

间接竞争酶联免疫法测定鱼体中的亚甲基蓝

黄宣运^{1,2,3,4}, 杨光昕^{1,2}, 孔 聪^{1,2}, 黄冬梅^{1,2}, 蔡友琼^{1,2*}

(1. 中国水产科学研究院东海水产研究所, 上海 200090; 2. 农业农村部水产品质量安全风险
评估实验室(上海), 上海 200090; 3. 上海海洋大学农业部鱼类营养与环境生态研究中心, 上海 201306;
4. 上海海洋大学水产科学国家级实验教学示范中心, 上海 201306)

摘 要: 目的 建立间接竞争酶联免疫法(indirect competitive enzyme linked immunesorbent assay, IC-ELISA)快速检测鱼体中亚甲基蓝的分析方法。**方法** 以牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)为载体蛋白, 以天青 C (Azure C)为半抗原, 采用戊二醛法合成免疫原 Azure C-BSA, 免疫新西兰大白兔, 制备多克隆抗体。通过对包被浓度、抗体浓度和二抗浓度等一系列实验条件的优化, 建立检测鱼体中亚甲基蓝的 IC-ELISA 法。**结果** 获得的多克隆抗体特异性强、灵敏度高, 在 5~400 ng/mL 范围内与抑制率之间线性良好, 线性回归方程为 $Y=0.3658X-0.1867$ ($r^2=0.9836$), 半抑制浓度(50% inhibition concentration, IC_{50})为 75.4 ng/mL, 检测限为 8.3 ng/mL, 样品添加回收率为 77.2%~79.3%, 相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)为 5.3%~8.1%。**结论** 该方法灵敏度高、特异性强, 可用于鱼体中亚甲基蓝的快速检测。**关键词:** 亚甲基蓝; 多克隆抗体; 酶联免疫法; 鱼

Detection of methylene blue in fish by indirect competitive enzyme linked immunosorbent assay

HUANG Xuan-Yun^{1,2,3,4}, YANG Guang-Xin^{1,2}, KONG Cong^{1,2},
HUANG Dong-Mei^{1,2}, CAI You-Qiong^{1,2*}

(1. East China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Shanghai 200090, China;
2. Laboratory of Quality & Safety Risk Assessment for Aquatic Products (Shanghai), Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Shanghai 200090, China; 3. Centre for Research on Environmental Ecology and Fish Nutrition of the Ministry of Agriculture, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 4. National Demonstration Center for Experimental Fisheries Science Education, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

ABSTRACT: Objective To develop a method for the determination of methylene blue in fish by indirect competitive enzyme linked immunosorbent assay (IC-ELISA). **Methods** Using bovine serum albumin (BSA) as a carrier protein, Azure C as a hapten, the immunogen Azure C-BSA by glutaraldehyde method was synthesized, then the New Zealand white rabbits were immunized to prepare polyclonal antibody. IC-ELISA method was developed for the determination of methylene blue in fish by optimizing the coating concentration, antibody concentration and secondary antibody concentration. **Results** The polyclonal antibody was highly specific and sensitive. The linear regression equation was $Y=0.3658X-0.1867$ ($r^2=0.9836$), with a good linearity with inhibition rate in the range of

基金项目: 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项项目(2015M05)

Fund: Supported by the Project of Special Research Fund for the National Non-Profit Institutes (2015M05)

*通讯作者: 蔡友琼, 研究员, 主要研究方向为水产品质量安全。E-mail: caiyouqiong@163.com

*Corresponding author: CAI You-Qiong, Professor, East Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Shanghai 200090, China. E-mail: caiyouqiong@163.com

5–400 ng/mL. The 50% inhibition concentration (IC_{50}) value and detection limit were 75.4 and 8.3 ng/mL, respectively. The recovery of sample addition was 77.2%–79.3%, with relative standard deviation (RSD) of 5.3%–8.1%. **Conclusion** This method has high sensitivity and specificity, which could be used for the rapid detection of methylene blue in fish.

