

重金属镉人工抗原的制备与鉴定

刘 岑, 王金荣*, 段二珍*, 王 瑜

(河南工业大学生物工程学院, 郑州 450001)

摘 要: 目的 制备重金属镉人工抗原并对其进行理化性质和免疫原性鉴定。**方法** 以乙二胺四乙酸二钠(ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt, EDTA·2Na)或二乙基三胺五乙酸(diethylenetriaminepentaacetic acid, DTPA)为双功能螯合剂, 将牛血清白蛋白(bovine albumin, BSA)和 Cd^{2+} 进行螯合, 制备镉人工抗原, 通过二喹啉甲酸(bicinchoninic acid, BCA)法、紫外全波长扫描、十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecylsulfate- polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)、火焰原子吸收法及动物免疫对人工抗原进行分析鉴定。**结果** 紫外全波长扫描和 SDS-PAGE 初步证明人工抗原合成成功; 人工抗原 BSA-EDTA- Cd^{2+} 和 BSA-DTPA- Cd^{2+} 的蛋白质质量浓度分别为 0.9488、0.5506 mg/mL, Cd^{2+} 质量浓度分别为 22.8、20.1 $\mu\text{g/mL}$, 说明人工抗原合成成功, 且 BSA-EDTA- Cd^{2+} 和 BSA-DTPA- Cd^{2+} 的偶联比分别为 14.2:1 和 21.6:1; 用 BSA-EDTA- Cd^{2+} 和 BSA-DTPA- Cd^{2+} 分别免疫小鼠, 四免后血清效价均能达到 1:25600, 且两组血清半数抑制浓度(median inhibition concentration, IC_{50})分别达到 208.88 和 83.91 ng, 与 Ba^{2+} 、 Fe^{3+} 、 Zn^{2+} 、 Pb^{2+} 几乎没有交叉反应。**结论** 人工抗原 BSA-EDTA- Cd^{2+} 、BSA-DTPA- Cd^{2+} 合成成功, 为制备单克隆抗体和建立重金属镉快速免疫分析技术提供理论基础。

关键词: 镉; 人工抗原; 理化性质; 免疫原性

Preparation and identification of artificial antigen for heavy metal cadmium

LIU Cen, WANG Jin-Rong*, DUAN Er-Zhen*, WANG Yu

(College of Biological Engineering, Henan University of Technology, Zhengzhou 450001, China)

ABSTRACT: Objective To prepare the artificial antigen of heavy metal cadmium (Cd), and identify its physical and chemical properties and immunogenicity. **Methods** With ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt (EDTA·2Na) and diethylenetriaminepentaacetic acid (DTPA) as the bifunctional chelating agents, bovine serum albumin (BSA) and Cd^{2+} were chelated to prepare artificial antigen of cadmium, the artificial antigens were identified by bicinchoninic acid (BCA) method, ultraviolet full-wavelength scanning, sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE), flame atomic absorption spectrometry and animal immunity. **Results** Ultraviolet full-wavelength scanning and SDS-PAGE preliminarily proved that the antigen synthesis was successful; the protein

基金项目: 国家自然科学基金项目(31702235)、河南工业大学创新基金支持计划专项资助项目(2020ZKCJ25)

Fund: Supported by the National Natural Science Foundation of China (31702235), and the Innovative Funds Plan of Henan University of Technology (2020ZKCJ25)

***通信作者:** 王金荣, 教授, 主要研究方向为动物营养与饲料科学。E-mail: wangjr@haut.edu.cn

段二珍, 讲师, 主要研究方向为饲料安全。E-mail: yingluo100@163.com

***Corresponding author:** WANG Jin-Rong, Professor, College of Biological Engineering, Henan University of Technology, Zhengzhou, 450001, China. E-mail: wangjr@haut.edu.cn

DUAN Er-Zhen, Lecturer, College of Biological Engineering, Henan University of Technology, Zhengzhou, 450001, China. E-mail: yingluo100@163.com

mass concentrations of artificial antigens BSA-EDTA-Cd²⁺ and BSA-DTPA-Cd²⁺ were 0.9488 and 0.5506 mg/mL, and the Cd²⁺ mass concentrations were 22.8 and 20.1 μg/mL, respectively; and the coupling ratios of BSA-EDTA-Cd²⁺ and BSA-DTPA-Cd²⁺ were 14.2:1 and 21.6:1. Mice were immunized with BSA-EDTA-Cd²⁺ and BSA-DTPA-Cd²⁺, respectively. The serum titers of artificial antigen reached 1:25600 after 4 immunizations, and the median inhibition concentration (IC₅₀) of serum in the 2 groups reached 208.88 and 83.91 ng, respectively, and there was almost no cross reaction with Ba²⁺, Fe³⁺, Zn²⁺ and Pb²⁺. **Conclusion** The artificial antigens BSA-EDTA-Cd²⁺ and BSA-DTPA-Cd²⁺ have been successfully synthesized, which provide a theoretical basis for the preparation of monoclonal antibodies and the establishment of rapid immunoassay for heavy metal cadmium.

KEY WORDS: cadmium; artificial antigen; physicochemical properties; immunogenicity

0 引言

镉(Cd)属于高毒性的重金属污染物^[1],在生物体内积累会导致各种疾病发生,如肺气肿、肾和肝功能障碍、骨质疏松症和心血管疾病等^[2-4]。我国食品安全国家标准 GB 2762—2017《食品安全国家标准食品中污染物限量》中明确规定了各类食品中含镉量的限量指标,监控食品中的镉含量,避免镉超标意义重大。常用的镉检测方法有火焰原子吸收法^[5-6]、石墨炉原子吸收光谱法^[7-8]、电感耦合等离子体质谱法^[9-10]等理化检测方法,虽然这些方法精确性高,能够实现微量镉的检测,但样品前处理过程复杂烦琐、仪器设备昂贵,检测灵敏度较差,并且需要专业的技术人员操作,很难适应镉的快速检测。相比之下,免疫学检测方法具有检测快速、灵敏度高、易于执行、成本低等优势。

