

环境科学

(HUANJING KEXUE)

ENVIRONMENTAL SCIENCE

第33卷 第2期

Vol.33 No.2

2012

中国科学院生态环境研究中心 主办
科学出版社 出版



目次

基于人体健康风险的水污染事件污染物安全阈值研究	郑丙辉, 罗锦洪, 付青, 秦延文, 胡林林 (337)
基于人体健康风险的水污染事件遗传性致癌物安全浓度研究	罗锦洪, 郑丙辉, 付青, 黄民生 (342)
湿地水环境健康评价方法及案例分析	李玉凤, 刘红玉, 郝敬峰, 郑因, 曹晓 (346)
北运河下游典型河网区水体中氮磷分布与富营养化评价	单保庆, 菅宇翔, 唐文忠, 张洪 (352)
漳卫南运河流域水质时空变化特征及其污染源识别	徐华山, 徐宗学, 唐芳芳, 于伟东, 程燕平 (359)
黄河三角洲浅层地下水化学特征及形成作用	安乐生, 赵全升, 叶思源, 刘贯群, 丁喜桂 (370)
沉积物扰动持续时间对悬浮物中磷形态数量分布的影响	李大鹏, 黄勇, 李勇, 潘杨 (379)
沉水植物生长期对沉积物和上覆水之间磷迁移的影响	王立志, 王国祥, 俞振飞, 周贝贝, 陈秋敏, 李振国 (385)
长寿湖表层沉积物氮磷和有机质污染特征及评价	卢少勇, 许梦爽, 金相灿, 黄国忠, 胡文 (393)
洪泽湖沉积物中营养盐和重金属的垂向分布特征研究	张文斌, 余辉 (399)
降雨对农家堆肥氮磷流失的影响及其面源污染风险分析	彭莉, 王莉玮, 杨志敏, 陈玉成, 乔俊婧, 赵中金 (407)
浅水湖泊水动力过程对藻型湖区水体生物光学特性的影响	刘笑菡, 冯龙庆, 张运林, 赵林林, 朱梦圆, 时志强, 殷燕, 丁艳青 (412)
基于半分析模型的太湖春季水体漫衰减系数 K_d (490) 估算及其遥感反演	刘忠华, 李云梅, 李瑞云, 吕恒, 檀静, 郭宇龙 (421)
基于 QAA 算法的巢湖悬浮物浓度反演研究	张红, 黄家柱, 李云梅, 徐伟凡, 刘忠华, 徐昕 (429)
好氧/厌氧潜流湿地结构工艺优化	李锋民, 单时, 李媛媛, 李扬, 王震宇 (436)
邻苯二甲酸二丁酯对短裸甲藻活性氧自由基的影响	别聪聪, 李锋民, 李媛媛, 王震宇 (442)
Rac-及 S-异丙甲草胺对 2 种微藻毒性特征影响研究	蔡卫丹, 刘惠君, 方治国 (448)
羟基自由基致死船舶压载水海洋有害生物研究	白敏冬, 张拿慧, 张芝涛, 陈操, 孟祥盈 (454)
天然菱铁矿改性及强化除砷研究	赵凯, 郭华明, 李媛, 任燕 (459)
零价铁降解 4-氯硝基苯动力学研究	廖娣劫, 杨琦, 李俊鎔 (469)
水体中氧氟沙星的光化学降解研究	邵萌, 杨桂朋, 张洪海 (476)
阿替洛尔在硝酸根溶液中的光降解研究	季跃飞, 曾超, 孟翠, 杨曦, 高士祥 (481)
吡啶在紫外光辐射下的生物降解	方苗苗, 阎宁, 张永明 (488)
蜜环菌漆酶对蒽醌类染料的脱色条件优化	朱显峰, 秦仁炳, 余晨晨, 范书军 (495)
ϵ -聚赖氨酸生产废菌体对六价铬吸附影响的研究	曹玉娟, 张杨, 夏军, 徐虹, 冯小海 (499)
丝状菌污泥致密过程的强化条件研究	李志华, 孙玮, 姬晓琴, 王晓昌 (505)
亚硝化颗粒污泥对温度变化的响应特性研究	罗远玲, 杨朝晖, 徐峥勇, 周玲君, 黄兢, 肖勇, 曾光明, 汪理科 (511)
我国典型工程机械燃油消耗量及排放清单研究	李东玲, 吴烨, 周昱, 杜让, 傅立新 (518)
北京市 PM_{10} 自动监测网络优化研究	齐玲, 赵越, 谢绍东 (525)
道路绿化带对街道峡谷内污染物扩散的影响研究	徐伟嘉, 幸鸿, 余志 (532)
Fe^{II} (EDTA) 络合协同 RDB 去除 NO 废气效能及过程分析	陈浚, 杨宣, 於建明, 蒋轶锋, 陈建孟 (539)
UV-B 辐射对亚热带森林凋落叶氮、磷元素释放的影响	宋新章, 张慧玲, 江洪, 余树全 (545)
干热河谷林地燥红土固碳特征及“新固定”碳表观稳定性	唐国勇, 李昆, 孙永玉, 张春华 (551)
九龙江河口表层水体及沉积物中甲烷的分布和环境控制因素研究	郭莹莹, 陈坚, 尹希杰, 孙治雷, 邵长伟 (558)
秋季黄河口滨岸潮滩湿地系统 CH_4 通量特征及影响因素研究	姜欢欢, 孙志高, 王玲玲, 牟晓杰, 孙万龙, 宋红丽, 孙文广 (565)
我国典型非木浆造纸二噁英排放研究	王志芳, 丁琼, 王开祥, 吴昌敏, 曲云欢, 赵晓冬 (574)
典型电器工业区河涌沉积物中的多溴联苯醚空间和垂直分布	邱孟德, 邓代永, 余乐洵, 孙国萍, 麦碧娴, 许玫英 (580)
电子废物拆解区农业土壤中多氯联苯的污染特征	王学彤, 李元成, 张媛, 缪绎, 孙阳昭, 吴明红, 盛国英, 傅家谟 (587)
北京科教园区绿地土壤中多环芳烃的残留特征与潜在风险	彭驰, 王美娥, 欧阳志云, 焦文涛, 陈卫平 (592)
上海城市样带土壤重金属空间变异特征及污染评价	柳云龙, 章立佳, 韩晓非, 庄腾飞, 施振香, 卢小遮 (599)
海河流域北部地区河流沉积物重金属的生态风险评价	尚林源, 孙然好, 王赵明, 汲玉河, 陈利顶 (606)
三峡库区消落带不同水位高程土壤重金属含量及污染评价	王业春, 雷波, 杨三明, 张晟 (612)
超声波促进好氧/缺氧污泥消化过程中细菌群落结构分析	叶运弟, 孙水裕, 郑莉, 刘宝健, 蔡明山, 许燕滨, 占星星 (618)
大庆聚驱后油藏内源微生物群落结构解析与分布特征研究	赵玲侠, 高配科, 曹美娜, 高梦黎, 李国强, 朱旭东, 马挺 (625)
不同碳源刺激对老化污染土壤中 PAHs 降解研究	尹春芹, 蒋新, 王芳, 王聪颖 (633)
应用电致化学发光分子探针技术对微小原甲藻的检测	朱霞, 甄毓, 米铁柱, 于志刚, 池振明, 路兴岚 (640)
软骨藻酸直接竞争 ELISA 方法的建立及优化	王茜, 程金平, 高利利, 董宇, 席磊 (647)
固相萃取-高效液相色谱法同时测定水体中的 10 种磺胺类抗生素	洪蕾洁, 石璐, 张亚雷, 周雪飞, 朱洪光, 林双双 (652)
五氯酚对 HeLa 细胞毒性及 DNA 损伤的研究	金帮明, 王辅明, 熊力, 张晓峰, 刘堰 (658)
建筑陶瓷碳计量与优化模型研究	彭军霞, 赵宇波, 焦丽华, 曾路, 郑为民 (665)
《环境科学》征订启事 (447) 《环境科学》征稿简则 (475) 信息 (524, 586, 605, 624)	

