

荧光探针法测定极地雪藻自由基含量的研究

耿予欢, 李国基, 魏东, 李琳

(华南理工大学轻化工研究所, 广东 广州 510640)

摘要: 本文研究利用二氯荧光素双醋酸盐 (DCFH-DA) 作为荧光探针来测定极地雪藻 *Chlamydomonas nivalis* 中自由基的含量。DCFH-DA 进入雪藻细胞后由还原型二氯荧光素 (DCFH) 迅速氧化成氧化型二氯荧光素 DCF, 其氧化过程的氧化量与自由基的含量成正比, 通过荧光分光光度计可直接进行检测。研究表明最佳的测定条件为: 荧光探针 DCFH-DA 用量为 60 $\mu\text{mol/L}$, 反应时间 1~2.5 h, 藻液细胞数为 $5 \times 10^6 \sim 20 \times 10^6$ 个/mL。荧光强度的测定条件为: 激发波长: 485 nm, 发射波长: 520 nm。在上述条件下能够稳定、快速地测定藻类细胞中自由基的含量。

关键词: 荧光探针; 极地雪藻; 自由基

中图分类号: TS207; 文献标识码: A; 文章编号: 1673-9078(2008)04-0381-04

Determination of Free Radicals in Snow Algae *Chlamydomonas nivalis* using Fluorescence Probe

GENG Yu-huan, LI Guo-ji, WEI Dong, LI Lin

(Research Institute of Light Industry and Chemical Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

Abstract: The free radicals in snow algae *Chlamydomonas nivalis* were determined using 2', 7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFH-DA) as fluorescence probe. In the cell, DCFH-DA was hydrolyzed to 2', 7'-dichlorodihydrofluorescein (DCFH), and then quickly oxidized to fluorescent compound 2', 7'-dichlorofluorescein (DCF). The quantity of oxidation was in direct proportion to the content of free radicals. For the determination of free radicals by fluorescence spectrophotometer, the best dosage of DCFH-DA, cell counts and reaction time were 60 $\mu\text{mol/L}$, $5 \times 10^6 \sim 20 \times 10^6$ cell/mL and 1~2.5 h, respectively. And the best excitation and emission wavelength were 485 nm and 520 nm, respectively. Under those conditions, the free radicals in algae can be stably and rapidly determined.

Key words: fluorescence probe; *Chlamydomonas nivalis*; free radical

雪藻 (snow algae) 是生活在两极以及地球上相近的极端环境中的一类特殊的单细胞微藻类群, 已发现几十种之多, 分属不同的门类^[1]。它们大部分细胞分布在雪地几厘米深的表层, 在冰雪融化时形成雪地藻华 (snow algal bloom), 因细胞富含类胡萝卜素 (虾青素) 而呈深红色, 因此, 又被称为“血雪” (blood snow)。其中, 极地雪藻 *Chlamydomonas nivalis* 是一种淡水的单细胞绿藻, 在分类学上属于绿藻门 (*Chlorophyta*)、绿藻纲 (*Chlorophyceae*)、团藻目 (*Volvocales*)。

有研究表明, 极地雪藻 *Chlamydomonas nivalis* 主要依靠合成特殊的细胞成分来适应极端环境, 包括类胡萝卜素、不饱和脂肪酸、胞外多糖和酚类物质^[2]。

首先, 在胁迫条件下细胞能够在叶绿体外的脂质球中合成并积累虾青素 (astaxanthin), 它覆盖在叶绿体表面, 可吸收大量光线, 从而保护了光合作用器, 同时它又是自由基淬灭剂, 减少了光抑制和光氧化损伤^[3]。这也是 *Chlamydomonas nivalis* 最重要的抗氧化保护机制, 由此保证了细胞生存所必需的物质和能量来源^[4,5]。二氯荧光素双醋酸盐 (2', 7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, DCFH-DA) 是一种用来检测细胞内活性氧和氧自由基的荧光探针^[6,7]。当 DCFH-DA 加入细胞生长体系中后, 它就可以通过细胞膜, 在细胞内部被酯酶水解, 形成无荧光的还原型二氯荧光素 (2', 7'-dichlorodihydrofluorescein, DCFH), 后者又迅速被自由基氧化成为具高荧光的物质—氧化型二氯荧光素 (2', 7'-dichlorofluorescein, DCF) 并存在细胞内 (该过程如图 1 所示)^[4,8]。因此, DCFH 被氧化成 DCF 的量 (或荧光强度) 与自由基的含量成正比, 而自由

