

文章编号: 1004-7271(2002)03-0208-07

富硒极大螺旋藻整细胞、藻胆体 及藻蓝蛋白的光谱特性

周志刚, 尹长松

(上海水产大学渔业学院, 上海 200090)

摘要 对培养富硒极大螺旋藻的最佳硒处理浓度作了研究。结果表明 40mg/L 的硒可促进该藻的生长。与对照组相比, 富硒极大螺旋藻的整细胞、藻胆体及藻蓝蛋白的光谱特性无显著差异, 这表明硒没有影响到极大螺旋藻光能的吸收与传递。

关键词 硒; 极大螺旋藻; 整细胞; 藻胆体; 藻蓝蛋白; 光谱特性

中图分类号: S917 文献标识码: A

Spectrum properties of intact cells, phycobilisomes and phycocyanin from Se-rich *Spirulina maxima*

ZHOU Zhi-gang, YIN Chang-song

(Fisheries College, Shanghai Fisheries University, Shanghai 200090, China)

Abstract: The best concentration of selenium for culturing Se-rich *Spirulina maxima* was studied. The results indicated that 40 mg/L Se can greatly increase the alga's growth. The spectra properties of intact cells, phycobilisomes and phycocyanin from Se-rich *S. maxima* and *S. maxima* were studied. No difference was found between them. All these results showed that selenium did not affect the absorbance and transfer of solar energy in *S. maxima*.

Key words Se; *Spirulina maxima*; intact cells; phycobilisomes; phycocyanin; spectra properties

硒是人体必需的微量元素之一, 构成若干抗氧化酶的活性中心^[1]。许多研究揭示, 硒具有多种生物学功能。我国在利用硒防治克山病、大骨节病及肿瘤等方面已取得可喜成就^[2]。目前, 对硒的研究已深入到人和动物的营养、生理作用, 以及抗癌机制研究。在动物和微生物体内亦已相继发现许多含硒酶和硒蛋白, 有些已深入到分子水平阐明其作用机理^[3]。

但硒和其它的必需微量元素一样, 在过量使用时(特别是无机状态的硒), 又会对生物体造成毒害。有机硒与无机硒相比, 更容易被机体吸收和利用, 生物活性更高而毒性却降低很多, 因而利用动植物对无机硒的吸收转化所获取的有机硒, 就有普遍的食用和保健价值。目前已相继开发出一些富硒保健食品, 如富硒酵母、茶叶、灵芝、大豆等。

螺旋藻因其中丰富而均衡的营养被誉为“人类明天最理想的食物”, 在食品及食品添加剂、饲料及其添加剂、医药制品、化学化工上都有广泛的应用。但天然螺旋藻中微量活性元素硒的含量极少, 而

微量硒培养的螺旋藻,其生长及抗氧化能力都有所提高^[4]。加硒培养的钝顶螺旋藻可以保藏更长的时间且颜色深而不变^[5]。低浓度硒培养的钝顶螺旋藻其品质也得到改善,而且富含硒,这对提高人们膳食中的硒含量具有重要的现实意义^[6]。

周志刚^[4]、李乐农^[7]等发现了含硒藻蓝蛋白的存在。藻蓝蛋白是藻胆蛋白的一种,对螺旋藻本身有两大功能:光能的吸收与传递功能,加宽了藻利用光的波长范围;蛋白质的贮藏功能,在氮源缺乏时提供氮源。藻胆蛋白作为天然色素,可用于食品、化妆品、染料等工业上,也可以用来作为荧光探针,应用于临床诊断、免疫化学等领域^[8,9]。光谱特性是藻胆蛋白的主要特性。光谱学方法是研究藻胆体、藻胆蛋白的结构和功能的重要方法。光谱特性的改变也能反应它们结构上的变化。对螺旋藻光谱特性系统而完整的研究尚未见报道,零散的报道也集中在对钝顶螺旋藻的研究上。本论文研究的对象为另一生产性藻种——极大螺旋藻,对其富硒培养的最佳加硒浓度作了研究,为生产富硒极大螺旋藻提供参考。并从整细胞、藻胆体、藻蓝蛋白这三个水平上对其光谱特性作了系统的研究,希望对阐明藻胆蛋白吸收与传递光能以及硒的影响等问题有所裨益。

