

河豚毒素中和性单抗的制备、鉴定及 TTX 检测方法的建立

郭建巍, 王珍光, 张云, 张雅芳, 赵强元, 马聪

(海军总医院检验科, 北京 100048)

【摘要】 目的 研制河豚毒素中和性单抗, 建立基于河豚毒素单抗的河豚毒素检测方法。方法 用 TTX-KLH 免疫 Balb/c 小鼠, 用 TTX-BSA 间接 ELISA 筛选, 建立杂交瘤细胞系, 腹腔接种 Balb/c 小鼠诱生腹水, Protein A Sepharose CL4B 亲和柱纯化, SDS-PAGE、间接 ELISA 鉴定; 用常规法确定 TTX 对昆明小鼠的 LD50; 将单抗和 TTX 混合物注入小鼠腹腔, 检测单抗对 TTX 的中和能力; 建立检测 TTX 的竞争 ELISA 法。结果 获得了 2 株 TTX 中和性单抗, 腹水用 Protein A Sepharose CL 4B 纯化后抗体纯度大于 95%; 常规间接 ELISA 检测, 显示单抗 5E7 的结合能力高于 5E4。单抗对 2 LD50 TTX 攻击昆明小鼠的保护率为 50%, 建立了基于中和性单抗的 TTX 检测方法, TTX 的最小检出浓度为 1.56 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。结论 获得了 TTX 中和性单抗, 对致死剂量 TTX 攻击昆明小鼠的保护率为 50%, 建立了基于中和性单抗的 TTX 检测方法, TTX 的最小检出浓度为 1.56 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

【关键词】 河豚毒素; 中和性单抗; 检测

【中图分类号】 R33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2012)10-0055-04

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2012.010.013

Establishment of a Method of Preparation and Identification of Neutralizing Monoclonal Antibody of Tetrodotoxin and Its Detection

GUO Jian-wei, WANG Zhen-guang, ZHANG Yun, ZHANG Ya-fang, ZHAO Qiang-yuan, MA Cong
(Department of Clinical Laboratory, Navy General Hospital, Beijing 100048, China)

【Abstract】 Objective To prepare neutralizing monoclonal antibody of tetrodotoxin (TTX) and establishment of a detection method of the antibody based on competitive ELISA. **Methods** Blab/c mice were immunized with TTX-KLH and its monoclonal antibody was detected by TTX-BSA coated indirect ELISA. A hybridoma cell line was established and its ascites was injected into peritoneal cavity of the mice. The monoclonal antibody was purified with protein A sepharose CL4B affinity column and identified with SDS-PAGE electrophoresis and indirect ELISA. LD50 of tetrodotoxin for Kunming mice was determined by routine method. A mixture of monoclonal antibody and TTX was injected into the peritoneal cavity of mice, and the neutralizing capacity of monoclonal antibody was detected. A detection method of TTX was also established by competitive ELISA. **Results** Two kinds of neutralizing monoclonal antibodies were obtained, and their purity was above 95% obtained by Protein A sepharose CL 4B affinity column. Monoclonal antibody 5E7 had a higher binding capacity with TTX than that of monoclonal antibody 5E4. The neutralizing antibody showed a protection rate of 50% for Kunming mice against 2 LD50 TTX attack. A detection method of TTX with the monoclonal antibody based on competitive ELISA was

【基金项目】 本研究受海军司令部科研基金资助(08-3309)。

【通讯作者】 郭建巍(1965-), 医学博士, 副教授, 海军总医院检验科副主任, 硕士研究生导师。研究方向: 基于抗体的病原细菌学和免疫学诊断。Email: jwkuo@sohu.com。

established and the detectable minimal concentration of TTX was 1.56 $\mu\text{g}/\text{mL}$. **Conclusion** Two kinds of neutralizing monoclonal antibody have been obtained. The protection rate was 50% for Kunming mice against 2 LD₅₀ TTX attack. A detection method of neutralizing monoclonal antibody established based on competitive ELISA, with a minimum detection limit of 1.56 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

【Key words】 Tetrodotoxin; Neutralizing monoclonal antibody; Detection

河豚毒素 (tetrodotoxin, TTX) 是一种重要的海洋生物毒素, 广泛存在于海洋生物和陆栖等众多生物中, 并可通过食物链富集等途径污染其它水产品, TTX 中毒屡有发生, 死亡率达 40% 以上。作为一种潜在的军用毒剂, TTX 已被列入国际生物安全公约清单^[1]。目前针对 TTX 中毒, 国内外还没有适用于人体的专用特效药^[2,3], 因此建立和发展具有自主知识产权的抗体制剂及检测方法具有非常重要意义。

