

回转器模拟微重力刺激对不同品系稻田鱼腥藻 代谢特性的影响

胡章立^{1,2} 刘永定² 涂 欢^{*}

(^{1,2}深圳大学生物工程系 深圳 518060)

(²中国科学院水生生物研究所 武汉 430072)

摘 要:以稻田鱼腥藻空间搭载克隆株(AoSRI6)、回复再搭载克隆株(AoSRI6-17)和原始出发株(*Anabaena oryza* HB23)为材料,通过回转器模拟微重力刺激实验,对不同品系稻田鱼腥藻的微重力生物学效应进行了分析。结果发现,模拟微重力刺激对稻田鱼腥藻不同品系均表现出一定的生长刺激效应,尤为空间飞行后的克隆株更为明显。比较三个品系在微重力刺激下的光合与呼吸活性,原始出发株的光合与呼吸活性明显高于空间搭载株。在回转器培养情况下,具有高固氮酶活性的克隆株(AoSRI6 和 AoSRI6-17)所固定的氮,除了用于藻细胞正常的生命活动外,主要用于其生长增强效应,而藻蛋白积累量和氨分泌量较之对照培养时要少得多。对回转器培养后的稻田鱼腥藻进行单克隆分离,结果没有出现类似于空间搭载实验的性状分离现象。

关键词:微重力, 稻田鱼腥藻, 回转器, 固氮酶活性

中图分类号:Q949 **文献标识码:**A **文章编号:**0001-6209 (2001) 04-0489-05

地球生物长期生活在 1G 重力场中,它们已完全适应了地球生态环境条件,在空间微重力环境条件下,它们将产生哪些生物学效应? 长期以来,空间生物学者们一直关注着这一问题。然而,尽管落塔实验和抛物线飞行能够产生一定水平的微重力环境,但通常时间很短,只有数秒钟,到目前为止,人们还无法在地球上产生超过几十秒的真正的微重力环境,这给微重力生物学效应的研究带来了一定的难度。但其“功能性失重”能通过回转器来产生。其原理已由 Silver 等^[1] 阐释,并为众多的科学研究所验证,本研究正是在这一原理的基础上,探讨藻类微重力刺激的生物学效应问题。

1 材料和方法

1.1 藻种

稻田鱼腥藻(*Anabaena oryza* HB23)由中国典型培养物保藏中心中国淡水藻种库(FACHB)提供。AoSRI6 品系:稻田鱼腥藻(*Anabaena oryza* HB23)通过空间飞行 8d 后返回地面,在实验室进行单克隆分离,筛选得到的一株具有高固氮酶活性的藻株^[2]。AoSRI6-17 品系:AoSRI6 经返回式科学卫星进行回复搭载后,得到的具有高固氮酶活性的返地单

* 深圳市科技局

作者简介:胡章立(1965-),男,深圳大学生物工程系副教授,博士,主要从事植物生理生化和分子生物学方面的研究。

收稿日期:2000-07-24,修回日期:2000-11-15

克隆株^[3]。

1.2 回转器培养

将接种后的初始培养物装入回转器的培养管内,在光照 $36\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 、温度 $25^{\circ}\text{C}\sim 28^{\circ}\text{C}$ 、微重力水平 $\leq 10^{-2}\text{g}$ 左右的条件下培养。本试验采用的回转器由中国科学院水生生物研究所与中国科学院上海技术物理研究所联合研制。

1.3 单克隆藻株的分离

取 2~3mL 的稻田鱼腥藻于一干净无菌的 10mL 小试管内,用超声波打断藻丝,镜检呈单细胞。用 BG-11 培养基稀释(10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 和 10^{-4})不同的浓度梯度,取 0.1mL 不同浓度梯度的藻液涂平板(每组 3 个以上)。当平板中长出单个藻落后,挑取单克隆藻落接种于 BG-11 液体培养基中光照温控培养,并逐一比较,检查培养物纯度后编号,分别得到各单克隆藻株。

1.4 固氮酶活性测定

采用乙炔还原法测定。具体步骤如下:取藻液 2mL,放入 6.3mL 的反应瓶中,盖上反耳塞,在真空泵下抽气充氩三次。放平压后,加入 $0.8\text{mL C}_2\text{H}_2$,置瓦氏呼吸仪下摇动保温,摇动频率为 60 次/min,温度为 30°C ,光照 $52\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 。30min 后终止反应。形成的乙烯在上海分析仪器厂生产的 103 型气相色谱仪上测定。

