

微囊藻胞内毒素的提取方法

彭亮^{1,2} 陈伟¹ 宋立荣¹

(1. 中国科学院水生生物研究所, 淡水生态与生物技术国家重点实验室, 武汉 430072;

2. 中国科学院研究生院, 北京 100049)

STUDY ON EXTRACTION METHODS OF INTRACELLULAR MICROCYSTINS

PENG Liang^{1,2}, CHEN Wei¹ and SONG Li-Rong¹

(1. State Key Laboratory of Freshwater Ecology and Biotechnology, Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072, China; 2. Graduate University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

关键词: 微囊藻细胞; 微囊藻毒素; 提取方法; 优化; 定量分析

Key words: Microcystis cell; Microcystins; Extraction methods; Optimize; Quantitative analysis

中图分类号: Q-33 文献标识码: A 文章编号: 1000-3207(2011)04-0708-05

随着全球淡水水体富营养化程度的不断加剧, 蓝藻水华及其毒素污染问题已经逐渐威胁到人类饮用水的安全。微囊藻(*Microcystis*)为常见的水华蓝藻种类, 其所产生的微囊藻毒素(Microcystins, MCs)不仅会严重危害水生生态系统, 并且可能会给人类健康带来威胁^[1,2]。我国云南滇池、江苏太湖和安徽巢湖等淡水湖泊均发生不同程度的蓝藻水华, 并检测到了高含量 MCs 的存在^[3,4]。微囊藻毒素不仅能通过饮用水直接进入人体内, 而且还可以在水生动植物体内积累, 并通过水生食物链传递进入人体^[5,6]。在水华和水柱中 MCs 检测及其风险评估研究是深入了解水华污染过程的基本手段和方法, 近年来已经成为该领域研究热点之一。而 MCs 的提取和纯化技术是准确测定的前提, 也逐渐备受关注。

MCs 检测方法主要有: 生物学方法, 包括小白鼠毒性实验、蛋白磷酸酶抑制检测法(PPIA)^[7,8]、酶联免疫吸附试验(ELISA)^[9,10]; 化学方法, 包括毛细管电泳(CE)、薄层层析(TLC)、HPLC、HPLC-MS^[11-13]等。无论选择何种检测方法, 充分提取是准确测试的先决条件。现阶段国内外已报道的提取方法较多, 但不统一, 这就给实验结果的可靠性和可对比性带来诸多不确定因素。对于细胞结合态 MCs 提取方法比较研究, 目前已有文献主要集中在对

提取溶剂体系的选择和提取技术的选择和比较上。已报道溶剂体系包括超纯水、5%乙酸、50%—100%甲醇、正丁醇、三氟乙酸(TFA)等; 提取方法包括反复冻融提取、超声波破碎提取、搅拌提取^[12-15]等。但现有研究忽略了不同样品类型的差异, 如室内培养物和野外水华样品之间的差异。一般来说, 室内纯培养物以单细胞为主, 易于 MCs 的提取, 而野外水华样品大多为大群体, 含有胶被, 完全提取比较困难。为提高 MCs 监测结果可靠性和不同实验室数据的可比性, 针对不同类型的藻样, 建立统一、高效的提取方法至关重要。本研究旨在探讨针对不同类型微囊藻样品细胞胞内的最优提取方法。

1 材料与方法

1.1 实验材料

MC-LR 和 MC-RR 标准品购自 Wako 公司(日本), 铜绿微囊藻(*Microcystis aeruginosa*)PCC7806 和 FACHB 905 来自中国科学院水生生物研究所淡水藻种库, 野外水华样品以 25#浮游生物网于 2004 年 7 月采自太湖梅梁湾。