免疫学检测方法^[11-13]是基于抗原与抗体的特异性结合反应来检测微量镉的方法,但是镉的分子量较小且结构简单,虽然具有抗原性,但不具有免疫原性,不能直接引起机体产生特异性抗体,必须与载体蛋白质结合后形成完全抗原才能刺激机体产生抗体。制备重金属抗原常用的载体有牛血清白蛋白(bovine albumin, BSA)、鸡卵清白蛋白(ovalbumin, OVA)、钥孔血蓝蛋白(keyhole limpet hemocyanin, KLH)^[14-17]。其中 KLH 分子量较大、结构复杂,其本身还具有广谱抗菌、抗病毒功能,具有较好的免疫效果,但其价格较高,限制了 KLH 的广泛应用^[18]; BSA 的应用技术成熟,不仅具有稳定的理化性质及形态结构,而且其偶联后的状态较为稳定,复合物的溶解性较好,且成本较低;OVA 虽然成本也较低,但是偶联后的复合物不稳定,易产生沉淀,常被用来制作包被原。Cd²⁺对蛋白质有不可逆的毒性,不能与蛋白质直接结合,需要通过螯合剂将 Cd²⁺与蛋白质连接^[19-20]。目前,常应用于制备镉完全抗原的双功能螯合剂主要是乙二胺四乙酸(ethylenediaminetetraacetic acid, EDTA)及其衍生物,柳心梅等^[21]利用异硫氰酸苄基乙二胺四乙酸(isothiocyanobenzyl-EDTA, ITCBE)合成镉离子完全抗原 Cd-ITCBE-BSA,仅通过紫外扫描对人工抗原进行理化鉴

定,最后通过 Cd²⁺抗血清的免疫学特性鉴定表明抗原合成成功;吴峰等^[22]用 OVA 偶联氨基苄基乙二胺四乙酸(aminobenzyl-EDTA)螯合的重金属镉离子作为免疫原,免疫 Balb/C 小鼠后成功获得了效价高、特异性好的多克隆抗体,对人工抗原进行理化鉴定是衡量抗原合成情况的必要手段,在人工抗原的鉴定过程中,通常采用多种检测手段并用的方法,并不单纯的依靠紫外全波长扫描、石墨炉原子吸收光谱法等某一种检测手段,以免因为环境因素或人为误差造成实验结果不准确,上述研究中对人工抗原的理化分析比较少,不能够充分证明产物中仍存在镉离子与半抗原偶联成功。已有研究中镉离子的人工抗原多使用 EDTA 及其衍生物作为双功能螯合剂,少有以 DTPA 及其衍生物作为双功能螯合剂制备人工抗原。本研究分别使用乙二胺四乙酸二钠(EDTA·2Na)和二乙基三胺五乙酸(diethylenetriaminepentaacetic acid, DTPA)螯合 Cd²⁺和 BSA 制备重金属镉人工抗原,对人工抗原进行较充分的理化分析和免疫原性鉴定,并分析两种人工抗原的异同,为单克隆抗体的制备及快速检测技术的研发奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

氯化镉(CdCl₂·2.5H₂O, 纯度≥99%, 国药集团化学试剂有限公司);氯化钡(BaCl₂·2H₂O, 纯度≥99.5%)、六水合三氯化铁(FeCl₃·6H₂O, 纯度≥99%)、硝酸铅[Pb(NO₃)₂, 纯度≥99%]、氯化锌(ZnCl₂, 纯度≥99.5%)(天津市科密欧化学试剂有限公司);透析袋 MD34(截留分子量 8000~14000)、4-羟乙基哌嗪乙磺酸{2-[4-(2-hydroxyethyl)piperazin-1-yl] ethanesulfonic acid, HEPES, 纯度≥99.0%}、5×蛋白质上样缓冲液、考马斯亮蓝 R-250、BSA(纯度 97%)、三羟甲基氨基甲烷(aminomethane, THAM, 纯度 99%)、甘氨酸(纯度 99%)、十二烷基硫酸钠(sodium dodecyl sulfate, SDS)、3,3',5,5'-四甲基联苯胺(3,3',5,5'-tetramethylbenzidine, TMB)单组份显色液(索莱宝生物科技有限公司);OVA(纯度 80%, 上海源叶生物科技有限公司);EDTA·2Na(纯度≥

99.0%, 美国 Genview 公司); DTPA(纯度 $\leq 100\%$, 同仁化学研究所); 二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)、无水乙醇、冰乙酸、三乙胺、氢氧化钾(分析纯, 天津市科密欧化学试剂有限公司); TureColor 三色预染蛋白 Marker(常规范围)[生工生物工程(上海)股份有限公司]; 二喹啉甲酸(bicinchoninic acid, BCA)蛋白浓度测定试剂盒、十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)凝胶快速配制试剂盒(碧云天生物技术有限公司); 辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠 IgG(武汉三鹰生物技术有限公司); 弗氏完全佐剂、弗氏不完全佐剂(美国 Sigma 公司)。

将 2.383 g HEPES 固体溶于约 800 mL 去离子水中, 调 pH 至 7.4, 定容至 1 L, 即为 HEPES 缓冲液; 将 1.142 g $\text{CdCl}_2 \cdot 2.5\text{H}_2\text{O}$ 固体先溶于约 400 mL 去离子水中, 定容至 500 mL, 10 mmol/L CdCl_2 溶液; PBST 洗涤液为含有 0.05% (V/V)吐温-20 的磷酸盐缓冲液(phosphate buffer saline, PBS); 封闭液为含有 5% (m/V)山羊血清的 PBST; 111 mL 18 mol/L 浓硫酸与 889 mL 去离子水混合即为 2 mol/L H_2SO_4 终止液; 将 0.5 g 的考马斯亮蓝 R-250 溶于 50 mL 无水乙醇和 50 mL 冰乙酸中, 定容至 500 mL, 即为考马斯亮蓝 R-250 染色液; 用量筒取 250 mL 无水乙醇和 100 mL 冰乙酸, 混合定容至 1 L, 作为脱色液。

1.2 仪器与设备

FA2004 电子分析天平(精度 0.1 mg, 上海舜宇恒平科学仪器有限公司); IQ7000 超纯水仪(美国 Millipore 公司); ZWY-240 恒温培养振荡器(上海智城分析仪器制造有限公司); SLK-O3000-S 脱色摇床(美国 SCILOGEX 公司); HJ-6 磁力加热搅拌器(金坛区西城新瑞仪器厂); TDL-50B 低速离心机(上海安亭科学仪器厂); UV-3100PC 紫外可见分光光度计(上海美谱达仪器有限公司); Spark10M 多功能酶标仪(瑞士帝肯公司); A3F-12 火焰原子吸收分光光度计(北京普析通用仪器有限责任公司); DYY-6C 电泳仪(北京市六一仪器厂); UVP Gel Solo 凝胶成像系统(德国耶拿分析仪器股份公司); Multiskan FC 型酶标仪[赛默飞世尔(上海)仪器有限公司]。

