

学校编码: 10384

分类号 _____ 密级 _____

学号: 20120051302030

UDC _____

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

双孢蘑菇热胁迫蛋白质表达差异分析

Analysis of Differently Expressed Proteins
in *Agaricus bisporus* under Heat Stress

陆 兆 明

指导教师姓名: 宋 思 扬 教授

专 业 名 称: 微 生 物 学

论文提交日期: 2008 年 6 月 23 日

论文答辩日期: 2008 年 7 月 22 日

学位授予日期: 2008 年 月 日

答辩委员会主席: 沈月毛 教授

评 阅 人: _____

2008 年 6 月

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为()课题(组)的研究成果,获得()课题(组)经费或实验室的资助,在()实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，
于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

2. 不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月 日

目 录

中文摘要.....	I
Abstract.....	III
第一章 前言.....	1
1. 双孢蘑菇的生物学特征.....	1
2. 影响双孢蘑菇生长发育的主要因素.....	2
3. 生物耐热性的研究进展.....	3
4. 真菌耐热特性研究.....	6
5. 蛋白质组学研究主要技术手段.....	8
6. mRNA表达定量分析-实时荧光定量PCR (Real-time PCR) 技术.....	13
7. 本研究的主要内容及意义.....	15
第二章 材料与amp;方法.....	16
1. 材料.....	16
2. 方法.....	21
第三章 结果与分析.....	34
1. 双孢蘑菇菌株 ITS 鉴定.....	34
2. 高温环境对双孢蘑菇菌丝体形态变化的影响.....	35
3. 双孢蘑菇在热诱导下的差异蛋白质组学.....	36
4. 部分差异蛋白质基因的Real-time PCR检测.....	50
第四章 讨论.....	55
1. 蛋白质提取方法选择和确定.....	55
2. 肽质量指纹谱 (PMF) 鉴定.....	55
3. 热激差异表达蛋白质分析.....	56
4. 课题展望.....	61
参考文献.....	63
附录.....	72
致谢.....	81

Catalogue

Chinese Abstract	I
Abstract	III
Chapter 1 Preface	1
1. Biological characteristics of <i>Agaricus bisporus</i>	1
2. Main factors that affect growth and development of <i>A.bisporus</i>	2
3. The research progress of biological heat resistance.....	3
4. Heat resistance of fungi.....	6
5. Main technology means of proteomics.....	8
6. Quantitative analysis of mRNA by real-time PCR technology.....	13
7. Main contents and significance of the research.....	15
Chapter 2 Materials and methods	16
1. Materials.....	16
2. Methods.....	21
Chapter 3 Results and analysis	34
1. Identification of <i>A.bisporus</i> by ITS.....	34
2. The effects of hot environment on the myceliums of <i>A.bisporus</i>	35
3. The differential proteomics of heat-induced <i>A.bisporus</i>	36
4. Real-time PCR detection for the genes of partial of differential expression proteins.....	50
Chapter 4 Discussion	55
1. Select and determinate the method of protein extraction.....	55
2. Protein identification by peptide mass fingerprinting.....	55
3. Analysis of differential expression proteins.....	56
4. The prospect of the subject.....	61
References	63
Appendix	72
Acknowledgements	81

摘要

双孢蘑菇 [*Agaricus bisporus* Lange (Imbach)] 是目前世界上人工栽培最广泛、产量最高、消费量最大的食用菌。它属于稳温结实性的菌类，温度是影响其生长的主要因素。加强和深化双孢蘑菇的分子生物学研究，特别是充分运用现代生物技术研究双孢蘑菇的热胁迫蛋白质表达差异以及耐热分子机理，对培育耐高温、高产、优质的菌株具有十分重要的理论和实践意义。

首先，本研究对双孢蘑菇耐高温型 02 菌株和温度敏感型 8213 菌株进行 ITS 鉴定。经过 ITS 鉴定分析，02 和 8213 菌株是双孢蘑菇种内的不同菌株。将 02 和 8213 菌株各分为 4 组：24℃ 常温培养、先 32℃ 热诱导 6h，再 37℃ 热处理 6h、37℃ 热处理 12h 和 42℃ 热处理 12h。观察不同温度处理条件下菌丝体的形态变化，结果发现：02 菌株比 8213 菌株耐高温；较低的亚致死诱导温度对于提高热耐受能力是有帮助的。