软骨藻酸直接竞争 ELISA 方法的建立及优化

王茜,程金平*,高利利,董宇,席磊

(上海交通大学环境科学与工程学院,上海 200240)

摘要:为建立软骨藻酸(domoic acid, DA)直接竞争 ELISA 方法快速检测样品中的软骨藻酸,本研究利用碳化二亚胺法将辣根过氧化物酶(HRP)标记软骨藻酸(DA),成功制得偶联物 DA-HRP. 在前期已制得抗软骨藻酸单克隆抗体的基础上,利用酶标抗原和单克隆抗体的特异性反应,对软骨藻酸进行定量分析. 通过对封闭液、封闭时间和温育温度的优化,建立标准曲线. 结果表明以 1% 明胶作为封闭液,在 37℃ 下封闭 1 h,加入单抗 37℃ 温育 1 h 是直接竞争 ELISA 法的最佳反应条件,方法检出限为 3.58 ng·mL⁻¹,孔间变异系数均≤15%,加标回收率为 80%~120%,检测速度较快,1.5 h 内可检测出一批样品,适用于现场和批量检测,具有广泛的发展前景.

关键词:软骨藻酸(DA);酶联免疫吸附法(ELISA);抗体;抗原;快速检测

中图分类号: X830.2 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2012)02-0647-05

Development of Direct Competitive Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for the Determination of Domoic Acid

WANG Qian, CHENG Jin-ping, GAO Li-li, DONG Yu, XI Lei

(School of Environmental Science and Engineering, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China)

Abstract: To develop a direct competitive enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for rapid detection of domoic acid concentrations, HRP (horse radish peroxidase) was successfully linked to DA using EDC. The concentration of DA was quantitatively analyzed on the basis of the specific immune responses between the DA-HRP and the monoclonal antibodies made in advance. Calibration curve were established after the optimization of reaction conditions such as the type of blocking solution, the blocking time and the incubation temperature. The results show that, the best reaction condition of the direct competitive ELISA is 1% gelatin, blocking 1 h at 37℃, incubating 1 h at 37℃ after the monoclonal antibodies added. The detect limit is 3.58 ng·mL⁻¹, the coefficient of variation between the holes is below 15%, and the recovery is 80%-120%. The whole analysis process could be completed within 1.5 h. It meets the requirements of rapid and batch detection of domoic acid. The method will have broad development prospects.

Key words: domoic acid(DA); enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA); antibody; antigen; rapid detection

软骨藻酸(domoic acid, DA),作为一种罕见的天然神经毒性氨基酸,由它引发的食物中毒可引起呕吐、腹泻、神志不清、记忆丧失、眩晕、昏迷甚至死亡^[1,2]. 1987年加拿大王子岛的东海岸首次发生有人食用了被软骨藻酸污染的贻贝而中毒死亡^[3],随后又相继在多种海洋生物中发现 DA^[4~7]. 为了保证人类健康,软骨藻酸的检测技术逐渐得到了发展. 目前,常用的软骨藻酸的检测技术包括:小白鼠生物检测法、高效液相色谱(HPLC)检测法、毛细管电泳检测法、酶联免疫吸附法等. 小白鼠生物检测法受外界影响因素多,检出限高,只有 300~1 000 μg·g⁻¹左右^[8],不能满足现今科研的要求. 高效液相色谱法检测速度快、检出限低,能够达到 μg·kg⁻¹级、测定结果精确度高,能够与紫外检测器、质谱仪和荧光检测器联用来改善方法的灵敏度^[9~12],但是仪器贵重,不能批次测定,携带不便,不适于现场的快速检测. 酶联免疫吸附法即 ELISA 法利用抗软骨藻酸抗体和抗原之间的特异反应,来测定样品中 DA 的浓度,

自 Newsome 等^[13]于 1991 年开发了 DA 的 ELISA 方法之后,ELISA 法得到了很大的发展. 在国外该方法的准确度、精密度都有了很大的改善,检出限已经能够达到 0.1 ng·mL⁻¹^[14]. 在国内,对于软骨藻酸 ELISA 方法的研究还较少,还没有开发出成熟的 ELISA 试剂盒. 成熟的 ELISA 试剂盒,便于携带,样品前处理相对简单,但是目前所开发的试剂盒多为间接竞争 ELISA 试剂盒,需要制备 DA 与蛋白质的偶联物并进一步加入酶标二抗,检测时间一般在 2~3 h 之间,因此开发出更加快速、操作简单、准确的试剂盒已经成为了软骨藻酸快速检测的主要趋势.

