

腹泻性贝毒研究现状

Review on research of diarrhetic shellfish poisoning

杨维东¹, 彭喜春², 刘洁生¹, 彭志英²

(1. 暨南大学 生物工程学系, 广东 广州 510632; 2. 华南理工大学 食品与生物工程学院, 广东 广州 510640)

中图分类号: X55

文献标识码: A

文章编号: 1000-3096(2005)05-0066-07

赤潮已成为当今国际社会共同关注的海洋环境问题中急需解决的涉及全球变化的重要领域之一^[1]。有毒、有害赤潮的危害之一是能产生和分泌毒素。这些毒素经贝类和鱼类积累后可通过食物链进入人体, 严重危害食用者的健康, 甚至威胁生命。误食藻毒素污染的贝类引起人员中毒死亡的事件已不再罕见^[2]。近年来对中国沿海部分海区贝类毒素的调查显示^[3-5], 中国双壳贝类已经受到了贝类毒素污染的威胁。辽东湾、胶州湾、莱州湾、秦皇岛、福建等海域均发现贝类毒素, 其中腹泻性贝毒 (diarrhetic shellfish poisoning, DSP) 的存在比较普遍。在胶州湾海域发现 DSP 的“肇事藻”之一渐尖鳍藻 (*Dinophysis acuminata*); 1998 年 9~10 月份在渤海湾发生的大面积赤潮, 其中引发藻之一倒卵形鳍藻 (*Dinophysis fortii*) 也可产生 DSP^[6]; 1997 年秋至 1998 年春广东沿海多次赤潮发生期间的几种优势赤潮藻类中也有 DSP 肇事藻——利玛原甲藻 (*Prorocentrum lima*) 和具尾鳍藻 (*Dinophysis caudate*) 存在^[7]; 中国黄海、东海和南海均发现有具尾鳍藻^[8]。显然, 在中国研究 DSP 产生藻种及其产毒行为和产毒机理的研究具有重要的现实意义。

1 腹泻性贝毒的来源

能够产生腹泻性贝毒的藻类很多, 有 *Dinophysis acuminata*、*D. caudata*、*D. acuta*、*D. fortii*、*D. mitra*、*D. norvegica*、*D. sacculus*、*D. tropos* 及 *Prorocentrum lima* Dodge、*P. concavum* Fukuyo、*P. hoffmannianum* Faust、*P. maculosum* Faust、*P. faustiae* Morton 等^[9, 10]。这些藻类作为食物, 在海洋贝类、鱼类和其他动物的滤食或摄食过程中, 转移到它们的胃或食道中, 经胃和肠消化、吸收并导致 DSP 在贝体内的积累和转化, 从而引起食用者腹泻性中毒。可积累这类毒素的贝类主要有日本栉孔扇贝 (*Chlamys nipponensis akazara*)、凹

线蛤蜊 (*Mactra sulcatara*)、牡蛎 (*Ostrea sp.*)、紫贻贝 (*Mytilus edulis*)、沙海螂 (*Mya arenaria*)、凤螺 (*Strombus sp.*)、锦蛤 (*Tapes japonica*)、蛤仔 (*Ruditapes philippinarum*)、斧文蛤 (*Meretrix lamarchii*)、中国蛤蜊 (*Mactra chinensis*) 和海扇 (*Placopecten magllanicus*) 等^[6, 10, 11]。

2 腹泻性贝毒的分析方法

腹泻性贝毒的分析方法主要包括化学分离分析及生物分析两大类^[11]。化学分离分析方法有免疫分析 (immunoassays)、气相色谱分析 (gas chromatography, GC)、高效液相色谱 (high-performance liquid chromatography, HPLC)、色谱质谱联用 (liquid chromatography-mass spectrometry, LC-MS)、毛细管电泳法 (capillary electrophoresis, CE) 及胶束毛细管电动色谱 (micellar electrokinetic capillary chromatography, MEKC)^[11-15]等。免疫分析法包括放射免疫分析 (RIA) 和酶联免疫分析 (ELISA) 两种, 该法具有选择性强、灵敏度高的特点。目前, 可用于藻类和贝类样品中大田软海绵酸 (okadaic acid, OA) 和鳍藻毒素 (dinophysistoxins, DTX1) 检测的酶联免疫分析试剂盒业已实现商品化。同时, 免疫化学技术已用于 DSP 的分离和纯化。Puech 等人利用免疫亲和柱分离和纯化 OA。无需进一步的处理, 贻贝甲醇抽提物的纯化率可达 95%; 气相色谱法可用于分离和测定 OA 系列的毒素。分析时首先用乙醚

收稿日期: 2003-05-17; 修回日期: 2003-08-25

基金项目: 教育部科学技术研究重点项目 (00214); 广东省自然科学基金项目 (031885); 广州市科技重点项目 (2002J1-C0011)

作者简介: 杨维东 (1967-), 博士, 副教授, 主要从事海洋毒素及分子毒理学研究, E-mail: jdywd@21cn.com.

