

学校编码: 10384

分类号 _____ 密级 _____

学号: 21620131152636

UD C _____

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

铜绿微囊藻 PCC7806 分泌蛋白 MrpC 的细胞定位及
其相互作用蛋白的研究

Cellular localization and interacting proteins study on
M. aeruginosa PCC 7806 secreted protein MrpC

郑秋艳

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: 2016 年 4 月

论文答辩时间: 2016 年 5 月

学位授予日期: 2016 年 6 月

答辩委员会主席: _____

评 阅 人: _____

2016 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.....	1
Abstract.....	1
1 前言.....	1
1.1 铜绿微囊藻和水华的相关介绍.....	1
1.1.1 蓝藻、铜绿微囊藻与水华.....	1
1.1.2 蓝藻水华发生的机理.....	1
1.1.3 蓝藻水华的危害.....	2
1.2 MrpC 蛋白悬浮功能的发现.....	3
1.3 免疫胶体金标记技术.....	5
1.3.1 胶体金标记的原理和特点.....	5
1.3.2 胶体金标记技术的应用.....	6
1.4 蛋白质相互作用研究方法综述.....	7
1.4.1 酵母双杂交.....	7
1.4.2 免疫共沉淀.....	8
1.4.3 GST Pull-down.....	9
1.4.4 其它技术.....	9
1.5 蛋白质 O-GlcNAc 糖基化的研究进展.....	10
1.5.1 <i>slpA</i> 、 <i>slpB</i> 基因的介绍.....	10
1.5.2 细菌蛋白质 O-GlcNAc 糖基化的研究进展.....	10
1.6 立题依据和研究意义.....	11
2 材料与方法.....	13
2.1 材料.....	13
2.2 实验方法.....	19
3 结果分析.....	32
3.1 <i>M. aeruginosa</i> PCC 7806 的分泌蛋白 MrpC 的细胞定位及组装分泌的研究.....	32

3.1.1	<i>M. aeruginosa</i> PCC 7806 分泌蛋白 MrpC 的细胞定位的研究.....	32
3.1.2	<i>M. aeruginosa</i> PCC 7806 分泌蛋白 MrpC 的组装及分泌.....	35
3.2	铜绿微囊藻 PCC 7806 分泌蛋白 MrpC 互作蛋白的研究.....	35
3.2.1	免疫共沉淀筛选 MrpC 的互作蛋白.....	35
3.2.2	酵母双杂交筛选 MrpC 的互作蛋白.....	36
3.3	<i>slpA</i> 和 <i>slpB</i> 基因敲除实验.....	50
3.3.1	<i>slpA</i> 、 <i>slpB</i> 基因敲除同源重组载体的构建.....	50
3.2.3	同源整合载体转化铜绿微囊藻.....	55
4	讨论.....	56
4.1	MrpC 蛋白在铜绿微囊藻 PCC 7806 细胞内的定位及组装.....	56
4.2	铜绿微囊藻基因组文库的构建.....	56
4.3	MrpC 互作蛋白的研究.....	57
4.4	同源重组法敲除铜绿微囊藻 PCC 7806 中 <i>slpA</i> 、 <i>slpB</i> 基因.....	58
5	小结.....	60
6	展望.....	61
	参考文献.....	62
	附录.....	66
	致谢.....	68

Contents

Abstract(Chinese version)	I
Abstract(English version)	I
1 Introduction	1
1.1 Introduction of <i>M.aeruginosa</i> and water blooms	1
1.1.1 Cyanobacteria, <i>M.aeruginosa</i> and water blooms.....	1
1.1.2 The mechanism of cyanobacterial blooms.....	1
1.1.3 The effects of cyanobacterial blooms.....	2
1.2 Discovery of MrpC suspension ability	3
1.3 Immuno-gold labeling technique	5
1.3.1 Principle and characteristics of immuno-gold labeling.....	5
1.3.2 Application of immuno-gold labeling technique.....	6
1.4 Summary of technique of protein-protein interaction	7
1.4.1 Yeast two-hybrid.....	7
1.4.2 Co-immunoprecipitation.....	8
1.4.3 GST Pull-down.....	9
1.4.4 Other techniques.....	9
1.5 Reviews of <i>O</i>-GlcNAc glycosylation	10
1.5.1 Introduction of slpA,slpB gene.....	10
1.5.2 Reviews of <i>O</i> -GlcNAc glycosylation in bacteria.....	10
1.6 Aims and significances of this research	11
2 Materials and methods	13
2.1 Materials	13
2.2 Methods	19
3 Results and analysis	32
3.1 Study cellular localization ,assembly and secret of secreted MrpC from <i>M.aeruginosa</i> PCC 7806	32

