

丙烯酰胺多克隆抗体的制备

王宵雪, 刘冰, 吕燕彦, 徐小婧, 方国臻, 王硕

(天津科技大学食品工程与生物技术学院, 教育部食品营养与安全重点实验室, 天津 300457)

摘要: 通过活化酯法制备了三种丙烯酰胺人工抗原并进行动物免疫, 得到高效价抗体, 经测定三种抗血清效价分别为 1:32000、1:40000、1:80000。比较三种人工抗原, 使用对巯基苯甲酸衍生方法获得的抗体对衍生产物表现了很高的特异性, 经测定针对 1 $\mu\text{g/mL}$ 衍生产物的抑制率达到 80.7%, 而针对丙烯酰胺及对巯基苯甲酸均无交叉反应。本研究为建立快速检测食品中丙烯酰胺残留的 ELISA 方法奠定基础。

关键词: 丙烯酰胺; 人工抗原; 多克隆抗体; 衍生化

文章编号: 1673-9078(2012)4-405-408

Preparation of Acrylamide Polyclonal Antibodies

WANG Xiao-xue, LIU Bing, LV Yan-yan, XU Xiao-jing, FANG Guo-zhen, WANG Shuo

(Key Laboratory of Food Nutrition and Safety, Ministry of Education of China, College of Food Engineering and Biotechnology, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300457, China)

Abstract: Rabbits were immunized with three kinds of acrylamide artificial antigens which were synthesized via active ester method, then the antibodies with the titer of 1:32000, 1:40000 and 1:8000 were obtained. High specific antibody was produced from acrylamide and 3-mercaptopbenzoic acid (3-MBA). The inhibition rate of antibody against acrylamide derivative at the concentration of 1 $\mu\text{g/mL}$ was 80.7%, and there was no cross-reactivity with acrylamide or 3-MBA. The research provided references for the rapid detection for acrylamide in processed food by ELISA method.

Key words: acrylamide; artificial antigen; polyclonal antibodies; derivative

含高碳水化合物食品, 经过煎、烤、炸等发生美拉德反应会产生丙烯酰胺, 其含量随加工温度的升高而增加, 对人类健康存在潜在的危害^[1]。丙烯酰胺是一种水溶性的神经毒性物质, 临床观察证明丙烯酰胺在人体内有蓄积作用, 它可引起动物致畸、致癌, 是人类的潜在致癌物质。国际肿瘤机构 (IARC) 把它认定为 2A 类致癌物^[2,3]。

丙烯酰胺残留分析多采用高效液相色谱法, 该方法对样本净化要求高, 前处理操作相对复杂且样本基质成分复杂, 操作繁琐, 检测成本较高、时间较长, 限制了此方法在现场检测丙烯酰胺的应用。近年来免疫分析技术依据抗原抗体反应的高度专一性和特异性、简单、快速、灵敏度高等优点在检测食品中丙烯酰胺的含量得到了应用^[4]。

本实验制备了三种丙烯酰胺人工抗原, 前两种将丙烯酸的羧基通过连接臂或直接与蛋白偶联, 第三种方法从丙烯酰胺的酰胺基部位引入衍生物, 之后与蛋

白进行偶联。使用第 3 种人工抗原免疫实验动物后, 获得针对衍生产物特异性很高的抗体。

1 材料与方法

1.1 实验材料

丙烯酰胺标准品、4-氨基丁酸、对巯基苯甲酸、牛血清白蛋白 (BSA)、卵清蛋白 (OVA)、N-羟基琥珀酰亚胺 (NHS)、二环己基碳二亚胺 (DCC)、酶标二抗、弗氏完全佐剂、弗氏不完全佐剂、弗氏不完全佐剂等 (Sigma 公司)。

