

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200480021338.X

G12Q 1/44 (2006.01)
G01N 21/64 (2006.01)
A61K 31/35 (2006.01)
A61P 11/06 (2006.01)
A61P 37/08 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

[43] 公开日 2006年10月25日

[11] 公开号 CN 1852988A

[22] 申请日 2004.7.21

[21] 申请号 200480021338.X

[30] 优先权

[32] 2003.7.25 [33] ES [31] P200301773

[86] 国际申请 PCT/ES2004/000343 2004.7.21

[87] 国际公布 WO2005/012543 西 2005.2.10

[85] 进入国家阶段日期 2006.1.24

[71] 申请人 圣地亚哥德·冈波忒拉大学

地址 西班牙拉科鲁尼亚

[72] 发明人 L·M·博塔纳洛佩斯

A·阿方索兰卡尼奥

M·J·帕索斯古尔德里斯

M·罗德里格斯比埃特斯

M·I·罗萨加西亚

J·M·维埃特斯巴普蒂斯塔德索萨

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 张轶东 刘 玥

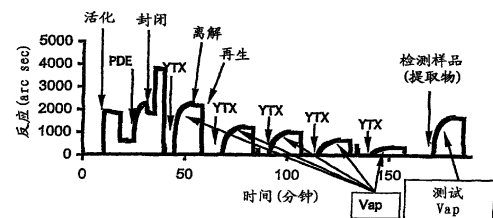
权利要求书 2 页 说明书 11 页 附图 5 页

[54] 发明名称

基于虾夷扇贝毒素对细胞磷酸二酯酶的激活
检测鱼产品中的这种毒素的定量方法以及这
种激活的治疗用途

[57] 摘要

本发明涉及检测鱼产品中虾夷扇贝毒素的定量方法,该方法基于所述毒素对细胞磷酸二酯酶的激活以及这种激活的治疗有效性。虾夷扇贝毒素(YTX)和其类似物的细胞靶是激活磷酸二酯酶(PDEs)。PDEs-YTX结合产生可测量的信号。利用亲和生物传感器或荧光可以对这种结合进行定量。生物传感器能检测生物分子之间的相互作用,并使得可能利用YTX和PDEs的相互作用来确定YTX的存在。平板荧光使得可能确定荧光衍生物邻氨基苯甲酰cAMP的降解速率的变化。当YTX存在时,PDEs降解所述分子的速率增加。YTX抑制大鼠肥大细胞的免疫学激活,而且在人肝癌细胞中能诱导细胞毒性作用,这提供了YTX可作为抗变应性药和抗肿瘤化合物的两种治疗用途。



1. 一种检测鱼产品中虾夷扇贝毒素 (YTXs) 的定量方法, 该方法基于所述毒素对细胞磷酸二酯酶的激活, 以及这种激活的治疗应用; 以及 YTX 和其化学类似物 (YTXs) 对磷酸二酯酶活性的激活作用在检测 YTXs (或具有类似活性的化合物) 的定量方法中的用途, 或者作为以 PDEs 为治疗靶的策略的用途。
5
2. 权利要求 1 所述的检测鱼产品中 YTXs 的方法, 所述方法基于 YTX 对 PDEs 的激活, 其特征在于使用与平面或基质支持表面结合的 PDEs 作为配体的亲和生物传感器, 在所述传感器上加入作为受体起作用的 YTXs, 所述传感器在 20-37°C 的温度范围内通过渐消效应能产生可定量的分子相互作用, 从而调节这种结合为准一级动力学, 从所述动力学特征获得表观 YTX-PDE 结合速率 (Rap)。
10
3. 权利要求 2 所述的方法, 其特征在于确定已知浓度的 YTXs 的表观结合速率并绘制校正线, 在知道鱼产品提取物检测样品的表观结合速率时, 利用校正线可计算出该样品的 YTX 浓度。
15
4. 权利要求 1 所述的检测鱼产品中 YTXs 的方法, 其特征在于利用类似的 cAMP 荧光底物通过 PDE 活性荧光来进行检测, 并利用从已知浓度的 YTX 获得的荧光底物破坏速率制备出的校正线计算出鱼产品样品中的 YTX 浓度。
20
5. 权利要求 4 所述的方法, 其特征在于利用邻氨基苯甲酰 cAMP 作为底物通过 PDE 活性荧光来进行检测。
6. 权利要求 4 所述的方法, 其特征在于确定 YTX 结合 PDEs 时偏振的荧光强度的变化。
7. 权利要求 2、3 或 6 所述的方法, 其用于检测天然或合成的化学化合物中等同于 YTX 的活性 (PDE 激活)。
25
8. 权利要求 7 所述的方法, 其在 HTS (高通量筛选) 方案中利用 PDEs 活性。
9. 权利要求 1 所述的用途, 其为 YTXs 作为抗变应性药或止喘药化合物对肥大细胞的作用的用途。
- 30 10. 权利要求 1 所述的用途, 其为 YTXs 作为抗肿瘤化合物对赘生性细

胞的作用的用途。

基于虾夷扇贝毒素

对细胞磷酸二酯酶的激活检测鱼产品中的

5 这种毒素的定量方法以及这种激活的治疗用途

本发明描述了依据虾夷扇贝毒素 (yessotoxins) 激活其细胞靶之一——磷酸二酯酶的能力来对所述毒素进行的体外检测和定量。它也描述了从虾夷扇贝毒素-磷酸二酯酶结合衍生的治疗应用。

10 海洋藻毒素是藻类产生的, 代表一个严重公共健康问题的物质。这些毒素以一定方式聚集在软体动物和鱼体内, 从而当人摄入软体动物和鱼时它们就会导致食物中毒。依据藻毒素所产生的中毒类型将其分成五大组: 麻痹性毒素 (PSP)、腹泻性毒素 (DSP)、神经毒性毒素 (NSP)、雪卡毒素 (CFP) 和遗忘性毒素 (ASP) (Van Dolah, 2000)。还有一些会产生不同症状且不包含在前述组中的其他藻毒素组, 它们是扇贝毒素 (pectenotoxin) (PTXs)、azaspiracids
15 和虾夷扇贝毒素 (YTXs) (Van Dolah, 2000)。最初 PTXs 和 YTXs 与 DSPs 分在一组, 因为它们都是亲脂性毒素, 经常在中毒事件中共存。但是, 最近十年, 却认为它们是不同的组, 因为它们不会导致腹泻, 口服毒性低, 且分子量也不同 (Draisci, Lucentini 等人, 2000)。在这些最近确定的组中, 虾夷扇贝毒素 (下文称为 YTXs) 代表一个严重的经济问题, 因为它们最近且普遍存在, 而且缺乏检测它们的敏感且特异的方法。
20