3.1.1 Study cellular localization of secreted MrpC from <i>M.aeruginosa</i> PCC 7806.....	32
3.1.2 Assembly and secret of secreted MrpC from <i>M.aeruginosa</i> PCC 780635	
3.2 Study interacting proteins of MrpC in <i>M. aeruginosa</i>.....	35
3.2.1 Screen interacting proteins of MrpC using Co-immunoprecipitation... 35	
3.2.2 Screen interacting proteins of MrpC using yeast two-hybrid.....	36
3.3 Knocknot of <i>slpA</i>, <i>slpB</i>.....	50
3.3.1 Construction of <i>slpA</i> and <i>slpB</i> homologous integration vector.....	50
3.3.3 Transfermation of homologous integration vector to <i>M. aeruginosa</i> PCC 7806.....	55
4 Discussion.....	56
4.1 Cellular localization and assembly of MrpC in <i>M. aeruginosa</i> PCC 780656	
4.2 Construction of genomic library of <i>M. aeruginosa</i>	56
4.3 The function of interacting protein of MrpC.....	57
4.4 The knockout of <i>slpA</i> 、 <i>slpB</i> gene from <i>M. aeruginosa</i> PCC 7806 by homologous recombination.....	58
5 Summary.....	60
6 Prospect.....	61
References.....	62
Appendix.....	66
Acknowledgement.....	68

摘要

铜绿微囊藻 (*Microcystis aeruginosa*) 是常见的水华蓝藻。本实验室的前期研究发现, *M. aeruginosa* PCC7806 胞外分泌蛋白 MrpC 呈纳米长纤维网状结构, 因而具有很好的细胞悬浮特性。进一步研究其丝状结构的形成过程对认识蓝藻水华的形成机制和防治有重要的意义。本论文研究 MrpC 蛋白在藻细胞内的定位分布及其互作蛋白, 可以帮助了解 MrpC 蛋白的合成组装分泌过程。MrpC 是糖蛋白, 在 *mrpC* 基因的下游有两个含有糖基化转移酶的基因, 分别是 *slpA*、*slpB* 基因。敲除 *slpA*、*slpB* 基因对于了解 MrpC 与 SlpA、SlpB 之间的关系具有重要意义。本文研究的主要内容和结果如下:

(1) 利用免疫胶体金标记技术定位铜绿微囊藻 PCC7806 的分泌蛋白 MrpC, 结果发现 MrpC 主要分布在细胞壁和胶质鞘区及类囊体区中, MrpC 蛋白单体在胞内合成组装成丝状蛋白并往胞外转运。从藻细胞的质壁分离电镜照片可以判断 MrpC 聚合体定位在细胞壁上。

(2) 利用免疫共沉淀和酵母双杂交技术筛选 MrpC 的互作蛋白, 但用免疫共沉淀没有成功筛选到 MrpC 的互作蛋白。用酵母双杂交发现 MrpC 蛋白能够发生自身相互作用, 并且成功筛选到 7 个可能与 MrpC 存在相互作用的蛋白。这些蛋白的发现为进一步研究 MrpC 蛋白的合成组装及分泌过程提供了新的思路。

(3) Glyco 是 SlpA 蛋白 C-端保守结构域, 具有糖基化转移酶结构域。克隆 *Glyco* 基因, 构建 pGADT₇-*Glyco* 载体。将 pGADT₇-*Glyco* 转化酵母菌 Y187, 结果显示 MrpC 与 Glyco 结构域没有发生相互作用。MrpC 与 SlpA 是否有相互作用, 还需要进一步验证。

(4) 分别构建 *slpA*、*slpB* 的同源整合敲除载体, 通过电击转化将载体转入野生藻中, 但没有筛选到突变藻, 需要对实验进行优化和改进。

关键词: 铜绿微囊藻; 分泌蛋白 MrpC; 胶体金定位; 互作蛋白; 糖基化蛋白

Abstract

Microcystis aeruginosa is a common water bloom. Our previous study found that the secreted protein MrpC from *M. aeruginosa* PCC 7806 which has network structure shows prominent suspension characteristics. We further studied the formation of its filamentous structure, it has great significance for understanding the formation of cyanobacterial blooms. This research studied the localization and interacting proteins of MrpC, it can further understand the synthesis, assembly and secret of MrpC. MrpC is a glycoprotein, two glycosyl transferase gene, *slpA* and *slpB*, are located downstream of the *mrpC* gene. The knockout of *slpA* and *slpB* is significant for understanding the relationship between MrpC and SlpA or SlpB. The main research results were as follows:

