

微囊藻毒素-LR 多克隆抗体的制备

盛建武, 何苗, 施汉昌, 钱易

(清华大学环境科学与工程系环境模拟与污染控制国家重点联合实验室, 北京 100084)

摘要:通过对新西兰大白兔免疫自制的微囊藻毒素-LR(Microcystin-LR, MC-LR)完全抗原 BSA-MC-LR, 获得了质量较好的抗 MC-LR 的多克隆抗体, 间接 ELISA 表明抗体的效价能达到 1.5×10^5 ; 固定包被抗原 OVA-MC-LR, 采用间接竞争 ELISA 测定水体中的微囊藻毒素, 标准曲线表明对水样中 MC-LR 的检测下限为 10ng/L, 线性区间为 30ng/L~3 μ g/L, 能满足对饮用水和地表水中 MC-LR 的检测要求。

关键词:微囊藻毒素-LR; 多克隆抗体; 间接竞争 ELISA

中图分类号: X173; X830.2 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2006)04-0783-04

Preparation of Polyclonal Antibody Against Microcystin-LR

SHENG Jianwu, HE Miao, SHI Hanchang, QIAN Yi

(ESPC State Key Joint Laboratory, Department of Environment Science and Engineering, Tsinghua University, Beijing 100084, China)

Abstract: Good quality polyclonal antibody against Microcystin-LR (MC-LR) was obtained from the New Zealand rabbit immunized with the homemade complete antigen BSA-MC-LR. Indirect ELISA shows the titer of this antibody is more than 1.5×10^5 ; Indirect competitive ELISA immobilized the coating antigen OVA-MC-LR was adapted to detect MCs, the calibration curve shows that the detection lower limit is 10ng/L, and the range of quantitative detection was between 30ng/L to 3 μ g/L, with a good linearity, which will well potentially suit for sensitive analysis for MC-LR in drinking as well as surface water samples.

Key words: Microcystin-LR; polyclonal antibody; indirect competitive ELISA

水体富营养化致使藻类异常增殖并释放藻毒素 (Algae Toxin), 这些次级代谢产物严重危害了人类的用水安全和其他水生生物的安全^[1]. 其中以微囊藻 (*Microcystis*) 等产生的微囊藻毒素 (Microcystins, MCs) 更应该引起重视, 微囊藻毒素-LR (Microcystin-LR, MC-LR) 是目前已知急性毒性最强、危害最大的一种淡水蓝藻毒素^[2,3]. 目前水体中 MCs 的检测大多采用 HPLC-MS 或 PPIA 等检测方法^[4,5], 近年来, 酶联免疫吸附检测 (Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 开始用于 MCs 的检测. 免疫检测技术由于检测限低、操作简单等其众多的优点, 呈现出了较好的应用前景, 受到国外研究人员的广泛关注^[6~12], 国内研究机构也作了相当多的工作^[13,14]. 本文利用自制合成的微囊藻毒素-LR 完全抗原, 免疫新西兰大白兔获得抗血清; 经纯化后获得多克隆抗体, 并应用于间接竞争 ELISA, 用来检测自配水样中 MC-LR 的浓度, 显示出良好的结果, 该方法具有推广和应用的潜力。

1 多克隆抗体的制备

1.1 材料和试剂

健康雄性新西兰大白兔 2 只, 体重 2.5kg 左右,

年龄 3 个月左右, 购自北京大学医学部试验动物中心. 免疫前 1 周购买并妥善喂养。

0.1mol/L pH7.4 磷酸盐缓冲溶液 (Phosphate buffer solution, PBS) 缓冲液; 弗氏完全佐剂和弗氏不完全佐剂 (Pierce); 合成的完全抗原 MC-LR-BSA, 合成方法及鉴定见文献^[15]; 5mL 的冻存管, 5mL 一次性注射器, 棉手套, 乳胶手套, 橡胶管 2 根, 离心机 (上海安亭科学仪器公司, TGL-16B), 1mL 离心管 6 个。

