

## 研究报告

## 一种水华蓝藻气囊的分离纯化及气囊结构蛋白的鉴定

许柏英<sup>1,2\*</sup> 苗娅<sup>1</sup>

(1. 重庆师范大学生命科学学院 重庆 401331)

(2. 中国科学技术大学生命科学学院 安徽 合肥 230026)

**摘要:**【目的】从水华蓝藻铜绿微囊藻(*Microcystis aeruginosa* PCC 7806)的细胞中分离纯化出高纯度且完整的气囊,并对气囊的结构组成蛋白进行鉴定。【方法】采用渗透冲击与溶菌酶处理相结合的方法,进行多次低速离心提纯气囊,纯化所得气囊用负染色透射电镜观察气囊的纯度、完整度和形态。将纯化得到的气囊溶解后进行 SDS-PAGE 电泳,电泳后的蛋白条带运用 LC-MS 质谱法完成鉴定。【结果】从气囊的电镜照片可以看出提纯后的气囊纯度高,完整性好。气囊是两端呈锥状的圆柱体状,各气囊的直径大小一致,约 120 nm,但长度不同,从约 500 nm 到 1 500 nm 不等。SDS-PAGE 电泳和质谱法鉴定出气囊的两种主要结构组成蛋白 GvpA 和 GvpC。【结论】这些研究对后续揭示气囊的精细结构和深入研究水华蓝藻浮力调节机制具有重要的意义。

**关键词:** 铜绿微囊藻, 气囊, 分离纯化, 结构蛋白, 电镜观察, 质谱鉴定

## Isolation and structural proteins determination of gas vesicles from a bloom-forming cyanobacterium

XU Bo-Ying<sup>1,2\*</sup> MIAO Ya<sup>1</sup>

(1. College of Life Sciences, Chong Qing Normal University, Chongqing 401331, China)

(2. School of Life Sciences, University of Science and Technology of China, Hefei, Anhui 230026, China)

**Abstract:** [Objective] In order to isolate high-purity and intact gas vesicles from the cells of bloom-forming cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* PCC 7806, and to identify structural proteins of gas vesicles. [Methods] Osmotic shock combined with lysozyme treatment and low speed centrifugation were used to isolate and purify gas vesicles. The purity, integrity and characteristic shape of gas vesicles were examined by negative staining and transmission electron microscope. The structural proteins of gas vesicles were detected and identified by SDS-PAGE electrophoresis and

**Foundation item:** Natural Science Foundation Project of Chongqing Science and Technology Committee (CSTC) (No. cstc2015jcyjBX0142, cstc2016jcyjA0375); The Science and Technology Project of Chongqing Municipal Education Commission (No. KJ1500326); The Doctoral Scientific Research Foundation of Chongqing Normal University (No. 15XLB009)

\*Corresponding author: E-mail: xbywh@126.com

**Received:** November 03, 2016; **Accepted:** December 19, 2016; **Published online** (www.cnki.net): December 27, 2016

**基金项目:** 重庆市基础与前沿研究计划项目(No. cstc2015jcyjBX0142, cstc2016jcyjA0375); 重庆市教委科学技术研究项目(No. KJ1500326); 重庆师范大学博士科研启动基金项目(No. 15XLB009)

\*通讯作者: E-mail: xbywh@126.com

**收稿日期:** 2016-11-03; **接受日期:** 2016-12-19; **优先数字出版日期**(www.cnki.net): 2016-12-27

LC-MS. **[Results]** Electron microscopic examination indicated that the isolated gas vesicles had high purity and showed good integrity. They took a cylinder shape with conical end caps and had a similar diameter of about 120 nm and the variable lengths from 500 to 1 500 nm. GvpA and GvpC identified by SDS-PAGE electrophoresis and LC-MS were two main structural proteins of gas vesicles. **[Conclusion]** Our findings would have great significance to reveal the fine structure of gas vesicles and to further study the buoyancy regulation mechanism of bloom-forming cyanobacteria.

