

DOI: 10.7524/AJE.1673-5897.20180110001

李景龙, 孙玉青, 陈保冬, 等. 丛枝菌根真菌砷酸盐还原酶基因 *RiarsC* 的克隆和功能分析[J]. 生态毒理学报, 2018, 13(3): 71-77

Li J L, Sun Y Q, Chen B D, et al. Cloning and characterization of arsenate reductase gene *RiarsC* from arbuscular mycorrhizal fungi [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2018, 13(3): 71-77 (in Chinese)

丛枝菌根真菌砷酸盐还原酶基因 *RiarsC* 的克隆和功能分析

李景龙^{1,2}, 孙玉青^{1,2}, 陈保冬^{1,2}, 李涛¹, 胡亚军¹, 张莘^{1,2,*}

1. 中国科学院生态环境研究中心 城市与区域生态国家重点实验室, 北京 100085

2. 中国科学院大学, 北京 100049

收稿日期: 2018-01-10 录用日期: 2018-02-28

摘要: 丛枝菌根真菌(AMF)在增强植物砷(As)抗性方面发挥着重要作用。已有相关研究表明,接种 AMF 能提高植物体内三价砷 As(III)的比例,AMF 可能参与了将五价砷 As(V)还原为 As(III)的过程从而提高了菌根植物的 As 抗性,但目前尚缺乏直接分子证据。本文从异形根胞囊霉(*Rhizophagus irregularis*)菌丝中克隆得到了一个砷酸盐还原酶基因 *RiarsC* 并进行序列分析。将该基因转入 *arsC* 缺陷型大肠杆菌(*Escherichia coli*)菌株 WC3110 ($\Delta arsC$)中,通过 As(V)抗性生长曲线和 As 形态测定,分析了该基因的功能。结果显示,*RiarsC* 属于谷氧还蛋白-谷胱甘肽依赖的砷酸盐还原酶家族;*RiarsC* 基因的表达显著提高了 As 敏感型 *E. coli* 菌株对 As(V)的抗性,当培养基中 As(V)浓度为 $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时表现更加明显。As 形态分析表明,表达 *RiarsC* 的 *E. coli* 菌株能够将培养基中 71.03% 的 As(V)还原为 As(III);与表达空载体的菌株相比,还原效率提高了 61.98%。本研究证明了 AMF 的砷解毒还原能力,为进一步开展 AMF 的砷代谢机制研究提供了一定的分子生物学基础。

关键词: 丛枝菌根真菌;砷酸盐还原酶基因;克隆;基因功能验证

文章编号: 1673-5897(2018)3-071-07 中图分类号: X171.5 文献标识码: A

Cloning and Characterization of Arsenate Reductase Gene *RiarsC* from Arbuscular Mycorrhizal Fungi

Li Jinglong^{1,2}, Sun Yuqing^{1,2}, Chen Baodong^{1,2}, Li Tao¹, Hu Yajun¹, Zhang Xin^{1,2,*}

1. State Key Laboratory of Urban and Regional Ecology, Research Center for Eco-Environmental Sciences, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100085, China

2. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

Received 10 January 2018 accepted 28 February 2018

Abstract: Arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) play a vital role in improving plant arsenic (As) tolerance. Studies have shown that AMF colonization could increase As(III) proportion in plants, suggesting that AMF might involve in reduction of As(V) into As(III). However, the molecular evidence of arsenate reduction in AMF is still lacking. Here, an arsenate reductase gene (*RiarsC*) from AM fungus *Rhizophagus irregularis* was cloned and characterized. *RiarsC* was transferred to *Escherichia coli* strain WC3110 ($\Delta arsC$), whose arsenate reductase gene was knocked out

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(41471219, 21677164)

作者简介: 李景龙(1992-), 男, 硕士, 研究方向为土壤污染修复, E-mail: caulijinglong@163.com

* 通讯作者(Corresponding author), E-mail: xinzhang@rcees.ac.cn

and was sensitive to As(V). The function of *RiarsC* was verified through growth curve comparison and As speciation analysis. The results showed that *RiarsC* belonged to the Grx/GSH linked *ArsC* family. Heterologous expression of *RiarsC* enhanced As(V) tolerance of WC3110, especially under the As(V) concentration of $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ in LB medium. *E. coli* expressing *RiarsC* reduced 71.03% of As(V) into As(III) in LB medium. The As(V) reduction rate of *E. coli* bearing *RiarsC* increased by 61.98% compared to the strain expressing empty vector. The present study proved the ability of AMF to alleviate As toxicity by As(V) reduction, and advanced the research into the mechanism of As detoxification in AMF.

