

黑曲霉分生孢子的萌发过程中 RNA 图谱的主要变化

翻译 : DevXia devxia@gmail.com

M.R. van Leeuwen¹, P. Krijgsheld², R. Bleichrodt², H. Menke³, H. Stam³, J. Stark³, H.A.B. Wösten², and J. Dijksterhuis^{1*}

¹Applied and Industrial Mycology, CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre, Uppsalalaan 8, 3584 CT Utrecht, The Netherlands; ²Microbiology and Kluyver Centre for Genomics of Industrial Fermentation, Molecular Microbiology, Utrecht University, Padualaan 8, 3584 CH Utrecht, The Netherlands; ³DSM Food Specialties, PO Box 1, 2600 MA Delft, The Netherlands

通讯作者: Jan Dijksterhuis, j.dijksterhuis@cbs.knaw.nl

摘要：本文研究黑曲霉分生孢子的转录组在其萌发之初的 8 小时内的变化。休眠孢子在接种后两小时开始在液体培养基上各向同性生长。在 6 小时后各向同性生长变成极性生长，这与细胞发生一次有丝分裂相符合。休眠孢子的转录本来自 4626 个基因。在萌发后两小时转录本基因数下降到 3557 个，在这之后（接种后 8 小时）表达的基因数出现增长，达到 4780 个。休眠阶段孢子的 RNA 组成与之后的所有的萌发阶段都有着本质差异。0 到 8 小时 RNA 图谱的相关系数为 0.46。相比于 8 小时，图谱在 2、4、6 小时的时候相关系数在 0.76 ~ 0.93 之间。休眠期孢子以高基因转录水平为特点，这些转录的基因的表达产物包含多种具有保护作用的物质，例如海藻糖、甘露醇和保护性蛋白（如热休克蛋白和过氧化氢酶）。转录本属于功能基因分类（DunCat）蛋白质合成。细胞周期、DNA 处理与细胞呼吸于 2 h 时在向上调节基因中过表达。鉴于代谢、细胞周期和 DNA 处理在 4 小时的时候在向上调节基因中过表达。在 6 小时和 8 小时时，不同表达程度的基因中没有功能基因的过表达或低表达。综上所述，我们可以借此预测黑曲霉孢子转录本在前两个小时的急剧变化，蛋白质合成起始，并且知道在萌发的早起阶段呼吸的十分重要。

关键词：黑曲霉，分生孢子，萌发，转录本

发布时间：2012 年 9 月 17 日；doi：10.3114/sim0009。付印：2013 年 3 月。

1 介绍

真菌主要通过分生孢子繁殖，孢子通过例如水、空气等不同媒介进行散播。空气中的孢子水活度较低，因而对高温、低温、紫外线和应激源（如活性氧化物）有一定的抗性。孢子在接触到水、空气或者无机盐、氨基酸与发酵糖类时会打破休眠。环境条件通过 Ras/MAPK 和 cAMP/PKA 信号转导通路的受体表征。萌发被活化时，孢子内的海藻糖与甘露醇含量下降，最终生成甘油。生成甘油意味着糖酵解途径开始活跃。

孢子萌发的第一个形态上的特征是各向同性生长，也叫做“膨胀（swelling）”。在此过程中孢子摄取水分，其直径增大两倍以上，细胞质微粘度下降。此外，分子直接到达细胞皮质使得原生质膜和细胞壁得以形成。各向同性生长伴随着代谢活动，例如呼吸作用、DNA、RNA 与蛋白质的合成。在这之后是极性生长，极性生长最终形成芽管。在极性生长时期，有关细胞形态的部分会被重定向到极化的位点。这些部分包括细胞骨架、囊泡转运系统、标记蛋白、信号通路和胞吞有关因子（例如 Rho GTP 酶分子、极体、Arp2/3 复合体）。此外细胞质膜中的脂质组分被出现的甾醇改变。在之后的生长阶段，芽管的生长速度加快，菌丝尖端的功能性组织通过胞吞和胞吐获得了全部潜力并且出现顶体（Spitzenkörper）。通过分支和菌丝间融合最终形成菌丝体。

散囊菌目（例如青霉菌属、曲霉属和拟青霉属）产生众多单细胞孢子大量散布在空气中。这些菌属与食物酸败有关并且可以产生大量霉菌毒素。它们也是条件致病菌。除此之外，这些菌种也是重要的细胞工厂。黑曲霉（*A.niger*）的基因序列和全基因组微阵列可以被利用，这使得它称为真菌的模型系统。到目前为止，我们只对黑曲霉的无性繁殖有认识。孢子通过复杂的发育途径形成。在本研究中，我们将对黑曲霉孢子在休眠期和萌发阶段（即各向同性生长之前）的转录组进行分析。数据表明休眠期孢子的转录组不同于其他萌发阶段。

2 材料与方法

2.1 菌体和生长条件

在此研究中使用黑曲霉菌种 N402 与它的衍生品种 RB#9.5。RB#9.5 表达一个编码了 sGTP 和 H2B 组蛋白融合基因的基因，并且受到 mpdA 启动子调节。为了分离孢子，菌种在 20°C 下于完全培养基（CM）中生长 12 天。完全培养每升包含：1.5% 琼脂，6.0g NaNO₃，1.5g KH₂PO₄，0.5g KCl，0.5g MgSO₄，4.5g D-葡萄糖，0.5% 酪蛋白氨基酸，1% 酵母膏和 200μL 微量元素（每升微量元素包含：10g EDTA，4.4g ZnSO₄·7H₂O，1.0g MnCl₂·4H₂O，0.32g CoCl₂·6H₂O，0.32g CuSO₄·5H₂O，0.22g (NH₄)₆Mo₇O₂₄·4H₂O，1.5g CaCl₂·2H₂O，1.0g FeSO₄·7H₂O）。孢子需收集在冰冷的 ACES-缓冲液中

(10 mM ACES , 0.02% 吐温-80 , pH6.8) 为此 , 用 T 型无菌刮刀在菌落表面轻轻刮取孢子 , 并且使用无菌玻璃纤维对孢子悬浮液进行过滤。孢子在冰冷的 ACES-缓冲液中洗涤 , 再次悬浮在完全培养基中并且在下一步操作之前持续冰浴保存。

2.2 显微镜

液态培养的样本被放在有多聚-L-赖氨酸 (西格玛) 涂层的盖玻片上。移除培养基之后 , 固定有孢子的盖玻片倒置放在一个覆盖有 2% 琼脂的薄层 (< 0.5mm) 的物体上。残留的液体用滤纸吸走除去。图像使用装备有 HBO 100 W 汞灯和一个 AxioCam MRc 照相机 (带有 FITC 滤镜) 的蔡司 Axioskop 2 plus 显微镜拍摄。每个时间点最少可以捕捉到 93 个细胞便于对休眠期或者萌发阶段的孢子核进行计数。

