

蚯蚓发光体系及其应用研究

吴 自 荣

(华东师范大学生物学系, 上海 200062)

惠 永 照

(无锡市新安中学)

关键词 蚯蚓, 生物发光, 荧光素酶

发光蚯蚓在世界各地普遍存在^[1]。Wampler^[2]研究了蚯蚓发光的生理学和生物化学性质。Mulkerri^[3]等还分离纯化了发光蚯蚓的荧光酶, 人工合成了荧光素。由于蚯蚓发光体系可用于许多生化分析, 因而引起许多学者的注意和兴趣。本文首次报道从我国无锡发现的发光蚯蚓, 并从其体液中提取荧光素酶粗提取物, 在体外重新组成新的发光体系。研究了这一发光体系的性质, 并对蚯蚓发光反应机制和可能应用作了初步探讨。

材 料 和 方 法

将采集来的发光蚯蚓洗净, 研碎, 加入缓冲液混和

后离心, 取上清液分装, 置 -20°C 冰箱中备用。在测试杯中加入 0.5 ml 缓冲液, 0.1 ml 荧光素酶粗提取液, 用注射器注射 0.4 ml 10 mmol/L H_2O_2 溶液, 用生物发光光度计测定发光强度的变化。将 2—3 条活体蚯蚓放入测试杯中, 用少量二甲苯刺激蚯蚓发光, 用日立 F850 型荧光分光光度计测定发光光谱。扫描范围 450—600 nm, 速度为 200 nm/min。

实 验 结 果

1. 各种无机离子对蚯蚓发光的影响

试验了 7 种 5 个不同浓度的无机离子对蚯蚓发光的影响, 结果见表 1。

表 1 各种不同无机离子对蚯蚓发光的影响

离子	离子浓度(%)						离子
	0	0.05	0.25	0.5	1.0	1.5	
Mg^{2+} (MgCl_2)	100	96	93	93	92	104	无影响
Mn^{2+} (MnCl_2)	100	97	100	112	87	93	
Na^+ (NaCl)	100	80	68	67	51	42	
Cu^{2+} (CuCl_2)	100	89	62	54	30	0	抑制作用
Fe^{3+} (FeCl_3)	100	94	99	81	68	67	
Ca^{2+} (CaCl_2)	100	125	136	121	128	119	刺激作用
Fe^{2+} (FeSO_4)	100	114	159	133	112	74	

从表 1 中看出, Na^+ 、 Cu^{2+} 和 Fe^{3+} 表现出抑制发光作用; 而 Ca^{2+} 和 Fe^{2+} 在一定浓度范围内则表现出刺激发光作用。

2. 不同浓度的 H_2O_2 对发光的影响

在蚯蚓发光体系中, 加入不同浓度的 H_2O_2 , 结果见图 1。从图中可见, 在一定浓度范围内, 发光能力随 H_2O_2 浓度的增加而增强。

3. 过氧化氢酶对发光的影响

在蚯蚓发光反应体系中加入一定量的过氧化氢酶, 则明显表现出抑制发光作用, 并随浓度的增加而抑

制能力增强。如图 2 所示。

4. 超氧阴离子对发光的影响

如果用一定量的黄嘌呤和黄嘌呤氧化酶溶液代替反应体系中的 H_2O_2 溶液, 结果同样能刺激发光。如图 3 所示。

5. 不同种类和浓度的长链脂肪醛对发光的影响

从图 4 看出, 长链脂肪醛可明显增强发光作用, 但随碳链长度不同而刺激发光强度的增强大小有明显差异。其作用大小顺序为癸醛 > 正辛醛 > 十二醛 > 十四醛 (图 4)。不同浓度的十二醛对发光的影响见图 5。

