

东湖铜绿微囊藻毒素的分离与鉴定*

何家菀 何振荣 俞家禄 俞敏娟

(中国科学院水生生物研究所, 武汉)

提要 1984—1985年从武昌东湖定期采集形成水华的铜绿微囊藻 *Microcystis aeruginosa*, 并进行了毒素的分离与鉴定。结果表明: (1) 用反复冻融的藻细胞糊对 20—25g 小白鼠进行腹腔注射, 其最低致死浓度为 100mg/kg ($LD_{50} = 100\text{mg/kg}$), 致死时间为 60—120min。 (2) 用匀浆、抽提、离子交换层析及高压液相层析 (HPLC) 纯化了毒素, 纯化毒素对小白鼠的最低致死量约为 1mg/kg, 引起小白鼠中毒致死的特征表明它是一种与以前文献报道相似的肝毒素。 (3) 纯化毒素在 230nm 和 240nm 有吸收肩峰; 对热稳定, 加热时碱性比酸性稳定; 主要氨基酸组成是, 天门冬氨酸、谷氨酸、丙氨酸、精氨酸、丝氨酸、苯丙氨酸; 其分子量约为 937。

武昌东湖是长江中下游的一个中型浅水湖泊, 面积约 40 000 亩。它不仅是著名的风景区, 而且也是一个饮用水源。近年来, 由于大量生活污水及工业废水的排入, 富营养化日趋严重, 每年夏秋季节形成大片水华, 水华中主要藻种为铜绿微囊藻 *Microcystis aeruginosa*、水华鱼腥藻 *Anabaena flos-aquae*、卷曲鱼腥藻 *Anabaena circinalis* 及硅藻和颤藻。已有研究证明, 东湖微囊藻细胞含有毒素^[1]。

关于蓝藻毒素的分离与鉴定, 国外已有不少研究^[2,5,8], 但国内尚无报道。Bishop 等^[3]最早分离出微囊藻毒素——Microcystin (快速致死因子), 认为它是一种含七个氨基酸的多肽。Botes 等分离的微囊藻毒素——Cyanoginosin (BE-4) 是一种环状多肽。Slatkin 等^[4]分离的微囊藻毒素 Toxin-LA 是一种含五个氨基酸的肽。Carmichael^[6,12] 等不仅从铜绿微囊藻菌株 7820 中分离出多肽毒素, 而且还从水华鱼腥藻和束丝藻分离出几种与微囊藻肽毒素不同的神经毒素。目前较多的研究结果证明, 不同的微囊藻株有类似的毒素存在, 毒素虽在氨基酸组成上有差异, 但可能都是一种具有肝中毒特征的小分子多肽, 其分子量从 654—19400^[7,9]。

我们分离、鉴定了 1984—1985 年采收的东湖微囊藻毒素并做了毒性试验, 研究和讨论了毒素的某些特性, 本文为初步结果的报道。

一、材料和方法

1. 微囊藻水华样品的收集

依照文献 [1] 的方法从 1984 年 7 月到 1985 年 9 月在东湖水华出现期间每月采集样品两次, 用塑料袋分装贮存于 -20°C 冰箱内, 冰冻成块。

* 本文承黎尚豪教授审阅, 谨志谢忱。本研究为中国科学院基金资助项目。
收稿日期: 1987 年 1 月 27 日。

2. 毒性试验

选用 20—25g 的健康小白鼠, 将反复多次冻融的藻细胞糊或提取、纯化的毒素分别以 0.2—0.05ml 注入小白鼠腹腔内, 以在 1—3h 内杀死 2—4 只小白鼠的最低剂量来确定其毒性。

