

学校编码: 10384

分类号 _____ 密级 _____

学号: 21720061152208

UDC _____

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

不同 N/P 条件下铜绿微囊藻 DNA 含量分析、
差异蛋白组研究及 PstB 的表达分析

DNA content detection, Differential proteomic study and
expression analysis of *pstB* in *Microcystis aeruginosa* PCC
7806 cultured on different N/P nutrients

陈江莲

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: 2009 年 06 月

论文答辩时间: 2009 年 月

学位授予日期: 2009 年 月

答辩委员会主席: _____

评 阅 人: _____

2009 年 月

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而产生的权利和责任。

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：2009年 月 日

导师签名：_____

日期：2009年 月 日

目录

摘要	I
Abstract	II
1 前言	1
1.1 铜绿微囊藻相关背景	1
1.2 铜绿微囊藻与水华	1
1.3 细菌的磷吸收转运机制	3
1.4 流式细胞术	4
1.5 蛋白质组学的研究进展	8
1.6 本论文研究目的与意义	15
2 材料与方法	16
2.1 材料	16
2.2 方法	22
3 结果与分析	33
3.1 铜绿微囊藻 <i>pstB</i> 基因的克隆表达及抗体制备	33
3.2 流式细胞术检测不同 N/P 条件下藻细胞的 DNA 含量	40
3.3 不同磷浓度诱导下的铜绿微囊藻蛋白表达差异	45
4 讨论	53
4.1 不同浓度的磷源对铜绿微囊藻 <i>pstB</i> 的表达调控	54
4.2 流式细胞术检测不同 N/P 条件下藻细胞的 DNA 含量	55
4.3 不同磷浓度诱导下的铜绿微囊藻差异蛋白质分析	55
4.4 如何提高质谱结果的可靠性	58
4.5 三部分实验之间的联系	59
5 小结	60
6 展望	61
参考文献	62
致谢	72

Catalogue

Abstract (Chinese version)	I
Abstract (English version)	II
1 Preface	1
1.1 Introduction of <i>Microcystis aeruginosa</i>	1
1.2 <i>Microcystis aeruginosa</i> and water bloom	1
1.3 The mechanism of absorption and transportation of phosphorus	3
1.4 The introduce of FCM	4
1.5 Development of proteomics	8
1.6 Aims and significances of this research	15
2 Materials and methods	16
2.1 Materials	16
2.2 Methods	22
3 Results and analysis	33
3.1 The clone, expression and antiserum preparation of <i>pstB</i>	33
3.2 FCM DNA content detection of cells on different N/P nutrients	40
3.3 Differential proteomics analysis of induced <i>M. aeruginosa</i>	45
4 Discussion	53
4.1 Regulation of PstB under different phosphorus conditions	53
4.2 FCM DNA content detection of cells on different N/P nutrients	54
4.3 Analysis of differential protein spots	54
4.4 How to improve the liability of MS results	58
4.5 Relations of the three parts	59
5 Summary	60
6 Prospect	61
References	62
Acknowledgement	72

摘要

铜绿微囊藻(*Microcystis aeruginosa*)是富营养化湖泊和水库中形成“水华”的主要藻种。利用分子生物学技术和蛋白质组学,研究常见赤潮、水华藻种在特定环境中的蛋白质组差异,从中寻找出有价值的差异蛋白质分子,这在理论和实践上对水华的防治都具有重要意义。

在水华蓝藻的形成因素中,氮磷比例是一个很大的影响因素,其最适 N/P 为 16: 1。我们设想,该 N/P 值是与细胞的生长分裂相关系的。磷在细胞中的作用是参与一些代谢途径的磷酸化反应,更重要的可能是与细胞 DNA、RNA 的合成有关;氮则是参与了蛋白质的合成,氮磷之间合适的比例,就代表了细胞生长与分裂之间量的关系。为了验证此设想,通过流式细胞术 PI 染色法来检测微囊藻细胞的 DNA 含量,设置不同的 N/P 比值,缺 NP、1: 1、16: 1、160: 1 四组,结果表明在 N/P 为 16: 1 时,藻细胞的 DNA 含量较其他对照组高,间接地反映了藻细胞的数目,即当 N/P 为 16: 1 藻细胞处于分裂的最佳水平。

