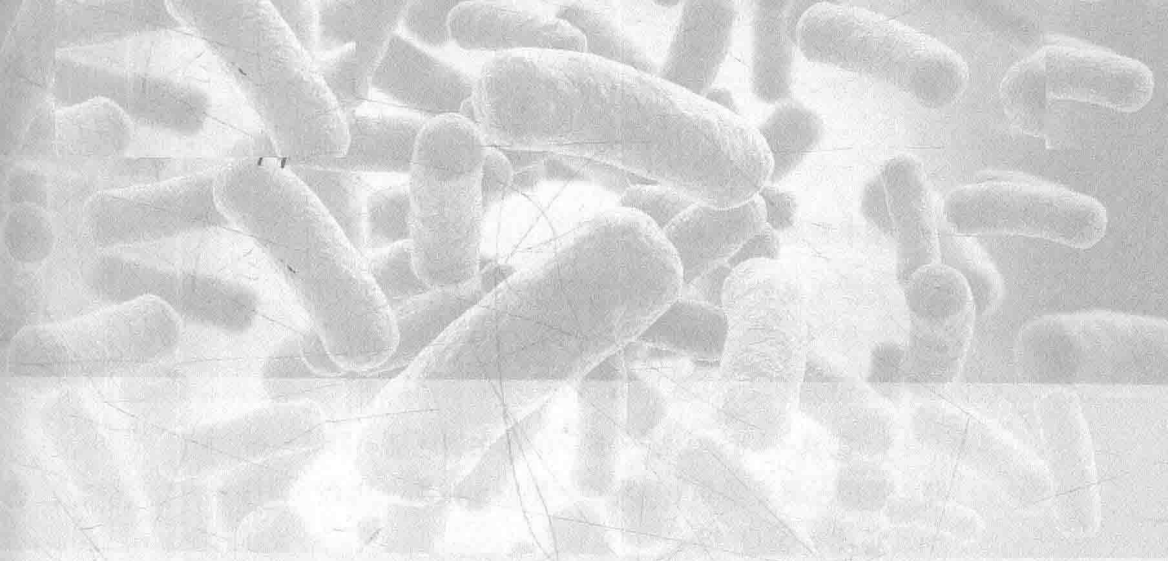


Molecular Mechanisms of Key Stress Responsive Genes in Eukaryotic Microalgae

真核微藻逆境响应关键基因 及分子调控机理研究



中國海洋大學出版社
CHINA OCEAN UNIVERSITY PRESS



真核微藻逆境响应 关键基因及分子调控机理研究

路延笃 著

中国海洋大学出版社

• 青岛 •

图书在版编目(CIP)数据

真核微藻逆境响应关键基因及分子调控机理研究 /
路延笃著. —青岛: 中国海洋大学出版社, 2018. 1

ISBN 978-7-5670-1752-8

I. ①真… II. ①路… III. ①非生物环境—影响—微藻—基因—研究②非生物环境—影响—微藻—分子—调控—研究 IV. ①Q949.2

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2018)第 062546 号

- | | | |
|-------|---|-------------------|
| 出版发行 | 中国海洋大学出版社 | |
| 社 址 | 青岛市香港东路 23 号 | 邮政编码 266071 |
| 出 版 人 | 杨立敏 | |
| 网 址 | http://www.ouc-press.com | |
| 电子信箱 | 465407097@qq.com | |
| 订购电话 | 0532-82032573 (传真) | |
| 责任编辑 | 董 超 | 电 话 0532-85902342 |
| 装帧设计 | 青岛汇英栋梁文化传媒有限公司 | |
| 印 制 | 北京虎彩文化传播有限公司 | |
| 版 次 | 2018 年 5 月第 1 版 | |
| 印 次 | 2018 年 5 月第 1 次印刷 | |
| 成品尺寸 | 170 mm × 240 mm | |
| 印 张 | 11.5 | |
| 字 数 | 181 千 | |
| 印 数 | 1~1000 册 | |
| 定 价 | 38.00 元 | |

如出现印装问题, 请致电 010-84720900 与印刷厂联系。

前言

Preface

低温、干旱和盐害等非生物胁迫因素严重影响植物的生长和发育。植物为适应各种外界环境刺激,最大限度地减少逆境对自身的伤害,在长期的进化过程中,从对逆境信号的感知、胞间信号转导和传递到最终表达各种逆境基因,产生适应性,形成了一系列复杂的逆境信号传递的分子机理。非生物逆境胁迫严重影响植物的生长发育和作物的产量。阐明植物的非生物胁迫适应机理,对培育耐逆性作物具有重要的理论价值和现实意义。

