

本书的出版得到卫生部2006年课题科研基金（WKJ2006-2-10）资助

张敬平 肖付刚 赵晓联 等编著 ●

微囊藻毒素

分析检测技术

Analysis and Detection Technology of Microcystin



化学工业出版社

微囊藻毒素

分析检测技术

中国药典 2015年版 微生物学部分 微生物学检验 第10章 第10.1节 第10.1.1条

本书的出版得到卫生部2006年课题科研基金（WKJ2006-2-10）资助



张敬平 肖付刚 赵晓联 等编著 ●

微囊藻毒素 分析检测技术

Analysis and Detection Technology of Microcystin



化学工业出版社

· 北京 ·

图书在版编目 (CIP) 数据

微囊藻毒素分析检测技术/张敬平, 肖付刚, 赵晓联等
编著. —北京: 化学工业出版社, 2009. 9
ISBN 978-7-122-06555-1

I. 微… II. ①张…②肖…③赵… III. ①蓝藻纲-毒素-
研究②蓝藻纲-水污染-研究 IV. R996.2 X52

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2009) 第 148668 号

责任编辑: 傅四周 孟 嘉
责任校对: 李 林

装帧设计: 刘丽华

出版发行: 化学工业出版社 (北京市东城区青年湖南街 13 号 邮政编码 100011)
印 装: 北京云浩印刷有限责任公司

720mm×1000mm 1/16 印张 15 字数 271 千字 2010 年 1 月北京第 1 版第 1 次印刷

购书咨询: 010-64518888 (传真: 010-64519686)

售后服务: 010-64518899

网 址: <http://www.cip.com.cn>

凡购买本书, 如有缺损质量问题, 本社销售中心负责调换。

定 价: 58.00 元

版权所有 违者必究

编写人员

(以姓氏笔画为序)

孙秀兰 肖付刚 吴庆刚 何恩奇 张敬平
赵晓联 钮伟民 黄 飏 虞锐鹏 蔡正森

序

水是生命之源，繁衍了人类。上善若水是亘古至今的真理。然而由于人类近来过度追求经济和工农业的超速发展，忘却了环境的柔弱，忽略了水源的匮乏，不慎打破了潘多拉魔盒，因此废水四溢，“肥水”横流。自 20 世纪下半叶以来，愈来愈多的湖泊惨遭污染，加速走完了富营养化的路程。蓝藻疯长，水华爆发，藻体腐烂，臭气涌动，毒素泻泄，毒害生灵，蓝藻水华成了世界关注的重点。

在当今琳琅满目的新书中虽不乏微囊藻毒素毒性毒理之类的专著，却鲜见治理蓝藻水华必不可少的分析检测方法的综合介绍。因此，无锡市疾病预防控制中心的技术人员携手江苏省苏微微生物研究有限公司、江南大学、许昌学院、江苏省原子医学研究所的同仁，收集了国内外藻毒素的检测方法，并加入许多他们自己辛勤研究的成果，编纂成书。

《微囊藻毒素的分析检测技术》一书内容丰富、翔实。就方法而言，它涵盖了化学分析法、生物分析法、生物化学分析法等各种方法；就实用性而言，不仅汇集了所用的仪器种类、操作参数，而且提供了样品前处理的方法与条件；不仅有水样的例子，也有水产品与水生植物的例子；不仅有近代仪器分析技术，亦有传统的常规手段。总之，其目的在于帮助读者全面了解现在实际应用于检测藻毒素的各种方法，亦供读者根据自己的条件做出科学的选择。

以上所述，就是本书作者们学习科学发展观最贴切的实践，亦是他们对太湖——母亲湖养育之恩的真情回报。希望太湖早日康复，向世人展现范仲淹笔下“平湖万顷碧，谢客一开颜。待得临清夜，徘徊载月还”的美丽容颜。

此书即将问世，翻阅书稿，欣慰之极，以此为序。

江南大学教授、博导



己丑年清明后五日于梁溪河畔

前言

随着工农业生产的发展,大量氮、磷排入水体中,导致水体富营养化现象日益严重。水体的富营养化危害最大的一个表征是蓝藻水华(湖靛)的出现,更严重的后果是蓝藻水华能释放生物毒素类次级代谢产物,危害人类和其他生物的安全。其中藻毒素(特别是微囊藻毒素)已引起人们的高度重视,它不仅能引起动植物中毒,而且已被证实为诱发人类肝癌的强致癌剂。一百多年来,微囊藻毒素(MC)所致的人畜中毒事件引起了世界范围内的关注,加拿大、英国、美国、澳大利亚、南非等国都有报道。

