

学校编码：10384
学号：22620101151390

密级

廈門大學

硕士学位论文

利用褐菖鮠肝 MT 和 HSPs 的 LAMP 技术
监测海洋重金属污染

Detection of hepatic MT and HSPs in *Sebastiscus
marmoratus* to monitoring metal pollution by loop-mediated
isothermal amplification

李珍珍

指导教师姓名：陈荣 副教授
专业名称：环境科学
论文提交日期：2013年5月
论文答辩时间：2013年6月

2013年6月

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为()课题(组)的研究成果,获得()课题(组)经费或实验室的资助,在()实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文(包括纸质版和电子版)，允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

()1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，于
年 月 日解密，解密后适用上述授权。

()2. 不保密，适用上述授权。

(请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。)

声明人(签名)：

年 月 日

摘要

目前我国对海洋环境中重金属污染的监测仍然是以化学分析为主,化学分析方法虽然能对环境或生物体内重金属含量进行精确的定量,但无法反映污染物的生物效应,也难以了解污染物对海洋生态系统造成的破坏程度,很难评估其潜在毒性。因此筛选出与环境污染物相关性好的分子生物标志物,并建立特异性强、微量鉴定、费用低廉的快速检测方法具有良好的应用前景和效益。

本研究以灵敏度高、特异性强的海洋重金属污染生物标志物—MT为指标,克隆了褐菖鲉(*Sebastes marmoratus*)的MT基因序列,建立并优化了针对MT的LAMP技术。为验证该方法的可行性,将褐菖鲉分别暴露于 $1.6 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $8.0 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $40 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $200 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $500 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的Cd和Pb 7 d后,利用LAMP技术和Realtime-PCR技术定量测定肝脏MT mRNA表达量,对比验证两者结果。同时利用LAMP技术对污染后HSPs(HSP60、HSC70、HSP70、HSP90)基因的表达量进行检测,分析Cd和Pb与HSPs各亚型的剂量-效应关系,筛选出重金属污染的早期预测指标。主要研究结果如下:

(1) 建立并优化了褐菖鲉MT的LAMP检测技术,结果表明,外引物与内引物浓度比为1:6时扩增效果最好,最佳 Mg^{2+} 浓度为 $6 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$,甜菜碱最佳浓度为 $0.4 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$,最佳dNTP浓度为 $1.4 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$,最适反应温度为 $64 \text{ }^\circ\text{C}$,最佳反应时间为60 min。

(2) Cd、Pb 污染实验表明,利用 LAMP 技术定量测定褐菖鲉肝脏 MT 表达量与 Real-time PCR 检测结果有高度的一致性,证实了 LAMP 技术应用于重金属污染样品检测的可行性。且 LAMP 技术具有反应速度快、设备简单、结果易于鉴定等 Real-time PCR 无法比拟的优势,更适合作为海洋重金属污染的现场监测方法。

(3) 褐菖鲉肝脏 MT 对不同浓度 Cd 和 Pb 污染的响应趋势大不相同。MT 对 Cd 污染较敏感,在 $8.0 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度组被强烈诱导且 mRNA 表达量达到最大值($P=0.000$),为对照组的 12.27 倍,其余各浓度组与对照组无显著性差异,表明 MT 可以作为 Cd 污染早期预测指标。MT 对 Pb 污染较不敏感, $40 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度组之前随浓度的增加 mRNA 表达量逐渐下降,而后逐渐上升,在 $500 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 组达到最大值,但所有浓度组与对照组均无显著性差异($P>0.05$)。

(4) 采取LAMP技术检测Cd与Pb污染后HSPs的表达量表明, HSPs对单一重金属的不同浓度以及不同重金属的响应趋势各异, 总体对Cd比Pb敏感。对Cd污染早期就比较敏感的基因有HSC70和HSP70, 较低浓度组诱导下HSC70和HSP70的表达量均上升, HSP70上升显著($P=0.000$), 为对照组的54.07倍; HSP60和HSP90在低浓度诱导下上升不显著或被抑制, 在污染高浓度组表达量上升, 分别在 $8.0 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $40 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 达到最大值。对Pb污染早期比较敏感的基因为HSC70和HSP90, 在 $1.6 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度组, 这两种基因的表达量均被诱导, HSP90上升显著($P=0.003$), 为对照组的4.7倍, 在小于 $500 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 组中, Pb对HSPs基因表达量的诱导或者抑制均不显著, 在 $500 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 被显著诱导的蛋白有HSP90($P=0.004$)和HSP70($P=0.013$), 分别为对照组的4.27和4.69倍。

