

一种可商业化生产的胶体金快速免疫层析卡:检测大田软海绵酸及其衍生物(DTX1,DTX2)

刘磊^{1,2}, 刘仁沿¹, 许道艳¹, 江天久², 曹洁³,
梁玉波¹, 刘材材⁴, 项凌云⁴

(1. 国家海洋环境监测中心, 辽宁 大连 116023; 2. 暨南大学, 生命科学技术学院, 广东 广州 510632; 3. 上海生物芯片有限公司, 上海 201203; 4. 国家海洋局东海环境监测中心, 上海 201206)

摘 要:建立一种胶体金快速免疫层析检测贝类体内腹泻性贝毒主要成分软海绵酸及其衍生物鳍藻毒素的方法。合成偶联抗原 OA-OVA, 将适当浓度的偶联抗原和 HRP 标记的羊抗鼠 IgG 分别包被在试纸条的检测线和控制线上, 胶体金标记的抗 OA 单克隆抗体包被金标垫, 优化检测线的最佳包被浓度等条件以得到最低检出限。结果表明: 该试纸条的检出限为 16 ng/mL (OA, DTX1&DTX2), 检测时间为 10 min。本研究所建立的胶体金免疫层析检测贝类中大田软海绵酸及其衍生物鳍藻毒素的方法可以满足规定的 160 µg/kg 贝肉的安全阈值, 可以应用于实际贝类样品的腹泻性贝毒的半定量检测。

关键词:胶体金; 快速免疫层析; 大田软海绵酸; 鳍藻毒素

中图分类号: O331

文献标识码: A

文章编号: 1007-6336(2017)06-0929-05

A commercial production of CGIA strip for detection of okadaic acid and its derivatives(DTX1,DTX2)

LIU Lei^{1,2}, LIU Ren-yan¹, XU Dao-yan¹, JIANG Tian-jiu², CAO Jie³,
LIANG Yu-bo¹, LIU Cai-cai⁴, XIANG Ling-yun⁴

(1. National Marine Environmental Monitoring Center, Dalian 116023, China; 2. College of life science and technology, Jinan University, Guangzhou 510632, China; 3. Shanghai Biochip Co., LTD, Shanghai 201203, China; 4. The State Oceanic Administration, East China Sea Environment Monitoring Center, Shanghai 201206, China)

Abstract: To establish a rapid detection method based on colloidal gold immune chromatography assay for detection okadaic acid and its derivatives (Dinophysistoxins) in marine bivalves. Appropriate concentration of coupling antigen OA-OVA and HRP marked goat anti mouse IgG were coated as the test line and control line respectively, colloidal gold labeling anti-OA monoclonal antibody coated as the conjugate pad, method detection limit was improved by optimize the coating concentration. The results showed that the detection of limit of the strip was 16 ng/mL (OA, DTX1&DTX2), detection time was 10min. The established methods in present study for detection of okadaic acid and its derivatives can fulfill the general regulation that OA in shellfish must be inferior to the safe threshold (160 µg/kg), and this method can be used to semi-quantitative assessment of the shellfish samples that contaminated diarrhetic shellfish poisoning.

Key words: colloidal gold; rapid immune chromatography; okadaic acid; dinophysistoxins

收稿日期: 2016-09-06, 修订日期: 2016-11-03

基金项目: 上海市科研计划项目(15DZ1202602); 国家重点研发计划(2017FYC1404303)

