

Se(IV)对藻蓝蛋白分子的氧化及纳米 Se(0)的生成

杨芳¹, 黄峙², 郭振江¹, 郑文杰¹

(暨南大学 生命科学技术学院 1. 化学系, 2. 生物工程学系, 广东 广州 510632)

摘要: 从钝顶螺旋藻(*Spirulina platensis*)中提取纯化藻蓝蛋白(Phycocyanin, PC), 光吸收值 A_{620}/A_{280} 为 3.1, 观察 Se(IV)与 PC 相互作用的光谱行为及红硒化现象。光谱检测发现, 加入 SeO_3^{2-} 后, PC 在 620 nm 的特征光吸收减弱, 并随 Se(IV)浓度增加和时间延长单调降低, 278 nm 和 347 nm 的光吸收增强; PC 的荧光发射和荧光激发也均呈现衰减。另外, PC 与 Na_2SeO_3 相互作用后, 观察到红硒化现象, 透射电镜(TEM)证明主要存在形态为红色纳米硒。结果提示 PC 可能是 SeO_3^{2-} 作用的敏感靶点, Se(IV)对 PC 主要表现为氧化损伤, 而 Se(IV)被还原为红色纳米硒。

关键词: 硒; 钝顶螺旋藻; 藻蓝蛋白; 光谱; 纳米

中图分类号: Q51

文献标识码: A

文章编号: 1000-3096(2010)06-0055-04

藻蓝蛋白(phycoyanin, PC)是藻胆体的主要捕光色素蛋白, 也是目前发现的最高效的捕光色素蛋白之一^[1]。大量研究表明, PC 是亚硫酸盐^[2]、UV-B^[3]、盐胁迫^[4]及重金属^[5]对藻细胞损伤的主要靶分子。PC 损伤主要表现为氧化作用并导致能量传递受阻, 光谱学分析是研究 PC 功能状态及光能传递的主要手段之一。

硒对螺旋藻具有低浓度生长促进和高浓度毒性双重效应^[6]。一方面, 螺旋藻作为硒的生物有机化载体, 可以富集和转化硒, 其中有机硒主要与蛋白质结合, 已发现硒藻蓝蛋白含硒量可达 267 $\mu\text{g}/\text{g}$, 动物实验发现富硒 PC 对小鼠肝氧化损伤有明显的保护作用^[7]。Cases 等也报道^[8], 富硒螺旋藻提取物中, >30 ku 的含硒组分生物活性最高, 而其中主要成分为藻蓝蛋白, 说明 PC 是结合硒的主要效应分子。另一方面, 微生物通过一系列氧化还原反应, 实现 Se(0)、Se()、Se()、Se()不同价态的转换, 在细菌 *Rhodospirillum rubrum* 中红色 Se(0)的产生是缓解硒毒的一种主要方式^[9]。但迄今为止, 微藻拮抗硒毒性的机制和分子靶点还不明确。作者利用纯化的 PC 在体外与 Se(IV)相互作用, 发现 PC 氧化损伤的光谱行为改变, 并伴随纳米红色 Se(0)微粒的形成。

1 材料与方法

1.1 钝顶螺旋藻的培养

钝顶螺旋藻(*Spirulina platensis*)藻种取自暨南大学水生物研究所, 实验室保种。采用 Zarrouk 标准

培养基培养, 2 000 mL 三角瓶中, 加入 500 mL 培养液, 取对数生长期(第 4 天)的藻细胞接种并调节初始 $A_{560}=0.10$, 置于无菌光照培养室中, 光强度 5 000 lx 左右, 光照时间 24 h/d, 温度 30 ± 1 , pH 8.5, 通气培养, 每天添加适量蒸馏水以补充水分蒸发, 第 9 天采收。

1.2 藻蓝蛋白的提取纯化

参照文献方法^[10], 简言之, 取干藻粉 2.0 g 悬浮于 30 mL 50 mmol/L 的 $\text{NaH}_2\text{PO}_4\text{-K}_2\text{HPO}_4$ 缓冲液(pH7.0)中, 冰浴中超声波破碎(工作 30 min, 间隔 10 min, 电压 120 V, 10 个循环), 4 条件下 5 000 r/min 离心 15 min, 上清液依次用 25%、45%饱和度硫酸铵沉淀, 将沉淀蛋白用少量缓冲液溶解, 超滤浓缩并脱盐后上 DEAE-52 纤维素柱(60 cm \times 2.5 cm)层析, 分部收集, 提取纯化后 PC 光吸收值 A_{620}/A_{280} 为 3.1, PC 吸收光谱测定结果(图 1)表明含少量别藻蓝蛋白(Allophycocyanin, APC)。

