

学校编码: 10384

分类号 _____ 密级 _____

学号: 21720061152207

UDC _____

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

假微型海链藻硅吸收与生物硅化作用特点
及相关蛋白研究

The Function Character and Related Proteins Involved in
Silicon Uptake and Bio-silicification in *Thalassiosira*
pseudonana

陈 丹 丹

指导教师姓名: 梁君荣 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10月

论文答辩时间: 2009年11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

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.....	I
Abstract.....	III
缩 略 词.....	V
第一章 前 言	1
1.1 硅藻细胞壁的结构特征及其形成特点.....	1
1.2 硅藻硅质细胞壁形成相关调控机理的研究进展.....	3
1.3 硅藻基因组的研究	10
1.4 蛋白质组学在藻类研究中的应用	11
1.5 本论文的研究目的和意义	13
第二章 材料与方 法	15
2.1 实验材料	15
2.2 实验方法	18
第三章 结 果	25
3.1 假微型海链藻硅吸收及生物硅化作用与细胞周期的耦合关系.....	25
3.2 假微型海链藻在同步化培养下不同时期的蛋白表达差异.....	30
第四章 讨 论	45
4.1 假微型海链藻同步化培养体系的建立.....	45
4.2 假微型海链藻吸收硅及生物硅化作用与细胞周期的耦合关系.....	46
4.3 假微型海链藻细胞蛋白提取方法的比较.....	47
4.4 假微型海链藻在同步化培养下不同时期的蛋白表达差异分析.....	48
第五章 总结与展望	52
5.1 总结	52
5.2 展望	52
参 考 文 献	54
附 图.....	62
在学期间发表的论文和参与的课题	65
致 谢.....	66

Contents

Abstract in Chinese.....	I
Abstract in English	III
Abbreviations	V
Chapter 1. Introduction.....	1
1.1 The structure and formation features of diatom cell wall	1
1.2 Review of the research on the silica structure formation mechanism of diatom	3
1.3 Advances in diatom genomic research.....	10
1.4 Application of proteomic methods in algae research.....	11
1.5 The objective and significance of the study.....	13
Chapter 2. Material and methods	15
2.1 Material	15
2.2 Methods	18
Chapter 3. Results.....	25
3.1 The coupling between silicon uptake, silicification and cell cycle of <i>Thalassiosira pseudonana</i>	25
3.2 The protein expression pattern of <i>Thalassiosira pseudonana</i> in different growth phases during synchrony	30
Chapter 4. Discussion	45
4.1 Establishment of the synchronized culture system of <i>Thalassiosira pseudonana</i>	45
4.2 The coupling between silicon uptake, silicification and cell cycle of <i>Thalassiosira pseudonana</i>	46
4.3 Compare the protein extracted methods of <i>Thalassiosira pseudonana</i>	47
4.4 Analysis of the differential protein expression of <i>Thalassiosira pseudonana</i> in different growth phases during synchrony	48
Chapter 5. Conclusion and prospect	52
5.1 Conclusion.....	52
5.2 Prospect	52
References	54

Attached diagrams	62
Published papers and participated research projects	65
Acknowledgement	66

厦门大学博硕士论文摘要库

摘要

硅藻是全球碳固定主要的贡献者之一，也是海洋中进行生物硅化的主要生物体。长期以来，硅藻的碳固定和硅代谢过程一直是人们的研究热点。而近年来，硅藻形态各异、美妙绝伦的硅质化结构的形成过程和机理更是引起了人们极大的兴趣。

本论文选用中心纲海洋硅藻——假微型海链藻（*Thalassiosira pseudonana* Hasle et Heimdal）为研究对象，采用硅饥饿方法构建了假微型海链藻同步化培养体系；运用荧光显微镜观测，流式细胞仪检测等方法探讨了假微型海链藻在细胞周期中硅吸收与生物硅化作用的变化特征及相互间的耦联关系；应用蛋白质组学及生物信息学方法研究了假微型海链藻在硅吸收和生物硅化作用活跃期细胞全蛋白和细胞壁蛋白的表达差异。这为硅藻硅化机理的进一步研究奠定了基础。主要结果如下：

