

蓝藻聚球藻高二氧化碳需求突变株的研究

宋立荣 余建维 D.Price M. Badger¹⁾

(中国科学院水生生物研究所, 武汉 430072)

¹⁾ (澳大利亚国立大学生物研究院, 堪培拉)

摘要 利用化学诱变法获得了蓝藻聚球藻 10% CO₂ 生长需求的突变株 N150。突变株 N150 具较高的无机碳运输速率和无机碳库, 表观光合作用对外源无机碳的亲合性与已知的其它高二氧化碳需求突变株有显著区别。突变株 N150 的突变缺陷主要在不能适应低 CO₂ 条件。当有 Na⁺ (100mmol / L) 存在时, 突变株可恢复在较低 CO₂ 浓度 (1%) 下生长的能力。

关键词 二氧化碳浓缩机制, 突变株分析, 光合放氧, Na⁺, 蓝藻

在目前已分离到的近 10 株蓝藻高二氧化碳需求突变体中, 其生长对 CO₂ 浓度的最大需求均不超过 5%。对需求高于 5% CO₂ 的突变株的分离和鉴定, 将可能为进一步认识藻类二氧化碳浓缩机制提供新的证据^[1,2]。本文报道单细胞蓝藻聚球藻突变株 N150 对 CO₂ 极高浓度的需求及其在光合放氧对外源无机碳亲合性上迥异于其它突变株的生理表现, 初步探讨了钠离子影响突变株 CO₂ 需求的方式。

1. 材料与方法

1.1 生长条件 聚球藻 (*Synechococcus* PCC7942) 生长于 Bg-11 培养基中, 培养基以缓冲液 BTP-HCl 调至 pH8.0, 培养物分别通以空气、含 1% CO₂ 和含 10% CO₂ 的空气, 培养温度 30℃, 光强 80μmol m⁻² s⁻¹。

1.2 突变株筛选 参照^[1] 方法并加以改进。指数期生长细胞经诱变剂甲基磺酸乙酯 (EMS, 0.4mol / L) 处理, 涂布于 Bg-11 琼脂平板面上的醋酸纤维膜上, 平板在 10% CO₂ 气相中放置 1d, 再转移至空气气相下 2~3d, 使待筛选的突变细胞耗尽体内的储藏碳源。然后将膜移至含有氨苄青霉素 (80μg / ml) 的 Bg-11 平板上, 1d 后绝大多数野生型细胞已被杀死, 再将膜转到正常 Bg-11 平板上生长 7~8d, 标出平板上所有的藻落 (未被抗生素杀死的野生型细胞), 此后将平板移置于含 10% CO₂ 空气条件下, 使待筛选突变细胞生长, 约一周开始出现新藻落, 这些藻落可初步推断为高二氧化碳需求突变。依次将藻落按复制平板法 (Replicate plate) 分别置于 1% CO₂ 和 10% CO₂ 下生长, 重复数次, 那些仅能在含 10% CO₂ 空气下生长的藻落可确定为 10% CO₂ 需求突变株。

中国科学院重点项目和武汉市晨光计划资助。

1998-03-22收到; 1998-05-21修回

1.3 光合放氧测定 利用 Clark 型氧电极测定蓝藻对外加无机碳源(NaHCO_3)的光合放氧反应。测定温度 30°C , 光强 $250\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ (石英卤钨灯光源)。表观光合放氧对外源无机碳的反应依报道方法。

在 ^{14}C 固定分析实验中, 光合放氧的测定亦利用 Clark 型氧电极。前处理方法同上。低碳细胞在反应槽中光合反应 2~3min 后, 开始向反应槽中加入 $3\mu\text{l NaH}^{14}\text{CO}_3$ (终浓度 1mmol/L), 其后每隔 1min 从中取 0.3ml 反应液加至 $0.5\text{ml HCl}(2\text{mol/L})$ 溶液中, 迅速摇荡, 每个样品取 4 次。样品管置通风橱加热蒸发, 直至干燥。测定时加入 3ml 闪烁液, 于 6890 液体闪烁系统测放射强度。Chl a 含量根据报道的方法测定^[4]。

