

超声对酵母细胞膜通透性的影响*

卢群^{1,2} 刘晓艳^{1,3} 丘泰球¹ 罗登林¹

1(华南理工大学,广州,510640) 2(广东药学院,广州,510224) 3(仲恺农业技术学院,广州,510225)

摘要 用不同参数的变幅杆浸入式超声波作用酵母细胞,测定细胞内核酸、蛋白质及 FDP(1,6-二磷酸果糖) 3 种物质渗出率,再用透射电镜观察细胞形态。探讨超声场对酵母细胞膜通透性影响的最佳参数及机理。结果表明,超声场的最佳参数是:电功率 500W、脉冲时间 3s、间隔时间 4 s、脉冲总时间共 225s,影响酵母细胞膜通透性变化的主要机制是空化作用使细胞膜在一定程度上损伤产生穿孔效应,细胞膜的通透性提高。

关键词 超声,细胞膜,通透性

细胞膜的重要功能之一是选择通透性。通过选择性地通透,细胞能接受或拒绝,保留或排出某种物质^[1]。人为地改变细胞膜的通透性,可以改变原料的输入或代谢产物的排出速率,以利于代谢产物在细胞外的积累,使代谢朝着人们希望的方向进行,是实现代谢人工调控的重要方法之一。而常用方法是添加药物的化学法、反复冻结和解冻的物理法。

目前应用较为广泛的是化学的传统法。其缺点是效率低,胞内物质释放率低,处理时间长,试剂用量大,成本高,同时后处理也有诸多不便。且由于化学试剂的毒性,进一步分离时需用透析等方法除去^[2]。超声波法效率高,处理时间短,无化学试剂残留,更没有进一步除毒的必要。低频超声的空化作用可以导致细胞的非热生物效应,使细胞膜短时局部破裂,从而改变细胞质膜的通透性,使细胞内物质释放或细胞外物质进入细胞内。本文就是采用超声波来处理酵母细胞,观察其通透性的变化情况,在不同参数的变幅杆浸入式超声波条件下,分析细胞内核酸、蛋白质及 FDP 这 3 种物质的渗出率,并利用透射电镜观察对细胞分析及作用机制探讨。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

酵母(*Saccharomyces cerevisiae*),活性干酵母,梅山马利;微量取液器,北京青云航空仪表有限公司;752 紫外分光光度计,上海精密科学仪器有限公司;灭菌锅,上海三申;恒温振荡器,THZ-C,江苏太仓市实验设备厂;电动离心机 80-2,上海悦丰仪表有限公司;变幅杆浸入式超声波处理机,JY92-II,

上海新芝生物技术研究所以;透射电镜,FEI-Tecnai12,日本电子。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养

将酵母接种到发酵培养基($C_6H_{12}O_6$, 0.55 mol/L、 Na_2HPO_4 , 0.2 mol/L、 NaH_2PO_4 , 0.2 mol/L、 $MgCl_2$, 0.01 mol/L)中,温度为 37.5~38.5℃,摇床转速 120 r/min,发酵时间为 1 d。

1.2.2 超声处理

将发酵液放置于冰水浴中,用超声处理。将处理后的发酵液继续发酵 2 h。发酵完毕后,取 20 mL 发酵液于 80℃的水浴中灭酶,剩余部分用于测细胞染色率。变幅杆浸入式超声的作用参数:频率 20~25 kHz,功率分别为 600 W,500 W,400 W,超声的作用时间为每次 3 s,间隔时间为 4 s,作用的总时间分别 90、135、180、225、270 s。容器的直径为:4.5 cm。

1.2.3 核酸、FDP 和染色率测定

核酸的测定参照文献[4]。

FDP 的测定参照文献[5]。

细胞存活率的测定参照文献[6]。

1.2.4 透射电镜观察

将酵母接种到发酵培养基中,摇床转速 120 r/min,37.5~38.5℃发酵 1 h,分别进行如下处理:

A: 不做任何处理;

B: 变幅杆浸入式超声处理;

B₁: 频率 20~25 kHz,功率为 300 W,每次 3 s,间隔时间为 4 s,作用的总时间分别 90 s;