1 材料与方法

1.1 极大螺旋藻的加硒培养及整细胞光谱特性

1.1.1 藻种及培养条件

藻种取自南京大学生命科学院藻种室。培养基为重蒸水配制的 Zarrouk 培养基,以亚硒酸钠供硒,硒浓度为 0 到最大忍受剂量。通过滤空气培养,以日光灯为光源,光照强度为 3000lx,光周期为光:暗 = 14:10 小时。在光照时选择温度 30℃,无光时为 25℃。每天定时用 752 型分光光度计测定藻液在 560nm 的吸光值,以此绘制曲线来表征藻的生长。

1.1.2 整细胞的光谱测定

将培养至对数期的藻液用 Zarrouk 培养基调 OD₅₆₀ 为 0.35 左右。用 amersham pharmacial biotech 公司的 uv/visible spectrophotometer,在室温下测 400nm 到 750nm 间的吸收光谱。用 Zarrouk 培养基作对照。

荧光光谱测定时将藻液调至 OD₅₆₀ 为 0.05 左右,用日立 850 型荧光分光光度计在室温下测定。

1.2 藻胆体的分离纯化及其光谱特性

1.2.1 藻胆体的分离纯化

根据上一节的结果选用最佳硒浓度来培养富硒极大螺旋藻,对照组不加硒。藻液 OD₅₆₀ 值达到 2.0 就可以收集藻体。藻胆体的提取根据 Gant^[10]和张玉忠^[11]的方法有所改进,省去了对设备要求高的超速离心这一步骤,首次将 Sepharose 4B 凝胶过滤引入藻胆体的分离纯化工艺。具体步骤如下:

用 300 目筛绢过滤收集,再用无硒新鲜培养基、蒸馏水、磷酸盐提取缓冲液分别洗三次,悬浮于 8 到 10 倍体积 1.25mol/L 的磷酸盐缓冲液(pH 7.0)中,冰浴条件下 JY92-2D 型细胞粉碎仪超声破碎 5 次,每次两分钟,间隔两分钟,共 20min,功率 200W。然后加曲拉通 X-100 至上述溶液中,终浓度为 2%,室温下搅拌 30min,然后 8 000g 离心 10min。用吸管小心去除上层的叶绿素并弃去上清。沉淀溶于 0.5 mol/L 磷酸盐缓冲液(pH 7.0)中,加曲拉通 X-100 至终浓度为 2%,搅拌 30min 后,10 000g 离心 10min,去沉淀和上层的叶绿素。取中部蓝紫色的溶液,加固体磷酸盐(K₂HPO₄:KH₂PO₄ = 1mol:1mol)至磷酸盐浓度为 0.85mol/L,于 12 000g 离心 20min,去除叶绿素,收集中部上清液,加固体磷酸盐(K₂HPO₄:KH₂PO₄ = 1mol:1mol)至终浓度为 1.5 mol/L,12 000g 离心 15min,沉淀溶于 0.5 mol/L 磷酸盐缓冲液(pH 7.0)中,将该藻胆体溶液过 Sepharose 4B 柱层析,用 0.9 mol/L 磷酸盐缓冲液(pH 7.0)洗脱,流速为 0.5mL/min,收集蓝紫色溶液待用。

1.2.2 藻胆体的光谱测定

藻胆体用 0.9 mol/L 磷酸盐缓冲液(pH 7.0)调至适当浓度,用相同的缓冲溶液作对照,测紫外可见吸收光谱。测定荧光光谱时用相同缓冲液调至蛋白浓度低于 20μg/mL。用 Bradford 法测定蛋白质浓