1 材料和方法

1.1 材料

河豚毒素(购于河北省水产研究所); HT、HAT、PEG1500 购自 Sigma 公司; 18 g ~ 20 g Balb/c 小鼠由海军总医院实验动物中心提供; 新生小牛血清购自北京元亨圣马生物技术研究所; HRP (RZ \geq 3.1) 及四甲基联苯胺 (TMB) 为 Sigma 公司产品; HRP 标记的羊抗小鼠抗体 (GAM-HRP) 由本室制备; Protein A 层析柱购自 Invitrogen 公司。

1.2 方法

1.2.1 免疫抗原的制备: 河豚毒素 (tetrodotoxin, TTX) 15mg 溶于 pH 5.0 的柠檬酸缓冲液中, 缓慢滴加到 15 mg KLH/0.01 mol/L PBS 溶液中, 调 pH 至 7.0, 冰浴下加入 1% 戊二醛 3 mL, 室温反应 1.5 h, 用 0.01 mol/L PBS 4 $^{\circ}\text{C}$ 透析 48 h, 检测蛋白定量, 既得 TTX-KLH 复合物即免疫原, 分装后 -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

1.2.2 检测用抗原的制备: 河豚毒素 10 mg 溶于 pH 5.0 的柠檬酸缓冲液中, 将此溶液缓慢滴加到 10 mg BSA/0.01 mol/L PBS 溶液中, 调 pH 至 7.0, 冰浴下加入 1% 戊二醛 3 mL, 室温反应 1.5 h, 用 0.01 mol/L PBS 4 $^{\circ}\text{C}$ 进行透析 48 h, 既得 TTX-BSA 复合物, 分装后 -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

1.2.3 抗 TTX 单克隆抗体杂交瘤细胞株的构建、筛选和鉴定: 选用 4 ~ 6 周龄的雌性 Balb/c 小鼠 6 只, 分别用 12.5 μg TTX-KLH 对小鼠腹股沟皮下多点注射免疫, 每 3 周免疫 1 次, 共免疫 4 次, 常规方法融合。用 TTX-BSA 间接 ELISA 筛选, 阳性细胞反复亚克隆直到所有杂交瘤细胞培养上清检测为

100% 阳性。于 Balb/c 小鼠腹腔接种杂交瘤细胞诱生腹水, protein A sepharose CL4B 亲和柱纯化, SDS-PAGE、间接 ELISA 鉴定。

1.2.4 抗 TTX 单抗的中和活性测定: 选用 4 ~ 6 周龄的昆明小鼠 100 只, 雌雄各半, 将 TTX 用双蒸水溶解, 原液浓度为 1 mg/mL, 用常规实验方法检测 TTX 的 LD₅₀。先将 1 mg/mL 的单抗 (对照组用蒸馏水) 注入小鼠腹腔, 然后注入 1.62 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 TTX 溶液, 72 h 动态观察并记录小鼠的生存状态。

1.2.5 TTX ELISA 检测方法的建立: 以 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ BSA-TTX 包被酶标板, 10% FCS PBS 过夜封闭。将 TTX 用 PBS 倍比稀释后分别加入包被好的酶标板中, 每孔 50 μL , 再加入 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ TTX-McAb 每孔 50 μL , 37 $^{\circ}\text{C}$ 1 h, 洗板后加入 1:2000 抗鼠二抗, 37 $^{\circ}\text{C}$ 45 min 后洗板 TMB 显色, 酶标仪测 A450。

