

论著

抗河豚毒素单克隆抗体联酶前纯化条件优化的研究

韩春卉¹, 张林², 张宏元¹, 李楠¹, 张靖¹, 江涛¹, 李凤琴¹

(1. 国家食品安全风险评估中心 卫生部食品安全风险评估重点实验室, 北京 100021;

2. 北京市朝阳区常营社区卫生服务中心, 北京 100024)

摘要:目的 了解不同辛酸浓度下盐析法、不同离心力对抗河豚毒素(TTX)单克隆抗体的纯化效果以及纯化后酶标抗体性能的影响,优化出纯化抗TTX单克隆抗体的方法,为免疫学方法检测TTX提供依据。方法 在传统辛酸-硫酸铵蛋白纯化方法的基础上进行改进,考察不同的辛酸浓度、不同的离心力对抗TTX单克隆抗体纯化效果的影响,并将纯化后抗体与辣根过氧化物酶(HRP)连接,用间接竞争酶联免疫吸附试验法(ELISA)检测酶标抗体的生物学活性及各项性能指标并比对。结果 不同方法纯化获得的抗体及其酶结合物的各项指标参数、活性不同,当腹水稀释液与辛酸体积比为1 000:11、纯化过程中离心力10 000 r/min时纯化获得的抗体虽然产量有所下降但纯度较高,酶标抗体的生物活性、各项指标均最优。结论 经过对抗TTX单克隆抗体纯度、抗体中蛋白含量、酶标抗体各项性能指标的对比,优化出用于抗TTX抗体纯化用腹水稀释液与辛酸比值1 000:11(V/V)、离心力10 000 r/min的试验条件。

关键词:河豚毒素;单克隆抗体纯化;改良过碘酸钠法;ELISA方法

中图分类号:R996.3 文献标识码:A 文章编号:1004-8456(2013)03-0194-04

Study on purification of monoclonal antibody against tetrodotoxin and optimization of enzyme-linked method for detection of tetrodotoxin

Han Chunhui, Zhang Lin, Zhang Hongyuan, Li Nan, Zhang Jing, Jiang Tao, Li Fengqin

(Key Laboratory of Food Safety Risk Assessment of Ministry of Health, China National Center for Food Safety Risk Assessment, Beijing 100021, China)

Abstract: Objective To understand the effects of different caprylic acid-ammonium sulfate concentration and centrifugal force on purification of HRP-labeled monoclonal antibody against tetrodotoxin (TTX) and to optimize the purification protocol for the antibody in order to provide the technical basis for TTX detection by immunoassay. **Methods** Under different centrifugal force and concentration of caprylic acid-ammonium sulfate, the antibody was purified and linked with the horseradish peroxidase enzyme (HRP), and the biochemical properties and parameters of HRP-labeled antibody were determined with indirect enzyme-linked immuno sorbent assay. **Results** The purity of antibody and HRP-labeled antibody obtained by different methods were different as well as other parameters and bioactivities. The best experiment conditions for high productivity and bioactivity of the monoclonal antibody were ascites diluent; lipoic acid (1 000 : 11, V/V) and 10 000 r/min centrifugation. **Conclusion** The purification protocol was optimized for the dilution and centrifugal conditions based on the productivity, purity and bioactivity.

Key words: Tetrodotoxin; monoclonal antibody purification; revised sodium iodide method; ELISA

河豚肉味鲜美,营养丰富,深受消费者喜爱,但食用或误食河豚引起的河豚毒素(tetrodotoxin, TTX)中毒是我国沿海地区食物中毒的主要死因。为了给消费者提供安全无毒的河豚、防止中毒事件

的发生,世界各国学者对TTX的检测技术进行了多方面的研究,建立了诸如小鼠生物实验法、荧光法、紫外分光光度法、薄层色谱法、气相色谱法、高效液相色谱法、毛细管等速电泳法等多种方法。小鼠法操作简便,但费时费力,影响因素较多,且目前我国大陆尚未建立小鼠生物实验法的标准曲线和小鼠品系;仪器法虽然准确,但技术要求较高,仪器昂贵,样品的前处理繁琐且对样品提取液的净化度要求较高,不适用于现场检测,难以在基层推广使用。本文建立了一种快速、灵敏、经济、适于基层推广的

收稿日期:2013-02-28

基金项目:国家高技术研究发展计划(863计划):2012AA101603)

