

研究简报

砷对蓝藻光合作用和细胞生长的影响

康瑞娟¹ 秦静芬² 汪晶¹ 曹恩华² 施定基¹

(1. 中国科学院过程工程研究所, 生化工程国家重点实验室, 北京 100080;

2. 中国科学院生物物理研究所, 北京 100101)

EFFECTS OF ARSENIC ON GROWTH AND PHOTOSYNTHESIS OF CYANOBACTERIA

KANG Rui-Juan¹, QING Jing-Fen², WANG Jing¹, CAO En-Hua² and SHI Ding-Ji¹

(1. State Key Lab. Biochem. Eng., Inst. Process Eng., Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080;

2. Institute of Biophysics, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101)

关键词: 砷; 荧光酶; 鱼腥藻 7120; 光合放氧速率; 生长

Key words: Arsenic; Luciferase; *Anabaena* sp. PCC7120; Photosynthesis activity; Growth

中图分类号: Q949.22 文献标识码: A 文章编号: 1000-3207(2005)02-0230-03

在世界的许多地方, 砷污染是一个严重的问题, 尤其是水体中的污染程度更加严重。砷主要以 As(V) 和 As(四) 形式存在。由于 AsO_4^{3-} 在结构上与 PO_4^{3-} 很相似, 它通过磷转运途径进入细胞, 因此砷的毒性主要是源于对磷代谢的干扰^[1]。砷对于人和动物的危害性是人所共知的, 它会引发细胞凋亡, 导致多种组织和器官发生癌变, 从而引起死亡。但是砷对于水体生态系统中的重要类群—藻类的生理和生长的影响报道较少。

Lux 基因是编码和调控发光细菌生物发光的操纵子, 作为报告基因, 具有快速、简便、灵敏和对细胞无伤害的优点, 在分子生物学、临床微生物以及生化检测中呈现潜在应用价值。蓝藻又称蓝细菌, 是一类能进行放氧光合作用的原核生物, 广泛存在于各种自然水体中。将细菌荧光酶基因转入丝状体固氮蓝藻—鱼腥藻 7120(*Anabaena* sp. PCC7120) 中, 利用其快速、灵敏的特点, 研究不同浓度的砷对藻细胞生长和代谢的影响。不仅有助于了解砷对水体生态系统的影响, 而且还将可作为水体污染的生物指示剂, 具有实际应用价值。

1 材料与方法

1.1 材料 转细菌荧光酶(*Vibrio harveyi*)基因及野生型鱼腥藻 *Anabaena* sp. PCC 7120 均来自中国科学院植

物所。 As_2O_3 由中国科学院生物物理所曹恩华教授惠赠。其他试剂为分析纯市售品。

1.2 方法 培养基为无氮的 BG-11^[2]。将 As_2O_3 配制成 $1\mu\text{mol/L}$ 的无菌储液, 以不同比例加入到培养基中达到所需浓度。在含有不同砷浓度的培养基中接种野生型及转基因的 *Anabaena* sp. PCC 7120, 置于摇床上照光培养。温度 28—30℃, 光强为 $120\mu\text{mol/m}^2\text{s}$ 。液体培养时转速为 130r/min。转基因藻在培养基中加入 $50\mu\text{g/mL}$ 的氨基青霉素。

1.3 蓝藻形态观测 将摇瓶中定时取出的样品置于光学显微镜下观察(XSZ-D2型, 重庆光学仪器厂), 并照相。

1.4 荧光酶表达测定 将 0.2g 牛血清蛋白和 $10\mu\text{L}$ 萘醛溶于 10mL 磷酸缓冲液($50\mu\text{mol/L}$, pH 7.5)中, 放置在冰浴中超声至溶液为半透明并出现蓝色荧光即可。将样品调整到适当浓度后, 取 2mL 藻液, 加入 $200\mu\text{L}$ 配好的试剂, 用 BPCL 微弱发光测量仪测定样品的发光强度。以单位细胞单位时间的发光强度代表荧光酶表达强度。每个样品至少测定 3 次。

1.5 光合放氧测定 光合放氧与呼吸速率是用 Clark 型氧气电极(Hansatech Ltd., U.K.) 测定。电极的反应室为 2mL 的密闭系统, 其温度由 DG-1015 低温恒温槽(宁波海曙天恒仪器厂)通过循环水控制。光源为红色发光二极管, 光强由电极自带的专用软件控制, 通过 ORT1 型光量子计标定。