作者简介: 刘磊(1984-), 男, 河北保定人, 博士研究生, 研究方向为海洋环境与赤潮生态, E-mail: liulei5453@163.com

通讯作者: 梁玉波(1962-), 男, 研究员, 博士, 研究方向为海洋生态, E-mail: ybliang@nmemc.org.cn

软海绵酸(okadaic acid, OA)及其衍生物鳍藻毒素(dinophysistoxin, DTX1&DTX2)是腹泻性贝类毒素(diarrhetic shellfish poisoning, DSP)的主要组成成分,它们是一类由有毒海洋微藻产生的脂溶性聚醚类藻毒素(图1),这些产毒藻主要包括原甲藻属(*Prorocentrum* spp.)及鳍藻属(*Dinophysis* spp.)的一些种类^[1-3]。贝类在滤食了这些有毒藻后会通过食物链传递给消费者,人们误食被污染的贝类后会出现一些肠道类症状,如恶心、呕吐、腹泻等^[4-5]。症状通常会在3 d消失,然而,有研究发现软海绵酸及其衍生物是多种细胞的凋亡诱导剂和潜在肿瘤促进剂,除此之外还有报道表明OA具有基因毒性^[6-11]。虽然至今还没有急性中毒死亡事件的报道,但其潜在的威胁已经引起了广泛的关注。因此,为了保障食品安全和贝类养殖经济的可持续发展,研制开发检测贝类中OA及其衍生物的快速分析方法很有必要。腹泻性贝类毒素中的常规检测方法是小鼠生物法(mouse biology assay, MBA),该方法可以检测出样品的总毒性,但误差大、重复性较差,并且因使用大量实验动物备受争议^[12-14]。高效液相-质谱串联法(high performance liquid chromatography-mass spectrometry, HPLC-MS)能够精确的分析各种毒素的化学结构,精密准确,但该方法样品的前处理过程复杂,检测成本高,技术要求严格,不易满足大批量样品的检测分析需要^[4, 15-16]。

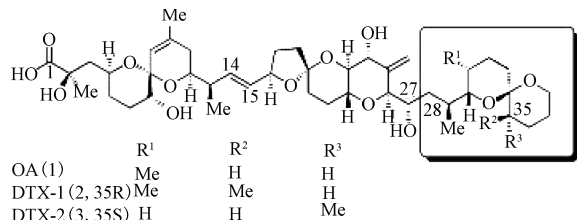


图1 OA及其衍生物的化学结构

Fig.1 Chemical structure of OA and its derivatives

胶体金快速免疫层析法(collodial gold immunochromatography assay, CGIA)是出现在20世纪80年代初期的免疫分析方法^[17-18],单克隆抗体技术、金标记技术以及新型材料的发展,使这种快速检测技术方法的灵敏度和特异性得到保障,并能够实现批量的商业化检测产品生产。相比酶联免疫吸附法(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)^[14, 19-20],它不需要仪器设备,更快速、简便,特别适合现场快速分析检测。

为了建立一种快速、灵敏的免疫层析方法用于OA及其衍生物鳍藻毒素的检测,此文利用一株本实验室已报道的、能分泌特异性抗OA单克隆抗体的融合细胞株,制备纯化单抗,与胶体金结合,通过优化实验条件,成功研制了能分析检测OA、DTX1、DTX2的金标试纸条,并能够实现商业化批量生产。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

腹泻性贝类毒素标准品OA、DTX1和DTX2,麻痹性贝类毒素标准品STX、GTX2,3和C1&2,失忆性贝类毒素标准品DA均购于加拿大国家海洋研究所(National Research Council of Canada, NRCC);神经贝类毒素标准品PbTX2、PbTX3购自北京伊普瑞斯科技有限公司;HRP标记羊抗鼠二抗购于Thermo Fisher公司;羟基琥珀酰亚胺(NHS)、碳化二亚胺(EDC)、二甲亚砜(DMSO)、卵清蛋白(OVA)、牛血清白蛋白(BSA)、PEG20000、聚乙烯吡咯烷酮(PVP)均购自美国Sigma-Aldrich公司;氯金酸(HAuCl₄)购于美国Amresco公司。组装试纸条所用耗材:PVC板、硝酸纤维素膜(NC膜)、玻璃纤维素膜、聚酯膜、吸水纸等均购于上海杰一生物技术有限公司,本研究所用其它试剂均为分析纯。

