

3 种酶联免疫分析法在蓖麻毒素定量测定中的比较

马小溪 刘合珠 唐吉军 郭磊 谢剑炜*

(军事医学科学院毒物药物研究所, 北京 100850)

摘 要 建立了蓖麻毒素的 3 种酶联免疫定量分析法,即光吸收、荧光和化学发光免疫分析法,并系统优化了各项实验条件。结果显示:对于化学发光检测法,当酶标抗体 HRP-4C13 稀释倍数为 1:8000 时可获得最佳的信噪比,且酶与底物反应 3 min 后信号趋于稳定。随后在各自优化的条件下将 3 种方法用于毒素的检测。比较结果表明:化学发光酶联免疫分析法除具有线性范围宽(0.02 ~ 5.5 $\mu\text{g/L}$, $r^2 = 0.999$)、灵敏度高(检出限为 5 ng/L)的特点外,还具有简单、快速、体系稳定性好等优点。将本方法用于不同实际样品基质,如饮用水、碳酸饮料、奶粉、咖啡和血清中添加的蓖麻毒素的检测,其检出限为 0.005 ~ 0.08 $\mu\text{g/L}$,回收率为 89.6% ~ 108.8%,适于污染及中毒样品中痕量蓖麻毒素的定量分析。

关键词 蓖麻毒素; 酶联免疫分析; 化学发光

1 引 言

蓖麻毒素(Ricin)是从大戟科植物蓖麻籽(*Ricinu communis*)中分离出来的一种 II 型核糖体失活蛋白,其相对分子量约为 66 kDa,由 A 链(约 32 kDa)和 B 链(约 34 kDa)通过二硫键连接而成。其中 A 链为效应链,具有失活核糖体的能力;B 链含有两个半乳糖残基结合位点,能与细胞上含半乳糖残基的糖蛋白或糖脂结合,从而介导毒素进入细胞发挥毒性^[1]。蓖麻毒素来源广泛、毒性极高,成年人口服 8 粒蓖麻籽即足以致死;且其易于提取、性质稳定,是一种极有可能被用作恐怖袭击或制造极端事件的生物毒素^[2,3]。为应对蓖麻毒素潜在的恐怖威胁,亟需建立准确、快速和灵敏的检测技术和方法^[4]。

目前,根据蓖麻毒素所具有的理化特性和免疫原性已发展出多种检测方法,其中多以免疫分析法为主。而免疫分析法中的酶联免疫吸附分析法(Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)既具备抗原抗体反应的特异性,又结合酶的高效催化性及信号放大体系等优点,因此其已成为检测蓖麻毒素的主要有效手段^[5~8]。但目前文献中报道的方法普遍存在灵敏度低等限制而无法直接应用于痕量生物医学样品的分析^[9]。本研究立足于不同检测策略的角度,分别建立了 3 种酶联免疫分析法,即光吸收、荧光和化学发光免疫分析法(CLIA)对蓖麻毒素进行定量分析,并在线性范围、检出限(LOD)、精密度、特异性等方面进行了比较研究,其中 CLIA 除具有操作简单、分析时间短、无放射性污染等特点外,还具有灵敏度高、特异性、重现性和准确性好等优点,其检测灵敏度高达 0.005 $\mu\text{g/L}$,已成功应用于饮料、食品和血清等实际样品基质中添加蓖麻毒素的检测。

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

LS55 型荧光分光光度计(美国 Perkin Elmer 公司);SpectraMax M5/M5e 型多功能酶联免疫分析仪(美国 Molecular Devices 公司);96 孔酶标板(美国 Costar 公司)。化学发光 HRP 底物试剂盒(美国 Millipore 公司)。

蓖麻籽(北京秀禾种子有限公司);N,N,N',N'-四甲基联苯胺(TMB),对氨基苯基-1-巯基- β -D-半乳糖苷-琼脂糖树脂,G75 型葡聚糖凝胶树脂(美国 Sigma 公司);Fast Flow 型 DEAE Sepharose(美国 Amersham Biosciences 公司);牛血清白蛋白(BSA,北京天佑达生物工程技术有限公司);对羟基苯丙酸

