

软骨藻酸多克隆抗体的制备

刘元嫒, 程金平, 高利利, 徐 玮, 吴浩东

(上海交通大学 环境科学与工程学院, 上海 200240)

摘要: 为建立软骨藻酸(DA)的免疫检测法, 本研究采用活泼酯法将 DA 与载体蛋白 KLH(BSA)偶联形成完全免疫抗原(包被抗原), 并通过紫外光谱扫描证明偶联成功与否。用完全免疫抗原 DA-KLH 对新西兰白兔进行免疫, 间接 ELISA 法测定血清效价。实验结果表明偶联成功, 经过 19 周免疫后血清效价达到 1:1600, 纯化后获得效价为 1:800 的多克隆抗体, 同时也间接证明了合成的完全抗原具有免疫原性, 为以后建立免疫分析法奠定了基础。

关键词: 软骨藻酸; 多克隆抗体; 活泼酯法

中图分类号: R392-33

文献标识码: A

文章编号: 1000-3096(2010)12-0067-03

软骨藻酸(Domoic Acid, DA)是赤潮毒素失去记忆性贝毒(Amnesic Shellfish Poisoning, ASP)的主要成分。中毒后可引起腹泻、呕吐、严重者可致意识混乱、记忆丧失。DA 最早于 1958 年从树枝软骨藻(*Chondria armata*)中分离, 并于随后相继分离了 A-H 八种异构体^[1]。其中异构体 A、B、C 的毒性远低于 DA 本身^[2]。DA 主要通过谷氨酸受体结合引发一系列生化反应, 从而导致神经元损伤及细胞死亡^[3]。自加拿大爱德华王子岛爆发了因食用被 DA 污染的紫贻贝而导致人类中毒事件后, 引起了人们对贝类产品中 ASP 检测的重视, 各国先后制定了 DA 的安全限量为 20 $\mu\text{g/g}$ 贝肉^[4]。目前 DA 较为普遍的检测方法有小白鼠生物检测法、HPLC-UV 法及免疫检测法。小白鼠生物法简单易行, 但其只能毒素的整体水平、精确度低、检测限高、易受其他种类毒素干扰、无法满足人们对食品安全的检测需求; HPLC-UV 法作为水产及水产加工品专业委员会(Codex Committee on Fish and Fishery Products, CCFFP)推荐的方法^[5]虽然具有灵敏度高、检测限低的优点, 但因其仪器昂贵、对分析人员的要求高、前处理繁琐而不适用于基层检测单位对大量样品的分析。而免疫检测如 ELISA 法, 则兼具检测便利快速、精确度较高等特点而已被广泛用于环境污染及农药兽药残留的检测^[6-8]。由于 DA 分子量小、结构简单无法刺激动物产生抗体, 因此目前为止还没有成熟的商品化检测试剂盒。作者采用活泼酯法将 DA 与载体蛋白偶联, 成功制备了完全抗原并免疫新西兰兔获得多克隆抗体, 为建立 DA 检测试剂盒奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 药品

软骨藻酸(DA)购自 ALEXIS 公司, 纯度为 98%; 牛血清白蛋白(BSA)、钥孔血蓝蛋白(KLH)、弗式完全佐剂(FCA)、弗式不完全佐剂(FIA)、二甲基亚砜(DMSO)、1-(3-二甲基氨基丙基)-3-乙基 碳化二亚胺盐酸盐(EDC-HCl)均购自 Sigma 公司; N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)、Tween-20、四甲基联苯胺(TMB)、96 孔酶标板、透析袋(截留分子量 8000)均购自上海生工; 辣根过氧化物酶标记羊抗兔 IgG 购自北京博奥森生物技术有限公司; Millipore 超滤管(截留分子量 10000); 无水乙醇、柠檬酸、过氧化氢、磷酸氢二钠、磷酸二氢钾、氯化钠、氯化钾、碳酸钠、碳酸氢钠、浓硫酸等均为分析纯, 购自国药集团化学试剂有限公司。

1.1.2 实验仪器

紫外可见分光光度计; Multiskan Mk 3 酶标仪(芬兰雷勃); 隔水式恒温培养箱 GNP-9050 型; HANGPING FA2004 电子分析天平(上海精密科学仪器有限公司); 单通道微量移液器(Enppendorf); 12 通道微量移液器(MedDragon);

