

# 重金属镉单克隆抗体的制备与性质分析

易翠平<sup>1</sup>, 苏芳<sup>1</sup>, 陈永发<sup>1</sup>, 彭新凯<sup>2</sup>, 朱向荣<sup>3</sup>

(1.长沙理工大学化学与生物工程学院, 湖南长沙 410114; 2.长沙市食品质量监督检测中心, 湖南长沙 410013;  
3.湖南省食品测试分析中心, 湖南长沙 410125)

**摘要:** 通过双功能螯合剂iEDTA螯合Cd<sup>2+</sup>并偶联卵白蛋白(OVA)和牛血清白蛋白(BSA), 合成免疫抗原Cd-iEDTA-OVA和筛选抗原Cd-iEDTA-BSA; 以Cd-iEDTA-OVA注射BALB/c小鼠, 制备Cd<sup>2+</sup>单克隆抗体, 以Cd-iEDTA-BSA通过酶联免疫吸附法(ELISA)进行筛选, 并分析抗体性质。结果表明: 以Cd<sup>2+</sup>和OVA含量分别为174.6230μg/L、1.7892mg/mL的Cd-iEDTA-OVA抗原免疫小鼠, Cd<sup>2+</sup>和BSA含量分别为48.1881μg/L、1.8065mg/mL的Cd-iEDTA-BSA抗原筛选, 可获得7F4和7E8两株特异性较好的杂交瘤细胞; 7E8E5、7E8G9、7F4B8、7F4D6和7F4H8共5株高纯度单抗, 均属IgG1型, 其中7E8E5效价最高, 达1:512000, 亲和常数也最高, 达4.55×10<sup>8</sup> L/mol。建立了Cd<sup>2+</sup>间接竞争ELISA法, IC<sub>50</sub>为1150ng/mL, 检测限为260ng/mL (R<sup>2</sup> = 0.9916); 与Hg<sup>2+</sup>有较强交叉, 与Zn<sup>2+</sup>、Cu<sup>2+</sup>、Ca<sup>2+</sup>交叉较弱, 与Mg<sup>2+</sup>、Ni<sup>2+</sup>、Al<sup>3+</sup>、Pb<sup>2+</sup>、Ba<sup>2+</sup>几乎无交叉。

**关键词:** 镉; 抗原; 杂交瘤细胞; 单克隆抗体; 酶联免疫吸附法

## Preparation and Properties of Monoclonal Antibody against Heavy Metal Cd<sup>2+</sup>

YI Cui-ping<sup>1</sup>, SU Fang<sup>1</sup>, CHEN Yong-fa<sup>1</sup>, PENG Xin-kai<sup>2</sup>, ZHU Xiang-rong<sup>3</sup>

(1. School of Chemical and Biomedical Engineering, Changsha University of Science and Technology, Changsha 410114, China;  
2. Supervision and Inspection Center on Food Quality Safety in Changsha, Changsha 410013, China;  
3. Hunan Food Test and Analysis Centre, Changsha 410125, China)

**Abstract:** Bifunctional chelator isothiocyanobenzyl-EDTA (iEDTA) was coupled with Cd<sup>2+</sup> and conjugate with ovalbumin (OVA) and bovine serum albumin (BSA) to obtain Cd-iEDTA-OVA as an immune-antigen and Cd-iEDTA-BSA as a screening antigen, respectively. Cd-iEDTA-OVA was injected to BALB/c mice to produce mAb against Cd<sup>2+</sup>, and Cd-iEDTA-BSA was utilized to screen the monoclonal antibodies (mAb) by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Results showed that specific hybridoma cell lines 7F4 and 7E8 were obtained after immunizing mice with Cd-iEDTA-OVA containing 174.6230 μg/L Cd<sup>2+</sup> and 1.7892 mg/mL OVA, and screening antibody with Cd-iEDTA-BSA containing 48.1881 μg/L Cd<sup>2+</sup> and 1.8065 mg/mL BSA. Five high purity mAbs were obtained, such as 7E8E5, 7E8G9, 7F4B8, 7F4D6 and 7F4H8, whose subtypes belong to IgG1. Among them, the titer of 7E8E5 was the highest, which was 1:512000; the affinity constant (K<sub>a</sub>) of 7E8E5 was 4.55 × 10<sup>8</sup> L/mol. As a result an indirect competitive ELISA method for Cd<sup>2+</sup> was established, and the IC<sub>50</sub> and detection limit were 1150 ng/mL and 260 ng/mL (R<sup>2</sup> = 0.9916), respectively. However, it showed strong cross reactivity with Hg<sup>2+</sup>, weak cross reactivity with Zn<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup> and Ca<sup>2+</sup>, and almost no cross reactivity with Mg<sup>2+</sup>, Ni<sup>2+</sup>, Al<sup>3+</sup>, Pb<sup>2+</sup> or Ba<sup>2+</sup>.

