

学校编码: 10384

分类号 _____ 密级 _____

学号: 21720091152115

UDC _____

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

衰老和营养盐饥饿限制下的假微型海链藻
(*Thalassiosira pseudonana*) 细胞程序性死亡

Programmed cell death in the marine diatom *Thalassiosira*
pseudonana triggered by culture age and nutrient
starvation

李 彩 霞

指导教师姓名: 梁君荣 副教授

专业名称: 水生生物学

论文提交日期: 2012 年 05 月

论文答辩时间: 2012 年 06 月

学位授予日期: 年 月

答辩委员会主席: _____

评 阅 人: _____

2012 年 06 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	
摘 要	IV
Abstract	III
缩略词	V
第一章 前言	1
1.1 细胞程序性死亡	1
1.1.1 细胞程序性死亡和细胞坏死.....	2
1.1.2 细胞程序性死亡和细胞凋亡.....	2
1.1.3 细胞程序性死亡的分类.....	2
1.2 动物细胞程序性死亡	3
1.2.1 细胞凋亡的形态特征.....	4
1.2.2 细胞凋亡的生化特征.....	4
1.2.3 细胞凋亡的基因调控.....	5
1.2.4 依赖 Caspase 的死亡信号通路.....	6
1.3 植物细胞程序性死亡	7
1.4 浮游植物细胞程序性死亡	8
1.5 细胞程序性死亡的检测方法	13
1.5.1 形态学检测.....	13
1.5.2 生化及分子生物学检测.....	14
1.5.3 流式细胞仪在细胞程序性死亡检测中的应用.....	16
1.6 本论文的研究内容和意义	17
第二章 材料和方法	18
2.1 藻种来源及培养	18
2.2 主要试剂与仪器	18
2.2.1 主要试剂.....	18
2.2.2 主要仪器.....	18
2.2.3 主要培养基.....	18

2.3 实验方法	20
2.3.1 藻生长过程中细胞数变化的测定	20
2.3.2 光合系统 II 最大光化学量子产量 (Fv/Fm)	21
2.3.3 藻细胞切片观察内部结构变化	21
2.3.4 CaspACE 测定细胞凋亡关键酶 Caspase 活性	21
2.3.5 TUNEL 检测凋亡 DNA 断裂	22
2.3.6 硅藻 Caspase 同源物系统发生树的构建	23
第三章 实验结果	24
3.1 氮、磷、硅、铁饥饿和完全培养细胞的生理反应	24
3.1.1 假微型海链藻生长曲线	24
3.1.2 光合系统 II 最大光化学量子产量 (Fv/Fm)	25
3.2 假微型海链藻细胞变化形态特征	26
3.2.1 完全营养组细胞衰老电镜观察	26
3.2.2 氮饥饿培养组电镜观察	27
3.2.3 磷饥饿培养组电镜观察	27
3.2.4 硅饥饿培养组电镜观察	27
3.2.5 铁饥饿培养组电镜观察	27
3.3 细胞程序性死亡 DNA 断裂检测	34
3.3.1 假微型海链藻完全营养组细胞衰老 DNA 断裂检测	36
3.3.2 氮饥饿培养组假微型海链藻细胞 DNA 断裂检测	36
3.3.3 磷饥饿培养组假微型海链藻细胞 DNA 断裂检测	36
3.3.4 硅饥饿培养组假微型海链藻细胞 DNA 断裂检测	36
3.3.5 铁饥饿培养组假微型海链藻细胞 DNA 断裂检测	37
3.4 假微型海链藻细胞程序性死亡 Caspase 活性原位检测	43
3.4.1 假微型海链藻完全营养组衰老细胞 Caspase 活性检测	43
3.4.2 氮饥饿培养组假微型海链藻细胞 Caspase 活性检测	43
3.4.3 磷饥饿培养组假微型海链藻细胞 Caspase 活性检测	43
3.4.4 硅饥饿培养组假微型海链藻细胞 Caspase 活性检测	44
3.4.5 铁饥饿培养假微型海链藻组细胞 Caspase 活性检测	44

