

· 专题论坛 ·

单细胞组学技术及其在植物保卫细胞研究中的应用

牛艳丽, 柏胜龙, 王麒云, 刘凌云*

河南大学生命科学学院, 植物逆境生物学重点实验室, 开封 475004

摘要 单细胞组学技术在动物研究中已经得到广泛应用, 但在植物学领域尤其是保卫细胞研究中还处于起步阶段。由保卫细胞构成的气孔承担着植物生命过程中水分散发及气体交换大门的作用。将单细胞组学技术应用到保卫细胞功能解析中将有助于了解保卫细胞参与的基本生理过程。该文综述了植物单细胞组学技术的发展、保卫细胞研究现状及单细胞组学技术在植物保卫细胞研究中的初步应用, 为借助该技术解决植物生物学中保卫细胞发育、代谢及对环境胁迫响应等基本问题提供研究思路和方法。

关键词 单细胞, 保卫细胞, 功能分析, 信号转导

牛艳丽, 柏胜龙, 王麒云, 刘凌云 (2017). 单细胞组学技术及其在植物保卫细胞研究中的应用. 植物学报 52, 788–796.

细胞的异质性(heterogeneity)是一个普遍存在的生物学现象。即使是同一来源的细胞, 细胞与细胞之间也存在差异, 即异质性。这种异质性的存在导致同一细胞亚群中的个体细胞之间存在巨大差异。这些差异可能会对植物的发育和抗性产生重要影响。单细胞组学技术和单细胞数据分析工具的发展为人们解决细胞异质性问题提供了很大的帮助。在单细胞水平上对包含多个细胞类型的样本进行组学检测, 即单细胞组学技术已成为一种研究植物细胞有力的新工具, 可以给研究者提供更多新的生物学信息。利用该技术不仅可以进一步验证过去已有的研究方法及结论, 也能够据此发现新的生物学规律(Barkla and Vera-Estrella, 2015; Efroni and Birnbaum, 2016; Barkla et al., 2016)。

植物气孔是由植物表皮的2个特化保卫细胞围成的小孔, 是植物从大气中吸收CO₂以及通过蒸腾作用丧失水分的大门。气孔开闭与陆生植物抗旱生理及作物产量积累密切相关。研究气孔开闭机理对于解析作物抗旱反应、合理利用水分、提高作物产量以及了解植物细胞内特定信号转导过程都具有重要的生物学意义。一方面植物激素及外部环境信号均可影响植物气孔开度, 另一方面成熟保卫细胞与相邻表皮细胞间没有胞间连丝存在(孟繁霞等, 2000), 因此具有相对

独立结构的保卫细胞成为研究植物细胞信号转导机制的模式材料。同时, 也正是保卫细胞结构的独特性, 使得对保卫细胞直接进行单细胞组学研究成为可能。目前在保卫细胞信号转导研究中, 已经建立起完善的细胞学、生理学以及蛋白质组学等各学科交叉的实验技术(Yang et al., 2008; Zhao et al., 2008; Misra et al., 2014)。本文将着重介绍单细胞组学技术、植物保卫细胞研究现状及单细胞组学技术在植物保卫细胞研究中的应用, 以期帮助人们更好地理解和研究植物保卫细胞功能及相关信号转导机制。

1 单细胞组学技术

原生质体分离、流式细胞分选和激光捕获显微切割技术使得单细胞的批量获得成为现实。最早的单细胞组学技术主要进行单细胞全基因组测序和转录组测序, 分别针对单细胞DNA和RNA进行详细的序列比对和基因表达量分析, 从而揭示相应细胞基因组和转录组的变化。目前, 单细胞组学技术也包括蛋白质组学、代谢组学和翻译组学等内容。

单细胞组学技术通常包含以下步骤: 单细胞分离与纯化、单细胞鉴定、单细胞检测与分析。本文以单细胞基因组学和单细胞转录组学为例来阐述常用的技术路线: 单细胞分离与纯化, DNA/RNA的提取和扩

收稿日期: 2016-08-08; 接受日期: 2017-03-06

基金项目: 河南省自然科学基金(No.162300410008)和河南省高等学校重点科研项目(No.15A180012)

* 通讯作者。E-mail: lingyunl@henu.edu.cn

增, 测序以及后续分析和应用。

1.1 单细胞的分离

单细胞组学技术的第1步是单细胞的分离和提取, 主要是克服植物细胞壁的壁垒, 目前常用的方法主要有如下4种: 手动分选、荧光激活细胞分选、激光捕获显微切割及微流控技术(图1) (Gross et al., 2015)。此外, 还有原生质体分离和生物免疫磁性微球分离技术。

手动分选术: 在荧光显微镜的辅助下用注射器分离单细胞, 该方法可操作性差, 获得细胞数量少又耗时。荧光激活细胞分选技术(**fluorescence activated cell sorting, FACS**): 待分选细胞经特异性荧光染料染色后, 根据染色细胞在激光照射下荧光信号转换的电信号进行细胞分选 (Iyer-Pascuzzi and Benfey, 2010; Carter et al., 2013)。激光捕获显微切割技术 (**laser capture microdissection, LCM**): 在显微镜下选择性地 将目的细胞或组织碎片粘到EVA (ethylene vinylacetate)膜上。该膜是一种可以被低能红外激光脉冲激活的热塑膜, 从而达到分离特定细胞或组织的目的 (Ludwig and Hochholdinger, 2014; Thakare et al., 2014; Anjam et al., 2016; Zhu et al., 2016)。微流控技术 (**microfluidics**): 一种用于精确控制微量液

