

## • 基础实验研究论著 •

## 软海绵酸胶体金免疫检测法的建立与应用\*

蔡春尔<sup>#</sup>, 柳俊秀<sup>#</sup>, 胡乐琴, 贾睿, 汪卿, 李春霞, 何培民<sup>△</sup>

(上海海洋大学水产与生命学院, 上海 201306)

**摘要:**目的 建立并应用软海绵酸(OA)胶体金免疫层析检测法。方法 通过纯化抗 OA 单抗、制备胶体金、标记单抗、制备胶体金试剂条、样品模拟提取与加标回收检测、贝类染毒提取及检测,建立和优化金标免疫层析法。结果 选择 30 nm 胶体金颗粒用于单抗标记,金标单抗浓度为 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ,金标单抗包被量为 2.5  $\mu\text{L}/\text{cm}$ ,二抗包被浓度为 1.0  $\text{mg}/\text{mL}$ ,反应时间为 3~5 min,对加标贝肉和染毒贝类的检测灵敏度为 25  $\text{ng}/\text{mL}$ 。结论 建立了可用于 OA 检测的胶体金免疫层析检测法,满足规定的贝类 OA 含量安全阈值,为腹泻性贝毒检测与食品安全检验提供了新的技术方法。

**关键词:**黑软海绵素 A; 腹泻性贝毒; 单克隆抗体; 胶体金免疫层析

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2012.18.002

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2012)18-2181-02

## Construction and application of gold-labeled immunology assay for the detection of okadaic acid\*

Cai Chun'er, Liu Junxiu<sup>#</sup>, Hu Yueqin, Jia Rui, Wang Qin, Li Chunxia, He Peimin<sup>△</sup>

(College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

**Abstract:** Objective To construct and apply gold-labeled immunology assay for the detection of okadaic acid. Methods Gold-labeled immunology testing technology for fast detecting okadaic acid was established and optimized by a series of procedures, including purification of monoclonal antibody of okadaic acid, preparation of colloidal gold, label of monoclonal antibody, preparation of strip, simulated sample extraction and spiked recovery detection, followed by extraction and testing of exposed shellfish. Results 30 nm colloidal gold particles were used to mark the test strip, the concentration and coated amount of gold-labeled monoclonal antibody were 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  and 2.5  $\mu\text{L}/\text{cm}$ , respectively, and the concentration of second antibody was 1.0  $\text{mg}/\text{mL}$ . The colloidal gold test strip detection in spiked shellfish and exposed shellfish were applied, with detection time of 3-5 minutes and detection limit of less than 25  $\text{ng}/\text{mL}$ . Conclusion Gold-labeled immunology assay for fast detecting okadaic acid was established, meeting the safe threshold of okadaic acid in shellfish food ruled by many countries and proving technical foundation for detection of okadaic acid in shellfish.

**Key words:** okadaic acid; diarrhetic shellfish poison; monoclonal antibody; colloidal gold immunochromatography

近年来河口、内湾和沿岸水域赤潮发生频率和危害程度明显上升。目前已知能够产生毒素的赤潮生物有 70 多种<sup>[1]</sup>。腹泻性贝毒(DSP)作为主要的赤潮毒素,包括鳍藻毒素(DTX)和软海绵酸(OA)两类,主要由鳍藻属和底栖甲藻利玛原甲藻等产生<sup>[2-3]</sup>。DSP 中毒症状为腹泻和呕吐,而 OA 导致体内蛋白质磷酸化,且能促进肿瘤形成<sup>[4-5]</sup>。目前 DSP 检测标准方法是采用小鼠生物法,不仅耗时,而且灵敏度低,迫切需要改进,其他检测方法包括生物传感器法、免疫法、酶活性抑制分析法等,各种方法的检测成本、时间和特异性相差较大<sup>[6]</sup>。建立快速简便的检测技术可为赤潮研究、生态环境监测以及食品安全检验提供简便、快捷的技术支持。胶体金免疫层析法(GICA)检测耗时较少,且无需检测仪器,特别适用于现场大批量样品筛查<sup>[7-8]</sup>。本研究对自制单克隆抗体进行胶体金标记,通过竞争免疫层析反应,初步研制出 OA 胶体金检测试纸条,可用于 OA 快速检测。

