

doi: 10.7541/2023.2022.0165

高耐镉膨胀肾形虫种群金属硫蛋白基因的鉴定与诱导表达

侯森¹ 赵雪¹ 高荣¹ 王影¹ 郑维彬¹ 王丽¹
潘旭明¹ 任南琪² 陈瑛^{1,2}

(1. 哈尔滨师范大学黑龙江省水生生物多样性研究重点实验室, 哈尔滨 150025; 2. 哈尔滨工业大学(深圳)土木与环境工程学院, 深圳 518055)

摘要: 为研究金属硫蛋白(Metallothionein, MT)对生物体抵抗重金属毒性的效应, 获得一种具有镉高耐受性的膨胀肾形虫(*Colpoda inflata*)东北种群, 该种群96h最高镉耐受浓度10 mg/L, 其金属硫蛋白含量表现出与镉浓度、肾形虫种群增长率存在正相关关系。克隆获得金属硫蛋白*Col-MT1*基因, 对基因序列和氨基酸序列特征分析表明, 其为金属硫蛋白基因家族7a亚型的新成员。qRT-PCR实验证实, *Col-MT1*基因在60h、84h和108h三个时间点对5种浓度镉胁迫均上调表达, 与镉浓度之间呈现出一定的剂量-效应关系。其分子调控机制还有待进一步研究。上述结果补充了原生动动物MT基因数据库, 为进一步揭示*C. inflata* MT基因的功能, 以及应用于镉污染监测和环境修复奠定了基础。

关键词: 镉耐受性; 金属硫蛋白; 中国东北种群; 膨胀肾形虫

中图分类号: Q344⁺.1

文献标识码: A

文章编号: 1000-3207(2023)08-1284-09



重金属是环境污染物的重要成员, 镉在优先控制的重金属类污染物中排在首位。环境中镉由于其难降解和积累效应含量不断上升, 并通过生物放大效应危及人类健康。因此, 围绕镉的毒理效应和作用机理及污染防治措施开展了大量研究。氧化应激反应是机体对镉产生的重要响应机制, 而金属硫蛋白能够与镉结合, 调节机体氧化应激反应并进行解毒, 是机体对抗镉毒性的关键蛋白之一^[1-3]。

金属硫蛋白(Metallothionein, MT)超家族广泛存在于生物界中, 包括脊椎动物、无脊椎动物、原生动物、植物和微生物, 并且富含20%—30%半胱氨酸(Cysteine)^[4-6]。首个MT在1957年由Margoshes等^[7]从马肾中分离纯化获得的镉结合金属硫蛋白(Cd-MT), 此后关于其编码基因、功能及作用机制等被逐一揭示。MT具有高度保守性, 是可诱导的胞内蛋白质, 并且与金属元素具有较高的亲和力^[8], 在生物体内主要参与金属的动态平衡和解毒、清除活性氧、储存必需金属元素、细胞周期的调节^[9,10]。根据物种种类金属硫蛋白被分为15个家族, 目前原

生动物界MT的报道仅见于纤毛门的四膜虫和草履虫两个类群中^[11,12], 属于超家族中的第七族, 其下又分为7a和7b两个亚家族, 其半胱氨酸排列方式及金属诱导类型均有所不同^[13,14]。

膨胀肾形虫(*Colpoda inflata*), 是纤毛门肾形属的模式物种, 在环境中分布广泛, 有多种地理种群^[15,16]。以往研究认为膨胀肾形虫具有重金属敏感的特性, 利用重金属或污染土壤的浸提液培养肾形虫, 发现肾形虫种群生长受到抑制且生长量显著下降, 表现出与污染物浓度、含量、种类之间存在较好的一致性, 而且膨胀肾形虫遗传变异率较低, 适合作为检测重金属污染的指示生物^[17-20]。本研究采集并培养了一种膨胀肾形虫中国东北种群, 对其镉耐受性检验发现高于以往报道的水平, 对该种群膨胀肾形虫体内金属硫蛋白含量检测发现与镉浓度梯度和胁迫时间呈现一定线性关系, 进而克隆了该地理种群的MT基因, 对其分子特征和镉诱导表达情况进行了分析, 初步探讨其高耐镉性的分子机制, 为金属硫蛋白功能和作用机制研究提供参考。

收稿日期: 2022-04-19; 修订日期: 2022-06-23

基金项目: 深圳市科技计划(KQTD20190929172630447)资助 [Supported by Shenzhen Science and Technology Program (KQTD20190929172630447)]

作者简介: 侯森(1997—), 男, 硕士; 主要从事原生动物细胞学研究。E-mail: hs15714536567@163.com

通信作者: 陈瑛(1972—), 女, 教授; 主要从事原生动物细胞学、毒理学及生态学研究。E-mail: chenying@hit.edu.cn

1 材料与方法

1.1 实验材料

Colpoda inflata的采集与纯培养 本研究所用的*C. inflata*采集自中国东北黑钙土(N 45°59' 47", E 126°38'18"), 区域年降水量400—800 mm, 年平均气温为10℃左右, 年平均pH 6.75。采用“非淹没培养法”^[21]进行初步培养和筛选, 挑取单细胞置于24孔培养板, 去离子水中加入灭菌的麦粒, 培养72h后, 再转移至6孔培养板中, 在25℃恒温恒湿光照培养箱中进行扩大培养, 细胞密度达到 1×10^4 ind./mL后可用于实验。毒理实验前通过形态学结合分子生物学(SSU rDNA)技术鉴定物种。

主要试剂 *Taq*酶(Easy *Taq*[®] DNA polymerase)、T₄ DNA连接酶、DNA Marker、感受态细胞(Trans1-T1 Phage Resistant Chemically Competent Cell)购自北京全式金生物技术有限公司。RNA提取试剂盒(TaKaRa MiniBEST Universa RNA Extraction Kit)和逆转录试剂盒(PrimeScript[™] II 1st Strand cDNA Synthesis Kit)购自宝生物工程(大连)有限公司, 普通琼脂糖凝胶DNA回收试剂盒(TIANgel Midi Purification Kit)、pGM-T克隆试剂盒和无内毒素质粒大提试剂盒(DP120)购自天根生化科技有限公司, 单细胞总RNA转录组扩增试剂盒(Single Cell Sequence Specific Amplification Kit)和荧光定量试剂盒(ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix)订购于诺唯赞生物有限公司, 氯化镉购自哈尔滨博仕生物技术有限公司, LB培养基和乙醇等其他药品购自上海生工生物工程技术有限公司。