在日本、欧洲、新西兰和智利已经检测到了 YTXs, 且它们由网状原角藻 (*Protoceratium reticulatum*) 和 *Lingulodinium polyedrum* (多边膝沟藻 (*Gonyaulax polyedra*)) 甲藻产生。这些毒素聚集在海洋软体动物体内, 且具有热稳定性,
25 因此在烹饪海产品的过程中不会受到破坏。虽然大鼠口服 YTXs 后, 在其肝脏和胰腺内检测到组织病理改变, 但 YTXs 从消化道的吸收低, 因此口服摄入不会中毒 (Terao, Ito 等人, 1990)。然而腹膜内注射这些毒素后则会引起严重的心脏中毒效应, 并显现出高致死性潜能 (Draisci, Lucentini 等人, 2000)。必须考虑这些腹膜内效应, 因为前面已经提到, YTXs 与 DSP 毒素共存, 且当在生物
30 测定中检测后者时, YTXs 可能产生导致检测呈假阳性的干扰。因为这一原因,

当制备鱼产品提取物时，为监测这些毒素的存在，需要用分离 YTXs 和 DSP 毒素的有机溶剂来进行额外的提取。可是这些改良意味着提取出大量的脂肪酸，其也可能产生假阳性（Yasumoto, Murata 等人, 1984）。

海洋产品提取物样品中的藻毒素的检测方法被分为测定方法和分析方法。

- 5 测定方法是那些通过测量包括了样品中所有毒素活性的单一生物或生物化学反应，来提供总毒素含量值的方法。分析方法是那些关于仪器反应对样品中毒素进行分离、鉴定和个体定量的方法。第一种方法包括大鼠或小鼠的体内测定方法，以及体外测定方法，其中必须强调的是酶抑制测定方法、细胞测定方法、受体测定方法等。在这些情形中，用每组中的一种代表性的毒素来获取剂量-反
- 10 应曲线，依据该曲线来确定毒性。其中，可通过比色测定、荧光测定、发光、偏振荧光方法或利用生物传感器实时确定配体-受体的相互作用来对反应进行定量。第二种方法是需要先用每种毒素的已知浓度标准来校准仪器设备的体外测定方法。这些测定包括化学方法，例如高效液相层析（HPLC）、质谱法或毛细管电泳。一般来说，当需要对样品中存在的每一种毒素进行鉴定和定量时，就
- 15 使用仪器化学方法。但是在监控或健康检查项目中，这种潜在的总毒性知识被给予了更大的关联性，因此使用测定方法，也称为功能方法（Fernández, Míguez 等人, 2002）。

- 有几种检测污染的软体动物体内 YTXs 的液相层析-质谱法（Draisci, Palleschi 等人, 1999; Goto, Igarashi 等人, 2001）和荧光 HPLC（Ramstad, Larsen
- 20 等人, 2001; Yasumoto 和 Takizawa, 1997）分析方法。在检测这些毒素的体外功能测定方法中有两种新近的方法：E-钙粘着蛋白检测测定（Pierotti, Malaguti 等人, 2003; Rossini, 2002）和天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶激活测定（Malaguti, Ciminello 等人, 2002）。但是依照 2002 年 3 月 15 日的委员会决定（Commission Decision）2002/225/EEC，官方接受的唯一方法是小鼠生物测定方法。这项决
- 25 定提供的软体动物样品中 YTXs 的最高水平为 1mgYTXs/kg 软体动物肉。生物测定方法在于观察腹膜内接种了提取物的三只小鼠 24 小时，其中提取物相当于 5g 通常会蓄积 YTXs 的软体动物消化腺或 25g 全软体动物。因为腹膜内施用允许的最大量 YTX 在 6 小时内会导致死亡，因此通过缩短观察时间和在该方法中导入另外的提取物对这种测定进行了改良。（Yasumoto, Murata 等人,
- 30 1984）。虽然这些另外的提取物意味着提取出大量的脂肪酸，但它们允许从 YTXs

中分离出 DSP、PTX 和 azaspiracid 毒素。如果三只接种小鼠中的两只死亡，就认为提取物中有 YTX。这种方法意味着要杀死动物，不能提供毒素浓度的准确值，几乎不可重复，会产生假阳性，且为了能与其他毒素的存在相区别需要额外的提取过程。提到的其他检测 YTXs 的生物方法是比较慢的方法，其在少于 24-48 小时的时间里不能获得结果，而且需要仔细的毒素提取过程。更进一步地，因为其他的 DSPs 和这些毒素一起被检测，所以这些方法不是基于 YTXs 的特殊和独特的特性的。

为了确定 YTXs 的细胞靶，并因此进而确定其作用机制，已经进行了几项研究。YTX 具有一个亲脂性分子，该亲脂性分子由通过醚基与不饱和侧链和两个磺酸酯结合的十一个环组成。图 1 中显示了一些侧链取代基不同的 YTXs 天然类似物，虽然最近已经描述了超过 50 种天然衍生物，但还没有鉴定出它们的结构。在体外对 YTX 的研究中已经观察到 YTX 能产生凋亡，但其潜能比一种通常和 YTX 相关联的 DSP 毒素——甲基软海绵酸的潜能低 (Leira, Alvarez 等人, 2001); 而且与甲基软海绵酸相反, YTX 不抑制细胞磷酸酶 (Draisci, Lucentini 等人, 2000)。因为 YTX 能抑制人肝细胞癌细胞 (HEP-G2) 的生长, 所以其具有细胞毒性效应, 并因此可以用作抗肿瘤药物。也有人描述 YTX 会改变淋巴细胞的胞质钙水平 (De la Rosa, L.A., Alfonso, A.等人., 2001), 并增加这些细胞中 maitotoxin 诱导的钙流动 (De la Rosa, L.A, Alfonso, A.等人, 2001)。最近也观察到 YTX 能通过激活破坏 cAMP 的细胞磷酸二酯酶 (PDEs) 来降低环腺苷酸 (cAMP) 第二信使的细胞内水平, 这表明磷酸二酯酶可能是 YTXs 的细胞靶之一 (Alfonso, de la Rosa A.等人, 2003)。另一方面, 已经观察到 YTX 是大鼠肥大细胞中由免疫学刺激激活的组胺释放抑制剂, 且因此可将其用作抗变应性药或止喘药。

