

琼胶寡糖诱导坛紫菜活性氧爆发

朱竹君, 陈海敏*, 骆其君, 杨 锐, 严小军, 王秀娟, 何 山

(宁波大学应用海洋生物技术教育部重点实验室, 浙江 宁波 315211)

摘要: 研究了琼胶寡糖诱导坛紫菜氧爆发的响应及其活性氧产生的位点。用琼胶寡糖诱导坛紫菜, 以微呼吸测量系统检测坛紫菜氧消耗的变化; 以对羟基苯乙酸(POHPAA)化学发光法检测坛紫菜的 H_2O_2 释放量; 利用 DCFH-DA 染色观察活性氧在细胞上的定位; 并利用实时定量 PCR 检测坛紫菜 NADPH 氧化酶基因 *Phrboh* 的差异表达; 通过 2-AMAC 标记琼胶寡糖, 观察其在坛紫菜的结合部位。结果显示, 100 $\mu\text{g/mL}$ 琼胶寡糖处理坛紫菜, 出现两次呼吸爆发, 分别在 4 min 和 10 min 左右, 强度分别是基础呼吸的 4 倍和 14.1 倍; 5 min 内出现 H_2O_2 的积累, 15 min 达到峰值, 比对照组高出近 10 倍。10 $\mu\text{mol/L}$ DPI 可部分抑制 H_2O_2 的产生。3 min 内 *Phrboh* 的表达已上调, 并持续近 10 min。DCFH-DA 染色显示, 活性氧主要产生在膜系统上。荧光标记琼胶寡糖的定位发现, 坛紫菜细胞膜上存在琼胶寡糖的结合位点。综上所述, 琼胶寡糖能识别细胞膜上的结合位点, 并诱导坛紫菜膜系统上的 H_2O_2 爆发, H_2O_2 的产生与 NADPH 氧化酶相关。

关键词: 坛紫菜; 琼胶寡糖; 活性氧爆发; NADPH 氧化酶

中图分类号: Q 591.9; S 917

文献标志码: A

在宿主与病原菌相互作用中, 识别是宿主遭受攻击时的最初反应, 包括对外源信号(来自于病原菌等)和内源信号(来自于宿主自身的降解物)的识别。这类信号分子被统称为激发子, 包括寡糖、LPS、鞭毛蛋白等。激发子的识别发生在宿主细胞的表面或胞浆中, 之后伴随氧化爆发, 产生活性氧的释放和积累, 而这与质膜定位的 NAD(P)H 氧化酶或非原生质体氧化酶相关^[1]。产生的活性氧既可以作为直接的杀菌物质, 又可以作为下游抗性相关反应的信号分子。氧化爆发已被证实是普遍存在于动植物防御反应中的一个早期特征性反应。

目前, 藻类学家在研究海藻的防御体系时发现寡糖是一类重要的激发子。如 Küpper 等^[2]报道褐藻胶寡糖能诱导掌状海带(*Laminariales digitata*)产生氧爆发, 显著地增强其抵御内生植物 *Laminariocolax tomentosoides* 侵染的能力。Küpper

等^[3]人用藻酸寡糖处理掌状海带的幼孢子体细胞, 发现能激发其呼吸氧爆发, 而 NADPH 氧化酶不可逆抑制剂 DPI 能够抑制掌状海带孢子体对寡糖的氧爆发响应。Potin 等^[4]和 Weinberger 等^[5-6]报道, 在龙须菜(*Chondrus crispus*)的配子体受到其寄生绿藻 *Acrochaete operculata* 攻击时, 能释放大量的 H_2O_2 , 当释放量达到 100 $\mu\text{mol/L}$ 时, 能有效诱导 *A. operculata* 的死亡。综上所述, 在藻类防御体系上, 氧化爆发是普遍存在的一个初始反应。

紫菜是亚洲地区重要的经济海藻。在养殖中, 紫菜会遭受病原菌的攻击, 有时会导致紫菜病害的发生^[7], 主要与紫菜的防御系统密切相关。紫菜的细胞壁是其遭受病原菌攻击时的第一道防线, 它以琼胶为主要骨架, 其上结合了硫酸基、酮酸基等多种基团。当紫菜受到琼胶降解菌等病原菌侵染时, 细胞壁会被降解成大小、结构不一的碎片。这