关键词: 环介导等温扩增技术; 金属硫蛋白; 热休克蛋白; 褐菖鲉; 重金属

Abstract

At present, monitoring of heavy metal pollutions in the marine environment is still based on the chemical analysis techniques. Although the chemical analysis method would precisely quantify the content of heavy metal in organism or in the environment, but it cannot reflect the effects of pollutants on organisms and assess the potential toxicity caused by the pollutants on marine ecosystems. Therefore, it is imperative to find the corresponding biomarkers of environmental pollutants and establish specific, low cost, rapid detection method of them.

In this study, MT gene was cloned from *Sebastes marmoratus*. LAMP technology for detecting the MT gene was established and optimized. To study the feasibility of LAMP, *Sebastes marmoratus* was exposed to $1.6 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, $8.0 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, $40 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, $200 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, $500 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ Cd and Pb, sampled after 7 days. The contents of MT mRNA in the liver of *Sebastes marmoratus* were measured by LAMP method and Real-time PCR. Simultaneously, the contents of HSPs mRNA in the liver of *Sebastes marmoratus* were also measured by LAMP method, filtered out the early prediction biomarkers of marine heavy metal pollution. The results showed as follows:

(1) LAMP technology for detecting the MT gene was developed. The data showed that the best ratio of outer primers to inner primers was 1 to 6, with $6 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{Mg}^{2+}$, $0.4 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ betaine and $1.4 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ dNTP, the optimal amplification condition was at $64 \text{ }^\circ\text{C}$ for 60 min.

(2) LAMP Technology test results of MT expression after exposure to Cd and Pb is highly consistent with Real-time PCR. Moreover, the LAMP as a novel nucleic acid amplification technology rapid, simple equipment and easy identification, which were the Real-time PCR incomparable advantages, indicating that the quantitative LAMP was suitable to measure marine heavy metal pollution on site.

(3) MT mRNA in the liver of *Sebastes marmoratus* exhibited different dose-effect relations to Cd and Pb pollution. It was more sensitive to Cd pollution. MT expression level was strongly induced in $8.0 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ concentrations and reached

the maximum of expression($P=0.000$), 12.27-fold to the control group, other concentrations were showed no significant difference to the control group, indicating that MT can be used as a early predictor for Cd pollution; MT was less sensitive for Pb contamination, began to be induced after $40 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ concentrations, reached the maximum of expression in $500 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ concentrations and showed no significant difference compared with the control group.

(4) The expression levels of HSPs after expose to Cd and Pb were much variable depending on the protein species and pollution concentrations. HSPs were all more sensitive to Cd than Pb. HSP70 and HSC70 genes showed better sensitivity and are induced under lower concentrations of Cd pollution, HSP70 is raised significantly($P=0.000$), 54.07-fold to the control group, HSP60 and HSP90 expressions induced by low Cd concentrations are insignificant or inhibited, their transcription levels only rise at high concentrations group, reached the maximum of expression in $8.0 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ and $40 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, respectively; HSP90 and HSC70 genes showed better sensitivity of Pb pollution, HSP90 is raised significantly($P=0.003$), 4.7 times of the control group. In less than $500 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ concentration groups, the expression of HSPs induction or inhibition by Pb were not significant. In $500 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ concentration group, HSP90($P=0.004$) and HSP70($P=0.013$) were significantly induced, 4.27- and 4.69-fold to the control group , respectively.

