

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20180507002

http://www.ykxjz.cn/

张恒宇, 柳逸群, 葛源. 莱茵衣藻 type I metacaspase 基因克隆及其参与调控程序性细胞死亡研究. 渔业科学进展, 2019, 40(6): 131-137

Zhang HY, Liu YQ, Ge Y. Cloning of the metacase type I gene of *Chlamydomonas reinhardtii* and its involvement in the regulation of programmed cell death. Progress in Fishery Sciences, 2019, 40(6): 131-137

# 莱茵衣藻 type I metacaspase 基因克隆 及其参与调控程序性细胞死亡研究\*

张恒宇<sup>1</sup> 柳逸群<sup>2</sup> 葛源<sup>1①</sup>

(1. 中国海洋大学海洋生命学院 青岛 266003; 2. 中国海洋大学水产学院 青岛 266003)

**摘要** Metacaspase 是在原生动物、真菌和植物中发现的一种具有底物精氨酸/赖氨酸特异性的半胱氨酸蛋白酶。根据蛋白质结构特征可将 metcaspase 分为 type I 与 type II 两种类型, 均参与调控多种植物与原生动物程序性细胞死亡。本研究根据 GenBank 数据库莱茵衣藻 (*Chlamydomonas reinhardtii*) type I metacaspase 基因 (GenBank No. XM\_001696904) 序列, 采用巢式 PCR 克隆获取 type I metcaspase 基因开放阅读框 (ORF) 序列并命名为 CrMC1。CrMC1 ORF 全长 987 bp, 推测编码 1 个包含 405 个氨基酸的蛋白质。通过与已知物种 type I metacaspase 氨基酸序列进行同源序列比对发现, CrMC1 具有高度保守的 p20、p10、连接区结构域以及精氨酸、半胱氨酸活性中心位点。研究显示, 在 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的莱茵衣藻程序性细胞死亡过程中, CrMC1 表达量显著提高 ( $P < 0.05$ ), 2 h 后达到峰值, 3 h 时下降至对照组同一水平。结果表明, 莱茵衣藻 type I metacaspase 基因 CrMC1 参与 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的莱茵衣藻程序性细胞死亡调控。

**关键词** Metacaspase; 莱茵衣藻; 程序性细胞死亡

中图分类号 S9 文献标识码 A 文章编号 2095-9869(2019)06-0131-07

莱茵衣藻 (*Chlamydomonas reinhardtii*) 是绿藻门 (Chlorophyceae)、团藻目 (Volvocales)、衣藻属 (*Chlamydomonas*) 的一种单细胞真核微藻, 具有良好的环境适应能力、繁殖能力以及生长速率, 能在固体培养基上形成单藻落, 也可在液体中培养, 有“绿色酵母”之称 (谢传晓等, 2003; 孙晓梅等, 2004; 耿予欢等, 2007)。目前, 莱茵衣藻全基因组测序已经完成 (Merchant *et al.*, 2007), 已成功建立针对莱茵衣藻线粒体、叶绿体与细胞核基因组的遗传操作系统和 CRISPR/Cas9 介导的基因组精确编辑系统 (Greiner *et al.*,

2017)。此外, 目前已建立莱茵衣藻光合作用、呼吸作用、细胞分裂、养分吸收、辐射、紫外线和化学诱变下的基因组稳定性和适应性反应、耐重金属植物修复、盐度、水温、渗透压和氧化胁迫应激等重要生理过程研究的模型 (Harris, 2001; Hanikenne, 2003; Hema *et al.*, 2007; Dimova *et al.*, 2008)。因此, 莱茵衣藻已经成为藻类遗传学、生物化学和分子生物学研究的重要模式物种 (徐田枚, 2007; Harper, 1999; Wu *et al.*, 1997)。

植物程序性细胞死亡 (Programmed cell death) 是指与动物细胞凋亡 (Apoptosis) 同源的植物细胞死亡

\* 863 计划生物医药领域青年科学家专项基金 (2015AA020903) 和青岛市科技计划基础研究项目 (13-1-4-253-jch) 共同资助 [This work was supported by China National High-Tech Research and Development Programme (863 Programme) (2015AA020903), and Qingdao Municipal Science and Technology Project Basic Science Research Programme (13-1-4-253-jch)]. 张恒宇, E-mail: 854636605@qq.com

① 通讯作者: 葛源, E-mail: geyuan@ouc.edu.cn

收稿日期: 2018-05-07, 收修改稿日期: 2018-05-17

方式,普遍存在于植物发育和应对病原感染、干旱等生物或非生物胁迫过程中(Reape *et al*, 2008)。然而,动物细胞凋亡通路中关键调控与执行基因家族胱冬肽酶(Cysteine aspartic acid specific protease, caspase)家族在植物中并不存在(van Doorn *et al*, 2005; Ge *et al*, 2016)。研究表明,植物中存在一种 caspase 同系蛋白 metacaspase。Metacaspase 是非后生动物完成正常生理学反应所必需的多功能蛋白酶,且植物和原生动物中氧化应激诱导的程序性细胞死亡过程都依赖于 metacaspase(Vercammen *et al*, 2007)。根据其结构特征, metacaspase 又可以分为 type I 与 type II 两类(马聪等, 2012)。其中, type I metacaspase 具有富含脯氨酸重复基序的 N 末端前结构域,并且包含锌指结构。而 type II metacaspase 缺乏前结构域,但在大(p20)、小(p10)亚基之间具有较长连接区。在原生动物和真菌中,目前仅发现了 type I metacaspase,而高等植物基因组中同时具有 type I 与 type II metacaspase。Metacaspase 活性中心普遍具有保守的组氨酸-半胱氨酸结构,其中半胱氨酸残基作为水解底物肽键的亲核体。

