

市售贝类麻痹性贝毒快速生化检测方法探究

刘元媛¹, 程金平^{1*}, 高利利¹, 王金辉², 宋玉玲¹, 陈雪¹, 王文华¹

(1. 上海交通大学环境科学与工程学院, 上海 200240; 2. 国家海洋局东海环境监测中心, 上海 200137)

摘要: 为了研究快速检测海产品中低浓度麻痹性贝毒 (paralytic shellfish poisoning, PSP) 的生化方法, 在传统小白鼠法的基础上, 使用浓度 (以 STXeq 计) 为 1 和 0.2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 的市售双壳贝类 PSP 提取液对小鼠进行腹腔注射, 分别研究注射后 15、60、120 min 后小鼠血液中 ACh、AChE、NO 和 NOS 的变化情况。结果发现, 低浓度 (0.2 $\mu\text{g}/\text{kg}$)、短时间 (15 min) 条件下仅 ACh 含量发生显著变化 [与对照组相比 $p < 0.05$, 含量 (以蛋白计) 为 $(141.2 \pm 14.8) \mu\text{g}/\text{mg}$]; 而 NO 与 NOS 却在长时间 (120 min) 后才发生改变 [与对照组相比 $p < 0.05$, 分别为 $(68.7 \pm 3.8) \mu\text{mol}/\text{g}$ 及 $(40.1 \pm 4.9) \text{U}/\text{mg}$]。在高浓度下, 3 个时间点的 ACh 含量也均发生显著变化。结果表明, 在低浓度及短时间条件下反映 PSP 效应的指标仅是 ACh, 从而可以尝试选择其作为快速检测 PSP 的生化指标。

关键词: 麻痹性贝毒; 快速检测; 生化指标; 双壳贝类

中图分类号: X836 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2010)07-1663-04

Rapid Biochemical Method for the Detection of Paralytical Shellfish Poisoning Toxins in Shellfish from Seafood Market

LIU Yuan-yuan¹, CHENG Jin-ping¹, GAO Li-li¹, WANG Jin-hui², SONG Yu-ling¹, CHEN Xue¹, WANG Wen-hua¹

(1. School of Environmental Science and Engineering, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200240, China; 2. East China Sea Environmental Monitoring Center, State Oceanic Administration, Shanghai 200137, China)

Abstract: A rapid biochemical method was discussed in order to detect low concentration of paralytic shellfish poisoning (PSP) in sea food. The mice were injected with PSP extract of bivalves (1 and 0.2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ respectively, as STX equivalents) purchased from seafood market. ACh, AChE, NO and NOS in blood were studied at 15, 60, 120 min respectively. The results showed that at low dose (0.2 $\mu\text{g}/\text{kg}$) and 15 min, only the contents of ACh changed significantly compared with control group ($p < 0.05$), which was $(141.2 \pm 14.8) \mu\text{g}/\text{mg}$, while the contents of NO and the activities of NOS changed until 120 min, compared to control group ($p < 0.05$), which were $(68.7 \pm 3.8) \mu\text{mol}/\text{g}$ and $(40.1 \pm 4.9) \text{U}/\text{mg}$ respectively. At high dose the contents of ACh changed at all three time point. It can be suggested that the contents of ACh is the only one of four indexes which can response to PSP at low dose in an early stage (15 min) and may be selected as a biochemical index for rapid detection of PSP.