1.2 镉耐受性检验

以去离子水作为溶剂将氯化镉($\geq 99.5\%$ 分析纯), 配制成浓度100 mg/L的母液备用。去离子水采用普力菲尔FST-RO-10分析型超纯水机自制。经预实验, 镉耐受实验浓度梯度设定为2、4、6、8和10 mg/L。12孔板, 每孔放入2 mL培养液, 1粒灭菌麦粒并接种100只*C. inflata*, 放入25℃恒温恒湿培养箱中, 每个浓度梯度和对照组设置3个重复。分别于24h、48h、72h、96h、120h、144h和168h对吸取虫液进行观察计数(去除*C. inflata*的包囊)。每孔计数重复5次, 每次2.5 μ L, 利用Excel和Origin 2018软件计算代时及种群增长率数据并绘制生长曲线。增长率计算公式为: $r = (\ln N_t - \ln N_0) / t$, 式中 N_0 、 N_t 分别为实验开始时和经过 t 时间后虫体个数。代时计算公式: $G = \ln 2 / r$ ^[22, 23]。

1.3 金属硫蛋白含量测定

将不同浓度镉处理组的*C. inflata*虫体离心清

洗, 富集至细胞密度约为 1×10^3 ind./mL, 进行MT含量的测定。挑入去离子水中饥饿处理24h, 使虫体内食物泡尽量减少, 避免食物泡中的物质对MT含量测定产生影响。然后用PBS缓冲液清洗虫体, 后用细胞裂解液(20 mmol/L Tris, 150 mmol/L NaCl, 1% Triton X-100, 1 mmol/L EDTA)裂解细胞, 在4℃下, 1000 r/min离心10min, 收集上清液, 用上海晶抗金属硫蛋白酶联免疫分析试剂盒进行MT含量测定。利用IBM SPSS Statistics 21对结果进行差异显著性分析, 并用Origin 2018绘制柱状图。

1.4 金属硫蛋白基因克隆

总RNA提取及cDNA合成 首先吸取纯培养的100只*C. inflata*置于1.5 mL的离心管中, 4℃下8000 r/min离心2min后, 弃去上清液。根据RNA提取试剂盒操作步骤进行洗脱获得高质量的RNA, 然后按照逆转录试剂盒操作步骤在Microtube中配制反应混合溶液: Oligo dT Primer 1 μ L, dNTP Mixture 1 μ L, 模板RNA 5 μ L, RNase free ddH₂O 3 μ L, 总体系为10 μ L。首先在65℃条件下保温5min后, 冰上迅速冷却。使模板RNA变性, 提高反转录效率。在上述Microtube管中配制反转录反应液: 上述变性后反应液10 μ L, 5 $\times$ PrimeScript II Buffer 4 μ L, RNase Inhibitor 0.5 μ L, PrimeScript II RTase 1 μ L, RNase free ddH₂O 4.5 μ L, 总体系为20 μ L, 缓慢混合均匀。首先在50℃条件下处理1h, 然后在95℃条件下处理5min, 进行反转录反应。反应后的产物于冰上冷却, 随后将产物放置在-20℃保存备用。

引物的设计与合成 根据NCBI数据库中公布的嗜热四膜虫MT基因的序列信息, 依据保守区域的基因序列利用Primer Premier 5.0软件设计引物, 上游引物为(MT-F): 5'-TGCAGGCAGAAGTC TTTTCA-3', 下游引物为(MT-R): 5'-TCACTGTTG GATGCTCTTGC-3', 由哈尔滨博仕生物技术有限公司合成。

克隆及测序 以*C. inflata*的cDNA为模板, 用设计的引物MT-F/MT-R扩增MT基因序列。PCR反应体系: 模板1 μ L; 上、下游引物各0.5 μ L; 2 $\times$ *Taq* MasterMix 10 μ L; RNase free ddH₂O 8 μ L, 总体系20 μ L。PCR扩增程序: 94℃初始变性5min; 94℃变性30s, 退火54℃ 30s, 72℃延伸30s, 共35个循环; 72℃延伸5min。PCR产物用1.0%的琼脂糖溶液电泳检测, 凝胶成像系统拍照保存, 取鉴定正确的PCR产物按照普通琼脂糖凝胶DNA回收试剂盒操作说明, 对目的产物进行切胶并回收。参考pGM-T克隆连接试剂盒中的说明书将目的基因连接至pGM-T载体上, 转入Trans1-T1感受态细胞, 在

含有氨苄青霉素的LB固体平板进行抗性筛选,挑取阳性菌落进行菌落PCR检测,同时对LB液体培养基进行摇菌。选取经菌液PCR检测,且目标条带大小正确的菌液送至哈尔滨博仕生物有限公司进行测序。

1.5 生物信息学分析

利用Prot-Param(<http://web.expasy.org/prot-param>)在线软件计算蛋白的分子质量、等电点及其他相关的理化性质;利用Prot Scale(<http://web.expasy.org/protscale/>)在线软件分析蛋白的亲水性和疏水性;利用Signal IP(http://www.cdb.dtu.dk/services/Signal_IP/)在线软件进行蛋白的信号肽预测;利用TMHMM 2.0(<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>)在线软件分析蛋白的跨膜结构域;利用TASSER(<https://zhanggroup.org/I-TASSER/>)蛋白模型预测蛋白二级结构;利用SWISS-MODEL(<http://swissmodel.expasy.org/>)在线软件预测蛋白三级结构;利用ClustalW(<https://www.genome.jp/tools-bin/clustalw>)和ENDscript/ESPrpt(<https://esprpt.ibcp.fr/ESPrpt/cgi-bin/ESPrpt.cgi>)进行蛋白的多重序列比对以及序列相似性分析。

1.6 系统进化树的构建

首先利用National Center for Biotechnology Information(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)在数据库中进行基因序列的BLASTP比对,选取和*C. inflata* MT基因序列相似度较高的序列,进行多重序列比对,通过校正,随后运用自展法检验对进化树分支的可信度进行评估。其次,通过对相似度以及可信度的分析评估选取合适的序列构建Fasta格式的序列文件。最后,利用软件MEGA-X运用最大似然法ML(Maximum Likelihood)构建MT的系统进化树,进化树构建完成后利用Adobe Photoshop 2021软件进行图片的精细化处理。

