

基于蛋白质组学对螺旋藻在高温胁迫下响应机制的初步研究

吕冰心[#], 常蓉[#], 李博生^{*}

北京林业大学生物科学与技术学院食品科学与工程系, 林业食品加工与安全北京市重点实验室(北京林业大学), 北京林业大学螺旋藻研究所, 北京100083

摘要: 本实验以螺旋藻为材料, 通过iTRAQ对螺旋藻细胞在高温胁迫下的全蛋白进行定量分析。结果表明: 40℃是螺旋藻可恢复的最大耐受胁迫温度, 并在此温度胁迫条件下启动响应机制。差异表达蛋白的筛选结果确定了18 523个独特的肽和2 085个蛋白质, 此外, 在UniProtKB/Swiss-Prot数据库中注释了142种独特的蛋白质。GO功能注释中, 共有207条蛋白序列被793条GO功能条目注释, 平均GO层次为6.545。KEGG通路注释中, 检测到呈现显著差异性表达的注释蛋白117个, 涉及光合作用、能量代谢、RNA的转录和翻译等方面。荧光定量PCR结果显示, 测序结果与iTRAQ实验相一致, 光合系统I P700叶绿素脱辅基蛋白A1、果糖1,6-二磷酸酶、核酮糖二磷酸羧化酶大侧链、光合系统I反应中心亚基XI下调; 顺反异构酶、热激蛋白70、热激蛋白90、磷酸甘油酸激酶、二磷酸核苷酸激酶上调。由此可知, 螺旋藻经高温胁迫后, 与光合作用和遗传信息相关的蛋白是影响螺旋藻热应激的关键。

关键词: 螺旋藻; 高温胁迫; 蛋白质组学; 双重机制; 光合作用

由于温度对许多植物生理过程具有抑制作用, 因此温度通常被认为是影响植物生长和农业生产力的主要非生物胁迫因素之一。温度可能会影响植物生长, 导致蛋白质、碳水化合物、色素和其他生化成分发生变化(Torzillo等1991; 杨学文等2006)。许多微生物生活在极端环境中, 例如, 念珠藻生活在高盐环境, 而螺旋藻则生活在高碱性水中, 这也使得它们成为研究环境胁迫下生理反应的极好模型(Los等2008; Whitton和Potts 2000), 并且在对蓝藻(包括螺旋藻)的HSP及耐热性的研究中常借助一些现代蛋白组学工具(Durham 2002; Slabas等2006; Suzuki等2006; Hongsthong等2009; Rowland等2010; Wang等2013)。研究发现, 集胞藻(*Synechocystis* sp. PCC6803)、聚球藻(*Synechococcus* sp. PCC7942)和鱼腥藻(*Anabaena* sp. PCC7120)等蓝藻具有热应激反应和耐热性, 而聚球藻PCC7002在热应激下显著参与放氧复合体(oxygen-evolving complex, OEC)的稳定化(Dillon和Dorman 2010; Nishiyama等1994, 1997), 并且其类囊体中纯化得到的细胞色素c-550 (cytochrome c-550, psbV)在氧释放恢复系统中也具有热稳定性的能力(Dillon和Dorman 2010); PSII 12 kDa外源蛋白(photosystem II 12 kDa extrinsic protein, PsbU)则是作为参与氧气进化的热稳定性的另一个重要因素(Nishiyama等1994), psbU基因的靶向诱变失活将导致热适应缺陷并降低OEC热稳定性(Nishiyama等1997)。这些研究表明

了热应激蛋白(heat shock proteins, HSP)在蓝藻热应激反应和耐热性方面起着核心作用(Rajaram等2014)。另外, 研究还发现组氨酸激酶在植物的热应激反应中具有重要作用, 它是集胞藻PCC-6803成为耐热菌株的主要因素(Suzuki等2005)。

目前, 国内外对螺旋藻的热应激反应及其耐热性的研究还比较少(Deshnium等2000; Kurdrid等2010, 2011; Wang等2013), 并存在以下问题: 一, 这些研究的重点在于螺旋藻在不同胁迫条件下, 仅对差异性蛋白的数量及其所涉及的某些代谢过程的描述, 并未对螺旋藻高温胁迫下整体响应机制进行研究, 并且, 高温胁迫的温度都设定为45℃, 而此温度在本研究中发现偏高。二, 对于藻类的抗高温机制的研究多集中在热应激蛋白的定性定量分析, 并且选择了藻细胞的极限耐受温度, 在这种高温胁迫下, 藻细胞中的部分生理代谢功能濒临崩溃, 已无法主动调节各生理代谢过程。三, 这些研究都是针对某个亚细胞结构(细胞膜、光合膜等)或者单一的代谢过程进行研究, 而生物有机体内的调控是通过各种代谢过程相互协调实现的, 所以将各部分分割开进行单一的研究不可避免地忽略了各种代谢过程之间的联系和相互作用。因

修定 2018-04-13

资助 国家林业局重点(2017-01)。

[#] 共同第一作者。

^{*} 通讯作者(libosheng1119@163.com)。

此,选择在适宜的高温胁迫下对整个细胞体进行全蛋白组研究,更有助于了解各代谢过程之间的联系和相互作用,并结合螺旋藻实际的生长量和藻丝形态的变化,完成内外衔接、相互统一的研究。

螺旋藻(*Spirulina*)是一种水生光自养原核生物,属于蓝藻的一种。螺旋藻含有50%~70%的蛋白质及人体必需氨基酸、不饱和脂肪酸、多糖、维生素、矿物质及微量元素等营养物质(Habib等2008)。螺旋藻在大型室外培养过程中,温度是影响螺旋藻生长的最主要的限制因素,并导致蛋白质、碳水化合物、色素等生化成分发生变化(Torzillo等1991)。因此,螺旋藻被认为是研究生态适应性和温度耐受性的良好模型,选用同位素相对标记和绝对定量技术(isobaric tags for relative and absolute quantification, iTRAQ)分析蛋白质组学已经成为组学研究中的首选方法,因为它对蛋白质的分子量、等电点或疏水性没有任何限制,并能够涵盖广泛的蛋白质(Ross等2004; 谢秀枝等2011)。然而,将这种方法用于蓝藻耐热机制的研究很少,仅有一项将iTRAQ用于揭示集胞藻的蛋白质组学变化研究,但该研究是基于亚细胞水平,并且仅分析了类囊体的变化(Rowland等2010)。

在本研究中,通过基于iTRAQ的蛋白质组学分析常温和高温下蛋白质的差异性表达,分析螺旋藻在高温胁迫下的代谢水平的变化,以揭示螺旋藻对高温胁迫的响应机制。

1 材料与方法

1.1 螺旋藻培养和蛋白质提取

1.1.1 螺旋藻培养

本实验选用藻种为北京林业大学螺旋藻研究所提供的钝顶螺旋藻(*Spirulina platensis* sp.)。

选取对数生长期的螺旋藻至1 L三角瓶中,用新的Zarrouk培养液稀释至原来的0.3%,置于30℃,光照强度为 $108 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 下培养24 h,光照周期为12:12(光暗比)。共设定4个不同处理,分别置于30、35、40和45℃下培养24 h后,再置于30℃条件下培养5 d。每个三角瓶中含有1 L螺旋藻液,每个实验组均进行3次独立的生物学重复。

1.1.2 螺旋藻生长率测定

使用紫外分光光度法,在波长为560 nm处测

定样品的吸光度值,每24 h测定1次,平行测定3次,即可得到螺旋藻每日生长量。

1.1.3 蛋白质提取

分别将样品放置液氮中,用研钵磨碎成细粉状。将组织细粉转入50 mL离心管中,加入25 mL TCA:丙酮(1:9)和65 mmol·L⁻¹ DTT, -20℃沉淀1 h。9 000×g离心45 min,去除上清,沉淀加入25 mL丙酮, -20℃沉淀1 h, 7 500×g离心45 min,取沉淀,空气干燥, -80℃保存。通过BCA法进行蛋白质定量。

