

软体动物粗蛋白对藻类的凝集作用

陈寅山^① 张鹭^{①②} 郑怡^①

(^①福建师范大学生物工程学院 福州 350007; ^②齐齐哈尔大学生物科学与工程学院 齐齐哈尔 161006)

摘要: 采用绿色巴夫藻 (*Pavlova viridis*)、盐藻 (*Dunaliella salina*)、塔胞藻 (*Pyramimonas* sp.)、海产小球藻 (*Chlorella vulgaris*)、亚心型扁藻 (*Platymonas cordiformis*)、蛋白核小球藻 (*Chlorella pyrenoidosa*)、紫球藻 (*Porphyridium purpureum*) 等 7 种单细胞藻类对福建省 10 种常见软体动物粗蛋白提取物进行凝集活性筛选, 其中有 7 种动物粗蛋白显示出对藻类细胞有凝集活性。同时, 发现紫球藻的敏感性强于其它种类。这些粗蛋白的凝集活性在不同酸碱度和高温下表现出较强的稳定性, 尤其是薄壳绿螺、菲律宾蛤仔、斑玉螺、短蛸的粗蛋白在 95℃ 恒温 15 min 后仍有活性。这些动物粗蛋白对紫球藻的凝集活性可以被 0.02 mol/L 和 0.04 mol/L 的 EDTA 所抑制, 同时还能被 9 种糖类所抑制。

关键词: 软体动物粗蛋白; 藻类; 凝集活性; 凝集抑制

中图分类号: Q17 **文献标识码:** A **文章编号:** 0250-3263(2002)05-06-04

Agglutination of Algal Cells to the Crude Proteins of Mollusks

CHEN Yin-Shan^① ZHANG Lu^{①②} ZHENG Yi^①

(^①Bioengineering College, Fujian Normal University Fuzhou 350007;

^②Bioscience and Bioengineering College, Qiqihaer University Qiqihaer 161006, China)

Abstract: An experiment on agglutination was conducted in which 7 species of unicellular algae, i. e. *Pavlova viridis*, *Dunaliella salina*, *Pyramimonas* sp., *Chlorella vulgaris*, *Platymonas cordiformis*, *Chlorella pyrenoidosa* and *Porphyridium purpureum* were incorporated into the crude proteins of 10 species of common mollusks from Fujian. 7 species of mollusks showed agglutinative activity and *P. purpureum* was more sensitive to molluscan proteins than the other algal species. Fairly constant agglutinative activity was observed under different pH conditions and high temperature. After being kept in a container at 95℃ for 15 min, the proteins of *Glauconome prineana*, *Ruditapes philippinarum*, *Natica tigrina* and *Octopus ocellatus* still showed agglutinative activity to *P. purpureum*. The agglutinative activity of these molluscan proteins to *P. purpureum* can be inhibited by both 0.02 mol/L, 0.04 mol/L EDTA and 9 kinds of saccharide.

Key words: Molluscan proteins; Algae; Agglutinative activity; Agglutination-inhibiting

凝集素是一类能够作用于外源细胞使之凝集成团的蛋白或糖蛋白, 常存在于动物的血液或体腔液中^[1-3]。作为一种生理活性物质, 分布的广泛性是其一大特点。但目前市售的凝集素大都来自植物^[4], 因此, 尽快查清动物体内凝集素的自然资源, 寻找易于提取和纯化的动物

凝集素资源, 具有极大的科学理论意义和实际应用价值。

当前对凝集素的筛选和活性测定, 常采用

第一作者介绍 陈寅山, 男, 50 岁, 副教授; 研究方向: 动物学。

收稿日期: 2001-12-05, 修回日期: 2002-07-08

脊椎动物红细胞^[5]、肿瘤细胞^[6]或微生物细胞^[4-7]作为指示物,很少使用藻类细胞、生殖细胞(配子)等。尤其在软体动物凝集性能的检测和筛选方面,迄今为止国内尚未见到采用藻类细胞作为凝集原的报道。国外的相关工作也较少,直到1996年K. Hor^[8]等才首次报道了植物凝集素对海洋单细胞藻类的凝集作用。本文以福建沿海10种水生软体动物为材料,研究其对7种水生单细胞藻类的凝集性能及影响因素,为寻找新的凝集素来源及探讨凝集反应发生的复杂的生理机制提供基础资料,同时也有助于进一步理解水生生物种群间的相互作用机理及动态变化。

