

研究简报

有毒铜绿微囊藻 *M. aeruginosa* PCC 7820

对氨基酸的吸收

徐平\* 曾昭琪

(南京大学生物系, 210008)

UPTAKE OF AMINO ACIDS BY TOXIC *MICROCYSTIS*  
*AERUGINOSA* PCC 7820

Xu Ping\* and Tseng Chaotsi

(Department of Biology, Nanjing University, 210008)

关键词 铜绿微囊藻, 氨基酸, 毒性

Key words *Microcystis aeruginosa*, Amino acids, Toxicity

有毒微囊藻在世界范围出现, 我国也已有报道<sup>[1]</sup>。目前已知的微囊藻毒素大多由几个氨基酸组成。研究氨基酸与毒素之间的关系, 必须了解有毒蓝藻对外源氨基酸的吸收情况, 为此, 作者对有毒微囊藻的氨基酸吸收进行了研究。

## 1 材料和方法

1.1 材料 铜绿微囊藻 (*M. aeruginosa* PCC7820) 有毒株来自 Prof. G.A.Codd, 英国丹迪大学。将上述藻株接种于 BG11<sup>[2]</sup> 培养基中, 25℃、光强 1500lx 连续光照培养。实验前取培养物于营养肉汤中培养 3d, 检查证明无其它微生物污染。

1.2 蓝藻氨基酸吸收测定 取对数生长的微囊藻, 于 2400r/min 离心 10min, 去上清液。将沉淀悬浮于 1ml pH7.6 的 2mmol/L 磷酸缓冲液中。在原培养条件下放置 30min 后, 取 0.5ml 悬浮液加入到 0.5ml 含放射性氨基酸的缓冲液 (2mmol/L 磷酸缓冲液中含一定量 <sup>14</sup>C 标记氨基酸) 中。定时取样, 经预湿的 Whatman 2.5cm GF/C 玻璃滤纸过滤抽干, 用约 10ml 蒸馏水洗涤细胞表面, 再抽干后置闪烁测定小瓶中。60℃ 烘干 (约 3h) 后, 加入闪烁液并测定放射性强度<sup>[3]</sup>。

1.3 氨基酸掺入蛋白质及动力学测定 测定吸收后的氨基酸进入蛋白质及动力学情况见文献<sup>[3]</sup>。

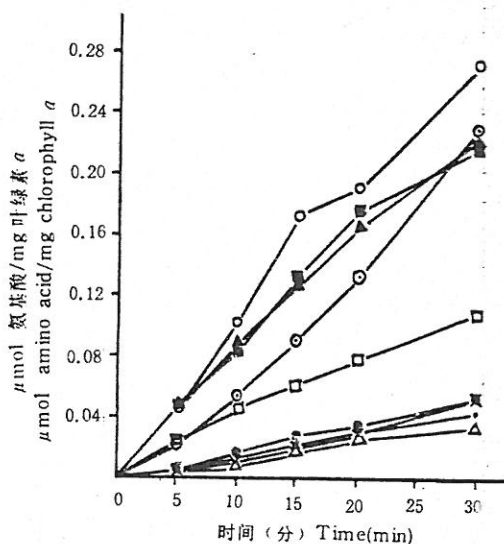
1.4 叶绿素含量测定 离心微囊藻细胞, 重新悬浮于 80% 丙酮溶液中, 4℃ 萃取 24h 后, 比色测定叶绿素 a 含量。

## 2 结果与讨论

2.1 微囊藻对多种氨基酸的吸收 用 <sup>14</sup>C 氨基酸测定吸收实验表明, 有毒微囊藻能吸收多种外源氨基酸 (图 1)。据报道, 微囊藻肽类毒素有多种, 不同藻株甚至同一藻株都可能不同结构和组成的毒素<sup>[4, 5, 6]</sup>, 但这些毒素基本都是由丙氨酸、亮氨酸、甲基天冬氨酸、谷氨酸和精氨酸等氨基酸组成的环状小肽。实验证明有毒微囊藻能够吸收多种氨基酸, 但这些氨基酸被吸收后, 是否参与有毒微囊藻体内毒素的生物合成, 还有待于进一步探讨。

\* 现在浙江农业大学生物技术研究所工作。

1991 年 7 月 15 日收到。

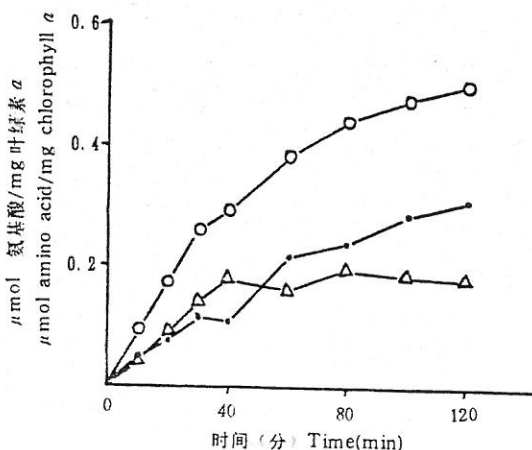
图1 微囊藻对<sup>14</sup>C标记氨基酸的吸收

○: 丙氨酸; ⊙: 精氨酸; △: 天冬酰胺; ×: 天冬氨酸; ·: 谷氨酸;

■: 组氨酸; □: 亮氨酸; ▲: 赖氨酸; ●: 苯丙氨酸

Fig.1 Uptake of <sup>14</sup>C labelled amino acids by *M. aeruginosa*

○: ala; ⊙: arg; △: asn; ×: asp; ·: glu; ■: his; □: leu; ▲: lys; ●: phe;