微藻和高等植物一样,有比较完整的光合作用系统。其中,绿藻中色素以叶绿素 a 和 b 最多,还有叶黄素和胡萝卜素,故呈绿色。其光合色素(叶绿素 a 和 b、胡萝卜素、叶黄素)的比例与高等植物相似,被认为与高等植物拥有共同的祖先。微藻具备出色的环境耐受能力,遍布于海洋、河流和湖泊等淡水中,以及土壤(包括酷热和寒冷的荒芜环境),甚至人迹罕至的南北极等极端环境中。部分微藻在通入烟道气时强劲生长,能够室外规模培养。解析逆境下微藻逆境响应适应生理和分子机理,阐释基因表达及信号传导网络调控网络对于阐明植物的适应性反应机理具有重要的借鉴意义。

雨生红球藻(*Haemotococcus pluvialis*)是一种淡水单胞绿藻,隶属绿藻门团藻目红球藻科红球藻属。该藻能大量累积虾青素而呈现红色。雨生红球藻比其他藻类更能适应光线、温度和盐度的剧烈的变化,因此广泛分布于自然界中。笔者研究发现,雨生红球藻通过累积虾青素来适应胁迫环境,茉莉酮酸甲酯(methyl jasmonate, MJ)和赤霉素(gibberellin, GA)对微藻细胞胁迫适应过程中相关基因的诱导表达起到重要的调控作用。选取雨生红球藻作为出发株,笔者研究了茉莉酮酸甲酯和赤霉素对虾青素合成途径关键酶 β -胡萝卜素酮化酶基因的调控作用。在其中一株雨生红球藻中克隆获得了 3

种不同的 β -胡萝卜素酮化酶基因。通过基因组步移,获得了3种 β -胡萝卜素酮化酶的5'侧翼序列(5'-flanking region),发现其中存在着多样的顺式作用元件,包括茉莉酮酸甲酯和赤霉素的顺式作用位点。进一步的实验表明,茉莉酮酸甲酯和赤霉素的诱导处理,可以促进雨生红球藻中虾青素的累积;同时,茉莉酮酸甲酯和赤霉素调控了3种 β -胡萝卜素酮化酶基因的转录水平。

小球藻(*Chlorella* sp.)是色球藻目中的常见种类,隶属于绿藻门小球藻属。小球藻的细胞结构原始,是地球上最早出现的光合生物之一,已在地球上生存了20亿年左右。南极冰藻是生存在南极海水、海冰及冰川融水等极端环境中各类微藻的总称,是南极生态系统中重要的生态群体和食物链的关键组成部分,也是夏季南大洋海冰-海水生态系统中初级生产力的主要来源。为了适应极端的南极环境,冰藻进化出特殊的适应机理。南极小球藻(*Chlorella vulgaris*) NJ-7是从南极海域筛选获得的耐受低温和高盐环境的藻种,可以在较大温度和盐度变化范围内存活,是研究生物胁迫适应机理的理想生物。笔者研究发现对数期的南极小球藻 NJ-7 主要的脂肪酸成分为 $C18:2\Delta^{9,12}$ 和 $C18:3\Delta^{9,12,15}$,含量分别占总脂肪酸的33.08%和24.99%。在低温和高盐胁迫条件下,南极小球藻 NJ-7 的 $C18:2\Delta^{9,12}$ 含量随着温度的降低而升高,随着盐度的升高而升高。为了验证 Δ^{12} 脂肪酸去饱和酶是否参与了逆境适应过程,本书笔者克隆获得了内质网型 Δ^{12} 脂肪酸去饱和酶 CvFAD2 和叶绿体型 Δ^{12} 脂肪酸去饱和酶 CvFAD6 的 cDNA 序列和基因组序列,采用酿酒酵母 INVSc1 和 pYES 2.0 表达系统验证了两者的功能。研究发现, CvFAD2 和 CvFAD6 的转录水平受到温度和盐度的调控,随着温度的降低而升高,随着盐度的升高而升高。基于上述发现,本书以笔者在雨生红球藻与南极小球藻适应胁迫环境的研究工作为重点,结合相关学者的研究工作,报道了两种真核微藻在胁迫响应过程中的关键基因及分子调控机理,并总结了真核微藻响应逆境胁迫的分子机理研究的进展。

目 录

Contents

第一章

引 言

- 第一节 逆境适应机理 / 2
- 第二节 植物逆境适应机理研究方法 / 7
- 第三节 藻类及藻类逆境生理研究进展 / 19
- 第四节 研究内容及意义 / 37

