

# 假微型海链藻硅吸收及硅化作用与细胞周期偶合关系的研究\*

陈丹丹 王鹏 高亚辉 洪伟鑫 陈长平 梁君荣\*\*

厦门大学生命科学学院, 厦门 361005

**摘要** 采用硅饥饿的培养方法, 假微型海链藻 (*Thalassiosira pseudonana* Hasle et Heimdal) 得以同步生长. 再通过流式细胞仪测定假微型海链藻的细胞周期, 荧光显微镜观察假微型海链藻新硅质壁的形成, 硅钼黄法检测假微型海链藻在细胞周期各阶段硅含量的变化, 研究了假微型海链藻在细胞分裂周期中硅吸收与硅化作用的变化特征及相互间的偶联关系. 结果表明: 硅饥饿 24 h 后, 细胞停滞在 G1/S 期的边界, 重新加入硅后, 细胞同步生长. 同步化培养后 1 h 和 3 h, 分别是吸收硅、合成新壳环带的主要时期, 与 G1/S 期偶合; 第 5 小时和第 7 小时, 分别是吸收硅、合成新壳面的主要时期, 与 G2 + M 期偶合.

**关键词** 硅化作用 硅转运 细胞周期 同步化

硅藻是海洋生态系统中初级生产力的重要组成部分, 占海洋初级生产力的 40%<sup>[1]</sup>, 对海洋生态系统的物质循环和能量流动都起着重要的作用. 不同于其他微藻, 硅藻的生长代谢除了需要碳、氮、磷等营养元素外, 还需要吸收硅来合成其硅质化的细胞壁. 硅藻细胞在硅元素缺乏的条件下, 细胞壁不能形成, 细胞分裂也会受阻停滞<sup>[2]</sup>, 因此硅元素也是硅藻生长代谢所必不可少的. 每一种硅藻的细胞壁都具有其独特而美妙绝伦的硅质形态结构, 这些结构一般是由规则花纹图案的超微孔形成, 或是比较大的孔和穴, 或是小的长刺或绚丽的突起. 这些精细而错综复杂的硅质结构同时又被精确地一代代地复制着, 并作为硅藻形态学分类的特征. 硅藻是如何形成这些形态各异、超微小的复杂的硅质化结构引起了人们的极大兴趣, 这其中包括海洋学家、生物学家、建筑设计师以及从事纳米材料的化学家等. 自 Hildebrand 等<sup>[3]</sup> 在硅藻中发现了一类全新的基因家族——硅转运基因, 有关硅藻硅转运和生物硅化的调控机理的研究逐渐被人们关注.

硅藻细胞合成硅质化细胞壁的过程非常复杂, 包括从外界吸收硅转运到细胞内、硅在细胞内进行浓缩、再转运到细胞内的硅沉积囊泡 (SDV), 以及在硅沉积囊泡内进行生物硅化的过程<sup>[2]</sup>, 其中许多具体细节和调控机理都还不清楚. 利用硅藻在缺硅条件下细胞分裂受阻的特性使细胞同步生长, 这对阐明有关硅质化细胞壁合成的生物化学、分子和细胞过程都有重要意义<sup>[4]</sup>. 本文选取了全基因组序列已被测得的假微型海链藻<sup>[5]</sup> (*Thalassiosira pseudonana* Hasle et Heimdal) 作为研究对象, 采用了硅饥饿方法对假微型海链藻进行同步化培养, 使用流式细胞术和荧光显微观察相结合的方法检测假微型海链藻的细胞周期及硅质壁的形成情况. 并用硅钼黄法测定了假微型海链藻胞外、胞内及硅质壁硅含量随细胞周期的变化情况, 以探明硅吸收和生物硅化与细胞周期的偶合关系. 这也是寻找硅转运和生物硅化相关蛋白及基因, 阐明海洋硅藻硅吸收和细胞内生物硅化相关蛋白的表达调控机理的首要前提.

