

学校编码: 10384

分类号_____密级_____

学号: 21620141152532

UDC_____

廈門大學

硕士学位论文

铜绿微囊藻 PCC7806 细胞聚集与 MrpC
蛋白的相关性研究及代谢组学分析

The correlation and metabolomics analysis of *M. PCC*
7806 cell aggregation and MrpC

古莎

指导教师姓名: 章军 副教授

专业名称: 生物化学与分子生物学

论文提交日期: 2017年 04 月

论文答辩时间: 2017年 05 月

学位授予日期: 2017年 06 月

答辩委员会主席:

评阅人:

2017年 06 月

厦门大学博硕士学位论文摘要库

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

厦门大学博硕士学位论文摘要库

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

厦门大学博硕士学位论文摘要库

目录

摘要.....	I
Abstract.....	III
1 前言	1
1.1 水华及其诱发条件研究进展	1
1.1.1 水华及危害.....	1
1.1.2 诱发水华的条件.....	2
1.2 铜绿微囊藻分泌蛋白 MrpC 研究进展.....	7
1.2.1 铜绿微囊藻.....	7
1.2.2 MrpC 蛋白.....	7
1.2.3 SPY 和 TPR 结构域.....	8
1.2.4 MrpC 蛋白的糖基化.....	9
1.2.5 CRISPR-Cas9 技术	10
1.3 立题依据和研究意义	11
2 材料与方法.....	13
2.1 材料	13
2.2 实验方法.....	18
3 结果分析	32
3.1 实验室中模拟铜绿微囊藻 PCC 7806 细胞聚集	32
3.1.1 营养盐对铜绿微囊藻 PCC 7806 细胞聚集的影响.....	32
3.1.2 微囊藻毒素对铜绿微囊藻 PCC 7806 细胞聚集的影响.....	36
3.1.3 光照强度对铜绿微囊藻 PCC 7806 细胞聚集程度的影响.....	38
3.1.4 代谢组学分析.....	42
3.2 检测 MrpC 与 SPY、TPR 结构域的相互作用	44
3.2.1 基因克隆及载体构建.....	44
3.2.2 检测 MrpC 蛋白的转录激活活性.....	48
3.2.3 利用酵母双杂交技术检测 MrpC 与 SPY、TPR 的相互作用	50

3.3 利用 CRISPR-Cas9 系统敲除 <i>mrpC</i> 基因	52
3.3.1 CRISPR-Cas9 基因敲除载体构建	52
3.3.2 重组载体转化铜绿微囊藻 PCC 7806	57
3.4 融合绿色荧光蛋白追踪 MrpC 蛋白的表达和定位	58
3.4.1 构建融合蛋白表达构建	58
3.4.2 重组载体转化铜绿微囊藻	61
4 讨论	63
5 小结	70
6 展望	71
参考文献	72
致 谢	77

厦门大学博硕士学位论文摘要

Contents

Abstract(Chinese version)	I
Abstract(English version)	III
1 Introduction	1
1.1 The introduction of waterbloom	1
1.1.1 The waterbloom and hazards	1
1.1.2 The conditions that induce bloom.....	2
1.2 The introduction of mrpC protein	7
1.2.1 <i>M.aeruginosa</i> PCC 7806	7
1.2.2 MrpC protein.....	7
1.2.3 SPY and TPR domain	8
1.2.4 The O-GlcNAc glycosylation of MrpC	9
1.2.5 CRISPR-Cas9	10
1.3 Aims and significances of this research	11
2 Materials and methods	13
2.1 Materials	13
2.2 Methods	18
3 Results and analysis	32
3.1 Simulate cell aggregation of <i>M.aeruginosa</i> PCC 7806 in lab	32
3.1.1 The effects of nutrients on cell aggregation.....	32
3.1.2 The effects of microcystin on cell aggregation.....	36
3.1.3 The effects of light intensity on cell aggregation.....	38
3.1.4 Metabolomics analysis.....	42
3.2 The interaction between MrpC and SPY 、 TPR domains	44
3.2.1 Gene cloning and vector construction.....	44
3.2.2 The transcriptional activation activity of MrpC.....	48
3.2.3 The examination of the interaction between MrpC and SPY 、 TPR ..	50
3.3 knocking out <i>mrpC</i> gene using CRISPR-Cas9 system	52

