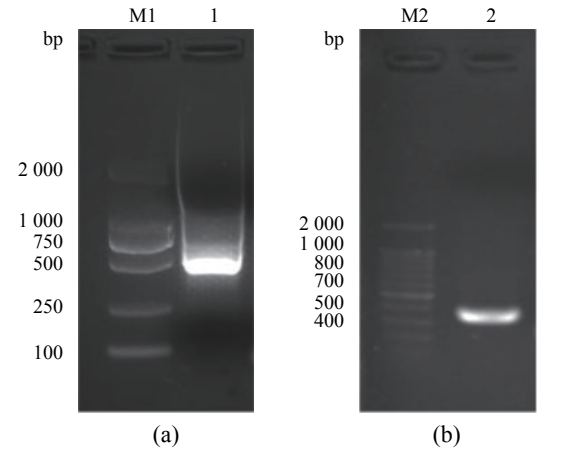


图 1 坛紫菜 *Ph-mad2* 基因 RACE 扩增产物电泳图
(a) *Ph-mad2* 基因 3' RACE 扩增产物, (b) *Ph-mad2* 基因 5' RACE 扩增产物; M1. DL2000 DNA Marker, M2. DL2000 DNA Marker

Fig. 1 Agarose electrophoresis of RACE of *Ph-mad2* gene in *P. haitanensis*

(a) 3'RACE products of *Ph-mad2*, (b) 5'RACE products of *Ph-mad2*; M1. DL2000 DNA Marker, M2. DL2000 DNA Marker

TargetP 1.1 Server 软件预测结果显示, PhMAD2 蛋白含有一段长 11 个氨基酸的转运蛋白。坛紫菜 *Ph-mad2* 基因编码氨基酸序列包含 HORMA domain, 属于 HORMA domain 家族 (例如 Hop1p, Rev7p 和 MAD2)。通过网上资源 Prabi 的 HNN 程序对编码蛋白进行二级结构分析, 结果表明二级结构中构成 α -螺旋 (H)、片层 (E) 和无规则卷曲 (C) 的氨基酸残基占总氨基酸的比例分别为 46.64%、20.18% 和 33.18%。利用在线软件 SWISS-MODEL 自动同源建模方式, 对 PhMAD2 蛋白的三级结构进行预测, 显示该蛋白由 3 个螺旋和 7 个片层组成 (图 3)。

多序列比对结果表明, 坛紫菜 *Ph-mad2* 基因编码的氨基酸序列与团藻 (*Volvox carteri f. nagariensis*) 和莱茵衣藻 (*Chlamydomonas reinhardtii*) MAD2 蛋白的氨基酸序列, 都有的典型的 HORMA 结构域和保守的丝氨酸与苏氨酸磷酸化位点 (图 4)。

