

蛇毒检测技术研究进展

车 军 刘洁生* 杨维东 邢少璟

(暨南大学生命科学技术学院 广州 510632)

摘要:介绍了放射免疫测定法、凝集测定法、免疫电泳检测、荧光免疫测定法、酶联免疫吸附测定法和生物传感器检测方法在蛇毒检测中的应用,并比较了各种方法的优点和不足。

关键词:蛇毒;检测方法

中图分类号:R996.3 文献标识码:A 文章编号:0250-3263(2002)01-76-04

Progress in Studies on Detection Methods of Snake Venom

CHE Jun LIU Jie-Sheng YANG Wei-Dong XING Shao-Jing

(College of Life Science and Technology Jinan University Guangzhou 510632, China)

Abstract: Radioimmunoassay, agglutination assay, immunoelectrophoresis assay, fluorescence immunoassay, enzyme-linked immunosorbent assay and biosensor were introduced in this paper as the methods to detect snake venom, and the advantages and disadvantages of these methods were compared.

Key words: Snake venom; Detection methods

在许多国家,被毒蛇咬伤引起很多问题。因为有重叠特征,要判断所咬伤的蛇的种类很困难,仅仅从临床表现判断,有时会发生误判,导致患者不能得到及时的治疗。因此,快速、准确的检测方法对治疗蛇咬伤是很重要的。

在过去几十年中,蛇毒的检测得到很大的发展,建立了许多检测蛇毒的方法。生物检测法(bioassay)、免疫扩散法(immunodiffusion)、免疫电泳法(immunoelectro-

phoresis)、放射免疫测定法(radioimmunoassay, RIA)、凝集测定法(agglutination assay)、荧光免疫测定法(fluorescence immunoassay)、酶联免疫吸附测定法(enzyme-linked immu-

* 通讯联系人;

第一作者介绍 车军,男,25岁,在读硕士研究生;研究方向:分子毒理学和药理学;E-mail:jun-che@21cn.com。

收稿日期:2000-11-01,修回日期:2001-06-15

nosorbent assay, ELISA)等被广泛的应用于蛇毒的检测方面。同时,ELISA在专一性、敏感性、快速性、方便性方面取得了很大的进步。单克隆抗体和亲合纯化的专一蛇毒抗体被用来提高ELISA的种属专一性,它现在似乎是蛇毒检测的最理想方法。酶联反应中的荧光底物和抗生物素蛋白-生物素复合物的结合将对蛇毒的测定提高到pg(picogram)水平。直接用血液和其它体液测定蛇毒能减少所需时间。虽然许多方法可用于蛇毒的检测,但仅有数种可用于野外检测。本文将现将其综述如下。

1 放射免疫测定法(radioimmunoassay, RIA)

1987年Pukrittayajamee^[1]等发展了一种很有竞争力的放射免疫测定法。他们通过运用抗蛇毒X因子的单克隆抗体MP2来检测病人体液中的鲁塞尔蛇毒。这种方法的灵敏度在尿液中为4 ng/ml,在0.1%小牛血清白蛋白-磷酸盐缓冲液中为20 ng/ml,在血清中为5 μg/ml。但是这种抗体的专一性不强,使用该抗体进行检测时,竹叶青蛇咬伤病人的血清呈阴性,但眼镜蛇咬伤病人的血清结果却显示阳性;而用眼镜蛇蛇毒和竹叶青蛇毒与鲁塞尔蛇毒做交叉反应时,发现眼镜蛇蛇毒和鲁塞尔蛇毒有交叉反应,而竹叶青蛇毒却没有。表明其阳性原因与交叉反应有关。相对来说,RIA方法需要样品量少、操作步骤也比较简单,1 h即内可完成。

Sjostrom等用RIA方法和传统的ELISA方法检测血浆中的蝰蛇毒,发现两种方法显示出良好的一致性^[2]。但ELISA用时少(ELISA需要2 h,RIA需要20 h)、灵敏度高(ELISA可达0.8 ng/ml,RIA可达2.0 ng/ml)、使用的试剂比较稳定。虽然RIA可信度和灵敏度均比较高,但由于放射性核素的运用和高要求的仪器,限制了它在野外和偏远地区的应用。

2 凝集测试(agglutination assay)

