

胡乐琴,吴春燕,杨秀文,等. 微囊藻毒素 ELISA 检测方法的建立与评估[J]. 江苏农业科学,2015,43(9):340-343.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.09.110

微囊藻毒素 ELISA 检测方法的建立与评估

胡乐琴, 吴春燕, 杨秀文, 李修栋
(上海海洋大学水产与生命学院,上海 201306)

摘要:采用制备的微囊藻毒素(MC-LR)单克隆抗体制备包被抗原,建立 MC-LR 的 ELISA 检测方法。该方法定量检测区间 LQD 为 0.20~4.00 μg/L,最低检测限 LOD 为 0.10 μg/L,最高检测限 HOD 为 8.00 μg/L,最佳包被抗原浓度为 0.5 μg/mL,对应抗体稀释度为 1:20 000 左右,酶标二抗工作稀释度选择为 1:6 000;应用该方法对加标水样进行检测,综合回收率为(98.0±10.7)%,各样品检测结果变异系数均小于 10%。该 ELISA 方法准确度良好,精密度优良。

关键词:微囊藻毒素;单克隆抗体;间接竞争 ELISA;检测

中图分类号:X17 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2015)09-0340-04

我国是世界上藻灾最为严重的国家之一,藻毒素严重威胁居民饮水安全和食品安全。我国主要的淡水藻毒素是微囊藻毒素(microcystin,MC),微囊藻毒素是淡水蓝藻产生的一类生物活性物质,能够对人体多个器官产生危害,危害最严重的靶器官是肝脏,长时间低剂量接触 MCs 会导致肝损伤和诱发癌症^[1-2]。有研究表明,我国肝癌多发区与当地水中高含

量的微囊毒素有关^[3-4],MCs 引发的急性肝中毒症状表现为肝细胞损伤、肝出血^[5]。

预防藻毒素侵害最主要是保持水体清洁,防止藻类过量生长;同时,能够精确及时地检测毒素也是预防毒素污染的有效方法。我国淡水微囊藻毒素污染严重,但迄今为止尚没有一种较适合于现场使用的藻毒素检测方法,因此研制我国自主知识产权的检测淡水中微囊藻毒素的方法已成为当务之急。

藻毒检测方法主要有色谱检测、生物检测、细胞检测^[6-8],这些检测技术或是需要昂贵的仪器、或是需要较长的检测时间、或是准确率不够。与其他检测方法相比,酶联免疫法具有灵敏度高、特异性好、重复性高和检测准确快速的优点,在现场快速检测上具有开发前景,近年来在赤潮藻毒素快

收稿日期:2014-09-11

基金项目:上海市科学技术委员会创新项目(编号:14YZ122);上海海洋大学博士启动基金。

作者简介:胡乐琴(1966—),女,江西九江人,博士,副教授,主要研究方向为微藻、微生物。Tel:(021)61900475;E-mail:yqhu@shou.edu.cn。

表 1 精确度试验结果

加样浓度 (mg/L)	3 次测定浓度(mg/L)			回收率 (%)	RSD (%)
	I	II	III		
4.00	3.36	3.60	3.45	86.84	3.46
12.00	11.67	10.58	11.00	92.37	4.96
18.00	16.52	17.39	15.99	92.40	4.26

速检测分析方法,确定了多菌灵的表面增强拉曼特征峰:630、730、1 004、1 221、1 262、1 368、1 462、1 528 cm⁻¹。采用 SERS 方法检测干茶中多菌灵农药的最低检测浓度为 2 mg/L,满足国标检测茶叶的要求;选用 630 cm⁻¹处的峰强度与多菌灵浓度制定标准曲线,在 2~50 mg/L 具有良好的线性关系,线性方程为 y=15.731x+1 151.9,r²=0.980 2;回收率为 86.84%~92.40%,RSD 均小于 5%,说明本方法有良好的重现率。该方法前处理简单,整个试验操作在 20 min 内完成,为检测农产品中农药残留提供了技术支持。

参考文献:

[1]郭爱华,王 玮,赵媛媛,等. 高效液相色谱法测定蔬菜中多菌灵的残留量[J]. 中国卫生检验杂志,2014(10):1407-1410.
[2]张雪波,上官良敏. 茶叶中多菌灵和甲萘威农药残留量的测定

