

鱼腥藻细胞外膜完整性与防氧的关系*

王业勤 冯渤 黎尚豪

(中国科学院水生生物研究所, 武汉)

摘 要

暴露鱼腥藻 7120 (*Anabaena* 7120) 细胞于膜扰乱剂 EDTA 或 Tris (pH 8.0, 37℃, 5—10 分钟), 导致细胞释放外膜脂多糖和蛋白成分。Tris 处理后, 细胞对结晶紫和洗涤剂 (SDS, Triton X-100) 的敏感性增加, 整细胞碱性磷酸酶活性增强, 暗示外膜结构被修饰, 透过性增大; 与此同时, 被处理细胞固氮酶活性在空气氧中大大降低, 而在厌氧条件下活性不受影响。将细胞释放物质与处理后的细胞重组时, 可明显恢复固氮活性, 表明外膜结构与固氮防氧保护有密切关系。EDTA 处理的细胞, 虽然释放的脂多糖和蛋白量较多, 但对外膜透过性和固氮活性的影响较小。电泳分析表明, Tris 处理, 细胞释放 3—4 种特异性多肽, 可能是特定部位或结构被修饰。

关键词 鱼腥藻; 外膜; 固氮氧保护

有关蓝细菌外膜的形态及一些组成成分已有所报道^[4,13]。但外膜大分子精细结构及功能仍了解甚少。根据我们以前对鱼腥藻氧敏感突变种固氮特性及成分分析^[1,2], 试图了解蓝藻细胞被膜在固氮防氧保护机制中的作用。

研究生物膜结构与功能关系的一个方法是利用膜扰乱剂, 如细菌中已广泛应用了 EDTA 和 Tris。EDTA 弱化脂多糖的相互作用, 破坏外膜结构, 导致部分脂多糖和其他外膜成分的释放, 使外膜的透过性增大, 细胞对一些疏水物质的敏感性增加^[7,11,12]。Tris 是常用的缓冲剂, 但它对细胞并不是生理上惰性的, 同样能使细胞释放外膜成分, 改变外膜透性, 增加胞浆周围区碱性磷酸酶的活性^[9,12]。本文参照在研究革兰氏阴性细菌时常用的 EDTA 和 Tris 浓度, 短时处理鱼腥藻细胞, 分析外膜成分的释放及外膜透过性的改变, 研究外膜结构的完整性与固氮防氧保护的关系。

材料与 方法

(一) 藻种及培养

固氮鱼腥藻 7120 (*Anabaena* 7120) 按前述方法^[1], 用无结合态氮基本培养基光照培养, 取生长 2—5 天的细胞为材料。

本文于 1987 年 6 月收到, 1987 年 7 月收到修改稿。

中国科学院科学基金资助的课题。

Projects Supported by Science Fund of the Chinese Academy of Sciences

• 杨林同志参加部分实验, 图片承何楚华同志拍摄, 在此致谢。

(二) EDTA 及 Tris 处理

细胞离心收集,用冷蒸馏水离心洗涤2次,悬浮于 Tris (60—120mmol/l) 或 EDTA (5 mmol/l) 溶液中 (pH 均为 8.0), 立即将藻液放在 37℃ 保温 5—10 分钟, 以悬浮于蒸馏水或基本培养基或 TES 缓冲液的细胞在相同条件下处理作为对照。考虑到被释放的外膜成分可能重新结合, 没有加镁离子终止反应^[7]。保温后立即离心 8000g, 10 分钟, 将细胞和上清液分开, 吸出上清液, 再离心 8000—15000g, 10 分钟, 除去可能污染的细胞, 即为细胞释放物。沉淀的细胞或悬浮于蒸馏水中测整细胞碱性磷酸酶活性, 或用基本培养基离心洗涤 2 次, 悬浮于培养基中, 测细胞固氮酶活性和细胞对药物的敏感性。

