3 种海洋赤潮微藻蛋白质和核酸合成对 UV-B 辐射增强的响应

张培玉^{1,2} 唐学玺^{1*} 蔡恒江¹ 于娟¹ 杨震¹

(1 中国海洋大学海洋生态学研究室, 青岛 266003) (2 曲阜师范大学生命科学学院, 山东曲阜 273165)

摘要 应用同位素标志法,研究了赤潮异弯藻(*Heterosigma akashiwo*)、亚历山大藻(*Alexandrium tamarense*)和中肋骨条藻(*Skeletonema costatum*)核酸和蛋白质合成对紫外线 B 波段(UV-B, 280 ~ 320 nm)辐射增强的响应变化。结果表明:1)按照由高到低的顺序,3 种海洋赤潮微藻对 UV-B 辐射增强的敏感性依次是赤潮异弯藻、亚历山大藻和中肋骨条藻。2) UV-B 辐射增强抑制赤潮异弯藻的生长和脱氧核糖核酸(DNA)的合成,而低剂量的 UV-B 辐射对中肋骨条藻和亚历山大藻的生长与 DNA 的合成表现出刺激作用,高剂量则表现出抑制作用。3)随着 UV-B 辐射的增强,3 种海洋赤潮微藻核糖核酸(RNA)和蛋白质的合成速度下降,其中赤潮异弯藻合成速度的下降幅度明显大于中肋骨条藻和亚历山大藻,表明赤潮异弯藻 RNA 和蛋白质的合成对 UV-B 辐射增强的敏感性高于中肋骨条藻和亚历山大藻。

关键词 海洋赤潮微藻 蛋白质 核酸 合成作用 紫外线 B

EFFECTS OF UV-B RADIATION ON PROTEIN AND NUCLEIC ACID SYNTHESIS IN THREE SPECIES OF MARINE RED-TIDE MICROALGAE

ZHANG Pei-Yu^{1,2} TANG Xue-Xi^{1*} CAI Heng-Jiang¹ YU Juan¹ and YANG Zhen¹

(1 College of Marine Life Science, Ocean University of China, Qingdao 266003, China)

(2 College of Life Science, Qufu Normal University, Qufu, Shandong 273165, China)

Abstract Because destruction of the ozone layer is becoming increasingly more serious, the amount of ultraviolet radiation reaching the earth's surface, esp. UV-B radiation that is harmful to the DNA of organisms, has increased. The increase in UV-B radiation has altered ecological systems on the earth and has emerged as one of the most noticeable forces of global change. Interest on the potential dangers and injuries from enhanced UV radiation on marine organisms (esp. marine plankton) has increased. A lot of work has been done on UV-B radiation effects on marine microalgae at the molecular, cellular, physiological and biochemical levels; however, there are few reports on red-tide microalgae. In this study, the effects of UV-B radiation on the protein and nucleic acid synthesis of three red-tide microalgae species, *Heterosigma akashiwo*, *Alexandrium tamarense* and *Skeletonema costatum*, were investigated to better understand the influence of UV-B radiation on marine ecological systems and the mechanism and occurrence of red tides. The microalgae were cultured in Erlenmeyer flasks with f/2 medium. Salinity of the seawater was $(30.0 \pm 1.0)\text{‰}$ and the initial pH of the culture was (8.0 ± 0.1) . Cultures were grown at $(19 \pm 1)^\circ\text{C}$ under a 12 h:12 h dark-light cycle at an illumination intensity of 3 000 Lx. Ultraviolet B radiation was provided by two UV-B tubes (Philips TL 40 w/12 uv) covered by a film of cellulose acetate (0.12 mm) to remove all radiation below 280 nm. In order to minimize the change of the filter properties of the film, the cellulose acetate was pre-burned for 48 h at a distance of 1 m from two UV-B lamps. Algae were exposed to UV-B radiation treatments of 0, 0.3, 0.6, 0.9, 1.2, 1.5, 1.8, 2.1, 2.4, 2.7, and $3.0 \text{ J}\cdot\text{m}^{-2}$, respectively, for 4 days. All experiments were carried out in triplicate.

