



## 研究简报

# 五属七种蓝藻原生质球分离研究\*

郭厚良

宋文贞

金传荫

(武汉大学生物系, 武汉, 430072)

(中国科学院水生生物研究所, 武汉, 430072)

## A STUDY ON THE ISOLATION OF SPHEROPLASTS FROM 7 SPECIES (5 GENERA) OF BLUE-GREEN ALGAE

Guo Houliang and Song Wenzhen

(Department of Biology, Wuhan University, Wuhan, 430072)

Jin Chuanyin

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

**关键词** 蓝藻, 原生质球, 青霉素, 溶菌酶

**Key words** Blue-green algae, Spheroplasts, Penicillin, Lysozyme

1967年, Biggins 首次报道采用溶菌酶处理法获得了有生活力的蓝藻原生质球<sup>[1]</sup>。但是, 这一方法存在很大的缺陷, 作者曾作过详尽的评述<sup>[2]</sup>, 并提出了一种新方法, 即青霉素-溶菌酶法<sup>[3,4]</sup>, 降低了酶处理温度, 缩短了酶处理时间, 并取得了比较好的分离效果。为了进一步检验这种方法的有效性, 作者又选了五个属的七种蓝藻进行了试验。

### 1 材料和方法

所用五属七种蓝藻为: 东湖项圈藻(*Anabaenopsis elenkini*), 程海项圈藻(*A. chenghaigis*), 钝顶螺旋藻(*Spirulina platensis*)(Nordst.) Getl., 引自中国科学院武汉植物研究所。席藻(*Phormidium lucidum*), 柱胞鱼腥藻(*Anabaena cylindrica*), 多变鱼腥藻(*A. variabilis* Kütz.), 赖氏鞘丝藻(*Lynbya largerheimii* Mab) Gom], 引自中国科学院水生生物研究所。材料的培养及试验处理的基本方法同前<sup>[4]</sup>。

### 2 结果和讨论

以上各种蓝藻单纯以青霉素处理均发生藻丝解体, 细胞破裂, 释放出细胞内含物。但以适度的青霉素处理后再转入溶菌酶处理, 情况则各不相同。

**2.1 东湖项圈藻和程海项圈藻** 丝状蓝藻, 细胞长圆(图版 I, 1)。染色显示<sup>[5]</sup>, 细胞外无胶质, 液体培养中藻丝可均匀分散。这两种蓝藻对青霉素异常敏感, 只需 100 uni/ml 和 3h 处理。超过此限度, 离心悬浮处理即引起细胞大部分甚至全部破裂。经青霉素预处理后转入溶菌酶, 数分钟之内就发生明显变化。开始, 藻丝伸直, 随后, 细胞迅速球形化。2h 后, 原生质球形成率就达 95% 以上。细胞圆球形, 透明度高, 胞内色素层显示清楚(图版 I, 2)。

**2.2 席藻** 丝状蓝藻(图版 I, 3)。胶质也较少。对青霉素敏感性较差, 以 1000 uni/ml 处理 6h 仍不发生细胞大量破裂。转入溶菌酶处理 2h, 原生质球形成率达 90% 以上, 球体结构也较好(图版 I, 4)。

**2.3 柱胞鱼腥藻** 丝状蓝藻, 对青霉素和溶菌酶处理的反应与固氮鱼腥藻相近<sup>[4]</sup>。使用青霉素 1000 uni/ml 处理 6h 和溶菌酶处理 3h, 原生质球形成率、球体结构和产量与上述完全一致。Yoshida

\* 湖北省自然科学基金资助项目。

1993年6月2日收到。1994年10月12日收到修改稿。

和 Toyama 曾报道<sup>[6]</sup>, 采用特殊的酶处理可得到完全无壁的原生质体, 但稳定性差, 不能进行再生培养。另孔繁翔和黎尚豪报道<sup>[7]</sup>, 采用 EDTA-溶菌酶处理分离柱胞鱼腥藻原生质球, 其中溶菌酶处理时间为 5—8h, 而原生质球最高分离率为 80%。