收稿日期: 2011-12-18

修回日期: 2012-03-09

资助项目: 宁波市创新团队(2011B81007); 宁波市自然科学基金(2010A610028); 浙江省自然科学基金(Y5100066)

通讯作者: 陈海敏, E-mail: chenhaiamin@nbu.edu.cn

些碎片很可能作为一种信号来激发紫菜自身的防御反应。但由于这些碎片存在着大小和结构的多样性,推测紫菜细胞很可能是以琼胶骨架为识别对象的。本研究以琼胶寡糖为激发子,研究其诱导坛紫菜(*Porphyra haitanensis*)氧爆发响应的能力,为寡糖激发紫菜防御反应提供基础理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料和试剂

坛紫菜叶状体,采自象山坛紫菜养殖场。实验前,先用无菌海水清洗 2~3 次,0.7% KI(w/v)杀菌 5~10 min,20 °C 下活化 24~48 h。

琼胶寡糖,由本实验室自制,聚合度 2~10。

RNAiso Plus 试剂盒,PrimeScript RT reagent Kit Perfect Real Time 试剂盒,SYBR Premix Ex Taq™ II(Perfect Real Time)试剂盒均购自 TaKaRa 公司。

1.2 方法

坛紫菜氧消耗检测 100 μg/mL 琼胶寡糖处理坛紫菜,用微呼吸测量系统(Unisense PA2000)检测培养液的实时溶氧量。再计算坛紫菜的呼吸速率,用 $R(\text{nmol/g}\cdot\text{s})$ 表示。

$$R = \Delta \text{CO}_2 \cdot V / (m \cdot \Delta t)$$

式中, Δt 表示两点实时溶氧量的时间间隔(s); ΔCO_2 表示在 Δt 内溶氧量的变化($\mu\text{mol/L}$); V 表示培养液总体积(μL); m 表示坛紫菜叶片鲜重(mg)。

$$R' = (R_{\text{real}} - R_{\text{basal}}) / R_{\text{basal}}$$

式中, R' 表示相对呼吸速率; R_{real} 表示寡糖处理组的呼吸速率; R_{basal} 表示对照组的呼吸速率。

坛紫菜释放 H_2O_2 检测 以含 100 μg/mL 琼胶寡糖的海水培养液处理坛紫菜叶片 1 h(培养密度为 7 mg/mL)。各时间点取培养液,添加 POHPAA 混合剂(6.13 μmol/L POHPAA, 276.9 U/L POD, 8.6 mmol/L Tris-HCl, pH=8.8),避光反应 35 min 后检测吸光值(ex=313 nm, em=400 nm)。具体计算方法参照文献[8]。

坛紫菜原生质体的制备 坛紫菜原生质体按许星鸿等^[9]的方法制备。海螺酶提取自短滨螺(*Littorina brevicula*)。

DCFH-DA 染色观察坛紫菜细胞活性氧产生部位 坛紫菜用琼胶寡糖(100 μg/mL)避光处理 1 h 后,加入 DCFH-DA(50 μmol/L)和 POD(45

U/mL),避光染色 45 min 后在荧光显微镜下观察绿色荧光产生部位,即活性氧产生部位。

坛紫菜的 NADPH 氧化酶基因 *Phrboh* 差异表达检测 100 μg/mL 琼胶寡糖处理坛紫菜,在各时间点采集叶片,提取总 RNA。反转录成 cDNA 后进行实时定量 PCR 检测。以藻类 NADPH 氧化酶类似物保守区为模板,设计 *Phrboh* 定量正向引物: 5'-TGCCGCTCAAGACGACCTA-3'; 反向引物: 5'-CACCCACCACAGACCCAGA-3', 扩增 90 bp 片段。以 18S 为参照基因,正向引物: 5'-AGTTAGGG-GATCGAAGACGA-3', 反向引物: 5'-CAGCCTTG-CGACCATACTC-3'。两基因同一程序下进行扩增: holding, 95 °C 3 min; 循环, 95 °C 10 s, 58 °C 18 s, 72 °C 15 s, 40 循环; melting, 60~90 °C。用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法进行结果分析。

