

【论著】

蓖麻毒素 B链蛋白多克隆抗体的制备及胶体金免疫层析快速检测法的建立

王俊虹¹, 康琳², 高珊², 王景林^{2*}

(1. 中国人民武装警察部队医学院, 天津 300162

2. 军事医学科学院微生物流行病研究所 病原微生物安全国家重点实验室, 北京 100071)

[摘要] 目的: 结合蓖麻毒素(RT)的多克隆抗体和单克隆抗体, 建立检测 RT的胶体金免疫层析快速检测方法。方法: 将纯化得到的重组蓖麻毒素 B链蛋白(rRTB)免疫兔, 获得抗血清经正辛酸-硫酸铵分步沉淀法纯化, 利用间接 ELISA 方法鉴定抗体效价和特异性。结合抗重组蓖麻毒素 A链蛋白(RTA)单克隆抗体, 采用双抗体夹心法, 建立检测天然 RT的胶体金免疫层析技术, 并对该方法进行特异性、敏感性、稳定性等评价; 在奶粉、血清、土壤等材料中进行模拟添加 RT检测。结果: 间接 ELISA 法测定抗体效价为 $1:10^5$, 并可特异性与 rRTB 结合; 胶体金法能在 5~10 min 内完成检测, 多种不同的蛋白及近缘毒素检测评价显示该法特异性良好, 检测灵敏性为 50 ng/ml 环境样品的检测敏感性也相同。结论: 利用抗 RTB 多抗和抗 RTA 单抗, 建立了适用于现场的快速、特异检测天然蓖麻毒素的胶体金免疫层析方法。

[关键词] 蓖麻毒素 B链; 多克隆抗体; 胶体金; 免疫层析法

[中图分类号] R996

[文献标识码] A

[文章编号] 1004-8685(2008)12-2480-04

Preparation of anti-ricin toxin B polyclonal antibody and development of colloidal gold-based immunochromatographic assay for the rapid detection of ricin toxin

Wang Jun-hong¹, Kang Lin², Gao Shan², Wang Jing-lin^{2*}

(1. Medical College of Chinese People's Armed Police Forces, Tianjin 300162, China; 2. State Key Laboratory of Pathogen and Biosafety, Institute of Microbiology and Epidemiology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100071, China)

[Abstract] **Objective** To develop a rapid sensitive immunochromatographic assay (IC) to detect ricin toxin in assay buffer and mimic samples. **Methods** The rRTB was used to immunize rabbit for producing the anti-serum. The polyclonal antibody (Pab) was purified by caprylate-saturated ammonium sulfate fractionation (50%). Indirect ELISA using RT directing coated to the well as antigen determined the specificity and titer of the Pab. One anti-ricin A chain monoclonal antibodies (Mab) was immobilized to a defined detection zone on a porous nitrocellulose membrane while the Pab was conjugated to colloidal gold particles which served as a detection reagent. **Results** The Pab was prepared and ELISA showed that the titer was $1:10^5$. The ricin-containing sample was detected by the colloidal gold-based immunochromatographic assay in 5~10 min and the assay sensitivity was 50 ng/ml. **Conclusion** The Pab was produced successfully and a rapid signal step and highly sensitive IC has been developed to detect ricin.

[Key words] Ricin toxin B chain; Polyclonal antibody; Colloidal gold-based assay; Immunochromatographic assay

蓖麻毒素(ricin toxin, RT)是蓖麻籽中含有的一种高毒性糖蛋白, 是由 A、B 多肽链靠二硫键组成的异二聚体, 相对分子质量在 66×10^3 左右, RTA 链为效应链, 具有 RNA N-糖苷酶活性, 可使核糖体失活, 也属于 II 型核糖体失活蛋白; RTB 链为结合链, 含有两个半乳糖结合位点, 介导 RTA 链进入细胞内发挥毒性作用^[1,2]。RT 小鼠腹腔 LD₅₀ 约为 3.0 μg/kg 其毒性至少是有机磷神经毒剂 VX 的 380 倍^[2,3]。由于 RT 毒性强、来源广和无需高技术条件即可大量制备, 已成为标准的毒素战剂之一^[4]。近年来, 有关多个恐怖组织和极端分子研制和拥有 RT 的消息频频警示, 这种致命的生物毒素已成为最有可