2010-08-20 收稿;2010-10-28 接受

本文系国家重大新药创制科技专项“综合性新药研发技术大平台”课题(No.2009ZX09301-002)资助

*Corresponding author. E-mail: xiejw@163.com Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

(HPPA, 美国 Alfa Aesar)。抗蓖麻毒素单克隆抗体 3D74 和辣根过氧化物酶(HRP) 标记的抗蓖麻毒素单克隆抗体 4C13(HRP-4C13) 由本单位王玉霞研究员惠赠^[10]; 人血清(中国人民解放军 307 医院); 其它试剂均为国产分析纯; 饮用水、碳酸饮料、奶粉、咖啡均为市售商品。所有溶液均以 Milli-Q 超纯水(美国 Millipore A10 型纯水仪) 配制。

2.2 实验方法

2.2.1 蓖麻毒素的提取^[11] 取 50 g 蓖麻籽, 去壳, 在 200 mL PBS 缓冲液中匀浆。匀浆液于 4 °C 浸泡 24 h 后滤残渣, 上清液于 4 °C 以 12000 r/min 离心 30 min。弃去沉淀和上层油脂后, 以 85% 饱和度的 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 沉淀上清液中的蛋白质。冰浴中缓慢搅拌 4 h, 于 4 °C 以 12000 r/min 离心 15 min, 弃上清液, 将沉淀用适量 10 mmol/L PBS 缓冲液(pH 7.4) 溶解, 即得蓖麻毒素粗提液。

将对氨基苯基-1-巯基- β -D-半乳糖苷-琼脂糖树脂装柱, 用 PBS 缓冲液平衡后, 加入粗提液, 于 4 °C 下充分结合 30 min。依次用 PBS 缓冲液、10 mmol/L D-半乳糖-PBS 缓冲液洗涤除去杂蛋白, 最后用 150 mmol/L D-半乳糖-PBS 缓冲液洗脱结合蛋白。将 G75 型葡聚糖凝胶树脂装入层析柱中, 经 10 mmol/L Tris-HCl (pH 8.4) 清洗平衡后加入上述亲和层析洗脱液, 随后用 10 mmol/L Tris-HCl (pH 8.4) 洗脱, 收集 280 nm 处存在紫外吸收的洗脱组分。将收集液通过活化的 Fast Flow 型 DEAE sepharose 阴离子交换树脂, 以 80 mmol/L Tris-NaCl 缓冲液洗脱, 即获得高纯度蓖麻毒素, 以十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE) 分析毒素纯度。

2.2.2 光吸收-酶联免疫分析法测定蓖麻毒素 将抗蓖麻毒素单克隆抗体 3D74 用 0.05 mol/L 碳酸盐包被缓冲液(pH 9.6) 稀释至 1 mg/L, 向酶标板中每孔加入 0.1 mL, 于 4 °C 下包被过夜。次日, 弃去包被液, 用 PBS-T (10 mmol/L PBS + 0.1% Tween-20) 洗涤 3 次, 甩干。每孔加入 0.3 mL 封闭液(1% BSA), 于 37 °C 下孵育 3 h, 甩干。将配制在 PBS 稀释缓冲液(PBS-BSA, 10 mmol/L PBS + 0.5% BSA, pH 7.4) 中的系列浓度为 1.4, 2.8, 5.6, 7.7, 11.2 和 15.4 $\mu\text{g/L}$ 的蓖麻毒素加入到酶标板中, 每孔 0.1 mL, 同时设置阴性对照孔, 于 37 °C 下孵育 1 h 后用 PBS-T 洗涤 3 次, 甩干。加入 1: 3000 稀释的 HRP-4C13, 每孔 0.1 mL, 37 °C 下孵育 40 min 后用 PBS-T 洗涤 6 次, 甩干。每孔加入 0.1 mL 显色底物 TMB, 室温反应 7 min 后, 以 2 mol/L H_2SO_4 终止该显色反应。于 450 nm 波长处测量吸光度值。

