

文章编号: 1003-8701(2008)05-0061-02

封闭液对 ELISA 检测蓖麻毒素的影响

牛春华¹, 刘文森², 高宏伟^{2*}, 邢丽杰^{2,3*}

(1. 吉林省农业科学院, 长春 130033; 2. 军事医学科学院十一所, 长春 130062;
3. 农业部食品质量监督检验测试中心, 新疆 石河子 832000)

摘要: 通过对 30 种封闭液与 3 种封闭条件对 ELISA 检测蓖麻毒素方法的封闭条件进行了优化, 由 P/N 值得到 1%酪蛋白 +5%脱脂乳与 5%脱脂乳 +2%PEG 2 万两种封闭剂在包被后孵育一次的封闭效果相似, 也是所有组合中封闭效果最好的, 从而大大提高了 ELISA 检测蓖麻毒素的敏感性和特异性。

关键词: 封闭液; ELISA; 蓖麻毒素

中图分类号: R446.61

文献标识码: A

Effect of Block Agent on Detection of Ricin with ELISA

NIU Chun-hua¹, LIU Wen-sen², GAO Hong-wei², XING Li-jie^{2,3}

(1. Academy of Agricultural Sciences of Jilin Province, Changchun 130033; 2. Academy of Military Medical Sciences, Changchun 130062; 3. Food Quality Monitor and Test Center, Ministry of Agriculture, Shihezi 83200, China)

Abstract: TO optimize the sensitivity and specificity of quantitative enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for ricin, 30 kinds of block agent were selected. The P/N showed that 1% caseinum+5% skimmed milk, 5% skimmed milk+2% PEG20000 were both effective. Simultaneously, 3 kinds of blocking condition were compared. The P/N showed that adding block agent to coated 96 plate with anti-ricin, then incubated for 1 hour in 37 °C, achieved the best blocking effect.

Key words: Block agent; ELISA; Ricin

酶联免疫吸附法(enzyme linked immunosorbent assay ELISA) 是 1971 年由 Engvall 等建立的一种生物活性物质微量测定技术, 以其灵敏度高(可达 ng 甚至 pg 水平)、特异性好等优点, 在生命科学领域得到广泛应用^[1]。而影响 ELISA 试验稳定性的因素多种多样, 封闭(blocking)就是其中最重要的影响因素之一。本试验同时对多种封闭剂及其组合进行了 ELISA 检测蓖麻毒素的试验, 并摸索其反应规律, 优选出了最佳封闭液, 提高了 ELISA 检测蓖麻毒素方法的敏感性与特异性。

1 材料与方法

收稿日期: 2008-04-14

作者简介: 牛春华(1964-), 研究实习员, 从事食品加工与安全检测实验工作。

通讯作者: 高宏伟, 教授, E-mail: gaochengwei@hotmail.com

邢丽杰, 讲师, xialongnv2088@163.com

1.1 阴阳性样品的准备

将蓖麻毒素溶解在 PBST 缓冲液中, 稀释至浓度为 1 μg/mL 作为阳性对照品; 阴性对照样品是 PBST 缓冲液。

1.2 双抗体夹心 ELISA 方法的基本程序

将抗体溶解在 PBST 缓冲液中, 包被酶标板, 每孔 100 μL, 37 °C 孵育 2 h, 倒空酶标板用洗涤液洗涤 3 次, 沥干, 每孔加入 100 μL 的 1%BSA 用于封闭蛋白结合位点, 酶标板在 37 °C 孵育 1 h, 洗涤 3 次, 沥干, 将 100 μL 阳性、阴性对照品及待检样品分别加到酶标板孔中, 37 °C 育温 1 h, 洗涤 3 次, 沥干, 将稀释好的单克隆抗体每孔加入 100 μL, 37 °C 孵育 1h, 洗涤 3 次, 沥干, 然后每孔加入 100 μL 底物溶液, 37 °C 显色 30 min, 每孔加入 100 μL 终止液终止反应, 酶标仪上读取 OD₄₅₀ 值并判定结果。

1.3 封闭剂的配制

分别配制 1%BSA、2%BSA、5%BSA、1%酪蛋白、

5%脱脂乳、2%蔗糖、2%葡聚糖 4 万、2%PEG2 万、1%明胶，并用排列组合的方式将 5%BSA、1%酪蛋白、5%脱脂乳、2%蔗糖、2%葡聚糖 4 万、2%PEG2 万、1%明胶其中的任意两种溶液等比例混合，分别为 5%BSA+1%酪蛋白、5%BSA+5%脱脂乳、5%BSA+2%蔗糖、1%酪蛋白 +5%脱脂乳、1%酪蛋白 +2%蔗糖、1%酪蛋白 +2%葡聚糖 4 万、5%脱脂乳 +2%葡聚糖 4 万、5%脱脂乳 +2%PEG2 万、5%脱脂乳 +1%明胶、2%葡聚糖 4 万 +2%PEG2 万、2%葡聚糖 4 万 +1%明胶、2%PEG2 万 +1%明胶、5%BSA+2%葡聚糖 4 万、5%BSA+2%PEG2 万、5%BSA+1%明胶、5%脱脂乳 +2%蔗糖、1%酪蛋白 +1%明胶、1%酪蛋白 +2%PEG2 万、2%蔗糖 +2%葡聚糖 4 万、2%蔗糖 +1%明胶、2%蔗糖 +2%PEG2 万。

