

·成果简介·

钝顶螺旋藻 (*Spirulina platensis*) 原生质球制备和液泡分离

郭厚良^{*} 赵以军[†]

(* 武汉大学生命科学学院, 武汉, 430072; † 华中师范大学生命科学学院, 武汉, 430079)

[关键词] 钝顶螺旋藻, 原生质球, 液泡

自 Biggins 首次报道采用溶菌酶处理得到有活力的蓝藻原生质球^[1]以来, 虽然许多研究者先后作了不少工作^[2-4], 但作为可以用于生物工程操作的蓝藻原生质球技术至今尚未能建立。在蓝藻原生质球研究方面, 人们对钝顶螺旋藻给予了更多的注意, 国内外多位研究者进行了钝顶螺旋藻原生质球制备和再生研究^[4-6]。但笔者认为, 除彭国宏等^[6]的制备物中有部分真正的原生质球外, 其他人实际上都没有得到真正的原生质球。最近十多年来, 我们在蓝藻原生质球方面进行了持续不断地努力, 在原生质球制备、培养再生和融合方面都取得进展^[7-10], 但分离钝顶螺旋藻原生质球却是不成功的^[8]。为了进一步澄清这个问题, 我们重新作了钝顶螺旋藻原生质球制备试验, 结果表明, 细心地结合多种处理方法可以得到比较好的原生质球。另一方面, 蓝藻有无液泡 (Vacuole) 至今还是一个不明确的问题, 早期曾有过许多研究, 不少人认为蓝藻有液泡^[11,12], 但也有人认为蓝藻液泡可能只是一种人工假象^[13]。这方面的研究已中断近 30 年之久, 使蓝藻液泡成为一个悬案。近年来, 我们在蓝藻原生质球研究中发现了蓝藻液泡^[14], 并初步实现了液泡的分离^[15,16]。为此, 在制备钝顶螺旋藻原生质球的基础上又进行了钝顶螺旋藻液泡的分离, 但得到的结果与其他蓝藻大不相同。

1 材料和方法

1.1 材料及培养

所用藻种由中国科学院武汉植物研究所提供, 采用 Zarroke 液体培养基静止培养, 间或振荡, 培养

在恒温光照培养箱中进行, 24 h 连续光照, 培养温度 28°(±0.5°), 光照强度 2000lux。

1.2 原生质球制备

先按彭国宏等^[6]的方法配制 PH 7 的磷酸盐缓冲溶液, 然后用此溶液配制酶处理液。在酶处理前进行脱胶质处理, 分别采用 KH₂PO₄ 溶液浸洗、蒸馏水浸洗及 3000rpm 离心处理。渗透稳定剂分别使用 0.8 mol/L KCl、0.4 mol/L KCl 及多盐复合液。此多盐复合液为原八盐溶液^[7]的改进, 即将 NaCl、KNO₃ 和 (NH₄)₂SO₄ 三种盐溶入磷酸盐缓冲溶液, 三种盐的浓度均为 0.05 mol/L。和原八盐溶液相比较, 保留了原有的全部无机离子, 排除了有机离子, 效果不变或更好。青霉素预处理分别采用 500 μg/mL 和 1000 μg/mL 两种剂量, 于培养 4 d 时进行。超声处理采用超声清洗机, 以强档处理 1 min。溶菌酶浓度为 0.1% (W/V), 酶解温度 28℃。

1.3 液泡分离

合乎标准原生质球得到后, 将原生质球离心沉淀去上清液, 加入蒸馏水对原生质球作极端低渗处理, 低渗处理产物置于相差显微镜下观察检查, 确认液泡的有无及数量, 并使用 100 倍油镜拍摄最高放大倍数显微照片。

2 结果和讨论

2.1 胶质洗脱试验

由于钝顶螺旋藻在液体培养基中分散悬浮性良好, 一直未曾注意藻体是否有胶质, 经按彭国宏等的方法进行洗胶处理, 发现藻丝外确有胶质。如果不作洗胶处理, 酶解几乎完全看不到效果, 7 h 以上长

时间处理藻丝不发生任何改变。经洗胶之后,藻丝透明度提高,可分辨出细胞间隔,酶解就看出效果,数 hr 之后可看到藻丝解体断裂,洗胶的效果极为显著。钝顶螺旋藻的胶质层很薄,去胶十分容易,不仅用 KH_2PO_4 溶液或蒸馏水很容易洗脱,甚至只需将藻丝悬浮液经 3 000 rpm 离心 3 min,弃去上清液后即得到无胶的藻丝。蓝藻的胶质依不同种类差异极大,例如鱼腥藻 7120,完全不必作洗胶处理,而多变鱼腥藻则必用强力才可去胶。

2.2 超声处理试验

参考彭国宏等的机械处理方法,使用超声清洗机强档处理 1 分钟,藻丝断裂为大量单胞和短片段。和完整藻丝比较,经超声处理的材料酶解作用迅速,而完整藻丝酶解作用缓慢,差异极为显著。材料作超声处理就不必作预脱胶,经超声处理胶质就自行脱去。