在哺乳动物细胞中大约有含有不同同工型的 11 个家族的 PDE (Houslay 和 Adams, 2003)。这些酶能够调节并维持 cAMP 和环鸟苷酸 (cGMP) 的水平稳定, cGMP 是参与多种生命机能的细胞发挥其功能所必需的第二信使 (Soderling 和 Beavo, 2000)。从制药观点来说, 这些酶家族是非常重要的, 因为它们调节涉及到治疗疾病, 例如哮喘、类风湿关节炎和癌症 (Houslay 和 Adams, 2003)。因为这个原因, 对影响 PDEs 的天然或合成分子的描述, 以及可用于 HTS (高通量筛选) 方案的研究这些分子活性的方法, 是发现对这些疾病的新治疗方法

的非常重要的工具。从这一点上来说，描述 YTXs 对肿瘤细胞生长的抑制效应和其对组胺释放的调节是这些分子对于其可能的治疗应用的药理学重要性的两个指征。

利用最近对 YTX 作用机制的描述，本发明开发了一种基于这些毒素对细胞 PDEs 的特异性亲和力，来检测鱼产品提取物中这些毒素的方法。这些方法是功能测定方法，在这些方法中，存在的其他作用机制不同的毒素时不会产生干扰，也就是说，这些其他毒素不对 PDEs 产生作用，但它们与 YTX 在中毒事件中并存。更进一步地，这种方法避免了假阳性和杀死动物，且因为在 1-2 小时内就能获得准确的毒素浓度，所以加快了所述产品的污染监控进程。

基于 YTX 是 PDE 激活剂并能将这种激活转化成可测量信号的发现，本发明描述了三种用途。

用途 1：利用亲和传感器确定 PDE-YTX 生物分子结合的方法

利用生物传感器实时确定分子间的相互作用是一种新技术，其应用正延伸到不同的研究领域 (Hide, Tsutsui 等人, 2002; Lee, Mozsolits 等人, 2001; Mariotti, Minunni 等人, 2002; Tsoi 和 Yang, 2002)。使用的生物传感器是检测被称为配体的生物活性分子，与另一种和它结合的被作为受体的分子之间的分子反应的设备。配体与这种设备的支持表面结合，所述设备通常为杯或板。在发生结合的支持表面上生成对质量变化非常灵敏的电磁场，也称为渐消场 (evanescent field)。生物传感器能将由配体-受体结合导致的支持表面上的质量变化转换成电信号。可用于本发明的商业生物传感器是那些由 Biacore 或 Thermo Labsystems 公司在市场上销售的传感器。在本发明中，将作为配体起作用的 PDEs 和作为受体起作用的含有 YTX 的样品加在一起。依赖于附着到 PDEs 上的毒素的量，并因此也依赖于样品中存在的 YTX，生物传感器的信号将变得更大或更小。

作为配体起作用的细胞 PDEs 与支持表面结合。接下来将已知浓度的作为受体起作用的 YTX 加入到这个表面上。利用平面表面或基质形成的表面能很好地实施这一技术。PDE-YTX 结合遵循调节为准一级方程的动力学，从所述方程可获得被称为表观结合速率 (Rap) 的常数，且毒素的每个浓度的 Rap 不同。利用 Rap 和毒素浓度数据画出了校正线。将检测样品 (鱼产品的提取物) 加入到表面上，计算出该样品的 Rap，将这个 Rap 值放到校正线上就可获得检测样品中的 YTX 浓度。

发明的实施方案

在 22-37°C 的温度下实施该方法。

- a. 将 pH 值为 7.7, 浓度为 0.1-0.24mg/ml 的 PDEs 溶液加入到活化的二室表面。通过不可离解的共价键将这些酶结合到支持表面上。接着用不同的封闭溶液 (BSA、Etanolamine、Tris-HCl...) 封闭没有结合 PDEs 的活性基团。
- b. 将已知浓度的含有 YTX 的溶液加入到一室中。另一室中用作空白, 并向其中加入毒素溶剂。记录 PDE 和 YTX 的结合动力学 15 分钟。
- c. 用 pH 值为 7.7 的缓冲溶液洗涤二室来实施配体受体的离解, 从而从 PDEs 上离解 YTX。
- d. 为了彻底去除 YTX, 用酸或碱溶液来再生所述室。这样 PDEs 将容易接近新加入的 YTX。
- e. 使用 5 中不同浓度的 YTX, 重复步骤 b、c 和 d。
- f. 从每一种浓度的毒素的结合动力学来获得表观结合速率 (Rap)。作出的 Rap 值对 YTX 浓度的图遵循回归系数大于 0.9 的线性拟合。因此可获得一条线, 当知道一个样品的 Rap 时, 利用这条线就能够确定所述样品中 YTX 的浓度。
- g. 对待研究的鱼产品的肉进行提取。依据 2002 年 3 月 15 日的决定 2002/225/EEC 或任何其他官方方法 (D.O.G.A, 1986) 中确定的最高水平和不同鱼产品中某种海洋毒素的分析方法来实施提取。取等分试样的提取物 (检测样品), 并将其加入到结合在表面上的 PDE 上。获取结合动力学, 并据此计算出 Rap。将检测的 Rap 值放在获得的回归线上, 就能够确定样品中 YTX 的浓度。

