

软骨藻酸胶体金免疫层析检测试纸条的研制

高利利, 程金平*, 刘元嫒, 王茜, 王文华

(上海交通大学环境科学与工程学院, 上海 200240)

摘要:制备软骨藻酸(DA)胶体金免疫层析快速检测试纸条,建立一种快速检测贝类食品中软骨藻酸含量的检测方法.采用柠檬酸钠还原氯金酸法制备颗粒直径 20 nm 的胶体金;电镜鉴定后,确定胶体金标记软骨藻酸单克隆抗体的最佳条件并制备金标抗体;金标抗体喷涂在玻璃纤维垫上制成胶体金结合垫;软骨藻酸与牛血清蛋白(BSA)的偶联物构成的包被抗原(DA-BSA)和羊抗鼠二抗分别包被在硝酸纤维素膜(NC膜)上构成检测线和控制线;组装成胶体金免疫层析试纸条并进行灵敏度测试.结果显示,胶体金试纸条检测灵敏度为 20 ng/mL,检测过程可在 15 min 内完成.该方法灵敏度高、简单快速,无需特殊仪器设备,适用于广大基层单位的现场和批量检测,有着良好的商业开发应用前景.

关键词:软骨藻酸;单克隆抗体;胶体金;免疫层析;快速检测

中图分类号:X836 文献标识码:A 文章编号:0250-3301(2011)08-2492-05

Development of Colloidal Gold Immunochromatographic Strip for Rapid Detection of Domoic Acid

GAO Li-li, CHENG Jin-ping, LIU Yuan-yuan, WANG Qian, WANG Wen-hua

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

Abstract: The colloidal gold immunochromatographic test strip was developed in order to establish a rapid detection assay of Domoic acid (DA) content in marine shellfish. The colloidal gold with particle diameter 20 nm was obtained by reducing gold chloride with sodium citrate. After identification by electron micrograph, optimum conditions for labeling were determined and colloidal gold was labeled by DA monoclonal antibody. The gold-labeled antibody was coated on some chosen glass fiber and dried. The coating antigen (DA-BSA) and Goat anti Mouse IgG were spotted respectively on a piece of nitrate fiber membrane as test line and control line. Finally the test strips were constructed and the detection sensitivity was measured. The results showed that, the detection limit of colloidal gold immunochromatographic test strip was 20 ng/mL and the whole analysis process could be completed within 15 min. The method established is sensitive and the procedure of determination is simple and quick without special equipment. The colloidal gold immunochromatographic test strip could be widely used for batch detection of domoic acid in shellfish on site and has great prospect for commercial development.

Key words: domoic acid; monoclonal antibody; colloidal gold; immunochromatographic; rapid detection

记忆缺失性贝毒(ASP)是有毒赤潮硅藻分泌产生的毒素,其主要活性成分软骨藻酸(domoic acid, DA)是一种氨基酸类毒素.海洋贝类通过食物链的传递作用可在体内累积 DA,有毒藻类也可以直接释放 DA 到海水中,人和海洋哺乳动物中毒之后,会干扰中枢神经系统,发生暂时性失去记忆甚至死亡^[1-4].虽然目前我国贝类食品中还未检测出软骨藻酸,但由于水污染的不断加剧,近年来赤潮频繁发生,极有可能伴随软骨藻酸的污染.所以在我国开展记忆缺失性贝毒快速检测技术研究具有特殊的意义,这既关系到消费者的健康安全又关系到我国贝类养殖业的发展.目前应用广泛、方法完善的检测分析软骨藻酸的方法仍然为高效液相色谱法^[5-7],但由于其操作繁琐,设备昂贵,测定时间较长,使其推广普及受到一定的限制.免疫化学方法是利用抗体对抗原的特异性结合建立的分析方法,具有灵敏度

