科学通报 2008 年 第 53 卷 第 4 期: 407 ~ 412
论 文
《中国科学》杂志社
SCIENCE IN CHINA PRESS

微囊藻毒素产生过程中氮素作用的同位素示踪研究

史红星[①②], 曲久辉[①*], 刘会娟[①], 牟瑛琳[②], 肖凯涛[②], 王凌[②]

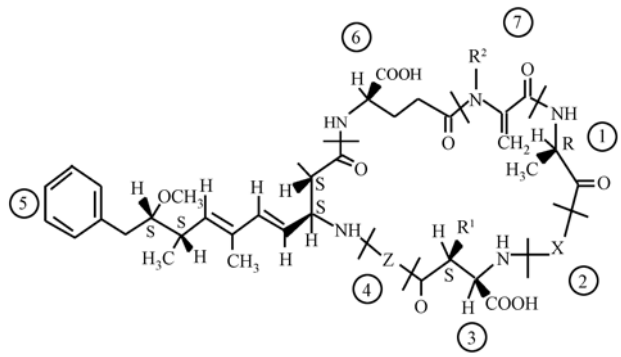
① 中国科学院生态环境研究中心, 环境水质学国家重点实验室, 北京 100085;
② 防化研究院, 北京 102205
* 联系人, E-mail: jhqu@rcees.ac.cn

2007-06-28 收稿, 2007-10-16 接受
国家自然科学基金(批准号: 20677078)资助项目

摘要 水华毒藻和藻毒素污染是目前水体富营养化治理与控制中的重要水质问题. 为了探索氮素对藻毒素产生过程的影响, 利用 ^{15}N 同位素示踪技术研究了无机氮在微囊藻毒素(Microcystins, MCs)生物合成过程中的作用. 纯种铜绿微囊藻室内同位素示踪培养实验和 MCs 分析结果发现, $^{15}NO_3^-$标记组可有 1~3 个 ^{15}N 原子引入 LR 型微囊藻毒素分子(Microcystin-LR, MCLR), 其中引入 2 个 ^{15}N 的概率最大; $^{15}NH_4^+$标记组可有 2~4 个 ^{15}N 原子引入 MCLR 分子, 引入 3 个 ^{15}N 的概率最大; 且来自 NH_4^+态氮的 ^{15}N 比来自 NO_3^-态氮的 ^{15}N 在 MCLR 分子中有更多的结合位点. 这说明, NH_4^+态氮和 NO_3^-态氮对 MCLR 的生物合成都具有重要的、直接的贡献, 但 NH_4^+态氮的存在更有利于微囊藻产生 MCLR. 因此, 在富营养化水体藻毒素污染预防和富营养化控制中, 不能单独强调磷素的突出作用, 氮素控制特别是氨氮控制应引起足够重视.

关键词
富营养化
水华
无机氮
微囊藻毒素
同位素示踪

微囊藻毒素(Microcystins, MCs)是由微囊藻等多种淡水蓝藻产生的一类最常见的肝毒素, 有几十种异构体, 它们通过抑制蛋白质磷酸酶的活性产生强烈的促肝癌作用. MCs强烈的毒性、较高的化学稳定性和水溶性对人和其他生物的健康安全产生严重威胁[1,2]. MCs化学结构为 7 肽单环缩氨酸, 分子量介于 900~1100, 其一般结构如图 1 所示, 结构为cyclo-(D-alanine1-X_2-D-MeAsp$_3$-Z_4-Adda$_5$-D-glutamate$_6$-Mdha$_7$). ⑤位为Adda基团, 是(2S, 3S, 8S, 9S)-3-氨基-9-甲氧基-2,6,8-三甲基-10-苯基-4,6-二烯酸的残基, 为MCs所独有, 在MCs表现致毒活性方面具有至关重要的作用, 且Adda基团在 238 nm有特征吸收峰. ②④位的X和Z是两个可变的左旋氨基酸, 它们通常是MCs异构体的主要命名依据[3], 如Microcystin-LR(MCLR)中, X= Leu(L), Z= Arg (R), Microcystin-RR(MCRR)中, X和Z 均为Arg (R). 其他位置氨基酸的变化主要包括Mdha和/或MeAsp基团不同程度的甲基化, 及Adda基团的异构化[4]. MCs分子中Adda$_5$-D-glutamate$_6$ 部分主要参与MCs与蛋白质磷酸酶的结合, 因而对其毒性具有重要作用[5,6]. 一般来说, Adda$_5$-D-glutamate$_6$ 部分的任何修饰, 比如Adda基团的异构化或Glu基团的酰化都将导致MCs毒性的完全丧失[7~9], 而MCs的缩氨酸结构被破坏后其毒性将下降至 1%以下[10,11]. 水华中最常见的MCs包括MCLR和MCRR等.