1.7 实时荧光定量PCR

内参基因的选择 实时荧光定量分析中以本实验中克隆出的MT基因设计引物进行实验验证,上游引物为(MT-F): 5'-AGGCAAGAGCATCCAAC AGT-3',下游引物为(MT-R): 5'-GGGAGAAAACA AGGGGAAAAGG-3'。以纤毛虫qRT-PCR实验中常用的18S rDNA作为内参基因,上游引物为(18S-F): 5'-AACCTGGTTGATCCTGCCAGT-3',下游引物为(18S-R): 5'-TGATCCTTCTGCAGGTTTACC TAC-3'。

qRT-PCR步骤 将不同待测基因的扩增引物进行混合,制成预混引物I(各引物的终浓度为0.1 $\mu\text{mol/L}$),在Nuclease free离心管中配置总体系

为5.0 μL 的RT-PreAmp Master Mix: 2 $\times$ Reaction Mix 2.5 μL , 0.1 $\mu\text{mol/L}$ Assay Pool 0.5 μL , RT/*Taq* enzyme 0.1 μL , Nuclease free ddH₂O 1.9 μL 。冰上放置待用,加入单个虫体,盖紧管盖,立即液氮冰冻2min, 4000 r/min离心2min,立即放入PCR仪进行扩增,首先50 $^{\circ}\text{C}$ 逆转录60min, 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性3min, 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性15s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 退火、延伸15min,共42个循环。反应结束后,每管加入20 μL ddH₂O(按照比例1:5稀释),涡旋混匀, 3000 r/min离心2min,立即进行后续的qRT-PCR反应。荧光定量PCR反应体系为: 2 $\times$ Cham Q Universal SYBR qPCR Master Mix 10 μL , Primer1 (10 $\mu\text{mol/L}$)0.4 μL , Primer2(10 $\mu\text{mol/L}$)0.4 μL , Template cDNA 1.0 μL , dd H₂O 8.2 μL , 总体系20 μL 。为每个模板的每对引物设置3个技术性重复,并设置一个阴性对照,反应程序为: 95 $^{\circ}\text{C}$ 3min 1个循环, 95 $^{\circ}\text{C}$ 10s和57 $^{\circ}\text{C}$ 30s共40个循环, 95 $^{\circ}\text{C}$ 15s、60 $^{\circ}\text{C}$ 60s和95 $^{\circ}\text{C}$ 15s共1个循环。

数据分析 使用2^{- $\Delta\Delta C_t$} 方法计算基因的相对表达量,利用GraphPad Prism 8.0软件进行作图。

2 结果

2.1 中国东北*Colpoda inflata*种群对镉的耐受性

在5个浓度镉胁迫实验组中,*C. inflata*均表现出一定的种群耐受性(图1)。与对照组相比,2、4和6 mg/L镉处理组的*C. inflata*生长曲线变化不大,对数增长期均为24—72h,在72h种群密度达到最大值,然后种群进入衰退期。其中,所有实验组最高种群密度均显著高于对照。48h内处理组*C. inflata*代时小于对照组(表1),48—72h的代时则高于对照组;种群增长率显示48h内4 mg/L处理组最高,48—72h,6 mg/L处理组最高。

8与10 mg/L镉处理组的生长曲线与对照和其他实验组不同,表现为对数增长期和衰退期均延后。对数增长期为48—96h,然后进入衰退期,在96h达到种群最大密度,且10 mg/L组显著高于8 mg/L以下的各实验组。且无论是平均种群增长率和代时,10 mg/L处理组种群状态均为最佳。

综上,10与2—8 mg/L的镉胁迫组相比,虽然肾形虫种群对数增长期延后了约24h,但种群最高密度和种群增长率均高于低浓度组和对照,代时也更短。因此,该东北地区*C. inflata*种群对高浓度镉胁迫具有耐受性,96h最高耐受镉浓度为10 mg/L。

2.2 中国东北*Colpoda inflata*种群金属硫蛋白对镉胁迫的响应

分别检测了对照组和5个不同浓度镉胁迫组在24—96h期间,*C. inflata*细胞内MT的含量(图2)。总

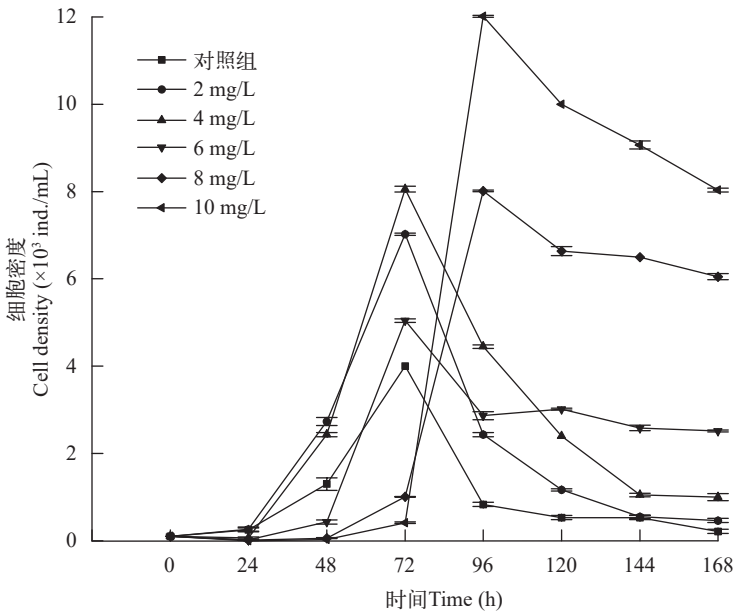


图 1 不同浓度镉胁迫下*C. inflata*的生长曲线

Fig. 1 The growth curves of *C. inflata* in different concentrations of cadmium solution

表 1 不同浓度镉胁迫对*C. inflata*种群的影响

Tab. 1 Effects of different concentrations of cadmium on *C. inflata*

镉浓度 Concentration (mg/L)	胁迫时间 Time (h)	细胞密度 Nt (ind./mL)	种群增长率 <i>r</i>	代时 G (h)
0	48	1300.00±141.42	0.07	10.09
	72	4000.00±0.00	0.05	14.80
	96	833.33±47.14	-0.07	-10.61
2	48	2733.33±94.28	0.10	7.15
	72	7022.50±22.50	0.04	17.63
	96	2433.33±47.14	-0.04	-15.70
4	48	2433.33±47.14	0.15	4.62
	72	8058.33±65.62	0.05	13.89
	96	4450.00±40.82	-0.02	-28.02
6	48	433.33±47.14	0.12	5.57
	72	5043.33±41.90	0.10	6.78
	96	2866.67±94.28	-0.02	-29.45
8	48	61.67±10.27	0.07	10.34
	72	1006.67±9.43	0.12	5.96
	96	8015.00±21.21	0.09	8.02
10	48	32.50±0.00	0.15	4.78
	72	415.00±21.21	0.11	6.53
	96	12015.00±21.21	0.14	4.94

