

酶联免疫法在贝类麻痹性贝毒检测中的应用

张 纹, 王 军, 苏永全

(厦门大学 海洋学系, 福建 厦门 361005)

摘要: 采用酶联免疫法检测菲律宾蛤仔(*Ruditapes philippin*)肌肉中麻痹性贝毒(Paralytic shellfish poison, PSP)含量, 通过优化实验条件, 规范操作程序, 确立了检测流程。试验表明以标准 PSP 为参照, 该检测方法平均灵敏度可达 $2 \mu\text{g}/\text{kg}$, 标准溶液测定的变异系数 $2.00\% \sim 7.66\%$, 样品精密度测试的变异系数为 $2.82\% \sim 8.40\%$, 平均添加回收率达 85.35% , 表现出快速、灵敏、可靠等特点, 适于常规工作中麻痹性贝毒的快速筛选检测。

关键词: 麻痹性贝毒; 酶联免疫法; 快速检测; 菲律宾蛤仔(*Ruditapes philippin*)

中图分类号: TS254.7

文献标识码: A

文章编号: 1000-3096(2005)06-0035-03

麻痹性贝毒是世界范围内分布最广、危害也最严重的一类毒素^[1], 作为其主要成分的石房蛤毒素(Saxitoxin, STX)对酸、热稳定, 一般的食品加工方法很难破坏染毒体的毒性, 致死量为 $1 \sim 3 \text{ mg}$ ^[2], 许多国家都将其列为贝类产品的常规检测项目之一, 并且随着海洋环境日益恶化, 赤潮发生日趋频繁, 它也成为监控海区养殖环境的一项重要指标。近年来我国贝类中毒的事件频繁发生, 贝毒已成为开发海洋生物资源的重大障碍。

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。中国至今仍未制订相关的国家标准, 主要沿用进出口商品检验行业标准, 通过小鼠腹腔注射的致死时间来测算毒性, 但其 $370 \mu\text{g}/\text{kg}$ 的检测限已满足不了欧盟提出的 $40 \sim 80 \mu\text{g}/\text{kg}$ 的要求, 而且重现性差, 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, 并有多种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^[3,4], 在水产品安全检测方面具有广阔的应用前景, 但国内关于该方法在贝毒检测中的应用研究尚未见报道。作者运用 ELISA 方

法开展菲律宾蛤仔肉中 PSP 含量检测, 通过优化和完善检测方法, 简化分析程序, 降低检测成本, 确立起自样品处理至数据处理的操作全流程, 为贝毒的快速检测开拓思路、积累经验, 为无公害水产品的检测以及标准化工作提供参考。

1 材料与方 法

1.1 仪器和试剂

BIO-TEK(ELX808IU)型酶标仪、LABOFUGE 400R 高速冷冻离心机(德国)、均质器和磁力搅拌器; 0.1 mol/L HCl 、RIDASCREEN PSP 试剂盒(德国 r-biopharm 公司), 其中包括 PSP 标准溶液、PSP 酶标记物、基质、发色剂、反应停止液、缓冲液及包被有特异抗体的微孔板条。

1.2 测定方法

1.2.1 样品来源与预处理

菲律宾蛤仔(*Ruditapes philippin*)样品于 2003 年 11 月 20 日购自厦门东渡水产品批发市场。

除去贝壳, 用双蒸水洗净肌肉后均质器均质。称取 10 g 均质后样品加入 $10 \text{ mL HCl}(0.1 \text{ mol/L})$, 煮沸并搅拌 5 min ; 室温 3 500 r/min 离心 10 min ; 取 $10 \mu\text{L}$ 上液用 1 mL 样品缓冲液稀释; 取 $50 \mu\text{L}$ 进行分析。

