

## 综述

## 海洋生物毒素检测的动物试验替代方法及标准化

程树军<sup>1</sup>,焦红<sup>1</sup>,谈伟君<sup>2</sup>

(1. 广东出入境检验检疫技术中心食品实验室, 广东 广州 510623;

2. 广东药学院食品科学学院, 广东 广州 510310)

**摘要:** 海洋生物毒素结构多样、种类繁多、作用机制复杂,给人类健康带来潜在的风险。使用动物模型检测贝类组织中的海洋毒素是许多国家监控计划推荐的方法。近年来,新的基于毒性作用机制和明确化学结构的检测方法不断被开发,如细胞检测法、免疫学方法、化学分析法和生物传感器方法等。有的方法已进入标准化和验证程序,逐渐被认可用于监控和检测目的。

**关键词:** 海洋生物毒素;动物实验;替代方法;标准化;食品安全

**中图分类号:** S94;TQ658 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-8456(2011)04-0373-05

**Alternative methods for testing marine biotoxin in animal models  
and the standardization of these methods**

Cheng Shujun, Jiao Hong, Tan Weijun

(Food Lab of Guangdong Entry-Exit Inspection and Quarantine Technology Center,  
Guangzhou 510623, China)

**Abstract:** Marine biotoxins bring potential health risks to human. Because of the complexity of chemical structure and the diversity of action mechanism of marine biotoxin, monitoring programs in many countries use animal models to detect the presence of marine biotoxin in shellfish tissues. Many new assay methods based on the mechanism and definite chemical structure of marine biotoxin were developed in recent years, including functional, immunological, chemical methods and biosensors. Several methods are going on the way of validation and standardization, and are gradually accepted by regulations.

**Key words:** Marine biotoxin; animal test; alternative method; standardization; food safety

海洋生物毒素主要由藻类或浮游植物产生,通常根据毒性作用机制分为腹泻性贝毒(DSP)、麻痹性贝毒(PSP)、神经性贝毒(NSP)和记忆缺损性贝毒(ASP) 4类。石房蛤毒素(saxitoxin, STX)及其衍生物属于麻痹类毒素,软骨藻酸(domoic acid, DA)属于遗忘毒素,冈田软海绵酸(okadaic acid, OA)和翅甲藻毒素(DTX)属于腹泻类贝类毒素,其中原多甲藻酸(azaspiracid, AZA)、扇贝毒素(pectenotoxin, PTX)和虾夷扇贝毒素(yessotoxin, YTX)属于亲脂毒素<sup>[1]</sup>。海洋生物毒素可以在滤食性的软体贝壳类动物的组织内蓄积,例如蚌、扇贝、蛤蚌、牡蛎等。如果人类食用了受污染的贝类动物会给健康带来很大风险,甚至引起死亡。因此,海洋生物毒素监控既是海洋水产品质量的监测项目,也是反映生态

环境变化的敏感指标。

传统生物毒素的检测法是动物试验,如检测PSP、DSP、NSP和ASP的小鼠生物试验法(MBA),检测DSP的大鼠生物法(RBA),有的方法已使用了50多年,多数MBA法是美国官方分析化学师协会(AOAC)指定的检测方法。但是近年来,随着人们对海洋生物毒素作用机制认识的不断深入,新的基于机制的检测方法被开发,而且在欧美等发达国家动物福利运动和3R(实验动物的减少、优化和替代)理念的推动下,国际社会明显加快了新的替代方法的验证和法规认可进程。现将替代方法的进展及标准化介绍如下。

### 1 海洋生物毒素检测的动物试验及局限性

MBA法的原理是将待检样品的提取液直接给小鼠腹腔内注射,观察临床症状和记录死亡时间。PSP的MBA法建立于1937年,是AOAC和欧盟指令91/492/EEC指定的检测方法,检测限值近似40 μg STXeq/100 g 贝壳组织,是目前最高残留限量

收稿日期:2010-05-19

基金项目:广东省科技计划项目(2009B060300013)

