

研究简报

己烯雌酚特异性抗体的制备及鉴定*

邓省亮^{1,2} 李平¹ 刘洪斌¹ 程玛丽³ 于洪侠¹ 陈刚¹ 杨曙明^{1**}

(1 中国农业科学院农业质量标准与检测技术研究所 北京 100081)

(2 江西省科学院微生物研究所 南昌 330029 3 北京农学院动物科学技术学院 北京 102206)

摘要 利用4-溴丁酸乙酯对小分子半抗原己烯雌酚(DES)进行活化,引入羧基活性基团,应用活泼酯法将其与牛血清白蛋白(BSA)偶联,合成DES-CP-BSA完全抗原,免疫新西兰长耳白兔,制备特异性抗体。结果显示:成功制备了DES完全抗原,且由此获得了特异性的DES抗体,效价达 1.28×10^5 ,与己烷雌酚、双烯雌酚的交叉反应分别为9.3%和1.1%,与雌二醇无交叉反应。在此基础上建立了间接竞争ELISA检测方法, IC_{50} 为7.0 ng/ml,检测限达0.3 ng/ml,可以满足动物性食品中DES残留检测的需要。

关键词 己烯雌酚 特异性抗体 ELISA

中图分类号 Q819

己烯雌酚(Diethylstilbestrol, DES)是一种人工合成的非甾体雌激素,由于其具有促进蛋白沉积、提高动物日增重和减少脂肪合成等作用,曾经一度作为促生长剂广泛应用于畜牧养殖业。随着其致畸致癌等毒副作用^[1,3]广泛被人们所认识,欧盟从20世纪70年代末开始关注和重视己烯雌酚的残留及危害问题,并先后颁布禁令,禁止其应用于畜牧生产。我国农业部发布《2003年度动物性产品中兽药残留监控计划》(农牧发[2003]6号),要求DES在动物性食品中不得检出。然而,由于经济利益的驱使,违法添加DES的现象依然存在,在肉类^[4]、奶粉^[5]和污水^[6]中均检测到DES。因此,建立一套快速的己烯雌酚残留检测方法以确保动物性食品的安全是十分必要的。

目前DES残留检测的方法主要有气相色谱-质谱联用法(GC/MS)^[7]、液相色谱-质谱联用法(LC/MS)^[8]等,此种方法可精确定量,但由于样品前处理繁琐,并不适于大量样品的同时筛查及快速检测,且仪器

设备昂贵,使其在基层科研机构或检测部门的应用受到了制约。酶联免疫吸附法(ELISA)以其简单、快速、灵敏等优点,可以很好弥补这一缺陷,它已成为普遍应用于兽药残留的筛查方法。本研究对己烯雌酚人工抗原合成及特异性抗体的制备进行了研究,并在此基础上建立了间接竞争ELISA检测方法,获得了高灵敏度的DES特异性抗体,为进一步开发DES快速检测试剂盒奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

己烯雌酚及结构类似物(Dr. Ehrenstorfer GmbH公司),4-溴丁酸乙酯(Acros公司),牛血清白蛋白(BSA)、卵清蛋白(OVA)(Sigma公司),羧琥珀酰亚胺(NHS)(Lancaster Synthesis公司),1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDC)(上海共价化学科技有限公司),葡聚糖凝胶G-25(Pharmacia公司),BCA Protein Assay Kit(Pierce公司),羊抗兔IgG-HRP(北京博奥森生物有限公司),96孔聚苯乙烯酶标板(Corning公司),薄层层析硅胶板GF₂₅₄型(青岛海洋化工有限公司)。紫外扫描仪(Perkin Elmer公司),酶标

收稿日期:2010-11-30 修回日期:2011-04-01

* 国家“863”计划(2007AA10Z438)、科技部科技支撑专项(2009BADB7B07)资助项目

** 通讯作者,电子邮箱:yangshumingcaas@sina.com

仪(Tecan Austria GmbH 公司),Autoflex MALDI-TOF Mass Spectrometer(Bruker Daltonics 公司),氮吹仪(杭州奥胜仪器有限公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 己烯雌酚-单羧基丙基醚(DES-CP)的合成^[9]