1.3 实验动物及饲养

实验用小鼠及日粮均购自郑州市惠济区华兴实验动物养殖场。6 周龄无特定病原(specified pathogen free, SPF)级 KM 雌性小鼠 18 只, 体重 16~20 g[生产许可证号: SCXK(豫)2019-0002]。自由采食和饮水, 每天 12 h 光照, 相对湿度为 40%~60%, 温度 22~26℃。

1.4 实验方法

1.4.1 透析袋的处理方法

将透析袋剪成适当(10~20 cm)的小段, 在 2% (m/V)碳酸氢钠和 1 mmol/L EDTA (pH 8.0)溶液中将透析袋煮沸 10 min,

用去离子水彻底清洗透析袋, 然后将透析袋放入 1 mmol/L EDTA (pH 8.0)溶液中再煮沸 10 min, 冷却后将透析袋存放于 4℃, 必须确保透析袋始终浸没在溶液内。

1.4.2 镉人工抗原合成

(1) 镉半抗原的合成

称取 12 mg BSA 溶于 4 mL HEPES 缓冲液中, 然后分别称取 4.2 mg EDTA·2Na 和 DTPA 溶于 1 mL DMSO 中, 分别向 BSA 溶液中缓慢滴加 EDTA·2Na 和 DTPA 溶液, 混匀后用三乙胺调 pH 至 9.0, 在 25℃恒温摇床中缓慢振荡反应 24 h, 在去离子水中透析 2 d, 每天早中晚各换一次去离子水, 透析完成后即制备出半抗原^[23]: BSA-EDTA、BSA-DTPA。

(2) 镉人工完全抗原的合成

向半抗原溶液中缓慢滴加 400 μL 10 mmol/L CdCl_2 溶液, 混匀后用 10 mol/L KOH 溶液调 pH 至 7.0, 之后在 25℃恒温摇床中缓慢振荡反应 6 h, 取出后在去离子水中透析 2 d, 每天早中晚各换一次去离子水, 透析完成后即获得镉完全抗原^[24]: BSA-EDTA- Cd^{2+} 、BSA-DTPA- Cd^{2+} 。

1.4.3 镉人工包被原的合成

用 1.4.2 的方法制备 Cd^{2+} 包被原 OVA-EDTA- Cd^{2+} 、OVA-DTPA- Cd^{2+} 。

1.4.4 镉人工抗原的理化性质鉴定

(1) 镉人工抗原蛋白质浓度测定

参照 BCA 试剂盒的操作说明, 以 BCA 作为标准蛋白, 在 562 nm 处测得的 OD 值为 Y 值, 蛋白质质量浓度(mg/mL)为 X 值, 绘制标准曲线, 由 BSA 标准曲线计算出样品中蛋白质浓度。

(2) 镉人工抗原紫外全波长扫描

准确称量 5 mg BSA, 用 pH 7.4 HEPES 缓冲液稀释至 1 mg/mL, 静置备用。再用 pH 7.4 HEPES 缓冲液分别将样品稀释至约 1 mg/mL, 以 pH 7.4 HEPES 缓冲液为空白对照, 在 220~400 nm 波长范围内对样品溶液进行紫外扫描, 分析吸收峰。

(3) 镉人工抗原 SDS-PAGE 电泳鉴定

使用试剂盒配制 5%浓缩胶和 12%分离胶, 对人工抗原进行 SDS-PAGE 凝胶电泳鉴定, 将样品溶液稀释至约 0.5 mg/mL, 浓缩胶电压为 90 V, 分离胶电压为 110 V, 上样量为 10 μL /孔。电泳结束后, 用考马斯亮蓝 R-250 染色液染色 4~5 h, 脱色液脱色 6~8 h, 每 2 h 更换一次脱色液, 脱色完成后拍照保存。

(4) 镉人工抗原金属离子浓度测定

采用火焰原子吸收法对人工抗原中的 Cd^{2+} 含量进行测定^[5]。

1.4.5 镉人工抗原偶联比的计算

根据人工抗原中的 Cd^{2+} 摩尔浓度, BCA 法定量检测人工抗原中的蛋白质摩尔浓度, 两者之比即为人工抗原偶联比, 按照公式(1)计算:

$$\text{镉人工抗原偶联比} = \frac{C_{\text{Cd}^{2+}}}{C_{\text{BSA}}} \quad (1)$$

式中: $C_{\text{Cd}^{2+}}$ 指 Cd^{2+} 在抗原溶液中的摩尔浓度(mol/L); C_{BSA} 指 BSA 在抗原溶液中的摩尔浓度(mol/L)。

1.4.6 镉人工抗原的免疫学性质鉴定

将 18 只雌性 KM 小鼠适应性饲养 7d 后, 随机分为 3 个处理组, 即 BSA-EDTA- Cd^{2+} 组、BSA-DTPA- Cd^{2+} 组和未经处理的空白组。每个处理 6 个重复, 每个重复 1 只小鼠。背部皮下五点注射, 首次免疫 3 周后进行第 2 次免疫, 之后每隔两周进行一次加强免疫, 并在每次免疫后的第 10 d 对小鼠断尾采血, 四免采血后脱颈处死。

(1) 小鼠抗 Cd^{2+} 多抗血清的制备

分别用 1.5.3 制备的 BSA-EDTA- Cd^{2+} 和 BSA-DTPA- Cd^{2+} 免疫小鼠, 用 pH 7.4 HEPES 缓冲液稀释抗原, 免疫蛋白量为 150 μg /只/次, 免疫剂量为 400 μL /只。自二免开始, 在免疫后 10 d 对小鼠进行断尾采血, 4 $^{\circ}\text{C}$ 下以 3000 r/min 离心 5 min 分离血清, 分装后保存在 -20 $^{\circ}\text{C}$ 中待测。

(2) 间接 ELISA 法检测多抗血清效价

人工包被原 OVA-EDTA- Cd^{2+} 和 OVA-DTPA- Cd^{2+} 用 pH 9.6 的 PBS 稀释至 1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 将其包被于 96 孔酶标板上, 包被量为 100 μL /孔, 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜。采用易翠平等^[25]的间接 ELISA 法对 1.4.6(1) 得到的多抗血清进行效价检测, 并用酶标仪测定其在 450 nm 处的 OD 值。以待测孔 OD₄₅₀ 值 $\geq$ 阴性对照 OD₄₅₀ 值的 2.1 倍为有效阳性效价。

