

DOI: 10.13376/j.cbls/2017052

文章编号: 1004-0374(2017)04-0393-07

毒黄素的合成、分离及其检测技术研究进展

翁晨辉^{1,2}, 李红艳², 陈小珍^{1,2*}, 黄海智²

(1 浙江工业大学化学工程学院, 杭州 310014; 2 浙江省质量检测科学研究院, 杭州 310013)

摘要: 毒黄素是一种小分子脂肪酸类外毒素, 存在于酵米面、变质银耳等被假单胞菌污染的食物中。毒黄素具有抑菌、杀菌、抗病毒、抗肿瘤性等潜在性能, 在抗菌剂和抗肿瘤剂开发上具有较高的商业价值。现就毒黄素的合成(化学合成法和生物合成法)、分离(薄层色谱法、重结晶法)及检测方法(分光光度法、高效液相色谱法、质谱法、生物传感测定法)等方面的最新研究进展作简要评述, 对开展毒黄素的合成及分离检测等相关研究具有重要意义。

关键词: 毒黄素; 合成; 分离; 检测

中图分类号: R379 **文献标志码:** A

Advances in the synthesis, separation and detection technology of toxoflavin

WENG Chen-Hui^{1,2}, LI Hong-Yan², CHEN Xiao-Zhen^{1,2*}, HUANG Hai-Zhi²

(1 College of Chemical Engineering, Zhejiang University of Technology, Hangzhou 310014, China;

2 Zhejiang Institute of Quality Inspection, Hangzhou 310013, China)

Abstract: Toxoflavin is an aliphatic acid exotoxin with small molecular mass found in *Pseudomonas* contaminated food such as yeast rice, white fungus and so forth. Toxoflavin has high commercial values as antibacterial and anti-tumor agent drugs due to its antibacterial, bactericidal, anti-viral and anti-tumor potential activities. In this paper, brief review about toxoflavin has been made in recent progress on its synthesis (chemosynthesis and biosynthesis), separation (TLC and recrystallization) and detection, including the methods of spectrophotometry, HPLC, MS and biosensor, which is significant to related researches.

Key words: toxoflavin; synthesis; separation; detection

毒黄素是由椰毒假单胞菌、荚壳伯克霍尔德氏菌、水稻细菌性谷枯病菌、唐菖蒲伯克霍尔德氏菌等菌种^[1]产生的小分子脂肪酸类外毒素^[2], 分子式为C₇H₇N₅O₂, 摩尔质量为193.21 g/mol, 结构式如图1所示。毒黄素具有抑菌和杀菌等功能^[3-7], 其强抗菌性可能源于其抑制呼吸链并产生过氧化物^[8-9]。多项动物实验研究表明, 毒黄素具有抗肿瘤作用^[6], 如对肺癌细胞、卵巢癌细胞及胃癌细胞等多种癌症细胞存在抑制作用^[10-14]。因此, 毒黄素作为新兴抗生素和抗肿瘤剂药物在细胞凋亡方面的研究具有很高的研究价值^[15]。除此之外, 基于毒黄素的选择性培养基分离禾谷镰刀菌的方法还可用于遗传学和疾病预测^[16], 对细胞生物学、毒理学和病理生物学研究等具有重要的意义。

毒黄素可对动物血管平滑肌^[17]、肾脏^[18]、肺脏、心脏^[19]等器官造成病理性损害。食用被椰毒假单胞菌污染的食物易发生食物中毒^[20], 症状较轻者将出现胃腹部不适, 重者将出现肝肾损伤及中毒性休克等症, 造成人体呼吸系统和循环系统的损害^[21-22]。毒理学研究表明, 静脉注射毒黄素的LD₅₀为1.7 mg/kg, 口服为8.39 mg/kg^[23-24]。

田凤丽等^[25]曾对毒黄素的化学提取分离、中毒机制及生理生化活性等方面的研究进行了简要综述, 但关于毒黄素的合成和定性定量检测分析等方面的

收稿日期: 2016-08-04; 修回日期: 2016-09-22

基金项目: 浙江省科技计划项目(2016C37072)

*通信作者: E-mail: cxz730@163.com

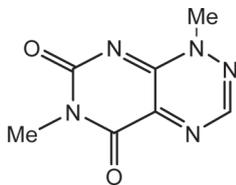


图1 毒黄素结构式

概述还未见研究报道。毒黄素作为一种食品污染中常见的细菌性毒素，其细胞生物学和病理生物学等方面的研究前景广阔，开展毒黄素分离检测技术及合成等相关研究具有重要意义。本文对国内外毒黄素的合成、分离及检测方法等方面的研究进行综述，为开发毒黄素类抗菌剂和抗肿瘤剂药物及开展毒黄素定性定量检测等方面的相关研究提供理论依据。