**Key words:** cadmium; antigen; hybridoma cell; monoclonal antibody (mAb); enzyme linked immunosorbent assay (ELISA)

中图分类号: Q785

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630(2013)21-0248-06

doi:10.7506/spkx1002-6630-201321050

镉在土壤中具有较强的生物化学活性, 水稻、蔬菜等农作物很容易吸收土壤中的镉而进入食物链, 从而在动物和人体中蓄积, 特别是肝脏和肾脏, 潜伏期可长达10~30a, 长期食用镉污染严重的食物会极大地增高骨

折、高血压、癌症和肾功能紊乱的风险, 严重地损害人类健康<sup>[1-2]</sup>。早期发生在日本富山县神通川流域的“骨痛病”, 主要就是长期饮用“镉水”和食用“镉米”造成的<sup>[3]</sup>, 目前, 我国已规定了食品中镉限量卫生标准<sup>[4]</sup>。因

收稿日期: 2013-06-27

基金项目: 湖南省科技计划重大专项(2011FJ1002-4); 国家自然科学基金青年基金项目(31301404);

“十二五”国家科技支撑计划项目(2012BAD34B08); 长沙市科技计划项目(K1207176-21)

作者简介: 易翠平(1973—), 女, 副教授, 博士, 研究方向为粮食、油脂与植物蛋白、食品安全与营养。

E-mail: yicp963@163.com

此对镉的监控显得尤为重要,传统的检测方法有原子吸收光谱法、电感耦合等离子体质谱法、电感耦合等离子体原子发射光谱法、溶出伏安法等,但仪器设备昂贵,需配备专门的检测人员,操作繁琐,检测时间长,成本高,尤其不能实现快速检测<sup>[5]</sup>。自1985年Reardan等<sup>[6]</sup>首次制备出重金属镉单克隆抗体,并建立免疫分析方法以来,抗体技术应用于重金属检测的研究非常活跃。与传统方法相比,免疫法具有灵敏度高、特异性强、操作简单、耗时短,最主要的是能大量、快速筛选等优点,使其得到迅速发展和广泛应用, Khosraviani<sup>[7]</sup>、Tawarada<sup>[8]</sup>、Liu Gongliang<sup>[9]</sup>、Darwish<sup>[10]</sup>等均报道了镉单克隆抗体的制备及在水样、环境、食品及血清中的应用。

本研究拟通过合成免疫抗原Cd-iEDTA-OVA注射BALB/c小鼠,制备Cd<sup>2+</sup>单克隆抗体,并采用酶联免疫吸附法(ELISA)对该单克隆抗体进行筛选,以期Cd<sup>2+</sup>的生物化学检测方法提供性能优良的抗体材料。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材料与试剂

iEDTA 日本同仁化学研究所; BSA 瑞士Roche公司; OVA、弗氏完全(不完全)佐剂 美国Sigma公司; 四甲基联苯胺(TMB) 上海阿拉丁试剂有限公司; BALB/c小鼠(8~9周龄,雌性)、小鼠骨髓瘤细胞(SP2/0)、羊抗小鼠IgG-HRP 湖南远泰生物技术有限公司; 其他试剂均为国产分析纯。

### 1.2 仪器与设备

AA6800石墨炉原子吸收分光光度计 日本岛津公司; Multiskan MK3酶标仪 美国Thermo公司; PowerPac 300电泳仪 美国Bio-Rad公司; 96孔酶标板 美国Corning/Costar公司; 30kD/6mL超滤管 德国Sartorius公司; 微量移液器 德国Eppendorf公司; YHYG450A全自动生化仪 湖南永和阳光科技有限责任公司; UV2600紫外分光光度计 上海舜宇恒平科学仪器有限公司; GL21M低温高速冷冻离心机 长沙英泰仪器有限公司; YCP系列CO<sub>2</sub>培养箱 长沙华曦电子科技有限公司。

### 1.3 方法

#### 1.3.1 Cd-iEDTA-OVA和Cd-iEDTA-BSA的制备

采用异硫氰酯法并加以改进<sup>[11]</sup>。用iEDTA螯合Cd<sup>2+</sup>合成半抗原Cd-iEDTA,再分别桥联载体蛋白OVA and BSA制得免疫抗原Cd-iEDTA-OVA和筛选抗原Cd-iEDTA-BSA,用无镉纯水代替镉溶液,制得筛选抗原iEDTA-BSA<sup>[10]</sup>,反应原理如图1所示。反应过夜后,用Centricon-30超滤离心管对其进行分离纯化<sup>[12]</sup>。石墨炉原子吸收法(GFAAS)在波长228.8nm,狭缝0.5nm,低灯电流8mA,

高灯电流300mA,点灯方式:SR较背景的条件下测定Cd<sup>2+</sup>含量,UV在230~320nm波长范围内扫描进行定性分析,在278nm波长处测定BSA、OVA的浓度<sup>[13]</sup>。

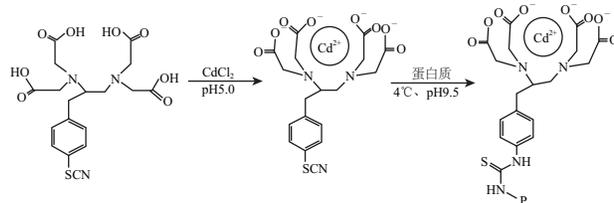


图1 异硫氰酯法制备Cd-iEDTA-BSA/OVA反应原理

Fig.1 Principle of preparing Cd-iEDTA-BSA/OVA through isothiocyanate method

### 1.3.2 腹水型单克隆抗体的制备

#### 1.3.2.1 抗血清的制备

选8~9周龄雌性BALB/c小鼠5只。一免用弗氏完全佐剂,每只50μg Cd-iEDTA-OVA,腹腔少量多点注射,总剂量0.5mL/只。间隔3周,进行二免,剂量为25μg/只,二免起用弗氏不完全佐剂,在腹腔、背部皮下、颈部等进行少量多点注射<sup>[14]</sup>,总剂量0.5mL/只。每隔2周分别进行三免、四免,四免后尾部采血,ELISA法检测效价,如效价未达到1:10<sup>4</sup>,OD<sub>450nm</sub>>1.0,则继续加强免疫,此时不加任何佐剂。