收稿日期: 2004-10-10; 修回日期: 2005-02-01

基金项目: 厦门市海洋与渔业局资助项目

作者简介: 张 纹(1976-), 女, 福建厦门人, 博士研究生, 研究实习员, 从事海洋生物分子生化研究, E-mail: wen518@sina.com; 苏永全, 通讯作者, E-mail: yqsu@jingxi-an.xmu.edu.cn

1.2.2 测定步骤

20~24℃条件下,在微孔中加入 50 μL 标准品或处理好的样品,各做 3 个平行;加入 50 μL 稀释的酶标记物(缓冲液:浓缩液=10:1),充分混合;用薄膜覆盖,室温下孵育 1 h;倒出孔中液体,将微孔架倒置在吸水纸上拍打以保证完全除去孔中液体;用 250 μL 蒸馏水充入孔中,再次倒出孔中液体,并拍打完全除去液体,重复洗板操作 2 次;加入 50 μL 基质和 50 μL 发色剂到每一孔中,充分混合并在室温下避光孵育 30 min;迅速加入 100 μL 停止液,混匀,酶标仪检测吸光度(450 nm),以空气为空白,参比波长 630 nm。

1.2.3 计算

(1) 按照以上步骤,以 0、10、30、90、270、810 ng/L 的 PSP 标准溶液建立标准曲线。标品和样品的吸光度值(以百分比表示)按以下公式计算:

$$\text{吸光度值}(\%) = \frac{\text{标品的吸光度值(或样品)} \times 100}{\text{标准的吸光度值}}$$

(2) 绘制对应 PSP 浓度的半对数曲线图,相对应的样品浓度从校正曲线上读出,或通过酶标仪设置公式和曲线,直接读出浓度。

将所测浓度乘以稀释倍数得到样品浓度,本法的稀释倍数为 200。

(3) 精密度测定

对标准溶液和待测样品重复测定 3 次,计算平均值和标准偏差。

(4) 回收率测定

分别取 20 μg/L 标准液 2.4 mL 和 40 μg/L 标准液 3.7 mL 加到 10 g 空白肉样中,按上述方法测定 PSP 含量,并计算回收率。

2 结果

2.1 PSP 标准曲线和检测灵敏度

以系列 PSP 标准液制作的标准曲线如图 1,精密

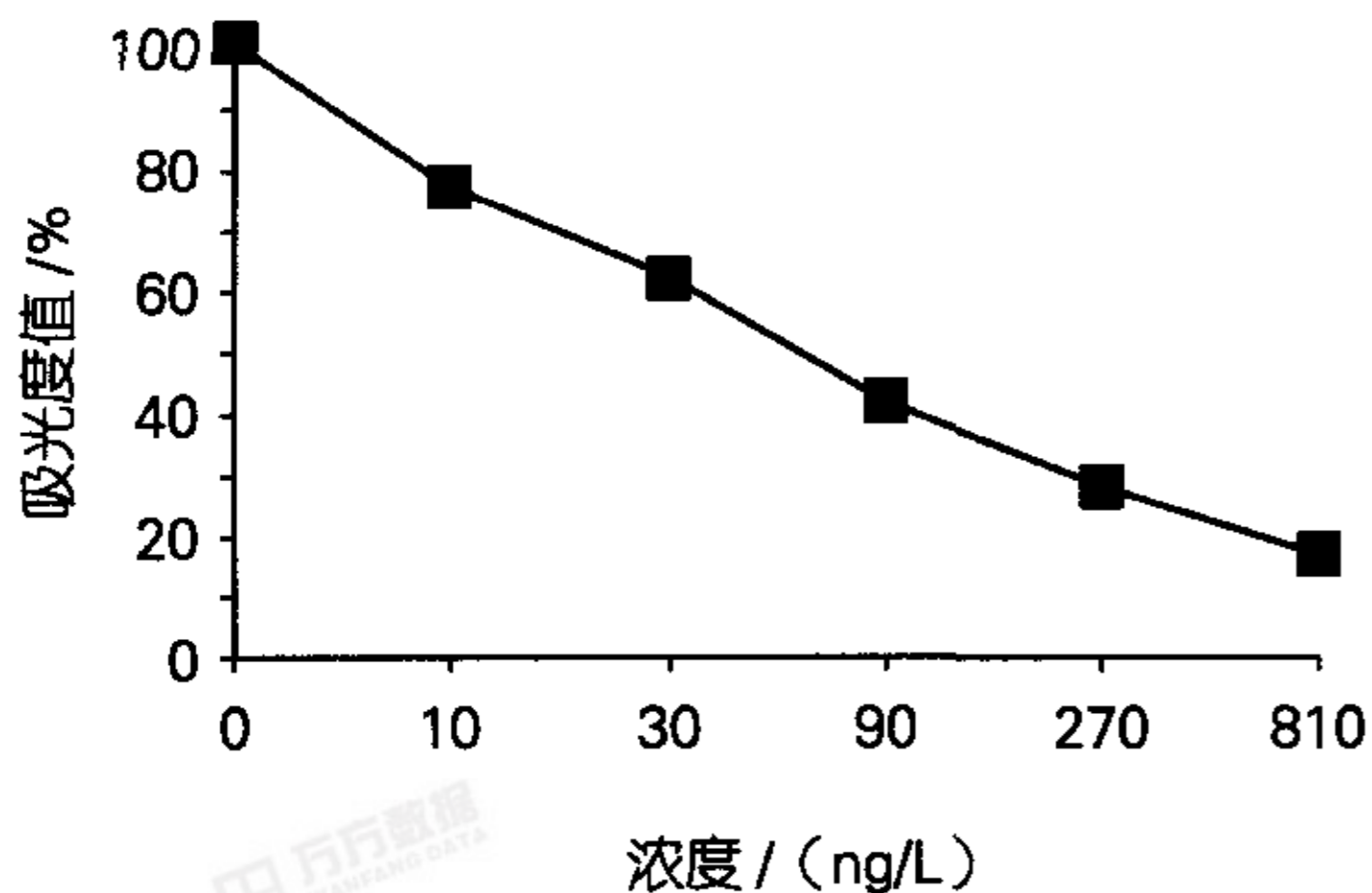


图 1 PSP 标准曲线

Fig. 1 Standard curve of PSP Fig.