萃取,再用硅胶渗透色谱和反相分配色谱分离和纯化,用氢焰检测器分析毒素的三甲硅油衍生物。高效液相色谱法被认为是分析藻毒素最有效的工具,应用非常广泛,也比较成熟。测定时先用80%的乙醇萃取,过柱、淋洗纯化萃取物。对于不同的物质,需用不同的荧光物质、色谱柱和流动相进行纯化,其缺点是由于分析样品的复杂性可能会导致选择性比较差。Gago - Martinez 等人运用“in situ”9 - anthryldiazomethane(ADAM)衍生以克服这一缺陷,发现可将DSP的几类毒素完全分离出来。另外,人们发展了多种色谱质谱联用技术,使得DSP的检测更趋简捷、灵敏,并在新毒素的鉴别方面发挥着重要作用。

腹泻性贝毒的生物分析主要有小白鼠分析(mouse bioassay)、大鼠分析(rat bioassay)、哺乳鼠分析(suckling mouse assay)、肠回路分析(intestinal loop assay)和细胞毒性分析(cytotoxicity)等方法^[10]。小白鼠分析法由Yasumoto等人建立,是AOAC标准方法,使用非常广泛,其测量单位是鼠单位(MU)。先提取、分离出样品中的DSP,用1%的吐温-60生理盐水溶解。然后腹腔注射小白鼠,观察小白鼠存活情况,计算毒力;大鼠分析检测法以大鼠为实验材料。取可疑贝样组织(肝、胰、腺),混在磨碎的鼠食中喂给禁食大鼠,观察其摄入量及粪便的情况,毒性大小对照《大鼠分析法的毒性参数》估算;哺乳鼠分析法原来是用于评估细菌毒力的。用于分析DSP毒力时,首先给鼠喂服贝类萃取物,然后测定肠中液体的富集情况。该方法重现性差,只在缺少分析手段时采用;肠回路分析法比较简便,但存在敏感性差、精确度低、重现性差的缺憾。用1%的吐温-60生理盐水将DSP溶解后,注射于兔或鼠的肠回路中。根据富集的流体体积(mL)与肠回路的长度(cm)的比值确定样品是否染毒,若大于10即可认为样品有毒;细胞毒性分析法有乳酸脱氢酶渗漏法、鼠白血病细胞L1210的生长抑制法、蛋白

磷酸酶抑制法(protein phosphatase inhibition, PPI)等。乳酸脱氢酶渗漏法通过测定鼠肝细胞经贝样萃取物处理后的乳酸脱氢酶渗漏状况来判断毒力。L1210的生长抑制法通过测定细胞生长受抑制的情况判断毒性大小。蛋白磷酸酶抑制法则是根据OA、DTX为蛋白磷酸酶1、2A(protein phosphatases 1, 2A)的特异抑制剂而设计,通过DSP对酶活性抑制程度进行检测。酶活性可通过比色法或荧光法测定,灵敏度非常高,是一种非常有潜力的分析方法。另外,Croci等^[17]最近建立了一种绿猴细胞毒性方法(Buffalo Green Monkey cytotoxicity test)和一种生物传感器法用于检测OA,可大大减小实验动物的用量,为DSP的检测提供了新的选择。

3 腹泻性贝毒的组成及结构

腹泻性贝毒是一类聚醚类或大环内酯类化合物,根据这些成分的碳骨架结构,一般将它们分成3组:(1)酸性成分的OA及其天然衍生物——鳍藻毒素(DTX 1~3);(2)中性成分的聚醚内酯——蛤毒素(pectenotoxins, PTXs)(PTX1~7, PTX-2SA, 7-epi-PTX-2SA);(3)其它成分的贝毒素——扇贝毒素(yessotoxins, YTX)及4,5-羟基扇贝毒素。它们都是由彼此相连的环醚组成,其化学结构如图1~3^[6, 10, 16]。其中有些毒素组分在海洋浮游植物中并未发现,如DTX-3型的酰化衍生物(acyl-derivatives of the DTX3-type);有些毒素仅在藻类存在,双壳贝类和浮游生物(pelagic plankton)中却未能检出,如DTX-4型化合物(DTX4-type compounds)。其原因在于,贝类在摄入产毒浮游生物后,浮游生物所产毒素在体内会发生积累(accumulated)或转化(transformed)。研究显示,其可能的转化方式有三类,即共轭物的水解、氧化及非酸形式的酰化作用(acylation of the free-acid forms)。各类毒素之间的生物转化途径非常复杂^[18]。