收稿日期: 2004-05-12; 修订日期: 2005-11-28

基金项目: 国家重点基础研究发展计划(NKBRSF 2002CB412306)资助

作者简介: 康瑞娟, (1965—), 女, 山东省茌平县人; 助研, 博士; 研究方向: 生化工程。感谢生物物理所张仲伦、郑雁珍老师对荧光酶测定提供的帮助

1.6 叶绿素浓度^[3] 离心收集藻细胞, 加入 3mL 甲醇, 混匀后 4℃ 浸泡 6—14h, 4000r/min, 离心 10min, 取上清, 测定 A₆₆₅ 值。根据公式: Chl(μg/mL) = 13.9 × A₆₆₅, 计算样品中叶绿素 a 的含量。

2 结果与讨论

2.1 砷对藻细胞生长的影响

将一瓶处于对数生长期的培养液, 分别接种在含有 50mL 培养基的小三角瓶中, 分为两组。每组都分别加入终浓度为 1、2、3、4 μmol/L 的砷溶液, 以不加砷的培养液为对照, 置于摇床上照光培养。通过遮挡使两组实验间的光强相差一倍, 其他条件相同。每隔 24h 取样, 测定其生长, 两批实验的平均结果示于图 1。

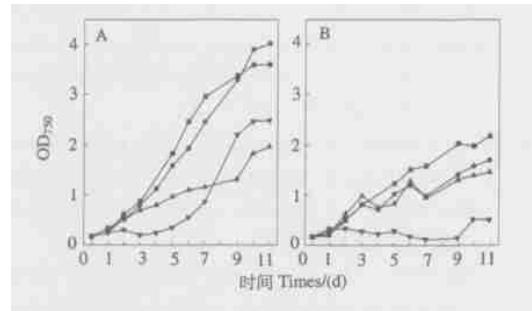


图 1 藻细胞在不同砷浓度和光强下的生长

Fig. 1 Growth of *Anabaena* sp. PCC7120 under different arsenic concentration and light intensities

A. 高光强; B. 低光强 ■ 对照, ● 1 μmol/L As₂O₃ ▲ 2 μmol/L As₂O₃
▼ 3 μmol/L As₂O₃

结果表明, 随着砷浓度的提高, 藻细胞的生长速率明显下降, 并经过较长的迟滞期才表现出较明显的生长。大量文献报道, 蓝藻中存在类金属硫蛋白, 使蓝藻细胞对重金属的毒害有一定的抗性^[4—8]。金属硫蛋白可以被包括砷在内的许多离子和化合物诱导^[9]。因此, 这种延迟增长的现象可能是由于藻细胞内被诱导产生了类金属硫蛋白, 解除了砷的毒性所致, 同时也预示着通过驯养提高藻细胞对砷耐受性的可能性。当砷浓度大于 4 μmol/L 时, 藻细胞生长受到抑制, 并在 3—4d 之内死亡(数据未显示)。砷对藻细胞生长的影响, 与光强有很密切的关系, 在砷浓度相同时, 强光下生长的藻细胞增殖速度大于弱光下的细胞增殖速度。实验中所有的砷浓度在低光强下都表现出对生长的抑制, 而在高光强下, 1 μmol/L 的砷对藻细胞的生长有促进作用, 与对陆生植物的作用相同^[10]。表明较强的光照有助于细胞耐受较高的砷浓度。

2.2 砷对荧光酶表达的影响

荧光酶基因转入蓝藻细胞后, 其表达要消耗前体和能量, 从而对宿主细胞的代谢产生影响, 而宿主细胞代谢过程的变化也影响外源基因的表达。为了研究藻细胞生长和荧光酶表达的关系, 测定了不同砷浓度下荧光酶的活性。

将处于对数生长期的种液, 分别接入含有 50mL 培养基的

小三角瓶中, 并加入终浓度为 1、2、3、4 μmol/L 的砷溶液, 以不加砷的培养液为对照, 置于摇床上正常光强下照光培养。24h 后取样, 测定荧光酶表达量, 两批实验的统计结果见图 2。

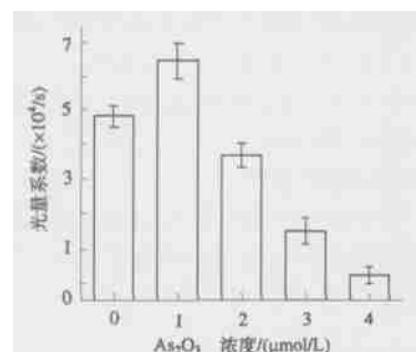


图 2 不同砷浓度下藻细胞的荧光酶表达量

Fig. 2 Expression of luciferase in *Anabaena* sp. PCC7120 under different arsenic concentrations