## 1 材料与与方法

**1.1 仪器与试剂** OA 标准品(北京伊普瑞斯),OA-OVA 包被抗原及 OA 单克隆抗体制备参照文献<sup>[9]</sup>,1.0  $\text{mg}/\text{mL}$  羊抗鼠 HRP-IgG(美国 Sigma),1% 氯金酸( $\text{HAuCl}_4$ ),1% 枸橼酸三钠,0.2  $\text{mol}/\text{L}$   $\text{K}_2\text{CO}_3$ 、含 1% BSA 的 0.02  $\text{mol}/\text{L}$  Tris、0.01  $\text{mol}/\text{L}$  PBS(国药集团);M135 硝酸纤维素膜(德国 Millipore),iMark 酶标仪(美国 Bio-Rad),ZX1000 喷膜机和 CM4000 切条

机(美国 BioDot)。

**1.2 胶体金的制备** 参照文献<sup>[10]</sup>制备不同直径大小的胶体金颗粒,分别标记鼠抗 OA 单克隆抗体,按工艺组装试纸条,以 1 例阳性标本及 PBS 加样,比较不同颗粒大小金标结合物的检测效果。阳性标本 OA 浓度为 50  $\text{ng}/\text{mL}$ ,要求 5 min 内不出现检测线,PBS 要求显色强,下同。

**1.3 单克隆抗 OA 抗体的纯化** 取单抗 0.5 mL,加 0.01  $\text{mol}/\text{L}$  PBS(pH7.2)0.5 mL,混匀;加饱和硫酸铵 1 mL,4  $^{\circ}\text{C}$  混匀静置 30 min。离心力 11 100 g 离心 15 min,取沉淀用 0.01  $\text{mol}/\text{L}$  PBS(pH7.2)0.6 mL 溶解。相同方法用饱和硫酸铵(0.40、0.33 mL)沉淀抗体 2 次,沉淀用 PBS 0.5 mL 溶解。溶解液用 PBS 作 1:10 稀释,测定  $A_{260}$  和  $A_{280}$ ,按如下公式计算盐析单抗浓度:盐析单抗浓度( $\text{mg}/\text{mL}$ )= $A_{280} \times 1.45 - A_{260} \times 0.74$ 。

**1.4 金标单抗的制备** 取胶体金 2 mL,加 50~400  $\mu\text{g}/\text{mL}$  单抗 0.2 mL,搅拌混匀 1 h,再加 20 mg BSA,继续搅拌 30 min,离心力 11 100 g 离心 30 min,取沉淀用 20  $\text{mmol}/\text{L}$  Tris-HCl(pH7.4)100  $\mu\text{L}$  溶解,加 BSA 至终浓度为 10  $\text{mg}/\text{mL}$ ,4  $^{\circ}\text{C}$  保存备用。用喷金机按 2.5  $\mu\text{L}/\text{cm}$  均喷不同浓度金标鼠抗 OA,干燥后组装试纸,以 50  $\text{ng}/\text{mL}$  OA 阳性标本和 PBS 加样比较不同单抗量对检测灵敏度的影响。

**1.5 胶体金试剂条的制备** 用喷金机对金标单抗进行包被,

喷不同喷量,干燥后按工艺组装试纸,以阳性标本和 PBS 加样比较不同包被浓度的灵敏度。调整鼠抗 OA-OVA 包被浓度,按制备工艺组装试剂条,以阳性标本和 PBS 加样比较不同包被浓度的灵敏度。调整羊抗鼠 IgG 抗体浓度,按制备工艺组装试剂条,以 PBS 加样比较不同包被浓度对照线显色时间。制备的胶体金试剂条加入 50 ng/mL OA 标准品,观察检出时间。以各最佳试验条件制备金标测试条,对各浓度 OA 作灵敏度检测。