(三) 碱性磷酸酶活性

按对硝基苯磷酸水解法^[7], 并结合藻细胞特点略作修改。1 个酶单位为 0.1OD_{410nm}/ml/h。

(四) 固氮酶活性

用乙炔还原法测定。活性表示为 nmol 乙烯/小时/μg 叶绿素。

(五) 细胞对结晶紫和洗涤剂的敏感性

用双层琼脂纸片法测定^[4]。在直径为 0.5cm 的纸片上滴适量药剂, 置光下培养 96 小时, 测抑制圈大小, 表示细胞对药物的敏感性。

(六) 脱氧辛酮糖酸 (KDO) 的测定

按改良方法^[10], 以水代替样品作空白对照, 1μmol/l KDO 消光值相当于 19OD_{540nm}。

(七) 蛋白的电泳分析

采用常规方法, SDS-聚丙烯酰胺凝胶板状梯度胶, 分离胶浓度 7.5—15%。用考马斯亮蓝或氨银染色。

(八) 蛋白量的测定

用 Folin 酚法, 用处理溶液为空白或将样品透析后测定。

(九) 糖的测定

用酚-硫酸法。

(十) 叶绿素 a 的测定

用 80% 丙酮提取光谱测定。

(十一) 外膜的制备

细胞离心收集, 蒸馏水洗涤, 悬浮于 TES (5mmol/l)-MgCl₂ (10mmol/l) 缓冲液 (pH8.0), 中, 加等体积 0.15—0.2mm 的玻璃珠, 4℃ 振荡 30 分钟, 抽滤除玻璃珠, 离心除去未破细胞, 上清液离心 2 × 10⁴g 30 分钟, 用缓冲液离心洗涤, 沉淀悬浮于上述缓冲液中, 加入 Triton X-100 达 2%, 在室温 30 分钟, 并离心洗涤 2 次, 蒸馏水洗 2 次, 悬浮于蒸馏水超声匀散备用。

实验结果

(一) Tris 及 EDTA 引起细胞释放脂多糖和蛋白

鱼腥藻细胞暴露于膜扰乱剂 Tris 或 EDTA, 在 37℃ 5—10 分钟、没有细胞裂解条件下, 导致细胞释放脱氧辛酮糖酸 (KDO) 和蛋白, 而 KDO 是外膜脂多糖的特有成分。

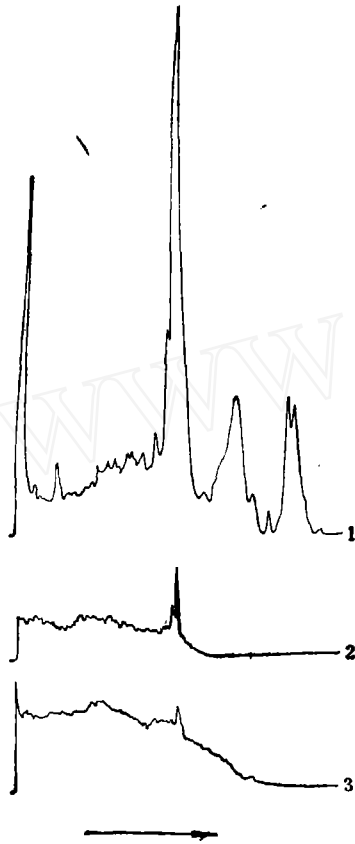


图1 分离的外膜经 EDTA 或蒸馏水洗涤时释放的蛋白电泳图谱(考马斯亮蓝染色)

1. 分离的外膜蛋白 2. EDTA 洗涤, 从分离的外膜中释放的蛋白 3. 蒸馏水洗涤, 从分离的外膜中释放的蛋白

Fig. 1 SDS-PAGE patterns of proteins released from isolated outer membrane by washing with EDTA or distilled water(stained with coomassie brilliant blue)

1. Isolated outer membrane proteins 2. Released proteins from isolated outer membrane by EDTA washing 3. Released proteins from isolated outer membrane by distilled water washing