1.2 实验仪器

液相色谱仪 LC-10A(日本岛津公司)、UV 检测器、Shim-pack VP-ODS 色谱柱(150 mm × 4.6 mm, 5 μm)、冷

收稿日期: 2010-05-17; 修订日期: 2010-12-28

基金项目: 973 项目(编号: 2008CB418006)资助

作者简介: 彭亮(1980—), 男, 湖南临湘人; 博士研究生; 主要研究方向为藻类毒理学。E-mail: pengliang0920@163.com

通讯作者: 宋立荣, E-mail: lrsong@ihb.ac.cn

冻干燥仪(Yamato, 日本)、ODS 固相萃取柱(Sep-pak ODS, Waters 公司)、旋转浓缩仪(Büchi 公司)、超声波破碎仪(宁波新芝)、六联磁力搅拌仪(江苏金坛)。

1.3 实验方法

铜绿微囊藻 PCC 7806 和 FACHB 905 用 BG11 置于 10 L 玻璃瓶中光照通气培养, 培养温度为 25℃, 光强为 20 $\mu\text{E}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$, 光暗周期为 12h 12h。

培养物经 8000 r/min 离心, 等重分装, 一部分-20℃反复冻融 3 次, 一部分 105℃烘干, 另一部分冷冻干燥, 称重后分别用以下溶剂提取: 超纯水(溶剂 A)、0.1% TFA-80%甲醇溶液(溶剂 B)、5% 乙酸提取后用 80% 甲醇提取两次(溶剂 C), 并辅以超声波破碎、搅拌等方法。离心后合并上清液, 用 ODS 固相萃取柱纯化, 后用 90%甲醇溶液洗脱, 洗脱液 40℃旋转浓缩至干, 1 mL 20%甲醇定溶待测。

MCs 检测的色谱条件为: 流动相为磷酸盐缓冲液(pH=3.0)/甲醇=40 60(v/v), 流速 1 mL/min, 柱温 40℃, 检测波长为 238 nm。

1.4 统计方法

结果以平均值表示。每个组所得数据用 ANOVA 进行分析, 以 Bonferroni 检验显著性。当 $P < 0.05$, 表示两组数据平均值之间的比较具有显著性差异。该研究中使用的统计软件为 Origin 数据分析软件(Ver 7.5, USA)。

2 结果与讨论

2.1 不同提取溶剂和超声波破碎对 MCs 提取效率的影响

室内纯培养物 FACHB 905 和 PCC 7806 两株藻经扩大培养离心收集后, 经反复冻融 3 次, 冷冻干燥, 然后提取 MCs。该实验分成 6 组进行(其中实验组 1—3 分别为溶剂 A、B、C 比较; 实验组 4—6 分别为溶剂 A、B、C 辅以超声波破碎提取比较), 具体如下(表 1): 溶剂 A 提取 3 次(实验组 1)、溶剂 B 提取 3 次(实验组 2)、溶剂 C 提取 3 次(实验组 3)、溶剂 A+超声波破碎(600 w, 5min)提取 3 次(实验组 4)、溶剂 B+超声波破碎提取 3 次(实验组 5)、溶剂 C+超声波破碎提取 3 次(实验组 6)。结果表明, 对于两株室内单细胞纯培养物, 经反复冻融 3 次后, 超声波破碎提取和 3 种溶剂对 MCs 提取无显著差异, 即使超纯水搅拌提取, 30min 也可达到最优提取效率(图 1、2)。Meriluoto, *et al.*^[14]发现用水和水-甲醇-正丁醇(75 20 5, v/v)分别提取冻干蓝藻中的 MCs 的效率差异不大, 因此, 他们认为提取 MCs 不需要有机溶剂。而 Lawton, *et al.*^[15]

研究发现用甲醇提取冻融过的蓝藻, 对极性较强的 MCs 异构体的效率要略微高于水-甲醇-正丁醇(75 20 5, v/v), 但要显著高于 5%的乙酸, 所以, 他们认为用甲醇作为提取溶剂最为理想。而本研究认为对于经冻融过的室内纯培养藻株, 超纯水搅拌 30min 即可, 这就可以节省有机溶剂, 同时避免有机溶剂对实验人员的身体损伤。