**1.6 样品模拟提取与加标回收检测** 洗净蛤蜊样品,去壳后沥干,用高速分散均质器将生物体匀浆;称取匀浆样品 5 g,置离心管中,加入一定量 OA 标准液,随后按 1:2(m/v)的比例加入 80%(v/v)弱酸性甲醇溶液,涡旋混匀 5 min;3 500 r/min 离心 10 min,取上清按 1:1(v/v)加入正己烷进行脱脂,收集合并正己烷相用于后续水解处理;向脱脂样品的甲醇相中按 1:1(v/v)加入氯仿溶液,收集氯仿提取液用旋转蒸发仪蒸干,用 100  $\mu$ L 甲醇溶解残余物,经 PBST(含吐温-20 的 PBS)稀释混匀后以 0.45  $\mu$ m 滤膜过滤;用胶体金试剂条检测提取液。

**1.7 贝类染毒提取及检测** 将蛤蜊置于密度约为  $10^6$ /mL 的利马原甲藻培养液中,分别在摄食 0、2、48、96 h 后取样;清洗后称量 2 g 蛤蜊样品,每个样品称量 3 份,按 1:2(m/v)的比例加入 80%(v/v)甲醇水溶液,用组织匀浆机处理 5 min;以 3 500 r/min 离心 10 min,取上清液;按照 1:1(v/v)加入正己烷进行脱脂,收集合并正己烷相用于后续水解处理;向脱脂样品的甲醇相中按 1:1(v/v)加入氯仿溶液,收集氯仿提取液用旋转蒸发仪蒸干,并以 1 mL 甲醇溶解(相当于每毫升甲醇提取 2 g 贝组织);用胶体金试剂条检测提取液。

## 2 结果

**2.1 胶体金颗粒大小** 颗粒大小必须同时满足试纸条检测线(T线)阳性标本检测不显色和 PBS 标本检测显色明显 2 个要求。试验结果显示,在直径大小分别为 5、18、30、50 nm 4 种胶体金颗粒中,仅 30 nm 金颗粒可同时满足上述 2 个要求,且具有较高稳定性,可用于抗体标记和试纸条制备。

**2.2 金标单抗浓度** 用 PBS 对盐析单抗作 1:10 稀释,测定  $A_{260}=0.249 6$ ,  $A_{280}=0.427 3$ ,计算单抗浓度为 4.35 mg/mL,以胶体金对浓度分别为 50、100、200、300、400  $\mu$ g/mL 单抗进行标记,分别制备试纸条检测阳性标本及 PBS 标本,结果显示单抗浓度为 200、300  $\mu$ g/mL 时,阳性与 PBS 标本检测结果均符合上述 2 个要求,考虑试剂成本,选择单抗浓度 200  $\mu$ g/mL。

**2.3 金标单抗包被量** 按金标单抗喷量 1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5  $\mu$ L/cm 制备试纸条,并检测阳性标本和 PBS 标本,结果显示当喷量为 2.5  $\mu$ L/cm 时,检测结果符合上述 2 个要求。

**2.4 T 线和控制线(C 线)工作液浓度** 以 0.1、0.25、0.5、0.75、1.0 mg/mL 作为 OA-OVA 包被浓度包被 T 线,分别制备试纸条并进行阳性标本和 PBS 标本检测,结果显示包被浓度为 0.75 mg/mL,包被量为 0.5  $\mu$ L/cm 时,检测结果符合上述 2 个要求。以 0.4、0.8、1.0、1.4、1.8 mg/mL 作为羊抗鼠 IgG 多克隆抗体包被浓度包被 C 线,分别制备试纸条并进行阳性标本和 PBS 标本检测,结果显示羊抗鼠 IgG 多克隆抗体包被浓度为 1.0 mg/mL,包被量为 0.5  $\mu$ L/cm 时,检测结果符合上述 2 个要求。

**2.5 反应时间** 以所制备试纸条分别对 50 ng/mL OA 标准品进行检测,分别在检测 2、3、5、10 min 内观察检测结果;结果显示反应时间为 2 min 时,T 线无条带,C 线显色弱,测试不合格;反应时间为 3、5 min 时,T 线无条带,C 线显色强,测试合格;反应时间为 10 min 时,T 线有条带,C 线显色强,测试不合格。最终确定反应时间 3~5 min 观察检测结果效果最佳。

**2.6 灵敏度** 以上述最佳试验条件制备试纸条,对浓度分别为 6.25、12.5、25、50、100、200、300、400 ng/mL 的 OA 标准品及 PBS 标本进行检测,结果显示 OA 浓度小于或等于 12.5 ng/mL 时,T 线均显色;OA 浓度大于或等于 25 ng/mL 时,T 线均未显色。以肉眼不可见 T 线显色为标准,确定所制备试纸条检测灵敏度可达 25 ng/mL。

