

东南景天捕光叶绿素 a/b 结合蛋白基因 *SaLhcb2* 的分离及功能

李 真^{1,2,3}, 刘明英^{2,3}, 韩小娇^{2,3}, 乔桂荣^{2,3}, 蒋 晶^{2,3}, 邢世岩¹, 卓仁英^{2,3}

(1. 山东农业大学 林学院, 山东 泰安 271000; 2. 中国林业科学研究院 亚热带林业研究所, 浙江 富阳 311400; 3. 中国林业科学研究院 林木遗传育种国家重点实验室, 北京 100091)

摘要: *LHCB* 基因对植物适应各种环境胁迫的过程中起着重要作用。序列分析显示: 东南景天 *Sedum alfredii* 的 *SaLhcb2* 基因全长 929 bp, 其中开放阅读框(ORF)为 798 bp, 含有 1 个 74 bp 的内含子。通过蛋白序列比对, *SaLhcb2* 基因编码的蛋白与多种植物的蛋白序列同源性都很高(92%以上)。分析 400 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 镉离子(Cd^{2+}), 铜离子(Cu^{2+})和铅离子(Pb^{2+})胁迫处理后的东南景天, 结果显示: 镉处理后 *SaLhcb2* 基因在茎、叶中表达量快速上升(12.0 h 内), 根中表达量到 48.0 h 后才上调。铜处理后 0.5 h 根中表达显著上调, 胁迫 6.0 h 后茎中表达量显著上调, 随后一直降低, 叶片中该基因表达量一直较低。铅处理后, 根中表达量降低, 96.0 h 左右比对照略微上调, 而茎中 96.0 h 内表达量相比对照都上调, 叶片中 96.0 h 内都降低。研究结果表明: *SaLhcb2* 与东南景天的镉、铜、铅胁迫抗性有密切的相关性。图 6 表 1 参 30

关键词: 植物学; 镉、铜、铅; 叶绿素 a/b 结合蛋白(LHCB); 荧光定量 PCR; 东南景天

中图分类号: S722.3

文献标志码: A

文章编号: 2095-0756(2014)06-0838-09

Characterization of a light-harvesting chlorophyll a/b binding protein (LHCB) gene, *SaLhcb2*, in *Sedum alfredii*

LI Zhen^{1,2,3}, LIU Mingying^{2,3}, HAN Xiaojiao^{2,3}, QIAO Guirong^{2,3}, JIANG Jing^{2,3},
XING Shiyan¹, ZHUO Renying^{2,3}

(1. School of Forestry, Shandong Agricultural University, Tai'an 271000, Shandong, China; 2. The Research Institute of Subtropical Forestry, Chinese Academy of Forestry, Fuyang 311400, Zhejiang, China; 3. State Key Laboratory of Tree Genetic and Breeding, Chinese Academy of Forestry, Beijing 100091, China)

Abstract: The light-harvesting chlorophyll a/b binding protein (LHCB) gene plays an important role in plants adapting to various environments. *Sedum alfredii* is a new Zn/Cd hyper-accumulator and whether *LHCB* in this interesting species was related to the heavy-metal tolerance interested us a lot. In the present study, we isolated a cDNA using homologous cloning and designated it as *SaLhcb2* which encoded a light-harvesting chlorophyll a/b binding protein in *Sedum alfredii*. A preliminary sequence analysis was conducted and homologous comparison was also performed using MegAlign. In order to identify the gene expression profiles of *SaLhcb2* response to heavy-metal stress, seedlings of *Sedum alfredii* were treated by 400 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Cd^{2+} , Cu^{2+} , and Pb^{2+} stresses with those cultured in water as a control. Roots, stems and leaves were dissected and promptly frozen in liquid nitrogen for RNA extraction and the followed real-time PCR. Sequence analysis showed that the coding se-

收稿日期: 2013-12-19; 修回日期: 2014-03-26

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(31200465)

作者简介: 李真, 从事植物分子生物学研究。E-mail: 15064169138@163.com。通信作者: 卓仁英, 研究员, 博士, 从事林木抗逆分子生物学研究。E-mail: zhuory@gmail.com。邢世岩, 教授, 从事林木遗传育种研究。E-mail: xingsy@sdau.edu.cn

quence of *SaLhcb2* was 929 bp and the open reading frame was 798 bp. The deduced protein, SaLHCB2, consisted of 266 amino acids and had a high homology (above 92%) with LHCB2 of other plants via homologous comparison. For the Cd^{2+} , Cu^{2+} , and Pb^{2+} stress treatments, the level of *SaLhcb2* was elevated dramatically in stems and leaves within 12.0 h. However, with the Cd^{2+} treatment, the expression of *SaLhcb2* in roots did not display a tendency of up-regulation until 48.0 h. For the Cu^{2+} treatment, in roots, the expression of *SaLhcb2* showed a prompt response of up-regulation at 0.5 h and then decreased weirdly. With the Pb^{2+} treatment, the expression of *SaLhcb2* in roots displayed a profile of down-regulation except the point of 96.0 h. Based on the above findings, it could be concluded that the expression of *SaLhcb2* in *Sedum alfredii* was influenced by heavy-metal treatment and may function in the process of plants combating heavy-metal stress. [Ch, 6 fig. 1 tab. 30 ref.]