1) 经流式细胞仪检测，假微型海链藻同步化培养体系的同步化效率最大可达 70%-80%。这为富集某一特定时期的细胞提供了很好的实验工具。

2) 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耦联关系。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。同步化培养的第 1 h、3 h，分别是吸收硅、合成新壳环带的主要时期，与 G1/S 期耦合；第 5 h、7 h，分别是吸收硅、合成新壳面的主要时期，与 G2/M 期耦合。

3) 应用双向电泳技术，以假微型海链藻同步化培养开始时的细胞为参照，比较分析了同步化培养 1 h、5 h 和 7 h 后细胞全蛋白和细胞壁蛋白的表达差异。通过软件分析找到了 23 个差异蛋白点。经质谱分析，鉴定到 21 个蛋白点，9 个为已知功能的蛋白，其余 12 个为功能未知的假想蛋白或预测蛋白。其中蛋白点 C4 为细胞质动力蛋白，T13 为磷酸甘油变位酶，与硅吸收及生物硅化作用有关。

4) 通过对 3 个假想蛋白和 9 个预测蛋白的同源性搜索，其中蛋白点 T10、

T11、C1、C8 找到了匹配性良好的同源蛋白，其他蛋白点未能搜寻到显著匹配的已知功能的蛋白，但蛋白点 T14、15 具有保守功能区。这些未知蛋白的具体功能及与假微型海链藻硅质壁合成的相关性有待进一步的研究加以佐证。

关键词：同步化 硅吸收 生物硅化作用 蛋白质组学

厦门大学博硕士论文摘要库

Abstract

Diatoms are the predominant contributors to global carbon fixation, and they are also the major organisms that possess of biosilicification in ocean. People have focused on the research of carbon fixation and silicon metabolism in diatoms for a long time. In recent years, people are more interest in diatom silica structure formation.

In this paper, we chose the centric diatom *Thalassiosira pseudonana* Hasle et Heimdal as an object of our research. The synchronized culture system of *Thalassiosira pseudonana* was established by silicon starvation. Flow cytometry and microscope studied on the variation characters and the coupling between silicon uptake and silicification during cell cycle. The techniques of proteomic and bio-information analysed on the protein differential expression in the active phases of silicon uptake and silicification of *Thalassiosira pseudonana* during synchrony. The main results showed as follows:

1) At mostly, the efficiency of synchrony would arrive at 70 %- 80 %. Use of synchronized culture is an important experimental tool that has greatly facilitated our enrichment of cells in specifically phases.

2) The variation of silicon uptake during the cell cycle was measured with silicon molybdenum yellow method. At the same time, using the flow cytometry and microscope, cell cycle stages of *Thalassiosira pseudonana* and the formation of the new cell wall were observed respectively. The results showed that the cells were arrested at the G1/S phase boundary after 24 h silicon starvation, and replenishing silicon leaded to synchronized growth. Cells mainly transported silicon from outside cell to inside at 1 h and synthesized the new girdle bands at 3 h, which associated with the G1/S phase. Another major period of silicon uptake happened at 5 h and synthesized the new valves at 7 h, which matched with the G2+M phase.

3) Using 2-DE, comparative analyzed the protein differential expression of *Thalassiosira pseudonana* in 0 h, 1 h, 5 h, 7 h during synchrony. 23 differential protein spots were found by 2-DE software and 21 of them were detected by MS. 9

of them were known function proteins, others were hypothetical proteins or predicted proteins that unknown functions. C4 and T13 was cytoplasmic dynein and phosphoglycerate mutase, respectively. Both of them were involved in silicon uptake and bio-silification.

4) According to homologue searching of hypothetical proteins and predicted proteins, T10, T11, C1, C8 had homologue proteins. Others did not match with any known function protein. T14 and T15 had not matched proteins, but they contained some conserved domains. The functions and the relationship with the silica structure formation of these unknown proteins needed to be proved by additional experiments.

