

间接竞争酶联免疫吸附测定水产品中的组胺残留

袁利鹏, 刘波

(广东农工商职业技术学院热带农林学院, 广东广州 510507)

摘要: 本文通过制备特异性识别组胺衍生物的多克隆抗体, 建立了针对水产品中组胺的间接竞争酶联免疫吸附分析方法(ic-ELISA)。以组胺等为反应原料经三步化学反应合成组胺半抗原, 采用活泼酯法将组胺半抗原分别与牛血清蛋白(BSA)和卵清蛋白(OVA)偶联作为包被原和免疫原, 用紫外扫描法进行鉴定, 结果显示组胺半抗原与载体蛋白偶联成功。通过免疫新西兰大白兔制备组胺抗血清, 采用辛酸-硫酸铵方法纯化血清获得了相应的特异性多克隆抗体。通过对 icELISA 系列反应条件的摸索, 确定了各组分的最适工作条件。试验结果表明: 该方法对于组胺的 IC_{50} 为 0.91 ng/mL, 与组氨酸、N-酰基组氨酸、3-甲基组胺等多种类似物及其衍生物均无交叉反应, 方法特异性良好; 线性检测范围为 0.1~8.1 ng/mL, 检出限为 0.10 ng/mL; 按照 10、20、30 ng/g 的添加量添加组胺至鱼、虾和贝类样品中, 测得其回收率为 98.9%~130.1%。方法检测的准确性好灵敏度高, 适用于实际水产样品中组胺的检测。

关键词: 组胺; N-酰化; 酶联免疫吸附测定; 水产品

文章编号: 1673-9078(2019)07-291-295

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2019.7.041

Determination of Histamine Residues in Aquatic Products by Indirect Competitive Enzyme-linked Immunosorbent Assay

YUAN Li-peng, LIU Bo

(Tropical Crops Department, Guangdong AIB Polytechnic, Guangzhou 510507, China)

Abstract: In this work, a novel monoclonal antibody against histamine derivative was obtained, and an indirect competitive enzyme-linked immunoassay (ic-ELISA) was developed for the analysis of histamine in aquatic products. The histamine hapten was prepared via three steps of chemical reactions, and then, the hapten was conjugated to carrier proteins of BSA and OVA by the active ester method to form immunogen and coating antigen, respectively. The results of UV scanning showed that histamine haptens were successfully conjugated with carrier protein. Histamine antiserum was prepared by immunizing New Zealand white rabbits, and then purified by caprylic acid-ammonium sulfate method. Under the optimized conditions, The IC_{50} of this developed ic-ELISA was 0.91 ng/mL, and negative cross reactions (CR) of antibody to Histidine, n-acyl histidine, 3-methyl histamine and other histamine analogues and their derivatives were observed, indicating the good specific method. The calibration curve of this ic-ELISA had a linear detection of 0.1~8.1 ng/mL, with the detect limit detection of 0.10 ng/mL. The average recoveries of histamine in fortified aquatic products were in the range of 98.9~130.1%. Therefore, the established ic-ELISA in this work is a practical method for determination of histamine residues in aquatic products.

Key words: histamine; N-acyl; ELISA; aquatic products

组胺(Histamine)是一种分子量只有 111 u 的小分子碱, 是组氨酸的脱羧产物。组胺广泛存在于各种有机体中, 低浓度时对于维持机体正常生理功能具有重要作用。然而, 在食品发酵或者食物腐败变质后, 组胺含量明显升高, 在一些发酵食品^[1]和水产品^[2]中

收稿日期: 2019-05-16

基金项目: 广东省自然科学基金项目(2015A030313793); 国家级星火计划项目(2015GA780082); 广东农工商职业技术学院重点课题(xyzd1606); 广东省教育厅高职食品加工技术专业领军人才项目

