

磷酸酶抑制比色法快速测定贝类中腹泻性贝毒素

郭萌萌¹, 吴海燕¹, 薛瑞宇², 谭志军¹, 李兆新¹, 翟毓秀¹

(1. 农业部水产品质量安全检测与评价重点实验室, 中国水产科学研究院黄海水产研究所, 山东青岛 266071)

(2. 青岛科技大学化学与分子工程学院, 山东青岛 266042)

摘要: 基于腹泻性贝毒素 (Diarrhetic shellfish poisoning, DSP) 的致腹泻性组分大田软海绵酸 (okadaic acid, OA) 及其衍生物鳍藻毒素 (dinophysistoxins, DTXs) 能抑制蛋白磷酸酶活性的特点, 建立了快速测定贝类中 DSP 的磷酸酶抑制比色分析方法。采用对硝基苯磷酸二钠 (p-nitrophenylphosphate disodium, p-NPP) 为底物, 其与蛋白磷酸酶 2A (protein phosphatase 2A, PP2A) 反应生成的黄色水解产物在碱性条件下于 405 nm 波长处有强烈的吸收峰, 根据吸光度值计算抑制剂的浓度。酶抑制法继承了小鼠生物法能建立剂量-效应关系的优势, 直接反映毒素的相对毒性大小, 测定的是 DSP 毒素致腹泻性成分的总量, 以 OA 浓度计。本研究优化了样品前处理方法并考察了基质浓度的影响。方法的筛选检出限为 80 μg/kg。采用该方法进行加标回收实验, 回收率在 90.43%~118.52% 范围内, 相对标准偏差 (RSD) 为 6.85%~13.93%。该方法操作简便、快捷, 回收率高, 重现性好, 可作为快速筛查工具用于贝毒的日常监控。

关键词: 磷酸酶; 比色法; 大田软海绵酸; 腹泻性贝毒素; 贝类

文章编号: 1673-9078(2014)6-263-267

Rapid Determination of Diarrhetic Shellfish Poisoning in Shellfish by Colorimetric Protein Phosphatase Inhibition Assay

GUO Meng-meng¹, WU Hai-yan¹, XUE Rui-yu², TAN Zhi-jun¹, LI Zhao-xin¹, ZHAI Yu-xiu¹

(1. Key Laboratory of Testing and Evaluation for Aquatic Product Safety and Quality, Ministry of Agriculture, P. R. China; Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China) (2. College of Chemistry and Molecular Engineering, Qingdao University of Science and Technology, Qingdao 266042, China)

Abstract: Okadaic acid (OA) and its derivatives, the components of diarrhetic shellfish poisoning (DSP), are potent inhibitors of protein phosphatases. Based on the mechanism of action, a protein phosphatase 2A (PP2A) inhibition assay for the rapid determination of DSP toxins in bivalve was developed. In this study, p-nitrophenyl phosphate (p-NPP) was used as the substrate and hydrolyzed by PP2A, then the product was measured at 405 nm. The total DSP content (calculated by OA) in samples could be detected according to the standard dose-effect curve developed with a series of OA standard solutions. The experimental conditions of sample preparation were optimized, and shellfish matrix loading limits for the protein phosphatase inhibition assay were established according to the shellfish species. The detection limit was 80 μg/kg, and the spiked recoveries for OA in shellfish samples were between 90.43% and 118.52%, with relative standard deviations (RSD) ranged from 6.85% to 13.93%. The colorimetric protein phosphatase inhibition assay was simple, rapid and showed good recovery and reproducibility, demonstrating this proposed method could be used as an efficient analysis tool for rapid screening of DSP in shellfish and suit for daily monitoring to control shellfish toxicity.

