

重金属铅多克隆抗体的制备及鉴定

翟一凡¹, 向军俭^{1,*}, 唐 勇¹, 郭常伟¹, 刘小锋², 杨红宇¹

(1.暨南大学抗体工程中心, 广东 广州 510632; 2.广州市千江企业有限公司, 广东 广州 510632)

摘 要: 目的: 合成铅离子完全抗原, 并对其进行鉴定; 用合成的完全抗原免疫 Balb/c 小鼠制备多克隆抗体, 鉴定效价和特异性。方法: 用双功能螯合剂 p-SCN-Bn-DTPA 将 Pb^{2+} 与载体蛋白 BSA 和 OVA 偶联在一起, 合成免疫抗原(Pb-DTPA-BSA)和检测抗原(Pb-DTPA-OVA), 并通过 SDS-PAGE、紫外扫描、电感耦合等离子体(ICP)检测抗原中 Pb^{2+} 含量, 以及通过免疫 Balb/c 小鼠, 采集血清进行间接 ELISA 和竞争 ELISA 检测。结果: 两种合成的抗原相对于各自的载体蛋白均出现了蛋白条带滞后, 紫外吸收峰偏移等现象; 免疫的 4 号和 5 号 Balb/c 小鼠的抗血清效价达 1:400000; 与 OVA 无交叉反应, ELISA 检测 IC_{50} 值为 1.5ng/mL, 与 Fe^{3+} 有近 5% 的交叉反应, 与其他重金属离子的交叉反应均小于 1%。结论: 铅离子多克隆抗体制备成功。

关键词: 铅离子; 合成抗原; ELISA; 多克隆抗体

Preparation and Identification of Anti-Lead-chelate Complex Polyclonal Antibody

ZHAI Yi-fan¹, XIANG Jun-jian^{1,*}, TANG Yong¹, GUO Chang-wei¹, LIU Xiao-feng², YANG Hong-yu¹

(1. Antibody Engineering Center, Jinan University, Guangzhou 510632, China;

2. Guangzhou Rivers Enterprise Co. Ltd., Guangzhou 510632, China)

Abstract: Objective: BAS and OVA were individually conjugated with lead-chelate complex (Pb-DTPA) to prepare 2 antigens, namely Pb-DTPA-BSA, immunogen and Pb-DTPA-OVA, detective antigen. The synthesized antigens were then used to immunize BALB/c mice for preparing polyclonal antibodies. Finally, the antisera withdrawn from immunized BALB/c mice were assessed for their titers and specificities. Methods: The artificial antigens were identified by SDS-PAGE and scanned with ultraviolet spectrophotometer. The Pb^{2+} concentrations of the synthesized antigens were determined using inductively coupled plasma (ICP) spectrophotometer. Indirect ELISA and competitive ELISA were used to determine antiserum titer and specificity, respectively. Results: Compared with carrier proteins, the synthesized antigens exhibited lagged protein bands in SDS-PAGE pattern and blue shift of UV absorption peaks. The antiserum titers of the fourth and fifth mice reached up to 1:400,000 without cross-reactivity with OVA. The IC_{50} determined by IC-ELISA was 1.5 ng/mL and the cross reactivity with the other heavy ions were less than 1% although the cross-reactivity with Fe^{3+} was close to 5%. Conclusion: The above results suggest that anti-lead-chelate complex polyclonal antibodies are prepared successfully.

Key words: lead ion; antigen synthesis; ELISA; polyclonal antibody

中图分类号: Q819

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2010)13-0180-04

环境重金属污染导致渔产品、农产品等食品中的重金属残留已成人们日益关注的问题, 重金属在人体内的长期积累, 会对人类健康造成严重威胁^[1]。目前我国农副产品中残留比较严重的重金属包括: 汞、铅、镉、铬、砷, 其中铅对成人神经系统、消化系统及心血管系统都有非常严重的损害。