作者简介: 袁利鹏(1979-), 男, 副教授, 研究方向: 食品安全快速检测

通讯作者: 刘波(1980-), 女, 副教授, 研究方向: 食品安全检测

常含有较高含量的组胺, 食品中的组胺被人体过量摄入后会引起中毒现象^[3]。有报道称当人体摄入 40 mg 以下组胺时就会产生轻微中毒症状, 超过 40 mg 摄入即可产生中等中毒症状, 大于 100 mg 摄入则产生严重中毒症状^[4]。摄入高浓度的组胺食品, 会引起人眼结膜充血、头昏恶心头闷等中毒症状, 严重者甚至会致人死亡。由于摄入大量组胺引起的食物中毒时常发生, 因此, 许多国家和组织对食品中的组胺制定了严苛的限量标准。美国 FDA 限定进口水产品中的组胺残留不能超过 50 mg/kg, 欧盟及南非则将限量值设定为 100 mg/kg, 澳大利亚与德国将限量值设定为

200 mg/kg^[5]。我国国标 GB 2733-2005 中规定鲑鱼中组胺含量不得超过 1000 mg/kg, 其他海水鱼中组胺不得超过 300 mg/kg。因此加强对食品尤其是水产品中组胺的检测对于判定食品新鲜度, 避免引起组胺中毒维护消费者身体健康非常重要。

目前水产品中组胺的检测方法主要有比色法、薄层色谱法、生物传感器法、毛细管电泳法和高效液相色谱法等^[6-9]。但大部分方法都比较繁琐、费时、费力且成本高, 而且检测灵敏度和检测范围有待提高。由于酶联免疫吸附测定方法有操作简便、灵敏度高、成本低、便于大规模筛选等优点^[10], 目前已成为检测食品中化学污染物的重要工具之一。国内有关食品中组胺的 ELISA 法较少, 为了结合我国食品安全检测的国情, 更多的进行现场初筛再配合大型仪器进一步确认, 探究方便高效的针对组胺残留的免疫检测方法, 对于提高实际样品检测效率具有重要意义。对于 ELISA 法检测组胺而言, 由于组胺分子量低, 分子特征不显著, 组胺抗体制备极为关键, 直接与蛋白偶联制备作为免疫抗原难以制备出特异性识别组胺的抗体^[11], 即使制备出来, 由于其特异性和灵敏度太低, 检测限一般只能达到 mg/kg 级别^[a], 实际应用受限。因此通常的做法是将组胺衍生, 制备特异性识别组胺苯醌衍生物的抗体, 从而建立基于衍生间接检测组胺的 ELISA 方法^[12]。本研究旨在通过制备针对组胺残留检测的有效抗体, 建立一种与现有检测方法相比更为灵敏、快速和可靠的免疫检测分析法, 并应用在实际样品中组胺残留的快速检测, 从而为水产品中组胺残留检测产品的开发提供技术支持。

1 材料与方法

1.1 实验材料

卵清蛋白(Ovalbumin, OVA)、牛血清蛋白(Bovine serum albumin, BSA)、弗氏佐剂, 弗氏不完全佐剂, 美国 Sigma 公司; 二环己基碳二亚胺(DCC)、N-羧基琥珀酰亚胺(NHS)、组胺, 4-溴丁酸乙酯、3-羟基-4-硝基苯甲酸、对硝基苯甲酰氯、N,N-二甲基甲酰胺(DMF)、阿拉丁试剂公司; 辣根过氧化物酶标记羊抗兔 IgG, 武汉博士德生物工程有限公司; 水产样品在农贸市场购买; 新西兰大白兔, 广东省医学动物实验中心; 包被液、稀释液、洗涤液、封闭液、TMB 底物溶液、终止液均按文献^[13]方法配制。其余化学试剂均为国产分析纯。