图 2 显示这种方法中所使用的步骤的曲线图, 所述步骤从表面活化到加入检测样品。图 3 显示了 Rap 值对已知 YTX 浓度的回归线。

用途 2: 利用荧光分子确定 YTX 激活 PDE 的方法

- 检测细胞 PDE 活性的常规方法是观察它们破坏 cAMP 的能力。有一种 cAMP 荧光衍生物——邻氨基苯甲酰 cAMP (激发波长: 350nm, 发射波长: 445nm), 当它降解时, 其荧光下降。荧光随时间推移的下降可表现为 cAMP 的破坏速率。在 PDEs 存在时, 破坏速率增加, 而且如果这些酶被活化, 则降解速率将会更高。在本发明中确定了 PDEs 存在时荧光指示剂邻氨基苯甲酰

cAMP 的降解速率，也研究了在加入含有 YTX 的样品时，所述降解速率的变化。用为读取微量滴定板而准备的荧光计读出所述荧光。确定几种已知浓度的 YTX 存在时的破坏速率。破坏速率对毒素浓度的图遵循回归系数大于 0.9 的线性拟合。因此可获得一条回归线，在这条线中可将从鱼产品样品（检测样品）

5 中获得的破坏速率值转换成 YTX 浓度。

发明的实施方案

在 22-37°C 的温度下，在微量滴定板中实施该方法，且在 360nm 的激发波长和 460nm 的发射波长处测量荧光。

有四种类型的孔，且每一种孔都重复实验 2 次。

10 A 孔：用来计算 cAMP 浓度的孔。往其中加入 5 个浓度的邻氨基苯甲酰 cAMP（荧光指示剂），浓度范围为 2-10 μ M。

B 孔：含有 8 μ M 荧光指示剂和酶的对照孔。

C 孔：含有 8 μ M 荧光指示剂、酶和已知浓度 YTX 的校正孔。

D 孔：含有 8 μ M 荧光指示剂、酶和任何鱼产品提取物样品的检测样品孔。

15 a. 在所有孔中加入检测缓冲液（10mM Tris HCl+1 mM CaCl₂, pH7.4）使最终的温育体积为 100 μ L。依据孔的类型加入相应量的邻氨基苯甲酰 cAMP。第一次读数 2 分钟。

b. 在 B 孔、C 孔和 D 孔中加入 2-5 μ g 的 PDEs，并再一次读数 2 分钟。

c. 在 C 孔和 D 孔中加入已知浓度 YTX 或从鱼产品中获得的样品。加入的 YTX 浓度范围为 0.1-10 μ M。依据 2002 年 3 月 15 日的决定 2002/225/EEC 或任何其他官方方法（D.O.G.A, 1986）中确定的最高水平和不同鱼产品中某种海洋毒素的分析方法来获得提取物样品。

20

d. 加入这些物质后，振荡所述板，进行 15 分钟的连续荧光测量，从而获取每分钟的数据。

25 e. 用从 A 孔中获得的荧光数据对每一孔中的指示剂浓度作图，可获得回归系数大于 0.999 的线。

f. 利用前面在邻氨基苯甲酰 cAMP 浓度方面的线将从其他孔中获得的在邻氨基苯甲酰 cAMP 浓度的荧光数据进行转换。从毒素加入时，即零时间的 cAMP 浓度和 10 分钟后的浓度可获得每单位时间被破坏的指示剂的量，也就是 AMPc 的破坏速率。

30

g. 将 B 孔获得的破坏速率数据视为对照破坏速率。

h. 将从 C 孔中获得的破坏速率对 YTX 浓度作图可获得 YTX 浓度标准线。在这条线上用从 D 孔中获得的破坏速率进行替换可确定所述样品中的 YTX。

图 4 代表针对邻氨基苯甲酰 cAMP 浓度的荧光单位校正线。图 5 代表用于标准测定方法的 cAMP 破坏速率对 YTX 浓度的标准线。

用途 3: 利用磷酸二酯酶作为 YTX 的治疗靶以及诱导激活磷酸二酯酶的化合物。

a.1. YTX 作为肥大细胞和嗜碱性粒细胞的免疫学激活抑制剂的用途。

肥大细胞和嗜碱性粒细胞的免疫学激活需要临时增加 cAMP。这种增加对细胞反应激活是必不可少的 (Botana 和 MacGlashan, 1994)。PDE 激活消除了这种开始的 cAMP 峰, 并因此能防止细胞激活。在 YTX 存在时, 也就是激活的 PDEs 存在时, 细胞反应将被抑制。所述抑制效应可用于抗变应性药或哮喘药治疗策略中, 所述变态反应和哮喘是肥大细胞起主要作用的两种病理状态 (Metcalf, Baram, D.等人, 1997)。此处的用途描述了 YTX 对细胞激活的抑制的定量, 所述细胞激活由在大鼠体内肥大细胞的免疫学刺激所诱导。可参照文献中描述的不同方案来确定细胞反应抑制。下面列出一种方案, 在该方案中依据大鼠肥大细胞释放到细胞外基质中的组胺来对反应进行定量 (Alfonso, Cabado, A.G.等人, 2000; Estévez, Vieytes 等人, 1994)。

发明的实施方案

a. 在进行实验前 15 天致敏大鼠。将每只大鼠皮下注射含有 150mg 卵清蛋白和 10^9 个百日咳博德特氏菌 (*Bordetella pertussis*) 的 1ml 生理血清。

b. 从致敏大鼠的胸和腹提取肥大细胞。将获得的两种群体混合得到细胞悬浮液。

c. 将细胞悬浮液与各种浓度的 YTX 一起预温育 10 分钟, 接着在 5mg/ml 的卵清蛋白存在时温育 10 分钟。

d. 在低温条件下终止反应, 并通过离心从细胞中残留的组胺中分离出释放的组胺。

e. 移去含有释放到培养基中的组胺的上清液, 并用盐酸和超声波切割细胞以使其释放对刺激作用不敏感的组胺。

f. 用三氯乙酸去除两种培养基中的蛋白。

g. 最后对组胺进行定量，从而通过在含有邻苯二醛 (o-phthalic dialdehyde) 的基础培养基中反应，将其转换成荧光分子。用盐酸终止反应，并在 360nm 激发处和 460nm 的发射处读出荧光。

