

He-Ne 激光对钝顶螺旋藻的诱变效应

赵萌萌 王卫卫

(西北大学生命科学学院, 西安 710069)

摘要 利用 He-Ne 激光(波长 632 nm, 功率 10 mW)诱变钝顶螺旋藻 IS (*Spirulina platensis* IS), 经过一定时间的辐照, 选取生长较快的藻种测量其 β -胡萝卜素、蛋白质及多糖含量, 进一步筛选出生长快、高产胡萝卜素或高产蛋白质的藻种. 实验结果表明: 与出发藻种 IS 相比, 经 He-Ne 激光 15 min 和 25 min 照射后的藻种 MS-1、MS-2 和 MS-3, 藻丝形态发生变化, 藻丝变短、螺旋变紧密, 生长速度明显加快, 其中 MS-1 的 β -胡萝卜素含量增幅为 18.1%, MS-3 的蛋白质和多糖含量均有较大增加. 此外通过对出发藻种和诱变藻种的叶绿素 *a* 和胡萝卜素的紫外吸收光谱进行比较, 发现诱变藻种与出发藻种相比最大吸收峰值略有变化, 从而说明 He-Ne 激光对于钝顶螺旋藻的诱变效应.

关键词 钝顶螺旋藻; He-Ne 激光; 形态; 生长; 藻种选育; 诱变

中图分类号 TN249 **文献标识码** A

0 引言

螺旋藻是地球上最早出现的一类光合放氧的多细胞原核生物, 属蓝藻门颤藻科, 嗜碱 (pH9 ~ 11) 和高温 (25 ~ 36℃). 它的蛋白质质量分数高达干重的 70%, 氨基酸种类齐全, 比例适当, 且功效比值 (PER) 很高, 消化率达 86%. 其多糖是一种免疫活性多糖, 它能够迅速补充人体所需的营养成分, 调节人体生理机能, 增强免疫力并抑制癌细胞. 除此之外还由于其细胞壁薄, 纤维素含量低, 很易消化吸收, 消化率达 95%^[1].

目前由螺旋藻形态变化而引起的减产、采收困难和藻种退化等问题已严重阻碍螺旋藻产业的发展^[2]. 因此高产优质螺旋藻藻种的筛选成为当前的一个重大课题. 激光在螺旋藻育种中的应用已见报道^[3-7], 本文除采用 He-Ne 激光辐照钝顶螺旋藻, 还通过逐级稀释法和静置培养分层分离法相结合的方法筛选出生长速度快、高产蛋白质等有效成分的优良藻种.

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 藻种

钝顶螺旋藻 IS (*Spirulina platensis* IS), 本实验室保存.

1.1.2 培养液和培养条件

Zarrouk 培养液^[8]. 光照强度 4000lx, 日光灯为光源, 光暗周期 12 h:12 h, 培养温度 34℃, 100 mL 培养液, 接入对数生长期藻种, 接种量 10%, 光照期

间每天定时间歇摇动四次.

1.2 方法

1.2.1 He-Ne 激光诱变

取对数生长期藻液 1 mL (2×10^{-3} g/mL) 于直径 1 cm 的 Ep 管中进行 He-Ne 激光照射^[9-11]. 时间分别为 5 min、10 min、15 min、20 min、25 min、30 min、35 min、40 min. 照射完后将藻液接种入 10 mL 新鲜培养基, 放入培养箱内 34℃ 扩大培养 7 d. 再将 10 mL 藻液接种入 100 mL 新鲜培养基, 继续扩大培养, 做后续研究.

将长势较好的对数生长期的藻种采用逐级稀释法^[12]进行纯化. 每天测其吸光度, 选取生长较快的藻种继续稀释纯化直到产生明显优势为止. 这时可认为该藻种中存在大量优势生长的藻丝. 据文献报道, 优势生长的藻丝易上浮, 呈螺旋形且粗壮, 因此通过静止培养分层分离法^[13], 将上浮的藻丝吸取放入少量新鲜培养基中培养. 开始几天要在弱光条件下 (500lx) 培养, 以免幼龄藻丝受到损伤, 3 d 后将光强逐渐增大至 2000lx, 待对数生长期再进行扩大培养, 然后进行各项指标的测定.