第二章

雨生红球藻虾青素代谢调控机理研究

- 第一节 概 述 / 39
- 第二节 雨生红球藻 β -胡萝卜素酮化酶基因 cDNA 和基因组序列的克隆 / 48
- 第三节 雨生红球藻 β -胡萝卜素酮化酶基因 5' 侧翼序列的克隆及分析 / 59
- 第四节 茉莉酮酸甲酯和赤霉素诱导雨生红球藻虾青素累积的研究 / 66
- 第五节 茉莉酮酸甲酯和赤霉素诱导雨生红球藻 *bkt* 转录模式的研究 / 69
- 本章小结 / 76

第三章

南极小球藻 NJ-7 低温高盐适应机理研究

- 第一节 概 述 / 78
- 第二节 不同胁迫条件下南极小球藻 NJ-7 的生长情况和脂肪酸含量 / 103
- 第三节 南极小球藻 NJ-7 内质网型和叶绿体型 Δ^{12} 脂肪酸去饱和酶基因 cDNA 及基因组序列的克隆 / 110

第四节 南极小球藻 NJ-7 内质网型和叶绿体型 Δ^{12} 脂肪酸去饱和酶基因在酿酒酵母中的表达 / 129

第五节 胁迫条件下南极小球藻 NJ-7 内质网型和叶绿体型 Δ^{12} 脂肪酸去饱和酶基因的转录模式 / 137

本章小结 / 143

结 论 / 145

参考文献 / 146

第一章

引言

逆境包括生物逆境和非生物逆境,前者包括各种真菌、细菌、病毒等生物的侵染;后者主要包括低温、干旱、高盐等环境因素。在藻类中,尤其是微藻,由于它们个体和生长环境的特殊性,往往还受到高氧化环境的胁迫,这也是非生物逆境的一个重要因素。逆境影响了植物的生理、生长和繁殖,是限制作物产量的主要环境因子,它们会引起植物体在生理生化水平和细胞分子水平上一系列的变化,从而影响植物的生长乃至存活。植物,不同于哺乳动物,缺少移动的防御细胞和可变的免疫防御体系。相反,它们主要依赖于单个细胞先天的免疫系统和信号传递体系。^[1-3]植物细胞通过感知并整合环境中各种各样的信息,及时调整机体的代谢水平和生长状态。细胞壁是病原体侵入的第一道屏障,木质素是细胞壁的重要组成,在防御的过程中起到了举足轻重的作用。木质化是植物抵抗病原体侵染最有效手段之一。羟脯氨酸糖蛋白(hydroxyproline-rich glycoprotein, HRGP)是植物细胞主要的结构蛋白,在细胞防御过程中起到重要作用。当植株细胞壁受病原体侵染时,羟脯氨酸糖蛋白在植物体内大量积累,以修复细胞壁结构,进而增强植物的抗病性。植保素(phytoalexin)在健康植株中不存在,它是植物受到侵染而产生的相对分子质量较小的化合物,一般出现在侵染部位附近,它的积累是植物的一种抗性反应。在植物病理组织中病原体生长受到抑制,常与某种植保素的高浓度积累有关。生物及非生物因子刺激均可直接或间接诱导植保素的产生和积累。目前已在 22 科的植物中发现了 150 种植保素,并且同一种植物所含的植保素有着明显相似性。多数植保素的结构已经明确,可以通过人工合成植保素,诱导增强植物抗性,防治病害,该方法已

经在生产上应用。病程相关蛋白(pathogenesis related proteins, PRP/PRs)是指植物在病理与病理相关的环境因子诱导下产生的一类蛋白。病程相关蛋白在健康植株中不存在或微量存在;当受到不同诱导因子诱导时,则迅速积累。近来的研究表明,病程相关蛋白与诱导抗病性关系密切。生物和非生物诱导因子都能诱导体内病程相关蛋白含量的增长,从而增强植株抗病性。植株受诱导产生抗病性后,体内的酚迅速积累,酚积累越明显,植株抗病性越强。酚本身具有抗病性,而其氧化物醌类杀菌力更强,能氧化胞外连丝而导致病原体扩散受阻,引起植株过敏性反应;酚物质可以形成木质素前体,使寄主细胞木质化而抗病。此外,酚还可以诱导增强寄主防御酶系统的活力。寄主防御酶系统主要包括苯丙氨酸酶(phenylalaninase, PAL)、过氧化物酶(Peroxidase, PO)、多酚氧化酶(polyphenoloxidase, PPO)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)等。植物诱导型抗病性的产生是通过这些酶系统的活化而实现。

