

鱼腥蓝细菌实时观察微型培养系统的建立和应用

唐国芳 王婧蓝 胡胜 陈雯莉 王莉

华中农业大学农业微生物学国家重点实验室,武汉 430070

摘要 为克服传统方法不能实现对特定菌丝或细胞的连续定点观察的难题,利用低熔点琼脂糖培养基将菌丝包埋在玻底培养皿中,制备了鱼腥蓝细菌 PCC 7120 菌株实时观察的微型培养体系。结果表明:在该培养体系中,菌丝能进行正常的生长、分裂和分化;利用该系统可以观察细胞分裂蛋白 FtsZ 和 DNA 双链损伤修复蛋白 RecN 在细胞分裂过程中的动态变化,实现对同一菌丝进行长时间的连续定点观察。

关键词 鱼腥蓝细菌 PCC 7120; 微型培养系统; 连续观察

中图分类号 Q 93-31 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2016)06-0037-07

蓝细菌是地球上现存的最为古老的生物之一,是迄今为止唯一能够进行产氧光合作用的原核微生物,是地球上最重要的初级生产者之一^[1]。除了光合作用之外,有的蓝细菌还能够进行生物固氮作用。目前蓝细菌已成为研究光合作用、生物固氮、细胞分化和生物进化的理想材料。同时,因具有特殊的生理功能且遗传背景相对简单,蓝细菌也作为一个新兴的基因工程宿主菌,在近年来倍受关注。目前,经基因工程修饰后的蓝细菌可用于生产各种生物燃料以及一些精细化产品,如乙醇^[2]、乙烯^[3]、异戊二烯^[4]、正丁醇^[5]、脂肪醇^[6]、游离脂肪酸^[7]、氢气^[8]等。

鱼腥蓝细菌 PCC 7120 (*Anabaena* sp. strain PCC 7120) 属于念珠藻目念珠藻科鱼腥蓝细菌属,是一种能够同时进行光合作用和生物固氮的多细胞丝状蓝细菌^[9-10]。在不含化合态氮源的培养条件下菌丝上的部分细胞能够分化成特定的专司固氮功能的异形胞。鱼腥蓝细菌作为一种多细胞的原核微生物,目前已成为研究细胞分化和多细胞形成机制的重要的模式菌株^[11]。此外,由于异形胞中固氮酶催化的固氮反应会产生大量的 H₂,近年来有研究者利用鱼腥蓝细菌这一特性生产新型清洁生物能源^[12]。

由于鱼腥蓝细菌 PCC 7120 具有多细胞的特性,在其生长分裂的过程中,不同的细胞本身会产生

一定的生理差异;同时还会涉及到细胞交流、物质交换以及信号传导等复杂的生理过程,因此,研究过程要更为复杂。用传统的方法研究鱼腥蓝细菌细胞分化与 DNA 复制以及细胞分裂等事件之间的协调机制时,对胞内一些功能因子或蛋白的动态学变化过程的观察成为难以解决的一大问题。

过去的研究报道中, Laura 等^[13] 使用延时拍摄技术(time lapse)研究了异形胞分化相关蛋白 HetN 在细胞分化过程中在异形胞内的定位情况,通过含 0.5% 琼脂的半固体培养基将菌丝包埋在载玻片上,定时观察胞内 HetN-GFP 的变化。这种观察方法存在一定的局限性:由于菌丝和培养基直接暴露于空气中,容易染菌;同时培养基容易失水干燥,只能用于短时间观察。近年来,一种新型的微流控芯片细胞培养观察系统开始出现,美国斯坦福大学 Quake 研究课题组^[14] 搭建了一个基于微流控芯片的完全自动化的哺乳动物细胞培养平台,实现了对人间充质干细胞的连续培养。Taylor 等^[15] 利用微流控细胞培养芯片,实现了神经细胞的极化生长等。微流控芯片细胞培养平台可以对培养的细胞进行实时检测,在细胞生物学的研究过程中具有重要意义。但由于该培养系统需要极其复杂的仪器设备且价格昂贵、操作复杂,难以实现广泛应用。