1.2.2 生长速度的测定

每天定时测生物量, 计算比生长速率 (μ) 并绘制其与时间的关系曲线.

1.2.3 β -胡萝卜素含量、蛋白质含量、多糖含量的测定

分别参照郭宏炳等 (1999)^[14] 的方法和《生物化学实验指导》^[15].

1.2.4 叶绿素 *a* 紫外吸收光谱扫描

将培养至对数期的藻种, 抽滤, 用自来水和蒸馏水分别洗 3 次, 称取 0.2 g, 加入 5 mL 98% 的甲醇, 摇匀, 置于 4℃ 冰箱中过夜, 3500 r/min 离心 15 min,

取上清液,稀释 8 倍,用 Lambda 25 UV/VIS 紫外-可见分光光度计在波长 360 nm ~ 720 nm 处扫描^[16],绘制吸收曲线.

1.2.5 类胡萝卜素紫外吸收光谱扫描

将培养至对数期的藻种,抽滤,用自来水和蒸馏水分别洗 3 次,称取 0.2 g,加入 5 mL 二甲基甲酰胺,摇匀,置于 4℃ 的冰箱中过夜,3500 r/min 离心 15 min,取上清液,稀释 5 倍,用 Lambda 25 UV/VIS 紫外-可见分光光度计在波长 360 nm ~ 720nm 处扫描,绘制吸收曲线.

2 结果与讨论

2.1 He-Ne 激光对藻丝形态的影响

经 He-Ne 激光辐照后的藻丝形态发生变化,如表 1. 与出发藻种相比,照射 15 min 和 25 min 的三个藻种的藻丝其长度变短,螺距变小,螺宽变大,生长速度显著加快;其余辐照时间的藻丝变松弛,有的则出现直形藻丝甚至死亡. 由此可知,He-Ne 激光照射可以使螺旋藻的藻丝形态发生变化,其诱变效应可以提高藻丝的形态变异率.

表 1 He-Ne 激光对钝顶螺旋藻藻丝形态参数的影响

	藻体长/ μm ($n=15$)	螺距长/ μm ($n=15$)	螺旋宽/ μm ($n=15$)	螺旋数/个 ($n=15$)
出发株	652 \pm 42	82.5 \pm 6.25	35 \pm 1.3	3-5
诱变株 MS-1	568 \pm 38	75 \pm 5.55	40 \pm 1.7	2-4
MS-2	392 \pm 30	67.5 \pm 3.75	47.5 \pm 1.6	2-3
MS-3	306 \pm 64	62.5 \pm 4.25	51.5 \pm 2.1	1-3

2.2 He-Ne 激光对藻生长速度的影响

由图 1 可知出发株和突变株的生长情况,出发株的 μ 值最小,突变株 MS-3 的 μ 值最大且指数生长期最长. 由此说明 MS-3 生长最快且指数期持续时间长.

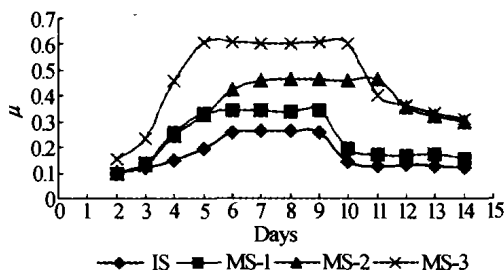


图 1 出发株和突变株的比生长速率(μ)曲线

Fig. 1 Growth curve of Initial Strain and Mutants strains

将出发株和突变株分别接入 50 mL 新鲜培养基,7~8 d 后抽滤称重. 可知照射 25 min 的藻种 MS-3 的藻体生物量增幅最大,达到 59.4%. 原因可能是由于激光照射使得大量藻丝断裂为单个藻丝,增加了其分裂增殖的基数,从而生长繁殖速度加快.

2.3 出发株与突变株 β -胡萝卜素含量的比较

取一定量新鲜藻液,经抽滤后获得新鲜藻体 2 g (干重 0.1 g),用 10 mL 乙醚溶解,放入冰箱内冻融,摇匀后用超声波细胞破碎仪破碎细胞 3 min (每 30 s 间隔 1 min),3000 r/min 离心 15 min,取上清液稀释 10 倍后在 450 nm 下测吸光度. 结果如表 2.

