

莱茵衣藻和斜生栅藻蛋白核的染色方法优化

吕学兰^{1,2}, 陆贻超¹, 葛亚明¹, 张亚杰^{1,*}

¹中国科学院宁波材料技术与工程研究所, 浙江宁波315201; ²中国科学院大学, 北京100049

摘要: 蛋白核(pyrenoid)作为真核藻类重要的、相对独立的固碳结构, 在CO₂高效浓缩和固定过程中发挥中重要作用, 可为开发高效生物固碳技术提供理论支持。染色法是快速观察蛋白核的最佳方法之一, 有助于深入研究蛋白核的结构和功能, 但目前对染色法仍缺乏系统研究。本文以较易染色的莱茵衣藻(*Chlamydomonas reinhardtii*)和较难染色的斜生栅藻(*Scenedesmus obliquus*)为材料, 探讨了碘染和溴酚蓝(BPB)染色观察蛋白核的方法。结果表明, 碘染法最适用于蛋白核外周淀粉观察, 最适染色液浓度和时间分别是0.1%~0.2% (W/V)和5 min。热激预处理和溴酚蓝染色相结合的蛋白核染色效果更好, 优化条件为: 70 °C水浴热激40 s, 0.05% (W/V) BPB染色15 min。本方法为研究微藻蛋白核提供了一种快速有效的直接观察方法。

关键词: 真核微藻; 蛋白核; 碘染色; 溴酚蓝染色

Optimization of Method for Staining Pyrenoid of *Chlamydomonas reinhardtii* and *Scenedesmus obliquus*

LÜ Xue-Lan^{1,2}, LU Yi-Chao¹, GE Ya-Ming¹, ZHANG Ya-Jie^{1,*}

¹Ningbo Institute of Materials Technology and Engineering, Chinese Academy of Sciences, Ningbo, Zhejiang 315201, China;

²University of Chinese Academy of Science, Beijing 100049, China

Abstract: Pyrenoid, as an important and relatively independent structure of carbon fixation in eukaryotic microalgae, plays a crucial role in CO₂ concentration and fixation. Study of pyrenoid could support the development of efficient bio-sequestration technologies. However, quick characterization of pyrenoid in algae cell was imperfect, which to some extent limited the in-depth study of its structure and function. In this study, two typical microalgae strains, *Chlamydomonas reinhardtii* and *Scenedesmus obliquus*, representing easily and difficult staining species, and two dyes, iodine and bromophenol blue (BPB), were used to optimize methods for staining pyrenoid. Results demonstrated that iodine could simultaneously stain stereoscopic pyrenoid and its starch sheath, and the optimal staining concentration and time were 0.1%–0.2% (W/V) and 5 min, respectively. In comparison to iodine staining, the combination of BPB staining and heat shocking showed a better result than iodine staining, which could clearly staining pyrenoid without staining starch sheath. The optimal staining condition was at 70 °C heat shock for 40 s, and 0.05% (W/V) BPB staining for 15 min. Our result provided a practical method that could characterize pyrenoid of microalgae *in vivo* fast and effectively.

Key words: eukaryotic microalgae; pyrenoid; iodine staining; bromophenol blue staining

光合作用是地球上最大的有机合成反应, 为所有生物提供有机物质来源。CO₂作为光合作用合成有机物质的底物, 是影响光合效率的关键因子之一。与空气相比, 水体较低的CO₂浓度是限制水生植物光合作用效率的最关键因素之一。在长期进化过程中, 水生光合植物进化出不同的高效CO₂浓缩和固定机制, 其中以蓝细菌羧化体(Badger和Price 2003)、硅藻的C₃和C₄协同固碳(Robert等2007)和绿藻蛋白核(Meyer等2012)等碳固定方式为主要代表。鉴于绿藻的细胞结构与高等植物更

加相似, 因此, 研究绿藻高效固碳结构可为将来提高高等植物的碳固定效率提供理论依据, 尤其是在构建高产作物方面具有重要的理论和实际应用价值。在绿藻高效固碳过程中, 蛋白核是其最关