The responses of protein and nucleic acid synthesis in *H. akashiwo*, *A. tamarense* and *S. costatum* to UV-B radiation were studied using isotope-tracing methods. The results showed that the order of sensitivity from high to low in three red-tide microalgae to UV-B radiation was *H. akashiwo*, *A. tamarense* and *S.*

costatum. The growth and DNA synthesis of *H. akashiwo* were inhibited. Whereas lower doses of UV-B radiation stimulated the growth and DNA synthesis of *A. tamarense* and *S. costatum*, higher doses had an inhibitory effect. The RNA and protein synthesis in all three species decreased with increased levels of UV-B radiation, but decreases in *H. akashiwo* were greater than in *A. tamarense* and *S. costatum*. Therefore, the sensitivity of RNA and protein synthesis to UV-B radiation enhancement in *H. akashiwo* was higher than that in *A. tamarense* and *S. costatum*.

Key words Marine red-tide microalgae, Protein, Nucleic acid, Synthesis, Ultraviolet B radiation

由于臭氧层侵蚀和破坏的日趋加重,使得到达地面的紫外线,尤其是对生物 DNA 具损伤作用的紫外线 B 波段 (UV-B, 280 ~ 320 nm) 的辐射增强。UV-B 辐射的增强已影响整个地面生态系统的变化,这是最引人注目的全球气候变化现象之一。研究表明:北海海水表面紫外线辐射率的 10% 能够穿透到 6 m 深的水层,而在北冰洋的清澈水域,10% 的表面辐射率可到达 30 m 的水层(李永祺,1999)。因此,整个海洋生态系统和海洋生物(尤其是海洋浮游生物)受紫外线辐射增强影响和伤害的潜在危险性不断增加。浮游植物是海洋生态系统的主要生产者,是海洋食物链的基础。浮游植物一旦受到破坏,势必影响到整个海洋生态系统的稳定性。关于 UV-B 辐射增强对鱼、贝类及高等植物伤害的研究国外已有报道(Adamo, 1997; Caldwell, 1993; Weinstein, 1997)。但是对低等植物——海洋微藻,尤其是赤潮微藻影响的研究国内外较少。本文在前期工作(唐学玺等,2002; 于娟等,2002)的基础上,选择 3 种海洋赤潮微藻,继续探讨 UV-B 辐射增强对海洋赤潮微藻大分子物质合成动态的影响。以期从微观水平阐明海洋生态系统对全球变化的响应提供有价值参考依据。

1 材料和方法

1.1 藻种来源

实验所用的中肋骨条藻(*Skeletonema costatum*)、赤潮异弯藻(*Heterosigma akashiwo*)和亚历山大藻(*Alexandrium tamarense*)取自中国海洋大学微藻培养中心,三者均属赤潮藻种。

1.2 培养方法和条件

培养液采用 f/2 营养盐配方。培养温度(19 ± 1) °C,光照强度 3 000 Lx,光暗周期 12 h:12 h。用于微藻培养的三角瓶预先用 $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的盐酸浸泡 24 h,消毒海水冲洗干净后待用。将处于指数生长期的藻液接种在 100 ml f/2 培养液中,同时设 4 个平行样,3 种藻的处理相同。

1.3 UV-B 辐射体系

采用北京曙光电源厂生产的紫外 B 灯,北京师范大学生产的 UV-B 型紫外辐射强度仪测定辐射强度。紫外 B 灯外用乙酸纤维素薄膜(上海生化试剂公司,厚度为 0.12 mm)包被,以除去 280 nm 的短波辐射。整个体系在正式实验前需连续照射 72 h,以减小薄膜滤过作用的不稳定性。所用薄膜每隔 1 周更换 1 次,防止薄膜的老化。

