

DOI: 10.3969/j.issn.2095-1787.2022.02.014

2 种石房蛤毒素完全抗原交联方法的比较及多克隆抗体的制备

陈睿, 高焯宏, 赵学楠, 杨敏仪, 吴惠娟, 王荣智, 汪世华*
生物农药与化学生物学教育部重点实验室, 福建省病原真菌与真菌毒素重点实验室,
福建农林大学生命科学学院, 福建 福州 350002

摘要:【目的】探究石房蛤毒素(STX)完全抗原制备方法和 STX 多克隆抗体免疫方案。【方法】通过碳二亚胺法(EDC)和高碘酸盐法(periodate reaction)2 种交联方法,将小分子石房蛤毒素与牛血清白蛋白(BSA)、鸡卵清蛋白(OVA)和孔血蓝蛋白(KLH)分别进行交联,制备了 6 种形式 STX 完全抗原,并对交联物进行琼脂糖凝胶电泳鉴定和紫外吸收峰迁移变化鉴定。分别将 EDC 法和高碘酸盐法交联的 STX-BSA、STX-KLH 4 种完全抗原作为免疫原,对 Balb/c 小鼠进行免疫,获得 STX 多克隆抗体。通过间接 ELISA 法,对不同方法制备的多克隆抗体进行分析比较。【结果】在石房蛤毒素完全抗原的制备中,在交联方法的选择上,EDC 法较高碘酸盐法更具优势;而在免疫原的选择上,STX-BSA 完全抗原效果最好。【结论】本研究探究了 2 种制备 STX 完全抗原的方法,为今后多克隆抗体生产以及特异性单克隆抗体筛选提供数据支撑。

关键词: 贝类毒素; STX 毒素; 蛋白交联; 完全抗原; ELISA



开放科学标识码
(OSID 码)

Comparison of two complete antigen conjugation methods for saxitoxin and preparation of polyclonal antibody

CHEN Rui, GAO Yehong, ZHAO Xuenan, YANG Minyi, WU Huijuan, WANG Rongzhi, WANG Shihua*
Key Laboratory of Biopesticide and Chemical Biology of Education Ministry, Key Laboratory of Pathogenic Fungi and Mycotoxins of Fujian Province, School of Life Sciences, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou, Fujian 350002, China

Abstract:【Aim】In order to explore the preparation method of complete antigen of saxitoxin (STX) and the immunization project of STX polyclonal antibody.【Method】We conjugated small molecule STX with bovine serum albumin (BSA) and porocyclocyanin (KLH) by carbodiimide method (EDC) and periodate reaction, respectively. Six forms of STX complete antigens were prepared, and the resulted products were identified by agarose gel electrophoresis and UV spectra. Balb/c mice were immunized with STX-BSA and STX-KLH crosslinked by EDC and periodate reaction to induce polyclonal antibodies against STX, and then the titer of the obtained polyclonal antibodies by different methods were analyzed and compared by indirect ELISA.【Result】The EDC method is superior to periodate reaction in the selection of conjugation method in the preparation of complete antigen of STX; in the selection of immunogens, STX-BSA complete antigen is the best.【Conclusion】This study explored two methods to prepare STX complete antigens, which provided datas support for the production of polyclonal antibodies and the screening of specific monoclonal antibodies in the future.

Key words: shellfish toxin; STX; conjugates; complete antigen; ELISA

石房蛤毒素(saxitoxin, STX)是一种毒素极强的胍胺类神经毒素,为麻痹性贝类毒素(paralytic shellfish position)的主要成分之一,该毒素主要来源于海水或淡水中的膝沟藻、海洋甲藻、淡水蓝藻等有害浮游生物,通过食物链积累于蛤类、贝类以及蟹类等水产中,哺乳动物食用了这些被污染后的水

