

蓝藻球形体的分离、培养及再生

孔繁翔* 黎尚豪

(中国科学院水生生物研究所, 武汉 430072)

提 要

在高渗溶液中,用0.05%溶菌酶和 $2-5\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ EDTA处理蓝藻柱胞鱼腥藻、多变鱼腥藻和组囊藻细胞。5—8h后,70—90%的细胞转为对渗透压敏感的球形体(Spheroplast),又称原生质球。研究了藻的不同培养条件对球形体形成率的影响。测定了EDTA处理藻细胞后外膜脂多糖的释放量。在高渗溶液中,藻细胞和经酶处理获得的球形体的光合放氧活性明显下降,固氮种类的固氮活性失去。饲养层法、固体混合法和含有 $0.5\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ BA的液体悬滴培养的柱胞鱼腥藻的球形体,9天后出现再生藻落;在固体混合法培养中获得了组囊藻球形体的再生藻落。在第4天的悬滴培养物中,可以看到球形体发生第一次细胞分裂。再生藻细胞和酶处理物中残留细胞的抗溶菌酶特性有差异。

关键词 球形体,再生,柱胞鱼腥藻,组囊藻

蓝藻作为自养的原核生物,其中一些种类的固氮、放氢及高蛋白含量等性状的应用价值日益受到重视。但蓝藻缺有性生殖,自发的遗传物质重组很少发生,通过转化进行基因转移,一般频率较低。对蓝藻球形体的研究,进而采用细胞融合技术,这对研究蓝藻细胞的生理、体细胞遗传以及基因转移都是很有前途的方法。有关蓝藻球形体的分离及代谢活性测定和细胞学研究已有不少报道^[5,13]。而球形体再生研究进展较慢。用液体培养基培养组囊藻球形体,8天后观察到不完整的细胞壁的出现^[9]。本文分离蓝藻球形体,摸索适合球形体培养的条件,以获得再生的蓝藻细胞,为诱导蓝藻细胞融合打下基础。

材 料 和 方 法

1. 藻种及培养 藻种均由本所藻种库提供。柱胞鱼腥藻和多变鱼腥藻(*Anabaena cylindrica* and *A. variabilis*)用Allen-Arnon无氮培养基培养;组囊藻(*Anacystis nidulans*)用Allen-Arnon有氮培养基培养;粗大螺旋藻(*Spirulina maxima*)用Zarrouk培养基;鞘丝藻(*Lyngbya spiralis*)用BBM培养基培养;阿格曼藻(*Agmenellum quadruplicatum* BG-1)用Asp-2培养基;粘球藻(*Gloeocapsa* sp.)用SE培养基。培养方法为静置培养、通气培养和摇床培养。温度为30℃,光强为2500—4000lx,同步诱导根

* 现在南京大学环境科学系工作。
1988年6月7日收到。

据 Lindaey 方法^[9]。

2. 溶菌酶 上海生化研究所生产,两次结晶纯化,用蒸馏水配成 10mg/ml 溶液,过滤灭菌。

3. 球形体的制备 采用 Biggins (1967)^[3] 方法稍作修改。溶菌酶浓度为 0.05% (W/V), EDTA 为 $2\text{mmol} \cdot \text{l}^{-1}$, 处理时间为 5—8h, 洗去残留酶液的球形体悬浮于 MA 高渗溶液中(有氮 Allen-Arnon 培养基中加入 $0.5\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ 的甘露醇)。鉴别球形体的方法是加入蒸馏水,降低渗透压,球形体将破裂。用血球计数板计算球形体的产率。

