

鱼腥藻 PCC7120 细胞液泡的初步研究*

郭厚良 金传荫¹⁾ 浦秋文 宋文贞 周云珍 杨清平

(武汉大学生命科学学院, 武汉 430072)

¹⁾ (中国科学院水生生物研究所, 武汉 430072)

摘要 从保存 3 个月以上的老化培养物中直接检查到游离液泡。液泡为标准圆球状, 完全透明, 大小相差极为悬殊, 多数大型液泡吞噬了数个衰老藻细胞。采用低渗酶解, 渗透冲击, 低渗酶解和渗透冲击相结合, 从培养 3 个月以上, 2 个月, 1 个月, 18d, 10d 及 3d 的藻丝细胞都分离到液泡。液泡略大于细胞, 泡内无吞噬物。培养 3d 的藻丝有 15% 的细胞分离到液泡。其他多种蓝藻也分离到同样的液泡。

关键词 鱼腥藻 PCC7120, 液泡

很早就知道, 衰老的蓝藻细胞形成液泡^[1], 并且认为, 液泡形成表明蓝藻细胞濒临死亡^[2]。亚显微结构研究也曾发现, 蓝藻的老化细胞内存在液泡式结构^[3,4]。但由于未能从蓝藻细胞内分离液泡以进行深入研究, 使得蓝藻液泡的存在得不到普遍承认。以至有人还认为, 蓝藻液泡可能只是一种人工假象^[5]。因此, 当植物^[6]和真菌^[7]液泡的研究兴起的时候, 蓝藻液泡的研究却中断, 后来的文献也不再把液泡作为蓝藻生物学研究的一个问题进行讨论^[8,9]。近年来, 在蓝藻原生质球研究中^[10-12]注意到, 某些无机盐能诱导一些蓝藻细胞产生泡状结构^[13]。经电镜检查, 证明此种泡状结构由单位膜所包围, 故确认为液泡^[14]。为了深入开展这方面研究, 进行了从细胞中分离此种液泡的研究, 并取得完全成功。研究中发现, 蓝藻液泡具有特异的耐低渗性质, 由此推测, 衰老的蓝藻细胞可能由细胞自溶破裂而释放液泡。如果衰老的蓝藻细胞确实形成液泡, 那么, 就有可能在衰老的蓝藻培养物中直接检查到游离液泡。为此, 在成功分离诱导液泡的基础上, 作者对蓝藻衰老培养物进行了液泡检查, 并发现了液泡。由此对蓝藻非衰老细胞也存在液泡的可能性作了进一步研究。

1 材料和方法

1.1 藻种及培养 主要用鱼腥藻 7120 (*Anabaena* sp. PCC 7120), 对其他多种蓝藻进行了小量试验。采用 Allen 培养基, 液体静止培养, 间或振荡, 培养温度 28℃ (± 0.5℃), 光照强度 2000 lx。全部材料引自中国科学院水生生物研究所。

* 国家自然科学基金资助项目 (编号: 39870083)

1999-02-18收到; 1999-07-13修回

1.2 衰老液泡检查 对培养和存放 3 个月以上的培养物进行检查,采取了两种方法。一是直接取培养物在显微镜下检查,二是对液泡进行浓集之后再取样检查。即将培养物倒入 $10 \times 100\text{mm}$ 粗试管,自然沉降一夜,弃去下沉的藻体,取上层清液 2000r/min 离心 5min 沉淀悬浮物,再取离心管底部的沉淀物检查。

