

文章编号:1004-7271(2002)02-0171-05

·综述·

## 酶联免疫吸附法在水产品 安全检测中的应用

### The application of ELISA for the analysis of seafood safety

叶 玫<sup>1</sup>, 吴成业<sup>1</sup>, 刘海新<sup>1</sup>, 庄 宛<sup>2</sup>

(1. 福建省水产研究所, 福建 厦门 361012; 2. 厦门出入境检验检疫局, 福建 厦门 361012)

YE Mei<sup>1</sup>, WU Cheng-ye<sup>1</sup>, LIU Hai-xin<sup>1</sup>, ZHUANG Wan<sup>2</sup>

(1. Fujian Fisheries Research Institute, Xiamen 361012, China;

2. Xiamen Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau of P. R. C., Xiamen 361012, China)

关键词 酶联免疫吸附法; 水产品安全; 检测

Key words enzyme-linked immunosorbent assay; seafood safety; analysis

中图分类号 S917 文献标识码: A

酶联免疫吸附法(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)是把抗原和抗体的特异性免疫反应和酶的高效催化作用有机结合起来检测技术,它始于 1971 年 Engvall 和 Perlmann 用碱性磷酸酶标记的 IgG 定量测定 IgG<sup>[1]</sup>。随着单克隆抗体技术的发展应用及免疫试剂盒的商业化,ELISA 已广泛应用于临床医学、生物学、分析化学、食品(乳制品、畜产品)分析等领域。但在水产品安全检测方面的应用,国内目前刚刚起步,本文通过对 ELISA 方法及应用的介绍,旨在促进该技术在水产品安全检测领域的应用和推广。

### 1 酶联免疫法的基本原理和特点

ELISA 的基本原理:将抗原或抗体结合到某种固相载体(聚苯乙烯微量反应板),并保持其免疫活性。将抗原或抗体与某种酶连接成酶标抗原或抗体,这种酶标抗原或抗体既保留其免疫活性,又保留酶的活性,常用的标记酶有辣根过氧化物酶(Horseradish Peroxidase, HRP)、碱性磷酸酶(Alkaline Phosphatase, AKP)等。在测定时,把受检标本(测定其中的抗体或抗原)和酶标抗原或抗体按不同的步骤与固相载体表面的抗原或抗体起反应。用洗涤的方法使固相载体上形成的抗原抗体复合物与其他物质分开,最后结合在固相载体上的酶量与标本中受检物质的量成一定的比例。加入酶反应的底物后,底物被酶催化变为有色产物,产物的量与标本中受检物质的量直接相关,可根据反应颜色的深浅进行定性或定量分析。酶的催化效率很高,极大地放大了初级的免疫反应效果,从而使测定方法达到很高的敏感度。常用的 ELISA 的测定方法分为三类:测定抗体的竞争法;测定抗原的双抗体夹心法;测定抗原的竞争法。研究者可根据自身的条件和要求,灵活地设计适当的 ELISA 测定方法<sup>[1]</sup>。

ELISA 具有高度的敏感性和特异性,几乎所有的可溶性抗原抗体系统均可用以检测。与经典的化

学、生物学的检测方法比较,具有以下特点:①灵敏度高。检测限可达 ng 甚至 pg 水平,可作定量测定。②干扰小。抗原抗体的免疫反应特异性强,结构类似物、有色物质、荧光物质对检测的干扰很小。③操作简便快捷。由于特异性强,简化了样品的预处理和提取纯化过程,可同时检测数十甚至上百个样品。④安全性高,污染少。因为灵敏度高,标准品的浓度可以很低,有机溶剂用量较少,减少对检测人员和环境的潜在危害。但 ELISA 也存在一些缺陷。对试剂的选择性很高,不能同时分析多种成份,对结构类似的化合物有一定程度的交叉反应,分析分子量很小的化合物或很不稳定的化合物有一定的困难。