2.3 RNA 提取

为了分离 RNA , 接种三份约 10⁹ 个孢子在 300mL 的完全培养基中。每次分离 , 将三份培养物在 24°C , 125rpm 的摇床上培养。在每个时间点 , 从培养基上各取样 15mL 共三份。样品合起来在 5°C , 1100g 下离心 5min。离心产物被冻结在液氮中并且用试剂盒 TissueLyser® 在一个提前用液氮冷冻的不锈钢研磨罐内研磨均匀。均质化之后加入 2ml RLT 缓冲液 (由试剂盒 RNeasy®Maxi 试剂盒提供)。所有的样本材料花费 0h 和 2h , 一半材料花费 4h , 三分之一材料花费 6h 和 8h 之后转运到 Greiner 管中。按照 RNeasy® Maxi 试剂盒的说明稍作修改进行 RNA 的提取操作。15mL 的 RLT 缓冲液提供 170μL 的 β-巯基乙醇。在离心 (3000 x g , 10min , 4°C) 之后 , 将上清液置于 50mL Greiner 管中 , 加入 15mL 70% 乙醇 , 之后转移到 RNeasy Maxi 柱上。离心 (3000g , 5min , 4°C) 之后 , 吸附柱用 10ml RW1 洗一次 , 之后再次离心 (10min) 之后用 10ml RPE 缓冲液洗脱两次。这之后用无 RNA 酶水稀释 RNA 到 800μL。2 分钟后将柱子在 4°C , 3000g 条件下离心 3 分钟 , 之后再重新用无 RNA 酶的水稀释到 800μL。用 SpeedVac® 将 RNA 水溶液的体积减少到大约 100-400μL。紧接着加入 600μL 2x T 和 C 的裂解液并且将该混合物在冰浴。5 跟种种后 , 加入 350μL MPC 蛋白质沉淀试剂 , 充分混合后离心 (12.000 x g , 10min , 4°C)。取上清液于一洁净微量离心管中 , 与 1000μL 异丙醇轻轻混合。RNA 在 12.000 x g , 4°C 条件下 10min 离心沉降后取出沉淀物在空气中干燥 5 分钟。之后重新将沉淀物悬浮在 100μL 无 RNA 酶的水中。再加入额外的 700μL RLT 缓冲液 (不含 β-巯基乙醇) 和 500μL 96% 乙醇。使用 RNeasy® Mini 试剂盒中的纯化方案对 RNA 进行进一步纯化。RNA 浓度使用 Nanodrop ND-1000 分光光度计进行测定。质量由 Agilent 2100 Bioanalyzer™ 试验测定 , 实验中使用 RNA 纳米实验室芯片 (Nano LabChip®)。

2.4 cDNA 标记、基因芯片杂交与数据分析

cDNA 标记、基因芯片杂交、芯片扫描在 ServiceXS (莱顿, 芬兰) 上根据 Affymetrix 方案进行。即实验中使用的 2 μ L 总 RNA 是运用 Affymetrix 真核单环靶向标记法和控制试剂使用生物素标记的反义 cRNA。cRNA 的质量使用 Agilent 2100 BioanalyzerTM。最终在每个时间点一式三份被标记的 cRNA 用于 Affymetrix 黑曲霉基因芯片进行杂交。在自动冲洗杂质的工艺之后, 表达的绝对值从扫描序列中计算得到, 计算则使用软件 Affymetrix 命令行控制台 v.1。序列按照从微阵列套件 v5.0 (MAS 5.0) 测得的所有基因特征当中的平均信号的目标值 (TGT) 进行全局扫描。所有这些组件都在 Genedata Expressionist 的 Refiner Array Affymetrix IVT Arrays 5.2 当中。序列数据被存储在美国国家生物信息中心 (NCBI) 的基因表达汇编中, 并且可以通过许可码 GSE36439 进行访问 (www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/)。MAS 5.0 侦测信号被用于计算每个探针组 存在/缺乏 信号时的数据。通过设定所有被标记 A 和 M 的数值为固定值 12 进行过滤。当基因表达差异 ≥ 2 倍时可以认为是不同的两种表达。样本之间的不同表达使用 Genedata Expressionist 中的 t-测试进行统计评估。0.01 作为重要等级被使用, 并且应用 Benjamini Hochberg 错误发现率 $p = 0.05$ 。功能目录 (慕尼黑蛋白质序列信息中心) 被用于对基因按照其功能进行分类。

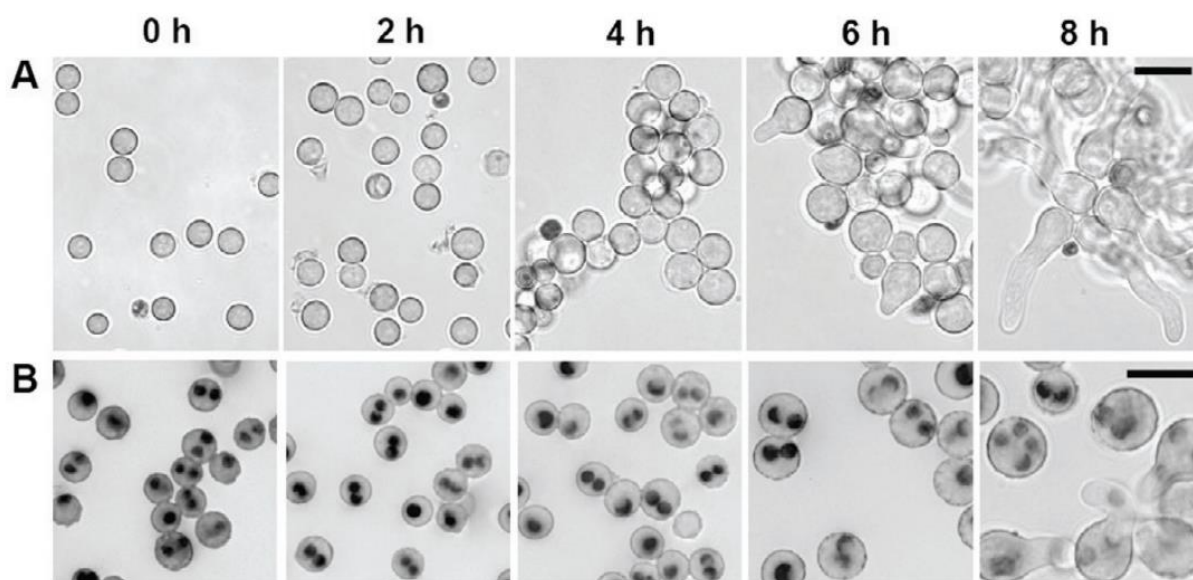


图1 黑曲霉孢子的萌发表示为明亮区域 (A) 和采用荧光镜检法 ($\lambda = 450-490$ nm, FT510, LP520) (B)。使用 RB#9.5 黑曲霉菌种。这个菌种中存在编码 sGFP 和组蛋白 H2B 融合蛋白的基因。途中的黑色条形尺的实际长度分别为 10 μ m (A) and 5 μ m (B)。

