

用改进的超声波溶菌酶法制备钝顶螺旋藻原生质球

银红梅, 张学成, 王志刚

(中国海洋大学 生命科学与技术学部, 山东 青岛 266003)

摘要:用改进的超声波-溶菌酶法制备钝顶螺旋藻原生质球。钝顶螺旋藻(*Spirulina platensis*)经超声波破碎后,用 1.5 mol/L NaCl 的 Zarrouk 培养基洗去细胞外壁的胶质鞘,然后进行酶解。酶解条件为: pH7.2 的 0.2 mol/L 磷酸钾缓冲液, 0.8 mol/L KCl, 0.5% 溶菌酶, 28~30℃ 水浴震荡酶解 5~7 h, 获得 40% 以上有活力的钝顶螺旋藻原生质球。

关键词: 钝顶螺旋藻(*Spirulina platensis*); 原生质球; 超声波; 溶菌酶

中图分类号: Q28

文献标识码: A

文章编号: 1000-3096(2007)02-0044-04

钝顶螺旋藻(*Spirulina platensis*)又名钝顶节旋藻(*Arthrospira platensis*)属蓝藻门,颤藻科,是一种具有重要应用价值的蓝藻^[1],并已经得到了开发应用^[2]。原生质球是生理研究和遗传育种的良好材料^[3],其制备在螺旋藻基因工程中是不可缺少的实验手段。螺旋藻细胞外被有内壁、外壁和胶质鞘多层结构,其中内层的肽聚糖是溶菌酶作用的对象,而外壁含有的脂蛋白和脂多糖以及胶质鞘,是溶菌酶不能起作用的结构^[4,5],因此,在制备螺旋藻的原生质球时常常用改进了的酶法。

周金鑫等^[6]用 NaCl 等处理螺旋藻后转入酶解液中得到原生质球并再生成功,但未报道球形体得率。彭国宏等^[7]采用机械法和酸性缓冲液去鞘,在混合酶液中获得原生质球。秦松等^[8]用超声波制得螺旋藻单细胞和部分原生质球。郭厚良等^[9]将螺旋藻经青霉素和超声处理后作静止酶处理得到了原生质球。上述方法,或是未报道得率,或是操作方法较为繁琐,延时较长。作者对制备钝顶螺旋藻原生质球的方法进行了改进,将超声波法、离子法和酶法相结合,经溶菌酶酶解后,得到大量有活性的原生质球,为螺旋藻遗传转化体系的建立和其他相关研究奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

藻种为本实验室纯培养的钝顶螺旋藻(*Spirulina platensis*) FACHB341,培养基为 Zarrouk^[11],培养条件:温度为 25℃±1℃,光照强度为 2 000~2 500 lx,光暗周期 12 h:12 h。

1.2 方法

1.2.1 螺旋藻胶质鞘的去除

取对数期($A_{360} = 0.6 \sim 0.8$)的钝顶螺旋藻 FACHB341 培养液,置于离心管中进行超声波处理,能量为 3~5 W,超声处理 1.0 s,间歇 0.5 s,处理 2 min,3 000 r/min 离心 10 min,收集沉淀,置于含 1.5 mol/L NaCl 的 Zarrouk 培养基中洗涤 5 min,3 000 r/min 离心 10 min,收集沉淀,用无菌 Zarrouk 培养基洗涤 2~3 遍,3 000 r/min 离心 10 min,收集沉淀。

1.2.2 酶解

沉淀转入酶解液中。酶液组成为:0.2 mol/L 磷酸钾缓冲液 pH7.2,渗透稳定剂 KCl 0.8 mol/L,0.5% 溶菌酶。在 28~30℃ 水浴低速震荡下酶解 5~7 h,低渗爆破法检测原生质球,显微镜下计数细胞总数,经伊文思蓝染色液活体染色每隔 1.5 h 计数原生质球数目,得出活体原生质球得率。