1.2 仪器

酶联免疫测定仪, 电热恒温培养箱, 紫外-可见分光光度计, LCQ 离子阱质谱仪: 美国 Finnigan 公司产品。

1.3 酶联免疫测定 (ELISA) 用溶液

包被缓冲液 (0.05 mol/L 碳酸盐缓冲液, pH 9.6): Na_2CO_3 1.6 g, NaHCO_3 2.9 g, 加双蒸水至 1000 mL, 调 pH 至 9.6; 磷酸盐缓冲液 (PBS): 10 mmol/L: 38.4 mmol/L Na_2HPO_4 , 11.5 mmol/L NaH_2PO_4 , 154.0 mmol/L NaCl ; pH 7.5; 封闭液 (1% BSA/PBS 溶液): 1 g BSA 溶于 100 mL PBS; 洗涤液 (PBST, pH 7.4):

收稿日期: 2012-01-05

基金项目: “十二五” 国家科技支撑计划项目 (2012BAK17B03)

作者简介: 王宵雪 (1987-), 女, 硕士, 研究方向为食品安全检测

通讯作者: 王硕 (1969-), 教授, 博导, 研究方向为食品安全和免疫学检测

Tween-20 0.5 mL, 加入到 1000 mL PBS, 调节 pH 至 7.4。显色底物溶液: TM B/H₂O₂; 终止液: 1.25 mol/L H₂SO₄。

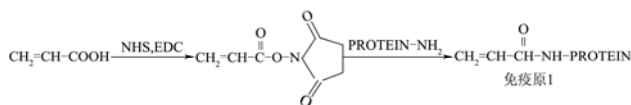
2 实验方法

2.1 人工抗原的制备

2.1.1 人工抗原 1 的制备

直接将丙烯酰胺活化后与蛋白偶联。具体的制备步骤如下: (1) 活化酯的合成: 取 2 mg (0.001 mmol) 丙烯酸, 3.5 mg (0.002 mmol) N,N-二环己基二亚胺 (EDC) 与 2.1 mg (0.002 mmol) N-羟基琥珀酰亚胺 (NHS) 于 10 mL 圆底烧瓶中, 加 150 μL DMF, 室温反应过夜, 得到目标产物。质谱鉴定结果 ESI-MS(m/z):170.32[M+H]⁺(C₇H₆O₄N, Mr=169); (2) 免疫原的制备: 取上步反应后的丙烯酸活化酯, 逐滴加入 4 mL 含 20 mg (0.0003 mmol) BSA 的磷酸盐缓冲液中, 边滴加边摇匀, 4 °C 旋转放置过夜, 将反应液转入透析袋, 4 °C 条件下 PBS 透析 3 d。

合成路线为:



2.1.2 人工抗原 2 的制备

2.1.2.1 4-丙烯酰胺基丁酸的制备

0.5 g 丙烯酰氯溶于 5 mL 甲苯, 4 °C 冷藏 3 h 以上, 为 A 液。配制 2 mol/L NaOH 溶液。将 0.618 g 的 4-氨基丁酸溶于 2 mol/L 的 NaOH 溶液, 4 °C 冷藏 3 h 以上, 为 B 液。每隔 5 min 向 B 液中加入 200 μL A 液和 200 μL 2 mol/L NaOH 溶液, 之后冰浴搅动反应 2 h。用浓 HCl 将反应溶液 pH 调至 2.0, 用 10 mL 乙酸乙酯萃取 3 次, 收集上层有机相, 减压浓缩, 得到白色粉末。质谱鉴定结果 ESI-MS(m/z):156.54[M]⁺, (C₇H₁₁O₃N, Mr=157);

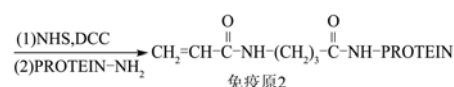
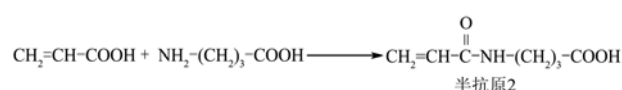
2.1.2.2 活化酯的合成