图 6 显示几种浓度的 YTX 存在时，卵清蛋白诱导的组胺释放被抑制的百分比。

a.2. YTX 作为增生性细胞增殖抑制剂的用途。

增生性细胞生长抑制是一个描述抗肿瘤活性的指标，广泛用于描述新药物的抗肿瘤特性。已经发现 YTX 对人肝细胞癌细胞具有细胞毒性，更进一步地，也已经描述这种毒素在成神经细胞瘤细胞中能诱导细胞凋亡（程序性细胞死亡）(Leira, Alvarez 等人, 2001)，这些都表明 YTX 容易被用作抗肿瘤药物。在此项用途中定量分析了 YTX 作为肝癌肿瘤细胞的细胞毒性药物的能力。可参照文献中描述的不同方案来确定细胞的生长抑制。下面列出这些方案中的一种，在该方案中通过结晶紫染色和接下来的乙酰化作用在 HEP-G2 细胞系中对反应进行定量。

发明的实施方案

- a. 在微量滴定板上以 10000 个细胞/孔的密度接种 HEP-G2 细胞。用生长培养基在 37°C 和 5%CO₂ 的条件下温育细胞 24 小时。
- b. 加入不同浓度的 YTX，在 37°C 和 5%CO₂ 的条件下温育 48 小时。
- c. 加入 10μL 11%的戊二醛以固定细胞，并将其温育 15 分钟。用蒸馏水洗涤 3-4 次。
- d. 加入 0.1%的结晶紫溶液，并振荡所述板 15 分钟。
- e. 通过用蒸馏水洗涤去除染料，接着进行干燥。
- f. 加入 10%的乙酸，并维持振荡 15 分钟。
- g. 在 595 纳米处用分光光度计读出吸光度。
- h. 用这种方案发现 10μM 的 YTX 可以诱导大约 82+/-1%的细胞生长抑制。

文献

Alfonso, A., Cabado, A. G., Vieytes, M. R. and Botana, L. M. (2000). "Calcium-pH crosstalks in rat mast cells: cytosolic alkalinization, but not intracellular calcium release, is a sufficient signal for degranulation." *Br J Pharmacol* **130**(8): 1809-1816.

Alfonso, A., de la Rosa, L. A., Vieytes, M. R., Yasumoto, T. and Botana, L. M. (2003). "Yessotoxin a novel phycotoxin, activates phosphodiesterase activity. Effect of yessotoxin on cAMP levels in human lymphocytes." *Biochem Pharmacol* **65**: 193-208.

Botana, L. M. and MacGlashan, D. W. (1994). "Differential effects of cAMP-elevating drugs on stimulus-induced cytosolic calcium changes in human basophils." *J Leukocyte Biol* **55**(6): 798-804.

D.O.G.A. (1986). "Diario oficial de Galicia".

De la Rosa, L. A., Alfonso, A., Vilariño, N., Vieytes, M. R. and Botana, L. M. (2001). "Modulation of cytosolic calcium levels of human lymphocytes by yessotoxin, a novel marine phycotoxin." *Biochem. Pharmacol.* **61**(7): 827-833.

De la Rosa, L. A., Alfonso, A., Vilariño, N., Vieytes, M. R., Yasumoto, T. and Botana, L. M. (2001). "Maitotoxin-induced calcium entry in human lymphocytes - Modulation by yessotoxin, Ca²⁺ channel blockers and kinases." *Cell Signal* **13**(10): 711-716.

Draisci, R., Lucentini, L. and Mascioni, A. (2000). Enteric toxic episodes. Pectenotoxins and yessotoxins: chemistry, toxicology, pharmacology and analysis. Seafood and freshwater toxins: pharmacology, physiology and detection. Botana, L. M. New York, Marcel Dekker: 289-324.

Draisci, R., Palleschi, L., Giannetti, L., Lucentini, L., James, K. J., Bishop, A. G., Satake, M. and Yasumoto, T. (1999). "New approach to the direct detection of known and new diarrhoeic shellfish toxins in mussels and phytoplankton by liquid chromatography-mass spectrometry." *J Chromatogr A* **847**(1-2): 213-221.

Estévez, M. D., Vieytes, M. R., Louzao, M. C. and Botana, L. M. (1994). "Effect of okadaic acid on immunologic and non-immunologic histamine release in rat mast cells." *Biochem Pharmacol* **47**(3): 591-593.

Fernández, M. L., Míguez, A., Cacho, E., Martínez, A., Diogéne, J. and Yasumoto, T. (2002). Bioensayos con mamíferos y ensayos bioquímicos y celulares para la detección de phycotoxins. Floraciones algales nocivas en el cono sur americano. Sar, E. A., Ferrario, M. E. and Reguera, M. Madrid, UNESCO y Ministerio de Ciencia y Tecnología.

Goto, H., Igarashi, T., Yamamoto, M., Yasuda, M., Sekiguchi, R., Watai, M., Tanno, K. and Yasumoto, T. (2001). "Quantitative determination of marine toxins associated with diarrhetic shellfish poisoning by liquid chromatography coupled with mass spectrometry." *J Chromatogr A* **907**(1-2): 181-189.

Hide, M., Tsutsui, T., Sato, H., Nishimura, T., Morimoto, K., Yamamoto, S. and Yoshizato, K. (2002). "Real-time analysis of ligand-induced cell surface and

intracellular reactions of living mast cells using a surface plasmon resonance-based biosensor." *Anal Biochem* **302**(1): 28-37.

Houslay, M. D. and Adams, D. R. (2003). "PDE4 cAMP phosphodiesterases: modular enzymes that orchestrate signalling cross-talk, desensitization and compartmentalization." *Biochem J.* **370**: 1-18.

Lee, T. H., Mozsolits, H. and Aguilar, M. I. (2001). "Measurement of the affinity of melittin for zwitterionic and anionic membranes using immobilized lipid biosensors." *J Pept Res* **58**(6): 464-476.

