

链状亚历山大藻的培养及麻痹性贝类毒素的提取和检测

刘晓丽, 章超桦, 解万翠, 杨锡洪*, 秦小明

(广东海洋大学食品科技学院, 水产品深加工广东普通高校重点实验室, 广东 湛江 524088)

摘要: 为了研究麻痹性贝类毒素 (paralytic shellfish poisoning toxins, PSP) 的来源和检测, 对实验室分离培养的产麻痹性贝类毒素的链状亚历山大藻进行了研究。首先通过接种对数生长期藻细胞, 培养 8 d 内就能达到最高细胞密度 (2.4×10^4 cells/mL) 左右, 再以 0.05 mol/L 的醋酸超声波破碎藻细胞提取粗毒素, 结合小白鼠生物检测法, 经高效液相色谱分析, 本株藻主要含有 C1/2、GTX4、GTX5 和 NEO, 浓度分别为 GTX5(0.827 5) > GTX4(0.339 2) > C2(0.252 6) > NEO(0.126 6) > C1(0.045 5) (单位: $\mu\text{mol/L}$), 毒素粗提液经过 Sephadex-G15 凝胶层析柱处理, 用小白鼠生物法和荧光分光光度法联合检测定位, 收集到纯度较高的 PSP, 本论文工作为将来贝类毒素的研究提供资料。

关键词: 链状亚历山大藻; 麻痹性贝类毒素; 高效液相色谱; 荧光分光光度法; 小白鼠生物检测

中图分类号: Q 948; S 917

文献标识码: A

有害赤潮 (harmful algal blooms, HABs) 肆虐于世界各国沿海, 对水产养殖业、人类健康和自然生态系统产生了严重的危害, 引起了各国政府的高度重视和社会各界的普遍关注^[1-3]。其中, 有毒甲藻赤潮因其潜在的毒性效应最为引人关注^[4]。有毒甲藻产生的毒素经食物链蓄积于贝类、鱼类等体中, 影响了近海贝类养殖业的生产, 也威胁着人类的健康与生命安全。链状亚历山大藻 (*Alexandrium catenella*) 是一种能够产生麻痹性贝类毒素 (paralytic shellfish poisoning toxins, PSP) 的海洋甲藻, 从 2002 年到 2006 年, 在东海长江口海域就发现了链状亚历山大藻形成的较大规模的赤潮, 其中海水中该藻细胞丰度最高可达 $10^6/\text{L}$ ^[5]。目前, 国内外已有一些学者对赤潮藻毒素麻痹性贝毒进行过相关研究^[6-7], 但对链状亚历山大藻的麻痹性贝毒毒素研究报道较少。

PSP 是含有两个胍基的三环化合物, 根据分子结构中 R4 基团的不同, 可分为 4 类: (1) 氨基甲酸酯类, 包括石房蛤毒素 (STX)、新石房蛤毒

素 (neoSTX) 和膝沟藻毒素 (GTX1-4); (2) N-磺酰胺甲酰基类, 包括 B1 (GTX5)、B2 (GTX6) 和 C1-4; (3) 脱氨甲酰基类, 包括 dcSTX、dcneoSTX 和 dcGTX1-4; (4) 脱氧脱氨甲酰基类, 包括 doSTX、doGTX2 和 doGTX3, 目前已发现 20 多种^[8]。

目前, 国际上普遍采用小鼠法^[9]、生物免疫法^[10]、高效液相色谱法 (HPLC)^[11] 等手段来检测贝类并做出预警预报, 而由于小白鼠本身造成结果的高变异性和低敏感性, 个体差异性等原因, 使得 HPLC 法的快速、高灵敏性、再现性好等优点更为突出, 从而成为目前检测 PSP 的主要方法。

本研究通过实验室培养链状亚历山大藻并提取 PSP, 对 Oshima 等^[11] 分析 PSP 方法加以改进, 用 HPLC 对其中的各个毒素成分进行了分析, 并用 Sephadex-G15 柱进行纯化, 用荧光分光光度法和小白鼠生物法对收集液进行检测, 得到了一定纯度的 PSP, 冷冻干燥后可用于后期的相关研究, 以期对有毒赤潮藻的防治提供生物学帮助和积累基础数据。