外界环境错综复杂,植物的生长不可能排除生物或非生物胁迫对其的影响。因此,在自然条件以及各种病虫害的选择压力下,植物在长期的进化过程中,形成了形式多样的防御系统。

第一节 逆境适应机理

一、生物逆境适应机理

逆境亦称为环境胁迫,是对植物生存生长不利的各种环境因素的总称。根据不同的分类方法可分为生物逆境和非生物逆境,或自然逆境和污染逆境等。植物所遇到的逆境包括:① 由于气候恶劣而造成的逆境,如干旱、热害、冻害和寒害。② 由于地理位置或海拔高度而造成的逆境,如土壤中盐分过多或缺乏、光照强度过高、海拔过高等。③ 由于生物因素造成的逆境,如病害和虫害。④ 由于天然的或人为的有毒物质所造成的逆境,特别是由于工业废水、废气、废渣的污染而造成的逆境。此外还有电离辐射等所造成的逆境。

研究植物逆境生理是研究植物在逆境条件下的生理生化变化及其机理。在多数情况下逆境强度用植物的生存能力、生长量、发育情况、光合速率或无机盐吸收速率等度量。抗逆性是指植物抵抗不利环境的能力。用较温和的逆境处理植物,使植物的抗逆能力增强的过程,称为植物锻炼或驯化。驯化不同于

适应。适应是指经过多代的选择所获得的抵抗逆境的遗传特性,驯化是在特定环境因子的诱导下植物抗性基因表达的过程。

对植物产生重要影响的逆境主要有水分亏缺、低温、高温、盐碱、环境污染等非生物逆境和害虫、杂草等生物逆境。非生物逆境之间通常是相互联系的。例如,水分亏缺通常伴随着盐碱和高温逆境,水分胁迫、低温胁迫和大气污染等都可引起活性氧伤害。植物对逆境的抵抗也存在共同的机理。例如,在低温驯化过程中产生的低温抗性,也可增强植物的抗旱能力。这种现象称为交叉抗性。了解植物的适应和驯化的生理机理以及逆境伤害机理对农业生产和保护生态环境具有极其重要的意义。

在千万年的繁衍过程中,植物形成了固有的特点,可以对周围环境和生物的影响做出反应。植物通过多种方式,适应逆境胁迫,减少逆境对机体造成的伤害。就生物逆境而言,一方面,在大量病原体的侵袭下,植物通过偶然的突变和重组产生一系列抗病物质,并形成相应的抗病机理。另一方面,在长期进化中,病原体通过自身的变异也会适应植物的变化。两者互相适应、协同进化。植物防御病虫害主要有3步反应:发现入侵病原体、杀死入侵病原体、将入侵病原体的信息储存以便再次遇到侵袭时迅速做出反应。已有的研究表明,植物免疫系统由两部分相辅而成。一部分采用了跨膜识别模式受体(pattern recognition receptors, PRRs),该系统主要作用于进化较慢的细菌或者病原相关分子模式(microbial-or pathogen-associated molecular patterns, MAMPS/PAMPs),如鞭毛蛋白;另一部分采用了大量R基因(resistance genes)编码的多态富含核酸结合蛋白亮氨酸的蛋白(nucleotide binding-leucine rich repeat, NB-LRR),这种方式主要在细胞内部发挥作用。多态富含核酸结合蛋白亮氨酸的介导的防御体系仅对寄生型或半寄生型病原体发挥作用。^[4]

Jones 和 Dangl 用“Z”模型描述植物免疫系统(图 1-1)。^[1]第一阶段,跨膜识别模式受体识别细菌或者病原相关分子模式,产生细菌或者病原相关分子模式触发的免疫(PAMP-triggered immunity, PTI),这样可以阻止病原体的进一步的入侵;第二阶段,成功入侵的病原体采用各种效应因子(effectors)产生毒性,干扰细菌或者病原相关分子模式触发的免疫,导致效应因子引发的感病性(effector-triggered susceptibility, ETS);第三阶段,多态富含核酸结合蛋白亮氨酸的蛋白识别特定的效应因子,两者之间一一对应,形成效应因子引发的免疫

性(effector-triggered immunity, ETI), 这种识别可能是间接的, 也可能是直接通过多态富含核酸结合蛋白亮氨酸的蛋白识别; 效应因子引发的免疫性反应更为剧烈, 常常会引发感染部位细胞的死亡反应; 第四阶段, 自然选择驱使病原体采取各种手段抑制效应因子引发的免疫性, 而植物则产生新的 R 基因来抵抗病原体的入侵。除此之外, 植物还采用小 RNA 介导的免疫系统来应对病原体的入侵(图 1-2)。[5, 6]