食品安全检测技术中有关重金属残留检测方法主要有原子吸收分光光度(atomic absorption spectrometry,

AAS)法、电感耦合等离子体-原子发射光谱(inductively coupled plasma-atomic emission spectrometry, ICP-AES)法、电感耦合等离子体-质谱分析(inductively coupled plasma-mass spectrometry, ICP-MS)法、原子荧光光谱分析法(atomic fluorescence spectrometry, AFS)法等, 这些重金属检测方法虽然能精确测量样品中单种金属的总量, 但相对费力、费时、费用昂贵, 需要进行大量的样品预处理, 且样品的检测需在大型分析设备的室

收稿日期: 2009-11-23

基金项目: 国家“863”计划项目(2008AA10Z427); 广州市天河区科技计划项目(085G079)

作者简介: 翟一凡(1984—), 男, 硕士研究生, 研究方向为食品安全检测。E-mail: zhayifan1984@yahoo.cn

* 通信作者: 向军俭(1952—), 男, 教授, 博士, 研究方向为抗体技术及应用研究。E-mail: txjj@jnu.edu.cn

内进行以及需要专业人员进行操作等缺陷,难以应用于现场检测。重金属免疫学检测方法具有检测速度较快、费用低廉、简单易携、高灵敏度和选择性的特点,它是以抗体技术为基础,其中重金属完全抗原的制备成为检测方法的关键^[2]。目前国外已有多种重金属螯合物的单抗并用于ELISA检测^[3],国内也有重金属镉^[4]和汞^[5]的抗原合成的相关报道,但尚未见铅离子抗原合成的报道。重金属铅螯合抗原的制备,是以双功能螯合剂p-SCN-Bn-DTPA先偶联载体蛋白BSA或OVA,再螯合铅离子^[6-7]。本研究利用合成的铅离子螯合抗原免疫小鼠,并制备重金属铅的多克隆抗体,以期建立快速、灵敏、特异的铅离子ELISA检测技术和免疫胶体金试纸条检测技术提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

螯合剂S-2-(4-isothiocyanobenzyl)-diethylenetriamine pentaacetic acid (p-SCN-Bn-DTPA) 美国Macrocyclics公司;牛血清白蛋白(BSA)、鸡卵白蛋白(OVA) 美国Sigma公司;BCATM protein试剂盒 美国Thermo公司;Centricon-30超滤离心管 美国Millipore公司;弗氏完全佐剂和弗氏不完全佐剂 美国Gibco公司;四甲基联苯胺(TMB)、96孔酶标板 德国Greiner公司;羊抗小鼠IgG-HRP 宝泰克公司;其他试剂均为国产分析纯。

1.2 仪器与设备

Cyberscan 1000 pH计 Eutech公司;Multiskan MK3酶标仪 美国Thermo公司;Biofuge primoR离心机 德国Heraeus公司;PowerPac HC™电泳仪 美国Bio-Rad公司;TS-2型脱色摇床 海门市麒麟医用仪器厂;ICP OPTIMA 2000DV 美国PE公司;UV-2550紫外-分光光度计 Shimadzu公司。

1.3 实验动物

Balb/c小鼠(6~8周龄,雌性) 南方医科大学实验动物中心。

1.4 方法

1.4.1 抗原的制备

1.4.1.1 Pb-DTPA-蛋白质抗原的制备

参考Blake^[8-9]、Zhu等^[10]的抗原合成方法制备,先将2mg的p-SCN-Bn-DTPA和4.5mg的蛋白质(BSA或OVA)在pH9.4的HEPES缓冲液中反应24h后,在4℃、6000r/min的条件下,超滤5min去除未偶联上的p-SCN-Bn-DTPA,再用pH7.4的HEPES缓冲液洗取截留物,然后逐滴加入1mol/L的Pb²⁺标准溶液100μL反应1h后,超滤去除未螯合上的Pb²⁺,再用反应缓冲液稀释截留物,最终得到2mL的溶液。使用前,用100mmol/L EDTA和

