

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20170808001

http://www.yykxjz.cn/

林颖辉, 王文磊, 徐燕, 纪德华, 陈昌生, 谢潮添. 坛紫菜丝氨酸羟甲基转移酶基因的克隆及表达特征. 渔业科学进展, 2018, 39(5): 122-129

Lin YH, Wang WL, Xu Y, Ji DH, Chen CS, Xie CT. Cloning and expression analysis of serine hydroxyl methyltransferase (SHMT) genes from *Pyropia haitanensis*. Progress in Fishery Sciences, 2018, 39(5): 122-129

坛紫菜丝氨酸羟甲基转移酶基因的 克隆及表达特征*

林颖辉 王文磊 徐 燕 纪德华 陈昌生 谢潮添^①

(集美大学水产学院 厦门 361021)

摘要 丝氨酸羟甲基转移酶(SHMT)在植物应答逆境胁迫中发挥着重要作用。本研究以坛紫菜(*Pyropia haitanensis*)为研究材料,采用普通 PCR 技术克隆得到 2 条坛紫菜的 SHMT 全长基因序列,分别命名为 *PhSHMT-1*(GenBank 收录号: MF687405)和 *PhSHMT-2*(GenBank 收录号: MF687406)。其中, *PhSHMT-1* 序列全长 1710 bp, 包含一个 1491 bp 的开放阅读框, 所编码的多肽包含 497 个氨基酸, 分子量为 121.443 kDa, 等电点为 4.93; *PhSHMT-2* 序列全长 1957 bp, 包含一个 1395 bp 的开放阅读框, 所编码的多肽包含 465 个氨基酸, 分子量为 113.969 kDa, 等电点为 4.95。多序列比对和系统进化树分析结果确认 *PhSHMT-1* 和 *PhSHMT-2* 基因属于 SHMT 基因家族。qRT-PCR 定量分析结果表明, 高温胁迫条件下, 2 条 *PhSHMT* 基因的表达模式基本一致, 均表现为先上调后下调再上调的趋势, 这说明 SHMT 基因可能在坛紫菜应答高温胁迫过程中发挥作用。

关键词 坛紫菜; 高温胁迫; 丝氨酸羟甲基转移酶; 活性氧; 基因克隆

中图分类号 S968.43+1 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2018)05-0122-08

丝氨酸羟甲基转移酶(Serine hydroxyl methyltransferase, SHMT)(Schirch *et al.*, 2005)广泛存在于真核生物和原核生物中, 在高等植物的一碳化合物代谢和光呼吸过程发挥着重要作用, 其主要功能是为蛋白质和嘌呤的生物合成提供甘氨酸, 并生成 N5,N10-亚甲基四氢叶酸(McClung *et al.*, 2000)。四氢叶酸是植物体内参与 C1 转移反应的重要辅酶, 并且在植物的甲基循环过程中发挥重要作用(Bekaert *et al.*, 2008)。生成的亚甲基四氢叶酸参与了 DNA 和 RNA 的合成, 并在亚甲基四氢叶酸还原酶的作用下, 再经过一系列的转化, 最终生成 S-腺苷甲硫氨酸(S-adenosyl-methionine,

SAM), 从而直接参与 DNA 的甲基化过程(Du *et al.*, 2017)。植物在缺少 SHMT 时, 会发生严重的生长延迟。同时, 已有的研究也表明, SHMT 在植物抵抗非生物胁迫时也发挥着重要的作用。例如, 谷胱甘肽是清除活性氧的重要抗氧化剂, 而谷胱甘肽的合成主要依赖于甘氨酸(Graham *et al.*, 1997; 李朝霞等, 2003)。Graham 等(1997)对杨树在逆境胁迫下谷胱甘肽合成的研究中发现, SHMT 基因参与了光呼吸过程并产生甘氨酸。李朝霞等(2003)认为, 在逆境胁迫条件下, 光呼吸不仅可以促进卡尔文循环参与抗逆反应, 而且可以参与甘氨酸的合成进而合成谷胱甘肽清除活性

* 福建省自然科学基金(杰青)(201412260001)资助 [This work was supported by the Natural Science Foundation of Fujian Province, China (Outstanding Youth Fund) (201412260001)]. 林颖辉, E-mail: 414350177@qq.com

① 通讯作者: 谢潮添, 教授, E-mail: ctxie@jmu.edu.cn

收稿日期: 2017-08-08, 收修改稿日期: 2017-08-29

氧。此外,对拟南芥 *SHMT* 突变体的研究表明,抑制 *SHMT* 基因的表达,植株抵抗非生物胁迫的能力显著下降,更易受到胁迫的侵害(Moreno *et al.*, 2005)。由此可见, *SHMT* 基因在植物的逆境胁迫应答中发挥着重要的作用。因此,研究逆境胁迫条件下植物体中 *SHMT* 基因的表达变化并应用于转基因实验中,是抗逆植物基因工程研究的一个重要方向。

