

大型蚤 ChE 和 NAGase 间接竞争和非竞争 ELISA 方法的比较

郎倩萍, 李少南*, 郑佳豪, 张文萍 (浙江大学农药与环境独立研究所, 浙江杭州 310029)

摘要 [目的]探索间接非竞争 ELISA 和间接竞争 ELISA 法测定大型蚤 ChE 和 NAGase 的试验条件及方法灵敏度。[方法]分别采用间接竞争和间接非竞争 ELISA 方法测定大型蚤 ChE 和 NAGase。[结果]对于 ChE, 间接非竞争 ELISA 的最适抗原浓度和抗体稀释倍数分别为 1.466 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 1:10 000, 灵敏度为 7.426 7 ng/mL; 间接竞争 ELISA 的最适抗原浓度和抗体稀释倍数分别为 5.277 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 1:8 000, 灵敏度为 0.163 4 ng/mL。对于 NAGase, 间接非竞争 ELISA 的最适抗原浓度和抗体稀释倍数分别为 8.961 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 1:6 000, 灵敏度为 4.199 9 ng/mL; 间接竞争 ELISA 的最适抗原浓度和抗体稀释倍数分别为 6.450 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 1:4 000, 灵敏度为 0.250 8 ng/mL。[结论]无论是 ChE 还是 NAGase, 间接竞争 ELISA 在最适抗体浓度下的检测灵敏度均高于间接非竞争 ELISA, 加之其操作简便, 间接竞争 ELISA 在生物和环境样品 ChE 和 NAGase 含量检测中值得推广应用。

关键词 胆碱酯酶; 氨基葡萄糖苷酶; 间接竞争 ELISA; 间接非竞争 ELISA; 大型蚤
中图分类号 S917.4 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2016)24-001-05

Comparison of Competitive and Non-competitive ELISA for Determination of ChE and NAGase from *Daphnia magna*

LANG Qian-ping, LI Shao-nan*, ZHENG Jia-hao et al (Institute of Pesticide and Environmental Toxicology, Zhejiang University, Hangzhou, Zhejiang 310029)

Abstract [Objective] To explore the test condition and method sensitivity of Cholinesterase (ChE) and β -N-Acetyl-D-glucosaminidase (NAGase) from *Daphnia magna* by the methods of competitive and non-competitive ELISA. [Method] ChE and NAGase of *Daphnia magna* were detected by the methods of indirect competitive and non-competitive ELISA, respectively. [Result] As for ChE, the optimal dilutions for the antigen and the antibody were 1.466 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and 1:10 000, respectively, and the sensitivity was measured to be 7.426 7 ng/mL if the enzyme was tested by indirect non-competitive ELISA. In case that the enzyme was tested by indirect and competitive ELISA, the optimal dilutions for the antigen and the antibody were 5.277 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and 1:8 000, respectively, and the sensitivity was 0.163 4 ng/mL. As for the NAGase, the optimal dilutions for the antigen and the antibody were 8.961 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and 1:6 000, respectively, and the sensitivity was 4.199 9 ng/mL if the enzyme was tested by the indirect and non-competitive ELISA. In case that the enzyme was tested by indirect and competitive ELISA, the optimal dilutions for the antigen and the antibody were 6.450 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and 1:4 000, respectively, and the sensitivity was 0.250 8 ng/mL. [Conclusion] Indirect and competitive ELISA is more sensitive than the non-competitive ELISA under the optimal concentration antigen for both ChE and NAGase. Moreover, it is simple in operation. Thus, indirect and competitive ELISA is worth to be promoted in determining NAGase and ChE content in biological and environmental samples.

Key words ChE; NAGase; Indirect and competitive ELISA; Indirect and non-competitive ELISA; *Daphnia magna*

在水生生态毒理研究中和环境监测上, 人们常利用 ChE 和 NAGase 作为农药, 特别是有机磷和氨基甲酸酯类杀虫剂水体污染的生物指示物^[1-2]。因为水体中 NAGase 比较容易失去活性, 大型蚤体内 ChE 在受到某些刺激下容易高于正常值, 所以通过大型蚤 ChE、NAGase 酶活性变化来了解农药对蚤类的毒性或作为指示物监测农药对水体污染, 其结果存在一定的不准确性。如果建立 ChE、NAGase 的酶联免疫吸附测定(ELISA)方法来测定农药暴露下的蚤体内 ChE 含量变化和水环境中 NAGase 含量的变化, 就可以使结果更准确。

