

# 实验室培养球形棕囊藻溶血毒素的提取、分离及其生成特征

彭喜春<sup>1</sup>, 杨维东<sup>2</sup>, 刘洁生<sup>2\*</sup>, 彭志英<sup>1</sup>, 邓瑞霞<sup>2</sup>, 江天久<sup>2</sup>

(1. 华南理工大学食品与生物工程学院, 广东 广州 510640; 2. 暨南大学生命科学技术学院, 广东 广州 510632)

**摘要:** 研究从实验室培养的球形棕囊藻 (*Phaeocystis globosa*) 提取溶血毒素的条件, 探讨不同生长期球形棕囊藻溶血毒素的生成特征, 用薄层色谱法对溶血成份进行了初步分析。结果表明, 球形棕囊藻细胞壁的超声波破碎最适条件为: 功率 600 W, 4℃ 下处理 30 min。对数生长期、平稳期和衰亡期藻细胞适宜处理量分别为每次 3 000、2 000、1 000 ml; 在球形棕囊藻生长的平稳期和衰亡期具有明显的溶血活性, 对数生长期溶血活性很低, 甚至检测不到。球形棕囊藻溶血毒素至少含有 4 种糖脂类化合物。

**关键词:** 藻类; 球形棕囊藻; 溶血毒素; 超声波

中图分类号: Q949.206

文献标识码: A

文章编号: 1005-3395(2005)01-0025-04

## Extraction of Haemolytic Substances from Alga *Phaeocystis globosa*

PENG Xi-chun<sup>1</sup>, YANG Wei-dong<sup>2</sup>, LIU Jie-sheng<sup>2\*</sup>,

PENG Zhi-ying<sup>1</sup>, DENG Rui-xia<sup>2</sup>, JIANG Tian-jiu<sup>2</sup>

(1. Food and Biological Engineering College, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China;

2. College of Life Sciences and Technology, Jinan University, Guangzhou 510632, China)

**Abstract:** The extraction of haemolytic toxin from *Phaeocystis globosa* was studied under laboratorial condition at various algal growth phases. Optimal conditions for breaking algal cell wall by ultrasonic was 600 W of power treated for 30 minutes at 4℃, the maximum volume of cultures being 3 000, 2 000 and 1 000 ml at logarithmic, stationary and senescent phases, respectively. High haemolytic activity was observed in stationary and senescent phases, but low or even nil in logarithmic phase. At least four haemolytic substances were found in this alga.

**Key words:** Alga; *Phaeocystis globosa*; Haemolytic toxin; Ultrasonic

近年来, 我国东南沿海持续发生大面积球形棕囊藻 (*Phaeocystis globosa*) 赤潮, 给当地水产养殖业造成极大危害<sup>[1,2]</sup>。何家苑等报道现场采集的球形棕囊藻可产生活性较强的溶血毒素, 并认为可能是导致大范围鱼类死亡的原因之一<sup>[3]</sup>。目前, 国内外对球形棕囊藻产毒的研究不多。在实验室培养条件下球形棕囊藻是否产毒? 毒素特征是否与野生球形棕囊藻相同? 不同生长期的毒素生成的规律如何? 这些均未见报道。本试验研究球形棕囊藻溶血毒素的提

取条件, 用薄层色谱法对溶血成份进行初步的分离和分析, 对不同生长时期球形棕囊藻溶血毒素的活性特征进行初步研究, 为进一步研究和探讨球形棕囊藻溶血毒素的生成机制提供参考。

### 1 材料和方法

**材料** 球形棕囊藻 (*Phaeocystis globosa* Sherffel) 汕头 (ST) 株系由暨南大学水生生物研究所藻种室提供。所用小白兔购自暨南大学实验动物

收稿日期: 2004-01-05 接受日期: 2004-04-01

基金项目: 国家自然科学基金(30470321, 30200030); 国家重点基础研究发展规划 973 项目(2001CB409710, 2001CB409709); 广东省自然科学基金重点项目(021168); 广州市科技计划项目(2002J1-C0011)资助

