

蓖麻毒素的间接酶联免疫快速检测

杨运云¹, 牟德海¹, 童朝阳², 穆晞惠², 郝兰群²

(1. 中国广州分析测试中心 广东省化学危害应急检测技术重点实验室, 广东 广州 510070

2. 解放军防化研究院第四研究所, 北京 102205)

摘要: 建立了间接酶联免疫法快速检测蓖麻毒素的方法。方法的线性范围在 0.08~ 1.25 mg/L 之间, 相关系数 $r=0.9923$ 检出限为 0.02 mg/L。将该法用于检测实际水样、土壤、奶粉和血液蓖麻毒素加标样品, 回收率在 60%~ 98% 范围。该方法简单、快速、假阳性率低, 非常适合蓖麻毒素的快速筛选、定性和半定量分析。

关键词: 蓖麻毒素; 酶联免疫; 间接测定

中图分类号: R446.61; S852.44 文献标识码: A 文章编号: 1004-4957(2007)04-0533-04

Rapid Determination of Ricin by Indirect Enzyme-linked Immunosorbent Assay

YANG Yun-yun¹, MU De-hai¹, TONG Zhao-yang², MU Xi-hui², HAO Lan-qun²

(1. Guangdong Provincial Key Laboratory of Emergency Test for Dangerous Chemicals China National

Analytical Center(Guangzhou), Guangzhou 510070, China 2. Research Institute of

Chemical Defense of PLA, Beijing 102205, China)

Abstract A method for rapid determination of ricin by indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was developed. The linear range of the method was 0.08–1.25 mg/L with a correlation coefficient of 0.9923. The limit of detection was 0.02 mg/L. The method was applied to determine the spiked ricin in water, soil, milk powder and blood samples. The recoveries were from 60% to 98%. The method is simple, rapid, relatively accurate and is suitable for qualitative and semi-quantitative determination of ricin.

Key words Ricin; Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA); Indirect determination

蓖麻毒素 (ricin) 是一种核糖体失活蛋白, 它由 A、B 两条肽链以二硫键共价相连, 相对分子质量约为 60 ku。A 链具有使核糖体失活的能力, B 链是一种半乳糖结合型蛋白^[1]。蓖麻毒素具有很强的毒性作用, 对成人的平均致死量为 1.5 μg 。其作用机制是抑制蛋白质的合成。蓖麻毒素进入人体后, B 链结合到细胞表面, A 链则渗透到细胞浆, 使核糖体失活, 从而抑制蛋白质合成, 造成人体中毒死亡^[2-3]。蓖麻种植广泛, 蓖麻籽中蓖麻毒素含量高、毒性大、易于提取, 国外已有报道恐怖分子用蓖麻毒素作为恐怖袭击的手段。因此, 建立蓖麻毒素的快速检测方法非常重要。

间接酶联免疫 (ELISA) 法的基本原理是直接包被抗原或含抗原的样品, 加入抗体后再加入酶标二抗, 利用酶催化底物显色的强度反映抗原的浓度。相对于夹心法、竞争法、生物素-酶亲和法, 该方法具有操作步骤少、简便、快速等优点。本研究间接 ELISA 法检测蓖麻毒素, 建立一种蓖麻毒素的简便、快速检测方法, 以满足蓖麻毒素的应急处理和检测的要求。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

Biofuge 22R 型冷冻离心机 (德国 Heraeus 公司); Hitach U-2001 型分光光度计 (日本日立公司); 680 型酶标仪 (美国 BioRad 公司)。

蓖麻毒素 (自制); 蓖麻毒素单抗 (自制); 辣根酶标记山羊抗小鼠 IgG (芭比尔生物技术发展中心); N-四甲基联苯胺 (TMB)、牛血清白蛋白 (BSA) 均购自华美生物技术有限公司; 碳酸缓冲盐 (CBS, pH 9.6); 磷酸缓冲盐洗涤液 (PBS-T, pH 7.4 0.01 mol/L PBS 含 0.1% (w) 吐温 20); 磷酸缓冲盐稀释液 (PBS-BSA, pH 7.4 0.01 mol/L PBS 含 1% (w) BSA, 用于稀释蓖麻毒素单抗和辣根酶标记山羊