图2 <sup>14</sup>C 苯丙氨酸在微囊藻细胞中的代谢

○: 细胞中放射性; ·: TCA 不溶解部分放射性 (蛋白质); △: TCA 溶解部分放射性 (游离氨基酸)

Fig.2 Metabolism of <sup>14</sup>C labelled phenylalanine in *M. aeruginosa* cells

○: radioactivity in cells; ·: radioactivity in TCA insoluble fraction (protein); △: radioactivity in TCA soluble fraction (pool)

**2.2 吸收氨基酸掺入蛋白质的测定** 比较三氯醋酸(TCA)处理前后微囊藻细胞中的<sup>14</sup>C 苯丙氨酸, 结果如图2。该实验表明,微囊藻吸收氨基酸后,迅速将它合成为蛋白质。随着吸收增加,细胞内总放射性及蛋白质内放射性(TCA 不溶解部分)不断增加,而细胞内游离氨基酸(TCA 溶解部分)上升到一定时期后则停止上升,达到平衡。

通过改变底物浓度测定微囊藻对苯丙氨酸吸收速度变化的动力学实验表明,它对氨基酸的吸收速度依赖于底物浓度,其米氏常数  $K_m$  为  $20.2 \mu\text{mol/L}$ , 最大吸收速度  $V_{max}$  为  $0.0417 \mu\text{mol/mg 叶绿素 a/min}$ 。蓝藻这种对氨基酸的吸收是需要能量的主动吸收,在另外用呼吸链抑制剂的实验中也证明了这一点<sup>[3]</sup>。

**2.3 微囊藻对几种氨基酸的竞争吸收** 为测定有毒微囊藻对氨基酸的吸收系统有无特异性,便于研究毒素,在测定微囊藻对<sup>14</sup>C 氨基酸吸收的同时,在溶液中加入另一种超过量的未经放射性标记的氨基酸。比较加入未标记氨基酸前后,微囊藻对标记氨基酸吸收的变化(表1),它说明,中性氨基酸苯丙氨酸的吸收可被丙氨酸、亮氨酸抑制;酸性氨基酸谷氨酸的吸收被天冬氨酸、天冬酰胺抑制;碱性氨基酸赖氨酸的吸收被精氨酸、组氨酸抑制。这初步表明,在有毒微囊藻细胞中,至少有三种不同的、比较广泛的氨基酸吸收系统:中性、酸性和碱性系统。据报道,原核异养的大肠杆菌中有30多种特异的氨基酸吸收系统<sup>[7]</sup>,而光能自养的真核高等植物细胞中仅有2—3种广泛性氨基酸吸收系统<sup>[6]</sup>。微囊藻是光能自养的原核生物,它的氨基酸吸收系统与大肠杆菌不同,而与高等植物比较接近。

表 1 铜绿微囊藻对不同氨基酸的竞争吸收

Tab.1 Competitive uptake of different amino acids by *M. aeruginosa*

标记的氨基酸 Labelled amino acid (1.3 $\mu$ mol/L)	未标记的氨基酸 Unlabelled amino acid (50 $\mu$ mol/L)	<sup>14</sup> C 吸收百分比 <sup>14</sup> C uptake (% control)
苯丙氨酸 (phe)	—	100.0
	苯丙氨酸 (phe)	10.9
	亮氨酸 (leu)	6.2
	丙氨酸 (ala)	14.0
	谷氨酸 (glu)	54.8
	精氨酸 (arg)	61.1
	天冬酰胺 (asn)	69.0
	天冬氨酸 (asp)	87.9
赖氨酸 (lys)	—	100.0
	赖氨酸 (lys)	11.9
	精氨酸 (arg)	0.8
	组氨酸 (his)	17.6
	谷氨酸 (glu)	62.0
	苯丙氨酸 (phe)	75.4
	—	100.0
	谷氨酸 (glu)	8.3
谷氨酸 (glu)	—	100.0
	谷氨酸 (glu)	8.3
	天冬氨酸 (asp)	11.5
	天冬酰胺 (asn)	28.1
	组氨酸 (his)	76.8
	精氨酸 (arg)	84.5
	赖氨酸 (lys)	88.2
	苯丙氨酸 (phe)	92.1

## 参 考 文 献

- [1] 张青学, 俞敏娟. 铜绿微囊藻 (*Microcystis aeruginosa*) 水华毒性及毒素的研究. 环境科学学报, 1989, 9(1): 86—94.
- [2] Stainer R Y, Kunisawa R, Mandel M, Cohen-Bazire G. Purification and properties of unicellular blue-green algae (Order Chroococcales). *Bacteriol. Rev.*, 1971, 35: 171—205.
- [3] Xu P, McAuley P J. Uptake of amino acids by the cyanobacterium *Anabaena* ATCC27893. *New Phytol.*, 1990, 115: 581—585.
- [4] Botes D P, Wessels P L, Kruger H, Runnegar M T C, Stntikarn S, Smith R J, Barna J C J, Williams D H. Structural studies on cyanoginosins -LR, -YR, -YA and -YM, peptide toxins from *Microcystis aeruginosa*. *J. Chem. Soc. Perkins Trans.*, 1985, 1: 2747—2748.
- [5] Carmichael W W. Algal toxins. *Advance in Botanical Research*, 1986, 12: 47—101.
- [6] Van der Westhuizen A J, Eloff J. N, Kruger G H J. Isolation of several toxins from the cyanobacterium, *Microcystis aeruginosa* (UV-006). *South Africa Journal of Science*, 1988, 84: 70—71.
- [7] Hama H, Shimamoto T, Tsuda M, Tsuchiya T. Characterization of a novel L-serine transport system in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, 1988, 170: 2236—2239.
- [8] Vaisanen E, Sopanen T. Uptake of proline by the scutellum of germinating barley grain. *Plant Physiol.*, 1986, 80: 902—907.