收稿 2014-03-27 修订 2014-05-26

资助 国家重点基础研究发展计划(2011CBA00905)和国家自然科学基金青年基金(31100183)。

* 通讯作者(E-mail: zhangyj@nimte.ac.cn; Tel: 0574-8669-0283)。

键的结构之一。但目前关于蛋白核快速观察和系统研究还相对很少,限制了其结构和功能的深入解析。

目前关于蛋白核的报道,主要是将蛋白核作为分类、进化或者叶绿体相关蛋白发育研究过程中的辅助证据(Nozaki等 2002; Badger等1998; Kuchitsu等1991)。尽管蛋白核的提取和纯化开展了一些相关的研究工作,但与高等植物的C₃和C₄固碳过程相比,对蛋白核高效固碳过程的研究还很少。为了深入研究蛋白核高效固碳机制,需在提取蛋白核的基础上,深入解析其结构和功能。因此,直接观察蛋白核发育状况方法,可为提取高质量的蛋白核提供技术保障。目前透射电镜技术在蛋白核观察方面已有相关应用(夏建荣和高坤山 2002; Villarejo等1997; Geraghty和Spalding 1996),但该技术存在制样复杂、耗时长及群体代表性差等问题,不能快速有效反映微藻蛋白核的大小和形态变化。因此,研发快速蛋白核观察技术,有助于蛋白核提取、结构和功能解析的研究的深入开展。

染色法是最佳的蛋白核快速观察方法之一。一些研究已有使用染色法观察蛋白核发育和形态变化,如溴酚蓝(bromophenol blue, BPB)染色法(Kuchitsu等1988a)、碘染色法(Kuchitsu等1988b)和丹酰胺荧光染色法(Kuchitsu等1991),但缺乏系统优化的条件,造成染色相对不清晰,染色容易过深或过浅,蛋白核边缘以及其外周淀粉鞘不易分辨的问题,且溴酚蓝染色中常用氯化汞(HgCl₂)处理,毒性较大,不便大范围推广使用。

本研究以具有典型蛋白核结构的微藻莱茵衣藻和斜生栅藻为材料,通过对碘染法与曝光修正相结合和BPB法与热激预处理相结合,缩短了染色时间并优化了染色效果,建立一种微藻蛋白核及其外周淀粉鞘的快速染色方法,为快速观察微藻细胞蛋白核形态和发育状况提供一种有效手段。

材料与amp;方法

1 藻种和培养条件

莱茵衣藻(*Chlamydomonas reinhardtii* CC-503, 基因突变无细胞壁藻株)和斜生栅藻(*Scenedesmus obliquus*, 自筛)的培养条件如下:采用TAP培养基,培养温度和光照强度分别为(25±2) °C和120 μmol·m⁻²·s⁻¹,

光周期为12 h/12 h。静置培养,定期摇动混匀。

2 试剂

2.1 TAP培养基

母液I: NH₄Cl (4 g·L⁻¹), MgSO₄·2H₂O (1 g·L⁻¹), CaCl₂·2H₂O (0.5 g·L⁻¹)。

母液II: K₂HPO₄ (1.08 g·L⁻¹), KH₂PO₄ (0.56 g·L⁻¹)。

母液III: Tris Base (24.2 g·L⁻¹)。

微量元素母液: H₃BO₃ (11.4 g·L⁻¹), MnCl₂·4H₂O (5.06 g·L⁻¹), ZnSO₄·7H₂O (22 g·L⁻¹), FeSO₄·7H₂O (4.99 g·L⁻¹), CoCl₂·6H₂O (1.61 g·L⁻¹), (NH₄)₆Mo₇·4H₂O (1.57 g·L⁻¹), Na₂EDTA (50 g·L⁻¹)。

配制时:取母液I、母液II和母液III各10 mL,加1 mL微量元素母液和1 mL冰乙酸,混合均匀后再称取2 g CHCOONa·3H₂O,搅拌溶解于上液中,用蒸馏水定容至1 000 mL,最后用HCl或者NaOH调节溶液pH为7.0,于121 °C下灭菌20 min。

