

学校编码: 10384

分类号 _____ 密级 _____

学号: 20120051302017

UDC _____

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

钝顶螺旋藻两种不同形态藻丝体的生理和
差异蛋白质组分析

Study on physiological and protein expression differences
among two morphologic filaments of *Spirulina platensis*

赵 振 坤

指导教师姓名: 刘仁海 副教授

徐 虹 副教授

专业名称: 水生生物学

论文提交日期: 2008 年 06 月

论文答辩时间: 2008 年 07 月

学位授予日期: 2008 年 月

答辩委员会主席: _____

评 阅 人: _____

2008 年 月

钝顶螺旋藻两种不同形态藻丝体的生理和差异蛋白质组分析

指导教师: 刘仁海 副教授

徐虹 副教授

厦门大学

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

兹提交的学位论文，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的其他个人或集体的研究成果，均在文中以明确方式标明。本人依法享有和承担由此论文产生的权利和责任。

声明人（签名）：

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人完全了解厦门大学有关保留、使用学位论文的规定。厦门大学有权保留并向国家主管部门或其指定机构送交论文的纸质版和电子版，有权将学位论文用于非赢利目的的少量复制并允许论文进入学校图书馆被查阅，有权将学位论文的内容编入有关数据库进行检索，有权将学位论文的标题和摘要汇编出版。保密的学位论文在解密后适用本规定。

本学位论文属于

- 1、保密（ ），在 年解密后适用本授权书。
- 2、不保密（ ）

（请在以上相应括号内打“√”）

作者签名： 日期： 年 月 日

导师签名： 日期： 年 月 日

目 录

摘要	I
Abstract	III
1 前言	1
1.1 螺旋藻简介	1
1.2 螺旋藻的应用	2
1.3 蓝藻中的细胞形态建成	4
1.4 螺旋藻形态学研究进展	5
1.5 植物中形态建成的研究进展	6
1.6 蛋白质组学的研究	7
1.7 本研究的目的是和意义	12
2 材料与方法	14
2.1 材料	14
2.2 方法	21
3 结果与分析	31
3.1 分离出的不同形态钝顶螺旋藻藻丝体	31
3.2 不同形态藻丝体的形态参数	32
3.3 不同形态藻丝体的生长曲线	33
3.4 不同形态藻丝体的叶绿素 a 含量	34
3.5 不同形态藻丝体的光合作用	35
3.6 不同形态藻丝体的总蛋白含量	37
3.7 不同形态藻丝体的 SOD 酶活力	38
3.8 不同形态藻丝体蛋白表达量的差异	38
4 讨论	50
4.1 两种不同形态藻丝体的生理学	50
4.2 两种不同形态藻丝体的蛋白质组分析	51
4.3 如何提高质谱结果的可靠性	55
5 小结与展望	56

参考文献.....	57
附录.....	63
致谢	66

厦门大学博硕

Catalogue

Abstract (Chinese version)	I
Abstract (English version)	III
1 Preface	1
1.1 Introduction of <i>Spirulina platensis</i>	1
1.2 Application of <i>Spirulina platensis</i>	2
1.3 Cell morphogenesis of <i>Cyanobacteria</i>	4
1.4 Development of morphology in <i>Spirulina platensis</i>	5
1.5 Development of morphology in Plant	6
1.6 Development of proteomics	7
1.7 Aims and significances of this research	12
2 Materials and methods	14
2.1 Materials	14
2.2 Methods	21
3 Results and analysis	31
3.1 Different morphologic filaments of <i>Spirulina platensis</i>	31
3.2 Growth curves of different morphologic filaments	32
3.3 Morphological parameters of different morphologic filaments	33
3.4 Content of chlorophyll <i>a</i> of different morphologic filaments	34
3.5 Photosynthesis of different morphologic filaments	35
3.6 Content of total protein of different morphologic filaments	37
3.7 Activity of SOD enzyme of different morphologic filaments	38
3.8 Differential proteomics analysis of different morphologic filaments	38
4 Discussion	50
4.1 Physiology of different morphologic filaments	50
4.2 Different protein expression in different morphologic filaments	51
4.3 How to improve the liability of MS results	55