## 2 ELISA 在水产品安全检测中的应用

### 2.1 药物残留的检测

水产品的药物残留是指在水生动、植物养殖过程中,为防病治病而人为使用的、在生物体内产生积累或代谢不完全的药物。违禁用药或药残超过安全限量的水产品,摄食后将直接危害人体健康。现在国际上比较重视的残留药物有抗生素、磺胺类、呋喃类、喹啉酮类、激素类和转基因类药物<sup>21</sup>,各国研究者不断寻求更加适用的检测方法。大部分抗菌素及激素类属于小分子半抗原,无法刺激免疫反应,但与牛血清蛋白(bovine serum albumin, BSA)或钥孔戚血蓝蛋白(keyhole limpet hemacyanin, KLH)等大分子蛋白连接,可转化为免疫抗原。80年代后期,ELISA在残留分析中发展迅速,目前几乎所有重要的兽药残留已建立或试图建立ELISA,如青霉素、链霉素、四环素、氯霉素、磺胺二甲基嘧啶、三甲氧苄氨嘧啶、莫能菌素、盐霉素、阿维菌素等。1999年,FAO/IAEA联合开展牲畜和畜牧产品中兽药残留监测的研究项目,就是开发和使用ELISA分析技术来证实一系列兽药残留,确定正确的分析方法。ELISA具有操作简便、灵敏度高、样品容量大、仪器化程度和分析成本低的优点,是目前最理想的残留筛选性分析方法之一。将ELISA分析与理化分析(HPLC、TLC)技术联用,可使兽药残留分析将免疫技术的高选择性和理化技术的快速分离和灵敏性融为一体,避免了ELISA直接测定样本信息量太少、假阳性和理化分析技术选择性低等不足,简化分析过程。

在抗菌素残留的检测中,微生物抑制分析方法、高效液相色谱(HPLC)、气相色谱(GC)、气质联用(GC-MS)等是最常采用的方法。但这些方法有它们的局限性:微生物法,缺乏灵敏度和特异性;HPLC、GC法的缺点是样品的前处理要耗费大量的时间,并且需要昂贵的实验室设备。ELISA法样品前处理简便,同时可分析多个样品,分析时间短,且敏感度高,特别适于做日常大量样品的筛选工作,同时也减少由于采用HPLC、GC检测而使用的甲醇、乙腈等有机溶剂对环境的污染。氯霉素对人体的造血系统危害很大,容易引起再生障碍性贫血,是禁用的抗生素,因此国外对禽畜水产品的氯霉素残留的限量相当严格,香港的限量标准为 $1\mu\text{g}/\text{kg}$ ,欧盟为 $0.3\mu\text{g}/\text{kg}$ 。我国水产品氯霉素残留问题已引起有关贸易国的严重关注,但国内水产品氯霉素残留的检测方法仍沿用SN0341-95出口肉及肉制品中氯霉素残留量检验所规定GC的方法,方法的检出限为 $10\mu\text{g}/\text{kg}$ ,灵敏度无法满足现行的国际标准。采用ELISA氯霉素试剂盒(RIDASCREEN Chloramphenicol)线性范围在 $50-1350\text{ng}/\text{kg}$ ,定量检测下限为 $100\text{ng}/\text{kg}$ ,满足国际上现行的氯霉素限量要求。磺胺类是常用的广谱抗菌素,用于鱼、虾、蟹的细菌性疾病,是人渔共用药物,如果通过食物链的传递,人必产生抗药性。自从美国联邦毒理学研究中心(NCTR)于1988年指出,磺胺二甲基嘧啶具致甲状腺肿瘤的可能性后,磺胺二甲基嘧啶及其它磺胺衍生物的残留更受关注,欧盟规定肉类磺胺的最大残留总量不得超过 $100\mu\text{g}/\text{kg}$ 。用ELISA在测定乳制品、猪肉中磺胺药残有比较成熟的研究和应用,检出限可达 $2.0\mu\text{g}/\text{kg}$ ,ELISA定性的初步筛选和HPLC定量配合使用,简化日常大量的检测工作,这方法水产品值得借鉴<sup>[3,4]</sup>。

