

渤海湾水母种类鉴定及溶血活性评估的方法研究

易柯含¹, 李冬梅^{1,2}, 李 魏¹, 沈 阳¹, 王瑞芳¹,
佟蒙蒙¹, 刘志亮³

(1.浙江大学 海洋学院, 浙江 舟山 316021; 2.国家海洋环境监测中心, 辽宁 大连 116023; 3.河北科技师范学院, 河北 秦皇岛 066004)

摘 要: 本研究以 2020 年夏季采集于渤海的白色霞水母 (*Cyanea nozakii*) 和沙海蜇 (*Nemopilema nomurai*) 为实验对象, 基于水母触手和刺丝囊形态特征, 设计了刺丝囊蛋白的溶血活性 (HA/protein)、单位质量触手的溶血活性 (HA/mass) 和单位面积触手的溶血活性 (HA/area) 三个指标来评估水母溶血活性。结果表明: 白色霞水母的 HA/protein 半数效应浓度 (EC₅₀) 为 145.4 μg/mL, 而沙海蜇的 EC₅₀ 仅为 4.36 μg/mL, 在相同刺丝囊蛋白浓度 (76 μg/mL) 下沙海蜇的溶血活性 (100%) 远高于白色霞水母 (0.42%), 约为其 238 倍。同时, 沙海蜇单位质量触手刺丝囊蛋白含量 (9.33±1.16 μg/g) 略高于白色霞水母 (7.34±1.22 μg/g), 单位面积触手刺丝囊蛋白含量 (1.619±0.424 μg/cm²) 显著高于白色霞水母 (0.136±0.004 μg/cm²), 结合 HA/protein EC₅₀ 值的显著性差异, 沙海蜇的 HA/mass 和 HA/area 依然最高。因此, 沙海蜇触手具有更高溶血活性, 在海滨浴场安全管理及临床急救诊断中, 应给予更高的关注。

关键词: 白色霞水母; 沙海蜇; 线粒体 COI; 刺丝囊形态; 溶血活性

中图分类号: Q176

文献标识码: A

文章编号: 1007-6336(2025)06-0876-09

Identification and methodological study on the evaluation of hemolytic activity of jellyfish in Bohai Sea

YI Kehan¹, LI Dongmei^{1,2}, LI Wei¹, SHEN Yang¹, WANG Ruifang¹,
TONG Mengmeng¹, LIU Zhiliang³

(1.Ocean College, Zhejiang University, Zhoushan 316021, China; 2.National Marine Environmental Monitoring Center, Dalian 116023, China; 3.Hebei Normal University of Science and Technology, Qinhuangdao 066004, China)

Abstract: In this study, jellyfish *Cyanea nozakii* and *Nemopilema nomurai* were collected from the Bohai Sea in the summer of 2020. Three indicators were designed to evaluate the hemolytic activity of these two jellyfish species based on their morphological characteristics of tentacles and nematocysts, namely the hemolytic activity of nematocysts protein(HA/protein), hemolytic activity per unit mass of tentacles(HA/mass), and hemolytic activity per unit area of tentacles(HA/area). The experimental results showed that the half-maximal effective concentration(EC₅₀) of *C. nozakii* HA/protein was 145.4 μg/mL, while it was 4.36 μg/mL for *N. nomurai*, the hemolytic activity of *N. nomurai*(100%) was about 238 times higher than that of *C. nozakii*(0.42%) under the same nematocyst protein concentration(76 μg/mL). Meanwhile, the nematocyst proteins of *N. nomurai* per unit mass of tentacles(9.33±1.16 μg/g) was slightly higher than that of *C. nozakii*(7.34±1.22 μg/g), and the content

收稿日期: 2024-12-06, 修订日期: 2025-01-22

基金项目: 国家重点研发计划项目 (2019YFC1407903)

作者简介: 易柯含 (1991—), 女, 湖南长沙人, 硕士, 主要研究方向为海洋赤潮与生物毒素, E-mail: kehanyi@zju.edu.cn

通信作者: 佟蒙蒙 (1980—), 女, 满族, 河北承德人, 副教授, 博士, 主要研究方向为海洋赤潮与生物毒素、赤潮生物毒素的快速检测技术, E-mail: mengmengtong@zju.edu.cn

of nematocyst proteins per unit area of tentacles in *N. nomurai* ($1.619 \pm 0.424 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) was significantly higher than that of *C. nozakii* ($0.136 \pm 0.004 \mu\text{g}/\text{cm}^2$). The HA/mass and HA/area of *N. nomurai* was higher than *C. nozakii* considering the significant difference in HA/protein EC_{50} . In summary, the tentacles of *N. nomurai* have higher hemolytic activity, therefore, more attention should be paid to the safety management and clinical emergency diagnosis of bathing beach.

Key words: *Cyanea nozakii*; *Nemopilema nomurai*; mitochondria COI; nematocyst morphology; hemolytic activity of jellyfish

近年来,大型水母在我国渤海、黄海、东海海域频繁暴发^[1-2],这不仅导致海洋渔业资源的衰退,还对发电厂冷却水系统造成堵塞等不利影响。此外,水母旺发还引发了多起蜇伤事件^[3],严重威胁生态平衡及人类生命健康,对我国经济、社会和海洋生态环境造成了严重影响。发生在我国北方的水母蜇伤主要由沙海蜇(*Nemopilema nomurai*)和白色霞水母(*Cyanea nozakii*)引起,但水母组织易碎、含水量多、样品采集后容易变形失真等,导致单从形态学角度鉴定水母种类十分困难。近些年来,随着分子生物技术的快速发展,线粒体编码的细胞色素氧化酶第一亚基(cytochrome c oxidase subunit I, COI)已逐渐成为水母种类鉴定及种内和种间差异分析的理想标签^[4-6]。