Key words: paralytic shellfish poisoning (PSP); rapid detection; biochemical index; bivalve

麻痹性贝毒 (paralytic shellfish poisoning, PSP) 是目前世界上分布最广、事故发生频率最高的一种赤潮藻毒素, 它严重威胁人类的身体健康, 并造成不可估量的经济损失。我国目前对市售贝类麻痹性贝毒的检测采用的是国际公认的小白鼠生物试验法 (mouse bioassay, MBA)^[1]。MBA 法能够较好地反映麻痹性贝毒对生物所产生的整体毒性, 便于操作, 技术人员不需要经过特殊培训。但其缺点也是显而易见的: 该法的准确性、敏感性较差。目前欧盟委员会的水产品投放市场卫生条件的规定所允许的海产品麻痹性贝毒含量的最大限值 (以 STXeq 计) 是 0.8 $\mu\text{g}/\text{g}$, 我国的限值是 4 MU/g (1 MU 约相当于 0.18 μg STX), 其他国家, 如墨西哥和菲律宾的标准仅为 0.3 和 0.4 $\mu\text{g}/\text{g}$, 而 MBA 法的检测限仅为 0.4 $\mu\text{g}/\text{g}$ ^[4], 可见其检测限甚至高于一些国家的限值。

另外现行的 MBA 法是将 PSP 提取液注射入小鼠体内, 观察小鼠死亡情况而判断毒素含量, 这种以“死亡”的宏观判断标准不能满足人类健康的要求, 同时也需要处死大量小鼠, 不能改善动物的福利。国内外其他方法, 诸如免疫法、细胞毒性法^[2]、HPLC^[3] 法等也均不能满足常规海产品经济、大量、快速的分析需求。生化检测法具有检测限低、快速经济的优点, 而且目前针对海产品中 PSP 的生化检测方法研究较少。

为了建立海产品中低浓度 PSP 的快速生化检测方法, 本研究在 MBA 法的基础上进行改进, 对小

收稿日期: 2009-09-02; 修订日期: 2009-11-04

基金项目: 上海科委科技攻关项目 (08DZ1206302)

作者简介: 刘元媛 (1985 ~), 女, 硕士研究生, 主要研究方向为环境科学, E-mail: yy_liu@sjtu.edu.cn

* 通讯联系人, E-mail: jipcheng@sjtu.edu.cn

鼠进行短时间(15 min)和非致死量($1/50 LD_{50}$)暴露,测定了小鼠血液中的乙酰胆碱(ACh)和 NO 含量及乙酰胆碱酯酶(AChE)和一氧化氮合酶(NOS)的活力,以筛选可用于低浓度 PSP 快速检测的生化指标。

1 材料与方法

1.1 实验动物与药品

ICR(institute of cancer research, ICR)品系小鼠,体重 16~20 g 购于上海斯莱克实验动物有限责任公司;硫代乙酰胆碱(AsCh, $m = 99\%$)、双硝基二硫代苯甲酸(DTNB, $m = 99\%$)、还原型谷胱甘肽($m = 98\%$)及硫酸毒扁豆碱均购自德国 Merck 公司;NO 和 NOS 试剂盒购于南京建成生物工程研究所。

1.2 市售海产品贝类 PSP 提取液的制备

毒 PSP 双壳贝类购自上海水产市场,按照 AOAC 推荐的小白鼠生物实验法提取并收集 PSP 粗提液^[1],用该方法确定 PSP 含量并调节提取液浓度为 4 MU/mL。分别用 $1/10$ 和 $1/50$ 的 LD_{50} 即(以 STX 计)1 和 $0.2 \mu\text{g/kg}$ (1 MU 约相当于 $0.18 \mu\text{g}$ STX,按每只小鼠的体重进行换算并注射)作为实验浓度。

1.3 动物检测实验

将动物按检测时间分为 3 大组,每组 9 只,检测时间分别为 15、60、120 min。每组内又分为检测组和对照组,检测组腹腔注射体重剂量分别为 1 和 $0.2 \mu\text{g/kg}$ 的 PSP 提取液,对照组注射等剂量溶剂。股动脉取血。

1.4 生化指标分析^[5]