1998年世界卫生组织(WHO)推荐饮用水中MC-LR(MC中最常见和毒性较强的一种)的限量标准为 $1\mu\text{g/L}$,并推荐人群最大可耐受日摄入量(TDI)为每千克体重 $0.04\mu\text{g}$ 。我国颁布实施的GB 5749—2006生活饮用水卫生标准也采用这一标准。值得注意的是MC不仅通过饮用水威胁人类健康,而且能在动植物等水产品中聚集,通过食物链威胁人类健康。遗憾的是易遭MC污染的各种水产品中的MC限量标准现在并未制定,并且WHO只制定了MC-LR的限量标准,其他MC,包括含量更多、毒性较强的MC-RR等都还没有限量标准,这应引起有关部门的足够重视。

由于目前缺乏防止藻类水华发生的有效措施,因此要预防和消除MC对人畜的危害,监测和控制MC在各类水体和藻类食品中的限量是行之有效的办法。目前国内外检测MC的方法有生物法、化学法、生物化学法、分子生物学法、免疫法等几大类。

在查阅了大量的国内外最新资料的基础上,本书对MC的分析检测技术进行了详细的归纳总结,并介绍了国内外关于MC分析检测技术的最新进展情况,其中汇聚了多位参编人员的硕士博士论文的最新研究成果。例如,我们研制的微囊藻毒素“金标”试纸条申报了发明专利并已获授权(CN1570642A);ELISA试剂盒申报了发明专利(申请号:200610041452.X),已开发出成熟的产品,并已在多家水质监测部门得到了应用;免疫亲和色谱柱(IAC)申报的发明专利已获授权(专利号:ZL 200710023770.8);微囊藻毒素分离纯化方法、微囊藻毒素-LR(MC-LR)定量快速检测传感器的制备及应用等研究也申报了多项专利,现正在向实用型转化。

国内出版的专著对 MC 的毒性毒理介绍较多, 较少见到对其分析检测技术的详细介绍, 本书重点内容侧重于 MC 最新的分析检测技术, 希望能对研究水污染和藻类水华危害以及 MC 分析检测的相关科研和管理人员提供帮助、为国家尽快制定各类水体和藻类食品中 MC 的限量标准提供技术支撑、为水质监测和食品安全监管及评估部门提供有力的检测手段。

本书的作者来自无锡市疾病预防控制中心、江苏省苏微微生物研究有限公司、江南大学、许昌学院、江苏省原子医学研究所, 上述单位为我们提供诸多便利和帮助。江苏省疾病预防控制中心马永建审阅了全书, 浙江省疾病预防控制中心任一平、上海市疾病预防控制中心汪国权、许昌学院梁保安等专家, 为本书的编写以及书中一些方法的建立提供诸多意见、建议和帮助, 在此向他们致以最真诚的感谢! 本书的出版得到卫生部 2006 年课题科研基金 (WKJ2006-2-10) 资助, 在此一并表示感谢!

由于时间仓促, 书中可能有错讹遗漏, 请读者不吝赐教。

编 者

2009 年 11 月

目 录

第一章 水体富营养化与蓝藻水华	1
第一节 蓝藻概述	1
第二节 水体富营养化	2
一、水体富营养化的概念	2
二、富营养化的评价标准	3
三、富营养化水体的特征	4
四、富营养化的产生机理	5
五、水体富营养化的危害	6
六、水体富营养化与蓝藻水华	9
七、富营养化研究的意义与展望	10
第三节 蓝藻水华的污染现状	10
第四节 蓝藻毒素的种类、结构及毒性机理	11
一、蓝藻神经毒素	12
二、蓝藻肝毒素	13
三、其他毒素	15
主要参考文献	15
第二章 微囊藻毒素概述	17
第一节 微囊藻毒素简介	17
一、概述	17
二、微囊藻毒素的结构	18
三、微囊藻毒素的理化性质	19
第二节 微囊藻毒素的产生、分布和变迁	21
一、微囊藻毒素的产生机制	21
二、微囊藻毒素的分布	23
三、微囊藻毒素在水体中的迁移	24
第三节 微囊藻毒素和环境因子之间的关系	25
一、光照对微囊藻毒素的影响	25
二、温度对微囊藻毒素的影响	26