(1) We localized the secreted protein MrpC in *M. aeruginosa* PCC 7806 with immuno-gold labeling, MrpC was mainly found in the area of wall and sheath, thylakoid area. Monomer of MrpC assembled to filamentous protein in the intracellular and transported to extracellular matrix. We speculated that MrpC polymer is positioned on the cell wall according to the electron micrograph of plasmolysis.

(2) We used co-immunoprecipitation and yeast two-hybrid to screen the interacting protein of MrpC, but we failure to screen the interacting protein of MrpC using co-immunoprecipitation. We found that MrpC have self-interaction in yeast using yeast two-hybrid. We finally found 7 proteins potentially interacted with MrpC using yeast two-hybrid, the discovery of these proteins provides new ideas for further research the formation of its filamentous structure and secret of MrpC.

(3) Glyco, a C-terminal conserved protein domains of SlpA, has a glycosyl transferase domain. We cloned the *Glyco* gene, constructed pGADT₇-*Glyco*, pGADT₇-*Glyco* is transferred to yeast Y187, the results demonstrated that MrpC was not interacted with Glyco in yeast. We need further verificate the relationship between MrpC and SlpA.

(4) We respectively constructed homologous integration vector of *slpA* & *slpB*, not find any transformants. We need explore the optimization condition of transformed them to *M. aeruginosa* PCC 7806 using eletroporation. Although we did eletroporation.

Key words: *M. aeruginosa*; secreted protein MrpC; immuno-gold localization; interacting protein; glycoprotein

1 前言

1.1 铜绿微囊藻和水华的相关介绍

1.1.1 蓝藻、铜绿微囊藻与水华

蓝藻，又称为蓝细菌（Cyanobacteria），是地球上出现最早的光合自养型原核生物。蓝藻结构简单，无典型的细胞核，细胞壁外被为胶质鞘。它主要通过营养繁殖和产生内生孢子或者外生孢子进行无性繁殖。蓝藻在全球生态系统中发挥着重要作用，与人类的生活密切相关。蓝藻能够以水为电子供体，利用光能将二氧化碳还原成有机化合物，并释放出氧气^[1]。部分蓝藻，如鱼腥藻、念珠藻、项圈藻等，还能利用固氮酶将大气中的氮气还原为氨。蓝藻的种类繁多，分布广泛，绝大多数为淡水蓝藻，部分为海水蓝藻。在富营养化的湖泊、水库、河流中，部分蓝藻大规模繁殖，在水面形成蓝绿色且粘稠而有腥臭味的浮沫，这种现象被称为蓝藻水华。

铜绿微囊藻（*Microcystis aeruginosa*）属于蓝藻门色球藻纲微囊藻属，细胞通常为圆形或长圆形，蓝绿色，最适宜生长温度在 28–32℃ 之间，多生长在湖泊、水库等有机质丰富的水域，营浮游生活。与其它蓝藻相比，铜绿微囊藻有较强的高温^[2]和低温耐受性^[3]；铜绿微囊藻能高效吸收浓缩低浓度的 CO₂^[4, 5]，具有较强的 CO₂ 浓缩机制；铜绿微囊藻具有气囊，能利用气囊进行垂直迁移至有利于吸收光能的位置^[6]；铜绿微囊藻含有叶绿素 a 和藻胆蛋白，这些色素使得铜绿微囊藻具有更宽的吸收光波段^[7]，能够利用其它藻类不能利用的绿、黄和橙光。铜绿微囊藻含有丰富的类胡萝卜素，它能保护细胞免受光的抑制，因而对强光有更大的忍耐性^[8]；铜绿微囊藻能通过胶质鞘粘结形成群体防止被牧食^[9]；除此之外，铜绿微囊藻还能分泌微囊藻毒素抑制其它水生植物的生长^[10]。这些得天独厚的优势使得铜绿微囊藻成为水华蓝藻的优势种。