1.1.4 SDS-PAGE电泳

分别取对照组和实验组40 μg蛋白质样品进行上样实验,以上样比例5:1 (V/V)加入6X上样缓冲液,然后进行沸水浴5 min,离心14 000 ×g, 10 min取上清液,进行12.5%的SDS-PAGE电泳,电泳条件为:恒流14 mA,时间90 min。采用考马斯亮蓝进行染色。

1.2 蛋白质消化和肽段定量

将对照组和实验组样品各取400 μg,分别加入DTT至终浓度为100 mmol·L⁻¹,沸水浴5 min,冷却至室温。加入200 μL UA buffer (8 mol·L⁻¹ Urea、150 mmol·L⁻¹ TrisHCl, pH 8.0)混匀,转入30 kDa超滤离心管,14 000×g离心15 min;加入200 μL UA buffer, 14 000×g离心15 min,弃滤液。加入100 μL IAA (50 mmol·L⁻¹ IAA加入UA中),450×g振荡1 min,避光室温下放置30 min,14 000×g离心10 min。加入100 μL UA buffer, 14 000×g离心10 min,重复2次。再加入100 μL Dissolution buffer (50 mL三乙基碳酸氢铵缓冲液与50 mL ddH₂O混合),14 000×g离心10 min,重复2次。加入40 μL Trypsin buffer (3 μg Trypsin加入40 μL Dissolution buffer中),450×g振荡1 min,然后在37℃下保持16~18 h。换新收集管,14 000×g离心10 min,取滤液,OD₂₈₀肽段定量。

1.3 iTRAQ标记

根据试剂盒使用说明,分别取对照组和实验组样品约100 μg,选择iTRAQ Reagent-4plex Multiplex Kit (AB SCIEX)试剂盒进行标记。对照样品(常温下生长的螺旋藻样品)标签为114,实验组样品(40℃高温胁迫处理后的螺旋藻样品)标签为115。2个独立的生物学重复用相同的分配进行标记。每个实验组均进行3个独立的生物学重复。将标记溶液反应物在室温下孵育1 h,然后进一步分析。

1.4 SCX分级

在进行LC-MS/MS分析之前,通过强阳离子交换(SCX)色谱分析进行标记的肽段分级,将真空干燥的多肽溶于强阳离子交换buffer A ($10\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}\text{KH}_2\text{PO}_4$ 溶于25%乙腈中, pH 3.0)中,装柱Polysulfoethyl 4.6 mm $\times$ 100 mm (5 μm , 200 $\text{\AA}$),洗脱速率为 $1\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ 。用适当的梯度洗脱进行肽段分离,洗脱液为buffer ($10\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}\text{KH}_2\text{PO}_4$ 和 $500\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}\text{KCl}$ 溶于25%乙腈中, pH 3.0),将洗脱下的多肽液用馏分收集器进行收集,用C₁₈ Cartridges [Empore™ SPE Cartridges C₁₈ (标准密度), bed I.D. 7 mm, 体积3 mL]进行脱盐,将每份样品都进行真空浓缩。所有样品在进行LC-MS/MS分析前都置于40 μL 0.1% (V/V)三氟乙酸中。

1.5 LC-MS/MS定量分析

1.5.1 HPLC分析

冻干样品复溶于40 μL 0.1%甲酸水溶液。取10 μL 样本进行纳升液相-串联质谱(nano-LC-MS/MS)分析。液相系统为Tempo™ nano LC。流动相分别为A: 2% 乙腈、0.1%甲酸和98%水; B: 98%乙腈、0.1%甲酸和2%水。样品通过100% A相在2 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ 流速下完成上样,富集于ChromXP C₁₈预柱上(3 μm , C18-CL, 120 $\text{\AA}$, 360 $\mu\text{m}\times$ 0.5 mm),并在300 $\text{nL}\cdot\text{min}^{-1}$ 的流速下,通过一个120 min的梯度在Thermo scientific EASY column (75 $\mu\text{m}\times$ 100 mm 3 μm -C₁₈)上得到分离。使用的梯度为: 0~100 min, B相由0线性升至50%; 100~108 min, B相由50%线性升至100%; 108~120 min, B相保持为100%。肽段经过液相分离后进入TrippleTOF™ 5600质谱仪(AB SCIEX)进行检测,质谱系统为AB SCIEX TripleTOF 5600质谱。

1.5.2 质谱分析

串联质谱TrippleTOF™ 5600质谱仪(AB SCIEX)检测采用的是信息关联扫描(information dependent acquisition, IDA)模式。TOF MS扫描分辨率为30 000 (FWHM),质荷比(m/z)范围设定为350~1 500,累积时间250 ms; 峰高超过120 cps (counts/second),且电荷为+2至+5的30个丰度最大的多肽选择MS/MS分析,质荷比(m/z)范围为100~1 250,每个TOF MS/MS扫描累积时间为100 ms,动态排除时间18 s。MS/MS获取时,开启增强iTRAQ碎裂(Enhance iTRAQ)和自动计算碰撞能量(AutoCE)功能。

1.6 荧光定量分析(Real-time PCR)

使用TotalRNAExtractor (SK1312)试剂盒进行RNA的提取。使用第一链cDNA合成试剂盒(AMV First Strand cDNA Synthesis Kit) (SK2445)进行反转录实验,并储存在 -20°C ; 利用Stepone plus型荧光定量PCR仪进行实时定量PCR。

利用Primer Premier 5.0软件设计引物序列,以16S *rRNA*作为内参基因,内参基因的上游和下游分别为: 16S-F: 5' AACCCTTGTCCTTAGTTGCCAT 3'; 16S-R: 5' CCTTTGTCCCAACCATTGTAGT 3'。

待测蛋白质基因引物序列具体见表1。

1.7 序列数据搜索和数据分析

使用嵌入Proteome Discoverer 1.3中的MASCOT引擎(2.2版本)建立螺旋藻数据库(47 062个序列,取决于我们的整个转录组测序)来搜索MS/MS质谱检测肽段。对于蛋白质鉴定, MASCOT参数设定如下: 肽的质量公差为20 ppm, MS/MS公差为0.1 kDa, 胰蛋白酶错过裂解数最多达2个, iTRAQ 8plex (K)固定改性, iTRAQ 8plex (N项), 氧化(M)的可变修改和反向的诱饵数据库模式。我们所有报道的数据都是基于至少一种独特的肽,对于通过假发现率($\text{FDR}\leq 0.01$)确定的蛋白质鉴定具有99%的置信度。查库使用ProteinPilot软件版本为ProteinPilot™ Software 4.2, 相关参数见表2。

1.8 生物信息学分析

利用Blast2GO (Version 2.7.2)对所有定量到蛋白的比对序列行使代谢途径追踪功能,将与其所有关联的GO功能条目分别进行提取,使用GO注释进行蛋白质的功能分析,并根据其生物学过程,分子功能和细胞成分对蛋白质进行分类。将差异表达蛋白质进行KEGG通路注释。

2 实验结果

2.1 高温胁迫对螺旋藻生长的影响

生长速率是衡量螺旋藻是否正常生长的第一标准。如图1所示,当温度升至 35°C 时,螺旋藻的生长并未受到显著的影响;当温度达到 40°C 时,螺旋藻的生长受到了极显著的抑制;当这种高温消失后,螺旋藻经过一定时间的调整后,逐渐恢复生长;但是,当温度达到 45°C 时,螺旋藻受到了不可恢复性的损伤,在较短的时间内死亡殆尽。因此,本实验对通过螺旋藻不同程度的高温胁迫,筛选

表1 荧光定量PCR中所用差异表达基因及其引物序列

Table 1 Differentially expressed genes and their primer sequences used in RT-qPCR