坛紫菜(*Pyropia haitanensis*)是我国南方沿海广泛栽培的大型经济海藻之一,其产量占全国紫菜产量的 70%以上(李晓川, 2011)。坛紫菜生活在潮间带的中高潮区,退潮时,坛紫菜叶状体会直接暴露于空气当中,遭遇高温、失水和高光强等环境因子的逆境胁迫。由于生存环境特殊,使得坛紫菜具备了独特的抵抗逆境胁迫的能力(Blouin *et al.*, 2011)。此外,近年来受到全球气候变暖的影响,海水水温过高严重影响坛紫菜栽培的产量和经济效益(Xu Y *et al.*, 2014; 李兵等, 2013; 张元等, 2011)。因此,研究坛紫菜的抗高温机制,克隆抗高温相关基因,对于后期海藻乃至经济作物抗逆基因工程的研究具有十分重要的理论价值和实际意义。目前,尚无在大型海藻中克隆获得 *SHMT* 相关基因的报导,研究 *SHMT* 基因在抵抗高温等逆境胁迫时如何发挥作用,对于研究大型海藻在抵抗逆境胁迫时的一碳化合物代谢和光呼吸变化十分必要。本研究克隆获得了 2 条坛紫菜 *SHMT* 基因的全长,并通过实时荧光定量 PCR(Real-time fluorescence quantitative PCR, qRT-PCR)技术分析 *SHMT* 基因在高温胁迫下的表达水平变化,不仅丰富了坛紫菜的基因库,而且可为坛紫菜抗逆机制研究提供理论参考。

1 材料与方法

1.1 坛紫菜样品及胁迫处理

本实验中所采用的实验材料取自福建省坛紫菜种质资源库, Z-61 品系是经人工诱变和杂交选育出的坛紫菜耐高温纯系(陈昌生等, 2008)。正常条件下培养的坛紫菜 Z-61 叶状体用于总 RNA 的提取,反转录成 cDNA 后进行相关基因的全长克隆。提取各高温胁迫下培养的 Z-61 叶状体总 RNA,用于基因表达水平的 qRT-PCR 分析。

坛紫菜 Z-61 叶状体的正常培养条件:培养温度(21.0±0.5)°C,光照强度 50~60 μmol/(m²·s),光照周期 12L:12D,每 48 h 更换一次新鲜的叶状体培养液。叶状体叶片长度培养至(16±2) cm 时,选取叶面平滑、无卷曲且生长状况良好的藻体作为实验材料。

坛紫菜 Z-61 叶状体的高温胁迫培养条件:取(16±2) cm 的健康藻体,分别于(31.0±0.5)°C 的恒温光照培养箱中进行高温胁迫处理(其余培养条件同适宜条件),胁迫处理时间为 0、3、6、12、24、48、96、144 h。

1.2 引物及其序列

基因序列的 PCR 扩增、阳性克隆筛选和不同胁迫处理下基因表达水平分析所用的引物序列均由厦门铂尚生物有限公司合成(表 1)。

1.3 总 RNA 的分离纯化

用滤纸吸干坛紫菜表面水分后,称取 0.1 g 藻体用于总 RNA 提取。总 RNA 提取采用 E.Z.N.A 植物 RNA 提取试剂盒(OMEGA, 德国)。所提取的总 RNA

表 1 实验中所用引物
Tab.1 Primers used in the experiment

基因 Gene	引物序列 Sequence(5'~3')	用途 Purpose
<i>PhSHMT1</i>	F: CCACAACGTCCGCCTTCAAC R: CGATTGGCTCCTTGCTGCAC	定量分析 qRT-PCR
<i>PhSHMT2</i>	F: TGATGGAGGCTGGCTACACG R: ACACCGCGTTCTTGTTGAGC	
<i>PhSHMT1</i>	F: CACACTCGCCACCAATG R: CCCCACTTCCGTCTCACTC	普通 PCR
<i>PhSMHT2</i>	F: GTTCATCCACGCCGACA R: TGCTCCGCACCTCACAGA	普通 PCR
<i>PhUBC</i>	F: TCACAACGAGGATTTACCACC R: GAGGAGCACCTTGAAACG	内参 Internal control
M13	F: CGCCAGGGTTTTCCCAGTCACGAC R: GAGCGGATAACAATTTTCACACAGG	阳性克隆筛选 Validate of positive clone

的完整性通过凝胶电泳进行检查,并通过 Cary50 紫外分光光度计(Varian, 美国)分别测定 $OD_{260\text{ nm}}$ 和 $OD_{280\text{ nm}}$ 值。根据测定结果判断核酸和蛋白质的污染情况,并计算所提取的 RNA 浓度。

1.4 *PhSHMT* 基因的全长克隆

根据坛紫菜转录组数据库(GenBank 登录号:GFOM00000000)unigene 的注释结果,筛选出 2 条注释结果为皱波角叉菜(*Chondrus crispus*)*SHMT* 基因的 unigene(Cluster-3452.15441, Cluster-3452.16340)序列,进行 *PhSHMT* 基因的克隆。通过 Blast 序列比对分析,发现 Unigene15441 已包含所编码基因 5'端起始密码子和 3'端终止密码子,因此,根据 Unigene15441 的序列设计普通 PCR 引物进行序列扩增验证(表 1);而对 Unigene16340 进行 Blast 比对,同样也已包含了 5'端起始密码子和 3'端终止密码子,因此,同样根据 Unigene16340 序列设计普通 PCR 引物进行序列扩增验证(表 1)。采用普通 PCR 方法对坛紫菜 *SHMT* 基因进行克隆。扩增产物经琼脂糖凝胶电泳后使用通用型 DNA 纯化回收试剂盒(TIANGEN)对目的片段进行回收,与 pMD19-T 载体(TaKaRa)连接后导入感受态细胞 *E.coli* DH5 α 中,筛选出阳性克隆后进行放大培养,采用质粒小提试剂盒(TIANGEN)提取质粒后寄送厦门铂尚生物工程有限公司测序。根据测序结果,获得 2 个 *PhSHMT* 基因全长序列。