激素类药物残留,会使正常人的生理功能发生紊乱,更严重的是影响儿童正常的生长发育。国内水产品中激素残留的检测方法尚不健全,多借鉴畜产品或参考国外一些方法,有待于建立完善。己烯雌酚(Diethylstilbestrol, DES)属人工合成激素类药物,作为饲料添加剂,提高动物的日增重和饲料效率。然而,许多科学试验表明己烯雌酚能引发动物的癌症,而且妊娠期间使用还会殃及下一代。1972年,

FAO/WHO 禁止使用己烯雌酚。欧盟对 DES 的限量值为  $2\mu\text{g}/\text{kg}$  我国水产行业标准 NY/T5070-2001 的限量值为  $1\mu\text{g}/\text{kg}$ 。GB/T14931-94 规定了用 HPLC 方法测定畜肉中 DES 残留,其检出限为  $250\mu\text{g}/\text{kg}$ ;郭志峰采用气质联(GC/MS)对鸡蛋中的 DES 的残留量进行分析<sup>[5]</sup>,其检出限为  $50\mu\text{g}/\text{kg}$ ,灵敏度都达不到要求。农业部淡水鱼种监督检验测试中心采用 DES 商业试剂盒(RIDASCREEN Diethylstilbestrol)测定中华鳖肌肉中己烯雌酚的残留,线性范围在  $25-200\text{ ng}/\text{kg}$ ,检出限为  $187.5\text{ ng}/\text{kg}$ ,回收率范围是  $71.7-91.3\%$  符合国内外对 DES 残留限量的检测要求。除了 DES 外,其它禁用激素类,如乙炔雌二醇、甲基睾酮、去甲基睾酮都有相应的商业试剂盒。

## 2.2 毒素的检测

有害藻类毒素自身或通过食物链在鱼类、贝类等生物体内蓄积,对生物直至人类产生危害。其中危害性较大的几种毒素分别是麻痹性贝毒(Paralytic shellfish poisoning, PSP)、腹泻性贝毒(Diarrhetic shellfish poisoning, DSP)、神经性贝毒(Neurotoxic shellfish poisoning, NSP)、西加鱼毒素(Ciguatera fish poisoning, CFP)、遗忘症贝毒(Amnesic shellfish poisoning, ASP)等。海洋生物毒素检测和预防已纳入 WHO 的 HACCP 计划。控制海洋生物毒素很难,主要预防措施是从捕捞区和贝类着床取样检查并分析毒素<sup>[6]</sup>。因此要求检测方法快速、方便、准确,并且在含量极微时即可检出以起到预警作用。近十几年来,用于海洋生物毒素检测的 ELISA 方法得到迅速发展,已有多种可靠的诊断试剂盒用于分析不同的毒素。与使用 HPLC 法和 AOAC 常规鼠生物测定法相比,它具有灵敏度好、快速简便等特点。ELISA 检测 DSP 毒素,抗体的制备都与单一腹泻源大田软海绵酸(okadaic acid, OA)有关,灵敏度可达  $20\text{ ng}/\text{g}$  (Riugier Bio-Rech),与 DSP 毒素其他测试方法(如 HPLC 和 LC-MS)的广泛比较,证明同样具有较高可信度。根据石房蛤毒素(saxtoxins, STX)多克隆抗体检测 PSP 毒素所使用的快速诊断免疫检测试剂盒(SAXITOXIN TESTER, Instituts Armand-Frappier)检测限  $0.64\mu\text{g}/\text{g}$  贝类组织。ELISA 因 PSP 各毒素间的交叉反应低,不能完全体现出样品的整体毒性,可作为定性和半定量检测<sup>[7]</sup>。

组胺引起鱼类食物中毒是一个世界范围内的难题,水产品组胺的 FDA 和 EEC 规定最大允许量  $100-200\text{ mg}/\text{kg}$ 。ELISA 法测定组胺始于 1983 年 Lerke 的研究<sup>[8]</sup>,之后方法不断完善,如 Neogen 组胺试剂盒,检出限达  $2.5\text{ mg}/\text{kg}$ ,  $35\text{ min}$  快速检测,检测结果不受样品盐分干扰,且直接用水相进行样品的前处理,避免有机试剂的污染。