作者简介:程树军 男 博士 副研究员 硕士生导师 研究方向  
为动物试验替代方法研究及标准化 E-mail:chengcjq@sohu.com



化学装置可作为生物工具对样品中的毒素进行筛选和评估。以 PP2A 为基础的 OA 毒素类功能检测方法已有商业化检测试剂盒。

(3) 虾夷扇贝毒素 (YTX) 类毒素: YTX 类毒素对磷酸二酯酶 (PDE) 活性具有增强作用, 而后者直接作用于环磷酸腺苷, 基于此机制, 建立了以培养的上皮细胞中 E-钙粘蛋白的测量为基础的 PDE 活性生物化学分析方法。检测程序涉及到细胞提取物的免疫印记法、荧光分析法和离子体共振 (SPR) 技术。Fonfria 等<sup>[8]</sup> 使用带有生物特异性评估软件的 x 表面等离子体共振生物传感器来定量测定 YTX, 结果表明信号与剂量呈正相关。如果采用多孔滴定板快速 (1 h) 荧光分析, 可适用于大量样品的筛选。

虽然目前开发的细胞检测方法取得了进展, 有些方法已完成了实验室间验证, 很多检测方法具有代替动物实验的商业化应用前景, 但是每个试验方法都应以国际通用的准则和程序进行正式验证, 需要从以下方面努力: ① 当受试样品只存在一种单一毒素时, 要能证明这种方法分析的准确性。② 对含有混合毒素的检测样品应能提供有良好重复性的证据, 最好通过一个参照机构使用同样的细胞方法对单一材料中毒素的总含量进行估计。③ 被测样品用单一法定方法分析评估得到的数据可以由细胞检测方法通过数据转化得出; ④ 进一步明确每个毒素类别中主要分析物的毒素等效因子的估计值, 以及其在独立程序中的特征描述; ⑤ 制备用于方法比较和实验室间验证的参照材料。

## 2.2 免疫学方法

免疫学方法建立在抗体与化合物特异性结合的基础上。可以将制备好的毒素抗体用于一系列的试验, 包括酶联免疫吸附试验 (ELISA)、横向流动免疫测定 (LFIA) 和基于表面等离子体共振的生物传感器 (SPR)。免疫学方法实际上是通过非功能分子的化学识别, 而不是对样品中毒素的直接测定。在只有一种毒素存在并且其抗体特异性高的情况下, 样品中毒素浓度的测量与其毒性直接相关 (如 DA 毒素的检测)。但在其他情况下, 抗体测定法的结果只能用于样品毒性的估计。由于这个不足, 免疫测定法只能当作筛选或定性方法, 不能作为定量方法。

(1) 遗忘毒素 (ASP): 已有许多免疫学测定方法, 包括检测 ASP 的横向流动免疫色谱法 (LFIC)、ELISA 法和 SPR 生物传感器技术。Yu 等<sup>[9]</sup> 研制出一种用于测定 ASP 中软骨藻酸毒素的光学免疫传感器。该毒素以共价键连接着一个混合自组装单

层膜 (SAM) 的改性的 SPR 芯片, 采用竞争法测定。由于该仪器的 SPR 的高灵敏度和 SAM 上非特异抗体吸附的减少, 检测限为 0.1 ng/ml, 远低于 ELISA 方法的检出限 (4 ng/ml)。Micheli 等<sup>[10]</sup> 使用微分脉冲伏安法耦合的 electrochemical immunosensor 检测 DA, 该免疫传感器建立在间接竞争免疫测定的基础上, 使用的是一次性的丝网印刷电极, DA 与牛血清白蛋白共轭结合后涂在工作电极表面, 经过样品 (或标准毒素) 和抗体孵育后, 用山羊 IgG 抗体-碱性磷酸酶 (AP) 来产生信号。结果表明, 电化学系统比较简单, 而且检测成本较低。

(2) 麻痹类毒素 (PSP): 目前有抗体法和受体锚定法 2 种方法检测石房蛤毒素 (STX)。抗体方法已经从 ELISA 方法向侧向横流免疫色谱 (LFIC) 的标准化试剂盒发展, 已完成协作试验, 有望通过 AOAC 的认可。采用这类 LFIC 试剂盒 (如 MIST Alert™) 检测 PSP, 可以在不到 20 min 时间内得到 40 μg/100 g 的检测极限, 非常方便田间试验和终产品的检测。

