

# 亚历山大藻细胞周期中毒素含量及组成的变化

林 琳, 张树刚, 洪华生, 王大志\*

(近海海洋环境科学国家重点实验室(厦门大学), 福建 厦门 361005)

**摘要:** 用细胞同步化培养的方法, 研究了塔玛亚历山大藻 *A. tamarensis* CI01 株不同细胞周期细胞中毒素含量与组成的变化. 结果表明, *A. tamarensis* CI01 细胞分裂主要发生在早上 6 时至 8 时, 细胞密度在 6 h 内增加近一倍. 细胞内毒素合成主要在细胞周期的  $G_1$  期, 由光诱导合成, 毒素含量( $\text{fmol}/\text{cell}$ ,  $Q_t$ ) 在光周期前 8 h 内从  $17 \text{ fmol}/\text{cell}$  增加到分裂前的  $24 \text{ fmol}/\text{cell}$ , 而在其它细胞周期细胞内毒素含量稳定, 基本不合成毒素. 比较分析单细胞  $C_{1,2}$  毒素和  $\text{GTX}_{2,3}$  毒素合成时间及速率, 推测在 *A. tamarensis* CI01 中细胞首先合成  $\text{GTX}_{2,3}$ , 在其它修饰酶的作用下再转化为  $C_{1,2}$ .

**关键词:** 亚历山大藻; 细胞周期; 毒素含量

**中图分类号:** Q 949. 24

**文献标识码:** A

**文章编号:** 0438 0479(2007)S1 0111 F 04

亚历山大藻是一类在全世界海区都广泛分布的甲藻<sup>[1-2]</sup>. 研究表明, 亚历山大藻属中的大多数种类都可以生产合成麻痹性贝毒. 在过去的 20 年中, 亚历山大藻赤潮的爆发频率呈显著增加趋势, 对海洋养殖业和人类健康等都造成了危害. 许多学者对不同海区的亚历山大藻的产毒生理进行了研究, 表明毒素的生产合成受到环境因子, 如营养盐、温度和盐度等的调控, 而一些研究则表明, 细胞内毒素含量在指数生长期和稳定生长期是不同的<sup>[3-6]</sup>, 说明毒素生产率和细胞生长率直接相关, 这暗示毒素合成与细胞周期密切相关<sup>[5]</sup>. 有研究证明, 甲藻细胞周期受普遍存在于真核生物中的细胞周期蛋白如类  $\text{cd}c-2$  蛋白激酶所调控<sup>[7-8]</sup>. Taroncher-Oldenburg 等<sup>[9]</sup> 采用同步化的方法研究了亚历山大藻 *A. fundyensis* 细胞周期中毒素含量和组成的变化. 他们通过分析各细胞周期细胞中毒素组成及含量的变化, 发现毒素合成在细胞的 M 期向  $G_1$  期过渡时开始增加, 并在  $G_1$  期的早期的 8~10 h 内毒素含量持续增加, 在其它细胞周期毒素含量则基本稳定, 证明毒素合成是不连续的, 光在毒素的合成中起着非常重要的作用.

亚历山大藻 *A. tamarensis* CI01 是从我国南海筛选的一株产毒藻, 对它的产毒生理已开展了较多的工作<sup>[10-11]</sup>, 但有关细胞周期对毒素生产合成的影响还不很清楚. 本研究运用同步化培养的方法, 对

*A. tamarensis* CI01 进行同步化处理, 分析了整个细胞周期中毒素含量及组成的变化, 探讨了亚历山大藻毒素生物合成的途径.

## 1 材料与方法

### 1.1 材 料

研究用藻种 *A. tamarensis* CI01 由暨南大学江天久教授提供. 种的保存采用 K-medium<sup>[3]</sup> 培养基, 保种条件: 温度  $20^\circ\text{C}$ , 盐度值 30, 光照强度  $4\,000 \text{ lx}$  和光暗周期  $14 \text{ h} \diamond 10 \text{ h}$ . 保种用海水取自厦门港.

毒素分析采用的离子对试剂庚基磺酸钠购自 Sigma 公司, 磷酸四丁基铵购自 Fluka 公司, 乙腈为 Merck 公司生产的色谱纯试剂, 其它试剂均为分析纯试剂. 分析用水为经 Millipore 超纯水系统生产的超纯水. 标准毒素部分购自加拿大海洋生物研究所(NRC), 包括  $\text{GTX}_{1-5}$ ,  $\text{neoSTX}$ ,  $\text{STX}$ ,  $\text{dcSTX}$ , 标准毒素  $C_{1,2}$  由本实验室自制并标定浓度.

