

鱼腥藻 7120 异形胞分化的调节及细胞蛋白的变化*

王业勤 杨林 冯渤

(中国科学院水生生物研究所, 武汉)

提 要

分离了有固氮活性的异形胞, 它的可溶部分和膜部分的吸收光谱与营养细胞明显不同。SDS 凝胶电泳图谱表明, 营养细胞中存在的可溶蛋白, 在异形胞中有一半左右被降解, 最明显的是藻蓝蛋白。异形胞具有与营养细胞共同的肽带, 但也合成了一些新的多肽。异形胞可溶蛋白有五条最主要的肽带, 表观分子量约为 73 K, 54 K, 48 K, 41 K 和 34 K。膜蛋白中至少有 2 个多肽带 (41 K, 35 K) 在营养细胞膜蛋白中是缺少的。

异形胞分化过程伴随着细胞蛋白酶活性的消长。1 mmol/L 甲苯磺酰氟 (PMSF) 完全封锁异形胞的分化。而利福平 (0.02 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 和酪蛋白水解物 (40 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 使异形胞分化频率增加近一倍, 与此同时, 营养细胞可溶蛋白的二个多肽 (72 K 和 56 K) 含量大大增加。

有异形胞的丝状蓝藻, 当从培养基中除去结合态氮后, 首先在藻丝的所有营养细胞中引起藻蓝蛋白的降解^[1], 接着诱导固氮酶的形成及已存在的部分营养细胞分化为异形胞。
• 异形胞在结构上与营养细胞明显不同, 具有独特成分的厚被膜; 类囊体排列方式发生改变; 缺藻胆体; 含有大的极粒; 仅以狭小的通道与营养细胞连接。在其细胞生化成分及功能方面也与营养细胞有重大差别。例如已经知道异形胞缺光系统 II 活性, 缺 RUDP 羧化酶活性; 而谷酰胺合成酶, 固氮酶以及戊糖磷酸循环酶系活性大大增高^[2]。Fleming 和 Haselkorn 应用同位素 ³⁵S 比较分析了分化过程细胞蛋白的合成及种类的变化, 表明两种类型细胞的多肽图谱有很大的不同^[3]。异形胞的分化受遗传及环境因子制约, 已经知道, 它的分化需要一定时间照光^[2], 并且成熟异形胞的产生需要氧^[4]; 结合态氮源通常封锁异形胞的分化, 并且假设谷酰胺合成酶本身或它的一种产物对异形胞分化起负调控^[4,5]。然而至今还不清楚诱导异形胞分化的信号究竟是什么。

显然, 营养细胞转变为异形胞的过程是研究细胞分化和基因表达的一个有用的模型系统。而且从分子水平上研究异形胞分化所涉及的变化仍是当代蓝藻生物学研究的主要目标之一。

本文以固氮鱼腥藻 7120 为材料, 研究营养细胞分化为异形胞后, 细胞可溶蛋白和膜蛋白的变化; 分化过程与蛋白水解酶活性消长的关系; 蛋白酶抑制剂甲苯磺酰氟, 以及低

* 本文图片承何楚华同志拍摄特此致谢
1985 年 12 月 9 日收到。

浓度利福平和酪蛋白水解物对异形胞分化的调节及其细胞蛋白的变化。试图找出可能参与调节异形胞分化的某种蛋白作为进一步探索的生化标记。

材料与方法

1. 藻种及其培养 藻种均为固氮鱼腥藻 7120(*Anabaena* 7120)。培养方法如前所述^[1],用含 KNO_3 (0.5 g/L) 的 Allen 和 Arnon 培养基, 静止悬浮培养或通气培养。光强 4000 lx。需氮饥饿时通过灭菌滤纸过滤洗涤, 悬浮于无结合态氮的上述培养基中。异形胞的形成用光学显微镜检查。

2. 异形胞的分离 按 Ernst 等人^[4]的方法略作修改, 将无结合态氮培养 48—60 小时的藻丝离心收集, 用 Buffer A (含 TES 10 mmol/L, MgCl_2 10 mmol/L, pH 7.5) 洗一次。这之后操作在厌氧条件下进行。所用 Buffer 均用 H_2 充分平衡, 并加入甲苯磺酰氟 (20 $\mu\text{g}/\text{ml}$)。藻丝再用 Buffer A 洗一次后, 悬浮于 Buffer B 中(在 Buffer A 中加入 0.3 mol/L 甘露糖醇), 加入溶菌酶 (1.5 mg/ml) 放在 35°C, 90 分钟。离心收集细胞, 用 Buffer B 洗一次, 悬浮于 Buffer A 中, 在冰浴中超声 4 分钟, 离心 1,000 g 5 分钟, 沉淀为异形胞和部分细胞残渣。悬液为破碎的营养细胞, 分别收集。沉淀用 buffer B 洗 3—5 次, 各离心 1,000 g 5 分钟, 所得异形胞厌氧悬浮于 buffer B 中备用。