2-AMAC 荧光标记寡糖观察细胞上寡糖结合位点 2~4 mg 琼胶寡糖用 200 μL 1 mol/L NaCNBH 溶解,加入 200 μL 0.1 mol/L 2-AMAC[由 21 mg 2-AMAC 固体溶于 1 mL 冰醋酸和 DMSO 混合液($V:V=3:17$)中配成],避光,90 °C 水浴 30 min 后将反应管放入冰中终止反应,以四氢喹啉萃取未反应荧光剂,反复离心(12 500 r/min, 4 °C, 15 min)直至荧光没有为止。

将 100 μg/mL 荧光标记的琼胶寡糖避光处理紫菜 30 min,在荧光显微镜下观察荧光部位,即寡糖结合位点。

数据分析 数据以 $\bar{x} \pm \text{SD}$ 表示, $n=3$ 。用 (One-Way ANOVA) 单因素方差分析方法进行统计分析。

2 结果

2.1 琼胶寡糖诱导坛紫菜 H_2O_2 爆发

100 μg/mL 琼胶寡糖处理 5 min 后,检测到坛紫菜迅速释放 H_2O_2 (图 1)。在 15 min 时, H_2O_2 释放量达到峰值(102.1 ± 6.82) nmol/L, 比对照组高出近 10 倍。单因素方差分析表明,琼胶寡糖诱导 15 min 时,对坛紫菜产生 H_2O_2 爆发有高度显著的影响($P < 0.01$)。用 10 nmol/L 的 DPI 预处理坛紫菜,再用琼胶寡糖诱导, H_2O_2 的积累浓度有所降低,峰值为(57.37 ± 14.62) nmol/L,说明坛紫菜产生 H_2O_2 与 NADPH 氧化酶存在一定相关性。

2.2 琼胶寡糖诱导下坛紫菜呼吸氧消耗

在 100 μg/mL 琼胶寡糖处理坛紫菜 4 min 左右, 检测到坛紫菜出现一个氧呼吸爆发, 持续约 1.5 min, 最高值为基础呼吸的 4 倍, 随后坛紫菜呼吸速率恢复正常。但在糖处理 10 min 左右可观察到一个更大的氧呼吸爆发, 同样持续近 1.5 min, 最高可达基础呼吸的 14.1 倍(图 2)。

2.3 DCFH-DA 染色观察坛紫菜细胞活性氧产生部位

100 μg/mL 琼胶寡糖诱导下, 可在坛紫菜的细胞外周观察到活性氧产生, 并且也能看到细胞内点状的荧光信号(图 3-b), 荧光细胞比例可达到 37.9%±6.5%。对坛紫菜细胞原生质体进行相同的处理, 同样在原生质体的外周和胞内看到荧光信号(图 3-d)。故推测坛紫菜受琼胶寡糖激发, 在细胞膜及一些内膜系统上产生了活性氧爆发。

2.4 琼胶寡糖诱导坛紫菜 NADPH 氧化酶 *Phrboh* 差异表达

100 μg/mL 琼胶粗糖处理坛紫菜 3 min, *Phrboh* 已出现表达上调, 比正常水平上调约 1.73 倍, 并且 12 min 内 *Phrboh* 一直处于上调。在 15 min 时, *Phrboh* 恢复到正常表达水平(图 4)。

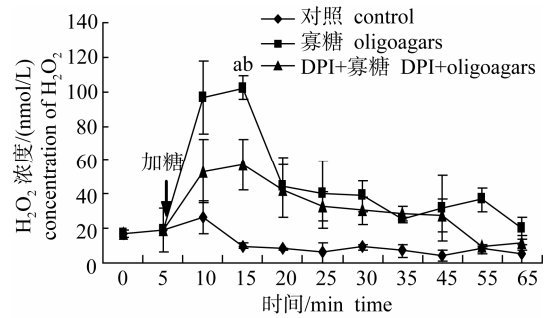


图 1 100 μg/mL 琼胶寡糖诱导坛紫菜 H₂O₂ 爆发 ab 表示有高度显著性差异, P<0.01

Fig. 1 H₂O₂ burst in *P. haitanensis* induced by 100 μg/mL oligoagars ab means highly significant difference, P<0.01

