

小定鞭藻毒素的分离与鉴定*

何家莞 陈明惠 何振荣

(中国科学院水生生物研究所, 武汉 430072)

提 要

从大量死鱼的鱼池中收集分离出小定鞭藻 *Prymnesium parvum* 的毒株, 并在实验室成功地进行了单种培养, 当温度 23℃, 光照 600—800lx, 盐度约 12—16‰左右时, 该藻在海水及人工海水培养基中均生长良好, 在对数生长末期到平衡期溶血毒素活性最高。从藻细胞及浓缩的培养液中提取出二种毒素: 溶血毒素 (Haemolytic toxins) 和鱼毒素 (Ichthyotoxins)。用新鲜牛血球测定了溶血毒素活性; 用孔雀鱼测定了鱼毒素活性。用部分纯化的溶血毒素经元素分析、红外光谱、核磁共振及 FAB 质谱测定, 结果显示该藻溶血毒素可能是一个糖脂。

关键词 小定鞭藻, 水华, 溶血毒素, 鱼毒素

小定鞭藻 (*Prymnesium parvum*) 广泛分布于海洋及半咸水内陆水体中, 这种鞭毛藻四季均可生长, 但以春初, 秋末繁殖迅速, 并在水体中形成水华。这种水华不仅引起鱼类大量死亡, 而且对其它水生动物也产生不利影响, 是渔业生产的一大天敌。

国外对小定鞭藻已做了不少研究, 认为该藻含有引起鱼及其他鳃呼吸动物死亡的毒素^[1, 2]; 引起哺乳动物等红血球细胞溶解的溶血毒素及镇痉素^[3, 4], 而且对溶血毒素进行了纯化及结构测定, 但其结论尚不一致。一些学者认为^[5]该毒素是一个乳糖甘油脂; 而另一些学者却认为它是一个磷酸蛋白脂等等^[6, 7]。

国内自 1963 年起先后在辽宁、内蒙、陕西、山东、天津等地的半咸水鱼池及水库中均发现了这种藻的存在, 并报道了它对渔业生产带来的危害, 一些科研单位, 大专院校也进行了有关该藻生物学及防治措施的研究, 但对该藻毒素的特性及结构分析尚缺乏研究。

本文报道了有毒小定鞭藻的分离、培养、毒素的提取、测定。获得了少量较纯的溶血毒素, 并对其特性及结构进行了研究与探讨。

1 材料和方法

1.1 藻类培养

将天津、山东地区鱼池中形成水华的小定鞭藻采回实验室, 按常规方法进行分离、纯化。把获得的单克隆藻株进行扩大培养, 培养液及培养条件参照文献^[6]并稍加修改。(其

* 国家自然科学基金资助项目: 编号38970588。

1994年4月13日收到。

中一部份藻种为天津水产研究所赠送,由本室藻种库保存)。

天然海水培养基		人工海水培养基**	
NaNO ₃	0.05g	NaCl	15g
K ₂ HPO ₄	0.005g	MgCl ₂ · 6H ₂ O	2.5g
Fe · citrate (1%)	0.1ml	KCl	0.4g
Urea	0.03g	KNO ₃	0.1g
B ₁₂	200m μ g	CaSO ₄ · 2H ₂ O	0.5g
B ₁	200m μ g	K ₂ HPO ₄ · 3H ₂ O	2.3mg
Sea water*	100ml	EDTA	50mg
		B ₁₂	200m μ g
		B ₁	200m μ g
		P ₄	0.3ml
		蒸馏水	2500ml

* 为取自青岛海洋所实验室经过滤的海水。

** 用 S. ULTZUK 等人^[6]所用的培养基稍加修改。二种培养基的盐度均为 15‰左右。

1.2 毒素的提取

将种群增长至对数生长末期(30 d 左右)的藻细胞经 400 r / min 离心取得藻细胞浆和上清液。

1.2.1 从藻细胞提取毒素

将冷冻的藻细胞溶于 20—50 倍体积的氯仿：甲醇中(2 : 1)进行研磨, 0℃ 放置 1h 左右, 离心(10000g × 30min)弃杂质。上清液(粗毒素)冷冻干燥。用丙酮 2—3 次提取去除部分叶绿素后, 不溶物减压干燥, 用少量氯仿：甲醇(7 : 3)溶解后上硅胶柱(Silica Gel loomesh), 用不断增加甲醇比例直至氯仿：甲醇为 1 : 1 时进行洗脱, 洗脱出含有不同色素的 6 个带, 测溶血素活性, 溶血毒素最强的收集部分减压干燥后, 过 C18 柱(Bond Elut C18 cartridge), 用甲醇及甲醇 : 水(1 : 1)洗脱, 测溶血素活性后, 将有毒的甲醇洗脱液浓缩, 用 3 倍体积的乙醚沉淀, 离心收集沉淀, 溶于甲醇 : 水中(4 : 3), 减压干燥, 保存备用。