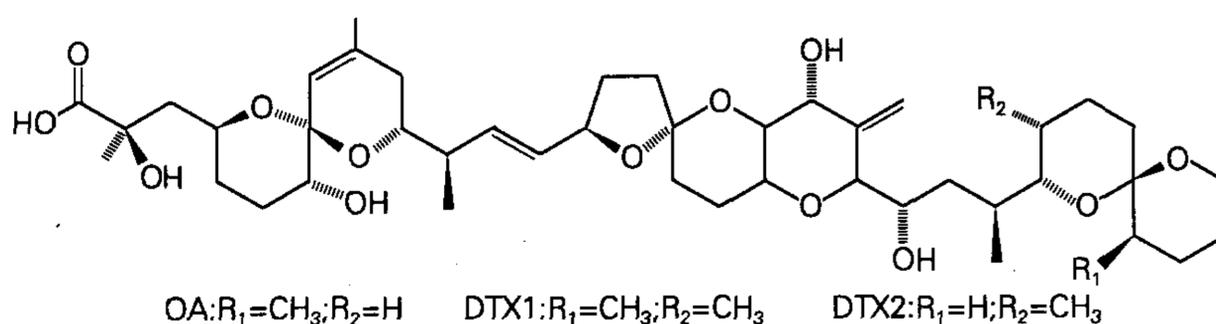
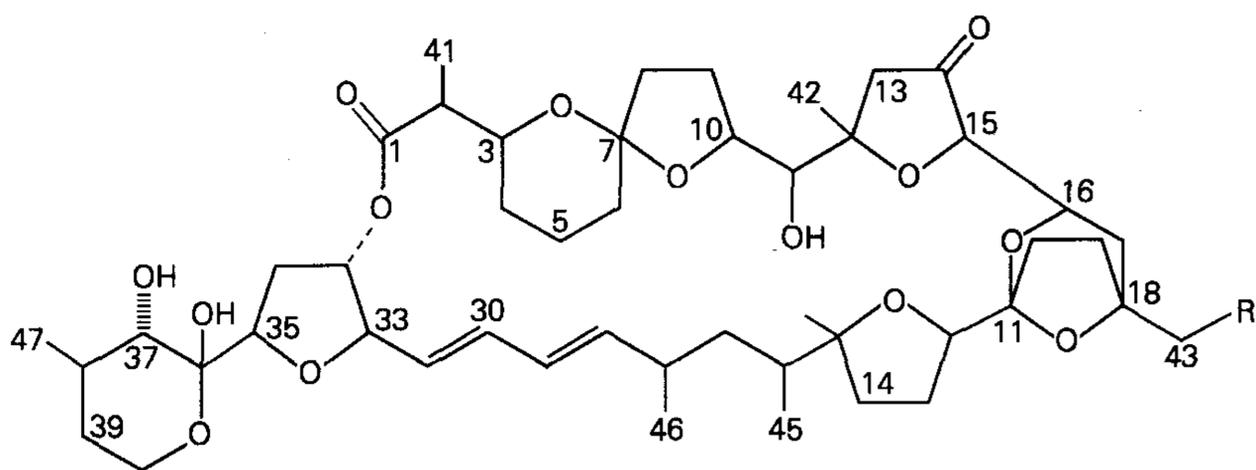
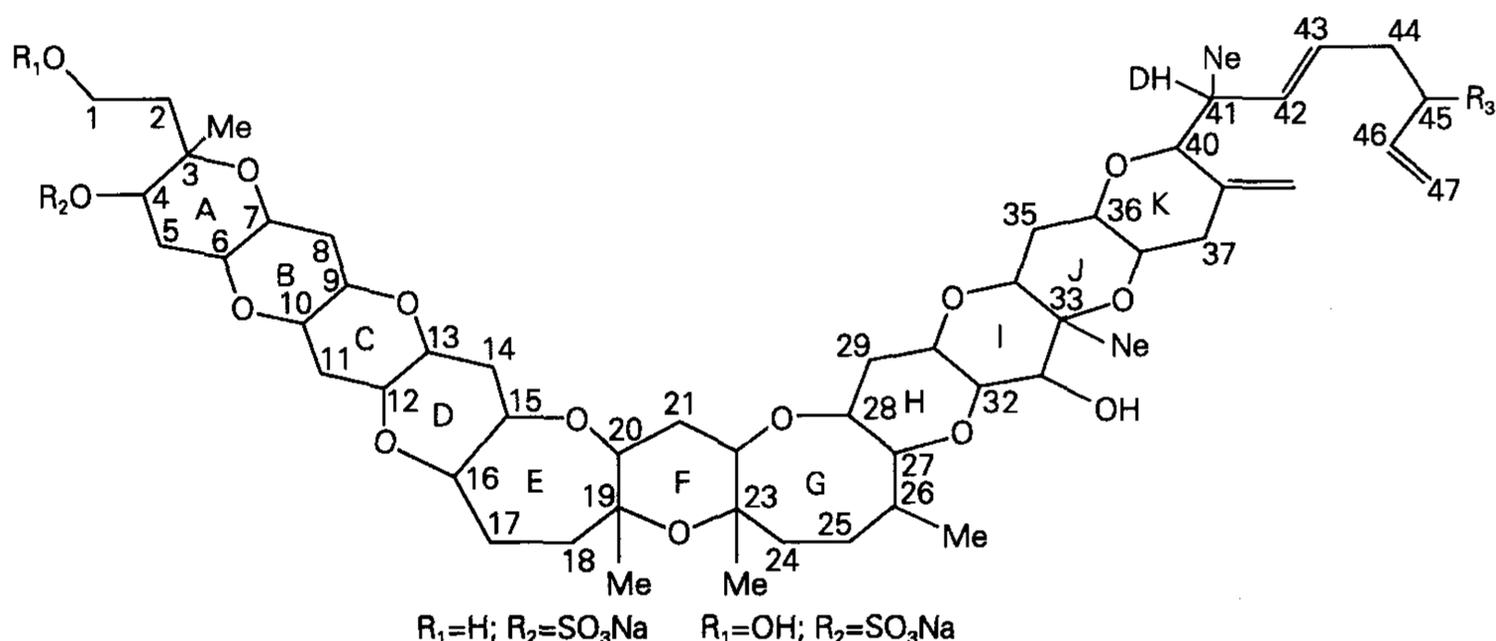