2 结果和讨论

根据以上实验方法,用超声波处理后,再用较高浓度的盐洗掉螺旋藻表面的胶质鞘,可获得大量细胞数目小于 10 的螺旋藻小片段和部分单细胞(图 1a),然后转入酶解缓冲液中,经过 6 h,即可获得数量较多、有活力的原生质球(图 1b),随着酶解时间的延长,到 7.5 h 部分原生质球开始变黄死亡(图 1c)。

收稿日期:2004-11-30;修回日期:2005-06-10

作者简介:银红梅(1989),女,内蒙古呼和浩特人,硕士研究生,研究方向:藻类分子生物学, E-mail: qdyhm@163.com;张学成,通讯作者,电话:0532-82032789, E-mail: xczhang@ouc.edu.cn

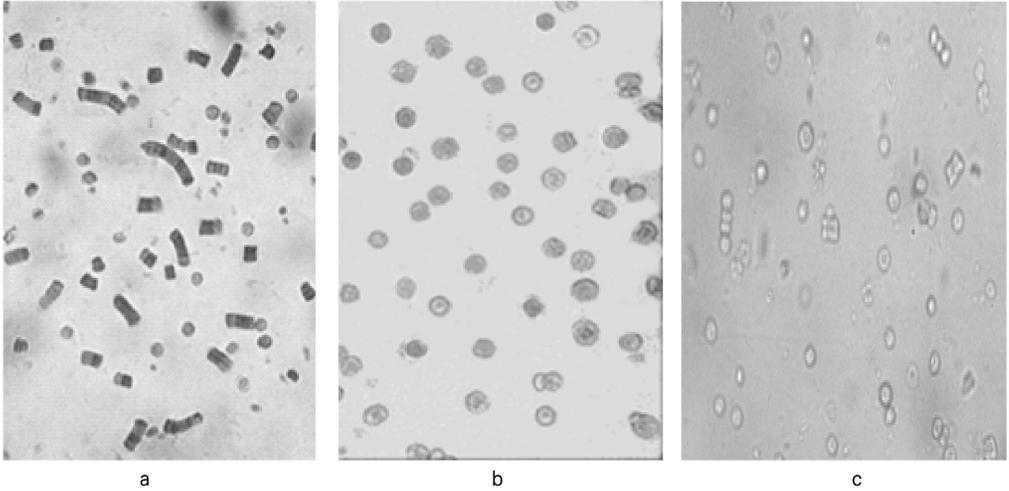


图 1 不同酶解时间螺旋藻原生质球的情况

Fig. 1 Spheroplasts of *Spirulina platensis* under different times of enzymatic treatment

- a. 经超声波和 NaCl 处理后螺旋藻片段; b. 酶解 6h 后出现大量原生质球; c. 酶解 7.5 h 出现死亡细胞
 a. Fragments of *Spirulina* disposed by ultrasonic and NaCl; b. Lots of spheroplasts appeared after being digested by lysozyme for 6 hours; c. The dead cells appeared after being digested by lysozyme for 7.5 hours

2.1 不同去鞘方法对钝顶螺旋藻 FACHB341 原生质球得率的影响

在酶解前经超声波打断藻丝,再用高浓度盐洗掉细胞壁外的胶质鞘后酶解,溶菌酶可以很有效地作用于螺旋藻细胞壁,原生质球得率为 42.5%;而不经过高浓度盐的处理,溶菌酶就很难发挥作用,酶解 4.5 h 原生质球得率仅为 20%,之后得率逐渐下降(图 2)。这表明,超声波并不能有效地去除细胞外壁的胶质鞘,而经高浓度盐洗脱,胶质鞘会逐渐脱去,暴露出胞壁。

