

两种微藻凝集素对几种不同类型细胞的凝集作用

郑怡¹, 陈晓清², 林雄平³

(1. 发育与神经生物学福建省高校重点实验室, 福建师范大学 生命科学学院, 福建 福州 350108; 2. 漳州师范学院 生物科学与技术系, 福建 漳州 363000; 3. 宁德高等师范专科学校 生物系, 福建 宁德 352100)

摘要: 经离子交换和分子筛层析从紫球藻(*Porphyridium cruentum*) 和海水小球藻(*Chlorella* sp.) 中分离纯化得到 2 种凝集素, 研究它们对几种不同类型细胞即动物和人血红细胞、海洋和淡水微藻、细菌和真菌的凝集活性。研究结果表明, 2 种微藻凝集素对它们当中一些类型的细胞或种类具有不同程度的凝集活性, 其中对水生聚胞藻(*Synechocystis aquetilis*) 的凝集活性最强, 最低质量浓度只需 0.031 3 g/L。

关键词: 微藻; 凝集素; 细胞; 凝集

中图分类号: Q949

文献标识码: A

文章编号: 1000-3096(2008)06-0030-05

凝集素是一类非免疫起源的蛋白质或糖蛋白, 能与相应的糖或糖蛋白分子专一性结合, 由于这一独特的性质, 使它们在生物化学和医学等领域有着广泛的用途^[1,2]。凝集素最早是在植物中发现, 长期以来研究最多、最活跃的也是植物凝集素, 其中又以种子植物凝集素为主, 而藻类凝集素的研究显得相对滞后, 起步较晚^[3]。近 10 年来大型海藻凝集素的研究在纯化数量和性质方面取得了较大的进展^[4], 但关于微藻凝集素的研究还很少, 目前分离纯化的只有几种, 因而对它们性质的了解十分有限, 在生物学活性研究方面还几乎是空白^[5-7]。细胞凝集作用是凝集素最基本的特征和最重要的生物学功能之一, 本实验利用从紫球藻(*Porphyridium cruentum*) 和海水小球藻(*Chlorella* sp.) 中纯化的 2 种凝集素, 研究它们对一些不同类型细胞的凝集作用, 为微藻凝集素的生物学活性研究提供一些重要的信息。

1 材料与方法

1.1 材料

实验用的紫球藻和海水小球藻, 分别来自中国科学院水生生物研究所和中国科学院海洋研究所藻种库。将处于对数生长期的 2 种藻种以适当的浓度转接入三角烧瓶中, 分别采用相应的培养液, 进行震荡扩大培养, 培养光强为 5 000 lx, 光暗周期为 12 h/12 h, 培养温度为 25~30℃, 培养过程不通气, 取对数期(培养 8 d 后)的培养物, 离心洗涤, 收集藻泥, 4℃保存备用。

1.2 微藻凝集素的分离纯化

取 2 种微藻的藻泥, 经磷酸盐缓冲液(PBS,

0.01 mol/L, pH 7.2, 内含 NaCl 0.14 mol/L) 浸提, 收集上清液, 后加入固体硫酸铵(30%~85%饱和度), 离心(5 000 r/min, 20 min) 收集沉淀, 加 PBS 溶解, 透析除盐后, 风干浓缩, 检测凝血活性, 获得凝集素粗制品。粗品经 DEAE-纤维素 52(1.6 cm × 30 cm) 离子交换层析, 用含不同浓度 NaCl 的 PBS 溶液洗脱, 收集活性峰部分, 再经 Sephadex G-100 分子筛层析(1.6 cm × 50 cm) 洗脱, 分部收集活性峰部分, 经风干浓缩, 获得纯化样品, 蛋白质浓度测定采用 CBB-G250 法, 纯化样品用不连续聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE) 测定纯度。凝集素配成 1 g/L, 分别用于不同类型细胞的凝集实验。

1.3 不同类型细胞的凝集实验

1.3.1 动物和人血红细胞的凝集实验

各种动物和人血(A型、B型、O型及AB型) 样品加入抗凝剂(Asever) 置 4℃保存备用。实验时血样经离心(1 000 r/min, 10 min) 收集红细胞, 用约 10 倍量的生理盐水离心洗涤 2 次后, 配制成 2% 积压的血红细胞悬液, 凝集反应在 96 孔 V 型血凝板上进行, 即用 40 μL 凝集素溶液与等量的生理盐水系列倍比稀释后, 分别加入红细胞悬液 40 μL, 振匀, 室温下放置 2 h 后, 以不加样品作为对照, 肉眼或显微镜下观察实验结果。