1.1.2 蓝藻水华发生的机理

蓝藻水华通常指水体富营养化状态下，在一定的光照、温度等条件下，蓝藻在水体中大量繁殖和聚集，形成肉眼可见的藻类聚集体，并在水面形成绿色或其

他颜色藻类漂浮物的现象^[7]。Brookes^[11]发现铜绿微囊藻浮力变化与营养盐及光照具有显著的关系。朱永春等^[12]建立太湖梅梁湾三维藻类迁移模型,发现不同风场对藻类在湖泊中的水平及垂直分布影响很大,风速小时能使藻类大量堆积,风速大时,则使藻类在水中均匀混合。Ishikawa 等^[13]对日本北盆地琵琶湖中微囊藻的迁移和聚集过程进行研究,提出“微囊藻旋回假说(the gyre-Microcystis hypothesiseis),研究人员发现离岸湖面聚集大量的蓝藻通常会发生蓝藻水华。孔繁翔等^[14]对太湖蓝藻水华形成进行原位观测,提出“四阶段理论”:指出蓝藻水华的形成经历越冬休眠、春季复苏、生物量增加、上浮和聚集四个阶段。孔繁翔等认为水华的暴发的前提是需要一定的藻类生物量,在合适的气象和水文条件下,藻类群体就能上浮至水面形成水华。秦伯强^[15]认为蓝藻水华的发生与蓝藻在环境中的竞争优势以及湖泊的光照、温度、营养盐和适宜的水动力有关。胡鸿钧^[16]提出了信号假说,认为微囊藻在四种信号(低温、黑暗、升温、光照)的驱动下使细胞内某些基因体系被打开或被关闭,这种开关通过有条不紊的、节律性的调节转录来建立;某些基因活动的产物反过来改变环境的条件,使蓝藻能更好的适应环境,并在富营养化中形成水华。蓝藻水华的发生受到各种环境因子及生理生态特征的影响,不同的湖泊环境,不同的蓝藻,产生水华的机理也不同。目前,学者们普遍认为氮磷释放导致水体富营养化是促使水华形成的直接原因^[17],但蓝藻水华发生的真正机理仍需要进一步的研究。

1.1.3 蓝藻水华的危害

随着水体富营养化的加剧,水华的暴发问题也越来越受到人们的重视。绝大部分的水华是由浮游藻类引起的,也有部分是由浮游动物——腰鞭毛虫引起的^[18]。在各种藻类水华当中,蓝藻水华发生的范围最广,危害最大,对人类的健康威胁也最大^[1]。在我国,不仅湖泊如巢湖、太湖和滇池等连年发生蓝藻水华,甚至有些水流速度较快的河流如汉江、钱塘江等也发生水华^[19]。在2007年太湖发生蓝藻水华,导致水体污染,引起了饮用水危机^[20]。近年来,在世界范围内,蓝藻水华发生的频率、严重程度和分布范围都呈现出迅猛的增长趋势^[21]。

水华的危害主要体现在:(1)破坏水体生态系统的平衡。当蓝藻水华暴发时,蓝藻大量增殖,降低水体透明度,导致水体中浮游植物不能进行光合作用。

蓝藻是水华中的优势种，还能释放有毒物质，抑制其他水生植物的生长发育，降低了其它藻类和其它浮游植物的生物多样性。藻类死亡后分解又会大量消耗氧气，造成水体中严重缺氧，进而导致水生动物因缺氧而死亡，降低了水生生物多样性，破坏了生态系统的平衡，造成经济损失。（2）影响供水水质。蓝藻死亡后会散发异味并产生有毒物质如微囊藻毒素、羟胺及硫化氢等，严重污染水体，直接危害水生动物，通过食物链间接影响人类身心健康。另外蓝藻死亡后会释放大量有机质，刺激致病的化能异养细菌大量繁殖。（3）影响水产养殖业。蓝藻水华的暴发，随着水体的 pH 上升，鱼类体内硫铵酶的活性也随之增强，致使维生素 B1 迅速分解，导致鱼类出现一些异常行为^[22]。蓝藻产生的有毒物质会导致养殖动物染病死亡，对养殖业造成严重的经济损失。（4）影响旅游业。蓝藻水华暴发时，蓝藻在水面上密集生长，使水体不再清澈。蓝藻和浮游动植物死亡后，会散发腥臭味，严重影响了水体景观，也影响人们进行水上娱乐活动。