度^[12]。

1.3 藻蓝蛋白的分离纯化及其光谱特性

1.3.1 藻蓝蛋白的分离纯化

极大螺旋藻的培养、藻泥的收集同制备藻胆体时相同,只是最后将藻泥悬浮于低浓度(0.1 mol/L)的磷酸盐缓冲液(pH 7.0)中。冰浴条件下超声波破碎,工作 1sec,间歇 1sec,功率 550W 左右,全程 6min(以下操作均在 4℃进行)。10 000g 离心 15min,除去细胞碎屑,量取上清,取 20~40%硫酸铵的分级沉淀部分,用少量提取缓冲液溶解。对 0.01 mol/L 的磷酸盐缓冲液(pH 7.0)透析,透析液用聚乙二醇浓缩。浓缩液过 Sephadex G-100 柱层析,用 0.01 mol/L 的磷酸盐缓冲液(pH 7.0)洗脱,收集特征吸收峰为 620nm 的洗脱液。蓝紫色的洗脱液直接上自制的羟基磷灰石柱,用 0.01 mol/L 到 0.1 mol/L 的磷酸盐缓冲液(pH 7.0)以 0.4mL/min 的流速洗脱。收集特征吸收峰在 620nm 的组分,对 0.01 mol/L Tris-HCl 缓冲液(pH 7.3)透析 24h,将透析后的样品直接上 DEAE-纤维素 52 柱层析,用含 0 到 0.5 mol/L KCl Tris-HCl 缓冲液(pH 7.3)进行梯度洗脱,收集蓝紫色洗脱液,对 0.01 mol/L 的磷酸盐缓冲液(pH 7.0)透析 24h,用聚乙二醇浓缩后,再过一次 Sephadex G-100 柱层析。藻蓝蛋白组分透析浓缩后,-20℃保存。

羟基磷灰石为自制,参考文献^[13,14],用溶解度大的 K_2HPO_4 代替溶解度小的 Na_2HPO_4 ,防止 Na_2HPO_4 在低于室温条件下的析出,在增大浓度的同时,可以减少反应容器的体积。

1.3.2 藻蓝蛋白的光谱测定

藻蓝蛋白溶液用 0.01 mol/L 的磷酸盐缓冲液(pH 7.0)调 620nm 处的吸光度小于 2.0,用相同的缓冲液作对照,测紫外可见吸收光谱。荧光光谱测定时用相同的缓冲液调蛋白浓度为 20 μ g/mL 左右。

2 结果与讨论

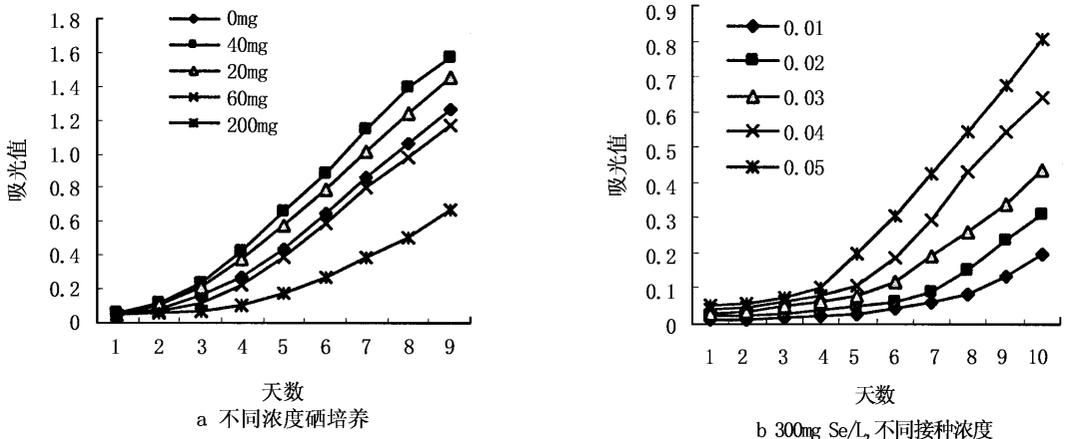


图 1 极大螺旋藻的生长曲线

Fig.1 The growth curves of *S. maxima*

2.1 硒对极大螺旋藻生长的影响

图 1-a 是根据 560nm 处的光吸收值描绘极大螺旋藻在不同硒浓度下的生长曲线。由该图可看出 20mg Se/L、40mg Se/L 对极大螺旋藻的生长有促进作用,但高于 60mg/L 的硒则起抑制作用。硒浓度越高,抑制作用越强,对数生长期明显滞后。硒对螺旋藻生长双重影响的原因可能是生物体内一些重要的含硒酶(如 GSH-PX)的活性中心是硒代半胱氨酸,低浓度的硒可能增加了这些酶的活性以及硒的抗氧化性能,能更有效地清除细胞内的活性氧自由基或其它过氧化物,从而增加细胞活力,延缓衰老,因此对极大螺旋藻的生长具促进作用。而高浓度的硒对极大螺旋藻生长的抑制,甚至死亡效应,可能是硒与硫存在一定的差异所致。硒一旦过多取代蛋白质中的硫,就有可能引起蛋白质空间结构和功能的明显改变,从

