

河豚鱼类中河豚毒素直接竞争抑制性酶联免疫吸附试验测定方法的研究

计 融 王健伟 罗雪云 江 涛 张 靖

(卫生部食品卫生监督检验所,北京 100021)

摘 要:为检测河豚鱼类中的河豚毒素,建立了用抗河豚毒素单克隆抗体检测河豚样品中河豚毒素的直接竞争抑制性酶联免疫吸附试验(ELISA)方法。结果表明,直接 ELISA 法较间接 ELISA 法灵敏,最低检出浓度为 0.1 ng/mL(每检测孔 0.01 ng),线性范围为 5~500 ng/mL,方法的加标回收率为 73.0%~118.0%。本法与传统的小鼠生物试验相比,两种方法的测定结果之间在统计学上差异无显著性(配对 t 检验, $P>0.1$),并具有良好的相关性($r=0.944$)。对来自江苏省东海和长江水域的河豚样品的毒力进行了测定,结果表明本方法简单、快速、灵敏,完全可以满足实际工作的需要。

关键词:河豚毒素;蝶蛎科;抗体,单克隆;酶联免疫吸附测定;小鼠;毒力

中图分类号:R15;Q959.5⁺2 **文献标识码:**A **文章编号:**1004-8456(2002)05-0007-04

河豚鱼类是指鲉形目中内脏及其它部位含有河豚毒素(tetrodotoxin, TTX)的鱼类(民间俗称“河豚”),已知我国有 40 余种,产量较大。^[1]河豚味道鲜美,营养丰富,在日本、中国等国家,人们自古便有嗜食的习惯。TTX 毒性极强(对人的致死剂量为 0.5~1.0 mg),^[2]中毒后缺乏有效的治疗手段,因食用或误食河豚而引起的 TTX 中毒历来是我国沿海地区食物中毒的主要死因。^[3]

鉴于河豚中毒给人类健康带来的严重危害,我国《水产品卫生管理办法》规定严禁河豚鲜售。但由于人们对河豚的喜爱和河豚在国际市场上的昂贵价格,我国沿海地区鲜河豚的非法制售活动禁而难止,其带来的危害日益严重。随着改革开放的深入,各企业和主管部门、各级卫生监督部门要求合理利用我国丰富的河豚资源,扩大出口创汇和满足人们消费需要的呼声越来越高。目前有关部门已同意进行河豚鲜食的可行性研究。这一工作迫切需要一种可靠、快速、灵敏、简便的 TTX 检测技术。根据文献报道 TTX 的检测方法有小鼠生物试验法、薄层色谱法、高效液相色谱法等多种方法。^[4]这些方法大多灵敏度较低,仪器分析价格昂贵,所需的样品前处理也非常复杂,小鼠生物测定则需要专门的动物,难以适应实际工作的需要。以单克隆抗体(monoclonal antibody, McAb)为基础的免疫化学检测方法,具有快速、简便、灵敏、经济的特点,将 McAb 应用于 TTX 检测,20 世纪 90 年代国外有个别成功的报道。^[5]我们在建立了单克隆抗体间接竞争抑制性酶联免疫吸附试验(ELISA)方法^[6]之后,又建立了直接竞争抑制性 ELISA 法,使 ELISA 检测更为快捷、灵敏,从而更能

满足河豚毒性快速筛检的需要。

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)、邻苯二酚(OPD)购自 Sigma 公司,辣根过氧化物酶(HRP)购自华美生物工程公司。其它化学试剂均为分析纯或保证试剂。

1.2 溶液系统

1.2.1 ELISA 用液 包被液为 pH 9.6 碳酸盐缓冲液,洗涤液为 PBS-T,即含 0.05% Tween 20 的 0.05 mol/L PBS(体积分数),底物缓冲液为 0.1 mol/L 柠檬酸加 0.2 mol/L 磷酸氢二钠, pH 5.0。

1.2.2 TTX 标准溶液 将 TTX 溶于 pH 4~5 的乙酸缓冲液,配成 1.0 mg/mL,作为储备液,4℃保存。ELISA 校正曲线使用的 1.0~5 000.0 ng/mL 标准液由上述溶液用 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 包被抗原牛血清蛋白-甲醛-河豚毒素连接物(BSA-HCHO-TTX)的制备 按文献[7]方法制备。

1.5 抗 TTX 特异性单克隆抗体的制备及纯化 按文献[7]报道的方法,用 BALB/c 小鼠生产含 McAb 的腹水,用饱和硫酸铵-辛酸法对腹水进行纯化。^[8]