1.2 MrpC 蛋白悬浮功能的发现

学者们普遍认为，蓝藻的浮力调节与气囊、细胞镇重物及蓝藻群体间形成的细胞间隙^[23]有关。本实验室的刘默^[24]通过观察发现培养时间较长的铜绿微囊藻 PCC7806 藻细胞在更换新鲜培养基后出现藻细胞下沉现象，而重置于原培养基中，藻细胞仍能保持悬浮。通过比较新旧培养基中藻细胞的气囊结构变化、碳水化合物和总蛋白含量变化，发现无论气囊结构的完整与否，都不能显著影响藻细胞的悬浮。并且新旧培养基中藻细胞的碳水化合物和总蛋白含量差别不大。对比新旧培养基中成分差异，发现盐浓度、胞外多糖及培养基渗透压的变化都不会对藻细胞的悬浮产生影响，而用沸水浴、冷冻干燥或蛋白酶处理原培养基可使藻细胞失去悬浮能力，说明影响藻细胞的悬浮的物质是某种分泌蛋白。用 10%左右硫酸铵沉淀得到的蛋白能够有效抑制藻细胞下沉，通过 SDS-PAGE 检测得到分子量约 14kDa 的蛋白，经过 MALDI-TOF-MS 鉴定，该蛋白为 *M. aeruginosa* PCC 7806 的分泌蛋白 MrpC (microcystin-related protein C)。

MrpC 最早是由 Zilliges 等^[25]在 2008 年发现与鉴定的。MrpC 存在两种亚型，分子量大小分别为 14kDa 和 17kDa，前者分泌在培养基中，而后者和细胞表面联系密切。在自然状态下，MrpC 蛋白一般形成 120-170kDa 大小的寡聚合物。与野

生型相比, $\Delta mcyB$ 突变株中 MrpC 表达量显著增加, 并且细胞间表现出明显的聚集现象。免疫荧光显微镜结果显示 MrpC 定位于整个细胞表面, 细胞与细胞之间具有黏附作用 (如图 1.1 所示)。

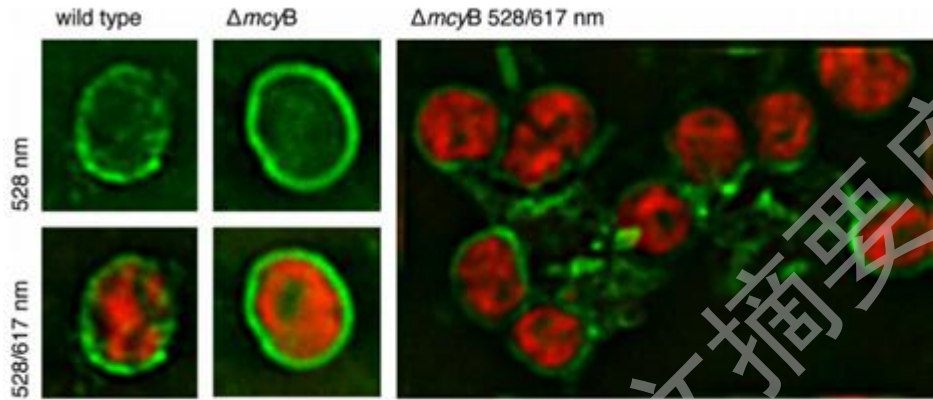


图 1.1 *M. aeruginosa* PCC 7806 $\Delta mcyB$ 突变株与 WT 的免疫荧光图^[25]

Fig 1.1 Immunofluorescence micrographs of the *mcyB* mutant and WT strains of *M. aeruginosa* PCC 7806 obtained by using the antibody against MrpC and a FITC-coupled secondary antibody.

本实验室的秦灵靓^[26]将 MrpC 蛋白稀释至 25–50 $\mu\text{g/ml}$, 负染干燥后置于冷冻电镜下观察。冷冻电镜结果显示 MrpC 为直径约为 13nm 的纳米纤维。纳米纤维的排列不规律, 有的多束纳米纤维并排形成簇, 不同空间排列的纤维丝或平行排列或纵横交错 (如图 1.2 左图所示)。将 MrpC 蛋白稀释至 30 $\mu\text{g/ml}$, 溶液经 1% 的磷钨酸负染干燥后, 透射电镜下进行观察。透射电镜结果显示 MrpC 为直径在 10nm–60nm 的纳米纤维。纳米纤维间相互缠绕、交错形成网状结构 (如图 1.2 右图所示)。刘默^[24]对 MrpC 蛋白进行加热、冷冻干燥及超声处理后发现其丧失了悬浮功能, 推断 MrpC 蛋白的三维大分子结构是维持其悬浮功能的前提条件。秦灵靓对 MrpC 进行加热、冷冻干燥及超声处理后, 透射电镜结果显示其结构与自然状态下相比, 最明显的是纳米纤维长度的变短、直径变小, 推测 MrpC 形成的长纳米纤维是 MrpC 具有悬浮功能的关键因素。