太湖水华蓝藻 太湖水华样品在保温冰箱中运输至实验室, 经反复冻融 3 次后冷冻干燥, 然后提取 MCs。按照上述方法设 6 个实验组(图 3)。结果表明: 3 种溶剂对 MCs 的提取回收率存在显著性差异($P < 0.05$), 实验组 1、3、5 之间均存在显著性差异。Fastner, *et al.*^[16]发现提取野外冻干蓝藻时 75%的甲醇要好于 100%甲醇; Barco, *et al.*^[17]在提取 PCC 7820 时发现 0.1%TFA 溶于 80%甲醇溶液提取效率最高; 闫海等^[18]用不同比例提取滇池晒干藻粉时发现, 40%甲醇效率最高, 而本研究发现溶剂 A 提取效率最低, 溶剂 B 略好, 溶剂 C 提取回收率最高。Fastner, *et al.*^[16]同时发现 5%乙酸对于亲水性的 MC-RR 有着更高的提取效率, 甚至接近纯甲醇提取效率的 2 倍, 另外, 5%乙酸的强极性对微囊藻群体结构也有更好的破坏能力。同时, 超声波破碎在用溶剂 A 提取过程中作用明显, 能较好提高溶剂 A 和溶剂 B 对微囊藻毒素的提取效率, 但对溶剂 C 提取无明显影响, 张维昊等^[19]也发现, 在 80%甲醇提取过程中, 超声波破碎对微囊藻毒素提取效率无显著提高。这也说明, 对于野外水华样品的 MCs 提取, 溶剂 C 作为溶剂最为合适。

2.2 反复冻融方法对 MCs 提取效率的影响

由以上结果可知, 无论是对于室内纯培养物还是野外水华样品, 溶剂 C 都是最适合的提取溶剂。铜绿微囊藻 PCC 7806、FACHB 905 和太湖水华样品, 经等重分装, 一部分-20℃反复冻融 3 次, 一部分 105℃烘干重, 另一部分冷冻干燥, 称重后用溶剂 C 提取, 同时辅以超声波破碎、搅拌。结果表明, 冷冻干燥和 105℃烘干对藻细胞生物量或细胞干重的准确计算无显著影响(图 4)。对于无冷冻干燥仪的实验室, 105℃烘干恒重即可准确计算藻细胞干重, 对 MCs 提取结果计算不会造成影响。反复冻融都能显著提高三种样品 MCs 的提取效率($P < 0.05$)(图 5), Lehman^[20]也曾发现, 反复冻融能促进细胞壁的破裂, 从而提高 MCs 提取效率, 本研究发现冻融后, 溶剂 C 对 FACHB 905、PCC 7806 和太湖水华样品的提取效率分别提高 37.7%、20.8%、24.2%, 因此, 本研究认为反复冻融是毒素提取的必需方法之一。

表 1 微囊藻毒素不同提取方法
Tab. 1 List of different methods on the extraction of microcystins

实验组 Experimental group 1	实验组 Experimental group 2	实验组 Experimental group 3	实验组 Experimental group 4	实验组 Experimental group 5	实验组 Experimental group 6
溶剂 A	溶剂 B	溶剂 C	溶剂 A+超声波破碎	溶剂 B+超声波破碎	溶剂 C+超声波破碎

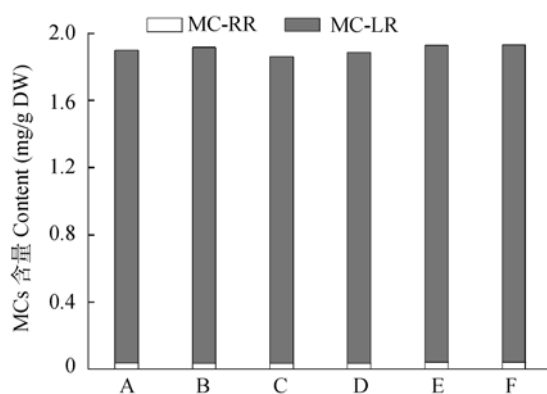


图 1 不同提取方法对铜绿微囊藻(*Microcystis aeruginosa*) FACHB 905(经三次冻融)中微囊藻毒素提取效率的影响

Fig. 1 The effects of different methods on the extraction of microcystins in *Microcystis aeruginosa* FACHB 905 (pre-treated by freezing-thawing for three times)