#### 1.3.2.2 细胞融合及亚克隆

取效价高的BALB/c小鼠最后加强免疫,3d后,脱颈死亡取B淋巴细胞,与复苏的骨髓瘤细胞(SP2/0)按比例1:2左右混合,并PEG-4000促融,转至铺好饲养细胞的96孔培养板中,置于37°C、5% CO<sub>2</sub>培养箱中培养。10~15d后,收集上清,间接ELISA法进行筛选,将阳性孔转移至24孔板扩大培养。并用有限稀释法对阳性孔进行亚克隆<sup>[15]</sup>。

#### 1.3.2.3 腹水型单克隆抗体的制备

选8~9周龄雌性BALB/c小鼠2只,腹腔注射弗氏不完全佐剂,0.5mL/只,3d后,杂交瘤细胞(约10<sup>6</sup>个细胞)接种腹腔,0.5mL/只,7~10d后,若小鼠腹部明显膨大、抚摸有紧张感,即可采集腹水<sup>[16]</sup>。

### 1.3.3 单抗的纯化

#### 1.3.3.1 预处理

在3000r/min条件下离心10min,除去油层和沉淀物,收集上清,4°C过夜。

#### 1.3.3.2 辛酸-硫酸铵盐析法纯化

取若干单抗加入4倍体积CH<sub>3</sub>COONa(40mmol/L,pH4.0);滴加辛酸至终体积分数2.5%;4°C、3000r/min条件下离心30min,去沉淀;过滤上清;用1mol/L NaOH小心调节pH值至7.4;室温下缓慢加入等体积饱和(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>;离心弃上清,沉淀溶于pH7.4 PBS中;转入透

析袋, PBS中透析过夜; 次日换液再透析两次; 离心去沉渣, 分装,  $-20^{\circ}\text{C}$  保存<sup>[17]</sup>。

### 1.3.4 抗体的鉴定

#### 1.3.4.1 间接ELISA法测定抗血清效价

1)包被: Cd-iEDTA-BSA包板,  $2\mu\text{g/mL}$ ,  $100\mu\text{L/孔}$ ,  $4^{\circ}\text{C}$ 包被过夜; 2)洗板: 倒液, PBST洗涤3次,  $3\text{min/次}$ , 拍干; 3)封闭: 1%BSA,  $200\mu\text{L/孔}$ ,  $37^{\circ}\text{C}$ 温育2h, 洗板; 4)加入一抗: 1:1000~1:4096000倍比稀释的抗血清, 设置空白对照, 并用正常小鼠血清作为阴性对照,  $37^{\circ}\text{C}$ 温育1h, 洗板; 5)加入二抗: 1:9000稀释的酶标羊抗小鼠IgG-HRP,  $50\mu\text{L/孔}$ ,  $37^{\circ}\text{C}$ 温育1h, 洗板; 6)TMB显色:  $100\mu\text{L/孔}$ ,  $37^{\circ}\text{C}$ 温育10min; 7)终止:  $2\text{mol/L}$   $\text{H}_2\text{SO}_4$ ,  $100\mu\text{L/孔}$ ; 8)测定: 波长450nm处测定, 以样品孔的OD值大于阴性孔的2.1倍( $\text{S/N}>2.1$ )为阳性。

#### 1.3.4.2 抗血清特异性的测定

以iEDTA-BSA包板,  $2\mu\text{g/mL}$ ,  $100\mu\text{L/孔}$ ,  $4^{\circ}\text{C}$ 包被过夜; 其他同1.3.4.1节。

#### 1.3.4.3 间接ELISA法鉴定单抗亚类

在1.3.4.1节步骤4)后, 依次加入IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG2c、IgG3、IgM,  $50\mu\text{L/孔}$ ,  $37^{\circ}\text{C}$ 温育1h; 其他相同。

#### 1.3.4.4 棋盘法测定抗原抗体最佳工作质量浓度

将抗原稀释至2.8、2.4、2.0、1.6、1.2、0.8、0.4、 $0.0\mu\text{g/mL}$ , 包板, 其他同1.3.4.1节<sup>[18]</sup>。

#### 1.3.4.5 SDS-PAGE法测定单抗分子质量及纯度

采用5%浓缩胶, 12%分离胶, Marker的点样量为 $2\mu\text{L/孔}$ , 待测样品 $20\mu\text{L/孔}$ , 进行垂直电泳, 并设置对照。点样前将样品置于沸水浴中, 使其充分变性<sup>[19]</sup>。按式(1)计算相对迁移率。

$$\text{相对迁移率} = \frac{\text{样品迁移率/cm}}{\text{染料迁移率/cm}} \quad (1)$$

#### 1.3.4.6 单抗亲和力的测定

将抗原稀释至4、2、 $1\mu\text{g/mL}$ ,  $100\mu\text{L/孔}$ , 包板,  $4^{\circ}\text{C}$ 包被过夜; 其他同1.3.4.1节<sup>[20-21]</sup>。

$$\text{亲和常数}(K_a)/(\text{L/mol}) = \frac{n-1}{2(n\text{Ab}_2 - \text{Ab}_1)} \quad (2)$$