蛋白编号	蛋白名称	引物序列(5'→3')
K6DV62	光合系统I P700叶绿素脱辅基蛋白A1	F:AACCCAGTTTAGATGAGAGATGATG R: TTATGGTGCGGGATTACGA
K1WP64	果糖1,6-二磷酸酶	F: CCTTCTCAGAAATAGCCAGCAC R: GGCGACCTTTTGTAACCCA
K1WIE0	核酮糖二磷酸羧化酶大侧链	F: ATGAAATCCTCCCAGACTTGC R: TCGTTCTCACCTATCTAACAC
H1WCZ9	光合系统II P680叶绿素脱辅基蛋白	F: GCGAATCACTCCATCAGCA R: TAACAGTCCCGCCAAAGGT
K6DZB1	光合系统I反应中心亚基XI	F: CTTCGGATTTATCCCCTTGG R: TGTGGCTTGGCTATGTTACTGA
K1XGZ5	光合系统II叶绿素结合蛋白CP43	F: GTGATTAACTTTCCCTACTTTG R: ACTTCAGGACCAGAACAGC
K1VYN4	顺反异构酶	F: TGTGGCTTACTTACGGCTCC R: CACGAATTGTGGTTGATGACTATG
K1WLU1	60 kDa伴侣蛋白	F: CGGTATCGGTAGCGAAGTAAG R: GACAAAGTGGGTAAAGAGGGTG
K6EGC6	热激蛋白70	F: ATGCCCAAATTATCAGGAGC R: GCGTATCGCTGCTTATCATTG
K1W7V7	热激蛋白DnaJ结构域蛋白	F: CCCAAATAATCGTGCGTGAG R: GATGATAGCGGGAGGAATAGC
K6DXZ6	热激蛋白90	F: TTCCCAAACATCCCCATCT R: CTCATCTTCCGCAGCACTTAT
K1VYQ4	磷酸甘油酸激酶	F: TTGCCCAAAGTTCCGACA R: GGCTCTATTAGTGATGATACCAGGAT
K6CQA7	二磷酸核苷酸激酶	F: AAGGTGTCATCGCCTCTGCT R: GCTAGGTTCCCAACTTACCAATT

表2 ProteinPilot搜索参数

Table 2 ProteinPilot search parameters

参数	设定
Sample type	iTRAQ 4-plex (peptide labeled)
Cys alkylation	Iodoacetamide
Digestion	Trypsin
Instrument	TripleTOF 5600
Special factors	None
Bias Correction	Auto
Search effort	Thorough
Unused Cutoff	>0.05
Fals discovery rate analysis	Yes

ProteinPilot结果过滤参数为: Protein FDR≤0.01。

其可以主动应对高温胁迫的温度为40℃, 并在此胁迫温度下展开螺旋藻响应机制的研究。

2.2 PCR验证实验结果

由图2可知, 我们对几种选择的螺旋藻差异性蛋白的基因进行了定量PCR的检测, 与iTRAQ实验

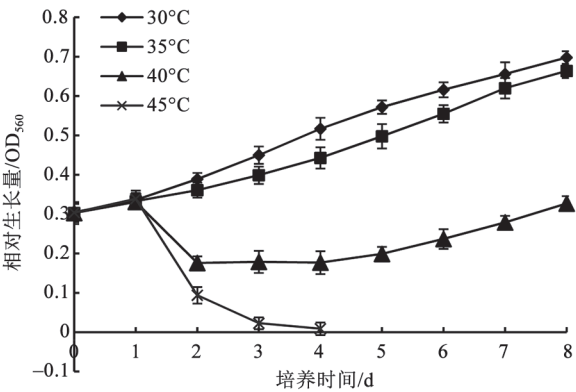


图1 不同温度下螺旋藻的生长曲线

Fig.1 The growth curve of *S. platensis* at different temperatures
1~2 d: 高温胁迫, 3~8 d: 恢复期。

相一致, 当螺旋藻受到高温胁迫时, 光合系统I P700叶绿素脱辅基蛋白A1、果糖1,6-二磷酸酶、核酮糖二磷酸羧化酶大侧链、光合系统I反应中心亚基

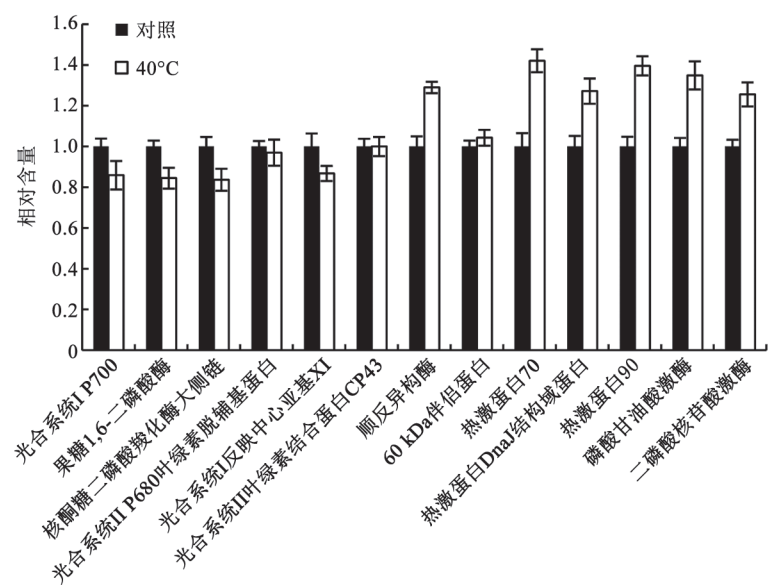


图2 利用定量PCR技术分析几种差异蛋白的mRNA的变化
Fig.2 Analysis of mRNA changes of several differential proteins by PCR

XI的mRNA呈现明显的下降。与iTRAQ实验相一致,当螺旋藻受到高温胁迫时, PpiC-type peptidyl-prolyl *cis-trans* isomerase (顺反异构酶)、热激蛋白70、热激蛋白90、磷酸甘油酸激酶、二磷酸核苷酸激酶的mRNA都呈现明显的上升趋势。

2.3 高温胁迫下螺旋藻蛋白质组学的动力学变化
2.3.1 差异表达蛋白的筛选

为了将大规模螺旋藻蛋白质组学分析与在高温胁迫下调节的蛋白质的定量信息相结合,我们采用等压标签进行相对和绝对定量。在本研究中,并非使用先前报道(Slabas等2006)中采用的下调蛋白Ratio≤0.8、上调蛋白的Ratio≥1.2的筛选范围,而是基于下调蛋白Ratio≤0.5、上调蛋白的Ratio≥1.5进行进一步分析。我们确定了18 523个独特的肽和2 085个蛋白质。这2 085个蛋白质中有162个显示出超过1.5倍的变化,有52个出现在40°C下显著低于0.7倍的变化。此外,在UniProtKB/Swiss-Prot数据库中注释了142种独特的蛋白质。剩下的蛋白质中,14个(10%)被注释为“预测”或“推定”的蛋白质。为了获得更多关于这些蛋白质的信息,使用BLAST软件测定其与数据库中其他已知蛋白质的同源性。

2.3.2 GO功能注释

在功能注释(Annotation)过程当中, Blast2GO

通过综合考量目标序列和比对序列的相似性、GO条目来源的可靠度以及GO有向无环图的结构,将Mapping功能过程中提取的已知的GO功能条目中符合条件的条目注释给目标蛋白。本研究中,共有207条蛋白序列被793条GO功能条目注释,平均GO层次为6.545。在GO分析过程中,各个注释蛋白在ontologies中所处的层次示意如图3所示。

