微囊藻毒素-LR 完全抗原的设计及制备

盛建武 ,何苗 ,宋保栋 ,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 :从偶联位点 、偶联剂 、载体蛋白和偶联步骤等分析出发 ,设计了微囊藻毒素-LR (Microcystin-LR , MC-LR) 完全抗原的制备方法 .在半抗原分子第 7 位氨基酸分子上引进 1 个自由的氨基 ;再用戊二醛 2 步法将此中间产物(H_2N-et MC-LR) 分别与 BSA 和 OVA 偶联 .中间产物和偶联产物分别经固相萃取和透析纯化后 ,经 SDS 凝胶电泳 、紫外扫描及生物质谱技术鉴定 ,结果表明 MC-LR 与 BSA 的平均偶联比能达到 5 以上 ,满足了进一步免疫的要求 .

关键词 :微囊藻毒素-LR ;完全抗原 ;偶联比
中图分类号 : X173 ; X830.2 文献标识码 : A 文章编号 :0250-3301(2005) 03-0033-05

Synthesis of Complete Antigen of Microcystin-LR and Its Antibody Production

SHENG Jian-wu , HE Miao , SONG Bao-dong , SHI Han-chang , QIAN Yi
(ESPC State Key Joint Laboratory , Department of Environment Science and Engineering , Tsinghua University , Beijing 100084 , China)

Abstract : Based on the analysis of coupling location , coupling regent , carrying protein and coupling process , completed antigen of Microcystin-LR (MC-LR) was synthesized . A free amidogen was introduced to microcystin-LR (MC-LR) using chemical modification (aminoethylation) of its 7th core amino acids , N-methyl-dehydroalanine . The intermediate product Aminoethyl-MC-LR (H_2N-et MC-LR) was purified by Solid Phase Elute (SPE) and identified by Mass Spectrometry , then coupled with BSA through glutaraldehyde to be complete antigen . The completed antigen was dialyzed and identified by SDS-PAGE , UV-scanning and bio-mass spectrometry . The result show that the coupling ratio between MC-LR and BSA of complete antigen in average was over 5 , and it is sufficient to immunity .

Key words : Microcystin-LR ; complete antigen ; coupling ratio

水体富营养化致使藻类异常增殖 ,并释放生物毒素 ——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] .目前水体中藻毒素的检测大多采用 HPLC-MS 或 LC-MS 等检测方法[4,5] ,这类检测技术往往操作复杂 、耗时长 、价格较高 、精度难以满足要求 ,限制了常规检测的次数 .而免疫检测技术在藻毒素的检测领域呈现了较好的应用前景 ,受到国内外研究人员的广泛关注[6~10] .

免疫检测技术的关键在于获得特异性和亲和力良好的多克隆抗体或单克隆抗体 .而抗体这 2 个主要特性很大程度上取决于抗原的性质 ;尤其对于微囊藻毒素-LR 等分子量1 000左右甚至更小的小分子物质 ,本身不具备免疫原性 ,属于半抗原 ,只有与大分子物质偶联成完全抗原才能促使机体产生免疫反应 ,从而获得抗体 .因此 ,合成并纯化免疫性能良好的 MC-LR 完全抗原并制备和纯化性能良好的抗体是非常关键的技术环节 .

1 合成方案的设计

1.1 偶联位点的选择

微囊藻毒素是一组环状七肽 ,其中微囊藻毒素-LR 的结构如图 1 所示 .目前已经发现微囊藻毒素各种异构体有 60 多种 ,其变化主要在于第 2 位和第 4 位上 2 个 L-氨基酸的不同 , MC-LR 这 2 个位置上的氨基酸分别为亮氨酸和精氨酸[11] .研究发现 ,第 5 位氨基酸 Adda 对微囊藻毒素的毒性是必需的 ,其共轭立体结构会影响其毒性 ,结构改变则毒性改变[12,13] .一般来说 ,偶联位点应选择对免疫来说最不重要的区域 ,而将抗原决定簇基团(致毒基团) 暴露在外面 ,因为抗体对远离偶联位点的基团的识别能力远远大于邻近偶联位点的基团的识别能力 .

文献表明 ,早期的偶联位点都是选择 MC-LR

收稿日期 :2004-09-06 ;修订日期 :2004-10-15
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 ,研究方向为水污染控制 .

