

# 东方弧菌的无细胞系统的发光:一种由长链脂肪醛启动的生物发光

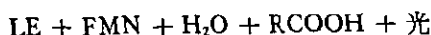
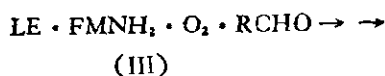
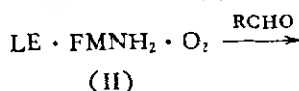
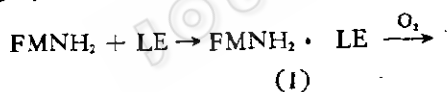
朱文杰 何学民 黄少华 姚敬

(华东师范大学生物学系, 上海)

采用常规的硫酸铵分级沉淀和 DEAE-纤维素柱层析从东方弧菌(*Vibrio orientalis*) 518 菌株的细胞裂解液中分离到一种组分, 仅需长链脂肪醛就可以启动发光。对其反应的动力学、生物发光光谱、荧光激发光谱、荧光发射光谱和吸收光谱等作了研究。其生物发光的衰减为一级反应, 速度常数  $K = 0.149$  秒。生物发光光谱与发光细菌的活体发光光谱一致。荧光光谱和吸收光谱的特征表明, 该组分与细菌发光反应的中间产物 II 相似。用本菌株的 COS 制备物作对比, 表明该组分确与 COS 的发光反应所需的条件不同。

**关键词** 东方弧菌; 生物发光; 长链脂肪醛

迄今, 海洋发光细菌的发光机制认为是由特异性的荧光酶 (LE)、还原性黄素 (FMNH<sub>2</sub>)、八碳以上长链脂肪醛 (RCHO) 和氧分子所参与的复杂反应, 大致历程为<sup>[1]</sup>:



其中 I、II 和 III 分别为反应中间产物, 寿命极短, 很难分离出来, 而且, 以上为体外重组体系的反应历程, 活细胞内的发光是否如此尚无定论。1975 年, Claude<sup>[2]</sup> 等人由哈维氏弧菌 (*Vibrio harveyi*) 中提取荧光酶, 在体外与有关底物反应后从中分离到中间产物 II。分离纯化的过程是在  $-20^\circ\text{C}$  至  $-30^\circ\text{C}$  的低温下进行的。该中

间产物 II 在  $20^\circ\text{C}$  时半寿期为 10—20 秒, 只有在液氮的低温下才较稳定。到目前为止, 还未见有在常规条件下直接从发光细菌的细胞裂解液中分离成功的报道。本文用常规方式从我国特有的发光细菌——东方弧菌 (*V. orientalis*) 518 菌株的细胞裂解液中分离到一种组分, 仅需长链脂肪醛就可启动其发光, 其光谱特征与中间产物 II 极为相似。

## 材料和方法

### (一) 菌种

东方弧菌 (*Vibrio orientalis*) 518 菌株<sup>[3]</sup>。

### (二) 培养基

液体培养基为人工海水发光培养基, 按 Baumann 的配方<sup>[4]</sup>, 固体培养基按 Eleg 的配方<sup>[5]</sup>。

### (三) 样品制备

本文于 1989 年 2 月 1 日收到。

将24小时培养(20℃)的东方弧菌 518 的斜面接到液体培养基中, 20℃ 振荡培养到对数晚期, 1000r/min 离心收集细胞, 用 0.01mol/L 的 Tris-HCl 缓冲液 (pH7.4) 洗涤细胞, 再次离心收集细胞。冰冻过夜后, 在 20℃ 温和融化, 每克湿细胞加 10ml 重蒸水 (内含 1mmol/L EDTA, pH7.0), 剧烈振荡, 超声波处理约 5 分钟, 外用冰水盐浴降温。在 4℃ 于 15000r/min 离心 15 分钟。在上清液中, 加入固体硫酸铵到 35% 的饱和度, 搅拌 30 分钟, 在 4℃ 于 15000r/min 离心 15 分钟, 取上清液, 然后以每次增加 5% 的硫酸铵饱和度进行分级沉淀, 用 0.1mol/L 的 pH7.0 的磷酸钾缓冲液 (含 0.01mol/L EDTA) 溶解沉淀物, 测定其发光反应, 合并活性部分, 直到硫酸铵的饱和度达 80%。大多数活性部分对上述磷酸缓冲液透析过夜, 15000r/min 离心 20 分钟, 取上清液用 DEAE-纤维素柱层析 (2.5 × 65cm), 用 0.1—0.5mmol/L pH7.0 的磷酸缓冲液线性梯度洗脱。大多数发光反应活性物质在 0.3—0.4 mmol/L 梯度时洗脱下来。此洗脱液就含有与长链脂肪醛反应而发光的组分, 以下即称之为“提取物”用于实验。