Key words: phosphatases; colorimetric analysis; okadaic acid; diarrhetic shellfish poisoning; shellfish

贝类以其鲜美的口味和丰富的营养, 深受广大消

收稿日期: 2014-01-23

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (41106109); 中央级基本科研业务
费项目 (20603022011004、20603022012019)

作者简介: 郭萌萌 (1981-), 女, 硕士, 助理研究员, 研究方向: 水产品质量
安全与质量控制

通讯作者: 谭志军 (1978-), 男, 博士, 副研究员, 研究方向: 水产品质量
与安全控制

费者喜爱, 成为我国渔业产业的主导品种, 但贝体内毒素的富集多年来一直困扰我国贝类产业的健康发展^[1]。近年来对我国部分海域贝类产区的调查显示, 在辽东湾、莱州湾、秦皇岛、福建等海域均发现了贝毒素, 并以腹泻性贝毒素 (Diarrhetic shellfish poisoning, DSP) 比较普遍。DSP 属多环聚醚类脂溶性贝毒素, 具热稳定性, 可在贝类组织中残留较长时间; 且加热、微波等常规加工方式因降低水产品中的水分含量而导

致毒素浓度更高, 所以此类毒素给消费者带来的潜在危害更难预防, 已成为发达国家制定监控计划和贸易壁垒的主要目标。研究证实, DSP的致腹泻性组分为大田软海绵酸(okadaic acid, OA)及其衍生物鳍藻毒素(dinophysistoxins, DTXs)^[2], 且OA及DTXs能够抑制蛋白磷酸酶的活性, 是一类潜在的肿瘤促进因子^[3]。欧盟、德国和英国等多个国家规定双壳贝类可食性组织中DSP不大于160 μg/kg(以OA计), 我国GB/T 18406.4-2001《农产品安全质量 无公害水产品安全要求》规定DSP的限量为600 μg/kg。

现有DSP的检测技术包括小鼠生物法^[4]、仪器分析法^[5-6]、免疫分析法^[7]以及酶活力抑制分析法^[8-9]。其中小鼠生物法和仪器分析法使用最为普遍, 小鼠生物法的毒素提取过程繁琐, 需时较长, 检出限偏高(200 μg OA eq./kg贝组织), 且易出现假阳性; 仪器分析法准确、灵敏, 但需要价格昂贵的仪器和专业的人员操作, 不能实现快速和现场检测; 免疫分析法灵敏度高、特异性好、操作简便; 酶活力抑制法继承了小鼠生物法能建立剂量-效应关系的优势, 直接反映毒素的相对毒性大小, 可在短时间内检测大量样品, 且降低了检出限, 具有很好的发展潜力。

基于OA和DTXs能够抑制蛋白磷酸酶活性的特点, 本文建立了一种利用蛋白磷酸酶活性变化检测贝类中OA毒性当量的测试方法。以对硝基苯磷酸二钠(p-nitrophenyl phosphate disodium, p-NPP)为底物, 在蛋白磷酸酶2A(protein phosphatase 2A, PP2A)与底物作用的酶反应过程中, 其水解产物在碱性条件下于405 nm波长处有强烈的吸收峰, 采用酶标仪读取吸光度值, 以标准溶液的酶活性抑制率对OA浓度值制作标准曲线, 进而计算抑制剂的浓度(以OA计)。本研究重点优化了样品的前处理过程, 考察了基质浓度对方法定量结果的影响, 方法定量准确, 操作简便, 4 h内可测试96个样品, 大大提高了检测效率, 具有较好的应用价值。

1 实验部分

1.1 仪器、试剂与材料

Infinite M200 酶标仪, 瑞士 Tecan 公司; T18 basic 型均质机, 德国 IKA 公司; KQ-300E 型超声波提取仪, 昆山市超声仪器有限公司; XW-80A 型旋涡混合器, 上海医大仪器厂; Himac CR 22G II 型高速离心机, 日本 Hitachi 公司; N-EVAP™112 型氮气吹扫仪, 美国 Organomation 公司; Milli-Q 型超纯水仪, 美国 Millipore 公司; 96 孔微孔板 (12×8), 美国 Costar 公司。

三羟甲基氨基甲烷 (Trizma base, Tris), Sigma 公司; 无水氯化镁 (MgCl₂), 上海安普科学仪器有限公司; 对硝基苯磷酸二钠 (p-nitrophenyl phosphate disodium, p-NPP), Sigma 公司; 1, 4-二巯基苏糖醇 (DL-1,4-Dithiothreitol, DTT), 百灵威科技有限公司; 乙二胺四乙酸 (Ethylenediaminetetra acetic acid, EDTA), Sigma 公司; 牛血清白蛋白 (Bovine serum albumin, BSA), 百灵威科技有限公司; 甲醇 (HPLC 级), Merk 公司; 超纯水 (18.2MΩ·cm); 蛋白磷酸酶 2A (protein phosphatase 2A, PP2A, 10 U), Sigma 公司; 大田软海绵酸 (okadaic acid, OA), 加拿大海洋生物科学研究所。