UV-160A 紫外-可见扫描仪, 日本 Kyoto 公司; MK3 多功能酶标仪, 美国 Thermo 公司; 6K-15 高速

冷冻离心机, 德国 Sartorius 公司; MODEL 1575 洗板机, Bio-Rad 公司; 洗板机, 美国 Thermo 公司。

1.2 组胺检测半抗原的合成路线

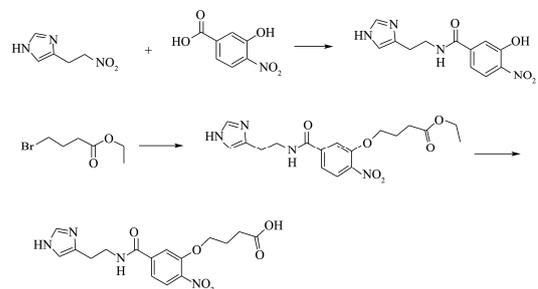


图1 组胺半抗原 (His-H) 合成路线

Fig.1 Synthesis route of histamine hapten (His-H)

1.3 组胺检测人工抗原的合成与鉴定

采用活泼酯法^[14]进行半抗原与载体的偶联, 免疫原采用 BSA 为载体, 包被抗原采用 OVA 为载体。取半抗原 0.1 mmol 溶于 0.5 mL DMF 中, 搅拌加入 DCC 和 NHS 各 0.2 mmol, 4 °C 下磁力搅拌反应 12 h, 离心取上清记为 A 液; 称取载体蛋白 BSA (或 OVA) 溶于 4 mL 浓度为 0.1 mol/L 的 PBS (pH=8.0) 中, 记为 B 液; 搅拌下将 A 液缓慢滴入 B 液, 4 °C 搅拌过夜; 离心取上清后于 4 °C 下用 PBS 透析 3 d, 每天换液 4 次, 得到的人工抗原分装冻存于 -20 °C 备用。分别将偶联物、载体蛋白、半抗原溶液在 200~400 nm 波长间进行紫外吸收光谱分析鉴定^[15]。

1.4 动物免疫及抗血清的制备

动物免疫参考张存政^[16]等人文献报道。选取 2.5 kg 左右的雌性新西兰大白兔 6 只, 首次免疫时, 注射免疫原的量为 0.5 mL/只, 取 0.5 mL 1 mg/mL 的免疫原加等体积的弗氏完全佐剂, 乳化充分后在兔子背部皮下多点注射, 每点约 200 μL; 四周后进行第 2 次免疫, 注射免疫原的量为 0.5 mL/只, 用等体积弗氏不完全佐剂乳化; 三周后进行第 3 次免疫, 第 4 次免疫与第 3 次之间也是间隔 3 周, 共免疫 4 次, 每个免疫原做 2 个平行, 4 次免疫后获得抗组胺血清, 经辛酸-硫酸铵方法纯化以备用。

1.5 标准品的酰化过程

酰化试剂的配制: 称取 100 mg 对硝基苯甲酰氯用 10 mL DMSO 溶解混匀后避光、干燥保存。取一块酶标板按照实际加样顺序加入 100 μL 梯度组胺标准品 (或处理过的样品液), 然后向每空加入 25 μL 酰化试剂, 充分混匀后在室温条件下孵育 15 min。待检测

时取 25 μL 用于酶联免疫分析。

1.6 ic-ELISA 操作步骤

用包被液将 His-H-OVA 稀释一定浓度, 加到酶标板孔中, 100 μL /孔, 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱过夜。用洗液洗涤 2 次, 甩干, 每孔加入封闭液 120 μL , 37 $^{\circ}\text{C}$ 温箱中孵育 3 h。甩干孔中液体, 置 37 $^{\circ}\text{C}$ 烘箱中 3 h 烘干备用; 抗体稀释适当倍数, 每孔分别加入不同浓度的 N-酰基组胺标准液和抗体各 25 μL , 轻摇混合, 37 $^{\circ}\text{C}$ 温箱中孵育 40 min。洗液洗涤 6 次, 甩干, 加入 1:5000 倍稀释的酶标记羊抗兔, 37 $^{\circ}\text{C}$ 温箱中孵育 30 min, 洗液洗涤 6 次, 甩干, 加显色液, 37 $^{\circ}\text{C}$ 温箱中孵育 10 min, 加入 50 μL /孔的终止液, 测 $A_{450\text{nm}}$ 值。

