切向流超滤法辅助ELISA检测血清中A型肉毒毒素

王文秀[1,2],周　伟[2],胡　爽[1],邢荣荣[1],陈　璇[1*]([1]山西医科大学药学院药物分析教研室,太原　030001;[2]兰州生物技术开发有限公司;[*]通讯作者,E-mail:ywfxcx@163.com)

摘要: *目的*　建立切向流超滤法辅助ELISA检测人血清中A型肉毒毒素,以提高ELISA对A型肉毒毒素的检测灵敏度。*方法*　采用切向流超滤技术对血清样本中的A型肉毒毒素进行分离纯化,考察膜材质(包括改性聚醚砜、聚醚砜、混合纤维素酯)、中空纤维内径、截留分子量、膜表面积、进液流量、跨膜压差(包括24.13 kPa、134.45 kPa和189.61 kPa)及循环速率对毒素萃取效率的影响,优化超滤条件;对优化后的超滤前处理流程进行方法学验证,并将其与ELISA联用,应用于含低浓度A型肉毒毒素的临床血清样本检测。　*结果*　改性聚醚砜对肉毒毒素的萃取效果最佳,达到79.17%,显著高于其他两种膜材质($P<0.05$);跨膜压差为134.45 kPa时对肉毒毒素的回收率最高(达82.40%);进液流量、循环速率及膜纤维内径、截留分子量、膜表面积对萃取效果无显著影响($P>0.05$)。方法学验证显示,建立的切向流超滤法辅助ELISA检测人血清中A型肉毒毒素的回收率为90.0%~105.0%,变异系数低于10%;应用于临床血清样本检测,超滤辅助ELISA可检出单纯ELISA无法检出的低浓度A型肉毒毒素样本。　*结论*　本研究成功建立了切向流超滤技术辅助ELISA检测人血清中A型肉毒毒素的方法,显著改善了ELISA对低浓度A型肉毒毒素的检测能力,为临床血清样本中低浓度A型肉毒毒素的精准检测提供了可靠、高效的技术方案。

关键词: A型肉毒毒素;　切向流超滤;　中空纤维膜;　ELISA;　方法学验证;　血清

中图分类号: R917　**文献标识码:** A　**文章编号:** 1007-6611(2026)08-0938-08　**DOI:** 10.13753/j.issn.1007-6611.2026.08.010

Tangential flow filtration-assisted ELISA for detection of botulinum toxin type A in human serum

WANG Wenxiu[1,2], ZHOU Wei[2], HU Shuang[1], XING Rongrong[1], CHEN Xuan[1*] ([1]*Department of Pharmaceutical Analysis, School of Pharmacy, Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, China*; [2]*Lanzhou Biotechnique Development Company Limited*; [*]*Corresponding author, E-mail: ywfxcx@163.com*)

Abstract: *Objective*　To establish tangential flow ultrafiltration (TFU)-assisted ELISA for enhancing the sensitivity of botulinum toxin type A (BoNT-A) detection in human serum. *Methods*　TFU was employed to separate and purify BoNT-A from serum samples. The effects of various parameters on toxin extraction efficiency were systematically investigated to optimize the ultrafiltration conditions, including membrane material (including modified polyethersulfone, polyethersulfone, and mixed cellulose ester), hollow fiber inner diameter, molecular weight cut-off (MWCO), membrane surface area, feed flow rate, transmembrane pressure (TMP, including 24.13 kPa, 134.45 kPa, and 189.61 kPa), and circulation rate. The optimized ultrafiltration pretreatment protocol was methodologically validated and subsequently integrated with ELISA for the detection of low-concentration botulinum toxin type A in clinical serum samples. *Results*　Modified polyethersulfone exhibited the best extraction efficiency for botulinum toxin, reaching 79.17%, which was significantly higher than that of the other two membrane materials ($P<0.05$). The highest recovery rate of botulinum toxin was achieved at a transmembrane pressure of 134.45 kPa. Influent flow rate, circulation rate, hollow fiber inner diameter, molecular weight cut-off, and membrane surface area had no significant effect on extraction efficiency ($P>0.05$). Methodological validation showed that the recovery rate of the established TFU-assisted ELISA for detecting BoNT-A in human serum ranged from 90.0% to 105.0%, with a coefficient of variation below 10%. When applied to clinical serum samples, TFU-assisted ELISA detected low-concentration BoNT-A that were undetectable by conventional ELISA alone. *Conclusion*　This study successfully established a TFU-assisted ELISA method for the detection of BoNT-A in human serum. This approach significantly enhanced the detection sensitivity of conventional ELISA for low-concentration BoNT-A, offering a reliable and efficient technical platform for accurate quantification of trace BoNT-A in clinical serum samples.