1 材料与方 法

1.1 实验材料 10种软体动物的新鲜活体均购自福州市区埔农贸市场,洗净后在实验室进行分类鉴定。

1.2 软体动物粗蛋白的制备 按文献[9]的方法制备软体动物粗蛋白并测定浓度。

1.3 藻类细胞悬液的制备 7种单细胞藻均取自本院藻类学实验室,绿色巴夫藻、海产小球藻、亚心型扁藻、塔胞藻、盐藻用无菌海水,蛋白核小球藻用0.85%无菌生理盐水,紫球藻用无菌海水与无菌生理盐水(1:1 w/w)配成的混合液稀释,经3000 r/min($r=15$)离心15 min,离心洗涤两次,再用相应的无菌水稀释配成藻类细胞悬液,终浓度约为 8.0×10^6 个/ml。

1.4 动物粗蛋白凝集性的筛选 凝集反应在v型血凝板上进行。先在孔中加入25 μ l样品溶液,再加入等量的藻类细胞悬液,均匀摇动1 min,室温下放置60 min后在显微镜下观察凝集反应结果。针对不同的藻类,分别用等量无菌海水,无菌生理盐水,无菌海水、生理盐水混合液代替粗蛋白溶液,作为阴性对照。选定最敏感细胞,阳性者在v型板上进行倍比稀释后与等量敏感细胞进行凝集反应以确定效价。

1.5 pH和温度敏感性实验 将有凝集性的粗蛋白样品分别在75 $^{\circ}$ C、80 $^{\circ}$ C、85 $^{\circ}$ C、90 $^{\circ}$ C、95 $^{\circ}$ C恒温水浴15 min,用紫球藻细胞悬液检测其凝集性。用柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液和磷酸盐缓冲液配制不同pH值的溶液加入v型孔内,再加入粗蛋白样品及紫球藻悬液,测定其凝集性变化。

1.6 凝集抑制实验 将9种糖配成浓度为0.08 mol/L的糖溶液。在v孔板上将各粗蛋白样品进行倍比稀释后,向各孔中依次加入等量糖液及紫球藻悬液。均匀振荡1 min,室温下放置60 min,观察糖抑制实验结果。

配制0.02 mol/L、0.04 mol/L的EDTA溶液,测定这两种浓度的EDTA对样品凝集性的影响。

2 结 果

2.1 凝集活性的筛选 检测10种水生软体动物粗蛋白对7种藻类细胞的凝集性。结果见表1。

表1 动物粗蛋白对藻类细胞的凝集性

	动物粗蛋白浓度(μ g/ml)	藻 类						
		绿色巴夫藻	盐藻	塔胞藻	海产小球藻	亚心型扁藻	蛋白核小球藻	紫球藻
波纹巴非蛤(<i>Paphia undulata</i>)	37.5	-	-	-	-	-	-	-
铜锈环棱螺(<i>Bellamyia parvicata</i>)	470	+	-	-	+	-	+	+
薄壳绿螺(<i>Glauconome primeana</i>)	670	-	-	-	-	+	-	+
斑玉螺(<i>Natica tigrina</i>)	870	+	-	-	-	-	-	+
杂色鲍(<i>Haliotis diversicolor</i>)	600	-	-	-	-	-	-	+
短蛸(<i>Octopus ocellatus</i>)	625	-	-	-	-	-	-	+
河蚬(<i>Corbicula fluminea</i>)	125	-	-	-	-	-	-	-
菲律宾蛤仔(<i>Ruditapes philippinarum</i>)	150	-	-	-	+	-	-	+
台湾东风螺(<i>Babylonia formosae</i>)	140	-	-	-	-	-	-	-
紫贻贝(<i>Mytilus edulis</i>)	125	+	-	-	-	-	-	+

+ 凝集反应阳性; - 凝集反应阴性

结果显示,10种待测动物粗蛋白对盐藻、塔胞藻均未显示凝集性,对亚心型扁藻、蛋白核小球藻则分别只有一种粗蛋白显示出了凝集性(薄壳绿螂、铜锈环棱螺)。虽然对海产小球藻有两种蛋白显示阳性反应,但这种作用很弱。对绿色巴夫藻有三种粗蛋白(斑玉螺、铜锈环棱螺、紫贻贝)有凝集活性。而10种粗蛋白中,除河蚬、波纹巴非蛤、台湾东风螺外,其余7种都对紫球藻显示出凝集性,占受检动物总数的70%。可见,紫球藻对凝集反应的敏感性要强于其它藻类,所以以下实验中均以紫球藻作为指示细胞。

