

海洋毒素大田软海绵酸完全抗原的制备与分析

卢士英¹, 周 玉¹, 任洪林¹, 霍方珍¹, 潘风光¹, 柳增善¹, 于师宇², 于 光³

(1. 人兽共患病教育部重点实验室, 吉林大学人兽共患病研究所, 吉林 长春 130062; 2. 福清出入境检验检疫局, 福建 福清, 350300; 3. 吉林出入境检验检疫局, 吉林 长春 130062)

摘要: 为了建立大田软海绵酸(Okadaic acid, OA)的免疫学检测方法, 利用活泼酯法将 OA 分子中的羧基与载体蛋白上的氨基偶联, 人工制备 OA 的免疫抗原(OA-IgG)和检测抗原(OA-BSA), 经电泳、动物实验及 ELISA 法进行了鉴定, 完全抗原的偶联成功, 为利用杂交瘤技术制备 OA 的单克隆抗体和海产品 OA 免疫学检测方法奠定了良好的基础。

关键词: 大田软海绵酸(okadaic acid, OA); 活泼酯法; 抗原偶联

中图分类号: X56

文献标识码: A

文章编号: 1000-3096(2009)02-0046-04

大田软海绵酸(Okadaic acid, OA)是一种重要的小分子海洋聚醚类毒素, 多由海洋甲藻, 如利马原甲藻(*Prorocentrum lima*)、渐尖鳍藻(*Dinophysis acuminata*)、倒卵形鳍藻(*Dinophysis fortii*)^[1]等产生, 常蓄积于贝类等海洋生物体内, 并经食物链引起多种海产品的以腹泻为主要特征的食物中毒, 因此对 OA 的检测对人们的生命安全和对各种海产品的开发利用至关重要。近年来以单(多)克隆抗体为探针的免疫学检测方法已用于多种海洋腹泻贝毒素的检测。但 OA 的相对分子质量只有 805, 是半抗原, 无免疫原性, 不能够刺激机体产生抗 OA 的抗体, 因此必须与载体蛋白相连制备成完全抗原才能够刺激机体发生免疫应答从而产生用于检测的抗体。通常用于偶联的蛋白有人 IgG、小牛血清白蛋白(BSA)、卵清蛋白(OVA)等^[2,3]。国外对 OA 类的小分子抗原的研究较多, 并已研制了商品化的 ELISA 检测试剂盒, 如日本 UBE 公司生产的 DSP-Check[®] ELISA^[4]和加拿大的 Rougier Bio-Tech[®] ELISA^[5]检测试剂盒, 对 OA 及其衍生物的检测具有很高的灵敏性。但国内有关这方面的研究报道较少, 为了开发研制具有我国自主知识产权的用于检测 OA 的试剂盒, 作者利用活泼酯法, 制备了 OA 的完全抗原, 并将其免疫小鼠获得了高效价抗血清, 这为利用杂交瘤技术制备 OA 单抗及研发海产品中 OA 等海洋腹泻性贝毒检测试剂盒奠定了良好的基础。

1 材料与方 法

1.1 主要试剂及仪器设备

OA 单克隆抗体, 本课题组制备并保存; OA 标准品 ALEXIS[®] BIOCHEMICALS 产品, 用 N, N-

DMF 稀释成 100 mg/L 贮存液; 人 IgG、牛血清白蛋白(BSA)、N-羟丁二酰亚胺(N-hydroxysuccinimide)、N, N 二环乙烷碳二亚胺(N, N-dicyclohexylcarbodiimide, DCC)、N, N-二甲基甲酰胺(N, N-dimethylformamide, DMF)、福氏完全佐剂、福氏不完全佐剂、邻苯二胺(OPD)等为 Sigma 公司产品; 离心超滤管为 MILLPORE 产品; 辣根过氧化物酶标记羊抗鼠 IgG 购于鼎国生物技术有限公司(北京), 其他所用试剂均为国产分析纯。