Keywords: botulinum toxin type A;　tangential flow filtration;　hollow fiber membrane;　ELISA;　method validation;　serum

肉毒毒素(botulinum toxin,BTX)作为肉毒杆菌繁殖产生的神经毒素,是一种大分子蛋白质,按其毒性的抗原性不同,可划分为A、B、C、D、E、F、G、H 8种亚型,其中,A型是引发人类中毒的主要亚

基金项目:国家自然科学基金项目(81973287);国家自然科学基金青年基金项目(22104076)

作者简介:王文秀,女,1986-09生,硕士,E-mail:xiusucceed@163.com

收稿日期:2025-06-05

型[1-4]，也是研究与应用最广泛的亚型。因其强毒性，肉毒毒素对人体健康存在潜在威胁，中毒可累及神经肌肉接头，严重时会导致呼吸衰竭，危及生命[3,4]。因此，精准检测体内肉毒毒素水平，对于肉毒毒素中毒的及时治疗、预防和处理潜在的中毒风险，保障患者的生命安全和身体健康至关重要。

肉毒毒素检测方法多样，各有特点。主要分为生物检测法、免疫分析法、分子生物学方法、基于传感的检测方法、细胞学检测法等，在实际应用中可根据不同场景和需求选择合适的方法[5]。当前针对A型肉毒毒素的检测研究仍很局限，被广泛应用的ELISA法在检测复杂基质样品时敏感度低，易出现交叉反应而引起假阳性结果[6]。样本前处理是肉毒毒素检测过程的关键环节，可直接影响检测方法灵敏度和准确度。切向流超滤（tangential flow filtration，TFF）是一种快速高效膜分离技术，近年来在生物医药行业发展迅速。该技术通过液体多次循环的方式实现跨膜过滤，压力驱动下，液体流动与膜表面呈切向方向（即平行方向），膜上的压力差驱动分离[7,8]。通过膜表面的剪切力，残留的物质随液体流动不断扫过，减少物质在膜表面的积累，实现了膜面积的有效利用，从而保证稳定的过滤速度，且在更长的时间内提供更高的通量[9,10]。TFF可以有效地从大颗粒的生物分子中分离出小分子物质，特别是对于产物稳定性有限的分子，如蛋白质、肽、单克隆抗体等，可以实现浓缩、纯化以及溶剂置换等目的[11,12]，效率更高，浓缩或渗滤速度更为快捷，从而可广泛应用于分子生物学、蛋白质化学、免疫学微生物学等领域[13]。

基于上述研究背景与技术优势，本研究拟建立中空纤维膜柱切向流超滤前处理方法，分离纯化血清样本中的A型肉毒毒素并辅助ELISA检测；通过系统考察不同操作参数对毒素萃取效率的影响，优化前处理工艺并评估方法有效性，旨在提升ELISA对血清中低浓度A型肉毒毒素的检测灵敏度，为临床样本中该毒素的精准检测提供技术支撑。

1 材料与方法

1.1 仪器

KrosFlo® KR2i TFF System购自瑞普利金（上海）生物科技有限公司，小型涡旋振荡仪购自上海科雅生物科技有限公司，分析天平购自赛多利斯（上海）贸易有限公司，超纯水净化机购自默克投资（中国）有限公司，振荡培养箱购自中国知楚仪器有限公司，高压灭菌锅购自中国施都凯仪器设备有限公司，台式高速离心机购自艾本德中国有限公司，酶标仪购自Thermo Fisher（中国）科技公司。

1.2 材料

健康人体血清和超纯水均购自默克投资（中国）有限公司，磷酸盐缓冲液干粉购自北京酷来搏科技有限公司，衡力注射用A型肉毒毒素购自兰州生物技术开发有限公司，羊抗兔-HRP二抗和兔抗A型肉毒毒素IgG均购自Thermo Fisher（中国）科技公司，四甲基联苯胺TMB显色液购自碧云天生物技术有限公司。中空纤维膜柱购自瑞普利金（上海）生物科技有限公司，主要包括不同规格的改性聚醚砜（modified polyethersulfone，M-PES）、聚醚砜（polyethersulfone，PES）和混合纤维素酯（mixed cellulose ester，MCE）材质的中空纤维膜柱（详细参数见表1）。带滤芯灭菌盒装吸头购自无锡耐思生命科技股份有限公司，灭菌离心管购自生工生物工程（上海）股份有限公司。