用A蛋白纯化的兔抗毒素IgG致敏乳胶颗粒构成的反乳胶凝集测试(reverse latex agglutination test)可以检测出泰国的6种重要的蛇毒^[3]。蛇毒和抗蛇毒致敏乳胶的悬浮和可见的凝集显示阳性反应,40 min可得到全部结果。反乳胶凝集检测可以检测到160~1 200 ng/ml的粗毒,阳性率可达52.5%。致敏性乳胶颗粒在4℃下可保存1年,如果冻干或干燥,室温下则可保存更长时间。一种类似于反凝集检测的方法,即在乳胶颗粒的表面粘附上亲和纯化的抗体,被用来检测体液中的黑纹珊瑚蛇(*Micrurus nigrocinctus nigrocinctus*)蛇毒,其最低

检测浓度为0.3 μg/ml。检测金黄珊瑚蛇(*M. fulvius*)和珊瑚蛇(*M. Spixii*)的最低检测浓度则为1.0 μg/ml^[4]。Kittigul^[5]等发展了一种被动反向血凝集测试(reverse passive hemagglutination, RPHA),用来检测泰国的6种主要毒蛇的蛇毒。这种方法的检测范围在2~635 ng/ml,大约需1~2 h。但在检测中发现同种蛇毒有交叉反应现象。

凝集检测具有快速、操作简便和不昂贵的优点,比较适合野外和偏远地区使用,但是检测的低敏感度和偶联剂的不稳定却是其难以解决的两个主要问题。

3 免疫电泳检测(immunoelectrophoresis assay)

曹金鸿^[6]等运用交叉免疫电泳法(也称双向电泳法)检测食鱼蝮蛇(*Agkistrodon piscivorus*)毒、矛头蝮蛇(*Bothrops atrox*)毒、棕点烙铁头蛇(*Trimeresurus gramineus*)毒、台湾竹叶青蛇(*Trimeresurus gracilis*)毒和五步蛇(*Agkistrodon acutus*)毒5种蛇毒。由于各种蛇毒共有组分种类、相对含量不同,因此电泳图谱中沉淀线位置和峰相对高度比等不相同,可以用来区分不同的蛇毒。但这种方法所需时间太长(24 h以上),而且不能进行定量测定。李碧晴^[7]等运用逆流免疫电泳法对食鱼蝮蛇毒、矛头蝮蛇毒、五步蛇毒进行了半定量分析,检测范围前两种在0.048~1.5 μg,后一种在0.024~1.5 μg。在0.15~1.5 μg范围内能区分蝮蛇毒、五步蛇毒、台湾竹叶青蛇毒和棕点烙铁头蛇毒,但不能区分食鱼蝮蛇毒与矛头蝮蛇毒。

免疫电泳检测方法设备简单、操作方便、灵敏度高。但检测时间长却是此方法的致命弱点。

4 荧光免疫检测(fluorescence immunoassay)

荧光测定法比分光光度测定法灵敏,是其10~1 000倍。基于酶联免疫试剂和荧光底物结合的原理,酶联荧光免疫测试将荧光测定法和免疫测试相结合,大大提高了免疫测试的灵敏度。4-甲基伞形酮磷酸盐(4-methyl umbelliferyl phosphate, 4MUP)结合碱性磷酸酶(alkaline phosphatase)通常被用做荧光反应物。Lomonte和Kahan^[8]使用单克隆抗体技术建立了酶联荧光免疫方法以检测矛头腹属的*B. asper*蛇毒。在针对*B. asper*的鼠mAbs(monoclonal antibody)(mAb1-mAb6和mAb8)中,mAb4适合查找,而mAb3适合检测;生物素酰基化mAb3与碱性磷酸酯合成酶和4-MUP共同检测,灵

敏度可达 1.5 ng。Bhatti^[9]等确立了一种更灵敏的酶联荧光免疫法用来检测 *D. r. russelli* 蛇毒。在被毒蛇咬死的小鼠尸体中其灵敏度达 0.1 pg/ml。

5 酶联免疫吸附检测 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)

1977 年 Theakston 等第一次用酶联免疫吸附检测法检测蛇毒及其抗体,灵敏度可达 1~5 ng 蛇毒/ml。在过去 20 多年中,ELISA 得到了广泛的应用,虽然它们在原理上和 Theakston 方法相同,但在灵敏度、专一性、快速性和方便性方面已有了很大的提高。