3. 细胞可溶部分和膜部分的制备 营养细胞经超声破碎的粗提取液, 离心 3,000 g 10 分钟, 除去粗的残渣。再经 Beckman 冷冻离心机离心 105,000—140,000 g 30 分钟, 上清液为营养细胞可溶部分。沉淀中的营养细胞膜部分用 Buffer A 洗 2 次, 各离心 105,000 g 30 分钟洗去污染的可溶部分, 膜制备物悬浮于上述 Buffer 中, 超声 30 秒匀散备用或贮存于 -40°C 冰箱中。

异形胞放在 Buffer A 中, -40°C 冻融, 在冰浴中厌氧超声 10 分钟(超声 1 分钟, 间隔 1 分钟), 低速离心除去未破细胞及粗残渣, 粗提取液厌氧离心 105,000—140,000 g 30 分钟, 上清液为异形胞可溶部分, 膜部分用上述 Buffer A 洗 2 次, 离心收集, 悬浮于上述 Buffer 中, 超声匀散, 贮存于 -40°C 冰箱中备用。

4. 蛋白的凝胶电泳分析 SDS 板状凝胶电泳按 Laemmli 的方法^[5], 主要修改如下: 浓缩胶浓度为 3.75%, 分离胶浓度为 7.5—18.5% 的梯度胶, 并含有 0.15 mol/L NaCl 胶板长 10 cm, 蛋白样品在 70°C 溶解 10 分钟, 并立即上样。电泳 Buffer 为 Tris-glycine 系统, 60 v 稳压电泳 12—15 小时, 用考马斯亮蓝 R₂₅₀ 染色。

5. 蛋白酶活性的测定 藻细胞离心收集用 Tris-HCl buffer (50 mmol/L pH 7.5) 洗涤并悬浮于上述 Buffer 中, 在冰浴中超声 4 分钟, 破碎细胞, 离心 5000 g 15 分钟, 取无细胞提取液测细胞总蛋白酶活性。以 α -casein 作为底物, 280 nm 测定吸收值的变化^[6]。按在 30°C 反应 30 分钟水解产生相当 1 μmol 酪氨酸等价物的酶量作为一个酶活单位。

6. 固氮酶活性的测定 用乙炔还原法。

7. 蛋白量的测定 用修改的 Lowry 法^[11]。

8. 叶绿素含量的测定 用 80% 丙酮提取后光谱测定。

9. 吸收光谱 用 Specord uv/vis 分光光度仪测定。

结 果

(一) 分离的异形胞的固氮活性

用溶菌酶处理，结合渗透冲击短时超声破碎营养细胞，再通过差异离心，反复洗涤可获得比较纯净和完整的异形胞(图1)。由于分离异形胞的过程是在氢气厌氧条件下进行，所分离的异形胞具有依赖于光和H₂的较高固氮活性。如加H₂在暗中反应或加空气在光下反应，均没有明显可检测的固氮活性。分离的异形胞的固氮活性至少可保持3小时以上(表1)。其固氮活性为347 nmol C₂H₄/分钟/mg叶绿素，比Ernst等人^[4]报道的结果略低，可能与反应时的光强有关。但分离后在暗中厌氧保存3小时尚具有原来活性的1/4。分离的异形胞是否有固氮活性，依赖于分离过程中厌氧条件的维持及其分离洗涤的

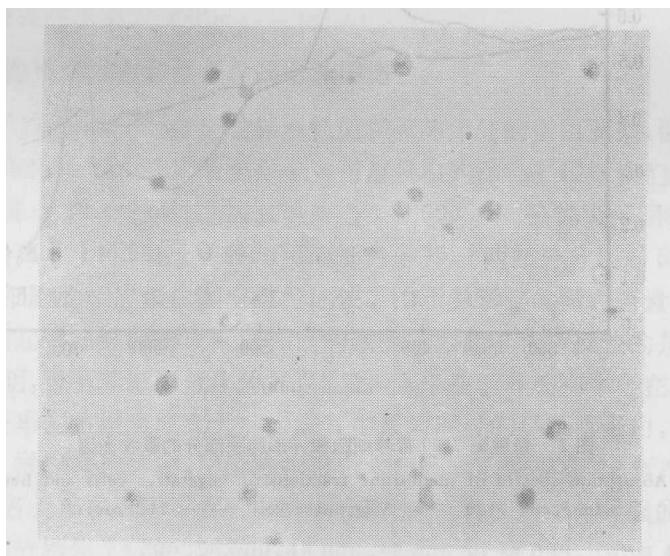


图1 分离的异形胞

Fig. 1 Isolated heterocysts

表1 异形胞的固氮酶活性

Tab. 1 Nitrogenase activity of isolated heterocysts

异形胞分离后保存的时间 Conservation time after isolation	反应条件 Conditions of reaction	固氮酶活性 Nitrogenase activity
0时 0 hr	光、氢气 light, H ₂	347
3小时 3 hrs	光、氢气 light, H ₂	94.7
3小时 3 hrs	暗、氢气 dark, H ₂	0
3小时 3 hrs	光、空气 light, air	0

注：活性表示为 nmol C₂H₄/分钟/毫克叶绿素。

Activities expressed as nmol C₂H₄/min/mg chlorophyll.