**Keywords:** *Microcystis aeruginosa*, Gas vesicles, Isolation, Structural protein, Electron microscopic observation, Mass spectrometry identification

水资源是人类生存必需的物质基础之一,但是近年来由于城市生活、农业生产和社会工业化快速发展使得我国水体富营养化加剧,最终导致蓝藻水华暴发,严重影响了人们的生产生活。据统计,目前我国已有超 60%的水体暴发水华,包括滇池、巢湖、太湖以及长江的三峡库区等<sup>[1-2]</sup>。其实不仅仅是我们国家,世界各国的生态系统都面临蓝藻水华的威胁。因此,防治蓝藻水华已是当前水资源保护研究的重要问题之一。

蓝藻,因呈蓝绿和暗绿色又名蓝绿藻,和细菌一样具有原核和裂殖的特征,又被称为蓝细菌,是一种革兰氏阴性的光合自养原核生物,也是地球上最古老的生物之一<sup>[3-4]</sup>。研究证实造成淡水湖泊生态系统暴发蓝藻水华较为常见的蓝藻种类包括微囊藻属、鱼腥藻属、束丝藻属等。其中铜绿微囊藻(*Microcystis aeruginosa* PCC 7806)不仅是我国太湖、巢湖、滇池等三湖水华形成的最优势藻种,也是世界范围内分布广、规模大、水华时间持续长的一类代谢生物毒素的藻类。

目前,蓝藻水华暴发的原因有多方面的理论研究假说<sup>[5]</sup>。其中,浮力调节机理假说认为蓝藻可通过一种亚细胞器来改变细胞密度为自身提供浮力,从而迁移至有利于其生长的水层来获取竞争优势<sup>[6]</sup>。这种亚细胞器结构就叫气囊(Gas vesicle)。100 多年前,德国微生物学家在水华蓝藻中发现伪空胞(Gas vacuole)结构<sup>[7]</sup>。后续研究发现这些伪空胞是由一簇簇中空的圆柱状囊泡堆叠而成的<sup>[8]</sup>,这些囊泡即被命名为气囊。成熟的气囊是呈现纺锤体状或者圆柱体状,宽度为 0.045  $\mu\text{m}$ –0.200  $\mu\text{m}$ ,长

度为 0.1  $\mu\text{m}$ –2.0  $\mu\text{m}$ 。气囊壁的厚度约为 2 nm,允许气体通过<sup>[9]</sup>。气囊结构稳定,但当暴露于一定压力下就会出现不可逆的破裂,这个压力即为临界压力,从 0.09 MPa 到超过 1 MPa 不等<sup>[9-10]</sup>。研究表明,气囊仅由蛋白质组成,气囊的合成涉及多个不同的气囊蛋白 Gvp (Gas vesicle proteins),其中 GvpA 和 GvpC 是主要结构组成蛋白。疏水性很强的蛋白 GvpA 是气囊的最主要结构蛋白,它在气囊壁上形成间距为 4.6 nm 的棱纹<sup>[9]</sup>。GvpC 则位于气囊壁的最外表面,与 GvpA 相互作用来增强气囊壁的力度,从而稳定气囊的结构<sup>[9,11]</sup>。除了 GvpA 和 GvpC 外,我们还鉴定出铜绿微囊藻(*M. aeruginosa* PCC 7806)气囊蛋白 GvpF 可能是气囊的结构组成蛋白之一<sup>[12]</sup>,但其余结构组分至今尚不清楚。虽然人们对气囊的研究迄今已有 50 多年<sup>[8]</sup>,但是它的结构细节仍然是一个谜。而且气囊形态发生的起始以及哪些 Gvp 蛋白参与合成起始和圆柱体的生长过程均不清楚。