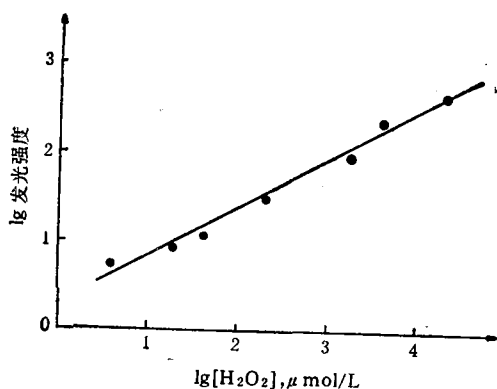


图1 不同浓度的 H_2O_2 对发光的影响

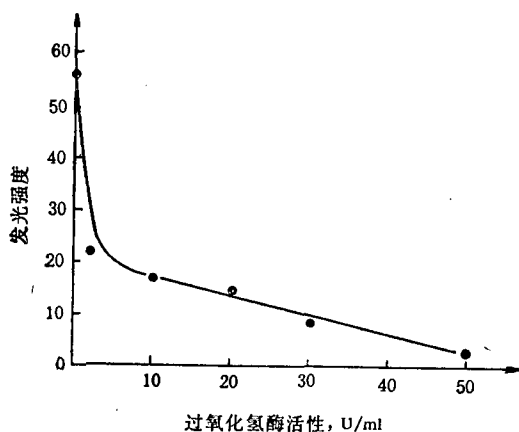


图2 过氧化氢酶对发光的影响

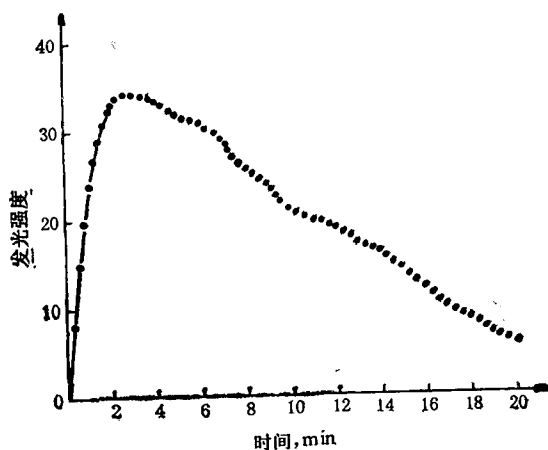


图3 超氧阴离子对发光的影响

6. 发光蚯蚓的发光光谱

发光蚯蚓的发光光谱具有属间特异性。而种间则无明显差异^[2]。一般发光蚯蚓的发光光谱范围为 500 nm—570 nm。本研究测定从我国发现的发光蚯蚓的发光光谱峰值为 530 nm, 见图 6。

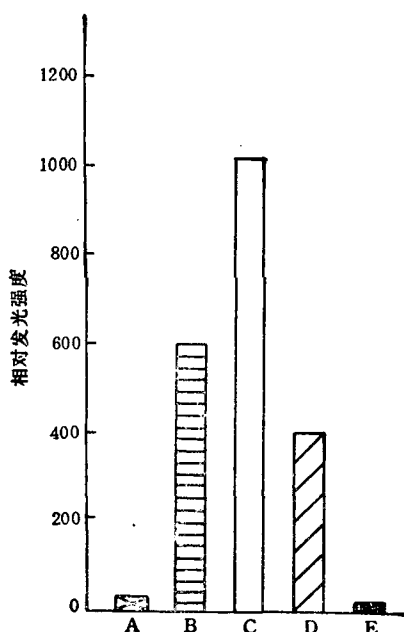


图4 不同种类脂肪醛对发光的影响

A: 不加脂肪醛; B: 正辛醛; C: 癸醛; D: 十二醛; E: 十四醛。醛浓度均为 0.1 mol/L

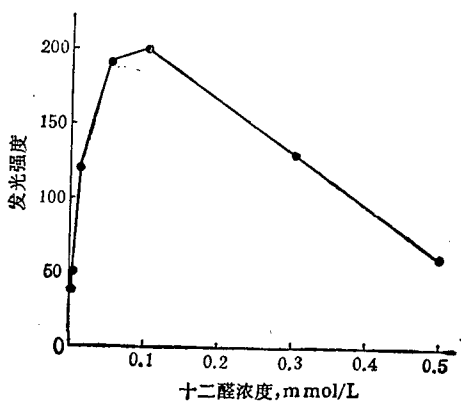


图5 不同浓度的十二醛对发光的影响

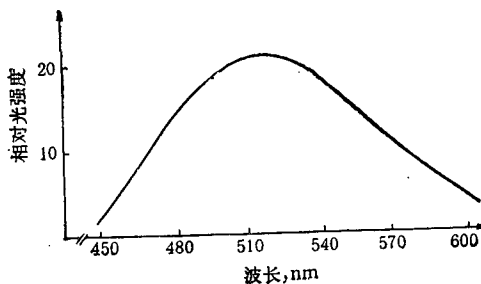


图6 发光蚯蚓的发光光谱

(下转第487页)