KEY WORDS: methylene blue; polyclonal antibody; enzyme linked immunosorbent assay; fish

1 引言

亚甲基蓝(methylene blue, MB)是一种具有吩噻嗪结构的小分子化合物^[1], 分子量是 319.9 Da, 分子式为 $C_{16}H_{18}C_4N_3S$ ^[2]。亚甲基蓝具有氧化还原性, 能与微生物的酶系统竞争氢离子, 使其失活, 从而起到杀菌作用, 因此亚甲基蓝在水产养殖过程中被作为消毒剂使用^[3,4]。研究表明, 亚甲基蓝具有毒副作用^[5,6], 如任其使用、滥用, 最终会威胁消费者的身体健康。为保护消费者的身体健康, 日本规定动物食品中亚甲基蓝最高残留限量为 10 $\mu\text{g/kg}$ ^[7], 欧盟规定亚甲基蓝禁止用于动物食品生产过程。

液相色谱法^[8–10]和液相色谱-串联质谱法^[11,12]是检测动物源性食品中亚甲基蓝残留的最常用方法, 这些方法均需要专业的设备和操作人员, 在大面积推广使用上具有一定的局限性。与仪器方法相比, 免疫学分析方法不依赖大型的仪器设备, 同时具有简便、灵敏、快速等优点^[13,14], 对于水产品药物残留的初步筛查更具优势。目前, 基于免疫学原理开发的快速检测方法已经广泛应用于动物源性食品^[15,16]中药物残留的检测, 对于鱼体中亚甲基蓝的快速检测方法, 尚未见相关研究报道。

本研究以天青 C (Azure C)-牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)为免疫原, 免疫新西兰大白兔, 制备出了高灵敏度的亚甲基蓝兔源多克隆抗体, 建立了可用于检测鱼体中亚甲基蓝的间接竞争酶联免疫吸附分析方法(indirect competitive enzyme linked immunosorbent assay, IC-ELISA), 为后续进一步开发亚甲基蓝快速检测试剂盒提供了参考依据。

2 材料与方法

2.1 材料与试剂

亚甲基蓝(含量 $\geq 98.9\%$, USP 美国药典标准品公司); 天青 A (含量 $\geq 99.0\%$, 山东西亚化学工业有限公司); 天青 B (含量 $\geq 95.1\%$, 北京正翔科技有限公司); 天青 C (含量 $\geq 90\%$)、弗氏完全、不完全佐剂(美国 Sigma 公司); BSA、鸡卵血清白蛋白(ovalbumin, OVA)、辣根过氧化物酶标记免疫球蛋白(immunoglobulin G, IgG)结合物-羊抗兔 IgG (酶标二抗)、96 孔酶标板、50%戊二醛(glutaraldehyde, GA) [生工生物工程(上海)公司]; 纯种新西兰大白兔(上海交通大学农业与生物学院); 本研究所用其他生物试剂(分析纯及

以上纯度, 含量 $>98.0\%$, 国药集团化学试剂有限公司)。

2.2 仪器设备

Multifuge X3R 离心机、Multiskan MK3 酶标仪[赛默飞世尔(上海)仪器公司]; U4100 紫外分光光度计[株式会社日立制作所(日本)]。

2.3 亚甲基蓝人工抗原的合成

采用戊二醛法合成亚甲基蓝免疫原(Azure C-BSA)和包被原(Azure C-OVA)。称取 5.0 mg 天青 C 溶解于 2 mL 磷酸盐缓冲溶液(phosphate buffered solution, PBS) (0.01 mol/L, pH 7.2)中, 加入 50 μL 50% GA 反应 1 h, 逐滴加入 2 mL 的 BSA 溶液(10 mg/mL), 在室温磁力搅拌下, 反应 24 h。将溶液转移至处理好的透析袋中, 并以 PBS 溶液为透析液在 4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下透析 3 d, 每天更换透析液 3 次。透析后即亚甲基蓝人工抗原, 4 $^{\circ}\text{C}$ 保持备用。Azure C-OVA 的制备方法方法与 Azure C-BSA 一致, 将 BSA 替换成 OVA 即可。

