

何丹,刘媛,李先保,等.微囊藻毒素LR免疫原及包被抗原的合成与鉴定[J].江苏农业科学,2019,47(9):226-230.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2019.09.053

微囊藻毒素 LR 免疫原及包被抗原的合成与鉴定

何丹^{1,2},刘媛²,李先保¹,龚航^{1,2},王丽¹,郝佳²,张晓帅²,徐重新²,张存政²,刘贤金²

(1.安徽科技学院,安徽滁州 233100; 2.江苏省食品质量安全重点实验室,江苏南京 210014)

摘要:微囊藻毒素 LR(MC-LR)分子量小于 1 000 u,为半抗原,需要与载体蛋白偶联后才能刺激免疫应答用于抗体制备。本研究利用碳二亚胺法将 MC-LR 分别与钥孔血蓝蛋白(KLH)和牛血清白蛋白(BSA)进行偶联,获得免疫抗原(MC-KLH)和包被抗原(MC-BSA)。采用紫外扫描光谱、SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)、基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(MALDI-TOF MS)等 3 种方法对 2 种人工抗原进行鉴定,并对小鼠进行免疫。用间接非竞争酶联免疫吸附测定法(ELISA)和竞争 ELISA 测定了抗血清效价和敏感度。结果表明,紫外扫描光谱法可观察到 2 种人工抗原的紫外吸收谱与载体蛋白相比发生改变。通过 SDS-PAGE 法可以观察到 MC-BSA 分子量比 BSA 增大。另外质谱法测定的 MC-BSA 的相对分子量为 76 515.84,计算得到的 MC-LR 与 BSA 的偶联比为 10:1。MC-KLH 免疫小鼠后,抗血清效价最高达到 1:32 000 倍,MC-LR 对鼠多抗血清的抑制中浓度(I_{50})为 0.53 $\mu\text{g/mL}$ 。成功合成了 MC-LR 的免疫原和包被原为其单克隆抗体的制备奠定了基础。还比较了 3 种鉴定方法的适用性和优缺点,为其他人工抗原的鉴定方法提供了有益的参考。

关键词:微囊藻毒素 LR;抗体;免疫原;包被原;鉴定

中图分类号:X52 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2019)09-0226-05

微囊藻毒素(microcystins,简称 MCs)是一种在蓝藻水华污染中出现频率最高、产生量最大和造成危害最严重的毒素种类^[1],其主要结构为环 D-丙氨酸- R_1 - R_2 -赤- β -甲基-D-异天冬氨酸-L-Z-adda-D-异谷氨酸-N-甲基脱氢丙氨酸,其中有 2 个可变的 L-型氨基酸(R_1 和

R_2),这 2 种 L-型氨基酸的不同组合更替及其他氨基酸的去甲基衍生出众多的毒素类型,至今已发现 80 种以上的 MCs 异构体^[2-4](图 1)。其中微囊藻毒素 LR(MC-LR)是已知毒性最强、急性危害最大的一种淡水蓝藻毒素,具有多器官毒性、遗传毒性和致癌性^[5]。世界卫生组织及许多发达国家制定的引用水标准和规范中规定,MC-LR 的含量不得超过 1.0 $\mu\text{g/L}$,我国生活饮用水卫生标准也规定饮用水中的 MC-LR 不得超过 1.0 $\mu\text{g/L}$ ^[6]。

目前 MC-LR 的检测方法主要包括液相色谱法、免疫分析法、磷酸酶抑制法、细胞毒性法和生物分析法等^[7-15]。免疫分析法因其灵敏度高、检测通量大等优点成为 MC-LR 最常用的筛选检测方法,其核心试剂抗体的制备国内外已有一些文献报道^[16]。然而目前商品化的 MC-LR 抗体仍然非常有限,且质量参差不齐。进口的 MC-LR 单克隆抗体主要为英国 Abcam 公司的产品,售价约达 3 000 元/mg。国内仅有中

收稿日期:2018-01-29

基金项目:国家自然科学基金(编号:31701724);安徽省家禽产业技术体系基金(编号:AHCYTX-10);江苏省社会发展项目(编号:BE2017706);江苏省农业科技自主创新资金[编号:CX(15)1016]。

作者简介:何丹(1993—),女,河南商丘人,硕士研究生,研究方向为食品加工与安全。E-mail:hehe_88dane@163.com。

通信作者:李先保,博士,教授,主要从事畜产品加工研究。E-mail:Lxb63@163.com;刘媛,博士,副研究员,主要从事农产品污染物快速检测技术。E-mail:zeranol@163.com。

(1):24-27.