2.3 坛紫菜 PhMAD2 蛋白的系统进化分析

利用坛紫菜 PhMAD2 蛋白序列与 NCBI 数据库中收录的其他 16 个物种的高度同源的 MAD2 蛋白序列构建了系统进化树 (图 5)。结果显示, 这些 MAD2 蛋白构建的系统进化树分为 4 个大的分支, 按照动物、真菌、绿色植物和绿藻分别聚为一个簇群, 坛紫菜 PhMAD2 蛋白与异丝水霉 (*Saprolegnia diclina* VS20 XP_008605595.1) 和

```

1 GCACGCGCCCCACCCAAATGGCACTGCATCCGGCCAGTCCGCCGACCTGTGCTGCACCAC
61 CGTCACGACTTCCCTCTGGATGCGCGTCTGCGTCTTGCGTCGAGCGTCGTCGGTGCACA
121 CGCGCTGACGGAGCTGGAGCTCGCTCGCGGGCGACAGTCTGAGCCTCAATACGTTGTGTT
181 GCTCGTCTTATTGCTCTGGGATACGGGTTGTTGACACTGCGCGCTCCGTCTTCTCTGC
241 CCGACTCGCTCCCACCACCTTCTCCATTCCCTTTCTGTTGCCAGTCTGCCTCCCCCC

301 TCCCCCCTCCCTTTTTTCCCGCCACCATGGCCACCGCTACGCCACTAGCTTCTCTCGC
1 M A T A T A L A S S R
361 CTGGCGACCACCTCTCCCGCCACGACCATCAGCTCAAAGGCTCCACCGCCCTCGTCACC
12 L A T T S P A T T I T L K G S T A L V T
421 GAGTTTTTCCACTACGCGGTCAACTCGGTGCTCTTCCAGCGGGGCATCTACCCCCCGAG
32 E F F H Y A V N S V L F Q R G I Y P P E
481 ACGTTTACGCGGGTGGCCAAGTACGGGCTGACTATGCTCGTCACCACCGAGGCCGCCCTG
52 T F T R V A K Y G L T M L V T T E A A L
541 ACCGACTACCTGTCCGCCACGCTCGGCCAGGTTGCGGAGTGGCTCGGCCCGGGGAGCTC
72 T D Y L S A T L G Q V A E W L G R G E L
601 CAGGCGCTCGTCCCTGGCCATCGCGTCCGTTGAGACGGGGCGGTGGTGGAGCGGTGGGTG
92 Q A L V L A I A S V E T G A V V E R W V
661 TTTGATGTGGAAGCGAGCGAGGACGGGGAGGAGGGGAGGCGCGCCCGCGGTCCGCGG
112 F D V E A S E D G E E G E A A A A G R G
721 GGCGCATCAAGGCGCCCAAGGAGGAAAAGCGGTGACGGCCGAGATCCAGGCCATCATC
132 G G I K A P K E E K A V T A E I Q A I I
781 CGGCAGATCACGGCAGCATCAGTTCTCCCGTCTTCGAGGACGCTGCACGTTTTCG
152 R Q I T A S I T F L P L L E D A C T F D
841 CTCATCTTTTACGTCTCTGCCGCGGCCACCCCGAGGAGTGTGAGGAGAGCGCGGG
172 L I F Y V S A A A A T P E E C E E S G G
901 CGGTGCGTCAATGCGCAGCAGGTGCGGCTGCGGAGCTTGACACGGGCGTCCACCGG
192 R C V V N A Q Q V R L R S F D T G V H R
961 GTGCACACGCTGGTGGCGTACGCGCGGCCGAGGAGTAGAGTAGTGGGGCGGAGGGGTGC
212 V H T L V A Y A R P E E *
1 021 GTTGATTGTACGTTTGTGCACAGACCCGTTGCTTAGTTTTCTGTTAAAAAAAAAAAA
1 081 AAAAAA

```

图 2 坛紫菜 *Ph-mad2* 基因编码的核苷酸序列及预测的蛋白序列

粗体 ATG 和 TGA 分别代表起始密码子和终止密码子, *代表蛋白翻译结束, 下划线区域代表 *Ph-mad2* 的 HORMA domain

Fig. 2 Nucleotide and deduced amino acid sequence of *Ph-mad2* gene of *P. haitanensis*

The start and stop codons are shown in bold, * represents the end of the protein translation, HORMA domain is underlined

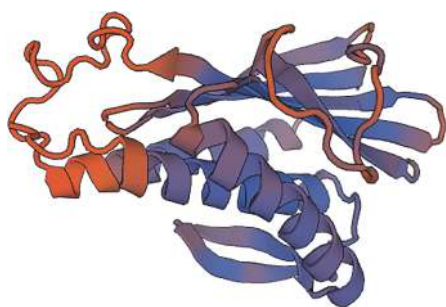


图 3 坛紫菜 PhMAD2 蛋白的三维结构预测

Fig. 3 Three-dimensional structure of deduced PhMAD2 protein of *P. haitanensis*

寄生水霉 (*S. parasitica* CBS 223.65 XP_012201068.1) 聚为一支。在藻类物种分类阶元上, 坛紫菜

PhMAD2 蛋白与温泉红藻 (*Galdieria sulphuraria*) MAD2 蛋白的亲缘关系更近, 而与其他物种的亲缘关系较远。

2.4 *Ph-mad2* 在坛紫菜单性生殖不同发育时期的表达分析

分别对坛紫菜雌配子体单性生殖过程中 5 个关键发育时期的藻体样本进行了 *Ph-mad2* 基因的表达检测 (图 6)。由于配子体营养细胞通过有丝分裂实现增殖, 其表达量比较稳定, 因此以营养细胞增殖期 (VPS) 作为对照进行 qRT-PCR。结果显示, *Ph-mad2* 基因的 mRNA 表达量在生殖细胞发育期 (RDS) 和单性孢子发育期 (PDS) 下调明显, 且在整个单性发育过程中这两个时期的