1.2 仪器与设备

Jasco V-550紫外分光光度计,日本分光公司;Biodot点膜仪XYZ3060,美国Biodot公司;鼓风干燥箱DHG-9240A,上海一恒科技有限公司;高速冷冻离心机3-18K,美国Sigma公司;Eppendorf Biophotometer分光光度计,德国Eppendorf公司;Millipore纯水仪,美国Millipore公司。

1.3 方法

1.3.1 抗体和抗原的制备

本试验所用抗OA单克隆抗体为本实验室自行研制^[19],含单克隆抗体腹水经纯化,蛋白质浓度利用Eppendorf Biophotometer分光光度计测定。

试验所用包被抗原OA-OVA按照下面方法进行制备:取0.5 mg OA标准品、0.78 mg NHS、和1.25 mg EDC,加入325 μL DMSO中,该混合物于25℃搅拌反应90 min,反应结束后加入7.75 mg OVA(事先溶于625 μL 0.085 mol/L, pH=8.4的硼酸盐缓冲液中),继续于该条件下反应10 h。

用0.01 mol/L的PBS(pH=7.4)透析3 d。所制备的OA-OVA保存于-20℃备用。

1.3.2 胶体金的制备^[21]

经硅烷化处理的烧杯中加入100 mL超纯水,加入1 mL 1% (w/v)的氯金酸溶液,持续搅拌煮沸,迅速加入1.4 mL新鲜配制的1% (w/v)的柠檬酸三钠溶液,继续煮沸10 min,颜色变成酒红色后,冷却至室温,测定其最大吸收波长。

1.3.3 金标抗体的制备与纯化

取10 mL上述胶体金溶液,加入200 μL新鲜配制的1% (w/v)碳酸钾溶液,调整pH为8.4,然后加入40 μL纯化的OA单克隆抗体(1.3.1),轻轻搅拌20 min后再加入132 μL 5% (w/v) PEG20000溶液,继续搅拌20 min,10000 rpm高速离心30 min,去除没有结合的抗体和胶体金颗粒,所得沉淀用Tris洗液重悬后再次离心,最后用Tris洗液重悬,调整其在520 nm处的吸光度值为5 OD,备用。

1.3.4 样品垫和金标垫的处理

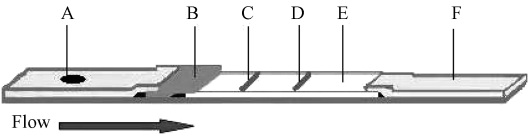
将玻璃纤维素膜(25 cm×30 cm)浸入含有0.25% (w/v) PVP、0.5% (w/v) BSA和1% (v/v) Triton X-100的硼酸盐缓冲液(0.6 mol/L, pH=8.0)中5 min,取出后置于洁净网架上,于37℃烘箱烘干3 h,取出后剪裁成条(1.8 cm×30 cm),室温干燥保存。

将聚酯纤维素膜(25 cm×30 cm)浸入到含有0.5% (w/v) PVA、1% (w/v) BSA和0.2% (v/v) Tween-20的Tris洗液(50 mmol/L, pH=8.0)中2 h,沥干后于37℃烘箱烘干过夜。次日用裁纸刀将其剪裁成0.7 cm×30 cm的长条。将所制备的金标抗体溶液滴加到处理过的聚酯膜条上,放入37℃烘箱烘干3 h后备用。

1.3.5 NC膜的选择与条件优化

选用3种厂家不同型号的NC膜进行试验,分别为Sartorius CN140、Waterman AE99、Millipore 135。首先将NC膜(2.3 cm×30 cm)贴于PVC塑料板上,将不同稀释度的包被抗原OA-OVA和HRP标记羊抗鼠IgG二抗(0.5 mg/mL)利用Biodot XYZ 3060胶体金点样系统喷涂其上,两条线的间距为0.8 cm。将贴有NC膜的PVC板于37℃烘箱烘干3 h。取出后将1.3.4中处理好的样品垫、吸水纸和金标垫按照图2组装好,用切条机切成条(5 mm)后组装成成品条,该步骤需要