体上镉胁迫实验组中MT含量高于对照, 但不同浓度镉在不同时间引起的MT含量的变化有差异。其中10 mg/L镉胁迫组在24h *C. inflata*处于休眠状态, 因此MT含量检测值为0。

每个浓度镉对MT的作用表现为随着时间的变化先诱导后抑制。对各时间段不同镉胁迫组MT含

量的进行比较, 则表明MT的含量与种群增长率具有一致性(图 2和表 1)。这说明该种群对镉的高耐受性与MT直接相关($r=0.51$, $P=0.03$), 且提示MT的表达与镉胁迫浓度和胁迫时间相关。

2.3 *Col-MTI*基因全长cDNA序列的克隆和分子特征

利用RNA提取试剂盒提取*C. inflata* RNA, 并以RNA为模板反转录出cDNA, 利用MT-F和MT-R为引物克隆*C. inflata*体内MT基因, PCR扩增片段经过胶回收、连接、转化及测序后得到*C. inflata* MT基因片段总长度为241 bp, 碱基含量预测中A占30.12%, T占24.90%, G占26.91%, C占18.07%, 其中GC含量占44.98%。进一步分析表明, 最大开放阅读框为159 bp, 预测分子量约为9.69 kD, 平均等电点为4.96, 理论等电点为5.33。在NCBI数据库中进行BLASTX比对, 发现该序列与嗜热四膜虫的MT基因序列相似度达到30.90%以上。该基因命名为*Col-MTI*, 序列信息已上传至NCBI基因库。

同源性分析发现, *Col-MTI*序列与其他纤毛虫氨基酸的序列具有较高的同源性, 与多色四膜虫(*Tetrahymena pigmentosa*)、美国四膜虫(*Tetrahymena americanis*)和长吻四膜虫(*Tetrahymena rosstrata*)的MT基因序列在140—240 bp同源性最高。保守位点分析发现, *Col-MTI*含有XXCXX和XCCX两个保守位点, 其中C为半胱氨酸, X为其他氨基酸。

2.4 *Col-MTI*基因编码蛋白的功能分析

*Col-MTI*基因共编码81个氨基酸, 正电荷氨基酸(K、R)18个, 占22.2%, 带负电荷氨基酸(D、E)9个, 占11.1%, 疏水性氨基酸(A、I、L、F、W、V)

30个,占37.1%,极性氨基酸(N、C、Q、S、T、Y) 16个,占19.7%,脂肪族类氨基酸(G、A、V、L、I) 27个,占33.4%,芳香族类氨基酸(F、W、Y)8个,占9.9%,碱性氨基酸(K、R、H)19个,占23.4%,酸性氨基酸(B、D、E、N、Q、Z)11个,占13.5%。疏水性分析结果显示: *Col-MTI*编码的蛋白疏水性区域位于42—77aa,亲水性区域位于5—41aa。不稳定系数为55.49, GRAVY是-0.273,属于亲水性蛋白。信号肽预测结果显示无信号肽,未形成跨膜结构域。*C. inflata*属于单细胞生物,说明该蛋白属于定位于细胞质基质或细胞器基质中的蛋白质,不属于分泌蛋白或膜蛋白。

TASSER蛋白质模型预测*Col-MTI*蛋白二级结构,是由 α -螺旋、 β -折叠和无规卷曲组成,占比分别为67.90%、11.11%和20.98%。SWISS-MODEL预测*Col-MTI*蛋白的3D空间结构,发现其与蓝藻类金属硫蛋白结构相似性最高GMQE为0.18, QME-ANDisCo Global为 0.53 ± 0.12 ^[24, 25]。

2.5 *Col-MTI*基因编码蛋白的系统进化分析

构建基于*Col-MTI*基因序列的ML最大似然树(图3),结果显示, *Col-MTI*基因序列与马来四膜虫、嗜热四膜虫和第四双小核草履虫等单细胞原生动物MT基因序列聚为一簇,亲缘关系较近。与斑马鱼、黑腹果蝇和小麦等多细胞动物或植物亲缘关系距离较远。

2.6 镉对*Col-MTI*基因表达的诱导

利用qRT-PCR对5种浓度镉胁迫组*Col-MTI*在60h、84h和108h三个时间点表达情况进行了检测,结果表明*Col-MTI*在镉诱导下几乎全部上调表达。

尤其是高于4 mg/L浓度的镉诱导作用显著(图4)。60h镉诱导下(图4A), 2 mg/L组*Col-MTI*表达量是对照组的1.28倍, 4、6、8和10 mg/L的处理组中*Col-MTI*上调表达量也相应增加,与镉浓度之间呈现出一定的剂量-效应关系。在84h镉诱导下(图4B),在2 mg/L的处理组中*Col-MTI*表达下调,但另外4组实验组仍表现出显著的上调表达,但与60h上调表达量相比,上调表达倍数降低。在108h镉胁迫下(图4C),镉处理组*Col-MTI*均为上调表达,但上调倍数普遍低于84h上调表达量,与镉浓度的剂量-效应关系减弱。

3 讨论

3.1 *Colpoda inflata*镉耐受性及其与金属硫蛋白关系

在重金属污染治理研究中,镉已经成为许多国家需要解决的重金属污染的主要问题^[26]。MT是能够结合重金属的超家族蛋白质,能够降低重金属的生物毒性。目前关于重金属镉及MT的相互作用机制在原生动物领域的研究还比较少。以往研究发现*C. inflata*对镉具有一定的耐受性^[27, 28],本研究明确了在实验室培养条件下,96h耐受浓度为2—10 mg/L。2013年曾报道一种*C. inflata*湖北种群对镉胁迫96h耐受浓度为1.9—12.0 mg/L,但是并未针对该种群耐镉机制进行深入研究,也未报道MT相关作用^[29]。以往的对四膜虫镉耐受性的研究表明^[12, 30],四膜虫对镉耐受最高的是梨形四膜虫,其在镉胁迫下24h的LC₅₀为4.0 mg/L^[31],而本研究获得的*C. inflata*东北种群镉胁迫下24h的LC₅₀达到了12.0 mg/L^[32]。可见该*C. inflata*种群对镉的耐受性为目前已报道原生动物中最高,本研究也进一步证实其高镉耐受