#### (四) 方法

1. 发光反应的试验: 取少量提取液, 用磷酸缓冲液 (pH7.0) 稀释到 1ml, 置于测量杯中, 放入发光光度计测量位置, 用注射器快速注入一定量的醛悬液, 立即有发光反应, 由记录仪记录下来。

2. 荧光光谱测定: 用日立-850 型荧光光谱仪测定。

3. 吸收光谱测定: 用 Beckman 公司的 DU-7 光谱仪测定。

4. 生物发光光谱的测定: 用日立-850 型荧光光谱仪, 但用光切将激发光路阻断, 扫描发射光谱。扫描速度每分钟 480nm,

带通 10nm。

5. “COS”的制备: 按 Yashikama 的方法<sup>[6]</sup>。

6. 蛋白质定量试验: 按 Colowick 的方法进行<sup>[7]</sup>。

7. 几种试剂的配制: (1)长链脂肪醛溶液: 取葵醛加入重蒸水, 经超声波处理成乳状液, 十二烷醛液制法与此相同。冰箱保存。(2) NADH 和 NAD<sup>+</sup> 均溶于 0.1 mol/L 的巴比妥钠溶液中。(3) FMNH<sub>2</sub> 的产生: 按 Styrelius 等的方法<sup>[8]</sup>。

## 结 果

### (一) 提取物分别与长链醛、NADH、FMNH<sub>2</sub> 等反应的特性

1. 提取物仅加长链醛时立即发光, 无需添加任何其他细菌发光参与物。发光强度与长链醛的浓度有关。葵醛比同量的十二烷醛对发光更好。此种特性可在 0℃ 以下保持数月, 在 10℃ 以下可保持数日, 但在 25℃ 时仅能维持几小时。

2. 仅加 NADH 或 FMNH<sub>2</sub> 时不发光, 这说明该提取物与细胞裂解后的“COS”组分不同, 后者仅需 NADH 即可发光, 无须长链醛的加入。

3. 当同时加入 NADH 和葵醛, 或以 FMNH<sub>2</sub> 与葵醛同时加入都能发光, 但其发光强度与 NADH 或 FMNH<sub>2</sub> 的用量无关, 仅与葵醛的用量有关。

由此可初步认为该提取物具有细菌发光反应中间物 II 的反应特性, 因为中间物 II 仅需长链醛即可发光。

### (二) 提取物的发光反应动力学

提取物与葵醛相遇, 立即发生发光反应, 1 秒钟即达发光高峰, 以后发光强度即发生衰减, 约 10 秒钟后维持相当一段时间的低水平发光, 发光强度约为最大值的 15—20% (图 1)。反应中充以氧气未见任

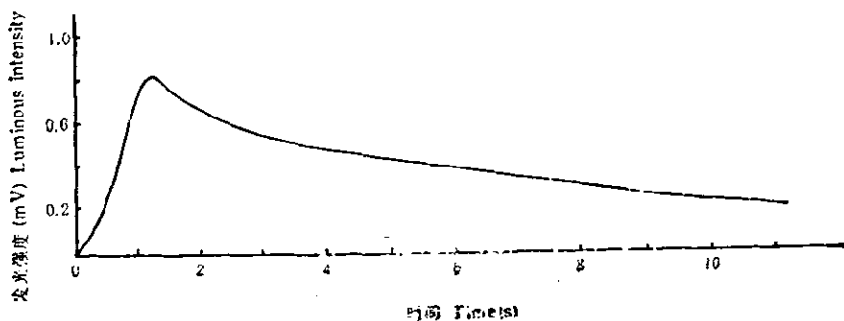


图1 提取物与葵醛的发光反应动力学曲线

发光反应的混合物内含提取物 1ml, 葵醛溶液 0.05ml, pH7.0 磷酸缓冲液 0.95ml。反应开始时由注射器注入葵和缓冲液以启动反应, 温度 10℃。

Fig. 1 The kinetics of decanal initiated bioluminescence

The reacted mixture contained the preparation 1 ml, decanal 0.05 ml, phosphate buffer (pH7.0) 0.95 ml. At 10℃, the final concentrations were the preparation 0.5mg protein/ml, the decanal 1000μmol/L.

