

DOI:10.19853/j.zgjsps.1000-4602.2022.22.023

GICA现场快检地表水中TMC-LR的前处理方法

陈 婧¹, 支红峰¹, 王 懿²

(1. 永康市食品药品检验检测中心, 浙江 永康 321300; 2. 广东达元绿洲食品安全科技股份有限公司, 广东 广州 510000)

摘 要: 胶体金免疫层析(GICA)是目前唯一能用于现场检测微囊藻毒素(MC)-LR的技术。现场使用GICA存在藻细胞内MC-LR无法检测、检出限随环境温度变化、基质效应等问题。为方便水源现场MC-LR总量(TMC-LR)的调查和预警,开发了“煮沸—浓缩—PES膜过滤—调pH(可选)”前处理方法并优化了相关参数。结果表明,检测卡能耐受2~12的pH、2 g/L的蛋白和200 g/L的多糖。该方法的最佳煮沸时间是30 min,浓缩1倍能保证在10~37℃环境温度下1 μg/L的检出限。用卵囊藻模拟进入藻华预警阶段的水体,采用模拟样品和实际样品进行了方法技术性能确认,结果满足筛选检测要求。该方法可用于现场快检地表水中的TMC-LR。

关键词: TMC-LR; 现场前处理; 现场检测; 胶体金免疫层析

中图分类号: TU991 **文献标识码:** B **文章编号:** 1000-4602(2022)22-0135-04

Pretreatment Method of On-site GICA for Rapid Detection of TMC-LR in Surface Water

CHEN Jing¹, ZHI Hong-feng¹, WANG Yi²

(1. Yongkang Food and Drug Inspection Center, Yongkang 321300, China; 2. Guangdong Dayuan & Oasis Food Safety Technology Co. Ltd., Guangzhou 510000, China)

Abstract: Gold immunochromatography colloidal assay (GICA) is the only technique available to detect microcystin (MC)-LR on-site. However, there are some problems in field application of GICA, such as the inability to detect MC-LR in algal cells, the change of detection limit with ambient temperature and matrix effect. To facilitate the on-site investigation and early warning of the total MC-LR (TMC-LR) at water sources, the pretreatment method of boiling, concentration, PES membrane filtration and pH adjustment (optional) was developed and the related parameters were optimized. The limits of pH, protein and polysaccharide tolerated by the test card were 2-12, 2 g/L and 200 g/L, respectively. The optimum boiling time was 30 min, and the detection limit of 1 μg/L at ambient temperature of 10-37 °C could be ensured by 1 time concentration. Oocystis was used to simulate the early warning stage of algal bloom in a water body, the technical performance of the method was verified by using simulated and real water samples, and the results met the requirements of selection and detection, indicating that the method could be used for rapid detection of TMC-LR in surface water.

Key words: total microcystin-LR; on-site pretreatment; on-site test; GICA

基金项目: 永康市科技计划基金资助项目(201829)

通信作者: 支红峰 E-mail: 835001733@qq.com

微囊藻毒素(MCs)是由藻类产生的一类最常见的环肽肝毒素,《生活饮用水卫生标准》(GB 5749—2006)规定饮用水中的微囊藻毒素-LR(MC-LR)不得超过 $1\mu\text{g/L}$ 。在MC-LR快检技术中,实验室内首推液质联用法^[1-2],实验室外(现场)只有胶体金免疫层析法(GICA)。国产检测MC-LR的GICA产品主要有食安科技品牌。食安科技检测卡采用竞争抑制免疫层析原理:水样加缓冲液调pH后与胶体金颗粒混合孵育。样品中MC-LR抗原物质会与胶体金标记的特异性单克隆抗体结合,抑制了单克隆抗体和NC膜检测线上全抗原MC-LR-BSA偶联物的结合,使检测线(T线)浅于质控线(C线)或者检测线不显颜色,结果为阳性;若样本中没有MC-LR抗原物质或者低于检测限时,检测线比质控线深或一样深,结果为阴性;无论样本中是否含有MC-LR物质,质控线都会显色,说明检测卡有效,否则为无效。