1.4 UV-B 辐射处理

在辐射强度一定($1.25 \mu\text{W} \cdot \text{cm}^{-2}$)的情况下通过调整辐射时间控制辐射剂量。在预备实验的前提下,设计 0、0.3、0.6、0.9、1.2、1.5、1.8、2.1、2.4、2.7 和 $3.0 \text{ J} \cdot \text{m}^{-2}$ 的辐射剂量,每天以紫外 B 灯取代日光灯管照射处理。处理时间为 4 d。

1.5 放射性同位素标志实验

接种的同时,在培养液中依次加入 ^3H -胸苷(Thymidine)、 ^3H -尿苷(Uridine)和 ^3H -亮氨酸(Leucine)(均为上海原子能研究所产品,比强为 $20 \text{ mci} \cdot \text{ml}^{-1}$),标志浓度为 $10 \text{ mci} \cdot \text{ml}^{-1}$),以 ^3H -胸苷标志 DNA, ^3H -尿苷标志 RNA, ^3H -亮氨酸标志蛋白质。培养 4 d 时取材,用无标志物的培养液漂洗干净。

1.6 核酸和蛋白质的提取及放射性同位素掺入测定

漂洗后的材料,加入 5 ml 纯乙醇研磨,离心沉淀的醇不溶物主要含 DNA、RNA 和蛋白质,4 °C 下用 5 ml 80% 的乙醇和 5 ml、0.2 mol 的过氯酸各洗 2 次。醇不溶物中的 DNA、RNA 用 0.2 mol 的过氯酸在 90 °C 下水解 15 min,残渣再用 0.5 ml、0.2 mol 的过氯酸洗 2 次,合并 3 次过氯酸溶液。蛋白质沉淀物用 1 mol NaOH 在 90 °C 下水解 10 min,并用 0.5 ml、1 mol NaOH 洗 2 次,合并 3 次的 NaOH 溶液。

将 DNA、RNA 和蛋白质的提取液分别用 NaOH 或过氯酸中和后取 0.3 ml 于闪烁瓶中,加入乙二醇甲醚,6 ml PPO-PoPoP 闪烁液(0.5% PPO 和 0.01% PoPoP,二甲苯配置)轻轻摇匀,互溶后测放射性强度。

1.7 细胞密度的计算

培养过程中定时摇动培养物,每天至少摇动 6

次,每隔 2 d 取 1 ml 藻液,用鲁格氏液固定,血球计数板计数并计算细胞密度。每个样品计数 3 次,取其平均值。

2 实验结果

2.1 UV-B 辐射增强对 3 种海洋赤潮微藻生长的影响

从相对增长率的变化上可以看出,3 种海洋赤潮微藻的生长对 UV-B 辐射增强的反应表现出明显的差异性(图 1)。随着 UV-B 辐射剂量的加大,赤潮异弯藻的相对增长率与对照相比下降极显著($p < 0.01$);低剂量的 UV-B 辐射(低于 $0.9 \text{ J}\cdot\text{m}^{-2}$ 和 $1.2 \text{ J}\cdot\text{m}^{-2}$)处理对亚历山大藻和中肋骨条藻生长不但没有抑制作用,反而表现出一定的刺激生长效应,二者的相对增长率均高于对照($p < 0.05$),高剂量的 UV-B 辐射(高于 $0.9 \text{ J}\cdot\text{m}^{-2}$ 和 $1.2 \text{ J}\cdot\text{m}^{-2}$)表现出对亚历山大藻和中肋骨条藻生长的抑制效应。UV-B 辐射增强对赤潮异弯藻、亚历山大藻和中肋骨条藻的 96 h 半抑制剂量见表 1。

图 1 UV-B 辐射处理对 3 种赤潮藻生长的影响
Fig.1 Effects of UV-B radiation treatment on growth of three species of red-tide microalgae