贝类样品为海湾扇贝、长牡蛎和紫贻贝, 于 2013 年 8 月采自环渤海, 洗净、去壳、匀浆后-20 °C 冷冻保存。

1.2 测试溶液的配制

缓冲溶液 (A 溶液): 30 mmol/L Tris-HCl, 2 mmol/L EDTA, 20 mmol/L MgCl₂ 缓冲溶液, pH 8.4, 4 °C 冷藏; BSA 溶液 (B 溶液): 用 A 溶液配制 0.2 mg/mL 的 BSA 溶液 (含 2 mmol/L DTT), 4 °C 冷藏; 酶溶液 (C 溶液): 用 B 溶液配制 1.25 U/mL PP2A 酶溶液, 配制过程中轻微振荡使其溶解 (不可以剧烈振荡, 避免蛋白聚合)。在室温 (22 °C±2 °C) 下放置 30 min, 使磷酸酶充分水解, 此溶液配制后应立即使用; 测试溶液 (D 溶液): 用 B 溶液配制 25 mmol/L p-NPP 溶液, 作为底物溶液, 避光保存。

1.3 样品预处理

1.3.1 提取

称取 2.00 g 匀浆的贝类样品置于 50 mL 具塞离心管中, 加入 8 mL 甲醇, 10000 r/min 均质提取 1 min, 于 8000 r/min 离心 5 min, 移取上清液并用甲醇定容至 10 mL。

1.3.2 水解

移取 1 mL 甲醇提取液至 5 mL 离心管, 先加入 125 μL 2.5 mol/L NaOH, 涡旋 10 s, 于 76 °C 恒温下加热 40 min, 冷却后再加入 125 μL 2.5 mol/L HCl 中和。最后, 将溶液氮吹近干, 加入缓冲溶液 (30 mmol/L Tris-HCl, 2 mmol/L EDTA, 20 mmol/L MgCl₂ 缓冲溶液, pH 8.4) 定容至 1 mL, 稀释 10 倍后用于酶抑制法的测试。

1.4 标准曲线的绘制和样品测试

以测试溶液 A 稀释 OA 标准溶液, 分别得到 0.1、0.2、0.5、1、2、5、10、20、50 和 100 μg/L 共 10 个

不同浓度的系列标准溶液，用于制作标准曲线。

测试包括3组：(1)标准组：用于测定OA标准溶液对酶活力的抑制程度，以绘制标准曲线；(2)阴性对照组：用于测定未受抑制的酶活力值，测试体系中含有酶但不含OA抑制剂；(3)样品测试组：用于测定实际样品对酶活力的抑制程度。每一组中的反应液体积均为200 μL，其中包括100 μL酶溶液，50 μL测试样品溶液和50 μL底物溶液。标准组中的测试样品溶液为不同浓度的OA标准溶液；阴性对照组的测试样品溶液均以A溶液代替；样品测试组的样品溶液为稀释后的扇贝、牡蛎和贻贝的样品储存溶液（基质浓度为20 mg/mL）。

在96孔微孔板中加入100 μL 1.25 U/mL PP2A酶溶液，取制备好的待检样及标准溶液各50 μL分别加入相应的检测小孔，然后快速加入50 μL底物溶液，轻微振荡混合。样品和标准品测试做2~3个平行。室温下（22 °C±2 °C）黑暗中孵育1 h，使用酶标仪测试405 nm处的吸光度。以OA浓度为横坐标，以酶抑制率为纵坐标，采用SigmaPlot 10.0软件绘制四元参数Logistic回归方程。

酶活性抑制率计算公式：

$$\text{抑制率}(\%) = \left(1 - \frac{A_{\text{样品}}}{A_{\text{阴性对照}}} \right) \times 100$$

