

氮限制有利于三角褐指藻脂质积累

赵佩佩^{①②†}, 顾文辉^{①†}, 伍松翠^{①②}, 解修俊^①, 赵宇鹏^③, 黄爱优^①, 邰丽^{①②}, 潘光华^③, 王广策^{①*}

① 中国科学院海洋研究所, 青岛 266071;

② 中国科学院大学地球科学学院, 北京 100049;

③ 天津科技大学海洋科学与工程学院, 天津 300457

† 同等贡献

* 联系人, E-mail: gcwang@qdio.ac.cn

2014-12-26 收稿, 2015-02-06 接受, 2015-07-02 网络版发表

科技部国家科技基础性工作专项(2012FY112900-01)、科技部国际合作专项(2015DFG32160)、中国科学院先导专项项目(XDA11020404, XDA05030401)和天津市自然科学基金重点项目(12JCZDJC22200)资助

摘要 三角褐指藻是一种重要的海洋硅藻, 其全基因组已完成测序. 三角褐指藻富含脂肪酸, 是一种潜在的生物柴油原料. 因此, 三角褐指藻是一种极具应用前景的模式海藻. 本文分别在蛋白质组、转录组和生理水平上比较分析三角褐指藻在正常培养和缺氮培养下的变化. 研究表明, 细胞骨架、染色体组分及参与信号转导的多个蛋白的含量在缺氮条件下变化明显, 蛋白质降解加速以利于氨基酸的重新利用; 涉及光合作用和卡尔文循环的多个酶显著下调, 叶绿素生物合成相关蛋白含量降低, 光合效率明显下降; 糖酵解和三羧酸循环相关蛋白的转录和表达水平大幅上调, 脂肪酸合成过程中多个关键酶也表现为上调趋势. 同时, 尼罗红(Nile red)和氟硼荧(BODIPY)染色实验结果显示, 三角褐指藻细胞在缺氮条件下脂滴增大. 基于以上结果, 本文认为, 氮限制促进了三角褐指藻中脂质的积累, 糖酵解和三羧酸循环的强化为脂质合成提供了充足的底物和能量.

关键词

硅藻
脂质合成
代谢途径
蛋白质组学
三角褐指藻

硅藻是一类重要的单细胞光合浮游生物, 其生物量约占地球初级生产力的1/5, 具有重要的生态意义^[1-3]. 一般认为, 硅藻起源于二次吞噬, 为进化中相对年轻的群体, 进化地位特殊^[4]. 硅藻包括羽纹纲和中心纲2个纲, 约有100000~10000000个不同的物种, 其中, 已被人们认识的物种有10000~12000种^[5], 广泛分布于各类水环境. 硅藻具有特殊的生物学特点, 基因组结果揭示其具有完整的尿素循环, 由此认为尿素循环只存在于后生动物和硅藻中, 其他真核生物中均没有发现尿素循环的存在^[6,7]. Allen等人^[4]认为, 尿素循环参与氮素再利用并将细胞代谢过程中产生的碳返回中心代谢. 因此, 研究硅藻对氮元素的吸收与利用具有重要意义.

氮元素是所有生物生长发育所必需的营养元素, 许多生物大分子的合成都必须有氮元素的参与, 如

蛋白质和核酸等. 硝酸盐是一种常见氮源, 硝酸盐被硅藻细胞吸收后, 先被胞浆NADH-依赖的硝酸盐还原酶(cytosolic NADH-dependent nitrate reductase, NR)还原为亚硝酸盐^[8-10], 然后转运到叶绿体, 被类似于蓝藻的依赖铁氧还蛋白的亚硝酸盐还原酶(cyanobacterium-like ferredoxin-dependent nitrite reductase, Fd-NiR)还原为铵^[11,12]. 随后, 谷氨酰胺合成酶(glutamine synthetase, GS)和谷氨酸合成酶(glutamate synthase, GOGAT)协调作用将铵同化为氨基酸和其他含氮化合物^[13-15]. Hockin等人^[16]利用蛋白质组学方法发现, 中心纲硅藻假微型海链藻(*Thalassiosira pseudonana*)在低氮条件下NR和Fd-NiR等蛋白下调, 而尿素酶(urease)含量却升高, 可能原因是使细胞利用有机氮——尿素作为氮源; 同时, 糖酵解和三羧酸循环(tricarboxylic acid cycle,

引用格式: 赵佩佩, 顾文辉, 伍松翠, 等. 氮限制有利于三角褐指藻脂质积累. 科学通报, 2015, 60: 2196-2208

Zhao P P, Gu W H, Wu S C, et al. Changes in central carbon metabolism of *Phaeodactylum tricornutum* are beneficial for lipid accumulation under nitrogen starvation conditions (in Chinese). Chin Sci Bull, 2015, 60: 2196-2208, doi: 10.1360/N972014-1391

TCA循环)相关酶的上调为氮限制条件下中心碳代谢路径的优化提供可能。由此可见,研究氮代谢为认识海洋硅藻碳代谢的调节过程,从而探究硅藻适应海洋环境的机制奠定了基础。

三角褐指藻(*Phaeodactylum tricornutum* Bohlin)是一种羽纹纲硅藻,其基因组已完成测序^[7]。三角褐指藻富含活性物质如二十碳五烯酸(eicosapentaenoic acid, EPA)和岩藻黄素,是重要的水产饵料藻类^[17],也是一种潜在的生物能源的原材料,所以越来越多的研究者高度关注这一物种^[18,19]。Allen等人^[20]发现,铁缺乏会导致三角褐指藻氮同化的下降。Osborne和Geider^[21]认为,氮限制与三角褐指藻细胞的生化组成相关。氮含量的降低有利于三角褐指藻饱和脂肪酸及非饱和脂肪酸的积累,半乳糖脂含量从21%降低到12%,中性脂和磷脂含量分别从73%和6%提高到79%和8%^[22]。最近,Yang等人^[23,24]发现,在氮和硅元素双重限制条件下,三角褐指藻在转录组和蛋白质组水平均发生变化。然而,单独缺氮条件下三角褐指藻的蛋白质组学分析未见报道。

本文利用液相色谱质谱联用(liquid chromatography-tandem mass spectrometry, LC-MS/MS)和数字化表达谱(digital gene expression analysis, DGE)比较分析了正常和缺氮条件下三角褐指藻蛋白质组和转录组的变化,阐述了三角褐指藻在缺氮条件下代谢路径的变化。同时还发现,在氮缺乏的条件下三角褐指藻的光合作用下降,脂质积累增加,从而分析了其分子机制。这些结果有助于进一步了解氮元素对于硅藻的影响。

1 材料与方法

(i) 藻种与培养方法。三角褐指藻(*Phaeodactylum tricornutum* Bohlin)为本实验室保存的藻种,利用f/2海水培养基进行无菌培养^[25]。光照强度为24 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$,光照周期为12 h/12 h(光照/黑暗),培养箱温度为(20 $\pm$ 1) $^{\circ}\text{C}$ 。培养8 d,每天手动摇瓶3次。4000 g离心5 min收集。

用灭菌的人工海水^[26]洗涤收集的藻体,重悬在正常(Normal)和无氮(N^{-})的无菌f/2人工海水培养基中,继续培养48 h(N^{-} 48 h)和1周(N^{-} 1 week)。4000 g离心5 min收集。液氮速冻,−80 $^{\circ}\text{C}$ 储存备用。

(ii) 细胞计数与生长测定。每隔1 d对正常(Normal)和无氮(N^{-})培养的细胞进行细胞计数,并测

定吸光度。利用光学显微镜(Leica DM2500, 德国)和血球计数板进行细胞计数,利用紫外-可见分光光度计(UV-1800, 岛津, 日本)测定藻液的吸光度(波长730 nm),绘制吸光度和细胞数目的标准曲线及细胞生长曲线。

(iii) 光合色素提取与分析。色素提取和定量计算按照Thayer和Björkman^[27]及Enriquez等人^[28]的方法,并略作修改。将−80 $^{\circ}\text{C}$ 储存的细胞悬浮在甲醇:丙酮(1:1, v/v)中,吹打几次,冰浴30 min,3000 g离心5 min(4 $^{\circ}\text{C}$),收集上清。若沉淀仍有绿色,重复抽提2次,合并上清。上清液用0.22 μm 滤膜过滤,所有步骤在黑暗低温状态下进行。