[J]. 质量技术监督研究,2009(2):19-21.
[3]林宏琳,华永有,倪 蕾,等. 液-质联用法同时测定食品中罗丹明 B 和苏丹红染料[J]. 中国卫生检验杂志,2012,22(10):2302-2304,2307.
[4]陈 曦,杨仁斌,董成森,等. 高效液相色谱法测定西瓜及其种植土壤中多菌灵残留的研究[J]. 湖南农业科学,2014(9):43-46.
[5]Shende C,Inscore F,Sengupta A,et al. Rapid extraction and detection of trace chlorpyrifos-methyl in orange juice by surface-enhanced Raman spectroscopy[J]. Sensing and Instrumentation for Food Quality and Safety,2010,4(3/4):101-108.
[6]崔淑华,郭庆龙,张 峰,等. 气相色谱-质谱法测定花生及制品中 17 种菊酯类农药残留[J]. 分析化学,2013,41(6):944-946.
[7]李晓舟,于 壮,杨天月,等. SERS 技术用于苹果表面有机磷农药残留的检测[J]. 光谱学与光谱分析,2013,33(10):2711-2714.
[8]张 萍,郑大威,刘 晶,等. 基于表面增强拉曼光谱技术的豆芽 6-BA 残留快速检测方法[J]. 光谱学与光谱分析,2012,32(5):1266-1269.
[9]刘燕德,叶 冰. 基于拉曼光谱技术的氧乐果含量定量分析[J]. 中国农机化学报,2014,35(1):88-91,102.
[10]王晓彬,吴瑞梅,刘木华,等. 多菌灵农药的激光拉曼光谱分析[J]. 光谱学与光谱分析,2014,34(6):1566-1570.

速检测方面得到重视和发展。笔者所在实验室在成功制备高效价 MC-LR 单克隆抗体的基础上,初步建立了检测 MC-LR 的间接竞争酶免疫学检测方法,为研制具有自主知识产权的相关检测试剂盒奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

微囊藻毒素单克隆抗体由笔者所在课题组研制;其他试剂均为国产分析纯。

1.2 包被抗原的制备

用兔血清白蛋白(rabbit serum albumin, RSA)制备包被抗原 MC-LR-RSA^[9],冰箱保存备用。

1.3 抗原、抗体最佳稀释浓度的确定

在 96 孔 ELISA 板上,检测抗原按纵向排列,抗体按横向排列。检测抗原用包被缓冲液(pH 值 9.6, 0.05 mol/L 碳酸盐缓冲液)稀释为 1:1 000、1:2 000、1:4 000、1:8 000 这 4 个浓度,每浓度 3 个重复,每孔 100 μ L,4 $^{\circ}$ C 过夜;洗涤液后静置 1 min,重复洗涤 3 次;用 0.1% BSA(用包被液进行稀释)的封闭液进行封闭,每孔 120 μ L,37 $^{\circ}$ C 1 h,洗涤 3 次,拍干。

MC-LR 抗体浓度调为 7.5 mg/mL,用高纯水稀释成如下梯度浓度:0、0.025、0.05、0.1、0.2、0.5、1、2、4、8、20 μ g/L 共 11 个点;依次加入酶标板上的 1 号至 12 号孔中,抗体体积为 100 μ L/孔,37 $^{\circ}$ C 温育后洗涤 3 次;加入 HRP 标记的羊抗鼠 IgG,酶标二抗羊抗鼠 IgG 浓度选择为 1:6 000,每孔加入 100 μ L,37 $^{\circ}$ C 温育 1 h,洗涤 4 次;显色液为 TMB;终止液为 2 mol/L H_2SO_4 。在酶标仪上测定 $D_{450\text{ nm}}$ 值,确定最佳包被抗原与抗体浓度。

1.4 标准曲线的测定

根据“1.3”节所得到的最佳包被抗原浓度和最佳抗体稀释倍数,以及最佳二抗浓度,用标准系列稀释的 MC-LR(0、0.025、0.05、0.1、0.2、0.5、1、2、4、8、20 μ g/L),按照间接竞争 ELISA 测定。采用 $n=3$ 个平行试验,获得标准曲线。