产后,会引发呼吸麻痹、死亡等一系列中毒反应(李淑冰等,2000)。STX 对小鼠的半致死剂量 LD_{50} 为 $10 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ (陈常英等,1994)。STX 在世界分布广泛,在我国的山东、福建、广东等地均发生过人类误食 STX 污染的水产品后引发的中毒事件(孔凡洲等,2007)。因此,渔业生产中亟需一种简便、快速、灵敏的 STX 检测方法。

目前,国际上用于检测贝类毒素的方法主要为理化分析法和生物测定法。理化分析法包括高效液相色谱法(high performance liquid chromatography, HPLC)、液相色谱(liquid chromatograph-mass spectrometer, LC-MS)、分光光度法、免疫化学法。其中,较常用的 HPLC 能精确测定毒素的种类和含量,但样品前处理较繁琐且需要昂贵的仪器(马燕玲,2013)。生物测定法包括小鼠生物测定法(mouse bioassay, MBA)、酶联免疫吸附测定法(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)、家蝇生物分析法(house-fly bioassay)、蝗虫生物分析法(locust bioassay, LBA)、神经细胞生物分析法(neuronal bioassay)等。其中, MBA 是国际上较通用的方法,该方法方便、快捷且成本低廉,但测定结果受小鼠个体的影响较大,误差大、重现性差,不能分析样品中的具体组分;ELISA 简便、快速、灵敏、成本低,同 MBA 及 HPLC 相比,更快速经济,以满足大批量样品快速筛查的需要(Zhi *et al.*, 2018)。目前,我国对 STX 的研究较少。本试验通过 2 种不同的方法,使用微量的 STX 制备了多种 STX 多克隆抗体,并采用酶联免疫分析对其效价进行比较,以期商业化生产多克隆抗体提供数据支撑。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试验动物 Balb/c 小鼠(雌性 6 周龄)购买于吴氏实验动物贸易有限公司。

1.1.2 试剂 STX 毒素标准品由台湾 Algalchem 公司提取,鸡卵清白蛋白(ovalbumin, OVA)购于源叶生物公司,牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)购于翊圣生物公司,钥孔血蓝蛋白(keyhole limpet hemocyanin, KLH)、高碘酸钠和硼氢化钠购于 Macklin 公司。弗氏完全佐剂(complete freunds adjuvant, CFA)和弗氏不完全佐剂(incomplete freunds adjuvant, IFA)购于 SIGMA 公司。N-羟基琥珀

酰亚胺(N-hydroxysuccinimide, NHS)购于 Aladdin 公司。1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(1-(3-Dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimide hydrochloride, EDC)购于梯希爱(上海)化成工业发展有限公司,辣根过氧化物标记的山羊抗鼠 IgG 购于 Bioss 公司。

1.2 方法

1.2.1 完全抗原的制备及分析 EDC 法:将 $0.09 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NHS 和 $0.09 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ EDC 分别加入装有 $450 \mu\text{L}$ 二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)的 1.5 mL EP 管中,分别制备 3 管,用移液枪吹打溶解,并用锡纸包裹管身,分别加入 $50 \mu\text{L}$ STX 标准品,固定于 25°C 恒温摇床中,转速 $120 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 混合 12 h。取出置于常温离心机中 $12000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min,取上清备用。将 20 mg 的 OVA、BSA、KLH 蛋白分别溶于 10 mL ddH₂O 中(pH6.5),并用 NaHCO₃ 缓冲液($0.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, pH9.6)将 pH 调至 7,最后每种蛋白取 5 mL 分装 3 个 10 mL EP 管中备用。将上清分别缓慢加入制备好的 3 种蛋白溶液中,固定于 25°C 恒温摇床中,转速 $120 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 振荡 12 h,取上清,按顺序用 $0.05 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 (NH₄)₂CO₃ 透析 4 h, $0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 (NH₄)₂CO₃ 透析过夜,再换成新的 $0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 (NH₄)₂CO₃ 透析 4 h,最后 ddH₂O 透析 4 h,用 PEG20000 置于冰上浓缩至 $1 \sim 2 \text{ mL}$,置于 -20°C 保存(Mei *et al.*, 2019)。用琼脂糖凝胶电泳和紫外分光光度计分析。