1.6 单克隆抗体辣根过氧化物酶标记物(McAb-HRP)的制备 采用改良过碘酸钠氧化标记法。^[8]

1.7 样品采集与制备 于河豚繁殖期后(6 月后),在江苏省启东(东海)、江阴(长江)两地搜集不同品

种的完整、新鲜河蟹和河蟹组织。根据皮肤斑纹特点、皮肤与鳍的颜色、有无棘刺及形态等进行品种鉴定。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。样品的处理方法同文献[6]。

1.8 试样提取 采用乙酸提取法,具体方法参见文献[6]。

1.9 河蟹试样的直接竞争抑制性 ELISA 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 μg/mL)包被酶标微孔板,每孔 100 μL,4℃ 过夜;(2)酶标板用 PBS-T 洗 3×3 min 后,加入不同浓度的 TTX 标准溶液(制作校正曲线)或样品提取液(检测样品)与 McAb-HRP 的混合液 100 μL(毒素标准液或样品提取液与 McAb-HRP 按 1:1 比例混合,在试验前配好,4℃ 过夜或 37℃ 2 h 备用),置 37℃,1 h;(3)酶标板洗 5×3 min 后,加入 OPD 溶液,每孔 100 μL,37℃,30 min;(4)加入终止液每孔 50 μL,于 490 nm 处测定 A 值。(5)计算:

TTX 含量 (ng/g) = CDX / SW

式中: C 为酶标板上测得的 TTX 浓度 (ng),根据校正曲线求得; D 为试样提取液的体积 (mL); X 为试样提取液的稀释倍数; S 为酶标板上每孔加入的样液体积 (mL); W 为试样重量 (g)。

1.10 小鼠生物试验 以体重 20 g 左右的雄性健康 ICR 品系小鼠为受试动物,具体方法参见文献[6]。对 ICR 小鼠而言,1 小鼠单位 = 0.178 μg TTX。

2 结果

2.1 McAb-HRP 的制备 将辛酸-饱和硫酸铵纯化过的抗体 6D9 与 HRP 进行连接反应,成功地制备了 6D9-HRP,其稀释度为 1:1×10⁵。

2.2 校正曲线 TTX 毒素储备液用 PBS 配成不同浓度,将 6D9-HRP 稀释至 1:20 000,用直接竞争抑制 ELISA 法测得的校正曲线如下图 1 所示。从图中可以看出该法对 TTX 的最低检出浓度为 0.1 ng/mL(每

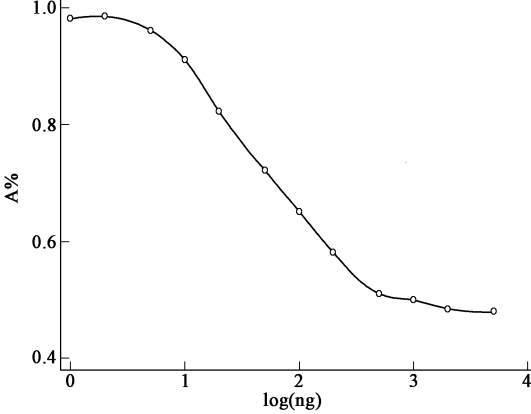


图 1 校正曲线

检测孔 0.01 ng),线性范围为 5~500 ng/mL。校正曲线的变异情况见表 1。

表 1 ELISA 直接法检测校正曲线批间和批内变异 ng/mL

	TTX 浓度	$\bar{x} \pm s$	RSD %
批内	0.50	0.58 ±0.11	18.9
	1.00	1.06 ±0.28	26.4
	5.00	4.72 ±0.52	11.0
	10.00	9.46 ±0.89	9.4
	50.00	53.70 ±2.14	4.0
	100.00	103.21 ±5.48	5.3
批间	500.00	503.41 ±47.83	9.5
	0.50	0.54 ±0.12	22.2
	1.00	0.96 ±0.23	23.9
	5.00	4.13 ±0.39	9.4
	10.00	11.38 ±1.56	11.7
	50.00	55.10 ±7.12	12.9
	100.00	96.70 ±10.87	11.2
	500.00	505.86 ±49.37	9.8

2.3 加标回收 在正常河蟹肌肉样品中加入一定量的 TTX 标准溶液,经提取后分别用间接法和直接法 ELISA 进行检测,所得回收结果见表 2。本法的回收率为 73.0%~118.0%,平均回收率为 95.6%。