5 Summary and prospect	56
References	57
Appendix	63
Acknowledge.....	66

厦门大学博硕

摘要

螺旋藻由于具有高营养价值与独特的保健功效以及富含多种生物活性物质而成为全球开发规模最大的经济微藻之一。一般而言,螺旋藻藻丝体在通常情况下是呈规则的螺旋形,但在外界环境条件改变或不良环境如低温、低光强、紫外线等条件的胁迫下,藻丝体会从正常螺旋形转变为卷曲度不同的螺旋形甚至是直线形。在形状改变的同时,藻丝体在营养学、生理学、生物化学、遗传学及养殖特性上也会发生相应的改变。分子生物学技术和蛋白质组学的快速发展为深入研究螺旋藻多形性变异的分子机制提供了重要手段。

本研究从三株钝顶螺旋藻(*Spirulina platensis*) FACBH 编号 869、882 和 1124 中分别分离纯化出了螺旋形(spiral, S)和直线形(linear, L)两种不同形态的藻丝体,并对这两种不同形态藻丝体的形态学特征、生长速率、叶绿素 a 含量、光合作用、蛋白含量、SOD 酶活性等分别进行了研究。结果发现,不同形态藻丝体在生长速率上并没有显著差别,但是在生理和生化组成上则存在不同程度差异:(1) 不同形态藻丝体叶绿素 a 含量不同,螺旋形藻丝体的叶绿素 a 含量比直线形藻丝体高,与此一致的是,螺旋形藻丝体的光合作用速率也比对应的直线形藻丝体大。(2) 不同形态藻丝体的总蛋白含量和 SOD 酶活力也存在差异。869 和 1124 藻株中直线形藻丝体的总蛋白含量分别比螺旋形藻丝体高 7.4%和 6.9%,而 882 藻株中直线形藻丝体的总蛋白含量则比螺旋形藻丝体低 9.6%;同时各藻株中不同形态藻丝体的 SOD 酶活力与其总蛋白的含量变化是一致的,869 和 1124 藻株中直线形藻丝体的 SOD 酶活力分别比螺旋形藻丝体高 13.8%与 29.5%,而 882 藻株中直线形藻丝体的 SOD 酶活力则比螺旋形藻丝体低 14.7%。

为了研究螺旋藻形态建成的分子调控机制,我们对三株藻株的螺旋形和直线形藻丝体的全蛋白进行了差异蛋白组分析,双向电泳分离结果显示有 17 个差异表达蛋白。其中,9 个蛋白点在形藻直线丝体中下调,8 个蛋白点在直线形藻丝体中上调。对这些差异蛋白点进行质谱分析和数据库检索,发现 14 个蛋白可能与螺旋藻的形态建成相关,并对其中 10 个蛋白进行了讨论,它们分别是:与细胞内光合色素蛋白表达及活性改变有关的藻蓝蛋白连接多肽 CpcI;参与藻丝体细胞壁合成与分解代谢的细胞壁水解酶/自溶酶、肽聚糖 N-乙酰葡萄糖胺转移酶、UDP-N-乙酰己糖胺焦磷酸化酶;促进或抑制化合物进出膜,改变细胞的内部环

境的 ABC 转运系统蛋白；调控叶绿素 a 合成的原叶绿素酸酯还原酶；调节营养物质运输的 OmpR；调控转录的 MarR；在不良环境中调控氨基酸代谢的 Glu/Leu/Phe/Val 脱氢酶以及氮调节蛋白 P-II。

关键词：钝顶螺旋藻 (*Spirulina platensis*)；形态建成；差异蛋白质组学

厦门大学博硕

Abstract

Spirulina is one of significant important microalgae which has high value of nutrition, possesses unique function of health protection, and produces multiply bioactive compounds. Generally speaking, the filament of *Spirulina* is regularly spiral form; however, its filaments can change from spiral to other abnormal morphologies, such as different degree of spiralization curved and even linear shapes, under intimidation of some exoteric alternative or bad environmental conditions, for example low temperature, low light intensity, ultraviolet radiation and so on. While morphology altered, the characteristics of filament also change accordingly in nutriology, physiology, biochemistry, genetics and breed aquatics. Rapid development of techniques of molecular biology and proteomics are helpful to explore the mechanism of *Spirulina* morphological alteration.