2.2.3 荧光-酶联免疫分析法测定蓖麻毒素 包被、封闭、加样等基本操作同 2.2.2。本法中蓖麻毒素的系列浓度设置为 0.2, 0.4, 0.8, 1.6, 3.2, 6.4 和 12.8 $\mu\text{g/L}$ 。加入 1: 1500 稀释的 HRP-4C13 并于 37 °C 下孵育 40 min, 用 PBS-T 洗涤 6 次, 甩干。每孔加入 0.1 mL 60 mmol/L 对羟基苯丙酸溶液作为荧光底物, 室温反应 15 min 后, 以 50 μL 0.1 mol/L NaOH 终止反应, 测定荧光强度。激发与发射波长分别为 320 和 413 nm, 狭缝宽度均为 15 nm。

2.2.4 CLIA 法测定蓖麻毒素 包被、封闭、加样等操作同 2.2.2 节。蓖麻毒素的系列浓度设为 0.005, 0.01, 0.02, 0.17, 0.34, 0.68, 1.38, 2.75 和 5.5 $\mu\text{g/L}$ 。加入 1: 8000 稀释的 HRP-4C13 并于 37 °C 下孵育 40 min, 用 PBS-T 洗涤 6 次, 甩干。加入化学发光底物, 室温反应 3 min 后测量化学发光强度。

2.2.5 CLIA 法检测不同基质中蓖麻毒素加标样品 分别取纯净水 1 mL、某碳酸饮料 1 mL、奶粉 1 g、咖啡 0.3 g 和人血清 1 mL, 均加入 9 mL PBS 稀释缓冲液, 混匀, 用上述基质溶液将蓖麻毒素分别稀释为不同浓度后以 CLIA 法进行检测。同时, 分别用以上基质溶液将蓖麻毒素配制成 0.3, 0.6 和 2.5 $\mu\text{g/L}$, 混匀后于 4 °C 下以 12000 r/min 离心 20 min, 测定上清液中蓖麻毒素含量, 计算出每种基质中蓖麻毒素的回收率。

3 结果与讨论

3.1 蓖麻毒素的分离

蓖麻籽粗提液中主要成分为蓖麻毒素 RCA 60、蓖麻凝集素 RCA 120 和大量的杂蛋白, 由于 RCA 60 和 RCA 120 具有半乳糖残基结合位点, 可采用半乳糖苷偶联的琼脂糖树脂对其进行亲和层析, 经 10 mmol/L 半乳糖溶液洗去大部分杂蛋白后, 用 150 mmol/L 半乳糖溶液将 RCA 60 和 RCA 120 同时洗脱。由于洗脱样品中含有较高浓度的盐, 且 pH 值也不适于后续的离子交换层析, 因此选用凝胶过滤层

析将洗脱样品脱盐,并将缓冲体系 pH 值调至 8.4。利用这两种蛋白质的等电点差异,采用阴离子交换层析对混合物进行分离,分离效果见图 1。SDS-PAGE 凝胶电泳图见图 2。结果表明:含 80 mmol/L NaCl 的缓冲液可洗脱得到电泳纯的蓖麻毒素,而更高的盐浓度则可洗脱凝集素。

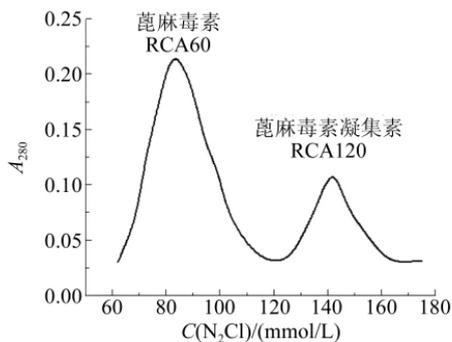


图 1 阴离子交换层析洗脱曲线

Fig. 1 Elution curve of anion-exchange chromatography

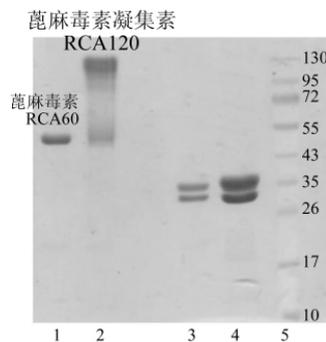


图 2 纯化蓖麻毒素 SDS-PAGE 分析图

Fig. 2 SDS-PAGE analysis of purified ricin and ricin agglutinin(RCA)