作者简介:韩春卉 女 副主任技师 研究方向为生物毒素检测

E-mail:hangchunhui0028@163.com

通信作者:李凤琴 女 研究员 研究方向为食品微生物

E-mail:lifengqin@cfsa.net.cn

检测 TTX 的酶联免疫吸附测定 (enzyme linked immunosorbent assay, ELISA) 方法。

河豚毒素单克隆抗体与辣根过氧化物酶的有效连接是用 ELISA 方法直接对 TTX 进行定性、定量快速检测的前提,但抗体纯化过程中抗体产量会随着其纯度的增加而下降,由此导致检测灵敏度的降低。为了优化传统的辛酸-硫酸铵沉淀法对抗 TTX 单克隆抗体纯化的试验条件,以期最大限度地在保证抗 TTX 单克隆抗体纯度的同时,确保抗体的工作效价,本研究对纯化抗 TTX 单克隆抗体的各种方法进行比较,同时对不同纯化方法获得的单克隆抗体连接辣根过氧化物酶后的各项指标及抗体生物活性等进行比较,优化出高纯度、高蛋白含量、可用于联酶及易于放大的抗 TTX 单克隆抗体纯化方法^[1]。

1 材料与方法

1.1 主要仪器与试剂

磁力控温搅拌仪、酶标仪、电泳仪、凝胶成像仪、高速冷冻离心机、紫外分光光度计、pH 计、透析袋、移液器、96 孔 ELISA 可拆板 (Costar, 美国)。

拜发 BCA 蛋白定量试剂盒、TTX6D9 细胞株 (TTX-KLH 免疫小鼠筛选获得) 产生的含有抗 TTX 单克隆抗体的同批次小鼠腹水 (本实验室自制)、TTX-BSA (本实验室自制)、辣根过氧化物酶 HRP (Sigma, 美国)、羊抗鼠 IgG (中山生物工程公司)、显色剂、硫酸铵、正辛酸、过碘酸钠 (分析纯)、碳酸钠、碳酸氢钠、无水醋酸钠、氨水、硼氢化钠。

1.2 实验方法

1.2.1 抗 TTX 单克隆抗体纯化过程中辛酸浓度的优化^[2]

取适量腹水 3 份于 3 个烧杯中,分别按腹水与醋酸缓冲液 1:2 (V/V) 的比例加入 0.06 mol/L pH 5.0 的醋酸缓冲液,磁力搅拌 2 min。按腹水醋酸缓冲液与辛酸 1 000:11、1 000:22、1 000:33 (V/V) 的比例边搅拌边逐滴加入辛酸,并用 1 mol/L 的 NaOH 调 pH 至 4.5,室温静置 30 min 后,5 000 r/min 离心 15 min。上清经 2 层纱布过滤后置透析袋中,于 20 倍体积 0.05 mol/L pH 7.2 的 PBS 中 4 ℃ 透析过夜,每隔 4 h 更换透析液。

取出透析后的腹水并测量其体积,按每 100 ml 腹水加入 25.8 g 硫酸铵的比例,室温下边搅拌边缓缓加入硫酸铵粉末,加入后继续搅拌 15 min,用氨水调 pH 至 7.4,4 ℃ 静置 2~4 h 后于 4 ℃ 10 000 r/min 离心 15 min,弃上清液,沉淀溶于等体积的 PBS 中。加入饱和硫酸铵溶液沉淀 (使溶液中硫酸铵的最终浓度为 45%),重复该步骤两次。沉淀溶于相

当初始腹水体积的 PBS 中,于 PBS 中 4 ℃ 透析过夜,8 000 r/min 离心 1 min 去除不溶性沉淀,上清即为纯化好的抗体。

取纯化好的抗体上清及未纯化的腹水,通过 BCA 试剂盒对总蛋白纯化前和纯化后的含量进行测定获得总蛋白回收率,并测定纯化蛋白中抗体滴度,观察不同的辛酸浓度对抗 TTX 单克隆抗体活性的影响,优化抗体纯化所需的适宜辛酸用量。同时用浓度为 0.125 μg/ml 的 TTX-BSA 抗原包被酶标板,将经不同浓度辛酸纯化的抗体作倍比稀释后取 100 ml 加入酶标板,37 ℃ 反应 1 h 后经洗板、显色后在 450 nm 处测其 OD 值,比较不同辛酸浓度纯化的抗体的效价。

1.2.2 离心力对抗 TTX 单克隆抗体纯化效果的影响^[3]