0.1mol/L、pH7.4的HEPES缓冲液对超滤离心管预处理。

1.4.1.2 DTPA-蛋白质的制备

采用同1.4.1.1节的方法,用三蒸水替代Pb²⁺的标准溶液即可。

1.4.2 抗原的鉴定

1.4.2.1 抗原蛋白质量浓度测定

分别用2mg/mL的BSA和OVA作为标准蛋白,将样品稀释5倍,利用BCA试剂盒构建标准曲线,方程为:BSA: $y = 0.0013x + 0.0366 (R^2 = 0.9966)$, OVA: $y = 0.0011x + 0.0605 (R^2 = 0.9926)$,式中: y 为样品在波长562nm处的吸光度, x 为样品的蛋白质量浓度。

1.4.2.2 抗原中Pb²⁺含量测定

将合成的Pb-DTPA-BSA和Pb-DTPA-OVA用pH7.4的HEPES缓冲液稀释100倍送到暨南大学分析测试中心,利用电感耦合等离子体发射光谱仪(ICP)测试样品中的Pb²⁺含量。

1.4.2.3 抗原的SDS-PAGE电泳

取BSA、DTPA-BSA、Pb-DTPA-BSA、OVA、DTPA-OVA、Pb-DTPA-OVA分别用三蒸水稀释到适当浓度,煮沸10min,用12%浓缩胶和5%分离胶进行垂直SDS-PAGE电泳。

1.4.2.4 抗原的紫外扫描分析

用pH7.4的HEPES缓冲液作空白,将BSA、OVA及其相应的偶联物用pH7.4的HEPES缓冲液稀释到适当的浓度,在240~360nm范围内扫描,观察其特征紫外吸收峰是否发生偏移。

1.4.3 多克隆抗体的制备及鉴定

1.4.3.1 小鼠免疫

以Pb-DTPA-BSA免疫6~8周龄雌性Balb/c小鼠5只(编号1~5)。每只小鼠以0.2mL (150μg) Pb-DTPA-BSA的剂量与等体积的完全弗氏佐剂均匀混合成乳剂,然后进行皮下多点注射,完成初次免疫。此后取0.2mL (150μg)的Pb-DTPA-BSA与等体积不完全弗氏佐剂混合,同法进行免疫,免疫5次后断尾采血,取上清液保存备用^[4]。

1.4.3.2 小鼠抗血清的鉴定

分别利用间接ELISA和竞争ELISA进行抗体效价和灵敏度的检测^[11]。间接ELISA以Pb-DTPA-OVA作为包被抗原,通过棋盘滴定确定以10ng/100μL的质量浓度进行包被,竞争ELISA以Pb-DTPA-OVA作为包被抗原,以Pb-DTPA作为竞争抗原,两者检测均用0.05g/mL脱脂奶粉封闭。用多种重金属Fe³⁺、Cu²⁺、Zn²⁺、Cd²⁺、Cr³⁺、Ca²⁺等,进行抗血清特异性检测,用交叉反应率表示。

$$\text{交叉反应率}/\% = \frac{\text{Pb}^{2+}\text{的IC}_{50}\text{值}}{\text{其他金属离子的IC}_{50}\text{值}} \times 100$$

2 结果与分析

2.1 二喹啉甲酸(bicinchoninic acid, BCA)法测定抗原蛋白质量浓度和 Pb^{2+} 含量

利用 BCA 法计算得 Pb-DTPA-BSA 的蛋白质量浓度为 2154 $\mu\text{g/mL}$, Pb-DTPA-OVA 的蛋白质量浓度为 1299.5 $\mu\text{g/mL}$, DTPA-OVA 的蛋白质量浓度为 988 $\mu\text{g/mL}$ 。经 ICP 检测的 Pb-DTPA-BSA、Pb-DTPA-OVA、DTPA-OVA 中的 Pb^{2+} 含量见表 1。