微囊藻有较高的磷吸收最大摄取速率,比其它藻类具有更强的储存磷的能力,可以在细胞中储存足够的磷。因此,利用蛋白质组学,分析铜绿微囊藻在不同磷浓度培养水平下的蛋白表达水平,并进行质谱分析,鉴定出关键的差异蛋白,分析这些关键蛋白的作用,对揭示铜绿微囊藻特殊的磷代谢机制有一定的帮助。试验中设置了三个不同磷浓度的诱导水平:即 0.005mg/L, 0.05mg/L, 0.5mg/L, 诱导 72h 后进行差异蛋白组分析。结果我们获得了二十多个差异点,选取其中可靠度较好的十一个点进行质谱分析,通过数据库比对,分析了一些与磷代谢相关的蛋白:硫胺素焦磷酸化酶、磷酸核酮糖激酶、磷酸甘油酸激酶、琥珀酰 CoA 合成酶微囊藻毒素相关蛋白 MrpA 等,均与磷代谢、缺磷逆境或者核酸代谢相关。

为研究蛋白 PstB 在铜绿微囊藻中与磷吸收代谢的关系,成功克隆表达了 *pstB*, 纯化免疫小鼠,制备多克隆抗体用于检测 PstB 在藻细胞的表达变化。结果表明,在缺磷条件下, PstB 表达量显著提高,而随着磷浓度的提高, PstB 表达量反而降低至本底水平。PstB 在藻细胞内受到缺磷条件的诱导,能保证藻细胞最大限度地吸收外界磷源。

关键词: 铜绿微囊藻; 差异蛋白组学; N/P; PstB

Abstract

Microcystis aeruginosa is the main cyanobacteria, which can form “water bloom” in lakes and reservoirs. So use the technologies of molecular biology and proteomics to study valued differential proteins expressed under specific conditions, which will either in theory or in practice pour great effect on the prevention of algae bloom.

In the formation of algae bloom, the proportion of nitrogen and phosphorus is a major factor. The optimal N/P for algae is 16:1. So it is assumed that the particular proportion must relate to the growth and division of cyanobacteria cells. Other than participated in the phosphorylate reaction in metabolic pathways, the most vital role in vivo of phosphorus is involved in DNA、RNA synthesis. As for nitrogen, it is related to the protein synthesis. The appropriate ratio between N and P may be presumed as a reflection of the relation in quantity between the growth and division of algae cell. In order to verify the assumption, we use the technology of FCM to detect the cells of *M. aeruginosa* stained by PI, which were cultured on different N/P nutrients. According to other papers, it sets different N/P ratios, as 16:1, 160:1, 1:1 and lacking of NP four groups. The results show that, when N/P=16:1, the DNA content of *M. aeruginosa* cells is higher than others. So it comes to a conclusion that the division of these cells is at an optimal level.

The phosphorus is a vital limiting factor for the growth of cyanobacteria, which also play a role in the breakout of algae bloom. In fact, *M. aeruginosa* has a maximum uptake rate of phosphorus. With a greater storage capacity of phosphorus than other cyanobacterias, *M. aeruginosa* can store adequate phosphorus in vivo. So it arose us great interest to study the metabolic mechanism of phosphorus in *M. aeruginosa*. The analysis of proteins expression level for *M. aeruginosa* induced at different phosphorus concentrations will help to unfold the metabolic mechanism of phosphorus. In the experiment, we set three different phosphorus concentrations: 0.005mg/L, 0.05mg/L, 0.5mg/L. After cultured on the three different nutrients for 72h, the cells were collected for differential proteomic study. Two-dimensional electrophoresis results show more than 20 differential protein spots, from which 11

