

两种裸藻的无叶绿体突变株

王江新 施之新 徐旭东

(中国科学院水生生物研究所, 武汉 430072)

摘要: 利用 Ofloxacin 处理获得了纤细裸藻和中型裸藻无叶绿体突变株。吸收光谱测定和自荧光显微观察证明突变株无叶绿素合成, DAPI 染色方法显示突变株细胞不存在质体 DNA, 而无色的长变胞藻细胞中仍有可检测质体 DNA, 说明二突变株质体已消失。SDS-PAGE 显示野生种和突变株各有特异蛋白表达。

关键词: 裸藻; 叶绿体; 突变株

中图分类号: Q949.22 文献标识码: A 文章编号: 1000-3207(2002)02-0175-05

裸藻属是一类单细胞鞭毛藻, 其中纤细裸藻(*Euglena gracilis* Klebs) 及其杆状变种(*E. gracilis* var. *bacillaris*) 叶绿体对多种化学和物理因子敏感, 如紫外线、持续高温、链霉素等都可以诱导藻株的可逆或不可逆退色, 质体 DNA 完全或部分丢失。而这种退色以及质体 DNA 的丢失几乎不影响生长与分裂^[1]。纤细裸藻及其变种的退色突变株在它们质体相关特性的表型方面有很大的异质性, 以纤细裸藻变种的两个突变株(W₃BUL, W₁₀BSmL)^[2]为例: W₃BUL 具有比野生型淡的眼点, 在合适的条件下可以形成前质体并可以进行有限的质体发育; 而 W₁₀BSmL 基本上观察不到眼点和胡萝卜素, 并且不存在前质体结构和质体 DNA。近年来, Ebringer 和 Krajcovic 等以纤细裸藻为材料, 选用多种 Quinolone 类药物进行抗诱变剂的研究, 他们发现了几种使纤细裸藻有效退色的 Quinolone 类药物, 在合适的剂量下, 在作用几天后退色效率即可达到 100%, 但没有对退色突变株进行过色素、质体以及质体 DNA 等方面的研究^[3-5]。笔者选用了退色效率最高的 Ofloxacin 处理裸藻属的纤细裸藻与中型裸藻嗜酸变种, 分别得到退色突变株 WJOflx 47 和 WJOflx 412。综合它们的色素、质体及其 DNA、蛋白质差异等情况, 认为二者均完全丧失质体结构, 属无叶绿体突变株。

1 材料与方法

1.1 藻株和培养条件 选择的纤细裸藻(*E. gracilis* FACHB47), 中型裸藻嗜酸变种(*E. intermedia* var. *acidophila* FACHB412) 和长变胞藻(*Astasia longa*) 均来自于中国科学院

收稿日期: 2001-07-10; 修订日期: 2001-08-20

基金项目: 中国科学院“百人计划”项目资助

作者简介: 王江新(1973-), 男, 浙江省义乌市人; 博士生

通讯作者: 徐旭东, xux@ihb.ac.cn

淡水藻培养保藏中心,并经过作者用稀释平板法获得无菌单克隆细胞株。裸藻以光照 1000lx, 10h/14h(黑暗/光照), PolyA 培养基(醋酸钠 2g/L, 牛肉膏 1g/L, 蛋白胨 1g/L, 高压灭菌)在 25℃ 培养。固体平板中加琼脂 1.2%。

1.2 诱变和筛选 在 PolyA 培养液中接种约 1×10^3 cells/mL, 3d 后同样取藻液转到 50mL 新鲜 PolyA 液体培养基中, 同样使细胞数达到 1×10^3 cells/mL。此时加入 0.05mL 100mmol/L Ofloxacin 使其终浓度达到 $100 \mu\text{mol/L}$, 继续培养。每隔 1d 取约含 100 Cells 的藻液涂一次平板。约 7d 后单克隆长出, 用灭菌牙签挑白色藻落, 转移到 200mL 新鲜液体 PolyA 培养基中。

1.3 色素吸收光谱的测定 取对数生长期的藻液 10mL, 于 3000r/min 离心 10min。沉淀用 200 μL 预冷水悬浮, 超声波破细胞, 加 800 μL 丙酮, 充分混匀, 于 4℃ 抽提 2h。用 UV-16-1 光谱扫描仪(Shimadzu)测定 400-700nm 吸收光谱。

