

· 专题论坛 ·

核糖体图谱技术在植物学研究中的应用

王豫颖, 王威浩*

中国科学院植物研究所, 中国科学院北方资源植物重点实验室, 北京 100093

摘要 随着高通量测序技术的持续发展和进步, 开发出很多新颖的测序技术, 为诸多悬而未决的生物学难题提供了解决方案。其中, 核糖体图谱技术能够在全基因组水平和单核苷酸分辨率上监控细胞内的翻译事件, 填补了转录组学和蛋白质组学研究之间的空隙。核糖体图谱技术不仅能够鉴定处于翻译状态的RNA分子, 还能够精确定位RNA分子上正在翻译的核苷酸, 进而准确描绘RNA分子上的开放阅读框。此外, 结合转录组测序数据, 核糖体图谱技术还可以确定每个转录本上的核糖体数量, 从而计算每个转录本的翻译效率。目前, 核糖体图谱技术已成功应用于动物、植物和微生物等研究领域, 加深了人们对翻译调控机制的认识。然而, 由于植物细胞和组织特性, 核糖体图谱技术在植物学研究中的应用仍然存在局限。该文综述了核糖体图谱技术的实验原理, 以及在植物学研究中的相关进展。

关键词 核糖体图谱, 翻译调控, 上游开放阅读框

王豫颖, 王威浩 (2022). 核糖体图谱技术在植物学研究中的应用. 植物学报 57, 673–683.

基因表达的调控包括转录、转录后、翻译和翻译后调控4个基本层面。相比而言, 对翻译调控的研究远远滞后于其它3种调控方式。翻译是核糖体将信使RNA (messenger RNA, mRNA) 中的遗传信息编译成肽链的过程。在翻译过程中, 核糖体结合在mRNA分子上, 将特定的核苷酸序列转换为氨基酸序列, 合成蛋白质。

广义的翻译组学研究对象包括参与翻译过程的所有元件, 而狭义的翻译组学研究对象则特指正在翻译的mRNA。多年来, 依托高通量的基因芯片和二代测序(next-generation sequencing, NGS)技术, 翻译组学技术已取得了快速发展和应用。例如, 多核糖体图谱(polysome profiling)、全长翻译mRNA图谱(full-length translating mRNA profiling/ribosome nascent-chain complex sequencing, RNC-seq)及翻译核糖体亲和纯化(translating ribosome affinity purification, TRAP-seq) (赵晶和张弓, 2017; Zhao et al., 2019)。然而, 这些技术仅能鉴定处于翻译状态的mRNA, 无法提供更高的分辨率, 导致我们始终无法从细胞内的翻译事件中获得更多信息。Ingolia等

(2009)以酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)为研究对象, 开发了一种在单核苷酸分辨率上监控细胞内翻译事件的高通量测序技术, 即核糖体图谱(ribosome profiling), 亦称核糖体印迹(ribosome footprint)或者Ribo-seq。该技术的原理是, 在翻译过程中, 核糖体结合在mRNA上滑行, 并始终覆盖约30个核苷酸(nucleotide, nt)的mRNA片段。当使用翻译抑制剂(如放线菌酮)处理细胞时, 核糖体移动发生停滞, 此时加入RNA酶进行消化, 这些约30 nt的mRNA片段因被核糖体覆盖而免遭降解, 因此它们被称为核糖体保护的mRNA片段(ribosome-protected mRNA fragments, RPFs), 亦称核糖体印迹。随后, 结合二代测序技术鉴定RPFs, 每个测序印迹代表1个核糖体的位置, 核糖体印迹不但表明了正在翻译的转录本, 还标注了它所在编码序列的精确位置, 因此核糖体图谱技术的分辨率能够达到单核苷酸水平。同时, 核糖体印迹的总体密度反映了特定转录本的翻译速率, 从而可以直接定量蛋白质合成速率。此外, 核糖体图谱技术还能在全基因组范围内鉴定具有翻译调控特性的上游开放阅读框(upstream open reading

收稿日期: 2022-02-14; 接受日期: 2022-06-28

基金项目: 北京市自然科学基金(No.6212024)和国家自然科学基金(No.32172638)

* 通讯作者。E-mail: wangweihao@ibcas.ac.cn

frame, uORF)。uORF是mRNA 5'非翻译区(untranslated region, UTR)的一种翻译调控元件,通常介导对主蛋白编码区(main ORF, mORF)的翻译抑制作用(Ingolia et al., 2009)。

1 核糖体图谱技术的原理和实验策略

核糖体图谱技术由RPFs富集技术和深度测序技术相结合而成。在生理条件下,正在翻译的mRNA通常结合多个核糖体,形成多聚核糖体(polysome) (林忠平, 1984)。多聚核糖体首先经RNA酶处理以消化未被核

糖体覆盖的区域,形成单核糖体(monosome)。随后将单核糖体解离,从中纯化RPFs用于构建文库和深度测序,测序结果揭示了在特定mRNA分子上核糖体印迹的位置和数量(图1)。同时,对相同的实验样品进行转录组测序(RNA sequencing, RNA-seq),就能够准确定量每个转录本上的核糖体数量,从而计算该转录本的翻译效率。此外,核糖体印迹的精确定位也能够在全基因组水平上鉴定ORF。