3.2 蓖麻毒素检测条件的优化

参照文献[12],优化荧光-ELISA 和 CLIA 中酶标抗体 HRP-4C13 的最佳稀释比例及与各自发光底物的最佳反应时间。

在荧光-ELISA 法中,当包被抗体 3D74 浓度为 1 mg/L,酶标抗体 HRP-4C13(2.5 g/L) 稀释比例在 1: 10000 ~ 1: 1500 范围时,荧光强度呈上升趋势;稀释倍数为 1: 1500 ~ 1: 1000 时,荧光强度趋于饱和。兼顾检测灵敏度及 HRP 酶标抗体的用量,本研究选择 HRP-4C13 的稀释倍数为 1: 1500。荧光-ELISA 法中,荧光底物反应时间在 15 min 内,荧光强度上升较为明显,随后荧光强度趋于平缓,即选择 15 min 时终止反应测量荧光强度^[13,14]。

在 CLIA 法中,较高浓度的 HRP-4C13 会导致空白值增加,当 HRP-4C13 稀释倍数为 1: 8000 时,样品的发光强度最强,且空白本底值较低,因此 HRP-4C13 稀释倍数选择为 1: 8000。最佳化学发光底物反应时间同样由对底物反应时间的监测曲线得到,3 min 后发光强度趋于稳定,从而选择 3 min 后测量化学发光强度。

3.3 3 种酶联免疫分析方法中的蓖麻毒素检测

在优化条件下,采用 3 种酶联免疫分析法对蓖麻毒素进行标准曲线、检出限及精密度的测定,方法结果见表 1。由表 1 可见,CLIA 法最为灵敏,其 LOD 比光吸收-ELISA 和荧光-ELISA 分别低 3 和 2 个数量级,同时其线性范围较宽,可达 2 个数量级。据文献[15]报道,成年人经肌肉注射或静脉注射蓖麻毒素的半数致死剂量约为 5 ~ 10 μg/kg。而本研究建立的 CLIA 法的 LOD 可达到 0.1% LD₅₀,显著低于蓖麻毒素半数致死剂量,为实现中毒人员体内微量蓖麻毒素的检测和体内毒物代谢动力学研究奠定了方法学基础。

表 1 3 种分析方法检测蓖麻毒素的比较

Table 1 Comparison of three different assay methods for determination of ricin

方法 Method	线性范围 Linear range (μg/L)	回归方程 Regression equation	相关系数 Correlation coefficient	检出限 Limit of detection (μg/L)	精密度 Relative standard deviation (% n = 3)		
光吸收法 Optical absorption	1.3 ~ 15	$Y = 0.06X + 0.03$	0.994	1.4	3.6 (3 μg/L)	3.3 (6 μg/L)	3.8 (10 μg/L)
荧光法 Fluorescent	0.2 ~ 12	$Y = 32.68X + 3.39$	0.995	0.2	3.9 (1 μg/L)	3.2 (5 μg/L)	4.8 (10 μg/L)
化学发光法 Chemiluminescent immunoassay	0.02 ~ 5.5	$Y = 49189.6X + 2106.5$	0.999	0.005	4.8 (0.08 μg/L)	4.6 (0.32 μg/L)	4.9 (2.5 μg/L)

3.4 3 种酶联免疫分析法的检测特异性

将 3 种免疫分析方法用于检测蓖麻毒素、蓖麻凝集素和相思子毒素,以验证 3 种方法的特异性。以光吸收法为例,结果见图 3,吸光度随蓖麻毒素浓度增加而增大;而检测蓖麻凝集素和相思子毒素时,响应值与空白对照接近。在同样实验条件下,荧光-ELISA 法和 CLIA 法对 3 种样品的检测结果与光吸收法一致。这表明实验中所用的单克隆抗体的特异性好,同时也说明所建立的方法准确、可靠。