近年的研究表明,单细胞藻类在生物和非生物胁迫条件下,亦可发生程序性细胞死亡。莱茵衣藻经被用于程序性细胞死亡研究,并获得了成功(Moharikar *et al*, 2006; Zuo *et al*, 2012; Pérezpérez *et al*, 2010; Yordanova *et al*, 2013; Sirisha *et al*, 2014)。全基因组序列预测显示,莱茵衣藻基因组中同时存在 type I 与 type II metacaspase 基因,其结构与功能尚不明确。本研究通过巢式 PCR 克隆获得莱茵衣藻 type I metacaspase ORF 序列,利用生物信息学技术预测其氨基酸序列并进行同源性分析,继而利用荧光定量 PCR 技术分析 type I metacaspase 基因在 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的莱茵衣藻程序性细胞死亡过程中的表达量变化。本研究为更好地阐明植物与微藻程序性细胞死亡的分子机制及其生物演化关系提供理论依据,同时为高品质微藻藻种选育和微藻增殖工业及应用(何舟等, 2015; 乔洪金等, 2016)提供技术支持。

## 1 材料与方 法

### 1.1 藻种培养

野生型莱茵衣藻藻种 cc-125 mt+购自美国明尼苏达大学莱茵衣藻种质库(Chlamycollection, University of Minnesota, 美国)。藻种接种至含 100 μmol/L 氮苜青霉素的固体 TAP 培养基平板,挑取单克隆接种于液体 TAP 培养基中,置于 25℃、光照强度 2000 lx

的光照培养箱振荡培养(100 r/min)至对数生长期(OD<sub>434 nm</sub>=1),光/暗周期为 12 h/12 h。

### 1.2 莱茵衣藻总 RNA 提取与 cDNA 合成

藻种离心收集后,采用液氮反复冻融法破壁,采用 QIAGEN RNeasy Plant Mini Kit 试剂盒提取莱茵衣藻总 RNA。采用琼脂糖凝胶电泳法和 Qubit 3.0 分光光度计鉴定总 RNA 质量与浓度。cDNA 合成采用 M-MLV 反转录酶试剂盒进行。利用莱茵衣藻 18 rRNA (GenBank No. AY665726)作为内参。

### 1.3 CrMC1 ORF 巢式 PCR 扩增

根据 NCBI GenBank 数据库中莱茵衣藻 type I metacaspase cDNA 序列(GenBank No. XM\_001696904)设计引物,进行两步法巢式 PCR 克隆,引物序列见表 1。使用 Nucleospin Gel and PCR Clean-up 试剂盒纯化第二步 PCR 产物,并进行 poly(A)-tailing 添加粘末端反应,进而将其连接到 pGEM-T 载体中进行蓝白斑筛选。筛选后提取质粒并送至生工生物工程(上海)有限公司进行测序、组装并输入 BLAST 进行验证,证实所获序列为莱茵衣藻 type I metacaspase ORF 序列,命名为 CrMC1。

表 1 莱茵衣藻 metacaspase type I ORF 克隆引物  
Tab.1 Primers for *C. reinhardtii* metacaspase type I ORF cloning

引物 Primer	序列 Sequence (5'~3')
CrMC1-NI-F1	TGTATAAGGCGTCCCTTGAGCCAC
CrMC1-NI-R1	CTTGGGTTGGGGTTACCG
CrMC1-NII-F1	ATGTATGGTTATCCCCCGC
CrMC1-NII-R1	TTAGATGTAAAGGCGGCTGG

### 1.4 生物信息学分析

利用在线 SMS 生物软件(<http://www.bio-soft.net/sms/>),根据 CrMC1 ORF 的 DNA 序列推测 CrMC1 氨基酸序列,获得包含 405 个氨基酸的序列。进而利用 Vector NTI 11.5 软件 ClustalX 方法将 CrMC1 与从 NCBI 数据库获得的其他物种 metacaspase 构建系统进化树,物种名与蛋白编号见表 2。此外,通过将 CrMC1 氨基酸序列与自 uniprot 数据库(<http://www.uniprot.org/>)获得的 3 种拟南芥(*Arabidopsis thaliana*) type I metacaspase (AtMC1, No. Q7XJE6; AtMC2, No. Q7XJE5; AtMC3, No. Q9FMG1)氨基酸序列的同源性比对,预测其功能域。

### 1.5 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导莱茵衣藻细胞死亡率测定

将处于生长对数期(OD<sub>434 nm</sub>=1)的莱茵衣藻

表 2 进化树所用 metacaspase 基因序列  
Tab.2 Metacaspase gene sequence of phylogenetic tree