Key words: botany; cadmium, copper, and lead; light-harvesting chlorophyll a/b binding protein (LHCB); real-time PCR; *Sedum alfredii*

随着工业化的迅速发展, 土壤的重金属污染已经成为了全球关注的问题。中国农田土壤镉污染面积已经超过 $2 \times 10^5 \text{ hm}^2$, 生产镉含量超标的农产品达 $1.46 \times 10^6 \text{ t} \cdot \text{a}^{-1}$ [1]。镉通过食物链进入人体, 引起了如“痛痛病”等慢性疾病。世界各国的土壤都存在重金属污染问题 [2]。如何治理和修复污染土壤已经成为国际热点问题。20 世纪 80 年代之后植物修复 (phytoremediation) 逐步发展起来, 因其操作简便、成本低廉、环境友好等优点而日益受到人们的关注 [3-4]。学术界公认的超富集植物需要满足 2 个条件: ①植物地上部富集的重金属达到一定临界值, 不同的重金属其富集界限不同; ②地上部分富集的重金属含量高于地下部分。据报道, 已鉴定的重金属超积累植物有 500 多种 [5], 但镉超积累的植物较少见, 已发现的仅有遏蓝菜属 *Thlaspi* 的几种植物 [6]。何冰等 [7] 发现了一种新型的锌、镉、铅超积累植物——矿山型东南景天 *Sedum alfredii*。矿山型东南景天对土壤中的镉、锌、镍等重金属具有极强的超积累富集能力 [8], 更重要的是适量的重金属含量已成为其维持更好的生长状态所必需 [9]。因此, 查清东南景天体内涉及重金属离子吸收、转运、隔离、耐受等相关基因的分子机制, 对林木重金属高抗新品种的培育具有重要理论指导意义。捕光蛋白复合体 (LHC) 能把捕获到的光能量迅速传导到光化学反应中心, 光系统 I 和光系统 II 都有各自的 LHC (LHC I 和 LHC II)。自 LHC II 被发现以来 [10], 人们对其结构和功能的研究取得了较大的进展 [11-12]。LHC II 含有 Lhcb1-6 等 6 种蛋白质, 它们在类囊体膜中进行光能的吸收和传递, 此外在维持类囊体膜的结构, 调节激发能量在 2 个光系统之间的分配, 光保护以及对各种环境的适应等过程中都起着重要的作用。林江波等 [13] 克隆和分析了中国水仙 *Narcissus tazetta* var. *chinensis* 叶绿素 a/b 结合蛋白, 推测其可能属于 Lhcb1 类蛋白; 高志民等 [14] 克隆了毛竹 *Phyllostachys edulis* 的 a/b 结合蛋白 cab-PhE1, 证明该基因在叶绿体的类囊体中表达; 向太和等 [15] 分离出了水稻 *Oryza sativa* 捕光叶绿素 a/b 结合蛋白, 分析显示该基因在叶片和茎中表达无差异, 但是光对其表达有明显促进作用; Simon 等 [16] 研究证明: 叶绿素结合蛋白中的 LI181 家族和胁迫响应相关; 张敏等 [17] 研究了 2 种生态型东南景天 *Lhcb2* 基因在镉和锌胁迫时的表达变化, 并发现镉、锌胁迫处理能够提高转基因烟草 *Nicotiana tabacum* 中该基因的表达, 且转基因烟草能够积累更多的镉。此外, 菊花 *Chrysanthemum morifolium* 等植物中的 Lhcb 蛋白也已被克隆 [18]。但这些研究主要集中于 LHCB 基因在不同光处理后的表达差异以及蛋白的结构和起源进化, 对于 Lhcb 蛋白与植物重金属胁迫相关方面的研究还相对较少。本研究初步探讨了该基因在镉、铜、铅胁迫后的表达差异, 结合前人研究推测东南景天 LHCB 基因可能是通过调节光合作用为重金属胁迫后的植物解毒机制提供能量, 从而缓解植物体中毒的现象。

1 材料与方法

1.1 实验材料与试剂

矿山型东南景天无性系采集于浙江省衢州市的一个铅/锌矿区, 取回后在人工气候箱中水培处理。胁迫处理时在水中添加设定浓度的重金属离子, 然后分别提取根、茎、叶的核糖核酸 (RNA), 用于后续研究。

RNA 提取使用总 RNA 提取试剂盒(加拿大, NORGENT, Thorold), DNA 凝胶回收试剂盒购自 AXY-GEN 公司(中国上海), 2×Goldstar *Taq* Master Mix 购自北京康为世纪生物技术公司(中国北京), 反转录试剂盒(Prime Script™ RT reagent Kit), 大肠埃希菌 *Escherichia coli* DH5α 感受态细胞和荧光定量试剂盒 SYBR Prime Script™ RT-PCR Kit 均购自 Takara 公司(中国大连)。

1.2 方法

1.2.1 东南景天 *LHCB* 基因 cDNA 序列克隆 以本实验室前期构建的 cDNA 文库为模板, 利用转录组测序结果设计特异引物 LHCB-F 和 LHCB-R, ORF-F 和 ORF-R, 分别以 LHCB-F 和 M13-以及 LHCB-R 和 M13+从基因中间向两端扩增, 以 ORF-F 和 ORF-R 扩增 ORF 进行验证(表 1)。20.0 μL 扩增体系为: 模板 0.6 μL, 引物 1.0 μL, 2×Goldstar *Taq* Master Mix 10 μL, 双蒸水(ddH₂O) 7.4 μL。聚合酶链式反应(PCR)程序为: 94 ℃预变性 10 min; 94 ℃变性 30 s, 60 ℃ 30 s, 72 ℃延伸 1 min, 32 个循环; 最后 72 ℃延伸 10 min。

1.2.2 东南景天 *LHCB* 基因组 DNA 序列克隆 采用十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)法^[19]提取东南景天叶片的基因组 DNA, 以其为模板, 引物和扩增程序同 cDNA 序列克隆。10 g·kg⁻¹ 琼脂糖凝胶电泳后回收目的片段, 分光光度计测定其比例, 将该片段连接到 pGEM-T-easy 载体上, 热激转化大肠埃希菌 DH5α 感受态细胞, 37 ℃过夜培养, 挑取单克隆至 800 μL LB 液体培养基(LB/ampicillin), 37 ℃, 180 r·min⁻¹, 过夜培养, 用通用引物 T7 和 SP6 进行菌液聚合酶链式反应(PCR)检测, 阳性结果送测序。测序和引物合成由生工生物工程(上海)股份有限公司完成。

