

螺旋藻富硒转化含硒蛋白质的鉴定及其抗氧化活性研究

黄峰^{1,2}, 单雪风², 张水妹², 蔡智辉², 凌钦婕², 黄峙²

(1. 佛山科学技术学院医学院, 广东佛山 528000) (2. 暨南大学生命科学技术学院, 广东广州 510632)

摘要: 研究富硒螺旋藻(SeSP)培养生物转化含硒蛋白质(SeP)中硒的含量及分布, 观察 SeP 在体外对氧自由基的清除效应。藻体总蛋白(TP)用 SDS-PAGE 电泳分离后, 用电感耦合等离子体质谱技术(ICP-MS)对不同分子量范围蛋白质中的硒含量进行精确定量; 通过激光烧蚀(LA)-ICP-MS 对纯化含硒藻蓝蛋白(SePC)硒含量在电泳胶上进行原位检测; 用制备 SDS-PAGE 凝胶电泳分离纯化不同分子量的 SeP 组份, 化学发光方法检测 SeP 在体外对超氧自由基和羟自由基的清除作用。结果发现, 与未富硒培养的螺旋藻(SP)相比, SeSP 总蛋白中硒含量提高了 32 倍, 可达 805.48 $\mu\text{g/g}$, 其中 75.81% 分布于 25 ku 以下小分子量含硒蛋白质(LMWSeP)中, LA-ICP-MS 证明纯化 SePC 亚基含有稳定共价结合活性硒元素, LMWSeP 对自由基的直接最大清除率在 70% 以上。结果提示, 利用 SeSP 培养可转化生产活性 SeP, SeSP 中低分子量 SeP 组份是一种具有较高抗氧化活性的天然活性硒资源, 其中硒的存在形态、合成转化机制和体内生物活性有待深入研究。

关键词: 富硒螺旋藻; 含硒蛋白; 硒; 抗氧化; 自由基

文章编号: 1673-9078(2015)7-99-104

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2015.7.017

Identification of Selenoproteins Formed via Biotransformation of Selenium-enriched *Streptomyces platensis* and Their Oxygen Free Radical Scavenging Activities

HUANG Feng^{1,2}, SHAN Xue-feng², ZHANG Shui-mei², CAI Zhi-hui², LING Qin-jie², HUANG Zhi²

(1. Medical School, Foshan Science and Technology College, Foshan 528000, China)

(2. College of Life Science and Technology, JiNan University, Guangzhou 510632, China)

Abstract: Selenium (Se) content and distribution of Se-containing biotransformation proteins (SeP) in Se-enriched *Streptomyces platensis* (SeSP) were explored. Additionally, the *in vitro* scavenging activity of oxygen free radicals by SeP was studied. Total proteins (TP) in *S. platensis* were separated using sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and Se content in different molecular-weight proteins was measured using inductively-coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS). Laser ablation (LA)-ICP-MS was used for *in situ* detection of Se content in purified Se phycocyanin (SePC) within the electrophoresis gel. The *in vitro* clearance of superoxide and hydroxyl free radicals by SeP was investigated by chemiluminescence. The results showed that Se content in SeSP-TP was 32-fold higher than that in non-enriched *S. platensis* (SP), reaching 805.48 $\mu\text{g/g}$, while 75.81% of total Se was distributed in low-molecular weight SePs (LMWSeP), with molecular weights ≤ 25 ku. LA-ICP-MS results confirmed that purified SePC subunits contained stable, covalently-bound, active Se. The maximum clearance rate of free radicals by LMWSeP was over 70%. The findings suggest that SeSP cultures could be used to produce active SeP by biotransformation. The LMWSeP components in SeSPs are a source of natural Se with high anti-oxidation activity. Further studies are required to determine the form of Se, transformation mechanism, and *in vivo* bioactivity.