4. 光合放氧活性测定 用氧电极方法 (Clark 电极) 测定样品的光合放氧量。光强为 7500lx。

5. 固氮活性测定 采用乙炔还原法测定固氮酶的活性。

6. 外膜脂多糖释放的测定 采用 Kaokhunis^[7] 和王业勤介绍的方法,测定脱氧辛酮糖酸 (KDO) 的释放量。

7. 球形体的培养及再生 分别采用平板饲养层法、固体混合法 (在试管内成斜面培养)、液体浅层培养和悬滴培养^[4]。并观察培养基中加入外源生长激素生长素 2,4-二氯苯氧乙酸 (2,4-D) 和细胞分裂素 N^6 -苄基腺嘌呤 (BA) 对球形体培养的影响,浓度分别为 $0.1\text{—}0.2\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$ 和 $0.5\text{—}1.0\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$ 。参考有关计算球形体再生率的方法^[6],相应于每次实验中的球形体悬浮液(记作“P-5”),同时设 5 个对照, P-水: 取等量球形体悬浮液离心,弃去上层高渗溶液,悬浮于等量无离子水中; P-水-5: 球形体悬浮液经水冲击后,重新悬浮于高渗溶液 MA 中; C-5, C-水, C-水-5,其条件除未加酶和 EDTA 处理,其它分别和 P-5, P-水, P-水-5 相同。所有处理均设 3 个重复。球形体培养在 LRH-150-G 型光照培养箱中,光照强度为 700—1 500lx 培养初期,温度为 20—22℃, 2 天后为 25—26℃。

8. 球形体融合试验 用 PEG 和高 pH/Ca 溶液诱导融合^[1,10]。

结 果

1. 球形体制备 经溶菌酶和 EDTA 处理一段时间后,丝状蓝藻开始有球形体从丝体上分离出来,而丝体越来越短,直至最后,在所检视野中不见丝体,全为单个球形体;杆状单胞蓝藻,转为球形。加水后,球形体吸水膨胀爆裂。已有 13 属,18 种蓝藻经酶处理获得了球形体。本实验条件下柱胞鱼腥藻,多变鱼腥藻和组囊藻,分离球形体获得满意效果,而粘球藻,螺旋藻和阿格曼藻处理 3 天,酶量增加到 0.2%, 均未见到球形体形成。

随着酶处理时间的延长,组囊藻球形体的比率逐渐上升,但到一定时间后,球形体的比率达到相对稳定值(图 1)。虽然偶有继续处理,比率有所增加,但处理液中出现藻胆素特有的颜色。这说明,在处理后期,既有新形成的球形体,又有已形成的球形体受损破裂,放出藻胆素。柱胞鱼腥藻细胞经不同方法预培养后,分离球形体达到同样比率所需要的时间不同。通气培养的藻最快,静置培养次之,而用甘露醇高渗溶液 ($0.4\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$) 预培养 24h 的藻最慢。(图 2)

图 3 说明,在分离组囊藻球形体的实验中,以在 39℃ 培养的藻细胞作为材料,经酶处

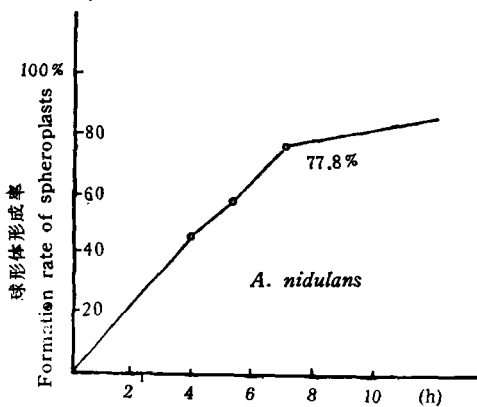


图1 不同处理时间球形体形成率

Fig. 1 The relation between the treatment time and formation rate of spheroplasts

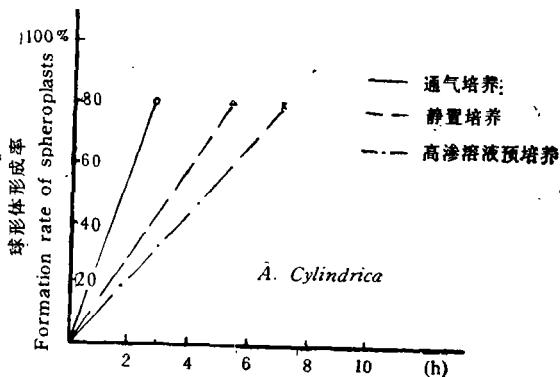


图2 不同预培养方式球形体形成率

Fig. 2 Effect of pre-culture methods on the formation rate of spheroplasts

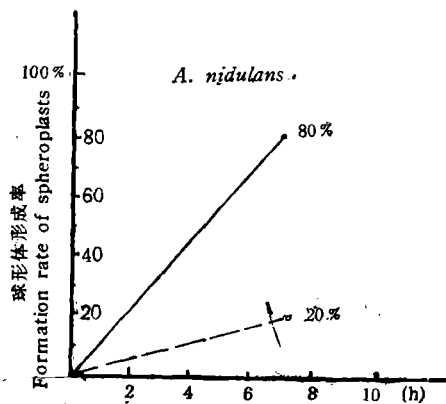


图3 不同预培养温度球形体形成率

Fig. 3 Effect of pre-culture temperature on the formation rate of spheroplasts

——30℃预培养, ---39℃预培养

理 7h, 其球形体比率仅达 20%。延长处理时间或增加酶浓度, 也未能见效; 而培养温度为 30℃ 的藻细胞, 在同样条件下处理 7h, 球形体可达 80%。EDTA 处理藻细胞释放 KDO 量如表 1 所示。相比之下, 处理温度和浓度对 KDO 的释放比处理时间的影响大些。