2009-04-03 收稿, 2009-04-27 收修改稿

\* 国家自然科学基金资助项目 (批准号: 40676082)

\*\* 通信作者, E-mail: Sunljr@xmu.edu.cn

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

假微型海链藻 (*T. pseudonana*, CCMP1335) 购自美国 Provasoli-Guillard 国家海洋浮游植物培养中心, Bigelow 海洋科学实验室。藻种保存条件: 培养温度为 20 °C, 光照强度为 4000 lux, 光暗周期为 L/D = 12 h/12 h, 采用高压灭菌后的人工海水<sup>[6]</sup>培养。

### 1.2 方法

**1.2.1 同步化培养** 将藻种接至 1 L 的聚碳酸酯三角瓶中通气扩大培养, 长至指数期, 离心 (5000 ×g, 15 min) 收集, 用无硅的人工海水洗涤, 重悬, 转接至 800 mL 无硅人工海水中, 培养 24 h 后, 加入 1 mL 的 0.2 mol/L Na<sub>2</sub>SiO<sub>3</sub> 溶液, 进行同步化培养。每隔 1 h 取样, 连续取样 10 h。

**1.2.2 流式细胞仪检测细胞周期** 每隔 1 h 取 10 mL 同步化培养的藻液, 离心去培养基, 加入 300 μL 的磷酸盐缓冲液 (PBS) 重悬, 再加入 700 μL 的 70% 乙醇, -20 °C 储存过夜。离心, 加入 70% 的乙醇反复洗涤至上清无色。向沉淀中加入 1 mL 的 PBS 洗涤去上清, 再加入 1 mL 用 PBS 配制的 0.3% Triton X-100, 室温下静置 40 min。离心, PBS 洗涤, 重悬, 向重悬液中加入 4 μL 的 RNase A, 37 °C 水浴 1 h, PBS 洗涤, 重悬, 再加入 10 μL 的 2.5 mg/mL 碘化丙啶 (PI) 溶液, 室温黑暗 10 min。FL3 通道检测 DNA 含量, 激发光波长 520 nm, 收集 20000 个细胞, 用 MultiCycle 软件计算细胞处于 G1, S, G2 + M 期的相对百分比。

**1.2.3 荧光显微观察** 向硅饥饿后同步化培养的藻细胞中, 加入荧光指示剂 2-(4-吡啶)-5-((4-(2-二甲氨基-氨基-氨基酰基)甲氧基)苯基)恶唑 (PDMPO) (加硅前 5 min) 使其终浓度为 0.1 μmol/L。每半小时取 1 mL 藻液, 离心收集细胞, MilliQ 洗 3 次。用 1 mL 4% 多聚甲醛室温下固定 40 min, 离心去上清, 加 1 mL PBS 洗涤细胞, 离心, 加入甲醇 -20 °C 储存, 以备荧光显微镜观察 (激发波长 365 nm, 发出波长 397 nm)。

**1.2.4 硅钼黄法测定藻细胞内外、硅质壁的硅含量** 每隔 1 h 取 12 mL 同步化培养的藻液, 用

0.22 μm 的滤膜过滤, 取 1 mL 过滤后的培养液, -20 °C 储存, 用于测定胞外的硅含量。用无硅的人工海水将滤膜上的藻细胞洗脱下来, 离心, 弃上清, 向藻细胞中加入 1 mL 的 MilliQ, 沸水浴 10 min, 离心, 取上清, 用于测定胞内的硅含量。沉淀中继续加入 500 μL 的 0.5 mol/L NaOH, 沸水浴 15 min, 冷却后, 加入 250 μL 的 0.5 mol/L H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 中和, 离心, 取上清, 用于测定硅质壁的硅含量。取各提取液 200 μL, 加入 12 μL 的钼酸铵-硫酸混合液, 混匀, 放置 5 min, 再加入 8 μL 的草酸溶液, 混匀, 显色 15 min。380 nm 处, 酶标仪测定吸光值。

## 2 结果

### 2.1 硅饥饿对假微型海链藻生长的限制

对假微型海链藻在硅充足和硅饥饿条件下的生长情况进行比较, 结果如图 1 所示。硅充足条件下, 假微型海链藻生长旺盛, 细胞密度持续增加。硅饥饿条件下, 假微型海链藻饥饿 12 h 后, 生长逐渐停滞, 至 24 h 这段时间内, 细胞密度保持恒定。硅饥饿 24 h 后, 假微型海链藻细胞密度逐渐下降, 细胞因缺硅而开始衰亡。由于在细胞培养同步化前需要细胞停滞生长且又保持足够的细胞活力, 根据以上硅饥饿对假微型海链藻生长的限制情况, 我们选取了 24 h 这个时间点作为硅饥饿培养的临界点。

