

常用人工抗原鉴定方法的比较

郭乃菲¹, 于基成², 马福敏¹, 郭小瑞¹,
徐美玲¹, 党亚丽³, 范永梅¹, 宫凯莹¹

(1. 辽宁中医药大学 药学院, 辽宁 大连 116600; 2. 大连民族学院 生命科学学院, 辽宁 大连 116600; 3. 浙江省医学科学院 保健食品所, 浙江 杭州 310013)

摘要: 以杀菌剂百菌清为基础制备人工抗原, 分别使用 Native-PAGE 电泳法、SDS-PAGE 电泳法和紫外分光光度法对其进行鉴定, 并测定各人工抗原的偶联比。研究结果表明, 使用紫外分光光度法鉴定人工抗原时, 存在假阳性情况, 此时仍可计算出人工抗原的偶联比。若使用假阳性人工抗原进行免疫, 所获得的抗体效价较低, 对载体蛋白的识别能力较强, 不适合用于免疫检测技术的建立。

关键词: 人工抗原; 紫外扫描; 非变性凝胶电泳; 聚丙烯酰胺凝胶电泳; 偶联比

中图分类号: TS 201.21 **文献标志码:** A **文章编号:** 1673—1689(2014)05—0517—05

Study of Comparison the Commonly Used Artificial Antigen Identification Methods

GUO Naifei¹, YU Jicheng², MA Fumin¹, GUO Xiaorui¹,
XU Meiling¹, DANG Yali³, FAN Yongmei¹, GONG Kaiying¹

(1. College of Pharmacy, Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Dalian 116600, China; 2. College of Life Science, Dalian Nationalities University, Dalian 116600, China; 3. Institute of Health Food, Zhejiang Academy of Medical Sciences, Hangzhou 310013, China)

Abstract: Research purpose of the paper was comparing the commonly identification methods of Artificial antigen, such as Native -PAGE electrophoresis, SDS -PAGE electrophoresis and UV spectro -photometry. In the paper, as the fungicide chlorothalonil was the based compound to prepare the artificial antigens. Native-PAGE electrophoresis, SDS-PAGE electrophoresis and UV spectro-photometry were used of qualitative analysing the artificial antigens, respectively. The results showed that the UV spectrophotometry identification method might cause the false positive, but it still could calculate the coupling ratio of the artificial antigen. If the false positive artificial antigen was used as immunizing antigen, the titer of antibody be low, while, the recognition ability with the carrier protein be strength, which is not suitable for establishing the immunoassay technology.

Keywords: artificial antigen, UV scanning, native-PAGE, SDS-PAGE, coupling ratio

收稿日期: 2013-08-02

基金项目: 浙江省卫生厅科技项目(2011KYB002)。

作者简介: 郭乃菲(1983—), 女, 辽宁沈阳人, 工学博士, 讲师, 主要从事食品质量与安全方面的研究。E-mail: guonaifei1983@126.com

免疫检测方法建立的关键是获得具有高特异性识别能力的抗原与抗体,而抗体是由相应的抗原诱导产生的,因此抗体分子的识别能力主要受到抗原分子结构的影响^[1-2]。人工抗原中半抗原分子与蛋白质分子之间存在着多种不同性质的作用力,其中有能够保持二者连接稳定的共价键力,例如:酰胺键、薛夫碱键等;也有一些弱的化学键在其中起作用,例如,范德华力等^[3-4]。偶联反应是一个温和的化学反应,因此弱的化学键有时候会成为反应体系中主导作用,其结果会使得反应的可逆性增加,人工抗原中半抗原与载体蛋白分离等问题。因此,需要一种稳定可靠的方法来对人工抗原进行鉴定,在进行免疫反应之前,尽可能的排除免疫原性差或者没有免疫原性的人工抗原,为获得高效价的抗血清奠定基础,又可以避免因无意义的实验造成的资源浪费。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

1.1.1 试剂 磷酸氢二钠、磷酸二氢钠、氢氧化钠、氯化钠、考马斯亮蓝等:国产分析纯;百菌清半抗原 CHT-NH₂, 人工抗原 CHT-NH₂-W-BSA、CHT-NH₂-M-BSA、CHT-NH₂-C-BSA, 包被抗原 CHT-NH₂-W-OVA、CHT-NH₂-M-OVA、CHT-NH₂-C-OVA: 作者所在实验室制备。