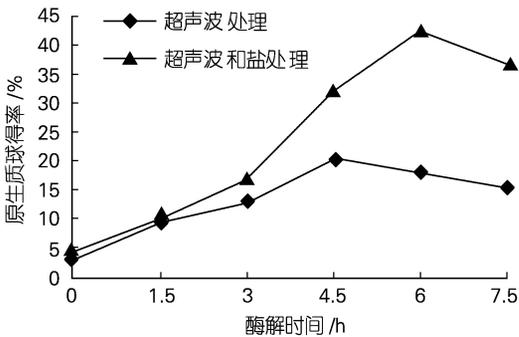


图 2 两种去鞘方法的比较

Fig. 2 Comparison of two methods of removing sheaths

2.2 不同渗透稳定剂对钝顶螺旋藻 FACHB341 原生质球得率的影响

其它酶解条件不变,改变酶解液的渗透稳定剂。4 种不同的渗透稳定剂分别为: 0.8 mol/L KCl, 0.8 mol/L 甘露醇, 0.8 mol/L 山梨醇, 复合渗透稳定剂各 0.05 mol/L 的 NaCl, KNO₃, (NH₄)₂SO₄。4 种渗透稳定剂分别溶于含 0.5% 溶菌酶的 0.2 mol/L 磷酸钾缓冲液中。

如图 3 所示,以甘露醇和山梨醇为渗透稳定剂的酶解缓冲液中,原生质球得率在 1.5 h 内没有变化,1.5 h 后细胞便开始死亡;在多盐复合渗透稳定剂的酶解液中,原生质球数目在 4.5 h 内成直线上升趋势,得率达到 27% 之后,原生质球数目便开始下降,原生质球逐渐变黄,趋向死亡;而以 KCl 作渗透稳定剂,螺旋藻原生质球在 6 h 都具有较高的活性,得率可达到 40% 以上,可见作为酶解液的渗透稳定剂 0.8 mol/L KCl 明显优于其他 3 种。

海藻细胞分离可用甘露醇、山梨醇、KCl、NaCl 等作渗透稳定剂^[10,11]。甘露醇、KCl 及多盐复合渗透稳定剂均曾应用于螺旋藻原生质球的制备。甘露醇引起细胞的死亡,可能是甘露醇对蓝藻细胞的毒害作用^[12],山梨醇作为有机渗透稳定剂引起螺旋藻细胞死亡的原因可能是与甘露醇相似。郭厚良等使用多盐复合渗透稳定剂^[8,13]制备螺旋藻原生质球效果较好,而对于螺旋藻 FACHB341 多盐复合渗透稳定剂

的渗透压偏低,造成原生质球后期死亡,这可能是品系之间的差异。因此,本实验仍然采用彭国宏等使用的 0.8 mol/L KCl 作为分离钝顶螺旋藻 FACHB341 原生质球的渗透稳定剂。

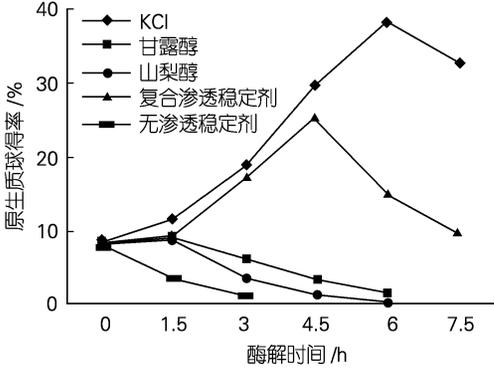


图 3 不同渗透稳定剂对原生质球得率的影响

Fig. 3 Effects of different osmosis stabilizers on the rate of spheroplasts

2.3 磷酸钾缓冲液的 pH 值对钝顶螺旋藻 FACHB341 原生质球得率的影响

在其他条件不变的前提下,改变磷酸钾缓冲液的 pH 值, pH 梯度设置为 6.0, 6.4, 6.8, 7.2, 7.6, 8.0。结果如图 4,当 pH 值为 7.2 时,原生质球得率在 6 h 可以达到 51.5%,明显优于其它 pH 值的得率。

