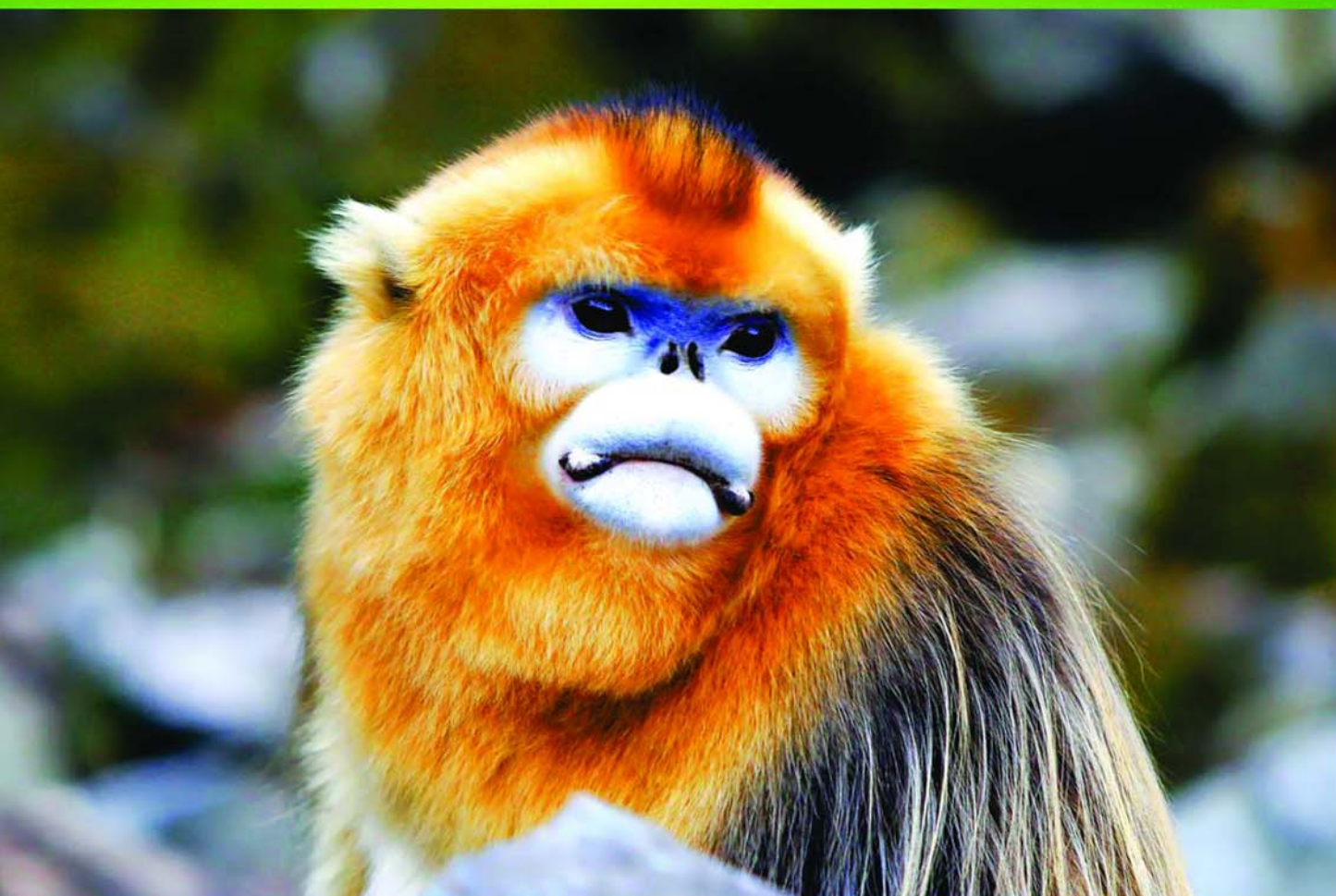


ISSN 1000-0933
CN 11-2031/Q

生态学报

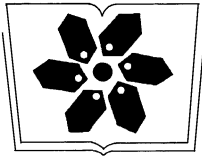
Acta Ecologica Sinica



第32卷 第2期 Vol.32 No.2 **2012**

中国生态学会
中国科学院生态环境研究中心
科学出版社

主办
出版



中国科学院科学出版基金资助出版

生态学报

(SHENGTAI XUEBAO)

第 32 卷 第 2 期

2012 年 1 月 (半月刊)