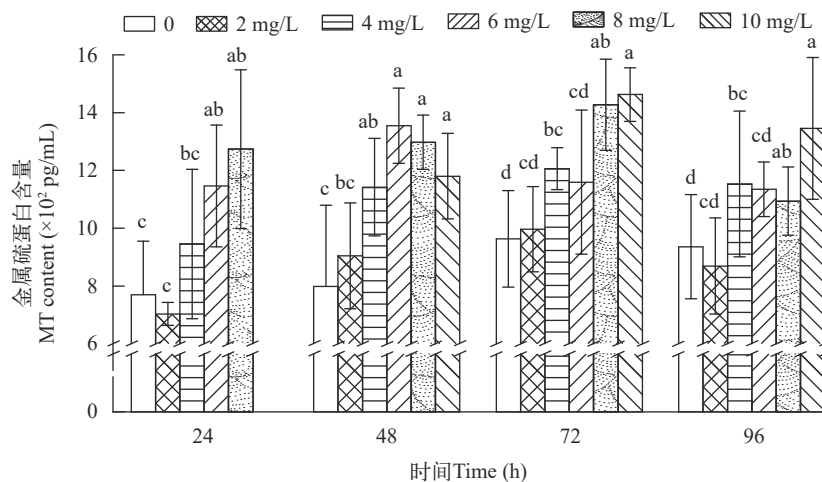


图2 *C. inflata*金属硫蛋白对不同浓度镉胁迫96h的响应

Fig. 2 Responds of *C. inflata* metallothionein on different concentrations of cadmium in 96h

差异显著性分析用“a、b、c、d”标注,无共同上标具有差异显著性意义($P < 0.05$)

The significant difference analysis is marked with “a, b, c and d”, no common superscript has significant difference ($P < 0.05$)

性与MT的解毒作用密切相关^[33,34]。

陈彪等^[35]针对小球藻的研究,发现低浓度的镉在一定程度上会加快小球藻的生长。本研究中*C. inflata*也表现出相似的特征,尤其是8—10 mg/L高浓度镉胁迫下,表现出先抑制生长,后促进生长的现象。这与*C. inflata*在高浓度镉胁迫下首先迅速进入包囊状态以抵御镉胁迫的机制有关^[36,37]。另外,结合金属硫蛋白含量和基因表达的变化,表明细胞内的金属硫蛋白显然是其能够在早期(本研究为72h内)抵御镉胁迫的关键分子,但在长期胁迫下(96h后),金属硫蛋白含量和基因表达均不显著增加,但种群的增长仍然保持,说明包囊休眠和提高种群增长率也是*C. inflata*有效的抗逆机制,其分子调控和生理学机制还有待进一步的研究。

3.2 *Col-MTI*分子特征与镉诱导表达

本文是首次对*C. inflata* MT基因进行克隆和序列分析,获得*Col-MTI*基因序列。其分子量与四膜虫分子量(8.2—19.3 kD)较为接近,多序列比对中多色四膜虫(17.944 kD)、长吻四膜虫(16.438 kD)和美国四膜虫(15.876 kD)的MT分子量符合四膜虫分子量的区间,本研究所得*Col-MTI*序列比三种四膜虫序列短且分子量稍低。此外,*Col-MTI*分子量高于哺乳动物MT分子量(6—7 kD),与前人研究相符^[38,39]。*Col-MTI*基因的平均等电点和理论等电点,在水生生物MT基因等电点3.5—6.0^[40]。*Col-*

*MTI*蛋白氨基酸序列的保守结构域中同样具有与嗜热四膜虫同样的XCCX和XCX半胱氨酸保守序列^[34]。由于含有两个结构域使得MT分子构象为哑铃型,与前人对MT基因的描述基本吻合^[41,42]。

已有研究表明多色四膜虫(*Tpig-MTI*)、嗜热四膜虫(*MTT1*)和梨形四膜虫(*Tp-MTI*和*Tp-MT2*)基因在核苷酸序列上有较高的同源性^[33],梨形四膜虫(*Tp-MTI*和*Tp-MT2*)、嗜热四膜虫(*MTT1*、*MTT3*和*MTT5*)、热带四膜虫(*Ttrop-MTI*)和长吻四膜虫(*Tros-MTI*)均为7a亚型且亲缘关系较近^[43]。在纤毛虫的Cd-MT研究中,半胱氨酸主要以CCC、CCX氨基酸簇的形式存在,其中CCC只存在于7a亚型,CCX同样常见于7a亚型,在7b亚型中非常稀有。本研究多序列比对所挑选的三条四膜虫序列与*Col-MTI*序列相似性较高,并且三条四膜虫序列中均含有CCC氨基酸簇,*Col-MTI*中含有CC簇。因此,*C. inflata*的*Col-MTI*基因属于7a亚型的MT基因^[44]。

此前对梨形四膜虫和多色四膜虫的研究均表明MT基因的表达量与镉浓度具有一定相关关系,镉浓度增加时基因表达量也随之增加,当基因表达量达到最大阈值时,随着镉浓度增加基因表达量减少并趋于稳定^[45]。本研究中同样发现*Col-MTI*基因表达量对镉浓度和胁迫时间均表现出一定的相关性。通过qRT-PCR技术分析单个*C. inflata*细胞MT基因相对表达量的变化,表明*C. inflata*种群不同