1.2 免疫方案

整个免疫过程如下: ①免疫前 1 周取家兔耳缘静脉血, 分离血清作为阴性对照. ②采用完全抗原 MC-LR-BSA 对 2 只家兔进行免疫. 免疫途径采用背部 6 点皮下注射 (靠近淋巴结的腋下、背部、腹股沟各两侧). 初次免疫剂量为每只 1.2mg 完全抗原 (约含半抗原 90 μ g). 初次免疫后 10d 左右, 即发现兔子出现消瘦、无精打采等现象; 背部免疫的点出现直径约 1cm 左右的脓肿. ③初次免疫 3 周后进行第 1 次加强免疫, 以后再次加强免疫, 时间间隔同样为

收稿日期: 2005-03-25; 修订日期: 2005-06-20

基金项目: 国家高技术研究发展计划 (863) 项目 (2002AA649160)

作者简介: 盛建武 (1978~), 男, 博士研究生, 主要研究方向为水污染控制。

3 周. 加强免疫的剂量与初次免疫相同. ④根据动物产生抗体的规律, 每次免疫后的第 7d 采血, 采血途径采用家兔耳缘静脉采血, 采血量为每只家兔 1.0mL. 分离血清, 检测抗体效价以检验免疫效果.

每次免疫取 1.5mL 完全抗原(浓度为 2 mg/mL)与等体积弗氏完全佐剂充分乳化后进行免疫. 考虑到乳化过程中的损失以及免疫前因排除针头内空气的损失, 所以完全抗原稍过量.

优化的乳化方法: 用 1 支 5mL 的一次性注射器(1 号)吸取 1.5mL 完全弗氏佐剂, 继续吸取 1.5mL 完全抗原. 加压注射到另 1 支不带针头的 5mL 的一次性注射器(2 号)中; 结束后将 1 号针头拔下, 接到 2 号注射器上, 同样加压注射回 1 号注射器; 再将针头反复换接注射, 直至乳化完全为止. 乳化完全的混合物呈乳白色, 最后变得非常粘稠. 取一滴滴在水面上, 若乳化物不散开, 则证明乳化完全.

1.3 抗血清的采集和纯化

末次测定血清效价达到要求后, 采集抗血清. 放血前禁食 24h, 以防血脂过高. 采用颈动脉放血. 将收集血液的平皿加盖后, 置 37℃温箱 1h, 再放 4℃冰箱过夜, 待血块收缩后分离血清, 分装每管 5mL, -20℃储藏备用.

抗体的纯化采用饱和硫酸铵盐析沉淀法. 材料: 饱和硫酸铵(Saturated ammonium sulfate, SAS); 透析袋(截留分子量范围 8 000~15 000); 0.1mol/L pH7.4 PBS; 高速低温离心机.

具体操作步骤如下: ①所取抗血清经 4℃或室温离心 13 000r/min, 30min, 收集上清. ②取上清约 20mL 与等体积生理盐水稀释, 冷却到 4℃, 缓慢加入 40mL 等体积饱和硫酸铵, 搅拌 30min 或过夜, 使蛋白充分沉淀. ③4℃离心 13 000r/min, 10min, 弃上清. 沉淀用 12mL 0.1mol/L 的 PBS 缓冲液溶解, 同步骤 2 滴加 8mL SAS, 4℃1h. ④同前离心, 用少许 PBS 将沉淀溶解, 一并装入透析袋. ⑤用大于 20 倍体积的 PBS 于 4℃透析, 更换透析液数次, 至无铵离子为止. 取出抗体置于 -20℃保存.

2 间接 ELISA 测定抗体

2.1 材料和试剂

聚苯乙烯微量细胞培养板(平板, 96 孔); BIO-RAD 550 型酶联免疫检测仪. 包被抗原采用鸡蛋白蛋白(Ovalbumin, OVA)按照文献[15]方法合成的 OVA-MC-LR. 包被液: 0.05mol/L pH9.6 碳酸缓冲液, 4℃, 保存. 稀释液: 0.01mol/L pH7.4 PBS, 4℃,

保存. 洗涤液为稀释液加入 0.05% Tween-20 即可. 封闭液: 0.5% 鸡卵清蛋白(5mg/mL), pH7.4 PBS. 酶标二抗(辣根过氧化物酶-羊抗兔 IgG), 工作稀释度 1:1 000. 邻苯二胺溶液(OPD, *o*-phenylenediamine)底物: 临用前配制 0.1mol/L 柠檬酸 6.1mL 0.2mol/L $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 6.4mL 加蒸馏水 12.5mL; 再加入邻苯二胺 10mg 溶解后, 临用前加 30% H_2O_2 40 μL . 终止液: 2mol/L H_2SO_4 .

