

俞华齐, 王娟, 姜忍忍, 等. 重金属铬单克隆抗体特异性 ELISA 免疫检测方法的建立[J]. 江苏农业学报, 2016, 32(2): 460-466.

doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2016.02.034

重金属铬单克隆抗体特异性 ELISA 免疫检测方法的建立

俞华齐¹, 王娟², 姜忍忍², 姚刚², 刘少伟¹

(1. 华东理工大学生物工程学院国家重点实验室, 上海 200237; 2. 中国科学院上海生命科学研究院营养科学研究所食品安全研究中心, 上海 200031)

摘要: 为了利用抗体库筛选技术制备检测重金属铬的单克隆抗体, 本研究利用螯合剂 DTPA 成功制备了重金属 Cr 的完全抗原, 并利用制备的完全抗原结合噬菌体展示技术成功筛选到了特异性识别 Cr-DTPA 的噬菌体抗体 Cr-DTPA-VHH 4-63。结果显示, 获得的抗体亲和常数为 1.279×10^9 L/mol, 与载体蛋白 BSA/OVA 及无金属抗原 DTPA-BSA/OVA 均无交叉反应, 与其他金属离子也没有交叉反应, 特异性强。利用制备的 Cr-DTPA 噬菌体抗体初步建立了 ELISA 免疫检测法, 其方法最低检测限达到 1 $\mu\text{g/L}$, 水样加标回收试验平均回收率 90%~114%, 达到国家饮用水检测标准, 可用于农业灌溉用水及生活饮用水中的重金属铬的检测。

关键词: 重金属 Cr; 纳米抗体; 噬菌体展示; 间接竞争性 ELISA

中图分类号: X832 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2016)02-0460-07

Development of specific ELISA for the detection of monoclonal antibody against heavy metal Cr

YU Hua-qi¹, WANG Juan², JIANG Ren-ren², YAO Gang², LIU Shao-wei¹

(1. The State Key Laboratory of Bioreactor Engineering, Department of Biological Engineering, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China; 2. Key Laboratory for Food Safety Research, Institute of Nutritional Sciences, Shanghai Institutes of Biological Sciences, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China)

Abstract: A complete antigen Cr-DTPA for heavy metal Cr was prepared using chelator p-SCN-Bn-DTPA, and the phage antibody Cr-DTPA-VHH 4-63 specifically identifying Cr-DTPA was selected by phage display technique. The nanobody showed a strong specificity, with no cross reactions with carrier protein BSA/OVA, non-metallic antigen DTPA-BSA/OVA, and other metallic ions. The indirect competitive ELISA method developed based on the nanobody could detect as low as 1 $\mu\text{g/L}$ Cr in the water sample. The average recovery of Cr spiked in the water sample reached 90%–114%, meeting the national standard for drinking water detection. The method established in this study could be applied for heavy metal detection in irrigation water and drinking water.

Key words: heavy metal Cr; nanobody; phage display; indirect competitive ELISA

收稿日期: 2016-01-27

基金项目: 科技部“十二五”国家科技支撑计划项目
(2011BAZ0319814, 2012BAK01B00)

作者简介: 俞华齐 (1990-), 男, 江苏淮安人, 硕士研究生, 主要从事生物技术和食品安全方面的研究。(E-mail) jsjhyh@163.com

通讯作者: 刘少伟, (E-mail) swliu@ecust.edu.cn

随着社会工业化的发展, 重金属问题已经成为环境污染的主要问题。重金属对人体危害极大, 其进入人体的途径主要有 3 种, 分别是食物、水和大气, 而水体中重金属污染最为突出, 其原因主要是当前工业废

水的大量排放以及农药和化肥的不合理使用^[1-2]。目前,对人体危害最为严重的重金属主要有 5 种^[1-4],即汞(Hg)、铬(Cr)、镉(Cd)、铅(Pb)和砷(As)。

铬(Cr)在自然界中普遍存在并被广泛应用,食品中铬污染主要来源于农业土壤中的工业废水,食用含铬过高的食品会引发口角糜、腹泻、消化不良等症状,并导致癌症。自然界和工业生产中的铬多以三价和六价的形式存在,六价铬(Cr^{6+})的毒性很强,比 Cr^{3+} 毒性高 10 倍;而三价铬(Cr^{3+})形成的化合物较稳定,存在于食物和生物组织中,参与生物体代谢活动,是人体必须的微量元素,毒性较低^[4]。因为两种价态是可以相互转化的,所以对于其相关的研究主要集中在 Cr^{3+} 。