Keywords: arbuscular mycorrhizal fungi; arsenate reductase gene; cloning; gene function verification

砷(arsenic, As)是一种毒性极强的环境污染物和一类致癌物。自然因素及人类活动造成的土壤和水体砷污染已经成为亟待解决的全球性的环境问题^[1]。亚洲是受砷污染威胁最严重的地区,越南、印度、孟加拉等国以及我国的湖南、贵州、广东、内蒙古、山西以及台湾等地均受到不同程度的砷污染危害^[2-3]。环境中的砷对生物体从表观、生理到遗传方面都有严重的毒害作用,更可以通过饮用水和食物链危及人体健康^[4]。

自然土壤和水体中的砷主要以无机五价砷 As(V)和无机三价砷 As(III) 2种氧化态存在^[5]。As(V)主要通过磷转运蛋白进入生物体内,而 As(III)通过水通道蛋白被生物吸收^[6]。砷吸收进入生物细胞后,会发生一系列砷还原和甲基化的转化过程。As(V)首先在砷酸盐还原酶的作用下被还原成 As(III),生成的 As(III)可以被金属硫蛋白、植物络合素等结合固持在液泡中降低其移动性,或者通过特异性的膜转运蛋白将 As(III)排出体外,抑或在砷甲基转移酶的作用下将 As(III)转化为低毒的甲基砷最后以挥发态排出体外,从而达到砷解毒的目的^[7]。因此,将 As(V)还原为 As(III)是生物砷代谢及解毒过程中的关键环节。砷酸盐还原酶基因在细菌、真菌以及植物中已有广泛报道。希瓦氏菌 *Shewanella* sp. strain ANA-3 敲除砷酸盐还原酶基因 *arrAB* 后则无法在含 As(V)的环境中存活^[8];莱茵衣藻 *C. reinhardtii* 能够利用其自身的砷酸盐还原酶基因 *CrACR2.1* 和 *CrACR2.1* 将培养基中添加的 As(V)还原为 As(III)并外排到环境中^[9]。

丛枝菌根真菌(arbuscular mycorrhizal fungi, AMF)是土壤中普遍存在的一类内生真菌,能够与绝大多数陆生植物形成共生关系^[10]。AMF在改善植物矿质营养状况,促进植物生长,提高植物对干旱、重金属等逆境胁迫的耐性等方面都发挥了重要作用^[11-12]。研究表明,接种 AMF 能够显著降低植物体

内的砷浓度。一方面,AMF通过改善植物磷营养状况,促进植物生长,从而稀释了植物体内过量的砷^[13];另一方面,AMF的侵染能够使植物根系的高亲和磷转运蛋白的表达量下调,抑制植物对 As(V)的吸收^[14]。此外,Gonzalez-Chavez 等^[15]发现,AMF可能同样具有将体内的砷通过 As(III)外排系统排出体外的能力。As(III)外排泵 *ArsAB* 由 ATP 酶 *GiArsA* 和 As(III)透过酶 *GiArsB* 组成。环境中的 As(V)通过根外菌丝上的高亲和磷转运蛋白 *GiPT* 进入真菌菌丝,随后在菌丝内被还原为 As(III),然后在 *ArsAB* 的作用下排出体外。Li 等^[16]研究发现,接种 AMF 能够显著提高水稻根系 As(III)/As(V)的比例;Zhang 等^[17]在接种 AMF 的紫花苜蓿体内检测到了更高比例的 As(III),这些结果表明 AMF 很可能直接参与了 As(V)的还原过程。在这一途径中,已鉴定出 As(V)转运蛋白基因 *GiPT* 和 As(III)外排泵 *ArsAB* 中的 ATP 酶基因 *GiArsA*^[15]。然而,作为 AMF 砷代谢的关键步骤,As(V)还原过程的分子机制还未见报道。

本研究从 AMF 异形根孢囊霉 *Rhizophagus irregularis* DAOM 197198 中克隆得到了一个砷酸盐还原酶基因 *RiarsC*,并将该基因转入 *arsC* 缺陷型大肠杆菌 *E. coli* 菌株中。通过对 *E. coli* 的砷抗性和砷形态分析,对该基因的功能进行了初步的验证,从分子水平阐释了 AMF 对 As(V)的还原机理,更进一步揭示了 AMF 增强植物砷耐性的分子机制。

1 材料与方法 (Materials and methods)

1.1 供试菌株

AMF 异形根孢囊霉 *Rhizophagus irregularis* DAOM 197198,由中国科学院生态环境研究中心土壤生态过程与生态重建研究组保藏。利用双重无菌培养体系对 *R. irregularis* 进行培养^[18]。二分室培养皿分为菌根室和菌丝室,在菌根室中加入 30 mL 固体 M 培养基,用 0.4% (w/v) phytagel (Sigma-Aldrich,