Key words: selenium-enriched *Spirulina platensis*; Se-containing proteins; selenium; anti-oxidation; free radical

收稿日期: 2014-01-22

基金项目: 广东省科技计划项目(2012B031800437、2013B010404029); 国家自然科学基金项目(20975045)资助

作者简介: 黄峰(1963-), 男, 副教授, 研究方向: 肝损伤、再生与修复

通讯作者: 黄峙(1968-), 男, 教授, 博士生导师, 研究方向: 硒蛋白家族、钙蛋白酶系统、细胞应激信号转导

硒(Selenium, Se)是人体必需的微量元素,其生物学活性主要体现在已经发现和鉴定的24种硒蛋白(selenoproteins)和硒酶(selenoenzymes)的功能上。活性硒元素以硒代半胱氨酸(Selenocysteine, Se-Cys)形式由密码子 UGA 编码,经独特的翻译调控机制掺入到硒蛋白/硒酶的活性中心,因此 Se-Cys 也被称为是第21种由基因编码合成蛋白质的氨基酸。目前在不同物种已经相继发现和确认了40余种硒蛋白,硒蛋白家族中的主要成员分别在原核生物和哺乳动物存在同源类似物,它们绝大多数因 Se-Cys 具有的活性-SeH 基团而表现出极强的氧化还原平衡调节作用,例如哺乳动物体内的谷胱苷肽过氧化物酶(GPx)家族为体内重要的抗氧化硒酶,其活性比半胱氨酸取代 Se-Cys 的突变体要高近千倍。因此,硒具有广泛的抗氧化、调节代谢和调节免疫功能,从而发挥其抑癌、抗病毒、抗心脑血管疾病、增强生殖力和免疫力等广泛的生物学作用^[1]。

硒也是一种有毒元素,生物体可将硒转化为低毒、无毒或活性形态。人们已应用多种生物载体进行生物富集转化含硒活性物质的研究。我们以前的研究认为螺旋藻(*S. platensis*, SP)是硒生物有机化的理想载体,并从富硒螺旋藻(Se enriched *S. platensis*, SeSP)中发现和提取了具有生物活性的硒藻蓝蛋白(Se phycocyanin, SePC)、硒别藻蓝蛋白(Se allophycocyanin, SeAPC)、硒多糖(Se polysaccharides, SePS)等成分^[2-5]。尽管人们对动物体内和原核生物由基因编码的硒蛋白和硒酶的研究和认识比较深入,但在植物体内硒的功能形式特别是含硒蛋白质的活性至今还不清楚。植物体内确实存在多种含硒氨基酸和含硒蛋白质^[6],在模式植物地衣藻(*Chlamydomonas reinhardtii*)体内发现有 Se-tRNA,表明植物可能具有与硒依赖生物相同或相似的硒蛋白合成途径。近年来,植物硒蛋白已陆续有实验报道,如发现地衣藻含有大、小两种硫氧还蛋白还原酶,其中大 TR 为硒蛋白,从地衣藻中还发现 GPx 样硒蛋白,从依赖硒生长的赫氏球石藻(*Emiliania huxleyi*)中发现有6种含硒蛋白质,并确定其中的二硫化物异构酶(disulfide isomerase, PDI)样蛋白是一种新的硒蛋白。以上报道提示,植物特别是藻类确实存在基因编码的硒蛋白,硒可能是部分植物或藻类的必需微量元素^[7-8]。

由于螺旋藻中蛋白质含量高,因此有必要对藻体蛋白质中硒的分布进行较为系统的观察。本实验利用电泳技术对藻体总蛋白(TP)进行分离纯化,通过 ICP-MS 和 LA-ICP-MS 等精确定量分析手段,研究 SeSP 转化含硒蛋白质(SeP)中硒的含量及分布,并初

步观察 SeP 在体外对氧自由基的清除效应。

1 材料与方法

1.1 试剂

分析纯亚硒酸钠(Sodium selenite)购自广州化玻公司,配成含硒 100 mg/mL 的贮存液(1000 \times)。鲁米诺(Luminal)、二硫苏糖醇(DTT)和碘乙酰胺购自上海生科生物科技有限公司。硒标准液由中国国家标物中心惠赠。不溶性聚乙烯吡咯烷酮(PVP)、蛋白定量试剂盒(Bio-Rad)、丙烯酰胺、N,N'-甲叉双丙烯酰胺、Tris 碱、甘氨酸、十二烷基硫酸钠(SDS)、溴酚兰、考马斯亮兰 R-350、TEMED 和 β -巯基乙醇(β -Met)购自广州合众生物科技有限公司。其它化学试剂由暨南大学试剂中心提供,均为 AR 级。Zarrouk 氏培养基按文献配制^[3]。