2.3 渗透稳定剂试验

彭国宏等使用 0.8 mol/L KCl 作为制备钝顶螺旋藻原生质球的渗透稳定剂。高浓度 KCl 是否优于我们使用的低浓度多盐复合液,作了对比试验。一对定性对比结果表明,0.4 mol/L KCl 和 0.8 mol/L KCl 比较,低浓度多盐复合液和 0.4 mol/L KCl 比较,先出现原生质球,差异显著。大量原生质球试验都表明,较低的渗透压(稍高于细胞渗透压)有利于原生质球形成。

2.4 青霉素预处理试验

在各种剂量和时间的青霉素预处理试验中,青霉素预处理都能明显提高酶解效果,使细胞降解过程加速。但任何青霉素预处理都未能导致稳定原生质球的形成,原生质球形成的根本条件产生于对原生质球形成过程不厌其烦的长时间观察和反复试验。

2.5 原生质球形成观察

钝顶螺旋藻原生质球制备显然属于最为困难的原生质球制备之一。在最初所作的大量重复试验中,在最有利的条件下也只看到藻丝降解断裂,细胞破裂解体。虽然常可见到藻丝先端有个别原生质球形成[图 1(A)],但始终都看不到大量原生质球的形成。有时试验中可看到众多貌似球形的细胞,很像原生质球,但细心跟踪观察,便发现它们并非真正球形。在一定的方位,它们为球形,若细胞滚动方位改变,就不再是球形,而是矩形或方形,表明它们为游离单细胞。继续往下检查,便发现它们走向破裂解体,并不形成原生质球。尤其是经超声处理的材料,

酶解 2—3 h 便发现一大片这类细胞,貌似原生质球而非原生质球。多个研究者所报道的钝顶螺旋藻原生质球实际上并非原生质球,而是游离单细胞和短片段,和我们所看到的情形一样,这从他们提供的照片上看得非常清楚^[4,5]。迄今,所有的人均只提供低放大倍数显微照片,即使这样还是可看出上面的细胞并非真正球形。这样,我们所作的第一批试验没有获得所希望的结果。由于没有结果,我们便将酶处理中的材料置于冰箱保存,以留待次日继续试验观察。但到第二天,经冰箱保存一夜的材料意外地检查到众多原生质球出现,这一现象不断得到重复。开始,我们将冰箱中形成原生质球归因于低温条件下(4℃左右)长时间缓慢酶解。后来又注意到,在冰箱中长达 12h 保持静置可能也是另一个原因。为此,又重复进行温箱 28℃ 条件下绝对静置的酶解试验,结果表明原生质球也能形成。如果为了促进藻细胞与酶液的接触而不时振荡酶处理材料,细胞就会受振而破裂。这样,通过反复大量试验,终于找到了钝顶螺旋藻原生质球制备的关键条件。

制备钝顶螺旋藻原生质球需要几种处理方法相结合,其有利条件组合如下:将材料培养 4—5 d,经 500 μg/mL 青霉素预处理 12 h,再超声处理 1 min,转入 0.1% 溶菌酶的多盐溶液于 28℃ 温箱培养条件下作静止酶处理。4 h 后,约 80% 的细胞转化为原生质球,形成密集的原生质球群[图 1(B)]。原生质球为标准园球状,无论细胞方位如何改变都保持球形不变,而且低渗立即破裂,这无疑属于真正的原生质球。和其他所作过的多种蓝藻原生质球相比较,钝顶螺旋藻原生质球有两个不同的特点。第一,原生质球内部结构均一,无明显分化。其他蓝藻原生质球都产生内部分化,形成色素区和无色透明区(即液泡区),为液泡化原生质球。第二,钝顶螺旋藻可形成小型亚原生质球[图 1(C)]。此种亚原生质球可由原生质球出芽形成,也可由酶解中的细胞出芽形成。迄今,我们分离过原生质球的蓝藻共有十余种,但从未出现过亚原生质球,钝顶螺旋藻为一个例外。

原生质球获得使液泡分离成为可能,参照前面的方法^[16],对钝顶螺旋藻原生质球用蒸馏水作低渗处理,原生质球立即全部破裂。但十分意外的是,能得到的液泡很少,其频率在 1% 以下。除大型液泡外,我们也发现有些原生质球释放出成群的细小液泡,这种细小的液泡混在细胞残渣中而显示困难。液泡的大概外形和结构与其他蓝藻液泡无异,为极