式中:  $n$ 为单抗物质的量浓度/(mol/L);  $\text{Ab}_1$ 为抗原抗体结合率为50%的抗体质量浓度/(ng/mL);  $\text{Ab}_2$ 为抗原抗体结合率为25%的抗体质量浓度/(ng/mL)。

#### 1.3.4.7 $\text{Cd}^{2+}$ 间接竞争ELISA标准曲线的绘制

在1.3.4.1节步骤4)改成配制0、250、500、1000、2000、4000ng/mL系列质量浓度 $\text{Cd}^{2+}$ ; 每孔加入 $10\mu\text{L}$   $100\text{mmol/L}$  EDTA、 $80\mu\text{L}$   $\text{Cd}^{2+}$ 溶液,  $10\mu\text{L}$ 最佳质量浓度的单抗,  $37^{\circ}\text{C}$ 温育1h; 其他相同。

#### 1.3.4.8 单抗与其他金属离子交叉反应实验

将 $\text{Cd}^{2+}$ 换成 $\text{Hg}^{2+}$ 、 $\text{Pb}^{2+}$ 、 $\text{Ba}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$ 、 $\text{Zn}^{2+}$ 、 $\text{Al}^{3+}$ 、 $\text{Ni}^{2+}$ 、 $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Cu}^{2+}$ 等金属离子, 并进行梯度稀释混匀, 其他同1.3.4.1节<sup>[22]</sup>。

各种金属离子的交叉反应率按式(3)计算。

$$\text{交叉反应率}(\text{CR})/\% = \frac{\text{IC}_{50}(\text{Cd}^{2+})}{\text{IC}_{50}(\text{其他金属离子})} \times 100 \quad (3)$$

## 2 结果与分析

### 2.1 Cd-iEDTA-OVA和Cd-iEDTA-BSA鉴定

#### 2.1.1 GFAAS检测 $\text{Cd}^{2+}$ 质量浓度

经GFAAS测得Cd-iEDTA-BSA和Cd-iEDTA-OVA中 $\text{Cd}^{2+}$ 质量浓度分别为 $48.1881\mu\text{g/L}$ 和 $174.6230\mu\text{g/L}$ , 说明 $\text{Cd}^{2+}$ 螯合成功。

#### 2.1.2 UV测定BSA和OVA

##### 2.1.2.1 UV定性分析人工抗原

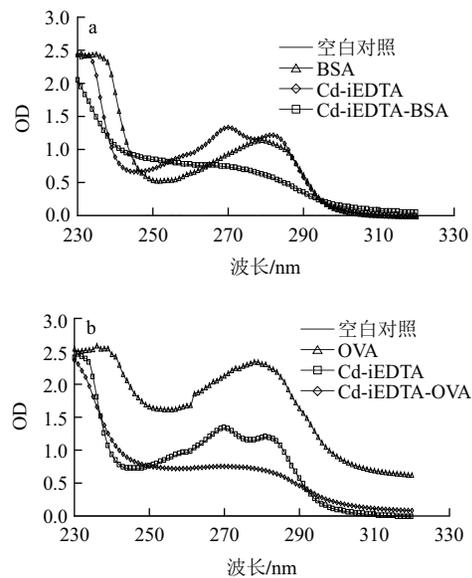


图2 Cd-iEDTA-BSA(a)和Cd-iEDTA-OVA(b)的紫外光谱

Fig.2 UV spectrum of Cd-iEDTA-BSA (a) and Cd-iEDTA-OVA (b)

由图2可知, BSA/OVA的最大特征吸收峰在波长278nm左右, 而半抗原Cd-iEDTA的最大特征吸收峰在波长270nm左右, 而偶联后所得产物Cd-iEDTA-BSA/OVA在270~280nm波长范围内的波形趋向于平缓。因此完全抗原Cd-iEDTA-BSA/OVA同时具备了载体蛋白BSA/OVA和半抗原Cd-iEDTA的吸收特性, 这可以间接证明完全抗原偶联成功。

##### 2.1.2.2 UV定量测定BSA和OVA质量浓度

配制标准质量浓度的BSA和OVA, 在波长278nm处进行测定, 得到BSA的标准曲线方程 $y=0.5879x-0.0104$  ( $R^2=0.9990$ ), BSA质量浓度为 $1.8065\text{mg/mL}$ ; OVA的标准曲线方程 $y=0.9945x-0.0098$  ( $R^2=0.9992$ ), OVA质量浓度为 $1.7892\text{mg/mL}$ , 又BSA和OVA的理论质量浓度为 $2.0\text{mg/mL}$ , 即BSA和OVA的偶联率分别为90.3%和89.5%。直接证明BSA和OVA均偶联成功。

