

刘淑娟,赵晓祥,程金平,等. 2014. 快速检测软骨藻酸的间接 ELISA 方法[J]. 环境科学学报,34(2):404-408

Liu S J, Zhao X X, Cheng J P, et al. 2014. Establishment of indirect ELISA to detect domoic acid[J]. Acta Scientiae Circumstantiae,34(2):404-408

快速检测软骨藻酸的间接 ELISA 方法

刘淑娟^{1,2}, 赵晓祥², 程金平^{1,*}, 王茜¹, 王文华¹

1. 上海交通大学 环境科学与工程学院, 上海 200240

2. 东华大学 环境科学与工程学院, 上海 201620

收稿日期:2013-06-29 修回日期:2013-09-02 录用日期:2013-09-03

摘要:分别对抗原、一抗、二抗的最佳稀释倍数、温育温度与时间、包被条件及其显色条件进行了优化,建立了一种快速检测软骨藻酸(Domoic acid, DA)的酶联免疫分析法(ELISA)。结果表明:抗原、一抗和二抗(HRP-IgG)最佳稀释度分别为1:12800倍、1:400倍和1:3000倍;最佳包被条件为4℃包被12h;抗原抗体最佳反应温度为37℃,反应时间为60min;二抗最佳反应温度为43℃,反应时间为30min;最佳显色条件为室温不避光显色20min。该方法的样品加标回收率高达86.8%~103.2%,其最低检测限(LOD)为4.86 ng·mL⁻¹,光吸收值(OD值)的变异系数(CV)在2.46%~7.08%之间。

关键词:软骨藻酸; 间接竞争 ELISA 法; 快速检测

文章编号:0253-2468(2014)02-404-05 中图分类号:X131 文献标识码:A

Establishment of indirect ELISA to detect domoic acid

LIU Shujuan^{1,2}, ZHAO Xiaoxiang², CHENG Jinping^{1,*}, WANG Qian¹, WANG Wenhua¹

1. School of Environmental Science and Engineering, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200240

2. College of Environmental Science and Engineering, Donghua University, Shanghai 201620

Received 29 June 2013; received in revised form 2 September 2013; accepted 3 September 2013

Abstract: An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was developed for rapid detecting domoic acid. The indirect competitive ELISA conditions, including the optimal dilution ratios of antigen, antibody and HRP-IgG, incubation and packets conditions as well as the color coating conditions, were optimized. The results showed that the optimal dilution ratios of the antigen, antibody and HRP-IgG were 1:12800, 1:400 and 1:3000, respectively; the best packets condition was 12 h at 4℃, incubating 60 min at 37℃ after the antibody added, incubating 30 min at 43℃ after HRP-IgG added, and the best color condition was 20 min at room temperature. The detection limit was 4.68 ng·mL⁻¹, with the coefficient of variation (CV) of OD of 2.46%~7.08%. The recoveries of this method was 86.8%~103.2%.

Keywords: domoic acid; indirect competitive ELISA; rapid detection

1 引言(Introduction)

软骨藻酸是赤潮毒素的一种,由海洋硅藻产生的兴奋性神经毒素氨基酸,可在贝类中富集,因最早从红藻属的树枝软骨藻(*Chondria armata*)中分离出来并确定其结构被命名为软骨藻酸(Fire *et al.*, 2009),人类和海洋哺乳动物误食含有DA的鱼虾贝类后会引起中毒,主要表现在干扰中枢神经系统,发生暂时性失去记忆甚至死亡(Smith *et al.*, 2006; Costa *et al.*, 2010; Jeffery *et al.*, 2004; Mafra *et al.*,

2009)。在免疫学的基础上得到快速发展的酶联免疫分析法,以其特异性高、灵敏度高、操作简便、检测迅速和分析成本低的优点被广泛应用于环境中污染物的分析(刘仁沿等,2009; Yu *et al.*, 2009)。间接竞争ELISA法是检测抗体常用的方法,其优点是只要变换包被抗原就可利用同一酶标抗体建立检测相应的抗体(Guo *et al.*, 2010)。

目前,国内还没有开发出成熟的ELISA试剂盒,国外已经有商品化的ELISA检测试剂盒,但价格昂贵。由于以ELISA为基础的免疫学检测方法具

基金项目: 海洋赤潮灾害立体监测技术与应用国家海洋局重点实验室开放研究基金(No. MATHAB20120101)

Supported by the Reserch Foundation of Key Laboratoty of Tnterated Marine Monitoring and Applied Technologies for Harmful Algal Blooms(No. MATHAB20120101)