白色霞水母和沙海蜇均隶属于刺胞动物门(Cnidaria)钵水母纲(Scyphomedusae)。其中,白色霞水母为旗口水母目(Semaeostomeae)霞水母科(Cyaneidae)霞水母属(*Cyanea*),其个体伞部直径约200~600 mm^[7-8],触手长而多,有的触手长达1~2 m,位于内伞部纵辐位,呈U形排列,共8束,其上分布有大量刺丝囊^[7,9];沙海蜇为根口水母目(Rhizostomeae)根口水母科(Rhizostomatidae)越前水母属(*Nemopilema*),个体较大,伞径可达2 m^[10],与白色霞水母相比,沙海蜇的触手短而粗,最长仅60~70 cm,触手上刺丝囊亦成簇排列,但簇直径较小(140~160 μm)且不明显,每毫米范围排列1~5个^[10]。刺丝囊作为水母赖以捕食和御敌的武器,遇到刺激时,水母可将刺丝囊中的刺丝猛烈射出,刺入动物体内并释放毒素。水母毒素主要是一类包含各种毒性组分的蛋白、多肽、酶类物质,具有溶血活性、心脏血管毒性、肝脏毒性、神经毒性等。目前,全球已发现有毒海洋腔肠动物70余种,我国已有记录的

50余种^[11],其中,以箱型水母(*Cubomedusae*)毒性最强,每年在太平洋西部海域造成数十起严重事故^[12]。而中国海域发现的这两种水母均能引起不同程度的局部至全身性症状,严重时可致人死亡^[13]。

在水母毒素众多活性中,溶血活性是指水母毒素对血红细胞膜的破坏能力,红细胞破裂导致血红蛋白等细胞内容物释放。水母毒素溶血活性的强弱除了与水母种类及毒素蛋白浓度相关外,还与血红细胞的来源有一定关系^[14]。此外,水母刺丝囊毒液的溶血活性不稳定,会受温度、pH、金属离子浓度等因素影响^[15-16]。在现有研究中,对自然环境中生活的上述两种水母刺丝囊溶血活性的定量对比研究较少,且多围绕同等浓度下,刺丝囊蛋白的溶血活性展开。有研究表明,沙海蜇单个刺丝囊蛋白浓度高于白色霞水母,但在相同刺丝囊蛋白浓度下,白色霞水母溶血活性略高于沙海蜇,其在30 min时对绵羊红细胞的 EC_{50} 值分别为63.62 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和69.69 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ^[17]。但单一的定量指标忽略了不同水母种类之间的形态学等差异,这对认识水母蜇伤规律及防治水母蜇伤十分不利。

基于此,本文采用线粒体COI基因片段编码的氨基酸序列分析方法,以渤海采集的大型水母样品为研究对象,进行系统发育分析;同时,根据水母毒素的致灾特征,创新提出采用同等浓度刺丝囊蛋白的溶血活性、单位质量触手的溶血活性和单位面积触手的溶血活性三个指标评估水母毒素溶血活性,以期为海滨浴场安全管理和临床诊断工作提供依据。

1 材料与方法

1.1 样品采集

采集的3只水母样品分别来自2020年7月

河北秦皇岛附近海域(样品编号 QHD-1)和8月大连瓦房店附近海域(样品编号 WFD-1、WFD-2)。其间平均水温约为 25 ℃,是水母旺发期。剪取采集的水母触手及口周围组织约 500 g,置于洁净的封口袋中,低温运输至实验室后,在 -80 ℃ 条件下保存备用。

1.2 水母种类鉴定

取约 25 mg 水母触手组织用液氮研磨成粉末后转移到 1.5 mL 离心管中,采用生工 Ezup 柱式动物基因组 DNA 抽提试剂盒,提取水母组织 DNA;基因组 DNA 以 EB 缓冲溶液保存于 -20 ℃。采用线粒体通用引物 LCO-1490 (5'-GGT CAACAAATCATAAAGATATTGG-3') 和 HCO-2198 (5'-TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATC A-3')^[18] 进行基因片段扩增(BIO-RAD T100 PCR)。PCR 反应总体积为 50 μL,包括 25 μL 2×Taq Plus MasterMix (Dye), 10 μM 引物各 2 μL, 4 μL 模板 DNA,其余以灭菌超纯水补足。扩增反应程序为:94 ℃ 预变性 4 min, 94 ℃ 变性 30 s, 55 ℃ 退火 30 s, 72 ℃ 延伸 45 s,运行 35 个循环;循环结束后 72 ℃ 终延伸 10 min, 4 ℃ 低温保存。取 4 μL PCR 扩增产物于 1% 琼脂糖凝胶电泳(200 V, 30 min)以检测 PCR 扩增结果,并在凝胶电泳成像系统上拍照记录。将凝胶电泳检测出含扩增片段的样品交由北京擎科生物科技有限公司杭州分公司测序,使用 ABI 测序仪(3730xl DNA Analyzer)进行双向测序以确保序列结果的准确性。

1.3 刺丝囊悬液制备及形态观察

刺丝囊悬液制备参考 Bloom 等^[19]的方法并略有改动。配制的人工海水经高温高压(126 ℃, 0.14 MPa)灭菌,冷却至室温后使用 0.22 μm 醋酸纤维滤膜过滤。从 -80 ℃ 冰箱中取出一定量的冷冻水母触手,称重,于 4 ℃ 条件下浸泡在无菌海水中 48~72 h,待水母组织自溶完全。其间每天更换新鲜海水,并定期用玻璃棒搅拌 2 次。随后,将粗悬液依次经 270 μm、120 μm、70 μm 筛绢过滤,滤液经 3420 g, 4 ℃ 离心 20 min。收集的沉淀用无菌海水清洗 2~3 次,并在适量 PBS 中重悬,即得到刺丝囊悬液。

取 10 μL 刺丝囊悬液于血球计数板上,在

SOPTOP EX20 系列生物显微镜(舜宇光学科技集团有限公司)下重复计数 3 次,计算单位质量触手刺丝囊数量;使用 0.1 mL 浮游生物计数板(北京普利特仪器有限公司)及 SOPTOP OD400 数码相机观察并拍照记录 200 个刺丝囊(重复 3 次),进行刺丝囊形态统计分析。

