

河豚毒素直接竞争 ELISA 检测方法的研究

董雪, 钟青萍, 黄安诚, 雷红涛, 孙远明

(华南农业大学食品学院/广东省食品质量安全重点实验室, 广东 广州 510642)

摘要: 本研究应用直接竞争ELISA法对河豚毒素(tetrodotoxin, TTX)进行快速检测。用过碘酸钠氧化法合成酶标记抗原(HRP-OVA-TTX), 用直接ELISA方法对合成的酶标记抗原进行鉴定表明其与抗TTX单克隆抗体具有特异性反应。在此基础上建立了包被单抗的直接竞争ELISA方法。该方法对TTX的检测限可达到1.1 $\mu\text{g/L}$, IC_{50} 为20.4 $\mu\text{g/L}$, 线性范围3.3~137 $\mu\text{g/L}$, 批内变异系数小于6.25%, 批间变异系数小于7.34%。对鲫鱼的肌肉组织添加TTX标准品, 回收率为65%~93.2%, 变异系数为9.41%~12.77%。

关键词: 河豚毒素; 酶标抗原; 直接竞争ELISA

中图分类号: TS201.7; 文献标识码: A; 文章篇号: 1673-9078(2009)08-0977-05

Development of a Direct Competitive ELISA Method for Tetrodotoxin Detection

DONG Xue, ZHONG Qing-pin, HUANG An-cheng, LEI Hong-tao, SUN Yuan-ming

(College of food science, South China Agriculture University, Food Quality and Safety Key Lab of Guangdong Province, Guangzhou 510642)

Abstract: A direct competitive enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) method was developed for the rapid detection of the tetrodotoxin (TTX) in this paper. A horseradish peroxidase(HRP)-labeled conjugated antigen was synthesized by the sodium periodate reaction. The direct competitive ELISA was conducted by simultaneously incubating solidified anti-TTX monoclonal antibody with TTX and HRP-OVA-TTX. The detection limit for TTX was 1.1 $\mu\text{g/L}$. The inter- and intra-assay coefficient of variation were <6.25% and <7.34% in the range of 3.3-37 $\mu\text{g/L}$, respectively. Recoveries from crucian muscle were in the range of 65%-93.2% and the coefficient of variation was in the range of 9.41%~12.77%.

Key words: TTX; enzyme conjugated antigen; direct competitive ELISA

河豚毒素是一种海洋生物毒素, 分布广泛, 不仅存在于河豚鱼中, 其他一些海洋动物体内也有。其毒力比氰化钠大 1000 倍, 0.5~1.0 mg 可致人死亡^[1], 是自然界毒性最强的非蛋白质之一。虽然我国明文规定豚毒鱼类禁止鲜售鲜食, 但是由于目前尚无统一有效的检测河豚毒素的方法, 加之相应的监督措施难以到位, 利用河豚鱼类生产的鱼干、鱼片中毒事件屡有发生, 病死率高达 60%, 至今无特效抗毒药^[2,3]。

自 1909 年日本人田原首次发现了河豚毒素以来, 人们对河豚毒素的检测方法做了深入的研究, 相继出现了小鼠生物实验法、高效液相色谱法、薄层色谱法等多种检测方法^[4]。这些方法大多灵敏度低, 仪器分析价格昂贵, 所需的样品前处理也非常复杂, 难以适应实际工作的需要。未来的 TTX 检测发展方向应该是开

发面向现场应用, 准确、快速、高效、操作简便并且单样本检测成本低廉的方法。从目前的发展情况看, 以单克隆抗体(monoclonal antibody, McAb)为基础的免疫化学检测方法最为接近上述要求。本文研究了以单克隆抗体为基础的酶标抗原直接竞争 ELISA 方法, 具有灵敏、简便、快速等优点, 从而满足了河豚毒素快速检测的要求。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 试剂

河豚毒素购自江苏省海洋渔业公司, 牛血清白蛋白(BSA)和卵清白蛋白(OVA)购自美国Sigma公司, 辣根过氧化物酶购自广州威佳科技公司。试验所用其他试剂均为分析纯。