2.2 PBS缓冲液

磷酸盐缓冲液, pH=7.2, 20 mmol·L⁻¹。

2.3 碘染色液

用去离子水配制质量浓度分别为4% I₂和6% KI碘染母液,用PBS缓冲液稀释至浓度:0.05%、0.1%、0.2%和0.3% (W/V,以碘浓度计)。

2.4 BPB染色液

用PBS缓冲液配制质量浓度分别为0.05%、0.075%、0.1%和0.2% (W/V)的BPB染色液。

3 染色方法

3.1 碘染色法

取培养至对数生长中后期藻液2 mL, 3 000×g离心5 min,收集沉淀,用PBS缓冲液清洗1遍,加入浓度分别为0.05%、0.1%、0.2%和0.3%的碘染色液,震荡摇匀后,室温下静置5 min,染色结束后用PBS清洗至溶液呈无色。每种处理设4个重复,将上述4种处理的每4个重复置于180 μmol·m⁻²·s⁻¹光照强度下进行曝光处理,处理时间分别为0、1、2和3 h。曝光结束后避光保存并于光学显微镜(OLYMPUS BX51, Japan)下观察染色情况。

3.2 溴酚蓝染色法

取培养至对数生长中后期的藻液,用PBS缓冲液清洗后,分为2组,每组4个重复,一组在70 °C水浴中热激40 s,另一组不经热激处理。将两组样品用浓度分别为0.05%、0.075%、0.1%和0.2%的

BPB在室温下染色15 min, PBS缓冲液清洗, 用光学显微镜观察染色情况。

4 扫描电镜(scanning electron microscope, SEM)观察

将热激处理前和处理后的莱茵衣藻和斜生栅藻用戊二醛固定, 参照Truby (1997) 的方法进行脱水制样和扫描电镜观察。

实验结果

1 碘液对蛋白核及其外周淀粉鞘的染色效果

随着碘液浓度增大, 蛋白核染色程度逐渐加深至棕黄色, 叶绿体及整个细胞颜色由绿色逐渐加深至棕黄色(图1)。碘液浓度为0.3%时, 莱茵衣藻和斜生栅藻蛋白核及其外周淀粉鞘均难以分辨, 且莱茵衣藻比斜生栅藻更易于被碘液染色。在0.1%浓度碘染条件下, 可清楚观察莱茵衣藻蛋白核和叶绿体的形态。斜生栅藻碘染色的最佳染色浓度是0.2%, 在此条件下, 可较清晰的观测蛋白核及其外周淀粉鞘。在上述三种碘液浓度染色条件下, 蛋白核及其外围淀粉鞘均无法清晰观察, 且立体感差。

曝光可有效提高蛋白核及其外围淀粉鞘的观察效果。随着曝光时间的延长, 藻细胞颜色由棕黄色变至黄绿色, 蛋白核的颜色变化程度较小, 但曝光后的蛋白核更容易分辨(图2)。莱茵衣藻在0.05%和0.1%染色浓度条件下曝光2 h, 0.2%染液浓度条件下曝光3 h, 其蛋白核的立体感加强, 可明显

观察到外周淀粉鞘与蛋白核(图2-A)。碘染液浓度达到0.3%时, 藻细胞曝光3 h后也能得到较好的染色效果, 叶绿体和蛋白核形态清晰可见。由于曝光处理后藻细胞整体颜色变浅, 因此, 染液浓度较低(0.05%)的藻细胞在曝光3 h后会出现藻体发白的现象。斜生栅藻曝光后的变化趋势和最佳染色、曝光条件与莱茵衣藻相同(图2-B), 但斜生栅藻叶绿体边缘不如莱茵衣藻清晰。