1.3 非衰老细胞液泡分离 为了排除制备原生质球分离液泡时渗透稳定剂和高渗透压可能的诱导作用,采取不加渗透稳定剂的酶处理破壁和机械手段破壁以游离液泡的方法,分别有三种:(1)低渗酶解法:将溶菌酶溶于蒸馏水,剂量 $0.1\%(\text{W/V})$,用以处理藻丝细胞。当被处理材料释放出蓝色物质时,表明细胞发生大量破裂,即取样检查。(2)渗透冲击法:将藻丝先置于 1mol/L MgCl_2 高渗溶液中, 30min 后再转入蒸馏水,在蒸馏水中静置 3min 后取样在显微镜下检查。因 MgCl_2 无液泡诱导作用^[13],而且处理时间短。因此, 1mol/L MgCl_2 30min 处理不会产生诱导液泡。(3)低渗酶解—渗透冲击法:将藻丝先用溶菌酶的蒸馏水溶液在 28°C 条件下处理 30min ,然后转入 1mol/L MgCl_2 溶液中 30min ,再转入蒸馏水 3min 后取样检查。

2 结果和讨论

细心地检查衰老培养物,的确可以找到游离的液泡,虽然数量比较少,但结果是完全肯定的。发现液泡的频度主要与藻丝和细胞解体程度相关。解体程度高,检查时可看到大量破细胞和碎细胞渣,就可以很容易地找到较多的液泡。解体程度低,碎细胞渣很少,找到液泡就比较困难。所谓发现液泡的频度和细胞降解程度只是一种粗放的主观估计,不是一个准确计量的数字,因为准确统计比较困难。但只要能通过细胞渣确认有细胞破裂现象,就可以找到液泡。从培养物直接检查液泡困难时,经浓集处理,再检查液泡就容易了。衰老培养物中自然存在的游离液泡也为标准圆球状,完全透明。与所分离的诱导液泡一样,自然存在的游离液泡大小相差悬殊。大的液泡可达到 $12\mu\text{m}$ 以上,小的只有 $2.5\mu\text{m}$ 。体积很大的液泡显然由多个液泡融合而来。与诱导分离的液泡不同的是,从衰老培养物分离的大液泡都吞噬了数个衰老藻细胞(图 1.a)。从图 1.a 可以看出,有些藻细胞完全位于液泡之中,而有些藻细胞则位于液泡膜表面,一半在液泡内,而另一半尚在液泡膜之外,表现为吞噬的一种中间过程。在检查衰老培养物时还注意到,衰老的培养物中长藻丝解体为片段,异形胞丢失,部分藻丝片段细胞液泡化(图 1.b)。图 1.b 清楚地显示,片段化的藻丝细胞内出现泡状结构,这一泡状结构和无机盐诱导的细胞结构泡状化^[13]完全一样,为液泡所在位置。由此推测,液泡化细胞进一步发展便是细胞自溶破裂,液泡释放。由于耐低渗,游离的液泡能在培养基中长时间存在,继而发生液泡与液泡,液泡与衰老细胞之间频繁的接触,从而产生液泡的相互融合和液泡对藻细胞的吞噬作用。因此,衰老培养物中天然存在的液泡充分表现了蓝藻液泡的耐低渗,稳定性高,易融合,吞噬能力强这些特点。衰老培养物中游离液泡的发现使得过去关于衰老的蓝藻细胞形成液泡的看法得到验证。由于这些液泡来自衰老细胞的自溶破裂,因此,形成液泡表明细胞濒临死亡的观点似乎也是正确的。但是,人们显然要提出一个问题:这些液泡究竟是什么时候形成的?我们对这一问题进行了实验分析。