1.7 组胺检测标准曲线绘制

将包被浓度、抗体稀释倍数、酶标二抗稀释倍数以及竞争药物浓度等优化到最佳状态, 根据最佳优化条件进行间接竞争 ELISA 测定, 以组胺标准品浓度 ($\mu\text{g}/\text{L}$) 的半对数值为 X 轴, 以 $A_{450\text{nm}}$ 吸光度比值为 Y 轴, 绘制标准曲线图。并用 Origin 8.6 软件中的四参数拟合竞争标准曲线。

1.8 组胺 ic-ELISA 方法特异性分析

将组胺、组氨酸、N-酰基组氨酸、3-甲基组胺等分别与抗体竞争做标准曲线, 计算各竞争物的 IC_{50} , 比较抗体对它们的亲合性。同时, 用下式计算各竞争物与抗 N-酰基组胺抗体的交叉反应率, 交叉反应率越低, 特异性越好。

$$\text{CR} = \text{N-酰基组胺的 } \text{IC}_{50} / \text{结构类似物的 } \text{IC}_{50} \times 100\%$$

1.9 实际样品的检测

将各水产肉样品均质后, 取其 1 g 加入 9 mL 蒸馏水震荡混匀, 然后离心 (4000 r/min, 5 min) 去除脂肪层, 取 1 mL 上清液加入 9 mL 蒸馏水充分混合再取其 200 μL 溶液用 9.8 mL 蒸馏水稀释备用, 稀释倍数为 5000。

2 结果与分析

2.1 半抗原的设计、合成与鉴定

前人研究结果显示, 直接将组胺的氨基与蛋白质偶联制备的抗原免疫后能够得到组胺特异性识别的抗体, 但由于制备的抗体检测限较高^[17,18], 且大部分样品需要提取后稀释来去除干扰, 因此过高的检测限限制了其在低浓度的组胺样品中的检测。然而, luo 等

人^[12]采取同样的策略尝试了以不做任何修饰的组胺为半抗原偶联 KLH 后制备免疫原免疫动物, 但是没有得到能识别组胺的抗体, 推测戊二醛法偶联形成的 $-\text{CH}=\text{N}$ -键不稳定, 容易水解断裂, 此外半抗原分子大小也是难以诱导动物免疫系统产生相应的免疫应答的原因。为了得到特异性的组胺抗体, 提高检测灵敏度, 本文将组胺的氨基进行 N-酰化后引入能够加强机体免疫反应的苯环, 在通过溴丁酸延长手臂后制备半抗原, 经质谱鉴定其半抗原 His-H 的化学结构, ESI-MS (positive) m/z : 363.1 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 其结果表明合成成功。