称取 27 mg DES 溶于 1 ml 二甲基亚砜(DMSO),加入适量无水碳酸钾和 4-溴丁酸乙酯,在 60~70 °C 下搅拌反应,通过 TLC 板监控反应程度。待反应完全后将反应产物加入预冷水中,用乙酸乙酯萃取,经蒸馏水洗涤、无水 Na₂SO₄ 干燥后在氮吹仪上吹干。然后将反应产物用甲醇溶解,然后加入 3 mol/L NaOH 溶液进行水解,待水解完全后滴加 6 mol/L HCl 溶液,pH 调至 3 左右,再用乙酸乙酯萃取,重复上述洗涤、干燥、氮吹步骤即得到目的产物。

1.2.2 DES-CP-BSA 免疫原的制备^[10] 称取 21 mg DES-CP 溶于 1 ml DMSO,加入 7 mg NHS,12 mg EDC,反应 3 h,将上述溶液缓慢加入 BSA 溶液中(34 mg BSA 溶于 2 ml 0.05 mol/L PB),反应 12 h,产物经 Sephadex G-25 凝胶层析柱纯化,以紫外检测仪监测 278 nm 处信号变化,首先出现的为大分子蛋白峰,收集,-20 °C 冻存。

1.2.3 DES-HS-OVA 包被原的制备^[11] 称取 27 mg DES 溶于 1 ml 吡啶中,加入 10 mg 琥珀酸酐,在 45 °C 下搅拌反应 8 h,氮气吹干后,加入预冷酸水中,有大量沉淀析出。用乙酸乙酯对反应产物进行萃取,经无水 Na₂SO₄ 干燥后,在氮吹仪上进行吹干。用 DMSO 溶解产物,加入 7 mg NHS,12 mg EDC,反应 3 h。将上述溶液加入 OVA 溶液中(34 mg OVA 溶于 2 ml 0.05 mol/L PB),反应 12 h,反应产物 Sephadex G-25 凝胶层析柱纯化,以紫外检测仪监测 278 nm 处信号变化,首先出现的为大分子蛋白峰,收集,-20 °C 冻存。

1.2.4 完全抗原的鉴定与测定 分别使用紫外可见分光光度计、基质辅助激光解吸附电离飞行时间质谱(MALDI-TOF-MS)和 Protein Assay Kit 对 DES-CP-BSA 和 DES-HS-OVA 完全抗原进行鉴定、偶联比及浓度测定。

1.2.5 动物免疫 选体重为 2.5 kg 左右健康雄性新西兰白兔,用无菌生理盐水将免疫原稀释至 2 mg/ml,与等体积弗氏完全佐剂充分混匀乳化后,于家兔背部脊椎两侧进行多点皮下注射,0.5 mg/只。每隔 2 周加强免疫一次,此时免疫原改用弗氏不完全佐剂进行乳化。二免后开始监测血清,于加强免疫后 7 天耳缘静

脉采血,用间接 ELISA 检测抗血清。待血清效价稳定后,心脏采血,4 °C 静止 12 h,离心后取上清,加入等量的甘油,-20 °C 冻存。

1.2.6 ELISA 操作程序 用碳酸盐缓冲液(pH 9.6, 0.05 mol/L)将包被原稀释至 0.5 μg/ml,每孔 100 μl 加到酶标板孔内,置 4 °C 过夜;次日取出,用 PBST(pH 7.4,0.5% tween 20)洗涤 3 次,于吸水纸上拍干,加 250 μl 含 3% 脱脂奶粉的封闭液,37 °C 孵育 1 h,洗涤同前;用 PBS 稀释抗血清,间接 ELISA 每孔加 100 μl 稀释的抗血清,进行间接竞争 ELISA 时,每孔加入 50 μl DES 标准液和 50 μl 稀释抗血清,37 °C 孵育 1 h,同时做阴性对照及空白对照;洗涤同前;将辣根酶标记的羊抗兔 IgG 按照说明书作 1:4000 稀释后,按每孔 100 μl 加入到板孔内,37 °C 孵育 45 min;洗涤同前;按每孔 100 μl 加入新鲜配制的 TMB 底物液后,室温孵育 10 min;按每孔 50 μl 加入终止液(2 mol/L H₂SO₄),以空白对照调零使用酶标仪测 OD₄₅₀ 值。