图1 腹泻性贝毒酸性成份的化学结构



PTX1: R=CH₂OH; C-7, R PTX2: R=CH₃; C-7, R PTX3: R=CHO; C-7, R
 PTX4: R=CH₂OH; C-7, S PTX6: R=COOH; C-7, R PTX7: R=COOH; C-7, S
 PTX-2SA: C-7, R 7-epi-PTX-2SA: C-7, S

图2 腹泻性贝毒中性成分的化学结构



R₁=H; R₂=SO₃Na R₁=OH; R₂=SO₃Na

图3 腹泻性贝毒其它成分的化学结构

4 腹泻性贝毒的毒理学特性

腹泻性贝毒的成份复杂,目前已证实与腹泻有关的组分是OA及其衍生物——DTX-1和DTX-3^[16]。

OA是无色晶体,熔点156~158℃, [α]²⁰_D=23° (C=0.43, CHCl₃),是一种高毒性化合物,小鼠i.v. LD₅₀和i.p. LD₉₉均为200 μg/kg;DTX-1是白色无定性固体,熔点134℃, [α]²⁰_D=28°(C=0.046, CHCl₃),小鼠i.v. LD₅₀和i.p. LD₉₉分别为166、160 μg/kg;DTX-3是无色固体,小鼠i.p. LD₅₀和i.p. LD₉₉均为500 μg/kg^[6, 16]。到目前为止,尚未见人类因中腹泻性贝毒而致死的报道,但在所有海洋毒素中,它的分布范围最广,发病率最高,几乎所有发达国家都在本国海域发现和检出本类毒素^[19]。

OA和DTX-1是蛋白磷酸酶(PP1和PP2A)的有效抑制剂,并因此导致腹泻、小肠上皮细胞的腹泻性退化和促进癌变的发展。OA可能扮演了霍乱弧菌相似的角色:先激活腺苷酸环化酶(adenylate cyclase, AC),从而引起一系列导致cAMP增加的事件。cAMP激活cAMP依赖性蛋白激酶,后者使某些调节小肠钠盐分泌的蛋白磷酸化^[20]。许多研究证实了DSP对蛋白质磷酸化酶和细胞调节的影响^[16]。

OA、DTX-1和DTX-3还是肿瘤促进因子^[21];同时具有遗传毒性,可引致DNA加合物的形成^[22];OA还可通过改变细胞内第二信使Ca²⁺的浓度发挥作用;强烈增加心肌细胞中L型Ca²⁺内流和气管平滑肌细胞上Ca²⁺依赖性K⁺通道开放状态的概率。其致癌机理不是通过激活蛋白激酶C起作用,而是通过对磷酸酯酶活性的抑制^[23]。由于其潜在的药理作用、生理活性

和毒理机制,OA 被列入十大海洋生物毒素之列^[24]。有关 DSP 的研究不仅受到赤潮界的重视,而且已引起医药领域和细胞生物学研究者的关注和青睐^[25]。事实上,由于甲藻具有特殊的进化地位,是间核生物,介于原核生物和真核生物之间,又介于动物、植物之间,其生殖与代谢途径比较特殊,可产生化学结构非常特殊的代谢产物。有些代谢产物虽然有毒,但可开发为抗肿瘤药物或为新药设计提供思路,因此已引起人们的高度关注。日本海洋生物工程研究公司已成功实现了利用水华束丝藻制取石房蛤毒素(saxitoxin, STX)、海洋细菌生产河豚毒素,为赤潮生物代谢产物的开发利用、新型海洋药物重要导向化合物的发现与研究开创了先河。