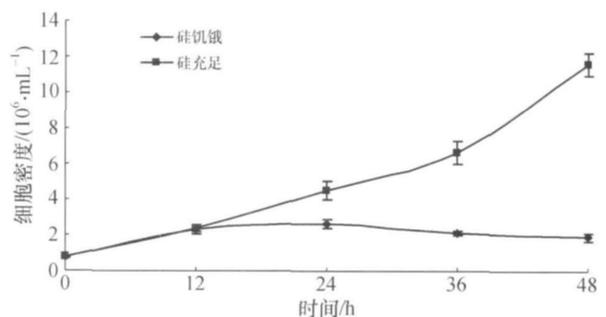


图 1 *T. pseudonana* 在硅饥饿和硅充足的条件下生长情况对比图

### 2.2 流式细胞仪检测假微型海链藻的细胞周期

PI 可以与细胞内的核酸结合, 用 RNAase 将 RNA 消化后, 通过流式细胞仪检测到的 PI 的荧光强度直接反映了细胞内 DNA 的含量。根据 DNA 的含量, 经 MultiCycle 软件分析后, 可知细胞处于细

胞周期各阶段的相对百分比, 其结果如图2所示. 硅饥饿24 h (0 h), 近50%的细胞停滞在了G1期, 32%的细胞处在S期, 19%的细胞处在G2+M期. 重新加入硅后, 细胞恢复生长. 加入硅后, 第3 h, 80%的细胞进入到S期. 第5 h, 78.5%的细胞处于G2+M期, 达最大值. 加入硅10 h后, 处于G1期的细胞数量逐渐增加, 细胞进入新一轮的分裂.

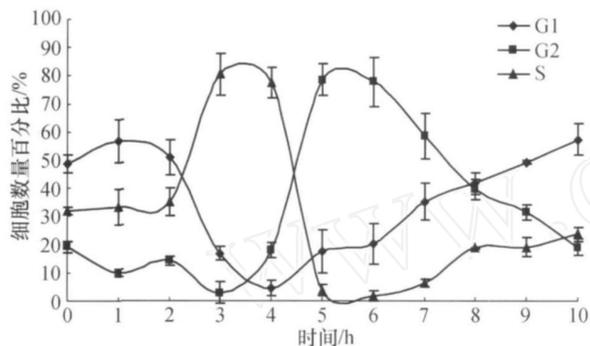
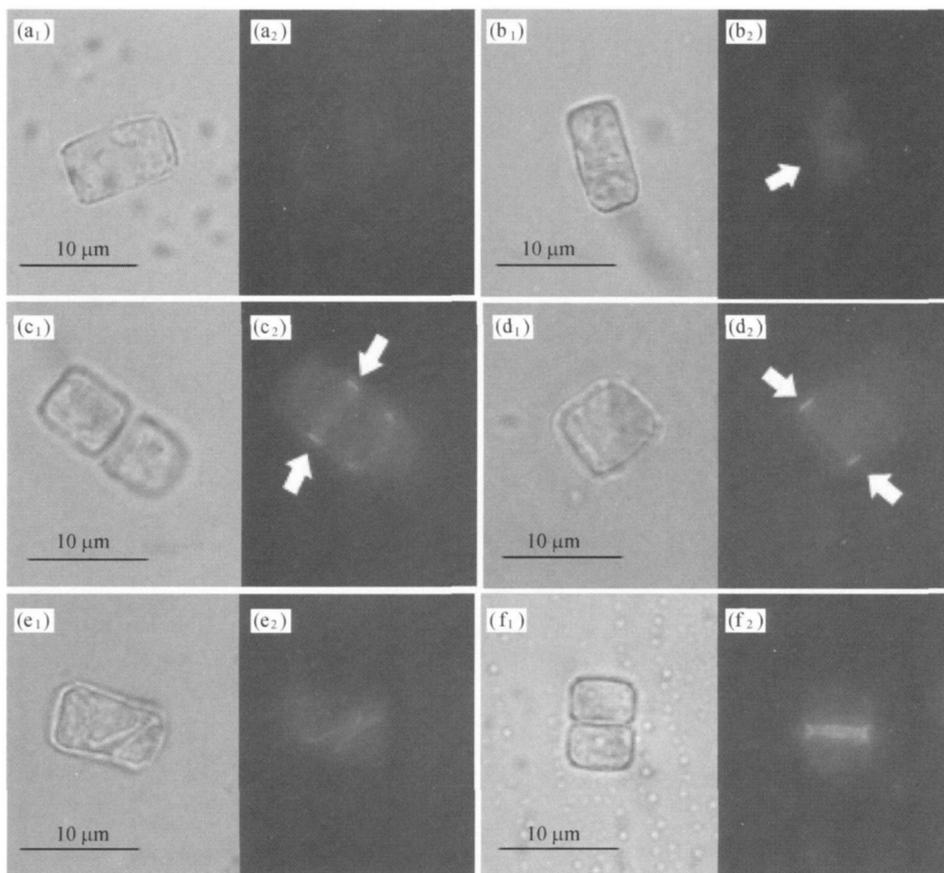