总之, 碘染色与曝光处理相结合, 可作为初步快速观察蛋白核一种方法, 但同时清晰观察蛋白核和淀粉鞘, 该染色方法还待改进。

2 BPB对蛋白核染色的效果

未热激预处理的莱茵衣藻经0.05%和2% BPB染色, 细胞着色分别过浅和过深, 蛋白核边缘模糊, 且不易分辨。当BPB浓度为0.075%和1%时, 蛋白核染色后呈蓝色(图3-B), 可分辨, 但轮廓欠佳。经热激预处理的莱茵衣藻, 在4个BPB浓度染色条件下, 蛋白核均呈现出清晰的鲜蓝色(图3-A), 边缘清晰、立体感强, 并且染色时间仅为15 min。BPB对热激预处理后的莱茵衣藻蛋白核的染色效果显著优于未热激预处理的藻细胞。

斜生栅藻热激预处理后的染色效果与莱茵衣藻情况相似。经过热激预处理后, BPB染色效果显著改善(图4-A), 藻细胞整体呈蓝色, 蛋白核着色明显, 呈鲜蓝色, 且边缘清晰, 易于观察。经15 min染色后, 未经热激预处理的斜生栅藻只有少数细胞蛋白核染成蓝色, 大部分藻细胞内无蓝色染液(如

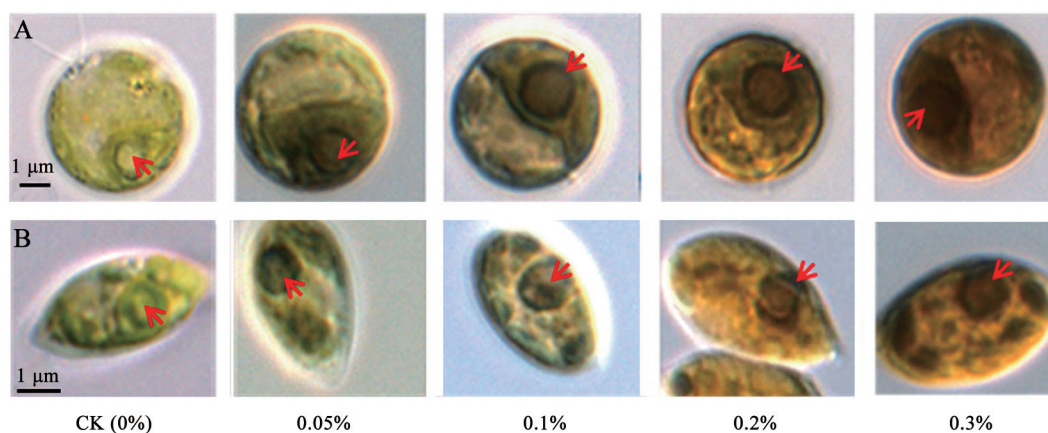


图1 在不同碘液浓度下, 莱茵衣藻(A)和斜生栅藻(B)未曝光处理时的蛋白核染色效果

Fig.1 Pyrenoid stained with different concentrations of iodine without exposure in *C. reinhardtii* (A) and *S. obliquus* (B)