differential proteins were chosen for MALDI-TOF analysis. (PGK), Then though data retrieval some important proteins related to phosphorus metabolism have been obtained, they are: thiamine-phosphate pyrophosphorylase (TPP), thioredoxin peroxidase, microcystin related protein MrpA, succinyl-CoA synthetase, ABC transporter related protein, succinyl-CoA synthetase beta chain, phosphoglycerate kinase, Bacterial fructose-1,6-bisphosphatase (glpx), Ycf48-like protein precursor, and so on.

Then do study primarily on the function of protein PstB. The western blot detection of the expression of PstB in *M. aeruginosa* under different phosphorus concentrations reveals that, the gene coding for PstB, is induced under lacking for phosphorus condition. So when phosphorus concentration in vitro in low, the gene *pstB* can ensure *M. aeruginosa* absorb external phosphorus in maximum. It is concluded that PstB plays an important role in the absorption and transportation of phosphorus.

Key word: *Microcystis aeruginosa*; Differential proteomics; N/P; PstB

1 前言

1.1 铜绿微囊藻(*Microcystic aeruginosa*)相关背景

铜绿微囊藻, 蓝藻门, 蓝藻纲, 色球藻目, 色球藻科, 微囊藻属^[1]。幼植物体为球形或圆形的实心群体, 后长成为网络状的中空囊状体, 随后, 由于不断扩展, 囊状体破裂而形成网状胶群体。群胶体被透明无色。细胞球形或近球形, 直径 3~7 μm, 蓝绿色, 一般具伪空胞。多生长于净水中, 在春及夏季节生长旺盛, 常形成水华。发生水华时, 水面常有蓝绿或黄绿色浮膜。

目前铜绿微囊藻的研究主要集中在以下几方面: 一、对铜绿微囊藻水华成因的探讨; 二、研究营养物质(如氮、磷)、微量元素(如镍、铁、锌等)和生理环境对铜绿微囊藻生长的影响; 三、研究铜绿微囊藻水华的防治(如紫外线辐射、粘土絮凝、化学除藻等); 四、对铜绿微囊藻毒素的毒性和作用机理的研究。另外, 研究人员还从分子水平上开展对铜绿微囊藻的研究, 例如种属鉴定, 光合作用的相关基因克隆及分子机制的研究等。

1.2 铜绿微囊藻与水华

1.2.1 水华

“水华”(water blooms)是在淡水中的一种自然生态现象, 由藻类引起的, 如蓝藻、绿藻、硅藻等。“水华”发生时, 水体一般呈蓝色或绿色。这种在自然界就有的“水华”现象, 在古代历史上就有记载。另外, 水中出现此现象(一般呈红色)则为赤潮。1831—1836年, 达尔文在《贝格尔航海记录》中记载了在巴西和智利近海面发生的束毛藻引发的水华现象事件。据载, 中国早在 2000 多年前就发现水华现象现象, 一些古书文献或艺术作品里已有一些有关水华现象方面的记载。如清代的蒲松龄在《聊斋志异》中就形象地记载了与水华现象有关的发光现象。

“水华”频繁出现, 面积逐年扩散, 持续时间逐年延长, 已经成为一种世界公害。美国、日本、中国、加拿大、法国、瑞典、挪威、菲律宾、印度、印度尼西亚、马来西亚、韩国、香港等 30 多个国家和地区水华现象发生都很频繁。在我国, 太湖、滇池、巢湖、洪泽湖都有“水华”, 就连流动的河流, 如长江最大支流——汉江下游汉口江段中也出现“水华”。“水华”造成的最大危害是:

饮用水源受到威胁，藻毒素通过食物链影响人类的健康，蓝藻“水华”的次生代谢产物能损害肝脏，具有促癌效应，直接威胁人类的健康和生存。

1.2.2 铜绿微囊藻水华形成的因素—N/P 学说

微囊藻在自然环境中的适宜环境下，往往能在较短时间内形成“水华”，分析其主要成因及主要的控制因子，一般认为是由蓝藻本身的生理特点以及温度、光照、营养盐、其它生物等诸多环境因素所引发的^[2]。在水华形成机理研究中，研究最多的可能就是有关营养盐与微囊藻生长之间的关系。由于蓝藻水华通常出现在富营养化的湖泊中，早期人们通常假设它们的生长可能需要较高的磷、氮浓度的支撑。确实，伴随着湖泊的富营养化，尤其是水体中磷浓度的增加，通常会导致水体中浮游植物的种群组成朝着形成水华的蓝藻演替^[3]。

事实上，微囊藻有较高的磷吸收的最大摄取速率 (V_{max})^[4]、比其它藻类具有更强的储存磷的能力，它们可以在细胞中储存足够的磷(够细胞分裂2~4次)^[5]、对磷、氮等营养盐的结合力比其它藻类高^[6]等，这些特点使得它们可以更有效地利用磷，尤其在氮、磷限制的条件下，具有比其它藻类更高的竞争力。因此，在许多氮、磷浓度较低的水体中，也时常可以见到蓝藻的水华。

据报道，不同的氮磷比例不仅会对微囊藻细胞的生长速度造成影响，甚至对细胞内物质的合成积累也有影响。A. C. Redfield (1958) 提出海水中平均 N/P 原子比是 15:1，蓝藻等浮游植物在生长时 N 和 P 也以 15:1 的比例被消耗。但因实验室分析结果认为浮游植物的组成 N/P 比是16:1，故后来的学者多以此值作为浮游植物生长的最适氮、磷比例^[7]。

Smith (1983) 通过收集世界范围的17个湖泊的资料，计算了生长季节表水层 (epilimnion) 中蓝藻生物量的平均比例以及TN/TP比，结果发现当TN/TP<29 (重量比) 时蓝藻倾向于占优势，而当TN/TP>29 (重量比) 时蓝藻倾向于稀少，从而提出了用于解释蓝藻水华发生的著名的N/P比学说，并将论文发表在Science上。他认为，营养盐比例 (nutrient ratios) 是自然的浮游植物群落种类组成的一个重要的决定性因素，该结果也暗示与其它藻类相比，蓝藻一般是很好的氮竞争者，而对磷的竞争能力较差^[8]。在这方面已有大量的综述研究，有些文章支持“TN/TP学说”^[9-11]，而有些文章则持否定态度，他们认为水华爆发中起作用的是P浓度的上升，而不是低的N/P^[12, 13]。

1.3 细菌的磷吸收转运机制

居于以上研究，磷是蓝藻水华爆发的关键因子。研究蓝藻，特别是铜绿微囊藻磷的吸收转运，对于解释铜绿微囊藻的水华爆发机制，有一定的揭示作用。现阶段，磷吸收转运过程的研究，主要集中在细菌中展开。蓝藻，亦称蓝细菌，居于细菌与蓝藻之间在进化上的亲缘关系，可以推断两者的磷吸收代谢过程是接近的。

1.3.1 细菌的磷代谢

作为细胞生长的必需元素，磷源的吸收和利用对细菌的生长有着重要的作用，因而细菌具有几种不同的代谢途径来降解不同的磷源。一般说来，细菌可利用三种形式的磷源，即：无机磷酸盐（inorganic phosphates, Pi），有机磷酸酯（organophosphates），磷酸酯（phosphonates, Pn）。Pi为通常情况下最适磷源^[14]。细胞吸收Pi后，其代谢途径主要取决于碳源、生长条件及生长状况。大概有三种情况：通过底物水平磷酸化生成1, 3-二磷酸甘油，或通过混合酸发酵生成乙酰磷酸，或通过氧化磷酸化生成ATP等。有机磷酸酯在细胞中可被作用释放出Pi，而成为Pi的提供者。Pn则被降解产生Pi后参与ATP的合成。细胞中磷代谢是复杂的，但从根本上说，任何磷化合物的利用需要两步进行，即磷的吸收和Pi合成ATP，之后可用于多种化合物的生成如膜脂、核酸及为蛋白质翻译后加工提供高能键等。而无论磷的最终去向如何，磷化合物的吸收同化总是与磷酸盐的吸收转运调节子息息相关^[14]。