收稿日期: 2006-06-28 修回日期: 2006-08-05

基金项目: 广东省重点实验室启动项目 (2003B60126)

作者简介: 杨运云 (1976-), 男, 广西柳州人, 硕士; 牟德海, 联系人, Tel: 020-87684306; E-mail: mudaha@tom.com

抗小鼠 IgG); 其它试剂按 ELISA 常规要求配制。

蓖麻毒素工作溶液: 用生理盐水分别配制一系列质量浓度为 0.02、0.04、0.08、0.15、0.30、0.60、1.25、2.50、5.00、10.00 和 20.00 mg/L 的蓖麻毒素工作溶液, 作标准曲线时使用。

蓖麻毒素水样加标样品: 在 1.0 mL 自来水中添加适当浓度的蓖麻毒素溶液, 用 0.01 mol/L PBS-1% BSA 稀释液分别将其稀释为 0.15、0.30、0.60 和 1.25 mg/L, 作为蓖麻毒素的水样加标样品。

蓖麻毒素土壤加标样品: 称取风干土壤 1.0 g 加入 5.0 mL 0.01 mol/L PBS-1% BSA 稀释液, 再加入质量浓度为 1.0 g/L 的蓖麻毒素 5.0 μ L, 混合均匀后分别稀释成 0.15、0.30、0.60 和 1.25 mg/L 的土壤加标样品, 然后把每个样品在 4 $^{\circ}$ C、8 000 r/min 条件下离心 20 min, 取上清液用于测定。

蓖麻毒素奶粉加标样品: 称取奶粉 1.0 g 同“蓖麻毒素土壤加标样品”处理, 然后把每个样品在 4 $^{\circ}$ C、15 000 r/min 条件下离心 15 min, 取上清液用于测定。

蓖麻毒素血液加标样品: 取小鼠血液 10.0 μ L, 同“蓖麻毒素土壤加标样品”处理, 然后把每个样品在 4 $^{\circ}$ C、5 000 r/min 条件下离心 10 min, 取上清液用于测定。

1.2 实验步骤

用 pH 9.6 的碳酸盐缓冲液稀释蓖麻毒素, 包被酶标板, 每孔 0.1 mL。42 $^{\circ}$ C 条件下孵育 5 h, 倒去包被液, 用 PBS-T 洗涤 3 次, 甩干。其中 1 个孔不加蓖麻毒素, 作为试剂空白, 测定时用作调零。用 1% BSA 封闭板上的空白位点, 每孔 0.2 mL, 37 $^{\circ}$ C 条件下孵育 1 h, 甩干。除阴性孔以外, 其余各孔加蓖麻毒素单抗 0.1 mL, 37 $^{\circ}$ C 条件下孵育 1 h, 用 PBS-T 洗涤 3 次, 甩干。所有各孔加酶标二抗(辣根酶标记山羊抗小鼠 IgG 液) 0.1 mL, 37 $^{\circ}$ C 条件下孵育 1 h, 用 PBS-T 洗涤 6 次, 甩干。每孔加 TMB 0.1 mL, 37 $^{\circ}$ C 条件下孵育 15 min, 再加 1 mol/L H_2SO_4 0.1 mL, 使反应终止。在酶联检测仪上 450 nm 波长处, 测量吸光度值 OD_{450} 。统计分析均采用 SSPS 软件包(版本 11.5)。

2 结果与讨论

2.1 实验条件的优化

2.1.1 酶标板对抗原最大吸附浓度的确定 包被一系列质量浓度分别为 0.02、0.04、0.08、0.15、0.30、0.60、1.25、2.50、5.00、10.00、20.00 mg/L 的蓖麻毒素酶标板, 在相同的条件下进行间接 ELISA 实验, 根据吸光度值选择酶标板对抗原的最大吸附浓度, 结果见图 1。当蓖麻毒素的包被质量浓度为 5.00 mg/L 时, OD_{450} 值趋于饱和。因此, 酶标板对抗原的最大吸附质量浓度为 5.00 mg/L。