1.2.2 从培养液中提取毒素

该藻生长至对数末期, 离心去除藻细胞, 收集 3000—4000ml 培养液, 用边搅拌边加浓碱(NaOH)使其产生白色絮状沉淀, 当 pH 为 10—11 时, 让其充分沉淀 1h, 离心将沉淀溶于 1mol / L HCl(约 100mL)。使溶液 pH 达 2—3。置透析袋中在 100mmol / m³ HCl 中 6℃ 透析 3d, 透析物冷冻干燥获约 200mg 粗毒素(A)。将此物放入冷的绝对丙酮得干燥物(B), 用 20ml 甲醇提取 B, 减压干燥得约 10mg 淡黄色粉末(C), 将 C 放在绝对丙醇中洗, 沉淀用丙醇 : 水(9 : 1)提取, 减压干燥溶于 30ml 丙醇 : 水(1 : 1), 离心去掉沉淀, 其上清液不断加入绝对丙醇, 减压干燥得约 5mg(D)浅黄色粉末, 按前所述, 经硅胶柱和 Bond-Elut C18 柱进一步纯化, 含毒素的部分, 冷冻干燥, 保存备用。

1.3 毒素的测定

1.3.1 溶血毒素(Haemolytic toxins)活性的测定

1.3.1.1 牛血球的制备 取新鲜牛血溶入等体积等渗液于4℃冰箱或室温保存。实验前取血球溶于10倍体积4℃保存的等渗盐溶液($\text{NaCl } 73\text{ mol/m}^3$, 柠檬酸钠 42 mol/m^3 葡萄糖 114 mol/m^3 用柠檬酸调pH至5.0)。低速离心5 min(500 r/min)弃上液, 如此重复三次, 然后将牛血球用等渗液稀释50倍(OD640约0.8左右)备用。

1.3.1.2 标准曲线的制作 洋地黄皂甙(Digitonin)是一种表面活性剂, 具溶血作用, 用其做标准物可以测定藻细胞及培养液中溶血素活性。配制 $5.2\mu\text{g/ml}$ 的标准洋地黄皂甙水溶液, 按浓度梯度取样使其含0.6—1.4溶血素单位/ml, 与2ml等渗盐溶液(pH5.0)及经上述处理的新鲜牛血球1ml充分混合, 置30℃水浴锅内, 保温25min, 然后在721分光光度计上, 在波长640nm处测光密度值。以Digitonin的浓度为横座标, 溶血的百分数为纵座标作图(图1)。

1.3.1.3 溶血毒素活性的测定 在标准实验系统中加入经甲醇溶解, 并经稀释的藻毒素(毒素占总体积的0.4%左右), 按上述方法测光密度下降, 确定溶血毒素活力的大小, 并计算出溶血素单位。1个溶血素单位(HU)指的是: 在1ml标准实验系统中(含等渗液、牛血球、溶血毒素、混合后溶液pH为5.0)使牛血球溶解50%时所需藻毒素的量(1.3 μg 的Digitonin是1个溶血素单位)。

1.3.1.4 鱼毒素活性的测定 用体长为25—40mm的孔雀鱼作为实验材料, 在250ml或100ml烧杯中注入100ml或50ml标准实验液(20 mol/m^3 tris缓冲液pH8.5, 链霉素或精胺0.1—0.05mg/ml)其中放孔雀鱼3尾, 同时加入0.01或0.02ml甲醇溶解毒素粗提液。在25℃(黑暗)观察鱼的死亡情况, 规定1个鱼毒素单位为: 在上述标准实验系统中, 8h内杀死所有鱼时, 每毫升所含藻毒素的最低量。

1.4 溶血毒素的结构分析

按溶血毒素纯化的方法获得的较纯溶血素样品, 进行了红外光谱, 核磁共振光谱, 质谱及元素的分析测定。

2 实验结果

2.1 小定鞭藻的种群增长与产毒曲线

2.1.1 不同培养液与种群增长曲线

小定鞭藻是生长在海水及咸水水体中的浮游鞭毛藻类, 因此在海水培养液中生长良好。但对远离海的实验室往往很难得到海水(特别是大量培养时)。为此作者进行了人工海水代替天然海水的培养试验, 并观察它的种群生长(温度22℃, 光照800lx)。从图2可

