

^{13}C 示踪技术在利玛原甲藻中腹泻性贝毒合成研究的应用*

张昊宇¹ 谭志军^{2,3} 郑关超² 吕颂辉⁴ 杨越聪¹ 吴海燕²

(1. 上海海洋大学食品学院 上海 201306; 2. 农业农村部水产品质量安全检测与评价重点实验室 中国水产科学研究院黄海水产研究所 山东青岛 266071; 3. 青岛海洋科学与技术试点国家实验室 山东青岛 266071; 4. 暨南大学赤潮与海洋生物学研究中心 广东广州 510632)

摘要 选取具有显著产毒差异的利玛原甲藻(*Prorocentrum lima*) SHG 株与 2XS 株为研究对象, 以 $2\text{-}^{13}\text{C}$ -甘氨酸为示踪原料结合高分辨质谱方法, 为腹泻性贝类毒素及其酯化态毒素合成与代谢途径的研究提供新方法和思路。结果表明, 两株藻共发现 16 种腹泻性贝毒及其酯化态毒素成分。对照培养条件下 SHG 株(大田软海绵酸毒素含量为 7.88 pg/cell, 鳍藻毒素 1 含量为 4.35 pg/cell)的产毒能力高于 2XS 株(大田软海绵酸毒素 5.70 pg/cell), 而甘氨酸作为氮源培养条件可显著提高两株藻的产毒总量($P < 0.05$)。 ^{13}C -甘氨酸标记组与甘氨酸培养组单细胞产毒量无显著变化($P > 0.05$)。腹泻性贝毒被标记后其同位素异构体丰度发生变化, 其中酯化态受 ^{13}C 标记的影响程度更高, 二级质谱图清晰表示出其碎片离子及脱水峰的标记情况。该方法直观阐明了甘氨酸可作为 *P. lima* 标记原料的产毒供体, 并使用稳定同位素标记方法首次实现了酯化态的同步标记, 有助于腹泻性贝毒生成机制的进一步研究。

关键词 利玛原甲藻; 腹泻性贝类毒素; 酯化态; ^{13}C 同位素示踪; 四极杆/静电场轨道阱高分辨质谱

中图分类号 S917 doi: 10.11693/hyhz20220600169

利玛原甲藻(*Prorocentrum lima*)是在海洋广泛分布的有害赤潮藻类, 是腹泻性贝毒(diarrhetic shellfish toxins, DSTs)的主要产生藻之一。DSTs 属聚酮类毒素, 主要包括大田软海绵酸毒素(okadaic acid, OA)、鳍藻毒素 1-3 (dinophysin toxins, DTX1-3)及其衍生物如酰化衍生物、7-O-酰基酯硫酸酯衍生物(sulfated diester)和乙二醇酯衍生物(diols esters), 如 C8: 2OA、C9: 2OA、C10: 2OA、OA 二醇酯和 35S DTX1(Wu *et al.*, 2020)。通常贝类摄食含有 DSTs 的藻类使其在贝类中蓄积, 被人类食用时可能导致腹泻性贝类中毒, 因此受到严格管控(Kilcoyne *et al.*, 2020), 被两大国际有害藻华研究计划 GEOHAB 和 GlobalHAB 纳入重点研究对象。近年来研究对 *P. lima* 种群多样性(Nishimura *et al.*,

2020)、产毒轮廓及其质量安全风险有了更为清晰的了解。现有研究表明所有 *P. lima* 均产 OA, 其中部分藻株可产不同比例的 DTX1 (Moreira-González *et al.*, 2022)。同时 *P. lima* 是我国近海四大海域广泛分布的底栖有毒赤潮藻(Lim *et al.*, 2019; Moreira-González *et al.*, 2019; Nishimura, 2020; Gu *et al.*, 2022), 已成为国家和社会共同关注的生态灾害和重大环境问题。

P. lima 毒素的合成与营养盐的浓度和形态息息相关(杨维东等, 2008; 徐杏等, 2012; Lee *et al.*, 2016; 曾玲等, 2017; David *et al.*, 2018; 古松, 2018), 氮和磷盐限制均可促进 *P. lima* 中 OA 等毒素的生成。其中氮盐的主要形式包括 NO_3^- 、 NO_2^- 、 NH_4^+ 等可溶性无机氮及尿素、可溶性游离氨基酸、核酸和腐殖质等可

* 中国水产科学研究院黄海水产研究所基本科研业务费资助, 20603022022019 号; 中国水产科学研究院基本科研业务费资助, 2020TD71 号; 科技基础资源调查专项, 2018FY100200 号。张昊宇, 硕士研究生, E-mail: 542068770@qq.com

通信作者: 吴海燕, 副研究员, E-mail: wuhy@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2022-06-27, 收修改稿日期: 2022-09-02

溶性有机氮(Bronk, 2002)。最近的研究发现,许多浮游植物(特别是甲藻)偏向利用有机氮(Mulholland *et al.*, 2004; Taylor *et al.*, 2006)。尤其是在夏季可溶性无机氮浓度较低时,高浓度的可溶性有机氮往往促进某些赤潮物种的繁殖(Flynn *et al.*, 1986),这可能与赤潮藻类对有机氮的利用有关(Berg *et al.*, 1997)。氨基酸作为可溶性有机氮库中重要的组分,广泛存在于天然水体、沉积物和大气中,湖水中 28%~46%的可溶性有机氮是氨基酸类有机氮(Yao *et al.*, 2012)。研究表明不同的氨基酸之间也可以通过转氨基作用而互相转化,氨基酸的分解代谢产生乙酰辅酶 A 和丙酮酸,它们可以作为产毒藻毒素合成的起始物(Lee *et al.*, 2016)。甘氨酸转移到线粒体后,在甘氨酸脱羧酶和丝氨酸羟甲基转移酶的作用下,可以将氮代谢与光呼吸相联系起来(Eckardt, 2005),并且光合作用中的转运蛋白 ABC 家族直接参与了 DSTs 的转运(Hou *et al.*, 2018; Gu *et al.*, 2019)。在这一假设的前提下,Souto 等(2001)的氨基酸添加实验得到了约两倍的毒素生成量。由此可见,氨基酸可能是潜在的 DSTs 合成供体,为 DSTs 合成路径的研究提供了新方法和思路。