2.2 抗体的鉴定

2.2.1 抗血清的效价测定

四免后采小鼠血清进行效价测定，以OD<sub>450nm</sub>值为纵坐标，抗血清稀释度的对数为横坐标，作图。按照S/N>2.1为阳性计算。绘制5只小鼠的抗血清效价图。由图3可知，当包被质量浓度为2μg/mL时，1<sup>#</sup>小鼠的抗血清稀释倍数为10<sup>5</sup>时，OD<sub>450nm</sub>值为1.097，大于1.0，2<sup>#</sup>、4<sup>#</sup>、5<sup>#</sup>小鼠抗血清稀释倍数为10<sup>4</sup>时，OD<sub>450nm</sub>值均大于1.0，而3<sup>#</sup>小鼠稀释倍数为10<sup>4</sup>时，OD<sub>450nm</sub>值小于1.0，由此可知1<sup>#</sup>小鼠抗血清效价最高；2<sup>#</sup>、4<sup>#</sup>、5<sup>#</sup>效价次之，且彼此接近；3<sup>#</sup>最低，且3<sup>#</sup>小鼠生命力不够旺盛，趋近死亡。所以选取1<sup>#</sup>小鼠进行加强免疫。

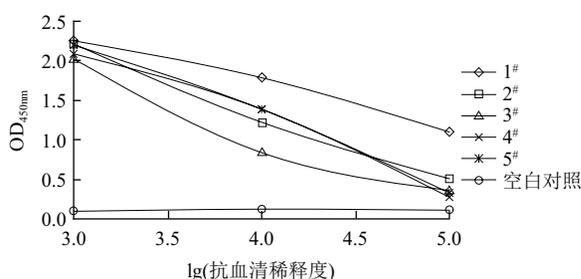


图3 四免后5只小鼠抗血清效价  
Fig.3 UV spectrum of Cd-iEDTA-OVA

2.2.2 抗血清特异性测定

以Cd-iEDTA-BSA和iEDTA-BSA分别检测1<sup>#</sup>小鼠抗血清，由图4可知，在不同稀释度条件下，抗Cd-iEDTA-BSA的OD<sub>450nm</sub>值均高于抗iEDTA-BSA，说明产生了抗Cd-iEDTA的抗体。

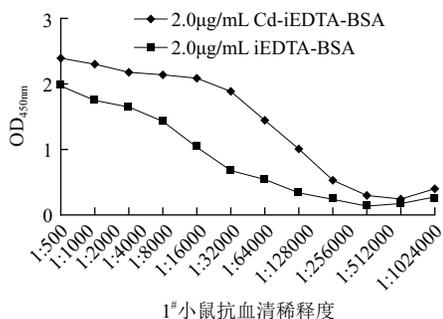


图4 1<sup>#</sup>小鼠细胞株抗血清特异性  
Fig.4 Antiserum titers of five mice after a fourth immunization

2.2.3 细胞融合

细胞融合7d后，用间接ELISA法检测杂交瘤细胞培养上清液。根据上清液OD<sub>450nm</sub>值检测结果，将其与阴性对照和阳性对照，初步判定18个阳性孔，再进行亚克隆，筛选到5株特异性较好的杂交瘤细胞。由图5可知，7E8和7F4分泌抗Cd<sup>2+</sup>抗体的特异性比7E3、7F6和7F9强，故选取7E8和7F4细胞株进行扩大培养及制备腹水型单抗。通过体内诱导法获得了7E8E5、7E8G9、7F4B8、7F4D6和7F4H8共5株单抗。

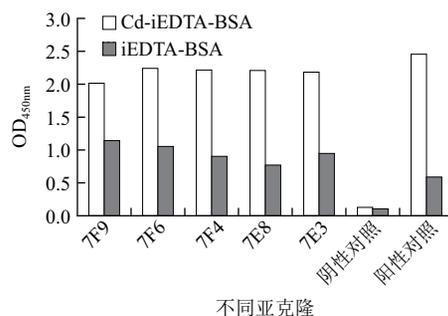


图5 不同亚克隆的差异率  
Fig.5 Antiserum specificity of 1<sup>#</sup> mouse cell line

2.2.4 单抗亚类的鉴定

间接ELISA法鉴定5株单抗，结果表明其亚类均属IgG1型。

2.2.5 棋盘法测抗原抗体最佳工作质量浓度

表1 棋盘法测7E8E5单抗最佳工作质量浓度  
Table 1 Optimal working concentration of 7E8E5 mAb by checkerboard method

抗原包被质量浓度(μg/mL)	lg(腹水型单克隆抗体稀释度)											
	2.70	3.00	3.30	3.60	3.90	4.20	4.51	4.81	5.11	5.41	5.71	6.01
2.8	2.488	2.334	2.290	2.214	1.978	1.874	1.189	0.680	0.366	0.235	0.156	0.148
2.4	2.306	2.199	2.181	2.213	2.074	1.901	1.467	1.001	0.540	0.308	0.226	0.207
2.0	2.266	2.241	2.149	2.103	1.937	1.617	1.143	0.76	0.374	0.226	0.209	0.174
1.6	2.345	2.168	2.199	2.127	1.997	1.726	1.418	0.857	0.428	0.275	0.185	0.163
1.2	2.392	2.301	2.177	2.138	2.087	1.886	1.444	1.008	0.530	0.399	0.298	0.242
0.8	2.374	2.189	2.142	2.155	1.991	1.783	1.405	0.974	0.544	0.323	0.202	0.284
0.4	2.385	2.260	2.137	2.048	2.000	1.738	1.407	0.827	0.539	0.276	0.209	0.416
0.0	0.089	0.064	0.064	0.063	0.071	0.062	0.060	0.055	0.098	0.064	0.087	0.141