体的技术。微流控芯片是实施该技术的平台, 通过极细的管道对液体实施操控, 进而控制单细胞样品的操作 (Grasso and Lintilhac, 2016; Maisch et al., 2016)。生物免疫磁性微球分离技术 (**immunomagnetic microspheres, IMMS**): 基于抗原和抗体反应通过磁性微球将特定细胞从混合物中分离的方法。该方法方便、快速, 分离的细胞纯度高, 具有较好的生物活性 (Mustroph et al., 2013)。以上几种单细胞分离方法均各有优缺点, 在植物单细胞组学研究中均有不同程度的应用。就保卫细胞而言, 由于其相对独立的结构特点, 更宜采用原生质体分离技术、荧光激活细胞分选技术和激光捕获显微切割技术。实际操作中可根据所选实验材料的差异选用不同的分离技术。例如, 分离拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 保卫细胞及其前体细胞时, 由于已知的保卫细胞Marker基因较多, 可以采用荧光激活细胞分选技术进行分离; 而分离C₄植物 *Gynandropsis gynandra* 的保卫细胞时, 则宜采用激光捕获显微切割技术。

1.2 DNA/RNA的扩增

单个细胞中DNA和RNA含量非常低(有的低至几个pg), 常规的测序仪对其难以检测。因此需要对这些

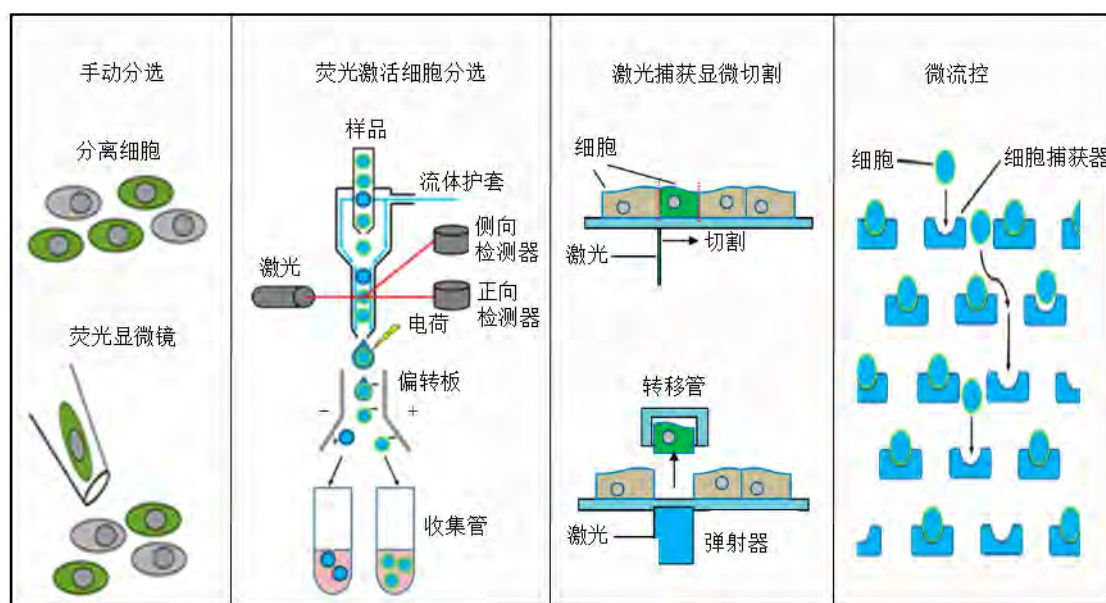


图1 单细胞分离方法(改自Gross et al., 2015)

Figure 1 Schematic overview of single-cell separation technologies (modified from Gross et al., 2015)

DNA和RNA样品进行大量扩增,同时尽量减少碱基错配。目前常用的基因组扩增技术主要有4种:简并寡核苷酸引物PCR (degenerate oligonucleotide primed PCR, DOP-PCR)、多重置换扩增(multiple displacement amplification, MDA)、多次退火环状循环扩增(multiple annealing and looping based amplification cycles, MALBAC)和乳液全基因组扩增(emulsion WGA, eWGA)。

DOP-PCR是一种快速、有效且不依赖物种的全基因组DNA扩增方法,该方法利用部分随机引物5'-CCGACTCGAGNNNNNNATGTGG-3'在基因组中分布频率较高的3'端ATGTGG碱基为引导,以该6个碱基的随机序列结合低退火温度来扩增起始位点,从而达到扩增整个基因组的目的(Telenius et al., 1992; Deng et al., 2014)。MDA是一种等温链置换扩增技术,该技术利用高保真、强持续能力的 ϕ 29 DNA聚合酶及抗核酸外切酶的随机六核苷酸引物对全基因组进行扩增,具有较高的基因组覆盖率(Dean et al., 2002; Cápál et al., 2015)。MALBAC采用特殊引物,使得扩增子尾巴互补成环,从而达到近乎线性扩增的结果。该方法通过形成闭合环来抑制DNA片段的重复复制,保持DNA扩增的均匀性,解决了传统方法中对单细胞基因组扩增的强烈偏好性问题。该技术在单个细胞水平实现全基因组93%的高覆盖率,同时也能够准确检测染色体拷贝数的变异(copy number variations, CNV) (Zong et al., 2012)。eWGA利用微流控技术,将单细胞基因组DNA片段分散在不同微型乳液反应体系,每一反应体系只含有极少量基因组DNA片段以保证扩增的均一性,所有反应体系均可达到饱和扩增。通过去乳化作用混合反应体系使各DNA片段扩增子间的差异最小化。eWGA方法能够减少扩增偏好性,提高基因组覆盖率,发现单细胞CNV并实现高精度的SNV (single-nucleotide variations) 检测(Fu et al., 2015),该方法可以与包括MDA在内的各种扩增方法兼容,在很多方面也优于当前流行的其它单细胞扩增技术。