在恒温恒湿间中操作(温度为22℃,湿度为45%~60%)。



注:(A:样品垫;B:金标垫;C:检测线;D:质控线;E:NC膜;F:吸水纸)

图2 胶体金快速免疫层析纸条结构

Fig.2 structure diagram of colloidal gold enhanced immunochromatography strip

1.3.6 贝类样品的前处理及加标试验

称取10 g匀浆贝肉,加入10 mL 50% (v/v)甲醇,混匀后超声破碎15 min,4℃下3000 rpm离心10 min,取出上清定容至10 mL,分析前过0.45 μm滤膜,向贝类提取液中添加系列浓度的OA及DTX1、DTX2标准溶液,用Tris缓冲盐稀释10倍,使其终浓度分别为0、8、12、16、20 ng/mL。

1.3.7 检测步骤

取100 μL已稀释的待测样品溶液加入到样品孔中,显色10 min,在控制线处能够看到清晰可见的条带,而检测线颜色的深浅取决于样品中OA及其衍生物浓度,样品中OA的浓度越高,检测线的颜色越浅。

2 结果与讨论

2.1 抗原抗体的特性

经测定本试验所用的纯化后抗体的浓度为1.24 mg/mL,其IC₅₀为2.5 ng/mL(图3)。经偶联所得包被抗原浓度为7.75 mg/mL。

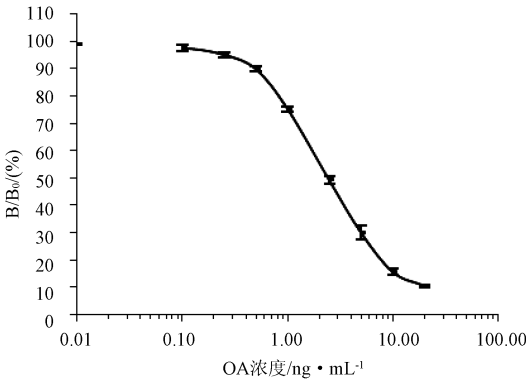


图3 抗OA单克隆抗体的抑制曲线

Fig.3 Inhibition curve of anti-OA antibody

2.2 胶体金及金标抗体的性质

本试验所制备的胶体金溶液为酒红色,肉眼观察清澈透明,无浑浊或漂浮物的产生,经紫外鉴定最大吸收波长在 517 nm 处,均一的胶体金颗粒为金标抗体探针的制备打下良好的基础,并且对试纸条检测线产生可目测的强烈信号至关重要。

胶体金标记技术以胶体金作为示踪标志物或显色剂,所以制备的胶体金的质量直接影响实验的成败,胶体金颗粒的大小主要受加入还原剂的影响,此外制备量的多少、容器的大小、洁净程度、加热的时间等因素也有一定的影响,在制备过程中不能忽视^[22-24]。

2.3 试纸条所用 NC 膜的优化

通过对 3 种不同厂家型号的 NC 膜进行试验,对比其相同条件下的显色时间、检测线的信号强度、最低检出限。结果表明,3 种 NC 膜在 10 min 内均能在检测线处产生条带,但 Millipore135 和 waterman AE99 所产生的信号要略低于 Sartorius CN140,所以最后采用 Sartorius CN140 NC 膜。

为了有效利用包被抗原 OA-OVA,经过预试验,我们进一步对检测线的包被浓度做了优化处理,分别以 0.8 mg/mL、0.9 mg/mL、1.0 mg/mL、1.1 mg/mL、1.2 mg/mL 的 OA-OVA 包被检测线,0.5 mg/mL 的羊抗鼠 IgG 二抗包被质控线,用阴性和不同加标浓度的贝类样品提取液进行检测。

结果如表 1 所示,检测线包被 OA-OVA 的浓度为 0.8 mg/mL 时,阳性检测结果可检测到 8 ng/mL 的贝类加标样品,但是阴性贝类样品显色较弱。在满足检出限的前提下为保证检测线显色清晰,OA-OVA 包被浓度选择 1.0 mg/mL。此条件下,样品经 10 倍稀释后最低可检测到 16 ng/mL 的阳性样品,符合欧盟规定的贝类样品中 OA 含量 160 μg/kg 的限量标准。