收稿日期: 2011-04-26; 修订日期: 2011-06-30

基金项目: 国家高新技术研究发展计划(863)项目(2007AA092001-15);上海科委科技攻关项目(08DZ1206302);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项目(MATHAB200917)

作者简介: 王茜(1987~),女,硕士研究生,主要研究方向为赤潮藻毒素的快速检测, E-mail: wangqian19870102@163.com

* 通讯联系人, E-mail: jpcheng@sjtu.edu.cn

本研究基于前期制备软骨藻酸单克隆抗体的基础上^[15],利用蛋白质偶联技术将 DA 与辣根过氧化物酶(HRP)偶联,直接利用抗体和酶标抗原的特异性免疫反应,建立直接竞争 ELISA 法快速检测 DA,检测时间相较于间接竞争 ELISA 法能够提高 1 h 左右,为我国记忆缺失性贝毒监测提供更加快速、稳定的分析方法。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

辣根过氧化物酶(HRP)购于上海生工、明胶购于中国国药集团、软骨藻酸单克隆抗体为本实验室自制。

其他试剂与仪器同本课题组刘元媛^[16]的研究。

1.2 实验方法

1.2.1 酶标抗原的制备

DA 为小分子,本身并不能产生免疫反应。本研究将 DA 与标记物 HRP 偶联制得酶标抗原,采用碳化二亚胺法^[17,18]合成酶标抗原,取 200 μg 软骨藻酸(DA),分别加入 0.4 mg EDC,0.3 mg NHS^[19],25℃反应 2 h,随后置于 4℃的冰箱里过夜。次日,取出反应液加入 500 μg HRP,25℃反应 3 h,使用截留分子量为 10 000 的超滤管离心。用移液枪取出离心后的内管液体,PBS 稀释,分装。考马斯亮蓝法测定其蛋白质浓度。

1.2.2 棋盘滴定法确定酶标抗原和抗体最佳使用浓度

将制得的单克隆抗体用包被缓冲液分别按 1:200、1:400、1:800、1:1 600 倍数稀释,每孔加入 100 μL ,同时加入一系列生理盐水作空白对照,一系列阴性血清做阴性对照,4℃包被过夜。次日倒出孔内液体,洗涤液洗涤 3 次,拍干。再在各孔中加入满孔 0.5% BSA,37℃封闭 1 h。将制得的 DA-HRP 稀释后,顺序加入,稀释比为 1:200、1:400、1:800、1:1 600,每孔加 100 μL ,37℃包被 1 h。洗涤拍干。每孔加新鲜配置的底物溶液 100 μL ,室温显色 10 min。每孔加终止液 50 μL 。在 450 nm 及 630 nm 处测定 D 值。

1.2.3 最佳封闭液、封闭时间和封闭温度的选择

包被 100 μL 抗体稀释液(浓度为 1.2.2 节确定的最佳抗体使用浓度)至酶标板中,加入一系列生理盐水作空白对照,一系列阴性血清做阴性对照,4℃包被过夜。次日倒出孔内液体,洗涤液洗涤 3 次,拍干。分别加入 1% BSA、0.5% BSA、0.1% 明胶、1% 明胶作为封闭液封闭 1 h,倒出拍干,加入最佳工作浓度

的 DA-HRP 100 μL ,温育 1 h,洗涤拍干,每孔加新鲜配置的底物溶液 100 μL ,室温显色 10 min。每孔加终止液 50 μL 。在 450 nm 及 630 nm 处测定 D 值,选定最佳封闭液。并在最佳封闭液条件下,分别测定封闭 30、60、90 min 时,在 25、37、43℃ 这 3 种不同温度下的 D 值。

1.2.4 最佳温育时间和温度的选择

包被、封闭过程同上,加入酶标抗原,在 25、37、43℃条件下分别温育 30、60、90、120 min,选定最佳温育时间和温度。

1.2.5 直接竞争 ELISA 方法的建立

每孔加入 100 μL 最佳使用浓度的抗体稀释液,4℃,包被过夜。次日倒出孔内液体,洗涤液洗涤 3 次,每次 3 min,拍干。加入最佳封闭液,按 1.2.3 节所确定的最佳封闭时间和温度封闭,加入最佳工作浓度的 DA-HRP 50 μL ,将 DA 用 PBS 配成 0、1、10、50、250、500、1 000 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的系列溶液,每孔加入 50 μL ,按 1.2.4 节所确定的温育时间和温度温育,洗涤拍干,显色测定。

1.2.6 加标回收率的测定

在样品中分别添加 1、5、10 和 50 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的 DA,按照 1.2.5 节的建立的 ELISA 方法测定浓度,计算样品加标回收率。

2 结果与讨论

2.1 酶标抗原浓度的测定及鉴定

反应完成后,通过考马斯亮蓝法测定反应物蛋白质浓度,为 8.36 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$,稀释至大约 1 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。将反应物(1 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$)、DA(1 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$)、HRP(1 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$)用紫外光谱进行特征扫描。扫描结果如图 1 所示。从中可以看出,DA 的

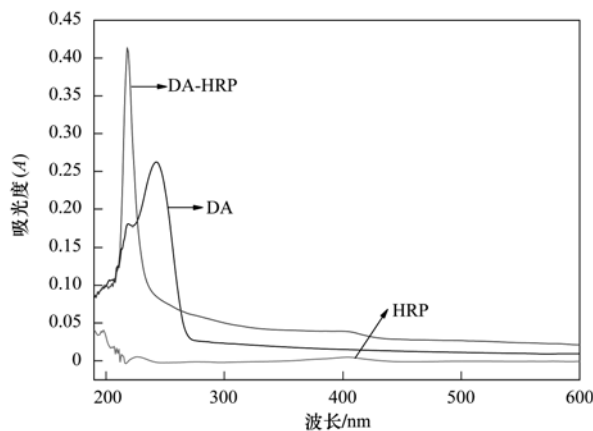


图 1 软骨藻酸、HRP、酶标抗原紫外扫描图

Fig. 1 UV scanning of DA, HRP, DA-HRP

最大吸收波长为 242 nm,HRP 在 403 nm 处有一个特征吸收峰,DA-HRP 的紫外扫描图像与 DA、HRP 有很大的区别,因此可以判断 HRP 成功的偶联到了 DA 分子上.

