

不同培养条件下莱茵衣藻细胞中 SGAT 酶活性的变化

李洪涛¹, 朱珂¹, 刘清岱², 左照江¹, 朱晔荣¹, 白艳玲¹, 王勇^{1,*}

¹南开大学生命科学学院, 天津 300071; ²天津科技大学食品工程与生物技术学院, 天津 300457

摘要: 利用模式单细胞植物莱茵衣藻, 研究不同培养条件下细胞中丝氨酸: 乙醛酸氨基转移酶活性的变化情况。结果表明: 莱茵衣藻 SGAT 酶活性的最适 pH 介于 5~7 之间, 当 pH 高于 7 以后, 酶活性逐渐下降; 随着细胞密度增加, SGAT 酶活性降低; 光强可显著影响 SGAT 酶活性, 在一定光强范围内, 随着光照强度的增加, 酶活性增强; 乙酸作为莱茵衣藻的唯一异养碳源也会影响 SGAT 酶活性, 两者间呈正相关; 提高氧浓度, 显著地提高了细胞内 SGAT 的酶活性; 当二氧化碳浓度增加时, 细胞内 SGAT 的酶活性也略有升高; 40 °C 高温和 15 °C 低温处理后, SGAT 酶活性均降低。此外, 提高氧浓度时细胞内 Gly 含量增加, Ser 含量减少, Gly/Ser 的比值从 0.79 提高到 1.49。

关键词: SGAT; 细胞密度; 光照强度; 乙酸; 氧浓度; 光呼吸; 莱茵衣藻

Variations in SGAT Enzyme Activity of *Chlamydomonas reinhardtii* L. Cells under Different Cultural Conditions

LI Hong-Tao¹, ZHU Ke¹, LIU Qing-Dai², ZUO Zhao-Jiang¹, ZHU Ye-Rong¹, BAI Yan-Ling¹, WANG Yong^{1,*}

¹College of Life Sciences, Nankai University, Tianjin 300071, China; ²Department of Biotechnology, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300457, China

Abstract: In this study, the model single cell plant *Chlamydomonas reinhardtii* was used to investigate variations in serine: glyoxylate aminotransferase activity in cells under different cultural conditions. The results showed the optimum pH of SGAT was in the range of 5–7, and SGAT decreased gradually when the pH was higher than 7. SGAT activity in the cell also declined with the increase of cell density. SGAT activity was influenced significantly by the light intensity, and the effect strengthened with the increase of light intensity. Moreover, acetate, which was the sole carbon source of *C. reinhardtii* in heterotrophic growth, also affected the SGAT activity. In addition, SGAT activity in the cell increased remarkably when the oxygen concentration was higher than that in the normal air, and the increased carbon dioxide concentration treatment also led to an increase. The SGAT activity both reduced under 40 or 15 °C. Furthermore, the content of Gly was increased and the content of Ser was decreased when the oxygen pressure increased in the air, resulting in a raise in Gly/Ser ratio from 0.79 to 1.49.

Key words: SGAT; cell density; light intensity; acetate; oxygen pressure; photorespiration; *Chlamydomonas reinhardtii*

丝氨酸:乙醛酸氨基转移酶(serine: glyoxylate aminotransferase, SGAT, EC 26.1.45)是植物中普遍存在的一种氨基转移酶,催化底物丝氨酸和乙醛酸之间的转氨作用,生成羟基丙酮酸和甘氨酸(Liepman 和 Olsen 2001; Honderd 等 1985)。高等植物的 SGAT 定位在过氧化物体,参与光呼吸途径的正常运转。SGAT 一旦失去功能,突变的植物体就不能在正常空气中生存(Ogren 1984; Wingler 等 2000; Igamberdiev 和 Lea 2002)。

近些年来,光呼吸途径的研究越来越受到人们的重视(Foyer 等 2009)。研究表明,光呼吸途径不仅可以补救利用光呼吸产物磷酸乙醇酸,大量减少 C₃ 植物中碳的损失,而且还与植物的抗病性(Taler