刘洪翠等^[3-4]建立了大型蚤 ChE、NAGase 的间接非竞争 ELISA。间接竞争 ELISA 方法是利用已知抗原包被固相载体, 加入待检测样品和限量抗体后, 已知抗原与样品中待检抗原竞争性结合限量抗体, 不同浓度的待检抗原对已知抗原与抗体结合形成不等的抑制率。在一定范围内, 该抑制率与待检样品浓度呈现线性关系, 因此, 可通过抑制率反映出样品中待检样品的浓度^[5]。竞争 ELISA 法常用于检测食品和药品中农药残留、毒素、各种化学品等有毒有害物质^[6]。该方法在病毒、特种蛋白等的检测上取得了很好的成

效^[7-8]。Wang 等^[9]建立间接竞争 ELISA 法用于检测羊乳中是否掺伪牛乳, 最低检测限为 0.35 ng/mL, 相对标准偏差小于 12%, 适用于检测高温高压处理的乳制品, 加之操作简单高效, 应用于大规模高通量样品筛查及羊乳样本中牛奶蛋白半定量分析。Xie 等^[10]制备黄曲霉毒素 B1 单克隆(AFB₁)抗体, 建立间接竞争 ELISA 检测方法用于受污染样品中的 AFB₁, 检测限为 1.04 $\mu\text{g}/\text{L}$, 且特异性高, 可用于实际样品中黄曲霉毒素 B1 的快速筛检。笔者比较了间接非竞争 ELISA 和间接竞争 ELISA 法测定大型蚤 ChE 和 NAGase 的试验条件及方法灵敏度, 以期间接竞争 ELISA 检测方法在生物和环境样品 ChE 和 NAGase 含量检测中的应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 抗原和抗体。大型蚤 ChE: 按照杨艳霞的方法^[11]分离纯化大型蚤体内的 ChE, 得到电泳纯 ChE。大型蚤 ChE-IgG: 由浙江杭州华安生物技术有限公司制备。以纯化的 ChE 蛋白免疫新西兰大白兔, 得到兔抗 ChE 多克隆抗血清, 纯化后得到 ChE-IgG, 浓度为 3.35 mg/mL。大型蚤 NAGase: 按照曾晨杰的方法^[4]分离纯化大型蚤体内的 NAGase, 得到电泳纯的 NAGase。大型蚤 NAGase 抗体: 以纯化的 NAGase 蛋白免疫新西兰大白兔, 得到兔抗 NAGase 多克隆抗血清, 效价为 1:8 000。

基金项目 浙江省自然科学基金项目(LY12B07008)。

作者简介 郎倩萍(1990-), 女, 浙江湖州人, 硕士研究生, 研究方向: 水生生态毒理学。*通讯作者, 副教授, 博士, 硕士生导师, 从事农药生态毒理研究。

收稿日期 2016-06-06

1.1.2 试剂。稀释液:pH 7.4, 0.01 mol/L 磷酸盐(PBS)缓冲液。包被液:pH 9.6, 0.20 mol/L 碳酸盐(CBS)缓冲液。洗涤液:pH 7.4, 0.01 mol/L PBST 缓冲溶液,即 pH 7.4, 0.01 mol/L PBS 缓冲液加体积分数为0.1%的吐温-20。封闭液:质量分数为2.0%脱脂奶粉。显色剂:EL-TMB 显色试剂盒,3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB)无色物质,作为供氢体,在辣根过氧化物酶作用下,可被氧化生成蓝色的产物,主要吸收峰在370和652 nm,加入酸后变黄,在450 nm 波长处有最大吸收峰,购自上海生工生物工程有限公司。

1.2 方法

1.2.1 间接非竞争 ELISA 试验。

1.2.1.1 抗原抗体最适工作浓度的选择。用方阵试验法对间接非竞争 ELISA 法抗体抗原最适工作浓度进行选择,其基本操作如下:用 CBS 将酶稀释成不同蛋白质浓度后包被于固相载体,每一种包被浓度设置不同的抗体稀释倍数,然后按间接非竞争 ELISA 法的基本步骤进行操作。当 OD_{450} 值约为1、抗原抗体用量最少、对照孔的 OD_{450} 值小于0.1时,抗原抗体浓度即为最适工作浓度^[12]。