Leira, F., Alvarez, C., Vieites, J. M., Vieytes, M. R. and Botana, L. M. (2001). "Okadaic acid and yessotoxin induce caspase-3 mediated apoptosis in neuroblastoma cells. Characterization of distinct apoptotic changes induced by these phycotoxins in the BE(2)-M17 cell line by means of new fluorimetric microplate assays." *Toxicology in vitro* **15**: 277-283.

Malaguti, C., Ciminello, P., Fattorusso, E. and Rossini, G. P. (2002). "Caspase activation and death induced by yessotoxin in HeLa cells." *Toxicol in Vitro* **16**(4): 357-363.

Mariotti, E., Minunni, M. and Mascini, M. (2002). "Surface plasmon resonance biosensor for genetically modified organisms detection." *Anal Chim Acta* **453**(2): 165-172.

Metcalf, D. D., Baram, D. and Mekori, Y. A. (1997). "Mast cells." *Physiol Rev* **77**(4): 1033-1079.

Pierotti, S., Malaguti, C., Milandri, A., Poletti, R. and Rossini, P. (2003). "Functional assay to measure yessotoxins in contaminated mussel samples." *Anal Biochem* **312**(2): 208-216.

Ramstad, H., Larsen, S. and Aune, T. (2001). "Repeatability and validity of a fluorimetric HPLC method in the quantification of yessotoxin in blue mussels (*Mytilus edulis*) related to the mouse bioassay." *Toxicon* **39**(9): 1393-1397.

Rossini, G. P. (2002). Process for measurement of dinophysistoxin and of yessotoxin. WO 02/03060 A2. International Application published under the patent cooperation treaty.

Soderling, S. H. and Beavo, J. A. (2000). "Regulation of cAMP and cGMP signaling: new phosphodiesterases and new functions." *Curr. Opin. Cell. Biol.* **12**(174-179).

Terao, K., Ito, E., Oarada, M., Murata, M. and Yasumoto, T. (1990). "Histopathological studies on experimental marine toxin poisoning--5. The effects in

mice of yessotoxin isolated from *Patinopecten yessoensis* and of a desulfated derivative." *Toxicon* **28**: 1095-1104.

Tsoi, P. Y. and Yang, M. S. (2002). "Kinetic study of various binding modes between human DNA polymerase beta and different DNA substrates by surface-plasmon-resonance biosensor." *Biochem J* **361**(2): 317-325.

Van Dolah, F. M. (2000). Diversity of marine and freshwater algal toxins. *Seafood and freshwater toxins: pharmacology, physiology and detection*. Botana, L. M. New York, Marcel Dekker: 19-44.

Yasumoto, T., Murata, M., Oshima, Y., Matsumoto, G. K. and Glardy, J. (1984). Diarrhetic shellfish poisoning. ACS Symp. Series. No 262. *Seafood toxins*. Ragelis, E. P. Washington, D.C., American Chemical Society: 207-214.

Yasumoto, T. and Takizawa, A. (1997). "Fluorometric measurement of yessotoxins in shellfish by high-pressure liquid chromatography." *Biosci Biotechnol Biochem* **61**(10): 1775-1777.