利用装配有C₁₈反相柱(4.6 mm $\times$ 250 mm)的高压液相色谱系统(Agilent 1200, 美国)进行色素分析。流动相包括A(水)、B(甲醇)、C(乙腈)和D(乙酸乙酯)。程序为:0~15 min, I (15%A, 30%B, 55%C, 0%D)到II (0%A, 15%B, 85%C, 0%D)线性梯度;15~17 min, II到III (15%A, 15%B, 35%C, 35%D)线性梯度;17~40 min, III到IV (0%A, 30%B, 0%C, 70%D)线性梯度。柱温为50 $^{\circ}\text{C}$,流速0.75 mL min^{−1},443 nm检测色素。色素定量标准品岩藻黄素和叶绿素a购自美国Sigma-Aldrich公司。测定不同浓度色素标准品的峰面积,绘制峰面积与浓度的标准曲线。利用该标准曲线计算实验样品中色素浓度。

(iv) 叶绿素荧光测量。叶绿素荧光测量按照Lin等人^[29]的方法,并略做修改。不同处理的细胞收集后(4000 g, 20 $^{\circ}\text{C}$, 5 min),用Imaging PAM(Heinz Walz GmbH, 德国)进行测量。样品先在暗处适应15 min,然后使用Imaging PAM软件控制叶绿素荧光仪,自动测量光诱导曲线。每种实验处理3个平行。

(v) 数字化表达谱分析。总RNA用TRIzol试剂盒(Gibco BRL, 美国)提取,提取方法按照试剂盒说明书进行。不同实验处理总RNA的DGE文库的建立参照de Lorgeril等人^[30]的方法。总RNA纯化并片段化处理,合成cDNA的第一和第二条链。cDNA加上Solexa接头,进行PCR扩增和测序。应用主要试剂耗材为Hiseq Cluster Generation Kit(Illumina, 美国)和Hiseq 2000测序芯片(Illumina, 美国),主要仪器是Illumina Hiseq 2000(美国)和Illumina Fluidics Systems系统。

测序数据与JDI(<http://genome.jgi.doe.gov/Phatr2/Phatr2.download.ftp.html>)中的*Phaeodactylum tricornutum*的Annotation中的Filtered Models(“best”)中

Transcripts的信息比对. 对结果进行统计分析和标准化(RPKM(reads per kilobase of exon model per million mapped reads)算法^[31]). 利用IDE6软件进行差异基因检测, 并用Gene Ontology和KEGG(Kyoto encyclopedia of genes and genomes)进行注释.

(vi) 蛋白提取. -80°C 储存的藻倒入研钵中, 加 1%~15%(w/w) PVPP(polyvinyl-polypyrrolidone), 50%(w/w)石英砂, 加入液氮研磨, 磨成粉末. 加入提取液(5%(w/v) SDS(sodium dodecyl sulfate), 10%(v/v) 甘油, 5%(v/v) β -巯基乙醇, 1%(v/v) 蛋白酶抑制剂(complete protease inhibitor cocktail), 65 mmol L^{-1} Tris-HCl, pH 6.8)摇匀, 4°C 放置 1 h, 中间摇动几次. 8000 g 离心 30 min(4°C), 去掉细胞沉淀, 上清加入 4 倍体积 10%(w/v) 三氯乙酸(trichloroacetic acid, TCA) 的丙酮溶液, 过夜沉淀. 8000 g 离心 30 min(4°C), 去掉上清, 沉淀用 100% 丙酮洗涤 3 次, 用 80% 丙酮洗涤 1 次, 空气干燥沉淀(4°C), -80°C 储存备用.

(vii) LC-MS/MS 蛋白鉴定和蛋白相对定量. 提取的蛋白干粉按照 Zhang 等人^[32] 的方法进行溶解. 空气干燥的蛋白干粉加入 8 mol L^{-1} 尿素(125 mmol L^{-1} 碳酸氢铵, pH 8), 90°C 溶解 20 min, 然后迅速放置冰上. 参照 Bradford^[33] 的方法进行蛋白定量.

蛋白尿素溶液中加入二硫苏糖醇(dithiothreitol, DTT) (1 mol L^{-1} DTT, 溶解于 125 mmol L^{-1} 碳酸氢铵中), 终浓度为 10 mmol L^{-1} , 37°C 水浴 1 h 还原蛋白二硫键. 室温加入碘乙酰胺(0.5 mol L^{-1} 碘乙酰胺, 溶解于 125 mmol L^{-1} 碳酸氢铵中), 终浓度为 50 mmol L^{-1} , 暗处放置 30 min, 使蛋白烷基化. 将尿素稀释到 1 mol L^{-1} , 按照蛋白:胰酶比例为 1:30(w/w) 添加胰蛋白酶(Promega, 美国), 37°C 水浴 12 h 进行酶切反应. 加入甲酸终止反应(甲酸终浓度 1%), 12000 g, 离心 15 min(4°C), 每管 70 μL 分装上清, 留待质谱分析.

质谱校正后(6520b QTOF, Agilent, 美国), 将上述酶解处理的样品注入高压液相色谱系统中(Agilent 1200 HPLC system, 装载 2.1 mm $\times$ 150 mm 反相柱, Zorbax SB-C18, 美国), 进样量为 60 μL . 多肽洗脱流动相 A(0.1% 甲酸的超纯水)和 B(0.1% 甲酸的乙腈)参照 Blonder 等人^[34] 的方法. 梯度设置为: 0~5 min, 3%B; 5~120 min, 3%~50%B 线性梯度; 120~150 min, 95%B. 流速为 0.2 mL min^{-1} , 柱压不超过 2×10^7 bar. 多肽进入质谱后进行离子化, 电喷射电压为 3.5 kV, 干燥气温度为 350°C .

(viii) 质谱数据分析. 利用 MassHunter software(版本 B03.01, Agilent, 美国)获取数据, 所有的 MS-MS 图谱通过 Spectrum Mill MS Proteomics Workbench 软件(版本 A.03.03, Agilent, 美国)处理, 并且搜索蛋白库, 进行蛋白定量计算. 所用数据库为 NCBI diatom 数据库(2013 年 4 月 30 日更新), 按照蛋白得分大于 15 过滤. NCBI 序列号转化为 UniProt 序号, 并查询蛋白功能.

(ix) 脂质分析. 尼罗红 (9-(diethyl amino)benzo[a]phenoxazin-5(5H)-one, Nile red) 染色参照 Liu 等人^[35] 的方法. 细胞稀释到 1×10^6 细胞 mL^{-1} , 按照 985 μL 藻液加 15 μL Nile red 溶液(0.1 mg mL^{-1} 丙酮溶液)混合, 暗处反应 7 min, 用荧光分光光度计(HITACHI F-4500, 日本)在 480 nm 下激发, 发射光波长为 570 nm. 染色细胞在蓝光激发下, 用激光共聚焦显微镜观察并拍照.

氟硼荧(4,4-difluoro-1,3,5,7-tetramethyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene, BODIPY)染色参照 Cooper 等人^[36] 的方法. 细胞稀释到 1×10^6 细胞 mL^{-1} , 按照 990 μL 藻液加 10 μL BODIPY 溶液(0.5 mg mL^{-1} 二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)溶液)混合, 暗处反应 7 min, 用荧光分光光度计(HITACHI F-4500, 日本)在 488 nm 下激发, 发射光波长为 510 nm. 染色细胞在蓝光激发下, 用激光共聚焦显微镜观察并拍照.

2 结果

2.1 缺氮与正常条件下三角褐指藻生长速率、色素及光合参数比较

正常及缺氮条件下培养的三角褐指藻的生长曲线如图 1(a)所示. 接种浓度为 $146.5(10^4 \text{ 细胞 } \text{mL}^{-1})$. 培养 48 h 和 1 周后, 正常培养的细胞浓度为 $274.42(10^4 \text{ 细胞 } \text{mL}^{-1})$ 和 $871.62(10^4 \text{ 细胞 } \text{mL}^{-1})$, 而缺氮培养的细胞浓度为 $229.13(10^4 \text{ 细胞 } \text{mL}^{-1})$ 和 $410.37(10^4 \text{ 细胞 } \text{mL}^{-1})$. 表明三角褐指藻在缺氮条件下仍然生长, 但是生长速度减慢.