1.5 *PhSHMT* 基因的生物信息学分析

基因序列同源性检测:利用 NCBI 的 Blastn (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)程序对所获得的 *PhSHMT* 全长基因序列进行检测。

开放阅读框(Open Reading Frame, ORF)分析:采用 ORF Finder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>)软件分析 *PhSHMT* 基因的开放阅读框以及其所编码氨基酸序列。

蛋白质序列一级结构分析:使用在线软件 ExPASy ProtParam(<http://web.expasy.org/protparam/>)分析 *PhSHMT* 基因所编码蛋白质的一级结构。

蛋白质序列二级结构分析:使用在线软件 PredictProtein(<https://www.predictprotein.org/>)分析 *PhSHMT* 基因所编码蛋白质的二级结构。

蛋白质跨膜结构分析:通过在线软件 TMHMM Server v.2.0(<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>)分析 *PhSHMT* 基因所编码蛋白质是否存在跨膜结构域。

亚细胞定位预测:通过在线软件 WoLFPSORT (<http://www.wolfpsort.org/>)对 *PhSHMT* 基因进行亚细

胞定位预测。

采用 ClustalX 进行氨基酸多重序列比对,并采用 MEGA 6.06 软件最大似然法(Maximum Likelihood, ML)构建 *PhSHMT* 蛋白系统进化树。

1.6 *PhSHMT* 基因表达水平的 qRT-PCR 分析

根据已获得的 *PhSHMT* 基因序列设计荧光定量 PCR 引物(表 1),并以 *PhUBC* 作为内参基因,分别进行 *PhSHMT* 在不同高温胁迫条件下基因表达水平的 qRT-PCR 分析。

提取的各样品总 RNA 按 PrimeScript RtreagentKit (TaKaRa, 大连)的流程将 RNA 反转录成 cDNA 定量模板。qRT-PCR 扩增以 10 \times 梯度稀释的 cDNA 为模板进行,用于制作 *PhSHMT1*、*PhSHMT2* 和内参基因的标准曲线。每个反应设 3 个平行复孔。通过 SPSS 19.0 和 Excel 软件对实验最终定量数据进行统计分析,并采用单因素方差分析(One-way ANOVA)和最小显著差异法(LSD)比较不同数据组间的差异($P < 0.05$ 表示差异显著, $P < 0.01$ 表示极显著差异)。

qRT-PCR 扩增的 20 μ l 反应体系:10 μ l 2 \times SYBR Premix *ExTaq*TM II (TaKaRa), 6.8 μ l ddH₂O, 0.4 μ l Rox Reference Dye I, 0.4 μ l 正反向引物和 2 μ l 反转录产物。扩增程序:95 $^{\circ}$ C 变性 30 s; 95 $^{\circ}$ C 5 s, 60 $^{\circ}$ C 31 s, 40 个循环。循环结束后从 55 $^{\circ}$ C 缓慢升温至 95 $^{\circ}$ C, 绘制熔解曲线。qRT-PCR 扩增在 7300 型定量 PCR 仪 (ABI, 美国)上进行。

2 结果与分析

2.1 *PhSHMT* 基因的全长克隆及序列分析

以坛紫菜 Cluster-3452.15441 为核心序列,通过普通 PCR 扩增和测序获得一条 1710 bp 的基因序列(图 1)。经过 Blast 比对,确定该基因为坛紫菜的 *PhSHMT* 基因,命名为 *PhSHMT-1*。该基因已提交到 GenBank 数据库中,收录号为 MF687405。通过 ORF Finder 在线软件分析发现,该基因 107~1598 个碱基为完整的开放阅读框。使用 ExPASy ProtParam 程序进行一级结构分析发现, *PhSHMT-1* 编码的蛋白质包含 497 个氨基酸,分子式为 C₄₂₃₅H₆₉₇₈N₁₄₉₄O₁₇₆₂S₄₅₀, 分子量为 121.443 kDa, 理论等电点为 4.93, 不稳定系数为 48.77, 脂肪系数为 17.60, 总平均疏水度为 0.807。通过 Predict Protein 程序预测 *PhSHMT-1* 的二级结构中构成螺旋(H)、片层(E)和环状(L)的氨基酸残基占总氨基酸比例分别为 43.46%、12.68%和 34.00%。TMHMM 软件检测发现该蛋白无跨膜结构域,亚细

