

利用电压敏感荧光染料测定贝体中的麻痹性贝毒

高利娟¹, 杨维东^{1,2*}, 刘洁生^{1,2}

1. 暨南大学生物工程学系, 广东 广州 510632

2. 水体富营养化与赤潮防治广东省高等学校重点实验室, 广东 广州 510632

摘要 麻痹性贝毒(paralytic shellfish poisoning, PSP)是分布最广、危害最大的赤潮毒素,可阻断钠离子通道从而抑制动作电位的形成导致动物体中毒。以膀胱癌移行细胞 T24 为实验材料,采用电压敏感荧光染料 bis-oxonol,根据 PSP 毒素 GTX_{2,3} 对藜芦定诱导细胞去极化的抑制作用,建立了一种麻痹性贝毒电压敏感荧光染料检测法。实验结果显示,在 2~100 ng·mL⁻¹ 范围内, PSP 毒素 GTX_{2,3} 可显著改变培养体系的荧光强度, GTX 浓度与荧光强度之间存在很好的线性关系。市售贝类 PSP 毒素检测结果表明,此方法测定结果与小鼠法基本一致,但灵敏度更高,说明根据 GTX 浓度与荧光强度之间的线性关系可实现对样品中 PSP 毒素的快速检测。利用电压敏感荧光染料测定贝体中的麻痹性贝毒是一种非常有潜力的贝毒快速筛查方法。

关键词 麻痹性贝毒; 荧光染料

中图分类号: Q948.8, X55 **文献标识码**: A **DOI**: 10.3964/j.issn.1000-0593(2009)04-1032-04

引言

近年来,全球范围内有害赤潮发生的频率、规模及其危害效应呈现逐渐上升的趋势,给人类健康、水产养殖和海洋生态系统带来严重的危害。赤潮的主要危害之一是某些赤潮藻类能够产生毒素,毒素通过食物链进入贝体内,人们食用染有贝毒的贝类后造成中毒甚至死亡^[1]。赤潮毒素的毒性各异,根据毒素对人类引发的中毒症状和藻源,可分为麻痹性贝毒(paralytic shellfish poisoning, PSP)、腹泻性贝毒(diarrhetic shellfish poisoning, DSP)、神经性贝毒(neurotoxic shellfish poisoning, NSP)、记忆缺失性贝毒(amsia shellfish poisoning, ASP)和西加鱼毒(ciguatera)等,其中以 PSP 分布最广,危害最大。我国 4 大海域均有检出^[2]。PSP 毒素是一类神经肌肉麻醉剂,与兴奋膜上的电压门控 Na⁺ 通道位点的氨基酸残基高度亲和,通过选择性阻断 Na⁺ 内流,抑制动作电位的形成,造成神经系统传输障碍^[3]。PSP 对酸、热稳定,一般的食品加工很难破坏其毒性,中毒后死亡率非常高,其中石房蛤毒素毒性是眼镜蛇毒素的 80 倍。更严重的是,这类毒素目前尚无对症的解毒剂。因此,国内外对 PSP

的检测,特别是 PSP 毒素的快速筛查技术尤为重视。

目前国际上有关 PSP 的调查、检测多采用小鼠法和 HPLC^[4]。小鼠法虽然快捷,能给出样品的毒性,但需大量的老鼠,花费大、耗时、灵敏度低、假阳性高、受待检样品量和标准活体动物的限制,用于批量样品的检测尚不够理想。HPLC 对样品预处理条件要求很高,费用昂贵,且标准品问题难以有效解决,更重要的不能及时有效、准确地反映样品的实际毒性,因而也不理想。

利用电压敏感染料(Voltage sensitive dye)光学记录膜电位是电生理研究中的一项崭新技术,具有非介入性,高度时间、空间分辨力的特点^[5,6]。应用电压敏感染料对记录细胞或组织进行一定的染色,当膜电位变化时,作为分子转换器,电压敏感染料随膜电位的变化在膜表面出现荧光或吸光变化,这些光学变化被探测系统记录,从而获得膜电位变化的信息^[7-9]。Bis-oxonol 是一种慢反应电压敏感染料,潘雅萍等^[10]利用 Bis-oxonol 建立了一种适用于高通量的钾通道调节剂快速筛选方法。Russell 等^[11]根据 PSP 毒素能够抑制藜芦定诱导神经突触体去极化作用的原理,利用对电压敏感的荧光玫瑰精探针检测神经突触体膜电压的变化用于 PSP 的检测。由于该方法直接利用了毒素的毒理特征,能真正反映

