

海洋生物发光的比較生化

ADVANCES IN COMPARATIVE BIOCHEMISTRY OF MARINE BIOLUMINESCENCE

薛廷耀

T. Y. HSUEH

(山东海洋学院;中国科学院海洋研究所)

(Shantung College of Oceanology; Institute of Oceanology, Academia Sinica)

在海洋中,普遍存在着能够发光的生物,从細菌、双鞭藻、原生动物到多細胞的无脊椎动物和脊椎动物,在主要的动植物及微生物的类羣中,有着种类繁多的发光生物^[1,31]。

这些发光生物所发出的光,全部是在人类视觉范围之內的,有时足以使波浪的波峯,船只的尾流或受到机械激动的桨和海水,显出亮光。这种发光現象,是海洋生物学領域中具有代表性的問題之一,在国防上和生產上有一定的重要性。已引起了形态学、生态学、微生物学、生理学和生物化学等方面的工作者的密切重視,并进行了許多深入細致的研究工作^[2,11,13,15,19,24]。

按种类来說,具有发光能力的生物典型代表,約占25个动物門的一半,并占植物界的一大类(細菌和真菌)^[13]。虽然,生物发光現象并不完全局限于海中,但在海里,发光生物的数量却比其他地域多得多^[13,31]。

生物发光是化学发光的一种类型。由于发光生物体仅能产生微小热量,因而生物性光亦可称之为“冷光”。按发光的特殊性质来說,生物发光大致可分为三种类型:(1)細胞內发光,例如巨口魚亞目和灯笼魚亞目的深海魚,它們发的光是从埋在皮肤中的許多本体发光胞发出的;(2)細胞外发光,例如海螢(*Cypridina*),当它被干扰时,其口部腺体所含的发光分泌物,即被挤至海水中而发光;(3)細菌发光,例如光天竺鯛科、尾鱈科等魚类,它們发的光是来自共栖的細菌所发出的光。

关于生物发光的早期研究以及发光动物的发光器官、組織和生理,主要总结在 Harvey 的《生物发光》专著^[11]及其在1957年所写的专論中^[12]。生物发光的生物化学,特别是細菌的化学发光以

及螢和海螢发光的比較生化^[13,19],最近有了显著的进展。Johnson 氏等对发光反应动力学的研究,尤为突出^[15]。本文主要报导最近一、二年来我們对发光細菌的初步試驗研究工作,結合前人有关生物发光重要的研究成果,闡发几种具有代表性的海洋微生物和海洋动植物的发光生化机理。为了叙述方便起見,本文課題是按生物的种类安排的。

一、发光生物在生物界的分布

尽管具有发光能力的生物典型代表,約占动物 25 个門类的一半,并占植物界的一大类(細菌和真菌),而在許多生物学及生物化学的教科书中,論及生物发光的課題却很罕見。一种新发现的动物能发光,但并不能确定它是自身发光;另一种情况是,个体被发光細菌感染,由于組織被寄生的微生物入侵,最后导致宿主的死亡。在某些类羣中,毫无疑问,共栖的发光細菌是生物发光的原因。这些发光細菌經常生活在非常特殊的发光器中,其中有投射光綫的特殊构造,或者有一个构造粗糙而透明类似透鏡的組織块,以調节光綫,有时甚至是受神經調节的。象这样蘊藏着共栖发光細菌的发光器,經常出現于許多动物的个体,在光天竺鯛科、尾鱈科、奇魚科等的魚类中,尤为常見^[12]。

根据现有的知識,現將自身发光的生物类羣列于表 1,表中附有經過詳細研究的典型代表属;习性——海洋的(以 M 表示之),淡水的(F),陆地的(T);发光类型——細胞內的(I)或細胞外的(E);发光时是否需要氧;螢光素-螢光素酶反应是否容易表証;以及三磷酸腺苷(ATP)在发光系統中是否是必需的。除表 1 所示者外,某些类羣的

表 1 附有典型代表属的发光生物^[18]