其次，通过双向电泳联用质谱技术研究 02 菌株热处理前后总蛋白 2-DE 图谱的变化以及同时热处理的 02 和 8213 菌株的总蛋白 2-DE 图谱差异，并对差异表达的蛋白质点进行 MALDI-TOF-MS 分析。2-DE 图谱分析结果表明：热处理后的 02 菌株，有 32 个蛋白质斑点出现明显的差异，其中热诱导出现蛋白质 5 个，表达量上调蛋白质 14 个，抑制表达蛋白质 4 个，表达量下调蛋白质 9 个；02 和 8213 菌株同时热处理后，有 41 个蛋白质斑点有较为明显的差异，其中 18 个蛋白质为 02 菌株独有，17 个蛋白质在 02 菌株中表达上调；3 个蛋白质为 8213 菌株独有，3 个蛋白质在 8213 菌株中表达上调。应用 MALDI-TOF-MS 分析 73 个差异蛋白质点，在 MASCOT 数据库中检索比对，共鉴定出 58 个差异表达蛋白质。将这 58 个已鉴定差异蛋白质序列在 COGs 数据库中进行比对功能分类，可分为以下几类：分子伴侣类、能量代谢类、物质代谢类、细胞过程和信号传导类、遗传信息类及功能未知蛋白质。功能簇中分子伴侣蛋白质共有 6 个，占全部已鉴定差异蛋白质的 10.3%，这表明包括热激蛋白在内的分子伴侣蛋白质对于耐高温可能起重要的作用。与能量代谢和物质代谢相关的蛋白质有 14 个，占全部已鉴定差异蛋白质的 24.1%，说明在热处理中双孢蘑菇的正常的能量和物质代谢受到了干扰。细胞信号、遗传信息传递相关蛋白质

基金项目：国家自然科学基金项目(30571259)和国家基础科学人才培养基金项目(J0630649)

共有11个，占已鉴定差异蛋白质的19%，说明双孢蘑菇在基因转录水平上对热激反应进行调控。

在差异蛋白质中，有两个被鉴定为Heat shock protein HSS1和HSP70。HSS1在02菌株热处理后表达上调；在02与8213菌株同时热处理的蛋白质组比较中，HSP70在02菌株蛋白质组中表达量较大。我们通过real-time PCR检测，发现02菌株热处理后HSS1和HSP70基因的表达量都上升5倍以上；同样进行热处理的02和8213菌株中，HSS1和HSP70基因在02菌株中的表达量分别为8213菌株的1.6倍和2.8倍，说明基因转录水平上调引起了HSS1和HSP70表达量的提高。

本研究通过双向电泳技术手段找到一些耐温02菌株热处理前后的差异表达蛋白质以及耐温02菌株和温度敏感型8213菌株同时热处理的差异表达蛋白质，并通过MALDI-TOF-MS和肽指纹质量图谱鉴定了部分差异蛋白质。通过分析已鉴定差异蛋白质的功能，初步了解双孢蘑菇可能的热应激机制，这将有助于揭示双孢蘑菇的耐热分子机理，为基因工程手段培育耐高温双孢蘑菇菌株提供理论基础。

关键词：双孢蘑菇；热胁迫；蛋白质组学；热激蛋白；实时荧光定量PCR

Abstract

Agaricus bisporus is the manual cultivation most widespread, the output highest, the consumption quantity biggest edible fungus in the present world. It belongs to stable-temperature fruitfulness fungi, temperature is the main factor affecting its growth. The enforced and deeply research of thermotolerance molecular biology of *A. bisporus*, especially researching on different expression proteins of heat shock and heat-resistant molecular mechanism by the modern biological technology, is important to breeding of *A. bisporus* for heat-tolerance, high yield, high quality in theory and practice.