注：A为吸光度值。

2 结果与讨论

2.1 样品前处理方法的优化

检测贝类中腹泻性贝毒素的前处理方法以甲醇^[10]或甲醇水溶液^[11]提取为主，有的方法增加了水解步骤^[12]，区别为对于未水解的样品来说，方法检测的为游离态的OA和DTXs，而对于水解的样品来说，因水解过程能将贝类中可能存在的OA和DTXs的酯化物转化为OA和DTXs，方法检测的为OA和DTXs及其酯化物的总量。而酶抑制法的检测原理是基于OA及其衍生物DTXs的生物毒性机理，测定的是OA及其衍生物毒性活性成分的总量，因此是否增加水解步骤影响酶抑制法的检测结果。本实验对前处理过程中未水解与水解的50个贝类样品进行了对比（表1），未水解样品如1.3.1提取后移取1 mL氮吹近干，以缓冲溶液定容后进行酶抑制法测试，同时取1 mL甲醇提取液过0.2 μm滤膜后LC-MS/MS分析；水解样品经提取后再经1.3.2步骤进行水解后测试，另取1 mL甲醇提取液同样步骤水解后氮吹近干，加入甲醇定容后过0.2 μm滤膜用于LC-MS/MS确证。由实验结果

看出，水解样品比未水解样品的检出率高，说明部分样品中存在OA和DTXs的酯化物，且DSP浓度高于筛选检出限（80 μg/kg）的样品经酶抑制法筛选和LC-MS/MS法比对验证的结果较为一致，因此用酶抑制法测试水解的贝类样品，能较真实地反映出样品的毒性大小，判定准确率高，可作为较理想的筛选方法。

表1 样品中大田软海绵酸检出率及其含量（μg/kg）

Table 1 Detection rate and OA content in some polluted samples

样品	酶抑制法		LC-MS/MS法	
	检出	含量	检出率	含量
未水解的扇贝样品	1/23	97.03	2/23	95.77, 27.81
水解的扇贝样品	2/23	153.12, 101.59	3/23	152.31, 109.24, 30.55
未水解的牡蛎样品	0/12	-	0/12	-
水解的牡蛎样品	0/12	-	0/12	-
未水解的贻贝样品	0/15	-	0/15	-
水解的贻贝样品	1/15	86.65	1/15	81.73

注：“-”为未检出。

2.2 基质浓度的影响

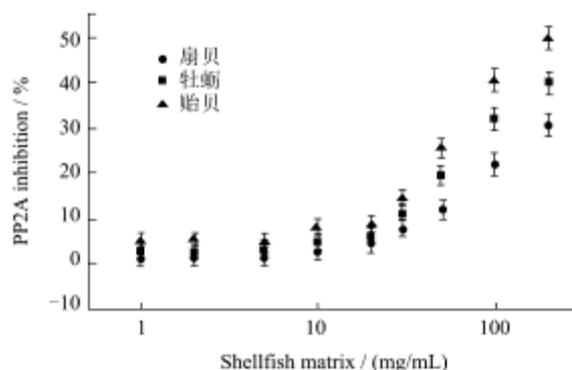


图1 不同基质浓度对PP2A酶活性抑制率的影响

Fig.1 PP2A inhibition percentage at different matrix concentrations

贝类样品基质复杂，内源性化合物的存在可能改变酶的自然环境，影响其活性。本实验选取阴性的扇贝、牡蛎和贻贝样品作为测试基质，重点考察了不同基质浓度（基质浓度点分别为1、2、5、10、20、30、50、100、200 mg/mL）对酶活性抑制率的影响。由图1所示，当基质浓度在1~20 mg/mL范围内变化时，酶活性抑制率在10%以内，且其变化不存在明显差异，

而基质浓度大于 20 mg/mL 时酶活性抑制率随基质浓度的增大而升高, 三种基质对酶活性抑制率的影响为贻贝>牡蛎>扇贝。根据 PP2A 酶抑制比色法中抑制率 10% 作为阈值的规定^[13], 低于 10% 抑制率认为对酶活性无显著影响, 因此本方法将 20 mg/mL 作为测试时的基质浓度。