3.5 CLIA 法检测复杂基质加标样品中的蓖麻毒素

3 种免疫分析方法的比较结果表明,与另外两种分析方法相比,CLIA 具有灵敏度高、线性范围宽、特异性高、精密度好等特点,故选择其用于复杂基质中的蓖麻毒素加标样品的定量检测。蓖麻毒素污染体系通常为饮用水、饮料和食品等,进入人体后主要存在于血液和组织中。将蓖麻毒素配制在水、某碳酸饮料、奶粉、咖啡和血清样品中,采用 CLIA 法测定这些基质加标样品中毒素的检出限、线性范围及回收率,结果见表 2。上述样品中,蓖麻毒素在奶粉基质中的检出限显著低于其它基质,这归因于奶粉中大量的酪蛋白和乳清蛋白对毒素和抗体活性的保护作用。

表 2 化学发光-酶联免疫分析法检测水样、碳酸饮料、奶粉、咖啡和血清加标样品中的蓖麻毒素

Table 2 Detection of ricin in water, carbonated beverage, milk powder, coffee and serum added samples by chemiluminescent immunoassay

样品 Samples	线性范围 Linear range ($\mu\text{g/L}$)	回归方程 Regression equation	相关系数 Correlation coefficient	回收率 Recovery(%, $n=3$)		
				0.3 $\mu\text{g/L}$	0.6 $\mu\text{g/L}$	2.5 $\mu\text{g/L}$
水 Water	0.04 ~ 5	$Y=29237X+2306$	0.999	102.4	100.8	93.6
碳酸饮料 Carbonated beverage	0.08 ~ 5	$Y=31762X-2241$	0.995	89.6	94.4	97.2
奶粉 Milk powder	0.005 ~ 1.25	$Y=44137X+1098$	0.998	106.7	107.2	103.6
咖啡 Coffee	0.08 ~ 5	$Y=14498X+4119$	0.997	108.8	97.6	94.0
人血清 Serum	0.08 ~ 5	$Y=27930X+5267$	0.998	106.1	100.8	95.6

本研究采用了光吸收法、荧光法和化学发光法定量分析蓖麻毒素。实验结果表明,化学发光法 (CLIA) 由于不需要任何光源照射,避免了光源稳定性、光散射等因素对分析检测结果造成的影响,且其灵敏度比光度法、荧光法高 2~3 个数量级。CLIA 法将更适用于污染与中毒样品中的微量蓖麻毒素的定量检测。

References

- Bradberry S M, Dickers K J, Rice P, Griffiths G D, Vale J A. *Toxicol. Rev.*, **2003**, 22(1): 65 ~ 70
- Schep L J, Temple W A, Butt G A, Beasley M D. *Environ. Int.*, **2009**, 35(8): 1267 ~ 1271
- Bigalke H, Rummel A. *Toxicology.*, **2005**, 214(3): 210 ~ 220
- BAO Yi, GUO Lei, CHEN Jia, LIN Ying, XIE Jian-Wei(暴钺, 郭磊, 陈佳, 林缨, 谢剑炜). *Chinese J. Anal. Chem.* (分析化学), **2009**, 37(5): 764 ~ 771
- Griffiths G D, Newman H, Gee D G. *J. Forensic Sic. Soc.*, **1986**, 26(5): 349 ~ 358
- GUO Jian-Wei, SHEN Bei-Fen, FENG Jian-Nan, HU Mei-Ru, YU Ming(郭建巍, 沈倍奋, 冯健男, 胡美茹, 于鸣). *Chin. J. Cell Mol. Immunol.* (细胞与分子免疫学杂志), **2006**, 22(4): 536 ~ 538
- Poli M A, Rivera V R, Hewetson J F, Merrill G A. *Toxicol.*, **1994**, 32(11): 1371 ~ 1377
- Leith A G, Griffiths G D, Green M A. *J. Forensic. Sci. Soc.*, **1988**, 28(4): 227 ~ 236
- YANG Yun-Yun, MOU De-Hai, TONG Zhao-Yang, MU Xi-Hui, HAO Lan-Qun(杨运云, 牟德海, 童朝阳, 穆晞惠, 郝兰群). *Chinese J. Anal. Chem.* (分析化学), **2007**, 35(3): 439 ~ 442