1.5 一抗最佳反应时间的确定

根据“1.3”节试验选取最佳的抗原、抗体稀释度,包被抗原浓度为 0.5 μ g/mL,对应的抗体稀释度为 1:20 000,作为 ELISA 的反应条件。将 MC-LR 标准品用高纯水配制成如下梯度浓度:0、0.2、0.5、1、2、4 μ g/L,共 6 个点,进行标准曲线测定,每孔 50 μ L 标准品;同时加入用 PBS 配制好的单抗溶液,每孔 50 μ L,放入 37 $^{\circ}$ C 培养箱中温育,一抗反应时间设定为 30、60、90 min 3 个组,每组 3 个平行;二抗体反应时间固定为 60 min。每个时间内标准曲线设置 2 个平行。反应结束后分别洗涤 3 次,拍干。

加二抗:酶标二抗采用 HRP 标记的羊抗鼠 IgG,采用 PBS 稀释,每孔加入 100 μ L,37 $^{\circ}$ C 温育 1 h,洗涤 4 次,拍干。

显色:加入新配制的底物液(TMB- H_2O_2),每孔 100 μ L,室温下固定反应 10 min。测定 $D_{450\text{ nm}}$ 值,选择最佳一抗反应时间。

1.6 实际水样的检测(准确度和精密验证)

1.6.1 水样的采集和预处理 选取上海市不同来源的水样,包括饮用水、地下水、景观娱乐用水(游泳池和公园水样)以及地表水(城市河道水体)14 个样品,每个水样采集体积为

10 mL,对较混浊的样品采用 0.45 μ m 的滤膜过滤。

1.6.2 水样的添加-回收测定 在 14 个水样中添加标准微囊藻毒素,每个样品毒素的最终浓度分别为 0.2、0.5、1.0 μ g/L,共 3 个不同浓度。采用直接竞争 ELISA 测定样品中毒素含量,每个水样平行测定 5 次,根据标准曲线计算水样中 MC-LR 浓度。同时测定原水中的毒素含量,结果进行比较,并计算回收率。回收率的计算方法如下:每个样品平行测定 5 次,计算吸光度的平均值,样品添加浓度(最终浓度)用 X 表示,未添加标准品的样品测定平均值为 x_1 ,添加了标准品的样品测定平均值为 x_2 ,则回收率计算如式(1)。当原水样 ELISA 测定浓度超出本方法的检测限,即小于 0.1 μ g/L 时,视为未检出,此时均按照 $x_1=0$ 计算回收率。

$$\text{回收率} = \frac{x_2 - x_1}{X} \times 100\% \quad (1)$$

1.7 一致性检验

按照确定的 ELISA 标准曲线测试方法,对所包被的单条可拆酶标板,同一个人分 3 d(2014 年 4 月 7—9 日)进行同样的试验。

试验过程描述如下:包被抗原浓度为 0.5 μ g/mL,对应的抗体稀释度为 1:20 000,微囊藻毒素-LR 标准品:0、0.2、0.5、1、2、4 μ g/L 共 6 个点,进行标准曲线测定,每孔 50 μ L 标准品;同时加入用 PBS 配制好的单抗溶液,每孔 50 μ L,放入 37 $^{\circ}$ C 培养箱中温育,时间 60 min;每个标准品设置 2 个平行。反应结束后洗涤 3 次,拍干。加二抗:酶标二抗采用 HRP 标记的羊抗鼠 IgG,采用 PBS 稀释,每孔加入 100 μ L,37 $^{\circ}$ C 温育 1 h,洗涤 4 次,拍干。显色:加入新配制的底物液(TMB- H_2O_2),每孔 100 μ L,室温下固定反应 10 min。终止:向每孔中加入 50 μ L 的 2 mol/L 的硫酸溶液。测定:用酶标仪测定其在 450 nm 的吸光度 $D_{450\text{ nm}}$ 。

2 结果与分析

2.1 包被抗原和抗体最佳浓度的确定

本试验结果包被抗原浓度为 0.5 μ g/mL,对应的抗体稀释度为 1:20 000 左右,可以作为 ELISA 良好的反应条件。酶标二抗工作稀释度为选择 1:6 000。

2.2 标准曲线的绘制和分析

间接竞争 ELISA 的标准曲线如图 1 所示,误差线为 $n=3$ 次平行试验的标准偏差,试验重复性良好,相对标准偏差(变异系数)均在 10% 以内。从图 1 可以看出,曲线呈现明显的反 S 形。