高碘酸盐法:将 5 mg 的 OVA、BSA、KLH 蛋白分别溶于 1 mL ddH₂O 中,用 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的乙酸将 pH 调至 4.4。将含有 6.9 mg 高碘酸钠的 0.3 mL ddH₂O 分别逐滴加入到配置好的蛋白溶液中,避光条件下反应 1 h,接着用乙酸钠缓冲液($0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, pH4.4)透析,放置备用。将 $28 \mu\text{L}$ 的 STX 加入到 $200 \mu\text{L}$ 乙酸溶液($0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$)中,混匀,分别制备 3 管,再分别加入到活化后的蛋白溶液中。用 NaHCO₃ 缓冲液($0.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, pH9.6)将 pH 调至 7.5。并在 20°C 条件下水浴 1 h,分别加入 0.1 mL NaBH₄($4 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)。最后在 4°C 下孵育 20 min,并分别用 PBS 透析 3 次,每次 4 h,再用 ddH₂O 透析 4 h,用 PEG20000 置于冰上浓缩至 $1 \sim 2 \text{ mL}$,置于 -20°C 保存(Christine *et al.*, 1995)。用琼脂糖凝胶电泳和紫外分光光度计分析。

1.2.2 试验小鼠的免疫 分别以 EDC 法和高碘酸

盐法制备的 STX-BSA、STX-KLH 为免疫原,分别免疫 6 周龄健康的 Balb/c 雌性小鼠,共免疫 3 组。首次免疫,将 200 μg 的免疫原用 PBS 稀释至 500 μL ,与等体积 500 μL 的弗式完全佐剂混合,并用乳化仪乳化成乳浊液,在小鼠皮下多点注射(刘帅平等,2011)。之后每隔 14 d,将 100 μg 免疫原用 400 μL 的 PBS 稀释,再与等体积 500 μL 的弗式不完全佐剂混合,并用乳化仪乳化成乳浊液,在小鼠皮下多点注射。

1.2.3 多克隆血清的获取 间隔 1~2 个免疫周期,用扎取小鼠尾部静脉血管的方法,取小鼠尾部静脉血进行血清效价测定。待小鼠免疫 7 次后,摘小鼠眼球取血,取血完毕后脱臼处死(王月英等,2007)。取得的血液置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温水浴锅中 30 min,再于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冷冻离心机中,12000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 30 min。取上层血清,加入体积甘油混匀,置于-20 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

1.2.4 ELISA 检测多克隆抗体的效价 分别将 EDC 法和高碘酸盐法制备的 STX-OVA 为检测原,用包被缓冲液(pH9.6)稀释到 10 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$,在高效价的 96 孔酶标板上每孔加入 100 μL ,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 2 h。取出弃掉残液,拍干,每孔加入 200 μL PBSM 封闭液,4 $^{\circ}\text{C}$ 封闭过夜。取出弃掉封闭液,用 PBS 洗涤 3 次,拍干,再用 PBST 洗涤 3 次,拍干,放置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱备用。将多抗血清与 PBSM 按照 1:500、1:1000、1:2000、1:4000、1:8000、1:16000、1:32000、1:64000 的比例稀释混匀,每孔 100 μL 按顺序加入包有相应检测原的酶标孔中,将 PBSM 加入 2 孔包有检测原的酶标孔中为阴性对照。37 $^{\circ}\text{C}$

孵育 1 h,取出弃掉残液,洗板操作同上,再加入稀释比为 1:8000 的 HRP 标记的山羊抗鼠 IgG 为二抗,每孔 100 μL ,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h,取出弃掉残液,洗板操作同上,加入 TMB 显色液,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 15 min,加入 2 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 H_2SO_4 终止液,每孔 50 μL (Cai *et al.*,2021)。用酶标仪测 $D_{450\text{ nm}}$ 的值,收集数据并分析。