通常情况下,核糖体图谱技术包括富集单核糖体、清除核糖体RNA (ribosomal RNA, rRNA)、纯化

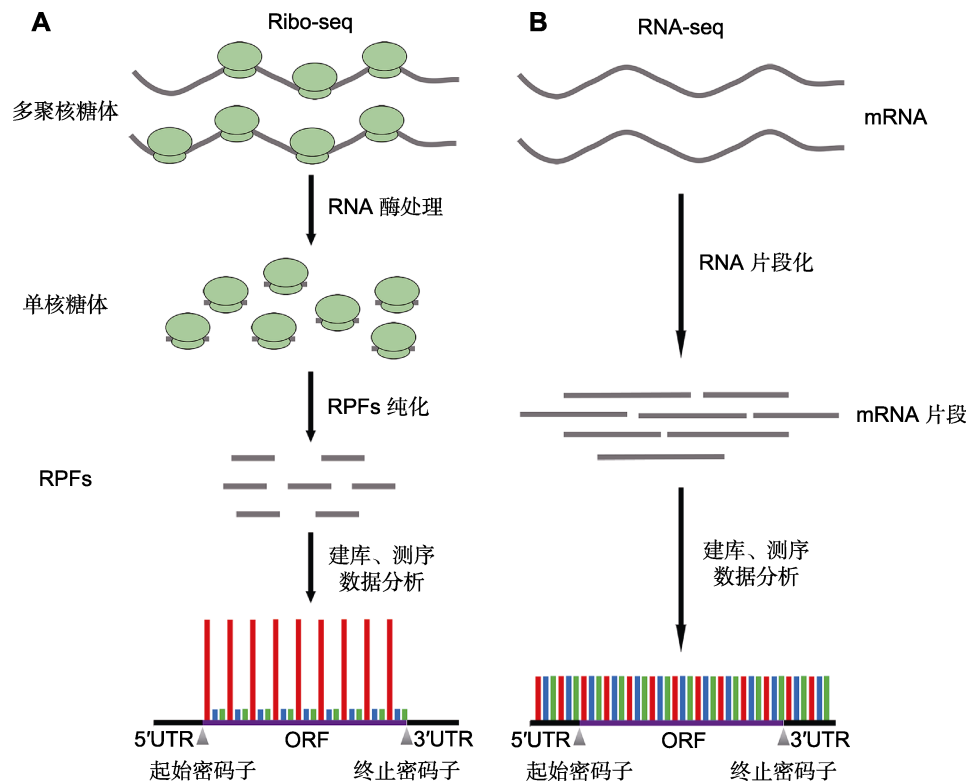


图1 核糖体图谱实验流程示意图

(A) 在核糖体图谱技术(Ribo-seq)中,多聚核糖体经RNA酶消化成单核糖体,约30 nt的受核糖体保护的mRNA片段(RPFs)未被RNA酶降解;将单核糖体解离,并从中分离和纯化RPFs用于高通量测序,仅mRNA的蛋白编码区有测序信号;(B) 搭配转录组测序(RNA-seq),可计算出每条转录本的翻译效率,在转录组测序中整个转录本上均有测序信号。5'UTR: 5'端非翻译区; 3'UTR: 3'端非翻译区; ORF: 开放阅读框

Figure 1 A schematic diagram of ribosome profiling

(A) In the experimental procedure of ribosome profiling (Ribo-seq), polysomes are degraded into monosomes by RNase, resulting in the preservation of the ~30 nucleotides of the ribosome-protected fragments (RPFs) owing to the resistance of the ribosome to the digestion. After isolation and purification from the monosomes, the RPFs are further used for high-throughput sequencing. The ribosome footprints typically show precise positioning within the coding sequence of a mRNA; (B) Ribosome profiling is usually accompanied by a parallel RNA sequencing (RNA-seq) to calculate the translation efficiency of the transcripts. RNA-seq captures mRNA fragments covering the entire transcripts. 5'UTR: 5' untranslated region; 3'UTR: 3' untranslated region; ORF: Open reading frame

RPFs、末端修复、加接头、反转录、纯化文库、上机测序及数据分析等流程。在整个流程中,除富集单核糖体外,其它实验步骤均有标准化操作方法或相关试剂盒可供参考和使用,因此,高效富集结构完整的单核糖体是核糖体图谱技术的重点和难点。

1.1 RNA酶的选择

在核糖体图谱技术中,RNA酶消化是制备RPFs的关键步骤。RNA酶消化需要满足2个条件:(1)完全降解核糖体结合位置以外的mRNA,即将多聚核糖体转化为单核糖体;(2)保持单核糖体结构的完整性。核糖体是由核糖体蛋白和rRNA组成的复合物,任何RNA酶都不可避免地消化rRNA,破坏单核糖体结构的完整性,导致在制备和纯化RPFs的过程中引入rRNA污染。核糖体图谱技术最初以酿酒酵母为研究对象完成开发,而酵母是一种理想的实验材料,其核糖体能够耐受RNA酶消化,并不会因此受到损伤而影响核糖体结构完整性。然而,不同物种的核糖体对RNA酶的耐受性并不相同。为了优化核糖体图谱实验,研究人员调研了4种常见的商业化RNA酶(RNase I、RNase S7、RNase A和RNase T1)消化大肠杆菌(*Escherichia coli*)、酿酒酵母、秀丽隐杆线虫(*Caenorhabditis elegans*)、果蝇(*Drosophila melanogaster*)和小鼠(*Mus musculus*)5种模式生物多聚核糖体的性能,发现不同物种来源的核糖体对不同RNA酶的耐受性不同(Gerashchenko and Gladyshev, 2017)。在大肠杆菌中,RNase I没有活性,但RNase S7、RNase A和RNase T1均适用于消化其多聚核糖体;在酿酒酵母中,4种RNA酶均适用于消化其多聚核糖体;线虫和果蝇的多聚核糖体仅能使用RNase T1进行消化;RNase S7和RNase T1适用于消化小鼠的多聚核糖体。值得注意的是,RNase I仅适用于消化酿酒酵母的多聚核糖体,RNase T1则在5个测试物种中均适用。目前,尽管尚未详尽调研各种RNA酶在不同植物核糖体图谱实验中的适用性,但RNase I在众多研究中始终是最可靠的选择(Lei et al., 2015; Merchante et al., 2015; Hsu et al., 2016; Wu et al., 2019, 2020; Li and Liu, 2020)。此外,不同RNA酶的切割偏好不同,如RNase I和RNase S7能够剪切4种核糖核苷酸,RNase T1仅能够剪切鸟嘌呤(G),RNase A能够剪切胞嘧啶(C)和尿嘧啶(U),但RNA酶的切割偏好对于核

糖体图谱实验结果并无负面影响(Gerashchenko and Gladyshev, 2017)。

1.2 单核糖体的制备

目前,从初始样品中制备单核糖体的方法有2种。第1种方法首先通过超速离心富集多聚核糖体,再用RNA酶消化多聚核糖体得到单核糖体(Merchante et al., 2015; Xu et al., 2017a)。第2种方法为直接消化法,即直接在裂解液中添加RNA酶,将样品裂解液中的多聚核糖体消化成单核糖体(Ingolia et al., 2012; Hsu et al., 2016; Wu et al., 2019; Xu et al., 2021)。第1种方法在步骤上略显繁琐,但能够为RNA酶的消化反应提供更稳定的环境;第2种方法因其操作简单,目前使用更为广泛。2种方法在多种植物研究中皆有报道,其效果并无明显优劣之分。然而,本实验室试图使用直接消化法从富含多糖多酚的果实样品中制备单核糖体却尚未成功,这表明RNA酶活性可能受到样品中杂质的干扰。

