

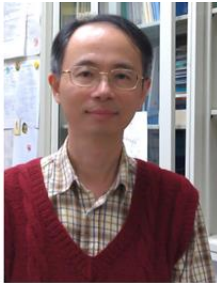
專題報導

高通量核酸定序技術

以大規模定序偵測海洋矽藻面對低磷環境的調控機制



海洋生物研究所
時繼宇博士



海洋生物研究所
張正教授

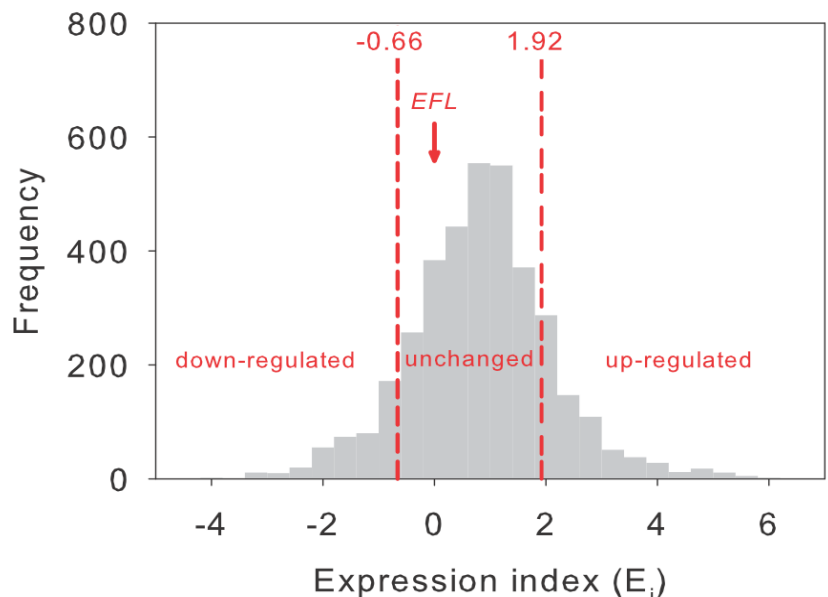
本校海洋生物研究所博士後研究員時繼宇博士與張正教授，在海洋中心與科技部共同支助下完成了一株矽藻：窄隙角刺藻 (*Chaetoceros affinis* CCMP160, 圖一) 的轉錄體 (transcriptome) 大規模定序，藉由基因分析與註解，觀察這株臺灣附近海域中常見的矽藻在面臨磷壓抑情況下的族群生長與基因表現。矽藻細胞的大小僅為十到數百微米，但是對於海洋的初級生產力約有 40% 的貢獻，並且佔全球固碳量的 25%，是一群生態上重要的物種。



圖一、實驗室培養之角刺藻
Chaetoceros affinis CCMP160。

而矽藻中的角刺藻屬在海洋中分佈範圍廣泛，在營養鹽快速補充後又消散的區域，像是湧升流和近岸海域，常常成為優勢種。在海洋中矽藻的生長可能會因為缺乏磷而受到限制，這是因為磷是生物生長與代謝中一個重要的角色，是核酸、磷脂質、ATP 與 ADP 的組成成分，同時也是酵素和輔酶的構成之一，所以和光合作用、呼吸作用、細胞分裂、蛋白質合成、細胞膜形成等作用都息息相關。高等植物的缺磷研究已經起步相當久了，而矽藻在演化上因為二次內共生的關係，使得基因體中包含了來自原生動物、紅藻、以及細菌的基因，於是在低磷狀態下的基因調控更顯得複雜難解。

有鑑於此，本研究使用次世代定序 (NGS) 技術建構窄隙角刺藻生長在低磷酸鹽和富營養鹽狀態下的全轉錄體 (transcriptome)，並在各處理組中得到 45 萬到 67 萬條讀序 (reads)。經由基因註解和統計，我們計算了 3,741 個功能基因的表現指數 (E_i , 圖二)，然後從中挑選 41 個基因以定量 PCR 來驗證全轉錄體的觀察結果，發現兩種技術所得到的結果趨勢一致，證實全轉錄體的結果是可信的 (圖三)。根據全轉錄體的表現指數，可觀察到在缺磷環境窄隙角刺藻與磷吸收相關的基因多為顯著增加表現，其中包括一個典型鹼性磷酸酶 (classical alkaline phosphatase) 以及兩個第 II 型的 Na^+/P_i 轉運蛋白 (type II Na^+/P_i cotransporters) 基因，顯示藻細胞期望從環境中獲得更多的磷，另外細胞會透過上調核糖核酸酶 (ribonuclease) 基因來增強細胞內的磷再生循環。



