

贝类毒素大田软海绵酸的免疫分析 检测技术研究进展

王 峥^{1,2#}, 李佳钰^{1,2#}, 匡佳妮¹, 赵辰昊¹, 张 智¹, 任振俦³, 秦 源^{1,2*}

[1. 浙江理工大学生命科学与医药学院, 杭州 310018; 2. 浙江理工大学绍兴生物医药研究院有限公司, 绍兴 312000; 3. 领博生物科技(杭州)有限公司, 杭州 310018]

摘 要: 大田软海绵酸(okadaic acid, OA)是一种广泛存在于贝类等生物中的海洋生物毒素,可引起人或动物的急性中毒,对食品安全和海洋养殖具有严重危害。因此建立快速、可靠、灵敏的 OA 检测技术具有重要意义。免疫分析检测技术基于抗原抗体的结合,特异性强、灵敏度高、应用范围广,是当前检测贝类毒素 OA 的主要手段。本文综述了近年来针对贝类毒素 OA 的免疫分析检测技术,其中包括酶联免疫吸附检测、免疫层析检测、时间分辨荧光免疫检测和基于免疫传感器的检测技术等。本文着重阐述了不同免疫分析技术的原理及其在 OA 检测中的实际应用,同时探讨了免疫分析技术在贝类毒素 OA 检测方面的挑战和发展趋势,以期为进一步开发性能更加优异的 OA 免疫检测技术提供研究思路。

关键词: 生物毒素; 腹泻性贝类毒素; 大田软海绵酸; 免疫分析检测

Recent progress in immunoassay detection technology of shellfish-toxin okadaic acid

WANG Zheng^{1,2#}, LI Jia-Yu^{1,2#}, KUANG Jia-Ni¹, ZHAO Chen-Hao¹,
ZHANG Zhi¹, REN Zhen-Chu³, QIN Yuan^{1,2*}

[1. College of Life Sciences and Medicine, Zhejiang Sci-tech University, Hangzhou 310018, China;
2. Zhejiang Sci-tech University Shaoxing Academy of Biomedicine Co., Ltd., Shaoxing 312000, China;
3. Lingbo Biotechnology (Hangzhou) Co., Ltd., Hangzhou 310018, China]

ABSTRACT: Okadaic acid (OA) is a marine biotoxin widely found in shellfish, which can cause acute poisoning in humans or animals, and has serious harm to food safety and marine aquaculture. Therefore, it is of great significance to establish a fast, reliable, and sensitive OA detection technology. Immunoassay detection technology is based on the combination of antigen and antibody, with strong specificity, high sensitivity, and wide application range, which is currently the main method for shellfish-toxin OA detection. This work reviewed the immunoassay techniques for shellfish-toxin OA in recent years, including enzyme-linked

基金项目: 浙江省自然科学基金项目(LQ23H050005)、浙江理工大学绍兴生物医药研究院有限公司开放课题基金项目(SXAB202207)、国家级大学生创新创业训练计划基金项目(202210338050)

Fund: Supported by the Natural Science Foundation of Zhejiang Province (LQ23H050005), the Open Fund of Shaoxing Academy of Biomedicine of Zhejiang Sci-tech University (SXAB202207), and the National College Students' Innovation and Entrepreneurship Training Program (202210338050)

#王峥、李佳钰为共同第一作者

#WANG Zheng and LI Jia-Yu are Co-first Authors

*通信作者: 秦源, 博士, 副教授, 主要研究方向为高灵敏免疫分析技术的开发与应用。E-mail: qinyuan@zstu.edu.cn

*Corresponding author: QIN Yuan, Ph.D, Associate Professor, Zhejiang Sci-tech University, No.928, No.2 Street, Xiasha High Education Park, Hangzhou 310018, China. E-mail: qinyuan@zstu.edu.cn

immunosorbent assay, immunochromatographic assay, time resolved fluoroimmunoassay, and immunosensor based detection techniques. This paper focused on the principles of different immunoassay techniques and their practical applications in OA detection, and discussed the development trends and challenges of immunoassay techniques in the detection of shellfish-toxin OA, in order to provide more new ideas to the authors for developing OA immunoassay techniques with better performance.

KEY WORDS: biotoxin; diarrheal shellfish poison; okadaic acid; immunoassay detection

0 引 言

赤潮是在特定环境条件下,海洋内浮游生物、细菌爆发性繁殖引起的海洋水体变质的一种有害的生态现象^[1-3]。我国是赤潮频发的国家,近年来随着人类活动导致的海水富营养化、氮磷比失衡等问题使得赤潮发生的频率越来越高,涉及地区越来越广,对人与海洋动物的危害也越来越大。海洋浮游藻类是引发赤潮的主要原因,全球几千种海洋浮游藻中有二百多种能形成赤潮,能形成赤潮的藻类中有近三分之一能产生贝类毒素^[4-7]。

在我国分布范围最广的原甲藻属甲藻产生的腹泻性贝类毒素(diarrhetic shellfish poisoning, DSP)引起的中毒事件最多,危害较大^[8-11]。DSP 的主要成分是大田软海绵酸(okadaic acid, OA),它是一种脂溶性物质,不溶于水,对热稳定,常规的加热烹调处理不能破坏贝类毒素 OA 的结构,

当人误食 OA 污染的海产品后会出现腹泻、恶心、呕吐等症状。近些年,世界各地因误食被污染海产品导致的贝类毒素 OA 中毒案例频发,引起公众和科研人员的高度重视。目前国内外对 OA 的研究包括:OA 的检测技术、OA 毒性效应和机制以及相关抗原抗体制备等,其中 OA 的检测技术不仅能监测海洋的生态环境、保证海产品安全,更与人们的身体健康息息相关,如何提高检测技术性能也越来越受到科研人员的关注。免疫分析检测技术利用抗原和抗体之间的特异性结合来测定待测物质,其特异性强、灵敏度高、应用范围广,是目前检测贝类毒素 OA 的重要技术手段,但此前尚未有文章针对 OA 的免疫分析检测技术进行系统总结。本文着重介绍了基于免疫分析检测原理对贝类毒素 OA 的检测方法(表 1),梳理了当前免疫分析检测技术在检测贝类毒素 OA 方面的挑战和未来的发展趋势^[10,12-16], 以为开发性能更加优异的 OA 免疫检测技术提供研究思路和理论基础。