3.5 硅藻 Caspase 同源物系统发生分析	50
第四章 讨论	52
4.1 实验材料的选择和方法的优化	52
4.2 细胞衰老条件下的假微型海链藻细胞程序性死亡	53
4.3 营养盐饥饿条件下的假微型海链藻细胞程序性死亡	54
4.4 硅藻 Caspase 同源物系统发生分析	58
第五章 总结与展望	61
5.1 主要研究工作	61
5.2 展望	61
参考文献	63
在学期间参与的课题和发表的论文	72
致谢	73

Content

CHINESE ABSTRACT	IV
ENGLISH ABSTRACT	III
ABBREVIATIONS	V
Chapter 1. Introduction	1
1.1 Programmed cell death	1
1.1.1 Programmed cell death and necrosis	2
1.1.2 Programmed cell death and apoptosis	2
1.1.3 Types of 1Programmed cell death	2
1.2 Programmed cell death in animal	3
1.2.1 Morphological characteristics of apoptosis	4
1.2.2 Biochemical characteristics of apoptosis	4
1.2.3 Gene regulation of apoptosis	5
1.2.4 Caspase-dependent apoptotic pathway	6
1.3 Programmed cell death in plant	7
1.4 Programmed cell death in phytoplankton	8
1.5 Methods of identifying apoptosis	13
1.5.1 Morphological methods	13
1.5.2 Biochemical and molecular methods	14
1.5.3 Flow cytometry in the detecting of PCD	16
1.6 objective and significance of this study	17
Chapter 2. Material and Methods	18
2.1 Source of microalage strains	18
2.2 Main reagent and instruments	18
2.2.1 Main reagent	18
2.2.2 Main instruments	18
2.2.3 Main media	18
2.3 Methods	20

2.3.1 Determination of cell number in the process of growth	20
2.3.2 Determination of (Fv/Fm).....	21
2.3.3 Observation of cell ultrastructure.....	21
2.3.4 Determine Caspase activity by CaspACE.....	21
2.3.5 Determine DNA fragments by TUNEL	22
2.3.6 Construction of phylogenetic tree.....	23
Chapter 3. Results	24
3.1 Cell's physiological change in N-starved, P-starved, Si-starved, Fe-starved and replete culture	24
3.1.1 growth curve	24
3.1.2 (Fv/Fm)	25
3.2 Morphological characteristics of intracellular structure	26
3.2.1 Observation of intracellular structure in replete culture	26
3.2.2 Observation of intracellular structure in N-starved culture	27
3.2.3 Observation of intracellular structure in P-starved culture.....	27
3.2.4 Observation of intracellular structure in Si-starved culture.....	27
3.2.5 Observation of intracellular structure in Fe-starved culture	27
3.3 Determination of DNA fragments	34
3.3.1 Cell's DNA fragments in replete culture	36
3.3.2 Cell's DNA fragments in N-starved culture	36
3.3.3 Cell's DNA fragments in P-starved culture.....	36
3.3.4 Cell's DNA fragments in Si-starved culture.....	36
3.3.5 Cell's DNA fragments in Fe-starved culture	37
3.4 Caspase activity in suit detection	43
3.4.1 Cell's Caspase activity in replete culture	43
3.4.2 Cell's Caspase activity in N-starved culture	43
3.4.3 Cell's Caspase activity in P-starved culture	43
3.4.4 Cell's Caspase activity in Si-starved culture	44
3.4.5 Cell's Caspase activity in Fe-starved culture	44

3.5 Phylogenetic analysis of diatom metacaspase	50
Chapter 4. Discussion	52
4.1 Choice of material and methods	52
4.2 programmed cell death in replete culture.....	53
4.3 programmed cell death in nutrient-starved culture	54
4.4 Phylogenetic analysis of diatom metacaspase	58
Chapter 5. Conclusion and Prospect.....	61
5.1 Summary of this study.....	61
5.2 Prospect.....	61
References.....	63
Participated research projects and published paper	72
Acknowledgement.....	73