1.2.3 镉、铜、铅胁迫后东南景天 *LHCB* 基因的表达分析 参考金晓芬^[20]和桑健等^[21]的研究数据, 分别以 400 μmol·L⁻¹ 的氯化镉(CdCl₂), 硫酸铜(CuSO₄)和硝酸铅[Pb(NO₃)₂]的水处理东南景天无性系植株 0.5, 6.0, 12.0, 24.0, 48.0, 72.0 和 96.0 h, 以未处理的东南景天无性系为对照, 按照 NORGENT 的 RNA 提取试剂盒说明, 分别提取不同处理时间东南景天根、茎、叶的 RNA, 设置 3 个生物学重复。用 NanoDrop 2000 分光光度计(Thermo, Massachusetts, 美国)测定浓度, 用 10.0 g·kg⁻¹ 的琼脂糖电泳分析完整性。反转录根据 RNA 的含量取 1.5~4.0 μg RNA, 使用主要 scripttm 逆转录试剂盒(Prime Script™ RT reagent Kit)反转合成第 1 链, 稀释 3 倍后利用 ABI 7300 实时荧光定量 PCR 仪(Applied Biosystems, Foster City, 美国)进行 qRT-PCR 分析。根据 *LHCB* 基因 cDNA 序列用 Primer 3 设计实时荧光定量引物 LHCB-RT-F 和 LHCB-RT-R。以东南景天泛素结合酶基因(ubiquitin conjugating enzyme 9)为内参, 其特异性引物为 UBC-F 和 UBC-R。实时荧光定量 PCR 扩增体系(10.0 μL) 为: 模板 2.0 μL, 特异引物(10 μmol·L⁻¹)0.4 μL, 2×SYBR Premix Ex *Taq*™ 10.0 μL, 50×ROX Reference Dye 0.4 μL, 双蒸水(ddH₂O)6.8 μL。扩增条件: 95 ℃预变性 10 s, 95 ℃变性 5 s, 60 ℃复性 31 s, 40 个循环。做 3 个重复·样品⁻¹。数据分析采用 ΔΔCT 法计算相对定量, 目标基因相对定量=2^{-ΔΔCT}^[22]。

1.2.4 表达载体 pET-28a-LHCB 的构建及原核表达 根据 *LHCB* 基因序列设计引物 LHCB-F-*Bam*H I 和 LHCB-R-*Xho* I, 在其两端引入酶切位点 *Bam*H I 和 *Xho* I。以东南景天 cDNA 文库为模板进行扩增, 利用限制性内切酶 *Bam*H I 和 *Xho* I 处理 PCR 产物和 pET-28a, 回收目的片段后进行连接, 获得重组原核表达载体 pET-28a-LHCB。将 pET-28a-LHCB 基因重组质粒用热激转化的方法转入 *E. coli* BL21 (DE3) 感受态细胞, 挑选单克隆过夜培养后用载体上的通用引物 T7 和 T7ter 进行 PCR 检测插入片段的长度, 阳性质粒送测序并用 *Bam*H I 和 *Xho* I 37 ℃处理 3 h 后电泳分析。在含有 Kanamycin 的 LB 液体培养基中

表 1 引物名称及对应序列

Table 1 Name and sequence of primers

引物名称	引物序列(5'→3')
LHCB-F	GTGGATCTTTTGACCCACTT
M13R	CAG GAA ACA GCT ATG ACC
M13F	TGT AAA ACG ACG GCC AGT
LHCB-R	TTCTCAACAGGTCCTTTTCC
ORF-F	ATGGCCACATCTGCTATCCAATC
ORF-R	TTATTTGCCGGGGACAAAGTTT
LHCB-RT-F	GAGGCGCACTGTGAAAAGCA
LHCB-RT-R	TTTCAGGGAAGACGCAACCT
UBC-F	TGGCGTCGAAAAGGATTCTGA
UBC-R	CCTTCGGTGGCTTGAATGGAT
T7	TAATACGACTCACTATAGGG
SP6	ATTTAGGTGACACTATAG
T7ter	TGCTAGTTATTGCTCAGCGG
LHCB-F- <i>Bam</i> H I	CGCGGATCCTCATCCGCCCTTTGCTGGC
LHCB-R- <i>Xho</i> I	CCGCTCGAGTTATTTGCCGGGGACAAAGTTT

培养细菌，当 $D(600)$ 为 0.6~0.8 时，加入异丙基硫代半乳糖苷(IPTG, $0.1\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)诱导培养，为了研究蛋白的具体定位，分离上清和包涵体，收集菌体进行蛋白质变性聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)分析。

1.2.5 生物信息学分析 用 DNAMAN 软件，DNAtools, SignalP 4.1 Server(<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)和 ExPASy (http://web.expasy.org/cgi-bin/compute_pi/pi_tool)等软件分析测定的 DNA, cDNA 及其编码的蛋白质结构特点，利用美国国家生物技术信息中心(NCBI)数据库信息进行比对(表 1)。

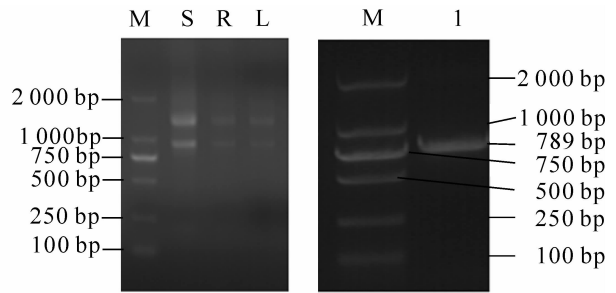
2 结果与分析

2.1 东南景天 *SaLhcb2* cDNA 及基因组序列分析

图 1 是东南景天根、茎、叶的 RNA 电泳图及胶回收后的目的条带电泳图，从图 1 可以看出：目的条带清晰无杂带、未降解，条带明亮，Nano Drop2000 分光光度计检测根、茎、叶、总 RNA 质量浓度分别为 $147.1, 299.8, 97.3\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ，吸光度 $D(260/280)$ 分别为 2.16, 2.30 和 2.02，电泳显示根、茎中总 RNA 略有降解，但都能满足后续反转录聚合酶链式反应(RT-PCR)试验要求。