2.3.3 KEGG通路注释

结果显示,30个(21%)显著性差异表达蛋白质主要涉及光合作用(表3),35个(25%)显著性差异表达蛋白质主要涉及RNA(表4),主要涉及能量代谢的显著性差异表达蛋白18个(13%)(表5),19个(13%)显著性差异表达蛋白质主要涉及碳代谢(表6),主要涉及氨基酸代谢的显著性差异表达蛋白8个(6%)和7个(5%)显著性差异表达蛋白主要涉及螺旋藻在40°C下的抗性(表7)。以上进行分组的蛋白仅限于其在响应高温胁迫时多参与的代谢过程及功能。在这些发生显著差异性变化的蛋白中,与光合作用直接相关的蛋白中,色素及色素蛋白共12个且全部上调;与光系统I (photosystem I, PSI)相关的仅1个,并呈现上调反应;与ATP相关的3个也全部呈现上调反应;与光系统II (photosystem II, PSII)相关的8个蛋白中,1个上调,7个下调;与暗反应相关的6个蛋白则全部呈现下调反应。

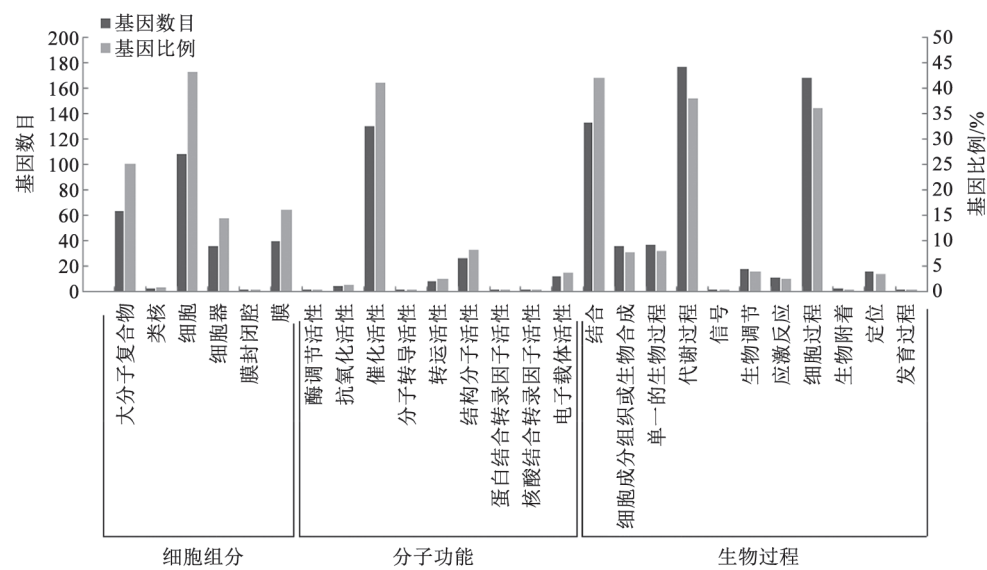


图3 由高温胁迫诱导螺旋藻的差异表达蛋白质的GO水平分布
Fig.3 GO-level distribution for differentially expressed proteins of *S. platensis* induced by high-temperature stress

表3 高温胁迫下螺旋藻的与光合作用相关的差异显著性蛋白

Table 3 Differentially expressed proteins associated with photosynthesis of *S. platensis* under high-temperature stress

序号	覆盖率/%	库编码	名称	比率	P值
1	40.4	K1XGZ5	SPII CP43蛋白叶绿素结合蛋白CP43	0.4742	0.0005023
2	56.6	K1X8N9	ATP合酶α亚基	0.4966	0.0011080
3	71.1	Q2PHG6	铁氧还蛋-NADP还原酶	0.5916	0.0148914
4	38.3	K1W3Q5	细胞色素f	0.6026	0.0188736
5	71.1	K6E4D6	SPI蛋白PsaD	0.6427	0.0409722
6	49.4	D5A278	SPI反应中心亚基III, 质体蛋白对接蛋白	1.7219	0.0090887
7	38.2	K6DR97	SPII 12 kDa外源蛋白	2.0137	0.0008151
8	65.6	K6CVX4	细胞色素c-550	2.1281	0.0003080
9	49.1	K1X2J1	细胞色素c6	2.3768	0.0000363
10	41.5	D5A0Q5	ATP合酶b亚基	2.4660	0.0000168
11	53.5	K6CR51	ATP合酶γ链	3.0761	0.0000001
12	60.2	K6DM89	藻胆体连接多肽	0.4920	0.0009481
13	5.4	K9VDQ4	反向PBS裂解酶HEAT结构域重复蛋白	0.5861	0.0131709
14	79.5	K6DQ82	别藻蓝蛋白α亚基	1.6444	0.0167878
15	81.1	K6CRH0	别藻蓝蛋白β亚基	1.7061	0.0103120
16	78.3	K6DRY3	藻胆蛋白	1.8707	0.0027004
17	98.1	K6EM73	别藻蓝蛋白β亚基	2.3121	0.0000634
18	94.4	Q8VRJ2	藻蓝蛋白α链	2.3988	0.0000300
19	58.4	K1WRI9	香叶基香叶基还原酶	0.5248	0.0026931
20	23.8	K1WI96	铁螯合酶	1.5417	0.0368954
21	62.0	K1WN81	血红素加氧酶	1.6293	0.0188857
22	25.3	K6DXX6	Mg-原卟啉IX甲基转移酶	1.6596	0.0149019
23	65.8	K1W8D5	卟吩胆色素原脱胺酶	1.8880	0.0023394
24	25.7	K1VT10	钴胺素合成蛋白CobW	1.9055	0.0020224
25	73.9	K1WP64	D-果糖1,6-二磷酸酶2类	0.2168	0.0000000
26	71.4	K1WIE0	核糖二磷酸羧化酶大链	0.2535	0.0000000
27	74.6	K1WET8	磷酸核糖激酶	0.5445	0.0047023
28	50.8	K1VR37	苹果酸脱氢酶	0.5445	0.0047023
29	69.7	H1WMK8	转酮酸酶1, 硫胺素结合	0.6081	0.0211601
30	81.4	K1W168	甘油醛-3-磷酸脱氢酶I型	0.6081	0.0211601

表4 高温胁迫下螺旋藻的与遗传相关的显著差异性蛋白

Table 4 Differentially expressed proteins related to heredity of *S. platensis* under high-temperature stress

类别	序号	覆盖率/%	库编码	名称	比率	P值
核糖体	1	78.4	K6E192	50S核糖体蛋白L23	0.3698	0.0000033
	2	53.1	K6CYG6	50S核糖体蛋白L21	0.3945	0.0000137
	3	67.7	K1W1H1	30S核糖体蛋白S13	0.3981	0.0000167
	4	41.1	Q118Z5	30S核糖体蛋白S12	0.4055	0.0000246
	5	62.5	D4ZPG1	50S核糖体蛋白L3	0.4285	0.0000756
	6	56.9	K1VRH0	30S核糖体蛋白S4	0.4571	0.0002593
	7	27.3	K6CSA7	50S核糖体蛋白L16	0.4656	0.0003626
	8	35.4	K1WPZ1	30S核糖体蛋白S17	0.4831	0.0006946
	9	40.5	K6DMZ3	50S核糖体蛋白L17	0.4875	0.0008114
	10	54.7	K6CVV6	30S核糖体蛋白S1	0.5012	0.0012908
	11	55.9	K1W1G7	50S核糖体蛋白L13	0.5152	0.0020155
	12	62.4	K1WD53	30S核糖体蛋白S3	0.5395	0.0041007
	13	59.0	B5WA94	50S核糖体蛋白L3	0.5395	0.0041007
	14	64.8	K6EK60	30S核糖体蛋白S5	0.5445	0.0047023
	15	30.4	K1W0I0	50S核糖体蛋白L25	0.5445	0.0047023
	16	49.2	K6CXN6	30S核糖体蛋白S21	0.5445	0.0047023
	17	57.6	K6DPD6	30S核糖体蛋白S19	0.5598	0.0070199
	18	46.2	K1WD58	50S核糖体蛋白L4	0.5916	0.0148914
	19	55.3	K1WD48	50S核糖体蛋白L24	0.6138	0.0237555
	20	40.4	K1XDH8	30S核糖体蛋白S9	0.6310	0.0331252
	21	45.1	K1XDJ4	50S核糖体蛋白L29	1.8197	0.0041118
RNA降解	22	59.0	K6DWQ1	50S核糖体蛋白L7/L12	2.3335	0.0000527
	23	35.2	K1WHW6	核糖核酸酶Rne/Rng家族	0.5200	0.0023334
	24	62.0	K1WC13	60kDa的分子伴侣	0.5248	0.0026931
	25	30.8	K1WSJ4	VacB和RNase II家族3'-5'外核糖核酸酶	0.5546	0.0061445
	26	20.0	K1WIR4	核糖核酸酶J	0.6026	0.0188736
	27	60.6	B5W7V6	含TPR重复蛋白	1.5417	0.0368954
	28	80.6	K1WLU1	60kDa的分子伴侣	2.2284	0.0001303
	29	59.3	K1W174	拟核相关蛋白SPLC1_S532150	2.3121	0.0000634
	30	70.9	K6DV40	拟核相关蛋白APPUASWS_22108	2.4210	0.0000247
嘧啶代谢	31	26.9	K1W820	乳清酸磷酸核糖基转移酶	1.7061	0.0103120
氨基酰-tRNA生物合成	32	46.9	K1WJF1	天冬酰胺-tRNA连接酶	0.5546	0.0061445
	33	21.8	K1WC57	组氨酸-tRNA连接酶	1.5136	0.0454902
	34	33.6	K1WH37	色氨酸-tRNA连接酶	1.5704	0.0297065
	35	34.8	K1W2S0	精氨酸-tRNA连接酶	1.7701	0.0061624

