

微囊藻毒素直接竞争 ELISA 检测法的初步建立

雷腊梅 宋立荣 吴英松

中国科学院水生生物研究所, 武汉市

摘 要

收集滇池微囊藻水华, 烘干, 用 5% 的乙酸抽提微囊藻毒素, 最后用 HPLC 分离制备毒素, 经分析, 毒素纯度为 50% 左右。将制备所得的微囊藻毒素 LR 通过 EDA 与 BSA 连接作为抗原免疫昆明鼠, 应用直接竞争 ELISA 法检测待测样品。藻细胞的破碎采用简单的沸水浴法。结果显示, 引起 50% 抑制率标准品浓度为 1.8 ng/mL。线性范围为 0.1~10 ng/mL。最低检出量为 0.2 ng/mL, 即 50 pg。共检测了 23 个样品, 其中 20 个样品含有毒素。

关键词: 微囊藻毒素, 抗体, ELISA

壹、前 言

水体环境富营养化引起的蓝藻水华问题在我国已日趋严重, 几大重要的淡水湖泊如滇池, 太湖, 巢湖, 每年夏秋季都会爆发高浓度的蓝藻水华^[1, 2], 对水体生态系统和人类健康带来直接或潜在的严重危害。在我国大多数水体中发生的蓝藻水华, 其优势种类主要是微囊藻, 它产生一种被称为微囊藻毒素的环状七肽毒素, 研究表明, 长期饮用含有微囊藻毒素的水可诱发肝癌, 直肠癌, 轻者可使人产生腹泻和皮肤过敏等症状^[3], 微囊藻毒素对人类健康的威胁已引起世界范围学者的广泛关注。

微囊藻毒素是一种细胞内毒素, 只有在细胞裂解后才释放到水体中, 因而建立可靠、敏感、快速的检测和分析微囊藻毒素的方法显得极为必要。迄今为止, 已建立了多种检测微囊藻毒素的方法, 如生物毒性实验^[4], HPLC 检测法^[4], 毛细管电泳法^[5], 碱性磷酸酶抑制性实验^[6]及酶联免疫抑制性实验^[7] (竞争 ELISA)。国内微囊藻毒素的检测基本采用 HPLC 法, 它既可定量也可定性, 灵敏度高, 是一种理想的用于实验室精确分析少量样品检测方法。而要进行大量样品及野外水样的快速分析时, ELISA 则更为实用。微囊藻毒素的 ELISA 检测法在国外已发展得非常快, 但仅有少数几个实验室能制备毒素抗体, 在国内则还未有报道。当前, 国内许多研究和水质分析部门对快速灵敏分析微囊藻毒素的测定方法的需求越来越迫切。

本文尝试用本实验室分离纯化的毒素 LR, 采用国外已建立的方法, 制备微囊藻毒素 LR 的多克隆抗体, 并初步将其应用于微囊藻毒素的检测。

贰、实验设备和方法

1. 微囊藻毒素的提取及制备

将采集的微囊藻水华于 7 000 r/min 离心 10 min, 沉淀用蒸馏水洗涤 2~3 次, 40℃左右干燥。干藻粉以 50 mL/g 的比例加入 5%的乙酸, 搅拌抽提 3h, 然后在 7 000 r/min, 离心 40 min, 收集上清, 沉淀加入 5%的乙酸继续抽提, 如此重复两次后, 全部上清用于过真空纤维素柱(核工业部第八研究所), 以去除离心所不能沉淀的藻细胞。以上所得的上清再过 Sep-pak C18 (Waters 公司) 小柱(需预处理, 先用 100%的甲醇, 后用去离子水冲洗), 随后 Sep-pak 柱先用 20%的甲醇洗一次, 再用 90%的甲醇洗脱下毒素。将 90%的甲醇洗脱液旋转蒸发干燥, 此干粉即为粗微囊藻毒素。将粗毒素溶于 20%甲醇中, 在制备型 HPLC 上将各个不同的微囊藻毒素峰分别收集, 然后冷冻干燥。所制备的纯毒素称取少量溶于 20%的甲醇中, 过滤后在分析型 HPLC (岛津公司) 与标准毒素比较后, 进行分析定量, HPLC 的流速为 1mL/min, 检测波长为 238 nm, 流动相是 pH=3.0 的磷酸盐缓冲液和甲醇, 两者以 4:6 的比例混合。