第 3 位的 D- MeAsp 或第 6 位的 D- Glu .利用其羧基通过偶联剂与载体蛋白相连,免疫动物产生抗体[14].但是由此产生的单抗和多抗都只能识别带有 Adda 氨基酸的藻毒素,而不能将它们区别开来.本研究偶联位点选择为第 7 位氨基酸 Mdha, Mdha 远离致毒基团 Adda,因而抗体能够有效的识别出微囊藻毒素和节球藻毒素;而且远离 2 个可变的氨基酸,因而能够识别出微囊藻毒素的各种异构体,这对于提高微囊藻毒素- LR 抗体的特异性非常重要.利用乙胺硫醇盐在此氨基酸的双键处引入 1 个氨基,并通过它与载体蛋白偶联是容易实现的[15,16].

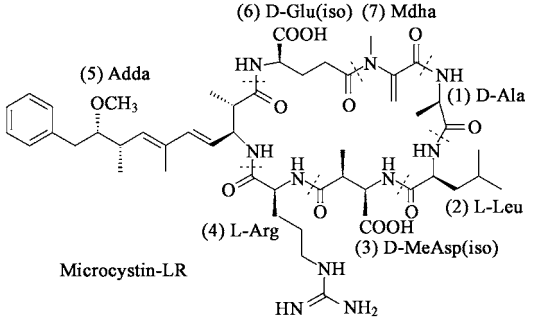

图 1 微囊藻毒素- LR 的分子结构

Fig .1 Molecular structure of Microcystin- LR

1.2 载体蛋白和偶联剂

载体有蛋白质、多肽聚合物、大分子聚合物等.蛋白质是一类结构复杂的高分子化合物,是一种良好的载体.一般而言,载体蛋白与免疫对象的血缘关系越远,则免疫效果越好.本研究采用常用的牛血清蛋白(BSA; 分子质量 67 000u) 作为载体蛋白.

戊二醛是一种双功能偶联试剂,能通过它 2 端的醛基将 2 个自由氨基偶联到一块.通过戊二醛偶联还可为多肽和载体蛋白之间提供一段非常灵活的长链,使它们之间有较大的空间,从而将半抗原充分暴露在外面,形成有利的免疫表位,进而达到良好的免疫效果.因此,本研究选用戊二醛作为偶联剂.

1.3 偶联步骤的确定

偶联原理和操作过程如图 2 所示,即分为 2 步: ①在 MC- LR 分子第七位的氨基酸 Mdha 的双键处修饰上一个自由的氨基,形成 H_2 N-et MC- LR; ②采用戊二醛二步法将 H_2 N-et MC- LR 偶联到载体蛋白 BSA 上.