5 腹泻性贝毒的产生机理

Dinophysis spp 的实验室培养非常困难^[9],因此利玛原甲藻 *Prorocentrum lima* Dodge 通常作为可产生腹泻性贝类毒素的毒藻模型,被广泛用于研究腹泻性贝毒产生动力学的研究,并已成为 OA、DTX1 毒素标准的可靠来源^[26]。目前,人们对利玛原甲藻 *Prorocentrum lima* Dodge 的研究目前主要集中在毒物及毒理学、生理生态学、检测方法等领域^[9, 27~30]。生理生态学研究的最终目标是阐明有毒种类的产毒机理,并保障有充分的材料供毒物分析、毒理学和药理学研究。由于毒素的材料问题是目前限制毒素开发利用和其他领域研究的瓶颈,因此有关利玛原甲藻生理生态学的研究,其中特别是有关 DSP 产生机制的研究备受人们关注。

研究显示,OA 可能是在甲藻叶绿体中合成的并贮存于叶绿体当中,很可能是甲藻光合作用的直接产物^[31];但有人认为,OA 及其衍生物贮存于胞质周围的液泡中^[32]。单位细胞中 OA 的量与细胞脂质水平、叶绿素浓度密切相关^[28];随培养时间的延长逐渐增加,至静止期时达到最大。这与 PSP 产生情况有所不同,后者在对数生长初期最大^[33]。毒素的产生个体差异很大,来自不同区域,甚至同一地区的不同藻株,其毒素组成和水平可能不同^[9, 34],这种差异可能缘自遗传差异^[28];也可能源于藻生理状态上的差异。DSP 合成后以低毒性的硫酸盐形式 DTX4 贮存于胞内,然后以酸性活性形式 OA 分泌于水体^[35],从而构成细胞对 OA 毒性的自我保护体系(self-protective system)。DSP 分子中的所有碳均来自乙酸盐和乙醇酸盐^[36],其碳骨

架通过聚酮化合物合成酶(PKS)合成,非常独特。与放线菌(actinomycetes)多醚的合成不同,OA 的生物合成中可能存在一氧化机制(Oxidn. Mechanism)^[37],存在 Baeyer-Villiger 氧化^[38]。

与 PSP 情况相似,DSP 的产生过程中,海洋细菌也可能扮演重要角色。不少学者认为,DSP 是由藻细胞内共生细菌生成的。但 Zhou 等^[35]对利玛原甲藻超微结构研究显示,这种共生细菌可能并不存在。同时,DSP 在无菌、有菌环境下均可由 *Prorocentrum* 产生,细菌可能并不参与 DSP 的生物合成^[2];但也有从利玛原甲藻中分离得到海洋细菌的报道^[39, 40]。

环境因子对 DSP 的产生也有一定影响^[41]。培养基中氮的水平是利玛原甲藻生长的限制因子,当藻生长受到抑制时,毒素水平显著增加^[42];磷对利玛原甲藻的生长、毒素合成的影响与磷的形态有关。无机磷培养体系中藻的生长速率明显高于有机磷体系,但单位细胞中毒素 OA 的水平却显著低于有机磷体系^[43]。另外,与哺乳动物细胞类似,当藻细胞密度比较低时,利玛原甲藻还存在接触抑制作用^[44]。

近年来,藻毒产生与细胞周期、细胞分裂速度之间的关系也引起了人们的关注^[45, 46]。*Alexandrium fundyense* 同步培养实验显示^[45],STX 是在细胞周期 G1 期早期产生的。环境因子如果能够延长或者改变细胞周期 G1 期的时间,就可增加和影响毒素的产生水平。而来自淡水微囊藻毒素的研究表明^[46],微囊藻毒素的生成速率与细胞分裂速度存在线性关系;特殊生理环境、温度、光照等因素对藻毒素的生成的影响是通过作用于细胞分裂速度而实现的,并非直接作用于毒素产生的代谢途径。DSP 的生成比较复杂^[47]。GTX4 的合成从 G1 期延伸至 S 期,OA 和 DTX1 则是在 S 期和 G2 期产生的;但所有成分均是在光照条件下产生的。不稳定的水溶性的 GTX4 可能是脂溶性毒素 OA 等的前体物质。但有些藻株只能产生 OA 或 GTX1,而不产生 GTX4。因此,OA 的生成也可不受 GTX4 约束。另外,温度、光照、盐度对利玛原甲藻生长、细胞分裂速度和毒素的产生也有一定影响^[42, 48];藻生长受到抑制时,毒素水平显著增加;毒素水平在静止期时达到最大,此时,细胞分裂终止。显然,DSP 的产生与细胞周期事件、光照等明显相关,环境因子有可能通过影响细胞周期时相或者细胞分裂速度进而影响毒素的产生。