随着人们对动物源食品中的某些毒素,通过食物链的作用,对人体产生潜在的危害的认识,对饲料原料和成品的质量要求愈加严格。黄曲霉素(AFT)是由真菌黄曲霉和寄生曲霉产生的一组次生代谢物,其中黄曲霉素  $B_1$ ( $\text{AFB}_1$ )毒性最大,分布也最广,已正式被定为人类的致癌物质,是水产饲料的典型毒素之一。1998 年,我国的成恒嵩教授起草了饲料中  $\text{AFB}_1$  的 ELISA 检测方法的国家标准,检出限为  $0.01\mu\text{g}/\text{kg}$ ,检测时间约为 2 小时。由于 ELISA 检测  $\text{AFB}_1$  方法成功的建立,其它黄曲霉素族毒素  $\text{AFM}_1$ 、 $\text{AFC}_1$ 、 $\text{AFB}_2$  的 ELISA 检测方法在国内也相继建立<sup>[9]</sup>。

## 2.3 农药残留的检测

养殖业的源头污染,也对水产品的安全构成威胁,农药作为传统的污染问题仍然存在。常用的农药的分析方法比较繁琐,分析过程冗长费时,对农药的中毒事件不能快速作出反应。发展快速、可靠、灵敏和实用的农残分析技术成为近年来研究的重点。自 1983 年以来,ELISA 成为许多国际权威分析机构,如美国官方农业化学家协会(Association of Official Agricultural Chemists, AOAC)分析残留农药的首选方法。应用 ELISA 检测食品中的农药残留主要是除草剂、杀虫剂、杀菌剂等<sup>[10,11]</sup>,但检测水产品农残污染应用于较少。

## 2.4 微生物的检测

微生物引起的食源性疾病是影响食品安全的主要因素之一。水产和水产加工品的微生物检验主要是检测一般的污染(大肠杆菌、菌落总数)和致病菌(沙门氏菌、副溶血性弧菌、金黄色葡萄球菌、大肠埃氏菌等)。常规的微生物学检验通常以分离培养、生化试验及血清学试验来进行判断,需要大量的手工

劳动 检验周期长(6-7d),应用 ELISA 检测微生物的优点受到人们越来越多的关注。由于养殖环境污染,养殖鱼虾贝类受沙门氏菌污染已成为世界许多地方的问题。文其乙和焦新安<sup>[12]</sup>建立直接 ELISA 检测沙门氏菌方法,它能检出沙门氏菌属 99 个菌株,而不与其他肠道杆菌交叉反应。应用此法检测粪样、鱼粉、奶样,其敏感性和特异性分别高达 100 和 97.6,该法不受各种样品成分的影响,而且在 2-3d 即可完成样品筛选,有重要实用价值。副溶血性弧菌是污染水产品并引起食物中毒的重要病原菌。王文和郝跃<sup>[13]</sup>建立了三种斑点 ELISA(Dot-ELISA、SPA-Dot-ELISA、BA-Dot-ELISA)快速检测水产品中副溶血性弧菌方法。用该法对 277 份鱼样的检测,阳性样经生化鉴定,结果表明三种方法稳定性好,不与溶藻性弧菌、亲水气单孢菌等 13 种杂菌发生交叉反应,简便快速,均可在 22-24h 内报告结果,比常规法快 4-6d。

现已发现有些细菌,如副溶血性弧菌、幽门螺杆菌、大肠杆菌等在低温贫营养的条件下,可进入“活的非可培养状态”(Viable but nonculturable state, VBNC)<sup>[14]</sup>。它们在适当的条件下还可以复苏,仍具有致病力。常规的培养法无法检测到处于这种状态的细菌,造成漏检,从而形成危害,因此寻找一种准确快速的检测方法非常重要。许多研究结果证实,进入 VBNC 的细菌仍然保持着和正常细菌一样的表面抗原<sup>[15,16]</sup>,因此可以利用免疫学技术进行检测,姚斐等<sup>[17]</sup>用间接 ELISA 检测 VBNC 大肠杆菌 O157:H7,就是在这一领域的探讨,同时也提示了 ELISA 在这一方面的应用潜力。