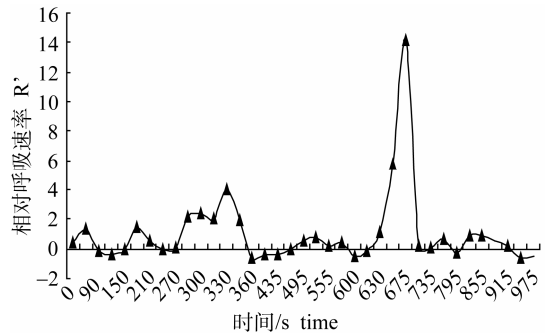


图 2 100 μg/mL 琼胶寡糖诱导坛紫菜相对呼吸速率的变化

Fig. 2 Relative respiratory rate of *P. haitanensis* challenged by 100 μg/mL oligoagars

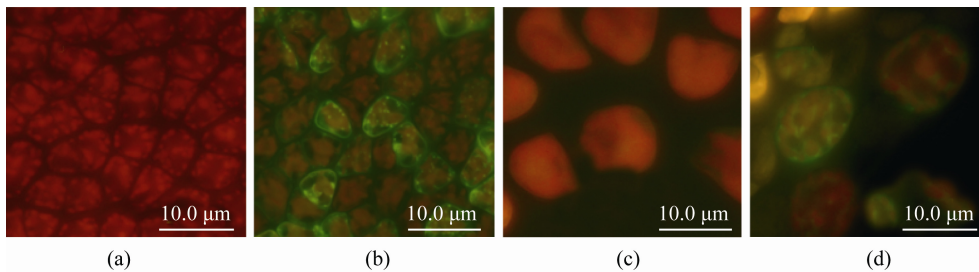


图 3 100 μg/mL 琼胶粗糖诱导下坛紫菜细胞活性氧产生部位

a, b 为非原生质体, a 为对照组, b 为实验组; c, d 为原生质体, c 为对照组, d 为实验组。

Fig. 3 The site of AOS in intact cells and protoplast of *P. haitanensis* challenged by 100 μg/mL oligoagars

a, b are non-protoplast, a is control group, b is test group; c, d are protoplast, c is control group, d is test group.

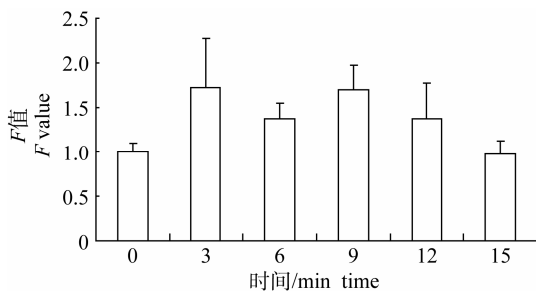


图 4 100 μg/mL 琼胶寡糖诱导下坛紫菜 *Phrboh* 的差异表达

Fig. 4 Expression level of *Phrboh* induced by 100 μg/mL oligoagars

2.5 2-AMAC 标记琼胶寡糖观察坛紫菜细胞上糖结合位点

2-AMAC 标记的琼胶寡糖(100 μg/mL)处理坛紫菜及其原生质体, 能观察到其细胞膜荧光信号(图 5-b, d), 说明在坛紫菜的细胞膜上存在琼胶寡糖的结合位点。

3 讨论

目前, 关于藻类活性氧产生的相关酶机制还存在争议, 主要观点: (1) 活性氧由质膜定位的

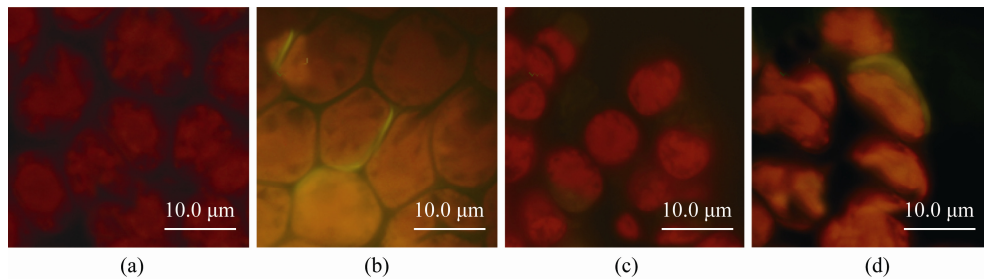


图 5 2-AMAC 标记的琼胶寡糖处理坛紫菜细胞

a, b 为非原生质体, a 为对照组, b 为实验组; c, d 为原生质体, c 为对照组, d 为实验组。

Fig. 5 The binding of intact cells and protoplast of *P. haitanensis* with 2-AMAC labelled oligogars

a, b are non-protoplast, a is control group, b is test group; c, d are protoplast, c is control group, d is test group.

