

文章编号 : 0379 - 1726(2001)04 - 0343 - 04

蛋白质和核糖核酸在阿哈湖沉积物中的变化特征

梁小兵, 万国江, 黄荣贵, 吴沿友

(中国科学院 地球化学研究所 环境地球化学国家重点实验室, 贵州 贵阳 550002)

摘 要: 阿哈湖沉积物中的蛋白质和核糖核酸(RNA)随时间和沉积深度的增加逐渐被分解。其含量分别在沉积深度为 17 cm 和 19 cm 以后明显降低, 而它们的分解产物氨基酸和核苷酸却有不同的变化规律, 氨基酸在沉积深度为 27 ~ 30 cm 的孔隙水中含量较高。这种变化规律与微生物对氨基酸和核苷酸利用的差异有关。由于地质聚合作用及矿物和有机聚合物对蛋白质的吸附作用的影响, 蛋白质在沉积深度为 17 cm 以后仍保留了一定的含量。

关键词: 蛋白质; 核糖核酸(RNA); 沉积物; 贵州省

中图分类号: P594.4; Q5; X131 **文献标识码:** A

0 引 言

蛋白质和核糖核酸(RNA)是重要的生物大分子,是湖泊沉积有机物的重要组成物质,它们的变化与沉积物中的生物作用、微生物活动、物质循环及早期成岩作用有关。湖泊沉积物作为流域地表运移物质、大气散落物质和水生生物残骸的共同宿体,发生了复杂的化学和生物化学变化。蛋白质和 RNA 作为有机质中易变的组成物质,其变化特征对研究沉积物中微生物活动及 C、N、P 和 S 循环具有重要的意义。沉积物中蛋白质所含的 N 和 C 占总氮和有机碳的很大部分,在沿岸海洋沉积物中蛋白质氮占总氮的 40% ~ 60%,蛋白质的降解与否常常用于衡量易变有机质是否发生了转化^[1-3]。

RNA 在海洋和湖泊沉积物的研究中具有重要的意义。用 RNA 作为分子探针指示沉积物中的生物类群和物质循环的研究工作已取得了一定的突破^[4-6],随着这方面工作的开展,将会在沉积物中发现更多新的原生生物和微生物类群,并揭示它们与物质循环的关系。蛋白质除参与沉积物的物质循环外还具有指示生物信息的作用,根据不同生物种属蛋白质序列分析的比较,可以建立与传统方法所得到的极其类似的进化树。生物化石的比较和建立在大量蛋白质或核酸序列分析基础上的进化论主流是无可争辩的^[7]。在对沉积物中的蛋白质含量及其随

沉积深度的空间分布规律了解的基础上,提取出不同沉积时序的蛋白质,通过特征片段的氨基酸顺序分析等方法,实现利用蛋白质来研究海洋和湖泊中的生物进化和生物多样性。因此,有必要先了解蛋白质和 RNA 在湖泊沉积物中的分布规律和变化特征。

1 材 料 和 方 法

1.1 样品来源

阿哈湖位于贵州省贵阳市郊,海拔 1 108 m,湖水面积 3.4 km²,补给系数 56.0,最大水深 24 m,平均水深 13.2 m,湖泊水寄宿时间仅有 0.44 a。利用湖泊沉积物-水界面采样装置,采取湖心水深 22 m 的沉积柱芯,上覆水长 9 cm,沉积物长 42 cm,按 1 cm 的间距分样。

1.2 孔隙水的分离

用冷冻离心机离心 30 min (5 °C, 4 000 r/min),倾出的水相即为孔隙水。

1.3 蛋白质和氨基酸的测定

蛋白质含量的测定利用双缩脲法,氨基酸含量的测定利用茚三酮法^[8,9]。氨基酸以进口分装的亮氨酸为标样;蛋白质以国外进口的酪蛋白为标样。其他试剂用分析纯化学试剂。

收稿日期: 2000 - 06 - 26; 接受日期: 2000 - 12 - 05

基金项目: 国家自然科学基金重点基金(49333040); 贵州省自然科学基金(3090)