表 2 出发株和诱变株 β -胡萝卜素含量的比较

	出发株		诱变株	
	IS	MS-1	MS-2	MS-3
β -胡萝卜素含量 ($\mu\text{g} \cdot \text{mg}^{-1}$)	4.4	5.2	4.3	4.7
增幅/(%)		18.1	-2.27	6.8
吸光度	0.151	0.180	0.14	0.15

β -胡萝卜素含量的变化是 MS-1 增幅最大,达 18.1%. MS-2 较出发株略有降低.

2.4 出发株与突变株蛋白质含量的比较

取 2 mL 藻液,置冰箱内反复冻融,然后超声波破碎,吸取 1 mL,用水补足 2 mL,加入 4 mL 双缩脲试剂,在分光光度计上测量.

对藻蛋白质含量的测定结果如表 3. 从表 3 可以看出,蛋白质含量增幅最大的是 MS-3,达到 38.4%,蛋白质占藻体干重的 58.5%,比出发株高 4.4%.

表 3 出发株和突变株蛋白质含量的比较

	出发株		突变株	
	IS	MS-1	MS-2	MS-3
蛋白含量/($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)	1.15	1.35	1.46	1.8
吸光度	0.031	0.037	0.041	0.049
增幅/(%)		3.84	12.2	38.4

2.5 出发株与突变株多糖含量的比较

采用钱志刚(2000)^[17]的方法加以改进. 取螺旋藻干粉 1 g,加入 12 mL pH10 的 NaOH 溶液,80℃ 水浴间歇搅拌提取 6 h,离心,上清液用 10% 的 HCl 调 pH7.0,加质量浓度为 5% 的三氯乙酸沉淀蛋白质,离心,上清液再用 5% 的三氯乙酸沉淀,离心所得上清液用于测吸光度.

测定结果如表 4,MS-3 的多糖含量最高,MS-1 次之,三个突变株均高于出发株.

表 4 出发株和突变株多糖含量的比较

	出发株		突变株	
	IS	MS-1	MS-2	MS-3
多糖含量/($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)	0.03	0.09	0.06	0.13
吸光度	0.001	0.0034	0.0025	0.0052
占藻体干重/(%)	1.56	3.57	2.42	4.61

激光照射引起螺旋藻 β -胡萝卜素、蛋白质及多糖含量的变化,原因可能为形成 DNA 分子的 C-N 键,它在分子中的比例较大,在一定能级作用下,激光可以将分子内的 C-N 键打断,使分子结构发生变化,诱导体内代谢过程的变化,从而产生上述生理特征参数和形态的变化.

2.6 叶绿素 *a* 的紫外吸收光谱

选取 MS-1 和 MS-3 两株较好的突变株与出发株比较. 由图 2 可以看出, 出发株的最大吸收峰在 438 nm ~ 440 nm 之间, 而两个突变株的最大吸收峰均在 435 nm 处, 三个藻种在 670 nm 处还有明显吸收峰. 出发株和 MS-1 在 505 nm ~ 560 nm 之间曲线基本重合. 总体的吸光度是 MS-3 > MS-1 > IS. 说明激光诱变可能使叶绿素分子的结构发生了变化, 从而使其吸收峰发生移动.

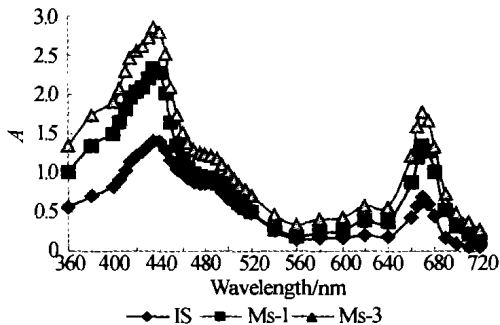


图 2 出发株和突变株叶绿素 *a* 的紫外吸收光谱
Fig. 2 Ultraviolet spectrum of Chlorophyll *a* of Initial strain and Mutants strains

2.7 类胡萝卜素的紫外吸收光谱

胡萝卜素只在蓝紫光区有最大吸收峰, 原始株的最大吸收峰在 435 nm ~ 438 nm 之间, 而 MS-1 的最大吸收峰在 435 nm, MS-3 则在 440 nm 处. 在 360 nm ~ 430 nm 和 450 nm ~ 520 nm 处三个藻种的吸收值为 IS > MS-3 > MS-1; 而 540 nm ~ 600 nm 三个藻种的吸收值为 MS-3 > MS-1 > IS (如图 3).

