

衣藻培养及其硝酸还原酶活力的测定

郑朝峰 孙惠珍 汤玉玮

(中国科学院上海植物生理研究所, 上海)

摘要 本文通过提高培养基的 pH 和磷酸盐浓度解决了衣藻在硝酸盐培养基上生长不良的问题。用完全合成培养基代替土壤提取液培养基。用钼酸钠和氯化钙代替钼酸铵和硝酸钙, 消除了培养基中影响硝酸还原酶 (NR) 诱导的因素。用单藻落繁殖的保种方法保持了 NR 的诱导特性。

在酶反应后用乙酸锌和甲硫吩嗪处理, 去除了反应过剩的 NADH 和衣藻粗提取液中的某些物质对亚硝酸显色反应的抑制, 建立了满意的 NR 活力测定技术。

关键词 衣藻培养; 硝酸还原酶; 酶活测定; 甲硫吩嗪

莱茵衣藻 (*Chlamydomonas reinhardtii*) 是真核的单细胞鞭毛绿藻, 结构简单, 既可以进行无性繁殖, 也能进行有性繁殖, 是生物化学和遗传学等基础生物学研究的经典实验材料。

硝酸还原酶 (NR, EC 1.6.6.2) 是高等植物和藻类硝酸同化的关键酶, 催化 NO_3^- 向 NO_2^- 的还原反应。用磺酰胺和萘乙酰胺测定 NO_2^- 的生成量是最方便、最灵敏的 NR 测活方法^[1,2]。但是, 藻类粗提液中的某些组分和反应液中过剩的 NADH 对 NO_2^- 的偶氮化显色反应有很强的抑制作用, 抑制程度随植物种类、NADH 的加入量和酶活力等因素的不同而表现不规则的变化^[1,3]。直接用该方法测定衣藻 NR 活力的结果很不理想^[2]。

本文改进了衣藻的实验室培养方法。通过乙酸锌和甲硫吩嗪 (PMS) 反应后处理, 去除了上述因素对 NO_2^- 显色反应的干扰, 得到了满意的 NR 活力测定方法。

材料和方法

1. 藻种: 莱茵衣藻 (*Chlamydomonas reinhardtii*, 水生-122⁺) 从中国科学院武汉水生生物研究所藻种室购得。

2. NR 提取液 (EB): 25m mol/L KH_2PO_4 - K_2HPO_4 缓冲液 (pH7.5), 内含 0.5m mol/L EDTA· Na_2 、2m mol/L 半胱氨酸和 0.01m mol/L FAD。

3. 试剂: NADH 和 PMS 为上海东风生物化学试剂厂产品。萘乙酰胺 (N-(1-Naphthyl)-aethylenediamin-dihydrochlorid) 为 Fluka (瑞士) 产品。其它均为常规分析纯试剂。

结果和讨论

(一) 衣藻培养

1. 氮源和 pH 对衣藻生长的影响: 本文所用藻种原来是用 Bristol- 土壤浸出液培养基 (BSE) 培养和保存的^[4], 以硝酸盐为氮源, pH 5.8 左右。由于铵和硝酸根均影响 NR 的诱导^[2], 我们对原用培养基做了一些改动: 用完全合成培养基代替 BSE, 用钼酸钠和氯化钙代替钼酸铵和硝酸钙。但是, 衣藻在 Bristol- NH_4^+ 培养基上生长很慢, 不久还会变黄和结块, 用硝酸盐作氮源时生长正常 (表 1)。如果使培养基的 pH 稳定在 7.0 左右, 以铵为氮源时衣藻不仅可以生长, 其速率还略高于硝酸盐 (表 1)。

图 1 表明硝酸盐和铵盐对衣藻生长速率的

表1 衣藻在不同培养基上生长速率的比较
(起始浓度: 4.2×10^6 细胞/ml, 光下生长 72 个小时后取样)

| 培养基 | Bristol | | 改良培养基 | |
|--------------------------|--------------------|------------------|--------------------|------------------|
| | NH ₄ Cl | KNO ₃ | NH ₄ Cl | KNO ₃ |
| 细胞数 ($\times 10^6$ /ml) | 1.19 | 4.50 | 4.48 | 3.21 |

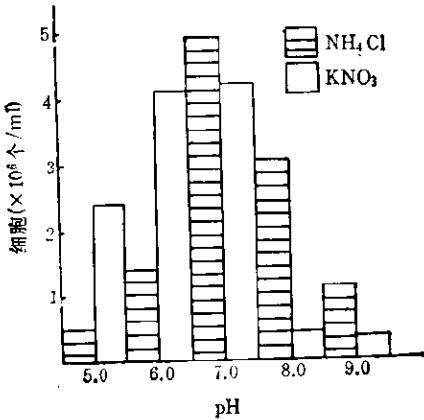


图1 pH对衣藻生长速率的影响
(起始细胞浓度: 4.2×10^6 /ml, 光照生长 72 小时)