**2.7 加标贝肉检测** 将不同浓度 OA 标准液加入贝肉样品中,每组设 5 个平行样品进行胶体金试纸条检测,检测结果见表 1。当加标浓度为 25 ng/mL 时,T 线颜色较 C 线浅,即检测结果为阳性。样品模拟提取法的平均回收率为 92.04%,即检测浓度为 23.01 ng/mL,与试纸条灵敏度基本一致。

表 1 加标贝肉的胶体金试纸条检测结果

| OA 标准液浓度 (ng/mL) | 检测结果 (n=5)    |
|------------------|---------------|
| 6.25             | +, +, +, +, + |
| 12.50            | ±, +, +, ±, ± |
| 25.00            | ±, ±, ±, ±, ± |
| 250.00           | -, ±, -, -, - |

+ : T 线和 C 线颜色一致,阴性结果;± : T 线颜色浅于 C 线,阳性结果;- : T 线无显色,阳性结果。

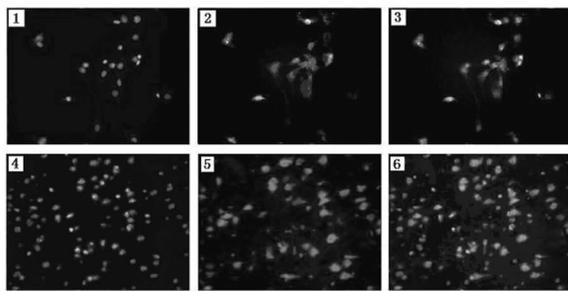
**2.8 染毒贝类检测** 分别取处理 0、2、48、96 h 染毒贝类样品进行胶体金检测,结果显示处理 2 h 样品呈阴性反应,即毒素浓度理论上低于检测灵敏度,处理 48、96 h 样品呈阳性反应,即毒素浓度理论上高于检测灵敏度。

## 3 讨论

本试验以平均粒径 30 nm 的胶体金颗粒标记抗 OA 单克隆抗体,以 OA-OVA 作为检测带,羊抗鼠 IgG 多克隆抗体作为质控带,依据免疫层析竞争原理,建立了快速 OA 快速检测方法,灵敏度为 25 ng/mL,反应 3~5 min 即可目测判断结果。GICA 检测 OA 的原理是将待检样品溶液滴加在试纸条的一端,通过毛细作用向上移动,样品中的 OA 先与胶体金标记抗 OA 单抗特异性结合,随后免疫复合物上移至 T 线(喷有 OA-OVA);如样品中的 OA 足够多,则金标抗体位点全部被结合,因此免疫复合物在 T 线不停留,即 T 线不显色,免疫复合物继续移动至喷有羊抗鼠 IgG 多克隆抗体的 C 线,包被抗体可与免疫复合物结合,使 C 线显红色;如样品中不含 OA 或 OA 浓度低于检测灵敏度时,2 条线均显红色,可根据 T 线颜色深浅初步判断样品 OA 浓度。胶体金颗粒本身带紫色,而颗粒大小将直接影响试纸条检测效果。根据试验结果,若样品 OA > 25 ng/mL, T 线不显色,为阳性结果;反之, T 线显红色,为阴性结果。加标贝肉检测结果表明,OA 浓度稍高于或接近检测灵敏度(25 ng/mL)的样品,一定要严格控制反应时间为 3~5 min。若延长反应时间,可能会由于少量金标抗体抗原复合物的长时间附着积累,以及其他一些非特异性吸附反应等的作用,干扰结果判断,因为 GICA 毕竟仅可实现半定量检测。

影响 GICA 检测性能的关键因素首先是抗体特异性,只有制备了高特异性抗体,才能生产出具有实用价值的检测产品。本研究制备的抗 OA 单克隆抗体,特异性高,最大抑制率达 90% 以上,因此所建立的 GICA 灵敏度较高,能够满足实际样品安全阈值检测,具有很高的实用价值。其次是包被抗原结合率。本研究以 OA-OVA 作为包被抗原包被在 T 线上,只有具备较高结合率的 OA-OVA 才能使竞争结合的金标抗体产生肉眼可识别的颜色变化,从而达到检测目的。此外,胶体金颗粒大小以及均一性,溶液 pH 值及所用容器洁净程度等因素可影响检测灵敏度;硝酸纤维素膜质量,特别是膜孔径大小和均匀度,会影响抗体结合的表面积及样本层析速度。