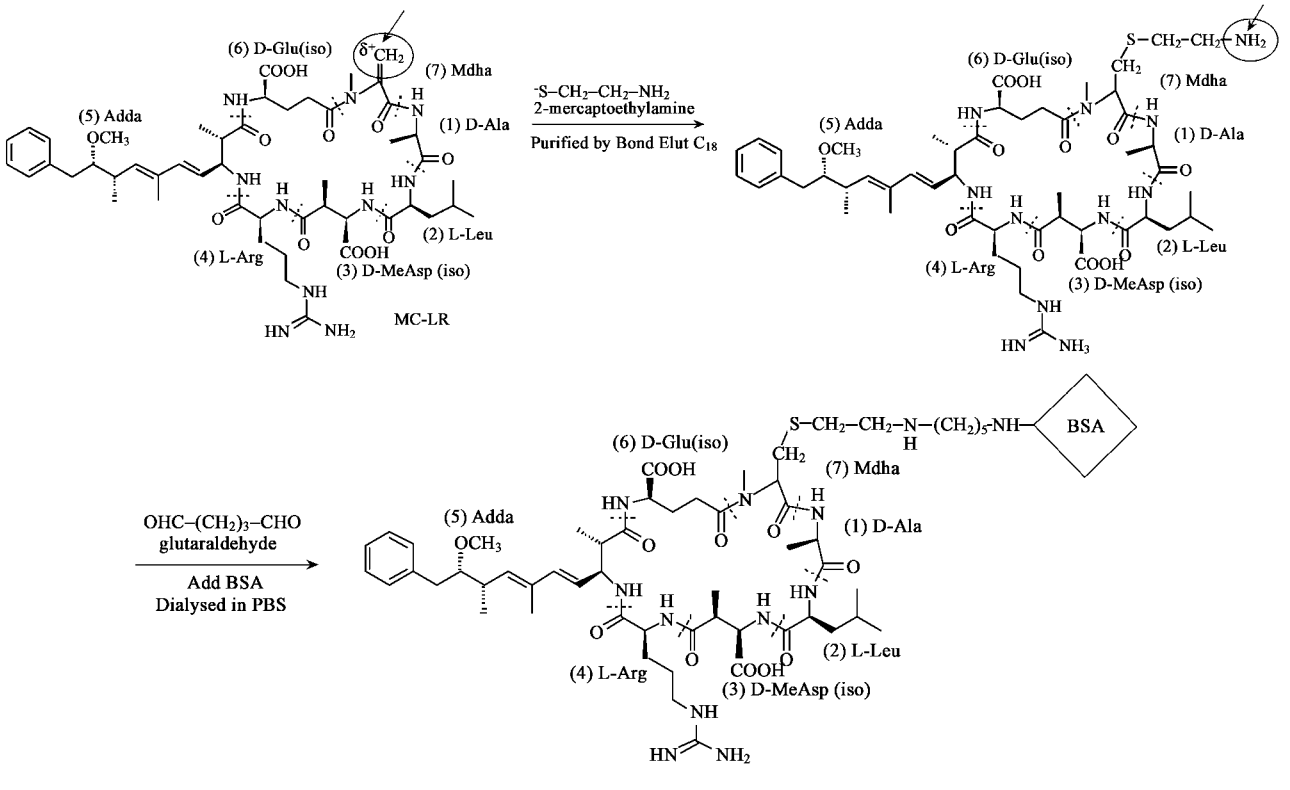

图 2 半抗原 MC- LR 与 BSA 偶联示意图

Fig .2 Overview of hapten conjugation of microcystin- LR to BSA

2　材料和方法

2.1　材料和试剂

微囊藻毒素-LR 为 sigma 公司产品,产品号 m2912;戊二醛、BSA、2-巯基乙胺均为为 sigma 产品;甲醇、乙酸、碳酸钠、碳酸氢钠、ELISA 所用化学试剂等为分析纯;500 mg 6 mL C_{18} BondElut cartridge (Varian, Walnut Creek, CA);透析袋(截留分子量范围:8 000 ~ 15 000).

2.2　操作步骤

首先进行微囊藻毒素-LR 的氨基修饰,具体操作如下:①将 0.5 mg MC-LR 溶于 2 mL 0.1 mol/L pH = 9 的碳酸盐缓冲液中;②称取 170.4 mg 2-巯基乙胺加入上述溶液中.混合物充分摇匀,在 50 ℃反应 1 h;③反应完毕,降到室温,加入与 2-巯基乙胺等摩尔的乙酸使反应停止.

接下来用戊二醛 2 步法合成完全抗原,具体操作如下:①将所获得的 H_2N-et MC-LR(含 MC-LR 约 0.5 mg)溶于 3 mL 0.01 mol/L pH7.4 的 PBS 中(预先加入 3 % (体积分数)的甲醇 methanol,即加入 100μL 甲醇);②按 MC-LR:戊二醛摩尔比为 10:1 加入适量 0.1 %的戊二醛,剧烈振摇,室温下避光反应 2h 以上;③用 500 mg 6 mL C_{18} BondElut cartridge 纯化所得产物;④按 MC-LR:BSA 摩尔比 10:1 加入 1 mg/mL 的 BSA 溶液 5 mL,充分混合,4 ℃振荡过夜;⑤反应完毕,混合物在 PBS 中透析 24h,4 ℃,(8h 换 1 次,共 3 次;每次用 PBS 2L).

2.3　产物纯化及鉴定技术

中间产物 H_2N-et MC-LR 的纯化采用固相萃取技术,材料为 500 mg 6 mL C_{18} BondElut cartridge,具体操作步骤如下:

活化:用 4 mL 甲醇活化,并用 6 mL 高纯水调整,分为 2 ~ 3 次使用;上样:将水样以 5 ~ 10 mL/min的流速流过固相萃取柱进行富集浓缩.重力过滤;淋洗:装样完毕后,用 5 %甲醇水溶液 6 mL 淋洗以净化样品,分为 3 次使用;洗脱:待固相萃取柱吹干后,以 4 mL 甲醇(分为 2 次)将微囊藻毒素洗脱并收集.中间产物的鉴定采用 MS 仪测定主要产物的分子量即可.对于合成抗原的鉴定,本研究采用了 SDS-PAGE、紫外扫描、多电荷生物质谱等方法和技术.

3　结果和讨论

3.1　MC-LR 的修饰及纯化结果

对于修饰后的 MC-LR,为了证实引进游离的巯基乙胺是否成功,本研究利用质谱仪 MS 测定目标产物(H_2N-et MC-LR)的分子量,质谱仪扫描结果如图 3 所示.