Algal trichomes in two different forms, *spiral*(*S*) and *linear* (*L*), were extracted and purified from *Spirulina platensis* FACBH Nos. 869, 882 and 1124, and research was conducted with regard to the morphological characteristics, growth rate, chlorophyll *a* content, photosynthesis, protein content, and SOD enzymatic activity of the two forms of algal trichomes. The results show that different forms of algal trichomes do not have a significant difference in growth rate but differ in physiology and biochemical composition to varying degrees: (1) different forms of algal trichomes contain different levels of chlorophyll *a*, with spiral algal trichomes containing more chlorophyll *a* than linear algal trichomes; consistent with this difference, spiral algal trichomes have faster photosynthesis than their linear counterparts; and (2) different forms of algal trichomes are different in total protein and SOD enzymatic activity as well. In Nos. 869 and 1124 algal strains, the SOD enzymatic activity of linear algal trichomes is higher than that of spiral algal trichomes by 13.8% and 29.5%, respectively, while in No. 882 algal strain, the SOD enzymatic activity of linear algal trichomes is higher than that of spiral algal trichomes by 14.7%.

To examine the molecule regulating mechanism of the formation of spiral algal

trichomes, we analyzed the total protein of the spiral and linear algal trichomes of three algal strains. Two-dimensional electrophoresis results show 17 differentially expressed proteins. Of these proteins, nine protein spots are downwardly adjusted in linear algal trichomes, so are eight protein spots upwardly in linear algal trichomes. A mass spectrographic analysis and database search found that possible connections between 14 proteins and the formation of the spiral algae and 10 of these proteins were discussed. CpcI, which is related to the changes of expression and activity of photo-pigment protein; Cell-wall hydrolase/autolysin, UDP-N-acetylglucosamine-N-acetylmuramyl-(pentapeptide)pyrophosphoryl undecaprenol N-acetylglucosamine transferase, UDP-N-acetylhexosamine pyrophosphorylase, which are participators in anabolism and catabolism of cell-wall; ABC transporter protein, which can transfer compounds between membranes stimulative or repressively and then regulates environment in vivo; Light-dependent protochlorophyllide oxido-reductase, which regulates anabolism of chlorophyll a; OmpR, adjusting nutrition transportation; transcriptional regulator of MarR family protein, which regulates transcription of protein; Glu/Leu/Phe/Val dehydrogenase and Nitrogen regulatory protein P-II, acting as regulation of amino acid metabolism in bad environment.

Key word: *Spirulina platensis*; Morphogenesis; Differential proteomics

1 前言

1.1 螺旋藻简介

1.1.1 螺旋藻的发现

1940年,法国生理学家 Dangeard 最早描述了被非洲乍得湖当地土著居民当作食物食用的螺旋藻。但是直到 25 年之后,法国的 Clement 博士和比利时植物学家 Jean Leonard 对螺旋藻的重新发现以及第一次对乍得湖螺旋藻进行分离培养的实验报道,才引起研究者的重视^[1]。1973年,墨西哥人通过大量的人体试验,证实螺旋藻没有毒性和副作用,可作为食品和饲料使用^[2]。随后,螺旋藻理想的蛋白质组成,被美国的食物蛋白咨询公司和联合国粮农组织(FAO)正式确认,并向全世界推荐发展螺旋藻。1993年在摩纳哥首次举行的螺旋藻世界大会一致认为螺旋藻是人类未来理想的食物。现在美国、法国、日本等国家均用螺旋藻来补充日常营养,防治各种疾病。

1.1.2 螺旋藻的形态生物学和生理学特性

螺旋藻(*Spirulina*),又称节旋藻(*Arthrospira*),在分类学上属于蓝藻门,颤藻纲,螺旋藻属,是一种多细胞、不分枝、无异形胞的微型丝状藻。藻细胞靠分裂增殖,营光合自养,主要生长于热带高温的碱性湖水中,同时广泛分布于土壤、沼泽、温泉、淡水及咸水湖泊和海洋中,在地球上已有 35 亿年的历史,是现存最古老的植物之一^[1]。虽然目前发现的螺旋藻有 50 多种,但是大规模培养的只有极大螺旋藻(*S. maxima*)与钝顶螺旋藻(*S. platensis*)^[2]。