而使正常生命活动紊乱,进而抑制藻细胞的生长^[15]。对于硒的这种双重作用,徐辉碧^[2]认为与活性氧形成的能力有关。硒化合物既可以清除体内的自由基,又能产生自由基。在较低浓度下可能以清除自由基为主要倾向,表现出有益的生理效应,即促进作用,而在高浓度下则以产生自由基(活性氧)为主,导致毒性作用。

图 1-b 是用 560nm 处的光吸收值描绘高浓度硒(300 mg/L)培养的极大螺旋藻在不同接种浓度下的生长曲线。可以看出,高浓度硒(300 mg/L)对极大螺旋藻生长的影响与藻液的接种浓度有很大关系。藻液的初始浓度越低,硒的抑制作用越明显,藻也越晚进入对数期。从显微形态上看,低硒浓度下培养的螺旋藻与不加硒的对照组没什么差异,而高浓度硒培养的螺旋藻卷曲程度大,藻体直径变细,颜色淡而显黄色。

现有的报道中,硒对螺旋藻的致死浓度有较大差异^[5,6,15]。从我们的实验结果来看,这除了与藻种、培养方法、硒源及添加方式有关外,与初始的藻液浓度也有很大关系。高浓度的藻液能耐受高浓度的硒,可能是接种前后的营养条件更一致,因此总的逆境胁迫较弱,导致高的生物量有较强的抗硒能力。某些硒积聚植物在野外生长时能散发出类似大蒜似的特殊气味,这是由于存在一些挥发性硒化合物,其中一种被证明为二甲基二硒醚,挥发性硒化合物产生的量与培养基中的硒化合物的形式有关^[5]。我们在用亚硒酸钠培养极大螺旋藻时也发现有特殊气味的产生,这可能是一些挥发性的硒化合物,它使得培养液中硒的浓度有所降低,加上驯化作用,极大螺旋藻在培养一段时间后就能耐受高浓度的硒,进入对数生长期。高浓度藻液能挥发掉较多的硒,抗逆能力也较强,因此比低浓度藻液更快进入对数生长期。

2.2 整细胞的光谱特性

图 2 为不加硒培养的螺旋藻、加 40 mg/L 硒培养的螺旋藻和 300mg/L 硒培养的螺旋藻在 Zarrouk 氏培养基中的吸收光谱。440nm 处为叶绿素的吸收峰,495 nm 处的肩峰为胡萝卜素的吸收峰,620 nm 处的吸收峰为藻蓝蛋白的吸收峰,680 nm 的吸收峰为别藻蓝蛋白和叶绿素的吸收峰^[16]。这些在低硒浓度下和高硒浓度下培养的螺旋藻中没有差异,但高硒浓度下培养的螺旋藻各个峰的值较低,表明色素含量偏低,尤其是叶绿素的含量,这在藻液的颜色上也有体现,高浓度硒培养的藻液颜色偏黄。

图 3-a 为 0mg/L 的硒和 40mg/L 的硒培养的藻液在 440nm 激发所测得的发射光谱,两者峰值都相同,682nm 处为别藻蓝蛋白-B 的发射峰,735nm 处为叶绿素的发射峰。没有发现藻蓝蛋白(648nm)和别藻蓝蛋白(660nm)的荧光发射峰,说明藻胆体内能量传递的效率极高,藻蓝蛋白和别藻蓝蛋白吸收的光能均能传递给别藻蓝蛋白-B 和叶绿素。而 682nm 的荧光激发光谱(图 3-b)的峰值在 622nm 处,没有发现别藻蓝蛋白的激发峰,说明在活体内,别藻蓝蛋白-B 发射的荧光主要来源于藻蓝蛋白,因而藻蓝蛋白是主要的捕光色素蛋白,而别藻蓝蛋白主要是传递光能的,对捕光的贡献较小。这和各种藻胆体模型中别藻蓝蛋白处于核心,而藻蓝蛋白分布在外围的棒状结构中的结论相一致^[17]。