将气囊从藻细胞中分离纯化出来,才能更好地研究它的形态特点、物理性质和结构组成。前人通过摸索建立了一些气囊的纯化方法,比如单独采用渗透冲击破裂细胞<sup>[13-14]</sup>或者溶菌酶处理破裂细胞<sup>[15]</sup>。后续为了获得高纯度的气囊,采用滤膜过滤<sup>[16]</sup>或者柱层析<sup>[13,17]</sup>的方法进一步纯化气囊。本研究是对铜绿微囊藻(*M. aeruginosa* PCC 7806)的气囊进行分离纯化,依据铜绿微囊藻的藻细胞及气囊特征,基于前人建立的气囊纯化方法,在此基础上做了一定的改进。本研究在培养蓝藻时加入青霉素 G 和  $\text{Mg}^{2+}$ ,这样可以抑制粘肽整合到细胞壁而弱化细胞壁的力度。后续再综合运用渗透冲击结合溶菌酶

处理的方法,在不破坏气囊完整度的前提下能更有效的裂解藻细胞。同时为得到高纯度且完整的气囊,依据气囊低于其它细胞组分密度的特性,简化了纯化步骤,仅利用长时间、多次低速离心加速气囊漂浮的方法分离气囊。因为使用滤膜过滤或者柱层析的方法得到的气囊破裂程度较大,且气囊的得率和纯度均不高。通过改进的纯化方法成功地对铜绿微囊藻(*M. aeruginosa* PCC 7806)的气囊进行了分离纯化,结合负染色电镜观察纯化后气囊的纯度和完整度,并通过 SDS-PAGE 和质谱结果初步鉴定了气囊结构蛋白的组成。这为后续进一步研究气囊的精细结构和合成过程奠定了基础,也对研究蓝藻特别是微囊藻的浮力调控和垂直迁移特征以及水华形成机制有着十分重要的意义。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料、主要试剂和仪器

铜绿微囊藻(*Microcystis aeruginosa* PCC 7806)原始菌株购自中国科学院水生生物研究所淡水藻种库。青霉素 G 和溶菌酶等为 BBI 公司生产,购自生工生物工程(上海)股份有限公司;其它常用生化试剂均为国产分析纯。Tecnai G2 F20 穿透电镜,美国 FEI 公司。

### 1.2 实验方法

**1.2.1 铜绿微囊藻的室内培养:**铜绿微囊藻(*M. aeruginosa* PCC 7806)菌株在超净台完成接种后,用 BG11 培养基<sup>[14]</sup>在控温摇床中进行扩大培养。培养条件为恒温 30 °C、持续光照 30  $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ 、200 r/min 振荡培养。培养至  $OD_{750}$  达到 1.0 即可用于后续实验。

**1.2.2 气囊的分离纯化:**气囊的分离和纯化主要参考 Weathers 等<sup>[14]</sup>的方法,但做了进一步的改进。当蓝藻培养至  $OD_{750}$  达到 0.66–1.00 之间时,加入青霉素 G (终浓度为 0.16 mg/L)和  $\text{Mg}^{2+}$  (终浓度为 1 mmol/L),继续振荡培养 5 h。培养结束后 4 °C、1 000 $\times g$  低速离心 15 min 收集藻细胞。离心力的大小要考虑微囊藻的临界压力,铜绿微囊藻 *M. aeruginosa* PCC 7806 的平均临界压力是  $0.65\pm 0.09$  MPa<sup>[18]</sup>,最大离心力可

依照公式  $g=(P_c/h)\times 100$  ( $g$  代表离心力,  $P_c$  是临界压力,  $h$  是收集的藻液高度,单位 mm)计算得出<sup>[19]</sup>。

将离心后漂浮于表层以及沉淀的藻细胞均重悬于合适体积的 BG11 培养基中,加入终浓度 1 mg/mL 的溶菌酶裂解细胞壁,37 °C 恒温箱中静置孵育至少 1 h。然后加入终浓度为 1 mol/L 的甘油,用玻棒轻轻搅拌约 15 min。再迅速加入 3 倍体积的 20 mmol/L Tris-HCl pH 7.7,对藻细胞进行渗透冲击,4 °C 静置过夜使细胞被充分裂解。