三、不同形态氮对微囊藻毒素的影响	26
四、不同形态磷对微囊藻毒素的影响	26
五、痕量金属对微囊藻毒素的影响	27
第四节 微囊藻毒素对水环境的影响	27
一、微囊藻毒素对水生细菌的影响	27
二、微囊藻毒素对浮游动物的影响	27
三、微囊藻毒素对底栖动物的影响	28
第五节 微囊藻毒素的污染现状	29
一、欧洲水体微囊藻毒素的情况	29
二、美洲水体微囊藻毒素的情况	30
三、亚洲水体微囊藻毒素的情况	30
四、我国淡水水体微囊藻毒素的情况	31
第六节 微囊藻毒素的危害和毒性机理	32
一、MC-LR 对动植物的危害	32
二、MC-LR 对人类健康的危害	33
三、MC 的毒性机理	33
第七节 微囊藻毒素的稳定性和去除方法	34
一、微囊藻毒素的一般稳定性和去除研究	34
二、化学方法对微囊藻毒素的分解和去除	34
三、生物法对微囊藻毒素的分解和去除	37
四、物理方法对微囊藻毒素的去除	39
第八节 微囊藻毒素标准制订	41
主要参考文献	42
第三章 微囊藻毒素的提取分离技术	47
第一节 原材料的来源	47
一、自然水域蓝藻水华	47
二、实验室培养产毒铜绿微囊藻	48
第二节 提取方法	48
一、细胞破碎	48
二、提取方式的选择	49
三、提取溶剂的选择	50
第三节 分离技术	51
一、色谱分离技术	51
实例 3-1 微囊藻毒素的提取和提纯研究	55
实例 3-2 大孔吸附树脂分离纯化微囊藻毒素	55

实例 3-3 薄层色谱法检测蓝藻和天然水中微囊藻毒素	56
二、过滤与膜分离技术	58
实例 3-4 超滤膜去除微囊藻毒素-LR 的机理和影响因素研究	59
三、超临界流体萃取技术	60
实例 3-5 超临界流体萃取蓝藻中的微囊藻毒素	61
第四节 样品的保存	61
第五节 纯度鉴定	62
主要参考文献	63
第四章 微囊藻毒素的化学分析检测方法	65
第一节 样品的采集与前处理	65
一、样品采集	65
二、样品的前处理	68
实例 4-1 水样的富集和洗脱	71
实例 4-2 蓝藻及动物样品的富集和净化	71
第二节 高效液相色谱法	72
一、液相色谱分析条件的选择	72
二、检测器的选择	73
三、MC 的液相色谱定性定量分析	74
实例 4-3 水中微囊藻毒素的液相色谱分析	75
实例 4-4 螺及鱼体内 MC 的液相色谱分析	76
第三节 液相色谱/质谱联用分析法	77
一、液相色谱/质谱联用技术概述	77
二、MC 的液相色谱-质谱联用定性定量分析	78
实例 4-5 高效液相色谱-质谱联用方法测定背角无齿蚌体内微囊藻毒素	79
实例 4-6 超高效液相色谱-飞行时间质谱快速检测饮用水及藻类制品中 的微囊藻毒素	81
实例 4-7 水样中 MC 的 LC-MS/MS 法检测	81
第四节 气相色谱法	86
一、气相色谱技术概述	86
二、MC 的气相色谱法定性定量分析	86
实例 4-8 用 MMPB 法分析沉淀物中的 MC	87
第五节 薄层色谱法	88
一、薄层色谱法概述	88
二、MC 的薄层色谱法分析	89
第六节 毛细管电泳法	89