度测定结果如图 2,变异系数为 2.00%~7.66%,平均灵敏度 2 μg/kg。

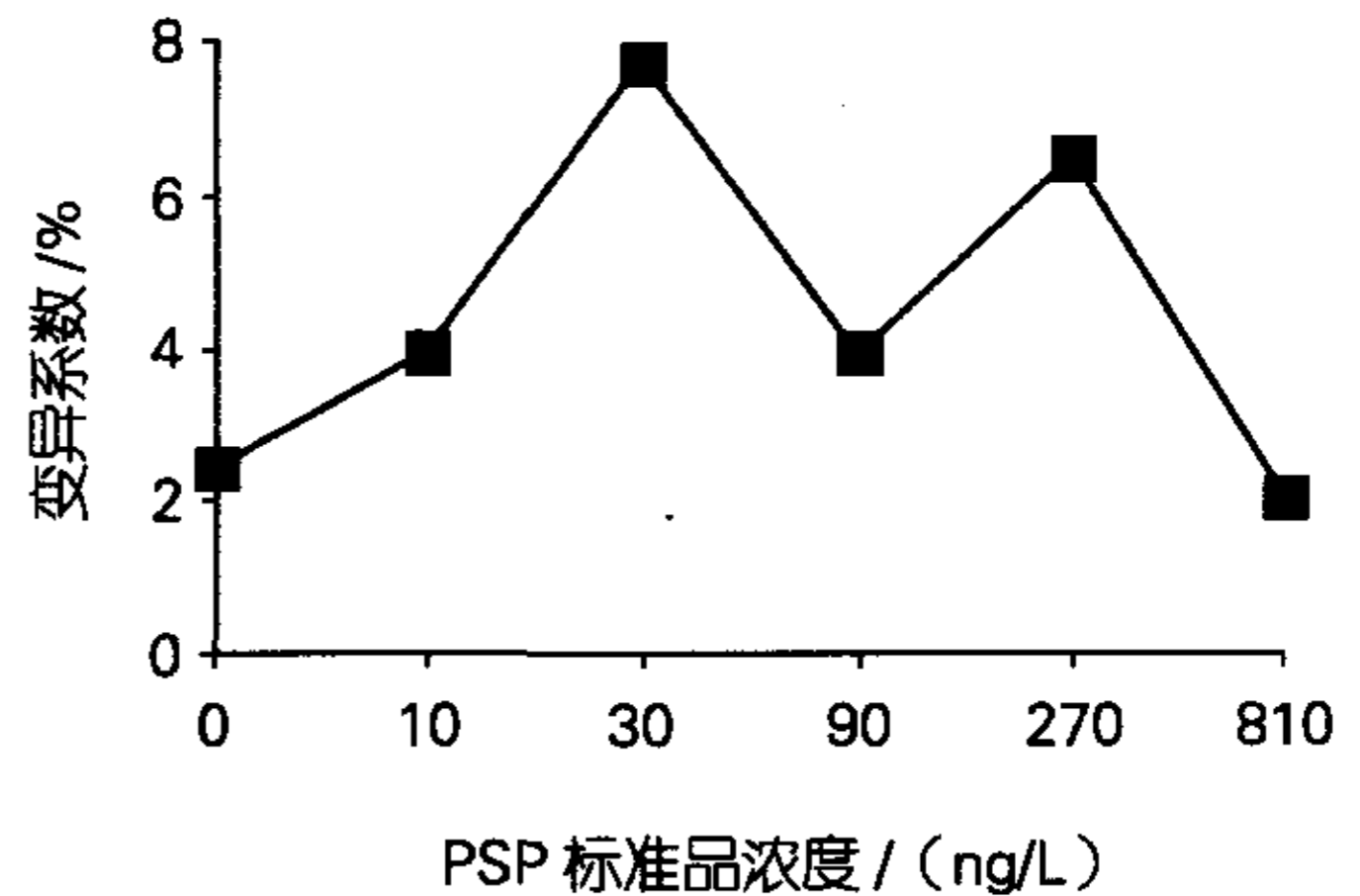


图 2 标准溶液精密度

Fig. 2 Precision of standards

2.2 测样精密度

由上述方法测定的样品检测结果如表 1,变异系数为 2.82%~8.40%。

表 1 样品精密度测定结果

Tab. 1 Precision of PSP assaying

测试样品	实测浓度 (μg/kg)	平均值 (μg/kg)	标准差	变异系数 (%)
1	3.907	3.826	0.117	3.06
	3.878			
	3.692			
2	13.897	14.957	1.256	8.40
	16.344			
	14.629			
3	100.005	103.371	2.915	2.82
	105.189			
	104.919			

2.3 回收率

利用外标法测定回收率结果如表 2,本方法平均回收率为 85.35%。

表 2 回收率测定结果

Tab. 2 Recovery rate of PSP assaying

添加浓度 (μg/kg)	样品实测浓度 (μg/kg)	回收率 (%)	平均回收率 (%)
4.8	3.9	81.25	85.35
	3.8	79.17	
14.8	4.2	87.50	
	12.5	84.46	
12.9	13.7	92.57	
	12.9	87.16	