2 结果

2.1 TTX 单克隆抗体的纯化

用 protein A sepharose CL 4B 亲和柱对所获得的 2 株单抗腹水进行了纯化, 获得了高纯度的 IgG 如图 1 所示。

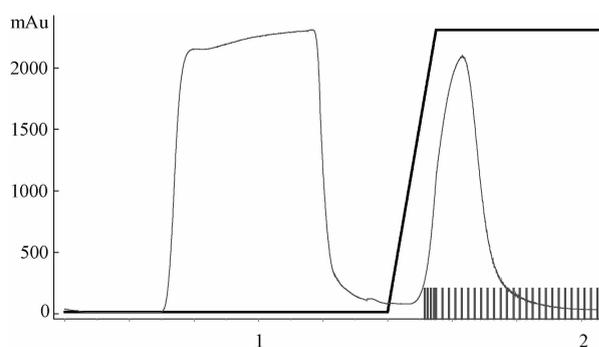


图 1 TTX 单抗的 Protein A sepharose CL 4B 纯化结果
1. 穿透峰; 2. 洗脱峰

Fig. 1 Purification results of TTX McAb with protein A sepharose CL 4B

Note: 1. Transmission peak; 2. Elution peak

2.2 纯化后 TTX 单抗的 SDS-PAGE 鉴定

将 protein A sepharose CL 4B 亲和柱纯化的单抗行 SDS-PAGE 电泳, 结果显示抗体纯度大于

95% (图 2)。

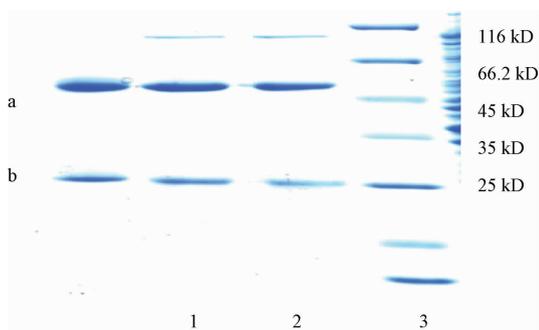


图 2 2 株 TTX 单抗纯化后 SDS-PAGE 结果
1. 5E4, 2. 5E7, 3. 蛋白质 Marker, a: 重链, b: 轻链

Fig. 2 SDS-PAGE results of purified TTX McAbs

Note: 1. 5E4; 2. 5E7; 3. Protein marker;
a: Heavy chain; b: Light chain

2.3 纯化后 TTX 单抗的间接 ELISA 鉴定

用 TTX-BSA 以 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 包被酶标板, 常规间接 ELISA 检测, 结果显示, 单抗 5E7 的结合能力高于 5E4 (图 3)。

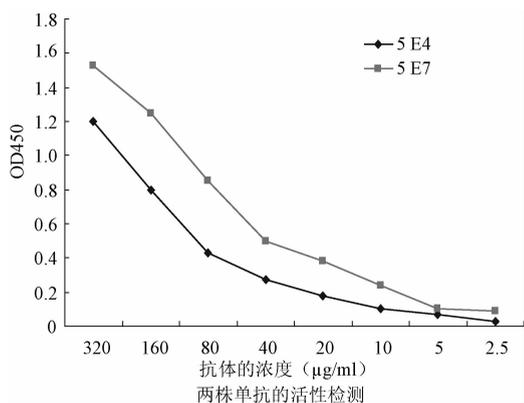


图 3 2 株 TTX 单抗的活性检测

Fig. 3 Detection of the activity of the anti-TTX McAbs

2.4 TTX 单抗的中和活性测定

将 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度的 TTX 0.5 mL 分别注入 10 只昆明小鼠腹腔后, 小鼠于 30 min 内全部死亡; 分别用 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、1.8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、1.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、1.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、1.48 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度的 TTX 测得 TTX 的 LD50 为 1.62 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。将 1 mg/mL 的 TTX 单抗 (对照组用蒸馏水) 0.5 mL 与 1.62 $\mu\text{g}/\text{mL}$ TTX 0.5 mL 混合后注入小鼠腹腔, 随时观察实验和对照组 (各 10 只) 小鼠的状况, 24 h 后通过不断追加 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ TTX, 每次 0.2 mL / 只, 每 30 min 观察 1 次, 直至对照组小鼠全部死亡, 测得当对照组小鼠全部死亡时, 即 2 LD50 时, TTX 单抗对实验小鼠的保护率为 50%。

2.5 TTX 的 ELISA 检测结果

用中性单抗与 TTX 竞争后加入酶标二抗, 通过 TMB 显色间接测定 TTX 浓度, 从图 4 可以看到, TTX 浓度与显色深浅成反比, 竞争 ELISA 测得 TTX 的最小浓度为 1.56 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

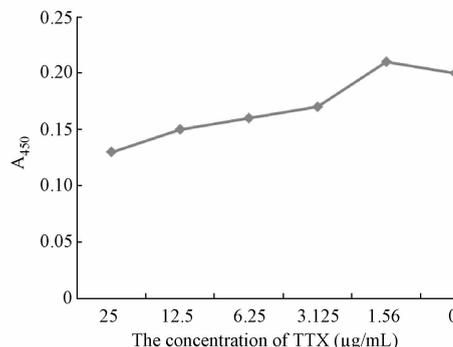


图 4 用竞争 ELISA 检测 TTX

Fig. 4 Detection of TTX by competitive ELISA

3 讨论

TTX 是高毒的非蛋白神经性海洋生物毒素, 人畜中毒死亡率高, 目前尚无特效抗毒药。TTX 在军事上也是潜在的化学战剂和实施恐怖活动的毒剂。研制 TTX 的中和性抗体及检测方法, 在平时和战时都具有重要的理论和现实意义。