Keywords: Loop-mediated isothermal amplification; Metallothionein; Heat shock proteins; *Sebastiscus marmoratus*; Heavy metal

缩略语

英文缩写	英文全称	中文名称
LAMP	Loop-mediated isothermal amplification	环介导等温扩增技术
PCR	Polymerase chain reaction	聚合酶催化链式反应
RACE	Rapid-amplification of cDNA ends	末端快速克隆的技术
CDS	Coding sequence	基因编码序列
GSP	Gene specific primer	基因特异性引物
UPM	Universal primer	通用引物
NUP	Nested primer	内嵌引物
Real-time PCR	Real-time Fluorescence Quantitative PCR	实时荧光定量 PCR
MT	Metallothionein	金属硫蛋白
HSPs	Heat Shock Proteins	热休克蛋白
DEPC	Diethyl pyrocarbonate	焦碳酸二乙酯
Cd	Cadmium	镉
Pb	Lead	铅

目录

摘要.....	I
Abstract.....	III
缩略语.....	IV
第 1 章 绪论	1
1.1 重金属污染概.....	1
1.1.2 海洋重金属污染现状.....	1
1.1.3 Cd 污染的生物学毒性.....	2
1.1.4 Pb 污染的生物学毒性.....	5
1.2 海洋重金属污染生物标志物.....	6
1.2.1 金属硫蛋白.....	7
1.2.2 热休克蛋白.....	12
1.2.3 其他生物指示物.....	13
1.3 环介导等温扩增技术.....	14
1.3.1 LAMP 原理.....	14
1.3.2 LAMP 反应体系.....	16
1.3.3 LAMP 的应用前景.....	17
1.4 本研究的目的、意义及主要内容.....	17
1.4.1 研究目的.....	17
1.4.2 主要意义.....	17
1.4.3 研究内容.....	18
第 2 章 厦门海域褐菖鲉金属硫蛋白基因的克隆	20
2.1 材料.....	20
2.1.1 实验用褐菖鲉.....	20
2.1.2 试剂与仪器.....	20
2.2 实验方法.....	21
2.2.1 MT 基因的克隆.....	21

2.2.2 RACE 扩增 cDNA 末端	24
2.3 实验结果.....	31
2.4 讨论.....	32
第 3 章 LAMP 技术检测金属硫蛋白基因表达方法的建立	33
3.1 实验材料和仪器.....	33
3.1.1 实验动物.....	33
3.1.2 主要试剂和仪器.....	33
3.2 实验方法.....	33
3.2.1 模板 cDNA 的制备	33
3.2.2 引物设计.....	33
3.2.3 LAMP 反应体系及条件的优化.....	34
3.2.4 标准品的制备.....	36
3.3 实验结果.....	36
3.3.1 引物验证结果.....	36
3.3.2 LAMP 反应体系优化结果	37
3.4 讨论.....	40
第 4 章 Cd 与 Pb 诱导褐菖鲉金属硫蛋白基因的表达	42
4.1 材料与方法.....	42
4.1.1 实验动物.....	42
4.1.2 主要试剂与仪器.....	42
4.1.3 实验方法.....	42
4.2 MT 表达定量.....	43
4.2.1 LAMP 定量	43
4.2.2 Real-time 定量.....	44
4.3 数据处理.....	44
4.4 实验结果.....	45
4.4.1 Cd 诱导后褐菖鲉肝 MT mRNA 的表达变化.....	45
4.4.2 Pb 诱导后褐菖鲉肝 MT mRNA 的表达变化	47
4.5 讨论.....	48

第 5 章 Cd 与 Pb 诱导褐菖鲉热休克蛋白基因的表达	50
5.1 材料与方法.....	50
5.2 热休克蛋白表达定量.....	50
5.2.1 LAMP 定量	50
5.3 实验结果.....	53
5.3.1 褐菖鲉肝 HSP60 mRNA 基因的表达变化.....	53
5.3.2 褐菖鲉肝 HSP70 mRNA 基因的表达变化.....	54
5.3.3 褐菖鲉肝 HSC70 mRNA 基因的表达变化	55
5.3.4 褐菖鲉肝 HSP90 mRNA 基因的表达变化.....	56
5.4 讨论.....	57
第 6 章 结论与展望.....	60
6.1 结论.....	60
6.2 创新点.....	60
6.3 展望.....	61
参考文献.....	62
发表文章及参加课题	70
致谢.....	71