表 2 河蟹肌肉试样的加标回收结果

TTX 加入量 ng/g	理论检出浓度 ng/mL	实际检出浓度 ng/mL	回收率	RSD %
10	0.5	0.59 ±0.10	118.0	16.9
50	2.5	2.04 ±0.04	81.6	2.0
100	5.0	4.63 ±0.31	92.6	6.7
500	25.0	18.25 ±1.06	73.0	5.8
1000	50.0	56.50 ±6.36	113.0	11.3

表 3 ELISA 法与小鼠生物试验法检测结果的比较 μg/g

编号	样品种类	小鼠生物试验	直接 ELISA 法
1	皮肤	4.19 ±2.69 ⁽¹⁾	6.94 ±0.55
2	肝脏	32.50 ±4.79	71.42 ±5.80
3	肝脏	59.58 ±6.96	75.29 ±6.12
4	肝脏	19.92 ±7.02	20.16 ±2.94
5	肠道	7.77 ±1.82	15.02 ±1.22
6	卵巢	7.75 ±1.91	10.16 ±0.83
7	卵巢	36.28 ±3.03	40.27 ±0.66
8	肝脏	1.44 ±0.01	2.28 ±0.33
9	肌肉	1.95 ±0.37	4.02 ±0.33
10	肌肉	4.40 ±2.11	4.65 ±0.15
11	肌肉	ND ⁽²⁾	ND
12	皮肤	ND	0.03 ±0.01
13	肠道	ND	ND

注:(1) $\bar{x} \pm s$, (2) ND 系未检出。

2.4 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 13 份样品的提取液分别进行检测,检测结果表明,两种方法检测结果符合良好。经配对 t 检验,两两之间在统计学上差异无显

著性 ($P > 0.1$) (见表 4)。

表 4 ELISA 法与小鼠生物试验法检测结果的统计学比较			
样品数	回归方程	相关系数(r)	P (配对 t 检验)
13	$y = 0.8204 + 0.6597x$	0.944	> 0.1

2.5 完整河鲀样品的毒力测定 用直接 ELISA 法

表 5 河鲀毒力的测定结果							μg/g
品 种	产 地	捕获水域	肌 肉	肝 脏	皮 肤	肠 道	
紫色东方鲀	江苏省启东市	东海	0.02 ±0.009	4.21 ±0.94	37.64 ±2.16	84.68 ±6.88	
暗纹东方鲀	江苏省启东市	东海	2.16 ±0.35	0.17 ±0.02	26.65 ±1.53	17.90 ±2.90	
黄鳍东方鲀	江苏省启东市	东海	8.16 ±0.21	27.18 ±1.91	0.95 ±0.08	135.99 ±32.88	
棕斑东方鲀	江苏省启东市	东海	ND	ND	0.30 ±0.07	0.34 ±0.03	
红鳍东方鲀	江苏省启东市	东海	0.19 ±0.00	4.32 ±0.04	1.08 ±0.26	2.96 ±0.24	
黄鳍双斑东方鲀	江苏省江阴市	长江	1.23 ±0.04	7.45 ±1.33	9.14 ±0.29	9.47 ±0.75	

注: ND 系未检出

3 讨论

继建立了检测 TTX 的间接 ELISA 方法之后,又建立了直接法。其最低检出浓度为 0.1 ng/mL,优于间接法(1 ng/mL),^[6]也明显优于传统方法,^[4]接近或优于国外同类方法。^[5,9]与传统检测方法相比,本法样品的提取无需复杂的柱层析净化过程,节省了大量时间和试验材料,并且不需要特殊设备。本法采样量极小(10 g 以下),不破坏鱼体的完整性,不影响受检河鲀的商业价值。TTX 为剧毒物质,人体中毒剂量约 0.5~1.0 mg,^[2]因此,在筛选可食河鲀时要求检测方法必须具有极高的灵敏度。按前文中推算的灵敏度要求,^[6]本方法的灵敏度完全可以满足实际工作的需要。直接法较间接法省时,减少了干扰环节,更便于现场工作使用。

小鼠生物试验法是日本法定的河鲀毒力测定方法。本研究用小鼠生物试验法对 ELISA 检测方法进行了验证,结果表明直接 ELISA 与小鼠生物试验符合良好,在统计学上差异无显著性 ($P > 0.1$)。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,这与前文报道的结果一致。其原因在前文中已加以讨论,在此不作赘述。^[6]

(本所王茂起所长及江苏省食品卫生监督检验所,江阴市、启东市卫生防疫站的同志协助采集河鲀

对我国江苏启东、江阴两地捕获的完整河鲀的毒力进行了检测。检测结果(表 5)表明,即使是繁殖期后的样品,各组织基本上仍然带毒,但其含量不一致。

样品,特此致谢。)

参考文献:

[1] 李明德. 鱼类学(上册)[M]. 天津:南开大学出版社, 1992.

