

鱼腥蓝细菌 PCC 7120 异形胞的分离

樊贵安 张巨源 陈雯莉 王莉

华中农业大学农业微生物学国家重点实验室, 武汉 430070

摘要 鱼腥蓝细菌 PCC 7120 是一种光合自养型丝状蓝细菌。缺氮条件下, 菌丝上 5%~10% 的营养细胞分化为异形胞, 发挥固氮作用。异形胞是研究生物固氮和细胞分化的理想材料。为研究异形胞生理功能及其发育过程中的基因表达变化, 需要从菌丝中分离高质量的异形胞。用 2 mg/mL 溶菌酶与 0.1% Triton X-100 同时处理菌丝 30 min, 得到了完整性好、纯度高的异形胞。

关键词 鱼腥蓝细菌 PCC 7120; 异形胞; 分离

中图分类号 Q 932 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2016)06-0025-05

鱼腥蓝细菌 PCC 7120 (*Anabaena* sp. strain PCC 7120) 是一种丝状细菌, 具有所有蓝细菌光合作用的共性, 还有部分蓝细菌才有的生物固氮功能^[1]。当环境中缺少化合态氮源时, 菌丝上有 5%~10% 的营养细胞进入分化状态, 在 24 h 内分化成一种不同于其原始形态的细胞, 称为异形胞^[2]。异形胞比营养细胞体积更大, 发育成熟后在其与两侧营养细胞相连的两极会形成极点, 而其外壁则形成多糖层与糖脂层双层包被的结构。异形胞中的色素蛋白会被降解^[3], 因此, 在显微镜白色光源下颜色较浅, 比营养细胞更透明, 在红色荧光下比营养细胞发出的红色荧光要暗。

长期以来, 人们对蓝细菌异形胞的特性及分化机制进行了较深入的研究^[4-8], 但异形胞分化的机制并没有得到充分的揭示。近年来, 随着组学技术的发展, 有更多与分化过程相关的基因被鉴别出来^[2]。但由于分析所用材料通常为菌丝体, 而异形胞数量仅占菌丝体细胞总数的 5%~10%, 可能有很多与异形胞分化相关、但表达丰度不高的基因被忽略。为了更准确地鉴别与异形胞分化相关的基因, 进一步揭示异形胞分化的调控机制, 有必要利用异形胞作为分析材料, 研究异形胞与营养细胞中基因的差异表达。

在过去报道的异形胞分离方法中, 有的为纯物理法, 如 Stewart 等^[9]采用厌氧操作, 用压榨及超声

波法破碎营养细胞, 离心分离纯化到具有固氮酶活性、但纯度较低的异形胞; 有的物理法与化学法结合, 如路荣昭等^[10]用溶菌酶处理结合超声波破碎营养细胞, 低速离心分离异形胞, 获得了较高固氮活性的异形胞; 也有纯生物化学法, 如钟泽璞等^[11]用毛地黄皂昔和甘露醇 TES 缓冲液处理藻丝, 破碎营养细胞, 并结合分级离心的方法获得纯度及完整性均较好的异形胞。但上述方法或费时, 或异形胞纯度和活性较低, 都可能导致分离到的异形胞在生理代谢活性上与其自然状态存在很大差异。鉴于此, 本研究通过摸索, 建立了一种简便快速分离高纯度异形胞的方法。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

Triton X-100 购自 Biosharp 公司; 溶菌酶、ED-TA 均购于国药集团; PBS 缓冲液由笔者所在实验室自配。

1.2 菌株培养及缺氮处理

鱼腥蓝细菌 PCC 7120 在 BG11 培养基中 (30 °C, 150 r/min) 培养至 $D_{750\text{nm}} = 0.5$, 然后抽滤收集藻体, 清洗藻体, 转移至等体积 BG11₀ 培养基, 缺氮培养约 30 h。

1.3 异形胞的分离

首先收集藻体, 抽滤处理, 每 50 mL 培养液中

收稿日期: 2016-05-28

基金项目: 国家自然科学基金项目(31570048); 中央高校基本科研业务费专项(2014PY055)

