

石房蛤毒素的酶联免疫检测技术研究

孙 帅¹, 赵 涵¹, 董益阳¹, 王 斌^{1, 2}, 刘佳蕙¹, 张克义³

- (1. 北京化工大学生命科学与技术学院, 北京 100029;
2. 北京化工大学环渤海生物产业研究院, 河北秦皇岛 066004;
3. 秦皇岛市食品药品检验中心, 河北秦皇岛 066004)

摘要: 利用相关的免疫反应和酶催化反应知识, 着重探索研究海洋生物毒素的代表——石房蛤毒素(saxitoxin, STX)的酶联免疫检测技术。在已有的商业化试剂盒基础上, 利用酶联免疫吸附测定(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)法进一步探索 STX 快速检测的标准曲线, 并通过优化实验条件, 为标准化试剂盒的研发打下基础。通过监测市场中常见贝类所含的此种毒素, 为日常的贝类饮食提供科学的参考建议。

关键词: 食品检验学; 食品安全; 酶联免疫吸附测定; 贝类毒素; 石房蛤毒素

中图分类号: R446.62 文献标识码: A 文章编号: 1674-2850(2017)21-2422-05

Research of enzyme-linked immunosorbent assay detecting saxitoxin

SUN Shuai¹, ZHAO Han¹, DONG Yiyang¹, WANG Bin^{1, 2}, LIU Jiahui¹, ZHANG Keyi³

- (1. College of Life Science and Technology, Beijing University of Chemical Technology, Beijing 100029, China;
2. Bohai Institute of Biological Industry, Beijing University of Chemical Technology, Qinhuangdao, Hebei 066004, China;
3. Qinhuangdao Municipal Food and Drug Inspection Center, Qinhuangdao, Hebei 066004, China)

Abstract: This study utilizes knowledge of the relevant immune response and enzymatic reaction, and focuses on exploring the study of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) detecting marine toxins—saxitoxin (STX). On the basis of existing commercial kits, the standard curve of the rapid detection of STX was further developed by ELISA method, and the basis for development of standardized kit was established by optimizing the experimental conditions. Through detecting such toxins in common shellfish in the market, a scientific reference was proposed for the daily shellfish diet.

Key words: food inspection; food safety; enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA); shellfish toxins; saxitoxin

0 引言

STX 是已知毒性最强的海洋生物毒素之一, 为贝类神经麻痹中毒(paralytic shellfish poisoning, PSP)的主要毒素之一, 由于是在美国阿拉斯加石房蛤和加州贻贝中发现的浓度最高且首先确定了 PSP 成分, 故得名^[1]。STX 是四氢嘌呤的一种衍生物, 为白色、吸湿性很强的固体, 溶于水, 微溶于甲醇和乙醇。其通过影响钠离子通道而抑制神经的传导, 毒性极强, 对成年人的轻度中毒量为 110 μg, 致死量为 540~1 000 μg, STX 和 neoSTX 毒性最高, 半数致死量(LD₅₀)为 10 μg/kg (小鼠)。鉴于 STX 的高危害性

基金项目: 河北省食品药品监督管理局科技计划(ZD2015007)

作者简介: 孙帅(1994—), 男, 硕士研究生, 主要研究方向: 酶联免疫检测技术

通信联系人: 董益阳, 教授, 主要研究方向: 食品安全检测与风险评估. E-mail: yydong@mail.buct.edu.cn

和分布的广泛性，世界各国均将其列为水产品安全检验的必检项目^[2~4]。STX 的结构式如图 1 所示。目前，检测贝类毒素的方法主要有小鼠生物法、高效液相色谱（high performance liquid chromatography, HPLC）法和免疫学测定方法。小鼠生物法误差大、重现性差，且存在不能分析样品中具体组分的缺点；HPLC 法能够精确测定毒素的种类和含量，但需要对样品进行繁琐的前处理并购买昂贵的设备。近年来，随着免疫学测定方法的迅速兴起，对贝类毒素有了进一步的研究。其中，直接的竞争性 ELISA 法是最常用的一种，另一种较常用的方法是间接的竞争性 ELISA^[5]。STX 本身为小分子物质，不具有免疫原性，因此需要连接到高分子载体上，使其成为完全抗原，再用来免疫动物。免疫学测定法具有特异性强、灵敏度高、操作简单、对样品处理要求较低、干扰少等特点，克服了上述技术的局限，提供了一种简单高效的检测方法^[6]。