柱孢鱼腥藻为固氮种类, 藻细胞和球形体悬浮于高渗溶液中, 固氮活性失去。而对照组 Allen-Arnon 液体中培养物仍具有固氮活性。结果表明, 高渗溶液对柱孢鱼腥藻细胞的光合放氧活性有抑制作用。一般下降 30—60%, 经酶处理, 光合放氧活性会进一步下降(图 4)。在 26℃ 下保存, 3—4 天后, 活性仅为原来的 0—10%; 低温下保存(4℃)则活性持续时间长些(图 6)。而经高渗溶液预培养的藻细胞, 酶处理时, 光合放氧活性下降缓慢, 但在后期保存中, 低温下仅能维持 1—2 天(图 5, 6)。

2. 球形体的培养及再生 分离出的蓝藻球形体经反复培养试验, 柱孢鱼腥藻和组囊藻获得了再生藻落(表 2)。在固体培养中, 柱孢鱼腥藻球形体经饲养层法培养 9 天后, 解

表 1 EDTA 处理对藻细胞外膜 KDO 释放量的影响

Tab. 1 Effect of EDTA on the amount of KDO released from out membrane of algal cells

藻 类	EDTA 浓度 $\text{mmol} \cdot \text{l}^{-1}$	温度($^{\circ}\text{C}$)	时间 (Time)	KDO ($\text{nmol} \cdot \text{ml}^{-1}$)
<i>A. cylindrica</i>	0	35	7h	1.0
	2			1.3
	5	37	15min	2.1
<i>A. nidulans</i>	0	35	7h	0.0
	2			0.1
	5	37	15min	0.6

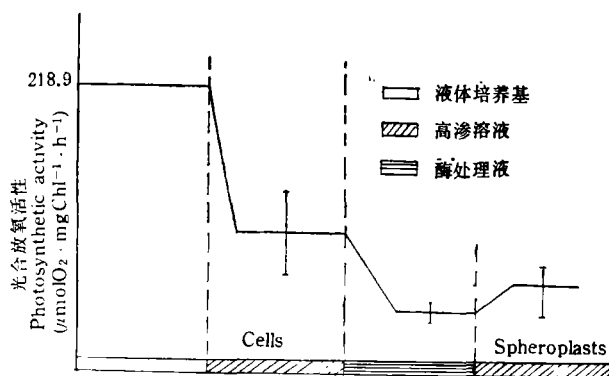


图 4 光合放氧活性测定 I: Allen-Arnon 培养基预培养

Fig. 4 Photosynthetic activity of cells and spheroplasts I: cells were pre-cultured in Allen-Arnon medium

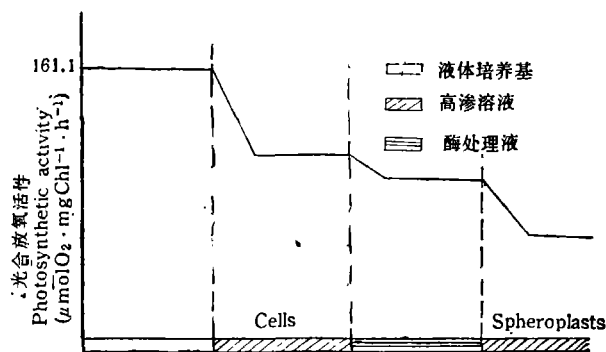


图 5 光合放氧活性测定 II: 高渗溶液预培养

Fig. 5 Photosynthetic activity of cells and spheroplasts II: cells were pre-cultured in hypertonic solution