1.5 藻胆蛋白含量测定

采用 Siegelman 等^[4]的方法。取 5mL 的藻液超声破细胞(镜检),然后置于 7000g 离心 15min,得到粗提液。然后分别于上海分析仪器厂 752 型分光光度计在 615nm、652nm 及 562nm 处比色,并根据计算公式计算出藻胆蛋白总量(mg/mL)。

1.6 氨排出的测定

采用 Soltzano.L 等^[5]的方法并稍加修改。取 5mL 藻液,离心后取上清液加入 0.2mL 酚试剂、0.2mL(0.5%)硝普酸钠和 0.5mL 氧化液(100mL 柠檬酸钠溶液和 25mL 1.5mol/L 次氯酸溶液混合均匀,应用当天配制。其中,柠檬酸钠溶液由 100g 柠檬酸钠和 5g NaOH 溶于 500mL 水中配制而成)搅拌。反应混合液在室温($22^{\circ}\text{C}\sim 27^{\circ}\text{C}$)放置 1h,在上海分析仪器厂 752 型分光光度计于 640nm 处的比色,根据标准曲线计算出氨量。

1.7 叶绿素含量测定

采用 Arnon 等^[6]的方法测定。取 5mL 藻液离心后弃去上清液,并将沉淀的藻细胞用 5mL 80%的丙酮重新悬浮,并在黑暗处抽提 24h 后,用上海分析仪器厂生产的 751 型分光光度计测定 OD_{663} 值,并根据公式叶绿素含量(mg/mL) = $OD_{663}/82.04$ 计算出测定结果。

1.8 呼吸耗氧速率测定

采用 Hansatech Clark 型(DW1, U.K.)溶氧测定仪测定藻细胞呼吸耗氧速率。具体步骤如下:测定仪预热 30min 后,测定氧标准曲线。取藻液 2mL,放入反应室并保持黑暗,稳定 2min 后,记录耗氧量,根据藻生物量计算出藻细胞耗氧速率。

1.9 光合荧光效率测定

使用 Hansatech MK2 型植物光合效率分析仪(PEA)测定藻细胞光合色素荧光的初始值 F_0 、最大值 F_m 和可变值 F_v ,以其最大荧光和可变荧光的比值表示藻细胞的光合效率。

2 结 果

2.1 稻田鱼腥藻在回转器中的生长情况

从图 1 可以看出,在起点相同的情况下,不同品系的稻田鱼腥藻于回转器中生长 7d 后,出发株的生物量较 AoSR16 和 AoSR16-17 均低。而在对照组的差异较小。就回转器实验组与对照的生物量比较,回转器实验组的生物量均稍大于对照组。这说明 AoSR16 和 AoSR16-17 较出发株对微重力环境有更强的适应能力;同时微重力对稻田鱼腥藻的生长有一定的刺激作用。

将经过 7d 回转器培养后的出发株、AoSR16 以及 AoSR16-17 在地面继续培养时,其生长速率与未经回转器处理的出发株、AoSR16 和 AoSR16-17 无显著差异(表 1)。

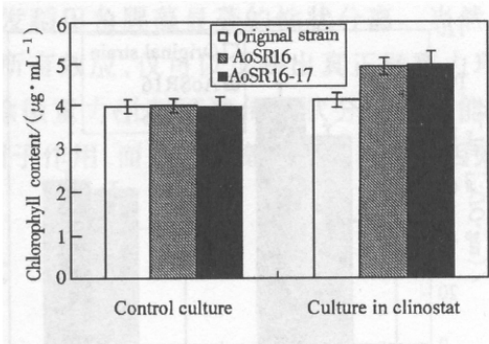


图 1 回转器对稻田鱼腥藻生长的影响

Fig.1 Effect of clinorotation on the growth in *Anabaena oryza*

表 1 回转器处理前后稻田鱼腥藻各藻株生长速率及固氮酶活性比较

Table 1 Effect of clinorotation on the growth rate and nitrogenase activity of *Anabaena oryza* strains

Strain	Average growth rate/(d ⁻¹)		Nitrogenase activity /(nmolC ₂ H ₂ ·mgChl ⁻¹ ·min ⁻¹)	
	Before clinorotation	After clinorotation	Before clinorotation	After clinorotation
Original strain	0.2453 ± 0.0123	0.2364 ± 0.01183	143.20 ± 8.59	137.81 ± 8.26
AoSR16	0.2299 ± 0.0091	0.2388 ± 0.0096	327.63 ± 19.6	338.74 ± 16.9
AoSR16-17	0.2485 ± 0.0149	0.2462 ± 0.0147	403.61 ± 24.2	398.73 ± 23.9