何影响。

由动力学曲线分析, 发光的衰减为一级反应, 反应速度常数  $K = 0.149s^{-1}$ 。与 Neelson 等人的报道相似<sup>[3]</sup>。

当固定葵醛的浓度, 改变提取物的浓度时, 发光反应的最大发光强度变动, 当提取物的蛋白含量为 0.5mg/ml 时有最大的发光产生。当提取物的蛋白浓度为 0.5mg/ml, 葵醛浓度为 1000μmol/L 时反应速度 (由反应动力学曲线在 1 秒时的斜率来计算) 达到最大值, 再加大葵醛浓度时反应速度

反而下降。而当葵醛浓度为 1000μmol/L 以下时, 反应速度随葵醛浓度的增加而呈 S 形上升, 显然不能用 Henri-Michaelis-Menten 方程来描述。当用 Eadie-Hafstee 及 Hans 作图法处理时也均未见线性关系存在。

### (三) 提取物的发光光谱

提取物与葵醛反应的发光光谱示于图 3。最大发射峰  $\lambda_{max} = 480-490nm$ 。与

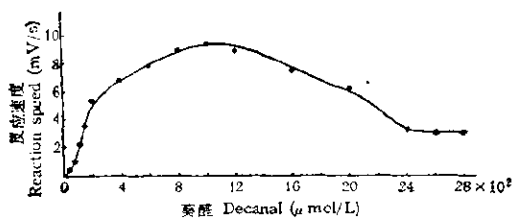


图2 发光反应与葵醛浓度的关系

测定条件: 提取物 1ml, 浓度为 0.5mg 蛋白/ml, 缓冲液 1ml, 葵醛液 50μl, 温度 10℃。

Fig. 2 The curve of the relationship between the velocities of reactions and the concentrations of decanal

The velocities were calculated via the slope of the point at the first sec. on the kinetics curve.

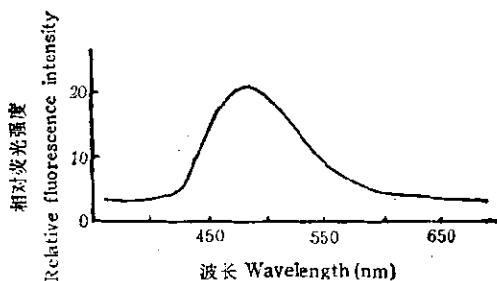


图3 提取物与葵醛反应的发光光谱

反应混合物中含有 1ml 提取物 (0.5mg 蛋白/ml), 1ml pH7.0 磷酸缓冲液内含 1000μmol/L 的葵醛, 测试温度 10℃。

Fig. 3 The decanal-initiated bioluminescence spectrum

The reaction mixture contained the preparation (0.5 mg protein/ml) and the decanal (1000μmol/L) at 10℃.

细菌荧光酶催化的体外重组体系的发光光谱相同, 也与作者以前报道的整体细胞的发光光谱相吻合<sup>[10]</sup>。

#### (四) 提取物的荧光光谱和吸收光谱

提取物与醛反应前的激发光谱(发射波长固定 505nm)在 370nm 处有一最大峰, 在 310nm 有一较小的峰, 其强度约为 370nm 处的 60%。提取物与醛反应后的激发光谱较反应前明显不同, 在 350nm 和 405nm 处各有一峰, 后者略大, 在 380nm 处还有一小肩峰, 其光强度仅为反应前的十分之一。提取物与醛反应前后的发射光谱也不相同(激发波长固定 370nm)。反应前在 440nm 和 505nm 处各有一个峰, 反应后则 505nm 的峰消失, 而在 525nm 处出现一个峰。当将激发波长由 370nm 改为 450nm 时, 则仅显示 525nm 的一个峰。提取物在反应前后的荧光强度无明显差异。此种荧光特征显然并非酶蛋白的荧光特征,