次日将裂解后的藻细胞 4 °C、300 $\times g$  离心至少 6 h 以上,用 1 mL 移液器收集离心后表面呈弯月形的淡蓝色藻液层。将收集的藻液层用灭菌的双蒸水稀释后再低速离心。这样重复操作至弯月形藻液层的淡蓝色褪去时止。最后将藻液层吸出后置于 1.5 mL EP 管中,用双蒸水稀释后再以 300 $\times g$  离心至少 6 h 以上。这样重复操作至能看见呈弯月形的乳白色藻液层。最后一次可以加速至 3 000 $\times g$  离心,之后吸出分离的气囊即位于液面的乳白色浑浊物。最终纯化的气囊保存在 6.3 mmol/L  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  和 5 mmol/L NaCN 的溶液中<sup>[13-14]</sup>。

**1.2.3 气囊的负染色电镜观察:**将亲水处理后的圆形 400 目的铜网倒扣在已纯化的浓度合适的气囊溶液液滴上,保持实验周围环境干净,静置结合 1 min 左右。然后用滤纸靠铜网边缘吸去多余的气囊溶液,用 2%醋酸铀染色铜网,室温晾干后置于 Tecnai G2 F20 穿透电镜(放大倍数最大是 750 000,电压 200 kV)下观察。操作电镜按放大倍数由小到大调节焦距,找出浓度最合适且染色均匀的视野观察气囊。

**1.2.4 聚丙烯酰胺凝胶电泳和质谱鉴定气囊蛋白:**取纯化的气囊约 1.5  $\mu\text{g}$  和裂解的藻细胞约 30  $\mu\text{g}$ ,向其中均加入终浓度是 2.5%的 SDS 和等体积的 2 $\times$ 制样缓冲液(60 mmol/L Tris-HCl, pH 6.8, 20% Glycerol, 0.2 mol/L Dithiothreitol DTT, 5% Sodium dodecyl sulfate SDS, 0.02% Bromophenol blue),吹吸混合后,置金属浴上 95 °C 加热煮 10 min。然后待冷却至室温 4 000 $\times g$  离心 30 s 后,将样品上样到 15% SDS-PAGE 中电泳鉴定气囊蛋白。其中气囊蛋白浓度是测定

500 nm 的光吸收波长下的压力敏感的光密度 (Pressure-sensitive optical density, PSOD), 1 mg/mL 气囊蛋白的 PSOD 是 20.8<sup>[18,20]</sup>。电泳结束后切出气囊对应泳道的蛋白条带进行 LC-MS 质谱鉴定。

## 2 结果与分析

### 2.1 气囊的分离纯化

气囊纯化至最后步骤, 在经过多次低速离心过程后, 可观察到 EP 管中的气囊会逐渐由蓝绿色变为乳白色(图 1A)。将分离纯化获得的铜绿微囊藻 *M. aeruginosa* PCC 7806 的气囊进行负染后透射电镜观察, 以鉴定气囊的纯度、完整性以及形态。从拍摄的气囊的电镜照片可以看出纯化的气囊纯度很高, 没有其它细胞质杂质或细胞碎片的污染。而

且从整体上来说, 纯化出的气囊的形态完整性比较好, 没有出现大量气囊的破损和断裂(图 1B 和 1D)。

另外, 从气囊的电镜照片还可以看出铜绿微囊藻 *M. aeruginosa* PCC 7806 的气囊是两端呈双锥状的圆柱体状。电镜照片中各气囊的圆柱体直径大小差不多一致, 大约 120 nm (图 1C)。照片中显示气囊的外表面有规则间隔分布的棱纹, 与气囊长轴近乎垂直(图 1C)。