Key words: synchrony; silicon uptake; bio-silification; proteomic

缩略词

2-DE: Two-dimensional gel electrophoresis (双向电泳)

PAGE: Polyacrylamide gel electrophoresis (聚丙烯酰胺凝胶电泳)

SDS: Sodium dodecyl surfate (十二烷基磺酸钠)

TEMED: N,N,N,N-Tetramethylethylenediami (四甲基乙二胺)

DTT: Dithiothreitol (二硫苏糖醇)

CHAPS: 3-[(3-Cholamidopropyl) dimethylammonio]-1-propane sulphonate (乙醇胺丙基二甲氨基丙磺酸盐)

Tris: hydroxymethyl methane (三羟甲基氨基甲烷)

IPG: Immobilized pH gradient (固相 pH 梯度)

PI: Propidium iodide (碘化丙啶)

PDMPO: (2-(4-pyridyl)-5-((4-(2-dimethylaminoethylamino-carbamoyl)methoxy)-phenyl)oxa-zole (2- (4-吡啶) -5- ((4- (2-二甲氨基-氨基-氨甲酰基) 甲氧基) 苯基) 恶唑)

HCCA: α -cyano-4-hydroxy-cinnamic acid (α -氰基-4-羟基肉桂酸)

MALDI-TOF-MS: matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight Mass spectrometry (基质辅助激光解析离子飞行时间质谱)

第一章 前言

硅藻是一类分布广泛的、光合自养的单细胞真核生物，遍布世界海洋和淡水系统。它是海洋生态系统最主要的初级生产者，每年通过光合作用生产45至50亿吨的有机碳，占海洋初级生产力的40%^[1]，其在全球碳循环中的作用可以媲美陆地雨林^[2]。硅藻是浮游动物、贝类、鱼类等的直接和间接饵料，是水域生态系统食物链中的重要环节，有“水中牧草”之称。浮游硅藻的盛衰必然影响到浮游动物，经济鱼类和贝类的相应变化，对生态系统的平衡起着至关重要的作用。

不同于其它浮游植物，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（即硅质壳，主要成分是无定型的水化硅）。硅藻是海洋中进行生物硅化的最主要生物体，是生物硅的最大贡献者。Tréguer 等^[3]研究发现，虽然全球海洋硅酸极不饱和，但是硅的循环是处在稳定状态，河流每年输入的陆源硅都由硅藻的硅质壳在沉积中的埋葬所平衡。因此，硅藻决定了硅的生物地球化学循环。此外，海洋硅藻的硅代谢与赤潮的发生也紧密相关。杨东方等^[4]认为，发生赤潮（或水华）的主要原因是由于水体中营养盐硅的缺乏，并与氮、磷的比例失去平衡所引起的。当营养盐硅一直过低，氮、磷过高，就会限制硅藻的生长，所形成的真空空间被非硅藻(如甲藻)迅速占据，产生非硅藻的水华。在极度缺乏硅的水域中，当营养盐硅突然大量提供时，硅藻会迅速增长，产生硅藻水华。

硅藻具有重要的生态学意义，在水产养殖、水质检测、法医鉴定，石油勘探、赤潮预报等领域都有广泛的应有。

1.1 硅藻细胞壁的结构特征及其形成特点

1.1.1 硅藻细胞壁的特征和结构

硅藻的细胞壁由硅质（ $\text{SiO}_2 \cdot n\text{H}_2\text{O}$ ）和果胶质(pectin)组成，形似小盒，由上、下两块组成。套在外面，形状较大的称为上壳（epitheca），套在里面，形状较小的，称为下壳（hypotheca）。上下相连带总称为壳环带（girdle band）^[5]。

