

免疫学方法在有害赤潮藻细胞检测中的应用

The use of immunological procedures for the detection of harmful algae

亓海刚¹, 米铁柱², 甄毓², 辛泽毓³, 李荣秀⁴, 于志刚²

(1. 中国海洋大学 生命科学与技术学部, 山东 青岛 266003; 2. 中国海洋大学 化学化工学院, 山东 青岛 266003; 3. 中国科学院 上海生命科学研究院 上海生物工程研究中心, 上海 200233; 4. 上海交通大学 生命科学技术学院, 上海 200030)

中图分类号: Q93-7

文献标识码: A

文章编号: 1000-3096(2007)06-0092-05

赤潮可以严重危害海洋渔业、海水养殖业和旅游业,甚至危害到人类的生命健康^[1,2],它的频繁发生已经引起各国政府的高度重视。虽然可以通过每日多次实时检测海水的水文、化学要素等来推测发生赤潮的可能性^[3],但是这些方法都不能直接反映有害赤潮藻的种类和数量,从而不能为赤潮监测和预报提供最直接的参考数据。实际上,对海水中的藻类进行分类、鉴定和数量分析是监测和预报赤潮发生的最直接有效的方法,这包括对水样采集、藻种类鉴定、毒性鉴定和赤潮藻定量计数等。传统的形态分类技术可以解决赤潮监测中的多数问题,但需要有经过专门训练的分类专家,而且还需要严格控制的操作过程、精细的仪器设备以及获得合适观察分析的机会,这就使得赤潮藻的鉴定与计数成为一件费时费力的工作,难以满足有害藻检测的要求^[4]。

当前,一些新的检测技术和方法已经逐渐综合应用到海洋生态环境的研究之中,这主要包括在传统形态学基础上建立的自动影像分析技术,基于藻类色素分析的化学分类方法、现场荧光检测法、水色遥感反演、核酸分子探针检测技术^[5]、藻毒素色谱分析技术^[6]和免疫学方法等。在微藻的研究中,免疫学检测主要是以特异性的抗体为基础构建的一系列的藻细胞或藻毒素的检测方法。其主要过程包括:制备多克隆抗体或者进一步细胞融合制备单克隆抗体、抗体特异性检测及抗体标记、样品检测和结果分析。这其中涉及到的检测方法和技术主要有荧光免疫测定、免疫磁性微粒、免疫传感技术、酶免疫测定、流式细胞术、单克隆抗体制备及封闭抗体技术等,这些方法和技术在生命科学其他领域已经广泛应用,较为成熟可靠,并且开始用于有害藻的研究之中。

1 进展和问题

1.1 免疫荧光检测

早在1977年,Fliermans等^[7]就把免疫荧光用于

一种真核绿藻的研究,现在该技术在海洋浮游微藻研究领域得到了比较广泛的应用。在有害藻的检测中,通常采用间接免疫荧光检测技术,荧光标记二抗的引入可以实现对第一抗体的定量,增加检测的灵敏性,还可以适用于多种第一抗体的标记显示,而第二抗体已经商品化生产,可使实验过程得以简化。

1993年Anderson等^[8]制备了*Aureococcus anophagefferens*的多克隆抗体,并利用免疫荧光技术研究这种金藻在美国东北海岸的分布,显示了多克隆抗体的良好应用价值。多克隆抗体的特异性可以达到种的水平,满足一般的检测要求,以特异性多抗为基础的间接免疫荧光测定一般用于有害藻的定性研究。1999年Chang等^[9]发现一株*Alexandrium minutum*的多抗与新西兰不同海域的4株该种海藻都有反应,与50多种其他藻则没有荧光信号。2004年Cho等^[10]制备了*Cochlodinium polykrikoides*的特异性多克隆抗体,荧光探针检测灵敏度达到每毫升海水5个细胞。