可代表脂多糖,不同处理释放的 KDO 量与糖量是平行的。蒸馏水处理,细胞也释放少量脂多糖和蛋白,但 Tris 处理,释放的脂多糖和蛋白量增加,而 EDTA 处理释放的脂多糖和蛋白分别为水处理释放量的 10 倍和 4 倍。EDTA 加 Tris 处理,释放的物质进一步增加(表 1)。此外在释放物中还有磷化合物。当将鱼腥藻细胞外膜分离出来后,经蒸馏水或 EDTA 或 Tris 洗涤时,可观察到部分外膜蛋白的释放(图 1)。可见,EDTA 和 Tris 对蓝细菌和其他革兰氏阴性细菌外膜的影响有共同之处。

(二) Tris 及 EDTA 影响细胞对药物的敏感性和碱性磷酸酶活性

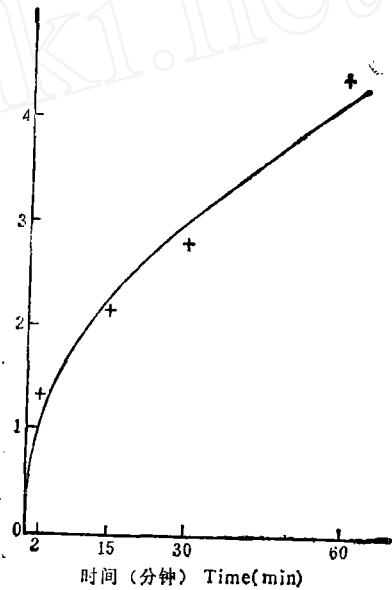


图2 细胞暴露于 Tris (120mmol/l, pH8.0, 4°C) 不同时间后对整细胞碱性磷酸酶活性的影响(酶反应 10 分钟, 30°C)

Fig. 2 Effect of exposing cells to Tris (120mmol/l, pH 8.0, 4°C) for different time on whole-cell alkaline phosphatase activity(Enzymatic reaction for 10 min at 30°C)

表 1 Tris, EDTA 处理细胞释放物质中的蛋白和脂多糖

Table 1 Lipopolysaccharide and protein released from cells by treatment with Tris, EDTA

处 理 Treatment (mmol/l)	蛋 白 质 Protein ($\mu\text{g/ml}$)	脂 多 糖 Lipopolysaccharide ($\mu\text{mol of KDO/ml}$)
蒸馏水 Distilled water	5.6	0.26
EDTA 5	21.9	2.10
Tris 120	8.1	0.78
EDTA 5 Tris 120	33.0	3.40

表 2 Tris, EDTA 处理后,细胞对不同疏水药物的敏感性和对碱性磷酸酶活性的影响

Table 2 Sensitivity of cells to different hydrophobic agents and the effect on alkaline phosphatase activity after cells treated with Tris or EDTA

处 理 Treatment (mmol/l)	细胞对不同疏水药物的敏感性 Sensitivity of cells to different hydrophobic agents			碱性磷酸酶活性 Alkaline phosphatase activity
	Triton X-100	SDS	结晶紫 Crystal violet	
蒸馏水 Distilled water	0.33	1.05	0.28	1.12
EDTA 5	0.40	1.25	0.30	1.40
Tris 120	0.80	1.40	0.60	3.00

Tris 或 EDTA 短时处理后,鱼腥藻细胞对一些疏水性药物如结晶紫和洗涤剂(SDS, Triton X-100)的敏感性增加。而洗涤剂和结晶紫作用的靶位是细胞质膜和细胞质,而对外膜没有明显影响^[42]。细胞对药物的敏感性增加,暗示 EDTA 和 Tris 处理除去部分外膜蛋白和脂多糖后,引起外膜透过性改变,染料或洗涤剂与细胞质或细胞质膜结合的量增加^[44]。然而,外膜脂多糖和蛋白的除去量与细胞对药物的敏感性增加并不是平行的。Tris 处理的细胞对结晶紫和洗涤剂的敏感性比 EDTA 处理的细胞高(表 2)。这暗示透过性的改变可能涉及特定的成分或结构。