1.2.5 2 种抗原制备方法所制备出的抗原的差异比较 分别将 EDC 法和高碘酸盐法制备的 STX-OVA 用包被缓冲液(pH9.6)稀释到 10 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 作为包被原,在高效价的 96 孔酶标板上每孔加入 100 μL ,其后的操作同 1.2.4。

2 结果与分析

2.1 完全抗原的制备及分析

2.1.1 EDC 法制备完全抗原与分析 利用 EDC 法制备 STX-BSA、STX-OVA 和 STX-KLH。将 BSA 与 STX-BSA 完全抗原和 OVA 与 STX-OVA 分别进行 0.8%琼脂糖凝胶电泳和紫外光谱扫描分析。在琼脂糖凝胶电泳中,STX-BSA 完全抗原与 BSA 蛋白相比,由于其分子质量更大,迁移率较低,说明成功制备了 STX-BSA 完全抗原。通过紫外分光光度计检测 STX、BSA 和 STX-BSA 完全抗原的光谱,STX-BSA 完全抗原的波峰同 BSA 和 STX 的波峰相比,出现红移,佐证了 STX-BSA 完全抗原的成功制备(图 1A、B)。图 1C、D 中,STX-OVA 完全抗原的迁移率比 OVA 蛋白低,且 STX-OVA 完全抗原的波峰同 OVA 和 STX 的波峰相比,出现红移,说明 STX-OVA 成功制备。用同样的方法也成功制备了 STX-KLH 的交联物。

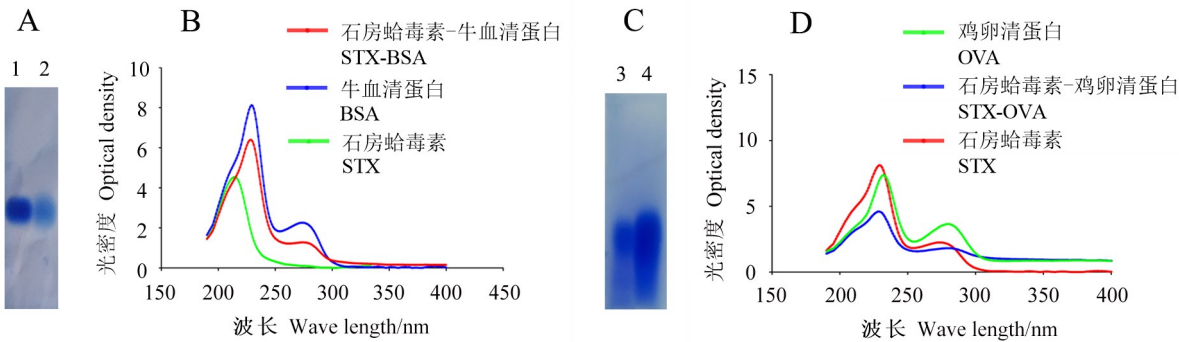


图 1 EDC 法交联 STX 的琼脂糖凝胶电泳和紫外光谱扫描

Fig.1 Agrose gel electrophoresis and UV-vis analysis of STX conjugates by EDC

A:泳道 1 为 BSA,泳道 2 为 STX-BSA 交联产物;B:STX、BSA 和 STX-BSA 交联产物紫外光谱扫描图;
C:泳道 3 为 OVA,泳道 4 为 STX-OVA 交联产物;D:STX、OVA 和 STX-OVA 交联产物紫外光谱扫描图。
A: Lane 1 is BSA protein, lane 2 is STX-BSA conjugates; B: UV-vis analysis of STX, BSA and STX-BSA conjugate;
C: Lane 3 is OVA protein, lane 4 is STX-OVA conjugates; D: UV-vis analysis of STX, OVA and STX-OVA conjugate.