目 次

北部湾秋季底层鱼类多样性和优势种数量的变动趋势	王雪辉,邱永松,杜飞雁,等 (333)
中国大陆鸟类和兽类物种多样性的空间变异	丁晶晶,刘定震,李春旺,等 (343)
粉蝶盘绒茧蜂中国和荷兰种群学习行为及 EAG 反应的比较	王国红,刘 勇,戈 峰,等 (351)
君主绢蝶的生物学及生境需求	方健惠,骆有庆,牛 犇,等 (361)
西南大西洋阿根廷滑柔鱼生物学年间比较	方 舟,陆化杰,陈新军,等 (371)
城市溪流中径流式低坝对底栖动物群落结构的影响	韩鸣花,海燕,周 斌,等 (380)
沉积再悬浮颗粒物对马氏珠母贝摄食生理影响的室内模拟	栗志民,申玉春,余南涛,等 (386)
太平洋中西部海域浮游植物营养盐的潜在限制	徐燕青,陈建芳,高生泉,等 (394)
几株赤潮甲藻的摄食能力	张清春,于仁成,宋静静,等 (402)
高摄食压力下球形棕囊藻凝聚体的形成	王小冬,王 艳 (414)
大型绿藻浒苔藻段及组织块的生长和发育特征	张必新,王建柱,王乙富,等 (421)
链状亚历山大藻生长衰亡相关基因的筛选	仲 洁,隋正红,王春燕,等 (431)
太湖春季水体固有光学特性及其对遥感反射率变化的影响	刘忠华,李云梅,吕 恒,等 (438)
程海富营养化机理的神经网络模拟及响应情景分析	邹 锐,董云仙,张祯祯,等 (448)
沙质海岸灌化黑松对蛀食胁迫的补偿性响应	周 振,李传荣,许景伟,等 (457)
泽陆蛙和饰纹蛙蝌蚪不同热驯化下选择体温和热耐受性	施林强,赵丽华,马小浩,等 (465)
麦蚜和寄生蜂对农业景观格局的响应及其关键景观因子分析	赵紫华,王 颖,贺达汉,等 (472)
镉胁迫对芥蓝根系质膜过氧化及 ATPase 活性的影响	郑爱珍 (483)
生姜水浸液对生姜幼苗根际土壤酶活性、微生物群落结构及土壤养分的影响	韩春梅,李春龙,叶少平,等 (489)
九州虫草菌丝体对 Mn 的耐性及富集	罗 毅,程显好,张聪聪,等 (499)
土霉素暴露对小麦根际抗生素抗性细菌及土壤酶活性的影响	张 昊,张利兰,王 佳,等 (508)
氮沉降对杉木人工林土壤有机碳矿化和土壤酶活性的影响	沈芳芳,袁颖红,樊后保,等 (517)
火炬树雌雄母株克隆生长差异及其光合荧光日变化	张明如,温国胜,张 瑾,等 (528)
湖南乌云界自然保护区典型生态系统的土壤持水性能	潘春翔,李裕元,彭 亿,等 (538)
祁连山东段高寒地区土地利用方式对土壤性状的影响	赵锦梅,张德罡,刘长仲,等 (548)
沙质草地生境中大型土壤动物对土地沙漠化的响应	刘任涛,赵哈林 (557)
腾格里沙漠东南缘可培养微生物群落数量与结构特征	张 威,章高森,刘光琇,等 (567)
塔克拉玛干沙漠南缘玉米对不同荒漠化环境的生理生态响应	李 磊,李向义,林丽莎,等 (578)
内蒙古锡林河流域羊草草原 15 种植物热值特征	高 凯,谢中兵,徐苏铁,等 (588)
不同密度条件下芨芨草空间格局对环境胁迫的响应	张明娟,刘茂松,徐 驰,等 (595)
环境因子对巴山冷杉-糙皮桦混交林物种分布及多样性的影响	任学敏,杨改河,王得祥,等 (605)
海藻酸铈配合物对毒死蜱胁迫下菠菜叶片抗坏血酸-谷胱甘肽循环的影响	栾 霞,陈振德,汪东风,等 (614)
城市化进程中城市热岛景观格局演变的时空特征——以厦门市为例	黄聚聪,赵小锋,唐立娜,等 (622)
基于遥感和 GIS 的川西绿被时空变化研究	杨存建,赵梓健,任小兰,等 (632)
亚热带城乡复合系统 BVOC 排放清单——以台州地区为例	常 杰,任 远,史 琰,等 (641)
研究简报	
不同水分条件下毛茛苔草枯落物分解及营养动态	侯翠翠,宋长春,李英臣,等 (650)
大山雀对巢箱颜色的识别和繁殖功效	张克勤,邓秋香,Justin Liu,等 (659)
期刊基本参数:CN 11-2031/Q * 1981 * m * 16 * 330 * zh * P * ¥ 70.00 * 1510 * 37 * 2012-01	



封面图说: 雄视——中国的金丝猴有川、黔、滇金丝猴三种,此外还有越南和缅甸金丝猴两种。金丝猴是典型的森林树栖动物,常年栖居于海拔 1500—3300m 的亚热带山地、亚高山针叶林、针阔叶混交林,常绿落叶阔叶混交林中,随着季节的变化,只在栖息的生境中作垂直移动。川金丝猴身上长着柔软金色长毛,十分漂亮。个体大,嘴角处有瘤状突起的是雄性金丝猴的特征。川金丝猴只分布在中国的四川、甘肃、陕西和湖北省。属国家一级重点保护、CITES 附录一物种。

彩图提供: 陈建伟教授 国家林业局 E-mail: cites.chenjw@163.com

DOI: 10.5846/stxb201012061734

仲洁, 隋正红, 王春燕, 丁弘叶, 周伟, 张杨. 链状亚历山大藻生长衰亡相关基因的筛选. 生态学报, 2012, 32(2): 0431-0437.

Zhong J, Sui Z H, Wang C Y, Ding H Y, Zhou W, Zhang Y. Screening of growth decline related genes from *Alexandrium catenella*. Acta Ecologica Sinica, 2012, 32(2): 0431-0437.

链状亚历山大藻生长衰亡相关基因的筛选

仲 洁¹, 隋正红^{1,*}, 王春燕², 丁弘叶¹, 周 伟¹, 张 杨³

(1. 中国海洋大学 海洋生物遗传育种教育部重点实验室, 青岛 266003; 2. 山东稼禾生化(沂南)有限公司, 沂南 276300;
3. 青岛海底世界, 青岛 266003)

摘要: 采用抑制性消减杂交 (Suppression subtractive hybridization, SSH) 技术构建了衰亡期的链状亚历山大藻 (*Alexandrium catenella*) 特异表达的 cDNA 文库。共获得 800 个克隆, 利用巢式引物进行 PCR 筛选, 最终确定阳性克隆 556 个。利用斑点杂交技术对这些阳性克隆进行差异筛选, 获得差异表达克隆 160 个。测序后得到片段 125 个, 经过归类, 获得 21 种序列, 其中 6 种在 NCBI 中经 Blast, 获得功能基因与其匹配, 这些功能基因分别是 CHK1 类似检测点蛋白 (checkpoint-like protein)、核酸外切酶复合体、谷氧还蛋白、Na⁺/K⁺ATPase、叶绿体中的一个开放阅读框和 pG1 蛋白, 其他 blast 无同源序列, 可能为新基因。推测链状亚历山大藻的衰亡过程可能涉及到 DNA 损伤、mRNA 降解过程、氧化还原状态的变化、离子动态平衡的变化以及叶绿体一些生理状况的变化等过程。

关键词: 链状亚历山大藻; 衰亡; 抑制性消减杂交

Screening of growth decline related genes from *Alexandrium catenella*

ZHONG Jie¹, SUI Zhenghong^{1,*}, WANG Chunyan², DING Hongye¹, ZHOU Wei¹, ZHANG Yang³