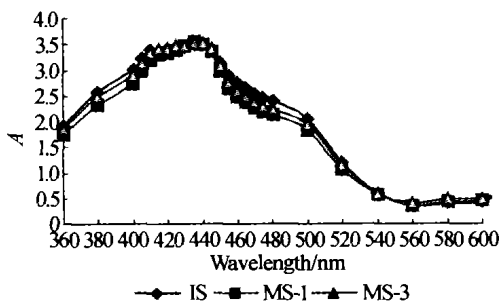


图 3 出发株和突变株类胡萝卜素紫外吸收光谱
Fig. 3 Ultraviolet spectrum of Carotenoid of Initial strain and Mutants strains

3 结论

1) 不同剂量的 He-Ne 激光对钝顶螺旋藻生长有不同的影响. 本实验所选用的时间剂量中, 大于 25 min 的抑制藻的生长, 小于 15 min 的促进生长的作用不明显; 15 和 25 min 则能明显促进藻的生长, 25 min 尤为显著; 经辐照后的藻丝显著变短, 螺距变小, 螺宽增大, 超过剂量的藻丝变长直至死亡. 诱变后筛选出的突变株其生长速率比出发株快, 每升培养液中干重增加最多达 59.4%; β -胡萝卜素含量最多增加 18.1%; 蛋白质含量增幅达 38.4%; 多糖含量也

有显著增加.

2) 将筛选出的优势藻种提取其叶绿素和胡萝卜素利用紫外分光光度计在 360 nm ~ 720 nm 波长下扫描其吸收值, 由吸收曲线可知经过 He-Ne 激光照射诱变的藻种它们的最大吸收峰与出发株比较都有不同程度的偏移, 说明 He-Ne 激光对于螺旋藻的诱变效应是显著的.

3) 实验结果表明由 He-Ne 激光进行辐照, 并且通过逐级稀释法和静置培养分层分离法可以达到筛选优良藻种的目的.

参考文献

- 彭志英. 食品生物技术. 北京: 中国轻工业出版社, 1999. 35 ~ 38
Peng Z Y. Food Biology Techniques. Beijing: China Light Industry Press, 1999. 35 ~ 38
- 陈必链, 施巧琴. 螺旋藻藻种选育研究进展. 食品与发酵工业, 1999, 26(3): 78 ~ 81
Chen B L, Shi Q Q. Food and Fermentation Industries, 1999, 26(3): 78 ~ 81
- 陈必链, 庄惠如, 王明兹, 等. 倍频 Nd:YAG 激光对钝顶螺旋藻的诱变效应. 激光生物学报, 2000, 9(2): 125 ~ 128
Chen B L, Zhuang H R, Wang M C, et al. Acta Laser Biology Sinica, 2000, 9(2): 125 ~ 128
- 殷春涛, 胡鸿钧, 李夜光, 等. 中温螺旋藻新品系的选育研究. 武汉植物学研究, 1997, 15(3): 250 ~ 254
Yin C T, Hu H J, Li Y G, et al. Journal of Wuhan Botanical Research, 1997, 15(3): 250 ~ 254
- 崔海瑞, 王志平, 徐步平. 甲基磺酸乙酯对钝顶螺旋藻生长和形态的影响. 浙江农业大报, 1997, 23(6): 645 ~ 648
Cui H R, Wang Z P, Xu B J. Journal of Zhejiang Agricultural University, 1997, 23(6): 645 ~ 648
- 赵炎生, 尹鸿平, 陈向东, 等. 倍频 Nd:YAG 脉冲激光诱变钝顶螺旋藻的初步研究. 光电子·激光, 1999, 10(6): 563 ~ 570
Zhao Y S, Yin H P, Chen X D, et al. Journal of Optoelectronics · Laser, 1999, 10(6): 563 ~ 570
- 龚小敏, 胡鸿钧. ^{60}Co - γ 射线诱变钝顶螺旋藻的研究. 武汉植物学研究, 1996, 14(1): 58 ~ 66
Gong X M, Hu H J. Journal of Wuhan Botanical Research, 1996, 14(1): 58 ~ 66
- Zarrouk C. Contribution a l'etude d'une cyanophycee. Influence de divers facteurs et chimiques sur la croissance et la photosynthese de spirulina maxima. Thesus, University of Paris, France, 1996
- 徐朝阳, 谭石慈, 邢达. 低强度 He-Ne 激光照射巨噬细胞对其免疫活性的影响. 光子学报, 2003, 32(3): 264 ~ 266
Xu C Y, Tan S C, Xing D. Acta Photonica Sinica, 2003, 32(3): 264 ~ 266