Table I. Luminous Groups with Representative Genera

生物类群及典型发光属 Group and Typical Luminous Genera	习性 (Habitat)	光的类型 (Type of light)	发光时是否需要氧 (Oxygen necessary)	荧光素与荧光素酶反应 (Luciferin-luciferase reaction)	ATP反应 (ATP reaction)
Bacteria (<i>Photobacterium</i> , <i>Achromobacter</i> , <i>Vibrio</i>) 细菌 发光细菌属 无色杆菌属 弧菌属	M ¹	I	+	+	-
Fungi Basidiomycetes (<i>Panus</i> , <i>Omphalia</i> , <i>Pleurotus</i>) 担子菌纲真菌 革耳属 卷边菇属 北风菌属	T	I	+	-	-
Radiolaria (<i>Thalassicola</i> , <i>Sphaerozoum</i> , <i>Collozoum</i>) 放射虫 无骨虫属 团水藻属	M	I	-	-	-
Dinoflagellata (<i>Noctiluca</i> , <i>Gonyaulax</i> , <i>Ceratium</i>) 双鞭藻 夜光藻属 旋沟藻属 角藻属	M	I	+	-?	-
Porifera (<i>Grantia</i>) 多孔动物 毛壶属	M	I?		-	
Hydroidea 水螅					
Hydroids (<i>Campanularia</i> , <i>Obelia</i> , <i>Aglaophenia</i>) 螅体 钟螅属 数枝螅属 羽螅属	M	I?		-	-
Hydromedusae (<i>Aequorea</i> , <i>Halistaura</i>) 水螅水母 多管水母属	M	I?	-	-	-
Siphonophora (<i>Diphyes</i> , <i>Hippopodius</i> , <i>Agalma</i>) 管水母 双生水母属	M	I?			
Scyphomedusae (<i>Pelagia</i>) 钵水母 游水母属	M	E?	-	-	--
Pennatulacea (<i>Cavernularia</i> , <i>Pennatula</i> , <i>Renilla</i>) 海鳃 海仙水掌属 海鳃属	M	I	+	-	+-
Gorgonacea (<i>Ceratoisis</i> , <i>Primnoisis</i>) 柳珊瑚 木贼珊瑚属	M	?			
Ctenophora (<i>Mnemiopsis</i> , <i>Beroë</i> , <i>Pleurobranchia</i>) 栉水母 瓜水母属 侧腕水母属	M	I	-	-	-
Nemertinae (<i>Emplectonema</i>) 纽形动物	M	I			
Polycheata 多毛类					
Polynoinae (<i>Acholoë</i> , <i>Polynaë</i> , <i>Harmothoë</i>) 多鳞沙蚕属	M	I	+	-	
Alciopidae (<i>Calizonella</i> , <i>Corybocephalus</i>) 浮蚕科	M				
Tomopteridae (<i>Tomopteris</i>)	M	I?		-	
Syllidae (<i>Odontosyllis</i>) 裂虫科	M	E		+	
Eunicidae (<i>Onuphis</i>) 磷沙蚕科	M	I			
Chaetopteridae (<i>Chaetopterus</i>) 磷沙蚕科 磷沙蚕属	M	E	+	-	-

表 1 (續)

生物类羣及典型发光属 Group and Typical Luminous Genera	习性 (Habitat)	光的类型 (Type of light)	发光时是否需要氧 (oxygen necessary)	萤光素与萤光素酶反应 (Luciferin-luciferase reaction)	ATP反应 (ATP reaction)
Cirratulidae (<i>Cirratulus</i> , <i>Heterocirrus</i>)	M	E			
Terebellidae (<i>Thelepus</i> , <i>Polycirrus</i>) 蛭龙介科	M	E	+	-	
Oligochaeta (<i>Microcolex</i> , <i>Eisenia</i> , <i>Pontodrilus</i> , <i>Octochaetus</i>) 寡毛类 泮蚯蚓属	T	E	+	+ -	-
Nudibranchia (<i>Plocamopherus</i> , <i>Phyllithoë</i>) 裸鳃类 叶海中属	M	E?		-	-
Pulmonata 有肺目					
Ariophantidae (<i>Dyakia</i>)	T	I			
Latiidae (<i>Latia</i>) 淡水蛭貝属	F	E		+	
Prosobranchia (<i>Planaxis</i>) 前鳃类	M	I		-	-
Bivalvia (<i>Pholas</i> , <i>Rocellaria</i>) 海笋属	M	E	+	+	-
Vampyromorpha (<i>Vampyroteuthis</i>)	M	I			
Decapod squid 十足烏鰂					
Oegopsida (<i>Watasenia</i> , <i>Lycoteuthis</i>) 螢烏鰂属	M	I	+	-	-
Myopsida (<i>Heteroteuthis</i> , <i>Stoloteuthis</i>)	M	E	+	-	-
Ostracoda (<i>Cypridina</i> , <i>Pyrocypris</i> , <i>Conchoecia</i>) 个形亚綱 海螢属	M	E	+	+	-
Copepoda (<i>Pleuromma</i> , <i>Leuckartia</i> , <i>Heterochaeta</i>) 橈足类	M	E	+	-	
Amphipoda 片脚类					
Hyperidea (<i>Scypholanceola</i> , <i>Streetsia</i>) 蛾科	M	I?			
Mysidacea (<i>Gnathopausia</i> , <i>Mysis</i> , <i>Siriella</i>) 糠虾类 糠虾属 节糠虾属	M	E			
Schizopoda (<i>Nyctiphanes</i> , <i>Euphausia</i>) 裂脚类 磷虾属	M	I		-	
Decapoda shrimp 十足虾					
(<i>Sergestes</i> , <i>Hoplophorus</i>) 櫻虾属	M	I		-	-
(<i>Systellaspis</i> , <i>Plesiopenaeus</i> , <i>Heterocarpus</i>)	M	E		+	-
Diplopoda (<i>Luminodesmus</i> , <i>Spirobolellus</i>) 倍足亚綱	T	I	+	-	-

表 1 (續)