能被用作恐怖袭击的生物战剂, 因此, 尽快建立 RT 的检测方法具有十分重要的意义。

RT 的检测方法国外已有研究报道, 比如美国已经建立了多种快速检测方法及车载、手持式毒素快速检测仪装备军队^[5-7,9-11], 我国台湾省也已建立了 RT 快速检测方法^[8]。国内的工作重点是研究其在肿瘤等疾病上的导向治疗, 关于检测方法的报道并不多见^[12]。因此, 本研究旨在高效表达重组 RTB 蛋白作为抗原免疫动物, 制备 RT 的检测多克隆抗体, 并结合抗 RTA 单克隆抗体, 应用双抗夹心法和胶体金免疫层析法检测天然 RT, 评价方法的灵敏性、特异性及该法应用于 RT 生物恐怖和环境样品的可行性。

[作者简介] 王俊虹(1977-), 女, 硕士, 讲师, 主要从事预防医学工作。

* 通讯联系人, E-mail: wangj6481@hotmail.com

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

1 材料和方法

1.1 材料

辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的羊抗兔 IgG 购自北京鼎国生物技术公司; 硝酸纤维素膜购自 Millipore 公司; 大耳白兔由军事医学科学院实验动物中心提供; 弗氏完全佐剂和弗氏不完全佐剂为美国 Sigma 公司产品; 抗 RTA 单克隆抗体由河北省科学院生物科学研究所制备; 单克隆抗体亚型鉴定试剂盒购自美国 Roche 公司; 其他试剂为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 抗 RTA 单克隆抗体亚型的鉴定 采用美国 Roche 公司 Mouse Monoclonal Antibody Isotyping Kit 按操作说明进行。

1.2.2 抗 rRTB 蛋白多克隆抗体的制备

1.2.2.1 重组 RTB 蛋白多克隆抗体的制备: 用纯化的 rRTB 蛋白 200 mg 与等体积的福氏完全佐剂充分混匀, 免疫新西兰纯种大白兔, 一周后用 1 mg 蛋白和等体积福氏不完全佐剂加强免疫 1 次; 此后每周耳缘静脉采血, 间接 ELISA 测定效价, 4 周后加强免疫蛋白 1 mg 3 天后颈动脉插管收集血清。免疫血清 37℃ 温育 1 h 后, 4℃ 温育 24 h 并于 -20℃ 保存。

1.2.2.2 重组 RTB 蛋白多克隆抗体的纯化: 利用正辛酸-硫酸铵分步沉淀法纯化抗体。取 1 份血清加入 4 份 60 mmol/L pH 4.0 的醋酸缓冲液, 用 NaOH 调节 pH 为 4.5。以每毫升稀释液中加入 70 μl 正辛酸的比例, 磁力搅拌 30 min, 4℃ 10000 r/min 离心 30 min, 弃沉淀, 取上清液通过滤纸过滤, 加入 5 倍体积的 PBS 调节 pH 为 7.4, 然后置冰浴至 4℃, 按照每毫升混合液加 0.27 g 硫酸铵, 继续磁力搅拌 30 min, 9000 r/min, 4℃ 离心 15 min, 收集沉淀物, 溶于 PBS 中, 透析至无 NH₄⁺, -70℃ 保存, 并经 SDS-PAGE 鉴定其纯度, 考马斯亮蓝定量浓度。

1.2.2.3 重组 RTB 蛋白多克隆抗体效价测定、特异性鉴定: 应用间接 ELISA 法进行。将纯化的重组 RTB 蛋白、重组相思豆 A 链蛋白、重组 A 型肉毒毒素重链 C 端片段蛋白、牛血清白蛋白 (BSA) 蛋白分别用 0.1 mol/L NaHCO₃ 稀释, 包被酶联板, 每孔 100 μl (浓度为 10 μg/ml), 4℃ 过夜后, 以 PBST (PBS + 0.05% Tween-20) 洗 3 次, 用 PBST 配制的 3 g/100 ml 小牛血清封闭, 37℃ 放置 1 h, PBST 洗 3 次, 加入 0.01 mol/L PBST 1×10 倍稀释的抗体 (100 μl/孔), 37℃ 作用 1 h, 用 PBST 洗 3 次, 加入 PBST 稀释羊抗兔 IgG (1:60000 稀释, 100 μl/孔), 37℃ 作用 1 h, 用 PBST 洗 3 次, 加显色液 OPD, 显色 5 min 后, 用 2 mol/L H₂SO₄ 终止反应, 测 A₄₅₀ 值。