本研究利用低熔点琼脂糖培养基将菌丝包埋在

收稿日期: 2016-05-13

基金项目: 国家自然科学基金项目(31570048); 中央高校基本科研业务费专项(2014PY055)

唐国芳,硕士研究生。研究方向: 蓝细菌分子生物学。E-mail: guofang201309@163.com

通信作者: 王莉,博士,副教授。研究方向: 蓝细菌分子生物学。E-mail: wangli@mail.hzau.edu.cn

玻底培养皿中,制备鱼腥蓝细菌 PCC 7120 的微型培养体系,旨在简单易行地完成对蓝细菌的实时定点观察,为蓝细菌细胞水平的研究带来一定的便利。

1 材料与方法

1.1 菌株

本研究所用的菌株见表 1。

1.2 试剂和仪器

低熔点琼脂糖(国药集团),玻底培养皿(武汉金中震荡培养。

表 1 本研究使用的菌株
Table 1 Strains used in this study

菌株 Strain	特点 Description	来源 Source
<i>Anabaena</i> sp. strain PCC 7120	野生型 Wild type	巴斯德菌种保藏中心 Pasteur Culture Collection
pRL277-P _{ftsZ} -Lgfp	Sp ^r Sm ^r , <i>ftsZ</i> 启动子驱动 <i>FsZ</i> 与 <i>Egfp</i> 的翻译融合通过 pRL277 质粒转入野生型 Sp ^r Sm ^r , pRL277 containing <i>ftsZ</i> _{ana} ORF with native promoter, and <i>Egfp</i> coding sequence	笔者所在实验室 Our lab
pRL25T-alr4961-gfp _{uv}	Nm ^r , <i>recN</i> 启动子驱动 <i>RecN</i> 与 <i>Gfpuv</i> 的翻译融合通过 pRL25T 质粒转入野生型 Nm ^r , pRL25T containing <i>recN</i> _{ana} ORF with native promoter, and <i>GFP</i> _{uv} coding sequence	笔者所在实验室 Our lab

1.4 玻底培养

将培养菌株活化至 $D_{750\text{ nm}} = 0.4 \sim 0.5$, 6 000 r/min 离心 2 min 收集 1 mL 菌体,用 500 μL 的 BG11 或 BG11₀(缺氮诱导)培养基重悬菌体,用枪头将菌丝反复吹打或超声波处理至菌丝长度适中(约 8~12 个细胞长度),用相应的培养基清洗菌体 2~3 次,最后用 300 μL 相应的培养基重悬菌体,取 5 μL 菌液分 15~20 滴点在玻底。将无菌的玻底培养皿静置在超净工作台,菌液自然干燥 2~3 min,至肉眼观察不到明显水珠即可(注意观察不可完全干燥,否则菌丝会失水死亡)。取冷却至 28 °C 的含有 0.5% 琼脂的半固体培养基 600 μL ,缓慢加入到培养皿玻底部位(注意培养基温度不可高于 30 °C,以免导致菌体死亡)。盖上培养皿盖至培养基完全凝固,倒置,在显微镜下镜检观察菌丝是否被固定在

苹果生物科技有限公司),Nikon Eclipse 80i 荧光显微镜、QHZ-98B 全温度光照震荡培养箱、GZL-P500B 光照培养箱。

1.3 培养基和培养条件

本研究中,菌株在正常培养条件下所用的培养基为 BG11,缺氮所用的培养基为 BG11₀。菌株置于 30 °C、连续光照(2 400 lx)的光照培养箱中静置培养;或 30 °C、150 r/min、连续光照(2 400 lx)的摇床

中震荡培养。

表 1 本研究使用的菌株

Table 1 Strains used in this study

玻底且视野良好适宜观察。在显微镜下寻找若干个符合实验需求的视野,拍照并记下准确位置,然后将培养皿倒置于光照培养箱中培养。每隔一定的时间间隔,将培养皿置于显微镜下观察,将视野调至所选取的位置,拍照记录,直至实验完成。