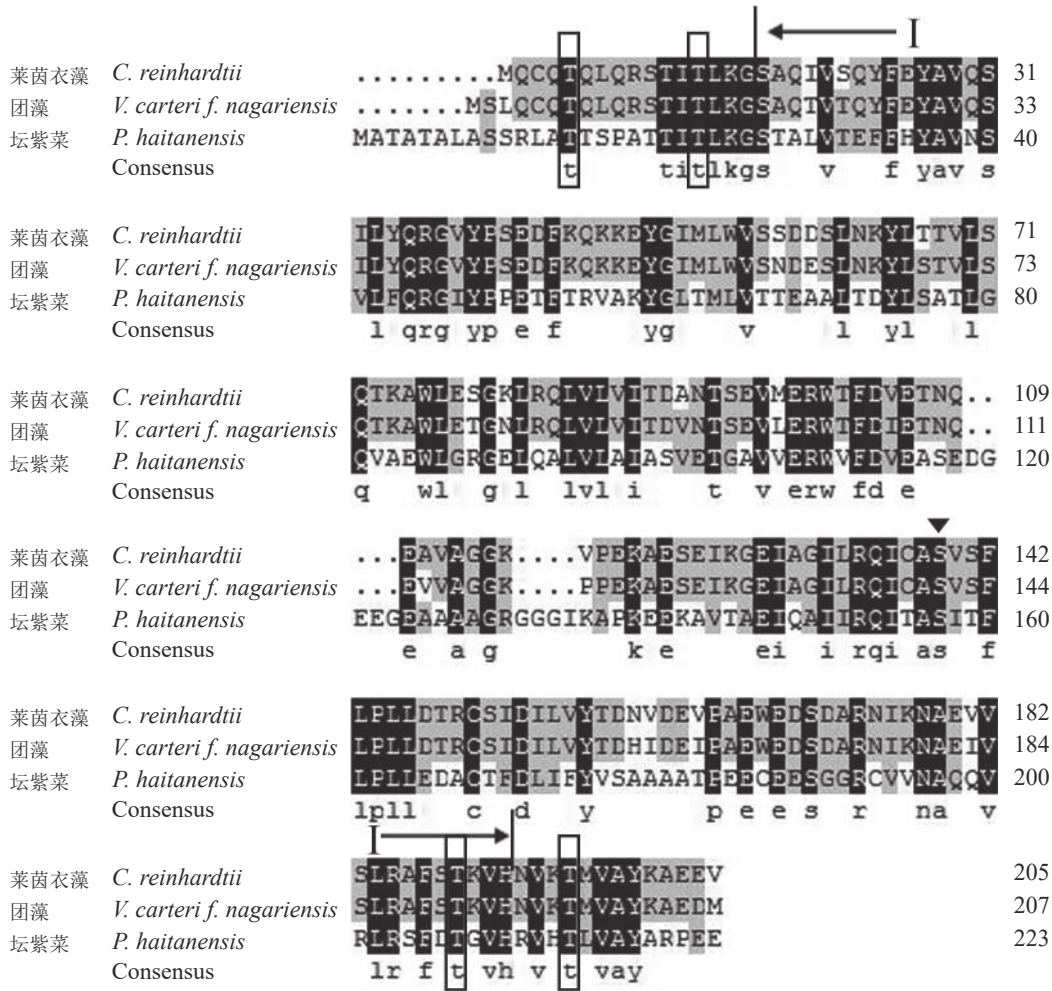


图 4 坛紫菜 PhMAD2 氨基酸序列的多重比较

黑色背景和灰色背景分别表示一致性和相似性氨基酸残基；序列内黑色三角形代表保守的丝氨酸磷酸化位点；黑色实线框表示保守的苏氨酸磷酸化位点；I 区域表示 HORMA domain

Fig. 4 Multi-alignment of amino acid sequence of MAD2 in *P. haitanensis*

Identical and conserved amino acid residues denoted with black and gray backgrounds respectively; serine phosphorylation site in the sequence is boxed with black triangle; phosphorylation sites of threonine are presented by solid line; the I region is HORMA domain