2.2 光合效率及呼吸活性

将原始出发株、AoSR16 与 AoSR16-17 在回转器中培养 6d 后,在呼吸与光合荧光效率方面的变化较明显。对照组出发株的光合和呼吸效率略高于 AoSR16 和 AoSR16-17;而回转器实验组与对照组比较,前者的呼吸与光合活性明显较后者高(图 2,图 3)。

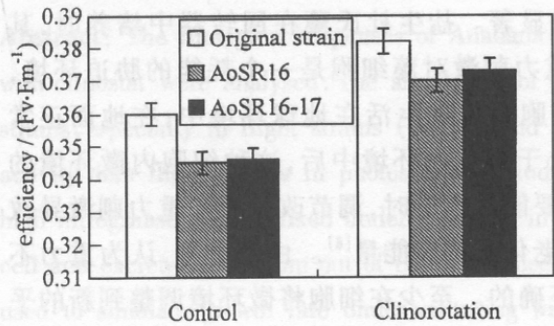


图 2 回转器对稻田鱼腥藻荧光效率的影响

Fig.2 Effect of clinorotation on photosynthetic fluorescence efficiency of *Anabaena oryza* strains

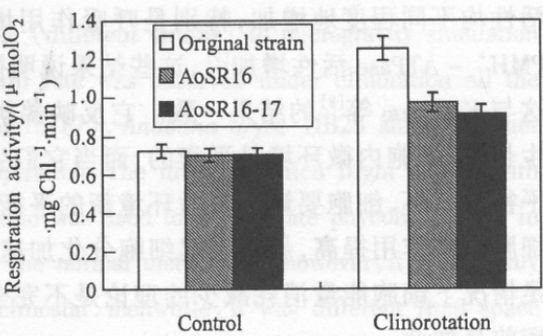


图 3 回转器对稻田鱼腥藻呼吸耗氧速率的影响

Fig.3 Effect of clinorotation on the respiration activity of *Anabaena oryza* strains

2.3 藻胆蛋白累积与氨分泌速率

在 7d 回转器实验中,出发株、AoSR16 和 AoSR16-17 的藻胆蛋白累积如图 4,AoSR16 和 AoSR16-17 明显高于出发株,但三者均较对照累积量少。在回转器中三者氨的排出量均较少(图 5)

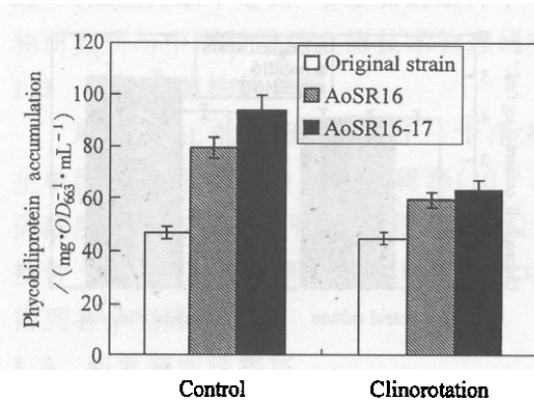


图 4 出发株、AoSR16 及 AoSR16-17 经回转器培养后的藻胆蛋白累积情况

Fig.4 Effect of clinorotation on phycobiliprotein accumulation in cell of the *Anabaena oryza* strains

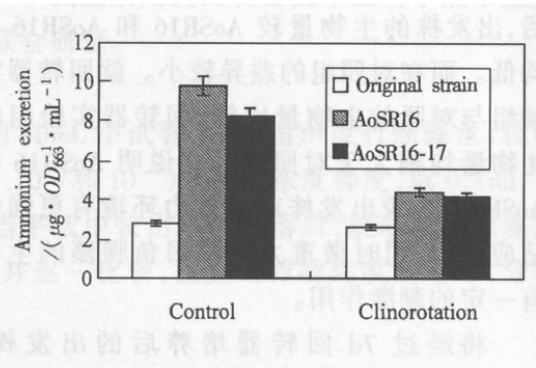


图 5 在回转器中培养 7d 后稻田鱼腥藻氨排出的变化

Fig.5 Effect of clinorotation on ammonium excretion of *Anabaena oryza*

将经回转器培养后的出发株、AoSR16 以及 AoSR16-17 在实验室继续培养,结果发现,各藻株的藻胆蛋白累积与 NH₄⁺ 排出均没有明显的差异。

2.4 单克隆分离

将经回转器运转 7d 后的出发株、AoSR16 及 AoSR16-17 分别进行单克隆分离,并对其单克隆株的固氮酶活性和生长速率进行测定,结果未发现类似空间飞行后的性状分离(表 1)。