图中红色箭头指示蛋白核及外周淀粉鞘。

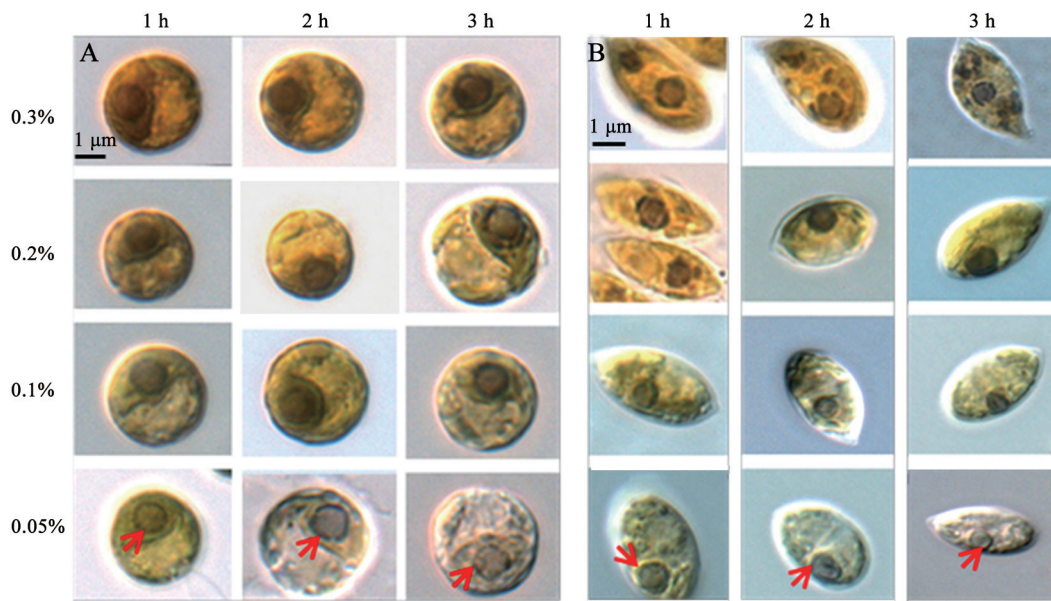


图2 不同曝光时间处理对莱茵衣藻(A)和斜生栅藻(B)蛋白核碘染效果的影响

Fig.2 Effects of exposure time on pyrenoid staining with different concentrations of iodine in *C. reinhardtii* (A) and *S. obliquus* (B)

图中红色箭头指示蛋白核及外周淀粉鞘。

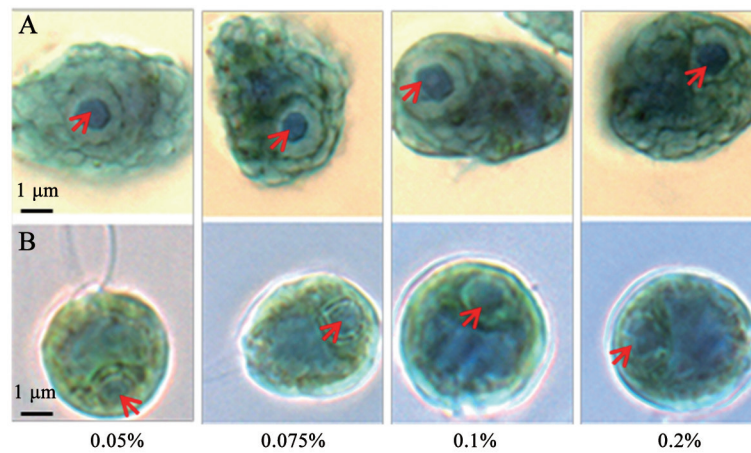


图3 不同浓度BPB浓度对莱茵衣藻的蛋白核的染色效果

Fig.3 Effects of different concentrations of bromophenol blue on pyrenoid staining in *C. reinhardtii*

A: 70 °C热激预处理40 s; B: 对照组。图中红色箭头指示蛋白核。

图4-B所示)。

3 热激处理对莱茵衣藻和斜生栅藻的结构的影响

热激预处理前,藻细胞形态完整(图5-A和B;图6-A和B)。热激预处理后,光学显微镜下莱茵衣藻细胞膜呈网格状(图5-C),经热激预处理的栅藻形态并未发生较大改变。电镜下观察发现,经过热激预处理的莱茵衣藻细胞膜上出现大量孔洞(图

5-D)。斜生栅藻细胞表面受到细胞壁的保护,尽管未能观察到细胞膜孔洞结构,但可直接观察到细胞壁受到破坏,有助于BPB直接渗透至细胞内的蛋白核,有效对蛋白进行染色观察(图6-D)。

