

付世杰, 孙 勇, 王亚楠, 等. 重金属锌离子人工抗原的合成及抗体特性[J]. 江苏农业科学, 2017, 45(2): 185–189.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.02.055

重金属锌离子人工抗原的合成及抗体特性

付世杰, 孙 勇, 王亚楠, 王自良

(河南科技学院动物科学学院, 河南新乡 453000)

摘要:研究锌离子人工抗原的合成及其多克隆抗体(pAb)的制备。用异硫氰酸苄基乙二胺四乙酸(ITCBE)螯合 Zn^{2+} 合成 Zn-ITCBE 半抗原、异硫氰酯法制备免疫抗原 Zn-ITCBE-BSA 和包被原 Zn-ITCBE-OVA, 紫外分光光度法(UV)、SDS-PAGE 和电感耦合等离子体原子发射光谱法(ICP-AES)进行鉴定;用 Zn-ITCBE-BSA 免疫 Balb/c 小鼠, 间接 ELISA 测定 Zn pAb 效价, 阻断 ELISA 鉴定其敏感性, 交叉反应试验其特异性。结果表明, Zn-ITCBE-BSA 偶联成功, Zn-ITCBE 和 BSA 的分子结合比为 25:1, Zn pAb 效价达到 $1:(2.56 \times 10^4)$, 对 Zn^{2+} 的 IC_{50} 为 9.23, 与其他重金属离子的交叉反应率低, 获得高价、敏感、特异的 Zn pAb, 为锌离子残留污染的免疫学检测方法的建立奠定基础。

关键词:重金属锌离子;半抗原;人工抗原;抗体;鉴定

中图分类号: TS201.6 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2017)02-0185-05

土壤和农产品中的重金属与人类健康密切相关。重金属污染主要是指生物毒性显著的汞、铬、镉、铅以及类金属砷, 还包括具有毒性的重金属铜、钴、镍、锡等金属污染物^[1]。重金属污染不同于其他类型污染, 具有隐蔽性、长期性和不可逆转性等特点。随着城市的扩大和大规模工业发展, 大量重金属进入环境后, 即使浓度很低也可能造成危害, 通过饮用水或者通过生物富集以及食物链等方式最终威胁到人体健康。

锌参与体内 200 多种酶的合成和活化, 是机体新陈代谢的重要物质, 是动物生长发育及维持正常生理机能所必须的微量元素, 参与蛋白质的合成, 促进细胞分裂、生长和再生;但环境污染和饲料、药物添加剂的滥用, 造成畜禽产品锌的残留不同程度超标^[2]。过量锌是一种作用迅速的中枢神经毒素, 通过对神经细胞的直接损害以及对体内各种物质的拮抗而影响脑功能, 摄入过量会导致机体代谢紊乱^[3-4];过量的锌还可明显抑制红细胞的免疫功能, 造成雏鸡肝、脾的结构和功能受损^[5-7]。许多试验和流行病学调查已证实, 如果锌在体内含量过高, 将会抑制吞噬细胞的活性和杀菌力, 降低人体免疫功能, 抵抗力减弱, 对疾病易感性增加^[5-7]。

同时, 锌主要来源于采矿、电镀和冶炼行业污染物的排放, 水和土壤中的锌污染已经引起环境科学工作者的广泛关注。土壤中锌超过 200 mg/kg 时可能对植物生长造成危害, 过量锌可直接导致植物发生锌污染中毒, 也可能间接影响植物对于重要营养元素 Fe 的吸收, 进而使植物因缺 Fe 而引起生长障碍, 甚至死亡。在重金属污染的预防和治理中, 重金属污染物的监测和识别至关重要。

因此, 衡量重金属的定性定量分析在食品和环境检测等方面非常重要。传统的重金属离子检测法有火焰原子吸收光谱法^[8]、电感耦合等离子体质谱法^[9]、火焰原子吸收光谱法^[10-11]、伏安法和离子色谱法^[12], 以及电热原子化原子吸收光谱法^[13-16]等, 检测必须在具备大型分析仪器的重点实验室内进行, 无法用于现场检测, 且受到费用高、处理量有限和检测时间长等限制^[17], 不利于在生产中推广应用, 难以适应环境及市场产品的现场抽查及产品进出口快速通关的要求。