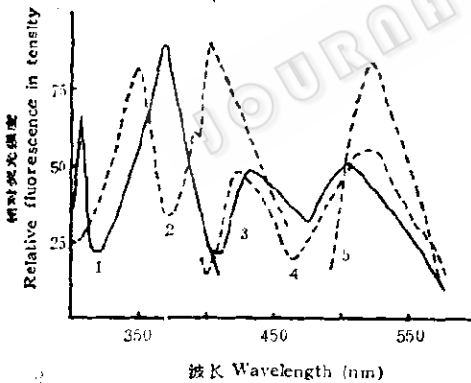


图4 提取物与醛反应前后的激发光谱和发射光谱

1. 反应前的激发光谱; 2. 反应后的激发光谱;
3. 反应前的发射光谱; 4. 反应后的发射光谱;
5. 反应后的发射光谱

Fig. 4 The excitation spectra and the emission spectra of the extract reacted with decanal 1. Excitation spectrum before reaction; 2. Excitation spectrum after reaction; 3. Emission spectrum before reaction; 4. Emission spectrum after reaction; 5. Emission spectrum after reaction

因为蛋白质的荧光一般认为由芳香族氨基酸所左右, 最大发射波长均小于 400 nm。值得注意的是, 发射光谱中 505nm 峰的存在及其反应后的消失, 代之以 525 nm 的峰, 此现象与 Claude<sup>[2]</sup>所提出的细菌荧光酶催化的反应中间物 II 的性状完全一致。说明反应后也产生了黄素, 故出现了 525 nm 的特征峰。

提取物的吸收光谱于图 5。在 414 nm 处有一最大吸收峰, 在 380 nm 处有一小肩峰, 此外在 485 nm 处有一小峰。反应后的吸收光谱除 380 nm 峰消失外, 其余不变。这与 Claude<sup>[2]</sup>的报道不同。

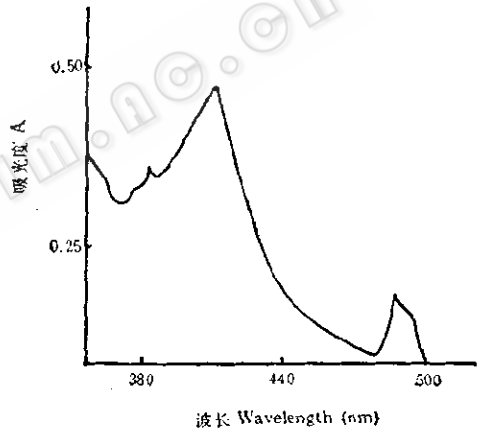


图5 提取物的吸收光谱  
(蛋白质浓度为 0.5mg/ml)

Fig. 5 The absorption spectrum of the extract (The concentration of the extract is 0.5 mg protein/ml)

#### (五) 东方弧菌 518 的“COS”<sup>[6]</sup> 的性质

当用 518 菌株的细胞裂解液制备成“COS”作为对比时, 也仅需加入 NADH 即可发光, 这与 Yashikama 报道的一致<sup>[6]</sup>。加入 NADH 后“COS”发光上升缓慢, 约 10 秒后达最大发光强度, 并维持 20 多分钟不衰减。这在动力学上与提取物与醛反应导致发光明显不同。

将24小时培养(20℃)的东方弧菌 518 的斜面接到液体培养基中, 20℃ 振荡培养到对数晚期, 1000r/min 离心收集细胞, 用 0.01mol/L 的 Tris-HCl 缓冲液 (pH7.4) 洗涤细胞, 再次离心收集细胞。冰冻过夜后, 在 20℃ 温和融化, 每克湿细胞加 10ml 重蒸水 (内含 1mmol/L EDTA, pH7.0), 剧烈振荡, 超声波处理约 5 分钟, 外用冰水盐浴降温。在 4℃ 于 15000r/min 离心 15 分钟。在上清液中, 加入固体硫酸铵到 35% 的饱和度, 搅拌 30 分钟, 在 4℃ 于 15000r/min 离心 15 分钟, 取上清液, 然后以每次增加 5% 的硫酸铵饱和度进行分级沉淀, 用 0.1mol/L 的 pH7.0 的磷酸钾缓冲液 (含 0.01mol/L EDTA) 溶解沉淀物, 测定其发光反应, 合并活性部分, 直到硫酸铵的饱和度达 80%。大多数活性部分对上述磷酸缓冲液透析过夜, 15000r/min 离心 20 分钟, 取上清液用 DEAE-纤维素柱层析 (2.5 × 65cm), 用 0.1—0.5mmol/L pH7.0 的磷酸缓冲液线性梯度洗脱。大多数发光反应活性物质在 0.3—0.4 mmol/L 梯度时洗脱下来。此洗脱液就含有与长链脂肪醛反应而发光的组分, 以下即称之为“提取物”用于实验。