收稿日期: 2010-07-18 修回日期: 2010-09-13

资助项目: 现代农业产业技术体系 (贝类 47) 建设专项资金资助

通讯作者: 杨锡洪, E-mail: yangxihong63@163.com

1 材料与方 法

1.1 材料与试剂

实验采用的藻株是链状亚历山大藻 (*Alexandrium catenella*), 分离自中国东海长江口海域赤潮。

离子对试剂: 庚烷磺酸钠, 购自日本东京化成工业株式会社 (TCI-Ace); 四丁基磷酸铵: 购自 SIGMA 公司; 高碘酸: 购自 ALFA Aesar A Johnson Matthey 公司; 乙腈: 美国 TEDIA 公司生产。

其它试剂如磷酸、盐酸等, 均为分析纯, 购自广州化学试剂有限公司。HPLC 分析用水是 Millipore 超纯水系统生产的超纯水。12 种标准毒素分别是 C1-2、GTX1-5、dcGTX2-3、NEOSTX、dcSTX 和 STX, 购自加拿大海洋生物研究所海洋分析化学标准组。

1.2 主要仪器

高效液相色谱系统: Agilent 1100 系列; 柱后衍生系统: 采用 Pickering Laboratories 公司的 PCX5200 型; 荧光检测器: 为 Agilent G1321A (激发波长 330 nm, 发射波 390 nm);

高效液相色谱柱: 采用 GL Sciences 公司生产的 Inertsil C8-3 反相柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 柱温 33 °C。整套 HPLC 系统由 Agilent Chem Station 2.1 版本进行管理。

超声波细胞破碎仪 (宁波新芝生物科技股份有限公司), 恒温生化培养箱 (上海比朗仪器有限公司), 真空冷冻干燥机 (日本 EYELA), 荧光分光光度计 (日本岛津 RF-5301PC)。

1.3 实验方法

链状亚历山大藻的培养 培养液采用 f/2-Si 配方, 所用海水取自广东湛江坡头附近海域, pH 值 (7.9 ± 0.1), 盐度 (30 ± 1), 分别经孔径 0.45、0.22 μm 的纤维滤膜过滤, 最后用高压灭菌锅灭菌 (121 °C, 20 min), 室温冷却后添加营养盐备用。

实验藻类培养温度为 (20 ± 1) °C, 光照强度 4 000 lx, 光暗比 14L: 10D, 接种密度为 0.02 × 10⁴ cells/mL, 每天早、晚各摇瓶一次。

每天取 1 mL 藻液, 用碘液固定, 以浮游植物计数框在倒置显微镜下计数藻细胞, 重复计数 3 次, 取其平均值, 得出平均藻细胞密度, 再计算出取样藻液的总细胞个数。

PSP 的提取 将处于稳定期生长的藻细胞分批在 4 °C 下离心 6 000 r/min, 10 min, 收集藻细胞, 然后用 0.05 mol/L 的乙酸重新悬浮, 在冰浴中超声破碎 (功率为 100 W, 破 15 s 停 10 s), 在显微镜下观察破碎状况, 直到破碎率达到 95% 以上, 然后在 4 °C 下分批于 10 000 r/min 离心 10 min, 上清液用超滤离心管离心 (10 000 r/min, 5 min), 藻液置于 -20 °C 条件下保存直到麻痹性贝毒素 (PSP) 分析。

PSP 的 HPLC 检测方法 采用 Oshima 等^[11] 的麻痹性贝毒分析方法并加以改进, 分析过程采用 3 次等梯度洗脱。第一次分析 GTX1-5 和 dcGTX2-3 类毒素, 洗脱液为 10 mmol/L 磷酸铵缓冲液含有 3.0 mmol/L 庚烷磺酸钠作为离子对试剂, pH 为 7.1; 第二次分析 STX 类毒素, 洗脱液为 30 mmol/L 磷酸铵缓冲液含有 2.0 mmol/L 庚基磺酸钠, pH 为 7.1, 并按 93.5:6.5 的比例加入乙腈; 第三次分析 C 类毒素 (C1-2), 洗脱液为 1.2 mmol/L 的四丁基磷酸铵溶液, 用氨水调整 pH 至 6.5。柱后衍生氧化剂为含有 10.0 mmol/L 高碘酸和 50 mmol/L 磷酸氢二钾的缓冲液, pH 为 9.0, 酸化剂为 0.5 mol/L 的乙酸溶液。洗脱液流速为 0.8 mL/min, 氧化剂和酸化剂的流速均为 0.4 mL/min, 色谱柱柱温 33 °C, GTX 类毒素和 STX 类毒素的柱后衍生温度为 75 °C, C 类毒素的柱后衍生温度为 65 °C。