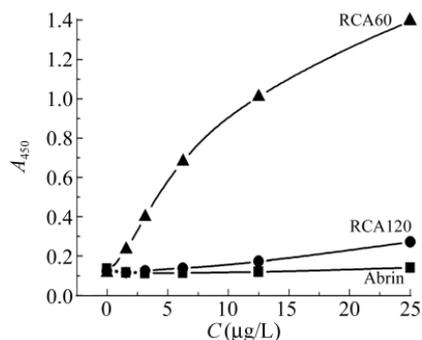


图 3 光吸收法特异性检测曲线

Fig. 3 Curves of specificity of optical absorption method

- 10 Guo J, Shen B, Sun Y, Yu M, Hu M. *Hydridoma.*, 2006, 25(4): 225 ~ 229
- 11 Lin T T, Li S L. *Eur. J. Biochem.*, 1980, 105(3): 453 ~ 459
- 12 LANG Li-Wei, WANG Yu-Xia, WANG Chen-Yu, ZHAO Yu, JIA Pei-Yuan, FU Feng-Hua(郎立伟,王玉霞,王晨雨,赵宇,贾培媛,付风华). *Journal of International Pharmaceutical Research(国际药学杂志)*, 2009, 36(1): 12 ~ 16
- 13 Meyer J, Karst U. *Analyst*, 2001, 126(2): 175 ~ 178
- 14 Matsumoto T, Furuta T, Nimura Y, Suzuki O. *Anal. Biochem.*, 1984, 138(1): 133 ~ 136
- 15 Musshoff F, Madea B. *Drug Test Anal.*, 2009, 1(4): 184 ~ 191

Comparison of Three Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Methods for Quantitative Determination of Ricin

MA Xiao-Xi, LIU He-Zhu, TANG Ji-Jun, GUO Lei, XIE Jian-Wei*
(Beijing Institute of Pharmacology and Toxicology, Beijing 100850)

Abstract Three determination methods in enzyme-linked immunosorbent assay, namely optical absorption, fluorescent and chemiluminescent immunoassay, were established for quantitation of biotoxins protein ricin in various matrices. The detection conditions were systematically optimized. The results showed the best signal-to-noise (SNR) could be obtained for CLIA when dilution factor was 1: 8000; and the chemiluminescence signal was stable at around 3 minutes after horseradish peroxidase reacted with its substrate. Whereafter, the three methods were compared for determination of ricin under individually optimized conditions. The comparative results indicated that chemiluminescent immunoassay could provide wider linear range (from 0.02 $\mu\text{g}/\text{L}$ to 5.5 $\mu\text{g}/\text{L}$ with correlation coefficient of 0.999), higher sensitivity (limit of detection was 0.005 $\mu\text{g}/\text{L}$), and could be adopted as a simple, rapid and robust approach. The CLIA method was applied to measure the spiked ricin in water, carbonated beverage, milk powder, coffee and human serum samples. The limits of detection and the recoveries were from 0.005 to 0.08 $\mu\text{g}/\text{L}$ and from 89.6% to 108.8%, respectively. The method was quite suitable for quantitative determination of trace amounts of ricin in contaminated or poisoned samples.

Keywords Ricin; Enzyme-linked immunosorbent assay; Chemiluminescent immunoassay

(Received 20 August 2010; accepted 28 October 2010)

《光谱分析仪器使用与维护》

该书全面、系统地介绍了目前市面上流行的各类光谱分析仪器使用与维护,每类仪器主要从仪器定性定量原理、仪器结构与组成、仪器安装与调试、仪器操作与使用、仪器维护与保养、仪器维修与故障排除等方面进行阐述,重点在于介绍仪器一线操作技术人员多年来的有关仪器操作和维护保养、故障排除等方面的经验,同时,对于仪器操作过程中一些注意事项也做了介绍。该书适合于我国专业检测机构和企业检测等分析行业实验室从事化验、检验工作的中、高级操作人员等检测一线专业技术人员阅读,也可作为高等院校分析化学专业和专业培训机构作为教材使用。

该书(化学分析工程师实用技术丛书,ISBN 978-7-422-09323-3)由化学工业出版社出版,刘崇华主编,定价49.0元。