## 2.5 转基因产品的检测

近年来,基因技术发展迅速,特别在农作物的基因改良方面。目前国际上已核准四十多项转基因作物的商业化生产。转基因生物及其产品(CMOs)的安全问题,尚存较大争议,到目前还没有切确的证据说明其有无害处,它的负面作用不能在短时间内显现出来。但无论从生态角度还是从健康角度出发,在 CMOs 安全问题未得出结论之前,加强对其管理是必要的,各国政府对 CMOs 的生产和进口都持谨慎限制的态度,许多 WTO 成员国对转基因农产品的进口做了一些限制。虽然国内尚没有 COMs 的大规模生产,但我国进口的农产品中不少是 COMs。近日我国《农业转基因生物标识管理办法》正式实施,因此,建立 COMs 检验标准是相当急迫的课题。检验 COMs 的方法,除了聚合酶链锁反应(polymerase chain reaction, PCR)法外,ELISA 法也较常用,在作快速定性的筛选方面,有它的优越性。有关转基因鱼的研究,在中国、美国、加拿大等国已取得进展。陈茹等<sup>[18]</sup>将地高辛标记的 PCR-ELISA(DIG-PCR-ELISA)技术,应用于转基因鱼的两种外源基因的检测。DIG-PCR-ELISA 技术是一种半定量核酸检测技术,它将 PCR 技术、核酸杂交鉴定以及 ELISA 量化检测相结合,具有传统 PCR 的技术的优点,在特异性鉴定及量化方面超越 PCR。敏感性显示,对外源基因 mMT 启动子和 hGH 基因的检测灵敏度可达  $10^{-3}$ ,与常规的 PCR 结合琼脂糖凝胶电泳检测相比,灵敏度提高了 100-1000 倍,且检测程序简捷,过程只需 5-6h,能满足检验检疫部门快速、准确的工作要求,若能实现 DIG-PCR-ELISA 的定量检测,其实用价值将进一步提高。

## 3 结语

我国的水产品安全问题不容乐观,一方面传统的污染问题继续存在,如农药、重金属、致病菌的污染;另一方面,由于养殖的集约化,饲料药物添加剂和亚治疗量的各类抗生素在生产中的广泛应用,及用药混乱及不合理规范等因素的存在,使水产品药物残留问题日益突出。这不仅造成餐桌污染,形成对公众健康直接或潜在的危害,而且,严重阻碍了我国水产品进入世界贸易的大流通。我国水产品的药物残留问题已引起有关贸易国的严重关注,过去的几年间,日本市场已多次退回或销毁抗生素超标的我国鳊鱼或鳊鱼制品,造成巨大的经济损失,因来自中国的褐虾中检验出的氯霉素,欧盟委员会宣布,自 2002 年 1 月 28 日起,停止从中国进口动物源食品,其中包括鸡肉,兔肉,蜂蜜,冷冻褐虾,大虾以及动物饲料。入世后,这些国家的“关注度”还将进一步增大,所制定的进口产品合格评定标准越来越严格,同时国外水产品进入中国市场已成为必然。因此,安全问题已成为水产业发展新阶段亟待解决的主要矛