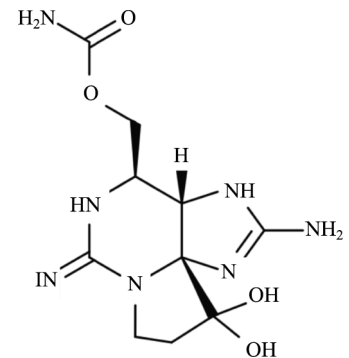


图 1 STX 的结构式

Fig. 1 Structural formula of STX

1 ELISA 法原理

酶联免疫吸附测定法简称酶联免疫技术，是一种建立在放射免疫分析技术理论基础上的非放射性标记免疫分析技术。其基本原理为：通过化学方法将酶与抗体或抗原共价连接，形成酶标记物；或通过免疫学方法将酶与抗体结合起来，形成免疫复合物。这些酶标记物或免疫复合物不仅保留了免疫活性，还具有酶的活性。因此，当它们在体系中遇到相应的抗原或抗体时，便可特异且高效地结合上去，再遇到特定的底物时，其上的酶便可催化底物发生反应，生成有色、发光或荧光产物，便于后面利用各种手段进行定性、定量分析。最常用的分析方法是分光光度法，即通过反应体系中颜色的变化来判定有无相应的免疫反应。而颜色的深浅，即吸光度数值的大小则可以快速、准确地反映样品中相应抗原或抗体量的多少^[7~8]。故 ELISA 法主要由三部分组成：1) 免疫学反应过程，包括抗原、抗体及酶标复合物相互之间的免疫识别与结合；2) 酶和底物的反应过程，其中可以根据实验条件等的不同，选择不同的酶/底物系统；3) 检测方法的建立，可以根据产物理化性质的不同，选择不同的检测手段，例如分光光度法、荧光分析法、化学发光分析法等。

2 实验

2.1 实验材料与仪器

牛血清白蛋白 (bull serum albumin, BSA)，氢氧化钾 (KOH)，氯化钠 (NaCl)，磷酸二氢钾 (KH₂PO₄)，十二水合磷酸氢二钠 (Na₂HPO₄·12H₂O)，二水合磷酸二氢钠 (NaH₂PO₄·2H₂O)，氯化钾 (KCl)，以上试剂均为分析纯；羊抗兔 IgG 抗体 (1.0 mg)，麻痹性贝类毒素试剂盒，蛭子，文蛤，白蛤。pH 计 (PHS-3C 型)，电子天平 (BT-25S)，旋转培养器 (QB-228 型)，震荡器 (VORTEX-6)，高速冷冻离心机 (3K15)，酶标仪 (ELx800)，分光光度计 (ND2000c)。

2.2 STX 直接竞争 ELISA 检测标准曲线的建立

为研究建立 STX 直接竞争的 ELISA 检测标准曲线^[9~12]，先将酶标记物加入到微孔中，再加入系列浓度的标准品或样品——受检抗原，最后加入抗体进行反应。反应完毕后，清洗酶标板，除去游离的分子。随后在每孔中加入底物溶液，结合酶标的复合物将无色底物通过反应生成为蓝色产物。显色完毕后，根据各孔的显色程度收集数据，并依据标准颜色得出样品的浓度值。

2.3 实验方案的优化

为得到更好的 STX 标准曲线, 即使其线性相关系数达到 0.99 以上, 也需要对初始的操作条件进行优化。本研究着重从游离酶标抗原对检测结果的影响、孵育温度及抗原抗体反应顺序 3 个方面进行探索和优化。

2.4 样品检测与前处理

基于 STX 试剂盒进行进一步的探索, 绘制并优化标准曲线用于检测, 并利用这一检测方法针对市场上常见的贝类样品进行检测, 从而对所建立的方法进行评价。因此, 在优化完成后, 对几种样品进行上样检测, 一方面可以验证本检测方法的准确度和可信用度, 另一方面也可以通过检测这些常见样品中是否含有 STX 或毒素浓度是否超标, 为日常饮食提供一些科学性建议。