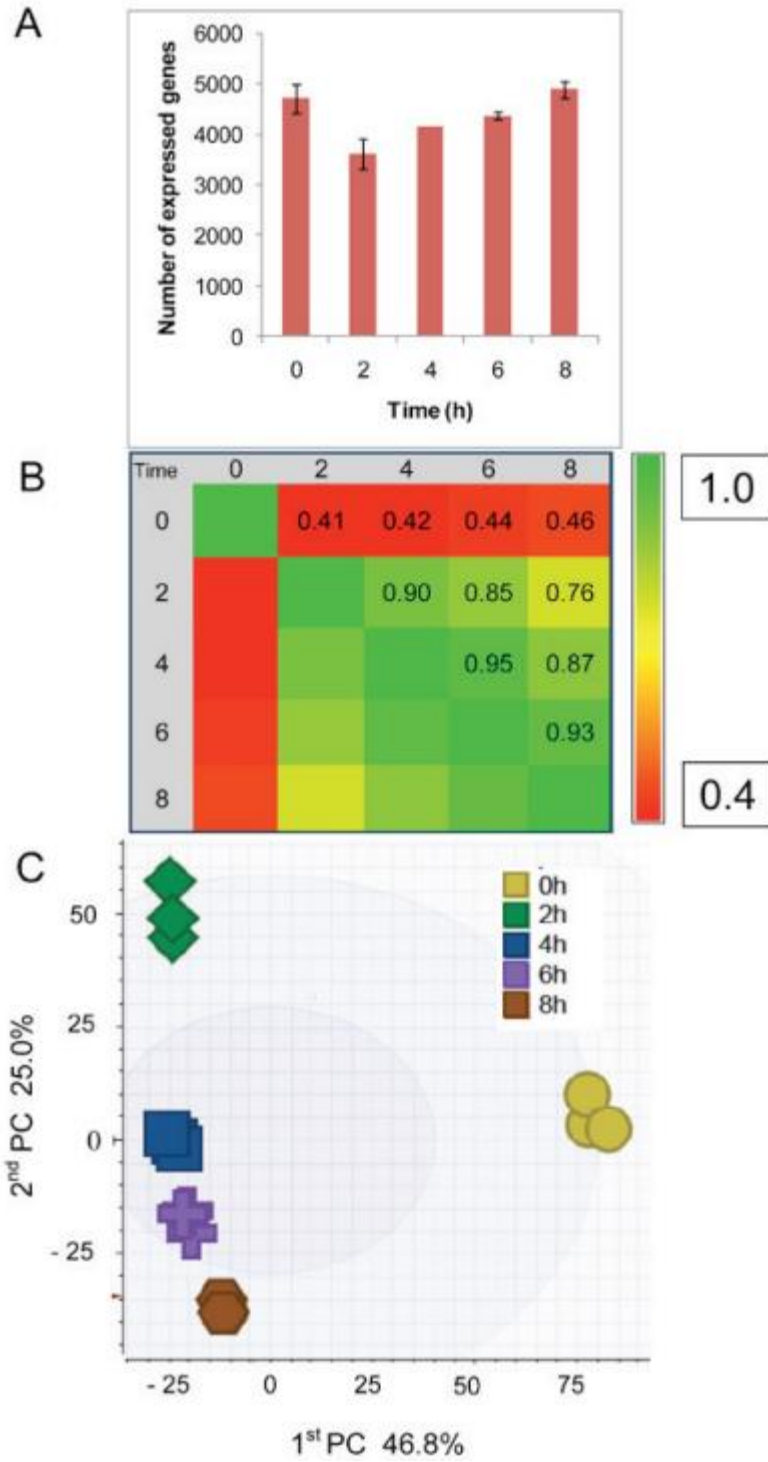


图2 黑曲霉孢子的萌发中表达的基因数，不同萌发阶段的RNA 图谱的相似性用相关系数表示 (B)，主要组分分析 (C)

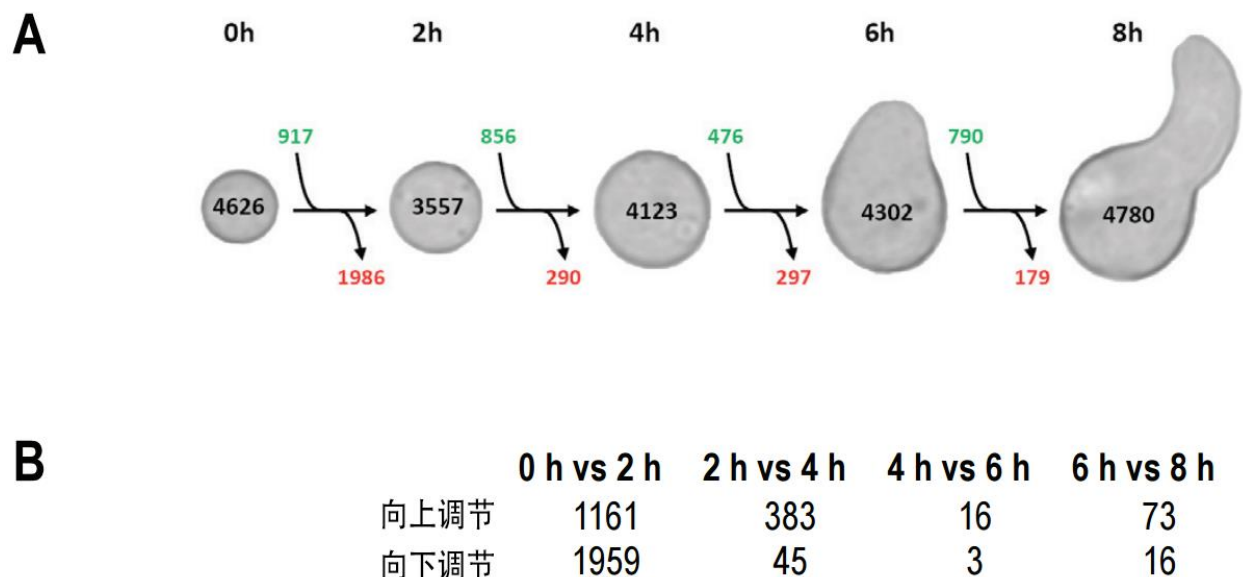


图3 (A) 孢子萌发过程中的转录组的变化概览。孢子内的表达的转录的数量是给定的。绿色和红色分别代表从无到有和从有到无。(B) 基因数量在不同萌发阶段的变化 ≥ 2 倍

3 结果

3.1 孢子萌发

黑曲霉孢子在 30-34°C 条件下萌发 6 小时后出现最大萌发率为 90% 以上。在本实验中黑曲霉生长在 25°C 以便于区分其在不同阶段的萌发 (如图 1A)。各向同性生长在接种后 2-6 小时出现, 而芽管在接种后 6-8 小时形成。黑曲霉报告菌种 (RB#9.5 表达一种受 *mpdA* 启动子调控的由 H2B 组蛋白和 sGFP 蛋白融合而成的蛋白质, 这种蛋白用于监控细胞核的分裂 (如图 1B)。休眠孢子当中双核的占大多数 (85%), 其余的都是单核。核分裂在萌发后 6-8 小时出现。在 8 小时之后, 42% 的萌发孢子有 3 个核, 34% 的萌发孢子有 4 个核, 10% 的萌发孢子有 1 个核, 14% 的萌发孢子有 2 个核。