稳定同位素示踪技术已被广泛应用于藻类毒素合成途径的研究。Anttila 等(2016)使用 ^{13}C -蛋氨酸培养亚历山大藻(*Alexandrium*)解析去甲基螺内酯 C 合成过程。Yamazaki 等(2012)使用 ^{18}O -醋酸酯解析了梯形聚醚——虾夷扇贝毒素(YTX)中的氧原子来源。高分辨液相色谱-质谱联用技术在稳定同位素标记方面具有很大的优势(Heuillet *et al.*, 2018; Sun *et al.*, 2020),并且 OA 及其酯化态鉴定技术也有了最新进展(Wu *et al.*, 2020)。本研究选取两株分布地域和产毒特征有较大差异藻株 2XS 株及 SHG 株,应用 ^{13}C 稳定同位素示踪技术和高分辨质谱技术联合手段,准确分析了甘氨酸培养下生长和毒素代谢谱变化,为探究 *P. lima* 产毒代谢通路提供了新思路。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

DSP 标准品: OA [$\text{C}_{44}\text{H}_{68}\text{O}_{13}$, (8.4±0.4) $\mu\text{g}/\text{mL}$, m/z 805.473 3]; DTX-1 [$\text{C}_{45}\text{H}_{70}\text{O}_{13}$, (8.5±0.7) $\mu\text{g}/\text{mL}$, m/z 819.488 9], 均购自加拿大国家研究理事会海洋生物科学研究所(CRM)。

化学试剂:甘氨酸、 $2\text{-}^{13}\text{C}$ -甘氨酸(99%纯度,ALDRICH 公司)甲醇、乙腈和丙酮(HPLC 级,美国 Merck 公司); 甲酸铵(HPLC 级,美国 Sigma Aldrich

公司); 盐酸、氢氧化钠(优级纯,国药); 吡啶(色谱纯, Duksan Pure Chemicals); 冰醋酸(分析纯,天津市科密欧化学试剂有限公司)其他未作特殊说明的试剂均为分析纯,实验用水为超纯水(18.2 M Ω .cm)。

1.2 藻种与培养基配制

P. lima 分别为 2018 年分离自渤海的 SHG 株(40°0'36"N, 119°54'36"E)和 2015 年分离自南海的 2XS 株(19°37'57"N, 110°58'32"E),由暨南大学赤潮与海洋生物学研究中心提供。培养所用的海水取自青岛汇龙湾天然海水,以 0.45 μm 混合纤维滤膜过滤后,煮沸灭菌,并转至高压灭菌的锥形瓶内,接入 f/2-Si 培养基进行培养,温度为 25 $^{\circ}\text{C}$,光照强度为 125 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$,盐度 28~32,光暗周期为 12 h : 12 h。分别以甘氨酸和 $2\text{-}^{13}\text{C}$ -甘氨酸作为氮源对 f/2 中的氮源进行替换(882 mmol/L)(其余成分不变)。实验设立对照组(f/2),甘氨酸培养组(gly)和 $2\text{-}^{13}\text{C}$ -甘氨酸标记组(^{13}C -gly)。

1.3 藻细胞培养与显微镜观察

以 10 000 cells/mL 的密度接种于细胞培养瓶中接种,每瓶 100 mL,每组 3 个平行。培养至 21 d,低功率超声(37 kHz) 30 s 使其与培养瓶分离后摇匀使藻液充分混匀后(全部藻细胞悬浮)移取 10 mL, 8 000 r/min 离心 10 min,去上清液待测。取 5 mL 藻液于离心管中,加 100 μL 鲁格试剂固定,在 TE100 倒置显微镜(Nikon E100)下用浮游植物计数框计数,记录细胞密度。

1.4 实验方法

1.4.1 样品前处理 藻细胞加入 5 mL 甲醇,低温超声破碎 20 min (30%功率、5 s 间隔),用甲醇定容至 10 mL,过 0.22 μm 滤膜待测游离态 DSTs; DSTs 总量分析:移取 1 mL 上述游离态 DSTs 提取液于螺纹口样品瓶中,加入 2.5 mol/L 的 NaOH 溶液 125 μL ,涡旋混合 0.5 min,密封于 76 $^{\circ}\text{C}$ 下温育 50 min。冷却至室温后,加入 2.5 mol/L 的盐酸 125 μL ,涡旋混合 0.5 min,过 0.22 μm 滤膜,待测。

1.4.2 色谱-质谱条件 Kinetex-C8 柱(150 mm \times 2.10 mm), 2.60 μm ; 柱温: 40.0 $^{\circ}\text{C}$; 流速: 0.35 mL/min; 进样量: 10 μL ; 流动相: A 为水(含有 2 mmol/L 甲酸氨和 50 mmol/L 甲酸), B 为 95%乙腈水溶液(含 2 mmol/L 甲酸氨和 50 mmol/L 甲酸); 流动相梯度洗脱程序为 0.00~0.50 min: 80% A; 5.00~13.00 min: 10% A; 13.10~15.00 min: 80% A。Q-Exactive 液相色谱质谱联用系统(美国 Thermo Fisher Scientific 公司); 质谱条件: 加热电喷雾离子源(HESI), 扫描模式: 质量范围: m/z 600~1500; 喷雾电压 3 500 V (正离子模式);

鞘气温度 300 °C; 一级全扫描(Full MS)分辨率为: 70 000 FWHM; 辅助气 10 arb; 毛细管温度 320 °C; 数据依赖二级子离子扫描(dd-MS², 分辨率为 17 500 FWHM, C-trap 最大容量(AGC target): 5×10^5 , C-trap 最大注入时间: 50 ms; 分步碰撞能量: 10/30 eV 和 20/40 eV。

1.5 数据分析

实验数据采用 origin 软件进行数据处理。采用多因素方差分析方法和 F 检验分析比较各环境因子不同条件对两株藻生长和产毒影响的显著性, 按概率 ($P < 0.05$) 设置显著性检验阈值。