对于RNA的扩增来说,主要是将样品中的RNA反转录为cDNA,再针对cDNA进行扩增。目前有3种方法可用于扩增单细胞cDNA: (1) PCR指数扩增; (2) IVT (*in vitro* transcription)扩增; (3) ϕ 29 DNA聚合酶扩增。一般而言,收集到单细胞后,裂解液裂解细胞

膜,然后将释放出来的RNA反转录成cDNA。第1种扩增方法为指数扩增,扩增速度快但容易造成引物二聚体的堆积。第2种方法为线性扩增,该方法比PCR指数扩增慢,但更为严格准确。第3种扩增方法是利用 ϕ 29 DNA聚合酶进行扩增,该方法需要将cDNA环化,然后进行滚环式扩增,类似于基因组DNA的扩增。这3种方法各有优缺点,可以根据特定的实验条件进行选择。

1.3 测序以及后续分析

单细胞测序一般分为单细胞基因组测序(单细胞基因组学)和单细胞转录组测序(单细胞转录组学)。无论哪种基因测序,由于单个细胞中所含DNA/RNA量非常少,达不到目前主流测序平台的建库要求,都需要先行全基因组或全转录组扩增。事实上,目前的技术很难做到完全的全基因组水平上的扩增,最终导致基因组中有些区域可以扩增到,有些区域则扩增不到,未扩增到的区域将无法被测序,因此存在测序数据对基因组覆盖度的问题。在经费有限的情况下,采用生物信息学策略即基因型填充(imputation)来减少低深度测序对基因型缺失的影响是一种可行的方法(Huang et al., 2010, 2015)。另外,扩增过程存在序列依赖性偏好,即在扩增到的区域,有些区域扩增的多,有些区域扩增的少。因此在后续生物信息学分析中,怎样有效去除扩增偏爱性以及怎样衡量基因表达量将会是一个重要且必须考虑的方面。实际操作中通常会通过增加生物学重复并结合qRT-PCR (real-time quantitative PCR)对基因表达结果进行验证,或者采用二代数据组装的保守基因进行定量评估,进而评判转录组表达实验结果的可靠性。但目前尚未见专门针对单细胞,尤其是针对特定扩增方法开发的生物信息分析软件或算法的报道。随着单细胞测序数据的增多,相信会很快涌现出新的算法和软件。

2 植物保卫细胞研究现状及亟待解决的问题

植物保卫细胞在调节光合作用中的二氧化碳捕获和水分状态上具有重要作用。为此,保卫细胞已经进化出多种机制来感知来自外部环境的各种刺激;同时,不同种属植物在进化中形成不同的气孔发育模式及

排列方式来适应不同的生存环境。这里我们简要总结近年来关于保卫细胞信号转导及气孔发育方面的研究进展及亟待解决的重要问题。

目前, 已知蓝光和红光均可促使气孔开放以保证光合作用所需CO₂的供应。蓝光通过激活保卫细胞质膜中的H⁺-ATPase活性调节胞质渗透势, 引起气孔开放。有研究表明, 蛋白激酶HT1 (HIGH TEMPERATURE 1)缺失时, 能够抑制红光和低浓度CO₂诱导的气孔开放, 而β-碳酸酐酶CA1 (carbonic anhydrases 1)和CA4 (carbonic anhydrases 4)双突变体对CO₂浓度低敏感, 但表现出红光调节的气孔开放表型, 从而证实红光和CO₂反应之间关系的复杂性(Matrosova et al., 2015)。ABA信号转导通路已经被广泛研究, 植物激素ABA通过影响保卫细胞Ca²⁺、K⁺通道活性进而促使气孔关闭。PIP2;1 (PLASMA MEMBRANE INTRINSIC PROTEIN 2;1)是近期鉴定的一个ABA诱导气孔关闭防止水分外流的关键水通道蛋白(Grondin et al., 2015)。然而, 一些新的ABA信号组分在信号网络中还没有合适的定位; 同时保卫细胞中ABA、H₂O₂和Ca²⁺诱导气孔关闭信号网络中的一些关键组分尚未被鉴定出来。其它植物激素在调节气孔运动方面也有重要作用, 但这些不同的植物激素之间是否存在信号交叉作用, 交叉点的确定仍是一个重要问题。此外, 植物在应对各种生物与非生物胁迫时, 保卫细胞感知胁迫诱导产生各种化学物质, 并将之整合成活性氧和钙信号等, 通过调节细胞膨压转换成相应的气孔运动。因此, 明确保卫细胞如何实现这些信号的整合并优化至适当的气孔开度是阐明气孔对环境变化做出快速反应的关键。

气孔对环境变化的长期响应通过影响其发育过程实现。bHLH (basic-helix-loop-helix)类转录因子(SPCH: SPEECHLESS、MUTE和FAMA)控制着气孔细胞发育的起始、增生及分化, 由分泌肽、受体激酶及下游的促分裂原活化蛋白激酶级联信号成分形成细胞与细胞之间的通讯, 共同决定气孔发育模式(Pillitteri and Torii, 2012)。SPCH可以结合在拟南芥1/3基因的启动子上, 特异地调控气孔发育过程, 细胞在分化过程中通过DNA修饰、转录后调控和异染色质化关闭了大量基因的表达(Lau et al., 2014)。因此气孔发育的表观遗传调控机制是一个有待详细研究的问题。MUTE作为一个拟分生组织到保卫细胞母细

