

学校编码: 10384

分类号_____密级_____

学号: 21620071152062

UDC_____

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

钝顶螺旋藻 FtsZ 蛋白的表达及定位的初步研究

The expression of FtsZ and its localization in *Spirulina platensis*

邹路阳

指导教师姓名: 徐虹 副教授

专业名称: 水生生物学

论文提交日期: 2010年06月

论文答辩时间: 2010年06月

学位授予日期: 2010年 月

答辩委员会主席: _____

评 阅 人: _____

2010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):

200 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）：

200 年 月 日

目录

摘要	I
Abstract.....	II
前言.....	1
1 螺旋藻简介.....	1
2 螺旋藻的开发及应用.....	1
3 螺旋藻形态学研究进展.....	3
4 原核细胞形态建成的研究进展.....	5
5 本论文研究的目的和意义.....	17
材料与amp;方法	19
1 材料.....	19
2 方法.....	24
结果与分析	31
1 钝顶螺旋藻 <i>ftsZ</i> 的克隆和融合表达载体的构建	31
1.1 钝顶螺旋藻 <i>ftsZ</i> 的克隆.....	31
1.2 融合表达载体的构建与重组质粒的鉴定.....	35
2 融合蛋白对大肠杆菌形态的影响.....	38
2.1 融合蛋白 His ₆ -FtsZ 的表达和对大肠杆菌形态的影响.....	38
2.2 融合蛋白 GFPxm-FtsZ 的表达和对大肠杆菌形态的影响	42
3 FtsZ 抗体制备、效价及螺旋藻中特异性检测.....	47
3.1 多克隆抗体的制备与鉴定	48
3.2 间接 ELISA 法测定抗体效价.....	48
3.2 Western blot 检测抗体的特异性.....	48
4 同源转化钝顶螺旋藻及形态变化藻的筛选	50
5 FtsZ 在螺旋藻中的免疫荧光定位研究	52

讨论	54
小结与展望	58
参考文献	59
缩略词及中英文对照	64
附录	65
致谢	66

厦门大学博硕士论文摘要库

Catalogue

Abstract (Chinese version)	I
Abstract (English version)	II
Preface	1
1 Introduction of Spirulina	1
2 Spirulina and its development	1
3 Research progress of morphology in <i>Spirulina</i>	3
4 Research progress of prokaryotic cytoskeleton	5
5 Aims and significances of this research	17
Materials and methods	19
1 Materials	19
2 Methods	24
Results and analysis	31
1 The cloning of <i>ftsZ</i> and construction of fusion expression vector	31
1.1 The cloning of <i>ftsZ</i> in <i>Spirulina platensis</i> FACHB869	31
1.2 The construction and identification of fusion expression vector	35
2 Morphology of <i>E. coli</i> BL21 carrying expression vector	38
2.1 Morphology of <i>E. coli</i> BL21 carrying expression vector pET28a-<i>ftsZ</i>	38
2.2 Morphology of <i>E. coli</i> BL21 carrying expression vector pGFPxm-<i>ftsZ</i>	42
3 Preparation of Antiserum against FtsZ of Spirulina	47
3.1 Preparation and identification of Antiserum against FtsZ	48
3.2 Measurement of Antiserum against FtsZ by the indirect ELISA	48
3.3 Detection of FtsZ in <i>Spirulina</i> by Western blot	48

4 Transformants through ultrasonic treatment in <i>Spirulina platensis</i>	50
5 Immunofluorescence analysis for FtsZ location in <i>Spirulina platensis</i>	52
Discussion	54
Summary and Prospect	58
References	59
Abbreviations and Chinese/English glossary	64
Appendix	65
Acknowledgement	66

厦门大学博硕士学位论文摘要库

厦门大学博硕士学位论文摘要库

摘要

FtsZ 是最早被鉴定出与真核微管蛋白类似的原核骨架蛋白,广泛存在于原核生物中,在植物中也有发现。它最先从大肠杆菌温度敏感型突变体中分离得到,当它突变后杆状大肠杆菌会停止分裂变成长丝状菌体。FtsZ 在细胞中部分裂位点形成一个 Z 环,接着细胞缢缩内陷分裂成两个子细胞。