1.3 单核糖体的纯化

由于RNA酶的消化液中存在一些RNA碎片,因此在制备单核糖体后需要进一步纯化。常见单核糖体的纯化方法包括2种:一是通过蔗糖密度梯度离心纯化单核糖体(Ingolia et al., 2009, 2012; Merchante et al., 2015; Xu et al., 2017a);二是利用MicroSpin S-400 HR (Cytiva)层析柱纯化单核糖体(Hsu et al., 2016; Wu et al., 2019; Xu et al., 2021)。MicroSpin S-400 HR层析柱原本用于从游离的引物(<32 mer)中快速纯化PCR产物(>200 bp),其工作原理同样适用于纯化单核糖体。当RNA酶的消化液流经该层析柱时,RNA碎片被层析柱吸附,而完整的单核糖体则经层析柱直接流出。第2种纯化方法最早见于Illumina公司为核糖体图谱实验开发的试剂盒(ARTseq/TruSeq Ribo Profile Kit),该试剂盒说明书表明,使用RNA酶直接消化法配合MicroSpin S-400 HR层析柱纯化单核糖体,可以摆脱超速离心机的限制,且其纯化RPFs的效果与密度梯度离心法相当。目前该款Illumina的试剂盒已停产,但仍然可以单独购买MicroSpin S-400 HR层析柱。

2 核糖体图谱技术在植物中的研究进展

核糖体图谱技术自问世以来,以其在翻译调控研究中

的巨大优势而在世界范围内备受科研人员关注,并迅速应用于植物学研究。目前,核糖体图谱技术已成功应用于拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)、番茄(*Solanum lycopersicum*)、玉米(*Zea mays*)和水稻(*Oryza sativa*)等植物(Lei et al., 2015; Merchante et al., 2015; Hsu et al., 2016; Xu et al., 2017a, 2021; Wu et al., 2019; Li and Liu, 2020)。

2.1 植物发育

Liu等(2013)解析了拟南芥幼苗在黑暗和光照条件下的核糖体图谱,揭示了拟南芥幼苗光形态建成过程中翻译调控的分子基础,证明基因表达的翻译调控是拟南芥幼苗光形态建成的一个基本层面。研究发现,光照能够增强参与叶绿体结构和功能相关基因的翻译。光照还改变了一些基因的翻译起始位点,通过调节蛋白质的信号肽来改变功能蛋白的亚细胞定位。根据核糖体图谱数据,该研究鉴定到数千个“ATG”起始的uORF和“CTG”起始的uORF。“ATG”起始的uORF能够介导下游mORF的翻译抑制,而“CTG”起始的uORF则无类似功能。

光照还能通过改变基因的转录起始位点参与翻译调控。Kurihara等(2018)用蓝光照射拟南芥幼苗后,发现很多基因的转录起始位点发生改变,部分新转录本的5'UTR中不再包含uORF序列,因此避免了uORF对mORF的翻译抑制;此外,蓝光照射本身也上调了众多基因的转录水平。这两种作用机制在转录和翻译水平上保证了光调控基因的高水平表达(Kurihara et al., 2018)。Kurihara等(2020)最近的研究还发现,非编码RNA(non-coding RNA, ncRNA)上存在能够翻译成小肽的小开放阅读框(small ORF, sORF),且其翻译效率也受蓝光调控。

2018年,研究人员对大豆(*Glycine max*)种子不同发育阶段的子叶进行核糖体图谱分析,发现子叶发育受到较严格的翻译调控。19个高丰度种子贮藏蛋白编码基因的转录水平在中熟期最高,但其翻译效率则在晚熟期达到最高点。216个基因的翻译效率在至少1个发育阶段显著升高,其中12个丝氨酸/半胱氨酸蛋白酶编码基因、16个2S清蛋白和富含半胱氨酸的低分子量蛋白编码基因在早熟期翻译效率较高,这些蛋白在种子发育早期起关键作用。同时,还有370个基因的翻译效率在至少1个发育阶段显著降低,包括48

个核糖体蛋白基因、95个与叶绿体和线粒体功能相关的基因,这些基因的表达主要受翻译水平的调控(Shamimuzzaman and Vodkin, 2018)。

Wu等(2020)通过转录组学、核糖体图谱、蛋白质组学和代谢组学等多组学联合分析,系统研究了茶树(*Camellia sinensis*)新芽发育过程中次生代谢的调控机制。结果表明,类黄酮作为茶叶中标志性的次生代谢物,其生物合成相关基因的表达较少受到翻译水平的调控,可能与这些基因内部uORF等翻译调控元件数量较少有关。然而,在茶树新芽发育过程中仍然鉴定到很多表达的sORF,它们多出现在mRNA的5'UTR和3'UTR,以及长链非编码RNA中,可能参与其它次生代谢过程。

2.2 植物激素

乙烯是一种小分子化合物,作为目前已知结构最简单的植物激素,在植物生长发育和胁迫应答中发挥重要作用(Zhao et al., 2021)。目前,对乙烯的生物合成及信号转导途径已有较为系统的认识,且对其转录、转录后和翻译后水平所受调控均有深入的研究,但唯独对翻译水平的调控缺少相应的认知。Merchante等(2015)用乙烯处理拟南芥后,利用核糖体图谱技术解析了乙烯响应基因表达的翻译调控机制。乙烯处理影响众多基因的转录和翻译,然而转录和翻译的相关性不高。乙烯信号通路的关键因子——EBF2,在没有乙烯存在的情况下,负责降解转录因子EIN3,阻断乙烯信号传递,是乙烯信号通路的负调控蛋白。EBF2的转录水平受乙烯诱导(Konishi and Yanagisawa, 2008),而蛋白水平却受乙烯抑制(Guo and Ecker, 2003),从mRNA到蛋白质之间的调控机制仍不清楚。转录组数据和核糖体图谱数据显示,乙烯处理后EBF2的转录水平升高了1.5倍,而翻译效率却降低了60%以上。因此,EBF2翻译效率的下降正是其蛋白水平下降的主要原因。进一步研究还发现,EBF2的3'UTR介导乙烯诱导的翻译抑制,且该翻译抑制依赖于EIN2蛋白的C端(EIN2C)。在乙烯存在的情况下,内质网膜蛋白EIN2被蛋白酶剪切,释放出游离的EIN2C,一部分EIN2C直接进入细胞核,向下游传递乙烯信号;另一部分EIN2C在细胞质中能够与EBF2的3'UTR结合,抑制EBF2的翻译,进一步解除EBF2对乙烯信号通路的阻断。此外,乙烯处理也显著抑制EBF1的翻译效