2 结果与分析

2.1 玻底培养体系的建立

为了同时满足鱼腥蓝细菌 PCC 7120 菌体培养及显微观察的需求,本研究选用直径为 32 mm、底部中心为直径 15 mm 玻片的玻底培养皿进行菌体培养(图 1)。将活化后的蓝细菌处理为含 8~12 个细胞的短菌丝,通过低熔点半固体培养基将菌丝固定在玻底,适宜的温度条件下进行菌体培养,同时进行菌体的实时观察。

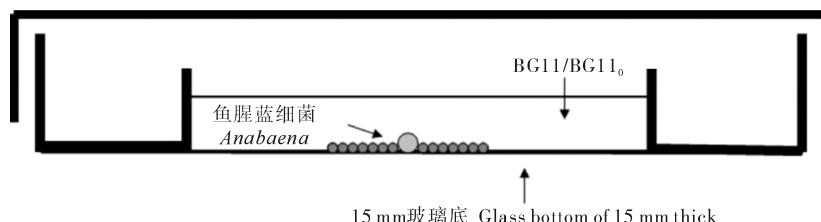


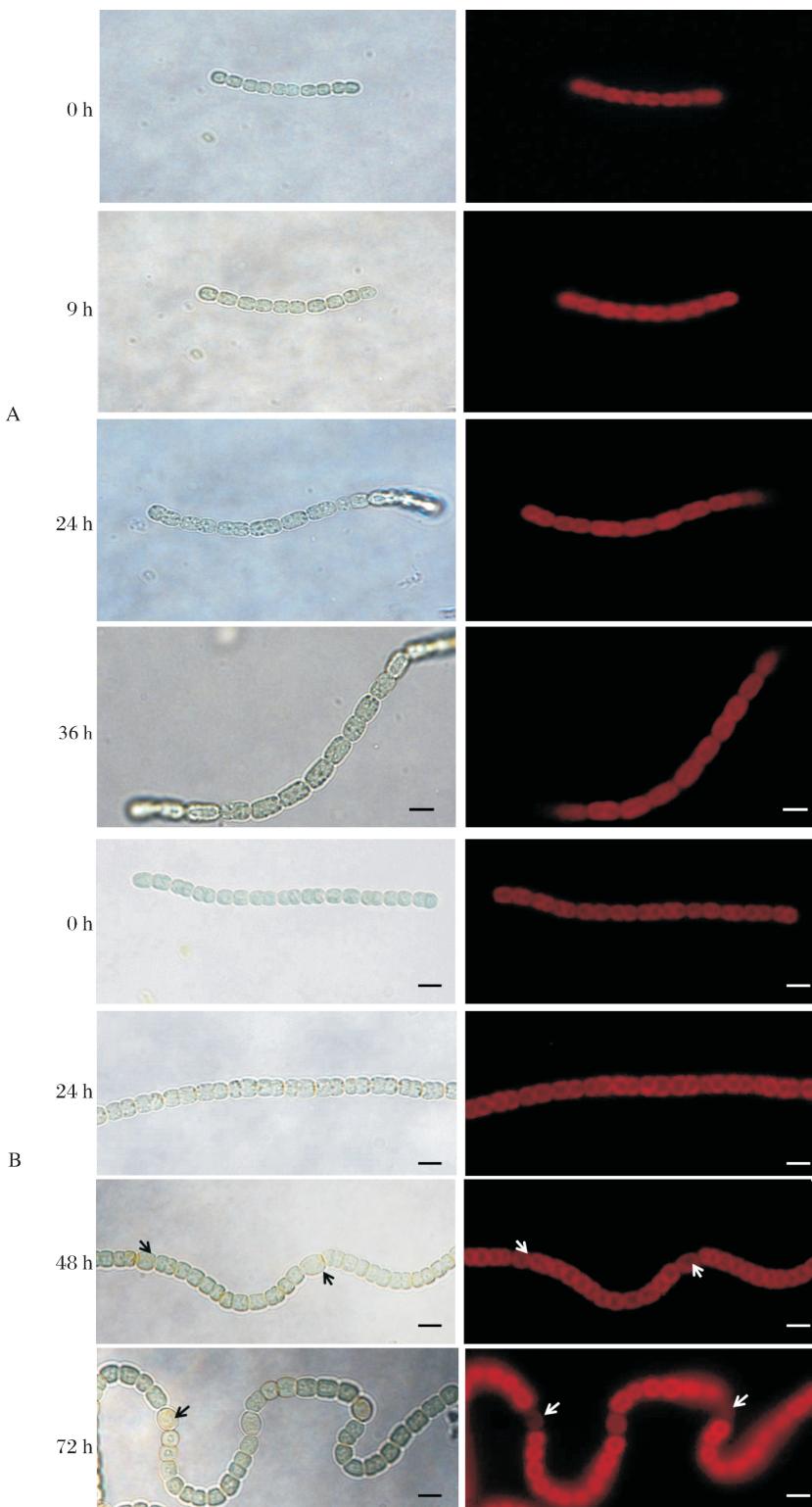
图 1 鱼腥蓝细菌的玻底培养皿培养体系

Fig.1 Culture system of *Anabaena* in glass bottom culture dish

2.2 玻底培养体系中菌株的生长状况

为了检测蓝细菌在玻底培养皿中能否进行正常

的分裂和分化,本研究分别对鱼腥蓝细菌 PCC 7120 在 BG11(含有硝酸盐)和 BG11₀(不含硝酸盐)培养



A.鱼腥蓝细菌 PCC 7120 在 BG11 培养条件下的生长情况。从上到下,依次为玻底培养 0、9、24、36 h 图片;左图为明视野,右图为荧光视野。B.