1.4 刺丝囊毒液制备及蛋白浓度测定

将刺丝囊悬液置于冰水浴中进行超声破碎(260 W, 45 次,每次 10 s,间隔 10 s),超声破碎后,镜检刺丝囊是否破碎完全。然后 12000 g, 4 ℃ 离心 20 min,取上清即得到水母刺丝囊毒液。以已知浓度的牛血清蛋白(BSA)为标准品,使用生工 BCA 法蛋白质浓度测定试剂盒测定样品蛋白质浓度。使用 4 ℃ 预冷的 PBS 溶液将水母刺丝囊毒液总蛋白浓度调整为 190 μg/mL 作为后续研究的母液,结合母液对应的刺丝囊密度,计算单个刺丝囊蛋白产量。

1.5 溶血活性测定

溶血活性的评估采用三个指标进行,即刺丝囊蛋白的溶血活性、单位质量触手的溶血活性和单位面积触手的溶血活性。其测定方法参考 Rottini 等^[20],取一定量的新鲜家鸡血红细胞(上海古朵生物科技有限公司),使用 PBS 溶液在 1000 g, 4 ℃ 条件下离心 10 min,重复清洗 3 次,收集底部红细胞用 PBS 溶液重悬,使红细胞个数达到 6×10^7 个/mL,置于冰上备用。对于不同浓度刺丝囊蛋白溶血活性测定,分别将 0.01 mL、0.05 mL、0.1 mL、0.2 mL、0.4 mL、0.6 mL、0.8 mL、1 mL 制备好的水母刺丝囊母液加入 1 mL 家鸡血红细胞悬液中,然后使用 PBS 溶液补齐至 2 mL。Triton X-100 可以破坏血红细胞的脂质双分子层,释放血红蛋白,因此将加入 0.5 mL Triton X-100 细胞裂解液的作为 100% 溶血的阳性对照;未加毒液组作为 0% 溶血的阴性对照。在 37 ℃ 条件下反应 30 min,然后 3000 g, 4 ℃ 离心 15 min,取 200 μL 上清于 96 孔板中,在 415 nm 下测定吸光值。计算公式:

$$\text{溶血活性}(\%) = \frac{\text{实验组}A_{415} - \text{阴性对照}A_{415}}{\text{阳性对照}A_{415} - \text{阴性对照}A_{415}} \times 100\% \quad (1)$$

对于单位质量/面积触手溶血活性的评估,则通过单个刺丝囊蛋白产量和单位质量/面积对

应的刺丝囊数量, 计算得到单位质量/面积触手刺丝囊蛋白含量, 并结合 HA/protein 进行溶血活性评估, 计算公式:

$$\begin{aligned} & \text{单位质量触手刺丝囊蛋白 } (\mu\text{g/g}) \\ &= \text{单个刺丝囊蛋白产量 } (\mu\text{g/cyst}) \\ &\times \text{单位质量刺丝囊数量 } (\text{cyst/g}) \quad (2) \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} & \text{单位面积触手刺丝囊蛋白 } (\mu\text{g/cm}^2) \\ &= \text{单个刺丝囊蛋白产量 } (\mu\text{g/cyst}) \\ &\times \text{单位面积刺丝囊数量 } (\text{cyst/cm}^2) \quad (3) \end{aligned}$$

1.6 数据分析

使用 DNAMAN 9 软件对测得的水母 COI 基因片段进行同源排序比对。结合从 GenBank 数据库中下载的线粒体片段 (cytochrome oxidase subunit 1) 蛋白序列, 对采集的水母种类和渤海海域常见水母种类进行系统发育研究, 使用 MEGA X 软件, 以每个位点的氨基酸差异数为单位, 使用成对距离矩阵法 (Pairwise Distances) 估算遗传距离; 采用邻接法 (Neighbor-Joining) 构建系统发育树, 系统发育树中各节点的自展值使用 Bootstrap 方法估计, 设 1000 次重复。对于每种水母, 拍照观察 500 ~ 900 个刺丝囊, 并记录其形态特征及发射状态。采用 GraphPad Prism 8 软件中剂量-反应拟合曲线计算水母刺丝囊毒液对家鸡红细胞 50% 溶血作用时对应的刺丝囊毒液蛋白浓度, 即 EC₅₀ 值。采用独立样本 T 检验

进行显著性差异分析, 数据采用平均值±标准差 (SD) 的形式表示。

2 结果与讨论

2.1 水母种类鉴定

利用线粒体 COI 基因片段通用引物扩增得到的基因片段长度为 684 bp, 将双向测序结果在 NCBI BLAST(<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 上进行比对, 得到 QHD-1 为白色霞水母, WFD-1、WFD-2 同为沙海蜇。使用 DNAMAN 9 软件对测得的水母 COI 基因片段进行同源排序比对, 结果显示, 两个沙海蜇成体 COI 基因序列完全一致, 不存在碱基变异位点。沙海蜇 A、T、C、G 含量分别为 36.8%、27.3%、18.3%、17.5%, 其中, A+T 含量为 64.1%, G+C 为 35.8%, AT/GC 为 1.79。白色霞水母 A、T、C、G 含量分别为 37.1%、27.8%、18.4%、16.7%, 其中, A+T 含量为 64.9%, G+C 含量为 35.1%, AT/GC 为 1.85。两个物种均表现出明显的 A/T 偏好, 种间差异性为 20.03%(图 1)。