1.1.2 单克隆抗体的制备

对本实验室建立的抗TTX单克隆抗体杂交瘤细胞

收稿日期: 2009-03-23

作者简介: 董雪(1983-), 女, 在读研究生;

通讯作者: 钟青萍(1967-), 女, 副教授

株进行复苏,采用小鼠腹腔注射法生产腹水抗体。采用辛酸-硫酸铵盐析法,对腹水中的单克隆抗体进行纯化^[5]。

1.1.3 人工抗原的制备

卵清白蛋白-甲醛-河豚毒(OVA-HCHO-TTX)偶联物的制备,采用文献方法进行制备^[6]。

1.1.4 酶标抗原的制备

采用过碘酸钠氧化标记法^[5]。

1.1.5 ELISA使用液

(1)包被液: 0.05 M碳酸盐缓冲液, pH 9.6; (2)抗体稀释液: 0.01 M PBST溶液(含0.05%Tween20的0.01 M的PBS)加1%BSA; (3)底物缓冲液: 0.1 M 柠檬酸加0.2 M 磷酸氢二钠, pH 5.0; (4)底物贮存液: 10 mg四甲基联苯胺(TMB)加入1 mL二甲基甲酰胺(DMF), 冷冻保藏; (5)底物显色液: 底物缓冲液10 mL, 底物贮存液150 μ L, 2 μ L H₂O₂; (6)终止液: 2M H₂SO₄; (7)洗涤液: 去离子水。

1.1.6 TTX标准液

将1 mg/mL的TTX标准品用0.01 M PBST分别配成0.1、0.5、1、5、10、50、100、1000、10000 ng/mL, 放置于4 $^{\circ}$ C保存。

1.2 直接竞争ELISA检测方法的基本步骤

用包被液将抗TTX单克隆抗体作一定倍数的稀释,加入96孔酶标板中,100 μ L/孔进行包被;洗涤5次后每孔加入200 μ L封闭液(5%脱脂奶粉-PBS),置37 $^{\circ}$ C温育2h,洗涤5次;将TTX标准品稀释成系列浓度,每孔加入50 μ L不同浓度的TTX标准溶液与和50 μ L酶标抗原HRP-OVA-TTX,混匀,置室温(25 $^{\circ}$ C),反应0.5 h,洗涤;每孔加入100 μ L现配的底物显色液,室温避光反应15 min;加入终止液,50 μ L孔,混匀;用酶标仪在450 nm波长下测定各孔的吸光值,对结果进行分析判定。

1.3 直接竞争ELISA检测方法的建立

1.3.1 包被单抗和酶标抗原最佳工作浓度的确定

用包被液将抗TTX单克隆抗体(原始浓度为1.86 g/L)做倍比稀释(从1:100倍比稀释到1:6400)包板;将酶标抗原(原始浓度为40.85 mg/L)做一定倍数稀释,进行方阵滴定,选择最佳的抗体包被浓度和酶标抗原工作浓度,TTX标准品用0.01M PH 7.4的PBST稀释成系列浓度进行ELISA测定,其余操作同1.2。

1.3.2 最佳竞争反应温度、时间的确定

竞争反应时间设定为三个时间: 30 min、45 min、60 min,同时设置37 $^{\circ}$ C和室温(20~25 $^{\circ}$ C)两种温度,其余操作同1.2。

1.3.3 酶标抗原最佳稀释液的确定

不同的酶标抗原稀释液对反应影响也很大,如选择不合适的稀释液会造成非特异性吸附的增加,所以选择四种常用的稀释液进行比较: ddH₂O、PBS、PBST和PBST+1%BSA。其余操作同1.2。

1.3.4 最佳包被方法的选择

选择合适的包被方法,可以使抗体更好更有效地结合在酶标板上,有利于竞争反应的进行。包被温度和时间分别设置如下: 4 $^{\circ}$ C过夜包被; 37 $^{\circ}$ C 1 h、2 h、3 h包被;微波1 min、3 min、5 min、10 min包被。其余操作同1.2。

1.4 敏感性试验(灵敏度)

根据1.3建立的直接竞争ELISA法,以0标准孔(用PBST代替TTX标准品溶液)的吸光值值为B₀,添加各相应标准品浓度时的吸光值为B,以B/B₀值为纵坐标,以标准品浓度为横坐标,绘制标准曲线,确定线性范围及检出限。