样品检测依据上述方法, 样品前处理方法如下: 去除贝壳取出贝肉, 在天平上称取质量并记录, 将全部贝肉放入搅拌机打碎匀浆; 准备 50 mL 离心管若干, 准确称取 1 g 均质好的样品于 50 mL 离心管中, 再加入 10 mL 0.1 mol/L 盐酸, 剧烈震荡混合; 将其放入沸水浴加热 10 min; 水浴完成后放置在室温下逐渐冷却; 待样品冷却后, 将样品置于离心机中室温下离心 10 min, 转速为 4 000 r/min; 离心完毕后, 用移液枪分别吸取 100 μ L 离心管中的上清液, 加入到 2.4 mL 样品稀释液中, 剧烈震荡混合; 用封口膜封好口并标记, 置于 4 $^{\circ}$ C 冰箱, 密封保存。

3 实验结果

3.1 STX 直接竞争的 ELISA 标准曲线

实验数据的优化处理采用 Beacon 公司提供的数据处理专用 Excel 表格, 该表格自动处理数据, 以标准品浓度的对数为横坐标, 并以关于吸光度之比的 Logit 函数为纵坐标, 绘制出线性关系良好的 STX 标准曲线, 如图 2 所示。

由图 2 计算出线性系数达到了 0.994 0, 说明检测方法较为可靠。根据灵敏度的定义, 20%抑制率所对应的毒素浓度可认为是该检测方法的灵敏度, 而 20%~80%抑制率范围所对应的毒素浓度为该检测方法的工作范围。因此, 计算得到本检测方法的灵敏度约为 1.6×10^{-11} , 而工作范围则大约在 $1.60 \times 10^{-11} \sim 2.44 \times 10^{-10}$ 之间。

3.2 实验优化

通过实验发现, 清洗酶标孔 4 次可以将游离酶标抗原对检测结果的影响降至可以忽略不计的程度。且在 37 $^{\circ}$ C 下既不利于抗原抗体间的识别反应, 也不利于酶与底物的显色反应, 因此使测量的吸光度值不论是在 405 nm 下还是在 490 nm 下均偏低, 不利于检测分析。而在 25~30 $^{\circ}$ C 下, 温度不会对反应产生较大的影响, 并且在此温度范围内, 吸光值相差不大, 最大误差也不超过 2.46%。故本实验中, 选择 25 $^{\circ}$ C 作为检测温度, 优化后的标准曲线如图 3 所示。

在经过上述优化操作之后, 本实验最终重复了一次 STX ELISA 标准曲线的绘制实验, 并将其作为样品检测和添加实验的测量标准曲线。通过分析数据可以看出, 该曲线的拟合直线的线性相关系数达到了 0.999 7, 有利于进一步检测和分析。