1.2.7 抗血清的免疫学评价 根据预试验结果,用间接 ELISA 方法测定抗血清的效价。效价定义为:阳性 OD₄₅₀ 值记为 P,阴性对照 OD₄₅₀ 值记为 N,当 P/N ≥ 2.1 判为阳性,P/N < 1.5 判为阴性,阳性血清的最大稀释比例为抗血清的效价。用 1 mg/ml 的 DES 标准液以甲醇:PBS(1:4, v/v)倍比稀释成一系列标准浓度进行间接竞争 ELISA,测定抗血清的抑制率。为了评价抗血清的特异性,将 DES 结构类似物己烷雌酚、双烯雌酚、17-β 雌二醇作为竞争物,按 DES 标准品相同的配制方法稀释成所需的一系列标准浓度,进行间接竞争 ELISA,通过制作各自标准曲线,得出线性方程计算各自 IC₅₀ 值(50% 抑制浓度),根据如下公式计算出交叉反应率。交叉反应率 = [IC₅₀(DES)/IC₅₀(结构类似物)] × 100%。

2 结果

2.1 完全抗原偶联情况的鉴定

2.1.1 紫外扫描图谱鉴定 由图 1 可见,DES 在 240 nm、BSA 在 278 nm 处有最大吸收峰,DES-CP-BSA 的紫外图谱兼具 DES 及 BSA 的特征吸收峰,且由于偶联物中 DES 和 BSA 的波形叠加效应,从而使得在 DES-CP-BSA 浓度(0.5 mg/ml)低于 BSA 浓度(1 mg/ml)的条件下,DES-CP-BSA 的波形较 BSA 波形在 240~280 nm 处明显上移,从而初步判定 DES 与 BSA 偶联成功。

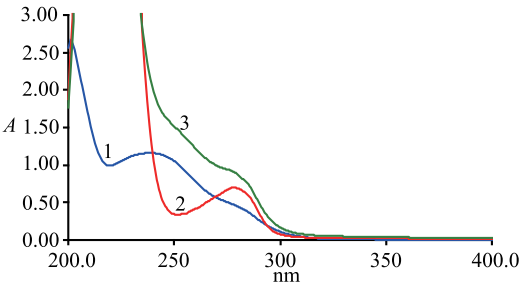


图1 DES、BSA 和 DES-CP-BSA 的紫外扫描图谱

Fig. 1 The UV-Vis spectra of DES,BSA and DES-CP-BSA

1: DES (20 µg/ml); 2: BSA (1 mg/ml); 3: DES-CP-BSA (0.5 mg/ml)