收稿日期: 2007-09-10; 修回日期: 2007-12-23

基金项目: 福建省科技计划重点项目(2005N036); 福建省自然科学基金项目(B0510008); 福建省科技厅项目(K04024)

作者简介: 郑怡(1959), 男, 福建福州人, 教授, 硕士, 主要从事藻类生物学研究, 电话: 0591-22868194, E-mail: zy718@fjnu.edu.cn

1.3.2 微藻细胞凝集实验

8种实验用的微藻包括海洋和淡水的种类,分别来自中国科学院海洋研究所和水生生物研究所。每种微藻分别接种至相应的培养液中复壮培养,在温度 25~30℃、光强 3 000 lx、光暗周期 12 h: 12 h 的条件下培养,离心收集处于指数生长期的藻细胞,海洋种类加消毒海水,淡水种类加生理盐水,分别离心洗涤 2 次,最后配成密度约为 8.0×10^6 个/mL 的藻细胞悬液,凝集实验同凝血测定方法在 V 型板上进行,1 h 后镜检结果。

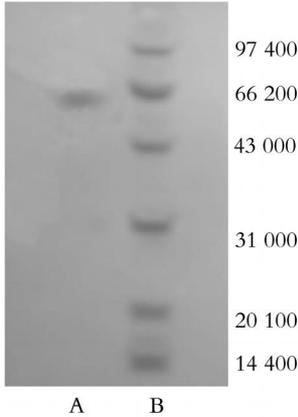


图 1 海水小球藻凝集素 SDS-PAGE
Fig.1 SDS-PAGE of *C. pacific* lectin
A. 纯化的样品; B. Marker
A. Purified sample; B. marker

1.3.3 细菌和真菌的凝集实验

实验用的细菌和真菌分别采用牛肉膏蛋白胨和马铃薯培养基经继代培养活化,分别配置成相应的活菌细胞或菌丝悬液,另取一部分枯草芽孢杆菌和大肠杆菌悬液在 80℃ 热处理 1 h。以上样品在 V 型血凝板上采用上述同样方法测定凝集活性,镜检结果。常见菌种为本实验室保存,植物病原菌由福建农林大学植保学院提供。

表 1 2 种微藻凝集素对动物和人血红细胞的凝集作用

Tab.1 Agglutination of erythrocytes from animals and human blood by two microalgal lectins

凝集素	最低凝集质量浓度(g/L)									
	动物红细胞						人类红细胞			
	兔	山羊	鸡	鸭	猪	鼠	A	B	AB	O
紫球藻凝集素	0.25	-	-	-	0.25	-	-	-	-	-
海水小球藻凝集素	0.062 5	0.125	-	-	0.125	-	-	-	-	-

注: - 表示不凝集

2 实验结果

紫球藻和小球藻的 PBS 浸取液加入硫酸铵后,获得的沉淀物经兔红细胞检测具有凝集活性,表明含有凝集素。此 2 种微藻凝集素粗品进一步经离子交换和分子筛层析分离纯化,分别获得纯化样品即紫球藻凝集素 PCL 和小球藻凝集素 CPL,经 SDS-PAGE(十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳)测定(图 1,图 2),它们的亚基分子质量分别为 32.5 ku 和 63.9 ku。

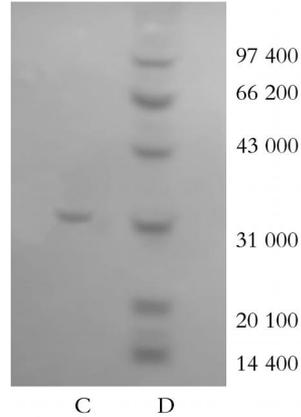


图 2 紫球藻凝集素 SDS-PAGE
Fig.2 SDS-PAGE of *P. cruentum* lectin
C. 纯化的样品; D. Marker
A. Purified sample; B. Marker

2.1 对动物和人血红细胞的凝集作用

以 6 种动物(兔、鸡、鸭、猪、山羊、鼠)和人 4 种血型的红细胞进行凝集活性测定,结果显示(表 1),2 种微藻凝集素对兔和猪血的红细胞具有凝集作用,而海水小球藻凝集素还能凝集山羊血红细胞;总的来看,海水小球藻凝集素的凝集活性要高于紫球藻凝集素,其中对兔血红细胞的凝集活性最强,最低浓度只需 0.062 5 g/L。2 种微藻凝集素对人 4 种血型的红细胞均无凝集活性,表明它们没有血型专一性。