5.1 专一性 多克隆抗体技术的应用往往因为蛇毒交叉反应,引起对蛇毒种类的判断不明甚至误判。亲和纯化的蛇毒专一抗体被用做免疫试剂来发展种属专一 ELISA。首先在实验动物体内(兔子或马)获得抗血清,然后通过亲和层析将能产生交叉反应的抗体去除,就可以获得种属专一的抗血清。Chaven-Olortegui^[10]等用此方法来区分矛头蝮属 *Bothrops* sp. 和南美响尾蛇属的 *Crotalus durissus* 蛇毒。能发生交叉反应的免疫球蛋白通过亲和层析从马的血清中去除,具有种属专一的免疫球蛋白被用于 ELISA。通过检测发现结果显示良好的专一性,最低检测可达到 5 ng。

5.2 灵敏度 大部分蛇咬伤的病例中,蛇毒的浓度一般在 ng/ml 范围内,所以要求检测方法必须非常灵敏。生物素-抗生物素蛋白在 ELISA 中的应用,大大提高了 ELISA 的灵敏度。如果增加抗体的亲和能力,则灵敏度还可以提高。Selvanayagam 用具有很高灵敏度的 AB-微 ELISA 技术 (AB-MicroELISA) 检测被印度 4 种常见毒蛇咬死病人的组织(脑、心、肝、脾、肾)和血液中的蛇毒。组织匀浆中检测灵敏度可达 100 pg/ml。Bhatti^[9]使用荧光 ELISA 检测圆斑蛙 (*Vipera russelli*) 蛇毒,灵敏度可达 0.1 pg/ml。但交叉反应比较严重。

5.3 快速性和简便性 毒蛇咬伤是一个紧急事件,如果我们能立刻检测出所咬的蛇种,就可以立刻注射相应的抗毒血清。使用高亲和的抗体不仅能增加灵敏度而且能增加临床检测的速度,同时,使用未稀释的样品也可以减少检测的时间。Labrousse^[11]等发展了一种快速 ELISA,可以直接检测实验动物的血液,整个过程只需 20 min,需样品 200 μ l。Amuy^[4]等发展一种快速 ELISA 检测体液中的黑纹珊瑚蛇 *M. n. nigrocinctus* 蛇毒在 90 min 内可以检测到 10 ng/ml 的蛇毒。伤口抽提物和尿液等也可以直接被用来检测蛇毒^[12]。

简便性也是影响检测的重要因素。毒蛇咬伤通常发生在偏远地区,医院比较少,被蛇咬伤常常需要很长

时间才能到医院治疗,而医院蛇伤专业人员较少,因此检测的简便性就显得很重要。现在已经有数种蛇毒检测试剂盒 (venom detection kit, VDK) 用于临床。澳大利亚是第一个生产商业检测试剂盒的国家。这种试剂盒可以检测澳大利亚 5 种主要毒蛇的蛇毒。但它过于昂贵,而且不易生产。1991 年 CSL (commonwealth serum laboratories) 发展了一比较简单,但效率更高的试剂盒,由于使用了不同的耦联物,不再使用亲和和吸附耦联抗体,因此减少了耦联物与抗体的温育和洗脱时间,它可以在 20 min 内检测出 2.5 ng/ml 的毒素^[13]。印度的 Selvanayagam 和 De 发明一种快速的、种属专一的 AB-Micro-ELISA 试剂盒 (AB-MicroELISA Kit),检测印度的 4 种主要蛇毒。检测只需 30 min,其中还包括采血、洗涤和读数时间,且只需 600 μ l 的样品,检测灵敏度可达 10 ng/ml。

6 生物传感器 (biosensor)

生物传感器主要是由固定化的生物大分子即识别元和适当的信号转换器组成。在过去的 10 年中得到迅速的发展。Rogers^[14]等将烟碱型乙酰胆碱受体 (nicotinic acetylcholine receptor, nAChR) 固定于光纤上,制成烟碱型乙酰胆碱受体生物传感器,利用其可以和金环蛇毒 (bungarotoxin) 特异结合的特性,检测蛇毒的浓度。但必须首先用标记的金环蛇毒测量生物传感器的烟碱型乙酰胆碱受体的密度,同时检测时需和样品共同温育(不到 10 min)。培养基的 pH 对其活性影响很大,最适 pH 为 3.5。它在磷酸盐缓冲液 (phosphate buffered saline, PBS) 中可保存 3 d,其后活性逐渐降低。

