



论文

原生动物柯立斯四膜虫(*Tetrahymena corlissi*) 超高砷耐受性的分子机制研究

韦薇^①, 袁冬霞^②, 杨文涛^②, 张晶^②, 陈瑛^{①*}, 缪炜^{②*}^① 哈尔滨师范大学生命科学与技术学院, 哈尔滨 150025;^② 中国科学院水生生物研究所, 水生生物多样性与保护重点实验室, 武汉 430072

* 联系人, E-mail: lh6666@126.com; miaowei@ihb.ac.cn

收稿日期: 2015-10-13; 接受日期: 2016-01-17; 网络版发表日期: 2016-03-04

国家自然科学基金(批准号: 31471950)资助

摘要 以原生动物柯立斯四膜虫(*Tetrahymena corlissi*)为实验对象, 通过流式细胞仪测定细胞密度分析四膜虫相对生长率, 得到砷暴露下 *T. corlissi* 24 h 的半数效应浓度(EC₅₀)为 110.7 μg/mL, 是梨形四膜虫(*T. pyriformis*)的 3 倍; 在克隆到 *T. corlissi* 砷甲基转移酶(*ArsM*)基因的基础上, RT-PCR 结果显示, 该基因在砷暴露下表达; 利用高效液相色谱-电感耦合等离子体质谱仪(HPLC-ICP-MS)联用方法对细胞内砷形态的检测显示, 野生型 *T. corlissi* 具有比 *T. pyriformis* 强数倍的甲基化砷的能力, *ArsM* 基因敲除的 *T. corlissi* 失去了甲基化砷的能力, 从而推测 *T. corlissi* 的 *ArsM* 具有高效甲基化砷的能力, 是其具有超高的砷耐受性的分子基础。

关键词 砷, 四膜虫, 砷甲基转移酶

砷是一种分布广泛的环境毒素和人类致癌物, 在 2011 年《环境保护机构综合环境响应、补偿和责任行为有害物质清单》上位居榜首(<http://www.atsdr.cdc.gov/spl/>)。有研究表明, 仅中国就有将近两千万人由于地下水污染而处在砷暴露的环境中^[1], 而且成人中约每十万人就有 106 人由于食物中无机砷的摄入而存在终生致癌风险^[2], 进而诱发人类产生一系列的疾病。因此, 砷的污染与治理一直是社会关注和相关研究领域的热点问题。

自然环境中主要以无机态三价砷(As(III))和五价砷(As(V))的形式存在, 也能够被甲基化生成一甲基

砷(MMA(V))、二甲基砷(DMA(V))或三甲基砷(TMA(III))^[3], 一般无机态毒性高、有机态毒性低。环境中的无机砷可以通过多种方式进行生物转化, 如氧化、还原和甲基化, 其中砷甲基化一直以来是人们关注的热点问题。目前已有研究表明, 在细菌、古生菌、真菌、红藻、植物、哺乳动物以及人类中都存在砷由无机态转化为有机态的现象。例如, 低等生物蓝细菌和红藻经无机砷暴露后均检测到 MMA(V)和 DMA(V)^[4,5]; 高等生物小鼠(*Mus musculus*)和人类(*Homo sapiens*)的尿液中也检测到由无机砷转化成的 MMA, DMA 和 TMA^[6]。说明许多生物体都能够将高

引用格式: 韦薇, 袁冬霞, 杨文涛, 等. 原生动物柯立斯四膜虫(*Tetrahymena corlissi*)超高砷耐受性的分子机制研究. 中国科学: 生命科学, 2016, 46: 285–293
Wei W, Yuan D X, Yang W T, et al. Molecular mechanism of high tolerance to arsenic in a protozoan, *Tetrahymena corlissi*. Sci Sin Vitae, 2016, 46: 285–293, doi: 10.1360/N052015-00323

毒性的无机砷转化为低毒性的有机砷, 同时这也证明了砷的生物甲基化现象广泛存在于自然界中. 尽管人们研究了近一个世纪的砷甲基化, 但是直至 21 世纪初才鉴定出第一个砷甲基转移酶(ArsM)^[7]. 这种酶已经在红藻(*Cyanidioschyzon merolae*)^[8]、斑马鱼(*Barchydanio rerio* var)^[9]、大鼠(*Rattus norvegicus*)^[10]和人类^[11]等生物体中都有发现, 是无机砷转化成有机砷过程中的关键酶. 传统的砷代谢途径认为, 无机砷首先需要被还原成三价砷才可以被甲基化, 进而在 ArsM 的作用下生成一甲基砷(MMA(III)), MMA(V), 二甲基砷(DMA(III)), DMA(V), TMA(III)或三甲基砷氧化物(TMAO)等一系列的甲基产物^[3,12]. 可见生物甲基化是环境中的砷进行生物化学转化循环过程的重要组成部分, 同时也是生物体催化减毒的一种方式. 因此, 寻找和研究“更多具有甲基化砷能力的生物体”对解决环境污染砷来说具有重要的意义.

原生动动物是广泛分布在水生环境中的一类单细胞真核生物群体. 它们不仅在生态食物链中处于基础地位并且还是生态系统物质循环中的重要参与者^[13]. 由于原生动动物具有个体行为与所处生境中的污染物质紧密联系的特点, 因此其作为毒理学研究的重要实验生物已有相当长的历史^[14]. 其中, 原生动动物四膜虫(*Tetrahymena*)已经很早就毒理学及环境毒理学的研究中得到应用, 尤其梨形四膜虫(*T. pyriformis*)更是环境毒理学中最常用的生物模型之一, 被美国国家环境保护局作为水和废水标准参考实验系统. Zhang 等人^[15]在无机砷对 *T. pyriformis* 的急性毒性实验中发现其对砷有较高的耐受性, 并预测具有相关砷耐受机制. Yin 等人^[16]发现 *T. pyriformis* 具有将无机砷甲基化的能力, 而此代谢途径是水体及土壤环境中生物的重要解毒途径. 近期, Ye 等人^[17]利用生物信息学和分子生物学等实验技术证明了 *T. pyriformis* 具有砷甲基化过程中的重要酶——ArsM, *T. pyriformis* 从而成为原生动动物中首个具有 ArsM 的种. 那么, 具有 ArsM 并甲基化砷是原生动动物产生高砷耐受性的普遍分子机制吗? 本文在发现了一种比 *T. pyriformis* 更高耐受砷的四膜虫——柯立斯四膜虫(*T. corlissi*)并克隆到其 ArsM 基因的基础上, 通过对该基因的表达及对野生型和 ArsM 基因敲除的 *T. corlissi* 细胞内砷形态的检测分析, 探讨了其具有

超高砷耐受性的分子机制.