剖镜下观察,已有藻落形成,14天后,已形成肉眼可见的藻落。固体混合法试管中,柱孢鱼腥藻和组囊藻的球形体均形成了再生藻落。液体培养中,在50ml锥形瓶中或在小试

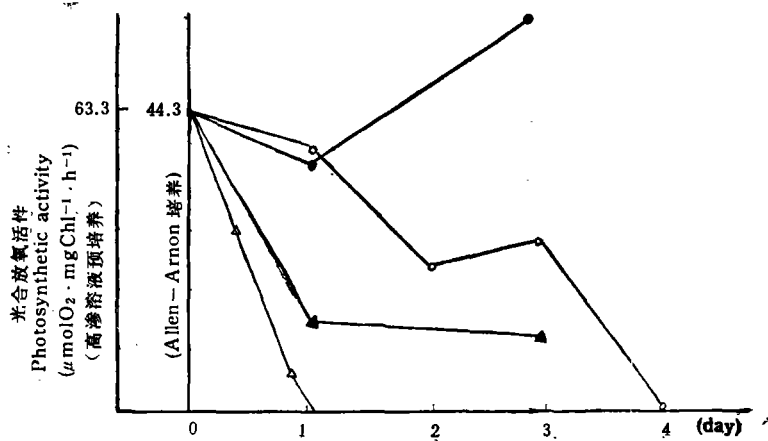


图6 不同温度保存下球形体光合放氧活性测定

Fig. 6 Photosynthetic activity of spheroplasts preserved at different temperatures

●——● 4°C 保存 (AA-N 培养) ▲——▲ 4°C 保存 (高渗溶液预培养)
○——○ 26°C 保存 △——△ 26°C 保存

表2 蓝藻球形体再生试验结果

Tab. 2 The result of regeneration experiment on blue-green algal spheroplasts

藻类 Algae	各种处理培养后藻落数 Number of alga Colony after different treated culture							观察方法 Observation	培养方法 Culture
	P-5	P-5-BA	P-水	P-水-5	C-5	C-水	C-水-5		
<i>A. cylindrica</i>	37 个/管	—	11	1	++++	++++	+++	解剖镜	固体混合
	+ / 管	+	○	○	—	—	—	肉眼	固体混合
	○ / 悬滴	+	○	○	++	++	+	显微镜	悬滴培养
	53.5 个/视野	—	4.9	—	+++	++++	+++	解剖镜	饲养层法
	1.07×10^3 个/皿	—	90—120	○	+++	++++	+++	肉眼	饲养层法
<i>A. nidulans</i>	419 个/管	—	○	—	+	+	—	解剖镜	固体混合

注: — 未做此项处理; ○ 有此项处理,但未出现藻落。

管中浅层静置培养,均未成功。6天后,大部分球形体裂解成碎片。悬浮培养中仅在含有 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ BA 的 P-5-BA 中,第4天发现球形体发生第一次细胞分裂,以后多次分裂,并形成丝体,丝体上的细胞数最多达 20 个(图7)。其它处理均未有藻丝体形成。在所有实验中,C-水植板率均高于 C-5 和 C-水-5。

3. 抗溶菌酶试验 在柱孢鱼腥藻球形体培养中,P-5 获得大量再生藻落的同时,P-水中也形成了少量藻落。分别从 P-5 和 P-水中挑取所形成的藻落扩大培养,进行抗溶菌

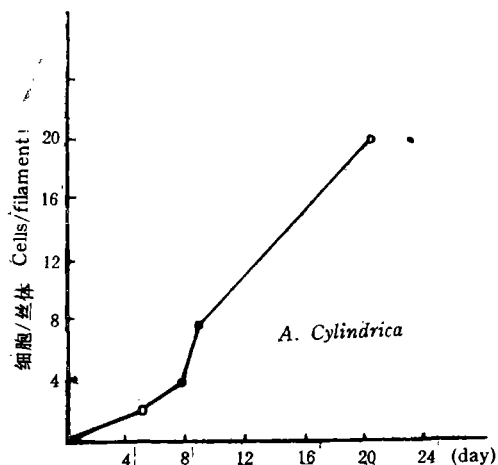


图7 *A. cylindrica* 球形体悬滴培养细胞再生数

Fig. 7 The number of cells in an algal filament regenerated from the spheroplasts of *A. cylindrica* in the drop-culture.