USA) 作为凝固剂;在培养基上接种转发根农杆菌 (*Agrobacterium rhizogenes*) Ri T-DNA 质粒的胡萝卜 (*Daucus carota*) 毛状根,并接种 *R. irregularis* DAOM 197198 无菌孢子;待毛状根布满菌根室后,在菌丝室加入 15 mL 液体 M 培养基;25 °C 黑暗培养 8 周直至 *R. irregularis* 菌丝布满菌丝室,用于 RNA 的提取。

1.2 RNA 提取

取 0.05 g 新鲜菌丝用 TRIZOL 试剂(Invitrogen, USA)提取总 RNA。用紫外分光光度计(Nano drop 2000, USA)测定 RNA 的浓度和纯度并通过琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的完整性。取 2 μg RNA,用逆转录试剂盒 PrimeScript[®] RT Reagent Kit(TAKARA, 大连)合成 cDNA,具体方法参照试剂说明书。

1.3 丛枝菌根真菌砷酸盐还原酶基因 *RiarsC* 的克隆

根据 GenBank 上 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>)丛枝菌根真菌异形根孢囊霉 *R. irregularis* DAOM 197198 基因组中预测的砷酸盐还原酶基因(Genbank 登录号 KI300620.1)设计全长引物 *RiarsC1F*: 5'-ATGTCATTTGACTAAATATGG-3' 和 *RiarsC1R*: 5'-TCATTCCTTTGTATATCCCAAC-3'。以 cDNA 为模板,利用高保真酶 KOD-plus(TOYOBO, Japan)进行 PCR 扩增,获得基因全长,将该基因命名为 *RiarsC*。PCR 条件为:94 °C 预变性 2 min, 94 °C 变性 15 s, 53 °C 退火 45 s, 68 °C 延伸 1 min 20 s, 35 个循环, 72 °C 终延伸 1 min。将扩增产物回收,连接 pGEM-T Easy 克隆载体(Promega, USA)后,转入感受态细胞 *E. coli* JM109(TAKARA, 大连),筛选阳性克隆送生工生物工程(上海)股份有限公司测序。从阳性菌株中提取质粒,利用引物 *RiarsC2F*: 5'-CGCGGATCCATGTCATTTGACTAAATATGG-3' 和 *RiarsC2R*: 5'-CCGGAATTCCTCATTTCCTTTGTATATCC-3' 进行 PCR 扩增为该基因加入酶切位点 BamHI 和 EcoRI(下划线所示),PCR 条件同上。扩增产物回收后,连接表达载体 pET-28a+(Biofeng, 上海)并转入砷敏感型 *E. coli* WC3110(DE3)($\Delta arsC$)中,该菌株敲除了 *E. coli* R773 质粒上的砷酸盐还原酶基因 *arsC*,对 As(V)的还原能力大大降低^[9]。将转入 *RiarsC* 的菌株命名为 WC3110+*RiarsC*;同时,将空载体 pET-28a+转入 *E. coli* WC3110 中作为阴性对照,将该菌株命名为 WC3110+pET28a。将菌株 WC3110+*RiarsC*, WC3110+pET28a, WC3110 和野生型 *E. coli* W3110 这 4 种菌株转入 LB 液体培养基中 37 °C、180 r·min⁻¹ 震荡培养。

1.4 *RiarsC* 序列分析和系统发育树构建

将测序成功的 *RiarsC* 扩增片段序列与已知的细菌、真菌砷酸盐还原酶基因序列在 NCBI 上进行 BLAST 分析。利用在线软件 ExPASy(<http://web.expasy.org>)对 RiArsC 蛋白进行氨基酸序列推导及分子量预测。利用 MEGA 7.0.14 软件,采用邻接法(Neighbor-Joining)构建氨基酸序列系统发育树。

1.5 As(V)抗性分析

将上述 4 种菌株在 LB 培养基中培养 8 h 后,取 1 mL 菌悬液分别加入到 100 mL 新鲜的 LB 培养基中。LB 培养基中加入 0.3 mmol·L⁻¹ IPTG, 50 mg·L⁻¹ 卡那霉素(WC3110 和 W3110 除外)以及 2 种浓度的 Na₃AsO₄·12H₂O(50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ and 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$; 分析纯,国药集团),每种菌株处理重复 3 次。4 种菌株于 37 °C, 180 r·min⁻¹ 避光震荡培养,利用紫外-可见分光光度计(UV-1700, Shimadzu, Japan)每 2 h 测定一次菌悬液在 600 nm 处的吸光度(OD 值),共计测量 7 次,将吸光值绘制成细菌生长曲线。