1.2 仪器

实验使用的主要仪器有:制备电泳仪(Bio-Rad Model 491)和 SDS-PAGE 电泳系统,冷冻离心机(Eppendorf 5424R), LGJ-18S 冷冻干燥机,电感耦合等离子体质谱仪(ThermoX 系列 ICP-MS),准分子激光烧蚀系统(GeoLas2005)与电感耦合等离子体质谱仪(Agilent 7500a)联用装置, LKB-251 型生物超弱发光检测仪(芬兰), RF-5400 型荧光光度计(日本), JY92-II 型超声波破碎仪(宁波新芝)。

1.3 方法

1.3.1 富硒螺旋藻培养

钝顶螺旋藻藻种(*Siprulina platensis*, SP)由暨南大学水生生物研究所提供。按文献方法经过硒胁迫诱导,筛选富硒稳定性藻株(SeSP0809)^[9]。采用 Zarrouk 氏培养基,用 5 L 鼓泡式生物反应器(本实验室自制)培养 SeSP。按文献方法分别在第 3 d、5 d、7 d 添加预配制的亚硒酸钠溶液(每次 100 mg/L)^[3]。培养条件为:温度 30 \pm 2 $^{\circ}$ C、pH 9.0 \pm 0.5、光照 5000 lux、光暗周期 12/12 h。以不加硒培养螺旋藻为对照,第 9 d 过滤采收藻细胞,冷冻干燥藻粉冰箱中保存备用。

1.3.2 藻体总蛋白分离提取

测定 SeSP 和 SP 藻粉总硒含量分别为 378.46 和 17.81 μ g/g DW,按文献^[4-5]方法制备并提取藻体总蛋白 SeSP-TP 和 SP-TP。简述如下:称取藻粉 5 g,加入含 2%不溶性聚乙烯吡咯烷酮(PVP)和 0.5% DTT 的 0.1MPB 缓冲液(pH 6.8) 100 mL,反复冻融数次,添加 2% Triton X-100,磁力搅拌提取 3 \times 30 min, 15000 g 4 $^{\circ}$ C 离心 15 min,合并上清液,采用饱和度为 30%的

硫酸铵溶液在室温混合搅拌 2 h, 同前离心 15 min, 去除沉淀后, 上清液再用饱和度为 80% 的硫酸铵盐析沉淀 2 h, 离心收集得到粗提总蛋白, 透析脱盐后冷冻真空干燥, 得到藻体总蛋白样品, 三批次 SeSP 和 SP 总蛋白样品分别编号为 SeSP-TP1、2、3 和 SP-TP1、2、3, ICP-MS 测定其中硒含量, -20 °C 保存备用。

1.3.3 藻蓝蛋白的纯化制备和 SDS-PAGE 电泳分析

藻蓝蛋白(phycoyanin, PC)和 Se-PC 的纯化按照文献^[4]方法经适当修改。简言之, 取 500 mg 的螺旋藻总蛋白冻干粉, 用 10 mM PB (pH 6.8, 含 2 mM EDTA 和 0.1 M NaCl) 平衡缓冲液溶解, 上样 HA 柱(20×2.5 cm), 先用约 100 mL 平衡缓冲液冲洗后, 换 40 mM PB (pH 7.0, 含 0.1 M NaCl) 洗脱, 收集合并 PC 含量较高的组份, 再上 DEAE-52 (30×2.5 cm) 柱, 用 150 mL 的 5 mM PB (pH 7.0, 含 2 mM EDTA) 冲洗, 再用 5~150 mM PB (pH 7.0, 含 2 mM EDTA) 线性梯度洗脱, 合并 $A_{620}/A_{280} > 4.0$ 洗脱蛋白液, 超滤浓缩后冻干。用 Bio-Rad 蛋白电泳装置进行常规 SDS-PAGE 电泳^[4], 主要步骤包括: 用 30% Acr/Bis 凝胶贮液依次灌制 12% 的分离胶和 4% 的浓缩胶; 待浓缩胶充分凝固后, 取出加样槽梳齿, 加满电泳缓冲液; 蛋白样品用上样缓冲液 95 °C 煮 5 min 后, 按实验设计依次上样; 200 V 恒压电泳 50 min; 取出电泳胶片进行考马斯蓝染色和激光烧蚀电感耦合等离子体质谱分析。