胞转化期间的bHLH型转录因子, 其如何精确调节靶基因仍然未知。FAMA既可作为转录激活子又可作为抑制子调控分化基因的表达, 通过开启保卫细胞分化和限制保卫细胞母细胞的不对称分裂调控气孔发育的最后一步, 但其详细分子机制仍不清楚。总之, 一方面气孔发育研究已经揭示了转录因子在调节气孔的起始、增殖及分化方面的特定功能; 另一方面, 研究发现气孔发育过程反过来也可以影响气孔的开闭(Dow et al., 2014)。信号转导关键组分、分泌肽配体、受体激酶及MAPK信号组分的鉴定打开了一扇解析气孔运动与发育信号机制的大门。然而, 气孔运动和发育的一系列重要问题仍然没有得到充分的阐明, 但目前单细胞组学技术的发展为我们回答这些问题提供了可能的技术支撑。

3 单细胞组学技术在植物保卫细胞研究中的初步应用

尽管目前动物单细胞组学技术较为成熟, 但在植物中, 由于细胞壁的存在导致单细胞内容物难以获取, 使这一技术的应用举步维艰。严建兵课题组发展了一种简单可行的用于分离玉米(*Zea mays*)四分体小孢子的方法, 并提取其完整DNA, 进行了植物单细胞全基因组测序, 使人们对玉米遗传重组规律有了新的认识, 为作物的遗传育种提供了有价值的信息(Li et al., 2015)。Efroni等(2016)采用FACS技术分选荧光标记的细胞原生质体, 通过单细胞RNA测序技术分析拟南芥根再生过程中特定细胞的基因表达变化, 解析植物组织再生过程中细胞命运的转化机制。近年来, 单细胞组学技术在植物保卫细胞中的应用主要包括转录组学、蛋白质组学、代谢组学和翻译组学。

3.1 单细胞转录组学

单细胞水平的基因表达分析能够加深我们对异常细胞分子机制的理解, 识别微量基因表达或罕见非编码RNA, 帮助人们揭示其基因调控网络(Harada et al., 2010; Thakare et al., 2014; Anjam et al., 2016)。与其它组学研究相比, 当前植物单细胞转录组学数据相对是最完整的。Leonhardt等(2004)用拟南芥保卫细胞原生质体分离结合基因芯片技术描绘了保卫细胞基因转录表达谱, 找到64个主要在保卫细胞中表达

的转录本。Wang等(2011)通过对脱落酸处理的拟南芥进行保卫细胞转录组分析,发现保卫细胞中有909个基因特异地受脱落酸调节,这些结果均对保卫细胞功能基因组学研究提供了重要帮助。Adrian等(2015)采用FACS方法分选拟南芥不同发育时期叶片保卫细胞及其前体细胞,结合RNA-seq和微阵列芯片技术研究气孔发育中的不同类型细胞转录组学,解析气孔发育进程中的关键事件,为深入研究气孔保卫细胞发育过程提供了有价值的参考。Aubry等(2016)以同为醉蝶花科的C₄植物*G. gynandra*和C₃植物*Tarenaya hassleriana*为研究对象,通过激光显微切割技术分别分离2类植物的保卫细胞和叶肉细胞,进行C₃和C₄植物单细胞转录组学分析,结果表明,保卫细胞中大多数离子和CO₂信号调节模式在2类植物中没有变化,差异主要体现在影响气孔行为的碳代谢相关通路基因表达上;数据分析也表明,C₄植物中至少存在2个基因调控网络协同调控叶维管束、叶肉细胞和保卫细胞基因的表达。对以上基因进行深入研究有助于通过基因工程手段将C₄植物光合特征应用到C₃植物,以提高农作物产量。总之,单细胞转录组技术由于其高通量、自动化及流程性而广泛用于分析不同植物保卫细胞的发育及信号转导过程,从而不同程度地解析植物气孔发育和环境应答的分子机制。

3.2 单细胞蛋白质组学

高等植物具有多种类型的细胞,不同类型的细胞具有各自的功能。对不同类型细胞的蛋白特性进行分析,不仅可以揭示其特殊细胞功能,也可以更加深入地了解有机体是如何协调工作的。Zhao等(2008)利用双向凝胶电泳、液相色谱、基质辅助激光解吸电离串联飞行时间质谱(matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight/time of flight mass spectrometry, MALDI-TOF/TOF MS)和多维蛋白质识别技术(multi-dimensional protein identification technique, MudPIT)对拟南芥保卫细胞原生质体进行检测,发现336个以前转录组学未找到的蛋白,并通过GO (gene ontology)分析找到52个可能的信号蛋白。其中,TGG1 (Thioglucoside Glucohydrolase 1)是一种催化硫代葡萄糖苷水解、产生异硫代氰酸盐等降解产物的葡萄糖硫苷酶,该酶在保卫细胞蛋白质组中丰度非常高。*tgg1*突变体对ABA抑制的保卫细胞内流K⁺通道