持续时间。如果一开始差异离心时，异形胞悬液中就混有大量细胞残渣，则必然增加洗涤次数而影响固氮活性。

(二) 异形胞和营养细胞膜部分与可溶部分的吸收光谱

将分离洗涤后的异形胞用超声破碎之后，经 105,000 g 以上沉降速度离心，把细胞的可溶部分与膜部分分开，膜部分再经离心洗涤 2 次，除去与膜结合的藻胆蛋白。分别测定

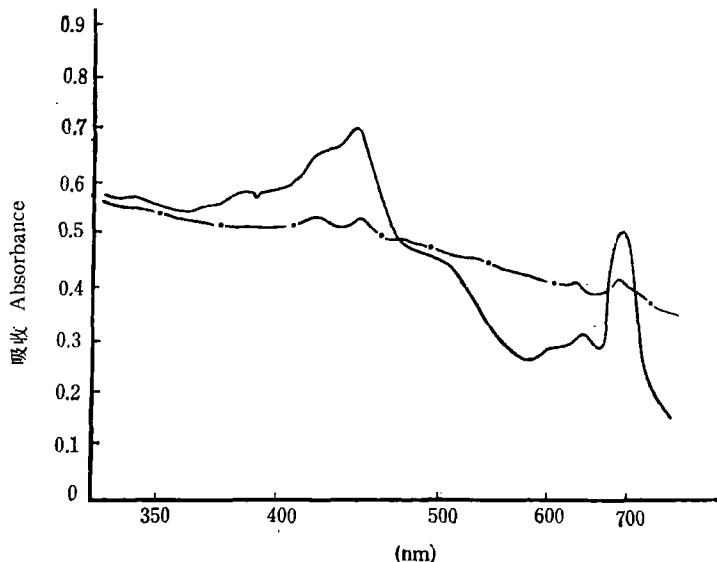


图 2 鱼腥藻 7120 营养细胞和异形胞膜部分的吸收光谱

Fig. 2 Absorption spectra of membrane fractions of vegetative cells and heterocysts in *Anabaena* 7120 —— Vegetative cell - - - Heterocyst

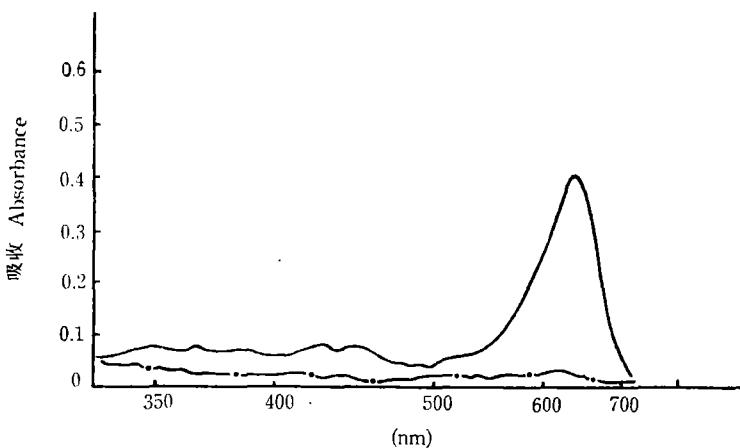


图 3 鱼腥藻 7120 营养细胞和异形胞可溶部分的吸收光谱

Fig. 3 Absorption spectra of soluble fractions of vegetative cells and heterocysts in *Anabaena* 7120 —— Vegetative cell - - - Heterocyst

