

研究简报

鱼腥藻 *Anabaena* PCC 7120 原生质球和液泡的同步诱导

郭厚良¹ 金传荫² 浦秋文¹ 宋文贞¹ 周云珍¹ 杨清平¹

(1. 武汉大学生命科学学院, 武汉 430072; 2. 中国科学院水生生物研究所, 武汉 430072)

SYNCHRONOUS INDUCTION OF SPHEROPLASTS AND VACUOLES
IN THE CYANOBACTERIUM ANABAENA PCC7120

GUO Hou liang¹, JIN Chuarr yin², PU Qiu wen¹, SONG Wen zhen¹,
ZHOU Yun zhen¹ and YANG Qing ping¹

(1. College of Life Sciences, Wuhan University, Wuhan 430072; 2. Institute of
Hydrobiology, The Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072)

关键词: 鱼腥藻 *Anabaena* PCC 7120; 原生质球; 液泡

Key words: *Anabaena* sp. PCC7120; Spheroplasts; Vacuoles

中图分类号: Q949. 22 文献标识码: A 文章编号: 1000- 3207(2001)01- 003

植物和真菌的液泡,都是通过原生质体途径被分离后才得以深入研究。要分离蓝藻液泡,首先要求制备蓝藻原生质体(球),而这一技术在蓝藻方面长期不过关。最近十年来,作者在这方面进行了不断的努力,先后在蓝藻原生质球制备^[1]、培养再生和融合^[2]等方面获得进展,这方面的研究导致了蓝藻液泡的重新发现^[3]。所发现的液泡由无机盐诱导产生,经电镜检查为单位膜所包围,故确定为液泡。借助较为成功的原生质球制备技术,首先分离了无机盐诱导形成的液泡,在此基础上进一步发现和分离了非诱导液泡^[4],在分离非诱导液泡的试验过程中发现了原生质球和液泡的同步诱导作用。

1 材料和方法

鱼腥藻 *Anabaena* PCC 7120,这是一种具异形胞的丝状固氮蓝藻,引自中国科学院水生生物研究所。采用 Allen 氏液体培养基作静止培养,间接振荡,培养在生化培养箱中进行,培养温度 28℃(±0.5℃),光照强度 2000lx。

1.1 原生质球制备 用培养 4—5d 的材料进行处理,采用多盐溶液为渗透稳定剂,先配制 pH7 的磷酸盐缓冲溶液(1/15mol/L),然后将 NaCl、KNO₃、(HN₄)₂SO₄ 以 0.05mol/L 的浓度溶入磷酸盐缓冲溶液,再加入溶菌酶至 0.1%(W/V)。藻丝材料按 2:1 进行酶处理,即 20mL 培养物用 10mL 酶处理液进行酶解,酶解温度 28℃。

收稿日期: 1999- 12- 29; 修订日期: 2000- 03- 18
基金项目: 国家自然科学基金资助项目(39870083)
作者简介: 郭厚良(1940—),男,湖北省天门市人;教授;主要从事细胞工程研究

1.2 液泡分离 酶解结束, 原生质球形成后, 1000r/min 离心沉淀原生质球, 弃去酶处理液, 加入蒸馏水, 5min 后取样检查液泡的释放。

以上原生质球和液泡的诱导分离设两个对照处理。

对照①: CaCl_2 酶解, 以 0.2mol/L CaCl_2 溶液作为渗透稳定剂, 其他条件相同。

对照②: 低渗酶解-渗透冲击处理; 分为三步骤。(1) 用溶菌酶的蒸馏水溶液将藻丝酶解 30min; (2) 将酶解后的藻丝转入 1mol/L MgCl_2 溶液高渗处理 30min, (3) 将藻丝从 1mol/L MgCl_2 转入蒸馏水 3min, 然后取样检查。

2 结果和讨论

此处原生质球制备方法是原有青霉素-溶菌酶法的改进, 省略了青霉素预处理, 将八盐溶液改为五盐溶液, 保留了原有的无机离子而去掉了原有的有机离子, 酶解效果进一步提高。经 3h 酶处理, 细胞转化为原生质球。此种原生质球和过去各种蓝藻的原生质球具有相同的结构特点, 即球形化细胞都划分为色素区 and 无色透明区(图 1. a), 并对低渗极为敏感。采用同样的方法, 将原生质球经蒸馏水作低渗处理, 原生质球破裂, 无色透明区膨大成为液泡, 从破裂的原生质球释放(图 1. b)。