由图 2 可以看出, 培养液中的砷浓度对荧光酶表达强度的影响, 与对藻细胞的影响趋势相同, 低浓度的砷对荧光酶的表达有刺激作用(1 μmol/L), 随着砷浓度的提高, 荧光酶的表达量迅速下降。实验中还发现, 荧光酶的表达与加砷时藻细胞的生长状态有关, 当细胞密度和砷浓度相同时, 新鲜培养液中的藻细胞中荧光酶表达强度高于接种 2—3d 后加砷的样品。

2.3 砷对光合放氧速率的影响

取在含有不同浓度砷的培养基中培养的处于对数生长期细胞, 用氧电极测定其光合放氧活性。两批实验的平均结果见图 3A。由图中可以看出, 当砷浓度在 1 μmol/L 时, 对于藻细胞光合放氧速率有促进。当砷浓度增加到 2 μmol/L 时, 光合放氧速率比对照略低。而砷浓度增加到 3 μmol/L 时, 光合活性下降到仅为对照的一半。这一变化规律与砷对细胞生长和荧光酶表达的影响是一致的。

为了研究砷对蓝藻细胞发生作用的时间, 测定了砷影响藻细胞光合活性的时间曲线。取 2mL 处于对数期的正常培养的藻液, 加入到氧电极的样品室中, 加入 8 μmol/L 砷后, 立即测量其光合放氧速率随时间的变化, 结果见图 3B。

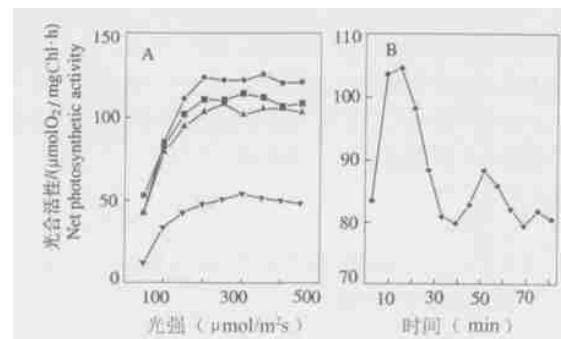


图 3 藻细胞在不同砷浓度下的光合作用活性(A) 和砷对细胞起作用的时间曲线(B)

Fig. 3 Photosynthesis activities of *Anabaena* sp. PCC7120 under different arsenic concentration and time curve of arsenic effecting
■ 对照, ● 1 μmol/L As₂O₃ ▲ 2 μmol/L As₂O₃ ▼ 3 μmol/L As₂O₃

由图 3B 可见, 砷的加入迅速影响藻细胞的光合活性。在加入砷的初期, 光合放氧速率会快速增加, 然后快速下降, 再反弹形成另一小的波峰。因此, 砷对藻细胞光合活性的影响在初期呈现衰减的振荡波形轨迹, 数十分钟至数小时(因砷浓度不同而异)后, 达到稳定。文献表明 AsO_4^{3-} 在结构上与 PO_4^{3-} 相似, 它可以通过磷转运途径迅速进入细胞^[1], 因此可知砷的毒性是速效性的。

2.4 砷对细胞形态的影响

取生长在含有不同砷浓度的培养基中的藻细胞, 于光学显微镜下观察其形态变化。图 4 为培养 48h 后生长在含砷 0, 1, 2, 4 $\mu\text{mol/L}$ 培养基中的细胞形态。

