

蓖麻毒素和相思子毒素蛋白质芯片检测方法的建立

路浩¹ 王兴龙² 李晓艳² 郎需龙² 唐婕² 张付贤¹ 王英超¹ 党源¹

【摘要】目的 建立蓖麻毒素和相思子毒素蛋白质芯片检测方法。方法 制备并纯化蓖麻毒素和相思子毒素单克隆抗体。采用竞争免疫法检测抗原,建立检测蓖麻毒素和相思子毒素的蛋白质芯片检测方法。应用蛋白质芯片检测两种毒素的模拟样品。结果 应用蛋白质芯片检测蓖麻毒素、相思子毒素和两种毒素混合的模拟样品时,在其相应区域均没有荧光信号,结果为阳性,与实验设计相符。结论 已成功建立了蓖麻毒素和相思子毒素蛋白质芯片检测方法,该方法具有广阔的应用前景。

【关键词】 蓖麻毒素 相思子毒素 蛋白质芯片

Development of Protein Chip Technique for Detection of Abrin and Recin

LU Hao[△], WANG Xing-long, LI Xiao-yan, et al ([△]The Military Veterinary Institute, Military Academy of Medical Science, Changchun 130062, China)

【Abstract】 Objective To develop a protein chip technique for detection of abrin and recin. Methods The McAbs against abrin and recin were prepared and purified, based on which a protein chip for detection of antigens by competitive immunoassay was prepared and used for detection of mock samples of abrin and recin. Results No fluorescent signals were observed in corresponding regions of mock samples of abrin, recin and their mixture by using the prepared protein chip, indicating positive results consistent with those designed. Conclusion The protein chip technique for detection of abrin and recin was successfully developed, which was of a broad prospect in application.

【Key words】 Abrin; Recin; Protein chip

相思子毒素和蓖麻毒素是常见的两种植物毒素,具有很强的毒性。蓖麻毒素的毒性是氰化物的 6 000 倍,而相思子毒素的毒性比蓖麻毒素还高 70 多倍^[1]。相思子和蓖麻植物资源丰富,分布广泛,提取简单,容易成为恐怖袭击的工具^[2],而误食这两种植物的种子造成中毒的事件也时有发生。准确、快速检测和鉴定蓖麻毒素及相思子毒素是应对生物恐怖和预防中毒的有效方法^[3]。随着蛋白质芯片技术的发展,生物毒素快速检测有了更先进的方法。本实验以抗原抗体反应为原理,建立了相思子毒素和蓖麻毒素的蛋白质芯片检测技术,为其进一步应用奠定了基础。

1. 材料与方法

1.1 细胞株

相思子毒素单克隆抗体杂交瘤细胞株由吉林大学畜牧兽医学院李小兵博士惠赠;蓖麻毒素单克隆抗体杂交瘤细胞株由军事医学科学院军事兽医研究所刘文森博士惠赠。

1.2 试剂及仪器

相思子毒素抗原由吉林大学畜牧兽医学院李小

兵博士惠赠;蓖麻毒素抗原由军事医学科学院军事兽医研究所刘文森博士惠赠;单增李斯特菌 ActA 蛋白及单增李斯特菌单克隆抗体由军事兽医研究所五室保存;HRP 标记的羊抗鼠 IgG 购自北京鼎国生物技术有限责任公司;Cy3 标记的羊抗鼠 IgG 购自 Amersham 公司;RPMI1640 培养基和二甲基亚砷均购自 GIBCOBRL 公司;HEPES 和 TMB 均购自 Promega 公司;Tween-20 和 BSA 均购自 Sigma 公司;高分子三维基片购自北京博奥生物芯片有限责任公司;Hi-Trap Protein A HP 亲和层析柱购自 GE Healthcare 公司;MicroGrid TAS 芯片点样仪购自 BioRobotics Corporation 公司;Personal4100A 型芯片扫描仪购自 GenePix 公司。