生物类羣及典型发光属 Group and Typical Luminous Genera	习 性 (Habitat)	光 的 类 型 (Type of light)	发 光 时 是 否 需 要 氧 (oxygen necessary)	萤 光 素 与 萤 光 素 酶 反 应 (Luciferin-luciferase reaction)	ATP 反 应 (ATP reaction)
Chilopoda (<i>Stigmatogaster, Orya, Geophilus</i>) 唇足亚綱	T	F	+	-	
Collembola (<i>Neanura, Onychiurus</i>)	T	I			
Hemiptera (<i>Fulgora</i>) 半翅类	T	?			
Diptera (<i>Ceroplatus, Platyura, Arachnocampa</i>) 双翅类	T	I		-	-
Coleoptera 甲虫类					
Lampyridae (<i>Photinus, Photuris, Luciola</i>) 萤火虫属	TF	I	+	+	+
Phengodidae (<i>Phengodes</i>)	T	I	+		-
Rhagophthalmidae (<i>Diopstoma</i>)	T	I			
Drilidae (<i>Diplocladon</i>)	T	I			
Drilidae (<i>Phrixothrix</i>)	T	I	+	-	-
Elateridae (<i>Pyrophorus</i>)	T	I	+	+	+
Ophiuroidea (<i>Amphiura, Ophioscolex, Ophiopsila</i>) 阳遂足类 阳遂足属	M	I	+	-	
Enteropneusta (<i>Ptychodera, Balanoglossus</i>) 腸鳃目 柱头虫属	M	E	+	-	-
Tunicata (<i>Pyrosoma, Appendicularia Sulpa</i>) 火体虫属 細鳃樽属	M	I		-	-
Elasmobranchii (<i>Etmopterus, Luemargus</i>) 板鳃类	M	I			
Teleostomi 硬骨鱼类					
Batrachoididae (<i>Porichthys</i>)	M	I			
Stomiatoidea (<i>Echiostoma, Gonostoma, Maurolicus, Polyipnus, Argyropelecus, Chauliodus</i>)	M	I		-	-
Myctophoidea (<i>Myctophum, Diaphus, Lampadena, Neoscopelus</i>)	M	I		-	-

M = marine
F = fresh water
T = terrestrial

I = intracellular
E = extracellular

动物对光的感应是极为敏锐，照光反而抑制它的发光(如栉水母 *Ctenophores*)，而某些藻类有昼夜节奏的发光现象，甚至把它放在暗室，在白天也永

远不发光[如双鞭藻中的旋沟藻(*Gonyaulax*)]^[13]。

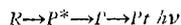
从表 1 可以看出：(1) 发光生物在动植物界的主要类羣中是普遍存在的。特别是在真菌門、

菌藻綱,原生动动物門,腔腸动物門,环节动物門,軟体动物門,节肢动物門,棘皮动物門,脊索动物門和脊椎动物門,而且它們絕大多数栖息在海洋中,因此,生物发光的研究是海洋生物学領域中具有代表性的問題之一;(2)螢光素-螢光素酶反应,除出現在細菌、海螢和发光甲虫的发光反应中外,还在4—5个其他类羣的生物当中出現,它們是:某些深海十足虾类(*Systellaspis*——这种动物射出丰富的分泌物至周围生活环境的海水中),裂虫(*Syllid worm*),淡水蠅(一种貝类 *latia*),双壳貝——海笋^[13];(3)发光甲虫是唯一在发光反应中需要ATP者,其他种类生物是否也需要,有待人們今后进一步研究,才能作出肯定的答案。真菌,培足亚綱(*diplopod myriopod*)的动物,櫛水母类,*Luminodesmus*等,甚至以近代方法,仍未能萃取其发光物質。由此可見,生物发光的生物化学,除細菌、螢及海螢发光的比較生化最近有了显著的进展外,而海笋和双鞭藻的发光机制的研究,正在开展中,其它类羣的生物发光机理生物化学的研究,截至目前为止可以說空自点。

关于海水的发光現象,有些科学家^[31]認為是由于生活在海里的微生物,特别是某些双鞭藻如角藻(*Ceratium*)夜光虫(*Noctiluca*)或旋沟藻(*Gonyaulax*)所造成的;其他較大的动物如水母、橈足类、磷虾、环节动物等也能发出較大、較亮的閃光。根据我們的調查資料,我們認為双鞭藻是海水发光的主要作用者,而海洋发光細菌,也是造成海水发光現象的生物組成之一。

二、发光的生物化学

生物发光的特殊性質主要是:反应在活的有机体内或在活的有机体所分泌的发光分泌物中进行的。生物发光是一种化学发光;光是在放热的反应中放出的。这种生化反应的能量激发螢光素中的若干分子,而这些分子中的电子被升迁至一較高的能量水平,当这些受激发的分子再度恢复到低能量水平时,光子(*photon*)即放出。上述可写成:



*R*代表反应物,*P**是电子在受激发的情况,*P*表示基本状况,*hν*表示量子。化学反应所产生的光强度或輻射流就是每秒射出的光子数目。

Dubois^[9]早期以螢光素(*luciferin*)这一名詞命名一种遇热稳定能透析的物质,这种物质在一

遇热不稳定的酶——螢光素酶存在的情况下,前者即被氧化而发光。螢光素-螢光素酶反应被認為是生物发光最基本的反应。这些物质已在細菌、海螢等生物体内被找到。最近十多年来,生物发光所必需的主要輔助物质也繼續在某些生物中被发现,其中重要之一是在螢火虫发现的三磷酸腺苷(ATP)。

在多数情况下可以这样說,溶解氧为生物发光所必需。但也有例外,如:无骨虫属(*Thalassicola*)的放射虫,游水母属(*Pelagia*)和瓜水母属(*Beroë*)的水母,在含有氢和鉛石棉的培培养基中也能发光^[13]。这可能是因为这些生物的发光物质早与氧結合成复合物,不易分开,但它却能被螢光素酶活化而发光。

一般情况下,一种生物的螢光素酶只能催化彼此亲緣关系密切(即属于同一科或同一属的生物)的螢光素发光。由此看来,亲緣关系不密切的动物的螢光素是不相同的。各种动物所发出的光在顏色和光譜位置上也不相同,这表明它們的发光物質的化学性質也不相同^[15]。各种生物的发光系統可能也不相同。可是,也发现某些动物是例外,例如一种天竺鯛属的魚——天竺鯛(*Apogon marginatus*),它有螢光素-螢光素酶反应,这种魚的萃取物能与海螢的螢光素酶起一种正的交叉反应^[10]。