2.3 藻胆体的分离纯化及其光谱特性

图 4 为富硒极大螺旋藻及其对照中提取的藻胆体的紫外可见吸收光谱。620nm 的峰值为藻蓝蛋白的特征吸收峰,藻蓝蛋白在 595nm 处也有一吸收肩峰,650nm 的肩峰为别藻蓝蛋白的特征吸收峰,由于这些吸收峰较近,吸收也强,因此在 500nm 到 700nm 间形成一个既宽且强的吸收峰。280nm 是蛋白中芳香族氨基酸的吸收峰,325nm 处的吸收峰可能来自二硫键。藻胆体与含硒藻胆体的紫外可见吸收光谱

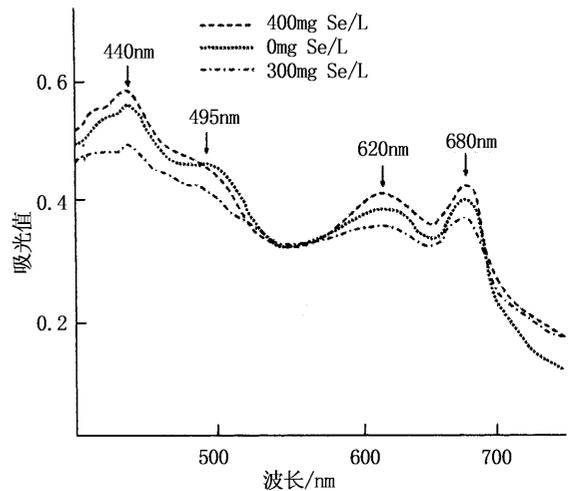


图 2 整细胞吸收光谱

Fig. 2 The absorption spectrum of intact cells

没有什么差异。

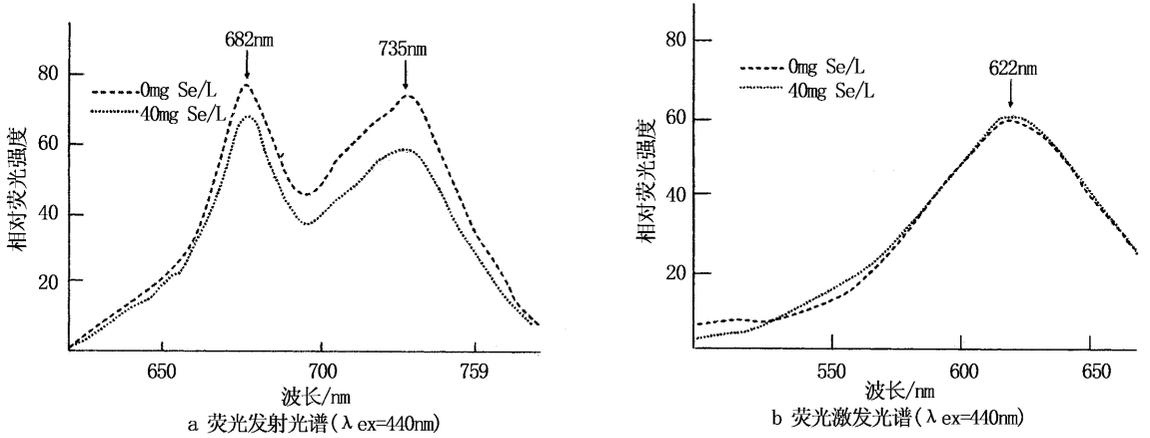


图 3 富硒极大螺旋藻及对照的荧光光谱

Fig.3 The fluorescence spectrum of intact cells from Se-rich *S. maxima* and the control