1.4 无机碳吸收和碳库 根据文献 [5] 质谱测定法测定细胞的无机碳吸收和碳库。

2. 结果

2.1 突变株筛选和初检

10^9 个野生型细胞经诱变处理后, 共出现 186 个仅能在含 $10\% \text{CO}_2$ 的空气中生长的藻落。发现除 20 株藻落外, 其它藻落都不同程度地表现出在 $1\% \text{CO}_2$ 下生长的趋势。通过对上述 20 个藻落再进行连续数代复制平板培养, 从中筛选出 3 个真正的高二氧化碳需求 (10%) 表型的突变株 N124、N126 和 N150。

从表 1 可见, 突变株 N150 最稳定, 而 N124 和 N126 的突变回复率在每 10^8 细胞中均大于 100 个。3 种突变株在光照下的无机碳库、吸收无机碳的能力及其暗中细胞内二氧化碳漏泄的速率如表 1 所示。测定胞内无机碳库时外加 1mmol/L NaHCO_3 。结果表明, 突变株 N124 和 N126 在无机碳的吸收、泄漏速率以及无机碳库上与野生型没有显著的差异, 而突变株 N150 的上述指标比野生型高出一倍以上。由于突变株 N150 对高 CO_2 需求的表型稳定, 故仅选择突变株 N150 作进一步分析材料。

表1 高二氧化碳需求突变株的初检
Tab.1 Initial screening of the high CO_2 requiring mutants

突变株	碳库	CO_2 吸收速率	CO_2 漏泄速率	突变回复率
Mutants	Pool size	CO_2 -uptake	CO_2 -efflux	Reversion rate
	(mmol/L)	($\mu\text{mol mg}^{-1} \text{ Chl h}^{-1}$)	($\mu\text{mol mg}^{-1} \text{ Chl} \cdot \text{h}^{-1}$)	(Per 10^8 cells)
WT(野生型细胞)	19.0	59.1	58.1	
N124	17.2	37.2	44.3	>100
N126	20.1	85.0	60.0	>100
N150	57.5	142.1	121.6	0

2.2 突变株的生长和光合作用特性

在 $10\% \text{CO}_2$ 空气气相下, 突变株 N150 的生长较正常。而当通入的 CO_2 浓度低于 1% 时, N150 的生长受到明显抑制 (未列出)。图 1 的生长曲线显示, 在空气和含 $1\% \text{CO}_2$ 空气气相下, 突变株 N150 均不能生长。在 $10\% \text{CO}_2$ 气相条件下, 突变株 N150 起始阶段的生长速度较低, 7d 后的生物量约比野生型低一倍。

表观光合作用放氧对外源无机碳的米氏常数 $K_{1/2}(\text{Ci})$, 能部分反映细胞吸收和利用无机碳的效率。 $K_{1/2}(\text{Ci})$ 值越高, 细胞对无机碳亲和性越低。本研究发现, 在含

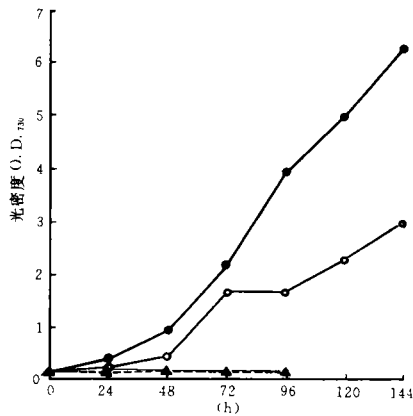


图1 液体培养的突变株 N150 对 CO₂ 的响应
Fig.1 Growth response of mutant N150 of *Synechococcus* PCC7942 to CO₂ in liquid culture