摘要

硅藻是海洋浮游植物的重要组成类群和海洋初级生产力的主要贡献者，同时也是主要的赤潮种之一。因此，它的死亡对海洋生态系统结构、物质和能量循环有着极其重要的影响。

本文以中心纲硅藻-假微型海链藻 (*Thalassiosira pseudonana* Hasle et Heimdal) 为研究对象，从形态学、分子与生物化学、生理学三个水平，检测了假微型海链藻细胞在氮、磷、硅、铁饥饿和衰老过程中的细胞程序性死亡。在形态学上采用透射电子显微镜 (Transmission electron microscopy) 对 5 种培养条件下的细胞超微结构进行观察。在分子与生物化学水平上，采用脱氧核糖核酸末端转移酶 (TdT) 介导的 dUTP 缺口末端标记法 (TUNEL) 对 DNA 片段化进行了定量测定；Caspase 原位标记法 (CaspACE) 对含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶 (Caspase) 活力进行定性及定量检测。在生理水平上描绘了细胞的生长曲线，并测定了细胞光合系统 II 最大光化学量子产量 (Fv/Fm)，以反映细胞在 5 种培养条件下的生长状态。主要结果如下：

(1) 假微型海链藻 (*T. pseudonana*) 细胞在衰老及氮、磷、硅、铁饥饿条件限制下，均表现出类似高等植物细胞程序性死亡的典型特征，如核质固缩，细胞器解体、消失，细胞空泡化，DNA 断裂，磷脂酰丝氨酸外翻，Caspase 活性增加，细胞膜结构完整等。伴随这些特征变化细胞代谢活性逐渐减弱，说明，衰老和氮、磷、硅、铁饥饿条件均可诱导 *T. pseudonana* 细胞发生自主的、由基因调控的细胞程序性死亡。

(2) *T. pseudonana* 细胞在氮、磷、硅、铁饥饿限制时较细胞衰老率先出现细胞程序性死亡的特征，说明营养盐饥饿能更早诱发出细胞程序性死亡。

(3) Caspase 活性的表达与细胞衰老及氮、铁、硅饥饿条件下的形态学和生长趋势的变化基本相吻合，且与 DNA 断裂呈正比。由此推测，细胞衰老及氮、铁、硅饥饿条件下的细胞程序性死亡可能又由 Caspase 介导产生。

(4) *T. pseudonana* 细胞在磷饥饿限制时，虽然可以引起细胞程序性死亡典型的形态学特征变化，但 Caspase 活性一直处于低水平状态，因此，推测磷饥饿条件限制下的细胞程序性死亡可能有不完全依赖 Caspase 的其它代谢途径。

(5) 利用 NJ 法 (Neighbor-joining, 邻接法) 的构建秀丽隐杆线虫

(*Caenorhabditis elegans*) 和人类 (*Homo sapiens*)、拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*)、水稻 (*Oryza sativa*)、酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*)、烟曲霉 (*Aspergillus fumigatus*)、莱茵衣藻 (*Chlamydomonas reinhardtii*)、强壮团藻 (*Volvox carteri*)、古老的最小绿藻 (*Ostreococcus tauri* 和 *Ostreococcus lucimarinus*)、三角褐指藻 (*Phaeodactylum tricornutum*)、假微型海链藻 (*Thalassiosira pseudonana*)、嗜热聚球藻 (*Thermosynechococcus elongatus*)、念珠菌 (*Nostoc* sp.) 和集胞藻 (*Synechocystis* sp.) 的 Caspase 同源物系统发生树表明：藻类中的 Metacaspase 与高等植物和真菌的 Metacaspase 高度同源，这暗示了藻类细胞中的 Metacaspase 可能与高等植物 Metacaspase 具有相似的生理功能。

关键词：假微型海链藻；衰老和营养盐饥饿；细胞程序性死亡

Abstract

Diatoms are an important component of marine phytoplankton and a major contributor to marine primary productivity. They are also a major species results in red tide. Therefore, the death of diatoms has an important influence on marine ecosystem structure, matter and energy cycle.