从东南景天文库中分离出 cDNA 全长，测序后将序列提交到 GenBank 中，登陆号为 KF806555。*SaLhcb2* 基因 cDNA 全长 929 bp(图 2a)，其中开放阅读框长度为 798 bp，5'端含非编码区 48 bp，3'端含非编码区 83 bp，其中 Poly(A)17 bp。该基因的开放阅读框编码 1 个 265 个氨基酸的蛋白，将它命名为 *SaLhcb2*。以基因组 DNA 为模板分离的基因组序列和 cDNA 序列比对，发现该基因在 147~222 bp 含有 1 个 74 bp 的内含子(图 2b)。

对 *SaLhcb2* 编码的蛋白进行分析，预测其分子量大小为 28.5 kd，等电点为 5.69，总平均亲水性为 -0.097，脂溶指数为 78.83。信号肽分析表明该蛋白含有 1 个信号肽，在第 20 个和第 21 个氨基酸之间有切割位点。跨膜结构分析表明该蛋白具有 3 个明显的跨膜区。二级结构预测，*SaLhcb* 的环状结构占 60.75%，螺旋结构占 39.25%。软件分析预测该蛋白位于叶绿体中。将 *SaLhcb2* 与其他物种的该基因编码蛋白进行同源比对，结果显示：*SaLhcb2* 和辽东槲木 *Aralia elata* 该蛋白源性最高(94.28%)，和蓖麻 *Ricinus communis* 的同源性相对最低(92.08%)(图 3)。



M. 标记物 2 000 bp; R. 根; S. 茎; L. 叶。

图 1 东南景天根、茎、叶 RNA 电泳图(左)和胶回收电泳图(右)

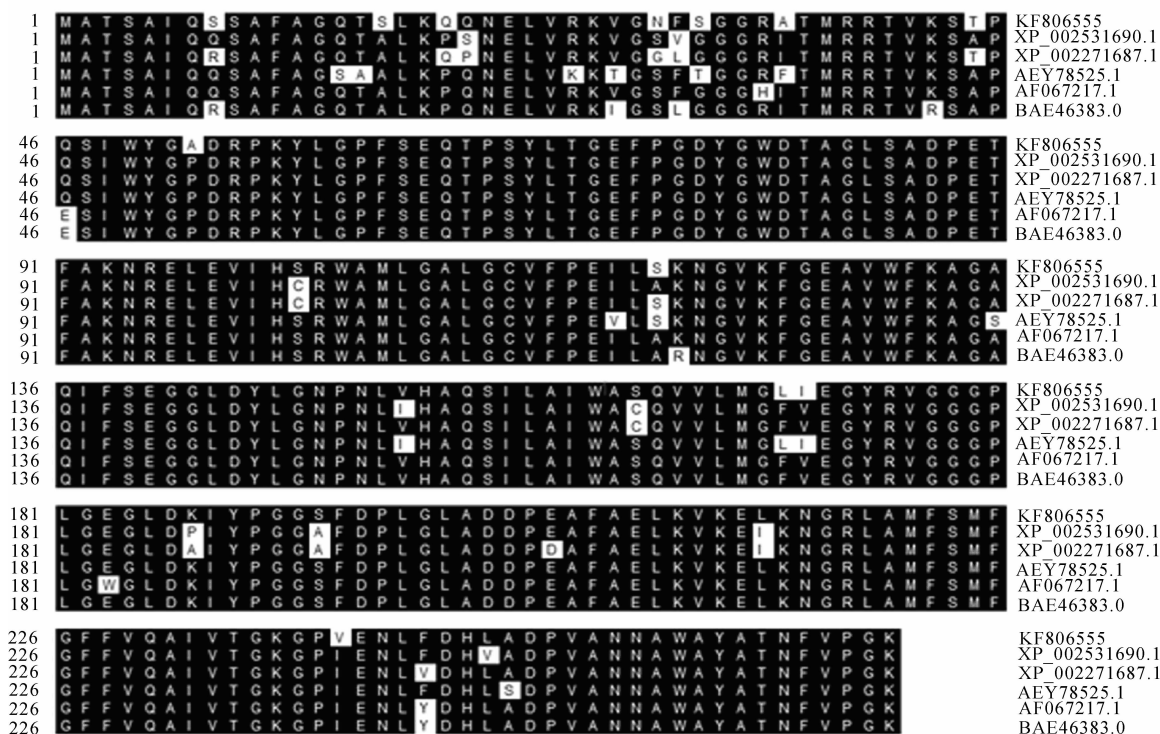
Figure 1 Electrophoresis figure of RNA in root stem leaf (left) and agarose gel DNA purification (right)



图 2 东南景天 *LHCB* cDNA 序列、内含子序列
Figure 2 cDNA sequence and intron sequence of *LHCB*