作者简介: 刘淑娟(1989—),女,E-mail:xiaosanl3@126.com; * 通讯作者(责任作者),E-mail:jpcheng@sjtu.edu.cn

Biography: LIU Shujuan(1989—),female, E-mail: xiaosanl3@126.com; * **Corresponding author**, E-mail:jpcheng@sjtu.edu.cn

有快速、简便、灵敏与经济的特点,适用于大批样品的筛查,因而越来越受到人们的青睐和重视. 本实验在课题组对软骨藻酸快速检测技术研究的基础上(王茜等,2012;高利利,2011;刘元嫒等,2011),进一步优化和建立了利用单抗快速检测 DA 的间接竞争 ELISA 方法,并对其线性检测范围、检测限、回收率及稳定性等参数进行了研究. 同时也利用该方法对部分贝类实际样品进行了初步检测,为最终形成商品化的检测试剂盒奠定了良好基础.

2 材料和方法(Materials and methods)

2.1 试剂与仪器

辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠(酶标二抗, HRP-IgG)购于上海生工,软骨藻酸单克隆抗体为本实验室自制. 常用化学试剂购自中国国药集团,分析纯. 其它实验所用仪器和试剂均与文献(王茜,2012)相同.

2.2 试验方法

2.2.1 包被抗原的制备 采用碳化二亚胺法合成包被抗原 DA-BSA,反应完成后取少量混合物稀释,用紫外可见分光光度计在 200~400 nm 进行扫描,用以判断 DA 是否与载体蛋白 BSA 偶联成功.

2.2.2 抗原及单抗最佳稀释度的选择 采用方阵滴定的方法:将包被抗原 DA-BSA 用碳酸盐缓冲液(pH 为 9.6)做 1:200、1:400、1:800、1:1600、1:3200、1:6400、1:12800、1:25600 倍稀释,每孔 100 μL ,4 $^{\circ}\text{C}$ 包被 12 h;用 PBST 洗涤 3 次,每次 3 min,拍干;用 1% PVA-PBS 做封闭液,37 $^{\circ}\text{C}$ 封闭 2 h;一抗用 0.1% BSA-PBS 做 1:200、1:400、1:800、1:1600、1:3200、1:6400 倍稀释,每孔 100 μL ,每块板同时设有空白和阴性对照,37 $^{\circ}\text{C}$ 温育 1 h;用 PBST 洗涤、拍干;将酶标二抗用 0.1% BSA-PBS 稀释至 1:3000,每孔 100 μL ,37 $^{\circ}\text{C}$ 温育 1 h;洗涤、拍干;每孔加 TMB 底物液 100 μL ,室温显色 15 min,用 2 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的浓硫酸每孔 50 μL 终止反应;在 450 nm 及 630 nm 处测定 OD 值,实际值为 $\text{OD}_{450} - \text{OD}_{630}$,依据 OD 值和 P/N 值筛选抗原和一抗最佳稀释倍数.

2.2.3 酶标二抗最适稀释度的选择 在确定的最佳包被抗原和单抗稀释度下,酶标二抗做 1:2000、1:3000、1:4000、1:5000 和 1:6000 倍稀释,进行 ELISA 测定,依据 OD 值和 P/N 值筛选最佳酶标二抗稀释度.

2.2.4 最佳抗原包被条件的选择 以包被抗原最

佳稀释度包被,设置 37 $^{\circ}\text{C}$ 包被 1 h 后转入 4 $^{\circ}\text{C}$ 包被 12 h,37 $^{\circ}\text{C}$ 包被 2 h 转入后 4 $^{\circ}\text{C}$ 包被 12 h,37 $^{\circ}\text{C}$ 包被 3 h 后转入 4 $^{\circ}\text{C}$ 包被 12 h,4 $^{\circ}\text{C}$ 包被 12 h,37 $^{\circ}\text{C}$ 包被 1 h,37 $^{\circ}\text{C}$ 包被 2 h 和 37 $^{\circ}\text{C}$ 包被 3 h 等 7 个包被条件,进行 ELISA 测定,依据其 OD 值和 P/N 值筛选最佳包被条件.

2.2.5 抗原、单抗最佳作用时间和温度的选择 在上述最佳条件下,选择在 25 $^{\circ}\text{C}$ 、37 $^{\circ}\text{C}$ 和 43 $^{\circ}\text{C}$ 3 个温育温度,抗原和一抗作用 30 min、45 min、60 min、90 min,进行 ELISA 测定,依据其 OD 值和 P/N 值筛选抗原、单抗最佳作用温度和温度.