2. 1. 2 飞行时间质谱 (MALDI-TOF-MS)扫描鉴定 将 BSA 和 DES-CP-BSA 样品进行飞行时间质谱扫描,结果见图 2 和图 3。

图 2 所示为 BSA,最大吸收峰值 66362,表明其分子量为 66362;图 3 所示为 DES-CP-BSA 的吸收峰,最大

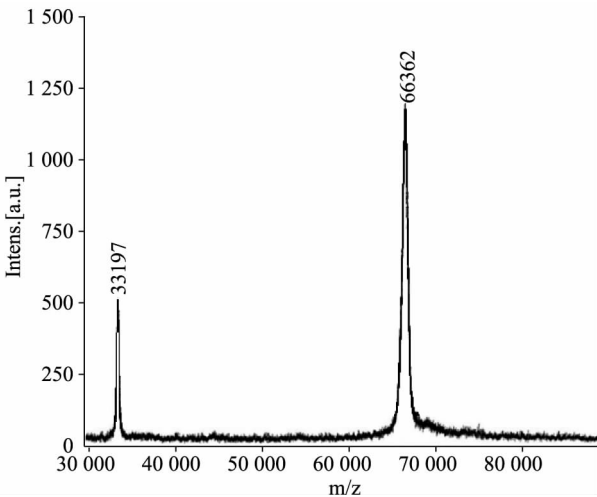


图2 BSA 飞行时间质谱扫描

Fig. 2 MALDI-TOF-MS spectrum of BSA

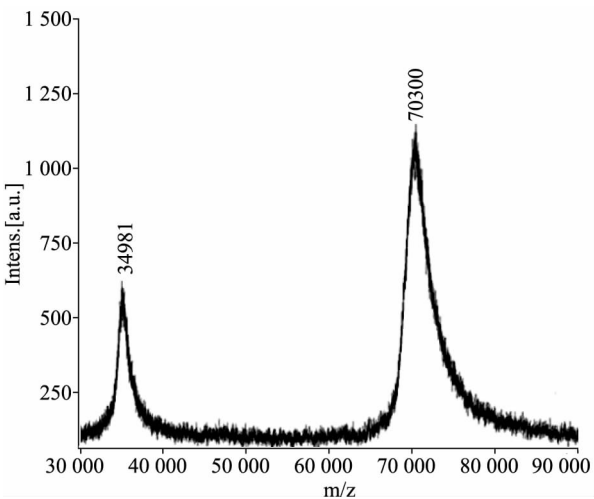


图3 DES-CP-BSA 飞行时间质谱扫描

Fig. 3 MALDI-TOF-MS spectrum of DES-CP-BSA

吸收峰值为 70300,表明其分子量为 70300。从图上可以看出,与 BSA 相比,偶联物最大吸收峰发生右移,其分子量加大,说明偶联成功,其分子结合比为:(完全抗原分子量 - 载体蛋白分子量)/半抗原分子量,经计算 DES 和 BSA 的结合比为 12:1。

2. 2 抗血清的评价

四次免疫后,用 DES-HS-OVA 包被酶标板进行间接 ELISA 和间接竞争 ELISA 检测,结果表明血清中产生了针对 DES 的特异性抗体,3 只兔血清抗体效价均达到 1:3.2 × 10⁴ 以上,其中 No. 2 兔血清效价更是达到 2.56 × 10⁵(表 1)。根据以 OD 值在 1.0 左右的稀释度作为抗体工作浓度的原则,将 1 mg/ml DES 标准液倍比稀释绘制抗血清的间接竞争 ELISA 标准曲线,见图 4,其中 No. 1 兔血清灵敏度最高,其线性方程为 y = -13.354 Ln (x) + 75.982, R² = 0.9992, IC₅₀ 为 7.0 ng/ml,1 ~ 30 ng/ml 呈线性关系,检测限达 0.3 ng/ml。再以相同方法对抗血清的交叉反应性进行测定,结果见表 2。

表 1 DES 抗血清的效价

Table 1 The titers of antisera against DES

| OD ₄₅₀ | 抗血清稀释度 (× 10 ³) | | | | | | | | 阴性对照 | 空白对照 |
|-------------------|-----------------------------|-------|-------|-------|-------|--------|-------|-------|-------|-------|
| | 1:2 | 1:4 | 1:8 | 1:16 | 1:32 | 1:64 | 1:128 | 1:256 | | |
| No. 1 | 3.327 | 2.354 | 1.387 | 0.637 | 0.456 | 0.261 | 0.222 | 0.162 | | |
| No. 2 | 3.575 | 3.304 | 2.874 | 1.641 | 0.866 | 0.608 | 0.355 | 0.257 | 0.081 | 0.077 |
| No. 3 | 1.782 | 1.055 | 0.657 | 0.344 | 0.227 | 0.153. | 0.117 | 0.087 | | |

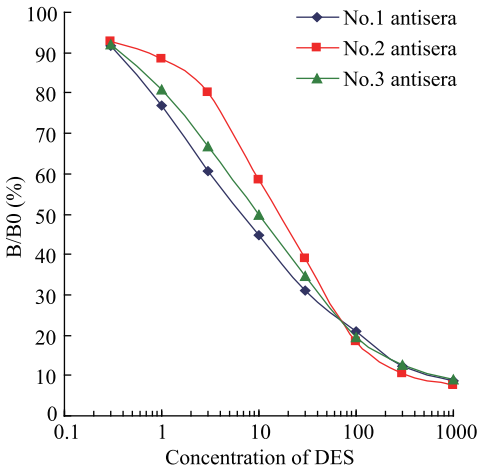


图 4 己烯雌酚间接 ELISA 法标准曲线

Fig. 4 Inhibition curve of DES determined by indirect competitive ELISA

| 表 2 DES 结构类似物与抗 DES 血清的交叉反应率 | | | |
|---|------------|-----------------------------|-------------------------|
| Table 2 Cross-reactivity of antisera to DES analogs | | | |
| Analogs | Structures | IC ₅₀ (ng/ml) | Cross-reactivity (%) |
| Diethylstilbestrol | | 7.0 | 100 |
| Hexestrol | | 74.9 | 9.3 |
| Dienestrol | | 614.2 | 1.1 |
| 17β-Estradiol | | >1000000 | <0.01 |