### 1.2 方 法

#### (1) 藻类同步化培养

培养两瓶各 5 L 的 *A. tamarensis* CI01, 至指数生长期时, 将瓶子放在黑暗处避光培养 36 h, 取出,  $2\,500 \text{ g}$  离心 5 min, 将离心后的藻液转移到新鲜的消毒海水中, 放置于  $14 \text{ h} \diamond 10 \text{ h}$  的光暗周期下, 静置一天, 第 2 天加入 K-medium. 12 h 后再一次将藻避光 36 h, 同第一次操作. 经过两次光限制处理后, 藻细胞基本上达到同步.

#### (2) 藻的培养及取样

将同步化的藻细胞扩接成 10 L 的实验用藻, 密度控制在  $1\,500 \text{ cells}/\text{mL}$  左右, 先让其经过一个细胞

收稿日期: 2007-04-10

基金项目: 国家自然科学基金(40376032), 科技部国际合作重点项目(2005DFA20430), 福建省科技厅重点项目(2006N002)资助

\* 通讯作者: dzwang@xmu.edu.cn

周期(大概一天左右),使细胞密度从 1 500 cells/mL 长到 3 000 cells/mL 左右,开始细胞周期实验.实验的当天晚上 7 时左右(晚上 8 时进入暗周期),将大瓶中的藻细胞轻轻分装到 13 个小瓶中,每瓶 500 mL,从晚上 8 时开始,每两个小时取一次样,连续 24 h,每次取 3 个 1 mL 的样品用来细胞计数,2 个 10 mL 的样品用 2 500 g 离心 5 min,离心下来的藻细胞中分别加入 0.5 mL 50 mmol/L 的醋酸溶液进行悬浮.所收集的样品保存在 -20 °C 冰箱中,待毒素分析时用,数据取两个平行样品所得的平均值.

### (3) 藻细胞计数

取 1 mL 的藻液放在 1.5 mL 离心管中,用 0.02 mL 的 Lugol's 固定剂固定,取 0.1 mL 滴在浮游植物计数框上,用光学显微镜进行观察计数.根据藻密度绘制出 *A. tamarense* CI01 的生长曲线.

### (4) 藻毒素的提取

上述藻悬浮液使用 Model 450 细胞超声破碎仪(Branson 公司,德国)进行破碎,功率 100 W,工作 3 s,间隙 3 s,冰浴冷却,镜检藻细胞完全破碎为止.后 10 000 g 离心 30 min,取上清液进行 HPLC 分析.

### (5) 毒素的分析

毒素分析采用 HP1100 系列高效液相色谱系统(Agilent 公司,美国).麻痹性贝毒的分析采用 Oshima 等<sup>[12]</sup>建立的经 Anderson 等<sup>[13]</sup>修改的 HPLC 柱后衍生法.采用 3 种洗脱液检测不同的毒素:1) C 类毒素,洗脱液为 2 mmol/L 的磷酸四丁基铵溶液,调整 pH 至 6.0;2) GTX 和 dcGTX 类毒素,洗脱液为含有 2 mmol/L 庚基磺酸钠离子对的 10 mmol/L 磷酸铵缓冲液, pH 为 7.1;3) STX 类毒素,洗脱液为含有 2 mmol/L 庚基磺酸钠离子对的 30 mmol/L 磷酸铵缓冲液, pH 为 7.1,并按 100:5 的比例加入乙腈.所有分析过程氧化剂均为含有 7 mmol/L 高碘酸的 50 mmol/L 磷酸氢二钾缓冲液, pH 为 9.0,酸化剂均为 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.分析 C 毒素时柱温 30 °C,衍生温度 45 °C;分析其它两类毒素时柱温为室温,衍生温度 80 °C.

## 2 实验结果

*A. tamarense* CI01 在 24 h 内完成了一个完整的细胞周期,细胞密度从前一天晚上 8 时(0 h)的 3 460 cells/mL 到第 2 天晚上 8 时(24 h)的 6 480 cells/mL (图 1A),考虑到同步化效率,细胞基本完成了一次分裂.从图中可明显看出来,细胞分裂集中在早上 4 时到 10 时这 6 个小时内,特别是从早上 6 时到 8 时这