物种名 Species	拉丁学名 Latin name	NCBI 序列号
矮牵牛(type I)	<i>Petunia x hybrid</i>	AFK93070.1
矮牵牛(type II)	<i>Petunia x hybrid</i>	AFK93071.1
爱尔兰海藻	<i>Chondrus crispus</i>	XP_005717184.1
本生烟草	<i>Nicotiana benthamiana</i>	ABD47740.1
扁藻	<i>Tetraselmis sp.</i>	JAC78936.1
番茄	<i>Solanum lycopersicum</i>	AFY10520.1
拟南芥(type I)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Q7XJE5.1
拟南芥(type II)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	O64517.1
玉山筷子芥	<i>Arabidopsis lyrata subsp. Lyrata</i>	EFH64039.1
橡胶树	<i>Hevea brasiliensis</i>	ADM52185.1
小麦(type I)	<i>Triticum aestivum</i>	ANH79181.1
小麦(type II)	<i>Triticum aestivum</i>	ACY82389.1
团藻(type II)	<i>Volvox carteri f. nagariensis</i>	XP_002948071.1
团藻(type II)	<i>Volvox carteri f. nagariensis</i>	XP_002946738.1
烟草	<i>Nicotiana tabacum</i>	ACG59943.1
玉米	<i>Zea mays</i>	NP_001151968.1
挪威云杉(type II)	<i>Picea abies</i>	CDG41615.1
挪威云杉(type II)	<i>Picea abies</i>	CAD59226.2
樟子松	<i>Pinus sylvestris</i>	ACB11499.1

cc125 mt+分别置于实验组(1 mmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)与对照组进行培养,并测定 0~480 min 内的死亡率。死亡率测定采取 SYTOX green 染料进行。利用正置荧光显微镜观察计数至少 200 个细胞,根据 SYTOX green 标记阳性为死亡细胞、隐性为存活细胞进行细胞计数,并计算死亡率。

### 1.6 荧光定量 PCR

提取不同时间点实验组与对照组莱茵衣藻总 RNA,并反转录获得 cDNA,利用荧光定量 PCR 法进行 CrMC1 表达量分析。荧光定量 PCR 反应使用 SensiFAST SYBR No-ROX 试剂盒在 ABI Prism 7000 型荧光定量 PCR 仪上进行。荧光定量 PCR 所得数据利用 18S rRNA 作为内参基因,按照 2<sup>-ΔΔC<sub>t</sub></sup>法处理数据。所得数据利用 Microsoft Excel 2010 软件进行平均值、标准差和差异显著性分析( $P < 0.05$ )并作图。CrMC1 与内参基因 18S rRNA (Nguyen *et al.*, 2011)引物见表 3。

表 3 荧光定量 PCR 引物  
Tab.3 Primers used in qRT-PCR

引物 Primer	序列 Sequence (5'~3')
CrMC1-QF1	ATTAGACCAAGGCCAACAT
CrMC1-QR1	GTTTCAGCTCGTCATCCACAA
CrMC2-QF1	GCAAGAAGGCTGTCCCTCATC
CrMC2-QR1	GCTCTTGTCCGTGTCATCA
18S RNA-QF	CCTGCGGCTTAATTTGACTC
18S RNA-QR	ACCGGAATCAACCTGACAAG

## 2 结果

### 2.1 CrMC1 基因克隆及进化分析

如图 1A 所示,本研究通过巢式 PCR 克隆到莱茵衣藻 type I metacaspase 基因 ORF 全长序列,包含 987 bp,推测编码 405 个氨基酸,命名为 CrMC1。为分析 CrMC1 进化关系,本研究从 NCBI 数据库中筛选出已分类的植物 metacaspase 蛋白氨基酸序列,包括拟南芥、小麦 (*Triticum aestivum*)、鸡 (*Gallus gallus domesticus*)、挪威云杉 (*Picea abies*)、团藻 (*Volvox carteri f. nagariensis*)等(表 1),使用 Vector NTI 11.5 软件的 ClustalX 法进行同源性分析,并构建系统进化树(NJ)。如图 1B 所示,系统进化树中的 19 个 metacaspase 成员形成了 2 个大分支,其中, CrMC1 与所有已知 type I metacaspase 位于同一分支内,故可推测 CrMC1 属于 type I metacaspase。此外,在 type I metacaspase 分支中, CrMC1 与团藻目的 *Volvox carteri f. nagariensis* metacaspase 具有最高相似性,与植物例如拟南芥 type I metacaspase AtMC2 亲缘关系较远,提示其位于生物演化的初级地位。

### 2.2 CrMC1 蛋白结构域预测

蛋白多序列比对分析显示(图 2), CrMC1 具有 metacaspase 家族典型的、高度保守的 p20 (氨基酸 44~195)结构域、p10 (氨基酸 229~328)结构域以及中间连