First, the ITS test are carried out to identify strains 02 and 8213. Strains 02 and 8213 are identified to different strains of *A. bisporus* by ITS test. Strains 02 and 8213 are grouped into four groups: cultured on 24°C; cultured on 32°C for 6h, then cultured on 37°C for 6h; cultured on 37°C; cultured on 42°C. From the morphotype of *A. bisporus* in different temperature conditions we found: strain 02 is more thermotolerance than strain 8213; lower sublethal temperature is helpful to thermotolerance.

Secondly, We have used two dimensional electrophoresis (2-DE) and Mass spectrometry (MALDI-TOF/MS) to identify proteins that are differentially expressed in group of strain 02 under heat stress and under normal temperature and group of strains 02 and 8213 under heat stress. From 2-DE data of strain 02 under heat stress and under normal temperature, 32 resolved differentially expressed proteins were detected, 5 of those were induced, 14 of those were up-regulated, 4 of those disappear, 9 of those were down-regulated. From 2-DE data of strains 02 and 8213 under heat stress, 41 resolved differentially expressed proteins were detected, 18 of those were only found in strain 02, 17 of those were up-regulated in strain 02, 3 of those were only found in strain 8213, 3 of those were up-regulated in strain 8213. All the 73 spots were subjected to tryptic digestion followed by MALDI-TOF-MS, compared in Mascot. Total 58 proteins were identified and classified into different functional categories by COGs. They are classified into molecular chaperon, energy, metabolism, cellular processes and signaling, information storage and processing, function unknown. Six of these are molecular chaperon proteins, accounting for 10.3%, showed that molecular chaperon proteins (including HSP) are helpful to

thermotolerance. Fourteen of these are energy and metabolism proteins, accounting for 24.1%, showed that the normal energy metabolism is interfered. Eleven of these are cellular processes and signaling, information storage and processing proteins, accounting for 19%, showed that *A.bisporus* regulate heat shock response on gene transcription level.

Heat shock protein HSS1 is identified up-regulated in strain 02 under heat stress. HSP70 is identified up-regulated in strain 02 compared to strain 8213. From real-time PCR detection, we find HSS1 and HSP70 are up-regulated to 5 times; in strains 02 and 8213 under heat stress, HSS1 and HSP70 are up-regulated to 1.6 and 2.8 in strain 02, showed that HSS1 and HSP70 are up-regulated induced by gene transcription level.

The study found differentially expressed proteins in group of strain 02 under heat stress and under normal temperature and group of strains 02 and 8213 under heat stress by 2-DE, then identify them by MALDI-TOF-MS and PMF. Analyze the identified differentially expressed proteins and understand the mechanism of heat stress is helpful to reveal heat-resistant molecular mechanism of *A.bisporus* and breed heat-tolerance strain by genetic engineering.

Key Words: *Agaricus bisporus*; heat stress; proteomics; HSP; real-time PCR

第一章 前言

双孢蘑菇[*Agaricus bisporus* Lange (Imbach)]又称白蘑菇、洋蘑菇，是目前世界上人工栽培最广泛、产量最高、消费量最大的食用菌。我国为仅次于美国的蘑菇生产大国，据统计，2005年我国的双孢蘑菇产量就达到了152万吨。对双孢蘑菇的营养成分分析表明，它含有丰富的蛋白质、多糖、维生素、核酸和不饱和脂肪酸，不仅营养丰富，肉质肥厚，味道鲜美，而且热能低，具有很高的医疗保健作用，日益受到各国人民的喜爱。双孢蘑菇属于稳温结实性的菌类，温度是影响其生长的主要因素。在蘑菇种植产业的发展中，控温培养（15℃~24℃）使栽培成本升高，这一问题在我国南方尤其突出。因此加强和深化双孢蘑菇的分子生物学研究，特别是充分运用现代生物技术研究双孢蘑菇的热胁迫蛋白质表达差异以及耐热分子机理，对于培育耐温、高产、优质的菌株具有十分重要的理论和实践意义。