樊贵安, 硕士研究生. 研究方向: 蓝细菌分子生物学. E-mail: 15827136361@163.com

通信作者: 王莉, 博士, 副教授. 研究方向: 蓝细菌分子生物学. E-mail: wangli@mail.hzau.edu.cn

收集的藻体转移至 2 mL 离心管(每管提前加 $1 \times$ PBS 缓冲液 $540 \mu\text{L}$), 转移之前 PBS 用缓冲液清洗藻体; 接着向每支离心管加 2 mg/mL 溶菌酶、适宜浓度的 Triton X-100、 5 mmol/L EDTA, 冰浴处理合适时间; 然后将以上经过溶菌酶处理的藻细胞悬浮液 $4 \text{ }^\circ\text{C}$ $5\ 000 \text{ r/min}$ 离心 5 min , 最后用 $600 \mu\text{L}$ PBS 缓冲液清洗 2~3 次, 即得到分离的异形胞。

1.4 蛋白的抽提

首先收集菌体, 抽滤处理, 将 50 mL 菌体转移至 FastPrep-24 细胞破碎离心管中, 离心管中先加入适量陶瓷珠(0.1 mm), 再加入 $500 \mu\text{L}$ $1 \times$ Protein loading buffer; 接着向离心管中加 $5 \mu\text{L}$ PMSF, 在冰上预冷片刻, 破碎细胞(6 m/s , $20 \text{ s} \times 3$ 次); 然后于 $4 \text{ }^\circ\text{C}$ $8\ 000 \text{ r/min}$ 离心 5 min , 小心吸取上清并转移至新离心管, 用 Bradford 测定样品浓度; 最后将样品于沸水中煮 10 min , 分装并做好标记, 于 $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ 冻存。异形胞总蛋白抽提与菌丝总蛋白抽提方法类似。

1.5 Western-blotting 检测

用 NifH(异形胞特异性表达蛋白)抗体检测不同浓度梯度菌丝与其异形胞总蛋白表达情况, 验证异形胞分离的效果。首先将蛋白样品用适当浓度

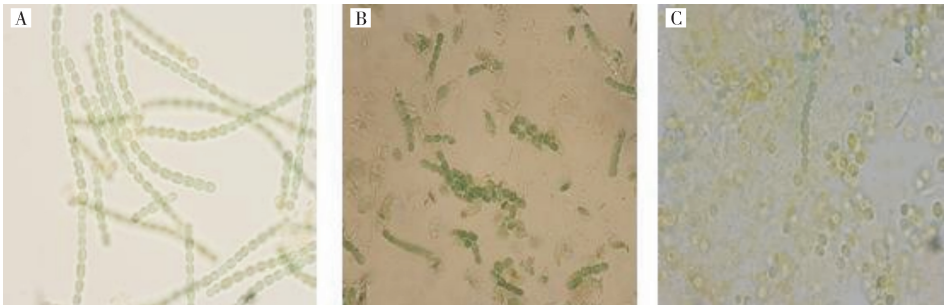
SDS-PAGE 凝胶电泳, 电泳结束后, 用半干转膜仪转膜; 然后按照封闭、洗膜、一抗($1:1\ 000$)杂交、洗膜、二抗($1:5\ 000$)杂交、洗膜的流程进行操作; 最后化学发光仪检测硝酸纤维素膜上的杂交信号, 曝光适当时间观察结果。

2 结果与分析

2.1 Triton X-100 对鱼腥蓝细菌细胞破碎的影响

蓝细菌菌丝上营养细胞被溶菌酶裂解的效率与溶菌酶的浓度、处理的温度和时间以及菌龄等因素有关。溶菌酶的最适作用温度约为 $35 \sim 50 \text{ }^\circ\text{C}$, 但本研究为了抑制细胞内各种活性代谢, 选择冰浴条件下, 采用 2 mg/mL 溶菌酶处理细胞。同时由于 Triton X-100 能溶解细胞壁中的蛋白及质膜中的脂质, 我们也尝试在溶菌酶处理体系中加入 0.1% Triton X-100。

溶菌酶处理前的菌体异形胞发育正常(图 1A); 2 mg/mL 溶菌酶处理 2 h 后, 长菌丝大多断裂为含 $3 \sim 5$ 个细胞的短菌丝及单个细胞(图 1B); 当溶菌酶处理体系中含 0.1% Triton 时, 30 min 后长的菌丝即大部分断裂为单个细胞(图 1C)。结果表明, Triton X-100 对溶菌酶的溶菌效应有显著的促进作用。



A. 未处理的菌丝; B. 溶菌酶处理菌丝 2 h 时镜检结果; C. 加入 0.1% Triton X-100 时处理 30 min 镜检结果。A. Untreated filaments; B. Filaments treated with 2 mg/mL lysozyme for 2 hours; C. Filaments treated with 2 mg/mL lysozyme and 0.1% Triton X-100 for 30 minutes.