单细胞产毒量计算公式:

$$X = \frac{C_1 V_1}{C_2 V_2} \times 1000, \quad (1)$$

式中, X 为最终样品藻细胞的毒素浓度, 单位: pg/cells; C_1 为测定样品藻细胞的毒素浓度, 单位: ng/mL; V_1 为样品提取剂体积, 单位: mL; C_2 为样品藻细胞密度, 单位: cells/mL; V_2 为样品藻液体积, 单位: mL。

同位素化合物的定量参考 Cho 等(2019)的研究并加以优化, 总结为公式如下:

$$\sum R' = \sum \left[R - r_2 \frac{(1 - r_1)}{r_1} \right], \quad (2)$$

式中, r_1 为所求物质对照组 ^{12}C 离子质谱峰面积占有同位素异构体质谱峰面积的比例; r_2 为所求物质 ^{13}C 标记后 ^{12}C 离子占有同位素异构体峰面积的比例。 \sum 表示对应成分的质谱峰面积。 $\sum R'$ 为修正后的质谱峰面积; $\sum r_1$ 及 $\sum r_2$ 表示对应比例所占的质谱峰面积; $R=1$, $\sum R$ 表示总质谱峰面积。

同位素标记相对丰度比值计算公式:

$$\lg(M+n)\% = \lg \left(\frac{M+n}{M+n_{\text{对照}}} \times 100\% \right), \quad (3)$$

式中, $M+n$ 为该离子质谱峰面积; $(M+n)\%$ 为该离子质谱峰面积所占同位素异构体质谱峰面积总和的比例; $n=0\sim 3$ 。

2 结果与讨论

2.1 甘氨酸对藻细胞生长和产毒影响分析

两株藻在 f/2 和 gly 培养基的生长情况及总产毒如图 1 所示。不同藻株甘氨酸处理组与对照组生长无显著性差异(图 1a) ($P > 0.05$), 而甘氨酸处理组产毒总量均显著提升(图 1b, 1c) ($P < 0.05$)。其中, SHG 株的 OA 和 DTX-1 单细胞产毒总量分别达到 7.88 和 4.35 pg/cell, 提升分别为 16.9% 和 37.1%。2XS 株仅产 OA 及其酯化态毒素, 其单细胞产毒量上升更为显著, 达到 5.70 pg/cell 提升了 48.5%。

OA 和 DTX1 在 ESI+ 模式下形成的分子离子峰包括 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 、 $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$ 、 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 和 $[\text{M}+\text{K}]^+$ 峰, 其中 $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$ 峰强度最大。通过比较质量-电荷比(m/z)和保留时间(T_R)来鉴定 DSTs 的毒素成分, 对其 $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$ 峰进行质谱分析, 如图 2 所示两种藻类 f/2 组、gly 组离子化模式一致且具有相同的同位素峰。二级质谱中 OA (m/z 822.500 7, $T_R=5.40$) 主要的特征峰为 m/z 223 和 267, DTX1 (m/z 836.516 2, $T_R=5.91$) 主要的特征峰为 m/z 267, 此外两者还含有各自的脱水峰簇($[\text{M}-n\text{H}_2\text{O}+\text{H}]^+$)。采用上述定性判定依据及参考文献(Wu *et al*, 2020)的 m/z 值及 RT 值在两株藻中共分离鉴定 16 种不同的 DSTs 毒素种类(表 1)。将其响应强度与藻细胞密度相比, 得到相对响应强度(图 1d, 1e)。两株藻均含高比例酯化态成分, 2XS 株和 SHG 株分别为 88.1%、98.8%, 其种类及相对含量分布如图 1d、1e 所示。SHG 株含量较高的 OA 酯化态成分为 C9:2 OA 1、C9:2 OA 2、C10:2 OA, 甘

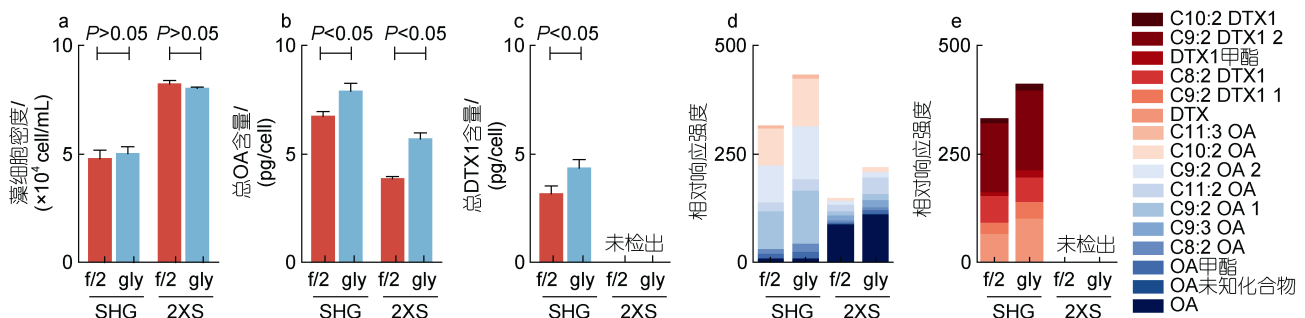


图 1 不同处理组 SHG 株和 2XS 株的细胞密度、产毒和酯化态组成

Fig.1 Growth, toxin production and esterification composition of SHG strain and 2XS strain in different treatment groups
注: a: 藻细胞密度; b: 总 OA 含量; c: 总 DTX1 含量; d: OA 酯化态分布; e: DTX1 酯化态分布; f/2: 对照组; gly: 甘氨酸培养组