取 2 mg (0.012 mmol) 丙烯酰胺基丁酸, 4.6 mg (0.024 mmol) N,N-二环己基二亚胺 (EDC) 与 3 mg (0.026 mmol) N-羟基琥珀酰亚胺 (NHS) 于 10 mL 圆底烧瓶中, 加 150 μL DMF, 室温反应过夜, 得到目标产物。质谱鉴定结果 ESI-MS(m/z):290.31[M+Cl]⁺, (C₁₁H₁₄O₅N₂, Mr=254);

2.1.2.3 免疫原的制备

将此种半抗原以活化酯法与载体蛋白偶联 (摩尔比 40:1), 制备相应的免疫原, 具体方法同 2.1.1 中免疫原的制备方法。

合成路线为:



2.1.3 人工抗原 3 的制备

2.1.3.1 半抗原 3 的制备

取 0.49 g (3.2 mmol) 对巯基苯甲酸置于圆底烧瓶中, 加入 10 mL 甲醇使其溶解, 之后加入 1 mL 0.1 mmol/L 碳酸盐缓冲液 (pH 9.6) 溶解的 0.12 mg (16.2 mmol) 丙烯酰胺, 40 °C 反应 1 h。真空抽滤收集产物, 之后避光真空干燥过夜, 得到白色粉末。ESI-MS(m/z):190.68[M]⁺, (C₁₀H₉O₃N, Mr=191);

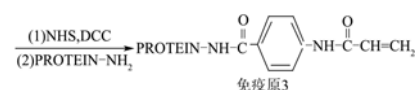
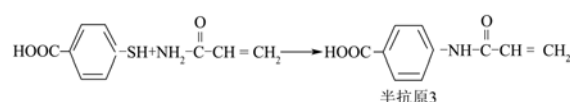
2.1.3.2 活化酯的合成

取 0.19 g (1.0 mmol) 对丙烯酰胺基苯甲酸, 0.17 g (1.50 mmol) N-羟基琥珀酰亚胺 (NHS) 于 25 mL 圆底烧瓶中, 加入 6 mL 无水四氢呋喃, N₂ 保护下, 逐滴加入溶有 0.31 g (1.50 mmol) N,N-二环己基二亚胺 (DCC) 的 4.5 mL 无水四氢呋喃溶液, 边滴加边搅拌, 室温反应过夜, 离心 (3000 r/min, 4 °C) 除去白色沉淀, 减压浓缩得到淡黄色粘稠物。质谱鉴定结果 ESI-MS(m/z):287.34[M]⁺, (C₁₄H₁₂O₅N₂, Mr=288);

2.1.3.3 免疫原的制备

将此种半抗原以活化酯法与载体蛋白偶联 (摩尔比 40:1), 制备相应的免疫原, 具体方法同 2.1.1 中免疫原的制备方法。

合成路线为:



2.2 抗体的制备

选取新西兰大白兔进行免疫, 月龄 3 个月, 体重 1.5 kg, 饲养于标准实验动物房中, 连续观察 3 d, 确定身体状况正常后进行免疫。取 2 mg 免疫原, 加入生理盐水至 2 mL, 与等量的弗氏完全佐剂充分混合乳化, 采取皮内多点注射和肌肉注射进行初次免疫, 加强免疫用不完全佐剂, 免疫原量减半, 前 3 次每隔两周免疫 1 次, 第 3 次后每隔 1 个月免疫 1 次, 从第 3 次免疫开始, 于每次加强免疫后 10 d 进行耳静脉采血, 测定抗体效价和特异性, 当抗体效价达到最高时采用股动脉取血法取全血。用 Sepharose4B-ProteinA 纯化抗血清, 所得抗体 PBS 透析后备用。

2.3 效价及特异性的测定

2.3.1 在聚苯乙烯酶标板上用包被液 (100 μL/孔) 包被已制好的包被抗原, 4 度包被过夜, 然后弃去孔中液体, 并用 PBST 洗液洗板 3 次;

2.3.2 室温下封闭液 (200 μL/孔) 封闭 1 h, 弃去封闭液, 并用 PBST 洗液洗板 3 次;