胞定位软件 WoLFPSORT 预测 *PhSHMT-1* 定位于线粒体中。

以坛紫菜 Cluster-3452.16340 为核心序列, 通过普通 PCR 扩增和测序获得一条 1957 bp 的基因序列 (图 1)。经过 blast 比对, 确定该基因为坛紫菜的 *PhSHMT* 基因, 命名为 *PhSHMT-2*。该基因已提交到 GenBank 数据库中, 收录号为 MF687406。通过 ORF Finder 在线软件分析发现, 该基因 269~1664 个碱基为完整的 ORF。使用 ExPASy ProtParam 程序进行一级结构分析发现, *PhSHMT-2* 基因编码的蛋白质包含 465 个氨基酸, 分子式为 C₃₉₉₂H₆₅₈₈N₁₃₉₈O₁₆₇₀S₄₀₈, 分子量为 113.969 kDa, 理论等电点为 4.95, 不稳定系数为 51.09, 脂肪系数为 17.60, 总平均疏水度为 0.775。通过 Predict Protein 程序预测 *PhSHMT-2* 的二级结构中构成螺旋(H)、片层(E)和环状(L)的氨基酸残基占总氨基酸比例分别为 43.23%、16.34%和 29.46%。TMHMM 软件检测发现, 该蛋白无跨膜结构域, 亚细胞定位软件 WoLFPSORT 预测 *PhSHMT-2* 定位于细胞质中。

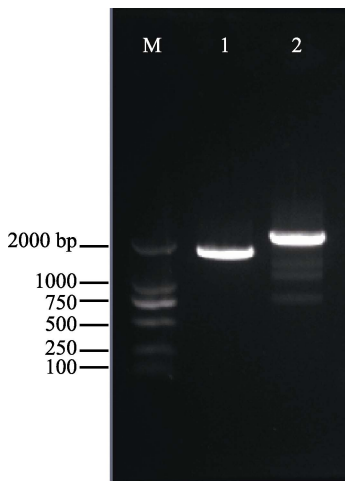


图 1 *PhSHMT* 基因克隆产物电泳
Fig.1 Agarose electrophoresis of PCR products of *PhSHMT* genes

1: *PhSHMT-1* 普通 PCR 扩增产物; 2: *PhSHMT-2* 普通 PCR 扩增产物; M: DL2000 DNA marker
1: PCR products of *PhSHMT-1*; 2: PCR products of *PhSHMT-2*; M: DL2000 DNA marker

多序列比对结果表明, PhSHMT-1 和 PhSHMT-2 间同源性较高, 且都具有 SHMT 家族特有的保守结构域, 在 PhSHMT-1 和 PhSHMT-2 序列中均发现了磷酸吡哆醛的结合位点(图 2), 说明 SHMT 是以磷酸吡哆醛作为辅酶进行反应的。

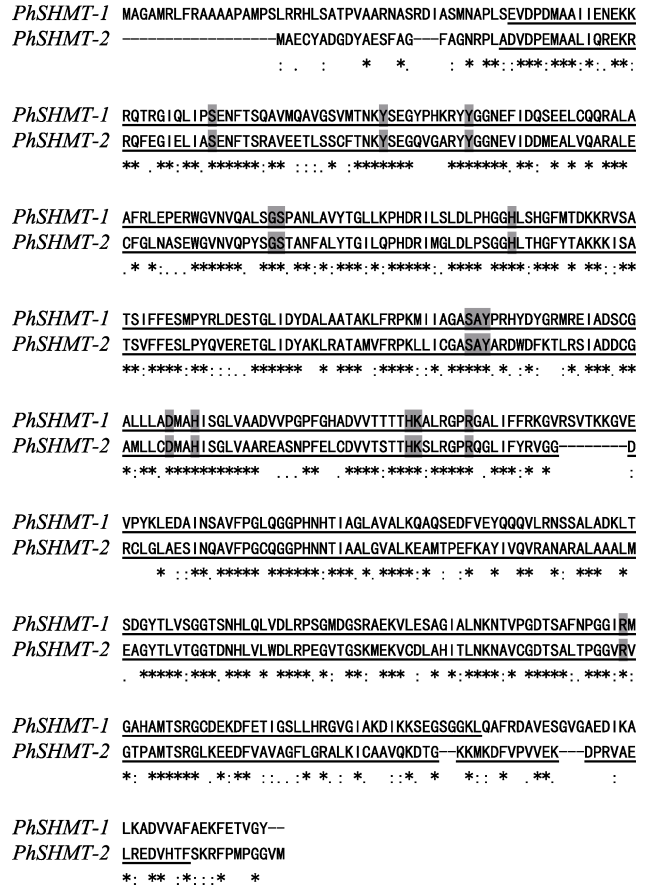


图 2 PhSHMT 蛋白氨基酸序列的多重序列比对
Fig.2 Multi-alignment of amino acid sequence of PhSHMT

下划线部分为 SHMT 基因家族特有的保守结构域,

阴影标记为磷酸吡哆醛的结合位点, “*”和“:”

分别表示一致性和相似性的氨基酸残基

The underlined sections were the conserved amino acids motif of SHMT gene family. The gray background were marked as the pyridoxal phosphate binding site. Asterisks (*) and colons (:) indicated identical and similar amino acid residues, respectively

2.2 *PhSHMT* 的系统进化分析

为进一步分析 *PhSHMT* 与其他物种的亲缘关系, 从 NCBI 的 GenBank 数据库选取 10 条 SHMT 相关氨基酸序列, 通过 MEGA 6.06 程序采用最大似然法 (Maximum likelihood, ML) 构建系统进化树。结果显示, *PhSHMT-1* 基因与一种红藻 (*Cyanidioschyzon merolae strain*) 和邹波角叉菜 (*Chondrus crispus*) 聚为一类, 而 *PhSHMT-2* 与三角褐指藻 (*Phaeodactylum tricorutum*)、一种温泉红藻 (*Galdieria sulphuraria*) 和假微型海链藻 (*Thalassiosira pseudonana*) 聚为一类, 且藻类的 SHMT 基因与高等植物遗传距离较大 (图 3), 说明藻类中 SHMT 基因与高等植物亲缘关系较远。