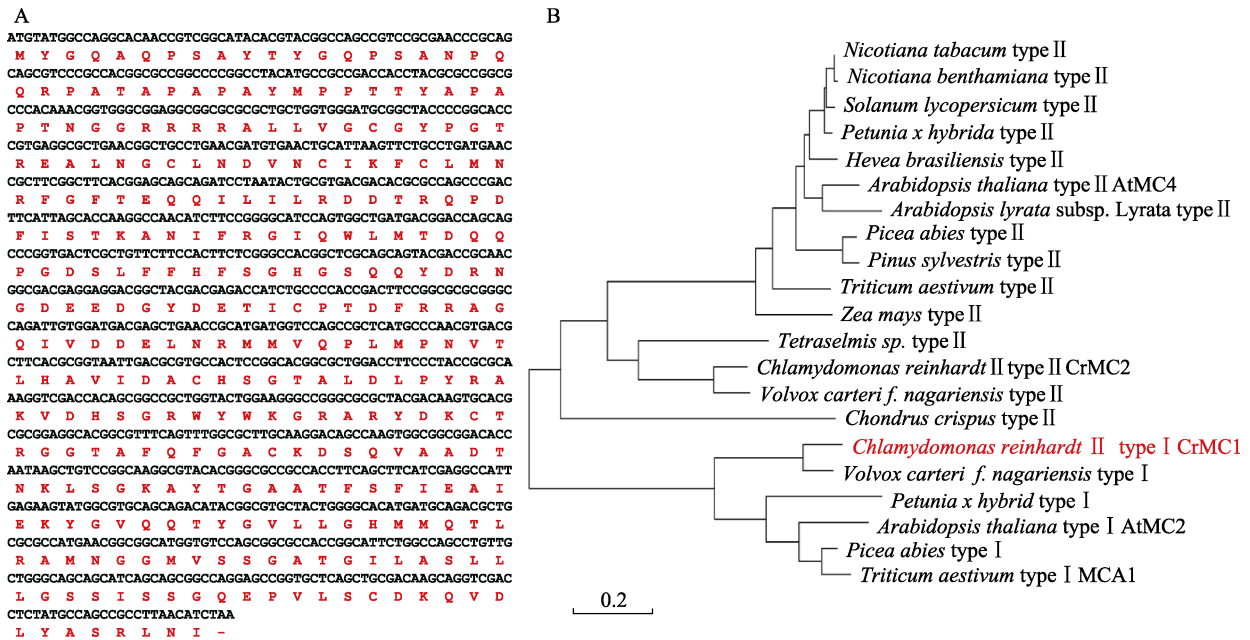


图 1 CrMC1 结构分析  
Fig.1 CrMC1 sequence analysis

A. 通过利用 SMS 生物软件(<http://www.bio-soft.net/sms/>)推测 CrMC1 氨基酸序列; B. 利用 Vector NTI 11.5 软件 ClustalX 方法将 CrMC1 与从 NCBI 数据库获得的其他物种 metacaspase 构建系统进化树, 物种名与蛋白编号见表 2

A. CrMC1 ORF was deduced to CrMC1 protein sequence using online SMS software (<http://www.bio-soft.net/sms/>);  
B. Phylogenetic tree was constructed using metacaspase protein sequence of different species obtained from NCBI database. Latin names and protein IDs are presented in Table 2