鱼腥蓝细菌 PCC 7120 在 BG11₀ 培养条件下的生长情况,从上到下,依次为玻底培养 0、24、48、72 h 图片,箭头所指为异形胞。图片标尺均为 5 μm 。A. The growth of *Anabaena* sp. strain PCC 7120 in BG11 medium. From top to bottom, each image was taken at 0, 9, 20, 32 h. Left for the bright-field, right for fluorescence images. B. The growth of *Anabaena* sp. strain PCC 7120 in BG11₀ medium. From top to bottom, each image was taken at 0, 24, 48, 72 h. Arrowheads indicate heterocysts. Scale bars correspond to 5 μm .

图 2 鱼腥蓝细菌在玻底培养体系中的生长情况

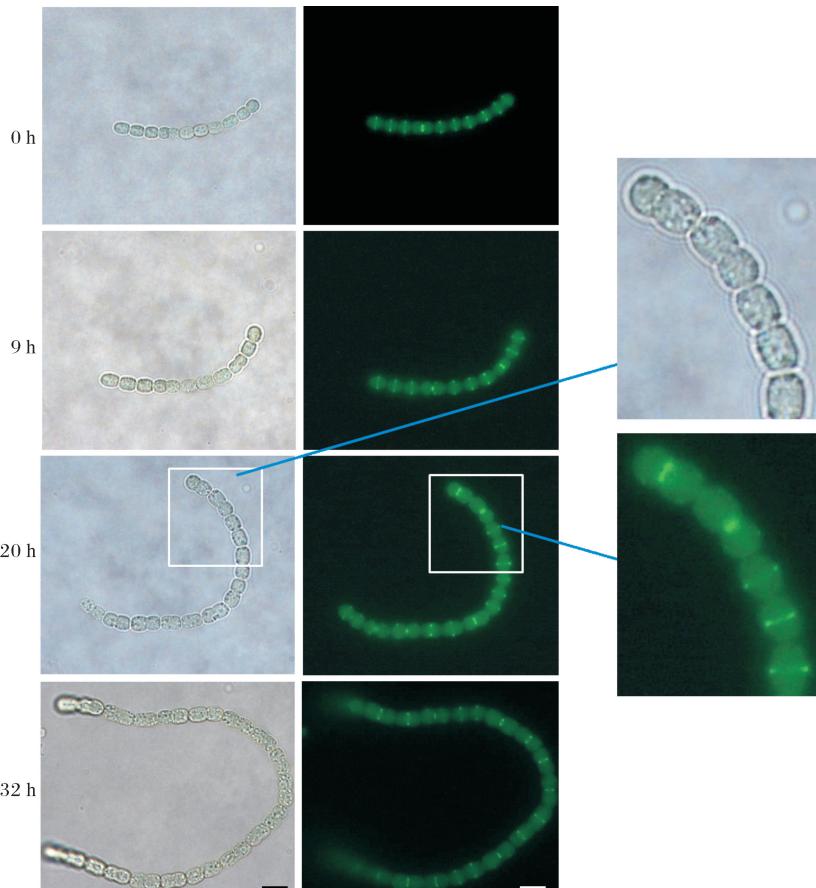
Fig.2 The growth of *Anabaena* in glass bottom culture dish