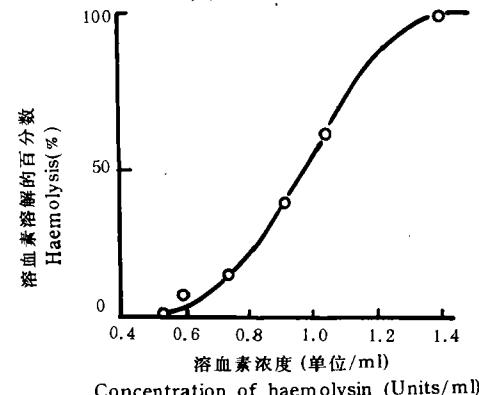


图1 溶血素浓度与溶血百分数之间的关系

Fig.1 Relationship between concentration of haemolysin and haemolysis (%)

以看出,该藻在上述培养条件下,无论是用天然海水或人工海水培养液进行培养均生长良好。通常当温度达到30—32℃时,藻细胞会停止生长,且变白沉淀。实验证明:盐度和光强对藻的正常生长也是很重要的,盐度在12—16‰,光照强度在800—1000lx时。从藻细胞和培养液中均能获取较多的毒素。

2.1.2 从小定鞭藻种群不同生长期所收集的藻细胞浆,经反复冻融,按方法(1.3)测定其毒性。结果表明该藻在指数增长末期进入平衡期时,突然出现毒性,并达到最高值。此结果与Mitsui,等人用蓝藻 *Synechococcus* sp. 的实验结果一致(图2)。

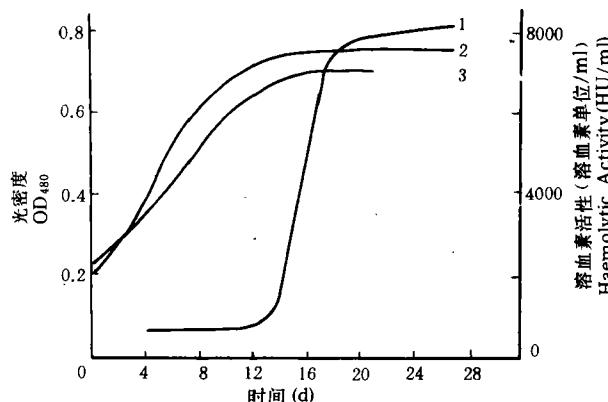


图2 小定鞭藻细胞生长与溶血毒素活性

Fig.2 Haemolytic activity of methanol soluble fractions of the cells during batch cultured growth of *Prymnesium parvum*

1.溶血素活性(Haemolytic activity): 2.天然海水培养基中的生长曲线(Growth curve in natural seawater medium): 3.人工海水培养基中的生长曲线(Growth curve in artificial seawater medium)

2.2 小定鞭藻毒素的特性及其结构分析

2.2.1 溶血毒素和鱼毒素活性

从标准曲线图可以看出在溶血单位为0.6—1.4 HU/ml这个范围内,溶血百分数与溶血素浓度基本呈直线关系,在标准实验系统中,能使血球溶解50%时,即为1个溶血素单位(HU),对于Digitonin来说:相当于1.3μg。据此,可查出从不同纯化阶段藻细胞中提取出的溶血毒素和鱼毒素活性。

经离心分离去除藻细胞后的培养液,按前述方法提取,并测定其中所含两种毒素的活性(表1)。

从表可看出,作者采用Vlitzur等和Yaviv^[6,7]等研究者对该藻毒素纯化方法。并用硅胶和Bond-Elut C18柱进一步纯化,(柱层析;在溶剂混合物中的溶解性;在双相溶剂混合物中分相等)从藻细胞和培养基中提取并纯化了溶血毒素和鱼毒素。

2.2.2 小定鞭藻毒素的特性

该藻从对数生长末期进入稳定期产生毒素(图2),从藻细胞和培养液中提取出并获得较纯毒素,毒素能溶于水,有机溶剂及双相溶剂混合物,pH对毒素活性,特别是鱼毒素活性有很大影响。当pH<5时,表现出溶血素活性;而pH从7—9时,鱼毒素的活性随着pH的增加而提高(表2)。鱼毒素活性的大小不仅依赖某些辅助因子及阳离子^[8,9],而

