

渗透稳定剂的互补效应及某些渗透稳定剂 对蓝藻细胞壁的降解作用*

¹ 陈贤均 ² 郭厚良

¹(咸宁医学院,湖北咸宁 437100)

²(武汉大学生命科学学院,武汉 430072)

摘 要

由多种盐组成的复合渗透稳定剂用于分离蓝藻原生质球的效力与单一盐溶液相比较,其作用多数显示加强,但对原生质球稳定性的影响随盐类组合而异。若干种盐类,如酒石酸铵、硫酸铵和硫酸镁,对蓝藻细胞壁表现一定的降解作用,以酒石酸铵作用最强,可用于分离原生质球。此种原生质球透明度较差,但对低渗敏感。

关键词 蓝藻;原生质球;渗透稳定剂

COMPLEMENTAL EFFECT OF OSMOTIC STABILIZERS AND THEIR ROLES IN DEGRADATION CELL WALLS OF BLUE-GREEN ALGAE

¹Chen Xian-jun and ²Guo Hou-liang

¹(Xianning Medical College, Hubei 437100)

²(College of Life Science, Wuhan University, Wuhan 430072)

Abstract

The compound osmotic stabilizers consisted of several salt solutions exerted a greater effect on the isolation of blue-green algae spheroplasts than a single salt solution. However, the effect of compound osmotic stabilizers on the spheroplast stability could be multiphasic. Some osmotic stabilizers, such as the solution of $(\text{NH}_4)_2\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6$, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ and MgSO_4 , exerted degradation on cell walls of the blue-green alga; among which the $(\text{NH}_4)_2\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6$ solution (0.15 mol/L) had the greatest degradation resulting in formation of spheroplasts.

收稿日期:1994-06-17 接受日期:1994-08-31

* 湖北省自然科学基金资助项目。

The spheroplasts were sensitive to hypotonic condition but were less transparent.

Key words Blue-green algae; Spheroplasts; Osmotic stabilizer

迄今, 还未发现任何一种生物细胞对渗透压保护溶液表现得像蓝藻那样敏感或不适应。Biggins 发现, 保存在甘露醇溶液中的蓝藻原生质球, 即使在冰箱 4 °C 条件下也只能稳定存在几个小时^[1]。随后, Vance 和 Ward^[2]发现, 在甘露醇溶液中 18~24 h, 蓝藻原生质球失活。以后, Grodzinski 和 Colman^[3]进一步发现, 在甘露醇溶液中, 蓝藻未处理细胞的光合活性大大下降。蓝藻原生质球和细胞对渗透压保护溶液的不适应在后来许多的研究^[4~6]中发现。也许正是这个问题, 使得 Gabriel^[7]所作的原生质球再生工作搁浅。此后, 国外就再未见到任何蓝藻原生质球培养的报道。我们发现, 蓝藻细胞在甘露醇及多种糖或盐的溶液中, 不仅不能生长, 还发生大量破裂^[8,9]。我们配制了一种由 8 种盐组成的复合剂取代甘露醇, 并将渗透压大幅度降低, 实现了原生质球的高产分离^[10,11]。本文报道渗透稳定剂的互补效应和几种盐对蓝藻细胞壁的降解作用。

1 材料和方法

本研究以浅黄席藻 [*Phormidium lucidum* (Kütz.) Gom.] 为材料。培养条件及方法同前文^[10], 原生质球分离采用青霉素-溶菌酶法^[10], 只是改变了渗透稳定剂的种类。由于反复试验, 甘露醇及多种糖类分离原生质球的效果均不佳, 故试验均以各种盐为对象。作了以下 3 组试验。

1.1 用 10 多种不同的盐类, 浓度均为 0.15 mol/L, 此浓度略高于蓝藻细胞液的渗透压。盐类组合为 6 种, 先将每种盐配制成 0.15 mol/L 的溶液, 然后各种盐溶液取等体积混合。由于蓝藻原生质球的形成对 pH 值不敏感^[11], 故各种溶液的 pH 值均未加测定和调整。在不同的渗透稳定剂条件下酶解 3 h 后, 用血球计数板统计原生质球形成率。

1.2 原生质球分离和统计后, 离心沉淀, 弃去含酶溶液, 再用同一溶液重新悬浮, 在培养条件下放置 24 h, 再次统计原生质球比例, 对照最初的原生质球比例计算原生质球破裂率。

1.3 酒石酸铵对蓝藻细胞壁的降解作用分别进行 3 项试验。第一, 青霉素-溶菌酶-酒石酸铵处理: 先按青霉素-溶菌酶法作原生质球分离处理, 酶解 2 h 后统计原生质球形成率, 然后将处理产物转入 0.15 mol/L 酒石酸铵溶液, 观察统计原生质球比率的变化, 连续进行 8 d。第二, 青霉素-酒石酸铵处理: 将材料经青霉素预处理后, 转入 0.15 mol/L 酒石酸铵溶液, 每天观察统计球形细胞比例, 连续 8 d。第三, 酒石酸铵处理: 将材料不经任何处理转入 0.15 mol/L 酒石酸铵溶液, 每天观察统计球形细胞的比例, 连续 8 d。以上各种试验重复均在 3 次以上。