讨 论

蛋白核是存在于多种真核藻类叶绿体内的一

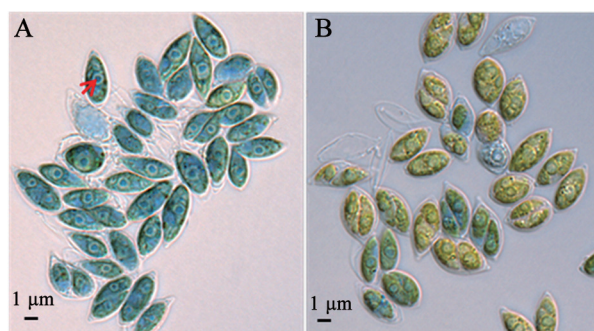


图4 热激预处理对斜生栅藻蛋白核染色效果的影响
Fig.4 Effects of heat shock on pyrenoid staining in *S. obliquus* with bromophenol blue

A: 热激预处理斜生栅藻蛋白核的染色情况; B: 未热激预处理斜生栅藻蛋白核的染色情况。图中红色箭头指示蛋白核。

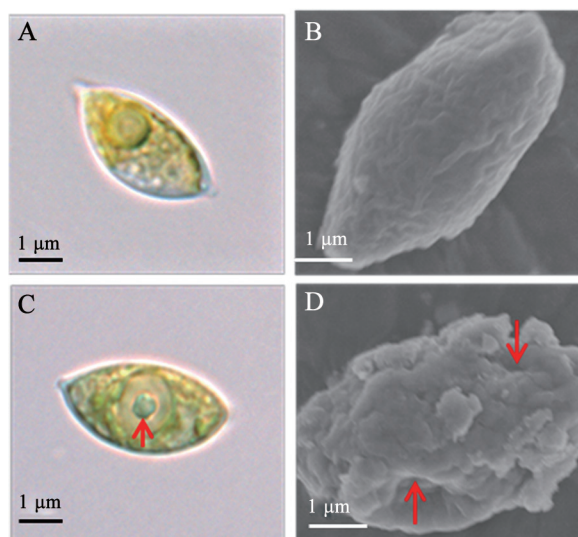


图6 热激处理对斜生栅藻细胞膜和蛋白核观察的影响
Fig.6 Effects of heat treatment on cell and pyrenoid in *S. obliquus*

A和B分别是热激预处理前光学显微镜和扫描电镜下的斜生栅藻细胞; C和D分别是热激预处理后光学显微镜和扫描电镜下的斜生栅藻细胞。红色箭头指示热激预处理后蛋白核和受损的细胞表面。

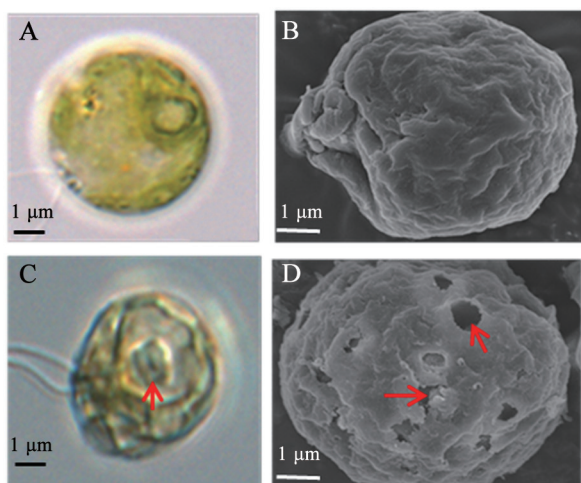


图5 热激预处理对莱茵衣藻细胞膜和蛋白核观察的影响
Fig.5 Effects of heat treatment on cell and pyrenoid in *C. reinhardtii*

A和B分别是热激预处理前光学显微镜和扫描电镜下的莱茵衣藻细胞; C和D分别是热激预处理后光学显微镜和扫描电镜下的莱茵衣藻细胞。红色箭头指示热激处理后蛋白核和细胞表面孔洞。

种独特的蛋白复合体, 或镶嵌于叶绿体内部, 或位于叶绿体边缘突出(Griffiths 1970)。目前认为其主要功能是参与CO₂浓缩, 同时高效固定CO₂。产物淀粉常积累于蛋白核周围形成块状淀粉鞘(Kuchitsu等1988a, 1991), 为通过染色淀粉观察蛋白核提供了有利条件。虽然碘染淀粉可以在一定程度上观察蛋白核, 但碘与外周淀粉鞘更容易结合, 微藻细胞内的淀粉鞘和蛋白核为球形结构, 因此, 直接碘

