

# 组织研磨器细胞破碎法提取霞水母(*Cyanea* sp.) 毒素的初步研究\*

李荣锋<sup>1,2</sup> 于华华<sup>1</sup> 冯金华<sup>1</sup> 李鹏程<sup>1</sup>

(1. 中国科学院海洋研究所 青岛 266071; 2. 中国科学院研究生院 北京 100049)

**摘要** 采用 Mini-Beadbeater 组织研磨器破碎的方法进行了提取霞水母刺丝囊细胞毒素的研究。首先制备霞水母刺丝囊细胞, 然后研究破碎频率、破碎时间对提取霞水母刺丝囊细胞毒素浓度的影响。结果表明, 组织研磨器能够在 2—3min 内破碎约 90% 的霞水母刺丝囊细胞, 从而提高水母毒素的提取效率。SDS-PAGE 结果显示, 提取的水母毒素蛋白条带没有发生明显差异, 是一种有效提取霞水母毒素的方法。

**关键词** 组织研磨器, 霞水母, 刺丝囊细胞, 毒素提取

**中图分类号** Q331

水母是一种胶质状的浮游动物, 其种类繁多, 主要包括四大类群: 刺胞动物门的水螅水母类、管水母类、钵水母类以及栉水母门的栉水母类(张芳等, 2005; 张姝等, 2009)。霞水母(*Cyanea* sp.) 属刺胞动物门、钵水母纲、旗口水母目、霞水母科, 触须长 2—4m, 广泛分布于我国沿海。近年来, 当夏季来临时, 大量的水母会聚集在近海区域集中出现, 给渔业生产、生态环境以及游泳者造成严重的影响(仲霞铭等, 2004; Jiang *et al.*, 2008; Xian *et al.*, 2005)。水母毒素是一类结构新颖的海洋生物蛋白, 具有多种生物活性, 如溶血活性、抗氧化活性、心脏血管毒性、肝脏毒性、酶活性和神经毒性等(李翠萍等, 2008; Li *et al.*, 2005; Kim *et al.*, 2006; Radwan *et al.*, 2000; Sanchez-Rodriguez *et al.*, 2006; Yu *et al.*, 2007), 这为开发新型的海洋药物提供重要的先导化合物发现途径, 而如何有效地从水母中提取毒素是研究毒素的结构、理化性质、生物活性以及对水母毒素进行开发应用的前提。

水母毒素主要存在于触手的刺丝囊细胞中, 因此提取水母毒素的途径主要有两种。其一, 直接对水

母触手进行破碎提取毒素(Li *et al.*, 2005), 该方法提取的毒素蛋白不可避免地含有大量的非毒素类蛋白; 其二, 先制备水母刺丝囊细胞, 然后再从刺丝囊细胞中提取水母毒素(Brinkman *et al.*, 2007, 2008; Helmholtz *et al.*, 2007, 2008), 该方法在制备刺丝囊细胞过程中能够将大多数水母触手残余除去, 有效降低非毒素类蛋白的引入, 从而得到更纯的水母毒素。不同的破碎细胞方法对毒素提取效果也有较大影响, 目前破碎水母刺丝囊细胞的方法主要有超声波破碎法(Radwan *et al.*, 2001; Chung *et al.*, 2001)和研钵研磨破碎法, 超声波破碎的过程中会产生大量的热量, 常常会引起部分水母毒素在破碎提取过程中结构遭到破坏和活性丧失, 而研钵研磨法所需要耗费的破碎时间很长, 且提取率并不高。组织研磨器具有提取效率高、对蛋白作用柔和等优点(Carrette *et al.*, 2004)。到目前为止, 利用组织研磨器从霞水母刺丝囊细胞中提取毒素的研究还未见报道。本文研究了利用 Mini-Beadbeater 组织研磨器从霞水母刺丝囊细胞中提取毒素的条件和效果, 为霞水母毒素的深入研究和开发

\* 国家自然科学基金项目, 41006095 号; 国家科技支撑计划, 2011BAE06B04-05 号; 青岛市科技计划联合基金项目, 08-1-3-51-jch 号; 中国科学院海洋研究所知识创新工程青年人才领域前沿项目, 2009—2011。李荣锋, E-mail: lirongfeng07@qdio.ac.cn

通讯作者: 于华华, 博士, 副研究员, E-mail: yuhuahua@qdio.ac.cn

收稿日期: 2011-02-11, 收修改稿日期: 2011-04-17

利用奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料的采集

霞水母(*Cyanea* sp.)于2008年8—9月采集于青岛第六海水浴场附近,采集后迅速运回实验室,人工将带有刺丝囊细胞的触手沿口腕部剪切下,立即冷冻于-20℃冰箱中保存备用。