率。在*EBF1*和*EBF2*的3'UTR中存在一段多次重复的保守结构域,该结构域也出现在其它翻译水平受乙烯调控基因的3'UTR中,暗示该结构域可能是EIN2C介导的翻译调控元件。

2.3 非生物逆境

干旱是最常见的自然灾害之一,对农作物的危害尤为严重。Lei等(2015)通过核糖体图谱分析发现,在干旱胁迫下玉米众多基因的转录和翻译发生了显著改变,但转录和翻译水平的变化并不一致,表明干旱胁迫介导的转录和翻译应答相对独立。干旱胁迫诱导近千个基因的翻译效率发生显著变化,基因5'UTR、CDS和3'UTR的长度、GC含量和归一化最小自由能(normalized minimal free energy, NMFE)等序列特征均显著影响其翻译效率。研究还发现,从正常生长状态下的玉米中鉴定到2 558个基因上有3 063个表达的uORF,总体上uORF抑制其对应mORF的翻译,且mRNA分子上uORF的数量越多,对mORF的翻译抑制效果越明显;而在干旱胁迫条件下,uORF本身的翻译效率显著升高。

洪涝灾害也是主要的自然灾害之一。Xiong等(2020)揭示了干旱-洪涝交替条件下施氮对水稻产量恢复的翻译调控机制。转录组测序和核糖体图谱研究结果表明,施氮显著影响682个基因的转录水平和845个基因的翻译水平,其中仅有约10%的响应基因在转录和翻译水平的变化一致,这表明基因表达在转录和翻译2个层面共同调控施氮对水稻产量的恢复。在旱涝交替后,无论施氮与否,基因的转录水平与其翻译效率呈负相关,即转录水平越高,翻译效率越低;但施氮可以使uORF的翻译效率下降,减弱其对mORF的翻译抑制作用,从而促进mORF的翻译。

高温胁迫是农业生产的巨大威胁。Lukoszek等(2016)通过核糖体图谱技术和转录组测序构建了拟南芥在持续高温胁迫下的基因表达变化网络,发现胁迫响应基因在转录和翻译水平的表达变化基本一致。Poidevin等(2021)解析了高温胁迫下花粉萌发过程的转录组和翻译组,发现基因表达在转录和翻译水平同样表现为协同变化。值得注意的是,一些ncRNA上存在翻译信号,暗示这些ncRNA可能通过编码小肽参与植物对热胁迫的响应。虽然植物的高温应答主要依靠转录调控,但在热适应过程中,叶绿体编码的蛋白

具有特异的翻译调控机制(Trösch et al., 2022)。

翻译调控在拟南芥幼苗低氧胁迫应答中起重要作用(Juntawong et al., 2014)。研究发现,低氧处理能够减少细胞内约50%的多聚核糖体,同时单核糖体和核糖体亚基的含量有所增加。低氧胁迫显著减少了核糖体在起始密码子附近出现的频率,这表明低氧胁迫主要抑制翻译的起始过程。核糖体图谱数据还显示,低氧胁迫改变了mRNA翻译效率、uORF对mORF的翻译抑制作用、mRNA的可变剪接以及ncRNA的编码潜能。

耕地盐碱化对全球作物生产造成严重影响。Yang等(2021)利用核糖体图谱技术分别对盐敏感(Nipponbare, NB)和耐盐(Sea Rice 86, SR86)水稻品种进行了系统分析,发现翻译重编程是水稻盐胁迫应答的重要机制。在盐胁迫状态下,基因转录和翻译水平的变化并不一致,且NB和SR86在翻译水平上响应盐胁迫的机制也不相同。相比较而言,SR86具有更多的盐胁迫响应基因受翻译水平的调控,而NB中核糖体停靠(ribosome stalling)水平更高,这可能是造成2个水稻品种在盐胁迫下翻译动力学差异的主要原因。

2.4 生物逆境

植物在自然界中时刻面临着病原菌的侵染,植物与病原菌的互作关系始终是研究热点,然而关于植物抗病反应的翻译调控机制研究却严重滞后。Xu等(2017a)利用核糖体图谱技术对病原相关分子模式触发的免疫(pathogen-associated molecular pattern-triggered immunity, PTI)进行了系统分析。研究发现,用病原相关分子模式elf18处理拟南芥后,基因表达在转录与翻译水平上的相关性较差,且翻译受到更为严密的调控。Elf18处理后,数百个基因的翻译效率发生了显著改变,翻译效率的变化与mRNA的丰度、长度和GC含量等参数相关性很小,而与mRNA的5'UTR中存在一段富含嘌呤的R-motif有关。在正常状态下,R-motif抑制基因的翻译;而elf18处理解除了R-motif的翻译抑制作用,提升了基因的翻译效率。虽然R-motif的作用方式与uORF类似,但它们对翻译的影响具有叠加性,R-motif通过与poly(A)结合蛋白互作抑制翻译,表明R-motif和uORF通过不同的机制调控翻译过程。

随后,该课题组又利用核糖体图谱技术对效应因

子触发的免疫(effector-triggered immunity, ETI)进行了系统分析(Yoo et al., 2020)。在接种携带效应因子基因*AvrRpt2*的丁香假单胞菌后,拟南芥基因转录与翻译水平的变化呈现较强的相关性,表明在ETI过程中拟南芥基因的转录和翻译调控是协同的。然而,仍然有一些基因明显受到翻译调控,这些基因参与芳香族氨基酸、苯丙烷、亚麻荠素和鞘脂等物质代谢,它们在ETI过程中发挥重要作用。该研究结果证实了代谢物相关基因表达的翻译调控是ETI的重要调控方式。