1.3.4 硒元素定量分析鉴定

ICP-MS 按文献方法设定参数^[10], 样品和标准液用微波消化炉在 10% (V/V) 优级纯硝酸中 300 °C 消化 3 h, 标准曲线: 1~100 ng/mL, 标准液由中国国家标物中心提供。LA-ICP-MS 对胶内硒元素检测鉴定委托中国地质大学(武汉)地质过程与矿产资源国家重点实验室进行。

1.3.5 自由基清除率检测

超氧阴离子自由基体外发生及化学发光检测采用焦性没食子酸-鲁米诺体系; 羟基自由基(OH)体外发生及化学发光检测采用抗坏血酸-Cu²⁺-酵母悬液-鲁米诺-H₂O₂ 体系^[11]。每一样品浓度设 3 个平行管, 用平均发光值与未加检测样品时对照吸光值计算清除率。绘制浓度-清除率曲线, 实验数据利用 Reed and Muench 法计算半数有效浓度 (EC₅₀), 公式如下:

$$EC_{50} = \lg^{-1} [\lg D - i(\sum P - 0.5)]$$

式中 D: 最大实验浓度, i 为相邻剂量间比例的对数, P 为清除率。

1.4 统计分析

所有试验重复 3 次。结果以平均值±标准差表示, 统计分析采用 SPSS 13.0 处理, 差异显著性用 $P < 0.05$ (*) 表示。

2 结果与讨论

2.1 螺旋藻富硒培养生物转化含硒蛋白质中的硒含量及其分布

在培养液中添加亚硒酸钠培养 SeSP, 利用 SDS-PAGE 电泳方法对提取的藻体总蛋白进行分离, 利用 ICP-MS 检测硒在不同蛋白质分子量范围内的分布情况。结果如图 1 所示, SeSP 提取总蛋白中硒含量可达 805.48 μg/g, 而常规培养的 SP 总蛋白中硒含量仅为约 25.04 μg/g, 富硒培养生物转化的蛋白含硒量提升了 32 倍(图 1a), 提示用螺旋藻作为富硒培养载体, 是利用生物转化生产含硒蛋白质的可行途径。对提取的藻体总蛋白(TP)进行 SDS-PAGE 电泳, 可发现 SP-TP 与 SeSP-TP 相比, 蛋白染色谱带有明显差异, 如在分子量约为 48 ku、30-32 ku、28 ku 附近位置上, SeSP-TP 出现几个水平下调的条带, 而在 25 ku 以下位置则有明显上调的蛋白带出现(图 1b), 提示进一步有必要进行藻体总蛋白质组学研究分析, 确认富硒培养调控的差异蛋白质类别及其生物学意义。对 4 批次提取的 SeSP-TP 进行电泳后, 按分子量差异切胶, 用 ICP-MS 对不同分子量范围内蛋白质中的硒含量进行精确定量检测, 每个 SeSP-TP 泳道蛋白上样量为 40.00 μg(推算含硒为 32.22 ng), 检测数据显示电泳胶蛋白结合硒总计为 25.68 ng, 回收率为 79.72%(图 1c)。SP-TP 上样量同为 40.00 μg, 推算含硒为 1.01 ng, 鉴于该水平已接近 ICP-MS 的检测下限, 未对 SP-TP 电泳胶进行切胶检测, 但对整条泳道消化处理后进行硒定量分析, 结果为 0.78 ng, 计算回收率为 77.01%。因 SDS-PAGE 为强还原条件下, 且变性蛋白质经 SDS 修饰, 表明 SeSP 中 SeP 主要以稳定的共价形态结合硒, 但其中以何种硒氨基酸形态存在还有待进一步分析证明。值得注意的是, 按分子量范围进行切胶、消化和硒定量检测, 发现 75.81% 生物转化的蛋白硒分布于 25 ku 以下小分子量蛋白质或亚基中(图 1d), 为进一步研究和开发利用 SeSP 中 SeP 提供重要参考。