彭国宏^[6]曾采用 pH8.0 的磷酸缓冲液获得钝顶螺旋藻原生质球,而在本实验中,发现原生质球在 pH7.2 的磷酸钾缓冲液中得率较高(图 4)。钝顶螺旋藻生活在高碱环境中(pH 8.5~10.5),pH 值较低不利于藻细胞的存活,pH 值较高又不利于溶菌酶的作用(溶菌酶的最适作用 pH=6~7),因此,作者选择 pH7.2 为缓冲液最佳 pH 值。

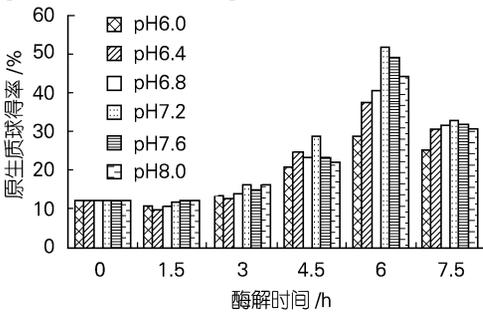


图 4 缓冲液 pH 值对原生质球得率的影响

Fig. 4 Effects of buffer's pH on the rate of spheroplasts

2.4 溶菌酶浓度对钝顶螺旋藻 FACHB341 原生质球得率的影响

设置溶菌酶浓度梯度为 0, 0.25%, 0.5%, 0.75%, 1.0%, 1.25%。结果如图 5,溶菌酶浓度为 0.5% 能获得最高得率的螺旋藻原生质球,低于此浓度不能有效地去壁,当溶菌酶浓度在 1.0% 以上时,原生质球在 6 h 后就开始部分死亡,到 7.5 h,原生质球和单细胞逐渐变黄死亡。因此,作者在原生质球的分离上采用浓度为 0.5% 的溶菌酶。

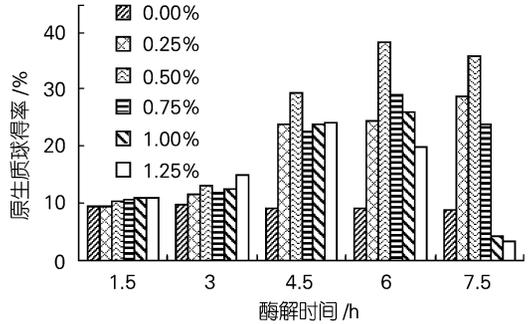


图 5 溶菌酶浓度对原生质球得率的影响

Fig. 5 Effects of lysozyme concentrations on the rate of spheroplasts

2.5 溶菌酶和果胶酶及单独溶菌酶对钝顶螺旋藻原生质球 FACHB341 得率的影响

分别使用 0.5% 溶菌酶和 0.5% 溶菌酶与 0.1% 果胶酶(Y-23)的组合酶酶解已去鞘的螺旋藻细胞。结果如图 6,果胶酶的加入并没有有效地提高原生质球得率。果胶酶的加入是为了去胶质鞘,而在酶解前,已用高盐溶液洗掉了大部分胶质鞘;更为重要的是,果胶酶的最适作用 pH 值介于 3.5~4.0 之间,在 pH 值为 7.2 的磷酸钾缓冲液中果胶酶也难以发挥作用。从试验结果来看(图 6),单独溶菌酶处理完全可以获得较多有活力的原生质球。