AtMC2 (1)	-----MLLLVDCSSCRTPHLPLPGATIRCAICHAFTLIAPEPRLQSHASASPPFPFNSSPAPSTFIYPPPTPS
AtMC3 (1)	-----MASRREVRCR-CGRRMWPQDPARTVQCSTCHVTQLYSLVDIARGANRIIHGFQQLLRQHPQHED----
CrMC1 (1)	-----MYGQAQPSAYTYGQP-----SANPQQRPATAPAP-----
AtMC1 (63)	-----PPQIHAPPG----QLPHPHGRKR-AVICGISYRFSRHELKGCINDAKCMRH
AtMC2 (70)	PYTHAPHAPSPFNHAPPDSYFTHAPPASSPFNHAPPG----PPPPVHGQKR-AVIVGVSYKNTKDELKGCINDANCMKF
AtMC3 (67)	-----QQQMMQAPPPRLLEPLSPFGKRR-AVLCGVNYKGSYSLKGCISDAKSMRS
CrMC1 (30)	-----AYMPPTTYA----PAPTNGGRRRALLVCGGYPGTREALNGLCLNDVNCIKF
AtMC1 (109)	LLINKFKFSPDSILMLTEEETDPYRIPTKQNMRYLWLVQGC TAGDSL VFHYSHGHSRQRNYNGDEVGDYDETLCLPDLF
AtMC2 (145)	MLMRRFQFPESCILMLTEEADPMRWPTKNNITMAMHWLVLSCKPGDSL VFHYSHGHNQMDNDGEVDGDFETLLPVDH
AtMC3 (119)	LLVQQMGFPIDSLMLTEDEASPQRIPTKRNIKAMRWLVEGNRARDSL VFHYSHGHSQQNDYNGDEIDGQDEALCLPDH
CrMC1 (77)	CLMNRFGFTQQILIRDDTRQPDFISTKANI FRGIQWLMTDQQPGDSL VFHYSHGHSQQYDRNGDEBDGYDEITCPTDF
AtMC1 (189)	ETQGMIVDDEINATIVRPLPHGVKLSIIDACHSGTVLLEPLFLCRMNRAGQYVWEDHRPRSGLWKGTAGGEAISTISGCD
AtMC2 (225)	RTSGVIVDDEINATIVRPLPYGVKLVHVIDACHSGTVMLPYLCRMDRLGNVWEDHRPRTGMWKTSGGVEVFFTGCD
AtMC3 (199)	EETEKIIDDEINRILVRLVHGAKLHAVIDACNSGTVLLEPLFICRMERNGSYEWEDHR-SVRAKGTDDGAAFCFSACDD
CrMC1 (157)	RRACQIVDDELNRMMVQPLMPNVTLHAVIDACHSGTALLPYRAKVDHSGRWYKGR--R-YDKTRGGTAFQFGACKD
AtMC1 (269)	DQTSADTSALSKITSTGAMTFCCIQAISRAQGTTYGSLNLSMRTTIRNTGNDG-G-----GSGGVVTVLSMLLTGGS
AtMC2 (305)	DQTSADTPQLSGSAWTGAMTYAFIQAIER-GHGMTYGSLLNAMRSTVHEIFDKNKGRELVEVGADFLSTLLGLLIGAS
AtMC3 (278)	DESSGYTPVFTGKN-TGAMTYSFIAVKTAGPAPTYGHLLNLMCSAIREAQSR-----LAFNGDYTSSDAS----
CrMC1 (234)	SQVAADTNKLSGKAYTGAATFSFIEAIEKYGVQQT YGVLLGHMMQTLRAMNGG-----MVSSGATGILASLLGSSI
AtMC1 (342)	AIGGLR-----QEPQLTACQTFDVIYAKPFTL
AtMC2 (384)	PPDEEEVNPAPQKTQEPQLSANEAFAYEKPFSL
AtMC3 (343)	-----AEPLLTSSEEFVYATKFLV
CrMC1 (306)	SSG-----QBPVLSCKQVDLYASRLNI

图 2 CrMC1 蛋白质结构预测  
Fig.2 CrMC1 protein domain prediction

利用 Vector NTI 11.5 软件 ClustalX 方法将 CrMC1 与自 uniprot 数据库(<http://www.uniprot.org/>)获得的 3 种拟南芥 I 型 metacaspase (AtMC1, NO. Q7XJE6; AtMC2, NO. Q7XJE5; AtMC3, NO. Q9FMG1)氨基酸序列进行同源比对。图中蓝色背景标示为 p20 结构域, 红色背景标示为 p10 结构域, 黑框标示区域为连接区。活性中心分别以\*和#标出  
CrMC1 was aligned with type I metacaspase from Arabidopsis: AtMC1, NO. Q7XJE6; AtMC2, NO. Q7XJE5; AtMC3, NO. Q9FMG1. Arabidopsis sequences were obtained from uniprot database. The domain of p20, p10 and internal linker is highlighted in blue background, red background and black frame, respectively. The conserved His-Cys residues are labelled by \* and # respectively

接区(氨基酸 196~228)。与拟南芥 type I metacaspase 蛋白 AtMC1/2/3 比较, 虽然 CrMC1 的 N 末端区域较为简单, 然而其脯氨酸含量较高, 为典型的富含脯氨酸区域(23.2%), 符合 type I metacaspase 的结构特征。CrMC1 蛋白酶活性中心包含高度保守的组氨酸(132) (图 2\*处)与半胱氨酸(188) (图 2#处)结构, 推测其具有已知 metacaspase 类似的蛋白酶活性。

### 2.3 莱茵衣藻 CrMC1 参与 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导细胞死亡调控

由图 3A 可见, 1 mmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 处理可诱导处于对数生长期的莱茵衣藻出现明显的细胞死亡现象。根据 Vavilala 等(2015)报道, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的莱茵衣藻细胞死亡方式为程序性细胞死亡。本研究进而利用荧光定量 PCR 方法检测处于对数生长期的莱茵衣藻 CrMC1

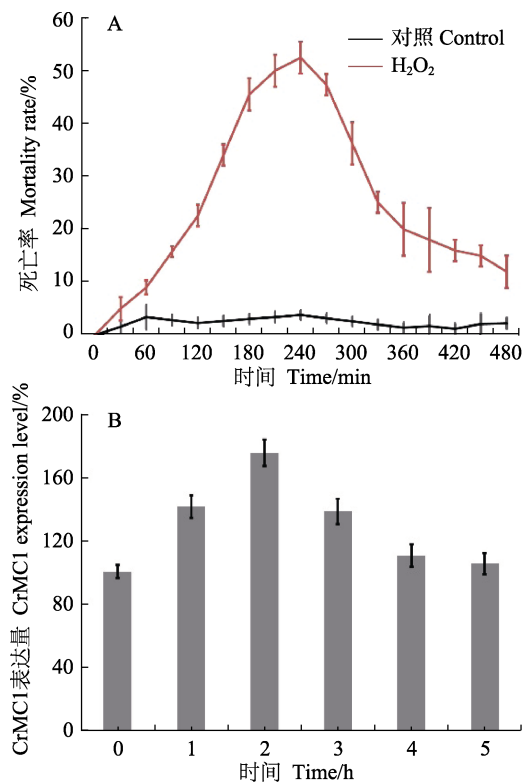


图 3 CrMC1 参与 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的莱茵衣藻程序性细胞死亡调控

Fig.3 CrMC1 involved in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced PCD regulation of *C. reinhardtii*

A. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 处理后 1~480 min 内莱茵衣藻细胞死亡率。莱茵衣藻培养与 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 处理如前所述; B. CrMC1 基因在 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的莱茵衣藻程序性细胞死亡中的表达量变化。实验均进行 3 次取平均值

A. The mortality of *C. reinhardtii* cells within 1~480 min after H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treatment. *C. reinhardtii* culture and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treatment as previously described; B. CrMC1 gene expression changes in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced PCD in *C. reinhardtii*. Each experiment was performed three times and averaged

基因在 1 mmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导后 1~8 h 内表达水平的变化情况。如图 3B 所示, 1 mmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导后, 莱茵衣藻 CrMC1 基因的表达量自 1 h 起显著高于对照组 ( $P < 0.05$ ), 2 h 后达到最高, 约为对照组 1.77 倍, 5 h 时下降至对照组同一水平, 与程序性细胞死亡发生时间基本同步, 推测 CrMC1 处于莱茵衣藻程序性细胞死亡调控通路的上游。

## 3 讨论

Madeo 等(2002)首次报道了使用酵母 Yca1 突变菌株在氧化应激导致的细胞死亡对 metacaspase 的依赖性, 证明 Yca1 在酵母细胞中参与病毒毒素和非生物相关因素应激以及细胞衰老过程中的细胞死亡 (Madeo *et al*, 2009)。此外, 还有研究表明, 脂毒性应激 (Low *et al*, 2008) 和肌醇饥饿 (Guérin *et al*, 2009) 等部分酵母细胞致死条件下, metacaspase 是酵母实现细胞死亡的必要的条件; 白念珠菌的 metacaspase, CaMCA1, 参与介导氧化应激诱导的细胞死亡 (Cao *et al*, 2009); 而构巢曲霉的 2 个 metacaspase 的其中之一, CasA 在 ER 应激相关的细胞死亡起促进作用 (Colabardini *et al*, 2010)。

目前, 在模式生物拟南芥中分别鉴定出 3 个 type I metacaspase 基因 (AtMC1~3) 与 6 个 type II metacaspase 基因 (AtMC4~9) (Vercammen *et al*, 2004)。Type I metacaspase AtMC1 显示为拟南芥中 HR 细胞死亡的正调节物, 而 AtMC2 则能拮抗 AtMC1 的这种细胞死亡效应。而且 AtMC2 作为抗凋亡调节剂, 其蛋白水解活性是显性的。通过对 2 种 metacaspase 的遗传操作, 几乎可以使植物细胞内的免疫受体消除 HR 活性 (Coll *et al*, 2010)。与高等植物相似, 莱茵衣藻中同时存在 1 个 type I metacaspase 基因与 1 个 type II metacaspase 基因。由此推测, 与酵母相比, 莱茵衣藻程序性细胞死亡调控与高等植物具有更高的同源性。因此, 对莱茵衣藻 metacaspase 基因及其功能的研究, 对更好地阐释植物程序性细胞死亡调控通路以及 type I 与 type II metacaspase 基因相互作用有着极为重要的意义。

本研究首次报道了莱茵衣藻 type I metacaspase 基因 ORF 序列及其参与调控 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导程序性细胞死亡作用。通过巢式 PCR 从野生型莱茵衣藻藻种中克隆到 1 个 type I metacaspase 基因并命名为 CrMC1。序列分析表明, CrMC1 具有 type I metacaspase 特征性的 N 末端脯氨酸富含区、保守的 p20 与 p10 结构域以及组氨酸-半胱氨酸活性中心结构, 推测其在演

化上与已知高等植物 metacaspase 具同源性。Type I metacaspase 在高等植物与酵母程序性细胞死亡中所扮演的角色尚存在争议。例如, AtMC2 表达量在拟南芥程序性细胞死亡过程中调高而 AtMC1 表达量调低或无变化。本研究的实验数据证实, 与 AtMC2 类似, CrMC1 表达量在过氧化物胁迫导致的莱茵衣藻程序性细胞死亡早期显著提高, 证实其参与早期程序性细胞死亡的调控。

综上所述, 本研究结果初步描述了莱茵衣藻中 type I metacaspase 基因的结构与功能, 为植物程序性细胞死亡研究和藻类增殖工业提供了理论基础和技术支持。