这个结果显示, 整个光合作用阶段都受到了高温胁迫的影响, 但是光合作用中光反应和暗反应所受到的高温胁迫的影响程度是不同的, 并且在光合作用中藻丝体细胞在光反应阶段和暗反应阶段是通过不同的代谢过程响应高温胁迫。这个结果可以发现利用螺旋藻研究光合作用可以更加全面的区分各阶段在光合作用整个过程中的各司其职。

在螺旋藻处于40℃的高温胁迫下, 发生扰动最大的是与RNA相关的蛋白, 其中仅核糖体蛋白

就有22个呈现显著性差异, 并且这22个差异蛋白中有20个是下调的, 有75%下调的蛋白是属于RNA大亚基上的, 仅有2个上调的蛋白也来自于RNA的大亚基; 与RNA降解和翻译过程相关的差异性蛋白中, 仅有1个蛋白质呈现上调差异性表达, 剩下的全部呈现下调差异性表达表达; 而可以合成RNA的前体物和拟核蛋白则全部呈现上调表达。由此可见, 在螺旋藻细胞受到高温胁迫时, RNA的大亚基部分受到的影响要远大于小亚基。

由图4可知, 在能量代谢中, 与调节代谢的能

表5 高温胁迫下螺旋藻的与能量代谢相关的差异显著性蛋白

Table 5 Differentially expressed proteins associated with energy metabolism of *S. platensis* under high-temperature stress

类别	序号	覆盖率/%	库编码	名称	比率	P值
嘌呤代谢	1	37.0	K1XD53	DNA定向RNA聚合酶	0.3698	0.0000033
	2	27.3	K1WBX4	磷酸核糖胺-甘氨酸连接酶	0.5495	0.0053761
	3	13.4	K1WA74	Ppx / GppA磷酸酶	0.5546	0.0061445
	4	26.2	K1W2A4	尿素酶α亚基	0.5754	0.0102845
	5	39.0	K1WKA5	硫酸腺苷酰转移酶	0.6252	0.0296926
氧化磷酸化	6	56.6	K1X8N9	ATP合酶α亚基	0.4966	0.0011080
	7	56.5	K1XCW4	NAD(P)H-醌氧化还原酶亚基I	0.5200	0.0023334
	8	43.6	K1VXA0	NAD(P)H-醌氧化还原酶亚基K	0.5970	0.0167521
	9	38.8	K1WT03	多磷酸激酶	0.6486	0.0454289
	10	41.5	D5A0Q5	ATP合酶b亚基	2.4660	0.0000168
	11	48.0	K6DLX5	ATP合酶b亚基	2.4889	0.0000138
	12	53.5	K6CR51	ATP合酶γ链	3.0761	0.0000001
糖酵解/糖异生	13	73.9	K1WP64	D-果糖1,6-二磷酸酶2类	0.2168	0.0000000
	14	14.2	K1W7K4	醛脱氢酶	0.2911	0.0000000
	15	81.4	K1W168	甘油醛-3-磷酸脱氢酶I型	0.6081	0.0211601
	16	54.8	K1X635	丙酮酸脱氢酶(乙酰转移)E1成分	0.6138	0.0237555
	17	36.5	B5W4Z5	2,3-二磷酸甘油酸非依赖性磷酸甘油酸变位酶	2.1878	0.0001847
	18	69.5	K1VYQ4	磷酸甘油酸激酶	2.8314	0.0000007

表6 高温胁迫下螺旋藻的与固碳作用相关的后差异显著性蛋白

Tabel 6 Differentially expressed proteins related to carbon sequestration of *S. platensis* under high-temperature stress

类别	序号	覆盖率/%	库编码	名称	比率	P值
碳代谢过程	1	73.9	K1WP64	D-果糖1,6-二磷酸酶2类	0.2168	0.0000000
	2	71.4	K1WIE0	核糖二磷酸羧化酶大链	0.2535	0.0000000
	3	73.6	K1WBA0	磷酸烯醇式丙酮酸合酶	0.5012	0.0012908
	4	74.6	K1WET8	磷酸核酮糖激酶	0.5445	0.0047023
	5	50.8	K1VR37	苹果酸脱氢酶	0.5445	0.0047023
	6	45.1	K1W7P1	丙酮酸属氧化还原酶	0.5495	0.0053761
	7	81.4	K1W168	甘油醛-3-磷酸脱氢酶I型	0.6081	0.0211601
	8	54.8	K1X635	丙酮酸脱氢酶(乙酰转移)E1成分	0.6138	0.0237555
	9	52.8	K1VS16	生物素羧基载体蛋白	1.5560	0.0331304
	10	57.2	K1W1I4	乌头酸水合酶2	1.6749	0.0132095
	11	36.5	B5W4Z5	2,3-二磷酸甘油酸非依赖性磷酸甘油酸变位酶	2.1878	0.0001847
	12	40.1	K1WR36	转醛醇酶	3.2509	0.0000000
原核生物的碳固定过程	13	73.9	K1WP64	D-果糖1,6-二磷酸酶2类	0.2168	0.0000000
	14	71.4	K1WIE0	核糖二磷酸羧化酶大链	0.2535	0.0000000
	15	74.6	K1WET8	磷酸核糖激酶	0.5445	0.0047023
	16	50.8	K1VR37	苹果酸脱氢酶	0.5445	0.0047023
	17	69.7	H1WMK8	转酮酶1, 硫胺素结合	0.6081	0.0211601
	18	81.4	K1W168	甘油醛-3-磷酸脱氢酶I型	0.6081	0.0211601
	19	69.5	K1VYQ4	磷酸甘油酸激酶	2.8314	0.0000007

量供应密不可分的嘌呤代谢相关的蛋白全部呈现下调表达, 在氧化磷酸化和糖酵解这两个主要产能途径中, 与ATP代谢相关的蛋白呈现上调差异性表达, 而与NADP相关的全部呈现下调差异性表

达。在碳代谢相关的19个差异性蛋白中, 有4个呈现上调差异性表达, 15个呈现下调差异性表达。与抗性直接相关的7个蛋白中, 3个呈现上调差异性表达, 4个呈现下调差异性表达。

表7 高温胁迫下螺旋藻的与氨基酸代谢及逆境相关的显著差异性蛋白
Table 7 Differentially expressed proteins associated with amino acid metabolism and adverse situation
of *S. platensis* under high-temperature stress