收稿 2010-01-19 修定 2010-03-28

资助 国家自然科学基金(30870185)。

* 通讯作者(E-mail: wangyong@nankai.edu.cn; Tel: 022-23504382)。

等2004)、抗逆性(Wingler等2000; Rivero等2009)以及衰老(Zhu等2004, 2005)等重要生理过程有关。最近, Zelitch等(2009)还证明光呼吸途径在C₄植物玉米中的高水平运转对于玉米的正常生长也是必不可少的。

衣藻为真核单细胞藻类, 是研究光合作用的模式植物之一。衣藻中同样存在光呼吸作用, 但是又有其独特之处。例如, 衣藻可以将乙醇酸分泌到细胞外(Nelson等1969; Moroney等1986); 乙醇酸的氧化是在乙醇酸脱氢酶而不是乙醇酸氧化酶的催化下进行的(Nakamura等2005; Atteia等2009); 衣藻中可能不存在过氧化体, 所以光呼吸途径的氨基转移酶如SGAT在衣藻中则定位在线粒体中(Atteia等2009)。因此, 衣藻的光呼吸作用、参与此途径的酶或酶系以及受环境因子的影响等值得深入研究。本文以莱茵衣藻为实验材料, 研究不同生长环境对细胞内SGAT酶活性的影响, 并通过液相色谱测定在不同氧分压下, 细胞内丝氨酸和甘氨酸的含量, 以此进一步了解细胞中SGAT酶活性变化与光呼吸的关系。

材料与方 法

本研究选用的实验材料是一种单细胞绿藻, 属于绿藻门(Chlorophyta)团藻目(Volvocales)衣藻属(*Chlamydomonas*)莱茵衣藻(*Chlamydomonas reinhardtii* L.)的325CW15品系, 由德国弗赖堡大学Beck教授惠赠。325CW15品系属细胞壁和精氨酸缺陷型, TAP培养液中加入外源精氨酸后才能正常生长(Tian等2006)。

从同一培养瓶中取相同数量的衣藻细胞, 分别放入添加精氨酸的TAP培养液, 然后在不同光照强度下进行培养。光照强度分别为30、60和90 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, 光周期为16 h·d⁻¹, 以完全黑暗条件作为对照。每个处理5个重复。培养6 d后, 收集细胞培养物, 并分别测定细胞密度和单位细胞中的SGAT酶活性。

为了确定衣藻培养过程中细胞密度对细胞中SGAT的活性是否有影响, 在光照强度为60 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 的条件下, 分别在培养衣藻24、30、36、42、52、60和66 h后进行取样, 然后提取SGAT并测定酶活性。每个处理3个重复。

将莱茵衣藻细胞在光照强度为60 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, 分别在含0、6、12和18 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 乙酸的TAP培养液中进行培养, 当细胞达到相近的密度时收集细胞(排除了光照和细胞密度的影响), 提取SGAT酶, 并测定酶活性。

莱茵衣藻细胞密度采用细胞计数法进行测定, 所用血球计数板为(25×16型), 根据以下公式计算细胞密度: 细胞密度(个·mL⁻¹)=实测数×5×10⁴×稀释倍数。

分别采用不同氧分压与CO₂浓度的空气(50% O₂或5% CO₂)或温度(40或15 °C)处理莱茵衣藻, 光照2 h后取样, 测定SGAT酶活性。

SGAT酶液提取参照Havir和McHale(1988)的方法, 将衣藻液体培养物在4 °C下3 000×g离心5 min, 将沉淀移入预冷的研钵中, 加液氮充分研磨成粉末后, 加200 μL 0.05 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的磷酸钾缓冲液(含1.5 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ DTT, pH 7.4)并研磨。将溶液移至1.5 mL离心管中, 再用磷酸钾缓冲液冲洗研钵3次, 合并缓冲液。18 000×g 4 °C离心5 min, 其上清液在18 000×g 4 °C再离心20 min, 上清液即为SGAT酶提取液, 也是氨基酸初提液。