3.2 转录特征识别

大多数从真菌当中分离 RNA 的方法是利用像 TRIzol® 这样的酚/酚基试剂来提取。但是用这种方法无法从休眠或萌发早期的孢子中提取 RNA。故此, 发展出一种新的黑曲霉孢子 RNA 提取方法, 该方法可以得到高质量的完整 RNA (详见补充材料图 1)。这种方法可以用来提取休眠期

(0h) 和萌发阶段 (2 , 4 , 6 , 8h) 孢子的 RNA。来自三种独立复制的 RNA 被用于黑曲霉芯片杂交，该芯片包含 14259 种开放阅读框架 (ORF)。

MAS 5.0 (微阵列套件 v5.0) 侦测信号被用来确定表达基因的数目。休眠孢子包含来自 4626 个基因的转录本 (如图 2A 和 3A)。萌发后 2 小时，表达基因的数目下降到 3557。这之后直到 8 小时，表达基因数逐渐上升到 4780。表达的相关性表明休眠孢子的 RNA 图谱与其他其他样本有很大不同 (如图 2B)。图谱中 0h 和 8h 的相关系数为 0.46。相比于 8h，2h、4h 和 6h 的相关系数从 0.76 上升到 0.93。主要组分的分析 (PCA) 也得出相似的结论 (如图 2C)。根据 PCA，0h 的样本与所有其他时间点的样本有着本质上的不同。当其他时间点存在变化时，它的第一主要组分占主导地位并且限制第二主要组分。

3.3 孢子萌发阶段表现的对照

在休眠孢子中，1986 个基因被表达，随后在时间点 2h 时变得很少 (如图 3A)。当与其他阶段相比时，这些数字的下降尤其显著。当受体向下调节使得受体数量变化 ≥ 2 倍时，受体数量也表现出相似的变化趋势 (如图 3B)。事实上，这种不同甚至更加显著。在 0h 和 2h 之间，1959 个基因向下调节，而在其他阶段只有 3-45 个基因受向下调节。相比于其他阶段，0h 和 2h 之间的向上调节基因数目也非常高。考虑到变化信号的数量，这种区别会小一些。

费舍尔精确检验 (Fisher exact test) 表明，功能蛋白质的转录本在休眠期孢子的 RNA 图谱中显示为过表达。2h 时，功能类蛋白合成基因的转录本以及其亚类的基因起始和转录在向上调节基因中被过表达 (详见表 1)。而且，这一类基因的能量 (包括亚类的呼吸作用)，细胞循环，DNA 加工和转录 (包括其亚类的 rRNA 合成与加工) 在 2h 时受向上调节，基因被过表达。不仅如此，当氨基酸分解基因低表达时，亚类的基因包括核苷酸代谢也受向上调节过表达。综上所述，这些数据表明转录起始和呼吸作用是孢子开始萌发的关键过程。

在萌发的后期 (2-8h 之间的阶段)，功能基因的表达量变化很小。事实上，这个 6h-8h 阶段没有功能蛋白过表达或者低表达。在 4h 阶段，代谢、细胞循环、DNA 加工向上调节被过表达。4h 阶段表明，无性孢子在为将在几个小时后进行的有丝分裂做准备。

表 1 黑曲霉孢子在不同时间点下的在功能基因在向上调节和向下调节下的高表达-(E)和低表达-(S)的对比

	0h 对比 2h		2h 对比 4h
	向上	向下	向上
01 代谢			E

01.01.10 氨基酸降解（分解代谢）	S		
01.02.01 氮和硫的利用率	S		
1.03 核苷酸代谢	E		
01.03.01 嘌呤核苷酸代谢	E		
01.03.04 嘧啶核苷酸代谢	E		
01.05.01 c-复合物和碳水化合物的利用率	S		
01.05.07 c-复合物，碳水化合物运输			S
01.20.05 合成乙酸衍生物			S
01.20.05.01 合成乙酰乙酸、丙酮、β-羟基丁酸	S		
01.20.35 生物合成 L-苯丙氨酸和酪氨酸衍生的副产品	S		
01.20.37 合成肽化合物	S		
02 能量	E		
02.11.05 辅助蛋白的电子传递和能量守恒	E		
2.13 呼吸	E		
02.13.03 有氧呼吸	E		
03 细胞周期和 DNA 加工	E		E
03.01.03 DNA 合成和复制			E
03.03.01 有丝分裂细胞周期和细胞周期控制			E
04 转录	E		
04.01.01 rRNA 的合成	E		
04.01.04 rRNA 加工	E		
04.05.05 mRNA 加工（剪接，5',3'-端加工）		S	
04.05.01 mRNA 的合成	S		
05 蛋白质的合成	E	S	
5.04 翻译	E		
05.04.01 萌生	E		
06 蛋白的修饰（折叠，修改，转运目标）	E	E	S
06.07.05 修饰的泛素化，泛素化	S		
06.13.01 细胞质和细胞核退化			E
11 细胞的拯救、防御和毒力	S		
29 转座子，病毒和质粒蛋白	S		
40 亚细胞定位	E		
99 未分类的蛋白质	S	S	S

3.4 特定转录本的变化与孢子萌发的关联

3.4.1 调控

目前为止，对黑曲霉无性繁殖的研究并不充分。然后对于基因序列预测而言，黑曲霉无性繁殖的机制与构巢曲霉相似。基因表达的预测包含无性繁殖的调控（如表 2）。主要调节因子 *brlA*（An01g10540）在休眠孢子中表达水平较低，而在萌发阶段几乎不表达。转录因子基因调控更多的下游基因，从 *brlA* 开始，包括 *medA*（An02g02150）、*abaA*（An01g03750），或许也包括 *hymA*（An02g08420）和 *dopA*（An02g08420）。转录因子基因相比于 *brlA* 表达水平更高，而且在 2h 后可以观测到高水平的表达。这是向上调节（*hymA* 和 *dopA*）和向下调节（*abaA*）的一个普遍趋势。相对而言，在萌发起始阶段 *stuA*（An05g00480）明显受向下调节。被预测直接激活基因的序列包括孢子形成和抗逆性（例如 *wetA*（An01g08900）、*atf1*（An14g06250，An02g07070，An12g10230）和 *sakA*（An08g05850）），其在休眠孢子中转录本水平较高并且总是表现出较强的向下调节水平。