鱼腥藻细胞经 EDTA 处理后,整细胞碱性磷酸酶活性也略有增加,但暴露于 Tris 后,整细胞碱性磷酸酶活性增加 2—3 倍(表 2),这与不同处理细胞对药物的敏感性之不同是一致的。已经知道,在细菌中,碱性磷酸酶是胞浆周围酶,存在于细胞质膜与细胞壁之间,由于对硝基苯磷酸通过外膜的通过性有限,整细胞碱性磷酸酶活性是“隐蔽”的。因而可利用这种特性监测外膜透过性的改变^[9]。在 4℃ 暴露鱼腥藻细胞于 Tris 不同时间,酶活性随处理时间之延长而增加(图 2)。因此,在此条件下,整细胞碱性磷酸酶活性之增强可作为外膜透过性被修饰的另一指标。

(三) Tris 及 EDTA 处理后细胞固氮对氧的敏感性

在空气氧条件下,藻细胞经 EDTA 或 Tris 处理 5 分钟后,固氮酶活性明显下降(表

表3 在厌氧或空气氧条件下暴露细胞于 Tris 或 EDTA 对固氮酶活性的影响

Table 3 Effect of exposing cells to Tris or EDTA on nitrogenase activity under anaerobic or air conditions

处 理 Treatment (mmol/l)	在厌氧条件下处理和反应 Treatment and reaction under anaerobic condition		在空气氧条件下处理和反应 Treatment and reaction under air condition	
	固氮酶活性 N ₂ ase activity	%	固氮酶活性 N ₂ ase activity	%
蒸馏水 Distilled water	30.1	100	17.3	100
EDTA 5	32.4	107	16.3	94.2
Tris 60	30.7	102	12.7	73.4
Tris 120	—	—	5.9	34.4

3)。EDTA 处理,细胞固氮酶活性下降 6% 左右,而 Tris 处理的细胞,固氮酶活性下降 30—70%,当 Tris 浓度增加时,酶活的损失增加。经 10 多次重复,不管处理时是以蒸馏水,培养基或 TES 缓冲液作为介质,其酶活下降范围基本如此。但是,如果在处理过程中,以及检测固氮活性时,均保持厌氧操作,那么在此条件下,EDTA 或 Tris 对细胞固氮酶活性没有出现在空气氧下由于处理引起酶活性下降的现象(表 3)。看来,在空气氧条件下处理引起酶活性的下降,并不是 Tris 或 EDTA 对固氮酶本身的直接作用,而是与氧的存在有密切关系。而固氮酶活性的下降与不同处理细胞之透过性改变是平行的,暗示处理后增加了细胞固氮对氧的敏感性。

(四) 处理细胞固氮活性的恢复及功能重组

用 Tris (60mmol/l) 加 EDTA (5mmol/l) 处理细胞,然后将洗涤的细胞放在光下继续培养,固氮酶活性经最初的下落后,有一个逐渐恢复的过程,至 24 小时,酶活达到对照细胞酶活水平(图 3)。推测这可能是被扰乱剂除去的被膜成分的重新合成而恢复其功能。

为此,参照在细菌中的重组方法^[3],用 120 mmol/l Tris 处理细胞后,离心除去细胞,将含细胞释放物的上清液再离心并对水透析 24 小时,再对培养基透过 24 小时(4℃),将此释放物重新加到 Tris/EDTA 处理并洗涤后的细胞中,在光下反应 15 分钟,离心洗涤除去未与细胞结合的释放物,悬浮后取样,在空气