A. 超纯水; B. 超纯水+超声波破碎; C. 0.1%三氟乙酸溶于 80% 甲醇; D. 0.1%三氟乙酸溶于 80%甲醇+超声波破碎; E. 5%乙酸接着 80%甲醇; F. 5%乙酸接着 80%甲醇+超声波破碎

A. pure water; B. pure water followed by ultrasonication; C. 0.1% trifluoroacetic acid in 80% methanol; D. 0.1% trifluoroacetic acid in 80% methanol followed by ultrasonication; E. 5% acetic acid followed by the extraction with 80% methanol; F. 5% acetic acid followed by the extraction with 80% methanol and ultrasonication

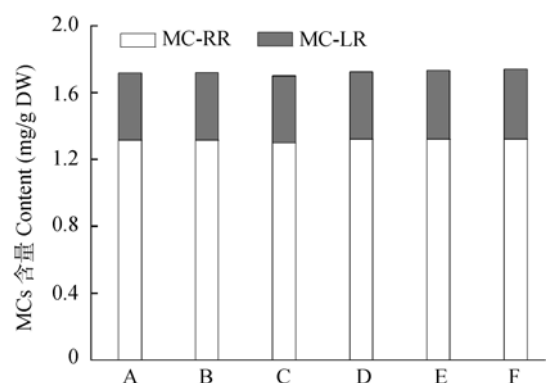


图 2 不同提取方法对铜绿微囊藻(*Microcystis aeruginosa*)PCC 7806 (经三次冻融)中微囊藻毒素提取效率的影响

Fig. 2 The effects of different extraction methods on the extraction of microcystins in *Microcystis aeruginosa* PCC 7806 (pre-treated by freezing-thawing for three times)

A. 超纯水; B. 超纯水+超声波破碎; C. 0.1%三氟乙酸溶于 80% 甲醇; D. 0.1%三氟乙酸溶于 80%甲醇+超声波破碎; E. 5%乙酸接着 80%甲醇; F. 5%乙酸接着 80%甲醇+超声波破碎

A. pure water; B. pure water followed by ultrasonication; C. 0.1% trifluoroacetic acid in 80% methanol; D. 0.1% trifluoroacetic acid in 80% methanol followed by ultrasonication; E. 5% acetic acid followed by the extraction with 80% methanol; F. 5% acetic acid followed by the extraction with 80% methanol and ultrasonication

2.3 提取次数对 MCs 提取的影响

三种样品经反复冻融干燥后,用 5%乙酸提取一次,再用 80%甲醇溶液提取两次,同时辅以超声波破碎、搅拌等提取方法。结果表明,对于室内纯培养物 FACHB 905

和 PCC 7806,两次提取即可达到完全提取效果,二者第一次提取效率分别为 93.8%、97.7%,第二次提取效率分别为 6.2%、2.3%,第三次提取二者均未检测到 MCs 的存在。而对于太湖水华样品,三次提取效率分别为 86.7%、12.4%、0.9%,说明无论是何种样品,三次提取即可达到完全(图 6)。Barco, *et al.* [17]发现,用酸化后的甲醇提取野外水华样品中的 MCs,第三次提取效率仅为 5%—9%,与本研究结果类似。