3. 毒素的分离及纯化

取 200ml 冻融的藻糊加 100ml 甲醇、25ml 丁醇, 用水稀释至 500ml 后, 在室温下搅拌 3h; 用 30 000g 离心 45min, 获得离心悬液; 经通氮气减少体积后, 通过 C_{18} 硅胶弹筒, 以去除某些光合作用色素, 然后用 20ml 左右 100% 甲醇洗脱; 用烧杯收集甲醇洗脱液, 并通氮气浓缩至 1—2ml; 将此浓缩液再通过 DEAE-Sephadex A_{50} 柱 (12mm × 33cm), 用含 0—0.2 mol/L NaCl 的 0.02 mol/L 磷酸缓冲液 (pH = 8.2) 进行梯度洗脱, 分别收集每个峰的流出液, 用通氮气或用台式快速离心干燥器浓缩; 最后将经生物鉴定毒性高的峰的浓缩液通过 Varian 高压液相色谱仪, 用半制备 4.9mm × 25cm C_{18} 柱进行纯化, 收集各峰流出液, 用生物检测确定毒峰。

Microcystis aeruginosa 毒株 7820 及它的纯毒素是由美国 Wright 州立大学生物科学系 Carmichael 教授赠送。

4. 测定

用日本岛津 UV-3000 紫外分光光度计测紫外吸收; 用“日立”835 型氨基酸自动分析仪分析氨基酸组成。

二、试验结果

1. 微囊藻毒素的验证

将水华期收集的藻细胞反复冻融后, 对 20—25g 左右的小白鼠进行腹腔注射, 得到的结果如表 1。从表 1 可以看出: 卷曲鱼腥藻与水华鱼腥藻混合形成的水华的冻融细胞及硅藻冻融细胞均是无毒的, 多次注射小白鼠均未引起死亡, 而 1984 年 10 月、1985 年 5—9 月采集的铜绿微囊藻细胞均有毒, 注射后小白鼠的死亡率为 100%。最低致死量的值是 $LD_{100} = 100\text{mgdry } W/\text{kg body } W$ 。解剖尸体发现, 肝中毒现象明显。试验组比对照组的鼠肝明显充血、肿大。所以东湖微囊藻毒素应是一种肝毒素。

2. 分离、纯化毒素的鉴定

按前述方法经 C_{18} 快速分离硅胶弹筒用 100% 甲醇进行洗脱的洗脱液, 将其浓缩除去甲醇后表现出高的生物活性。将此毒液经 DEAE-Sephadex A_{50} 柱进一步分离、纯化, 结果如图 1 和表 2。从图 1 和表 2 可以看出, 毒素的粗提液经 DEAE-Sephadex A_{50} 柱, 可被分离出现三个峰, 多次生物检测证明, 主要毒素是在 II 峰。将 II 峰浓缩液经高压液相色谱测定, 结果如图 2 和图 3。图 2 结果表明第 III 个峰为毒峰, 小白鼠致死量为 1mg/kg。测定表明, 它含有 6 种氨基酸: 天门冬氨酸、谷氨酸、丙氨酸、精氨酸、丝氨酸、苯丙氨酸。

图 3 表明, 7820 毒素(a)与东湖微囊藻毒素(b)在高压液相层析时, 240nm 光吸收峰位置基本一致, 而东湖微囊藻纯化毒素比 7820 毒素多一个峰但不具毒性。