图 1 Triton X-100 对溶菌酶破碎营养细胞效果的影响

Fig.1 Effect of Triton X-100 on lysozyme-based cell lysis

2.2 Triton X-100 的浓度及处理时间对鱼腥藻细胞破碎的影响

为了确定最适宜的 Triton X-100 处理条件, 我们设置了不同的浓度梯度及时间处理菌丝。结果显示, 当缓冲液中加入 0.05% Triton X-100 时, 随着处理时间延长, 菌丝基本断裂, 但仍有少量含有 $3 \sim 5$ 个细胞的短菌丝存在; 当加入 0.1% Triton X-100 处理时, 随着时间的延长, 菌丝断裂层度增加, 处理

60 min 时, 所有菌丝全部断裂为单个细胞, 但仍可观察到大量完整的营养细胞; 当加入 0.5% Triton X-100 处理约 30 min 时, 视野内营养细胞很少, 而异形胞数量约占总细胞数的 90% 左右, 而处理 60 min 时, 虽然视野中几乎都是异形胞, 但异形胞数量相比处理 30 min 时更少(图 2)。因此, 本研究认为最合适的异形胞分离条件为: 2 mg/mL 溶菌酶与 0.5% Triton X-100 同时处理菌丝 30 min 。

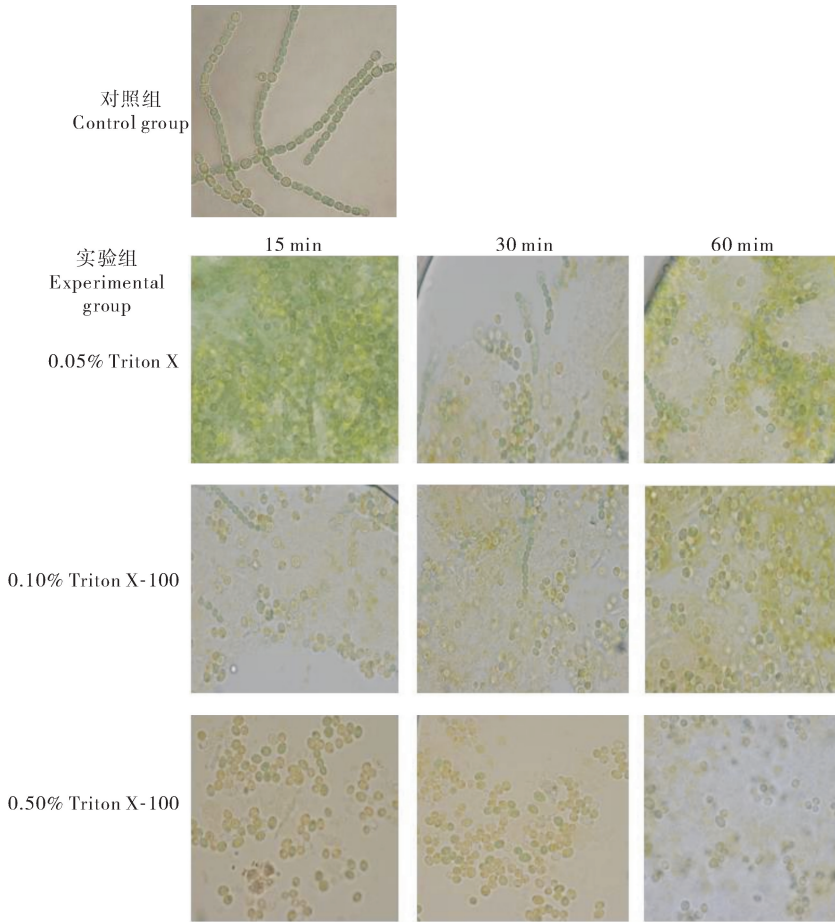
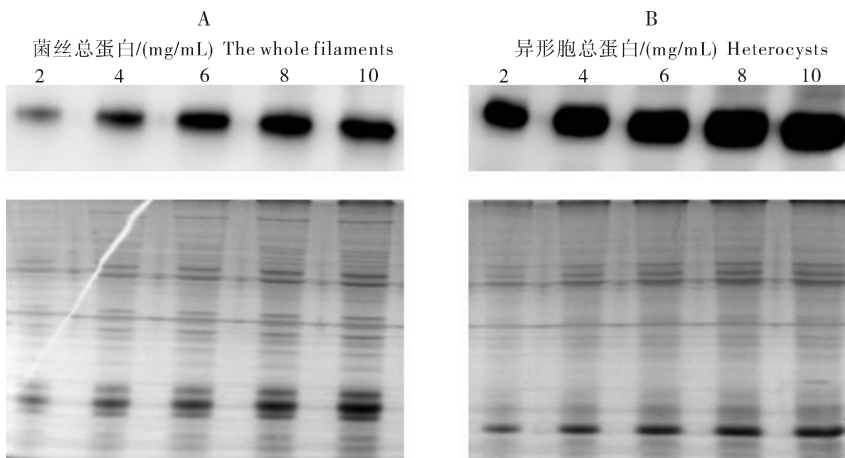