因此, 建立快速、简便、经济、大批量筛检的锌免疫检测技术, 对于减少环境污染、提高食品质量和保障食品安全具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试剂与溶液 $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, Alfa Aesar 产品, 质量分数为 99.9%;异硫氰酸苄基乙二胺四乙酸(ITCBE), 购于上海同仁化学研究所;4-羟乙基哌嗪乙磺酸, 质量分数为 99.5%, Sigma 产品;牛血清白蛋白(BSA)和鸡卵清蛋白(OVA), Sigma 产品;弗氏完全佐剂(complete Freund's adjuvant, CFA)、弗氏不完全佐剂(incomplete Freund's adjuvant, IFA)、四甲基乙二胺(TEMED)、十二烷基硫酸钠(sodium dodecyl sulfate, SDS)、巯基乙醇(β -mercaptoethanol, β -ME), 均为 Sigma 产品;考马斯亮蓝 R-250、30% 丙烯酰胺溶液、三羟甲基氨基甲烷(TRIS)、过硫酸铵(ammonium persulfate)、甘氨酸(glycine), 均为北京索莱宝科技有限公司;乙酸汞(mercury acetate)、钼酸(molybdic acid)、硫酸钴(cobalt sulfate neptahydrate)、硝酸锶(strontium nitrate)、三氧化二铁(ferric sesquioxide)、氧化镁(magnesium oxide)、碳酸钙(calcium carbonate)、铜粉(copper powder)、铬粉(chromium powder)、铅粉(lead powder), 均为国产分析纯;四甲基联苯胺(tetramethyl benzidine, TMB), 上海五联化工厂;羊抗鼠酶标二抗(GaMIG-HRP), 上海华美生物工程公司;试验用水为重

收稿日期:2015-11-24

基金项目:国家科技支撑计划(编号:2011BAK10B01-15)。

作者简介:付世杰(1988—), 男, 河南新乡人, 硕士, 主要从事动物性食品安全快速免疫检测技术研究。E-mail:372677205@qq.com。

通信作者:王自良, 博士, 教授, 硕士生导师, 从事动物性食品安全快速检测技术研究。E-mail:15836090463@163.com。

蒸去离子水(double distilled water, DDW)。其他试剂市售所得,均为 AR 级。

1.2 溶液

1.2.1 SDS-PAGE 所需溶液 电泳染色液:将 45 mL 甲醇、45 mL DDW 和 10 mL 冰乙酸混匀,然后加入 0.25 g 考马斯亮蓝,充分溶解后,滤纸过滤后备用。

电泳脱色液:将 40 mL 甲醇、40 mL DDW 和 10 mL 冰乙酸混匀即可。

分离胶缓冲液:称取 18.17 g Tris,加入 DDW 100 mL,充分溶解后用盐酸调节 pH 值至 8.8,4 °C 冰箱保存。

浓缩胶缓冲液:称取 6.0 g Tris,加入 DDW 100 mL,充分溶解后用盐酸调节 pH 值至 6.8,4 °C 冰箱保存。

上样缓冲液:称取 SDS 0.2 g、溴酚蓝 10 mg,加入浓缩胶缓冲液 0.5 mL、甘油 1 mL、 β -ME 0.25 mL,然后用 DDW 定容至 5 mL,4 °C 冰箱避光保存。

5 × 电泳缓冲液:称取 7.55 g Tris、47 g 甘氨酸,溶解在 450 mL DDW 中;再加入 10% SDS,用 DDW 定容至 500 mL,室温保存,使用时 5 倍稀释。

1.2.2 ELISA 所需缓冲液 0.01 mol/L 磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS):NaCl 8.0 g, KCl 0.2 g, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 3.56 g, KH_2PO_4 0.2 g,溶于 DDW 定容至 1 000 mL。

洗涤缓冲液(PBS + Tween20, PBST):PBS + 0.05% Tween20。

0.05 mol/L $\text{NaHCO}_3/\text{Na}_2\text{CO}_3$ 缓冲液(carbonate buffered saline, CBS): Na_2CO_3 1.59 g, NaHCO_3 2.93 g,加 DDW 定容至 1 000 mL。

封闭液(SPBST):5% 猪血清 + PBST。

TMD 底物缓冲液:(1) A 液。用 0.1 mol/L pH 值为 5.0 醋酸钠/柠檬酸缓冲液加热溶解 0.5 g 过氧化脲,再与 0.08 g 非那西丁(预先加热溶于 DDW)混合,定容至 1 000 mL。(2)

