

# 石房蛤毒素酶联免疫吸附测定方法的研究

刘帅帅<sup>1,2</sup>, 朱兰兰<sup>2</sup>, \*周德庆<sup>2</sup>

(1. 中国海洋大学 食品科学与工程学院, 山东 青岛 266003;

2. 中国水产科学研究院 黄海水产研究所, 山东 青岛 266071)

**摘要:** 建立间接竞争酶联免疫吸附分析方法(idc-ELISA)测定石房蛤毒素(Saxitoxin, STX)。采用碳化二亚胺法,将半抗原STX分别与卵清蛋白(OVA)和牛血清蛋白(BSA)偶联,得到免疫抗原STX-OVA和包被抗原STX-BSA。用STX-OVA免疫BALB/c小鼠制备多克隆抗体。确定的最佳包被抗原质量浓度为2 μg/mL,多抗的工作浓度为1:800,羊抗鼠二抗工作浓度为1:1000。回归方程 $Y=0.1366X-0.0151$ ,  $R^2=0.9901$ 。该方法的灵敏度达到5.8 μg/mL,检出范围在0.2~926 μg/mL。

**关键词:** 石房蛤毒素;多克隆抗体;酶联免疫吸附分析

中图分类号: R991

文献标志码: A

doi: 10.3969/jissn.1671-9646(X).2011.09.003

## ELISA Detection Method of Saxitoxin

Liu Shuaishuai<sup>1,2</sup>, Zhu Lanlan<sup>2</sup>, \*Zhou Deqing<sup>2</sup>

(1.College of Food Science and Engineering, Ocean University of China, Qingdao, Shandong 266003, China;

2.Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao, Shandong 266071, China)

**Abstract:** A indirect competitive enzyme-linked immunosorbent assay is developed for measurent Saxitoxin. STX is coupled to bovine serum albumin (BSA) and ovalbumin (OVA) by carbodiimide reaction for immunogen and coating ligand. STX-OVA is injected in BALB/c mice. The polyclonal antibodies anti-STX is obtained. The optimal concentration of the coating antigen is 2 μg/mL, The dilutions of polyclonal antibody against STX and sheep anti-rabbit IgG are 1:800 and 1:1000, respectively. The regression equation is  $Y=0.1366X-0.0151$ ,  $R^2=0.9901$ . The sensitivity of idc-ELISA is 5.8 μg/mL, the detection limits is 0.2~926 μg/mL.

**Key words:** STX; Polyclonal antibody; Enzyme-linked immunosorbent assay

麻痹性贝类毒素(Paralytic shellfish poison, PSP)已成为世界上分布最广、安全事故发生频率最高、危害程度最大的一类海洋生物毒素<sup>[1]</sup>。在我国近海可食用贝类中含有麻痹性贝毒,福建省东山县、广东省大亚湾及台湾省近年来都有因食用染毒贝类而引起多人中毒或死亡事件<sup>[2]</sup>。孔凡洲等人<sup>[3]</sup>对2002~2005年我国黄渤海海域采集的贝类样品进行了麻痹性贝毒毒性检测,再次证实,我国北方海域有麻痹性贝毒存在。石房蛤毒素(Saxitoxin, STX)为麻痹性贝类毒素的主要成分之一,是四氢嘌呤的一种衍生物,是白色、吸湿性很强的固体,溶于水,微溶于甲醇和乙醇。STX及天然衍生物有很高的致死率,它通过影响钠离子通道而抑制神经的传导。STX对成年人轻度中毒量为110 μg,致死剂量为540~1000 μg,

STX和neoSTX毒性最高,LD<sub>50</sub>为9 μg/kg(小鼠,ip)<sup>[4]</sup>。鉴于STX的高危害性和分布的广泛性,国内外将其列为水产品安全检验的必检项目。

麻痹性贝类毒素的分析方法主要有:小鼠生物测试法、HPLC法及免疫方法等。小鼠生物测试法是常用方法<sup>[5]</sup>,但此种方法不能确知毒素的组成及含量,且重复性差、灵敏度不高。近几年发展起来的HPLC法具有灵敏、高效的特点,但成本高、费时。酶联免疫吸附测定方法(ELISA)具有简便、快速、灵敏、成本低等特点,ELISA法与传统的小鼠生物测试法及HPLC法相比较,更快速经济,可以满足大批量样品快速筛查的需要。于兵等人<sup>[6]</sup>比较了ELISA法与小鼠生物法检测贝类中的麻痹性贝毒,结果表明,ELISA与小鼠生物法检测PSP的结果吻合程度