2 结果和讨论

2.1 原生质球分离及稳定性

表 1 列出 6 组试验中的 3 组试验结果。从表 1 可以看出, 原生质球的分离率在多种盐

组合而成的复合液中较在单盐溶液中明显地高,显示互补效应。这一试验结果为我们前面的一项工作提供了解释,即我们配制的 8 种盐复合剂用于分离原生质球为什么会表现那么优良的效果(分离率 90% 以上)^[10]。8 种盐溶液组成复杂,所产生的互补效应也突出。由此看来,复合渗透稳定剂的概念是一个可供参考的有用的新概念。在培养试验中,多盐复合液较之单盐更能显示明显的生长优势。不过,应该说明,所谓互补效应也是相对的,互补作用依不同的组合而有差异,而且还可能发生反方向的互补。

表 1 不同盐类和盐类组合对蓝藻原生质球分离和稳定性的影响
Table 1 Effect of different individual and compound salts on isolation and stability of blue-green alga spheroplasts

盐类及盐类组合 Individual salt and salt combinations (all at 0.15 mol/L)	原生质球分离率 Percentage of spheroplasts (%)	原生质球 24 h 破裂率 Percentage of torn spheroplasts in 24 h (%)
(1)		
(NH ₄) ₂ SO ₄ + (NH ₄) ₂ C ₄ H ₄ O ₆	76.9	-14.0 ¹⁾
(NH ₄) ₂ SO ₂	77.4	-4.5
(NH ₄) ₂ C ₄ H ₄ O ₆	71.2	-14.3
平均 Average	74.3	-9.4
(2)		
CaCl ₂ + MgSO ₄	61.2	86.8
CaCl ₂	49.1	39.4
MgSO ₄	44.8	-10.4
平均 Average	47.0	14.5
(3)		
KH ₂ PO ₄ + NH ₄ NO ₃ + Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇ + NaNO ₃	74.6	46.6
KH ₂ PO ₄	63.8	29.1
NH ₄ NO ₃	60.8	100.0
Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇	60.4	63.1
NaNO ₃	58.1	100.0
平均 Average	60.8	73.0

1) 负值表示原生质球增加数大于破裂数。

1) The negative value represents the number of spheroplasts which is more multiplier than the break.

在对原生质球稳定性的影响方面,情况则有所不同。复合液可能提高原生质球的稳定性,也可能降低原生质球的稳定性,依不同的组合而异,这可能分属两种不同的情况。(1) 由于蓝藻细胞膜与壁紧贴,以致于在高渗溶液中不能发生质壁分离,膜受到壁的严格保护而比较脆弱。因此,去壁越充分,原生质球稳定性就可能越差。(2) 多盐复合液中的某些离子可能对膜有一定的保护作用,这就可以同时提高原生质球的稳定性。

试验表明,酒石酸铵、硫酸铵和硫酸镁对原生质球有保护作用。原生质球在这 3 种溶液中的破裂率为负值,说明原生质球数目在保存期间增加,而且增加数明显大于破裂数。我们设想,这 3 种盐溶液可使蓝藻细胞壁发生进一步的降解作用。

2.2 酒石酸铵对蓝藻细胞壁的降解作用

用青霉素-溶菌酶-酒石酸铵进一步试验(表 2)表明,席藻酶解 2 h 后,原生质球形成率为 63.4%,转入酒石酸铵溶液中后,原生质球比例逐渐提高,由于溶菌酶已经除去,此原生质球的增加只能归因于酒石酸铵的作用。

表 2 席藻原生质球比率在酒石酸铵溶液中的变化

Table 2 Change in percentage of spheroplasts of *Phormidium lucidum* preserved in $(\text{NH}_4)_2\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6$ solution

保存天数 Days for preserving	1	2	3	4	5	6	7	8
原生质球比率 Percentage of spheroplasts (%)	63.4	80.1	87.3	89.6	83.2	76.7	60.8	37.0

从表 3 可以看出, 席藻经青霉素预处理再转入酒石酸铵溶液后, 原生质球开始形成, 其比例逐日上升, 到第 6 天达最高比例。此种球体为规则球状, 但没有青霉素-溶菌酶原生质球那样大的透明度, 胞内结构不明显。毫无疑问, 这种球体的形成应归因于酒石酸铵。

表 3 青霉素-酒石酸铵处理席藻形成原生质球

Table 3 Spheroplasts of *Phormidium lucidum* formed from penicillin- $(\text{NH}_4)_2\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6$ treatment