●—10% CO₂ of Wt ; ○—10%CO₂; △—1% CO₂;
■—Air

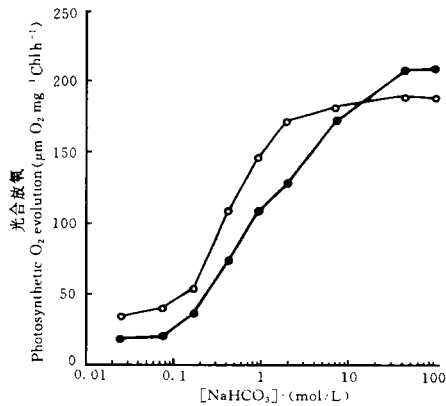


图2 突变株 N150 光合放氧对外加 HCO₃⁻ 的响应
Fig.2 The response of photosynthetic O₂ evolution of mutant N150 of *Synechococcus* PCC7942 to added HCO₃⁻

●—Wt cells; ○—N150

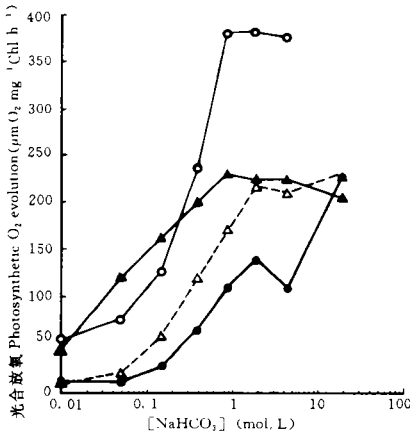


图3 由 10%CO₂ 转至 1%CO₂ 18h 后突变株 N150 光合放氧对外加 HCO₃⁻ 的响应
Fig.3 The response of photosynthetic O₂ evolution of mutant N150 of *Synechococcus* PCC 7942 to HCO₃⁻ 18h after its transfer from 10% CO₂ to 1% CO₂

●—wt, 10% CO₂; ○—wt, 18h induction;
△—N150, 10% CO₂; ▲—N150, 18h

10%CO₂空气培养条件下,突变株 N150 和野生型的光合作用放氧对外源无机碳的米氏常数 $K_{1/2}$ (Ci) 分别为 0.23mmol / L 和 0.87mmol / L (图 2), 两者的最大光合放氧速率 V_{max} 无显著区别。另一方面,当培养物由 10%CO₂ 下的转移至 1%CO₂ 下诱导 18h,突变株和野生型的 $K_{1/2}$ (Ci) 分别降至 0.038mmol / L 和 0.169mmol / L (图 3),说明低碳条件可诱导提高突变株细胞对无机碳的亲合性。

在饱和无机碳浓度下,细胞的无机碳吸收与光合放氧量比值以及光合固定碳与放氧量的比值应接近 1。由表 2 可见,当外源无机碳浓度达到 1000μmol / L 时,突变株和野生型无机碳吸收和放氧量之比接近 1,而固定碳与放氧量之比值很低。这是由于细胞在极高二氧化碳下碳固定途径部分受阻,还是由于细胞内除了水光解放氧外还有其它途径产氧,有待于进一步证实。

2.3 NaCl 对突变株 N150 高二氧化碳需求的影响

通入 10%CO₂ 时,普通培养基起始 pH 值往往降低至 5 左右,在此 pH 下,细胞生长缓慢或完全停顿,若加入一定浓度的 NaHCO₃ 则可使培养物的 pH 稳定在 8.0 左右。若在空气或 1%CO₂ 气相下外加同样浓度的 NaHCO₃,则会引起培养物 pH 过高。因此,本研究在 10%CO₂ 气相条件下,均加入 NaHCO₃ 70mmol / L 以调节 pH,而在空气或 1%CO₂ 气相条件下,未添加 NaHCO₃ 成分。考虑上述实验设计的差异,则提出一种可能:突变株生长对高二氧化碳的需求,是否也包含对高 Na⁺ 离子的需