1.2.1.2 间接非竞争 ELISA 法基本操作步骤。包被不同蛋白浓度的酶在96孔酶标板,每孔100 μ L,装入保湿盒内,放入37 $^{\circ}$ C培养箱中,静置2 h, PBST 洗涤3次;用质量分数为2.0%的脱脂奶粉封闭,每孔200 μ L,装入保湿盒内,放入37 $^{\circ}$ C培养箱中,静置0.5 h,用 PBST 洗涤3次;加入经质量分数为2.0%的脱脂奶粉稀释的最适浓度抗体100 μ L,放入37 $^{\circ}$ C培养箱中,静置1 h,用 PBST 洗涤3次;加入经质量分数为20%的脱脂奶粉稀释5 000倍的羊抗兔酶标 IgG-HRP 液100 μ L,放入37 $^{\circ}$ C培养箱中1 h, PBST 洗涤3次;加入显色剂,每孔100 μ L,37 $^{\circ}$ C培养箱培养15 min;每孔加入2 mol/L 硫酸50 μ L 终止反应,并用 Molecular Devices VERSA max microplate reader 测定各孔的 OD_{450} 值^[12]。

1.2.1.3 标准曲线绘制。将标准品(纯化酶液)用含1 mmol/L EDTA 的50 mmol/L Tris-HCl 缓冲液(pH 8.1)稀释成系列质量浓度,按“1.2.1.1”得到的最适抗体稀释倍数稀释抗体,用“1.2.1.2”所示的间接非竞争 ELISA 方法测定其与系列浓度标准品反应的 OD_{450} 值,用分析软件 CurveExpert 2.2 中的 Exponential Association(2)拟合标准曲线^[3]。

1.2.1.4 灵敏度检测。灵敏度是指该法能够检测出待测抗原的最低量,即最小检出量;测定10个0 μ g/mL 标准液,计算 OD_{450} 的平均值(X)和标准差(SD),根据公式 $Z = X + 2SD$

求出最低检测限,在标准曲线上查出 Z 所对应的浓度即为标准品最小检出量^[13]。

1.2.2 间接竞争 ELISA 试验。

1.2.2.1 抗原抗体最适工作浓度的选择。用方阵试验法对间接竞争 ELISA 法抗体抗原最适工作浓度进行选择,其基本操作如下:用 CBS 将酶稀释成不同蛋白质质量浓度后包被固相载体,每一种包被浓度设置不同的抗体稀释倍数,然后按间接竞争 ELISA 法的基本步骤进行操作。当 OD_{450} 值约为1,抗原抗体用量最少时的抗原抗体浓度即为最适工作浓度^[14]。

1.2.2.2 间接竞争 ELISA 法基本操作步骤。包被最适浓度的抗原在96孔酶标板,每孔100 μ L,装入保湿盒内,放入37 $^{\circ}$ C养箱中静置2 h, PBST 洗涤3次;用质量分数为2.0%的脱脂奶粉封闭,每孔200 μ L,装入保湿盒内,放入37 $^{\circ}$ C培养箱中,静置0.5 h,用 PBST 洗涤3次;加入50 μ L 抗原,再加入经质量分数为2.0%的脱脂奶粉稀释的最适浓度抗体50 μ L,放入37 $^{\circ}$ C培养箱中,静置1 h,用 PBST 洗涤3次;加入经质量分数为2.0%的脱脂奶粉稀释5 000倍的羊抗兔酶标 IgG-HRP 液100 μ L,放入37 $^{\circ}$ C培养箱中1 h, PBST 洗涤3次;加入显色剂,每孔100 μ L,37 $^{\circ}$ C培养箱培养15 min;每孔加入2 mol/L 硫酸50 μ L 终止反应,并用 Molecular Devices VERSA max microplate reader 测定各孔的 OD_{450} 值。参考 Reinhold Kittelberger 的方法并稍作改进^[14]。

1.2.2.3 标准曲线绘制。将标准品(纯化酶液)用含1 mmol/L EDTA 的50 mmol/L Tris-HCl 缓冲液(pH 8.1)稀释成系列质量浓度,按“1.2.2.1”得到的最适抗原抗体稀释倍数稀释抗体,用“1.2.2.2”所示的间接竞争 ELISA 方法测定其与系列浓度标准品反应的 OD_{450} 值,用分析软件 CurveExpert 2.2 中的线性模型拟合标准曲线^[15]。