(3) 神经性贝毒 (NSP): 目前已有 ELISA 方法检测短裸甲藻毒素, 并被美国官方认可。Garthwaite 等<sup>[11]</sup> 提出了一套针对 NSP 毒素的 ELISA 检测法, 在支持膜上采用化学固定技术先将 P 短裸甲藻毒素 (PbTx-3) 抗原与牛血清白蛋白共轭, 然后通过牛血清白蛋白上的赖氨酸基团与固定的膜形成共价闭环, PbTx-3 抗体与葡萄糖氧化酶共轭连接, 然后将两者放在一起孵育, 让其发生抗体抗原反应, 用 β-D-葡萄糖来检测过氧化氢的生成量。在没有游离 PbTx-3 竞争的情况下信号最强, 在有竞争的情况下, 信号与游离 PbTx-3 的浓度成反比。对于 PbTx-3 的检测限为 0.53 mg/ml, 其优势是可以直接分析海水, 而且有潜力作为鉴别有毒鞭毛藻的工具。

总之, 当结果有质疑时, 目前只有少数免疫检测方法可作为确证方法, 但是, 多数免疫学方法作为替代动物试验的筛选方法是非常有应用前景的。

## 2.3 化学分析方法

化学分析方法以液相色谱 (LC) 分离原样或净提取物为基础, 然后用物理化学方法进行特异性毒素检测, 例如用紫外线 (LC-UV)、荧光法 (LC-FL) 或质谱分析法 (LC-MS)。由于这些方法对化合物检测的特异性, 化合物中单一物质的单独浓度的原始数据必须用转换因子转换成毒素当量。化学方法是目前欧盟等法规检测海洋毒素的定量分析方法 (如 HPLC 检测 ASP), 如德国已废除了体内动物试验方法, 而采用生物化学检测和化学分析方法。缺点是需要高纯度对照标准品, 而对于大多数毒素, 合成

或提纯这样的标准品非常困难。

### 2.4 生物传感器方法

生物传感器以生物化学和传感技术为基础,是用生物活性物质(如酶、抗体、抗原、细胞等)作识别元件,配以适当的物理或化学信号转换器所构成的分析工具。传感器技术是建立在对毒素作用机制充分了解的基础上,适用于贝毒的快速检测,多数方法仍处于实验室开发阶段。

短裸甲藻毒素和西加毒素等麻痹性贝毒(PSP)的作用机制是与钠通道受体靶部位结合,激活钠通道,增加钠离子通透,而对静息电位或钾通道无作用。青蛙的膀胱膜含有丰富的钠离子通道,用青蛙膀胱膜覆盖 Na<sup>+</sup> 电极,使之形成一个流动的细胞。然后对钠离子的运输进行研究,可以用于毒素的检测。

OA类毒素的作用机制是对蛋白磷酸酶2A(PP2A)产生特异性抑制作用,利用这一特点,Campas 和 Jean-Louis<sup>[12]</sup>2007年开发了一种用于OA的电化学检测酶传感器,这种传感器建立在固定该毒素的PP2A酶的抑制作用和由酶引起脱磷酸化作用之后才具有电化学活性的酶基质的基础上。使用石英晶体微天平(QCM)来测定OA,采用直接竞争法结合化学发光检测技术以提高检测的灵敏度。

对于神经性贝毒(NSP)的检测可有类似的方法,如由 Kulagina 等<sup>[13]</sup>开发神经元网络生物传感器检测PbTx-3,利用的是PbTx-3对胞外动作电位的效应,尽管这两种毒素在神经组织上具有不同的作用(STX抑制动作电位的传播,PbTx-3增强钠离子通道的激活能力),但同时都抑制脊索神经网络的

平均的锋电位几率。PbTx-3的检测限在缓冲溶液中为296 pg/ml,在稀释25倍的海水中为430 pg/ml。

目前用于贝类毒素检测的商业化产品并不多见。其原因主要是:大多数生物传感器只能完成某一特定指标的分析,且不能像免疫分析一样进行多样品的同时检测,这就使其应用范围受到极大限制;检测的稳定性仍有待进一步验证,生物识别元件的再生及可重复利用问题并未得到根本解决。针对以上问题,今后的研究趋势应当是:通用型快速检测平台的建立;逐步向蛋白质芯片过渡,能够完成多指标、多样品的同时检测;检测设备应朝着小型化、集成化、自动化的方向发展,使之能用于现场快速筛选。作为一种新兴的现代分析手段,生物传感器本身具有许多独特的优势,尽管目前仍有许多缺陷有待弥补,但随着研究的不断深入和技术的不断发展,相信它会拥有非常广阔的发展前景<sup>[14]</sup>。