表 1 对 OA 免疫分析检测技术的对比
Table 1 Comparison of OA immunoassay detection techniques

检测技术	检测原理	优点	缺点
酶联免疫吸附技术	将 OA 与载体偶联,使抗原抗体反应在固相载体表面进行,在酶作用下通过底物显色来判断结果	操作简单,无须特殊设备,试剂成本低	容易出现假阴性或假阳性结果,灵敏度低,适用于对 OA 的定性和半定量检测
免疫层析技术	将特异的 OA 抗体固定于某一区带,在毛细管作用下样品沿着膜向前移动,当移动至有抗体的区域时,样品中 OA 的抗原与该抗体发生特异性结合使该区域显示一定的颜色,从而实现特异性的免疫分析检测	使用方便,检测成本低,检测结果直观,肉眼可观察,无须特殊设备	灵敏度低,OA 的抗原抗体容易脱离,标记物不稳定,只能给出定性或者半定量结果
化学发光免疫分析技术	含有免疫分析和化学发光分析两个系统。以化学发光物质或酶为标记物,直接标记在 OA 的抗原或抗体上,加入氧化剂或酶的发光底物,利用发光信号测量仪器进行检测	较宽的线性动力学范围,光信号持续时间长,结果稳定,误差小,灵敏度较高	发光过程短,本底较高,仪器故障率较高,试剂稳定性差,检测精度不高,工作曲线随时间漂移
时间分辨荧光免疫分析技术	用镧系元素标记 OA 的抗体,根据镧系元素螯合物的发光特点,用时间分辨技术测量荧光,同时检测波长和时间两个参数进行信号分辨	灵敏度较高,分析范围宽,标记结合物稳定,有效使用期长,测量快速,易自动化,无放射性污染	易受环境、试剂和容器中的镧系元素离子的污染,使本底增高
免疫传感器	利用 OA 的抗原(抗体)对抗体(抗原)的识别功能而研制成的生物传感器	灵敏度高,降低了检测下限;减少分析时间,简化分析过程,检测设备小型化,测量过程自动化	操作复杂,试剂成本高,仪器维护费用高,有本底干扰

1 酶联免疫吸附技术

酶联免疫吸附技术 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 是当前使用最广泛的免疫检测技术, 其优势在于单分子的酶可以作为催化剂转化多个底物分子, 使得检测信号高度放大, 如图 1 所示, 因此 ELISA 又常被称为酶放大体系^[17]。该技术实现了在微克、纳克水平上对待测物质进行定量或半定量分析。有报道显示, 常规的 ELISA 商品试剂盒的检出限可达到 750 pg/mL, 目前市场上已上市众多商品化贝类毒素 OA 的 ELISA 检测试剂盒, 其中绝大多数都能达到国家标准, 可以满足大部分应用场景的需求^[7,18-21]。

近些年人们对检测贝类毒素 OA 的精密度和灵敏度要求不断提高, 研究人员将贝类毒素 OA-ELISA 检测技术的改良方向聚焦于放大显色酶的发光信号、优化载体等方面。PANG 等^[22]研发了一种以环氧基团活性炭壳磁珠为抗体载体的检测方法, 所构建的磁珠作为一种多功能和生物兼容的抗体固定化载体, 表现出快速的磁响应、再分散和易于操作的特点, 可以替代传统的 ELISA 用来检测 OA。该技术具有快速、简便、经济的优点, 其检出限可达到 350 pg/mL。另一项研究建立了一种新的直接竞争性微孔板检测技术, 通过将具有特异性识别贝类毒素 OA 的分子印迹二氧化硅复合物固定在 96 孔微板表面, 在 10.0~100.0 mg/kg 的范围内该微板法的滤泡猝灭性能与贝类毒素 OA 的浓度具有良好的线性关系, 其对贝类样品的检出限为 0.25 mg/kg^[23]。ZHANG 等^[24]建立了毛细管电泳酶联免疫分析和电化学检测系统, 将贝类毒素 OA 的检出限降低至 50 pg/mL。随着检测技术的发展, 基于 ELISA 的贝类毒素 OA 检测方法呈现多样性的发展趋势。国外有学者设计了一种与间接竞争 ELISA 相结合, 使用智能手机作为辅助芯片的免疫传感器对 OA 进行定量比色检测。该系统操作简便、检测速度快、灵敏度高, 对 ELISA 检测贝类毒素 OA 提供了新的发展方向^[25]。

ELISA 是将酶对底物高效催化过程和抗原抗体的特异性反应相结合的一种检测方法, 凭借其相对较高的灵敏度、准确性、相对便捷的操作、结果易于分析等优点, 已成为世界范围内食品安全和临床诊断中使用率最高的检测方法之一。虽然与其他方法相比, 现在的 ELISA 对贝类毒素 OA 的检测存在一些不足之处, 如重复性不好、受外界实验环境影响较大、不能满足高灵敏检测需要等等^[26-29], 但是 ELISA 操作简便, 载体易于标准化, 使用成本低, 仍然是检测贝类毒素 OA 的常规技术。未来针对贝类毒素 OA 的 ELISA 检测方法的进一步研究和开发, 可以向缩短检测时间、简化检测步骤、实现现场检测等方向发展, 同时, 寻找低成本的等效新材料和精细化生产等成本控制手段也是重要的考虑因素。