#### (四) 方法

1. 发光反应的试验: 取少量提取液, 用磷酸缓冲液 (pH7.0) 稀释到 1ml, 置于测量杯中, 放入发光光度计测量位置, 用注射器快速注入一定量的醛悬液, 立即有发光反应, 由记录仪记录下来。

2. 荧光光谱测定: 用日立-850 型荧光光谱仪测定。

3. 吸收光谱测定: 用 Beckman 公司的 DU-7 光谱仪测定。

4. 生物发光光谱的测定: 用日立-850 型荧光光谱仪, 但用光切将激发光路阻断, 扫描发射光谱。扫描速度每分钟 480nm,

带通 10nm。

5. “COS”的制备: 按 Yashikama 的方法<sup>[6]</sup>。

6. 蛋白质定量试验: 按 Colowick 的方法进行<sup>[7]</sup>。

7. 几种试剂的配制: (1)长链脂肪醛溶液: 取葵醛加入重蒸水, 经超声波处理成乳状液, 十二烷醛液制法与此相同。冰箱保存。(2) NADH 和 NAD<sup>+</sup> 均溶于 0.1 mol/L 的巴比妥钠溶液中。(3) FMNH<sub>2</sub> 的产生: 按 Styrelius 等的方法<sup>[8]</sup>。

## 结 果

### (一) 提取物分别与长链醛、NADH、FMNH<sub>2</sub> 等反应的特性

1. 提取物仅加长链醛时立即发光, 无需添加任何其他细菌发光参与物。发光强度与长链醛的浓度有关。葵醛比同量的十二烷醛对发光更好。此种特性可在 0℃ 以下保持数月, 在 10℃ 以下可保持数日, 但在 25℃ 时仅能维持几小时。

2. 仅加 NADH 或 FMNH<sub>2</sub> 时不发光, 这说明该提取物与细胞裂解后的“COS”组分不同, 后者仅需 NADH 即可发光, 无须长链醛的加入。

3. 当同时加入 NADH 和葵醛, 或以 FMNH<sub>2</sub> 与葵醛同时加入都能发光, 但其发光强度与 NADH 或 FMNH<sub>2</sub> 的用量无关, 仅与葵醛的用量有关。

由此可初步认为该提取物具有细菌发光反应中间物 II 的反应特性, 因为中间物 II 仅需长链醛即可发光。

### (二) 提取物的发光反应动力学

提取物与葵醛相遇, 立即发生发光反应, 1 秒钟即达发光高峰, 以后发光强度即发生衰减, 约 10 秒钟后维持相当一段时间的低水平发光, 发光强度约为最大值的 15—20% (图 1)。反应中充以氧气未见任

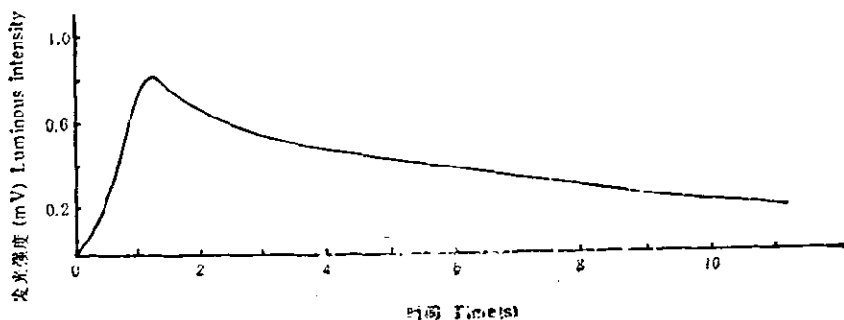


图1 提取物与葵醛的发光反应动力学曲线

发光反应的混合物内含提取物 1ml, 葵醛溶液 0.05ml, pH7.0 磷酸缓冲液 0.95ml。反应开始时由注射器注入葵和缓冲液以启动反应, 温度 10℃。

Fig. 1 The kinetics of decanal initiated bioluminescence  
The reacted mixture contained the preparation 1 ml, decanal 0.05 ml, phosphate buffer (pH7.0) 0.95 ml. At 10℃, the final concentrations were the preparation 0.5mg protein/ml, the decanal 1000μmol/L.