岩藻黄素和叶绿素 *a* 含量如图 1(b)所示. 正常培养条件下, 岩藻黄素和叶绿素 *a* 的含量分别为 11.88 ± 0.32 和 $29.69\pm 1.47(10^{-5} \text{ ng 细胞}^{-1})$. 缺氮 48 h 后, 2 种色素的含量分别下降到 7.14 ± 0.70 和 $16.47\pm 1.56(10^{-5} \text{ ng 细胞}^{-1})$; 缺氮 1 周后, 下降到 5.43 ± 0.15 和 $12.49\pm 0.26(10^{-5} \text{ ng 细胞}^{-1})$. 叶绿素作为含氮的大分子, 氮

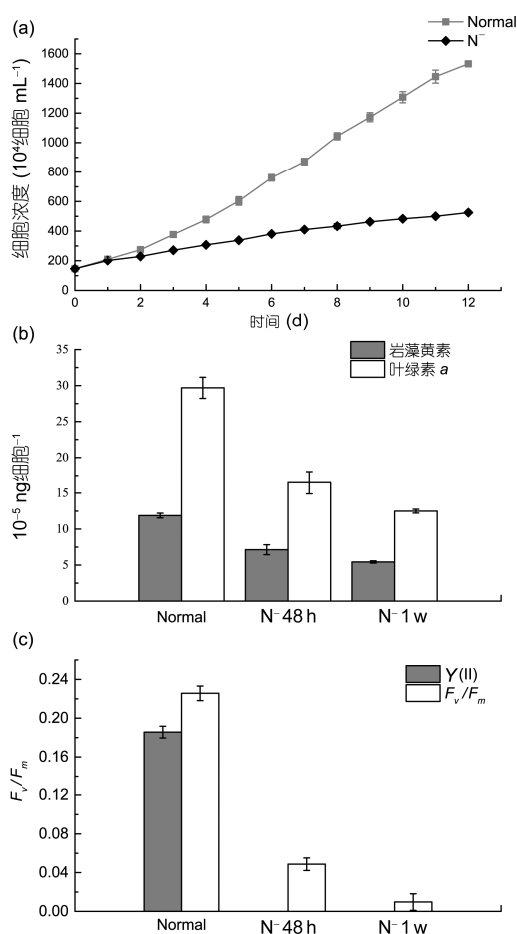


图 1 不同培养条件下三角褐指藻的生长、色素及光合参数. (a) 细胞浓度; (b) 岩藻黄素和叶绿素 *a* 含量; (c) 光合参数. Normal: 正常培养; N⁻: 缺氮培养; N⁻ 48 h: 缺氮培养 48 h; N⁻ 1 w: 缺氮培养 1 周; F_v/F_m : PS II 潜在最大光量子产量; $Y(II)$: PS II 实际光量子产量

Figure 1 Cell density, pigment contents, and photosynthesis data of *P. tricornutum* under different culture conditions. (a) Cell density; (b) fucoxanthin and chlorophyll *a* contents; (c) photosynthesis data. Normal: normal cultured *P. tricornutum*; N⁻: nitrogen-starved cultured *P. tricornutum*; N⁻ 48 h: 48 h nitrogen-starved cultured *P. tricornutum*; N⁻ 1 w: one week nitrogen-starved cultured *P. tricornutum*; F_v/F_m : maximum quantum yield of PSII; $Y(II)$: effective PSII quantum yield

缺乏影响其合成, 并且影响随时间变化.

光系统 II (PS II) 实际量子产量($Y(II)$)和潜在最大量子产量(F_v/F_m)如图1(c)所示. 正常培养的三角褐指藻 F_v/F_m 值为 0.226 ± 0.008 , 48 h及1周缺氮处理该值下降到 0.049 ± 0.006 和 0.010 ± 0.009 . 正常培养的三角褐指藻 $Y(II)$ 值为 0.186 ± 0.006 , 缺氮培养时下降为0. 这2个参数的下降表明, 氮元素对于光合效率有较大影响. 如前文所述, 缺氮导致光合色素和生长速率的下降, 与光合效率的下降是一致的.

2.2 缺氮条件下三角褐指藻转录水平变化

所有的测序读段(reads)已上传至NCBI sequence read archive(SRA)(accession number SRP035546). 正常培养、缺氮48 h和1周的三角褐指藻样品中比对上的reads数分别为8448103, 9802782和11131845. 变化量在2倍以上认为是具有生物学意义的显著性差别. 正常培养与缺氮48 h的样品有1641个差异表达基因, 与缺氮1周的样品有3074个差异表达基因. 大量的编码中心碳代谢相关酶的mRNA, 如磷酸戊糖途径和光合固碳途径中的酶, 在缺氮细胞中上调. 碳代谢的主要途径如图2所示. KEGG分析结果表明, 淀粉和蔗

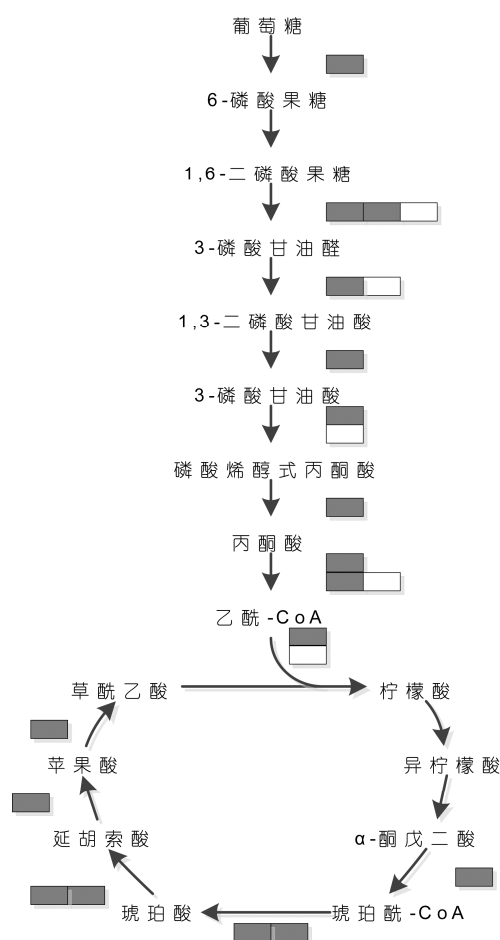


图 2 不同培养条件下三角褐指藻转录水平变化. 每个方块代表一个同工型, 不同行代表此步骤有不同的酶. 灰色方格代表缺氮培养条件下转录水平上调, 白色方格代表下调

Figure 2 A comparison of changes in transcript levels of normal cultured and nitrogen-starved *P. tricornutum*. Each box represents an isoform, and multiple rows show that there is more than one enzyme detected responsible for the step. Gray boxes show that transcript increased in nitrogen-starved *P. tricornutum*, white boxes show a decreased transcript level

中脂肪酸延长相关的酶的mRNA增加. 嘌呤和嘧啶代谢分析表明, 同化相关的mRNA增加. 似乎细胞在糖在缺氮条件下分解加速, 而几个编码线粒体缺氮条件下消耗碳储存为蛋白和DNA合成做准备.

光合作用相关蛋白的转录水平, 如光合天线蛋白(如Lhca1)和PS II 蛋白(如Psb M)最初下降后又上升. 细胞色素*b6/f*复合体的一个组分(Pet C)和色素合成在缺氮细胞中上升. 光合作用相关蛋白的DGE结果与色素分析和叶绿素荧光测定结果不一致, 因此需要在蛋白水平进一步确定.

2.3 缺氮条件下三角褐指藻蛋白种类及含量变化

LC-MS/MS分析鉴定出10分以上的阳性蛋白999个, 15分以上的374个. 其中, 在缺氮细胞中有80个上调, 109个下调. 在UniProt (<http://www.uniprot.org/>)网站搜索蛋白功能, 并分成了几个大类(图3). 由图3可以看出, 有大约1/3的差异表达蛋白为推测蛋白(predicted proteins), 在数据库中没有注释. 其他蛋白被分为碳代谢、光合作用、脂质代谢等相关蛋白. 图4显示了中心碳代谢相关的蛋白含量变化.

(i) 中心碳代谢. 鉴定出的差异表达蛋白中, 糖酵解相关的蛋白上调, 包括胞浆 II 类醛缩酶(cytosolic class II aldolase, UniProt编号B7G4R3), 胞浆3-磷酸甘油醛脱氢酶(cytosolic glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, Q9M7R3)和磷酸甘油酸激酶(phosphoglycerate kinase, B7G6H0). 这些酶在缺氮细胞中上调了1.88~3.51倍(表1).