1.4 RNA 的分离提取方法

参考有关 RNA 的提取方法^[10-13], 本研究的提取方案如下: 精确称取 2 g 左右的湿沉积物样品, 加入 6 mL SDS 缓冲液和 6 mL 苯酚溶液, 振荡 15 min 后, 在 0~4 °C 条件下离心 10 min (3 500 r/min), 取出上清液, 并加入 5 mL 氯仿-异戊醇, 振荡 15 min; 然后再在 0~4 °C 条件下离心 5 min (3 500 r/min), 取出上清液稀释至 10 mL 作为 RNA 提取液。

取 3 mL RNA 提取液消化后定容至 10 mL, 从中取 5 mL 用定磷法测定 RNA^[12]。

用紫外吸收法^[14] 测定沉积物孔隙水中游离的核苷酸。

1.5 有机碳的测定

取沉积物干样用元素分析仪(PE2400 II)直接测定有机碳, 无机碳用滴定法^[15], 总碳减去无机碳即为有机碳。

1.6 样品采集和测定过程中的防污染措施

样品采集后立即装入洗净并灭菌的离心管中, 加盖。在样品的处理和测定过程中, 戴上一次性手套和口罩, 尽量在超净工作台上进行。在测定中以不含样品的空白对照, 以消除背景值的影响。

2 结果与讨论

2.1 蛋白质和氨基酸在湖泊沉积物中的变化规律

阿哈湖沉积物孔隙水中蛋白质含量的垂直分布见图 1。由图 1 可见, 蛋白质含量在 0.32~1.71 mg/mL 之间。阿哈湖各层沉积物孔隙水中蛋白质的分布随深度的增加没有呈现数量级的减少, 说明蛋白质在沉积物各层中随着时间的推移还保存了一定的含量, 而不是被分解殆尽。阿哈湖沉积物在表层 5 cm 和 7 cm 存在蛋白质的峰值, 以后逐渐减少, 17 cm 以后保持较低含量, 但至少为 0.32 mg/mL。

氨基酸既是蛋白质的基本结构单位又是其水解产物, 阿哈湖沉积物孔隙水中氨基酸含量(以含氮量计)的垂直分布见图 2。

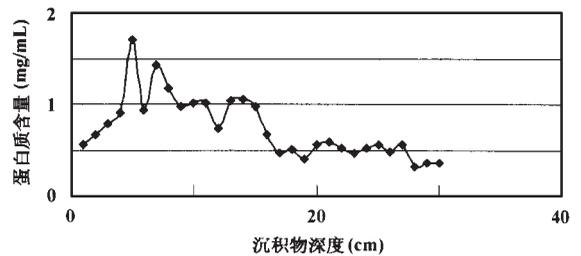


图 1 阿哈湖沉积物孔隙水中蛋白质含量的垂直分布
Fig. 1 Vertical distribution of protein contents in pore water in the sediments of Lake Aha

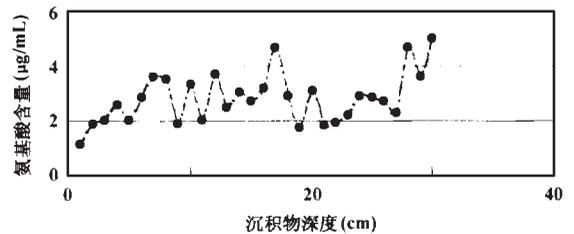


图 2 阿哈湖沉积物孔隙水中氨基酸含量的垂直分布
Fig. 2 Vertical distribution of amino acid contents in pore water in the sediments of Lake Aha

阿哈湖沉积物的有机质输入量较高, 在采样点坝前, 水深达 23 m。由于缺氧和沉积速率较大, 有机质不易分解, 在沉积物中得到很好的保存(表 1)。

阿哈湖沉积物孔隙水中氨基酸的含量在 1.69~4.46 µg/mL 之间。氨基酸在阿哈湖沉积物表层 7 cm 内逐渐增高, 7~21 cm 内含量变化呈振荡走势, 21 cm 后呈升高的趋势, 尤其是 27 cm 以后明显增高。这种随着沉积深度的增加氨基酸含量增加的现象, 与微生物的活动减弱导致对氨基酸吸收减少有关。