Microcystin-LR:X= Leu(L), Z= Arg (R)
Microcystin-RR:X= Arg (R), Z= Arg (R)

图 1 MCs 一般结构

MCLR毒性最大，关于它的研究也最多，其分子式为$C_{49}H_{74}N_{10}O_{12}$，分子大小为 1.2~ 2.6 nm[12]. 目前对MCs的研究已经成为水环境安全领域的研究热点[13~17].

氮磷等营养元素导致的水体富营养化已成为世界范围内的重要水质问题. 欧洲、非洲、北美洲和南美洲分别有53%, 28%, 48%和41%的湖泊存在不同程度的富营养化现象，亚太地区 54%的湖泊处于富营养化状态 [14]. 水体富营养化导致的直接后果之一就是水华和/或赤潮爆发，而伴随水华与赤潮产生的更严重的水体污染物就是这些藻类产生的毒素，即所谓的“藻毒素”.

氮磷对藻类生长的促进作用已成共识，但氮磷与藻毒素产生的直接关系仍有待深入研究. 虽然目前有一些研究，但结论很不一致，有人认为磷作用明显，氮碳影响不大 [18]；有人则认为氮在产毒中具有重要作用 [19]. 比如 2004 年美国的一项研究表明MCs的产生与总氮(TN)强烈正相关，而加拿大和德国的一些研究表明MCs和TN几乎没有关系 [20]. 野外和实验室研究都已表明，蓝藻、MCs和环境因子之间的关系很复杂. 不仅每个品系产毒能力差别很大，而且对环境因子变化的响应也不相同，因而针对各个水体的具体情况很难有一个合适的经验值 [21].

氮元素不仅可以促进藻细胞生长而且是 MCs 分子的主要构成元素，磷元素促进藻细胞生长却没有进入 MCs 分子. 因此，氮元素和 MCs 之间应该具有直接的、必然的联系. 但这种必然联系是什么，具体是哪个形态的氮起更重要的作用却并不清楚. 加之，国内外对氮素影响的研究主要集中在总氮等指标上. 因此，探讨研究氮源，特别是无机氮形态对藻毒素生物合成的影响具有重要意义.

本文报道利用 ^{15}N 同位素示踪技术，研究无机氮形态对铜绿微囊藻合成 MCs 的影响，为探索富营养化水体藻毒素的产生机理和控制水体藻毒素的污染提供科学依据.

1 实验

(ⅰ) 实验方法. 利用经高压蒸汽灭菌的 MA 培养基平行接种纯种铜绿微囊藻若干瓶，培养 2 天后，根据微囊藻的生长情况剔除个别生长异常的培养瓶，选取 3 组平行样进行 ^{15}N 添加培养实验，标记为A,B,C 3 个组，每组包含 9 个平行的培养瓶. A 组不添加 ^{15}N; B 组只添加 ^{15}N 标记的 $Na^{15}NO_3$; C 组只添加 ^{15}N 标记的 $^{15}NH_4Cl$. MA 培养基水溶液每升包含 $NaNO_3$ 50 mg, KNO_3 100 mg, $Ca(NO_3)_2\cdot 4H_2O$ 50 mg, Na_2SO_4 40 mg, $MgCl_2\cdot 6H_2O$ 50 mg, Na_2EDTA 5 mg, $FeCl_3\cdot 6H_2O$ 0.5 mg, $MnCl_2\cdot 4H_2O$ 5 mg, $ZnCl_2$ 0.5 mg, $CoCl_2\cdot 6H_2O$ 5 mg, $Na_2MoO_4\cdot 2H_2O$ 0.8 mg, H_3BO_3 20 mg, Bicine (*N*,*N*-二羟乙基甘氨酸) 500 mg, $C_3H_7O_6PNa_2$(β-甘油磷酸钠)100 mg. 控制 ^{15}N 添加量，使 B 组和 C 组中两种形态的 ^{15}N 具有相同丰度. 隔日测定藻细胞生长曲线，静态生长期同时破碎藻细胞并提取藻毒素，利用 HPLC 和 LC-MS/MS 分别对比分析产生 MCs 的差异.