3.3.1 CRISPR-Cas9 vector construction.....	52
3.3.2 Transformation of <i>M.aeruginosa</i> PCC 7806	57
3.4 Fusion of EGFP to track MrpC protein expression and localization.....	58
3.4.1 Vector construction	58
3.4.2 Transformation of vector.....	61
4 Discussion.....	63
5 Summary	70
6 Prospect	71
References	72
Acknowledgements	77

厦门大学博硕士学位论文摘要

摘要

蓝藻水华的形成可分为四个阶段：藻细胞休眠、复苏、生物量积累、聚集上浮。铜绿微囊藻 (*Microcystis aeruginosa*) PCC 7806 是一种频繁引发水华的淡水蓝藻。在实验室中培养的藻细胞均匀分散，即使生物量积累到足够爆发水华的阶段，也未观察到藻细胞聚集成群落的现象。研究水华的形成机制，需要在实验室中先模拟蓝藻聚集。本实验室前期研究发现，铜绿微囊藻 PCC 7806 分泌的 MrpC 蛋白，可在水体中形成网状纤维结构，具有抑制藻细胞下沉的功能。在藻细胞表面也附着有 MrpC 蛋白。尚不清楚 MrpC 蛋白与藻细胞聚集的关系。本论文主要包括在实验室中模拟藻细胞聚集，探究 MrpC 蛋白与藻细胞聚集的关系，分析藻细胞在聚集状态下的代谢组学。这对了解水华的形成机制具有重要意义。

通过调整营养盐和光照强度，在实验室中模拟出藻聚集成群落的现象。藻在聚集状态下的 MrpC 蛋白表达量比分散状态下高，附着在细胞表面的 MrpC 蛋白纤维更密集粗大。外源添加 MrpC 蛋白至 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，有藻细胞上浮至水面，部分藻细胞悬浮在水体中。表明 MrpC 蛋白与藻细胞聚集和上浮呈正相关。我们推测，附着在藻细胞表面的 MrpC 蛋白可能介导藻细胞聚集，分泌到培养基中的 MrpC 蛋白可能参与藻细胞上浮。MrpC 蛋白在水华的爆发过程中具有关键作用。

通过前期的模拟实验，获得了大量聚集的藻细胞。分析代谢组学发现，在聚集状态的藻细胞中，肝毒性增强，与异生素代谢相关的物质增加，可推测藻毒素的代谢上调，藻细胞内通过耦合金属离子等异生素来降低藻毒素损害的防御机制增强。作为生长素前体的色氨酸分解代谢增强，可推测生长素的合成随之减少，从而诱导产生胁迫应答反应。此外，脂质分解代谢上调，糖代谢、光合作用、呼吸作用减弱，藻细胞聚集，均可看作机体对环境胁迫的应答反应。

通过酵母双杂交鉴定，MrpC 蛋白与糖基化相关结构域 SPY、TPR 存在相互作用，初步表明 MrpC 蛋白会受到糖基化修饰。CRISPR-Cas9 技术敲除 *mrpC* 基因，抗性平板上没有藻落生长，推测是脱靶后细胞未能修复 DSB 而导致藻细胞死亡。将 MrpC 蛋白与绿色荧光蛋白 EGFP 融合表达，以追踪 MrpC 的表达。可能因为蛋白的表达相互干扰，未观察到荧光现象，需优化 linker。