目前重金属的检测方法主要以仪器检测法为主,包括微谱分析法(MS)^[5]、紫外可见分光光度法(UV)^[5-6]、原子吸收法(AAS)^[7]等。虽然这些方法具有灵敏度高、特异性好等特点,但所需设备较为昂贵,需要专业技术人员进行操作,样品前处理过程复杂,检测费力费时且成本高。所以,建立一种简便、快速、特异性好、灵敏度高的检测方法已然成为新的研究热点。而免疫学检测方法为重金属检测提供了一种新的策略和途径^[8-10],该方法是一种具有高度特异性和灵敏度的分析方法,并且操作简单、价格低廉、检测时间短,适于大规模的筛选。目前,国内外对于重金属的免疫检测法所用抗体的获得方式主要采用杂交瘤试验,但该方法耗时长,筛选过程复杂,成功率低。本研究以重金属铬(Cr)为研究对象,参考国外相关文献^[11-16],利用噬菌体-纳米抗体展示技术成功获得了一种新型的特异性针对 Cr-DTPA 的单克隆抗体,拟建立重金属铬间接竞争性 ELISA 免疫检测法。

1 材料与方法

1.1 试验材料

PBS 缓冲液:NaCl 8.00 g, KCl 0.20 g, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 3.63 g, KH_2PO_4 0.24 g,加蒸馏水定容至 1 L。

2×TY 培养基:胰蛋白胨 16 g,酵母提取物 10 g, NaCl 5 g,加蒸馏水定容至 1 L。

洗涤液 1×PBST:1×PBS 1 L, Tween20 0.5 ml,调 pH 值为 7.3。

ELISA 包被液: NaHCO_3 2.93 g, Na_2CO_3 1.59 g,

调 pH 值为 9.6 左右,加蒸馏水定容至 1 L。

底物 A 液:柠檬酸 10.507 g, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 17.907 g, 30% H_2O_2 3 ml,加蒸馏水定容至 1 L。

底物 B 液: TMB 0.30 g, DMSO 30 ml, 甘油 200 ml, EDTA · 2Na 1.86 g,加蒸馏水定容至 1 L。

驼源天然单域重链 VHH 抗体库为意大利 IFOM-IEO 中心的 Ario de Marco 博士惠赠。

1.2 完全抗原的制备

取一定量的 DTPA 溶液(10 mg/ml)于无菌的 1.5 ml EP 管中,用 0.1 mol/L pH 为 7.4 的 HEPES 缓冲液稀释,然后以 Cr^{3+} 与 DTPA 摩尔比为 4:1 的比例逐滴缓慢的加入 $\text{Cr}_2(\text{SO}_4)_3$ 溶液,边加边缓慢振荡,用 H_2SO_4 调 pH 至 7.0 后用封口膜将管口封好,然后将上述混合液转移至旋转培养器上,25 °C 下螯合反应 16 h。

取一定量的载体蛋白溶液 BSA 和 OVA 于 1.5 ml EP 管中(0.1 mol/L pH 9.0 HEPES 缓冲液稀释),然后将螯合好的螯合物取出,按蛋白质与螯合剂的摩尔比为 30:1 缓慢地加入到载体蛋白稀释液中,边加边缓慢混匀,用 NaOH 调 pH 至 9.0 后用封口膜将管口封好,然后于旋转培养器上,25 °C 下偶联反应 24 h。同时,制备一批无重金属抗原,即 DTPA-BSA/OVA (步骤同螯合物与载体蛋白的偶联过程)。

偶联结束后,将混合物转移至预先处理好的 Millipore 超滤管(先用去离子水冰浴 0.5 h,再用预冷的 HBS 缓冲液冰浴 0.5 h)中,BSA 制备的抗原用 30 KD 的超滤管, OVA 制备的抗原用 10 KD 超滤管。先用 0.01 mol/L pH 9.0 的 HEPES 缓冲液稀释至终体积为 3 ml 超滤 1 次,然后再用 0.1 mol/L pH 7.4 的 HEPES 缓冲液稀释超滤 3 次,分别于 3 500 r/min、4 °C 离心 10 min,最后 2 次均用移液枪小心吹洗滤膜,以免膜上有载体蛋白残留,超滤结束后小心将内管底部的液体吸出,即为完全抗原 Cr-DTPA-BSA/OVA 及无重金属抗原 DTPA-BSA/OVA。