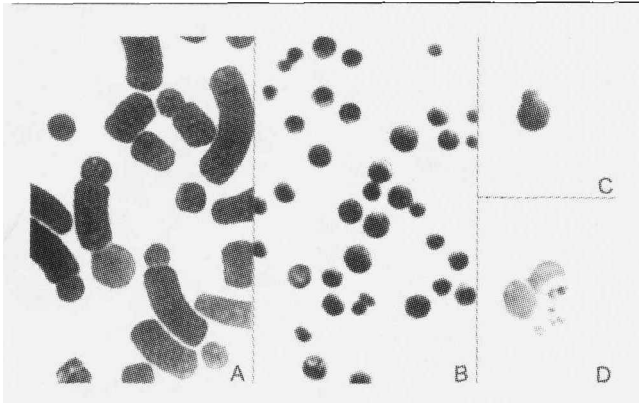


图1 钝顶螺旋藻原生质球和液泡

- (A)原生质球从藻丝片段先端首先形成, $\times 1000$;
 (B)酶处理4h后形成的游离原生质球, $\times 1000$;
 (C)原生质球出芽形成亚原生质球, $\times 1000$;
 (D)经低渗从破裂原生质球释放的液泡, $\times 1000$

为规则圆球状,完全透明,无任何色素物质[图1(D)],在普通光学显微镜下看不到,只能在相差显微镜下显示,这就与原生质球完全不同。和其他蓝藻液泡一样,钝顶螺旋藻液泡在蒸馏水中也能保持不破裂,可见也耐低渗。因此,虽然钝顶螺旋藻液泡的分离率很低,但液泡的性质与其他蓝藻液泡相同,而与植物和真菌液泡严格区别。植物和真菌液泡都极其脆弱,对低渗敏感^[17,18]。钝顶螺旋藻液泡的低得率与原生质球结构相关,其他各种蓝藻均形成液泡化原生质球,每个原生质球都释放液泡,而钝顶螺旋藻形成非液泡化原生质球,球体内一般无液泡分化,只有极个别原生质球显示液泡化,它们便是个别液泡的来源。钝顶螺旋的这一特性在蓝藻中有多大代表性,这种差异的生物学基础又是什么?这显然是有待研究的新问题。

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**:1 442—1 446.

- [2] Gabriel M. Preparation, growth and regeneration of incomplet cell wall in spheroplasts of the blue-green alga *Anacystis nidulans* in liquid media. *Z. Allg. Mikrobiol*, 1984, **24**:679—689.
- [3] Beliner M D, Neely-Fisher D, Rosen B H et al. Spheroplast induction in *Anabaena variabilis* Kütz and *A. azollae* stras. *Protoplasma*, 1987, **139**:36—40.
- [4] Lanfaloni L, Grifattini R, Petris A et al. Production and regeneration of spheroplasts from the cyanobacterium *Spirulina platensis*. *FEMS Microbiol Lett*, 1989, **59**:141—146.
- [5] Sethu K M P, Prabha T N, Venkataraman L V. Preparation of protoplasts from the cyanobacterium *Spirulina platensis* and a novel viability assay. *Letters in Applied Microbiology*, 1994, **18**:241—244.
- [6] 彭国宏,施定基,费修绶等.螺旋藻原生质球的分离及其光合作用特性的研究. *植物学报*, 1996, **38**:861—866.
- [7] 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.
- [8] 郭厚良,宋文贞,金传荫.五属七种蓝藻原生质球分离研究. *水生生物学报*, 1996, **20**:93—94.
- [9] 郭厚良,金传荫,宋文贞.丝状固氮蓝藻柱胞鱼腥藻原生质球的培养再生. *植物学报*, 1996, **38**:637—640.
- [10] 郭厚良,陈贤均,金传荫.PEG诱导的柱胞鱼腥藻(*Anabaena cylindrica*)原生质球融合. *武汉大学学报(自然科学版)*, 1996, **42**:459—462.
- [11] von Zastrow E M. Über die organisation der Cyanophy Ceenzelle. *Arch Microbiol*, 1953, **19**:174—205.
- [12] Desikachary T V. *Cyanophyta*, New Delhi:Indian Council of Agricultural Research, 1959, 8.
- [13] Carr N G, Whitton B A. *The Biology of Blue-green Algae*. London: Blackwell Scientific Publications, 1973, 142.
- [14] 郭厚良,黄开耀,易平等. KCl 诱导柱胞鱼腥藻形成液泡. *水生生物学报*, 1998, **22**:198—199.
- [15] 郭厚良,金传荫,浦秋文等.鱼腥藻 PCC7120 细胞液泡的初步研究. *水生生物学报*, 1999, **23**:363—367.
- [16] 郭厚良,易平,浦秋文等.鱼腥藻 sp. PCC 7120 液泡的诱导和分离. *武汉大学学报(自然科学版)*, 2000, **46**:246—248.
- [17] Wagner G J, Siegelman H W. Large-scale isolation of intact vacuoles and isolation of chloroplasts from protoplasts of mature plant tissues. *Science*, 1975, **190**:1 298—1 299.
- [18] Injge K J. The isolation and Properties of the yeast cell vacuole. *J Gen Microbiol*, 1968, **51**:441—446.

PREPARATION OF SPHEROPLASTS AND ISOLATION OF VACUOLES FROM THE CYANOBACTERIUM *SPIRULINA PLATENSIS*

Guo Houliang* Zhao Yijun†

(* College of Life Sciences, Wuhan University, Wuhan, 430072; †College of Life Sciences, Central China Normal University, Wuhan, 430079)

Key words *Spirulina platensis*, spheroplasts, vacuoles