2.2 系统发育树构建

本研究使用 MEGA X 软件, 采用 COI 基因编码的氨基酸序列, 构建 NJ 系统发育树 (图 2), 树中各节点上的数值为 1000 次重复抽样检验后得到的对应分支的自展值。结果显示, 11 条氨

```

N1 GACCAAAAAATCAAAACAGGTGTTGGAATAAAATAGGGTCTCCTCCTCCGGCAGGGTCAAAAAAGATGTGTTAAAGT 78
N2 .....T.AA.....A.....T..T.....C.....A..T.....G.....A..A.....

N1 TTCTATCTGTCAATAACATAGTTATTGCTCCTGCTAACACAGGTAAGATAACAACAATAATATTGCTGTGATTAAAA 156
N2 .....T.....A.....A.....A.....T....GT..T.GA.GA.....G..A.C.....

N1 CTGATCAAAACAAATAAAGGAATTCTATCCATAGTCATTCAGGAGCTCTCATATTCAATATTGTTGTGATAAAATTTA 234
N2 .....T.A.T.....T..T.....T..A.....A.....G..

N1 TTGTTCCCATTTATTGAAGAAGCTCCTGCTAAATGTAACTAAATATTGCCATGTCTACAGATCCTCCTGAGTGAAATT 312
N2 .A.C.....A..A..G..G.....G.GG.....A.....A..A..G..C.....GC..

N1 GAATAGATGCTAAAGTGGGATAAACAGTCCATCCTGTTCTCCTGCACCTTGTTCTATTAAAGCTGATCCTAATAAGTA 390
N2 .T....ACTA.GG.GA..G..G.T..T.....T.....A.C...G.A.....G..A..

N1 AGAGAGCAGGTGGTAAAGCCAGAAGCTAATATTGTTAAAGTCTGGGGAAGCCATATCAGGACTTCCTATCATCAAAG 468
N2 .T.A...T..A.....T.A..A..A.....T.AC..A.....G.....G..C...GC.....ATAA.GG..

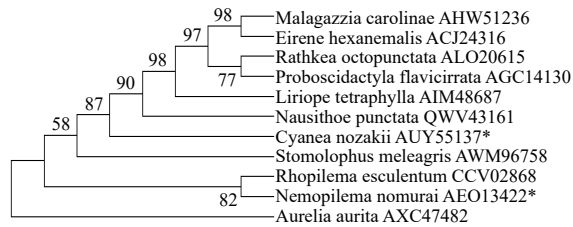
N1 GTATAAGTCAATTACCAATCCTCTATAAGAACAGGCATTACGAAGAAAAATATCATACTAGAGCGTGAGCTGTTA 546
N2 .A.CT.AC..G..T.....C.....T..A.....A..A.....T..T..AT.....T...G..

N1 CTACAACATTATAGATTTGATCATCTCCTAACATGGAGCCAGGACCAGATAATTCTAATCTAATAATCATACTAAAGG 624
N2 .A..T..G.....A.G...G.....T..T..T..C.....GC...T.....

N1 CGGTACCCACCATAGCAGAGAATGCACCAAAAAATAATATATAAAGTTCCAATATCTTTAT 684
N2 .A..T..T..T.....G..A.....C.....G.....A.....
  
```

图 1 白色霞水母 (N1) 与沙海蜇 (N2) COI 基因同源序列比对

Fig. 1 Homologous sequence alignment of gene COI from jellyfish *Cyanea nozakii*(N1) and *Nemopilema nomurai*(N2)



注: *表示本次采集到的水母种类

图 2 基于 COI 基因编码的氨基酸序列构建的渤海海域常见水母种类的 NJ 系统发育树

Fig. 2 Phylogenetic tree of common jellyfish species in the Bohai Sea, constructed based on amino acid sequences encoded by gene COI, using NJ method

氨基酸序列大致分为两组,即钵水母纲和水螅水母纲。根口水母目的海蜇 (*Rhopilema esculentum*) 与沙海蜇 (*Nemopilema nomurai*) 先聚在一起,然

后再和钵水母纲的海月水母 (*Aurelia aurita*)、口冠水母 (*Stomolophus meleagris*)、红斑游船水母 (*Nausithoe punctata*) 相聚,最后与水螅水母纲的其他类群相聚,与传统分类基本一致。

此外,采用成对距离矩阵法计算了渤海海域常见水母种类两两物种间的遗传距离,由表 1 可知,10 个物种间的遗传距离范围在 0.0106 ~ 0.1755。其中,海蜇与沙海蜇的亲缘关系最近,两者的遗传距离仅为 0.0106;与白色霞水母的亲缘关系较远,两者间的遗传距离为 0.0798;与八斑芮氏水母、四枝管水母的亲缘关系最远,达 0.1436。白色霞水母与口冠水母的遗传距离最近,为 0.0638,与四枝管水母的亲缘关系最远,为 0.1755。

表 1 基于 COI 编码的氨基酸序列计算的渤海海域常见水母种类的遗传距离

Tab.1 Genetic distances between common jellyfish species in the Bohai Sea, calculated based on the amino acid sequences encoded by gene COI

	口冠水母 <i>S. meleagris</i>	海蜇 <i>R. esculentum</i>	八斑芮氏水母 <i>R. octopunctata</i>	四枝管水母 <i>P. flavicirrata</i>	沙海蜇 <i>N. nomurai</i>	红斑游船水母 <i>N. punctata</i>	卡玛拉水母 <i>M. carolinae</i>	四叶小舌水母 <i>L. tetraphylla</i>	六辐和平水母 <i>E. hexanemalis</i>	白色霞水母 <i>C. nozakii</i>
海蜇 <i>R. esculentum</i>	0.0266									
八斑芮氏水母 <i>R. octopunctata</i>	0.1277	0.1489								
四枝管水母 <i>P. flavicirrata</i>	0.1489	0.1436	0.0585							
沙海蜇 <i>N. nomurai</i>	0.0266	0.0106	0.1436	0.1436						
红斑游船水母 <i>N. punctata</i>	0.1223	0.1277	0.1702	0.1596	0.1223					
卡玛拉水母 <i>M. carolinae</i>	0.1170	0.1170	0.0638	0.0585	0.1117	0.1543				
四叶小舌水母 <i>L. tetraphylla</i>	0.1117	0.1223	0.1011	0.1170	0.1170	0.1383	0.0798			
六辐和平水母 <i>E. hexanemalis</i>	0.1277	0.1277	0.0691	0.0745	0.1223	0.1649	0.0160	0.0904		
白色霞水母 <i>C. nozakii</i>	0.0638	0.0798	0.1543	0.1755	0.0798	0.1330	0.1543	0.1436	0.1649	
海月水母 <i>A. aurita</i>	0.0106	0.0160	0.1383	0.1596	0.0160	0.1223	0.1277	0.1223	0.1383	0.0638