条件下的玻底培养生长进行了连续观察。结果显示,在 BG11 培养的条件下,9 h 后鱼腥蓝细菌 PCC 7120 菌丝长度没有显著变化;24 h 后菌丝显著增长,细胞正在分裂或已完成分裂;36 h 后菌丝进一步延长(图 2A)。在不含化合态氮源(BG11₀)的培养条件下,24 h 后菌丝中没有成熟的异形胞;培养 48 h 后,菌丝中能观察到成熟的异形胞,异形胞的频率约为(7.1±0.6)%。这些结果表明,在玻底培养皿中,蓝细菌能够进行生长和分裂,倍增时间约为 24 h,与传统固体平板培养的生长速度无显著的差异;在氮源缺乏的条件下,蓝细菌也能分化异形胞,且与传统固体平板培养条件下异形胞分化频率一

致。上述结果表明在玻底培养体系中菌丝的生长情况同传统培养条件下一致,该培养体系可以用于对特定菌丝进行连续定点观察。

2.3 微型实时观察系统在鱼腥蓝细菌中的应用

1) 鱼腥蓝细菌 PCC 7120 中细胞分裂蛋白 FtsZ 的定位。本研究利用玻底培养体系培养 FtsZ-GFP 翻译融合菌株 pRL277-P_ftsZ-Lgfp,对细胞分裂蛋白 FtsZ 在细胞生长分裂过程中的细胞定位进行连续观察。结果显示,在细胞分裂间期,FtsZ 定位在细胞中央并形成环状结构;随着细胞分裂的进行,环状结构缢缩;细胞分裂结束后环状结构消失;在下一轮细胞分裂开始时重新在子细胞的中部形成环状结构(图 3)。



图中显示的是同一条菌丝在不同培养时间下的生长情况。从上到下,依次为玻底培养 0、9、20、32 h 图片,左图为明视野,右图为荧光视野。图片标尺均为 5 μm。The growth of the same filament at different culture time. From top to bottom, each image was taken at 0, 9, 20, 32 h; left for the bright-field, right for fluorescence images. Scale bars correspond to 5 μm.