根据不同离心力对蛋白质沉降速度不一,即离心力大、蛋白沉降量多的特点,比较不同离心力下抗体的纯化效果。

方法一:取适量腹水,按腹水与醋酸缓冲液 1:2 (V/V) 的比例加入 0.06 mol/L pH 5.0 醋酸缓冲液,磁力搅拌 2 min。按上述腹水稀释液与辛酸 1 000:11 (V/V) 的比例边搅拌边逐滴加入辛酸,此后按照 1.2.1 中“并用 1 mol/L 的 NaOH 调 pH 至 4.5”步骤进行,纯化后的抗体溶液用紫外分光光度计在 280 和 260 nm 处分别测定其 OD 值,并调整蛋白浓度至 10.0 mg/ml 备用。

方法二:基本步骤同上,不同之处一是加入辛酸后离心速度由 5 000 r/min 增至 10 000 r/min,以使沉淀下来的杂蛋白含量多于方法一;其次为硫酸铵对蛋白沉淀的提取过程中,离心速度由 10 000 r/min 减至 5 000 r/min,以增加抗河豚毒素单克隆抗体的纯度。

1.2.3 酶标抗 TTX 单克隆抗体^[4]

4.0 mg 辣根过氧化物酶用 1.0 ml 双蒸水溶解,加入 0.1 ml 新配制的 0.1 mol/L 过碘酸钠,室温轻微避光搅拌 20 min 后,置于 0.001 mol/L、pH 4.4 的 1 000 ml 醋酸缓冲液中透析过夜,每 4 h 更换透析液将上述辣根过氧化物酶溶液和纯化后的抗体等体积混合,室温下避光轻搅拌 2 h,加入 0.1 ml 新配制的 4 mg/ml 硼氢化钠溶液,4 ℃ 放置 2 h 后于 0.02 mol/L、pH 7.2~7.4 的 PBS 中透析过夜,每 4 h 更换透析液。透析后的溶液置于烧杯中,按 1.2.1 中“按每 100 ml 腹水加入 25.8 g 硫酸铵的比例”步骤进行纯化。收集纯化后的酶标抗体测定其 OD₂₆₀、OD₂₈₀、OD₄₀₃ 值,计算各项指标参数后,加等体积 0.1 mol/L 的海藻糖,分装后低温冻干并保存。

1.2.4 酶标抗 TTX 单克隆抗体与河豚毒素竞争活性的评价^[5]

用 ELISA 法评价抗 TTX 单克隆抗体的生物活性及检测灵敏度。即用浓度为 0.125 ng/ml 的 TTX-BSA 抗原包被酶标板,同时制备浓度分别为 0、5.0、20.0、50.0 和 200.0 ng/ml 的 TTX 标准系列溶液,取抗酶标 TTX 单克隆抗体和毒素各 50 ml 加入酶标板孔,37 °C 竞争反应 1 h 后经洗板、显色、终止反应,在 450 nm 处测其 OD 值,计算 50% 抑制率、线性回归方程和回归系数等指标。

1.2.5 两种方法联酶后各项指标的评价

评价两种不同离心力下纯化抗体浓度、酶标记率、酶结合量、酶与 IgG 克分子比值、酶结合率、抗体蛋白含量等指标,计算方法^[6]如下:

$$\text{联酶前蛋白浓度 (mg/ml)} = (1.45 \text{ OD}_{280} - 0.74 \text{ OD}_{260}) \times \text{稀释倍数}$$

$$\text{酶标记率} = \text{OD}_{403} / \text{OD}_{280}, \text{IgG 含量 (mg/ml)} = (\text{OD}_{280} - \text{OD}_{403} \times 0.30) \times 0.62,$$

$$\text{酶结合量 (mg/ml)} = \text{OD}_{403} \times 0.42 \times \text{终体积},$$

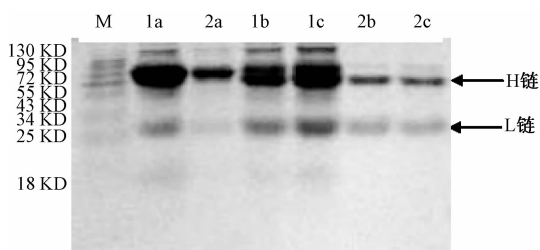
$$\text{酶与 IgG 克分子比值} = \text{酶浓度} (\mu\text{g/ml}) / 40\,000 / (\text{IgG mg/ml}) / 160\,000,$$

$$\text{酶结合率} = \text{结合物中酶总量} / \text{标记时加入的酶量} \times 100\%$$

表 1 不同辛酸浓度纯化的抗体中蛋白含量及活性结果

Table 1 Determination of protein content and activity purified by different caprylic acid