1.6 砷形态分析

将上述 4 种菌株和只加 As(V)的无菌空白对照(Control)共 5 个处理在 LB 培养基中培养 8 h 后,取 1 mL 菌悬液分别加入到 100 mL 新鲜的 LB 培养基中。LB 培养基中加入 0.3 mmol·L⁻¹ IPTG, 50 mg·L⁻¹ 卡那霉素(WC3110 和 W3110 除外)以及 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Na₃AsO₄·12H₂O, 每个处理重复 3 次。将所有处理于 37 °C、180 r·min⁻¹ 避光震荡培养 12 h 后, 8 000 r·min⁻¹ 离心 10 min 收集菌体和上清液。菌体-50 °C 冷冻干燥后称重,加入 5 mL 1% HNO₃(优级纯,国药集团)在 MARS 5 微波消解萃取系统(CEM, USA)中消解。消解程序为:55 °C 维持 10 min; 75 °C 维持 10 min; 95 °C 维持 30 min。消解液及上清液过 0.45 μm 滤膜后置于 4 °C 保存。采用高效液相色谱-电感耦合等离子体质谱仪联用(HPLC-ICP-MS)(Agilent 7500, Agilent Inc., U.S.A.)测定滤液中各形态砷的含量。不同砷形态的分离采用 PRP-X100 阴离子交换柱(Hamilton, U.S.A.; 240 mm×4.1 mm),并配有相同填料的保护柱(11.2 mm, 12~20 mm)。流动相含有 10 mmol·L⁻¹ (NH₄)₂HPO₄ 和 10 mmol·L⁻¹ NH₄NO₃, pH=6.2。流动相:超纯水体积比=70:30,流动相流速为 1 mL·min⁻¹。样品中各砷形态根据标准物质中三价砷 As(III)和一甲基砷 MMA、二甲基砷 DMA、五价砷 As(V)的保留时间确定,用 winfasc 积分软件计算峰面积。

1.7 数据统计方法

利用 SPSS 20.0 软件(SPSS, Inc., U.S.A.)对细菌的生长曲线数据进行重复测量的单因素方差分析(Repeated measured ANOVA)计算 4 种菌株生长曲线的差异显著性。

2 结果(Results)

2.1 AMF 砷酸盐还原酶基因 *RiarsC* 的克隆与序列分析

从异形根孢囊霉 *R. irregularis* DAOM 197198 cDNA 中克隆得到了一个砷酸盐还原酶基因 *RiarsC*。测序结果显示完整的开放阅读框(ORF)全长为 438 bp, 编码 145 个氨基酸, 估测的蛋白质分子量为 16.69 kDa, 等电点为 8.50(Genbank 登录号 ERZ96229.1)。系统发育树分析显示, 在已知的砷酸盐还原酶家族中, *RiarsC* 与谷氧还蛋白-谷胱甘肽依赖的砷酸盐还原酶 Grx/GSH 家族具有高度的同源性(图 1)。

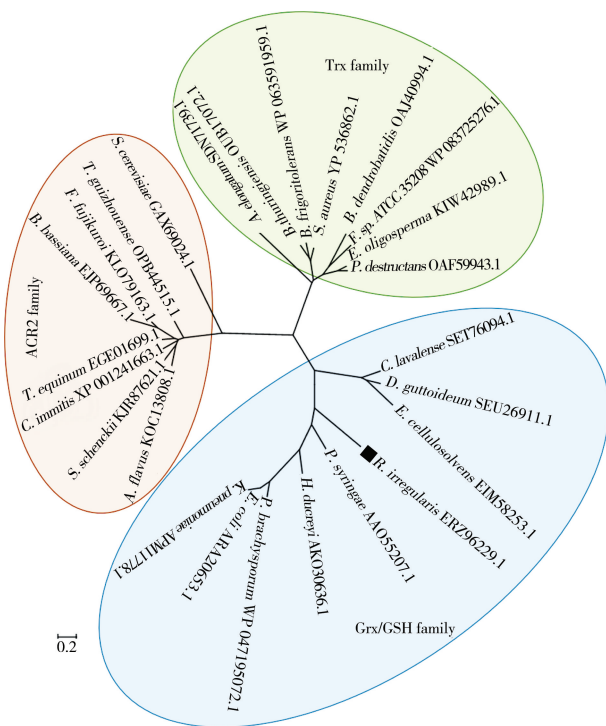


图 1 基于邻接法(Neighbor-Joining)构建的 *RiarsC* 蛋白与其他细菌、真菌砷酸盐还原酶氨基酸序列系统进化树

注:物种名称后显示该蛋白的 Genbank 登录号,黑色方框所示为 *RiarsC*。

Fig. 1 Phylogenetic tree of *RiarsC* and other arsenate reductases in bacteria and fungi based on the Neighbor-Joining Method using MEGA 7.0.14

Note: The accession numbers are shown after the species names.

RiarsC is labeled using a black square.