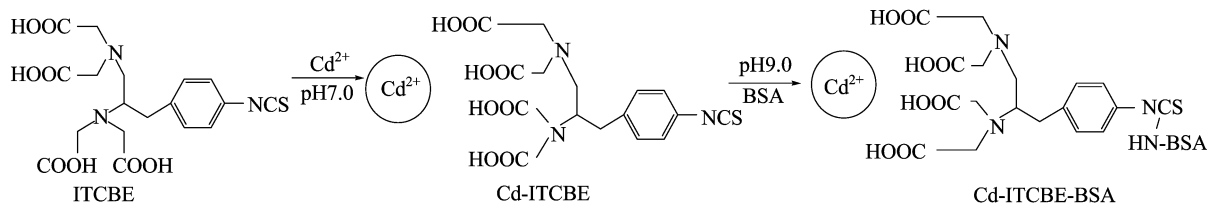


图1 免疫原的合成线路

1.5.2 Zn^{2+} -ITCBE-OVA 包被原的合成 合成方法同“2.1.1”节。

1.6 人工抗原的鉴定

1.6.1 人工抗原浓度测定 以 HEPES 溶液做为空白对照,将免疫抗原 Zn^{2+} -ITCBE-BSA 和包被抗原 Zn^{2+} -ITCBE-OVA 用 HEPES 缓冲液稀释 100 倍,用蛋白核酸分析仪在 280 nm 波长下测定人工抗原中的蛋白浓度。

1.6.2 SDS-PAGE 鉴定 根据 BSA 的 $M_r(6.62 \times 10^4)$,选择浓缩胶浓度为 5%,分离胶浓度为 12%,浓缩胶电压为 120 V,分离胶电压为 60 V,点样量 10 μg /孔,对 BSA、 Zn^{2+} -ITCBE-BSA 进行垂直 SDS-PAGE 电泳,用考马斯亮蓝染色,紫外仪照相。

1.6.3 ICP-AES 检测抗原中 Zn^{2+} 的含量 将 100 μg /mL

B 液。TMB 1.27 g 溶于 500 mL 甲醇,再与 500 mL 甘油混合。

2 mol/L H_2SO_4 终止液:98% 浓硫酸(18 mol/L) 10 mL 稀释至 180 mL。

1.3 主要仪器

PHS-3C 酸度计,上海雷磁公司;98-1 磁力搅拌器,上海司乐仪器有限公司;JY-3000 电泳仪,北京君意东方电泳设备有限公司;Optima 2100DV 型电感耦合等离子体发射光谱仪(ICP),美国 PE 公司;WD-9403D 型紫外仪,北京六一仪器厂;抗原与佐剂乳化器,本实验室自制;Multiskan MK3 酶标仪,美国 Thermo 公司;SZ-93 自动双重纯水蒸馏器,上海雅荣生化仪器设备有限公司;Legend micro 17 型离心机,美国 Thermo 公司;303A1 型电热恒温培养箱,北京中兴伟业仪器有限公司。

1.4 试验动物

SPF 级 6 周龄雌性 Balb/C 小鼠购自郑州大学医学院实验动物中心,本实验室饲养。

1.5 金属螯合物人工抗原的合成

1.5.1 Zn^{2+} -ITCBE-BSA 免疫原的合成 采用异硫氰酯法^[18],参考 Chakra 等的方法并加以改进合成免疫原 Zn^{2+} -ITCBE-BSA^[19]。称取 10 mg ITCBE 溶于 1 mL 二甲基亚砜(DMSO)中形成金属螯合剂溶液;称取 6.65 mg ZnSO_4 溶于 1 mL pH 值为 8.0 的 HEPES 缓冲液(10 mmol/L)中形成 Zn^{2+} 溶液;将金属螯合剂溶液和 Zn^{2+} 溶液混合并用 NaOH 调节 pH 值至 7.0,然后在室温条件下放在摇床上反应 12 h,即形成 Zn^{2+} -ITCBE 螯合物半抗原。称取 20 mg BSA 溶于 1 mL pH 值为 8.0 的 HEPES 缓冲液(10 mmol/L)中形成 20 mg/mL 的载体蛋白溶液;取 1 mL Zn^{2+} -ITCBE 螯合物半抗原溶液加入到 1 mL 载体蛋白溶液中并用 NaOH 调节 pH 值至 9.0,室温摇床反应 24 h,然后移入透析袋中透析 5 d,即形成 Zn^{2+} -ITCBE-BSA 完全抗原。合成路线见图 1。

的 Zn^{2+} 标准储备液用 2% 的硝酸稀释成 0.025、0.050、0.100、0.200、0.400 μg /mL 的浓度梯度,仪器软件自动绘制标准曲线,并得出线性回归方程;样品溶液 50 倍稀释,用 226 nm 波长在最佳优化试验条件下进行测定,仪器软件自动分析结果。