1 双孢蘑菇的生物学特征

双孢蘑菇在分类学中隶属于真菌门，担子菌纲，无隔担子菌亚纲，伞菌目，蘑菇科，蘑菇属。以较为特殊的二极性次级同宗配合方式进行繁殖^[1, 2]。其遗传方式及生活史如图1所示：

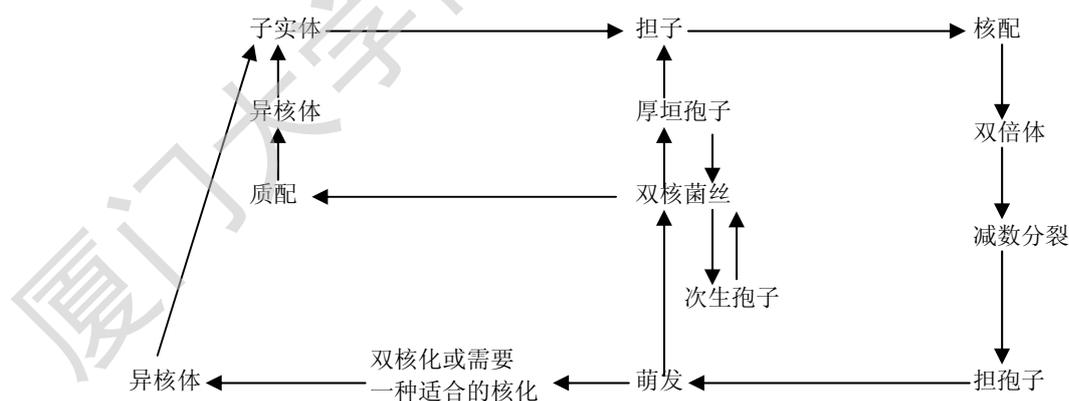


图1 双孢蘑菇的生活史示意图^[3]

Fig.1 Diagrammatic representation of the life cycle of *A. bisporus*

双孢蘑菇的得名缘于它的担子只产生两个孢子，这两个孢子包含由减数分裂产生的四个核中的两个，如果这两个核是性可亲和的，则该孢子自身可育，而如

果该孢子为单核或同核孢子,其萌发产生的菌丝则需与另一性可亲和的孢子萌发的菌丝进行配合杂交形成异核体方可恢复育性。

对双孢蘑菇的生殖体系如此详尽的认识主要归功于Elliott T. J和Miller R E各自领导的研究小组对双孢蘑菇的一系列研究^[1-3]。在双孢蘑菇传统菌株的生活史中,双孢担子占绝大多数,四孢担子为数极少,所以次级同宗配合的遗传方式在其完整生活史中占着很大的比例。但在1992年,美国加州发现了双孢蘑菇的四孢变种,在这一变种中,四孢担子占绝大多数^[4],异宗配合是其主要繁殖方式。四孢变种的发现使双孢蘑菇生活史的研究得到了很好的补充^[5]。

2 影响双孢蘑菇生长发育的主要因素

影响双孢蘑菇生长发育的因素很多。首先它是草腐菌,因此要求培养基含有丰富的氮源、碳源、无机元素等;对水分和湿度也有严格要求,培养基中适宜的含水量为60~65%,菇房的空气湿度在菌丝生长阶段应保持在75%~80%,出菇期应提高到90~95%,过干过湿都会影响其生长发育;同时双孢蘑菇为好氧性真菌,菌丝体和子实体的呼吸作用需要不断的吸进O₂,呼出CO₂,整个生长过程对CO₂浓度很敏感;此外还要有合适的pH值(6.8~7.0)。而温度更是重要的影响因素^[6],但温度对蘑菇生长的效应因蘑菇的品种,发育阶段,培养条件的不同而变化。