图2 *T. pseudonana* 同步化培养过程中处于G1, S, G2+M期的细胞数量百分比

### 2.3 荧光染色指示假微型海链藻硅质壁的形成

PDMPO是一种荧光化合物, 它能够迅速进入硅藻细胞内, 与细胞内的活性硅共沉积, 在365 nm激发光的激发下发出绿色荧光. 因此, PDMPO能作为指示剂指示硅质壁的形成<sup>[7,8]</sup>.

同步化培养的细胞, 在加入PDMPO和硅酸钠后30 min, 荧光显微镜下没有观察到荧光现象. 1 h时, 细胞内出现微弱的绿色荧光(图3(b<sub>2</sub>), 箭头所示), 这表明细胞开始形成新的硅质壁. 2 h时, 观察到了新形成的壳环带(图3(c<sub>2</sub>), 箭头所示). 3 h时, 形成新的壳环带的细胞数量增多, 且在个别细胞内能较为清晰的观察到两个新形成的下壳面(图3(e<sub>2</sub>)). 此后的几小时, 越来越多的细胞中形成了新的下壳面, 且新壳面的荧光强度也逐渐增强. 在6 h时, 已可以观察到细胞分离现象(图3(g<sub>2</sub>)). 8 h后, 大多细胞都已完成了细胞分裂, 两个子细胞各自带有一个发绿色荧光的下壳面完全分离开(图3(h<sub>2</sub>)).



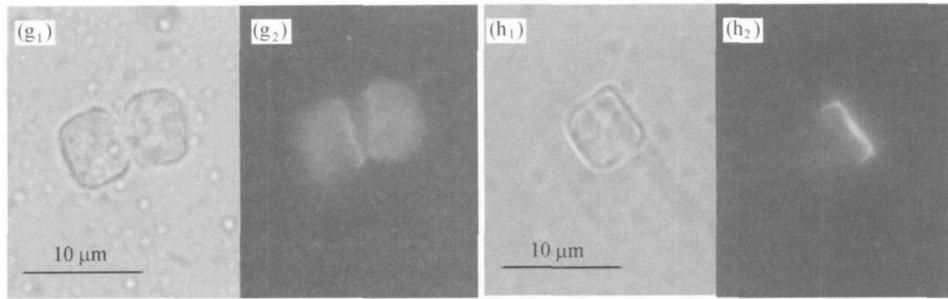


图3 *T. pseudonana* 硅质壁的形成过程(亮面观)

(a<sub>1</sub>)—(g<sub>1</sub>): 光学显微照片; (a<sub>2</sub>)—(g<sub>2</sub>): 荧光照片. 图片拍摄的时间顺序: 加入硅和 PDMPO 后 30 min (a<sub>1</sub>), (a<sub>2</sub>); 1 h (b<sub>1</sub>), (b<sub>2</sub>); 2 h (c<sub>1</sub>), (c<sub>2</sub>); 3 h (d<sub>1</sub>), (d<sub>2</sub>), (e<sub>1</sub>), (e<sub>2</sub>); 5 h (f<sub>1</sub>), (f<sub>2</sub>); 6 h (g<sub>1</sub>), (g<sub>2</sub>); 8 h (h<sub>1</sub>), (h<sub>2</sub>).