SGAT酶活性测定参照Rehfield和Tolbert(1972)的NADH氧化间接测定法进行。取20 μL 待测酶液加入到1 mL反应体系中(含有15.4 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 丝氨酸、5 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 乙醛酸、20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 磷酸吡哆醛、77 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的磷酸钾缓冲液), 30 °C温浴反应30 min, 加入100 μL 10%三氯乙酸终止反应, 反应液加入40 μL NADH(3.5 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$)和10 μL 稀释后的乳酸脱氢酶(LDH, 13 $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$, Amresco), 在室温下进行LDH催化的NADH氧化反应, 根据反应体系的OD₃₄₀减少值(即NADH的氧化量)间接计算SGAT酶活性。以OD₃₄₀变化值为纵坐标细胞体积(代表酶量的多少)为横坐标作图。

丝氨酸与甘氨酸含量采用液相色谱进行测定, 其衍生化反应体系主要参照商振华等(1993)方法进行, 并稍做修改。将氨基酸初提液分别用2,4-二硝基氟苯进行衍生化反应, 衍生化反应体系为: 62.5 μL NaHCO₃、62.5 μL 氨基酸初提液、100 μL FDNB, 用KH₂PO₄补齐1.25 mL。60 °C水浴中反应1 h后, 将衍生化产物用孔径0.45 μm 的滤膜过

滤, 吸取 20 μL 滤液进样。色谱柱为 Kromasil C_{18} 柱(250 mm \times 4.6 mm i.d., 10 μm), 流动相是乙腈与醋酸盐缓冲系统, 二元高压线性梯度洗脱, 流速 1 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$, 柱温 25 $^{\circ}\text{C}$, 检测波长 360 nm。

实验结果

1 SGAT 酶活性测定曲线及 pH 值对 SGAT 酶活性的影响

图1表明, OD_{340} 的变化值和 SGAT 酶活性之间存在较好的线性关系, 可以用来检测酶活性在 8 倍以内的差异。在不同 pH 值条件下, 测定 SGAT 酶活性结果(图2)表明, SGAT 酶在酸性条件下活性较高, 并且在 pH 5~7 之间变化不大, 当 pH 超过 7 时活性开始逐渐下降。

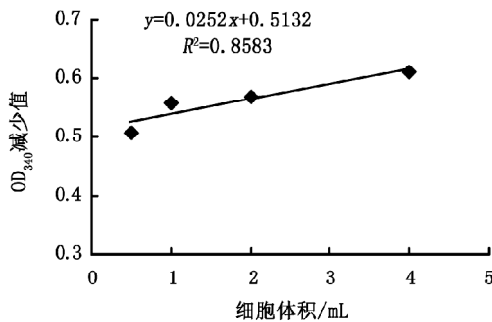


图1 SGAT 酶活性与 OD_{340} 减少值之间的线性关系
Fig.1 Linear correlation between the decrease in OD_{340} value and the SGAT activity

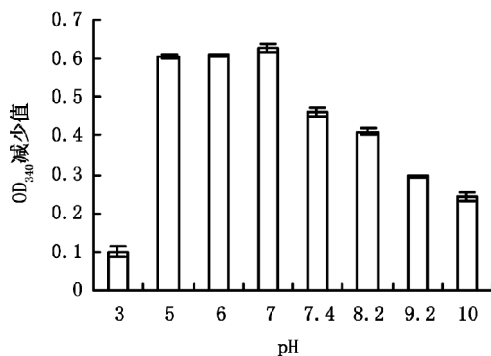


图2 不同 pH 值对 SGAT 酶活性的影响
Fig.2 Effect of different pH on the SGAT activity

2 光强对莱茵衣藻 SGAT 酶活性的影响

从图3-a 中可以看出, 光照明显地促进了细胞

的生长, 同时也提高单位细胞中 SGAT 的酶活性, 而且光照越强, 效果越明显。进行了同样的细胞培养和酶活性测定, 但取样时间不同, 使取样时每个处理的细胞密度接近, 以排除细胞密度差异导致 SGAT 酶活性的不同。其结果(图3-b)表明, 在相同细胞密度下, 光照及其强度对细胞中 SGAT 的活性同样产生了显著的影响。