2.5 杂种优势

杂种优势表现为杂交后代在生长、产量、抗性和适应性等方面的性状优于亲本,在农业生产上常用于培育产量更高、抗性更强的作物品种(商连光等, 2017)。多年来,科学家提出了多个遗传模型尝试解释杂种优势,但迄今为止仍没有一个模型能够完全揭开杂种优势的奥秘。2021年,国内多个研究团队利用转录组、核糖体图谱和蛋白质组等多组学技术对玉米亲本B73、Mo17及其F₁杂交后代进行分析,从新的角度解析了玉米杂种优势的分子机制(Zhu et al., 2022)。转录组和翻译组(核糖体图谱)数据显示, F₁杂交后代与2个亲本间主要表现为基因加性表达模式,但翻译组中非加性表达所占的比例高于转录组。很多基因在转录组中表现为加性表达模式,但在翻译组中转换为非加性表达模式,且这种转换在*maize1*亚基因组中显著富集。此外,与2个亲本相比, F₁杂交后代的一些基因在翻译过程中改变了优势亚型,这有助于F₁杂交后代高效积累某些功能蛋白。这些优势亚型改变的基因在*maize2*亚基因组中显著富集,而优势亚型保持不变的基因则在*maize1*亚基因组中显著富集。上述结果表明,玉米亚基因组的翻译分化可能与杂种优势的形成有关(Zhu et al., 2022)。

2.6 细胞器基因表达的翻译调控

在植物细胞中,叶绿体和线粒体的基因表达调控也具有重要意义。Zoschke等(2013)利用改进后的核糖体图谱技术首次解析了玉米叶绿体基因的翻译图谱。他们从玉米叶片中富集RPFs后,不是通过深度测序鉴定RPFs,而是将这些RPFs与基因芯片(plastid OR-Feome)进行杂交,以此报告每个叶绿体mRNA的表

达丰度和翻译状态。通过这种方法检测到*atp1*、*atp4*、*ppr10*和*crp1*等突变体中叶绿体基因表达的已知缺陷,证实了该技术的准确性和灵敏性。此外,该研究也有新的发现:(1) 重叠基因*atpB/atpE*的翻译是独立的而非偶联的;(2) 对于带有内含子的叶绿体mRNA (如*atpF*), 内含子剪切并不是其翻译起始的先决条件。

叶绿体是植物进行光合作用的场所,由非光合作用的前质体发育而来。由于玉米幼叶从叶基到叶尖呈现光合分化逐渐增加的趋势,研究人员利用玉米幼叶的自然发育梯度,通过核糖体图谱和转录组测序对叶绿体4个分化阶段的基因表达进行了系统解析(Chotewutmontri and Barkan, 2016)。研究发现,从叶基部到叶尖部,叶绿体核糖体印迹逐步增加,细胞质翻译事件的占比由99%下降到57%;大多数叶绿体基因的翻译输出随叶绿体发育增加,至叶绿体成熟后下降。在叶绿体发育早期,优先翻译的mRNA (*rpl*、*rps*、*rpo*和*matK*)主要参与叶绿体的基因表达;而在成熟的叶绿体中,优先翻译的mRNA (*psb*、*psa*、*atp*和*pet*)主要参与光合作用。叶绿体基因以多顺反子结构存在,同一个转录单元内的基因,其mRNA丰度类似;不同转录单元的基因, mRNA丰度则差别较大。叶绿体内有多个蛋白复合体,组成这些蛋白复合体的亚基来自不同的转录单元,它们的mRNA水平差异较大,但通过调控翻译效率能够将同一蛋白复合体中各亚基的蛋白丰度调整至相似的水平。叶绿体mRNA在转录后存在碱基编辑现象,特定的胞嘧啶(C)被编辑成尿嘧啶(U)。RNA编辑位点的核糖体印迹表明,叶绿体的核糖体通常对编辑和未编辑的RNA无偏好性。但对于*rpl2*和*ndhA*两个基因,编辑过的mRNA优先翻译。*rpl2*起始密码子处ACG到AUG的编辑是其翻译起始的关键,虽然ACG可以被识别为起始密码子,但玉米叶绿体的核糖体并不能将未编辑的*rpl2*基因的ACG识别为起始密码子;*ndhA*的编辑位点与内含子剪切相关,未编辑的*ndhA*因存在内含子而不能正常翻译。

在自然界中,光周期和光照强度都是影响光合作用的重要因素。叶绿体光系统II D1反应中心的PsbA蛋白容易受到光损伤。在玉米幼苗光-暗转换过程中, *psbA* mRNA上的核糖体在光照后迅速增加,而在黑暗处理后1小时内显著减少,这种光响应的核糖体占位的动态变化在叶绿体基因中独一无二,揭示了在光系统II修复过程中*psbA*基因受光诱导的翻

译调控机制(Chotewutmontri and Barkan, 2018)。此外,光强的变化也会引发类似的翻译调控机制。研究发现,烟草(*Nicotiana tabacum*)幼苗从中等强度光照($350 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$)转换至高强度光照($1\,000 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$)的2天内,叶绿体基因转录和翻译水平的变化均不明显,但*psbA*亚基的翻译输出显著升高;从低强度($50 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$)转换至高强度光照后,*psbA*亚基的翻译输出也显著升高;而从高强度转换至低强度光照后,*psbA*亚基的翻译输出则显著降低。上述结果表明,叶绿体对不同强度光照的适应性依赖于*psbA*亚基的翻译调控(Schuster et al., 2020)。

在不同的光合植物中,叶绿体基因的翻译调控机制既保守,也存在差异(Trösch et al., 2018)。研究人员对衣藻(*Chlamydomonas reinhardtii*)、烟草和拟南芥叶绿体的基因表达进行了比较,发现大多数叶绿体基因的翻译输出在3种植物中较为一致,但藻类和陆生植物分别通过不同的策略实现叶绿体蛋白合成的稳态。在衣藻中,叶绿体基因的转录水平和翻译输出高度一致,说明衣藻的叶绿体基因表达以转录调控为主;而在烟草和拟南芥中,转录水平和翻译输出的相关性较低,表明它们的叶绿体基因表达以翻译调控为主。