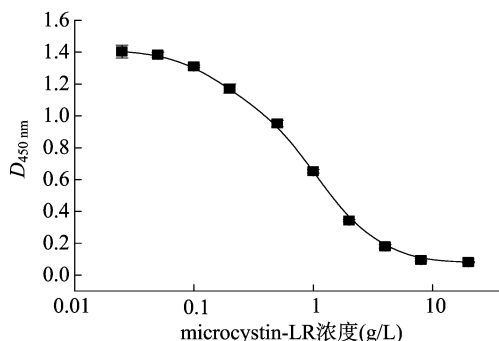


图1 间接竞争 ELISA 标准曲线

由标准曲线可以分析:(1) 半抑制浓度 $IC_{50} = (0.81 \pm 0.05) \mu\text{g/L}$ 。(2) 检测限。间接竞争 ELISA 的最低检测限 LOD 是结合率 $y = 10\%$ 时所对应的目标物质的浓度,即 $LOD = 0.10 \mu\text{g/L}$;最高检测限 HOD 是结合率 $y = 90\%$ 时所对应的目标物质的浓度,即 $HOD = 8.00 \mu\text{g/L}$ 。(3) 定量检测区间。靠近中点处(x_0)的一段区间是线性的,称之为定量检测区间,间接竞争 ELISA 的定量检测区间是结合率为 $80\% \sim 20\%$ 所对应的目标物质的浓度区间,即 LQD 为 $0.20 \sim 4.00 \mu\text{g/L}$ 。

2.3 最佳一抗反应时间的确定

一抗反应 30 min 的结果(图 2)表明,吸光度偏低,同时在较高浓度范围内,吸光度变化不是太明显,标准曲线有拖尾的现象。一抗反应 60 min 的结果(图 3)表明,标准曲线线性较好,能满足实际检测的需要。

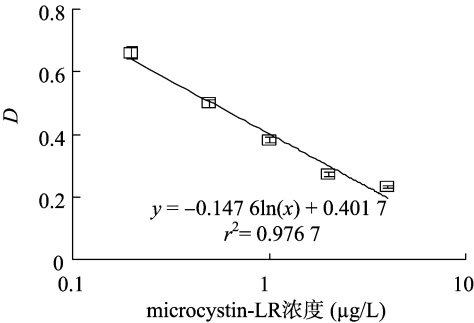


图2 一抗反应 30 min 结果

一抗反应 90 min 的结果(图 4)表明,吸光度较高,说明反应充分;同时标准曲线的线性度也较好,也能满足实际检测要求。但是 90 min 相对来说时间较长,不推荐在实际操作中应用。

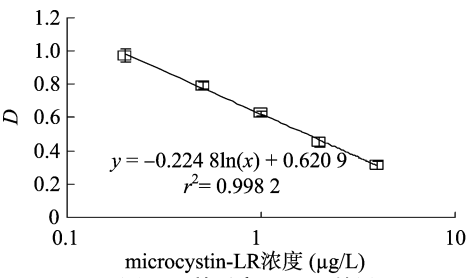


图3 一抗反应 60 min 结果

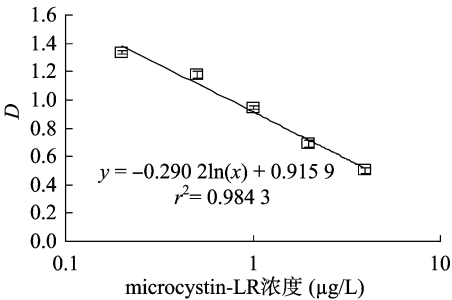


图4 一抗反应 90 min 结果

2.4 添加-回收检测结果分析

表 1 中样品 1~4 分别为笔者所在实验室饮用水、地下水、游泳池水及公园景观水。由表 1 可知,水样 1~4 的 ELISA 测定结果均小于 $0.1 \mu\text{g/L}$,均视为未检测出 MC-LR。其中水样 4 为地表水体,有富营养化趋势,最有可能存在 MC-LR。但由于采样时间为 3 月底,尚没有发生藻类水华的暴发,因而没有检出 MC-LR。各样品的综合回收率为 $(98.0 \pm 10.7)\%$ 。此结果表明,本研究的 ELISA 方法准确度良好。而且各样品检测结果的变异系数均小于 10% ,精密度优良,所建立的 ELISA 检测方法具有良好的稳定性。