螺旋形状是螺旋藻属的特性,但是螺距及螺旋直径随品种不同而异。光学显微镜下,钝顶螺旋藻呈蓝绿色,多细胞线性排列形成丝状,细胞近方形,细胞宽 6~8 μm ,长 4~6 μm ,螺旋疏松弯曲,螺旋藻宽 33~42 μm ,螺间距 52~84 μm ,藻丝长 200~500 μm ,末端细胞宽圆形,横壁略收缢。极大螺旋藻呈灰绿色,细胞宽 7~9 μm ,长小于宽,螺间距 70~80 μm ,顶端微尖,横壁不收缢^[3]。

螺旋藻是地球上最早出现的产氧光合原核生物,其超微结构和生物特性很像细菌和高等植物的叶绿体,其藻细胞中含有不成堆的光合层片(类囊体),光合作用的电子传递反应发生于类囊体内,它所含的光合色素有叶绿素 a,藻蓝蛋白、藻红蛋白及别藻蓝蛋白。据研究发现,钝顶螺旋藻光能利用率为 6%~12%,远远高于自然生长或种植的作物^[3]。

1.2 螺旋藻的应用

1.2.1 螺旋藻的化学组成及营养保健价值

螺旋藻的蛋白质含量占 60%~70%，相当于牛羊肉的 3~4 倍，小麦、大米的 8~10 倍。其氨基酸组成比例十分理想，其中 8 种必需氨基酸含量接近或超过 FAO 推荐的标准。同时还含有较多对人体有益的不饱和脂肪酸和微量元素，以及丰富的维生素 E 和 β -胡萝卜素。美国、日本和法国的科学家经过多次临床实验证实螺旋藻对许多疾病具有预防作用，而又没有任何副作用，这与螺旋藻所含的多种活性成分是分不开的(见表 1)^[5]。

表 1 螺旋藻对某些疾病的预防机理

Table 1. The defence mechanism of *Spirulina* against some disease

病名	螺旋藻的预防机理
糖尿病 胃病	螺旋藻为营养碱性食品，能增加营养并且改善酸性体质，调整新陈代谢，消化率高达 95%
高血压 心脏病	螺旋藻能降低胆固醇，且钾的含量远高于钠，丰富的叶绿素可以改善血红素水平，提高血液循环系统的功能
贫血病	螺旋藻含丰富的铁质和叶绿素
肝病	螺旋藻能为病人提供高蛋白和维生素
肾脏病	螺旋藻可以清除由重金属和药物引起的肾毒素，起清洁肾脏的作用
风湿病	螺旋藻所含的 γ -次亚麻油酸(GLA)对于风湿性关节炎很有帮助
癌症	螺旋藻含丰富的天然 β -胡萝卜素,以及其他植物罕有的藻青素,因此对各种癌症具有抑制作用
艾滋病	螺旋藻含有一种糖脂质的硫酸酯，美国国家癌症组织(NCI)经动物实验证明具有预防艾滋病的作用
骨骼疏松症	含丰富钙质的螺旋藻，可起到补钙的作用

1.2.2 饵料与饲料业

螺旋藻是一种营养价值高的优质饵料，可提高水产动物特别是海珍品育苗成活率，降低育苗成本，提高幼体的免疫力和活力，还可使观赏鱼类体色鲜艳。对鲍鱼、对虾、鱼、鲷鱼、鲂鱼、扁贝、珍珠贝等均有良好的营养效果^[2]。在国际

上,螺旋藻作为优质饵料已占很大的比重。日本 DIC 公司在泰国兴建的螺旋藻养殖场年产 150t,其中作饲料的就有 50t-60t,墨西哥 TEXCOCO 公司年产藻粉 300t,其中有 100t 用于饵料和饲料,我国台湾省年产藻粉 300t,其中有 120t 用于虾苗和其他海珍品、观赏鱼类和贝类的饲料。我国已是螺旋藻的养殖大国,也是水产养殖的大国,故在这方面的应用存在很大的潜力。由于不同的品种,不同的幼苗对营养要求不同,不同发育期幼体对饵料颗粒大小要求也不同,故应研制出各种不同配比,不同规格的螺旋藻饵料,生产出系列产品来满足不同幼苗的需要^[6]。