1 材料与方法

1.1 实验材料

T. corlissi(购自 American type culture collection, 编号 50086), *T. pyriformis*(加州大学圣塔芭芭拉分校 Eduardo Orias 教授赠送); 无机态五价砷 $\text{Na}_3\text{AsO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (中国科学院城市环境研究所朱永官研究员实验室提供), 溶于无菌 Milli-Q 水后经 0.22 μm 滤膜过滤, 保存于 4℃ 待用.

1.2 细胞培养

四膜虫于无菌条件下培养在超级胨蛋白胨(super proteose peptone, SPP)SPP 培养基内, 其包含 2% 蛋白胨(BD, 美国)、0.1% 酵母提取物(Oxoid, 英国)、0.2% 葡萄糖(Sinopharm, 北京)和 0.003% 柠檬酸铁(Sigma, 美国)^[18], 置于恒温 27℃, 恒速 135 r/min 摇床内培养至对数期前期($\sim 1.2 \times 10^5$ cells/mL)待用.

1.3 砷暴露下四膜虫 24h EC₅₀ 的测定

(1) 实验方法. (i) 砷暴露浓度梯度的确定. 根据预实验结果, 确定砷暴露下 *T. corlissi* 和 *T. pyriformis* 的无抑制浓度(相对生长率为 100%)和完全抑制浓度(相对生长率为 0%), 在此浓度范围内设置等比梯度的砷暴露浓度, 梯度间比例为 F, 计算公式

如下: $F = 10^{\left\{ \log \left(\frac{B}{A} \right) \right\} / N}$, A: 无抑制浓度; B: 完全抑制浓度; N: 梯度数;

相对生长率=

$$\frac{\text{处理组24 h细胞密度}-\text{处理组0 h细胞密度}}{\text{对照组24 h细胞密度}-\text{对照组0 h细胞密度}} \times 100\%.$$

(ii) 砷暴露实验过程. 上述两种四膜虫各设置 11 个不同砷水平的处理组, 1 个对照组(表 1), 每组各均有 3 个平行样. 将四膜虫大量培养至对数期前期后取 5 mL 细胞分装至黑盖瓶(江苏省江阴市西石桥精英玻璃制品厂); 然后从黑盖瓶中取出 200 μL 细胞于 96 孔板内, 以测取 0 h 细胞初始密度, 每组实验均有 3 次重复. 处理组分别加入 1% 的不同浓度砷溶液(体积比), 使砷终浓度为所设定的暴露浓度; 对照组加入等体积的无菌 Milli-Q 水, 细胞置于恒温 27℃, 恒速

135 r/min 摇床内培养 24 h 后再次测取 24 h 细胞密度. 实验细胞密度计数采用流式细胞仪(guava easyCyte HT, 赛默飞世尔科技公司, 上海)测定, 根据实际情况分别适宜地调整 SSC(Side Scatter)和 FSC(Forward Scatter)参数 (测定同种四膜虫时需保持一致), 将 96 孔板放置于其中即可快速准确地得到细胞密度值, 再根据相对生长率的计算得到数据后输入软件进行分析结果分析.

(2) 数据处理. 实验数据采用 Microsoft Excel 2007 进行处理, 砷暴露下四膜虫 24 h EC_{50} 采用 GraphPad Prism 5.0 软件进行分析.

1.4 砷暴露下 *T. corlissi* *ArsM* 基因的表达分析

(1) *T. corlissi* 中 *ArsM* 基因的鉴定. *T. pyriformis* *ArsM* 基因两端序列^[17]设计引物(表 2), 以 *T. corlissi* 总 DNA 为模板进行 PCR 扩增, PCR 反应体系: 10× 附加(long and accurate, LA)缓冲液(TaKaRa, 大连) 2 μL, 2.5 mmol/L dNTP(TaKaRa) 1.6 μL, 0.4 μL 正向引物(10 μmol/L), 0.4 μL 反向引物(10 μmol/L), 0.2 μL LA Taq(TaKaRa)混合, 加入 0.4 μL DNA 模板, 最后用双蒸水配成 20 μL PCR 反应体系; PCR 反应程序如下: 94℃ 5 min 预变性, 94℃ 15 s, 55℃ 15 s, 72℃ 60 s 共 36 个循环反应, 最后于 72℃ 再延伸 10 min; PCR 产物在 1% 琼脂糖凝胶上进行电泳后, 特异性 DNA 片

段用胶回收试剂盒(Axygen, 美国)回收, 产物连接到 pGEM-Teasy 载体(Promega, 美国)多克隆位点, 之后转入到大肠杆菌 DH5α 感受态细胞中, 涂平板挑斑, 筛选出的阳性克隆菌液进行测序.