户外使用食安科技检测卡存在以下问题:①检测卡只检测溶解于水的MC-LR,而不能检测藻细胞内的MC-LR,无法得到MC-LR总量(TMC-LR),无法准确反映水体毒性。②检测卡在实验室环境下通常搭配 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 恒温孵育器使用,而户外检测很难达到该温度,不能保证孵育效果和检出限。③样品基质可能会影响检测结果,如蛋白和多糖可能会降低显色程度,均匀性和稳定性;pH过高会影响蛋白质与胶体金颗粒的结合;pH过低会破坏胶体金颗粒等^[3]。针对以上问题,开发了适用于食安科技检测卡的现场煮沸破壁前处理方法。

1 实验方法

1.1 试剂仪器

试剂:MC-LR(SB05-287-2012,农业部环境保护科研检测所);牛血清白蛋白(NIM-RM3627-10,中国计量科学研究院);葡萄糖(DRE-C14027000, Dr. Ehrenstorfer);牛血清蛋白(合肥巴斯夫);考马斯亮蓝G-250,生物试剂;硫酸、磷酸和苯酚,分析纯;卵囊种藻液(南华千牧)。

仪器:AB 5500超高效液相色谱-质谱联用仪;Algaaccount S200藻类智能鉴定计数仪;普析TU-1810紫外可见分光光度计;上海雷磁PHS-3C酸度计;广东珠江牌LHR-150B生化培养箱;广东达元绿洲食品安全科技的MC-LR胶体金快速检测卡;安谱聚醚

砜(PES)针式滤膜($13\text{ mm}\times 0.22\mu\text{m}$)等。

1.2 样品处理和快检

50 mL烧杯取20 mL水样,慢火煮沸后微沸至少30 min,中间加纯水以防烧干,然后用纯水定容至10 mL(对pH超2~12范围的水样,可调pH后再定容),混匀后用PES滤膜过滤。取1 mL过滤水样加0.1 mL缓冲稀释液($80\text{ g/L NaCl}+29\text{ g/L Na}_2\text{HPO}_4+2.6\text{ g/L KH}_2\text{PO}_4$)后混匀;取80 μL 待测液到有胶体金颗粒的微孔,吹打混合、孵育5 min,将全部孵育液转移到加样孔,8~10 min内观察结果。

1.3 蛋白质检测

依据《出口乳、蛋、豆类食品中蛋白质含量的测定 考马斯亮蓝法》(SN/T 3926—2014)检测:水样在4 000 r/min下离心15 min,取0.5 mL上清液于10 mL比色管中,加0.5 mL纯水、5 mL考马斯亮蓝G-250溶液(0.1 g/L 考马斯亮蓝+4.75%乙醇+8.7%磷酸),振荡混匀静置2 min,用1 cm比色池在595 nm波长处测定吸光度(以试剂空白调零)。为扣除样液浊度和色度的影响,混合0.5 mL样液和5.5 mL纯水做吸光补偿。

1.4 糖类检测

依据《出口植物源食品中粗多糖的测定 苯酚-硫酸法》(SN/T 4260—2015)检测:水样在4 000 r/min下离心15 min,取上清液过 C_{18} SPE小柱。取1 mL过滤液于20 mL比色管中,加1 mL 5%苯酚溶液和5 mL硫酸,涡旋混匀,静置10 min, $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴20 min,用1 cm比色池在490 nm波长处测定吸光度。