1.2.3 美容与化妆品业

螺旋不仅营养丰富,可作为优质食品和饲料,还由于螺旋藻具有清除和抑制自由基的能力,能起到防皱、防晒、抗辐射、祛斑、抗衰老的作用,故广泛应用于美容与化妆品行业。根据北京医科大学药物所、昆明医学院、昆明市中医院、昆明医学院第一附属医院等皮肤科和医学美容中心等单位进行的 236 例临床试用表明:螺旋藻营养液能提供皮肤所需要的氨基酸、藻多糖、SOD 等多种营养活性成分,有增加皮肤水弹性、润肤保湿、除皱、祛斑等功效,同时由于螺旋藻化妆品的透过性较好,能起到皮肤表面和深层营养及护理作用,而且使用十分安全,对皮肤没有刺激和致敏作用。由于化妆品对色泽、气味等有一定的特殊要求,故螺旋藻作化妆品应用,应经过提取、脱色和除腥等工艺过程,制成相应的液剂。不同的提取方法对螺旋藻营养液的成分、功能有较大的影响。其中以不加酶或酸的超滤效果取好^[4]。

1.2.4 废水处理和环保业

把螺旋藻培养应用于废水处理是很有发展前景的。因为丝状的螺旋藻比较容易从培养液中分离出来,是一种用于废水处理很有前途的微藻。用各种来源的,经过一定处理的污水培养螺旋藻,不但可以使污水得以净化,减少环境污染,还可以将得到的藻生物量用作饲料、肥料,甚至还可以用于生产有用的化学物质。在这方面已作了许多研究工作。例如,利用城市污水、糖蜜发酵废水,动物排泄物,以及缫丝废水、制药、酿造、制单等工业有机废水,造纸废水、有机印染废水、味精肌废水等配制成培养基,用于养殖螺旋藻,这说明螺旋藻应用于上述废水的二级处理是可行的。吴开国等以沼气池发酵液配制了螺旋藻培养基(BGM)培养钝顶螺旋藻,平均产量达 7.43g(干藻粉)/m² d,平均蛋白质含量为 62.27%,

所含 8 种必需氨基酸与 Zarrouk 培养液培养的螺旋藻相近，并含有丰富的 β -胡萝卜素及锌、硒、铜等人体必需的微量元素，其培养成本远低于 Zarrouk 培养液的培养产品^[7]。另外，蒋培森等利用啤酒厂废水污泥培养钝顶螺旋藻的研究也是废水综合利用的又一例证^[8]。在用废水养殖螺旋藻的过程中，螺旋藻始终是优势藻类。它在稀释废水中的生长状态、生理活性与自养时十分接近。它不仅具有上浮性而且易于收获，生长过程中还能分泌胞外生物絮凝剂，从而强化了废水处理过程。收获的藻粉是一种优质蛋白的来源，也为废水处理工程带来了效益，开辟了利用废水蛋白源的新途径。由于螺旋藻在养殖过程中能有效去除有机废水中的营养源，因而明显净化了废水。在传统的三级处理相比，用螺旋藻处理废水的过程，具有成本低、能耗少、效益大的优点，是一项非常有开发潜力的环保工程。当然，还要结合筛选和驯化高效混合营养型的藻种，研究处理工艺，才能取得良好的社会和经济效益。此外，细菌和蓝藻是自然界生物圈中几乎一切固定氮的来源，而蓝藻又是唯一既具有光合作用产生氧气，又具有固氮能力的生物。在水稻田中培养螺旋藻，当水田的水分排干后，藻体腐烂，便成为一种很好的氮肥而被水稻利用。