以能发生凝集作用的最低样品浓度来表示各种粗蛋白对紫球藻的凝集活性,则测得薄壳绿螂、紫贻贝、菲律宾蛤仔、杂色鲍、斑玉螺、铜锈环棱螺、短蛸的浓度依次为($\mu\text{g/ml}$):41.9、62.5、75、150、217.5、235、312.5。

2.2 pH和温度对凝集性的影响 各动物粗蛋白在-20℃、4℃下放置近两个月,对紫球藻的凝集性仍然未变。而对相当范围的pH和高温处理也显示出较强的适应性(表2)。

2.3 凝集抑制实验 所有受试动物凝集素对紫球藻的凝集活性都可以被EDTA所抑制。但对9种糖抑制的反应则各不相同(表3)。

表2 酸碱度和温度对凝集素凝集性能的影响

粗蛋白来源	酸碱度(pH)					强碱	温度(℃)				
	4.0	5.0	6.0	7.0	8.0		75	80	85	90	95
薄壳绿螂	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
菲律宾蛤仔	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
斑玉螺	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
铜锈环棱螺	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-
紫贻贝	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
杂色鲍	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
短蛸	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+

+ 凝集反应阳性; - 凝集反应阴性

表3 糖对动物凝集素凝集活性的抑制作用

凝集素来源	产生明显抑制作用的最大蛋白浓度($\mu\text{g/ml}$)								
	D-葡萄糖	D-果糖	D-山梨醇	D-树胶醛糖	半乳糖	木糖	蔗糖	乳糖	甘露糖
薄壳绿螂	167.5	83.75	335	335	335	83.75	670	670	-
菲律宾蛤仔	-	-	-	-	-	-	-	75	-
斑玉螺	-	870	435	217.5	217.5	217.5	435	435	-
铜锈环棱螺	-	-	235	235	-	-	-	-	235
紫贻贝	-	62.5	125	125	125	125	125	-	-
杂色鲍	600	150	600	300	600	300	150	150	600
短蛸	312.5	625	-	-	-	625	625	-	-

- 表示未产生抑制作用; 9种糖的浓度均为0.08 mol/L

3 讨论

本次实验所采用的10种软体动物中有7种对单细胞藻类具有凝集活性,从分类地位上划分,这7种动物属于软体动物门的三个纲:腹足纲、瓣鳃纲、头足纲^[10],从生态环境上划分,它们分别栖息于海水、半咸水和淡水中。由此可以认为凝集素在软体动物中分布较广泛,至于其分布是否具有种属及生境特异性,由于本次实验所采用的动物数量有限,尚不足以给出

定论。

用以检测凝集性的7种单细胞藻类中,除紫球藻属于红藻门外,余者皆属于绿藻门^[11]。紫球藻可以和7种供试动物粗蛋白发生凝集反应,而绿藻门的6种藻细胞仅能分别与3种以下粗蛋白发生反应。这种敏感性上的明显差异可以得出凝集作用具有藻类的类群专一性这一结论。

细胞凝集是高度复杂的反应,凝集作用能否发生取决于凝集素分子与藻类细胞表面能否

发生互补或嵌合作用。对于某一种凝集素而言,细胞表面糖分种类愈多,结构愈复杂,二者发生凝集反应的机率就越高。紫球藻与绿藻的细胞壁都分为内外两层,内层都是纤维素层,而壁的外层,紫球藻由富含多种糖类的藻胶质构成,绿藻则由糖类组成较少的果胶构成,有的在壁外还有一些碳酸盐结晶^[11],进一步降低了绿藻对凝集反应的敏感性。而更为特殊的盐藻类甚至没有细胞壁^[11]。所以,当用藻类细胞进行动物凝集素筛选时,紫球藻的效果会更好些。

全部动物蛋白的凝集活性在 80℃ 时 15 min 后仍不受影响,薄壳绿螂、菲律宾蛤仔、斑玉螺、短蛸的粗蛋白能耐受 95℃ 的高温。各种动物的凝集素都表现出了较强的温度适应性,这可能与这些软体动物凝集素的化学结构和化学特性有关,例如凝集素分子中蛋白质与糖分在量上的比例及在空间的分布等,这方面还有待于对凝集素纯化后作进一步研究。