### 2.2 气囊结构蛋白的鉴定

将纯化的气囊溶解处理后进行 SDS-PAGE 电泳检测, 从电泳胶图上可以看出在分离胶上只出现一条蛋白条带(图 2), LC-MS 质谱鉴定为蛋白 GvpC。

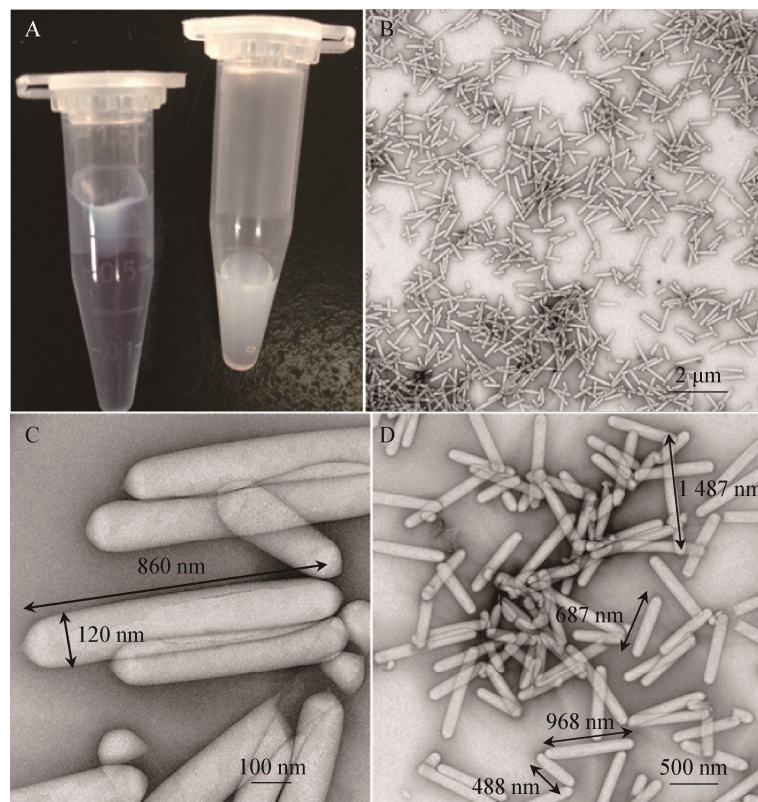


图 1 分离纯化的铜绿微囊藻的气囊

Figure 1 Purified gas vesicles from *M. aeruginosa* PCC 7806

注: A: 纯化过程中的浅蓝色气囊和乳白色气囊; B: 铜绿微囊藻 *M. aeruginosa* PCC 7806 气囊的电镜图; C 和 D: 气囊的尺寸, 气囊的直径和不同长度的大小均在图中分别标出。

Note: A: Light blue and milky white gas vesicles in the purification process; B: Electron micrographs of highly purified intact gas vesicles from *M. aeruginosa* PCC 7806; C and D: Dimensions of gas vesicles; Intact gas vesicles were negatively stained with uranyl acetate; The diameter and different lengths of gas vesicles are labeled respectively.



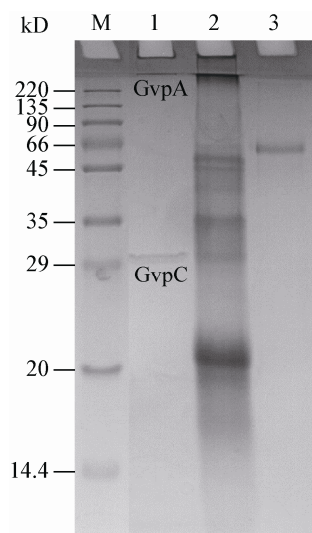


图2 气囊的 SDS-PAGE 电泳检测

**Figure 2 SDS-PAGE analysis of purified gas vesicles**

注: M: 蛋白标签; 1: 纯化的气囊, GvpA 和 GvpC 蛋白已被标出; 2: 细胞裂解液; 3: 对照 BSA.

Note: M: Protein marker; 1: Purified gas vesicles with GvpA and GvpC labeled on lane 1; 2: Cell lysates; 3: BSA (control).