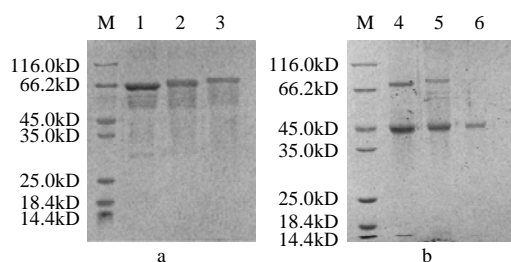
表 1 ICP 检测抗原中 Pb^{2+} 质量浓度

Table 1 Pb^{2+} concentrations of Pb-DTPA-BSA and Pb-DTPA-OVA

抗原	Pb-DTPA-BSA	Pb-DTPA-OVA	DTPA-OVA
Pb^{2+} 质量浓度/ $(\mu\text{g/mL})$	34	27	0

2.2 抗原的 SDS-PAGE 电泳图谱

通过蛋白质在 SDS-PAGE 中的迁移率来判断各种抗原的相对分子质量的变化。合成的 DTPA-BSA 和 Pb-DTPA-BSA 相对于 BSA 均存在滞后现象,表明二者分子质量均有增加,且 Pb-DTPA-BSA 相当于 DTPA-BSA 也有滞后现象,表明前者比后者分子质量增加更大,这与理论上抗原合成成功现象相符(图 1a)。合成的 DTPA-OVA 和 Pb-DTPA-OVA 相对于 OVA 有滞后现象,且 Pb-DTPA-OVA 相对于 DTPA-OVA 也有滞后现象,由此可以定性的判断免疫抗原和检测抗原合成成功(图 1b)。



a. BSA 及其相应抗原; b. OVA 及其相应抗原; M. Marker; 1. BSA(66.2kD); 2. DTPA-BSA; 3. Pb-DTPA-BSA; 4. OVA(45kD); 5. DTPA-OVA; 6. Pb-DTPA-OVA。

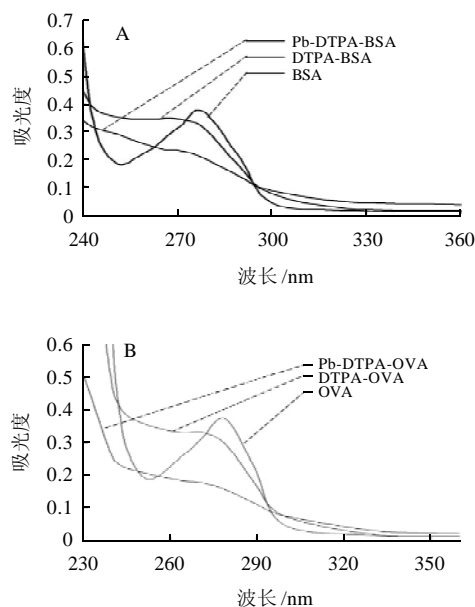
图 1 BSA、OVA 及其相应抗原的 SDS-PAGE 电泳

Fig.1 SDS-PAGE patterns of BSA, OVA and corresponding antigens

2.3 抗原的紫外扫描分析图

BSA 和 OVA 的最大吸收波长分别为 280nm 和 278nm。DTPA-BSA 的最大吸收波长在 266nm, 相对于

BSA 的最大吸收峰值向左发生偏移,且吸收曲线发生改变, Pb-DTPA-BSA 的紫外扫描在 260~280nm 之间同时具有 BSA 和 DTPA-BSA 的特征(图 2A)。DTPA-OVA 的最大吸收波长在 271nm, 相对于 OVA 的最大吸收峰值也向左发生偏移,同时吸收曲线也发生改变, Pb-DTPA-OVA 的紫外扫描在 240~280nm 之间也同时具有 OVA 和 DTPA-OVA 的特征(图 2B)。进一步从理论上表明两种抗原合成成功。