\* 通讯联系人 Corresponding author

场。

**仪器与试剂** LRH-250-GS 人工光照气候箱 (广东省医疗器械厂), 721 型分光光度计 (上海第三分析仪器厂), JY92-II 型超声波细胞粉碎机 (宁波新芝生物科技股份有限公司), XSZ-D2 型倒置显微镜 (广州光学仪器厂 L-1000)。硅胶 GF<sub>254</sub> 和 P-1 型层析缸 (200×200 mm, 上海信谊仪器厂)。95% 4-甲氧基苯甲醛, 其它试剂均为分析纯。

**藻种培养** 实验盐度为 33‰ 的人工海水, 采用 f/2 培养液改良配方<sup>[4]</sup>。将配制好的培养基用 0.22 μm 微孔滤膜过滤灭菌, 收集 1.5 L 滤液于锥形瓶中。取对数生长末期的球形棕囊藻, 用血细胞计数板计数并计算其细胞密度后接种, 接种密度约为 1.5×10<sup>5</sup> 个 ml<sup>-1</sup>。接种后置于人工气候箱中培养, 培养温度 22℃, 光照强度为 200 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>, 光暗循环为 L:D=12:12。每天固定时间取样于倒置显微镜下计数, 绘制藻细胞的生长曲线, 根据藻细胞生长曲线, 分别取对数期、稳定期和衰亡期藻细胞进行毒素的分离和溶血活性测定。

**溶血毒素的提取** 采用超声波破碎方式提取球形棕囊藻溶血毒素, 超声波处理均在冰浴条件下处理, 藻细胞溶液维持 4℃ 以下。

将衰亡期的藻细胞培养物 3 000 ml, 均匀地分三次 2 000×g 离心, 分别收集藻细胞并置于装有 50 ml 蒸馏水的小烧杯中, 分别用 200、400 和 600 W 超声波破碎 30 min, 于显微镜下观察, 检测其破碎率, 确定其最佳破碎功率; 取对数期、平稳期及衰亡期的藻细胞样品, 在最佳功率下超声波破碎藻细胞, 每 5 min 取样于显微镜下观察、计数, 确定藻细胞完全破碎所需时间; 各取 3 000、2 000、1 000 ml 不同生长期的藻细胞培养物在选定的最佳功率和时间条件下破碎, 观察、计数, 确定每次处理藻细胞的最佳量。以上实验每组做三个平行样。

根据上述优化的球形棕囊藻细胞破碎条件, 将不同生长期藻细胞各 6 L 分批离心分离, 置 50 ml 氯仿: 甲醇: 水 = 13: 7: 5 的混和溶液中进行细胞破碎, 待完全分层后取下层溶液, 真空干燥后溶解于适量的甲醇中, 即得到溶血毒素。置于 -18℃ 下贮存备用。

**溶血毒素的薄层分离与分析**<sup>[5]</sup> 选用了极性不同的两种展开剂体系进行展开。载体为硅胶板 GF<sub>254</sub>。毒素用溶剂系统 I (氯仿: 甲醇: 水 = 75: 25: 4) 在薄层板上展开后, 喷涂 5% 兔红细胞溶液, 确定其毒素组分; 用溶剂系统 II (氯仿: 甲醇 = 9: 1) 展

开后, 分别喷涂 0.5% 红细胞溶液 (A 板)、若丹明 B 溶液 (B 板) (若丹明 B 50 mg 溶解于 100 ml 乙醇溶液中) 和 4-甲氧基苯甲醛溶液 (C 板) (8 ml 浓硫酸, 0.5 ml 4-甲氧基苯甲醛, 80 ml 甲醇和 10 ml 冰醋酸)。其中, B 板再喷涂 1 mol/L 的 KOH, 在紫外发生器上显色; C 板待其稍干后置于烘箱中 100℃ 烘烤 1-2 min。

实验中, A 板用于获取溶血组分的 R<sub>f</sub>, B 板和 C 板分别是为了获取棕囊藻粗提液中的糖类物质和脂类物质的 R<sub>f</sub>。