### 3 替代方法的标准化

尽管生物毒素的检测方法已经取得较大进展,许多具有前景的替代方法正在开发或进入验证阶段(见表2)<sup>[3]</sup>。但迄今为止只有3种AOAC正式方法用来检测海洋生物毒素:PSP毒素检测的MBA方法;DA毒素检测的HPLC方法;STX毒素类检测的HPLC方法。

目前欧洲标准委员会(CEN)已完成标准化的海洋生物毒素分析方法分别是<sup>[14]</sup>:用来检测贝类DA毒素的LC-UV方法、PR-HPLC加荧光法,检测OA毒素的前置柱衍生作用加荧光检测的LC-FL方

表2 海洋生物毒素的动物试验及替代方法

Table 2 Animal testing and alternative methods for marine biotoxins

毒素类别	细胞检测方法	免疫学方法	化学分析方法	动物实验
原多甲藻酸(AZA)	细胞形态		LC-MS	MBA/RBA
短裸甲藻毒素	钠通道受体结合试验神经母细胞瘤	ELISA	LC-MS	APHA-MBA
环状亚胺			LC-MS	MBA
软骨藻酸(DA)	受体结合试验	ELISA, 免疫传感器	LC-UV, LC-FL, LC-MS, TLC	
冈田软海绵酸(OA)	PP2A, PPI, F-肌动蛋白	ELISA	LC-MS, LC-FL	MBA/RBA
腹泻性贝毒(PTX)	F-肌动蛋白		LC-MS, LC-FL, LC-UV	MBA
石房蛤毒素(STX)	钠通道受体结合试验;saxiphilin受体结合试验;神经母细胞瘤	ELISA, LFIC, FIFLD	LC-FL, LC-MS	AOAC-MBA
扇贝毒素(YTX)	E-钙粘附分子片断;PDE-增强试验	ELISA	LC-MS, LC-FL	MBA

注:MBA:小鼠生物检测;RBA:大鼠生物检测;AOAC-MBA:小鼠生物检测按照AOAC标准;APHA-MBA:美国公共卫生协会小鼠生物检测;PP2A:蛋白磷酸酶2A;PPI:蛋白磷酸酶1;PDE:磷酸二酯酶;LFIC:侧向横流免疫色谱;LC-FL:液相色谱-荧光检测;LC-MS:液相色谱-质谱检测;LC-UV:液相色谱-紫外吸收检测;TLC:薄层色谱分析;FIFLD:流动注射荧光检测。

法,检测贝壳类STX和dc-STX毒素的前置柱衍生作用加荧光检测的LC-FL方法,检测贝壳类OA毒素的有后置柱衍生作用加荧光检测的LC-FL方法等,所有这些方法都以液相色谱技术为基础。原则

上,标准的CEN方法也可以采用其它技术,例如细胞功能检测、免疫学测定、化学分析和生物传感器技术。前提是这些方法的科学性和相关性能满足特定目的之需要,即经过验证。虽然动物试验仍在

世界范围内被广泛应用,但 CEN 没有针对海洋毒素检测的动物试验统一标准,例如目前在 EU 法规中用于检测 PSP、DSP 毒素和其它一些亲脂毒素用 MBA 方法就存在许多试验方案。

CEN 认为制定海洋毒素检测标准的目的是主要是保障人类健康和安,对国际贸易来说不是很重。但在实际工作中,CEN 标准通常被用作确证方法。目前已有一些替代方法被推荐作为食品法典委员会的参照方法,例如细胞功能检测、免疫学检测、化学分析和生物传感器技术。未来 CEN 标准化工作的重点应主要集中在:LC-MS 方法的标准化,尤其是对贝壳类水生动物中的亲脂毒素,PSP 毒素和 ASP 毒素的优先次弃应降低。因为在替代动物试验的压力下,亲脂毒素的传统动物试验方法被广泛质疑<sup>[3]</sup>,开发化学方法(例如 LC-MS)备受期待。