双孢蘑菇属于稳温结实性的菌类,温度是双孢蘑菇生长发育的一个主要因素。双孢蘑菇菌丝发育温度范围为4~32℃,最适温度为22~25℃,在适温下培养有利于孢子的萌发,也使得菌丝体生长得浓密粗壮;温度过高菌丝生长速度快,但稀疏、细弱无力,34~35℃将导致死亡。因此蘑菇栽培多在秋冬季节,而在炎热的夏季,菌丝体几乎无法存活。对于子实体发育而言,通常6~20℃是其分化和发育的适温范围。低温下子实体致密粗壮,18℃以上子实体生长加快,菌柄徒长,菌盖易开伞,由于菌丝体实质上是相通的管子,营养物质借助菌丝体中原生质体流动传送至菇蕾,供其生长发育,若此时温度升高,则菌丝养分消耗大,菇蕾营养物质又转运回菌丝体以维持平衡,结果使得已形成的子实体枯萎,因此只有温度稳定于15~16℃时,子实体发育得最好,而且质量好、产量高^[7,8]。

由于温度这个受限因素的存在,蘑菇的生产季节和产量受到了制约。因此要延长产季,提高栽培利润,需要培育耐高温的优良菌株。耐高温优良菌株将使得蘑菇栽培期延长,使四季周年生产成为可能,减少降温栽培费用,降低生产成本,使蘑菇成为四季时令食品,其经济效益是无法估量的。

3 生物耐热性的研究进展

热休克反应(Heat Shock Response HSR)现象最早是Ritossa(1962)在观察果蝇(*Drosophila busckii*)幼虫唾液腺细胞染色体在过热环境中形态变化时发现的。Ritossa发现,环境温度高于正常生长温度4~6℃时,染色体上会出现膨突(puff)^[9],此时正常的蛋白质合成被抑制,同时启动了一套新的蛋白质合成基因,新合成或增加合成一类应激蛋白,这种反应就是热激反应,由高温诱导合成的蛋白质则被统称为热激蛋白(Heat Shock Protein, HSP)^[10]。以后的研究逐渐发展到了昆虫、鸟类、哺乳动物、人类以及细菌、酵母等生物,发现从细菌到人类都具有合成HSP的能力,因而认识到热激反应是一个普遍的生物现象^[11]。除了受到广泛认同的HSP外,在某些生物中碳水化合物的积累及水解也与热胁迫反应相关^[12];此外,热休克反应还可以诱导某些生物体产生一种小胞质RNA共同参与热耐受^[10]。

3.1 热激蛋白(HSP)的分类及生物学功能研究

Ritossa发现热休克反应现象之后的十年间,对热休克反应的研究多处于细胞水平。直到1972年,Tissieres和Mitchell发现热休克反应与一些特殊蛋白质的合成相一致,HSP才被发现^[13]。Schlesing将HSP定义为:(1)主要是在环境因素刺激下合成,特别是当环境温度升高几度时产生的;(2)在其基因的5'端非编码区存在一段由14个碱基组成的保守序列(即Pelham box)作为HSP mRNA转录的启动子^[10]。这种现象也在其他一些非高温胁迫环境中出现,如低氧^[14]、局部缺血^[15]、酸中毒^[16]、能量缺乏^[17]、重金属^[18]、氨基酸类似物^[19]、葡萄糖类似物^[20]和紫外辐射^[21]等也同样可以诱导HSP的产生。

不同生物体的HSP的热诱导温度不同,诱导温度的高低与其正常生长温度相关^[22]。果蝇的诱导作用发生在33~37℃;生长于50℃环境下的嗜热菌,只有在温度升高至60℃时才诱导产生HSP;极地鱼类生长于0℃环境中,它的HSP在5~10℃条件下即可诱导产生,哺乳动物在高烧温度下诱导生成HSP。一些双温病原体生活史的一段时期在相对低温的环境中,而另一段时期则在温度相对较高的哺乳动物体内,这种温差变化就伴随着HSP的诱导产生。

HSP是一组可溶的胞内蛋白质家族,占正常胞内蛋白质的5%,但在应激状态下能升高到15%或更多。HSP基因与其所编码的蛋白质定位于胞内的不同部位,包括原核生物的细胞质和真核生物的细胞质、细胞核^[23]、内质网^[24]、线粒体^[25]、叶绿体等,并存在于所有细胞的整个生命活动中^[26]。众多研究表明,HSP具有“分