1 Key Laboratory of Marine Genetics and Breeding Ministry of Education, Ocean University of China, Qingdao 266003, China

2 Shandong Jiahe Biochemistry (Yinan) Co. Ltd., Yinan 276300, China

3 Qingdao Underwater World, Qingdao 266003, China

Abstract: With worldwide industrialization, red tide events have been reported more frequently and their harm to humans has become increasingly severe. Although great efforts have been made to elucidate the ecology and biology of red tide events, studies of their molecular mechanisms are still limited, including those of the mechanisms involved in the decline phase of red tide. *Alexandrium catenella* is an important causative dinoflagellate associated with harmful algal blooms and paralytic shellfish poisoning. In this study, a growth decline specific cDNA library of *A. catenella* was constructed using suppression subtractive hybridization (SSH) technology to identify genes expressed in response to decreased growth of red tide algal cells as a primary step in elucidating the red tide process. Samples collected during the decline phase of growth were analyzed and compared with those collected during other phases of growth, which were considered to be controls. A total of 800 clones were obtained from the SSH library, and 556 positive clones were identified by nested PCR. Dot blot hybridization was conducted to screen differentially expressed genes from the positive clones, and a total of 160 differentially expressed clones were identified. After sequencing and classification, 21 sequences were obtained, six of which were found to be homologous with functional genes in the NCBI database. Specifically, these genes were homologous with CHK1 checkpoint-like protein, exosomal 3'—5' exonuclease complex, glutaredoxin, Na⁺/K⁺ATPase, chloroplast gene and pG1 protein. The remaining sequences did not match any present functional genes in the database and were therefore

基金项目: 高校博士点基金资助课题 (20100132110007)

收稿日期: 2010-12-06; 修订日期: 2011-04-07

* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: suizhengh@ouc.edu.cn

assumed to be novel. Checkpoint is a biochemical process that detects DNA damage or problems during DNA replication and restricts problematic cells by maintaining them in certain cell phases or inducing apoptosis. Chk1 is a serine/threonine kinase that functions as an important signal transducer in the DNA damage process. Glutaredoxin can regulate intracellular redox balance and resist oxidative damage response. Na^+/K^+ ATPase is widely distributed in the cell membrane, where it regulates the Na^+ , K^+ concentration gradient to maintain the electrical charge over the cell membrane. There is increasing evidence indicating that ion dynamic balance involves the cell apoptosis process. Because Na^+/K^+ ATPase is the primary system used to acquire K^+ , the functional loss of this enzyme and disorder of ion dynamic balance are clarified as critical symbols for the induction of apoptosis and disease produced by apoptosis. Degradation of mRNA is an important step in regulation of gene expression in eukaryotes. The degradation of mRNA can be divided into degradation of normal and abnormal transcripts. The degradation of abnormal transcripts is a method of maintaining normal physiological function. At present, a large number of studies have indicated that exosomal 3'—5' exonuclease plays an important role in the mRNA degradation process. The function of the pG1 protein is not currently available. However, considering its high frequency within sequencing reports, the gene is highly transcribed. Based on the analysis conducted in this study, we speculate that the growth decline of *A. catenella* involves processes of DNA damage, mRNA degradation, redox status changes, ion dynamic equilibrium and changes in the chloroplast physiological status. This study will help us to better understand the decline mechanism of red tide algae, and provide a foundation for studying the molecular biological mechanism of red tide dynamics and developing possible methods to monitor and control red tide.

Key Words: *Alexandrium catenella*; decline; suppression subtractive hybridization

链状亚历山大藻(*Alexandrium catenella*)是引发中国沿海赤潮的种类之一,会对赤潮区域带来很大的危害。Zingone 等^[1]将赤潮的危害效应分成四类,包括对人类健康、海洋生物资源、海洋旅游和娱乐功能以及海洋生态系统的危害。

赤潮的消亡与爆发一样呈现突然和一致性的群体的生长改变,是赤潮研究中必须阐明的热点问题。关于赤潮消亡的机理,有很多研究者认为这是一种细胞程序性死亡(programmed cell death, PCD)的过程。Vardi 等^[2-3]认为在以色列基尼烈湖中的赤潮生物 *Peridinium gatunense* 的消亡过程是由于 CO_2 限制引起的氧压力所启动的类似 PCD 的过程,并在细胞中检测到了活性氧物质,他们还证明正在衰老的细胞会分泌一种胞外硫醇蛋白,这种蛋白会促使未衰老的细胞对氧压力敏感。Zhang 等^[4]在赤潮生物东海原甲藻(*Prorocentrum donghaiense*)中分离出了与 PCD 相关的序列,一个是半胱天冬酶基因,一个是增殖细胞核抗原基因,它们都是细胞程序性死亡中的关键蛋白。而关于衰亡分子机理的研究还未见报道。

抑制性消减杂交技术(Suppression subtractive hybridization, SSH)是以抑制性 PCR 为基础,将 cDNA 分子拷贝均等化和消减杂交技术合为一体发展起来的一种高效分离差异表达基因的方法,均等化(Normalization)过程使原来有丰度差别的单链 cDNA 含量趋于一致^[5-6]。本文采用 SSH 技术来寻找衰亡期特异表达的基因,为阐明赤潮衰亡机理奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

链状亚历山大藻,来源于中国海洋大学藻种室,由国家海洋局海洋环境监测中心赠送。

1.1.1 培养条件

以 5000 个/mL 的量接种,用 f/2 培养基,置于温度 $(20 \pm 1)^\circ\text{C}$, 光暗比 12 h : 12 h, 光照度为 30—35 $\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$ 的培养室中培养。隔天取藻计数,绘制生长曲线图,在第 2 天(延迟期),第 11 天(对数期),第 21 天(对数期)和第 37 天(衰亡期)收藻。

1.1.2 材料处理

本实验中所用藻种在分离纯化时,均使用了含抗生素的培养基;为避免操作中细菌等的污染,实验中藻的接种及收集均是无菌操作;而且在收藻过程中,用灭菌的海水对藻细胞做了冲洗处理。

本实验的研究对象是处于不同生长时期(是一种总体的生长趋势)的藻,在进行正式实验之前,对藻进行多次活化处理,培养至对数期之后,从中取出接种至新的培养基中进行后续实验,由此可保证藻细胞处于同一生长时期。