[6]蒋倩. 6-BA 对百合切花保鲜效果的影响[J]. 甘肃科技, 2009,25(11):148-150.

[7]朱秀敏,张晓丽,尹园园. 不同保鲜剂对鲜切花保鲜效果的研究[J]. 北方园艺,2011(9):185-188.

[8]夏晶晖. 8-羟基喹啉和柠檬酸对切花菊生理效应的影响[J]. 北方园艺,2010(9):194-195.

[9]黄少明,何泽佳,黄胜琴,等. 绿茶浸泡液对康乃馨和菊花的插花保鲜作用[J]. 华南师范大学学报(自然科学版),2010(增刊1):5-6,26.

[10]史国安. 牡丹开花与衰老的生理生化机制研究[D]. 武汉:华中农业大学,2010.

[11]徐心诚. 不同保鲜剂对康乃馨切花保鲜效果的影响[J]. 湖北农业科学,2016,5(11):2872-2875.

[12]马丽. 明矾和硝酸铵对康乃馨切花保鲜效果的影响[J]. 北方园艺,2013(22):135-137.

[13]余前媛,任永波,夏晶晖,等. 西昌地区切花康乃馨保鲜剂配方的筛选[J]. 中国农学通报,2006(6):289-291.

[14]甄志先,张景兰,李彦慧,等. 几种保鲜药剂组合对香石竹保鲜效果的影响[J]. 河北林果研究,2007,22(3):321-323.

[15]王学奎. 植物生理生化实验原理和技术[M]. 北京:高等教育出版社,2006:127-128.

[16]李合生. 植物生理生化实验原理和技术[M]. 北京:高等教育出版社,2000:260.

[17]夏晶晖. AgNO₃ 对切花康乃馨保鲜效果的研究[J]. 西南大学学报(自然科学版),2009,31(10):48-51.

[18]赵丽,蔡永亮,朴炫春,等. BA 对康乃馨切花保鲜的影响[J]. 林业实用技术,2013(12):38-40.

国水生生物研究所、江苏省微生物研究所和清华大学等少数几家单位研制的 MC-LR 单、多克隆抗体。现有的商品化 MC-LR 抗体难以完全满足巨大市场检测需求和科研使用。因此,加快 MC-LR 单克隆抗体的研制和自主知识产权的快速检测技术产品的研发,为解决我国特别是江苏地区太湖蓝藻暴发水体污染监测等社会、环境问题意义重大。

由于 MC-LR 分子量为 995.17 u,属于半抗原,必须要和载体蛋白偶联才能具有免疫原性,从而获得抗体。因此,合成性能良好的免疫原及包被原是制备抗体和建立检测方法的关键。本研究利用碳二亚胺法将 MC-LR 与载体蛋白钥孔血蓝蛋白(KLH)、牛血清白蛋白(BSA)分别进行偶联,作为免疫原和包被原,并用紫外扫描光谱、十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺电泳(SDS-PAGE)和基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(MALDI-TOF MS)等 3 种方法进行鉴定。

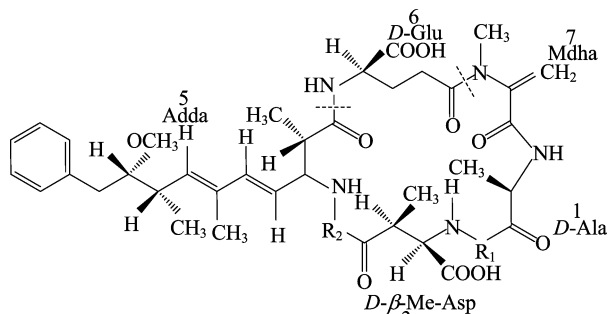


图1 微囊藻毒素分子结构示意图

1 材料与方法

1.1 主要材料

微囊藻毒素 LR,购自瑞典 Alexis Biochem 公司。6~8 周龄雌性 Balb/c 小鼠,购自江苏省扬州大学比较医学中心。钥孔血蓝蛋白、牛血清白蛋白、50% 聚乙二醇(PEG)溶液(分子量为 1 450 ku)、弗氏完全和不完全佐剂,均购自美国 Sigma 公司。*N,N*-二甲基甲酰胺(DMF),购自无锡中西药品器械集团有限公司。辣根过氧化物酶(HRP)标记羊抗鼠 IgG,购自南京康维生物科技有限公司。1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐(EDC·HCl)、*N*-羟基琥珀酰亚胺(NHS)、四甲基联苯胺(TMB),均购自上海丽珠东风生物技术有限公司。透析带(截留分子量为 14 000 ku),购自上海华美生物工程有限公司。4×蛋白上样缓冲液、脱脂奶粉,均购自索莱宝生物科技有限公司。10% 预制胶,购自南京金斯瑞生物科技有限公司。