子伴侣 (molecular chaperon) ” 活性, 作为高度保守的“分子伴侣”, 在细胞内广泛地参与许多复杂的功能活动, 其生物功能的广泛性不仅表现在应激条件下维持细胞必需的蛋白质空间构象^[27], 保护细胞生命活动, 确保细胞生存, 而且在蛋白质聚集折叠^[28]、跨膜运输和转位、细胞骨架及核骨架稳定等基本功能方面也发挥着重要调节作用。HSP也参与细胞凋亡、热耐受^[29]、免疫调控、抗肿瘤^[30]及病毒感染^[31]等病理生理过程, 进而从多个方面影响着生物体的生命活动。

HSP通常按照分子量(KD)的大小进行分类命名。HSP一般分为以下几个家族: HSP100、HSP90、HSP70、HSP60 和小分子量(LMW)HSP (15-30KD)^[32]。而Morimoto等^[33]则将其分为HSP90、HSP70、HSP60、小分子(LMW)HSP四个家族。另外, 泛素 (Ubiquitin) ——一种参与胞内蛋白质水解的小蛋白质也被认为是一种HSP。不同家族的HSP无明显的序列同源性。目前研究比较多的是HSP90、HSP70和小分子HSP家族。

HSP90家族是一类高度保守的组成性蛋白质^[34]。HSP90家族有多个成员, 分子量在92~95KD之间的主要分布在高尔基体中, 80~90KD之间的主要分布在细胞质中^[35]。在较高等的动物生物体内, HSP90有两种, 即 α 型和 β 型, 它们的同源性为84%。真核生物的HSP90是HSP家族中为数不多的含有内含子的成员之一。在大部分真核生物中, HSP90由一个多基因家族编码, 包括5~6个成员^[36, 37]。HSP90家族在氨基酸序列上高度保守, 如白色念珠菌和其它真菌, 脊椎动物和植物的HSP90相比有61~79%的同源性, 人与酵母的HSP90同源性为69%, 人与*E. coli*的同源性为50%。同一物种内HSP90家族的同源性更高, 如拟南芥HSP90-2、HSP90-3和HSP90-4同源性高达96%^[37]。这意味着HSP90的结构在各物种之间有较大的相似性。除热激外, 光照、低温、高盐及水分胁迫等都可以诱导HSP90的高表达^[37]。

HSP90蛋白家族包括83、90、100和104KD四种HSP, 其中了解较多的是HSP90。HSP90的细胞功能的发现最早源于它可与甾体激素受体一同沉淀。当无激素存在时, 与受体形成的复合物较稳定, 但当加入激素后, 此复合物快速分离, 同时受体发生二聚化^[38]。HSP83在正常细胞中含量很高, 可达蛋白质总量的13%, 热休克时HSP83的总量保持不变, 但核浆分布的比值增高^[39]。HSP104在啤酒酵母热耐受中起重要作用, 缺乏HSP104的变异株在高温下其菌株活力下降到原来的1%以下, 而在变异株中引入HSP104基因则可以完全弥补此酵母菌热耐受的缺陷^[40]。就功能

来说, HSP90家族是一类特异的分子伴侣, 早期认为它可协助变性蛋白质从高温或其它应激环境中复性, 或介导受损蛋白质或未正常折叠蛋白质的降解^[41-44]。近年来的研究显示, HSP90家族具有广泛的生理功能, 它参与调节多种蛋白质在非应激条件下的生物活性, 其中包括调节DNA的复制、基因转录、亚细胞结构的蛋白质转移、细胞信号转导、免疫应答、癌变, 以及生长、发育、凋亡等^[45]。

HSP70家族是HSP中最保守最主要的一类, 包括68、70、72及78KD的HSP, 其中70KD是研究最广泛的一种。在真核生物之间HSP70蛋白质的氨基酸序列有68~75%的同源性, 在真核与原核生物之间同源性也高达50%^[32]。所有HSP70同系物都具微弱的ATPase活性, Pelham推测HSP70及其同系物可能在ATP依赖的蛋白质折叠和组装中起重要作用^[46]。在真核生物中除了热调节HSP70基因外, 还存在不受热调节作用的HSP70相关基因, 这些HSP具有重要的细胞功能, 比如分子伴侣功能^[47], 参与细胞耐热和细胞保护^[48], 抗细胞凋亡作用^[49], 抗氧化作用^[50], 免疫作用^[51]等。HSP70基因的调控机制目前尚不完全清楚。