2.4 亚甲基蓝人工抗原的表征

将天青 C、BSA、OVA、Azure C-BSA 和 Azure C-OVA 用 PBS 稀释至适当浓度后, 用紫外-可见分光光度计对其进行表征, 观察人工抗原是否偶联成功。

2.5 多克隆抗体制备

挑选 2 只健康的 6 周龄的新西兰大白兔(约 2 kg), 暂养 1 周后, 进行耳静脉采血(作阴性对照)。将 0.5 mL 2 mg/mL 的 Azure C-BSA 与 0.5 mL 弗氏佐剂混合后, 采用皮下多点注射的方式进行首次免疫。首次免疫后的 2 周, 进行第 2 次免疫, 免疫剂量为与首次相同, 将弗氏佐剂改为弗氏不完全佐剂。之后每隔 2 周免疫 1 次, 共免疫 6 次。从第 3 次免疫开始, 在免疫完成后的 1 周进行取血, 测定血清效价, 最后 1 次免疫后 1 周, 颈部动脉取血, 对血清进行分离纯。采样用硫酸铵盐沉淀法纯化多克隆抗体抗血清。

2.6 间接竞争 ELISA 法的建立

2.6.1 抗体效价测定

采用 ELISA 法测定多抗效价, 以上清液吸光度为阴性值吸光度 2 倍(即 $P/N \geq 2.0$)判断为阳性。将包被原稀释 1000 倍后加入酶标板中, 每孔 100 μL , 37 $^{\circ}\text{C}$ 包被 1 h。弃去废液, PBST (0.5% Tween-20)洗板 3 次(以下简称洗板), 拍干。每孔加入 200 μL 的 PBS (5%的牛奶)封闭过夜, 洗板, 拍干, 每孔加入 100 μL 倍比稀释抗体, 同时设置空白和阴

性对照, 37 °C, 1 h。洗板, 拍干后加入羊抗鼠酶标二抗 (1:2000) (P/P, 下同) 37 °C, 0.5 h, 洗板, 拍干。每孔添加新配置的四甲基联苯胺(tetramethylbenzidine, TMB)显色液 100 μ L, 37 °C, 10 min, 加入 2 mol/L H₂SO₄ 50 μ L 终止反应, 用酶标仪在 450 nm 读数。

2.6.2 ELISA 法工作条件的优化

采用棋盘法确定最优包被原和多克隆抗体工作浓度, 选择光密度值(optical density, OD)接近 1.0 的孔所用的抗原抗体浓度作为最佳工作浓度^[17]; 在确定最佳抗原抗体工作浓度的基础上, 将酶标二抗按照 1:100、1:500、1:1000、1:2000、1:4000 进行稀释, 选择 OD_{450 nm} 值在 1.0 左右的酶标二抗稀释倍数作为酶标二抗最佳反应浓度^[15]。

2.6.3 标准曲线的建立

用含 5% 甲醇的 PBS 将 MB 标准品梯度稀释(5、10、50、100、200、400 ng/mL), 在最佳实验条件下, 采用 IC-ELISA 法分析测定, 依据吸光度计算各浓度样品对抗体的抑制率。其中不添加抑制物的空白孔 OD 值为 A₀, 添加 MB 标准品的孔 OD 值为 A。每个 MB 标准品浓度进行 3 组平行实验, 取平均 OD 值计算抑制率(inhibition), 抑制率(%)=(1-A/A₀)×100%, 并以其为纵坐标, 以 MB 标准品浓度的对数为横坐标绘制标准曲线。依据线性回归方程计算半抑制浓度(50% inhibition concentration, IC₅₀)和检测下限浓度 IC₁₅, 即抑制率为 50% 和 15% 时所对应的标准品浓度。

2.6.4 抗体特异性测定

以亚甲基蓝代谢物天青 A、天青 B、天青 C、孔雀石绿和结晶紫等作为竞争物, 用间接竞争 ELISA 测定多抗对各竞争物的 IC₅₀。交叉反应率(cross reactivity, CR)为 MB 标准品的 IC₅₀ 与各竞争物的 IC₅₀ 的百分比。