抗体编号	腹水与辛酸比 (V/V)	蛋白量 (mg/ml)	蛋白回收率 (%)	不同抗体稀释度下的 OD 值							
				1:200	1:400	1:800	1:1600	1:3200	1:6400	1:12800	1:25600
1 号	1 000:11	1.460	58.84	1.013	1.03	0.985	1.01	0.909	0.846	0.727	0.574
2 号	1 000:22	0.975	39.29	1.012	1.009	0.98	0.936	0.854	0.721	0.481	0.431
3 号	1 000:33	0.893	35.98	0.671	0.534	0.385	0.276	0.174	0.111	0.095	0.085



注:1a、2a 分别为用方法一、方法二纯化后的抗体溶液 10 倍稀释后的电泳结果;1b、1c、2b、2c 分别为方法一、方法二纯化后的抗体溶液 20 倍稀释后的电泳结果。

图 1 不同辛酸浓度纯化抗 TTX 抗体后的电泳结果

Figure 1 Electrophoresis analysis anti-TTX purified by different caprylic acid

方法一和方法二蛋白质浓度经紫外吸收测定分别为 18.58 和 13.65 mg/ml,综合以上结果,方法一纯化的蛋白总量优于方法二。

2.2 两种方法纯化抗体联酶后的纯度分析结果^[7]

将两种纯化方法获得的抗体蛋白联酶,经 10 倍

2 结果

2.1 辛酸浓度对腹水中抗体效价的影响

不同浓度辛酸对腹水中抗体的纯化结果显示,辛酸浓度越高,纯化抗体溶液中蛋白含量越低,具体见表 1。由表可见,1、2 和 3 号抗体纯化、酶标后其反应的 OD 值达 0.5 时需要将原抗体分别稀释 2.56 万、2.8 万和 400 倍,1 号抗体纯化后溶液中蛋白含量最高、活性最大(见图 1),由图 1 可见,两种方法获得的抗体纯度和含量不同,方法二纯化后的 IgG 只有两条蛋白亚基带,而方法一除了有两条 IgG 蛋白亚基带外,还有杂蛋白。说明方法二获得的抗体纯度高于方法一,但相同抗体稀释度下所获得的蛋白含量明显不同,表现在电泳图谱上的蛋白条带有量的明显差别,无论是抗体轻链还是重链,方法一获得的蛋白条带均宽于方法二,抗体溶液中的蛋白含量相对较高。因此虽然方法一纯化后的抗体杂蛋白量稍多于方法二,但单克隆抗体浓度高于后者。鉴于 1 号抗体样品纯化时使用的辛酸浓度可以最大限度的保证抗体纯化过程中的蛋白含量及抗体活性,因此抗 TTX 单克隆抗体纯化时腹水稀释液与辛酸的最佳比值为 1 000:11 (V/V),并作为后续腹水纯化研究中使用的辛酸添加量浓度。

稀释后对联酶后的纯度、各项性能指标进行分析,结果见表 2。

表 2 两种方法纯化后酶标抗体各项指标分析

Table 2 Index analysis of enzyme-labeled antibody purified by two methods

各项指标	方法一	方法二	指标对比 (方法二/方法一)
联酶前 OD ₂₈₀	1.905	1.439	
联酶前 OD ₂₆₀	1.253	0.974	
联酶后 OD ₂₈₀	2.078	1.393	
联酶后 OD ₄₀₃	0.644	0.970	
联酶前总蛋白抗体浓度 (mg/ml)	18.85	13.65	0.7
酶标记率	0.310	0.696	3.2
IgG 含量 (mg/ml)	1.168	0.683	0.6
酶结合量 (mg/ml)	0.540	0.814	1.5
酶与 IgG 克分子比值	0.925	1.111	
	(一般)	(较好)	
酶结合率	13.5%	20.4%	
	(较好)	(较好)	

评价酶标抗体优劣的标准是酶结合量(mg/ml)最好为 ≥ 1.0 ,较好为 $0.5 \sim 1.0$,一般为 $0.4 \sim 0.5$;酶结合率最好为30%以上,较好为9%~30%,一般为7%~9%;酶IgG克分子比最好为 > 1.5 ,较好为 $1.5 \sim 1.0$,一般为 $0.7 \sim 1.0$ [7]。根据上述评价方法,由表2可以看出,虽然方法一获得的总蛋白含量略高于方法二,但方法二的抗体酶标记率和酶结合量分别是方法一的3.2和1.5倍,且方法二获得的IgG克分子比值和酶结合率都符合ELISA试验中酶标抗体的各项指标评价要求,因此,方法二纯化后的抗体蛋白纯度、酶标后评价较好,而方法一纯化后的抗体酶结合率评价较好,但IgG克分子比值评分一般。总体而言,方法二优于方法一。