1.3.2 细菌磷的吸收转运机制

细菌中有两个或者三个磷吸收转运的关键系统：高亲和性的ABC转运系统（Phosphate specific transport, Pst），亦称为磷酸盐特殊转运系统；较低亲和性的磷酸盐转运系统（phosphate regulon, Phn）；以及磷酸转运系统（Pi transport, Pit）^[15, 16]。Pit系统在细胞中为组成型表达，对磷的亲合力较低；而Pst系统的表达则受到Pi的浓度抑制，在磷的浓度超过 10^{-3} umol^[17]以上，Pst系统即受到抑制。除了转运磷酸盐，Pst系统还在一些受到磷酸盐抑制的调节基因中扮演着重要的调控作用，如*phoA*，为碱性磷酸酶的结构基因^[18]。Phn系统则对细菌磷酸盐转运进行总体调控^[19]。

磷酸盐调节子Phn，非专门磷酸盐转运系统，主要吸收磷酸酯的磷源，该操

纵子由十四个基因组成的，包括一个Pn转运系统和一个Pn降解系统^[14]。

Pst操纵子包括五个基因：*pstS pstC pstA pstB phoU*（图1）^[20]。PstS是外

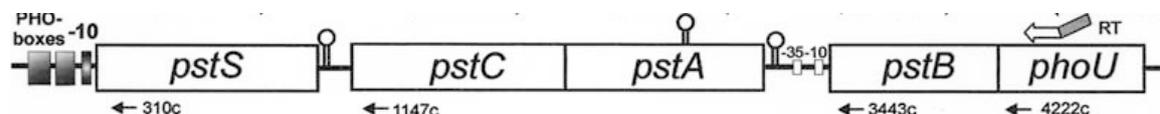


图1 Pst操纵子模型

Fig.1 the Pst operon model

周结合蛋白，PstA 与 PstC 形成内膜疏水性孔道蛋白，PstB，则类属于ABC蛋白家族，结合并水解ATP，为Pi的转运提供能量^[20]。这种类属于细菌型ABC转运子、可以结合ATP的亚单位，至今还被推测有其他的生物学功能。据研究，*pstB* 在具有氟化苯酚酮抗性的结核杆菌中，过量表达，这暗示了它可能除了在磷转运方面的功能外，还扮演着其它新的角色。此外，在现今的原核生物中，*pstB* 均存在于它们的基因组中，这可能揭示了*pstB* 基因对微生物的重要作用^[21]。

因此，基于*pstB* 基因在磷转运中的重要作用，且其研究都主要集中在细菌中，我们有必要探讨一下该基因在蓝藻，尤其是铜绿微囊藻中的作用，或许对蓝藻磷吸收转运机制的了解有一定的作用。

1.4 流式细胞术

流式细胞术(flowcytometry , FCM) 是一项新型的、发展迅速的生物学分析技术，它是集激光技术、光电测量技术、计算机技术、流体力学以及细胞免疫荧光化学技术、单克隆抗体技术为一体的新型高科技细胞分析技术^[22]。流式细胞仪是应用流式细胞术建立起来的仪器装置。它使细胞或微粒在液流中流动，逐个通过一入射光束，并用高灵敏度检测器记录下散射光及各种荧光信号，从而得以对粒子进行多参数分析，包括诸如粒子形状和大小、细胞周期、多药耐药蛋白、细胞内细胞因子、细菌表面抗原、细胞DNA内含物、多分子复合体排列、多价反应动力学等^[23]。FCM一般还有筛分的作用，可以根据所检测细胞的某种性质进行分选，并且如果分选的过程实在无菌条件下进行的，这些细胞还可以用来培养。