2.3.3 每列 A 孔作为空白, B-H 孔加入不同浓度的抗血清稀释液 (50 μL/孔), 或标准品和抗血清稀释液各 50 μL, 室温孵育 1 h, 然后用 PBST 洗液洗板 4 次;

2.3.4 每孔加入 100 μL 稀释度为 1:20000 羊抗兔 IgG 辣根过氧化物酶 (HRP) 标记物, 室温孵育 30 min, 然后用 PBST 洗液洗板 5 次;

2.3.5 在每孔中添加 100 μL 底物液, 室温下反应 20 min;

2.3.6 终止反应在每孔中添加 50 μL 终止液, 终止反应;

2.3.7 在双波长方式 (450~650 nm) 下用酶标仪读取 OD 值, 选择吸光度值在 0.7~1.2 范围内的抗血清稀释倍数, 即为抗血清效价, 由抑制率得出抗血清的特异性。

3 结果与分析

3.1 半抗原合成鉴定

3.1.1 半抗原 2 (4-丙烯酰胺基丁酸) 的鉴定

丙烯酰氯接臂后, 收集产物做质谱分析。目标半抗原分子量 157, 合成的半抗原质谱图 (图 1) 中, 质荷比 156.54 的阴分子离子峰最高, [M-H]⁻, 证明此半抗原合成成功。

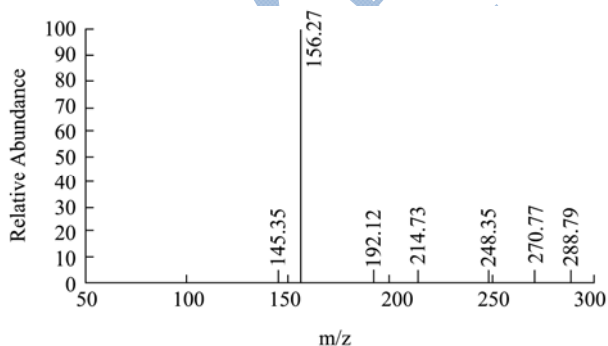


图 1 半抗原 2 阴离子质谱图

Fig.1 Mass spectrum of the hapten 2

3.1.2 半抗原 3 (对丙烯酰胺基苯甲酸) 的鉴定

图 2 是丙烯酰胺与对巯基苯甲酸衍生后产物全扫描质谱图。目标半抗原分子量 191, 合成的半抗原质谱图中, 质荷比为 190.68 的碎片峰度最高, [M-H]⁻, 质荷比为 381.40 的碎片峰为目标物的二倍体, [2M-H]⁻, 证明已成功合成半抗原。

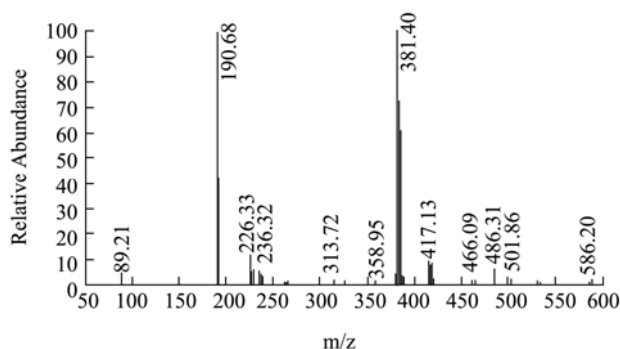


图 2 半抗原 3 阴离子质谱图

Fig.2 Mass spectrum of the hapten 3

3.2 人工抗原制备鉴定

三种制备好的丙烯酰胺人工抗原在透析 72 h 后取出。使用紫外-可见分光光度计在 200~800 nm 范围内分别扫描半抗原、牛血清蛋白 (BSA)、免疫原, 观察有无峰的偏移。因丙烯酰胺在 200~800 nm 范围内没有紫外吸收峰, 故免疫原 1、免疫原 2 的紫外可见扫描图无法观察到峰的位移。