(2) *T. corlissi* 总 RNA 提取和 cDNA 合成. 取长势良好的对数期前期四膜虫分别进行无砷处理和砷暴露处理, 砷处理浓度为该株系的 EC_{50} 值, 继续培养 24 h 收集细胞. 分别取 3 mL 四膜虫经 4390×g 离心 5 min 富集细胞. 根据 RNA 提取试剂盒 TRIzol Reagent (Invitrogen, 美国)的说明书提取总 RNA, 总 RNA 最终溶于 50 μL 经焦碳酸二乙酯(diethyl pyrocarbonate, DEPC)处理过的双蒸水中. 分光光度法测定样品浓度并用琼脂糖凝胶电泳法检测 rRNA 条带完整性. 分别取约 5 μg 总 RNA 样品经 Dnase I (Promega)处理后进行逆转录合成 cDNA: 5× 反转录(reverse transcription, RT)缓冲液(Promega) 4 μL, 2 mmol/L dNTP(Fermentas, 立陶宛) 1 μL, RNasin(Promega) 1 μL, 随机引物(Promega) 0.5 μL, 0.1 mol/L 二硫苏糖醇(dithiothreitol, DTT)(Promega) 2 μL, 逆转录酶 M-MLV(Promega) 1 μL, DEPC 水配成 20 μL 反应体系, 经过 25℃ 10 min, 37℃ 50 min, 70℃ 15 min 反应得到 cDNA.

(3) RT-PCR. 以上述步骤(2)中得到的两种 cDNA 分别为模板, 用 *T. corlissi* *ArsM* 基因引物进行

表 1 四膜虫砷暴露浓度列表

物种名称	处理组 As(V) (μg/mL)											对照组
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	
<i>T. corlissi</i>	4.00	7.96	15.84	31.52	62.73	124.83	248.42	494.35	983.75	1500.00	2000.00	Milli-Q H ₂ O
<i>T. pyriformis</i>	0.42	1.00	2.37	5.62	13.34	31.62	74.99	177.83	421.70	1000.00	1100.00	

表 2 引物列表

引物名称	引物序列(5'-3', 下划线为酶切位点及保护碱基)
<i>T. pyriformis</i> - <i>ArsM</i> -F	ATCACAAACAGCTCGCTATC
<i>T. pyriformis</i> - <i>ArsM</i> -R	ACAACAGCCACTACTTTTGC
<i>T. corlissi</i> - <i>ArsM</i> -(RT-PCR)-F	TTGATTGATGACTTTGTAGATGTTG
<i>T. corlissi</i> - <i>ArsM</i> -(RT-PCR)-R	GCACTATAGACTTCAGCAGCATTT
<i>T. corlissi</i> - <i>ArsM</i> -5'-F	ATTTGCGGCCGCAACAAACCTTGCAATTTCTATGGG (Not I)
<i>T. corlissi</i> - <i>ArsM</i> -5'-R	TGCACTGCAGTCTTTTATCGAGAAAATTGATATTTCA (Pst I)
<i>T. corlissi</i> - <i>ArsM</i> -3'-F	CCCAAGCTTTTAAGATTAAGTTTATGTTTGAAATTTAGA (HindIII)
<i>T. corlissi</i> - <i>ArsM</i> -3'-R	CCGCTCGAGGTGCAATTGATAATGAAAAGTAAGAA (Xho I)
<i>T. corlissi</i> -Δ <i>ArsM</i> -F	AAAATGGATAATAAATAAATCGCCTT
<i>T. corlissi</i> -Δ <i>ArsM</i> -R	TCGATAACTGAAAAGAACAATAAAGTT
<i>Neo4</i> -F	ATTGAACAAGATGGTTTACACGCT
<i>Neo4</i> -R	TGCATTTTCCAGTAAAAATTTGAA

RT-PCR 扩增. RT-PCR 反应体系: 10×LA 缓冲液 (TaKaRa) 2 μL, 2.5 mmol/L dNTP (Fermentas) 1.6 μL, 0.4 μL 正向引物 (10 μmol/L), 0.4 μL 反向引物 (10 μmol/L), 0.2 μL LA Taq (TaKaRa) 混合, 加入 0.4 μL cDNA 模板, 最后用双蒸水配成 20 μL PCR 反应体系; PCR 反应程序如下: 94℃ 5 min 预变性, 94℃ 15 s, 55℃ 15 s, 72℃ 20 s 共 36 个循环反应, 最后于 72℃ 再延伸 10 min; PCR 产物在 1% 琼脂糖凝胶上进行电泳后, 特异性 DNA 片段用胶回收试剂盒 (Axygen) 回收, 产物连接到 pGEM-Teasy 载体 (Promega) 多克隆位点, 之后转入到大肠杆菌 DH5α 感受态细胞中, 涂平板挑斑, 筛选出的阳性克隆菌进行测序.

1.5 *ArsM* 基因四膜虫敲除株的构建

(1) 敲除载体的构建. 从 *T. corlissi* 测序结果分析 *ArsM* 基因序列, 设计特异引物, 以 *T. corlissi* DNA 为模板, 引物 *ArsM*-5'-F 和 *ArsM*-5'-R (表 2) 扩增 *ArsM* 基因的 5' 非翻译区 (untranslated region, UTR) 序列, 长度 1039 bp. 该片段和载体 p*Neo4* 分别用 *Not* I 和 *Pst* I 双酶切后获得的目的片段连接, 得到重组构建体 p*ArsM*-5' UTR-*Neo4*. 再以 *T. corlissi* DNA 为模板, 引物 *ArsM*-3'-F 和 *ArsM*-3'-R (表 2) 扩增 *ArsM* 基因的 3'UTR 序列, 长度 993 bp. 将该片段和载体 p*ArsM*-5' UTR-*Neo4* 分别用 *Hind* III 和 *Xho* I 双酶切, 目的片段连接获得重组构建载体 p*ArsM*-5'UTR-*Neo4*-*ArsM*-3'UTR (图 1), 将其进行测序验证 *Neo4* 两端连接的目的片段.