ACh 含量测定采用碱性盐酸羟胺测定法,AChE 活力测定采用改良 Ellman 法,NO 含量和 NOS 活力的测定依据试剂盒要求进行。

1.5 统计分析

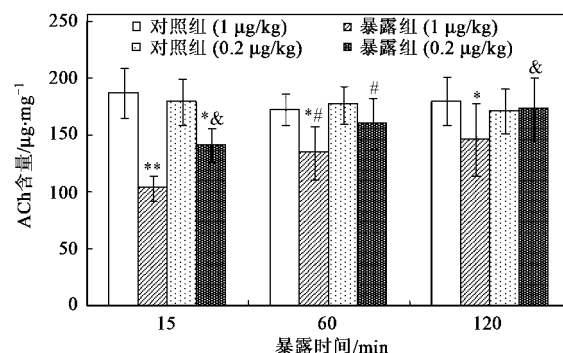
结果用均值 $\pm$ 标准方差表示,数据采用 SPSS 11.0 进行 t 检验,并分析数据的显著性差异。

2 结果与分析

2.1 小鼠血液中 ACh 含量及 AChE 活力变化

从图 1 和图 2 看出,在短时间(15 min)和低浓度($1/50 LD_{50}$)条件下血液中发生明显变化的指标是 ACh(与对照组相比 $p < 0.05$),而且高浓度($1/10 LD_{50}$)3 个时间点 ACh 均发生了明显改变,并随着时间的延长 2 个浓度下均有增加的趋势。并且发

现在 15 min,血液中 ACh 的含量低剂量组明显高于高剂量组($p < 0.05$)。而对于 AChE 活力仅在高浓度 15 min 时才发生显著改变。低剂量组则直至 120 min 时才出现下降的趋势(与 60 min 组相比 $p < 0.05$)。其余时间点则没有明显变化。



*, ** 表示与对照组相比 $p < 0.05$, $p < 0.01$; #, ## 同一浓度相邻2组(组与组相比,空白组与空白组)相比 $p < 0.05$, $p < 0.01$; &, && 同一时间点不同浓度2组相比 $p < 0.05$, $p < 0.01$,下同

图 1 小鼠血液中 ACh 含量的变化

Fig. 1 ACh in mice's blood

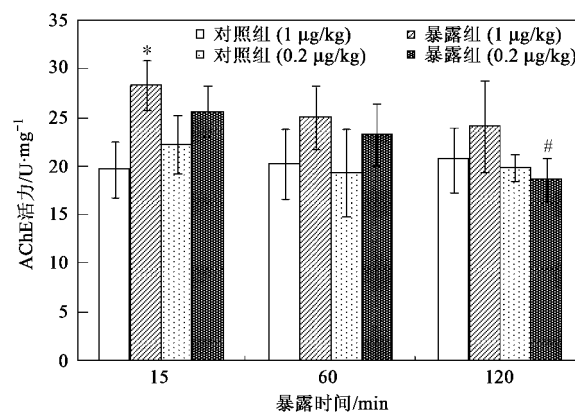


图 2 小鼠血液中 AChE 活力的变化

Fig. 2 Enzyme activities of AChE in mice's blood

2.2 小鼠血液中 NO 含量及 NOS 活力变化

从图 3 和图 4 看出,在 15 min 时 NO 和 NOS 2 个指标均无明显变化。随着时间的延长,NO 在高浓度组的 2 个检测时间(60、120 min)上发生了显著降低(与对照组相比 $p < 0.05$),并随着时间延长呈现继续降低的趋势。而低浓度组则直到 120 min 时 NO 含量才出现显著变化(与对照组相比 $p < 0.01$)。NOS 活力也只有在 120 min 时才检测到了变化,其余时间点没有明显变化。