图 3 细胞分裂过程中 FtsZ 蛋白的定位情况

Fig.3 The localization of FtsZ during cell division timing

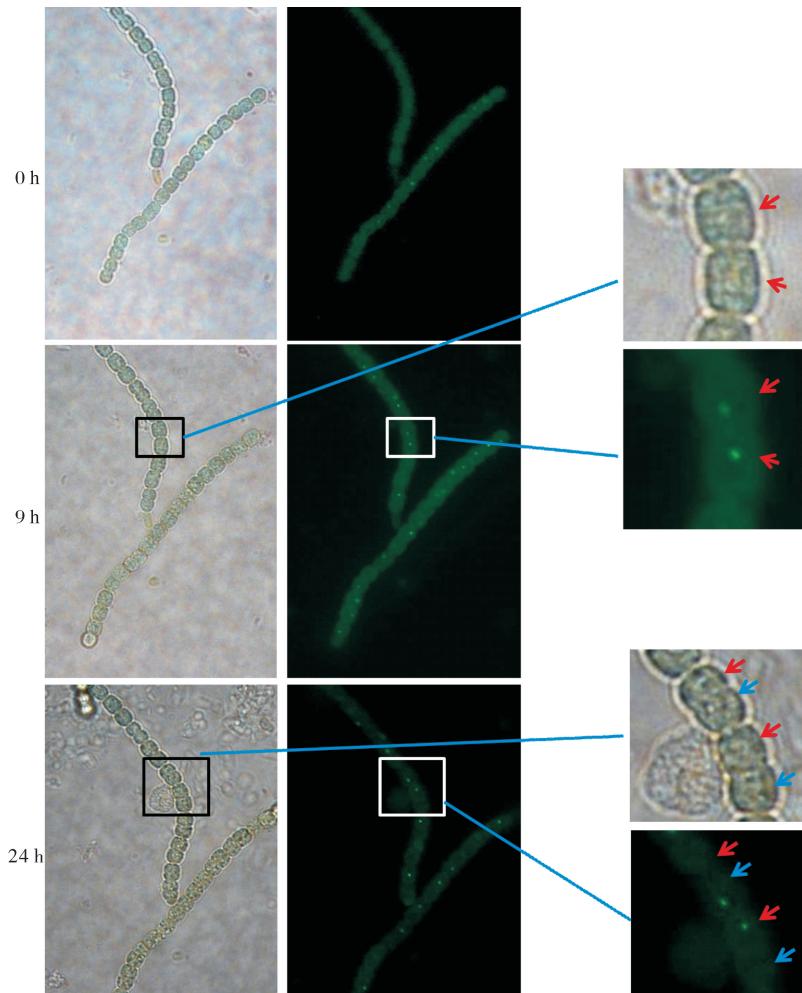
2) 鱼腥蓝细菌 PCC 7120 中 DNA 重组修复蛋白 RecN 的亚细胞定位。本研究对鱼腥蓝细菌 PCC 7120 的 DNA 双链损伤的起始修复蛋白 RecN^[16-17]的亚细胞定位也进行了研究。以 RecN-GFP 翻译

融合菌株 pRL25T-alr4961-gfp_{uv} 为材料,通过该微型培养体系观察了在细胞生长的不同阶段 RecN 在细胞内的定位。

通过连续观察发现,RecN-GFP 在细胞内聚集

成点状分布, 荧光点在细胞中的位置并非固定不变, 而是随着细胞的生长分裂发生显著改变。在细胞分裂的过程中, RecN 进行了不对称分配, 在 2 个正在分裂的子细胞中, 通常只有 1 个子细胞中有 RecN-

GFP 荧光点; 而在另一个子细胞中没有可见的 RecN-GFP 荧光点, 在这个子细胞中随着细胞的生长会重新形成 1 个新的 RecN-GFP 荧光点, 随后在细胞内发生移动(图 4)。



图中显示同一条菌丝在不同培养时间的生长情况。从上到下,依次为玻底培养 0、9、24 h 图片,左图为明视野,右图为荧光视野。
The growth of the same filament at different culture time. From top to bottom, each image was taken at 0, 9, 24 h; left for the bright-field, right for fluorescence images.