1.2 主要仪器

酶标仪(美国 Thermo),洗板机(美国 Thermo),台式冷冻离心机(美国 Beckman),紫外-可见分光光度计(美国 PerkinElmer),微量可调移液器(芬兰 Finnpipette),超纯水净化仪(美国 Millipore),分析天平(美国 Ohaus),磁力搅拌器(杭州仪表电机有限公司),96 孔酶标板(美国 CORNING),垂直板电泳仪(美国 Bio-rad),MALDI-TOF/TOF 5800 质谱分析仪(美国 AB Sciex 公司),5% CO₂ 培养箱(美国 Thermo)等。

1.3 免疫抗原和包被抗原的合成

免疫抗原(MC-KLH)的制备:MC-LR 与 KLH 的偶联,

参考 Yu 等的方法^[17]。具体为取 0.1 mg MC-LR 溶解于 0.1 mL DMF,再与 0.3 mL 溶解有 6 mg 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDC·HCl)和 6 mg NHS 的 DMF 溶液混合,轻微振荡并混匀,室温反应 30 min 后,4℃ 反应过夜,得 MC-LR 活泼酯衍生物(I)。称取 3 mg KLH 溶解于 3 mL 0.1 mol/L pH 值为 9.6 的碳酸盐缓冲液(CBS)中,将衍生物(I)缓慢滴加入 KLH 溶液中,轻微振荡并混匀,避光室温反应 2 h。将反应物移入透析袋,透析袋放在 pH 值为 7.4 的 0.01 mol/L 磷酸盐缓冲液(PBS)中,4℃ 下透析 2 d,每天更换透析液 3 次,透析产物分装后于 -20℃ 保存。

包被抗原(MC-BSA)的制备:将 0.1 mg MC-LR 溶解于 25% 乙醇溶液中,再加入 335 μg BSA,振荡混匀。随后将溶于 1 mg EDC·HCl 的 200 μL 水溶液逐滴加入 MC-LR 和 BSA 的混合液中,4℃ 反应过夜。制备好的包被抗原装入透析袋,在 PBS 缓冲液中 4℃ 下透析 2 d,每天更换透析液 3 次,分装后于 -20℃ 保存。

1.4 鉴定方法

1.4.1 紫外扫描光谱法 将免疫抗原、包被抗原溶解于 PBS 中,使其浓度为 200 μg/mL,载体蛋白 KLH、BSA 浓度为 1 mg/mL,半抗原 MC-LR 浓度为 10 μg/mL,用紫外分光光度计对各物质进行紫外全波长扫描,绘制紫外吸收曲线。

1.4.2 SDS-PAGE 法 配制 200 μg/mL 的 MC-BSA 和 BSA,与蛋白上样缓冲液混合后,煮沸 3 min。样品上样量为 5 μL/孔,蛋白 marker 上样量为 2 μL/孔。使用 10% 的预制胶分离,140 V 恒压电泳 70 min,通过银染法显色。

1.4.3 基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱法 将 1 μL 0.5 mg/mL PBS 溶解的 BSA 或 MC-BSA 偶联物点至样品靶上,自然干燥后,再取 0.6 μL CHCA 基质溶液点至对应靶位上并自然干燥,用相同方法在样品靶位相邻位置点标准品。在正离子模式下选择反射方法对样品测试范围进行校准测试。反射校准物质范围为 39 212 ± 100 至 66 430 ± 100;在正离子模式下选择反射方法测试样品分子量。质谱数据及图谱处理由 MALDI-TOF MS 产生,原始数据及图谱由 4000 Series Explorer V3.5 软件导出。按照以下公式计算半抗原与载体蛋白偶联比:偶联比 = (偶联物分子量 - 载体蛋白分子量) / 半抗原分子量。