1 毒黄素的合成

1.1 化学合成

毒黄素及其衍生物潜在的抗菌、抗癌作用，对开展相关药物的研究具有良好的研究前景和商业价值。化学合成毒黄素具有合成周期短、简便、成本低等优点，可用于大批量生产，具体合成方法如下所述。

1.1.1 催化还原法

Daves 等^[26]以 2- 硫代巴比妥酸为原料，经过甲基化、氯化、水解、硝化、催化还原、回流等步骤合成毒黄素，合成效率约为 28%。该方法步骤复杂，耗时较长。Black^[27]以 6- 羟基-3- 甲硫基-4-(3H)- 嘧啶酮为原料合成毒黄素，该方法与先前的合成方法相比具有更好的收率，产物产量可达 41%。

1.1.2 环化嘧啶环法

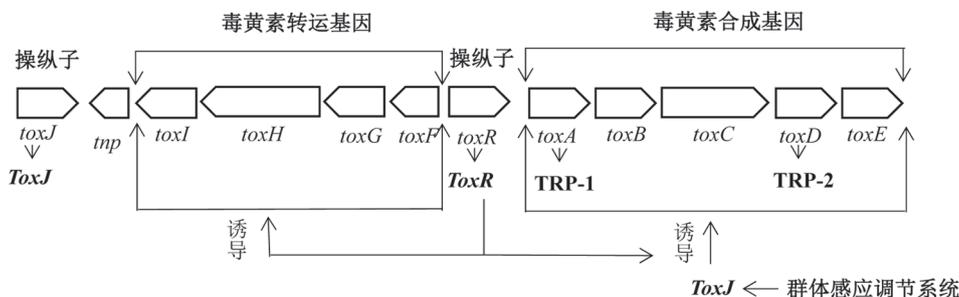
环化嘧啶环是一种新型、简便的合成方法，通过延长 3- 甲基-6-(1'- 甲基胍基) 尿嘧啶硝化环合成毒黄素，产率可达 35%^[28-29]。Mao 等^[6]以甲基脛、丙二酸和乙酸酐为原料，经过氯化、凝结、重氮化

等步骤合成毒黄素，合成效率为 14.2%，纯度为 98.6%，该方法新颖、温和、实用，但收益率低。利用微波辅助合成毒黄素，可有效节约反应时间，避免使用金属盐^[30]。

1.2 生物合成

化学合成步骤复杂，所需有机试剂较多，具有副产物多、污染环境等缺点；而生物合成具有污染小、反应条件温和等优点，研究毒黄素的生物合成对其毒性机理及其分子生物学研究有重要作用^[31]。产生毒黄素的基因可分为两类，分别是合成基因和转运基因，如图 2 所示。其中，合成基因包括 *toxA*、*toxB*、*toxG*、*toxH* 和 *toxI*，转运基因包括 *toxR*、*toxS*、*toxT* 和 *toxU*。从 *toxA* 上游基因中可分离出作为 LysR 型转录调节器的 *toxR*，该基因辅助诱导合成和转录基因操纵子的表达。另外，合成基因和转运基因的操纵子需由转录激活因子 *ToxJ* 激活，而这些基因的操纵子全都由 TofI-TofR 群体感应调节系统 (QS) 控制，该系统可编码产生 N- 辛酰基高丝氨酸内酯 (C8-HSL) 和 N- 己酰基高丝氨酸内酯 (C6-HSL) 及其同源受体，在毒黄素合成过程中起着重要作用^[32-36]。Lee 等^[33]认为 TofI 和 TofR 之间的基因区域存在独立突变体 TofM，它对毒黄素的产生起着积极的调节作用，若失去 TofIMR，毒黄素系统将会失活，补充 TofIMR 后可恢复毒黄素的生物合成。TRP-1 和 TRP-2 是与毒黄素合成相关的两个蛋白质，其中 *toxA* 编码具有甲基转移酶特点的 TRP-1，*toxI* 编码 TRP-2^[37]。

将假单胞菌接种在经高温灭菌的培养基中^[38-39]，加入同位素标记物，接种后 12~20 h，毒黄素的积累速度呈线性增加，随后毒黄素的产率下降，毒黄素的增加不仅是因为细胞悬浮液中的嘌呤，也可能是因为标记特定碳原子的嘌呤碱基参与了它的合成。同位素标记实验表明，毒黄素嘧啶部分来自于环状嘌呤衍生物 (黄嘌呤)，N- 甲基取代基来自于

图2 基因组成图^[32,37]

甲硫氨酸甲基基团, 嘌呤前体的咪唑部分 (C8) 插入氨基甲基甘氨酸后形成毒黄素三嗪环。Suzuki 等^[37] 根据核黄素合成途径推断出毒黄素的生物合成应包含 5 个酶促反应, 如图 3A 所示。有研究者