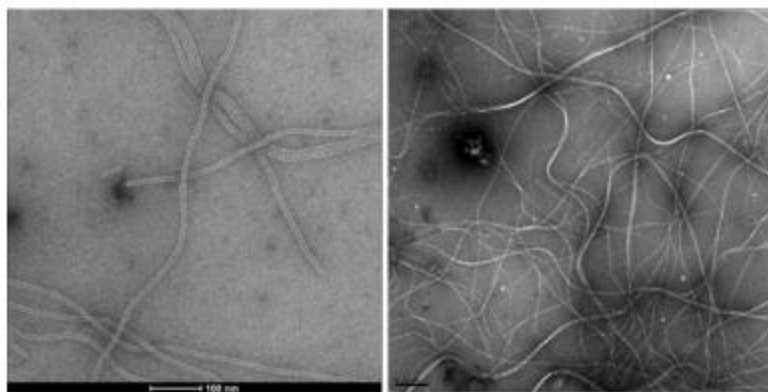


图 1.2 MrpC 蛋白冷冻电镜和透射电镜观察图^[26]

Fig. 1.2 Cryo-EM and TEM image of MrpC

左图为 MrpC 冷冻电镜结果图，右图为 MrpC 透射电镜结果图

1.3 免疫胶体金标记技术

1.3.1 胶体金标记的原理和特点

氯化金（又称为氯金酸， HAuCl_4 ）水溶液在还原剂作用下形成聚合的金颗粒，在颗粒之间因静电作用而相互排斥，保持一个较稳定的胶体状态，故称为胶体金（colloidal gold）。胶体金颗粒表面能结合多种生物大分子，如免疫球蛋白、protein A、植物凝血素、刀豆球蛋白 A 等^[27, 28]。胶体金独特的物理学特性，如特定大小和性状、高电子密度、颜色反应及活化后的不同的生物学特点，使得它在免疫学、组织细胞化学等领域得到广泛的应用。

胶体金的优点如下：（1）制备简易。与其他标记物相比，胶体金的制备更简易，只需要精确的试剂浓度、pH 值和离子强度。（2）精确定位。胶体金作为颗粒性标记物，具有较精确的定位能力，标记后对细胞超微结构分辨影响较小。小颗粒胶体金空间位阻小，能更多的结合到特定部位，可提高标记的敏感性和精确定位能力。（3）高辨识度。胶体金具有比铁蛋白更高的电子密度，不容易与动物体内的铁蛋白和其它铅、铀等重金属染料相混淆。（3）特异性吸附。火化后的胶体金颗粒在细胞上的非特异性吸附比其它标记物低。（4）应用广泛。金颗粒的高电子密度使其具有较好的发射二次电子的能力，因而可用于扫描电镜的观察。胶体金本身的颜色以及与其它显色染料结合应用可用于光学显微镜观察。

另外, 胶体金可以制备成不同大小的金颗粒, 小颗粒胶体金能在更高分辨率的水平上进行电镜观察。大颗粒胶体金能够提高观察效率, 主要用在较低分辨率水平上进行透射、扫描或光学显微镜观察。除此之外, 还可利用不同大小的胶体金同时分别标记多种抗原, 可获得多标记效果。