表1 不同材质与规格中空纤维膜柱的关键性能参数

Table 1 Key performance parameters of hollow fiber membrane columns with different materials and specifications

材质	型号	截留分子量（kD）	有效长度（cm）	膜表面积（cm^2）
M-PES	C02-E030-10-N	30	20.0	13~20
	C02-E030-05-N	30	20.0	13~20
	C04-E030-05-N	30	41.5	26~59
	C02-E0100-05-N	100	20.0	13~20
PES	C02-P030-10-N	30	20.0	13~20
MCE	C02-M030-06-N	30	20.0	13~20
	C02-M030-10-N	30	20.0	13~20

注：M-PES，改性聚醚砜；PES，聚醚砜；MCE，混合纤维素酯。

1.3　切向流超滤条件的优化与方法学验证

首先，围绕切向流超滤技术参数优化展开单因素考察，通过控制变量法逐一分析不同实验条件对毒素萃取效果的影响，筛选出最优前处理参数并完成方法学验证，最终通过临床样本比对明确方法的应用价值。核心方法为切向流超滤辅助酶联免疫吸附试验（简称切向流超滤法辅助ELISA），先通过切向流超滤技术对血清样本中的A型肉毒毒素进行分离富集，再结合ELISA完成靶标毒素的定量检测。核心检测指标包括不同条件下A型肉毒毒素的萃取效率、毒素回收率和方法变异系数。同时，以临床样本检测的可检出率作为应用指标，系统评估方法的检测性能。其中，萃取效率与回收率用于评估超滤前处理对靶标毒素的富集能力，变异系数用于验证方法的重复性与稳定性，临床样本可检出率用于验证方法对低浓度靶标的检测优势。

1.4　溶液制备

1.4.1　标准溶液制备　取A型肉毒毒素标准品100 U溶于1 mL PBS缓冲液，涡旋混匀成浓度为100 U/mL的初始溶液，用PBS缓冲液1∶1稀释为50，25，12.5，6.25 U/mL的溶液各1 mL，涡旋混匀，作为不同浓度标准品溶液用于标准曲线的测定。

1.4.2　ELISA检测试剂制备　首先称取8 g NaCl、0.2 g KCl、1.44 g Na_2HPO_4和0.24 g KH_2PO_4，溶于800 mL蒸馏水中，用HCl调节溶液的pH值至7.4，后加蒸馏水定容至1 000 mL作为包被缓冲液；然后称取0.2 g KH_2PO4、2.9 g $Na_2HPO4\cdot12H_2O$、8.0 g NaCl和0.2 g KCl，加入0.5 mL吐温20后，用蒸馏水稀释至1 000 mL作为洗涤缓冲液（PBST）；再添加5 g脱脂奶粉溶于100 mL洗涤缓冲液中作为封闭缓冲液，用包被缓冲液配制10 μg/mL的兔抗A型肉毒毒素IgG作为捕获抗体溶液；1∶5 000封闭缓冲液稀释的羊抗兔-HRP作为检测抗体溶液（二抗）；0.16 mol/L硫酸作为终止液。

1.4.3　血清样本制备

1.4.3.1　模拟血清样本的制备　取A型肉毒毒素（200 U）溶于2 mL健康人血清中，涡旋混匀成浓度为100 U/mL的模拟肉毒毒素样品，用健康人血清定容至20 mL，涡旋混匀后于4 ℃下保存用于切向流超滤方法的建立。

1.4.3.2　临床血清样本的制备　从3名志愿者获得美容注射完肉毒毒素后血清样本，1名健康志愿者血清样本作为阴性对照。4名志愿者都已签署知情同意书（伦理批准审批号：2021GLL019）。这些样本中的毒素可能受到患者生理状态、病程及治疗方式的影响，因此具有较大的异质性。

抽取志愿者血液4 mL（不经抗凝处理），12 000 r/min离心5 min，取血清2 mL用PBS缓冲液定容至20 mL，涡旋混匀利用切向流超滤法进行A型肉毒毒素检测。

严格按照生物安全操作指南，所有涉及肉毒毒素的试验操作都在2级生物安全柜中进行，操作过程中始终打开HEPA过滤器。试验结束后，打开紫外消杀安全柜，所有接触过肉毒毒素的废弃耗材和废液均通过高压灭菌法彻底灭活。