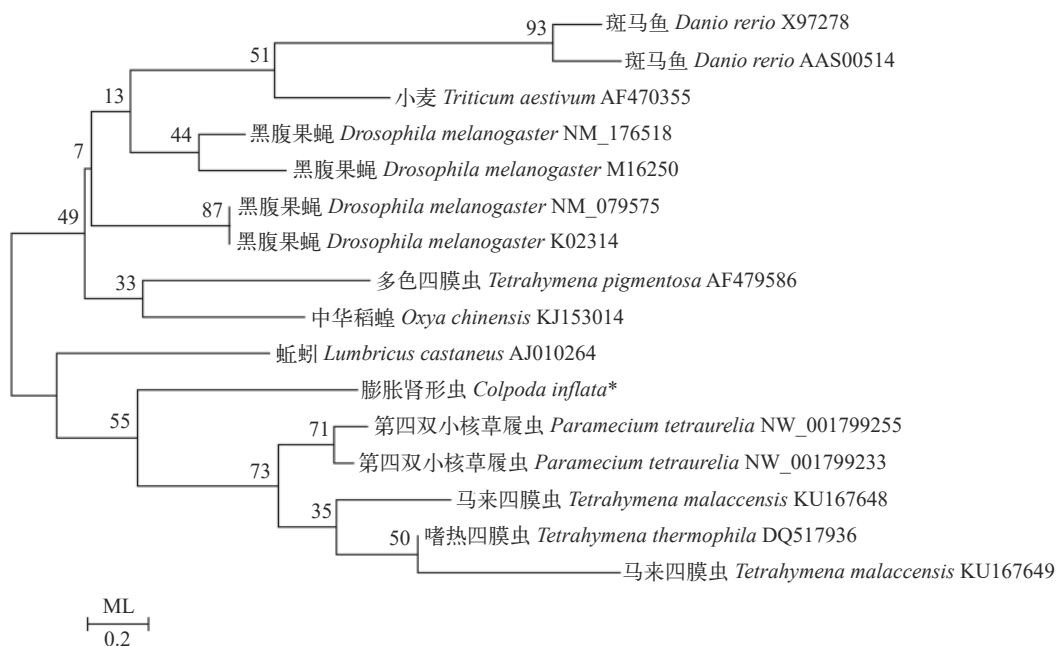


图3 根据不同物种的MT基因序列构建的最大似然树

Fig. 3 Phylogenetic tree inferred from different species of MT gene sequences using ML

“*”代表*C. inflata*为本实验所用东北种群

“*” representing the northeast population of *C. inflata* used in this experiment

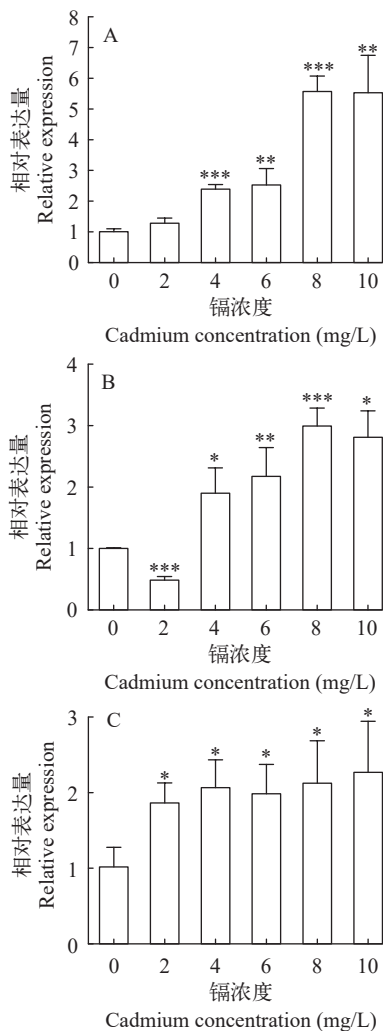


图4 镉处理下*Col-MT1*表达量变化

Fig. 4 The change of *Col-MT1* expression under cadmium treatment

A. 镉处理后60h; B. 镉处理后84h; C. 镉处理后108h

A. 60h after cadmium treatment; B. 84h after cadmium treatment; C. 108h after cadmium treatment; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$

生长阶段对*MT*基因表达量有影响。*MT*蛋白含量在种群衰退期呈现下降趋势, 与之对应的*MT*基因表达量在衰退期也呈现下降趋势。同时期对照组*C. inflata*种群和实验组种群相比, *Col-MT1*基因表达量始终受到镉的诱导, 使得实验组高于对照组, 但随着时间延长, 种群从对数生长进入衰退, 镉与*MT*基因和蛋白之间的剂量-效应关系逐步减弱, 并最终趋于稳定, 这再次表明金属硫蛋白只是肾形虫耐镉机制之一。

4 结论

本研究获得一种对镉具有较高耐受性的*C. inflata*东北种群, 证明其*MT*与其高镉耐受性直接相

关。克隆获得*C. inflata MT*基因*Col-MT1*, 通过分析基因和氨基酸序列特征, 确定其*MT*基因家族7a亚型。并进一步证实该基因的表达受到镉浓度和胁迫时间的调控。其分子调控机制还有待进一步研究。上述结果补充了原生动物*MT*基因数据库, 为进一步揭示*C. inflata MT*基因的功能及作用机制, 以及应用于镉污染监测和环境修复奠定了基础。

参考文献:

- [1] Almeida J A, Diniz Y S, Marques S F G, *et al.* The use of the oxidative stress responses as biomarkers in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) exposed to in vivo cadmium contamination [J]. *Environment International*, 2002, **27**(8): 673-679.
- [2] Park J D, Liu Y, Klaassen C D. Protective effect of metallothionein against the toxicity of cadmium and other metals [J]. *Toxicology*, 2001, **163**(2-3): 93-100.
- [3] Squibb K S, Cousins R J, Silbon B L, *et al.* Liver and intestinal metallothionein: function in acute cadmium toxicity [J]. *Experimental and Molecular Pathology*, 1976, **25**(2): 163-171.
- [4] Cobbett C, Goldsbrough P. Phytochelatins and metallothioneins: Roles in heavy metal detoxification and homeostasis [J]. *Annual Review of Plant Biology*, 2002(53): 159-182.
- [5] Kagi J H R. Evolution, Structure and Chemical Activity of Class I Metallothioneins [M]//Suzuki K T, Imura N, Kimura M (Eds.), *Metallothionein III*, Basel, 1993: 29-55.
- [6] Coyle P, Philcox J C, Carey L C, *et al.* Metallothionein: the multipurpose protein [J]. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 2002, **59**(4): 627-647.
- [7] Margoshes M, Vallee B L. A cadmium protein from equine kidney cortex [J]. *Journal of the American Chemical Society*, 1957, **79**(17): 4813-4814.
- [8] Santovito G, Irato P, Palermo S, *et al.* Identification, cloning and characterisation of a novel copper-metallothionein in *Tetrahymena pigmentosa*. Sequencing of cDNA and expression [J]. *Protist*, 2001, **152**(3): 219-229.
- [9] Ghoshal K, Jacob S T. Regulation of metallothionein gene expression [J]. *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology*, 2001(66): 357-384.
- [10] Felix-Portillo M, Martínez-Quintana J A, Arenas-Padilla M, *et al.* Hypoxia drives apoptosis independently of p53 and metallothionein transcript levels in hemocytes of the whiteleg shrimp *Litopenaeus vannamei* [J]. *Chemosphere*, 2016(161): 454-462.
- [11] Chang Y. Characterization and expression analysis of Cd-metallothionein gene in the protozoan *Tetrahymena* and construction of heavy metal biosensor [D]. Beijing: University of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, 2014, 16-18. [畅悦. 原生动物四膜虫镉金属硫蛋白基因的鉴定、表达特征及重金属生物传感器的构建 [D]. 中