1.4 包被后应用封闭剂

将多抗适当稀释后包被酶标板，洗涤后应用配制的封闭液封闭，然后按 1.2 步骤进行 ELISA 试验检测阴、阳性样品。

1.5 孵育样品后应用封闭剂

将多抗适当稀释后包被酶标板后每孔加入阳性、阴性对照品及待检样品分别加到酶标板孔中，37 育温 1 h，洗涤后应用配制的封闭液封闭，然后按 1.2 步骤进行 ELISA 试验。

1.6 包被后与孵育样品后均应用封闭剂

将多抗适当稀释后包被酶标板，洗涤后应用配制的封闭液封闭，洗涤后加入阴、阳性样品孵育 37 1 h，洗涤后再次应用配制的封闭液封闭，然后按 1.2 步骤进行 ELISA 试验检测阴、阳性样品。

2 结果

2.1 包被后应用封闭剂

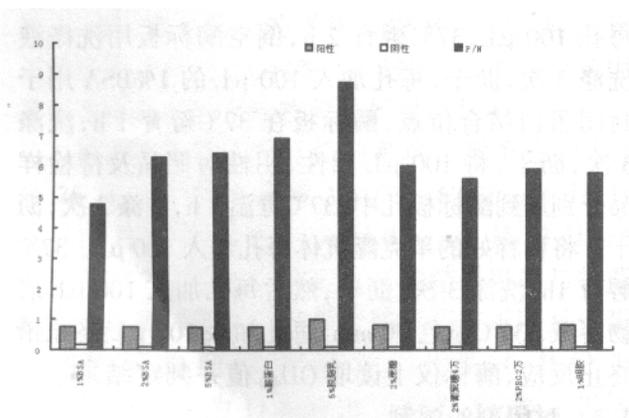


图 1 使用单一封闭剂在包被后应用一次进行 ELISA 检测

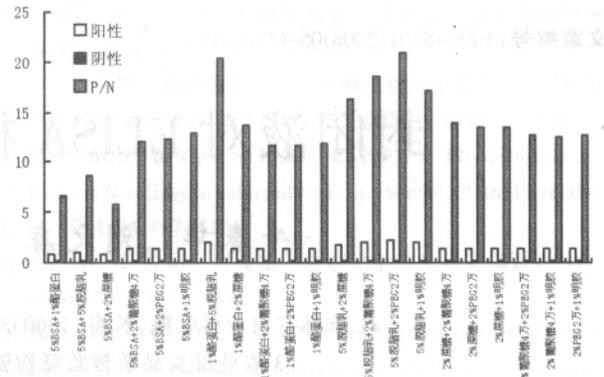


图 2 使用复合封闭剂在包被后应用一次进行 ELISA 检测

将多抗适当稀释后包被酶标板，洗涤后应用配制的封闭液封闭，然后按 1.2 步骤进行 ELISA 试验检测阴、阳性样品。由图 2 的 P/N 值可知，1%酪蛋白 +5%脱脂乳与 5%脱脂乳 +2%PEG2 万两种封闭剂的封闭效果相似，也是所有组合中封闭效果最好的。

2.2 孵育样品后应用封闭剂

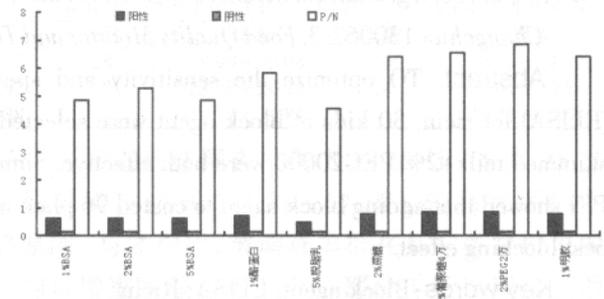


图 3 使用单一封闭剂在抗原孵育后应用一次进行 ELISA 检测

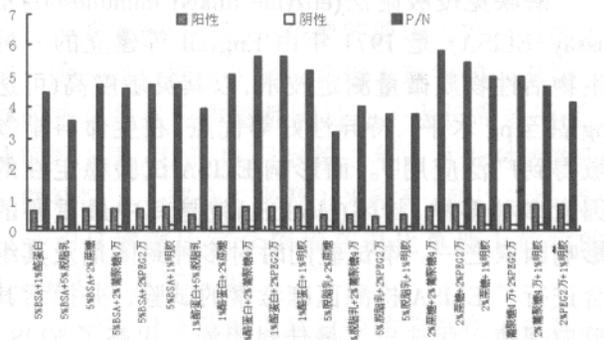


图 4 使用复合封闭剂在抗原孵育后应用一次进行 ELISA 检测

将多抗适当稀释后包被酶标板后每孔加入阳性、阴性对照品及待检样品分别加到酶标板孔中 37 育温 1 h，洗涤后应用配制的封闭液封闭，然后按 1.2 步骤进行 ELISA 试验。由图 4 的 P/N 值可知，2%蔗糖 +2%PEG2 万的封闭效果最好。