2.2 SaLHCB2 原核表达分析

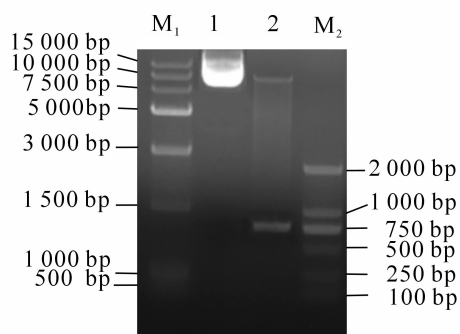
重组产物送测序并用 *BamH* I 和 *Xho* I 双酶切电泳检测(图 4)。图 4 中可以看出:重组后的质粒经过双酶切之后电泳结果出现载体片段和 800 bp 左右的的目的基因,结合测序结果证明:*SaLhcb2* 和表达载体 pET-28a 重组成功。图 5 中泳道 2~5 分别是诱导前和诱导 4.0, 5.0 和 6.0 h 后的蛋白电泳结果,红色框内为目的蛋白条带。可以看出:经 IPTG 诱导后,随着诱导时间的延长,目的片段蛋白浓度逐渐增加,即 *SaLhcb2* 表达量升高,说明重组蛋白能够在原核系统中高效表达,泳道 6 和泳道 7 分别是上清和包涵体中的目的蛋白条带,可以看出,蛋白主要位于包涵体中,因此,需要在后续实验进行蛋白复性以用于功能研究。



Kf806555 东南景天; XP_002531690.1 蓖麻; XP_002271687.1 葡萄;
AEY78525.1 万寿菊; AFO67217.1 辽宁楸木; BAE46383.1 人参。

图 3 *SaLhcb* 和其他植物该氨基酸序列同源性比对

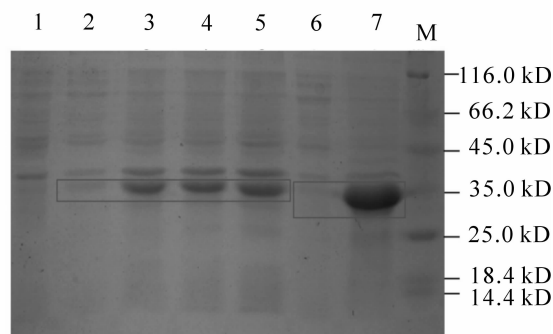
Figure 3 Homology comparison of *LHCB* in *Sedum alfredii* and other plants



1. 酶切前; 2. 酶切后;
M₁: 标记物 15 000 bp;
M₂: 标记物 2 000 bp。

图 4 双酶切电泳图

Figure 4 Double enzyme electrophoresis figure



1. *E. coli* BL21(DE3)载体; 2. 诱导前对照;
3. 诱导后 4 h; 4. 诱导后 5 h; 5. 诱导后 6 h; 6. 超
声破碎后的上清液; 7. 超声破碎后的包涵体。

图 5 pET-28a-LHCB SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳

Figure 5 SDS polyacrylamide gelelectrophoresis of pET-28a-LHCB

2.3 不同镉、铜、铅处理时间条件下东南景天根、茎、叶中 *SaLhcb2* 基因的表达分析

以东南景天泛素结合酶基因为内参，借助实时荧光定量，分析在镉、铜、铅不同胁迫时间后根、茎、叶中 *SaLhcb2* 基因的表达量。从图 6 中可以看出：镉处理后，根中 *SaLhcb2* 基因的表达量呈现先下调后上调的趋势，在 48.0 h 后其表达量显著上调，达到对照的 4.45 倍；在茎中除了 6.0 h *SaLhcb2* 基因胁迫后的表达量都明显上调外，在 0.5 h 时为最高，为对照的 5.86 倍；叶中表达量先降低后升高，在 12.0 h 后表达量上调，72.0 h 达到最高，为对照的 3.91 倍。铜处理后，0.5 h 根中该基因表达量就显著上调，6.0 h 时茎中的表达量也显著上调，分别为对照的 12.78 倍和 54.39 倍，随后其表达量都急剧降低；在叶片中表达量一直偏低，且变化不明显。铅处理后，根中 *SaLhcb2* 基因胁迫后 0.5~72.0 h 一直显著降低，96.0 h 时才出现上调，表达量接近未处理时；茎中 *SaLhcb2* 基因的表达量显著上调，6.0 h 时达到最高，为对照的 2.93 倍；但叶片中的表达量低于对照，48.0 h 时略有上升，为对照的 0.98 倍。说明 *SaLhcb2* 能够响应重金属镉、铜、铅的胁迫，但是响应模式和响应速度不同。3 种重金属处理后，从地下部位——根部的基因表达变化分析结果可以看出：镉、铅胁迫使得 *SaLhcb2* 基因表达量在一定时期内 (24.0 h 和 72.0 h) 受到抑制，而铜胁迫后，根中表达量迅速上调 (0.5 h)，表明根部对 3 种重金属都较为敏感；从茎部受胁迫后表达量看：镉、铅胁迫后，该基因表达量明显上调；铜处理后，在 6.0 h 左右该基因表达量显著上调，随后一直表达量较低。从叶片表达量来看：镉胁迫后，目的基因表达量在 12.0 h 后都显著上调，而铜、铅胁迫后表达量都基本上都比对照水平低。从超积累植物的特性可知，地下部位积累量很少，主要超富集重金属的部位是地上部位。推测东南景天的 *SaLhcb2* 对 3 种重金属响应模式不同，已有的研究结论显示：东南景天能够超富集镉，能够耐受一定程度的铅，但是目前未有研究证明