图 5-a 为富硒极大螺旋藻及其对照中提取的藻胆体在 440nm 激发所得的发射光谱,峰值在 682nm,表明藻胆体是完整的。没有发现叶绿素的荧光发射峰,表明提取的藻胆体中没有叶绿素污染。它们在 682nm 的荧光激发光谱(图 5-b)中有别藻蓝蛋白和藻蓝蛋白的激发峰,峰值分别在 655nm 和 622nm 处,这在含硒藻胆体与对照藻胆体中一样。但和整细胞在 682nm 的荧光激发光谱(图 3-b)相比,多了别藻蓝蛋白的激发峰——655nm 的峰。表明整细胞的藻胆体荧光发射峰主要源于藻蓝蛋白吸收的能量,别藻蓝蛋白贡献较小。而离体的藻胆体中,别藻蓝蛋白-B 的荧光有很大一部分是由别藻蓝蛋白贡献的,可能是离体的藻胆体在结构上有所变化,使得处于藻胆体核心的别藻蓝蛋白比在活体时更容易吸收光能。完整藻胆体的荧光发射峰在 682nm 处,该峰值是 APC-B 的荧光发射峰。说明在完整的藻胆体内,PC 和 APC 吸收的光能均能高效地传给 APC-B。但藻胆体 682nm 的荧光激发光谱(图 5-b)只有 620nm 和 655nm 两处,分别来自于 PC 和 APC,而没有 APC-B 的荧光峰(670nm 左右),表明藻胆体 682nm 荧光发射峰的能量来自于 PC 和 APC,而不是来自 APC-B 本身吸收的光能,或者是 APC-B 浓度太低而无法检测到。

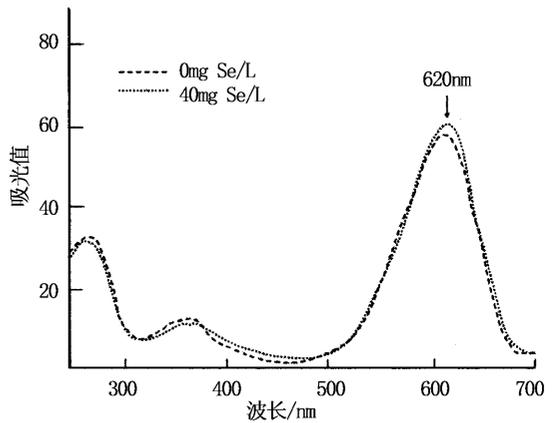


图 4 富硒极大螺旋藻藻胆体及对照的紫外可见吸收光谱

Fig.4 The ultraviolet and visible absorption spectrum of phycobilisomes from Se-rich *S. maxima* and the control

2.4 藻蓝蛋白的分离纯化及其光谱特性

图 6 为富硒极大螺旋藻及其对照中提取的藻蓝蛋白的紫外可见吸收光谱。两者没有什么显著差异。在 280nm、325nm 和 620nm 处有三个明显的吸收峰,在 595nm 有一吸收肩峰,这些都是 C-藻蓝蛋白的典型特征吸收峰^[16]。

图 7 为它们的荧光光谱,7-a 是在 440nm 处激发的荧光发射光谱,荧光发射峰均在 648nm 处,这是藻蓝蛋白的特征发射峰^[16]。648nm 的荧光激发光谱也是一致的(图 7-b),峰值均在 325nm 处,而可见光区没有明显的激发峰,或者是离 λ_{em} 太近而无法观察到。

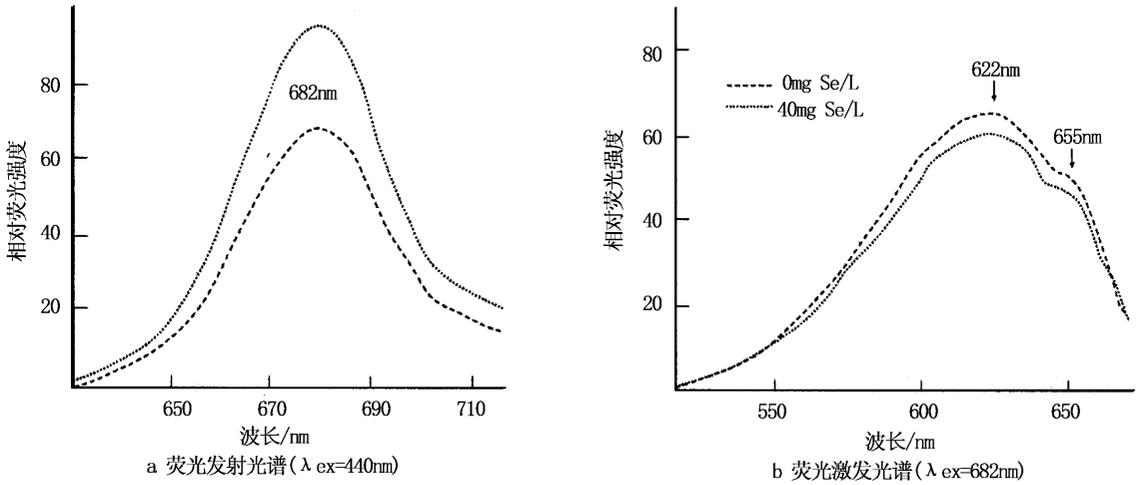


图 5 富硒极大螺旋藻藻胆体及对对照的荧光光谱

Fig.5 The fluorescence spectrum of phycobilisome from *S. maxima* and the control