高,特异性强,仪器设备简单易操作,样品前处理相对简单等优点,适用于一定条件下的现场监测和大量样本快速筛查,在药物残留检测^[8,9]、赤潮毒素^[10-12]分析等领域受到极大的重视,国内已有关于软骨藻酸 ELISA 检测方法的报道^[11,13].本课题组前期也已经成功制备软骨藻酸单克隆抗体^[14]并研究出应用酶联免疫检测技术(ELISA)检测软骨藻酸的方法^[15].该技术检测全过程需要 2~4 h,可一次检测多个样品,但由于 ELISA 是一种很敏感的技术,分析结果变异性大,检测需要酶标仪等仪器,需要有经验的操作人员,实现真正的现场操作有困难.胶体

收稿日期:2010-09-30;修订日期:2010-12-27

基金项目:海洋赤潮灾害立体监测技术与应用国家重点实验室项目(MATHAB200917)

作者简介:高利利(1986~),女,硕士研究生,主要研究方向为污染物快速监测、预警与风险评估技术,E-mail: gaolili_002 @ 163.com

* 通讯联系人, E-mail: jpcheng@sjtu.edu.cn

金免疫层析法是 20 世纪 80 年代初期发展起来的以胶体金为标记物应用于抗原抗体的一种新型、简便、快速的检测技术,检测时间可缩短到 3 ~ 15 min,不需要操作仪器,更加适用于现场检测.近年来该方法发展迅速,目前国内外已有应用胶体金技术检测海水或海产品中甲藻毒素^[16]、河豚毒素^[17]、麻痹性贝毒^[18]、腹泻性贝毒^[19]等方面的报道,但鲜见应用胶体金技术检测记忆缺失性贝毒软骨藻酸的报道.

为了建立一种快速检测贝类食品中软骨藻酸的检测方法,本研究在前期制备软骨藻酸单克隆抗体^[14]的基础上,利用胶体金技术标记抗体,通过竞争免疫反应,研制出快速检测软骨藻酸的胶体金免疫层析试纸条,以期为我国记忆缺失性贝毒监测提供快速分析方法.

1 材料与方法

1.1 试剂

软骨藻酸(DA),氯金酸($\text{HAuCl}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$),牛血清蛋白(BSA)为 Sigma 公司产品,软骨藻酸单克隆抗体和包被抗原(DA-BSA)为本实验室自制,羊抗鼠免疫球蛋白(IgG)购于北京博奥森生物技术有限公司,硝酸纤维素膜(NC 膜)为 Millipore 公司产品,其余膜材料为上海金标生物有限公司产品,其余试剂均为国产分析纯.

1.2 主要仪器

紫外可见分光光度计(UNICO-UV-2102),速冷冻离心机(Sigma 3K30),透射式电子显微镜(JEM-2100, Japan),隔水式恒温培养箱(GNP-9050).

1.3 实验方法

1.3.1 胶体金的制备与鉴定

采用柠檬酸三钠还原法制备 20 nm 胶体金,取 0.01% 的氯金酸溶液 100 mL,放入经酸洗并硅化的洁净锥形瓶中,搅拌状态下,加热至沸腾,一次性加入 1% 柠檬酸三钠 1 mL,继续搅拌加热 15 min,直至溶液呈透亮的红色,室温冷却,4℃ 保存备用.

1.3.2 胶体金标记抗体最佳条件的确定

最佳抗体标记量:用 0.01 mol/L pH 7.4 的磷酸盐缓冲液(PBS)对软骨藻酸单克隆抗体作系列梯度稀释(13.5 ~ 135 $\mu\text{g}/\text{mL}$,以及 0 $\mu\text{g}/\text{mL}$),各取 100 μL 按顺序加入一些装有 1 mL 胶体金的试管中,混匀,放置 5 min 后,向上述各管中加入 100 μL 10% 的 NaCl 溶液.摇匀,静置 30 min,3 500 r/min 离心 30 min 后测定上清液 520 nm 处的吸光度,从而确定最佳抗体加入量.

最佳标记 pH 值:取一系列试管分别加入 1 mL 胶体金溶液,用 0.1 mol/L K_2CO_3 调节 pH 值(pH 6.0 ~ 9.0),各管中加入单克隆抗体的最佳标记量,5 min 后分别加入 0.1 mL 10% NaCl,混匀静置 30 min 后,3 500 r/min 离心 30 min 后测定上清液 520 nm 处的吸光度,从而确定胶体金最佳标记 pH 值.