2. 免疫原的制备

(1) EDA-BSA 的制备

300 mg BSA 溶于 15 mL 双蒸水中, 在搅拌状态下加入 400 mg EDPC, 溶解后加入 1mL 10%EDA(乙二胺), 用 1M HCl 调节 pH 至 5.5, 混合物室温下搅拌反应 2 h, 之后再加入 200 mg EDPC, 同样用 1M HCl 调节 pH 至 5.5, 混合物 4℃培育过夜, PBS(7.2) 透析 2 d(一天换一次液), 冻干。

(2) MCYST-LR-EDA-BSA 的制备

5 mg MCYST-LR 溶解在 0.08 mL 无水乙醇, 再加 0.32 mL 双蒸水稀释。此溶液与 EDA-BSA(20 mg EDA-BSA 溶解在 0.4 mL 双蒸水中)混合, 用几滴 0.2 N NaOH 调节 pH 至 5.0, 之后该溶液逐滴滴入 EDPC 溶液(1.32g EDPC 溶于 1.5 mL 双蒸水), 整个过程不停的搅拌, pH 值保持 5.0, 室温下反应 5 h, 反应混合物用 0.1M NaCl 透析 24 h, 冻干。

3. 免疫程序

毒素-BSA 与弗氏完全佐剂混合, 皮下多点注射昆明种小白鼠, 每只 100 μg 毒素-BSA; 15 d 后, 同样量毒素-BSA 与弗氏不完全佐剂混合, 皮下多点注射; 15d 后采用腹腔注射, 10 d 后加强一次, 7 d 后尾静脉采血检测。血清经 50%和 33%的饱和硫酸铵沉淀, PBS 透析后备用。

4. 毒素-HRP 的制备

5 mg 毒素溶解在 1mL 25%乙醇中, 加入 15 mg EDPC 混合, HRP 溶液 (1.12 mg HRP 溶解在 1mL 25%乙醇)逐滴加到上述溶液, 之后再加 15 mg EDPC, 混合液室温搅拌反应 30 min, 再加 15 mg EDPC, 之后 6℃反应过夜, 次日用 0.01M 碳酸氢铵(pH7.1)2 L, 6℃透析 2 d, 一天换 2 次, 冻干, 贮存于 -20℃。

5. 标准品的制备

将上述制备的毒素 LR 用甲醇配制成 1mg/mL, 再用 PBS 稀释成 0.0001ng/mL 至 10 μg/mL 一系列浓度梯度的对照溶液。

6. 直接竞争 ELISA

抗体用包被液(碳酸盐缓冲液,pH=9.6)稀释,每孔 100 μL 包被酶标板,4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜,次日 PBS-T 洗涤二次,0.05%BSA-PBS 封闭,每孔 0.17mL,37 $^{\circ}\text{C}$ 反应 30 min,用 PBS-T 洗涤 3~4 次后,制备标准曲线时每孔加入 50 μL 标准品毒素,测定样品时加 50 μL 藻样抽提液,同一定浓度的毒素-HRP50 μL 混合包被孔,阴性对照为加 50 μL PBS 和 50 μL 毒素-HRP。37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 60 min, PBS-T 洗涤 4 次, TMB 显色, 2 M H_2SO_4 终止反应,置酶标仪上测吸光度 A_{490} 。将标准品的浓度对吸光度作成标准曲线。以正常鼠血清为空白对照。

抑制率的计算:抑制率=(对照组 A_{490} -实验组 A_{490})/对照组 A_{490} $\times 100\%$ ^[2],对照组 A_{490} 为不加竞争抑制剂时所测的值,实验组为加未标记毒素竞争抑制后所测的值。引起 20% 抑制时的量为检出的最低量。