2.1.2 最适蓖麻毒素单克隆抗体工作浓度的确定 包被质量浓度为 0.60、1.25、2.50、5.00 mg/L 的 Ricin 毒素酶标板, 分别加入质量浓度为 0.5、1.0、5.0、10.0、50.0、100.0、250.0、500.0 mg/L 的蓖麻毒素单克隆抗体, 在相同的条件下进行间接 ELISA 实验, 根据吸光度值选择蓖麻毒素单抗的最适浓度, 结果见图 2。当蓖麻毒素单抗浓度为 50.0 mg/L 时, OD_{450} 值均趋于饱和。因此, 最适蓖麻毒素单抗工作质量浓度为 50.0 mg/L。

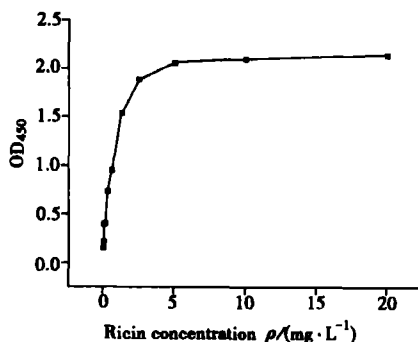


图 1 蓖麻毒素抗原包被质量浓度与 OD_{450} 值曲线图

Fig. 1 The curve of ricin polyclonal antibody antigen peridium concentration with OD_{450}

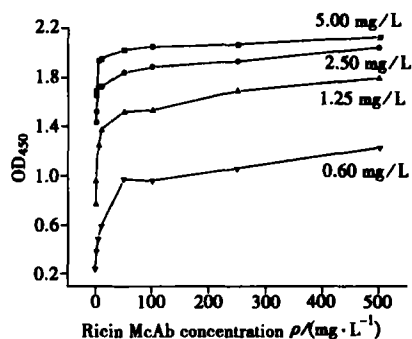


图 2 蓖麻毒素单抗工作质量浓度与 OD_{450} 值曲线图

Fig. 2 The curve of ricin monoclonal antibody working concentration with OD_{450}

2.1.3 包被处理方法的确定 采用 42℃ 孵育 5 h 和 4℃ 过夜两种包被方法, 同等条件下进行间接 ELISA 实验, 根据吸光度值 OD_{450} 确定最佳包被处理方法。结果表明, 蓖麻毒素浓度在 0.02~5.00 mg/L 范围, 42℃ 孵育 5 h 包被法的吸光度值均大于 4℃ 过夜包被法。故认为 42℃ 孵育 5 h 包被方法优于 4℃ 过夜包被方法。

2.1.4 最佳酶标记二抗体工作浓度的确定 同等条件下进行间接 ELISA 实验, 添加不同稀释倍数的辣根酶标记山羊抗小鼠 IgG, 根据吸光度值 OD_{450} 选择最佳辣根酶标记山羊抗小鼠 IgG 的稀释倍数, 结果见图 3。当辣根酶标记山羊抗小鼠 IgG 的稀释倍数为 1:10 000~1:8 000 时, OD_{450} 值呈上升趋势, 稀释倍数为 1:8 000~1:5 000 时, OD_{450} 值趋于平台。稀释倍数小于 1:5 000 时, 又缓慢增加。为兼顾检测灵敏度和节约辣根酶标记山羊抗小鼠 IgG 用量, 故认为辣根酶标记山羊抗小鼠 IgG 的最适工作浓度为 1:8 000。

2.1.5 底物显色时间的确定 按上述优化的实验条件进行间接 ELISA 实验, 加底物 TMB 0.1 mL 后做不同显色时间的比较, 显色时间分别为 3、5、10、15、20、25、30 min, 根据吸光度值的变化选择适合的底物显色时间, 结果见图 4。显色时间 15 min 为宜, 少于 15 min 显色不完全, 超过 15 min OD_{450} 值没有太大增加, 20 min 后 OD_{450} 值反而有所下降, 而且本底增加, 故选择 15 min 作为底物显色时间。