关键词：聚集；MrpC 蛋白；代谢

厦门大学博硕士学位论文摘要库

Abstract

The formation of cyanobacteria bloom can be divided into four stages: algal cell dormancy, resuscitation, biomass accumulation, aggregation and uplift. *Microcystis aeruginosa* PCC 7806 is a freshwater cyanobacteria that causes water bloom. Under the condition of laboratory culture, the algae cells are uniformly dispersed. Even if the biomass accumulate enough to burst the water bloom, no aggregation is observed. Therefore, the study of bloom formation mechanism requires the simulation of cyanobacteria aggregation. The MrpC protein secreted by *microcystis aeruginosa* PCC 7806 has a fibrous network structure in water and has the function of inhibiting cell sinking. In this paper, the relationship between MrpC protein and algal cell aggregation is studied, and the metabolomics of algal population is analyzed. This is important for understanding the relationship between MrpC protein and water bloom.

By adjusting the nutrient and light intensity, the phenomenon of algae gathered into the community is simulated in the lab. The expression of MrpC in algae population is higher than that in dispersal algae, and the MrpC protein fiber attached to the cell surface is more dense and thicker. Add external MrpC protein to 30 μ g/mL, algae float to the surface, part of the algal cells suspend in the water. MrpC protein is positively correlated with the aggregation of algal cells. We hypothesize that MrpC attached to the cell surface may mediate aggregation of algal cells, and that MrpC secreted into the culture medium may participate in algal cells. MrpC plays an important role in the outbreak of bloom.

Metabolomics analysis was carried out to find that substances related to hepatotoxicity and heterotin metabolism were increased, which can be estimated that the metabolic uptake of algal toxins, algal cells through the coupling of metal ions and other aldehydes to reduce algal toxin damage, thus enhance the defense mechanism. The catabolism of Tryptophan is enhanced, which is a precursor of auxin. It is speculated that the synthesis of auxin decrease, induce to produce a stress response. In addition, lipid metabolism upregulation, the weaken of glucose metabolism, photosynthesis and respiration, algal cell aggregation, can be seen as the response to environmental stress.

MrpC protein interacts with the glycosylation-related domains SPY and TPR, suggesting that MrpC protein is glycosylated. Using CRISPR-Cas9 technology to knock out *mrpC*, no algae grow, it is estimated that the cells fail to repair DSB and cause death. The *mrpC* and *egfp* is integrated into the genome of the algae by transposon, but the expression of the protein is disturbed by each other. No fluorescence is observed and the linker need to be optimized.

Keywords: aggregation; MrpC protein; metabolism

厦门大学博硕士学位论文摘要库

1 前言

1.1 水华及其诱发条件研究进展

1.1.1 水华及危害

水华一般是指在一定的温度和光照条件下,当水体富营养化时,浮游植物的生物量显著高于一般水体中的平均值,并在水体表面大量聚集,形成绿色或其他颜色漂浮物的现象^[1]。由具有浮力和运动能力的藻类所引起的水华叫做蓝藻水华,也有部分水华是由浮游动物例如腰鞭幼虫等引起^[2]。蓝藻水华多发生在夏季 6-9 月,受温度、阳光、营养物质的影响,有明显的季节性。当温度在 20℃以上,水体 PH 值偏高,光照度强且时间久,富营养化水体中的蓝藻大量生长增殖,叶绿素 a 浓度超过 10mg/m³,或者藻细胞浓度超过 1.5×10⁷ 个/L,在水面形成一层蓝绿色有恶臭的漂浮物^[3]。