样品中 PSP 毒素的 HPLC 定量测定: 每个水平的 3 个平行实验样品连续测定, 每个毒素组分的峰面积取平均值, 然后与相邻的两个标准样品对照进行定量计算, 以减小毒素组分峰面积变化所造成的误差。

PSP 的纯化 按照“PSP 的提取”中的方法大量处理藻细胞后, 将上清液合并, 冷冻干燥作为 PSP 粗毒素。再重新溶解在 0.1 mol/L 的乙酸溶液中, 加到用 0.1 mol/L 乙酸平衡的 1.8 cmID × 100 cm 的 Sephadex-G15 凝胶层析柱, 流速为 0.5 mL/min, 用部分收集器收集, 小白鼠生物检测法和荧光分光光度法检测定位。

PSP 的荧光分光光度法检测 将“PSP 的纯化”中的收集液从每管取 0.5 mL 用荧光检测来确定毒素位置。加入到 2 mL 氧化剂中 (50 mmol/L 磷酸二氢钾的缓冲溶液含有 10 mmol/L HIO₄, pH = 9.0), 在温度 T = 65 °C 下, 水浴加热

10 min,迅速取出加入 2.5 mL 浓度为 0.5 mol/L 醋酸,酸化后的毒素氧化液进行荧光检测(激发波长:330 nm,发射波长:390 nm),测定相对荧光强度。将具有最大荧光值的毒素收集液合并,作为毒素混合液。

PSP 毒素的浓缩 采用冷冻干燥方式对 PSP 毒素进行浓缩,以小鼠法监测该方法对毒素毒性的影响。

小白鼠生物检测法 参考 AOAC 制定的标准化方法(2000)操作^[9]。试验小白鼠为雄性昆明小白鼠,体重为(20 ± 1) g,每个平行用昆明小白鼠 3 只,毒性鼠单位的计算以 20 g 重的小白鼠在腹腔注射后 15 min 死亡的致死剂量规定为 1 个鼠单位(MU)。

2 结果与讨论

2.1 链状亚历山大藻细胞生长曲线

在对数期进行接种,藻细胞生长不会出现停滞期,在第二天就开始进入对数生长期,在接种后的 8 d 左右,藻细胞密度可高达 2.4×10^4 cells/mL 左右。对数期持续时间为 6 d,此后进入稳定期,藻细胞密度保持在 $(2.43 \sim 2.44) \times 10^4$ cells/mL(图 1)。

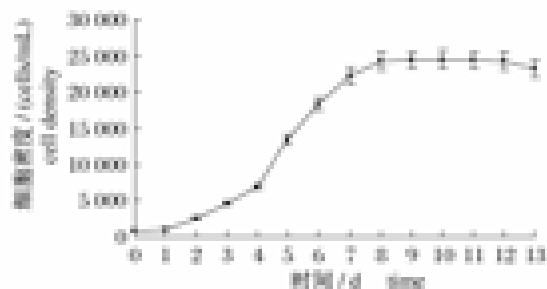


图 1 藻细胞生长曲线

Fig. 1 Growth curve of cell

2.2 链状亚历山大藻 PSP 毒素分析

提取物中的毒素 NEO、GTX4、GTX5 和 C1/2 的保留时间(图 2、图 3、图 4)与标准毒素的保留时间(图 5、图 6、图 7)基本一致,说明从该株藻中提取的毒素中含有 NEO、GTX4、GTX5 和 C1/2。但是提取毒素的比例和标准毒素有所不同,对于 C2、GTX5 来说,样品峰面积较标准毒素峰面积大,说明含量较高,而样品中 NEO、GTX4 和 C1 的峰面积明显小于标准毒素峰面积,说明这三类

毒素的含量较低(表 1),其它种毒素则未检测出。细胞中各个成分的含量大小依次为: GTX5 (3.830) > GTX4 (1.570) > C2 (1.169) > NEO (0.586) > C1 (0.211)(单位:fmol/cell),总体含量较低。