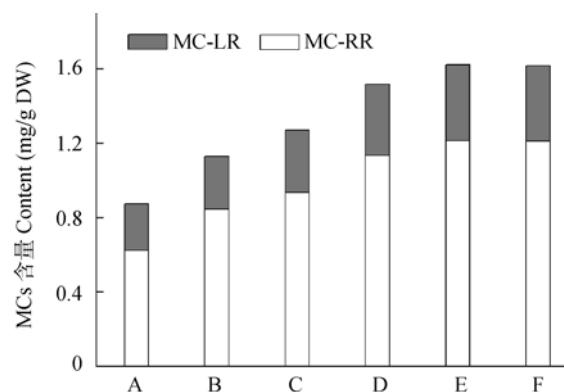


图 3 不同提取方法对太湖水华蓝藻(经三次冻融)中微囊藻毒素提取效率的影响

Fig. 3 The effects of different methods on the extraction of microcystins in bloom cyanobacterial bloom from Lake Taihu (pre-treated by freezing-thawing for three times)

A. 超纯水; B. 超纯水+超声波破碎; C. 0.1%三氟乙酸溶于 80% 甲醇; D. 0.1%三氟乙酸溶于 80%甲醇+超声波破碎; E. 5%乙酸接着 80%甲醇; F. 5%乙酸接着 80%甲醇+超声波破碎

A. pure water; B. pure water followed by ultrasonication; C. 0.1% trifluoroacetic acid in 80% methanol; D. 0.1% trifluoroacetic acid in 80% methanol followed by ultrasonication; E. 5% acetic acid followed by the extraction with 80% methanol; F. 5% acetic acid followed by the extraction with 80% methanol and ultrasonication

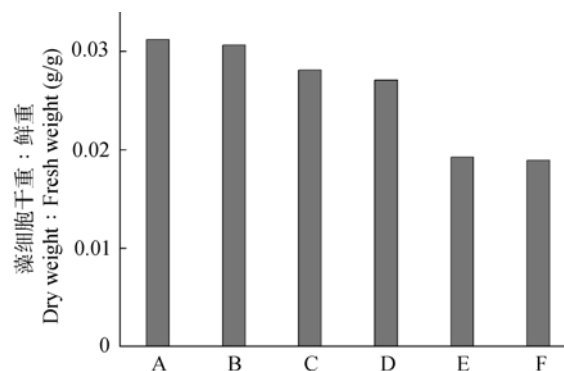


图 4 冷冻干燥和 105°C 烘干对分析结果的影响

Fig. 4 The effects of freeze drying and dry by heat under 105°C on the calculation of toxin contents in algal samples

A. 铜绿微囊藻 FACHB 905 105°C 烘干; B. 冷冻干燥; C. 铜绿微囊藻 PCC7806 105°C 烘干; D. 冷冻干燥; E. 太湖水华蓝藻 105°C 烘干; F. 冷冻干燥

Heating under 105°C: A. FACHB 905; C. PCC7806; E. bloom cyanobacterial from Lake Taihu; Freeze drying: B. FACHB 905; D. PCC7806; F. bloom cyanobacterial from Lake Taihu

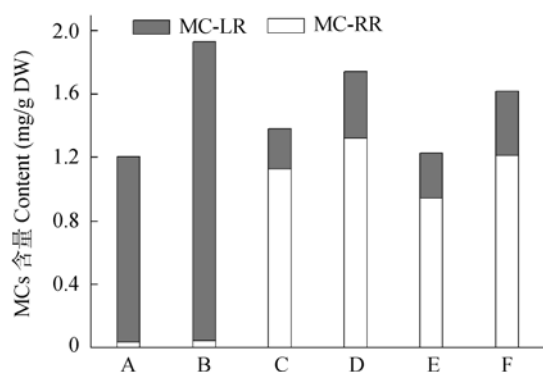


图5 反复冻融对铜绿微囊藻(*Microcystis aeruginosa*)PCC 7806、FACHB 905 和太湖水华蓝藻中微囊藻毒素提取效率的影响

Fig. 5 The effects of repeated freezing and thawing on the extraction of microcystins from *Microcystis aeruginosa* PCC 7806, FACHB 905 and filed blooms from Lake Taihu