2.6.5 样品回收率测定

在空白草鱼样品中, 按照 10、25 和 50 μ g/kg 的比例, 加入 MB 标准品, 参照余伟珏^[11]的方法对样品进行前处理, 复溶液为含有 5% 甲醇的 PBS。采用 IC-ELISA 方法检测加标样品中 MB 标准品的含量, 计算回收率。

3 结果与分析

3.1 亚甲基蓝人工抗原的鉴定

对天青 C、BSA、OVA 和人工抗原进行紫外图谱扫描鉴定, 结果如图 1 所示, 天青 C、BSA 和 OVA 的最大吸收峰分别在 286、278、279 nm 处, Azure C-BSA 和 Azure C-OVA 的最大吸收峰分别为 260 nm 和 266 nm, 与各自载体蛋白最大吸收峰相比较, 人工抗原的最大吸收峰发生了蓝移, 表明人工抗原偶联成功。

3.2 多克隆抗体鉴定

从第 3 次免疫开始, 用 ELISA 法测定血清效价。从图 2 可以看出, 随着免疫次数的增加, 抗体效价在不断升高,

最后一次免疫时, 1 号兔子血清效价为 32000, 2 号兔子血清效价为 64000。选取效价更高的 2 号兔子产生抗体进行后续实验。用紫外分光光度计测定^[17]抗体浓度为 10.2 mg/mL。

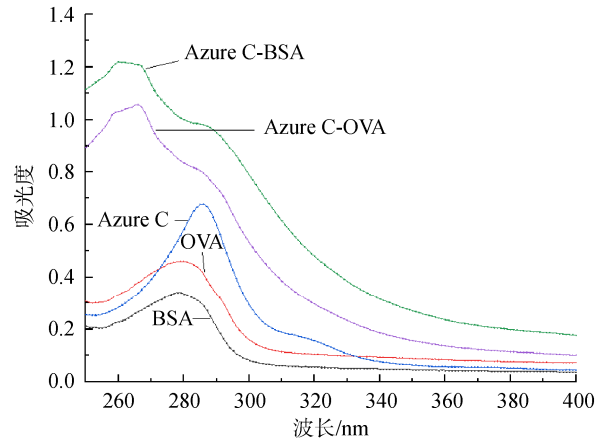


图1 人工抗原紫外扫描图谱

Fig.1 Ultraviolet (UV) scanning spectrum of antigen

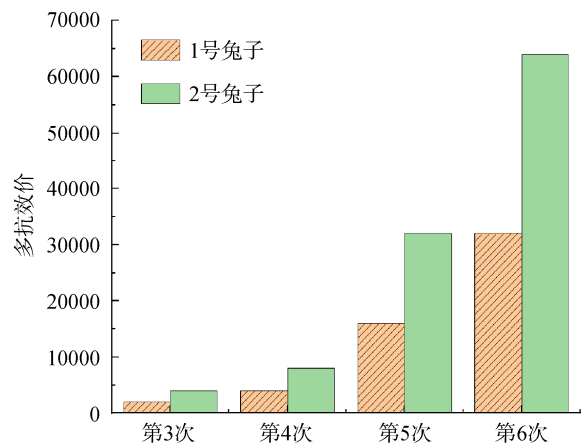


图2 多克隆抗体效价 (n=3)

Fig.2 The titer of polyclonal antibody (n=3)

3.3 间接竞争 ELISA 法条件优化及方法建立

包被原和抗体最佳工作浓度的优化结果如表 1 所示。选择 OD 值在 1.0 左右的包被原和抗体稀释度作为最佳工作浓度, 结果分别为 1:16000 和 1:8000。酶标二抗优化结果如图 3 所示, 随酶标二抗稀释倍数增加, OD₄₅₀ 值逐渐降低, 当二抗稀释 2000 倍时, OD₄₅₀ 值为 1.079, 因此, 选择该浓度为二抗最佳工作浓度。