Planchard等(2018)以拟南芥花器官为材料,通过核糖体图谱技术绘制了线粒体基因的翻译图谱。他们发现大多数拟南芥线粒体基因的核糖体印迹长度为27 nt和28 nt,这与人类(27 nt和33 nt)和酵母(38 nt)差异较大。根据核糖体图谱数据,虽然没有发现新的线粒体编码基因,但却修正了多个线粒体基因的注释,更正了*rps4*的起始密码子和*nad6*、*mttB*、*ccmC*的终止密码子的位置。与叶绿体类似,线粒体mRNA也存在C转换为U的碱基编辑现象,线粒体核糖体对这些mRNA的翻译同样不依赖其编辑状态。研究还发现,编码呼吸链复合体亚基的mRNA翻译效率远高于其它线粒体mRNA。在各呼吸链复合体中,除了ATP合成酶(复合体V)外,大多数编码亚基的翻译效率差异不显著。在复合体V中,*atp1*、*atp4*、*atp8*和*atp9*的翻译效率远高于*atp6-1*和*atp6-2*,而*atp6-1*又远高于*atp6-2*。由此可见,不同线粒体mRNA的翻译效率存在巨大差异,翻译调控是植物线粒体基因表达调控的重要环节,但我们仍然缺乏对其内在调控机制的认识。该研究为进一步理解高等植物线粒体的翻译机制奠定了基础。

2.7 翻译调控机制的保守性

对于特定的基因,uORF介导的翻译抑制在不同植物中是保守的(Zhang et al., 2018; Si et al., 2020; Xing et al., 2020)。那么对于不同物种,整体的翻译调控机制是否也具有保守性?

为了比较拟南芥和番茄2种模式植物翻译调控机制的保守性,Wu等(2019)利用核糖体图谱和转录组测序解析了番茄根尖的翻译事件。该研究鉴定到众多未注释的翻译事件,包括已知基因的1 329个uORF和未注释基因的354个sORF,进一步完善了番茄基因组的注释。uORF对其下游的mORF起翻译抑制作用,而sORF可能编码信号分子。与拟南芥中的数据(Hsu et al., 2016)相比较,除进化上保守的sORF外,茄科植物还有近百个特有的sORF。蛋白质组学分析也证实这些未注释的uORF和sORF具备合成蛋白质的能力。因此,与拟南芥相比,番茄的翻译调控特性既具有保守性,又体现出物种的特异性。

翻译是基因表达调控的关键节点,翻译起始是决定蛋白质合成的限速步骤(Jackson et al., 2010)。在哺乳动物细胞中,可变翻译起始位点(alternative translation initiation sites, ATISs)普遍存在,它们参与调控下游mORFs的翻译、合成全新的蛋白质或者不同N-端序列的蛋白变体(Ingolia et al., 2011; Lee et al., 2012)。因此,ATISs在重塑哺乳动物细胞蛋白质组中发挥重要作用。然而,关于ATISs对植物基因表达的影响还不清楚。Li和Liu(2020)对拟南芥和番茄的翻译起始位点(translation initiation sites, TISs)进行比较和分析,探讨了ATISs在植物中的生物学意义。在番茄和拟南芥中,除基因组注释的TISs外,还有数以千计的基因拥有2个或以上的TISs,新发现的TISs总数超过了已注释的TISs。在新发现的TISs中,一半以AUG为起始密码子,另一半以非AUG为起始密码子。非AUG起始密码子的使用偏好植物和哺乳动物中具有保守性,CUG和ACG的使用频率最高,而AAG和AGG的使用频率最低。随后,在对uORF的TISs进行分析时发现,以AUG为起始密码子的uORF抑制下游mORF的翻译,而以非AUG为起始密码子的uORF则无此功能,这在植物中是保守的。可见,ATISs可以通过调控翻译效率和丰富蛋白质多样性来重塑植物蛋白质组。此外,研究人员还比较了拟南芥和番茄中

具有ATISs的直系同源基因,发现少数ATISs在2个物种中是保守的,而多数ATISs并不保守。这表明可变翻译起始的机制虽然保守,但是ATISs的选择却是多变的。综上,该研究揭示了可变翻译起始机制在不同植物中既具有保守性,又有各自的特异性,在扩充植物基因组的编码潜能方面发挥重要作用。

3 研究展望

核糖体图谱技术能够在全基因组范围内监控翻译事件,其既能够用于修正已有的基因组注释,又可以鉴定新的ORF,尤其擅长鉴定翻译调控元件uORF和ncRNA上的sORF (Liang et al., 2021)。通常情况下,uORF的翻译会抑制其下游mORF的翻译,而且这种抑制作用是特异的(Zhang et al., 2019)。因此,uORF在作物性状改良中具有广阔的应用前景。

拟南芥转录因子TBF1的翻译受uORF调控,参与植株生长与抗病之间的转换。在正常生长状态下,uORF_{TBF1}进行翻译,抑制mORF_{TBF1}的翻译;而在感病状态下,uORF_{TBF1}不翻译,解除了其对mORF_{TBF1}的翻译抑制作用,实现了植物对病害的快速响应(Pajerowska-Mukhtar et al., 2012)。随后,该团队利用uORF_{TBF1}的翻译抑制功能,将其与NPR1(水杨酸信号通路中的关键抗性基因)的mORF融合,在水稻中过表达。通常情况下,基因过表达会因过度消耗资源而限制转基因植物的生长。然而,由于uORF_{TBF1}对mORF_{NPR1}存在翻译抑制作用,转基因水稻既能正常生长,又能够快速响应病害,可兼顾产量和抗性2种优势性状(Xu et al., 2017b)。2018年,高彩霞团队以生菜(*Lactuca sativa*)为研究材料,利用CRISPR/Cas9技术突变了维生素C合成关键基因GPP2的uORF,解除了uORF_{GPP2}对mORF_{GPP2}的翻译抑制作用,提高了生菜维生素C的含量,并且增强了生菜对氧化胁迫的耐受性(Zhang et al., 2018)。2020年,高彩霞团队再次利用CRISPR/Cas9技术对FvebZIPs1.1的uORF进行突变,大幅提高了草莓(*Fragaria vesca*)果实的含糖量(Xing et al., 2020)。综上,无论是通过基因过表达来利用uORF的翻译抑制功能,还是通过CRISPR/Cas9介导的突变来原位解除uORF的翻译抑制功能,uORF在作物性状改良中均具有成熟的应用条件。而核糖体图谱技术作为目前

在全基因组范围内鉴定uORF的唯一选择,将为利用uORF改良作物品质提供丰富的靶点。

尽管Ribo-seq技术有其独特的优势,但目前植物学研究中仍很难普及,除了该技术本身门槛较高外,植物组织本身的特性也是重要的限制因素。截至目前,成功的研究报道均使用相对幼嫩的叶片和根尖组织,且样品需求量也相对较大。而对于农作物和园艺作物而言,以果实、块茎等组织器官为研究材料进行Ribo-seq实验仍存在难以克服的技术障碍,目前尚无相关的研究报道。近期, VanInsberghe等(2021)在生物信息学分析流程中借助机器学习的方法,大幅提高了Ribo-seq检测的灵敏度,开发了动物细胞的单细胞Ribo-seq技术。虽然单细胞Ribo-seq尚未成功应用于植物学研究中,但该技术能在很大程度上降低对样品的要求,这对于植物学研究来说无疑是一个好消息,希望将来植物学领域的Ribo-seq研究不再受样品的制约。