表 1 检测线包被浓度的优化

Tab. 1 optimization of coating concentration for test line

加标浓度 /ng · mL ⁻¹	检测线浓度/mg · mL ⁻¹				
	0.8	0.9	1.0	1.1	1.2
0	+	++	++	+++	+++
8	-	+/-	+/-	+	++
12	-	-	+/-	+/-	+
16	-	-	-	+/-	+/-
20	-	-	-	-	-

注:“+”表示检测线显色强度,“-”表示检测线不显色

2.4 样品前处理及加标试验

由于样品处理过程中所用的溶剂为甲醇溶液,高浓度的甲醇对 NC 膜有一定的损害,其只能耐受低于 10% 的甲醇。我们在研究中做了甲醇浓度对试纸条检出限的研究(数据未列出),综合考虑样品的前处理方法和试纸条的检出限,故选定 50% 的甲醇进行样品的提取,用 Tris 稀释 10 倍后的样品来进行检测,达到了很好的效果。

表 2 利用胶体金试纸条检测 OA 及其衍生物加标样品

Tab. 2 Using colloidal gold strip to test samples spiked with OA and its derivatives

加标浓度/ng · mL ⁻¹	OA	DTX1	DTX2
0	++	++	++
8	+	+	+
12	+/-	+/-	+/-
16	-	-	-
20	-	-	-

注:“+”表示检测线显色强度,“-”表示检测线不显色

2.5 试纸条的稳定性与特异性

所制备的试纸条在室温条件下放置 2a 后,对阴性样品及加标样品同时做检测,效果无明显差异。综上所述,本试纸条稳定性已达到保存要求。

在已确定检测线和质控线的最佳条件下,用本实验室现有的腹泻性贝毒标准品 DTX1 和 DTX2,麻痹性贝毒标准品 STX、GTX2,3、C1&2,失忆性贝毒标准品 DA 以及神经贝毒标准品 PbTX2、PbTX3 做特异性检测,结果显示所制备试纸条与 DTX1 和 DTX2 有交叉,但与其他毒素均无交叉反应,特异性较好。

3 结 论

本研究通过用胶体金标记抗 OA 单克隆抗体,建立了 OA 及其衍生物 DTX1 和 DTX2 的胶体金免疫层析块速检测技术方法,并研制成功快速检测试纸条样条,可批量化商业生产。该产品可以用于海产贝类体内的腹泻性贝毒主要成分 OA 及其衍生物鳍藻毒素 DTX1、DTX2 的分析检测,其检出限完全能满足贝类组织中腹泻性贝毒安全阈值 160 μg/kg 的要求,为开展我国贝类毒素的监管计划、保障海产品安全提供了快速检测产品。

参考文献:

[1] BRAVO I, FERNÁNDEZ M L, RAMILO I, et al. Toxin composi-

- tion of the toxic dinoflagellate *Prorocentrum lima* isolated from different locations along the Galician coast (NW Spain) [J]. *Toxicon*, 2001, 39(10): 1537-1545.
- [2] FODEN J, PURDIE D A, MORRIS, et al. Epiphytic abundance and toxicity of *Prorocentrum lima* populations in the Fleet Lagoon, UK [J]. *Harmful Algae*, 2005, 4(6): 1063-1074.
- [3] MORTON S L, VERSHININ A, SMITH LL, et al. Seasonality of *Dinophysis* spp. and *Prorocentrum lima* in Black Sea phytoplankton and associated shellfish toxicity [J]. *Harmful Algae*, 2009, 8(5): 629-636.
- [4] 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]. *中国畜牧兽医*, 2011, 38(2): 152-156.
- [5] YASUMOTO T, MURATA M, OSHIMA Y, et al. Diarrhetic shellfish toxins [J]. *Tetrahedron*, 1985, 41(6): 1019-1025.
- [6] ZHANG N S, LI H Y, LIU J S, et al. Gene expression profiles in zebrafish (*Danio rerio*) liver after acute exposure to okadaic acid [J]. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 2014, 37(2): 791-802.
- [7] KAMAT P K, RAI S, NATH C. Okadaic acid induced neurotoxicity: an emerging tool to study Alzheimer's disease pathology [J]. *NeuroToxicology*, 2013, 37: 163-172.
- [8] VALDIGLESIAS V, FERNÁNDEZ-TAJES J, MENDOZA J, et al. The marine toxin okadaic acid induces alterations in the expression level of cancer-related genes in human neuronal cells [J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2013, 92: 303-311.
- [9] MARTÍN-LÓPEZ A, GALLARDO-RODRÍGUEZ JJ, SÁNCHEZ-MIRÓN A, et al. Cytotoxicity of yessotoxin and okadaic acid in mouse T lymphocyte cell line EL-4 [J]. *Toxicon*, 2012, 60(6): 1049-1056.
- [10] 黄爱君, 黄海燕, 庄志雄, 等. 大田软海绵酸对 HL-7702 肝细胞毒性效应的研究 [J]. *安徽农业科学*, 2010, 38(10): 5251-5253.
- [11] 邢鸣鸾, 陈加平, 王晓峰, 等. 大田软海绵酸对人胚胎羊膜细胞 FL 凋亡的影响 [J]. *水生生物学报*, 2007, 31(4): 607-609.
- [12] 吴施卫, 曾森, 卢大鹏, 等. 广东近岸海域 2005 年春季的腹泻性贝毒素特征分析 [J]. *海洋环境科学*, 2008, 27(2): 165-168, 181.
- [13] 赵晓芳, 计融. 国内外腹泻性贝类毒素管理控制措施的对比分析 [J]. *中国热带医学*, 2006, 6(2): 350-354.
- [14] 曹际娟, 卫锋, 马惠蕊, 等. 贝类毒素检测技术及研究进展 [J]. *检验检疫科学*, 2004, 14(1): 53-56.
- [15] SUZUKI T, YASUMOTO T. Liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry of the diarrhetic shellfish poisoning toxins okadaic acid, dinophysistoxin-1 and pectenotoxin-6 in bivalves [J]. *Journal of Chromatography A*, 2000, 874(2): 199-206.
- [16] 卢士英, 柳增善, 周玉, 等. 海产品贝毒素大田软海绵酸 ELISA 及 HPLC-MS/MS 检测方法的研究 [J]. *食品科学*, 2009, 30(8): 158-162.
- [17] 张洋, 贾睿, 何培民. 免疫胶体金试纸条快速检测贝类体内的腹泻性贝毒 [J]. *生物技术通报*, 2013, 29(6): 221-225.
- [18] 王中民, 李君文, 王新为, 等. 胶体金免疫层析法快速检测沙门氏菌 [J]. *微生物学免疫学进展*, 2004, 32(4): 36-38.
- [19] 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.
- [20] VDOVENKO MM, HUNG C T, SAKHAROV I Y, et al. Determination of okadaic acid in shellfish by using a novel chemiluminescent enzyme-linked immunosorbent assay method [J]. *Talanta*, 2013, 116: 343-346.
- [21] 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.
- [22] LINARES E M, KUBOTA L T, MICHAELIS J, et al. Enhancement of the detection limit for lateral flow immunoassays: evaluation and comparison of bioconjugates [J]. *Journal of Immunological Methods*, 2012, 375(1/2): 264-270.
- [23] QIAN S Z, BAU H H. A mathematical model of lateral flow bio-reactions applied to sandwich assays [J]. *Analytical Biochemistry*, 2003, 322(1): 89-98.
- [24] SHYU R H, SHYU H F, LIU H W, et al. Colloidal gold-based immunochromatographic assay for detection of ricin [J]. *Toxicon*, 2002, 40(3): 255-258.