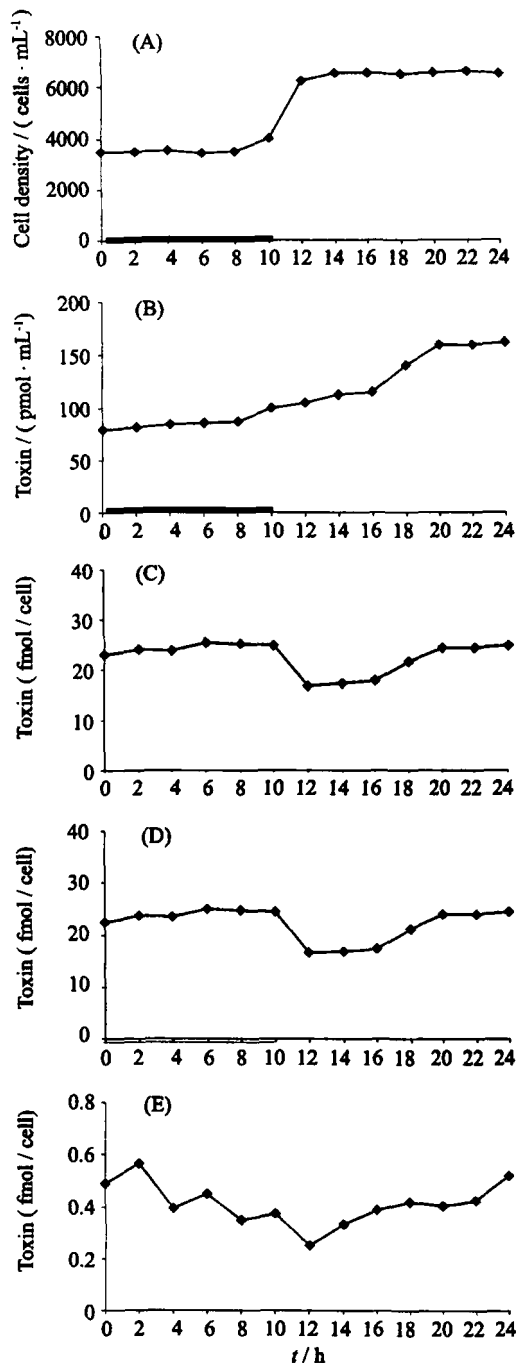


图 1 细胞周期的各种参数的变化

A. 细胞密度; B. 单位水体藻毒素含量; C. 单细胞藻毒素含量; D. 单细胞 C 毒素含量; E. 单细胞 GTX 毒素含量; X 坐标轴上的黑色部分表示暗周期,其余表示光周期

Fig. 1 Variations of toxin and other parameters in cell cycle

两个小时,细胞密度从 4 000 cells/mL 迅速增加到 6 200 cell/mL.

毒素的变化包括单位水体中藻毒素含量变化(图 1B)和单细胞藻毒素含量变化(图 1C),其中单位水体中藻毒素含量从早上 4 时开始持续升高到下午 4 时,

由 86 nmol/L 升到 159 nmol/L。而单细胞毒素含量从前一天晚上 8 时到第 2 天早上 6 时都维持在 24 fmol/cell 左右, 在早上 8 时含量降到 17 fmol/cell, 之后开始慢慢升高, 到下午 4 时含量基本恢复到细胞分裂前的水平, 即 24 fmol/cell, 此后保持不变。

*A. tamarense* CI01 含有  $C_1$ ,  $C_2$ ,  $GTX_2$  和  $GTX_3$  毒素, 其中以  $C_{1,2}$  为主, 约占细胞总毒素的 95%。本研究分别分析了整个细胞周期细胞内  $C_{1,2}$  毒素(图 1D) 和  $GTX_{2,3}$  毒素(图 1E) 含量的变化。 $C_{1,2}$  毒素的变化趋势与单细胞总毒素的变化趋势一样, 从前一天晚上 8 时到第 2 天早上 6 时  $C_{1,2}$  含量保持稳定, 维持在 23 fmol/cell 左右, 在早上 8 时含量明显下降, 后开始慢慢升高, 至下午 4 时含量基本恢复到细胞分裂前的水平。而  $GTX_{2,3}$  毒素含量在暗周期时有波动, 呈降低趋势, 到早上 8 时开始升高, 晚上 8 时与前一天晚上 8 时的毒素水平基本一致, 达到 0.5 fmol/cell。