1.3 藻蓝蛋白与 Se(IV)作用

把上述所得的藻蓝蛋白装入透析袋(截留分子量: 8~10 ku)中, 4 下, 用 50 mmol/L 的 $\text{NaH}_2\text{PO}_4\text{-K}_2\text{HPO}_4$ 缓冲液(pH7.0)透析 2 d。藻蓝蛋白的浓度按

收稿日期: 2008-10-12; 修回日期: 2009-01-05

基金项目: 国家自然科学基金(20771044); 广东省科技计划项目(2007B030703007及2008A030201020); 中国博士后基金(20090460787); 中央高校基本科研业务费专项资金(21610303)

作者简介: 杨芳(1976-), 女, 博士, 研究方向: 生物无机化学, E-mail: tyoung@jnu.edu.cn, 电话: 020-85220223; 郑文杰, 通信作者, E-mail: tzhwj@jnu.edu.cn

($\alpha\beta$)单体的摩尔浓度计量, ($\alpha\beta$)单体分子质量为 35 ku^[11], 藻蓝蛋白浓度以下列公式^[12]计算:

$$PC(\mu\text{mol/L}) = (A'_{615} - A'_{650} \times 0.474) / 0.187$$

$$A'_{615} = A_{615} - A_{750}, A'_{650} = A_{650} - A_{750}$$

A_{615} 、 A_{650} 、 A_{750} 分别为 615、650、750nm 处的吸光度。

测定吸收光谱的藻蓝蛋白溶液浓度为 3.5 $\mu\text{mol/L}$, 以 Se(IV)与藻蓝蛋白摩尔比(R)为 0.1、1、10、100 确定 Se(IV)溶液的加入量。荧光光谱的藻蓝蛋白浓度为 0.11 $\mu\text{mol/L}$, 同样以 Se(IV)与藻蓝蛋白摩尔比(R)为 1、10、100、1000。上述溶液均用 50 mmol/L 的 $\text{NaH}_2\text{PO}_4\text{-K}_2\text{HPO}_4$ 缓冲液(pH7.0)配制。25 °C 下, 避光、密封保存。光谱测定在室温下进行。

1.4 红色纳米硒的电镜观察

将 PC 与 Se(IV)作用一定时间(观察到有红色 Se 的实验组)所得的红色硒蛋白溶胶涂在附有碳膜的铜网上, 迅速干燥后用透射电子显微镜观察粒子形状、分散情况。

1.5 仪器

JY92-II 型超声波细胞破碎机; UV-1100 型紫外/可见光度计; 970CRT 荧光分光光度计(上海三科仪器总厂); TECNAI 10(PHILIPS)透射电子显微镜。

2 结果与讨论

PC 含有 α 和 β 亚基, 发色团(PCB)位于 α 亚基的半胱氨酸残基(cysteine, Cys) Cys84 (λ_{max} : 580~590 nm)和 β 亚基的 Cys84、Cys155(λ_{max} : 615~620 nm)^[13],

599 nm 的激发峰属于 α 亚基的 PCB, 629 nm 的激发峰属于 β 亚基的 PCB。纯化的 PC 具有典型的光谱特性(图 1), 特征吸收峰位于 620 nm; 650 nm 处的肩峰提示含少量 APC, 但不影响本研究的实验观察。荧光光谱(图 2)显示 1 个荧光发射峰(657 nm)和 2 个荧光激发峰(599、629 nm)。螺旋藻 PCB 均结合于 Cys 残基, 可能是硒氧化损伤的敏感位点。

2.1 Se(IV)对 PC 吸收光谱影响

如图 1 所示, 随 Se(IV)浓度增加和作用时间延长, PC 620 nm 的吸光度单调降低, 而 278 nm 和 347 nm 的吸光度增强, 并与 620 nm 光吸收的变化趋势相反。Se(IV)对 PC 的损伤可能涉及破坏氢键、氧化作用、静电作用等, 影响蛋白质空间构象与功能。实验中低 R [Se(IV)对 PC 的摩尔比]即引起 PC 吸收光谱的明显变化, 但对样品中 650 nm 肩峰(样品中存在少量别藻蓝蛋白)影响不大, 鉴于藻蓝蛋白和别藻蓝蛋白的性质和结构相似性, 推测 Na_2SeO_3 的电解质效应对 PC 的损伤不是主要因素。有报道^[14]藻蓝蛋白是 Cu^{2+} 等重金属离子的作用靶分子, Cu^{2+} 等重金属离子带正电荷, 通过强配位中心体影响带负电荷以及有配位功能的基团。本实验观察到 Se(IV)对 PC 光谱的影响与 Cu^{2+} 离子相似, 表现出 620 nm 吸光度减弱, 可能是 SeO_3^{2-} 带负电荷且具有较强的氧化性, 可攻击藻蓝蛋白分子中带正电和不带电荷或具有还原性的氨基酸侧链, 如 Cys 残基中的-SH, 引起 PC 构象松散, “暴露”PC 分子中一部分“埋藏”的酪氨酸或色氨酸残基, 导致 278 nm 光吸收增强。同时, Se(IV)可能通过氧化损伤作用对 PCB 活性产生影响,