1.2.3 胶体金颗粒的制备 参照文献报道^[13]的方法, 应用柠檬酸钠还原法制备胶体金。具体操作方法如下: 将 HAuCl₄ 先配制成质量分数为 0.01% 水溶液, 取 100 ml 加热至沸。搅动下准确加入 1.25 ml 质量分数为 1% 的柠檬酸钠水溶液。继续加热煮沸 15 min, 此时可观察到淡黄色的氯金酸水溶液在柠檬酸钠加入后很快变灰色, 继而转成黑色, 随后逐渐稳定成红色。约 10~15 min 后停止加热。冷却至室温后 4℃ 避光保存。

1.2.4 稳定胶体金最适抗体量测定 采用试管观测法^[14]测得稳定胶体金最适抗 RTB 多克隆抗体量为 0.08 mg/ml。

1.2.5 胶体金探针制备 取调好 pH 8.2 的胶体金 100 ml 放

入装有磁转子的小烧杯中, 在磁力搅拌上, 调转速为液面不出现气泡为宜。加入已纯化好的浓度为 0.2 mg/ml 的抗 RTB 多克隆抗体 4 ml 缓慢搅拌 10 min 后, 加入 BSA, 使其终浓度为 1%, 继续搅拌 10 min 以上。将上面初步制得的胶体金探针以 4000 r/min 离心 20 min, 收集上清以 10000 r/min 4℃ 离心 60 min 弃上清, 留下管底暗红色疏松状沉淀, 用 0.005 mol/L, pH 7.6 的 PBS 缓冲液重新悬浮, 同前再离心洗涤 1 次。最后将沉淀用相同 PBS 缓冲液悬浮, 置 4℃ 保存。

1.2.6 免疫层析试纸条的制备 样品垫、结合垫 (加入标记的胶体金, 37℃、3 h 干燥)、硝酸纤维素膜 (检测带: 抗 RTA 单克隆抗体 1 mg/ml 1 μl/cm; 质控带: 羊抗兔 IgG 1 mg/ml 1 μl/cm)、吸水垫依次贴上带有粘和剂的底衬卡, 切成 0.4 cm 的检测条, 干燥室温储存备用。

1.2.7 检测及结果判读 手工加样 100 μl 待测液至制备好的层析条样品垫端, 5~10 min 后, 检测带和质控带均出现红色为阳性, 只有质控带出现红色为阴性, 检测带和对照带均不显色, 则为试剂失效, 需换新的层析条重测。

1.2.8 敏感性、特异性实验 以质量分数为 1% Tween 的 PBS 样品稀释液同样分别处理天然 RT 溶液 (浓度为 50Q、10Q、5Q、10 ng/ml)、重组相思豆毒素 A 链蛋白 (浓度为: 0.2 mg/ml)、BSA (浓度为: 1 mg/ml), 以制备好的胶体金免疫层析试纸条检测, 并与同样的 PBS 溶液样品对照。

1.2.9 稳定性实验 将胶体金免疫层析试纸条于 37℃ 存放, 并在 1 天、2 天、3 天、4 天、5 天, 按 1.2.8 方法分别处理天然 RT 溶液 (浓度为 10Q、5Q、10 ng/ml)、重组相思豆毒素 A 链蛋白 (浓度为: 0.2 mg/ml)、BSA (浓度为: 1 mg/ml), 进行检测, 并与同样的 PBS 溶液样品对照。

1.2.10 模拟“环境污染物”样品检测 奶粉、血清、土壤等样品约 50 mg 加入到 1 mg/ml RT 溶液中, 混匀, 静置 10 min 或离心 (8000 r/30 s), 直接用于检测。

2 结果

2.1 抗 RTA 单克隆抗体亚型的鉴定

应用美国 Roche 公司 Mouse Monoclonal Antibody Isotyping Kit 进行鉴定, 4 株杂交瘤单克隆细胞株 3D8F1、3G6B5、2E5A8、2C9B8 分泌的单克隆抗体均属于 IgG₁ 轻链均为 k 型。