注：表中数据均为OD<sub>450nm</sub>值。

由表1可知，当7E8E5细胞株的包被质量浓度是1.2μg/mL，抗体稀释度是1:64000时，OD<sub>450nm</sub>值接近1.0，曲线斜率较好。故初步判定最佳包被抗原质量浓度为1.2μg/mL，最佳单抗稀释度为1:64000。但检测时选择包被质量浓度应略高于最佳包被质量浓度，选为2.0μg/mL。

2.2.6 单抗效价的测定

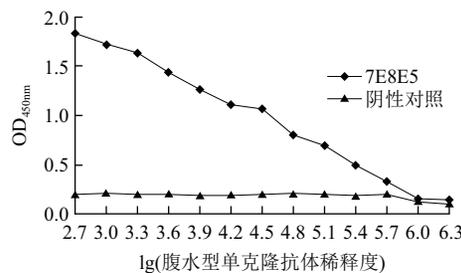


图6 7E8E5腹水型单克隆抗体效价  
Fig.6 Difference between subclones

当抗原Cd-iEDTA-BSA包被质量浓度为2μg/mL时，加入倍比稀释的单抗，同时加入系列稀释的SP2/0腹水

为阴性对照,按照 $S/N > 2.1$ 为阳性计算。由图6可知,测得7E8E5的效价为1:512000。同样测得7E8G9的效价为1:256000,7F4B8的效价为1:128000,7F4D6的效价为1:51200,7F4H8的效价1:6400。由此可知,7E8E5的效价最大。

### 2.2.7 单抗的SDS-PAGE分析

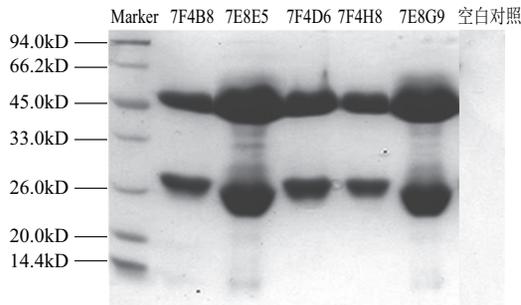


图7 腹水型单抗的SDS-PAGE分析

Fig.7 Titer of ascite monoclonal antibody 7E8E5

由图7可知,根据单抗的相对迁移率计算出7E8E5、7E8G9、7F4B8、7F4D6、7F4H8的 $M_r$ 分别约为67500、67400、68900、75400、75500D。此外,7E8E5、7E8G9、7F4B8、7F4D6和7F4H8株单抗有且只有两条清晰的区带,第1条为重链带,第2条为轻链带,无其他杂链条带。说明抗体纯度高。

### 2.2.8 单抗亲和力的测定

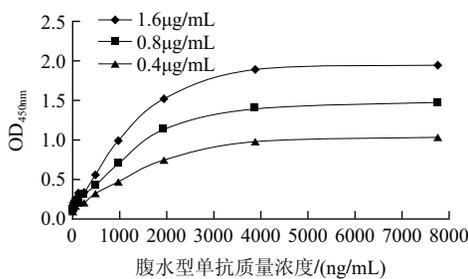


图8 7E8E5单抗亲和力常数测定曲线

Fig.8 SDS-PAGE profile of ascite mAb

使用倍比稀释的抗原铺板,倍比稀释得到的 $OD_{450nm}$ 值对7E8E5单抗的质量浓度作图(图8)。曲线接近平台表示全部抗原被结合,找出 $OD_{450nm}$ 值50%时结合抗体的质量浓度。

根据公式(2)计算出 $K_a(7E8E5)$ 为 $4.55 \times 10^8 L/mol$ ,同理7E8G9、7F4D6、7F4H8、7F4B8的 $K_a$ 分别为 $2.20 \times 10^8$ 、 $2.63 \times 10^8$ 、 $2.03 \times 10^8$ 、 $1.99 \times 10^8 L/mol$ 。其中7E8E5亲和力最高且7E8E5效价也最高,且7E8亚克隆的特异性最强,故选择7E8E5细胞株进行下一步实验研究。

### 2.2.9 $Cd^{2+}$ 间接竞争ELISA标准抑制曲线

以抑制率( $A/A_0$ )为纵坐标, $Cd^{2+}$ 质量浓度的对数作为

横坐标作标准曲线,得到标准曲线方程: $y = -62.007x + 239.97 (R^2 = 0.9916)$ 。以10%抑制率( $IC_{90}$ )时的 $Cd^{2+}$ 质量浓度为最低检测限,约为260ng/mL, $IC_{50}$ 为1150ng/mL,以90%抑制率( $IC_{10}$ )时的 $Cd^{2+}$ 质量浓度为最高检测限,约为5100ng/mL。曲线在260~5000ng/mL范围内趋近直线,相关系数 $R^2 = 0.9916$ 。