尽管有某些发光海藻和发光高等植物的报导,但在植物界肯定能发光的只有細菌和真菌。海藻的光是由于在海藻表面上生长的水螅羣体所造成的^[13]。活的被子植物叶体的光,經常是由于叶体上生长着一种卷边菇真菌(*Omphalia flavida*)所引起的^[29]。某些担子菌綱真菌,它的菌絲体或子实体能发光或者二者都能发光。企图获得担子菌的无細胞发光提取液,但迄今尚未看到成功的报导。

除个别外,真菌和細菌的发光与动物发光最重要的区别是,动物只在刺激后才发光,而細菌和真菌的光是連續的、稳定的、强度均匀的,仅随温度或营养供应等条件而改变。細菌和真菌不受刺激而发光。許多科学家企图以提取細菌发光物质的方法提取真菌的发光素,但未成功。

由此看来,真菌的发光基础物质与細菌发光素的組成有所不同。双鞭藻的某些种,虽属于植物界但显然有不同的发光特性。例如旋沟藻,沒有光和光合作用就不能生存,从这些特征来看,它

好象是植物,然而它只是在刺激后才发光,从这一角度来看,它显示出具有动物的发光特征。有些动物的光(如萤火虫的卵和蛹以及雌性 *phengodes* 发的光),不是由于细菌活动所引起的,而是一种稳定的光,它们的发光胞不受刺激即能发光^[13]。

1. 细菌

Harvey 在表 1 中列出发光细菌隶属的三个属,即发光细菌属 (*Photobacterium*)、无色杆菌属 (*Achromobacter*)、弧菌属 (*Vibrio*)。根据国际通用的 Bergy's 细菌鉴定手册最新版本^[3]所示,发光细菌隶属于裂殖菌纲的一个属即发光细菌属。这一属有四种,即产光杆菌 (*Photobacterium phosphoreum*)、皮氏发光杆菌 (*P. picrantonii*) 费氏发光杆菌 (*P. fischeri*) 和哈维氏发光杆菌 (*P. harveyi*)。最近一、二年来,我们从发光的海水、鱼类和乌贼的体表面分离出来的菌种,只有前者三种,没有找到哈维氏发光杆菌^[1]。

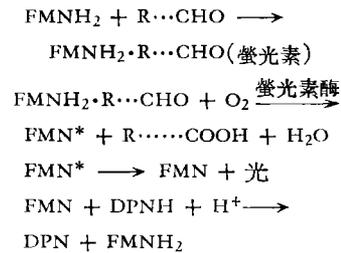
多年来未能证实的发光细菌的荧光素-荧光素酶反应,自从有了在细胞呼吸极为重要的、纯粹的、生物的化合物,如还原型二磷酸吡啶核苷酸 (DPNH) 和黄素核苷酸 (FMN),创造了灵敏的测光仪器,系统研究这些化合物对细菌萃取液的作用以后,从而明确了细菌发光所涉及的几个因子。人们早已熟悉,快速干燥的发光细菌当再被潮湿时又能瞬息发光,因而许多科学工作者认为荧光素及荧光素酶必定在发光细菌中存在。

从无菌的发光细菌萃取液,研究影响发光的复杂因子的一系列过程^[8,19,22,27,30],得知细菌的发光系统主要包括:二氢黄素核苷酸 (FMNH₂),荧光素酶,一长链醛 (CH₃...CHO) 及氧。无菌萃取液的发光已于 1953 年被 Strehler 所证实^[27],用丙酮提取的发光细菌干粉末,加上发光菌的冰水萃取液,也能使之在体外发光。从一系列的实验结果,使人们认为细菌的荧光素可能就是二氢黄素核苷酸 (dihydroflavin mononucleotide, FMNH₂) 的醛复合物,这种醛是含 6 碳的长链化合物。参与细菌体外发光,除酶类来自活细胞外,其它的有机化合物都能用人工合成了^[28,30]。

自从发光细菌的荧光素被认为可能就是二氢黄素核苷酸醛复合物之后,细菌的荧光素酶的结构问题即成为学者探索的课题。McElroy 及其合作者^[19,22],进行了提纯的工作,用水裂解费氏杆菌 (*Achromobacter fischeri*) 得一溶液,溶液中的残渣用离心法除去,溶液用 HCl 调整至 pH 4.5 出现

沉淀,所得的有效沉淀物用水再溶解之。在 5°C 用 (NH₄)₂SO₄ 分提,又得一有效沉淀物。这种沉淀物是无色的,在低温的蒸馏水中耐透析。用 (NH₄)₂SO₄ 重复分提。通过超离心法,测出其分子量约为 85,000。这种物质在 pH 7.6 的电泳活动中,含有三种稍有不同的化合物。细菌荧光素酶系的最适 pH 值为 6.7。根据学者们的^[21,32]报导:细菌荧光素酶是 FMN 型的一种黄素蛋白质。

在分子态氧存在的情况下,二氢黄素核苷酸 (FMNH₂)-醛复合物,在水中与用冷水提取的发光菌荧光素酶相遇时,即发出闪光。在这一化学发光过程中,FMNH₂ 先与醛结合成一复合物(荧光素),通过荧光素酶的催化作用,被 O₂ 氧化成黄素核苷酸 (FMN) 而发光。黄素核苷酸被还原型二磷酸吡啶核苷酸 (DPNH) 还原成 FMNH₂ 后,继续再发光。在适宜环境下,发光菌能稳定不断地发光,上述反应可写成:



II. 双鞭藻 (Dinoflagellates)

由于用培养基大量培植海洋双鞭藻的方法已日臻完善,因此就有可能在此阐述双鞭藻无细胞提取液的某些化学特性。Hastings 和 Sweeney^[14]报导,从旋沟藻 (*Gonyaulax polyhedra*) 提取发光物质的方法。这种旋沟藻含有叶绿素,并能不断照光的情况下,长期生存。这种小海藻呈日夜节奏的发光现象(经过刺激),在缺乏光合作用食物而死亡之前,它能在不断地处于暗淡光情况下至少维持生存 14 天,在暗室也能活几天。在强光环境下,就是刺激也几乎不发光,甚至在相当于夜间的情况也是这样。

Hastings 氏^[14]发现:从半夜采得标本制成的粗提取液,其光度比从中午采得的标本制成的大 5—15 倍。另一方面,在夜间活动的双鞭藻,其亮度比放置于黑暗处的白天标本大 40—60 倍。

粗提取物是用下列方法制备的:将培养物倒入 Buchner 玻璃漏斗,用漏斗上的滤纸收集双鞭藻,用蒸馏水洗滌去掉盐类,再将滤纸上的过滤物

投入-25°C的丙酮中。用过滤与蒸发等方法去掉丙酮。将水加入这种“丙酮粉末”时即显微光，而加入1.2M盐溶液即呈亮光。粗制品与精制品的最大照射强度出现在：478m μ ，最适温度为24°C，最适pH为6.6，氧为发光所必需，但经过一段缺氧期后再通入空气，即不能再发光。粗提取物中的萤光素酶已用(NH₄)₂SO₄分提得半纯品，大部分有效物质是在硫酸铵达30—60%饱和时沉下(沉淀最多时是在40—50%)。用水溶解沉淀，所得溶液与沸水提取的旋沟藻粗提取液相混合时即发光。后一因子(即沸水的提取液)可称之为“萤光素”。企图用各种溶剂(乙醇、醋酸乙酯等)从这种丙酮粉末中提取萤光素，但尚未成功。“萤光素”透析缓慢，使用透析方法分出纯品的希望不大。加入在其他发光系统中有效的辅助因子(如ATP, DPNH, 黄素等)到发光的旋沟藻提取液中去，未发现活性物质。因此，关于这种萤光素的化学特性可以说的就不多了。

虽然，从以上事实来看，双鞭藻的萤光素一定是存在着，但必须注意，当将冷水萃取的旋沟藻粗提取液，加至同一藻类而用沸水提取后冷却的粗提取液时，并不能使熄灭的发光现象重发光。只有使用经过(NH₄)₂SO₄提纯的萤光素酶沉淀，才能使沸水萃取的旋沟藻提取液恢复发光，这可能是由于在粗制的冷水萃取的提取液中存在着一种抑制物，但这种抑制物可用纯化方法除去之。

III. 海萤(Cypridina)

海萤(*Cypridina hilgendorfi*)口部近旁有一腺体，内含发光分泌物，当动物受干扰时，由于肌肉收缩即将发光分泌物挤入海水中而发光。自从Harvey早期表证了海萤的萤光素和萤光素酶^[11]以来，许多的研究工作都针对着这两种物质的纯化和化学特性方面。遇热不稳定的部分(萤光素酶)具有酶的组成特征，它催化遇热稳定部分(萤光素)，并使之发光。在含氧的水中，只有萤光素和萤光素酶在发光反应中是必需的。活海萤的萤光素含量为2.5—4.0Mg%，含量随季节而改变^[20]。

用乙醇提取，再用氯化苯甲酰(benzoylation)处理，即能获得较纯的海萤萤光素。这种萤光素经纸层析及电泳再提纯后，分析表明它含有氮^[7]；用钼蓝反应(molybdenum blue)试出，在两环的萤光素中不含磷；用anthrone试法测出它不含糖。总之，萤光素所含的重要元素有C、H、O及N。截至现时为止，尚未发现它含有硫^[13]。

Mason^[17]，Mason和Davis^[18]首先应用近代仪器分析及生化实验法，如红外分光术、层析及酸水解等方法，进行海萤萤光素的纯化及其结构的探索，红外分光术是用干的二环萤光素薄膜进行的，结果表明强的吸收光带是分别在3,250, 2,825, 1,680, 1,625及1,510厘米⁻¹处，这表明海萤萤光素有酰胺键。纸层析的萤光素加水分解后，得一黄色素及8种氨基酸。Mason^[17]认为海萤萤光素是具有环状性质的多色肽。萤光素的多肽结构，若列入天然有机物如抗菌素、酪菌肽(gramicidin)和多粘菌肽(Polymycin)的范畴，两者对比，前者的多肽结构多一黄色基。海萤萤光素和酪菌素的溶解度及紫光吸收光谱彼此也不相同。

Tsuiji, Chase和Harvey^[33]的纸层析及纤维素层析的研究表明，经过以Anderson氏的氯化苯甲酰法(benzoylation)处理的海萤萤光素，仍含有杂质，大部分杂质可用层析法除去，纯制品用Moore和Stein的方法水解后分析，其氨基酸含量顺序如下：苯丙氨酸，精氨酸，异亮氨酸，甘氨酸，亮氨酸，缬氨酸，少量的天冬氨酸，苏氨酸，谷氨酸及蛋氨酸。此外，还有相当数量的氨。

用各种不同方法制备的“层析纯”萤光素，氨基酸含量略有不同，而吸收光谱亦稍有不同。萤光素的性质呈现与一系列氨基酸相结合的黄色基羧，形成环状多色肽^[17]。氨基酸不同，可能产生一系列不同的海萤萤光素，这些萤光素在萤光素酶存在的情况下，均能发光。多肽结构的功用可能是，使萤光素容易与萤光素酶相结合。