#### 4 结语

动物试验替代方法的研究是海洋生物毒素检测技术研发的热点,目前标准化的检测技术和商品化的试剂盒还难以满足需要,其中需要解决的问题包括:多数细胞检测法或化学分析法只能完成某一特定类别毒素的分析,使其应用范围受到一定限制;免疫学方法虽然能进行多样品的同时检测,但灵敏度和检测限还不能满足监控要求;替代方法的稳定性仍有待进一步验证,生物传感器方法中生物识别元件的再生及可重复利用问题并未得到根本解决;替代方法的适用范围需要明确。随着人们对海洋生物毒素作用机制的深入了解和检测技术的进步,在 3R 原则的推动下,相信会有许多替代动物实验的方法被研发并应用于海洋产品的质量检测<sup>[15]</sup>。

#### 参考文献

- [ 1 ] FAO. Report of the Joint FAO/IOC/WHO Ad hoc expert consultation on biotoxins in molluscan bivalves [ R ]. FAO, 2005:1-8.
- [ 2 ] STABELL O B, STEFFENAK I, AUNE T. An evaluation of the mouse bioassay applied to extracts of diarrhoeic shellfish toxins food and chemical [ J ]. *Toxicology*, 1992, 30:139-144.
- [ 3 ] HESS P, GRUNE B, ANDERSON D B, et al. Three Rs approaches in marine biotoxin testing [ J ]. *ATLA*, 2006, 34: 193-224.
- [ 4 ] AUNE T, RAMSTAD H, HEIDENREICH B, et al. Zinc accumulation in oysters giving mouse deaths in paralytic shellfish poisoning bioassay [ J ]. *J Shellfish Res*, 1998, 17:1243-1246.
- [ 5 ] TWINER M J, REHMANN N, HESS P, et al. Azaspiracid shellfish poisoning: a review on the chemistry, ecology, and toxicology with an emphasis on human health impacts [ J ]. *Marine Drugs*, 2008, 6:39-72.
- [ 6 ] ROSSINI G P. Functional assays in marine biotoxin detection [ J ]. *Toxicology*, 2005, 207:451-462.
- [ 7 ] LOUZAO M C, VIEYTES M R, BAPTISTA D E, et al. A fluorimetric method based on changes in membrane potential for screening paralytic shellfish toxins in mussels [ J ]. *Analy Biochem*, 2001, 289:246-250.
- [ 8 ] FONFRIA E S, VIARINO N, VIEYTES R, et al. Feasibility of using a surface plasmon resonance-based biosensor to detect and quantify yessotoxin [ J ]. *Anal Chim Acta*, 2008(1): 1-4.
- [ 9 ] YU Q M, CHEN S F, TAYLOR A D, et al. Detection of low-molecularweight domoic acid using surface plasmon resonance sensor [ J ]. *Sensors and Actuators B*, 2005, 107: 193-201.
- [ 10 ] MICHELI L, RADOI A, GUARINA R, et al. Disposable immunosensor for the determination of domoic acid in shellfish [ J ]. *Biosens Bioelectron*, 2004, 20: 190-196.
- [ 11 ] GARTHWAITE I, ROSS K M, MILES C O, et al. Polyclonal antibodies to domoic acid, and their use in immunoassays for domoic acid in sea water and shellfish [ J ]. *Natural Toxins*, 1998, 6:93-104.
- [ 12 ] CAMPAS M, JEAN-LOUIS M. Enzyme sensor for the electrochemical detection of the marine toxin okadaic acid [ J ]. *Anal Chim Acta*, 2007, 605: 87-93.
- [ 13 ] KULAGINA N V, MIKULSKI C M, GRAY S, et al. Detection of marine toxins, brevetoxin-3 and saxitoxin, in seawater using neuronal networks [ J ]. *Environ Sci Technol*, 2006, 40(2):578-583.
- [ 14 ] European Committee for Standardization. European Standard CEN/TC 275. Foodstuffs-determination of domoic acid in shellfish and finish by RP-HPLC using UV detection [ S ]. CEN, 2008: 2-15.
- [ 15 ] 程树军,焦红.实验动物替代方法原理与应用 [ M ].北京:科学出版社,2010:544-554.