影响取决于培养基的 pH 值: 低 pH 条件有利于在硝酸盐上生长, 高 pH 时在铵盐培养基上生长较好。如果考虑到 Bristol 培养基的 pH 只有 5.8, 磷酸盐浓度只有 1.72 m mol/L 以及衣藻在以 $100\text{--}150 \text{ n mol/h} \cdot \text{ml}$ 的速率同化 NH₄⁺ 时引起的 pH 下降等因素, 就不难理解为什么衣藻在 Bristol-NH₄⁺ 培养基上生长不好了。

因此, 通过调整 KH₂PO₄ 和 K₂HPO₄ 的比值将 pH 调至 7.0 左右, 并把磷酸盐浓度提高到 10 m mol/L 使培养基的缓冲能力增强, 避免了 pH 变化对实验结果的影响。表 2 列出了改进的衣藻培养和保存培养基。

2. 藻种保存: 藻种用 SBNM 斜面保存。特别应当注意的是每隔两个月转接新斜面时, 应挑典型的单藻落繁殖新的斜面, 否则连续转接 3—4 代后 NR 活力降低, 诱导特性改变^[2]。

3. 种子藻液制备: 将一定量藻体从斜面转入含 50ml BAM 的 150ml 三角瓶中, 无菌条件下在恒温 (25℃) 水浴摇床上连续光照培养 5—

表2 衣藻培养基(单位: mg 或 ml)

| | BNM (pH 6.7) | SBNM (pH 6.0) | BAM (pH 6.7) |
|---|-----------------|------------------|-----------------|
| KNO ₃ | 210 | 210 | 0 |
| NH ₄ Cl | 0 | 0 | 57 |
| CaCl ₂ | 26 | 26 | 26 |
| MgSO ₄ · 7H ₂ O | 75 | 75 | 75 |
| K ₂ HPO ₄ · 3H ₂ O | 760 | 1.5 | 760 |
| KH ₂ PO ₄ | 907 | 75 | 907 |
| NaCl | 25 | 25 | 25 |
| 琼脂 | 0 | 5000 | 0 |
| 微量元素* | 1 | 1 | 1 |
| EDTA-Fe 溶液** | 1 | 1 | 1 |
| H ₂ O | 998 | 998 | 998 |

* A, 溶液: H₃BO₃: 2.9g; MnCl₂ · 4H₂O: 1.81g; ZnSO₄ · 7H₂O: 0.22g; CuSO₄ · 7H₂O: 0.08g; Na₂MoO₄: 0.021g; H₂O: 1000ml; H₂SO₄: 1滴。

** 将 10ml 0.1N 的 EDTA · Na₂ 和 10ml 1N 的 HCl (含 0.9g FeCl₃) 稀至 1000ml 即成。

7 天, 此为种子藻液。

4. 大量培养: 用 1 升的三角瓶 (含 400ml BAM) 进行。接种一定量种子藻液后, 25℃ 下光、暗各 12h 通气培养 3—5d, 光强 4000lx。这样培养的藻较连续光照培养的同步性好。由于自来水和市售蒸馏水的组分往往不稳定, 最好用重蒸水配制培养基。

(二) NR 的诱导、提取和活力测定

1. 诱导: 2000g 离心 5min 收集处于对数生长期的藻细胞, 沉淀用 BFM 洗三次以去除铵离子。然后悬浮在 BFM 中, 将其在 640nm 处的光吸收调至 0.6, 相应的细胞密度为 8.4×10^6 个/ml, 加 2 m mol/L KNO₃ 诱导 NR。

2. 提取: 诱导 3h 后离心收集藻体并置低温冰箱保存。提取时将冰冻细胞悬浮在适量 EB 中, 使细胞密度在 1.5×10^7 个/ml 左右。超声波破碎两次, 每次 30s, 间隔 30s。然后 15000g 离心 15min, 弃去沉淀, 上清液为粗酶液, 用于 NR 活力测定。提取在 5℃ 以下进行。

3. 活力测定: NR 活力测定系统总体积为 1ml, 内含 0.1m mol KH₂PO₄-K₂HPO₄ (pH 7.5)、0.03 m mol KNO₃、0.4μ mol NADH 和适量酶液。30℃ 水浴保温 30min, 加 0.1ml 0.5mol/L

