

鱼腥藻 7120 质膜、类囊体膜和细胞壁 的分离及特性分析*

杨 劭 王业勤 黎尚豪

(中国科学院水生生物研究所, 武汉 430072)

提要 于1987—1989年对鱼腥藻 7120 质膜、类囊体膜和细胞壁进行分离纯化和基本的色素与蛋白质特性分析。采用机械性方法破碎细胞, 以非连续蔗糖密度梯度离心分离纯化鱼腥藻 7120 营养细胞的质膜和类囊体膜, 以 Triton X-100 处理方法获得细胞壁。色谱分析和电泳结果表明, 其质膜、类囊体膜的色素和蛋白质特性与单细胞蓝藻相类似; Triton 不溶细胞壁未发现可见光谱吸收, 其两条主要蛋白带 52KD 和 14KD 均为糖蛋白, 并且 14KD 蛋白为肽聚糖层连接蛋白, 细胞壁蛋白质全部对胰蛋白酶处理敏感, 其上未发现“热修饰”蛋白。

关键词 鱼腥藻 7120 质膜 类囊体膜 细胞壁 分离

蓝藻细胞的细胞壁、质膜和类囊体膜执行着细胞的许多重要生理功能。类囊体膜由于量大易获而且与蓝藻的光合放氧功能有关, 因而得到较多的研究; 对膜结构与功能的深入研究依赖于对膜的分离纯化, 质膜和细胞壁的分离纯化近年才得以在单细胞蓝藻中成功进行 (Omata et al., 1983; 1984; Jürgens et al., 1985)。丝状蓝藻质膜、细胞壁的有效分离纯化尚未见报道, 而其中鱼腥藻等种类的固氮能力使其膜系统的深入研究更具有独特意义。本文报告鱼腥藻 7120 营养细胞的质膜、类囊体膜和细胞壁的分离纯化和特性分析的结果, 以期作为其膜系统结构与功能深入研究的基础。

1 材料和方法

1.1 藻种与培养 鱼腥藻 7120 (*Anabaena* 7120) 于1982年得自中国科学院水生生物研究所淡水藻种库, 以 BG-11 为培养基 (Stanier et al., 1971), 在 28°C 下光照 (3 000lx), 静置培养。

1.2 质膜、类囊体膜的分离 收集对数后期生长的藻细胞 (湿体积约 3 ml), 用缓冲液 A (10 mmol/L HEPES-NaOH, pH = 7.5, 2 mmol/L EDTA) 洗涤 2 次, 悬浮于 30 ml 缓冲液 B (10 mmol/L HEPES-NaOH, pH = 7.5, 2 mmol/L EDTA, 20% 蔗糖) 中。加入溶菌酶 15mg, 于 37°C 下保温 1h 后离心收集细胞。用缓冲液 A 洗涤 2 次, 再悬浮于少量缓冲液 B 中, 加入 2 倍体积的玻璃砂 (80—100 目), 置于 4°C 摇床上强烈振荡 1h; 过滤除去玻璃砂, 滤液中加入 PMSF 至 1mmol/L, DNaseI 至 0.001%。低速离心除去未破细

* 国家自然科学基金资助, 3850042 号。

收稿日期: 1991年4月3日, 接受日期: 1994年3月18日。

胞和大碎片,得到无细胞破碎液,加入 0.75 体积的 90% (W/V) 的梯度液使之达到 50% (W/V) 蔗糖浓度。按图 1 制作梯度,梯度液均以缓冲液 A 配制。130 000 × g 离心 16h

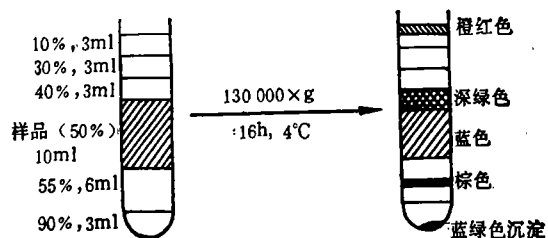


图 1 鱼腥藻 7120 质膜、类囊体膜的密度梯度离心分离

Fig. 1 Isolation of cytoplasmic and thylakoid membranes of *Anabaena* 7120 with discontinuous sucrose density gradient centrifugation

(Beckman L8-70 型离心机, 4°C)。各分离带加 3 倍缓冲液 A 稀释, 180 000 × g 离心 1h (4°C), 沉淀用缓冲液 A 洗涤 1 次后再溶于少量缓冲液 A 中, 保存于 -40°C。