1.2 实验动物

健康雌性 BALB/c 小鼠(8 周龄)购自卫生部长春生物制品研究所。

1.3 完全抗原制备

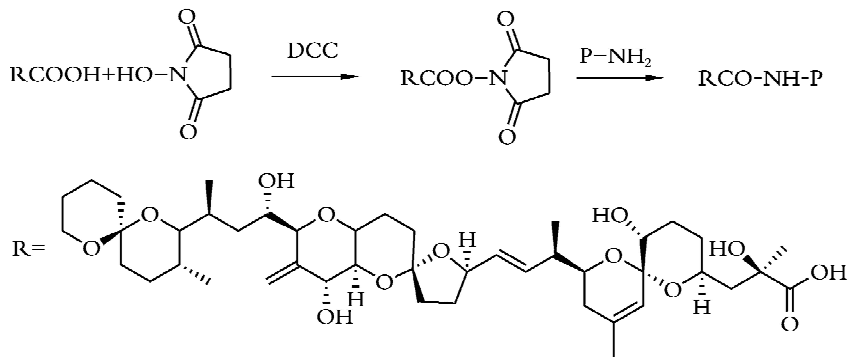
原理是利用 OA 分子中的 COOH-基团在 N, N-二环己基碳二亚胺的作用下与 N-羟基琥珀酰亚胺反应生成活泼脂衍生物, 后者与载体蛋白上的氨基反应, 形成以酰氨键连接的偶合物, 反应的过程如下:

偶联抗原 OA-IgG(用于免疫)和 OA-BSA(用于检测)具体制备方法参照文献^[3], 稍作改动, 操作方法如下: 1 mg OA、0.155 mg N-羟丁二酰亚胺、0.285 mg N, N 二环乙烷碳二亚胺于 60 μ L DMF 中混均, 室温孵育 2 h, 其中 20 μ L 反应液加入 0.75 mg IgG(溶于 50 μ L 0.1 mol/L NaHCO₃·NHCO₃), 另外 40 μ L 反应

收稿日期: 2006-09-20; 修回日期: 2006-12-27

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30671762); 国家质检总局资助项目(2003IK044, 2008IK003); 吉林大学农学部博士启动基金资助项目(4305050102C8)

作者简介: 卢士英(1973-), 女, 吉林梨树人, 讲师, 主要从事食品安全研究, 电话: 0431-87836716. E-mail: lushiving1129@163.com; 柳增善, 通信作者, 电话: 0431-87836703, E-mail: zslu1959@163.com



液加入 0.95 mgBSA(溶于 50 μ L 0.1 mol/L NaHCO₃)，室温继续孵育 2 h，未反应的物质通过超滤离心去除，将偶联抗原用适当体积的 PBS(pH 7.4)溶解，使其质量浓度为 1 000 mg/L，-20 $^{\circ}$ C 保存备用。同时作过程载体蛋白的对照(即不加 OA)。

1.4 偶联抗原偶联效果分析

1.4.1 偶联抗原琼脂糖凝胶电泳分析

用 TAE 电泳缓冲液配制 1% 琼脂糖凝胶，将载体蛋白、过程载体蛋白及偶联抗原 5 μ L 与等量上样缓冲液(0.04% 溴酚蓝、6.67% 蔗糖水溶液)混匀后点样。电压为 100 V，电泳时间 30 min。电泳结束后用 20% 三氯乙酸固定 30 min，考马斯亮蓝 R-250 染色，脱色液(25 mL 95% 乙醇，8 mL 乙酸，67 mL 蒸馏水)脱色^[6]，UVI 凝胶自动成像系统进行拍照。

1.4.2 偶联抗原 SDS-PAGE 电泳分析

用常规方法^[7]配制质量分数为 10% 的分离胶，将载体蛋白、过程载体蛋白及偶联抗原 10 μ L 与等量上样缓冲液(0.04% 溴酚蓝、6.67% 蔗糖水溶液、4% SDS 和 10% 的 2-巯基乙醇)混匀后点样。积层胶电压为 70 V，待指示剂移到分离胶后，将电压升至 120 V，指示剂移出凝胶后关闭电源。三氯乙酸固定，考马斯亮蓝 R-250 染色、脱色，UVI 凝胶成像同上。