收稿日期: 2011-03-18

基金项目: 公益性行业(农业)科研专项(200903055)。

作者简介: 刘帅帅(1985-),男,山东人,硕士生,研究方向: 食品安全。E-mail: liushuai3036@126.com。

\*为通讯作者: 周德庆(1962-),研究员,博士生导师,研究方向: 食品安全与质量控制。

很好。

Johnson 等人<sup>[7]</sup>采用甲醛法制备了麻痹性贝毒的多克隆抗体,为建立 ELISA 方法奠定了基础。目前国内也相继开展了针对贝类毒素的研究工作,但主要集中于一大类毒素,针对某一大类中的一种毒素的研究不是很多。向军俭<sup>[8-9]</sup>制备了抗麻痹性贝毒 GTX2,3 的单克隆抗体,同时比较了间接竞争和直接竞争 ELISA 方法的灵敏度和检出限。目前,对 STX 的酶联免疫吸附法研究较少。本试验采用卵清蛋白为载体,合成免疫抗原,制备多克隆抗体,建立了石房蛤毒素间接竞争酶联免疫分析方法。

## 1 材料与方法

### 1.1 试剂和仪器

7 周龄雌性 BALB/c 小鼠,购自山东大学新药测试中心;STX 标准品购自加拿大;水溶性碳化二亚胺 EDC [1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride]、N-羟基琥珀酰亚胺 (N-hydroxysuccinimide, NHS)、牛血清白蛋白 (bovine serum albumin, BSA)、卵清蛋白 (ovalbumin, OVA)、弗氏完全和不完全佐剂, Sigma 公司提供;3,3',5,5'-四甲基联苯胺 (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine, TMB), Amresco 公司提供;辣根过氧化物酶 (horse radish peroxidase, HRP) 标记羊抗鼠 IgG,北京中杉金桥公司提供;酶标仪,北京普朗公司提供。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 半抗原—载体蛋白偶联物的制备

STX—OVA 的制备参照文献<sup>[10-11]</sup>,将 100  $\mu\text{g}$  的 STX 溶于 1 mL 二甲基亚砜中,配成质量浓度为 0.1  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  的母液,将 EDC, NHS, BSA, OVA 用磷酸盐缓冲液 (PBS, pH 值 7.5) 配成质量浓度为 1 mg/mL 的工作液。取 100  $\mu\text{L}$  的 STX 母液,加入 20  $\mu\text{L}$  的 EDC 和 12  $\mu\text{L}$  的 NHS 工作液,室温反应 3 h。再加入 100  $\mu\text{L}$  的 OVA,振荡反应 12 h。将反应物转移到透析卡中,用 pH 值 7.5 的 PBS 缓冲液透析 72 h,每 12 h 换液 1 次。透析完成后取出反应物, -20  $^{\circ}\text{C}$  保存。STX—BSA 的偶联方法同上。

#### 1.2.2 多克隆抗体的制备

以 STX—OVA 为免疫抗原,免疫 6 周龄的雌性 BALB/c 小鼠。首次免疫用 200  $\mu\text{L}$  的 STX—OVA (含 5  $\mu\text{g}$  的 STX) 与等体积弗氏完全佐剂混合,充分乳化后制成乳浊液,腹腔注射小鼠,之后每隔 2 周取同量 STX—OVA 与等体积弗氏不完全佐剂充分乳化,腹腔注射。取尾血测定小鼠血清效价,待效价大于要求值后,杀死小鼠取血,室温放置 30 min,转速 8 000 r/min 离心 20 min,取上层血清,加甘油分装, -20  $^{\circ}\text{C}$  保存待用。