1.3 Triton 不溶细胞壁的制备

参照 Jürgens 等 (1985) 的方法。用 2% Triton X-100 处理无细胞破碎液 3 次, 再用缓冲液 A 洗涤 2 次, 即得棕色细胞壁。

1.4 膜组份的扫描光谱测定 常

温下用岛津 UV-3000 型分光光度计测 300—800nm 扫描光谱。

1.5 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 按 Laemmli (1970) 的方法。分离胶梯度为 7.5%—15%, 膜样品溶于样品缓冲液, 于 100°C 加热 5min, 离心去沉淀, 上清液上样电泳。

1.6 蛋白质分析 肽聚糖层连结蛋白质的分析, 见 Jürgens 等 (1985) 的方法。糖蛋白的分析, 按上述方法进行 SDS-PAGE, 以过碘酸-希夫试剂染色 (Segrest et al., 1972)。细胞壁的胰蛋白酶处理, 见 Bachhawat 等 (1987) 的方法。蛋白质含量测定, 见 Lowry 等 (1951)。

2 结果与讨论

2.1 质膜、类囊体膜的分离纯化结果 对 Omata 等 (1984) 的方法作修改后, 将样品铺在 55% 和 90% (W/V) 蔗糖梯度液上, 其上再铺以 40%, 30%, 10% (W/V) 的梯度液, 经离心 (130 000 × g, 16h) 达到平衡后, 离心管中形成 3 条明显的色带: 10% 梯度液中的橙红色带, 50% 梯度处的深绿色带和 55% 梯度处的棕色带 (见图 1)。

橙红色带与单细胞蓝藻质膜颜色相同, 比重相近 (Omata et al., 1984)。此带经稀释后离心能全部沉淀, 并含有高浓度蛋白质, 表明此带不是类胡萝卜素形成的色素带。此带的光谱和 SDS-PAGE 分析结果表现出与单细胞蓝藻质膜有相似特征 (见下文) 而与类囊体膜、细胞壁有明显区别, 并且也未发现类囊体膜和细胞壁的交叉污染峰 (带), 可知此带为鱼腥藻 7120 营养细胞的质膜带。

深绿色带的颜色、比重、扫描光谱及 SDS-PAGE 图谱均与单细胞蓝藻类囊体膜相同 (Omata et al., 1984)。经超薄切片电镜观察 (图谱未附), 亦证明其为类囊体膜。

棕色带的颜色、比重虽与单细胞蓝藻细胞壁相似 (Omata et al., 1984), 但其光谱及 SDS-PAGE 图谱均表明有类囊体膜成份存在。

用 2% Triton X-100 分别处理上述 3 种组份并离心, 只有棕色带出现沉淀, 说明其中还含有细胞壁成份, 此带再经差速区带离心也可获得纯细胞壁。而质膜和类囊体膜则无细胞壁污染。

与 Omata 等(1984)的结果不同,在此分离过程中,经试验各种梯度均未能一次获得纯细胞壁;但将其梯度中的 45% 级份改为 40% 则可提高质膜和类囊体膜之间的分离效果。若将样品铺在整个介质梯度上进行差速区带离心,则试用各种连续或非连续梯度都未能获得质膜带,质膜在离心管中均匀弥散。

细胞的破碎方法对分离结果产生重要影响。在膜的分离过程中,文献中多以 French pressure cell 破碎的方法。经我们比较,玻璃砂破碎法与其效果是相同的。但以超声波破碎将难以得到质膜带。另外, Mg^{2+} 的消除是必要的,否则将加速各种膜凝集。

2.2 Triton 不溶细胞壁的制备结果 革兰氏阴性菌质膜和细胞壁外膜对去污剂的抗性是不同的 (Fillip et al., 1973)。由于蓝藻与革兰氏阴性菌细胞壁结构的相似性,在 Mg^{2+} 存在的条件下,质膜和类囊体膜都溶于 2% Triton X-100 而细胞壁不溶,我们用此法获得了鱼腥藻 7120 营养细胞的细胞壁。与革兰氏阴性菌不同的是,在同样的条件下,鱼腥藻 7120 营养细胞的细胞壁可溶于 0.5% Sarkosyl,说明二者细胞壁结构是有差异的。