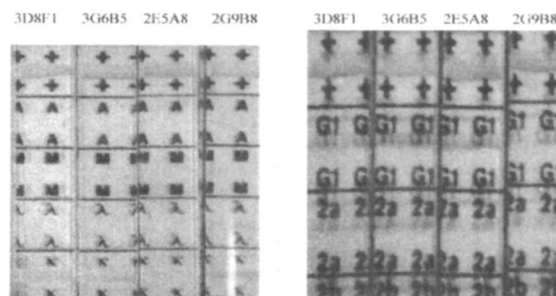


图 1 抗重组 RTA 蛋白单克隆抗体亚型鉴定

2.2 重组 RTB 蛋白多克隆抗体的纯化

以正辛酸-硫酸铵沉淀法纯化抗 RTB 多克隆抗体 (图 2), 经 TotalLab 2.0 图像软件分析, 其纯度约达 90%。考马斯亮蓝法定量抗 RTB 单克隆抗体浓度约为 4 mg/ml。

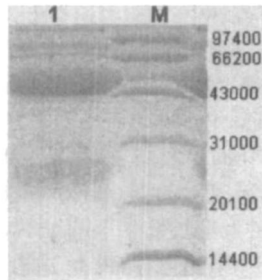


图 2 抗重组 RTB 蛋白兔多克隆抗体的正辛酸-硫酸铵纯化

M. Low molecular weight protein marker Lane 1. purified pAb

2.3 重组 RTB 蛋白多克隆抗体效价测定、特异性鉴定

间接 ELISA 检测抗 RTB 多克隆抗体的结果: $1:10^2$, $1:10^3$, $1:10^4$ 为强阳性 (+ +), $1:10^5$ 为阳性 (+), 其余稀释度均未显色; 检测重组相思豆 A 链蛋白、重组 A 型肉毒毒素重链 C 端片段蛋白、BSA 蛋白, 各稀释度均未显色。

2.4 胶体金免疫层析试纸条特异性检测

优化检测带、质控带蛋白浓度和胶体金探针浓度以及层析条的特征后, 以样品稀释液分别处理的重组相思豆毒素 A 链蛋白 (浓度为: 0.2 mg/ml)、BSA (浓度为: 1 mg/ml)、不含 RT 的 PBS 溶液进行检测, 并与同样处理的天然 RT 溶液 (浓度为: 50 ng/ml) 为对照 (图 3), 可见检测条对于检测无关毒素和蛋白无非特异现象出现。

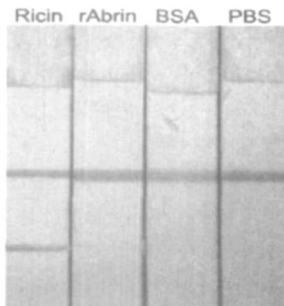


图 3 胶体金免疫层析法特异性实验结果

2.5 胶体金免疫层析试纸条敏感性评价

以天然 RT 溶液 (浓度为 $500, 100, 50, 10 \text{ ng/ml}$) 进行检测, 以不含 RT 的 PBS 溶液样品为空白对照, 检测结果见图 4。结果显示免疫层析条检测灵敏度为 50 ng/ml 。

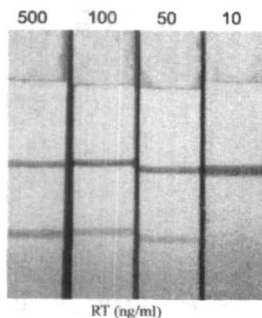


图 4 胶体金免疫层析法敏感性实验结果

2.6 胶体金免疫层析试纸条稳定性检测

将新制备的胶体金免疫层析试纸条于 37°C 存放, 并于第 1 天、第 2 天、第 3 天、第 4 天、第 5 天, 分别应用含天然 RT 溶液

及“近缘”毒素进行检测, 发现于第 5 天出现非特异性。

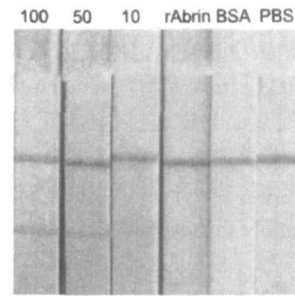


图 5 胶体金免疫层析法稳定性实验结果 (第 5 天)

2.7 胶体金免疫层析试纸条检测“环境模拟污染物”

分别将土壤、奶粉和肉汤样品以样品稀释液稀释, 并添加天然 RT, 终浓度为 50 ng/ml 结果见图 6。可见在不同的样本条件下, 本方法仍可检测至 50 ng/ml 的天然 RT。