提出毒黄素的产生虽然与核黄素相似, 但他们推断产物并不是以 5,6-氨基尿嘧啶 (物质 4) 为基础, 而应是 5-氨基-6-(5-磷酸-核糖醇氨基)尿嘧啶或其脱磷酸产物^[5], 见图 3B。toxB 和 toxE 与核黄素的

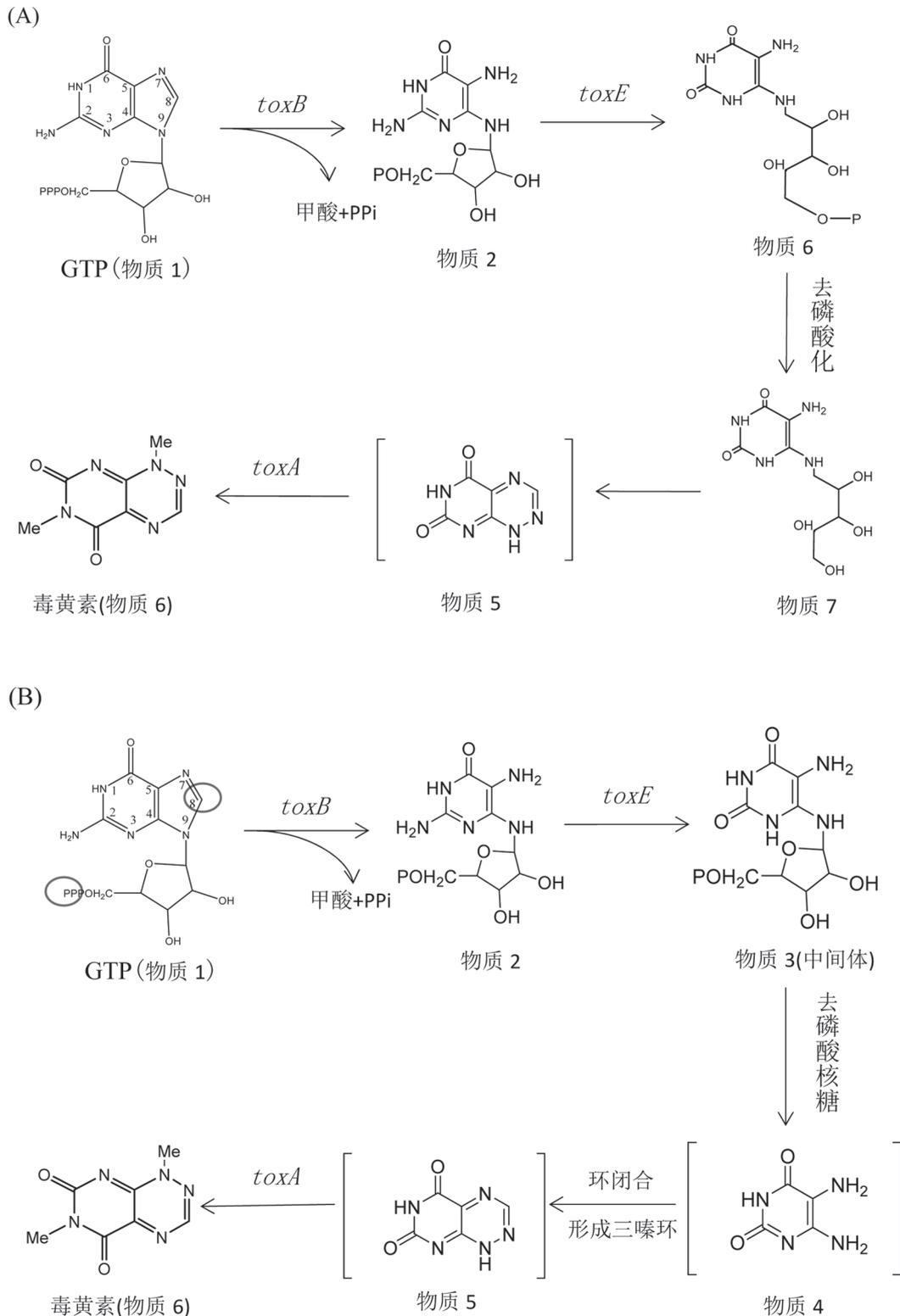


图3 毒黄素生物合成途径

合成基因呈现显著相似性。*toxB* 可编码 GTP 环化水解酶 II, 使 GTP 开环, 其嘌呤环成为毒黄素一部分; *toxE* 编码脱氨酶, 催化羟基取代氨基。有 *toxB*、*toxE* 参与的毒黄素合成过程与核黄素合成过程相同。若操纵子发生突变或产生 *toxA*⁻ 衍生物, 菌株将丧失产毒黄素的能力^[35]。