2.3 质膜、类囊体膜和 Triton 不溶细胞壁的扫描光谱 鱼腥藻 7120 营养细胞的质膜在 455, 482 和 519nm 处有类胡萝卜素的吸收(图 2a)。Omata 等(1983, 1984)曾报道两种单细胞蓝藻 *Anacystis nidulans* 和 *Synechocystis* PCC 6714 质膜的扫描光谱,其吸收波长分别为 390, 435, 455, 487, 673nm 和 455, 480, 515, 672nm。与之比较,鱼腥藻 7120 质膜的类胡萝卜素组成与后者较为接近。三者的相似之处在于都具有 455nm 和 673(672) nm 处的吸收。673nm 峰总是稳定地伴随质膜出现而不出现于其它膜级份中,因此也可能是质膜的某种固有色素。

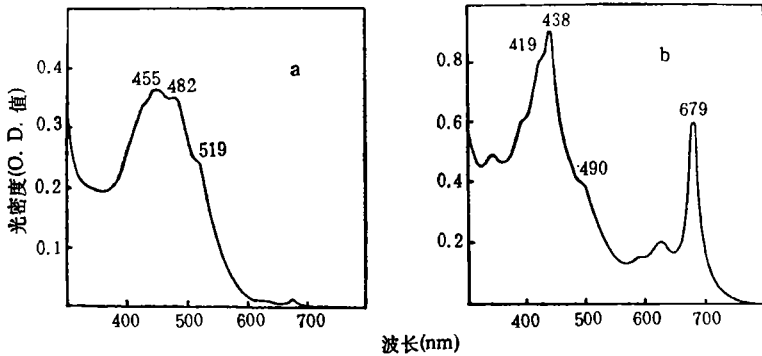


图 2 鱼腥藻 7120 质膜(a)、类囊体膜(b)的扫描光谱

Fig. 2 Absorption spectra of cytoplasmic (a) and thylakoid membrane (b) fractions of *Anabaena* 7120

制备的类囊体膜在 419, 438 和 679nm 处有 Chl.a 的吸收,在 490nm 处有类胡萝卜素的吸收(图 2b)。与单细胞蓝藻类囊体膜的吸收光谱未发现差异 (Omata et al., 1984)。

鱼腥藻 7120 的 Triton 不溶细胞壁在 400—800nm 之间未测得光谱吸收。但 Jürgens 等(1985)证明单细胞蓝藻 *Synechocystis* PCC 6714 细胞壁外膜含有数种类胡萝卜素而且 Triton X-100 的处理能改变某些色素和脂肪酸成份的含量。据此推测,可能是 Triton

的多次处理破坏或释放了鱼腥藻 7120 细胞壁外膜色素的缘故。

2.4 质膜、类囊体膜和 Triton 不溶细胞壁的蛋白质特性分析结果 鱼腥藻 7120 质膜的 SDS-PAGE 图谱有 30 多条可分辨的蛋白带, 其中 48, 55 和 104KD 蛋白带染色较深(图版 I:1)。而单细胞蓝藻 *Anacystis nidulans* 和 *Synechocystis* PCC 6714 的主要蛋白带分别为 45KD (Omata et al., 1983) 和 23, 104KD (Omata et al., 1984)。由此可见, 质膜的蛋白质组成在不同种蓝藻中有着明显区别。

制备的类囊体膜的 SDS-PAGE 图谱显示 40 多条蛋白带, 其中 54KD 染色较深(图版 I:2)。此图谱特征与单细胞蓝藻类囊体膜 (Omata et al., 1984) 十分接近。不同蓝藻类囊体膜蛋白和色素组成的相似性, 也许与类囊体膜在细胞内所执行功能的一致性有关。

制备的 Triton 不溶细胞壁的 SDS-PAGE 图谱显示 40 多条蛋白带, 其中 52KD 和 14KD 为主要蛋白带(图版 I:3); 并且都是糖蛋白(图版 I:4)。单细胞蓝藻 *Anacystis nidulans* R-2 细胞壁主要蛋白带为 50KD 和 52KD, 前者为糖蛋白 (Resch et al., 1983)。对于 *Synechocystis* PCC 6714 的主要蛋白带, Omata 等 (1984) 认为是 76KD 和 69KD, 而 Jürgens 等 (1985) 则认为是 67KD 和 61KD, 并且都是肽糖层连结蛋白。

鱼腥藻 7120 细胞壁蛋白全部对胰蛋白酶处理敏感, 电泳图谱中 43KD 处和 10KD 以下的蛋白带为细胞壁蛋白降解后的短肽片断(图版 I:9), 说明细胞壁蛋白都有暴露于胞外的位点。但单细胞蓝藻 *Anacystis nidulans* R-2 细胞壁蛋白对蛋白酶处理不敏感 (Resch et al., 1983)。