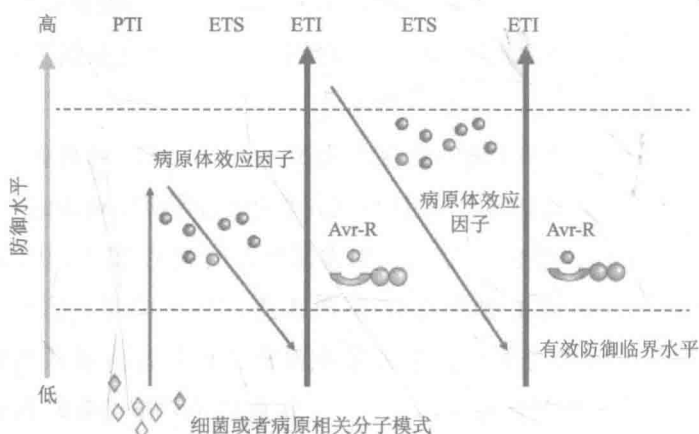


图 1-1 植物免疫系统“Z”模型示意图



a. 在侵染细胞表面后, 病毒在入侵细胞内大量复制, 并向临近细胞转移, 不断向周围细胞扩散, 直至进入植物维管系统后, 病毒快速地向植物组织扩散。植物宿主启动 siRNA 沉默机理, 抵抗病毒的入侵。沉默信号沿着与病毒扩散类似的路径, 在植物组织内扩散。植物与病毒之间展开了竞赛。b. 如果沉默信号首先到达未感染细胞, 则会沉默后侵入的病毒基因组, 病毒入侵失败。c. 如果病毒首先到达未感染细胞, 则会导致细胞感染

图 1-2 siRNA 和 miRNA 介导的病毒防御系统

二、非生物逆境适应机理

非生物逆境如干旱、低温、高盐, 可以导致植物生长受阻。每年, 非生物逆境

导致全球主要作物减产超过 50%，是影响作物产量的主要因素。^[7] 如耕地的盐碱化，对全球造成了破坏性的影响。在今后 20 年内，盐碱化将导致全球可用耕地面积减少约 30%，到 2050 年，这个数目将达到 50%。非生物逆境导致植物的形态、生理、生化和分子机理发生变化，从而影响植物的生长和产量。低温、干旱、高盐和氧化的胁迫作用常常是相互关联的，它们可能会对细胞产生相似的伤害。比如，干旱和高盐胁迫首先引起渗透压胁迫，最终打乱了细胞内的动态平衡和离子分布。氧化胁迫常常和高温、高盐或者干旱胁迫相伴而生，导致细胞功能失常。^[8] 由此可见，不同环境胁迫通过激活类似的细胞信号途径，进而调整细胞反应，如产生胁迫蛋白和累积抗氧化剂等。如何提高植物的抗逆能力，减少非生物逆境对植物造成的伤害，已成为目前科研工作者的一项重要研究课题。

为了适应胁迫环境，植物往往通过调整基因的表达水平来调节生理代谢反应过程(图 1-3)。许多基因被证明与逆境适应相关。^[9] 这些基因的产物可以分为两种类型：一种直接参与了逆境适应过程，另一种则参与调节逆境适应过程中其他基因的表达和信号转导。^[10] 前者比如干旱胁迫适应过程中产生的各种渗透质(osmoprotectants)合成酶、胚胎发生晚期丰富蛋白(late-embryogenesis-abundant (LEA) proteins)、抗冻蛋白(antifreeze proteins)、分子伴侣(chaperones)和脱毒酶(detoxification enzymes)；后者则包括各种转录因子、蛋白激酶和参与磷酸肌醇代谢的酶。^[9]

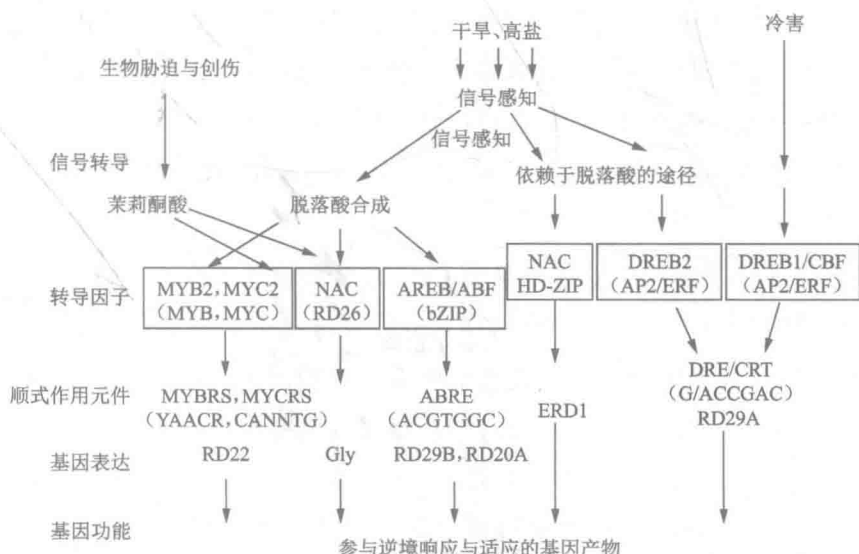


图 1-3 非生物逆境胁迫下植物信号转导和基因调控网络^[9]