1.4.1 流式细胞术的发展及原理

1930年人类致力于细胞的计数，1947年烟雾微粒计数器研制成功，1954年光

电粒子计数器的诞生,1969年发明第一台荧光检测细胞计,1972年细胞分选器的改进型研制成功,1975年提出单克隆抗体技术,现今随着光电技术的进一步发展,流式细胞仪已开始向模块化发展。进入了21世纪,流式细胞术已经日臻完善,成为分析细胞学领域中无可替代的重要工具^[24]。

流式细胞仪主要由4部分组成:液流系统、光学系统、电子系统、分析系统^[25]。它只能检测悬浮的单细胞或微粒的信号。一般是将待测细胞或微粒进行荧光染色后制成悬液标本,在一定气体压力下将待测样品压入流动室,用不含细胞或微粒的缓冲液(又称鞘液)在高压下从鞘液管喷出,鞘液管入口方向与待测细胞或微粒流成一定角度,使鞘液包绕着细胞或微粒高速流动,形成一个圆形的流束(即鞘流),待测细胞在鞘液的包裹下单行排列,依次通过流式细胞仪的检测区域,经激发光激发后产生荧光信号。流式细胞仪通常以激光作为激发光源,经过聚焦整形后的光束垂直照射在样品流上,被荧光染色的细胞在激光束的照射下产生散射光和激发荧光。这两种信号同时被前向光电二极管和90°方向的光电倍增管(PMT)接收。光散射信号在前向小角度进行检测,称为前向散射(forward scatter, FSC),这种信号基本上反映细胞体积的大小;90°散射光又称侧向散射(side scatter, SSC)是指与激光束-液流平面垂直的散射光,其信号强度可反映细胞部分结构的信息。荧光信号的接收方向与激光束垂直,经过一系列双色性反射镜和带通滤光片的分离,形成多个不同波长的荧光信号。这些荧光信号的强度代表所测细胞膜表面抗原的强度或其细胞内、核内物质的浓度,经光电倍增管接收后可转换为电信号,再通过模/数转换器,将连续的电信号转换为可被计算机识别的数字信号。计算机采集所测量到的各种信号进行计算处理,将分析结果显示在计算机屏幕上,也可以打印出来,还可以数据文件的形式存储在硬盘上,以备日后的查询或进一步分析。检测数据的显示视测量参数的不同而有多种形式可供选择。单参数数据以直方图的形式表达,其x轴为测量的散射光或荧光的强度(可以是线性轴,也可以选择对数轴),纵轴为相对细胞数。一般来说,流式细胞仪坐标轴的分辨率有256或1024通道数,这视其模/数转换器的分辨率而定。对于双参数或多参数数据,既可以单独显示每个参数的直方图,也可以选择二维的散点图、等高线图或三维的立体视图等^[24]。流式细胞仪还可以对分析中的目的细胞进行分选提取,它通过分离含有单细胞的液滴而实现的。在流动室的喷口上配有一个超

高频电晶体, 充电后振动, 使喷出的液流断裂为均匀的液滴, 待测定细胞就分散在这些液滴之中。将这些液滴充以正负不同的电荷, 当液滴流经带有几千伏特的偏转板时, 在高压电场的作用下偏转, 落入各自的收集容器中, 不予充电的液滴落入中间的废液容器, 从而实现细胞的分离^[26]。