收稿日期: 2008-05-10, 修订日期: 2008-08-20

基金项目: 国家重点基础研究发展规划“973”项目(2001CB409710), 国家自然科学基金-广东省联合基金重点项目(U0733006), 广东省科技计划项目(2003C20412)和广州市科技计划项目(2002J1-C0011)资助

作者简介: 高利娟,女,1981年生,暨南大学生命科学技术学院硕士研究生 e-mail: gaoli_138@163.com

*通讯联系人 e-mail: tywd@jnu.edu.cn

样品的实际毒性,且灵敏度高、操作简单、方便,对仪器的要求不高,因此是一种颇有潜力的贝毒筛选方法。但由于小鼠突触体的制备比较复杂,影响和限制了其推广和应用。为克服这一缺点,本文拟选择易培养且钠通道丰富的膀胱癌移行细胞 T24,采用 Bis-oxonol 建立一种以细胞为基础的、基于毒素毒理特征的、用于 PSP 毒素检测的电压敏感荧光染料测定法。

1 实验部分

1.1 主要仪器与试剂

CO₂ 培养箱(美国 Themro), F-4500 荧光分光光度计(日本 Hitachi), 超净工作台(苏州), 倒置显微镜(日本 Olympus), 电热恒温鼓风干燥箱(南京), 低速离心机(Dopont), 电子天平, 血球计数板。

胎牛血清(杭州四季青公司), DMEM/F12(1:1)培养基(杭州吉诺公司), 胰蛋白酶(上海生工), 荧光染料 Bis-oxonol, 藜芦定(Veratridine)和短杆菌肽(Gramicidin)(Sigma 公司), GTX2,3 由暨南大学理工学院江天久研究员提供, 其他试剂为分析纯。

1.2 实验动物与细胞

膀胱癌移行细胞系 T24 购于中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心;昆明系雄性小鼠,体重 16~20 g,由暨南大学实验中心提供;贝类购自广州市黄沙海产品批发市场,共 5 种,分别为海湾扇贝(*Argopecten irradians*)、华贵栉孔扇贝(*Chlamys nobilis*)、翡翠贻贝(*Perna viridis*)、毛蚶(*Scapharca subcrenata*)、西施舌(*Coelomactra antiquata*)。样品采集后,迅速送至实验室,洗净外壳泥沙,将肉与壳分离。对于海湾扇贝和华贵栉孔扇贝,将其消化腺剪下单独保存,将处理的样品立即放入 -20℃ 冰箱冻存备用。

1.3 细胞培养

将 T24 细胞接种于 25 cm² 的细胞培养瓶中,加入含 10% 胎牛血清的 DMEM/F12(1:1)培养基,于 37℃、5% CO₂、饱和湿度的细胞培养箱中培养。1~2 d 换一次液,待细胞生长至对数生长期时,用 0.25% 胰蛋白酶消化传代。

1.4 细胞荧光强度与 PSP 毒素浓度的关系

荧光测定参照 Louzao 的方法^[12,13]。取适量细胞密度为 2.5 × 10⁵ cells · mL⁻¹ 的细胞悬液加入至 1 mL 的比色杯中,依次加入终浓度为 4 nmol · L⁻¹ 的 Bis-oxonol、40 μmol · L⁻¹ 的藜芦定和一定浓度的 GTX2,3 毒素标准品,使毒素的终浓度分别为 2, 20, 40, 80 和 100 ng · mL⁻¹,最后加入 10 μg · mL⁻¹ 短杆菌肽。对照组加入双蒸水。于激发波长 530 nm,发射波长 560 nm,狭缝 5.0 nm,流速 1 200 nm · min⁻¹ 条件下测定荧光,计算 GTX2,3 对荧光强度的抑制率,绘制抑制率与毒素浓度间的关系曲线。

1.5 贝类样品中毒素的分析

取适量贝肉,沥净多余水分,匀浆。取 100 g 于烧杯中,加入 100 mL 0.18 mol · L⁻¹ 盐酸溶液,搅拌均匀,调节 pH 2.0~4.0,徐徐煮沸 5 min,充分搅拌。冷却至室温,再次调节 pH 2.0~4.0,于 4 000 r · min⁻¹ 离心 5 min,取上清液,