鱼腥藻 7120 细胞壁的 52KD 蛋白在低温下 (40℃) 不溶(图版 I:5) 而只在高温下 (100℃) 才溶解于电泳样品缓冲液(图版 I:4)。这种现象与 *Synechocystis* PCC 6714 的两条主要蛋白带相似 (Omata et al., 1984)。而当在碱性条件下 (pH = 8.0), 用 2% SDS 和 0.01% 巯基乙醇处理时, 细胞壁蛋白中只有 14KD 具有一定抗性(图版 I:6—8), 因此 14KD 为肽糖层连结蛋白; 但由于 70℃ 下此带已几乎被完全洗脱, 与 *Synechocystis* PCC 6714 比较 (Jürgens et al., 1985), 这种非共价键的连结要松散得多。

细胞壁样品在低温下 (40℃) (图版 I:5) 和高温下 (100℃) (图版 I:4) 处理后电泳, 除 52KD 在低温下未被溶解外, 图谱中未出现蛋白带位置变化的现象, 因此其上不存在“热修饰”蛋白。然而这种蛋白质广泛存在于革兰氏阴性菌的细胞壁中并在一定程度上起着稳定外膜的作用 (Zikaido et al., 1985)。

参 考 文 献

- Bachhawat, A. and Ghosh, S. 1987, Isolation and characterization of the outer membrane proteins of *Azospirillum brasilense*, *J. Gen. Microbiol.*, **133**: 1751—1758.
- Phillip, C.P. et al., 1973, Solubilization of the cytoplasmic membrane of *E. coli* by ionic detergent sodium-lauryl sarcosinate, *J. Bact.*, **115**:717—722.
- Jürgens, U.J. et al., 1985, Characterization of the cell wall of the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6714, *Arch. Microbiol.*, **142**:168—174.
- Laemmli, U.K., 1970, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature*, **227**:680—685.
- Lowry, O.H. et al., 1951, Protein measurement with the Follin phenol reagent, *J. Biol. Chem.*, **193**: 265—275.
- Omata, T. and Murata, N., 1983, Isolation and characterization of the cytoplasmic membranes from blue-green alga (cyanobacterium) *Anacystis nidulans*, *Plant and Cell Physiol.*, **24**:1101—1112.

- Omata, T. and Murata, N., 1984, Isolation and characterization of the three membranes from the cyanobacterium (blue-green alga) *Synechocystis* PCC 6714, *Arch. Microbiol.*, **139**: 113—116.
- Resch, C.M. and Gibson, J., 1983, Isolation of the carotenoid-containing cell wall of three unicellular cyanobacteria, *J. Bact.*, **155**: 345—350.
- Segrest, J.P. and Jackson, R.L., 1972, Molecular weight determination of glycoprotein by polyacrylamid gel electrophoresis in sodium dodecyl sulfate, *Methods in Enzymol.*, **28**:56.
- Stanier, R.Y. et al., 1971, Purification and properties of unicellular blue-green algae (Order Chroococcales), *Bacteriol. Rev.*, **35**: 171—205.
- Zikaido, H. and Varra, M., 1985, Molecular basis of bacterial outer membrane permeability, *Microbiol. Rev.*, **49**:1—32.

ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF THE CYTOPLASMIC, THYLAKOID MEMBRANES AND CELL WALLS OF *ANABAENA* 7120