与前面的液泡诱导和分离不同, 此处所用的是未经无机盐预先培养诱导的藻丝材料, 细胞无液泡化现象。但经多盐酶解液处理, 随着细胞形状向球形转变, 细胞渐渐发生结构分化, 无色透明区形成并不断扩大。当原生质球形成时, 无色透明区扩大到细胞的一半大小(图 1. a)。在以往的原生质球制备过程中, 细胞向原生质球转变也均如此, 但由于对蓝藻液泡没有认识, 不知道细胞中为什么会形成无色透明区以及此种无色透明区是一种什么结构, 据此推测, 细胞内形成无色透明区可能是液泡分化的表现, 无色透明区内可能存在液泡。根据此种推测, 便对原生质球作低渗处理, 无色透明区果然膨大为液泡释放(图 1. b)。在酶处理前, 细胞不存在无色透明区和液泡的明显分化, 液泡的分化和无色透明区的形成是伴随着原生质球形成而逐渐分化形成的, 与原生质球的形成同步。一个在显微水平上看不到液泡的细胞经 3h 处理分化出一个很大的液泡, 此种分化速度是不寻常的。

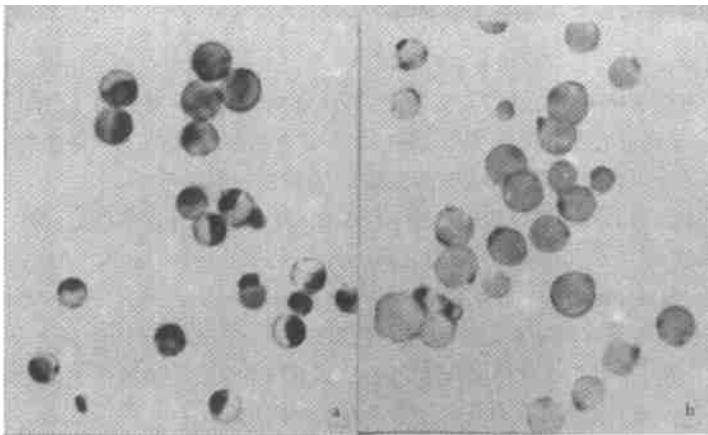


图 1 鱼腥藻 *A. nabaena* PCC 7120 同步诱导的原生质球和液泡

Fig1. The spheroplasts and vacuoles induced synchronously from *A. nabaena* PCC 7120

a. 原生质球 Spheroplasts, $\times 1270$; b. 液泡 vacuoles $\times 1270$;

液泡与原生质球的同步诱导形成和液泡经特定无机盐诱导形成后再分离, 这两者存在一定的区别。(1) 经特定无机盐预培养诱导后, 蓝藻细胞结构发生改变, 细胞普遍液泡化并发生体积膨大。而未经此种诱导处理的细胞处于正常状态, 无液泡化现象;(2) 经无机盐诱导处理的材料形成的原生质球和分离

的液泡明显较大,因为此种细胞已经比较大,又经过第二次分离原生质球的重复诱导处理。而未经无机盐培养诱导的材料形成的原生质球较小,所分离的液泡也较小;(3) 无机盐培养诱导液泡化需经 3d,而液泡与原生质球的同步诱导只需 3h。但两种材料分离液泡的频率一致,即每个原生质球都释放液泡。从蓝藻原生质球和液泡同步诱导可以看出,蓝藻原生质球的形成似乎不完全是一个细胞壁被降解和形态球形化的被动过程,而是细胞面对不适宜的外部新环境主动改变生理状态的过程,是一种分化,它包含了内在细胞组分改制和基因表达改变的复杂过程,这无疑是一个值得研究的新问题。