(ⅱ) 微囊藻培养. MA 培养基每瓶 400 mL，接种 20 mL 铜绿微囊藻(藻种购于中国科学院武汉淡水藻种库)，置于人工气候箱中 12 h/12 h 昼夜交替光照培养. 白天温度 25℃，连续光照，箱内沿对角线方向对开两支照明日光灯，对角线中心平均照度约 950~1010 LX; 夜间温度 18℃，无光照. 三角瓶每日手摇，随机放置以减少光照影响.

(ⅲ) ^{15}N 标记. 为保证 ^{15}N 丰度的较高精度，实验采用 Aldrich 化学品公司生产的两种高丰度 ^{15}N 标准品 $Na^{15}NO_3$ 和 $^{15}NH_4Cl$ 作为标记物，二者 ^{15}N 丰度均不低于 98%. A 组为无标记对照组, B 组为 $^{15}NO_3^-$标记组，C 组为 $^{15}NH_4^+$标记组，各培养瓶在实验过程中严格操作，以提高样本组内的平行性和组间的可比性.

(ⅳ) MCs提取及 ^{15}N分析. 于 8000 r/min冷冻离心分离静止生长期微囊藻培养液，获得藻细胞浓缩液，采用冻融法和超声细胞粉碎法破碎浓缩液中的藻细胞以获得粗提MCs，粗提MCs经纯化并定容后即得到待测MCs样品. 样品中MCs的分离鉴定采用HPLC方法 [22]，结果表明试验微囊藻只产生MCLR[16]. MCLR中 ^{15}N分析采用HPLC-MS-MS方法 [16]，分析条件如下: Agilent 1100 HPLC, Agilent C_{18} 5μ 2.1 mm × 150 mm色谱柱，流动相为 30%乙腈+70%水，其中水中含有 0.5%乙酸，流速为 300 μL/min. 自动进样器进样量设为 30.00 μL. 质谱仪为QTRAP LC-MS/ MS (Applied Biosystems), ESI离子源，主要工况参数如下 CUR: 20.00, GS1: 35.00, GS2: 20.00, ihe: ON, IS: 5500.00, TEM: 350.00, CAD: High, DP: 160.00, EP: 10.00, CEP: 33.47, CE: 75.00, C2B: −300.00.

2 结果与讨论

通过一级质谱(MS^1)考察 ^{15}N 标记 MCLR 相对于无标记 MCLR 的分子量变化，通过二级质谱(MS^2)考察 ^{15}N 在 MCLR 分子结构中的位置，以探索 ^{15}N 不同形态在 MCLR 生物合成中的作用.

2.1 无标记组产生 MCLR 的分子特征

无标记组(A组)产生MCLR的质谱分析结果如图 2 所示. 图 2(a)MS^1 显示无标记组MCLR的精确分子量(M_W)为 994，对应的准分子离子为m/z = 995.4[23]，并同时存在两个m/z分别为 996.5 和 997.4 的同位素峰，分子量分别为 995 和 996，两同位素峰所占基准分子量的比例分别为 57%和 23%. 由于碳元素稳定同位素有 ^{12}C和 ^{13}C两种形式，分别占总额含量的 98.893%和 1.107% (共 100%). 每种有机物都是由不同同位素组成的混合分子，碳原子在有机化合物分子中都按以上两种同位素比例自然存在. 对某一有机化合物$C_WH_XN_YO_Z$而言(W, X, Y, Z分别表示C, H, N, O原子个数)，由重同位素的天然存在引起的M^{+1}和M^{+2}峰的相对强度可按下式计算[24,25]:

$$(M^{+1})峰(\%) = 1.1W + 0.015X + 0.037Y + 0.09Z$$

$$(M^{+2})峰(\%) = (1.1W)^2\times(0.2Z)/200$$

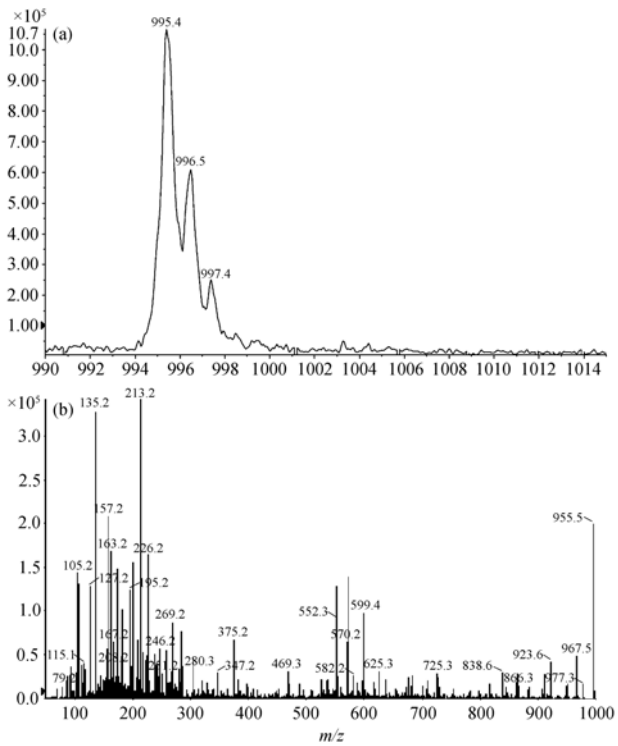


图 2 无标记组产生 MCLR 的 MS^1 和 MS^2

(a) MS^1, (b) MS^2 (M_W = 994)

根据计算结果确定，m/z 分别为 996.5 和 997.4 的同位素峰主要是由 ^{13}C 天然同位素引起的，而 ^{15}N 处于自然丰度.

图 2(b)MS^2 显示，MCLR (M_W = 994)可裂解产生几种主要碎片，m/z 分别为 135, 213, 552 和 570，其中 m/z = 135 碎片为 MCLR 最为特征的一个碎片，即 Adda 基团中的苯甲氧基；m/z = 213 的碎片为 Glu + Mdha + H；m/z = 552 为 M-Adda-Glu；m/z = 570 为 M-Adda-Glu + H_2O.

2.2 $^{15}NO_3^-$标记组产生 MCLR 的分子特征

图 3 为 $^{15}NO_3^-$标记组 MCLR 的一级质谱和几个主要分子离子的二级质谱结果. 与图 2 无标记组相比，图 3 $^{15}NO_3^-$标记组 MCLR 的质谱变化较大.

图 3(a)显示，由于 ^{15}N 原子的引入，MCLR 基准分子量发生了偏移，精确分子量增加为 996，并形成了以 m/z = 997 为中心的类似正态分布的一个分子量分布.

人工添加的重同位素引起分子量的变化需要单独计算. 在 MCLR 分子中，如果有 1 个 ^{15}N 原子引入，分子量就由 994 增加为 995，如果有 2 个 ^{15}N 原子引入，分子量就增加为 996，如此类推. 因此，当 MCLR 分子中有 1 个 ^{15}N 原子引入时，用 MS 检测时就会出现以质荷比 996 为中心的同位素族峰，强度与分子中各元素的原子数目及其重同位素的丰度密切相关. 因此，图 3(a)表明，$^{15}NO_3^-$标记组 MCLR 分子中可引入 1~3 个 ^{15}N 原子，而引入 2 个 ^{15}N 原子的概率最大.

图 3(b)为准分子离子峰 m/z = 997 的二级质谱，结果显示 MCLR 分子中引入来自于 $^{15}NO_3^-$态的 2 个 ^{15}N 原子时，M-Adda-Glu+H_2O 基团的质荷比 m/z 由 570 增加为 572，说明 ^{15}N 原子的结合位置在 M-Adda-Glu 基团，而 Glu + Mdha + H 基团 m/z 仍然保持 213 没有变化，说明引入的 ^{15}N 原子没有结合在 Glu + Mdha 基团，因此，来自于 $^{15}NO_3^-$态的 2 个 ^{15}N 原子结合在 Ala, Leu, Asp 和 Arg 4 个氨基酸中.