和气孔开放不敏感,暗示硫代葡萄糖苷-葡萄糖硫苷酶系统参与保卫细胞对ABA的响应。随后,Zhao等(2010)进一步采用同位素亲和标记、同位素标记相对和绝对定量技术(isotope-coded affinity tags and isobaric tags for relative and absolute quantitation, iTRAQs)以及与质谱分析相结合的相对定量技术MALDI-TOF/TOF MS寻找保卫细胞中ABA信号与G蛋白 α 亚基GPA1的关系,通过对拟南芥Col野生型及*gpa1-4*突变体进行ABA处理前后保卫细胞蛋白质组学分析,发现有18个保卫细胞蛋白受到GPA1影响,对这些蛋白进行功能分析,发现GPA1能够抑制保卫细胞光合作用,并能促进保卫细胞中活性氧的有效利用。Zhu等(2009)结合iTRAQ和二维液相质谱技术,对酶解纯化欧洲油菜(*Brassica napus*)保卫细胞和叶肉细胞进行蛋白质组学分析,并对其中427种蛋白进行定量分析,鉴定到74种蛋白是保卫细胞所特有的,并发现参与能量、转运、转录、细胞结构和信号转导的蛋白主要在保卫细胞中表达,而参与光合作用、淀粉合成、抗病/防御/胁迫和其它代谢途径的蛋白大多在叶肉细胞中表达;保卫细胞中66个ABA依赖的和38个ABA下调表达蛋白特异响应钙震荡、活性氧反应、光合及信号转导。这些结果是对已有保卫细胞转录组数据的补充和完善,同时也为进一步分析保卫细胞参与的生物与非生物胁迫响应提供了新的研究思路和方向。但植物单细胞蛋白质组学的研究依然受制于单个细胞待分析蛋白浓度过低(低于仪器检测极限)的问题。相信随着分析检测技术的发展,这一问题应该很快会得到解决。

3.3 单细胞代谢组学

与其它组学研究方法类似,特定类型细胞的代谢组学研究会受到植物组织多细胞异质性的影响。利用物理或者化学分析方法,如GC-TOF-MS (gas chromatography-time of flight-mass spectrometry) (Schad et al., 2005)、LCM和LMPC (laser microdissection optionally coupled to laser pressure catapulting) (Kehr, 2003)及MALDI (matrix-assisted laser desorption/ionization) (Sturtevant et al., 2016),能够帮助研究者进行不同类型植物单细胞代谢组学的定性与定量研究。

拟南芥和蚕豆(*Vicia faba*)代谢组学研究表明,

保卫细胞中黄酮类物质、活性氧、脱落酸、一氧化氮和生长素的积累与渗透胁迫及致病菌(如假单胞杆菌)引起的信号级联反应密切相关(Desikan et al., 2004; He et al., 2013; Jin et al., 2013; Joudoi et al., 2013; Ou et al., 2014; Misra et al., 2015a)。随着苯丙烷类和黄酮类化合物含量的上升, 拟南芥保卫细胞产生更多的抗病、抗虫及抗紫外线辐射的保护性物质(He et al., 2013)。对鸭跖草(*Commelina communis*)和拟南芥保卫细胞脂类进行分析, 结果表明, 脂肪酸类物质在植物应对生物与非生物胁迫的气孔反应中发挥重要作用(Sun et al., 2013)。Misra等(2015b)通过施加 HCO_3^- 增加二氧化碳浓度来研究油菜保卫细胞和叶肉细胞代谢组学的变化, 发现 HCO_3^- 处理的不同类型细胞代谢物存在明显差异, 其中氨基酸、苯丙烷类化合物、还原类代谢物、生长素和细胞分裂素在叶肉细胞中含量明显上升; 而保卫细胞初级碳代谢物、氮代谢物(如氨基酸和嘌呤等)、防御反应相关物质(如生物碱、酚和类黄酮类)均有不同程度的增加, 暗示不同类型细胞在响应 HCO_3^- 时表现出C/N代谢平衡的差异。Jin等(2013)运用液相质谱多重反应检测质谱法(LC-multiple reaction monitoring-(MRM)-MS method)分析了拟南芥保卫细胞原生质体, 经ABA处理后发现了85个ABA信号相关代谢物。Fujii等(2015)选用显微镜观察结合质谱分析, 在几分钟内检测到活体单细胞中成千上万个代谢峰。但与基因不同, 单个植物细胞代谢物浓度过低且代谢物不能扩增, 因此对单细胞代谢物的分析面临更多困难。为了分析单细胞内如此微量的代谢物, 研究人员已尝试和发展了多种技术。尤其在质谱分析中, 标记技术在识别代谢物敏感性和电离方法方面的进步, 为单细胞代谢物分析带来了新的机遇。

3.4 单细胞翻译组学

DNA的基因信息要经过转录和翻译, 最终生成蛋白质, 从而执行生物学功能。细胞内mRNA与蛋白质的相关性极低。因此, 翻译调控是生物体内普遍而重要的调控层次, 翻译起始效率决定细胞的功能与表型, 翻译延伸速率决定蛋白质的折叠构象、定位与功能。翻译组学能够探索翻译调控的过程, 找出翻译差异, 发现导致这种差异的调控分子(如miRNA和lncRNA等), 从而得知其进行翻译调控的分子网络。现已知翻

译控制与生物抗逆有着紧密的联系。这些研究将对探讨植物生长规律和促进农业生产有重要意义。

Mustroph等(2009)用拟南芥保卫细胞特异表达启动子pKAT1 (K^+ 通道蛋白)启动核糖体蛋白RPL18 (ribosomal protein L18)的表达, 结合免疫沉淀和基因芯片技术解析保卫细胞特异表达蛋白的翻译组学。该方法能够使人们更好地了解只在特定细胞特异表达涉及胁迫耐受、代谢及发育相关蛋白的mRNAs转录后翻译调控机制; 同时对这些仅在特定细胞特定环境中表达的基因进行鉴定。这些结果将有助于植物学家更好地研究植物生长发育及对环境响应的调控网络。但由于大多数种类的植物保卫细胞的Marker基因未知, 导致相应保卫细胞特异表达的启动子克隆比较困难, 这在很大程度上限制了单细胞翻译组学技术在保卫细胞研究中的应用。