2.2 表达 *RiarsC* 基因的 *E. coli* 菌株的 As(V) 抗性分析

砷敏感型 *E. coli* 菌株 WC3110 与野生型菌株 W3110 相比,敲除了砷酸盐还原酶基因 *arsC*, As(V) 还原能力大大降低。重复测量的单因素方差分析结果表明,在较低的 As(V)添加水平下($50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$), WC3110 的 OD 值显著低于 W3110,对 As(V)的抗性不及野生型菌株 W3110(图 2a; $P < 0.05$);在高浓度的 As(V)($100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)处理下, W3110 与 WC3110 相比的生长优势更加明显(图 2b; $P < 0.05$);在 As(V)添加浓度为 $50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,表达 *RiarsC* 的菌株 WC3110+*RiarsC* 与表达空载体的菌株 WC3110+pET28a 相比对 As(V)具有更强的抗性(图 2a; $P < 0.05$);当砷添加浓度升高至 $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,虽然 WC3110+*RiarsC* 与 WC3110+pET28a 的生长均受到了明显的抑制,但 WC3110+*RiarsC* 的生长优势体现得更加明显(图 2b; $P < 0.05$)。

2.3 *Escherichia coli* 菌株的砷形态分析

经 12 h 的培养,野生型 *E. coli* 菌株 W3110 将 LB 培养基中 87.29% 的 As(V)还原为 As(III),而 *arsC* 缺陷型菌株 WC3110 只将培养基中 16.33% 的 As(V)转化为 As(III)(图 3a, b)。表达 *RiarsC* 的菌株 WC3110+*RiarsC* 对培养基中 As(V)的还原率为 71.04%,比 *arsC* 缺陷型菌株 WC3110 对 As(V)的还原能力提高了 4.35 倍,比表达空载体的菌株 WC3110+pET28a 还原效率提高了 61.98%(图 3a, b)。

在 *E. coli* 菌体中, WC3110+*RiarsC*, WC3110+pET28a, WC3110 和 W3110 这 4 种菌株 As(III)占总砷的比例分别为 50.24%, 17.16%, 12.22% 和 60.69%(图 3c, d)。其中,野生型 *E. coli* 菌株中 As(III)的比例比 *arsC* 缺陷型菌株 WC3110 提高 48.47%;表达 *RiarsC* 的菌株 WC3110+*RiarsC* 与表达空载体的菌株 WC3110+pET28a 相比, As(III)的比例提高了 33.08%。此外, WC3110+*RiarsC* 与 W3110 菌体中的总砷浓度要明显低于 WC3110+pET28a 和 WC3110(图 3c, d)。

3 讨论(Discussion)

砷酸盐还原酶在微生物和植物体的不同砷代谢途径中均发挥着重要的作用。本文从 AMF 异形根孢囊霉 *R. irregularis* 中克隆得到了一个砷酸盐还原酶基因 *RiarsC*。利用异源表达的方法将其导入砷敏感型 *E. coli* 菌株 WC3110 中。结果表明, *RiarsC* 基因的表达提高了 *E. coli* 对 As(V)的抗性;同时,表达

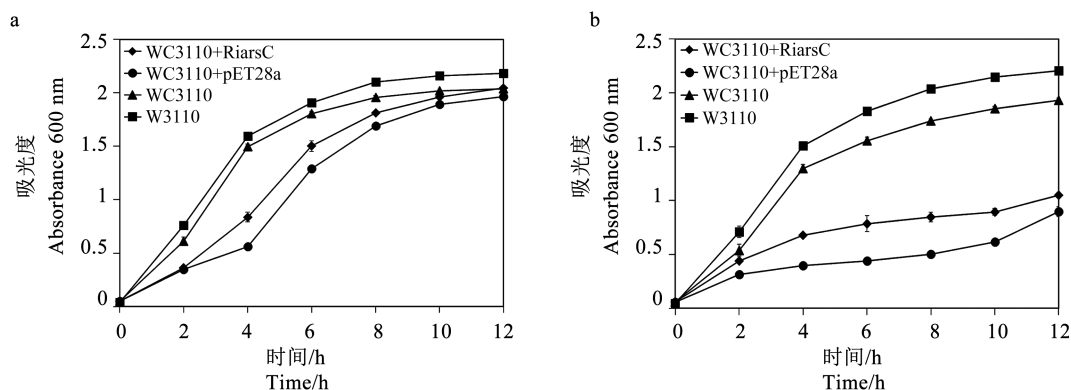


图 2 不同 *Escherichia coli* 菌株的 As(V)抗性生长曲线

注:图 a,b 分别表示添加 $50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ As(V)时,表达 *RiarsC* 的 *E. coli* 菌株 WC3110+*RiarsC*, 表达空载体的 *E. coli* 菌株 WC3110+pET28a, 砷酸盐还原酶基因 *arsC* 缺陷型 *E. coli* 菌株 WC3110(Δ *arsC*)和野生型 *E. coli* 菌株 W3110 的 As(V)抗性生长曲线;均值 \pm SE, $n=3$ 。

Fig. 2 The growth curves of *Escherichia coli* strains

Note: Figure a and b respectively indicate at the As(V) concentrations of $50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ and $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, the growth curves of *E. coli* bearing *RiarsC* (WC3110+*RiarsC*), vector plasmid pET28a (WC3110+pET28a), WC3110 (Δ *arsC*) and wild type (W3110); means \pm SE, $n=3$.