虽然多克隆抗体的制备方法单一,但仍旧可以通过对免疫原纯化、改变免疫程序、选择合适试验动物等方法来改善多抗的特异性与抗原的结合能力。2003年Lin等^[11]在建立检测*Pfiesteria piscicida*的免疫荧光技术时发现用不溶性细胞碎片作免疫原比

收稿日期: 2004-08-11; 修回日期: 2004-10-20

基金项目: 国家高技术研究发展计划(863计划)资助项目(2001AA635090); 山东省优秀中青年科学家科研奖励基金项目(01BS08); 高等学校博士学科点专项科研基金项目(20030423005)

作者简介: 亓海刚(1980),男,山东淄博人,硕士研究生,主要从事海洋浮游植物的分子生物学研究, E-mail: q909501@126.com; 于志刚,通讯作者, E-mail: zhigangyu@ouc.edu.cn



全细胞更容易产生高效价的抗体。这可能是因为相对较小的细胞碎片能够暴露更多的抗原表位,更容易刺激实验动物的免疫系统进行初次免疫应答。

荧光抗体技术可以降低细胞鉴别中的难度,但对于繁重的计数过程并没有改进;许多藻类自身可以发出荧光,使检测背景加深,如果标记抗体的荧光强度较弱,容易形成假阳性的结果^[12];此外,当前常用的荧光色素有些能够和细胞表面蛋白直接作用,也可导致错误的鉴定。制备高特异性高亲和力的抗体、增加荧光信号强度和对荧光基团进行必要改进是解决问题的重要途径。

1.2 免疫磁性微粒

磁性微粒无需进行离心过程即可实现靶分子或细胞的分离纯化,将其应用于免疫检测,可使操作过程大为简化,国外已有少数学者尝试把该方法用于有害藻的分选过程。

Costas 等^[13]在 1995 年借助高亲和力的多克隆抗体利用该技术对天然海水样品中的 *Alexandrium minutum* 藻细胞进行分离,发现 61%~92% 的藻细胞可被分选出来,而误选率只有 1%~9%,表明这项技术可以应用于特定有害藻细胞的快速分离。Aguilera 等^[14]的实验结果也表明该方法对野外和实验室样品均有较好的分离识别效果。Lopez Rodas 等^[15]对 *Prorocentrum lima* 分离试验结果说明,与传统的直接分离过程相比,该技术耗费时间较少,不易受样品中的泥沙、碎屑等物质的干扰,分选效率也比较高。

磁性微粒技术本身已经相对较为成熟,限制其应用的主要障碍来源于高亲和力高特异性有害藻抗体的获得,以及抗体对其他杂质的非特异性吸附。

1.3 免疫传感技术

免疫传感器是生物传感器的一种,在藻毒素和藻细胞的检测方面都有报道^[16,17]。在有害藻细胞的检测中,有文献报道的主要是压电式免疫传感器,其检测信号主要来源于抗原与抗体结合之后晶片质量所产生的变化^[18]。1996 年 Nakanishi 等^[19]把一种对 *Chatonell marina* 的表面糖蛋白具有高度专一性识别的单克隆抗体在镀金的压电晶片上包被制作了一种压电式免疫传感器来检测 *C. marina*,可以检测出每毫升 100~10 000 个藻细胞;同年, Nakanishi 等^[20]还制作了一种检测 *Alexandrium affine* 的免疫传感器,但采用的是一种等离子多聚己二胺薄膜固定抗体,发现用这种方法制作的免疫传感器灵敏性有所提高。利用免疫传感技术可以直接测定海水中的浮游藻,但特异性抗体的获得是关键,同时晶片容易被海水侵蚀及其中的杂质沉积而导致检测不准确也是

一个限制其应用的技术障碍。

1.4 酶免疫测定

酶联免疫检测方法目前在医学和生命科学其他领域中已经得到了极其广泛的应用,亦有针对多种藻毒素的 ELISA 检测方法得以建立^[21,22]。最近几年来,以间接型 ELISA 为代表的酶免疫测定技术在有害藻细胞的鉴定和计数方面表现出很大的应用潜力。