可溶部分和膜部分的紫外及可见光吸收光谱，并与营养细胞的可溶部分和膜部分的吸收光谱相比较。异形胞和营养细胞的膜部分在紫外区的吸收光谱基本类似，随波长增加，吸收值递降，没有明显的吸收峰。两种类型细胞可溶部分的紫外吸收光谱，主要表现为核酸和蛋白的吸收峰。但是异形胞膜和营养细胞膜部分的可见光吸收光谱明显不同，营养细胞膜主要由于叶绿素 a 在 685, 420, 440 nm 处的吸收峰是典型的，在 515 nm 处的肩峰可能是细胞质膜的类胡萝卜素吸收峰^[12]。虽然异形膜的 685, 420, 440 nm 吸收小峰是存在的，但它们的相对值不同。并且整个吸收光谱变化平缓，可能受细胞壁以外成分的影响（图 2）。至于两种类型细胞可溶部分的可见光吸收光谱中，差别最明显者为 627 nm 的藻蓝素吸收峰。异形胞的这个吸收峰是很低的（图 3）。异形胞可溶部分液体是无色的。这与营养细胞分化为异形胞后藻蓝蛋白降解的报道是一致的。根据吸收光谱的明显不同，一方面表明所分离的异形胞是比较纯净的。另一方面从中反映了营养细胞分化为异形胞后细胞结构成分发生了重大变化。

（三）异形胞可溶蛋白和膜蛋白的电泳图谱

Fleming 和 Haselkorn^[9] 曾报道异形胞膜和可溶部分的蛋白图谱，但根据他们所应用的离心速度（14000g）不可能消除膜蛋白对可溶蛋白的污染。根据我们的实验，细胞提取液经 105,000 g 离心 30 分钟后，上清液再离心 140,000 g 30 分钟尚可回收少量的膜，为了避免污染，一般离心 140,000 g 将膜与可溶部分分开。两部分分别用 SDS 梯度凝胶电泳分析，并与营养细胞的相应蛋白图谱进行比较。由于异形胞的蛋白含量低，考虑到应用浓缩方法可能会引起蛋白被降解或电泳图谱的改变。因此电泳所反映的是主要多肽带图谱（图 4），结果表明，当营养细胞分化为异形胞后，原来在营养细胞中存在的可溶蛋白种类，在异形胞中有一半左右消失或大大减少。其中最为明显的是藻蓝蛋白，这与图 3 结果是一致的（图 4）。根据我们测定，异形胞中蛋白水解酶的活性很高，比营养细胞的蛋白酶活性至少高 3—4 倍。在异形胞可溶蛋白的电泳图谱中，有 5 条染色最强的主要蛋白带，其表观分子量大约分别为 73,000, 54,000, 48,000, 41,000 和 34,000。其中 48 K 和 34 K 带在营养细胞可溶蛋白的电泳图谱上是缺或少的，此外，在次要带中，37 K 和 58 K 带（后者推测可能是固氮酶钼铁蛋白），也是明显有别于营养细胞的。在异形胞全蛋白（包括可溶蛋白和膜蛋白）的电泳图谱中，其主要肽带与可溶蛋白的主要肽带是对应的。异形胞膜蛋白与营养细胞膜蛋白电泳图谱的差别不如两者可溶蛋白图谱差别明显，但异形胞中也减少了一些在营养细胞中存在的膜蛋白，如 37 K 带，但有 2 条主要带（如 35 K 和 41 K 带）也是明显有别于营养细胞膜蛋白的（图 5）。为准确证明其差别最好应用同位素标记。我们曾应用染色灵敏度高的氨银染色蛋白图谱，但有些膜蛋白并不被氨银染色。根据上述主要蛋白染色带图分析，不难看出，在异形胞分化过程中涉及了细胞可溶蛋白和膜蛋白的深刻改组变化，许多蛋白被降解，并且合成一些新的蛋白种类。它们对于异形胞的功能维持可能是重要的，值得注意。