通过研究发现,用合适的溶胶-凝胶 (sol-gel) 作为生物单元的固定剂应用于酶光极,不但可以大大提高生物单元的稳定性,还可以利用溶胶本身良好的光学性能提高整个敏感元件的性能^[15]。但就目前的技术水平而言,很多生物单元的稳定性远远不能满足实际应用的需要。目前生物传感器在蛇毒方面的检测报道还比较少,但在其它领域的使用已经很广泛,而且可以看出,由于生物传感器的快速发展,其体积的小型化、检测时间缩短、灵敏度提高使其成为最适于在野外使用的蛇毒检测方法。

综上所述,蛇毒的检测方法很多,但目前既能快速又具有高灵敏度的检测方法只有 ELISA 法,而生物传感器则是未来发展的方向,只是目前技术水平的限制,其稳定性、灵敏度等方面尚待改进。运用种属专一的抗体和稳定的底物或许可以解决这个问题。

参 考 文 献

- [1] Pukrittayakamee S, Ratcliffe P J, McMichael A J *et al.* A competitive radioimmunoassay using a monoclonal antibody to detect the factor X activator of Russell's viper venom. *Toxicon*, 1987, **25**: 721 ~ 729.
- [2] Sjoström L, Karlson-Stiber C, Persson H *et al.* Development and clinical application of immunoassay for European adder (*Vipera berus berus*) venom and antivenom. *Toxicon*, 1996, **34**: 91 ~ 98.
- [3] Chinonavanig L, Karnchanachetane C, Pongsettakul P *et al.* Diagnosis of snake venoms by a reverse latex agglutination test. *Clin Toxicol*, 1991, **29**: 493 ~ 503.
- [4] Amuy E, Alape-Giron A, Lomonte B *et al.* Development of immunoassays for determination of circulating venom antigens during envenomations by coral snake (*Micrurus species*). *Toxicon*, 1997, **35**: 1 605 ~ 1 616.
- [5] Kittigul L, Ratanabanangkoom K. Reverse passive hemoagglutination tests for rapid diagnosis of snake envenomation. *J Immunoassay*, 1993, **14**: 105 ~ 127.
- [6] 曹金鸿, 李碧晴. 交叉免疫电泳法鉴定蛇毒的研究. 上海免疫学杂志, 1990, **10**(8): 177 ~ 179.
- [7] 李碧晴, 曹金鸿. 逆流免疫电泳法检测蛇毒. 中国免疫学杂志, 1990, **5**: 317.
- [8] Lomonte B, Kahan L. Production and partial characterization of monoclonal antibodies of *Bothrops asper* (Tercciopelo) myotoxin. *Toxicon*, 1988, **26**: 675 ~ 689.
- [9] Bhatti A R, Wong J P, Siddiqui Y M *et al.* A sensitive fluorogenic enzyme linked immunosorbent assay for the detection of *Vipera russelli* venom. *Nat Toxins*, 1993, **1**(5): 277 ~ 282.
- [10] Chaven-Olortegui C, Penaforte C L, Silba R R *et al.* An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) that discriminates between the venoms of Brazilian *Bothrops species* and *Crotalus durissus*. *Toxicon*, 1997, **35**: 253 ~ 260.
- [11] Labrousse H, Nishikawa A K, Bon C *et al.* Development of a rapid and sensitive Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for measuring venom antigens after an experimental snake bites. *Toxicon*, 1988, **26**: 1 157 ~ 1 167.
- [12] Minton S A. Present tests for detection of snake venom: clinical applications. *Ann-Emerg-Med*, 1987, **16**(9): 932 ~ 937.
- [13] Cox J C, Moisisid A V, Shepherd J M *et al.* A novel format for a rapid sandwich EIA and its application to the identification of snake venoms. *J Immunol Methods*, 1992, **146**: 213 ~ 218.
- [14] Rogers K R, Valdes J J, Eldefrawi M E. Effects of receptor concentration, media pH and storage on nicotinic receptor-transmitted signal in a fiber-optic biosensor. *Biosens Bioelectron*, 1991, **6**(1): 1 ~ 8.
- [15] Psoma S, Turner A P F. 3rd World Congress on Biosensors. Oxford, UK: Elsevier Applied Science, 1994.