2.2 酶标抗原和抗体最佳使用浓度的确定

通过酶标板的包被、封闭、显色等过程测定各孔 D 值,结果如表 1 所示.

选取 P/N 值 ≥ 2.1 的且 D 值在 0.8~1.2 之间

的那一组数值作为抗原抗体最佳工作浓度^[20].表 1 显示,当酶标抗原稀释比为 1:400,抗体稀释度为 1:200 时,D 值为 0.905 0,P/N=7.39, ≥ 2.1 ,抗体稀释比 1:200 和酶标抗原稀释比 1:200 这组浓度的 D 值与 P/N 值也符合要求,但是抗原浓度较高,会使非特异性结合增强,本底值相对偏高^[21],P/N 值减小,另外酶标抗原 1:400 的稀释度更能节约抗原,降低成本,因此选用抗体 1:200,酶标抗原 1:400 为最佳

表 1 酶标抗原和抗体最佳使用浓度的确定

Table 1 Optimal concentration of DA-HRP and antibody						
抗原稀释浓度	抗体稀释浓度				阴性对照	空白
	1:200	1:400	1:800	1:1 600		
1:200	0.827 5	0.362 0	0.108 5	0.079 5	0.106 0	0.064 5
1:400	0.905 0	0.224 5	0.096 0	0.100 5	0.113 0	0.063 0
1:800	0.519 0	0.231 5	0.125 0	0.081 5	0.125 0	0.064 0
1:1 600	0.460 0	0.406 5	0.107 5	0.131 5	0.097 0	0.075 0

工作浓度.

2.3 最佳封闭液、封闭时间、封闭温度的确定

在 1:400 的酶标抗原稀释度和 1:200 的抗体稀释度的条件下,本研究比较了 1% BSA、0.5% BSA、0.1% 明胶、1% 明胶这 4 种封闭液的效果,结果如图 2 所示.在抗原或抗体包被后,常加入封闭液以去除微孔表面残留的吸附位点.经封闭液处理后酶标板非特异性结合位点被封闭,可以降低非特异性的背景显色,提高特异性和灵敏度.通过图 2 可以看出,使用 1% 的明胶时 D 值较接近于 1,P/N 值 ≥ 2.1 ,同时明胶做封闭液的阴性对照的 D 值为 0.099 0,对阴性值的影响不大,所以选用 1% 明胶作为封闭剂.

另外封闭时间和温度对封闭效果也有重大影响.如图 3 所示.

当封闭温度为 25℃ 时,随封闭时间增加 P/N 值随之也增加,但是当封闭时间过长时会造成封闭液的难于清洗与能源的浪费;当温度为 37℃ 时,封闭 1

h 效果最佳,当封闭温度增加到 43℃ 时,封闭 30 min 效果较佳,当封闭时间加长时,显色效果明显下降,因为较高温度较长时间的封闭,抗体抗原的敏感度下降.通过比较选择 37℃ 封闭 1 h.

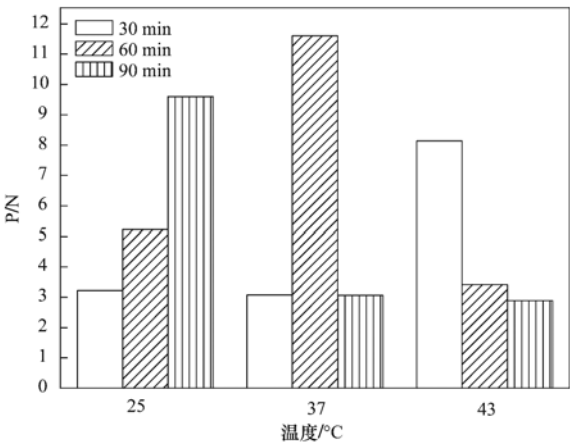


图 3 封闭时间和温度对 P/N 的影响

Fig. 3 Influence of blocking time and temperature

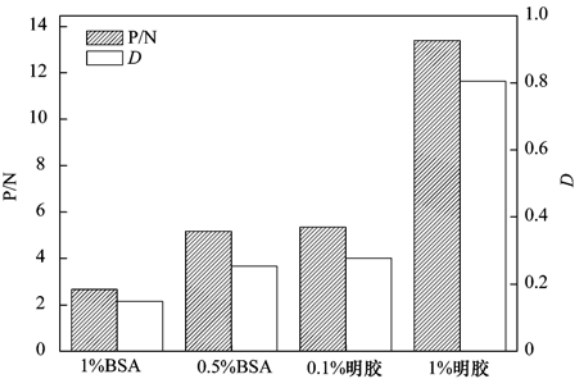


图 2 不同封闭液对于 P/N 和 D 值的影响

Fig. 2 Influence of blocking solution

2.4 最佳温育时间和温度的选择

本研究通过控制温育温度和温育时间,确定了温育时间和温度(图 4).酶对热变温度很敏感,酶免疫测定中常用的反应温度 25~37℃,随着温度的升高,酶促反应速度加快.当温度较低为 25℃ 时,则需要较长的温育时间,因为要使液相中的抗原或抗体与固相上的特异抗原或抗体完全结合,必须在一定的反应条件下反应一定时间^[22];当温度升高至为 43℃ 时,酶促反应速度较快,在 30 min 时就可以达到较好的效果,当在 43℃ 情况下温育 2 h 时,显色效果较差,可能是较长时间的高温温育使液体蒸发,非

特异性结合紧附于反应孔周围,难以清洗彻底^[23],另外较高的温育温度也可使部分酶失活.