(2) 细胞的转化、筛选和鉴定. 将敲除载体 p*ArsM*-5'UTR-*Neo4*-*ArsM*-3'UTR 用 *Not* I 和 *Xho* I 进行双酶切后产物在 1% 琼脂糖凝胶上进行电泳, 目的片段用胶回收试剂盒 (Axygen) 回收. 采用基因枪轰击法将目的片段转化入饥饿 24 h 后的 *T. corlissi* 虫体中

进行基因同源重组. 转化后的细胞置于恒温 27℃、恒速 50 r/min 摇床内培养 3 h, 然后加入 1 μg/mL CdCl₂ 诱导巴龙霉素 (paromomycin) 抗性. 继续培养 1 h 后加入巴龙霉素使其初始浓度为 80 μg/mL. 通过细胞的存活进行筛选, 逐步提高 SPP 中巴龙霉素的浓度, 直至达到 1 mg/mL 后挑取单克隆细胞进行培养. 以野生型 *T. corlissi* 细胞株为对照组, 根据 *T. corlissi* *ArsM* 基因序列设计一对引物为 Δ*ArsM*-F 和 Δ*ArsM*-R (表 2), 通过 PCR 扩增筛选和鉴定 *T. corlissi* 敲除株内 *ArsM* 基因的残余量. 根据 *Neo4* 序列设计一对引物为 *Neo4*-F 和 *Neo4*-R (表 2), 通过与其他引物组合进行 PCR 扩增证实 *Neo4* 的重组位点正确. 得到正确的 *ArsM* 基因完全敲除的 *T. corlissi* (*T. corlissi*-Δ*ArsM*) 细胞株用于后续实验.

1.6 砷暴露下四膜虫细胞内的砷形态分析

(1) 砷暴露处理和样品制备. 取长势良好的对数期前期 *T. corlissi*, *T. corlissi*-Δ*ArsM* 和 *T. pyriformis* 进行砷暴露处理, 处理浓度为各株系的 EC₅₀ 值, 继续培养 24 h 后收集细胞. 细胞样品于冷冻干燥机 (ALPH2-45LSC, Christ, 德国) 处理 24 h 后称重. 每 0.02 g 的冻干样品加入 6 mL 1% HNO₃, 置于微波消解仪 (Multiwave 3000, Anton Paar, 奥地利) 中, 微波消解样品程序如下: 程序 1: power 800, ramp 10 min, hold 10 min; 程序 2: power 1400, ramp 10 min, hold 25 min; 程序 3: power 0, ramp 0 min, hold 15 min. 消化后样品经 4390×g 离心 3 min, 上层清液经 0.22 μm 滤膜过滤后存储在 4℃ 等待分析.

(2) HPLC-ICP-MS 分析砷形态. 砷暴露下四膜虫细胞内的砷形态由 HPLC-ICP-MS 仪器 (NexION-300X, PekinElmer, 美国) 进行分析鉴定. 高效液相色谱仪使用汉密尔顿 PRP-X100 10 μm 阴离子交换

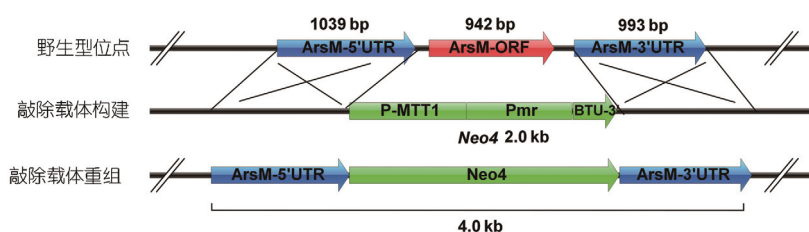


图 1 *ArsM* 基因敲除载体的构建和重组示意图

Neo4 盒式结构由 3 部分组成: *T. pyriformis* 金属硫蛋白 (*P-MTT1*) 启动子, 抗巴龙霉素基因 (*Pmr*) 编码区和部分 *T. pyriformis* β 微管蛋白 3' 非翻译区 (*BTU-3'*)

柱(250 mm×4.1 mm). 流动相由 1 mmol/L TBAOH、1 mmol/L NaH₂PO₄ 和 5% MeOH 配制而成, 稀硝酸或 NH₄OH 调整 pH 值为 5.8. 样品中砷的形态通过与标准样品 As(V), As(III), MMA(V)和 DMA(V)(中国科学院城市环境研究所朱永官研究员实验室提供)的保留时间相比较进行定性. 砷总量是由外部校准曲线同峰面积进行定量.

2 结果

2.1 砷暴露下 *T. corlissi* 与 *T. pyriformis* 24 h EC₅₀ 的比较

野生型 *T. corlissi* 和 *T. pyriformis* 两种四膜虫培养至对数期前期(~1.2×10⁵ cells/mL), 然后将其暴露于一系列不同浓度的 As(V)溶液, 通过流式细胞仪测取细胞密度来计算四膜虫的 24 h EC₅₀, 结果显示, 两种四膜虫在砷耐受性上有很大差异, *T. corlissi* 具有高的砷 EC₅₀ 值, 达到 110.7 μg/mL, 较 *T. pyriformis* 的 35.48 μg/mL 高 3 倍之多, 而且相较其他水生动植物也显示出很高的砷耐受性, 是它们的 8~130 倍(表 3), 这说明 *T. corlissi* 内可能存在特定的砷耐受机制.

2.2 *T. corlissi* *ArsM* 基因的克隆与表达

根据 *T. pyriformis* *ArsM* 基因设计的引物在 *T. corlissi* 中进行 PCR 扩增, PCR 反应产物在琼脂糖凝胶上进行电泳检测, 如图 2 所示, 扩增得到一条特异性 DNA 片段, 大小约为 1 kb, 测序后与已报道的 *T. pyriformis* 中 *ArsM* 基因比较显示两者的核酸序列一致性为 79.73%(网络版附图 1A), 氨基酸序列一致性为 80.06%, 通过 InterPro(<http://www.ebi.ac.uk/interpro/search/sequence-search>)预测了 *ArsM* 基因的保守结构域, 其序列一致性高达 86.98%(网络版附图

1B), 说明 *T. corlissi* 基因组中包含了 *ArsM* 基因; 进而对该目的基因在无砷处理下和砷暴露下的 RT-PCR 的 PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳检测(图 2), 分别得到与所设计片段大小相同的特异性的 200 bp DNA 片段, 结果表明, 在无砷暴露下和砷暴露下 *T. corlissi* 的 *ArsM* 基因都是表达的, 说明该基因属于组成型表达基因.

