

T-2毒素与硒对酵母生长的影响 及其拮抗作用

唐家骏 芮海凤 张洪勋

(中国科学院生态环境研究中心)

摘 要

通过培养产阮假丝酵母比较RNA与蛋白含量的变化,评价加入培养基中的T-2毒素与硒的细胞毒性和生理活性。试验表明,5ppm T-2毒素明显抑制产阮假丝酵母的生长,1ppm硒对生长的促进作用显著,且可完全拮抗5ppm T-2毒素的毒性。

T-2毒素(T-2 Toxin)是一种可由多种镰刀菌(*Fusarium*)和木霉(*Trichoderma Lignorum*)产生的单端孢菌烯(*Trichothecene*)。联合国粮农组织(FAO)和世界卫生组织(WHO)已将镰刀菌毒素,同黄曲霉素一样列入自然发生的最危险的食品污染物^[1]。人畜误食T-2毒素污染的食物,时常出现急性中毒症状^[2,3]。据Pier报导^[4],在美国玉米中的T-2毒素含量达到2ppm;显然,T-2毒素的食源性致毒值得重视。

T-2毒素的主要作用在于抑制DNA和蛋白质的合成^[5];它抑制多核糖体上蛋白合成的起始^[1]。Fauris^[6]等用离体培养的人体细胞比较RNA合成的速度,以评价水中有害物的细胞毒性。RNA的主要生物化学作用是指导蛋白质的合成。本文旨在以便于培养的真核细胞——酵母为材料,观测其RNA与蛋白合成变化的方法,评价T-2毒素与硒对真核细胞生长的影响,以及硒对T-2毒素细胞毒性的拮抗作用;以期揭示食源性T-2毒素与人体健康的相关性,并为寻求保健措施提供依据。

材料与 方法

1. 产阮假丝酵母 [*Candida utilis* (Henneb.) L. et Kreger V.R.]

系大连Y₂₅₃饲料酵母,由中国科学院微生物所提供。

2. T-2毒素

由中国军事医学科学院六所提供。化学结构式见图1。

3. 硒化Kappa-卡拉胶 (Kappa-sclenocarrageenan)

本室制备,其末端单元结构见图2,含硒量为4000ppm,溶于水。

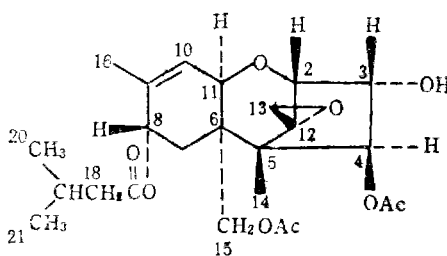


图1 T-2毒素的化学结构式^[1]

Fig.1 Constitutional formula of T-2 Toxin

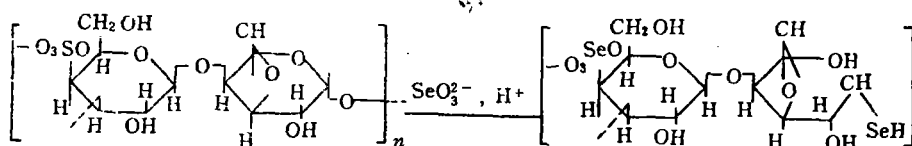


图 2. 硒化Kappa-卡拉胶的末端单元结构

Fig.2 Terminal unit of Kappa-selenocarrageenan

4. 试验方法

试验分 6 组, 50ml 培养基/500ml 三角瓶, 每组 8 瓶, 每瓶接斜面菌体一环。在 28—29℃, 160 转/min 摇床培养 68h 后, 用 $\phi 0.45\mu\text{m}$ 微孔滤膜收集菌体。

试验组培养基组成:

(1) 对照组(合成基础培养基) 蔗糖 100g, 氯化钙 0.1g, 硫酸钠 1.2g, 硫酸镁 0.2g, 磷酸氢二钾 0.5g, 蒸馏水定容至 1000ml 后, 以 1N HCl 调节 pH 至 6.9。

(2) 1ppm 亚硒酸钠硒组 每 100ml 基础培养基中加含硒 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的亚硒酸钠液 1ml, 以 1N NaOH 调节 pH 至 6.88。