1.5 现场检测便携包

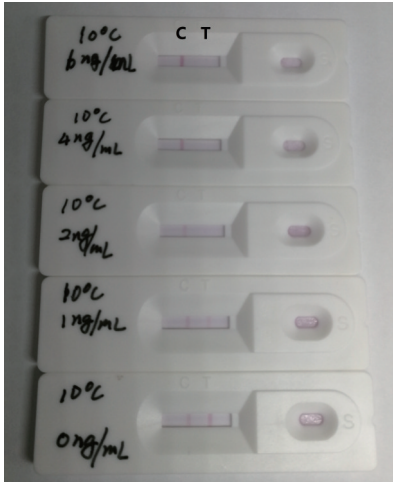
藻毒素快检卡;缓冲稀释液(20 mL);纯水(100 mL);酒精(100 mL);pH调节剂(10 mL 0.02%酚酞溶液、50 mL 0.5 mol/L NaOH溶液、50 mL 0.2 mol/L 硝酸、50 mL 0.005 mol/L 硝酸);洗瓶1个;酒精灯1个;三角架1个;三角架用垫网1片;打火机1个;铝箔纸(挡风用);棉布手套1双;一次性无菌注射器和PTFE针式滤膜若干;50 mL锥形瓶2个;10 mL比色管2根;1 mL刻度试管2支;0.1 mL刻度试管2支(或一次性80、100 μL 定量毛细管各1盒);吸耳球1个;pH试纸1包;2 mL离心管若干;一次性0.5 mL和3 mL塑料吸管若干。

2 结果与讨论

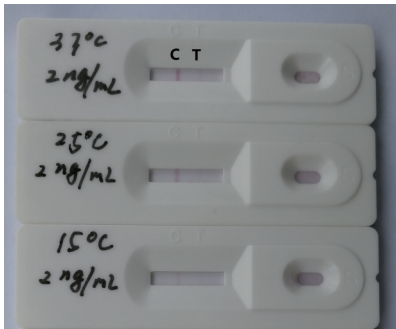
2.1 环境温度对检测卡性能的影响

藻类生长季节的环境温度基本在 $10\text{ }^{\circ}\text{C}$ 以上,用

恒温生化培养箱模拟 10~37℃环境温度,测试温度对检测卡的影响,结果见图 1。从图 1(a)可见,在 10℃的环境温度下,当 MC-LR 浓度为 1 μg/L 时,T 线和 C 线显色接近,容易被误判为阴性;当 MC-LR 浓度≥2 μg/L 时,仅 C 线显色(阳性),且浓度越高,C 线颜色越深,阳性程度越高。结合图 1(b),在 10、15、25 和 37℃的环境温度下,当 MC-LR 浓度为 2 μg/L 时,检测结果均为阳性;且环境温度越高,C 线颜色越深,阳性程度越高。



a. 检测卡在 10℃环境温度下对不同浓度 MC-LR 的检测结果



b. 检测卡在 15~37℃环境温度下对 2 ng/mL MC-LR 的检测结果

图 1 检测卡对不同环境温度和 MC-LR 浓度的检测结果

Fig.1 Detection results of the test card for different ambient temperatures and MC-LR concentrations

因此,为使 1 μg/L MC-LR 水样在现场能被稳定检出,可在前处理过程中 1 倍浓缩水样,使 MC-LR 浓度达到 10~37℃下均能稳定检出的 2 μg/L。由于 C 线显色颜色会随温度的变化而变化,因此检测卡只能用于定性检测。

2.2 基质对检测的影响

藻液在加热煮沸后会产生蛋白质、多糖等组分和导致 pH 变化,可能影响检测卡的检测效果。用氢氧化钠和盐酸配制不同 pH 的溶液测试检测卡,

结果见表 1。发现当 pH=13 和 pH=1 时,检测卡的 C 线和 T 线均不显色,检测结果无效。当 pH=12 和 pH=2 时,T 线比 C 线深,检测结果为阴性。检测含 2 μg/L MC-LR 的 pH=12 和 pH=2 的溶液,检测结果为阳性。检测卡之所以能耐受这么宽的 pH 范围,是因为其缓冲稀释液具有很强的 pH 缓冲能力。