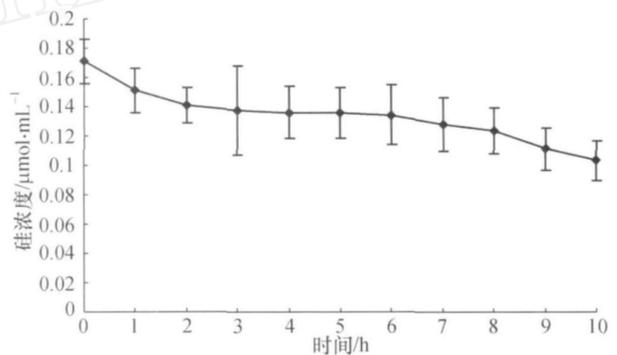
## 2.4 同步化培养过程中假微型海链藻细胞外、胞内及硅质壁硅含量的变化

实验测定了同步化培养过程中, 假微型海链藻细胞外、细胞内及硅质细胞壁硅含量的变化, 结果如图 4 所示. 随细胞分裂的进行, 培养基中硅被细胞逐渐吸收, 硅浓度持续下降(图 4(a)); 随同步化的进程, 细胞内的硅含量出现起伏变化, 在硅加入后的 1, 5 h 两处出现吸收硅的高峰(图 4(b)); 硅质细胞壁的硅含量在硅加入后的 3 h 时陡然增加, 在 7 h 时再次出现陡增达峰值(图 4(c)), 细胞硅质壁硅含量的增加表明了细胞内发生了硅化作用形成了新的硅质壁, 在 3, 7 h 时硅化作用最为活跃.

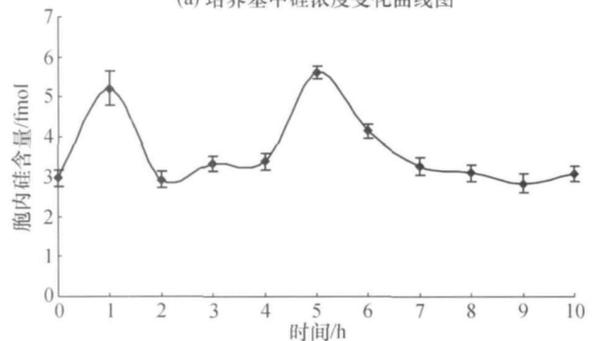
## 3 讨论

### 3.1 缺硅条件下硅藻的生长停滞点

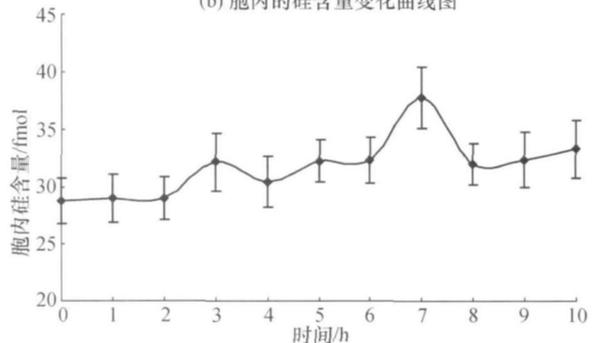
几乎所有硅藻的生长都需要硅元素, 在缺乏硅的条件下, 硅藻的生长普遍存在两个停滞点, 一个在 G<sub>1</sub> 期(或是 G<sub>1</sub>/S 期的边界), 另一个在 G<sub>2</sub>+M 期<sup>[9,10]</sup>. 其停滞点根据硅藻种类的不同而有所不同. 根据 Coombs 等<sup>[11]</sup>的研究, 舟形藻(*Navicula pelliculosa*)停滞点在 G<sub>2</sub> 期. 而本实验结果表明, 假微型海链藻在硅饥饿后, 细胞的主要停滞在 G<sub>1</sub>/S 期的边界. 有人认为 G<sub>1</sub>/S 停滞点的存在表明硅藻 DNA 合成有赖于硅元素, 虽然硅元素对 DNA 聚合酶或其他蛋白是否有直接作用还没得到证实<sup>[6]</sup>. 但也有研究认为停滞可帮助细胞确定是否有足量的硅质来完成细胞壁的生物合成<sup>[10]</sup>. 本文利用了硅藻的这一特性, 对硅藻硅吸收及硅化作用与细胞周期进程间关系进行了探讨.



(a) 培养基中硅浓度变化曲线图



(b) 胞内的硅含量变化曲线图



(c) 硅质壁的硅含量变化曲线图

图4 同步化培养的 *T. pseudonana* 胞外、胞内及硅质壁的硅含量随细胞周期变化曲线图

### 3.2 假微型海链藻的同步化培养

根据本实验的结果,假微型海链藻在同步化培养的第5小时进入G2+M期,这与Hildebrand等<sup>[9]</sup>的结果有所不同(G2+M期的最大值在4h),但两种结果并不矛盾.硅藻的生长除受硅元素的影响外,也受光照,温度及其他营养元素的影响.细胞培养条件细微的差异都将引起细胞生长状况的不同.在本实验中,S期和G2+M期分别在3h,5h处同步生长的细胞比例达80%,同步化效率较高.硅饥饿前培养的细胞密度,细胞转接至无硅培养基中的密度,及硅饥饿时间的长短都是影响同步化效率的关键.由于硅藻细胞衰亡后,硅质壁会重新溶解释放到胞外<sup>[10]</sup>,因此硅饥饿前的细胞扩大培养,应避免细胞密度过大,以减少衰败细胞的数量.细胞转接至无硅培养基中的密度也应控制,细胞密度控制在 $1 \times 10^6$  细胞/mL左右较好,密度过大会导致细胞在硅饥饿的过程中聚集成团,影响硅饥饿的效果和流式细胞仪的检测.硅饥饿的时间也要恰到好处,既要细胞停滞生长,又要细胞保持足够的活力.