2.3 HPLC-ICP-MS 对四膜虫细胞内砷形态的分析

将野生型 *T. corlissi*, *T. corlissi*-Δ*ArsM* 和 *T. pyriformis* 用各自 EC₅₀ 浓度的砷暴露处理 24 h, 随后采用 HPLC-ICP-MS 分析四膜虫细胞内砷的形态及含量, 检测结果如图 3. 结果表明, 野生型 *T. corlissi* 细胞内检测到 As(V), As(III), MMA 和 DMA 4 种形态砷, 而 *T. corlissi*-Δ*ArsM* 细胞内只检测到 As(V)和 As(III)两种无机砷(图 3A), 说明敲除 *ArsM* 基因的 *T. corlissi* 细胞株不具备将无机砷进行甲基化的能力,

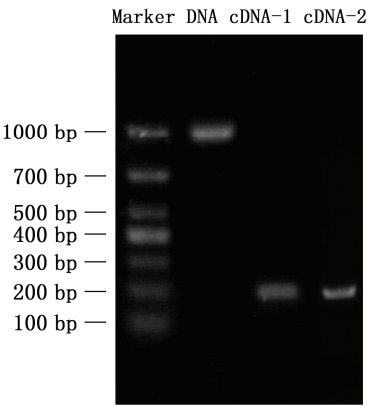


图 2 *T. corlissi**ArsM* PCR 鉴定结果
DNA 表示为 *T. corlissi* 的总 DNA; cDNA-1 表示为 *T. corlissi* 在砷暴露下合成的 cDNA; cDNA-2 表示为 *T. corlissi* 在无砷暴露下合成的 cDNA

表 3 砷暴露下不同生物的半数效应浓度(EC₅₀)

物种名称/文献	砷试剂	暴露时间(h)	效应指标	EC ₅₀ (μg/mL)
柯立斯四膜虫(<i>Tetrahymena corlissi</i>)(本研究)	Na ₃ AsO ₄ · 12H ₂ O	24	生长率	110.70
梨形四膜虫(<i>Tetrahymena pyriformis</i>)(本研究)	Na ₃ AsO ₄ · 12H ₂ O	24	生长率	35.48
绿海胆(<i>Lytechinus variegatus</i>) ^[19]	Na ₂ (AsHO ₄) · 7H ₂ O	24	致死率	1.33
长额象鼻蚤(<i>Bosmina longirostris</i>) ^[20]	Na ₂ (AsHO ₄) · 7H ₂ O	96	静止数	0.85
大型溞(<i>Daphnia magna</i>) ^[19]	Na ₂ (AsHO ₄) · 7H ₂ O	48	静止数	1.13
中肋骨条藻(<i>Skeletonema costatum</i>) ^[19]	Na ₂ (AsHO ₄) · 7H ₂ O	72	生长重量	4.46
黑藻(<i>Hydrilla verticillata</i>) ^[21]	Na ₃ AsO ₄ · 12H ₂ O	96	茎伸长量	5.22
绿球藻(<i>Chlorococcum littorale</i>) ^[22]	As(V)	72	生长率	5.50
紫背浮萍(<i>Spirodela polyrrhiza</i> L.) ^[23]	As(V)	168	生长量	13.6245±1.509

即 *ArsM* 是 *T. corlissi* 甲基化砷的分子基础。同时, 在野生型 *T. corlissi* 和 *T. pyriformis* 细胞内均检测到 As(V), As(III), MMA 和 DMA 4 种形态砷(图 3B), 但是它们的含量却存在明显差异, *T. corlissi* 细胞内 4 种形态砷的含量皆大于 *T. pyriformis*, 并且两者细胞内无机砷含量均表现为 As(III)>As(V), 有机砷为 DMA>MMA(图 3B); 进而对单位时间内 *ArsM* 催化生成甲基化砷(MMA, DMA)的含量进行比较, 发现 *T. corlissi* *ArsM* 每小时催化无机砷生成 MMA 和 DMA 的量分别是 *T. pyriformis* 的 15 倍和 3 倍(图 3C), 说明 *T. corlissi* *ArsM* 甲基化砷的效率高于 *T. pyriformis*, 即 *T. corlissi* 具有更高的将无机砷转化成甲基化砷的效率。

3 讨论

环境中的砷主要以毒性高的无机态形式溶解在水中, 造成了水体砷污染的问题。水体中的动植物

表现出不同程度的砷耐受能力, 例如, 水生植物紫背浮萍在 As(V) 的暴露下, 通过测定植物的生长量得到其 EC_{50} 为 $(13.6245 \pm 1.509) \mu\text{g/mL}$ ^[23]; 水生动物长额象鼻蚤经 As(V) 的暴露后, 通过计算虫体的静止个数得到其 EC_{50} 为 $0.85 \mu\text{g/mL}$ ^[20]。本研究的 *T. corlissi* EC_{50} 为 $110.7 \mu\text{g/mL}$, 与已报道的水体环境中不同生物在 As(V) 暴露下的 EC_{50} 进行比较, 发现 *T. corlissi* 的耐砷能力明显高于水生动植物, 并且比其同属的 *T. pyriformis* 高 3 倍之多(表 2), 表明 *T. corlissi* 具有高砷的耐受能力, 这可能与其体内存在高效的砷解毒机制有关。