3.4 间接竞争 ELISA 法标准曲线的建立

IC-ELISA 法检测 MB 的标准曲线如图 4 所示, 该法的线性范围为 5~400 ng/mL, 线性回归方程为 $Y=0.3658X-0.1867$ ($r^2=0.9836$), IC₅₀ 为 75.4 ng/mL, 最低检测限 IC₁₅ 为 8.3 ng/mL, 板内变异系数为 1.89%~7.92%, 表明该法具有良好的稳定性。

表 1 包被原与抗体工作浓度的筛选
Table 1 Screening of coating source and antibody working concentration

包被原稀释倍数	抗体稀释倍数						阴性	空白
	1000	2000	4000	8000	16000	32000		
1000	2.919	2.524	1.979	1.650	1.316	0.945	0.089	0.071
2000	3.041	2.276	1.798	1.428	0.908	0.579	0.092	0.082
4000	2.987	2.602	1.880	1.595	1.042	0.731	0.106	0.067
8000	2.835	2.589	1.746	1.225	0.938	0.519	0.115	0.058
16000	2.633	1.903	1.542	1.021	0.874	0.431	0.095	0.091
32000	2.263	1.797	1.458	0.987	0.654	0.321	0.093	0.076
64000	0.919	0.689	0.311	0.128	0.142	0.124	0.110	0.054
128000	0.541	0.224	0.121	0.130	0.087	0.092	0.109	0.073

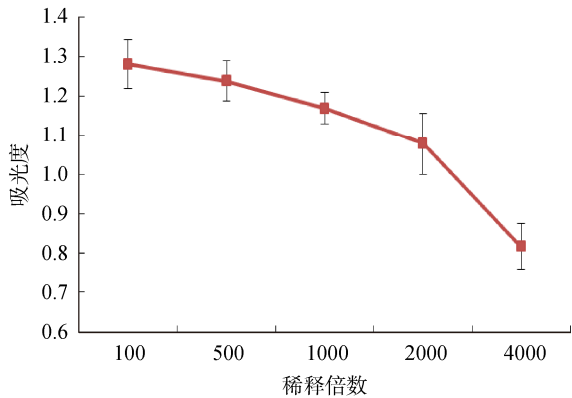


图3 酶标二抗浓度优化(n=3)

Fig.3 Optimization of enzyme-labeled secondary antibody concentration (n=3)

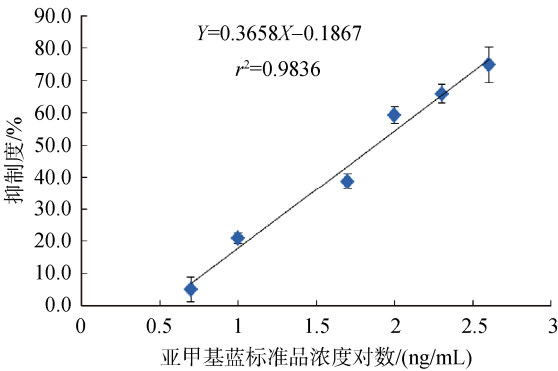


图4 亚甲基蓝IC-ELISA方法标准曲线(n=3)

Fig.4 The standard IC-ELISA inhibition curve of MB (n=3)

3.5 抗体特异性

制备的多克隆抗体与其他物质的交叉反应结果如表 2 所示: 抗体与目标物结构非常接近的天青 A、天青 B 和天青 C 的交叉反应率分别为 85.3%、95.0%和 107.1%, 与水产品中常见其他药物几乎不存在交叉反应(CR<0.01%)。由此说明, 该抗体不仅可以高特异性地识别目标物(亚甲基蓝), 而且能够识别与其结构相似的代谢物(天青 A、天青 B 和天青 C)。

表 2 多克隆抗体与类似物的交叉反应率
Table 2 Cross-reactivity of related analogues of polyclone antibody