序号	覆盖率/%	库编码	名称	比率	P值
1	21.4	K1WER7	二氨基庚二酸脱羧酶	0.3767	0.0000050
2	40.0	H1WMJ7	乙酰乳酸合成酶	0.4742	0.0005023
3	65.3	H1W8H5	谷氨酰胺合成酶	0.5297	0.0031077
4	51.0	K1WAB9	S-腺苷甲硫氨酸合成酶	0.6138	0.0237555
5	34.1	K1VZ82	色氨酸合成酶 α 亚基	1.5417	0.0368954
6	70.3	K1W106	乙酰乳酸合酶III小亚基	1.8197	0.0041118
7	49.3	B5VWF1	5-甲基四氢丙酰基三聚谷氨酸-高半胱氨酸甲基转移酶	1.9409	0.0015045
8	69.5	K1VYQ4	磷酸甘油酸激酶	2.8314	0.0000007
9	65.3	H1W8H5	谷氨酰胺合成酶	0.5297	0.0031077
10	41.8	K1W520	谷氨酸合酶	0.6081	0.0211601
11	75.8	K1WIZ2	短链脱氢酶/还原酶SDR	1.7701	0.0061624
12	23.1	K1WNQ7	FAD连接氧化酶结构域蛋白	2.4889	0.0000138
13	65.3	H1W8H5	谷氨酰胺合成酶	0.5297	0.0031077
14	26.2	K1W2A4	尿素酶 α 亚基	0.5754	0.0102845
15	29.0	K6DJV1	尿素酶 γ 亚基	1.8707	0.0027004

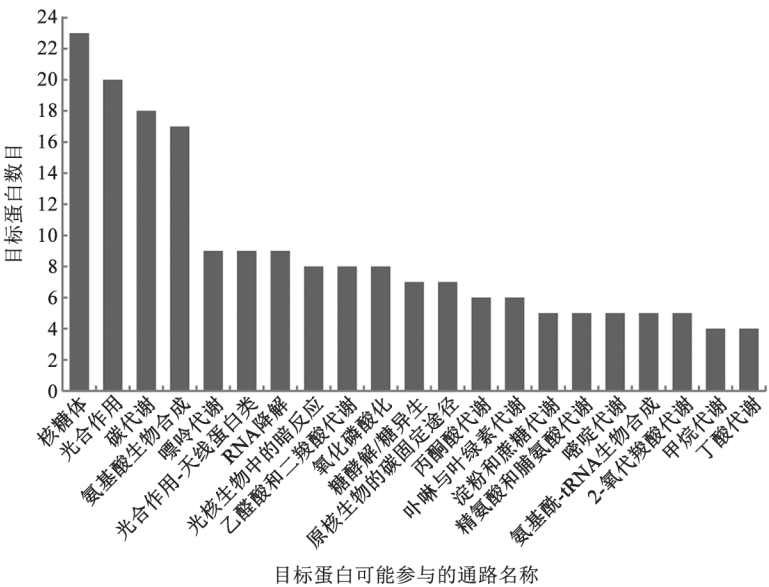


图4 在高温胁迫下螺旋藻的差异表达蛋白质的功能分类
Fig.4 Functional classification of differentially expressed proteins in *S. platensis* under high-temperature stress

3 讨论

3.1 光合作用相关的蛋白质

3.1.1 光反应阶段

光反应主要通过4个蛋白复合物(PSII、细胞色素b6f复合体(cytochrome b6f, Cyt b6f)、PSI和ATP合成酶)进行。在光能第一阶段时,光能以能量载体ATP和NADPH的形式转化为化学能。在本

研究中,光反应所需的16种蛋白质呈现差异性上调表达,14种呈现差异性下调表达。

PSII是一种多聚体蛋白质复合物,含有20个亚基。这种类囊体膜定位的复合物用于被捕获的光子激发的电子来氧化水分子。结果发现,与PSII相关的蛋白质不但呈现差异性上调表达,且上调表达量在2倍以上,其中主要包括psbV和PsbU蛋白的两种变体,而这些蛋白质是OEC的组成成分。研

究表明, PsbV蛋白在氧释放恢复系统中具有热稳定性的能力, PsbU蛋白则是作为参与氧气进化热稳定性的另一个重要因素, psbU基因的靶向诱变失活将导致热适应缺陷并降低OEC热稳定性(Nishiyama 1997; Dillon和Dorman 2010), 因此, PsbU和PsbV蛋白的上调表达是提高螺旋藻中OEC耐热性的基础机制。另外, 我们还观察到在PSII中具有捕获光子能力的 PSII CP47反应中心蛋白(photosystem II CP47 reaction center protein, CP47)和PSII CP43反应中心蛋白(photosystem II CP43 reaction center protein, CP43)减少了, CP43和CP47是将激发能量转移到反应中心的含叶绿素的蛋白质(Nishiyama等1997; Kargul等2012), CP43和CP47的降低证明这种能量转运的功能受到了高温损伤。已知螺旋藻在热应激条件下会不断地刺激PSII, 从而使得能量转移受到抑制, 但这种抑制作用并未发生在PSI中(Wen等2005), 为弥补高温胁迫给PSII带来的能量传递的抑制, 别藻蓝蛋白 α 链(Allophycocyanin α chain, ApcA)作为PSII的光子捕获蛋白同样进行了应激性调整, 即增加了2倍以上用于更高效的捕获光能。与此同时, 具有捕获光能及促进光能传递的相关蛋白叶绿体细胞色素C6 (cytochrome c6, chloroplastic, petJ)作为膜结合Cyt b6f和PSI在氧合光合作用中的电子载体, 在高温胁迫下, 同样呈现大幅度的上调表达, 而这些蛋白质的上调表达, 将大大提高了PSII捕获光能的活性以用于平衡能量传递过程中受到的损伤。与PSII不同, PSI只检测到一个关键蛋白呈显著性差异表达, 即PSI反应中心子单元III, 属于一种质体蓝素停靠蛋白, 其主要功能是负责传递电子, 它是P700的电子供体。PSI反应中心子单元III的上调表达表明, PSII受到高温胁迫时, 抑制了电子的正常传递, 所以不得不加强PSI电子供给以确保PSII和PSI之间的电子正常传递。

在能量传递方面, V型ATP合成酶 α 亚基(v-type ATP synthase α chain, AtpA)在高温胁迫下降低了一半以上, AtpA是F1的组成部分, 并且通过ATP合成酶参与由ADP和无机磷酸酯的ATP合成, 该蛋白质的显著降低对ATP的合成造成了较大的影响。但是, 在细胞的氧化磷酸化中, ATP酶反而全部呈现上调表达, 而这种F型ATP酶由两个结构域

组成, 含有外膜催化核心的F1和含有膜质子通道的F0, 它们通过中心茎和外周茎连接在一起。在催化过程中, F1通过中心亚基的旋转机制与质子转位相结合, 催化结构域中的ATP合成, 而这部分产生的ATP都可以用于光合作用的光反应中光子吸收所需要的能量。

综上所述, 在整个光反应过程中, 高温胁迫对PSII中的电子和能量传递造成了损伤。但是, 却通过提高PSII和PSI的光子捕获以及促进PSII和PSI之间的电子传递来平衡上述损伤对光反应造成的影响, 并且通过细胞的氧化磷酸化提供捕获光子所需要的能量作为补偿, 进而维持光反应的正常进行。

3.1.2 暗反应阶段

核酮糖二磷酸羧化酶(ribulose diphosphate carboxylase, RuBisCO)从空气中捕获CO₂并通过由PSI生成的NADPH进行暗反应而释放三碳糖的关键酶。研究表明, 在蓝藻中, RuBisCO被包围在称为羧基体的蛋白质微型化合物中, 是CO₂浓缩机理的一部分(Hope 2000)。RuBisCO由两个亚基组成, 大亚基RbcL和小亚基RbcS, 并以L8S8的复合形式存在, 结果中RbcL在高温胁迫下降低75%以为蛋白质合成提供氨基酸。D-葡萄糖1,6-二磷酸酶2类(D-fructose 1,6-bisphosphatase class 2, FBPase-2)是卡尔文循环所必需的酶, 在高温下降低近80%。因此, RuBisCO和FBPase-2这两种关键酶大幅度降低将直接影响暗反应的进程, 进而影响营养物质的累积, 从而导致螺旋藻生物量的降低。