一、毛细管电泳法概述	89
二、MC 的毛细管电泳法分析	89
第七节 其他化学分析方法	90
一、极谱伏安分析	90
二、红外法	91
三、核磁共振法	92
主要参考文献	93
第五章 微囊藻毒素的生物检测方法	96
第一节 小鼠法	96
第二节 盐水虾法	97
实例 5-1 藻毒素的盐水虾法分析	97
第三节 发光细菌法	99
一、原理	99
二、发展	99
三、检测实例	100
实例 5-2 水产品中藻毒素的发光细菌法分析	100
第四节 其他生物方法	103
一、动物法	103
二、植物法	103
主要参考文献	104
第六章 微囊藻毒素的生物化学分析检测方法	105
第一节 蛋白磷酸酶抑制分析法	105
一、原理与分类	105
二、特点	105
三、微囊藻毒素的蛋白磷酸酶抑制分析法	106
实例 6-1 蛋白磷酸酶抑制法——荧光法检测微囊藻毒素的影响因素 研究	108
第二节 2-甲基-3-甲氧基-4-苯基丁酸法	109
一、原理	109
二、方法的发展与改进	110
三、特点	110
四、最新研究进展与应用	111
第三节 蛋白磷酸酯酶竞争性结合法	112
第四节 组织培养细胞毒性法	112

第五节 其他生物化学方法	113
主要参考文献	113
第七章 微囊藻毒素的分子生物学检测方法	115
第一节 全细胞聚合酶链式反应法	115
一、聚合酶链式反应的发展	115
二、原理	116
三、PCR 反应体系与反应条件	117
四、PCR 反应特点	120
五、PCR 扩增产物分析	120
六、微囊藻毒素的全细胞 PCR 分析法	120
实例 7-1 微囊藻毒素合成酶基因的 PCR 检测方法	123
第二节 实时定量 PCR 法	125
一、实时定量聚合酶链式反应原理与特点	125
二、实时定量 PCR 研究进展	125
三、微囊藻毒素的实时定量 PCR 检测法	129
第三节 生物传感器	129
主要参考文献	130
第八章 微囊藻毒素的免疫学检测方法	133
第一节 酶联免疫吸附分析法	133
一、酶联免疫吸附分析法概述	133
二、微囊藻毒素-LR 完全抗原的制备及鉴定	134
三、微囊藻毒素-LR 抗体的制备与鉴定	137
四、微囊藻毒素-LR 高灵敏 ELISA 检测方法的建立	141
五、微囊藻毒素-LR 高灵敏 ELISA 酶免试剂盒的研制	143
第二节 胶体金免疫色谱法	147
一、胶体金免疫检测技术概述	147
二、微囊藻毒素-LR 单抗胶体金结合物的制备及鉴定	150
三、微囊藻毒素-LR “金标”试纸条的研制及验证	153
第三节 微囊藻毒素的放射免疫分析法	157
一、基本原理	157
二、标记技术	158
三、放射免疫分析实验注意事项及常见问题	162
四、微囊藻毒素的放射免疫检测	164
第四节 微囊藻毒素的时间分辨荧光免疫分析	168

一、时间分辨荧光免疫分析介绍	168
二、时间分辨荧光免疫分析方法的建立	172
三、时间分辨荧光免疫分析的注意事项	181
四、微囊藻毒素时间分辨荧光免疫分析的方法	182
实例 8-1 微囊藻毒素直接竞争时间分辨荧光免疫分析法	182
实例 8-2 微囊藻毒素间接竞争时间分辨荧光免疫分析法	184
第五节 免疫亲和色谱法	185
一、原理	185
二、特点	187
三、分类	187
四、亲和吸附剂	188
五、亲和色谱的基本操作	193
六、免疫亲和色谱柱的工作原理	195
七、微囊藻毒素-LR 免疫亲和色谱柱的研制	196
实例 8-3 水中微囊藻毒素-LR 的免疫亲和色谱-高效液相法检测	199
实例 8-4 藻样中微囊藻毒素的免疫亲和色谱-液质联用法检测	204
第六节 免疫传感器法	209
一、原理、特点与分类	209
二、免疫传感器的固定方法	211
三、检测步骤	213
四、免疫传感器在藻毒素检测中的应用进展	214
实例 8-5 藻样中微囊藻毒素的免疫传感器检测	214
主要参考文献	219
第九章 展望	222
附录	225
附录一 主要缩略语表	225
附录二 蓝藻水华照片	227