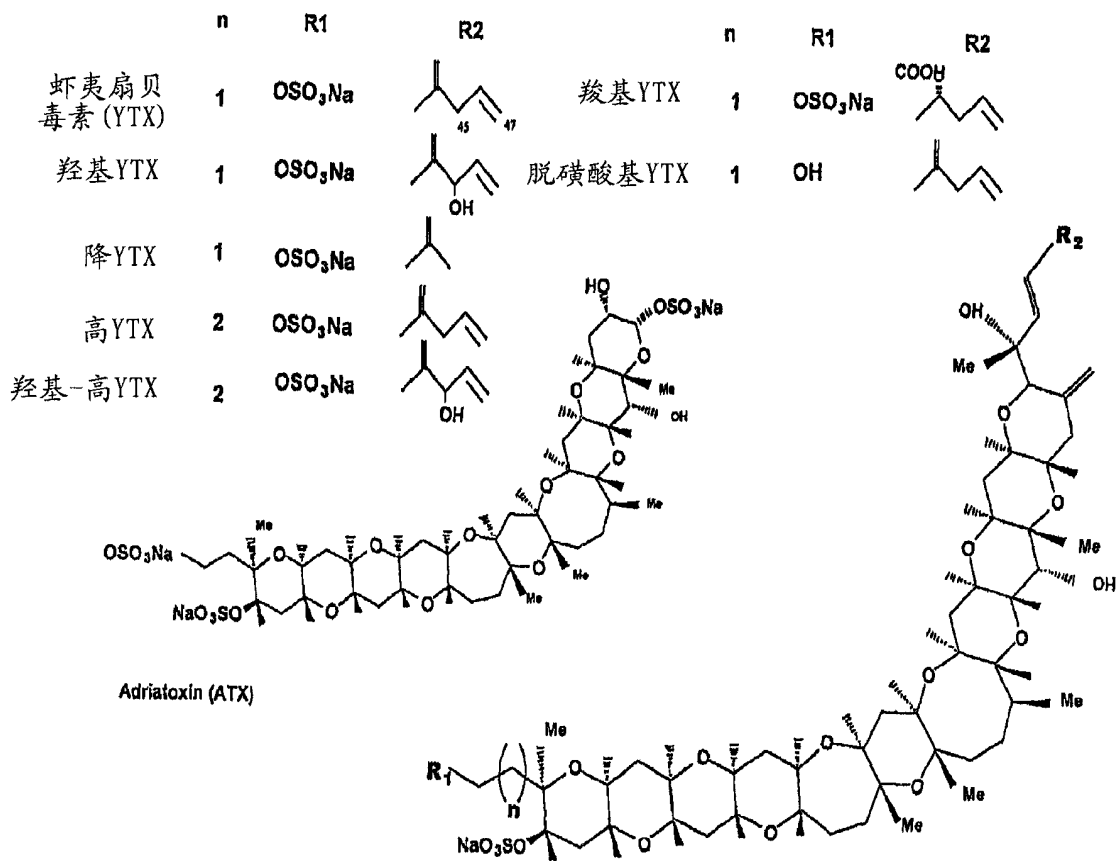


图 1

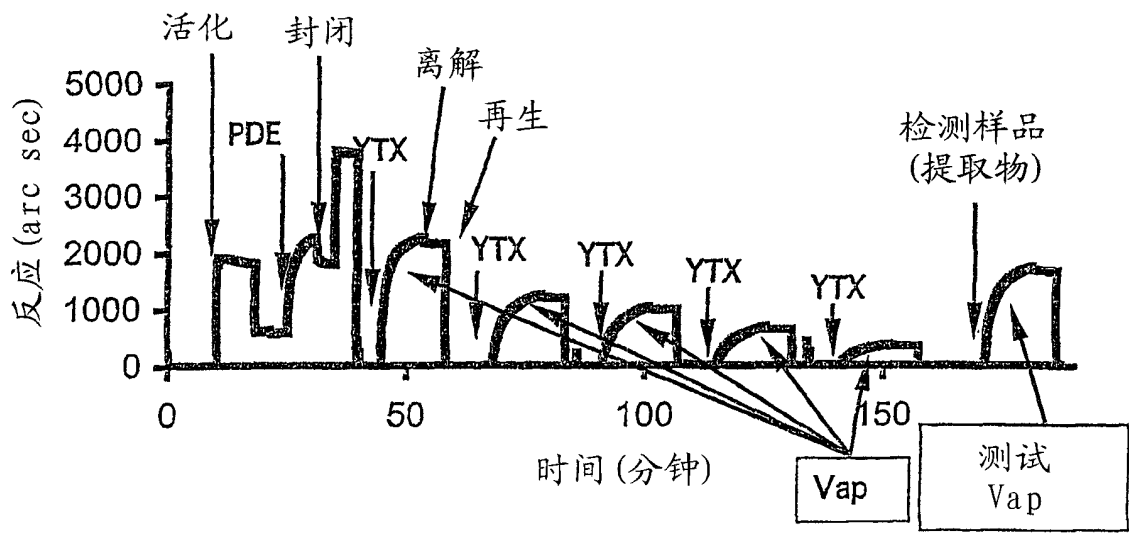


图 2

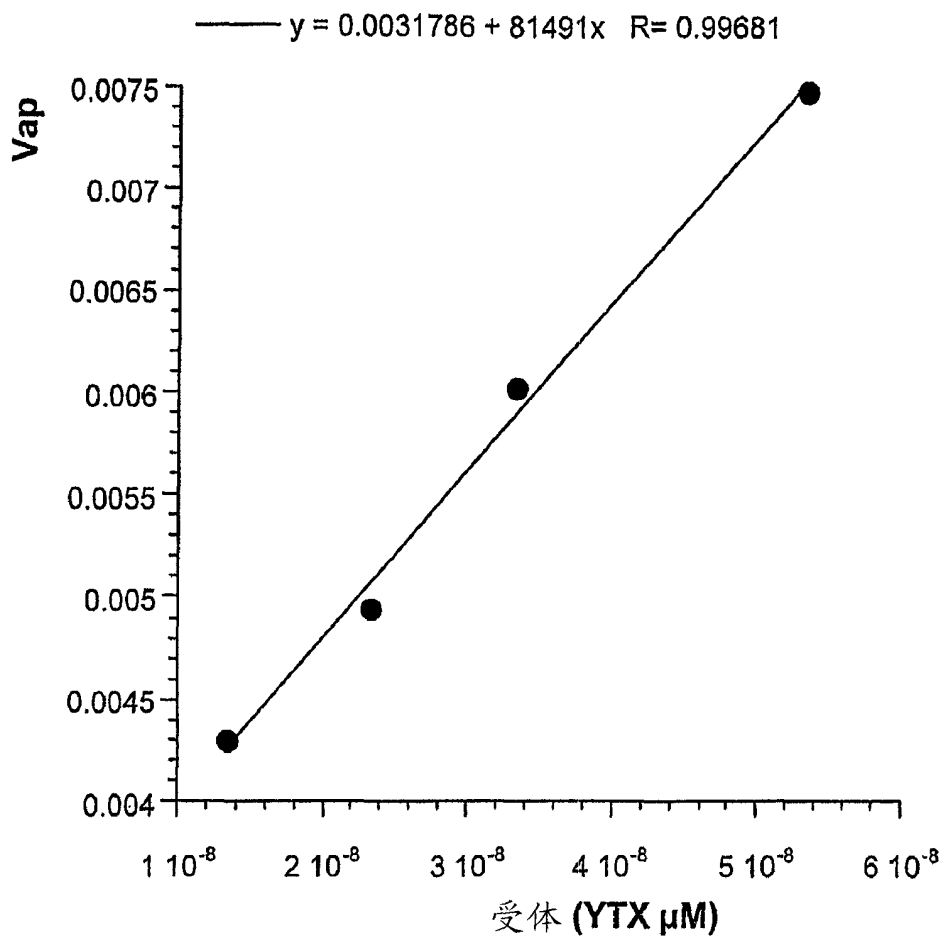


图 3