### 参 考 文 献

- Cao Y, Huang SB, Zhu Z, *et al.* Candida albicans cells lacking CaMCA1-encoded metacaspase show resistance to oxidative stress-induced death and change in energy metabolism. *Fungal Genetics and Biology*, 2009, 46(2): 183–189
- Colabardini AC, De Castro PA, De Gouvêa PF, *et al.* Involvement of the *Aspergillus nidulans* protein kinase C with farnesol tolerance is related to the unfolded protein response. 2010, 78(5): 1259–1279
- Coll NS, Vercammen D, Smidler A, *et al.* Arabidopsis type I metacaspases control cell death. *Science*, 2010, 330(6009): 1393–1397
- Dimova EG, Bryant PE, Chankova SG, *et al.* Adaptive response: Some underlying mechanisms and open questions. *Genetics and Molecular Biology*, 2008, 31(2): 396–408
- Ge Y, Cai YM, Bonneau L, *et al.* Inhibition of cathepsin B by caspase-3 inhibitors blocks programmed cell death in *Arabidopsis*. *Cell Death and Differentiation*, 2016, 23: 1493–1501
- Geng YH, Wei D, Li GJ, *et al.* Research progress on *Chlamydomonas nivalis*. *Natural Product Research and Development*, 2007, 19(1): 175–179 [耿予欢, 魏东, 李国基, 等. 极地雪衣藻的研究进展. *天然产物研究与开发*, 2007, 19(1): 175–179]
- Greiner A, Kelterborn S, Evers H, *et al.* Targeting of photoreceptor genes in *Chlamydomonas reinhardtii* via zinc-finger nucleases and CRISPR/Cas9. *Plant Cell*, 2017, 29(10): 2498–2518
- Guérin R, Beauregard PB, Leroux A, *et al.* Calnexin regulates apoptosis induced by inositol starvation in fission yeast. *PLoS One*, 2009, 4(7): e6244–e6244
- Hanikenne M. *Chlamydomonas reinhardtii*, as a eukaryotic photosynthetic model for studies of heavy metal homeostasis and tolerance. *New Phytologist*, 2003, 159(159): 331–340
- Harper JDI. *Chlamydomonas*, cell cycle mutants. *International Review of Cytology*, 1999, 189(08): 131–150
- Harris EH. *Chlamydomonas* as a model organism. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 2001, 52(52) 363–406
- He Z, Song J, Chang YQ, *et al.* Effects of adding *Myriophyllum spicatum* L. meal in diets on the growth, body composition and digestive enzymes activities of juvenile sea cucumber *Apostichopus japonicus* (Selenka). *Progress in Fishery Sciences*, 2015, 36(4): 122–127 [何舟, 宋坚, 常亚青, 等. 穗花狐尾藻 (*Myriophyllum spicatum* L.) 饲喂对刺参 (*Apostichopus japonicus*) 幼参生长、体成分及消化酶的影响. *渔业科学进展*, 2015, 36(4): 122–127]
- Hema R, Senthil-Kumar M, Shivakumar S, *et al.* *Chlamydomonas reinhardtii*, a model system for functional validation of abiotic stress responsive genes. *Planta*, 2007, 226(3): 655–670
- Low CP, Shui G, Liew LP, *et al.* Caspase-dependent and -independent lipotoxic cell-death pathways in fission yeast. *Journal of Cell Science*, 2008, 121: 2671–2684
- Ma C, Kong WW. Research progress in plant metacaspase. *Chinese Bulletin of Botany*, 2012, 47(5): 543–549 [马聪, 孔维文. 植物 Metacaspase 研究进展. *植物学报*, 2012, 47(5): 543–549]
- Madeo F, Carmona-Gutierrez D, Ring J, *et al.* Caspase-dependent and caspase-independent cell death pathways in yeast. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2009, 382(2): 227–231
- Madeo F, Herker E, Maldener C, *et al.* A caspase-related protease regulates apoptosis in yeast. *Cell*, 2002, 9(4): 911–917
- Merchant SS, Prochnik SE, Vallon O, *et al.* The *Chlamydomonas* genome reveals the evolution of key animal and plant functions. *Science*, 2007, 318(5848): 245–250
- Moharikar S, D'Souza JS, Kulkarni AB, *et al.* Apoptotic-like cell death pathway is induced in unicellular chlorophyte *Chlamydomonas reinhardtii* (chlorophyceae) cells following UV irradiation: Detection and functional analyses. *Journal of Phycology*, 2006, 42(2): 423–433
- Nguyen AV, Toepel J, Burgess S, *et al.* Time-course global expression profiles of *Chlamydomonas reinhardtii* during photo-biological H<sub>2</sub> production. *PLoS One*, 2011, 6(12): e29364
- Pérezpérez ME, Florencio FJ, Crespo JL. Inhibition of target of rapamycin signaling and stress activate autophagy in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiology*, 2010, 152: 1874–1888
- Qiao HJ, Wang JY, Zhang LM, *et al.* Effects of dietary fish oil replacement by microalgae in microdiets on growth performance, survival and fatty acid profile of Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) juveniles. *Progress in Fishery Sciences*, 2016, 37(5): 56–63 [乔洪金, 王际英, 张利民, 等. 微粒饲料中以微藻粉替代鱼油对牙鲆 (*Paralichthys olivaceus*) 稚鱼生长存活和脂肪酸组成的影响. *渔业科学进展*, 2016, 37(5): 56–63]
- Reape TJ, Molony EM, McCabe PF. Programmed cell death in plants: distinguishing between different modes. *Journal of Experimental Botany*, 2008, 59(3): 435–444
- Sirisha VL, Sinha M, D'Souza JS. Menadione-induced caspase-dependent programmed cell death in the green chlorophyte *Chlamydomonas reinhardtii*. *Journal of Phycology*, 2014, 50(3): 587
- Sun XM, Hu HJ, Li YG. New material of family Chlamydomonaceae (Volvocales) in China. *Journal of Wuhan Botanical Research*, 2004, 22(6): 503–506 [孙晓梅, 胡鸿钧, 李夜光. 中国衣藻科(团藻目)新资料. *武汉植物学研究*, 2004, 22(6): 503–506]
- van Doorn WG, Woltering EJ. Many ways to exit? Cell death categories in plants. *Trends in Plant Science*, 2005, 10(3): 117–122
- Vavilala S, Gawde K, Sinha M, *et al.* Programmed cell death is induced by hydrogen peroxide but not by excessive ionic stress of sodium chloride in the unicellular green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *European Journal of Phycology*,