与温度类似,这些动物凝集素也表现出了较强的 pH 适应性,无论酸、碱条件下均能发生凝集反应,除短蛸外,这些凝集素分别在 pH 4~5 和 pH 7~8 时出现两次较强的凝集作用,推测可能有如下原因:(1)pH 7~8 与软体动物内环境 pH 值接近,凝集素作为一种生理活性物质,在适宜的 pH 条件下发生较强的凝集作用,是一种正常反应;(2)凝集素分子中含有蛋白成分,当环境 pH 低至这种多肽或蛋白等电点以下时,会引起凝集素分子的自身非特异性凝集,即酸凝集^[12];(3)紫球藻细胞外壁含有由多种糖分组成的藻胶质,藻胶质可能在酸性条件下分解成各种多糖或单糖,增加了细胞表面对凝集素分子的结合位点,令凝集作用更易于发生。

当前对凝集素的非糖类抑制剂研究较多的是 EDTA^[13]。作为螯合剂,EDTA 可以络合凝集素分子中的多种金属离子。7 种动物凝集素的凝集性均可被 EDTA 抑制,说明这些凝集素分子中具有维持活性所必需的一种或多种金属离子,表现出金属离子的依赖性。至于所需离子

的种类,则有待于对凝集素纯化后再进一步确定。

凝集素具有特异性地识别细胞表面糖残基的功能,而糖类抑制剂可以与凝集素分子的识别位点结合,从而阻止它与靶细胞的结合。能对凝集素产生抑制作用的糖的种类越多,说明凝集素分子上的识别位点越多,从而其凝集范围越广。薄壳绿螂、杂色鲍可以分别被 8 种和 9 种糖所抑制,而菲律宾蛤仔仅能被乳糖抑制,铜锈环棱螺也仅能受到山梨醇、D-树胶醛糖、甘露糖的抑制。可见,在软体动物中,即使同一纲内,其凝集素分子的结构也不尽相同。但是对于凝集反应发生的复杂的机理,还需要对凝集素分子及藻类细胞表面分子水平的深入研究。

参 考 文 献

- [1] Li M F, Flemming C. Hemagglutinins from oyster hemolymph. *Canadian J Zoology*, 1967, 45: 1 225 ~ 1 234.
- [2] Hardy S W. Factors in the hemolymph of the mussel *Mytilus edulis* of possible significance of defense mechanisms. *Biochem Soc Trans*, 1976, 4: 473 ~ 475.
- [3] Vasta G R. A cell membrane-associated lectin of the oyster hemocyte. *J Invertebr Pathol*, 1982, 40: 367 ~ 377.
- [4] 陈皓文,孙丕喜. 从来克丁物质与微生物相互作用看水产无脊椎动物对疾病的防御活动. *黄渤海海洋*, 1998, 16 (1): 55 ~ 63.
- [5] 吴兰如,徐元,黄全荣等. 海洋生物中选择素的筛选. *海洋药物*, 1983, 3: 145 ~ 146.
- [6] 余萍,黄德祺,朱苏闽. 韭菜 (*Allium tuberosum* Rottle. ex Spreng.) 凝集素的细胞凝集和糖制作用. *福建师范大学学报(自然科学版)*, 1992, 8(3): 64 ~ 67.
- [7] 陈皓文,孙丕喜. 毛蚶 (*Arca subcrenata*) 体液来克丁的凝集作用. *黄渤海海洋*, 1999, 17(4): 60 ~ 65.
- [8] Hori K, Ogata T, Kamiya H *et al.* Lectin-like compounds and lectin receptors in marine algae: hemagglutination and reactivity with purified lectins. *Journal of Phycology*, 1996, 32: 783 ~ 790.
- [9] 陈寅山,郑怡,许友勤等. 福建 11 种海洋贝类凝集素的研究. *中国海洋药物*, 2001, 20(3): 47 ~ 49.
- [10] 江静波,陈俊民,陈如作等. *无脊椎动物学*. 北京:人民教育出版社, 1982. 216 ~ 240.
- [11] B. 福迪. 藻类学. 上海:上海科学技术出版社, 1980. 175 ~ 360.
- [12] 陈奖励,何昭阳,赵文. *水产微生物学*. 北京:农业出版社, 1993. 338 ~ 339.
- [13] 胡新平,李智恩,徐祖洪等. 海藻凝集素研究进展. *海洋科学*, 2000, 24(8): 34 ~ 37.