1.2 方法

1.2.1 RNA 的提取

用 Trizol (promega) 法提取各个时期链状亚历山大藻的总 RNA,将前 3 次收集的藻 RNA 等量混合作为 Driver,将最后 1 次收集的藻 RNA 作为 Tester,电泳检测总 RNA 的完整性,用紫外分光光度计检测其纯度和浓度。

1.2.2 cDNA 的合成

用 SMARTer™ PCR cDNA Synthesis Kit (Clontech) 分别合成 Driver 和 Tester 的 cDNA 一链和二链。

1.2.3 抑制性消减杂交

实验参照 PCR Select™ cDNA Subtraction Kit (Clontech) 操作手册进行,对合成的二链 cDNA 用 FastDigest RsaI (MBI) 进行酶切,之后经过加接头,两次杂交,两轮 PCR,最终得到抑制性消减杂交的产物。其中第二轮扩增为巢式 PCR,其扩增参数为:94 °C 变性 20 s,68 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 1.5 min,17 个循环。

1.2.4 消减杂交文库的构建

将抑制性消减杂交获得的二轮 PCR 产物与载体 PMD-18T (Takara) 进行连接,转化入大肠杆菌 DH5α 菌株,挑取单克隆,用巢式 PCR 引物 Nested1 (5'-TCGAGCGGCCCGCCGAGGT-3') 和 Nested2R (5'-AGCGTGGTCGCGGCCGAGGT-3') 进行菌落 PCR,检测阳性克隆,选取有清晰的单一条带,片段长度在 100 bp 以上的克隆进行后续筛选实验。菌落 PCR 扩增参数为:94 °C 预变性 5 min;94 °C 变性 1 min,68 °C 退火 1 min,72 °C 延伸 1 min,30 个循环;72 °C 后延伸 10 min^[7]。

1.2.5 斑点杂交验证

按照 DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit I (Roche) 中的方法,分别取纯化后的消减和未消减的二轮 PCR 产物各 3 μg 进行探针标记(分别记为探针 1 和 2)。再用探针 1 和 2 与得到的菌落 PCR 产物分别进行斑点杂交。杂交前对 1.2.4 中得到的菌落 PCR 产物进行定量,浓度保持在 300 ng/μL(浓度过高或过低的浓缩或稀释成 300 ng/μL)。杂交条件:取 5 μL PCR 产物与等量的 0.6 mol/L 的 NaOH 混合变性 15 min,取 1 μL 点到尼龙膜 (Amersham) 上,每个样品制备两张相同的膜,每张膜上点 3 个平行样。样品点完,将膜晾干,于 120 °C 烘箱中烘烤 30 min;68 °C,预杂交 30 min;68 °C 杂交 6 h。洗膜条件为:2×SSC,1% SDS,室温 2×5 min;0.5×SSC,1% SDS,68 °C,2×15 min;洗脱缓冲液,5 min;封阻液,30 min;抗体溶液,30 min;洗脱缓冲液,2×15 min;检测缓冲液,5 min。最后在显色底物中显色过夜,用灭菌的蒸馏水终止显色。

1.2.6 测序

将斑点杂交中与探针 1 的杂交信号达到与探针 2 杂交信号的 1.4 倍以上的克隆送去华大基因测序,所得序列经去载体在 NCBI 网站 (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 进行序列比对。

2 结果与分析

2.1 *A. catenella* 生长曲线

将 *A. catenella* 于 f/2 培养基中进行培养,隔天取藻计数,图 1 为其生长曲线图,分别在第 2 天(延迟期),第 11 天(对数期),第 21 天(对数期)和第 37 天(衰亡期)收藻。将收集的藻体于液氮中储存待用。

2.2 总 RNA 质量检测

用 Trizol 法提取 *A. catenella* 的 RNA,用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的质量,RNA 完整性较好,通过紫外分光光度计检测,Tester 与 Driver OD_{260/280} 分别为 2.114,2.026,浓度分别为 619.2 ng/μL,452.4

ng/ μ L。

2.3 消减产物的巢式 PCR 分析

将消减前后的 Tester cDNA 用巢式引物进行二轮 PCR 扩增,结果如图 2,由图可以清楚地看到经过消减的 Tester 巢式 PCR 产物电泳图片中 700 bp 左右和 200 bp 左右有两条明显的主带,而未经消减的产物中没有这两条主带,由此说明经过消减的 PCR 扩增特异性明显强于未消减的 PCR 扩增,差异条带得到了明显的富集。

2.4 菌落 PCR 检测

用巢式 PCR 引物对插入的片段进行 PCR 检测,部分结果如图 3 所示,插入片段集中在 100—750 bp 之间,500 bp 以下的片段居多,去除重复序列、空载体以及有两条以上条带的克隆,得到阳性克隆 556 个,阳性率为 70%。

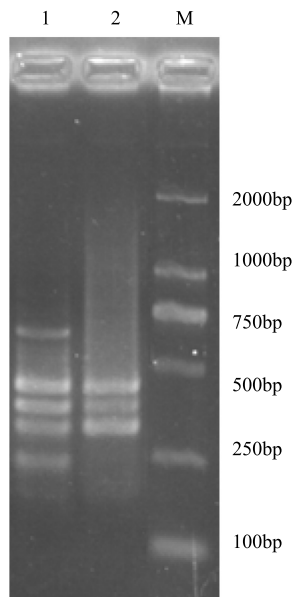


图 2 巢式 PCR 电泳图

Fig. 2 Electropherogram of nested PCR

M: 分子量标准, 1: 消减后 PCR 产物, 2: 消减前 PCR 产物

2.5 斑点杂交

经过斑点杂交,得到 160 个克隆的 PCR 产物在消减后的信号强度是未消减的 1.4 倍以上,部分结果如图 4,具体信号值见表 1。由图 4 和表 1 可以看到,每个克隆的平行样品之间的重复性都很好,用 μ 检验所得 P 值均大于 0.05,表明实验有很好的平行性。