蛋白质作为生物体的重要结构和功能物质, 在离开细胞进入沉积物后, 逐渐被残留的和微生物分泌的胞外蛋白酶水解。随着沉积深度的增加, 即随着时间的推移, 蛋白质被分解, 在 17 cm 后保持较低的含量。蛋白质的分解速率由沉积物中蛋白酶的活力大小决定, 而蛋白酶会随着时间的推移而失去活性。因此, 下层沉积物的蛋白酶活性会越来越低。此外, 不断生长的微生物还会分泌新的胞外蛋白酶, 但随着沉积深度的加深, 微生物数量逐渐减少, 所分泌的蛋白酶也逐渐减少。总之, 随着沉积深度的增加,

表 1 阿哈湖沉积物中有机碳含量

Table 1 Contents of organic carbon in the sediments of Lake Aha

沉积深度(cm)	1~2	3~4	5~6	7~8	9~10	11~12	13~14	15~16	17~18
有机碳含量(%)	3.901	5.204	4.859	5.076	5.189	5.351	5.351	5.139	6.060

蛋白酶的活性会逐渐减弱,造成蛋白质的分解逐渐减弱。沉积物不像生物活体,不能合成蛋白质,而且蛋白质不能透过微生物的细胞膜被直接吸收利用。因此,进入沉积物的蛋白质只能是在生物体内合成的,在沉积物中只能降解而不能被微生物直接吸收利用。沉积物中蛋白质的降解方式和其他生物大分子相似,发生在沉积物的孔隙水中。蛋白质之所以在 30 cm 的深层沉积物中还有一定的含量,与地质聚合作用及矿物和有机聚合物对蛋白质的吸附有关,存在于沉积物固体部分和孔隙水中的蛋白质处于动态平衡之中。

氨基酸是蛋白质的水解产物,同时又是生物的营养物质,能被沉积物中的微生物吸收利用,因此,它在沉积物中的变化与蛋白质有所不同。到一定的沉积深度后,沉积物孔隙水中的氨基酸含量仍较高,这与微生物在沉积物中的变化有关。随着沉积深度的增加,微生物数量逐渐减少,对氨基酸的吸收利用减弱,使得氨基酸得以积累。

2.2 RNA 和核苷酸在湖泊沉积物中的变化规律

RNA 在沉积物中的垂直分布曲线见图 3。由图 3 可见,沉积物表层 0~19 cm 范围内, RNA 呈高低不同的分布, 19 cm 以后明显维持在低含量水平。说明沉积物上层是生物活动强烈的地带,第一层为最新的沉积物, RNA 含量最高;下层生物活动减弱,随着时间的推移, RNA 通过酶解作用被逐渐分解掉,同时也没有合成新的 RNA 来补充损失,因此 19 cm 以后 RNA 含量很低。

核苷酸是 RNA 的基本结构单位,又是它的水解产物。核苷酸在沉积物中的垂直分布见图 4。由图 4 可见,核苷酸在沉积物孔隙水中从悬浮层到表层 4 cm 含量逐渐增高, 4 cm 处达到峰值,以后呈逐渐降低的趋势。核苷酸由湖泊沉积物中的 RNA 水解形成。由于核苷酸不属于微生物的营养物质,体内核

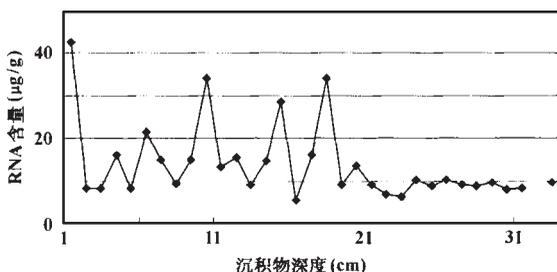


图 3 RNA 在阿哈湖沉积物中的垂直分布曲线

Fig. 3 Vertical distribution curve of RNA contents

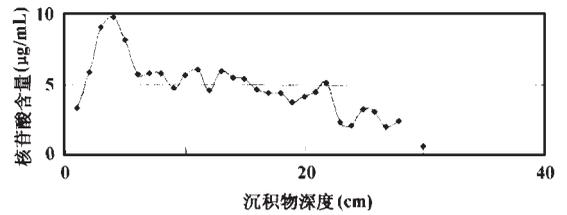


图 4 阿哈湖沉积物孔隙水中核苷酸含量的垂直分布

Fig. 4 Vertical distribution of nucleotide contents in pore water in the sediments of Lake Aha