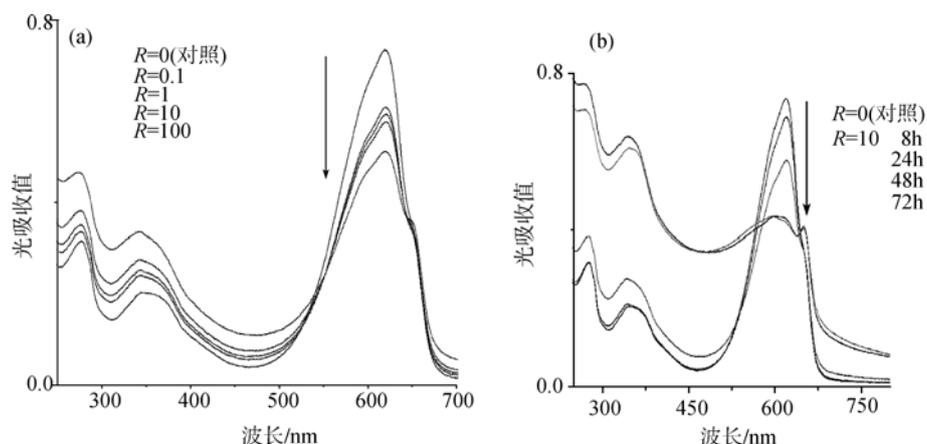


图 1 Se(IV)与 PC 相互作用的吸收光谱 ($R = \text{Se(IV)}:\text{PC}$, 摩尔比)

Fig. 1 Absorption spectra of interaction between Se(IV) and PC ($R = \text{Se(IV)}:\text{PC}$, molar ratio)

a. 不同 Se(IV): PC 摩尔比的吸收光谱 (8 h) b. 随时间变化的吸收光谱($R = 10$)

a. Absorption spectra of different molar ratio of Se(IV) to PC (8 h) b. Absorption spectra of different time($R = 10$)

从而使 620 nm 的吸收减弱。PC 分子的结构是保证藻蓝蛋白内 PCB 正常光谱性质的前提^[15]，所以，光谱分析结果可为环境与微藻应答的敏感性之间关系的研究提供线索。

2.2 Se(IV)对 PC 荧光光谱影响

图 2 表明，随 Se(IV)浓度的增加，PC 荧光发射和激发强度均逐渐减弱，但峰位置均无明显的改

变。Se(IV)对 PC 的 2 个荧光激发峰的影响程度不同，如图 2a 所示，在 R 值为 1 时，599 nm 激发峰强度即开始减弱，629 nm 处激发峰的强度基本不变，随着 R 值的增大，2 个激发峰强度虽然均有所减弱，但 599 nm 比 629 nm 相对荧光强度的减弱更为明显。表明 Se(IV)对 α 和 β 亚基上 PCB 发色团均有作用，但有差异。

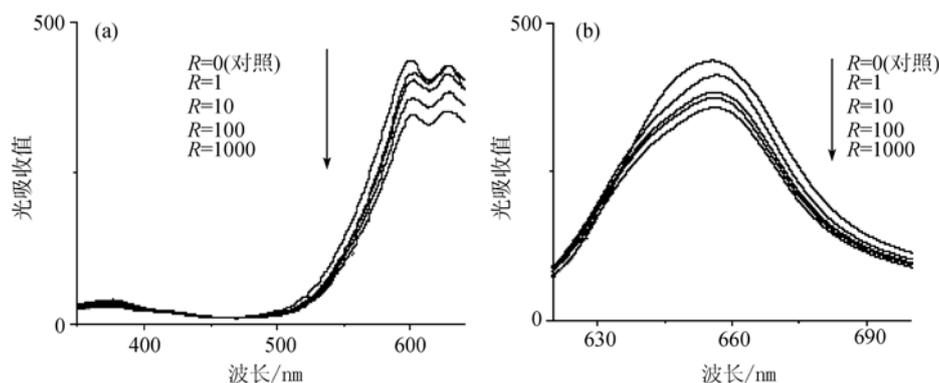


图 2 Se(IV)与 PC 相互作用的荧光光谱

Fig. 2 Fluorescence spectra of interaction between Se(IV) and PC

a. 激发光谱 ($\lambda_{em}=657$ nm, 8 h) b. 发射光谱 ($\lambda_{ex}=599$ nm, 8 h)
a. excitation spectra ($\lambda_{em}=657$ nm, 8 h) b. emission spectra ($\lambda_{ex}=599$ nm, 8 h)