1.2.2.4 灵敏度检测。灵敏度是指该法能够检测出待测抗原的最低量,即最小检出量;测定10个0 μ g/mL 标准液,计算 OD_{450} 的平均值(X)和标准差(SD),根据公式 $Y = [(X - 2SD)/X] \times 100\%$ 求出最低检测限,在标准曲线上查出 Y 所对应的浓度即为标准品最小检出量^[15]。

2 结果与分析

2.1 胆碱酯酶间接非竞争 ELISA

2.1.1 最适抗原抗体浓度。由表1可知,当抗体稀释倍数是10 000倍时,随着抗原浓度的增加, $OD_{450 \text{ nm}}$ 值也随之升高,当抗原浓度为1.466 μ g/mL 时, $OD_{450 \text{ nm}}$ 值约为1.0,以抗原浓度为1.466 μ g/mL 作为包被原,测定抗体稀释倍数对 $OD_{450 \text{ nm}}$

表1 ChE 间接非竞争 ELISA 法最适抗原抗体浓度测定结果($OD_{450 \text{ nm}}$ 值)

Table 1 Determination of the optimum working concentration ($OD_{450 \text{ nm}}$ values) of indirect and non-competitive ELISA for ChE

抗体稀释倍数 Antiserum dilution	抗原浓度 Antigen concentration// μ g/mL							
	0	0.107	0.213	0.733	1.466	2.190	4.398	6.597
1:20 000	0.001	0.136	0.250	0.480	0.572	0.674	0.676	0.814
1:16 000	0.003	0.074	0.276	0.385	0.445	0.547	0.682	0.904
1:14 000	0.004	0.239	0.133	0.348	0.644	0.820	0.994	1.073
1:12 000	0.005	0.107	0.148	0.506	0.706	0.833	1.054	1.157
1:10 000	0.006	0.239	0.326	0.453	0.990	1.133	1.243	1.386
1:8 000	0.007	0.237	0.312	0.517	1.108	1.257	1.335	1.537
1:6 000	0.008	0.310	0.441	0.779	1.303	1.500	1.605	1.800
1:4 000	0.010	0.219	0.481	0.920	1.492	1.691	1.840	2.003

值的影响,随着抗体稀释倍数的增加,OD_{450 nm} 值随之减小,抗体稀释倍数为 10 000 时 OD_{450 nm} 值约为 1.0,抗体的最适工作浓度为 1:10 000。即当抗体稀释倍数为 10 000、抗原浓度为 1 466 μg/mL 时达到了抗原抗体用量最少,OD_{450 nm} 值约为 1.0。

2.1.2 标准曲线。将标准品稀释成系列浓度(0~10 μg/mL),抗体 1:10 000 稀释,得到的标准曲线如图 1 所示。曲线方程为: $Y = 1.4399 \times (1 - e^{-0.8106x})$, 相关系数 $r = 0.9854$, 标准误差 $S = 0.2716$ 。

2.1.3 灵敏度。由“2.1.2”标准曲线和公式可得出 ChE 间接非竞争 ELISA 的灵敏度为 7.4267 ng/mL ($X = 0.0064$, $2SD = 0.0021$)。

2.2 胆碱酯酶间接竞争 ELISA

2.2.1 最适抗原抗体浓度。由表 2 可知,当抗体稀释倍数是 8 000 倍时,随着抗原浓度的减小,OD_{450 nm} 值也随之降低,当抗原浓度为 5.277 μg/mL 时,OD_{450 nm} 值约为 1.0。以抗原浓度为 5.277 μg/mL 作为包被原,测定抗体稀释倍数对 OD_{450 nm} 值的影响,随着抗体稀释倍数的增加,OD_{450 nm} 值随之

减小,抗体稀释倍数为 8 000 时 OD_{450 nm} 值约为 1.0,抗体的最适工作浓度为 1:8 000。即当抗体稀释倍数为 8 000、抗原浓度为 5 277 μg/mL 时达到了抗原抗体用量最少,OD_{450 nm} 值约为 1.0。

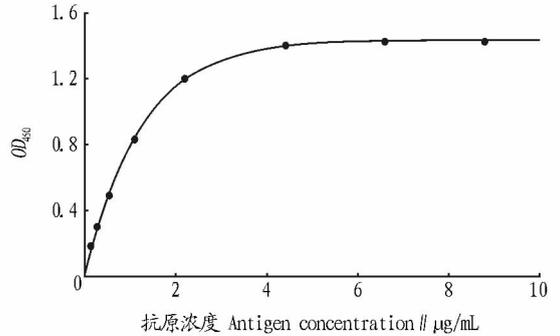


图 1 ChE 间接非竞争 ELISA 的标准曲线

Fig.1 Standard curve of indirect and non-competitive ELISA for ChE

表 2 ChE 间接竞争 ELISA 法最适抗原抗体浓度测定结果 (OD_{450 nm} 值)