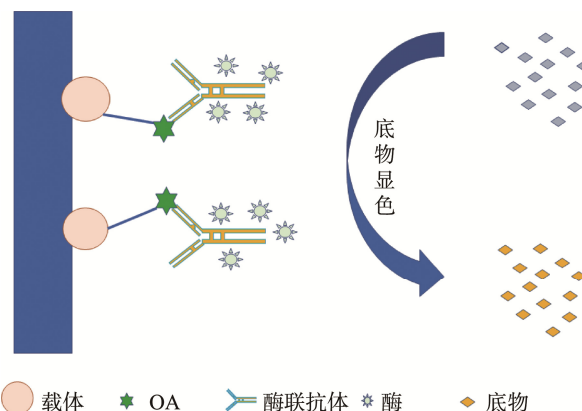


图 1 酶联免疫吸附技术原理示意图

Fig.1 Schematic diagram of enzyme-linked immunosorbent technology

2 免疫层析技术

免疫层析技术 (immunochromatographic assay, ICA) 是 20 世纪末发展起来的一种结合了免疫和色谱层析的检测分析技术, 也是现场即时检测的重要手段, 该方法操作简便、特异性强, 不需要额外检测仪器, 可用肉眼直接观察结果^[30-32]。免疫层析技术中发展最为成熟的是胶体金免疫层析技术 (colloidal gold enhanced immunochromatography assay, GICA), 它是将胶体金作为示踪标记物用于抗原抗体的免疫标记检测, 在 GICA 对贝类毒素 OA 的检测研究报道中, 其肉眼即可观察到的检出限可达 1 ng/mL (图 2)。随着 GICA 的不断发展完善, 近些年有团队开发了一种可以同时检测贝类毒素 OA 和河豚毒素 (tetrodotoxin, TTX) 的方法^[33], 其检测原理是通过金纳米颗粒与 OA 和 TTX 的特异性单克隆抗体分别偶联并混合, 用混合物捕获其相应的毒素, 最后形成复合物, 该方案可同时检测贝类毒素 OA 和 TTX, 提高了检测通量、降低了测试成本^[34]。虽然传统的 ICA 在长期的应用中已可以胜任 OA 的快速检测, 但新的方法也在不断探索并应用于 OA 的检测。国内有团队研制出了可检测贝类毒素 OA、鳍藻毒素、鳍藻毒素-2 的时间分辨荧光免疫层析试纸条, 其检出限分别为 90.6、115.4 和 69.8 $\mu\text{g/kg}$, 时间分辨荧光免疫层析利用稀土离子的荧光特性, 使得检测灵敏度较传统 ICA 提高很多^[35]。

ICA 是将色谱技术与抗原抗体的特异性反应相结合的一种简单快速的检测方法, 该方法对检测设备和使用者的要求较低, 非专业人员同样可以操作使用。ICA 技术可实现贝类毒素 OA 的低成本、快速的现场即时检测, 与高效液相色谱法、液相色谱-串联质谱法等复杂昂贵检测方法形成互补。但是, ICA 对贝类毒素 OA 的检测灵敏度较低, 仅能实现定性或半定量检测, 不过, 近年来光电检测仪器的出现和新型标记材料的应用使 ICA 在定量检测方面不断

取得突破。随着生物技术、纳米材料的进一步发展, 会有越来越多的新型标记物、高灵敏抗体应用于 ICA 检测, 其检测性能将会得到更大的提升, 未来这种简便、快速的免疫分析检测技术在贝类毒素 OA 的检测领域会有更加广阔的应用前景^[30]。

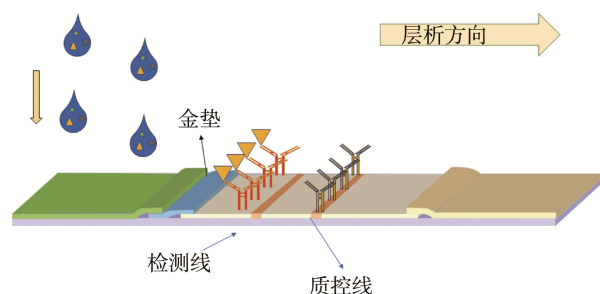


图 2 免疫层析技术原理示意图

Fig.2 Schematic diagram of immunochromatography

3 化学发光免疫分析技术

化学发光免疫分析技术(chemiluminescent immunoassay, CLIA)是化学发光法和免疫分析法结合的检测技术。该方法通过化学发光反应的试剂标记抗原或抗体, 经过一系列的免疫反应和理化步骤测定发光强度来检测待测物含量, 在 CLIA 中主要通过化学发光酶免疫分析对贝类毒素 OA 进行检测。化学发光酶免疫分析是用参与催化化学发光反应的酶来标记抗原或抗体, 再由光子量子阅读系统读出(图 3)。为此有实验室研发出了一种利用自动化化学发光微阵列来检测贝类中 OA 含量的方法, 该方法在贝类样品中检出限为 500 ng/mL, 回收率达到了 86.2%, 每次实验只需要 20 min 就可以得出检测结果, 能够进行多通路检测, 通过添加十二烷基硫酸钠-盐酸盐缓冲液清洗微阵列还可以重复进行多次实验, 大大降低了实验的成本^[36]。为了进一步放大标记酶的发光信号, 常用酚类、胺类、苯基硼酸及其衍生物对检测体系的发光强度进行增强。王权^[37]使用羧基苯甲酸作为增强剂, 开发的间接竞争化学发光免疫吸附法检测贝类毒素 OA, 检出限可达 1.232 ng/kg。而联合使用 3-(10'-吩噻嗪基)-丙烷-1-磺酸盐与 4-吗啉吡啶作为增强剂的直接竞争化学发光免疫吸附法检测贝类毒素 OA 时, 检出限可达 0.01 ng/mL^[38]。

CLIA 是将免疫反应与化学发光结合建立起来的分析方法, 其凭借特异性好、灵敏度高、操作简便、成本低等优势, 在贝类毒素 OA 的检测中发挥着至关重要的作用。未来针对 OA 的 CLIA 研究的主要趋势有: (1)标记物的优化, 提高检测灵敏度、避免其他毒素的干扰、增加检测范围; (2)新型免疫反应系统和化学发光分析系统的研发, 增强反应的稳定性、降低检测成本、提供便捷快速的现场即时筛选; (3)多通路检测的研发, 提高检测效率、降低样品污染、节

约检测时间。CLIA 自 20 世纪 70 年代问世以来, 已经成为食品安全、医药健康等多个领域的重要检测方法, 同时随着国内外的深入研究, CLIA 对 OA 及其他毒素的检测性能将进一步提高。