1.3 Cr 抗体库的筛选

将抗原 Cr-DTPA-BSA 用包被缓冲液(pH = 9.6)稀释至浓度为 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$,加入 Nunc 孔中,每孔 250 μl 进行包被,包被结束后,将孔内液体甩干,用无菌的 PBS 洗涤,分别用 10 mmol/L 的乙醇胺溶液和 3% 的 BSA 溶液封闭孔中活性位点和潜在的蛋白质结合位点。

取原始噬菌体 VHH 库 300 μl (共约 10^{13} 个噬菌

体)与 300 μl 3%的 BSA 混合(用来降低非特异性),然后以 200 μl /孔的体积加入 Nunc 孔中,振荡 40 min,然后静置 1 h。

用无菌的 PBST 和 PBS 各洗涤 10 次,甩干后每孔加入 10 mmol/L 的 HCl 200 μl ,振荡洗脱 30 min,将洗脱液小心吸出,加入到 50 ml 离心管中,再加入 200 μl 的 0.1 mol/L Tris-HCl 混匀中和。

将洗脱中和后的噬菌体加入到 10 ml OD_{600} 为 4.0~6.0 的新鲜的 TG1 菌液中,37 $^{\circ}\text{C}$ 静置 40 min,再加 5 μl 的 M13K07 噬菌体(约 10^{12} 个)于上述侵染液中,37 $^{\circ}\text{C}$ 静置辅助侵染 1 h,然后于 4 800 r/min 室温离心 10 min,弃上清液,将沉淀重悬于 50 ml 新鲜的 2 \times TY 培养基中,加入氨苄霉素、卡那霉素和葡萄糖,然后于 30 $^{\circ}\text{C}$ 200 r/min 振荡培养 16~20 h。

将过夜菌转移至离心管中,4 800 r/min 4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 20 min,弃去沉淀,将上清液转移到新的离心管中,加入其 1/5 体积的 40% PEG 4000 和 2.5 mol/L NaCl 溶液,强烈振荡混匀后冰浴 20 min,然后再于 4 800 r/min 4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 20 min,弃上清液,用 1 ml 无菌的 1 \times PBS 缓冲液将沉淀重悬后用 0.22 $\mu\text{mol/L}$ 滤膜过滤除菌,并测其滴度,即为筛选出的第一轮抗体库^[17-18]。

第二轮、第三轮、第四轮、第五轮的富集步骤^[18]同第一轮。因为重金属离子本身的分子量太小,针对其的抗体也很少,在筛选过程中有很多都是针对载体蛋白或螯合剂的抗体,所以为了降低非特异性,我们采用 2 种抗原即 Cr-DTPA-BSA 和 Cr-DTPA-OVA 交替进行抗体库的筛选,即第二轮筛选时包被的是抗原 Cr-DTPA-OVA,后面的几轮依次交替进行。由于抗原的交替,加抗体库的时候也要同时加入相对应的载体蛋白共同孵育,以吸附非特异性抗体,从而降低最终获得的抗体库的非特异性。

1.4 单克隆抗体库特异性 ELISA 检测

取一定量的 Cr-DTPA-BSA 和 Cr-DTPA-OVA 作为抗原,BSA 和 OVA 作为阴性对照组,抗原包被浓度均为 2.5 $\mu\text{g/ml}$,4 $^{\circ}\text{C}$ 包被 12 h。包被结束后用 1 \times PBST 洗涤 5 遍,加入 5%的脱脂奶粉封闭 1.5 h。洗涤后每孔中分别加入不同轮次的 VHH 噬菌体 10^{11} 个,37 $^{\circ}\text{C}$ 静置 1 h 后洗涤,加入 HRP-Anti-M13K07 兔抗,用 5%的脱脂奶粉稀释后加入孔中进行反应。反应完成后洗涤,加入显色底物 A+B 液(两者体积比 1:1)显色,每孔 100 μl ,显色时间根据阴性对照组显色情况而定,用 2 mol/L 的 H_2SO_4 进