2.2 纯化 SePC 中硒的胶内原位检测

在原核生物和动物体内, 营养水平的硒经过复杂的代谢转化过程, 主要以 Se-Cys 形态掺入到硒蛋白中, Se-Cys 是第 21 种蛋白质氨基酸。与原核生物和动物不

同, 至今在植物体内还没有发现普遍存在的以 Se-Cys 形态通过基因编码掺入的硒蛋白, 然而在地衣藻 (*Chlamydomonas*) 中已经证实含有基因编码 Se-Cys 的硒蛋白^[7-8]。此外, 所有生物体均可转化硒代蛋氨酸 (selenomethionine, SeMet), SeMet 可随机掺入蛋白质中, 是食物链中有机硒的主要形态, 广泛存在于植物蛋白和动物蛋白质中。

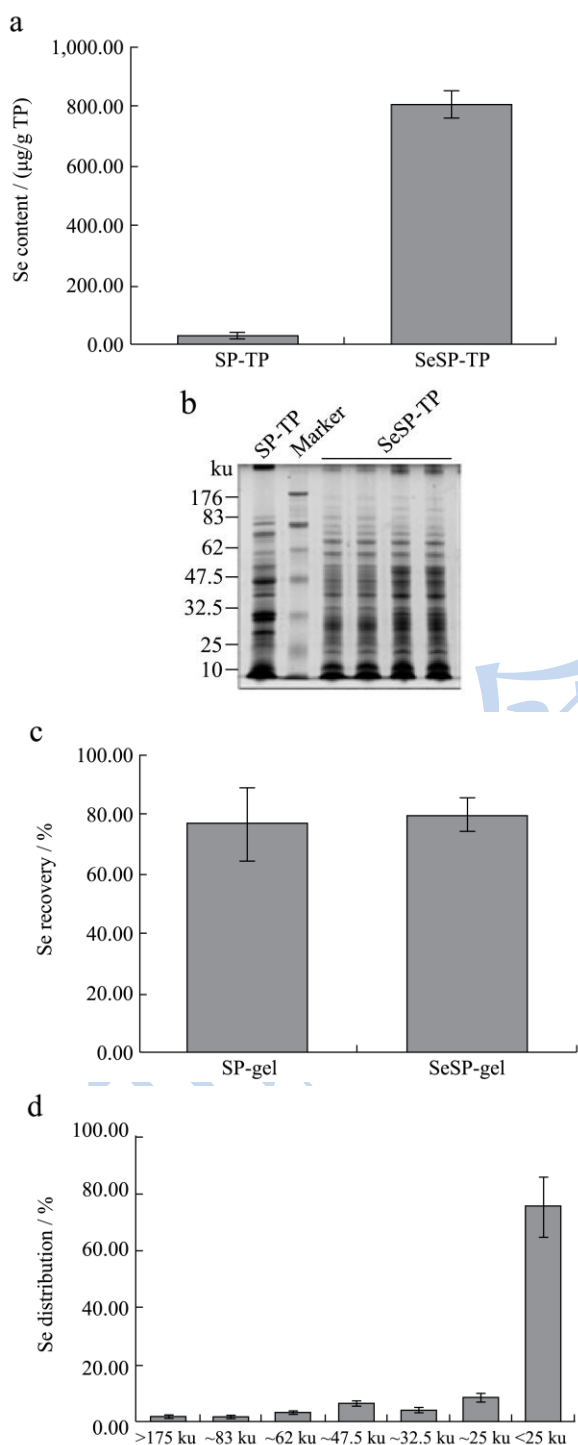


图1 藻体总蛋白电泳及硒在不同分子量范围中的分布
Fig.1 SDS-PAGE of SP total proteins and Se distribution pattern in proteins of different molecular weights