1.4.2 流式细胞术在海洋生物学中的应用

流式细胞仪自20世纪70年代初发明后, 起初在医学上应用广泛, 主要用于免疫学、血液学、肿瘤学、细胞生物学、细胞遗传学、生物化学等临床医学和基础医学的研究^[27]。在科研上主要应用于细胞动力学功能研究、环境微生物分析、流式细胞术与分子生物学研究等方面。FCM在生命科学中的应用, 标志着细胞生物学、肿瘤学、免疫学等进入了细胞和分子水平的研究。为从微观认识细胞及横向比较特征提供了精密、准确的方法和仪器。20世纪80年代末, 随着海洋科学的发展, 流式细胞仪开始进入海洋生物学的研究范畴。目前在水生生物中多数用于DNA含量和倍性方面的研究^[28], 以及海洋浮游植物和海洋细菌的分类鉴定计数、生理生化研究和海洋经济物种遗传育种等方面。

流式细胞仪最早应用于浮游植物的研究始于20世纪80年代末, Yentsch^[29, 30]等有关海洋中生物微粒粒径的划分和分析方法的叙述, 对流式细胞仪应用于海洋微型浮游植物研究起了积极的推动作用。在常规显微技术难以观察的微型及超微型浮游植物类群的分析检测方面逐渐占有了一席之地。海洋浮游植物的种类繁多, 如果仅仅依靠传统方法进行种类分类和计数需要投入大量人力和资金, 并且主观性较大。而这恰恰是流式细胞仪的优势所在。它可以对单细胞浮游植物进行同步、迅速并且多参数的分析。它可以根据微粒的荧光特性反映出浮游藻类的大小、形状、结构或者是色素类型, 从而对浮游植物进行定量和定性研究。因此, 流式细胞仪被海洋生物学家广泛地用于进行浮游植物的种类和数量分布的研究^[31-33]。Garrison^[34]等利用流式细胞仪研究了阿拉伯海微生物食物网结构, 并分析了海区不同深度浮游植物的能量收支和动态变化, 发现在混合层, 原核生物原绿球藻 (*Prochlorococcus marinus*)、聚球藻 (*Synechococcus* spp.) 以及绝大部分超微真核生物的个体密度呈现明显的昼夜变化节律, 个体密度在中午或黄昏最小, 在午夜最大, 昼夜变幅大于40%, 而且超微型藻类的生长量和被摄食量在一昼夜的时间尺度上接近平衡。DuRand等^[35]利用流式细胞仪调查了百慕大大西洋的浮游藻类

的群落结构，分析了浮游植物的季节变化规律。

流式细胞仪在海洋细菌相关研究中的应用主要表现在以下几个方面：（1）海洋细菌的计数以及生物量统计；（2）海洋细菌生理生化分析，如细菌的活性或细胞膜的完整性以及代谢物质的测定；（3）与分子生物学相结合，进行海洋细菌的种类鉴定。与分子生物学和细胞生物学的结合已成为流式细胞仪发展的方向，例如，采用流式细胞仪与荧光原位杂交技术（FISH）及变性梯度凝胶电泳（DGGE）结合的方法来研究浮游细菌的分类鉴定^[36]。Magarnos 在基于细菌细胞膜完整性的条件下，利用流式细胞仪进行细菌的活体检测，研究了在贫营养条件下杀鱼巴斯德氏菌（*Pasteurella piscicida*）在海水中的分布状况与生态环境因子之间的关系^[37]。Grégori在实验室条件下模拟了不同温度条件下异养细菌的增殖能力，并利用流式细胞仪分析了法国马赛湾异养细菌的季节变化情况^[32]。