Table of Contents

Abstract (in Chinese)	I
Abstract (in English).....	III
List of Abbreviations.....	IV
Chapter 1 Preface.....	1
1.1 Marine heavy metal pollution	1
1.1.2 Pollution Situation of heavy metal	1
1.1.3 Biological toxicity of Cd	2
1.1.4 Biological toxicity of Pb	5
1.2 Marine pollution biomarkers.....	6
1.2.1 Metallothionein	7
1.2.2 Heat shock protein	12
1.2.3 Other biological indicators.....	13
1.3 Loop-Mediated Isothermal Amplification	14
1.3.1 Principle of LAMP method.....	14
1.3.2 Reaction system of LAMP method.....	16
1.3.3 Application of LAMP method.....	17
1.4 Significance and main point of the research.....	17
1.4.1 Research purposes.....	17
1.4.2 Main significance.....	17
1.4.3 Content of the study	18
Chapter 2 Cloning of MT gene from <i>Sebastes marmoratus</i>	20
2.1 Materials.....	20
2.1.1 Animal.....	20
2.1.2 Reagents and instruments	20
2.2 Methods.....	21
2.2.1 Gene cloning of MT.....	21
2.2.2 RACE.....	24

2.3 Results.....	31
2.4 Discussion.....	32
Chapter 3 Development of LAMP method to detect the expression of	
MT.....	33
3.1 Materials and instruments.....	33
3.1.1 Animals.....	33
3.1.2 Reagents and instruments.....	33
3.2 Methods.....	33
3.2.1 Preparation of the target DNA.....	33
3.2.2 Design of the primers.....	33
3.2.3 Optimized conditions for LAMP.....	34
3.2.4 Preparation of the standard.....	36
3.3 Results.....	36
3.3.1 Results of primer validation.....	36
3.3.2 Results of the optimization of LAMP conditions.....	37
3.4 Discussion.....	40
Chapter 4 Expression of MT gene from <i>Sebastiscus marmoratus</i> to	
Cd and Pb.....	42
4.1 Materials and Methods.....	42
4.1.1 Animals.....	42
4.1.2 Reagents and instruments.....	42
4.1.3 Methods.....	42
4.2 Quantitative expression of MT.....	43
4.2.1 LAMP quantitative.....	43
4.2.2 Real-time PCR quantitative.....	44
4.3 Statistical analysis.....	45
4.4 Results.....	45
4.4.1 The expression of MT gene in the liver of <i>Sebastiscus marmoratus</i>	

after exposure to Cd	45
4.4.2 The expression of MT gene in the liver of <i>Sebastiscus marmoratus</i> after exposure to Pb	47
4.5 Discussion	48
Chapter 5 Expression of HSPs gene from <i>Sebastiscus marmoratus</i> to Cd and Pb	50
5.1 Materials and Methods	50
5.2 Quantitative expression of HSPS	50
5.2.1 LAMP quantitative	50
5.3 Results	53
5.3.1 The expression of HSP60 gene in the liver of <i>Sebastiscus marmoratus</i> after exposure	53
5.3.2 The expression of HSP70 gene in the liver of <i>Sebastiscus marmoratus</i> after exposure	54
5.3.3 The expression of HSC70 gene in the liver of <i>Sebastiscus marmoratus</i> after exposure	55
5.3.4 The expression of HSP90 gene in the liver of <i>Sebastiscus marmoratus</i> after exposure	56
5.4 Discussion	57
Chapter 6 Summary and prospection	60
6.1 Conclusions	60
6.2 Innovation	60
6.3 Prospection	61
Reference	62
Participated project and publication	70
Acknowledgements	71

第 1 章 绪论

1.1 重金属污染概述

经济的迅速发展,加速了沿海城市的工业化,大量的工业废水致使沿海海域的环境受到了严重的污染。其中,因为重金属具有特殊的化学性质及毒性效应,而被称为环境中具有潜在危害的重要污染物,具有高度危害性和难治理性,引起了全世界范围的广泛关注。目前污染海洋的重金属元素主要有 Hg、Cd、Pb、Zn、Cr、Cu 等,它们对海洋生物都具有不同程度的毒性作用。而海洋生物对它们的蓄积作用也影响了海洋水产品的品质,并可通过食物链影响人类的健康。重金属污染还广泛影响捕捞业、养殖业和旅游业的发展,并有可能刺激赤潮的发生。因此重金属污染是海洋环境监测中的重要内容。

1.1.2 海洋重金属污染现状

海洋重金属污染呈全球化分布,危害较大,它们一般多种类共存,且在水体中分布形态多样,分布状况不仅受自物化性质影响,pH、水温等环境条件,水文气象条件及大气沉降都能对其产生影响。对世界各地海域的重金属污染状况进行调查表明,全球多地海域都有重金属污染。如,希腊的萨洛尼卡湾(Zabetoglou et al., 2002),美国的旧金山湾,德国的波罗的海海域等(Szefer et al., 2009)。