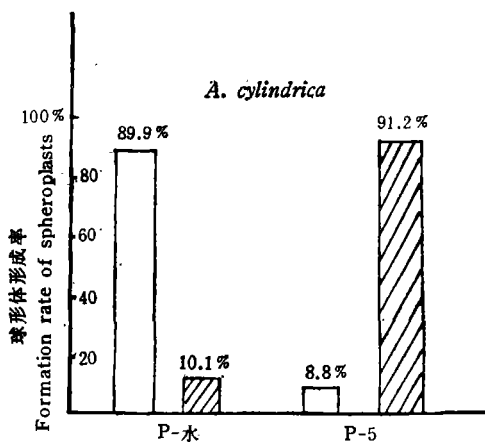


图8 抗溶菌酶特性比较

Fig. 8 Comparison of lysozyme-resistance between P-5 and P-water.

□: 细胞 ▨: 球形体

酶特性比较实验,其培养条件和酶反应浓度、温度、时间均如前所述。P-5 中所形成的藻落经 6h 酶处理后,绝大部分已转为球形体;P-水中的藻细胞在相同条件下处理,仍以丝体为主(图 8)。这表明, P-5 中的藻落是由对溶菌酶敏感的野生型细胞经酶处理后形成的球形体发育而成的,而 P-水中,则是由对溶菌酶有抗性的细胞残留在酶处理物中形成的藻落。

4. 球形体融合实验 同一种藻的球形体易融合。然而,经多次重复,PEG 不同分子量的不同浓度,不同处理时间、温度以及不同钙离子浓度等多种组合,仍未能见到柱孢鱼腥藻和组囊藻球形体的融合。

讨 论

1. 在本实验所用几种藻的胶鞘,粘球藻的最厚,多变鱼腥藻的较薄,而柱孢鱼腥藻则不明显。这几种藻分离球形体的难易程度与其胶鞘的厚度相关,胶鞘越厚的细胞壁越难降解。更明显的对比是柱孢鱼腥藻的静置培养物和通气培养物对酶敏感性的差异(一般来说,通气培养中,藻所形成的胶鞘比静置培养中薄得多)。这个结果与 Crespi (1962 年)^[4]的结论相反,他在比较了具有胶鞘的席藻 (*Phormidium* sp.) 和无胶鞘的颤藻 (*Oscillatoria* sp.) 对酶敏感性差异后认为,具有明显粘质胶鞘的藻更易受到酶的侵蚀。但不同种藻其细胞壁组分不同,在比较不同种藻对酶敏感性时,不能仅考虑胶鞘的厚薄。而我们以一种蓝藻作为材料,比较其不同培养条件下胶鞘厚薄不同而导致对酶的敏感性差异,可以排除种类差异的影响。所以本实验的结论是,细胞胶鞘阻碍了溶菌酶对细胞壁的降解作用。

2. 球形体的细胞壁再生,仅在固体培养和加有外源生长激素的液体悬滴培养中发生,在液体浅层培养中无再生现象,可见适当的培养方法是蓝藻球形体再生的前提。适当的

水份以及在球形体周围形成一稳定的微环境是必要的。实验中球形体埋在琼脂内(固体混合法)的再生重复率比在琼脂表面(饲养层法)的高,而在饲养层法中球形体培养 4—5 天后,要向琼脂表面加入液体培养基逐步降低渗透压,在液体培养中,由于液体的流动性常常破坏球形体周围的微环境,似使新合成的细胞壁物质难以在细胞膜表面积累以形成新的细胞壁。

3. 根据已有报道, EDTA 处理细胞,不管怎样改变方法,外膜脂多糖的释放量不会超出总量的 50%^[8]。EDTA 浓度及处理时间与已有方法比较,相对缓和些。其目的是确保分离出的球形体的质量。因为 EDTA 作为络合物,能与质膜上的蛋白质和离子结合,破坏质膜的完整性,影响球形体的活力。但同时也降低了脂多糖的释放量,质膜外围所残留的脂多糖较多。在随后的细胞融合实验中,两亲本球形体彼此紧密粘连,但未融合,可能是残留的脂多糖阻碍了两亲本质膜的直接接触,使融合未能实现。但残留的脂多糖并非细胞融合不可逾越的障碍。PEG 能诱导革兰氏阳性菌枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) 的原生质体和革兰氏阴性菌大肠埃希氏菌 (*Escherichia coli*) 的球形体实现融合^[2]。最近 Ruthe (1985)^[11] 用电场诱导革兰氏阴性菌间的球形体融合也获得成功 (*E. coli* and *Salmonella typhimurium*)。在电场诱导和脉冲冲击下,球形体质膜外围的脂多糖结构不会阻碍质膜融合。所以强调,没有必要一定先将脂多糖去除。但这种能够进行融合的球形体是来自在 β -丙酰胺中预培养的细胞,即“巨型球形体”其质膜远远超过了包裹原生质所需要的量,因而很易弯曲。在电场中,球形体彼此质膜的接触面积增大,克服了残留脂多糖的阻碍,使融合能够实现。而一般的球形体在电场中不能融合。这也说明质膜彼此接触是球形体融合的前提。