1.5　中空纤维膜柱切向流超滤法样品前处理

将中空纤维膜柱安装到切向流超滤系统中，先用0.5 mol/L NaOH对中空纤维膜柱循环冲洗30 min，再用无菌超纯水冲洗切向流超滤系统至电导为0 ms/cm左右。选择压降法测试其密封性，以1 min内压力下降≤3.45 kPa作为合格判定标准。再用无菌PBS溶液冲洗切向流超滤系统30~40 min，直至pH为7.2~7.5，电导为15~20 ms/cm左右。取血清样本20 mL进行中空纤维膜柱切向流超滤纯化。调节剪切力和控制跨膜压差，浓缩倍数接近10倍时停止循环。超滤结束后，用超纯水和0.5 mol/L NaOH交替冲洗系统，每种溶液循环30 min，交替循环2遍，将电导冲洗至约0 ms/cm。最后，拆下中空纤维膜柱，关闭系统和电脑。

1.6　ELISA检测A型肉毒毒素浓度

通过中空纤维膜柱切向流超滤，获得含A型肉毒毒素的超滤液2 mL，进行ELISA检测。具体操作如下：取96孔酶标板，每孔加入100 μL捕获抗体溶液，于4 ℃封膜包被过夜，弃液后400 μL洗涤缓冲液清洗3~4次，倒置拍干；随后每孔加入300 μL封闭缓冲液，37 ℃封闭1 h，弃液后洗板3~4次；接着每孔加入100 μL标准品或待测样品，37 ℃孵育1 h，洗板6次，再加入100 μL二抗溶液，常温500 r/min混匀孵育2 h，弃液后洗板5次；之后每孔加入100 μL TMB显色剂，室温显色30 min；最后加入100 μL终止液，30 min内于450 nm波长处测定吸光度。

1.7　统计学分析

结果以均值±标准差（$\bar{X}\pm S$）表示，组间差异采用单因素方差分析，多重比较采用Tukey法，$P<0.05$为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 切向流超滤条件的优化

2.1.1 不同膜柱材质对血清样本中A型肉毒毒素萃取效果的影响 M-PES、PES、MCE 3种不同材质的中空纤维膜柱对肉毒毒素的萃取效果存在显著差异。其中，M-PES膜柱的回收率最高，达79.17%，显著优于PES和MCE膜柱（$P<0.05$，见表2）。

表2 不同膜柱材质对血清样本中A型肉毒毒素含量的影响

Table 2 Effect of different membrane column materials on the content of botulinum toxin A in serum samples

材质	型号	A型肉毒毒素浓度（U/mL）				变异系数（%）	回收率（%）
		1	2	3	$\overline{X}\pm S$		
M-PES	C02-E030-10-N	79.92	74.21	83.39	79.17±4.64*	5.9	79.17
PES	C02-P030-10-N	64.46	62.94	69.78	65.73±3.59	5.5	65.73
MCE	C02-M030-10-N	50.19	43.48	51.70	48.46±4.38	9.0	48.46

注：M-PES，改性聚醚砜；PES，聚醚砜；MCE，混合纤维素酯；与PES材质及MCE材质分别比较，*$P<0.05$。

2.1.2 不同中空纤维内径对血清样本中A型肉毒毒素萃取效果的影响 其余参数不变，考察不同纤维内径对肉毒毒素萃取效果的影响。实验选用混合纤维素酯（C02-M030-06-N，C02-M030-10-N）与改性聚醚砜（C02-E030-10-N，C02-E030-05-N）两种材质的中空纤维膜柱，且严格控制膜柱截留分子量、有效长度及膜表面积等关键参数完全一致。结果表明，两种材质下不同纤维内径的膜柱对肉毒毒素的萃取效果差异无统计学意义（$P>0.05$，见表3）。

表3 不同膜柱纤维内径对血清样本中A型肉毒毒素含量的影响

Table 3 Effect of different membrane fiber inner diameters on the content of botulinum toxin type A in serum samples

名称	型号	纤维内径（mm）	A型肉毒毒素浓度（U/mL）				变异系数（%）	回收率（%）
			1	2	3	$\overline{X}\pm S$		
MCE	C02-M030-06-N	0.63	45.38	49.08	52.61	49.02±3.62	7.4	49.02
	C02-M030-10-N	1.00	50.19	43.48	51.70	48.46±4.38	9.0	48.46
M-PES	C02-E030-10-N	1.00	79.92	74.21	83.39	79.17±4.64	5.9	79.17
	C02-E030-05-N	0.50	81.54	77.63	73.72	77.63±3.91	5.0	77.63