表达量最低 ($P < 0.05$)；细胞发育至单性孢子体形成期 (PFS) 时，表达量上升到与对照组 VPS 相近的水平 ($P > 0.05$)，但发育至单性孢子体生长期 (PGS) 时，其表达量下调明显 ($P < 0.05$)。

3 讨论

细胞增殖是生物体繁殖、生长和发育的基本生命现象，这个过程是通过细胞周期来实现的。有丝分裂阻滞缺陷蛋白 2 (MAD2) 是组成真核生物有丝分裂纺锤体组装检验点的一个功能蛋白^[3,21]。本研究采用 RACE 扩增技术成功获得了一条编码坛紫菜 MAD2 的 ORF 序列，命名为 *Ph-mad2*，该 cDNA 序列长 672 bp，编码 223 个

氨基酸，预测蛋白分子量为 23.8 ku，蛋白大小与已报道的酿酒酵母、玉米、小麦和拟南芥的 MAD2 分子量相接近^[10,12-13]。本研究中，坛紫菜的 PhMAD2 含有 HORMA 结构域 (HORMA domain)，由 185 个氨基酸残基组成，包含多个保守的 motif 和氨基酸残基。相关研究表明，有丝分裂纺锤体组装检验点 (SAC) 组件中仅 MAD2 含有 HORMA 结构域，其结构完整性是 MAD2 蛋白实现关闭 (C-MAD2) 和开放 (O-MAD2) 构象转换所必需的^[22]，可能参与相关的 α 螺旋 (α -helices) 和复杂 β 片层 (β -sheets) 的形成^[23]，并调控染色质的动态和结构^[24]。其次，PhMAD2 内丝氨酸 (Ser) 的存在可能为其后翻译 (post-translation) 过程的构

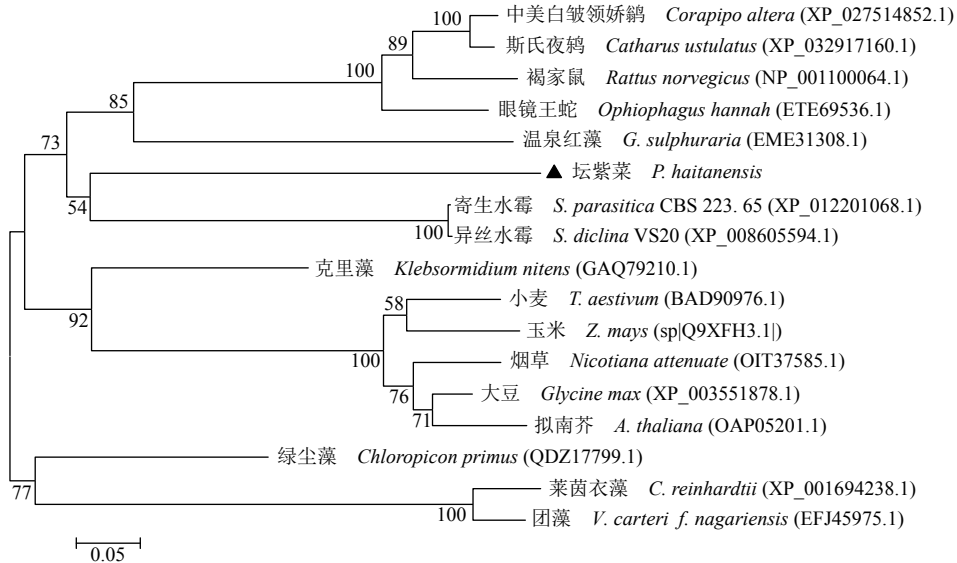


图 5 坛紫菜 PhMAD2 蛋白与其他 MAD2 蛋白的进化树分析

Fig. 5 Phylogenetic analysis of the PhMAD2 amino acid sequence of *P. haitanensis* and other MAD2 proteins

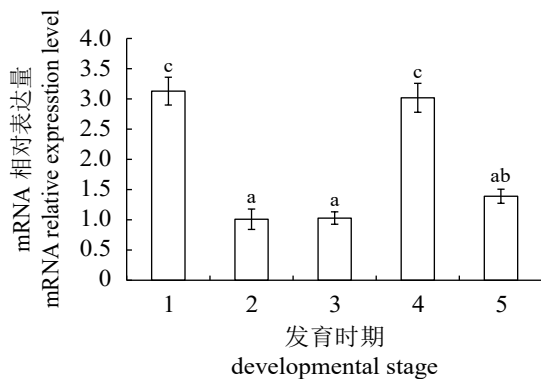


图 6 *Ph-mad2* 在坛紫菜的单性生殖不同发育时期的荧光定量 PCR 分析

1. 配子体营养细胞增殖期, 2. 生殖细胞发育期, 3. 单性孢子发育期, 4. 单性孢子体形成期, 5. 单性孢子体生长期; 不同字母表示差异显著 ($P < 0.05$)