采用低渗酶解法,很容易地从培养 3 个多月和 2 个多月的材料分离到液泡。从这种分

离试验可以确定,并没有发生液泡化的藻丝材料也可以分离出液泡,这种材料不算很衰老。但对培养1个月的材料采用低渗酶解法处理,当蓝色物质释放细胞绝大部分破裂时,检查不到液泡。将低渗酶处理进一步延长24hr后,液泡出现(图1.c)。进一步对培养不满一个月的材料作低渗酶解,无论怎样延长处理也得不到液泡。渗透冲击法得到的结果有所不同,当材料在1mol/L $MgCl_2$ 高渗条件下30min后转入蒸馏水,渗透压急剧下降引起许多细胞破裂。采用这种方法,从培养18d、10d、6d的材料都能得到液泡。这样,两种方法的结果不一致。我们注意到,两种方法处理比较年轻的培养物各存在不同的缺点。低渗酶解法产生的破裂细胞还保持着细胞的原有形态,可能仍对液泡有束缚作用,使其中的液泡难以释放。渗透冲击法细胞破裂率比较低,如培养6d的材料只能引起3%的细胞破裂,处理6d以下的材料细胞破裂率更低。为了克服两种方法各自的缺点,采取低渗酶解和渗透冲击相结合的方法处理,结果,从培养3d的年轻培养物也得到液泡。采用这种方法处理培养3d的材料,50%以上细胞破裂,15%以上的破裂细胞释放液泡,结果完全可靠。在这一试验中,液泡在低渗条件下吸水膨胀,突破降解细胞的残壁而成为可见液泡。如果液泡不够大,可能仍包藏在细胞中不能游离出来。因此,已经形成液泡的细胞应远在15%之上。究竟有多少细胞形成了液泡,是否实际上每个细胞都含有液泡,这一点还有待深入研究。

对经无机盐诱导产生液泡,人们可能提出疑问,认为这是一种不正常现象,并非蓝藻本身就含有液泡。上述试验结果则完全可以消除这种疑问,证明液泡是蓝藻细胞的一种固有结构,在细胞发育的一定阶段形成。Cocking在植物原生质体和液泡分离的经典工作中就发现,根尖分生组织形成无液泡的原生质体,其他区域的细胞形成含液泡的原生质体。因此,蓝藻细胞也应存在相似的阶段,某种阶段没有液泡,越过这一阶段,液泡出现。因此非诱导液泡的发现同时也修正了过去那种认为形成液泡表明细胞濒临死亡的观点。至于蓝藻液泡是否也像真核生物液泡那样具有多方面功能,这一点尚待进一步研究。

蓝藻的诱导液泡和非诱导液泡具有完全相同的性质,只是分离率不同。在诱导条件下,几乎每个细胞可产生一个液泡。而不经无机盐诱导时,能分离到液泡的细胞是少数。液泡的诱导可能只是刺激幼小的液泡发育成长而已。初步实验注意到,液泡分离率与藻龄相关,藻龄短的液泡分离率低,高龄藻液泡分离率高。

迄今,在所试验的五个属十余种蓝藻都发现了液泡。可见蓝藻存在液泡是普遍的。蓝

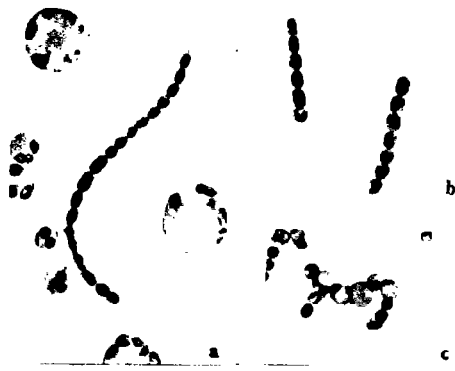


图1 鱼腥藻 PCC 7120 液泡的检查和分离

Fig1. Determination and isolation of vacuoles in the blue-green alga *Anabaena* sp. PCC 7120

- a. 培养和保存4个月零14d的培养物中的游离液泡;
- b. 液泡化的衰老藻丝; c. 低渗酶解法处理培养1个月的材料得到液泡, $\times 800$
- a. The free vacuoles in the cultures preserved for 4 months and 14days; b. The aged and vacuolated trichome; c. The vacuoles isolated by hypotonic enzymolysis from the trichome cells grown for 1 month. $\times 800$