行终止。用酶标仪读取 OD_{450} 值,并分析结果。

1.5 单克隆抗体初步检测

根据抗体库富集度检测结果,在到达平台期的第四轮、第五轮筛选得到的抗体库中随机挑取 100 个 VHH 单菌落,分别接种于 1 ml 新鲜的 2 \times TY+Amp (100 $\mu\text{g/ml}$) 中,37 $^{\circ}\text{C}$ 振荡培养过夜,次日重新 1:100 接种于 5 ml 2 \times TY 培养基中,加入氨苄霉素,37 $^{\circ}\text{C}$ 振荡培养至 $OD_{600} = 0.4\sim 0.6$ 后分别用 M13K07 侵染辅助扩增,37 $^{\circ}\text{C}$ 静置侵染 1 h,4 800 r/min,室温离心 10 min,弃上清液,沉淀重悬于 5 ml 2 \times TY 培养基中,加入氨苄霉素、卡那霉素和 IPTG,次日于 4 800 r/min 4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 20 min,上清液转移至新的离心管中,直接作为抗体进行 ELISA 检测。

包被抗原为完全抗原 Cr-DTPA-BSA 和无重金属抗原 DTPA-BSA,包被和封闭步骤与方法 1.4 相同,在封闭完成并清洗甩干后,将每个单克隆上清液分别加入对应的孔内,每孔 100 μl ,37 $^{\circ}\text{C}$ 静置 1 h,后续试验步骤与方法 1.4 相同。

1.6 单克隆抗体特异性检测

将阳性克隆噬菌体扩增纯化后,进行竞争性 ELISA 试验,用 BSA 和 DTPA-BSA 作为阴性对照,按照抗体库验证的方法验证单克隆的特异性,挑选出阳性较好的单克隆。将重金属离子 Cr^{3+} 梯度稀释于 1 mmol/L 的 DTPA 溶液中作为竞争抑制剂,与挑选出的单克隆抗体 1:1(体积比)混合,37 $^{\circ}\text{C}$ 反应 45 min 后进行竞争性 ELISA 检测,试验步骤同方法 1.4,最终选择出抑制效果最好的单克隆抗体。

1.7 Cr-DTPA-VHH 间接竞争性 ELISA 检测法的建立

1.7.1 棋盘法确定抗原抗体最佳反应浓度及其亲和常数 K_{aff} 的测定 抗原 Cr-DTPA-BSA 分别用 5.000 $\mu\text{g/ml}$ 、2.500 $\mu\text{g/ml}$ 、1.250 $\mu\text{g/ml}$ 和 0.625 $\mu\text{g/ml}$ 4 个浓度梯度包被,阴性对照组包被对应浓度的 BSA,包被封闭后,用 5%的脱脂奶粉梯度稀释抗体,抗体浓度分别为 1×10^9 PFU/ μl 、 2×10^8 PFU/ μl 、 4×10^7 PFU/ μl 、 8×10^6 PFU/ μl ,将上述各梯度的抗体稀释液分别加入对应的孔内,每孔 100 μl ,37 $^{\circ}\text{C}$ 静置 1 h,后续试验步骤同方法 1.4。

1.7.2 DTPA 浓度对试验的影响 因为通过螯合剂将重金属离子与载体蛋白偶联制备的抗原筛选得到的抗体很大程度上要依赖于螯合剂,但螯合剂浓度太高又会对抗原抗体的结合产生影响,所以需要确

定抗体与 DTPA 的关系。将不同浓度的 DTPA (0 mmol/L, 0.125 mmol/L, 0.250 mmol/L, 0.500 mmol/L, 1.000 mmol/L, 2.000 mmol/L, 4.000 mmol/L 和 8.000 mmol/L) 分别与稀释好的抗体 1:1 混和,充分混匀后于 37 °C 反应 45 min 作为抗体参与 ELISA 反应,其余步骤同方法 1.4。

1.7.3 抗体标准抑制曲线绘制 在上述最佳反应条件下,制作该抗体间接竞争性 ELISA 标准抑制曲线。根据预备试验数据选用 1 mmol/L 的 DTPA 作为螯合剂,对 Cr^{3+} 离子进行螯合,重金属离子 Cr^{3+} 梯度稀释于 1 mmol/L 的 DTPA 溶液中作为竞争抑制剂,与稀释好的抗体按体积比 1:1 混合,37 °C 反应 45 min 后进行 ELISA 检测,以 Cr^{3+} 浓度为横坐标,抑制率为纵坐标,绘制标准曲线。