叁、结果和讨论

1. 微囊藻毒素的制备

在微囊藻毒素的制备过程中,直接在 40 $^{\circ}\text{C}$ 左右烘干微囊藻取代冷冻干燥,用真空纤维素柱去掉藻细胞残渣,而不是常见的高速离心,这使制备程序更为合理简便。经与标准毒素对比分析表明,微囊藻毒素 LR 的纯含量在 50% 左右。将 LR 按前面的方法免疫老鼠,结果表明该纯度的毒素可以成功的用于制备多抗。

2. ELISA 实验条件优化和特性分析

经方阵滴定测试表明,抗体最适包被浓度为 1:500,毒素-HRP 最适工作浓度为 40 ng。一般的 ELISA 竞争曲线类似 S 型,理论上毒素-HRP50% 被抑制处的曲线最陡,因而所得到的 IC₅₀ 值误差最小。为保证实验结果有较好的精确性和重复性,每一样品应设平行 3 孔,最后的吸光度取平均值。图 1 为上述条件下加入不同浓度的标准品所得的标准曲线。可得出引起 50% 抑制率标准品浓度为 3.8 ng/mL,即每孔 0.19 ng。线性范围为 0.1ng/mL - 10 ng/mL。最低检出量为 0.2 ng/mL,即每孔 50 pg。与 Chu 等报道的最低检出量 20 pg 大致相当。