TTX 为氨基全羟基唑啉化合物, 毒性强, 分子量小, 分子式为 $\text{C}_{11}\text{H}_{17}\text{N}_3\text{O}_8$, 主要通过阻滞钠离子通道, 阻断神经肌肉电信号传导, 能够引起肌肉麻痹和呼吸麻痹, 导致人畜死亡^[4-6]。作为典型的小分子半抗原 ($M_r = 319$), TTX 本身无免疫原性。我们用甲醛将 TTX 与大分子的嗜孔血蓝蛋白偶联成 TTX-KLH, 免疫 BALB/c 小鼠, 用 TTX-BSA 作为检测抗原, 通过将 TTX 与不同蛋白交联, 避免了非特异性免疫蛋白的干扰, 取得了较好的免疫应答及检测结果^[7]。

昆明小鼠同时腹腔注射 LD50 剂量的 TTX 和抗 TTX 的单抗后, 以 TTX 攻击。结果表明, 两株单抗对染毒动物具有一定的保护效果, 对 2LD50 及致死剂量 TTX 攻击小鼠的保护率为 50%, 显示出良好的抗毒效果。

用中和性抗体作为拮抗剂应用的一个最大问题就是, TTX 分子量非常小, 进入机体后能够迅速作用于靶器官, 而与之相比, 抗体分子量大, 穿透力弱, 与毒素的结合需要一个过程, 要在短时间内阻断毒素的作用具有一定难度。保护实验结果充

分说明了这一点,这也是今后其它小分子化合物毒素拮抗剂研究中所面临的问题。

尽管如此,在目前 TTX 中毒无任何特效抗毒药的情况下,我们的实验结果无疑展现了希望。基于 TTX 的中和性抗体,我们建立了检测 TTX 的竞争 ELISA 方法,此方法检测 TTX 的灵敏度为 1.56 $\mu\text{g}/\text{mL}$,与传统 ELISA 的检测灵敏度相比,仍具一定差距,需要进一步完善。鉴于 TTX 的小分子特性及与靶器官的快速结合,阻止其与钠通道靶位结合的能力主要决定于亲和力及拮抗剂分子量的大小。下一步的工作将是继续研制高亲和力的优质 TTX 小分子拮抗剂,以便实现对 TTX 中毒的有效保护和急救治疗;完善基于 TTX 中和性抗体的高灵敏度免疫检测方法,对 TTX 的快速侦检具有重要意义。

参考文献:

[1] Chang FC, Bauer RM, Benton BJ et al. 4-Aminopyridine antagonizes saxitoxin- and tetrodotoxin-induced cardiorespiratory

depression [J]. *Toxicol*. 1996, 34(6): 671-90.

[2] Chowdhury FR, Nazmul Ahasan HA, Mamunur Rashid AK, et al. Tetrodotoxin poisoning: a clinical analysis, role of neostigmine and short-term outcome of 53 cases [J]. *Singapore Med J*. 2007, 48(9): 830-833.

[3] 宫庆礼,崔建洲. 河豚鱼的安全食用研究 [J]. *卫生研究*, 2003, 32(4): 346-348.

[4] Kao CY. Tetrodotoxin, saxitoxin and their significance in the study of excitation phenomena. *Pharmacol Rev* [J]. 1966, 18(2): 997-1049.

[5] 宋杰军,毛庆武. 海洋生物毒素学 [M]. 北京:北京科学技术出版社,1996:162-181.

[6] Chang FC, Benton BJ, Salyer JLet al. Respiratory and cardiovascular effects of tetrodotoxin in urethane-anesthetized guinea pigs [J]. *Brain Res*. 1990, 528(2): 259-268.

[7] Kawatsu K, Hamano Y, Yoda T et al. Rapid and highly sensitive enzyme immunoassay for quantitative determination of tetrodotoxin [J]. *Jpn J Med Sci Biol*. 1997, 50(3): 133-150.

[修回日期]2012-09-25



《中国实验动物学报》《中国比较医学杂志》投稿系统开通

《中国实验动物学报》《中国比较医学杂志》投稿系统现已开通。1. 向《中国实验动物学报》投稿,请登录(<http://zgsydw.alljournal.ac.cn/sydwybjyx/ch/index.aspx>)注册后按照提示投稿。2. 向《中国比较医学杂志》投稿,请登录(<http://zgsydw.alljournal.ac.cn/zgbjyxzz/ch/index.aspx>)注册后按照提示投稿。3. 作者也可通过登陆中国实验动物学会网站(www.calas.org.cn)链接进入两刊投稿系统。4. 两刊采用论文授权书形式替代单位介绍信,请在两刊投稿系统网站下载中心下载后赶写盖章,扫描件或照片件以附件形式随文章一同投稿上传。5. 作者寄出 100 元审稿费、版面费后请及时登陆系统按提示登记,系统将通知编辑及时开具并寄出发票。如有疑问请电话联系 010-67779337。

两刊编辑部