注: a: 总蛋白硒含量; b: SDS-PAGE 电泳图; c: 总蛋白(40µg)硒电泳回收率; d: 硒在蛋白质分子量范围中的分布。

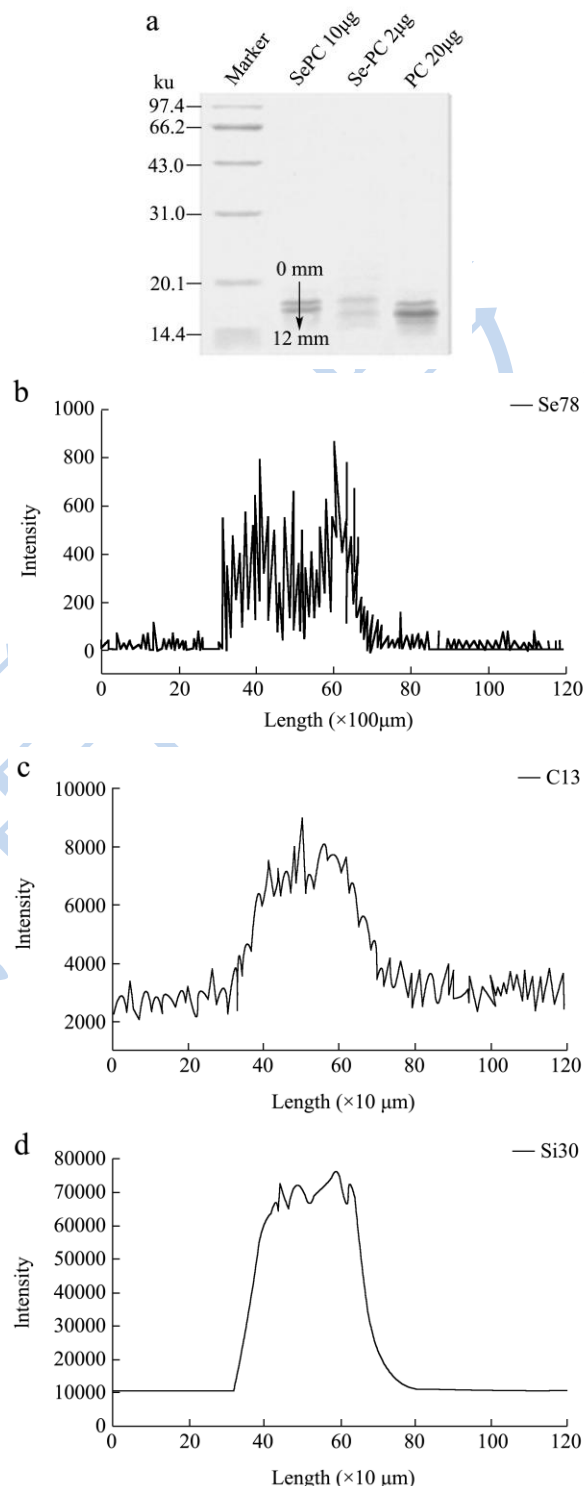


图2 纯化含硒藻蓝蛋白的激光剥蚀 ICP-MS 鉴定

Fig.2 Identification of purified SePC by LA-ICP-MS

注: a: 纯化含硒藻蓝蛋白 SDS-PAGE 电泳; b: LA-ICP-MS 检测 Se78 质谱信号; c 和 d: C13 和 Si30 质谱信号。

我们以前研究证明^[3], SeSP 生物转化的有机硒主要存在于蛋白质组份中, 对提取纯化的 SePC 不同多聚体及其亚基中硒含量进行了分析检测, 发现多聚蛋白

解聚和亚基解离伴随蛋白硒含量的降低,对 PC 亚氨基酸序列检索分析发现,其蛋氨酸和半胱氨酸残基均不多,因此推测可能存在其它的硒结合方式。

本实验利用 LA-ICP-MS 对 SePC(Se 含量为 316.22 μg/g)电泳胶内的硒进行原位检测鉴定,结果如图 2 所示,SePC 上样 10 μg 时,推算其中结合硒为 3.16 ng,LA-ICP-MS 检测到 SePC 的 α、β 亚基均有明显 Se78 信号,说明 SePC 含有稳定共价结合的硒元素,但尚未能确定硒的具体结合形式。