1.5 动物免疫

取适量的 MC-KLH 与等体积完全弗氏佐剂混合,完全乳化,免疫 3 只 6~8 周龄雌性 Balb/c 小鼠,25 μg/只腹腔注射。3 周后,取适量的 MC-KLH 与等体积不完全弗氏佐剂混合,乳化后皮腹腔注射,根据此方法每 14 d 免疫 1 次,共加强免疫 4 次。选取效价最高小鼠,用 PBS 溶解的 25 μg MC-KLH 进行腹腔注射,进行冲击免疫,3 d 后取脾脏融合。

1.6 抗血清效价及灵敏度的测定

1.6.1 间接非竞争酶联免疫吸附测定法(ELISA)测定效价

(1)包被:用 2.5 μg/mL CBS 稀释的 MC-BSA,100 μL/孔加入酶标板,4℃ 包被过夜。(2)封闭:次日用含有 0.05% Tween 20 的 PBS 溶液(PBST)洗板 3 次,每孔加入 200 μL PBS 配制的体积分数为 2% 的脱脂奶粉,37℃ 封闭 1 h。(3)加样:PBST 洗板 3 次后,每孔加入 100 μL PBS 梯度稀释的鼠阳性血清,以相应稀释倍数的鼠阴性血清作为阴性对照,37℃

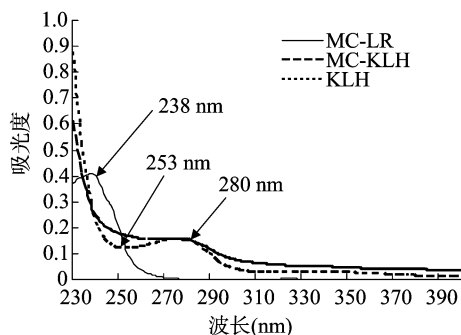
温育 1 h。(4)加酶标二抗:PBST 洗板 3 次,每孔加入 100 μL HRP 标记的羊抗鼠 IgG 工作液(1:5 000 倍 PBS 稀释),37 $^{\circ}\text{C}$ 温育 1 h。(5)显色:PBS 洗板 3 次后,每孔加入 100 μL 现配的底物溶液(100 μL 二甲亚砷溶解的 TMB 和 25 μL 0.65% H_2O_2 加入 9.875 mL 0.1 mol/L pH 值为 5.5 的柠檬酸缓冲液),37 $^{\circ}\text{C}$ 显色 15 min 后,每孔加入 50 μL 2 mol/L H_2SO_4 终止液终止反应,在酶标仪上读取 450 nm 处的吸光度,以大于相应的阴性血清吸光度 2.1 倍的阳性血清最大稀释倍数作为抗血清效价。用方阵滴定法确定包被抗原及鼠血清的工作浓度。

1.6.2 间接竞争 ELISA 测定抗血清敏感度 酶标板的包被及封闭、加酶标二抗和显色步骤同“1.6.1”节。按操作步骤如下:用 PBS 将 MC-LR 标准品稀释成 100、10、1、0.1、0.01、0.001 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 等 6 个浓度,酶标板每孔加入 50 μL 不同浓度 MC-LR 标准品和 50 μL 2 倍工作浓度的鼠抗血清混合液,以 50 μL PBS 和 50 μL 2 倍工作浓度的鼠抗血清混合液作为零浓度的 MC-LR。计算不同浓度 MC-LR 标准品对应吸光度(B)与零浓度 MC-LR 对应吸光度(B_0)的比值,绘制 MC-LR 浓度与 B/B_0 的标准抑制曲线,并计算抑制中浓度(I_{50})。

2 结果与分析

2.1 紫外扫描光谱法

紫外扫描光谱法是免疫抗原和包被抗原鉴定的一种常用方法。它是通过比较载体蛋白、人工抗原、半抗原的紫外吸收



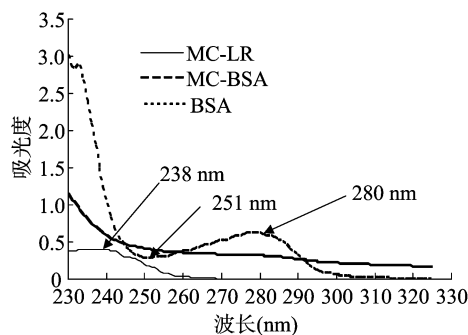
A. 人工免疫抗原 MC-KLH 通过紫外分析进行鉴定原始数据

光谱的迁移或叠加情况来分析偶联结果。图 2-A 显示了免疫抗原 MC-KLH、半抗原 MC-LR 和载体蛋白 KLH 的紫外扫描光谱。在紫外扫描范围内,半抗原 MC-LR 在 238 nm 处具有特征吸收峰,KLH 在 280 nm 处具有蛋白质特征吸收峰,在 253 nm 处出现波谷。偶联物 MC-KLH 在 238~280 nm 范围内,紫外吸收曲线呈平滑下降趋势,没有 KLH 的 280 nm 处的特征吸收峰和 253 nm 处的波谷出现,这可能是由于 MC-LR 与 KLH 偶联后,2 种物质的紫外吸收发生叠加导致,由此推测 MC-LR 和 KLH 偶联成功。