### 1.2 主要仪器及试剂

组织研磨器(Mini-Beadbeater-1, Biospec, 美国),凝胶成像系统(PowerLook 1120, Firewire, 美国),荧光倒置显微镜系统(Olympus IX70, Olympus, 日本),高速冷冻离心机(GL220B2, 上海安亭科学仪器厂)等。

考马斯亮蓝试剂,牛血清蛋白(BSA),分子量标准蛋白,0.5mm玻璃珠等,实验试剂均为分析纯。

### 1.3 霞水母刺丝囊细胞的制备

霞水母刺丝囊细胞的制备方法参考 Bloom 等(1998)方法,即把冰冻的霞水母触手浸泡在纯净的海水中,4℃下自溶3—4d,期间不断更换新鲜海水并搅拌以加速刺丝囊细胞从触手上脱落,浸泡结束后,缓慢倒掉上清浸泡液,收集下层带有沉淀的浸泡液,然后分别用纱布和孔径为0.250mm的分样筛过滤,得到含大量刺丝囊细胞的提取液,4℃,1000g冷冻离心15min,收集下层沉淀,再用海水洗2—3次,相同条件下离心,即得到较为纯净的水母刺丝囊细胞,冷冻干燥,干燥后的霞水母刺丝囊细胞保存在-20℃冰箱中备用。

### 1.4 霞水母刺丝囊毒素的提取

称取10mg刺丝囊细胞样品和移取1.2ml pH 7.6的磷酸缓冲液,加入到6组破碎管,分别用Mini-Beadbeater在功率4200、4600、4800r/min下破碎30s、60s、90s、120s、150s、180s,每破碎30s,将破碎管取出置于冰水中冷却1min,破碎完毕后于4℃、1000g冷冻离心5min,收集上层液,作为霞水母刺丝囊毒素,以牛血清白蛋白(BSA)作标准,用Bradford法(Bradford, 1976)测定毒素的浓度。

### 1.5 SDS-PAGE

不同破碎条件下提取得到的霞水母毒素,其SDS-PAGE根据Laemmli(1970)方法,分别采用5%的浓缩胶和12%的分离胶,标准蛋白为β-半乳糖苷酶、牛血清白蛋白、卵白蛋白、乳酸脱氢酶、REase Bsp981蛋白、β-乳球蛋白、溶菌酶,分子量分别为116.0、66.2、45.0、35.0、25.0、18.4、14.4kDa,电泳后蛋白

条带经考马斯亮蓝R-250染色,脱色液脱色后于凝胶成像系统拍摄。

### 1.6 显微观察破碎效果

利用荧光倒置显微镜系统在放大倍数为200倍下观察组织研磨器在功率为4600r/min下不同破碎时间的细胞破碎情况。具体方法为:当细胞破碎完毕后,取出破碎管并摇匀,然后用移液枪吸取5μl破碎液滴加到载薄片上,缓慢加盖薄片并压匀,于显微镜下观察并且记录破碎时间分别为0s、60s、120s、180s时的破碎效果图。

## 2 结果与讨论

### 2.1 不同破碎条件下水母毒素提取浓度

如图1所示,在破碎的开始阶段,水母毒素蛋白的提取浓度均随破碎时间的增加而迅速增加,但当破碎2min后,水母毒素的浓度增长速度减缓,尤其是4600r/min和4800r/min下水母毒素的浓度几乎不再变化。而相同破碎时间内,较大破碎功率时的水母毒素提取浓度要高于较低破碎功率时的水母毒素的提取浓度,即: $C_{4800r/min} > C_{4600r/min} > C_{4200r/min}$ 。

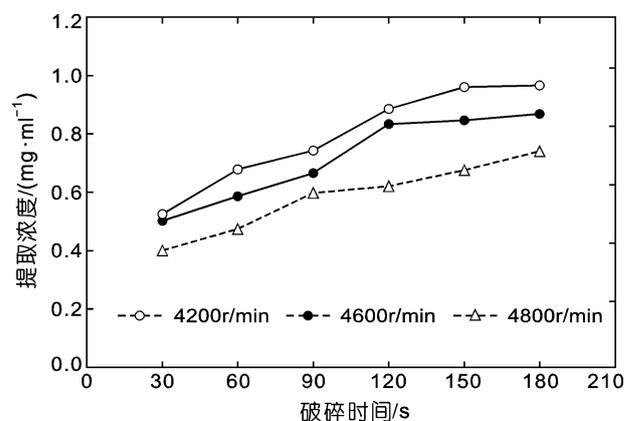


图1 不同破碎条件下的水母刺丝囊毒素的提取浓度  
Fig.1 Concentration of venom extracted from jellyfish nematocysts under different disruption conditions

### 2.2 SDS-PAGE

如图2的SDS-PAGE所示,利用Mini-Beadbeater在破碎功率分别为4200、4600、4800r/min下,破碎时间均为2min时,提取的水母毒素的蛋白条带并没有发生明显的差异。