藻蓝蛋白在可见光区有特征吸收峰，并具有较强的荧光。这种特性是螺旋藻中藻蓝蛋白吸收和转化光能的基础。Se(IV)与 PC 作用后，PC 在可见光区的光吸收和荧光强度都减弱，说明 PC 是 Se(IV)的靶分子，直接使 PC 分子产生损伤。这种作用的结果会导致藻在生长过程中对光能的吸收减少，光能传递受阻，从而抑制光合作用过程。从 PC 和 APC 对 Se(IV)的不同敏感程度来看，Se(IV)对藻的捕光系统影响主要是作用在 PC 上。

2.3 藻蓝蛋白对 Se(IV)的红硒化

Se(IV)与 PC 作用 92 h 后，观察到 $R>1$ 实验组

出现红硒化，提示 Se(IV)对 PC 结构与功能产生影响的同时，PC 中的某些基团把 Se(IV)还原为 Se(0)。PC 与 Se(IV)作用 240 h 后得到的红色硒溶胶中粒子的 TEM 照片(图 3)，粒径为 3~160 nm。推测其形成的大致过程如下：首先 Se(IV)被还原并形成直径一般<30 nm 的硒粒子(图 3a, 3b)，由于其表面能很高，易进一步团聚，同时硒原子有空的 4 d 轨道，是亲电子粒子，可作为配位体接受蛋白质侧链上带孤对电子的基团配位，此外，蛋白质肽链中的肽单位 O=C-N 链段，在它们三个原子形成的平面上羟基的电子有些离域的作用，即易于与 Se(0)的 4d 轨道通过共用电子

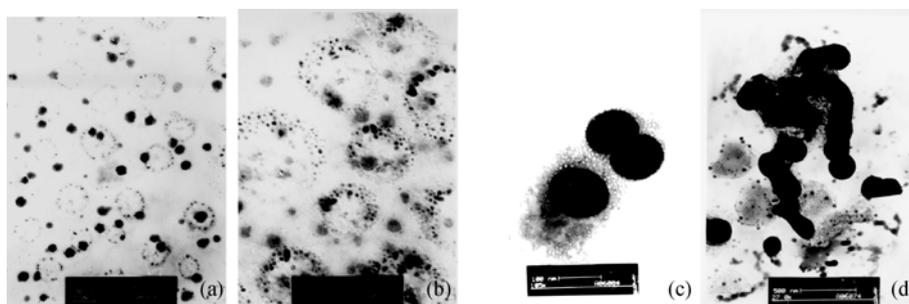


图 3 PC 还原 Se(IV)生成的 Se(0)纳米粒子的 TEM 形貌

Fig. 3 TEM morphology of nano-Se(0) reduced from Se(IV) by PC

a、b 为 < 30nm 的 Se(0)粒子；c、d 为 Se(0)聚集成更大的粒子
a and b are Se(0) particles less than 30nm; c and d are bigger parcels accumulated by Se(0)

而连接起来。在本实验条件下, 蛋白分子带负电荷, 因此, 硒纳米粒子容易吸附在蛋白质的酰胺平面上, 结合成以蛋白分子为核, 小纳米粒子为壳的笼状粒子(图 3-c, d), 其详细的作用机制尚有待进一步验证。红色纳米硒本身具有一定的生物活性^[16,17], 与具有生物活性的 PC 分子结合而成的这种特殊结构的笼状粒子预期有着不同寻常的功能。

另外, 在富硒螺旋藻的培养中, 也观察到培养液中有 Se(0)的形成。初步研究结果表明藻体对 Se(IV)转化生成的 Se(0)为纳米簇状聚集态, 呈红色, 但尚未证明是在螺旋藻胞内还是胞外产生, 还是两者兼之。离体藻蓝蛋白与 Se(IV)作用产生 Se(0)的实验事实提示了在螺旋藻胞内首先产生 Se(0)的可能的分子机制, 即 PC 是 SeO_3^{2-} 的靶分子。因此, 证实 SeO_3^{2-} 的氧化作用是导致 PC 分子损伤的主要原因之一。而在本文观察中, SeO_3^{2-} 对 PC 的氧化作用是使 PC 变性从而引起一系列光谱变化的主要原因。