FadA（An08g06130）、*SfaD*（An18g02090）和 *FlbA*（An02g03160）是调控从营养生长到分生孢子生产过程转运的信号通路的成员基因。这些基因在萌发孢子中表达，但是其转录本也能在休眠期孢子中发现。基因 *fadA* 编码一个异养 G-蛋白的 α 亚组，在萌发后 2h 受向上调节。基因 *sfaD* 编码的 $G\beta$ -亚组也在萌发期表现出相同趋势。有趣的是，抑制该信号通路的 *flbA* 基因有受向下调节的趋势。令人惊讶的是，一个名为 *GanB*（An08g05820）的 α 亚组中的异养 G-蛋白在构巢曲霉中参与孢子萌发，而在黑曲霉的萌发孢子中却低表达。它的信号通过腺苷酸环化酶（An11g01520）和蛋白激酶（An02g04270）共同组成调节因子 *PkaR*（An16g03740）。*PkaR* 体现了黑曲霉孢子的特征表达模式。这种模式包括：休眠期基因转录本的高积累量、萌发后 2h 的急剧下降（但并不为 0）、在之后的萌发阶段中向上调节的明确趋势。这样的基因表达模式与酵母中的 *Gpr1* 受体基因（An07g08810）非常相似，它拥有一个对营养物敏感的 G-蛋白偶联受体。

fluG 基因（An14g03390）编码一个参与引导转录因子的向上调节基因 *brlA* 形成的胞外因子。一些 *flb*-基因对上游基因有调控作用与这些因子很像，上游基因包括 *brlA* 和三个 An 基因（An02g05420，An12g08230，An01g04830）。这些基因只是低水平表达（两个 *flbC* 相似物中的一个在萌发期受向上调节），而 *fluG* 在萌发后 8h 表现出明确的向上调节趋势。反观 *brlA* 在萌发期不表达。*fluG* 的向上调节在黑曲霉生长中起其他作用。

不同研究都关心构巢曲霉孢子的 *RasA* 信号通路的重要性。与 *RasA* GTP 结合蛋白基因（An01g02320，*rasA*）相似的基因在接种后 2h 受到强烈的向上调控。而 *rasB*（An05g00370）在萌发期根本不表达。

三个黑曲霉基因 (An01g10790 , An04g02110 , An12g10240) 与粗糙脉孢霉的孢子因子高度同源。这些转录本表现出在黑曲霉休眠孢子中大量积累。

表2 黑曲霉中调节基因在萌发的孢子中的不表达调控。给出的数值为三次独立实验的平均值。白色到黑色的阴影表示从极少 (12 个表达单位) 的表达水平到 >7000 个表达单位。轮廓为虚线意味着基因的表达水平相比之前的时间点有显著差异差异表达 (> 2 倍) 。 SS = 高相似 ; S = 相似 ; WS = 低相似。 Anid = 构巢曲霉 ; Anig = 黑曲霉 ; Hsap = 智人 ; Mgri = 稻瘟病菌 ; Ncra = 粗糙脉孢菌 ; Pans = 鹅绒委陵菜 ; Spom = 粟酒裂殖酵母 ; Scer = 酿酒酵母。

名称	描述	休眠	2 h	4 h	6 h	8 h
An01g10540	SS 发育调控蛋白 BrlA-Anid	17	12	12	12	12
An02g02150	SS Medusa (MedA) - Anid [截断的 ORF]	20	94	70	54	63
An01g03750	SS 蛋白质 AbaA - Anid	86	76	61	51	27
An05g00480	SS 参与分化的转录因子 StuA - Anid	115	12	12	23	60
An02g08420	SS 菌丝样梗基蛋白	33	27	60	92	96
An01g08900	SS 调控蛋白 WetA - Anid	548	26	31	26	26
An14g06250	WS 转录因子 Atf1+ - Spom	163	23	17	19	26
An02g07070	SS 转录因子 Atf1+ - Spom	1024	42	69	69	69
An12g10230	S ATF/CREB 族转录因子 Atf21 - Spom	262	12	13	13	14
An08g05850	SS 渗透敏感性 MAP 激酶 OSM1 (SakA) - Mgris	1191	105	293	327	416
An08g06130	SS GTP-结合调控蛋白 α链 FadA - Anid	300	879	588	601	677
An08g05820	SS G 蛋白α亚基 Mod-D - Pans (ganB)	66	16	22	29	28
An18g02090	SS G 蛋白β亚基 SfaD - Anid	65	95	100	122	144
An02g03160	SS 发育调节 FibA - Anid	178	141	103	102	62
An18g06110	SS 相关 α-凝集素核心蛋白 Aga1 - Ncra (RgsA)	81	58	47	54	54
An11g01520	SS 腺苷酸环化酶 Mac1 - Mgr	532	70	78	100	131
An02g04270	依赖 cAMP 的蛋白激酶催化亚基 PkaC - Anig	263	17	74	81	100
An16g03740	依赖 cAMP 的蛋白激酶调控亚基 PkaR - Anig	800	20	87	128	262
An07g08810	SS G 蛋白偶联受体 Gpr1 - Scer	1800	87	140	171	132
An02g01560	WS G 蛋白偶联受体 Edg-4 - Hsap (gprD)	14	18	12	17	16
An01g06290	SS 与 VeA - Ncra 相关的假定蛋白	186	55	72	66	58
An14g03390	SS FluG - Anid	137	58	65	170	300
An02g05420	SS 推断的锌指蛋白(FibC) - Anid	25	46	49	43	45
An12g08230	SS 锌指蛋白 FibC - Anid	22	27	17	22	12
An01g04830	SS 类 myb 的 DNA 结合蛋白 FibD - Anid	12	31	12	26	14
An01g02320	SS GTP 结合蛋白 A-ras - Anid	38	152	161	288	359
An05g00370	SS 粗糙脉孢菌 Ras-2 蛋白	15	12	12	12	12
An02g08420	SS 发育关于游行和与性繁殖 DopA - Anid	32	20	49	66	107
An01g10790	SS 产孢子特异性蛋白 Con-10 - Ncras	2061	30	57	100	99
An04g02110	S Con-8 - Ncras	7110	28	49	21	17
An12g10240	SS 分生孢子特异性蛋白 pCon-10a - Ncras	2876	12	12	12	12