In this paper, we chose the centric diatom *Thalassiosira pseudonana* Hasle et Heimdal as an object of our research. The physiology, morphology, molecular biology and biochemistry were investigated, in order to identify the PCD in the different culture conditions, including culture age, N starvation, P starvation, Si starvation and Fe starvation. Cell morphological ultrastructures were observed by TEM under 5 kinds of culture conditions. On the molecular and biochemical level, the DNA fragmentation was quantitatively and qualitatively detected by TUNEL; the detection of Caspase activity was used FITC-VAD-FMK in situ maker (CaspACE). The growth curve and maximum photochemical quantum yield of photosynthetic system II were depicted to reflect the state of cell growth in 5 culture conditions. The main results were showed as follows:

(1) *T. pseudonana* cells showed several typical characteristics of plant PCD under culture age, N starvation, P starvation, Si starvation and Fe starvation, including cytoplasm shrinks, organelles degradation and disappear, cell vacuolization, DNA fragmentation, Caspase activity increased and cell membrane intact. Accompanied by the appearance of these changes, cell metabolic activity weakened. All these results indicated that *T. pseudonana* could be induced proactive and gene regulation of PCD under 5 kinds of culture conditions.

(2) Compared to culture age, *T. pseudonana* cells were found to have characteristics of PCD in nutrient starvation early. It indicated that nutrient starvation could induce the emergence of PCD earlier.

(3) Caspase activity was basically consistent with the changes of morphology and growth trend, and directly proportional to DNA fragmentation in culture age and N starvation, Si starvation and Fe starvation conditions. The results showed that

Caspase play a key role in the process of PCD in culture age and N starvation, Si starvation and Fe starvation conditions.

(4) Although P-starvation could induce the morphological changes of PCD, but Caspase activity had been in a low level. It suggested that there might be another way of PCD under P-starvation condition, which not entirely dependent on Caspase.

(5) Using NJ to construct Metacaspase phylogenetic tree, Which including Metacaspases of *Caenorhabditis elegans*, *Homo sapiens*, *Arabidopsis thaliana*, *Oryza sativa*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Aspergillus fumigatu*, *Chlamydomonas reinhardtii*, *Volvox carteri*, *Ostreococcus tauri*, *Ostreococcus lucimarinu*, *Phaeodactylum tricornutum*, *Thalassiosira pseudonana*, *Therm osynechococcus elongates*, *Nostoc* sp. and *Synechocystis* sp. Metacaspases from phytoplankton, higher plants and fungi had a high degree of homology, which might indicate that they have similar physiological roles.

Key words: *T. pseudonana*; culture age and nutrient starvation; PCD

缩略词

PCD: programmed cell death (细胞程序性死亡)

TEM: Transmission electron microscopy (透射电子显微镜)

TUNEL: Terminal deoxynucleodityl transferase-mediated dUTP nick-end-labeling (脱氧核糖核苷酸末端转移酶 (TdT) 介导的 dUTP 缺口末端标记技术)

Caspase: cyseine aspartic acid specific protease (含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶)

Fv/Fm: variable fluorecence/maximum fluorecence ratio (可变荧光与最大荧光的比值)

PI: propidine iodide (碘化丙啶)

第一章 前言

硅藻是浮游植物的重要组成类群,在浮游植物类群中具有极高的生物量和生物多样性,作为海洋食物链的基础,制约着许多水生生物的产量,对生态系统的平衡起着至关重要的作用。硅藻作为单细胞的光合自养生物,它是海洋生态系统中初级生产力的主要生产者,占海洋初级生产力的40%^[1],这对海洋圈中有机C的循环和大气圈中CO₂的调节具有十分重要的影响。同时硅藻通过大量吸收硅合成其特殊的生物硅质壁结构决定了硅的生物地球化学循环。此外,硅藻还是造成赤潮的主要种群之一。因此,它的盛衰对海洋物质循环和能量流动以及赤潮的调控都具有重要的影响。近年来研究证实,除沉降和捕食外,浮游植物的程序性死亡是造成其种群多样性和生物量改变的重要原因^[2]。这种细胞程序性死亡概念的提出及其在浮游植物中证实,为我们认识硅藻在海洋生态系统中的重要作用提供了新的思路,使我们更深入理解硅藻赤潮形成和消亡过程,为赤潮的预防和治理提供新方法。