A. BSA 及其相应抗原; B. OVA 及其相应抗原。

图 2 BSA、OVA 及其相应抗原的紫外光谱图

Fig.2 UV absorption spectra of BSA, OVA and corresponding antigens

2.4 小鼠血清的间接 ELISA 和竞争 ELISA 检测

小鼠经 5 次免疫后抗血清效价的间接 ELISA 检测结果见图 3。

由图 3、4 可知, 经免疫 5 只小鼠均产生针对于 Pb-DTPA-OVA 的抗体, 且 4、5 号小鼠在血清以 1:640000 稀释时, 其 $\text{OD}_{450\text{nm}}$ 值在 1.0 左右, 并且与 OVA 也没有交叉反应。

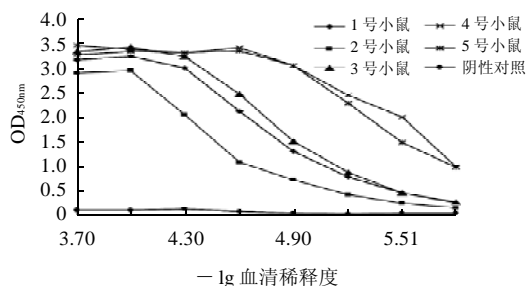


图 3 5 次免疫后小鼠血清的间接 ELISA 测定结果

Fig.3 Indirect ELISA curves of mouse antisera obtained after five immunizations

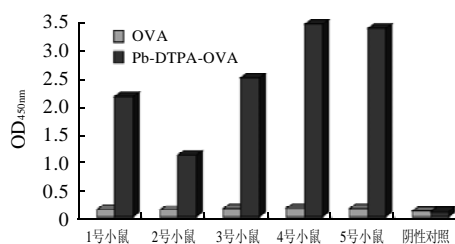


图4 小鼠抗血清与OVA的交叉反应

Fig.4 Cross-reactivity between antiserum and OVA

取小鼠的血清按表2所示的稀释倍数稀释,进行间接竞争ELISA检测结果见图5。5只小鼠的血清相对于0ng/mL的竞争抗原时的OD_{450nm}值均有下降,其中4、5号小鼠在0~3.2ng/mL范围内的竞争曲线的线性关系比较好,其半抑制率(IC₅₀)均可达到1.5ng/mL。

表2 小鼠血清稀释倍数

Table 2 Dilution factors of mouse antisera

小鼠编号	1号	2号	3号	4号	5号	空白
血清稀释倍数	80000	30000	120000	400000	400000	100000

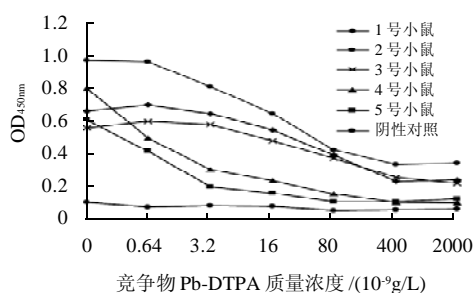


图5 5次免疫后小鼠血清的间接竞争ELISA检测

Fig.5 Indirect competitive ELISA curves of mouse antisera obtained after five immunizations

用4号小鼠的血清与其他重金属离子进行交叉反应性实验,结果见表3,表明制备的重金属铅的抗血清只与Fe³⁺有近5%的交叉反应,与其他重金属离子的交叉反应均小于1%。

表3 抗血清特异性的检测

Table 3 Specificity of antiserum of the fourth mouse to Pb²⁺

金属离子	IC ₅₀ /(ng/mL)	交叉反应率/%
Pb ²⁺	1.5 ± 0.042	100
Fe ³⁺	30.36 ± 0.341	4.94
Cd ²⁺	348.84 ± 0.253	0.43
Cu ²⁺	> 700	< 0.214
Cr ³⁺	> 700	< 0.214
Ca ²⁺	> 700	< 0.214
Zn ²⁺	> 700	< 0.214