**溶血毒素的生成特征** 取从不同生长期球形棕囊藻细胞提取的溶血毒素各 0.25 ml, 用磷酸盐等渗缓冲液 (pH=7) 补充至 1 ml, 加 0.5% 的兔红细胞溶液, 37℃ 水浴 30 min, 于 540 nm 下测其透光度值。根据透光率的大小估计球形棕囊藻产毒情况。实验分三组同步进行, 取平均值<sup>[3,6,7]</sup>。

## 2 结果和分析

### 2.1 球形棕囊藻的生长曲线

从图 1 可知, 球形棕囊藻经过 3-4 d 的延滞期之后, 细胞开始快速分裂, 细胞的数目呈对数增加, 进入对数生长期。6 d 后, 一些藻细胞停止分裂, 少数藻细胞继续分裂, 进入平稳生长期。12 d 几乎所有的藻细胞停止分裂并有少数细胞开始死亡, 藻细胞进入衰亡期。

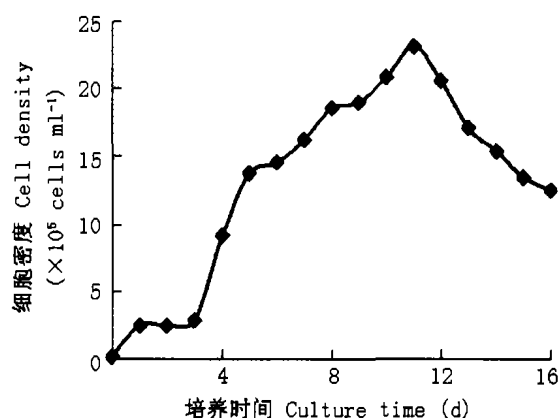


图 1 球形棕囊藻的生长曲线

Fig. 1 Growth curve of *P. globosa*

### 2.2 溶血毒素提取条件的优化

一些研究表明<sup>[6]</sup>, 衰亡期藻细胞细胞壁的破碎条件相对比较苛刻。因此本实验首先探讨不同功率下, 衰亡期球形棕囊藻细胞在超声波处理 30 min 后的破碎率。

200 W 和 400 W 超声波处理 30 min 后, 藻细胞

的破碎率较低, 只有 63% 和 78%, 而 600–800 W 处理的细胞破碎率可达 86%–88%, 变化不明显。本实验选择 600 W 的超声波对细胞进行破碎处理。

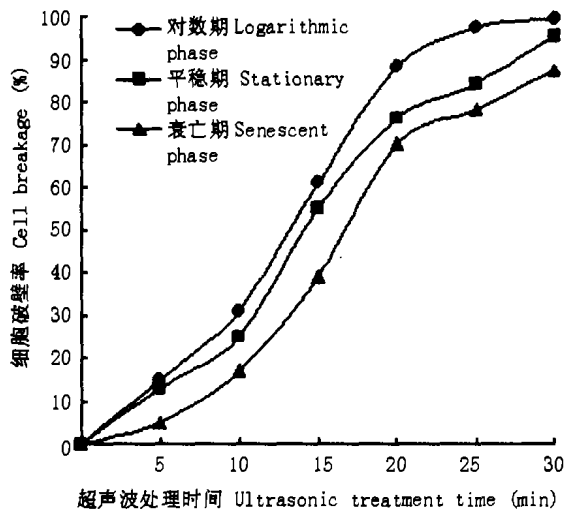


图 2 球形棕囊藻细胞超声波破碎率

Fig. 2 Breaking rate of *P. globosa* cells by ultrasonic treatment

图 2 为不同生长时期球形棕囊藻细胞壁破碎的情况。处理开始的 5–10 min 内, 只有少数细胞壁破碎; 大部分的细胞壁在 10–20 min 内破碎; 20–30 min 也只有少数细胞壁破碎。对数期藻细胞经过 30 min 的超声波处理, 细胞壁破碎率达到 99%, 倒置显微镜下观察, 几乎无藻细胞存在; 平稳期为 95%; 衰亡期只有 87%。与对数期、平稳期相比较, 衰亡期细胞的破碎率较低, 这与文献结果一致<sup>[9]</sup>, 提示衰亡期藻细胞细胞壁成分与对数期、平稳期有所不同, 可能发生了某种变化。