1.1.2 缓冲液配方 磷酸盐缓冲液(PBS, pH 7.4, 0.2 mol/L): 准确称取 Na₂HPO₄·12H₂O 35.82 g、NaH₂PO₄·2H₂O 15.61 g, 分别用去双蒸水溶解并定容至 500 mL 的容量瓶中。按照两者体积比 81:19 混匀后静置, 贮存于试剂瓶中, 备用。

1.1.3 电泳凝胶配方 见文献 [5]。

1.1.4 仪器 Free Zone 4.5 台式冷冻干燥机: 美国 Labconco; Bio-Rad 680 酶标仪: 美国伯乐; 96 孔酶标板: 美国 Corning; DNP-9082 型恒温培养箱: 上海精宏; 紫外光谱仪: UV-2450, 日本岛津; 电泳仪: DYY-12, 北京六一。

1.1.5 免疫动物 新西兰大白兔: 雄性 (2~2.5 kg), 购自大连医科大学实验动物中心。

1.2 方法

1.2.1 紫外分光光度法鉴定人工抗原 将每种人工抗原溶解于 0.01 mol/L 的 PBS 溶液中, 使其质量浓度为 40 μg/mL, 用紫外光谱仪对其进行扫描, 获得其扫描曲线。

1.2.2 Native-PAGE 电泳法鉴定人工抗原 制备的

人工抗原用 Native-PAGE 非变性电泳进行鉴定。用 10 g/dL 分离胶、5 g/dL 浓缩胶、以载体蛋白 (BSA 或 OVA) 为对照样品, 恒流 (50 mV) 下电泳 5 h, 考马斯亮蓝 R250 染色后, 脱色^[6-7]。

1.2.3 SDS-PAGE 电泳法鉴定人工抗原 制备的人工抗原用 SDS-PAGE 变性电泳进行鉴定。用 10 g/dL 分离胶、5 g/dL 浓缩胶、以载体蛋白 (BSA 或 OVA) 为对照样品, 恒流 (50 mV) 下电泳 5 h, 考马斯亮蓝 R250 染色后, 脱色^[8-9]。

1.2.4 偶联比的测定 采用 Bradford 法^[10-11]测定人工抗原中的蛋白质含量, 以紫外光谱法测定抗原中 CHT-NH₂ 含量, 按下式估算偶联比 (ϵ 表示摩尔吸收系数)。

$$\text{半抗原:BSA/OVA} = \epsilon_{\text{半抗原}} : \epsilon_{\text{BSA/OVA}}$$

1.2.5 抗血清制备 将人工抗原用生理盐水稀释, 加入等体积弗氏完全佐剂充分乳化, 于新西兰大白兔背部皮下多点免疫, 初次免疫剂量为 0.5 mg/kg。三周后加强免疫 (弗氏不完全佐剂), 免疫剂量为初次免疫 20%~30%, 2 周 1 次, 共 4 次。从第 3 次加强免疫开始, 免疫后 7~10 d 耳缘静脉取血, 采用间接 ELISA 法测定抗血清的效价。免疫 4 次后, 颈主动脉放血, 分离抗血清, 于 -20 °C 保存备用^[12-13]。

1.2.6 ELISA 测定抗血清效价

1) 包被: 10.0 μg/mL 包被原包被酶标板, 100 μL/孔, 37 °C 温育 3 h。

2) 洗板: PBST 洗板 3 次, 150 μL/孔, 静置 3 min, 在吸水纸上将酶标板拍干。

3) 封闭: 1 g/dL 明胶, 150 μL/孔, 37 °C 温育 1.5 h。

4) 抗原抗体反应: 洗板, 加入不同稀释度抗血清 (以阴性血清为空白), 100 μL/孔, 37 °C 温育 1 h。

5) 抗体与酶标二抗反应: 洗板, 加入辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG, 100 μL/孔, 37 °C 温育 1 h。