B₂: 频率 20~25 kHz,功率为 500 W,每次 3 s,间隔时间为 12 s,作用的总时间分别 270 s。

将处理后的样品经戊二醛固定、纯 812 树脂包埋 18 h 后用 LKB-7800 型超薄切片机切片,然后用 FEI-Tecnai12 透射电镜观察,定位摄影。

第一作者:博士,讲师。

* 国家自然科学基金资助项目(批准号:10174021)

收稿日期:2005-05-16

2 结果

2.1 不同功率超声对细胞膜通透性的影响

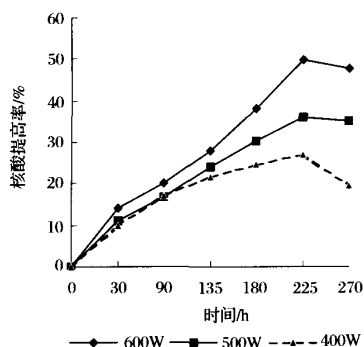


图1 超声对核酸渗透的影响

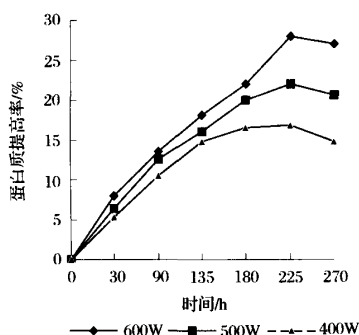


图2 超声对蛋白质渗透的影响

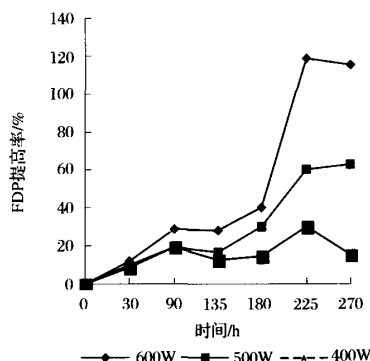


图3 超声对FDP渗透的影响

图1、图2、图3分别是测定发酵液中核酸、蛋白、FDP变化率的趋势曲线,也就是细胞外分泌物变化反映胞内变化趋势曲线。

核酸(蛋白、FDP)提高率 = $\left[\frac{\text{处理后发酵液中核酸(蛋白、FDP)的含量}}{\text{未处理发酵液中核酸(蛋白、FDP)的含量}} - 1 \right] \times 100\%$

存活率 = $\frac{\text{细胞总数} - \text{死细胞总数}}{\text{细胞总数}} \times \%$

图1~图3表明,随着超声作用时间的增加,不同功率的超声都使胞内核酸、蛋白质及FDP的渗出浓度逐渐提高。其中600 W超声的作用最为明显,500 W次之,400 W最差。超声的作用时间在135 s以内时,核酸、蛋白质及FDP的渗出浓度的增幅不很明显,在225 s左右,胞外的核酸、蛋白质、FDP的测定值增幅较大。

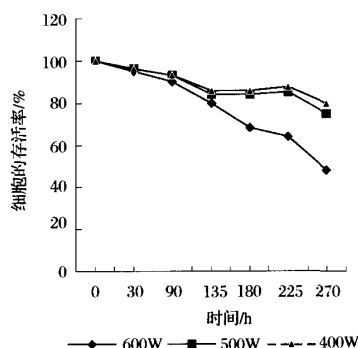


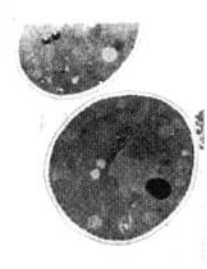
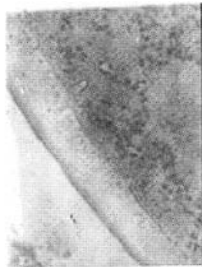
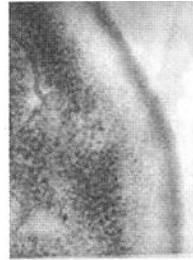
图4 超声对细胞存活率的影响