图 2 不同浓度 Triton X-100 及处理时间对丝状蓝细菌营养细胞破碎效果的影响
Fig.2 Effect of Triton X-100 concentration and incubation time on the efficiency of cell lysis



A.菌丝总蛋白 NifH 抗体检测结果; B.异形胞总蛋白 NifH 抗体检测结果。蛋白上样量分别为 2、4、6、8、10 mg/mL, 上图为 Western-blotting 检测结果, 下图为总蛋白跑胶结果。A.NifH expression in the whole filaments; B.NifH enrichment in the isolated heterocysts. The upper panels are results of immunoblotting, and the lower panels are of the corresponding samples quantified using SDS-PAGE.

图 3 Western-blotting 检测异形胞分离效果

Fig.3 The quality and enrichment of isolated heterocysts examined by Western-blotting with the antibody against NifH, one of the heterocyst-specific proteins

2.3 Western-blotting 检测分离的异形胞完整性及浓度

为了确定分离的异形胞是否完整,以检测异形胞收集的效果,分别抽提了菌丝总蛋白,以及经 2 mg/mL 溶菌酶与 0.5% Triton X-100 处理菌丝 30 min 后分离获得的异形胞的总蛋白,通过凝胶电泳,观察两者间是否存在蛋白表达的差异,并通过 Western 杂交检测不同浓度梯度总蛋白中 NifH (异形胞特异性表达蛋白) 的表达情况(图 3)。凝胶电泳结果显示,分离的异形胞总蛋白和菌丝总蛋白电泳条带有显著差异,与王业勤等^[12]报道的异形胞与营养细胞中的蛋白表达存在极大的差异结果吻合,表明本研究分离到的细胞主要是异形胞。Western 杂交结果显示,异形胞特异性表达蛋白 NifH 在异形胞中的丰度约为其在菌丝中的 4~5 倍,进一步表明本研究分离获得的异形胞能够很好地应用于研究异形胞与营养细胞的差异表达。

3 讨论

蓝细菌是革兰氏阴性细菌,细胞壁由外膜和肽聚糖层组成^[13]。溶菌酶主要通过破坏细胞壁中的 N-乙酰胞壁酸和 N-乙酰氨基葡萄糖之间的 β -1,4-糖苷键,使细胞壁不溶性黏多糖分解成可溶性糖肽,导致细胞壁破裂、内容物逸出,而使细菌溶解^[14]。异形胞具有额外的糖脂层及多糖层,这使得它对溶菌酶的敏感性降低。因而可以通过溶菌酶处理,选择性地裂解菌丝上的营养细胞以实现异形胞的分离。单一的溶菌酶处理可以通过作用肽聚糖层以实现营养细胞裂解,但作用时间较长。本研究发现体系中加入非离子型表面活性剂 Triton X-100 后,溶菌酶处理裂解营养细胞的效率大大增加。Triton X-100 能溶解脂质和蛋白^[15],笔者推测其存在时,溶菌酶能够更容易地接触肽聚糖底物。

本研究应用溶菌酶结合 Triton X-100 的处理方法能快速、便捷地从丝状鱼腥蓝细菌中分离获得异形胞。仅处理 30 min,镜检结果即显示菌丝体全裂解为单细胞,且约 90% 为完整异形胞;用 SDS-PAGE 及 Western-blotting 比较菌丝总蛋白与分离异形胞总蛋白,发现二者蛋白带型明显不同,且异形胞样品中 NifH 的含量显著增加,这显示出所得异形胞纯度较高。与其他分离异形胞的方法^[9-11]相比较,本方法能更简单、快速地获得大量异形胞,便于