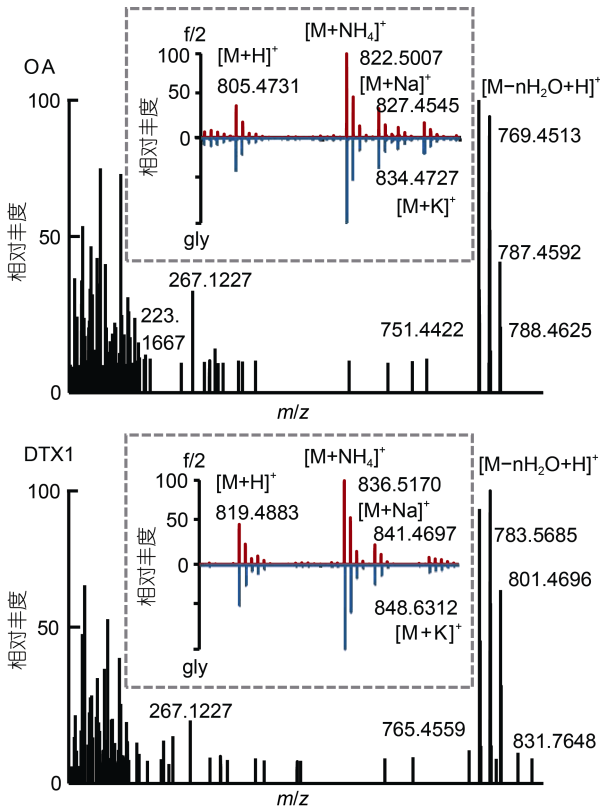


图2 不同处理组 OA 和 DTX1 同位素分布及二级质谱图

Fig.2 Isotopic distribution and MS/MS spectra of OA and DTX1 in different treatment groups
注: f/2: 对照组; gly: 甘氨酸培养组

氨酸处理后产毒量分别提高 39.8%、40.9%和 29.5%。SHG 株独有的 C 9 : 2 DTX1 1、C 9 : 2 DTX1 2 和 C 10 : 2 1 成分, 分别上升了 50.4%、15.5%和 47.0%。2XS 株主要酯化态毒素为 C 9 : 2 OA 1、C 9 : 2 OA 2 分别提高 30.9%和 50.1%。

研究发现影响产毒因素主要有藻株生理特性 (Nagahama *et al*, 2011; Zhang *et al*, 2015)和环境 (David *et al*, 2018)。在甘氨酸作用下, *P. lima* 单细胞产毒量上升, 且其细胞密度并未受到影响, 这意味着甘氨酸可能对 *P. lima* 产毒合成途径有着促进作用或是其关键限速物质, 并且可以通过提供额外的碳源以增强细胞毒性 (Lee *et al*, 2016), 而作为营养盐存在可以保证 *P. lima* 维持正常的生长和生理行为。目前由于研究的局限性和基因组信息的缺乏, DSTs 的生物合成的机制尚未完全阐明。然而, 毒素的化学结构可以为它们的产生提供一些迹象。OA 和 DTX1 属于聚酮类毒素, 具有这些代谢物的共同结构——环聚醚。研究证明 *P. lima* 中含有大量的 PKS II (聚酮合酶 II) (汤敬谦等, 2009), 荧光标记法 (Macpherson *et al*, 2003) 也证明了甘氨酸在 DSTs 结构中的转化。研究发现 *P. lima* 在富含氨基酸的培养基中单细胞产毒总量上升 60%~120%甚至对毒素谱产生了影响, 其中在亮氨酸存在的情况下, 最大细胞密度增加约 25%, 细胞

表 1 精确分子质量及偏差
Tab.1 Exact molecular weight and deviation

化合物	分子式	保留时间 /min	预测分子量 [M+NH ₄] ⁺ /Da	实测分子量 [M+NH ₄] ⁺ /Da	质量准确度 ×10 ⁻⁶
OA	C ₄₄ H ₆₈ O ₁₃	5.4	822.499 8	822.500 7	0.48
OA 甲酯	C ₄₅ H ₇₀ O ₁₃	5.74	836.515 5	836.516 2	0.07
OA 未知化合物	C ₅₄ H ₈₆ O ₁₆	5.72	1 006.609 8	1 006.610 8	1.99
C 8 : 2 OA	C ₅₂ H ₈₀ O ₁₄	5.86	946.588 6	946.591 5	1.48
C 9 : 2 OA 1	C ₅₃ H ₈₂ O ₁₄	5.91	960.604 3	960.607 4	4.88
C 9 : 2 OA 2	C ₅₃ H ₈₂ O ₁₄	6.01	960.604 3	960.605 7	4.33
C 9 : 3 OA	C ₅₃ H ₈₀ O ₁₄	5.88	958.588 6	958.589 9	2.31
C 10 : 2 OA	C ₅₄ H ₈₄ O ₁₄	5.91	974.619 9	974.621 4	1.43
C 11 : 2 OA	C ₅₅ H ₈₆ O ₁₄	6.01	988.635 4	988.633 6	1.81
C 11 : 3 OA	C ₅₅ H ₈₄ O ₁₄	6.2	986.619 9	986.622 1	4.76
DTX1	C ₄₅ H ₇₀ O ₁₃	5.91	836.515 5	836.516 2	0.07
DTX1 甲酯	C ₄₆ H ₇₂ O ₁₃	6.27	850.531 1	850.532 7	0.16
C 8 : 2 DTX1	C ₅₄ H ₈₄ O ₁₄	6.26	960.604 3	960.605 8	4.33
C 9 : 2 DTX1 1	C ₅₄ H ₈₄ O ₁₄	6.01	974.619 9	974.621 8	1.43
C 9 : 2 DTX1 2	C ₅₄ H ₈₄ O ₁₄	6.34	974.619 9	974.621 8	1.43
C 10 : 2 DTX1	C ₅₅ H ₈₆ O ₁₄	6.27	988.635 4	988.636 7	0.13

毒素水平增加一倍(Souto *et al*, 2001)。综上可见, 氨基酸可能在 *P. lima* 生长和毒素生成中发挥重要作用。

2.2 ^{13}C -甘氨酸对藻细胞的产毒影响及标记情况分析

对 gly 和 ^{13}C -gly 处理组的 OA 和 DTX1 的一级图谱和其 $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$ 离子二级图谱进行分析结果见图 3。 ^{13}C 标记对毒素及其酯化成分的保留时间无影响, 批内偏差为 0.48%。而 ^{13}C 标记与未标记样品 OA 和 DTX1 不同加和方式的离子峰的同位素丰度均发生改变。与未标记样品的相应碎片离子相比, 在质谱图中除了最轻同位素组成的离子所形成的 M+0(M)峰外, 还会出现一个或多个重同位素组成的离子峰, 这种离子峰叫做同位素异构体离子峰, 对应的 m/z 为