#### 1.2.3 酶联免疫吸附分析方法测定多克隆抗体的效价

建立酶联免疫吸附分析方法测定多抗的效价。用 STX—BSA 偶联物作为包被抗原,用碳酸盐缓冲液 (pH 值 9.6) 稀释到质量浓度为 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  添加到 96 孔酶标板中,每孔 100  $\mu\text{L}$ , 4  $^{\circ}\text{C}$  过夜;弃去残液,用 PBS—T (含质量分数 0.1% 的 Tween20 的 PBS 溶液) 洗涤 4 次并拍干,用 3% 的 BSA 溶液封闭, 37  $^{\circ}\text{C}$  孵育 1 h。弃去封闭液,洗板 4 次并拍干,加入适当稀释的多克隆抗体和阴性对照小鼠的血清,每孔 100  $\mu\text{L}$ , 37  $^{\circ}\text{C}$  孵育 1 h;洗板 4 次并拍干,加入 20 000 倍稀释的酶标二抗,每孔 100  $\mu\text{L}$ , 37  $^{\circ}\text{C}$  孵育 1 h;洗板 5 次并拍干,每孔加底物溶液 TMB 100  $\mu\text{L}$ , 37  $^{\circ}\text{C}$  显色 30 min,加 50  $\mu\text{L}$  浓度为 2 mol/L 的  $\text{H}_2\text{SO}_4$  中止反应,在波长 450 nm 处测量 OD 值 (吸光度值)。

#### 1.2.4 建立间接竞争酶联免疫吸附方法分析 STX

96 孔板的包被和封闭同多抗效价测定。测定时每孔加入 50  $\mu\text{L}$  适当稀释的多克隆抗体,再加入 50  $\mu\text{L}$  STX 标准溶液或待测样品溶液,混匀, 37  $^{\circ}\text{C}$  孵育 1 h;洗板 4 次并拍干,加入适当稀释的酶标二抗,每孔 100  $\mu\text{L}$ , 37  $^{\circ}\text{C}$  孵育 1 h;洗板 5 次并拍干,每孔加 TMB 底物溶液 100  $\mu\text{L}$ , 37  $^{\circ}\text{C}$  显色 30 min,加 50  $\mu\text{L}$  2 mol/L 的  $\text{H}_2\text{SO}_4$  中止反应,波长 450 nm 处测量 OD 值。

#### 1.2.5 确定包被抗原浓度、多克隆抗体和酶标二抗工作浓度

首先确定包被抗原的浓度,以质量浓度 1, 2, 3  $\mu\text{g}/\text{mL}$  包被抗原包被酶标板。多抗的工作浓度选择 1:200, 1:400, 1:800, 1:1 600, 1:3 200, 二抗浓度选择在 1:3 000;确定了包被抗原的最佳浓度后,再确定多克隆抗体和二抗的工作浓度,二抗的工作浓度选择为 1:200, 1:400, 1:800, 1:1 000, 1:3 000, 1:5 000, 1:8 000。其余具体操作同 1.2.4,通过方阵滴定法,进行 ELISA 测定。依据  $\text{OD}_{450}$  值选择包被抗原的饱和浓度。选择  $\text{OD}_{450}$  值在 1.0 左右的多抗和二抗的稀释倍数作为工作浓度。

#### 1.2.6 抑制曲线的制作

分别配制不同浓度的 STX 标准溶液,质量浓度分别为 0, 1, 10, 100, 1 000, 10 000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。按照 1.2.4 的方法和 1.2.5 确定的反应最佳工作浓度进行间接竞争 ELISA 测定,制作抑制曲线。其中无 STX 时的  $\text{OD}_{450}$  值为  $B_0$ ,各相应质量浓度的 STX 的  $\text{OD}_{450}$  值为  $B$ ,抑制率  $(B_0 - B) / B_0$  与  $\lg C_{\text{STX}}$  成线性回归关系,从而可计算出回归曲线的方程与相关系数。

## 2 结果

### 2.1 免疫小鼠血清的效价

不同稀释倍数多克隆抗体的 OD 值见表 1。

不同稀释比的多抗 OD 值和阴性对照值都减去空

表1 不同稀释倍数多克隆抗体的 OD 值

稀释比	1 : 200	1 : 500	1 : 1 000	1 : 3 000	1 : 5 000	1 : 8 000	1 : 10 000	空白	阴性对照
OD 值	1.373	0.962	0.427	0.299	0.195	0.137	0.109	0.099	0.136

白值,以 OD 值大于阴性的 2 倍作为参照,小鼠血清效价达到 3 000。

## 2.2 包被抗原浓度、多抗和酶标二抗工作浓度的确定

不同包被抗原浓度的 OD 值见表 2。

表2 不同包被抗原浓度的 OD 值

包被抗原质量浓度 / $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	多抗稀释比				
	1 : 200	1 : 400	1 : 800	1 : 1 600	1 : 3 200
1	1.05	0.95	0.82	0.61	0.53
2	1.11	1.02	0.95	0.65	0.59
3	0.74	0.81	0.69	0.42	0.39