6) 显色: 洗板, 加入显色液 (邻苯二胺), 100 μL/孔, 37 °C 显色 15 min。

7) 终止: 加入终止液 (2.0 mol/L H₂SO₄), 50 μL/孔, 采用酶标仪在 490 nm 测定其 OD 值。

在 ELISA 测定过程中, 分别以包被抗原、BSA 包被酶标板, 按上述步骤测定其 A 值, 考察抗血清对 BSA 和 CHT-NH₂ 的识别能力^[14-15]。

2 结果与分析

2.1 紫外分光光度法鉴定人工抗原

由图 1~2 可见, 人工抗原 CHT-NH₂-W-BSA 和

CHT-NH₂-M-BSA 的紫外扫描曲线在 247、301、360 nm 处均有吸收峰出现,并且较半抗原的各个吸收峰略微红移(1 nm 左右)这些吸收峰同时也在半抗原的扫描曲线中出现,说明在人工抗原的吸收体系中存在由半抗原分子的特征基团引起的紫外吸收。由图 3 可知,人工抗原 CHT-NH₂-C-BSA 中由蛋白质肽键引起的 210 nm 左右的吸收与 BSA 中相同原因引起的吸收峰在位置上略微蓝移。人工抗原中其他的吸收峰均可与半抗原的各个吸收峰相对准。

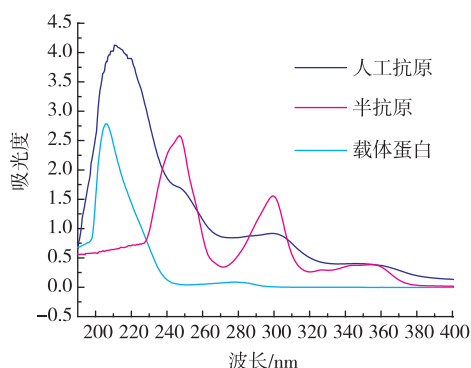


图 1 CHT-NH₂-W-BSA 紫外光谱图

Fig. 1 UV spectrum of CHT-NH₂-W-BSA

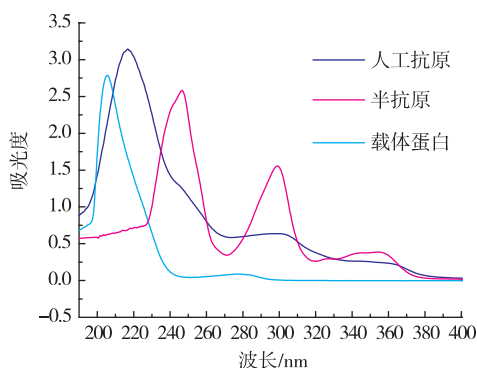


图 2 CHT-NH₂-M-BSA 紫外光谱图

Fig. 2 UV spectrum of CHT-NH₂-M-BSA

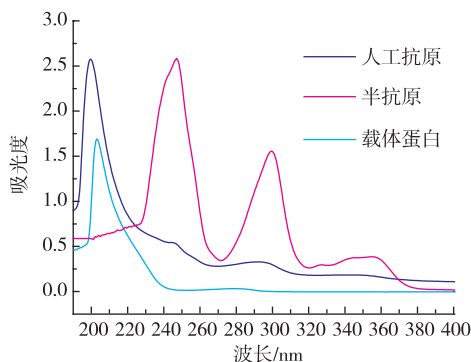
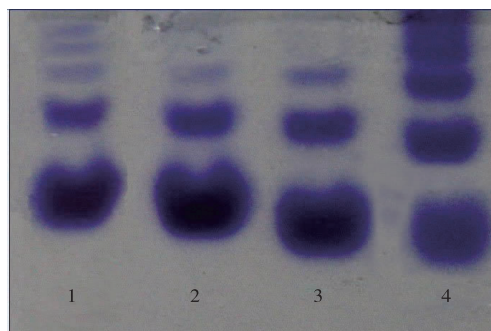