Fig. 6 Expression profiles of *Ph-mad2* mRNA during different developmental stages of parthenogenesis in *P. haitanensis*

1. vegetative cell proliferation stage (VPS), 2. reproductive cell development stage (RDS), 3. parthenospore development stage (PDS), 4. parthenosporophyte formation stage (PFS), 5. parthenosporophyte growth stage (PGS); different letters indicate significant differences ($P < 0.05$)

象改变提供了磷酸化位点^[25]。

对 *Ph-mad2* 编码氨基酸进行多序列比对, 结果显示, 其与藻类中的团藻和莱茵衣藻的同源性较高。系统进化树分析表明, 坛紫菜与真菌门 (Eumycophyta) 的藻状菌纲 (Phycomycetes) 的

异丝水霉和寄生水霉的亲缘关系相近。坛紫菜隶属原红藻纲 (Protofloridae), 是进行典型孢子繁殖的红藻^[26], 这与产生孢囊柄 (sporangiophores) 进行生殖的真菌极其类似^[27-28], 具有相近的进化特征。坛紫菜雌配子体营养细胞采用有丝分裂进行细胞增殖^[17], 当细胞发育依次进入类果胞、类果胞原生质体和类果孢子时, 均能观察到一个增大的间期细胞核和数目加倍的染色体组, 说明这一发育过程的细胞完成了染色体二倍化^[17]。本研究中, 配子体营养生长期的 *Ph-mad2* 基因保持着较高的表达水平, 提示 PhMAD2 蛋白监控了配子体营养细胞有丝分裂纺锤体组装检验点, 维持了营养细胞的正常增殖。随后, 在单性生殖发生早期的生殖细胞发育期 (RDS) 和单性孢子发育期 (PDS) 的 *Ph-mad2* 基因表达下调, 这提示参与有丝分裂纺锤体组装检验点组成的 PhMAD2 蛋白有所下降, 可能延滞了细胞的有丝分裂。相关研究表明, MAD2 的等位基因缺失往往会造成芽殖酵母的倍性改变^[4, 15]。本团队前期的细胞学观察表明了单性孢子体形成期 (PFS) 和单性孢子体生长期 (PGS) 的细胞均通过有丝分裂进行细胞增殖^[17]。在经历 RDS 和 PDS 这两个关键发育时期后, *Ph-mad2* 基因在 PFS 时期显著上调表达, 回复到与配子体营养细胞相近的表达水平, 且在 PGS 时期其表达量也高于进行染色体加倍的 RDS 和 PDS 时期。这与完成染色体自然加倍后

的类果孢子采用有丝分裂方式进行细胞增殖的结果一致^[17]。然而, *Ph-mad2* 基因在 VPS 时期的表达量明显高于 PGS 时期的表达量, 这可能是因为坛紫菜的配子体具有扩散增长和多样化的形态建成模式, 而孢子体仅有顶端生长和基本的丝状藻丝建成模式^[29]。因此, 坛紫菜配子体的增殖速率明显快于孢子体的增殖速率, 也可能与 *Ph-mad2* 基因的表达差异相关。