后续研究的进行。

参 考 文 献

- [1] WOLK C P. Heterocyst formation[J]. *Annu Rev Genet*, 1996, 30(1): 59-78.
- [2] MURO-PASTOR A M, HESS W R. Heterocyst differentiation: from single mutants to global approaches[J]. *Trends Microbiol*, 2012, 20(11): 548-557.
- [3] FLORES E, HERRERO A. Compartmentalized function through cell differentiation in filamentous cyanobacteria[J]. *Nat Rev Microbiol*, 2010, 8(1): 39-50.
- [4] HIGA K C, RAJAGOPALAN R, RISSER D D, et al. The RGS-GR amino acid motif of the intercellular signalling protein, HetN, is required for patterning of heterocysts in *Anabaena* sp. strain PCC 7120[J]. *Mol Microbiol*, 2012, 83(4): 682-693.
- [5] RIVERS O S, VIDEAU P, CALLAHAN S M. Mutation of *sepJ* reduces the intercellular signal range of a *hetN*-dependent paracrine signal, but not of a *patS*-dependent signal, in the filamentous cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120[J]. *Mol Microbiol*, 2014, 94(6): 1260-1271.
- [6] 苏波, 陈雯莉, 王莉. 鱼腥蓝细菌 PCC 7120 中 *sigC* 突变体的构建和表型分析[J]. *华中农业大学学报*, 2015, 34(3): 46-50.
- [7] RISSER D D, CALLAHAN S M. Genetic and cytological evidence that heterocyst patterning is regulated by inhibitor gradients that promote activator decay[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009, 106(47): 19884-19888.
- [8] ZHANG S R, LIN G M, CHEN W L. *ppGpp* metabolism is involved in heterocyst development in the cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120[J]. *J Bacteriol*, 2013, 195(19): 4536-4544.
- [9] STEWART W D, HAYSTEAD A, PEARSON H W. Nitrogenase activity in heterocysts of blue-green algae[J]. *Nature*, 1969, 224(5216): 226-228.
- [10] 路荣昭, 于延利. 高固氮酶活性的多变鱼腥藻异形胞的分离[J]. *植物学通报*, 1984, 2(5): 25-27.
- [11] 钟泽璞, 张慧苗, 白克智. 用毛地黄皂普分离异形胞及其对光合和固氮的某些特性的影响[J]. *植物学报*, 1985(3): 277-283.
- [12] 王业勤, 杨林, 冯渤. 鱼腥藻 7120 异形胞的分化调节及细胞蛋白的变化[J]. *水生生物学报*, 1987(11): 41-50.
- [13] 董妍玲, 潘学武. 从基因角度解读蓝藻细胞壁的结构和功能[J]. *生物学通报*, 2010, 45(12): 14-16.
- [14] GRISHAM C M, GARRETT R H. Mechanism of enzyme action: chapter 14[M]. Australia: Thomson Brooks/Cole, 2007: 467-469.
- [15] KOLEY D, BARD A J. Triton X-100 concentration effects on membrane permeability of a single HeLa cell by scanning electrochemical microscopy (SECM)[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010, 107(39): 16783-16787.

Isolating heterocysts from *Anabaena* sp. strain PCC 7120

FAN Guian ZHANG Juyuan CHEN Wenli WANG Li

*State Key Laboratory of Agricultural Microbiology, Huazhong Agricultural University,
Wuhan 430070, China*

Abstract The filamentous cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120 is able to undergo cell differentiation. When facing nitrogen deficiency, 5%~10% vegetative cells will develop into heterocysts for fixing nitrogen. Thus this strain is an excellent material for studying nitrogen fixation and prokaryotic cell differentiation. Isolation of high quality heterocysts is a prerequisite to study their physiological changes and regulation of related gene. However, currently available methods for isolating heterocyst are usually time-consuming, low yield and low purity, unable to fulfill the requirements of many researches. An efficient method for isolating heterocyst was developed, in which vegetative cells were effectively broken in the presence of 2 mg/mL lysozyme and 0.1% Triton X-100, allowing heterocysts to be enriched with high purity and good integrity. This method will greatly facilitate heterocyst-related studies.

Keywords *Anabaena* sp. strain PCC7120; heterocyst; isolation

(责任编辑:张志钰)