6 腹泻性贝毒 (DSP) 分子生物学研究展望

尽管人们已对利玛原甲藻 DSP 产生机制进行了大量卓有成效的工作,但产毒机制并未完全阐明,许多假设尚待证实、补充和完善,许多问题期待解决。比如毒素产生与光合作用强度以及细胞分裂、细胞周期的关系,环境因子影响毒素生成的途径和机制,产毒相关基因的分离、鉴别及定位,毒素生成的分子调控机制等等目前都不清楚,特别是毒素合成相关分子生物学的研究几属空白。

贝毒生成关键酶基因的分离和鉴别工作是一项极具挑战性、又非常诱人的研究课题,业已引起赤潮界的广泛注目,为此人们做了大量工作,但进展甚微^[49, 50]。其原因在于贝毒素不是蛋白质,许多分离、鉴别基因的方法对藻类并不适合。作为藻类次生代谢的产物,贝毒素的合成既受遗传控制也受共生体的影响。毒素合成过程需要一系列的酶^[50]。其基因可能通过转座子或噬菌体在藻类细胞之间及与细菌之间发生转移,以基因簇的形式存在。产毒藻株 DNA 位点可能同时接纳多种次生代谢物产生基因^[51]。如同高等植物一样,次生代谢物的合成可能由代谢频道中的关键酶和限速酶决定^[52]。关键酶或限速酶往往是多基因家族编码的同功酶中的特定成员。代谢频道内酶可以多酶复合体的形式存在于细胞的不同部位,但可协同表达^[53]。DSP 生物合成途径的复杂性使得其酶的分离、纯化研究进展非常缓慢,关键酶基因的克隆非常困难。

然而,近来 Sako 等^[50]从 *Gymnodinium catenatum* 中分离出 N-sulfotransferase,为赤潮毒素 STX 生物合成途径的研究打开了大门,对 STX 基因 (saxitoxin genes) 的分离将发挥至关重要的作用,因而对 DSP 基因的研究也将具有重要的参考和借鉴价值。而且,多种植物次生代谢物合成途径中关键酶基因的成功克隆为 DSP 关键酶基因的研究提供了成功的典范和借鉴。另外,借助 PSP 生成与细胞周期事件的相关性, Taroncher - Oldenburg 等^[54]采用 DD-PCR 技术从 *Alexandrium fundyense* 成功分离出 3 个与毒素生成可能有关的基因,为贝毒素生物合成关键酶基因的克隆注入了希望,提供了参照。同时,分子生物学方法和技术的飞速发展和日渐成熟也为这一领域的研究和发

参考文献:

- [1] 陆斗定. 全球赤潮生态学与海洋学(GEOHAB)国际合作计划 [J]. 东海海洋, 2002, 20(1): 60-64.
- [2] Quilliam M A. Phycotoxins [J]. J AOAC Int, 1999, 82(3): 773-81.
- [3] 李伟才, 栾刚, 李立, 等. 我国沿海部分海区贝类毒素的调查[J]. 海洋科学, 2000, 24(9): 19-22.
- [4] 刘宁, 潘国伟, 李春盛, 等. 辽东湾赤潮污染海区贝类软海绵酸的染毒情况调查分析 [J]. 中国公共卫生, 1999, 15(3): 209-210.
- [5] 周名江, 朱明远, 张经. 中国赤潮的发生趋势和研究进展[J]. 生命科学, 2001, 13(2): 54-59.
- [6] 陈则玲, 付云娜, 巩宁. 腹泻性贝毒及其高效液相色谱检测方法[J]. 海洋通报, 2000, 19(1): 73-78.
- [7] 王朝晖, 吕颂辉, 陈菊芳, 等. 广东沿海几种赤潮生物的分类学研究[J]. 武汉植物学研究, 1998, 16(4): 310-314.
- [8] Wang L, Li X. Management of shellfish safety in China [J]. J Shellfish Res, 1998, 17(5): 1609.
- [9] Lawrence J E, Cembella A D. An immunolabeling technique for the detection of diarrhetic shellfish toxins in individual dinoflagellate cells [J]. Phycologia, 1999, 38(1): 60-65.
- [10] 丁君. 赤潮毒素中腹泻性贝毒和麻痹性贝毒的研究及进展[J]. 大连水产学院学报, 2001, 25(3): 212-218.
- [11] 王菊英, 关道明, 韩庚辰. 腹泻性贝类毒素的分析方法研究[J]. 海洋环境科学, 1996, 15(4): 62-67.
- [12] Puech L, Dragacci S, Gleizes E, et al. Purification and extraction of okadaic acid by use of immunoaffinity (first approach) [J]. Toxicon, 1998, 36(12): 1744.
- [13] Gago - Martinez 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]. J Chromatography A, 2003, 992: 159-168.
- [14] Li D, Sun L, Chen Z, et al. Survey of the distribution of red tide toxins (okadaic acid and dinophytoxin - 1) in the Dalian Bay sea area of China by micellar electrokinetic capillary chromatography [J]. Electrophoresis, 2001 22(16): 3583-3588.
- [15] Boualicha N, Hennion M C, Sandra P. Capillary electrophoresis: a highly sensitive technique for the determination of marine phycotoxins. [J]. Toxicon, 1996, 34(10): 1084.
- [16] Burgess V, Shaw G. Pectenotoxins - an issue for public