3.3 市场样品的检测

利用优化后的检测方法, 对市场上的一些贝类食品(文蛤、蛏子、白蛤)进行检测, 采用商业化试

试剂盒的 ELISA 分析软件分析计算结果，各样品的检测结果如表 1 所示。

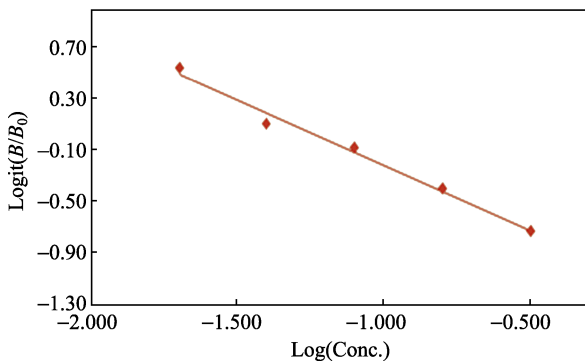


图 2 STX 标准曲线

Fig. 2 STX standard curve

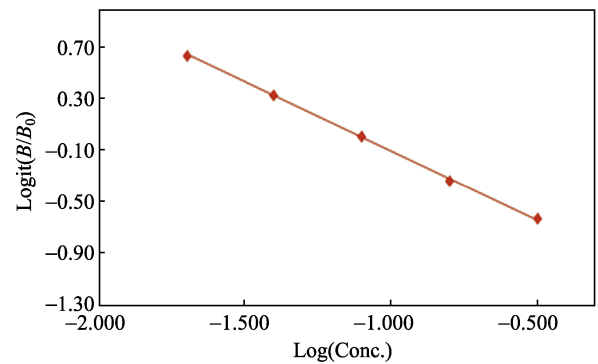


图 3 优化后的 STX 标准曲线

Fig. 3 Optimized STX standard curve

表 1 样品检测数据分析

Tab. 1 Data analysis of sample inspection

样品	平均吸光度	Logit(B/B ₀)	计算浓度/(ng/mL)	稀释倍数	最终浓度/(ng/mL)	判断
文蛤	1.173	0.110	0.064	250.0	15.904	合格
蛭子	0.973	-0.057	0.091	1 000.0	91.396	不合格
白蛤	1.105	0.053	0.072	250.0	18.000	合格

从上述结果来看，本实验所检测的三类样品中，蛭子所含有的 STX 浓度最高，文蛤的最低。究其原因，根据之前所查文献，大多数的 STX 聚集分布在贝类的呼吸器官和消化腺中^[1]。而根据本实验提取样品的经验，蛭子的贝肉不论在体积上还是质量上，都远远大于文蛤和白蛤，其呼吸器官及消化腺也远远大于两者，因此蛭子所含有的 STX 也会更多。国际上通用的用于检测贝类中所含有 STX 的标准为 80 μg/100 g 贝肉^[13]，此标准限量经过本实验中匀浆液浓度的换算即为 80 ng/mL。进一步在数据表中对所测数据进行分析，可以看到本实验所检测的三类样品中，只有蛭子的毒素含量超标，不符合国际标准规定，而其余的两种贝类——文蛤和白蛤的 STX 含量均远远低于国际标准。

4 结论

本课题以 Beacon 公司所提供的 STX ELISA 检测试剂盒为基础，逐步探索、建立并优化出一套适用于标准化现场检测的试剂盒检测方法和平台。总体来说，本研究的实验阶段主要分为 3 个步骤：1) 建立标准曲线；2) 优化实验条件和操作条件；3) 实际样品的检测。最终得到一套建立在试剂盒基础上的比较完整的 STX 直接竞争 ELISA 标准检测方法。通过蛭子、文蛤及白蛤三类样品的检测，将其计算浓度与国际标准进行对比，直观地反映出其毒素含量的多少。因此，日常摄入此类海鲜尤其是蛭子类食物，需留心可能造成的 STX 超标风险。

开展贝类毒素的检测和排查对我国的食品安全和卫生十分必要，目前针对贝类毒素的检测主要是传统的小鼠生物法、HPLC 法和免疫学测定方法。虽然这些方法比较成熟，但在现场和快速检测等方面也存在一些不便。目前，越来越多的新技术发展起来并应用在贝类毒素的检测方面，例如涉及多领域前沿技术的微流体芯片^[14]，因其反应和传质速度快、灵敏度高等优点，已初步成功地应用于贝类毒素等海洋生物毒素和真菌毒素^[15]的检测和机理研究工作中，在不久的将来应会成为研究热点。

[参考文献] (References)