2.1.2 高碘酸盐法制备完全抗原与分析 利用高碘酸盐法制备 STX-BSA、STX-OVA 和 STX-KLH。将 BSA 与 STX-BSA 完全抗原分别和 OVA 与 STX-OVA 进行 0.8%琼脂糖凝胶电泳和紫外光谱扫描分析。在琼脂糖凝胶电泳中,STX-BSA 完全抗原与 BSA 蛋白相比,迁移率较低,说明成功制备 STX-BSA 完全抗原。通过紫外光谱扫描检测 STX、BSA

和 STX-BSA 完全抗原的光谱,STX-BSA 完全抗原的波峰同 BSA 和 STX 的波峰相比,出现红移,说明 STX-BSA 完全抗原的成功制备(图 2A、B)。图 2C、D 中,STX-OVA 完全抗原的迁移率均比相应的蛋白载体低,且波峰均出现红移,说明 STX-OVA 完全抗原的成功制备。用同样方法也成功制备了 STX-KLH 的交联物。

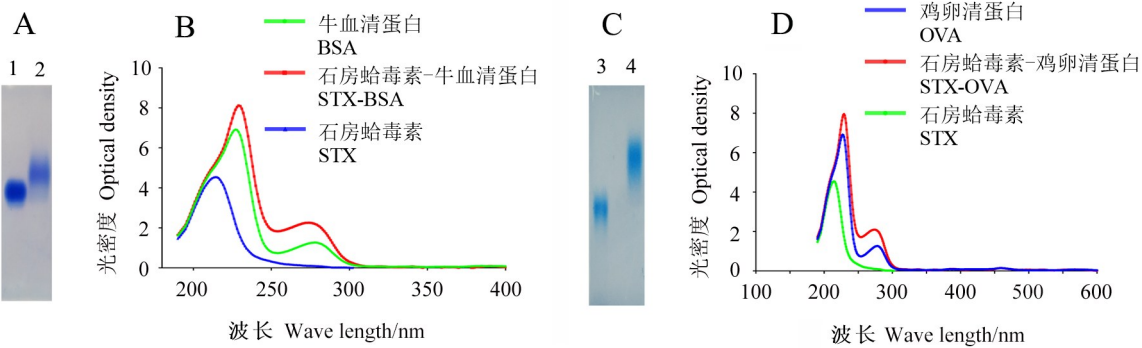


图 2 高碘酸盐法交联 STX 的琼脂糖凝胶电泳和紫外光谱扫描

Fig.2 Agrosegel electrophoresis and UV-vis analysis of STX conjugates by periodate reaction

A:泳道 1 为 BSA,泳道 2 为 STX-BSA 交联产物;B:STX、BSA 和 STX-BSA 交联产物紫外光谱扫描图;
C:泳道 3 为 OVA,泳道 4 为 STX-OVA 交联产物;D:STX、OVA 和 STX-OVA 交联产物紫外光谱扫描图。
A: Lane 1 is BSA protein, lane 2 is STX-BSA conjugates; B: UV-vis analysis of STX, BSA and STX-BSA conjugate;
C: Lane 3 is OVA protein. Lane 4 is STX-OVA conjugates; D: UV-vis analysis of STX, OVA and STX-OVA conjugate.

2.2 多克隆抗体的效价测定

2.2.1 EDC 法制备的完全抗原的效价测定 以 STX-BSA 和 STX-KLH 为免疫原,分别皮下免疫 2 只小鼠,得到多抗血清,进行 ELISA 试验,用酶标仪测效价。以 STX-BSA 为免疫原免疫小鼠,得血清效价图 3A,1 号小鼠的效价最为明显,血清滴度为 1 : 1000 时, $D_{450\text{ nm}}$ 为 3.316;血清滴度为 1 : 8000 时, $D_{450\text{ nm}}$ 为 0.06,获得较高效价。而 2 号小鼠在各血

清滴度下, $D_{450\text{ nm}}$ 均为 0.050 左右,故以 EDC 法制备的 STX-BSA 为免疫原进行皮下免疫的 2 只小鼠中,仅有 1 号小鼠能发生特异性免疫应答。以 STX-KLH 为免疫原免疫小鼠得血清效价图 3B,1 号小鼠与 2 号小鼠相比,能显示出效价梯度,但血清滴度为 1 : 500 时, $D_{450\text{ nm}}$ 仅为 0.596,说明用 EDC 法制备的 STX-KLH 的完全抗原的效果并不理想。