图 3(c)和(d)为准分子离子峰 m/z = 996 和 m/z = 998 的二级质谱，结果也表明，当 MCLR 分子引入 1 个或 3 个 ^{15}N 原子时，Ala, Leu, Asp 和 Arg 4 个氨基酸仍然是其主要的结合部位.

2.3 $^{15}NH_4^+$标记组产生 MCLR 的分子特征

图 4(a)~(d)为 $^{15}NH_4^+$标记组 MCLR 的一级质谱和几个主要分子离子的二级质谱结果. 图 4(a)和无标记组及 $^{15}NO_3^-$标记组 MCLR 质谱相比，$^{15}NH_4^+$标记组

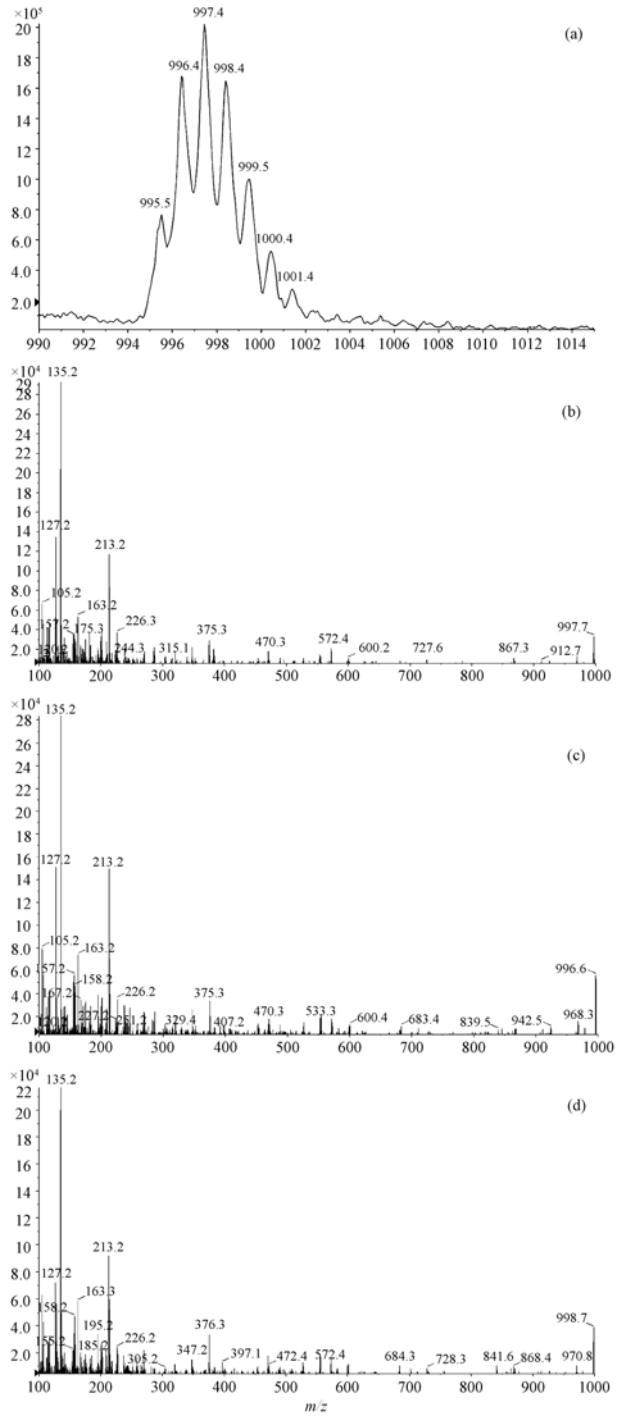


图 3 $^{15}NO_3^-$标记组 MCLR 的 MS^1 和 MS^2

(a) MS^1, (b) MS^2 (M_W = 996), (c) MS^2 (M_W = 995), (d) MS^2 (M_W = 997)

MCLR 的质谱发生的变化最大. 由于 $^{15}NH_4^+$形态 ^{15}N 原子的引入, MCLR 的基准分子量发生了较大偏移, 精确分子量增加 3 个单位, 变为 997, 并形成了以 997 分子量为中心的类似正态分布的一个分子量分布.