生物体具有将高毒性无机砷转化成低毒性有机砷的能力, 而在此代谢过程中的关键酶——*ArsM* 发挥了重要作用。 *ArsM* 可将无机态的砷甲基化生成有机态的 MMA(III), MMA(V), DMA(III), TMA(III)或 TMAO 等一系列甲基产物^[3,12]。目前在人类、黑猩猩(*Pan troglodytes*)、牛(*Bos taurus*)、褐家鼠(*Rattus norvegicus*)、小鼠、原鸡(*Gallus gallus*)、紫色球海胆

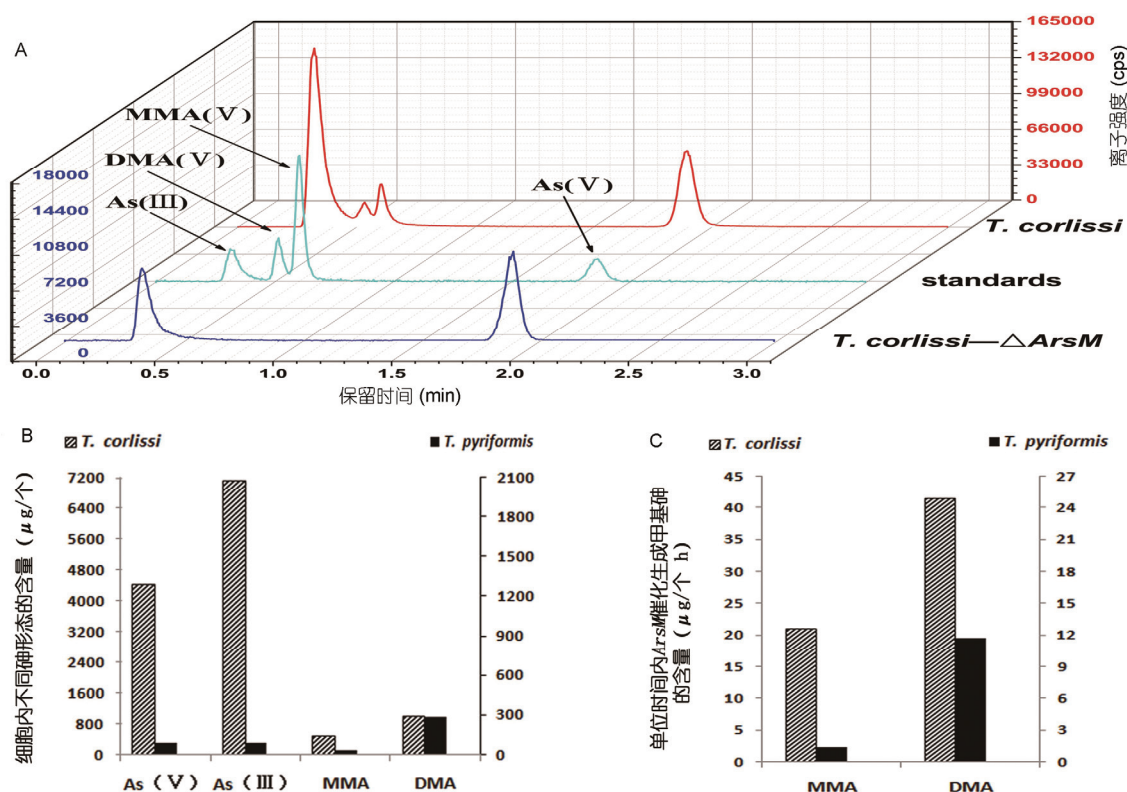


图 3 *T. corlissi*, *T. corlissi-ΔArsM* 和 *T. pyriformis* 细胞内砷形态的检测结果

A: HPLC-ICP-MS 分析 *T. corlissi* 和 *T. corlissi-ΔArsM* 细胞内不同砷形态; B: *T. corlissi* 和 *T. pyriformis* 细胞内不同砷形态的含量; C: *T. corlissi* 和 *T. pyriformis* 单位时间内 *ArsM* 催化生成甲基砷的含量

(*Strongylocentrotus purpuratus*)等生物体中都有发现 *ArsM*. *ArsM* 在生物进化中高度保守, 无论是高等的哺乳动物黑猩猩, 还是低等的水生植物红藻, 它们的 *ArsM* 的氨基酸序列一致性达到 42%, 而总体的相似度高达 60%, 且都有共同的甲基转移酶保守结构域^[3,12]. 基于 *T. corlissi* 比 *T. pyriformis* 表现出更高的砷耐受性, 进而根据 *T. pyriformis* 含有 *ArsM* 这一特性, 在 *T. corlissi* 中克隆到了 *ArsM* 基因, 说明 *T. corlissi* 基因组中含有 *ArsM* 基因. 通过 InterPro 预测了 *ArsM* 基因的保守结构域, 发现 *T. corlissi* *ArsM* 基因上也具有保守的甲基转移酶结构域, 并且两种四膜虫 *ArsM* 的保守结构域的氨基酸序列一致性高达 86.98%. RT-PCR 结果显示, *T. corlissi* *ArsM* 基因在无砷暴露下和砷暴露下都是有表达的, 说明 *T. corlissi* 中 *ArsM* 基因是属于组成型表达基因. 有研究表明, Lin 等人^[7]在对大鼠肝细胞中的 *ArsM* 基因表达特征分析后, 认为 *ArsM* 是一个组成型表达基因; Thomas 等人^[24]的研究中也认为玻璃海鞘中的 *ArsM* 基因属于组成型表达基因. 因此, *T. corlissi* 可能通过该基因将无机砷转化成有机砷来解毒, 从而表现出超高砷的耐受性.