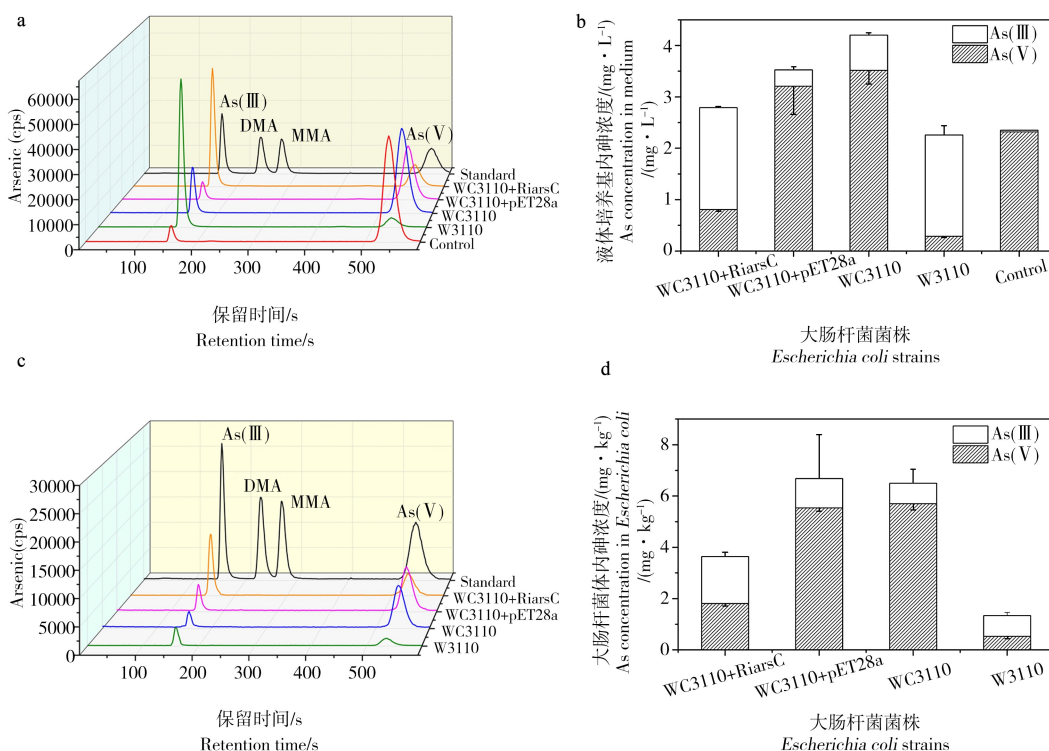


图 3 不同 *Escherichia coli* 菌株和培养基中的砷形态及浓度

注:图 a,b 分别表示表达 *RiarsC* 的 *E. coli* 菌株 WC3110+*RiarsC*, 表达空载体的 *E. coli* 菌株 WC3110+pET28a, 砷酸盐还原酶基因 *arsC* 缺陷型 *E. coli* 菌株 WC3110(Δ *arsC*), 野生型 *E. coli* 菌株 W3110 及 As(V)无菌空白对照 Control 处理中液体 LB 培养基中的砷形态和浓度;图 c,d 分别表示上述 4 种 *E. coli* 菌株中的砷形态和浓度;均值 \pm SE, $n=3$ 。

Fig. 3 The As species and concentration in *Escherichia coli* and LB medium

Note: Figure a and b indicate the As species and concentration in LB medium cultivating WC3110 bearing *RiarsC* (WC3110+*RiarsC*), vector plasmid pET28a (WC3110+pET28a), WC3110 (Δ *arsC*), wild type (W3110) and blank (Control), respectively. Figure c and d respectively indicate the As species and concentration in four different *E. coli* strains; means \pm SE, $n=3$.