（四）在异形胞分化过程中蛋白酶活性的消长

如上所述，在异形胞分化过程中涉及细胞蛋白的深刻变化。一部分蛋白特别是藻蓝蛋白被降解，提供新合成蛋白所需的氨基酸。这一过程显然与蛋白水解酶的活性变动有

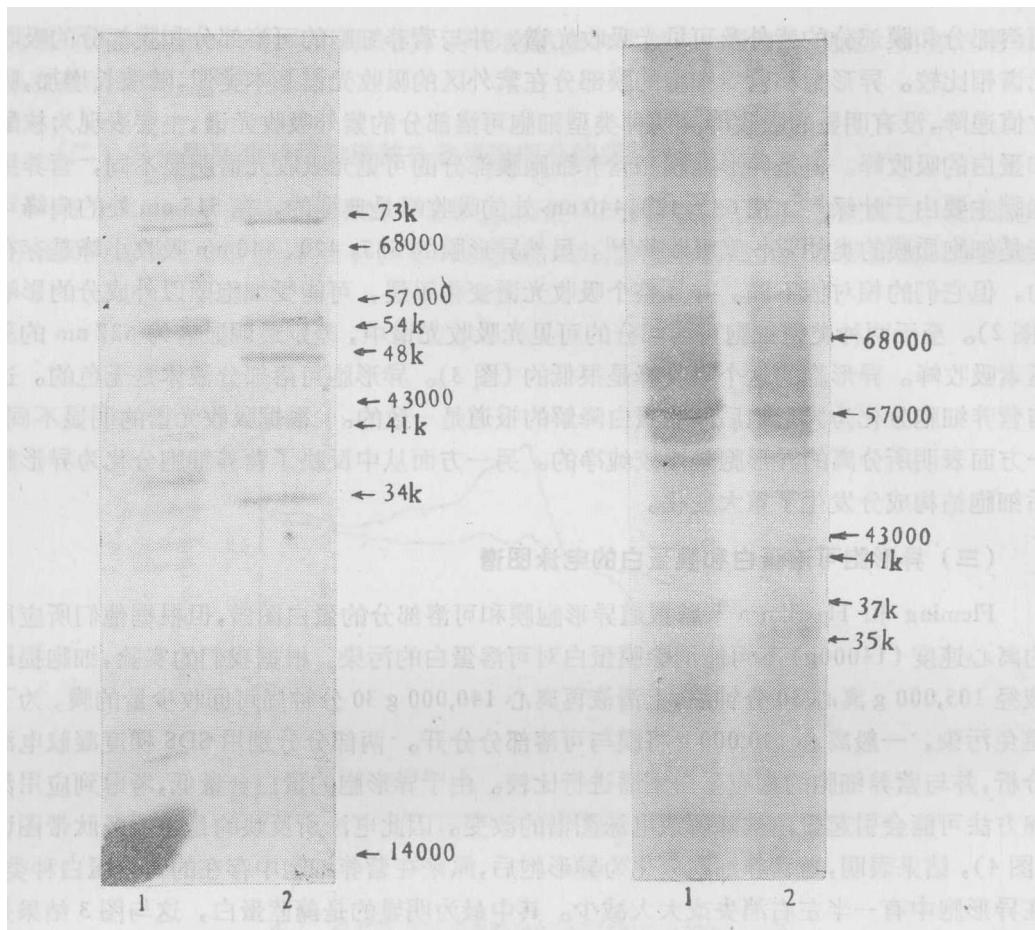


图4 营养细胞和异形胞主要可溶蛋白的电泳图谱比较

Fig. 4 Comparison of SDS-PAGE polypeptide patterns of major soluble proteins of vegetative and heterocyst cells

1. 营养细胞可溶蛋白 (19微克)
Vegetative cells (19μg)
2. 异形胞可溶蛋白 (13微克)
Heterocyst (13μg)

关。当把藻细胞从含结合态氮的培养基中转向无结合态氮培养基后,一般在24小时内有5—10%左右的营养细胞已分化为异形胞。与此同时,细胞总蛋白酶活性逐渐增高。如图6所示,除去结合态氮后12小时,蛋白酶活性增加40%,至24小时,活性增加60%。但42小时后,蛋白酶活性又下降至接近原来加 NO_3^- 培养细胞的酶活水平。因此,异形胞的分化过程看来与细胞蛋白酶活性的消长一致。异形胞分化时,酶活迅速增加,分化结束,酶活下降。显然,蓝藻异形胞的分化也与其他微生物细胞分化一样受蛋白酶的调节。

(五) 甲苯磺酰氟对异形胞分化的抑制

甲苯磺酰氟 (PMSF) 是丝氨酸蛋白酶的一种抑制剂。已有报道指出,枯草杆菌的产孢需要丝氨酸蛋白酶参与, PMSF 抑制产孢^[3]。我们检查了 PMSF 对异形胞分化的影响。

图5 营养细胞和异形胞主要膜蛋白的电泳图谱比较

Fig. 5 Comparison of SDS-PAGE polypeptide patterns of major membrane proteins of vegetative and heterocyst cells

1. 营养细胞膜蛋白 (37微克)
Vegetative cells (37μg)
2. 异形胞膜蛋白 (25微克)
Heterocyst (25μg)

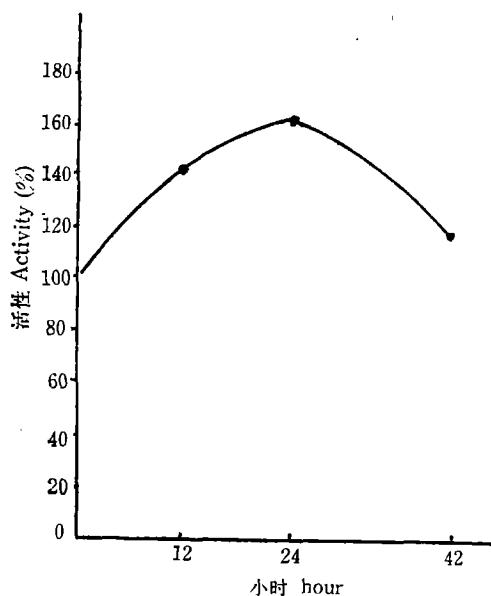


图 6 除去结合态氮后细胞蛋白酶活性的消长

Fig. 6 Curve of cell proteinase activity after removal of combined nitrogen from the medium