Table 2 Determination of the optimum working concentration (OD_{450 nm} values) of indirect and competitive ELISA for ChE

抗体稀释倍数 Antiserum dilution	抗原浓度 Antigen concentration// μg/mL							
	13.190	8.790	6.590	5.270	4.390	2.190	1.090	0.500
1:2 000	2.441	3.191	2.799	2.339	2.561	1.825	1.215	0.550
1:4 000	1.738	1.912	1.973	1.564	1.714	1.275	0.757	0.316
1:6 000	1.599	1.573	1.503	1.075	1.363	0.806	0.472	0.260
1:8 000	0.889	1.290	1.398	0.998	0.860	0.763	0.457	0.255
1:10 000	0.690	1.166	1.121	0.675	0.620	0.489	0.345	0.208
1:12 000	0.656	0.921	0.952	0.571	0.723	0.465	0.321	0.229
1:14 000	0.831	0.637	0.833	0.523	0.680	0.417	0.308	0.224
1:16 000	0.708	0.509	0.677	0.474	0.560	0.437	0.329	0.194

2.2.2 标准曲线。将标准品稀释成系列浓度(0~2.5 μg/mL),抗体 1:8 000 稀释,得到的标准曲线如图 2 所示。标准曲线方程为: $Y = 94.2619 - 28.7178X$, 相关系数 $r = 0.9959$,

标准误差 $S = 2.2600$ 。

2.2.3 灵敏度。由“2.2.2”标准曲线和公式可得出 ChE 间接竞争 ELISA 的灵敏度为 0.1634 ng/mL ($X = 1.0081$, $2SD = 0.0607$)。

2.3 NAGase 间接非竞争 ELISA

2.3.1 最适抗原抗体浓度。由表 3 可知,当抗体稀释倍数是 6 000 倍时,随着抗原浓度的减小,OD_{450 nm} 值也随之降低,当抗原浓度为 8.961 μg/mL 时,OD_{450 nm} 值约为 1.0。以抗原浓度为 8.961 μg/mL 作为包被原,测定抗体稀释倍数对 OD_{450 nm} 值的影响,随着抗体稀释倍数的增加,OD_{450 nm} 值随之减小,抗体稀释倍数为 6 000 时 OD_{450 nm} 值约为 1.0,抗体的最适工作浓度为 1:6 000。即当抗体稀释倍数为 6 000、抗原浓度为 8 961 μg/mL 时达到了抗原抗体用量最少,OD_{450 nm} 值约为 1.0。

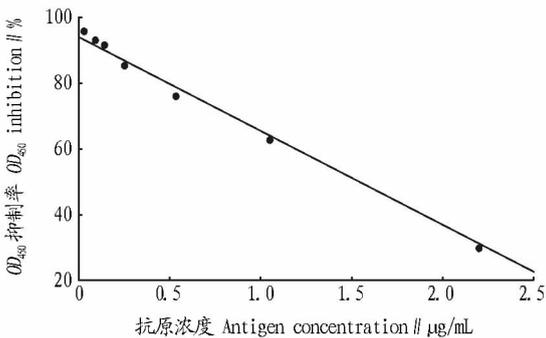


图 2 ChE 间接竞争 ELISA 的标准曲线

Fig.2 Standard curve of indirect and competitive ELISA for ChE

表 3 NAGase 间接非竞争 ELISA 法最适抗原抗体浓度测定结果 (OD_{450 nm} 值)

Table 3 Determination of the optimum working concentration (OD_{450 nm} values) of indirect and non-competitive ELISA for NAGase

抗体稀释倍数 Antiserum dilution	抗原浓度 Antigen concentration// μg/mL								
	0	0.375	1.500	3.000	6.000	8.961	12.700	20.000	25.200
1:14 000	0.001	0.099	0.130	0.146	0.186	0.397	0.437	0.480	0.691
1:12 000	0.002	0.108	0.158	0.191	0.232	0.482	0.493	0.689	0.796
1:10 000	0.005	0.125	0.180	0.243	0.358	0.594	0.695	0.792	0.896