表 1 pH 对检测卡性能的影响

Tab.1 Effect of pH on the performance of the test card

pH	1	2	12	13
2 μg/L MC-LR	无效	阳性	阳性	无效

用牛血清白蛋白模拟微囊藻中的水溶性蛋白质,测试检测卡的蛋白耐受限。发现对含 2 g/L 牛血清蛋白的未加标液,结果为阴性。对含 1 μg/L MC-LR、2 g/L 牛血清蛋白的溶液,结果为阳性。当牛血清蛋白浓度达到 20 g/L 时,样液无法渗透到检测区域,C 线和 T 线均不显色,检测卡失效。用岩藻糖模拟多糖,测试检测卡的多糖耐受限。发现对含 200 g/L 岩藻糖的未加标液,结果为阴性;对含 MC-LR 1 μg/L、岩藻糖 200 g/L 的溶液,结果为阳性。综上,水样能耐受 2~12 的 pH、2 g/L 的蛋白和 200 g/L 的多糖。蛋白浓度过高、pH 过高或过低时,检测卡会失效。

2.3 煮沸过滤对基质的影响

用市售卵囊藻模拟藻类阴性样品,因为卵囊藻不含 MC-LR,但细胞组成与微囊藻接近。用《水和废水监测分析方法》中的藻类计数法镜检卵囊藻液,藻密度约 1.2×10¹⁰ 个/L。超声使藻分布均匀,进行煮沸实验。每种煮沸时间做 3 个平行,煮沸后定容使浓缩 1 倍。原液和定容液过滤后同时做粗多糖、蛋白质、pH 和感官检测,结果见表 2。因藻毒素要煮沸 30 min 才能完全释放^[1],故煮沸时长从 30 min 起。

表 2 煮沸时长对藻液 pH、蛋白、多糖和感官的影响

Tab.2 Effect of boiling duration on the pH, protein, polysaccharide and sense of algal solution

煮沸时长/min	原液	30	50	70	90
pH	8.10	6.12	6.11	6.02	5.96
蛋白/(mg·L ⁻¹)	<6	<6	<6	<6	7
多糖/(mg·L ⁻¹)	0.0	12	14	12	13
感官	澄清、无色				

处理后样液澄清、无色,说明过滤能有效去除叶绿素、颗粒物等,是必要的前处理步骤。藻液经 30 min 的煮沸,pH 从 8.10 降到 6.12;继续煮沸 50、

70、90 min, pH从6.12降到5.96, 下降幅度小。原藻液中可溶性多糖浓度与空白值接近, 经30 min煮沸后, 多糖浓度升高到12 mg/L; 延长煮沸时间, 多糖浓度在12~14 mg/L, 远低于检测卡对多糖的耐受限。未破壁藻液的水溶蛋白浓度小于检出限, 处理后样液的水溶蛋白浓度依然在检出限附近, 远低于检测卡对蛋白的耐受限。综上, 煮沸30 min后没有必要再延长煮沸时间, 最佳煮沸时间为30 min。

2.4 现场调pH方法

如果煮沸浓缩后样液的pH超出检测卡的缓冲能力(pH为2~12), 可现场用0.5 mL滴管调pH: 煮沸后的样液先加入1滴0.02%酚酞溶液; 如果样液没有变红, 滴加0.5 mol/L的NaOH溶液使变红; 颜色深时, 滴加0.2 mol/L硝酸溶液使红色变浅, 滴加0.005 mol/L硝酸溶液使红色消失; 加纯水定容到10 mL, 混匀待测。

为测试所加试剂对检测卡性能的影响, 配制试剂空白样(5 mL纯水加1滴酚酞溶液和1滴0.5 mol/L NaOH溶液、用硝酸溶液调pH到无色, 定容到10 mL)和试剂加标样(试剂空白样定容前加标液, 使MC-LR浓度达到2 $\mu\text{g/L}$)。试剂空白样检测卡测试结果为阴性, 试剂加标样测试结果为阳性, 说明调pH所用试剂对检测卡性能没有影响。