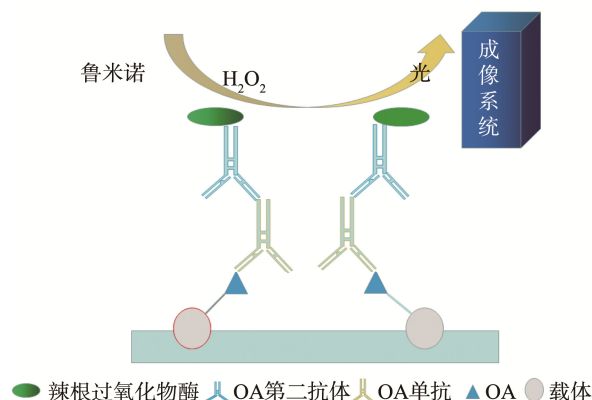


图 3 化学发光免疫分析技术原理示意图

Fig.3 Schematic diagram of chemiluminescence immunoassay technology

4 时间分辨荧光免疫分析技术

时间分辨荧光免疫分析技术(time resolved fluoroimmunoassay, TRFIA)是近几十年来发展起来的一种免疫分析技术^[39-40], 该技术利用镧系元素(如铕、钆、铽、镱等)作为标记物, 其激发光与发射光波长存在较大差异, 激发光与测量光之间存在时间差, 避免了普通紫外-可见分光分析法中杂色光的影响和常规荧光示踪剂分析检测中背景荧光的干扰(图 4)。此外, 铕、钆等镧系元素可以与有机配体形成高荧光强度的螯合物, 这些螯合物具有斯托克斯位移大、无放射性、衰减时间长和量子产率高等优点, 从而降低了背景噪声、增强了信号强度最终提高了检测灵敏度。TRFIA 已被用于多种小分子检测, 如环境中的沙丁胺醇、饲料中的黄曲霉毒素 B₁ 和食品中的氧氟芬等, 相关检测方法均表现出优异的灵敏度和准确性^[41-42]。QIN 等^[43]利用 TRFIA 建立了一种对贝类毒素 OA 的高灵敏度检测方法, 并将该方法应用于对贝类产品的污染监测, 其检出限为 2.49×10^{-3} ng/mL, 该结果优于欧盟、美国的 OA-TRFIA 对贝类毒素 OA 的检测限度, 是常规 ELISA 检测 OA 灵敏度的 5 倍, 显著提高了 OA 的检出限。

TRFIA 是基于免疫学原理, 将特异性抗原或抗体与稀土元素结合在一起的免疫分析方法。TRFIA 同时具备了荧光免疫技术、ELISA、放射免疫技术的优点, 在对贝类毒素 OA 的检测中具有特异性强、灵敏度高、稳定性好、荧光寿命长且线性范围宽、非放射性和操作简单等优势, 自 20 世纪被提出以来, 已成为科研人员检测海洋毒素不可或缺的重要手段。未来科研人员可以在螯合物的改良和

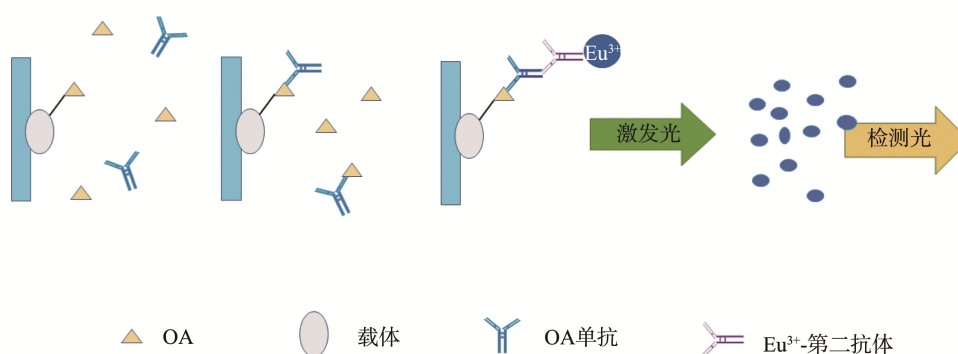


图 4 时间分辨荧光免疫分析技术原理示意图

Fig.4 Schematic diagram of time resolved fluoroimmunoassay

稀土掺杂纳米材料制备中进一步研发, 提高 TRFIA 对海洋毒素检测的灵敏度和特异性并扩大 TRFIA 的应用范围。在实际应用方面, 可以完善 TRFIA 检测体系, 提高反应的稳定性、降低检测成本并实现现场即时分析。相信 TRFIA 在海洋毒素检测中将具有更广阔的应用前景。

5 免疫传感器

传感器是信号转化的媒介, 由响应元件和报告元件组成, 响应元件与被检测物相互作用, 完成信号输入、信号产生并可可视化输出。免疫传感器(immunosensor)将抗体作为响应元件, 将抗原抗体的特异性反应通过传感器输出信号。随着现代科技的不断发展, 免疫传感器的类型也呈现多元的发展趋势, 相较于常规的针对 OA 的免疫分析检测方法, 免疫传感器可以更加直观地显示检测数据^[44-46]。

5.1 电化学免疫传感器

电化学免疫传感器可以具体分析生物样品中的不同成分, 将样品中的生物信息转化为易于处理和表达的电子信号^[47-49]。近些年, 丝网印刷电极(screen-printed electrode, SPE)在电化学生物传感器的制备中得到了广泛的应用(图 5), 因为 SPE 较低的使用成本使它可以成为一次性的检测工具, 而且通过在电极表面共价偶联的方式直接固定贝类毒素 OA 也可以提高电化学免疫传感器的灵敏度, 这种易得且方便携带的 SPE 提高了对贝类毒素 OA 的检测效率, 也优化了免疫传感器的操作步骤。电极材料是电化学免疫的重要组成部分, 新型电极材料石墨烯具有电子转移率快和导电性高的特点, 也有利用 4-羧基苯基重氮阳离子对石墨烯修饰的丝网印刷电极进行电化学修饰用于检测贝类毒素 OA, 检出限为 0.019 $\mu\text{g/L}$ ^[50]。除了优化电极材料, 研究人员也格外关注输出结果的探测方式及描述方法多样性的问题, 如利用电化学阻抗法可以快速检测贝类毒素 OA^[51], 也有科研人员研发出几种基于固相萃取的电化学免疫传感器来检测贝类毒素 OA, 通过卵白蛋白、牛血清白蛋白或磁珠等连接物将 OA 固定在电极表面, 通过竞争法在酶的作用下产生电化学信号将信号放大读出^[52-53]。