1.3.2 胶体金标记技术的应用

目前, 胶体金主要应用于以下几个方面: (1) 免疫组织化学。胶体金的高电子密度在电镜下很容易观察和辨认, 因此胶体金标记技术在电镜免疫化学和组织研究中得到广泛的应用。1971年, Faulk等^[29]首先将胶体金作为特异的标记物应用于电镜的研究。Lucocq等^[30]用胶体金标记SPA和凝集素, 定位了胰腺外分泌部上的淀粉酶分泌位置和肾脏上凝集素结合的部位。Shi等^[31]首次将胶体金标记用于铜绿微囊藻的研究, 通过胶体金标记铜绿微囊藻(*M. aeruginosa*) PCC 7820、铜绿微囊藻 UTEX2063(不产肝毒素)和泡沫节球藻(*Nodularia spumigena*) L-575中的肝毒素(hepatotoxins), 发现肝毒素主要分布在类囊体区和核区。Agarwal等^[32]用胶体金标记集胞藻(*Synechocystis*) PCC 6803的RuBisco, 通过实验发现RuBisco定位在集胞藻的类囊体膜上。(2) 胶体金标记示踪。早在1962年, Feldherr和Marshall^[33]就介绍了胶体金可以作为一种在电子显微镜下示踪的标志。Morris等^[34]用生物素连接假单胞菌外毒素A(PE), 再用胶体金标记生物素。将培养的小鼠成纤维细胞与带有生物素标记的PE反应, 再用金标亲和素显色。示踪结果表明, 细胞在4℃孵育时, 胶体金颗粒随机分布在细胞膜表面; 在37℃孵育30s, 金颗粒进入细胞膜的凹陷中; 1min时, 则位于细胞内的囊泡中; 5分钟后位于次级溶酶体中。(3) 免疫层析分析。胶体金颗粒的高电子密度使得它可以吸附抗体或是SPA(staphylococcus protein A), 从而实现对抗体(抗原)的标记。李晨旭等^[35]将胶体金技术与层析分析技术结合, 建立了胶体金试纸检测血清中乙型肝炎表面抗原(HBsAg)的方法。目前, 胶体金技术被广泛应用于胶体金试纸膜和胶体金试剂盒检测, 如早早孕HCG胶体金诊断试纸、快速一步法胶体金尿测试条、cTnT快速测试试剂盒等。除此之外, 胶体金还可以与银颗粒结合, 发展成胶体金-银染法(IGSS), IGSS法既可以用于冰冻切片, 又可用于石蜡切片, 还能进行计数染色。胶体金与流式细胞仪结合可用来定性、

定量测定细胞内的 DNA、细胞表面抗原及进行细胞分类等。

1.4 蛋白质相互作用研究方法综述

生物体是一个复杂的有机体。生物分子如蛋白质、DNA、RNA、脂类、多糖等常常同类分子间或（和）不同分子间形成结构复合体，执行特定的生物功能。蛋白质间相互作用存在于机体每个细胞的生命活动过程中，生物学中的许多现象如复制、转录、翻译、剪切、分泌、细胞周期调控、信号转导和中间代谢等均受蛋白质间相互作用的调控^[36]。目前，研究蛋白质相互作用的方法主要有酵母双杂交、免疫共沉淀、GST pull-down、串联亲和纯化、荧光共振能量转移、双分子荧光互补等。

1.4.1 酵母双杂交

酵母双杂交技术最早是由 Fields 和 Song^[37] 在 1989 年提出并初步建立的。它是建立在对真核生物调控转录起始过程认识。细胞起始基因转录需要反式转录激活因子参与。转录激活因子一般具有两个或者两个以上独立的功能结构域，其中包括 DNA 结合域 (binding domain, BD) 和转录活化结构域 (active domain, AD)。这两个结构域距离较远时仍具有各自的功能，但不能激活转录。只有这两个结构域在足够接近时，才能起到转录激活作用。

根据酵母双杂交的原理，将蛋白质 X (诱饵蛋白, Bait protein) 与报告基因转录因子特异的 BD 融合构建成 BD-X 载体，同时将蛋白质 Y (即猎物蛋白, Prey protein) 与 AD 融合构建成 AD-Y 载体，将两个质粒转进酵母中进行表达。当编码两种结构域的基因在酵母细胞核内同时表达时，蛋白 X 与 Y 之间若存在相互作用，就会使 AD 与 BD 两结构域上的上游活化序列 (upstream activation sequence, UAS) 相互接近，进而激活转录过程，使报告基因 (如 *His3*、*Ade2*、*Leu2* 和 *lacZ* 等) 得到表达^[37]。

与其它研究蛋白质间相互作用的方法相比，酵母双杂交系统具有其独特的优势。(1) 酵母生长周期短，操作简单，能够执行大多数真核生物所特有的蛋白质翻译后修饰，比如蛋白质水解、折叠、二硫键的形成和糖基化^[38]。它可保持蛋白质的天然三维结构，并且无需模拟蛋白质的作用条件和作用力，在一定程度上

Degree papers are in the “[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)”.

Fulltexts 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.