TCA循环相关的蛋白在缺氮条件下也表现了上升趋势. 其中柠檬酸合酶(citrate synthase, B7G9P5)上升了1.96倍, 乌头酸水合酶(aconitate hydratase,

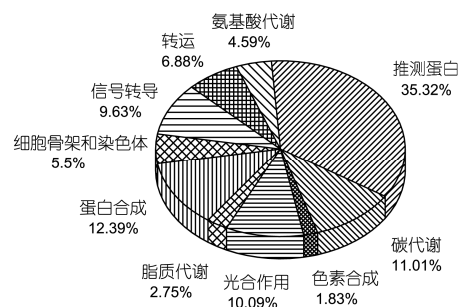


图3 差异表达蛋白的功能分类

Figure 3 Functional categories of differentially expressed proteins

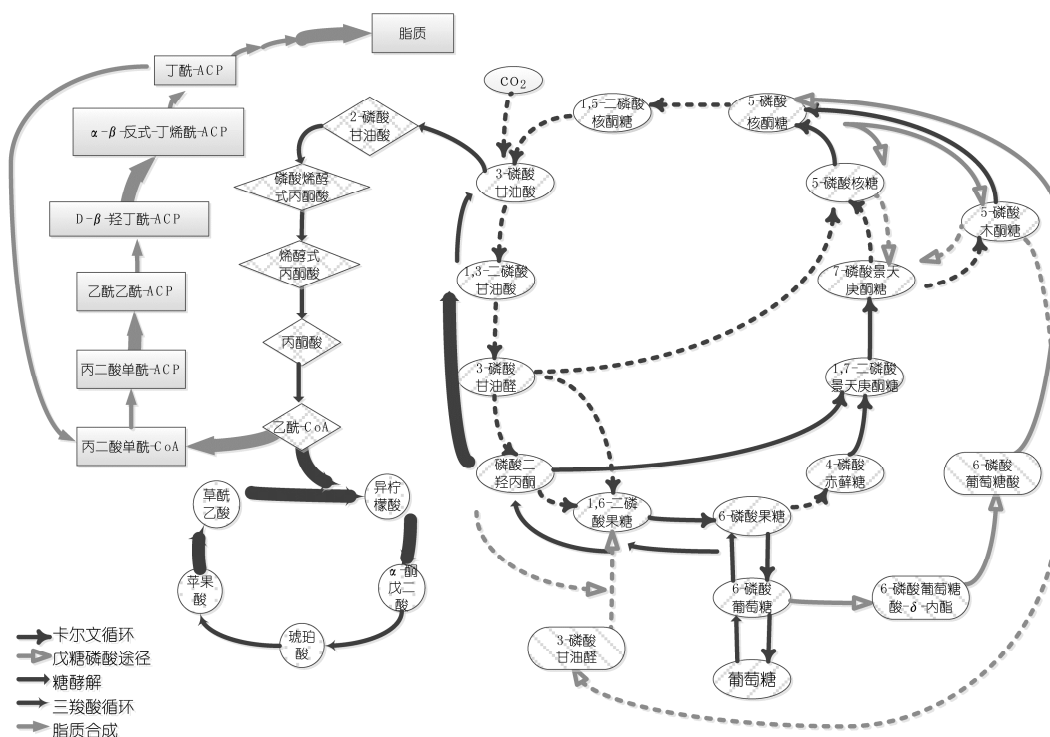


图4 中心碳代谢途径变化. 缺氮时上调蛋白用粗线箭头表示, 下调蛋白用虚线箭头表示

Figure 4 Representation of the changes in the abundance of proteins associated with central carbon metabolism in *P. tricornutum* brought on under the condition of nitrogen starvation. Increases are shown by thick arrows and decreases by dashed arrows

表 1 缺氮培养/正常培养条件下碳代谢相关差异表达蛋白^{a)}

Table 1 Differential expression proteins involved in carbon metabolism in *P. tricornutum* under the condition of nitrogen starvation compared with normal culture condition^{a)}

UniProt	蛋白	差异倍数
B7G4R3	胞浆 II 类醛缩酶(cytosolic class II aldolase)	1.88±0.00
Q9M7R3	胞浆 3-磷酸甘油醛脱氢酶(Cytosolic glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase)	1.92±0.06
B7G6H0	磷酸甘油酸激酶(phosphoglycerate kinase)	3.51±2.81
B5Y5C8	短链乙醇脱氢酶(short-chain alcohol dehydrogenase)	2.12±0.20
B7S4B2	乙醇脱氢酶(alcohol dehydrogenase)	6.27±0.39
B7G9P5	柠檬酸合酶(citrate synthase)	1.96±0.00
B7FUR4	乌头酸水合酶(aconitate hydratase)	5.90±0.29
B7GEG9	L-苹果酸脱氢酶(L-malate dehydrogenase)	3.52±1.48
B7GE51	UDP-葡萄糖-焦磷酸化酶(UDP-glucose-pyrophosphorylase)	NDZ
K0QZN0	假定蛋白(hypothetical protein)	1.66±0.60
Q945G8	碳酸酐酶(carbonic anhydrase)	1.30±0.18
B7FNU0	碳酸酐酶(carbonic anhydrase)	2.80±0.00
Q9TK52	核酮糖二磷酸羧化酶大亚基(ribulose biphosphate carboxylase large chain)	1.95±0.04
H1A8C7	核酮糖二磷酸羧化酶大亚基(ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit, partial (chloroplast))	1.43±0.12
F5GW69	核酮糖二磷酸羧化酶大亚基(ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit, partial (chloroplast))	1.92±1.25
F5GW20	核酮糖二磷酸羧化酶大亚基(ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (chloroplast))	3.17±0.93
A0T0E2	核酮糖二磷酸羧化酶大亚基(ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase small subunit)	2.34±0.25
Q9M7P7	磷酸甘油酸激酶(phosphoglycerate kinase)	2.06±0.57
Q84XB5	果糖 1,6-二磷酸醛缩酶前体(fructose-1,6-bisphosphate aldolase precursor)	1.91±0.17
Q84X64	果糖 1,6-二磷酸醛缩酶前体(fructose-1,6-bisphosphate aldolase precursor)	NDN
B7G5Q1	3-磷酸甘油醛脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase precursor)	2.03±0.17
Q9LE93	磷酸丙糖异构酶(triosephosphate isomerase)	2.42±0.21
B7FUU0	转酮酶(transketolase)	4.03±0.52
B5Y5F0	磷酸核酮糖激酶(phosphoribulokinase)	2.82±0.45

a) 部分 LC-MS/MS 结果. UniProt: <http://www.ebi.uniprot.org/index.shtml> 中的蛋白编号; NDZ: 正常培养的 *P. tricornutum* 中未检测到; NDN: 缺氮培养 1 周的 *P. tricornutum* 中未检测到

B7FUR4)上升5.90倍, L-苹果酸脱氢酶(L-malate dehydrogenase, B7GEG9)上升3.52倍. 另外, 2个与无氧呼吸相关的蛋白在缺氮条件下也上调. 缺氮条件下卡尔文循环(Calvin cycle)相关的大部分蛋白下调, 因此细胞固碳能力下降.

(ii) 光合作用和色素生物合成. 捕光蛋白如岩藻黄素-叶绿素 *a/c* 蛋白(protein fucoxanthin chlorophyll *a/c* protein, 如B7G503, B7FQE1等), PS II 蛋白如PS II 叶绿素 *a* 中心天线脱辅基蛋白(photosystem II chlorophyll A core antenna apoprotein, A0T0B2)和PS II CP43 叶绿素脱辅基蛋白(photosystem II CP43 chlorophyll apoprotein, P49472), 以及PS I 蛋白PS I 反应中心亚基 IV (photosystem I reaction center subunit IV, A0T0F3)在缺氮时下调(表2). 电子传递

相关的铁氧还蛋白-NADP还原酶(ferredoxin-NADP reductase, B7GCT8)和质体醌-质体蓝素氧化还原酶(plastoquinol-plastocyanin reductase, B5Y3C9)在缺氮时也下调(表2). 光合作用相关的蛋白中, 介导电子在PS II 和PS I 之间传递的细胞色素 *b6/f* 复合体(cytochrome *b6/f* complex)的1个组分, 在缺氮条件下有轻微上调.

谷氨酸-1-半醛 2,1-氨基变位酶(glutamate-1-semialdehyde 2,1-aminomutase, B7G134), 光合色素叶绿素生物合成的一个关键酶(表S1), 在缺氮条件下显著下调. 镁离子螯合酶(magnesium-chelatase, A0T0B5)也表现相同趋势, 表明氮元素显著影响了色素的合成.