1.3 实验动物

SPF 级 BALB/c 小鼠,7~8 周龄,购自长春生物制品研究所实验动物室。

1.4 腹水的制备及单抗的纯化

将杂交瘤细胞注射至 BALB/c 小鼠腹腔,经 10 d 左右采集腹水,4 000 r/min 离心 5 min,用辛酸-硫酸铵法进行初步纯化^[4]。初步纯化的抗体经 HiTrap-Protein A HP 亲和层析柱纯化后,进行 SDS-PAGE 分析,采用 Bradford 法测定单抗浓度。

1.5 单抗亲和力的测定

按文献[5]方法测定单抗的亲和力。以 2 μg/ml

作者单位:1 吉林大学畜牧兽医学院(长春 130062) 2 军事医学科学院军事兽医研究所(长春 130062)。

通讯作者:王兴龙 E-mail wangxl-2006@163.com

(Ag)和 1 μg/ml (Ag')的抗原分别包被酶标板 ,等比稀释一抗 ,加入酶标板中 ,37℃ 温育 1 h ,洗涤后与 HRP 标记的羊抗鼠 IgG 37℃ 温育 1 h ,酶标仪测定 A₄₉₂ 值。用抗体浓度对数与 A₄₉₂ 值作曲线 ,分别求出 50%抗原饱和时的抗体浓度[Ab]₁、[Ab']₁ ,按下式计算抗体的亲和常数。

抗体亲和常数(K_{ad}) = 1 / 2([Ab']₁ - [Ab]₁)

1. 6 蛋白质芯片的制备

将相思子毒素和蓖麻毒素抗原分别溶于 80% 的丙三醇中 ,终浓度为 0. 1 mg/ml ,作为检测抗原 ;将 Cy3 标记的羊抗鼠 IgG 溶于丙三醇中 ,终浓度为 10 μg/ml ,作为坐标点 ,将 PBS 溶于丙三醇中 ,作为空白对照 ;单增李斯特菌 ActA 蛋白作为阴性对照。点样温度为 20 ℃ ,湿度为 70%。使用 MicroGrid TAS 芯片点样仪 ,采用夹缝针在 高分子三维基片表面进行点样。点样矩阵图见图 1。制备好的蛋白芯片保存于 4 ℃ 备用。

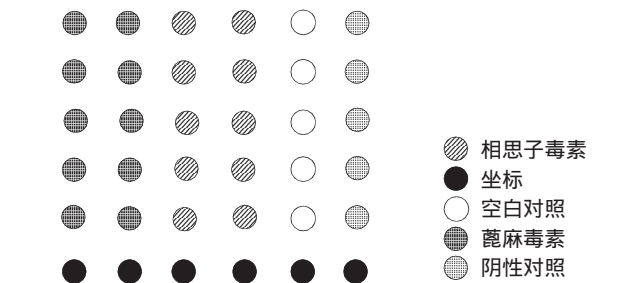


图 1 点样模式图
Fig 1. Array layout

1. 7 蛋白质芯片反应检测

采用竞争免疫法检测抗原。取 4℃保存的蛋白芯片 ,加入 3% BSA ,37℃封闭 1 h ,PBST(0. 01%PBS , 20%Tween-20 ,pH 7. 4)洗涤。将相思子毒素单抗、蓖麻毒素单抗和单增李斯特菌单抗稀释至相同浓度后混合 ,使每种单抗的终浓度均为 5 μg/ml ,作为捕捉抗体。分别将相思子毒素蛋白、蓖麻毒素蛋白和同时含有这两种蛋白的溶液作为模拟样品。将捕捉抗体与模拟样品以 1 : 10 的比例(v/v)混合 ,37℃反应 1 h。将反应产物分别加至蛋白质芯片上 ,每围栏矩阵加 25 μl ,37℃ 作用 1 h。PBST 洗涤后 ,加入