1.2.1 微生物发酵法

微生物发酵法在生物合成法中是成本相对较低, 经济效益较高, 工业生产中使用较多的方法。Zhu 等^[24] 将稻秆切成小块, 经提取后取 0.1 mL 均匀分布在 NGM 琼脂培养基表面, 28 °C 下培养 2 d, 再纯化呈黄色的菌落 (将一菌环量的黄色菌落均匀分布在 L 型杆上, 接种于 NGM 琼脂培养基表面, 28 °C 培养 2~3 d, 典型菌落再涂在培养基上, 反复 3 次), 纯化后的菌落在斜面试管中于 4 °C 储存。基于 16S rRNA 序列的系统进化分析表明该产毒菌株为唐菖蒲伯克霍尔德氏菌, 预培养此菌 1 d 后, 将其接种到 NGM 液体培养基中, 在 28 °C 下以 160 r/min 培养 48 h, 培养液离心过滤后即可进行分离, 得到毒黄素。有研究者利用相同方法分离存在枯萎症状的植物的病原体, 包括西红柿、芝麻、紫苏、茄子、红椒等, 经生化特性对比、脂肪酸甲酯分析及 16S rRNA 基因测序分析后, 该病原体被认定为水稻细菌性谷枯病菌, 其最佳生长温度为 37 °C, 所用培养基为 CPG 或 TZC^[23]。将椰毒假单胞菌接种在由 KCl、丙三醇、蛋白胨、去离子水等组成的 200 mL 培养基中, 以 180~200 次/分钟的速度摇晃, 前 20 h 毒黄素产量随时间增加而增加^[38]。

1.2.2 基因重组法

有研究者为得到水稻细菌性谷枯病菌 BGR1(*B. glumae* BGR1) 的基因组库, 使用 DNA 探针 (扩增的 *toxA* 基因) 进行菌落杂交筛选。所得的 3 个重叠克隆基因分别插入质粒并经过大肠杆菌表达, 并使用 Tn3-*gusA* 诱导突变形成目标菌株, *B. glumae* BGR1 和大肠杆菌在 LB 培养基中培养, 育种温度为 37 °C, 实验结果发现, ToxR 和毒黄素复合体以及转录激活因子 ToxJ 控制操纵子的表达, 若在培养基中加入适量毒黄素则有助于其表达^[32]。同样, 唐菖蒲伯克霍尔德氏菌 BSR3(*B. gladioli* BSR3) 的基因也可通过扩增技术得到, Lee 等^[33] 使用合适的限制性内切酶剪切经 PCR 技术扩增的片段和 pBBR1MCS-2 质粒, 得到常用的限制位点, 再用 DNA 连接酶重组, 使目标基因 *tofI*、*tofM*、*tofR* 或 *tofIMR* 插入质粒。目标载体转导的 DH5α λpir 大肠

杆菌在卡那霉素 (50 μg/mL) 培养基中培养, 用于质粒增殖, S17-1 λpir 大肠杆菌将质粒基因和 KACC11889 菌株 (缺少 *tofIMR* 基因而不产毒黄素) 接合, 形成转化菌株, *tof* 转化菌株在 LB 培养基中于 30 °C 下培养 1 d 可产生毒黄素。

2 毒黄素的分离纯化

不同方法合成的毒黄素、被毒黄素污染的物质等由于杂质干扰需进行分离纯化, 一般采用薄层色谱法和重结晶法。毒黄素属水溶性黄色素, 溶于甲醇、乙醇、氯仿、乙酸乙酯等有机溶剂, 不溶于石油醚、乙醚和二甲苯等^[40]。Jeong 等^[23] 先将溶液以氯仿提取, 提取物旋蒸后用甲醇溶解, 采用薄层色谱硅胶层析板以氯仿: 甲醇=95: 5 作为展开剂, 粗提毒黄素, 再以乙酸乙酯: 氯仿: 乙酸=20: 8: 1 为展开剂进行精提, 两次提取的洗脱剂皆为甲醇, 毒黄素晶体在冷甲醇中析出, 即完成分离过程。Daves 等^[26] 和 Van Damme 等^[39] 利用液液萃取富集毒黄素, 晶体粗产物在 -5 °C 正丙醇中析出, 重结晶后晶体纯度提高^[6]。结合薄层层析法和重结晶法提纯毒黄素可保证产率和纯度^[27], 具有分离效率高、操作简便、灵敏度高等优点。

3 毒黄素的检测技术研究

关于毒黄素定性定量的分析方法主要有薄层色谱法^[33,41-42]、分光光度法^[26,32,43-44]、高效液相色谱法及高效液相色谱-质谱法^[24,45-46] 以及生物传感测定法。