综上所述, 高温胁迫并未直接对光合作用中的光反应造成伤害, 而是对暗反应的积累过程造成了显著的影响, 结合螺旋藻的生长状况的变化, 受到高温胁迫后, 螺旋藻的生长受到了明显的抑制。所以, 高温胁迫并未直接对光合作用中的光反应造成影响, 而是通过影响暗反应进行进而影响光反应, 从而使得整个光合作用受到抑制。

3.2 有关遗传信息保护的双重响应机制

3.2.1 第一重响应机制

RNA是以DNA的一条链为模板, 以碱基互补配对原则, 转录形成的一条单链, 是遗传信息传递过程中的桥梁。核糖体由两个大小亚基组成, 其主要的成分是相互缠绕的RNA在细胞中负责完成

“中心法则”，由RNA到蛋白质，该过程称之为翻译。在进行翻译前，核糖体小亚基会先与转录得到的mRNA结合，再结合核糖体大亚基构成完整的核糖体后，最后利用tRNA运送的氨基酸分子合成多肽。当核糖体完成一条mRNA单链的翻译后，大小亚基会再次分离。

依据以上路径并结合本实验结果可知，当螺旋藻处于40℃高温胁迫下，大亚基对温度的敏感性强于小亚基。由于核糖体的小亚基并未显著受高温影响，并且与mRNA的结合也并未受到阻碍，因此，其细胞内获取初始遗传信息并未受到显著性的损伤，仍旧可正常获取遗传信息。核糖体小亚基结合的mRNA需与其大亚基进一步结合才可以形成完整的核糖体，但核糖体大亚基很大程度上受到了高温胁迫的伤害，这也使得机体细胞内形成完整的核糖体这一过程受阻，进而直接影响多肽乃至蛋白质的合成。虽然核糖体大亚基受到了高温胁迫的影响，但是仍有2个蛋白呈现了显著上调表达，分别是RpoB和RpoC，这两个皆是RNA聚合酶的功能性亚基，RpoB和RpoC的显著性上调表达，促进DNA转录合成mRNA。另外，核糖核酸酶E(ribonuclease E, RNE)，维生素B12依赖性核糖核苷-二磷酸还原酶(vitamin B12-dependent ribonucleoside-diphosphate reductase, RNR)，核糖核酸酶J(ribonuclease J, RNJ)和多磷酸激酶(polyphosphate kinase, PPK)呈现的显著性下调表达，抑制了mRNA的降解。因此，对于mRNA，一方面促进合成，另一方面抑制降解，以促进完整核糖体的形成，从而保证多肽与蛋白质的合成。

其次，在核糖体大亚基呈现显著下调表达的差异性蛋白质中，L3、L4、L23、S19、S3、L19都属于延伸因子EF-Tu，EF-Tu可以与GTP结合连接一个氨酰形成三复合体，EF-Tu的降低直接阻碍了多肽链的延长。EF-Ts可以为 β （催化）亚基提供稳定的支架，有助于分离模板DNA的双链并促进生成RNA，这类蛋白质的显著性降低，同样阻碍了多肽链的延长。与此同时，在核糖体小亚基上唯一呈现显著性下调表达的信号识别粒子蛋白(signal recognition particle protein, Ffh)、信号识别粒子受体FtsY (signal recognition particle receptor FtsY, FtsY)、Ffh-FtsY复合物的构象及其GTP酶(guanosine triphos-

phatase, GTPase)活性的调节受4.5S RNA的调控。Ffh-FtsY复合物的形成导致两种GTPase相互刺激，作为一个由信号识别粒子(signal recognition particle, SRP)和核糖体新生链(sibosome-nascent chain complex, RNC)形成的复合物受体参与新生膜蛋白进入细胞质膜的靶向和插入。SRP-RNC的相互作用导致RNC复合体转移到Sec转移酶以便插入膜中，通过Ffh和FtsY水解GTP，并将SRP-FtsY复合物解离成单个组分。所以，Ffh-FtsY的大幅度下降，使得蛋白质信号识别受阻。另外，还有一类显著性下调表达的蛋白SecY (protein translocase subunit SecY, SecY)，Sec蛋白转移酶复合物由SecY, SecE (protein translocase subunit SecE, SecE)和SecG (protein translocase subunit SecG, SecG)子单元组成，Sec蛋白转移酶能够转移蛋白质形成低聚物，与核糖体、SecDF-YajC和膜蛋白插入酶YidC (membrane protein insertase YidC)相互作用。在核糖体对接期间，SecY可能与23S rRNA和核糖体蛋白L23接触。SecY与SecA的相互作用可能需要低聚物，单一的SecY分子能够形成易位的孔，完成由A-P的移位后，释放tRNA。即当上述过程无法顺利完成时，将无法完成tRNA的释放，从而影响翻译过程，并导致蛋白质的合成受损。

综上所述，当螺旋藻受到可耐受极限的高温胁迫伤害时，螺旋藻有机体开始启动第一重机制，即促进由DNA向RNA的转录过程，生成大量携带遗传信息的mRNA，并且抑制tRNA水解，以维持螺旋藻细胞在高温胁迫下遗传信息的复制传递过程得以进行。

3.2.2 第二重响应机制

本研究中发现，可检测到的所有拟核蛋白(nucleoid-associated proteins, NAPs)都呈现显著性上调表达，拟核蛋白是存在于原核生物中一个位于无明显边界区域的环形DNA分子的不规则形区域，内含遗传物质，里面的核酸为双股螺旋形式的环状DNA，且同时具有多个相同的复制品。NAPs参与调控许多与DNA相关的过程，包括基因表达、DNA保护、重组、修复和拟核的形成与维持等(Dillon等2010)。由此可知，在本研究中这类蛋白的大幅度增加，在很大程度上直接保护了DNA，使得其在高温胁迫下得到保护和修复。另外，由前

人研究可知, NAPs除了有保护、重组、修复DNA的功能外, 还有部分功能类似于真核生物中的组蛋白。在2015年, 英国爱丁堡大学生物学院的Robin教授在Science上发表称决定遗传的不仅有DNA, 它还可能产生于细胞中的其他物质, 而组蛋白就属于这类物质。即是说, 当NAPs大量增加时, 不但保护了主要的遗传信息DNA, 同时其本身也作为携带遗传信息的物质被大量合成。所以, 组蛋白受到不同环境的刺激作用时, 可以通过修饰使得在DNA序列不发生改变时, 诱导基因表达发生变化, 而其磷酸化得到的一些酶类可以促进HSP的合成。综上所述, NAPs的大量合成, 使得螺旋藻细胞内的遗传信息物质得到了保护, 而此过程可认为是螺旋藻在对高温胁迫响应的第二重机制。

通过以上分析最终得出以下结论: 螺旋藻在40°C的高温胁迫下时, 一方面促进mRNA的转录合成, 抑制tRNA的水解以保证遗传信息的顺利传递; 另一方面, 大量合成拟核蛋白用于保护并修复主要遗传物质DNA, 使其免受高温伤害。我们也将响应机制称之为螺旋藻应对高温胁迫响应的双重机制。

本研究首次发现的高温胁迫下的双重应对机制, 开辟了高温胁迫研究的新视角, 为后人研究植物高温胁迫机制提供重要依据。

参考文献(References)