收稿日期: 2007-12-18

基金项目: 广东省自然科学基金项目 (05006524)

作者简介: 耿予欢, 女, 讲师

基的含量又与自由基的淬灭剂(如类胡萝卜素)的含量呈负相关的关系。即:细胞内 DCF 的产量(或荧光强度)能直接反映细胞内自由基的含量。上述反应过程产生的 DCF 的荧光强度可通过荧光分光光度计或流式细胞仪进行检测。

本研究采用 DCFH-DA 为荧光探针来测定极地雪藻细胞内自由基的含量,并确定了此方法的最适反应条件,从而建立了一种准确、快速的定量测定极地雪藻胞内自由基含量的方法。

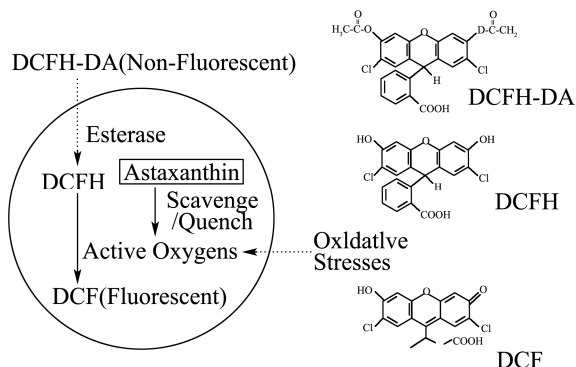


图1 氧化应力下极地雪藻细胞中 DCF 形成过程示意

Fig.1 diagram of DCF formation process in *Chlamydomonas nivalis* under oxidative stresses

Note: DCFH-DA (Non Fluorescent): DCFH-DA (无荧光的); Esterase: 酯酶; Active Oxygens: 活性氧; DCF (Fluorescent): DCF (发荧光的); Astaxanthin: 虾青素; Scavenge/Quench: 清除/猝灭; Oxidative stresses: 氧化应力。

1 材料和方法

1.1 材料和仪器

1.1.1 藻种

极地雪藻 *Chlamydomonas Nivalis*, 购自美国藻种库 UTEX。

1.1.2 培养液

BBM 培养基 (Blod's Basic Medium): 见文献^[9]

1.1.3 主要试剂

2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFH-DA), 2',7'-dichlorofluorescein (DCF), 美国 Sigma 公司产品; 其它试剂均为国产分析纯。

1.1.4 主要仪器

高速冷冻离心机, BIOFUGE 28RS 型, 美国贺利士公司; 光照培养箱, PYX-250-B 型, 广东省医疗器械有限公司; 荧光分光光度计, BMG Labtechnologies; 超净工作台, 苏净集团安泰公司; 超声波发生器, UP400S, 德国 Dr. Hielscher 公司; 灭菌锅, 日本 SANYO Labte, Ltd.; 电子显微镜, L2000A, 广州光学仪器厂;

照度计, ZDS-10 型照度计; 电子天平, BS200S 北京 Sartorius 有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 极地雪藻的培养条件

在装有 500 mL BBM 培养基的透明方盒中, 按 10% 的接种量接入对数期的雪藻藻种, 使接种后的藻液光密度值 (O.D.) 在 0.10 左右。在 23 °C、9000 lx 光照 (12L/12D) 条件下通气培养。

1.2.2 检测

取生长对数期的藻液, 加入荧光前体物 DCFH-DA 进行反应, 反应后离心 (4000 r/min) 洗涤, 在冰浴中进行超声破碎 (5×30 s), 然后在 4 °C 条件下离心 (15000 r/min) 10 min, 取上清液在 485 nm 激发波长, 520 nm 发射波长下进行荧光强度的检测 (gain: 20), 减去空白的荧光强度值进行数据的校正, 同时进行 3 个平行实验, 结果取其平均值。