即得 PSP 粗提液。

采用上述荧光染料测定法和小鼠生物测定法测定毒素含量。小鼠生物测定采用 AOAC(association of official analytical chemists)推荐的“麻痹性贝毒小鼠测定法”进行,结果以鼠单位(MU · g⁻¹)表示,1 个小鼠单位是指使 1 只体重 20 g 小鼠在 5 min 内死亡的毒素的量,相当于 0.18 μg STX。

2 结果与分析

2.1 细胞荧光强度随荧光染料的变化

于细胞悬液中加入 Bis-oxonol、藜芦定和一定浓度的 GTX2,3 后,细胞荧光强度的变化曲线如图 1 所示。可以看出,加入 Bis-oxonol 后细胞荧光强度趋于不变;加入藜芦定诱导细胞去极化后,荧光强度迅速增加;加入 GTX 后,荧光强度明显降低;加入短杆菌肽使细胞完全去极化,荧光强度再次升高。表明毒素 GTX 的加入可有效改变细胞的荧光强度。由于 Bis-oxonol 在细胞内外的分散具有电压依赖性,达到能斯特平衡后,加入藜芦定诱导细胞去极化。钠通道开放,Na⁺ 内流,阴离子染料 Bis-oxonol 被释放到细胞膜表面,膜表面染料浓度增加,荧光增强。加入钠通道的阻断剂 GTX2,3,降低藜芦定诱导的去极化,Bis-oxonol 又进入细胞内,细胞膜表面染料浓度降低,荧光强度也会降低。最后加入短杆菌肽使细胞完全去极化,荧光强度再次升高。

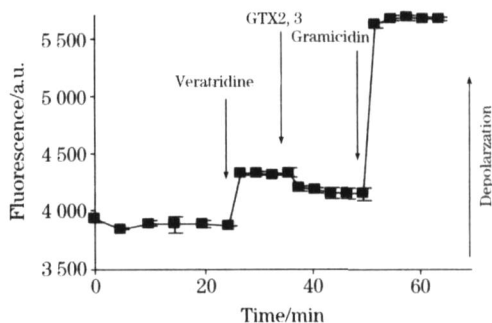


Fig 1 Changes of fluorescence intensity in T24 cells after addition of bis-oxonol, veratridine and GTX2,3

2.2 荧光强度与 GTX2,3 浓度的关系

图 2 为荧光强度与 GTX2,3 浓度的关系。可以看出,加入不同浓度 GTX 时,细胞荧光强度发生不同程度的降低,

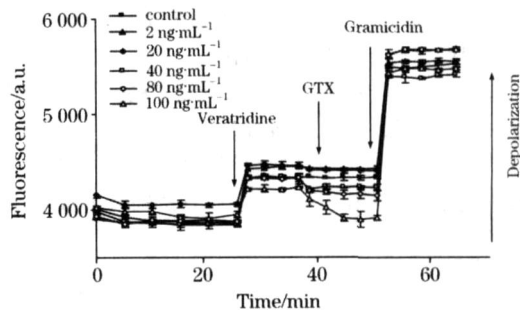


Fig 2 Changes of fluorescence intensity induced by different amounts of GTX2,3 in T24 cells

荧光强度的变化与 GTX 之间存在明显的剂量-效应关系。

进一步计算 GTX2, 3 对荧光强度的抑制率, 绘制抑制率与毒素浓度间的关系曲线, 如图 3。可以看出, 毒素浓度在 2~100 ng·mL⁻¹ 之间时, 抑制率与 GTX 的浓度呈明显的线性关系, R^2 达 0.98, 说明可以利用 PSP 毒素对藜芦定诱导细胞去极化的抑制作用来测定毒素的含量。

2.3 市售贝类 PSP 毒素的检测

市售贝类 PSP 毒素的检测结果如表 1 所示。由于不同的毒素毒力有显著不同, 为便于比较, 表 1 中将小鼠法和荧光法测定结果均换算成 STX 毒力, 1MU 相当于 0.18~0.22 μg STX, 1 μg GTX2, 3 相当于 0.76 μg STX。可以看出, 两种方法的检测结果基本一致, 荧光检测法比小鼠检测法检出限更低, 灵敏度更高, 小鼠法的检出限只有 160 ng STX·mL⁻¹, 相当于 210 ng GTX·mL⁻¹, 而荧光检测法的最低检