### 2.3 组织研磨器破碎霞水母刺丝囊细胞显微观察

如图3所示,通过显微镜在放大倍数为200倍下观察破碎后的提取液,可以明显看出,在破碎前霞水

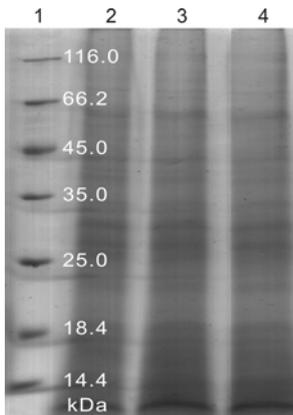


图2 不同破碎功率下提取的水母毒素的 SDS-PAGE 图  
Fig.2 SDS-PAGE analysis of jellyfish venom extracted under different disruption powers  
注: 1. Marker, 2. 4200r/min 刺丝囊细胞提取物, 3. 4600r/min 刺丝囊细胞提取物, 4. 4800r/min 刺丝囊细胞提取物

增长速度明显减缓, 并通过显微镜观察到, 此时刺丝囊细胞的破碎率已达到 90% 左右; 而相同破碎时间内, 露水母刺丝囊毒素的提取浓度随着破碎功率的增加而增加, 通过 SDS-PAGE 检测后发现, 各功率下得到水母毒素蛋白成分几乎没有变化, 说明在较大功率下进行破碎时也没有影响水母毒素。所以, 用组织研磨器从露水母刺丝囊细胞中提取水母毒素是非常有效的一种提取方法。

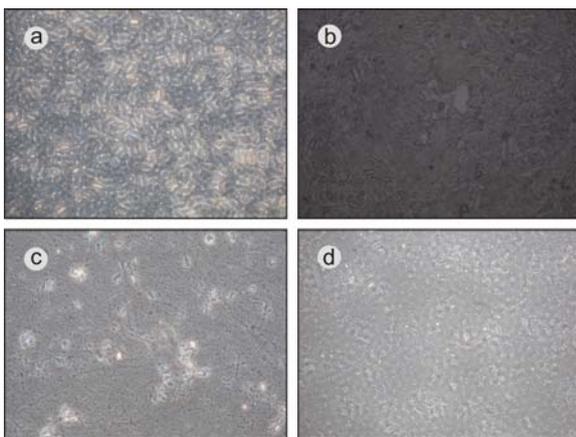


图3 组织研磨器功率为 4600r/min 不同破碎时间下刺丝囊细胞破碎效果显微观察

Fig.3 Observations of nematocysts after disruption under the power of 4600r/min by Mini-Beadbeater in different time intervals  
注: a. 破碎前, b. 破碎 60s, c. 破碎 120s, d. 破碎 180s

母刺丝囊细胞的分布非常密集, 但是随着破碎时间增加到 60s 时; 刺丝囊细胞的密度明显降低, 当破碎时间达到 120s 左右时, 刺丝囊细胞的破碎率已经接近 90%, 破碎时间增加到 180s 时, 刺丝囊细胞的数量继续减少但变化不是很大, 此时仅有极少数量的刺丝囊细胞未破碎。

根据实验结果可以看出, 相同破碎功率下, 露水母刺丝囊毒素的提取浓度随着破碎时间的增加而增加, 但当破碎时间达到 2—3min 时,

### 3 结论

本文研究了利用组织研磨器在不同破碎时间和破碎功率下从露水母(*Cyanea sp.*)刺丝囊细胞中提取毒素的效果。实验结果表明, 当在破碎功率为 4800r/min 下破碎 2—3min, 露水母刺丝囊细胞的破碎率可达 90% 以上。该方法不仅可以避免在破碎过程中引入过多的非毒素类杂质, 而且能够在较短的时间内破碎绝大多数的刺丝囊细胞, 使毒素从刺丝囊细胞中释放出来, 提高了毒素提取效率和浓度。通过 SDS-PAGE 可以观察到, 在所研究的破碎功率和时间下, 提取的露水母毒素的蛋白条带没有发生明显差异, 说明此方法还在破碎过程中对毒素作用柔和, 破坏较小, 是一种有效的从露水母中提取毒素的方法, 对今后露水母毒素的高效提取和深入研究与开发利用有所帮助。