(iii) 脂质代谢. 脂质生物合成相关的几个关键

表 2 缺氮培养/正常培养条件下光合作用及脂质代谢相关差异表达蛋白^{a)}

Table 2 Differential expression proteins involved in photosynthesis and lipid metabolism in *P. tricornutum* under the condition of nitrogen starvation compared with normal culture condition^{a)}

UniProt	蛋白	差异倍数
光合作用		
B7G503	岩藻黄素叶绿素 <i>alc</i> 蛋白(protein fucoxanthin chlorophyll <i>alc</i> protein)	2.31±0.33
B7FQE1	岩藻黄素叶绿素 <i>alc</i> 蛋白(protein fucoxanthin chlorophyll <i>alc</i> protein)	2.06±0.08
B7FSP4	岩藻黄素叶绿素 <i>alc</i> 蛋白(protein fucoxanthin chlorophyll <i>alc</i> protein)	1.91±0.32
B7GAS4	岩藻黄素叶绿素 <i>alc</i> 蛋白(protein fucoxanthin chlorophyll <i>alc</i> protein)	1.80±0.43
B7GBK7	岩藻黄素叶绿素 <i>alc</i> 蛋白(protein fucoxanthin chlorophyll <i>alc</i> protein)	1.85±0.00
B7G8E5	岩藻黄素叶绿素 <i>alc</i> 蛋白(fucoxanthin chlorophyll <i>alc</i> protein, deviant)	3.43±1.26
A0T0B2	光系统 II 叶绿素 <i>a</i> 中心天线脱辅基蛋白(photosystem II chlorophyll A core antenna apoprotein)	2.95±0.89
P49472	光系统 II CP43 叶绿素脱辅基蛋白(photosystem II CP43 chlorophyll apoprotein)	2.51±0.09
Q84XB9	放氧增强蛋白 1 前体(oxygen-evolving enhancer protein 1 precursor, partial)	3.82±0.10
B7FZ94	放氧增强蛋白 3(oxygen-evolving enhancer protein 3)	NDN
A0T0C6	细胞色素 <i>c</i> -550(cytochrome <i>c</i> -550)	NDN
H2EV21	光系统 II 蛋白 D2(photosystem II protein D2 (chloroplast))	2.75±0.89
A0T0G9	光系统 II 反应中心蛋白 D1(photosystem II reaction center protein D1)	2.38±0.08
A0T0M1	光系统 I 蛋白 F(photosystem I protein F)	2.09±0.48
A0T0B8	细胞色素 <i>b</i> 6(Cytochrome <i>b</i> 6)	1.30±0.16
B7G6S9	推测蛋白(predicted protein)	1.15±0.15
Q41075	ATP 合酶 γ 链(ATP synthase gamma chain, chloroplastic)	3.8±0.90
A0T0F3	光系统 I 反应中心亚基IV(photosystem I reaction center subunit IV)	2.06±0.31
B7GCT8	铁氧还蛋白-NADP 还原酶(ferredoxin-NADP reductase)	1.75±0.01
B5Y3C9	质体醌-质体蓝素氧化还原酶(plastoquinol-plastocyanin reductase)	2.38±0.00
B7G386	过氧化物酶(peroxidase activity)	1.68±0.00
Q6Y682	38 kD 核糖体-相关蛋白(38 kD ribosome-associated protein)	4.09±0.00
脂质代谢		
B7G7S4	乙酰辅酶 A 羧化酶(acetyl-CoA carboxylase)	1.71±0.04
B7GEB5	生物素羧化酶(biotin carboxylase)	3.00±1.06
B7GCM0	3-氧酰基-[酰基载体蛋白]还原酶(3-oxoacyl-[acyl-carrier-protein] synthase)	4.70±2.97
B7GDA8	3R-羟酰基-[酰基载体蛋白]脱水酶(3R-hydroxyacyl-[acyl carrier protein] dehydrase)	NDZ
B7FYK0	长链乙酰辅酶 A 合酶(long chain acyl-CoA synthetase)	NDZ
K0RDM0	假定蛋白(THAOC_34158Hypothetical protein THAOC_34158)	NDN

a) 部分 LC-MS/MS 结果). UniProt: <http://www.ebi.uniprot.org/index.shtml> 中的蛋白编号; NDZ: 正常培养的 *P. tricornutum* 中未检测到; NDN: 缺氮培养 1 周的 *P. tricornutum* 中未检测到

蛋白如乙酰辅酶 A 羧化酶(acetyl-CoA carboxylase, B7G7S4), 3- 氧酰基-[酰基载体蛋白]还原酶(3-oxoacyl-[acyl-carrier-protein] synthase, B7GCM0)和 3R-羟酰基-[酰基载体蛋白]脱水酶(3R-hydroxyacyl-[acyl carrier protein] dehydrase, B7GDA8)在缺氮时上调. 在脂质代谢中具有水解酶活性的一个假定蛋白(hypothetical protein, K0RDM0)下调(表2). 脂质合成相关酶的上调及水解酶的下调可能会引起缺氮细胞中脂质积累上升.

(iv) 蛋白质代谢和染色体整合. 解旋酶(helicase, K0R8Y4和B7FR43)和多聚核苷酸腺苷酰基转移酶(polynucleotide adenylyltransferase, K0TEB9)

在缺氮时上调(表S1). 这2个酶促进mRNA的成熟, 这与DGE的结果一致. 核糖体组分(如B7G715, B7FTI0等)和翻译延长因子(translation elongation factor, 如A0T0K6, B8LEI9等)下调, 表明增加的mRNA没有被翻译. 异构酶(isomerase, 如B7FX39, B7FQT3等)增加, 分子伴侣蛋白(chaperones, B7G4P7和B7FQ72)双向调节, 并且1个与蛋白复合体组装相关的蛋白下降, 可能导致除一些必需酶之外的其他蛋白含量下降. 泛素延伸蛋白(ubiquitin extension protein, B7FY02)的增加表明蛋白降解加剧. 在缺氮条件下, 蛋白的降解有利于氨基酸的重新利用. 细胞分解非必需蛋白以合成必需蛋白, 为度过逆境做

准备.

蛋白质组学结果也表明细胞骨架组分(cytoskeleton components, 如A5JP15, B5Y3W7等)和染色体组分(chromosome components, 如B7FWR8, B7G2A5等)在缺氮条件下上调(表S2). 染色质浓缩成染色体, 为在合适条件下进行细胞分裂做准备.

(V) 信号转导和转运蛋白. 许多参与信号转导或转运的蛋白含量也发生了变化. 2个具有hedgehog受体活性的蛋白(B5Y414和B7FYV4)在缺氮时上调(表S3). 铵跨膜转运蛋白(ammonium transmembrane transporter, B7G0Y4)在缺氮条件下增加了11.48倍(表S4). 1个铁饥饿诱导蛋白(iron starvation-induced protein, B7FYL2)在缺氮条件下没有检测到. 1个尿素循环相关酶, 精氨酸琥珀酸合成酶(argininosuccinate synthase, B5Y3V3)在缺氮的细胞中也没有检测到(表S4). 总之, 信号转导或关键代谢过程中的不少蛋白均发生了显著变化, 表明氮元素在细胞中起着至关重要的作用.

2.4 缺氮条件下三角褐指藻中性脂含量变化

图5所示为Nile red和BODIPY染色的三角褐指藻的相对荧光值. Nile red染色的正常培养的三角褐指藻的相对荧光值为 14.33 ± 3.17 (a.u.), 缺氮培养48 h和1周后分别上升到 26.21 ± 0.82 和 72.67 ± 1.72 (a.u.). 表明细胞在缺氮条件下脂质积累. 图6(a)~(c)所示为Nile red染色的三角褐指藻细胞. Nile red染色的脂滴(lipid body)在蓝光激发下发出特征性的黄色荧光. 缺氮培养1周的三角褐指藻的脂滴明显比正常培养和缺氮48 h的大, 这与相对荧光值是一致的.

BODIPY 505/515染色的三角褐指藻的相对荧光

值与Nile red染色的细胞表现相同的趋势. 图6(d)~(f)所示为BODIPY染色的三角褐指藻细胞. BODIPY 染色的脂滴在蓝光激发下发出特征性的绿色荧光. 缺氮条件下脂滴的变化与Nile red染色细胞一致. 两种染色方法显示在缺氮条件下脂质积累增加, 这与蛋白质组学的结果是一致的.