2.3 螺旋藻转化含硒蛋白对自由基的清除作用

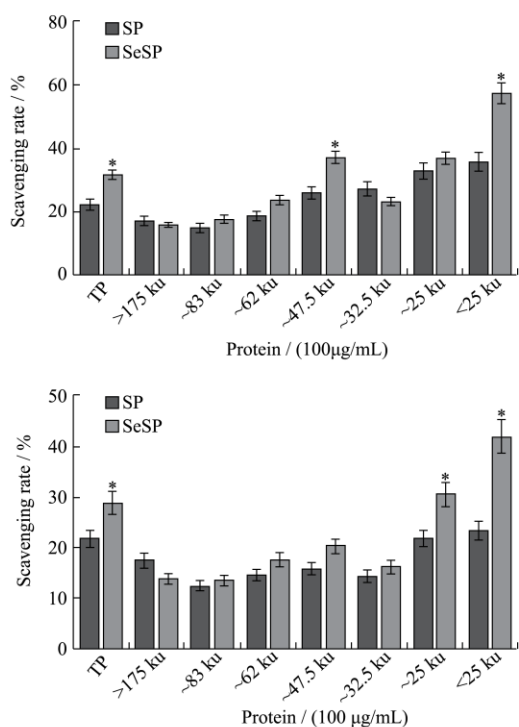


图 3 螺旋藻含硒蛋白对超氧离子(a)和羟自由基(b)的清除率
Fig.3 The clearance rates of SP/Se-containing protein on (a) superoxide anions and (b) hydroxyl radicals

为了证明 SeSP 转化生成的 SeP 是否具有生物活性,我们初步测定了利用制备 SDS-PAGE 电泳收集的不同分子量范围的 SeP 组份在体外对超氧阴离子自由基和羟基自由基的清除作用。因 SDS-PAGE 电泳体系用 SDS 对变性蛋白进行修饰,实验中为消除 SDS 干扰,采用二硫苏糖醇(DTT)进行处理,并用碘乙酰胺清除过剩的 DTT,最后用 Zeba 离心式脱盐柱纯化。结果如图 3 所示,数据表明,SeP 对超氧阴离子自由基和羟基自由基均具有较好的清除效应,并呈现明显的硒含量相关性。值得提出的是,相同剂量的 SeSP-TP 与 SP-TP 相比,其体外对超氧阴离子自由基和羟基自

由基的清除效应均有显著提升,尤其是分子量小于 25 ku 的含硒蛋白质或亚基组分对自由基清除作用最强,提示 SeSP 转化生成的小分子量含硒蛋白具有较高的营养价值和较好的医药应用前景。

表 1 LMWSeP 体外清除超氧阴离子和羟自由基的最大清除率和 EC50

Table 1 The maximum clearance rate and EC50 of LMWSeP on superoxide and hydroxyl radicals in vitro

实验活性成分	超氧自由基		羟自由基	
	最大清除率/%	EC ₅₀ /(μg/mL)	最大清除率/%	EC ₅₀ /(μg/mL)
LMWSeP	81.37	76.62	74.21	128.77
Se-Met ^[12]	41.80	1.75	54.52	4.81
Se-PS ^[12]	73.23	26.29	61.07	41.45
Se-PC ^[12]	70.46	98.42	72.68	319.36
SeSP-TP ^[12]	61.81	201.40	62.57	390.95

SeSP 转化含硒活性成分在体外对超氧自由基和羟自由基的最大清除率和 EC50 总结如表 1 所示。螺旋藻转化低分子量含硒蛋白(LMWSeP)对两种自由基的体外直接最大清除率分别为达到 81.37%和 74.21%,比同等剂量的 SePC 和 SeSP-TP 对自由基清除作用明显增强(P<0.05)。普遍认为,硒的生物作用主要体现在硒蛋白的功能,特别是谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GPX)和硫氧还蛋白还原酶(thioredoxin reductase, TR)等硒酶家族,它们在清除细胞内过剩自由基、调节氧化还原平衡及相应信号转导方面起重要作用,从而保护细胞膜、线粒体膜和微粒体膜等生物膜流动性和弹性,维持细胞正常的生理功能状态。本研究发现螺旋藻转化 LMWSeP 对自由基的良好清除作用,为其作为生物硒源开发利用提供实验依据。

3 结论

SeSP 培养可生物转化较高水平的含硒蛋白质,其中 75%以上的硒与分子量小于 25 ku 的蛋白质结合,SDS-PAGE 胶上原位 LA-ICP-MS 显示含硒藻蓝蛋白含有稳定共价结合的活性硒元素。SeSP 生物转化含硒蛋白质中低分子量含硒蛋白质组分在体外对超氧阴离子和羟自由基的清除作用最强,经过进一步纯化和酶解制备富硒多肽,可作为新型天然活性生物硒资源,在功能性食品、营养保健品和新药研制方面具有较好的应用开发价值。SeSP 生物转化含硒蛋白质的进一步纯化鉴定和体内生物活性评价值得深入研究。