注：MCE，混合纤维素酯；M-PES，改性聚醚砜；同一材质不同内径组间A型肉毒毒素浓度均数比较，$P>0.05$。

2.1.3 不同截留分子量对血清样本中A型肉毒毒素萃取效果的影响 其余参数固定不变，对比分析不同截留分子量对肉毒毒素的萃取效果。基于上述实验结果（2.1.1），中空纤维膜柱选择M-PES为膜材质，其他参数包括纤维内径、有效长度和膜表面积都相同。结果表明，M-PES的2种截留分子量对血清模拟样本中肉毒毒素萃取效果差异无显著性（$P>0.05$，见表4）。

表4 不同截留分子量对血清样本中A型肉毒毒素含量的影响

Table 4 Effect of different molecular weight cut-offs on the content of botulinum toxin type A in serum sample

型号	截留分子量（kD）	A型肉毒毒素浓度（U/mL）				变异系数（%）	回收率（%）
		1	2	3	$\overline{X}\pm S$		
C02-E030-05-N	30	81.54	77.63	73.72	77.63±3.91	5.0	77.63
C02-E0100-05-N	100	70.82	85.91	79.47	78.73±7.57	9.6	78.73

注：两组间A型肉毒毒素浓度均数比较，$P>0.05$。

2.1.4 不同膜表面积对血清样本中A型肉毒毒素萃取效果的影响 其余参数固定不变，考察不同膜表面积对肉毒毒素萃取效果的影响。基于上述实验结果，中空纤维膜柱选择M-PES为膜材质，纤维内径和截留分子量都相同，而有效长度与膜表面积相一致。结果表明，M-PES的不同膜表面积对血清模拟样本中肉毒毒素萃取效果差异无统计学意义（$P>0.05$，见表5），但是膜表面积大的中空纤维膜柱超滤具有较高的肉毒毒素回收率。

表5　不同膜表面积对血清样本中A型肉毒毒素含量的影响
Table 5　Effect of different membrane surface areas on the content of botulinum toxin type A in serum samples

型号	膜表面积（cm^2）	A型肉毒毒素浓度（U/mL）				变异系数（%）	回收率（%）
		1	2	3	$\overline{X}\pm S$		
C02-E030-05-N	13~20	81.54	77.63	73.72	77.63±3.91	5.0	77.63
C04-E030-05-N	26~59	78.93	80.03	84.13	81.03±2.74	2.7	81.00

注：两组间A型肉毒毒素浓度均数比较，$P>0.05$。

2.1.5　不同进液流量对血清中A型肉毒毒素萃取效果的影响　为进一步讨论切向流超滤对肉毒毒素萃取的影响，选用M-PES（型号C02-E030-05-N）材质的中空纤维膜柱对血清模拟样本中的肉毒毒素进行萃取工艺参数优化。结果表明，其他系统参数固定不变，不同进液流量对模拟血清样本中肉毒毒素的萃取效果无显著差异（$P>0.05$，见表6），超滤结束时回收率均超过70%。

表6　不同进液流量对血清样本中A型肉毒毒素含量的影响
Table 6　Effect of different influent flow rates on the content of botulinum toxin type A in serum samples

进液流量［L/(min·m^2)］	A型肉毒毒素浓度（U/mL）				变异系数（%）	回收率（%）
	1	2	3	$\overline{X}\pm S$		
4	80.01	74.85	68.84	74.57±5.59	7.5	74.57
5	67.81	73.26	76.26	72.44±4.28	5.9	72.44
6	76.07	75.32	69.22	73.54±3.76	5.1	73.54

注：三组间A型肉毒毒素浓度均数比较，$P>0.05$。

2.1.6　不同跨膜压差对血清中A型肉毒毒素萃取效果的影响　其他系统参数固定不变，考察不同跨膜压差对血清样本中肉毒毒素的萃取效果。结果表明，跨膜压差24.13 kPa时，肉毒毒素的回收率低于其他2组压差；134.45 kPa和189.61 kPa时回收率变化不明显，但是过高跨膜压差（189.61 kPa）会导致肉毒毒素的回收率降低（见表7）。

表7　不同跨膜压差对血清样本中A型肉毒毒素含量的影响
Table 7　Effect of different transmembrane pressures on the content of botulinum toxin type A in serum samples

跨膜压差（kPa）	A型肉毒毒素浓度（U/mL）				变异系数（%）	回收率（%）
	1	2	3	$\overline{X}\pm S$		
24.13	67.57	70.67	64.76	67.67±2.96	4.4	67.67
134.45	78.32	82.42	86.39	82.38±4.04	4.9	82.40
189.61	74.49	79.58	83.67	79.25±4.60	5.8	79.25