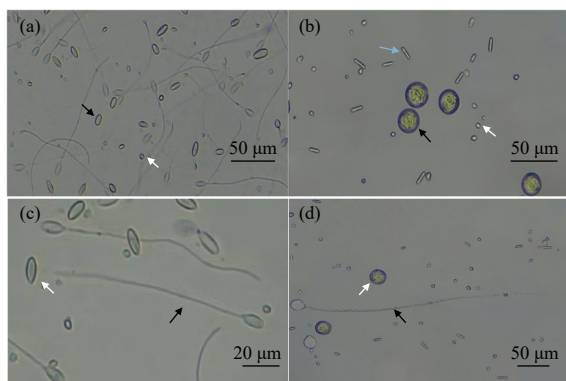
2.3 刺丝囊形态特征

通过显微镜观察,可以看到白色霞水母刺丝囊主要呈圆形和椭圆形 [图 3(a)],以椭圆形刺丝囊为主,约占 76.98%,圆形刺丝囊约占 23.02%。其中,椭圆形刺丝囊长径约 13.0±1.5 μm,短径 5.8±0.3 μm;圆形刺丝囊直径约 2.9±0.3 μm。白色霞水母已发射的刺丝囊约占 46.59%,未发射的刺

丝囊占 53.41% [图 3(c)、图 4(a)]。刺丝长度可达囊体的 8 ~ 10 倍,整个刺丝在光学显微镜下无明显倒刺结构。

沙海蜇刺丝囊主要呈梨形、棒状、椭球形三种形态 [图 3(b)],以梨形为主,约占 69.72%,棒状刺丝囊约占 13.45%,椭球形刺丝囊约占 16.84%。其中,椭球形刺丝囊体积较大,长径可达 29.5±

3.0 μm , 短径约 $23.5 \pm 3.0 \mu\text{m}$, 在未释放的囊腔中可见明显的螺旋缠绕的刺丝结构 [图 3(b)]。棒状刺丝囊长径约 $15.0 \pm 3.0 \mu\text{m}$, 短径 $3.9 \pm 0.35 \mu\text{m}$; 梨形刺丝囊长径约 $7.5 \pm 0.7 \mu\text{m}$, 短径 $5.0 \pm 0.7 \mu\text{m}$ 。分离得到的沙海蜇刺丝囊大多呈未发射状态, 发射刺丝囊占比不到 1% [图 3(d)、4(b)]。



注: (a) 图中黑色箭头: 椭圆形刺丝囊; 白色箭头: 圆形刺丝囊。
(b) 图中黑色箭头: 椭圆形刺丝囊; 白色箭头: 梨形刺丝囊; 蓝色箭头: 棒形刺丝囊。(c)(d) 图中黑色箭头: 发射刺丝囊; 白色箭头: 未发射刺丝囊

图 3 白色霞水母 (a、c) 与沙海蜇 (b、d) 刺丝囊显微形态
Fig. 3 Morphological picture of nematocysts from jellyfish *Cyanea nozakii*(a, c) and *Nemopilema nomurai*(b, d)

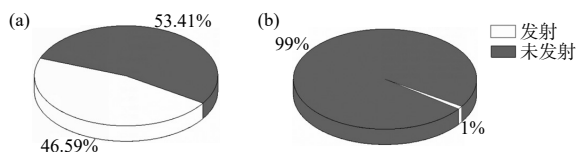


图 4 白色霞水母 (a) 与沙海蜇 (b) 刺丝囊发射状态统计
Fig. 4 Statistics of nematocyst emission status of jellyfish *Cyanea nozakii*(a) and *Nemopilema nomurai*(b)

2.4 蛋白浓度与溶血活性测定

沙海蜇和白色霞水母毒液在 30 min 时, 对家鸡红细胞的 EC_{50} 分别是 $4.36 \mu\text{g/mL}$ 和 $145.4 \mu\text{g/mL}$ (图 5)。沙海蜇刺丝囊毒液蛋白浓度为 $1.9 \mu\text{g/mL}$ 时, 对家鸡红细胞的溶血活性为 24.62%, 毒液蛋白浓度为 $9.5 \mu\text{g/mL}$ 时的溶血活性为 88.37%, 毒液蛋白浓度为 $19 \mu\text{g/mL}$ 时的溶血活性为 97.39%, 此后趋于稳定, 并达到 100%。白色霞水母刺丝囊毒液蛋白浓度小于 $38 \mu\text{g/mL}$ 时, 未检测出溶血活性。毒液蛋白浓度为 $76 \sim 114 \mu\text{g/mL}$ 时, 对家鸡红细胞的溶血活性为

0.42% ~ 4.75%, 毒液蛋白浓度为 $152 \sim 190 \mu\text{g/mL}$ 时, 其溶血活性为 13.97% ~ 20.54%, 根据拟合曲线结果, 其最大溶血活性为 24.25% ~ 25.28%。在同等刺丝囊蛋白浓度下 ($76 \mu\text{g/mL}$), 沙海蜇的溶血活性远高于白色霞水母, 约为其 238 倍 (100% VS 0.42%)。

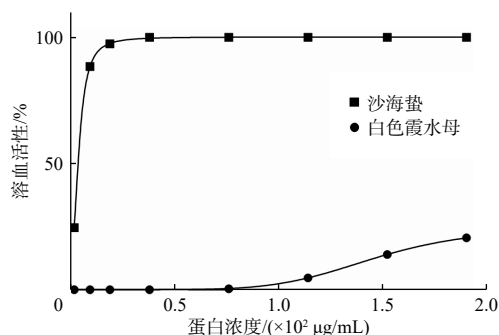


图 5 不同蛋白浓度下两种水母毒素对家鸡红细胞 30 min 的溶血结果

Fig. 5 Hemolytic activity of jellyfish toxins in *Cyanea nozakii* and *Nemopilema nomurai* on blood cells of chicken at different protein concentrations for 30 min