1.1 细胞程序性死亡

细胞程序性死亡(Programmed cell death, PCD)是指细胞在生理条件下,为完成生长发育、维持内环境的稳定和适应生存环境而进行的一种受基因调控的、主动的、生理性的死亡过程^[3]。

对细胞程序性死亡的研究最早起源于1842年,当时Vogt在研究蝌蚪发育时发现一种不同于细胞坏死的死亡现象。1965年,发育生物学家Lockshin发现飞蛾在羽化过程中,幼虫部分肌肉细胞出现发育调节性死亡,这种死亡不引起炎症反应,是多细胞生物调控机体发育,维护内环境稳定,由基因控制的细胞自动死亡过程,并首次将上述死亡称作细胞程序性死亡(programmed cell death; PCD)^[4]。1885年,Flemming在研究卵巢滤泡时,再一次发现了有不同于细胞坏死的细胞死亡现象,指出这种细胞死亡是生物体生理机能的一部分,并将自己发现的细胞死亡命名为染色质溶解死亡。1972年,澳大利亚科学家Kerr等在研究小鼠肝缺血时观察到两种不同的细胞死亡形式:一种细胞膜破损,细胞器形态改变,溶酶体消失即细胞坏死;另一种细胞膜和细胞器形态完整,染色质固缩,核破碎,细胞最终自行分解为若干外膜包被的小体^[5]。Kerr等科学家认为后一种细胞死亡方式可能是由自身基因程序启动引起的主动性自身破坏过程,并根据其细胞形态

学特征，采用来源于希腊语原意为描述秋天树叶凋落和花瓣散落的名词 apoptosis (凋亡) 来命名这种死亡方式，首次将细胞凋亡的概念引入生物界^[6]。

1.1.1 细胞程序性死亡和细胞坏死

到目前为止，科学家提出的细胞死亡有两种形式：细胞程序性死亡和细胞坏死。尽管其最终结果都是导致细胞死亡，但细胞程序性死亡的诱导因素、发生机制、过程及意义都明显不同于细胞坏死性死亡。细胞程序性死亡是细胞主动参与的自身死亡过程，是生物调控发育、维护内环境稳定、由基因控制的细胞主动死亡过程，是生物（细胞）生命周期中的重要组成部分，具有生理性、主动性、非炎症性和不可逆性等特征。而细胞坏死则通常是由细胞损伤或细胞毒物作用引起的，是一种被动的病理性死亡。两者在形态学和生物特性上有本质的不同，这种区别是由于发生死亡过程中分子机制的不同决定的。其区别在于：坏死导致细胞溶酶体破坏，细胞内容物外溢，引起炎症反应，而凋亡细胞则形成细胞膜包裹的、内涵物不外泄的凋亡小体，后被吞噬细胞或邻周细胞识别、吞噬，不引起炎症反应。

1.1.2 细胞程序性死亡和细胞凋亡

长期以来，在许多关于细胞死亡的文献中，细胞凋亡和细胞程序性死亡这两种说法被认为是相同的，不加区别地互换使用。事实上，两者的含义是完全不同的。严格意义地说，凋亡是一种形态学概念，描述一件有着一整套形态学特征的与坏死完全不同的细胞死亡形式。而细胞程序性死亡是一个功能性概念，它是指由基因调控的细胞死亡的过程和路径。虽然在多数情况下程序性细胞死亡采用凋亡方式，但 Wyllie (1984) 观察到一些确定是程序性死亡的细胞极少表现目前已被公认的凋亡过程的特点，甚至有些明显不同于凋亡过程。例如 T 细胞、某些神经元细胞和红细胞等^[7]。植物细胞程序性死亡的研究进展更加证实了非典型凋亡形态特征的存在。因此，一般可以认为细胞凋亡只是细胞程序性死亡的一种特殊方式。

1.1.3 细胞程序性死亡的分类

随着细胞程序化死亡和细胞凋亡概念的区分，以及新的细胞死亡途径的发现，人们对不同表现的细胞程序性死亡进行了分类，其中 Clarke 的形态学分类^[8]得到广大学者的认可，沿用至今。随后 van Doorn^[9]在植物细胞程序性死亡的研究中也取得突出的成果。

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