测限为 2 ng·mL⁻¹。

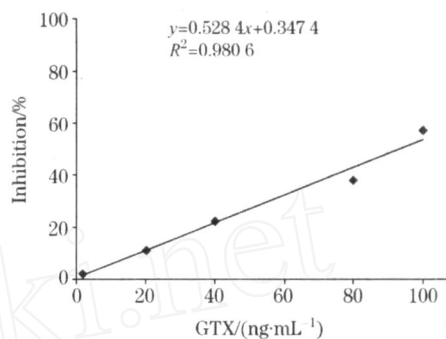


Fig 3 Relationship between the inhibition of GTX2, 3 on veratridine-induced depolarization and GTX2, 3 concentration

Table 1 PSP toxin value in shellfish obtained by fluorescence assay and by the mouse bioassay

贝样	小鼠检测法		电压敏感荧光染料检测法	
	毒素含量 /(μg GTX2, 3·g ⁻¹ 贝肉)	相对 STX 毒力 /(μg STX·g ⁻¹ 贝肉)	毒素含量 /(μg GTX2, 3·g ⁻¹ 贝肉)	相对 STX 毒力 /(μg STX·g ⁻¹ 贝肉)
毛蚶	0	0	0.61 ±0.37	0.45 ±0.25
翡翠贻贝	0	0	0.59 ±0.063	0.44 ±0.04
施舌	0	0	0.23 ±0.07	0.17 ±0.26
海湾扇贝	10.71 ±1.61	1.93 ±0.09	2.91 ±0.56	2.21 ±0.58
华贵栉孔扇贝	22 ±0.48	3.96 ±1.02	5.51 ±0.57	4.18 ±0.43

3 讨论

麻痹性贝毒(paralytic shellfish poison, PSP)是目前世界上分布最广、危害最严重的一类贝毒, 现已发现 20 多种衍生物, 按其取代基不同可分为四种类型^[14]: (1)氨基甲酸酯类毒素(Carbamate toxins), 包括石房蛤毒素(Saxitoxin, STX)、新石房蛤毒素(NeoSTX)和膝沟藻毒素 1-4(Gonyautoxins, GTX1- GTX4)等; (2)N-磺酰氨基甲酰基类毒素(N-sulfocarbamoyl toxins), 包括 B1-B2 和 C1-C4 等; (3)脱氨基甲酰基类毒素(Decarbamoyl toxins), 包括 dcSTX、dcneoSTX 和 dcGTX1-4 等; (4)脱氧脱氨基甲酰基类毒素(Deoxydecarbamoyl toxins), 包括 doSTX 和 doGTX2-3。不同毒素的毒力大小不同, 毒力大小依次为^[6]: STX > dcSTX = neoSTX > GTX1, 4 > dcneoSTX > GTX2, 3 > dcGTX2, 3 > GTX5。

由于 PSP 毒素属于剧毒品, 可作为化学武器, 国际上限制流通, 因此标准品的获得非常困难。另外, 新的 PSP 毒素衍生物的不断发现提示以 HPLC 为代表的成分分析法会存在毒素漏检的情况, 因此很难准确反映样品的实际毒性。其他方法如 MS-LC、毛细管电泳检测技术相对于传统的液相色谱技术有了一定的改进, 但这些方法需要昂贵的仪器设

备, 样品前处理复杂, 也存在类似 HPLC 的问题。免疫检测法方便、迅速, 但价格高, 偶联难度大且存在交叉反应, 不能完全体现出样品的毒性。

本文以膀胱癌细胞 T24 为材料, 采用荧光探针 Bis-oxonol, 借助 PSP 毒素阻塞钠通道的特性, 建立了一种以毒素毒理特征为基础的 PSP 毒素荧光测定法。实验结果显示, 毒素浓度在 2~100 ng·mL⁻¹ 之间时, 荧光强度的抑制率与 GTX 的浓度呈明显的线性关系, 表明利用 PSP 毒素对藜芦定诱导细胞去极化的抑制作用来测定毒素的含量是可行的。为进一步说明这一问题, 我们分别用本方法和小鼠生物测定法测定了市售贝类中的 PSP 毒素, 并进行了比较。结果表明, 两种方法检测结果基本相同, 与文献对相关贝类的检测结果基本一致^[15]。与小鼠法相比, 荧光法更敏感, 对 GTX 的最低检测浓度可达 2 ng·mL⁻¹ (约 0.02 MU·g⁻¹), 比小鼠法低 2 个数量级。更重要的, 由于该方法是根据 PSP 毒素的毒理特征设计的, 可以检出一些未知结构的 PSP 毒素, 有效避免了毒素漏检的情况。同时, 该方法对样品的提取无特别要求, 操作非常简单, 测定时间短。所用细胞膀胱癌细胞 T24 为常见细胞株, 易培养。实验室只需配备相应的细胞培养设备和荧光分光光度计, 就可开展 PSP 毒素的检测和筛查工作。因此, 本方法有很强的推广应用前景。

