

黄玉柳, 黄国秋, 叶欣宇, 等. 水产品中麻痹性贝类毒素(PSP)的快速检测[J]. 江苏农业科学 2012, 40(1): 255-256.

# 水产品中麻痹性贝类毒素(PSP)的快速检测

黄玉柳, 黄国秋, 叶欣宇, 黎小正, 吴祥庆, 庞燕飞, 谢宗升, 陈 静

(广西水产研究所, 广西南宁 530021)

**摘要:** 介绍了美国 ABRAXIS 麻痹性贝类毒素试剂盒的测定原理和测定方法, 应用该试剂盒对广西钦州和防城港海域近江牡蛎样品各 20 个、北海海域文蛤样品 20 个, 进行麻痹性贝类毒素检测。应用酶联免疫试剂盒检测麻痹性贝类毒素, 全部试验过程在 2 h 内完成, 检测限 0.02 ng/g, 灵敏度为 0.015 ng/g。应用 ELISA 法检测麻痹性贝类毒素, 具有简便、快捷、灵敏、成本低廉等特点, 非常适于快速检测的实际需求, 有望作为理想的筛选分析方法之一, 在水产品质量快速检测、养殖区染毒情况调查以及上市贝类质量监控方面发挥重要作用。

**关键词:** 麻痹性贝类毒素; 酶联免疫; 食品检验; 小白鼠生物法

**中图分类号:** R446.62 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2012)01-0255-02

麻痹性贝类毒素(PSP)是指存在于贝类体内、化学结构以石房蛤毒素(Saxitoxin, STX)为代表、摄食后可产生麻痹作用的海洋生物毒性物质的总称, 主要是由甲藻类中的亚历山大藻(*Alexandrium*)以及膝沟藻属(*Gonyaulax*)、原甲藻属(*Prorocentrum*)等一些形成赤潮的种类产生的一系列氨基甲酸酯类衍生物, 是目前世界上分布最广、食物中毒发生频率最高、危害程度最大的一类毒素。目前国际上普遍采用小鼠法、生物免疫法、色谱法和质谱法等手段来检测贝类并做出预警预报<sup>[1-2]</sup>。

小白鼠生物法重现性差、灵敏度低、耗时长, 且易受多种因素干扰而影响结果的准确性, 在实际应用中受到很大限制。寻找简便、灵敏、可靠的赤潮毒素快速检测技术并用于水产品检验, 是保障食用安全、有效控制赤潮毒素造成的影响、减少损失和及时了解水产品染毒情况的迫切要求。近年来, 利用抗原抗体结合的酶联免疫法(Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, ELISA)在海洋生物毒素检测方面得到了迅速发展, 并有多重可靠的诊断试剂盒用于分析不同毒素, 特别在定性定量初筛检测方面效果很好, 已成为德国的官方方法, 并被美国官方农业化学家协会(association of official agricultural chemists, AOAC)推荐使用, 在水产品安全检测方面具有广阔的应用前景。本研究介绍了美国 ABRAXIS 麻痹性贝类毒素试剂盒的快速测定方法的应用, 并和小白鼠生物法进行比较, 为食品卫生监控和保障食品安全快速检测提供有利的数据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试剂与主要仪器

美国 ABRAXIS 贝类毒素试剂盒、甲醇、酶标比色仪(BIO-TEK)、离心机、均质器、微量进样器、电子天平。

收稿日期: 2011-02-14

作者简介: 黄玉柳(1976—), 女, 广西都安人, 硕士, 工程师, 主要从事微生物质检工作。E-mail: huangyuliu88@163.com。

通信作者: 黎小正, 硕士, 高级工程师, 主要从事水产品质检工作。Tel: (0771) 5301119。

### 1.2 样品来源

分别采集广西钦州和防城港海域近江牡蛎各 20 个、北海海域文蛤样品 20 个, 共 60 个。采样后立即放在冰排中保存, 送回笔者所在单位中心实验室检验。

### 1.3 方法

**1.3.1 测定原理** 采用直接竞争 ELISA 方法, 用特异性抗体识别石房蛤毒素。样本中的石房蛤毒素可与石房蛤毒素-酶结合物竞争, 同包被在微孔板上的兔抗-石房蛤毒素抗体结合。石房蛤毒素抗体与包被在微孔底部的二抗结合, 洗板后加入底物溶液, 显蓝色。蓝色的深度与石房蛤毒素在样本中的浓度成反比。颜色反应在规定时间内终止, 颜色用酶标仪读值。每孔的样本浓度值可以通过标准曲线来读取。