4 展望

最近几年, 单细胞组学技术逐渐受到重视。随着二代和三代测序技术的发展, 单细胞多组学联合分析在医学研究中的应用已经成为可能(Hou et al., 2016)。原生质体分离技术和激光显微切割技术的发展使单细胞组学在植物保卫细胞研究中的应用也越来越广泛。有意思的是, 苏黎世联邦理工学院研究人员最近开发出一种利用纳米注射器研究HeLa细胞的单细胞组学新方法, 这种纳米注射器的微型针能够穿透单个活细胞, 收集细胞核或细胞质内容物。该技术的开发使得科学家们能够在分子水平上确定单个细胞间的差异, 以及鉴定和分析稀有类型细胞; 重要的是提取出一些分子后的细胞仍然处于生活状态, 因此研究人员可以对同一活细胞多次取样以分析它的RNA和蛋白, 甚至可能是代谢物(Guillaume-Gentil et al., 2016)。相信在不久的将来, 植物保卫细胞纳米注射技术的应用、原生质体分离技术、活细胞成像技术, 结合单细胞多组学联合分析可以使人们更加全面地理解保卫细胞的功能(Fritzsch et al., 2012; Misra et al., 2014; Hossain et al., 2015)。另外, 随着方法学的不断发展, 人们在气孔保卫细胞研究方面取得了卓著的成果, 也对气孔种类、发育以及信号转导过程调控网络有了一定的了解。但还存在一些重要问题有待深入研究: (1) 不同环境因素和激素信号如何通过交互作用影响气

孔发育? (2) 不同物种气孔发育机制有何差异? (3) 气孔如何感知环境的变化进而实现合理的气孔开度? 这些问题的解决结合单细胞组学技术的应用将为揭示气孔发育机制并调控植物抗逆性提供新的思路。

参考文献

- 孟繁霞, 张蜀秋, 娄成后 (2000). 气孔功能的结构基础. 植物学通报 17, 27–33.
- Adrian J, Chang J, Ballenger CE, Bargmann BOR, Alasimone J, Davies KA, Lau OS, Matos JL, Hachez C, Lanctot A, Vatén A, Birnbaum KD, Bergmann DC (2015). Transcriptome dynamics of the stomatal lineage: birth, amplification, and termination of a self-renewing population. *Dev Cell* 33, 107–118.
- Anjam MS, Ludwig Y, Hochholdinger F, Miyaura C, Inada M, Siddique S, Grundler FMW (2016). An improved procedure for isolation of high-quality RNA from nematode-infected Arabidopsis roots through laser capture microdissection. *Plant Methods* 12, 25.
- Aubry S, Aresheva O, Reyna-Llorens I, Smith-Unna RD, Hibberd JM, Genty B (2016). A specific transcriptome signature for guard cells from the C₄ plant *Gynandropsis gynandra*. *Plant Physiol* 170, 1345–1357.
- Barkla BJ, Vera-Estrella R (2015). Single cell-type comparative metabolomics of epidermal bladder cells from the halophyte *Mesembryanthemum crystallinum*. *Front Plant Sci* 6, 435.
- Barkla BJ, Vera-Estrella R, Raymond C (2016). Single-cell-type quantitative proteomic and ionic analysis of epidermal bladder cells from the halophyte model plant *Mesembryanthemum crystallinum* to identify salt-responsive proteins. *BMC Plant Biol* 16, 110.
- Cápal P, Blavet N, Vrána J, Kubaláková M, Doležel J (2015). Multiple displacement amplification of the DNA from single flow-sorted plant chromosome. *Plant J* 84, 838–844.
- Carter AD, Bonyadi R, Gifford ML (2013). The use of fluorescence-activated cell sorting in studying plant development and environmental responses. *Int J Dev Biol* 57, 545–552.
- Dean FB, Hosono S, Fang LH, Wu XH, Faruqi AF, Brayward P, Sun ZY, Zong QL, Du FY, Du J, Driscoll M, Song WM, Kingsmore SF, Egholm M, Lasken RS (2002). Comprehensive human genome amplification using multiple displacement amplification. *Proc Natl Acad Sci USA* 99, 5261–5266.
- Deng CL, Bai LL, Li SF, Zhang YX, Li X, Chen YH, Wang RRC, Han FP, Hu ZM (2014). DOP-PCR based painting of rye chromosomes in a wheat background. *Genome* 57, 473–479.
- Desikan R, Cheung MK, Bright J, Henson D, Hancock JT, Neill SJ (2004). ABA, hydrogen peroxide and nitric oxide signaling in stomatal guard cells. *J Exp Bot* 55, 205–212.
- Dow GJ, Bergmann DC, Berry JA (2014). An integrated model of stomatal development and leaf physiology. *New Phytol* 201, 1218–1226.
- Efroni I, Birnbaum KD (2016). The potential of single-cell profiling in plants. *Genome Biol* 17, 65.
- Efroni I, Mello A, Nawy T, Ip PL, Rahni R, DelRose N, Powers A, Satija R, Birnbaum KD (2016). Root regeneration triggers an embryo-like sequence guided by hormonal interactions. *Cell* 165, 1721–1733.
- Fritsch FS, Dusny C, Frick O, Schmid A (2012). Single-cell analysis in biotechnology, systems biology, and biocatalysis. *Annu Rev Chem Biomol Eng* 3, 129–155.
- Fu YS, Li CM, Lu SJ, Zhou WX, Tang FC, Xie XS, Huang YY (2015). Uniform and accurate single-cell sequencing based on emulsion whole-genome amplification. *Proc Natl Acad Sci USA* 112, 11923–11928.
- Fujii T, Matsuda S, Tejedor ML, Esaki T, Sakane I, Mizuno H, Tsuyama N, Masujima T (2015). Direct metabolomics for plant cells by live single-cell mass spectrometry. *Nat Protoc* 10, 1445–1456.
- Grasso MS, Lintilhac PM (2016). Microbead encapsulation of living plant protoplasts: a new tool for the handling of single plant cells. *Appl Plant Sci* 4, 1500140.
- Grondin A, Rodrigues O, Verdoucq L, Merlot S, Leonhardt N, Maurel C (2015). Aquaporins contribute to ABA-triggered stomatal closure through OST1-mediated phosphorylation. *Plant Cell* 27, 1945–1954.
- Gross A, Schoendube J, Zimmermann S, Steeb M, Zengerle R, Koltay P (2015). Technologies for single-cell isolation. *Int J Mol Sci* 16, 16897–16919.
- Guillaume-Gentil O, Grindberg RV, Kooger R, Dorwling-Carter L, Martinez V, Ossola D, Pilhofer M, Zambelli T, Vorholt JA (2016). Tunable single-cell extraction for molecular analyses. *Cell* 166, 506–516.
- Harada E, Kim JA, Meyer AJ, Hell R, Clemens S, Choi YE (2010). Expression profiling of tobacco leaf trichomes identifies genes for biotic and abiotic stresses. *Plant Cell Physiol* 51, 1627–1637.
- He JM, Ma XG, Zhang Y, Sun TF, Xu FF, Chen YP, Liu X, Yue M (2013). Role and interrelationship of Gα protein,