1.6.4 多抗血清(pAb)鉴定

1.6.4.1 Zn^{2+} -EDTA pAb 的制备 用 Zn^{2+} -ITCBE-BSA 免疫 6 周龄雌性 Balb/C 小鼠 5 只,免疫剂量为 50 μg ·0.2 mL/只,背部皮下 4 点注射。首免,用无菌 PBS 溶解 Zn^{2+} -ITCBE-BSA,与等量 CFA 混合,充分乳化;加强免疫,用无菌 PBS 溶解 Zn^{2+} -ITCBE-BSA,与等量 IFA 混合,充分乳化,首免后 3 周进行,共免 5 次,每次间隔 2 周,最后 1 次免疫后 10 d 断尾采血,5 000 r/min 离心 10 min, -20 °C 保存备用。

1.6.4.2 效价测定 采用间接 ELISA 测定 pAb 效价,基本程序参照 Tijssen 的方法。第 1 步,用经 pH 值为 9.6 0.05 mol/L 的碳酸盐缓冲液稀释的 Zn^{2+} - ITCBE - OVA 包板,包被浓度 2 $\mu\text{g/mL}$,包被量每孔 100 μL ,37 $^{\circ}\text{C}$ 温育 2 h, PBST 洗板 4 次,每次间隔 3 min;第 2 步,用 5% 猪血清封闭,每孔 200 μL ,37 $^{\circ}\text{C}$ 温育 1 h, PBST 洗板 4 次,每次间隔 3 min;第 3 步,加 pAb,每孔 50 μL ,用封闭液倍比稀释,设阴性对照 (negative control, NC) 和空白对照 (blank control, BC), 37 $^{\circ}\text{C}$ 温育 15 min, PBST 洗板 4 次,每次间隔 3 min;第 4 步,加 RaMlgG - HRP, 1 : 1 000 用封闭液稀释,每孔 50 μL ,37 $^{\circ}\text{C}$ 温育 30 min, PBST 洗板 4 次,每次间隔 3 min;第 5 步,加酶底物 TMB 显色,每孔 100 μL ,室温反应 10 min;第 6 步,终止显色反应,每孔加入终止液 2 mol/L H_2SO_4 100 μL ,用酶标仪读 $D_{450\text{ nm}}$ 值;第 7 步,结果判断,以待测孔 $D_{450\text{ nm}} \geq \text{NC } D_{450\text{ nm}}$ 的 2.1 倍 ($P/N \geq 2.1$) 判为阳性。

1.6.4.3 敏感性鉴定 用 10 mmol/L HEPES 缓冲液配制 EDTA 溶液,将 Zn^{2+} 标准储备液稀释成 0、3.906、7.812、15.625、31.250、62.500、125.000、250.000、500.000、1 000.000 ng/mL 的浓度梯度,用 NaOH 调节 pH 值为 6.0,室温摇床反应 24 h,即形成 Zn^{2+} - EDTA 螯合物溶液。以此溶液为抑制剂,采用阻断 ELISA 试验鉴定其敏感性,基本程序参照覃雅丽等的方法,见文献[20]。第 1 步,用 Zn^{2+} - ITCBE - OVA 包板,包被浓度 2 $\mu\text{g/mL}$,包被量每孔 100 μL , 37 $^{\circ}\text{C}$ 温育 2 h, PBST 洗板 4 次,每次间隔 3 min;第 2 步,用 5% 猪血清封闭,每孔 200 μL ,37 $^{\circ}\text{C}$ 温育 1 h, PBST 洗板 4 次,每次间隔 3 min;第 3 步,加 $D_{450\text{ nm}}$ 为 1.0 的小鼠血清 50 μL 和不同浓度的 Zn^{2+} - EDTA 螯合物溶液 50 μL ,设 NC 和 BC, 37 $^{\circ}\text{C}$ 温育 15 min, PBST 洗板 4 次,每次间隔 3 min;第 4 步,加 RaMlgG - HRP, 1 : 1 000 用封闭液稀释,每孔 50 μL ,37 $^{\circ}\text{C}$ 温育 30 min, PBST 洗板 4 次,每次间隔 3 min;第 5 步,加酶底物 TMB 显色,每孔 100 μL ,室温反应 10 min;第 6 步,终止显色反应,每孔加入终止液 2 mol/L H_2SO_4 100 μL ,用酶标仪读 $D_{450\text{ nm}}$ 值;第 7 步,计算抑制率 (B/B_0 , B_0 为 Zn^{2+} - EDTA 0 浓度时的吸光度, B 为 Zn^{2+} - EDTA 不同浓度时的吸光度)。以 B/B_0 为纵坐标,以不同浓度抑制剂的数值为横坐标,在半对数坐标纸上绘制 Zn^{2+} - EDTA 对 Zn^{2+} - EDTA pAb 的抑制曲线,根据曲线趋势推导回归方程,计算 pAb 对 Zn^{2+} - EDTA 的 50% 抑制浓度 (IC_{50}),并以 IC_{50} 做为敏感度。