1.4 叶绿素自荧光与 DAPI 染色荧光显微观察 藻细胞用 Carnoy 液处理后用于叶绿素自荧光显微观察。再将藻细胞于 4℃ 静置 5h, 小心吸去固定液, 并重悬于 100 μL ddH₂O。取一滴藻液(约 20 μL)置于载玻片上, 加 5 μL DAPI(3 $\mu\text{g/mL}$)小心吹打混匀, 加盖玻片。在 Nikon FDX-35 荧光显微镜, UV 激发光, 滤光片 EX380-420 和 EX330-380, 分别进行叶绿素自荧光与 DAPI 染色荧光的显微观察。

1.5 SDS-PAGE 取藻样约 50mg, 于 4℃, 3000r/min 离心 5min 后悬浮于 300 μL 预冷的 0.02mol/L TrisCl(pH7.5), 加 30 μL 1mol/L 的蛋白酶抑制剂 PMSF。超声波破碎细胞。12 000r/min 离心 10min, 取 10 μL 上清, 加 10 μL 2 $\times$ 上样缓冲液, 于沸水浴加热 3 min, 冷却至室温。各取 15 μL 样品用于 SDS-PAGE(5% 的浓缩胶, 10% 的分离胶)。用考马斯亮蓝 R-250 染色。



图 1 突变株的筛选, 空心箭头所指为退色突变株藻落

Fig. 1 Selection of mutants. Arrows point to candidate colonies of the bleaching mutant

2 结果与讨论

2.1 突变株的筛选

用 Ofloxacin 处理藻细胞 24h 后涂 PolyA 平板。7d 后可观察到白色藻落与绿色藻落数比值约为 1:1(图 1)。在 72h 处理后平板上观察到的全部都是白色藻落。这个结果与 Ebringer, Krajcovic 等的报道^[4]一致, 挑取不同作用时间(1 d, 3 d, 5 d)得到的白色藻落, 在液体 PolyA 培养基中, 进一步培养。经过筛选获得性状稳定的突变株。经过 100 多天的连续液体培养和平板培养检查, 突变株无回复现象。光照条件下, 液体培养基中生长的白色突变株和野生型代时分别为 23h 和 24h, 并无显著差别。

2. 2 色素的吸收光谱

为确认突变株中叶绿素是否完全丧失, 用丙酮提取藻细胞中的光合色素, 并进行了吸收光谱扫描, 结果如图 2。野生型色素抽提液波长 662nm 和 431nm 处有叶绿素吸收峰。WJOflx 47, WJOflx 412 完全不显示叶绿素吸收的特征光谱。但在 463nm 附近仍有较弱的吸收值, 硅胶板层析进一步证实, 突变株不存在叶绿素, 但仍有叶黄素与类胡萝卜素(结果未附), 463nm 处存在的微弱吸收值可能与叶黄素与类胡萝卜素有关^[6, 7]。

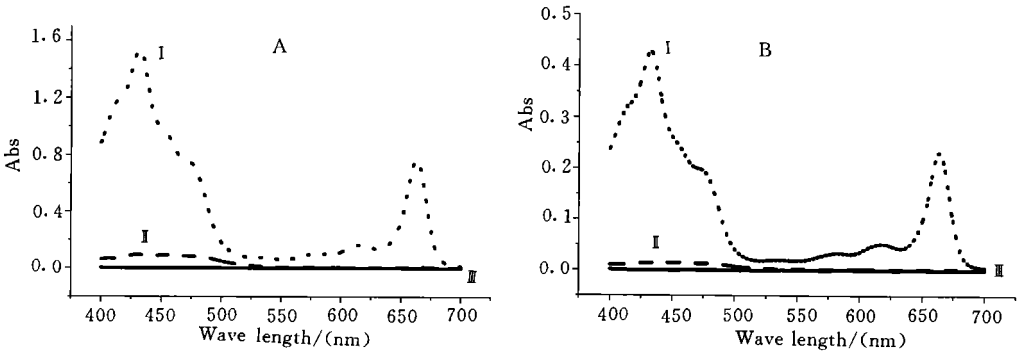


图 2 色素吸收光谱

A. 纤细裸藻(I)、突变株 WJOflx 47(II) 和长变胞藻(III);

B. 中型裸藻(I)、突变株 WJOflx 412(II) 和长变胞藻(III)

Fig. 2 Absorption spectra of pigments. A. *E. gracilis*(I), WJOfl 47 (II) and *A. longa*(III);