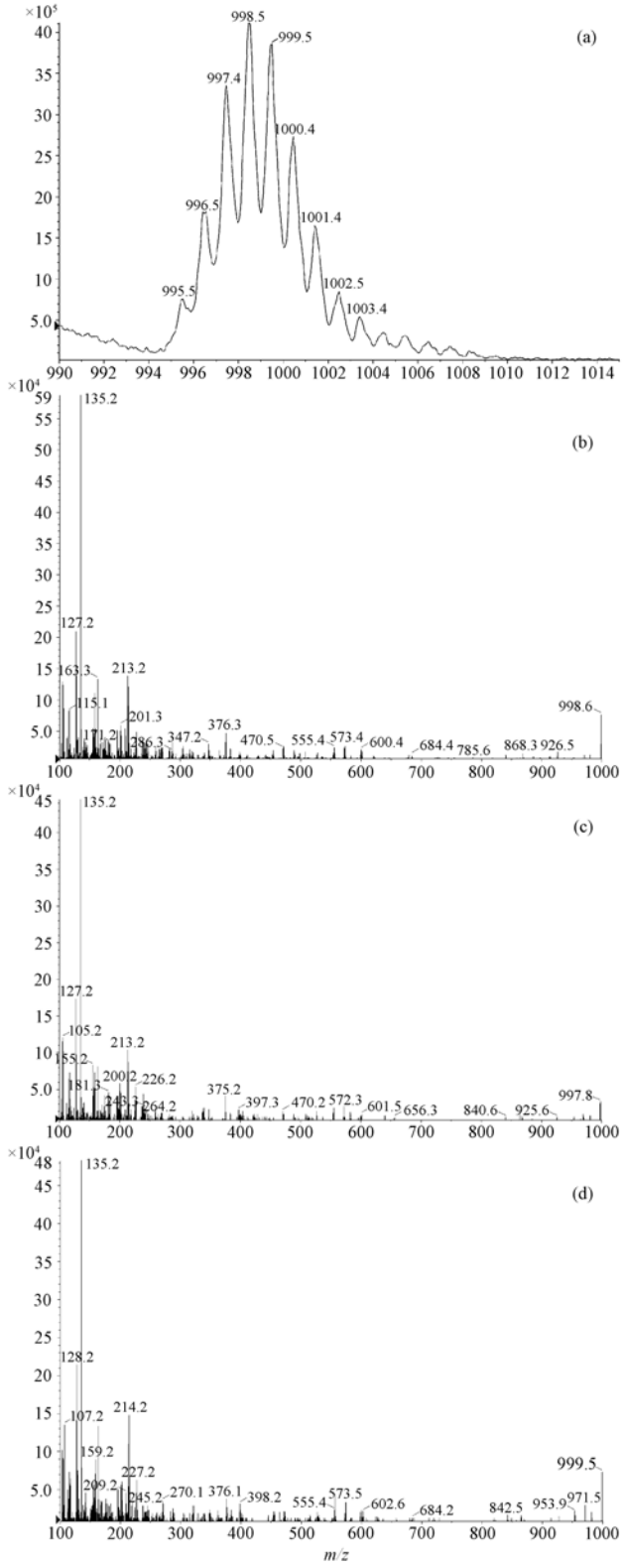


图 4 $^{15}NH_4^+$标记组 MCLR 的 MS^1 和 MS^2

(a) MS^1, (b) MS^2 (M_W = 997), (c) MS^2 (M_W = 996), (d) MS^2 (M_W = 998)

$^{15}NH_4^+$标记组 MCLR 分子中的 10 个 N 原子中有 2~4 个为 ^{15}N 原子，而以引入 3 个 ^{15}N 原子的概率最高.

图 4(b)中 3 个 ^{15}N 原子的引入使 MCLR 分子量增加为 997，对应 m/z = 998.6. m/z 分别为 135, 213 的几个基团没有发生变化，而 m/z 分别为 552 和 570 的基团质量数分别增加 3 个单位，变为 555 和 573. 这说明，来自 $^{15}NH_4^+$形态的 3 个 ^{15}N 被合成到 MCLR 分子时，其结合位置与来自 $^{15}NO_3^-$形态的 2 个 ^{15}N 原子在 MCLR 分子中的结合位置基本一致，都在 Ala, Leu, Asp 和 Arg 4 个氨基酸之间. 图 4(c)中 2 个 ^{15}N 原子被引入 MCLR 分子时，^{15}N 的结合位置与图 4(b)类似.