表2 突变株N150无机碳吸收、¹⁴C固定与光合放氧的关系

Tab.2 Ratio of Ci uptake and ¹⁴C fixation to O₂ production of mutant N150

添加无机碳 Ci-added	无机碳吸收与产氧比值		¹⁴ C 固定与产氧比值	
	Ci uptake/O ₂ production		¹⁴ C fixation/O ₂ production	
	Mutant N150	Wild Type	Mutant N150	Wild Type
250μmol/L	0.19	0.98	—	—
1000μmol/L	0.97	1.07	0.29	0.34

求? 为此,又进一步试验了不同浓度 NaCl 对突变株 N150 生长的影响。结果表明,当外加 NaCl 浓度达到 100mmol / L 时,突变株 N150 可以在 1% CO₂ 条件下生长,而同样浓度的 KCl 并不表现促进,表明突变株能够恢复在 1% CO₂ 气相生长是由于 Na⁺ 的作用引起的效果。有意义的是,NaCl 并不能支持突变株在空气中生长(图 4)。结果显示 Na⁺ 能直接影响突变株 N150 生长对 CO₂ 的依赖程度。

3. 讨论

Kaplan 等将蓝藻高二氧化碳需求突变株划分为两个类型:第一类型的突变株表现出‘适应突变株’(Adaptation mutants)的特征,它们不能在低浓度的 CO₂ 下生长,但表观光合放氧对外源无机碳的亲性和类似于野生型;第二类型的突变株包括所有表观光合放氧对外源无机碳亲和性低于野生型约 100 倍的突变株。自第一株 *Synechococcus* 高二氧化碳需求突变株分离以来^[6],至今已分离鉴定了十几株突变株,其中仅突变株 D4 和 R14^[7]可划归为第一类型突变,而所有其它的突变株均属于第二类型突变。突变株 N150 的表观光合作用对外源无机碳的亲性和甚至比野生型高,似可将其划归具有‘适应突变株’(Adaptation mutants)特征的第一类型。这一发现为 Kaplan 最新提出的两类突变株的划分提供了新的证据。

Na⁺ 是蓝藻在碱性 pH 生长所必需的成分^[8],这主要表现在细胞光合作用对 Na⁺ 需求上。在 *Synechococcus* PCC7942,达到最大光合作用速率所需的 Na⁺ 在 μmol / L 范围内^[9,10]。本文发现,当 NaCl 浓度达到 100mmol / L 时,能使原来需要 10% CO₂ 才能生长的突变株 N150 在 1% CO₂ 下也能生长,说明高浓度的 Na⁺ 能减低 N150 对高二氧化碳的依赖程度。Na⁺ 离子为什么能减低突变株 N150 对高二氧化碳的依赖,有待探讨。

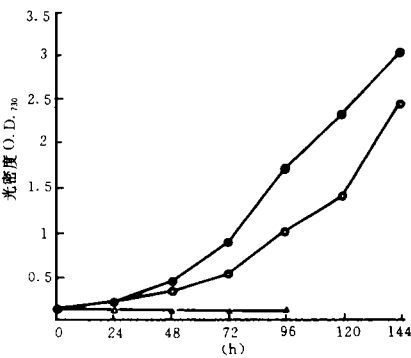


图4 在空气和1% CO₂ 下 NaCl 100mmol / L 对突变株 N150 生长的影响
Fig.4 Growth performance of mutant N150 *Synechococcus* PCC7942 in the presence of 100mmol / L NaCl at air and 1% CO₂
●— 10% CO₂; ○— 1% CO₂ + 100mol / L NaCl; △— Air + 100mol / L NaCl