2.2.6 酶标二抗最佳作用时间和温度的选择 在上述最佳条件下,选择在 25 $^{\circ}\text{C}$ 、37 $^{\circ}\text{C}$ 和 43 $^{\circ}\text{C}$ 3 个温育温度,二抗温育 30 min、45 min、60 min、90 min,进行 ELISA 测定,依据其 OD 值和 P/N 值筛选酶标二抗最佳作用时间和温度.

2.2.7 最佳显色条件的选择 在上述最佳条件下进行 ELISA 测定,于室温和 37 $^{\circ}\text{C}$ 条件下,避光和不避光显色 5 min、10 min、15 min、20 min、30 min,依据其 OD 值和 P/N 值筛选最佳显色条件.

2.2.8 标准曲线的制作 利用上述建立的最佳条件包被抗原,洗涤;一抗稀释至最佳稀释度,每孔加入 50 μL ;将 DA 用 PBS 配成 100 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、50 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、20 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、10 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、4 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、2 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、0 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 系列浓度,每孔加入 50 μL . 按之前建立的最佳条件进行 ELISA 测定.

2.2.9 重复性试验 将 DA 稀释为 0、20、50 和 100 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 4 个不同浓度,按上述建立的间接竞争 ELISA 法操作步骤,同一浓度在同一板内、不同时间、相同条件下重复检测 5 次,同一浓度在不同板内、同一时间、相同条件下重复 5 次计算板内精密度和板间精密度.

2.2.10 加标回收率的测定 在阴性样品中分别添加 10、20 和 50 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的 DA,按照本文建立的间接竞争 ELISA 方法测定,计算加标回收率.

3 结果与讨论(Results and discussion)

3.1 包被抗原的制备与鉴定

软骨藻酸为小分子化合物,属于半抗原类物质,可以与抗体发生反应,具有抗原性,但是无法与有机体产生免疫应答反应. 为使软骨藻酸具有免疫原性,需将它与高分子载体偶联形成包被抗原. 本研究选择载体蛋白 BSA 对 DA 进行偶联. 反应完成后,将合成

完的偶联物 DA-BSA 和 DA、BSA 稀释,用紫外光谱仪进行扫描,所获得的紫外吸收谱如图 1 所示。

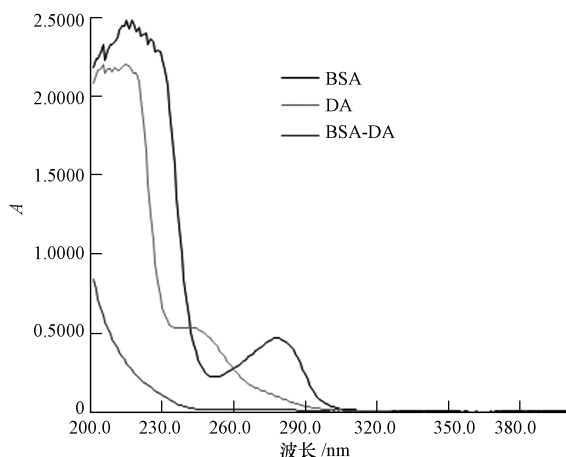


图 1 DA、BSA、DA-BSA 紫外吸收图谱

Fig. 1 UV absorption spectrums of DA, BSA and DA-BSA

由图 1 可以看出,DA 的 UV 特征吸收峰在 242 nm 处,载体蛋白 BSA 在 215 nm 和 278 nm 处各有一个吸收峰,而合成的偶联物的紫外吸收图谱与 DA 和 BSA 图谱的峰型及最大吸收峰有明显的区别,因此推断 DA 成功偶联到 BSA 上,成功制得包被抗原 DA-BSA。

3.2 包被抗原和一抗的最佳稀释度的确定

试验采用方阵滴定法,筛选出抗原和一抗最佳稀释度,从而使抗体与抗原充分结合,提高了反应的灵敏度。由表 1 可见:随着一抗稀释倍数的增加 OD 逐渐降低。当抗原稀释 12800 倍、一抗稀释 400 倍数时,OD 值为 1.031, P/N 值为 21.6。因此确定抗原和一抗的最佳稀释度为 1:12800 倍和 1:400 倍。

表 1 包被抗原和一抗最佳稀释度的确定

Table 1 Optimization of the coating antigen and antibody concentrations

包被抗原 稀释倍数	OD 值						空白	阴性
	抗体稀释倍数							
	200	400	800	1600	3200	6400		
400	0.997	0.558	0.291	0.164	0.140	0.088	0.080	0.163
800	1.044	0.520	0.309	0.185	0.137	0.115	0.104	0.246
1600	1.279	0.691	0.375	0.226	0.191	0.109	0.092	0.207
3200	1.359	0.894	0.541	0.323	0.204	0.136	0.113	0.254
6400	1.307	0.963	0.581	0.398	0.256	0.174	0.153	0.184
12800	1.259	1.031	0.653	0.422	0.278	0.171	0.166	0.206
25600	1.232	1.091	0.716	0.468	0.310	0.218	0.314	0.322