竞争物	IC ₅₀ /(ng/mL)	交叉反应率/%
天青 A	88.4	85.3
天青 B	79.4	95.0
天青 C	70.4	107.1
孔雀石绿	>1000	<0.01
无色孔雀石绿	>1000	<0.01
亮绿	>1000	<0.01
隐性亮绿	>1000	<0.01
结晶紫	>1000	<0.01
隐性结晶紫	>1000	<0.01

3.6 样品回收率

在空白草鱼样品中添加系列浓度的 MB 标准品, 通过 IC-ELISA 法进行检测, 计算加标回收率, 检测结果如表 3。IC-ELISA 对样品的平均回收率在 77.2%~79.3%之间, RSD 为 5.3%~8.1%。

表 3 IC-ELISA 法检测样品中 MB 的回收率(n=3)
Table 3 Recoveries of MB detected by IC-ELISA spiked samples (n=3)

加标质量浓度/ (μg/kg)	检测值/ (μg/kg)	平均回收 率/%	相对标 准差/%
10	7.25	79.3	8.1
	8.18		
	7.31		
25	19.1	77.2	5.3
	18.4		
	20.4		
50	35.7	76.3	5.8
	39.8		
	39.3		

4 结论与讨论

本研究成功建立了 IC-ELISA 检测鱼体中亚甲基蓝的分析方法, 该方法在 5~400 ng/mL 范围内, 线性良好, 检测限为 8.3 ng/mL, 样品添加回收率为 77.2%~79.3%之间, RSD 为 5.3%~8.1%。本方法特异性强, 且具有较好的准确度和灵敏度, 可用于鱼体中亚甲基蓝的快速检测。

参考文献

- [1] 崔瑾, 杨洪生, 章建浩, 等. 超高效液相色谱-电喷雾串联质谱法测定水产品中亚甲基蓝及代谢物[J]. 南方水产科学, 2013, 9(3): 67-73.
Cui J, Yang HS, Zhang JH, *et al.* Determination of methylene blue and its metabolites in aquaculture products by UPLC/ESI-MS/MS [J]. South Chin Fish Sci, 2013, 9(3): 67-73.
- [2] 杨方, 刘正才, 胡小钟, 等. 噻嗪类染料在动物体内的代谢及检测研究进展[J]. 药物分析杂志, 2008, 28(8): 1395-1400.
Yang F, Liu ZC, Hu XZ, *et al.* Progress in study of determination thionine dyes and metabolize of animal *in vitro* [J]. Chin J Pharm Anal, 2008, 28(8): 1395-1400.
- [3] 杨卫军, 张静余, 严敏鸣. 亚甲基蓝检测方法及其代谢动力学研究进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2018, 9(10): 2419-2425.
Yang WJ, Zhang JY, Yan MM. Advances in the detection methods and metabolic kinetics of methylene blue [J]. J Food Saf Qual, 2018, 9(10): 2419-2425.
- [4] 龙举, 李子孟, 喻亮, 等. 高效液相色谱法测定养殖水体中的亚甲基蓝[J]. 安徽农业科学, 2015, 43(24): 5-6.
Long J, Li ZM, Yu L, *et al.* Determination of methylene blue in aquaculture water by HPLC [J]. J Anhui Agric Sci, 2015, 43(24): 5-6.
- [5] Wang YL, Huang XY, Lv XM, *et al.* The metabolism of methylene blue and its derivatives in Japanese eel (*Anguilla Japonica*) [J]. J Ocean Univ China, 2020, 19(3): 653-658.
- [6] 梁楠, 胡鲲, 杨先乐. 亚甲基蓝代谢及生物毒性研究概况[J]. 渔业致富指南, 2016, (10): 17-19.
Liang N, Hu K, Yang XL. Overview of metabolism of methylene blue and its biological toxicity [J]. Fish Guide Rich, 2016, (10): 17-19.
- [7] Xu JZ, Dai L, Wu B, *et al.* Determination of methylene blue residues in aquatic products by liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. J Sep Sci, 2009, 32: 4193-4199.
- [8] 王媛, 于慧娟, 钱蓓蕾, 等. 液相色谱法测定水产品中亚甲基蓝残留量[J]. 分析试验室, 2013, (1): 90-94.
Wang Y, Yu HJ, Qian BL, *et al.* Determination of methylene blue residues in aquatic products by liquid chromatography [J]. Chin J Anal Lab, 2013, (1): 90-94.
- [9] 吴艳兵, 王建华, 李广领. 高效液相色谱法检测水产品中亚甲基蓝的残留[J]. 湖南农业科学, 2008, (3): 165-167.
Wu YB, Wang JH, Li GL. Determination of methylene blue residue in aquatic products by HPLC [J]. Hunan Agric Sci, 2008, (3): 165-167.
- [10] 宫向红, 徐英江, 任传博, 等. HPLC 测定水产品中孔雀石绿、亚甲基蓝、结晶紫及其代谢物的残留量[J]. 食品科学, 2012, 33(4): 144-147.
Gong XH, Xu YJ, Ren CB, *et al.* Simultaneous determination of malachite