螺旋藻在不良环境下会从正常螺旋形转变为不同螺旋度的螺旋形甚至直线形。本实验以钝顶螺旋藻 (*Spirulina platensis*) FACHB 869 FtsZ 为出发点,研究其功能及与螺旋藻形态建成的关系。我们克隆了钝顶螺旋藻 FACHB 869 的 *ftsZ* 基因全序列并构建了表达载体 pET28a-*ftsZ* 和荧光融合表达载体 pGFPxm-*ftsZ*。在大肠杆菌中过表达 His₆-FtsZ 和 GFP-FtsZ 融合蛋白发现所有的杆状细胞都变为丝状细胞。GFP-FtsZ 在菌体中以点状、带状或螺旋丝状间隔分布于细胞中。分时段诱导长度统计发现,大肠杆菌长度随 FtsZ 表达量的增加而增长,诱导约 7h 后长度达到稳定范围。

为研究 FtsZ 在螺旋藻中的功能、表达及定位,通过表达、纯化,制备了相应的多克隆鼠抗,Western blot 检测 FtsZ 在螺旋藻中的表达,结果显示 FtsZ 在直线形螺旋藻 FACHB 869 和 882 中表达上调,在螺旋藻 FACHB 882 直线形和螺旋形中表达差异明显。通过螺旋藻超声波处理后加入单酶切的转化质粒 pET28a-*ftsZ* 同源重组得到一株形态变化藻株,测量发现形态变化藻细胞平均宽为 $8.72\pm 0.29\mu\text{m}$,螺距宽为 $37.79\pm 2.41\mu\text{m}$,螺距长为 $92.19\pm 5.30\mu\text{m}$,这三项数据均明显大于野生藻。通过免疫荧光技术利用 FITC 标记观察到螺旋藻 FtsZ 蛋白在藻细胞中呈环状分布于细胞膜上。

关键词: 钝顶螺旋藻; FtsZ; 原核细胞骨架蛋白; 形态建成

Abstract

FtsZ is a prokaryotic homologue of eukaryotic tubulins. It appears to be universal in eubacteria and archaeobacteria and has also been identified in plants. *ftsZ* has been identified as temperature-sensitive mutants(*fts*) in *Escherichia coli*. FtsZ mutants can grow for a time at the non-permissive temperature, but septation is blocked, leading to long filamentous cells. FtsZ forms Z-rings at the centre of rod-shaped cell. The inner membrane invaginates and the outer membrane and cell wall follow the inner membrane, forming a septum that will divide the bacterium. When the invagination is completed, the membranes seal and the daughter cells separate.

The filaments of *Spirulina* can change from spiral to other abnormal morphologies, such as different degree of spiralization curved and even linear shapes under bad environmental conditions or intimidation of some exoteric alternative. To explore the morphogenesis determination mechanism, FtsZ was picked out for further research in *Spirulina platensis* FACHB 869 which is itself the major part of the division machine. The *ftsZ* gene was cloned from *S. platensis* FACHB 869 and then expressed in *E. coli* leading to long filamentous cells. The use of green fluorescent protein have provided clear images of FtsZ localized in a dotlike or helical filament alternate distribution in bacteria. Western blot showed that FtsZ was upwardly adjusted in linear algal trichomes both in *S. platensis* FACBH 869 and FACBH 882. Then this recombinant donor plasmid was transformed into *S. platensis* through ultrasonic treatment and one morphological change of *S. platensis* was obtained by G418 screening. The results showed that the average of cell width and the length/width of spiral pitch had some change in transformant. Recent advances in immunofluorescence had shown that FtsZ localized in a ring at the septation site in *S. platensis* FACHB 869.

Key word: *Spirulina platensis*; FtsZ; Prokaryotic cytoskeleton proteins; morphogenesis

前言

1 螺旋藻简介

1.1 螺旋藻形态学和生理学特性

螺旋藻 (*Spirulina*)，又称节旋藻(*Arthrospira*)，是一类低等生物。螺旋藻在分类地位上属于蓝藻门、蓝藻纲、藻殖段目、颤藻科、螺旋藻属。常用于培养的螺旋藻有钝顶螺旋藻、极大螺旋藻和盐泽螺旋藻^[1]。它们与细菌一样，细胞内没有真正的细胞核，所以又称蓝细菌。蓝藻的细胞结构原始，且非常简单，是地球上最早出现的光合生物，在这个星球上已生存了 35 亿年^[2]。它生长于水体中，在显微镜下可见其形态为螺旋丝状，故而得名。其适温范围为 20~37℃，最适温度范围为 24~30℃。最适光照强度范围为 30000~35000 lux。适应酸碱度范围是 pH8.6~9.5^[3]。

蓝藻类细胞无色素体，色素分布在原生质体外部的色素区。原生质体内部有一无色的中央区，类似其他藻类的细胞核，但无核仁和核膜，因此螺旋藻是原核植物。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 6~8μm，长 4~6μm，螺旋疏松弯曲，螺旋藻宽 33~42μm，螺间距 52~84μm，藻丝长 200~500μm，末端细胞宽圆形，横壁略收缢，藻丝的顶端细胞钝圆，无异形胞。极大螺旋藻呈灰绿色，细胞宽 7~9μm，长小于宽，螺间距 70~80μm，顶端微尖，横壁不收缢^[4]。