- 国科学院大学, 2014, 16-18.]
- [12] Dar S, Shuja R N, Shakoori A R. A synthetic cadmium metallothionein gene (*PMCd1syn*) of *Paramecium* species: expression, purification and characteristics of metallothionein protein [J]. *Molecular Biology Reports*, 2013, **40**(2): 983-997.
- [13] Lu J G, Xu J, Zhang P X, *et al.* Analysis of functional compensation of two different metallothionein subfamilies from *Tetrahymena thermophila* [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2014, **38**(2): 249-256. [卢剑功, 许静, 张鹏幸等. 嗜热四膜虫两类不同金属硫蛋白的功能补偿分析 [J]. *水生生物学报*, 2014, **38**(2): 249-256.]
- [14] Lu J g. Recombinant expression and functional analysis of metallothionein *MTT1* and *MTT2* from *Tetrahymena thermophila* [D]. Taiyuan: Shanxi University, 2013: 7-9. [卢剑功. 嗜热四膜虫金属硫蛋白MTT1和MTT2的重组表达和功能分析 [D]. 太原: 山西大学, 2013: 7-9.]
- [15] Li Y H. Taxonomy of ciliates from different types of soil [D]. Qingdao: Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, 2010: 1-4. [李玉红. 不同类型土壤纤毛虫分类学研究 [D]. 青岛: 中国科学院(海洋研究所), 2010: 1-4.]
- [16] Abraham J S, Sripoorna S, Dagar J, *et al.* Soil ciliates of the Indian Delhi Region: Their community characteristics with emphasis on their ecological implications as sensitive bio-indicators for soil quality [J]. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 2019, **26**(6): 1305-1313.
- [17] Xu Z, Bowers N, Pratt J R. Variation in morphology, ecology, and toxicological responses of *Colpoda inflata* (Stokes) collected from five biogeographic realms [J]. *European Journal of Protistology*, 1997, **33**(2): 136-144.
- [18] Bowers N, Pratt J R, Beeson D, *et al.* Comparative evaluation of soil toxicity using lettuce seeds and soil ciliates [J]. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 1997, **16**(2): 207-213.
- [19] Forge T A, Berrow M L, Darbyshire J F, *et al.* Protozoan bioassays of soil amended with sewage sludge and heavy metals, using the common soil ciliate *Colpoda steinii* [J]. *Biology and Fertility of Soils*, 1993, **16**(4): 282-286.
- [20] Campbell C D, Warren A, Cameron C M, *et al.* Direct toxicity assessment of two soils amended with sewage sludge contaminated with heavy metals using a protozoan (*Colpoda steinii*) bioassay [J]. *Chemosphere*, 1997, **34**(3): 501-514.
- [21] Zheng W B, Wang L, Wang X, *et al.* Dominant protozoan species in rhizosphere soil over growth of *Beta vulgaris* L. in Northeast China [J]. *Bioengineered*, 2020, **11**(1): 229-240.
- [22] Taylor W D, Berger J. Growth of *Colpidium campylum* in monoxenic batch culture [J]. *Canadian Journal of Zoology*, 1976, **54**(3): 392-398.
- [23] Zhang Y, Wang J, Geng X, *et al.* Does microplastic ingestion dramatically decrease the biomass of protozoa grazers? A case study on the marine ciliate *Uronema marinum* [J]. *Chemosphere*, 2021(267): 129308.
- [24] Morby A P, Turner J S, Huckle J W, *et al.* *SmtB* is a metal-dependent repressor of the cyanobacterial metallothionein gene *smtA*: identification of a Zn inhibited DNA-protein complex [J]. *Nucleic Acids Research*, 1993, **21**(4): 921-925.
- [25] Guo Xiangxue, Shi Dingji, Ru Binggen. Metallothionein and its studying trends in *Cyanobacterium* [J]. *Progress in Biochemistry and Biophysics*, 1996, **23**(3): 237-239. [郭祥学, 施定基, 茹炳根. 蓝藻的类金属硫蛋白及其研究进展 [J]. *生物化学与生物物理进展*, 1996, **23**(3): 237-239.]
- [26] Suhani I, Sahab S, Srivastava V, *et al.* Impact of cadmium pollution on food safety and human health [J]. *Current Opinion in Toxicology*, 2021(27): 1-7.
- [27] Trielli F, Chessa M G, Amaroli A, *et al.* Effects of organophosphate compounds on a soil protist, *Colpoda inflata* (Ciliophora, Colpodidae) [J]. *Chemosphere*, 2006, **65**(10): 1731-1737.
- [28] Díaz S, Martín-González A, Carlos Gutiérrez J. Evaluation of heavy metal acute toxicity and bioaccumulation in soil ciliated protozoa [J]. *Environment International*, 2006, **32**(6): 711-717.
- [29] Zou T, Liu X L, Huang W D, *et al.* Effects of Cd^{2+} , Pb^{2+} and Hg^{2+} on *Colpoda inflata* [J]. *Hubei Agricultural Sciences*, 2013, **52**(7): 1556-1560. [邹涛, 刘先利, 黄卫东等. Cd^{2+} 、 Pb^{2+} 、 Hg^{2+} 对膨胀肾形虫的毒性效应 [J]. *湖北农业科学*, 2013, **52**(7): 1556-1560.]
- [30] Ziller A, Yadav R K, Capdevila M, *et al.* Metagenomics analysis reveals a new metallothionein family: sequence and metal-binding features of new environmental cysteine-rich proteins [J]. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 2017(167): 1-11.
- [31] Vilas-Boas J A, Cardoso S J, Senra M V X, *et al.* Ciliates as model organisms for the ecotoxicological risk assessment of heavy metals: a meta-analysis [J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2020(199): 110669.
- [32] Zheng W B. The response mechanism research of heavy metal cadmium on *Colpoda inflata* [D]. Harbin: Harbin Normal University, 2020: 35-36. [郑维彬. 膨胀肾形虫对重金属镉的响应机制研究 [D]. 哈尔滨: 哈尔滨师范大学, 2020: 35-36.]
- [33] Guo L, Fu C, Miao W. Cloning, characterization, and gene expression analysis of a novel cadmium metallothionein gene in *Tetrahymena pigmentosa* [J]. *Gene*, 2008, **423**(1): 29-35.
- [34] Wang Q, Xu J, Chai B, *et al.* Functional comparison of metallothioneins *MTT1* and *MTT2* from *Tetrahymena thermophila* [J]. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2011, **509**(2): 170-176.
- [35] Chen B. Role of extracellular polymeric substances from *Chlorella vulgaris* in the removal of ammonium and orthophosphate under the stress of cadmium [D]. Xiangtan: Xiangtan University, 2015: 20-22. [陈彪. 重金属镉胁迫下胞外聚合物在小球藻脱氮除磷过程中的作用 [D]. 湘潭: 湘潭大学, 2015: 20-22.]