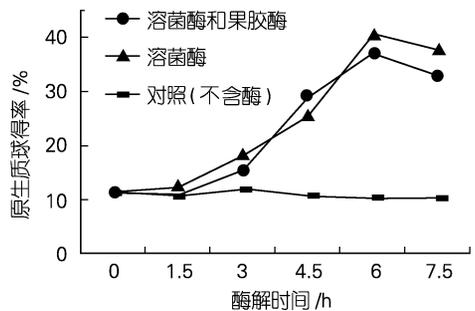


图 6 不同酶处理对原生质球得率的影响

Fig. 6 Effects of different enzymes on the rate of spheroplasts

如图 6 所示,螺旋藻原生质球最佳酶解时间是 6 h, 6 h 后部分原生质球和单细胞开始死亡。

作者探索了更为适合制备钝顶螺旋藻原生质球的方法和条件,采用了改进的制备螺旋藻原生质球的方法——超声波-溶菌酶法:螺旋藻培养液经超声破碎 2 min,用 1.5 mol/L NaCl 的 Zarrouk 培养基洗去细胞外壁的胶质鞘,然后溶菌酶酶解 6 h,可获得 40% 以上有活力的钝顶螺旋藻原生质球,为螺旋藻的进一步遗传转化以及基因工程研究提供了实验基础。

参考文献:

[1] 陈峰,姜悦. 微藻生物技术[M]. 北京:中国轻工业出版社, 1999. 106-110.
 [2] 张学成,信式祥,李清华,等. 螺旋藻最完美的功能食品[M]. 青岛:青岛海洋大学出版社, 1999. 90-121.
 [3] Butler D M, Evansand L V, Klarger B. Isolation of protoplasts from marine macroalgae[A]. Akatsuka I. Introduction to Applied Phycology[C]. Netherlands: SPB Academic Publishing, 1990. 132-147.
 [4] 吴国芳,冯志坚,马炜梁,等. 植物学(下册)[M]. 北

京:高等教育出版社, 1995. 13.
 [5] 王高歌,张宝红,茅云翔,等. 无菌钝顶螺旋藻单细胞的制备和再生[J]. 高技术通讯, 2001, 4: 6-10.
 [6] 李捷津,周金鑫,梁方晴,等. 螺旋藻细胞球形体的研究[J]. 暨南大学学报, 1993, 14(1): 84-85.
 [7] 彭国宏,施定基,费修纛,等. 螺旋藻原生质球的分离及其光合作用特征的研究[J]. 植物学报, 1996, 38(11): 861-866.
 [8] 秦松,王希华,童顺,等. 钝顶螺旋藻部分原生质体及单细胞的制备与培养[J]. 海洋与湖沼, 1995, 26(1): 109-114.
 [9] 郭厚良,赵以军. 钝顶螺旋藻原生质球制备和液泡分离[J]. 中国科学基金, 2000, 6, 356-358.
 [10] 王素娟. 海藻生物技术[M]. 上海:上海科学技术出版社, 1994. 50-53.
 [11] 张士瑾,马英军,范晓,等. 海洋生物技术原理和应用[M]. 北京:海洋出版社, 1998. 100-102.
 [12] 郭厚良. 甘露醇对蓝藻细胞的作用[J]. 武汉植物学研究, 1990, 8(1): 70-74.
 [13] 郭厚良. 蓝藻原生质球渗透稳定剂的研究[J]. 水生生物学报, 1994, 18(3): 290-291.

Preparation of spheroplasts from *Spirulina platensis* by ultrasonic lysozyme method

YIN Hong-mei, ZHANG Xue-cheng, WANG Zhi-gang

(Life Sciences and Technology College, Ocean University of China, Qingdao 266003, China)

Received: Nov., 30, 2004

Key words: *Spirulina platensis*; spheroplasts; ultrasonic; lysozyme

Abstract: The obtainment of spheroplasts of *Spirulina platensis* by the improved ultrasonic lysozyme method was dealt with in the paper. *S. platensis* was broken by ultrasonic, and the gelatinous sheath of the cells was rinsed with Zarrouk medium containing 1.5 mol/L NaCl. Then the cells were digested by lysozyme at 28~30°C for 5~7 hours, the enzyme solution was composed of 0.8 mol/L KCl, 0.5% lysozyme and 7.2 pH, 0.2 mol/L buffer of K₂HPO₄ and KH₂PO₄. Results showed that spheroplasts rate could be obtained above 40%.

(本文编辑:张培新)