1.7.4 Cr-DTPA-VHH 与其他金属离子的交叉试验

运用我们建立的间接竞争性 ELISA 进行抗体与其他金属离子的交叉试验。本次试验共选用 9 种金属离子,包括一价的 Na^+ 、 K^+ ,二价的 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Sn^{2+} 以及三价的 Fe^{3+} 、 Al^{3+} 。金属离子与 DTPA 螯合比例均为 4:1,螯合剂 DTPA 的用量相同,25 °C 螯合 16 h,螯合完全后用于交叉试验。本次试验选择 Cr-DTPA 的抑制浓度为 1 mmol/L,同样其余的金属离子按与其完全相同的浓度加入,对比试验结果,如果在如此高的浓度条件下仍没有抑制作用的话,也就可以证明抗体与其他金属离子没有交叉反应,那么可以说明该抗体是特异性针对重金属铬的。

本次试验抗原包被浓度及抗体的孵育浓度同上,同时设置阳性对照即无金属螯合物竞争剂进行对照试验。

1.7.5 水样加标回收试验 采取向去离子水中加入一定浓度梯度的重金属 Cr 及螯合剂 DTPA,运用我们建立的间接竞争性 ELISA 检测法,通过得到的特异性针对 Cr-DTPA 的抗体 Cr-DTPA-VHH 4-63 对其进行回收率检测。

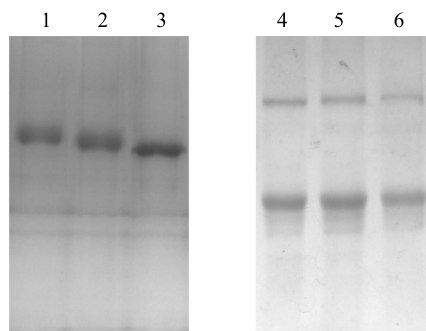
取一定量的去离子水(无任何金属离子),设置依次为 1 mmol/L、2 mmol/L、4 mmol/L、8 mmol/L 4 个 Cr-DTPA 的稀释梯度进行试验,试验方法同方法 1.4。

2 结果与分析

2.1 完全抗原的制备

通过 SDS-PAGE 检测结果(图 1)可知,载体蛋

白组、DTPA-载体蛋白、重金属-DTPA-载体蛋白三者形成明显的梯度,因为在蛋白胶中蛋白的分子量越大,其迁移速率就越慢,因此可以证明完全抗原制备是成功的。



1: Cr-DTPA-BSA; 2: DTPA-BSA; 3: BSA; 4: OVA; 5: DTPA-OVA; 6: Cr-DTPA-OVA。

图 1 SDS-PAGE 试验分析 Cr-DTPA-BSA/OVA 的制备

Fig. 1 Analysis of Cr-DTPA-BSA/OVA conjugates by SDS-PAGE

2.2 Cr 抗体库的筛选

由图 2 可知,通过对比完全抗原 Cr-DTPA-BSA/OVA 和载体蛋白 BSA/OVA 组,可以看出交替筛选后的抗体库中针对载体蛋白的抗体很少,而针对完全抗原的抗体在逐渐增多,在第 4 轮后进入平台期,随后第 5 轮的抗体特异性反而有所下降,可能是因为筛选过程中有抗体的损失,因此决定从第四轮和第五轮中挑选 100 个单克隆进行验证。

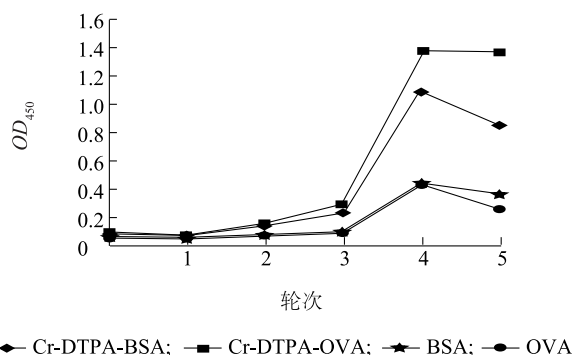


图 2 Cr 抗体库的筛选结果

Fig.2 The selection of Cr-VHH

2.3 单克隆抗体初步检测

通过对挑选的单克隆进行阳性克隆 ELISA 验证,我们发现其中大多数是对 DTPA-BSA 表现阳性,

只有少数对 Cr-DTPA-BSA 表现阳性,我们从中挑选出对 Cr-DTPA-BSA 表现阳性较为明显的 5 个单克隆(Cr-DTPA-VHH 4-29、Cr-DTPA-VHH 4-31、Cr-DTPA-VHH 4-54、Cr-DTPA-VHH 4-63、Cr-DTPA-VHH 4-72)进行下一步的验证。