- [36] Liu Y, Niu Y N. Research progress on cell dormancy of protozoan ciliates [J]. *Biology Teaching*, 2012, **37**(10): 2-4. [刘影, 牛延宁. 原生动物纤毛虫细胞休眠现象研究进展 [J]. *生物学教学*, 2012, **37**(10): 2-4.]
- [37] Wu C, Chao Y, Shu L, *et al.* Interactions between soil protists and pollutants: an unsolved puzzle [J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2022(429): 128297.
- [38] Yang X B, Wang J T. Review of research on metallothionein in mammals [J]. *Animal Husbandry and Feed Science*, 2009, **30**(4): 134-136. [杨晓勃, 王建庭. 哺乳动物金属硫蛋白的研究概述 [J]. *畜牧与饲料科学*, 2009, **30**(4): 134-136.]
- [39] Guo R. Heterologous expression and functional analysis comparison of two metallothioneins from *Tetrahymena ellioti* [D]. Taiyuan: Shanxi University, 2016: 5-7. [郭荣. 四膜虫 *Tetrahymena ellioti* 两种金属硫蛋白的异源表达和功能比较 [D]. 太原: 山西大学, 2016: 5-7.]
- [40] Li T T, Zong J J, Gao X H, *et al.* Research progress of metallothionein [J]. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2018, **46**(25): 15-18. [李婷婷, 宗婧婧, 高学慧等. 金属硫蛋白的研究进展 [J]. *安徽农业科学*, 2018, **46**(25): 15-18.]
- [41] Ru B G. New kind of food additive-metallothionein [J]. *Fine and Specialty Chemicals*, 2002, **10**(8): 15-16. [茹炳根. 一种新型食品添加剂——金属硫蛋白 [J]. *精细与专用化学品*, 2002, **10**(8): 15-16.]
- [42] Zhou Y, Li L, Ru B. Expression, purification and characterization of β domain and β domain dimer of metallothionein [J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 2000, **1524**(2-3): 87-93.
- [43] Amaro F, del Pilar de Lucas M, Martín-González A, *et al.* Two new members of the *Tetrahymena* multi-stress-inducible metallothionein family: characterization and expression analysis of *T. rostrata* Cd/Cu metallothionein genes [J]. *Gene*, 2008, **423**(1): 85-91.
- [44] Díaz S, Amaro F, Rico D, *et al.* *Tetrahymena* metallothioneins fall into two discrete subfamilies [J]. *PLoS One*, 2007, **2**(3): e291.
- [45] Santovito G, Irato P, Piccinni E. Regulation of metallothionein (MT) in *Tetrahymena*: induction of MT-mRNA and protein by cadmium exposure [J]. *European Journal of Protistology*, 2000, **36**(4): 437-442.

IDENTIFICATION AND INDUCED EXPRESSION OF THE METALLOTHIONEIN GENE OF A HIGH CD-TOLERANCE *COLPODA INFLATA* POPULATION

HOU Sen¹, ZHAO Xue¹, GAO Rong¹, WANG Ying¹, ZHENG Wei-Bin¹, WANG Li¹,
PAN Xu-Ming¹, REN Nan-Qi² and CHEN Ying^{1,2}

(1. Key Laboratory of Biodiversity of Aquatic Organisms, Harbin Normal University, Heilongjiang 150025, China; 2. School of Civil and Environmental Engineering, Harbin Institute of Technology (Shenzhen), Shenzhen 518055, China)

Abstract: Cadmium ranks first among the heavy metal pollutants under limited controll in water. Metallothionein is one of the key proteins that can bind to cadmium and regulate the oxidative stress response of organisms. The protozoan MT has been reported in two ciliates, *Tetrahymena* and *Paramecium*. In this study, we obtained a northeast population of *Colpoda inflata* with high cadmium tolerance. Metallothionein content of *C. inflata* showed a positive correlation with cadmium concentration and growth rate of population in five gradient concentration of cadmium stress experimental groups from 24—96h. The highest Cd-tolerance concentration was 10 mg/L in 96h. Metallothionein gene of *Colpoda inflata* was cloned and named *Col-MTI*. The gene sequence and amino-acid sequence were analyzed. The results showed that *Col-MTI* had high homology with the amino acid sequences of other ciliates, and contains two conserved sites XXCXX and XCCX. It was a new member of subtype 7a of metallothionein gene family. TASSER protein model predicted that the secondary structure of *Col-MTI* protein was composed of α -helix, β -folding and random crimp, accounting for 67.90%, 11.11% and 20.98%, respectively. SWISS-MODEL predicted that the 3D structure of *Col-MTI* protein was the most similar to that of cyanobacteria metallothionein. qRT-PCR experiment confirmed that at 60h, 84h and 108h, the expression of *Col-MTI* gene was up-regulated to different concentration cadmium and showed a dose-response relationship with cadmium concentration. The molecular mechanism of gene expression still needs further study. Above results supplemented the MT gene database of protozoa and lay a foundation for revealing the mechanism of *C. inflata* MT gene. As well as provide reference for monitoring and remediation of cadmium pollution.

Key words: Cadmium tolerance; Metallothionein; Northeast China population; *Colpoda inflata*