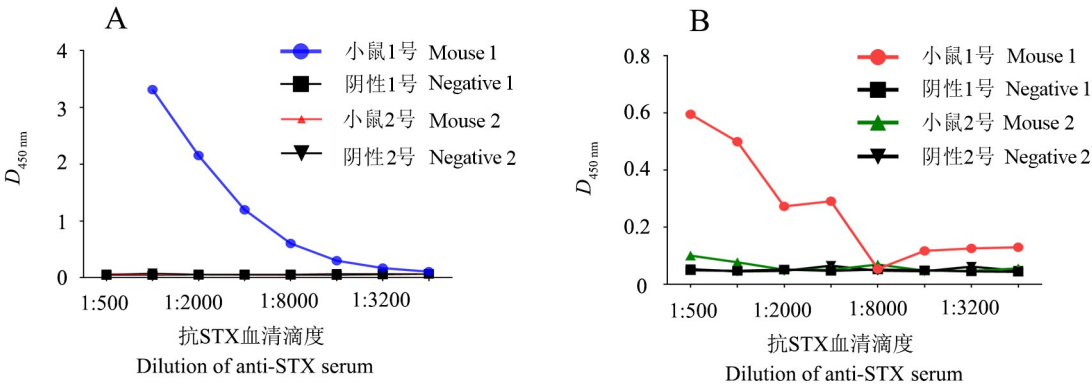


图 3 EDC 法制备的抗原免疫小鼠血清效价测定

Fig.3 The titer assay of anti-serum with EDC method

A:以 STX-BSA 为免疫原;B:以 STX-KLH 为免疫原。
A: Immunogen is STX-BSA; B: Immunogen is STX-KLH.

2.2.2 高碘酸盐法制备的完全抗原的效价测定

分别以 STX-BSA 和 STX-KLH 为免疫原,皮下免疫 3 只小鼠,用 STX-OVA 作为检测原免疫小鼠得到多抗血清进行 ELISA 试验,用酶标仪测效价。以 STX-BSA 为免疫原免疫小鼠可得得血清效价图 4A, 1 号和 2 号小鼠均随着血清滴度增加表现出明显的效价梯度:1 号小鼠在血清滴度为 1 : 500 时, $D_{450\text{ nm}}$ 为 0.882,获得 较高效价;2 号小鼠在血清滴度为 1 : 500 时, $D_{450\text{ nm}}$ 为 0.452,血清滴度为 1 : 8000 时, $D_{450\text{ nm}}$ 为 0.284,获得效价。3 号小鼠在各血清滴度下, $D_{450\text{ nm}}$ 均为 0.050 左右,说明 3 号小鼠没有发生特异性免疫反应。故以高碘酸盐法交联 STX-BSA

为免疫原进行皮下免疫的 3 只小鼠中,1 号和 2 号小鼠均能发生特异性免疫应答,且 1 号小鼠多抗血清的效价较高。以 STX-KLH 为免疫原免疫小鼠得血清效价图 4B,3 只小鼠均随着血清滴度增加表现出明显的效价梯度:1 号小鼠在血清滴度为 1 : 500 倍时, $D_{450\text{ nm}}$ 为 1.856,获得较高效价;2 号小鼠在血清滴度为 1 : 500 时, $D_{450\text{ nm}}$ 为 0.990,获得效价;3 号小鼠在血清滴度为 1 : 500 时, $D_{450\text{ nm}}$ 为 0.488,在血清滴度为 1:8000 时, $D_{450\text{ nm}}$ 为 0.076,具有效价。故以高碘酸盐法交联 STX-KLH 为免疫原进行皮下免疫的 3 只小鼠中,3 只小鼠都发生特异性免疫应答,其中 1 号小鼠多抗血清的效价较高。