1.4.3 偶联抗原免疫效果分析

采用两种免疫方案免疫健康 BALB/c 雌性小鼠^[8]，一种是大剂量长周期免疫方案：即首次免疫用 100 μ g OA-IgG 与等量福氏完全佐剂混匀腹腔注射，3 周后再用 100 μ g OA-IgG 与等量福氏不完全佐剂混匀，腹腔免疫。此后每两周用 50 μ g OA-IgG 重复腹腔加强免疫；另一种是小剂量短周期免疫方案：即首次免疫用 100 μ g OA-IgG 与等量福氏完全佐剂混匀分 3 次腹腔注射，间隔 2 d，3 周后再用 100 μ g OA-IgG 与等量福氏不完全佐剂混匀，腹腔分 3 次免疫。此后每 2 周用 50 μ g OA-IgG 腹腔加强免疫。从第 3 次免疫后开始，每次免疫后第 10 天开始利用偶联的检测抗原 OA-BSA ELISA 法跟踪检测抗体效价。

1.4.4 偶联抗原分子结合比分析

用固相抗原与游离抗原共同竞争结合抗体原理建立的以抗 OA 的单克隆抗体为探针的间接竞争抑制 ELISA 方法对偶联抗原作定量分析，具体 ELISA 程序如下：用 0.05 mol/L，pH9.6 的碳酸盐缓冲液将包被抗原 OA-BSA 稀释到 1 mg/L，每孔 100 μ L 包被 96 孔酶标板，4 $^{\circ}$ C 过夜；用 PBST 洗板 3 次，每次 3 min；加入 OA 偶联物与相同体积的 OA 单克隆抗体(1 : 160 000)各 50 μ L，37 $^{\circ}$ C 反应 30 min；PBST 洗板 3 次；每孔加入 100 μ L 辣根酶标记羊抗小鼠 IgG(1 : 4 000)，37 $^{\circ}$ C 反应 30 min，PBST 洗板 3 次；每孔加 100 μ L 邻苯二胺(OPD)37 $^{\circ}$ C 15 min 显色；每孔加入 50 μ L 2 mol/L 浓硫酸终止液，酶联免疫检测仪测定 490 nm 处吸光值。将吸光值代入标准工作曲线计算偶联抗原中 OA 的量，结合分子质量计算二者的分子结合比(假定载体蛋白不损失)。

2 结果

2.1 偶联物的琼脂糖凝胶电泳结果

偶联物经 1% TAE 琼脂糖凝胶电泳，结果见图 1 和图 2。载体蛋白的处理对照样品与载体蛋白相比，其电泳轨迹未有明显变化，但偶联抗原的电泳轨迹与其相比却发生了明显变化，与 BSA 偶联后其泳带变得较为分散，与 IgG 偶联后电泳的方向改变。



图 1 OA-BSA 琼脂糖凝胶电泳分析
Fig.1 Analysis of OA-BSA by agarose gels
1. BSA;2. DDC-treated BSA;3. OA-BSA



图2 OA-IgG 琼脂糖凝胶电泳分析

Fig. 2 Analysis of OA-IgG by agarose gels

1. IgG; 2. 过程 IgG; 3. OA-IgG

1. IgG; 2. DDC-treated IgG; 3. OA-IgG

2.2 偶联物的 SDS-PAGE 凝胶电泳结果

偶联物经 10% SDS-PAGE 凝胶电泳, 结果见图 3 和图 4。偶联抗原与载体蛋白的处理对照样品和载体蛋白相比, 迁移速度有所减慢。



图3 OA-BSA SDS-PAGE 分析

Fig. 3 Analysis of OA-BSA by SDS-PAGE

1. BSA; 2. 过程 BSA; 3. OA-BSA

1. BSA; 2. DDC-treated BSA; 3. OA-BSA₃



图4 OA-IgG SDS-PAGE 分析

Fig. 4 Analysis of OA-IgG by SDS-PAGE

1. IgG; 2. 过程 IgG; 3. OA-IgG

1. IgG; 2. DDC-treated IgG; 3. OA-IgG

2.3 偶联抗原免疫效果分析

将偶联的免疫抗原采用两种免疫方案免疫小鼠, 三免后用检测抗原间接 ELISA 法跟踪检测, 7 d 后均有抗体产生, 10 d 之后效价可达 1 : 12 800 和

