

间接竞争抑制性酶联免疫吸附试验 测定豚毒鱼类中河豚毒素的研究*

王健伟* 罗雪云 计 融 张 镒 张 靖

(卫生部食品卫生监督检验所, 北京 100021)

摘要 将河豚鱼样品的组织匀浆用 0.1% 乙酸溶液煮沸 2 次, 合并滤液用乙醚脱脂 2 次, 将水相用 0.05mol/L PBS 稀释后(调 pH6.5 ~7.0) 供 ELISA 检测之用。结果表明, 本法的最低检出浓度为 1.0×10^{-3} mg/L (0.1ng/检测孔), 线性范围为 0.01 ~1.0mg/L, 方法的加标回收率为 73.8% ~117.4%。用传统的小鼠生物试验比较了方法的准确性。测定结果表明, 两种方法之间在统计学上无显著性差异(配对 t 检验, $P > 0.2$), 并具有良好的相关性($r = 0.916$)。

关键词 河豚毒素 豚毒鱼类 单克隆抗体 间接竞争抑制性酶联免疫吸附试验 小鼠生物试验

A Monoclonal Antibody-Based Indirect Competitive Inhibition Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Detecting Tetrodotoxin in Puffer Fish

Wang Jianwei; Luo Xueyun; Ji Rong; Zhang Di; et al.

(Institute of Food Safety Control and Inspection, Ministry of Health,
Beijing 100021, China)

The homogenized tissue samples of puffer fish were extracted with boiling 0.1% acetic acid solution for 2 times, then the combined filtrate was defatted with ether ethyl for 2 times and the water phase were diluted with 0.05 mol/L PBS for ELISA determination (adjusted pH to 6.5 ~ 7.0). The results showed that the minimum detectable concentration of tetrodotoxin was 1.0×10^{-3} mg/L (0.1ng/assay), and the standard curve was linear between 1.0×10^{-2} and 1.0mg/L. The recovery rates from tetrodotoxin spiked samples of this method were 73.8% ~ 117.4%. The accuracy of ELISA was compared with the traditional mouse bioassay system. The results showed no significant differences between the two meth-

* 中国预防医学科学院科研基金资助项目

ods (for paired- t test, $P > 0.2$), and significant correlations in tetrodotoxin concentration were obtained ($r = 0.916$).

Key Words: tetrodotoxin; puffer fish; monoclonal antibody; indirect competitive inhibition enzyme-linked immunosorbent assay; mouse bioassay

以单克隆抗体(monoclonal antibody, McAb)为基础的免疫化学检测方法是 90 年代国际上新报道的定量检测 TTX 的方法,但这方面的研究国内尚属空白。本文利用抗 TTX 的特异性 McAb 建立了适用于现场工作的酶联免疫吸附测定方法(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA),从而为我国加强河豚的管理、预防河豚中毒提供了技术保证。

1 材料与方法

1.1 试剂 河豚毒素购自大连海洋渔业公司,牛血清白蛋白(Bovine serum albumin, BSA)、3,3',5,5'-四甲基联苯氨(TMB)购自美国 Sigma 公司,辣根过氧化物酶标记羊抗鼠 IgG 购自军事医学科学院五所。其它试剂均为分析纯。抗 TTX 单克隆抗体按前文报道的方法制备^[1]。

1.2 溶液系统 ELISA 用液:包被液为 0.05 mol/L 碳酸盐缓冲液(pH9.6),洗液(PBS-T)为含 0.05% Tween 20 的 0.05 mol/L PBS;底物缓冲液为柠檬酸-磷酸缓冲液。

TTX 标准溶液:将 TTX 溶于 pH4~5 的乙酸缓冲液中,配成 1000.0 mg/L,作为储备液。ELISA 工作用液用乙酸缓冲液稀释至 20.0 mg/L,4℃ 保存。ELISA 标准曲线使用的 0.01~5.0 mg/L 标准液是以上述溶液用 0.05 mol/L PBS 新鲜配制。

1.3 实验动物 BalB/c 小鼠、ICR 品系小鼠均购自中国医学科学院实验动物研究所动物繁育场。

1.4 牛血清蛋白-甲醛-河豚毒素连接物

(BSA-HCHO-TTX)的制备 按文献报道的方法进行^[1]。

1.5 样品采集与制备 于河豚繁殖期后(1995 年 6 月),在江苏省启东(东海)、江阴(长江)两地搜集各个不同品种的完整、新鲜河豚和河豚组织。为防止毒素扩散,样品自采集后立即在 -20℃ 下无水速冻保存,在冷冻状态下空运至北京。

在检测前,将样品解冻、蒸馏水清洗后,用滤纸吸干,然后将鱼体分解成肌肉、肝脏、肠道、皮肤、卵巢(雄性为精囊)等诸部分,用蒸馏水洗去血污,再用滤纸吸干,称重后用于检测或分开包装, -40℃ 冻存备用。