图 3 CHT-NH₂-C-BSA 紫外光谱图

Fig. 3 UV spectrum of CHT-NH₂-C-BSA

2.2 非变性聚丙烯酰胺电泳鉴定人工抗原

由图 4 可见,人工抗原的电泳条带要比 BSA 的电泳条带多,且都位于载体蛋白质条带出现的上方。这是由于蛋白质上所带的电荷发生因偶联反应的发生而被屏蔽掉。因此人工抗原所带的电荷数减少,在电场中的迁移率较低,造成电泳条带的出现。人工抗原 CHT-NH₂-C-BSA 的电泳条带与载体蛋白的非常相似,说明二者在相对分子质量和分子所带电荷方面的情况相同,这可能是由于所制备的人工抗原中半抗原与载体蛋白质分子之间是以非共价键的形式连接。而在紫外分光光度法进行鉴定时,体系中仍然可存在一定数目的半抗原分子而使吸收曲线发生变化,从而导致鉴定结果的误差。



1:CHT-NH₂-M-BSA;2:BSA;3:CHT-NH₂-M-BSA;4:CHT-NH₂-W-BSA

图 4 人工抗原的非变性聚丙烯酰胺电泳图

Fig. 4 Native-PAGE electrophoresis of Immunogen

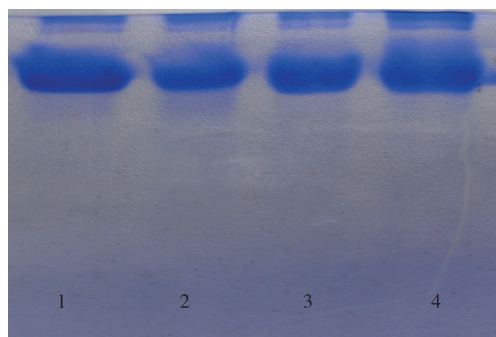
2.3 SDS-PAGE 法鉴定人工抗原

由图 5 可见,人工抗原的迁移率与载体相比并未发生明显的变化,因此,对于本研究所涉及的人工抗原,这种鉴定方法具有一定的局限性。其原因可能在于,本研究所设计的半抗原相对分子质量较小,加之偶联比有限,因此对人工抗原的相对分子质量影响有限。另外,人工抗原的相对分子质量应大于载体蛋白质,因此人工抗原的电泳条带应在载体蛋白质的电泳条带上方出现。

2.4 人工抗原偶联比的测定

根据采用 Bradford 法测定了人工抗原中载体蛋白质的含量。其中蛋白质在 595 nm 的标准曲线为: $y=0.005\ 4x+0.018\ 4$ ($R^2=0.987\ 2$);蛋白质在 297 nm 的标准曲线为 $y=0.000\ 1x+0.043$ ($R^2=0.986\ 5$);半抗原 CHT-NH₂ 在 297 nm 的标准曲线为: $y=0.052\ 3x+0.056\ 7$ ($R^2=0.9952$),计算出半抗原 CHT-NH₂-W-BSA、CHT-NH₂-M-BSA、CHT-NH₂-C-BSA 相应

的偶联比分别为 36.99:1, 2.34:1 和 8.10:1。



1: CHT-NH₂-C-BSA; 2: CHT-NH₂-W-BSA; 3: CHT-NH₂-M-BSA; 4: BSA

图 5 人工抗原的变性聚丙烯酰胺电泳图

Fig. 5 SDS-PAGE electrophoresis of artificial antigens

2.5 抗血清效价测定

由百菌清抗血清滴定曲线(图 6~8)可知, CHT-NH₂-W 和 CHT-NH₂-M 具有较高的效价, 分别为 6.4×10^3 和 4.0×10^4 , 而 CHT-NH₂-C 测得抗血清效价很低, 进一步验证了 Native-PAGE 电泳实验的结果。