注：三组间A型肉毒毒素浓度均数比较，$P>0.05$。

2.1.7　不同循环速率对血清中A型肉毒毒素萃取效果的影响　同样，其他系统参数固定不变，结果如表9所示，肉毒毒素溶液循环速率25~75 mL/min对萃取效果无显著影响（$P>0.05$，见表8）。

表8　不同循环速率对血清样本中A型肉毒毒素含量的影响
Table 8　Effect of different circulation rates on the content of botulinum toxin A in serum samples

循环速率（mL/min）	A型肉毒毒素浓度（U/mL）				变异系数（%）	回收率（%）
	1	2	3	$\overline{X}\pm S$		
25	74.57	73.35	67.81	71.91±3.60	5.0	71.91
50	75.51	74.10	70.16	73.26±2.77	3.8	73.26
75	76.16	71.19	80.57	75.97±4.69	6.2	75.98

注：三组间A型肉毒毒素浓度均数比较，$P>0.05$。

2.2 方法学考察

2.2.1 线性、范围、检测限 本研究采用改性聚醚砜中空纤维膜柱（型号C02-E030-05-N）切向流超滤法，设置134.45 kPa跨膜压差，其他参数固定不变，拟在最优条件下，对模拟血清样本中的A型肉毒毒素进行检测。取A型肉毒毒素（100 U）溶于1 mL健康人血清，涡旋混匀成浓度为100 U/mL的初始溶液，用健康人血清1∶1稀释为100，50，25，12.5，6.25 U/mL的溶液各1 mL，涡旋混匀，经切向流超滤后测定其在450 nm波长处的吸光度。A型肉毒毒素浓度在6.25~100 U/mL范围内，以浓度为横坐标，$\overline{X}\pm S$为纵坐标，计算回归方程，拟合方程为$y=-0.584\ 3x+3.071\ 8$，$R^2=0.990\ 7$，线性关系良好。以阴性平均值的2.1倍[14]，即0.221为有效值，可以得出A型肉毒毒素的检测限为6.25 U/mL。每组变异系数均在10%以下，表明组内精密度良好（见表9）。

表9 改性聚醚砜中空纤维膜柱切向超滤法检测A型肉毒毒素的效能参数

Table 9 Performance parameters for the detection of botulinum toxin type A by tangential flow ultrafiltration using modified polyethersulfone hollow fiber membrane cartridge

浓度	A型肉毒毒素含量（U/mL）				变异系数（%）
	1	2	3	$\overline{X}\pm S$	
100 U/mL	2.636	2.513	2.578	2.576±0.062	2.4
50 U/mL	1.738	1.909	1.883	1.843±0.092	5.0
25 U/mL	1.265	1.273	1.296	1.278±0.016	1.3
12.5 U/mL	0.652	0.641	0.639	0.644±0.007	1.1
6.25 U/mL	0.265	0.242	0.255	0.254±0.012	4.5
阴性对照	0.116	0.111	0.118	0.115±0.004	3.1

2.2.2 重复性、准确度和中间精密度 为系统评估该分析方法的可靠性，本研究对其重复性、准确度及中间精密度进行了考察。重复性通过由同一名分析人员对3个浓度水平（12.5，25，50 U/mL）的A型肉毒毒素样品分别进行3次重复测定来评估。准确度通过测定与重复性同浓度系列的样品，每个浓度平行测定3次，并依据回收率进行评价，回收率计算公式为：回收率（%）=[待测样品浓度（U/mL）×待样样品体积（2 mL）/起始投入量（200 U）]×100%。中间精密度则由两名检测人员独立操作，分别对上述相同浓度的同一样品各重复测定3次，其结果通过计算变异系数（CV）进行评价，计算公式为：CV（%）=（标准差/均值）×100%。

结果如表10和11所示，A型肉毒毒素的回收率均在90.0%~105.0%，CV均小于10%。根据《ICH生物分析方法验证指导原则》，重复性要求CV≤10%、回收率在90%~110%范围内、中间精密度要求CV≤15%，说明该方法的重复性和准确度良好，中间精密度符合要求。

表10 改性聚醚砜中空纤维膜柱切向超滤法检测A型肉毒毒素的重复性和准确度结果

Table 10 Repeatability and accuracy results for the detection of botulinum toxin type A by tangential flow ultrafiltration using modified polyethersulfone hollow fiber membrane cartridge