参考文献

- 林忠平 (1984). 植物mRNA和多聚核糖体的分离. 植物学报 2(5), 52–54.
- 商连光, 高振宇, 钱前 (2017). 作物杂种优势遗传基础的研究进展. 植物学报 52, 10–18.
- 赵晶, 张弓 (2017). 翻译组学: 方法及应用. 生命的化学 37, 70–79.
- Chotewutmontri P, Barkan A (2016). Dynamics of chloroplast translation during chloroplast differentiation in maize. *PLoS Genet* 12, e1006106.
- Chotewutmontri P, Barkan A (2018). Multilevel effects of light on ribosome dynamics in chloroplasts program genome-wide and *psbA*-specific changes in translation. *PLoS Genet* 14, e1007555.
- Gerashchenko MV, Gladyshev VN (2017). Ribonuclease selection for ribosome profiling. *Nucleic Acids Res* 45, e6.
- Guo HW, Ecker JR (2003). Plant responses to ethylene gas are mediated by SCF^{EBF1/EBF2}-dependent proteolysis of EIN3 transcription factor. *Cell* 115, 667–677.
- Hsu PY, Calviello L, Wu HYL, Li FW, Rothfels CJ, Ohler U, Benfey PN (2016). Super-resolution ribosome profiling reveals unannotated translation events in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA* 113, E7126–E7135.
- Ingolia NT, Brar GA, Rouskin S, McGeachy AM, Weissman JS (2012). The ribosome profiling strategy for

- monitoring translation *in vivo* by deep sequencing of ribosome-protected mRNA fragments. *Nat Protoc* **7**, 1534–1550.
- Ingolia NT, Ghaemmaghami S, Newman JRS, Weissman JS** (2009). Genome-wide analysis *in vivo* of translation with nucleotide resolution using ribosome profiling. *Science* **324**, 218–223.
- Ingolia NT, Lareau LF, Weissman JS** (2011). Ribosome profiling of mouse embryonic stem cells reveals the complexity and dynamics of mammalian proteomes. *Cell* **147**, 789–802.
- Jackson RJ, Hellen CUT, Pestova TV** (2010). The mechanism of eukaryotic translation initiation and principles of its regulation. *Nat Rev Mol Cell Biol* **11**, 113–127.
- Juntawong P, Girke T, Bazin J, Bailey-Serres J** (2014). Translational dynamics revealed by genome-wide profiling of ribosome footprints in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA* **111**, E203–E212.
- Konishi M, Yanagisawa S** (2008). Two different mechanisms control ethylene sensitivity in *Arabidopsis* via the regulation of *EBF2* expression. *Plant Signal Behav* **3**, 749–751.
- Kurihara Y, Makita Y, Kawashima M, Fujita T, Iwasaki S, Matsui M** (2018). Transcripts from downstream alternative transcription start sites evade uORF-mediated inhibition of gene expression in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA* **115**, 7831–7836.
- Kurihara Y, Makita Y, Shimohira H, Fujita T, Iwasaki S, Matsui M** (2020). Translational landscape of protein-coding and non-protein-coding RNAs upon light exposure in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol* **61**, 536–545.
- Lee S, Liu BT, Lee S, Huang SX, Shen B, Qian SB** (2012). Global mapping of translation initiation sites in mammalian cells at single-nucleotide resolution. *Proc Natl Acad Sci USA* **109**, E2424–E2432.
- Lei L, Shi JP, Chen J, Zhang M, Sun SL, Xie SJ, Li XJ, Zeng B, Peng LZ, Hauck A, Zhao HM, Song WB, Fan ZF, Lai JS** (2015). Ribosome profiling reveals dynamic translational landscape in maize seedlings under drought stress. *Plant J* **84**, 1206–1218.
- Li YR, Liu MJ** (2020). Prevalence of alternative AUG and non-AUG translation initiators and their regulatory effects across plants. *Genome Res* **30**, 1418–1433.
- Liang Y, Zhu WC, Chen SJ, Qian JQ, Li L** (2021). Genome-wide identification and characterization of small peptides in maize. *Front Plant Sci* **12**, 695439.
- Liu MJ, Wu SH, Wu JF, Lin WD, Wu YC, Tsai TY, Tsai HL, Wu SH** (2013). Translational landscape of photomorphogenic *Arabidopsis*. *Plant Cell* **25**, 3699–3710.
- Lukoszek R, Feist P, Ignatova Z** (2016). Insights into the adaptive response of *Arabidopsis thaliana* to prolonged thermal stress by ribosomal profiling and RNA-seq. *BMC Plant Biol* **16**, 221.
- Merchante C, Brumos J, Yun J, Hu QW, Spencer KR, Enríquez P, Binder BM, Heber S, Stepanova AN, Alonso JM** (2015). Gene-specific translation regulation mediated by the hormone-signaling molecule EIN2. *Cell* **163**, 684–697.
- Pajerowska-Mukhtar KM, Wang W, Tada Y, Oka N, Tucker CL, Fonseca JP, Dong XN** (2012). The HSF-like transcription factor TBF1 is a major molecular switch for plant growth-to-defense transition. *Curr Biol* **22**, 103–112.
- Planchard N, Bertin P, Quadrado M, Dargel-Graffin C, Hatin I, Namy O, Mireau H** (2018). The translational landscape of *Arabidopsis* mitochondria. *Nucleic Acids Res* **46**, 6218–6228.
- Poidevin L, Forment J, Unal D, Ferrando A** (2021). Transcriptome and translome changes in germinated pollen under heat stress uncover roles of transporter genes involved in pollen tube growth. *Plant Cell Environ* **44**, 2167–2184.
- Schuster M, Gao Y, Schöttler MA, Bock R, Zoschke R** (2020). Limited responsiveness of chloroplast gene expression during acclimation to high light in tobacco. *Plant Physiol* **182**, 424–435.
- Shamimuzzaman M, Vodkin L** (2018). Ribosome profiling reveals changes in translational status of soybean transcripts during immature cotyledon development. *PLoS One* **13**, e0194596.
- Si XM, Zhang HW, Wang YP, Chen KL, Gao CX** (2020). Manipulating gene translation in plants by CRISPR-Cas9-mediated genome editing of upstream open reading frames. *Nat Protoc* **15**, 338–363.
- Trösch R, Barahimipour R, Gao Y, Badillo-Corona JA, Gotsmann VL, Zimmer D, Mühlhaus T, Zoschke R, Willmund F** (2018). Commonalities and differences of chloroplast translation in a green alga and land plants. *Nat Plants* **4**, 564–575.
- Trösch R, Ries F, Westrich LD, Gao Y, Herkt C, Hoppstädter J, Heck-Roth J, Mustas M, Scheuring D, Choquet Y, Räsche M, Zoschke R, Willmund F** (2022). Fast and global reorganization of the chloroplast protein biogenesis network during heat acclimation. *Plant Cell* **34**, 1075–1099.