染色体自然加倍是一个复杂的过程, 现在认为核内再复制 (endoreduplication) 是植物细胞自发多倍化 (endopolyploidy) 的最常见模式, 据估计超过 90% 的被子植物及藻类和真菌细胞内都存在核内再复制现象^[30]。进行核内再复制的植物细胞在完成染色体加倍的过程中, 其间期 DNA 连续复制而不进入分裂期, 整个过程不会出现明显的染色质凝聚和解聚及胞质分裂 (cytokinesis)^[31-32]。坛紫菜单性生殖过程中的细胞二倍化, 说明单倍的类果胞可能经历了连续 2 轮的 DNA 复制, 而细胞周期仍停滞在间期, 在 RDS 和 PDS 时期都能观察到增大的细胞核和数目加倍的染色体, 其潜在的加倍机制是核内再复制^[17]。在真核生物中, *mad2* 基因表达促进了拟南芥的根尖分生组织的细胞分裂^[10], *mad2* 基因的表达下调会抑制芽殖期酿酒酵母的有丝分裂并增加染色体的丢失^[4], 且敲除 *mad2* 基因的酿酒酵母的染色单体 (monosome) 可以通过 DNA 核内再复制机制回复到纯合的二倍体^[15]。细胞学观察表明, 在坛紫菜单性生殖发生初期 (RDS、PDS) 也存在加倍的中期染色体, 这说明这两个时期的大部分细胞 (含有类果胞、类原生质体和类果孢子) 正处在从核内再复制周期向有丝分裂细胞周期转化的过程, 且仅少部分细胞在间期完成了 2 次 DNA 复制后, 才转入了后续的有丝分裂细胞周期^[17]。本研究中, 这两个关键发育时期的 *Ph-mad2* 基因表达下调, 可能导致 PhMAD2 蛋白的缺少, 提示大量的细胞未在间期完成二倍化之前是无法进入分裂期的, 必须在间期进行了 2 轮连续的 DNA 复制之后, 才能进入有丝分裂中期, 而呈现出细胞的染色体自然加倍现象。因此, *Ph-mad2* 基因可能在坛紫菜采用核内再复制实现细胞二倍化过程中发挥了重要的调控作用, 一定程度上参与了染色体的自然加倍过程。在后续实验中, 有待进行 PhMAD2 蛋白的多克隆抗体的制备, 开展

<https://www.china-fishery.cn>

蛋白质免疫印迹和免疫荧光观察等实验, 进一步验证 *Ph-mad2* 基因在坛紫菜单性生殖染色体自然加倍过程中的调控机制。

4 结论

本实验从坛紫菜雌性配子体的转录组数据库中筛选了 *mad2* 非重复序列 (unigenes), 进行了 cDNA 克隆、蛋白结构分析、系统进化树比较和 qRT-PCR 表达分析。结果显示, 坛紫菜 PhMAD2 蛋白中具有与团藻和莱茵衣藻 MAD2 蛋白相同的 HORMA 结构域和保守的丝氨酸磷酸化位点。系统进化树显示, 坛紫菜与藻状菌纲的异丝水霉和寄生水霉的亲缘关系最近, 符合其进化特征。qRT-PCR 检测显示, 在坛紫菜单性生殖过程发生细胞二倍化的生殖细胞和单性孢子发育时期, *Ph-mad2* 基因的表达量显著下调, 推测 *Ph-mad2* 基因的表达下调可能参与了单性生殖早期发生的染色体加倍。本研究结果为进一步探究坛紫菜单性生殖过程中的细胞二倍化机制提供了分子生物学依据。

参考文献 (References):

- [1] Hoyt M A, Totis L, Roberts B T. *S. cerevisiae* genes required for cell cycle arrest in response to loss of microtubule function[J]. *Cell*, 1991, 66(3): 507-517.
- [2] Li R, Murray A W. Feedback control of mitosis in budding yeast[J]. *Cell*, 1991, 66(3): 519-531.
- [3] Musacchio A, Salmon E D. The spindle-assembly checkpoint in space and time[J]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2007, 8(5): 379-393.
- [4] Barnhart E L, Dorer R K, Murray A W, et al. Reduced Mad2 expression keeps relaxed kinetochores from arresting budding yeast in mitosis[J]. *Molecular Biology of the Cell*, 2011, 22(14): 2448-2457.
- [5] Yu H T. Regulation of APC-Cdc20 by the spindle checkpoint[J]. *Current Opinion in Cell Biology*, 2002, 14(6): 706-714.
- [6] Fang G W, Yu H T, Kirschner M W. The checkpoint protein MAD2 and the mitotic regulator CDC20 form a ternary complex with the anaphase-promoting complex to control anaphase initiation[J]. *Genes & Development*, 1998, 12(12): 1871-1883.
- [7] Gorbisky G J, Chen R H, Murray A W. Microinjection of