3.1 薄层色谱法

薄层色谱法可实现毒黄素分离, 多被用于产毒菌株的筛选及不同产毒菌株的毒黄素浓度比较。样品在经过离心、氯仿萃取、浓缩、80% 乙醇再溶解后于薄层色谱板上点样, 在 365 nm 紫外灯照射下清晰可见, 通过斑点颜色深浅可初步比较不同植株毒黄素的浓度^[33]。Suzuki 等^[37] 和 Zhu 等^[24] 在紫外波长 302 nm 或 258 nm 下, 对比样品和毒黄素标准物的斑点位置及 Rf 值, 发现样品斑点位置及 Rf 值均与标样相符, 表明样品中含有毒黄素。为确定 *aiiA* 对群体感应淬灭的影响, 研究者将野生型水稻细菌性谷枯病菌与 *aiiA* 转化菌株进行对比, 薄层色谱实验表明两者皆产生毒黄素 (紫外波长 302 nm), 由此证明 *aiiA* 不影响毒黄素的产生^[42]。

3.2 高效液相色谱-质谱法

质谱法作为一种定性定量工具, 具有进样量

小、灵敏度高、应用范围广等优点。Philmus 等^[5]对高效液相色谱中 14.3 min 出峰的物质进行质谱解析, 一级质谱采用增强全扫描模式, 二级质谱采用 EPS 模式, 离子谱图表明该物质可定性为毒黄素。Jeong 等^[23]利用薄层色谱法对 9 种粮食作物的培养液进行提取, 所得毒黄素晶体采用电喷雾电离质谱 (ESI-MS) 进行分析, 得到的质谱图与化学合成的毒黄素进行对比, 以 $[M+1]^+$ 峰 194 及碎片离子峰 169、137 和 109 为定性依据。Gwynn 等^[47]将土壤细菌 326-32B 产生的物质进行浓缩提取, 利用电子轰击质谱 (EI-MS) 确定其相对分子质量为 193, 结合元素分析、UV、IR 和 ¹HNMR 谱图确定该黄色萃取物为毒黄素。

3.3 分光光度法

分光光度法具有仪器简单、成本低、操作方便、易于普及等优势, 毒黄素于 258 nm 和 393 nm^[4] ($\epsilon = 16\ 400, 2\ 500$) 存在紫外吸收。有研究采用分光光度法比较天然毒黄素及合成毒黄素的紫外吸收图谱, 以相同吸收图谱判定合成物为毒黄素^[26]。为确定每种菌株产生毒黄素的含量, 可根据不同浓度的毒黄素制作标准曲线, 以培养液的氯仿萃取液或水做空白, 测定每组样品的吸光度值^[32,43-44]。分光光度法自动化程度低、分离效果和重现性差, 不适合分析复杂物质, 在应用上具有一定的局限性。

3.4 高效液相色谱法

随着现代分析技术的发展, 高效液相色谱法因进样量小、灵敏度高、分离效率高、分析快等优势, 成为近年来应用最为广泛的分析技术。Buckle 和 Kartadarma^[45]采用高效液相色谱法测定培养液中毒黄素的浓度, 研究菌株种类、pH、培养时间、氯化钠浓度等不同条件对菌株产毒的影响, 该实验采用 Waters 高效液相色谱仪, 以 C18 柱为分离柱, 流动相甲醇: 水: 乙酸 (8: 91: 1) 以 1.6 mL/min 的速度将毒黄素洗脱, 其测定上限为 10 $\mu\text{g/g}$ 。为探究毒黄素的生物合成途径, 有研究者将假单胞菌 Pf-5 中的 *toxC*、*toxB*、*toxD*、*toxE* 等基因片段从宿主细胞中剔除, 以 100 μL 为进样体积检测培养介质中毒黄素的含量, 发现剔除 *toxG-H*、*toxM*、*toxE*、*toxB* 的菌株均存在毒黄素色谱峰, 且根据色谱峰面积可确定这 4 种菌株产生毒黄素的含量^[5]。该实验采用 Agilent 1100, 流速为 1 mL/min, 流动相 A 为水 + 甲酸 (0.1%), 流动相 B 为甲醇 + 0.1% 甲酸, 并采用梯度洗脱对毒黄素进行分离, 毒黄素最终在 9.4 min 出峰。Zhu 等^[24]利用 Waters 高效液相色谱仪对大

曲中毒黄素的浓度进行测定, 以甲醇 - 水 (0.005% 乙酸) 为流动相, 通过比较样品和毒黄素标准品的峰面积来确定大曲中毒黄素的浓度, 样品 DQ1、DQ2 和 DQ3 的相对含量分别是 5.99 $\mu\text{g/g}$ 、8.33 $\mu\text{g/g}$ 和 2.38 $\mu\text{g/g}$, 样品中毒黄素的最高浓度接近其半致死量。当进样量为 10 μL 时, 毒黄素吸光度在浓度为 1~300 $\mu\text{g/mL}$ 时呈线性相关; 当进样量为 50 μL 时, 毒黄素吸光度在浓度为 1~60 $\mu\text{g/mL}$ 时呈线性相关; 当进样量为 50 μL 时, 含有毒黄素 3.1 $\mu\text{g/mL}$ 的样品其标准偏差为 4.4%^[48]。