此外, 当超声破碎后的刺丝囊悬液蛋白浓度为 $190 \mu\text{g/mL}$ 时, 白色霞水母单个刺丝囊毒素蛋白平均产量约为 $0.09 \times 10^{-4} \mu\text{g/cyst}$, 显著低于沙海蜇 ($1.797 \times 10^{-4} \mu\text{g/cyst}$) (表 2)。尽管白色霞水母单位质量触手刺丝囊数为 $8.07 \times 10^5 \text{ cyst/g}$, 显著高于沙海蜇 ($0.52 \times 10^5 \text{ cyst/g}$) (表 2), 但计算得出的沙海蜇单位质量触手刺丝囊蛋白含量 ($9.33 \pm 1.16 \mu\text{g/g}$) 略高于白色霞水母 ($7.34 \pm 1.22 \mu\text{g/g}$), 结合 HA/protein EC_{50} 值的显著性差异, 沙海蜇 HA/mass 更高。此外, 尽管白色霞水母单位面积触手刺丝囊约 14909 cyst/cm^2 , 显著高于沙海蜇 9008 cyst/cm^2 [21], 但单位面积沙海蜇触手刺丝囊蛋白含量约 $1.619 \pm 0.424 \mu\text{g/cm}^2$, 显著高于白色霞水母 $0.136 \pm 0.004 \mu\text{g/cm}^2$, 结合 HA/protein EC_{50} 值的显著性差异, 沙海蜇 HA/area 更高。

2.5 讨论

白色霞水母和沙海蜇作为我国常见的两种大型水母, 在渤海地区已有记录的水母灾害事件及各类生态调查中多有出现 [1,22-23], 而每年 7—8 月, 是北戴河近岸海域白色霞水母与沙海蜇暴发期 [23], 这主要由夏季水温升高、渔业资源枯竭导

表 2 两种水母单个刺丝囊蛋白产量、单位质量/面积触手刺丝囊数及对应蛋白含量

Tab.2 Protein yield from single nematocyst of each jellyfish species, number of nematocysts and corresponding protein yield per gram or square centimeters tentacle

	白色霞水母	沙海蜇	<i>t</i>
单个刺丝囊蛋白产量($\times 10^{-4}$ $\mu\text{g}/\text{cyst}$)	0.09 $\pm$ 0.002	1.797 $\pm$ 0.231	-12.767***
单位质量触手刺丝囊数($\times 10^5$ cyst/g)	8.07 $\pm$ 1.34	0.52 $\pm$ 0.06	9.767**
单位质量触手刺丝囊蛋白($\mu\text{g}/\text{g}$)	7.34 $\pm$ 1.22	9.33 $\pm$ 1.16	-2.044
单位面积触手刺丝囊数($\times 10^3$ cyst/cm^2) ^[21]	14.909 $\pm$ 0.496	9.008 $\pm$ 2.363	4.233*
单位面积触手刺丝囊蛋白($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	0.136 $\pm$ 0.004	1.619 $\pm$ 0.424	-6.048*

注: $p<0.05^*$, $p<0.01^{**}$, $p<0.001^{***}$

致的生态失衡、渤海休渔期(每年 5—9 月)捕捞活动减少等原因造成^[22]。线粒体 COI 序列作为分类学鉴定的有效手段,已被广泛应用于水母乃至海洋浮游动物的鉴定与分类^[4-6]。Ortman 等^[24]使用 COI 区域作为 DNA 条形码对采集自大西洋、北冰洋和东北太平洋海域水母亚门(Medusozoa)的物种进行分子鉴定,共鉴定出 1 种立方水母、10 种钵水母和 84 种水螅水母;Bucklin 等^[25]通过对楚科奇海和北冰洋中部海域采集的样本进行 COI 序列扩增和测序,共鉴定得到包括 6 种水螅水母和 1 种钵水母在内的 41 种浮游动物。本研究通过扩增 COI 基因片段和 DNA 测序,得到所采集的水母种类分别为白色霞水母和沙海蜇,该结果验证了 COI 序列实现水母种类鉴定的有效性。同时,本研究通过分析白色霞水母和沙海蜇 COI 碱基组成,发现其碱基含量比 AT/GC 约为 1.8,呈现明显的 A/T 偏好,这与其他水母类 COI 基因 A/T 含量相似,符合后生动物线粒体基因组碱基组成特点^[26]。

白色霞水母(*Cyanea nozakii*)与海月水母(*Aurelia aurita*)同属于钵水母纲(Scyphomedusae)旗口水母目(Semaeostomeae),基于 COI 片段编码的氨基酸序列计算得到的系统发育结果显示,白色霞水母与海月水母的遗传差异较大(0.0638),高于白色霞水母与口冠水母科(Stomolophidae)口冠水母(0.0106)以及与根口水母目(Rhizostomeae)海蜇和沙海蜇的遗传距离(0.0160),与传统分类地位存在一定差别,这可能是由于较高分类阶元 COI 突变饱和,不同水平遗传差异存在重叠所致,因此 COI 序列可能并不适于解析同目不同科层次的系统发育关系^[5,26]。尽管有研究表明,

COI 序列在更高分类水平的系统发育分析或未知序列的分类上仍然存在缺陷^[24],但在本研究中,基于 COI 片段编码的氨基酸序列进行的系统发育分析可以将钵水母纲和水螅水母纲的水母分配到所属类群,证明在更高分类阶元上,COI 序列具有一定程度的解析能力^[5]。此外,有研究表明,刺胞动物线粒体氨基酸序列的系统发育解析能力好于对应的核酸序列^[6],COI 片段编码的氨基酸序列在更高分类阶元的解析能力可能比由 DNA 推导的氨基酸序列更能为基因和物种的长期进化提供有效信息^[27]。