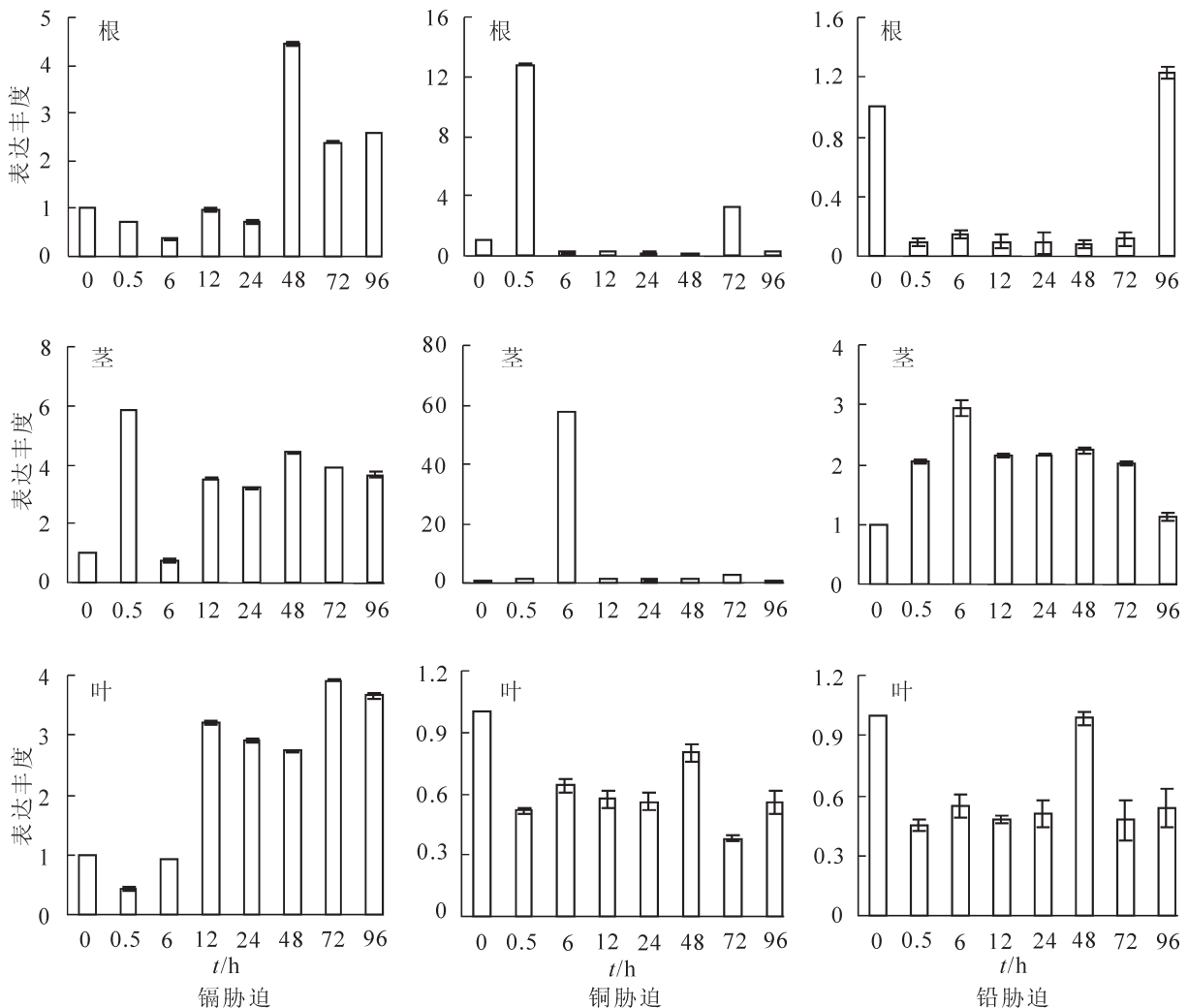


图 6 不同镉离子、铜离子、铅离子处理时间根茎叶 *Lhcb2* 基因表达量分析

Figure 6 Expression change of *Lhcb2* under different treat time with Cd^{2+} , Cu^{2+} and Pb^{2+}

其能超富集铜,从基因表达分析结果可以看出,铜胁迫后根部响应最快,随后茎部响应,这与离子运输的过程相符合,推测镉胁迫后茎叶部位能够超积累镉。

3 讨论

本研究利用本实验室前期构建的东南景天 cDNA 文库,克隆获得了 *SaLhcb2* 基因,构建了 pET-28a-LHCB 原核表达载体,初步研究了 *SaLhcb2* 基因和镉、铜、铅的相关性,为进一步研究重金属胁迫下 *SaLhcb2* 基因的调控机理奠定了基础。

Jun 等^[23]研究了光系统 II 中捕光蛋白的结构和功能,指出 *LHCB* 基因编码 LHC II 蛋白,它是光系统 II 的主要捕光叶绿素 a/b 结合蛋白,其主要功能是光能的吸收和传递,提高捕光效率,此外, LHC II 还能够调节光能的分配。光系统 II 中的捕光蛋白复合物主要由 3 种基因编码,分别是 *Lhcb1*, *Lhcb2* 和 *Lhcb3*^[24]。在这 3 种蛋白中 *Lhcb1* 和 *Lhcb2* 含量最丰富,当植物体内 *Lhcb1* 和 *Lhcb2* 的表达量受到抑制时,植物体内构成 LHC II 复合物的亚单元将缺失^[25]。镉胁迫致使 LHC II 复合体构象发生变化,这种变化可能是由于镉胁迫使得 *Lhcb1* 和 *Lhcb2* 蛋白分子量降低^[26]。田生科^[27]和张晓玲^[28]的研究显示:超积累型东南景天植株中的镉分布特点是叶中最高,茎次之,根中最低;铅则是根中最多,茎叶中含量较低。张敏等^[17]分析了 2 种不同生态型东南景天 *LHCB* 基因对镉/铜胁迫的响应,证明 *LHCB* 基因的超表达能够增加超积累型东南景天根和茎的生物量,并提高镉在植物体内的积累量。