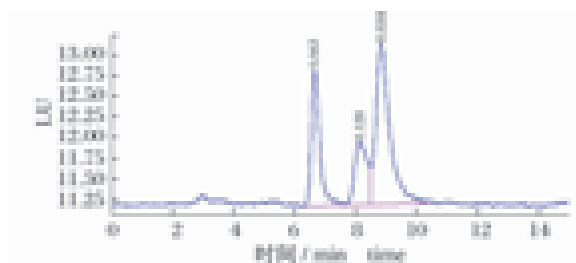


图 2 STX 类标准品色谱分离图

Fig. 2 Chromatographs obtained from STX standard



图 3 GTX 类标准品色谱分离图

Fig. 3 Chromatographs obtained from GTX standard

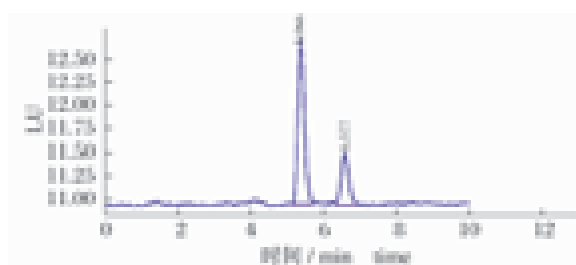


图 4 C 类标准品色谱分离图

Fig. 4 Chromatographs obtained from C standard

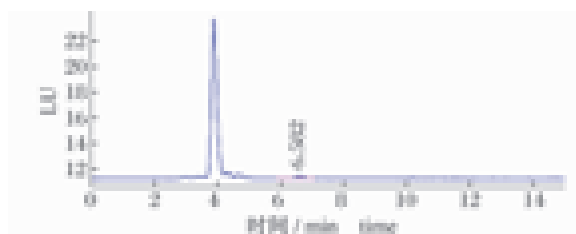


图 5 样品 STX 类色谱分离图

Fig. 5 Chromatographs obtained from STX of sample

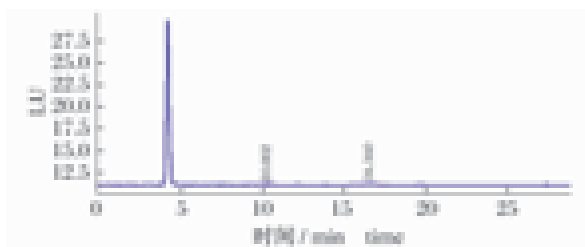


图6 样品 GTX 类色谱分离图

Fig. 6 Chromatographs obtained from GTX of sample

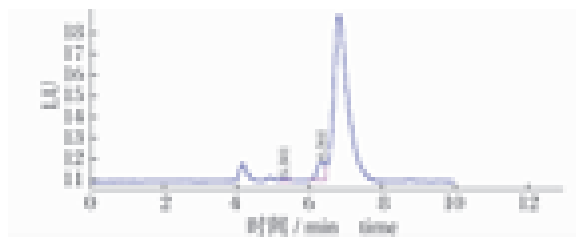


图7 样品 C 类色谱分离图

Fig. 7 Chromatographs obtained from C of sample

表1 链状亚历山大藻的毒素成分与含量

Tab. 1 Toxin ingredient and content of *A. catenella*

毒素成分 oxin components	标准品峰面积 standard peak area	样品峰面积 sample peak area	标准品浓度 ($\mu\text{mol/L}$) standard concentration	样品浓度 ($\mu\text{mol/L}$) sample concentration	相对分子质量 relative molecular weight	毒素含量 (fmol/cell) toxin content	百分比 (%) percentage
C1	25.50	2.44	0.475 0	0.045 5	475.4	0.211	2.86
C2	9.15	15.85	0.145 8	0.252 6	475.4	1.169	15.87
GTX4	6.75	5.23	0.437 5	0.339 2	411.3	1.570	21.31
GTX5	7.20	7.33	0.812 5	0.827 5	379.3	3.830	52.00
NEO	30.60	4.77	0.812 5	0.126 6	315.3	0.586	7.96
总计 total						7.366	100

贺华等^[12]对渤海一株链状亚历山大藻的麻痹性贝类毒素的分析表明:该藻细胞中主要含有C毒素和GTX1-4毒素,每个细胞毒素含量约为10.81 fmol/cell,其中C2的含量达到了85.2%。吴振兴等^[13]对东海一株链状亚历山大藻的毒性进行了HPLC的检测,结果显示:此株藻中含有neoSTX、GTX-5,6、C1和C2五种毒素,其中C2毒素为主要成分,占其所含总PSP毒素的摩尔百分比为88.39%。本株藻中GTX5的含量最多,达到了52%,其次为GTX 421.31%,而C2的含量占毒素总量的15.87%,平均每个细胞毒素含量约为7.366 fmol/cell,相比较而言,本实验所用的藻株其毒素的种类与前二者基本相同,但主要毒素的含量却不同,且本藻株毒力较低。