从图 3 可以看出, 经过 30 min 600 W 的超声波处理, 3 000 ml 培养物的藻细胞量在衰亡期的破碎率只有 61%, 2 000 ml 的只有 74%, 1 000 ml 的达到

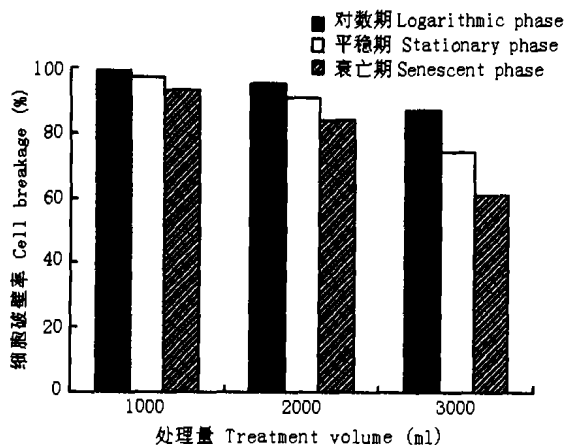


图 3 不同生长时期不同量的藻细胞处理 30 min 后的破碎率

Fig. 3 Breaking rate of algal cells at different growth phases treated by ultrasonic for 30 min

87%。因此, 衰亡期球形棕囊藻细胞培养物每次处理量以 1 000 ml 为宜。对数期和平稳期藻细胞处理量为 1 000 ml 的破碎率达到最大, 但 3 000 ml 和 2 000 ml 的处理量的破碎率也分别达到 93% 和 91%。

不同生长时期的藻细胞破壁条件不同, 其原因可能在于培养末期藻细胞壁结构的变化。随着培养时间的延长, 培养基中的营养逐渐消耗, 藻细胞为了适应外界环境的变化, 细胞壁结构的韧性和强度加大, 以达到保护自身的目的。

### 2.3 溶血毒素成分分析

用溶剂系统(I)展开, 喷上 5% 兔红细胞溶液后, 观察发现, 在  $R_f=0.95$  和  $R_f=0.92$  有 2 个明显的溶血白斑,  $R_f=0.58$  及  $R_f=0.20$  处也有两个不明显的溶血白斑, 据此可以初步推断, 球形棕囊藻产生的溶血毒素至少含有 4 种组分; 以溶剂系统(II)展开, 也可看到有 4 个溶血白斑, 但其  $R_f$  值不同, 分别为  $R_f=0.84, 0.77, 0.68, 0.14$ 。

为进一步了解球形棕囊藻溶血毒素 4 种组分的构成成份, 本实验以(II)为展开剂展开, 依次喷上若丹明 B 溶液、1 mol/L 的 KOH 溶液后, 240 nm 紫外灯观察发现, 该粗提物中的糖类成分至少有 8 种, 其中, 与前述溶血白斑相对应的地方有相应荧光出现,  $R_f$  值分别为 0.82, 0.79, 0.68, 0.15。

用(II)为展开剂展开, 4- 甲氧基苯甲醛溶液显色发现在  $R_f=0.82$  和 0.80 附近有 2 个明显的斑点, 而  $R_f=0.70$  和 0.16 附近也分别存在 1 个斑点。这 4 个脂斑点与 4 个溶血白斑及四个糖斑点的位置均很相近。提示溶血组分兼有糖类和脂类两者的特征, 可能均为糖脂类物质。

### 2.4 溶血毒素的生成特征

检测结果显示, 对数生长期球形棕囊藻并不表现出溶血活性(透光率为 0), 平稳期和衰亡期呈现出一定的溶血活性, 透光率分别为 43.9 和 89.4, 衰亡期溶血活性最强。这表明, 球形棕囊藻的产毒与 *Protogonyaulax* spp. 相似<sup>[10]</sup>, 后者产生的大田软海绵酸也随藻类培养时间的延长逐渐增加; 但不同于麻痹性贝毒的产生, *Protogonyaulax tamarensis* 和 *Protogonyaulax catenella* 在对数生长初期麻痹性贝毒的产量最大<sup>[9,11]</sup>。石房蛤毒素(STX)(一种麻痹性贝毒)的产生是在 *Alexandrium fundyense* 细胞周期的  $G_1$  期早期产生的<sup>[12]</sup>。