3. 检测样品

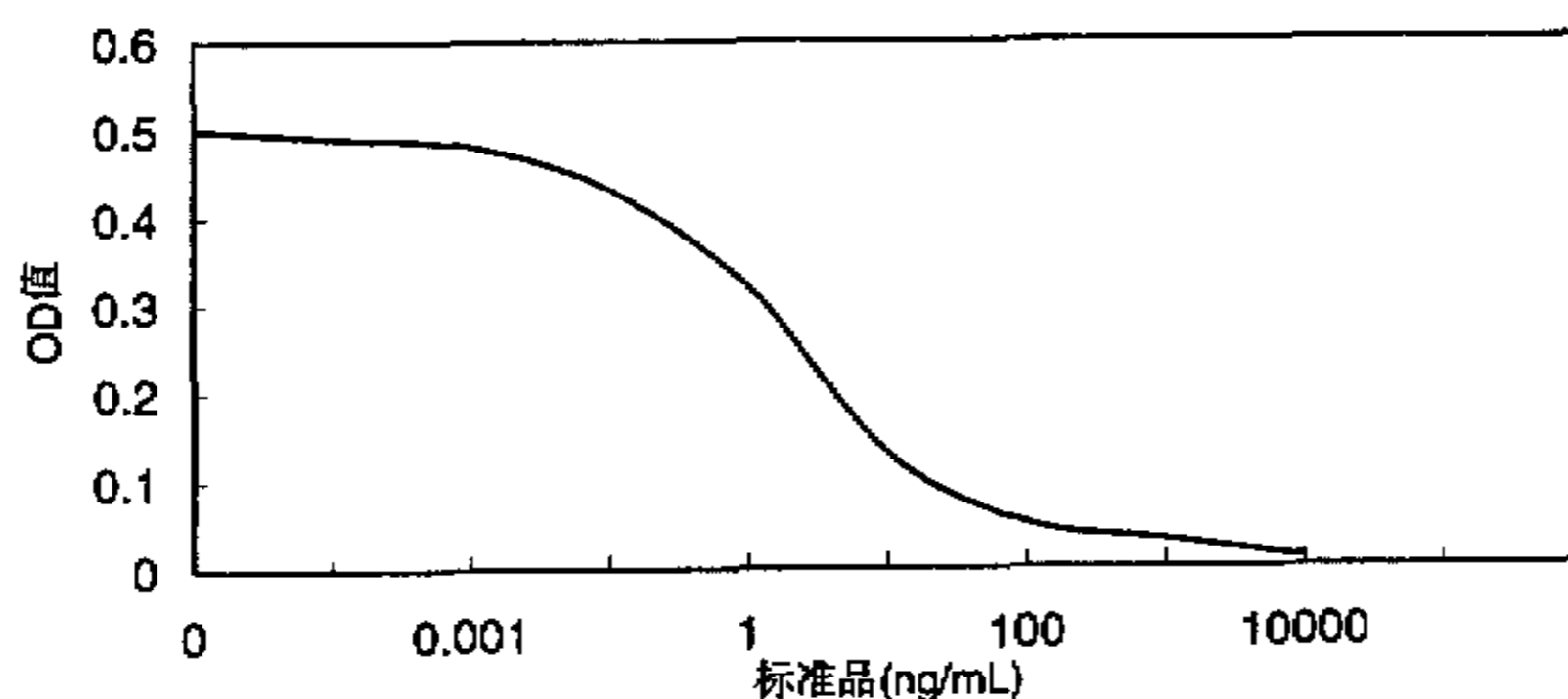


图1 ELISA标准曲线

以 1 : 500 稀释度的粗提抗体包被, 40 μg 毒素 - HRP 为反应抗原, 加不同藻样的抽提液为竞争抗原, 对藻有无产毒进行检测, 抑制率大于 20% 判定为阳性, 共检测了 23 个样品。其中检测到 20 个样品含有毒素, 根据抑制率计算出毒素含量都在 2 ng/mL 以上。我们还检测了生长良好的微囊藻和即将死亡的微囊藻培养液的微囊藻毒素的存在, 结果表明, 前者的培养液中毒素含量甚微, 而后者则相对较高, 这种结果表明, ELISA 可方便的应用于野外水样的检测。另外, 我们对藻细胞样品的破碎方法也进行了摸索, 直接用沸水浴使细胞破裂, 离心后的上清取少量用于藻细胞内毒素的检测, 使样品的批量处理更为简易。通过以上实验, 我们初步建立了微囊藻毒素检测的 ELISA 反应模式。但由于利用多抗进行反应不易标准化。所以我们下一步的目标就是制备抗毒素 - LR 的单克隆抗体。

肆、结 论

一、我们用传统的 HPLC 制备微囊藻毒素, 将藻细胞干燥和细胞碎片去除的步骤简化, 制备的毒素可用于抗体制备和作为标准毒素。

二、获得的微囊藻毒素 LR 的多抗, 初步将其用于微囊藻藻样和水样中微囊藻毒素的检测, 获得较好的结果。

三、为建立微囊藻毒素的 ELISA 检测法奠定了基础。是微囊藻毒素单抗制备的前期工作。

参 考 文 献

- [1] He Z R, et al. Seven microcystins from Microcystis water bloom in Lake Dalai. *China J Envir Sci*, 1997,9(1):113~119
- [2] 吴为梁,等.滇池水体中主要藻种毒素研究.云南环境科学, 1997,16(2):26~29
- [3] Codd G A. Cyanobacterial toxins: occurrence, properties and significance. *Water Sci Technol*, 1995,32:149~156
- [4] Jussi M. Chromatography of microcystins. *Analytica Chimica Acta*, 1997,352:277~298
- [5] Honkanan R E, Codispoti B A, Tse K, et al. Characterization of natural toxins with inhibitory activity against serine/threonine protein phosphatases. *Toxicon*, 1994,32(3):339~350
- [6] Onyewuenyi N, Hawkins P. Separation of toxic peptide(microcystins) in capillary electrophoresis, with the aid of organic mobile phase modifiers. *J Chromatogr*, 1995,749:271
- [7] Chu F S, Huang X, Wei R D, et al. Production and characterization of antibodies against microcystins. *Appl Environ Microbiol*,1989,55(8):1928~1933
- [8] 王卓智,王琰,李竞,等.抗原表位定向选择的人源抗 TNF- α Fab 的鉴定.中华微生物学和免疫学杂志.1999,19(3):242~245