2.2 间接 ELISA 法检测蓖麻毒素标准方法的建立

2.2.1 线性范围 在优化的实验条件下, 用间接 ELISA 法测定配制好的蓖麻毒素工作溶液。当蓖麻毒素质量浓度在 0.08~

1.25 mg/L 范围时, 质量浓度 (x , mg/L) 与吸光度值 (y) 之间呈线性关系, 线性回归方程为 $y = 1.01x + 0.33$ 线性相关系数 $r = 0.9923$ 。

2.2.2 检出限 根据 IUPAC 对检出限的定义 $LOD = 3\sigma/D$ (其中 σ 为空白的相对标准偏差, D 为线性方程的斜率) 计算, 间接 ELISA 法测定蓖麻毒素的检出限为 0.02 mg/L。

2.2.3 重复性 在线性浓度范围内, 取 0.15、0.30、0.60 和 1.25 mg/L 4 个工作浓度点, 验证间接 ELISA 法的重复性, 其相对标准偏差 (RSD) 分别为 2.3%、1.6%、0.8% 和 1.0% ($n = 6$), 符合免疫检测和定量分析的要求。

2.2.4 特异性 用上述建立的间接 ELISA 法分别检测不同浓度蓖麻毒素、相思子毒素 (Abrin) 和葡萄球菌肠毒素 B (SEB), 以验证该方法是否具有特异性。检测蓖麻毒素时, 随着蓖麻毒素浓度增加, 其吸光度 OD_{450} 值呈线性增加趋势。而检测不同浓度 Abrin 和 SEB 时, 其所得吸光度值与阴性值接近, 表明该法检测蓖麻毒素具有很好的特异性。

2.3 实际蓖麻毒素加标样品的测定

配制一系列浓度的水样、土壤、奶粉和血液蓖麻毒素加标样品, 用间接 ELISA 法测定样品吸光度值, 每个样品的每个浓度点测定 3 次, 按测定平均值计算样品中蓖麻毒素的实测浓度和回收率, 结果见表 1。

在测定血液加标样品时的回收率较低, 可能是由于血液中的红细胞上含有蓖麻毒素的受体, 1% BSA 不能完全封闭红细胞上的受体结合位点, 使其蓖麻毒素与红细胞结合, 从而使回收率降低, 但该方法对血液样品总体回收率达到了 60%~80%, 对于半定量快速筛选来说已经足够。

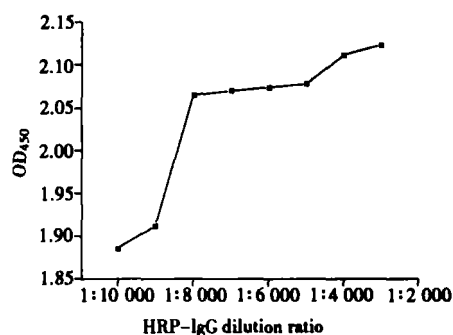


图 3 酶标记二抗体工作浓度与 OD_{450} 值曲线图

Fig. 3 The curve of second enzyme labelling antibody dilution ratio with OD_{450}

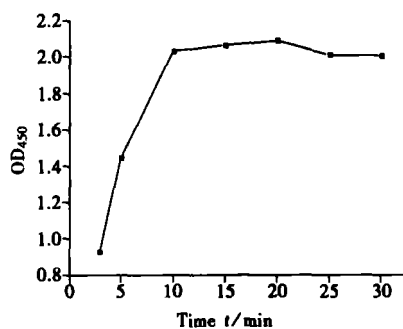


图 4 显色时间与 OD_{450} 值曲线图

Fig. 4 The curve of developing time with OD_{450}

表 1 间接 ELISA 法检测加标水样、土壤、奶粉和血液样品的检测结果和回收率
Table 1 The analytical results and recoveries of water, soil, milk powder and blood added samples