3.5 生物传感测定法

近年来, 生物传感测定法越来越多应用于生物毒素的测定, 它是以酶、免疫制剂、微生物、DNA 或全细胞等作为选择性活性物质, 将识别反应的信息以电、光等形式进行检测的方法^[49], 具有特异性强、灵敏度高、响应快、廉价、可在线监测^[50-51]等优点。Varzakas 等^[52]总结了生物传感器在食品包括转基因食物检测方面的应用, 生物传感器可用于食品中农药残留的检测、转基因植株确定、毒素的测定 (包括赭曲霉毒素、毒黄素等) 及气味的测定等。Choi 等^[1]采用生物传感器对毒黄素进行测定, 根据 β -半乳糖苷酶活性判断外源性毒黄素浓度, 该装置由应变传感器 (COK71)、基质 (半乳糖苷) 和培养基组成, 其建立基于 *lacZ* 报告基因与毒黄素合成操纵子 *toxA* 的转录融合。该方法对毒黄素的检测范围为 50~500 nmol/L, 且可用于实际样品的检验。青紫色素杆菌 (CV206) 可作为检测是否存在酰基高丝氨酸内酯 (AHL) 的生物传感器, Kim 等^[32]利用 ESI-MS 分析证实覆盖生物传感器的野生型 BGR1 菌株产生 C8-HSL 和 C6-HSL。在 QS 感应系统中, TofR-C8-HSL 复合体可触发毒黄素产生, 有研究者利用 CV206 对 ΔtofI 、 ΔtofR 、 $\Delta\text{tofI-tofR}$ 及 336gr-1 (野生型) 菌株进行检测, 判断是否产生 AHL, 结合毒黄素产量比较群体感应基因与毒黄素合成的关系^[44]。

4 展望

毒黄素是椰毒假单胞菌酵米面亚种所产生的强毒性外毒素, 关于毒黄素食物中毒及中毒机制的研究已多见报道。多年来国内外多项研究表明, 毒黄素在抗菌、抗肿瘤等方面具有较高的生物活性, 预示着在药理学、毒理学等研究领域具有前瞻性。我国抗菌药物使用率高, 金额投入大, 耐药菌株逐年增多, 新抗菌药物的研发能缓解临床上用药品种少

的情况。因此, 开发毒黄素作为抗菌剂和抗肿瘤剂药物具有较高的商业价值, 但高毒性及低溶解性是毒黄素作为拮抗剂在临床上应用的最大缺点, 如何克服这些困难将毒黄素开发成为有效的抗菌剂和抗肿瘤剂是开发过程中的重难点。与此同时, 传统的理化分析已经不能满足对毒素的痕量分析要求, 许多新技术已被应用于毒素检测, 如分子印迹技术、生物传感器技术、串联质谱技术等。随着食品检测往高通量、低残留的趋势发展, 研究食品污染残留检测和检出限问题也亟需解决, 简单的HPLC方法已不能解决问题, 因此, 开发具有分离净化效果好、基质干扰小、精密度和准确度好、灵敏度高的检测方法对毒黄素安全检测具有重要意义。另外, 毒黄素生物合成法的研究已经取得一定进步, 但要真正实现工业化生产还需要解决很多问题, 如工程菌株获得、培养条件优化、成本控制等, 这有待于进一步研究。

[参 考 文 献]