同时, 仔细观察胶图同一泳道的上样孔处, 可以看出有蛋白样品沉淀在胶孔处或积层胶与分离胶的交界处, 并没有随着电泳进入分离胶中(图2)。依据文献报道由于气囊的结构蛋白 GvpA 具有非常强的疏水性质, 一般以不溶状态或多聚体形式存在, 由此可推测此蛋白为 GvpA, 而质谱结果也验证了这一推测。气囊蛋白的电泳鉴定结果与前人的研究结果一致<sup>[21-22]</sup>。

### 3 结论与讨论

基于前人建立的气囊纯化方法, 我们又摸索条件做了几个方面的改进。第一, 运用渗透冲击结合溶菌酶处理的方法裂解藻细胞, 两种温和方法的结合使用能更有效的裂解藻细胞, 且不会破坏气囊的完整性。第二, 为了获得高纯度的气囊, 有的文献中用滤膜过滤<sup>[16]</sup>或者柱层析<sup>[13,17]</sup>的方法使气囊进一步纯化。我们也尝试了使用这两种方法, 但是发现得到的气囊破裂程度较大, 且气囊的得率和纯度均不高。第三, 为了得到纯度和完整度均较高的气囊, 依据气囊比其它细胞组分密度低的特性, 简化

纯化步骤, 仅利用低速离心加速气囊漂浮, 从而达到分离的目的。离心时需先根据气囊的临界压力来计算最大离心力。通过多次用水或缓冲液稀释分离的气囊后再多次低速离心的简易方法, 即可分离出纯度高且完整的气囊。

运用 SDS-PAGE 和质谱鉴定相结合的方法分析纯化获得的气囊的蛋白质组成, 结果只鉴定出气囊的两种主要结构蛋白 GvpA 和 GvpC。虽然只鉴定出这两种含量最大的结构蛋白, 但这一结果并不能说明气囊的结构组成蛋白只有两种, 可能其它的结构蛋白含量很少, 仅通过 SDS-PAGE 和质谱的方法还不能够被检测出, 需要摸索其它更为灵敏的方法进行鉴定。另外, 纯化气囊是在蓝藻生长的对数期或对数末期开始的, 有可能某些结构蛋白在对数期已经降解或尚未开始表达, 所以未被检测出来。

蓝藻气囊的研究历史已经有半个多世纪, 但是气囊的精细结构仍有一些未解之谜。从藻细胞中提纯出高纯度且完整的气囊是气囊结构研究的第一步, 因此气囊的分离纯化方法则显得尤为重要。而我们摸索建立的这种改进了的气囊纯化方法则满足了纯化气囊的要求。但是在气囊结构蛋白鉴定方面, 后续还需要综合考虑气囊结构蛋白的含量及鉴定方法的灵敏度, 还有气囊的生长和降解过程, 需从多方面进行严谨的实验设计, 并尝试更多先进更为灵敏的技术方法进行气囊结构组成蛋白的鉴定。总之, 本研究的结果为后续揭示气囊的精细结构打下了前期的研究基础, 对深入研究水华蓝藻浮力调节的分子机制具有重要的意义。

### 参考文献

- [1] Wang SM, Dou HS, Chen KZ, et al. China Lakes Record[M]. Beijing: Science Press, 1998: 3-21 (in Chinese)  
王苏民, 窦鸿身, 陈克造, 等. 中国湖泊志[M]. 北京: 科学出版社, 1998: 3-21
- [2] Zhong CH. A study on the eutrophication of the three gorges reservoir[D]. Chengdu: Doctoral Dissertation of Sichuan University, 2004 (in Chinese)  
钟成华. 三峡库区水体富营养化研究[D]. 成都: 四川大学博士学位论文, 2004
- [3] Schopf JW. The fossil record: tracing the roots of the