3 讨论

3.1 缺氮条件下三角褐指藻光合作用效率显著下降

蛋白质组结果表明, 叶绿素生物合成的一个关键酶谷氨酸-1-半醛2,1-氨基变位酶(glutamate-1-semialdehyde 2,1-aminomutase, B7G134)在缺氮条件下明显下调, 导致该色素含量的下降, 色素含量测定结果支持这一结论(图1(b)). 光合作用相关蛋白, 包括PS II和PS I蛋白, 在细胞缺氮时下降. 叶绿素荧光测定结果表明, 三角褐指藻的光反应活性在缺氮条件下明显降低(图1(c)). 由于光反应与碳固定紧密相连, 光反应活性的降低不能为无机碳的还原提供充足的能量和还原力(如ATP和NADPH等)^[37], 由此导致细胞内卡尔文循环的下降. 从表1可以看出, 三角褐指藻在缺氮时涉及卡尔文循环的几个蛋白显著下调, 这与缺氮时光反应活性的降低是一致的(图1(c)). Yang等人^[23]发现, 缺氮时三角褐指藻核酮糖磷酸3-差向异构酶(plastidic ribulose-phosphate 3-epimerase)上调, 由此推出碳固定在此条件下被促进. 然而, 本文没有发现这一蛋白的变化, 可能是本文的实验条件不同于Yang等人, 因为Yang等人^[23]

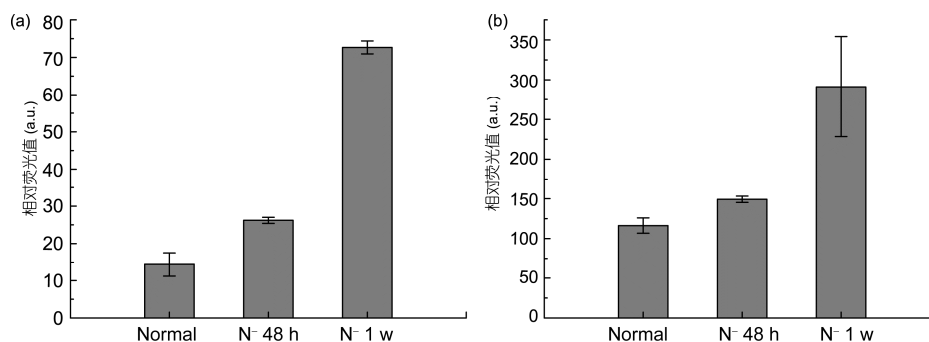


图5 Nile red/BODIPY 染色的三角褐指藻的相对荧光值. (a) Nile red 染色的三角褐指藻的相对荧光值; (b) BODIPY 染色的三角褐指藻的相对荧光值. Normal: 正常培养; N⁻ 48: 缺氮培养 48 h; N⁻ 1 week: 缺氮培养 1 周

Figure 5 Relative fluorescence intensity of Nile red/ BODIPY stained *P. tricornutum*. (a) Relative fluorescence intensity of Nile red stained *P. tricornutum*; (b) relative fluorescence intensity of BODIPY stained *P. tricornutum*. Normal: normal cultured *P. tricornutum*; N⁻ 48 h: 48 h nitrogen-starved cultured *P. tricornutum*; N⁻ 1 w: one week nitrogen-starved cultured *P. tricornutum*

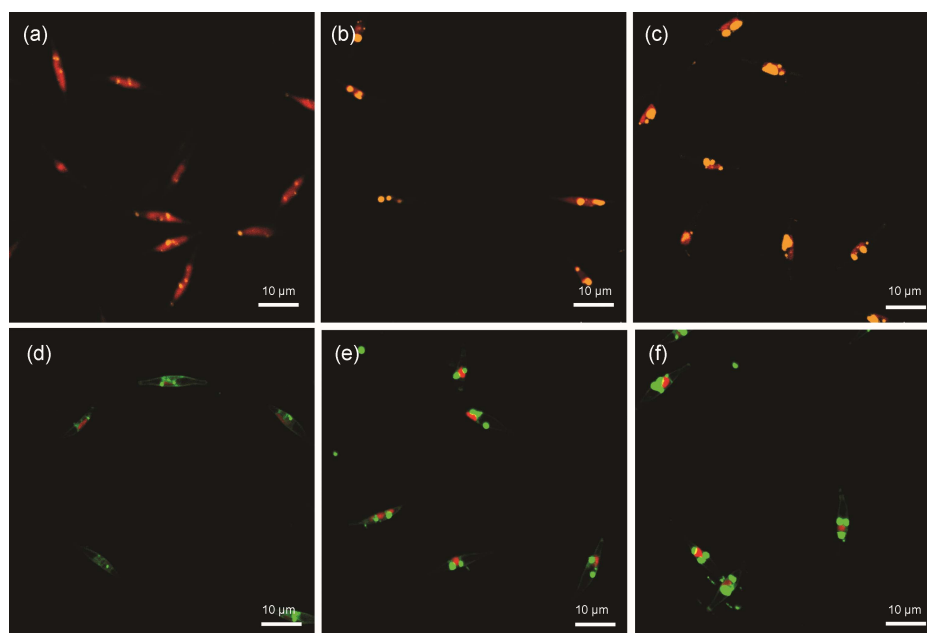


图6 Nile red/BODIPY 染色的三角褐指藻. (a) Nile red 染色的正常培养的三角褐指藻; (b) Nile red 染色的缺氮培养 48 h 的三角褐指藻; (c) Nile red 染色的缺氮培养 1 周的三角褐指藻; (d) BODIPY 染色的正常培养的三角褐指藻; (e) BODIPY 染色的缺氮培养 48 h 的三角褐指藻; (f) BODIPY 染色的缺氮培养 1 周的三角褐指藻

Figure 6 *P. tricornutum* cells stained by Nile red/BODIPY. (a) Normal cultured *P. tricornutum* stained by Nile red; (b) 48 h nitrogen-starved cultured *P. tricornutum* stained by Nile red; (c) one week nitrogen-starved cultured *P. tricornutum* stained by Nile red; (d) normal cultured *P. tricornutum* stained by BODIPY; (e) 48 h nitrogen-starved cultured *P. tricornutum* stained by BODIPY; (f) One week nitrogen-starved cultured *P. tricornutum* stained by BODIPY

是以缺硅为参比研究缺氮和缺硅的条件下蛋白质组的变化。

根据光合作用和叶绿素生物合成的DGE分析, 转录水平与蛋白质组的结果并不完全一致. 本文认为, 细胞内蛋白质是执行代谢功能的生物活性组分, 蛋白含量的变化直接反映细胞对于特定环境的适应. 许多生物在逆境条件下积累RNA, 但是没有翻译成蛋白, 因为蛋白合成是一个相对耗能的过程. Plumley 和 Schmidt^[38]曾报道氮限制条件下莱茵衣藻 (*Chlamydomonas reinhardtii*) 出现捕光蛋白复合体缺陷, 光合蛋白合成下降, 但是叶绿体中mRNA含量增加. 逆境胁迫条件下一些基因诱导表达, 例如, 甜菜碱醛脱氢酶(betaine aldehyde dehydrogenase, BADH) 基因的表达受盐胁迫诱导, 高盐浓度下菠菜 (*Spinacia oleracea* L.) 叶片中BADH的mRNA含量增加3~4倍^[39]; Huan等人^[40]发现, 浒苔(*Ulva prolifera*) 在高盐胁迫下RNA含量显著增加. Zhou等人^[41]观察到条斑紫菜(*Pyropia yezoensis*) 在干旱脱水时蛋白含量明显降低. Hockin 等人^[16]对假微型海链藻 (*Thalassiosira pseudonana*) 蛋白质组的研究中发现, 5

个参与叶绿素及其前体合成的蛋白在氮饥饿时下降1.5~2.5倍, PS II 的光合效率也下降. 在本文中, 光合作用和叶绿素生物合成相关的蛋白在缺氮条件下显著下降, 进一步证明光合作用下调是光合生物应对缺氮逆境的普遍反应^[16].

3.2 缺氮条件下三角褐指藻脂质合成增加

蛋白质组结果表明, 脂质合成的关键蛋白如乙酰辅酶A羧化酶(acetyl-CoA carboxylase, B7G7S4)、3-氧酰基-[酰基载体蛋白]还原酶(3-oxoacyl-[acyl-carrier-protein] synthase, B7GCM0)和3R-羟酰基-[酰基载体蛋白]脱水酶(3R-hydroxyacyl-[acyl carrier protein] dehydrase, B7GDA8)在缺氮时上调(表2). 因此认为脂质合成在缺氮时上调. 如前所述, 糖酵解和TCA循环相关的蛋白含量上调了1.88~5.90倍(表1), 由此糖酵解和TCA循环活性升高. 糖酵解和TCA循环的强化为脂肪酸生物合成提供大量的中间产物如乙酰辅酶A和能量物质(如ATP等). Nile red和BODIPY染色结果表明, 缺氮的三角褐指藻细胞中脂滴增大(图6).