2.3 两种纯化方法抗体联酶后与毒素竞争比较

用间接竞争ELISA法检测联酶后抗体与TTX的竞争情况,并在490 nm波长下测定吸光度,结果见表3。表3可以看出,两条竞争曲线的 r^2 值趋近于1,曲线线性关系良好,50%的抑制率(灵敏度)相近,由于用方法一联酶的TTX抗体工作浓度为1:4 000(V/V),方法二联酶的TTX抗体工作浓度为1:8 000(V/V),因此方法二的抗体活性比方法一高一倍,方法二优于方法一。

表3 两种方法纯化后的抗体联酶后与毒素的竞争曲线测定

TTX(ng)	0	5	20	50	200	IC ₅₀	曲线 r^2 值
方法一	0.708	0.588	0.454	0.385	0.266	70.3	0.997 9
方法二	0.762	0.691	0.532	0.406	0.273	72.0	0.995 8

综上所述,经过对抗TTX单克隆抗体纯度、抗体中蛋白含量、酶标抗体各项性能指标的对比,优化出用于抗TTX抗体纯化用腹水稀释液与辛酸比值1 000:11(V/V),10 000 r/min离心力的试验条件。

3 讨论

在免疫学实验中,制备高特异性、高效价的抗

体是实验的基础,抗体质量的高低将直接影响实验的成败。通过不同方法制备的抗体往往与多种杂蛋白混杂在一起,为了获得成分相对单一的抗体或将抗体用于特定的用途,就需要进行抗体纯化。抗体分子是一类蛋白质分子,与其他蛋白质一样,它有一定的等电点、溶解度、荷电性及疏水性,因此本试验选择盐析沉淀技术进行抗体蛋白的分离、纯化,并经蛋白含量测定、电泳方法确定纯化蛋白中抗体含量和纯度。在抗体联酶时需要抗体纯度高,生物活性高,但纯化过程中随着纯度增高,纯化蛋白中抗体产量下降,试验过程中选择适宜的离心速度可有效地去除腹水中的杂蛋白。虽然方法二存在总蛋白含量低于方法一的缺陷,但考虑到其联酶后的抗体生物活性(效价)高于方法一,因此认为方法二优于方法一,但要切实了解纯度与活性的关系还要做进一步的定量分析。本试验根据蛋白质的物理性质优化了试验条件,改善了纯化目的抗体的纯度和提高联酶后抗体生物活性的关系,为联酶前抗体纯化方法的改进提供依据,为酶标抗体的理论研究和生产应用提供了必要的实验基础。

参考文献

- [1] 王建伟,王德斌,罗雪云,等. 抗豚毒素单克隆抗体的制备及其特性的初步研究[J]. 卫生研究,1996,25(5):308-310.
- [2] 周玉,李岩松,潘风光,等. 小鼠腹水IgG类单克隆抗体纯化方法的研究[J]. 黑龙江畜牧兽医,2006(10):14-16.
- [3] 邓宁,向军俭,饶桂荣,等. 重组人源性抗HBsAg Fab抗体纯化方法的比较研究[J]. 生物工程学报,2004,20(6):884-889.
- [4] 刘继明,邱玉华,张毅,等. 小鼠腹水IgM型单抗的纯化[J]. 中国免疫学杂志,1999,11(15):501-503.
- [5] 刘琦,张爱华,石磊. 两种抗体纯化方法对乙型肝炎核心抗体酶标试剂盒质量的影响[J]. 华中科技大学学报:医学版,2002,31(1):108-200.
- [6] 岳喜庆,冯巧萍,张和平,等. 牛血清免疫球蛋白的盐析法提取与纯化[J]. 中国乳品工业,2005,33(3):16-21.
- [7] 黄祯祥,洪涛,刘崇柏. 医学病毒学基础及实验技术[M]. 北京:科学出版社,1990:210-212.

· 请示批复 ·

关于同意将冬青科苦丁茶作为普通食品管理的批复

卫计生函[2013]86号

海南省卫生厅:

你厅《关于调整冬青科苦丁茶为普通食品的请示》(琼卫法规[2012]38号)收悉。经研究,我委同意将冬青科苦丁茶(Ilex kudingcha C. J. Tseng)作为普通食品管理。生产经营上述食品应当符合有关法律、法规、标准规定。

此复。

国家卫生和计划生育委员会
二〇一三年四月十日