3. 微囊藻毒素的理化特性

将经 C_{18} 快速分离硅胶弹筒的浓缩液稀释作为藻毒粗提取液, 此液用 1mol/L HCl 或

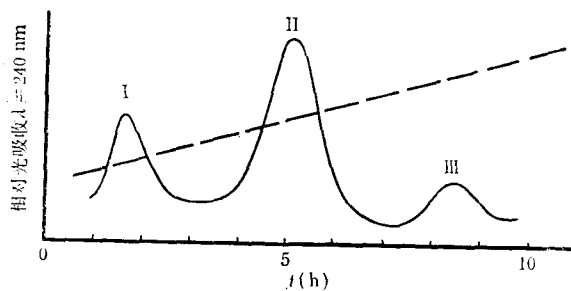
表 1 东湖水华藻类冻融细胞的毒性

Tab. 1 Toxicity of algal cells of water blooms in Donghu Lake

采集日期及地点 (年.月.日)	藻 类	注入藻细胞量 ¹⁾ (mg dry W/one mouse)	毒 性 ²⁾ (mg/kg)	
1984.10.18 湖边	铜绿微囊藻	9.70	370	
		5.50	220	
		2.50	100	
1985.4.28 湖中心	卷曲鱼腥藻 及水花鱼腥藻	2.90	0	
		2.90	0	
		1.90	0	
1985.5.18 湖边	铜绿微囊藻	2.50	100	
		1.00	0	
1985.6.25 湖边	铜绿微囊藻	3.70	150	
		5.50	220	
1985.7.9 湖中心	铜绿微囊藻	2.50	100	
		硅 藻	3.30	0
			2.00	0
1985.8.16 湖中心	铜绿微囊藻	6.50	260	
		3.25	130	
		1.65	0	

1) 每个浓度注射 2—4 只老鼠,并用 0.9% 盐水做对照;

2) 用腹腔注射测定。

图 1 DEAE-Sephadex A₅₀ 柱洗脱图Fig. 1 Elution pattern of the toxic fractions on DEAE-Sephadex A₅₀

用含 0—0.2 mol/L NaCl 梯度的 0.02 mol/L 磷酸缓冲液洗脱。

I 为杂蛋白峰; II 为毒素峰; III 为杂蛋白峰。

1 mol/L NaOH 调成不同 pH, 并用不同温度处理, 所得结果如表 3。由表 3 可以看出, 在 pH = 6.5 时, 加热藻毒到 60, 80, 100°C, 其毒性仍稳定不变。此结果与 Rabin 等^[10]的结果一致。但在不同 pH 时, 碱性条件 (pH = 10 左右) 比酸性条件 (pH = 2 左右) 稳定。

将在 HPLC 收集的毒素测紫外吸收, 可看出在波长 230 nm 和 240 nm 处各有一小的吸收肩 (图 4)。

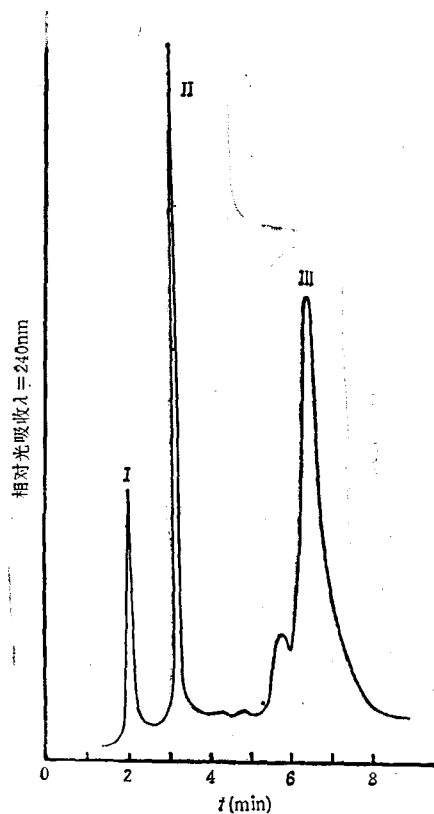


图 2 *Microcystis aeruginosa* 部分纯化样品的 HPLC 剖析图

Fig. 2 HPLC u. v. profile of partially purified toxin from *M. aeruginosa* obtained from Donghu Lake

采用 C₁₈ Alltech Anal 柱。流动相为 26% 乙腈加 74% 0.01mol/L 醋酸铵; 流速为 1ml/min。

I 为杂蛋白峰; II 为杂蛋白峰; III 为毒素峰。

表 2 DEAE-Sephadex A₅₀ 柱各洗脱峰浓缩液的毒性

Tab. 2 Toxicity of elution peaks, concentrated by DEAE-Sephadex A₅₀

洗脱温度(°C)	峰 号	毒 性	收集时间 (h)
14	I II III	- + -	8-10
14	I II III	- + -	8-10
15	I II III	- + -	8-10
15	I II III	+ + -	8-10
22	I II III	+ + -	3
29	I II III	+ + +	3