1.5 重复性试验(精密度)

方法的精密度以组内误差和组间误差来表示。组内误差(CV)的测定: 在同一块酶标板上,每一标准品浓度做4个重复,以其组内变异系数表示组内误差。组间误差(CV')的测定: 在4块酶标板上分别重复组内误差测定操作,测出4块板内各自的平均抑制和标准差,再对4次测定的值进行平均后求出各浓度的组间变异系数。根据下列公式分别计算批间、批内变异系数: $CV(\%) = s/x \times 100\%$ 。

1.6 添加回收试验

取鲫鱼的肌肉4份,2 g/份,分别加入10 μ g/mL的TTX,使其终浓度为10 ng/g、100 ng/g、1000 ng/g、5000 ng/g。等TTX完全渗入组织后(大概0.5 h),加入20 mL乙酸-甲醇混合液(10 mL 1%冰乙酸+10 mL 甲醇),匀浆处理,所得匀浆液100 $^{\circ}$ C不断搅拌煮沸10 min,然后迅速冷却,4500 r/min离心10 min,取上清液过滤到分液漏斗中,沉淀加入20 mL乙酸-甲醇混合液100 $^{\circ}$ C不断搅拌煮沸10 min,迅速冷却后超声波振荡30 min,4500 r/min离心10 min,再取上清液过滤到分液漏斗中,将两次的上清液转移至圆底烧瓶,置于旋转蒸发器蒸发至剩1 mL,再加0.1%乙酸定容至4 mL,摇匀后取0.5 mL提取液和0.5 mL乙醚于离心管中,8000 r/min离心3 min,去醚层后,再加等体积的乙醚再8000 r/min离心3 min,去醚层,取水层用0.1%乙酸定容至20 mL用于检测。取1 mL按1.3的方法进行ELISA测定,每个浓度测定4次,每次作6个重复。从标准曲线上求出待检样品的TTX浓度,根据以下公式计算添加回收率: 添加回收率(%)=(实测浓

度-空白样品浓度)/加入标准品浓度×100%。

2 结果与分析

2.1 酶标抗原的合成与鉴定

对合成的酶标抗原进行的ELISA鉴定结果如图1所示。结果表明,在不同单抗包被浓度下,随着酶标抗原稀释度的不断升高,吸光值 OD_{450} 均有明显的下降梯度,说明合成的酶标抗原与抗TTX单克隆抗体有较强的特异性结合。

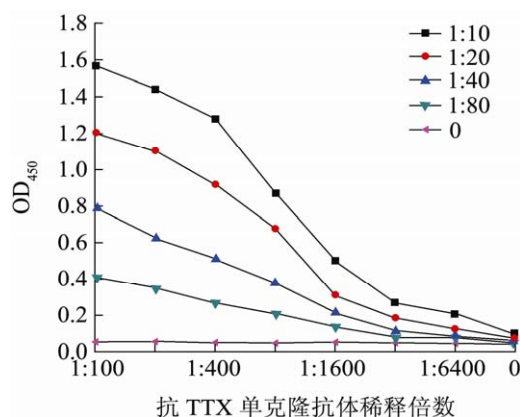


图1 酶标抗原的ELISA鉴定结果

Fig.1 Identification of enzyme conjugated antigen by ELISA

2.2 直接竞争ELISA法条件的优化

2.2.1 包被单抗和酶标抗原最佳工作浓度

采用方阵滴定法确定的抗体最佳工作浓度为1:500 (浓度为3.72 mg/L), 酶标抗原最佳工作浓度为1:10 (浓度为4.08 mg/L)。

2.2.2 最佳竞争反应时间和温度

确定最佳竞争反应时间和温度结果如图2所示。37℃的反应温度下 dcELISA 拟合曲线不规律,, 取 B/B_0 比值所作的拟合曲线拟合效果不好; 在室温条件下 dcELISA 拟合曲线比较规范, 并且以 B/B_0 比值所作的拟合曲线(图b)显示: 所有的竞争反应时间所得的曲线几乎可以重合, 充分表明酶标抗原在室温中反应时 dcELISA 检测更趋于稳定。