检测项目	理论浓度（U/mL）	A型肉毒毒素实际测定浓度（U/mL）				变异系数（%）	回收率（%）
		1	2	3	$\overline{X}\pm S$		
重复性	50	53.42	51.20	50.64	51.75±1.47	2.8	103.5
	25	23.89	25.21	25.86	24.99±1.00	4.0	100.0
	12.5	12.63	11.88	11.22	11.91±0.71	5.9	95.3
准确度	50	51.86	47.92	48.95	49.58±2.04	4.1	99.2
	25	24.27	27.27	24.93	25.49±1.58	6.2	102.0
	12.5	11.51	12.82	13.38	12.57±0.96	7.7	100.6

2.2.3 临床血清样本的检测 同样采用改性聚醚砜中空纤维膜柱（型号C02-E030-05-N）切向流超滤法，设置134.45 kPa跨膜压差，其他参数固定不变，对4名志愿者临床血清样本进行A型肉毒毒素

表11　改性聚醚砜中空纤维膜柱切向超滤法检测A型肉毒毒素的中间精密度结果

Table 11　Intermediate precision results for the detection of botulinum toxin type A by tangential flow ultrafiltration using modified polyethersulfone hollow fiber membrane cartridge

理论浓度（U/mL）	A型肉毒毒素实际测定浓度（U/mL）							变异系数（%）	回收率（%）
	1	2	3	4	5	6	$\overline{X}\pm S$		
50	50.83	49.79	53.68	47.67	50.48	52.14	50.77±2.05	4.0	101.5
25	26.49	23.99	24.64	22.65	24.83	25.68	24.71±1.33	5.4	98.9
12.5	10.38	12.64	11.32	12.48	10.69	12.73	11.71±1.05	9.0	93.7

注：1-3.检测员A检测结果；4-6.检测员B检测结果。

检测。结果如表12所示，除健康志愿者外，志愿者1，2，3的血清样本中均成功检测出A型肉毒毒素，其中志愿者3的样本仅通过切向流超滤辅助ELISA法检出，而单纯ELISA检测未检出志愿者3血清样本中的肉毒毒素。此外，单纯使用ELISA检测会有样本损耗，使用切向流超滤法进行样本前处理之后，富集倍数提高，检测浓度范围更广，提升了ELISA检测的灵敏度和准确度。

表12　不同检测方法下临床血清样本中A型肉毒毒素的检测结果

Table 12　Detection results of botulinum toxin type A in clinical serum samples by different detection methods

志愿者	A型肉毒毒素（U/mL）	
	ELISA法	切向流超滤辅助ELISA法
1	27.85±0.09	30.64±0.06
2	18.48±0.04	21.65±0.07
3	-	10.69±0.01
健康	-	-

3　讨论

血清中低浓度A型肉毒毒素的精准检测是临床诊断与治疗的关键环节，ELISA作为目前主流的检测方法，存在基质干扰导致灵敏度不足的问题。本研究首次尝试采用中空纤维膜柱切向流超滤技术对血清中A型肉毒毒素进行浓缩与纯化，建立了一种切向流超滤结合ELISA用于检测临床人血清中A型肉毒毒素含量的方法，为解决上述问题提供了新的技术路径。

本研究发现，不同中空纤维膜柱材质会显著影响A型肉毒毒素的检测效果，其中M-PES对A型肉毒毒素的萃取效果最佳，回收率达到79.17%，显著优于PES及MCE。进一步分析发现，MCE和M-PES的不同纤维内径对肉毒毒素萃取效果无差异，膜孔径差异未达到足以影响肉毒毒素通过或截留的程度，因此肉毒毒素的回收率无显著变化。另外，利用不同膜表面积对肉毒毒素萃取效果进行对比分析，结果发现M-PES的不同膜表面积对血清模拟样本中肉毒毒素萃取效果无显著差异，但膜表面积大的中空纤维膜柱可以获得较高的肉毒毒素回收率。

在工艺操作参数方面，本研究选定M-PES材质的中空纤维膜柱对血清模拟样本中的肉毒毒素进行萃取工艺参数优化。结果发现，不同进液流量和循环速率对血清样本中肉毒毒素的富集效果无显著差异；而跨膜压差作为驱动物质跨膜传输的核心动力，与切向流速存在紧密的耦合关系，适度提高跨膜压差能够显著增强血清样本中肉毒毒素的富集效率。由此可见，切向流超滤技术各参数既相互关联又彼此制约，任何单一参数的调整均会引发系统响应的连锁变化。若要实现提升分离纯化效率与降低成本的双重目标，可通过多因素协同优化，精准定位参数间的最佳平衡点，构建高效、稳定的切向流超滤工艺体系，为肉毒毒素的规模化分离提供技术保障。