中国水产学会主办 sponsored by China Society of Fisheries

- antibody to Mad2 protein into mammalian cells in mitosis induces premature anaphase[J]. *Journal of Cell Biology*, 1998, 141(5): 1193-1205.
- [8] Tang Z Y, Bharadwaj R, Li B, *et al.* Mad2-independent inhibition of APC^{Cdc20} by the mitotic checkpoint protein BubR1[J]. *Developmental Cell*, 2001, 1(2): 227-237.
- [9] Singh G K, Karade S S, Ranjan R, *et al.* C-terminal region of Mad2 plays an important role during mitotic spindle checkpoint in fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*[J]. *Molecular Biology Reports*, 2017, 44(1): 89-96.
- [10] Caillaud M C, Paganelli L, Lecomte P, *et al.* Spindle assembly checkpoint protein dynamics reveal conserved and unsuspected roles in plant cell division[J]. *PLoS One*, 2009, 4(8): e6757.
- [11] Ding D F, Muthuswamy S, Meier I. Functional interaction between the *Arabidopsis* orthologs of spindle assembly checkpoint proteins MAD1 and MAD2 and the nucleoporin NUA[J]. *Plant Molecular Biology*, 2012, 79(3): 203-216.
- [12] Kimbara J, Endo T R, Nasuda S. Characterization of the genes encoding for MAD2 homologues in wheat[J]. *Chromosome Research*, 2004, 12(7): 703-714.
- [13] Yu H G, Muszynski M G, Dawe R K. The maize homologue of the cell cycle checkpoint protein MAD2 reveals kinetochore substructure and contrasting mitotic and meiotic localization patterns[J]. *The Journal of Cell Biology*, 1999, 145(3): 425-435.
- [14] Michel L S, Liberal V, Chatterjee A, *et al.* MAD2 haploinsufficiency causes premature anaphase and chromosome instability in mammalian cells[J]. *Nature*, 2001, 409: 355-359.
- [15] Zang Y H, Garrè M, Gjuracic K, *et al.* Chromosome V loss due to centromere knockout or MAD2-deletion is immediately followed by restitution of homozygous diploidy in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Yeast*, 2002, 19(6): 553-564.
- [16] Tseng C K, Sun A. Studies on the alternation of the nuclear phases and chromosome numbers in the life history of some species of *Porphyra* from China[J]. *Botanica Marina*, 1989, 32(1): 1-8.
- [17] Zhong C H, Aruga Y, Yan X H. Morphogenesis and spontaneous chromosome doubling during the parthenogenetic development of haploid female gametophytes in *Pyropia haitanensis* (Bangiales, Rhodophyta)[J]. *Journal of Applied Phycology*, 2019, 31(4): 2729-2741.
- [18] Kato M, Aruga Y. Comparative studies on the growth and photosynthesis of the pigmentation mutants of *Porphyra yezoensis* in laboratory culture[J]. *Japanese Journal of Phycology*, 1984, 32: 333-347.
- [19] Xu Y, Chen C S, Ji D H, *et al.* Proteomic profile analysis of *Pyropia haitanensis* in response to high temperature stress[J]. *Journal of Applied Phycology*, 2014, 26(1): 607-618.
- [20] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-ΔΔC_t} method[J]. *Methods*, 2001, 25(4): 402-408.
- [21] Musacchio A, Hardwick K G. The spindle checkpoint: structural insights into dynamic signalling[J]. *Nature reviews Molecular Cell Biology*, 2002, 3(10): 731-741.
- [22] Rosenberg S C, Corbett K D. The multifaceted roles of the HORMA domain in cellular signaling[J]. *Journal of Cell Biology*, 2015, 211(4): 745-755.
- [23] Muniyappa K, Kshirsagar R, Ghodke I. The HORMA domain: an evolutionarily conserved domain discovered in chromatin-associated proteins, has unanticipated diverse functions[J]. *Gene*, 2014, 545(2): 194-197.
- [24] Aravind L, Koonin E V. The HORMA domain: a common structural denominator in mitotic checkpoints, chromosome synapsis and DNA repair[J]. *Trends in Biochemical Sciences*, 1998, 23(8): 284-286.
- [25] Kim S, Sun H B, Ball H L, *et al.* Phosphorylation of the spindle checkpoint protein Mad2 regulates its conformational transition[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2010, 107(46): 19772-19777.
- [26] Yoon H S, Müller K M, Sheath R G, *et al.* Defining the major lineages of red algae (Rhodophyta)[J]. *Journal of Phycology*, 2006, 42(2): 482-492.
- [27] Bergman K, Burke P V, Cerdá-Olmedo E, *et al.* Phycomycetes[J]. *Bacteriological Reviews*, 1969, 33(1): 99-157.
- [28] 杨晓燕, 李梅, 张林, 等. 哈茨木霉Th-33厚垣孢子形成过程的转录组变化分析[J]. *中国生物防治学报*, 2015, 31(1): 85-95.
- Yang X Y, Li M, Zhang L, *et al.* Transcriptome analysis of *Trichoderma harzianum* Th-33 in Chlamydospore