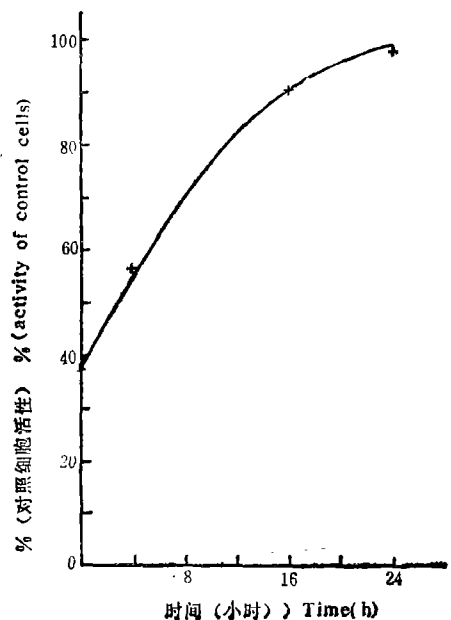


图3 Tris (60mmol/l) + EDTA (5mmol/l) 处理后的细胞在培养条件下固氮酶活性的恢复

Fig. 3 Recovery of nitrogenase activity under growing condition of cells after treatment with Tris (60mmol/l) and EDTA (5mmol/l)

表 4 被处理后的细胞与 Tris 处理释放物质的功能重组及它们的固氮酶活性的恢复
 Table 4 Functional reconstitution of treated cells with material released from the cells by Tris treatment and the recovery of their nitrogenase activities

处 理 Treatments (mmol/l)	加或不加释放物质 Addition or no addition of the released material	固氮酶活性 Nitrogenase activity	
		活 性 Activity	%
TES 5	不 加 No addition	11.7	100
Tris 60 EDTA 5	不 加 No addition	6.5	55.5
Tris 60 EDTA 5	加释放物 Addition	8.4	71.6
Tris 60 EDTA 5	加释放物和 MgCl ₂ Addition of the released material and MgCl ₂	9.5	81.0

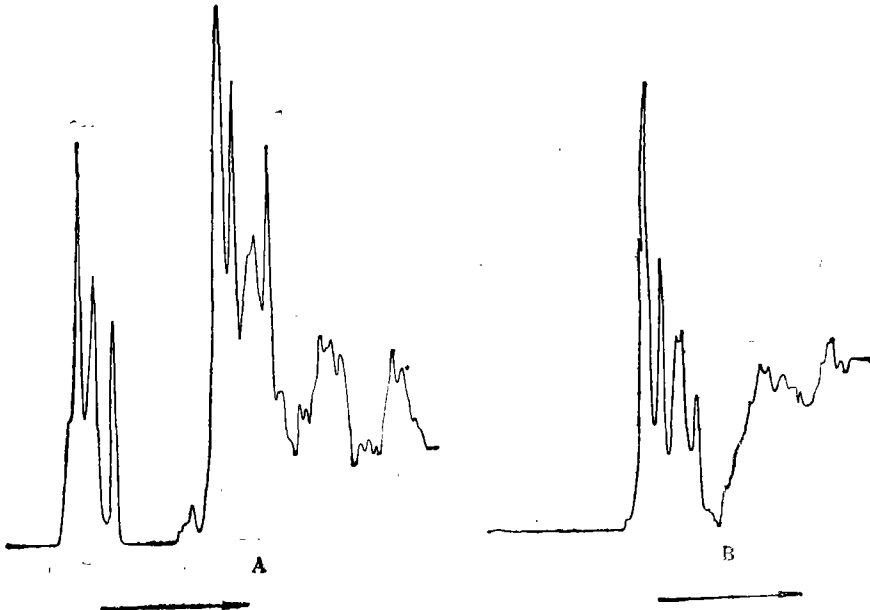


图 4 Tris 及蒸馏水处理细胞释放蛋白的电泳图谱(氨银染色)

A. Tris (120mmol/l) 处理 B. 蒸馏水处理

Fig. 4 SDS-PAGE patterns of proteins released from cells treated with Tris or distilled water (stained with ammonia silver)