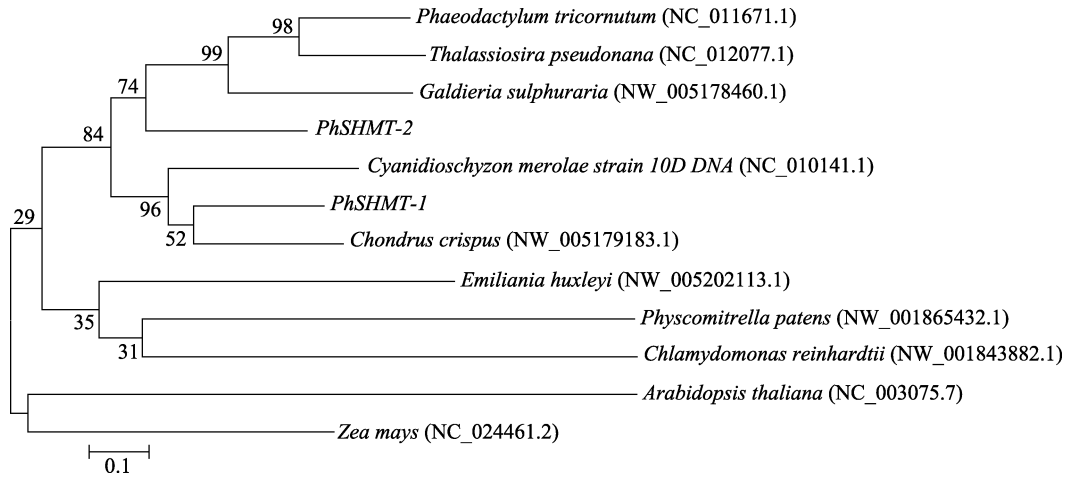


图 3 SHMT 基因的蛋白系统进化树

Fig.3 Phylogenetic tree of SHMT protein constructed by the maximum likelihood method

2.3 PhSHMT 基因表达水平的 qRT-PCR 分析

为研究 *PhSHMT* 基因在坛紫菜响应逆境胁迫中所发挥的功能,本研究对 *PhSHMT* 基因表达水平进行了定量检测。通过 qRT-PCR 技术对 2 条 *PhSHMT* 基因在高温胁迫下的表达特征进行了相对定量分析(图 4、图 5)。

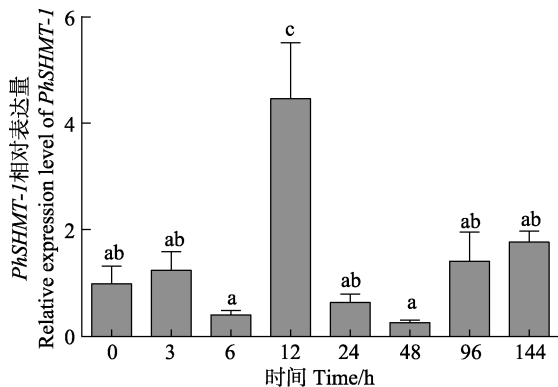


图 4 PhSHMT-1 在高温胁迫水平下的相对表达

Fig.4 Relative expression levels of *PhSHMT-1* gene under high temperature stress

具有不同字母上标的数据间差异显著($P < 0.05$),下同 Bar of each column with different small letters mean significant difference ($P < 0.05$). The same as below

结果表明,在 31 °C 高温胁迫不同时间下, *PhSHMT-1* 和 *PhSHMT-2* 基因的表达模式基本一致:在高温胁迫 12 h 时, *PhSHMT-1* 和 *PhSHMT-2* 基因的表达水平受到高温刺激,表达水平显著上调($P < 0.05$);当高温胁迫超过 12 h 后, *PhSHMT-1* 和 *PhSHMT-2* 基因可能已适应高温过程,表达水平恢复到正常值;当高温胁迫超过 4 d 时, *PhSHMT-1* 和 *PhSHMT-2* 基因

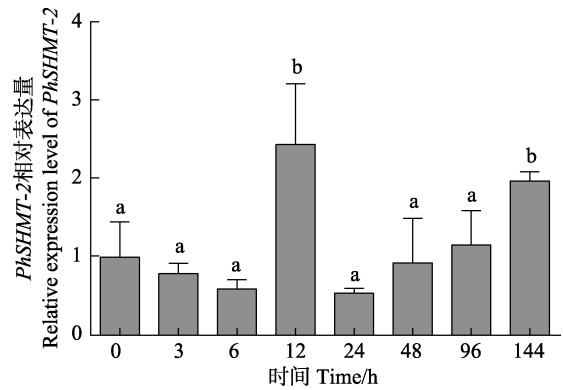


图 5 PhSHMT-2 在高温胁迫下的相对表达

Fig.5 Relative expression levels of *PhSHMT-2* gene under high temperature stress