植物适应环境胁迫的过程可分为3个阶段,通过二级信号转导实现(图1-4)。低温、干旱和高盐是很复杂的信号,可以对细胞产生多种不同的效应。例如,低温可能直接导致细胞的机械伤害、大分子物质活性的变化和细胞周围环境渗透势的降低;高盐则会引发诸如离子组成(化学)和渗透性(物理)的改变。非生物逆境胁迫所引发的信号多样性是构成胁迫信号复杂性的一个方面,很难想象如此多样的信号只被一种信号感应方式识别;相反,每种胁迫所产生的信号传递途径的每一个分支都可能受到单独的信号感应方式的调节。举例来说,低温导致细胞膜流动性的改变。^[9] 感应细胞膜流动性的传感器通过检测膜流动性的变化而传递信号,但是这种传感器未必可以响应低温引发的细胞蛋白构象和活性的改变。可见,细胞通过多样的一级感应器(primary sensors)感知环境胁迫,进而引发信号传导。



图1-4 非生物逆境胁迫下植物二级信号转导途径,胞内 Ca^{2+} 释放成为第二信使

二级信号分子(secondary signals)(如激素和第二信使)可以引发有别于一级感应器的信号通路。在时间和空间上,二级信号分子引发的信号通路有别于一级感应器引发的通路。前者往往在时间上滞后于后者;同时,前者往往发生在细胞内或细胞间,不同于一级感应器产生的亚细胞位置。此外,二级感应器的专一性和一级感应器也不同,它们可以被不同的胁迫响应通路共用,是不同胁迫响应通路相互作用的物质基础。然而,一种一级感应器则可以引发多种不同信号通路。

二级信号分子则通过受体介导的 Ca^{2+} 通道来调节膜内 Ca^{2+} 水平,进而引发磷酸化,作用于直接参与细胞保护的蛋白,也可以作用于胁迫调控相关基因的转录因子,这些基因的产物可能会影响其他调控因子的生成,这些调控因子则参与了其他信号分子的合成过程,如植物激素脱落酸(abscisic acid, ABA)^[12]、水杨酸(salicylic acid, SA)^[13-15]、赤霉素、茉莉酮酸(jasmonic acid, JA)和乙烯(ethylene, ET)等,而后者反过来引发了新一轮的信号传递通路,逐级放大信号^[9]。

第二节 植物逆境适应机理研究方法

功能基因组学的研究方法发展迅速,包括功能基因的克隆表达(functional cloning)、基因微阵列(microarray)技术、基因表达序列分析(serial analysis of gene expression, SAGE)、表达序列标签(expressed sequence tags, ESTs)、生物信息学(bioinformatics)、转基因(transgenics)技术、基因敲除(gene knock-out)技术等。目前,研究逆境胁迫下植物生理生化及分子水平变化时,应用较多的方法有基因微阵列技术、蛋白质组学(proteomics)技术和代谢组学(metabolics)技术等。

一、基因微阵列技术

基因微阵列技术又称 DNA 微阵列技术或 DNA 芯片技术,比较通俗的名字是基因芯片技术,经由一次测验,即可提供大量基因序列相关信息。它是基因组学和遗传学研究的工具。研究人员利用基因芯片可以在同一时间定量地分析大量(成千上万个)基因的表达水平,具有快速、精确、低成本的特点。将寡核苷酸或 DNA 序列密集排列于硅片等固相支持物上,用标记后的研究样品和对照样品与其杂交,根据杂交位点及信号强弱来研究基因的转录和表达。

基因芯片的制作方式可分为以下几种:① 斯坦福法:根据美国斯坦福大学开发的 cDNA 芯片的制作方法,将预先合成好的核酸探针布放于玻片载体上。其优点是设计较长的探针长度可增加专一性;缺点是芯片密度较光罩法低,需要有良好的保存设计。这种方法又可分为点制法与印制法。点制法适用于小规模生产或实验室自制的低密度芯片。该方法以机械手臂上带有毛细作用的细微刻痕的钢针,将核酸探针溶液点放于玻片或聚酯纤维膜上。该方法成本低廉,适合探针数少或制造需求量不大的状况。印制法是从喷墨打印机的方式变化而来,用加热气泡的方式将核酸探针印于玻片上。使用制作良好的喷头可同时实现高密度、长探针的基因芯片的制作。② 原位合成法(insitu synthesis method):原来用于电子芯片制作的光刻法(photolithography)转为核酸序列的合成技术。利用光罩控制反应位置,将核苷酸分子依序列一个一个接上去,可大量生产超高密度的芯片。由于制程与光罩成本等因素,这种方法做出的探针长度在 25-mer 以下,所以同一个基因需要多个探针对应,以避免误判。③ 微珠布放法:依诺米那(Illumina)公司有其独特的微珠阵列,将核酸探针制作于微小颗粒上,再将其布放于特制玻片上。