2.2 对微藻细胞的凝集作用

实验结果表明(表2), 2种微藻凝集素对水生聚胞藻(*Synechocystis aquetilis*)、亚心形扁藻(*Platymonas subcordiformi*)、盐生杜氏藻(*Dunaliella salina*)及塔胞藻(*Pyramidomonas delicatula*) 4种微藻均有凝集作用, 而海水小球藻凝集素还能凝集塔玛亚历山大藻(*Alexandrium tamarense*), 它们对斜生栅藻(*Scenedesmus obliquus*)、绿色巴夫藻(*Pavlova viridis*)及黄绿等鞭金藻(*Isochrysis galbana*) 3种微藻没有凝集作用。在对微藻的凝集反应中, 2种微藻凝集素对水生聚胞藻的凝集活性最强, 最低质量浓度只需 0.031 3 g/L。

2.3 对细菌和真菌的凝集作用

表3的实验结果表明: 2种微藻凝集素在质量浓

度 1 g/L 时, 对供试的 4 种细菌和 4 种真菌的凝集结果不同, 它们均能凝集甘薯薯瘟病原菌(*Fasarium oxysporam*), 而不能凝集枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、普通变形杆菌(*Proteas vulgaris*)及啤酒酵母(*Saccharomyces carlsbergensis*)。此外, 大肠杆菌(*Escherichia coli*)和稻瘟病菌(*Pyricularia oryzae*)只能被海水小球藻凝集素所凝集, 而中华根霉(*Rhizopus chinensis*)和黑曲霉(*Aspergillus niger*)只能被紫球藻凝集素所凝集。从表3还可以看出, 细菌和真菌对2种微藻凝集素的敏感性相当。热处理实验结果表明, 海水小球藻对处理前后样品的反应不变即对大肠杆菌都有凝集作用, 对枯草芽孢杆菌都没有凝集作用, 而紫球藻凝集素对枯草芽孢杆菌由原来的没有作用变成了有凝集活性。

表2 2种微藻凝集素对某些微藻种类的凝集作用

Tab. 2 Agglutination of some microalgae by two microalgal lectins

藻 种	最低凝集质量浓度(g/L)	
	紫球藻凝集素	海水小球藻凝集素
水生聚胞藻 <i>Synechocystis aquetilis</i>	0.031 3	0.031 3
斜生栅藻 <i>Scenedesmus obliquus</i>	-	-
亚心形扁藻 <i>Platymonas subcordiformi</i>	0.25	0.25
盐生杜氏藻 <i>Dunaliella salina</i>	0.125	0.25
绿色巴夫藻 <i>Pavlova viridis</i>	-	-
塔胞藻 <i>Pyramidomonas delicatula</i>	0.5	0.062 5
黄绿等鞭金藻 <i>Isochrysis galbana</i>	-	-
塔玛亚历山大藻 <i>Alexandrium tamarense</i>	-	0.125

注: - : 不凝集

表3 2种微藻凝集素对细菌和真菌的凝集作用

Tab. 3 Agglutination of bacteria and fungi by two microalgal lectins

生物名称	紫球藻凝集素	海水小球藻凝集素
枯草芽孢杆菌 <i>Bacillus subtilis</i>	-	-
大肠杆菌 <i>Escherichia coli</i>	-	+
普通变形杆菌 <i>Proteas vulgaris</i>	-	-
甘薯薯瘟病原菌 <i>Fasarium oxysporam</i>	+	+
啤酒酵母 <i>Saccharomyces carlsbergensis</i>	-	-
中华根霉 <i>Rhizopus chinensis</i>	+	-
黑曲霉 <i>Aspergillus niger</i>	+	-
稻瘟病菌 <i>Pyricularia oryzae</i>	-	+

+ : 凝集; - : 不凝集; 凝集素质量浓度为 1 g/L

3 讨论

在凝集素众多的生物学活性中,细胞凝集作用是其最重要的生物学功能之一,这种作用是基于凝集素分子与细胞表面糖分子的专一性结合,由于这个特性使凝集素能够应用于细胞分类和分型、肿瘤细胞分子标记物以及微生物的鉴定等方面的研究^[8]。细胞凝集作用通常与凝集素的来源和分子特征及不同类型或种类的细胞有关。最常用于细胞凝集研究的是来自各种动物的血红细胞,如兔、羊、鸡、鸭、猪等,研究表明,它们的凝集活性与凝集素的来源和供血动物的种属有关。在研究的大多数动物血红细胞中,通常兔红细胞对陆生植物和海藻凝集素最敏感,能够被大多数凝集素所凝集,且所需的凝集素浓度更低。在本实验中,除兔血红细胞敏感性较好外,猪和山羊对2种微藻凝集素也有较好的敏感性,这可能与凝集素的来源和分子特征有关。