M+1、M+2、M+3 等表示。以 $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$ 峰(M)为例, 表现为 M+1 的响应强度明显上升, M+2、M+3 响应强度均有提升, 且出现了可被明显观察到的 M+4 峰。例如, ^{13}C 标记后的 OA 母离子的精确质量数分别为 m/z 823.503 9、 m/z 824.506 8、 m/z 825.509 9、 m/z 826.510 5 ($[\text{M}+\text{NH}_4]^+$)与理论值一致($\Delta 1.6$ mDa: 针对 $^{13}\text{C}_{1-4}-\text{C}_{40-43}\text{H}_{68}\text{O}_{13}+\text{NH}_4^+$ 计算的 m/z)。同时在被标记后得二级质谱图中可发现在标记后 m/z 267 后出现新的 268 峰, 并且使其脱水峰的同位素分布也发生改变, ^{13}C 异构体峰的响应强度显著提升, 且 OA 出现 m/z 753、771 和 789 新的同位素异构体碎片离子。

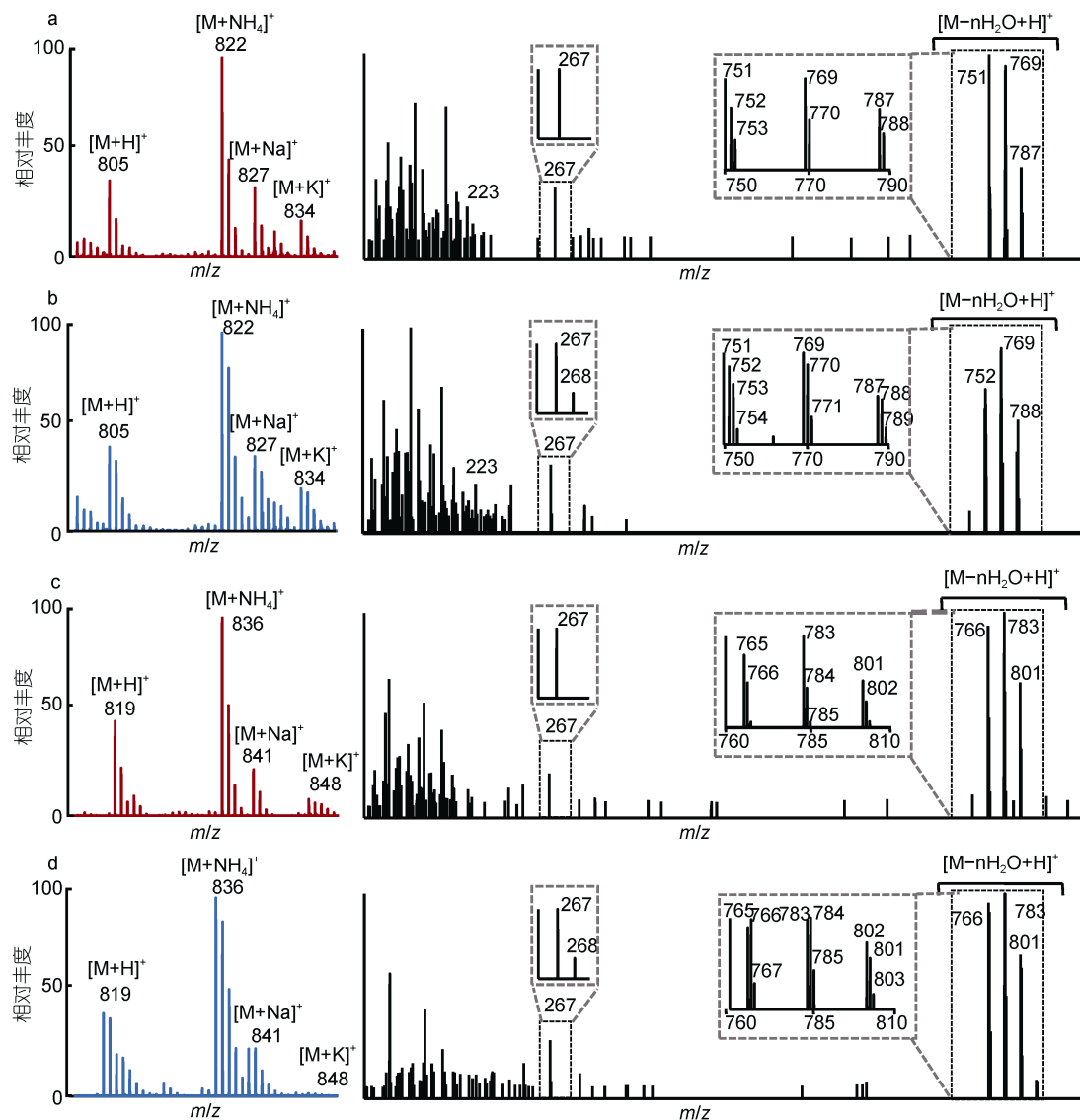


图 3 ^{13}C 标记前后 OA、DTX1 的同位素分布及二级质谱图

Fig. 3 The MS/MS spectra of OA and DTX1 and the isotopic distribution by gly and ^{13}C -gly
注: a: gly 组 OA; b: ^{13}C -gly 组 OA; c: gly 组 DTX1; d: ^{13}C -gly 组 DTX1