表 1 实际水样检测分析结果

样品编号	原水中 MC-LR 浓度 ($\mu\text{g/L}$)	加入的标准 MC-LR 浓度 ($\mu\text{g/L}$)	加标后检测结果 ($\mu\text{g/L}$)	变异系数 (%)	回收率 (%)
样品 1	<0.1	0.2	0.22	1.8	110
		0.5	0.56	2.0	112
		1.0	0.96	3.6	96
样品 2	<0.1	0.2	0.21	3.5	105
		0.5	0.52	2.3	104
		1.0	0.90	4.5	90
样品 3	<0.1	0.2	0.17	7.9	85
		0.5	0.41	9.7	82
		1.0	0.91	7.2	91
样品 4	<0.1	0.2	0.18	8.7	90
		0.5	0.49	5.3	98
		1.0	1.13	9.0	113

2.5 一致性试验

试验结果(图 5、图 6、图 7)表明,各标准曲线的斜率较为接近;吸光度虽然略有差异,但这应该是由试验过程中显色-终止时间的微小差异决定的,不可避免。总体来说,所建立的微囊藻毒素 ELISA 方法,一致性较好。

3 讨论

微囊藻毒素目前已经分离出 80 多种异构体^[10],其中 MC-LR 是目前毒性最大、存在最广泛、研究最多的一种,也

是我国最常见的微囊藻毒素种类^[11]。目前 MC-LR 被定为检测微囊藻毒素污染的指标。为了降低 MCs 对人和水生动物的毒性及潜在危害性,世界卫生组织(WHO)推荐水中微囊藻毒素的安全指导值 MC-LR 是 $1\,000 \text{ ng/L}$ ^[12]。

常用的藻毒素检测方法是高效液相色谱法(HPLC)、免疫学法以及生物毒性法(MBA)。HPLC 法精确灵敏,但需要复杂的设备和专业的操作人员;MBA 法简单直观,但精确性和灵敏性较差。免疫学技术利用抗原抗体之间的特异性进行样品捕获和检测,被应用于检测领域后取得了显著的效果,具有快速、

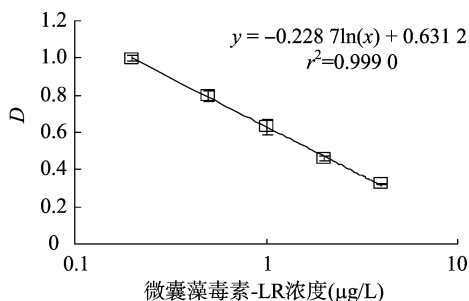


图5 2014年4月7日检测数据

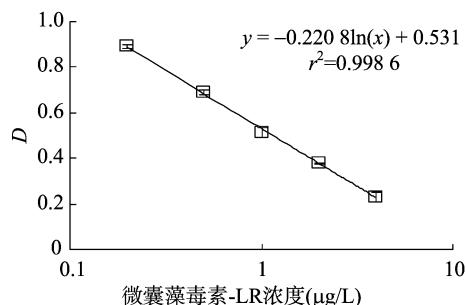


图6 2014年4月8日检测数据

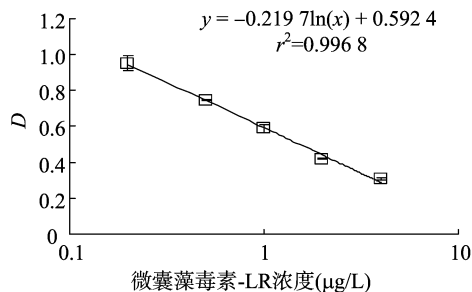


图7 2014年4月9日检测数据

灵敏、操作简单、不需要复杂仪器设备、价格低廉、便于制成可携带的检测纸板和试剂盒等优点,成为我国攻克藻毒素现场快速检测的首选方法。国际上已经有关于免疫检测技术在藻毒素检测的研究报道,并且已经制备出了部分藻毒素的 ELISA 试剂盒,如美国、日本、欧洲一些国家有微囊藻毒素(microcystin)^[13-14]和软海绵酸(okadaic acid, OA)的 ELISA 检测试剂盒销售^[15-16],但价格昂贵,检测成本高,不适合大量样品的检测;近年我国也有学者研究藻毒素的免疫检测技术,如盛建武等将 MC 与 BSA 偶联制备免疫原 MC-LR-BSA,用其研制的抗体建立的 ELISA,最低的检测限为 10 ng/L^[17]。赵晓联等采用人 KLH 作为载体制备免疫原 MC-LR-KLH,其抗体建立的 ELISA 最低检测限为 0.01 ng/mL^[18]。