- hydrogen peroxide, and nitric oxide in ultraviolet B-induced stomatal closure in Arabidopsis leaves. *Plant Physiol* **161**, 1570–1583.
- Hossain MS, Joshi T, Stacey G** (2015). System approaches to study root hairs as a single cell plant model: current status and future perspectives. *Front Plant Sci* **6**, 363.
- Hou Y, Guo HH, Cao C, Li XL, Hu BQ, Zhu P, Wu XL, Wen L, Tang FC, Huang YY, Peng JR** (2016). Single-cell triple omics sequencing reveals genetic, epigenetic, and transcriptomic heterogeneity in hepatocellular carcinomas. *Cell Res* **26**, 304–319.
- Huang L, Ma F, Chapman A, Lu SJ, Xie XS** (2015). Single-cell whole-genome amplification and sequencing: methodology and applications. *Annu Rev Genomics Hum Genet* **16**, 79–102.
- Huang XH, Wei XH, Sang T, Zhao Q, Feng Q, Zhao Y, Li CY, Zhu CR, Lu TT, Zhang ZW, Li M, Fan DL, Guo YL, Wang AH, Wang L, Deng LW, Li WJ, Lu YQ, Weng QJ, Liu KY, Huang T, Zhou TY, Jing YF, Li W, Lin Z, Buckler ES, Qian Q, Zhang QF, Li JY, Han B** (2010). Genome-wide association studies of 14 agronomic traits in rice landraces. *Nat Genet* **42**, 961–967.
- Huang XH, Yang SH, Gong JY, Zhao Y, Feng Q, Gong H, Li WJ, Zhan QL, Cheng BY, Xia JH, Chen N, Hao ZN, Liu KY, Zhu CR, Huang T, Zhao Q, Zhang L, Fan DL, Zhou CC, Lu YQ, Weng QJ, Wang ZX, Li JJ, Han B** (2015). Genomic analysis of hybrid rice varieties reveals numerous superior alleles that contribute to heterosis. *Nat Commun* **6**, 6258.
- Iyer-Pascuzzi AS, Benfey PN** (2010). Fluorescence activated cell sorting in plant developmental biology. *Methods Mol Biol* **655**, 313–319.
- Jin XF, Wang RS, Zhu MM, Jeon BW, Albert R, Chen SX, Assmann SM** (2013). Abscisic acid-responsive guard cell metabolomes of Arabidopsis wild-type and *gpa1* G-protein mutants. *Plant Cell* **25**, 4789–4811.
- Joudoi T, Shichiri Y, Kamizono N, Akaike T, Sawa T, Yoshitake J, Yamada N, Iwai S** (2013). Nitrated cyclic GMP modulates guard cell signaling in Arabidopsis. *Plant Cell* **25**, 558–571.
- Kehr J** (2003). Single cell technology. *Curr Opin Plant Biol* **6**, 617–621.
- Lau OS, Davies KA, Chang J, Adrian J, Rowe MH, Ballenger CE, Bergmann DC** (2014). Direct roles of SPEECHLESS in the specification of stomatal self-renewing cells. *Science* **345**, 1605–1609.
- Leonhardt N, Kwak JM, Robert N, Waner D, Leonhardt G, Schroeder JI** (2004). Microarray expression analyses of Arabidopsis guard cells and isolation of a recessive abscisic acid hypersensitive protein phosphatase 2C mutant. *Plant Cell* **16**, 596–615.
- Li X, Li L, Yan JB** (2015). Dissecting meiotic recombination based on tetrad analysis by single-microspore sequencing in maize. *Nat Commun* **6**, 6648.
- Ludwig Y, Hochholdinger F** (2014). Laser microdissection of plant cells. *Methods Mol Biol* **1080**, 249–258.
- Maisch J, Kreppenhof K, Büchler S, Merle C, Sobich S, Görling B, Luy B, Ahrens R, Guber AE, Nick P** (2016). Time-resolved NMR metabolomics of plant cells based on a microfluidic chip. *J Plant Physiol* **200**, 28–34.
- Matrosova A, Bogireddi H, Mateo-Peñas A, Hashimoto-Sugimoto M, Iba K, Schroeder JI, Israelsson-Nordström M** (2015). The HT1 protein kinase is essential for red light-induced stomatal opening and genetically interacts with OST1 in red light and CO₂-induced stomatal movement responses. *New Phytol* **208**, 1126–1137.
- Misra BB, Acharya BR, Granot D, Assmann SM, Chen SX** (2015a). The guard cell metabolome: functions in stomatal movement and global food security. *Front Plant Sci* **6**, 334.
- Misra BB, Assmann SM, Chen SX** (2014). Plant single-cell and single-cell-type metabolomics. *Trends Plant Sci* **19**, 637–646.
- Misra BB, de Armas E, Tong ZH, Chen SX** (2015b). Metabolomic responses of guard cells and mesophyll cells to Bicarbonate. *PLoS One* **10**, e0144206.
- Mustroph A, Zanetti ME, Girke T, Bailey-Serres J** (2013). Isolation and analysis of mRNAs from specific cell types of plants by ribosome immunopurification. *Methods Mol Biol* **959**, 277–302.
- Mustroph A, Zanetti ME, Jang CJH, Holtan HE, Repetti PP, Galbraith DW, Girke T, Bailey-Serres J** (2009). Profiling translatoemes of discrete cell populations resolves altered cellular priorities during hypoxia in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci USA* **106**, 18843–18848.
- Ou XB, Gan Y, Chen PL, Qiu MQ, Jiang K, Wang GX** (2014). Stomata prioritize their responses to multiple biotic and abiotic signal inputs. *PLoS One* **9**, e101587.
- Pillitteri LJ, Torii KU** (2012). Mechanisms of stomatal development. *Annu Rev Plant Biol* **63**, 591–614.
- Schad M, Mungur R, Fiehn O, Kehr J** (2005). Metabolic profiling of laser microdissected vascular bundles of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Methods* **1**, 2.
- Sturtevant D, Lee YJ, Chapman KD** (2016). Matrix assisted laser desorption/ionization-mass spectrometry imaging