与大多数纤毛虫一样, 四膜虫具有核二态性, 小核是生殖核, 二倍体, 在营养生长阶段不表达; 大核是由小核发育而来, 也称营养核, 多倍体, 具有转录活性. 其在无性生殖阶段, 小核进行有丝分裂, 而大核进行无丝分裂, 此时仅有大核的染色体具有转录活性. 四膜虫已建立起一系列成熟的基因重组等分子遗传学操作方法和技术, 使得在四膜虫中进行基因敲除十分方便, 通过敲除大核染色体的基因, 即可观察到四膜虫缺乏该基因所产生的表型. 因此, 为了分析 *T. corlissi* *ArsM* 基因功能与甲基化砷作用之间的关系, 研究构建了 *ArsM* 基因的敲除载体, 通过同源重组获得 *T. corlissi-ΔArsM* 细胞株. 将野生型 *T. corlissi* 和 *T. corlissi-ΔArsM* 细胞株暴露于 As(V) 环境中, HPLC-ICP-MS 检测结果显示, 对照组野生型 *T. corlissi* 细胞内含有 As(V), As(III), MMA 和 DMA 4 种形态砷; 而 *T. corlissi-ΔArsM* 细胞内只存在 As(V) 和 As(III) 两种无机砷, 与野生型相比缺少 MMA 和 DMA 这两种有机砷. 说明 *T. corlissi* 大核染色体上的 *ArsM* 基因功能是将无机砷甲基化成有机砷. 由于 *ArsM* 可将毒性高的无机砷转化成毒性低的有机砷, 直接降低了砷的毒性, 从而间接地提高生物对砷的

耐受性. 因此, 具有 *ArsM* 是生物高砷耐受性的重要途径之一.

同时, 将 *T. corlissi* 和 *T. pyriformis* 以各自 EC₅₀ 值的砷浓度暴露处理 24 h, 使两种四膜虫处于相同的砷毒性胁迫环境, 通过 HPLC-ICP-MS 方法对其细胞内砷形态进行定性和定量的分析. 结果显示, 在 *T. corlissi* 和 *T. pyriformis* 细胞内均检测到 As(V), As(III), MMA 和 DMA 4 种形态砷, 由于在环境中只加入了 As(V), 说明生物体是吸收环境中的 As(V) 进入细胞内才开始砷的生物转化过程. 前期研究表明, 进入生物体的 As(V) 首先被酶促反应或非酶促反应还原成 As(III), 进而 As(III) 在 *ArsM* 的催化下生成 MMA, 再进一步被甲基化为 DMA. 结果分析发现, *T. corlissi* 细胞内 4 种砷形态的含量均大于 *T. pyriformis*, 并且两者细胞内砷形态含量均表现为 As(III) > As(V), DMA > MMA. 由于进入细胞内的 As(V) 必须被还原成 As(III) 才能作为 *ArsM* 的反应底物进行甲基化反应, 而 As(III) 的甲基化促进了 As(V) 更多地还原成 As(III), 有利于甲基化反应的顺利进行, 因此, 两种四膜虫细胞内 As(III) 含量高于 As(V). 本研究只检测到 MMA 和 DMA 两种甲基化砷, MMA 由 As(III) 甲基化生成的同时也会被甲基化成 DMA, 而 DMA 的含量在细胞内一直积累, 则认为 DMA 是甲基化反应的主要产物, 所以两种四膜虫细胞内 DMA 含量高于 MMA. 此外, *T. corlissi* *ArsM* 在单位时间内催化无机砷生成 MMA 和 DMA 的量分别是 *T. pyriformis* 的 15 倍和 3 倍, 说明 *T. corlissi* *ArsM* 甲基化砷的效率高于 *T. pyriformis*. 由于 *T. corlissi* 具有更为高效的砷甲基化能力, 因此可以更多地将毒性高的 As(III) 催化生成毒性低的小 MMA, 再催化 MMA 生成 DMA, 另外 As(III) 的消耗会促进更多 As(V) 被还原, 从而进一步促进细胞对环境中 As(V) 的吸收, 因此, *T. corlissi* 细胞内不仅 MMA 和 DMA 的含量均大于 *T. pyriformis*, 而且也由于更多有机砷的生成促进了无机砷的吸收使其 As(V) 和 As(III) 含量也大于 *T. pyriformis*. 那么, *T. corlissi* 具有表达活性的 *ArsM* 并能高效甲基化砷就是其具有超高的砷耐受性的分子基础. 但是, 就目前的实验结果还无法区别 *T. corlissi* 的这种高效甲基化砷的能力是由于其 *ArsM* 基因的表达量高, 还是 *ArsM* 的酶活力高. 一方面推测 *T. corlissi* 在砷的暴露下, 其 *ArsM* 基因在转录水平上生成更多的 mRNA 造成的和翻译出更多的 *ArsM*, 从

而更高效甲基化砷; 另一方面, 也可能是 *T. corlissi* 的 ArsM 与 *T. pyriformis* 及其他生物的 ArsM 在结构上有所差异, 存在某些与提高酶活性相关的特殊结构域或氨基酸位点. 这些都需要在未来的工作中深入研究.

本文进行了原生动动物 *T. corlissi* 超高砷耐受性的研究, 发现 *T. corlissi* 是一种高能力耐砷和高效甲基化砷的原生动动物. *T. corlissi* 这种高效地将毒性高的无

机砷转化成毒性低的有机砷的分子机制不仅可以提高自身对砷的耐受能力, 也可以缓解环境中砷污染的压力. 因此, 寻找自然环境中更多具有 *ArsM* 基因且高效甲基化砷的原生动动物, 具有十分重要的科研意义和潜在的应用价值. 而原生动动物是生物界中成员丰富、遗传多样性的生物类群, 这也提供了更多有待挖掘的与污染物生物治理相关的原生动动物遗传资源.