A. Treated with Tris (120mmol/l) B. Treated with distilled water

气相中测乙炔还原活性,以 TES(5mmol/l) 按相同操作处理的细胞作为对照。从表 4 结果可看出,处理的细胞未与释放物质重组时,固氮活性为对照细胞固氮活性的 55.5%,与释放物质重组后,活性为对照活性的 71%,如果重组时再加 MgCl₂,则活性为对照活性的 81%,表明被释放物质能与被处理细胞重新结合,部分恢复其功能,至于释放物中哪种成分起作用尚不清楚。

(五) 释放物中蛋白的电泳分析

释放物中的微量蛋白经冷冻浓缩后电泳,并用氨银染色。在此条件下,可观察到的多肽带数量依扰乱剂处理时细胞的浓度及浓缩倍数之提高而增加,一般有 15 条多肽带以上。其中分子量在 50000—67000 之间的四条多肽带是不同处理释放的主要蛋白种类,以 EDTA 处理时它们的释放量最多。但即使用蒸馏水处理,它们也易于释放,我们也观察到在细胞培养中这类蛋白的释放,它们可能是周转很快的外膜蛋白^[9]。释放的低分子量蛋白,氨银染色时常受其中糖的干扰,但没有观察到不同处理间的明显差别。然而在 Tris 处理释放的蛋白中,在分子量区有 3—4 条多肽带为其他处理所缺少。图 4 为 Tris 处理及蒸馏水处理释放的蛋白之电泳图谱。

讨 论

在本研究中,EDTA 短时处理对鱼腥藻细胞固氮活性的影响较小,而暴露于 Tris 固氮活性明显降低,然而这种作用仅发生于空气氧下,在厌氧条件下没有影响。我们用 Tris 或 EDTA 处理单细胞胶球藻时,也观察到了类似的现象。

以前 Gallon 等人^[6](1981)未能解释 EDTA 在有氧条件下对胶球藻固氮的抑制及钙离子的保护作用。我们的结果表明,这种现象的出现与处理细胞外膜结构的改变及透过性的增加是平行的。有关 EDTA 和 Tris 对外膜的影响已有评述^[12,15]。

我们推测,可能是做为阻碍氧扩散速率的外膜结构被修饰后,氧扩散进入细胞的速度增加,使固氮酶失活,有关外膜结构与固氮防氧保护相关的另一方面证据是,我们分离的鱼腥藻氧敏感突变种不能在空气中固氮^[1],它的外膜缺少 25kd 蛋白,细胞对疏水药物的敏感性增加,暗示了它的外膜结构不完整。但是,结构的修饰可能不仅涉及透过性的改变,也可能同时使位于被膜上的除氧防护系统的活性成分被扰乱丢失,致使防氧保护功能降低。本文的重组试验类似于以前报道的用野生种细胞被膜互补,氧敏感突变种后,恢复后者在较高氧压下固氮的结果。因此,在处理细胞的释放物中可能存在与防氧保护有关的活性成分。

参 考 文 献

- [1] 王业勤,何家菀,戴玲芬,黎尚豪,1981: 鱼腥藻对氧敏感的固氮突变种。植物学报, 23: 288—296。
- [2] 王业勤,何家菀,黎尚豪,1982: 固氮蓝藻细胞中保护固氮酶的除氧系统。植物学报, 24: 231—240。
- [3] Brunner, D. P., R. A. Caputa and R. W. Treick. 1977: Functional reconstitution of EDTA-treated *E. coli*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 74: 919—925.
- [4] Drews, G., and J. Weckesser, 1982: Function, structure and composition of cell walls and external layers. In "The Biology of Cyanobacteria" (N. G. Carr and B. A. Whitton eds). Blackwell Scientific Publications, London, pp. 333—358.
- [5] Garen, A., and C. Levinthal, 1980: A fine structure and characterization of alkaline phosphatase of *E. coli*. I. Purification and characterization of alkaline phosphatase. *Biochem. Biophys. Acta*, 38: 470—483.
- [6] Gallon, J. R., 1981: The oxygen sensitivity of nitrogenase: a problem for biochemists and micro-organisms. *Trends Biochem. Sci.*, 6: 19—23.
- [7] Hardaway, K. C., and C. S. Buller. 1979: Effect of EDTA on phospholipids and outer membrane function in *E. coli*. *J. Bacteriol.* 137: 62—68.
- [8] Hoekstra, D. J. W. van der laan, L. de leij, and B. Witholt, 1976: Release of outer membrane fragments from normally growing *E. coli*. *Biochem. Biophys. Acta*, 455: 889—899.
- [9] Irvin, R. T., T. J. MacAlister, and J. Costerton, 1981: Tris (hydroxymethyl) aminomethane buffer modifica-