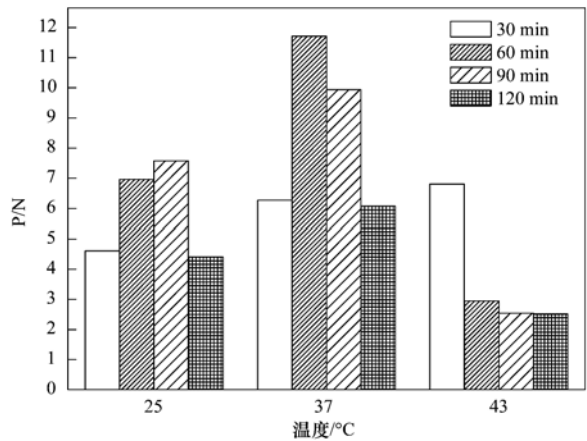


图4 温育时间与温育温度对 P/N 的影响

Fig. 4 Influence of incubation time and incubation temperature

2.5 直接竞争 ELISA 方法的建立

加入不同浓度的 DA 标准物质后,DA 与其酶标

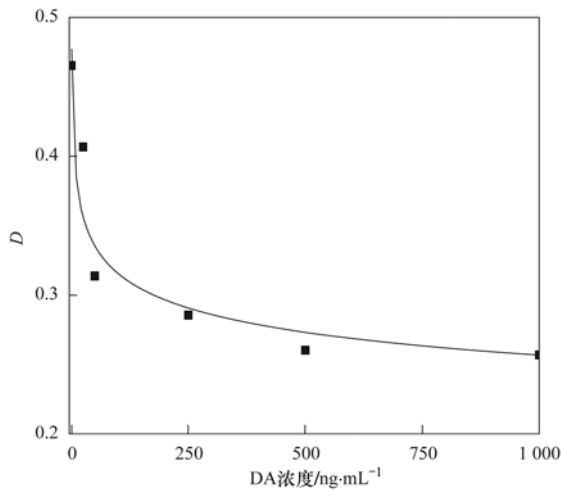


图5 ELISA 酶联免疫吸附试验 DA 浓度与 D 值变化关系图

Fig. 5 Relationship between DA concentration and D

记物 DA-HRP 竞争与抗体结合,加入的 DA 浓度越高,与抗体竞争结合的 DA-HRP 就越少,显色后的 D 值就越低,因此以 DA 浓度做为横坐标,D 值做为纵坐标,得到 D 值随 DA 浓度变化的关系,如图 5 所示.

同时,以结合率 B/B_0 为纵坐标,DA 浓度的对数为横坐标优化了酶联免疫吸附法的标准曲线,如图 6,可以看出结合率和 DA 浓度的对数呈线性关系,线性回归方程为 $y = -0.156 08x + 0.986 6$, $R^2 = 0.982 97$,根据标准曲线求得半数抑制率 IC_{50} 为 $1.32 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$,从中可以看出该直接竞争 ELISA 法的线性范围为 $5 \sim 1\,000 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$,以抑制率为 90% 时的浓度作为最低检出限,约为 $3.58 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$.

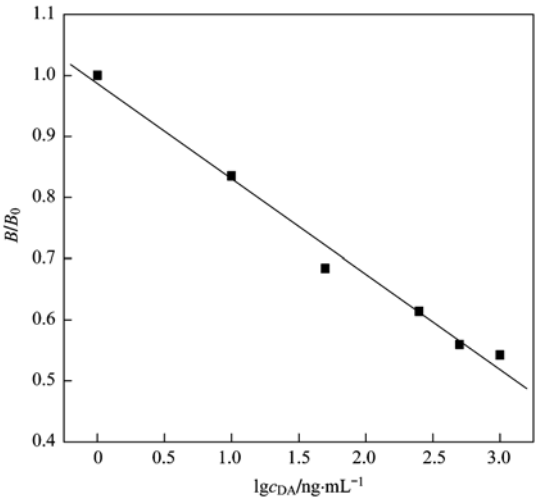


图6 ELISA 酶联免疫吸附试验标准曲线

Fig. 6 Standard curve of cdELISA

2.6 加标回收率的测定

取阴性样本经添加一定浓度的标准 DA,回收率和变异系数如表 2 所示,可以看出变异系数小于 15%^[24],在正常范围内,可知本研究的直接竞争 ELISA 法一般检测要求.

表 2 加标回收率和变异系数

Table 2 Sample recovery and coefficient of variation

样品添加值 /ng·mL ⁻¹	样品数 /个	平均值 /ng·mL ⁻¹	加标回收率 /%	孔间变异系数(Cv)/%
1	10	1.14	114.40	10.90
5	10	4.75	95.10	12.30
10	10	10.98	109.80	8.23
50	10	44.36	88.70	8.94

3 结论

(1)本研究利用碳化二亚胺法成功将辣根过氧化物(HRP)与软骨藻酸(DA)偶联,制得 DA-HRP,

将 DA-HRP 作为固相包被在酶标板上,加入 1% 明胶做封闭液,37℃ 封闭 1 h,洗涤,加入抗 DA 单克隆抗体和 DA,37℃ 温育 1 h,使固相 DA-HRP 和游离的 DA 竞争与抗体发生特异性结合,加入显色液显色,

测定 D 值, 相应得到一条标准曲线: $y = -0.15608x + 0.9866$, $R^2 = 0.98297$, 方法的加标回收率在 88% ~ 120% 之间, 变异系数在 8% ~ 20% 之间, 检出限为 $3.58 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$, 符合国际规定的 $20 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ [25] 安全限值的测定要求。

(2) 本研究基于直接竞争 ELISA, 因此检测时间比间接竞争 ELISA 法短, 成熟的直接竞争 ELISA 试剂盒检测时间可缩短至 1.5 h 左右, 大大缩短了检测时间。因为本方法携带方便, 检出限低, 适用于现场快速监测, 具有较好的发展潜力。

参考文献:

- [1] Lefebvre K A, Noren D P, Schultz I R, *et al.* Uptake, tissue distribution and excretion of domoic acid after oral exposure in coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) [J]. *Aquatic Toxicology*, 2007, **81**(3): 266-274.
- [2] Costa L G, Giordano G, Faustman E M. Domoic acid as a developmental neurotoxin [J]. *NeuroToxicology*, 2010, **31**(5): 409-423.
- [3] Lefebvre K A, Robertson A. Domoic acid and human exposure risks: a review [J]. *Toxicon*, 2010, **56**(2): 218-230.
- [4] Work T M, Barr B, Beale A M, *et al.* Epidemiology of domoic acid poisoning in brown pelicans (*Pelecanus occidentalis*) and Brandt's cormorants (*Phalacrocorax penicillatus*) in California [J]. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 1993, **24**(1): 54-62.
- [5] Sierra-Beltrán A, Palafox-Urbe M, Grajales-Montiel J, *et al.* Sea bird mortality at Cabo San Lucas, Mexico: evidence that toxic diatom blooms are spreading [J]. *Toxicon*, 1997, **35**(3): 447-453.
- [6] Lefebvre K A, Bargu S, Kieckhefer T, *et al.* From sanddabs to blue whales: the pervasiveness of domoic acid [J]. *Toxicon*, 2002, **40**(7): 971-977.
- [7] Fire S E, Wang Z H, Leighfield T A, *et al.* Domoic acid exposure in pygmy and dwarf sperm whales (*Kogia* spp.) from southeastern and mid-Atlantic US waters [J]. *Harmful Algae*, 2009, **8**(5): 658-664.
- [8] 吴多加, 李凤琴. 软骨藻酸与人类健康关系研究进展 [J]. *卫生研究*, 2005, **34**(3): 378-381.
- [9] Quilliam M A, Wright J L C. The amnesic shellfish poisoning mystery [J]. *Analytical Chemistry*, 1989, **61**(18): 1053A-1060A.
- [10] Lefebvre K A, Powell C L, Busman M, *et al.* Detection of domoic acid in Northern anchovies and California sea lions associated with an unusual mortality event [J]. *Natural Toxins*, 1999, **7**(3): 85-92.
- [11] Piletska E V, Villoslada F N, Chianella I, *et al.* Extraction of domoic acid from seawater and urine using a resin based on 2-(trifluoromethyl) acrylic acid [J]. *Analytica Chimica Acta*, 2008, **610**(1): 35-43.
- [12] Maroulis M, Monemvasios I, Vardaka E, *et al.* Determination of domoic acid in mussels by HPLC with post-column derivatization using 4-chloro-7-nitrobenzo-2-oxa-1, 3-diazole (NBD-Cl) and fluorescence detection [J]. *Journal of Chromatography B*, 2008, **876**(2): 245-251.
- [13] Newsome H, Truelove J, Hierlihy L, *et al.* Determination of domoic acid in serum and urine by immunochemical analysis [J]. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 1991, **47**(3): 329-334.
- [14] Garthwaite I, Ross K M, Miles C O, *et al.* Polyclonal antibodies to domoic acid, and their use in immunoassays for domoic acid in sea water and shellfish [J]. *Natural Toxins*, 1998, **6**(3-4): 93-104.
- [15] 高利利, 刘元娜, 程金平, 等. 抗软骨藻酸单克隆抗体杂交瘤细胞株的构建 [J]. *海洋渔业*, 2010, **32**(3): 233-238.
- [16] 刘元娜. 软骨藻酸的多克隆抗体制备及间接 ELISA 方法的建立 [D]. 上海: 上海交通大学, 2010. 24-26.
- [17] 吴瑜, 胡昌勤, 金少鸿. 半抗原免疫分析研究进展 [J]. *药物分析杂志*, 2007, **27**(5): 771-776.
- [18] 洪孝庄, 孙曼霁. 蛋白质连接技术 [M]. 北京: 中国医药科技出版社, 1993. 4.
- [19] Yu F Y, Liu B H, Wu T S, *et al.* Development of a sensitive enzyme-linked immunosorbent assay for the determination of domoic acid in shellfish [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2004, **52**(17): 5334-5339.
- [20] 张明洲, 方结红, 陈宗伦, 等. 苏丹红 I 直接竞争 ELISA 检测试剂盒的研制 [J]. *核农学报*, 2010, **24**(2): 341-348.
- [21] 盛建武, 何苗, 余少青, 等. 水体中微囊藻毒素-LR 的间接竞争 ELISA 检测 [J]. *环境科学*, 2006, **27**(6): 1166-1170.
- [22] 李会英. 酶联免疫吸附试验影响因素的分析 [J]. *检验医学与临床*, 2007, **4**(10): 985-986.
- [23] 陆亭屹, 徐萍. HIV 抗体 ELISA 测定中影响因素探讨 [J]. *实用医技杂志*, 2008, **15**(26): 3542-3543.
- [24] 李彬彬, 邓瑞广, 侯玉泽, 等. 二氟沙星残留检测直接竞争 ELISA 方法的建立 [J]. *农业生物技术学报*, 2009, **17**(3): 403-408.
- [25] Pulido O M. Domoic acid toxicologic pathology: a review [J]. *Marine Drugs*, 2008, **6**(2): 180-219.