NADPH 氧化酶生成; (2)由非原生质体氧化酶类产生 O_2^- 或 H_2O_2 ^[3]。Weinberger 等^[10]人发现在 *Gracilaria conferta* 中, 活性氧在质膜被激活, 推测 *G. conferta* 藻体上质膜定位的 NADPH 氧化酶对 H_2O_2 的释放有贡献。但 Weinberger 等^[11]在亚细胞水平上进行检测, 显示 *G. chilensis* 的 H_2O_2 在细胞壁释放。说明亲缘关系非常近的红藻对琼胶寡糖发展出了两种完全不同的反应来决定 H_2O_2 的产生。其中 *G. conferta* 激活定位在细胞膜的 NADPH 氧化酶样酶, 产生胞外 H_2O_2 , 并能直接作为生物杀灭剂。而在 *G. chilensis* 中, H_2O_2 的产生是由细胞壁定位的寡糖氧化酶作用的, 不涉及原生质体。实验中我们也观察到, 用 10 $\mu\text{mol/L}$ DPI 预处理坛紫菜后, 再以琼胶寡糖刺激, 仍有一定量的 H_2O_2 产生, 但强度降低了 1/2 左右。说明在坛紫菜中, 活性氧的产生除了与 NADPH 氧化酶相关外, 可能还涉及其它的氧化酶类。

近年来, 已有学者从 *Chondrus crispus*、条斑紫菜(*P. yezoensis*)等藻类中克隆到 NADPH 氧化酶类基因, 又称呼爆发氧化酶类似物基因, 如 *Ccrboh*、*Pyrboh*^[12]。本研究以这类基因的保守区设计定量引物, 分析发现在琼胶寡糖的诱导下, 坛紫菜的 *Phrboh* 表达上调, 且上调时间在 H_2O_2 爆发之前。说明在坛紫菜中, 琼胶寡糖能诱导 NADPH 氧化酶基因表达上调, 以增强酶活力, 进而参与活性氧的爆发。

紫菜等红藻在自然水域里生活时, 会经常遭受到诸如琼胶降解菌等病原菌的攻击。Weinberger 等^[10]曾报道琼胶寡糖诱导 *G. conferta* 产生的防御信号强到足以杀死藻体表面的附生菌。大约 60% 的附生菌群在藻体被激发后 60 min 内被消灭, 而大约 90% 的琼胶降解菌在藻体被激发后的 15 min

内被消灭。本研究结果显示, 这种防御信号很可能就是藻体产生的活性氧, 如释放到水体里的 H_2O_2 。因此推测, 藻体很可能是通过识别自身被降解的一些细胞壁寡糖碎片, 来调节自身的防御体系, 以维持自身的健康生长。

综上所述, 在坛紫菜的防御体系中, 寡糖作为信号分子能结合细胞膜上的相关位点, 在细胞膜上激发活性氧响应, 活性氧的产生很可能与膜定位的 NADPH 氧化酶类的参与有关。

参考文献:

- [1] Ebel J, Mithofer A. Early events in the elicitation of plant defence[J]. *Planta*, 1998, 206: 335–348.
- [2] Küpper F C, Müller D G, Peters A F, *et al.* Oligoalgal-ginate recognition and oxidative burst play a key role in natural and induced resistance of saprophytes of *Laminariales*[J]. *Journal of Chemical Ecology*, 2002, 28(10): 2057–2081.
- [3] Küpper F C, Kloareg B, Potin P, *et al.* Oligoguluronates elicit an oxidative burst in the brown algal kelp *Laminaria digitata*[J]. *Plant Physiology*, 2001, 125: 278–291.
- [4] Potin P, Bouarab K, Salaun J P, *et al.* Biotic interactions of marine algae [J]. *Current Opinion in Plant Biology*, 2002, 5(4): 308–317.
- [5] Weinberger F, Pohnert G, Kloareg B, *et al.* A signal released by an endophytic attacker acts as a substrate for a rapid defensive reaction of the red alga *Chondrus crispus*[J]. *Chemistry and Biochemistry*, 2002, 12: 1260–1263.
- [6] Weinberger F, Pohnert G, Berndt M L, *et al.* Apoplastic oxidation of L-asparagine is involved in the control of the green algal endophyte *Acrochaete operculata* Correa & Nielsen by the red seaweed *Chondrus crispus* Stackhouse[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2005, 56 (415): 1317–1326.
- [7] 闫咏, 马家海, 许璞, 等. 1 株引起条斑紫菜绿斑病的柠檬假交替单胞菌[J]. *中国水产科学*, 2002, 9(4): 353–358.