且受到这些因子浓度大小的影响, 在所有辅助因子中以精胺(spermine)4mol / m³的激活作用最强; Ca⁺⁺有增加鱼毒素活性的作用, 而 Na⁺有抑制活性的作用(图 3)。

表 1 小定鞭藻细胞和培养基中的毒素

Tab.1 The toxins of algae cells and extracellular medium of *Prymnesium parvum* cultures

部位名称 Fraction	纯化程度 Purification	溶血素活性(溶血素单位 / mg)	鱼毒素活性(鱼毒素单位 / mg)
		Haemolytic activity (HU / mg)	Ichthyotoxic activity (IU / mg)
藻细胞 Algal cells	A(粗提液) B(纯化液)	3000 9000	1100 2700
培养基 Medium	A(粗提液) B(丙酮提取液) C(甲醇提取液) D(纯化液)	1100 1400 4500 6000	400 470 1400 1700

表 2 pH 对鱼毒素活性的影响

Tab.2 The effect of pH on ichthyotoxic activity

辅助因子 Co-factor used at	鱼毒素活性(鱼毒素单位 / 毫升) Activity of ichthyotoxin(IU / ml)		
	pH 7.0	pH 8.0	pH 9.0
硫酸链霉素 Streptomycin	< 100	1000	4000
精胺 Spermine	< 100	10,000	40,000
氯化钙 CaCl	< 100	1000	4000
氯化钠 NaCl	< 100	< 100	< 100
对照(无辅助因子) (without co-factor)	< 100	< 100	< 100
Contrast			

注: 实验在 5mol / m³-tris 缓冲液, 20—25℃ 黑暗中进行, 8h 后记录实验结果, 表中是用每个辅助因子所做的 3 次实验结果

Experiments were carried out at pH 7.0, 8.0 and 9.0 with 5 mol / m³-tris buffer at 20—25℃ in dark. Results were recorded after 8 hr. Identical results were obtained in all of the three assays conducted with each cofactor.

2.2.3 纯化的溶血毒素结构初步测定

纯化的溶血毒素元素分析不含 N, 为 C, H, O 组成的化合物。红外光谱分析在 3400^{cm}⁻¹, 1150^{cm}⁻¹ 及 1060^{cm}⁻¹ 有吸收带, 说明含有羟基, 1639^{cm}⁻¹ 有吸收带则含 C=C

双键; 同时在 896cm^{-1} 有吸收峰可能有 $\text{R}-\text{C}=\text{C}-\text{H}$, 从 FAB 质谱中可知未知物含有一个葡萄糖基, 它的准分子离子峰是 $611[\text{M}+\text{H}]^+$ 则分子量 $M=610$, 所以推测小定鞭藻的溶血毒素可能是小分子糖脂。

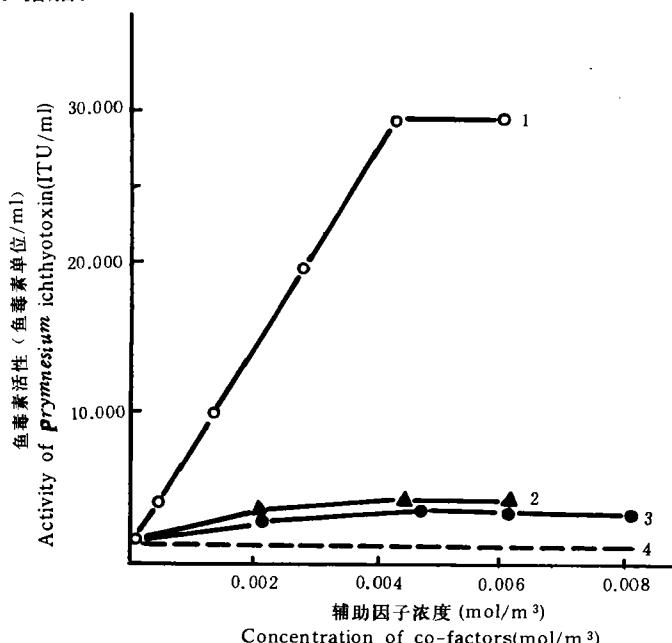


图 3 精胺 1、链霉素 2、氯化钙 3、氯化钠 4 对小定鞭藻鱼毒素活性的影响(所用毒素含 9000 鱼毒素单位 / ml)

Fig.3 The effect of spermine 1, streptomycin 2, CaCl_2 3 and NaCl 4 on activity of *Pyrrhomonas parvum* ichthyotoxin (The toxin concentration, 9000ITU / ml)