染更加有利于观察外周淀粉鞘。如果未准确控制碘染条件, 染色立体效果不佳, 无法清晰分辨蛋白核和外周淀粉鞘。同时, 基于碘光照后易升华和碘化钾在光下可缓慢分解为碘的原理, 曝光处理有效改善染色效果, 增加立体感, 可简单区分蛋白核与外周淀粉鞘(图2)。

除此之外, 受碘主要染色淀粉的限制, 对于未有明显淀粉鞘包围的蛋白核, 碘染法则不适用。例如角苔属(*Anthoceros*)植物, 其含有25至30个近似圆盘状或者纺锤形的蛋白核(Griffiths 1970)。藻类细胞的蛋白核在细胞分裂过程中发生变化, 蛋白核会在细胞分裂前消失, 并在子代细胞中重新生成(Griffiths 1970), 此时蛋白核外周淀粉鞘不太明显, 难以使用碘染法准确染色观察。一些研究表明, 蛋白核的发育受外界CO₂浓度的调控(Miyachi等1986; Tsuzuki等1986; Ramazanov等1994; 蔡春尔等2009), 且蛋白核淀粉含量和细胞颗粒淀粉含量受到氮元素等条件影响(Kuchitsu等1988b), 在上述情况下, 需要对蛋白核直接染色, 而非通过淀粉鞘进行间接观察。因此, 针对细胞包含多个蛋白核或蛋白核发育过程中淀粉鞘不发达的情况, 直接

染色观察蛋白核的溴酚蓝染色方法,可以弥补碘染法的缺陷。

BPB作为常用的蛋白染色剂,不易进入微藻细胞,特别是细胞壁较厚的微藻,如斜生栅藻,因此,需要对微藻细胞进行热激预处理,破坏细胞壁结构,使BPB与蛋白核直接相互作用。经过热激预处理的莱茵衣藻和斜生栅藻,4个BPB染色浓度,蛋白核均呈现出清晰的鲜蓝色,边缘清晰、立体感强(图3和4),且最短染色时间仅为15 min,显著短于文献报导中的1 h (Kuchitsu等1988a)。扫描电镜下观察结果表明,在热激预处理后,莱茵衣藻和斜生栅藻的细胞膜和细胞壁的结构分别受到严重破坏,其中莱茵衣藻细胞表面呈现大量孔洞结构(图5),膜选择性功能丧失(李合生2006),BPB分子可以快速进入到细胞内,与蛋白质充分结合,极大缩短了染色时间,提高了染色效果。热激预处理后的两种藻类蛋白核周围均出现未着色的空白区域,可能是蛋白核外周的淀粉鞘在热激条件下被溶解,使BPB与蛋白核快速着色,颜色鲜亮。与传统的HgCl₂固定再使用BPB的染色方法相比,使用热激和溴酚蓝染色相结合,具有无毒、时间短和效果好的优势,更加适用于微藻细胞蛋白核的观察。

本研究通过对比碘液和BPB对莱茵衣藻和斜生栅藻蛋白核及其外周淀粉鞘的染色效果,发现在适宜浓度下,两种染液均可对藻类蛋白核进行染色,但碘主要是通过染色蛋白核外周淀粉鞘来观察蛋白核,容易染色过深。尽管可以通过曝光加以改善,但碘染法不适用于淀粉鞘不发达及颗粒淀粉较多的微藻。通过热激预处理和溴酚蓝染色,可有效地提高蛋白核染色率和缩短染色时间,且蛋白核边缘清晰,着色明显,比碘染法效果更好,克服了碘染法的缺点。热激与BPB结合染色作为一种快速观察蛋白核的方法,可为后续研究微藻高效固碳结构—蛋白核的结构和功能奠定直接观察的技术基础。