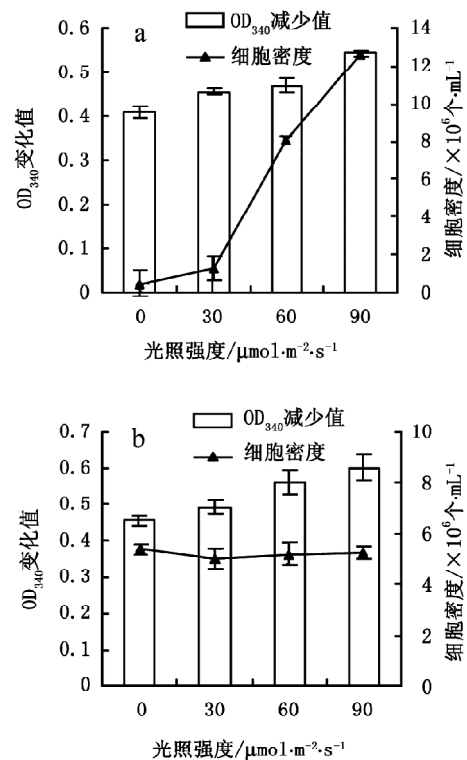


图3 不同光强对细胞 SGAT 酶活性的影响
Fig.3 Effects of different light intensities on SGAT activity in cells cultivated
a: 细胞生长的密度不同; b: 细胞生长达到相同的密度。

3 细胞密度对莱茵衣藻 SGAT 酶活性的影响

图4 表明, 细胞密度对衣藻细胞中 SGAT 的活性确实有影响, 随着细胞生长密度的增加, 细胞中 SGAT 的活性明显呈下降趋势。

4 乙酸浓度对莱茵衣藻 SGAT 酶活性的影响

衣藻细胞可以以乙酸作为唯一碳源在黑暗条件下进行生长。因此目前研究中最常采用的 TAP 培养基中含有较高浓度(18 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)的乙酸。图5 表明, 当培养液中乙酸浓度越高, 衣藻细胞中 SGAT 的活性越高, 乙酸浓度对酶活性的影响非常显著。

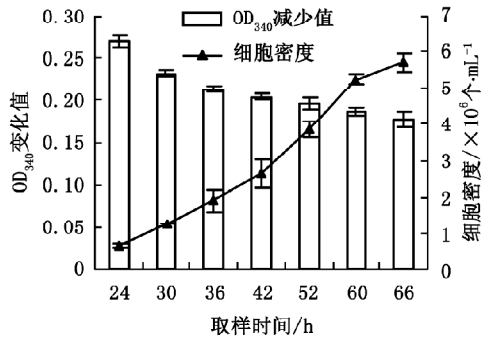


图4 细胞密度对 SGAT 酶活性的影响
Fig.4 Effect of cell density on the SGAT activity

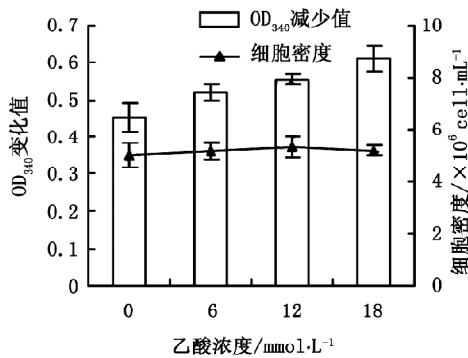


图5 不同乙酸浓度对 SGAT 酶活性的影响
Fig.5 Effects of different concentrations of acetic acid on SGAT activity

5 不同氧浓度或 CO₂ 浓度对莱茵衣藻 SGAT 酶活性的影响

增加空气中氧气含量可以增加光呼吸作用,而增加空气中 CO₂ 含量则可以抑制光呼吸作用的进行。分别用氧浓度为 50% 和 CO₂ 浓度为 5% 的空气处理莱茵衣藻 2 h 的结果(图6)中可以看出,与正常空气培养的莱茵衣藻相比,氧浓度为 50% 处理的莱茵衣藻细胞内 SGAT 酶活性增加。而 CO₂ 浓度为 5% 的空气处理后,细胞内 SGAT 酶活性也升高,只是增加幅度略低于氧浓度为 50% 的空气处理。