B. *E. intermedia* var. *acidophila*(I) , WJOflx 412(II) and *A. longa*(III)

2. 3 叶绿素自荧光与 DAPI 染色荧光显微观察

叶绿素自荧光观察表明, 野生型叶绿体在波长 380—420nm 的激发光下, 有很明显的红色自发荧光(图 3); 而相同情况下, 在突变株中却没有观察到这种红色荧光(图 3)。这一结果与以上色素吸收光谱结果证明了突变株中完全没有叶绿素合成。尽管如此, 并不能肯定突变株中是否仍有不完全发育的质体结构。为此, 以 DAPI 荧光染料处理细胞观察它们有无质体 DNA 的存在。裸藻类质体 DNA 的 G/C 含量约为 25% 而细胞核 DNA 的含量为 53%。这种异质性使得 DAPI 染色对裸藻类的质体 DNA 非常敏感。并且已经证明, 其线粒体 DNA 不会干扰这种荧光显微观察^[2]。为证明这一实验方法的可靠性, 选用无色但仍有残留质体结构的长变胞藻做为参照, 长变胞藻细胞中存在着 73 kb 的质体 DNA^[8], DAPI 染色观察到为数不多、处于核外的质体 DNA(图 3)。与叶绿素自荧光观察结果相同的是, 尽管 Carnoy 固定液引起了副淀粉和叶绿体在藻细胞一侧的聚集, DAPI 荧光染色清晰地显示了野生型细胞的质体 DNA; 而在突变株中并没有发现。

2. 4 全细胞蛋白质 SDS-PAGE

由于突变株失去了叶绿体结构, 与之相关的一些蛋白质必然消失。以 SDS-PAGE 检查全细胞蛋白, 结果如图 4。野生型细胞中的一些蛋白质条带, 如 I 1, I 2 和 G 1, G 2(I 1 和 G 2、I 2 和 G 2 有相同的迁移率) 等, 在无叶绿体突变株中不存在, 这些蛋白质可能是叶绿体特异的。但突变株中也出现了一些野生型细胞中观察不到的蛋白, 如 Ga, Ia 等; 还有一些表达显著提高的蛋白带, 如 Gb。而且在与相应突变株之间差别方面, 纤细裸藻和中型

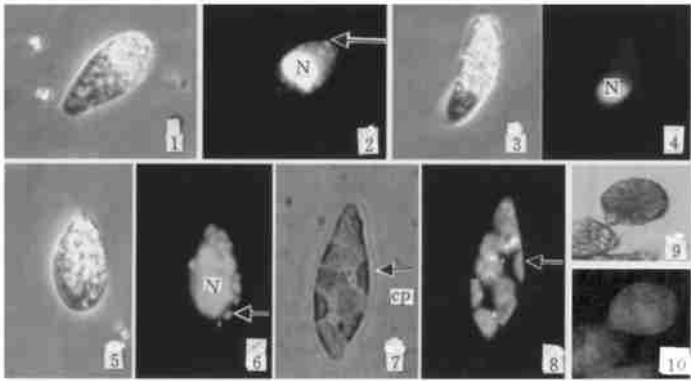


图 3 藻细胞相差 (1, 3, 5, 7, 9)、DAPI-DNA 荧光 (2, 4, 6) 和叶绿素自荧光 (8, 10) 显微观察, 显示叶绿体和质体 DNA. 1 和 2, 长变胞藻; 3, 4, 9, 10, 突变株 WJOflx 47; 5, 6, 7, 8, 野生型纤细裸藻. N 代表细胞核; cp 代表叶绿体. 箭头所示为质体 DNA 或叶绿体

Fig. 3 Phase-contrast (1, 3, 5, 7, 9), DAPI-DNA fluorescence (2, 4, 6) and chlorophyll autofluorescence (8, 10) micrographs of algal cells, showing chloroplasts or plastid DNA.
1 and 2, *Astasia longa*; 3, 4, 9, 10, mutant strain WJOflx 47; 5, 6, 7, 8, wild type *Euglena gracilis*.
N stands for nucleus; cp stands for chloroplast. Arrows indicate plastid DNA or chloroplast