1.3.3 金标单抗的制备与纯化

在胶体金标记抗体最适稳定量的基础上再加入 20% 抗体即为稳定胶体金的实际抗体需要量,根据用以标记的胶体金总量计算出所需抗体的总量.加入适量 0.1 mol/L K_2CO_3 溶液调节胶体金溶液至最适 pH;电磁搅拌下,将抗体溶液加入到胶体金溶液中,继续搅拌 1 h;电磁搅拌下加入 10% 的 BSA 至终浓度为 1%,以稳定胶体金颗粒的残留表位,再搅拌 30 min,4℃ 条件下隔夜静置 12 h.

采用低温超速离心法纯化金标单抗,以除去其中未标记的抗体、未标记的胶体金、未标记的 BSA 以及标记过程中形成的各种聚合物.将金标抗体用 2 000 r/min,4℃ 离心 20 min,弃去沉淀;将上清以 13 000 r/min 离心 60 min,弃去上清;将沉淀以原体积的金标稀释液[含 0.2% 聚乙二醇(20 000),0.5% BSA,0.02% NaN_3 的 0.01 mol/L pH 7.4 的 PBS 溶液]溶解,重复离心 2 ~ 3 次,沉淀溶于原体积 1/10 的金标稀释液中,4℃ 保存备用.

1.3.4 免疫层析检测试纸的制备与组装

将 NC 膜裁成 4 mm × 2.5 cm 大小,取 1 μL 羊抗鼠 IgG(1 mg/mL)和 1 μL 包被抗原 DA-BSA(0.8 mg/mL)喷涂在 NC 膜上,分别作为质控线和检测线,两线相隔 0.5 cm,37℃ 真空干燥 1 h;干燥后完全浸泡于含 1% BSA 的 pH 7.4 的 PBS 溶液中,以封闭 NC 膜的残余吸附能力,封闭 2 h;然后用 pH 7.4 的 0.01 mol/L 的 PBS 溶液洗涤两次,每次 5 min,37℃ 真空干燥后后备用.将标记好的抗体溶液 1:4 稀释后按照 60 $\mu\text{L}/\text{cm}^2$ 的量均匀涂布在 4 mm × 5 mm 的玻璃纤维上,37℃ 真空干燥 1 h 后取出,作为金标结合垫.截取 4 mm × 3 cm 的吸水纸作吸收垫.4 mm × 2.8 cm 的玻璃纤维作样品垫.将以上各部分首尾相连,粘贴在 4 mm × 8 cm 的 PVC 底板上,组装结束后,与干燥剂一起装入铝箔袋,密封储存.如图 1 所示.

1.3.5 检测方法

检测时,将软骨藻酸样品溶液滴加到样品垫上,15 min 后观察结果.如果检测线和质控线均出现红色条带,说明样品呈阴性;如果检测线没出现红色条

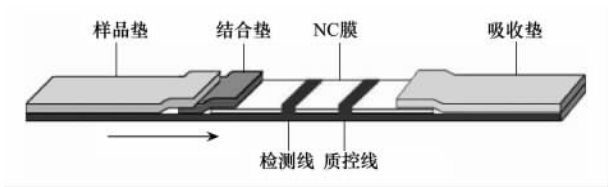


图 1 胶体金免疫层析试纸条组装示意^[20]

Fig. 1 Assembly image of gold immunochromatographic test strip

带,只有质控线出现红色条带,说明样品呈阳性;如果检测线和质控线均未出现红色条带,说明试纸条无效.

1.3.6 试纸条灵敏度实验

用 0.01 mol/L pH 7.4 的 PBS 将 1 mg/mL 的 DA 储存液分别稀释至 10 μg/mL、1 μg/mL、100 ng/mL、80 ng/mL、40 ng/mL、20 ng/mL、15 ng/mL、10 ng/mL和 5 ng/mL 9 个浓度梯度,并设 PBS 空白对照.用试纸条检测的标准方法检测,每个浓度重复 4 次,根据实验结果判断试纸条的检测灵敏度.