3 讨 论

本试验的结果表明,培养于回转器中的出发株、AoSR16 及 AoSR16-17 的光合与呼吸活性均不同程度地增加,特别是呼吸作用增强显著。盐生杜氏藻在回转器中培养时,其 PMH⁺ - ATPase 活性增加^[7],这些结果说明微重力刺激对藻细胞是一个耗能的胁迫环境,这与 Kordyum 等^[8]的结果一致。它反映藻类细胞因长期生活在地球环境中,在地面正常生长时,细胞内微环境是平衡的,而当它们生长于微重力环境中后,这种细胞内微环境的平衡被破坏,细胞要调整到微环境新的平衡需要能量。同时,调节改变了的重力刺激导致细胞自噬作用提高,从而引起细胞分化加速与老化也需要能量^[8]。由此可见,认为重力不足情况下细胞能量消耗减少的理论是不完全正确的。至少在细胞将微环境调整到新的平衡前是如此。

由于 AoSR16 和 AoSR16-17 是经空间飞行后得到的高固氮酶活性变异株,它们的许多特性都表现出对空间环境的适应性^[2,3],除了用于正常的生命活动外,在地面培养时固定的氮主要以藻胆蛋白累积在体内和以氨的形式排出体外,生长方面的变化很少;而在回转

器中培养时,其固定的氮则主要用于生长增强效应,而藻胆蛋白累积和氮的排出量很少。这也从另一个角度说明了它们对空间微重力环境的适应。

经回转器模拟微重力刺激后的稻田鱼腥藻并没有出现类似空间飞行所导致的可遗传性状分离现象,这说明微重力刺激可能不是导致稻田鱼腥藻出现可遗传性状分离的直接原因,或者说,较低水平的微重力刺激不足以引发稻田鱼腥藻显著的性状分离。当然,由于回转器实验结果不能完全反映空间微重力的所有效应,仅可以反映出真正微重力环境导致的大部分效应^[9],因此我们并不能完全排除微重力引起可遗传性状分离的可能性。同时,也许这些空间效应的诱变因子并不是单因子作用,而是诸如微重力与辐射等因素的协同效应。

参 考 文 献

- [1] Silver I L. *J Theor Biol*, 1976, **61**: 353 ~ 362.
- [2] 刘永定,林惠民,戴玲芬,等. 科学通报, 1993, **38**(2): 177 ~ 180.
- [3] Hu Z L, Liu Y D, Dai L F, et al. *Chinese Science Bulletin*, 1996, **41**(8): 679 ~ 683.
- [4] Siegelman H W, Kycia J H. Algal biliproteins. In: Hellebust J A and Graigie J S ed. *Handbook of phycological methods, physiological and biochemical methods*. Cambridge: Cambridge University Press, 1978. 111(1): 1 ~ 61.
- [5] Solotzano L. *Limnology and Oceanography*, 1969, **14**(5-6): 799 ~ 801.
- [6] Arnon D I. *Plant Physiol*, 1949, **24**(1): 1 ~ 15.
- [7] 胡章立,刘永定. 科学通报, 1998, **43**(16): 1750 ~ 1754.
- [8] Kordyum E L. *Adv pace Res*, 1994, **14**(8): 77 ~ 85.
- [9] Laurinavicius R, Stockus A, Buchen B, et al. *Adv pace Res*, 1996, **17**(6/7): 91 ~ 94.

EFFECT OF MICROGRAVITY SIMULATION WITH CLINOSTAT ON DIFFERENT STRAINS IN ANABEANA ORYZA

Hu Zhangli^{1,2} Liu Yongding² Tu Huan

(¹ Department of Biotechnology, Shenzhen University, Shenzhen 518060, China)

(² Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072, China)

Abstract: The Biological responses of *Anabana oryza* (different strains) to microgravity simulation with clinostat were analyzed. The simulation of growth rate was observed under clinorotation all the strains, especially in flight strains (AoR16 and AoSR16-17). *Anabana oryza* HB23 showed higher activity than flight strains in photosynthesis and respiration. The nitrogen which flight strains with high nitrogenase activity fixed under culturing in ground was used to accumulate phycobiliprotein in cell and excrete ammonium out of cell after meeting the normal metabolism, however, it was mainly used to simulate growth rate under culturing with clinostat. meanwhile, it was different from space flight that microgravity simulation with clinostat was not able to induced the phenotype segregation in *Anabana oryzae*.

Key words: Microgravity, *Anabana oryzae*, Clinostat, Nitrogenase activity