6 温度对莱茵衣藻 SGAT 酶活的影响

在高温和低温胁迫条件下,光呼吸速率会增加。用 40 °C 高温或 15 °C 低温处理衣藻培养物 2 h 的结果(图7)表明,40 或 15 °C 的处理都能引起细胞内 SGAT 酶活性的降低。

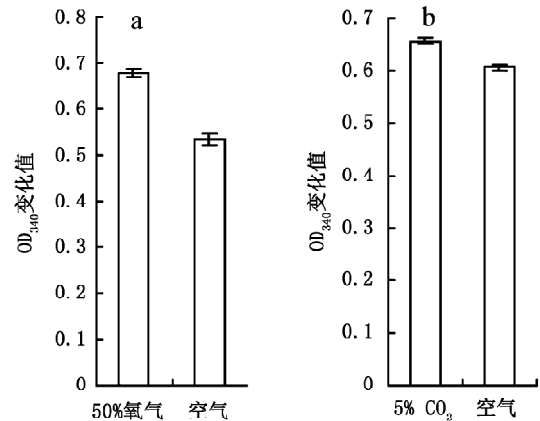


图6 不同 O₂ 及 CO₂ 浓度对 SGAT 酶活性的影响
Fig.6 Effects of different oxygen and carbon dioxide concentrations on SGAT activity

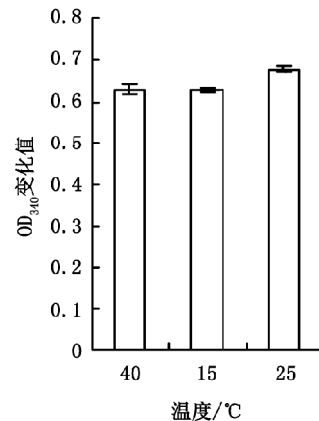


图7 温度对 SGAT 酶活性的影响
Fig.7 Effect of temperature on SGAT activity

7 50% 氧浓度的空气对莱茵衣藻细胞内丝氨酸和甘氨酸水平的影响

经 50% 氧浓度的空气处理的结果(图8)表明,细胞中 Gly 的含量与正常空气相比显著增加, Ser 含量则显著降低。同时,其 Gly/Ser 比值为 1.49,而正常空气处理莱茵衣藻的 Gly/Ser 比值为 0.79,比值升高了 0.7。

讨 论

本文确定了模式单细胞植物莱茵衣藻 SGAT 酶活性的最适 pH 范围,结果表明为偏酸性,在 5~7 之间差异不大(图2),这与 Truszkiewicz 和

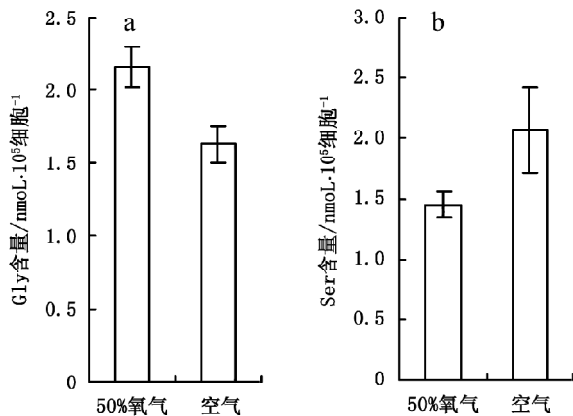


图8 50%氧浓度对细胞中Gly及Ser含量的影响
Fig.8 Effects of 50% oxygen on the contents of Ser and Gly in the cell

Paszkowski (2004)报道的玉米和小麦叶片中提取的SGAT, 以及Kendziorek和Paszkowski (2008)报道的拟南芥叶片中提取的SGAT酶反应最适pH值有所不同, 这些高等植物的SGAT酶活性的最适pH值都大于7, 这可能是由于水生低等植物和陆地高等植物间实际生长环境的pH值差异所致。