(3) 多抗血清灵敏度的检测

以 Cd^{2+} -EDTA 或 Cd^{2+} -DTPA 螯合物作为抑制剂。用 PBS 分别配制 2 mg/mL 的 Cd^{2+} 、EDTA 和 DTPA 溶液, 将 Cd^{2+} 溶液分别与 EDTA 和 DTPA 溶液等体积混合, 制备成质量浓度为 1 mg/mL 的抑制剂, 摇床振荡, 室温反应 12 h, 待完全溶解后, 将抑制剂稀释成以下 9 个梯度: 1000.000、500.000、250.000、125.000、62.500、31.250、15.625、7.812、3.906 ng/mL, 另设阳性对照孔(抑制剂质量浓度 0 ng/L)和空白对照孔。抗原抗体反应中每孔加入用 PBS 稀释的抗血清 50 μL 和不同浓度的抑制剂 50 μL 混匀, 其他操作步骤同 1.4.6(2)。

(4) 多抗血清特异性的检测

多抗血清的特异性可以用交叉反应率(cross reactivity, CR)来表示, 即小鼠抗血清对 Cd^{2+} -EDTA 或 Cd^{2+} -DTPA 的灵敏度与其他金属离子的灵敏度的比值, 按照公式(2)计算。采用间接竞争 ELISA 法测定多抗血清的特异性, 操作步骤与 1.5.7(2)大致一样, 不同之处在于将抗原抗体竞争反应中的竞争抗原分别以不同浓度的其他金属离子(Ba^{2+} 、 Fe^{3+} 、 Zn^{2+} 、 Pb^{2+})代替。

$$\text{CR}/\% = \text{Cd 离子灵敏度} / \text{其他离子灵敏度} \times 100\% \quad (2)$$

1.5 数据处理

实验数据是以平均值 $\pm$ 标准差表示, 采用 Microsoft Office Excel 2019 软件处理计算; 利用 Origin 2019b 软件绘制紫外、效价等图谱。

2 结果与分析

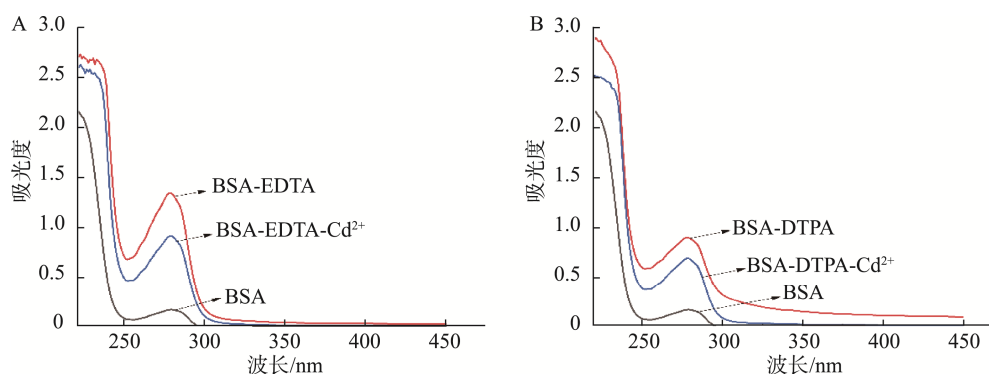
2.1 镉人工抗原的理化性质

2.1.1 镉人工抗原蛋白质浓度测定

根据标准曲线方程 $Y=1.0194X+0.0788$ ($r^2=0.9919$) 计算得到半抗原 BSA-EDTA、BSA-DTPA 的蛋白质浓度分别为 (1.2943 $\pm$ 0.0263)、(1.0127 $\pm$ 0.1055) mg/mL; 人工抗原 BSA-EDTA- Cd^{2+} 、BSA-DTPA- Cd^{2+} 的蛋白质浓度分别为 (0.9488 $\pm$ 0.0575)、(0.5506 $\pm$ 0.0014) mg/mL, 由半抗原制备人工抗原过程中, 向半抗原溶液中滴加 Cd^{2+} 会使蛋白质变性, 因此人工抗原中的蛋白质浓度低于半抗原溶液。

2.1.2 镉人工抗原紫外全波长扫描图谱

BSA、半抗原及人工抗原在波长 220~400 nm 范围内的紫外全波长扫描图谱如图 1, BSA 的最大吸收峰在 279 nm, BSA-EDTA 和 BSA-DTPA 的吸收曲线相对于 BSA 有所改变, 且最大吸收峰发生左移, 位于 278 nm 处, 人工抗原 BSA-EDTA- Cd^{2+} 的紫外扫描图谱在 240~300 nm 范围内具有 BSA 和 BSA-EDTA 的特征, 且 BSA-DTPA- Cd^{2+} 的紫外扫描图谱在 240~300 nm 范围内也具有 BSA 和 BSA-DTPA 的特征, 紫外扫描图初步证明人工抗原合成成功。



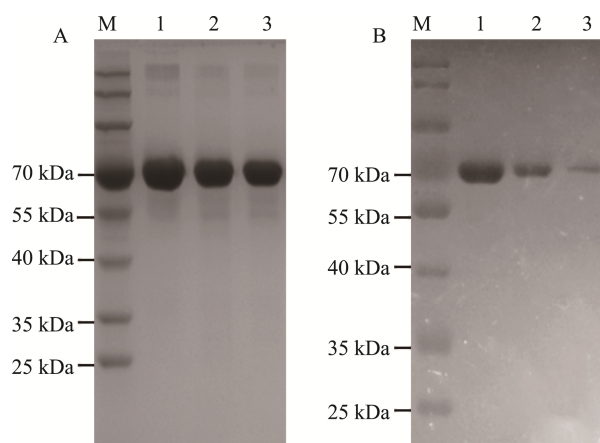
注: A 为 BSA、BSA-EDTA 和 BSA-EDTA- Cd^{2+} 的紫外扫描光谱图; B 为 BSA、BSA-DTPA 和 BSA-DTPA- Cd^{2+} 的紫外扫描光谱图。

图 1 镉人工抗原的紫外扫描光谱图

Fig.1 Ultraviolet spectra of artificial antigen of cadmium

2.1.3 镉人工抗原 SDS-PAGE 电泳鉴定

BSA 的分子量约为 67 kDa, 重金属螯合剂 EDTA·2Na、DTPA 的分子量分别是 0.372、0.393 kDa, 所以半抗原 BSA-EDTA、BSA-DTPA 的分子量应是大于 BSA 的分子量, 而分别小于人工抗原 BSA-EDTA-Cd²⁺和 BSA-DTPA-Cd²⁺的分子量, SDS-PAGE 鉴定结果见图 2。两种半抗原 BSA-EDTA、BSA-DTPA 的电泳条带略微滞后于 BSA, 迁移速度稍快于两种人工抗原 BSA-EDTA-Cd²⁺和 BSA-DTPA-Cd²⁺, 正对应分子量大小, 由此表明人工抗原合成成功。