收稿日期: 2010-02-22; 修回日期: 2010-06-13

基金项目: 上海科委科技攻关项目(08DZ1206302)

作者简介: 刘元嫒(1985-), 女, 硕士研究生, 主要研究方向为环境健康, Email: yy_liu@sjtu.edu.cn; 程金平, 通信作者, 博士, 副教授, 电话: 021-54742823, 13916873206, E-mail: jpcheng@sjtu.edu.cn

1.1.3 实验动物

新西兰大白兔数只, 雌性, 体质量 1.8~2 kg, 购自上海陈行实验用兔有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 完全免疫抗原与包被抗原的合成

1 mg DA 溶于少量溶剂中(DMSO:水=1:9), 加入 0.8 mg EDC·HCl(10 mg/mL)、1.2 mg NHS(20 mg/mL) 及少量反应缓冲液(0.1 mol/L PBS, pH7.0), 置于 25 °C 反应 2 h 后转移至 4 °C 冰箱内反应过夜。加入用稀释缓冲液(0.01 mol/L PBS, pH7.0)溶解的 KLH 或 BSA 2 mg, 并补加少量反应缓冲液, 置于 25 °C 反应 3 h 后, 转移入超滤管 4500 r/min 离心 15 min, 除去未反应完的小分子。适度稀释后, 取少量反应物用紫外分光光度计检测、剩余药品分装后于 -20 °C 保存。

1.2.2 抗体的制备

新西兰白兔在动物房内适应性驯养一周后, 选择身体健康的白兔, 从耳静脉抽取 2~4 mL 血, 分离阴性血清, -20 °C 冻存备用。一周后进行免疫, 首免用 200 μg DA-KLH, 同时分别用 KLH 和生理盐水作为免疫原作为对照。将偶联物稀释至 0.5 mL, 采用注射器双推法, 与等体积弗式完全佐剂充分乳化, 颈背部多点皮内注射。三周后进行二免, 剂量方法同首免, 与弗式不完全佐剂混合乳化。以后以相同剂量与方法每隔两周免疫一次。从三免开始, 每次免疫一周后, 耳静脉取血 2 mL, 测定效价。待效价达到一定程度后, 用等体积的稀释缓冲液稀释后, 耳静脉注射加强免疫。一周后心脏取血, 37 °C 放置 1 h, 4 000 r/min、4 °C 离心 15 min 分离

血清。采用辛酸-硫酸铵法对抗血清纯化, 用 0.01 mol/L PBS(pH7.4)透析 3 天除盐, 用少量 0.01 mol/L PBS 稀释后分装, -20 °C 冻存备用。

1.2.3 抗体效价的测定

采用间接酶联免疫吸附法测定抗体效价。用 DA-BSA 作包被抗原, 以碳酸盐缓冲液(pH 9.6)做梯度稀释, 每孔 100 μL, 4 °C 包被过夜; 弃去残液后, 每孔加 200 μL PBS-T(含 0.05% Tween-20 的 0.01 mol/L PBS 溶液, pH 7.4), 振荡洗涤 3 次, 每次 3 min; 每孔加 200 μL 封闭液(含 0.05% BSA 的 0.01 mol/L PBS), 37 °C 封闭 2 h; 拍干板内液体后, 加梯度稀释的血清, 每孔 100 μL, 37 °C 孵育 1 h; 洗板 3 次; 加入辣根过氧化酶标记的二抗, 每孔 100 μL, 37 °C 孵育 1 h; 洗板 5 次; 每孔加 100 μL TMB-H₂O₂ 显色液(pH 5.0), 显色 10 分钟后, 每孔加 50 μL 2 mol/L H₂SO₄ 终止液, 用酶标仪测定波长 450 nm 及 630 nm 处的光吸收值。

2 结果

2.1 完全抗原的偶联与鉴定

采用活泼酯法^[7,9,10]将 DA 上的羧基先与 NHS 及 EDC 反应, 先生成酯类中间产物, 然后与载体蛋白上的自由氨基反应形成由酰胺键相连的偶联物。反应方程式如图 1。

将合成完的偶联物、DA、KLH、BSA 稀释, 用紫外光谱进行特征扫描。如图 2、图 3 可见 DA 的特征吸收峰在 242 nm 处, 载体蛋白 KLH 及 BSA 的特