除动物血红细胞外,其他类型的细胞如细菌、淋巴细胞、肿瘤细胞及藻类细胞等也逐渐被用于凝集素的细胞凝集研究。Bird等^[9]最早利用藻类(海藻)凝集素粗品研究对细菌的凝集作用,但结果表明对细菌只有微弱的凝集活性。凝集素对藻类细胞的凝集研究最先开展的是Hori等^[10]的实验,研究了多种不同类型的凝集素(陆生种子植物和海藻)对海洋微藻的凝集作用,结果发现16种海洋微藻中有4种发生了凝集反应,这项作为微藻细胞表面凝集素受体的研究奠定了重要的基础。通过本实验的研究表明两种微藻凝集素不仅能够凝集某些海洋微藻,而且也能凝集淡水微藻(水生聚胞藻)。最近荆剑等^[11]还报导了大豆凝集素对几种癌细胞的凝集作用。以上这些研究将为植物凝集素在研究不同类型细胞表面糖分子特征及细胞分型等方面提供重要的参考资料。

参考文献:

[1] Liener I E. Phytohemagglutinins (Phytolectins) [J].

Ann Rev Physiol, 1997, 27: 291-319.

- [2] Basu P S, Majhi R, Batabyal S K. Lectin and serum PSA interaction as a screening test for prostate cancer [J]. *Clinical Biochemistry*, 2003, 36(2003): 373-376.
- [3] Rogers D J, Hri K. Marine algal lectin: new developments [J]. *Hydrobiologia*, 1993, 260/261: 589-593.
- [4] Nascimenoto K S, Nagano C S, Nunes E V, et al. Isolation and characterization of a new agglutinin from the red marine alga *Hypnea cervicoidis* J. Agardh [J]. *Biochem Cell Biol*, 2006, 84(1): 49-54.
- [5] Sato Y, Murakami M, Miyazawa K, et al. Purification and characterization of a novel lectin from a freshwater cyanobacterium, *Oscillatoria agardhii* [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B*, 2000, 125: 169-177.
- [6] Jimbo M, Yamaguchi M, Muramoto K, et al. Cloning of the *Microcystis aeruginosa* M228 lectin (MAL) Gene [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communication*, 2000, 273: 499-504.
- [7] 郑怡, 余萍, 刘艳如. 蛋白核小球藻凝集素分离纯化及部分性质研究 [J]. *水生生物学报*, 2003, 27(1): 36-40.
- [8] Shanmugham L N, Castellani M L, Salini V, et al. Relevance of plant lectins in human cell biology and immunology [J]. *Riv Biol*, 2006, 99(2): 227-249.
- [9] Bird K T, Chiles T C, Longley R E, et al. Agglutinins from marine macroalgae of the southeastern United States [J]. *J Appl Phycol*, 1993, 5: 213-218.
- [10] Hori K, Kamiga H. Lectin like compounds and lectin receptors in marine microalgae: hemagglutination and reactivity with purified lectins [J]. *J Phycol*, 1996, 32: 819-825.
- [11] 荆剑, 赵翔, 张页. 大豆凝集素的纯化及其凝集不同肿瘤细胞的探讨 [J]. *中国生物化学与分子生物学报*, 2003, 19(3): 401-405.

Agglutination of different cells by two lectins from microalgae

ZHENG Yi¹, CHAN XIAO-qing², LIN Xiong-ping³

(1. Fujian Higher Educational Key Laboratory of Development and Neural Biology, College of Life Sciences, Fujian Normal University, Fuzhou 350108, China; 2. Department of Biology Science & Technology, Zhangzhou Normal College, Zhangzhou 363000, China; 3. Department of Biology, Ningde teachers' College, Ningde 352100, China)

Received: Sep., 10, 2007

Key words: microalgae; lectin; cell; agglutination

Abstract: Two lectins were purified from *Porphyridium cruentum* and marine *Chlorella* by the method of ion exchange and gel filtration, and their agglutinations were conducted with cells from erythrocytes of animal and human blood group, species of marine and fresh microalgae, bacteria and fungi. The two lectins purified could agglutinate some cells or species of them in different degrees. Of these agglutinations, the strongest agglutinative activity at a minimum concentration of 0.031 3 g/L was found toward *Synechocystis aquetilis*.

(本文编辑: 张培新)