2003 年辛泽毓等^[23]制备了 *Chaetoceros curvisetus* 和 *C. debilis* 两种角毛藻的多克隆抗体,并建立了一种竞争型间接 ELISA 方法计数这两种藻细胞,检测极限可以达到几百个细胞。由于抗体只表现出属间的特异性,所以其应用受到一定的限制。但初步显示了利用该方法进行藻细胞定量检测是可行的。

Caron 等^[24]制备了 *Aureococcus anophagefferens* 的特异性单克隆抗体,建立了一种快速检测这种藻的 ELISA 方法。由于借助于预先封闭好的 96 孔过滤板定量收集天然海水样品中的藻类,使得检测时间缩短为 3~4 h,检测范围在 1 000~600 000 个细胞,与直接计数基本吻合。每一块 96 孔板可以检测 20 多份样品,大大降低了鉴定和计数过程的工作量,对于赤潮的预报意义重大。

2004 年, Xin 等^[25]制备了一种裸甲藻 *Gymnodinium* sp. 的高特异性多克隆抗体,并对竞争型 ELISA 的条件进行了探索和优化,使得该方法的检测范围达到了 24~6 250 000 个细胞,检测极限达到了 12 个藻细胞,方法的批内和批间变异系数分别达到 5.8% 和 9.7%,整个检测过程可在几个小时内完成。对胶州湾 6 份天然海水样品中 *Gymnodinium* sp. 的技术结果和光镜直接计数基本一致。

应用酶免疫技术检测有害藻细胞,选择合适的试验方法对于工作量的降低、检测灵敏性的提高和检测时间的缩短很关键。目前尚未发现采用直接 ELISA 定量检测有害藻细胞的文献,与免疫荧光检测类似,酶标第二抗体已商品化,可简化实验过程,还可以增加检测的灵敏性。海水样品中的藻细胞碎片及细胞内容物对于 ELISA 定量检测可以产生一定的干扰,此外,获得高特异性的抗体也是应用该方法的前提和关键。

1.5 免疫流式细胞术

该技术以流式细胞仪为分析工具,用特异性的抗体来识别待检测藻细胞,抗体或者第二抗体多采用荧光物质进行标记。Taylor 等^[26]用多克隆抗体标记 *Alexandrium tamarense* 时发现不同株的细胞荧光信号都有较大的差异;而抗体非特异性结合和藻类的自



发荧光信号强度有时可以达到正常标记细胞的30%^[12]；此外，不同环境条件也可导致细胞表面抗原表达量的变化，从而产生荧光信号差异，这些都可能导致错误的细胞识别，限制该方法的实际应用。因此，用该方法把特定的藻细胞从多种藻混杂的样品中鉴定、计数和分选，要保证每个待检藻细胞的荧光信号在一定范围内保持恒定^[27]。

1996年，Vrieling等^[27]用一种单克隆抗体研究*Gyrodinium aureolum*和*Gymnodinium nagasakiense*在不同生长条件及不同生长时期表面抗原表达的差异，发现各个生长时期的细胞都可以利用免疫流式细胞技术进行识别和分选，只是在细胞生长的平台后期荧光信号才有所降低，说明在细胞生长的末期，即将死亡或者溶解的细胞对特定抗原的表达产生了差异。因此，利用免疫流式细胞技术对处于不同生长阶段的藻细胞进行鉴别和分选是可行的，其成败与否在很大程度上决定于特异性抗体的性质。如果特异性多抗中含有较多的针对各个生长时期的抗体或者制备的单抗是针对在各个生长时期都可以稳定表达的一种表面抗原，则实验取得成功的可能性比较大。

Costas等^[13]把获得的高特异性和高亲和力的*Alexandrium minutum*的多抗用于流式细胞仪计数藻细胞，可以把假阳性控制在1%以下，在较高细胞密度时光学显微镜计数比较准确，而在较低细胞密度时，直接光镜计数最大误差在28%，流式细胞仪只有10%。对低密度细胞良好的计数能力使该项技术在赤潮前期监测和预报中具有重要意义。