3 讨论

较之于色谱、质谱等精密仪器分析方法,在小分子半抗原残留检测方面,免疫分析技术以其快速、灵敏等优点,具有非常广阔的应用及发展前景。DES 的分子量为 268,低于 1000,属小分子半抗原,本身不具有免疫原性,需将其与载体蛋白偶联合成完全抗原后免疫动物才能引起免疫应答^[12],但由于其分子结构本身不含适于偶联的活性基团,因而在半抗原偶联设计上,本研究以 4-溴丁酸乙酯对 DES 进行活化,目的是在 DES 的一侧羟基端引入羧基以便与载体蛋白上的氨基相结合。另外,在活化 DES 的同时也增加了一个 4 个碳链

的间隔臂,它可减小整个半抗原的空间位阻效应,且使半抗原的分子结构远离载体而更加暴露,使半抗原-载体蛋白免疫动物时易被机体识别而产生免疫效应。通常认为半抗原与载体蛋白之间含 3~6 个原子的间隔臂比较容易产生针对目标抗原的特异性抗体^[13],本文采用含 4 个碳链的 4-溴丁酸乙酯活化 DES,实验结果证明获得了针对 DES 的特异性抗体。

小分子与载体蛋白的偶联比通常采用紫外扫描来计算各自的摩尔消光系数估算出偶联比^[14],其结果与实际值存在一定的偏差。而 MALDI-TOF-MS 是近年来应用在生命科学领域中的重要分析工具之一,其灵敏度高,可以直接对大分子蛋白进行分子量的测定,本研究采用 MALDI-TOF-MS 对完全抗原及载体的分子量进行测定,计算得出 DES 与 BSA 的偶联比为 12:1。免疫结果显示兔子经 4 次免疫后均产生了较高效价的血清,说明本实验所合成的人工抗原具有很好的免疫原性。在实际的调查过程中发现畜产品和河流污水中 DES 的残留量总体较低^[4-6],这对于使用免疫学方法检测 DES 提出了更高的要求,所以在获得较高抗体效价的情况下,高灵敏度的抗体是追求的目标。因此,本文后续的研究是选用灵敏度最高的 No.1 兔抗血清进行,以该抗血清建立了间接竞争 ELISA 检测方法,检测限达 0.3 ng/ml,与结构类似物己烷雌酚、双烯雌酚的交叉反应分别为 9.3% 和 1.1%,与雌二醇无交叉反应,进一步证明了抗体的特异性强。由于本研究未对影响 ELISA 反应的影响因素(如 pH 值、盐离子强度、表面活性剂浓度、有机溶剂效应、反应时间等)进行全面优化,所以本方法的灵敏度还有提高的空间。从而,该抗体的成功制备将为研究动物组织中 DES 残留及开发 DES 快速检测试剂盒奠定了基础。

参考文献

[1] Palmer J R, Wise L A, Hatch E E, et al. Prenatal diethylstilbestrol exposure and risk of breast cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2006, 15 (8): 1509-1514.

[2] Strohsnitter W C, Noller K L, Hoover R N., et al. Cancer risk in men exposed in utero to diethylstilbestrol. *J Natl Cancer Inst*, 2001, 93 (7): 545-551.

[3] Newbold R R, Padilla-Banks E, Jefferson W N. Adverse effects of the model environmental estrogen diethylstilbestrol are transmitted to subsequent generations. *Endocrinology*, 2005, 147 (6): s11-s17.