2 结果与讨论

2.1 胶体金质量鉴定

胶体金颗粒吸附抗体蛋白并显示检测结果,其粒径大小是重要影响因素之一.在胶体金免疫层析实验中,检测信号是由于金颗粒在检测线或者质控线上聚集而成的,所以如果金颗粒太小就不能产生足够的颜色信号,如果太大又会遇到空间位阻问题,空间位阻可以阻止小分子蛋白质接近金颗粒的 Zeta 电位,其结合蛋白后不稳定,不易保存,且不易通过 NC 膜,导致检测灵敏度下降.临床使用较多的是 20~40 nm 直径的胶体金,它们可以与抗体及大多数抗原偶联.由于软骨藻酸的相对分子质量为

311.134,属于小分子半抗原,所以应该选用 20 nm 左右的胶体金颗粒来标记^[21].

肉眼观察制备的胶体金溶液外观呈深红色,色泽鲜艳,晶莹透亮.从胶体金溶液在波长 400~600 nm 的紫外扫描图谱[图 2(a)]可以看出,最大吸收峰波长为 522 nm,根据经验公式 $y = 0.786x + 505.53$ (y : Amax; x : 粒径)^[22]得到胶体金颗粒直径约为 20 nm,波峰较窄,说明粒径较统一.经透射电镜扫描[图 2(b)]显示,胶体金粒径比较均一、分散,基本无凝聚现象,经计算出得胶体金的平均粒径为 19 nm,与紫外扫描鉴定法得到的颗粒直径接近,符合后续实验标记抗体要求.

2.2 胶体金标记抗体最佳条件的确定

抗体的用量是影响胶体金标记蛋白质质量好坏的一个重要因素.由于软骨藻酸胶体金快速检测试纸条是采用免疫学竞争原理设计的,因此标记的抗体的量尤为关键,标记抗体量过多,灵敏度就会降低,达不到应用的价值;反之,标记抗体量过小,尽管能提高灵敏度,但是会使阴性显色条带较淡,不易与阳性做比较,容易造成假阳性结果.由图 3(a)可知,当每 1 mL 胶体金溶液中单抗添加量等于或大于 8.1 μg/mL时,胶体金抗体蛋白结合物的吸光度值不再发生较大的变化,趋于平稳,说明胶体金颗粒对抗体蛋白的吸附基本达到饱和.稳定胶体金的最小蛋白用量为每 1 mL 胶体金溶液中添加 8.1 μg 抗体蛋白,在此基础上再增加 20% 即为待标记抗体的实际用量^[23].最终确定实际抗体用量为每 1 mL 胶体金溶液中添加 9.72 μg 单克隆抗体.

胶体金 pH 值是影响标记结果的另一个重要因素.一般认为,在蛋白质的等电点略低或略高于等电点(0.5~1)的条件下,二者已形成牢固的复合物,

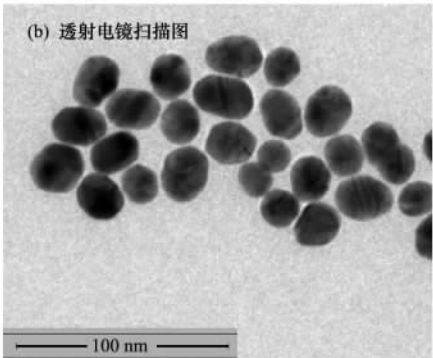
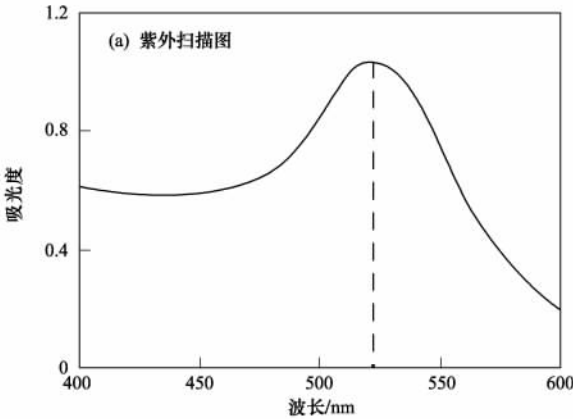


图 2 胶体金质量鉴定

Fig. 2 Determination of colloidal gold

因此在标记之前一般使用 Na_2CO_3 或 HCl 来调节胶体金的 pH 值略大于抗体等电点 0.5 个 pH 单位^[23]. 从不同 pH 值下的蛋白质凝絮曲线的变化情况[图 3(b)]可以看出,当胶体金溶液 pH 值为 8.5

时,胶体金标记抗体得到的胶体金抗体蛋白结合物的吸光度值较高,说明胶体金颗粒和抗体吸附较好,由此确定胶体金标记软骨藻酸单克隆抗体时的 pH 值为 8.5.