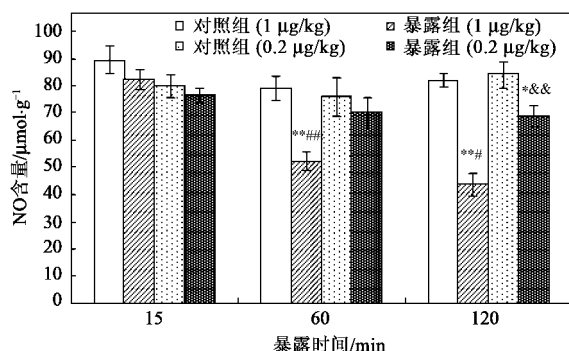


图3 小鼠血液中 NO 含量的变化

Fig. 3 NO in mice's blood

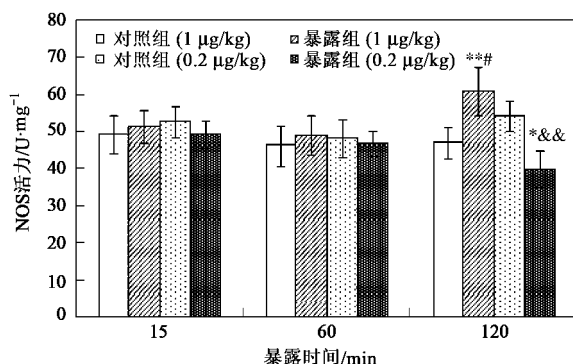


图4 小鼠血液中 NOS 活力的变化

Fig. 4 Enzyme activities of NOS in mice's blood

3 讨论

本研究通过使用市售双壳贝类的 PSP 粗提液对小鼠进行 2 种浓度的注射,并分别检测其 15、60、120 min 时小鼠血液内 ACh、AChE、NO、NOS 这 4 个生化指标的变化。结果发现低浓度注射组小鼠血液内 ACh 的含量在短时间(15 min)发生了明显降低($p < 0.05$)。高浓度组在 3 个时间检测点上 ACh 含量均发生明显变化,且随着注射时间的延长呈现增加趋势。同时可以发现高浓度组在 15 min 时 ACh 含量显著降低(与对照组相比 $p < 0.01$),且明显高于高浓度组($p < 0.05$)。相比之下,NO 和 NOS 这 2 个指标则在 15 min 时没有发生明显变化,随着注射时间的增加至 60 min 时高浓度组的小鼠血液中 NO 含量才发生明显变化(与对照组相比 $p < 0.05$),120 min 时高浓度组两指标才发生显著变化(与对照组相比 $p < 0.01$)。可见血液中 ACh 含量在低浓度、短时间就有明显变化,推测其为 PSP 中毒的早期敏感性指标,NO 含量在注射毒液后虽然也发生变化,但其产生变化时间远滞后于 ACh 从而不利于早期检

测,因此可尝试将血液中 ACh 含量作为快速检测 PSP 的生化指标。

麻痹性贝毒是神经肌肉麻痹性毒素,通过竞争性阻断 Na^+ 内流,阻碍动作电位的形成而起抑制作用,造成神经系统传输障碍,从而产生麻痹作用^[2]。ACh 作为一种神经递质主要分布在与躯体和内脏运动相关的传出神经元,较多储存于突触前膜的囊泡中。当大量 Na^+ 流入细胞内,形成动作电位传到神经末梢时,使突触前膜发生去极化,前膜上电压门控 Ca^{2+} 通道开放,细胞外 Ca^{2+} 进入突触前末梢内,引起 ACh 的释放,ACh 的释放量与神经末梢内的 Ca^{2+} 量呈正相关。ACh 含量的显著减少可能正是由于不同浓度的 PSP 对 Na^+ 内流的阻断程度不同,从而导致了血液中 ACh 的含量不同。从中可以推测出将血液中 ACh 含量作为检测指标不仅可以定量,同时也反映出了 PSP 对生物的整体毒性效应。