2.2 UV-B 辐射对 3 种海洋赤潮微藻 DNA 合成的影响

UV-B 辐射作用下 3 种海洋赤潮微藻 DNA 合成的变化类似于其相对增长率的变化。即赤潮异弯藻随着 UV-B 辐射的增强,DNA 的合成速度依次下降。亚历山大藻和中肋骨条藻在较低剂量(分别低于 $0.9 \text{ J}\cdot\text{m}^{-2}$ 和 $1.2 \text{ J}\cdot\text{m}^{-2}$)的 UV-B 辐射作用下,DNA 合成

旺盛,合成速度不但没有降低,反而表现出上升趋势;高剂量的 UV-B 辐射(高于 $0.9 \text{ J}\cdot\text{m}^{-2}$ 和 $1.2 \text{ J}\cdot\text{m}^{-2}$)显示出对亚历山大藻和中肋骨条藻 DNA 合成的抑制效应,其 DNA 合成速度均低于对照组($p < 0.05$)(图 2)。

表 1 3 种赤潮藻的 96 h 半抑制剂量
Table 1 96 h EC₅₀ value of three species of red-tide microalgae

藻种 Species	赤潮异弯藻 <i>Heterosigma akashiwo</i>	亚历山大藻 <i>Alexandrium tamarense</i>	中肋骨条藻 <i>Skeletonema costatum</i>
96h EC ₅₀ 值($\text{J}\cdot\text{m}^{-2}$)	1.63	2.34	2.58

图 2 UV-B 辐射对 3 种赤潮微藻 DNA 合成的影响
Fig.2 Effects of UV-B radiation on DNA synthesis of three species of red-tide microalgae
图例同图 1 Legends see Fig.1

2.3 UV-B 辐射对 3 种海洋赤潮微藻 RNA 合成的影响

在 UV-B 辐射作用下,3 种海洋赤潮微藻 RNA 合成速率的变化与其相对增长率和 DNA 的合成速率的变化有所不同(图 3)。首先,在实验所选用的 UV-B 辐射剂量范围内,3 种海洋赤潮微藻 RNA 的合成没有出现加速的现象;其次,在较低剂量(低于 $0.9 \text{ J}\cdot\text{m}^{-2}$)的 UV-B 辐射处理对亚历山大藻和中肋骨条藻的 RNA 合成影响都不明显($p > 0.05$),其合成速度相对稳定,在高剂量(高于 $0.9 \text{ J}\cdot\text{m}^{-2}$)的 UV-B 辐射作用下,两种藻 RNA 的合成明显受到了抑制($p < 0.05$),但是对亚历山大藻的抑制性仍然明显大于对中肋骨条藻的抑制性;第三,赤潮异弯藻 RNA 的合成对 UV-B 辐射处理表现的较为敏感,其合成速率随着 UV-B 辐射剂量的提高逐渐降低($p < 0.05$)。

图3 UV-B 辐射对 3 种赤潮微藻 RNA 合成的影响
Fig.3 Effects of UV-B radiation on RNA synthesis of three species of red-tide microalgae
图例同图 1 Legends see Fig.1

2.4 UV-B 辐射对 3 种海洋赤潮微藻蛋白质合成的影响

总体上,3 种海洋赤潮微藻的蛋白质合成都受到了 UV-B 辐射处理的抑制,但 3 种微藻间的变化表现出一定的差异性。低于 $0.9\text{ J}\cdot\text{m}^{-2}$ 的 UV-B 辐射处理对赤潮异弯藻蛋白质的合成影响不明显,蛋白质的合成速度基本上维持在一个较稳定的水平上,当 UV-B 辐射剂量超过 $0.9\text{ J}\cdot\text{m}^{-2}$ 时,蛋白质的合成速度迅速降低($p < 0.01$)。对于亚历山大藻,低于 $1.2\text{ J}\cdot\text{m}^{-2}$ 的 UV-B 辐射处理对蛋白质的合成影响不明显,随着辐射剂量的继续加大,蛋白质的合成速度逐渐降低($p < 0.05$)。而中肋骨条藻的蛋白质合成速率随着 UV-B 辐射的增强,蛋白质的合成速度始终呈现出平缓下降的趋势(图 4)。