在缺氮条件下高等植物和绿藻中多余的碳通常

储存在低氮或无氮的分子中,如高等植物中通常以淀粉的形式存储^[42,43]。Peng等人^[44]提出拟南芥(*Arabidopsis*)在缺氮条件下提高2个参与淀粉生物合成基因的转录水平,Wang等人^[45]报道在莱茵衣藻中多余的碳进入脂肪酸的生物合成,Miller等人^[46]指出莱茵衣藻在缺氮条件下脂质合成相关基因的表达上调,硅藻以脂质或金藻昆布糖的形式储存多余的碳^[6,47]。Palmucci等人^[48]发现,硅藻和其他微藻在缺氮条件下脂质和脂肪酸产物增加,认为脂肪酸比碳水化合物需要更多的能量和还原力,这两种碳储存形式的变化增加了细胞内能量和还原力的积累。Hockin等人^[16]发现,假微型海链藻在低氮条件下糖酵解和TCA循环相关蛋白上调,却没有发现脂质合成相关酶的变化,由此推测假微型海链藻在氮限制条件下消耗碳储存,或者细胞在缺氮后期开始储存脂肪酸。本文的研究结果显示,细胞有增加脂肪酸合成的趋势,脂质分析结果发现,缺氮条件下脂质开始积累,并且随着培养时间增加。

3.3 缺氮条件下三角褐指藻其他的生物过程也发生变化

蛋白质组学和DGE分析表明,除了参与中心碳代谢(TCA循环)的基因,许多基因的转录上调,但是翻译下调,如转酮酶(transketolase)。除了一些必需酶之外,蛋白降解增加。因此本文认为,缺氮条件下蛋白质的降解有利于氨基酸的重新利用,非必需蛋白的降解为必需蛋白的合成提供氮源。如前所述,蛋白合成是一个耗能过程,细胞在逆境下合成RNA,为生物体的复苏做准备。在缺氮条件下RNA的生物合成和加工过程加强,表现为多聚核苷酸腺苷酰基转移酶(polynucleotide adenylyltransferase, K0TEB9)上调,但是蛋白合成下降,因为翻译延长因子(translation elongation factor, A0T0K6)下调(表S1)。

但是,Yang等人^[23]发现1个多腺苷酸结合蛋白(putative polyadenylate binding protein)下调,而1个延长因子(putative elongation factor)上调,可能原因是缺硅。与三角褐指藻相似,假微型海链藻在低氮条件下细胞蛋白含量下降2.2倍,2个核糖体蛋白和1个转录因子下降1.8~3.1倍,可能说明蛋白合成下降是硅藻应对氮营养胁迫的普遍反应^[16]。

细胞骨架组分和染色体组分上调,染色质趋向于浓缩成染色体,基因活性降低,这可能防止染色体在逆境下遭到破坏,并为复苏时进行有丝分裂做准备。2个具有hedgehog受体活性的蛋白在缺氮时上调。Hedgehog基因首次在果蝇(*Drosophila*)中发现,并且具有调节细胞分化的功能^[49]。尽管三角褐指藻是单细胞生物,Li等人^[50]观察到它也具有有性生殖。上调的hedgehog受体为硅藻中存在有性生殖提供依据。Hockin等人^[16]发现,假微型海链藻中参与硝酸盐还原为亚硝酸盐进而还原为铵的酶——硝酸盐还原酶(nitrate reductase, NR)、亚硝酸盐还原酶(NADPH-NiR和Fd-NiR)在低氮时下调了2.5~9.5倍。本文的研究结果中没有发现这几个酶的变化,但是1个铵跨膜转运蛋白(ammonium transmembrane transporter, B7G0Y4)在缺氮时上调了11.48倍,细胞中加强的铵转运和重新利用帮助其度过缺氮环境。

4 结论

本文对三角褐指藻不同层面的研究结果表明,在缺氮条件下,光反应和卡尔文循环活性下调,其他生物过程如糖酵解、TCA循环和脂质合成上调。与高等植物中储存淀粉不同,硅藻细胞在氮胁迫环境下储存脂肪酸,这种碳储存形式可能增加了细胞内能量和还原力的积累。作为潜在的生物能源原材料,研究氮胁迫导致三角褐指藻脂质积累的机制对优化产油微藻培养条件具有重要意义。

参考文献

- 1 Falkowski P G, Barber R T, Smetacek V. Biogeochemical controls and feedbacks on ocean primary production. *Science*, 1998, 281: 200–206
- 2 Field C B, Behrenfeld M J, Randerson J T, et al. Primary production of the biosphere: Integrating terrestrial and oceanic components. *Science*, 1998, 281: 237–240
- 3 Kroth P. Molecular biology and the biotechnological potential of diatoms. *Adv Exp Med Biol*, 2007, 616: 23–33

- 4 Allen A E, Vardi A, Bowler C. An ecological and evolutionary context for integrated nitrogen metabolism and related signaling pathways in marine diatoms. *Curr Opin Plant Biol*, 2006, 9: 264–273
- 5 Norton T A, Melkonian M, Andersen R A. Algal biodiversity. *Phycologia*, 1996, 35: 308–326
- 6 Armbrust E V, Berges J A, Bowler C, et al. The genome of the diatom *Thalassiosira pseudonana*: Ecology, evolution, and metabolism. *Science*, 2004, 306: 79–86
- 7 Bowler C, Allen A E, Badger J H, et al. The *Phaeodactylum* genome reveals the evolutionary history of diatom genomes. *Nature*, 2008, 456: 239–244
- 8 Gao Y, Smith G J, Alberte R S. Nitrate reductase from the marine diatom *Skeletonema costatum* (biochemical and immunological characterization). *Plant Physiol*, 1993, 103: 1437–1445
- 9 Berges J A, Harrison P. Nitrate reductase activity quantitatively predicts the rate of nitrate incorporation under steady state light limitation: A revised assay and characterization of the enzyme in three species of marine phytoplankton. *Limnol Oceanogr*, 1995, 40: 82–93
- 10 Allen A E, Ward B B, Song B. Characterization of diatom (Bacillariophyceae) nitrate reductase genes and their detection in marine phytoplankton communities. *J Phycol*, 2005, 41: 95–104
- 11 Milligan A J, Harrison P J. Effects of non-steady-state iron limitation on nitrogen assimilatory enzymes in the marine diatom *Thalassiosira weissflogii* (Bacillariophyceae). *J Phycol*, 2000, 36: 78–86
- 12 Bowler C, Vardi A, Allen A E. Oceanographic and biogeochemical insights from diatom genomes. *Annu Rev Mar Sci*, 2010, 2: 333–365
- 13 Dortch Q, Ahmed S, Packard T. Nitrate reductase and glutamate dehydrogenase activities in *Skeletonema costatum* as measures of nitrogen assimilation rates. *J Plankton Res*, 1979, 1: 169–186
- 14 Clayton J, Ahmed S. Detection of glutamate synthase (GOGAT) activity in phytoplankton: Evaluation of cofactors and assay optimization. *Mar Ecol Prog Ser*, 1986, 32: 115–122
- 15 Zehr J P, Falkowski P G. Pathway of ammonium assimilation in a marine diatom determined with the radiotracer ^{15}N . *J Phycol*, 1988, 24: 588–591
- 16 Hockin N L, Mock T, Mulholland F, et al. The response of diatom central carbon metabolism to nitrogen starvation is different from that of green algae and higher plants. *Plant Physiol*, 2012, 158: 299–312
- 17 Fajardo A R, Cerdan L E, Medina A R, et al. Lipid extraction from the microalga *Phaeodactylum tricornutum*. *Eur J Lipid Sci Tech*, 2007, 109: 120–126
- 18 Montsant A, Jabbari K, Maheswari U, et al. Comparative genomics of the pennate diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Plant Physiol*, 2005, 137: 500–513
- 19 Oudot-Le Secq M P, Grimwood J, Shapiro H, et al. Chloroplast genomes of the diatoms *Phaeodactylum tricornutum* and *Thalassiosira pseudonana*: Comparison with other plastid genomes of the red lineage. *Mol Genet Genomics*, 2007, 277: 427–439
- 20 Allen A E, LaRoche J, Maheswari U, et al. Whole-cell response of the pennate diatom *Phaeodactylum tricornutum* to iron starvation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105: 10438–10443
- 21 Osborne B, Geider R. Effect of nitrate-nitrogen limitation on photosynthesis of the diatom *Phaeodactylum tricornutum* Bohlin (Bacillariophyceae). *Plant Cell Environ*, 1986, 9: 617–625
- 22 Alonso D L, Belarbi E H, Fernández-Sevilla J M, et al. Acyl lipid composition variation related to culture age and nitrogen concentration in continuous culture of the microalga *Phaeodactylum tricornutum*. *Phytochemistry*, 2000, 54: 461–471
- 23 Yang Z K, Ma Y H, Zheng J W, et al. Proteomics to reveal metabolic network shifts towards lipid accumulation following nitrogen deprivation in the diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *J Appl Phycol*, 2013, 26: 73–82
- 24 Yang Z K, Niu Y F, Ma Y H, et al. Molecular and cellular mechanisms of neutral lipid accumulation in diatom following nitrogen deprivation. *Biotechnol Biofuels*, 2013, 6: 67
- 25 Smith W L, Chanley M H. *Culture of Marine Invertebrate Animals*. New York: Plenum Press, 1975. 29–60
- 26 Harrison P J, Waters R E, Taylor F. A broad spectrum artificial sea water medium for coastal and open ocean phytoplankton. *J Phycol*, 1980, 16: 28–35
- 27 Thayer S S, Björkman O. Leaf xanthophyll content and composition in sun and shade determined by HPLC. *Photosynth Res*, 1990, 23: 331–343
- 28 Enriquez M M, LaFountain A M, Budarz J, et al. Direct determination of the excited state energies of the xanthophylls diadinoxanthin and diatoxanthin from *Phaeodactylum tricornutum*. *Chem Phys Lett*, 2010, 493: 353–357
- 29 Lin A P, Wang C, Qiao H J, et al. Study on the photosynthetic performances of *Enteromorpha prolifera* collected from the surface and bottom of the sea of Qingdao sea area(in Chinese). *Chin Sci Bull*, 2009, 54: 399–404 [林阿朋, 王超, 乔洪金, 等. 青岛海城漂浮和沉降浒苔的光合作用研究. 科学通报, 2009, 54: 294–298]