此外,采用蒸馏水裂解原生质球释放液泡可以同时达到三个目的。第一是最大限度的分离液泡,蒸馏水的渗透压降到了最低点,使酶解细胞充分裂解。如果渗透压仍比较高,可能有些细胞能维持其结构而不裂解,包藏在内的液泡就不能释放;第二,可测验液泡是否耐低渗,如果液泡不耐低渗,液泡会吸水膨胀而破裂,这样就得不到液泡;第三,可以测验液泡是否含有丰富的内含物。如果液泡无丰富内含物,渗透压就会比较低,可能耐低渗,但不会发生明显的吸水膨胀。试验清楚地表明,当原生质球转入蒸馏水时,无色透明区立即吸水膨大,突破残壁和原生质膜而成为游离液泡。因此,三个目的都圆满地达到。由于吸水膨胀,液泡的体积大大超过原生质球无色透明区,甚至比原生质球还要大。

人们可能要问:所谓与原生质球同步生成的液泡是否并非诱导生成,而是细胞原来所具有的?这就需要两个对照比较说明。

在对照①中,藻丝细胞在 0.2mol/L CaCl_2 溶液中由溶菌酶降解细胞壁,可形成对低渗敏感的球形细胞,但基本上不液泡化。经转入蒸馏水只有少数细胞破裂时释放液泡。根据过去的诱导试验,NaCl、 KNO_3 、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 等无机盐能诱导柱胞鱼腥藻藻丝细胞液泡化,而 CaCl_2 无此诱导作用。不仅如此,只要有 0.05mol/L CaCl_2 存在,上述无机盐的诱导作用也不能发生^[5], CaCl_2 能显示强大的反效应。用鱼腥藻 7120 重复以上试验结果相似, CaCl_2 和 MgCl_2 均不能诱导细胞液泡化。在本试验里,藻细胞受 CaCl_2 作用的时间更短,更不会有诱导作用。因此,试验所得到的液泡非诱导产生。

在对照②中,藻丝细胞经低渗酶解和渗透冲击双重处理,大约 50% 破裂,其中约 15% 的破裂细胞释放液泡。和对照①一样,释放液泡的细胞为少数。低渗酶解液中无任何诱导因子,用于高渗处理的 MgCl_2 也非诱导因子,处理时间也比较短,同样不会发生诱导作用。因此,得到的液泡也非诱导产生。

在以上两个对照试验中,都只有少数细胞能释放液泡。与两个对照试验相比较,由多盐溶液作渗透稳定剂进行酶解处理所诱导的原生质球几乎 100% 释放液泡。大量的液泡是经多盐作用诱导形成的。从对照 2 可以估计,全部液泡之中约 15% 是细胞原来所具有的,其余 85% 是与原生质球同步形成的,这两部分液泡在膜结构和内含物组成方面会有多大差异,有待进一步研究。

蓝藻原生质球和液泡的同步诱导具有普遍性。经对五个属的十种蓝藻进行试验,四个属九种蓝藻 (*Anabaena* PCC 7120, *A. cylindrica*, *A. flos aquae*, *A. siamesis*, *A. azolae*, *A. variabilis*, *Nostoc flagelliforme*, *Phormidium mucicola*, *Cylindrospermum licheniforme*) 对诱导敏感,每个原生质球都释放液泡。有一个属的一种蓝藻对诱导无反应,这就是钝顶螺旋藻 (*Spirulina platensis*),诱导形成非液泡化原生质球,约 0.1%—1% 的原生质球释放液泡。因此,以液泡和原生质球的同步诱导为依据,可将蓝藻划分为两类。这一划分的生物学意义有待进一步探讨。

参考文献:

- [1] 郭厚良,宋文贞,金传荫. 五属七种蓝藻原生质球分离研究[J]. 水生生物学报, 1996, (2): 93—94
- [2] 陈贤均,郭厚良. 柱胞鱼腥藻原生质球自发融合的研究[J]. 武汉植物学研究, 1997, 15: 375—377
- [3] 郭厚良,黄开耀,易平,等. KCl 诱导柱胞鱼腥藻形成液泡[J]. 水生生物学报, 1998, 22: 198—199
- [4] 郭厚良,金传荫,蒲秋文,等. 鱼腥藻 PCC7120 细胞液泡的初步研究[J]. 水生生物学报, 1999, 23: 363—367
- [5] 郭厚良,金传荫,宋文贞. 无机盐对蓝藻细胞结构的影响和原生质球形成[J]. 水生生物学报, 1997, 21: 190—