1.3 蓝藻中的细胞形态建成

目前，对于蓝藻中的细胞形态建成主要是集中在鱼腥藻 *Anabaena* sp.PCC 7120 异形胞的形成，并且对于其异形胞的形成与分布图式已经在基因水平上阐述的比较明确。鱼腥藻藻丝体由一系列细胞组成，在缺氮诱导的条件，其中一些营养细胞分化成异形胞进行固氮作用，形成较规律的图式。其分布图式的形成和发育过程的调控机理是异形胞分化遗传学研究中的两个主要方面。

越来越多的证据表明，在分化过程中基因表达调控主要发生在转录水平上，但是调控机理和调控网络大多尚不清楚。根据基因调控和细胞学证据，有学者认为，异形胞的发育过程应分为三个阶段，即启动分化、细胞分裂的终止和形态建成^[9]。因此，目前已经发现的与蓝藻分化有关的基因可以分三个阶段进行描述。一是启动异形胞分化的基因，虽然已发现并鉴定了很多异形胞分化必需的基因，其中有四个基因是启动异形胞发育所必需的，即 *ntcA*, *hanA*, *hetR* 和 *hetF*。二是细胞分裂的终止，目前已证明 *hetC* 基因对于异形胞发育早期细胞分裂的终止起关键的作用。三是参与控制异形胞形态建成的基因，包括包被多糖层与糖脂层

组成的生物合成、运输、组装以及定位等基因和决定类囊体膜系与蛋白复合体重组的基因等^[10]。

1.4 螺旋藻形态学研究进展

早在 1985 年, Hindak 就指出自然界的螺旋藻存在不同的形态, 但未提及有直线形^[11], 胡鸿钧等则报道螺旋藻在一定的条件下能够从螺旋形(helical)转变成直线形(linear)^[12]。吴开国发现钝顶螺旋藻纯种静止数周后, 表层结成的薄膜全部变成了直线形^[13]。Avigad 认为当培养温度和光照增强时, 螺距可以变小; 而在光强度很低的情况下, 螺距可以很长, 超过 100 μm ^[14]。汪志平也发现螺旋藻长时间静止培养时更容易发生形态变异^[10], 同时对螺旋形螺旋藻和直线形螺旋藻这两种不同形态藻丝体的生物量、蛋白含量、遗传背景和蛋白质差异进行过初步比较研究^[15]。彭卫民等从正常培养的藻液中分离得到了直线形变异藻丝体, 并对其藻丝体进行了上浮性分析和藻胆蛋白含量分析^[16]。吴红艳等用太阳紫外线照射钝顶螺旋藻, 发现藻丝体会被打断而变短^[17]。这些研究结果表明, 螺旋藻螺旋形的特征形态, 在自发和诱导条件下均会发生变异, 藻丝体的螺距长度和形态会发生改变, 甚至变为直线形或其他扭曲形状。螺旋藻形态变异的现象不仅在实验室培养条件下时有发生, 即使在国内外的规模化工厂化养殖实践中, 随着培育条件的变化, 这种现象也频繁发生, 我们在福建顺昌螺旋藻养殖场采集到的螺旋藻也发现了多形性变异的存在。由此可见, 螺旋藻形态的多形性是一种普遍的现象。

但是关于引起螺旋藻发生形态转变的原因和机理, 不同学者提出了不同看法。Van E 等认为藻丝体的不同形态变化可能是由于细胞表面失水或复水使细胞刚性发生改变的结果^[18]。Vladeanu 等、陈必链等和 Rajagopal 等的研究表明, 用⁶⁰Co- γ 射线、激光及 UV-B 等照射螺旋藻导致其形态的改变, 可能与照射后螺旋藻细胞内光合色素蛋白的表达及活性改变有关^[19-21]。而汪志平等认为螺旋藻形态的改变可能是由于基因转座所致的突变^[10]。Apiradee 等分析了单种藻株两种不同形态藻丝体的可溶性和不可溶性蛋白的差异表达, 研究表明不同形态藻丝体在蛋白质组学上确实存在一定的差异^[22]。

由上述研究结果可知, 螺旋藻形态的多形性变异是一个非常复杂的过程。对这一过程产生机制及其调控机理的阐明, 不仅要在形态结构及生理生化水平上进

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.

廈門大學博碩