CONTENTS

Safety Value of Contaminant in Water Pollution Accident Based on Human Health Risk	ZHENG Bing-hui, LUO Jin-hong, FU Qing, <i>et al.</i> (337)
Safety Concentration of Genotoxic Carcinogens in Water Pollution Accident Based on Human Health Risk	LUO Jin-hong, ZHENG Bing-hui, FU Qing, <i>et al.</i> (342)
A Quantitative Method and Case Analysis for Assessing Water Health	LI Yu-feng, LIU Hong-yu, HAO Jing-feng, <i>et al.</i> (346)
Temporal and Spatial Variation of Nitrogen and Phosphorus and Eutrophication Assessment in Downstream River Network Areas of North Canal River Watershed ...	SHAN Bao-qing, JIAN Yu-xiang, TANG Wen-zhong, <i>et al.</i> (352)
Spatiotemporal Variation Analysis and Identification of Water Pollution Sources in the Zhangweinan River Basin	XU Hua-shan, XU Zong-xue, TANG Fang-fang, <i>et al.</i> (359)
Hydrochemical Characteristics and Formation Mechanism of Shallow Groundwater in the Yellow River Delta	AN Le-sheng, ZHAO Quan-sheng, YE Si-yuan, <i>et al.</i> (370)
Impacts of Sediment Disturbance Time on the Distribution of Phosphorus Forms in Suspended Solids	LI Da-peng, HUANG Yong, LI Yong, <i>et al.</i> (379)
Influence of Submerged Macrophytes on Phosphorus Transference Between Sediment and Overlying Water in the Growth Period	WANG Li-zhi, WANG Guo-xiang, YU Zhen-fei, <i>et al.</i> (385)
Pollution Characteristics and Evaluation of Nitrogen, Phosphorus and Organic Matter in Surface Sediments of Lake Changshouhu in Chongqing, China	LU Shao-yong, XU Meng-shuang, JIN Xiang-can, <i>et al.</i> (393)
Vertical Distribution Characteristics of Nutrients and Heavy Metals in Sediments of Lake Hongze	ZHANG Wen-bin, YU Hui (399)
Effects of Rainfall on Nitrogen and Phosphorus Loss from Courtyard Compost and Its Risk of Nonpoint Source Pollution	PENG Li, WANG Li-wei, YANG Zhi-min, <i>et al.</i> (407)
Effects of Hydrodynamic Process on Bio-optical Properties in Algal-Dominated Lake Region of Shallow Lake	LIU Xiao-han, FENG Long-qing, ZHANG Yun-lin, <i>et al.</i> (412)
Estimation and Remote Sensing Inversion of Diffuse Attenuation Coefficient $K_d(490)$ in Lake Taihu in Spring Based on Semi-analytical Model	LIU Zhong-hua, LI Yun-mei, LI Rui-yun, <i>et al.</i> (421)
Monitoring the Total Suspended Matter of Lake Chaohu Based on Quasi-Analytical Algorithm	ZHANG Hong, HUANG Jia-zhu, LI Yun-mei, <i>et al.</i> (429)
Optimization of Aerobic/Anaerobic Subsurface Flow Constructed Wetlands	LI Feng-min, SHAN Shi, LI Yuan-yuan, <i>et al.</i> (436)
Effects of Allelochemical Dibutyl Phthalate on <i>Gymnodinium breve</i> Reactive Oxygen Species	BIE Cong-cong, LI Feng-min, LI Yuan-yuan, <i>et al.</i> (442)
Toxicity Effects of <i>Rac</i> - and <i>S</i> -Metolachlor on Two Algae	CAI Wei-dan, LIU Hui-jun, FANG Zhi-guo (448)
Studies for Killing the Oceanic Harmful Organisms in Ship's Ballast Water Using Hydroxyl Radicals	BAI Min-dong, ZHANG Na-hui, ZHANG Zhi-tao, <i>et al.</i> (454)
Modification of Natural Siderite and Enhanced Adsorption of Arsenic	ZHAO Kai, GUO Hua-ming, LI Yuan, <i>et al.</i> (459)
Kinetic Study of 4-Chloronitrobenzene Degradation by Zero-Valent Iron	LIAO Di-jie, YANG Qi, LEE Chun-chi (469)
Photochemical Degradation of Ofloxacin in Aqueous Solution	SHAO Meng, YANG Gui-peng, ZHANG Hong-hai (476)
Photodegradation of Atenolol in Aqueous Nitrate Solution	JI Yue-fei, ZENG Chao, MENG Cui, <i>et al.</i> (481)
Biodegradation of Pyridine Under UV Irradiation	FANG Miao-miao, YAN Ning, ZHANG Yong-ming (488)
Optimization on Decoloration Conditions of Anthraquinone Dyes by Laccase from <i>Amillariella mellea</i>	ZHU Xian-feng, QIN Ren-bing, YU Chen-chen, <i>et al.</i> (495)
Biosorption of Chromium(VI) by Waste Biomass of ϵ -Poly-L-lysine Fermentation	CAO Yu-juan, ZHANG Yang, XIA Jun, <i>et al.</i> (499)
Investigation on Enhanced Conditions for the Densification of Filamentous Sludge	LI Zhi-hua, SUN Wei, JI Xiao-qin, <i>et al.</i> (505)
Effect of Temperature on the Response Characteristics of Shortcut Nitrification Granular Sludge	LUO Yuan-ling, YANG Zhao-hui, XU Zheng-yong, <i>et al.</i> (511)
Fuel Consumption and Emission Inventory of Typical Construction Equipments in China	LI Dong-ling, WU Ye, ZHOU Yu, <i>et al.</i> (518)
Optimization of PM ₁₀ Monitoring Network in Beijing	QI Ling, ZHAO Yue, XIE Shao-dong (525)
Effect of Greenbelt on Pollutant Dispersion in Street Canyon	XU Wei-jia, XING Hong, YU Zhi (532)
Investigation of Effect and Process of Nitric Oxide Removal in Rotating Drum Biofilter Coupled with Absorption by Fe ^{II} (EDTA)	CHEN Jun, YANG Xuan, YU Jian-ming, <i>et al.</i> (539)
Effect of UV-B Radiation on Release of Nitrogen and Phosphorus from Leaf Litter in Subtropical Region in China	SONG Xin-zhang, ZHANG Hui-ling, JIANG Hong, <i>et al.</i> (545)
Characteristics of Carbon Sequestration and Apparent Stability of New Sequestered Carbon in Forested Torrid Red Soil at Dry-Hot Valley	TANG Guo-yong, LI Kun, SUN Yong-yu, <i>et al.</i> (551)
Spatial Distribution of Methane in Surface Water and Sediment of Jiulongjiang Estuary and the Effect Environment factors of It	GUO Ying-ying, CHEN Jian, YIN Xi-jie, <i>et al.</i> (558)
Methane Fluxes and Controlling Factors in the Intertidal Zone of the Yellow River Estuary in Autumn	JIANG Huan-huan, SUN Zhi-gao, WANG Ling-ling, <i>et al.</i> (565)
Study on Dioxin Emission for Typical Non-Wood Pulp Making in China	WANG Zhi-fang, DING Qiong, WANG Kai-xiang, <i>et al.</i> (574)
Horizontal and Vertical Distribution of Polybrominated Diphenyl Ethers (PBDEs) in River Sediment from a Typical Electrical Equipment Industrial Area	QIU Meng-de, DENG Dai-yong, YU Le-huan, <i>et al.</i> (580)
Characteristics of Polychlorinated Biphenyls in Soils from an Electronic Waste Recycling Area	WANG Xue-tong, LI Yuan-cheng, ZHANG Yuan, <i>et al.</i> (587)
Characterization and Potential Risks of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Green Space Soils of Educational Areas in Beijing	PENG Chi, WANG Mei-e, OUYANG Zhi-yun, <i>et al.</i> (592)
Spatial Variability and Evaluation of Soil Heavy Metal Contamination in the Urban-transect of Shanghai	LIU Yun-long, ZHANG Li-jia, HAN Xiao-fei, <i>et al.</i> (599)
Assessment of Heavy Metal Pollution in Surface Sediments of Rivers in Northern Area of Haihe River Basin, China	SHANG Lin-yuan, SUN Ran-hao, WANG Zhao-ming, <i>et al.</i> (606)
Concentrations and Pollution Assessment of Soil Heavy Metals at Different Water-level Altitudes in the Draw-down Areas of the Three Gorges Reservoir	WANG Ye-chun, LEI Bo, YANG San-ming, <i>et al.</i> (612)
Analysis of Community Structure on Sludge Aerobic/anoxic Digestion After Ultrasonic Pretreatment	YE Yun-di, SUN Shui-yu, ZHENG Li, <i>et al.</i> (618)
Research on Population Structure and Distribution Characteristic of Indigenous Microorganism in Post-polymer-Flooding Oil Reservoir	ZHAO Ling-xia, GAO Pei-ke, CAO Mei-na, <i>et al.</i> (625)
Study on Degradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) with Different Additional Carbon Sources in Aged Contaminated Soil	YIN Chun-qin, JIANG Xin, WANG Fang, <i>et al.</i> (633)
Detection of <i>Prorocentrum minimum</i> (Pavillard) Schiller with the Electrochemiluminescence-Molecular Probe	ZHU Xia, ZHEN Yu, MI Tie-zhu, <i>et al.</i> (640)
Development of Direct Competitive Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for the Determination of Domoic Acid	WANG Qian, CHENG Jin-ping, GAO Li-li, <i>et al.</i> (647)
Simultaneous Determination of 10 Sulfonamide Antibiotics in Water by Solid-phase Extraction and High Performance Liquid Chromatography	HONG Lei-jie, SHI Lu, ZHANG Ya-lei, <i>et al.</i> (652)
Effects of Pentachlorophenol on DNA Damage and Cytotoxicity of HeLa Cells	JIN Bang-ming, WANG Fu-ming, XIONG Li, <i>et al.</i> (658)
Modeling of Carbon Dioxide Measurement and Optimization on Building Ceramic Industry	PENG Jun-xia, ZHAO Yu-bo, JIAO Li-hua, <i>et al.</i> (665)