- [8] Miller W L, Kester D R. Hydrogen peroxide measurement in seawater by (*p*-Hydroxyphenyl) acetic acid dimerization[J]. Analytical Chemistry, 1988, 60: 2711–2715.
- [9] 许星鸿, 王萍, 赵素珍. 制备条斑紫菜原生质体的工具酶研究[J]. 淮海工学院学报:自然科学版, 2007, 16(3): 66–69.
- [10] Weinberger F, Friedlander M. Response of *Gracilaria conferta* (Rhodophyta) to oligoagars results in defense -against agar-degrading epiphytes[J]. Journal of Phycology, 2000, 36(6): 1079–1086.
- [11] Weinberger F, Leonardi P, Miravalles A, *et al.* Dissection of two distinct defense-related responses to agar oligosaccharides in *Gracilaria chilensis* (Rhodophyta) and *Gracilaria conferta* (Rhodophyta) [J]. Journal of Phycology, 2005, 41: 863–873.
- [12] Herve C, Tonon T, Boyen C, *et al.* NADPH oxidase in Eukaryotes: red alage provide new hints[J]. Current Genetic, 2006, 49: 190–204.

Oxidative burst in *Porphyra haitanensis* (Rhodophyta)

ZHU Zhu-jun, CHEN Hai-min*, LUO Qi-jun, YANG Rui, YAN Xiao-jun,
WANG Xiu-juan, HE Shan

(Marine Biotechnology Laboratory, Key Laboratory of Applied Marine Biotechnology,
Ministry of Education, Ningbo University, Ningbo 315211, China)

Abstract: Oligosaccharides could induce some physiological responses in algae to defend attacks from pathogens. One of the earliest responses induced by oligosaccharides was so-called oxidative burst. This study has surveyed the recognition and oxidative burst response of *Porphyra haitanensis* to agar-oligosaccharide. Oxygen consumption was detected by an oxygen electrode. H₂O₂ concentrations in the medium were determined by measuring the dimerization of (*p*-hydroxyphenyl) acetic acid. The elicited oxidative burst was observed by loading the *P. haitanensis* with redox-sensitive fluorescent probe dichlorohydrofluorescein (DCFH-DA). Gene expression level of NADPH oxidase (named *Phrbob*) was detected by real-time PCR. 2-AMAC labeled agar-oligosaccharides were used to research the binding of agar-oligosaccharide on algae. Results showed that two respiration peaks were observed after addition of 100 µg/mL agar-oligosaccharide in *P. haitanensis*. Fourfold increase occurred in the first respiration peak 4 minutes after the addition, and fourteen times higher in the second response 10 minutes after the exposure to agar-oligosaccharide. The accumulation of H₂O₂ in the culture medium was detected 5 minutes after challenged with agar-oligosaccharide. The concentration of H₂O₂ reached its peak after 15 minutes, which was nearly ten times higher than control. The gene expression level of NADPH oxidase in *P. haitanensis* was up-regulated 3 minutes after the addition of agar-oligosaccharide, suggesting that the synthesis of H₂O₂ was closely related to the activation of *Phrbob*. Based on the analyses of the fluorescence of redox-sensitive dye, activated oxygen species mainly accumulated around the plasma membrane. Under the fluorescent microscope, specific binding of 2-AMAC labeled agar-oligosaccharide on cell plasma membrane was also observed, which indicated that there was recognition site of agar-oligosaccharide on *P. haitanensis* plasma membrane. In summary, *P. haitanensis* could recognize agar-oligosaccharide and respond with oxidative burst which was associated with the activation of NADPH oxidase.

Key words: *Porphyra haitanensis*; agar-oligosaccharide; oxidative burst; NADPH oxidase

Corresponding author: CHEN Hai-min. E-mail: chenhaiamin@nbu.edu.cn