图4可知,随着超声作用时间的增加,细胞的死亡率都逐渐增加,也就是存活率下降。600 W的超声使细胞死亡率增加最快,500 W,400 W最慢。也就是说500 W,400 W超声对细胞的活性影响最小,但是,500 W时细胞通透性好,600 W超声对细胞的活性影响最大。在225 s内,细胞死亡率在36% (600 W)、15% (500 W)、12% (400 W)内,大部分细胞存活。

图1~图4可知在一定超声作用下,酵母细胞大多数存活,其细胞内核酸、蛋白质、FDP向胞外渗透率提高,反映出其细胞膜通透性提高。提高酵母细胞膜通透性的最佳功率超声条件为:功率500 W、作用时间总225 s、脉冲时间3 s。

2.2 透射电镜观察结果

图5~图10的照片为视野中任一个样品的透射电子显微镜照片。图5是未经过任何处理的酵母细胞,酵母细胞结构完整,细胞壁与细胞质界限清晰,细胞结构完好;图6、图7是经过不同处理方法处理的酵母细胞,图6所观察到的现象与图5没有什么差别,图6至图8中,细胞结构仍保持完整,膜上出现可逆小孔,但细胞壁颜色逐渐变深,是细胞膜通透性变大而引起的细胞内物质外渗;图9中细胞膜有多处断裂,但仍能看到细胞膜;图10中几乎观察不到细胞膜结构,但在细胞内可以看到其他质膜结构,该条件下超声使酵母细胞膜破裂程度较为严重。

图5 A ($\times 13.0\text{k}$)图6 B₁ ($\times 18.5\text{k}$)图7 B₂ ($\times 18.5\text{k}$)图8 A ($\times 98.0\text{k}$)图9 B₁ ($\times 98.0\text{k}$)图10 B₂ ($\times 98.0\text{k}$)

透射电子显微镜观察可知,超声处理后细胞膜有一定程度损伤,并且成可逆小孔,即“穿孔效益”,是膜通透性提高的主要原因。

3 讨论

不同功率的变幅杆浸入式超声波都使胞内核酸、蛋白质及 FDP 这 3 种物质的渗出率提高,作用时间的长短对胞内核酸、蛋白质及 FDP 的渗出率有不同的影响。其中胞内核酸、蛋白质渗出率在超声的作用时间为 225 s 时,达到最大值,之后降低原因需进一步探讨;FDP 渗出率随作用时间的增加而提高,225 s 后仍增加原因需进一步探讨。膜通透性改变程度与功率、作用时间密切相关。随着超声作用功率、时间的增加,细胞的死亡率逐渐增加,存活率都逐渐减小,即细胞的破碎程度增大。提高超声作用功率、延长作用时间,将不利于细胞保持活性,同时由于在高功率长时间的作用下,设备发热量大,易使设备损伤,不利于设备的维护,一般不采用 600 W 以上的超声长时间处理。

选择适宜的超声条件既要考虑功率大小、作用时间,还要考虑细胞的存活情况。在一定超声条件下作用酵母细胞,可以提高细胞膜的通透性,但细胞又不死亡,通过测定细胞染色率、FDA、蛋白质、核酸的提高率来反映。

透射电镜观察超声处理样品中有少量细胞的崩

解,多数细胞的细胞壁颜色逐渐变深,是膜受一定损伤,产生可逆的小孔后,膜通透性增加,胞内物外渗引起。当超声的强度过大,作用时间延长时,细胞的崩解很快,细胞壁颜色逐渐变深到看不清,直到镜界全是细胞碎片。

在功率 500 W、作用时间总 225 s、脉冲时间 3 s 的超声条件下,核酸渗透增加 36%、蛋白质渗透增加 22%、FDP 渗透增加 60%,细胞存活率为 85%。此时细胞膜有一定损伤,但细胞不死亡,一定时间后又恢复正常。