通过纸电泳实验表明，在pH值2.5、4及5.8，萤光素带正电荷，具有阳离子的作用。由于这种物质容易迅速被氧化，更碱数值，尚付缺如，截至现时为止，尚未测出等电点。

根据Shimomura等人最近的工作报告^[26]，海萤萤光素晶体为橙色针状，在182—195°C融化(172°C变黑)，易溶于甲醇及乙醇，不易溶于水及丙酮，不溶于乙醚及苯。苯骈环三酮戊烷(ninhydrin)试验负反应。没有磷和硫的成分。简单分子式为C₂₁H₂₆₋₂₈O₂N₆·2HCl。

为时过早揣测海萤萤光素的结构，但实验结果表明，在黄色水溶液中，它是一种低分子量(470)而含有多种氨基酸的化合物。当它与海萤萤光素酶及氧相接触时即发光。从500克整个的、干的海萤粉末，经一系列制备提纯可得3毫克结晶体，

其发光强度按重量計較原材料大 37,000 倍^[13]。

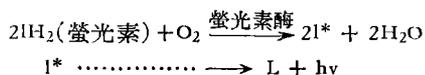
关于萤光素酶的化学构成,迄今为止知之不多。McElroy 和 Chase^[20] 以海萤干粉末提取液,进行纯化工作。在低温,用 HCl 调整水提取液的 pH 值至 4.5 即产生沉淀。仍在低温,将这沉淀用离心法除去。其上部清液立即以 NaOH 再调节至 pH 7.5,在 0°C 徐徐倒入冷丙酮至占容量的 35%,混合物在 -5°C 静置 15 分钟,出现的沉淀仍用离心法除去,再加冷丙酮至占容量的 55%。移出有效沉淀并用冷水溶解之。在 pH 7.5 再用 (NH₄)₂SO₄ 重复分提。而溶液达 40—65% 饱和时得一具有特殊活力的物质,此物质比粗提取物的活力大 100 倍。以磷酸钙凝胶吸附法再度纯化,继用 10% (NH₄)₂SO₄ 洗出,如此可增加其特殊活力,但大大降低其回收率。

这种纯物质与纯萤光素相遇发出亮光时,并不需要 Mg 和 Mn 离子存在,其吸收光谱尽在紫光区,高峰在 280mμ。此现象表示它与黄素,嘌呤或核酸成分无关。遇热时这种纯物质较粗萤光素酶活性丧失为少。

在 7 种不同 pH 值 (2.38—6.18) 以丙酮-(NH₄)₂SO₄ 纯萤光素酶进行纸电泳实验表明,它的等电点为 3.28 (这数值在酶类中是低的)。在 Spinco 分析的超离心法中,Chase 观察到二个高分子量的组成成分,其中之一的沉积常数 (2.9—3.6 Svedberg 单位) 较低,鉴定为萤光素酶。如揣测这种分子为球形而无结合水,分子量的最低数值是在 35,000—40,000 之间^[6]。

关于海萤萤光素酶的化学性质,根据现在知道的,它是一种简单蛋白质,可能是清蛋白,没有卟啉类 (Porphyrins)、黄素或吡啶核苷酸的补缺基 (Prosthetic group),后三种化合物的吸收光带不在纯萤光素酶的吸收光谱中出现,海萤萤光素酶与萤火虫萤光素酶不同,前者溶于无盐的水中,又能被胰蛋白酶消化,不是一种球蛋白,并能在兔血中形成抗萤光素酶 (antiluciferase)^[34]。

在水溶液中,萤光素酶催化萤光素的氧化作用,一分子萤光素与一分子萤光素酶起作用,随之在反应中有光放出。反应可写成:



由于只需要萤光素、萤光素酶、氧及水,因此海萤的化学发光不象细菌和萤火虫的发光反应那

样复杂。从生光的总量来说,海萤发光反应效率是受温度、氢离子浓度、培养基的盐含量等因子所影响^[16]。

IV. 海笋 (*Pholas*)

详细查阅本文表 1 即可看出,萤光素-萤光素酶反应,除在发光甲虫 (萤火虫等)、细菌和海萤被发现外,至少还在下列几种动植物中存在着: 某些深海的十足虾 (*Systellaspis*), 裂虫 (Syllid worm), 淡水蛾 (一种贝类-*Latia*), 海笋和旋沟藻 (*Gonyaulax*)。海笋发光机理生化学的研究,以现有的科学文献报导来看,仅仅是正在开展中。因此,关于它的发光系统的生物化学,截至现时为止,我们只能获得初步的、片断的报导。

海笋的发光器,不管它是干的还是重新润湿的,都能发光。Dubois 氏就是用这种动物表证了萤光素-萤光素酶反应。一种冰水萃取的、粗制的提取物 (i), 另一种新鲜的沸水萃取的提取物 (ii), 当前后两种提取液相混合时即发光。提取物 (i) 含萤光素酶; 提取物 (ii) 含基质即萤光素。

Harvey 氏^[13] 转述 Dubois 氏列出的海笋的萤光素、萤光素酶的性质如下: 海笋萤光素在 70°C 以上即被破坏,透析缓慢,这种萤光素在海笋的萤光素酶,过锰酸钾,二氧化氢,高铁血红素及多种海洋甲壳类和软体动物的血液等物质存在的情况下,即被氧化而发光。海笋萤光素酶遇热不稳定,在 60°C 被破坏,不透析,不溶于脂溶剂,在水中形成一种胶体溶液。它不能被胰蛋白酶所消化,是一种特殊的氧化酶。