其藻细胞中含有不成堆的光合片层(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为 6%~12%，远远高于自然生长或种植的作物^[5]。螺旋藻行无性二分裂繁殖，繁殖结果使藻丝长度迅速增加。钝顶螺旋藻主要靠藻丝断裂增加丝状体的数量，有时也形成“藻殖段”，藻殖段细胞分裂成新的螺旋状藻丝。

2 螺旋藻的开发及应用

2.1 螺旋藻的营养价值和药用价值

螺旋藻是至今为止世界上最丰富、最全面的天然食物，几乎含有人体所需的全部营养素被近代科学誉为“微型营养库”^[6]。它的蛋白质含量高达 60% -70%，

其脂肪组成以不饱和脂肪酸为主，尤其必需脂肪酸含量丰富；螺旋藻维生素含量也高，尤其是具有抗氧化作用的胡萝卜素、维生素 E 和维生素 C；它的矿物质和微量元素含量丰富，如钙、镁、钠、钾、磷、碘、硒、铁、铜等^[7]。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)^[8]。

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

2.2 螺旋藻在饲料工业中的应用

螺旋藻可直接或间接作为饲养动物的添加剂。其蛋白质中含有较丰富的赖氨酸、苏氨酸和含硫氨基酸，而这正是谷物类蛋白质所缺乏的。因此把螺旋藻用在配合饲料中，可以起着“氨基酸的互补作用”，可以解决植物蛋白质营养价值低的问题。它能促进动物的生长，增加机体免疫力，提高生产性能，降低饲料消耗

[9]。有报道,在蛋鸡日粮中添加 1%的藻粉,就能使蛋黄颜色加深,提高蛋品的商品价值;在水产饵料中,由于螺旋藻型体甚微且由单细胞构成,直径与长度都很小,可直接用其活体或干粉作水产养殖的开口料或幼苗饵料,诱食效果较好,且制成的颗粒饵料投入水中不易下沉、不凝集、不易败坏水质,养殖效果良好,在海珍品中还可起到增色作用^[10]。

2.3 螺旋藻在化妆品业的应用

螺旋藻可提高皮肤细胞的免疫力,保护皮肤的自我调节功能,防止水分流失,抵抗紫外线侵害,消除皮肤表面自由基,增加皮肤胶原蛋白的合成,软化角质层,促进血液循环和皮肤再生,可起到防皱、防晒、抗辐射、美白、祛斑、抗衰老的作用,并可促进头发生长。螺旋藻营养液能提供皮肤所需氨基酸、藻多糖、SOD等多种营养活性成分,可增加皮肤弹性、润肤保湿、除皱、祛斑。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,且使用十分安全无刺激和致敏作用。它还是一种安全有效的食欲抑制剂,可作为美容减肥产品^[11]。

2.4 螺旋藻在环保方面的应用

螺旋藻具有良好的营养价值及药用价值,但随着可适合螺旋藻生长的水体的逐渐减少,如何减少场地耗费,同时利用工业废水来培养螺旋藻成为最近几年的热门研究方向。因其在生长繁殖过程中需要吸取大量营养物质,具有生长繁殖快、适应性强,具有更高的可发酵性的特点,因此螺旋藻是一种用于废水处理很有前途的微藻^[12],它不仅具有上浮性,且丝状的螺旋藻比较容易从培养液中分离出来,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^[13,14]。