图 4(d)中 4 个 ^{15}N 原子被引入 MCLR 分子时，^{15}N 的结合位置出现了明显变化. MCLR 分子量增加到了 998，对应 m/z = 999.5. m/z 分别为 552 和 570 的基团质量数分别增加 3 个单位，表明有 3 个 ^{15}N 原子引入；但 m/z 为 213.2 离子的 m/z 增加为 214.2，表明另外一个 ^{15}N 原子引入 Glu + Mdha 基团.

图 4(b)~(d)表明，虽然来自硝态氮和氨态氮的两种氮源在 MCLR 分子中结合的位置存在一些相同点，但也存在一定差异，氨态氮在毒素分子中的结合位点相对较多，来自于 $^{15}NO_3^-$态的 ^{15}N 原子可结合在 Ala, Leu, Asp 和 Arg 4 个氨基酸中，而来自于 $^{15}NH_4^+$态的 ^{15}N 原子可结合在 Ala, Leu, Asp, Arg, Glu 和 Mdha 6 个氨基酸中.

2.4 三实验组产生 MCLR 分子量分布对比

图 5 对比了 MCLR 分子量的理论分布和不同实验组微囊藻产生的 MCLR 的分子量分布. 由图可见，未标记组(A 组)MCLR 的实际分子量分布与理论分布基本一致，^{15}N 标记组(B 和 C 组)培养条件下产生的 MCLR 的分子量分布中心发生了一定的偏移，且 C 组偏移较大，说明培养基中的 ^{15}N 被微囊藻藻细胞不同程度地合成到 MCLR 分子中，且铵态氮更有利于被合成 MCLR. 扣除 ^{13}C 同位素对分子量分布的影响后，A 组 MCLR 的基准分子量为 994；而 B 组 MCLR 基准分子量增加为 996，分子量表现为从 995~997 的一个分布；C 组 MCLR 基准分子量增加为 997，分子量表现为从 996～998 的一个分布.

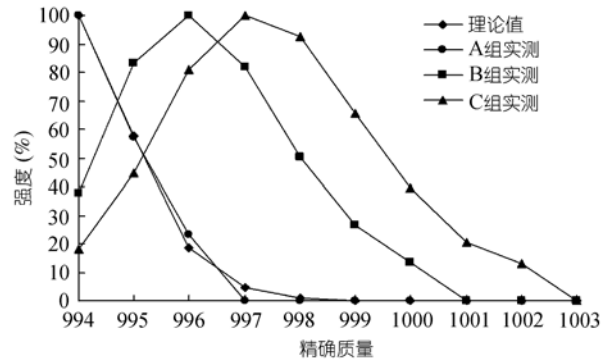


图 5 MCLR 分子量的分布变化

3 结论

(1) 同位素示踪技术是研究生源要素与藻细胞代谢产物之间的关系以及代谢产物分子属性变化的良好方法.

(2) 铜绿微囊藻产生 MCs 与无机氮源的形态具有直接的内在联系. 铵态氮添加组有 2~4 个 ^{15}N 合成进入 MCLR 分子，分子中包含 3 个 ^{15}N 的概率最大，硝酸盐添加组有 1~3 个 ^{15}N 合成进入 MCLR 分子，分子中包含 2 个 ^{15}N 的概率最大.

(3) 铵态氮在 MCs 分子结构中有较多的结合位点. 来自于 $^{15}NO_3^-$态的 ^{15}N 原子可结合在 Ala, Leu, Asp 和 Arg 4 个氨基酸中，来自于 $^{15}NH_4^+$ 态的 ^{15}N 原子可结合在 Ala, Leu, Asp, Arg, Glu 和 Mdha 6 个氨基酸中.