qRT-PCR 结果显示,镉处理后,根部的 *SaLhcb2* 基因在 24.0 h 内表达量均降低,48.0 h 后表达量上调,在茎、叶中 12.0 h 后该基因表达都上调。*SaLhcb2* 基因在镉处理 0.5 h 时茎中显著升高,12.0 h 时叶片中显著升高,推测其对镉胁迫相对敏感,为前期响应基因。在叶片中响应速度相比茎中较慢,推测这可能和根、茎对镉的隔离作用有关,使得叶片中镉的积累相对较慢。*SaLhcb2* 基因可能并不直接参与东南景天受到镉胁迫之后的解毒机制,但是能够为其提供能量,使得地上绿色部分光能的吸收效率提高,并传递能量到茎、叶中。张玉秀等^[29]的研究表明:重金属镉或铜胁迫能够增强印度芥菜 *Brassica juncea* 重金属 ATP 酶的表达,说明重金属富集与能量代谢相关。我们推测在茎和叶中由于积累的镉离子较多从而相对需要更多的能量,所以该基因的表达量较高,而根部镉积累量较少,所以 *SaLhcb2* 基因表达量较低,这与田生科等^[27]的研究结果一致。铜处理后 0.5 h 根中表达量就极显著上调,6.0 h 时茎中表达量极显著上调,叶片中表达量一直较低,可能在 0.5 h 根中能够积累和吸收部分铜,6.0 h 时转移到茎中,但是叶片中不能够积累铜,目前报道并未显示东南景天能够超富集铜。铅处理后,该基因在根中表达量一直较低,到 96.0 h 才上调,而胁迫 0.5 h 后茎中该基因的表达就迅速上调随后其表达量一直较对照高,而叶片中表达量在 96.0 h 内都较低。东南景天铅积累的特点是在茎和叶片中积累较少,而根部积累较多^[27],推测可能 *SaLhcb2* 定位于叶绿体中,所以在根部该基因本身的表达量偏低, *SaLhcb2* 基因可能为后期铅胁迫响应基因。此外,3 种重金属胁迫后根部该基因显著上调的时间点不同,说明东南景天对这 3 种重金属的敏感度有差异;一般重金属富集主要是在地上部位,在茎中,可以看出长时间处理后 (96.0 h),镉、铅处理过的植株该基因表达量相比铜更高,说明植株茎中富集镉和铅的能力强于铜,同理可看出在叶片中富集镉的能力强于铜和铅。

参考文献:

- [1] 柳絮,范仲学,张斌,等.我国土壤镉污染及其修复研究[J].山东农业科学,2007,39(6):94-97.
LIU Xu, FAN Zhongxue, ZHANG Bin, et al. Soil pollution and repair of Cd in our country [J]. *Shandong Agric Sci*, 2007, 39(6): 94-97.
- [2] 郑喜坤,鲁安怀,高翔,等.土壤中重金属污染现状与防治办法[J].土壤与环境,2002,11(1):79-84.
ZHENG Xishen, LU Anhuai, GAO Xiang, et al. Contamination of heavy metals in soil present situation and method [J]. *Soil Environ Sci*, 2002, 11(1): 79-84.
- [3] 陈同斌,韦朝阳,黄泽春,等.砷超富集植物蜈蚣草及其对砷的富集特征[J].科学通报,2002,47(3):207-210.
CHEN Tongbin, WEI Chaoyang, HUANG Zechun, et al. Enrichment characteristics of arsenic in *Pteris vittata* L.: a kind of arsenic hyperaccumulation plants [J]. *Chin Sci Bull*, 2002, 47(3): 207-210.

- [4] SAIFULLAH, MEERS E, QADIR M, *et al.* EDTA-assisted Pb phytoextraction [J]. *Chemosphere*, 2002, **74**(10): 1279 – 1291.
- [5] 何启贤. 镉超富集植物筛选研究进展[J]. 环境保护与循环经济, 2013, **33**(1): 46 – 49.
HE Qixian. Research advance in screening of cadmium hyperaccumulation plants [J]. *Environ Prot & Circular Econ*, 2013, **33**(1): 46 – 49.
- [6] 熊愈辉. 镉污染土壤植物修复研究进展[J]. 安徽农业科学, 2007, **35**(22): 6876 – 6878.
XIONG Yuhui. Research advance in soil phytoremediation polluted by cadmium [J]. *J Anhui Agric Sci*, 2007, **35**(22): 6876 – 6878.
- [7] HE Bing, YANG Xiao'e, NI Wuzhong, *et al.* *Sedum alfredii*: a new lead-accumulating ecotype [J]. *Acta Bot Sin*, 2002, **44**(11): 1365 – 1370.
- [8] 杨肖娥, 龙新宪, 倪吾钟, 等. 东南景天 *Sedum alfredii*: 一种新的锌超级累植物[J]. 科学通报, 2002, **47**(13): 1003 – 1006.
YANG Xiao'e, LONG Xinxian, NI Wuzhong, *et al.* *Sedum alfredii*: a new zinc-accumulating ecotype[J]. *Chin Sci Bull*, 2002, **47**(13): 1003 – 1006.
- [9] LIU Fengjie, TANG Yetao, DU Ruijun, *et al.* Root foraging for zinc and cadmium requirement in the Zn/Cd hyperaccumulator plant *Sedum alfredii* [J]. *Plant Soil*, 2010, **327**(1): 365 – 375.
- [10] THORNER J P, ALBERTE R S. *The Organization of Chlorophyll in vivo* [M]. Beilin: Springer, 1977: 574 – 582.
- [11] BASSI R, RIGONI F, GIACOMETTI G M. Chlorophyll binding proteins with antenna function in higher plants and green algae [J]. *Photochem & Photobiol*, 1990, **52**(6): 1187 – 1206.
- [12] BASSI R, DAINESE P A. Supramolecular light-harvesting complex from chloroplast photosystem (II) membranes [J]. *Eur J Biochem*, 1992, **204**(1): 317 – 326.
- [13] 林江波, 王伟英, 邹晖, 等. 中国水仙叶绿素 a/b 结合蛋白基因 *Ntcab1* 的克隆与序列分析[J]. 福建农业学报, 2013, **28**(5): 463 – 467.
LIN Jiangbo, WANG Weiying, ZOU Hui, *et al.* Cloning and sequence analysis on gene of chlorophyll a/b-binding protein from *Narcissus tazetta* var. *chinensis* [J]. *Fujian J Agric Sci*, 2013, **28**(5): 463 – 467.
- [14] 高志民, 刘颖丽, 彭镇华. 毛竹 PS II 大量捕光天线蛋白基因克隆及其表达分析[J]. 植物科学学报, 2012, **30**(1): 64 – 71.
GAO Zhimin, LIU Yingli, PENG Zhenhua. Cloning and molecular characterization of the major light harvesting antenna protein genes of PS II in *Phyllostachys edulis* [J]. *Plant Sci J*, 2012, **30**(1): 64 – 71.
- [15] 向太和, 王利琳, 庞基良. 水稻(*Oryza sativa* L.)捕光叶绿素 a/b 结合蛋白全长 cDNA 的克隆和特性分析[J]. 作物学报, 2005, **31**(9): 1227 – 1232.
XIANG Taihe, WANG Lilin, PANG Jiliang. Cloning and characterization of a full-length cab gene encoding the light-harvesting chlorophyll a/b-binding proteins in rice (*Oryza sativa* L.)[J]. *Acta Agron Sin*, 2005, **31**(9): 1227 – 1232.
- [16] DITTAMI S M, MICHEL G, COLLÉN J, *et al.* Chlorophyll-binding proteins revisited-a multigenic family of light-harvesting and stress proteins from a brown algal perspective [J]. *BMC Evol Biol*, 2010, **10**(11): 365 – 378.
- [17] ZHANG Min, SENOURA T, YANG Xiao, *et al.* *Lhcb2* gene expression analysis in two ecotypes of *Sedum alfredii* subjected to Zn/Cd treatments with functional analysis of *SaLhcb2* isolated from a Zn/Cd hyperaccumulator [J]. *Biotechnol Lett*, 2011, **33**(9): 1865 – 1871.
- [18] 韩霜, 刘瑞霞, 张兆和, 等. 菊花叶绿素 a/b 结合蛋白基因 *CmLhcb1* 及其启动子的克隆和表达分析[J]. 园艺学报, 2013, **40**(6): 1119 – 1128.
HAN Shuang, LIU Ruixia, ZHANG Zhaohe, *et al.* cloning of chlorophyll a/b binding protein *CmLhcb1* and promoter from *Chrysanthemum morifolium* and expression analysis [J]. *Acta Horti Sin*, 2013, **40**(6): 1119 – 1128.
- [19] 王关林, 方红筠. 植物基因工程[M]. 2 版. 北京: 科学出版社, 2002: 744.
- [20] 金晓芬. 镉超级累植物东南景天谷胱甘肽代谢特征及比较蛋白质组学研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2008.
JIN Xiaofen. *Glutathione Metabolisms in Cadmium Hyperaccumulator Sedum alfredii Hance and its Proteomics Analysis* [D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2008.
- [21] SANG Jian, HAN Xiaojiao, LIU Mingying, *et al.* Selection and validation of reference gene for real-time