- (MALDI-MSI) for direct visualization of plant metabolites *in situ*. *Curr Opin Biotechnol* **37**, 53–60.
- Sun QX, Liu J, Zhang Q, Qing XH, Dobson G, Li XZ, Qi BX** (2013). Characterization of three novel desaturases involved in the delta-6 desaturation pathways for polyunsaturated fatty acid biosynthesis from *Phytophthora infestans*. *Appl Microbiol Biotechnol* **97**, 7689–7697.
- Telenius H, Carter NP, Bebb CE, Nordenskjöld M, Ponder BAJ, Tunnacliffe A** (1992). Degenerate oligonucleotide-primed PCR: general amplification of target DNA by a single degenerate primer. *Genomics* **13**, 718–725.
- Thakare D, Yang RL, Steffen JG, Zhan JP, Wang DF, Clark RM, Wang XF, Yadegari R** (2014). RNA-seq analysis of laser-capture microdissected cells of the developing central starchy endosperm of maize. *Genom Data* **2**, 242–245.
- Wang RS, Pandey S, Li S, Gookin TE, Zhao ZX, Albert R, Assmann SM** (2011). Common and unique elements of the ABA-regulated transcriptome of Arabidopsis guard cells. *BMC Genomics* **12**, 216.
- Yang YZ, Costa A, Leonhardt N, Siegel RS, Schroeder JI** (2008). Isolation of a strong Arabidopsis guard cell promoter and its potential as a research tool. *Plant Methods* **4**, 6.
- Zhao ZX, Stanley BA, Zhang W, Assmann SM** (2010). ABA-regulated G protein signaling in Arabidopsis guard cells: a proteomic perspective. *J Proteome Res* **9**, 1637–1647.
- Zhao ZX, Zhang W, Stanley BA, Assmann SM** (2008). Functional proteomics of Arabidopsis thaliana guard cells uncovers new stomatal signaling pathways. *Plant Cell* **20**, 3210–3226.
- Zhu MM, Dai SJ, McClung S, Yan XF, Chen SX** (2009). Functional differentiation of Brassica napus guard cells and mesophyll cells revealed by comparative proteomics. *Mol Cell Proteomics* **8**, 752–766.
- Zhu YD, Li H, Bhatti S, Zhou SP, Yang Y, Fish T, Thannhauser TW** (2016). Development of a laser capture microscope-based single-cell-type proteomics tool for studying proteomes of individual cell layers of plant roots. *Hortic Res* **3**, 16026.
- Zong CH, Lu SJ, Chapman AR, Xie XS** (2012). Genome-wide detection of single-nucleotide and copy-number variations of a single human cell. *Science* **338**, 1622–1626.

Applications of Single-cell Technologies in Guard Cells

Yanli Niu, Shenglong Bai, Qiyun Wang, Lingyun Liu*

Key Laboratory of Plant Stress Biology, College of Life Sciences, Henan University, Kaifeng 475004, China

Abstract Single-cell technologies have been used in an increasing number of animal studies, but the techniques have yet to be widely used in plants, especially in guard cells. Stomatal pores are formed by pairs of guard cells and serve as major gateways for both CO₂ influx into plants from the atmosphere and transpirational water loss. The application of single-cell technologies will be valuable for better understanding the underlying mechanisms of stomatal pores. In this review, we discuss single-cell technologies, current research and problems with guard cells and focus on the application of single-cell technologies to guard cells. Single-cell technologies may have potential to provide new perspectives for plant problems, such as development, metabolism and response to environmental stresses of guard cells.

Key words single cell, guard cells, functional analysis, signaling

Niu YL, Bai SL, Wang QY, Liu LY (2017). Applications of single-cell technologies in guard cells. *Chin Bull Bot* **52**, 788–796.

* Author for correspondence. E-mail: lingyunl@henu.edu.cn

(责任编辑: 朱亚娜)