由于 PMSF 微溶于水, 考虑到溶解 PMSF 的有机溶剂对藻细胞生长有害, 因此将 PMSF 固体粉末直接加入细胞悬液中^[3], 在不加结合态氮的培养物中加入不同量的 PMSF, 分别为 50, 150, 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。结果表明, 当 PMSF 含量为 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (0.3 mmol/L) 时, 细胞生长速度和异形胞分化频率与未处理对照细胞相同, 150 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的 PMSF 完全封锁异形胞分化, 而对细胞生长没有明显影响, 但 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ PMSF 严重抑制细胞生长, 也没有异形胞产

表 2 甲苯磺酰氟对细胞生长, 蛋白含量和异形胞分化的影响

Tab. 2 The effect of PMSF on cell growth, protein content and heterocyst differentiation

处 理 Treatment	光密度 OD			蛋白含量 $\mu\text{g}/\text{ml}$ protein content			异形胞频率 heterocyst frequency		
	0	24	48	0	24	48	0	24	48 小时 (h)
对 照 control	0.29	0.39	0.45	120	112	132	0	8%	8.2%
加 PMSF with PMSF 150 $\mu\text{g}/\text{ml}$	0.29	0.38	0.38	120	104	108	0	0	0

生。表 2 数据系 150 $\mu\text{g}/\text{ml}$ PMSF 对细胞生长, 细胞蛋白含量及异形胞分化影响的重复实验。可见在我们的实验条件下, 当细胞光密度为 0.3 左右时, 加入相当于 1mmol/L (150 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 的 PMSF, 在 24 小时内对细胞生长和蛋白含量的影响是不明显的, 但完全封锁了异形胞的分化。至 48 小时, 可能由于不能固氮, 细胞生长和蛋白含量明显低于对照细胞。推测可能是由于 PMSF 抑制一种蛋白酶, 从而影响异形胞的分化。我们观察到在异形胞

分化过程中的不同时间,蛋白酶在体外被甲苯磺酰氟抑制的程度不同¹⁾。

(六) 利福平和酪蛋白水解物对异形胞分化的调节及其细胞蛋白的变化

利福平(Rifampicin)是DNA转录的一种抑制剂,当浓度为 $1\mu\text{g}/\text{ml}$ 时,对藻细胞的生长有严重抑制,但如果浓度降至 $0.02\mu\text{g}/\text{ml}$ 时,对藻细胞的生长没有影响,反而增加异形胞分化的频率(表3)^[7]。当加入利福平($0.02\mu\text{g}/\text{ml}$)时,异形胞分化频率从5.4%增加至7.3%,如加利福平的同时加入酪蛋白水解物($40\mu\text{g}/\text{ml}$),则分化频率为9%。并且细胞

表3 利福平和酪蛋白水解物对异形胞频率和固氮酶活性的影响

Tab. 3 Effect of Rifampicin and casein hydrolysate on heterocyst frequency and nitrogenase activity

处 理 Treatment	异形胞频率% Frequency of heterocyst %	固氮酶活性 Nitrogenase activity
对 照 Control	5.9	215
利福平 Rifampicin $0.02\mu\text{g}/\text{ml}$	7.3	278.3
利福平 Rifampicin $0.02\mu\text{g}/\text{ml}$ 酪蛋白水解物 casein hydrolysate $40\mu\text{g}/\text{ml}$	9.0	338.3

注: 固氮酶活性表示为 nmol. $\text{C}_2\text{H}_4/\text{分钟}/\text{mg}$ 叶绿素。

Nitrogenase activities expressed as nmol. $\text{C}_2\text{H}_4/\text{min}/\text{mg}$ chlorophyll.

的固氮活性也有所提高。对蛋白酶活性和总蛋白量的测定结果表明,处理的藻细胞中,蛋白酶活性按每毫升细胞计算比对照细胞的酶活高,但处理细胞的总蛋白量也高于未处理细胞的蛋白量。这似乎反映了处理细胞中蛋白的合成发生了一定变化。为此对处理及未处理细胞的可溶蛋白和膜蛋白进行了SDS凝胶电泳分析。图7表明,处理及未处理细胞的膜蛋白电泳图谱没有可见的差别。但在细胞可溶蛋白电泳中,虽然两种细胞的多肽种类是一致的,但处理的细胞有2条多肽带染色强度比对照细胞的这2条相应多肽带深得多。这暗示了在处理细胞中这2个多肽的合成大大增加。我们推测,这2个多肽可能参与异形胞分化的调节。对它们性质的进一步分析有可能对有关异形胞分化调控机制提供有益的启示。