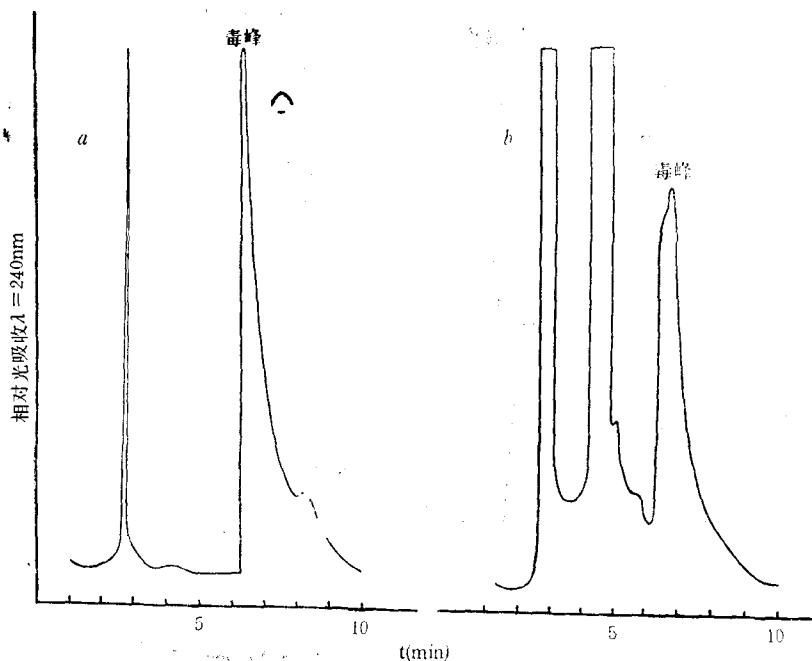


图3 东湖微囊藻毒素 HPLC 层析图与毒株 7820 毒素层析图比较
 Fig. 3 Comparison between HPLC profiles of toxins from Donghu *Microcystis aeruginosa* and *M. 7820*

a 为微囊藻毒株 7820 毒素 (100μl); b 为东湖微囊藻毒素 (50μl) 加 7820 毒素(50μl)。

表3 温度、pH 对东湖微囊藻粗提液毒性的影响¹⁾

Tab 3 Effects of temperature and pH on toxicity of crude extract from *M. aeruginosa* in Donghu Lake

温度 (°C)	pH	死亡率	致死时间 (h)
60	6.5	2/2	1
80	6.5	2/2	1
100	6.5	4/4	1.2
100	2.0	0/2	—
100	10.0	2/2	1

1) 处理时间均为 1h。

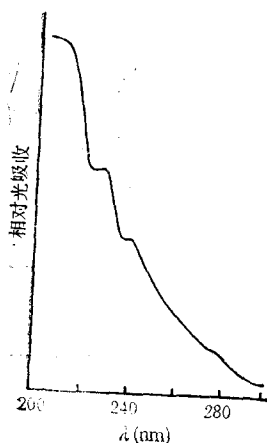


图4 东湖微囊藻纯化毒素的紫外光吸收

Fig. 4 Profile of u. v. absorption of purified toxin from *M. aeruginosa* in Donghu Lake

用快速原子轰击质谱 (FAB) (以甘油作为样品的基质) 及用聚丙烯酰胺凝胶电泳, 以毒株 7820 毒素作对照, 测出东湖微囊藻毒素分子量约为 937。

三、讨论

微囊藻 *M. aeruginosa* 是淡水蓝藻水华的主要种, 在考虑如何控制水华发生及消除它对水生生物、人畜及环境产生不良影响时, 必须了解毒素的理化特性及其结构, 因此毒素的分离、纯化及毒性的研究极为重要。