苷酸的合成是以磷酸核糖、氨基酸、一碳单位、 CO_2 等简单物质为原料的从头合成途径及以碱基和核苷为原料的补救途径来完成的^[16],因此,微生物所需的核苷酸来自体内,而不是从外界吸收。在沉积物中不存在微生物的吸收和分解的动态平衡过程,仅仅是单一的降解过程,因此,与氨基酸的变化不同,随着深度的增加, 20 cm 后不存在含量明显增高的区段。

RNA 的生物功能是参与遗传信息的储存和表达,离开生物体后很容易分解。湖泊沉积物中的胞外酶能把它分解成核苷酸。在生物碎屑含量较高的表层沉积物中 RNA 含量较高,随着时间的推移,在下层沉积物中含量较低。核苷酸的主要变化方向也是被分解,其含量随沉积深度的增加逐渐降低。RNA 和核苷酸在沉积物中的变化与它们的生物功能及微生物利用特点有关,它们在生物体内主要承担传递遗传信息的功能,而不像蛋白质和氨基酸具有构建生物体和作为营养物质的功能,因此,在体外(如沉积物)变化与参加变化的生物之间的关系和蛋白质及氨基酸有所不同。

2.3 RNA 和蛋白质在沉积物中的变化特点

RNA 和蛋白质同属生物大分子,在沉积物中离开活体细胞后被逐渐降解。RNA 同样不能被生物直接吸收利用,也不能在生物体外合成,因此,随着时间的推移,在沉积物中含量逐渐减少。从以上的研究结果来看, RNA 还不具有像蛋白质那样强烈地因地质聚合作用造成的、在沉积物中保留的性质。RNA 和蛋白质在细胞中的含量不同,蛋白质约占干细胞的 45%,而 RNA 和脱氧核糖核酸(DNA)总量只占干细胞的 5%~15%^[16,17]。因此,从生物细胞进入沉积物的 RNA 和蛋白质的数量不同,造成空间分布上蛋白质含量高于 RNA 含量。

RNA 和蛋白质作为生物体的结构和功能物质,离开生物体进入无机的沉积物后,必然发生降解,造

成结构和功能的变化。它们作为生命物质,在沉积物中的降解由胞外酶催化,而胞外酶的含量和活力大小又与微生物的活动有关;降解产物氨基酸作为营养物质可被微生物吸收利用,参与到微生物的新陈代谢过程中,也可以像核苷酸一样被进一步降解。因此,RNA 和蛋白质及其降解产物核苷酸和氨基酸在沉积物中的变化与生物活动有关,与沉积物中的微生物的种类及其新陈代谢有关。

RNA 和蛋白质随着时间和空间的变化逐渐被分解,在沉积物中随着时间的推移,到一定的沉积深度后,RNA 和蛋白质的含量均有所降低。沉积深度在 17~19 cm 以后,阿哈湖沉积物的 RNA 和蛋白质均明显减少。当沉积深度的时标确定后,就可算得 RNA 和蛋白质在沉积物中主要降解变化过程所经历的时间。