从表 2 可见,包被抗原的质量浓度为 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的 OD 值比 1 和 3  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的大,故试验采用 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  为包

被抗原的工作质量浓度。

不同多抗和酶标二抗稀释比的 OD 值见表 3。

表3 不同多抗和酶标二抗稀释比的 OD 值

多抗 稀释比	酶标二抗稀释比						
	1 : 200	1 : 400	1 : 800	1 : 1 000	1 : 3 000	1 : 5 000	1 : 8 000
1 : 200	2.48	2.18	1.72	1.54	0.93	0.67	0.44
1 : 400	2.28	2.17	1.70	1.33	0.90	0.62	0.39
1 : 800	2.23	2.12	1.69	1.02	0.55	0.38	0.21
1 : 1 600	2.19	2.09	1.59	0.82	0.41	0.27	0.13
1 : 3 200	2.13	1.86	1.31	0.79	0.39	0.25	0.09

选择 OD 值在 1.0 左右的多抗和酶标二抗的组合,选择多抗的稀释比为 1 : 800,酶标二抗稀释比 1 : 1 000。

## 2.3 idc-ELISA 抑制曲线的建立

根据 idc-ELISA 反应程序,所得间接竞争 ELISA 标准曲线。

STX 间接竞争 ELISA 标准曲线结果见表 4,STX 间接竞争抑制曲线见图 1。

由图 1 可知,线性回归方程为:

$$Y = 0.1366X - 0.0151, R^2 = 0.9901$$

以产生半数抑制时的毒素浓度 ( $\text{IC}_{50}$ ) 表示该方法的灵敏度,抑制率到达 50%时,该方法的灵敏度为 5.8  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。检出范围按照抑制率的 30%~80%确定,由回归方程算出抑制率在 30%时,STX 质量浓

度为 0.2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ,抑制率为 80%时  $C_{\text{STX}}$  为在 926  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ,检出范围为 0.2~926  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

## 3 讨论

由于 STX 是一种相对分子质量只有 299 的小分子半抗原,小分子半抗原因缺乏可作夹心法的 2 个以上的位点,因此不能用双抗体夹心法进行测定,试验采用间接竞争法模式。采用碳化二亚胺方法进行了半抗原与载体蛋白的偶连,其反应原理是利用碳化二亚胺使羟基和氨基间脱水形成酰胺键,半抗原上的羧基先与 EDC 反应生成一个中间物,然后再与蛋白质偶联。该方法简单易行、副反应少,对 STX 的抗原性影响小。本研究建立的 ELISA 方法中 STX 的质量浓度与吸光度值具有较强的相关性,

表4 STX 间接竞争 ELISA 标准曲线结果

STX 质量浓度 $C_{\text{STX}}/\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	$\lg C_{\text{STX}}$	OD 值	抑制率 / %
0	-	1.145	-
1	0	1.132	1.10
10	1	1.042	8.90
100	2	0.859	24.90
1 000	3	0.686	40.10
10 000	4	0.528	53.90

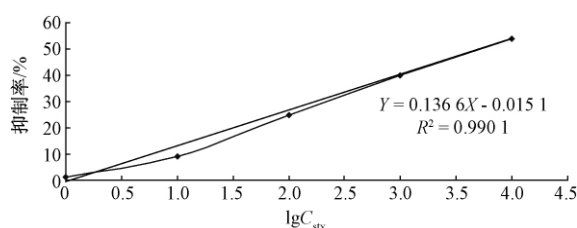


图1 STX 间接竞争抑制曲线

(下转第 36 页)

将 3 种解冻方法适当的结合起来,使冻肉解冻有较好的解冻时间和较好的解冻品质,以满足生产、生活的实际需要。

#### 参考文献:

- [1] 邢书婕,刘开华. 冻结肉解冻技术的研究进展 [J]. 肉类工业, 2002, 257 (9): 23-25.

- [2] 李里特. 食品物性学 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2001.  
[3] 李修渠, 李里特, 李法德. 肉的电导率研究 [J]. 肉类工业, 2001 (12): 19-21.  
[4] 李修渠, 李里特, 李法德. 通电加热解冻的模拟电路模型及实验研究 [J]. 农业机械学报, 2002, 33 (2): 57-60.  
[5] Cheol—Goo Yun. Ohmic thawing of a frozen meatch—unk [J]. Food sci.&Tech, 1998, 30 (4): 842-847.