基于生化指标的变化而发展出的检测方法在食品和环境污染物的快速检测中已有广泛研究^[6-8]。此类检测法具有快速、高灵敏度等优点。从本实验结果来看,在小鼠无明显个体行为反应的剂量($1/50 \text{ LD}_{50}$)以下血液中的 ACh 含量在极短时间(15 min)内就出现了明显变化,且其变化程度在高剂量时加剧。可以看出通过检测对 PSP 的敏感生化指标(如本研究中小鼠血液中 ACh 的含量)来尝试快速检测海产品中的 PSP,比传统的 MBA 法具有更高的敏感性,检测限更低,估计为 $1/50 \text{ LD}_{50}$ 以下,有望进行半定量或定量检测。另一方面,传统 MBA 法是将各种浓度的 PSP 粗提液注射到一定数量小鼠体内,必需调节其死亡时间中位数至 5~7 min 内,才能经过查表计算得到注射液 PSP 浓度,该方法需要处死大量小鼠,且耗时长。根据欧盟委员会 86/609/EEC 指令及动物科学应用法案[Animal (Scientific Procedures) Act, 1986],应尽可能地改善、减少、取消动物在生物分析方法中的使用^[9]。因此对于本研究所选择的检测指标 ACh,可以说不仅可以达到早期快速检测的目的,而且只需要少量血液即可检测,不需处死小鼠,大大改善了小鼠的福利。

但由于本研究只分析了 2 个浓度,在毒素浓度与指标变化的定量化研究上不够充分,在今后的研究过程中还需进一步加强浓度系列的探讨,以达到定量检测的目的。另外还需考察不同鼠种间指标变化的差异,以评价该方法的可比性。

4 结论

采用血液中 ACh 含量作为生化指标对海产品

中 PSP 含量进行快速检测是一种极具潜力的方法. 其不仅经济、灵敏度高、检测限低而且能够反映出 PSP 对生物的整体毒性效应,改善动物福利.

参考文献:

- [1] SN 0352-95, 出口贝类麻痹性贝类毒素检验方法[S].
- [2] Okumura M, Tsuzuki H, Tomita B. A rapid detection method for paralytic shellfish poisoning toxins by cell bioassay[J]. *Toxicon*, 2005, **46**(1):93-98.
- [3] He H Z, Li H B, Jiang Y, *et al.* Determination of paralytic shellfish poisoning toxins in cultured microalgae by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2005, **383**(6):1014-1017.
- [4] Campàs M, Prieto-Simón B, Marty J L. Biosensors to detect marine toxins: Assessing seafood safety[J]. *Talanta*, 2007, **72**(3):884-895.
- [5] 程金平, 宋玉玲, 张鉴达, 等. 麻痹性贝毒毒性早期预测指标的筛选[J]. *上海交通大学学报*, 2008, **42**(5):697-700.
- [6] 张雪梅, 陈雁君, 谷昊明, 等. 生物标志物在农药残留监测中的研究和进展[J]. *中国卫生检验杂志*, 2008, **18**(2):375-376.
- [7] Amine A, Mohammadi H, Bourais I, *et al.* Enzyme inhibition-based biosensors for food safety and environmental monitoring [J]. *Biosens Bioelectron*, 2006, **21**(8):1405-1423.
- [8] 汪承润, 王晓荣, 于红霞, 等. 运用蚕豆幼苗叶片生物标志物评价铅污染土壤[J]. *环境科学*, 2008, **29**(11):3247-3251.
- [9] Holtrop G, Petrie J, McElhiney J, *et al.* Can general anaesthesia be used for the Paralytic Shellfish Poison bioassay? [J]. *Toxicon*, 2006, **47**(3):336-347.

《环境科学》荣获“新中国 60 年有影响力的期刊”称号

2009 年 12 月 22 日“第四届中国期刊创新年会”公布了“新中国 60 年有影响力的期刊”评选结果,《环境科学》荣获“新中国 60 年有影响力的期刊”称号. 此次评选,全国共有 9 000 多种参评期刊,最终有 161 种期刊入选. 该评选活动是中国期刊协会、中国出版科学研究所为纪念新中国成立 60 周年,表彰和鼓励在政治、经济、文化、科技和社会发展领域中起到重要作用的期刊而举办的.