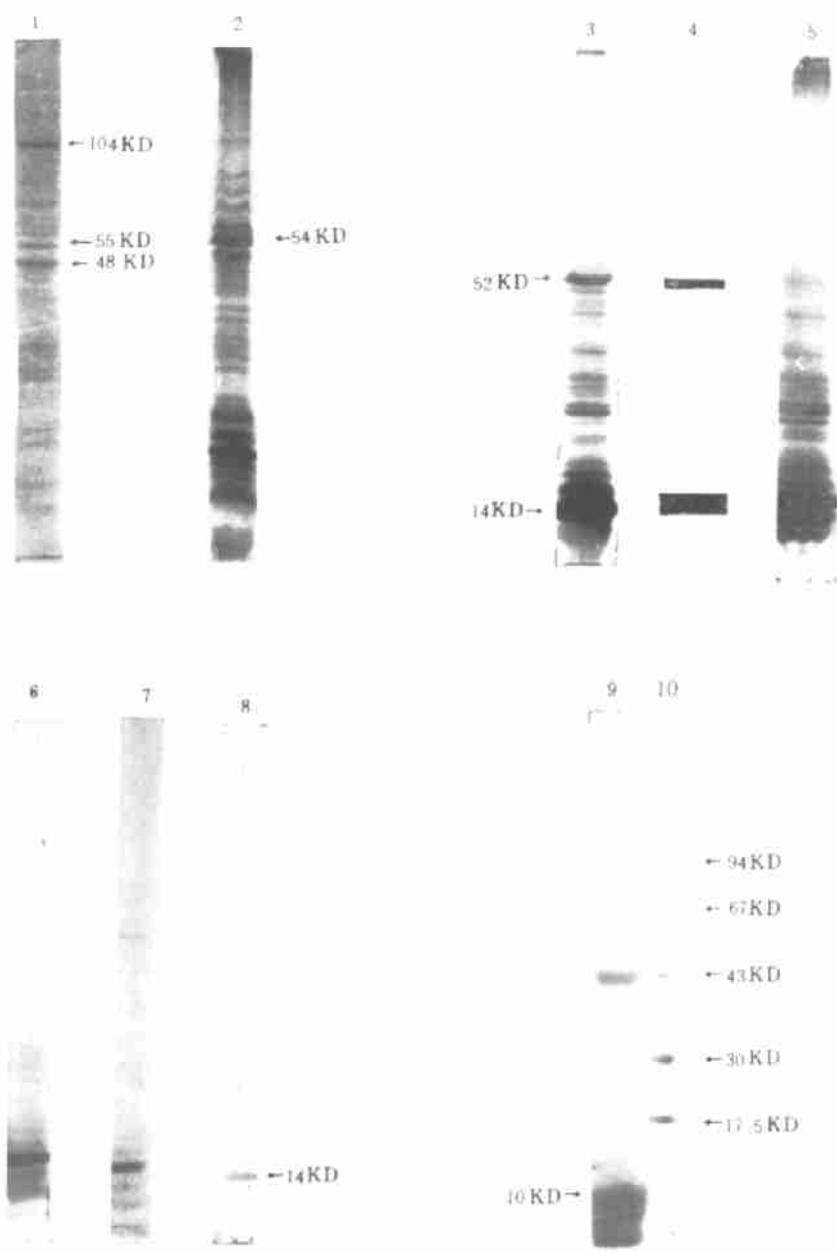
Yang Shao, Wang Yeqin, Li Shanghao

(*Institute of Hydrobiology, Academia Sinica, Wuhan 430072*)

ABSTRACT

Isolation of the cytoplasmic and thylakoid membranes, and cell walls of *Anabaena* 7120 and analysis of the features of their pigments and proteins were studied during 1987—1989. The cytoplasmic and thylakoid membranes of *Anabaena* 7120 were isolated by mechanical disruption of the vegetative cells followed by discontinuous sucrose density gradient centrifugation. The cell walls of *Anabaena* 7120 were obtained by the Triton X-100 treatment method. The features of pigments and proteins of cytoplasmic and thylakoid membranes of *Anabaena* 7120 were similar to those of unicellular blue-green algae. The Triton-insoluble cell wall of *Anabaena* 7120 had no spectral absorption in visible light. Its SDS-PAGE map showed two major polypeptide bands with apparent MW. of 52KD and 14KD and both of them were glycoproteins. 14KD was peptidoglycan-associated protein. Almost all of the cell wall proteins were sensitive to trypsin treatment. The “heat-modifiable protein” was not found in the cell walls of *Anabaena* 7120.

Key words *Anabaena* 7120 Cytoplasmic membrane Thylakoid membrane
Cell wall Isolation



图版 I 鱼腥藻 7120 质膜、类囊体膜和细胞壁蛋白质的电泳分析

Plate I Analysis of proteins of cytoplasmic, thylakoid membranes and cell walls of *Anabaena* 7120 by electrophoresis

1.质膜。2.类囊体膜。3.Triton 不溶细胞壁。4.细胞壁的糖蛋白染色。5.细胞壁在 40℃ 下用电泳样品缓冲液处理 60min。6—8. 肽糖层连接蛋白质的分析, 处理方式分别为: 6.30℃, 30min; 7.50℃, 30min; 8.70℃, 15min, 9. 细胞壁的胰蛋白酶处理。10.电泳标记。