藻液泡的重新发现和分离具有重要意义。第一,由于蓝藻有液泡,使得蓝藻和植物之间的亲缘关系更为密切,而使蓝藻和细菌之间增加了一条鲜明的分界线,这将对蓝藻的分类地位、不同生物之间的演化关系及演化途径等问题产生影响。蓝藻液泡的存在使蓝藻成为植物和细菌之间的一个中间类型,为此,建议给蓝藻这样一个新名称:蓝藻菌(Cyanophytomyces)即相当于放线菌位于细菌和真菌之间那种位置。同时,蓝藻液泡和植物液泡的同源性为探讨两者的亲缘关系提出了一个新的方向。第二,蓝藻液泡给蓝藻研究提出了一个新的研究对象,对于深入研究蓝藻细胞的结构功能、细胞的发育分化及基因表达控制等提出了新的思路。这包括液泡内含物成分及由此显示的功能,与液泡形成相关的细胞阶段划分,液泡的起源发生,诱导液泡的机理,诱导和非诱导液泡的异同等相当广泛的内容。第三,由于蓝藻液泡突出的耐低渗、高度稳定、易融合、吞噬能力强等特点,蓝藻液泡可能作为细胞工程的有用工具而得到应用。

参 考 文 献

- [1] Von Zastrow E M. Über die organisation der Cyanophyceenzelle, *Arch Mikrobiol*, 1953, **19**:174—205
- [2] Desikachary T V. Cyanophyta, Neu Delhi, 1959, 1—687
- [3] Lang N J, Rae P M M. Structures in a blue-green alga resembling prolamellar bodies. *Protoplasma*, 1967, **64**:67—74
- [4] Jensen T E, Bowen C C. Cytology of blue-green algae, II, Unusual inclusions in the cytoplasm. *Cytologia*, 1970, **35**:132—152
- [5] Fuhs G W, Cytochemical examination of blue-green algae, in: *The Biology of Blue-green Algae*. London; Blackwell Scientific Publications, 1973, 117—144.
- [6] Cocking E C. A method for the isolation of plant protoplasts and vacuoles. *Nature*, 1960, **187**:962—963
- [7] Indge K J. The isolation and properties of the yeast cell vacuole. *J Gen Microbiol*, 1968, **51**:441—446
- [8] Carr N G, whitton B A. *The Biology of Cyanobacteria*. University of Canifornia Press, Berkeley and los Angeles, 1982
- [9] Fay P. *The Blue-greens*, Edward Arnold, London; 1983
- [10] 郭厚良. 青霉素-溶菌酶法分离蓝藻原生质球. *植物学报*, 1990, **32**: 510—513.
- [11] 郭厚良、宋文贞、余传荫. 五属七种蓝藻原生质球分离研究. *水生生物学报*, 1996, **20**: 93—94.
- [12] 郭厚良、金传荫. 宋文贞. 丝状固氮蓝藻柱胞鱼腥藻原生质球的培养再生. *植物学报*, 1996, **38**: 637—640.
- [13] 郭厚良、金传荫、宋文贞. 无机盐对蓝藻细胞结构的影响和原生质球形成. *水生生物学报*, 1997, **21**: 190—193
- [14] 郭厚良等. KCl 诱导柱胞鱼腥藻形成液泡. *水生生物学报*, 1998, **22**: 198—199

A PRELIMINARY STUDY OF THE VACUOLES OF CELLS IN A BLUE-GREEN ALGAL *ANABAENA* PCC7120

Guo Houliang, Jin Chuanyin¹⁾, Pu Qiuwen,
Song Wenzhen, Zhou Yunzhen and Yang Qingping

(College of Life Science, Wuhan University, Wuhan 430072)

¹⁾ (Institute of Hydrobiology, The Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072)

Abstract There were a lot of free vacuoles to have been examined in the liquid cultures which had been preserved for over 3 months. The vacuoles were typically spherical, fully transparent and varied in size. The giant vacuoles showed a phagocytosis and there were many aged cells to be engulfed by them. Both the aged and nonaged cells which were grown for 3 months, 2 months, 1 month, 18 days, 10 days and 3 days could also be able to release vacuoles in the isolation experiments. Three methods, enzymolysis in hypotonic condition, osmotic shock and hypotonic enzymolysis-osmotic shock, were used for the isolation of vacuoles. Over 15% of cells which were grown for 3 days could release vacuoles in the experiments.

Key words *Anabaena* sp. PCC7120, Vacuoles