- [1] Choi O, Lee Y, Han I, et al. A simple and sensitive biosensor strain for detecting toxoflavin using β -galactosidase activity. *Biosens Bioelectron*, 2013, 50: 256-61
- [2] 王静, 刘秀梅. 分泌外毒素细菌产毒相关基因的分子遗传学进展. *国外医学: 卫生学分册*, 1996, 3: 157-64
- [3] Mehrotra MM, Sternbach DD, Rutkowske RD, et al. Reactions of fervenulone. An unprecedented ring contraction of a 7-azapteridine ring system. *J Organ Chem*, 1995, 60: 7063-5
- [4] Karki HS, Shrestha BK, Han JW, et al. Diversities in virulence, antifungal activity, pigmentation and DNA fingerprint among strains of *Burkholderia glumae*. *PLoS One*, 2012, 7: e45376
- [5] Philmus B, Shaffer BT, Kidarsa TA, et al. Investigations into the biosynthesis, regulation, and self-resistance of toxoflavin in *Pseudomonas protegens* Pf-5. *Chem Bio Chem*, 2015, 16: 1782-90
- [6] Mao Y, Tian W, Huang Z, et al. Convenient synthesis of toxoflavin that targets β -catenin/Tcf4 signaling activities. *J Heterocyc Chem*, 2014, 51: 594-7
- [7] Nagamatsu T, Yamasaki H, Hirota T. Syntheses of 3-substituted 1-methyl-6-phenylpyrimido (5,4-e)-1,2,4-triazine-5,7(1H,6H)-diones (6-phenyl analogs of toxoflavin) and their 4-oxides, and evaluation of antimicrobial activity of toxoflavins and their analogs. *Chem Pharmaceut Bull*, 1993, 41: 362-8
- [8] Latuasan HE, Berends W. On the origin of the toxicity of toxoflavin. *Biochim Biophys Acta*, 1961, 52: 502-8
- [9] Taylor EC, Morrison RW. A synthesis of pyrimido [4,5-e]-as-triazines (6-Azapteridines) 1a,b. *J Am Chem Soc*, 1965, 87: 1976-9
- [10] Choi G, Lee J, Ji JY, et al. Discovery of a potent small molecule SIRT1/2 inhibitor with anticancer effects. *Int J Oncol*, 2013, 43: 1205-11
- [11] Wei W, Chua MS, Grepper S, et al. Small molecule antagonists of Tcf4/ β -catenin complex inhibit the growth of HCC cells *in vitro* and *in vivo*. *Int J Cancer*, 2010, 126: 2426-36
- [12] Lepourcelet M, Chen YN, France DS, et al. Small-molecule antagonists of the oncogenic Tcf/ β -catenin protein complex. *Cancer Cell*, 2004, 5: 91-102
- [13] Goh KC, Wang H, Yu N, et al. PLK1 as a potential drug target in cancer therapy. *Drug Dev Res*, 2004, 62: 349-61
- [14] Zeller J, Turbiak AJ, Powelson IA, et al. Investigation of 3-aryl-pyrimido [5,4-e][1,2,4] triazine-5,7-diones as small molecule antagonists of β -catenin/TCF transcription. *Bioorg Med Chem Lett*, 2013, 23: 5814-20
- [15] Aminov RI. The role of antibiotics and antibiotic resistance in nature. *Environ Microbiol*, 2009, 11: 2970-88
- [16] Jung B, Lee S, Ha J, et al. Development of a selective medium for the fungal pathogen *Fusarium graminearum* using toxoflavin produced by the bacterial pathogen *Burkholderia glumae*. *Plant Pathol J*, 2013, 29: 446-50
- [17] Wang Z, Ma M, Wang R. Enhanced vasoconstriction of rat tail arteries by toxoflavin. *Br J Pharmacol*, 1996, 117: 293-8
- [18] 吴洪娟, 李锋杰, 张圣明. 毒黄素对小鼠肾脏毒性作用的超微病理观察. *电子显微学报*, 2012, 31: 51-5
- [19] 岳启安, 张式暖. 毒黄素对呼吸和循环系统的毒性研究. *潍坊医学院学报*, 1998, 2: 6-7
- [20] 刘秀梅. 我国椰毒假单胞菌酵米面亚种食物中毒流行趋势浅析. *中华预防医学杂志*, 1996, 30: 372-4
- [21] 马麦生, 田凤丽, 谭明, 等. 毒黄素中毒大鼠胃底平滑肌细胞超微结构观察. *数理医药学杂志*, 2009, 22: 280-2
- [22] 赵怀龙, 付留杰, 唐功臣. 我国主要的食源性致病菌. *医学动物防制*, 2012, 28: 1212-6
- [23] Jeong Y, Kim J, Kim S, et al. Toxoflavin produced by *Burkholderia glumae* causing rice grain rot is responsible for inducing bacterial wilt in many field crops. *Plant Dis*, 2003, 87: 890-5
- [24] Zhu D, Wu Z, Luo A, et al. Characterization and detection of toxoflavin-producing *Burkholderia* in rice straws and Daqu for Chinese Maotai-flavour liquor brewing. *J Inst Brewing*, 2015, 121: 290-4
- [25] 田凤丽, 马麦生, 钱震雯, 等. 椰醇伯菌毒黄素的研究进展. *医学综述*, 2007, 13: 1822-4
- [26] Daves Jr GD, Robins RK, Cheng CC. The total synthesis of toxoflavin. *J Am Chem Soc*, 1961, 83: 3904-5
- [27] Black TH. An improved, large-scale synthesis of xanthothricin and reumycin. *J Heterocyc Chem*, 1987, 24: 1373-5
- [28] Yoneda F, Nagamatsu T. A convenient synthesis of toxoflavins, toxoflavin 4-oxides and 1-demethyltoxoflavins. *Chem Pharmaceut Bull*, 1975, 23: 2001-9
- [29] Yoneda F, Shinomura K, Nishigaki S. A convenient synthesis of toxoflavins and toxoflavin-n-oxides. *Tetrahedron Lett*, 1971, 12: 851-4
- [30] Todorovic N, Giacomelli A, Hassell J A, et al. Microwave-