小分子量HSP家族, 包括22、23、27和30KD HSP这些小分子量HSP, 在进化上不如HSP70保守, 但其分布却非常广泛^[52]。Chretien在对热耐受的中国仓鼠细胞突变株的研究中发现, HSP27的含量及磷酸化的程度对热耐受的产生是必需的, 不具备热耐受能力的细胞突变株能合成其他种类的HSP, 但不能合成HSP27; 在热耐受的突变株细胞中, 非诱导的HSP27含量为野生型的2倍。因此在热休克中HSP27可能与HSP70具有协同作用。Plesofskyvig等人对脉孢霉(*Neurospora crassa*)的HSP30基因表达的研究发现, 在高温胁迫下HSP30对碳水化合物的有效利用起重要作用, 同时它可与线粒体膜蛋白相互作用并起分子伴侣的作用^[53]。小分子HSP不仅在生物体受到化学、物理、辐射等多种因素胁迫下大量表达, 一些小分子HSP家族成员在生物体的正常生长发育过程中也有表达^[54, 55]。目前, 对于小分子HSP的功能有多种假说, 还处于推测阶段, 没有得到充分的证据支持, 普遍的看法认为, 小分子HSP具有分子伴侣的功能。

总之目前最流行的理论认为, HSP作为分子伴侣参与机体热耐力形成, 即帮助新合成或解折叠蛋白质正确折叠和成功组装, 使之成为有活性的、成功到达作用区域的一类蛋白质。HSP有双重作用, 既可以抑制新合成(包括转运中的)蛋白质的错误折叠, 降低产生不溶性聚集物的危险性, 又可帮助需要折叠的蛋白质正确折叠。HSP可以在机体热应激时加快正常蛋白质的合成, 补充热休克时由于

变性而减少的蛋白质，因此使机体获得热耐受力。HSP还可能有利于维持酶的动力学特征，避免机体酶热诱导时结合能力下降，此外，HSP在细胞中的广泛分布可能是HSP增强机体热耐力的关键，它们广泛参与到细胞骨架和核骨架中，能直接与细胞结构结合使之得以稳定。亚致死性热休克可使细胞获得对随后的致死性热休克的耐受能力，从而大大增加细胞的生存能力，主要原因可能是热诱导合成了HSP，增强了生物体抵抗更为恶劣的胁迫环境的能力^[56]。HSP具有“分子伴侣”活性，在细胞内广泛地参与许多复杂的功能活动，在应激条件下维持细胞必需的蛋白质空间构象，保护细胞生命活动，确保细胞生存，对于生物体的抗逆性起到了不可或缺的重要作用。

3.2 其他与生物耐热性相关的物质

近年来，有研究表明，细胞中碳水化合物及其水解酶的含量与热耐受相关。当环境温度变化时，真菌细胞中起保护作用的碳水化合物成分发生变化。在高温胁迫时，菌丝体中的海藻糖和肌醇的含量增加，而在低温胁迫下，甘露醇和葡萄糖的水平提高，在具有不同最适生长温度的真菌中，这种现象在菌丝体和孢子中都存在^[12]。对海藻糖酶水平和热耐受的相关性研究发现，海藻糖是温度耐受中的保护分子^[57]，对酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)海藻糖酶基因突变体NTH1和YBR0106的研究发现，在热休克后这些基因对于酵母细胞的修复是必需的，在葡萄糖转换为丙三醇的过程中，中性或酸性海藻糖酶缺陷使得该突变体生长缺陷，这可能与弱热休克修复(poor heat shock recovery)表型的产生有关^[58]。