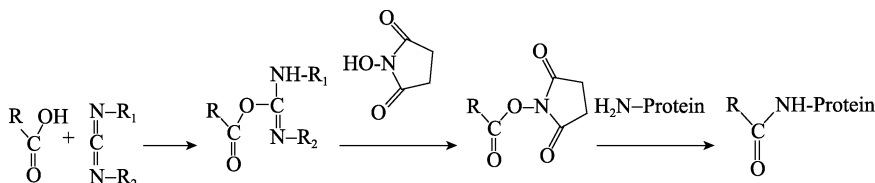


图 1 DA 与载体蛋白的偶联

Fig. 1 Reactions between DA and carrier protein

征吸收峰在 280 nm 处, 而合成的偶联物的紫外光谱扫描的特征谱线与 DA、KLH 及 BSA 的谱线的峰型及最大吸收峰有较大的区别, 可定性证明活泼酯法能成功地将载体蛋白和 DA 进行偶联。

2.2 抗体效价的测定

以 DA-BSA 为包被抗原, 用棋盘法测定血清效价。P/N 2.1 为阳性判断终点, 以判为阳性的最高稀释倍数为终点效价, 免疫 8 次后, 效价变化如图 4。在八次免疫过后, 注射 DA-KLH 的白兔血清中抗

体效不再增加, 滴度为 1:1600, 间接证明了合成的完全免疫抗原具有一定的免疫原性。经辛酸-硫酸铵二步法纯化后抗体各个滴度的吸光度值如表 1 所示。纯化后抗体效价为 1:800, 比纯化前下降一个滴度。

3 讨论

本研究采用了活泼酯法将 DA 与载体蛋白偶联, 通过紫外光谱扫描发现偶联物与单体的谱图有较大地差异, 故而定性证明了成功合成了免疫抗原

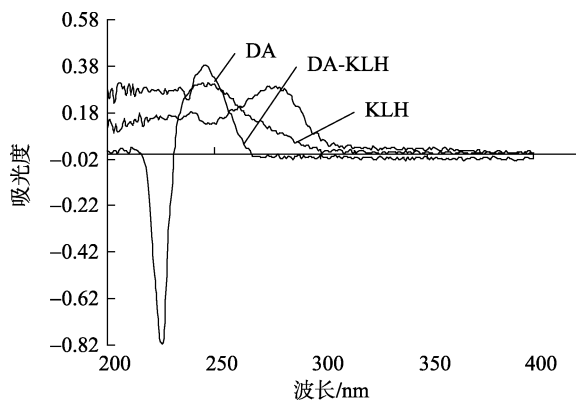


图 2 完全免疫抗原 DA-KLH 紫外光谱扫描图

Fig. 2 UV absorption of DA-KLH

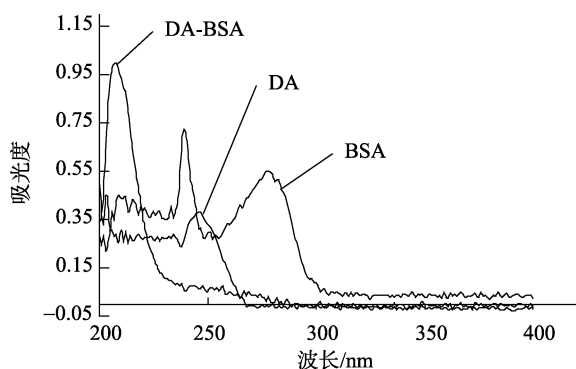


图 3 包被抗原 DA-BSA 紫外光谱特征扫描图

Fig. 3 UV absorption of DA-BSA

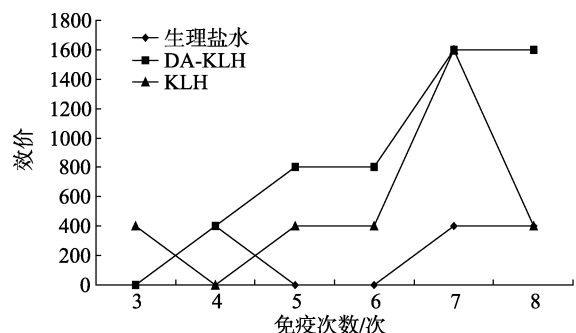


图 4 血清中抗体效价的变化

Fig. 4 Rabbit serum titers determined by indirect ELISA

DA-KLH 及包被抗原 DA-BSA, 并使用 DA-KLH 对新西兰白兔进行免疫。经过八次共 19 周的免疫, 用间接 ELISA 法测定效价, 效价达到 1:1600, 纯化后获得效价为 1:800 的抗体。