注: A 图中 M. Marker; 1. BSA; 2. BSA-EDTA; 3. BSA-EDTA-Cd²⁺; B 图中 M. Marker; 1. BSA; 2. BSA-DTPA; 3. BSA-DTPA-Cd²⁺。

图 2 镉人工抗原的 SDS-PAGE 电泳图

Fig.2 SDS-PAGE electropherograms of artificial antigens of cadmium

2.1.4 镉人工抗原金属离子浓度测定

采用火焰原子吸收法测定 Cd²⁺标准溶液, 得标准曲线 $Y=0.5993X-0.0006$ ($r^2=0.9991$); 计算结果发现 BSA 和两种半抗原溶液中 Cd²⁺浓度几乎为零, 而透析后的人工抗原 BSA-EDTA-Cd²⁺和 BSA-DTPA-Cd²⁺中 Cd²⁺浓度分别为 (22.8 ± 0.0) 和 (20.1 ± 0.0) $\mu\text{g/mL}$, 进一步证明人工抗原合成成功。

2.1.5 镉人工抗原偶联比的计算

人工抗原 BSA-EDTA-Cd²⁺和 BSA-DTPA-Cd²⁺的偶联

比值分别为 14.2:1 和 21.6:1。偶联比可以作为合成人工抗原的参考, 当偶联比为 15:1 时, 可以获得较高的抗体效价和中等的抗体特异性^[26], 但是当完全抗原的偶联比开始接近 20:1 时, 溶液中很容易产生絮状沉淀, 无法直接进行后期的免疫实验。在本研究条件下, BSA-EDTA-Cd²⁺和 BSA-DTPA-Cd²⁺的偶联比处于适宜偶联比 5:1~25:1 之内^[27], 说明螯合剂将 Cd²⁺与蛋白质连接成功。

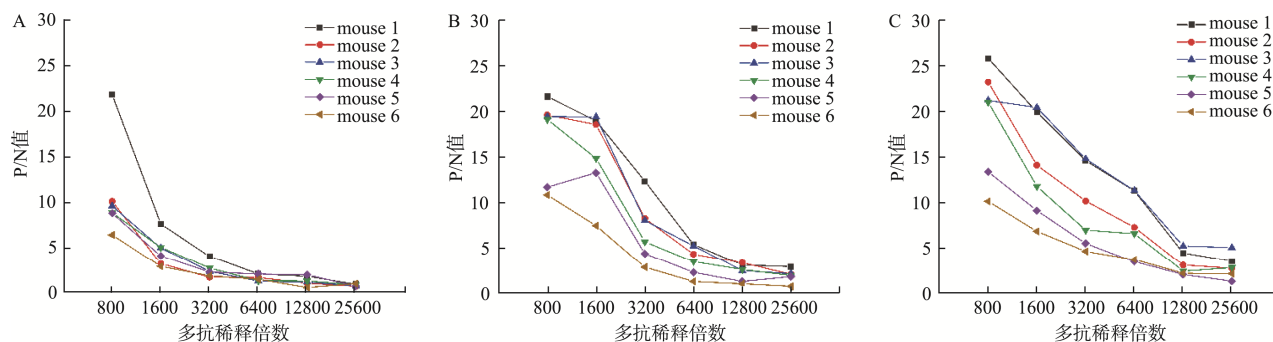
2.2 镉人工抗原的免疫学性质鉴定

2.2.1 间接 ELISA 法检测多抗血清效价

由图 3 可知, 当使用人工抗原 BSA-EDTA-Cd²⁺免疫小鼠时, 随着免疫次数的增多, 小鼠血清效价逐渐升高, 经过 4 次免疫后小鼠血清效价达到 1:25600, 其中以 3 号小鼠的血清效价最高; 图 4 是使用人工抗原 BSA-DTPA-Cd²⁺免疫小鼠, 小鼠的血清效价在三免后上升较快, 四免后效价略有降低, 但都达到了 1:25600, 其中 1 号小鼠的血清效价更好, 对比两组血清效价发现, 偶联比较低的 BSA-EDTA-Cd²⁺组整体血清效价稍高于 BSA-DTPA-Cd²⁺组, 这可能是因为在弱碱性环境中, EDTA 与 Cd²⁺的结合能力优于 DTPA^[28], 且 BSA-EDTA-Cd²⁺在结构上暴露了较多的抗原表位, 使机体免疫系统更易对 Cd²⁺进行识别并产生特异性抗体。

2.2.2 多抗血清灵敏度的检测

如图 3~4 所示, BSA-EDTA-Cd²⁺组 3 号小鼠和 BSA-DTPA-Cd²⁺组 1 号小鼠血清效价稍高。因此, 本研究以 Cd²⁺-EDTA、Cd²⁺-DTPA 螯合物为抑制剂, 在 0~1000 ng/mL 的范围内分别对 BSA-EDTA-Cd²⁺组 3 号和 BSA-DTPA-Cd²⁺组 1 号免疫小鼠的多抗血清进行阻断, 绘制抑制曲线 (图 5), 其中, 3 号线性回归方程为 $Y=22.340X-1.826$, $r^2=0.986$, 半数抑制浓度 (median inhibition concentration, IC₅₀) 为 208.88 ng/mL; 1 号线性回归方程为 $Y=20.923X+9.749$, $r^2=0.951$, 半数抑制浓度 IC₅₀ 为 83.91 ng/mL, 由此说明, 本研究制备的人工抗原能够成功诱导小鼠机体产生针对镉的特异性抗体。



注: A 二免血清效价; B 三免血清效价; C 四免血清效价; P/N 值=(OD₄₅₀ 阳性血清-OD₄₅₀ 空白孔)/(OD₄₅₀ 阴性血清-OD₄₅₀ 空白孔), 下同。