- cyanobacterial lineage[A]/Whitton BA, Potts M. The Ecology of Cyanobacteria: Their Diversity in Time and Space[M]. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2000: 13-35
- [4] Gademan K, Portmann C. Secondary metabolites from cyanobacteria: complex structures and powerful bioactivities[J]. Current Organic Chemistry, 2008, 12(4): 326-341
- [5] Dokulil MT, Teubner K. Cyanobacterial dominance in lakes[J]. Hydrobiologia, 2000, 438(1/3): 1-12
- [6] Reynolds CS, Oliver RL, Walsby AE. Cyanobacterial dominance: the role of buoyancy regulation in dynamic lake environments[J]. New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research, 1987, 21(3): 379-390
- [7] Ahlborn F. Über die Wasserblüte *Byssus flos-aquae* und ihr Verhalten gegen Druck[J]. Verhandlungen des Naturwissenschaftlichen Vereins in Hamburg, 1895, 3: 25-36
- [8] Bowen CC, Jensen TE. Blue-green algae: fine structure of the gas vacuoles[J]. Science, 1965, 147(3664): 1460-1462
- [9] Walsby AE. Gas vesicles[J]. Microbiological Reviews, 1994, 58(1): 94-144
- [10] Stoeckenius W, Kunau WH. Further characterization of particulate fractions from lysed cell envelopes of *Halobacterium halobium* and isolation of gas vacuole membranes[J]. The Journal of Cell Biology, 1968, 38(2): 337-357
- [11] Englert C, Pfeifer F. Analysis of gas vesicle gene expression in *Haloflex mediterranei* reveals that GvpA and GvpC are both gas vesicle structural proteins[J]. The Journal of Biological Chemistry, 1993, 268(13): 9329-9336
- [12] Xu BY, Dai YN, Zhou K, et al. Structure of the gas vesicle protein GvpF from the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*[J]. Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography, 2014, 70(11): 3013-3022
- [13] Jones DD, Jost M. Isolation and chemical characterization of gas-vacuole membranes from *Microcystis aeruginosa* Kuetz. emend. Elenkin[J]. Archiv Für Mikrobiologie, 1970, 70(1): 43-64
- [14] Weathers PJ, Jost M, Lamport DTA. The gas vacuole membrane of *Microcystis aeruginosa*: a partial amino acid sequence[J]. Archives of Biochemistry and Biophysics, 1977, 178(1): 226-244
- [15] Walsby AE, Hayes PK. The minor cyanobacterial gas vesicle protein, GVPc, is attached to the outer surface of the gas vesicle[J]. Microbiology, 1988, 134(10): 2647-2657
- [16] Buckland B, Walsby AE. A study of the strength and stability of gas vesicles isolated from a blue-green alga[J]. Archiv Für Mikrobiologie, 1971, 79(4): 327-337
- [17] Jones DD, Haug A, Jost M, et al. Ultrastructural and conformational changes in gas vacuole membranes isolated from *Microcystis aeruginosa*[J]. Archives of Biochemistry and Biophysics, 1969, 135: 296-303
- [18] Dunton PG, Walsby AE. The diameter and critical collapse pressure of gas vesicles in *Microcystis* are correlated with GvpCs of different length[J]. FEMS Microbiology Letters, 2005, 247(1): 37-43
- [19] Konopka AE, Lara JC, Staley JT. Isolation and characterization of gas vesicles from *Microcycus aquaticus*[J]. Archives of Microbiology, 1977, 112(2): 133-140
- [20] Belenky M, Meyers R, Herzfeld J. Subunit structure of gas vesicles: a MALDI-TOF mass spectrometry study[J]. Biophysical Journal, 2004, 86(1): 499-505
- [21] Griffiths AE, Walsby AE, Hayes PK. The homologies of gas vesicle proteins[J]. Journal of General Microbiology, 1992, 138(6): 1243-1250
- [22] Buchholz BEE, Hayes PK, Walsby AE. The distribution of the outer gas vesicle protein, GvpC, on the *Anabaena* gas vesicle, and its ratio to GvpA[J]. Journal of General Microbiology, 1993, 139(10): 2353-2363