3.4.2 相容性物质

海藻糖和甘露醇需要保护蛋白和隔膜来抵抗热、干旱和其他应激源。这些相容性物质在休眠孢子中积累，并且在萌发期被降解。米曲霉构巢曲霉的每个孢子含 0.7-1.4pg 海藻糖，现代刚玉 2%-4% 孢子湿重。海藻糖的生物合成取决于 6-磷酸海藻糖合酶（TPS）。他连接 UDP-葡萄糖（UDP，尿苷磷酸化酶）与 6-磷酸葡萄糖最终生成 6-磷酸海藻糖。接下来的步骤中，6-磷酸海藻糖中的磷酸基团被磷酸酯酶（TPP）去除，因此生成海藻糖。tpsA（An08g10510），tpsC（An14g02180），tppB（An13g00400）和 tppC（An07g08720）的转录本可在休眠孢子中发现（如表 3）。这些基因的表达水平在接种后 2h 急剧下降。tpsA、tpsC 和 tppB 的表达水平在 2h 后逐渐升高，而 tppC 没有向上调节。其他预测中也表明 tps 和 tpp 基因（即 An02g07770 和 An11g10990）在萌发过程中表达水平逐渐增加。在孢子中编码中性海藻糖的基因（An01g09290）转录水平很高，这是在发芽过程中海藻糖降解所需的主要酶。在萌发的早期阶段转录水平急剧下降，而在各向同性生长阶段中表现出明显增加的趋势。编码酸性海藻糖酶的基因（An01g01540）与营养生长过程中胞外海藻糖的降解有关。该基因在休眠期的转录水平但在萌发阶段明显增加。综上所述，大多数海藻糖合成和降解酶的转录本在休眠孢子中相对丰富。在 2h 时急剧下降之后，他们的表达逐渐增加。

黑曲霉孢子中甘露醇的含量高于海藻糖，占干重的 10-15%。甘露醇脱氢酶（MTD）催化果糖转化为甘露醇，反之亦然。果糖进入糖酵解经过 6-磷酸果糖和 1,6-二磷酸果糖转化为 3-磷酸甘油醛。6-磷酸果糖可由 1-磷酸甘露醇脱氢酶（MPD）减少 1-磷酸甘露醇或进入甘油代谢。mtdA（An15g05450，个人通信）和 mpdA（an02g05830）的转录本在休眠孢子中含量丰富（如表 3）。如同参与海藻糖合成和降解的基因，mtdA 和 mpdA 表达水平在最初急剧下降，之后在萌发阶段又逐渐增加。

3.4.3 孢子产量、热休克蛋白和其他保护性因素

预测休眠孢子中大量的存在的转录本编码保护性蛋白（如表 4）。转录水平在 2h 急剧下降。An02g07350 基因编码的蛋白质是赋予孢子抗旱特性的同源 3 组 LEA 蛋白。一般认为这种保护蛋白也包括与烟曲霉当中的脱水素类似的蛋白质（An13g01110 和 An14g05070）和热休克蛋白。例如，由 An06p01610 编码的蛋白质和粟酒裂殖酵母中 Hsp9 编码的热休克蛋白是同源的。这种蛋白质也与酿酒酵母中的 Hsp12 基因编码的类 LEA 蛋白非常相似，该蛋白可以在稳定的细胞膜中找到。An01g13350 基因编码的同源的热休克蛋白 Hsp104，它与海藻糖在酵母细胞中一同表达时细胞获得耐热性。其他 10 个基因预测编码热休克蛋白（例如 An15g05410，An07g09990 和 An18g00600）也在休眠孢子中显示出高积累量，但有些在最后阶段进一步向上调节（例如

An16g09260，An11g00550 和 An08g05300)。有趣的是，转录本 An01g00160 可能是未折叠蛋白响应的调节器 (酵母中的 Hac1p)，它也在休眠孢子高水平表达。

超氧化物歧化酶，过氧化氢酶，谷胱甘肽，硫氧还蛋白也通过对抗孢子在物质转运或干燥孢子回潮中造成的氧化压力来保护孢子。与过氧化氢酶的编码基因类似的转录本 (如 An01g01830，An12g10720，An09g03130 和 An08g08920) 在休眠孢子中高表达，但是在萌发的孢子中较少表达。An07g03770 基因编码超氧化物歧化酶，在休眠细胞中 mRNA 水平很高。在起初的急剧下降之后，接种后 4h 该基因的 mRNA 水平有所增加。参与谷胱甘肽的合成的基因 (即 An02g06560，An01g15190 和 An09g06270) 在休眠孢子的高表达，在萌发孢子中低表达。相反，编码硫氧还蛋白的基因在休眠和萌发的孢子中转录水平相似。综上所述，编码过氧化氢酶、超氧化物歧化酶基因的 mRNA 与参与谷胱甘肽和硫氧还蛋白的合成的基因在休眠孢子中大量存在 (表达)，之后在开始萌发后急剧下降。这些数据表明，孢子抗逆性在萌发初期很可能有所降低。

表3 参与相容性溶质代谢相关基因的表达。给出的数值为三个独立的实验结果的平均值。白色到黑色的阴影表示从极少 (12 个表达单位) 的表达水平到 > 1200 个表达单位。更多的解释参见表 2。Smut = 变形链球菌。

名称	描述	休眠期	2 h	4 h	6 h	8 h
An08g10510	6- 磷酸海藻糖合酶亚基TpsA - Anig	871	44	106	175	270
An14g02180	SS 6-磷酸海藻糖合酶TpsB - Anig	456	16	59	69	134
An07g08710	磷酸海藻糖磷酸合酶TpsB - Anig	121	45	100	87	99
An02g07770	SS 海藻糖合成酶TSase - 多叶奇果菌	139	22	104	173	494
An13g00400	SS 海藻糖-6-P 合成酶/磷酸酶复合物 Tps3 - Scer	392	14	19	21	45
An07g08720	SS 123K 6-磷酸海藻糖合酶 Tsl1 - Scer	286	19	31	19	27
An11g10990	SS to TPP 专利号 WO200116357-A2 - Scer	96	104	123	136	198
An01g09290	SS 中性海藻糖酶 (TreB) - Anid	1203	17	60	87	178
An01g01540	SS α,α-海藻糖酶 TreA - Anid	22	31	42	66	329
An02g05830	SS 甘露醇-1-磷酸5-脱氢酶 MtID - Smut	140	16	27	30	153
An15g05450	SS NADPH依赖的羧基还原酶 S1-念珠菌	425	84	894	606	862
An03g02430	SS 荧光假单胞杆菌 mtID -甘露醇脱氢酶	645	36	77	119	200
An02g07610	SS 甘露醇转运 MAT1 - 芹菜	467	12	12	12	12

表4 参与抵抗氧化应激的保护性蛋白的基因的表达。给出的数值的三个独立的实验结果的平均值。白色到黑色的阴影表示从极少(12个表达单位)的表达水平到>6500个表达单位。更多的解释见表2。Mmar = *Methylobacter marinus* ; Nmen = 脑膜炎双球菌 ; Pchry = 产黄青霉 ; Zmay = 玉米。