3.3 酶标羊抗小鼠二抗最佳使用浓度的确定

将酶标羊抗小鼠二抗分别稀释 2000、3000、4000、5000 和 6000 倍,分别测其 OD 值并计算出 P/N 值,结果如表 2 所示。

表 2 二抗使用浓度与 P/N 值变化

Table 2 Variations between P/N value and HRP-IgG concentration

二抗稀释倍数	OD 值	P/N 值
2000	1.286	7.3
3000	1.006	17.9
4000	0.752	9.5
5000	0.654	7.9
6000	0.522	5.7

当酶标二抗稀释度为 1:3000 时,OD 值为 1.006, P/N 值为 17.9, 故酶标二抗最佳稀释度为 1:3000 倍。

3.4 抗原包被条件的确定

将最佳稀释度的抗原在不同包被条件下进行 ELISA 测定,结果如表 3 所示。当抗原在 4 °C 包被 12 h 时 OD 值为 0.9820, P/N 最大,故最佳包被条件为 4 °C 包被 12 h。

表 3 抗原最适包被条件的确定

Table 3 Conditional optimization of antigen coating

包被条件	OD 值	P/N 值
37 °C 包被 1 h	0.6854	10.7
37 °C 包被 2 h	0.6045	5.4
37 °C 包被 3 h	0.6016	3.1
4 °C 包被 12 h	0.9820	16.5
37 °C 包被 1 h 后 4 °C 包被 12 h	0.7159	10.8
37 °C 包被 2 h 后 4 °C 包被 12 h	0.6249	6.9
37 °C 包被 3 h 后 4 °C 包被 12 h	0.6858	5.3

3.5 抗原、抗体最佳作用时间和温度的确定

分别选择 25 °C、37 °C 和 43 °C 为反应温度,抗原和一抗作用 30 min、45 min、60 min、90 min. 研究结果显示:在 37 °C 反应 60 min 时 OD 值为 0.987, P/N 值为 16.8, 因此抗原抗体最佳反应温度为 37 °C, 反应时间 60 min.

3.6 酶标二抗最佳作用时间和温度的确定

分别选择 25 °C、37 °C 和 43 °C 为反应温度,二抗反应 30 min、45 min、60 min 和 90 min. 研究结果显示:在 43 °C 反应 30 min 时 OD 值为 0.963, P/N 值为 49.6, 因此酶标二抗最佳反应温度为 43 °C, 反应时间 30 min.

3.7 最佳显色条件的选择与确定

以避光和不避光为反应条件,分别在室温和 37 °C 反应 5 min、10 min、15 min、20 min 和 30 min. 结果显示:在室温不避光条件下,反应 20 min 时 OD 值为 0.977, P/N 值为 8.8, 因此最佳显色条件为室温不避光显色 20 min.

3.8 标准曲线的绘制

以不同浓度标准品的对数值为横坐标,以 B/B_0 值为纵坐标绘制标准曲线,计算曲线的回归方程和可决系数, $B/B_0 = 1.2$ 时对应的 DA 浓度值即为最

低检测限. 所获标准曲线如图 2 所示,曲线方程为 $y = -0.0896x + 0.975$, $R^2 = 0.9943$. 利用回归方程计算出该间接 ELISA 法的最低检测限为 $4.86 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$.

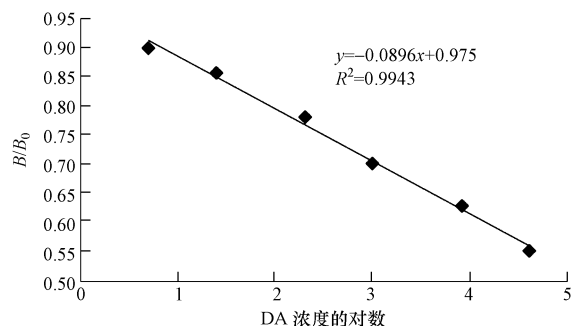


图 2 间接竞争 ELISA 标准工作曲线

Fig. 2 Standard working curve of ic-ELISA

3.9 重复性试验

间接竞争 ELISA 标准曲线的孔间差异如表 4 所示. 间接竞争 ELISA 标准曲线的板间差异如表 5 所示. 由表 4 和表 5 计算出 OD 值的孔间变异系数为 2.81% ~ 7.08%, 板间变异系数为 2.46% ~ 5.96%, 均小于 15.00%, 表明本方法具有良好的重现性.