同样图 2-B 显示了包被抗原 MC-BSA、MC-LR 和 BSA 的紫外扫描光谱。BSA 在 280 nm 处具有蛋白质特征吸收峰,在 251 nm 处出现波谷。偶联物 MC-BSA 在 238~280 nm 范围内,紫外吸收曲线呈平滑下降趋势,没有 BSA 的 280 nm 处的波峰和 251 nm 处的波谷出现,这可能是由于 MC-LR 与 BSA 偶联后,两者紫外吸收发生叠加导致,由此推测 MC-LR 和 BSA 偶联成功。

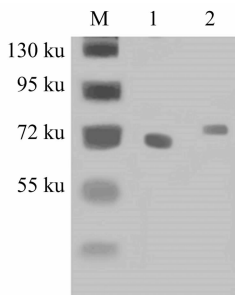
2.2 SDS-PAGE 法

SDS-PAGE 法是鉴定蛋白分子量的经典方法。由于 SDS-PAGE 法的电泳迁移率主要取决于蛋白分子量的大小,可以通过比较载体蛋白和偶联物的电泳迁移率来分析是否偶联成功。如图 3 所示,BSA 的条带在 72 ku 下方,符合 66 ku 的 BSA 分子量预期,而 MC-BSA 的条带接近于 72 ku。MC-BSA 的分子量大于 BSA,因此可以推测 MC-LR 与 BSA 偶联成功。



B. 包被抗原 MC-BSA 通过紫外分析进行鉴定原始数据

图2 免疫抗原(A)及包被抗原(B)的紫外扫描光谱



M 为蛋白 marker; 1 为载体蛋白 BSA; 2 为偶联物 MC-BSA
图3 BSA 和 MC-BSA 的 SDS-PAGE 分析结果

由于试验所用的 KLH 蛋白来源于海洋软体动物钥孔帽贝 (*Megathura crenulata*),该蛋白由 KLH1 和 KLH2 (350~400 ku)2 个亚基聚合而成,分子量范围在 400~800 ku 之间。

并非单一分子量纯品,而且 KLH 分子量过大不能适用于常规的蛋白 marker 及凝胶,因此未用此种方法对 MC-KLH 进行鉴定。

2.3 基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱法

MALDI-TOF MS 的原理是用一定强度的激光照射样品与基质形成共结晶薄膜,基质从激光中吸收能量,基质-样品直接发生电荷转移使得样品分子电离后在电场作用下加速飞过飞行管道,根据到达检测其的飞行时间不同而被检测。即依据样品质荷比 (m/z) 不同进行检测得到样品的相对分子质量。

试验用 MALDI-TOF MS 对 BSA 和 MC-BSA 进行分子量测定,测定的 BSA 和 MC-BSA 相对分子量值分别是 66 455.70、76 515.84 (图 4)。MC-BSA 分子量比 BSA 大,证实了 MC-LR 与 BSA 偶联成功,计算得到的 MC-LR 和 BSA