近年来的研究表明, 在具有CO₂浓缩泵的C₄植物和CO₂浓缩机制的单细胞藻类中, 光呼吸途径是一条不可或缺的途径。光呼吸途径可能在植物的抗性方面也发挥着非常重要的作用。作为光呼吸途径中的关键酶, SGAT参与细胞中氨基酸的代谢, 因此细胞中SGAT酶活性的变化可能与其在细胞中发挥的生理作用以及植物细胞的生理状态密切相关。本文表明, 光照能够促进细胞中SGAT的酶活性(图3), 这可能因为光照能促进光合作用和光呼吸途径的快速运转, 因此需要较高水平的参与光呼吸途径的酶的总活性。这一现象在其他植物中也有发现(Honderd等1987; Foyer等2009)。但是目前还没有报道阐述光对细胞中SGAT酶活性正调控的机制, 值得深入研究。在紫萍的研究(Zhu等2004)中发现, 当植物从生长进入衰老阶段后, 细胞中SGAT编码基因的表达和酶活性都会开始下降。本文发现, 随着细胞的生长, 培养液里细胞密度增加, 细胞内SGAT的酶活性逐步降低(图4)。这一点可能与细胞的生理状态有关。

乙酸是目前已知化合物中衣藻唯一可利用的

异养碳源, 但是其在衣藻中的代谢途径还不清楚。目前研究表明, 乙酸在衣藻细胞中首先转化成乙酰辅酶A, 然后再进入碳代谢途径(Boyle和Morgan 2009)。乙酸转化成乙酰辅酶A需要能量, 衣藻的SGAT酶位于细胞中能量产生的线粒体中。乙酸浓度与莱茵衣藻细胞中SGAT酶活性之间存在正相关关系(图5), 这就意味着SGAT可能参与了乙酸的代谢过程。

本文发现, 氧浓度的升高促进了衣藻细胞中SGAT活性的增加(图6-a)。但空气中二氧化碳浓度的升高则抑制光呼吸作用, 衣藻细胞中SGAT的活性并没有降低(图6-b), 这说明衣藻细胞中SGAT的活性不一定总是伴随光呼吸的增强而增强。温度胁迫也会增强呼吸作用(邓向前等1984; 刘厚诚等2006), 而衣藻细胞中SGAT的活性也不随温度的胁迫而增加, 相反略有下降(图7)。

细胞中甘氨酸/丝氨酸的比值经常被用于判断光呼吸作用的强弱(Novitskaya等2002; Niessen等2007), 当光呼吸作用增加后, 该比值会升高。在氧浓度升高后, 光呼吸作用增强, 细胞中SGAT活性的降低导致了甘氨酸的积累和丝氨酸的减少, 从而使其的比例发生了显著变化。

参考文献

- 邓向前, 吕章荣, 李明启(1984). 不同光照强度和温度对水稻光合作用和光呼吸的影响. 华南农学院学报, 5 (1): 32~38
- 刘厚诚, 黄红星, 孙光闻, 陈日远(2006). 温光处理对节瓜幼苗光合作用的影响. 沈阳农业大学学报, 37 (3): 386~389
- 商振华, 于亿年, 郭为, 刘一辉, 王俊德(1993). 高效液相色谱法(硝基氟苯柱前衍生化和紫外吸收)测定猪血红蛋白氨基酸组成. 色谱, 11 (4): 236
- Atteia A, Adrait A, Brugière S, Tardif M, van Lis R, Deusch O, Dagan T, Kuhn L, Gontero B, Martin W et al (2009). A proteomic survey of *Chlamydomonas reinhardtii* mitochondria sheds new light on the metabolic plasticity of the organelle and on the nature of the alpha-proteobacterial mitochondrial ancestor. *Mol Biol Evol*, 26: 1533~1548
- Boyle NR, Morgan JA (2009). Flux balance analysis of primary metabolism in *Chlamydomonas reinhardtii*. *BMC Sys Biol*, 3/4: 1186~1752
- Foyer CH, Bloom AJ, Queval G, Noctor G (2009). Photorespiratory metabolism: genes, mutants, energetics, and redox signaling. *Ann Rev Plant Biol*, 60: 455~484
- Havir EA, McHale NA (1988). A mutant of *Nicotiana sylvestris* lacking serine: glyoxylate aminotransferase. *Plant Physiol*, 87: 806~808