毒素的生物合成机制非常复杂, 不同生长时期

藻类的产毒能力往往有所不同。本文结果显示,球形棕囊藻与大多数双鞭藻类产毒情况相似,即当细胞进入生长平稳期末或衰亡期时,细胞内毒素的生产能力增强<sup>[9-12]</sup>。在藻的培养过程中,随着培养时间的延长,培养液中营养逐渐消耗,至平稳期和衰亡期时,培养基内的营养远低于对数生长期,溶血毒素的生物合成可能是球形棕囊藻的一种自我保护机制。

### 参考文献

- [1] Chen J F(陈菊芳), Xu N(徐宁), Jiang T J(江天久), et al. A report of *Phaeocystis globosa* bloom in coastal water of Southeast China [J]. *J Jinan Univ (Nat Sci)*(暨南大学学报 自然科学版), 1999, 20(3):125-129. (in Chinese)
- [2] Qi Y Z(齐雨藻), Shen P P(沈萍萍), Wang Y(王艳). Taxonomy and lifecycle of genus *Phaeocystis* (Prymnesiophyceae) [J]. *J Trop Subtrop Bot*(热带亚热带植物学报), 2001, 9(2):174-184. (in Chinese)
- [3] He J W(何家苑), Shi Z Y(施之新), Zhang Y H(张银华), et al. Morphological characteristics and toxins of *Phaeocystis* cf. *Pouchetii* (Prymnesiophyceae) [J]. *Oceanol Limnol Sin*(海洋与湖沼), 1999, 30(2):172-179. (in Chinese)
- [4] Guillard R R L, Ryther J H. Studies on marine planktonic diatoms. I. *Cyclotella nana* Hustedt and *Detonula confervacea* (Cleve) [J]. *Can J Microbiol*, 1962, 8:229-239.
- [5] Simonsen S, Moestrup Ø. Toxicity tests in eight species of *Chrysochromulina* (Haptophyta) [J]. *Can J Bot*, 1997, 75:129-136.
- [6] Johansson N, Graneli E. Influence of different nutrient conditions on cell density, chemical composition and toxicity of *Prymnesium parvum* (Haptophyta) in semi-continuous cultures [J]. *J Exp Mar Biol Ecol*, 1999, 239:243-258.
- [7] Yariv J, Hestrin S. Toxicity of the extracellular phase of *Prymnesium parvum* cultures [J]. *J Gen Microbiol*, 1961, 24:165-175.
- [8] Chen Y(陈勇), Liu J S(刘洁生), Yang W D(杨维东), et al. Preliminary research on the methods of fragmentation of the cell wall and the toxicity of *Alexandrium tamarense* in different growth phases [J]. *J Envir Health*(环境与健康杂志), 2002, 19(3):175-178. (in Chinese)
- [9] Boyer G L, Sullivan J J, Andersen R J, et al. Effects of nutrition limitation on toxin production and composition in marine dinoflagellate *Protogonyaulax tamarensis* [J]. *Mar Biol*, 1987, 96:123-128.
- [10] Boyer G L, Sullivan J J, Andersen R J, et al. Toxin production of three isolates of *Protogonyaulax* spp. [A]. In: Anderson D M, White A W, Baden D G. Toxic Dinoflagellates. Proceedings of the Third International Conference on Toxic Dinoflagellates [C]. New York: Elsevier, 1985. 281-286.
- [11] Boczar B A, Beitler M K, Liston J, et al. Paralytic shellfish toxins in *Protogonyaulax tamarensis* and *Protogonyaulax catenella* in axenic culture [J]. *Plant Physiol*, 1988, 88:1285-1290.
- [12] Anderson D M. Toxin variability in *Alexandrium* species [A]. In: Graneli E P, Sundstrom B. Toxic Marine Phytoplankton [M]. New York: Elsevier, 1990. 41-51.