2.6 序列分析

将经过斑点杂交得到的差异克隆送去华大基因测序,共得到 125 个有效序列,经分析共代表 21 种不同的功能基因,其中有 6 种与已知的功能基因有较高的同源性,这些已知基因分别是 pG1 蛋白、叶绿体中的一个开放阅读框、CHK1 类似检测点蛋白 (checkpoint-like protein)、核酸外切酶复合体、谷氧还蛋白和 Na^+/K^+ ATPase,具体数据见表 2。其中出现频率最高的是类似 pG1 蛋白的片段,其次叶绿体中的开放阅读框、CHK1 类似检测点蛋白 (CHK1 checkpoint-like protein)、核酸外切酶复合体出现的频率也较高。另外还有 15 条序列

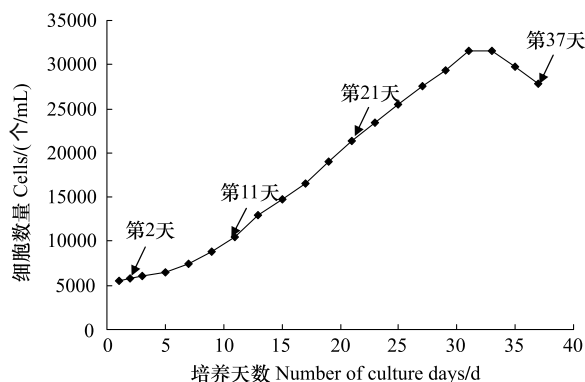


图 1 *A. catenella* 生长曲线

Fig. 1 Growth curve of *A. catenella*

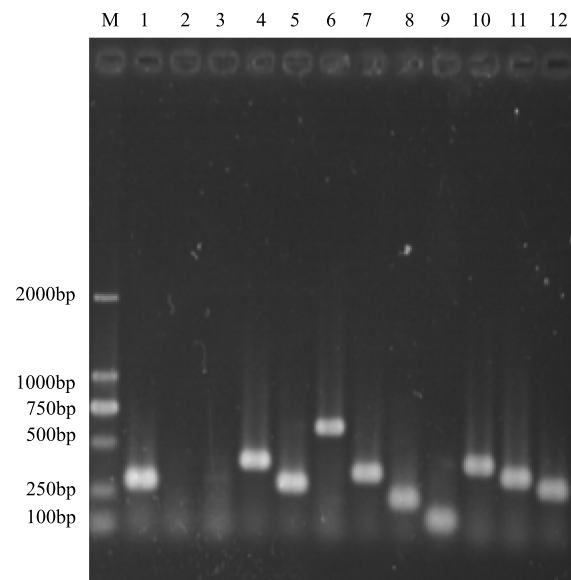


图 3 阳性克隆检测

Fig. 3 Positive clones detection

M: 分子量标准, 1—12: 不同的克隆

在 NCBI 中没有找到同源基因的序列,在这 15 条序列中 ACSSH378 和 ACSSH71 出现频率最高,分别为 22 次和 16 次,其次是 ACSSH169, ACSSH188, ACSSH122, ACSSH155 和 ACSSH70,均出现了 5 次以上。

3 讨论

利用 SSH 技术找出处于衰亡期的链状亚历山大藻中特异表达的基因,可以更好地理解赤潮生物衰亡的机制,从而为将来研究赤潮的分子机制以及有效的监测赤潮的消亡和寻找控制赤潮的有效方法奠定一定的基础。

以衰亡期的藻作为 Tester,其他时期的藻作为 Driver,得到了在衰亡期特异表达的基因。一般基因表达差异在两倍以上,可认定为表达差异显著,考虑到斑点杂交光密度显示的精度,为防止遗漏一些重要的差异表达基因,选取信号差异在 1.4 倍以上的克隆进行进一步分析。经过测序最终得到有效序列 21 个,其中 6 个与已知功能的基因有较高的同源性,分别为CHK1类似检测点蛋白(checkpoint-likeprotein)、核酸外切酶复

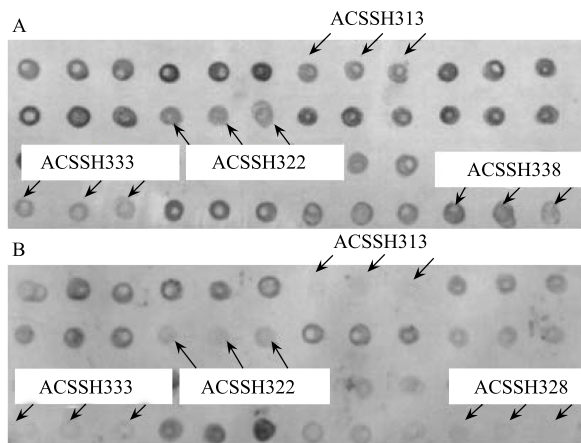


图4 部分斑点杂交结果
Fig.4 Part results of dot blots

A:与探针1杂交结果 The result of hybridization with probe 1, B:与探针2杂交结果 B The result of hybridization with probe 2

表1 部分差异表达克隆在不同探针斑点杂交结果

Table 1 The dot hybridization result of partial differentially expressed clones reacted with different probes				
克隆序号 Clone No.	探针1杂交信号值* The signal value of hybridization with probe 1	探针2杂交信号值* The signal value of hybridization with probe 2	探针1与2杂交信号比值* The signal value of probe 1 against probe 2	平均值 Average value
ACSSH313	57.2	14.3	4.0	4.0±0.9
	55.4	17.3	3.2	
	55.8	11.5	4.9	
	86.4	42.8	2.0	
ACSSH322	88.6	42.9	2.1	1.8±0.4
	71.2	49.5	1.4	
	32.6	15.4	2.1	
	31.9	16.6	1.9	
ACSSH333	25.2	15.7	1.6	1.9±0.3
	59.3	16.7	3.6	
	51.6	18.7	2.8	
	29.8	17.5	1.7	
ACSSH338				2.7±0.9

* 用 μ 检验所得 $P>0.05$

表2 差异表达序列的 blast 分析结果

Table 2 The blast search of differential expression sequences against NCBI public database						
克隆序号 Clone No.	出现频数 Frequency	片段长度 Length/bp	同源序列号 The number of homologous sequence	功能注释 Functional annotation	E	相似度/% Identities
ACSSH104	17	406	refl ZP_04645459.1	pG1 protein	2×10^{-18}	58
ACSSH422	8	364	refl YP_001152215.1	ORF441(chloroplast)	7×10^{-5}	81
ACSSH193	7	600	gb ABK29471.1	CHK1 checkpoint-like protein	2×10^{-10}	78
ACSSH254	7	399	refl XP_003082145.1	Exosomal 3'-5' exoribonuclease complex, subunit Rrp44/Dis3 (ISS)	4×10^{-11}	31
ACSSH239	2	393	refl XP_002903515.1	glutaredoxin, putative	3×10^{-14}	40
ACSSH164	1	314	gb AAR98515.1	Na ⁺ /K ⁺ ATPase alpha 1b	2×10^{-38}	96