裸藻有所不同。如 G2 条带在纤细裸藻中很明显, 在 WJOflx 47 中基本上观察不到; 而在中型裸藻和 WJOflx 412 中差别不明显。以上结果表明, 细胞核和叶绿体之间的作用是相互的, 不仅叶绿体的发育是受细胞核的调控; 另一方面, 叶绿体也控制了某些核基因的表达。在叶绿体被去除时, 某些被抑制的核基因被激活表达, 以调整代谢类型的变化。

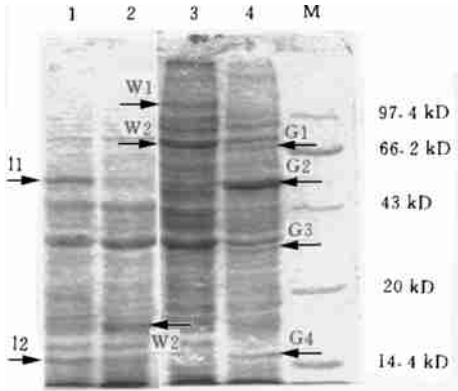


图 4 SDS-PAGE. M, 低分子量标准蛋白, 分子量如图所示。
泳道 1- 4 分别为中型裸藻, WJOflx 412, WJOflx 47 和纤细裸藻的蛋白质样品. 箭头所指为差异蛋白质条带
Fig. 4 SDS-PAGE. M, low-molecular-weight standard protein marker. Lanes 1- 4 are samples of *E. intermedia* var. *acidophila*, WJOflx 412, WJOflx 47 and *E. gracilis* respectively.
Arrows indicate the differentially expressed protein bands

参考文献:

- [1] John L. Megaw. The Biology of *Euglena* [M]. New York: Academic Press, 1968
- [2] Osafune T, Jerome A. Schiff. W10BSmL, a mutant of *Euglena gracilis* var. *bacillaris* lacking plastids [J]. *Exp Cell Res*, 1983, **148**: 530– 535
- [3] Krajcovic L, Chreno O, Ebringer L. Different effect of hyperthermia and heat shock on the action of quinolone drugs versus some mutagens against chloroplasts of *Euglena gracilis* [J]. *Mutation Res*, 1990, **244**: 21– 25
- [4] Krizkova L, Nagy M, Polonyi J, et al. The effect of flavonoids on ofloxacin-induced mutagenicity in *Euglena gracilis* [J]. *Mutation Res*, 1998, **416**: 85– 92
- [5] Krizkova L, Nagy M, Polonyi J, et al. Phenolic acids inhibit chloroplast mutagenesis in *Euglena gracilis* [J]. *Mutation Res*, 2000, **469**: 107– 114
- [6] 潘瑞炽, 董愚得. 植物生理学, 第 3 版 [M]. 北京: 高等教育出版社, 1995
- [7] Rowan K. S. Photosynthetic pigments of algae [M]. Cambridge: Cambridge University Press, 1989
- [8] Siemeister G, Hachtel W. Organization and nucleotide sequence of ribosomal RNA genes on a circular 73 kbp DNA from the colourless flagellate *Astasia longa* [J]. *Current genet*, 1990, **17**: 433– 438

CHLOROPLAST-LESS MUTANTS OF TWO SPECIES OF *EUGLENA*

WANG Jiang-xin, SHI Zhi-xin and XU Xu-dong

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

Abstract: Chloroplast-less mutants of *E. gracilis* and *E. intermedia* were generated by treatment with Ofloxacin. Absorption spectra and autofluorescence microscopic observations showed that chlorophyll was not synthesized in the two mutants. Using DAPI fluorescence photomicrograph, plastid DNA was found in *Astasia longa*, a colorless species of Euglenoid, but not in the ofloxacin-induced mutants of *Euglena*, which suggest that plastids have been completely lost in the two mutants. SDS-PAGE indicated that specific proteins were synthesized in the wild type and mutant strains respectively.

Key words: *Euglena*; Chloroplast; Mutants