1.6.4.4 特异性鉴定 采用交叉反应试验鉴定其特异性。交叉反应试验选择汞、铬、铅、锌、铜、铍、钴、钼、铁与 EDTA 的螯合物(螯合方法同上)和 EDTA 溶液做为抑制剂,用阻断 ELISA 测定各抑制物的 IC_{50} ,以 Zn^{2+} - EDTA pAb 对 Zn^{2+} - EDTA 的 IC_{50}

和 Zn^{2+} - EDTA pAb 对各竞争物的 IC_{50} 之比的百分数为其交叉反应率 (cross - reactivity, CR%)。计算方法如下:

$$\text{CR} = Zn^{2+} - \text{EDTA 的 } \text{IC}_{50} / \text{其他抑制物 } \text{IC}_{50} \times 100\%$$

2 结果与分析

2.1 紫外分光光度法测定抗原浓度

利用 Pharmacia 蛋白质核酸分析仪在 280 nm 波长下测定透析后的 Zn^{2+} - ITCBE - BSA、 Zn^{2+} - ITCBE - OVA 蛋白的浓度分别为 8.48、9.23 mg/mL。

2.2 SDS - PAGE 电泳鉴定

由图 2 可知,BSA 的泳动速度大于 Zn^{2+} - ITCBE - BSA,说明 Zn^{2+} - ITCBE - BSA 的分子量大于 BSA,证明 BSA 与 Zn^{2+} - ITCBE 已成功偶联。

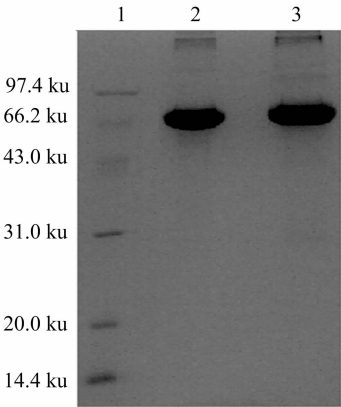


图2 免疫原 Zn^{2+} -ITCBE-BSA的SDS-PAGE 鉴定

2.3 ICP - AES 测定抗原中 Zn^{2+} 含量

由表 1 可知稀释 50 倍后的样品读数,透析后的 Zn^{2+} - ITCBE - BSA 和 Zn^{2+} - ITCBE - OVA 2 种抗原中 Zn^{2+} 的含量分别为 197.45、130.80 $\mu\text{g/mL}$,可以证明金属螯合物人工抗原合成成功。

表 1 ICP - AES 测定样品中 Zn^{2+} 含量

样品	浓度 ($\mu\text{g/mL}$)	相对标准偏差 (%)	相关系数
Zn^{2+} - ITCBE - BSA	3.949	0.297 0	0.999 9
Zn^{2+} - ITCBE - OVA	2.616	0.312 5	0.999 9

2.4 Zn^{2+} - EDTA pAb 鉴定

2.4.1 间接 ELISA 效价测定 由表 2 可知,免疫的 5 只小鼠血清抗体效价均达到了 10^{-4} ,说明获得了较好的免疫效果,其中 4 号小鼠效价最高,为 0.597。

2.4.2 Zn^{2+} - EDTA pAb 敏感性鉴定 由表 3 可知,以 Zn^{2+} 在 3.906 ~ 1 000 ng/mL 与过量 EDTA 螯合后形成的螯合物为

表 2 小鼠抗 Zn^{2+} - ITCBE 血清效价

序号	不同抗血清稀释倍数效价										阴性	空白
	100	200	400	800	1 600	3 200	6 400	12 800	25 600	51 200		
1	2.634	2.243	1.983	1.759	1.587	1.352	1.255	0.949	0.759	0.180	0.070	0.068
2	2.066	1.954	1.606	1.400	1.438	1.141	0.805	0.658	0.407	0.197	0.068	0.062
3	1.985	1.774	1.637	1.579	1.327	1.115	0.918	0.693	0.355	0.134	0.095	0.075
4	3.126	2.872	2.563	2.381	1.997	1.751	1.451	1.148	0.933	0.597	0.082	0.054
5	2.229	2.030	1.907	1.741	1.512	1.358	1.161	0.951	0.636	0.310	0.076	0.058

抑制剂,5 只小鼠的抗血清均产生了抑制。其中 4 号小鼠抑制效果最好,将其 $D_{450\text{ nm}}$ 值转化为 B/B_0 ,再对 $\lg[\text{Zn}^{2+} - \text{EDTA}/$