参考文献

1 Jochimsen E M, Carmichael W W, An J, et al. Liver failure and death after exposure to microcystins at a hemodialysis center in Brazil. N Engl J Med, 1998, 338: 873—878[doi]

2 Carmichael W W, Azevedo S M F O, An J, et al. Human fatalities from cyanobacteria chemical and biological evidence for cyanotoxins. Environ Health Perspect, 2001, 109(7): 663—668[doi]

3 Carmichael WW, Beasley V R, Bunner D L, et al. Naming of cyclic heptapeptide toxins of cyanobacteria (blue-green algae). Toxicon, 1988, 26: 971—973[doi]

4 Rinehart K L, Namikoshi M, Choi B W. Structure and biosynthesis of toxins from blue-green algae (cyanobacteria). J Appl Phycol, 1994, 6: 159—176[doi]

5 Barford D, Keller J. Co-crystallization of the catalytic subunit of the serine/threonine specific protein phosphatase 1 from human in complex with microcystin-LR. J Molecular Biol, 1994, 235: 763—766[doi]

6 Goldberg J, Huang H B, Kwon Y G, et al. Three-dimensional structure of the catalytic subunit of protein serine/threonine phosphatase-1. Nature, 1995, 376: 745—753[doi]

7 Rinehart K L, Namikoshi M, Choi B W. Structure and biosynthesis of toxins from blue-green algae (cyanobacteria). J Appl Phycol, 1994, 6: 159—176[doi]

8 Harada K I, Ogawa K, Matsuura K, et al. Structural determination of geometrical isomers of microcystins-LR and -RR from cyanobacteria by two-dimensional NMR spectroscopic techniques. Chem Res Toxicol, 1990, 3: 473—481[doi]

9 Harada K I, Matsuura K, Suzuki M, et al. Isolation and characterization of the minor components associated with microcystins-LR and -RR in the cyanobacterium (blue-green algae). Toxicon, 1990, 28: 55—64[doi]

10 Choi B W, Namikoshi M, Sun F, et al. Isolation of linear peptides related to the hepatotoxins nodularin and microcystins. Tetrahedron Letters, 1993, 34: 7881—7884[doi]

11 Bourne D, Jones G J, Blakeley R L, et al. Enzymatic pathway for the bacterial degradation of the cyanobacterial cyclic peptide toxin microcystin -LR. Appl Env Microbiol, 1996, 62: 4086—4094

12 Donati C, Drikas M, Hayes R, et al. Microcystin-LR adsorption by powdered activated carbon. Water Res, 1994, 29(8): 1735—1742[doi]

13 张维昊. 滇池微囊藻毒素的环境化学行为研究. 博士学位论文. 武汉: 中国科学院武汉水生生物研究所, 2001

14 闫海. 微囊藻毒素的产生与生物降解研究. 博士学位论文. 北京: 中国科学院生态环境研究中心, 2002

15 闫海, 潘纲, 邹华, 等. 碳纳米管加载微生物高效去除微囊藻毒素研究. 科学通报, 2004, 49(13): 1244—1248

16 史红星. 官厅水库微囊藻毒素分析及电化学降解. 博士学位论文. 北京: 中国科学院生态环境研究中心, 2005

17 Harada K. Recent advances of toxic cyanobacteria research. J Health Sci, 1999, 45(3): 150—165

18 Kameyama K, Sugiura N, Isoda H, et al. Effect of nitrate and phosphate concentration on production of microcystins by Microcystis viridis NIES 102. Aquatic Ecosystem Health Management, 2002, 5(4): 443—449[doi]

19 Downing T G, Meyer C, Gehringer M M, et al. Microcystin content of Microcystis aeruginosa is modulated by nitrogen uptake rate relative to specific growth rate or carbon fixation rate. Environ Toxicol, 2005, 20(3): 257—262[doi]

20 Graham J L, Jones J R, Jones S B, et al. Environmental factors influencing microcystin distribution and concentration in the Midwestern United States. Water Res, 2004, 38(20): 4395—4404[doi]

21 Vézie C, Rapala J, Vaitomaa J, et al. Effect of nitrogen and phosphorus on growth of toxic and nontoxic Microcystis strains and on intracellular microcystin concentrations. Microb Ecol, 2002, 43(4): 443—454[doi]

22 史红星, 曲久辉, 王爱民, 等. 官厅水库蓝绿藻及藻毒素初步研究. 高等学校化学学报, 2005, 26(9): 1653—1655

23 史红星, 曲久辉. 官厅水库微囊藻毒素的 LC-ESI/MS 研究. 环境科学, 2005, 26(6): 97—100

24 从浦珠, 李笋玉. 天然有机质谱学. 北京: 中国医药科技出版社, 2003

25 施耀曾, 孙祥祯, 蒋燕灏, 等. 有机化合物光谱和化学鉴定. 南京: 江苏科技出版社, 1988