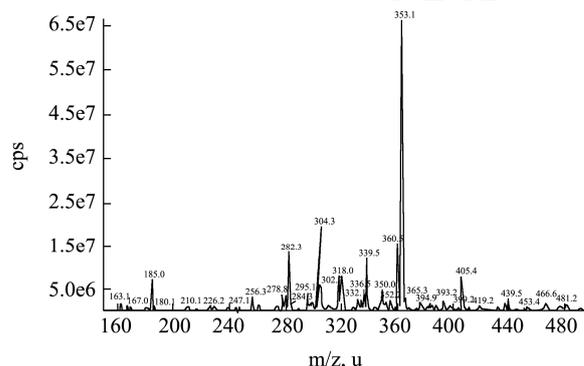


图2 组胺半抗原质谱图

Fig.2 The MS of histamine hapten

2.2 人工抗原的鉴定

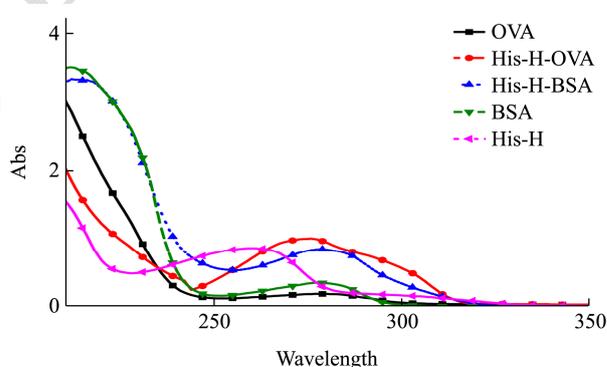


图3 免疫抗原和包被抗原紫外吸收曲线

Fig.3 UV spectra of immunogen and coating antigens

通常将半抗原、载体蛋白和偶联后免疫原的紫外图谱进行对比来确定半抗原与载体蛋白偶联是否成功。由于载体 BSA 和 OVA 为蛋白质, 一般在 280 nm 附近有吸收峰, 半抗原与其偶联后, 该特征峰有一定的偏移; 同时, 如果半抗原如果也有特征吸收峰, 如偶联成功的, 人工抗原相应的在该处的吸收会变强。由图 3 可以看出本研究中, 半抗原 His-H 在 262 nm 有最大吸收, 载体蛋白在 280 nm 附近也有吸收峰, 活泼酯法偶联后人工抗原 His-H-OVA 和 His-H-BSA 的特征吸收已经发生明显蓝移。这是因为在载体蛋白上成功偶联半抗原后, 半抗原最大吸收和载体蛋白最大

吸收相互叠加, 导致其最大吸收发生蓝移。从紫外光谱扫描结果可以判定组胺的人工抗原合成成功, 可进行下一步动物免疫。

2.3 标准曲线的绘制

分别测定 0、0.1、0.3、0.9、2.7、8.1 ng/mL 标准品的吸光度值, 以 N-酰基组胺标准品浓度的对数为横坐标, 以 N-酰基组胺标准品的百分吸光率为纵坐标, 绘制标准曲线。以 N-酰基组胺标准品浓度的对数为横坐标, $\ln[B/(B_0-B)]$ 为纵坐标建立双对数直线拟合曲线, 数学模型为 $\ln[B/(B_0-B)] = a + blgC$, 其 IC_{50} 为 0.9 ng/mL, 检出限为 0.1 ng/mL, 线性检测范围为 0.1~8.1 ng/mL, 该抗体灵敏度远高于直接识别组胺的抗体, 也高于目前大部分衍生后检测的组胺的 ELISA 方法^[12,19]。从图 4 中可知, 说明 N-酰基组胺的 ELISA 检测试剂盒线性关系良好。

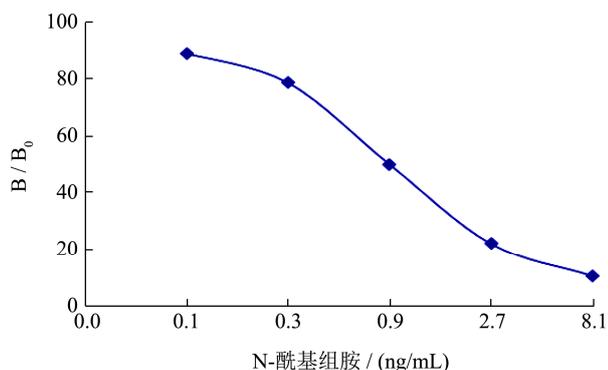


图 4 N-酰基组胺标准曲线

Fig.4 Standard curve of N-acyl histamine

2.4 特异性分析

表 1 几种组胺类似物交叉反应率结果

Table 1 IC_{50} and Cross-reactivity (%) of 6 analogues.