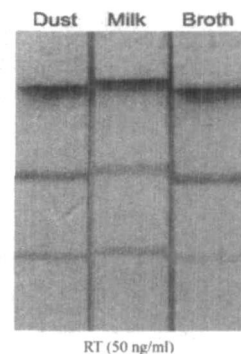


图 6 胶体金免疫层析法模拟检测“环境污染物”实验结果

3 讨论

蓖麻毒素 (RT) 的发展具有广泛的民用价值和军事意义, 作为治疗药物、抗癌导向药物和预防疫苗制剂, 它的作用机理和效力的研究仍在积极探索之中。与此同时, 由于 RT 的毒性高, 目前仍是合成化学毒素难以达到的, 近几年来成为一种重要的潜在性生物恐怖剂, 已引起国际上的关注, 发展该毒素的检测、鉴别和防护方法和手段也成为国际上研究的热点 [5~7, 9~11]。

RTB 作为 RT 的结合链, 依靠链上的半乳糖结合位点与细胞表面含末端半乳糖残基的受体结合, 促进整个毒素分子以吞噬方式进入细胞, 从而导致细胞死亡。我们利用 RTB 蛋白为免疫原免疫新西兰大白兔, 制备其兔多克隆抗体, 将所制备的抗血清应用正辛酸-硫酸铵分步沉淀法纯化, 经 TotalLab 2.0 图像软件分析, 其纯度约达 90%。考马斯亮蓝法定量抗 RTB 多克隆抗体浓度约为 4 mg/ml 应用间接 ELISA 检测该多克隆抗体的效价, 为 $1:10^5$ 。

本实验结合抗 RTA 单抗和抗 RTB 多抗, 建立双抗体夹心的胶体金免疫层析试纸条检测天然 RT。该方法适用于现场快速检测, 尤其是对生物恐怖袭击的含 RT 的环境污染物检测, 具有简便、快速、特异、敏感、稳定等特点。该法通常能在 5~10 min 完成检测, 样品处理方法简便、操作灵活、运输方便、不需要其它辅助仪器, 结果可直观判断, 成为提供个体现场检测单一 RT 的最佳检测法, 因此应用前景广阔。

(下转第 2571 页)

3 讨论

3.1 气相色谱条件

在多组分农药残留测定中,样品里组分复杂,其气相色谱条件十分重要,采用程序升温方式和不分流进样方式,5种有机磷类农药分离时间短,分离质量高,达到预期的分离效果,因此适合多组分分析。

3.2 回收率

青椒中有机磷农药加标回收率大都在 80% 左右,从分离图谱上来看,样品中的杂峰基本上对加标的待测组分没干扰,分离效果好,对于低含量的青椒样品来说,基本可以接受,但还需进一步提高。

3.3 样品的萃取与净化

液-液萃取是有机磷农药最常用的萃取技术之一,但所用的溶剂多为有机溶剂,对操作者和环境都会造成不良的影响。本法使用的固相萃取法是在前者的基础上改进而成的一种颇受欢迎的预富集及纯化样品的前处理技术,操作简便、所需样品体积小、易实现自动化、样品不易被污染,成为色谱分析中最常用的既快速又灵活的一种样品前处理技术。随着科学的发展,有更多的萃取净化农药样品的新技术得到应用,如超临界萃取技术、微波辅助萃取技术、单滴微萃取技术、压力液体萃取和亚临界水萃取等^[11 12],使色谱分离达到理想的效果。

4 结论

本文应用气相色谱程序升温和不分流进样方式,测定蔬菜中多组分有机磷类农药残留量,样品经液液萃取,硅胶柱净化,浓缩后由气相色谱法测定,结果,5种有机磷类农药测定的精密度相对标准偏差 $RSD (\% n = 6)$ 为 0.78 ~ 8.6,检测限为 2

~ 4 $\mu\text{g/kg}$ 回收率 74% ~ 88%。方法快速简便,多组分分离效果好,适用蔬菜类食品中多种有机磷农药测定。

[参考文献]