胞质小RNA分子参与热耐受的现象是在嗜热四膜虫中发现的，热休克可诱导嗜热四膜虫产生一种胞质小分子量G8 RNA，这种RNA是由RNA聚合酶III转录的，它与影响核糖体功能的7S rRNA 和4.5S rRNA有弱同源性。G8 RNA基因失活的嗜热四膜虫在热休克反应时活力散失较快，此时总蛋白质的合成能力下降也较快，嗜热四膜虫可产生两种热耐受：一种是适当热处理可增加45~49℃热休克反应时的细胞活力(此时几乎所有蛋白质的合成均停止)；另一种则是适当热处理可增加42~44℃热休克反应时的细胞活力，此时有HSP的产生，这种热耐受需有G8 RNA的参与，因为G8 RNA基因失活的嗜热四膜虫在43℃热休克反应时的总蛋白质合成减少的较快，活力下降的也较快，尽管此时有HSP的诱导产生^[22]。

4 真菌耐热特性研究

真菌在生长发育过程中往往会受到各种环境因子的胁迫，其中温度是影响真

菌生长的主要因子。热休克反应是生物应对高温刺激的普遍反应，真菌在热胁迫环境中也会产生HSP。众多学者对高温胁迫下的真菌的形态生理变化，及产生HSP和适应高温的机理进行了大量研究工作。

陈兰芬^[59]对双孢蘑菇菌丝形态的观察发现，经一段时间的亚致死条件(32℃)诱导培养后可以提高双孢蘑菇的耐热性，即可以在更高温度条件下维持一定的生理状态，热锻炼后热耐力提高可以增强机体在致死高温下的生存能力。严培兰^[60]、王波^[61]等人对香菇(*Lentinus edodes*)耐热性的研究表明，随着温度上升，香菇菌丝各种生物化学反应速率加快，菌丝内对温度较敏感的蛋白质、核酸等组分，可能发生不可逆的破坏，如果温度继续升高，菌丝就会死亡。30℃是香菇菌丝生长的临界温度，这时菌丝生长速度比25℃时明显减慢。Friborg^[62]研究*Chaetomium thermophilum*发现，当温度从45℃提高到52.5℃时，海藻糖的干重从0.17%提高到了1.5%，说明海藻糖可能做为一种保护剂，在胞浆中累积，参与热应激反应。

关于真菌HSP的研究也比较多。Raphaella^[63]对*Blastocladiella emersonii*热激前后转录组差异进行了分析，发现与蛋白质折叠和抗氧化相关的mRNA在热激后的转录组中高度富集，蛋白质水解和细胞转运相关mRNA的转录水平也出现上调。其中，与蛋白质折叠相关的蛋白质基因HSP10、HSP40、HSP60、HSP70、HSP70-2、HSP70-8、HSP90、HSP100和Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase(肽脯氨酰顺反异构酶)都出现上调。Julio^[64]发现真菌*Phycomyces blakesleeanus*在热激条件下诱导表达HSP100，该蛋白有一个蛋白质作用域和两个ATP结合域，在高温下具有ATP酶和蛋白质水解酶活性，还能帮助蛋白质解聚。HSP100基因的启动子含有3个热激元件，在热激下被激活转录。Ferreira^[65]研究*Pisolithus*在42℃热激30min时蛋白质表达的变化，发现小分子热激蛋白(sHSP)在热激反应中发挥重要作用。sHSP起了分子伴侣的功能，在高温胁迫环境中，协助蛋白质正确折叠，阻止热敏感蛋白质聚集。Kuei-Yu Chen^[66]等研究土壤样品中的真菌热胁迫蛋白质表达，发现大分子和中等大小的HSP在40℃时就开始合成，而sHSP则需要在50℃时才产生。Helene^[67]研究*Neurospora crassa*热胁迫反应，发现45℃时菌丝中大部分的蛋白质合成停止，分子量为98000、83000、67000和30000的HSP开始合成；在40~47℃之间，孢子中HSP的合成速率很低，但高于47℃时，孢子中开始合成分子量为38000和34000的sHSP。分子量为30000、38000和34000的sHSP都是和线粒体相关的，而线粒体在热胁迫反应中正常的蛋白质合成停止，细胞色素C氧化

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库