### 3.3 假微型海链藻吸收硅及硅化作用与细胞周期的偶合关系

综合分析实验结果可知,在本实验的培养条件下,假微型海链藻完成一次细胞分裂约需8h.同步化培养开始后的1h,细胞从培养基中大量吸收硅,并在胞内浓缩聚集;第3小时(即细胞分裂进入到S期),细胞内的硅沉积硅化合成了子细胞的壳环带;第5小时(即细胞分裂进入到G2+M期),细胞再次从培养基中吸收大量的硅,为新的下壳面的合成准备原料;第8小时,子细胞的下壳面基本合成完毕,两个子细胞分离,细胞分裂结束.

探究细胞周期与细胞吸收硅和生物硅化偶合关系,采用同步化培养将大多数的细胞限定在某一特定时期如壳面的合成,这段时间内参与这一进程的基因和蛋白质很可能会最大限度地表达.根据本实验结果可判断,同步化培养的第1,5小时,细胞内的硅含量剧增,是细胞吸收硅的主要时段,说明硅转运相关基因和蛋白在此时最为活跃.第3,7

小时,硅质壁的硅含量剧增,是细胞进行硅化合成硅质壁的主要时段,与硅化作用相关的基因和蛋白在此时表达得最多.这一偶合关系的研究对硅藻吸收硅和硅化作用调控机理的进一步研究提供了重要的参考依据.

### 参 考 文 献

- 1 Nelson DM, Tréguer P, Brzezinski MA, et al. Production and dissolution of biogenic silica in the ocean: Revised global estimates, comparison with regional data and relationship to biogenic sedimentation. *Global Biogeochem Cycl*, 1995, 9: 359—431
- 2 Hildebrand M. Biological processing of nanostructured silica in diatoms. *Progress in Organic Coating*, 2003, 47: 256—266
- 3 Hildebrand M, Volcani BE, Gassmann W, et al. A gene family of silicon transporters. *Nature*, 1997, 385: 688—689
- 4 Frigeri LG, Radabaugh TR, Haynes PA, et al. Identification of proteins from a cell wall fraction of the diatom *Thalassiosira pseudonana*: insights into silica structure formation. *Mol Cell Proteomics*, 2006, 5: 182—193
- 5 Armbrust E, Berges J, Bowler C, et al. The genome of the diatom *Thalassiosira pseudonana*: Ecology, evolution, and metabolism. *Science*, 2004, 306: 79—86
- 6 Darley WM, Volcani BE. Role of silicon in diatom metabolism. A silicon requirement for deoxyribonucleic acid synthesis in the diatom *Cylindrotheca fusiformis* Reimann and Lewin. *Experimental Cell Research*, 1969, 58: 334—342
- 7 Hazelaar S, Van der Strate HJ, Gieskes WC, et al. Monitoring rapid valve formation in the pennate diatom *Navicula Salinarum* (Bacillariophyceae). *J Phycol*, 2005, 41: 354—358
- 8 Shimizu K, Amo YD, Brzezinski MA, et al. A novel fluorescent silica tracer for biological silicification studies. *Chemistry & Biology*, 2001, 8: 1051—1060
- 9 Hildebrand M, Frigeri LG, Davis AK. Synchronized growth of *Thalassiosira pseudonana* (Bacillariophyceae) provides novel insights into cell wall synthesis processes in relation to the cell cycle. *J Phycol*, 2007, 43: 730—740
- 10 Martin-Jezequel V, Hildebrand M, Brzezinski MA. Silicon metabolism in diatoms: implications for growth. *J Phycol*, 2000, 36: 821—840
- 11 Coombs J, Halicki PJ, Holm-Hansen O, et al. Studies on the biochemistry and fine structure of silica shell formation in diatoms. Changes in concentration of nucleoside triphosphates during synchronized division of *Cylindrotheca fusiformis* Reimann and Lewin. *Exp Cell Res*, 1967, 47: 302—314