2.4 单克隆抗体特异性检测

特异性较好的单克隆抗体要求其尽量对 Cr-DTPA-BSA 表现出较好的亲和力,而与 BSA 和 DTPA-BSA 的结合要弱。图 3 显示,Cr-DTPA-VHH 4-63、Cr-DTPA-VHH 4-72 2 个抗体具有对 Cr-DTPA-BSA 较好的特异性,可以进入下一步的验证。

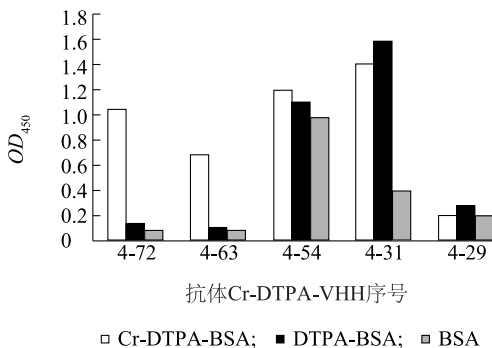


图3 单克隆抗体特异性检测结果

Fig.3 The specificity detection of antibody

由图 4 可以看出,当 Cr-DTPA 的浓度逐渐增加时,Cr-DTPA-VHH 4-63 明显表现出抑制现象,而 Cr-DTPA-VHH 4-72 的抑制现象较弱,因此我们将 Cr-DTPA-VHH 4-63 确定为研究对象进行条件优化并建立其免疫竞争性 ELISA 检测法。

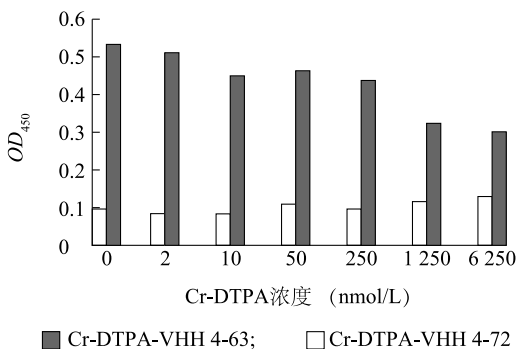


图4 单克隆抗体与 Cr-DTPA 竞争性 ELISA 检测结果

Fig.4 The competitive ELISA detection of Cr-DTPA and antibody

2.5 单克隆 VHH 编码序列测定

VHH 氨基酸序列共分为 7 部分:4 个骨架区分别为 FR1、FR2、FR3 及 FR4,3 个超变区分别为 CDR1、CDR2 及 CDR3。如图 5 所示,通过 DNAMAN 软件对 Cr-DTPA-VHH 4-63 的测序结果分析,最终确定其符合典型的纳米抗体序列特征^[19]。

| | |
|--|-------------|
| MADVQLQASGGGLVQAGGSLRLSCAAS | GRTSKMYR |
| FR1 | CDR1 |
| MGWFRQAPGKEREFVAA | IRWSGGST |
| FR2 | CDR2 |
| LYSDSVKGRFTISVDNAKNTVYLQMNNLKPEDTAVYSC | |
| FR3 | |
| AAKGSSGLYNQINAYTYW | GQGTQVTSSGR |
| CDR3 | FR4 |

图5 Cr-DTPA-VHH 4-63 测序结果

Fig.5 The sequencing results of Cr-DTPA-VHH 4-63

2.6 Cr-DTPA-VHH 间接竞争性 ELISA 检测法的建立

2.6.1 棋盘法确定抗原抗体最佳反应浓度及其亲和常数 K_{aff} 测定 随着抗体浓度的逐渐增加, OD_{450} 也逐渐增大,在浓度每孔 5×10^{10} PFU 时开始进入平台期。而就抗原包被浓度而言,随着抗原浓度的增加,抗体与抗原的结合能力没有明显的增加,尤其是 $5.0 \mu\text{g/ml}$ 和 $2.5 \mu\text{g/ml}$ 浓度条件下,增加的幅度很小,几乎接近平台期。所以,从试验灵敏性和经济两方面考虑,之后验证试验的最佳抗原包被浓度为 $2.5 \mu\text{g/ml}$,抗体孵育浓度为每孔 5×10^{10} PFU。

根据非竞争性亲和力计算法^[20-22],该抗体 Cr-DTPA-VHH 4-63 的 K_{aff} 约为 $1.279 \times 10^9 \text{ L/mol}$ 。