### 2.2.10 单抗与其他金属离子的交叉反应

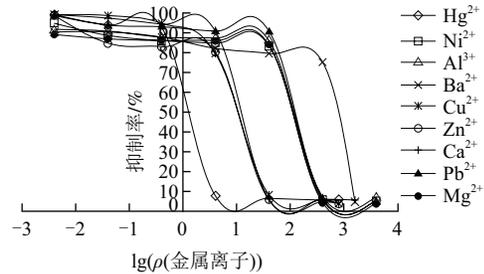


图9 其他各种金属离子的竞争抑制曲线

Fig.9 Affinity constant curves of mAb 7E8E5

由图9可知,将 $Cd^{2+}$ 换成 $Cu^{2+}$ 、 $Zn^{2+}$ 、 $Hg^{2+}$ ,质量浓度梯度为0、0.004、0.04、0.4、4、40、400、800 $\mu g/mL$ ;  $Ba^{2+}$ 、 $Ca^{2+}$ ,质量浓度梯度为0、0.004、0.04、0.4、4、40、400、1600 $\mu g/mL$ ;  $Ni^{2+}$ 、 $Pb^{2+}$ 、 $Mg^{2+}$ 、 $Al^{3+}$ ,质量浓度梯度为0、0.004、0.04、0.4、4、40、400、4000 $\mu g/mL$ ,其他与 $Cd^{2+}$ 相同。

表2 抗体与金属离子交叉反应率

Table 2 Cross-reactivity with other metal ions

金属离子	$Cd^{2+}$	$Hg^{2+}$	$Zn^{2+}$	$Cu^{2+}$	$Ca^{2+}$	$Mg^{2+}$	$Ni^{2+}$	$Al^{3+}$	$Pb^{2+}$	$Ba^{2+}$
$IC_{50}(\mu g/mL)$	1.15	1.27	10.17	10.44	12.15	107.00	107.89	114.52	122.24	657.51
交叉反应率/%	100	91	11	11	9	$\leq 1$	$\leq 1$	$\leq 1$	$\leq 1$	$\leq 0.2$

由表2可知,在ELISA中,抗体对 $Hg^{2+}$ 的交叉较重,对 $Cu^{2+}$ 、 $Ca^{2+}$ 和 $Zn^{2+}$ 交叉较弱,对 $Mg^{2+}$ 、 $Ni^{2+}$ 、 $Al^{3+}$ 、 $Pb^{2+}$ 、 $Ba^{2+}$ 几乎无交叉。

## 3 结论与讨论

制备重金属离子特异性抗体是建立免疫法的关键,而人工抗原的成功制备是制取抗体的前提。由于重金属离子的分子质量较小,结构较简单,没有T/B细胞表位,且带电荷,会引起机体中毒;重金属与螯合剂螯合后形成半抗原,但是免疫原性弱,也不能引起免疫应答反应<sup>[23]</sup>。故选择双功能螯合剂EDTA螯合 $Cd^{2+}$ ,并偶联载体蛋白BSA和OVA制备完全抗原,免疫BALB/c小鼠获得特异性单抗。

SDS-PAGE检测抗体纯度时,每株单抗有且只有2条带(1条重链带,1条轻链),与杨先乐<sup>[24]</sup>、郝亚明<sup>[25]</sup>等的报

道一致,说明抗体纯度较高;若有3条带(1条重链+1条轻链+1条未变性的抗体)说明可能上样前样品变性不彻底;跑出3条以上带说明杂抗体较多,纯度低。

亲和力是指抗体与抗原或半抗原结合的程度,亲和力常数反映了抗体的亲和力,根据James<sup>[26]</sup>研究表明亲和常数为 $10^7\sim 10^{12}$ L/mol抗体亲和力高,亲和常数为 $10^5\sim 10^7$ L/mol亲和力低。本实验单抗亲和常数数量级均达 $10^8$ ,亲和力高。

特异性是衡量抗体质量的标准之一,该单抗与 $Hg^{2+}$ 有较强交叉,与 $Zn^{2+}$ 、 $Cu^{2+}$ 、 $Ca^{2+}$ 、 $Mg^{2+}$ 、 $Ni^{2+}$ 、 $Al^{3+}$ 、 $Pb^{2+}$ 、 $Ba^{2+}$ 交叉较弱或几乎无交叉,与Blake<sup>[27]</sup>、张海棠<sup>[28]</sup>、唐勇<sup>[29]</sup>等研究的结果相近。这可能是由于不同金属-螯合剂复合物之间的结构差异很小,容易产生交叉反应。Jones等<sup>[30]</sup>采用距离矩阵法比较不同金属-螯合剂复合物分子之间晶体结构进行比较,发现Cd-EDTA复合物与Hg-EDTA复合物的三维结构差异最小。

建立了 $Cd^{2+}$ 间接竞争ELISA的检测方法,最佳包被抗原质量浓度为 $2.0\mu g/mL$ ,最佳单抗稀释度为1:64000,  $IC_{50}$ 为 $1150ng/mL$ ,最低检测限为 $260ng/mL$ ,在 $260\sim 5000ng/mL$ 范围内趋近直线( $R^2=0.9916$ ),可通过优化竞争ELISA条件进一步提高该方法的检测限,以扩大应用范围。该方法为生物法快速检测食品和环境 $Cd^{2+}$ 残留提供了一条可行的途径。