许多科学工作者都看到海笋有生光的粒状体^[23]。任何一种物质,若能溶解粒状体必然导致光的散射。比如将海笋虹吸管的海水提取液,任其静置至光消失时,再用蒸馏水稀释,缓慢加热,或加入乙醚,氯仿,皂角苷 (Saponin), 甘胆酸盐 (glycocholate), 又能使它恢复发光。这是细胞的溶解作用所造成的,而发光就是由于生光粒状体的溶解。

Plesner 氏^[25] 以海笋的丙酮干粉末提取物进行研究,发现它的发光系统和细菌的相似。这种软体动物的组织匀浆,先用冷的丙酮处理,继用乙醚提取。酶制品是用吸附剂制备的; 基质提取物是用原材料加水煮沸制得的。将煮沸过的提取物或将 FMN + DPNH 加至酶的提取物中,即产生瞬息闪光。如此看来,海笋的萤光素也许就是 FMNH₂ (关于这种反应的机理,可参阅本文“细菌”一节中

所叙述的)。

V. 鱼类

发光鱼类可分为共栖性细菌发光和本体发光胞发光两种类型。属于前一类型,比较肯定的有长尾鳕科、鳕鱼科、奇鱼科、光天竺鲷科及鲛鱼科等9科的鱼类。凡有共栖性发光菌的鱼类发光器(发光菌就生长在鱼体深处腺体构造的空腔中),常有导管及小孔,并以小孔通达海水。有的用一长管,依肌肉的收缩,将细菌挤出(长尾鳕科);有的通过小孔,细菌并不大量向外挤出。属于本体发光类型的发光鱼类,绝大多数是属于巨口鱼亚目和灯笼鱼亚目的深海鱼;在板鳃类(如某些种鲨鱼)及鳗鱼科鱼类,有的也属于这一类型^[12]。后一类型(本体发光类型)鱼类的某些种,光是从埋在皮肤中的许多发光胞发出的,发光胞中含有生光细胞和色素细胞^[12]。它们的光强度变化,就象照相机光阑结构那样,是以色素细胞的扩张和收缩调节的。虽然,鱼的发光胞在腹面及侧面比背面为多,也能在发光引诱鬚的末端、触鬚等位置上找到它,但多数发光胞是在皮肤上排列成行或呈其他各种形式^[12]。

虽然,有些动物(如鱼类、乌贼等),它们的光来自共栖的发光菌,是具有重大的生物学和特殊演化重要性的。但是,它们却不能增长我们对生物发光比较生化的知识。关于共栖性细菌发光机理的生物化学,我们认为可参阅本文“细菌”一节的阐释,此处不再赘述。至于鱼类本体发光的发光胞的生化作用机理,迄今为止我们只看到片断的报导,在此就不便多加揣测了。

可是,荧光素和荧光素酶反应已在两种硬骨鱼类——*Parapricanthus beryciformis* 和 *Apogonelliotti* (天竺鲷)的水提取液中表证了,而且发现天竺鲷的发光提取液和海萤的发光提取液相混合时,得一正的交叉反应。即是说,天竺鲷的荧光素和海萤的荧光素酶相混合时即发光,反之亦然。FMN、DPNH 及 ATP 对上述两种提取液的发光并无显著影响,而这两种动物的发光系统或系与细菌的发光系统不同^[10]。

三、发光的用途

比较高等的动物发光可能有一定的目的——求偶(引起异性注意),各个个体相互识别,辨别雌雄;也可以作为猎取食物的诱感物,或者作为防卫手段以迷惑敌人,逃避时突然闪光,使掠食者一时

目力紊乱,不易追及;或者是一种警告讯号;也可能还有照明作用,等等。

细菌发光是化学发光的一种类型,它的生光反应是和它的产色或萤光细菌产生萤光化合物属于同一范畴,在细菌的生命活动中并无实际用途。因此,细菌发光对细菌本身来说并不是必需的。可是发光菌所发出的光在实践中却有許多用途^[11],例如:它的光可作为光合作用实验中微量氧是否存在的标志;或作为滤器是否破裂的指示菌;还可以作为抗菌素毒性试验的一种检验方法;由于细菌产生的光是冷光,发光菌灯可作为火药库的安全措施;在第二次世界大战中,日本曾经使用发光细菌作为夜间的联络讯号和灯火管制时的标志;有人推荐以发光菌作水溶性油漆^[4]等等。

生物学作为一门自然科学来说,其主要任务之一是要解决能量与质量、运动与结构的相互关系问题。其中生物体内能量变化、形成与规律的研究,更是错综复杂,而发光微生物由于构造简单、大量培养比较方便,作为能量变化的研究材料是绝好不过的。