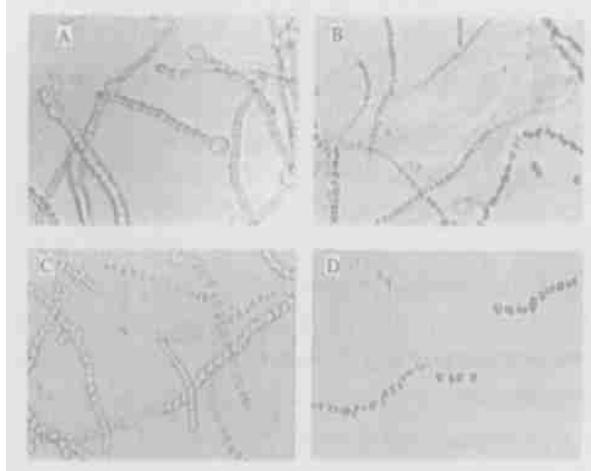


图 4 不同砷浓度下的细胞形态

Fig. 4 Effects of arsenic concentrations on morphology of *Anabaena* sp. PCC7120

A. 对照; B. 1 $\mu\text{mol/L}$ As_2O_3 ; C. 2 $\mu\text{mol/L}$ As_2O_3 ; D. 3 $\mu\text{mol/L}$ As_2O_3

实验结果表明, 砷对藻细胞的形态有显著影响, 在含砷的培养基中藻丝变短, 细胞膨大、变圆, 颜色变浅, 胞质部分出现空腔, 与正常状态下衰老细胞的形态相似。在砷存在时, 这种细胞形态上的变化, 对数生长期就开始出现, 并持续存在于整个培养周期, 而正常培养条件下, 只有在进入稳定期后才出现。砷浓度越高, 这种变化越显著。在动物细胞中, 砷通过诱导细胞凋亡导致细胞的死亡。Ning^[11]等报道盐胁迫条件会诱导鱼腥藻 7120 细胞产生凋亡, 凋亡细胞的形态与本实验结果类似。因此, 对于砷诱导的藻细胞形态变化的机理的进一步研究, 具有十分重要的意义。

3 结论

在本研究中, 以转细菌荧光酶基因的鱼腥藻 7120(*Anabaena* sp. PCC7120) 为研究对象, 在添加不同浓度的 As_2O_3 培养基中进行光自养培养, 研究砷对藻细胞生长、光合活性和基因表达的影响。研究结果表明, 藻细胞对低浓度的砷有一定的抗性。随着砷浓度的增加, 砷的毒害作用趋于严重。砷对于藻细胞的作用机理可能与对动物细胞的影响相同, 都是诱导细胞凋亡。藻细胞对砷的耐受浓度可以通过驯化而提高, 由此可以展望将来有可能将藻类作为去除水体砷污染的有用工具。

参考文献:

- [1] Nies D H. Microbial heavy-metal resistance [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1999, **51**: 730—750
- [2] Castenholz R W. Methods in Enzymology [M], New York: Academic Press, 1998. 63—93
- [3] Marker A M H. The use of acetone and methanol in the estimation of chlorophyll in the presence of phaeophytin [J]. *Freshwater Biol.*, 1972, **2**: 361—385
- [4] Gupta A, Whitton B A, Morby A P, et al. Amplification and rearrangement of a prokaryotic metallothionein locus *smt* in *Synechococcus* PCC6301 selected for tolerance to cadmium [J]. *Proc R Soc Lond Ser B Biol Sci*, 1992, **248**: 273—281
- [5] Gupta A, Morby A P, Turner J S, et al. Deletion within the metallothionein locus of cadmium-tolerant *Synechococcus* PCC 6301 involving a highly iterated palindrome (HIP1) [J]. *Mol Microbiol*, 1993, **7**: 189—195
- [6] Turner J S, Morby A P, Whitton B A, et al. Construction of Zn^{2+} / Cd^{2+} hypersensitive cyanobacterial mutants lacking a functional metallothionein locus [J]. *J Biol Chem*, 1993, **268**: 4494—4498
- [7] Turner J S, Robinson N J, Gupta A. Construction of Zn^{2+} / Cd^{2+} tolerant cyanobacteria with a modified metallothionein divergent: further analysis of the function and regulation of *smt*. *J Ind Microbiol*, 1995, **14**: 259—264
- [8] Turner J S, Glands P D, Samson A C, et al. Zn^{2+} sensing by the cyanobacterial metallothionein repressor *SmB*: different motifs mediate metal-induced protein-DNA dissociation [J]. *Nucleic Acids Res*, 1996, **24**: 3714—3721
- [9] Coyle P, Philcox J C, Carey L C, et al. Metallothionein: The multipurpose protein [J]. *CMLS Cell Mol Life Sci*, 2002, **59**: 627—647
- [10] Xu J L, Yang J R. Heavy metals in terrestrial ecosystem [M]. Beijing: Chinese Environment Pres. 1995, 137[许嘉琳, 杨居荣. 陆地生态系统中的重金属. 北京: 中国环境出版社. 1995, 137]
- [11] Ning S B, Guo H L, Wang L, et al. Salt stress induces programmed cell death in prokaryotic organism *Anabaena* [J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2002, **93**: 15—28