2 结果与分析

2.1 DCF 标准曲线的测定

用 10 mmol/L 的储备液配制浓度范围为 0~200 nmol/L 的 DCF 溶液, 测定其在 485 nm 激发波长, 520 nm 发射波长下的荧光强度, 结果如图 2 所示。荧光强度在 DCF 浓度为 0~150 nmol/L 范围内呈良好的线性关系。

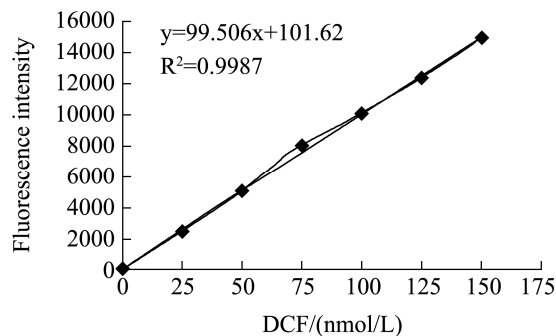


图2 DCF 标准曲线

Fig.2 Specification curve of DCF

2.2 DCFH-DA 用量对实验结果的影响

取一定量生长对数期的藻液, 离心 (4000 r/min, 10 min) 洗涤两次, 测定其细胞数为 4.675×10^6 个/mL。分装于 7 支试管中, 每支 3 mL, 加入不同体积的 10 mmol/L 的 DCFH-DA, 使反应体系中 DCFH-DA 的量分别为: 0 μ mol/L、20 μ mol/L、40 μ mol/L、60 μ mol/L、80 μ mol/L、100 μ mol/L、120 μ mol/L, 避光反应 2 h, 再离心洗涤两次, 于冰浴中超声破碎, 然后在 4 °C 条件下进行离心 (15000 r/min) 10 min, 取上清液测定荧光强度, 以 DCFH-DA 的量为横坐标, 每 10^6 个

胞中 DCF 的量为纵坐标绘图, 结果如图 3 所示。

从图 3 知随着反应体系中 DCFH-DA 的不断加大, 反应生成的 DCF 含量也逐渐升高, 到 DCFH-DA 的用量为 60 $\mu\text{mol/L}$ 时, 增到最大值, 即每 10^6 个细胞所产生的 DCF 量为 4.3994 nmol/L , 之后, 生成 DCF 的量又逐渐降低。因此得出如下结论: 在上述反应条件下, 荧光前体物质 DCFH-DA 的最适用量为 60 $\mu\text{mol/L}$ 。