3 结论

用不同浓度的硒培养极大螺旋藻,结果显示低浓度的硒促进藻的生长,而高浓度的硒则起抑制作用。接种时高浓度的藻液能耐受更高浓度的硒。40mg/L的硒是培养富硒极大螺旋藻的适宜浓度。用改进的方法提取藻胆体和藻蓝蛋白。富硒极大螺旋藻整细胞、藻胆体、藻蓝蛋白与对照相比,紫外可见吸收光谱和荧光光谱没有明显差异,表明硒对藻生长的影响不是通过影响光能的吸收与传递,而是通过另外的途径来实现的,其具体机理有待于进一步研究。

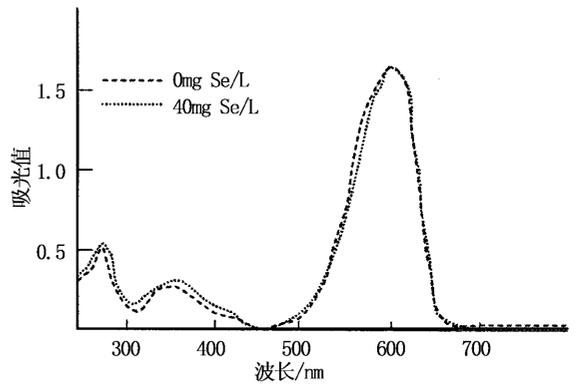


图 6 富硒极大螺旋藻藻蓝蛋白及其对照的紫外可见吸收光谱

Fig.6 The ultraviolet and visible absorption spectrum of phycyanin form Se-rich *S. maxima* and the control

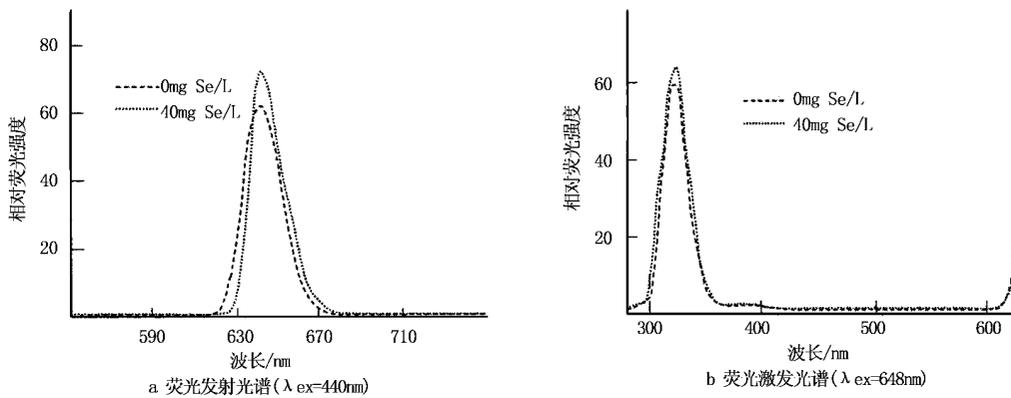


图 7 富硒极大螺旋藻藻蓝蛋白及对对照荧光光谱

Fig.7 The The fluorecence spectrum of phycocyanin form Se-rich *S. maxima* and the control

参考文献:

- [1] 郭荣富, 张 羲, 陈克麟. 微量元素硒代谢及硒蛋白基因表达调控最新研究进展[J]. 微量元素与健康研究, 2000, 17(1): 62-65.
- [2] 徐辉碧, 黄开勋. 硒的化学、生物化学及其在生命科学中的应用[M]. 武汉: 华中工业大学出版社, 1994. 209-243.
- [3] 赵利军, 徐光禄. 硒蛋白的基因分子生物学研究进展[J]. 国外医学医学地理分册, 1997, 18(1): 4-6.
- [4] 周志刚, 李朋富, 刘志礼, 等. 三种螺旋藻及其蛋白质、多糖和脂类结合硒的研究[J]. 海洋与沼, 1997, 28(4): 363-370.
- [5] 喻达辉, 刘少明. 钝顶螺旋藻对不同无机硒的吸收研究[J]. 海洋学报, 2000, 22(2): 137-141.
- [6] 乔玉辉, 商树田. 施硒对钝顶螺旋藻品质的影响[J]. 中国农业大学学报, 2000, 17(1): 31-34.
- [7] 李乐农, 张秀平, 江 涛, 等. 富硒螺旋藻中含硒藻蓝蛋白的纯化、结晶及初步晶体学研究[J]. 中国科学(C 辑), 2000, 30(5): 449-455.
- [8] 路荣昭, 刘 斌, 李凤平. 螺旋藻(*Spirulina platensis*)藻胆体在解离过程中荧光发射光谱和光能传递的研究[J]. 生物物理学报, 1994, 10(3): 479-484.
- [9] 王向阳. 螺旋藻荧光探针的研究[C]. 中国螺旋藻产业发展研讨会论文集汇编(国家科委中国农村技术开发中心, 中国螺旋藻产业协会(筹), 1996. 27.
- [10] Gantt E. Phycobilisomes[J]. Annu Rev Physiol, 1981, 32: 327-347.
- [11] 张玉忠, 陈秀兰, 周百成, 等. 钝顶螺旋藻中一种新的模型藻胆体[J]. 中国科学(C 辑), 1999, 29(2): 145-150.
- [12] 颜子颖, 王海林. 精编分子生物学实验指南[M]. 北京: 科学出版社, 1998. 332-333.
- [13] 蔡武城. 生物化学实验技术教程[M]. 上海: 复旦大学出版社, 1971. 144-145.
- [14] Johan A Hellebust, James S Craigie. Handbook of phycological methods: physiological and biochemical methods[M]. Cambridge: Cambridge University press, 1978. 72-79.
- [15] 李志勇, 郭祀远, 李 琳. 富硒螺旋藻培养技术研究[J]. 水生生物学报, 2001, 25(4): 386-391.
- [16] Borwitzka, Lesley J Borwitzka. Micro-algal biotechnology[M]. UK: Cambridge University Press, 1988. 85-122.
- [17] 王广策, 曾呈奎. 藻胆体结构与功能的研究概况[J]. 水生生物学报, 1998, 22(4): 372-377.

欢迎订阅 2003 年《水产科学》

《水产科学》杂志是由辽宁省水产学会主办的水产科技期刊, 1982 年创刊, 国内外发行。是中文水产、渔业类核心期刊和全国农业系统优秀期刊之一, 现已被俄罗斯《文摘杂志》、英国《动物学记录》、《国际农业与生物研究中心》、美国《剑桥科学文摘》等收录。是中国科学引文数据库、中国学术期刊综合评价数据库、《中国学术期刊(光盘版)》、中国期刊网和万方数字化期刊群全文收录期刊, 是《中国水产文摘》来源期刊之一。杂志主要刊载水产资源、海水淡水捕捞、水产养殖与增殖、水产生物病害及防治、水产品保鲜与加工综合利用、渔船、渔业机械与仪器及水产基础科学等方面研究的新进展、新技术、新方法等。设有科学实验、实用技术、渔业管理、综合评述、问题探讨与建议、科普讲座、科技信息等栏目。读者对象为水产科技人员, 大中专院校水产、生物、环保等专业师生, 渔业行政事业和企业单位有关管理和技术人员, 以及广大知识渔民。本刊为双月刊, A₄ 开本, 56 页, 逢单月 25 日出版, 定价 5.00 元, 全年 30.00 元。邮发代号 8-164, 订阅者请到邮局订阅, 也可直接汇款到本刊编辑部订阅。

地址: 大连市沙河口区黑石礁街 50 号辽宁省海洋水产研究所《水产科学》编辑部, 邮政编码: 116023 电话(0411)4679512; 或通过银行汇款。

开户行: 工商银行大连星海支行 帐号: 3400202309008900681