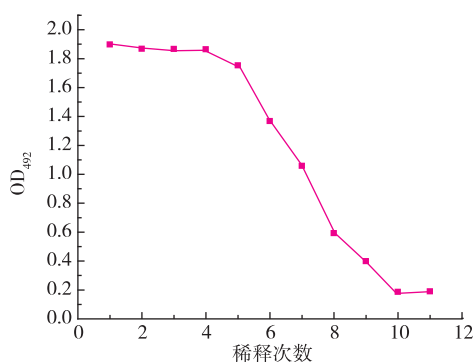


图 6 抗血清 CHT-NH₂-W ELISA 反应曲线

Fig. 6 Reaction curve of ELISA for antiserum CHT-NH₂-W

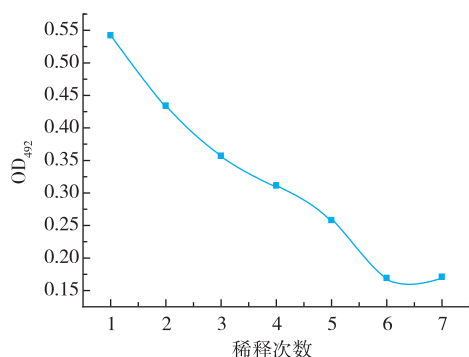


图 7 抗血清 CHT-NH₂-C ELISA 反应曲线

Fig. 7 Reaction curve of ELISA for antiserum CHT-NH₂-C

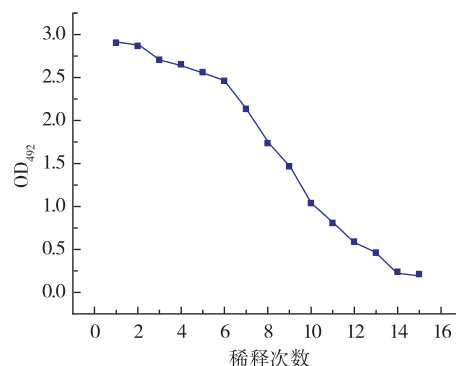


图 8 抗血清 CHT-NH₂-M ELISA 反应曲线

Fig. 8 Reaction curve of ELISA for antiserum CHT-NH₂-C

3 结 语

在试验过程发现, 有些人工抗原的制备并不成功, 例如 CHT-NH₂-C-BSA。但是其所获得的紫外光谱却发生了一定的变化, 与载体蛋白质的紫外光谱不尽相同。从实验结果可以推断出, 在重氮化法的反应混合体系中, 蛋白质对半抗原的识别能力与其余二者有差异。在人工抗原 CHT-NH₂-C-BSA 中, 半抗原分子与载体蛋白可能是靠着一些较弱的分子间作用力来维持, 例如范德华力等, 而戊二醛法和羰基咪唑法则是在半抗原分子与载体蛋白质之间以薛夫碱键或酰胺键等共价键连接^[16-18]。

由于人工抗原分子中存在半抗原分子的结构, 使得紫外扫描曲线发生了相应的略微红移的变化, 但是只有 CHT-NH₂-C-BSA 的紫外扫描曲线在 200~220 nm 范围内略微蓝移。产生这一现象的原因可能是因为偶联反应的失败。同时结合偶联比的测定结果来看, CHT-NH₂-C-BSA 的偶联比为 2.34:1, 因此这一方法所制备的人工抗原并不理想。

参考文献:

- [1] 李志勇. 食品安全 ELISA 快速检测技术[M]. 北京:中国标准出版社,2009:10-16.
- [2] 陈建新,陈梅英,赵会杰. 免疫学技术在植物科学中的应用[M]. 北京:中国农业大学出版社,1998:46-53.
- [3] Pankaj Kulshrestha,N. Sukumar,Jane S. Murray,et al. Computational prediction of antibody binding sites on tetracycline antibiotics:electrostatic potentials and average local ionization energies on molecular surfaces [J]. **J Phys Chem A**,2009,113(4):756-766.
- [4] Umaporn Pimpitak,Songchan Putong,Kittinan Komolpis,et al. Development of a monoclonal antibody-based enzyme-linked immunosorbent assay for detection of the furaltadone metabolite,AMTZ,in fortified shrimp samples [J]. **J Food Chemistry**,2009,116(3):785-791.
- [5] 郭尧君. 蛋白质电泳实验技术[M]. 北京:科学技术出版社,2005:98-105.
- [6] 梁宝萍,原玉香,朴凤植,等. 大白菜非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳技术的优化[J]. 河南农业科学,2012,41(5):129-132.
LIANG Baoping,YUAN Yuxiang,PIAO Fengzhi,et al. The optimization of technique of native polyacrylamide gel electrophoresis (native-PAGE)[J]. **Journal of Henan Agricultural Sciences**,2012,41(5):129-132. (in Chinese)
- [7] 朱蕙霞,陈蓉,金国华,等. 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳在大鼠海马组织蛋白分离中的应用[J]. 南通医学院学报,2003,23(4):373-374.
ZHU Huixia,CHEN Rong,JIN Guohua,et al. The application of non-denature PAGE on separating proteins of hippocampus tissue in rat.[J]. **Acta Academiae Medicinae Nantong**,2003,23(4):373-374. (in Chinese)
- [8] 刘宇新,靳力争,张仲国,等. 向日葵食用蛋白的提取和 SDS-PAGE 电泳技术研究[J]. 天津农业科学,2012,18(2):8-10.
LIU Yuxin,JIN Lizheng,ZHANG Zhongguo,et al. Technical study on the edible protein extraction from sunflower and protein analysis with SDS-PAGE electrophoresis[J]. **Tianjin Agricultural Sciences**,2012,18(2):8-10. (in Chinese)
- [9] 朱雄伟,张佑红,徐智鹏,等. 自噬基因融合蛋白重组多克隆抗体的纯化与检测[J]. 武汉工程大学学报,2013,35(2):37-41.
ZHU Xiongwei,ZHANG Youhong,XU Zhipeng,et al. Purification and detection of autophagy-related gene fusion protein restructured polyclonal antibody[J]. **Wuhan Inst Tech**,2013,35(2):37-41. (in Chinese)
- [10] 贾俊芳,张铁莉,韩大明,等. 3-吡啶乙酸印迹聚合物分子识别机理的色谱和光谱研究[J]. 唐山师范学院学报,2009,31(5):9-12,65.
JIA Junfeng,ZHANG Tieli,HAN Daming,et al. Chromatographic and spectroscopic study on molecular recognition mechanism of indole-3-acetic acid-imprinted polymer[J]. **Journal of Tangshan Teachers College**,2009,31(5):9-12,65. (in Chinese)
- [11] 钮伟民,何恩奇,戴维杰,等. 三聚氰胺单克隆抗体的制备及其免疫学特性鉴定[J]. 食品与生物技术学报,2011,30(6):884-886.
NIU Weimin,HE Enqi,DAI Weijie,et al. Preparation and immunological characterization of monoclonal antibody against melamine[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**,2011,30(6):884-886. (in Chinese)
- [12] Jae Koo Lee,Ki Chang Ahn,Oee Suk Park,et al. Development of an ELISA for the detection of the residues of the insecticide imidacloprid in agricultural and environmental samples[J]. **J Agric Food Chem**,2001,49(5):2159-2167.
- [13] Yongchao Guo,Danhui Cheng,Tsz Yan Lee,et al. New immunoassay platform utilizing yeast surface display and direct cell counting[J]. **Anal Chem**,2010,82(23):9601-9605.
- [14] 彭方毅,徐建建,姜海蓉,等. 抗氨甲酰化蛋白抗体的制备及其 ELISA 检测方法的建立[J]. 重庆理工大学学报:自然科学,2013,27(3):37-42.
PENG Fangyi,XU Jianjian,JIANG Hairong,et al. Preparation of antibodies against carbamylated/homocitrullinated proteins and development of ELISA method[J]. **Journal of Chongqing University of Technology:Natural Science**,2013,27(3):37-42. (in Chinese)
- [15] LI Jun,LIU Xiang,WANG Jianping. Multidetermination of four nitrofurans in animal feeds by a sensitive and simple enzyme-linked immunosorbent assay[J]. **J Agric Food Chem**,2009,57(6):2181-2185.
- [16] 冯艳,薛赛凤,牟兰,等. 光谱法研究七、八元瓜环对亚甲基蓝的分子识别[J]. 光谱学与光谱分析,2009,29(11):3042-3046.
FENG Yang,XUE Saifeng,MU Lan. Recognition of cucurbiturils toward methylene blue with spectroscopy[J]. **Spectroscopy and Spectral Analysis**,2009,29(11):3042-3046. (in Chinese)
- [17] 苏雪丽,孙彦. 蛋白质静电吸附的可动平衡模型[J]. 天津大学学报,2004,37(11):953-958.
SU Xueli,SUN Yan. A mobile model for protein adsorption equilibrium by electrostatic interactions [J]. **Journal of Tianjin University**,2004,37(11):953-958. (in Chinese)