水母毒素主要存在于刺丝囊中,制备纯净、完整的刺丝囊有利于毒素的分离提纯。常用的提取水母刺丝囊的方法主要包括了密度梯度离心法、自溶过滤法^[19]等。本研究采用 Bloom 等^[19]的自溶过滤法,获得的沙海蜇刺丝囊平均得率为 5.1×10^4 个/g,略高于成熙^[28]使用高镁人工海水及密度梯度离心法分离纯化的沙海蜇刺丝囊得率(9.31×10^3 个/g),证明了使用天然海水及自溶过滤法制备水母刺丝囊的可靠性。在本研究中,沙海蜇单个刺丝囊毒素蛋白平均提取产量为 1.797×10^{-4} $\mu\text{g}/\text{个}$,显著高于白色霞水母(0.09×10^{-4} $\mu\text{g}/\text{个}$),在同等刺丝囊蛋白浓度下(76 $\mu\text{g}/\text{mL}$),沙海蜇的溶血活性远高于白色霞水母,约为其 238 倍;徐金涛^[21]发现,白色霞水母和沙海蜇单个刺丝囊毒素蛋白含量相近,沙海蜇单个刺丝囊总蛋白含量仅略高于白色霞水母,并且在相同刺丝囊蛋白浓度下(82 $\mu\text{g}/\text{mL}$),沙海蜇和白色霞水母毒素对家鸡红细胞的溶血率近似,分别为 52% 和 57.6%。该差异产生的原因可能与水母样品采集过程及刺丝囊制备和分离过程中的损

耗有关。在本研究中,白色霞水母的刺丝囊发射率为46.59%,这可能导致部分刺丝囊毒素在提取前外排并失活,从而导致测得的溶血活性低于其实际值;此外,水母溶血活性还受物种、个体发育水平、采样地理位置、温度、pH、金属离子浓度等多种环境因子影响。有研究表明,与沙海蜇溶血活性相关的金属蛋白酶,其活性在我国近海岸较低,另一种与溶血活性相关的磷脂酶A₂活性则在黄海南部海域较低^[29]。并且不同水母品种,其毒素种类也存在区别^[12]。此外,有研究表明,海蜇(*Rhopilema esculentum*)毒素的溶血活性在pH 6~10条件下最强;在Mg²⁺、Cu²⁺、Zn²⁺、Fe²⁺、Ca²⁺(≥2 mM)等金属离子存在的条件下,海蜇溶血活性显著降低;而在温度超过40℃条件下预孵育海蜇毒素,可导致其溶血活性的显著降低^[15]。

另外,沙海蜇椭圆形刺丝囊显著大于白色霞水母刺丝囊,导致两种水母触手刺丝囊在排列分布上存在明显不同。本研究中,白色霞水母单位质量触手刺丝囊得率(8.07×10⁵个/g)显著高于沙海蜇(0.52×10⁵个/g),约为其15.5倍;也有研究表明,白色霞水母触手刺丝囊的分布密度约为沙海蜇的1.66倍^[21],即便如此,我国渤海海域自然环境中的沙海蜇个体更大^[23],并且结合二者EC₅₀的显著性差异,沙海蜇单位质量/面积触手的溶血活性更高。

水母毒素溶血活性的强弱除了与水母种类及毒素蛋白浓度相关外,还与血红细胞的来源有一定关系,箱型水母(*Carybdea marsupialis*)毒液对山羊血红细胞很敏感^[20],在Gusmani等^[14]对地中海水母(*Rhopilema nomadica*)的研究中发现,其毒素对不同物种血红细胞的溶血活性存在差异,对于人、兔子、山羊、豚鼠血红细胞,其EC₅₀分别为32 ng、55 ng、57 ng和67 ng。成熙^[28]使用昆明小鼠血红细胞测得沙海蜇刺丝囊毒素浓度分别为2 μg/mL、5 μg/mL、7 μg/mL、10 μg/mL、15 μg/mL、20 μg/mL时,溶血活性随剂量上升,在沙海蜇刺丝囊毒素浓度达到8 μg/mL时,溶血率达到50%,在本文中,沙海蜇毒液在30 min时,对家鸡血红细胞的EC₅₀值为4.36 μg/mL,可见不同动物血红细胞对同种水母刺丝囊毒液具

有相似的敏感性。

值得注意的是,除溶血活性外,水母毒素还具有细胞毒性、心脏毒性、肝脏毒性、神经毒性等生物活性,已有研究表明,沙海蜇和白色霞水母刺丝囊毒素对培养中的小鼠皮下结缔组织细胞和人横纹肌瘤细胞存活率都具有抑制作用,抑制作用呈显著的时间和剂量相关性,并且,白色霞水母刺丝囊毒素对两种细胞毒性的EC₅₀-24 h值分别为49.8 μg/mL和43.6 μg/mL,低于沙海蜇刺丝囊毒素(78.0 μg/mL和70.1 μg/mL),白色霞水母表现出更高的细胞毒性^[30]。本文主要对野外采集的两种水母进行了溶血活性的定量分析,未考虑其他毒性成分的协同作用。因此,在未来的研究中,还需对水母毒素的多种生物活性进行综合评价,为评估水母毒害风险和制定防护对策提供更全面的参考依据。

3 结论

线粒体COI序列作为分类学鉴定的有效手段,可以准确实现水母的物种鉴定。在系统发育分析中,由于COI序列遗传差异在同目不同科水平发生重叠,无法准确解析上述阶元的分类地位,但在更高分类阶元,COI序列具备一定程度的解析能力。在刺丝囊及其溶血活性研究中发现,在同等刺丝囊蛋白浓度下,沙海蜇的溶血活性远高于白色霞水母,约为其238倍。尽管白色霞水母触手中刺丝囊的分布密度显著高于沙海蜇,但沙海蜇单个刺丝囊总蛋白含量显著高于白色霞水母,并且在自然环境中,沙海蜇个体更大,因此,沙海蜇的三个指标,HA/protein、HA/mass和HA/area均最高,在海滨浴场安全管理及临床急救诊断中,应该给予更高的关注。

参考文献:

- [1] 王彬,李玉龙,沈鸿,等. 2005~2013年辽东湾北部近海白色霞水母的数量分布[J]. 海洋渔业, 2014, 36(2): 146-154.
- [2] 李聪. 我国水母灾害研究现状与展望[J]. 渔业研究, 2018, 40(2): 156-162.
- [3] 岳洋. 水母毒素酶类成分鉴定、生物活性及其抑制剂研究[D]. 青岛: 中国科学院大学(中国科学院海洋研究所), 2017: 1-26.
- [4] 张姝,张芳,刘媛,等. 我国海域两种大型水母的分子

