

研究简报

用蛋白磷酸酶抑制法-比色法检测水中微囊藻毒素类物质

王晓峰¹ 郭宗楼² 王 燕¹ 徐立红¹ 宋立荣³

(1. 浙江大学劳动卫生与环境卫生研究所, 杭州 310031; 2. 浙江大学生物系统工程与食品科学学院, 杭州 310029;
3. 中国科学院水生生物研究所, 武汉 430072)

DETECTION OF MICROCYSTIN CLASS COMPOUNDS IN WATER BY COLORIMETRIC PROTEIN PHOSPHATASES INHIBITION ASSAY

WANG Xiao-Feng¹, GUO Zong-Lou², WANG Yan¹, XU Li-Hong¹ and SONG Li-Rong³

(1. Institute of Occupational and Environmental Health, Zhejiang University, Hangzhou 310031; 2. College of Biosystem Engineering and Food Science, Hangzhou 310029; 3. Institute of Hydrobiology, The Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072)

关键词:微囊藻毒素;蛋白磷酸酶;比色法;水华

Key words: Microcystin; Protein phosphatase; Colorimetric method; Water bloom

中图分类号:X173 **文献标识码:**A **文章编号:**1000-3207(2003)04-0431-003

水体富营养化加剧水华的发生已成为全球性环境问题,水华的普遍发生使微囊藻毒素成为了一种存在广、影响大的天然有毒物,对水体尤其是富营养化水体中微囊藻毒素水平的监测是水环境监测的重要任务。因此,建立快速、灵敏、简便可行的蓝藻毒素检测体系以对毒素进行早期检测和预报是保护水生态系统和人类健康的关键措施之一。本研究建立了蛋白磷酸酶抑制法-比色法并对发生水华的水体中的微囊藻毒素类物质进行了测定。

1 材料与方法

1.1 仪器 Bio-TEK Synergy HT 酶标仪;BECKMAN-COULTERTM Microfuge[®]R 高速离心机, BECKMAN COULTERTM Optima 超速离心机。

1.2 试剂 六水对硝基酚磷酸钠(4-nitrophenyl phosphate disodium salt hexahydrate, 简写 pNPP) Molecular Probes 产品,微囊藻毒素 LR 由日本名城大学原田健一教授赠送,其他试剂均为分析纯。

1.3 水华样品及水样 采集 2002 年 10 月杭州贴沙河的水华样品及水样。将水样经 Whatman GF/C 滤纸过滤后直接测定其对蛋白磷酸酶活性的抑制。浓缩水样为上述过滤水样 50mL 经 Sep-Pak C18 富集,用甲醇洗脱,经氮气吹干后加入

1mL 蒸馏水得到浓缩 50 倍的水样。藻种鉴定:取水样 100mL,用 5mL 5%浓度的鲁哥氏溶液固定,沉淀取出用于藻鉴定。

1.4 蛋白磷酸酶 2A(PP2A)的分离纯化 根据文献^[1]方法,小鼠为浙江大学动物实验中心提供的 NIH 小鼠。

1.5 微囊藻毒素抑制标准曲线的制作 根据文献^[2]方法,反应系统由 0.25mol/L Tris-HCl (pH8.1), 10mmol/L MnCl₂, 0.2mol/L MgCl₂ 和 5mg/mL BSA 以体积比 50:4:26:20 于测定当日混合;底物溶液,由反应系统、60mmol/L pNPP (当日配制)和 20mmol/L DTT 以体积比 5:4:1 混合。将 10μL PP2A 和 10μL 不同浓度的标准 LR 溶液(浓度范围 1—100μg/L)混合于 96 孔板,37℃ 预热 5min,以加入 100μL 底物溶液开始反应,37℃,2h,反应完成后用酶标仪测定 OD₄₀₅,微囊藻毒素-蛋白磷酸酶活性抑制的标准曲线由 PP2A 相对活性对 LR 浓度作图得到,其 PP2A 相对活性百分比计算公式:PP2A 相对活性(%)=(含 LR OD₄₀₅-空白 OD₄₀₅)/(对照 OD₄₀₅-空白 OD₄₀₅)×100%,对照由蒸馏水代替 LR,空白由蒸馏水代替 PP2A 和 LR。标准曲线方程由测定数据根据非线性回归模型求得。