2.2 间接 ELISA 的操作步骤^[16, 17]

①包被抗原: 用包被液将抗原稀释成 10 $\mu\text{g/L}$, 每孔加 200 μL , 37℃温育 0.5h 或者 4℃冰箱放置 16~18h(过夜). ②洗涤: 倒尽板孔中液体, 加满洗涤液, 静放 3min, 反复 3 次, 最后将反应板倒置在吸水纸上, 使孔中洗涤液流尽. ③加封闭液 200 μL , 37℃放置 1h, 洗涤同前. ④加被检血清: 用稀释液将被检血清作 2 倍梯度稀释, 每孔 200 μL . 同时作稀释液对照. 37℃放置 1.5h, 洗涤同前. ⑤加辣根过氧化物酶羊抗兔 IgG, 每孔 200 μL , 放置 37℃1h, 洗涤同前. ⑥加新鲜配置的底物: 邻苯二胺溶液加 200 μL , 室温暗处 10~15min. ⑦加终止液: 每孔 50 μL . ⑧观察结果: 用酶联免疫检测仪记录 492nm 读数(桔红色, 或 490nm).

3 间接竞争 ELISA 检测水样

3.1 材料和试剂

配置一系列浓度梯度的 MC-LR($\mu\text{g/L}$)标准溶液: 0, 0.001, 0.003, 0.01, 0.03, 0.1, 0.3, 1, 3, 10, 30.

再配置若干浓度已知的 MC-LR 水样, 其中 MC-LR 标准样品购自 Alexis 公司(产品号 ALX-350-012); 其它材料和试剂同间接 ELISA.

3.2 间接竞争 ELISA 的操作步骤^[18, 19]

①包被完全抗原和封闭同间接 ELISA, 洗涤 3 次. ②加不同浓度的 MC-LR: 每孔 50 μL . ③加稀释后的抗体(1:2 000), 每孔 50 μL , 混匀, 37℃放置 1h. 洗涤 3 次. ④加辣根过氧化物酶羊抗兔 IgG, 每孔 100 μL , 放置 37℃1h. 洗涤 3 次. ⑤加新鲜配置的底物显色, 加终止液, 观察结果均同间接 ELISA.

4 结果与讨论

4.1 抗体的效价分析

以 OVA-MC-LR 作为包被抗原, 用间接 ELISA 分别测定阴性血清、第 1 次和第 2 次加强免疫后的血清; 用 OVA 作为包被抗原, 间接 ELISA 测定第 2

次加强免疫后的血清,实验结果如图 1 所示。

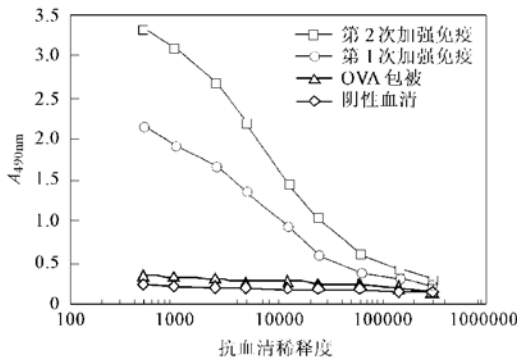


图 1 间接 ELISA 鉴定抗血清
Fig. 1 Antiserum identification by indirect ELISA

由图 1 可知,①所获抗血清对包被抗原 MC-LR-OVA 有较高的吸收值,而对 OVA 吸收值较低,说明兔抗血清中存在抗 MC-LR 的抗体,而不存在抗 OVA 的抗体。②阴性对照孔吸光值极低,说明血清中抗 MC-LR 抗体不是事先存在的,而是通过合成的完全抗原免疫获得的。③第 2 次加强免疫对比第 1 次加强免疫,效价有明显提高,灵敏度也有提高。④抗血清的效价定义为当阳性抗血清吸光值大于 2.1 倍阴性对照吸光值时,抗血清的稀释倍数。图 1 中“第 2 次加强免疫”曲线即为所获抗血清的效价曲线,分析可知稀释倍数为 150 000 时,其吸光值仍然高于阴性血清吸光值的 2.1 倍,因而所获兔抗血清效价大于 1.5×10^5 ,该效价说明所获得的抗血清质量较好。