何影响。

由动力学曲线分析, 发光的衰减为一级反应, 反应速度常数  $K = 0.149s^{-1}$ 。与 Neelson 等人的报道相似<sup>[3]</sup>。

当固定葵醛的浓度, 改变提取物的浓度时, 发光反应的最大发光强度变动, 当提取物的蛋白含量为 0.5mg/ml 时有最大的发光产生。当提取物的蛋白浓度为 0.5mg/ml, 葵醛浓度为 1000μmol/L 时反应速度 (由反应动力学曲线在 1 秒时的斜率来计算) 达到最大值, 再加大葵醛浓度时反应速度

反而下降。而当葵醛浓度为 1000μmol/L 以下时, 反应速度随葵醛浓度的增加而呈 S 形上升, 显然不能用 Henri-Michaelis-Menten 方程来描述。当用 Eadie-Hafstee 及 Hans 作图法处理时也均未见线性关系存在。

### (三) 提取物的发光光谱

提取物与葵醛反应的发光光谱示于图 3。最大发射峰  $\lambda_{max} = 480-490nm$ 。与

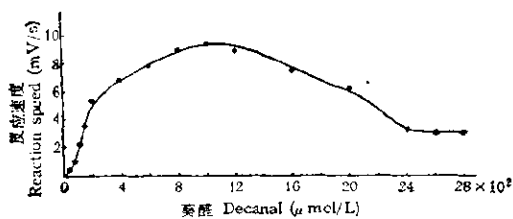


图2 发光反应与葵醛浓度的关系

测定条件: 提取物 1ml, 浓度为 0.5mg 蛋白/ml, 缓冲液 1ml, 葵醛液 50μl, 温度 10℃。

Fig. 2 The curve of the relationship between the velocities of reactions and the concentrations of decanal

The velocities were calculated via the slope of the point at the first sec. on the kinetics curve.

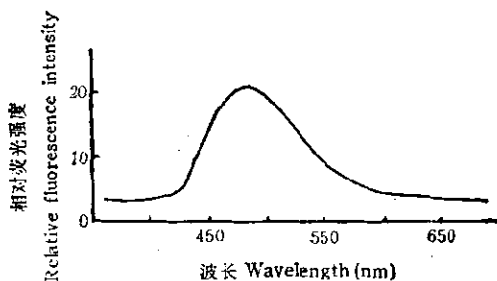


图3 提取物与葵醛反应的发光光谱

反应混合物中含有 1ml 提取物 (0.5mg 蛋白/ml), 1ml pH7.0 磷酸缓冲液内含 1000μmol/L 的葵醛, 测试温度 10℃。

Fig. 3 The decanal-initiated bioluminescence spectrum

The reaction mixture contained the preparation (0.5 mg protein/ml) and the decanal (1000μmol/L) at 10℃.

细菌荧光酶催化的体外重组体系的发光光谱相同, 也与作者以前报道的整体细胞的发光光谱相吻合<sup>[10]</sup>。

#### (四) 提取物的荧光光谱和吸收光谱

提取物与醛反应前的激发光谱(发射波长固定 505nm)在 370nm 处有一最大峰, 在 310nm 有一较小的峰, 其强度约为 370nm 处的 60%。提取物与醛反应后的激发光谱较反应前明显不同, 在 350nm 和 405nm 处各有一峰, 后者略大, 在 380nm 处还有一小肩峰, 其光强度仅为反应前的十分之一。提取物与醛反应前后的发射光谱也不相同(激发波长固定 370nm)。反应前在 440nm 和 505nm 处各有一个峰, 反应后则 505nm 的峰消失, 而在 525nm 处出现一个峰。当将激发波长由 370nm 改为 450nm 时, 则仅显示 525nm 的一个峰。提取物在反应前后的荧光强度无明显差异。此种荧光特征显然并非酶蛋白的荧光特征,