图 4 细胞分裂过程中 RecN 蛋白的定位情况

Fig.4 The localization of RecN during cell division timing

3 讨 论

细胞培养技术作为细胞生物学研究的基础, 在生物科学领域中起着至关重要的作用。传统的蓝细菌培养方法主要由液体震荡和固体平板培养, 但这 2 种培养方法难以对菌丝的生长过程进行实时监控。因此, 细胞的连续培养观察成为蓝细菌研究过程中难以解决的一大问题。

本研究制备了适合鱼腥蓝细菌 PCC 7120 菌株

连续培养观察的微型培养体系。我们根据蓝细菌的生长特性, 选取透光性较好并且可以直接在显微镜下观察的一种特殊的玻底培养皿, 以低熔点琼脂糖作为固定细胞的介质, 将菌丝体包埋在玻底培养皿中, 既可以直接受到显微镜下观察, 也能够置于光照培养箱中培养。在显微镜下观察时, 只需记下菌丝的位置, 每隔一定的时间间隔, 将培养皿置于显微镜下相同的位置, 即可对同一细胞或菌丝的生长过程进行实时监测。显微观察显示, 鱼腥蓝细菌 PCC

7120能够在玻底培养皿中进行正常的生长分裂和分化,并且可以连续培养观察1周以上。

值得注意的是,培养基的添加温度及菌丝的干燥程度是该培养体系中非常关键的环节,要尽可能地保持菌丝的活性。与传统的培养方法相比,由于玻底培养皿要置于显微镜下观察,菌丝会受到强光的照射,对其生长会产生一定的影响,菌丝会略微发黄。所以,在显微观察时,要尽可能将光强调低,同时要操作迅速,尽可能降低光照对其生长产生的影响。

本研究应用该微型培养体系连续观察了鱼腥蓝细菌PCC 7120菌株中细胞分裂蛋白FtsZ和DNA损伤修复蛋白RecN在细胞分裂过程中的亚细胞定位变化情况,结果观察到在细胞生长分裂过程中FtsZ蛋白会聚集形成环状结构,并定位在细胞的中央;随着细胞的分裂环状结构缢缩,至细胞分裂结束后环状结构消失(图3);在下一轮细胞分裂开始时又重新在子细胞的中部形成环状结构。这些结果与前人的研究结果一致^[18-19],但之前的研究是根据细胞的状态来确定FtsZ环的变化,而本研究是通过连续观察特定细胞分裂过程中Z环的变化,从而得出FtsZ在细胞分裂过程中的动态变化,结果更加直观可信。此外,我们还通过该微型培养体系实时观察到RecN蛋白在细胞内的位置会随着细胞的生长分裂而发生改变,在分裂的成对子细胞中,只有一个子细胞中有RecN-GFP荧光点(图4);而在另一个新生的子细胞中,会重新形成一个新的RecN-GFP荧光点,随后在细胞内发生移动,该实验结果与已报道的结果一致^[20]。

本研究设计的微型实时观察及培养系统,操作过程简单方便,成本较低,并且能够满足对特定细胞或菌丝连续观察的需要。该微型培养体系的建立可为从细胞水平上研究各种调控机制带来一定的便利。