刘仁沿等<sup>[11-12]</sup>制备了抗 OA 单克隆抗体,(下转第 2184 页)



1~3: NF 表达检测, 1 为 DAPI 染色的细胞核, 2 为 NF 表达, 3 为 1~2 合并图; 4~6: NeuN 表达检测, 其中 4 为 DAPI 染色的细胞核, 5 为 NeuN 表达, 6 为 4~5 的合并图。

图 1 STBI 脑组织匀浆诱导人脐血 MSCs 3 d 后 NF 及 NeuN 的表达 (×1 000)

### 3 讨 论

干细胞移植对 TBI 患者脑功能的恢复性治疗十分重要<sup>[6-7]</sup>。人脐血 MSCs 具有自我增殖、更新能力和多向分化潜能, 在不同诱导条件下, 可分化为成骨细胞、心肌细胞、肝细胞、神经细胞等, 并具有取材方便、易于体外培养、异体移植不易引起排斥反应等优点, 所以得到广泛的研究运用<sup>[8-9]</sup>。已有很多研究探讨了对 MSCs 的诱导分化条件, 如细胞因子、化学分子等等, 已证实二甲亚砜(DMSO)、2-巯基乙醇、3-叔丁基-4 羟基茴香醚(BHA)、碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)等均可诱导 MSCs 成神经分化<sup>[10]</sup>; 但 MSCs 是在患者损伤脑组织特定微环境中进行分化的, 所以研究模拟微环境的诱导可行性更有意义。

以脑组织匀浆作为 MSCs 成神经分化的诱导剂可提供与体内微环境类似的生长条件, 有报道 MSCs 在脑组织匀浆诱导下可转化为神经样细胞, 并证实脑组织细胞分泌的生长因子(如神经生长因子、胶质源性神经营养因子等)在转化过程中起到促进作用。本研究采用前期构建的 STBI 小鼠模型<sup>[5]</sup>, 制作了 TBI 脑组织匀浆诱导液, 对人脐血 MSCs 进行诱导, 3 d 后进行荧光免疫细胞化学试验检测, 证实正常脑组织匀浆和 STBI 脑组织匀浆均可诱导人脐血 MSCs 表达 NF 和 NeuN, 且 STBI 脑组织匀浆诱导组 NF 和 NeuN 阳性率高于正常脑组织匀浆诱导组( $P < 0.05$ )。由此可见, 脑组织匀浆可诱导人脐 MSCs 向神经元样细胞分化, 表达神经细胞特异标志分子 NF 和 Ne-

uN, 且 STBI 脑组织匀浆的诱导效果好于正常脑组织匀浆。

本研究初步证实了模拟 STBI 微环境的诱导剂可诱导人脐血 MSCs 表达神经细胞的标志分子, 具有诱导人脐血 MSCs 成神经分化能力, 但分化生成的细胞是否具有神经细胞功能, 以及具体的分化调控机制还需进一步深入探讨。