- health (A review of their comparative toxicology and metabolism) [J]. **Environment International**, 2001, 27: 275 - 283.
- [17] Croci L, Stacchini A, Cozzi L, et al. Evaluation of rapid methods for the determination of okadaic acid in mussels [J]. **J Appl Microbiol**, 2001, 90(1): 73 - 77.
- [18] Moroño A, Arévalo F, Fernández ML, et al. Accumulation and transformation of DSP toxins in mussels *Mytilus galloprovincialis* during a toxic episode caused by *Dinophysis acuminata* [J]. **Aquatic Toxicology**, 2003, 62: 269 - 280.
- [19] 唐守亭. 腹泻性贝类毒素及其检测 [J]. **卫生研究**. 1998, 27 (增刊): 88 - 89.
- [20] Cohen P, Holmes C F, Tsukitani T. Okadaic acid: a new probe for the study of cellular regulation [J]. **TBIS**, 1990, 15: 98 - 102.
- [21] Creppy E E, Traoré A, Baudrimont I, et al. Recent advances in the study of epigenetic effects induced by the phycotoxin okadaic acid [J]. **Toxicology**, 2002, 181 - 182: 433 - 439.
- [22] Fessard V, Grosse Y, Pfohl - Leszkowicz A, et al. Okadaic acid treatment induces DNA adduct formation in BHK21 C13 fibroblasts and HESV keratinocytes [J]. **Mutat Res**, 1996, 361(2 - 3): 133 - 141.
- [23] 徐年军, 范晓, 韩丽君, 等. 藻类抗肿瘤活性物质的研究 [J]. **中国海洋药物**, 2000, 6: 30 - 35.
- [24] 秦路平. 生物活性成分的高通量筛选 [M]. 上海: 第二军医大学出版社, 2001.
- [25] Fernandez J J, Candenias ML, Souto ML, et al. Okadaic acid, useful tool for studying cellular processes [J]. **Curr Med Chem**, 2002, 9(2): 229 - 262.
- [26] Bravao I, Fernandez ML, Ramilao I, et al. Toxin composition of the toxic dinoflagellate *Prorocentrum lima* Dodge isolated from different locations along the Galician coast (NW Spain) [J]. **Toxicon**, 2001, 39: 1 537 - 1 545.
- [27] Windust A J, Wright J L C, McLachlan J L. The effects of the diarrhetic shellfish poisoning toxins, okadaic acid and dinophysistoxin - 1, on the growth of microalgae [J]. **Mar Biol**, 1996, 126(1): 19 - 25.
- [28] Morton Steve L, Tindall Donald R. Morphological and biochemical variability of the toxic dinoflagellate *Prorocentrum lima* Dodge isolated from three locations at heron island, Australia [J]. **J Phycol**, 1995, 31: 914 - 923.
- [29] Souto ML, Fernandez J J, Norte M, et al. Influence of amino acids on okadaic acid production [J]. **Toxicon**, 2001, 39: 659 - 664.
- [30] Hu T, Curtis J M, Walter J A, et al. Two new water - soluble DSP toxin derivatives from the dinoflagellate *Prorocentrum maculosum*: possible storage and excretion products [J]. **Tetrahedron Letters**, 1995, 36: 9 273 - 9 276.
- [31] Zhou J, Fritz L. Okadaic acid antibody localizes to chloroplasts in the DSP - toxin - producing dinoflagellates *Prorocentrum lima* Dodge and *Prorocentrum maculosum* [J]. **Phycologia**, 1994, 33(6): 455 - 461.
- [32] Barbier M, Amzil Z, Mondeguer F, et al. Okadaic acid and PP2A cellular immunolocalization in *Prorocentrum lima* (Dinophyceae) [J]. **Phycologia**, 1999, 38(1): 41 - 46.
- [33] 邹迎麟, 朱明远, Hall S. 两种亚历山大藻产毒过程和毒素特征研究. **黄渤海海洋**, 2001, 19(3): 65 - 70.
- [34] Heredia - Tapia A, Arredondo - Vega B O, Nunez - Vazquez E J, et al. Isolation of *Prorocentrum lima* (Syn. *Exuviella lima*) and diarrhetic shellfish poisoning (DSP) risk assessment in the Gulf of California, Mexico [J]. **Toxicon**, 2002, 40(8): 1 121 - 1 127.
- [35] Zhou J, Fritz L. Ultrastructure of two toxic marine dinoflagellates, *Prorocentrum lima* and *Prorocentrum maculosum* [J]. **Phycologia**, 1993, 32(6): 444 - 450.
- [36] Needham J, Hu T, McLachlan J L, et al. Biosynthetic studies of the DSP toxin DTX - 4 and an okadaic acid diol ester [J]. **J Chem Soc, Chem Commun**, 1995, 16: 1 623 - 1 624.
- [37] Izumikawa M, Murata M, Tachibana K, et al. 18O - labelling pattern of okadaic acid from H218O in dinoflagellate *Prorocentrum lima* elucidated by tandem mass spectrometry [J]. **Eur J Biochem**, 2000, 267(16): 5 179 - 5 183.
- [38] Murata M, Izumikawa M, Tachibana K, et al. Labeling pattern of okadaic acid from 18O2 and [18O2] acetate elucidated by collisionally induced dissociation tandem mass spectrometry [J]. **J Am Chem Soc**, 1998, 120(1): 147 - 151.
- [39] Lafay B, Ruimy R, Rausch - de - Traubenberg C, et al. *Roseobacter algicola* sp. nov., a new marine bacterium isolated from the phycosphere of the toxin - producing dinoflagellate *Prorocentrum lima* [J]. **Int J Syst Bacteriol**, 1995, 45(2): 290 - 296.
- [40] De Traubenberg C R, Geraud M L, Soyer Gobillard M O, et al. The toxic dinoflagellate *Prorocentrum lima* and its associated bacteria I. An ultrastructural study [J]. **Eur J**