合体、 $\text{Na}^+/\text{K}^+\text{ATPase}$ 、谷氧还蛋白、pG1 蛋白、叶绿体中的一个开放阅读框。

Checkpoint 是一种生化途径,它能够检测 DNA 损伤或 DNA 复制过程中出现的问题,并且通过将其束缚在细胞周期或导致凋亡等作用来响应这些问题的出现^[8]。CHK1 是一种丝氨酸/苏氨酸激酶,它是 DNA 损伤过程中一种重要的信号传感器^[9]。谷氧还蛋白 (glutaredoxin, Grx), 又称巯基转移酶 (thioltransferase, TTase), 是巯基-二硫键氧化还原酶家族的重要组分,在生物界普遍存在。它可以起到调节细胞内氧化还原平衡状态的作用,还可以抵抗氧化应急损伤,如细胞生长、抑制凋亡等^[10-12]。 $\text{Na}^+/\text{K}^+\text{ATPase}$ 广泛分布于细胞膜上,维持细胞内外 Na^+ 、 K^+ 的浓度梯度,可以保持细胞的膜电^[13]。随着人们对细胞凋亡的认识越来越全面,越来越多的证据表明离子的动态平衡与细胞凋亡有密切的关系,这被称为由 K^+ 动态平衡调节的凋亡,而因为 $\text{Na}^+/\text{K}^+\text{ATPase}$ 是获取 K^+ 的首要系统,因此该酶的功能紊乱以及由其导致的离子动态失衡已经被当做判断细胞凋亡以及引起与凋亡相关疾病的一个至关重要的因素^[14]。在真核细胞中, mRNA 的降解是调节基因表达的一个重要步骤。mRNA 的降解可分为正常转录物的降解和异常转录物的降解。异常转录物的降解是指针对细胞功能紊乱产生的一些非正常的转录物的降解,也是细胞维持正常生理功能的一种方式,本质上来说,异常转录物降解是属于 mRNA 监督的范畴^[15]。大量研究显示 Exosomal 3'—5' exoribonuclease 在真核生物细胞的 mRNA 的降解过程中发挥着重要的作用^[16-18]。pG1 蛋白的具体功能还未见研究报道,但从测序结果来看,该基因出现的频率很高,有待于更深一步的研究。

鉴于对测序所得片段的分析及上述论述,猜测链状亚历山大藻的衰亡过程涉及到 DNA 损伤、氧化还原状态的变化、离子动态平衡的变化、mRNA 降解过程以及叶绿体一些生理状况的变化等,这些过程的调节机制,有待进一步验证。

ACSSH378、ACSSH71 等克隆重复的频率也很高,这些片段出现频率高的原因虽然可能是因为经历了 PCR 扩增过程,而更可能的原因是其在衰亡期的藻体中表达量本身就很高,才会在巢式 PCR 过程中得到较高的富集。有些片段没有比对上功能基因,也就无法对其进行分析,推测它们可能是新的基因。

References:

- [1] Zingone A, Enevoldsen H O. The diversity of harmful algal blooms: a challenge for science and management. *Ocean & Coastal Management*, 2000, 43(8/9): 725-748.
- [2] Vardi A, Berman-Frank I, Rozenberg T, Hadas O, Kaplan A, Levine A. Programmed cell death of the dinoflagellate *Peridinium gatunense* is mediated by CO_2 limitation and oxidative stress. *Current Biology*, 1999, 9(18): 1061-1064.
- [3] Vardi A, Eisenstadt D, Murik O, Berman-Frank I, Zohary T, Levine A, Kaplan A. Synchronization of cell death in a dinoflagellate population is mediated by an excreted thiol protease. *Environmental Microbiology*, 2007, 9(2): 360-369.
- [4] Zhang X F, Yang G, Liu Y, Yu W, Pan K, Li R X, Zhu M. Induction of programmed cell death in aging *Prorocentrum Donghaiense* cells as was evidenced preliminarily by the identification of associated transcripts. *Acta Biologica Hungarica*, 2006, 57(4): 473-483.
- [5] Diatchenko L, Lau Y F, Campbell A P, Chenchik A, Moqadam F, Huang B, Lukyanov S, Lukyanov K, Gurskaya N, Sverdlov E D, Siebert P D. Suppression subtractive hybridization: a method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1996, 93(12): 6025-6029.
- [6] Cai J L, Li C B, Zhao S Y. A new method of identifying differentially expressed genes-suppression subtractive hybridization (SSH). *Chinese Bulletin of Life Sciences*, 1998, 10(3): 115-118.
- [7] Wang C Y, Sui Z H, Mao Y X, Wen R B. Screening of environment factors responsive genes via suppressive subtractive hybridization technique from *Alexandrium catenella*. *Periodical of Ocean University of China*, 2009, 39(S1): 127-132.
- [8] Chen Y H, Pereira E A, Sanchez Y. Chk1. UCSD-Nature Molecule Pages. Published online, 2007. doi: 10.1038/mp.a000642.01.
- [9] Pérez-Martín J. DNA-damage response in the basidiomycete fungus *Ustilago maydis* relies in a sole Chk1-like kinase. *DNA Repair*, 2009, 8(6): 720-731.
- [10] Zhang C J, Yu H T, Zou Z X, Dong Q, Zhou H B. Biological activities and the relation with human disease of Glutaredoxin. *Chemistry of Life*, 2006, 26(2): 163-165.
- [11] Yue L L. Glutaredoxins and oxidative stress. *Journal of Qiqihar Medical College*. 2007, 28(20): 2487-2489.
- [12] Lillig C H, Berndt C, Holmgren A. Glutaredoxin systems. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2008, 1780(11): 1304-1317.