名称	IC_{50} /(ng/mL)	交叉反应率
N-酰基组胺	0.91	100%
组胺	>1000	<0.01%
组氨酸	>1000	<0.01%
N-酰基组氨酸	>1000	<0.01%
3-甲基组胺	>1000	<0.01%
N-酰基-3-甲基组胺	>1000	<0.01%
对硝基苯甲酰氯	>1000	<0.01%

进一步对抗血清的特异性进行考察。分别以组胺衍生物及交叉反应物为抑制药物的 ic-ELISA 抑制曲线, 结果如表 1 所示, 可以看出, 免疫半抗原的 IC_{50} 最低达到了 0.91 ng/mL, 以抗血清与组胺衍生物 (N-酰基组胺) 的交叉反应率为 100%, 但抗血清与组胺并无交叉反应, 说明该抗体智能识别组胺衍生物。同

时, 本研究还考察了该抗血清与组胺类似结构, 如组氨酸和 3-甲基组胺的交叉反应, 结果抗体与其并不存在交叉反应, 其类似物经过 N-酰化后与抗血清也基本没有交叉反应, 与酰化试剂对硝基苯甲酰氯也没有交叉反应, 说明加入的酰化试剂即使过量也不会干扰检测结果。抗体除了能与酰化的组胺分子特异性结合, 与其他结构类似物没有交叉反应, 说明该抗体只对 N-酰基组胺具有专一性识别。

2.5 实际样品的检测

根据实际检测需要, 本文选择了 3 种经常食用的水产样品添加组胺高、中、低三个浓度水平, 按 1.9 中相应前处理方式处理后并稀释相应倍数, 用所建 ic-ELISA 方法分别检测组胺含量并计算添加回收率, 结果表明, 所建立的 ic-ELISA 方法回收率介于 98.9%~130.1%, 大多数回收率介于 80%~120%, 回收率偏高的一个原因是质量最好的水产其体内也含有一定量的组胺, 但一般在 10 mg/kg 以下, 根据此实际情况回收率能够满足样品检测的需要。

表 2 3 种样品的添加回收实验

Table 2 Recovery test of three kinds of samples

添加量/(μ g/g)	回收率/%		
	鱼	虾	贝
10	121.3	130.1	128.4
20	115.2	107.8	114.5
30	98.9	105.4	103.8

3 结论

高质量的抗体是建立免疫化学方法的基础, 而高质量的抗体取决于小分子半抗原的改造和人工抗原的合成。由于组胺分子量非常小且结构简单, 将其直接与载体蛋白偶联免疫得到的抗体效价较低、灵敏度较差, 因此制备针对组胺的高特异性抗体一直是相关科技工作者致力解决的难题。为了获得更高的灵敏度, 目前检测组胺的免疫检测方法都是通过测定组胺的衍生物来实现的, 因此对于衍生试剂的选择尤为重要, 它可能导致衍生时间变长、效率低、副产物多、难以纯化以及后续免疫获得抗体灵敏度低等问题。本文选择对硝基苯甲酰氯作为衍生试剂克服以上等问题, 衍生时间短且衍生剂与抗体并无交叉, 即使衍生剂添加过量也不会对检测结果造成影响, 本文使用的衍生剂为后续继续研究该项目的工作者提供一种借鉴。本研究完成了组胺多克隆抗体的制备和 ELISA 检测方法的建立, 所制备的抗体效价高, 特异性好。通过对抗原抗体反应浓度的优化, 标准曲线 0.1~8.1 μ g/L 范