本文试验再次证明,东湖微囊藻细胞含有毒素,当最低剂量为 100mg/kg (纯化毒素 1mg/kg) 时可使小白鼠在 1—3h 内死亡。经鉴定,毒素在紫外光吸收、热稳定性以及在酸性条件下缓慢降解等性质上,与毒株 7820 相似(图 3)。解剖试验小白鼠尸体发现肝充血、肿大。试验组肝重占体重的 9—10%,对照组仅占 5—6%。关于微囊藻毒素致死小白鼠(或其它动物)的机理目前仍有争论^[11,12]。Theiss 和 Carmichael 认为,可能是 *M. aeruginosa* 毒株 7820 毒素直接作用于肝,并在肺里有肝坏死碎片的沉积;也可能是肝凝血导致心脏衰竭,及肝充血坏死。东湖微囊藻毒素注射到小白鼠腹腔后,表面上可看到肝充血、肿大,但到底什么原因使小白鼠致死,尚有待于组织病理切片的进一步观察研究。

毒素在纯化过程中,特别是经 DEAE-Sephadex A₅₀ 柱分离时,有时产生毒素不能很好集中在某一峰内的现象,这可能因柱体积偏小(12mm × 33cm)而上柱样品浓度高所致。表 2 中的数据明显指出:在分离过程中,有时除 II 峰外,I、III 峰也含有毒素。而试验中我们只收集了 II 峰流出液进行检测、浓缩、纯化。这样毒素的回收率(产量)大大降低。因此,纯化毒素的最低致死浓度是以 7820 毒株的纯毒素的紫外吸收(200—300nm)做标准曲线所求得的,其值为 1mg/kg。此值约是毒株 7820 毒素最低致死量的 10 倍^[6]。纯化毒素毒性降低的原因估计是由于在 HPLC 上收集的毒峰流出液纯度不够高所致(图 2, 3)。

1982 年, Botes^[4] 从微囊藻中分离出 BE₁—BE₄ 种不同的毒素,东湖微囊藻只含一种毒素还是含有几种不同的毒素还需进一步检测。

Ellement 等^[7,13]报道,微囊藻毒素分子量为 654—2950,由 5—16 个氨基酸组成。近期研究表明^[4,12],微囊藻毒素为环状七肽,各作者测定中有五个氨基酸相同,另两个氨基酸有差异。毒素在氨基酸组成上这些差异的原因尚不清楚。我们用聚丙烯酰胺凝胶电泳及质谱法以 7820 毒株的纯毒素为标准测了分子量。实验中发现毒肽对染料考马斯亮蓝 R₂₅ 不敏感,因此不易染色。若用氨银染色,7820 毒肽在溴酚蓝带上方分子量约为 1000 左右处有一条肽带;东湖微囊藻位置稍低。用质谱测得 7820 毒素和东湖微囊藻毒素分子量分别为 978 和 937 道尔顿。此值与国外的报道接近。两种毒素均含有天门冬氨酸、谷氨酸、丙氨酸、精氨酸;不同的是东湖微囊藻毒素含丝氨酸和苯丙氨酸,而 7820 毒素含甲基脱氢丙氨酸。以上这些差别是由于东湖微囊藻毒素的纯度不够,测定仪器及某些方法不同,还是毒素本身结构不同,尚不得而知。

目前,我们已分离出东湖微囊藻毒株,正在培养,以上问题将进一步深入探讨。

参 考 文 献

- [1] 俞家禄等, 1987. 武汉东湖蓝藻水华毒性的研究 1. 淡水蓝藻毒性的检测. 水生生物学报 11 (3): 212—218.
- [2] Amann, M. J., F. Juttner, 1981. A rapid procedure for the isolation of an unstable *Microcystis* toxin with FDF-feature. *FEMS Microbiol Letters* 12: 191—193.
- [3] Bishop, C. T., E. F. L. J., Anet and P. R. Gorham, 1959. Isolation and identification of the fast-death-factor in *Microcystis aeruginosa* NRC-1. *Can. J. Biochem. Physiol.* 37: 453—471.
- [4] Botes, D. P., Helene Kruger and C. C. Viljoer, 1982. Isolation and characterization of four toxins from Bluegreen *Microcystis aeruginosa*. *Toxicon*. 20: 945—954.
- [5] Bent, P. E., W. W. Carmichael, 1980. Isolation and characterization of peptide toxins from freshwater cya-