2009 年至今,我国已经连续发生了 30 多起重特大重金属污染事件,重金属污染问题越来越受到人们的关注。我国的香港海域、渤海湾、三亚湾、珠江口海域及湛江港湾等都出现不同程度的重金属污染(黄德银等, 2003; 郝泽嘉等, 2008; 毛天宇, 2009)。Qin 等(2006)对渤海湾的研究表明,在大沽口与秦口河河口沉积物中的 Cd 污染较严重,表现出明显的人类活动迹象,陆源污染是这些河口地区沉积物中主要污染物的来源。整个渤海湾 Cd 背景值含量已经因影响而发生变化;全监测区 Pb 污染的状况也不容乐观,表现为海水可溶态 Pb 平均含量均超过国家一级海水水质标准,其中 2002~2004 连续 3 年 Pb 含量均超过国家海水水质二级标准,且含量呈增加态势,持续长时间大面积的海水 Pb 污染必然会对渤海湾的生态环境带来负面影响(Verlecar et al., 2006; Kertesz et al., 2006)。黄海涛等(2009)研究表明:江河湖库底质的污染率高达 80.1%。太湖底泥中 TCu、TPb、TCd 含量均处于轻度污染水平;在全国各近岸海域海水采集的样品中 Pb 超标率

62.9%，Cu 超标率为 25.9%，Cd 和 Hg 也有明显超标现象。在我国重金属污染中，最严重的是 Cd、Hg、Pb 和 As。

1.1.3 Cd 污染的生物学毒性

1.1.3.1 Cd 的毒理学效应

1.1.3.1.1 引起过氧化损伤

过氧化损伤是一种重金属等外源环境污染物对生物体的毒性作用(周启星等, 2004)。过量的环境污染物包括 Cd^{2+} 进入机体后, 会诱导机体内产生大量的活性氧自由基(reactive oxygen species, ROS), 包括羟基自由基($\cdot\text{OH}$), 超氧阴离子自由基($\text{O}^{\cdot-}$)和过氧化氢(H_2O_2)等, 这些活性氧自由基进攻不饱和脂肪酸并引发生物膜的脂质过氧化, 导致抗氧化系统的失调和损伤以及酶系统不同程度的破坏(周启星等, 2004)。同时, 过氧化自由基也会攻击核酸分子, 造成 DNA 断裂, 最终造成细胞损伤甚至凋亡(周启星等, 2004)。研究发现, Cd^{2+} 对细胞内抗氧化酶和巯基的破坏是诱发脂质过氧化的主要原因(Sharma et al., 1991)。抗氧化酶系统的破坏会降低细胞对过氧化自由基的清除作用, 导致产生大量的过氧化自由基。 Cd^{2+} 还会降低线粒体的呼吸功能(马卓和陈万芳, 1996), 这可能是 Cd^{2+} 诱发自由基产生的另一原因。

1.1.3.1.2 遗传毒性

Cd 对生物体具有遗传毒性, 其损失的方式与机制也一直是遗传毒理学研究的热点。Cd 对生物体的遗传毒性机制包括: 对核酸大分子的攻击; 促进自由基链式反应; 抑制 DNA 损伤的修复; 干扰细胞分裂等(赵伟和王强, 1999)。低浓度的 Cd 能够抑制体内酶的活性并诱导细胞膜的脂质过氧化产生各种活性氧自由基, 这些活性氧自由基会攻击 DNA 大分子, 造成 DNA 的断裂, 若断裂的 DNA 不能及时修复, DNA 的功能就会受到影响进而损伤遗传物质(赵伟和王强, 1999); 高浓度的 Cd 会影响核酸内切酶及聚合酶的活性, 干扰复制的精确性从而引发 DNA 突变(赵伟和王强, 1999)。另外, Cd 还会诱导细胞染色体内的同源基因重组, 诱导非程序性的 DNA 合成及促进细胞核微核的形成, 对基因产生毒性作用(赵伟和王强, 1999)。胡晓磐等(2004)研究了 Cd 对鲫鱼(*Carassius auratus*)淋巴细

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

廈門大學博碩士論文摘要庫