- quantitative PCR in hyperaccumulating ecotype of *Sedum alfredii* under different yeavy metals stresses [J]. *PLOS one*, 2013, **8**(12): 1 – 10.
- [22] LIVAK K J, SCHMITTGEN T D. Analysis of relative gene expression data use real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method [J]. *Methods*, 2001, **25**(4): 402 – 408.
- [23] MINAGAWA J, TAKAHASHI Y. Structure, function and assembly of photosystem II and its light-harvesting proteins[J]. *Photosynth Res*, 2004, **82**(3): 241 – 263.
- [24] LUCINSKI R, JACKOWSKI G. The structure, functions and degradation of pigment-binding proteins of photosystem II [J]. *Acta Biochim Pol*, 2006, **53**(4): 693 – 708.
- [25] JENNY A, MARK W, ROBIN G, *et al.* Absence of the Lhcb1 and Lhcb2 proteins of the light-harvesting complex of photosystem (II) effects on photosynthesis, granna stacking and fitness [J]. *Plant J*, 2003, **35**(3): 350 – 361.
- [26] JANIK E, MAKSYMIEC W, MAZUR R, *et al.* Structual and functional modifications of the major light-harvesting complex II in cadmium-or copper-treated *Secale cereal* [J]. *Plant Cell Physiol*, 2010, **51**(8): 1330 – 1340.
- [27] 田生科. 超级累东南景天(*Sedum alfredii* Hance)对重金属(Zn/Cd/Pb)的解毒机制[D]. 杭州: 浙江大学, 2012.
TIAN Shengke. *Mechanisms Behind Detoxification of Heavy Metals (Zn/Cd/Pb) in the Hyperaccumulatoor Sedum alfredii Hance* [D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2012.
- [28] 张晓玲. 东南景天古银矿生态型超级累镉的生理机制与调控[D]. 杭州: 浙江大学, 2008.
ZHANG Xiaoling. *Physiological Mechanisms of Cd Hyperaccumulation by the ASME of Sedum alfredii H. and its Regulation*[D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2008.
- [29] 张玉秀, 张媛雅, 柴团耀. 印度芥菜重金属 ATP 酶基因的分离与表达[J]. 中国科学院研究生院学报, 2011, **28**(4): 551 – 555.
ZHANG Yuxiu, ZHANG Yuanya, CHAI Tuanyao. Isolation and expression of heavy metal ATPase in *Brassica juncea* L.[J]. *J Grad Univ Chin Acad Sci*, 2011, **28**(4): 551 – 555.
- [30] 张圆圆, 窦春英, 姚芳, 等. 氮素营养对重金属超积累植物东南景天吸收积累锌和镉的影响[J]. 浙江林学院学报, 2010, **27**(6): 831 – 838.
ZHANG Yuanyuan, DOU Chunying, YAO Fang, *et al.* Nitrogen application to enhance zinc and cadmium uptake by the hyperaccumulator *Sedum alfredii* [J]. *J Zhejiang For Coll*, 2010, **27**(6): 831 – 838.