*RiarsC*的 *E. coli* 能够将培养基及体内更多的 As(V) 还原为 As(III), 显著提高了 *E. coli* 对 As(V) 的还原效率。

生物的二磷酸盐还原酶主要包括 3 个家族(图 1): 最早发现的是 Grx/GSH 家族, 它使用谷氧还蛋白(Grx)或谷胱甘肽(GSH)作为电子供体, 由 *ars* 操纵子上的 *arsC* 基因编码, 产物为 ArsC, 主要存在于原核细胞中; 第二家族的蛋白产物也叫 ArsC, 但使用硫氧化还原蛋白(Trx)作为电子供体, 被称为 Trx 家族, 与 Grx/GSH 家族的基因序列和蛋白结构有所不同; 第三家族被称作 ACR2 家族, 该家族也使用 Grx/GSH 作为电子供体, 主要存在于真核生物中, 如酵母、藻类和植物等^[20]。本文从 AMF *R. irregularis* 中克隆获得了一个二磷酸盐还原酶基因, 命名为 *RiarsC*。序列分析结果显示, 该基因编码的蛋白序列与 Grx/GSH 家族的二磷酸盐还原酶具有高度的相似性。与通常的分类不同的是, *RiarsC* 并不属于真核生物的二磷酸盐还原酶 ACR2 家族, 而与原核生物的二磷酸盐还原酶 ArsC 具有更近的亲缘关系。目前为止, 只有极少数真菌的二磷酸盐还原酶属于此类, 如假裸囊菌属的 *P. destructans* (GenBank: OAF59943.1) 和外瓶霉属的 *E. oligosperma* (GenBank: KIW42989.1) 等。AMF 在将 As(V) 还原为 As(III) 的过程中是否利用 Grx/GSH 作为还原剂, 以及具体的调控机制还需要深入研究。

砷抗性分析结果表明, 与野生型 *E. coli* 菌株 W3110 相比, *arsC* 缺陷型菌株 WC3110 在含 As(V) 培养基中的生长受到明显的抑制。而表达 *RiarsC* 基因的 *E. coli* 菌株在含有 As(V) 的培养基中的生长状况与表达空载体的菌株相比具有更加明显的优势, 甚至当 As(V) 浓度升高至 $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时仍然对 As(V) 具有一定的抗性。这说明 *RiarsC* 基因在一定程度上弥补了 *E. coli* 中 *arsC* 的功能缺失, 增强了菌株 WC3110 对 As(V) 的抗性。

E. coli 的砷代谢过程由 R773 质粒上 *arsRBC* 操纵子调控, 细胞内的 As(V) 被 ArsC 还原后再在 ArsR 和 ArsB 的共同作用下排出体外^[21]。为进一步探究 *RiarsC* 提高 *E. coli* 对 As(V) 的抗性机理, 我们对 *E. coli* 菌株和培养基中的砷进行了形态分析。我们发现, 与野生型菌株 W3110 相比, *arsC* 缺陷型 *E. coli* 菌株 WC3110 对 As(V) 的还原能力大大减弱, 体内积累了更多的砷无法通过 As(III) 转运通道排出体外, 对 As(V) 的抗性较弱。因此, LB 培养基中以 As(V) 为主要的砷形态。当 WC3110 转入 *RiarsC* 基因后,

菌株体内及培养基中的 As(III) 浓度显著升高, 说明这时 *E. coli* 菌株重新获得了将 As(V) 还原为 As(III) 的能力, 体内积累的砷能够以 As(III) 的形式排出体外。因此该菌株内的总砷浓度大大降低而培养基中的主要砷形态也由 As(V) 转为 As(III)。以上结果证明了 *RiarsC* 基因具备将 As(V) 转为 As(III) 的能力。

本研究从 AMF 中克隆得到了一个二磷酸盐还原酶基因 *RiarsC*, 并通过异源表达的手段初步探讨了该基因的体外功能。结果发现, *RiarsC* 提高了砷敏感型 *E. coli* 的 As(V) 抗性, 并且能够将培养基中的 As(V) 还原为 As(III) 后排出体外。微生物的砷外排机制主要包括 As(V) 的吸收, As(V) 的还原以及 As(III) 的跨膜运输。已经有研究鉴定出了 AMF 砷外排过程中的 As(V) 吸收通道蛋白 GiPT 和 As(III) 跨膜运输过程中的关键基因 *GiArsA*^[15], 为 AMF 的耐砷机制提供了有力的证据。在此基础上, 本研究进一步为 AMF 的砷代谢机理提供了新的分子证据。后续的研究应该在原位开展 AMF 的砷形态转化和外排机理, 明确这些功能基因在 AMF 砷代谢过程中的相互联系, 为 AMF 的耐砷机制提供更全面的证据。

致谢: 感谢国家自然科学基金面上项目(41471219, 21677164) 对本研究的支持。感谢中国科学院城市与环境研究所朱永官教授对 *E. coli* 菌株 W3110 和 WC3110 的惠赠。

通讯作者简介: 张莘(1980-), 女, 博士, 副研究员, 主要从事逆境胁迫下菌根生理生态学研究, 发表学术论文 40 余篇。

参考文献 (References):