参考文献

- 1 Rodriguez-Lado L, Sun G, Berg M, et al. Groundwater arsenic contamination throughout China. *Science*, 2013, 341: 866–868
- 2 Li G, Sun G X, Williams P N, et al. Inorganic arsenic in Chinese food and its cancer risk. *Environ Inter*, 2011, 37: 1219–1225
- 3 Bentley R, Chasteen T G. Microbial methylation of metalloids: arsenic, antimony, and bismuth. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2002, 66: 250–271
- 4 Meharg A A, Hartley-Whitaker J. Arsenic uptake and metabolism in arsenic resistant and nonresistant plant species. *New Phytol*, 2002, 154: 29–43
- 5 Ye J, Rensing C, Rosen B P, et al. Arsenic biomethylation by photosynthetic organisms. *Trends Plant Sci*, 2012, 17: 155–162
- 6 Song X L, Geng Z R, Zhu J S, et al. Structure-function roles of four cysteine residues in the human arsenic (+3 oxidation state) methyltransferase (hAS3MT) by site-directed mutagenesis. *Chem Biol Interact*, 2009, 179: 321–328
- 7 Lin S, Shi Q, Nix F B, et al. A novel S-adenosyl-L-methionine: arsenic(III) methyltransferase from rat liver cytosol. *J Biol Chem*, 2002, 277: 10795–10803
- 8 Ajees A A, Marapakala K, Packianathan C, et al. Structure of an As(III) S-adenosylmethionine methyltransferase: insights into the mechanism of arsenic biotransformation. *Biochemistry*, 2012, 51: 5476–5485
- 9 Hamdi M, Yoshinaga M, Packianathan C, et al. Identification of an S-adenosylmethionine (SAM) dependent arsenic methyltransferase in *Danio rerio*. *Toxicol Appl Pharm*, 2012, 262: 185–193
- 10 Thomas D J, Waters S B, Styblo M. Elucidating the pathway for arsenic methylation. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2004, 198: 319–326
- 11 Dheeman D S, Packianathan C, Pillai J K, et al. Pathway of human AS3MT arsenic methylation. *Chem Res Toxicol*, 2014, 27: 1979–1989
- 12 Challenger F. Biological methylation. *Adv Enzymol Rel S Bi*, 1951, 12: 429–491
- 13 Fenchel T. Ecology of Protozoa: the Biology of Free-Living Phagotrophic Protists. Madison: Science Tech Publishers, 1987
- 14 傅诚杰, 俞婷, 缪炜, 等. 四膜虫: 毒理学与生态毒理学研究中的优良模式生物. *动物学杂志*, 2005, 40: 108–113
- 15 Zhang Y Y, Yang J, Yin X X, et al. Arsenate toxicity and stress responses in the freshwater ciliate *Tetrahymena pyriformis*. *Eur J Protistol*, 2012, 48: 227–236
- 16 Yin X X, Zhang Y Y, Yang J, et al. Rapid biotransformation of arsenic by a model protozoan *Tetrahymena thermophila*. *Environ Pollut*, 2011, 159: 837–840
- 17 Ye J, Chang Y, Yan Y, et al. Identification and characterization of the arsenite methyltransferase from a protozoan, *Tetrahymena pyriformis*. *Aquatic Toxicol*, 2014, 149: 50–57
- 18 Gorovsky M A, Yao M C, Keevert J B, et al. Isolation of micro- and macronuclei of *Tetrahymena pyriformis*. *Methods Cell Biol*, 1975, 9: 311–327
- 19 Taylor A, Branch S, Day M P, et al. Atomic spectrometry update. Clinical and biological materials, foods and beverages. *J Anal Atom Spectrom*, 2006, 21: 439–491
- 20 Passino D R M, Novak A J. Toxicity of arsenate and DDT to the cladoceran *Bosmina longirostris*. *Bull Environ Contam Toxicol*, 1984, 33: 325–329
- 21 薛培英, 颜昌宙, 曹英兰, 等. 铜、砷单一及复合污染对黑藻的毒性效应. *环境科学研究*, 2011, 24: 1052–1058
- 22 Satoh A, Vudikaria L Q, Kurano N, et al. Evaluation of the sensitivity of marine microalgal strains to the heavy metals, Cu, As, Sb, Pb and Cd. *Environ Inter*, 2005, 31: 713–722
- 23 Zhang X, Hu Y, Liu Y X, et al. Arsenic uptake, accumulation and phytofiltration by duckweed (*Spirodela polyrrhiza* L.). *J Environ Sci*

China, 2011, 23: 601–606

- 24 Thomas D J, Nava G M, Cai S Y, et al. Arsenic (+3 oxidation state) methyltransferase and the methylation of arsenicals in the invertebrate chordate *Ciona intestinalis*. *Toxicol Sci*, 2010, 113: 70–76

Molecular Mechanism of High Tolerance to Arsenic in a Protozoan, *Tetrahymena corlissi*

WEI Wei¹, YUAN DongXia², YANG WenTao², ZHANG Jing², CHEN Ying¹
& MIAO Wei²

1 College of Life Science and Technology, Harbin Normal University, Harbin 150025, China;

2 Key Laboratory of Aquatic Biodiversity and Conservation, Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072, China

In this study, the half maximum effective concentrations (EC₅₀) of *Tetrahymena*, under 24 h arsenic exposure, were measured by detecting cell density using flow cytometry. The EC₅₀ of *T. corlissi* is 110.7 ug/mL, which is three times that of *T. pyriformis*. The arsenite methyltransferase gene (*ArsM*) was cloned in *T. corlissi*, and expressed under arsenic exposure. The arsenic speciation analysis *in vivo* by HPLC-ICP-MS showed that *T. corlissi* has a much greater ability to methylate arsenic than does *T. pyriformis*. Also *ArsM* knock-out *T. corlissi* lost the ability to methylate arsenic. This indicated that the more effective *ArsM* of *T. corlissi* could result in its high tolerance to arsenic.

arsenic, *Tetrahymena*, arsenite methyltransferase

doi: 10.1360/N052015-00323