参考文献

蔡春尔,尹顺吉,孙净,山梅,汪卿,霍元子,何培民(2009). CO₂浓度对条浒苔Rubisco酶聚集蛋白核的影响. 生物技术通报, (增刊): 271~276
李合生(2006). 现代植物生理学(第二版). 北京: 高等教育出版社, 348~349

夏建荣,高坤山(2002). 不同 CO₂ 浓度下培养的蛋白核小球藻细胞结构的变化. 武汉植物学研究, 20 (5): 403~404
Badger MR, Andrews TJ, Whitney S, Ludwig M, Yellowlees DC, Leggat W, Price GD (1998). The diversity and coevolution of Rubisco, plastids, pyrenoids, and chloroplast-based CO₂-concentrating mechanisms in algae. Can J Bot, 76 (6): 1052~1071
Badger MR, Price GD (2003). CO₂ concentrating mechanisms in cyanobacteria: molecular components, their diversity and evolution. J Exp Bot, 54 (383): 609~622
Geraghty AM, Spalding MH (1996). Molecular and structural changes in *Chlamydomonas* under limiting CO₂ (a possible mitochondrial role in adaptation). Plant Physiol, 111 (4): 1339~1347
Griffiths DJ (1970). The pyrenoid. Bot Rev, 36 (1): 29~58
Kuchitsu K, Tsuzuki M, Miyachi S (1988a). Characterization of the pyrenoid isolated from unicellular green alga *Chlamydomonas reinhardtii*: Particulate form of Rubisco protein. Protoplasma, 144 (1): 17~24
Kuchitsu K, Tsuzuki M, Miyachi S (1988b). Changes of starch localization within the chloroplast induced by changes in CO₂ concentration during growth of *Chlamydomonas reinhardtii*: independent regulation of pyrenoid starch and stroma starch. Plant Cell Physiol, 29 (8): 1269~1278
Kuchitsu K, Tsuzuki M, Miyachi S (1991). Polypeptide composition and enzyme activities of the pyrenoid and its regulation by CO₂ concentration in unicellular green algae. Can J Bot, 69 (5): 1062~1069
Meyer MT, Genkov T, Skepper JN, Jouhet J, Mitchell MC, Spreitzer RJ, Griffiths H (2002). Rubisco small-subunit α -helices control pyrenoid formation in *Chlamydomonas*. Proc Natl Acad Sci USA, 109 (47): 19474~19479
Miyachi S, Tsuzuki M, Maruyama I, Gantar M, Miyachi S, Matsushima H (1986). Effects of CO₂ concentration during growth on the intracellular structure of *Chlorella* and *Scenedesmus* (Chlorophyta). J Phycol, 22: 313~319
Nozaki H, Onishi K, Morita E (2002). Differences in pyrenoid morphology are correlated with differences in the *rbcl* genes of members of the *Chloromonas* lineage (Volvocales, Chlorophyceae). J Mol Evol, 55: 414~430
Ramazanov Z, Rawat M, Henk MC, Mason CB, Matthews SW, Moroney JV (1994). The induction of the CO₂-concentrating mechanism is correlated with the formation of the starch sheath around the pyrenoid of *Chlamydomonas reinhardtii*. Planta, 195 (2): 210~216
Robert K, Greanum E, Leegood RC, Raven JA (2007). Carbon acquisition by diatoms. Photosynth Res, 93: 79~88
Truby EW (1997). Preparation of single-celled marine dinoflagellates for electron microscopy. Microsc Res Tech, 36 (4): 337~340
Tsuzuki M, Gantar M, Aizawa K, Miyachi S (1986). Ultrastructure of *Dunaliella tertiolecta* cells grown under low and high CO₂ concentrations. Plant Cell Physiol, 27: 737~739
Villarejo A, Orús MI, Martínez F (1997). Regulation of the CO₂-concentrating mechanism in *Chlorella vulgaris* UAM 101 by glucose. Physiol Plant, 99 (2): 293~301