- 10 黄建新,马艳玲,惠友权,等. He-Ne 激光对产 ALDC 地衣芽孢杆菌的诱变效应. 光子学报,2001,30(6):680~683
Huang J X, Ma Y L, Hui Y Q, et al. *Acta Photonica Sinica*, 2001, 30(6):680~683
- 11 郭爱莲,徐金贵,杨琳. He-Ne 激光选育高木质素降解率的白腐真菌 L₁. 光子学报,2001,30(6):685~687
Guo A L, Xu J G, Yang L. *Acta Photonica Sinica*, 2001, 30(6):685~687
- 12 谭桂英,周百成. 钝顶螺旋藻优良品系 S6 的生长特性及光和特性的研究. 海洋学报,1993,15(3):89~93
Tan G Y, Zhou B C. *Journal of Ocean*, 1993, 15(3):89~93
- 13 王志平,贾小明,傅俊杰,等. 不同形态钝顶螺旋藻藻丝体分离和纯化方法. 浙江农业学报,1998,10(5):275~277
Wang ZP, Jia XM, Fu JJ, et al. *Acta Agriculturae Zhejiangensis*, 1998, 10(5):275~277
- 14 郭宏炳,钟镜金,苏子仁. 螺旋藻中 β -胡萝卜素的含量测定. 生物学杂志,1999,16(4):31~32
Guo H B, Zhong J J, Su Z R. *Journal of Biology*, 1999, 16(4):31~32
- 15 北京大学生物系. 生物化学实验指导. 北京:人民教育出版社,1985. 22~24
Biology Department of Beijing University. *Biochemistry Experiment Instruction*. Beijing: people's Education Press, 1985. 22~24
- 16 刘华,乔辰. 螺旋藻光和生理的比较研究. 内蒙古农业大学硕士论文,2002. 12~13
Liu H, Qiao Z. *Comparation Studies on the Photosynthetic Physiology of Spirulina*. Inner Mongolia Agriculture University Master Paper, 2002. 12~13
- 17 钱志刚. 螺旋藻多糖提取新工艺研究. 淮海工学院学报,2000,9(2):50~52
Qian Z G. *Journal of Huaihai Institute of Technology*, 2000, 9(2):50~52

Studies on the Mutagenesis of *Spirulina Platensis* Using He-Ne Laser

Zhao Mengmeng, Wang Weiwei

College of Life Science, Northwest University, Xian 710069

Received date:2003-12-16

Abstract *Spirulina platensis* was mutated by He-Ne Laser (wave length 632 nm, power 10 mW), irradiated for some time, some strains which grow faster than others were chosen to measure the content of β -carotene, protein and polysaccharide, then the strains with high production, high content of β -carotene and protein ext were selected. The result shows that, *spirulina platensis* sp MS-1, MS-2 and MS-3 which were irradiated by He-Ne laser for 15 min and 25 min, compared with original strain IS, its morphologh parameter changed, morphologh parameter shorted, helix tighted and grow speed was increased obviously. The content of β -carotene of MS-1 was increased by 18.1%, the content of protein and polysaccharide of MS-3 were also increased. In addition, the peak value of original strain was changed compared with the mutant strains by the ultraviolet spectrum of chlorophyll and carotenoid. It showed the mutagenesis domino effect of *spirulina platensis* by He-Ne Laser.

Keywords *Spirulina platensis*; He-Ne Laser; Morphologh; Growth; Stains filament; Mutagenesis

Zhao Mengmeng was born in August 1980, in Xi'an, Shaanxi province. Bachelor's degree was acquired in Northwest Normal University in Lanzhou during 1998-2002. Then, she has been studied in Northwest University for master degree. Her research involed the *spirulina platensis*.