- [1] Mandal B K, Suzuki K T. Arsenic round the world: A review [J]. *Talanta*, 2002, 58(1): 201-235
- [2] Berg M, Tran H C, Nguyen T C, et al. Arsenic contamination of groundwater and drinking water in Vietnam: A human health threat [J]. *Environmental Science and Technology*, 2001, 35(13): 2621-2626
- [3] 常思敏, 马新明, 蒋媛媛, 等. 土壤砷污染及其对作物的毒害研究进展 [J]. *河南农业大学学报*, 2005, 39(2): 161-186
Chang S M, Ma X M, Jiang Y Y, et al. Research progress on arsenic contamination in soils and arsenic toxicity in crops [J]. *Journal of Henan Agricultural University*, 2005, 39(2): 161-186 (in Chinese)
- [4] Moreno-Jimenez E, Esteban E, Penalosa J M. The fate of arsenic in soil-plant systems [J]. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, 2012, 215: 1-37

- [5] Dixit S, Hering J G. Comparison of arsenic(V) and arsenic(III) sorption onto iron oxide minerals: Implications for arsenic mobility [J]. *Environmental Science and Technology*, 2003, 37(18): 4182-4189
- [6] Rosen B P, Liu Z. Transport pathways for arsenic and selenium: A minireview [J]. *Environment International*, 2009, 35(3): 512-515
- [7] Tsai S L, Singh S, Chen W. Arsenic metabolism by microbes in nature and the impact on arsenic remediation [J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2009, 20(6): 659-667
- [8] Saltikov C W, Cifuentes A, Venkateswaran K, et al. The ars detoxification system is advantageous but not required for As(V) respiration by the genetically tractable *Shewanella species* strain ANA-3 [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, 69(5): 2800-2809
- [9] Yin X, Wang L, Duan G, et al. Characterization of arsenate transformation and identification of arsenate reductase in a green alga *Chlamydomonas reinhardtii* [J]. *Journal of Environmental Sciences*, 2011, 23(7): 1186-1193
- [10] Schwab S M, Menge J A, Tinker P B. Regulation of nutrient transfer between host and fungus in vesicular-arbuscular mycorrhizas [J]. *New Phytologist*, 1991, 117(3): 387-398
- [11] Li T, Hu Y J, Hao Z P, et al. First cloning and characterization of two functional aquaporin genes from an arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* [J]. *New Phytologist*, 2013, 197(2): 617-630
- [12] 陈保冬, 孙玉青, 张莘, 等. 菌根真菌重金属耐性机制研究进展[J]. *环境科学*, 2015, 36(3): 1123-1132
Chen B D, Sun Y Q, Zhang X, et al. Underlying mechanisms of the heavy metal tolerance of mycorrhizal fungi [J]. *Environmental Science*, 2015, 36(3): 1123-1132 (in Chinese)
- [13] Chen B, Xiao X, Zhu Y G, et al. The arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae* gives contradictory effects on phosphorus and arsenic acquisition by *Medicago sativa* Linn [J]. *Science of the Total Environment*, 2007, 379(2-3): 226-234
- [14] Christophersen H M, Smith F A, Smith S E. Arbuscular mycorrhizal colonization reduces arsenate uptake in barley via downregulation of transporters in the direct epidermal phosphate uptake pathway [J]. *New Phytologist*, 2009, 184(4): 962-974
- [15] Gonzalez-Chavez M C, Ortega-Larrocea M P, Carrillo-Gonzalez R, et al. Arsenate induces the expression of fungal genes involved in As transport in arbuscular mycorrhiza [J]. *Fungal Biology*, 2011, 115(12): 1197-1209
- [16] Li H, Man Y B, Ye Z H, et al. Do arbuscular mycorrhizal fungi affect arsenic accumulation and speciation in rice with different radial oxygen loss? [J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2013, 262: 1098-1104
- [17] Zhang X, Ren B H, Wu S L, et al. Arbuscular mycorrhizal symbiosis influences arsenic accumulation and speciation in *Medicago truncatula* L. in arsenic-contaminated soil [J]. *Chemosphere*, 2015, 119: 224-230
- [18] St-Arnaud M, Hamel C, Vimard B, et al. Enhanced hyphal growth and spore production of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* in an *in vitro* system in the absence of host roots [J]. *Mycological Research*, 1996, 100(3): 328-332
- [19] Mukhopadhyay R, Shi J, Rosen B P. Purification and characterization of ACR2p, the *Saccharomyces cerevisiae* arsenate reductase [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2000, 275(28): 21149-21157
- [20] Mukhopadhyay R, Rosen B P. Arsenate reductases in prokaryotes and eukaryotes [J]. *Environmental Health and Perspectives*, 2002, 110: 745-748
- [21] Carlin A, Shi W, Dey S, et al. The *ars* operon of *Escherichia coli* confers arsenical and antimonial resistance [J]. *Journal of Bacteriology*, 1995, 177(4): 981-986 ◆