- [1] 王富华,杨素心. 速测技术在蔬菜农药残留检测技术中的应用[J]. 湖北农学院学报, 2003, 23(2): 81- 83.
- [2] GB/T5009.145- 2003. 植物性食品中有机磷和氨基甲酸酯类农药多种残留的测定[S].
- [3] GB5009.19- 1996. 食品中六六六、滴滴涕残留量的测定方法[S].
- [4] 赵建庄,康国瑞. 快速测定蔬菜中农药残留的方法研究[J]. 农业环境保护, 2002, 21(1): 70- 71.
- [5] 刘慧,闫树刚,朱力. 食品中农药残留快速检测方法的研究[J]. 中国农学通报, 2003, 19(4): 138- 141.
- [6] 朱任群,郭玲. 固相萃取毛细管气相色谱法分析果蔬中有机磷农药残留[J]. 海峡预防医学杂志, 2007, 13(5): 53- 54.
- [7] 金雁,姚家彪,付海滨,等. 气相色谱法快速测定蔬菜、水果中多种有机磷农药残留[J]. 中国卫生检验杂志, 2007, 17(7): 1153- 1154.
- [8] 汤富彬,陈宗懋,罗逢健,等. 固相萃取- 气相色谱法检测茶叶中的有机磷农药残留量[J]. 分析实验室, 2007, 26(2): 43- 47.
- [9] 林文华,罗惠明,蔡颖. 气相色谱法测定蔬菜、水果中多种有机磷农药残留量[J]. 中国卫生检验杂志, 2008, 18(1): 73- 74.
- [10] 孙鹏,袁静,张荣洲. 蔬菜中 8 种有机磷农药残留的气相色谱法测定[J]. 中国公共卫生, 2006, 22(4): 42- 44.
- [11] 王建华,王国源. 超临界流体萃取- 气相色谱法测定水果和蔬菜中有机磷农药残留量[J]. 分析实验室, 1999, 18(6): 55- 58.
- [12] 冯秀琼,汤庆勇. 中草药中 14 种有机磷农药残留量同时测定- 微波辅助提取法[J]. 农药学报, 2001, 3(3): 45- 52.

(收稿日期: 2008- 08- 14)

(上接第 2482 页)

[参考文献]

- [1] Ski JL, Craft DL. Evaluation of an in vitro bioassay for the detection of purified ricin and castor bean in beverages and liquid food matrices[J]. J Food Prot, 2007, 70(10): 2377- 2382.
- [2] Olsens S, Kozlov JV. Ricin[J]. Toxicon, 2001, 39(11): 1723- 1728.
- [3] 王景林. 蓖麻毒素生物恐怖及其医学防护[J]. 科技导报, 2003, 21(7): 35- 37.
- [4] Patocka J. Abrin and ricin: two dangerous poisonous proteins. <http://www.asabktr.cin/newsletter/01- 4/article/Abrin&RicinRev.pdf>
- [5] Dill K, Montgomery DD, Ghindilis AL, et al. Immunoassays based on electrochemical detection using microelectrode arrays[J]. Biosens Bioelectron, 2004, 20(4): 736- 42.
- [6] Dayan Kenigsberg J, Bertocchia A, Garber EA. Rapid detection of ricin in cosmetics and elimination of artifacts associated with wheat lectin[J]. J Immunol Methods, 2008, 336(2): 251- 254.
- [7] Garber EA, O'Brien TW. Detection of ricin in food using electrochemiluminescence-based technology[J]. J AOAC Int, 2008, 91(2): 376- 382.

- [8] Shyu RH, Shyu HF, Lin FW, et al. Colloidal gold- based immunochromatographic assay for detection of ricin[J]. Toxicon, 2002, 40(3): 255- 258.
- [9] Roday S, Sturm MR, Bakajd, et al. Detection of an basic site in RNA with stem- loop DNA beacons: application to an activity assay for Ricin Toxin A- Chain[J]. J Biochem Biophys Methods, 2008, 70(6): 945- 953.
- [10] Shyu HF, Chiao DJ, Liu HW, et al. Monoclonal antibody- based enzyme immunoassay for detection of ricin[J]. Hybrid Hybridomics, 2002, 21(1): 69- 73.
- [11] Feltis BN, Sexton BA, Glenn FL, et al. A hand- held surface plasmon resonance biosensor for the detection of ricin and other biological agents[J]. Biosens Bioelectron, 2008, 23(7): 1131- 1136.
- [12] 宋云扬,刘娟,应天翼,等. 夹心免疫 PCR 法检测蓖麻毒素[J]. 免疫学杂志, 2002, 18(3): 229- 231.
- [13] Zhu L, Chen X. Experimental methods of immunology[J]. Public of Army Press, 2000, 99- 110.
- [14] 严杰,罗海波,陆德源. 现代微生物学实验技术及其应用[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1997, 222- 223.

(收稿日期: 2008- 06- 20)