4.2 间接竞争 ELISA 标准曲线分析

为了获得间接竞争 ELISA 标准曲线,经过反复试验,最终确定配置的 MC-LR 标准溶液梯度分别为: 0, 0.001, 0.003, 0.01, 0.03, 0.1, 0.3, 1, 3, 10, 30 $\mu\text{g/L}$, 共计 11 个点,试验结果如图 2 所示(3 组平行试验的结果)。从图 2 可以看出,曲线呈现明显的反 S 型,其中阴性孔(MC-LR 浓度为 0)的 $A_{490\text{nm}}$ 值为 1.608,半抑制浓度 IC_{50} 为 0.2 $\mu\text{g/L}$,该方法对 MC-LR 的最低检测限为 0.01 $\mu\text{g/L}$,最高检测限为 10 $\mu\text{g/L}$ 。

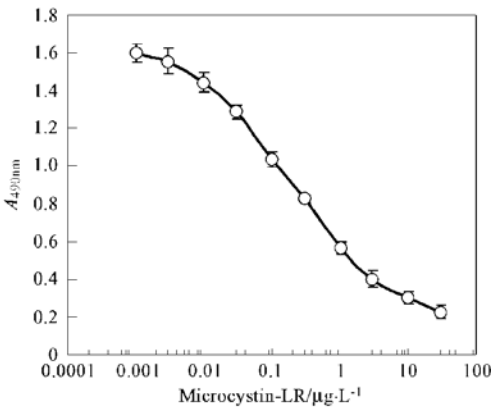


图 2 间接竞争 ELISA 标准曲线
Fig. 2 Standard curve obtained with indirect competitive ELISA

靠近 IC_{50} 的一段线形区间称为定量检测区间,由图 3 可知,该方法对 MC-LR 的定量检测区间所对应的浓度范围为 0.03~3 $\mu\text{g/L}$,线性度良好,回归系数 $R^2 = 0.997$,如图 3 所示。

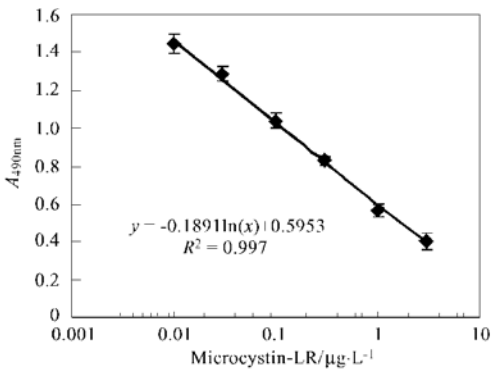


图 3 间接竞争 ELISA 定量检测范围
Fig. 3 The limit of quantitative detection

4.3 自配水样测定结果

分别配置 4 个不同浓度的 MC-LR 标准溶液,用间接竞争 ELISA 测定吸光值 $A_{490\text{nm}}$,每个样品做 3 个平行,按图 3 中的线性回归方程计算 MC-LR 的浓度,同时计算 3 次测定的标准偏差以及测定结果与理论值的相关系数,列于表 1。由表可知,该方法重复性较好,变异系数均小于 10%,与标准值相关性较好(相关系数为 0.998)。

表 1 标准样品的测定结果
Table 1 Detection results of standard samples

标准 MC-LR / $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	测定值 $A_{490\text{nm}}$			平均值	变异系数/%	计算值 MC-LR/ $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	相关系数
	$n = 1$	$n = 2$	$n = 3$				
0.05	1.182	1.187	1.212	1.194	1.3	0.043	0.999
0.1	1.032	1.028	1.039	1.033	0.5	0.099	
1	0.571	0.582	0.594	0.582	2.0	1.067	
2	0.448	0.452	0.463	0.454	1.7	2.093	

5 结论

本研究通过采用自制的完全抗原 MC-LR-BSA 免疫新西兰大白兔, 获得了质量较好的抗 MC-LR 的多克隆抗体, 间接 ELISA 表明抗体的效价能达到 1.5×10^5 ; 固定半抗原分子, 采用间接竞争 ELISA 测定标准曲线, 结果表明对水样中 MC-LR 的检测下限为 10ng/L, 线性区间为 30ng/L ~ 3 μ g/L, 且线性度良好; 运用该方法对自配 MC-LR 标准溶液进行测定, 重现性和相关性都能达到要求, 表明运用获得的抗体进行的间接竞争 ELISA 方法能满足对饮用水和地表水中 MC-LR 的检测要求。