- formation[J]. Chinese Journal of Biological Control, 2015, 31(1): 85-95(in Chinese).
- [29] Pueschel C M, Cole K M. Rhodophycean pit plugs: an ultrastructural survey with taxonomic implications[J]. *American Journal of Botany*, 1982, 69(5): 703-720.
- [30] Barow M, Meister A. Endopolyploidy in seed plants is differently correlated to systematics, organ, life strategy and genome size[J]. *Plant, Cell & Environment*, 2003, 26(4): 571-584.
- [31] Edgar B A, Orr-Weaver T L. Endoreplication cell cycles: more for less[J]. *Cell*, 2001, 105(3): 297-306.
- [32] Maluszynska J, Kolano B, Sas-Nowosielska H. Endopolyploidy in plants[M]//Greilhuber J, Dolezel J, Wendel J F. *Plant genome diversity*, Volume 2. Vienna: Springer, 2013: 99-119.

Cloning and characterization of homologue of mitotic arrest deficient 2 from *Pyropia haitanensis* and its expression analysis during parthenogenesis

ZHONG Chenhui^{1,2}, HUAN Zhongyan², TANG Longchen¹, LU Zhen², LIN Qi², YAN Xinghong^{1*}

(1. Key Laboratory of Exploration and Utilization of Aquatic Genetic Resources, Ministry of Education, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;

2. Key Laboratory of Cultivation and High-value Utilization of Marine Organisms in Fujian Province, Fisheries Research Institute of Fujian, Xiamen 361013, China)

Abstract: To investigate the role and molecular mechanism of diploidization of cells during the parthenogenetic development of female gametophyte in *Pyropia haitanensis*, a cDNA sequence of homologue of *mad2* was isolated and its expression profile at different developmental stages of parthenogenesis was characterized. In this study, the cDNA of *Ph-mad2* spans 672 bp that encodes a protein of 223 amino acids (aa) with a predicted molecular weight of 23.8 ku. The deduced protein sequence of PhMAD2 has a typical HORMA domain and conservative serine and threonine phosphorylation sites. Phylogenetic analysis revealed that evolutionary status of *P. haitanensis* was extremely related to the fungi from Phycmycetes, such as *Saprolegnia diclina* and *S. parasitica*. Quantitative real-time PCR (qRT-PCR) analysis showed that the expressions of *Ph-mad2* at reproductive cell development stage (RDS) and parthenospore development stage (PDS) with diploid carpogonium-like cells and carpospore-like cells were significantly down-regulated compared with that at vegetative cell proliferation stage (VPS) with haploid vegetative cells, while its expression profiles were up-regulated in the later stages of parthenosporophyte formation stage (PFS) and parthenosporophyte growth stage (PGS), in which the diploid carpospore-like germlings and parthenosporophytes underwent normal mitosis. These results suggested that *Ph-mad2* reduction potentially prevented the formation of spindle assembly checkpoint (SAC) at mitotic cells during the early stages of parthenogenesis, and triggered their development of diploidization. These results provide important information for revealing the mechanism of spontaneous chromosome doubling in the parthenogenesis of *P. haitanensis*.

Key words: *Pyropia haitanensis*; parthenogenesis; mitotic arrest deficient 2; gene cloning; gene expression

Corresponding author: YAN Xinghong. E-mail: xhyan@shou.edu.cn

Funding projects: National Key Research and Development Program of China (2018YFD0900606); China Agriculture Research System (CARS-50); Science and Technology Planning Project of Jiangsu Province (BE2018335); Major Science and Technology Special Fund of Agriculture (Fisheries) New Variety Breeding of Zhejiang Province (2016C02055-6); Science and Technology Program of Fujian Province (2019R1013-8); Youth Innovation Fund of Xiamen(3502Z20206001)