A 相思子毒素 B 蓖麻毒素 C 两种毒素的混合样品
图 3 蛋白质芯片反应结果图

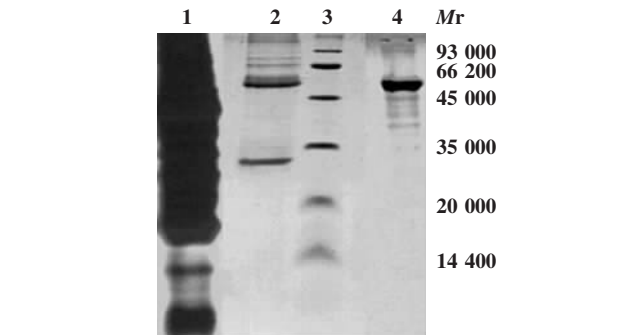
Fig 3. Determination of mock samples of abrin and ricin by protein chip technique

0. 3 μg/ml 的 Cy3 荧光标记的羊抗鼠 IgG ,每围栏矩阵加 25 μl ,37℃作用 1 h。反应后的芯片用 37℃ 预热的 PBST 洗涤 ,Personal 4100A 型芯片扫描仪扫描图像。如待检物质中含有目标抗原 ,芯片扫描无荧光信号 ,而阴性点有荧光信号。

2. 结果

2. 1 单抗的纯化

纯化的相思子毒素和蓖麻毒素单抗经 SDS-PAGE 分析 ,均可见轻链和重链。相思子毒素单抗的相对分子质量约为 81 000 ,蛋白含量为 2. 14 mg/ml ,抗体含量为 1. 16 mg/ml ;蓖麻毒素单抗的相对分子质量约为 73 000 ,蛋白含量为 1. 45 mg/ml ,抗体含量为 0. 96 mg/ml。见图 2。



1 :未纯化的腹水 ;2 :纯化的蓖麻毒素单抗 ;3 :蛋白质 marker ;4 :纯化的相思子毒素单抗
图 2 纯化单抗的 SDS-PAGE 分析
Fig 2. SDS-PAGE profile of purified McAbs

2. 2 单抗的亲和力

经计算 ,相思子毒素和蓖麻毒素单抗的亲和常数分别为 2. 9 × 10⁸ /mol 和 3. 2 × 10⁹ /mol。

2. 3 蛋白质芯片反应结果

在模拟样品芯片图像中 ,坐标点信号值正常 ,说明点样过程正常。阴性点单增李斯特菌信号明显 ,空白对照点没有信号。在检测相思子毒素、蓖麻毒素和两种毒素混合的模拟样品时 ,在其相应区域均没有荧光信号 ,结果为阳性 ,与实验设计相符 ,见图 3。表明本实验制备的蛋白质芯片达到了检测这两种毒素的设计要求。图中两个矩阵作为平行试验 ,得到了一致信号值 ,确保了芯片的整体稳定性。

3. 讨论

胶体金试纸条是常用的检测毒素的方法之一,效果较好,但检测样品种类单一,不能高通量对大量样品进行快速检测。蛋白质芯片技术为毒素的高通量检测提供了先进的方法。本实验采用竞争免疫的方法检测抗原^[6]。反应原理为:在芯片基质上点样一定浓度的抗原,制备抗原蛋白检测芯片,使用单克隆抗体捕捉待检样品中的抗原。抗体与待检物质反应后,将反应产物与芯片反应,洗涤除去与待检物质中相应抗原结合的单克隆抗体。如果样品中没有抗原,单克隆抗体就会与芯片上的抗原结合。再使用荧光标记的二抗与芯片反应,扫描图像。待测样品中目标抗原的量与荧光强度成反比,即如果待测物质中有目标抗原,芯片扫描则没有荧光信号,而阴性反应有荧光信号。

蛋白质芯片检测系统中,保持芯片上各种抗原物质的活性十分重要,采用适当的基片可以长时间保持点样抗原的活性。抗体混合物与被检物质的反应时间需要逐步优化^[7-9]。如反应时间过短,抗体与被检抗原就不能充分结合,在芯片结合后就会造成检测信号值有误差;如反应时间过长,单抗在 37℃ 的温度下效价和亲和力就会下降,其中未结合的抗体与芯片结合时效率会下降,可能出现假阳性。本实验合理设计了多个对照点,监测各步反应,标记 Cy3 的羊抗鼠 IgG 作为阳性坐标探针,还可以监测蛋白芯片制备过程中蛋白的结合情况;PBS 作为空白对照点,可以监测点样过程是否有样品相互污染;单增李斯特菌 ActA 作为阴性对照,不仅可以监测反应过程中是否有交叉污染,由于其反应过程中只加了二抗,还可以作为芯片与二抗反应的对照。