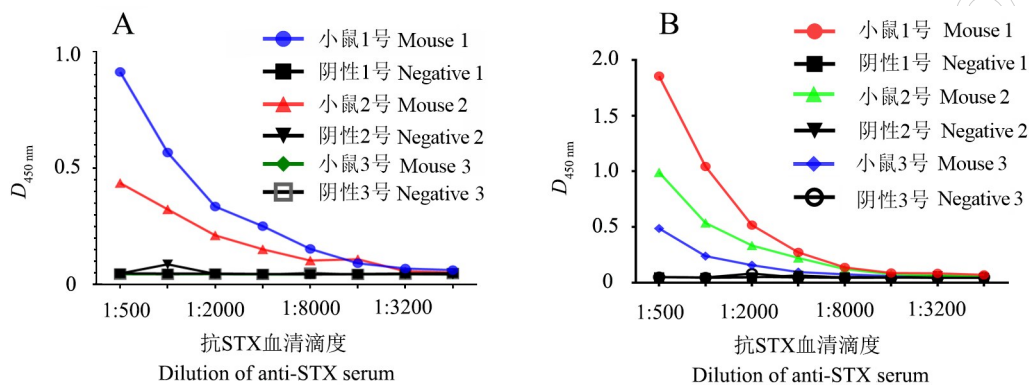


图 4 高碘酸盐法制备的抗原免疫小鼠血清效价测定

Fig.4 The titer assay of anti-serum with periodate reaction

A:以 STX-BSA 为免疫原;B:以 STX-KLH 为免疫原。

A: Immunogen is STX-BSA; B: Immunogen is STX-KLH.

2.2.3 2 种制备方法所制备出的免疫原的差异

由上述试验结果可知,EDC 法和高碘酸盐法交联的 STX-BSA 和 STX-KLH 完全抗原均可作为免疫原引起小鼠的特异性免疫应答。比较这 2 种方法制备的完全抗原免疫小鼠后得到的多克隆抗体血清的效价差异,结果见表 1。表中为免疫不同完全抗原后的 4 组小鼠与不同方法制备出的检测原进行 ELISA 试验,选取效价最高的 1 只进行分析,比对 $D_{450\text{ nm}}$ 为 1 时的多克隆抗体血清的稀释度。用 EDC 法交联的 STX-BSA 免疫小鼠获得多克隆抗体血清,与用 EDC 法交联的 STX-OVA 为检测原进行间接 ELISA 试验,测得 $D_{450\text{ nm}}$ 为 1 时的抗体稀释度最高,为 4×10^3 。此外,多克隆抗体血清对于不同交联方法制备出的检测原 STX-OVA 对多克隆抗体血清的检测效果相似,证明 EDC 法和高碘酸盐法制备出的 STX-OVA 交联产物可作为通用的检测原混用,同时证明这 2 种方法均能保留 STX 的主要结构。

表 1 不同的多克隆抗体对于检测原的效价比较			
Table 1 Comparison of different polyclonal antibodies to titer of detective antigen			
免疫原 Immunogen	交联方法 Immunization methods	检测原 STX-OVA Detection antigen STX-OVA	
		EDC 法 EDC mehod	高碘酸盐法 Periodate reaction
STX-BSA	EDC 法	4×10^3	4×10^3
	EDC mehod		
	高碘酸盐法 Periodate reaction	5×10^2	—
STX-KLH	EDC 法	—	—
	EDC mehod		
	高碘酸盐法 Periodate reaction	10^3	10^3

—: $D_{450\text{ nm}}$ 最高值未到 1.0。
—: The maximum value of $D_{450\text{ nm}}$ is less than 1.0.