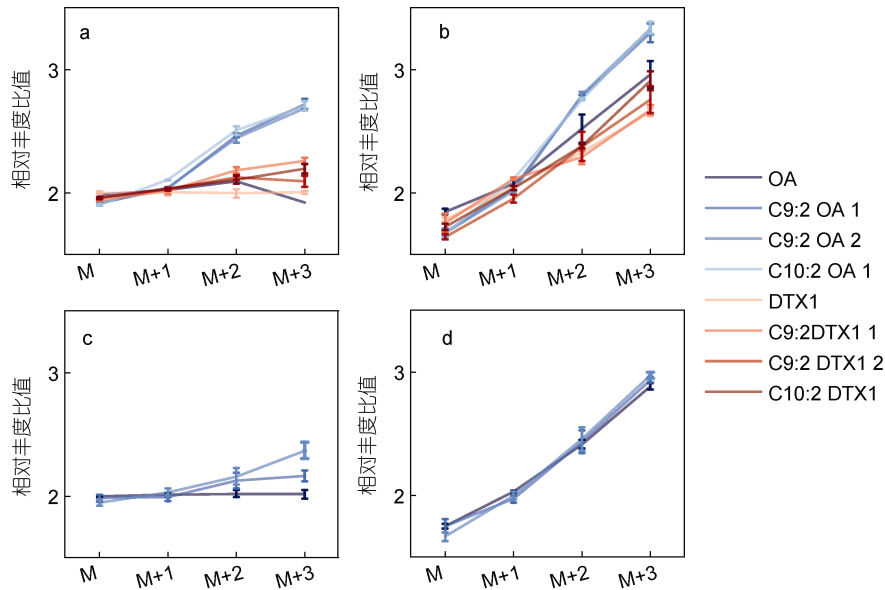


图 4 ^{13}C 同位素标记 DSTs 组分同位素异构体分布情况

Fig.4 Distribution of isotopic isomers of DSTs components labeled by ^{13}C isotopes

注: a: gly 组 SHG 株; b: ^{13}C -gly 组 SHG 株; c: gly 组 2XS 株; d: ^{13}C -gly 组 2XS 株

对标记后化合物去除自然产生的稳定同位素的影响后计算同位素的相对含量(Heuillet *et al*, 2018)。在 $2\text{-}^{13}\text{C}$ -甘氨酸标记后 SHG 株产毒量分别为 OA (7.31 ± 0.51) ng/cell、DTX1 (4.27 ± 0.21) ng/cell, 2XS 株为 OA (5.93 ± 0.71) ng/cell。Gly (图 2)与 ^{13}C -gly 组毒素生成量均无显著差异($P < 0.05$), 表明同位素替代不影响毒素的产生。通过对同位素异构体各质谱峰面积增加值取对数, 可以比较标记后 SHG 和 2XS 不同毒素标记后同位素异构体比率的变化(图 4)。Gly 组 OA 和 DTX1 的 $\lg[M\sim(M+3)]\% = 2$, ^{13}C -gly 标记组 DSTs 成分 M 的响应值下降, M+2 和 M+3 显著上升。同时, 酯化态成分也可被 $2\text{-}^{13}\text{C}$ -甘氨酸所标记。其中不同 DSTs 变化程度有所不同, 上升最高的 SHG 株 OA(图 4b)的 3 种酯化态成分 M+3 达到 $3.30\sim 3.34$ [$\lg(M+3)\%$]。

由于研究的局限性和基因组信息的缺乏, DSTs 生物合成的机制尚未阐明(Camacho-Muñoz *et al*, 2021)。通过用 $1, 2\text{-}^{13}\text{C}_2$ -甘氨酸和 $2\text{-}^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}$ -甘氨酸, 证明 DTX-5a 和 DTX-5b 硫化侧链中的氨基酸残基来自甘氨酸(Hu *et al*, 2017)。诸多学者研究采用如乙酸盐, 乙醇酸等同位素标记试剂实现了 DTX5 和 DTX4 的标记(Wright *et al*, 1996)。如 $[1\text{-}^{13}\text{C}]$ 乙酸盐的掺入导致 YTX 的 15 个碳的标记(Yamazaki *et al*, 2011)。在底栖甲藻(*Prorocentrum belizeanum*)添加 $[1\text{-}^{13}\text{C}]$ 乙酸钠和 $[2\text{-}^{13}\text{C}]$ 乙酸钠后分别富集了 24 和 38 个碳, 证实

DTX-5c 中 68 个碳中的 62 个来自乙酸, 包括所有侧甲基(Vilches *et al*, 2012)。已经报道了有限数量的此类代谢物的生物合成, 研究在很大程度上受到化合物产量低和同位素标记前体中标记物严重扰乱的阻碍, 因此 DSTs 的合成机制研究仍处于早期阶段(Kalaitzis *et al*, 2010)。但相比之下, 本研究中使用 $2\text{-}^{13}\text{C}$ -甘氨酸使 DSTs 被标记且确定了其标记的碎片离子, 并且首次实现并示踪了多种酯化态的毒素。研究发现二醇酯具有更高的标记比率, 或因其代谢速率或活跃程度所导致(Nagahama *et al*, 2011; Freund *et al*, 2017)。Hu 等(2017)认为酯化态毒素时 *P. lima* 储存的非毒性前体。而 Wu 等(2020)通过小鼠证明二醇酯类的强毒性。这与通常认为酯化态是储存在叶绿体中非活性前体的结论存在矛盾。此外, 有研究表明 *P. lima* 酯化态毒素组成与不同藻株及其细胞生长周期有关(Pan *et al*, 1999; Wu *et al*, 2020), 因此借助同位素标记手段进一步研究细胞生长过程中的毒素及同位素丰度变化具有深远的意义。同时应用本方法可获得 ^{13}C 标记的 OA 和 DTX1, 既满足代谢流量分析也可应用于质谱检测内标。 ^{13}C 甘氨酸可以为 *P. lima* 的 DSTs 合成路径的研究提供新方法和思路。

3 结论

通过 $2\text{-}^{13}\text{C}$ -甘氨酸培养实现了对利玛原甲藻中的 DSTs 及其酯化态的同位素标记。甘氨酸显著促进了

DSTs 及其酯化态成分的合成, 且两种藻株对甘氨酸的响应有所不同。同时鉴定了 *P. lima* 酯化态毒素及发现了其标记后同位素丰度的变化, 为后期探究 *P. lima* 的产毒通路提供了参考。