### 参 考 文 献

- 仲霞铭, 汤建华, 刘培廷, 2004. 露水母(*Cyanea nozakii* Kishinouye)暴发与海洋生态之关联性探讨. 现代渔业信息, 19(3): 123—130
- 李翠萍, 于华华, 陈晓琳等, 2008. 白色露水母蛋白抗氧化活性的初步研究. 海洋科学, 32(7): 65—70
- 张 芳, 孙 松, 杨 波, 2005. 胶州湾水母类生态研究. 种类组成与群落特征. 海洋与湖沼, 36(6): 507—517
- 张 姝, 张 芳, 刘 媛等, 2009. 我国海域两种大型水母的分子鉴定. 海洋与湖沼, 40(1): 94—101
- Bloom D A, Burnett J W, Alderslade P, 1998. Partial purification of box jellyfish (*Chironex fleckeri*) nematocyst venom isolated at the beachside. Toxicon, 36: 1075—1085
- Bradford M M, 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem, 72: 248—254
- Brinkman D, Burnell J, 2007. Identification, cloning and sequencing of two major venom proteins from the box jellyfish, *Chironex fleckeri*. Toxicon, 50: 850—860
- Brinkman D, Burnell J, 2008. Partial purification of cytolytic venom proteins from the box jellyfish, *Chironex fleckeri*. Toxicon, 51: 853—863
- Carrette T, Seymour J, 2004. A rapid and repeatable method for venom extraction. Toxicon, 44: 135—139
- Chung J J, Ratnapala L A, Cooke I M *et al*, 2001. Partial purification and characterization of a hemolysin (CAH1) from Hawaiian box jellyfish (*Carybdea alata*) venom. Toxicon, 39: 981—990
- Helmholz H, Naatz S, Lassen S *et al*, 2008. Isolation of a cytotoxic glycoprotein from the Scyphozoa *Cyanea lamarckii* by lectin-affinity chromatography and characterization of

- molecule interactions by surface plasmon resonance. *Journal of Chromatography B*, 871: 60—66
- Helmholz H, Ruhnau C, Schutt C *et al*, 2007. Comparative study on the cell toxicity and enzymatic activity of two northern scyphozoan species *Cyanea capillata* (L.) and *Cyanea lamarkii* (Peron & Leslieur). *Toxicon*, 50: 53—64
- Jiang Hong, Cheng He-Qin, Xu Hai-Gen *et al*, 2008. Trophic controls of jellyfish blooms and links with fisheries in the East China Sea. *Ecological Modeling*, 212: 492—503
- Kim E, Lee S, Kim J S *et al*, 2006. Cardiovascular effects of *Nemopilema nomurai* (Scyphozoa: Rhizostomeae) jellyfish venom in rats. *Toxicology Letters*, 167: 205—211
- Laemmli U K, 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T<sub>4</sub>. *Nature*, 227: 680—685
- Li Cuiping, Yu Huahua, Liu Song *et al*, 2005. Factors affecting the protease activity of venom from jellyfish *Rhopilema esculentum* Kishinouye. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 15: 5370—5374
- Radwan F F Y, Burnett J W, Bloom D A *et al*, 2001. A comparison of the toxinological characteristics of two *Cassiopea* and *Aurelia* species. *Toxicon*, 39: 245—257
- Radwan F F Y, Gershwin L A, Burnett J W, 2000. Toxinological studies on the nematocyst venom of *Chrysaora achlyos*. *Toxicon*, 38: 1581—1591
- Sanchez-Rodríguez J, Torrens E, Segura-Puertas L, 2006. Partial purification and characterization of a novel neurotoxin and three cytolytins from box jellyfish (*Carybdea marsupialis*) nematocyst venom. *Arch Toxicol*, 80: 163—168
- Xian Weiwei, Kang Bin, Liu Ruiyu, 2005. Jellyfish blooms in the Yangtze Estuary. *Science*, 307: 41
- Yu Huahua, Xing Rong, Liu Song *et al*, 2007. Studies on the hemolytic activity of tentacle extracts of jellyfish *Rhopilema esculentum* Kishinouye: Application of orthogonal test. *International Journal of Biological Macromolecules*, 40: 276—280

## METHODS OF EXTRACTING VENOM FROM JELLYFISH *CYANEA* SP. NEMATOCYST USING MINI-BEADBEATER

LI Rong-Feng<sup>1,2</sup>, YU Hua-Hua<sup>1</sup>, FENG Jin-Hua<sup>1</sup>, LI Peng-Cheng<sup>1</sup>

(1. Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao, 266071; 2. Graduate School, Chinese Academy of Sciences, Beijing, 100049)

**Abstract** Extraction of venom from jellyfish *Cyanea* sp. nematocysts using Mini-Beadbeater under different conditions was investigated. First, jellyfish nematocysts were prepared from tentacles, then concentration of nematocyst venom extracted in different disruption conditions, such as disruption time and power, were determined. Microscopy images of disrupted jellyfish nematocysts showed only taken 2—3min for Mini-Beadbeater to disrupt approximately 90% of the nematocysts, an improvement in yield in extracting venom in jellyfish. The protein profile showed no obvious difference from our SDS-PAGE results. Our extraction methodology is proven to be an effective way to extract the venom from jellyfish *Cyanea* sp.

**Key words** Mini-Beadbeater, *Cyanea* sp., Nematocyst, Venom extraction