2.3 剂量-反应标准曲线

根据不同浓度的 OA 对 PP2A 酶的抑制情况, 得到 OA 抑制酶活性的标准曲线 (图 2)。由图 2 可知, 标准曲线在对数坐标上呈“S”形分布。当 OA 浓度低于 1.60 μg/L (酶活性抑制率低于 10%) 时, 酶相对活性没有显著变化, 且样品测试的重复性降低, 重复 3 次的标准偏差较大, 因此在此范围内的测试结果准确性不高。当 OA 浓度在 1.60~20 μg/L 时, 酶活性抑制率从 10.05% 升到 90.37%, 相对酶活性对 OA 浓度的变化响应非常明显。当 OA 浓度高于 20 μg/L 时, 酶活性抑制率也没有明显变化, 对 OA 浓度的响应灵敏度降低。因此, 利用该标准曲线计算 OA 的有效浓度范围为 1.60~20 μg/L。以 10% PP2A 酶活性抑制率对应的 OA 浓度为检出限 (LOD), 50% PP2A 酶活性抑制率对应的 OA 浓度为半抑制浓度 (IC₅₀)^[14], 标准曲线方程由四元参数 Logistic 拟合得出。本方法的检出限, 半抑制浓度, 标准曲线及相关系数见表 2。由表 2 可见, 方法的检出限和半抑制浓度分别为 1.60 和 5.62 μg/L, 说明相对酶活性对 OA 浓度的变化较灵敏, 准确定量 OA 的最低浓度为 1.60 μg/L, 方法中优化的基质浓度为 20 mg/mL, 由此计算得检出限为 80 μg OA eq./kg 贝组织。该检出限低于小鼠生物法 (200 μg OA eq./kg 贝组织) 和目前许多国家采用的 DSP 食用安全标准 (160 μg OA eq./kg 贝组织), 且远低于我国《农

产品安全质量 无公害水产品安全要求》规定的 DSP 限量 (600 μg OAcq./kg 贝组织)。

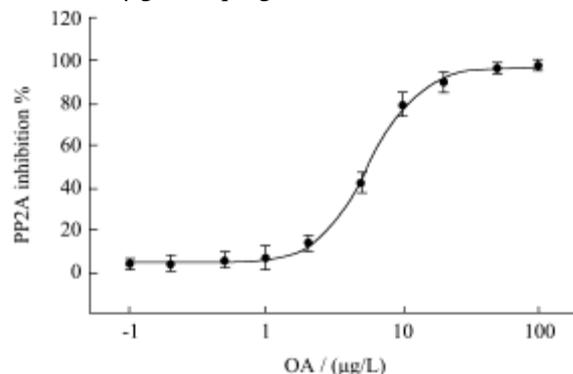


图 2 OA 抑制 PP2A 酶活性的标准曲线

Fig.2 Standard calibration curves obtained by inhibition of PP2A by OA

表 2 OA 抑制 PP2A 酶活性的四元参数 Logistic 拟合曲线参数

Table 2 Curve parameters derived from the sigmoidal logistic four-parameter fitting for the inhibition of PP2A by OA

	LOD/(μg/L)	IC ₅₀ /(μg/L)	Logistic 回归方程	R ²
PP2A 酶	1.60	5.62	$y = 5.00 + \frac{91.47}{1 + (\frac{5.72}{x})^{2.32}}$	0.9984

2.4 加标回收率与精密度

选用阴性的牡蛎、扇贝和贻贝为空白测试基质, 分别添加 3 个浓度的 OA 标准溶液, 每个浓度做 6 个平行样品, 按本方法进行加标回收率和精密度实验, 分析结果见表 3。由表 3 可见, 采用磷酸酶抑制比色法对三个浓度的加标样品进行测试, OA 的平均回收率为 90.43%~118.52%, 相对标准偏差小于 15%, 结果显示了较高的回收率和良好的精密度, 满足贝毒素的日常监测要求。

表 3 方法的加标回收率和精密度结果 (n=6)

Table 3 Recoveries and RSDs of the method (n=6)

分析物	添加浓度 (μg/kg)	长牡蛎		海湾扇贝		紫贻贝	
		回收率/%	RSD/%	回收率/%	RSD/%	回收率/%	RSD/%
OA	80	103.02	12.36	107.42	10.52	101.27	11.69
	160	112.57	7.91	95.97	13.93	115.58	9.97
	240	90.43	8.56	118.52	6.85	92.26	8.08