水体营养化是湖泊分类和演化学的一个概念,是指水库、河流和湖泊接收过多的氮、磷等营养物质,水体的功能和结构产生变化,使得浮游藻类尤其是蓝藻爆发性生长繁殖,从而出现蓝藻水华的现象。随着人类经济的发展,人为得对自然造成了很多干扰,大量含氮、磷等营养物质的工业废水和生活污水排入自然环境中,使得淡水和海水中氮、磷含量增加,加速水体富营养化,从而诱发水中的微生物爆发性生长,导致水体呈现蓝色、红色、乳白色和棕色等异常颜色。90 年代以来,我国淡水水体富营养化形势十分严峻,有 66%以上的天然湖泊和水库处于不同程度的富营养化状态,其中重度富营养和超级富营养的约占 22%^[4]。伴随湖泊营养化的一个普遍现象就是水华。太湖、滇池、巢湖、洪泽湖等湖泊每年 5-10 月都会出现水华,给周边人们的社会生活和生产造成重大影响和损失。流动的河流,例如钱塘江、长江最大支流—汉江下游汉口江段中也出现水华^[5]。包括非洲的维多利亚湖、欧洲的波罗的海、北美的伊利湖等,都出现过严重的蓝藻水华^[6]。

水华的危害主要是: (1) 影响饮用水源。供给水源发生水华时,自来水会出现异味和有毒物质,为此需要对水进行相应处理,导致产水率降低,水处理费用增加。蓝藻死亡会产生有毒的次生代谢产物,例如微囊藻毒素、硫化氢和羟胺等。在自然界已知的毒素中,微囊藻毒素排名第二。这些产物通过食物链威胁人类健康,能对肝脏等器官造成严重损害,具有促癌效应。(2) 使水体生态系统

失去平衡。水体是一个生物环境相互依存、相互制约的复杂生态系统。蓝藻大量生长繁殖以及腐败，会造成水体缺氧，鱼类因缺氧而死亡，给养殖业造成重大的经济损失。其释放的微囊藻毒素能抑制其他生物的生长发育，降低水体群落的多样性。同时，密集的藻类降低了水体透明度，阻挡了阳光，影响其他植物的光合作用^[7]。

在自然条件下，越冬时，微囊藻以单细胞状态存在，春季复苏时，逐步成长为数千个细胞的大群体，直至最后上浮到水面形成水华。水华蓝藻以群体形态漂浮于水面，通常由 $10-10^3$ 个单细胞构成^[8]。形成水华的过程中，蓝藻群体的形成和壮大是产生水华的必要条件之一。蓝藻群体对蓝藻的抗捕食压力^[9]和在水体中的迁移速率^[10]有着重要影响，是对野外多变环境的一种适应机制。蓝藻群体的形成与胞外多糖的含量具有直接相关性。当转移至实验室培养时，蓝藻群体形态消失，以分散的单细胞或者少量的双细胞形式存在。这是由于实验室培养条件和自然条件的差异导致的，包括：光照强度^[11]、氮磷营养盐、藻毒素^[12]、浮游生物的摄食^[13]等。

1.1.2 诱发水华的条件

以往普遍认为，蓝藻可以在极短时间内快速生长，使得水华的发生具有突发性，并且难以预测^[14]。事实上，蓝藻水华的爆发只是表观现象，前提是藻量积累到一定程度，并且是一个逐渐形成的过程。孔繁翔提出了蓝藻水华成因的四阶段理论假设：蓝藻水华的形成分为休眠、复苏、生物量增加、聚集和上浮这四个阶段。在冬季，受黑暗和低温条件影响，水华蓝藻处于休眠状态。在春季，受温度和溶解氧的控制，水华蓝藻复苏。当气象和水文达到合适的条件，水体中累积的大量蓝藻群体将上浮至表面，形成肉眼可见的水华^[3]。秦伯强^[15]等人认为水华爆发经历了四个阶段：蓝藻细胞增殖、细胞团形成、细胞团上浮、水华爆发（如图 1.1）。Brookes^[16]和 Oliver^[17]等人认为，蓝藻上浮是由伪空泡的形成和变化来调节自身浮力，当氮、磷等营养物质以及光照强度产生细微变化时，伪空泡会做出一系列响应来改变浮力。Snelder 认为蓝藻的上浮和下沉不是由浮力变化来调节，而是因风力诱导混合或者生物扰动而悬浮的被动过程^[17]。现存的理论和假说表明，蓝藻水华并非由一两个关键因子导致，而是因为水华蓝藻具有独特的生理特

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