1 : 25 600 (对照抗体 1 : 200 稀释), 如图 5。

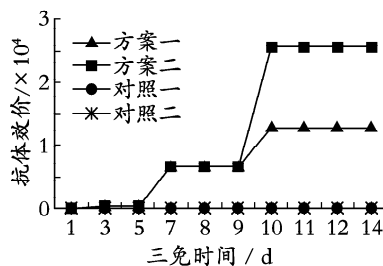


图5 两种免疫方案抗体效价变化曲线

Fig. 5 Antibody titer change curve of two immunizing scheme

2.4 偶联抗原分子结合比分析

利用间接竞争抑制 ELISA 法对偶联抗原中 OA 的量作定量测定, 将所得吸光值代入标准工作曲线计算 OA 的量, 并根据相对分子量计算得 OA (805 U) 与载体蛋白 BSA (66 000) 和 IgG (160 000) 的分子结合比分别为 8 : 1 和 24 : 1。

3 讨论

OA 等海洋生物毒素多为小分子半抗原, 必须将其偶联到大分子载体蛋白上才能刺激机体产生针对小分子的抗体。偶联的方法很多, 对于含羧基的半抗原, 常采用混合酸酐法、活泼酯法或碳二亚胺法; 对于含氨基的半抗原, 则多采用戊二醛法或重氮化; 羟基半抗原则可直接与丁二酸酐衍生后再与蛋白质交联; 巯基半抗原则可通过同源或异源双功能试剂交联; 而酮基半抗原则常用氨基乙酐化^[9]。

OA 是 38 碳的聚醚类小分子毒素, 分子中含有一个羧基, 对与这类含羧基的小分子半抗原偶联时常用 3 种方法, 原理如下: (1) 混合酸酐法^[10]: 半抗原的羧基在三甲胺存在下, 与氯甲酸异丁脂反应, 生成混合酸酐活泼中间体, 然后与蛋白质上的伯氨基反应, 以酰胺键使半抗原与蛋白质连接; (2) 碳二亚胺法^[11]: 碳二亚胺 (R-N=C=N-R) 是一种很强的脱水剂, 能使羟基和氨基间脱水形成酰胺键, 在反应时, 活化的毒素与碳二亚胺反应生成一个加成中间产物, 然后再与蛋白质上的游离氨基反应形成毒素-蛋白质连接物。(3) 活泼酯法^[12]: 半抗原的羧基在 N, N'-二环乙基碳二亚胺 (又称 DCC, 是有机合成和医药制造工业常用的脱水剂, 它可以使两个本来不能反应的分子, 脱水形成化学键) 作用下, 与 N-羟基琥珀酰亚胺反应生成活泼酯, 然后与蛋白质的氨基交联。此法是对碳二亚胺法的改进, 避免了蛋白分子间的交联。