- 鉴定[J]. *海洋与湖沼*, 2009, 40(1): 94-101.
- [5] 王敏晓, 程方平, 李超伦, 等. 基于线粒体 *cox1* 片段序列的胶州湾浮游动物 DNA 条形码分析[J]. *海洋与湖沼*, 2011, 42(5): 702-710.
- [6] 何劲儒. 中国近海水螅水母类 DNA 条形码研究及四叶小舌水母线粒体基因组分析[D]. 厦门: 厦门大学, 2014: 41-60.
- [7] DONG J, SUN M, WANG B, et al. Comparison of life cycles and morphology of *Cyanea nozakii* and other scyphozoans[J]. *Plankton and Benthos Research*, 2008, 3(Suppl): 118-124.
- [8] LI R F, YU H H, LI A Y, et al. Preparation and neutralization efficacy of novel jellyfish antivenoms against *Cyanea nozakii* toxins[J]. *Toxins*, 2021, 13(2): 165.
- [9] 董 婧, 王 彬, 刘春洋. 白色霞水母各发育阶段的形态[J]. *水产学报*, 2006, 30(6): 761-766.
- [10] KAWAHARA M, UYE S I, OHTSU K, et al. Unusual population explosion of the giant jellyfish *Nemopilema nomurai* (Scyphozoa: Rhizostomeae) in East Asian waters[J]. *Marine Ecology Progress Series*, 2006, 307: 161-173.
- [11] 洪惠馨, 李福振, 林利民, 等. 我国常见的有毒海洋腔肠动物[J]. *集美大学学报(自然科学版)*, 2004, 9(1): 32-41.
- [12] THAIKRUEA L, SIRIARIYAPORN P, WUTTHANARUNGSAN R, et al. Review of fatal and severe cases of box jellyfish envenomation in Thailand[J]. *Asia Pacific Journal of Public Health*, 2015, 27(2): NP1639-NP1651.
- [13] 郭宇姝, 杨峥维, 田 力. 初步缓解水母蜇伤局部症状的急救方法[J]. *中国急救复苏与灾害医学杂志*, 2017, 12(11): 1102-1104.
- [14] GUSMANI L, AVIAN M, GALIL B, et al. Biologically active polypeptides in the venom of the jellyfish *Rhopilema nomadica*[J]. *Toxicon*, 1997, 35(5): 637-648.
- [15] YU H H, LI C P, LI R G, et al. Factors influencing hemolytic activity of venom from the jellyfish *Rhopilema esculentum* Kishinouye[J]. *Food and Chemical Toxicology*, 2007, 45(7): 1173-1178.
- [16] LI R F, YU H H, FENG J H, et al. Two-step purification and in vitro characterization of a hemolysin from the venom of jellyfish *Cyanea nozakii* Kishinouye[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2011, 49(1): 14-19.
- [17] PANG M, XU J T, LIU Y L, et al. Comparative study of the hemolytic and cytotoxic activities of nematocyst venoms from the jellyfish *Cyanea nozakii* Kishinouye and *Nemopilema nomurai* Kishinouye[J]. *Journal of Oceanology and Limnology*, 2018, 36(4): 1255-1265.
- [18] FOLMER O, BLACK M, HOEH W, et al. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome *c* oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates[J]. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 1994, 3(5): 294-299.
- [19] BLOOM D A, BURNETT J W, ALDERSLADE P. Partial purification of box jellyfish (*Chironex fleckeri*) nematocyst venom isolated at the beachside[J]. *Toxicon*, 1998, 36(8): 1075-1085.
- [20] ROTTINI G, GUSMANI L, PAROVEL E, et al. Purification and properties of a cytolytic toxin in venom of the jellyfish *Carybdea marsupialis*[J]. *Toxicon*, 1995, 33(3): 315-326.
- [21] 徐金涛. 沙蜇 (*Nemopilema nomurai*) 和白色霞水母 (*Cyanea nozakii*) 刺丝囊毒素的溶血活性、细胞毒性比较研究[D]. 青岛: 国家海洋局第一海洋研究所, 2014: 13-27.
- [22] 葛立军, 何德民. 生态危机的标志性信号——霞水母旺发今年辽东湾海蜇大面积减产[J]. *中国水产*, 2004(9): 23-25.
- [23] 韩业越, 刘婧美, 刘春洋, 等. 北戴河近岸海域水母暴发现象调查及防控建议[J]. *江西水产科技*, 2022(1): 40-43.
- [24] ORTMAN B D, BUCKLIN A, PAGÈS F, et al. DNA barcoding the medusozoa using mtCOI[J]. *Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography*, 2010, 57(24/25/26): 2148-2156.
- [25] BUCKLIN A, HOPCROFT R R, KOSOBOKOVA K N, et al. DNA barcoding of Arctic Ocean holozooplankton for species identification and recognition[J]. *Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography*, 2010, 57(1/2): 40-48.
- [26] 程方平, 王敏晓, 王彦涛, 等. 中国北方习见水母类的 DNA 条形码分析[J]. *海洋与湖沼*, 2012, 43(3): 451-459.
- [27] NEI M, KUMAR S. 分子进化与系统发育[M]. 吕宝忠, 钟扬, 高莉萍, 等译. 北京: 高等教育出版社, 2002: 15-28.
- [28] 成 熙. 东海大型水母刺丝囊分离鉴定及毒素蛋白纯化研究[D]. 上海: 第二军医大学, 2017: 10-31.
- [29] YU C L, YUE Y, YIN X J, et al. Identifying and revealing the geographical variation in *Nemopilema nomurai* venom metalloprotease and phospholipase A₂ activities[J]. *Chemosphere*, 2021, 266: 129164.
- [30] 徐金涛, 张学雷, 庞 敏. 沙蜇和白色霞水母刺丝囊毒素的细胞毒性比较研究[J]. *海洋科学进展*, 2014, 32(4): 543-550.

(本文编辑: 曲丽梅)