(上接第 14 页)

本实验最关键的是制作效价高、特异性好的多克隆抗体,由于受 STX 标准品价格昂贵等条件的限制,小鼠免疫的剂量不是很高,同时目前还没有一种很好的方法检测 STX 和载体蛋白的偶联效果,值得进行进一步的研究。今后的研究目标是寻找简便经济的方法检测半抗原和蛋白的偶联效果,并制备效价更高,特异性更强的抗体。

#### 参考文献:

- [1] Chang F H, Anderson D M, Kulis D M, et al. Toxin production of *Alexandrium minutum* (Dinophyceae) from the Bay of Plenty, New Zealand [J]. Toxicon, 1997, 35: 393-409.  
[2] 孔凡洲, 徐子钧, 于仁成, 等. 黄渤海海域贝类麻痹性贝毒的检测与分析 [J]. 中国海洋大学学报, 2007, 37 (2): 305-309.  
[3] 江天久, 江涛. 中国沿海部分海域麻痹性贝毒研究 [J]. 海洋与湖沼, 2007, 38 (1): 36-40.  
[4] Sunami A, Glaaser I W, Fozzard H A. Structural and gating changes of the sodium channel induced by mutation of aresidue in the upper third of IVS6, creating an external access path for local anesthetics [J]. Mol Pharmacol, 2001, 59 (4): 684-691.

- [5] 朱小兵, 向军俭. 赤潮藻毒素检测研究进展 [J]. 暨南大学学报 (自然科学版), 2002, 23 (5): 110-115.  
[6] 于兵, 曹际娟, 尤永莉, 等. ELISA 与小白鼠生物法检测贝类中麻痹性贝毒的比较 [J]. 检验检疫科学, 2005, 15 (1): 32-35.  
[7] Johnson H M, Frey P A, Angelotti R, et al. Haptenic properties of paralytic shellfish poison conjugated to proteins by formaldehyde treatment [J]. Proc.Soc.Exp.Biol.Med, 1964, 117: 425-430.  
[8] 向军俭, 唐琦, 罗辉武, 等. 抗麻痹性贝毒素 GTX2, 3 单克隆抗体的制备及特性分析 [J]. 生态科学, 2005, 24 (2): 132-135.  
[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, 26 (6): 663-664.  
[10] Feng-Yih Yu, Bing-Hui Liu, Ting-Shu An Wu, et al. Development of a Sensitive Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for the Determination of Domoic Acid in Shellfish [J]. Agric.Food Chem, 2004, 52: 5 334-5 339.  
[11] Zih-Jay Tsao, Yi-Chun Liao, Bing-Hui Liu, et al. Development of a Monoclonal Antibody against Domoic Acid and Its Application in Enzyme-Linked Immunosorbent Assay and Colloidal Gold Immunostrip [J]. Agric.Food Chem, 2007, 55: 4 921-4 927.

(上接第 29 页)

- [12] 尚远, 卢立新, 许文才. 橙汁饮料中 VC 的无氧分解动力学 [J]. 食品工业科技, 2008, 29 (10): 120-122.  
[13] 史焱, 詹先成, 吕太平, 等. VC 溶液无氧降解动力学 [J]. 化学学报, 2006, 64 (11): 1 189-1 194.  
[14] 尚远, 卢立新, 林朝荣. 橙汁饮料中 VC 动态吸氧的研究 [J]. 饮料工业, 2008, 11 (5): 4-7.  
[15] 张妍. 橙汁特征性理化品质分析与鉴别方法研究 [D]. 武汉: 华中农业大学, 2008.  
[16] 徐斐, 蔡宝玉, 陈翠华, 等. 柑桔汁成分对其褐变的影响 [J]. 食品工业, 1999 (2): 8-10.

- [17] Roig M G, Bello J F, Rivera Z S, et al. Studies on the occurrence of non-enzymatic browning during storage of citrus juice [J]. Food Research International, 1999, 32: 609-619.  
[18] 熊海燕, 李莹. 不同果汁发酵液中酵母菌生长曲线的测定及 pH 值的变化 [J]. 农产品加工, 2009 (4): 26-27.  
[19] 张爱霞, 陆淳, 生庆海, 等. 感官分析技术在食品工业中的应用 [J]. 中国乳品工业, 2005, 33 (3): 39-40.