- 2015, 50(4): 422–438
- Vercammen D, Cotte BVD, Jaeger GD, *et al.* Type II metacaspases Atmc4 and Atmc9 of *Arabidopsis thaliana* cleave substrates after arginine and lysine. *Journal of Biological Chemistry*, 2004, 279(44): 45329–45336
- Vercammen D, Declercq W, Vandenabeele P, *et al.* Are metacaspases caspases? *Journal of Cell Biology*, 2007, 179(3): 375–380
- Wu L, Hepler PK, John PCL. The met 1 mutation in *Chlamydomonas reinhardtii*, causes arrest at mitotic metaphase with persisting p34 cdc2-like H1 histone kinase activity that can promote mitosis when injected into higher-plant cells. *Protoplasma*, 1997, 199(3): 135–150
- Xie CX, Han W, Yu ZL. Progress of *Chlamydomonas* as a model organism. *Hereditas*, 2003, 25(3): 350–354 [谢传晓, 韩伟, 余增亮. 模式生物衣藻及其研究进展. *遗传*, 2003, 25(3): 350–354]
- Xu TM. Analysis of the mutational character of *Chlamydomonas reinhardtii* Nfr-4 mutant strain. Master's Thesis of Xinjiang University, 2007 [徐田枚. 莱茵衣藻 (*Chlamydomonas reinhardtii*) Nfr-4 突变株的突变性质分析. 新疆大学硕士研究生学位论文, 2007]
- Yordanova ZP, Woltering EJ, Kapchinatoteva VM, *et al.* Mastoparan-induced programmed cell death in the unicellular alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Annals of Botany*, 2013, 111(2): 191–205
- Zuo Z, Zhu Y, Bai Y, *et al.* Acetic acid-induced programmed cell death and release of volatile organic compounds in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2012, 51(2): 175–184

(编辑 冯小花)

## Cloning of the Metacase Type I Gene of *Chlamydomonas reinhardtii* and Its Involvement in the Regulation of Programmed Cell Death

ZHANG Hengyu<sup>1</sup>, LIU Yiqun<sup>2</sup>, GE Yuan<sup>1</sup><sup>①</sup>

(1. College of Marine Life Science, Ocean University of China, Qingdao 266003;

2. College of Fisheries, Ocean University of China, Qingdao 266003)

**Abstract** The metacaspase is a cysteine protease with the substrate of arginine/lysine, specifically found in protozoa, fungi, and plants. The metacaspase is generally believed to be closely related to the caspase of the metazoan. Previous studies have shown that metacaspases can be divided into type I and type II according to the differences in their structural characteristics, and both types have been found to be involved in the regulation and the control of programmed cell death in various plants and protozoa. Based on the information of the sequence of the *Chlamydomonas reinhardtii* type I metacaspase cDNA, obtained from the Genbank database (Genbank NO. XM\_001696904), this study was able to use the method of two-step nested PCR cloning to retrieve the Open Reading Frame (ORF) of the sequence of the *C. reinhardtii* type I metacaspase cDNA. The ORF sequence, mentioned above, was named as the CrMC1 in this study. The length of the CrMC1 ORF, in its entirety, is 987 bp, from which can be inferred that there are 405 amino acids encoded in this sequence. By the method of homologous sequence comparative analysis with the already known type I metacaspase protein, it was then found that the CrMC1 has conservative p20, p10, linker domain, and arginine and cysteine active center sites. Furthermore, this study is also able to show that, during the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induced programmed cell death of *C. reinhardtii*, the gene transcripts of the CrMC1 was increased at a statistically significant level ( $P < 0.05$ ). The gene transcripts of the CrMC1 then reached its peak after 2 h. Eventually, the gene transcripts of the CrMC1 decreased to the same level as it was in the control group at 3 h. In conclusion, the results as discussed above have indicated the following: the *C. reinhardtii* CrMC1 was involved in the regulation and the control of the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induced programmed cell death of *C. reinhardtii*.

**Key words** Metacaspase; *Chlamydomonas reinhardtii*; Programmed cell death

① Corresponding author: GE Yuan, E-mail: geyuan@ouc.edu.cn