Jiang等^[6]研究了不同环境因子对塔玛亚历山大藻(大鹏湾)的藻毒力影响,其结果表明,不同培养条件下的塔玛亚历山大藻细胞毒力差异明显。即使有其他研究者^[14-15]使用了与其相同的藻株,仍然测出了不同的藻毒力,藻毒力相差最大可达30倍。因此,笔者分析造成这种差别的原因主要是:虽然同是亚历山大属,但分离于不同的海域,故其种系可能不同,且藻细胞的培养条件、培

养时间及测定的方法等方面的差异,也会影响产毒情况。

2.3 凝胶色谱中PSP荧光检测

用Sephadex-G15凝胶层析柱纯化PSP,经荧光分光光度法检测出PSP毒素集中在370~450 mL(图8)。将不同阶段的收集液混合后,做小白鼠生物检测,结果显示在有荧光峰值的位置(37~45管)试验小鼠全部死亡,而其余各管收集液均未使小鼠死亡,这与用荧光法检测定位的结果吻合(表2)。将收集液冷冻干燥,回收率可达到95%以上,因此Sephadex-G15凝胶层析柱能有效地除粗毒素中的杂质。

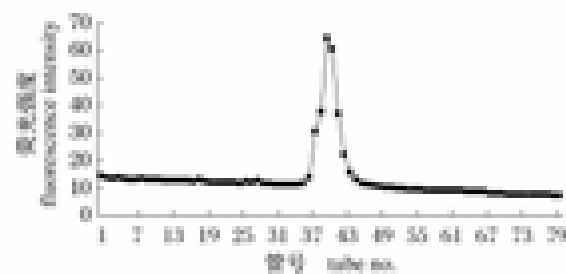


图8 毒素组分凝胶柱分离荧光检测

Fig. 8 Fluorescence intensity of different fractions eluted from Sephadex-G15 column

表 2 麻痹性贝类毒素的小白鼠检测结果

Tab. 2 Result of mouse bioassay of PSP

检测项 test items	剂量(mL) dose	动物数 mice quantity	死亡数 death quantity	总毒性(MU) total toxicity
对照组	1	3	0	-
PSP 粗提液	1	3	3	6 872
Sephadex-G15				
1~36	1	3	0	-
37~45	1	3	3	5 778
46~80	1	3	0	-
AC	1	3	3	4 820

注:1~36,37~45,46~80 均为过 Sephadex-G15 凝胶层析柱时的收集液的管号; AC 为经真空冷冻干燥后得到的 PSP 白色粉末。

Notes:1~36,37~45,and 46~80 were the tube numbers of the refined purified via Sephadex-G15 column chromatography. AC was the PSP white power collected after vacuum freeze-drying.

2.4 PSP 毒素的浓缩

通过小白鼠生物检测结果显示(表 2),总毒力为 6 872 MU 的 PSP 粗提液,在经过 Sephadex-G15 凝胶层析柱后,得到了总毒力为 5 778 MU 的毒素收集液。采用真空冷冻干燥机将峰值处的收集液冻干,得到 PSP 的白色粉末,再将该粉末重新溶解,用小白鼠生物检测其总毒力为 4 820 MU,毒性变化较小,且真空冷冻干燥时干燥速度快,是比较理想的浓缩方法。得到的 PSP 白色粉末可用于后期的研究。

3 结论

通过实验室大量培养有毒赤潮藻类,对 PSP 的提取提供了充足的原料。在对链状亚历山大藻的培养过程中发现,接种处于对数期的藻细胞则可很快进入对数生长期。在藻细胞生长的最佳时期提取 PSP,经 HPLC 检测该株藻各成分的浓度为 GTX5 (0. 827 5) > GTX4 (0. 339 2) > C2 (0. 252 6) > NEO(0. 126 6) > C1 (0. 045 5) (单位:μmol/L),而其它成分未检测出。粗提液呈橙红色,可能有蛋白质和色素等杂质。用 Sephadex-G15 凝胶层析柱分离能够有效的分离纯化 PSP 毒素,回收率高,且毒性没太大的变化,采用荧光分光光度检测法和小白鼠检测法对洗脱液中 PSP 定位,能够准确确定毒素组成及含量。收集液经冷冻干燥后可用于后期进一步的研究。

参考文献:

[1] Smayda T. Novel and nuisance phytoplankton blooms in the sea:evidence for a global epidemic[J]. Toxic Marine Phytoplankton,1990:29-40.