1.6 样品提取 采用稍加修改的乙酸提取法^[2]:将河豚组织用研钵或匀浆器磨成糊状,称取 5.0 g 加 5 倍体积 0.1% 乙酸(25 ml),放入 100℃ 水浴中不断搅拌煮沸 10 min。待冷却至室温后,快速过滤于 125 ml 分液漏斗中,滤纸残渣用 20 ml 0.1% 乙酸反复洗净后,水浴加热 3 min。合并滤液,加入等体积乙醚振摇脱脂,静置待分层后,放出水层至另一分液漏斗中,再重复脱脂一次。然后将水层放入 50 ml 容量瓶中,用 1 mol/L NaOH 调 pH 至 6.5~7.0,再用 PBS 定容至 50 ml,立即用于检测。此提取液 1 ml 相当于 0.1 g 样品。

1.7 河豚样品的间接竞争抑制性酶联免疫吸附试验测定方法 各试验条件的最佳组合用棋盘滴定法确定。(1)用 TTX-HCHO-BSA (10~20 mg/L)包被酶标微孔板,每孔 100 μ l, 4℃ 过夜;(2)酶标板用 PBS-T 洗 3 \times 3 min 后,加入不同浓度的 TTX 标准溶液(制作标准曲线)或样品提取液(检测样

品)与 McAb 的混合液 100μl(该液系毒素标准液或样品提取液与 McAb 按 1 : 1 比例混合,在试验前配好,4 ℃ 过夜或 37 ℃ 2h 备用),置 37 ℃ , 2h;(3) 酶标板用 PBS-T 洗 3 × 3min 后,加入辣根过氧化物酶标记羊抗鼠 IgG,每孔 100μl,37 ℃ , 1h;(4) 酶标板洗 5 × 3min 后,加入底物溶液(TMB),每孔 100μl,37 ℃ , 30min;(5) 每孔加入 50μl1mol/LH₂SO₄ 终止反应,于 450nm 波长处测定 OD 值。(6) 计算:

$TTX \text{ 含量}(\text{ng/g}) = CVX / SW$
式中: C 为酶标板上测得的 TTX 浓度(ng),根据标准曲线求得; V 为样品提取液的体积(ml); X 为样品提取液的稀释倍数; S 为酶标板上每孔加入的样液体积(ml); W 为样品重量(g)。

当样品重为 5g,提取液体积为 50ml 时,上式可写为:

$TTX \text{ 含量}(\text{ng/g}) = 200CX$

1.8 小鼠生物试验 以体重 20g 左右的雄性健康 ICR 品系小鼠为受试动物,综合文献报道的方法进行^[2,3]。

1.8.1 预备试验: 按上述方法得到的提取液用水 10、100、1000、10000 倍稀释,将每一稀释倍数的溶液 1ml 腹腔注射 2 只 ICR 小鼠,观察小鼠是否死亡并记录死亡时间。

1.8.2 正式试验: 对预备试验中使小鼠 5 ~ 10min 死亡的稀释倍数,再按 1 : 1.2 的比例稀释 3 个阶段。自每个稀释阶段各取 1ml 腹腔注射 2 只小鼠,如在 10min 左右死亡,被检液再注射 5 ~ 7 只小鼠。

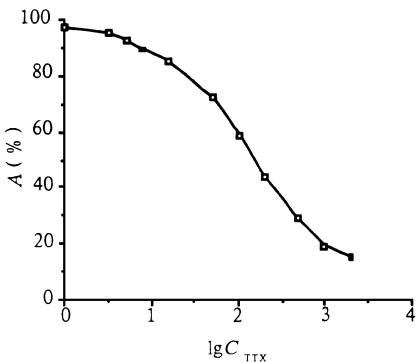
1.8.3 计算: 先计算正式试验中小鼠的中位死亡时间,再根据中位死亡时间在“小鼠中位死亡时间-小鼠单位换算表”中查出稀释溶液的小鼠单位(mouse unit, MU)数。根据小鼠体重在“体重校正表”中查出体重校正系数,最后按下式计算:

式中: A 为根据中位死亡时间在“小鼠中位死亡时间小鼠单位换算表”中查出稀释溶液的小鼠单位数; F 为体重校正系数; X 为样品提取液稀释倍数; W 为每 ml 提取液相当于河豚组织的 g 数。

对 ICR 小鼠而言,1MU = 0.178μg,故 TTX 含量(μg/g) = TTX 含量(MU/g) × 0.178

2 结果

2.1 标准曲线 TTX 毒素工作溶液用 PBS 配成不同浓度,将 6D9 抗体稀释至 1 : 300000,用间接竞争抑制 ELISA 法测得的标准曲线如附图所示,表明该法对 TTX 的最低检出限为 1.0μg/L (0.1ng/检测孔),线性范围为 0.01 ~ 1.0mg/L。