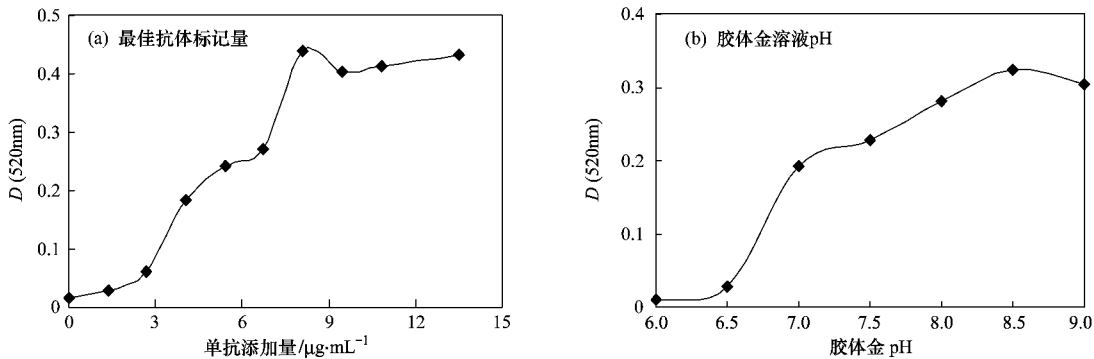


图 3 胶体金标记抗体蛋白最佳条件的选择

Fig.3 Optimum condition determination of gold colloid binding protein

2.3 金标抗体的质量鉴定

将羊抗鼠 IgG 点于 NC 膜上,直接与金标抗体作用,可见有明显的红色斑点(图 4),说明软骨藻酸单克隆抗体被成功标记到胶体金颗粒上,表明金标抗体有活性,可以进行下一步实验.



图 4 金标抗体质量鉴定结果

Fig.4 Determination of gold-labeled antibody quality

2.4 免疫层析试纸条灵敏度实验

用免疫层析试纸条检测系列浓度的软骨藻酸标准品,重复 4 次,通过肉眼观察检测线,结果见表 1. DA 浓度为 0 ng/mL(阴性对照)时,检测线出现很深的红色条带,随着 DA 标准品浓度的增加,检测线的颜色逐渐减弱,当 DA 标准品浓度增至 20 ng/mL 时,检测线无红色条带,当 DA 标准品浓度继续增至 10 000 ng/mL 时,检测线都无红色条带,而质控线均出现红色条带.由此判断,该试纸条检测软骨藻酸的检测灵敏度为 20 ng/mL.

表 1 软骨藻酸免疫层析试纸条灵敏度检测结果

Table 1 Sensitivity of DA immunochromatographic test strip				
DA 标准品 /ng·mL ⁻¹	平行样			
	1	2	3	4
0	-	-	-	-
5	-	-	-	-
10	- / +	- / +	- / +	- / +
15	+ / -	+ / -	+ / -	+ / -
20	+	+	+	+
40	+	+	+	+
80	+	+	+	+
100	+	+	+	+
1 000	+	+	+	+
10 000	+	+	+	+

1) “+”、“-” 分别表示试纸条检测结果为阳性和阴性

3 结论

本研究利用柠檬酸三钠还原法制备出颗粒直径 20 nm 的胶体金并标记抗软骨藻酸单克隆抗体,建立了胶体金免疫层析试纸条技术快速检测软骨藻酸,检测时间不超过 15 min,检测灵敏度达 20 ng/mL (对于贝类食品相当于 8 μg/g 贝肉),可以满足国际规定的 20 μg/g 的安全限值. 软骨藻酸胶体金免疫层析快速检测法的建立,为贝类食品中记忆缺失性贝毒快速检测胶体金试纸条的开发奠定了基础,为海产品安全监测提供了重要的工具.