的表达水平又显著上调($P < 0.05$),这可能是由于过久的高温胁迫,藻体需要更多的谷胱甘肽以清除活性氧,而藻体中的甘氨酸通过合成谷胱甘肽导致含量下降,需要重新合成更多的甘氨酸。

3 讨论

甘氨酸作为一种植物抗逆调节剂,通过合成谷胱甘肽来清除活性氧(Yan *et al.*, 2013)。植物可以通过光呼吸过程将丝氨酸转化为甘氨酸(马莉等, 2008),而 SHMT 在植物光呼吸过程中发挥着重要作用。研究表明,如果将 SHMT 基因敲除,植株的抗逆能力明显降低,更容易受到活性氧的毒害(Moreno *et al.*, 2005)。不仅如此,SHMT 在光呼吸过程产生的四氢叶酸可以进一步生成 SAM,其可以调控 CpG 岛胞嘧啶 DNA 的甲基化(Kim, 2005)。然而,目前对于大型海藻中 SHMT 基因的研究尚处于空白。本研究以转录组测序获得的 SHMT 基因序列为基础,通过普通 PCR 扩增

技术成功克隆了 2 条坛紫菜的 *SHMT* 基因。

植物在逆境胁迫下会导致卡尔文循环障碍, 并产生大量的活性氧, 对植物机体结构造成氧化损伤 (Mittler, 2002)。而光呼吸可以促进卡尔文循环进而提高植物抵抗逆境胁迫的能力, 并且光呼吸过程的代谢中间产物也发挥了重要作用(赵宏伟等, 2016), 如脯氨酸与谷胱甘肽。其中, 脯氨酸是一种重要的细胞渗透调节剂, 其合成主要受到谷氨酸含量的影响, 而光呼吸过程产生的 NH_3 参与了谷氨酸的合成。谷胱甘肽是一种重要的抗氧化物质, 在清除活性氧方面扮演着重要角色, 谷胱甘肽的合成主要依赖于甘氨酸, 而甘氨酸是光呼吸过程的重要代谢产物。*SHMT* 作为一类参与光呼吸与一碳代谢的重要酶类, 目前已经在许多物种中被鉴定出。植物体内存在 3 种形式的 *SHMT*, 包括细胞质 *cSHMT*、线粒体 *mSHMT* 和叶绿体 *SHMT*(Bauwe *et al*, 2003; Garrow *et al*, 1993)。在本研究中, 对克隆出的 2 条 *PhSHMT* 基因进行亚细胞定位发现, *PhSHMT-1* 基因定位于线粒体上, 而 *PhSHMT-2* 基因定位于细胞质上。这说明, 坛紫菜中可能存在细胞质型和线粒体型的 *SHMT*, 而是否存在叶绿体型的 *SHMT* 尚待进一步的研究。根据以往的研究(Kamalay *et al*, 1980、1984)推测: 坛紫菜线粒体型的 *SHMT* 首先在光呼吸过程发挥作用, 将甘氨酸分解形成 CO_2 和 NH_3 , 进而生成丝氨酸; 而随着丝氨酸进入细胞质中被分解, 坛紫菜细胞质型的 *SHMT* 又将丝氨酸催化生成甘氨酸。

植物在应对逆境胁迫时的响应是一个非常复杂的生理生化过程, 其中包括了多种基因、多种生理机制的共同调控。植物在遭受高温胁迫时会产生大量的活性氧, 在植物长期的演变过程中形成了一系列复杂的活性氧清除机制, 例如激活抗氧化酶基因的表达和增强抗氧化酶活性等。坛紫菜的早期研究发现, 坛紫菜在应对高温胁迫时, 其过氧化氢酶基因会在短时间内迅速大幅度上调表达以清除细胞内多余的过氧化物(仵燕青, 2016); 此外, 谷胱甘肽过氧化物酶基因在 12 h 时显著上调表达(张晗晗等, 2016)。本研究发现在 31℃ 高温胁迫条件下, 随着胁迫时间的增加, 坛紫菜 2 条 *PhSHMT* 基因均表现出先上调后下调再上调的趋势, 在高温胁迫时间为 12 h 时, 2 条基因的表达水平平均达到最高; 随着胁迫时间的增加, 2 条基因的表达水平下降, 在高温胁迫时间为 4 d 时, 2 条基因表达水平又显著上调。通过以上结果可以推测: 坛紫菜在高温胁迫下, 光呼吸通过促进卡尔文循环参与到抗逆反应中, 光呼吸代谢的许多中间产物在这个阶段也发挥了重要作用。光呼吸过程产生甘氨酸, 甘

氨酸通过合成谷胱甘肽来清除多余的活性氧。*SHMT* 基因作为植物光呼吸过程中关键的基因, 在高温胁迫下通过大量的上调表达以促进光呼吸过程, 进而产生更多甘氨酸用于合成谷胱甘肽来清除多余的氧化活性物质。在这个过程中可能伴随坛紫菜甲基化的过程: 高温引起 *PhSHMT* 基因的大量上调表达, 这个过程中不仅可以合成甘氨酸用以应对高温胁迫, 还产生大量的四氢叶酸。由于四氢叶酸参与 SAM 的合成 (Du *et al*, 2017), 高温胁迫下, 推测可能伴随着坛紫菜甲基化水平的上升, 这与许多物种在高温条件下甲基化水平变化相似(Naydenov *et al*, 2015; Xu *et al*, 2014; 胡能兵等, 2016), 但该推测还需要进一步的实验进行验证。