表 4 间接竞争 ELISA 标准曲线的孔间差异

Table 4 The variation among holes in standard curve of ic-ELISA

DA 浓度/($\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$)	OD ₄₅₀ - OD ₆₃₀ 值					CV
0	1.057	1.011	0.982	0.968	0.973	3.69%
20	0.732	0.603	0.698	0.662	0.675	7.08%
50	0.603	0.594	0.569	0.612	0.583	2.84%
100	0.535	0.507	0.542	0.513	0.521	2.81%

表 5 间接竞争 ELISA 标准曲线的板间差异

Table 5 The variation between-assay in standard curve of ic-ELISA

DA 浓度/($\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$)	OD ₄₅₀ - OD ₆₃₀ 值					CV
0	1.036	1.041	0.996	0.973	1.114	5.21%
20	0.721	0.621	0.673	0.654	0.677	5.45%
50	0.611	0.536	0.594	0.627	0.576	5.96%
100	0.527	0.538	0.504	0.529	0.518	2.46%

3.10 加标回收率的测定

取阴性样本添加一定浓度的 DA, 其回收率如表 6 所示. 可以看出, 该法的添加回收率在 85% ~ 115% 范围内, 可见本研究建立的间接竞争 ELISA 法能够满足一般检测要求.

表 6 间接竞争 ELISA 加标回收率

Table 6 Sample recovery of ic-ELISA

样品添加浓度/ ($\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$)	样品数/ 个	OD ₄₅₀ - OD ₆₃₀ 平均值/ ($\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$)	加标 回收率
10	10	0.736	86.80%
20	10	0.662	98.20%
50	10	0.594	103.20%

4 结论(Conclusions)

本文建立的间接竞争 ELISA 法快速、灵敏、重现性好。不仅能满足国际规定的 $20 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ DA 安全限值的测定要求,而且也适合应用于现场对大批量样本的检测。

责任作者简介:程金平,男,博士,研究员,研究领域为环境化学,先后作为项目负责人或主要参与人,承担国家自然科学基金、国家“863”、国家“973”、上海科委科技攻关在内的科研项目 20 余项;2012 年入选教育部新世纪优秀人才。

参考文献(References):

- Costa L G, Giordano G, Faustman E M. 2010. Domoic acid as a developmental neurotoxin[J]. *Neuro Toxicology*, 31(5):409-423
- Fire S E, Wang Z H, Leighfield T A, *et al.* 2009. Domoic acid exposure in pygmy and dwarf sperm whales (*Kogia* spp.) from southeastern and mid-Atlantic US waters [J]. *Harmful Algae*, 8(5):658-664
- 高利利,程金平,刘元嫒,等. 2011. 软骨藻酸胶体金免疫层析检测试纸条的研制[J]. *环境科学*, 32(8):2492-2496
- Guo D, Wang B, Han F, *et al.* 2010. RNA interference therapy for glioblastoma[J]. *Expert Opin Biol Ther*, 10(6):927-936
- Jeffery B, Barlow T, Moizer K, *et al.* 2004. Amnesic shellfish poison[J]. *Food and Chemical Toxicology*, 42(4):545-557
- 刘仁沿,许道艳,董玉华,等. 2009. 海水和贝类中软骨藻酸的酶联免疫吸附分析方法研究[J]. *卫生研究*, 38(5):622-624
- 刘元嫒,高利利,程金平,等. 2011. 软骨藻酸间接竞争 ELISA 检测方法的研究[J]. *环境化学*, 30(6):1192-1196
- Mafra L L, Legar C, Bates S S, *et al.* 2009. Analysis of trace levels of domoic acid in seawater and plankton by liquid chromatography without derivatization using UV or mass spectrometry detection[J]. *Journal of Chromatography A*, 1216(32):6003-6011
- Smith E A, Papapanagiotou E P, Brown N A, *et al.* 2006. Effect of storage on amnesic shellfish poisoning (ASP) toxins inking scallops (*Pecten maximus*) [J]. *Harmful Algae*, 5(1):9-19
- 王茜. 2012. 抗软骨藻酸单克隆抗体直接竞争 ELISA 方法的建立及试剂盒的组装[D]. 上海:上海交通大学
- 王茜,程金平,高利利,等. 2012. 软骨藻酸直接竞争 ELISA 方法的建立及优化[J]. *环境科学*, 33(2):647-651
- Yu Z, Feng G P, Yan S L, *et al.* 2009. Colloidal gold probe-based immunochromatographic assay for the rapid detection of brevetoxins in fishery product samples[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 24(8):2744-2747