续表 3

抗体稀释倍数 Antiserum dilution	抗原浓度 Antigen concentration// $\mu\text{g}/\text{mL}$								
	0	0.375	1.500	3.000	6.000	8.961	12.700	20.000	25.200
1:8 000	0.007	0.158	0.248	0.368	0.490	0.785	0.784	0.888	1.086
1:6 000	0.009	0.192	0.342	0.484	0.791	0.998	1.088	1.196	1.245
1:4 000	0.009	0.235	0.496	0.699	0.987	1.197	1.245	1.288	1.393
1:2 000	0.010	0.351	0.599	0.887	1.196	1.542	1.591	1.648	1.789
1:1 000	0.011	0.594	0.893	1.196	1.591	2.094	2.094	1.960	2.036

2.3.2 标准曲线。将标准品稀释成系列浓度(0~36 $\mu\text{g}/\text{mL}$),抗体 1:6 000 稀释,得到的标准曲线如图 3 所示。曲线

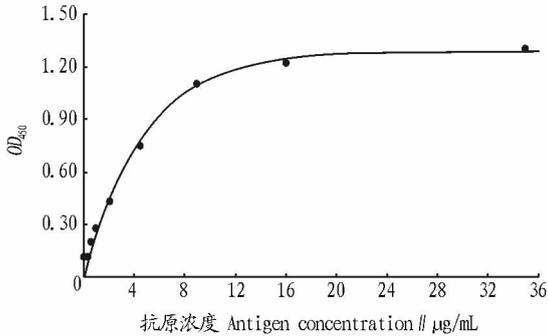


图 3 NAGase 间接非竞争 ELISA 的标准曲线(大型蚤)

Fig.3 Standard curve of indirect and non-competitive ELISA for NAGase

表 4 NAGase 间接竞争 ELISA 法最适抗原抗体浓度测定结果($OD_{450\text{nm}}$ 值)Table 4 Determination of the optimum working concentration ($OD_{450\text{nm}}$ values) of indirect and competitive ELISA for NAGase

抗体稀释倍数 Antiserum dilution	抗原浓度 Antigen concentration// $\mu\text{g}/\text{mL}$							
	29.830	17.890	11.730	8.940	6.450	4.470	2.230	1.119
1:400	2.122	2.369	2.379	2.486	2.371	2.489	2.034	1.636
1:800	2.035	1.946	2.036	2.174	2.137	2.263	1.738	1.431
1:1 000	1.916	2.037	2.034	1.979	2.024	2.051	1.793	1.358
1:2 000	1.409	1.327	1.274	1.669	1.429	1.490	1.388	0.896
1:4 000	0.882	0.938	0.976	1.040	1.009	1.131	0.880	0.550
1:6 000	0.514	0.514	0.600	0.731	0.642	0.686	0.586	0.365
1:8 000	0.383	0.425	0.511	0.475	0.499	0.536	0.480	0.306
1:10 000	0.305	0.338	0.332	0.374	0.337	0.362	0.289	0.267

2.4.2 标准曲线。将标准品稀释成系列浓度(0~8 $\mu\text{g}/\text{mL}$),抗体 1:4 000 稀释,得到的标准曲线如图 4 所示。标准曲线方程为: $Y = 90.7526 - 12.0664X$,相关系数 $r = 0.9918$,标准误差 $S = 4.871$ 。

2.4.3 灵敏度。由“2.4.2”标准曲线和公式可得出 NAGase 间接竞争 ELISA 的灵敏度为 0.2508 ng/mL ($X = 1.0113$, $2SD = 0.1068$)。

3 讨论

该研究建立了大型蚤 ChE 和 NAGase 的间接竞争 ELISA 方法,其灵敏度分别为 0.1634 和 0.2508 ng/mL,刘洪翠等^[3]曾报道大型蚤 ChE 间接非竞争 ELISA 方法的灵敏度为 24.0000 ng/mL。曾晨杰^[4]曾报道大型蚤 NAGase 间接非竞争 ELISA 方法的灵敏度为 2.1200 ng/mL。该研究比较了 ChE 和 NAGase 的竞争法和非竞争法,结果表明在灵敏度方

方程为: $Y = 1.2864 \times (1 - e^{-2.1191x})$,相关系数 $r = 0.9957$,标准误差 $S = 0.0484$ 。

2.3.3 灵敏度。由“2.3.2”标准曲线和公式可得出 NAGase 间接非竞争 ELISA 的灵敏度为 4.1999 ng/mL ($X = 0.009$, $2SD = 0.0024$)。