《环境科学》第6届编辑委员会

主 编: 欧阳自远

副主编: 赵景柱 郝吉明 田 刚

编 委: (按姓氏笔画排序)

万国江 王华聪 王凯军 王绪绪 田 刚 田 静 史培军
朱永官 刘志培 汤鸿霄 陈吉宁 孟 伟 周宗灿 林金明
欧阳自远 赵景柱 姜 林 郝郑平 郝吉明 聂永丰 黄 霞
黄 耀 鲍 强 潘 纲 潘 涛 魏复盛

环 境 科 学

(HUANJING KEXUE)

(月刊 1976年8月创刊)

2012年2月15日 33卷 第2期

ENVIRONMENTAL SCIENCE

(Monthly Started in 1976)

Vol. 33 No. 2 Feb. 15, 2012

主 管	中国科学院	Superintended	by	Chinese Academy of Sciences
主 办	中国科学院生态环境研究中心	Sponsored	by	Research Center for Eco-Environmental Sciences, Chinese Academy of Sciences
协 办	(以参加先后为序) 北京市环境保护科学研究院 清华大学环境学院	Co-Sponsored	by	Beijing Municipal Research Institute of Environmental Protection School of Environment, Tsinghua University
主 编	欧 阳 自 远	Editor-in -Chief		OUYANG Zi-yuan
编 辑	《环境科学》编辑委员会 北京市2871信箱(海淀区双清路 18号, 邮政编码:100085) 电话:010-62941102, 010-62849343 传真:010-62849343 E-mail: hjkx@rcees. ac. cn http://www. hjkx. ac. cn	Edited	by	The Editorial Board of Environmental Science (HUANJING KEXUE) P. O. Box 2871, Beijing 100085, China Tel:010-62941102, 010-62849343; Fax:010-62849343 E-mail: hjkx@rcees. ac. cn http://www. hjkx. ac. cn
出 版	科 学 出 版 社 北京东黄城根北街16号 邮政编码:100717	Published	by	Science Press 16 Donghuangchenggen North Street, Beijing 100717, China
印 刷 装 订	北京北林印刷厂	Printed	by	Beijing Bei Lin Printing House
发 行	科 学 出 版 社 电话:010-64017032 E-mail: journal@mail. sciencep. com	Distributed	by	Science Press Tel:010-64017032 E-mail: journal@mail. sciencep. com
订 购 处	全国各地邮电局	Domestic		All Local Post Offices in China
国外总发行	中国国际图书贸易总公司 (北京399信箱)	Foreign		China International Book Trading Corporation (Guoji Shudian), P. O. Box 399, Beijing 100044, China

中国标准刊号: ISSN 0250-3301
CN 11-1895/X

国内邮发代号: 2-821

国内定价: 70.00元

国外发行代号: M 205

国内外公开发行