参考文献

- [1] Huang Z, Rose AH, Hoffmann PR. The role of selenium in inflammation and immunity: from molecular mechanisms to therapeutic opportunities [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2012, 16(7): 705-743
- [2] 黄峙,郑文杰,郭宝江.钝顶螺旋藻富硒培养条件的优化[J]. *生物工程学报*,2002,18(3):373-376
HUANG Zhi, ZHENG Wen-jie, GUO Bao-jiang. Optimization of cultivation conditions in Se-enriched *Spirulina platensis* [J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2002, 18(3): 373-376
- [3] 王韵,蔡智辉,张逸波,等.富硒螺旋藻蛋白水解多肽的制备及其对ACE活性的抑制作用[J].*现代食品科技*,2013,29(7): 1574-1579
WANG Yun, CAI Zhi-hui, ZHANG Yi-bo, et al. Preparation of Polypeptides by Hydrolysis of Selenium-enriched *Spirulina* Protein and their Inhibitory Activity for Angiotensin-converting Enzyme [J]. *Modern Food Science and Technology*, 2013, 29(7): 1574-1579
- [4] Huang Z, Guo B J, Wong RNS, et al. Characterization and Antioxidant Activity of Selenium-Containing Phycocyanin Isolated from *Spirulina platensis* [J]. *Food Chemistry*, 2007, 100 (3): 1137-1143
- [5] Zhang H, Chen T, Jiang J, et al. Selenium-containing allophycocyanin purified from selenium-enriched *Spirulina platensis* attenuates AAPH-induced oxidative stress in human erythrocytes through inhibition of ROS generation [J]. *J. Agric. Food Chem.*, 2011, 59(16): 8683-90.
- [6] Mangiapane E, Pessione A, Pessione E. Selenium and selenoproteins: an overview on different biological systems [J]. *Curr. Protein Pept. Sci.*, 2014, 15(6): 598-607
- [7] Novoselov SV, Rao M, Onoshko NV, et al. Selenoproteins and selenocysteine insertion system in the model plant cell system, *Chlamydomonas reinhardtii* [J]. *EMBO J.*, 2002, 21: 3681-93
- [8] Obata T, Shiraiwa Y. A novel eukaryotic selenoprotein in the haptophyte alga *Emiliania huxleyi* [J]. *J. Biol. Chem.*, 2005, 280: 18462-8
- [9] 黄峙,郑文杰,杨芳,等.硒胁迫螺旋藻集落形成及富硒稳定性[J].*应用与环境生物学报*,2005,11(5):542-544
HUANG Zhi, ZHENG Wen-jie, YANG Fang, et al. Colony formation and selenium-enriched stability of *Spirulina platensis* under selenium stress [J]. *Chinese Journal of Applied & Environmental Biology*, 2005, 11(5): 542-544
- [10] Huang Z, Pei Q L, Sun G F, et al. Low selenium status affects arsenic metabolites in an arsenic exposed population with skin lesions [J]. *Clinica Chimica Acta*, 2008, 387(1-2): 139-144
- [11] 赵雪,薛长湖,徐强,等.琼胶寡糖体外清除自由基活性的研究[J].*中国水产科学*,2002, 9(3):280-282
ZHAO Xue, XUE Chang-hu, XU Qiang, et al. Antioxidant abilities of agar oligosaccharides [J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2002, 9(3):280-282.
- [12] 靳兴媛,周永林,任璐艳,等.螺旋藻转化纳米元素硒的制备及其体外清除自由基活性的初步研究[J].*中国生物工程杂志*,2012,32(1):30-35
JIN Xing-yuan, ZHOU Yong-lin, REN Lu-yan, et al. Nano Elemental Selenium Bio-transformed from *S. Platensis* and Scavenging Activity on Oxygen Free Radicals *in vitro*[J]. *China Biotechnology*, 2012, 32(1): 30-35