100]进行回归分析,4 号小鼠的线性回归方程为 $y = -0.298\ 4x + 0.975\ 2$, r^2 为 0.943 5, IC_{30} 为 39.26 ng/mL(图 3)。

表 3 小鼠抗血清对 $\text{Zn}^{2+} - \text{EDTA}$ 的抑制效价

序号	不同 Zn^{2+} 稀释浓度抑制效价										阴性	空白
	1 000 ng/mL	500 ng/mL	250 ng/mL	125 ng/mL	62.5 ng/mL	31.25 ng/mL	15.625 ng/mL	7.812 ng/mL	3.906 ng/mL	0		
1	0.116	0.149	0.184	0.267	0.378	0.496	0.672	0.843	0.994	1.016	0.076	0.067
2	0.154	0.184	0.211	0.376	0.493	0.558	0.597	0.795	1.011	1.197	0.075	0.067
3	0.141	0.167	0.192	0.279	0.315	0.475	0.614	0.868	0.955	1.013	0.088	0.068
4	0.174	0.191	0.226	0.259	0.361	0.552	0.602	0.742	0.847	1.058	0.073	0.072
5	0.137	0.158	0.194	0.253	0.398	0.446	0.698	0.839	1.051	1.112	0.081	0.058

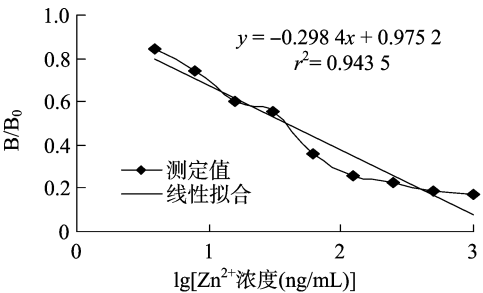


图3 1号小鼠多抗血清对 $\text{Zn}^{2+} - \text{EDTA}$ 的阻断 ELISA 抑制曲线

2.4.3 $\text{Zn}^{2+} - \text{EDTA}$ pAb 特异性鉴定 由表 4 可知, $\text{Zn}^{2+} - \text{EDTA}$ 对其 pAb 结合反应的特异性很强;除与 $\text{Hg}^{2+} - \text{EDTA}$ 具有较强的交叉反应外,与 EDTA 及其他金属离子螯合物无交叉反应。

3 讨论

3.1 关于人工抗原的合成

Zn^{2+} 结构简单,不具有 T、B 2 种细胞表位而无法直接诱导机体产生特异性抗体,既无免疫原性,也无反应原性,而且 Zn^{2+} 带有电荷,能与机体内生物分子发生强烈的不可逆的反应而导致机体中毒。因此,必须将 Zn^{2+} 通过螯合剂进行螯合,然后再将其连接到载体蛋白合成人工抗原,通过动物免疫制备 Zn^{2+} 螯合物的特异性抗体。选择合适的偶联剂是人工

表 4 $\text{Zn}^{2+} - \text{EDTA}$ pAb 与其他金属螯合物的交叉反应

化合物	IC_{50} (ng/mL)	交叉反应率(%)
$\text{Zn}^{2+} - \text{EDTA}$	26.85	100
EDTA	$> 6.4 \times 10^3$	< 0.5
$\text{Hg}^{2+} - \text{EDTA}$	27.98	95.96
$\text{Pb}^{2+} - \text{EDTA}$	$> 6.4 \times 10^3$	< 0.5
$\text{Cu}^{2+} - \text{EDTA}$	$> 3.2 \times 10^3$	< 0.9
$\text{Cd}^{2+} - \text{EDTA}$	$> 3.2 \times 10^3$	< 0.9
$\text{Co}^{2+} - \text{EDTA}$	$> 6.4 \times 10^3$	< 0.5
$\text{Mo}^{2+} - \text{EDTA}$	$> 6.4 \times 10^3$	< 0.5
$\text{Ca}^{2+} - \text{EDTA}$	$> 6.4 \times 10^3$	< 0.5