未经冻融: A. FACHB 905; C. PCC7806; E. 太湖水华蓝藻; 冻融: B. FACHB 905; D. PCC7806; F. 太湖水华蓝藻

Without freezing and thawing: A. FACHB 905; C. PCC7806; E. bloom cyanobacterial from Lake Taihu; With repeated freezing and thawing: B. FACHB 905; D. PCC7806; F. bloom cyanobacterial from Lake Taihu

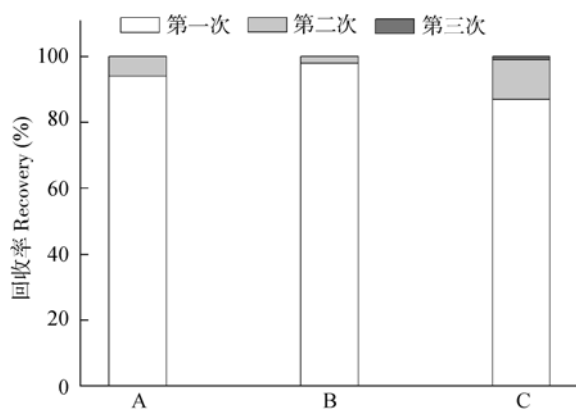


图6 提取次数对铜绿微囊藻(*Microcystis aeruginosa*)中微囊藻毒素提取效率的影响

Fig. 6 The effects of extraction times on the recovery of microcystins from *Microcystis aeruginosa*

A. FACHB 905; B. PCC 7806; C. 太湖水华蓝藻

A. FACHB 905; B. PCC 7806; C. bloom samples from Lake Taihu

3 结论

(1) 无论是室内纯培养物还是野外水华蓝藻样品, 均需经过反复冻融三次以上才能达到 MCs 提取的最高效率。

(2) 室内单细胞纯培养物经反复冻融后, 用超纯水同时辅以超声波破碎、搅拌等方法提取 MCs 即可达到最高效率, 在一定程度上节约有机溶剂并避免了有机溶剂对实验人员的身体损伤。而对于野外水华样品, 需用 5% 乙酸接着两次 80% 甲醇才能达到完全提取。

(3) 冷冻干燥和 105℃ 烘干对藻细胞准确计算干重

无显著影响。对于无冷冻干燥仪的实验室, 105℃ 烘干即可准确计算藻细胞干重, 对毒素提取结果计算不会造成影响。

(4) 无论是室内纯培养物还是野外水华样品, 三次提取可达最大效率。

参考文献:

- [1] Brittain S, Mohamed Z A, Wang J, et al. Isolation and characterization of microcystins from a River Nile strain of *Oscillatoria tenuis* Agradh ex Comont [J]. *Toxicon*, 2000, **37**: 1759—1771
- [2] Falconer I R. Toxic cyanobacterial bloom problems in Australian waters: Risks and impacts on human health [J]. *Phycologia*, 2001, **40**(3): 228—233
- [3] Zhang W H, Xu X Q, Qiu C Q. Advance in study on microcystins in aquatic environment [J]. *Research of Environmental Sciences*, 2001, **14**(2): 57—61 [张维昊, 徐小清, 丘昌强. 水环境中微囊藻毒素研究进展. 环境科学研究, 2001, **14**(2): 57—61]
- [4] Yan H, Pan G, Zhang M M. Advances in the study of microcystin toxin [J]. *Acta Ecological Sinica*, 2002, **22**(11): 1968—1975 [闫海, 潘纲, 张明明. 微囊藻毒素的研究进展. 生态学报, 2002, **22**(11): 1968—1975]
- [5] Li X Y, Zhang Z J, Li L. Effect of microcystin on the growth and reproduction of *Daphnia magna* [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2009, **33**(6): 1198—1201 [李效宇, 张志娟, 李磊. 有毒和无毒微囊藻对大型溞生长和繁殖的影响. 水生生物学报, 2009, **33**(6): 1198—1201]
- [6] Wu X Q, Gong Y, Wang Z, et al. Residue levels and distribution features of microcystins in fish samples from Lake Dianchi [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2010, **34**(2): 388—393 [吴幸强, 龚艳, 王智, 等. 微囊藻毒素在滇池鱼体内的积累水平及分布特征. 水生生物学报, 2010, **34**(2): 388—393]
- [7] Wang Y, Yin L H, Pu Y P, et al. A fluorescent protein phosphatase inhibition assay for the detection of microcystins in water [J]. *Modern Preventive Medicine*, 2006, **33**(5): 681—683 [王亚, 尹立红, 浦跃朴, 等. 应用荧光蛋白磷酸酶抑制法检测水中微囊藻毒素. 现代预防医学, 2006, **33**(5): 681—683]
- [8] Ikehara T, Imamura S, Oshiro N, et al. A protein phosphatase 2A (PP2A) inhibition assay using a recombinant enzyme for rapid detection of microcystins [J]. *Toxicon*, 2008, **51**(8): 1368—1373
- [9] Mathys W, Surholt B. Analysis of microcystins in freshwater samples using high performance liquid chromatography and an enzyme-linked immunosorbent assay [J]. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 2004, **207**: 601—605
- [10] Sheng J W, He M, Shi H C, et al. A comprehensive immunoassay for the detection of microcystins in waters based on