本研究选取我国典型微囊藻毒素(microcystin-LR)为研究对象,采用碳二亚胺缩合方法分别合成了毒素的完全抗原 MC-LR-KLH,利用制备的单克隆抗体发展建立了有效的 MC-LR 间接竞争酶联免疫检测,最佳包被抗原浓度为 0.5 μg/mL,对应抗体稀释度为 1:20 000 左右,酶标二抗工作稀释度选择为 1:6 000;检测区间 LQD 为 0.20~4.00 μg/L,最低检测限 LOD 为 0.10 μg/L,最高检测限 HOD 为 8.00 μg/L,特异性较好。

应用该方法对 4 个加标水样进行检测,各水样原水均未检测出 MC-LR (<10 ng/L),检测结果相对标准偏差均小于 10%,与投加的标准 MC-LR 相关系数大于 0.98,样品的回收率在综合回收率为 (98.0 ± 10.7)%。该 ELISA 方法准确度高,精密度优良。

参考文献:

- [1] 许川,舒为群,曹佳. 我国水环境微囊藻毒素污染及其健康危害研究[J]. 癌变·畸变·突变,19(3):202-205.
- [2] 隋海霞,严卫星,徐海滨,等. 武汉东湖微囊藻污染及其在鱼体内的动态研究[J]. 卫生研究,2004,33(1):39-41.
- [3] 陈刚,俞顺章,卫国荣. 肝癌高发区不同饮用水类型中微囊藻毒素含量调查[J]. 中华预防医学杂志,1996,30(1):6-9.
- [4] 张明东,俞顺章,梁任祥. 广西扶绥县原发肝癌病例对照研究[J]. 中华流行病学杂志,1993,14(1):14-17.
- [5] 俞顺章,赵宁,资小林. 饮水中微囊藻毒素与我国原发肝癌关系的研究[J]. 中华肿瘤杂志,2001,23(2):96-99.
- [6] Poon G K, Griggs L J, Edwards C. Liquid chromatography - electrospray ionization - mass spectrometry of cyanobacterial toxins[J]. Journal of Chromatography,1993,628(2):215-233.
- [7] Mails M, Budde W L. LC/MS method for the determination of cyanobacteria, toxins in water[J]. Analytical Chemistry,2004,76(5):1342-1351.
- [8] Quilliam M A, Wright J L C. The amnesic shellfish poisoning mystery[J]. Analytical Chemistry,1989,61(18):1053-1059.
- [9] 盛建武,何苗,钱易,等. 微囊藻毒素-LR 完全抗原的设计及制备[J]. 环境科学,2005,26(3):33-37.
- [10] An J, Carmichael W W. Use of a colorimetric protein phosphatase inhibition assay and enzyme linked immunosorbent assay for the study of microcystins and nodularins[J]. Toxicon,1994,32(12):1495-1507.
- [11] Shen P P, Shi Q, Hua Z C, et al. Analysis of microcystins in cyanobacteria blooms and surface water samples from Meiliang Bay, Taihu Lake, China[J]. Environ Int,2003,29(5):641-647.
- [12] WHO. Guidelines for drinking - water quality[R]. Geneva: World Health Organization,1998.
- [13] Chu F S, Huang X, Wei R, et al. Production and characterization of antibodies against microcystin[J]. Appl Environ Microbiol,1989,55:1928-1933.
- [14] McDermott C M, Feola R, Prude J. Detection of cyanobacterial toxins (microcystins) in waters of northeastern Wisconsin by a new immuno - assay technique[J]. Toxicon,1995,33:1433-1442.
- [15] Tagmouti - Talha F, Moutaouakkil A, Taib N, et al. Detection of paralytic and diarrhetic shellfish toxins in moroccan cockles (Acanthocardia tuberculata)[J]. Bull Environ Contam Toxicol,2000,65:707-716.
- [16] Llamas N M, Stewart L, Fodey T, et al. Development of a novel immunobiosensor method for the rapid detection of okadaic acid contamination in shellfish extracts[J]. Anal Bioanal Chem,2007,389(2):581-587.
- [17] 盛建武,何苗,余少青,等. 水体中微囊藻毒素-LR 的间接 ELISA 检测[J]. 环境科学,2006,27(6):1166-1170.
- [18] 赵晓联,孙蔚榕,刘媛,等. 微囊藻毒素(MC-LR)多克隆抗体的制备、纯化及鉴定[J]. 2006,35(1):76-78.