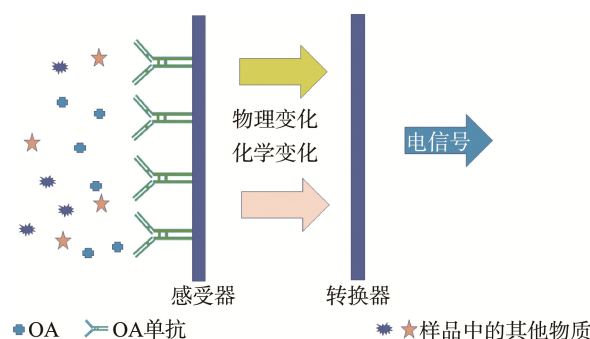


图 5 电化学免疫传感器原理示意图

Fig.5 Schematic diagram of electrochemical immunosensor

5.2 等离子体共振法

从简单的物理层面来看, 抗体与抗原的结合实则是一个“沉积”的过程, 等离子体共振法(surface plasmon resonance, SPR)可以很好地捕捉这种“沉积”, 近年来该项技术也应用于对贝类毒素 OA 的检测, 具有稳定性好、检测快速、对样品剂量要求低等优点^[54]。有科研团队设计了一种用于 OA 的竞争性 SPR 光学免疫传感器^[55], 用蛋白 G 包被的磁珠固定 OA 抗体, 同时将 OA 固定在传感器芯片表面, 将抗体与游离 OA 标准品或样品一起添加到传感器中, 与固定化 OA 结合的分子会产生与结合质量成正比的响应, 从而反映 OA 的浓度信息。新型抗体开发、新纳米材料等不同领域技术在免疫传感器中的应用, 为各种不同类型的免疫传感器的研发开辟了广阔的探索空间, 使免疫传感器对贝类毒素 OA 的检测更加灵敏和准确^[56-57]。

5.3 流式荧光免疫微球技术

流式荧光免疫微球技术(flow fluorescence immunomicrobeads assay, FFIA)又称液态芯片技术, 该技术有机整合了荧光编码微球、激光分析、流式细胞、高速数字信号处理等多项技术, 具有高通量、高速度、重复性好、灵敏度高、线性范围广、无需洗涤等优点。FRAGA 等^[58]利用 FFIA, 通过固相微球-流式细胞术系统开发了一种多指标生物毒素分

析方法,该方法能够同时检测贝类样本中的OA、软骨藻酸和石房蛤毒素。流式荧光技术的应用,将对包括贝类毒素OA在内的海洋生物毒素的高通量检测起到重要的推动作用。

5.4 其他检测方法

有科研团队设计出一种基于声波技术的免疫传感器检测OA,声波技术在液体介质中检测目标物时表现出很高的灵敏度,当传感器表面发生变化时,声波会受到强烈干扰,在干扰下输出的信号更强,该方法对OA的检出限为5.5 ng/mL^[59]。近年来也有报道将生物素-亲和素系统加入基于ELISA的免疫传感器中检测OA,检出限达到0.04 ng/mL^[60]。除了使用生物素-亲和素系统放大信号,也有研究发现核酸适配体具有较高特异性和亲和性,适用于快速检测,王晓煜^[61]研发出一种检测OA的核酸适配体传感器,其检出限为0.043 ng/mL。未来可以尝试将更多的技术与免疫传感器相结合,进一步开发出低成本、高灵敏度、高通量的免疫传感器检测OA,充分发挥免疫传感器的优势。

从20世纪60年代UPDIKE和HICKS研发的葡萄糖酶电极至今^[62-65],免疫传感器的研究不断取得突破,与传统的生物传感器相比,抗体的特异性和灵敏度赋予了免疫传感器更加优秀的检测性能,其在贝类毒素OA的检测应用中呈现多样性发展。在材料制备方面,进一步开发新型微电极材料和其他新型纳米材料,建立新型检测模式,是贝类毒素OA免疫传感器开发的基础问题;在抗体制备方面,进一步优化抗体检测性能,提高抗体的灵敏度、特异性,是贝类毒素OA免疫传感器开发的核心问题;在检测体系方面,优化传感器与计算机、智能手机的匹配,提高检测自动化程度,完善检测体系,是贝类毒素OA免疫传感器开发的关键问题。

6 结束语

贝类毒素OA是一种遍布全球的海洋生物毒素,中毒后使人恶心、呕吐、腹痛、腹泻,由此产生的食品安全问题已经成为了重大的公共卫生问题,对海产品养殖及人民生命安全带来严重威胁,加强对贝类毒素OA的检测尤为重要。免疫分析检测技术以抗原与抗体特异性地结合为基础,用不同的示踪物示踪,具有便捷、灵敏、准确等特点,在腹泻性贝类毒素的检测方面展现出良好的应用前景。

本文综述了近年来针对贝类毒素OA的免疫分析检测技术,阐述了不同免疫分析技术的原理及其OA检测的实际应用。目前成熟的检测方法大多仅针对某一种腹泻型贝类毒素的检测,而贝类体内可同时富集多种腹泻性贝类毒素,单一毒素检测效率较低,高通量检测技术的开发有望成为未来研发的重点方向之一。对于大规模的实际应用,快捷、准确的现场检测技术也必不可少,结合不同的学科优势,改进或开发新的检测技术势在必行,如研发新型显