参考文献:

- [1] Ingrid C, Jamie B. Toxic Cyanobacteria in Water [M]. London and New York: E & FN Spon Publisher, 1999. 416.
- [2] Sivonen K. Cyanobacterial toxins and toxin production [J]. Phycologia, 1996, **35**(Suppl 6): 12~ 24.
- [3] 韩志国, 郑解生, 谢隆初. 淡水水体中的蓝藻毒素研究进展 [J]. 暨南大学学报, 2001, **22**(3): 129~ 135.
- [4] Dahlmann J, Budakowski Wes 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.
- [5] Rivasseau C, Martins S, Hennion M C, *et al.* Determination of some physicochemical parameters of microcystins (cyanobacterial toxins) and trace level analysis in environmental samples using liquid chromatography [J]. Journal of Chromatography A, 1998, **799**(1-2): 155.
- [6] Lawrence James F, Menard Cathie. Determination of microcystins in blue-green algae, fish and water using liquid chromatography with ultraviolet detection after sample cleanup employing immunoaffinity chromatography [J]. Journal of Chromatography A, 2001, **922**(1-2): 111~ 117.
- [7] Kondo Fumio, Ito Yuko, *et al.* Determination of microcystins in lake water using reusable immunoaffinity column [J]. Toxicon, 2002, **40**(7): 893~ 899.
- [8] Fontal O I, Vieytes M R. A fluorescent microplate assay for microcystin-LR [J]. Analytical Biochemistry, 1999, **269**(2): 289~ 296.
- [9] Zeck Anne, Eikenberg Anja. Highly sensitive immunoassay based on a monoclonal antibody specific for [4-arginine] microcystins [J]. Analytica Chimica Acta, 2001, **441**(1): 1~ 13.
- [10] Rivasseau Corinne, Hennion Marie-Claire. Potential of immunoextraction coupled to analytical and bioanalytical methods (liquid chromatography, ELISA kit and phosphatase inhibition test) for an improved environmental monitoring of cyanobacterial toxins [J]. Analytica Chimica Acta, 1999, **399**(1-2): 75~ 87.
- [11] Tsutsumi Tomoaki, Nagata Satoshi, Yoshida Fuyuko, *et al.* Antidiotype monoclonal antibodies against anti-microcystin antibody and their use in enzyme immunoassay [J]. Toxicon, 1998, **36**(2): 235~ 245.
- [12] Ueno Y, Nagata S. ELISA analysis of microcystins, algal hepatotoxins, in environmental water [J]. Toxicon, 1997, **35**(4): 482~ 483.
- [13] 雷腊梅, 甘南琴, 宋立荣, 等. 三种检测微囊藻毒素的 ELISA 方法比较研究 [J]. 高技术通讯, 2004, **7**: 89~ 92.
- [14] Lei La Mei, Wu Ying Song, Song Li Rong, *et al.* An ELISA-like time-resolved fluorescence immunoassay for microcystin detection [J]. Clinica Chimica Acta, 2004, **348**(1-2): 177~ 180.
- [15] 盛建武, 何苗, 钱易, 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.
- [16] Nagata S, Soutome H, Tsutsumi T, *et al.* Novel monoclonal antibodies against microcystin and their protective activity for hepatotoxicity [J]. Nat. Toxins, 1995, **3**(2): 78~ 86.
- [17] Nagata S, Tsutsumi T, Yoshida F, *et al.* A new type sandwich immunoassay for microcystin: production of monoclonal antibodies specific to the immune complex formed by microcystin and an anti-microcystin monoclonal antibody [J]. Nat. Toxins, 1999, **7**(2): 49~ 55.
- [18] Mikhailov Andrey, Härmä-Braskén Anri-Sofi, Meriluoto Jussi, *et al.* Production and specificity of mono and polyclonal antibodies against microcystins conjugated through N-methyldehydroalanine [J]. Toxicon, 2001, **39**(4): 477~ 483.
- [19] Mikhailov Andrey, Härmä-Braskén Anri-Sofi, Polosukhina Elena, *et al.* Production and specificity of monoclonal antibodies against nodularin conjugated through N-methyldehydrobutyryne [J]. Toxicon, 2001, **39**(10): 1453~ 1459.