参考文献:

[1] Smith E A, Papapanagiotou E P, Brown N A, et al. Effect of storage on amnesic shellfish poisoning (ASP) toxins in king scallops (*Pecten maximus*) [J]. Harmful Algae, 2006, 5 (1) : 9-19.

[2] Jeffery B, Barlow T, Moizer K, *et al.* Amnesic shellfish poison [J]. Food and Chemical Toxicology, 2004, **42** (4): 545-557.

[3] 顾佳萍,袁涛. 赤潮毒素软骨藻酸检测方法研究进展[J]. 海洋通报, 2010, **29**(4): 472-477.

[4] 吴多加,李风琴. 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.

[5] Turrell E A, Stobo L. A comparison of the mouse bioassay with liquid chromatography-mass spectrometry for the detection of lipophilic toxins in shellfish from Scottish waters [J]. Toxicon, 2007, **50**(3): 442-447.

[6] Mafra L L, Legar C, Bates S S, *et al.* 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, 2009, **1216** (32): 6003-6011.

[7] 卫锋,程日方,宫静宏,等. 高效液相色谱法测定贝类中的软骨藻酸[J]. 色谱, 2001, **19**(3): 248-250.

[8] 刘廷凤,刘亚子,孙成. 氯菊酯农药间接酶联免疫吸附测定法的建立[J]. 环境科学, 2006, **27**(2): 347-350.

[9] 席海燕,蔡强,何苗,等. 污水中大肠杆菌的酶联免疫检测方法研究[J]. 环境科学, 2005, **26**(5): 128-131.

[10] Litaker R W, Stewart T N, Eberhart B T, *et al.* Rapid enzyme-linked immunosorbent assay for detection of the algal toxin domoic acid[J]. Journal of Shellfish Research, 2008, **27**(5): 1301-1310.

[11] 刘仁沿,许道艳,董玉华,等. 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, 2009, **38**(5): 622-624.

[12] 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.

[13] 沈庆丰. 抗软骨藻酸单克隆抗体制备及 ELISA 检测方法建立 [D]. 长春: 吉林大学, 2008.

[14] 高利利,刘元嫒,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.

[15] 刘元嫒. 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.

[16] Yu Z, Feng G P, Yan S L, *et al.* Colloidal gold probe-based immunochromatographic assay for the rapid detection of brevetoxins in fishery product samples [J]. Biosensors and Bioelectronics, 2009, **24**(8): 2744-2747.

[17] Yu Z, Li Y S, Lu S Y, *et al.* Gold nanoparticle probe-based immunoassay as a new tool for tetrodotoxin detection in puffer fish tissues[J]. Sensors and Actuators B: Chemical, 2010, **146** (1): 368-372.

[18] Laycock, M V, Donovan M A, Easy D J. Sensitivity of lateral flow tests to mixtures of saxitoxins and applications to shellfish and phytoplankton monitoring[J]. Toxicon, 2010, **55** (2-3): 597-605.

[19] 刘仁沿,梁玉波,陈媛,等. 胶体金免疫层析法快速检测腹湾性贝毒软骨海绵酸的研究[J]. 分析科学学报, 2010, **26**(1): 31-34.

[20] 任立松,党荣理,柳增善,等. 苏丹红 I 胶体金检测试纸条的研制[J]. 中国食品卫生杂志, 2010, **22**(1): 36-39.

[21] Chandler J, Gurmin T, Robinson N. The place of glod in rapid tests[J]. IVD Technology, 2000, **6**(2): 37-49.

[22] 贺昕,熊晓东,梁敬博,等. 免疫检测用纳米胶体金的制备及粒径控制[J]. 稀有金属, 2005, **29**(4): 471-474.

[23] 陈小峰,刘曙照. 胶体金标记免疫层析及其在小分子化合物快速检测中的应用[J]. 药物生物技术, 2004, **11**(4): 278-280.