参 考 文 献

- 古松, 2018. 利玛原甲藻三个 ABC 转运蛋白全长 cDNA 序列的获取及其在不同环境条件下的表达分析[D]. 广州: 暨南大学.
- 汤敬谦, 李挺, 杨维东, 等, 2009. 利玛原甲藻中聚酮合酶基因克隆与分析[J]. 生态学报, 29(5): 2383-2390.
- 杨维东, 钟娜, 刘洁生, 等, 2008. 不同磷源及浓度对利玛原甲藻生长和产毒的影响研究[J]. 环境科学, 29(10): 2760-2765.
- 徐杏, 于仁成, 罗璇, 等, 2012. 温度、盐度和光照对一株有毒利玛原甲藻生长的影响研究[J]. 海洋科学, 36(12): 19-24.
- 曾玲, 文菁, 韩冰, 2017. 光照强度对利玛原甲藻生长的影响[J]. 企业科技与发展(7): 34-37.
- ANTILA M, STRANGMAN W, YORK R, *et al*, 2016. Biosynthetic studies of 13-desmethylspirolide C produced by *Alexandrium ostenfeldii* (= *A. peruvianum*): rationalization of the biosynthetic pathway following incorporation of ^{13}C -labeled methionine and application of the odd-even rule of methylation [J]. Journal of Natural Products, 79(3): 484-489.
- BERG G M, GLIBERT P M, LOMAS M W, *et al*, 1997. Organic nitrogen uptake and growth by the chrysophyte *Aureococcus anophagefferens* during a brown tide event [J]. Marine Biology, 129(2): 377-387.
- BRONK D A, 2002. Dynamics of DON [M] // HANSELL D A, CARLSON C A. Biogeochemistry of Marine Dissolved Organic Matter. Amsterdam: Academic Press: 15-249.
- CAMACHO-MUÑOZ D, PRAPTIWI R A, LAWTON L A, *et al*, 2021. High value phycotoxins from the dinoflagellate *Prorocentrum* [J]. Frontiers in Marine Science, 8: 638739.
- CHO Y, TSUCHIYA S, OMURA T, *et al*, 2019. Intermediatic study of saxitoxin analogues and biosynthetic intermediates in dinoflagellates using ^{15}N -labelled sodium nitrate as a nitrogen source [J]. Scientific Reports, 9(1): 3460.
- DAVID H, LAZA-MARTÍNEZ A, KROMKAMP J C, *et al*, 2018. Physiological response of *Prorocentrum lima* (Dinophyceae) to varying light intensities [J]. FEMS Microbiology Ecology, 94(1): fix166.
- ECKARDT N A, 2005. Photorespiration revisited [J]. The Plant Cell, 17(8): 2139-2141.
- FLYNN K J, BUTLER I, 1986. Nitrogen sources for the growth of marine microalgae: role of dissolved free amino acids [J]. Marine Ecology Progress Series, 34(3): 281-304.
- FREUND D M, HEGEMAN A D, 2017. Recent advances in stable isotope-enabled mass spectrometry-based plant metabolomics [J]. Current Opinion in Biotechnology, 43: 41-48.
- GU H F, WU Y R, LÜ S H, *et al*, 2022. Emerging harmful algal bloom species over the last four decades in China [J]. Harmful Algae, 111: 102059.
- GU S, XIAO S W, ZHENG J W, *et al*, 2019. ABC Transporters in *Prorocentrum lima* and their expression under different environmental conditions including okadaic acid production [J]. Marine Drugs, 17(5): 259.
- HEUILLET M, BELLVERT F, CAHOREAU E, *et al*, 2018. Methodology for the validation of isotopic analyses by mass spectrometry in stable-isotope labeling experiments [J]. Analytical Chemistry, 90(3): 1852-1860.
- HOU D Y, MAO X T, GU S, *et al*, 2018. Systems-level analysis of metabolic mechanism following nitrogen limitation in benthic dinoflagellate *Prorocentrum lima* [J]. Algal Research, 33: 389-398.
- HU T M, LEBLANC P, BURTON I W, *et al*, 2017. Sulfated diesters of okadaic acid and DTX-1: self-protective precursors of diarrhetic shellfish poisoning (DSP) toxins [J]. Harmful Algae, 63: 85-93.
- KALAITZIS J A, CHAU R, KOHLI G S, *et al*, 2010. Biosynthesis of toxic naturally-occurring seafood contaminants [J]. Toxicon, 56(2): 244-258.
- KILCOYNE J, BURRELL S, NULTY C, *et al*, 2020. Improved isolation procedures for okadaic acid group toxins from shellfish (*Mytilus edulis*) and microalgae (*Prorocentrum lima*) [J]. Marine Drugs, 18(12): 647.
- LEE T C H, FONG F L Y, HO K C, *et al*, 2016. The mechanism of diarrhetic shellfish poisoning toxin production in *Prorocentrum* spp.: physiological and molecular perspectives [J]. Toxins, 8(10): 272.
- LIM Z F, LUO Z H, LEE L K, *et al*, 2019. Taxonomy and toxicity of *Prorocentrum* from Perhentian Islands (Malaysia), with a description of a non-toxicogenic species *Prorocentrum malayense* sp. nov. (Dinophyceae) [J]. Harmful Algae, 83: 95-108.
- MACPHERSON G R, BURTON I W, LEBLANC P, *et al*, 2003. Studies of the biosynthesis of DTX-5a and DTX-5b by the dinoflagellate *Prorocentrum maculosum*: regiospecificity of the putative Baeyer-Villigerase and insertion of a single amino acid in a polyketide chain [J]. The Journal of Organic Chemistry, 68(5): 1659-1664.
- MOREIRA-GONZÁLEZ A R, FERNANDES L F, UCHIDA H, *et al*, 2019. Variations in morphology, growth, and toxicity among strains of the *Prorocentrum lima* species complex isolated from Cuba and Brazil [J]. Journal of Applied Phycology, 31(1): 519-532.
- MOREIRA-GONZÁLEZ A R, ROSA K M S, MAFRA L L, 2022. Prevalence of okadaic acid in benthic organisms associated *Prorocentrum lima* complex in a sub-tropical estuary [J]. Food Additives & Contaminants: Part A, 39(2): 382-396.
- MULHOLLAND M R, BONEILLO G, MINOR E C, 2004. A comparison of N and C uptake during brown tide (*Aureococcus anophagefferens*) blooms from two coastal bays on the east coast of the USA [J]. Harmful Algae, 3(4): 361-376.
- NAGAHAMA Y, MURRAY S, TOMARU A, *et al*, 2011. Species boundaries in the toxic dinoflagellate *Prorocentrum lima* (Dinophyceae, Prorocentrales), based on morphological and phylogenetic characters [J]. Journal of Phycology, 47(1): 178-189.
- NISHIMURA T, UCHIDA H, NOGUCHI R, *et al*, 2020. Abundance of the benthic dinoflagellate *Prorocentrum* and the diversity, distribution, and diarrhetic shellfish toxin production of *Prorocentrum lima* complex and *P. caipirignum* in Japan [J]. Harmful Algae, 96: 101687.
- PAN Y, CEMBELLA A D, QUILLIAM M A, 1999. Cell cycle and