名称	描述	休眠期	2 h	4 h	6 h	8 h
An02g07350	WS 组别3 Kea蛋白 Mgl3 - Zmay	4559	20	122	72	74
An13g01110	S 假定蛋白 An14g05070 (dehydrin) - Anig	550	15	32	19	18
An14g05070	WS 异核体不亲和蛋白 Het-C (dehydrin) - Ncra	785	12	106	19	13
An06g01610	SS 热休克蛋白 Hsp9p - Spom	4577	80	1248	525	460
An01g13350	SS 热休克蛋白 Hsp104 - Scer	385	13	28	40	61
An15g05410	SS 热休克蛋白 Hsp30 - Anid	1275	31	27	32	30
An18g06650	SS 热休克蛋白 Hsp30 - Anid	610	37	93	118	97
An07g09990	SS 热休克蛋白 Hsp70 - 荚膜组织胞浆菌	4139	1247	2733	2140	1895
An03g00400	S 热休克蛋白 Hsp42 - Scer	61	23	28	21	19
An11g08220	S 热休克蛋白 Hsp70 专利 WO200034465-A2 - Nmen	476	12	12	12	12
An18g00600	SS 热休克蛋白 Hsp30 - Ncras [truncated ORF]	513	12	12	38	12
An11g00550	SS 伴侣蛋白 Hsp10 - Scer	303	537	704	647	685
An08g05300	SS 热休克蛋白 Hsp70 Pss1+ - Spom	251	913	803	692	558
An12g04940	SS 线粒体热休克蛋白 Hso60 - Scer	522	1011	1211	1158	1036
An16g09260	SS DnaK型分子伴侣 Ssb2 - yeast Scer	3585	6676	6741	6299	6103
An08g03480	SS 线粒体热休克蛋白 Hsp78p - Scer	618	57	201	217	361
An01g00160	S 未折叠蛋白应答调节器 (UPR) Hac1p - Scer	999	219	244	441	619
An08g08920	SS 过氧化氢酶C CatC - Anid	78	24	56	29	29
An09g03130	SS 过氧化氢酶CatA - Anid	3106	24	34	29	37
An12g10720	SS 过氧化氢酶Cat - 巴氏甲烷八叠球菌	1978	12	12	12	12
An01g01830	SS 过氧化氢/过氧化物酶 CpeB - 网链霉菌	555	27	49	49	61
An07g03770	SS 铜锌超氧化物歧化酶 SodC - Afum	3091	12	529	856	1380
An02g06560	SS 谷胱甘肽S-转移酶 IsoJ - Rhodococcus sp.	379	12	49	75	185
An01g15190	SS 谷胱甘肽依赖型甲醛脱氢酶 Fdh - Mmar	568	12	12	12	12
An09g06270	SS SPBC1198.01 - Spom	6489	26	398	239	323
An16g06100	S 谷胱甘肽S-转移酶 Gst1 -	64	12	28	18	12
An13g02540	SS 谷胱甘肽S-转移酶 Gtt1 - Scer	150	14	16	39	176
An02g08110	SS 谷胱甘肽过氧化物酶 Hyr1 - Scer	251	80	132	193	337
An01g02500	SS 硫氧还蛋白 - Anid	1002	385	1141	1642	2018
An01g08570	SS 氧还原蛋白还原酶 TrxB - Pchry	77	139	148	135	128
An15g07230	S 线粒体硫氧还蛋白 专利号 WO9832863-A2 - Rattus sp.	194	22	20	12	15
An03g02980	SS 硫氧还蛋白 - Anid	65	154	206	191	242

3.4.4 细胞壁的调控

黑曲霉孢子具有较厚且分层的细胞壁，其含有色素的细胞壁外膜在萌发时脱落。孢子含有复杂的黑色素。黑色素合成途径涉及的三个基因（An03g03750，An09g05730，An14g05350）的转录产物在休眠孢子中含量丰富，而萌发时却不再存在。七个基因中有五个编码与疏水蛋白相似的蛋白质，该蛋白在休眠孢子中大量积累并且在孢子萌发起始阶段急剧减少。编码细胞壁降解和合成酶的基因在萌发后的每一个阶段都有表达（详见表 5）。GPI-锚定的几丁质酶（An09g06400）的编码基因在接种后 6-8h 高表达。这种酶与构巢曲霉的极化生长有关，这与接种后 6-8h 形成芽管的事实相吻合。与 ChiA 高度相似的基因 An04g1430 在接种后 8 h 高表达，但其转录本在休眠孢子中也大量存在。这体现了在其他过程（例如孢子形成过程）中的一种激活作用。几丁质合成酶与几丁质酶对应，有报道在真菌细胞中发现。An07g05570（chs1，构巢曲霉），An09g04010（chsC，烟曲霉）和 An12g10380（chsC，烟曲霉）的转录本在接种 2h 后积累，而 An02g02340 和 02360 的转录本在所有阶段都有转录。所有阶段皆有表达的几个基因与 csmA、V 类几丁质合酶、肌球蛋白运动域相似，他们与菌丝的顶端生长相关。

两个编码可降解细胞壁的葡聚糖酶的基因在整个萌发阶段都表达；基因 An08g10740 在萌发阶段向上调节，而 An12g09130 在休眠孢子和 8h 萌发体中积累。

一个编码类似于巴西副球孢子中葡聚糖合成酶的基因（An06g01550）在接种后 2h 向上调节且直到接种后 8h 其表达水平依旧很高。另一个编码葡聚糖合成酶的基因（An09g03070，类似于粟酒裂殖酵母中的 mok1）在萌发阶段有相同的表达量。与细胞壁加工有关的其他基因如表 5 所示。它们编码的蛋白可以使 1,6- 和 1,3-葡聚糖和葡聚糖交联，也可以使葡聚糖和几丁质交联。基因 An08g03580 的转录本在休眠期、接种后 2h、8h 的孢子中积累。在发芽的各个阶段，可以看到酶的特殊活动，但是大多数酶在接种后 2h 高表达。

4 讨论

在这项研究主要针对休眠和萌发阶段的黑曲霉孢子的转录组。本文献是第一个针对散囊菌目菌种休眠和萌发阶段孢子的全基因组表达分析报告。这个类包含曲霉属和青霉属。数据显示，孢子休眠期的 RNA 图谱（表达谱）相比于其他的萌发阶段有着本质上的不同，且每个阶段都有其典型的形态学特点。各向同性生长阶段之前发生转录组重组，之后的 RNA 图谱逐渐变化。这些变化使用描绘了孢子在休眠期、接种 2h、4h、6h 和 8h 的图谱中的相关系数来表示，其中休眠期和 8h 的相关系数为 0.46，2、4、6 直至 8h 的相关系数在 0.76-0.93 之间。

4.1 休眠孢子

14253 个基因中有一半的表达黑曲霉的营养菌丝中表达，大约 40% 的基因是活跃在基外结构（即气生菌丝、孢子梗、分生孢子）。33% 的基因在休眠阶段的孢子中表达，这与在禾谷镰刀菌和烟曲霉中发现的 42% 和 27% 的基因非常相符。分生孢子 RNA 当与营养菌丝和基外结构相比时，更低的基因表达量说明了为什么只形成单细胞类型的孢子。与之相反，营养菌丝体和胞外结构包含了不同类型的菌丝和细胞。例如，营养菌丝由不同的菌龄、形态和处于不同环境条件下的细胞组成。事实上，即使是相邻的菌丝中的细胞的表达图谱也有很大出入。