图 3 BSA-EDTA-Cd²⁺组多抗血清效价曲线

Fig.3 Titer curves of serum antibody in BSA-EDTA-Cd²⁺ group

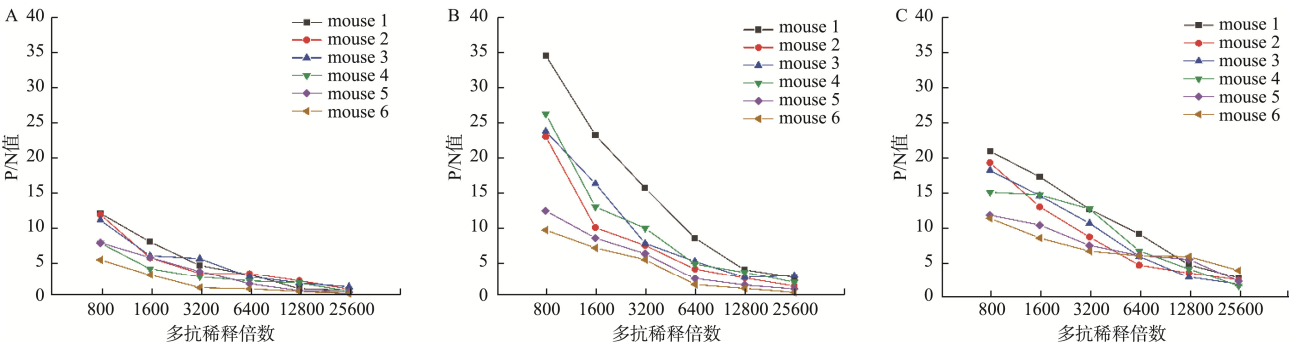
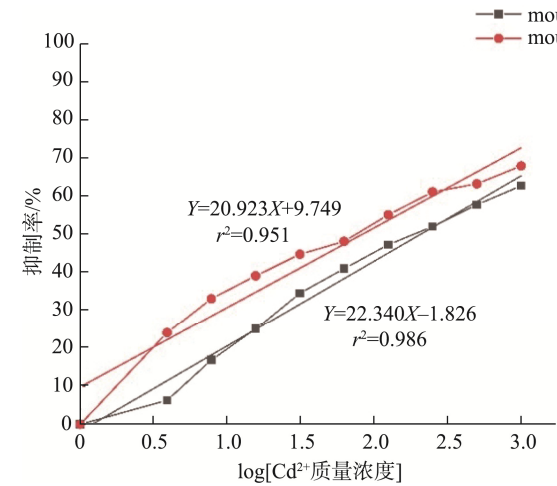


图 4 BSA-DTPA-Cd²⁺组多抗血清效价曲线
Fig.4 Titer curves of serum antibody in BSA-DTPA-Cd²⁺ group



注: Cd²⁺质量浓度单位为 μg/L。

图 5 多抗血清抑制曲线
Fig.5 Inhibition curves of serum antibody

2.2.3 多抗血清特异性的检测

BSA-EDTA-Cd²⁺组 3 号和 BSA-DTPA-Cd²⁺组 1 号小鼠血清以间接竞争 ELISA 法检测血清与 Ba²⁺、Fe³⁺、Zn²⁺、Pb²⁺的交叉反应性,考察多抗血清的特异性。结果如表 1 所示,BSA-EDTA-Cd²⁺组 3 号血清对其他金属离子的交叉反应率都低于 1%;BSA-DTPA-Cd²⁺组 1 号血清对其他金属离子的交叉反应率都低于 0.5%,说明这两种人工抗原制备的多抗血清特异性高,可用于对 Cd²⁺的检测。

表 1 BSA-EDTA-Cd²⁺组 3 号和 BSA-DTPA-Cd²⁺组 1 号小鼠抗血清与不同金属离子的交叉反应

金属离子	BSA-EDTA-Cd ²⁺ 组 3 号		BSA-DTPA-Cd ²⁺ 组 1 号	
	IC ₅₀ (ng/mL)	交叉 反应率/%	IC ₅₀ (ng/mL)	交叉 反应率/%
Cd ²⁺	208.88	100	83.91	100
Ba ²⁺	>30000	<1	>20000	<0.5
Fe ³⁺	>30000	<1	>20000	<0.5
Zn ²⁺	>30000	<1	>20000	<0.5
Pb ²⁺	>30000	<1	>20000	<0.5

3 讨论与结论

人工抗原理化性质的鉴定虽然只是分析人工抗原合成情况的辅助手段,但是对抗体的质量有关键性的影响。为了更全面的分析抗原的结构,避免因为误差影响实验结果的准确性,鲁亮^[29]采用同步辐射 X 射线吸收结构精细光谱对镉离子人工抗原进行分析鉴定,得到了镉离子在人工抗原中的配位情况,进一步验证了人工抗原合成成功。庞钰权^[30]用荧光分光光度法分析人工抗原的荧光光谱、荧光相图和荧光偏振光谱特性,以此判断人工抗原是否合成成功。虽然这些方法理论上都能鉴定抗原是否合成成功,但评价人工抗原合成情况的决定性因素在于抗体的鉴定^[31]。BSA-EDTA-Cd²⁺和 BSA-DTPA-Cd²⁺抗原结构不同,抗体的效价和性能也有较大的差异,因为不同螯合剂与金属离子结合后呈现不同的特征,EDTA 与一些金属离子可以形成六价态复合物,而 DTPA 与金属离子可以形成八价态复合物^[32]。特异性抗体的产生除了与抗原本身有关之外,还与免疫方法、剂量和周期有关。

免疫方法直接影响研究中能否得到特异性抗体,常用的小鼠免疫方法有腹腔注射、皮下注射等^[33]。皮下注射持续时间长,但是对小鼠的伤害小;腹腔注射对操作的要求高,而且对小鼠损伤大,一般只在冲击免疫中使用腹腔注射。免疫剂量也是影响免疫效果的关键因素,本研究中小鼠的免疫剂量是 150 μg/只/次,实验中小鼠并未出现不良反应且均能产生良好的血清效价,而鲁亮^[29]在相同免疫周期的条件下对 3 组小鼠注射不同剂量(200、100 和 50 μg/只/次)的镉离子完全抗原,3 组小鼠都能够产生免疫应答反应,血清效价差异不大,但是注射剂量为 200 μg/只/次组的小鼠出现慢性镉中毒且死亡现象,这说明免疫剂量太大可能导致免疫耐受且会导致实验动物产生不良影响,免疫剂量太小又不利于机体的免疫应答反应。此外,免疫周期也是影响免疫效果的重要因素,不同实验动物采用的免疫周期也有所差别,实验小鼠对皮下注射的抗原吸收速率较慢,因此本实验根据已有研究确定采用的免疫周期是两周,