SHMT 基因作为植物中一类响应逆境胁迫的基因, 在坛紫菜响应高温胁迫时发挥了重要的作用。*SHMT* 可以通过参与植物体中谷胱甘肽的合成, 以清除高温胁迫条件下产生的活性氧, 维持坛紫菜细胞内的氧化还原稳态环境。因此, 本研究为理解坛紫菜的耐高温机制以及耐高温品系的培育提供了新的视野和理论基础。

参 考 文 献

- Bauwe H, Kolukisaoglu U. Genetic manipulation of glycine decarboxylation. *Journal of Experimental Botany*, 2003, 54(387): 1523–1535
- Bekaert S, Storozhenko S, Mehrshahi P, *et al*. Folate biofortification in food plants. *Trends in Plant Science*, 2008, 13(1): 28–35
- Blouin, Nicolas A, Brodie, *et al*. Porphyra: A marine crop shaped by stress. *Trends in Plant Science*, 2011, 16(1): 29–37
- Chen CS, Ji DH, Xie CT, *et al*. Preliminary study on selecting the high temperature resistance strains and economic traits of *Porphyra haitanensis*. *Acta Oceanologica Sinica*, 2008, 30(5): 100–106 [陈昌生, 纪德华, 谢潮添, 等. 坛紫菜耐高温品系选育及经济性状的初步研究. *海洋学报*, 2008, 30(5): 100–106]
- Du J, Wang S, He C, *et al*. Identification of regulatory networks and hub genes controlling soybean seed set and size using RNA sequencing analysis. *Journal of Experimental Botany*, 2017, 68(8): 1955–1972
- Garrow TA, Brenner AA, Whitehead VM, *et al*. Cloning of human cDNAs encoding mitochondrial and cytosolic serine hydroxymethyltransferases and chromosomal localization. *Journal of Biological Chemistry*, 1993, 268(16): 11910
- Graham N, Arisi ACM, Lise J, *et al*. The role of glycine in determining the rate of glutathione synthesis in poplar: Possible implications for glutathione production during stress. *Physiologia Plantarum*, 1997, 100(2): 255–263

- Hu NB, Sui YH, Su YJ, *et al.* Effect of heat stress on isoenzyme and DNA methylation of different heat-sensitive peppers. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2016, 36(1): 131–138 [胡能兵, 隋益虎, 舒英杰, 等. 高温胁迫对不同热敏型辣椒同工酶及 DNA 甲基化的影响. *西北植物学报*, 2016, 36(1): 131–138]
- Kamalay JC, Goldberg RB. Organ-specific nuclear RNAs in tobacco. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1984, 81(9): 2801–2805
- Kamalay JC, Goldberg RB. Regulation of structural gene expression in tobacco. *Cell*, 1980, 19(4): 935–946
- Kim YI. Nutritional epigenetics: Impact of folate deficiency on DNA methylation and colon cancer susceptibility. *Journal of Nutrition*, 2005, 135(11): 2703
- Li B, Xu Y, Ji DH, *et al.* Effects of high temperature and non-aeration stress on the quality of *Porphyra haitanensis*. *Marine Fisheries Research*, 2013, 34(3): 104–110 [李兵, 徐燕, 纪德华, 等. 高温静水胁迫培养对坛紫菜品质的影响. *渔业科学进展*, 2013, 34(3): 104–110]
- Li XC. Industry development, standard and safety assessment of seaweed in China. *Chinese Fishery Quality & Standards*, 2011, 1(3): 9–12 [李晓川. 我国紫菜产业发展、标准状况及安全性评价. *中国渔业质量与标准*, 2011, 1(3): 9–12]
- Li ZX, Zhao SJ, Meng QW. Pathways and function of photorespiration. *Chinese Bulletin of Botany*, 2003, 20(2): 190–197 [李朝霞, 赵世杰, 孟庆伟. 光呼吸途径及其功能. *植物学报*, 2003 20(2): 190–197]
- Ma L, Chen LM, Liu DQ, *et al.* Research progresses on the molecular properties and physiological functions of plant serine hydroxymethyltransferase. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2008, 36(4): 1357–1359 [马莉, 陈丽梅, 刘迪秋, 等. 植物丝氨酸羟甲基转移酶及其生理作用研究进展. *安徽农业科学*, 2008, 36(4): 1357–1359]
- McClung CR, Hsu M, Painter JE, *et al.* Integrated temporal regulation of the photorespiratory pathway. Circadian regulation of two *Arabidopsis* genes encoding serine hydroxymethyltransferase. *Plant Physiology*, 2000, 123(1): 381–392
- Mittler R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science*, 2002, 7(1): 405–410
- Moreno JI, Mart NR, Castresana C. *Arabidopsis* SHMT1, a serine hydroxymethyltransferase that functions in the photorespiratory pathway influences resistance to biotic and abiotic stress. *Plant Journal*, 2005, 41(3): 451–463
- Naydenov M, Baev V, Apostolova E, *et al.* High-temperature effect on genes engaged in DNA methylation and affected by DNA methylation in *Arabidopsis*. *Plant Physiology & Biochemistry*, 2015, 87: 102–108
- Schirch V, Szebenyi DM. Serine hydroxymethyltransferase revisited. *Current Opinion in Chemical Biology*, 2005, 9(5): 482–487
- Wu YQ, Xiao HD, Xu K, *et al.* Cloning and expression pattern analysis of catalase (CAT) gene from *Pyropia haitanensis*. *Journal of Fisheries of China*, 2016, 40(10): 1576–1585 [仵燕青, 肖海东, 许凯, 等. 坛紫菜过氧化氢酶基因的克隆及表达特征. *水产学报*, 2016, 40(10): 1576–1585]
- Xu X, Lei J, Zhang C, *et al.* Methylation-sensitive amplified polymorphism analysis of DNA methylation in hot pepper under high temperature and air humidity stress. *Journal of Nuclear Agricultural Sciences*, 2014, 28(7): 1175–1180
- Xu Y, Chen C, Ji D, *et al.* Proteomic profile analysis of *Pyropia haitanensis* in response to high-temperature stress. *Journal of Applied Phycology*, 2014, 26(1): 607–618
- Yan H, Mao P, Xia F. Research progress in plant antioxidant glutathione (Review). *Acta Agrestia Sinica*, 2013, 21(3): 428–434
- Zhang HH, Xu Y, Ji DH, *et al.* Cloning and expression analysis of the glutathione peroxidase gene from *Pyropia haitanensis*. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2016, 23(4): 791–799 [张哈哈, 徐燕, 纪德华, 等. 坛紫菜谷胱甘肽过氧化物酶基因的克隆及表达特征. *中国水产科学*, 2016, 23(4): 791–799]
- Zhang Y, Xie CT, Chen CS, *et al.* Physiological responses of gametophytic blades of *Porphyra haitanensis* to rising temperature stresses. *Journal of Fisheries of China*, 2011, 35(3): 379–386 [张元, 谢潮添, 陈昌生, 等. 高温胁迫下坛紫菜叶状体的生理响应. *水产学报*, 2011, 35(3): 379–386]
- Zhao HW, Wang XP, Yu MF, *et al.* Effect of drought stress and rewatering on antioxidant system and proline in rice during tillering stage. *Journal of Northeast Agricultural University*, 2016, 47(2): 1–7 [赵宏伟, 王新鹏, 于美芳, 等. 分蘖期干旱胁迫及复水对水稻抗氧化系统及脯氨酸影响. *东北农业大学学报*, 2016, 47(2): 1–7]