- tion of *E. coli* outer membrane permeability. *J. Bacteriol.*, 145: 1397—1403.
- [10] Karkhunis, Y. D., 1978: A new and improved microassay to determine 2-Keto-3-deoxyoctonate in lipopolysacchride of gram-negative bacteria. *Analytical Biochem.*, 85: 595—601.
- [11] Leive, L., 1968: Physical chemical and immunological properties of lipopolysaccharide released from *E. coli* by EDTA. *J. Biol. Chem.*, 243: 6384—6491.
- [12] Nikaida, H., and M. Vaara, 1985: Molecular basis of bacterial outer membrane permeability. *Microbiol' Reviews*, 49: 1—32.
- [13] Omata, T., and N. Murata, 1984: Isolation and characterization of three types of membranea from the cyanobacterium *Synechocystis* PCC6714. *Arch. Microbiol.*, 139: 113—116.
- [14] Sanderson, K. E., T. Macalister, J. W. Costerton and K. T. Cheng, 1974: Permeability of lipopolysaccharide deficient (rough) mutants of *Salmonella typhimurium* to antibiotics, lysozyme, and other agents. *Can. J. Microbiol.*, 20: 1135—1145.
- [15] Stan-jotter, H., M. Gupta, and K. E. Sanderson, 1979: The influence of cations on the permeability of the outer membrane of *Salmonella typhimurium* ad other gram-negative bacteria *Can. J. Microbiol.*, 25: 475—485.

RELATION OF INTEGRITY OF OUTER MEMBRANE WITH ITS PROTECTION FROM OXYGEN IN ANABAENA CELL

Wang Ye-qin, Feng Bo and Li Shang-hao
(*Institute of Hydrobiology, Academia Sinica, Wuhan*)

Abstract

Exposure of *Anabaena* 7120 cells to membrane perturbant such as EDTA or Tris (pH 8.0, 37°C, for 5—10 min) resulted in the release of outer membrane lipopolysaccharide and proteins from cells. After Tris treatment, the sensitivity of cells to crystal violet and detergents such as SDS and Triton x-100 increased and whole-cell alkaline phosphatase activity enhanced obviously, suggesting that the structure of outer membrane was modified and its permeability increased. At the same time, Tris was found to reduce nitrogen fixation activity of cells considerably in air, but not in anaerobic condition. Reconstitution of Tris-treated cells with released material might recover nitrogen-fixing activity of cells clearly, indicating that the structure of outer membrane is closely related to the protection of nitrogen fixation from oxygen.

Although EDTA-treated cells released more lipopolysaccharide and proteins than those of Tris-treated cells, the permeability of outer membrane and nitrogen-fixing activity were not influenced significantly. SDS-gel electrophoresis showed that Tris-treated cells released 3—4 specific polypeptides which were not present in the released material from EDTA-treated or water-treated cells. These experiments suggest that membrane perturbants-induced loss of outer membrane function is mediated through the modification of specific position in outer membrane.

Key words *Anabaena*; Outer membrane; Oxygen protection of nitrogen fixation