- polyclonal antibodies [J]. *Analytica Chimica Acta*, 2006, **572**(2): 309—315
- [11] Gago-Martínez A, Piñeiro N, Aguete E C, *et al.* Further improvements in the application of high-performance liquid chromatography, capillary electrophoresis and capillary electrochromatography to the analysis of algal toxins in the aquatic environment [J]. *Journal of Chromatography A*, 2003, **992**: 159—168
- [12] Jurczak T, Tarczyńska M, Karlsson K, *et al.* Characterization and diversity of cyanobacterial hepatotoxins (microcystins) in blooms from Polish freshwaters identified by liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry [J]. *Chromatographia*, 2004, **59**: 571—578
- [13] McElhiney J, Lawton L A. Detection of the cyanobacterial hepatotoxins microcystins [J]. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2005, **203**: 219—230
- [14] Meriluoto J A O, Eriksson J E. Rapid analysis of peptide toxins in cyanobacteria [J]. *Journal of Chromatography A*, 1988, **438**: 93—99
- [15] Lawton L A, Edwards C, Codd G A. Extraction and high-performance liquid chromatographic method for the determination of microcystins in raw and treated waters [J]. *Analyst*, 1994, **119**: 1525—1530
- [16] Fastner J, Flieger I, Neumann U. Optimised extraction of microcystins from field samples - a comparison of different solvents and procedures [J]. *Water Resources*, 1998, **32**(10): 3177—3181
- [17] Barco M, Lawton L A, Rivera J, *et al.* Optimization of intracellular microcystin extraction for their subsequent analysis by high-performance liquid chromatography [J]. *Journal of Chromatography A*, 2005, **1074**: 23—30
- [18] Yan H, Pan G, Zhang M M, *et al.* Study on the extraction and purification of microcystins [J]. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2004, **24**(2): 355—359 [闫海, 潘纲, 张明明, 等. 微囊藻毒素的提取和提纯研究. 环境科学学报, 2004, **24**(2): 355—359]
- [19] Zhang W H, Xiao B D, Fang T, *et al.* Extraction and purification of microcystins from natural cyanobacterial bloom [J]. *Environmental Pollution & Control*, 2003, **25**: 265—267 [张维昊, 肖邦定, 方涛, 等. 天然水华蓝藻中微囊藻毒素的提取和净化研究. 环境污染与防治, 2003, **25**: 265—267]
- [20] Lehman E M. Seasonal occurrence and toxicity of Microcystis in impoundments of the Huron River, Michigan, USA [J]. *Water Resources*, 2007, **41**: 795—802