在诱导动物产生特异性抗体的过程中影响因素颇多, 除了外部环境、动物自身的免疫应答能力等因素外, 抗原本身的免疫原性及免疫特性最为重要。小分子半抗原的免疫特性的好坏主要取决于基团结构的复杂性、结构中环的数目、杂原子的数目和结构的不均一性^[11]。而半抗原本身又不具备免疫原性, 必须与载体蛋

白偶联后才可刺激动物产生抗体。DA 上带有 3 个羧基均可与载体蛋白偶联, 故偶联的时候具有较大的随机性, 易将杂环包裹从而降低特性。但由于 DA 价格昂贵, 不适于对其进行基团修饰, 因此根据文献报道^[10], 进行直接偶联, 同时对其方法做了适当改进, 使反应中尽可能得不损失抗原。免疫后结果如图 4 及表 1, 实验表明, 选择了免疫原性较好的 KLH 作为免疫抗原的载体蛋白, 对实验动物进行常规免疫, 能够刺激动物产生针对 DA 的抗体, 利用间接 ELISA 法检测的效价也尚可, 纯化后得到可以使用的抗体, 为今后进一步建立 ELISA 检测方法奠定了基础。

表 1 纯化后抗体效价测定结果

Tab. 1 Titers of purified serum by different immunogens

抗体稀释 倍数	KLH 组	DA-KLH 组	生理盐水组
	$A_{450-630}$	$A_{450-630}$	$A_{450-630}$
1:400	0.375	0.878	0.351
1:800	0.215	0.557	0.252
1:1600	0.117	0.255	0.198
1:3200	0.111	0.160	0.151
1:6400	0.061	0.097	0.117
阴性 血清	0.166	0.194	0.322
空白	0.024	0.074	0.149

参考文献:

- [1] Zaman L O, Arakawa A, Shimosu Y, *et al.* Two new isomers of domoic acid from a red alga, *Chondria armata*[J]. *Toxicon*, 1997, **35**(2): 205-212.
- [2] Munday R, Holland P T, McNabb P, *et al.* Comparative toxicity to mice of domoic acid and isodomoic acids A, B and C[J]. *Toxicon*, 2008, **52**(8): 954-956.
- [3] Lefebvre K A, Robertson A. Domoic acid and human exposure risks: A review[J]. *Toxicon*, 2009, **54**(10): 1016-1021.
- [4] 吴多加, 李凤琴. 软骨藻酸与人类健康关系研究进展[J]. *卫生研究*, 2005, **34**(3): 378-381.
- [5] FAO, WHO. Report of the twenty-ninth session of the codex committee on fish and fishery products 31st session[R]. 2008.144.
- [6] 沈红, 李焕荣, 吴国娟, 等. 氨基磺胺多克隆抗体的制备[J]. *中国兽药杂志*, 2006, **40**(4): 13-16.
- [7] 戴焯, 李方实, 孙峰. 甲磺隆人工抗原的合成及多克隆抗体的制备[J]. *南京工业大学学报*, 2007, **29**(3): 39-42.
- [8] 董玉华, 刘仁沿, 许道艳, 等. 酶联免疫吸附方法分析海水和贝类中的滴滴涕及代谢物[J]. *水产科学*, 2007, **26**(4): 229-233.
- [9] 余宇燕, 唐舒雅, 庄惠生. 五氯酚人工抗原的合成与多克隆抗体的制备[J]. *农业环境科学学报*, 2007, **26**(1): 314-317.
- [10] Yu F Y, Liu B H, Wu T S, *et al.* Development of a sensitive enzyme-linked immunosorbent assay for the determination of domoic acid in shellfish[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2004, **52**(17): 5334-5339.
- [11] 吴瑜, 胡昌勤, 金少鸿. 半抗原免疫分析研究进展[J]. *药物分析杂志*, 2007, **27**(5): 771-776.

(下转第 74 页)