green, methylene blue, crystal violet as well as their metabolites in aquatic products by high performance liquid chromatography [J]. Food Sci, 2012, 33(4): 144-147.

- [11] 余玮玥, 黄冬梅, 史永富, 等. 液相色谱-串联质谱法测定水产品中亮绿、亚甲基蓝及其代谢物残留量[J]. 分析测试学报, 2019, 38(1): 58-63.
Yu WY, Huang DM, Shi YF, *et al.* Determination of brilliant green, methylene blue and their metabolites in aquatic products by liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. J Instrum Anal, 2019, 38(1): 58-63.
- [12] 侯建波, 谢文, 祝泽龙, 等. 液相色谱-串联质谱法同时测定水产品中三苯甲烷类与噻嗪类染料及其代谢产物[J]. 理化检验-化学分册, 2015, 51(3): 403-408.
Hou JB, Xie W, Zhu ZL, *et al.* Determination of triphenylmethane, thiazide and their metabolites residues in aquatic products by LC-MS/MS [J]. Phys Test Chem Anal Part B, 2015, 51(3): 403-408.
- [13] Peng DP, Wei W, Pan YH, *et al.* Preparation of a monoclonal antibody against amantadine and rimantadine and development of an indirect competitive enzyme-linked immunosorbent assay for detecting the same in chicken muscle and liver [J]. J Pharm Biomed Anal, 2017, (133): 56-63.
- [14] Oliveri CG, Copat C, Wang ZH, *et al.* Determination of illegal antimicrobials in aquaculture feed and fish: an ELISA study [J]. Food Control, 2015, (50): 937-941.
- [15] 王敏, 王玮, 吕青骏, 等. 间接竞争 ELISA 方法快速检测猪肉组织中的氯丙嗪[J]. 南京农业大学学报, 2020, 43(1): 172-177.
Wang M, Wang W, Lv QQ, *et al.* Rapid detection of chlorpromazine in pork tissue by indirect competitive ELISA [J]. J Nanjing Agric Univ, 2020, 43(1): 172-177.
- [16] Han XY, Sheng F, Kong DX, *et al.* Broad-spectrum monoclonal antibody and a sensitive multi-residue indirect competitive enzyme-linked immunosorbent assay for the antibacterial synergists in samples of animal origin [J]. Food Chem, 2019, (280): 20-26.
- [17] 李冰莲, 杨光听, 谷麟. 酶联免疫法检测海洋贝类中的荧蒽[J]. 分析试验室, 2019, 38(2): 196-201.
Li BL, Yang GX, Gu L. Detection of fluoranthene in marine shellfish by ELISA [J]. Chin J Anal Lab, 2019, 38(2): 196-201.

(责任编辑: 满朝坤)

作者简介



黄宣运, 助理研究员, 主要研究方向为水产品质量安全。

E-mail: hxyseven@163.com



蔡友琼, 研究员, 主要研究方向为水产品质量安全。

E-mail: caiyouqiong@163.com