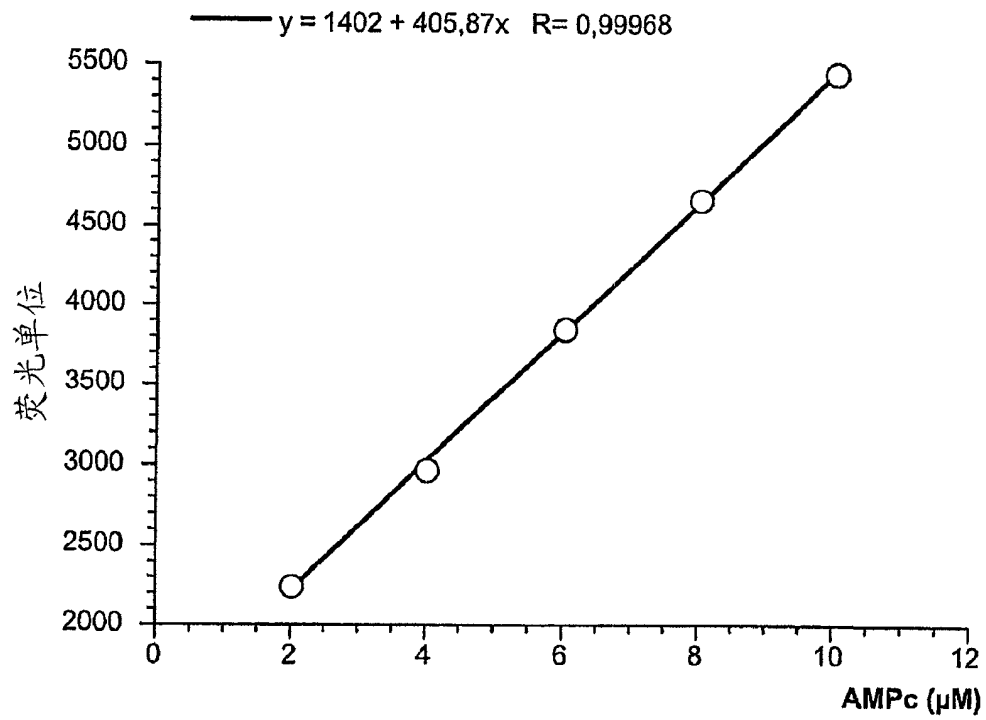


图 4

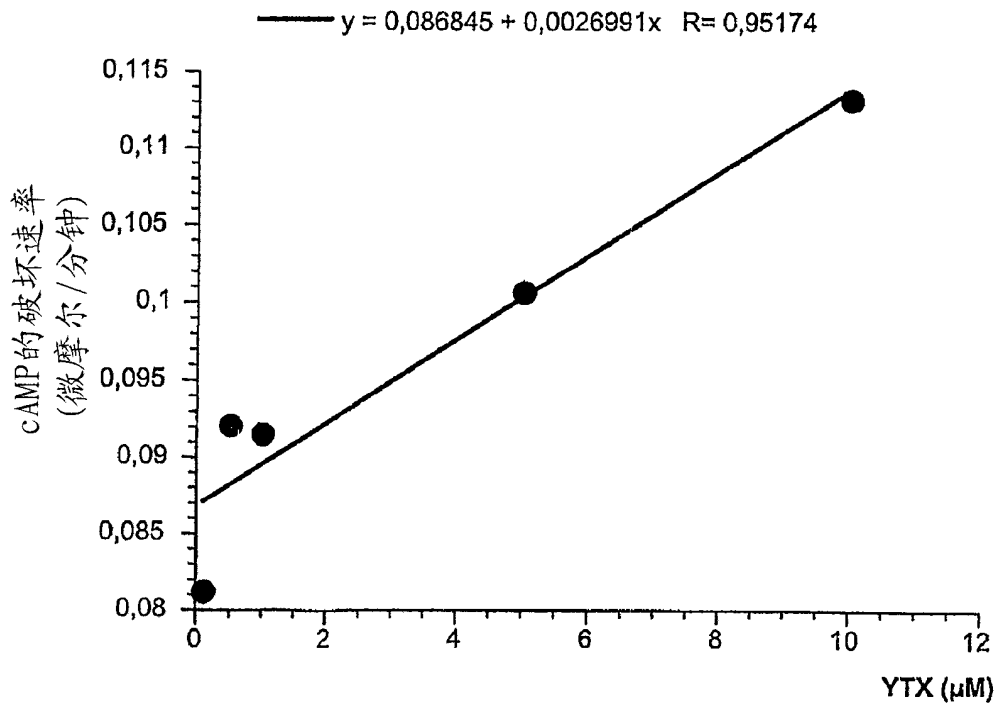


图 5

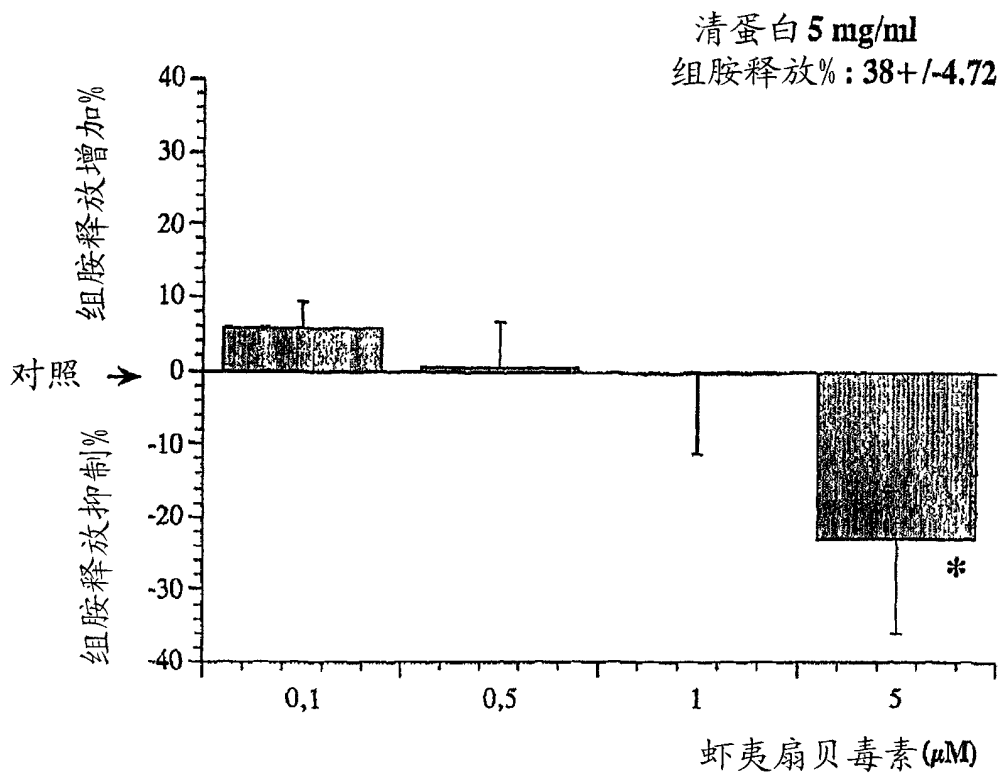


图 6