附图 间接 ELISA TTX 标准抑制曲线

2.2 加标回收 在正常河豚肌肉样品中加入一定量的 TTX 标准溶液,经提取后本法回收率为 73.8% ~ 117.4%,平均回收率为 96.4%,见表 1。

表 1 河豚肌肉样品的加标回收结果

TTX 加入量(ng/g)	理论检出浓度(μg/L)	实际检出浓度(ng/L)	回收率(%)	CV(%)
50	2.5	2.94 ± 1.54	117.4	52.5
100	5.0	5.69 ± 1.05	113.9	18.6
500	25	20.2 ± 3.79	80.8	18.8
1000	50	36.9 ± 2.49	73.8	6.8

2.3 ELISA 检测方法与小鼠生物试验的比较 用本法和小鼠生物试验对肌肉、肝脏、肠道、皮肤、卵巢等 13 份不同样品的同一提取液分别进行检测, 结果表明两种方法检测结果符合良好, 配对 t 检验, $P > 0.2$ 。回归方程为 $\hat{Y} = 4.8831 + 0.3441X$, 相关系数 (r) 为 0.916。

3 讨论

本文在获得抗 TTX 的单克隆抗体的基础上, 建立了检测 TTX 的间接 ELISA 方法, 其最低检出浓度为 $1.0 \times 10^{-3} \text{ mg/L}$, 明显优于传统方法, 接近或优于国外同类方法^[4,5]。与传统方法相比, 本法的样品提取方法也比较简单, 河豚样品经用乙酸提取、脱脂、定容后, 毋需传统检测方法中复杂的柱层析净化过程, 可直接进行检测, 节省了大量时间和试验材料, 并且不需要特殊设备, 可以满足现场工作的需要。本法采样量极小 (10g 以下), 不会破坏鱼体的完整性, 不影响受检河豚的商业价值。

TTX 对人体的致死剂量只有 $0.5 \sim 1.0 \text{ mg}^{[1]}$ 。在筛选可食河豚时要求检测方法必须具有极高的灵敏度, 假定一人每次摄入河豚 1000g, 考虑 10 倍的保险系数, 当摄入 TTX 总量为 0.5mg 时, 河豚组织 TTX 含量为 50 ng/g , 以本法而论, 当样品提取液未浓缩时, 相当于 $2.5 \times 10^{-3} \text{ mg/L}$; 当样品提取液浓缩 10 倍后, 则相当于 $2.5 \times 10^{-2} \text{ mg/L}$, 均高于方法的最低检出限, 因此本方法完全可以满足实际工作的需要。

由于找不到足够的无毒样品, 我们只测定了河豚肌肉样品的回收率, 对于其它组织样品本法的回收率如何, 尚需进一步研究。

小鼠生物试验法是日本法定的河豚毒力测定方法。本研究以该法为标准, 对 ELISA 检测方法进行了验证, 结果表明本法与小鼠生物试验方法符合良好 ($P >$

0.2)。但是观察具体检测结果仍然可以看出, ELISA 法测定的数值一般高于小鼠法, 这与文献报道的结果一致。其原因可从以下三个方面考虑: (1) 样品提取液中存在着某些使检测结果偏高的干扰物质; (2) 河豚样品中可能存在一定量的 TTX 衍生物或类似物, 这些物质可能与抗体发生反应, 而其毒力却低于 TTX^[6]; (3) 小鼠生物试验本身的误差。目前小鼠生物试验一般采用 ddy 小鼠, 由于在我国无法获得 ddy 小鼠, 故采用了台湾学者报道的 ICR 小鼠, 该小鼠品系死亡时间-TTX 剂量关系的准确性和稳定性有待进一步验证。上文提到的这种可能存在的误差, 对于一种快速筛选方法来讲是可以接受的。考虑到 TTX 的剧毒性, 在筛选可食河豚时, 这种对 TTX 含量过高估计的倾向或许会成为一种保护因素。

(本文的工作曾得到白竞玉、杨祖英教授的帮助, 在此谨致谢忱!)

4 参考文献

- 1 王健伟, 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. 卫生研究, 1996, 25(5): 308
- 2 厚生省环境卫生局. 食品卫生检查指针 (日本). 日本: 日本食品卫生协会, 1978
- 3 Hwang DF, Jeng SS. Bioassay of tetrodotoxin using ICR mouse strain. J Chin Biochem Soc, 1991, 20: 80
- 4 王健伟(综述). 河豚毒素的定量检测方法研究进展. 国外医学卫生学分册, 1995, 22: 86
- 5 Watabe S, Sato Y, Nakayama M, et al. Monoclonal antibody raised against tetrodonic acid, a derivative of tetrodotoxin. Toxicon, 1989, 27: 265
- 6 Kao CY. Tetrodotoxin, saxitoxin and their significance in the study of excitatin phenomena. Pharmacol Rev, 1966, 18: 997

(1996-05-30 收稿)