**2.4 赖氏鞘丝藻** 丝状蓝藻 (图版 I, 5), 藻丝极长, 互相缠绕形成团块。藻丝外壁坚韧, 对处理敏感性差, 以 1000uni/ml 青霉素处理 16h 也不见细胞破裂。转入溶菌酶后 3.5h 才出现个别球体, 首先从断裂的小段藻丝一端或两端形成一个或两个原生质球。接着, 下面的细胞逐渐球形化。直至 11h, 仍只有少部分细胞转化为原生质球。但球体结构良好, 大而圆, 内部色素层清晰 (图版 I, 6)。

**2.5 多变鱼腥藻** 丝状蓝藻 (图版 I, 7), 藻丝外有很厚的胶质层, 粘结成团, 不能直接进行溶菌酶处理。在青霉素 1000uni/ml 处理 6h 后, 采用一定的方法<sup>[8]</sup>, 先除胶质, 然后进行溶菌酶处理。但处理使绝大部分细胞破裂, 只能得到个别原生质球。球体大而圆, 极为透明, 色素层清晰 (图版 I, 8)。经 3h 酶处理后, 处理液成为粘稠的胶质状态。因此, 少数原生质球也无法离心收集。这结果与过去的报道<sup>[9, 10]</sup>不大一致。

**2.6 钝顶螺旋藻** 螺旋形丝状蓝藻, 细胞横壁不明显。青霉素处理可引起细胞破裂, 藻丝解体。经适度青霉素预处理后转入溶菌酶处理, 可发现藻丝透明度逐渐增加, 细胞横壁显示。进而发生细胞破裂, 长藻丝断裂为小片段, 并出现圆形细胞。但细胞进而破裂, 不转变为原生质球。

以上结果及综合前面的试验表明, 青霉素-溶菌酶法共在三属六种蓝藻获得了优异的原生质球分离效果, 较一般的溶菌酶处理要好。首先表现为球体结构好, 细胞透明, 显示内部色素层, 说明去壁较为充分, 从而使细胞融合增加了可能。第二, 细胞破裂比较少, 绝大多数细胞转化为原生质球, 分离率高, 从而大大提高了原生质球的可操作性。但有些蓝藻用青霉素-溶菌酶法也难以得到原生质球, 这一问题有待进一步研究。

## 参 考 文 献

- [1] Biggins J, Preparation of metabolically active protoplasts and particle preparations from the blue-green alga *Phormidium lucidum*, *Plant Physiol*, 1967, 42: 1441—1446.
- [2] 郭厚良, 蓝藻原生质球研究的现状及存在问题, 武汉植物学研究, 1988, 6(2): 173—178.
- [3] 郭厚良, 蓝藻原生质球分离新方法: 青霉素-溶菌酶法; 武汉植物学研究, 1990, 8(4): 399—400.
- [4] 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.
- [5] 郭厚良, 蓝藻胶质鞘的染色观察, 植物杂志, 1989, (1): 16.
- [6] Yoshida M and Toyama, A new method to isolate protoplasts from the Cyanobacterium *Anabaena cylindrica*, *J Plant Physiol*, 1987, 129: 301—310.
- [7] 孔繁翔, 黎尚豪, 蓝藻球形体的分离、培养和再生, 水生生物学报, 1991, 15: 119—126.
- [8] 郭厚良、王正元, 蓝藻胶质层的消除和再生, 植物学通报, 1994, 11(增刊): 89—90.
- [9] Gusev M V, Nikitina K A and Korzhenevskaya T G, Metabolically active spheroplasts of blue-green algae, *Mikrobiologiya*, 1970, 34: 862—868.
- [10] Beliner M D, et. al Spheroplast induction in *Anabaena Variabilis* Kutz and *A. azollae*.

## 图 版 说 明 (图 版 I)

1. 东湖项圈藻未处理藻丝; 2. 东湖项圈藻原生质球; 3. 席藻未处理藻丝; 4. 席藻原生质球; 5. 赖氏鞘丝藻未处理藻丝; 6. 赖氏鞘丝藻原生质球; 7. 多变鱼腥藻未处理藻丝; 8. 一个多变鱼腥藻原生质球。×1160。

1. An untreated trichome of *Anabaenopsis elenkini*; 2. Spheroplasts of *A. elenkini*; 3. Untreated trichome of *Phormidium lucidum*; 4. Spheroplasts of *Phormidium lucidum*; 5. Untreated trichome of *Lynbya largerheimii*; 6. Spheroplasts of *L. largerheimii*; 7. Untreated trichome of *Anabaena variabilis*; 8. One spheroplast of *A. variabilis*. ×1160.