但目前流式细胞术对天然海水样品中聚生的藻类细胞计数结果不准确^[13]，也不适于分析较大型的浮游植物，许多研究者采用诸如单一激发荧光、多角度散射、流动数字成像等较新的度量手段来扩大流式细胞术识别细胞大小、形状的范围，并使之可以参与藻类色素的分析^[28]。

1.6 单克隆抗体和封闭抗体

如前所述，获得对藻细胞具有较高特异性的抗体是各种免疫测定方法建立的关键，抗体至少要具有属或者种的特异性才可以开展相关的测定实验。特异性的多克隆抗体的获得具有很大的随机性，抗体制备之前尚不具备对其特异性进行推测和评估的有效手段，因此在很大程度上限制了多克隆抗体的应用，为了解决这个问题，具有种间特异性的单克隆抗体得以发展^[19,24,29]。

单抗良好的特异性使检测的准确度和灵敏性得到提高，解决了部分多抗存在的交叉反应问题，但是

传统的单抗制备技术较为复杂、成本较高、对操作要求严格、筛选过程工作量大，制约了单抗的开发和利用。2003年向军俭等^[30]利用传统杂交瘤技术制备了*Chattonella marina*、*C. ovata*、*Heterosigma akashiwo*、*Prorocentrum dentatum*、*Pseudonitzschia pungens*的单克隆抗体，其中一个细胞株分泌的单抗可与除*P. pungens*外的4种藻产生明显的高效价的交叉反应，显示此单抗可代替5种海藻的抗血清。

抗体封闭技术则为研究人员提供了一条去除交叉反应，改良抗血清的简易途径。1995年Mendoza等^[31]用不同株系的*Alexandrium minutum*和*A. lusitanicum*分别封闭处理*A. lusitanicum*和*A. minutum*的抗血清，不仅完全排除了严重的种间的交叉反应，而且获得了具有克隆特异性的*A. minutum*的多克隆抗体，可以分别区分不同株系的*A. minutum*藻细胞；同样，对具有良好种间特异性的*Gymnodinium catenatum*和*Gyrodinium* sp.的多克隆抗体分别用其不同株系的藻细胞封闭处理，同样可以获得具有克隆特异性的多抗。1999年Lopez Rodas等^[15]制备了具有良好种特异性的*Prorocentrum lima*和*P. rostratum*的多抗，然后通过预吸附处理也获得了具有种特异性的*P. triestinum*、*P. micans*、*P. minimum*的多抗。

对于细胞的分选过程，除抗体特异性外还必须考虑到抗体和目标藻的结合能力。通常，单克隆抗体和目标藻的结合能力比较弱，而封闭处理过的多抗仍具有比较强的结合能力，因此，Costas等^[13]认为经过封闭处理的多抗是进行快速免疫鉴定、计数以及分离的最佳选择。

2 结语

在形态上相似的海洋微藻，其基因序列却可能有较大差异，传统的微藻分类方法则在一定程度上割裂了表型(外部形态特征)与基因型(内部基因序列)的相互联系。20世纪80年代后分子生物学的迅猛发展使人们已经可以在基因水平上对微藻进行鉴定分析^[32]，同时使基于基因序列差异的有害藻核酸探针定性定量检测技术成为可能^[33]，利用免疫学方法也可以对藻类进行表型分析与归类^[15]，同其他分子生物学方法一起，有助于澄清当前分类上的一些模糊，解决一些传统分类上的争论。

2003年Lin等^[11]对免疫检测方法与PCR检测技术做了对比，发现前者的灵敏性略低，但免疫方法在较高细胞密度的检测结果更稳定，并对样品中存在的抑制物质不敏感。与以核酸为待检目标的分子检

测法相比较,免疫方法的优势还在于不需要对自然样品进行过多预处理就可以进行测定,同时制备抗体的成本较低廉。免疫荧光检测在细胞的鉴定方面优势明显;ELISA 法所需仪器设备简单,可以同时实现藻细胞的定性和定量,便于对有害藻细胞进行快速检测;单克隆抗体技术使制备高特异性、高度均一的抗体成为可能;封闭抗体技术则使多克隆抗体的应用价值得到极大提高;多种免疫检测方法的应用则使有害赤潮藻细胞的抗体检测技术日趋成熟。总之,免疫学方法是进行赤潮监测和预报的有力手段,也是今后藻类检测技术的一个重要发展方向。

参考文献:

[1] 苏纪兰. 中国的赤潮研究[J]. 中国科学院院刊, 2001, 5: 339-342.