参 考 文 献

- [1] LIU Jie-sheng, YANG Wei-dong, CHE Jun, et al(刘洁生, 杨维东, 车 军, 等). *Oceanologia et Limnologia Sinica*(海洋与湖沼), 2003, 34(5): 566.
- [2] LIU Jie-sheng, NIE Li-hua, YANG Wei-dong, et al(刘洁生, 聂利华, 杨维东, 等). *Chinese Journal of Public Health*(中国公共卫生), 2006, 22(11): 1394.
- [3] LIU Jie-sheng, LI Yu-rong, NIE Li-hua, et al(刘洁生, 刘玉荣, 聂利华, 等). *Chinese Journal of Pathophysiology*(中国病理生理杂志), 2005, 21(7): 1368.
- [4] Hayashi R, Saito H, Okumura M, et al. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2006, 54: 269.
- [5] YANG Shi-ming, JIANG Si-chang, YANG Wei-yan, et al(杨仕明, 姜泗长, 杨伟炎, 等). *Progress in Physiological Sciences*(生理科学进展), 2002, 33(2): 106.
- [6] XU Zheng-hong, ZHANG Zhen-xi, WANG Jing, et al(徐正红, 张镇西, 王 晶, 等). *Spectroscopy and Spectral Analysis*(光谱学与光谱分析), 2007, 27(7): 1359.
- [7] Vale C, Alfonso A, Vieytes M R, et al. *Analytical Chemistry*, 2008, 80(5): 1770.
- [8] Plasek J, Sigler K A. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 1996, 33: 101.
- [9] Andrew C, Benniston A H, Iain E. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 2004, 163(1-2): 61.
- [10] PAN Ya-ping, XU Xiang-hua, WANG Xiao-liang(潘雅萍, 徐向华, 王晓良). *Acta Pharmaceutica Sinica*(药学报), 2004, 39(2): 85.
- [11] Russell A N, Li Guo-hua, Enrico B, et al. *Toxicol*, 2002, 40(6): 831.
- [12] Louzao M C, Vieytes M R, Cabado A G, et al. *Chemical Research in Toxicology*, 2003, 16(4): 433.
- [13] Louzao M C, Vieytes M R, Sousa J M V B, et al. *Analytical Biochemistry*, 2001, 289: 246.
- [14] Christian B, Luckas B. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2008, 391: 117.
- [15] YANG Li, YANG Wei-dong, LIU Jie-sheng, et al(杨 莉, 杨维东, 刘洁生, 等). *Journal of Hygiene Research*(卫生研究), 2006, 35(4): 435.

A Fluorescent Dye Method Based on Changes in Membrane Potential for Detecting PSP Toxins in Shellfish

GAO Li-juan¹, YANG Wei-dong^{1,2*}, LIU Jie-sheng^{1,2}

1. Department of Biotechnology, Jinan University, Guangzhou 510632, China

2. Guangdong Province's Higher Education Key Lab of Eutrophication and Red Tide Control, Guangzhou 510632, China

Abstract We developed a method to screen paralytic shellfish poisoning (PSP) toxins based on their functional activity. The assay was a fluorimetric assay by detecting changes in the membrane potential of transitional cell carcinoma of the bladder cells T24 and involved several steps: stain of T24 cells with fluorescent dye bis-oxonol, cell depolarization with veratridine, and inhibition of depolarization with PSP toxins GTX2,3 or shellfish samples containing PSP toxins. Toxic potency of the samples was evaluated by measuring toxin-induced changes in membrane potential. Within 2-100 nmol · L⁻¹ of GTX2,3, veratridine-induced depolarization was shown to be inhibited by GTX2,3 in a dose-dependent manner. There was a linear correlation between the percentage of inhibition and toxin concentration. The PSP toxin value in shellfish obtained by this fluorescence assay was in concordance with that by the mouse bioassay, and with higher sensitivity. In conclusion, the fluorescent dye method based on changes in membrane potential was a rapid, specific, and reliable method for detecting paralytic shellfish poisoning toxins in shellfish.

Keywords Paralytic shellfish poisoning toxins; Fluorescent dye

* Corresponding author

(Received May 10, 2008; accepted Aug. 20, 2008)