结果显示 BSA-EDTA-Cd²⁺免疫小鼠时, 在四免之前效价呈现上升趋势, 但 BSA-DTPA-Cd²⁺组小鼠在三免之后效价稍有降低, 于汶等^[34]对家兔进行免疫周期为 2、4、6 周的免疫, 发现 2 周组家兔在第 5 次免疫后抗体不再上升, 4 周组家兔每次免疫时期均为抗体上升阶段, 6 周组在免疫后 5~6 周时抗体效价不再上升, 加强免疫后抗体水平迅速升高, 其抗血清具有高特异性及高亲和力, 表明合适的免疫周期对产生高特异性和高亲和力的抗体具有重要影响。综上, 免疫方法, 剂量和周期对抗体的产生都有不同程度的影响, 本研究选择了较常用的免疫方法、剂量与周期, 为了使小鼠能够产生更高的免疫反应, 因此下一步可以考虑建立小鼠免疫模型, 深入探讨不同的免疫方法、剂量和周期对小鼠产生特异性抗体的影响。

为了正确严谨的对血清进行分析, 需要对 ELISA 的各种实验条件进行研究, 如包被原的最佳工作浓度、最佳包被液、最佳封闭液等^[35]。为了避免假阳性结果的出现, 在 ELISA 实验中应该避免使用与血清发生交叉反应的试剂, 减少实验误差, 进而选出最优的血清效价, 本研究初步摸索了 ELISA 检测条件, 为后续 ELISA 检测试剂盒的开发提供方法参考。总的来说, 本研究成功制备了人工抗原 BSA-EDTA-Cd²⁺和 BSA-DTPA-Cd²⁺, 人工抗原 BSA-EDTA-Cd²⁺刺激小鼠产生的抗体效价高于 BSA-DTPA-Cd²⁺, 两种抗原均适用于免疫及后续的抗体制备, 为进一步制备高特异性、高灵敏性抗重金属镉单克隆抗体和建立重金属镉免疫分析方法奠定了基础。

参考文献

- [1] HEPP LU, PRATAS JAMS, GRACA MAS. Arsenic in stream waters is bioaccumulated but neither biomagnified through food webs nor biodispersed to land [J]. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2017, 139: 132–138.
- [2] WANG S, JI C, LI F, *et al*. Toxicological responses of juvenile Chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis* and swimming crab *Portunus trituberculatus* exposed to cadmium [J]. *Ecotox Environ Saf*, 2022, 234: 113416.
- [3] CHEN Y, XU X, ZENG Z, *et al*. Blood lead and cadmium levels associated with hematological and hepatic functions in patients from an e-waste-polluted area [J]. *Chemosphere*, 2019, 220: 531–538.
- [4] OBENG-GYASI E. Chronic cadmium exposure and cardiovascular disease in adults [J]. *J Environ Sci Health A*, 2020, 55(6): 726–729.
- [5] 郭英. 火焰原子吸收分光光度法测定地表水中的铜、锌、铅、镉[J]. *环境科学导刊*, 2017, 36(3): 106–108.
- [6] 张喜林, 钱亚峰. 火焰原子吸收光谱法测定镁及镁合金中镉含量不确定度评定[J]. *化学分析计量*, 2022, 31(3): 83–87.
- [7] 罗安秀, 柳春莉, 何明杰, 等. 快速消解-石墨炉原子吸收分光光度法测定土壤中铅、镉[J]. *中国检验检疫*, 2022, 30(2): 43–45.
- [8] 秦琴, 郭琳, 郭阳, 等. 微波消解-石墨炉原子吸收光谱法测定圆白菜中铅、镉含量[J]. *现代农业科技*, 2022, (3): 217–220.
- [9] 胡桂霞, 曹美萍, 张燕峰. 电感耦合等离子体质谱法测定大米中总砷、镉和铅含量的不确定度评估[J]. *食品安全质量检测学报*, 2021, 12(6): 2098–2104.
- [10] 李洁, 申颖, 农蕊瑜, 等. 石墨湿法消解-电感耦合等离子体质谱法测定云南水产品鱼类中的铅、铬、镉含量[J]. *食品安全质量检测学报*, 2019, 10(22): 7540–7545.
- [11] LING SM, ZHAO Q, IQBAL MN, *et al*. Development of immunoassay methods based on monoclonal antibody and its application in the determination of cadmium ion [J]. *J Hazard Mater*, 2021, 411: 124992.
- [12] ZHANG YF, LI SF, PENG T, *et al*. One-step icELISA developed with novel antibody for rapid and specific detection of diclazuril residue in animal-origin foods [J]. *Food Addit Contam A*, 2020, 37(10): 1633–1639.
- [13] WANG YL, ZHANG CZ, LIU FQ. Antibody developments for metal ions and their applications [J]. *Food Agric Immunol*, 2020, 31(1): 1079–1103.
- [14] MOUSAVI MF, MIRSIAN S, NOORI A, *et al*. BSA-templated Pb nanocluster as a biocompatible signaling probe for electrochemical EGFR immunosensing [J]. *Electroanalysis*, 2017, 29(3): 861–872.
- [15] MANDAPPA IM, RANJINI A, HAWARE DJ, *et al*. Immunoassay for lead ions: Analysis of spiked food samples [J]. *J Immunoassay Immunochem*, 2014, 35(1): 1–11.
- [16] 翟璐, 郭建军, 金仁耀, 等. 基于杂环类双功能螯合剂 DOTA 的重金属铅人工抗原的制备与鉴定[J]. *中国食品学报*, 2020, 20(10): 254–261.
- [17] 杨松鑫, 冯建远, 郭旋, 等. 小分子化合物单克隆抗体的制备及其在动物医学领域的应用[J]. *中国畜牧兽医*, 2021, 48(3): 1121–1131.
- [18] 李容庆, 权春善, 张丽影, 等. 人工抗原合成研究进展[J]. *中国生物工程杂志*, 2018, 38(12): 65–75.
- [19] LUO ANX, LIU CL, HE MJ, *et al*. Determination of lead and cadmium in soil by graphite furnace atomic absorption spectrophotometry with rapid digestion [J]. *China Inspect Body Lab*, 2022, 30(2): 43–45.
- [20] QIN Q, GUO L, WU Y, *et al*. Determination of lead and cadmium content in cabbage by microwave digestion-graphite furnace atomic absorption spectrometry [J]. *Mod Agric Sci Technol*, 2022, (3): 217–220.
- [21] HU GX, CAO MP, ZHANG YF. Uncertainty evaluation for determination of total arsenic, cadmium and lead content in rice by inductively coupled plasma mass spectrometry [J]. *J Food Saf Qual*, 2021, 12(6): 2098–2104.
- [22] LI J, SHEN Y, NONG RY, *et al*. Determination of lead, chromium and cadmium in fish of Yunnan aquatic products by graphite wet digestion-inductively coupled plasma mass spectrometry [J]. *J Food Saf Qual*, 2019, 10(22): 7540–7545.