(下转第 65 页)

秸秆利用研究的主要方向包括以下方面:

秸秆燃料:如植物型煤、秸秆炭化的方法及设备(或装置)。

气化燃料:以秸秆为原料生产气体燃料的方法、工艺和设备。

液化燃料:以秸秆为原料生产液体燃料的方法、工艺和设备,如酒精、汽油等。其中,以玉米秸秆、高粱秸秆为原料生产乙醇的方法与产品专

利技术是 2005 年的非职务发明。

制氢及氢能发电:以秸秆为原料制氢及氢能发电的方法、工艺和设备。

饲料:方法、工艺和设备。

参考文献:

(中文参考文献 121 篇略)



(上接第 62 页)

2.3 包被后与孵育样品后均应用封闭剂

将多抗适当稀释后包被酶标板,洗涤后应用配制的封闭液封闭,洗涤后加入阴、阳性样品孵育 37 1 h,洗涤后再次应用配制的封闭液封闭,然后按 1.2 步骤进行 ELISA 试验检测阴、阳性样品。由图 6 中的 P/N 值可知,2%蔗糖 +2%葡聚糖 4 万与 5%脱脂乳 +2%PEG2 万两种封闭剂的封闭效果相似,也是所有组合中封闭效果最好的。

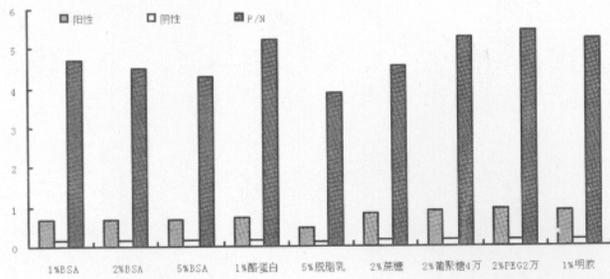


图5 使用单一封闭剂在包被后和抗原孵育后各应用一次进行 ELISA 检测

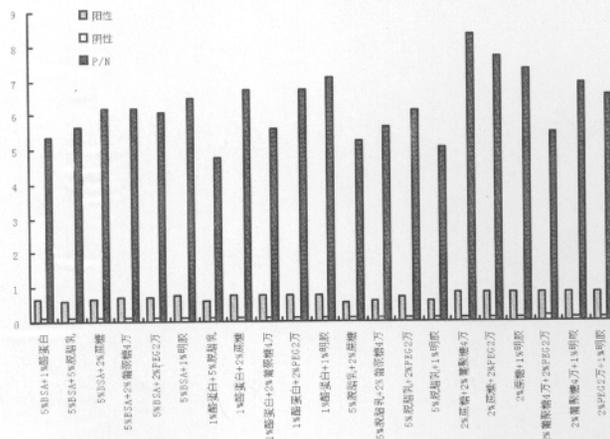


图6 使用复合封闭剂在包被后和抗原孵育后各应用一次进行 ELISA 检测

3 讨论

影响 ELISA 试验稳定性的因素多种多样,封闭(blocking)就是其中最重要的影响因素之一。本试验同时对多种封闭剂及其组合进行了 ELISA 检测蓖麻毒素的试验。综合所有的结果可以看出,当使用某一种单一的封闭剂时,不管是在包被后使用一次抗原孵育后使用一次,还是在包被后和抗原孵育后各使用一次所得到的 P/N 值均分布在 4~6 左右,封闭效果相差不大;在抗原孵育后使用复合封闭剂时,P/N 值主要分布在 4~5 左右,封闭效果也不是很理想;在包被后和抗原孵育后各使用一次复合封闭剂时所得到的 P/N 值主要分布在 6~9 左右,效果比较理想;而在包被后使用复合封闭剂时,P/N 值主要分布在 10~20 之间,封闭效果非常理想。特别是 1%酪蛋白 +5%脱脂乳与 5%脱脂乳 +2%PEG2 万在包被后封闭的 ELISA 的 P/N 值达到 20.177 与 19.98,这大大提高了 ELISA 检测蓖麻毒素的敏感性和特异性。

参考文献:

- [1] 张也,刘以祥.酶联免疫技术与食品安全快速检测[J].食品科学,2003,24(8):200-203.
- [2] 李文敏.酶联免疫吸附反应的技术进展及应用[J].湖北职业技术学院学报,2003,6(4):65-69.
- [3] 胡小钟,余建新.酶联免疫吸附分析法检测克仑特罗时假阳性问题初探[J].中国畜牧杂志,2000,36(5):24-25.
- [4] 张喜悦,徐天刚,王志亮等.酶联免疫吸附试验(ELISA)三种底物的比较试验[J].中国动物检疫,2003,20(11):23-24.
- [5] Chris Winder. Toxicity of Ricin Journal of Toxicology [J]. 2004, 23(1).
- [6] Changhong Y. Lindsey, Judith G. Pace-Templeton Validation of ELISA for the determination of anti-ricin immunoglobulin G concentration in mouse sera[J]. Biologicals 2006: 34.