- Honderd D, McCHunter J, Keth R, Trrus DE, Becker WM (1985). Isolation of serine: glyoxylate aminotransferase from cucumber cotyledons. *Plant Physiol*, 79: 95~102
- Honderd D, Wadler D-M, Trrus DE, Becker WM (1987). Light stimulated accumulation of peroxisome enzymes hydroxypyruvate reductase and serine: glyoxylate aminotransferase and their translatable mRNAs in cotyledons of cucumber seedlings. *Plant Mol Biol*, 9: 259~275
- Igamberdiev AU, Lea PJ (2002). The role of peroxisomes in the integration of metabolism and evolutionary diversity of photosynthetic organisms. *Phytochemistry*, 60: 651~674
- Kendziorzek M, Paszkowski A (2008). Properties of serine: glyoxylate aminotransferase purified from *Arabidopsis thaliana* leaves. *Acta Biochim Biophys Sin*, 40: 102~110
- Liepmann AH, Olsen LJ (2001). Peroxisomal alanine: glyoxylate aminotransferase (AGT1) is a photorespiratory enzyme with multiple substrates in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J*, 25: 487~498
- Moroney JV, Wilson BJ, Tolbert NE (1986). Glycolate metabolism and excretion by *chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol*, 82: 821~826
- Nakamura Y, Kanakagiri S, Van K, He W, Spalding MH (2005). Disruption of a glycolate dehydrogenase gene in a high-CO₂-requiring mutant of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Can J Bot*, 83: 796~809
- Nelson EB, Tolbert NE, Hess JL (1969). Glycolate stimulation of oxygen evolution during photosynthesis. *Plant Physiol*, 44: 55~59
- Niessen M, Thiruveedhi K, Rosenkranz R, Kebeish R, Hirsch HJ, Kreuzaler F, Peterhänsel C (2007). Mitochondrial glycolate oxidation contributes to photorespiration in higher plants. *J Exp Bot*, 58 (10): 2709~2715
- Novitskaya L, Trevanion SJ, Driscoll S, Foyer CH, Noctor G (2002). How does photorespiration modulate leaf amino acid contents? A dual approach through modelling and metabolite analysis. *Plant Cell Environ*, 25: 821~835
- Ogren WL (1984). Photorespiration: pathways, regulation, and modification. *Ann Rev Plant Physiol*, 35: 425~442
- Rehfield DW, Tolbert NE (1972). Aminotransferases in peroxisomes from spinach leaves. *J Biol Chem*, 247: 4803~4811
- Rivero RM, Shulaev V, Blumwald E (2009). Cytokinin-dependent photorespiration and the protection of photosynthesis during water deficit. *Plant Physiol*, 150: 1530~1540
- Taler D, Galperin M, Benjamin I, Cohen Y, Kenigsbuch D (2004). Plant eR genes that encode photorespiratory enzymes confer resistance against disease. *Plant Cell*, 16: 172~184
- Tian BJ, Wang Y, Zhu YR, Lu XY, Huang KY, Shao N, Beck CF (2006). Synthesis of the photorespiratory key enzyme serine: glyoxylate aminotransferase in *C. reinhardtii* is modulated by the light regime and cytokinin. *Physiol Plant*, 127: 571~582
- Truskiewicz W, Paszkowski A (2004). Serine: glyoxylate aminotransferases from maize and wheat leaves: purification and properties. *Photosynth Res*, 82: 35~47
- Wingler A, Lea PJ, Quick WP, Leegood RC (2000). Photorespiration: metabolic pathways and their role in stress protection. *Phil Trans Roy Soc Lond B Biol Sci*, 355: 1517~1529
- Zelitch I, Schultes NP, Peterson RB, Brown P, Brutnell TP (2009). High glycolate oxidase activity is required for survival of maize in normal air. *Plant Physiol*, 149: 195~204
- Zhu YR, Lü XY, Wang SF, Wang NN, Wang Y (2005). The relationship between photorespiration and senescence of *S. polyrrhiza* P143. *Plant Sci*, 168: 1625~1632
- Zhu YR, Tao HL, Lü XY, Wang SF, Wang NN, Wang Y (2004). High level of endogenous L-serine initiates senescence in *Spirodela polyrrhiza*. *Plant Sci*, 166: 1159~1166