#### 参考文献:

- [1] 陈钰,金泰虞. 镉的血管效应研究进展[J]. 劳动医学, 2004, 21(2): 150-152.
- [2] FALCON M, VINAS P, OSUNA E, et al. Environmental exposures to lead and cadmium measured in human placenta[J]. Arch Environ Health, 2002, 57(6): 598-602.
- [3] 宫靖. 镉米杀机[J]. 新世纪周刊, 2011(6): 26-33.
- [4] 中国疾病预防控制中心营养与食品安全所, 卫生部卫生监督中心. GB 2762—2005 食品中污染物限量[S]. 北京: 中国标准出版社, 2005.
- [5] BLAKE D A, BLAKE II R C, KHOSRAVIANI M, et al. Immunoassays for metal ions[J]. Analytica Chimica Acta, 1998, 376: 13-19.
- [6] REARDAN DT, MEARES C F, GOODWIN D A, et al. Antibodies against metal chelates [J]. Nature, 1985, 316: 265-268.
- [7] KHOSRAVIANI M, PAVLOV A R, FLOWERS G C, et al. Detection of heavy metals by immunoassay: optimization and validation of a rapid, portable assay for ionic cadmium[J]. Environ Sci Technol, 1998, 32: 137-142.
- [8] TAWARADA K, SASAKI K, OHMURA N, et al. Preparation of anticadmium-EDTA complex monoclonal antibody and its binding specificity[J]. The Japan Society for Analytical Chemistry, 2003, 52(8): 583-587.
- [9] LIU Gongliang, WANG Jufang, LI Zhiyong, et al. Immunoassay for cadmium detection and quantification[J]. Biomedical and Environmental Sciences, 2009, 22: 188-193.
- [10] DAWISH I A, BLAKE D A. One-step competitive immunoassay for cadmium ions: development and validation for environmental water samples[J]. Analytical Chemistry, 2001, 73: 1889-1895.
- [11] ZHU X, XU L, LOU Y, et al. Preparation of specific monoclonal antibodies (MAbs) against heavy metals: MAbs that recognize chelated cadmium ions[J]. Agric Food Chem, 2007, 55(19): 7648-7653.
- [12] JOHNSON D K. A fluorescence polarization immunoassay for cadmium (II) [J]. Analytica Chimica Acta, 1999, 399: 161-172.
- [13] 朱培坤. 免疫酶技术[M]. 济南: 山东科学技术出版社, 1983: 14-22.
- [14] SNYDER S L, SOBOCINSKI P Z. An improved 2,4,6-trinitrobenzenesulfonic acid method for the determination of amines[J]. Anal Biochem, 1975, 64(1): 284-288.
- [15] 庞硕权. 重金属镉单克隆抗体的制备及其免疫学特性研究[D]. 临安: 浙江林学院, 2009: 36-38.
- [16] 向军俭, 刘小青, 廖俊珊, 等. 抗碱性纤维细胞生长因子单克隆抗体的制备及特异性分析[J]. 中国免疫学杂志, 1998, 14(5): 371-374.
- [17] REIK L M, MAINES S L, RYAN D E, et al. A simple, non-chromatographic purification procedure for monoclonal antibodies. Isolation of monoclonal antibodies against cytochrome P450 isozymes[J]. Immunol Methods, 1987, 100(1/2): 123-129.
- [18] XIANG J J, ZHAI Y F, TANG Y, et al. A competitive indirect enzyme-linked immunoassay for lead ion measurement using mAbs against the lead-DTPA complex[J]. Environ Pollut, 2010, 158(5): 1376-1380.
- [19] 袁道强, 黄建华. 生化化学实验和技术[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2006: 196-198.
- [20] 徐志凯. 实用单克隆抗体技术[M]. 西安: 陕西科学技术出版社, 1992: 82-92.
- [21] 万文徽. 单克隆抗体亲和常数的测定[J]. 单克隆抗体通讯, 1993, 9(2): 72-75.
- [22] 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.
- [23] 江天久, 牛涛. 重金属污染物的免疫学检测技术研究进展[J]. 生态环境, 2005, 14(4): 590-595.
- [24] 杨先乐, 黄宣运, 胡鲲, 等. 环丙沙星单克隆抗体的制备及鉴定[J]. 食品科学, 2010, 31(12): 16-20.
- [25] 郝亚明, 周玉, 卢士英, 等. 重金属镉单克隆抗体的制备[J]. 中国实验诊断学, 2011, 15(5): 822-825.
- [26] JAMES S W G. Monoclonal antibodies: principles and practice[M]. London: Academic Press Inc Ltd, 1983: 142-147.
- [27] BLAKE D A, CHAKRABARTI P, KHOSRAVIANI M, et al. Metal binding properties of a monoclonal antibody directed toward metal-chelate complexes[J]. J Biol Chem, 1996, 271(44): 27677-27685.
- [28] 张海棠, 王申峰, 姜金庆, 等. 镉离子单克隆抗体的制备及其阻断ELISA检测方法的建立[J]. 中国生物制品学杂志, 2011, 24(2): 208-212.
- [29] 唐勇, 王建华, 向军俭, 等. 镉离子单克隆抗体的鉴定及竞争ELISA的建立[J]. 免疫学杂志, 2009, 25(2): 214-218.
- [30] 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.