(3) 1ppm 硒化 Kappa-卡拉胶硒组 每 100ml 基础培养基中加含硒 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的 硒化 Kappa-卡拉胶 1ml, 以 1N NaOH 调节 pH 至 6.9。

(4) 5ppm T-2 毒素组 取定量 T-2 毒素丙酮液于无菌的三角瓶内, 待丙酮挥发后加入已灭菌的基础培养基(灭菌前, 用 1N HCl 调节 pH 至 6.9)。

(5) 5ppm T-2 毒素, 加 1ppm 亚硒酸钠硒组。

(6) 5ppm T-2 毒素, 加 1ppm 硒化 Kappa-卡拉胶硒组。

5. RNA 含量测定^[7]

(1) 过氯酸-钼酸铵沉淀剂 0.25% $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} + 2.5\% \text{HClO}_4$, 0.25g 钼酸铵溶于 96.4ml 蒸馏水后加 3.6ml 70% HClO_4 。

(2) 操作 取湿菌体 1g 加 10% NaCl 15ml, 摇匀, 沸水浴 1h, 冷却后, 3500 转/min 离心 20min, 沉淀留待测定蛋白。上清液冷却至 10℃ 后, 以 6N HCl 调节 pH 至 1.8, 于 4℃ 中放置 15min, 再以 3500 转/min 离心 20min, 沉淀即 RNA。而后以氨液调节 pH 至 7.0 的蒸馏水 10ml 溶解沉淀。甲管加以上溶液 2ml, 蒸馏水 2ml; 乙管加以上溶液 2ml, 过氯酸-钼酸铵沉淀剂 2ml。摇匀后, 于 4℃ 放置 15min, 3500 转/min 离心 10min。取上清液 1ml, 定容至 50ml。以蒸馏水作空白测定 OD_{260} 值。乙管空白系 2ml 高氯酸-钼酸铵沉淀剂, 2ml 蒸馏水摇匀后取 1ml 稀释至 50ml 的 OD_{260} 值。

(3) 计算 $\text{RNA}(\mu\text{g}) = \frac{\text{甲管OD}_{260} - \text{乙管OD}_{260}}{0.022} \times \text{样品总毫升数} \times \text{稀释倍数}。$

6. 蛋白含量测定^[8]

(1) pH8.6 Tris-HCl 缓冲液 50ml 0.1M 三羟甲基氨基甲烷, 与 12.4ml 0.1N HCl 混匀后, 蒸馏水稀释至 100ml。

(2) 操作 在提取 RNA 所得的沉淀中, 加 10ml pH8.6 的 Tris-HCl 缓冲液(内含 10% 甘油、20mM $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), 搅拌提取 2h 后, 3500 转/min 离心 15min, 清液按

600mg/ml量加入硫酸铵,溶解后3500转/min离心15min. 上清液对蒸馏水透析 4h, 以除去硫酸铵. 透析后的蛋白溶液及离心所得沉淀, 以0.1M硫酸钾溶液定容至100ml (0.1M硫酸钾液内含 5 mM KH_2PO_4 , 以KOH调节pH至7.0).

以0.1M硫酸钾液调零, 测 OD_{280} , OD_{205} .

(3) 计算 样品蛋白的绝对量 (mg/ml) = $A_{205} / [27 + 120(A_{280}/A_{207})]$

结 果 与 讨 论

1. 试验结果列于表1. 由表1可见, 与对照组相比, 在正常培养基中加入 5 ppm含量的T-2毒素后, 就明显地抑制了产朊假丝酵母的生长, 每毫升培养液中的平均菌体量(湿重)降低13%, 菌体RNA降低20%, 菌体蛋白降低45%, 而在正常培养基中加入

表 1 T-2毒素与硒对酵母生长的影响

Table 1 The Effects of T-2 Toxin and Selenium on Growth of Yeast

试 验 组	菌体湿重		RNA含量		蛋白含量	
	mg/ml培养液	相对%	mg/ml培养液	相对%	mg/ml培养液	相对%
对照组 (正常培养基)	21	100	0.025	100	0.040	100
1ppm亚硒酸钠组	22	107	0.037	148	0.048	120
1ppm硒化Kappa-卡拉胶组	27	131	0.041	164	0.066	165
5ppm T-2毒素组	18	87	0.020	80	0.022	55
1ppm亚硒酸钠, 5ppm T-2毒素组	24	115	0.032	128	0.046	115
1ppm硒化Kappa-卡拉胶, 5ppm T-2毒素组	24	115	0.066	264	0.057	143