- VanInsberghe M, van den Berg J, Andersson-Rolf A, Clevers H, van Oudenaarden A** (2021). Single-cell Riboseq reveals cell cycle-dependent translational pausing. *Nature* **597**, 561–565.
- Wu HYL, Song GY, Walley JW, Hsu PY** (2019). The tomato translational landscape revealed by transcriptome assembly and ribosome profiling. *Plant Physiol* **181**, 367–380.
- Wu LY, Lv YQ, Ye Y, Liang YR, Ye JH** (2020). Transcriptomic and translational analyses reveal insights into the developmental regulation of secondary metabolism in the young shoots of tea plants (*Camellia sinensis* L.). *J Agric Food Chem* **68**, 10750–10762.
- Xing SN, Chen KL, Zhu HC, Zhang R, Zhang HW, Li BB, Gao CX** (2020). Fine-tuning sugar content in strawberry. *Genome Biol* **21**, 230.
- Xiong QQ, Zhong L, Du J, Zhu CL, Peng XS, He XP, Fu JR, Ouyang LJ, Bian JM, Hu LF, Sun XT, Xu J, Zhou DH, Cai YC, Fu HH, He HH, Chen XR** (2020). Ribosome profiling reveals the effects of nitrogen application translational regulation of yield recovery after abrupt drought-flood alternation in rice. *Plant Physiol Biochem* **155**, 42–58.
- Xu GY, Greene GH, Yoo H, Liu LJ, Marqués J, Motley J, Dong XN** (2017a). Global translational reprogramming is a fundamental layer of immune regulation in plants. *Nature* **545**, 487–490.
- Xu GY, Yuan M, Ai CR, Liu LJ, Zhuang E, Karapetyan S, Wang SP, Dong XN** (2017b). uORF-mediated translation allows engineered plant disease resistance without fitness costs. *Nature* **545**, 491–494.
- Xu QT, Liu Q, Chen ZT, Yue YP, Liu Y, Zhao Y, Zhou DX** (2021). Histone deacetylases control lysine acetylation of ribosomal proteins in rice. *Nucleic Acids Res* **49**, 4613–4628.
- Yang XY, Song B, Cui J, Wang LN, Wang SS, Luo LL, Gao L, Mo BX, Yu Y, Liu L** (2021). Comparative ribosome profiling reveals distinct translational landscapes of salt-sensitive and -tolerant rice. *BMC Genomics* **22**, 612.
- Yoo H, Greene GH, Yuan M, Xu GY, Burton D, Liu LJ, Marqués J, Dong XN** (2020). Translational regulation of metabolic dynamics during effector-triggered immunity. *Mol Plant* **13**, 88–98.
- Zhang H, Wang YR, Lu J** (2019). Function and evolution of upstream ORFs in eukaryotes. *Trends Biochem Sci* **44**, 782–794.
- Zhang HW, Si XM, Ji X, Fan R, Liu JX, Chen KL, Wang DW, Gao CX** (2018). Genome editing of upstream open reading frames enables translational control in plants. *Nat Biotechnol* **36**, 894–898.
- Zhao H, Yin CC, Ma B, Chen SY, Zhang JS** (2021). Ethylene signaling in rice and *Arabidopsis*: new regulators and mechanisms. *J Integr Plant Biol* **63**, 102–125.
- Zhao J, Qin B, Nikolay R, Spahn CMT, Zhang G** (2019). Translatomics: the global view of translation. *Int J Mol Sci* **20**, 212.
- Zhu WC, Chen SJ, Zhang TF, Qian J, Luo Z, Zhao H, Zhang YR, Li L** (2022). Dynamic patterns of the transcriptome in a hybrid triplet show translational fractionation of the maize subgenomes. *Crop J* **10**, 36–46.
- Zoschke R, Watkins KP, Barkan A** (2013). A rapid ribosome profiling method elucidates chloroplast ribosome behavior *in vivo*. *Plant Cell* **25**, 2265–2275.

Recent Advances of Ribosome Profiling in Plants

Yuying Wang, Weihao Wang*

Key Laboratory of Plant Resources, Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100093, China

Abstract With the great development and progress of high-throughput sequencing (HTS) technologies, many newborn techniques have provided solutions to unresolved biological puzzles. Ribosome profiling has emerged as an HTS-based technique that facilitates the genome-wide investigation of translation at single-nucleotide resolution, and it resolves the missing link between transcriptome and translome. Ribosome profiling not only identifies the mRNAs in translation, but also provides precise positions of the ribosomes on mRNA to help identify the coding regions of the mRNAs. In addition, combined with the parallel RNA sequencing, ribosome profiling can determine the translation efficiency for each mRNA by comparing the rates of protein synthesis and the abundance of mRNAs. Based on its extraordinary advances, ribosome profiling has been successfully applied in animals, plants and microbes, and has thoroughly enhanced our understanding of translational regulation. However, due to the restrictions caused by the physical characteristics of plant cells and tissues, there are still considerable limitations in the application of ribosome profiling in plants. Here, we introduce the experimental principle of ribosome profiling and review the recent progresses made in botanical researches.

Key words ribosome profiling, translational regulation, upstream open reading frame

Wang YY, Wang WH (2022). Recent advances of ribosome profiling in plants. *Chin Bull Bot* **57**, 673–683.

* Author for correspondence. E-mail: wangweihao@ibcas.ac.cn

(责任编辑: 朱亚娜)