色材料、发光材料应用于酶联免疫吸附法、免疫层析法等检测方法,提高检测灵敏度;研制新型廉价的便携检测设备,进一步提高现场检测的速度和灵敏度等等。随着免疫分析技术的不断发展,对贝类毒素的检测方法呈现多样的趋势,从灵敏度的角度出发,高灵敏度有利于检测出海产品中残留的毒素,利于海产品的出口、海洋生态环境的监测。总之,开发高通量、便捷、灵敏的检测产品具有广阔的应用前景,这将为保护环境、保障人民生命财产安全做出重要贡献。

参考文献

- [1] WU D, CHEN J, WANG J, *et al.* Monitoring and warning of lipophilic marine algal toxins in mariculture zone based on toxin profiles of phytoplankton [J]. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2020, 197: 110647.
- [2] FARABEGOLI F, BLANCO L, RODRIGUEZ LP, *et al.* Phycotoxins in marine shellfish: Origin, occurrence and effects on humans [J]. *Mar Drugs*, 2018, 16(6): 188.
- [3] LOUZAO MC, VILARIÑO N, VALE C, *et al.* Current trends and new challenges in marine phycotoxins [J]. *Mar Drugs*, 2022, 20(3): 198.
- [4] CAMPOS A, FREITAS M, ALMEIDA AM, *et al.* OMICs Approaches in diarrhetic shellfish toxins research [J]. *Toxins (Basel)*, 2020, 12(8): 493.
- [5] CORRIERE M, BAPTISTA M, PAULA JR, *et al.* Impaired fish swimming performance following dietary exposure to the marine phycotoxin okadaic acid [J]. *Toxicon*, 2020, 179: 53–59.
- [6] LIU Y, XU S, CAI Q, *et al.* *In vitro* interactions between okadaic acid and rat gut microbiome [J]. *Mar Drugs*, 2022, 20(9): 556.
- [7] MOREIRAS G, LEÃO JM, GAGOM A. Analysis of cyclic imines in mussels (*Mytilus galloprovincialis*) from Galicia (NW Spain) by LC-MS/MS [J]. *Int J Environ Res Public Health*, 2019, 17(1): 281.
- [8] 刘晓玉, 徐静, 黄莲芝, 等. 腹泻性贝类毒素及检测技术研究进展[J]. *食品安全质量检测学报*, 2015, 6(10): 4096–4102.
- [9] LIU XY, XU J, HAUNG LZ, *et al.* Research progress on diarrhetic shellfish poison and the detection methods [J]. *J Food Saf Qual*, 2015, 6(10): 4096–4102.
- [10] LU Y, ZHOU Z, CHEN S, *et al.* Progress on the metabolic rules and detection methods for okadaic acid related toxins in biological samples [J]. *Se Pu*, 2020, 38(6): 621–626.
- [11] DILLON M, ZACZEK MMA, EDWARDS C, *et al.* Current trends and challenges for rapid SMART diagnostics at point-of-site testing for marine toxins [J]. *Sensors (Basel)*, 2021, 21(7): 2499.
- [12] GU H, WU Y, LU S, *et al.* Emerging harmful algal bloom species over the last four decades in China [J]. *Harmful Algae*, 2022, 111: 102059.
- [13] YAN T, LI XD, TAN ZJ, *et al.* Toxic effects, mechanisms, and ecological impacts of harmful algal blooms in China [J]. *Harmful Algae*, 2022, 111: 102148.
- [14] ZINGONE A, ESCALERA L, ALIGIZAKI K, *et al.* Toxic marine microalgae and noxious blooms in the Mediterranean Sea: A contribution to the Global HAB Status Report [J]. *Harmful Algae*, 2021, 102: 101843.
- [15] BWAMBOK DK, SIRAJ N, MACCHI S, *et al.* QCM sensor arrays, electroanalytical techniques and NIR spectroscopy coupled to multivariate analysis for quality assessment of food products, raw materials, ingredients