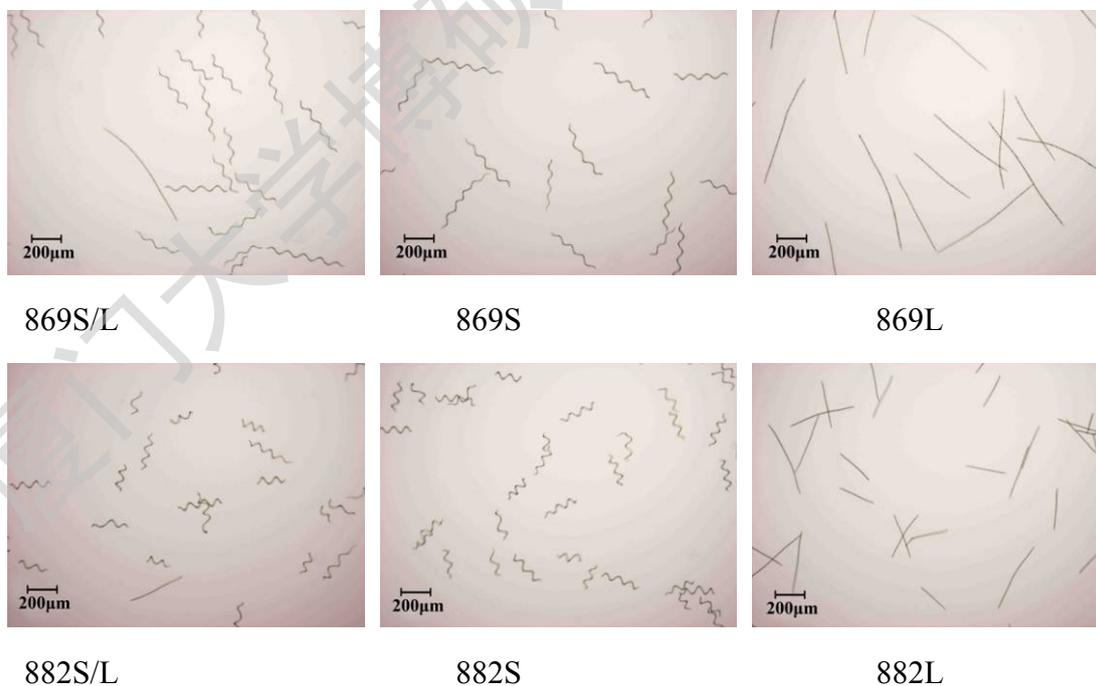
随着螺旋藻在分子遗传学、高光合效率、形态建成,以及耐盐碱、抗辐射机制等基础领域研究的不断深入,一方面推动了生物起源与进化、生存与适应机制等重大生物学问题的研究,另一方面也极大地推动了螺旋藻产业的进一步发展^[15,16]。

3 螺旋藻形态学研究进展

尤珊等^[17]对不同光照条件下螺旋藻藻丝体形态进行了观察,在较强光照下,螺旋藻生长较快,藻丝体较长、较粗,螺旋度较大,由于 Chla 含量丰富而呈黄蓝绿色;光照较弱(10000 lux 以下)、生长较慢,藻丝体较短,较细,螺旋度小呈蓝绿色藻液的。Avigad^[18]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 。陈必链等^[19]采用半导体激光辐照钝顶螺旋藻，处理组的藻丝长、螺距、螺旋数都较出发株变小；而螺径的变化较小，有 2 组处理组还使螺旋变松弛。汪志平等^[20]对钝顶螺旋藻 Sp-D 中 3 种形态(螺旋形、正弦波形和长直形)的藻丝体进行 γ -射线辐照后发现，0.3kGy 的 γ -射线可使长直形藻丝体生长繁殖或转变成弯曲形藻丝体。彭卫民等^[21]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。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，藻丝体的形态和螺距长度会发生改变，甚至变为其他扭曲形状或直线形^[22]。

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，即使在国内外的大规模工厂化养殖实践中，随着培育条件的变化，这种现象也频繁发生。由此可见，螺旋藻形态的多形性是一种普遍的现象。本实验室从中科院武汉水生所购买的藻种里也含有两种形态的藻丝体，我们将其分离出来，各自培养（如图 1），它们能长期保持其形态（至少在我们分离后的这三年里保持其形态），未发生形态突变^[15]。



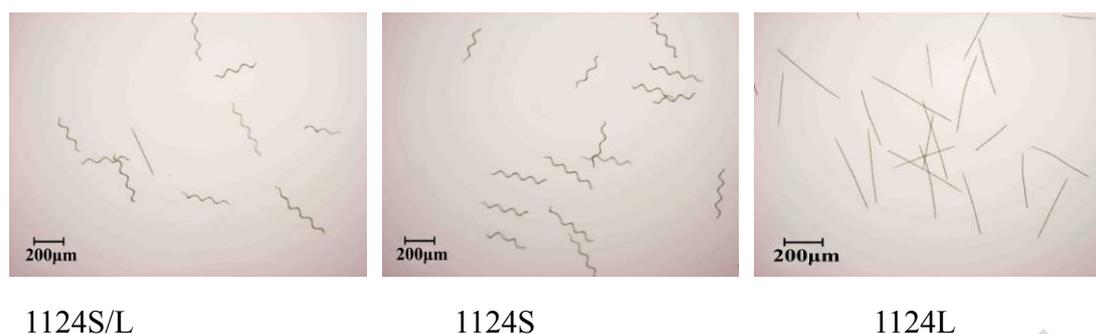


图 1. 显微镜下钝顶螺旋藻的不同形态藻丝体^[22]