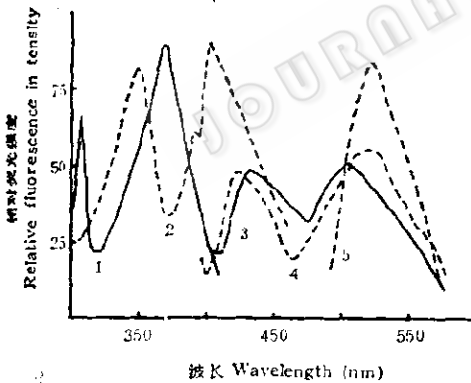


图 4 提取物与醛反应前后的激发光谱和发射光谱

1. 反应前的激发光谱; 2. 反应后的激发光谱;
3. 反应前的发射光谱; 4. 反应后的发射光谱;
5. 反应后的发射光谱

Fig. 4 The excitation spectra and the emission spectra of the extract reacted with decanal 1. Excitation spectrum before reaction; 2. Excitation spectrum after reaction; 3. Emission spectrum before reaction; 4. Emission spectrum after reaction; 5. Emission spectrum after reaction

因为蛋白质的荧光一般认为由芳香族氨基酸所左右, 最大发射波长均小于 400 nm。值得注意的是, 发射光谱中 505nm 峰的存在及其反应后的消失, 代之以 525 nm 的峰, 此现象与 Claude<sup>[2]</sup>所提出的细菌荧光酶催化的反应中间物 II 的性状完全一致。说明反应后也产生了黄素, 故出现了 525 nm 的特征峰。

提取物的吸收光谱于图 5。在 414 nm 处有一最大吸收峰, 在 380 nm 处有一小肩峰, 此外在 485 nm 处有一小峰。反应后的吸收光谱除 380 nm 峰消失外, 其余不变。这与 Claude<sup>[2]</sup>的报道不同。

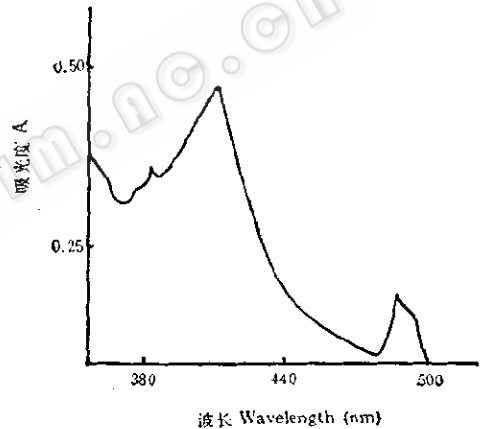


图 5 提取物的吸收光谱  
(蛋白质浓度为 0.5mg/ml)

Fig. 5 The absorption spectrum of the extract (The concentration of the extract is 0.5 mg protein/ml)

#### (五) 东方弧菌 518 的“COS”<sup>[6]</sup>的性质

当用 518 菌株的细胞裂解液制备成“COS”作为对比时, 也仅需加入 NADH 即可发光, 这与 Yashikama 报道的一致<sup>[6]</sup>。加入 NADH 后“COS”发光上升缓慢, 约 10 秒后达最大发光强度, 并维持 20 多分钟不衰减。这在动力学上与提取物与醛反应导致发光明显不同。

当发光达到最大值并维持在此水平时,一经注入少量葵醛,可使发光强度快速上升,达 100 倍左右,且反应状况类似于提取物与醛的反应(图 6)。这也许意味着 518 菌株的“COS”由 NADH 的加入而启动发光反应,但由于“COS”本身所含的内源醛含量有限,会累积一定量中间物 II,当外源醛一加入,立即与累积的中间物 II 反应而造成发光强度急剧上升。

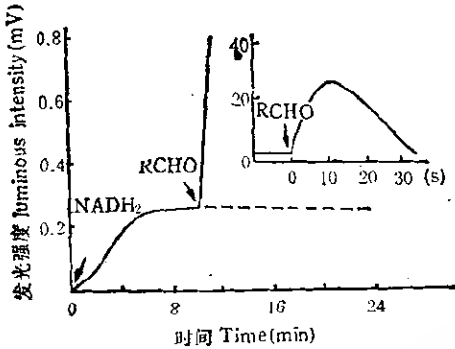


图 6 东方弧菌 518 的“COS”与 NADH 反应的发光动力学曲线

插入的小图显示外源醛加入后的发光曲线

Fig. 6 NADH initiated bioluminescence for the “COS” system

When the light emission was maintaining the level of the maximum, by adding decanal the light intensity increased rapidly like the preparation with decanal. The insert showed the same sample at a different ordinate.