[2] 刘志诚,于守洋,主编. 营养与食品卫生学[M]. 第二版. 北京:人民卫生出版社 1987.

[3] 王健伟,罗雪云,计融. 河豚中毒及其防治(综述)[J]. 中国食品卫生学杂志,1995,7(1):58~63.

[4] 王健伟. 河豚毒素的定量检测方法研究进展(综述)[J]. 国外医学·卫生学分册,1995,22:86~89.

[5] Raybould T J, Bignami G S, Inouye L K, et al. A monoclonal antibody-based immunoassay for detecting tetrodotoxin in biological samples[J]. J Clin Lab Anal. 1992,6(2):65~72.

[6] 王健伟,罗雪云,计融,等. 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[J]. 卫生研究,1997,26(2):106~109.

[7] 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[J]. 卫生研究,1996,25(5):308~311.

[8] 徐志凯,主编. 实用单克隆抗体技术[M]. 西安:陕西科学技术出版社,1992.

[9] Watabe S, Sato Y, Nakayama M, et al. Monoclonal antibody raised against tetradonic acid, a derivative of tetrodotoxin. Toxicon, 1989, 27: 265~268.

Determination of tetrodotoxin in puffer fishes using monoclonal antibody-based direct competitive inhibition enzyme-linked immunosorbent assay/Ji Rong, Wang Jianwei, Luo Xueyun, et al. //Chinese Journal of Food Hygiene. - 2002,14(5):7~10.

Abstract: Direct competitive inhibition enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for determination for tetrodotoxin in puffer fish samples was developed using anti-tetrodotoxin monoclonal antibodies. Results showed that direct ELISA was

sensitive than indirect ELISA, the minimum detectable concentration of tetrodotoxin was 0.1 ng/mL (0.01 ng/assay), and the linear range of standard curve was between 5 and 500 ng/mL. The recoveries from tetrodotoxin spiked samples of the method were 73.0% ~ 118.0%. Compared with the traditional mouse bioassay system, it showed no significant difference between the two methods (for paired t test, $P > 0.1$), and good correlations for tetrodotoxin were obtained ($r = 0.944$). In addition, the toxicity of some puffer fish samples from the East China Sea and the Yangzi River in Jiangsu Province were determined. The results implied that this was a simple, fast and sensitive method which met the need of detection of tetrodotoxin in puffer fish.

Author's address: Ji Rong, Institute of Food Safety Control and Inspection, Ministry of Public Health, Beijing 100021, PRC.

Key Words: tetrodotoxin; Salamandridae; antibodies, monoclonal; Enzyme-Linked Immunosorbent Assay; Mice; Virulence

[收稿日期: 2002 - 06 - 12]

卫生部文件

卫法监发[2002]135号

卫生部关于暂不受理以大孔吸附树脂分离 纯化工艺生产的保健食品的通知

各省、自治区、直辖市卫生厅局, 新疆生产建设兵团卫生局, 卫生部卫生监督中心:

鉴于大孔吸附树脂分离纯化工艺的安全性尚在研究中, 为保障食品的食用安全, 我部暂不受理以此工艺生产的保健食品。

特此通知。

中华人民共和国卫生部
二〇〇二年五月三十日

中华人民共和国卫生部公告

2002年第4号

为保证食品卫生安全, 防止食品污染和有害因素对人体的危害, 5月下旬我部组织部分省市对美国惠氏药厂爱尔兰有限公司生产的学儿乐奶粉、幼儿乐奶粉、金装幼儿乐奶粉、金装健儿乐奶粉、金装爱儿乐奶粉等产品进行了抽检。抽检结果表明, 美国惠氏药厂爱尔兰有限公司生产的学儿乐奶粉亚硝酸盐含量超标(亚硝酸盐检测结果为 2.25—3.83 mg/kg, 国家卫生标准为 ≤ 2 mg/kg)。根据《中华人民共和国食品卫生法》第七条规定, 美国惠氏药厂爱尔兰有限公司生产的不符合国家卫生标准的学儿乐奶粉不得销售。

各级卫生行政部门及卫生监督机构应加强监督检查。

中华人民共和国卫生部
二〇〇二年六月三日