硅藻细胞普遍存在两种结构类型：轴对称和左右对称。中心纲硅藻中最常

见的是中心轴对称，但不一定都呈圆形。羽纹纲硅藻普遍比较细长，多呈左右对称^[6]。硅藻的细胞壁表面高度纹理化，不同的硅藻纹饰通常也不一样，因而被用作硅藻种类形态学鉴定的主要特征依据。目前，已经鉴定的硅藻种类有10000—12000种，并且存在的种类远远多于已鉴定的种类^[7]。在这数以万种的硅藻中，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（见图1.1）。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。硅藻是如何形成这些形态各异、超微小的复杂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。科学家正试图在遗传上控制硅藻细胞壁合成的过程，寻求一种新的纳米硅材料的制造方法。

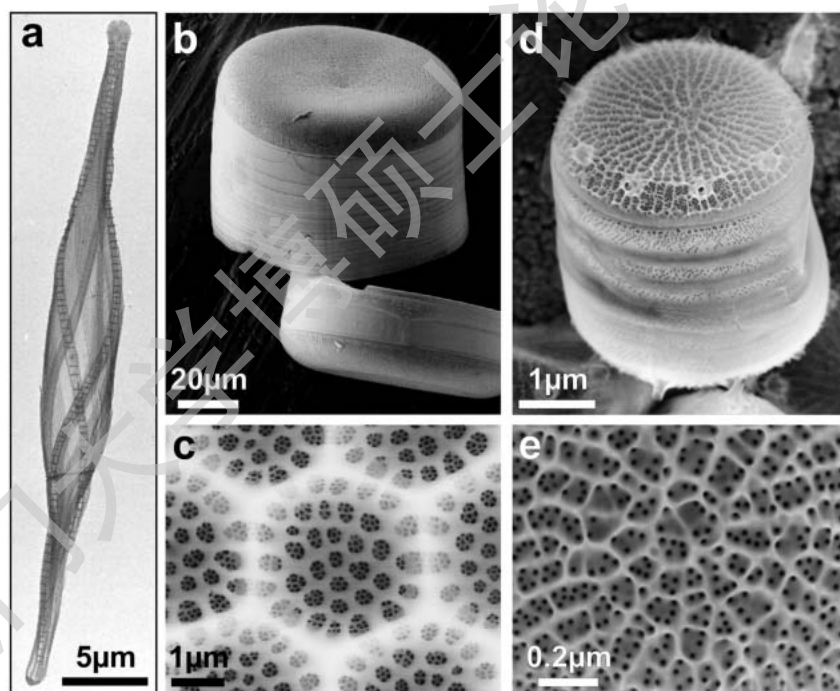


图1.1 硅藻细胞壁结构（电子显微镜照片）

a: *Cylindrotheca fusiformis*; b,c: *Coscinodiscus asteromphalus*; d,e: *Thalassiosira pseudonana*. (引自Kröger and Sumper, 2004)^[8]

Fig. 1.1 Structures of diatom cell walls (Electron microscopy images)

a: *Cylindrotheca fusiformis*; b,c: *Coscinodiscus asteromphalus*; d,e: *Thalassiosira pseudonana*. (Kröger and Sumper, 2004)^[8]

1.1.2 硅藻细胞周期与硅化作用的相关性

真核细胞的细胞周期大致分为四个期：S期，DNA合成，染色体复制；G2期，间隔期；M期，有丝分裂（发生胞质和细胞分离）；G1期，细胞生长。在营养生长期间，S期染色体复制，有丝分裂后期胞质分裂形成两个子细胞的原生质体。与其他真核细胞不同，硅藻的子细胞不会立即分离，分离通常发生在壳面合成后。硅藻壳面的合成发生在子细胞原生质体卵裂沟附近的硅沉积囊泡（silica deposition vesicle, SDV）中^[6]。壳面一旦成形，SDV将其分泌到胞外，使其成为子细胞细胞壁的一部分。然后，两个子细胞分离。相对于壳面的合成，壳环带的合成时间随硅藻种类不同而有所不同。有些种类在壳面合成后细胞分裂前形成壳环带，有些种类在细胞分离后合成壳环带^[9]。