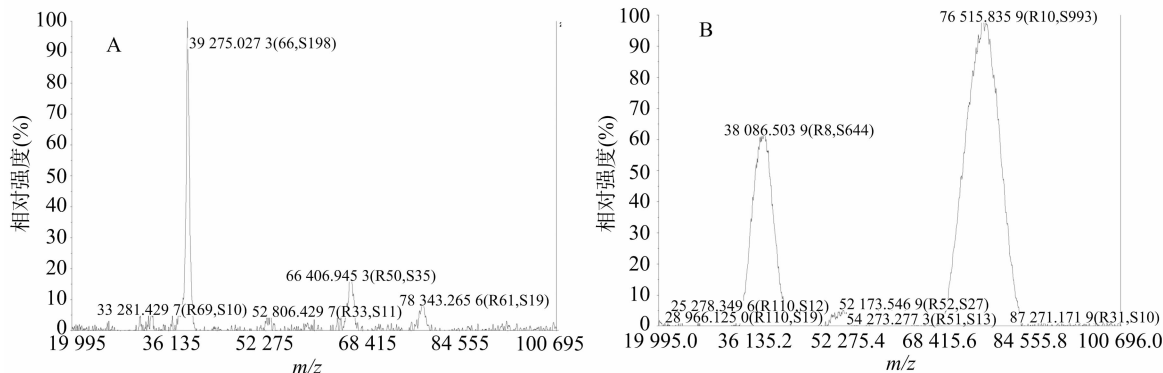


图4 BSA 以及 MC-BSA 质谱鉴定结果

的偶联比为 10 : 1。

由于 KLH 没有精确的分子量,无法用质谱法准确测定 MC - KLH 的分子量,因此未采用此方法进行鉴定。

2.4 免疫鼠血清效价以及敏感度鉴定

如图 5 所示,以大于阴性血清吸光度 2.1 倍计,3 只 Balb/c 小鼠的抗血清效价在 1 : 8 000 ~ 1 : 32 000 之间。选择效价最高且抑制效果最好的 1 号鼠抗血清用方阵滴定法优化包被原和抗血清工作浓度,优化后的包被抗原工作浓度为 2.5 $\mu\text{g/mL}$,抗体稀释倍数为 1 : 8 000。在优化条件下用间接竞争 ELISA 法测定抗血清对微囊藻毒素 LR 的敏感度(图 6),计算得到的 MC - LR 对鼠抗血清的抑制中浓度(I_{50})为 0.53 $\mu\text{g/mL}$ 。结果表明,试验合成的免疫抗原 MC - KLH 成功刺激小鼠产生免疫应答,并产生了能够灵敏识别 MC - LR 的抗体,由此确证了免疫抗原合成成功。

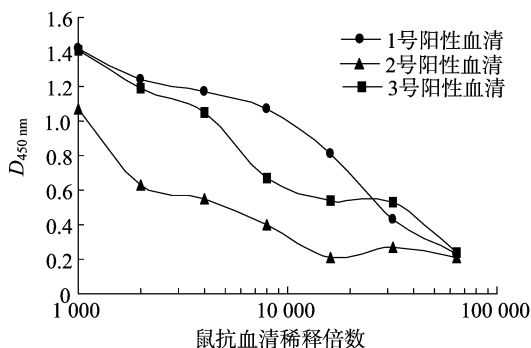


图5 间接非竞争 ELISA 法测定鼠抗血清效价

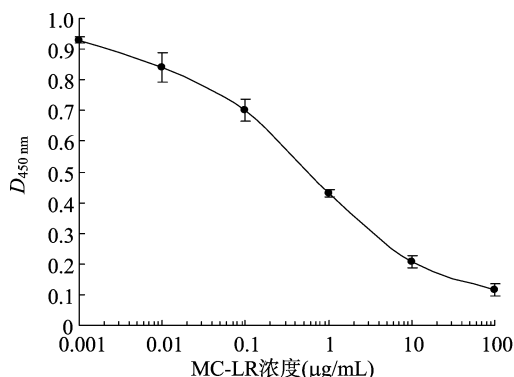


图6 间接竞争 ELISA 法测定鼠抗血清的敏感度

3 讨论与结论

3.1 免疫抗原和包被抗原的合成方法

目前常用的包被抗原和免疫抗原的合成方法有很多,含羧基($-\text{COOH}$)的半抗原一般采用碳二亚胺法、混合酸酐法、 N -羟基丁二酰亚胺活性酯法等合成。含氨基($-\text{NH}_2$)的半抗原一般使用戊二醇法、卤代硝基苯法、二异氰酸酯法、重氮化法等。含羟基($-\text{OH}$)的半抗原一般可用琥珀酸酐法、光气法、卤代羧基法等合成。含有巯基($-\text{SH}$)、醛($-\text{CHO}$)、酮($-\text{CO}-$)结构的半抗原亦可利用相应的双功能团试剂与蛋白偶联合成^[18]。早期, Metcalf 等将 MC - LR 与 2-巯基胺反应形成氨基乙硫醇 - MC - LR,从而引入 1 个游离氨基,再通过戊二醛法将其与载体蛋白 KLH 偶联^[19]。Zeck 等则将阳离子化卵清蛋白(cOVA)进行巯基化修饰后,与 MC - LR 第 7 位氨基酸(MdhA)进行偶联^[20]。盛建武等则在 MC - LR 第 7 位氨基酸分子上引入 1 个游离氨基,形成中间产物($\text{H}_2\text{N}-\text{et MC}-\text{LR}$),再使用戊二醛法将其分别与 BSA 和 OVA 偶联^[21]。以上方法虽然获得了灵敏度较高的抗体,但是须要对 MC - LR 进行复杂的化学修饰后再与载体蛋白偶联。