参 考 文 献

- [1] 李向辉, 1986. 植物原生质体的培养和再生植株。北京大学出版社。
- [2] 李明风, 1981. 枯草杆菌和大肠杆菌通过原生质体融合转移质粒。中国科学院遗传研究所工作年报, 17—18, 科学出版社。
- [3] Biggins, J., 1967. Preparation of metabolically active protoplast from the blue-green alga *Phormidium laridum*. *Plant Physiol.*, 42, 1442—1446.
- [4] Crespi, H. L., 1962. The action of lysozyme on several blue-green algae. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 9, 567—577.
- [5] Gabriel M., 1984. Formation, growth and regeneration of incomplete cell wall in spheroplasts of the blue-green algae *Anacystis nidulans* in liquid medium. *Z. allg. mikrobiol.*, 24(10), 679—689.
- [6] Hirokawa, H., 1962. Biochemical and cytological observation during the reversing process from spheroplasts to rod-form cells in *E. coli*. *J. Bact.*, 84, 1161—1168.
- [7] Kaokhunis Y. D., 1978. A new and improved microassay to determine 2-keto-3-deoxyoctonate in LPS of gram-negative bacteria. *Analytical Biochem.*, 85, 595—601.
- [8] Loretta L., 1968. Physical, chemical, and immunological properties of LPS released from *E. coli* by EDTA. *J. Biol. Chem.*, 243, 6384—6391.
- [9] Lindsey J. K., 1971. Spheroplasts formation and associated ultrastructural change in a synchronous culture of *Anacystis nidulans* treated with lysozyme. *J. Phycol.*, 7, 65—71.
- [10] Reinert J. and Yeoman M. M., 1982. Plant cell and tissue culture. Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York 44—45.
- [11] Ruthe H. J., 1985. Fusion of bacterial spheroplasts by electric field (BBA 72732). *Biochim. Biophys. Acta* 819: 105—113.
- [12] Минеева, Л. А., Семёнова, Л. Р. И М. В. Гусев., 1979. Влияние лизоцима. Этилендиаминотетраацетата, мальния и маннита на образование сферопластов у *Anacystis nidulans*. Микробиология 48: 693—698.

- [13] Семёнова Л. Р., Минеева Л. А., И М. В. Гусев, 1982. Влияние осмотических стабилизаторов на образование и фотосинтетическую активность сферопластов цианобактерий. Микробиология 51, 259—266.

ISOLATION, CULTURE AND REGENERATION OF SPHEROPLASTS OF BLUE-GREEN ALGAE

Kong Fanxiang and Li Shanghao

(Institute of Hydrobiology, Academia Sinica, Wuhan 430072)

Abstract

Growing cells of *Anabaena cylindrica*, *A. variabilis* and *Anacystis nidulans* were treated with 0.05% lysozyme (w/v) and 2—5 mmol·l⁻¹ EDTA, at 35°C in hypertonic solution. Within 5—8 h, about 70—90% of the cells were converted to osmotically sensitive spheroplasts. The effect of culture methods on the formation rate of spheroplasts was studied. The amount of lipopolysaccharides (LPS) released from outer membrane of cells treated with EDTA only was measured. The photosynthetic activity of the spheroplasts and cells suspended in hypertonic solution decreased obviously. The cells suspending in hypertonic solution lost their nitrogen-fixing activity. The spheroplasts of *A. cylindrica* plated on the agar feed-layer, embedded in the agar medium (0.8—1.5%) or suspended in the culture drop containing 0.5 mg·l⁻¹ BA formed the regenerated algae colonies after 9 days. The spheroplasts of *A. nidulans* embedded in the soft agar (0.8%) formed the regenerated algae colonies. Cell division of spheroplasts suspended in the drop culture could be found on the 4th day of culture. Lysozyme-resistance of regenerated algae colonies was compared with that of the cell colonies developed from the residual cells in the lysozyme-treated solution. Spheroplasts of two species were induced to fusion with PEG and high pH/Ca, but the attempt failed.

Key words Spheroplasts, Regeneration *Anabaena cylindrica*, *Anacystis nidulans*.