3 结论

通过上述观察可以得出以下结论: 藻蓝蛋白分子是 Se(IV)的主要靶分子之一, Se(IV)对藻蓝蛋白分子可能具有多重作用, 但氧化损伤是主要的; 藻蓝蛋白分子对 Se(IV)的还原产物是藻蓝蛋白分散的红色纳米 Se(0), 其还原作用提示螺旋藻在 Se(IV)胁迫环境下细胞内产生红色纳米 Se(0)的分子机制; PC 对 Se(IV)的还原及红色纳米硒的生成提供了一种制备纳米硒的简便易行的新方法, 可能具有潜在的应用前景。

参考文献:

- [1] Glazer A N. Light guides: Directional energy transfer in a photosynthetic antenna[J]. **J Biol Chem**, 1989, 1: 1-4.
- [2] Singh S P, Singh R P. Bisulphite-induced pigment damage in the blue-green alga *Nostoc calcicola*[J]. **New Phytologist**, 1984, 2: 277-283.
- [3] Sah J F, Krishna K B, Srivastava M, *et al.* Effects of ultraviolet-B radiation on phycobilisomes of *Synechococcus* PCC 7942: alterations in conformation and energy transfer characteristics[J]. **Biochem Mol Biol Int**, 1998, 2: 245-257.
- [4] Verma K, Mohanty P. Changes of the photosynthetic apparatus in *Spirulina cyanobacterium* by sodium stress[J]. **Z Naturforsch (C)**, 2000, 1-2: 16-22.
- [5] Gelagutashvili E S, Belokobyl'skiĭ A I, Rcheulishvili A N, *et al.* Interaction of Pb(II) ions with C-phycoerythrin from *Spirulina platensis*: effect of ionic strength[J]. **Biofizika**, 2003, 4: 589-594.
- [6] 陈思嘉, 杨芳, 郑文杰. 硒剂量对钝顶螺旋藻的生理生化影响[J]. **海洋学报**, 2007, **29(6)**: 87-92.
- [7] 黄峙, 郑文杰, 杨芳, 等. 含硒藻蓝蛋白抗小鼠实验性肝损伤的作用[J]. **中国病理生理杂志**, 2002, 7: 819-822.
- [8] Cases J, Wysocka I A, Caporiccio B, *et al.* Assessment of selenium bioavailability from high-selenium *Spirulina* Subfractions in selenium-deficient rats[J]. **J Agric Food Chem**, 2002, 13: 3 867-3 873.
- [9] Kessi J, Ramuz M, Wehrli E, *et al.* Reduction of selenite and detoxification of elemental selenium by the phototrophic bacterium *Rhodospirillum rubrum*[J]. **Appl Environ Microbiol**, 1999, 11: 4 734 - 4 740.
- [10] 李乐农, 张季平, 郭宝江, 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, 5: 449-455.
- [11] Hilditch C M, Smith A J. Phycocyanin from the cyanobacterium *aphanothece halophytic*[J]. **Phytochemistry**, 1991, 11: 3 515-3 517.
- [12] Sode K, Horikoshi K, Takeyama H, *et al.* On-line monitoring of marine cyanobacterial Cultivation based on phycocyanin fluorescence[J]. **Journal of Biotechnology**, 1991, 21: 209-218.
- [13] Schirmer T, Bede W, Huber R, *et al.* X-ray crystallography structure of light harvesting biliprotein C-phycoerythrin from the thermophilic cyanobacterium, *Mastigocladus laminosus* and its resemblance to globin structures[J]. **J Mol Biol**, 1985, 184: 257-277.
- [14] 杜林方, 付华龙, 邹晓东. 铜离子对钝顶螺旋藻完整细胞中光系统活性和藻胆体能量传递的影响[J]. **植物学报**, 1996, 2: 109-113.
- [15] Toole C M, Plank T L, Grossman A R, *et al.* Biolin deletions and subunit stability in cyanobacterial light-harvesting proteins[J]. **Molecular Microbiology**, 1998, 3: 475-486.
- [16] Zhang J S, Wang X F, Xu T W. Elemental selenium at nano size (Nano-Se) as a potential chemopreventive agent with reduced risk of selenium toxicity: comparison with Se-methylselenocysteine in mice[J]. **Toxicol, Sci**, 2007, 101: 22-31.
- [17] Chen T F, Wong Y S, Zheng W J, *et al.* Selenium nanoparticles fabricated in *Undaria pinnatifida* polysaccharide solutions induce mitochondria-mediated apoptosis in A375 human melanoma cells[J]. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, 2008, 67: 26-31.

(下转第 65 页)