经 OriginPro7.5 软件分析后获得的 IC_{50} 值进行比较, 结果如图3所示: 反应温度对剂量-效应曲线有显著影响, 37℃下检测所得的 IC_{50} 值随着竞争反应时间的延长而增大, 室温下检测所得的 IC_{50} 值较为一致, 其曲线性能更为稳定。为了方便快速的原则, 故确定 ELISA 反应中的最佳反应时间、反应温度为 30min, 室温 (20~25℃)。

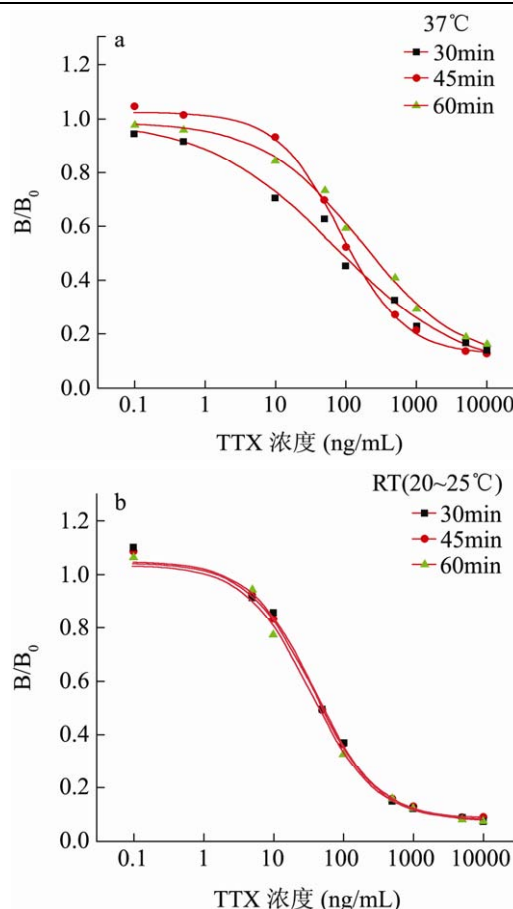


图2 dcELISA最佳反应时间、反应温度的确定

Fig.2 Determination of optimum reaction time and temperature of dcELISA

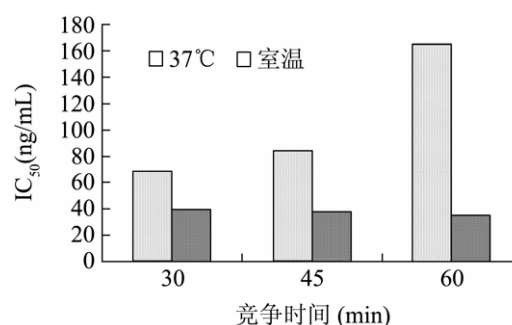


图3 不同反应时间、温度下 IC_{50} 值比较

Fig.3 Comparison of IC_{50} value at different reaction time and temperature

2.2.3 酶标抗原的最佳稀释液

酶标抗原最佳稀释液的选择结果如图4所示: 用 PBST+1%BSA作稀释液时, dcELISA检测值最高, 而用其它三种稀释液稀释酶标抗原时, dcELISA检测值都偏低; 用PBST+1%BSA稀释酶标抗原, 所测得的

dcELISA抑制曲线最稳定, IC₅₀值较低, 故确定PBST+1%BSA为酶标抗原最佳稀释液。

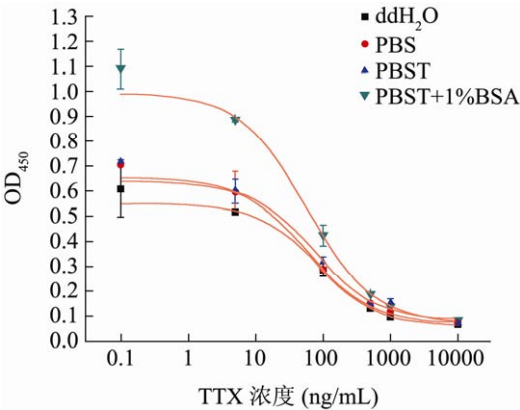


图4 酶标抗原最佳稀释液的确定

Fig.4 Determination of optimum diluent of enzyme conjugated antigen

2.2.4 抗体的最佳包被方法

最佳包被方法的选择结果如表1所示, 微波最小火力包板所测得的吸光值比常规方法的低, 但可以看出微波3 min包被所测得的IC₅₀值最小, 说明单抗经微波最小火力3 min包被可以提高dcELISA检测的灵敏度, 故确定dcELISA(酶标抗原)最佳包被方法为微波最小火力3 min。