图4 UV-B 辐射对 3 种赤潮微藻蛋白质合成的影响
Fig.4 Effects of UV-B radiation on protein synthesis of species of red-tide microalgae
图例同图 1 Legends see Fig.1

3 讨 论

3.1 环境因子胁迫对海洋微藻生长的促进作用

低剂量的 UV-B 辐射(低于 $0.9\text{ J}\cdot\text{m}^{-2}$ 和 $1.2\text{ J}\cdot\text{m}^{-2}$)处理下,亚历山大藻和中肋骨条藻的生长不但没有受到抑制,反而出现了生长促进现象,其相对增长率高于对照组。类似的现象在其它的工作中也有报道(Beaumont & Newman, 1986),Stebbing(1982)和高尚德等(1994)在研究有机锡对海洋微藻的毒性效应时发现了有机锡对海洋微藻生长的促进作用,唐学玺等(1995, 1998)的工作表明多种有机磷农药在较低浓度时都可引起海洋微藻生长的加快。而赵素达等(2000)发现低浓度的重金属污染对海洋大型藻-石莼(*Ulva pertusa*)的生长、光合作用和呼吸作用都有一定的促进作用。这说明胁迫因子在低浓度或低剂量下对海洋微藻生长的促进作用具有一定的普遍性。Stebbing(1982)在其研究中指出:毒物在低浓度下出现的促生长现象是其在无毒情况下的刺激反应,他把这一现象称作“毒物的兴奋(刺激)效应”。

3.2 3 种海洋微藻对 UV-B 辐射作用的敏感性差异

UV-B 辐射的增强无论是对海洋生态系统还是对陆地生态系统都将产生至今我们还无法估计的生物学效应和生态学效应,因此,通过生物体在不同水平上对 UV-B 辐射增强的响应研究来寻求能够灵敏而有效的指示 UV-B 辐射增强对生物乃至生态系统伤害的生物学指标是目前急需解决的问题。对海洋生物来说,海洋微藻由于其单细胞个体、种类繁多、易于取材和培养以及生活在海水表层等特点,成为指示 UV-B 辐射增强对海洋生物和海洋生态系统伤害的优选生物类群。本文的工作发现,3 种赤潮藻对 UV-B 辐射处理的反应是不同的。在实验所采用的 UV-B 辐射剂量范围内,赤潮异弯藻的生长始终受到了抑制,而亚历山大藻和中肋骨条藻在低剂量的 UV-B 辐射处理下表现出刺激生长的作用,在高剂量的 UV-B 辐射处理下才显示出了抑制作用。从表 1 中 UV-B 辐射处理对 3 种赤潮藻生长的半抑制剂量可以看出,3 种赤潮藻对 UV-B 辐射处理的敏感性存有明显的差异性,赤潮异弯藻最敏感,亚历山大藻次之,中肋骨条藻最不敏感。

对核酸和蛋白质的合成研究同样表明,赤潮异弯藻 DNA、RNA 和蛋白质的合成对 UV-B 辐射增强的敏感性也都大于亚历山大藻和中肋骨条藻。所以相对于亚历山大藻和中肋骨条藻,赤潮异弯藻是指