- and foodborne pathogen detection: challenges and breakthroughs [J]. *Sensors (Basel)*, 2020, 20(23): 6982.
- [15] REYNOLDS DA, YOO MJ, DIXSON DL, *et al.* Exposure to the Florida red tide dinoflagellate, *Karenia brevis*, and its associated brevetoxins induces ecophysiological and proteomic alterations in *Porites astreoides* [J]. *PLoS One*, 2020, 15(2): e0228414.
- [16] MEDLIN LK, GAMELLA M, MENGES G, *et al.* Advances in the detection of toxic algae using electrochemical biosensors [J]. *Biosensors (Basel)*, 2020, 10(12): 207.
- [17] DUBOIS M, DEMOULIN L, CHARLIER C, *et al.* Development of ELISAs for detecting domoic acid, okadaic acid, and saxitoxin and their applicability for the detection of marine toxins in samples collected in Belgium [J]. *Food Addit Contam A*, 2010, 27(6): 859–868.
- [18] GUILLOTIN S, DELCOURT N. Marine neurotoxins' effects on environmental and human health: An OMICS overview [J]. *Mar Drugs*, 2021, 20(1): 10.
- [19] CARMODY EP, JAMES KJ, KELLY SS. Diarrhetic shellfish poisoning: Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay methods for determination of dinophysistoxin-2 [J]. *J AOAC Int*, 2020, 78(6): 1403–1407.
- [20] CHIN JD, QUILLIAM MA, FREMY JM, *et al.* Screening for okadaic acid by immunoassay [J]. *J AOAC Int*, 2020, 78(2): 508–513.
- [21] FIRE SE, BROWNING JA, DURDEN WN, *et al.* Comparison of during-bloom and inter-bloom brevetoxin and saxitoxin concentrations in Indian River Lagoon bottlenose dolphins, 2002–2011 [J]. *Aquat Toxicol*, 2020, 218: 105371.
- [22] PANG L, QUAN H, SUN Y, *et al.* A rapid competitive ELISA assay of Okadaic acid level based on epoxy-functionalized magnetic beads [J]. *Food Agric Immunol*, 2019, 30(1): 1286–1302.
- [23] ZHANG Z, YU X, ZHAO J, *et al.* A fluorescence microplate assay based on molecularly imprinted silica coated quantum dot optosensing materials for the separation and detection of okadaic acid in shellfish [J]. *Chemosphere*, 2020, 246: 125622.
- [24] ZHANG X, ZHANG Z. Development of a capillary electrophoresis-based enzyme immunoassay with electrochemical detection for the determination of okadaic acid and dinophysistoxin2 in shellfish samples [J]. *Anal Lett*, 2012, 45(11): 1365–1376.
- [25] LI X, CHENG Y, XU R, *et al.* A smartphone-assisted microarray immunosensor coupled with GO-based multi-stage signal amplification strategy for high-sensitivity detection of okadaic acid [J]. *Talanta*, 2022, 247: 123567.
- [26] ZHENG L, CAI G, WANG S, *et al.* A microfluidic colorimetric biosensor for rapid detection of *Escherichia coli* O157:H7 using gold nanoparticle aggregation and smart phone imaging [J]. *Biosens Bioelectron*, 2019, 124–125: 143–149.
- [27] BAGAL KDR, CHIANG BH. Portable paper-micro well device composed of agglomerated nano-hematite clusters in enzyme-hydrogel composite for beta glucan detection using smartphone [J]. *Sensor Actuat B: Chem*, 2021, 339: 129836.
- [28] HÁRENDARČÍKOVÁ L, PETR J. Smartphones & microfluidics: Marriage for the future [J]. *Electrophoresis*, 2018, 39(11): 1319–1328.
- [29] 伍志强, 王本成, 孙艳波, 等. 贝类中大田软海绵酸的液相色谱-串联质谱优化测定法[J]. *食品安全质量检测学报*, 2015, 6(1): 265–271.
- WU ZQ, WANG BC, SUN YB, *et al.* Improvement of determination method of okadaic acid in shellfish by liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *J Food Saf Qual*, 2015, 6(1): 265–271.
- [30] 李静宇, 何小维, 刘晓云, 等. 克伦特罗荧光免疫层析试纸条的制备及特性研究[J]. *中国畜牧兽医*, 2015, 42(10): 2606–2611.
- LI JY, HE XW, LIU XY, *et al.* Preparation and properties analysis of clenbuterol fluorescent immunochromatographic strip [J]. *China Anim Husb Vet Med*, 2015, 42(10): 2606–2611.
- [31] FU LL, ZHAO XY, JI LD, *et al.* Okadaic acid (OA): Toxicity, detection and detoxification [J]. *Toxicon*, 2019, 160: 1–7.
- [32] 权浩然, 庞林江, 张宜明, 等. 大田软海绵酸及快速检测技术应用进展[J]. *食品工业科技*, 2017, 38(11): 391–394, 399.
- QUAN HR, PANG LJ, ZHANG YM, *et al.* Progress in application of okadaic acid and rapid detection technology [J]. *Sci Technol Food Ind*, 2017, 38(11): 291–394, 399.
- [33] LING S, LI X, ZHANG D, *et al.* Detection of okadaic acid (OA) and tetrodotoxin (TTX) simultaneously in seafood samples using colloidal gold immunoassay [J]. *Toxicon*, 2019, 165: 103–109.
- [34] TURNBULL AR, TAN JYC, UGALDE SC, *et al.* Single-laboratory validation of the neogen qualitative lateral flow immunoassay for the detection of paralytic shellfish toxins in mussels and oysters [J]. *J AOAC Int*, 2018, 101(2): 480–489.
- [35] 韩蕾, 赵芮, 刘昭, 等. 大田软海绵酸和鳍藻毒素时间分辨荧光免疫层析试纸条的研制与应用[J]. *海洋环境科学*, 2022, 41(5): 783–790.
- HAN L, ZHAO R, LIU Z, *et al.* Development and application of time-resolved fluorescent immunochromatography test strip for okadaic acid and dinophysistoxins [J]. *Mar Environ Sci*, 2022, 41(5): 783–790.
- [36] SZKOLA A, CAMPBELL K, ELLIOTT CT, *et al.* Automated, high performance, flow-through chemiluminescence microarray for the multiplexed detection of phycotoxins [J]. *Anal Chim Acta*, 2013, 787: 211–218.
- [37] 王权. 海产品中 大田软海绵酸和水产品中药物残留快速检测新技术的研究及应用[D]. 南京: 南京农业大学, 2011.
- WANG Q. Development of new techniques of fast detection for okadaic acid in marine products and drug residue in fishery products and their application [D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2011.
- [38] VDOVENKO MM, DEMIYANOVA AS, CHEMLEVA TA, *et al.* Optimization of horseradish peroxidase-catalyzed enhanced chemiluminescence reaction by full factorial design [J]. *Talanta*, 2012, 94: 223–226.
- [39] FARRELL H, AJANI P, MURRAY S, *et al.* Diarrhetic shellfish toxin monitoring in commercial wild harvest bivalve shellfish in New South Wales, Australia [J]. *Toxins (Basel)*, 2018, 10(11): 446–446.
- [40] CHEN X, ZHOU K, XIANG Z, *et al.* Establishment and clinical application of time-resolved immunofluorescence assay of lipoprotein-associated phospholipase A2 [J]. *Anal Biochem*, 2022, 648: 114674.
- [41] WANG R, ZENG L, YANG H, *et al.* Detection of okadaic acid (OA) using ELISA and colloidal gold immunoassay based on monoclonal antibody [J]. *J Hazard Mater*, 2017, 339: 154–160.
- [42] 李静, 李培武, 张奇, 等. 时间分辨荧光免疫层析试纸条在油料饼粕黄曲霉毒素 B₁ 检测中的应用[J]. *中国油料作物学报*, 2014, 36(2): 256–262.
- LI J, LI PW, ZHANG Q, *et al.* Investigation of time-resolved fluoro-immunochromatographic assay strip for quantitative determination of aflatoxin B₁ in oilseed meals [J]. *Chin J Oil Crop Sci*, 2014, 36(2):