参 考 文 献

- [1] Badger M R, Price G D, Yu J- W. Selection and analysis of mutants of the CO_2 concentrating mechanism in cyanobacteria. *Can. J. Bot.* 1991, **69**:974—983
- [2] Kaplan A, Schwarz, Lieman-Hurwitz J, et al. Physiological and molecular studies on the response of cyanobacteria to changes in the ambient inorganic carbon concentration In: Bryant DA (ed). *The Molecular Biology of Cyanobacteria*. Kluwer Academic Publishers. 1994. 469—485
- [3] Price G D, Badger M R. Isolation and characterization of high- CO_2 requiring mutants of the cyanobacterium *Synechococcus* PCC7942. Two phenotypes that accumulate inorganic carbon but are apparently unable to generate CO_2 within the carboxysomes. *Plant Physiol* 1989a, **91**:514—525
- [4] Wintermans J F G M, de Mots A. Spectrophotometric characteristics of chlorophylls a and their pheophytins in ethanol. *Biochem Biophys Acta* 1965, **109**:448—453
- [5] Price G D, Badger M R. Ethoxymolamide inhibition of CO_2 uptake in the cyanobacterium *Synechococcus* PCC7942 without apparent inhibition of internal carbonic anhydrase activity. *Plant Physiol*, 1989b, **89**:37—43
- [6] Marcus Y, Schwarz R, Friedberg D, et al. High CO_2 requiring mutant of *Anacystis nidulans* R2. *Plant Physiol.*, 1986, **82**:610—612
- [7] Schwarz R, Lieman-Hurwitz J, Hassidim M, et al. Phenotypic complementation of high- CO_2 -requiring mutants of the cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain PCC7942 by inosine 5'-monophosphate. *Plant Physiol* 1992, **100**:1987—1993
- [8] Miller A G, Turpin D H, Calvin D T. Na^+ requirement for growth, photosynthesis and pH regulation in the alkalotolerant cyanobacteria *Synechococcus leopollenensis*. *J. Bacterial* 1984, **159**:100—106
- [9] Miller A G, Calvin D T. Na^+ -stimulation of photosynthesis in the cyanobacterium *Synechococcus* UTEX 625 grown on high level of inorganic carbon. *Plant Physiol* 1987, **84**:118—124
- [10] Kaplan A, Schwarz R, Ariel R, et al. The CO_2 concentrating mechanism of cyanobacteria: physiological molecular and theoretical studies. In: Kanai R, Katoh S, Miyachi S (eds), *Regulation of Photosynthetic Processes*, Vol 2. Botanical Magazine, Tokyo Special Issue 1990, 53—71

ISOLATION AND ANALYSIS OF A HIGH CO₂ REQUIRING MUTANT OF CYANOBACTERIUM *SYNECHOCOCCUS* PCC7942

Song Lirong, Yu Jianwei, D. Price and Badger M.¹⁾

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

¹⁾ (Plant Environmental Biology Group, Research School of Biological Sciences, The Australian National University, P. O. Box 475, Canberra City, Australia)

Abstract Some physiological characteristics of a mutant (No. 150) of *Synechococcus* PCC7942, which requires very high CO₂ (10%) for growth, were studied. The mutant was isolated after ethylmethyl sulphonate (EMS) mutagenesis and ampicillin enrichment. Unlike other cyanobacterial high CO₂ requiring mutant, where the apparent photosynthetic affinity for inorganic carbon is approximately 2 orders of magnitude lower than that of the wild type, the mutant exhibits photosynthetic characteristics similar to those of its wild type grown at high CO₂ (Fig 2). Furthermore, the Ci influx and efflux rate, and Ci pool of the mutant are two and three times higher than that of the wild type grown at high CO₂, respectively (Table 1). It was later found that, with added NaCl at a concentration no less than 100mmol / L, the mutant could grow equally well in air containing 1% CO₂ as that in air containing 10% CO₂. It is suggested that Sodium could partly alleviate the demanding of the mutant for very high CO₂. The results indicated that mutant is mainly defected in the ability to adapt to low CO₂ conditions.

Key words CO₂-concentrating mechanism, Mutant analysis, Photosynthetic O₂ evolution, Na⁺, Cyanobacterium