相较于传统的离心、沉淀等前处理方法，本研究建立的切向流超滤前处理方法具有效率高、操作简便、毒素损失率低等优势，可有效去除血清中的基质干扰成分，显著提升后续ELISA检测的灵敏度。该方法不仅可直接应用于肉毒毒素多种检测方法的样品前处理环节，也为临床实验室提供了高效、快捷的肉毒毒素临床样本前处理技术方案。

本研究仍存在一定局限性，研究所用中空纤维膜柱仅限于实验室小体积液体超滤，样本处理量有限，膜表面积的细微差异尚不足以显著提升肉毒毒素的萃取效率，本研究仅对部分关键参数进行了单因素优化，未开展多因素交互作用的全面分析。后续研究可通过采用大体积样本开展验证实验，进一步探究膜表面积对肉毒毒素萃取效果的影响规律，

同时，可结合响应面法等优化方法开展多因素协同优化，构建更稳定、高效的工艺体系。此外，还需开展更多的临床评估，进一步验证该方法的可靠性和准确性，推动其在临床检验领域的广泛应用，为临床诊断和治疗提供更可靠的依据，在保障公众健康方面发挥重要的现实意义。

参考文献：

[1] Carré F, Amar J, Tankéré F, *et al*. Botulinum toxin injections to manage sequelae of peripheral facial palsy[J]. Toxins (Basel), 2024, 16(3):161-180.

[2] Hall C. Optimizing facial aesthetics: sequential application of botulinum toxin A and dermal fillers for enhanced results[J]. Plast Aesthet Nurs (Phila), 2024, 44(1):70-71.

[3] Saini RS, Ali Abdullah Almoyad M, Binduhayyim RIH, *et al*. The effectiveness of botulinum toxin for temporomandibular disorders: a systematic review and meta-analysis[J]. PLoS One, 2024, 19(3):e0300157.

[4] Gong X, Tang HN, Zhang AR, *et al*. Application of botulinum toxin at the yonsei point for the treatment of gummy smile: a randomized controlled trial[J]. Plast Reconstr Surg, 2024, 153(4): 711e-721e.

[5] 叶婷，张雪平.肉毒毒素体外检测方法的研究进展[J].微生物学免疫学进展，2016，44(5)：57-63.

[6] 张幸，刘蓓蓓，翟荣启，等.增敏型酶联免疫吸附法在农药残留检测中的应用研究进展[J].农药学学报，2025，27(2)：221-232.

[7] Yuan R, Zhou Y, Arias GF. Extracellular vesicle isolation by a tangential-flow filtration-based large-scale purification method[J]. Methods Mol Biol, 2023, 2668:45-55.

[8] Hayati H, Kurtz C, Feng Y, *et al*. Computational fluid particle dynamics modeling of tangential flow filtration in perfusion cell culture[J]. Bioprocess Biosyst Eng, 2025, 48(2):331-342.

[9] Worsham RD, Thomas V, Farid SS. Impact of ethanol on continuous inline diafiltration of liposomal drug products[J]. Biotechnol J, 2023, 18(11):e2300194.

[10] Bell BE, Burton IK, Arreola-Patino J. Scalable purification of recombinant structural proteins, hagfish intermediate filament α and γ, from inclusion bodies for fiber formation[J]. Protein Expr Purif, 2022, 199:106152.

[11] Wei ZH, Xia Y, Su YN. Modulating and optimizing Pluronic F-68 concentrations and feeding for intensified perfusion Chinese hamster ovary cell cultures[J]. Biotechnol Prog, 2023, 39(4): e3340.

[12] Andriolo G, Provasi E, Brambilla A. Methodologies for scalable production of high-quality purified small extracellular vesicles from conditioned medium[J]. Methods Mol Biol, 2023, 2668: 69-98.

[13] 李小娟，张若晖，苗承辉. A型肉毒神经毒素理化及生物学特性研究[J].微生物学免疫学进展，2016，44(4):7-11.

[14] Shao K, Yue YX, Zhao LM, *et al*. Optimization of the cut-offs in acetylcholine receptor antibodies and diagnostic performance in asthenia gravis patients[J]. Clin Chim Acta, 2022, 533:122-130.

（责任编辑：马艳霞）