硅藻的细胞周期进程主要依赖于硅的利用^[10]。硅限制会增加细胞完成细胞周期的总时间，硅饥饿会使细胞周期完全停滞^[11-13]。细胞周期的停滞可出现在多个阶段，根据硅藻的种类而有所不同。但普遍存在两个停滞点，一个在G1期（或是G1/S期的边界），另一个在G2/M期（与新壳面合成相关）^[11, 13-15]。威氏海链藻（*Thalassiosira weissflogii*）停滞点在G1和G2期^[11]，纺锤筒柱藻（*Cylindrotheca fusiformis*）停滞点在G1/S期边界^[15]。由于特异性的停滞点，硅藻细胞在重新加入硅后能同步生长。同步化使富集细胞壁合成时的细胞成为可能，从而能够富集参与这一进程的mRNA、蛋白质和结构中间体。同步化培养提供了重要的实验工具，方便我们进一步了解各个种类硅藻的硅代谢^[16-18]。

1.2 硅藻硅质细胞壁形成相关调控机理的研究进展

硅藻细胞的整个生物硅质化过程是一个非常复杂的过程，包括硅从细胞外吸收转运到细胞内、细胞内硅的吸收浓缩、再转运到细胞内的硅沉积囊泡（silica deposition vesicle, SDV）进行硅质结构的生物硅质化^[19]。其中许多的细节和调控机理都还不清楚。但随着硅藻硅转运基因及硅化相关蛋白的发现，为硅藻硅质细胞壁形成的研究掀开了新篇章。

1.2.1 硅藻硅酸转运基因

1.2.1.1 硅酸转运子的分子特征

Hildebrand 等人^[18]首先在纺锤筒柱藻中鉴别到了参与硅藻硅酸转运的基因——硅酸转运子 (silicon transporters, *SITs*)。向非洲爪蟾 (*Xenopus laevis*) 卵母细胞注射这类基因转录合成的 mRNA, 卵母细胞表现出的硅酸吸收特征与硅藻相似, 表明了该基因编码硅酸转运蛋白。该蛋白具有 10 个跨膜结构域和一个长的亲水羧基末端, 在亲水羧基端有介导与其他蛋白相互作用的卷曲螺旋 (coiled coil) 结构^[18]。但在假微型海链藻 (*Thalassiosira pseudonana*) 和中肋骨条藻 (*Skeletonema costatum*) 中鉴定到的 *SITs* 序列缺乏这种蛋白之间相互作用的模体 (motif)^[20]。在大量进化发生分歧的硅藻中都鉴定到了 *SIT* 序列, 甚至在金藻——彼得森黄群藻 (*Synura petersenii*) 和卵形棕鞭藻 (*Ochromonas ovalis*) 中也有鉴定到^[20-23]。每种硅藻中都有多种 *SITs*^[20], 这就决定了每种硅藻都有多个在动力学特性、细胞内的位置或表达特征上不不同的转运子^[16]。

尽管目前已经获得了大量的基因序列, 但仍没有找到 *SITs* 的同源物, 其进化起源仍不清楚。Schörder 等人^[24]报道, 在海绵中克隆到一个潜在的硅酸转运子, 但经基因鉴定其为碳酸氢盐转运子的同系物, 和 *SITs* 没有同源性, 只是推理证明了其对硅酸的吸收有作用。Ma 等人^[25]对水稻的硅转运系统进行了描述, 确定了水稻的硅酸转运子与水通道蛋白 (aquaporin) 同源, 也与硅藻的 *SITs* 没有相似性。

1.2.1.2 硅酸转运机制模型

SITs 是第一个表现出与硅酸相结合但不促进其聚合的蛋白, 这为研究蛋白如何与硅酸结合提供了模型。首先需要确定参与识别绑定硅酸的氨基酸, 氨基酸在进化上的保守性通常对蛋白质的功能非常重要。比较 *SIT* 序列是最初的研究方式, 根据序列比较, 提出了两种氨基酸与硅酸相互作用的模型。一种模型是基于锌参与硅酸转运的模型^[26]。此模型提出, *SITs* 通过氨基酸序列 CMLD (cys-met-leu-asp) 中的半胱氨酸残基束缚锌^[23], 并协调硅酸绑定^[23]。在假微型海链藻中鉴定到的三个 *SITs* 中只有一个含有半胱氨酸, 另外两个 *SITs* 仅参与硅酸的流出^[27]。然而, 对这三个 *SITs* 的 mRNA 表达水平的进行检测表明, 含有半胱氨酸的 *SIT* mRNA 的积累比另外两个少 40 – 80 倍^[28], 这与其在吸收中