Fig 1. Different morphologic filaments of *S.platensis* ^[22]

近年来,虽然螺旋藻的多形性一直受到人们的关注,但是有关螺旋藻形态变异和形态建成机理的研究却仍处于初步探索阶段^[23]。Van E 等^[24]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。陈必链等^[19]和 Rajagopal 等^[25]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。Apiradee 等^[26]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。汪志平等^[27]提出了螺旋藻形态建成的转座子调控模型,当在螺旋藻形态建成相关基因中插入转座子时,该基因失活,藻丝体有螺旋形变为直线形;当转座子从形态建成相关基因上脱落,该基因又可以正常表达,从而使直线形藻丝体回变为正常的螺旋形^[23]。

由此可知,螺旋藻的形态改变是一个多因素调控的过程,既有环境因素变化的影响,又有生理生化和基因调控方面的作用。因此,对这一过程产生机制及其调控机理的阐明需要借助于现代分子生物学技术手段对螺旋藻细胞和分子遗传背景做出进一步的研究。

4 原核生物形态建成的研究进展

细菌细胞骨架参与到了与细胞功能有关的方方面面,从决定细胞形态到细胞分裂,质粒分离,从膜结构到膜相关蛋白的定位,以及其他一系列细菌的生理活动,比如参与胞内物质运输、细胞运动、分泌吸收、信息传递、基因表达等。细菌的细胞骨架蛋白可以分为4类,肌动蛋白(actin-like)类似物:MreB, ParM, MamK;

中间纤维丝 (intermediate-filament proteins, IF) 类似物: 卷曲螺旋丰富蛋白 (crescentin, FilP); 微管蛋白 (tubulin-like) 类似物: (FtsZ, TubZ); 细菌所特有的骨架蛋白 ParA/MinD 家族^[28]。下面介绍下这几类原核细胞骨架蛋白的结构与功能。

4.1 肌动蛋白类似物

目前在细菌中发现的肌动蛋白类似物包括 MreB、MreB 类似物、与质粒相关的 ParM 和存在于趋磁细菌中的 MamK 等几类蛋白。

4.1.1 MreB 及其 MreB 类似物

MreB 纤维丝由 2 条平行的链组成, 而 ParM 纤维丝则是以螺旋扭曲的链组成。MreB 以螺旋结构形式存在于细胞内并且沿着细胞长轴方向环绕于细胞膜内壁。大部分原核生物只含有 MreB, 而小部分还包含有 MreB 的类似蛋白, 如 *Bacillus subtilis*。它含有三种类似物 MreB、Mbl 和 MreBH, Mbl 和 MreBH 也以螺旋结构形式存于细胞内^[29]。MreB 对于非球形细菌的生存能力和杆状形态的维持具有极其重要的作用^[30]。在杆状细菌中敲除 MreB 会导致细胞变成巨大的球形并最终死亡^[31]。另外, 在弧状细菌 *Caulobacter crescentus* 中敲除 MreB 会造成膜蛋白定位异常并使细胞失去极性^[32]。研究发现 *B. subtilis* 中 MreB 和 Mbl 结构在细胞内沿着螺旋轨道迅速分别朝着细胞极和远离细胞极方向移动, *E. coli* 的 MreB 螺旋结构和 *B. subtilis* 的 MreB 类似骨架蛋白在细胞生长过程中会改变其弧度和构象。在 *C. crescentus* 中 MreB 螺旋骨架在正常的生长条件下改变其结构模式, 细胞分离时 MreB 由原来扩展的螺旋状态缢缩为环状结构定位于细胞中部或者附近, 细胞分裂后 MreB 恢复原来的螺旋模式^[33]。在 *E. coli* 和 *C. crescentus* 中 *mreB* 突变株形态异常表现为球状, 在 *B. Subtilis* 中, *mreB* 突变株细胞形态异常主要表现为细胞呈球形或变宽, *mbl* 突变株主要表现为细胞伸长和无规则卷曲, 而 *mreBH* 突变株形态异常则较 *mreB* 和 *mbl* 突变株轻, 细胞的宽度和长度只受轻微的影响, 主要表现在某些位置出现弯曲同时弯曲位置细胞壁较厚^[34]。可见在 *B. Subtilis* 中 MreB 主要参与调控细胞的宽度, Mbl 控制细胞的长度和保持细胞长轴方向的直线性而 MreBH 与细胞壁形成有关。从以上实验现象可知 MreB 及其同系物在杆状菌形态形成中有重要作用。

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