#### 1.3.2 样品前处理

##### 1.3.2.1 肌肉前处理方法 1(稀释倍数为 1:2 000)

- (1) 除去贝壳, 用双蒸水洗净贝肉后均质器均质。
- (2) 称取 10 g 均质后的样品加入 10 mL 80% 0.1 mol/L HCl, 煮沸 5 min, 边煮沸边搅拌。
- (3) 冷却后 3 500 g 离心 10 min。
- (4) 用 5 mol/L HCl 调节 pH 值, 使 pH 值小于 4。
- (5) 取 10  $\mu$ L, 用样品稀释液稀释到 1 mL, 振荡(稀释倍数 1:1 000)。
- (6) 待测。

##### 1.3.2.2 肌肉前处理方法 2(可选用)

- (1) 除去贝壳, 用双蒸水洗净贝肉后均质器均质。
- (2) 称取 1 g 均质后的样品加入 6 mL 80% 的甲醇(甲醇:蒸馏水为 80:20)。
- (3) 3 500 g 离心 10 min, 收集上清液。
- (4) 加 2 mL 80% 的甲醇(甲醇:蒸馏水为 80:20)到上步骤中的残留贝肉组织中再离心: 4  $^{\circ}$ C 下、3 500 g 离心 10 min, 收集上清液, 加入到步骤(3)收集的上清液中。
- (5) 重复步骤(4), 待收集的上清液达到 10 mL 时, 用 0.45  $\mu$ m 的滤膜过滤。
- (6) 取 10  $\mu$ L 滤液, 用样品稀释液稀释到 1 mL(100 倍稀释)。
- (7) 取 100  $\mu$ L 用试剂盒进行分析, 此时的稀释倍数是

1 000 倍。

### 1.3.3 测定程序

(1) 加样: 依次在预包被抗体的微孔板中加入浓度分别为 0、0.02、0.05、0.10、0.20、0.40 ng/mL 的 PSP 标准溶液和待测样品提取液各 50  $\mu$ L。

(2) 加入竞争酶标物: 每个孔中加入 50  $\mu$ L 石房蛤毒素酶标记物, 轻轻摇动微孔板, 混合; 在每个孔中加入 50  $\mu$ L 石房蛤毒素抗体, 轻轻摇动微孔板, 混合后覆盖上薄膜, 室温孵育 30 min。

(3) 洗涤: 孵育完成后, 把封口膜取掉, 将微孔中的溶液用力地倒入水槽中, 用洗液洗板 3 次, 每孔每次至少加入 250  $\mu$ L 洗液。拍板, 去掉残留的洗液。

(4) 显色: 每个测试孔加入 100  $\mu$ L 的显色液(底物)。封口膜把微孔板盖上, 轻轻的震荡微孔板 30 s 使里面的液体混匀, 不要使液体洒出。室温孵育 20~30 min, 此步骤避免太阳光照射。每个测试孔加入 100  $\mu$ L 终止液。

(5) 测定: 用酶标测定仪在 450 nm 处测量吸光度值。

(6) 标准曲线的绘制: 试剂盒中提供的 PSP 标准液浓度为 0、0.02、0.05、0.10、0.20、0.40 ng/mL。

结果分析可以采用商业 ELISA 分析软件(4 - parameters, Logit/Log)。手工计算可以先计算标准的吸光度值的平均值, 然后计算每个标准的  $D/D_0$  (用其他标准的吸光度值除以零标准的吸光度值乘以 100%)。以每个标准的  $D/D_0$  作 y 轴、每个标准的石房蛤毒素的浓度作 x 轴构建标准曲线。利用标准曲线把样品的  $D/D_0$  代入标准可以计算出样品中冈田酸的浓度。样品中石房蛤毒素的含量小于 0.02 ng/mL 时, 样品为