## 讨 论

如前所述,由于提取物与醛反应不能符合米氏方程,试以 Hill 方程<sup>[10]</sup>加以处理,都呈现良好的线性关系,在葵醛浓度小于  $1000 \mu\text{mol/L}$  时,得到直线斜率  $n = 2$ 。虽然迄今未见有细菌荧光酶之变构效应的报道,但考虑到细菌荧光酶是由  $\alpha$  与  $\beta$  亚

基之二聚体,其解离与聚合必然影响酶活性,酶与醛分子的结合是否影响其活性有待探讨。Edward<sup>[11]</sup>在研究荧光酶  $\alpha$  和  $\beta$  亚基的作用时,也报道了高浓度葵醛有抑制酶活性的效应,但未阐明原因。

提取物与醛的反应动力学曲线与中间物 II 和醛的反应动力学相似<sup>[2]</sup>。荧光光谱反应前后的变化,即 505nm 峰消失、525nm 峰的出现显示了反应后有 FMN 的生成(525nm 是 FMN 的特征峰),说明该提取物确实结合有 FMN。这些均显示了中间物 II 的特性,因而可认为提取物主要组分为中间物 II。考虑到各菌种的荧光酶的特异性,东方弧菌 518 菌株在常温下具有比较稳定的发光反应的中间物不是不可能的。这为今后常温下研究细菌发光反应的机制,尤其是活细胞内的机制带来极大的方便。

## 参 考 文 献

- [1] Hastings, J. W. et al.: *Advances in Microbial Physiology*, 26: 235, 1985.
- [2] Claude, B. et al.: *Biochemistry*, 14(21): 4719, 1975.
- [3] Yang Yikong, et al.: *Current Microbiology*, 8: 95, 1983.
- [4] Baumann, P. et al.: *The Prokaryotes*, 2: 1302, (ed. Starr, M. P. et al.) Springer-Verlag Berlin Heidelberg, New York, 1981.
- [5] Eley, M. et al.: *J. General Microbiology*, 72: 415, 1972.
- [6] Yushikama, J. and Kunic, O.: *J. Appl. Microbiology*, 17(3): 239, 1971.
- [7] Colowick, S. P. et al.: *Methods in Enzymology*, 3: 447, 1957.
- [8] Styrelus, I. et al.: *J. Appl. Biochemistry*, 4: 542, 1982.
- [9] Nealson, K. H. et al.: *Microbiological Review*, 13(4): 496, 1979.
- [10] 朱文杰等: *发光学报*, 7(1): 127, 1986.
- [11] Edward, A. et al.: *J. Biological Chemistry*, 255 (23): 11181, 1980.



## BIOLUMINESCENCE OF *VIBRIO ORIENTALIS* IN VITRO: DECANAL INITIATED BIOLUMINESCENCE

Zhu Wenjie He Xuemin Huang Shaohua Yau Jing

(Department of Biology, East China Normal University, Shanghai)

Under routine conditions, an extract has been isolated and purified preliminarily from the lysis of marineluminous bacteria, *Vibrio orientalis* 518, which emits light initiated only by adding decanal in phosphate buffer (0.1 mol/L, pH 7.0). However, it can not react with NADH. The molecular oxygen has no affect on the light emission. The decay of the light emission is the first order reaction.

The bioluminescence spectra of the extract have a peak at 485—490 nm. It is in agreement with the bioluminescence spectra of the bacteria luciferase catalyzed *in vitro*.

The activities for light emission of the extract were very stable below 0°C, maintained a few days at 10°C, a few hours at 20°C, but unstable at 25°C.

The fluorescence emission spectra of the extract obtained via excitation at 370 nm had been assayed. It showed two peaks at about 435 nm and 505 nm respectively. However, the extract which had reacted with decanal showed a peak at 525 nm, and the peak at 505 nm was disappeared. This phenomenon implied that the reacted extract had produced the FMN which had a fluorescence peak at 525 nm. It indicated that the extract contained the compound which was almost the same as the intermediate II, or was identical.

### Key words

*Vibrio orientalis*; Bioluminescence; Long chain aldehyde