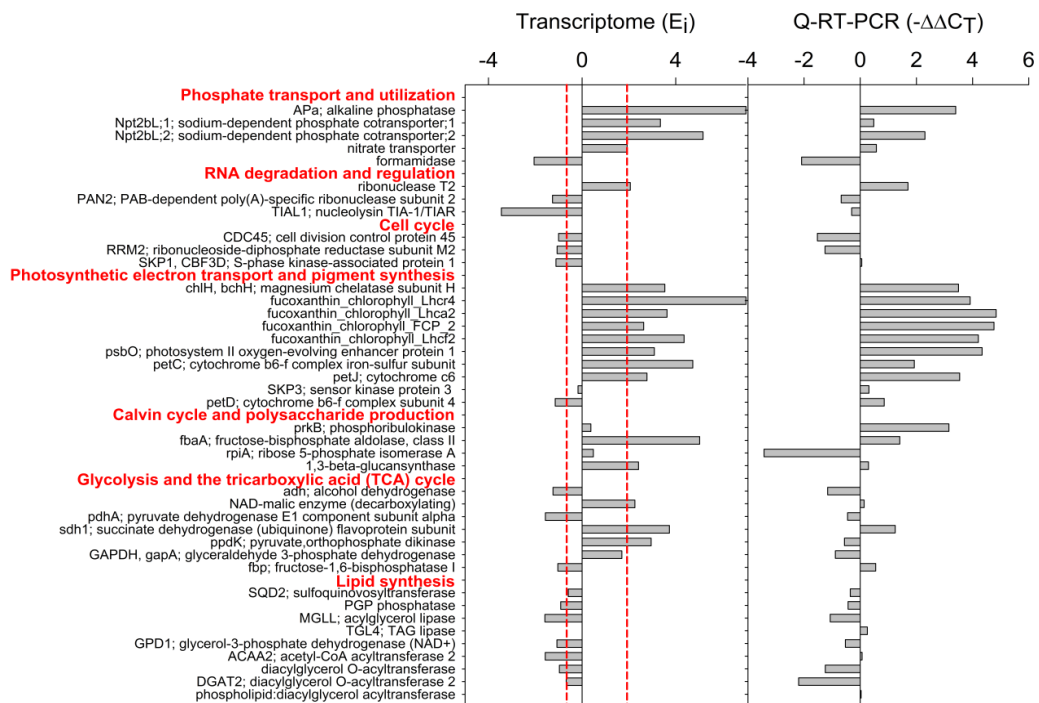
圖二、根據窄隙角刺藻生長在低磷酸鹽和富營養鹽狀態下的 3,741 個功能基因所算出的表現指數 (E_i) 及其頻度分佈。計算方法是在各個全轉錄體中以管家基因 *EFL* 為基準來標準化各功能基因的讀序數，再計算低磷酸鹽標準化讀序數和富營養鹽標準化讀序數的比率，這個比率的對數值就是 E_i 。利用 E_i 的變化範圍，可以篩選出低磷狀態中表現量有顯著差異的基因。摘自 Shih et al., 2015。

海洋中心電子報

CENTER OF EXCELLENCE FOR THE OCEANS

而在脂肪相關代謝中，許多以往研究證實在缺磷環境植浮會以硫取代磷產生含硫脂肪 (sulfolipids)，但本次研究所使用的窄隙角刺藻不會製造取代磷脂的含硫脂肪 (sulfolipids)，因此此類基因沒有顯著變化，這一點和另一種圓心矽藻的生理反應不同。光化學反應方面，光捕獲複合物基因 (light-harvesting complex genes) 具有很高的表現量，但光合作用的效率 (F_v/F_m) 卻很低，顯示缺磷生長下多餘的光能量不會進入光合作用過程而直接消散。還有NAD-蘋果酸酶 (NAD-malic enzyme) 會增加表現量，在醱解作用中經由一個較不依賴磷的代謝途徑製造丙酮酸 (pyruvate)。缺磷帶來的衝擊最後會反應在生長曲線上，低磷培養組的細胞分裂調控蛋白45 (cell division control protein 45) 以及核糖核苷二磷酸還原酶 (ribonucleoside-diphosphate reductase) 基因的表現指數都顯著下降 (圖三)，顯示細胞增殖速率降低。

藉由次世代定序的技術，研究人員可以直接量測矽藻細胞內所有基因表現量的變化，而不需再經由繁複的基因選殖和設計引子等步驟來偵測基因表現，在瞭解低磷環境如何影響基因表現後，這些資料將會幫助我們評估矽藻在海洋中的生理狀態，並預測全球變遷對矽藻的衝擊。



圖三、在窄隙角刺藻中利用轉錄體的表現指數 (E_i) 以及定量 PCR 的 $-\Delta\Delta C_T$ 測值來判別各個生理途徑的所屬基因在低磷環境下的表現量增減。圖中虛線表示 1.92 和 -0.66 數值的位置，分別為表現量顯著上升和下降的門檻值。摘自 Shih et al., 2015. J. EXP. Mar. Biol. Ecol. 470 : 43。

中心業務報告

1. 海洋中心104學年度儀器教育訓練已於日前舉辦完畢，詳情教學講義及使用手冊電子檔可至中心網站查詢下載 (<http://www.ceo.ntou.edu.tw/files/11-1048-3645.php?Lang=zh-tw>)。