- Protistol.** 1995, **31**(3): 318 – 326.
- [41] Morton S L, Bomber J W. Maximizing okadaic acid content from *Prorocentrum hoffmannianum* Faust [J]. **J Appl Phycol**, 1994, **6**(1): 41 – 44.
- [42] McLachlan J L, Marr J C, Conlon Kelly A. Effects of nitrogen concentration and cold temperature on DSP – toxin concentrations in the dinoflagellate *Prorocentrum lima* (*Prorocentrales*, Dinophyceae) [J]. **Nat Toxins**, 1994, **2**(5): 263 – 270.
- [43] Tomas Carmelo R, Baden Daniel G. The influence of phosphorus source on the growth and cellular toxin content of the benthic dinoflagellate *Prorocentrum lima*. *Developments in Marine Biology* [J]. *Toxic Phytoplankton Blooms in the Sea*, 1993, **3**: 565 – 570.
- [44] Costas E, Aguilera A, González Gil S, *et al.* Contact inhibition: Also a control for cell proliferation in unicellular algae? [J]. **Biol Bull Mar Biol Lab Woods Hole**, 1993, **184**(1): 1 – 5.
- [45] Taroncher – Oldenburg G, Kulis D M, Anderson D M. Toxin variability during the cell cycle of the dinoflagellate *Alexandrium fundyense* [J]. **Limnol Oceanogr**, 1997, **42**: 1 178 – 1 188.
- [46] Orr P T, Jones G J. Relationship between microcystin production and cell division rate in nitrogen – limited microcystis aeruginosa cultures [J]. **Limnol Oceanogr**, 1998, **43**(7): 1 604 – 1 614.
- [47] Pan Y, Cembella A D, Quilliam M A. Cell cycle and toxin production in the benthic dinoflagellate *Prorocentrum lima* [J]. **Mar Biology (Berlin)**, 1999, **134**: 541 – 549.
- [48] Morton S L, Norris D R, Bomber J W. Effect of temperature, salinity and light intensity on the growth and seasonality of toxic dinoflagellates associated with ciguatera [J]. **J Exp Mar Biol Ecol**, 1992, **157**(1): 79 – 90.
- [49] Plumley F G. Marine algal toxins: Biochemistry, genetics and molecular biology [J]. **Limnol Oceanogr**, 1997, **42**(5, part2): 1 252 – 1 264.
- [50] Plumley F G. Purification of an enzyme involved in saxitoxin synthesis [J]. **J Phycol**, 2001, **37**(6): 926 – 928.
- [51] 林永成, 周世林. 海洋微生物及其代谢产物. 北京: 化学工业出版社, 2003
- [52] Winkel – Shirtey B. Evidence for enzyme complexes in the phenylpropanoid and flavonoid pathway [J]. **Physiol Plant**, 1999, **107**: 142 – 149.
- [53] 何水林, 郑金贵, 王晓峰, 等. 植物次生代谢: 功能、调控及其基因工程 [J]. *应用与环境生物学报*, 2002, **8**(5): 558 – 563.
- [54] Taroncher – Oldenburg G, Anderson D M. Identification and characterization of three differentially expressed genes, encoding s – adenosylhomo – cysteine hydrolase, methionine aminopeptidase, and a histone – like protein, in the toxic Dinoflagellate *Alexandrium fundyense* [J]. **Appl Environ Microbiol**, 2 000, **66**(5): 2 105 – 2 112.

(本文编辑:张培新)