第一章 水体富营养化与蓝藻水华

第一节 蓝藻概述

蓝藻 (blue-green algae) 又称蓝细菌 (cyanobacteria), 是藻类的一个门, 包括 150 属、约 2000 种, 属于原核生物, 在淡水、海水和潮湿的陆地上均可繁衍生息。除原绿藻外, 蓝藻是唯一的原核藻类。它是最简单的光合营养有机体, 是一类具有叶绿素、营自养生活、植物体没有真正的根茎叶分化、生殖器官是单细胞的、用单细胞的孢子或合子进行生殖的低等植物 (Ingrid and Jamie, 1999)。蓝藻门 (Cyanobacteria) 就其亲缘关系来说更接近于原核细菌而不是真核藻类 (胡鸿均, 1981)。但是, 因其具有叶绿素 a 和原植体被看做是藻类。蓝藻是在自然界的各种环境中普遍存在的自养生物, 是一种极其古老而原始的原核生物, 有着极其悠久的历史。据考证, 大约在 35 亿~33 亿年前, 地球上就出现了蓝藻 (周志刚, 1995)。蓝藻的种类繁多, 根据其生境大多分为淡水藻类、海水藻类和陆地藻类。其分布极广, 高山、海洋、悬崖峭壁、两极、赤道、土壤、树皮等, 都有蓝藻的踪迹 (胡春香, 1995)。蓝藻在物质的生物化学循环和保持生物多样性方面发挥着重要作用。在长期的进化过程中形成了极强的生态竞争优势, 水体富营养化可促使其暴发繁殖形成蓝藻水华。

目前, 世界上淡水湖泊蓝藻水华发生的频率与严重程度都呈现迅猛的增长趋势, 发生的地点遍布全球各地。欧洲、非洲、北美洲和南美洲分别有 53%、28%、48% 和 41% 的湖泊存在不同程度的富营养化现象, 亚太地区 54% 的湖泊处于富营养化状态。在我国, 由于环境意识、法规措施等方面的原因, 许多工业废水和生活污水未经处理即排入水体。同时由于农业生产中大量使用化肥、农村大规模围网拦坝进行多种养殖, 使水流改向、水速减缓, 水体自净能力不断下降。这些都大大促进了藻类特别是蓝藻的生长繁殖。早在 20 世纪 60 年代, 中国科学院南京地理研究所在进行太湖科学考察时就曾发现有条状分布的蓝藻出现。80 年代初, 我国曾在有关部门的组织协调下对全国范围内的水源水质进行全面调查, 结果表明 34 个湖泊中有一半以上的湖泊属于富营养化状态。这些湖泊主要位于工业企业相对密集或人类生活活动频繁的大中城市近郊或江河下游。进入

90年代,全国淡水水体富营养状态日益严重,涉及范围不断扩大,1992~1993年对滇池外海的调查显示,7月份水体中浮游藻类个数高达每升上亿个,蓝藻数量占70%(江耀慈等,2001)。1998年洱海藻类群落演变成终年以曲鱼腥藻、束丝藻、铜绿微囊藻为主,其中蓝藻占79.9%~98.7%。90年代以来,太湖水体中蓝藻门占绝对优势,最高时约占总量的94%,以单一铜绿微囊藻为主。近年的调查显示,除了云南滇池、江苏太湖和安徽巢湖三大淡水湖已发生严重的蓝藻水华污染,长江、黄河中下游的许多水库、湖泊也检测出蓝藻毒素。2000年10月鄱阳湖的蓝藻数量占藻类总量的74%,武汉东湖蓝藻数量占总量的90%(隋海霞等,2004);且上述水体中产生的毒素主要是微囊藻毒素(microcystin, MC)。目前,全国每年都有许多自来水厂因蓝藻暴发造成的水源污染而被迫减产或停产,如1989~1992年合肥市多次发生因自来水发腥、发臭而短期停止供水现象,1992年以来以黄河水为水源的郑州市水源水厂的调蓄池内经常出现因藻类大量生长而导致自来水出现明显鱼腥味的现象。调蓄池水中MC含量达264ng/L(孟玉珍等,1999);20世纪90年代以来太湖几乎每年出现蓝藻水华,水体异常腥臭,严重阻碍无锡市8个自来水厂的正常运行,使全市85%的供水受阻(顾岗,1996),对市民的饮用水安全供给构成了越来越严重的威胁。