2.5 方法效能验证

施玮等^[4]推荐饮用水源水体藻类危险限值为 1.2×10^6 个/L。用江水稀释卵囊藻液或在加热过程中添加江水, 分别模拟藻密度为 1.2×10^6 、 1.2×10^7 、 1.2×10^8 、 1.2×10^9 和 1.2×10^{10} 个/L的不同藻华预警阶段水体^[4], 用“电热板煮沸—过滤—GICA”法测试加标样(含1 $\mu\text{g/L}$ MC-LR)和不加标样, 同时做平行检测。10个阳性模拟样均为阳性, 10个阴性模拟样均为阴性。检测结果满足《合格评定 化学分析方法确认和验证指南》(GB/T 27417—2017)中定性检测要求。结果说明: 虽然前处理过程中会有蛋白释放、变性沉淀等反应, 但这些反应对检测没有影响。

大坑水库、大桥水库和鱼塘的水样用液质检出MC-LR浓度分别为0.27、0.043和0.025 $\mu\text{g/L}$ 。用“酒精灯煮沸30 min—浓缩1倍—PES膜过滤”法处理3种水样, 原样检测结果均为阴性, 加标样(加标使MC-LR浓度达到1 $\mu\text{g/L}$)检测结果均为阳性。

3 结语

采用“煮沸30 min—浓缩1倍—PES膜过滤—调pH(选用)”现场前处理法检测微囊藻毒素(MC)-LR, 该方法弥补了MC-LR胶体金免疫层析技术在现场应用的缺陷, 可为偏远、分散、水资源紧张、检测力量薄弱的农村地区提供直观的藻毒素预警现场检测, 具有一定的现实意义。

参考文献:

- [1] 李秋霞, 蔡超海, 许桂兰. 超快速液相色谱-串联质谱法快速检测生活饮用水中的微囊藻毒素-LR[J]. 中国卫生检验杂志, 2010, 20(8): 1875-1877.
LI Qiuxia, CAI Chaohai, XU Guilan. Rapid detection of microcystin-LR in drinking water by ultra-fast liquid chromatography tandem mass spectrometry[J]. Chinese Journal of Health Laboratory Technology, 2010, 20(8): 1875-1877(in Chinese).
- [2] 陈婧, 支红峰, 胡中豪, 等. UPLC-MS/MS测定地表水中总微囊藻毒素的快速前处理方法探究[J]. 环境监测管理与技术, 2021, 33(1): 47-50.
CHEN Jing, ZHI Hongfeng, HU Zhonghao, et al. Study on rapid pretreatment method for detecting total microcystins in surface water by UPLC-MS/MS[J]. The Administration and Technique of Environmental Monitoring, 2021, 33(1): 47-50 (in Chinese).
- [3] 张付贤, 王兴龙. 免疫胶体金技术影响因素分析[J]. 中国畜牧兽医, 2009, 36(5): 199-202.
ZHANG Fuxian, WANG Xinglong. Analysis of the affecting factors of immune colloidal gold technique[J]. China Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2009, 36(5): 199-202 (in Chinese).
- [4] 施玮, 蒋颂辉, 朱惠刚. 中国饮用水源水中藻类卫生标准的研究[J]. 卫生研究, 2003, 32(2): 97-100.
SHI Wei, JIANG Songhui, ZHU Huigang. Study on guideline of alga in source water[J]. Journal of Hygiene Research, 2003, 32(2): 97-100 (in Chinese).

作者简介: 陈婧(1977—), 女, 浙江永康人, 博士, 高级工程师, 主要从事水质和食品检测研究工作。

收稿日期: 2021-02-04

修回日期: 2022-03-07

(编辑: 孔红春)