1.6 水样中微囊藻毒素的测定 将过滤水样、浓缩处理水样分别作为待测样用于蛋白磷酸酶抑制实验,根据对酶活性抑制百分比和标准曲线,计算样品中微囊藻毒素类物质的浓度。

收稿日期:2003-02-17;修订日期:2003-03-31

基金项目:国家高技术研究发展规划(2001AA641030);教育部博士点基金 20020335078 资助

作者简介:王晓峰(1979—),男,浙江桐乡人;浙江大学劳动卫生与环境工程专业硕士研究生;主要研究方向为环境毒理学

通讯作者:徐立红

2 结果与讨论

2.1 微囊藻毒素对蛋白磷酸酶作用的标准曲线

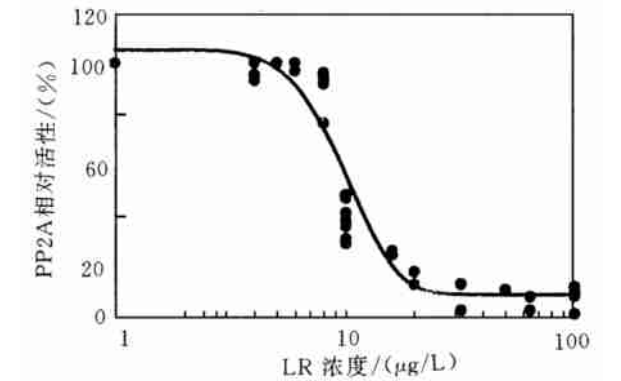


图 1 不同微囊藻毒素浓度对蛋白磷酸酶活性的影响
Fig.1 Effects of microcystins on protein phosphatase

图 1 是不同 LR 作用时蛋白磷酸酶的相对活性, 图形为一典型的 S 型曲线。根据 LR 浓度($\mu\text{g/L}$)与 PP2A 相对活性($\%$)的散点图可以推断 LR 浓度(x)与 PP2A 相对活性(y)之间的关系可用下列非线性回归模型来描述:

$$\hat{y} = a_1 \cdot e^{a_2 \left(\log(x) + a_3 \right)^{a_4} + a_5} \quad (1)$$

式中, a_1, a_2, a_3, a_4, a_5 为待定的回归系数; \hat{y} 为 y 的回归值。
求回归模型式(1), 即要求出待定的 a_1, a_2, a_3, a_4, a_5 回归系数, 使一切与 LR 浓度 x_i 对应的 PP2A 活性 y_i 与回归值 $\hat{y}_i = a_1 \cdot e^{a_2 \left(\log(x_i) + a_3 \right)^{a_4} + a_5}$ 的偏离达到最小。为此采用最小二乘法, 用该法所求出的偏差平方和达到最小值的回归曲线代表性最好。即确定的 a_1, a_2, a_3, a_4, a_5 回归系数应使式(2)达到最小:

$$\left(\min_{a_1, a_2, a_3, a_4, a_5} \sum_{i=1}^n \left(y_i - \hat{y}_i \right)^2 \right) = \left(\min_{a_1, a_2, a_3, a_4, a_5} \sum_{i=1}^n \left(y_i - \left[a_1 \cdot e^{a_2 \left(\log(x_i) + a_3 \right)^{a_4} + a_5} \right] \right)^2 \right) \quad (2)$$

式中, n 为试验数据点数。
式(2)是一个求极小值的无约束的非线性规划问题, 可以采用无约束非线性优化方法求解, 如共轭梯度法、牛顿法等。
将试验数据代入式(2), 调用非线性优化方法的计算机程序, 得 a_1, a_2, a_3, a_4, a_5 回归系数值为:

系数名	a_1	a_2	a_3	a_4	a_5
系数值	96.5484	-0.7084	0.0000	6.0000	8.6949

即
$$\hat{y} = 96.5484e^{-0.7084(\log(x))^6} + 8.6949 \quad (3)$$

用 y 代替 \hat{y} , 从式(3)解出 x 得
$$x = 10^{\left[-\ln \left(\frac{y - 8.6949}{96.5484} \right) / 0.7084 \right]^{\frac{1}{6}}} \quad (4)$$