相思子毒素和蓖麻毒素是结构上十分相近的两种毒素,相思子毒素的 A 链与蓖麻毒素的 A 链存在 102 个相同的氨基酸残基,在很多检测方法中,这两

种毒素常被用来相互作用特异性鉴定^[1,10]。本实验将两种毒素点样在同一芯片上,单抗混合后同时对样品进行检测。通过实验结果目标点的特异性证明,本毒素检测蛋白芯片具有良好的特异性。

实验中发现,蛋白芯片检测还存在一些问题,如样品的富集不能像多聚酶链反应一样可以扩增样品。尽管如此,蛋白芯片仍是一种检测毒素的先进技术,具有广阔的应用前景。

参考文献

- [1] Bradberry S. Ricin and abrin. *Medicine*, 2007, 35 (10): 576-577.
- [2] Olsnes S. The history of ricin, abrin and related toxins. *Toxin*, 2004, 44 (4): 361-370.
- [3] Ler SG, Lee FK, Gopalakrishnakone P. Trends in detection of warfare agents—detection methods for ricin, staphylococcal enterotoxin B and T-2toxin. *J Chromatogr A*, 2006, 1133(1-2): 1-12.
- [4] 董志伟,王琰. 抗体工程. 2 版. 北京:北京医科大学出版社, 2002: 280-281.
- [5] Guglielmo-Viret V, Thullier P. Comparison of an electrochemiluminescence assay in plate format over a colorimetric ELISA, for the detection of ricin B chain (RCA-B). *J Immunol Mtd*, 2007, 328 (1-2): 70-78.
- [6] Du HW, Wu MT, Yang WP, et al. Development of miniaturized competitive immunoassays on a protein chip as a screening tool for drugs. *Clin Chem*, 2005, 51 (2): 368-375.
- [7] Rucker VC, Havenstrite KL, Herr AE, et al. Antibody microarrays for native toxin detection. *Anal Biochem*, 2005, 339 (2): 262-270.
- [8] Du HW, Lu Y, Yang W, et al. Preparation of steroid antibodies and parallel detection of multianabolic steroid abuse with conjugated hapten microarray. *Anal Chem*, 2004, 76 (20): 6166-6171.
- [9] Kim SW, Kim MG, Jung HA, et al. An application of protein microarray in the screening of monoclonal antibodies against the oyster mushroom spherical virus. *Anal Biochem*, 2008, 374 (2): 313-317.
- [10] 李小兵,谢光洪,周昌芳,等. 相思子毒素-α 的纯化及鉴定. *中国兽医学报*, 2008, 28 (3): 310-313.

(收稿日期 2008-12-23)

【消息】

征 稿

《中国生物制品学杂志》为报道我国生物制品研究开发重大成果和国内外最新进展的国内唯一的生物制品专业学术期刊。由国家卫生部主管,中华预防医学会和中国生物技术集团公司长春生物制品研究所主办,是中华预防医学会系列杂志之一,月刊。

本刊主要刊载生物制品和生物技术产品相关领域,如预防医学、免疫学、微生物学、生物化学、流行病学、临床医学等方面的研究、生产、使用和质控等学术文章。在选择来稿时注

重学术性、前沿性和实用性。优先报道基金项目及各种基金赞助课题的文章,并适当照顾边远地区和基层单位。

本刊设有基础研究、预防制品、治疗制品、诊断制品、实验技术、临床观察、研究简报、综述、述评、会议快讯、消息动态等栏目。

征稿细则见本刊稿约或 <http://www.zgswj.com.cn>。

《中国生物制品学杂志》编辑部