抗原制备的关键。Meares 等的研究结果表明,作为金属离子人工抗原的偶联剂必须满足 3 个条件,一是能够选择性结合金属离子并减弱金属离子与生物分子之间的反应能力,二是能够与载体蛋白偶联,三是偶联物能够被免疫系统识别,具有免疫原性^[21-23]。通过大量筛选对比试验,大分子双功能螯合剂是最为理想的偶联剂(图 4)。本试验选择异硫氰酸苄基乙二胺四乙酸(ITCBE)作为螯合剂, Zn^{2+} 与 ITCBE 螯合后,形成一个稳定的六齿状的配位化合物,该化合物具有独特的空间构型和一定的分子量,相当于 1 个半抗原,然后再用异硫氰酯法将该螯合物偶联到 BSA 或 OVA 上制备成人工抗原。笔者认为,在合适的 pH 值范围内 ITCBE 才能够充分的螯合金属离子,这是使合成的人工抗原具有较好免疫原性的关键。

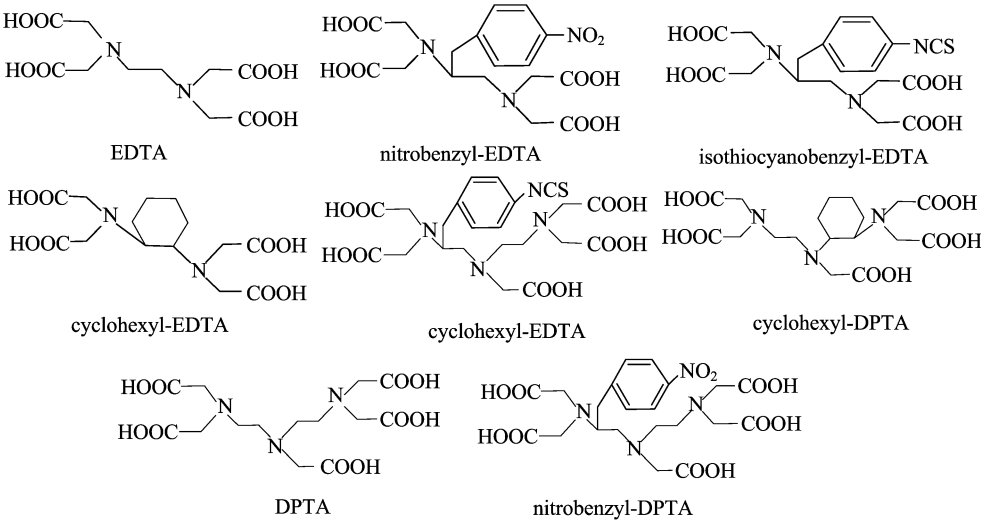


图4 Zn^{2+} 常用双功能螯合剂

3.2 关于载体蛋白的选择

载体蛋白的作用是提供 T 细胞识别表位,小分子半抗原与载体蛋白结合后,可作为载体蛋白的抗原决定簇,进而诱导 B 细胞激活、分化、增殖,从而产生针对半抗原小分子的特异性抗体。常用的载体蛋白有牛血清白蛋白(BSA)、鸡卵清蛋白(OVA)、钥孔血蓝蛋白(KLH)、人血清白蛋白(HAS)、兔血清白蛋白(RSA)及人工合成的多聚赖氨酸(PLL)等,本研究选用 BSA 作载体蛋白,原因是 BSA 理化性质稳定,不易变性,价廉易得,分子内含自由氨基多,在较大 pH 范围和不同离子强度下均能保持较大的溶解度,更有利于偶联反应的进行。

3.3 关于人工抗原的鉴定

本试验对合成的金属螯合物抗原进行了 SDS-PAGE 电泳鉴定、ICP-AES 测定抗原中 Zn^{2+} 含量和抗血清鉴定。在人工抗原的合成中偶联到载体蛋白上的有些螯合剂并未螯合金属离子,即形成 ITCBE-BSA 无金属人工抗原,这些无金属抗原与金属螯合物抗原在进行紫外扫描和 SDS-PAGE 电泳鉴定中不容易区别;个别 Zn^{2+} 可以结合到载体蛋白上,故 ICP-AES 所测定的抗原中 Zn^{2+} 含量不能准确地代表螯合离子的量。鉴于以上原因,本试验没有对所合成的人工抗原进行偶联率的计算。因此,笔者认为,ICP-AES 测定抗原中 Zn^{2+} 含量和 SDS-PAGE 电泳鉴定只能作为辅助的重金属螯合物人工抗原的鉴定,抗血清鉴定是重金属螯合物人工抗原最为准确、可靠的鉴定方法。

4 小结

利用双功能螯合剂异硫氰酸苄基乙二胺四乙酸通过异硫氰酯法合成了重金属 Zn^{2+} 的免疫抗原和包被抗原,并对所合成的抗原进行 SDS-PAGE 电泳、ICP-AES 检测其 Zn^{2+} 含量和小鼠免疫试验,结果证明所合成的人工抗原具有较好的免疫原性,为 Zn^{2+} 螯合物多克隆抗体(pAb)和单克隆抗体(mAb)的进一步研制奠定了研究基础和技术储备。