### 3 讨论

*A. tamarense* CI01 同步化后细胞基本处于同一细胞期, 这可从图 1A 中看出, 当光暗周期转换时, 细胞分裂, 从暗周期(早上 4 时)到光周期(早上 10 时) 6 h 内细胞几乎增加一倍, 这一段时间是细胞周期的有丝分裂期 M 向间期  $G_1$  过渡的阶段, 而毒素的合成主要集中在  $G_1$  期。我们在分析毒素变化时采用了两种参数: 单位体积水体中藻毒素的含量和单细胞藻毒素的含量, 前者表示毒素的净产生量, 一般情况下不会减少, 除非细胞大量死亡, 毒素渗漏出去, 而细胞周期所用的藻为指数期细胞, 不存在这一问题。后者则表示单个细胞的毒素变动, 是单细胞毒素累积的过程。从图 1B 可以看出, 毒素的增加集中在早上 8 时到下午 4 时这一段时间, 这段时间为细胞周期的  $G_1$  期, 这从单细胞藻毒素含量的变化看的更清楚(图 1C), 在细胞分裂时, 亲体细胞中的毒素分配在两个子细胞内, 导致每个细胞所含的毒素量减少(早上 8 时), 在接下来的几个小时内, 细胞合成毒素, 单细胞藻毒素含量逐渐增加, 到下午 4 时, 单细胞毒素含量已经恢复到分裂前的水平。考虑到毒素的合成是在  $G_1$  期进行, 而与此有密切关系的因素就是光, 因此一个重要的推断就是: 毒素是由光诱导合成的。先前的许多研究表明, 毒素的生产合成受光调控<sup>[14-18]</sup>。Taroncher-Oldenburg 等<sup>[9]</sup>的研究表明, 同步化的 *A. fundyense* 细胞毒素也是在 M 期向  $G_1$  期过渡时开始增加, 即在暗光周期转换点时毒素开始合成, 他们认为光在毒素合成中起着非常重要的作用, 而我们的实验结果也证明了这一点。

分析单细胞  $C_{1,2}$  毒素含量和  $GTX_{2,3}$  毒素含量时发现, 在早上 8 时,  $GTX_{2,3}$  毒素含量开始增加, 且增加速度较快, 而  $C_{1,2}$  毒素含量在早上 8 时以后的 2-4 h 内, 毒素含量没有增加, 之后才开始快速增加, 同时在有丝分裂之前的间期  $G_2$  期  $GTX_{2,3}$  毒素含量逐渐下降。根据上述研究结果, 我们推测在 *A. tamarense* CI01 中, 细胞中首先合成  $GTX_{2,3}$  毒素, 在酶的作用下, 如硫转运酶将  $GTX_{2,3}$  转化为  $C_{1,2}$  毒素。该毒素合成途径与日本学者 Sako 等<sup>[19]</sup>提出的毒素合成转化途径一致, 而与 Taroncher-Oldenburg 等<sup>[9]</sup>对毒素转化途径的阐述相反, 他们认为细胞首先合成 C 毒素, 如  $C_{1,2}$ , 在一些脱硫酶的作用下,  $C_{1,2}$  去掉磺酸基生成  $GTX_{2,3}$ 。目前由于缺少直接的证据, 对亚历山大藻毒素的合成转化途径还不是很清楚, 上述两种途径哪一种更接近实际情况, 现在还无法判定, 需要更多的生化方面的证据, 如毒素合成的直接前体和参与毒素合成的酶等。

### 参考文献:

- [1] Anderson D M, Kulis D M, Doucette G J, et al. Biogeography of toxic dinoflagellates in the genus *Alexandrium* from the northeastern United States and Canada[J]. Marine Biology, 1994, 120: 467-468.
- [2] Hallegraeff G M. Harmful algal blooms: a global overview[M]// Hallegraeff G M, Anderson D M, Cembella A D, eds. Manual on harmful marine microalgae. Paris, France: Imprimerie Landais, 2005: 25-49.
- [3] Boyer G L, Sullivan J J, Andersen R J, et al. Toxin production in three isolates of *Protogonyaulax* sp. [M]// Anderson D M, White A W, Baden D G, eds. Toxic dinoflagellates, Elsevier. New York, 1985: 281-286.
- [4] Bocaz B A, Beitler M K, Liston J, et al. Paralytic shellfish toxins in *Protogonyaulax tamarensis* and *Protogonyaulax catenella* in axenic culture[J]. Plant Physiology, 1988, 88: 1285-1290.
- [5] Anderson D M, Kulis D M, Sullivan J J, et al. Dynamics and physiology of saxitoxin production by the dinoflagellates *Alexandrium* spp[J]. Marine Biology, 1990b, 104: 511-524.
- [6] Anderson D M, Kulis D M, Sullivan J J, et al. Toxin composition variations in one isolate of the dinoflagellate *Alexandrium fundyense*[J]. Toxicon, 1990, 28: 885-893.
- [7] Rodriguez M, Cho J W, Sauer H W, et al. Evidence for the presence of cdc2 like protein kinase in the dinoflagellate *Cryptocodinium cohnii* [J]. J Eukaryotic Microbiol, 1994, 40: 91-96.
- [8] Varr Dolah F M, Leighfield T A, Sandel H D, et al. Cell