起主要作用的事实不相符。Thamatrakoln 等人^[29]在最近实验中使用了锌螯合剂，也证明了这对 $\text{Si}(\text{OH})_4$ 的吸收没有影响。

SIT 介导转运的第二个模型是基于 8 种硅藻中 26 个 *SIT* 序列的比较结果^[20]。在这项研究中检测的所有种类，包括金藻都鉴定到一个保守的 GXQ (gly-X-gln, X 代表不同的氨基酸) 序列模体，其在全序列中重复四次。GXQ 模体的位置保守，一组位于跨膜片段 7 和 8 间，另一组位于细胞质内面向原生质膜附近的跨膜片段 2 和 3 上^[20]。根据跨膜片段的位置，这两组中谷氨酰胺的位置可能相反且相对于彼此稍微错开。该模型（见图 1.2）提出，跨膜片段 7 和 8 间位置相反的谷氨酰胺通过氢键与硅酸配位（图 1.2 中），导致蛋白构象变为向内开放型（图 1.2 右），便于硅酸被谷氨酰胺释放且与跨膜片段 2 和 3 上的谷氨酰胺结合，使释放的硅酸能够进入细胞。流出过程与此相反。这个模型是以交替存取转运功能模式为基础，根据细胞外或细胞内的环境，蛋白质构象交替变化暴露出底物结合位点^[30]。

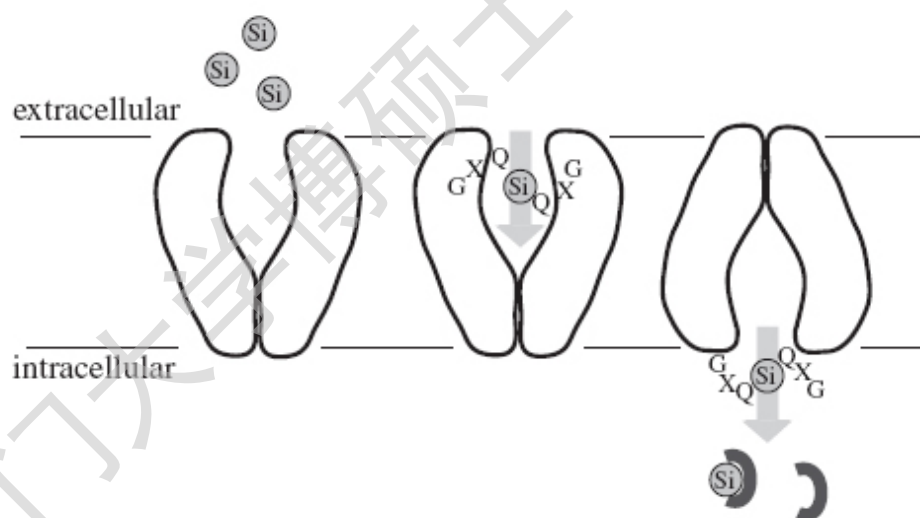


图 1.2 硅转运模型（引自 Thamatrakoln, et al. 2006）^[20]

Fig. 1.2 Silicic acid transport model (Thamatrakoln, et al. 2006) ^[20]

最近的一篇报导提供了海链藻目 (Thalassiosirales) 45 个种的 *SIT* 序列数据，共有 97 段序列^[31]。虽然不是全长序列，但也包括了跨膜片段 7 和 8 上的 CMLD 和 GXQ 模体。尽管 CMLD 模体的氨基酸组成高度保守，但半胱氨酸的保守性较低（仅存在于 64 % 的序列中），在此位点发现了 6 个不同的氨基酸。此外，其中有一个种在这个区域包含的模体完全丢失。这些特征没有显示

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