3 讨论

STX 为小分子半抗原,分子质量为 299 ku,在免疫反应中没有免疫原性,需要与分子质量大的载体蛋白交联制备成完全抗原才能进行免疫。常用

的载体蛋白有 OVA、BSA 和 KLH 等。本试验仅用了少量的 STX 通过 2 种交联方法成功制备了 6 种 STX 的完全抗原,并通过免疫小鼠获得抗 STX 的多克隆抗体,对其进行了间接 ELISA 试验,比较了不同免疫原制备的多克隆抗体的差异。对比 2 种交联方法,EDC 法先是通过 EDC 活化 STX 上的酰胺基团,接着 NHS 替换了活化后的酰胺基团,最让其与蛋白载体产生缩合反应,从而交联。高碘酸盐法中高碘酸钠为氧化剂,先将 STX 上的惰性羟基氧化为醛基形成中间产物,再通过硼氢化钠还原剂,除去多余高碘酸钠的同时,让中间产物与蛋白交联。2 种方法的交联产物虽然在结构上略有差别,但制备的完全抗原均具有免疫原性,证明这 2 种交联方法并未影响 STX 的结构。通过对比交联出的免疫原所制备出的多克隆抗血清的效价发现,EDC 法更具优势。

对比不同的蛋白载体,BSA 来源于牛血清,为一种可溶性良好且稳定的一种蛋白载体。KLH 来源于软体动物,与哺乳动物的亲缘性较远,试验发现,2 种交联方法均能让 STX 与 BSA 载体蛋白交联,从而使免疫小鼠产生免疫应答,但是从免疫效果来看,与 BSA 交联的完全抗原能产生更高的效价,因此,BSA 更适合作为 STX 的蛋白载体。

本试验的结果表明,在石房蛤毒素完全抗原的制备中,在交联方法的选择上,EDC 法较高碘酸盐法更具优势;而在免疫原的选择上,STX-BSA 完全抗原效果最好。该结果可为商业化批量生产 STX 多克隆抗体提供一定的数据支撑。

参考文献

刘帅帅,朱兰兰,周德庆,2011. 石房蛤毒素酶联免疫吸附

测定方法的研究. *农产品加工* (9): 12-14.

陈常英,潘心富,孙悦光,陈春华,1994. 石房蛤毒素 (STX) 衍生的电子结构与毒性-结构关系研究. *化学学报*, 52(5): 441-447.

李淑冰,李惠珍,许旭萍,2000. 贝毒素的研究现状及产生源探究. *食品科学*, 21(5): 1460-1464.

孔凡洲,徐子钧,于仁成,李钦亮,2007. 黄渤海海域贝类麻痹性贝毒的检测与分析. *中国海洋大学学报(自然科学版)*, 37(2): 305-309.

王月英,路璐,吴红英,李德冠,王勇,张俊伶,孟爱民,2007. IRM-2 等三种小鼠免疫学指标的测定与分析//中国核学会. 第四届中国核学会省市“三核”论坛论文集. 天津:中国医学科学院放射医学研究所: 46-55.

燕格格,2019. Punctin-2 多克隆抗体的制备与鉴定. 硕士学位论文. 长沙:湖南大学.

CAI P, WANG R, LING S, WANG S, 2021. A high sensitive platinum-modified colloidal gold immunoassay for tenuazonic acid detection based on monoclonal IgG. *Food Chemistry*, 360: 110-126.

CHRISTINE B, EWALD U, RICHARD D, ERWIN M, 1995. Production and characterization of antibodies against neosaxitoxin utilizing a novel immunogen synthesis procedure. *Food Chemistry*, 7: 315-322.

MEI S L, LAN X L, PING D Z, KE W, WEN W Z, QIANG Z, ZHI R W, JUN Y, JIE S X, HUA S W, 2019. Detection of okadaic acid (OA) and tetrodotoxin (TTX) simultaneously in seafood samples using colloidal gold immunoassay. *Toxicon*, 165: 103-109.

ZHI R W, FANGY Z, CHENG J W, HANG Y, JUN Y, HUA S W, 2018. Development of an ic-ELISA and immunochromatographic strip based on IgG antibody for detection of ω -conotoxin MVIIA. *Journal of Hazardous Materials*, 378: 137-160.

(责任编辑:郭莹)