- toxin production in the benthic dinoflagellate *Prorocentrum lima* [J]. *Marine Biology*, 134(3): 541-549.
- SOUTO M L, FERNÁNDEZ J J, NORTE M, *et al*, 2001. Influence of amino acids on okadaic acid production [J]. *Toxicon*, 39(5): 659-664.
- SUN Q S, FAN T W M, LANE A N, *et al*, 2020. Applications of chromatography-ultra high-resolution MS for stable isotope-resolved metabolomics (SIRM) reconstruction of metabolic networks [J]. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 123: 115676.
- TAYLOR G T, GOBLER C J, SAÑUDO-WILHELMY S A, 2006. Speciation and concentrations of dissolved nitrogen as determinants of brown tide *Aureococcus anophagefferens* bloom initiation [J]. *Marine Ecology Progress Series*, 312: 67-83.
- VILCHES T S, NORTE M, DARANAS A H, *et al*, 2012. Biosynthetic studies on water-soluble derivative 5c (DTX5c) [J]. *Marine Drugs*, 10(10): 2234-2245.
- WRIGHT J L C, HU T, MCLACHLAN J L, *et al*, 1996. Biosynthesis of DTX-4: confirmation of a polyketide pathway, proof of a baeyer-villiger oxidation step, and evidence for an unusual carbon deletion process [J]. *Journal of the American Chemical Society*, 118(36): 8757-8758.
- WU H Y, CHEN J Q, PENG J X, *et al*, 2020. Nontarget screening and toxicity evaluation of diol esters of okadaic acid and dinophysistoxins reveal intraspecies difference of *Prorocentrum lima* [J]. *Environmental Science & Technology*, 54(19): 12366-12375.
- YAMAZAKI M, IZUMIKAWA M, TACHIBANA K, *et al*, 2012. Origins of oxygen atoms in a marine ladder-frame polyether: evidence of monooxygenation by ¹⁸O-labeling and using tandem mass spectrometry [J]. *The Journal of Organic Chemistry*, 77(11): 4902-4906.
- YAMAZAKI M, TACHIBANA K, SATAKE M, 2011. Complete ¹³C-labeling pattern of yessotoxin in a marine ladder-frame polyether [J]. *Tetrahedron*, 67(5): 877-880.
- YAO X, ZHU G W, CAI L L, *et al*, 2012. Geochemical characteristics of amino acids in sediments of Lake Taihu, a large, shallow, eutrophic Freshwater Lake of China [J]. *Aquatic Geochemistry*, 18(3): 263-280.
- ZHANG H, LI Y, CEN J Y, *et al*, 2015. Morphotypes of *Prorocentrum lima* (Dinophyceae) from Hainan Island, South China Sea: morphological and molecular characterization [J]. *Phycologia*, 54(5): 503-516.

APPLICATION OF ¹³C TRACING TECHNOLOGY IN THE SYNTHETIC PATHWAY OF DIARRHEAL SHELLFISH TOXIN IN *PROROCENTRUM LIMA*

ZHANG Hao-Yu¹, TAN Zhi-Jun^{2,3}, ZHENG Guan-Chao², LYU Song-Hui⁴,
YANG Yue-Cong¹, WU Hai-Yan²

(1. Collage of Food Sciences & Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 2. Key Laboratory of Testing and Evaluation for Aquatic Product Safety and Quality, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, P. R. China, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China; 3. Pilot National Laboratory for Marine Science and Technology (Qingdao), Qingdao 266071, China; 4. Research Center for Harmful Algae and Marine Biology, Jinan University, Guangzhou 510632, China)

Abstract The SHG and 2XS strains of *Prorocentrum lima* with significant differences in toxin production were selected as the research objects, and 2-¹³C-glycine was used as the tracer material combined with high resolution mass spectrometry for new method and idea to study the synthesis and metabolic pathway of diarrheal shellfish toxins and their esterified toxins. Sixteen types of diarrheal shellfish poison and their esterified toxin components were identified in the two strains of algae. Under the control culture condition, the toxin production ability of SHG strain (okadaic acid 7.88 pg/cell and dinophysistoxins 14.35 pg/cell) was greater than that of 2XS strain (okadaic acid 5.70 pg/cell), while glycine as nitrogen source could significantly increase the total toxin production of the two algae. There was no significant change in single cell toxin production between ¹³C-glycine labeled group and glycine culture group ($P < 0.05$). The abundance of isotope isomers of diarrheal shellfish poisoning changed after being labeled, in which the esterification state was more affected by ¹³C labeling, and the secondary mass spectrometry clearly showed the labeling of fragment ions and dehydration peaks. This study shows that glycine can be used as the labeling material of *P. lima*, and thus the synchronous labeling of esterified state is realized for the first time by stable isotope labeling, which is helpful for the further study on the formation mechanism of diarrheal shellfish poisoning.

Key words *Prorocentrum lima*; diarrheal shellfish toxin; esterified state; ¹³C stable-isotope-tracer technique; quadrupole electrostatic field orbital trap high resolution mass spectrometry