(编辑 冯小花)

Cloning and Expression Analysis of Serine Hydroxyl Methyltransferase (SHMT) Genes from *Pyropia haitanensis*

LIN Yinghui, WANG Wenlei, XU Yan, JI Dehua, CHEN Changsheng, XIE Chaotian^①

(College of Fisheries, Jimei University, Xiamen 361021)

Abstract Serine hydroxyl methyltransferase (SHMT) plays an important role in plant response to stress. Under adversity stress, the *SHMT* gene not only promotes the Calvin cycle to participate in the anti-stress reaction, but also participates in the synthesis of glycine, and then synthesis of glutathione, scavenging reactive oxygen species. *Pyropia haitanensis*, naturally grows in the coastal intertidal zone, is an important economic macroalgae in Fujian, Zhejiang and Guangdong provinces. Because of the special living environment, *P. haitanensis* has the unique ability to resist adversity. With global warming, the temperature of seawater increases, which causes damage to seedlings of *P. haitanensis* and leads to great economic losses in the aquaculture industry. As for the physiological and molecular response of *P. haitanensis* to high temperature and dehydration stress conditions, our previous studies found *SHMT* plays an important role in stress resistance. In this study, based on unigene sequences which were obtained from whole transcriptome sequencing of *P. haitanensis*, two full-length *PhSHMT* genes were obtained by ordinary PCR, and named *PhSHMT-1* (GenBank accession No: MF687405) and *PhSHMT-2* (GenBank accession No: MF687406). The full-length cDNA of the *PhSHMT-1* gene comprised 1710 nucleotides and contained an open reading frame (ORF) of 1491 bp, encoding a protein of 497 amino acid residues, with the predicted molecular weight of 121.443 kDa and theoretical isoelectric point of 4.93; and the full-length cDNA of the *PhSHMT-2* gene comprised 1957 nucleotides and contained an ORF of 1395 bp, encoding a protein of 465 amino acid residues with the predicted molecular weight of 113.969 kDa and theoretical isoelectric point of 4.95. Multiple sequence alignment and phylogenetic analysis indicated that the *PhSHMT-1* and *PhSHMT-2* belong to the plant *SHMT* enzyme family. The expressions of the two *PhSHMT* genes, as measured by real-time fluorescence quantitative PCR (qRT-PCR), were consistent under high temperature stress. During high-temperature stress, the expression levels of the two *PhSHMT* genes were significantly upregulated first and then decreased, but as the high-temperature stress continued, the expression levels were upregulated again. Results suggested that the gene of *PhSHMT* enzyme plays an important role in responses of *P. haitanensis* to high-temperature stress.

Key words *Pyropia haitanensis*; High temperature stress; Serine hydroxyl methyltransferase; Active oxygen; Gene cloning

^① Corresponding author: XIE Chaotian, E-mail: ctxie@jmu.edu.cn