- Deshnium P, Paithoonrangasrid K, Suphatrakul A, et al (2000). Temperature-independent and-dependent expression of desaturase genes in filamentous cyanobacterium *Spirulina platensis* strain C1 (*Arthrospira* sp. PCC 9438). *FEMS Microbiol Lett*, 184 (2): 207–213
- Dillon SC, Dorman CJ (2010). Bacterial nucleoid-associated proteins, nucleoid structure and gene expression. *Nat Rev Microbiol*, 8 (3): 185–195
- Durham UK (2002). Proteomic study of the soluble proteins from the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC6803 using automated matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight peptide mass fingerprinting. *Proteomics*, 2: 1735–1742
- Hongsthong A, Sirijuntarut M, Yutthanasirikul R, et al (2009). Subcellular proteomic characterization of the high-temperature stress response of the cyanobacterium *Spirulina platensis*. *Proteome Sci*, 7 (1): 33
- Hope AB (2000). Electron transfers amongst cytochrome f, plastocyanin and photosystem I: kinetics and mechanisms. *Biochim Biophys Acta*, 1456 (1): 5–26
- Kargul J, Janna Olmos JD, Krupnik T (2012). Structure and function of photosystem I and its application in biomimetic solar-to-fuel systems. *J Plant Physiol*, 169 (16): 1639–1653
- Kurdrud P, Phuengcharoen P, Cheevadhanarak S, et al (2010). Identification of a heat shock-responsive cis-acting DNA sequence and its transcriptional regulator: Their roles in the expression of the *Spirulina-desD* gene in response to heat stress. *J Biosci Bioeng*, 109 (3): 205–210
- Kurdrud P, Senachak J, Sirijuntarut M, et al (2011). Comparative analysis of the *Spirulina platensis* subcellular proteome in response to low- and high-temperature stresses: uncovering cross-talk of signaling components. *Proteome Sci*, 9 (1): 39–55
- Los DA, Suzuki I, Zinchenko VV, et al (2008). Stress responses in *Synechocystis*: regulated genes and regulatory systems. In: Herrero A, Flores FG (eds). *The Cyanobacteria: Molecular Biology, Genomics and Evolution*. Norfolk: Caister Academic Press, 117–157
- Nishiyama Y, Hayashi H, Watanabe T, et al (1994). Photosynthetic oxygen evolution is stabilized by cytochrome c550 against heat inactivation in *Synechococcus* sp. PCC7002. *Plant Physiol*, 105 (4): 1313–1319
- Nishiyama Y, Los DA, Hayashi H, et al (1997). Thermal protection of the oxygen-evolving machinery by PsbU, an extrinsic protein of photosystem II, in *Synechococcus* species PCC 7002. *Plant Physiol*, 115 (4): 1473–1480
- Nishiyama Y, Los DA, Murata N (1999). PsbU, a protein associated with photosystem II, is required for the acquisition of cellular thermotolerance in *Synechococcus* species PCC 7002. *Plant Physiol*, 120 (1): 301–308
- Rajaram H, Chaurasia AK, Apte SK (2014). Cyanobacterial heat shock response: role and regulation of molecular Chaperones. *Microbiology*, 160: 647–658
- Ross PL, Huang YN, Marchese JN, et al (2004). Multiplexed protein quantitation in *Saccharomyces cerevisiae* using amine-reactive isobaric tagging reagents. *Mol Cell Proteomics*, 3 (12): 1154–1169
- Rowland JG, Simon WJ, Nishiyama Y, et al (2010). Differential proteomic analysis using iTRAQ reveals changes in thylakoids associated with Photosystem II-acquired thermotolerance in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Proteomics*, 10 (10): 1917–1929
- Slabas AR, Suzuki I, Murata N, et al (2006). Proteomic analysis of the heat shock response in *Synechocystis* PCC6803 and a thermally tolerant knockout strain lacking the histidine kinase 34 gene. *Proteomics*, 6 (3): 845–864
- Suzuki I, Kanasaki Y, Hayashi H, et al (2005). The histidine kinase Hik34 is involved in thermotolerance by regulating the expression of heat shock genes in *Synechocystis*. *Plant Physiol*, 138 (3): 1409–1421

- Suzuki I, Simon WJ, Slabas AR (2006). The heat shock response of *Synechocystis* sp. PCC 6803 analysed by transcriptomics and proteomics. *J Exp Bot*, 57 (7): 1573–1578
- Torzillo G, Sacchi A, Materassi R (1991). Temperature as an important factor affecting productivity and night biomass loss in *Spirulina platensis*, grown outdoors in tubular photobioreactors. *Biores Technol*, 38 (2-3): 95–100
- Wang H, Zhao X, Lin M, et al (2013). Proteomic analysis and qrt-pcr verification of temperature response to *Arthrospira* (*Spirulina*) *platensis*. *PLoS ONE*, 8 (12): e83485
- Wen X, Gong H, Lu C (2005). Heat stress induces an inhibition of excitation energy transfer from phycobilisomes to photosystem II but not to photosystem I in a cyanobacterium *Spirulina platensis*. *Plant Physiol Biochem*, 43: 389–395
- Whitton BA, Potts M (2000). *The Ecology of Cyanobacteria: Their Diversity in Time and Space*. Boston: Kluwer Academic
- Xie XZ, Wang X, Liu LH, et al (2011). iTRAQ technology and its application in proteomics. *Chin J Biochem Mol Biol*, 27 (7): 616–621 (in Chinese with English abstract) [谢秀枝, 王欣, 刘丽华等(2011). iTRAQ技术及其在蛋白质组学中的应用. *中国生物化学与分子生物学报*, 27 (7): 616–621]
- Yang XW, Li BS, Wang ZZ, et al (2006). Effect of temperature on the growth and protein content of three kinds of *Spirulina* (*Arthrospira*). *J Inner Mongolia Agric Univ (Nat Sci Edn)*, 27 (2): 60–64 (in Chinese with English abstract) [杨学文, 李博生, 王志忠等(2006). 温度对3种产业化螺旋藻生长及蛋白质含量影响的研究. *内蒙古农业大学学报(自然科学版)*, 27 (2): 60–64]

Study on the response mechanism of *Spirulina platensis* to high temperature stress based on proteomics

LÜ Bing-Xin[#], CHANG Rong[#], LI Bo-Sheng^{*}

Beijing Forestry University, Department of Food Science and Engineering, College of Biological Sciences and Technology, Beijing Key Laboratory of Forest Food Processing and Safety, Institute of Spirulina, Beijing 100083, China

Abstract: In this experiment, *Spirulina* was used as a material to quantitatively analyze whole proteins of *Spirulina* cells under high temperature stress by iTRAQ. The results showed that 40°C was the maximum tolerable stress of *Spirulina*, and the response mechanism was initiated under this stress condition. The screening results for differentially expressed proteins identified 18 523 unique peptides and 2 085 proteins. Besides, 142 unique proteins were annotated in the UniProtKB/Swiss-Prot database. In the GO functional annotation, a total of 207 protein sequences were annotated with 793 GO functional entries, with an average GO level of 6.545. In the KEGG pathway annotation, 117 annotated proteins with significantly different expressions were detected and involved in photosynthesis, energy metabolism, RNA transcription and translation, and other aspects. The results of RT-qPCR showed that the sequencing results were consistent with the iTRAQ experiment. Photosystem I P700 chlorophyll a apoprotein A1, D-fructose 1,6-bisphosphatase, Ribulose bisphosphate carboxylase large chain, Photosystem I reaction center subunit XI were down-regulated; PpiC-type peptidyl-prolyl *cis-trans* isomerase, Heat shock protein Hsp70, Heat shock protein 90, Phosphoglycerate kinase, Nucleoside diphosphate kinase were up-regulated. Therefore, it is known that the proteins associated with photosynthesis and genetic information were the key factors affecting the heat stress of *Spirulina*.

Key words: *Spirulina*; heat stress; proteomics; double mechanism; photosynthesis

Accepted 2018-04-13

This work was supported by the State Forestry Administration Key Projects (2017-01).

[#]Co-first authors.

^{*}Corresponding author (libosheng1119@163.com).