3 结论

建立了贝类中腹泻性贝毒素的磷酸酶抑制比色法。样品前处理过程中增加水解步骤, 能较真实地反映出样品的毒性大小, 准确率高; 优化的基质浓度使方法普遍适用于扇贝、牡蛎和贻贝样品; 样品前处理和检测步骤简单, 操作技术要求不高, 耗时较短 (<4

h)。样品分析结果以致腹泻性成分的总量进行测定 (以 OA 计), 继承了小鼠生物法进行毒素总量测定的优点, 但避免了伦理及假阳性问题; 方法回收率、重复性及筛选检出限较好, 不仅满足多个国家的限量要求, 更重要的是符合 CAC/EFSA 等国际组织有关贝毒素监控工作的方法要求, 可作为我国 DSP 监控工作一种理想的筛选方法。

参考文献

- [1] 吉薇,郑洁莹,曾雪萍,等.南海海域软骨藻酸(DA)贝类毒素的HPLC方法检测[J].现代食品科技,2011,27(1):120-122
JI Wei, ZHENG Jie-ying, ZENG Xue-ping, et al. HPLC analysis of domoic acid poisoning in south China sea [J]. Modern Food Science and Technology, 2011, 27(1): 120-122
- [2] 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
- [3] Creppy E E, Traore 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
- [4] Turrell E A, Stobo L. A comparison of the mouse bioassay with liquid chromatography-mass spectrometry for the detection of lipophilic toxins in shellfish from Scottish waters [J]. Toxicon, 2007, 50(3): 442-447
- [5] Artemis P L, Anastasia V B, Panagiota K, et al. Determination of okadaic acid, dinophysistoxin-1 and related esters in Greek mussels using HPLC with fluorometric detection, LC-MSMS and mouse bioassay [J]. Toxicon, 2010, 55(4): 724-733
- [6] 郭萌萌,谭志军,吴海燕,等.液相色谱-串联质谱法同时测定贝类中大田软海绵酸、鳍藻毒素、蛤毒素和虾夷扇贝毒素[J].色谱,2012,30(3):256-261
GUO Meng-meng, TAN Zhi-jun, WU Hai-yan, et al. Simultaneous determination of okadaic acid, dinophysistoxin, pectenotoxin and yessotoxin in shellfish by liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Chinese Journal of Chromatography, 2012, 30(3): 256-261
- [7] Sassolas A, Catanante G, Hayat A, et al. Improvement of the efficiency and simplification of ELISA tests for rapid and ultrasensitive detection of okadaic acid in shellfish [J]. Food Control, 2013, 30(1): 144-149
- [8] Garibo D, Devic E, Marty J L, et al. Conjugation of genetically engineered protein phosphatases to magnetic particles for okadaic acid detection [J]. Journal of Biotechnology, 2012, 157(1): 89-95
- [9] Albano C, Ronzitti G, Rossini A M, et al. The total activity of a mixture of okadaic acid-group compounds can be calculated by those of individual analogues in a phosphoprotein phosphatase 2A assay [J]. Toxicon, 2009, 53(6): 631-637
- [10] Gerssen A, McElhinney M A, Mulder P P J, et al. Solid phase extraction for removal of matrix effects in lipophilic marine toxin analysis by liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2009, 394: 1213-1226
- [11] 母清林,方杰,万汉兴,等.液相色谱-串联质谱法检测贝类产品中腹泻性贝类毒素[J].分析化学,2011,39(1):111-114
MU Qing-lin, Fang Jie, Wan Han-xing, et al. Determination of diarrhetic shellfish poisoning in shellfishes by liquid chromatography with tandem mass spectrometry [J]. Chinese Journal of Analytical Chemistry, 2011, 39(1): 111-114
- [12] Cimmiello P, Dell'Aversano C, Fattorusso E, et al. Investigation of the toxin profile of Greek mussels *Mytilus galloprovincialis* by liquid chromatography-mass spectrometry [J]. Toxicon, 2006, 47(2): 174-181
- [13] Garibo D, Damaso E, Eixarch H, et al. Protein phosphatase inhibition assays for okadaic acid detection in shellfish: Matrix effects, applicability and comparison with LC-MSMS analysis [J]. Harmful Algae, 2012, 19(3): 68-75
- [14] Hayat A, Barthelmebs L, Marty J L. A simple colorimetric enzymatic-assay for okadaic acid detection based on the immobilization of protein phosphatase 2A in sol-gel [J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2012, 166(1): 47-56