主要产物的理论分子量为 MC-LR 与

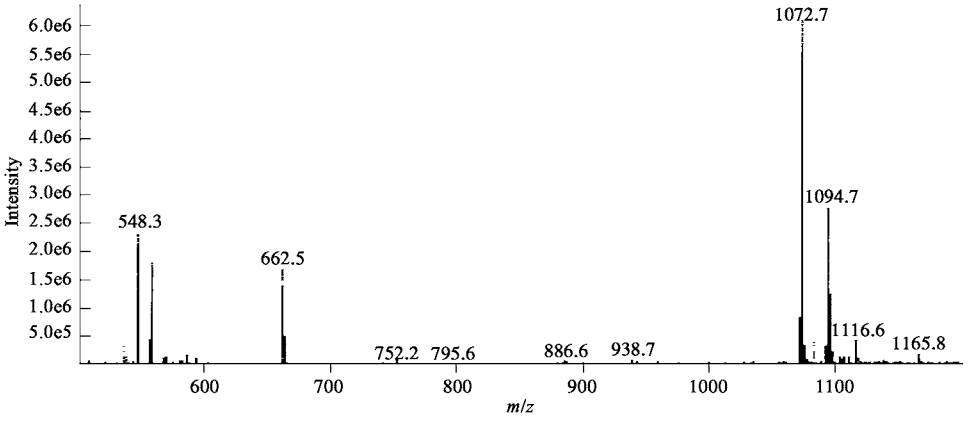

图 3　H_2N-et MC-LR 质谱图

Fig.3　The mass spectrum of H_2N-et MC-LR

H_2N-CH_2CH_2-SH的分子量之和,即 1072.2,MS 测定值为 1072.7,二者基本一致.结果表明,氨基修饰是成功的.笔者多次实验结果表明,针对微囊藻毒素的固相萃取技术重复性良好,没有交叉污染,洗脱产物污染物极少,能获得纯度很高的目标产物.

3.2　合成完全抗原的定性分析

利用 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳法定性分析所获得的完全抗原分子量范围,所得结果如图 4 所示.其中左侧系列条带为标准低分子量蛋白系列,从上往下第 2 条为标准 BSA 蛋白条带,右侧为合成的完

全抗原电泳条带.

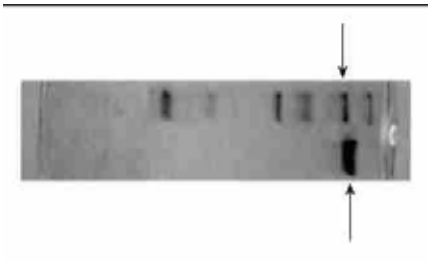

图 4 MC-LR-BSA 电泳照片

Fig.4 SDS-PAGE photograph of MC-LR-BSA

从图 4 可以看出,所制备的完全抗原,分子量范围更宽,而且平均分子量明显高于 BSA 分子量水平.可以定性表明,完全抗原的合成是比较成功的. BSA, MC-LR 及偶联物的紫外扫描曲线如图 5 所示.由图 5 可知,偶联物和 BSA 同样在 280nm 处有吸收峰;而 238nm 是 MC-LR 的吸收峰,偶联物紫外扫描结果在 238nm 附近发生明显的红移,从而可以判断,偶联是有效的.

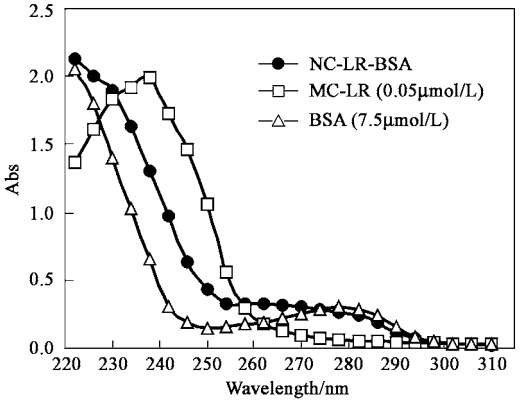

图 5 BSA, MC-LR 以及 MC-LR-BSA 紫外扫描曲线

Fig.5 UV spectrum curve of BSA, MC-LR and MC-LR-BSA

3.3 合成完全抗原的定量分析

本研究采用生物质谱技术对偶联产物进行定量分析.将所获得的完全抗原纯化、脱盐后,利用 API3000 液相色谱质谱联用仪测定的质谱图如图 6 所示.