1 ppm含量的硒后, 对产朊假丝酵母生长的促进作用显著, 按每毫升培养液中的平均重量计, 加入亚硒酸钠硒与硒化Kappa-卡拉胶硒后, 菌体量(湿重)分别增加7%和31%, 菌体RNA分别增加48%和64%, 菌体蛋白量亚硒酸钠硒组提高20%, 而硒化Kappa-卡拉胶硒组增加了65%. 在正常培养基中一并加入 5 ppm含量的T-2毒素和 1 ppm含量的硒时, 加入亚酸钠硒与硒化Kappa-卡拉胶硒后菌体量(湿重)也分别增加 15%, 菌体RNA分别增加28%和164%, 菌体蛋白量分别提高15%和43%.

2. 试验结果还表明, 在正常培养基中加入 1 ppm含量的硒不仅对产朊假丝酵母生长的促进作用明显, 还可以完全拮抗培养基中 5 ppm含量的 T-2 毒素对产朊假丝酵母生长的抑制作用, 同时还揭示有机硒化物硒化Kappa-卡拉胶硒, 较之无机硒化物亚硒酸钠硒具有更好的效果.

3. 在培养基中加入T-2毒素与硒化物, 观测其对产朊假丝酵母RNA和蛋白合成的影响, 可以评价T-2毒素与硒的细胞毒性或细胞生理活性. 试验所得结果, 与Cole^[1]报导的 T-2 毒素抑制多核糖体上蛋白合成的起始步, 以及我们^[9]用小鼠试验表明的硒化Kappa-卡拉胶可明显提高血红蛋白含量, 且其生理效应优于亚硒酸钠的结果, 完全一致. 本方法在细胞毒理和生理活性评价中, 有其一定的应用价值.

参 考 文 献

- [1] Richard J C et al., 1981. Handbook of Toxic Fungal Metabolites. Academic Press, New York, 185—188
- [2] 王志, 1986. 畜禽主要的致病性真菌毒素. 动物毒物学, 1(1): 12—17
- [3] Irving L et al., 1978. The role of T-2 toxin in experimental alimentary toxic aleukia: A toxicity study in cats. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 43: 111—124
- [4] Allan C P, 1982. *Mycotoxins and Animal Health*, 25: 185—207
- [5] 董钟云等, 1987. 巨噬细胞细胞毒功能的调变, 4. 霉菌毒素T-2对M ϕ 活化过程的影响. 中华微生物学和免疫学杂志, 7(4): 246—249
- [6] Christine F, 1985. Rapidity of RNA Synthesis in human cells-A highly sensitive parameter for water cytotoxicity evaluation. *Water Research*, 19(6): 677—684
- [7] 朱俭等, 1981. 生物化学实验. 上海科技出版社, 149—153
- [8] Seops R K, 1974. Measurement of protein by spectrophotometry at 205nm. *Analytical Biochemistry*, 59: 277—282
- [9] 唐家骏等, 1985. 硒化Kappa-卡拉胶的抗辐射效应. 环境化学, 专辑, 153—155

1988年8月29日收到。

EFFECTS OF T-2 TOXIN AND SELENIUM ON THE GROWTH OF YEAST AND IT'S ANTAGONISM

Tang JiaJun Rui Haifun Zhang Hongxun

(Research Center for Eco-Environmental Sciences, Academia Sinica)

ABSTRACT

The changes of RNA and protein synthesis by cultures of *Candida utilis* (Henneb.) L. et Kreger V.R., resulting in the evaluation of the cell toxicities and physiological activities of T-2 toxin and selenium added in the culture were compared. Our experimental findings indicate the striking growing failure in the yeast receiving 5 ppm T-2 toxin, and the growth to be accelerated markedly and the toxicities of 5 ppm T-2 toxin to be antagonized completely in the yeast receiving 1ppm selenium.