参考文献

- 1 大连轻工业学院. 生物化学[M]. 北京:轻工业出版社, 1980.492
- 2 段学辉,叶勤,张嗣良. 啤酒酵母的通透性对 ATP 生产活性的影响[J]. 华东理工大学学报, 2000, 26(1): 33~36
- 3 冯若,李化茂. 声化学及其应用[M]. 合肥:安徽科学技术出版社, 1992. 23~24
- 4 沈同,王镜岩. 生物化学上册[M]. 北京:高等教育出版社, 1990. 87; 347
- 5 王蕾,孙志浩. 果糖-1,6-二磷酸的酶法测定[J]. 工业微生物, 1994, 24(4): 15~18
- 6 微生物研究法讨论会编. 微生物学实验法[M]. 北京:科学出版社, 1981
- 7 Ju Chu, Bailin Li, Siliang Zhang. On-line ultrasound stimulates the secretion and production of gentamicin by *Micromonospora echinospora*[J]. Process Biochemistry, 2000,

(35): 569~572

8 Trick H N, Finer J J. SAAT : sonication-assisted Agrobacterium-mediated transformation[J]. Transgenic Res, 1997 (6) :329~336

9 Trick H N, Finer J J. Sonication-assisted Agrobacterium-mediated transformation of soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] embryogenic suspension culture tissue[J]. Plant Cell Rep,1988, 17:482~499

10 李重九,侯玉霞,蔡祝南,等. 用超声波法使烟草花叶病毒侵染烟草细胞[J]. 植物病理学报,1999,29(1):86~90

11 刘晓艳,丘泰球,刘石生,等. 超声影响微生物细胞膜通透性及其应用[J]. 应用声学,2002,21(2):26~29

Effect of Ultrasound on Membrane Permeability of *Saccharomyces cerevisiae*

Lu Qun^{1,2} Lu Xiaoyan^{1,3} Qiu Taiqiu¹ Luo Denglin¹

1 (South China University of Technology, Guangzhou, 510640, China)

2 (Guangdong College of Pharmacy, Guangzhou, 510224, China)

3 (Zhong-kai College of Agricultural Technology, Guangzhou, 510225, China)

ABSTRACT The release of nucleic acid, protein and FDP were determined on *Saccharomyces cerevisiae* cell by different parameters of ultrasound. The cell configuration was assayed by transmission electron microscopy (TEM). The aim of this paper was to study the optimal parameters and mechanism of *Saccharomyces cerevisiae* cell membrane permeability induced by ultrasound. The optimal parameters were power 500 W, treating time 225s pulse 3s and interval time 4s, respectively. The mechanism of ultrasound induced cell membrane permeability was that the cavitation effect of ultrasound led to the perforated effect resulted from cell membrane damage. Ultrasound could increase the permeability of *Saccharomyces cerevisiae* membrane.

Key words *Saccharomyces cerevisiae*, ultrasound, membrane permeability

仪器信息网“人才频道”全新推出

仪器信息网“人才频道”自 2005 年 4 月改版完成以来，以全新的页面出现在广大用人单位和求职人员的面前，更以其全新的服务功能和模式赢得了业界人士的青睐。短短的半年时间里，在本频道发布的招聘信息和上传的简历均大幅增加，取得了令人满意的效果。我们相信在大家的共同努力下，人才频道将真正成为仪器行业最受欢迎的人才交流平台！

现阶段主要服务和功能		
免费服务		收费服务
专业人才(免费 VIP 会员)	招聘单位(测试机构)	招聘单位(注册厂商)
1)可查看所有单位的招聘信息和联系方式 2) 可以上传详细简历，并随时修改 3) 上传简历后，可进行在线应聘 4) 把感兴趣的职位添加到收藏夹 5) 可定期收到符合自己要求的含有最新职位和用人单位信息的 Email	在本网免费注册后， 1) 可任意发布招聘信息 2) 可随时更新、更改招聘信息 3) 查看应聘人的简历 4) 收藏满意的简历	成为本网的“协议用户”后，在招聘期内， 1) 可任意发布招聘信息 2) 可随时更新、更改招聘信息 3) 任意查看仪器信息网简历库 4) 可以根据具体要求搜索相应的人才 5) 收藏满意的简历 6) 发布的职位免费收录到《人才快讯》

如果您有什么意见和建议，欢迎随时与我们联系。

☎ 010-51654077-13 ✉ JOB@instrument.com.cn