- nophytes *Anabaena flos-aquae* and *Microcystis aeruginosa*. *Ohio. J. Sci.* **80**: 66—68.
- [6] Codd, G. A., W. W. Carmichael, 1982, Toxicity of a clonal isolate of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* from Great Britain. *FEMS Microbiology Letters* **13**: 409—411.
- [7] Elleman, T. C., I. R. Falcomer and M. T. Runnegar, 1978. Isolation characterization and pathology of the toxin from a *Microcystis aeruginosa* bloom. *Aust. J. Biol. Sci.* **31**: 209—218.
- [8] Gorham, P. R., W. W. Carmichael, 1979. Phycotoxins from Blue-green algae. *Pure and Appl. Chem.* **52**: 165—174.
- [9] Kirpenko, Yu. A. et al. 1975. Isolation of toxin from Blue-green algae biomass and some of its physico-chemical properties. *Dopov. Akad. Nauk. Ukr. RESR Ser B*: 359—361.
- [10] Rabin, P., and A. Darbre, 1975. An improved extraction procedure for the endotoxin from *Microcystis aeruginosa* NRC-1. *Biochem. Soc. Trans.* **3**: 428—430.
- [11] Slatkin, D. N., R. D. Stoner and W. H. Adams, 1983. A typical pulmonary thrombosis caused by a toxic cyanobacterial peptide. *Science* **220**: 1382—1385.
- [12] Theiss, W. W. and W. W. Carmichael, 1986. Physiological effect of a peptide toxin produced by the freshwater cyanobacteria (blue-green algae) *Microcystis aeruginosa* strain 7820. Mycotoxins and Phycotoxins A Collection of Invited Papers Presented at the Sixth International IUPAC Symposium on Mycotoxins and Phycotoxins Pretoria, Ed by P. S. Steyn and R. Vlegaar. Republic of South Africa, pp: 22—25.
- [13] Watanabe, M. F., S. Oishi, 1982. Toxic substance from a natural bloom of *Microcystis aeruginosa*. *Applied and Environmental Microbiology* **43**(4): 819—822.

ISOLATION AND IDENTIFICATION OF TOXINS CONTAINED IN *MICROCYSTIS AERUGINOSA* FROM DONGHU LAKE, WUHAN

He Jiawan, He Zhenrong, Yu Jialu and Yu Minjuan

(Institute of Hydrobiology, Academia Sinica, Wuhan)

ABSTRACT

Eutrophication of water supplies and recreational water bodies in China has increased that causes the water bloom of blue green algae. Studies were carried out in order to determine the presence of toxic Cyanobacteria in freshwater lakes and ponds.

In 1984—1985 during the water bloom seasons algal cells of *Microcystis aeruginosa* were collected from Donghu lake. Most of them were toxic.

The toxin was isolated by homogenization, extraction, ultracentrifugation, ionexchange chromatography and purified by high performance liquid chromatography. The results showed that the toxicity of the freeze-thaw cells was 100mg/kg for 20—25 g mice by intraperitoneal injection, with survival time of 60—120 min (LD_{100} = 100 mg/kg).

The toxicity of purified toxin was 1 mg/kg in mice by i.p. The modes of poisoning are similar to that reported of hepatotoxic peptides from *Microcystis aeruginosa*. The pure toxin has two u. v. absorbance shoulders at 230 and 240 nm respectively, stable in heat and alkaline. The main amino acids of the toxin were aspartic acid, glutamin acid, alanine, arginine, serine, phenylalanine. The fast atom bombardment mass spectra of toxin showed the molecular weight is about 937 daltons.