2.4 NAGase 间接竞争 ELISA

2.4.1 最适抗原抗体浓度。由表 4 可知,当抗体稀释倍数是 4 000 倍时,随着抗原浓度的减小, $OD_{450\text{nm}}$ 值也随之降低,当抗原浓度为 6.450 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时, $OD_{450\text{nm}}$ 值约为 1.0。以抗原浓度为 6.450 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 作为包被原,测定抗体稀释倍数对 $OD_{450\text{nm}}$ 值的影响,随着抗体稀释倍数的增加, $OD_{450\text{nm}}$ 值随之减小,抗体稀释倍数为 4 000 时 $OD_{450\text{nm}}$ 值约为 1.0,抗体的最适工作浓度为 1:4 000。即当抗体稀释倍数为 4 000、抗原浓度为 6.450 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时达到了抗原抗体用量最少, $OD_{450\text{nm}}$ 值约为 1.0。

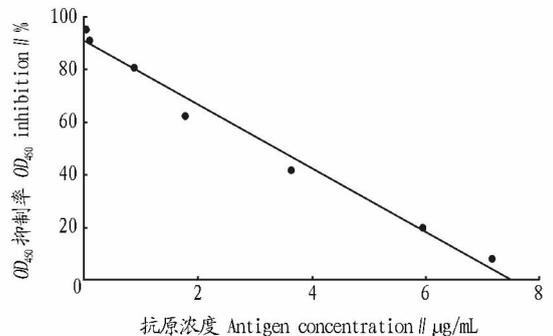


图 4 NAGase 间接竞争 ELISA 的标准曲线

Fig.4 Standard curve of indirect and competitive ELISA for NAGase

面间接竞争法占有相当的优势。

间接竞争 ELISA 方法是先在固相载体上加入已知抗原,

然后加入限量抗体,同时加入待检样品,样品中待检抗原与固相载体上包被的已知抗原竞争性结合抗体,洗涤后,固相载体上只剩下固相已知抗原与抗体结合物,经显色检测 OD 值,计算待检抗原的竞争抑制率,通过抑制率反映样品中待检抗原的浓度水平。间接竞争 ELISA 方法的理论基础是反应体系中加入限量抗体,只有在限量抗体基础上,2 种抗原才能形成竞争关系^[15]。

由于 ELISA 方法灵敏度高,很多因素会对结果产生影响。对竞争反应体系而言,加样顺序是影响 ELISA 结果的重要因素。目前,常用竞争反应体系的加样方式有 2 种:一种是加待检样品(抗原)后加特异性抗体(顺序加样方式),另一种是先将待检样品(抗原)与特异性抗体混合然后加入反应板孔(混合加样方式)。江湖^[16]在建立黄曲霉毒素 B1 (AFB1) 间接竞争 ELISA 检测方法时比较了 2 种加样方式的灵敏度,当抑制率为 50% 时,顺序加样方式和混合加样方式检测 AFB1 的最低浓度分别为 2.5 和 1.5 ng/mL,即混合加样方式的灵敏度更高。梁明燕^[15]检测金黄色葡萄球菌肠毒素的间接竞争 ELISA 的结果显示顺序加样和混合加样方式检测到的抗原最低浓度分别为 5.068 和 8.905 ng/mL,即顺序加样方式的灵敏度较高。这与江湖^[16]的报道并不一致。这些结果表明不同的检测样品对试验条件要求不同。同一样品在不同的试验条件下结果也会不同。在该试验中,并未很好地摸索竞争 ELISA 的最适条件,也未比较 2 种加样顺序是否会影响到灵敏度,或者哪种加样顺序灵敏度高,而是主要比较了间接竞争 ELISA 和间接非竞争 ELISA,2 种方法基于相同的包被液、洗涤液和温育时间,后续试验中可以进一步摸索间接竞争 ELISA 的最适试验条件,比较不同条件下 ELISA 的灵敏度。

4 结论

ChE 间接非竞争 ELISA 的最适抗原浓度和抗体稀释倍数分别为 1.466 $\mu\text{g/mL}$ 和 1:10 000,灵敏度为 7.426 7 ng/mL;ChE 间接竞争 ELISA 的最适抗原浓度和抗体稀释倍数分别为 5.277 $\mu\text{g/mL}$ 和 1:8 000,灵敏度为 0.163 4 ng/mL;NAGase 间接非竞争 ELISA 的最适抗原浓度和抗体稀释倍数分别为 8.961 $\mu\text{g/mL}$ 和 1:6 000,灵敏度为 4.199 9 ng/mL;