3 讨论

3.1 不同产毒藻类的毒性及致毒机理比较

作者从大量死鱼的咸水鱼池中分离的有毒小定鞭藻, 成功地进行了大量培养, 毒素分离纯化。测定实验证明: 该藻含有可引起鱼类死亡的鱼毒素, 使红血球溶解的溶血素及引起小白鼠死亡的毒素。Yasumoto 等^[10]研究了“9”种底楼甲藻的毒素。从他们的研究结果可以看出, 甲藻可产生与小定鞭藻相同的毒素, 而且各种毒素在不同种中的毒性强度亦不同, 其中有 6 个种可产生使小白鼠致死的毒素, 3 个种可产生鱼毒素, 而所有的种可以产生溶血毒素。小定鞭藻所产生的毒素及毒素活性大小与甲藻 *Amphidinium carteri* 较为相似。Mitsui, 等^[3], 也从海生蓝藻 *Synechococcus sp.* 中提取出与甲藻及小定鞭藻的毒性与结构类似的溶血毒素。研究结果指出^[3, 11]致死老鼠的毒素是类似于肿瘤促发剂大田软海绵酸(Okadaic acid)的物质。由于引起动物肝损伤, 使之死亡。溶血素被认为是类似于 Digitonin 的物质。使动物红血球细胞溶解破裂引起动物死亡。许多文献报道^[2, 12]鳃是鱼毒素作用的靶器官, 毒素对生物膜的可逆作用引起通透、泄漏, 使之死亡。

可以推断小定鞭藻、甲藻与一种名称海生聚球藻的蓝藻所含毒素其致毒方式是相似的。

3.2 溶血毒素结构的探讨

在小定鞭藻所含的3种毒素中, 化学结构研究的较多的是溶血毒素, 但所获得的研究结果尚不一致, Ulitzur 和 Shilo 等^[6]认为它是一种酸极性蛋白脂; Kozakai 等^[5]认为是一种半乳糖甘油脂; 近几年较多的研究^[2,3]认为溶血毒素由5种组分组成, 其中溶血素I-II被认为是单或双半乳糖甘油脂。它们的毒素活性分别是商品型 Digitonin(洋地黄皂甙)活性的80%和25%, 而毒素III-V的毒素活性分别是商品型 Digitonin 的 100, 9 和 2 倍。除I-II外, 其它3种毒素的结构尚不清楚。Kozakai 和 Mitsui, A, 等所做的小定鞭藻溶血毒素I-II和聚球藻的溶血毒素I-II的结果与以上甲藻溶血毒素I-II的结构类似均为半乳糖甘油脂。作者从硅酸柱上也将粗毒素分成5个组分, 仅取溶血素活性高, 含量多的一个组分进一步纯化、鉴定。由于纯结晶量少、核磁共振仅做了¹H NMR而未做¹³C NMR 测定, 但综合其它测定结果, 特别是在 FAB 质谱分析中, 未知毒素的准分子离子峰是 $[M + H]^+ = 611$, 其分子量 $M = 610$, 又碎片峰中有 $M / 8477$ 则 $610 - 477 = 163$, 显示一个糖基。由于在测 IR 和 MS 时, 将含有待测样品的丙醇溶液于 105°C 干燥得固体物, 所以推测结构和可能结构如下。

推测小定鞭藻溶血毒素组分之一结构如图4(A)

可能结构如图4(B)