参 考 文 献

- [1] 薛廷耀、孙国玉、丁美丽等,海洋发光微生物的研究(未刊稿)。
- [2] 中村浩,1945. 发光微生物,日本岩波书店,197页。
- [3] Breed, R. S. et al., Bergy's Manual of Determinative Bacteriology, 7th ed. 1—1094. Bailliere. Tindal and Cox, LTD., London.
- [4] Bryson, H. C., 1940. Bioluminescence. *Paint Manuf.* 10(1):170—173.
- [5] Chase, A. M., 1950. Studies on cell enzyme Systems IV. The kinetics of heat inactivation of Cypridina Luciferase. *J. Gen. Physiol.* 33(5):535—546.
- [6] Chase, A. M., 1955. The molecular weight of Cypridina luciferase. *J. Cell. Comp. Physiol.* 45(1):13—20.
- [7] Chase, A. M. and Grey, J. H., 1949. Analysis of Cypridina luciferin for nitrogen. *J. Cell. Comp. Physiol.* 33(1):69—77.
- [8] Cormier, M. J. and B. L. Strehler, 1953. The identification of KCF: requirement of longchain aldehydes for bacterial extract luminescence. *J. Am. Chem. Soc.* 75(19):4864—4865.
- [9] Duboid, R., 1887. *Compt. rend.*, 105: 690—692 (未见原文,引自本文文献[11])。
- [10] Haneda, Y., Johnson, F. H. and H. C. Sie,

1958. Luciferin and luciferase extracts of a fish—*Apogon marginatus*, and their luminescent Cross reactions with those of a crustacean, *Cypridina hilgendorfi*. *Biol. Bull.* **115**(2):336.
- [11] Harvey, E. N., 1952. *Bioluminescence*, Academic Press, New York. pp. 1—649.
- [12] Harvey, E. N., 1957. "Luminous Organs of Fishes" in *The Physiology of Fishes* (ed. by M. E. Borwn), Vol. II, 345—366, Academic Press, New York.
- [13] Harvey, E. N., 1960. "Bioluminescence" in *comparative Biochemistry*, (M. Florkin, H. S. Manson, ed.), Academic Press, New York, pp. 545—591.
- [14] Hastings, J. W. and B. M. Sweeney, 1957. Characteristics of the diurnal rhythm of Luminescence in *Gonyaulax polyhedra*. *J. Cell Comp. Physiol.* **49**:115—128.
- [15] Johnson, F. N. ed. "The Luminescence of Biological Systems", Amer. Ass. Adv. Sci. Wash. D. C. pp. 1—452.
- [16] Johnson, F. N. et al., 1954. "The Kinetic Basis of Molecular Biology" John Wiley, New York. 1—874.
- [17] Mason, H. S., 1952. The Beta-Luciferin of *Cypridina*. *J. Am. Chem. Soc.* **74**(10):4727.
- [18] Mason, H. S. and Davis, E. F., 1952. *Cypridina Luciferin*. Partition Chromatography. *J. Biol. Chem.* **197**(1):41—47.
- [19] McElroy, W. D., 1960. "Bacterial Luminescence" in *The Bacteria* (I. C. Gunsalus, R. Y. Stanier, ed.), Vol. II, 479—507, Academic Press, New York.
- [20] McElroy, W. D. and A. M. Chase, 1951. Purification of *Cypridin* luciferase. *J. Cell Comp. Physiol.* **38**:401—408.
- [21] McElroy, W. D. and A. Green, 1955. Enzymatic properties of bacterial luciferase. *Arch. Biochem. Biophys.* **56**(1):240—255.
- [22] McElroy, W. D., J. W. Hasting et al., 1954. Partial purification and properties of bacterial Luciferin and Luciferases. *J. Bacteriol.* **67**(4):402—408.
- [23] Nicol, J. A. C., 1960. Histology of the light organ of *Pholas Dactylus* (Lamellibranchia). *J. Mar. Biol., Ass. U. K.* **39**(1):109—114.
- [24] Nicol, J. A. C., 1962. "Animal Luminescence" in "Advances in Comparative Physiology and Biochemistry" pp. 217—273 (ed. by O. Lowenstein), Academic Press, New York.
- [25] Plensner, P. E., 1959. Light emission mechanism of *Pholas dactylus*. *Pubbl. Staz. Zool. Napoli*, **31**:44—46.
- [26] Shimomura, O., Goto, T. and Hirata, Y., 1957. Crystalline *Cypridina* luciferin. *Bull. Chem. Soc. Japan* **30**:927—933.
- [27] Strehler, B. L., 1953. Luminescence in Cell-free extracts of luminous bacteria and its activation by DPN. *J. Am. Chem. Soc.* **75**(5):1264.
- [28] Strehler, B. L. and M. J. Cormier, 1954. Isolation, identification and function of long chain fatty aldehydes affecting the bacterial luciferin-luciferase reaction. *J. Biol. Chem.* **211**(1):213—225.
- [29] Strehler, B. L. and Arnold, W., 1951. Light production by green plants. *J. Gen. Physiol.* **34**(6):809—820.
- [30] Strehler, B. L., Harvey, E. N., Chang, J. J. and M. J. Cormier, 1954. The luminescent oxidation of reduced riboflavin or reduced riboflavin phosphate in the bacterial luciferin-luciferase reaction. *Pro. Natl. Acad. Sci. Wash.* **40**(1):10—12.
- [31] Sverdrup, H. U., et al., 1942. "The oceans", Prentice-Hall, New York. pp. 1—1087.
- [32] Totter, J. R. and M. J. Cormier, 1955. The reaction of bacterial luciferase to alternative pathways of dihydroflavin mononucleotide oxidation. *J. Biol. Chem.* **216**(2):801—811.
- [33] Tsuji, F. I., Chase, A. M. and E. N. Harvey, 1955. In "The Luminescence of Biological Systems" (F. H. Johnson, ed.) pp. 127—159. Am. Ass. Adv. Sci. Wash. D. C. (1955).
- [34] Tsuji, F. I. and D. L. Davis, 1959. A Quantitative photometric method for studying the reaction between *Cypridina* luciferase and specific antibody. *J. Immunol.* **82**(1):153—160.