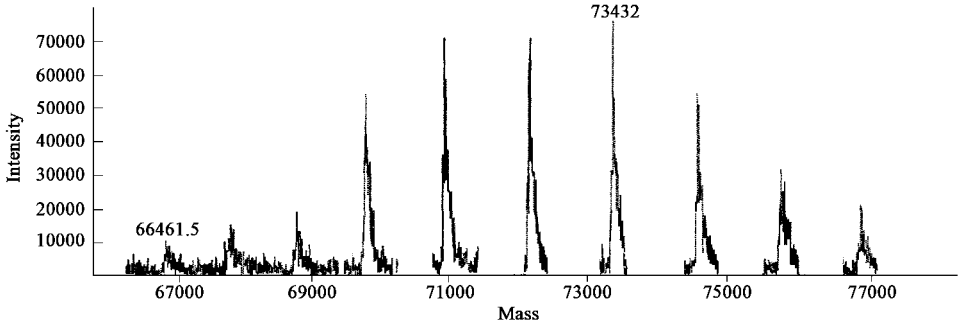

图 6 MC-LR-BSA 质谱图

Fig.6 The mass spectrogram of MC-LR-BSA

由于 MS 测定的 BSA 分子量为66 463.0,每偶联上 1 个 H_2N-et MC-LR 分子,分子量增加1 000左右.图 6 中偶联物的分子量分布可以看到,偶联比在 3 ~ 8 之间的偶联物信号较大,未参与偶联的 BSA 信号较小.

4 结论

本研究在偶联位点的选择和偶联步骤的确定上进行了研究,设计了一条制备微囊藻毒素-LR 完全抗原的合成路线.对微囊藻毒素-LR 进行氨基修饰后,采用戊二醛 2 步法合成了 MC-LR 完全抗原,即在半抗原分子第 7 位氨基酸分子上引进一个自由的氨基;再用戊二醛 2 步法将此中间产物(H_2N-et MC-LR)与 BSA 偶联.用固相萃取法和透析法分别对中间产物和合成产物进行纯化,获得了良好的效果;运用生物质谱技术对 2 种纯化后的物质进行鉴定.本研究合成的完全抗原偶联比在 3 ~ 8 之间,平均偶联比为 5 左右,满足了进一步免疫的要求.

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,武宝玕,郑解生,等.淡水水体中的蓝藻毒素研究进展.暨南大学学报,2001,**22**(3): 129 ~ 135.

[4] Dahlmann J, Budakowski Wes R, Luckas B. Liquid chromatography-electrosprayionisation-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 MC, *et al*. Determination of some physicochemical parameters of microcystins (cyanobacterial toxins) and trace level analysis in environmental samples using liquid chromatography [J]. J-chromatogr-A. 1998, **799**(1-2): 155.

[6] James F Lawrence, Cathie Menard. Determination of microcystins in blue-green algae, fish and water using liquid chromatography with ultraviolet detection after sample clean-up employing immunoaffinity chromatography [J]. Journal of Chromatography A, 2001, **922**: 111 ~ 117.

[7] Fumio Kondo, Yuko Ito, *et al*. Determination of microcystins in lake water using reusable immunoaffinity column [J]. Toxicon, 2002, **40**: 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] Anne Zeck, Anja Eikenberg. Highly sensitive immunoassay based on a monoclonal antibody specific for [4-arginine] microcystins [J]. Analytica Chimica Acta, 2001, **441**: 1 ~ 13.

[10] Corinne Rivasseau, Marie-Claire Hennion. 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**: 75 ~ 87.

[11] Hitzfeld B C, Hoger S J, Dietrich D R. Cyanobacterial toxins: removal during drinking water treatment, and human risk assessment [J]. Environ Health Perspect, 2000, **108**(Suppl 1): 113 ~ 122.

[12] Baiera W, Loleit M. Generation of antibodies directed against the low-immunogenic peptide-toxins microcystin-LR/RR and nodularin[J]. International Journal of Immunopharmacology, 2000, **22**: 339 ~ 353.

[13] 吴冬辉,沈联芳.程海微囊藻毒素的结构分析[J].环境科学学报,1994, **14**(1): 56 ~ 63.

[14] Anj, Carmichael W W. Use of a colorimeric protein phosphatase inhibition assay and enzyme linked immunosorbent assay for the study of microcystins and nodularins [J]. Toxicon, 1994, **32**: 1495 ~ 1507.

[15] Metcalf J S, Bell S G. Production of novel polyclonal antibodies against the cyanobacterial toxin microcystin-LR and their application for the detection and quantification of microcystins and nodularin [J]. Wat. Res., 2000, **34** (10): 2761 ~ 2769.

[16] Andrey Mikhailovb, Ann-Sofi. Production and specificity of mono and polyclonal antibodies against microcystins conjugated through N-methyldehydroalanine [J]. Toxicon, 2001, **39**: 477 ~ 483.