④ qPCR 芯片法: 在 96 孔或 384 孔标准 PCR 盘或 384 孔微流体盘中, 预先合成好即时 PCR 引子与探针, 将检体注入后以定量 PCR 方式进行反应与侦测分析。分析量比传统芯片少, 属于低密度阵列, 但兼具准确定量与定性的特点; 并且所需设备与技术门槛低, 在一般分子生物实验室即可自行操作。

通过基因微阵列技术可以获得在胁迫处理前、后样品表达水平变化较大的基因, 而这些基因很可能是与逆境胁迫适应相关的基因, 可以作为进一步研究的对象。^[9] 2001 年, Seki 等制作了含有 1300 个 cDNA 全长序列的芯片, 利用该芯片他们研究了拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)在干旱和低温胁迫下的基因转录情况, 并分析了调控胁迫诱导下基因表达的转录因子(DREB1A/CBF3)的靶基因。他们发现了 44 个干旱基因, 其中, 30 个被证明是新基因; 19 个低温诱导表达的基因中, 10 个被证明是新基因; 同时, 他们还发现了 12 个 DREB1A 的靶基因, 其中 6 个是首次发现。^[16] 2002 年, 他们利用由 7000 个全长 cDNA 制成的芯片研究了干旱、低温和高盐胁迫下的基因转录图谱。结果发现, 分别有 53、277 和 194 个基因对低温、干旱和高盐胁迫产生响应, 与对照相比, 它们的转录水平均提高了 5 倍以上。此外, 有 22 个基因同时受到 3 种胁迫信号的诱导。通过研究上述基因在胁迫诱导下的转录谱发现, 它们表现出不同的响应机理, 如低温诱导型基因至少可以分成 2 组。^[17] 之后, 他们进一步研究了拟南芥复水过程中以及高渗、高盐和氧化压力下的基因转录图谱。^[9] 同期, Kreps 等研究了 4℃、100 mmol/L NaCl 溶液和 200 mmol/L 甘露醇胁迫下, 拟南芥 8100 个基因的转录图谱以及它们的时空效应。^[7] Kawaguchi 等通过基因芯片研究了核糖体结合或非核糖体结合的 mRNA 情况, 发现干旱胁迫抑制了相关基因的转录水平, 而这些基因通过提高转录水平来增强适应性。^[18] Bray^[19] 比较了 Seki、Kreps 和 Kawaguchi 的研究结果(表 1-1), ^[20] 发现仅有少数基因在 3 组研究中表现出一致的转录响应机理, 其中只有 27 个基因的转录水平在 3 组研究中同时表现为上调, 3 个基因的转录水平表现为下调。目前为止, 通过基因芯片(Affimetrix 22K Gene Chip ATH1)已经鉴定获得了多种与胁迫相关的基因, 相关数据存放在美国斯坦福大学卡耐基研究所的拟南芥信息资源中心(简称“TAIR URL”; <http://www.arabidopsis.org/>)。

表 1-1 3 种不同缺水胁迫条件下基因转录水平变化^[19]

实验条件	转录水平升高 / 降低的基因数目	芯片基因总数	升高 / 降低基因百分比 (%)
滤纸脱水处理 3 周龄植物	359 ^a /161	7000	5.1/2.3
200 mmol/L 甘露醇处理 4 周龄植物 3 h 或 27 h	466 ^b /573	8100	5.8/7.1
渐进式脱水 7 周龄植物 8 d 至叶片相对含水量为 65% ^[18]	119 ^c /654	8200	1.4/4.0

注: ^a 处理前后, 基因转录水平升高 3 倍以上; ^b 处理前后, 基因转录水平升高 2 倍以上; ^c 处理前后, 基因转录水平增大 2 倍以上。变化倍数的计算方法参照^[18]

Rabbani 等采用基因芯片研究了水稻在低温、干旱、高盐 and 脱落酸诱导下的转录图谱。^[21] Kawasaki 等研究了水稻在高盐胁迫下初始阶段的变化, 最初的几分钟内, 150 mmol/L 的 NaCl 溶液使水稻的光合活性减少到原来的 1/10; 1 h 以后, 1728 个靶基因中有 10% 在转录水平上表现出明显的变化。^[22]