- division in the dinoflagellate *Gambierdiscus toxicus* is phased to the diurnal cycle and accompanied by activation of the cell cycle regulatory protein cdc2 kinase [J]. *J Phycol*, 1995, 31: 95– 400.
- [ 9 ] Taroncher Oldenburger G, Kulis D, Anderson D M. Toxin variability during the cell cycle of the dinoflagellate *Alexandrium fundyense* [ J ]. *Limnol Oceanogr*, 1997, 42: 1177– 1188.
- [ 10 ] Wang D Z, Hsieh D P H. Dynamics of C2 toxin and chlorophyll a formation in the dinoflagellate *Alexandrium tamarens* during large scale cultivation [ J ]. *Toxicon*, 2001, 39: 1533– 1536.
- [ 11 ] Wang D Z, Hsieh D P H. Effects of different nitrogen / phosphorus nutrient ratios on the growth and C2 toxin bioproduction in *Alexandrium tamarens* CI01 [ J ]. *Mar Poll Bull*, 2002, 45: 286– 289.
- [ 12 ] Oshima Y, Sugino K, Yasumoto T. Latest advances in HPLC analysis of paralytic shellfish toxins [ M ] // *Myco toxins and phycotoxins*. Amsterdam: Elsevier, 1989: 319– 326.
- [ 13 ] Anderson D M, Kulis D M, Qi Y Z, et al. Paralytic shellfish poisoning in Southern China [ J ]. *Toxicon*, 1996, 34: 579– 590.
- [ 14 ] Ogata T, Ishimaru T, Kodama M. Effect of water temperature and light intensity on growth rate and toxicity change in *Protogonyaulax tamarens* [ J ]. *Marine Biology*, 1987, 95: 217– 220.
- [ 15 ] U sup G, Kulis D M, Anderson D M. Growth and toxin production of the toxic dinoflagellate *Pyrodinium bahamense* Var. compressum in laboratory cultures [ J ]. *Natural Toxins*, 1994, 2: 254– 262.
- [ 16 ] Hwang D F, Lu Y H. Influence of environmental and nutritional factors on growth, toxicity, and toxin profile of dinoflagellate *Alexandrium minutum* [ J ]. *Toxicon*, 2000, 38: 1491– 1503.
- [ 17 ] Hamasaki K, Horie M, Tokimitsu A, et al. Variability in toxicity of the dinoflagellate *Alexandrium tamarens* isolated from Hiroshima Bay, western Japan, as a reflection of changing environmental conditions [ J ]. *J Plank Res*, 2001, 23: 271– 278.
- [ 18 ] Etheridge S, Roesler C. Effects of temperature, irradiance, and salinity on photosynthesis, growth rates, total toxicity, and toxin composition for *Alexandrium fundyense* isolates from the Gulf of Maine and Bay of Fundy [ J ]. *Deep Sea Res, II*, 2005, 52: 2491– 2500.
- [ 19 ] Sako Y, Yoshida T, Uchida A, et al. 2001 Purification and characterization of a sulfotransferase specific to N-21 of saxitoxin and gonyautoxin 2+ 3 from the toxic dinoflagellate *Gymnodinium catenatum* ( Dinophyceae ) [ J ]. *J Phycol*, 2001, 37: 1044– 1051.

## Toxin Content and Composition of *Alexandrium tamarens* Varied with the Cell Cycle

LIN Lin, ZHANG Shur gang, HONG Hua sheng, WANG Da zhi\*

( State Key Laboratory of Marine Environmental Science, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

**Abstract:** Toxin content and toxin composition of a toxic dinoflagellate *Alexandrium tamarens* CI01 in a cell cycle were investigated using synchronization approach. The results showed that the cell division mainly occurred from 6:00 am to 8:00 am, the cell density of *A. tamarens* CI01 doubled within 6 hours. Toxin production was discontinuous, induced by light, and always occurred during a defined time frame within the G<sub>1</sub> phase of the cell cycle. Total cellular toxin content ( fmol/cell, Q<sub>t</sub> ) increased from 17 fmol/cell within 8 h in early G<sub>1</sub> to 24 fmol/cell before cell division, and Q<sub>t</sub> remained relatively constant within the other cell cycle phase. By analysing toxin biosynthesis time and ratio of C<sub>1,2</sub> and GTX<sub>2,3</sub>, a putative sequence of interconversions between the derivatives could be established. We presume GTX<sub>2,3</sub> was the first compound be produced and later be converted to C<sub>1,2</sub> by other modified enzymes.

**Key words:** *Alexandrium* ; cell cycle; toxin variability