表 1 dcELISA 法最佳包被方法的选择

Table 1 Determination of the optimum antibody coating

method		
不同包被方法	OD ₄₅₀	IC ₅₀ 值/(μg/L)
4 ℃过夜包被	1.336	45
37 ℃ 1 h 包被	1.073	59
37 ℃ 2 h 包被	1.381	38
37 ℃ 3 h 包被	1.263	35
微波 1 min 包被	0.920	41
微波 3 min 包被	1.008	37
微波 5 min 包被	0.960	49
微波 10 min 包被	1.005	48

2.3 敏感性试验

根据最佳工作条件建立直接竞争ELISA法标准曲线, 结果见图5。由标准曲线可知, 该方法对TTX的检测下限可达到1.1 μg/L, IC₅₀值为20.4 μg/L, 定量检测范围3.3~137 μg/L。

2.4 重复性试验

从表2可以看出, 0.1~10000 μg/L的9个标准品浓度得批内平均变异系数为6.16%, 批间平均变异系数为7.34%。

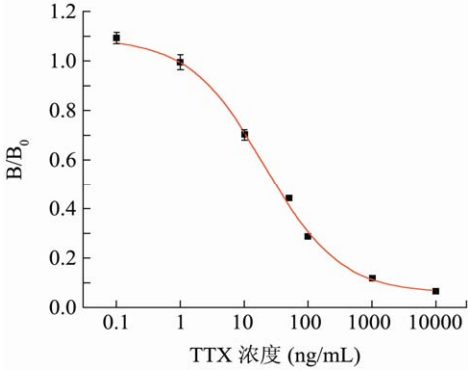


图5 最佳条件下dcELISA法的标准曲线

Fig.5 Calibration curve of dcELISA under the optimum conditions

表 2 dcELISA 法的重复性

Table 2 Repeatability of dcELISA method

TTX/(μg/L)		$\bar{x} \pm s$	CV/%
批内	0.10	1.19±0.05	3.88
	1.00	1.10±0.05	4.96
	10.00	0.91±0.08	11.40
	100.00	0.28±0.02	7.04
	500.00	0.13±0.02	13.08
	1000.00	0.10±0.00	0.97
批间	10000.00	0.08±0.002	2.41
	0.10	1.14±0.05	4.49
	1.00	1.08±0.02	1.64
	10.00	0.99±0.10	10.58
	100.00	0.63±0.09	14.95
	500.00	0.37±0.02	5.38
	1000.00	0.17±0.02	11.53
	10000.00	0.07±0.002	2.70

注: \bar{x} 是 OD₄₅₀ 值平均值, s 是标准偏差, CV%是变异系数。

2.5 添加回收试验

表 3 TTX 的加标回收结果 (n=4)

Table 3 Recovery of TTX added to the muscle of crucian by dcELISA

添加值/(μg/L)	实测值/(μg/L)	回收率/%	CV/%
1	0.65±0.083	65	12.77
10	7.12±0.670	71.2	9.41
100	86.53±9.320	93.2	10.77
500	370.05±35.78	74.1	9.67

鲫鱼肌肉组织的加标回收结果见表3。回收率为65%~93.2%, 变异系数为9.41%~12.77%, 平均变异系数为10.66%。

3 讨论与结论

3.1 讨论

3.1.1 制备酶标抗原时,并没有采用小分子直接与HRP相连这一常规方法,而是先合成人工抗原OVA-TTX,再采用过碘酸钠法通过载体OVA将TTX与HRP相连,这种方法合成的酶标抗原应用于ELISA法中灵敏度较高^[7,8],加入1%BSA作为保护剂存放于-20℃可以得到很好的保存。