参 考 文 献

- [1] RASMUSSEN B, FLETCHER I R, BROCKS J J, et al. Reassessing the first appearance of eukaryotes and cyanobacteria [J]. *Nature*, 2008, 455(7216): 1101-1104.
- [2] DENG M D, COLEMAN J R. Ethanol synthesis by genetic engineering in cyanobacteria [J]. *Appl Environ Microbiol*, 1999, 65(2): 523-528.
- [3] TAKAHAMA K, MATSUOKA M, NAGAHAMA K, et al. Construction and analysis of a recombinant cyanobacterium expressing a chromosomally inserted gene for an ethylene-forming enzyme at the *psbAI* locus [J]. *J Biosci Bioeng*, 2003, 95(3): 302-305.
- [4] LINDBERG P, PARK S, MELIS A. Engineering a platform for photosynthetic isoprene production in cyanobacteria, using *Synechocystis* as the model organism [J]. *Metab Eng*, 2010, 12(1): 70-79.
- [5] LAN E I, LIAO J C. Metabolic engineering of cyanobacteria for 1-butanol production from carbon dioxide [J]. *Metab Eng*, 2011, 13(4): 353-363.
- [6] TAN X M, YAO L, GAO Q Q, et al. Photosynthesis driven conversion of carbon dioxide to fatty alcohols and hydrocarbons in cyanobacteria [J]. *Metab Eng*, 2011, 13(2): 169-176.
- [7] LIU X Y, FALLON S, SHENG J. CO₂-limitation-inducible Green Recovery of fatty acids from cyanobacterial biomass [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108(17): 6905-6908.
- [8] MCNEELY K, XU Y, BENNETTE N, et al. Redirecting reductant flux into hydrogen production via metabolic engineering of fermentative carbon metabolism in a cyanobacterium [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2010, 76(15): 5032-5038.
- [9] WOLK C P. Heterocyst formation [J]. *Annu Rev Genet*, 1996, 30: 59-78.
- [10] 苏波, 陈雯莉, 王莉. 鱼腥蓝细菌PCC 7120中sigC突变体的构建和表型分析 [J]. 华中农业大学学报, 2015, 34(3): 46-50.
- [11] KUMAR K, MELLA-HERRERA R A, GOLDEN J W. Cyanobacterial heterocysts [J]. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2010, 2(4): a000315. DOI: 10.1101/cshperspect. a000315. PubMed: 20452939.
- [12] CHEN M, LI J H, ZHANG L, et al. Auto-flotation of heterocyst enables the efficient production of renewable energy in cyanobacteria [J]. *Sci Rep*, 2013, 4: 3998.
- [13] CORRALES-GUERRERO L, MARISCAL V, NURNBERG D J, et al. Subcellular localization and clues for the function of the HetN factor influencing heterocyst distribution in *Anabaena* sp. strain PCC 7120 [J]. *J Bacteriol*, 2014, 196(19): 3452-3460.
- [14] WANG C C, KAO Y C, CHI P Y, et al. Asymmetric cancer-cell filopodium growth induced by electric-fields in a microfluidic culture chip [J]. *Lab on a chip*, 2011, 11(4): 695-699.
- [15] TAYKOR A M, BLURTON-JONES M, RHEE S W, et al. A microfluidic culture platform for CNS axonal injury, regeneration and transport [J]. *Nat Methods*, 2005, 2(8): 599-605.
- [16] LEMON K P, GROSSMAN A D. Localization of bacterial DNA polymerase: evidence for a factory model of replication [J]. *Science*, 1998, 282(5393): 1516-1519.
- [17] HU S, WANG J L, WANG L, et al. Dynamics and cell-type specificity of the DNA double-strand break repair protein Recn in the developmental cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120 [J]. *PLoS One*, 2015, 10(10): e0139362.
- [18] LUTKENHAUS J. Assembly dynamics of the bacterial MinC-

- DE system and spatial regulation of the Z ring[J]. Annu Rev Biochem, 2007, 76: 539-562.
- [19] ROWLETT V W, MARGOLIN W. The bacterial Min system [J]. Curr Biol, 2013, 23(13): 553-556.
- [20] 胡胜. 鱼腥蓝细菌 PCC7120 细胞周期与异形胞分化之间协调机制研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2015.

Establishment and application of micro real-time observation system of *Anabaena* sp. strain PCC7120

TANG Guofang WANG Jinglan HU Sheng CHEN Wenli WANG Li

State Key Laboratory of Agricultural Microbiology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China

Abstract The filaments were embedded in glass bottom plate to fix filaments by using low melting point agarose. A real-time observation of microscopic culture system for *Anabaena* sp. strain PCC 7120 was prepared. Results showed that *Anabaena* sp. strain PCC 7120 grew well in glass bottom culture dish, and exhibited normal activity of cell division and differentiation. The continuous dynamics changes of cell division protein FtsZ and DNA double-stranded damage response of protein RecN during cell division process through this cultivation method were observed. It is indicated that continuous fixed-point observation of the same filament was successfully achieved.

Keywords *Anabaena* sp. strain PCC 7120; micro culture system; continual observation

(责任编辑:张志钰)