3 讨论

作者采用 ELISA 试剂盒, 通过摸索实验条件, 优化实验程序, 规范操作规程, 建立起贝类中麻痹性毒素的快速检测方法和操作流程。试验结果表明, 其平均灵敏度可达 $2 \mu\text{g}/\text{kg}$, 标准溶液测定的变异系数 $2.00\% \sim 7.66\%$, 样品精密度测试的变异系数为 $2.82\% \sim 8.40\%$, 平均添加回收率达 85.35% , 具有可靠的重复性和较高的回收率; 操作方面, 方法简单、易掌握, 特别是样品前处理, 耗时短又简便; 检测时间上, 只需 $5 \sim 6 \text{ h}$ 就可得出检测结果; 设备方面, 投资少, 且无放射性污染, 好操作。试验中发现, 由于本方法非常灵敏, 实验精密度要求较高, 因此对于实验中的一些关键步骤和因素必须加以严格控制, 比如加酸煮沸时要控制好温度并注意搅拌, 以防液体溅出; 洗板时要彻底均一; 加样品和标准溶液、酶标记物、基质和发色剂时要求动作快而准, 保证试样间的一致性。因此必须严格规范实验操作, 尽量增加同批测定样品的数量, 减少由于偶然误差造成的影响。

相比于传统的生物测定法, ELISA 检测灵敏度高且快速简便, 结果不受小鼠品系和体内生化物质的影响, 更客观准确, 在操作性和重现性方面也更加方便和可靠, 同时避免了由于操作人员熟练程度及小鼠死亡时间判断上的主观差异。另外, 由于小白鼠生物测定法在测定高毒性贝类样品时变异性较高, 并且测出的是贝类含毒素的总量, 无法区别出具体的毒素种类, 专一性差^[5], 不利于调查追踪污染源以及对染毒贝类进行早期监控和预警预报, 在基层单位和日常性的监

控普查中, ELISA 检测具有更大优势和推广应用前景。

ELISA 检测相比于高效液相色谱法或质谱法, 虽然后者可以提供关于毒素的更多信息, 专一性也更强, 但实验需建立在配备昂贵高档仪器和专业培训的技术人员基础上, 并且 SIX 标准品已被收入《化学武器公约》中禁止化学品的第二类清单, 难以购买或获得, 大大限制了其在一般检验机构或实验室中的应用。而 ELISA 检测仪器简单, 操作方便, 且无需另购标准品, 大大降低了成本, 同时检测限和灵敏度已足以满足要求, 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。

参考文献:

- [1] 于仁诚, 周名江. 麻痹性贝毒研究进展[J]. 海洋与湖沼, 1998, 29(3): 330-338.
- [2] 许敏, 赵以军, 程凯. 水华和赤潮的毒素及其检测与分析[J]. 湖泊科学, 2001, 13(4): 376-384.
- [3] Garthwaite I, Ross K M, Miles C O, *et al.* Integrated enzyme-linked immunosorbent assay screening system for amnesic, neurotoxic, diarrhetic, and paralytic shellfish poisoning toxins found in New Zealand[J]. *Journal of AOAC International*, 2001, 84(5): 1 643-1 648.
- [4] Usleber E, Dietrich R, Burk C, *et al.* Immunoassay methods for paralytic shellfish poisoning toxins[J]. *Journal of AOAC International*, 2001, 84(5): 1 649-1 656.
- [5] 郝林华. 麻痹性贝类毒素的研究概况[J]. 海洋水产研究, 1998, 19(1): 97-103.

Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) quantitative analysis for paralytic shellfish poison (PSP) in shellfish

ZHANG Wen, WANG Jun, SU Yong-quan

(Department of Oceanography, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

Received: Mar., 18, 2004

Key words: paralytic shellfish poison; ELISA; screening method; *Ruditapes philippin*

Abstract: Quantitative analysis of Paralytic Shellfish Poison (PSP) in *Ruditapes philippin* was carried with Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA). It showed that: the mean detection limit was $2 \mu\text{g}/\text{kg}$, mean recovery rate was 85.35% , and coefficients of variation of $2.82\% \sim 8.40\%$ indicated that the screening method is rapid, reliable, and sensitive.

(本文编辑:张培新)