蛋白质在沉积物中与在生物体内的变化规律不同,在沉积物中因地质聚合作用及矿物和有机聚合物对蛋白质的吸附作用而得到不同程度的保留。在沉积物的 pH 条件下,蛋白质是带电荷的物质,而沉积物主要是由无机矿物组成,矿物质组成的胶体物质对蛋白质等生物大分子有一定的吸附作用,被吸附的生物大分子抵抗降解的能力增强。关于蛋白质等生物大分子的地质聚合作用机理,我们推测和酶的固定化作用相似,固定化酶的很多参数包括半衰期都发生了变化。室内实验证实了沉积物固体部分对蛋白质的吸附作用,在阿哈湖沉积物干样中加入等体积的标准蛋白质溶液(4 mg/mL)后,测得溶液中的蛋白质含量只有标准液的 39%。由于矿物质等组成的胶体物质的吸附作用,蛋白质在沉积物中的半衰期提高,使它随着时间的增加在沉积物中仍保留了一定的含量。这还有待于进一步证实。

感谢罗莎莎博士进行有机碳的测定工作。

参考文献:

- [1] Henrichs S M, Farrington J W. Early diagenesis of amino acids and organic matter in two coastal marine sediments [J]. *Geochim Cosmochim Acta*, 1987, 51: 1~15.
- [2] Burdige D J, Martens C. Biogeochemical cycling in an organic-rich coastal marine basin: 10. The role of amino acids in sedimentary organic carbon and nitrogen cycling [J]. *Geochim Cosmochim Acta*, 1988, 52: 1 571~1 584.
- [3] Pantoja S, Lee C. Molecular weight distribution of proteinaceous in Long Island Sound sediments [J]. *Limnol Oceanogr*, 1999, 44 (5): 1 323~1 330.
- [4] Henrichs K U, Hayers J M, Sylva S P, *et al.* Methane-consuming archaeobacteria in marine sediments [J]. *Nature*, 1999, 398: 802~805.
- [5] Summons R. Molecular probing of deep secrets [J]. *Nature*, 1999, 398: 752~753.
- [6] Pace N R. A molecular view of microbial diversity and the biosphere [J]. *Science*, 1997, 276: 734~740.
- [7] 邹承鲁. 21 世纪的生命科学——邹承鲁教授访谈录[J]. *生物化学与生物物理进展*, 2000, 27(1): 3~5.
- [8] 张龙翔. *生物化学实验指导* [M]. 北京:人民教育出版社, 1981. 160~168.
- [9] 西北农业大学. *基础生物化学实验指导* [M]. 西安:陕西科学技术出版社, 1985. 51~64.
- [10] 李永明. *实用分子生物学方法手册* [M]. 北京:科学出版社, 1998. 242~320.
- [11] 何立望. *生物化学实验* [M]. 贵阳:贵州科技出版社, 1992. 68~70.
- [12] 北京大学生物系生物化学教研室. *生物化学实验指导* [M]. 北京:人民教育出版社, 1979. 127~133.
- [13] 张龙翔. *生化实验方法和技术* [M]. 北京:人民教育出版社, 1981. 221~224.
- [14] 朱俭. *生物化学实验* [M]. 上海:上海科技出版社, 1981. 127~132.
- [15] 李酉年. *土壤农业化学常规分析方法* [M]. 北京:科学出版社, 1983. 221~226.
- [16] 祝其锋. *生物化学* [M]. 广州:广东科技出版社, 1997. 1~46.
- [17] 沈同. *生物化学* [M]. 北京:人民教育出版社, 1981. 158.

Variation of protein and RNA in the sediments of Lake Aha

LIANG Xiao-bing, WAN Guo-jiang, HUANG Rong-gui, WU Yan-you

(State Key Laboratory of Environmental Geochemistry, Institute of Geochemistry, Chinese Academy of Sciences, Guiyang 550002, China)

Abstract: Protein and RNA are gradually decomposed in Lake Aha with time and sediment depth. The contents of protein and RNA decrease distinctly below 17 cm and 19 cm, respectively, but their decomposed products, amino acids and nucleotides, have different variation regulations. The contents of amino acids are relative high in pore water in the sediment with a depth of 27~30 cm, which is related to the utilization difference between amino acids and nucleotides by microorganisms. Protein still keeps low contents (at least 0.32 mg/mL) below 17 cm because of geopolymerization and sorption of minerals and organic polymers.

Key words: protein; ribonucleic acid (RNA); sediments; Guizhou Province