- LI RQ, QUAN CS, ZHANG LY, *et al.* Progress in the synthesis of artificial antigen [J]. *China Biotechnol*, 2018, 38(12): 65–75.
- [19] 郝亚明, 周玉, 卢士英, 等. 重金属镉单克隆抗体的制备[J]. *中国实验诊断学*, 2011, 15(5): 822–825.
- HAO YM, ZHOU Y, LU SY, *et al.* Preparation of anti-cadmium monoclonal antibodies [J]. *Chin J Lab Diag*, 2011, 15(5): 822–825.
- [20] 张云显. 重金属镉人工抗原的合成与抗镉单克隆抗体的制备[D]. 兰州: 甘肃农业大学, 2009.
- ZHANG YX. Synthesis of artificial cadmium antigen and preparation of anti-cadmium monoclonal antibodies [D]. Lanzhou: Gansu Agricultural University, 2009.
- [21] 柳心梅, 田巍, 冯春梅, 等. 重金属镉特异性抗体的制备及 icELISA 检测方法的建立[J]. *现代食品科技*, 2020, 36(8): 325–32, 37.
- LIU XM, TIAN W, FENG CM, *et al.* Preparation of specific antibody to cadmium and establishment of icELISA detection method [J]. *Mod Food Sci Technol*, 2020, 36(8): 325–32, 37.
- [22] 吴峰, 吕琦, 毛茅, 等. 抗重金属汞、镉离子小鼠多克隆抗体快速制备[J]. *云南大学学报(自然科学版)*, 2019, 41(S1): 108–111.
- WU F, LV Q, MAO M, *et al.* Rapid preparation of murine polyclonal antibodies against heavy metal mercury ion and cadmium ion [J]. *J Yunnan Univ (Nat Sci Ed)*, 2019, 41(S1): 108–111.
- [23] BLAKE DA, CHAKRABARTI P, KHOSRAVIANI M, *et al.* Metal binding properties of a monoclonal antibody directed toward metal-chelate complexes [J]. *J Biol Chem*, 1996, 271(44): 27677–27685.
- [24] XIANG JJ, ZHAI YF, TANG Y, *et al.* A competitive indirect enzyme-linked immunoassay for lead ion measurement using mAbs against the lead-DTPA complex [J]. *Environ Pollut*, 2010, 158(5): 1376–1380.
- [25] 易翠平, 苏芳, 陈永发, 等. 重金属镉单克隆抗体的制备与性质分析[J]. *食品科学*, 2013, 34(21): 248–253.
- YI CP, SU F, CHEN YF, *et al.* Preparation and properties of monoclonal antibody against heavy metal Cd²⁺ [J]. *Food Sci*, 2013, 34(21): 248–253.
- [26] SINGH KV, KAUR J, VARSHNEY GC, *et al.* Synthesis and characterization of hapten-protein conjugates for antibody production against small molecules [J]. *Bioconjugate Chem*, 2004, 15(1): 168–173.
- [27] 孙凤霞, 康立超, 庞芳琴, 等. 克百威人工抗原合成及其免疫应用[J]. *西北农业学报*, 2018, 27(1): 131–137.
- SUN FX, KANG LC, PANG FQ, *et al.* Synthesis and Immune application of artificial antigen of carbofuran [J]. *Acta Agric Boreali-occidentalis Sin*, 2018, 27(1): 131–137.
- [28] 薛清华, 黄凤莲, 梁芳, 等. EDTA/DTPA 与柠檬酸混合连续淋洗土壤中镉铅及其对土壤肥力的影响[J]. *矿冶工程*, 2019, 39(5): 74–78.
- XUE QH, HUANG FL, LIANG F, *et al.* Continuous soil washing with EDTA/DTPA combined with citric acid for removing Cd and Pb and its impact on soil fertility [J]. *Min Metall Eng*, 2019, 39(5): 74–78.
- [29] 鲁亮. 重金属镉人工抗原构建及其多克隆抗体的制备[D]. 武汉: 华中农业大学, 2011.
- LU L. Preparation of cadmium artificial antigen and anti-cadmium polyclonal antibody [D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2011.
- [30] 庞钰权. 重金属镉单克隆抗体的制备及其免疫学特性研究[D]. 杭州: 浙江林学院, 2009.
- PANG SQ. Preparation of monoclonal antibodies against cadmium ion and study on the immunological characteristics [D]. Hangzhou: Zhejiang Forestry University, 2009.
- [31] 陈臣. 重金属铅人工抗原的制备与纯化及抗体免疫检测体系的建立[D]. 南昌: 南昌大学, 2012.
- CHEN C. Preparation of lead artificial antigen and establishment of antibody detection system [D]. Nanchang: Nanchang University, 2012.
- [32] 张鹏. 重金属铅单克隆抗体的制备及 ELISA 检测方法的建立[D]. 雅安: 四川农业大学, 2010.
- ZHANG P. Preparation of monoclonal antibody against lead and establishment of ELISA method [D]. Ya'an: Sichuan Agricultural University, 2010.
- [33] 孔涛. 重金属铜、镉快速免疫检测技术研究[D]. 长春: 吉林大学, 2010.
- KONG T. Studies on immunological determination of heavy metal copper and cadmium [D]. Changchun: Jilin University, 2010.
- [34] 于汶, 葛衡, 吕卓人, 等. 抗哇巴因多克隆抗体的制备及免疫周期和剂量的研究[J]. *西安医科大学学报(中文版)*, 2000, (1): 66–68.
- YU W, GE H, LV ZR, *et al.* Study on the production of polyclonal antiouabain antibody [J]. *J Xi'an Jiaotong Univ (Med Sci)*, 2000, (1): 66–68.
- [35] 杨树宇, 王文哲, 吴玉苹, 等. 洛美沙星多克隆抗体制备与鉴定[J]. *畜牧兽医学(电子版)*, 2021, (6): 1–6.
- YANG SY, WANG WZ, WU YP, *et al.* Preparation and identification of polyclonal antibody of lomefloxacin [J]. *Graz Vet Sci (Electron Ver)*, 2021, (6): 1–6.

(责任编辑: 郑丽 韩晓红)

作者简介



刘岑, 硕士研究生, 主要研究方向为动物营养与饲料科学。
E-mail: 1961451633@qq.com



王金荣, 教授, 主要研究方向为动物营养与饲料科学。
E-mail: wangjr@haut.edu.cn



段二珍, 讲师, 主要研究方向为饲料安全。
E-mail: yingluo100@163.com