[4] 袁超,李杰,耿微,等. 哈尔滨市售动物性食品中兽药残留量

- 检测. 中国公共卫生, 2009, 25 (6): 747-748.
- Yuan C, Lie J, Geng W, et al. Chinese Journal of Public Health, 2009, 25 (6): 747-748.
- [5] 周建科, 张前莉, 韩康, 等. 中老年奶粉中双酚 A 和己烯雌酚的反相高效液相色谱测定. 食品工业科技, 2007, 28 (2): 233-235.
- Zhou J K, Zhang Q L, Han K, et al. Science and Technology of Food Industry, 2007, 28 (2): 233-235.
- [6] 金士威, 徐盈, 惠阳, 等. 污水中 8 种雌激素化合物的定量测定. 中国给水排水, 2005, 21 (12): 94-97.
- Jin S W, Xu Y, Hui Y, et al. China Water and Wastewater, 2005, 21 (12): 94-97.
- [7] Dickson L C, MacNeil J D, Reid J, et al. Validation of screening method for residues of diethylstilbestrol, dienestrol, hexestrol, and zeranol in bovine urine using immunoaffinity chromatography and gas chromatography/mass spectrometry. J AOAC Int, 2003, 86 (4): 631-639.
- [8] Malone E M, Elliott C T, Kennedy D G. Rapid confirmatory method for the determination of sixteen synthetic growth promoters and bisphenol A in bovine milk using dispersive solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2010, 878 (15-16): 1077-1084.
- [9] Xu C L, Chu X G, Peng C F, et al. Comparison of enzyme-linked immunosorbent assay with liquid chromatograph-tandem mass spectrometry for the determination of diethylstilbestrol residues in chicken and liver tissues. Biomed Chromatogr, 2006, 20, 1056-1064.
- [10] Nakagomi M, Iida S, Hara Y, et al. Preparation of specific antisera to 15 α -hydroxyestrogen 15-N-acetylglucosaminides. Steroids, 1999, 64 (7): 491-496.
- [11] Jiang X X, Shi H Y, Wu N, et al. Development of an enzyme-linked immunosorbent assay for diniconazole in agricultural samples. Food Chem, 2011, 125 (4): 1385-1389.
- [12] Pauillac S, Naar J, Branaa P, et al. An improved method for the production of antibodies to lipophilic carboxylic hapten using small amount of hapten-carrier conjugate. J Immunol Methods, 1998, 220: 105-114.
- [13] Kim Y J, Cho Y A, Lee H S, et al. Synthesis of haptens for immunoassay of organophosphorus pesticides and effect of heterologous in hapten spacer arm length on immunoassay sensitivity. Anal Chim Acta, 2003, 475: 85-96.
- [14] Feng Q Q, Xu Y, Zhou Y X, et al. Preparation of dichlorvos-protein complete antigen by mannich-type reaction. J Mol Struct, 2010, 977: 100-105.

Preparation and Identification of the Specific Antibody against Diethylstilbestrol

DENG Sheng-liang^{1,2} LI Ping¹ LIU Hong-bin¹ CHENG Ma-li³
YU Hong-xia¹ CHEN Gang¹ YANG Shu-ming¹

(1 Institute of Quality Standard and Testing Technology for Agro-Product, Chinese Academy of Agriculture Sciences, Beijing 100081, China)

(2 Institute of Microbiology, Jiangxi Academy of Sciences, Nanchang 330029, China)

(3 Animal Science and Technology College, Beijing University of Agriculture, Beijing 102206, China)

Abstract Diethylstilbestrol was activated by ethyl 4-bromobutyrate to introduce carboxyl group and then conjugated to BSA via EDC/NHS as immunogen, New Zealand rabbits were immunized and antisera were prepared. The results showed that complete antigen was successfully synthesized and specific antibody was generated, with titer of 1.28×10^5 the antisera cross-reactivity with hexestrol (9.34%), dienestrol (1.1%) and no cross-reactivity with 17 β -estradiol. An indirect competitive enzyme-linked immunosorbent assay (IC-ELISA) was developed for determination of DES. In the linear range between 1 and 30 ng/ml, IC₅₀ of 7 ng/ml and a detection limit of 0.3 ng/ml for DES were reached. Therefore the assay as screening method can meet the demand of DES residue detection for animal food products.

Key words Diethylstilbestrol Specific antibody ELISA