根据图 1, 当 y 在 20%—80% 之间时, 毒素浓度与酶相对活性成线性关系。

2.2 水华样品鉴定及水样中微囊藻毒素的测定

2002 年夏季, 由于水交换受阻, 杭州市自来水备用水源贴沙河出现了明显的水华, 而且持续时间较长。经藻种鉴定, 证明形成水华的主要藻是铜绿微囊藻。

对水华其间采集的经过滤的原水样(水样 I)直接测定, 未发现对蛋白磷酸酶活性有抑制, 但当对水样进行简单的浓缩处理后, 浓缩 50 倍的水样(水样 II)可测定出其对蛋白磷酸酶活性的明显抑制。为使待测样品对酶活性的抑制百分比在标准曲线的线性范围内, 再对该浓缩水样进行适当稀释(水样 III), 根据式(4)从样品存在时 PP2A 相对活性 Y 计算出水样 III 中的微囊藻毒素类物质的浓度 X , 随后根据稀释倍数和样品浓缩倍数计算出原水样中毒素浓度, 结果表明贴沙河涵洞东西两侧水样中微囊藻毒素类物质的浓度分别为 $1.72\mu\text{g/L}$ 和 $1.17\mu\text{g/L}$ 。

表 1 水华样品中微囊藻毒素类物质的浓度($\mu\text{g/L}$)
Tab.1 Concentrations of microcystin class compounds in water bloom samples($\mu\text{g/L}$)

水华样品	西侧	东侧
相对活性($\%$) Y	26.5	25.3
水样 III (稀释倍数) X	14.3(6 倍)	14.6(4 倍)
水样 II 浓度	85.8	58.4
水样 I 浓度	1.72	1.17

2.3 讨论

目前, 虽有不同测定微囊藻毒素的方法, 但尚无一种方法能满足环境监测的各种测定要求。高效液相色谱法(HPLC)可对不同的微囊藻毒素作较准确定性定量测定, 但测定时间相对较长。酶联免疫吸附剂法(ELISA)比 HPLC 具有更高的灵敏度, 但选择性略差, 干扰较多。蛋白磷酸酶法可以反映各种毒素的总量、检测灵敏度高而且测定时间较短, 在用于环境监测时具有较多优势。最初采用蛋白磷酸酶的同位素标记生理底物, 反应专一性强, 干扰少, 检测灵敏度高, 但同位素废弃物问题使其无法发展成为常规的环境监测方法。为解决这个问题, 蛋白磷酸酶-比色法^[3]、蛋白磷酸酶-荧光法^[4]相继被采用, 与同位素法相比, 它们具有测定更简便、经济、无放射性污染的优点, 并且两者各具优势, 比色法对仪器的要求不高, 但灵敏度略低, 荧光法对设备有一定要求, 但灵敏度更高一些。本研究采用的蛋白磷酸酶抑制法-比色法, 虽然直接检测限($3\mu\text{g/L}$)高于蛋白磷酸酶抑制法-同位素法($0.02\mu\text{g/L}$)^[1], 但对水样进行简单浓缩处理后, 检测限完全可以达到蛋白磷酸酶抑制法-同位素法的检测限, 而且从样品浓缩到酶活性测定, 该方法对于应用于环境监测都是简单可行的。

由于蛋白磷酸酶抑制法将所有能抑制其酶活性的物质都计算在内, 因此所测物质被称为微囊藻毒素类物质并以 LR 当量作为测定对照的标准。本研究中证实发生水华的水体中铜绿微囊藻是主要优势种, 而对水样测定的结果表明水体中微囊藻毒素类物质的 LR 当量已高于世界卫生组织所要

求的饮用水中 $LR < 1 \mu g/L$ 的标准,这预示水华形成将对水质产生严重的影响,应该引起高度重视。

参考文献:

[1] Xu L., Chen J., Xu J. et al, Use of protein phosphatase inhibition assay for measuring microcystin class compounds in aquatic system [J]. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 1999, **19**(5);536—539. [徐立红,陈加平,许建明,等. 用蛋白磷酸酶抑制法测定水体中的微囊藻毒素类物质,环境科学学报,1999,**19**(5);536—539]

[2] Heresztyn T. and Nicholson B. C.. Determination of cyanobacterial hepatotoxins directly in water using a protein phosphatase inhibition assay [J]. *Water Research*, 2001, **35**;3049—3056

[3] Wong B., Lam P. K S, Xu L. et al. A colorimetric assay for screening microcystin class compounds in aquatic systems [J]. *Chemosphere*, 1999, **38**;1113—1122

[4] Douglas O, Mountfort, Suzuki T. et al, Protein phosphatases inhibition assay adapted for determination of total DSP in contaminated mussels[J]. *Toxicon*, 2001, **39**;383—390