- assisted synthesis of 3-aryl-pyrimido [5,4-e][1,2,4] triazine-5,7 (1H, 6H)-dione libraries: derivatives of toxoflavin. *Tetrahedron Lett*, 2010, 51: 6037-40
- [31] Zhang H, Ning X, Hang H, et al. Total synthesis of thaxtomin A and its stereoisomers and findings of their biological activities. *Organ Lett*, 2013, 15: 5670-3
- [32] Kim J, Kim JG, Kang Y, et al. Quorum sensing and the LysR-type transcriptional activator ToxR regulate toxoflavin biosynthesis and transport in *Burkholderia glumae*. *Mol Microbiol*, 2004, 54: 921-34
- [33] Lee J, Park J, Kim S, et al. Differential regulation of toxoflavin production and its role in the enhanced virulence of *Burkholderia gladioli*. *Mol Plant Pathol*, 2016, 17: 65-76
- [34] Shingu Y, Yoneyama K. Essential regulator gene toxR for toxoflavin biosynthesis of *Burkholderia glumae*. *J Gen Plant Pathol*, 2004, 70: 108-14
- [35] Ham JH, Melanson RA, Rush MC. *Burkholderia glumae*: next major pathogen of rice. *Mol Plant Pathol*, 2011, 12: 329-39
- [36] Kim J, Oh J, Choi O, et al. Biochemical evidence for ToxR and ToxJ binding to the *tox* operons of *Burkholderia glumae* and mutational analysis of ToxR. *J Bacteriol*, 2009, 191: 4870-8
- [37] Suzuki F, Sawada H, Azegami K, et al. Molecular characterization of the *tox* operon involved in toxoflavin biosynthesis of *Burkholderia glumae*. *J Gen Plant Pathol*, 2004, 70: 97-107
- [38] Levenberg B, Linton SN. On the biosynthesis of toxoflavin, an azapteridine antibiotic produced by *Pseudomonas cocovenenans*. *J Biol Chem*, 1966, 241: 846-52
- [39] van Damme PA, Johannes AG, Cox HC, et al. On toxoflavin, the yellow poison of *Pseudomonas cocovenenans*. *Recueil des Travaux Chimiques des Pays-Bas*, 1960, 79: 255-67
- [40] Stern KG. Oxidation-reduction potentials of toxoflavin. *Biochem J*, 1935, 29: 500
- [41] Jung WS, Lee J, Kim MI, et al. Structural and functional analysis of phytotoxin toxoflavin-degrading enzyme. *PLoS One*, 2011, 6: e22443
- [42] Park JY, Lee YH, Yang KY, et al. AiiA-mediated quorum quenching does not affect virulence or toxoflavin expression in *Burkholderia glumae* SL2376. *Lett Appl Microbiol*, 2010, 51: 619-24
- [43] 林黎明, 赵乃昕. 萃取-分光光度法测定酵母面假单胞菌的毒黄素. *潍坊医学院学报*, 1988, 4: 9
- [44] Chen R, Barphagha IK, Karki HS, et al. Dissection of quorum-sensing genes in *Burkholderia glumae* reveals non-canonical regulation and the new regulatory gene *tofM* for toxoflavin production. *PLoS One*, 2012, 7: e52150
- [45] Buckle KA, Kartadarma E. Inhibition of bongkrek acid and toxoflavin production in tempe bongkrek containing *Pseudomonas cocovenenans*. *J Appl Bacteriol*, 1990, 68: 571-6
- [46] Fenwick MK, Philmus B, Begley TP, et al. Toxoflavin lyase requires a novel 1-His-2-carboxylate facial triad. *Biochemistry*, 2011, 50: 1091-100
- [47] Gwynn MN, Box SJ, Brown AG, et al. MM 42842, a new member of the monobactam family produced by *Pseudomonas cocovenenans*. I. Identification of the producing organism. *J Antibiotics*, 1988, 41: 1-6
- [48] Voragen AG, De Kok HA, Kelholt AJ, et al. Determination of bongkrek acid and toxoflavin by high pressure liquid chromatography. *Food Chem*, 1982, 9: 167-74
- [49] 蒋雪松, 许林云, 卢利群, 等. 生物传感器在食品污染物检测中的应用研究进展. *食品科学*, 2013, 34: 357-62
- [50] Pang P, Huang S, Cai Q, et al. Detection of *Pseudomonas aeruginosa* using a wireless magnetoelastic sensing device. *Biosens Bioelectron*, 2007, 23: 295-9
- [51] Guntupalli R, Hu J, Lakshmanan RS, et al. A magnetoelastic resonance biosensor immobilized with polyclonal antibody for the detection of *Salmonella typhimurium*. *Biosens Bioelectron*, 2007, 22: 1474-9
- [52] Varzakas T, Nikoleli GP, Nikolelis DP. Recent advances of biosensors in food detection including genetically modified organisms in food. *Adv Bioelectron Mater*, 2015, 10: 355-88