[2] Yang Z B, Hodgkiss I J. Hong Kong's worst "red tide" - causative factors reflected in a phytoplankton study at Port Shelter station in 1998[J]. **Harmful Algae**, 2004, 3: 149-161.

[3] 廉双喜. 赤潮监测和预报的构想[J]. 海洋技术, 2002, 21(2): 74-77.

[4] 曾呈奎, 相建海. 海洋生物技术[M]. 济南: 山东科学技术出版社, 1998. 416-429.

[5] 米铁柱, 甄毓, 于志刚, 等. 海洋浮游藻类检测技术发展及其展望[J]. 高技术通讯, 2003, 13(3, 增刊): 96-100.

[6] Quilliam M A. The role of chromatography in the hunt for red tide toxins[J]. **Journal of Chromatography A**, 2003, 1000: 527-548.

[7] Fliermans C, Schmidt E. Immunofluorescence for autecological study of a unicellular bluegreen alga[J]. **Journal of Phycology**, 1977, 13: 364-368.

[8] Anderson D M, Keafer B A, Kulis D M, et al. An immunofluorescent survey of the brown tide chrysophyte *Aureococcus anophagefferens* along the north-east coast of the United States[J]. **Journal of Plankton Research**, 1993, 15(5): 563-580.

[9] Chang F H, Garthwaite I, Anderson D M, et al. Immunofluorescent detection of a PSP-producing dinoflagellate, *Alexandrium minutum*, from Bay of Plenty, New Zealand[J]. **New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research**, 1999, 33(4): 533-543.

[10] Cho E S, Costas E. Rapid monitoring for the potentially ichthyotoxic dinoflagellate *Cochlodinium polykrioides* in Korean coastal waters using fluorescent probe tools[J]. **Journal of Plankton Research**, 2004, 26(2): 175-180.

[11] Lin S, Feinstein T N, Zhang H, et al. Development of an immunofluorescence technique for detecting

Pfiesteria piscicida[J]. **Harmful Algae**, 2003, 2(3): 223-231.

[12] Vrieling E G, Anderson D M. Immunofluorescence in phytoplankton research: applications and potential[J]. **Journal of Phycology**, 1996, 32(1): F16.

[13] Costas E, Lopez Rodas V. Enumeration and separation of the toxic dinoflagellate *Alexandrium minutum* from natural samples using immunological procedures with blocking antibodies[J]. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, 1996, 198(1): 81-87.

[14] Aguilera A, Gonzalez Gil S, Keafer B A, et al. Immunomagnetic separation of cells of the toxic dinoflagellate *Alexandrium fundyense* from natural plankton samples[J]. **Marine Ecology Progress Series**, 1997, 143: 255-269.

[15] Lopez Rodas V, Costas E. Immunochemical characterization of morphospecies and strains of *Prorocentrum* (Dinophyceae)[J]. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, 1999, 238(2): 293-308.

[16] Marco M P, Gee S, Hammock B D. Immunochemical techniques for environmental analysis I. Immunosensors[J]. **Trends in Analytical Chemistry**, 1995, 14(7): 341-350.

[17] Marquette C A, Coulet P R, Blum L J. Semi-automated membrane-based chemiluminescent immunosensor for flow injection analysis of okadaic acid in mussels[J]. **Analytica Chimica Acta**, 1999, 398: 173-182.