本研究利用 MC - LR 的第 3 位($D-\beta-\text{Me}-\text{Asp}$)和第 6 位($D-\text{Glu}$)氨基酸中的 2 个游离羧基,用 EDC · HCl 和 NHS 将其与载体蛋白进行直接偶联。该方法具有无需半抗原修饰的优点,大部分试验易于掌握,而且偶联反应条件温和。另外,本试验采用了 KLH 作为免疫原的载体蛋白,KLH 分子量巨大(400 ~ 800 ku),1 个 KLH 分子带有数百个伯氨基基团,可以用于 MC - LR 偶联,相比于 BSA 或 OVA 可以引发更强烈的免疫应答。从小鼠免疫的实际效果来看,本试验用 MC - KLH 免疫的小鼠最高效价达到 1 : 32 000 倍,免疫应答效果良好。

3.2 免疫抗原和包被抗原的鉴定方法

紫外扫描光谱法和 SDS - PAGE 是国内试验室最常用的 2 种偶联物鉴定方法,它们具有仪器设备价格低以及操作简便等优点。但这 2 种方法也存在了一定的局限性,如紫外扫描光谱法是通过观察偶联物的紫外吸收谱图与载体蛋白和半抗原相比有没有偏移或叠加来推测是否成功,是较为粗略的判断方法。以本研究为例,MC - KLH 和 MC - BSA 的紫外谱图虽与载体蛋白存在差异,但偶联物并没有出现明显的

238 nm 处的半抗原特征吸收峰,因此难以准确判断是否偶联成功。另外用紫外扫描光谱法来计算半抗原与载体蛋白偶联比,是通过计算摩尔吸光系数来换算,结果并不精确。

SDS - PAGE 法是通过比较载体蛋白和偶联物电泳迁移率的方法来判断偶联物分子量是否增大。对于本试验可以明显观察到 MC - BSA 的电泳迁移率低于 BSA,证明偶联物分子量增大。但是对于许多分子量更小的半抗原以及偶联比极低情况,由于载体蛋白分子量较大(通常几十到几百 ku),偶联了几十到一两百 u 的半抗原后,用此方法就难以区分。另外,也要注意一些电荷异常和构象异常及由亚基构成的蛋白可能不适用于 SDS - PAGE 测定分子量,如果采用这些蛋白作为载体蛋白偶联,鉴定时应考虑其他方法。

近年来兴起的基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱技术,其准确度远远高于目前常规应用的 SDS - PAGE 与高效凝胶色谱技术,目前可测定生物大分子的分子量高达 600 ku。它是通过对蛋白质分子离子化后通过质荷比进行分析,更能够准确地获得蛋白质相对分子质量,从而能精确计算出半抗原与载体蛋白的偶联比。本试验采用了此种方法精确测定了 MC - BSA 和 BSA 的分子量,最终确定了偶联比。

另外,本试验用于制备免疫抗原的 KLH 由于没有准确的分子量,难以用 SDS - PAGE 和 MALDI - TOF MS 对其偶联结果进行鉴定,但用该免疫原对小鼠免疫后获得了高效价和灵敏度的抗血清,最终证明了免疫原 MC - KLH 合成成功。

本研究成功合成了 MC - LR 的免疫抗原和包被抗原,为其单克隆抗体的制备奠定了基础。试验还系统比较了紫外扫描光谱、SDS - PAGE、MALDI - TOF MS 等 3 种鉴定方法的适用性和优缺点,为其他人工抗原的鉴定方法提供了有益的参考。

参考文献:

- [1] 闫海,潘纲,张明明,等. 微囊藻毒素的提取和提纯研究[J]. 环境科学学报,2004,24(2):355-359.
- [2] Humpage A R, Falconer I R. Oral toxicity of the cyanobacterial toxin cylindrospermopsin in male Swiss albino mice: determination of no observed adverse effect level for deriving a drinking water guideline value[J]. Environmental Toxicology, 2003, 18(2):94-103.
- [3] Blahova L, Marsalek O B, Sejnohova L, et al. The first occurrence of the cyanobacterial alkaloid toxin cylindrospermopsin in the Czech Republic as determined by immunochemical and LC/MS methods[J]. Toxicon, 2009, 53(5):519-524.
- [4] Meng G M, Sun Y, Fu W Y, et al. Microcystin - LR induces cytoskeleton system reorganization through hyperphosphorylation of tau and HSP27 via PP2A inhibition and subsequent activation of the p38 MAPK signaling pathway in neuroendocrine (PC12) cells[J]. Toxicology, 2011, 290(2/3):218-229.
- [5] 刘媛, Tuomas H, 刘贤金, 等. 基于磁珠和时间分辨荧光免疫分析的微囊藻毒素 LR 单抗抗体筛选与鉴定[J]. 中国农业科学, 2012, 45(2):330-337.
- [6] 顾丽丽. ELISA 试剂盒法测定水中 LR 型微囊藻毒素[J]. 化学分析计量, 2013, 22(1):97-99.
- [7] Rapala J, Erkkoma K, Kukkonen J, et al. Detection of microcystins with protein phosphatase inhibition assay, high - performance liquid chromatography - UV detection and enzyme - linked immunosorbent assay: comparison of methods[J]. Analytica Chimica Acta, 2002, 466(2):213-231.
- [8] Dahlmann J, Budakowski W R, Luckas B. Liquid chromatography - electrospray ionisation - mass spectrometry based method for the simultaneous determination of algal and cyanobacterial toxins in phytoplankton from marine waters and lakes followed by tentative structural elucidation of microcystins[J]. Journal of Chromatography A, 2003, 994(1/2):45-57.
- [9] Spoof L, Vesterkvist P, Lindholm T, et al. Screening for cyanobacterial hepatotoxins, microcystins and nodularin in environmental water samples by reversed - phase liquid chromatography - electrospray ionisation mass spectrometry[J]. Journal of Chromatography A, 2003, 1020(1):105-119.
- [10] Fischer W J, Garthwaite I, Miles C O, et al. Congener - independent immunoassay for microcystins and nodularins[J]. Environmental Science & Technology, 2001, 35(24):4849-4856.
- [11] Tsutsumi T, Nagata S, Hasegawa A, et al. Immunoaffinity column as clean - up tool for determination of trace amounts of microcystins in tap water[J]. Food & Chemical Toxicology, 2000, 38(7):593-597.
- [12] Aranda - Rodriguez R, Kubwabo C, Benoit F M. Extraction of 15 microcystins and nodularin using immunoaffinity columns[J]. Toxicon, 2003, 42(6):587-599.
- [13] Ward C J, Beattie K A, Lee E Y, et al. Colorimetric protein phosphatase inhibition assay of laboratory strains and natural blooms of cyanobacteria: comparisons with high - performance liquid chromatographic analysis for microcystins[J]. FEMS Microbiology Letters, 1997, 153(2):465-473.
- [14] Hereszyn T, Nicholson B C. Determination of cyanobacterial hepatotoxins directly in water using a protein phosphatase inhibition assay[J]. Water Research, 2001, 35(13):3049-3056.
- [15] Kiviranta J, Sivonen K, Niemelä S I, et al. Detection of toxicity of cyanobacteria by *Artemia salina* bioassay[J]. Environmental Toxicology & Water Quality, 1991, 6(4):423-436.
- [16] McElhiney J, Lawton L A. Detection of the cyanobacterial hepatotoxins microcystins[J]. Toxicology & Applied Pharmacology, 2005, 203(3):219-230.
- [17] Yu F Y, Liu B H, Chou H N, et al. Development of a sensitive ELISA for the determination of microcystins in algae[J]. Journal of Agricultural & Food Chemistry, 2002, 50(15):4176-4182.
- [18] 周思祥, 刘福成. 农药人工抗原的合成研究进展[J]. 农药, 2005, 44(8):337-341.
- [19] Metcalf J S, Bell S G, Codd G A. Production of novel polyclonal antibodies against the cyanobacterial toxin microcystin - LR and their application for the detection and quantification of microcystins and nodularin[J]. Water Research, 2000, 34(10):2761-2769.
- [20] Zeck A, Eikenberg A, Weller M G, et al. Highly sensitive immunoassay based on a monoclonal antibody specific for [4 - arginine] microcystins[J]. Analytica Chimica Acta, 2001, 441(1):1-13.
- [21] 盛建武, 何苗, 宋保栋, 等. 微囊藻毒素 - LR 完全抗原的设计及制备[J]. 环境科学, 2005, 26(3):33-37.