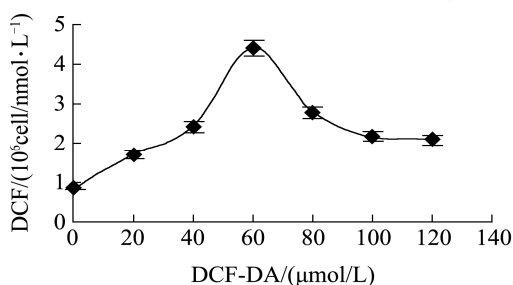


图 3 不同 DCFH-DA 用量对结果的影响

Fig.3 Effects of dosage of DCFH-DA on results

2.3 反应时间对实验结果的影响

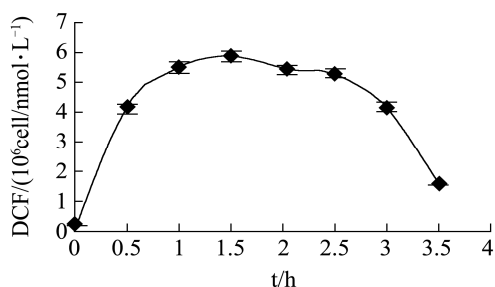


图 4 反应时间对结果的影响

Fig.4 Effects of reaction time on results

取一定量生长对数期的藻液, 离心 (4000 r/min , 10 min) 洗涤两次, 测定其细胞数为 5.25×10^6 个/ml。分装于 7 支试管中, 每支 3 mL, 加入 18 μL 的 10 mmol/L 的 DCFH-DA, 使反应体系中 DCFH-DA 的量为 60 $\mu\text{mol/L}$, 避光反应时间分别为 0.5 h、1.0 h、1.5 h、2.0 h、2.5 h、3.0 h、3.5 h, 再离心洗涤 2 次, 于冰浴中超声破碎, 离心 (15000 r/min , 10 min) 后取上清液测定荧光强度, 以反应时间为横坐标, 反应体系中每 10^6 个细胞所生成 DCF 的量 (nmol/L) 为纵坐标绘图, 结果如图 4 所示。

从图 4 知反应在 1 h 后进入稳定状态, 持续到 2.5 h, 生成 DCF 的量基本保持在同一水平, 其中 1.5 h 的结果略有提高, 而 3 h 后 DCF 的生成量明显下降, 这可能与反应体系各物质的稳定性有关。因此, 反应时间取 1~2.5 h 较为合适。

2.4 藻液浓度对实验结果的影响

取一定量生长对数期的藻液, 离心 (4000 r/min , 10 min) 洗涤两次, 配成不同浓度, 分装于 7 支试管

中, 每支 3 mL, 细胞数分别为 0.42×10^6 个/mL、 0.815×10^6 个/mL、 1.9×10^6 个/mL、 4.425×10^6 个/mL、 11.8×10^6 个/mL、 20.3×10^6 个/mL、 34.1×10^6 个/mL: 加入 18 μL 的 10 mmol/L 的 DCFH-DA, 使反应体系中 DCFH-DA 的量为 60 $\mu\text{mol/L}$, 避光反应 2 h, 再离心洗涤两次, 于冰浴中超声破碎, 离心 (15000 r/min , 10 min) 后取上清液测定荧光强度, 以藻液细胞数为横坐标, 反应体系中所生成 DCF 的量 (nmol/L) 为纵坐标绘图, 见图 5。

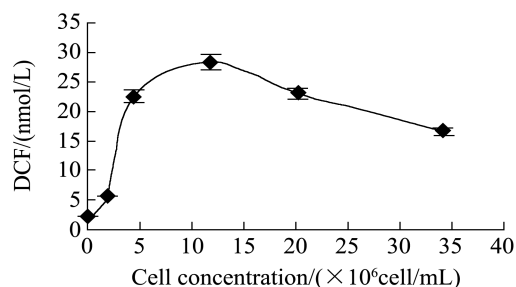


图 5 不同浓度反应体系的实验结果

Fig.5 Effects of reaction system concentration on results

从图 5 知藻液细胞数在 $5 \times 10^6 \sim 20 \times 10^6$ 个/mL 为较合适的底物浓度, 其中, 细胞数为 11.8×10^6 个/mL 时所生成的 DCF 量达到了最大, 而在此范围之外的实验结果都不理想。

3 结论

用 DCFH-DA 作为荧光探针可较灵敏、稳定、快速地测定雪藻内自由基含量。该方法比较适宜的反应条件为: DCFH-DA 用量为 60 $\mu\text{mol/L}$, 反应时间 1~2.5 h, 藻液细胞数为 $5 \times 10^6 \sim 20 \times 10^6$ 个/mL。荧光强度的测定条件为: 激发波长: 485 nm, 发射波长: 520 nm。

参考文献

[1] Hoham R. W. Microbial ecology of snow and freshwater ice with emphasis on snow algae. In: Snow ecology: an interdisciplinary examination of snow-covered ecosystems. 2001,166-228

[2] Brian Duval, Kalidas Shetty and William H. Thomas, Phenolic compounds and antioxidant properties in the snow alga *Chlamydomonas nivalis* after exposure to UV light. [J] Journal of Applied Phycology. 2000,11: 559-566

[3] 耿予欢,李国基,等.UV-B 辐射对极地雪藻 *Chlamydomonas nivalis* 的生物学效应.[J]华南理工大学学报(自然科学版), 2006,34(3):106-110

(下转第 332 页)