盾之一,这要求我们进一步建立完善水产品检验监督质量控制体系。

现行的水产品安全检验标准相对落后于水产业生产和国际贸易的发展水平,体现在:检测方法多借鉴畜产品或参照国外的一些方法,不完整,没能形成体系,可比性、可操作性较差,检测方法繁琐、报告结果周期长,不适应日常大量的生产流通环节对产品质量的监控;检测灵敏度无法达到国际上现行的、越来越严格的标准。酶联免疫吸附法因其简便、快速、灵敏、微量化等诸多的优点,在建立和改进水产品安全检验方法方面有很大的应用空间,事实上,湖北、福建、上海的若干个水产品质量检验站已开始尝试用 ELISA 法检测水产品中的氯霉素、己烯雌酚等药物残留。现在,有大量的 ELISA 商业试剂盒,可供作相应项目的检测,但由于水产品原料体系的多样性、复杂性,ELISA 法要成为某一水产品安全检验的标准方法,并将其推广应用,还有一定距离。在改进样品的纯化步骤,提高回收率、灵敏度方面;在减少基底干扰,提高重现性和稳定性方面;在简化分析程序,降低分析成本方面;在与其它理化分析方法联用,克服自身局限性方面;在试剂、操作规程的标准化等方面有待于进一步摸索,大量工作要做。目前许多学者正致力于改进完善这种技术,不断有新的研究成果推出,可以肯定,ELISA 在水产品安全检测领域有很好的应用前景。

### 参考文献:

- [1] 王重庆.分子免疫学基础[M].北京:北京大学出版社,1997.
- [2] 李兆新,冷凯良,李健,等.我国渔药状况及水产品中渔药残留监控[J].海洋水产研究,2001,24(4):76-80.
- [3] Martlbauer, E., E. Usleber, E. Schneider. Immunochemical detection of antibiotics and sulfonamides[J]. Analyst, 1994, 119: 2543-2548.
- [4] Sheth H B, Sporns P. Development of a single ELISA for detection of sulfonamides[J]. J Agricult Food Chem, 1991, 39: 1696-1700.
- [5] 郭志峰.鸡蛋中己烯雌酚的 GC/MS 法分析测定[J].质谱学报,1994,18(3):36-40.
- [6] FAO. Assurance of seafood quality[M]. FAO Fisheries Technical Paper 334. 1994: 22-25.
- [7] 郭皓.免疫方法在藻毒素及贝毒素检测中的应用[J].卫生研究,1999,28(2):52-55.
- [8] Lerke P A, Porcuna M N, Chin H B. Screening test for histamine in fish[J]. J Food Sci, 1983, 48: 155-157.
- [9] 赵晓联,赵春城,蔡建荣,等.酶联免疫吸附法在饲料毒素检测中的应用[J].中国饲料,2000(6):21-22.
- [10] 朱慧莉,黎锡流.酶联免疫吸附法(ELISA)在乳制品检测中的应用[J].食品工业,2001(5):44-45.
- [11] 朱慧莉,黎锡流,许喜林.酶联免疫吸附法及其在食品分析中的应用[J].食品工业科技,2001,22(2):80-82.
- [12] 文其乙,焦新安.直接 ELISA 检测沙门氏菌方法的建立及其应用研究[J].中国兽医学报,1995,15(2):105-108.
- [13] 王文,郝跃.三种斑点 ELISA 快速检测水产品中副溶血性弧菌[J].动植物检疫,1991(2):16-18.
- [14] Xu H S, Roberts N, Singleton F L et al. Survival and viability of nonculturable *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae* in the estuarine and marine environment[J]. Microbiol Ecol, 1982, 8: 313.
- [15] 徐怀恕.霍乱弧菌(*Vibrio cholerae*)的细胞形态研究—活的非可培养状态细胞[J].青岛海洋大学学报,1997,27(2):187-190.
- [16] Jacob J, Martin W, Holler C. Characterization of viable but nonculturable stage of *C. coli* characterized with respect to electron microscopic findings, whole cell protein and lipooligosaccharide(LOS) pattern[J]. Microbiol, 1993, 118(1):3.
- [17] 姚斐,沙莎,陈刚,等.间接酶联免疫吸附技术检测活的非可培养状态的大肠杆菌 O157:H7[J].青岛海洋大学学报,2001,31(2):211-214.
- [18] 陈茹,林志雄,刘琳琳,等.用地高辛标记的 PCR-ELISA 技术快速检测转基因鱼[J].中国水产科学,2001,24(4):13-16.