本试验采用活泼脂法,在 DCC 作用下通过 N-羧基琥珀酰亚胺作为中间物将小分子毒素 OA 偶联在大分子载体蛋白 IgG 和 BSA 上,OA 不溶于水,而偶联反应是在水溶液中进行的,所以在此活泼酯法中需要加一定比例的 DMF,保证反应在酯相中进行。由于 OA 标准品很难制备,价格极其昂贵,此反应体积积极其微量,因此偶联后未反应的小分子物质及副产物通过超滤离心法去除,以避免传统透析法对样品的浪费,偶联产物经琼脂糖凝胶电泳法检测,与对照相比有明显不同,BSA 与 OA 偶联后轨迹变得分散,分析是因为每个 BSA 分子上偶联的 OA 分子多少不同所致;而 IgG 与 OA 偶联后运动方向与 IgG,过程 IgG 明显不同(与通常电泳方向相反),IgG 作为蛋白质在电泳中比较特殊,4 个亚型有不同的表现。G3 和 G4 与一般蛋白无异,泳向阳极;而 G1 和 G2 则因其带电荷少,受电渗的作用力大于电泳,所以被水分子携裹向阴极移动^[13]。但由于 OA 的偶联,中和了蛋白质的部分正电荷,使其带上了负电而移向阳极,因此导致偶联物与对照相比运动方向相反。为了验证以上分析,作者对两组偶联物进行了变性聚丙烯酰胺凝胶电泳,消除电荷的影响,根据分子质量来判断是否偶联成功,电泳结果表明两组均因为 OA 的引入使载体蛋白分子质量增大从而使偶联 OA 的载体运动速度均减慢。但无论采用何种电泳检测方法,都能够充分说明完全抗原制备成功;由于 OA 没有紫外吸收^[14],不能通过常用的紫外分光光度法测定分子的结合比,但通过建立的竞争抑制 ELISA 法定量分析 OA 与载体蛋白的分子结合比,结果表明每个载体分子均与多个 OA 分子结合。研究表明载体所连接的半抗原并非越多越好,通常认为连接 5~40 个半抗原分子均可达到较好的免疫效果,覆盖的半抗原过多时会影响载体与淋巴细胞或巨噬细胞表面受体结合,同样也影响免疫相关蛋白与载体接近,不利于抗体产生,作者所获偶联抗原结合比例较合适,且将偶联的免疫抗原利用两种免疫方案经 3 次免疫 BALB/c 雌性小鼠后获得的抗血清经检测抗原 ELISA 法检测效价均可以达到 4 000 以上,进一步说明制备的偶联抗原是成功的,OA 已经成为载体蛋白上的一个抗原表位,并引发了机体的免疫应答系统,产生了抗 OA 的抗体,此种免疫脾细胞的获得为下步的细胞融合及杂瘤细胞株的建立奠

定了良好的基础。

参考文献:

- [1] 谢金镇,刘广发.介核生物分子生物学研究进展[J].台湾海峡,2003,22(3):386-394.
- [2] Levine L, Fujiki H, Yamada K, *et al.* Production of antibodies and development of a radioimmunoassay for okadaic acid[J]. *Toxicon*, 1988,26:1 123-1 128.
- [3] Matsuura S, Kita H, Takagaki Y. Specificity of mouse monoclonal anti-okadaic antibodies to okadaic acid and its analogs among diarrhetic shellfish toxins [J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 1994, 58(8): 1 471-1 475.
- [4] Hallegraef G M, Anderson D M, Cembella A D. Manual on harmful marine microalgae [R]. Paris:IOC Manuals and Guides No. 33. UNESCO,1995.
- [5] Shestowsky W S, Quilliam M A, Sikorska H M. An idiotypic-anti-idiotypic competitive immunoassay for quantitation of okadaic acid [J]. *Toxicon*,1992,30(11): 1 441-1 448.
- [6] Zhou Yu, Li Yan-song, Wang Zhe, *et al.* Synthesis and identification of the antigens for ciprofloxacin [J]. *中国兽医学报*,2006,26(2):200-203.
- [7] 萨姆布鲁克 J,拉塞尔 D W.分子克隆实验指南[M].北京:科学出版社,2002.
- [8] 于光,卢士英,李岩松,等.抗大田软海绵酸单克隆抗体的制备、纯化及其特性[J]. *中国兽医学报*,2006,26(6): 639-641.
- [9] 洪孝庄,孙曼霁.蛋白质连接技术[M].北京:中国医药科技出版社,1993.
- [10] 何谷,黄维,郭丽.混合酸酐法合成 CCK-4[J]. *华西药理学杂志*,2005,20(6):518-520.
- [11] 胥传来,刘剑波,彭池方,等.氯霉素 BSA 和氯霉素 OVA 偶联物的制备与鉴定[J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2005,21(6):789-791.
- [12] Usagawa T, Nishimura M, Itoh Y, *et al.* Preparation of monoclonal antibodies against okadaic acid prepared from the sponge *Halichondria okadai* [J]. *Toxicon*, 1989,27(12):1 323-1 330.
- [13] 吕世静.免疫学及免疫学检验[M].北京:人民卫生出版社,1998.
- [14] 华泽爱.赤潮毒素的成分及其危害[J]. *海洋与海岸带开发*,1992,9(2):52-59.

(下转第 54 页)