3 讨论

重金属的免疫学检测技术已成为当前农副产品中重

金属残留的重要检测技术之一,它是以单克隆抗体技术为基础,其中重金属完全抗原的制备成为检测方法建立的关键。本实验选取双功能螯合剂p-SCN-Bn-DTPA,它一方面与重金属Pb²⁺螯合,另一方面通过-SCN和蛋白质上的自由Lys的ε-NH₃偶联形成硫脲基,而与大分子蛋白(BSA或OVA)偶联在一起,形成完全抗原^[12-13]。并对合成的抗原进行了初步鉴定,通过SDS-PAGE、紫外扫描以及ICP检测Pb²⁺含量定性的判断出抗原偶联成功,随后又通过合成的抗原直接免疫小鼠,采集血清进行间接ELISA、竞争ELISA、交叉反应检测,判断出重金属铅多克隆抗体制备成功,为下一步的细胞融合、铅离子单克隆抗体的制备提供参考。

参考文献:

- [1] ZAIDI M I, ASRAR A, MANSOOR A, et al. The heavy metal concentration along roadside trees of Quetta and its effects on public health[J]. J Appl Sci, 2005, 5(4): 708-711.
- [2] CHAKRABARTI P, HATCHER F M, BLAKE R C, et al. Enzyme immunoassay to determine heavy metals using antibodies to specific metal-EDTA complexes: optimization and validation of an immunoassay for soluble indium[J]. Analytical Biochemistry, 1994, 217(1): 70-75.
- [3] BLAKE D A, KHOSRAVIANI M, PAVLOV A R, et al. Immunoassay for metal ions[J]. Analytica Chimica Acta, 1998, 376(1): 13-19.
- [4] 唐勇, 向军俭, 罗辉武, 等. 重金属镉离子单克隆抗体的制备[J]. 食品科学, 2005, 26(9): 350-353.
- [5] 黄佳俊, 王菊芳, 刘功良, 等. 重金属汞螯合物人工抗原的合成与鉴定[J]. 中国生物工程杂志, 2008, 28(2): 71-75.
- [6] JONES R M, YU H N, DELEHANTY J B, et al. Monoclonal antibodies that recognize minimal differences in the three-dimensional structures of metal-chelate complexes[J]. Bioconjugate Chem, 2002, 13(3): 408-415.
- [7] ROBERTS V A, IVERSON B L, IVERSON S A, et al. Antibody remodeling: A general solution to the design of a metal-coordination site in an antibody binding pocket[J]. Proc Nat Acad Sci, 1990, 87: 6654-6658.
- [8] BLAKE D A, YU H N, KHOSRAVIANI M, et al. Antibodies and antibody-based assays for hexavalent uranium[J]. Analytica Chimica Acta, 2001, 444(1): 3-11.
- [9] BLAKE D A, CHAKRABARTI P, KHOSRAVIANI M, et al. Metal binding properties of a monoclonal antibody directed toward metal-chelate complexes[J]. Journal of Biological Chemistry, 1996, 271(44): 27677-27685.
- [10] ZHU Xiaoxia, HU Baishi, LOU Yang, et al. Characterization of monoclonal antibodies for lead-chelate complexes: Applications in antibody-based assays[J]. J Agric Food Chem, 2007, 55(13): 4993-4998.
- [11] 王建华, 唐勇, 向军俭, 等. 镉离子多克隆抗体ELISA竞争法的初步建立[J]. 中国生物制品学杂志, 2008, 21(1): 56-59.
- [12] MEYER D L, FINEMAN M, UNGER B W, et al. Kinetics of the dissociation of indium-(p-substituted-benzyl) ethylenediaminetetraacetic acid hapten analogues from the monoclonal anti-hapten antibody CHA255[J]. Bioconjugate Chem, 1990, 1(4): 278-284.
- [13] BRECHBIEL M W, GANSOW O A, PIPPIN C G, et al. Preparation of the novel chelating agent N-(2-aminoethyl)-trans-1, 2-diaminocyclohexane-N, N', N''-pentaacetic acid (H5CyDTPA), a preorganized analogue of diethylenetriaminepentaacetic acid (H5DTPA), and the structure of Bi(III) (CyDTPA) 2 and Bi(III) (H2DTPA) complexes[J]. Inorganic Chemistry, 1996, 35: 3643-3648.