围内线性关系好,最低检测能力为 0.1 $\mu\text{g/L}$ 。本方法可以用于水产品中组胺的筛查和定量。

参考文献

- [1] Latorre-Moratalla M L, Comas-Basté O, Bover-Cid S, et al. Tyramine and histamine risk assessment related to consumption of dry fermented sausages by the Spanish population [J]. *Food and Chemical Toxicology*, 2017, 99: 78-85
- [2] Verkhivker Y, Altman E. Influence parameters of storage on process of formation the histamine in fish and fish products [J]. *Journal of Water Resources and Ocean Science*, 2018, 7(1): 10-14
- [3] 林洪,周德庆,等.水产品安全性[M].北京:中国轻工业出版社,2005
- [4] Hungerford J M. Scombroid poisoning: a review [J]. *Toxicon*, 2010, 56(2): 231-243
- [5] Carelli D, Centonze D, Palermo C, et al. An interference free amperometric biosensor for the detection of biogenic amines in food products [J]. *Biosensors and Bioelectronics*. 2007, 23(5): 640-647
- [6] Keow C M, Abu B F, Salleh A B, et al. An amperometric biosensor for the rapid assessment of histamine level in tiger prawns spoilage [J]. *Food Chemistry*, 2007, 105(4):1636-1641
- [7] Perez S, Bartroli J, Fabregas E. Amperometric biosensor for the determination of histamine in fish samples [J]. *Food Chemistry*, 2013, 141(4): 4066-4072
- [8] 翟红蕾,杨贤庆,郝淑贤,等.生物胺高效液相色谱法测定条件的选择与优化[J].食品科学,2011,32(18):180-184
ZHAI Hong-lei, YANG Xian-qing, HAO Shu-xian, et al. Optimization of operating conditions for HPLC determination of biogenic amines [J]. *Food Science*, 2011, 32(18): 180-184
- [9] Tao Z H, Sato M, Han Y L, et al. A simple and rapid method for histamine analysis in fish and fishery products by TLC determination [J]. *Food Control*, 2011, 22(8): 1154-1157
- [10] Gui W J, Liu Y H, Wang C M, et al. Development of a direct competitive enzyme-linked immunosorbent assay for parathion residue in food samples [J]. *Analytical Biochemistry*, 2009, 393(1): 88-94
- [11] Morel A M, Delaage M A. Immunoanalysis of histamine through a novel chemical derivatization [J]. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 1988, 82(4): 646-654
- [12] Luo L, Xu Z L, Yang J Y, et al. Synthesis of novel haptens and development of an enzyme-linked immunosorbent assay for quantification of histamine in foods [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2014, 62(51): 12299-12308
- [13] 朱立平,陈学清.免疫学常用实验方法[M].北京:人民军医出版社,2000
- [14] Singh K V, Kau R J, Varshney G C, et al. Synthesis and characterization of hapten-protein conjugates for antibody production against small molecules [J]. *Bioconjugate Chemistry*, 2004, 15(1): 168-173
- [15] Gosling J P. *Immunoassays a Practical Approach* [M]. America: Oxford University Press, 2000
- [16] 张存政,刘贤进,余向阳,等.对硫磷半抗原改造及其免疫抗体[J].南京农业大学学报 2002,25(4):37-40
ZHANG Cun-zheng, LIU Xian-jin, YU Xiang-yang, et al. Hapten and antiserum for parathion immunoassay [J]. *Journal of Nanjing Agricultural University*, 2002, 25(4): 37-40
- [17] Aygün O, Schneider E, Scheuer R, et al. Comparison of ELISA and HPLC for the determination of histamine in cheese [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1999, 47(5): 1961-1964
- [18] Marcobal A, Polo M C, Martín-Alvarez P J, et al. Biogenic amine content of red Spanish wines: comparison of a direct ELISA and an HPLC method for the determination of histamine in wines [J]. *Food Research International*, 2005, 38(4): 387-394
- [19] Luo L, Yang JY, Xiao ZL, et al. A sensitivity-enhanced heterologous immunochromatographic assay based on a monoclonal antibody for the rapid detection of histamine in saury samples [J]. *RSC Advances*. 2015, 5(96): 78833-78840