参考文献:

- [1] 陈邦俊. 世界铅锌工业现状与展望[J]. 世界有色金属,1997(5):19-24.
- [2] 逢瑞珊. 我国畜禽产品质量安全存在的问题及应对策略[J]. 黑龙江粮食,2007(4):20-22.
- [3] 崔恒敏,赵翠燕,黎得兵,等. 高锌对雏鸡免疫功能影响的研究[J]. 畜牧兽医学报,2005,36(3):240-245.
- [4] 崔恒敏,彭西,方静,等. 实验性雏鸭锌中毒症的病理学研究[J]. 畜牧兽医学报,2004,35(2):217-221.
- [5] Pamla J,曹来福. 锌与免疫功能的关系[J]. 国外医学:卫生学分册,1987(6):334-337.
- [6] 乔德堂. 锌营养作用的研究进展[J]. 山东畜牧兽医,2007,28(5):52-53.
- [7] 徐铭,朱丹丹. 锌与动物免疫功能的关系[J]. 畜牧兽医科技信息,2013(4):11-12.
- [8] Kloft C, Appellius H, Siegert W, et al. Determination of platinum complexes in clinical samples by a rapid flameless atomic absorption spectrometry assay[J]. Therapeutic Drug Monitoring, 1999, 21(6): 631-637.
- [9] Almeida C M, Vasconcelos M T. Lead contamination in Portuguese red wines from the Douro region: from the vineyard to the final product[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2003, 51(10): 3012-3023.
- [10] Yaman M. The improvement of sensitivity in lead and cadmium determinations using flame atomic absorption spectrometry[J]. Analytical Biochemistry, 2005, 339(1): 1-8.
- [11] Bakircioglu Y, Segade S R, Yourd E R, et al. Evaluation of Pb-Spec® for flow-injection solid-phase extraction preconcentration for the determination of trace lead in water and wine by flame atomic absorption spectrometry[J]. Analytica Chimica Acta, 2003, 485(1): 9-18.
- [12] Buldini P L, Cavalli S, Sharma J L. Determination of transition metals in wine by IC, DPASV-DPCSV, and ZGFAAS coupled with UV photolysis[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1999, 47(5): 1993-1998.
- [13] Jurado J M, Martín M J, Pablos F, et al. Direct determination of copper, lead and cadmium in aniseed spirits by electrothermal atomic absorption spectrometry[J]. Food Chemistry, 2007, 101(3): 1296-1304.
- [14] Freschi G G, Dakuzaku C S, de Moraes M, et al. Simultaneous determination of cadmium and lead in wine by electrothermal atomic absorption spectrometry[J]. Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy, 2001, 56(10): 1987-1993.
- [15] Viitak A, Volynsky A B. Simple procedure for the determination of Cd, Pb, As and Se in biological samples by electrothermal atomic absorption spectrometry using colloidal Pd modifier[J]. Talanta, 2006, 70(4): 890-895.
- [16] Vilar M, Barciela J, Garcia-Martin S, et al. Comparison of different permanent chemical modifiers for lead determination in Orujo spirits by electrothermal atomic absorption spectrometry[J]. Talanta, 2007, 71(4): 1629-1636.
- [17] 刘功良,王菊芳,李志勇,等. 重金属离子的免疫检测研究进展[J]. 生物工程学报,2006,22(6): 877-881.
- [18] 朱育菁,于晓杰,潘志针,等. 生物耦合技术的原理及其应用[J]. 福建农业学报,2010,25(1): 118-125.
- [19] Chakrabarti P, Hatcher F M, Blake R N, 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.
- [20] 王颖,任立松,李研东,等. 抗氯霉素单克隆抗体的制备、纯化及其特异性鉴定[J]. 吉林大学学报(医学版),2008,34(2): 336-339.
- [21] Meares C F, McCall M J, Reardan D T, et al. Conjugation of antibodies with bifunctional chelating agents: isothiocyanate and bromoacetamide reagents, methods of analysis, and subsequent addition of metal ions[J]. Analytical Biochemistry, 1984, 142(1): 68-78.
- [22] Boden V, Colin C, Barbet J, et al. Preliminary study of the metal binding site of an anti-DTPA-indium antibody by equilibrium binding immunoassays and immobilized metal ion affinity chromatography[J]. Bioconjugate Chemistry, 1995, 6(4): 373-379.
- [23] Perrin C L, Kim Y J. Symmetry of metal chelates[J]. Inorganic Chemistry, 2000, 39(17): 3902-3910.