NAGase 间接竞争 ELISA 的最适抗原浓度和抗体稀释倍数分别为 6.45 ng/mL 和 1:4 000,灵敏度为 0.250 8 ng/mL;对于大型蚤 ChE 和 NAGase,间接竞争 ELISA 法的灵敏度明显高于间接非竞争 ELISA 法。

参考文献

- [1] HANSON M L, LAGADIC L. Chitinase activity as an indicator of aquatic ecosystem health [J]. Aquatic ecosystem health & management, 2005, 8 (4):441-450.
- [2] DIAMANTINO T C, ALMEIDA E, SOARES M V M, et al. Characterization of cholinesterases from *Daphnia magna* straus and their inhibition by zinc [J]. Environmental contamination and toxicology, 2003, 71(2):219-225.
- [3] 刘洪翠, 杨艳霞, 李少南. 大型蚤胆碱酯酶间接非竞争酶联免疫吸附定量分析法的建立 [J]. 浙江大学学报(农业与生命科学版), 2012, 38(3):347-354.
- [4] 曾晨杰. 大型蚤 NAGase 多克隆抗体检测水生节肢动物丰度的适用性研究 [D]. 杭州:浙江大学, 2012.
- [5] 王硕, 张鸿雁, 王俊平. 酶联免疫吸附分析方法:基本原理及其在食品化学污染物检测中的应用 [M]. 北京:科学出版社, 2011:25-41.
- [6] LU S Y, ZHOU Y, LI Y S, et al. Production of monoclonal antibody and application in indirect competitive ELISA for detecting okadaic acid and dinophytin-1 in seafood [J]. Environmental science and pollution research, 2012, 19(7):2619-2626.
- [7] 李媛媛, 刘宾, 曹凤波, 等. 测定三种乳蛋白抗原性间接竞争 ELISA 法的建立 [J]. 食品工业, 2015, 36(3):290-294.
- [8] 布冠好, 朱婷伟, 陈复生, 等. 大豆球蛋白间接竞争 ELISA 检测方法的建立 [J]. 河南工业大学学报(自然科学版), 2014(4):1-5, 11.
- [9] WANG S F, ZHANG S W, LAI X T, et al. Detection of adulteration of bovine milk into goat milk by a high specific indirect competitive enzyme linked immunosorbent assay [J]. China dairy industry, 2015, 43(10):41-43, 46.
- [10] XIE H, ZHANG X, WANG X, et al. Preparation of anti-aflatoxin B1 monoclonal antibodies and its use in an indirect competitive ELISA for aflatoxin B1 [J]. Microbiology China, 2015, 42(10):2033-2040.
- [11] 杨艳霞. 大型蚤胆碱酯酶免疫测定:有机磷污染的生物指示 [D]. 杭州:浙江大学, 2010.
- [12] 杨利国, 胡少昶, 魏平华. 酶免疫测定技术 [M]. 南京:南京大学出版社, 1998:385-481.
- [13] KHATTAB A D, ALI L S. Immunoassays for avian butyrylcholinesterase: Implications for ecotoxicological testing and clinical biomonitoring [J]. Environmental toxicology and pharmacology, 2007, 24(3):275-285.
- [14] KITTELBERGER R, MCFADDEN A M J, HANNAH M J, et al. Comparative evaluation of four competitive/blocking ELISAs for the detection of influenza A antibodies in horses [J]. Veterinary microbiology, 2011, 148:377-383.
- [15] 梁明燕. 金葡菌肠毒素表位的串联表达与间接竞争 ELISA 方法的建立 [D]. 合肥:安徽农业大学, 2013.
- [16] 江湖. 黄曲霉毒素 B1 间接竞争 ELISA 检测方法的建立与单克隆抗体免疫亲和柱的初步研究 [D]. 南昌:南昌大学, 2005.

本刊提示 参考文献只列主要的、公开发表的文献,序号按文中出现先后编排。著录格式(含标点)如下:(1)期刊——作者(不超过3人者全部写出,超过者只写前3位,后加“等”)。文章题名[J]。期刊名,年份,卷(期):起止页码。(2)图书——编著者.书名[M]。版次(第一版不写)。出版地:出版者,出版年:起止页码。(3)论文集——析出文献作者.题名[C]//。主编.论文集名.出版地:出版者,出版年:起止页码。