示 UV-B 辐射增强对海洋微藻伤害程度的优选藻种。

3.3 3 种海洋赤潮微藻的生长与 DNA、RNA 和蛋白质合成的相关性

实验结果(图 1, 图 2)发现, 在 UV-B 辐射作用下, 无论是赤潮异弯藻还是亚历山大藻和中肋骨条藻, 三者相对增长率的变化与其 DNA 合成动态的变化呈现出相似的变化规律性。即低剂量的 UV-B 辐射处理不仅促进亚历山大藻和中肋骨条藻的生长, 而且促进其 DNA 的合成速度。反之, 高剂量的 UV-B 辐射处理不仅表现出对亚历山大藻和中肋骨条藻生长的抑制效应, 同样抑制了二者 DNA 的合成速度。对赤潮异弯藻, 相对增长率和 DNA 的合成速度在整个辐射剂量范围内始终呈现出逐渐下降的趋势。所以比较 RNA 和蛋白质合成的变化(图 3, 图 4)不难发现, DNA 的合成与 3 种海洋赤潮微藻的生长具有密切的相关性, 而 RNA 和蛋白质的合成只是在高剂量的 UV-B 辐射处理下, 才与 3 种海洋赤潮微藻的生长表现出一定的相关性。

参 考 文 献

Adamo DR (1997). Bioaccumulation and biomagnification of polycyclic aromatic hydrocarbons in aquatic organisms. *Marine Chemistry*, 56, 45 – 49.

Beaumont AR, Newman PB (1986). Low levels of tributyltin reduce growth of marine microalgae. *Marine Pollution Bulletin*, 17, 457 – 461.

Caldwell CR (1993). Ultraviolet-induced photodegradation of cucumber microsomal and soluble protein tryptophanyl residues in vitro. *Plant Physiology*, 101, 947 – 953.

Gao SD (高尚德), Wu YP (吴以平), Zhao XY (赵心玉) (1994). The physiological effect of organotin on marine microal-

gae. *Oceanologica et Limnologia Sinica* (海洋与湖沼), 25, 362 – 366. (in Chinese with English abstract)

Li YQ (李永祺) (1999). *The Improvement and Protection of Ecological Environment of Sea Culture* (海洋养殖生态环境的改善与保护). Shandong Science and Technology Press, Ji'nan, 74 – 126. (in Chinese)

Stebbing ARD (1982). Homesis-the stimulation of growth by low levels of inhibitors. *Science of the Total Environment*, 22, 213 – 234.

Tang XX (唐学玺), Huang J (黄健), Wang YL (王艳玲), Wang M (王蒙), Wang LL (王丽丽) (2002). Interaction of UV-B radiation and anthracene on DNA damage of *Haedactylum tricornutum*. *Acta Ecologica Sinica* (生态学报), 22, 375 – 378. (in Chinese with English abstract)

Tang XX (唐学玺), Li YQ (李永祺), Li CY (李春雁), Dong BX (董宝贤) (1995). Biological study of monocrophos toxicity to microalgae III. Monocrophos damage to *Dicrateria* sp. through free-radical. *Marine Science Bulletin* (海洋通报), 14, 29 – 34. (in Chinese with English abstract)

Tang XX (唐学玺), Xu JY (徐家英), Li YQ (李永祺) (1998). Biological study of monocrophos toxicity to microalgae IV. Toxicity effect of parathron on four kinds of marine microalgae. *Marine Environmental Science* (海洋环境科学), 17, 1 – 7. (in Chinese with English abstract)

Weinstein JE (1997). An ultrastructural examination of mode of UV-induced toxic action of fluoranthene in the fathead minnow. *Aquatic Toxicology*, 39, 1 – 22.

Yu J (于娟), Tang XX (唐学玺), Tian JY (田继远) (2002). Joint toxic effects of anthracene and UV-B radiation on *Nitzschia closterlum* and *Platymonas subcordiforming*. *Journal of Fishery Sciences* (中国水产科学), 9, 157 – 160. (in Chinese with English abstract)

Zhao SD (赵素达), Fu CQ (付成秋), Zhu SL (朱松龄) (2000). Effect of cadmium on photosynthesis, chlorophyll concentration and respiration of *Ulva pertusa*. *Journal of Ocean University of Qingdao* (青岛海洋大学学报), 30, 519 – 523. (in Chinese with English abstract)

责任编辑: 张大勇 责任编辑: 刘丽娟