表3 乙酸锌和甲硫吩嗪对表观 NR 活力的影响

| 处 理 | STD (直接显色) | STD+ZnAcO | STD+PMS | STD+ZnAcO+ PMS (离心) | STD+ZnAcO+ PMS (不离心) |
|---|---------------|-----------|---------|------------------------|-------------------------|
| 酶 活 力 ($\mu\text{mol NO}_2^-/30\text{ min, mg}$) | 30 | 108 | 55 | 166 | 56 |

的乙酸锌水溶液终止反应, 4000r/min 离心 5min。吸出上清液, 在其中加 PMS 至 150n mol/ml, 30°C 保温 20min 后依次加入氨基苯磺酰胺 (1%, 溶于 3mol/L HCl 中) 和 0.02% (W/V) 的萘乙酰胺水溶液各 0.5ml 显色, 根据工作曲线求出 NO_2^- 的生成量。以不加 NADH 的为对照。每分钟催化形成 $1\mu\text{mol NO}_2^-$ 的酶量为一个酶活力单位 (u)。

非酶实验中, $0.4\mu\text{mol/L}$ NADH 使 NO_2^- 显色值降低 50%, 150n mol/ml PMS 处理 20min 可以完全去除 NADH 的抑制^[2]。

50m mol/L 乙酸锌和 150m mol/L PMS 本身不影响 NO_2^- 的显色反应^[2], 但分别使表观 NR 活力提高到反应后直接显色时的 3.60 和 1.83 倍(表 3)。两者的作用可以加成, 结合使用时的 NR 活力提高到对照的 5.53 倍。如果加乙酸锌后不离心去除沉淀就用 PMS 处理, 后者仍有效果, 但乙酸锌的作用未得以表现(表 3), 这与玉米中的情况不同^[3]。可见衣藻粗提取液对 NO_2^- 显色反应有很强的抑制作用, 乙酸锌的作用是去除其中的干扰因子。

NADH 是 NR 的底物之一, 过少限制酶反应, 过多则抑制 NO_2^- 显色值, 降低表观 NR 活力^[4,5]。图 2 表明只用乙酸锌处理时 NR 活力在 NADH 浓度为 0.1m mol/L 时呈一尖峰; 再加 PMS 处理后, 在 $0.1-0.4\text{m mol/L}$ NADH 之间 NR 活力一直保持最大值。这样, NADH 的用量范围比较大, 既能满足酶反应的需要, 又不抑制 NO_2^- 显色。

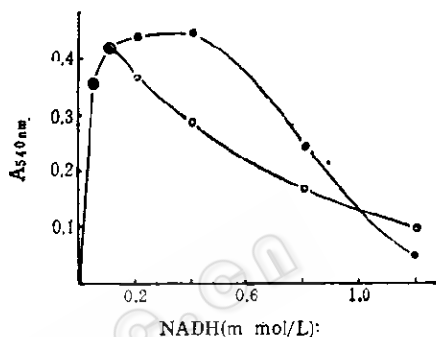


图2 PMS 对表观 NR 活力的促进

○ STD ● STD + 150n mol/ml PMS

植物粗提取液中干扰 NO_2^- 显色的物质多用乙酸、乙酸锌或乙酸锌+乙醇沉淀法去除^[5,6]。活性炭吸附^[7]、透析^[8]和酶氧化法^[9]都曾被用来去除反应液中过剩的 NADH, 但均不如 PMS 法简便实用。用醋酸锌和 PMS 反应后处理法测定的 NR 活力与酶量呈很好的线性关系^[2]。

参 考 文 献

- [1] 林振武: 植物生理学通讯, 6: 8-13, 1987.
- [2] 郑朝峰: 中国科学院上海植物生理研究所博士研究生毕业论文, 1988.
- [3] Scholl, R. L. et al.: *Plant Physiol.*, 53: 825-828, 1974.
- [4] 中国科学院水生生物研究所藻种保藏室编: 水生所培养保藏的淡水藻种目录.
- [5] 李正平等: 科学通报, 25: 802-804, 1980.
- [6] Hageman, R. H. and Hucklesby, D. P.: *Methods Enzymol.*, 23A: 491-494, 1973.
- [7] Stulen, I.: *Acta Bot. Neel.*, 19: 425-430, 1970.
- [8] Jones, R. W. and Sheard, R. W.: *Can. J. Plant Sci.*, 53: 207-213, 1973.
- [9] Hewitt, E. J. and Notton, B. A.: *Biochem. J.*