Lamarre (2008) 表示，烟曲霉分生孢子的 RNA 图谱在储藏一年后只发生轻微变化。他们认为休眠孢子存在预先装备好的 mRNA 以供后续的翻译。这将便于孢子在条件适宜时迅速萌发。事实上，费舍尔精确检验 (Fisher exact test) 表明，功能蛋白质的转录本在休眠期孢子的 RNA 图谱中显示为过表达。应该指出的是，大量的转录本 (mRNA) 在萌发阶段都不发挥作用。这可以解释为什么超过 40% 的基因和休眠孢子的转录本在接种后 2h 不再活跃。在黑曲霉中包括对干燥、低温、高温、紫外辐射和其他应激源（如活性氧物）的抗逆性。例如，编码保护性蛋白（如类 LEA 蛋白）和脱水蛋白的基因的转录本在孢子中高度积累。参与相容性溶质的合成和降解的基因在特定的孢子中表达。另一个例子是参与胞外壁形成的基因（其中包括参与色素沉着和编码疏水蛋白的基因。编码转录因子的基因在休眠孢子中表达，但开始萌发后表达量下降。

4.2 萌发的孢子

Lamarre 等人 (2008) 通过覆盖约 3000 个基因的基因芯片研究烟曲霉分生孢子萌发早期阶段的表达谱。研究中 37°C 培养 30min 后观察到近 800 个基因（其中 80% 受到向上调节）。在我们的研究中，我们对处于早期萌发阶段的孢子进行全基因组表达分析。接种后的前 2 小时（即各向同性生长阶段）的特点是转录本的消失。如上所述，1986 个基因的转录在此阶段无法检测到。另一方面，917 个基因变得活跃。功能性基因类蛋白质的合成及其子类蛋白的基因为受向上调节的基因。此外，这类能源（包括子类的呼吸作用）、细胞周期和 DNA 加工以及转录（与它的子类 rRNA 的合成和加工）相关的基因都过表达。另一方面，在 mRNA 加工中所涉及的基因低水平表达。综上所述，休眠期孢子和接种后 2h 的孢子的 RNA 组成表明，蛋白质的合成是孢子萌发关键的。类似的描述在烟曲霉中亦已存在 (Lamarre 等人, 2008)。在萌发早期蛋白质合成的重要性也表明这样一个事实：蛋白合成抑制剂环己酰亚胺（放线菌酮）可阻止各向同性的增长，而细胞骨架与 DNA、RNA 的合成抑制剂并不受此影响。

在本研究中，孢子发芽过程中形态上的变化与转录组的变化并不相关联。而与此不同的是，Kasuga 等人 (2005) 的研究得出结论，粗糙脉孢菌中孢子发芽过程中形态上的变化与转录组的变

化是相关联的。黑曲霉接种后 2h，孢子中只有 3557 个基因的转录本。这个数字在接种后 8h 增加到 4780 个。基因差异表达水平相对较低。在 2h 和 4h 之间，4h 和 6h 之间，6h 和 8h 之间，有 16-383 个基因之间向上调节差异 ≥ 2 倍。另一方面，在这些阶段只有 3-45 个向下调节基因 ≥ 2 倍。在基因表达的微小变化也说明一个事实：在接种后 2h 和 8h 只有类代谢和细胞周期和 DNA 处理中表达上调的基因代表之间的 2h 和 4h 后表明，孢子分裂确实发生在几小时后。综上所述，黑曲霉的萌发是典型的转录过渡。在原生动物盘状细胞粘菌的萌发中也存在这样的转录过渡。

对孢子萌发的进一步研究提供基础的 RNA 分布在孢子萌发早期的过渡机制。尽管存在抗菌物质，纳塔尔链霉早期萌发也会发生类似规模转录组重组。这表明，转录组重组相对来说是一个内生的过程，在稳定的真菌孢子营养生长细胞中起着重要的作用。

5 鸣谢

MRVL 由荷兰技术基金会 (STW) 开放技术项目 ubc.6524 支持。作者感谢 Ferry Hagen, Timon Wyatt, Frank Segers (在 CBS-KNAW 真菌生物多样性中心), Jan Grijpstra (乌得勒支大学) 对本研究提供的宝贵意见。感谢 Eefjan Breukink, Yvonne te Welscher 和 Ben de Kruijff (膜生物化学系, 乌得勒支大学, 荷兰) 在本研究中卓有成效的探讨。

6 参考文献

(翻译略)

附：涉及词汇的相关解释

- 转录组 (transcriptome)：广义上指某一生理条件下，细胞内所有转录产物的集合，包括信使 RNA、核糖体 RNA、转运 RNA 及非编码 RNA；狭义上指所有 mRNA 的集合。
- 热休克蛋白 Heat Shock Proteins (HSPs)：是在从细菌到哺乳动物中广泛存在一类热应急蛋白质。当有机体暴露于高温的时候，就会由热激发合成此种蛋白，来保护有机体自身。许多热休克蛋白具有分子伴侣活性。按照蛋白的大小，热休克蛋白共分为五类，分别为 HSP110，HSP90，HSP70，HSP60 以及小分子热休克蛋白 small Heat Shock Proteins (sHSPs)(Kyeong et al., 1998)。
- Arp2/3 复合体 (Arp2/3 complex) 是一个包含 7 个次单元的蛋白质，专门调控肌动蛋白 (actin) 细胞骨架。
- 顶体 (德语：Spitzenkörper、英语：apical body)：在真菌学中指的是菌丝顶端负责菌丝生长、延长的区域，由许多囊泡组成，在孢子萌发及菌丝要分支时特别明显，在光学显微镜下即可看见。顶体在菌丝顶端的位置反映了菌丝将要生长的方向，另外在真菌细胞中，顶体可算是内膜系统的一部分。
- 向上调节 (up regulation)：是一种上层性调节，结果是受体数目增加，表现敏感性增高。通常长期使用受体的拮抗剂会产生此种效应。如长期使用普萘洛尔等药物，停药后会出现甲状腺功能亢进。
- 向下调节 (down regulation)：是一种衰减性调节，结果是受体数目下降，表现敏感性降低。通常长期使用受体的激动剂会产生此种效应。如长期使用异丙肾上腺素治疗哮喘，其疗效会不断下降。
- G 蛋白偶联受体 (G Protein-Coupled Receptors，GPCRs)：是一类膜蛋白受体的统称。这类受体的共同点是其立体结构中都有七个跨膜 α 螺旋，且其肽链的 C 端和连接第 5 和第 6 个跨膜螺旋的胞内环上都有 G 蛋白 (鸟苷酸结合蛋白) 的结合位点。目前为止，研究显示 G 蛋白偶联受体只见于真核生物之中，而且参与了很多细胞信号转导过程。在这些过程中，G 蛋白偶联受体能结合细胞周围环境中的化学物质并激活细胞内的一系列信号通路，最终引起细胞状态的改变。已知的与 G 蛋白偶联受体结合的配体包括气味，费洛蒙，激素，神经递质，趋化因子等等。这些配体可以是小分子的糖类，脂质，多肽，也可以是蛋白质等生物大分子。