以能做成理想的胶板为标准。

用国产马铃薯淀粉作电泳支持物,淀粉来源广,价格低廉。其不足之处是:由于产品质量不稳定,有时不能检出少部分样品的后白蛋白(Po)。据日本学者大石孝雄报道^[3],加拿大 Connaught 公司制造的水解淀粉也存在类似现象,有时不能同时检出五种血清蛋白质(Tf、Pa、Cp、Hpx、Am)。采用国产淀粉,除Po检出率和重复性稍差以外,其他五种蛋白质的检出率和重复性都相当好。

工作过程中,得到了导师邹峰教授的指导,同室研究生周英忠的协助以及中科院遗传研究所周德旺先生的热情帮助,

谨致谢意。

参 考 文 献

- 1 Smithies O. *Biochem J*, 1955; **61**: 629
- 2 Baker L N. *Vox Sang*, 1968; **15**: 154
- 3 大石孝雄. 畜产の研究, 1980; **34**(10): 1263
- 4 邹峰等. 畜牧兽医学报, 1982; **13**(3): 195
- 5 黄路生, 邹峰. 江西农大学学报, 1988; (4): 26
- 6 Poulik M D, Smithies O. *Biochem J*, 1958; **68**(4): 634
- 7 Kristjansson F K. *Genetics*, 1963; **49**: 1059
- 8 Kristjansson F. K. *Genetics*, 1966; **53**: 675
- 9 吴译夫. 上海畜牧兽医通讯, 1988; (1): 8

本文于 1989 年 10 月 14 日收到

(上接第 480 页)

讨 论

发光蚯蚓的发光机制虽然还不很清楚,但在化学上至少有几种物质参与反应。其中包括荧光酶,荧光素,过氧化物(如 H_2O_2 , O_2^-)。我们的实验结果也证明了这一点。在实验体系中必须加入 H_2O_2 才能使该体系发光(图 1)。当加入过氧化氢酶时又使发光大大减弱(图 2)。当在反应体系中用黄嘌呤和黄嘌呤氧化酶代替 H_2O_2 时,同样能刺激发光(图 3)。由此可见, O_2^- 可能作为蚯蚓发光反应中的一个活泼中间产物而参与发光反应。

蚯蚓发光反应需有荧光素参与。这种荧光素已被纯化,鉴定和人工合成^[4]。它是一种简单的脂肪醛, N-异戊基-3-氨基丙醛。而在我们实验中发现癸醛、正辛醛和十二醛都可以充当荧光素的作用,其中癸醛刺激作用最强(图 4)。

由于蚯蚓的发光反应对 H_2O_2 等过氧化物特别敏感,因而可以利用这一发光体系测定出极低浓度的过

氧化物。也可以测定与 H_2O_2 反应相偶联的其它物质如过氧化氢酶活性等。特别令人感兴趣的是有人认为超氧阴离子 O_2^- 是蚯蚓发光反应中一个活泼的中间产物。因而推测发光蚯蚓的荧光素酶如同超氧化物歧化酶一样能清除 O_2^- , 从而阻断 O_2^- 产生对生物的毒害作用。

古小文, 张盛强同志参加部份工作; 虞乃而同志帮助测定发光光谱, 在此表示感谢。

参 考 文 献

- 1 Deluca MA, McElroy WD. *Bioluminescence and Chemiluminescence*. New York: Academic Press, 1981: 249—256
- 2 Wampler J M. *Comp Biochem Physiol*, 1980; **66**B: 43—50
- 3 Mulkerrin MG et al. *Methods in Enzymology*, 1978; **57**: 375—381
- 4 Ohtsuka H et al. *Biochemistry*, 1976; **15**: 1001

【本文于 1989 年 10 月 14 日收到】