3.1.2 在用抗TTX单克隆抗体包被酶标板时,我们研究了三种方法,分别是常规包被法(4℃过夜和37℃包被)和微波包被法。从实验的检测结果中发现,微波包被法所测得的吸光值偏低,但灵敏度较高,说明微波包被法可以提高dcELISA检测方法的灵敏度。

3.2 结论

本文以单克隆抗体为基础建立直接竞争ELISA检测方法,首先优化了dcELISA试验条件:抗体最佳包被浓度为1:500(浓度为3.72 mg/L),酶标抗原最佳工作浓度为1:10(浓度为4.08 mg/L);最佳反应时间、反应温度分别为30 min、室温(20~25℃);最佳酶标抗原稀释液为PBST+1%BSA;单抗的最佳包被方法为微波最小火力3 min包板。经条件优化后所建立的dcELISA标准曲线可知,该方法对TTX的检测下限可达到1.1

μg/L,定量检测为范围3.3~137 μg/L。

此法灵敏度高,特异性好,方便快捷,可以应用于定量检测河豚毒素,有望进一步开发河豚毒素的商品化ELISA试剂盒。

参考文献

- [1] 刘志诚,于守洋.营养与食品卫生学[M].第二版.北京:人民卫生出版社,1987
- [2] 朱宝平,段发森,陈恺玲.一起食用烤鱼片引起食物中毒的调查[J].海峡预防医学杂志,2000,6(4):23
- [3] 马群飞,林升清,王明.烤鱼片干河豚毒素中毒事件的追踪调查[J].中国卫生监督杂志,2001,8(4):145-147
- [4] 王建伟.河豚毒素的定量检测方法研究进展[J].国外医学.卫生学分册,1995,22:86-89
- [5] 徐志凯.实用单克隆技术[M].西安:陕西科学技术出版社,1991,75-76
- [6] 王建伟,王德斌,罗雪云,等.抗河豚毒素单克隆抗体的制备及其特性的初步研究[J].卫生研究,1996,25(5):308-311
- [7] 刘百红,熊宁,等.直接竞争ELISA快速检测动物源性食品中磺胺嘧啶残留[J].中国兽药杂志,2008,42(2):16-19
- [8] 窦勇,胡佩红.ELISA法快速检测水产品中副溶血性弧菌[J].现代食品科技,2008,24(6):598-602

(上接第976页)

3 结论

(1) 菜的热量及食盐含量受烹饪方法影响很大,以清蒸、清炒最为科学。

(2) 菜的热量及食盐含量受原料的影响也很大,有的原料本身脂肪含量高,也有的原料脂肪含量不高但吸油性很强。

(3) 菜的热量及食盐含量受辅料的影响,以天然的调味料比较好。

(4) 菜的热量及食盐含量受到人为因素的影响,为了增加口感,人为地使用大量的油、盐烹制菜肴,如小炒黄牛肉、水烫生菜。

(5) 湘菜的食盐含量普遍高于粤菜的食盐含量。

参考文献

- [1] 关于外出就餐的调查报告.www.mrpad.com.2005
- [2] Debby K, Demory-Luce, Miriam Morales, Theresa Nicklas.

Acculturation, weight status, and eating habits among Chinese-American preschool children and their primary caregivers: a pilot study [J]. Nutrition Research, 2005, 25: 213-224

- [3] Jayne Hurley, Bonnie Liebman. Chinese Restaurant Food [J]. Nutrition Action Healthletter, 2007, 4: 13-15
- [4] 陈丽燕,刘静丽等.粤式餐饮食品——广式茶点的营养研究[J].中国食品,2008,5:85-86
- [5] 马栋,陈丽燕等.饺子的营养情况研究[J].现代食品科技,2009,1(25):111-113
- [6] 杨月欣,王光亚,潘兴昌等.中国食物成分表[M].北京:北京大学医学出版社,2002,12:106
- [7] 杨月欣,王光亚,潘兴昌等.中国食物成分表[M].北京:北京大学医学出版社,2002,12:112

致谢: 本实验得到了陈智雄、徐永亮,杨媚同学的帮助,故在此向他们表示衷心的感谢!