[18] Kumar A. Biosensors based on piezoelectric crystal detectors: Theory and application[J/OL]. <http://www.tms.org/pubs/journals/JOM/0010/Kumar/Kumar-0010.html>.

[19] Nakanishi K, Karube I, Hiroshi S, et al. Detection of the red tide-causing plankton *Chattonella marina* using a piezoelectric immunosensor[J]. **Analytica Chimica Acta**, 1996, 325(1-2): 73-80.

[20] Ishida Y, Karube I, Masao A, et al. Detection of the red tide-causing plankton *Alexandrium affine* by a piezoelectric immunosensor using a novel method of immobilizing antibodies[J]. **Analytical Letters**, 1996, 29(8): 1247-1258.

[21] Graf R, Schiesser M, Lussi A, et al. Coordinate regulation of secretory stress proteins (PSP/ reg, PAP I, PAP II, and PAP III) in the rat exocrine pancreas during experimental acute pancreatitis[J]. **Journal of Surgical Research**, 2002, 105: 136-144.

[22] Imai I, Sugioka H, Nishitani G. Monitoring of DSP toxins in small sized plankton fraction of seawater collected in Mutsu Bay, Japan, by ELISA method: relation with toxin contamination of scallop[J]. **Mar**

- rine Pollution Bulletin**, 2003, 47: 114-117.
- [23] 辛泽毓, 王探春, 亓海刚, 等. 两种角毛藻酶联免疫检测法的建立和应用[J]. 高技术通讯 2003, 13(增刊): 74-79.
- [24] Caron D A, Dennett M R, Moran D M, *et al.* Development and application of a monoclonal antibody technique for counting *Aureococcus anophagefferens*, an alga causing recurrent brown tides in the Mid-Atlantic United States[J]. **Applied and Environmental Microbiology**, 2003, 69(9): 5492-5502.
- [25] Xin Z, Yu Z, Wang T, *et al.* Identification and quantification of the toxic dinoflagellate *Gymnodinium* sp. with competitive enzyme linked immunosorbent assay (cELISA)[J]. **Harmful Algae**, 2005, 4(2): 297-307.
- [26] Lassus P, Arzul G, Erard E, *et al.* Harmful Marine Algal Blooms[M]. Paris: Lavoisier, 1995. 89-94.
- [27] Vrieling E G, van de Poll W H, Vriezekolk G, *et al.* Immunoflow cytometric detection of the ichthyotoxic dinoflagellates *Gyrodinium aureolum* and *Gymnodinium nagasakiense*: independence of physiological state[J]. **Journal of Sea Research**, 1997, 37(1-2): 91-100.
- [28] Collier J L. Flow cytometry and the single cell in phyecology[J]. **Journal of Phycology**, 2000, 36(4): 1529-8817.
- [29] Vrieling E G, Peperzak L, Gieskes W W C, *et al.* Detection of the ichthyotoxic dinoflagellate *Gyrodinium* (cf.) *aureolum* and morphologically related *Gyrodinium* species using monoclonal antibodies: a specific immunological tool[J]. **Marine Ecology Progress Series**, 1994, 103(1-2): 165-174.
- [30] 向军俭, 朱小兵, 吕颂辉, 等. 五种赤潮藻单克隆抗体的制备[J]. 暨南大学学报(自然科学版), 2003, 24(3): 103-108.
- [31] Mendoza H, Lopez Rodas V, Gonzalez Gil S, *et al.* The use of polyclonal antisera and blocking of antibodies in the identification of marine dinoflagellates: species-specific and clone-specific antisera against *Gymnodinium* and *Alexandrium*[J]. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, 1995, 186(1): 103-115.
- [32] 苟万里, 刘东艳, 甄毓, 等. 利用 rDNA 和 ITS 序列对 1 株裸甲藻的初步鉴定[J]. 中国海洋大学学报, 2004, 34(1): 75-83.
- [33] Tyrrell J V, Connell L B, Scholin C A. Monitoring for *Heterosigma akashiwo* using a sandwich hybridization assay[J]. **Harmful Algae**, 2002, 1: 205-214.