在酒石酸铵中的时间 Time placed in $(\text{NH}_4)_2\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6$ solution	3 h	2 d	3 d	4 d	5 d	6 d	7 d	8 d
原生质球比率 Percentage of spheroplasts (%)	2.7	21.0	25.5	28.0	56.4	64.1	60.7	20.8

从表 4 可以看出, 在酒石酸铵溶液中形成比例很高的原生质球。这种球形细胞加蒸馏水稀释立即破裂, 但透明度较差, 不能显示胞内结构(图 1)。从细胞球形化和对低渗敏感这两点来判断, 此种球形细胞属于原生质球。与青霉素-溶菌酶原生质球比较, 这种原生质球的结构较差。表明此种原生质球细胞壁的降解不够, 难以用于细胞融合杂交。但由于细胞的完整性已受到破坏, 所产生的缺损可为外源基因或 DNA 片段的导入提供通道, 因此, 用于遗传工程的受体还是可行的。

表 4 酒石酸铵处理形成原生质球

Table 4 Spheroplasts formed in $(\text{NH}_4)_2\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6$ solution

在酒石酸铵中的时间 Time placed in $(\text{NH}_4)_2\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6$ solution	3 h	2 d	3 d	4 d	5 d	6 d	7 d	8 d
原生质球比率 Percentage of spheroplasts (%)	1.8	9.2	20.5	48.3	65.8	71.8	63.0	17.0

另外两种盐类, 即硫酸铵和硫酸镁也显示类似作用, 但效果较差。

此种原生质球的形成机理、原生质球的再生能力及用于遗传操作的前途有待进一步研究。

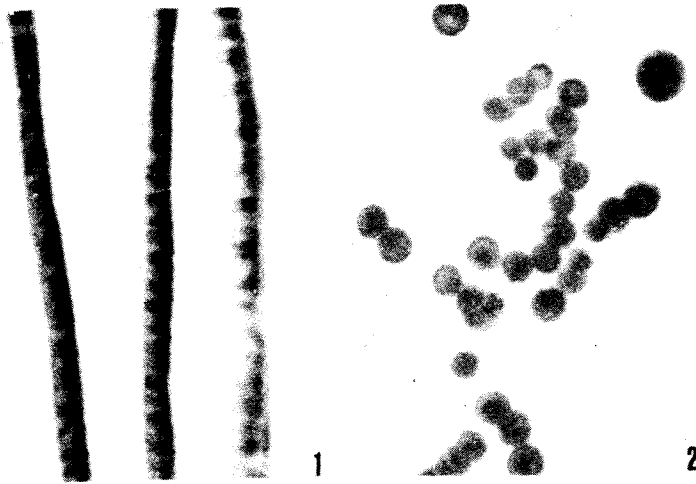


图 1 在酒石酸铵(0.15 mol/L)溶液中形成原生质球(第六天)。×2450
 1. 未处理藻丝 2. 原生质球
 Fig. 1 Spheroplast formed in 0.15 mol/L of $(\text{NH}_4)_2\text{C}_2\text{O}_4$ solution (6 th day). ×2450
 1. Untreated trichome 2. Spheroplasts

参 考 文 献

- 1 Biggins J. Preparation of metabolically active protoplasts from the blue-green alga. *Phormidium lucidum*. *Plant Physiology*. 1967. **42**:1442~1446
- 2 Vance B D. Ward H B. Preparation of metabolically active protoplasts of blue-green algae. *J Phycol.* 1969. **5**:1~3
- 3 Grodzinski B. Colman B. Loss of photosynthetic activity in two blue-green algae as a result of osmotic stress. *J Bacteriol.* 1973. **115**:456~458
- 4 Semenova L R. Mineeva L A. Gusev M B. The effect of osmotic stabilizing agents on the formation of spheroplasts in Cyanobacteria and their photosynthetic activity. *Mikrobiologiya*. 1982. **51**:259~266
- 5 Zenvirth D. Kaplan A. Photosynthesis and inorganic uptake by spheroplasts isolated from the Cyanobacterium *Anabaena variabilis*. *J Gen Microbiol.* 1984. **130**:1995~1997
- 6 Delaney S F. Spheroplasts of *Synechococcus* PCC 6031. *J Gen Microbiol.* 1984. **130**:2771~2773
- 7 Gabriel M. Formation, growth and regeneration of incomplet cell wall in liquid media. *Z Allg Mikrobiol.* 1984. **24**:679~689
- 8 郭厚良. 甘露醇对蓝藻细胞的作用. 武汉植物学研究. 1988. **8**:37~41
- 9 郭厚良, 于登洲. 渗透稳定剂对蓝藻细胞的作用. 武汉大学学报(自然科学版). 1991. (2):121~124
- 10 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
- 11 郭厚良, 蔡坤, 于登洲. 分离蓝藻原生质球主要影响因子的研究. 武汉大学学报(自然科学版). 1990. 91~94