- 30 de Lorgeril J, Zenagui R, Rosa R D, et al. Whole transcriptome profiling of successful immune response to *Vibrio* infections in the oyster *Crassostrea gigas* by digital gene expression analysis. PLoS One, 2011, 6: e23142
- 31 Mortazavi A, Williams B A, McCue K, et al. Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq. Nat Methods, 2008, 5: 621–628
- 32 Zhang N, Chen R, Young N, et al. Comparison of SDS- and methanol-assisted protein solubilization and digestion methods for *Escherichia coli* membrane proteome analysis by 2-D LC-MS/MS. Proteomics, 2007, 7: 484–493
- 33 Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem, 1976, 72: 248–254
- 34 Blonder J, Chan K C, Issaq H J, et al. Identification of membrane proteins from mammalian cell/tissue using methanol-facilitated solubilization and tryptic digestion coupled with 2D-LC-MS/MS. Nat Protoc, 2007, 1: 2784–2790
- 35 Liu Z Y, Wang G C, Zhou B C. Effect of iron on growth and lipid accumulation in *Chlorella vulgaris*. Bioresour Technol, 2008, 99: 4717–4722
- 36 Cooper M S, Hardin W R, Petersen T W, et al. Visualizing “green oil” in live algal cells. J Biosci Bioeng, 2010, 109: 198–201
- 37 Shikanai T. Cyclic electron transport around photosystem I: Genetic approaches. Annu Rev Plant Biol, 2007, 58: 199–217
- 38 Plumley F G, Schmidt G W. Nitrogen-dependent regulation of photosynthetic gene expression. Proc Natl Acad Sci USA, 1989, 86: 2678–2682
- 39 Ishitani M, Nakamura T, Han S Y, et al. Expression of the betaine aldehyde dehydrogenase gene in barley in response to osmotic stress and abscisic acid. Plant Mol Biol, 1995, 27: 307–315
- 40 Huan L, Xie X J, Zheng Z B, et al. Positive correlation between PSI response and oxidative pentose phosphate pathway activity during salt stress in an intertidal macroalga. Plant Cell Physiol, 2014, 55: 1395–1403
- 41 Zhou W, He L W, Yang F, et al. *Pyropia yezoensis* can utilize CO₂ in the air during moderate dehydration. Chin J Oceanol Limn, 2014, 32: 358–364
- 42 Diaz C, Purdy S, Christ A, et al. Characterization of markers to determine the extent and variability of leaf senescence in *Arabidopsis*: A metabolic profiling approach. Plant Physiol, 2005, 138: 898–908
- 43 Wingler A, Purdy S, MacLean J A, et al. The role of sugars in integrating environmental signals during the regulation of leaf senescence. J Exp Bot, 2006, 57: 391–399
- 44 Peng M S, Bi Y M, Zhu T, et al. Genome-wide analysis of *Arabidopsis* responsive transcriptome to nitrogen limitation and its regulation by the ubiquitin ligase gene *NLA*. Plant Mol Biol, 2007, 65: 775–797
- 45 Wang Z T, Ullrich N, Joo S, et al. Algal lipid bodies: Stress induction, purification, and biochemical characterization in wild-type and starchless *Chlamydomonas reinhardtii*. Eukaryot Cell, 2009, 8: 1856–1868
- 46 Miller R, Wu G, Deshpande R R, et al. Changes in transcript abundance in *Chlamydomonas reinhardtii* following nitrogen deprivation predict diversion of metabolism. Plant Physiol, 2010, 154: 1737–1752
- 47 Kroth P G, Chiovitti A, Gruber A, et al. A model for carbohydrate metabolism in the diatom *Phaeodactylum tricornutum* deduced from comparative whole genome analysis. PLoS One, 2008, 3: e1426
- 48 Palmucci M, Ratti S, Giordano M. Ecological and evolutionary implications of carbon allocation in marine phytoplankton as a function of nitrogen availability: A fourier transform infrared spectroscopy. J Phycol, 2011, 47: 313–323
- 49 Mohler J. Requirements for hedgehog, a segmental polarity gene, in patterning larval and adult cuticle of *Drosophila*. Genetics, 1988, 120: 1061–1072
- 50 Li S, Pan K H, Zhu B H, et al. Nuclear transition between the conjunction cells of *Phaeodactylum tricornutum* Bohlin (Bacillariophyta). J Ocean Univ China, 2012, 11: 383–388

Changes in central carbon metabolism of *Phaeodactylum tricornutum* are beneficial for lipid accumulation under nitrogen starvation conditions

ZHAO PeiPei^{1,2}, GU WenHui¹, WU SongCui^{1,2}, XIE XiuJun¹, ZHAO YuPeng³, HUANG AiYou¹, HUAN Li^{1,2}, PAN GuangHua³ & WANG GuangCe¹

¹ Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China;

² College of Earth Sciences, University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China;

³ College of Marine Science and Engineering, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China

Phaeodactylum tricornutum is an important diatom that is rich in fatty acids. Information on its whole genome is publicly available. Here, we studied the proteome, transcriptome, and physiology of this organism in normal culture and under nitrogen starvation conditions. Our results showed that protein metabolism, the cytoskeleton, chromatin, and other bioprocesses including signal transduction changed dramatically when nitrogen was unavailable. Under the nitrogen starvation condition, photosynthesis and the Calvin cycle were down-regulated, while glycolysis, the TCA cycle, and lipid biosynthesis were up-regulated compared with the normal culture control. We suggest that the up-regulated glycolysis and TCA cycle may provide large amounts of substrates and energy for lipid biosynthesis. Nile red and BODIPY staining of *P. tricornutum* revealed that the lipid bodies were enlarged in the nitrogen-starved cells compared with the controls. These findings indicate that limited availability of nitrogen can stimulate the accumulation of lipids in *P. tricornutum*.

diatom, lipid synthesis, metabolic pathway, proteome, *P. tricornutum*

doi: 10.1360/N972014-00948

补充材料

表 S1 缺氮培养/正常培养条件下色素合成及蛋白合成相关差异表达蛋白

表 S2 缺氮培养/正常培养条件下细胞骨架组分及染色体相关差异表达蛋白

表 S3 缺氮培养/正常培养条件下信号转导相关差异表达蛋白

表 S4 缺氮培养/正常培养条件下转运及氨基酸代谢相关差异表达蛋白

本文以上补充材料见网络版 csb.scichina.com. 补充材料为作者提供的原始数据, 作者对其学术质量和内容负责.