- [1] 孟宪梅, 卢士英, 阎东明, 等. 石房蛤毒素研究及应用进展[J]. 食品科技, 2010, 35 (8): 150-154.
MENG X M, LU S Y, YAN D M, et al. Progress of saxitoxin research and application[J]. Food Science and Technology, 2010, 35(8): 150-154. (in Chinese)
- [2] 王燕芳, 周维善. 石房蛤毒素[J]. 海洋科学, 1984, 8 (5): 55-58.
WANG Y F, ZHOU W S. Saxitoxin[J]. Marine Science, 1984, 8(5): 55-58. (in Chinese)
- [3] CUSICK K D, SAYLER G S. An overview on the marine neurotoxin, saxitoxin: genetics, molecular targets, methods of detection and ecological functions[J]. Marine Drugs, 2013, 11(4): 991-1018.
- [4] MURRAY S A, WIESE M, STÜKEN A, et al. *sxtA*-based quantitative molecular assay to identify saxitoxin-producing harmful algal blooms in marine waters[J]. Applied & Environmental Microbiology, 2011, 77(19): 7050-7057.
- [5] 马敬军, 曾名勇, 周德庆. 贝类毒素检验及排除方法的研究进展[J]. 中国海洋药物, 2003, 22 (6): 41-45.
MA J J, ZENG M Y, ZHOU D Q. Advances in methods of assay and detoxification of shellfish poisons[J]. Chinese Journal of Marine Drugs, 2003, 22(6): 41-45. (in Chinese)
- [6] 张也, 刘以祥. 酶联免疫技术与食品安全快速检测[J]. 食品科学, 2003, 24 (8): 200-204.
ZHANG Y, LIU Y X. Enzyme linked immunosorbent assay and rapid detection of food safety[J]. Food Science, 2003, 24(8): 200-204. (in Chinese)
- [7] 邱伟芬. 酶联免疫吸附分析及其在食品安全检测中的应用[J]. 粮食与饲料工业, 2004 (3): 44-45.
QIU W F. ELISA and its application in food safety determination[J]. Cereal & Feed Industry, 2004(3): 44-45. (in Chinese)
- [8] 王强, 王旭峰, 黄珂, 等. 酶联免疫吸附法测定水产品中甲基睾酮残留[J]. 现代食品科技, 2015, 31 (5): 303-308.
WANG Q, WANG X F, HUANG K, et al. Determination of methyltestosterone residue in aquatic products by enzyme-linked immunosorbent assay[J]. Modern Food Science and Technology, 2015, 31(5): 303-308. (in Chinese)
- [9] 罗辉武, 向军俭, 唐勇, 等. 麻痹性贝类毒素 GTX2,3 间接与直接竞争酶免疫学检测方法的比较研究[J]. 中国卫生检验杂志, 2006, 16 (6): 663-664.
LUO H W, XIANG J J, TANG Y, et al. Comparison of indirect and direct competitive enzyme-linked immunoassay for detection of GTX2,3[J]. Chinese Journal of Health Laboratory Technology, 2006, 16(6): 663-664. (in Chinese)
- [10] 刘涛, 王向红, 常彧, 等. 直接竞争酶联免疫法检测大麦中玉米赤霉烯酮[J]. 食品与机械, 2008, 24 (2): 97-99, 117.
LIU T, WANG X H, CHANG Y, et al. Direct competitive enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of zearalenone in barley[J]. Food and Machinery, 2008, 24(2): 97-99, 117. (in Chinese)
- [11] 罗奕铭, 王丽, 钟青萍. 直接竞争酶联免疫吸附法检测虾过敏蛋白[J]. 食品工业科技, 2012, 33 (3): 337-339.
LUO Y M, WANG L, ZHONG Q P. Direct competition enzyme linked immunoassay for detection of shrimp allergic protein[J]. Science and Technology of Food Industry, 2012, 33(3): 337-339. (in Chinese)
- [12] 王华. 有机磷农药残留酶联免疫直接竞争检测技术的研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2007.
WANG H. Study on direct competition detection technology of organophosphorus pesticide residue[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2007. (in Chinese)
- [13] 刘智勇, 计融. 各国贝类水产品中麻痹性贝类毒素限量标准的比对[J]. 中国热带医学, 2006, 6 (1): 176-178.
LIU Z Y, JI R. Comparison of criteria for paralytic shellfish poisons in shellfish aquatic products in various countries[J]. China Tropical Medicine, 2006, 6(1): 176-178. (in Chinese)
- [14] 赵望. 基于微流控芯片技术的快速环境免疫分析检测新方法[D]. 上海: 复旦大学, 2013.
ZHAO W. A new method for rapid environmental immunoassay detection based on microfluidic chip technology[D]. Shanghai: Fudan University, 2013. (in Chinese)
- [15] 裴亚峰. 赭曲霉毒素 A 无毒免疫学快速检测方法的研究[D]. 洛阳: 河南科技大学, 2012.
PEI Y F. Study on rapid immunological detection of ochratoxin A[D]. Luoyang: Henan University of Science and Technology, 2012. (in Chinese)