### 参考文献

- [1] Vincent AS, Roebuck-Spencer T, Gilliland K, et al. Automated neuro-psychological assessment metrics (v4) traumatic brain injury battery: military normative data[J]. Mil Med, 2012, 177(3): 256-269.
- [2] Hoffman JM, Bell KR, Powell JM, et al. A randomized controlled trial of exercise to improve mood after traumatic brain injury[J]. PM-R, 2010, 2(10): 911-919.
- [3] Tatsuki I, Shigeo H, Takao S, et al. Edaravone increases neural stem cell number around the area of damage following rat traumatic brain injury[J]. Neurosci Res, 2010, 68(1): 426-433.
- [4] Catale C, Germain S, Meulemans T, et al. Exploration of perceptual and motor inhibition in children with traumatic brain injury[J]. Percept Mot Skills, 2011, 112(3): 667-679.
- [5] 邓均, 艾国平, 周桃莉, 等. G-CSF 动员循环间充质干细胞及其对颅脑损伤修复的可行性分析[J]. 第三军医大学学报, 2007, 29(12): 1131-1134.
- [6] 阮成钧, 张化彪, 冯伟生, 等. 细胞移植对脑出血脑损伤的保护作用[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2008, 12(38): 7551-7554.
- [7] 步兴耀, 黄志起, 张永福. 骨髓间充质干细胞移植治疗缺血性脑损伤的研究进展[J]. 实用诊断与治疗杂志, 2004, 18(2): 113-115.
- [8] Knippenberg M, Helder MN, Doulabi BZ, et al. Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells acquire bone cell-like responsiveness to fluid shear stress on osteogenic stimulation[J]. Tissue Eng, 2005, 11(11/12): 1780-1788.
- [9] Ertem M, Ileri T, Azik F, et al. Related donor hematopoietic stem cell transplantation for Fanconi anemia without radiation: a single center experience in Turkey[J]. Pediatr Transplant, 2009, 13(1): 88-95.
- [10] Jiang J, Lv Z, Gu Y, et al. Adult rat mesenchymal stem cells differentiate into neuronal-like phenotype and express a variety of neuro-regulatory molecules in vitro[J]. Neurosci Res, 2010, 66(1): 46-52.

(收稿日期: 2012-01-09)

(上接第 2182 页)

建立并分析了影响 ELISA 法和胶体金标记方法检测 OA 灵敏度的可能因素。本文则对比分析了试纸条制备过程中多种因素的影响, 最终获得了高于之前检测灵敏度的稳定制备流程, 并对其实用性进行了验证。目前多数国家规定的贝类组织 OA 安全阈值是每 100 g 贝肉 OA 含量不超过 20 μg, 本研究所建立方法的检测灵敏度基本满足该要求, 可用于进行现场快速检测和大量筛查, 在检验检疫、食品安全部门及卫生监控部门具有较为广泛的应用前景。

### 参考文献

- [1] 全先庆, 曹善东. 赤潮的危害、成因及防治[J]. 山东教育学院学报, 2002, 17(2): 87-88.
- [2] Hallegraeff G. Harmful algal blooms: a global overview [J]. Monogra Oceanogra Methodol, 2003, 11(1): 25-49.
- [3] Viviani R. Eutrophication, marine biotoxins, human health[J]. Sci Total Environ, 1992, 139(Suppl): 631-662.
- [4] Fernandez J, Candenias M, Souto M, et al. Okadaic acid, useful tool for studying cellular processes[J]. Curr Med Chem, 2002, 9(2): 229-262.

- [5] Wright JLC. Dealing with seafood toxins: present approaches and future options[J]. Food Res Int, 1995, 28(4): 347-358.
- [6] 孟宪梅, 卢士英, 林超, 等. 大田软海绵酸致病性及检测方法研究进展[J]. 疾病防治, 2011, 38(2): 152-156.
- [7] 方立超, 程平, 蒋丽莉, 等. 甲胎蛋白纳米金侧流免疫层析快速检测试纸的研制[J]. 国际检验医学杂志, 2011, 32(7): 736-738.
- [8] 张茂海, 吴建业, 陆玲娜, 等. 胶体金与酶联免疫法检测乙肝表面抗原结果分析[J]. 国际检验医学杂志, 2011, 32(14): 1625-1626.
- [9] 胡乐琴, 柳俊秀, 王权, 等. 抗大田软海绵酸单克隆抗体的制备及免疫学特性分析[J]. 免疫学杂志, 2011, 27(9): 809-811.
- [10] Frens G. Controlled nucleation for the regulation of the particle size in monodisperse gold suspensions[J]. Nat Phys Sci, 1973, 24(17): 120-122.
- [11] 刘仁沿, 梁玉波, 陈冰君, 等. 胶体金免疫层析方法快速检测腹泻性贝毒软海绵酸的初步研究[J]. 分析实验室, 2008, 27(7): 26-29.
- [12] 刘仁沿, 陈冰君, 梁玉波, 等. 腹泻性贝毒软海绵酸单克隆抗体的制备和酶联免疫检测方法的建立[J]. 卫生研究, 2008, 37(4): 443-445.

(收稿日期: 2012-04-09)