- [13] Xu W L, Qian L J, Zhang C G. The progress of study on Na^+ , K^+ -ATPase. Foreign Medical Sciences; Section of Pathophysiology and Clinical Medicine, 2003, 23(5): 531-534.
- [14] Yu S P. Na^+ , K^+ -ATPase: the new face of an old player in pathogenesis and apoptotic/hybrid cell death. Biochemical Pharmacology, 2003, 66(8): 1601-1609.
- [15] Liu L M, Xu Z P. Eukaryotic mRNA decay pathways. Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology, 2008, 24(10): 883-889.
- [16] Cui F, Yang K G. Advances of research on function and mechanism of action of exosome. Foreign Medical Science (Molecular Biology Section), 2002, 24(6): 321-324.
- [17] Schmid M, Jensen T H. The exosome: a multipurpose RNA-decay machine. Trends in Biochemical Sciences, 2008, 33(10): 501-510.
- [18] Hoof A V, Parker R. The Exosome: a proteasome for RNA? Cell, 1999, 99(4): 347-350.

参考文献:

- [6] 蔡静莉, 李昌本, 赵寿元. 鉴别差异表达基因的新方法——抑制消减杂交法 (SSH). 生命科学, 1998, 10(3): 115-118.
- [7] 王春燕, 隋正红, 茅云翔, 温若冰. 应用抑制性消减杂交技术筛选链状亚历山大藻环境条件响应基因. 中国海洋大学学报, 2009, 39(S1): 127-132.
- [10] 张春晶, 于海涛, 邹朝霞, 董钦, 周宏博. 谷氧还蛋白的生物学活性及其与人类疾病的关系. 生命的化学, 2006, 26(2): 163-165.
- [11] 岳丽玲. 谷氧还蛋白与氧化应激状态. 齐齐哈尔医学院学报, 2007, 28(20): 2487-2489.
- [13] 徐文琳, 钱令嘉, 张成岗. Na^+ , K^+ -ATPase 研究进展. 国外医学: 生理、病理科学与临床分册, 2003, 23(5): 531-534.
- [15] 刘黎明, 许正平. 真核生物 mRNA 降解途径. 中国生物化学与分子生物学报, 2008, 24(10): 883-889.
- [16] 崔凡, 杨克恭. Exosome 的功能及作用机制的研究进展. 国外医学(分子生物学分册), 2002, 24(6): 321-324.

ACTA ECOLOGICA SINICA Vol.32 ,No.2 January ,2012(Semimonthly)

CONTENTS

Dynamics of demersal fish species diversity and biomass of dominant species in autumn in the Beibu Gulf, northwestern South China Sea	WANG Xuehui, QIU Yongsong, DU Feiyan, et al (333)
Spatial variation in species richness of birds and mammals in mainland China	DING Jingjing, LIU Dingzhen, LI Chunwang, et al (343)
Comparative study on learning behavior and electroantennogram responses in two geographic races of <i>Cotesia glomerata</i>	WANG Guohong, LIU Yong, GE Feng, et al (351)
Biological characteristics and habitat requirements of <i>Parnassius imperator</i> (Lepidoptera: Parnassidae)	FANG Jianhui, LUO Youqing, NIU Ben, et al (361)
Annual variability in biological characteristics of <i>Illex argentinus</i> in the southwest Atlantic Ocean	FANG Zhou, LU Huajie, CHEN Xinjun, et al (371)
The impact of run-of stream dams on benthic macroinvertebrate assemblages in urban streams	HAN Minghua, YU Haiyan, ZHOU Bin, et al (380)
Effect of suspended sediment on the feeding physiology of <i>Pinctada martensii</i> in laboratory	LI Zhimin, SHEN Yuchun, YU Nantao, et al (386)
Potential nutrient limitation of phytoplankton growth in the Western and Central Pacific Ocean	XU Yanqing, CHEN Jianfang, GAO Shengquan, et al (394)
Ingestion of selected HAB-forming dinoflagellates	ZHANG Qingchun, YU Rencheng, SONG Jingjing, et al (402)
Formation of aggregation by <i>Phaeocystis globosa</i> (Prymnesiophyceae) in response to high grazing pressure	WANG Xiaodong, WANG Yan (414)
Growth and reproduction of the green macroalga <i>Ulva prolifera</i>	ZHANG Bixin, WANG Jianzhu, WANG Yifu, et al (421)
Screening of growth decline related genes from <i>Alexandrium catenella</i>	ZHONG Jie, SUI Zhenghong, WANG Chunyan, et al (431)
Analysis of inherent optical properties of Lake Taihu in spring and its influence on the change of remote sensing reflectance	LIU Zhonghua, LI Yunmei, LU Heng, et al (438)
Neural network modeling of the eutrophication mechanism in Lake Chenghai and corresponding scenario analysis	ZOU Rui, DONG Yunxian, ZHANG Zhenzhen, et al (448)
The compensatory growth of shrubby <i>Pinus thunbergii</i> response to the boring stress in sandy coast	ZHOU Zhen, LI Chuanrong, XU Jingwei, et al (457)
Selected body temperature and thermal tolerance of tadpoles of two frog species (<i>Fejervarya limnocharis</i> and <i>Microhyla ornata</i>) acclimated under different thermal conditions	SHI Linqiang, ZHAO Lihua, MA Xiaohao, et al (465)
Effects of landscape structure and key landscape factors on aphids-parasitoids-hyper parasitoids populations in wheat fields	ZHAO Zihua, WANG Ying, HE Dahan, et al (472)
Effects of cadmium on lipid peroxidation and ATPase activity of plasma membrane from Chinese kale (<i>Brassica alboglabra</i> Bailey) roots	ZHENG Aizhen (483)
Effects of ginger aqueous extract on soil enzyme activity, microbial community structure and soil nutrient content in the rhizosphere soil of ginger seedlings	HAN Chunmei, LI Chunlong, YE Shaoping, et al (489)
Manganese tolerance and accumulation in mycelia of <i>Cordyceps kyusyuensis</i>	LUO Yi, CHENG Xianhao, ZHANG Congcong, et al (499)
Influence of oxytetracycline exposure on antibiotic resistant bacteria and enzyme activities in wheat rhizosphere soil	ZHANG Hao, ZHANG Lilan, WANG Jia, et al (508)
Effects of elevated nitrogen deposition on soil organic carbon mineralization and soil enzyme activities in a Chinese fir plantation	SHEN Fangfang, YUAN Yinghong, FAN Houbao, et al (517)
Differences in clonal growth between female and male plants of <i>Rhus typhina</i> Linn. and their diurnal changes in photosynthesis and chlorophyll fluorescence	ZHANG Mingru, WEN Guosheng, ZHANG Jin, et al (528)
Soil water holding capacity under four typical ecosystems in Wuyunjie Nature Reserve of Hunan Province	PAN Chunxiang, LI Yuyuan, PENG Yi, et al (538)
The effect of different land use patterns on soil properties in alpine areas of eastern Qilian Mountains	ZHAO Jinmei, ZHANG Degang, LIU Changzhong, et al (548)
Responses of soil macro-fauna to land desertification in sandy grassland	LIU Rentao, ZHAO Halin (557)
Characteristics of cultivable microbial community number and structure at the southeast edge of Tengger Desert	ZHANG Wei, ZHANG Gaosen, LIU Guangxiu, et al (567)
Physiological and ecological responses of maize to different severities of desertification in the Southern Tklamakan desert	LI Lei, LI Xiangyi, LIN Lisha, WANG Yingju, et al (578)
Characterization of caloric value in fifteen plant species in <i>Leymus chinensis</i> steppe in Xilin River Basin, Inner Mongolia	GAO Kai, XIE Zhongbing, XU Sutie, et al (588)
Spatial pattern responses of <i>Achnatherum splendens</i> to environmental stress in different density levels	ZHANG Mingjuan, LIU Maosong, XU Chi, et al (595)
Effects of environmental factors on species distribution and diversity in an <i>Abies fargesii</i> - <i>Betula utilis</i> mixed forest	REN Xuemin, YANG Gaihe, WANG Dexiang, et al (605)
Effects of alginate cerium complexes on ascorbate- glutathione cycle in spinach leaves under chlorpyrifos stress	LUAN Xia, CHEN Zhende, WANG Dongfeng, et al (614)
Analysis on spatiotemporal changes of urban thermal landscape pattern in the context of urbanisation: a case study of Xiamen City	HUANG Jucong, ZHAO Xiaofeng, TANG Lina, et al (622)
The analysis of the green vegetation cover change in western Sichuan based on GIS and Remote sensing	YANG Cunjian, ZHAO Zijian, REN Xiaolan, et al (632)
An inventory of BVOC emissions for a subtropical urban-rural complex: Greater Taizhou Area	CHANG Jie, REN Yuan, SHI Yan, et al (641)
Scientific Note	
Litter decomposition and nutrient dynamics of <i>Carex lasiocapa</i> under different water conditions	HOU Cuicui, SONG Changchun, LI Yingchen, et al (650)
Nest-box color preference and reproductive success of great tit	ZHANG Keqin, DENG Qiuxiang, Justin Liu, et al (659)