阴性。当样品中石房蛤毒素的含量大于 0.4 ng/mL, 要稀释后再测定。标准曲线见图 1。

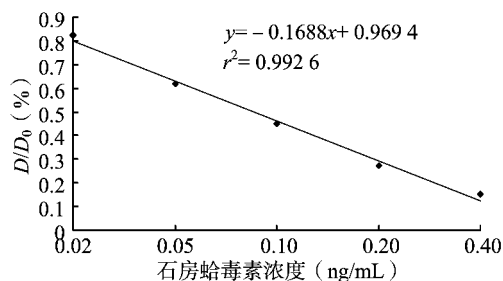


图1 标准曲线

## 2 结果

### 2.1 方法灵敏度和检测限

本方法灵敏度为 0.015 ng/g。根据样品处理稀释系数, 检测下限为 0.02 ng/g。

### 2.2 样品检测应用

钦州近江牡蛎 PSP 平均含量为 1.8 ng/g; 防城港近江牡蛎 PSP 平均含量为 3.1 ng/g; 北海文蛤 PSP 平均含量为 1.5 ng/g。

### 2.3 ELISA 法和小鼠生物法检测 PSP 的比较

从表 1 和表 2 可以看出, ELISA 法和小鼠生物法吻合程度很好, 且 ELISA 法检测限低, 用于日常检测筛查可更加及时地控制赤潮毒素的发生, 减少损失, 及时向管理部门提供食品风险预警信息, 避免由此带来的食品卫生风险, 为人们食用水产品安全提供保障。

表 1 ELISA 法和小鼠生物法结果比对

检测方法	阴性样品	可疑样品	阳性样品	备注
ELISA 法	阴性	阳性	阳性	ELISA 法检出率比小鼠生物法低, 因此, 生物法可疑样品 ELISA 法检测结果为阳性
小鼠生物法	阴性	可疑	阳性	

表 2 ELISA 法和小鼠生物法的比较

检测方法	检测时间 (h)	检测限 (ng/g)	检测需要的样品重量 (g)	检测效率
ELISA 法	<2	0.11	1	检测效率高, 可以同时做大批量样品
小鼠生物法	>24	1.75	200	检测效率低, 不能同时做大批量样品

## 3 讨论

PSP 检测最常使用的是以小白鼠为试验动物的小鼠生物测定法, 该方法已列入 AOAC 方法, 成为国际海产品贸易中贝类麻痹性贝毒的测定方法。该方法易掌握, 不需要专门的仪器设备, 但缺点是专一性差, 操作繁琐、灵敏度不高, 且在酸性环境中加热有可能导致磺酰氨基类毒素转变为相应的氨基甲酸酯类毒素, 使毒性增大<sup>[2]</sup>。这种方法的局限性是小鼠本身易造成结果的高变异性和低敏感性, 而且对鼠种的要求较高, 导致某些地区因找不到合适的鼠种, 无法开展此项检测工作。同时, 由于标准品属于剧毒品, 价格昂贵且不易购买, 无法进行定量分析。在国内, 于兵等<sup>[3]</sup>、罗辉武等<sup>[4]</sup>对 ELISA 方法作了相关的比较研究, 他们一致认为 ELISA 是快速筛选贝类毒素和藻类毒素的首选技术。随着免疫学分析技术的发

展, 应用酶联免疫技术(ELISA)作为快速筛选的首选方法逐渐成为潮流。

### 参考文献:

- [1] 曹际娟, 卫 锋, 马惠蕊, 等. 贝类毒素检测技术及研究进展[J]. 检验检疫科学 2004, 14(1): 53-56.
- [2] 葛 虹. 贝类毒素的检测[J]. 渔业致富指南, 2008(12): 36-37.
- [3] 于 兵, 曹际娟, 尤永莉, 等. ELISA 与小白鼠生物法检测贝类中毒麻痹性贝毒的比较[J]. 检验检疫科学 2005, 15(1): 32-35.
- [4] 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.