自1878年首次报道动物由于饮用含蓝藻的水而死亡以来,国内外因藻毒素引起的水生动物、鸟类、畜类甚至人类死亡的事件频繁发生。天然水体富营养化已成为我国乃至世界所面临的重大环境污染问题之一。

第二节 水体富营养化

一、水体富营养化的概念

水体富营养化,是指湖泊、水库、海湾等封闭性或半封闭性水体以及某些河流水体内的氮、磷等营养元素富集,水体生产力提高,藻类和其他水生植物大量繁殖,水体透明度和溶解氧浓度下降,水质恶化,其他水生生物大量死亡,水体生态系统和水功能受到阻碍和破坏的现象。水体富营养化,是一种水体衰老现象。水体出现富营养化现象时,浮游生物大量繁殖,水面往往呈现蓝色、红色、棕色、乳白色,视占优势的浮游生物的颜色而定。这种现象在江河湖泊中称为“水华”,海中称为“赤潮”(王玲玲,2007)。

具体来说,水体的富营养化主要是由于大量的氮、磷等植物性营养元素排入到流速缓慢、更新周期长的地表水体,使藻类等水生生物大量地生长繁殖,使有机物产生的速度远远超过消耗速度,水体中有机物积蓄,水生生态平衡被破坏。水体富营养化是自养型生物(浮游藻类)在水体中建立优势的过程,包含着系

列生物、化学和物理变化,与水体的化学特性、物理性状、湖泊形态和底质,以及气象、地理等众多因素有关。

水体富营养化可分为自然富营养化和人为富营养化。天然的湖泊都有一个从贫营养向富营养的发展过程,进而发展到沼泽,直至消失,这是湖泊的自然发展规律,也是一个漫长的历史进程,但是人类活动会大大加速这个进程。理论上,水体富营养化是指水中营养物质富集的过程,包括水体富营养化程度和水体富营养状态。

一谈到水体的富营养化,人们常常想到总氮、总磷超标。诚然,总氮、总磷等营养盐是发生富营养化的必要条件。如果水体中总氮、总磷浓度很低,不可能发生富营养化。反之则不然,水体中总氮、总磷浓度的升高并不一定发生富营养化。富营养化的发生和发展是水体的整个环境系统出现失衡,导致某种优势藻类大量生长繁殖的过程。因此要研究富营养化的发生机理和发生条件,实质上需了解藻类生长繁衍的过程。对于不同的水域,由于存在水域地理特性、自然气候条件、水生生态系统和污染特性等诸多差异,会出现不同的富营养化表现症状,即出现不同的优势藻类种群,并连带出现各种不同类型的水生生物种类的失衡。但富营养化发生所必备的条件基本上是一样的,最主要的影响因素可以归纳为以下几个方面:① 总氮、总磷等营养盐相对比较充足;② 铁、硅等含量比较适度;③ 适宜的温度、光照条件和溶解氧含量;④ 缓慢的水流流态,水体更新周期长。只有在上述四方面条件都比较适宜的情况下,才会出现某种优势藻类“疯狂增长”现象,发生富营养化。

二、富营养化的评价标准

富营养化的指标,从测定项目上分可大致分为物理、化学和生物学三种指标,这些指标是衡量富营养化的一个尺度,但富营养化现象是复杂的,必须把这些因子的复杂性交织在一起才能表示富营养化状态。水中含磷量超过一定范围,则藻类生长繁殖将明显加快。有学者提出综合营养状态指数作为水体富营养化评价方法与分级标准,综合营养状态指数公式如下(王明翠,2002):

$$TLI(\Sigma) = \sum_{j=1}^m W_j \cdot TLI(j)$$

式中,TLI(Σ)表示综合营养状态指数;TLI(j)代表第j种参数的营养状态指数;W_j为第j种参数的营养状态指数的相关权重。

目前判断水体富营养化的一般标准是:氮含量超过0.2~0.3mg/L,磷含量大于0.01~0.02mg/L,BOD大于10mg/L,pH 7~9的淡水中细菌总数超过10个/mL,叶绿素含量大于10μg/L(吴邦灿,1999)。

目前,许多国家如美国、日本、瑞典、俄罗斯等都对水体富营养化的程度定