讨 论

从原来已存在的营养细胞分化为异形胞后,在其形态结构上的改变是其分化过程中一系列生化反应发生变化的结果。这些反应大致可粗分为以下几类;1) 对异形胞是必需的和特异性的,如特异性糖脂的合成^[10],特异性蛋白酶的诱导^[6];2) 对异形胞具有特异性,但并不影响分化过程,是可有可无的,如在空气氧条件下固氮酶的合成,然而固氮基因缺失的突变种,同样形成异形胞^[14];3) 对异形胞是必需的,但并不是异形胞所特有的,

1) 杨林等,固氮鱼腥藻的蛋白水解酶及其部分性质的研究(待发表)。

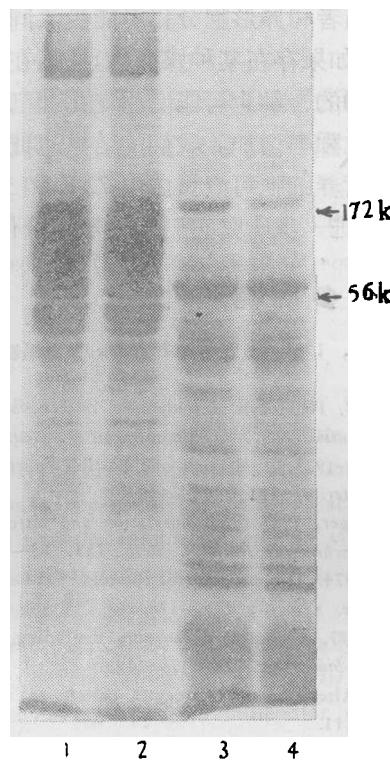


图 7 利福平和酪蛋白水解物对细胞蛋白合成的影响

Fig. 7 Effect of rifampicin and casein hydrolysate on the protein synthesis of vegetative cells

1. 处理细胞膜蛋白 (50 微克)
Membrane proteins of treated cells (50μg)
2. 对照细胞膜蛋白 (50 微克)
Membrane proteins of control cells (51μg)
3. 处理细胞可溶蛋白 (40 微克)
Soluble proteins of treated cells (40μg)
4. 对照细胞可溶蛋白 (42 微克)
Soluble proteins of control cells (42μg)

如循环光合磷酸化, 氧化磷酸化反应。4) 对异形胞是非必需的, 因而被降解, 如藻蓝蛋白的降解等。

从上述的营养细胞和异形胞的可溶蛋白及膜蛋白的电泳图谱的异同反映了下述反应: 1) 在营养细胞中存在的许多种蛋白, 其数目约占营养细胞主要蛋白一半, 在异形胞中被降解或含量大大减少; 2) 在异形胞中保留了与营养细胞共同的一些蛋白; 3) 在异形胞中合成了一些新的蛋白, 或者在营养细胞中含量很低, 而在异形胞中含量很高。我们的结果与 Fleming 和 Haselkorn 用 ^{35}S 标记电泳分析所得到的结果是一致的。在异形胞中出现的一些新的蛋白的性质以及它们在不同条件下的合成变化, 对于认识异形胞的功能, 如除氧保护功能等无疑是重要的。

然而异形胞分化本身是一个复杂的过程, 不仅有时间上的控制, 并且尚有空间上的分隔, 在藻丝上按一定间隔出现异形胞。从蛋白酶活性的消长可以看出, 分化初期藻丝蛋白酶活性迅速增高, 分化结束, 酶活性下降。有着精确的控制机构。在蛋白酶中可能存在组

成性蛋白酶和诱导性蛋白酶。后者和异形胞分化可能受共同的信号或媒介物所调节。但至今对此毫无所知。我们设想,如果存在某种媒介物,那么在一定条件下,促使异形胞分化频率大大增加时,这种媒介物的含量也可能发生变化。已经知道低浓度的利福平和酪蛋白水解物可诱导异形胞的分化频率增加。我们的结果也证实了上述的观察。而且表明利福平和酪蛋白水解物处理的营养细胞可溶蛋白中 72 K 和 56 K 多肽的含量大大增加。它们有可能作为一种生化标记,进一步研究它们与异形胞分化的关系。