1.4.3 检测不同 N/P 条件下藻细胞的 DNA 含量

DNA是遗传信息的载体，是构成染色体的主要化学物质。DNA含量的测定主要反映的是细胞核DNA的含量。

目前，利用流式细胞术PI染色法来检测细胞的DNA含量，主要应用于基础和临床医学肿瘤细胞的检测方面。已知不同种类、不同增殖时期的细胞其核DNA含量不同，核DNA可以一定的方式与DNA染料结合，结合染料的多少与细胞摄取染料的能力和DNA含量有关，由此可对DNA的含量进行定量测定，以流式细胞术对荧光染料如碘化丙锭的荧光强度进行测定是DNA含量分析的最佳方法^[38]。其原理是，碘化丙锭为一种插入性的荧光染料，能够嵌入双链核酸（DNA和RNA）的碱基对中，经RNA酶的处理后RNA被消化掉，PI可对DNA进行特异的染色。PI可选择地、定量地与核酸（DNA、RNA）双螺旋部分的化合物结合，在488nm激光的激发下，PI的发射光谱为562~588nm，呈现橙黄色。PI分子直接插入DNA的两个碱基对之间，每隔5个碱基插入一个荧光分子，这种结合十分紧密、稳定，不因染色过程而造成染料脱落丢失^[39]。因此可作为DNA含量的定量分析，进行细胞周期研究和细胞的亚二倍体、二倍体、四倍体、六倍体鉴定等。目前，DNA的倍性检测的一些研究主要在特殊的真核细胞中进行，如肿瘤细胞、血细胞等。

蓝藻因其为原核细胞生物，没有明显的细胞周期，应用于流式细胞术PI染色

法来检测细胞的DNA含量方面，尚属少见。蓝藻有多个染色体拷贝，其染色体在细胞分裂中按随机的方式分离^[40]。因此我们利用藻细胞来进行PI染色法DNA含量的检测时，无法得到正常的二倍体、四倍体峰，无法区分出正常的细胞周期。所以，我们以所检测到藻细胞的平均PI荧光强度来间接地反映藻细胞平均的DNA含量，从而判断藻细胞的生长状况。

前面我们介绍了铜绿微囊藻水华爆发因素—N/P学说中，提到当水体中的氮磷比处于一个比较合适的比值时，容易爆发水华。该学说指出，海水中平均 N/P 原子比是 15 : 1，蓝藻等浮游植物在生长时 N 和 P 也以 15 : 1 的比例被消耗，因实验室分析结果认为浮游植物的组成 N/P 比是16 : 1，故后来的学者多以此值作为浮游植物生长的最适氮、磷比例^[38]。在这个假说中，主要针对外界水华爆发来阐述其合适的氮磷比，而我们想探讨一下，更深层次的原因，为何铜绿微囊藻的最适氮、磷比例是16 : 1。我们假设，N/P=16 : 1，该值是与藻细胞生长分裂相关系的，磷在细胞中的作用主要是一些代谢途径的磷酸化，而更重要的可能是与细胞DNA、RNA的合成有关。因此，为了证明该假设，实验设置了不同N/P水平下的诱导浓度，检测一定量的铜绿微囊藻细胞的DNA含量，分析N/P与藻细胞DNA含量之间的关系。

1.5 蛋白质组学的研究进展

基因研究是上世纪生命科学的主线，以遗传学为代表；下半世纪，以分子生物学为代表，生命科学通过对基因复制、转录、翻译及遗传密码的分析与破译，最终以“中心法则”的问世而集成：上世纪 90 年代，随着全球性基因组计划尤其是人类基因组计划规模空前、速度惊人的推进，基因研究已近“登峰造极”。但是，人们在欢呼基因组计划辉煌业绩之时，亦愈来愈清醒地意识到一项更艰巨、更宏大的任务即基因组功能的阐明已经摆在面前，生命科学研究几乎在转瞬之间开始了新的征程—蛋白质组研究，进入了新的纪元—后基因组时代（Postgenome era）。

1.5.1 蛋白质组学研究的研究意义和背景

基因是遗传信息的携带者，蛋白质才是全部生物功能的执行者，它有自身的活动规律，因此仅从基因的角度来研究生命活动规律是远远不够的，必须研究由基因转录和翻译出蛋白质的过程，才能真正揭示生命活动规律。

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