二、蛋白质组学技术

基因的功能主要是通过其编码的蛋白质来实现, 因而, 科学家们逐渐开始致力于生命活动真正的执行者——蛋白质的研究。蛋白质组(proteome)一词, 源于蛋白质(protein)与基因组(genome)两个词的组合, 意指“一种基因组所表达的全套蛋白质”, 即包括一种细胞乃至一种生物所表达的全部蛋白质。蛋白质组学本质上指的是在大规模水平上研究蛋白质的特征, 包括蛋白质的含量、翻译后的修饰、蛋白质与蛋白质相互作用等, 由此获得关于疾病发生、细胞代谢等过程的蛋白质水平上的整体而全面的认识。这个概念最早是由 Marc Wilkins 在 1994 年提出的。蛋白质组的概念与基因组的概念有许多差别, 它随着组织甚至环境状态的不同而改变。在转录时, 一个基因可能以多种 mRNA 形式剪接, 并且同一蛋白质可能以许多形式进行翻译后的修饰。故一个蛋白质组不是一个基因组的直接产物, 蛋白质组中蛋白质的数目有时可以超过基因组编码基因的数目。通常情况下基因组是由 DNA 组成, 是只含有 4 种碱基的简单线性分子, 蛋白质则是由 20 种氨基酸组成的复杂结构, 而且由于不存在度量修饰蛋白质种类的尺度, 再加上多样的蛋白质修饰手段, 人们无法像确定基因组核苷酸序列那样, 准确地统计出生物体内蛋白质组的蛋白质总数。因此在后基因组学时代, 在进行蛋白质组学研究时, 科学家们面临着更多的挑战。

蛋白质组学的研究试图比较细胞在不同生理或病理条件下蛋白质表达的异同,对相关蛋白质进行分类和鉴定。更重要的是蛋白质组学的研究要分析蛋白质间相互作用和蛋白质的功能。其主要研究内容包括:① 蛋白质鉴定。可以利用一维电泳和二维电泳并结合蛋白质印迹分析等技术,利用蛋白质芯片和抗体芯片及免疫共沉淀等技术对蛋白质进行鉴定;② 翻译后修饰。很多 mRNA 表达产生的蛋白质要经历翻译后修饰如磷酸化、糖基化、酶原激活等。翻译后修饰是蛋白质调节功能的重要方式,因此对蛋白质翻译后修饰的研究对阐明蛋白质的功能具有重要作用;③ 蛋白质功能确定。如分析酶活性和确定酶底物,细胞因子的生物分析/配基-受体结合分析。可以利用基因敲除和反义 RNA 技术分析基因表达产物——蛋白质的功能。另外,对蛋白质表达出来后在细胞内的定位研究也在一定程度上有助于对蛋白质功能的了解。Clontech 的荧光蛋白表达系统就是研究蛋白质在细胞内定位的一个很好的工具;④ 亚细胞水平研究。不同发育、生长期和不同生理、病理条件下不同的细胞类型的基因表达是不一致的,因此对蛋白质表达的研究应该精确到细胞甚至亚细胞水平。

二维电泳可以将不同类型的蛋白质按照等电点和相对分子质量差异进行高分辨率的分离。成功的二维电泳可以将 2000 ~ 3000 种蛋白质进行分离。电泳后对胶进行高灵敏度的染色如银染。如果是比较两种样品之间蛋白质表达的异同,可以在同样条件下分别制备二者的蛋白质样品,然后在同样条件下进行二维电泳,染色后比较两块胶。也可以将二者的蛋白质样品分别用不同的荧光染料标记,然后将两种蛋白质样品在一块胶上进行二维电泳的分离,最后通过荧光扫描技术分析结果。胶染色后可以利用凝胶图像分析系统成像,然后通过分析软件对蛋白质点进行定量分析,并且对感兴趣的蛋白质点进行定量。通过蛋白质点切割系统,可以将蛋白质点所在的胶区域进行精确切割。接着对胶中蛋白质进行酶切消化,酶切后的多肽经脱盐/浓缩处理后就可以通过点样系统将多肽点样到特定材料的表面。最后这些蛋白质就可以在质谱(mass spectrometry, MS)系统中进行分析,从而得到蛋白质的定性数据,这些数据可以用于构建数据库或与已有的数据库进行比较分析。激光捕获显微切割(laser capture microdissection, LCM)-二维电泳-质谱的技术路线是典型的一条蛋白质组学研究的技术路线。除此以外,激光捕获显微切割-抗体芯片的技术路线也是一条重要的蛋白质组学研究的技术路线,即通过激光捕获显微切割技术获