[2] Burkholder J M. Implications of harmful microalgae and heterotrophic dinoflagellates in management of sustainable marine fisheries [J]. Ecological Applications,1998,8:S37-S62.

[3] Landsberg J H. The effects of harmful algal blooms on aquatic organisms [J]. Reviews in Fisheries Science,2002,10(2):113-390.

[4] 张清春,于仁成,周名江,等. 不同类型含磷营养物质对微小亚历山大藻(*Alexandrium minutum*)生长和毒素产生的影响[J]. 海洋与湖沼,2005,36(5):465-474.

[5] 李天深,于仁成,周名江. 链状亚历山大藻(东海株)对磷营养物质的需求与吸收策略[J]. 海洋环境科学,2009,28(4):355-359.

[6] Jiang T J,Huang W J,Wang Z H, et al. Effects of water temperature, salinity and pH on growth and toxicity of *Alexandrium tamarense*(Lebour)(Dapeng Bay strain) [J]. Chin J Appl Environ Biol,2000,6(2):151-154.

[7] Chou H N,Chenb Y M,Chen C Y. Variety of PSP toxins in four culture strains of *Alexandrium minutum* collected from the southern Taiwan [J]. Toxcon,2004,43:337-340.

[8] 曾呈奎,相建海,海洋生物技术[M]. 济南:山东科学技术出版社,1998:416-427.

[9] AOAC Official Method 959. 08, Paralytic Shellfish Poison Biological Method[S]. 2000.

[10] Kawatsu K, Hamano Y, Sugiyama A, et al. Development and application of an enzyme immunoassay based on a monoclonal antibody against gonyautoxin components of Paralytic Shellfish Poisoning toxins [J]. Food Protection,2002,65:1304-1308.

- [11] Oshima Y, Machida M, Sasaki K. Liquid chromatographic fluorometric analysis of paralytic shellfish toxins[J]. *Agric Biol Chem*, 1984, 48(7): 1707-1711.
- [12] 贺华, 王学魁. 渤海裸甲藻和链状亚历山大藻的麻痹性贝毒毒素分析[J]. *海洋通报*, 2007, 26(5): 67-73.
- [13] 吴振兴, 邹迎麟, 朱明远. 中国海域四株亚历山大藻的毒素分析[J]. *海洋科学进展*, 2005, 23(2): 205-210.
- [14] Anderson D M, Kulis D M, Qi Y Z, *et al.* Paralytic shellfish poisoning in southern China[J]. *Toxicon*, 1996, 34(5): 579-590.
- [15] 郑淑贞, 林晓, 林慧贞, 等. 塔玛亚历山大藻的麻痹性贝毒研究[J]. *海洋与湖沼*, 1998, 29(5): 477-480.

Cultivation of *Alexandrium catenella* and extraction and detection of paralytic shellfish poisoning (PSP)

LIU Xiao-li, ZHANG Chao-hua, XIE Wan-cui, YANG Xi-hong*, QIN Xiao-ming
(Key Laboratory of Aquatic Product Advanced Processing of Guangdong Higher Education Institutes,
College of Food Science & Technology, Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524088, China)

Abstract: In order to accumulate the basic data and the raw material for future research, paralytic shellfish poisoning (PSP) of *Alexandrium catenella* cultured in the laboratory was studied. Firstly, in the logarithmic phase the algae cells were inoculated, the cell growth rate kept higher in initial 8 days. After it attained the highest density of cell (2.4×10^4 cells/mL), the algae were collected by filtration, the crude toxin was extracted by 0.05 mol/L acetic acid. Combined with the mice bioassay, the crude toxin was identified. The result showed that the major toxic component from *A. catenella* were C1/2, GTX4, GTX5 and NEO by high performance liquid chromatography (HPLC) and the concentrations of them were about 0.045 50, 0.252 6, 0.339 2, 0.827 5, 0.126 6 $\mu\text{mol/L}$ respectively. The crude toxin was purified via Sephadex-G15 column chromatography and detected by fluorescence spectroscopy and the mice bioassay, and the result showed that the impurities can be effectively excluded by Sephadex-G15 column chromatography.

Key words: *Alexandrium catenella*; paralytic shellfish poisoning toxins; HPLC; fluorescence spectroscopy; mice bioassay

Corresponding author: YANG Xi-hong. E-mail: yangxihong63@163.com