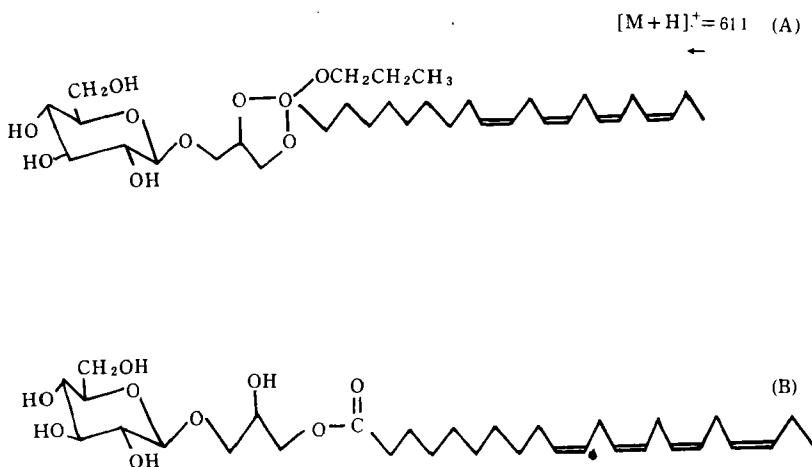


图4 小定鞭藻溶血毒素组分之一结构

Fig.4 One component of hemolysin from *Prymnesium parvum*

作者初步认为小定鞭藻溶血毒素组分之一为糖脂。

在测定中发现粗毒素(含鱼毒素和溶血毒素)的红外光谱在 1725cm^{-1} 有吸收带, 说明含有羰基, 而纯化的溶血毒素红外测定则不含羰基或在进一步纯化过程中丢失; 辅助因子及 pH 8—9 均对鱼毒素活性有激活作用, 而纯化的溶血毒素不受辅助因子影响, 当在 pH 为 5 时活性稳定, 所以这两种毒素的相互关系及结构异同点, 尚不清楚。由于小定鞭藻毒素较为复杂, 化学结构及致毒机理将有待进一步深入研究。

参 考 文 献

- [1] Keizo Inoue, Masae Imai, and Takayuki kitagawa., Studies on the mechanism of action of *Prymnesium* toxin toward membranes. *Animal. plant and Microbiol toxins*, 1976, 339—352.
- [2] Ulitzur, S and Shilo, M., Mode of action of *Prymnesium parvum* ichthyotoxin. *J. Protozool*, 1966, 13: 332—336.
- [3] Mitsui, A. Rosner, D. et al., Hemolytic toxins in marine cyanobacterium *Synechococcus* sp. Red Tides—Biology Environmental Science and Toxicology. *Ed by Tomotoshi okaichi. et al.* 1988 pp. 367—370.
- [4] Shilo, M., Formation and mode of action of algal toxins. *Microbiological Reviews*. 1967, 31(3): 180—193.
- [5] Hiroshi Kozakai, Yasukatsu Oshima and Takeshi Yasumoto., Isolation and structural elucidation of haemolysin from the Phytoflagellate *Prymnesium*. *Agric. Biol. chem*, 1982, 46(1): 233—236.
- [6] Ulitzur, S. and shilo, M., Procedure for purification and separation of *Prymnesium parvum* toxins. *Biochim Biophys Acta*, 1970, 201: 350—363.
- [7] Yariv, J. and Hestrin, S., Toxicity of the Extracellular phase of *Prymnesium parvum* Cultures. *J. Gen. Microbiol*, 1961, 24: 165—175.
- [8] Ulitzur, S. and shilo, M., A sensitive assay system for determination of the ichthyotoxicity of *Prymnesium parvum*. *J. Gen. Microbiol*, 1964, 36: 161—169.
- [9] Keich, K. and Parnas., Effect of illumination on ichthyotoxin in an axenic culture of *Prymnesium parvum* carter. *J. Protozool*, 1962, 9: 38—40.
- [10] Takeshi Yasumoto, Naoko Seins. et al., Toxins produced by benthic *dinoflagella tes*. *Biol. Bull*, 1987, 172: 128—131.
- [11] Collins, M., Algal toxins. *Microbiological Reviews*. 1978, 42(4): 725—746.
- [12] Zipora Dafni and shilo, M., The cytotoxic principle of the phytoflagellate *Prymnesium parvum*. *The Journal of cell Biology*, 1966, 28: 461—470.

ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF TOXINS FROM THE PHYTOFLAGELLATE *PRYMNESIUM PARVUM*

He Jiawan, Chen Minghui and He Zhenrong

(Institute of hydrobiology, The Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072)

Abstract

Toxic strains of *Prymnesium parvum* were isolated from fish ponds with blooms of a toxicogenic flagellate *P. parvum* and high fish mortality. The pure culture was successfully achieved in laboratory. Culture of *P. parvum* grew well in medium of artificial sea water medium (Salinity, 12—16‰) and natural sea water at 23°C and 600—800 lx illumination. Haemolytic activity appeared during the stationary phase of the exponential growth phase and maximized at the latter stationary phase. Two kinds of toxins, i. e. hemolysin and ichthyotoxin were extracted from *Prymnesium* cells as well as from extracellular medium. The activity of *P. parvum* haemolysin and ichthyotoxin was detected respectively using bovine erythrocytes and *Poecilia reticulata*. The dependence of *P. parvum* ichthyotoxin on various co-factors was also studied. The major component of a homolysin was identified being a glycolipid.

Key words *Prymnesium parvum*, Blooms, Haemolysin, Ichthyotoxin