- 256–262.
- [43] QIN Y, LI J, KUANG J, *et al.* Sensitive time-resolved fluoroimmunoassay for the quantitative detection of okadaic acid [J]. *Front Mar Sci*, 2022, 9: 961751.
- [44] LONGO UG, CANDELA V, BERTON A, *et al.* Biosensors for detection of biochemical markers relevant to osteoarthritis [J]. *Biosensors (Basel)*, 2021, 11(2): 31.
- [45] NELIS JLD, TSAGKARIS AS, ZHAO Y, *et al.* The end user sensor tree: An end-user friendly sensor database [J]. *Biosens Bioelectron*, 2019, 130: 245–253.
- [46] KIM J, CAMPBELL AS, DE ÁBE, *et al.* Wearable biosensors for healthcare monitoring [J]. *Nat Biotechnol*, 2019, 37(4): 389–406.
- [47] GRIESHABER D, MACKENZIE R, VÖRÖS J, *et al.* Electrochemical biosensors-sensor principles and architectures [J]. *Sensors (Basel)*, 2008, 8(3): 1400–1458.
- [48] COUTO RA, LIMA JL, QUINAZ MB. Recent developments, characteristics and potential applications of screen-printed electrodes in pharmaceutical and biological analysis [J]. *Talanta*, 2016, 146: 801–814.
- [49] THÉVENOT DR, TOTH K, DURST RA, *et al.* Electrochemical biosensors: Recommended definitions and classification [J]. *Biosens Bioelectron*, 2001, 16(1–2): 121–131.
- [50] EISSA S, ZOUROB M. A graphene-based electrochemical competitive immunosensor for the sensitive detection of okadaic acid in shellfish [J]. *Nanoscale*, 2012, 4(23): 7593–7599.
- [51] HAYAT A, BARTHELMEBS L, MARTY JL. Electrochemical impedimetric immunosensor for the detection of okadaic acid in mussel sample [J]. *Sensor Actuat B: Chem*, 2012, 171–172: 810–815.
- [52] 徐睿航, 何培民, 贾睿. 大田软海绵酸的毒性、检测及应用的研究进展[J]. *中国海洋药物*, 2021, 40(1): 59–68.
- XU RH, HE PM, JIA R. Research progress on the toxicity, detection and application of okadaic acid [J]. *Chin J Mar Drugs*, 2021, 40(1): 59–68.
- [53] CAMPÁS M, IGLESIA P, BERRE M, *et al.* Enzymatic recycling-based amperometric immunosensor for the ultrasensitive detection of okadaic acid in shellfish [J]. *Biosens Bioelectron*, 2008, 24(4): 716–722.
- [54] 唐恒坤, 吴惠娟, 杨敏仪, 等. 基于免疫生物传感器的大田软海绵酸检测研究进展[J]. *武夷科学*, 2022, 38(1): 1–9.
- TANG HK, WU HJ, YANG MY, *et al.* Progress in detection of okadaic acid on immunosensor [J]. *Wuyi Sci J*, 2022, 38(1): 1–9.
- [55] GARIBO D, CAMPBELL K, CASANOVA A, *et al.* SPR immunosensor for the detection of okadaic acid in mussels using magnetic particles as antibody carriers [J]. *Sensor Actuat B: Chem*, 2014, 190: 822–828.
- [56] RAMALINGAM S, CHAND R, SINGH CB, *et al.* Phosphorene-gold nanocomposite based microfluidic aptasensor for the detection of okadaic acid [J]. *Biosens Bioelectron*, 2019, 135: 14–21.
- [57] VERMA M, CHAUDHARY M, SINGH A, *et al.* Naphthalimide-gold-based nanocomposite for the ratiometric detection of okadaic acid in shellfish [J]. *J Mater Chem B*, 2020, 8(36): 8405–8413.
- [58] FRAGA M, VILARIÑO N, LOUZAO MC, *et al.* Multidetecion of paralytic, diarrhetic, and amnesic shellfish toxins by an inhibition immunoassay using a microsphere-flow cytometry system [J]. *Anal Chem*, 2013, 85(16): 7794–802.
- [59] ZOU L, TIAN Y, ZHANG X, *et al.* A competitive love wave immunosensor for detection of okadaic acid based on immunogold staining method [J]. *Sensor Actuat B: Chem*, 2017, 238: 1173–1180.
- [60] 邱先鑫. 检测腹泻性贝类毒素大田软海绵酸的免疫传感器的研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2017.
- QIU XX. Study on immunosensor for detecting diarrhoeal shellfish toxin daeda soft sponge acid [D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2017.
- [61] 王晓煜. 海洋贝类中大田软海绵酸核酸适配体技术研究与应[D]. 舟山: 浙江海洋大学, 2022.
- WANG XY. Research and application of okadaic acid detection technology in marine shellfish based on nucleic acid aptamer technology [D]. Zhoushan: Zhejiang Ocean University, 2022.
- [62] TANG L, CHANG SJ, CHEN CJ, *et al.* Non-invasive blood glucose monitoring technology: A review [J]. *Sensors (Basel)*, 2020, 20(23): 6925.
- [63] 杨辉, 刘斌, 赵慧琴, 等. 河北省市售贝类中脂溶性毒素的调查研究[J]. *食品安全质量检测学报*, 2021, 12(5): 1741–1745.
- YANG H, LIU B, ZHAO HQ, *et al.* Investigation on liposoluble toxins in shellfish sold in Hebei province [J]. *J Food Saf Qual*, 2021, 12(5): 1741–1745.
- [64] BHALLA N, JOLLY P, FORMIASANO N, *et al.* Introduction to biosensors [J]. *Essays Biochem*, 2016, 60(1): 1–8.
- [65] QU R, LI G. Overview of liquid crystal biosensors: From basic theory to advanced applications [J]. *Biosensors (Basel)*, 2022, 12(4): 205.

(责任编辑: 张晓寒 郑 丽)

作者简介



王 峥, 硕士研究生, 主要研究方向为高灵敏免疫分析技术的开发与应用。
E-mail: wangzheng20223090@163.com



李佳钰, 硕士研究生, 主要研究方向为高灵敏免疫分析技术的开发与应用。
E-mail: jiayuli2021@163.com



秦 源, 博士, 副教授, 主要研究方向为高灵敏免疫分析技术的开发与应用。
E-mail: qinyuan@zstu.edu.cn