2.6.2 VHH 与 DTPA 浓度关系确定 随着 DTPA 浓度的增加会对抗原抗体的结合产生抑制作用,所以确定抗体与 DTPA 的浓度关系存在其必要性,根据图 6 结果显示:DTPA 浓度小于 1 mmol/L 的情况下对抗原抗体的结合是没有影响的,所以,之后的验证试验中螯合剂 DTPA 的用量应小于 1 mmol/L 。

2.6.3 抗体标准抑制曲线绘制 以 Cr^{3+} 的浓度为横坐标,抑制率为纵坐标绘制标准曲线(图 7),可以算出该抗体的最低检测限(即抑制率为 10%)可以达到 $1 \mu\text{g/L}$, IC_{50} 为 75 mg/L 。

2.6.4 Cr-DTPA-VHH 与其他金属离子的交叉试验 用不同金属离子的螯合物作为竞争剂,运用建立的间接竞争性 ELISA 法进行抗体与不同金属离子

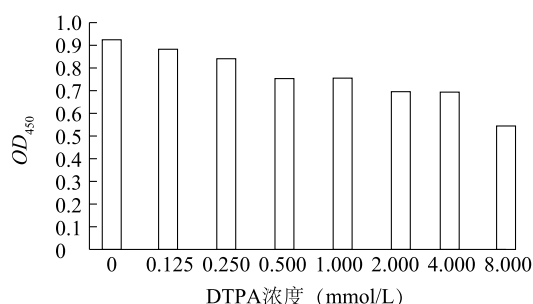


图6 DTPA 浓度对抗体的抑制影响

Fig.6 The inhibitory effect of the concentration of DTPA on antibody

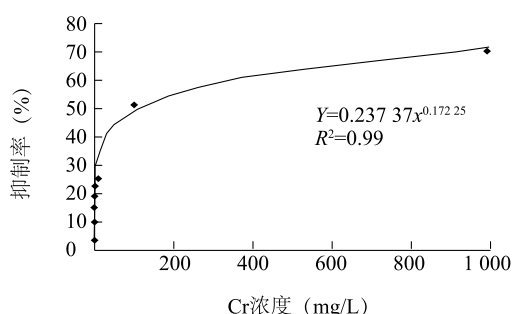


图7 抗体标准抑制曲线

Fig.7 The standard inhibition curve of the antibody

的交叉反应。结果表明,该抗体与其他金属离子(包括一价、二价及三价等不同价态的金属离子)基本没有交叉性,证明该抗体的特异性很好。

2.6.5 水样加标回收试验 在不含任何金属离子的超纯水中加入不同梯度的重金属螯合物 Cr-DTPA,运用建立的间接竞争性 ELISA 法进行回收试验检测,通过与标准曲线对比计算其重金属回收率,由表 1 发现,其平均回收率可达 90%~114%。

表 1 水样加标回收试验

Table 1 Recovery of Cr spiked in water sample

| 水样加标浓度 (mmol/L) | 加标回收率 (%) |
|-----------------|-----------|
| 1 | 90 |
| 2 | 97 |
| 4 | 114 |
| 8 | 108 |

3 结论

本试验通过螯合剂 DTPA 与重金属离子 Cr^{3+} 螯

合,同时与载体蛋白 BSA 和 OVA 偶联,成功制备了重金属 Cr^{3+} 的完全抗原 Cr-DTPA-BSA 和 Cr-DTPA-OVA 及用于排除非特异性的无金属抗原 DTPA-BSA 和 DTPA-OVA。

以 2 种完全抗原 Cr-DTPA-BSA 和 Cr-DTPA-OVA 交替筛选的方式,结合噬菌体展示技术,成功筛选了 Cr-DTPA 抗体库,并通过单克隆筛选得到了两个特异性针对 Cr-DTPA 的单克隆抗体,即 Cr-DTPA-VHH 4-63 及 Cr-DTPA-VHH 4-72。

抗 Cr-DTPA 的单克隆纳米抗体 Cr-DTPA-VHH 4-63,亲和力较高,亲和常数为 $1.279 \times 10^9 \text{ L/mol}$;与其他金属离子没有交叉反应,特异性很强,并由此初步建立了间接竞争性 ELISA 检测法,且最低检测限达到 $1 \mu\text{g/L}$;水样加标回收试验平均回收率 90%~114%,达到国家饮用水检测标准。该方法方便快捷,适用于常见农业灌溉水体及生活饮用水的检测。

参考文献:

- [1] 贾广宁. 重金属污染的危害与防治[J]. 有色矿冶, 2004, 20(1): 39-42.
- [2] 徐振球, 成强, 徐金晶, 等. 水产品及其环境重金属含量监测与分析[J]. 江苏农业科学, 2015, 43(2): 284-286.
- [3] 王宏镇, 束文圣, 蓝崇钊. 重金属污染生态学研究现状与展望[J]. 生态学报, 2005, 25(3): 596-605.
- [4] 贾英, 方明, 吴友军, 等. 上海河流沉积物重金属的污染特征与潜在生态风险[J]. 中国环境科学, 2013, 33(1): 147-153.
- [5] STEEULAND K, BOFFETTA P. Lead and cancer in humans: where are we now? [J]. Am J Ind Med, 2000, 38: 295-299.
- [6] BAKIRCIOGLU Y, SEGADÉ S R, YOUXD E R, et al. Evaluation of Pb-SPEc for flow-injection solid-phase extraction pre-concentration for the determination of trace lead in water and wine by flame atomic absorption spectrometry [J]. Anal Chim Acta, 2003, 485(10): 9-18.
- [7] YUAN D, FU D Y, WANG R, et al. Rapid determination of chromium (VI) in electroplating waste water by use of a spectrophotometric flow injection system [J]. Spectrochim Acta A, 2008, 71: 276-279.
- [8] GARY B P, LI S Z, BROWN K C. From phage display to nanoparticle delivery: functionalizing liposomes with multivalent peptides improves targeting to a cancer biomarker[J]. Bioconjugate Chem, 2013, 24: 85-96.
- [9] PHILIPPA M O, AITKEN R. Antibody phage display, methods in molecular biology[M]. Totowa: Humana Press, 2003.
- [10] HAN D, HUH S, MYUNG H. Selection and characterization of a 7-mer peptide binding to divalent cations[J]. Journal of Peptide Sci-

- ence, 2011, 17: 565-568.
- [11] JONES R M, YU H N, DELEHANTY J B, et al. Monoclonal antibodies that recognize minimal differences in the three 2-dimensional structures of metal-chelate complexes [J]. *Bioconjug Chem*, 2002, 13(3): 408-415.
- [12] WANG Y Z, YANG H, PSCHENITZA M, et al. Highly sensitive and specific determination of mercury (II) ion in water, food and cosmetic samples with an ELISA based on a novel monoclonal antibody [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2012, 403: 2519-2528.
- [13] BAI Y H, LIU Z H, BI Y F, et al. Preparation of polyclonal antibodies and development of a direct competitive Enzyme-Linked immunosorbent assay to detect residues of phenylethanolamine in urine samples [J]. *J Agric Food Chem*, 2012, 60: 11618-11624.
- [14] KONG T, LI X B, LIU G W, et al. Preparation of specific monoclonal antibodies against chelated copper Ions [J]. *Biol Trace Elem Res*, 2012, 145: 388-395.
- [15] LIU F Q, LOU Y, SHI X Y, et al. Preparation and characterization of monoclonal antibody specific for copper-chelate complex [J]. *Journal of Immunological Methods*, 2013, 387: 228-236.
- [16] ZHANG Y, LI X B, LIU G W, et al. Development of ELISA for detection of mercury based on specific monoclonal antibodies against mercury-chelate [J]. *Biol Trace Elem Res*, 2011, 144: 854-864.
- [17] 翟慧泉, 金星龙, 岳俊杰, 等. 重金属快速检测方法的研究进展 [J]. *湖北农业科学*, 2010, 49(8): 1995-1998.
- [18] LEE C M, IORNO N, SIERRO F, et al. Selection of human antibody fragments by phage display [J]. *Nature Protocols*, 2007, 2(11): 3001-3008.
- [19] HOOGENBOOM H R. Selecting and screening recombinant antibody libraries [J]. *Nature Biotechnology*, 2005, 23(9): 1105-1116.
- [20] 万文徽. 单克隆抗体亲和常数的测定 [J]. *单克隆抗体通讯*, 1993, 9(2): 72-75.
- [21] 白慧玲, 赵粤萍, 刘广超, 等. 非竞争性 ELISA 法测定抗 DR5 单克隆抗体功能性亲和常数 [J]. *河南大学学报*, 2005, 24(4): 11-13.
- [22] 郑大勇, 罗荣城, 韩焕兴. 非竞争性 ELISA 法测定人源抗 HBsAg Fab 功能性亲和常数 [J]. *解放军医学杂志*, 2004, 29(2): 110-113.

(责任编辑: 陈海霞)