$\rho_A/(mg \cdot L^{-1})$	Water		Soil		Milk powder		Blood	
	Found	Recovery	Found	Recovery	Found	Recovery	Found	Recovery
	$\rho_F/(mg \cdot L^{-1})$	$R/\%$	$\rho_F/(mg \cdot L^{-1})$	$R/\%$	$\rho_F/(mg \cdot L^{-1})$	$R/\%$	$\rho_F/(mg \cdot L^{-1})$	$R/\%$
0.15	0.14±0.01	93	0.13±0.01	87	0.12±0.01	80	0.09±0.01	60
0.30	0.28±0.03	93	0.27±0.04	90	0.26±0.02	87	0.21±0.01	70
0.60	0.59±0.01	98	0.56±0.04	93	0.54±0.01	90	0.45±0.01	75
1.25	1.23±0.01	98	1.19±0.02	95	1.17±0.11	94	1.00±0.02	80

参考文献:

[1] DAV D N S, BRIAN M J F. Selective uptake of ricin A-chain by hepatic non-parenchymal cells in vitro: Importance of mannose oligosaccharides in the toxin[J]. FEBS, 1986, 196: 344–348.

[2] OLSNES S, REFSNES K, PHIL A. Mechanism of action of the toxic lectins abrin and ricin[J]. Nature, 1974, 249: 627–631.

[3] ENDO Y, MITSUOKA, MOTIZUKIM, et al. The mechanism of action of ricin and related toxic lectins on eukaryotic ribosomes[J]. J Biol Chem, 1987, 262: 5908–5912.

(上接第 532 页)

参考文献:

[1] 程元恺, 杨宪桂, 杨中枢. 环境致癌物—多环芳烃研究[M]. 北京: 中国科学技术出版社, 1990: 1–4.

[2] 董新艳, 杨亦文, 任其龙. 复杂基体中痕量多环芳烃分析测定方法的研究进展[J]. 色谱, 2005, (6): 48–54.

[3] 黄业茹, 狄安, 施钧慧, 等. 北京、东京、筑波大气中有机污染物组成研究[J]. 环境科学研究, 2001, 14(1): 4–8.

[4] 李军, 张干, 祁士华, 等. 广州市大气中颗粒态多环芳烃(PAHs)的主要污染源[J]. 环境科学学报, 2004, 24(4): 661–666.

[5] 郝蓉, 万洪富, 杜卫兵, 等. 亚热带地区农业土壤和植物中多环芳烃的分布[J]. 浙江大学学报: 农业与生命科学版, 2005, 31(4): 374–380.

[6] MEUDEEC A, DUSSAUZE J, JOURDN M, et al. Gas chromatographic-mass spectrometric method for polycyclic aromatic hydrocarbon analysis in plant biota[J]. J Chromatogr A, 2006, 1108: 240–247.

[7] 崔艳红, 巨天珍, 曹军, 等. 加速溶剂提取法测定蔬菜中的多环芳烃和有机氯化物[J]. 农业环境科学学报, 2003, 22(3): 364–368.

[8] 王建华, 姜海云, 王惠, 等. 气相色谱—质谱法测定蔬菜中的 16 种多环芳烃[J]. 中国卫生检验杂志, 2006, 16(2): 197–199.

[9] 储少岗, 徐晓白. 鱼组织中多环芳烃的测定[J]. 环境科学学报, 1994, 14(2): 229–235.

[10] 宋玉芳, 区自清, 孙铁珩. 土壤、植物样品中多环芳烃(PAHs)分析方法研究[J]. 应用生态学报, 1995, 6(1): 93–96.

[11] 高彦征, 朱利中, 凌婉婷, 等. 土壤和植物样品的多环芳烃分析方法研究[J]. 农业环境科学学报, 2005, 24(5): 1003–1006.

[12] KIPOPOULOU A M, MANOLIE, SAMARA C. Bioconcentration of polycyclic aromatic hydrocarbons in vegetables grown in an industrial area[J]. Environmental Pollution, 1999, 106: 369–380.

[13] CHEN L G, RAN Y, XING B S, et al. Contents and sources of polycyclic aromatic hydrocarbons and organochlorine pesticides in vegetable soils of Guangzhou, China[J]. Chemosphere, 2005, 60: 879–890.