参 考 文 献

- [1] 王业勤、何家宛、戴玲芬、黎尚豪, 1981。鱼腥藻 (*Anabaena*) 对氧敏感的固氮突变种。植物学报, **23**: 288—296。
- [2] Bradley, S. and N. G. Carr, 1977. Heterocyst development in *Anabaena cylindrica*: The necessity for light as initial trigger and sequential stages of commitment. *J. Gen. Microbiol.*, **101**: 291—297.
- [3] Dancer, B. N. and J. Mandelstam, 1975. Production and possible function of serine protease during sporulation of *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.*, **121**: 406—410.
- [4] Ernst, A., Bohme, H. and D. Boger, 1983. Phosphorylation and nitrogenase activity in isolated heterocysts from *Anabaena variabilis*. *Biochim. et Biophys. Acta*, **723**: 83—93.
- [5] Fleming, H. and R. Haselkorn, 1974. The program of protein synthesis during heterocyst differentiation in nitrogen-fixing blue-green algae. *Cell*, **3**: 159—170.
- [6] Foulds, I. J. and N. G. Carr, 1977. A proteolytic enzyme degrading phycocyanin in the cyanobacterium *Anabaena cylindrica*. *FEMS Microbiol. Lett.*, **2**: 117—119.
- [7] Grover, I. S. and S. Puri, 1979. Alteration of heterocysts pattern in *Cylindrospermum* sp. by rifampicin. *Indian J. Exp. Biol.*, **17**: 109—111.
- [8] Haselkorn R. Mazur, B. Orr, J. Rice, O. Wood, N. B. and R. Rippka, 1980. Heterocyst differentiation and nitrogen fixation in cyanobacteria. In "Nitrogen fixation" II pp. 259—278. edi by Newton, W. E., and Orme-Johnson, W. H., University park press Baltimore.
- [9] Laemmli, U. K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₄. *Nature*, **227**: 680—685.
- [10] Lambein, F. and C. P. Wolk, 1973. Structural studies on the glycolipids from the envelope of heterocyst of *Anabaena cylindrica*. *Biochemistry*, **12**: 791—798.
- [11] Markwell, M. A. K., 1978. A modification of the Lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples. *Analytical Biochem.*, **87**: 206—210.
- [12] Omata T. and U. Murata, 1984. Isolation and characterization of three types of membrane from the cyanobacterium *Synechocystis PCC 6714*. *Arch. Microbiol.*, **139**: 113—116.
- [13] Rippka, R. and R. Y. Stanier, 1978. The effects of anaerobiosis on nitrogenase synthesis and heterocyst development by Nostocacean cyanobacteria. *J. Gen. Microbiol.*, **105**: 83—94.
- [14] Singh, R. N., Sinha, R. and H. D. Kumar, 1977. Genetic control of heterocyst formation in the blue-green algae *Nostoc muscorum* and *Nostoc linckia*. *Arch. Microbiol.*, **114**: 155—159.
- [15] Stewart, W. D. P. and P. Rowell, 1975. Effects of L-methionine-DL-sulfoximine on the assimilation of newly fixed NH₃, acetylene reduction and heterocyst production in *Anabaena cylindrica*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **65**: 846—856.
- [16] Waxman, L. and F. G. Krebs, 1978. Identification of two protease inhibitors from bovine cardiac muscle. *J. Biol. Chem.*, **253**: 5888—5891.
- [17] Wood, N. and R. Haselkorn, 1980. Control of phycobiliprotein proteolysis and heterocyst differentiation in *Anabaena*. *J. Bacteriol.*, **141**: 1375—1385.

THE REGULATION OF HETEROCYST DIFFERENTIATION AND CHANGES OF CELL PROTEINS IN *ANABAENA* 7120

Wang Yeqin Yang Lin and Feng Bo

(Institute of Hydrobiology, Academia Sinica, Wuhan)

Abstract

Heterocysts with higher nitrogen-fixing activity were isolated from *Anabaena* 7120. The absorbance spectra of their soluble and membrane fractions are different obviously from that of the vegetative cells. The polypeptide compositions in soluble and membrane fractions of these two types of cells were compared by means of SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. The results show that about one half of the soluble proteins in vegetative cell are degraded after the heterocyst is differentiated. Heterocyst has polypeptides as those in vegetative cell but it also synthesizes some new polypeptides.

The soluble proteins of heterocyst show five major polypeptide bands with apparent molecular weights of 73000, 54000, 48000, 41000 and 34000. In the membrane proteins of heterocyst, at least two polypeptide bands having apparent molecular weights of 41000 and 35000 are deficient in membrane proteins of vegetative cell.

The process of heterocyst development is correlated with the fluctuation of intracellular protease activity. Thus, the activity increases rapidly after differentiation initiation and reduces to its original level when the process ceases. Phenylmethylsulfonylfluoride was found to block the formation of heterocyst, whereas rifampicin and casein hydrolysate may double the differentiated frequency of the heterocyst. In the latter situation, two polypeptide bands with apparent molecular weights of 72000 and 56000 in soluble proteins of vegetative cell are deeply stained. The possibility of using the stained bands as a biochemical marker is discussed in this paper.

Key words

Anabaena, heterocyst differentiation, protein regulation