《生态学报》2012 年征订启事

《生态学报》是中国生态学学会主办的自然科学高级学术期刊,创刊于 1981 年。主要报道生态学研究原始创新性科研成果,特别欢迎能反映现代生态学发展方向的优秀综述性文章;研究简报;生态学新理论、新方法、新技术介绍;新书评介和学术、科研动态及开放实验室介绍等。

《生态学报》为半月刊,大 16 开本,280 页,国内定价 70 元/册,全年定价 1680 元。

国内邮发代号:82-7 国外邮发代号:M670 标准刊号:ISSN 1000-0933 CN 11-2031/Q

全国各地邮局均可订阅,也可直接与编辑部联系购买。欢迎广大科技工作者、科研单位、高等院校、图书馆等订阅。

通讯地址:100085 北京海淀区双清路 18 号 电 话:(010)62941099; 62843362

E-mail: shengtaixuebao@rcees.ac.cn 网 址: www.ecologica.cn

编辑部主任 孔红梅 执行编辑 刘天星 段 靖

生 态 学 报
(SHENGTAI XUEBAO)
(半月刊 1981 年 3 月创刊)
第 32 卷 第 2 期 (2012 年 1 月)

ACTA ECOLOGICA SINICA
(Semimonthly, Started in 1981)
Vol. 32 No. 2 2012

编 辑	《生态学报》编辑部 地址:北京海淀区双清路 18 号 邮政编码:100085 电话:(010)62941099 www.ecologica.cn shengtaixuebao@rcees.ac.cn	Edited by	Editorial board of ACTA ECOLOGICA SINICA Add:18, Shuangqing Street, Haidian, Beijing 100085, China Tel:(010)62941099 www.ecologica.cn Shengtaixuebao@rcees.ac.cn
主 编	冯宗炜	Editor-in-chief	FENG Zong-Wei
主 管	中国科学技术协会	Supervised by	China Association for Science and Technology
主 办	中国生态学学会 中国科学院生态环境研究中心 地址:北京海淀区双清路 18 号 邮政编码:100085	Sponsored by	Ecological Society of China Research Center for Eco-environmental Sciences, CAS Add:18, Shuangqing Street, Haidian, Beijing 100085, China
出 版	科 学 出 版 社 地址:北京东黄城根北街 16 号 邮政编码:100717	Published by	Science Press Add:16 Donghuangchenggen North Street, Beijing 100717, China
印 刷	北京北林印刷厂	Printed by	Beijing Bei Lin Printing House, Beijing 100083, China
发 行	科 学 出 版 社 地址:东黄城根北街 16 号 邮政编码:100717 电话:(010)64034563 E-mail:journal@cspg.net	Distributed by	Science Press Add:16 Donghuangchenggen North Street, Beijing 100717, China Tel:(010)64034563 E-mail:journal@cspg.net
订 购	全国各地邮局	Domestic	All Local Post Offices in China
国外发行	中国国际图书贸易总公司 地址:北京 399 信箱 邮政编码:100044	Foreign	China International Book Trading Corporation Add:P. O. Box 399 Beijing 100044, China
广告经营 许 可 证	京海工商广字第 8013 号		



ISSN 1000-0933
CN 11-2031/Q

国内外公开发行

国内邮发代号 82-7

国外发行代号 M670

定价 70.00 元