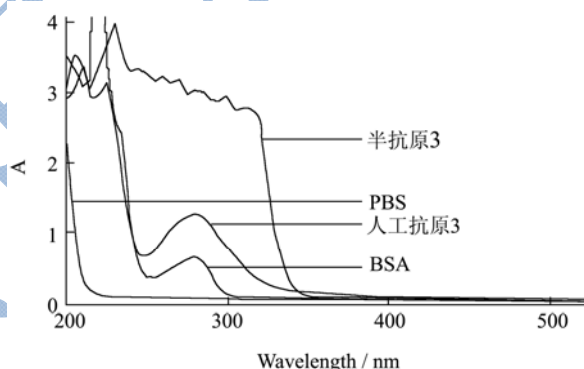


图 3 人工抗原 3 的紫外可见扫描

Fig.3 Ultravioletscan spectra of artificial antigen 3

图 3 是免疫原 3 的紫外可见扫描图。半抗原 3 在 200~350 nm 范围内有八个吸收峰, BSA 在 280 nm 有吸收峰, 对比免疫原 3 与 BSA 和半抗原 3, 免疫原 3 在 277 nm 有最大吸收峰, 证明 BSA 成功偶联半抗原 3 制备免疫原 3。

3.3 抗血清效价特异性的测定

由图 4 可知, 由免疫原 1、免疫原 2 制备的抗血清的效价均不到 30000 倍, 且对丙烯酰胺没有特异性的识别。从图 4、表 1 中可以看出, 使用免疫原 3 制备的抗血清具有很高的效价, 最后一次采血效价达到 80000 倍。最后一次取血后, 抗血清不能特异性地识别丙烯酰胺及对巯基苯甲酸 (3-MBA); 第一次取血后, 抗血清对半抗原 3 (1 μg/mL) 的抑制率为 59.1%; 第二、三次取血后, 抗血清对半抗原 3 (1 μg/mL) 的抑制率分别为 67.4%、73.5%; 最后一次取血后, 抗血清对半抗原 3 (1 μg/mL) 的抑制率为 80.7%。

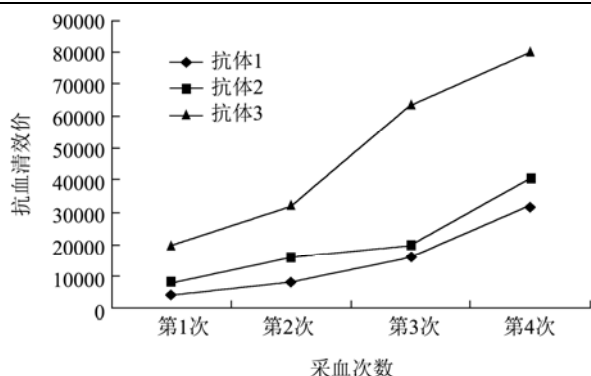


图4 三种抗血清效价

Fig.4 Titer of the Antiserum

表1 抗血清(免疫原3)亲和性的测定

Table 1 the affinity of antiserum (artificial antigen 3)

采血	目标物			
	丙烯酰胺	对巯基苯甲酸	衍生结合物(3-MBA-ACRY)	
第1次	—	—		59.1%
第2次	—	—		67.4%
第3次	—	—		73.5%
第4次	—	—		80.7%

注：“—”代表抗血清对目标物没有识别，亲和性是指抗血清对目标物(1 μg/mL)的抑制率。

4 讨论

4.1 丙烯酰胺属于小分子半抗原(Mr=71.08)，无免疫原性，必须与大分子物质连接后才能刺激机体产生抗体。因此，首先需要合成可直接与载体蛋白偶联，并能最大程度模拟待测分子结构的半抗原。理想的半抗原，一方面应具备待测物的结构特征，特别是立体结构；另一方面与载体连接后应保证该特征结构能最大程度地为免疫活性细胞识别和结合，以制备出具有预期选择性和亲合性的抗体^[4]。

4.2 本实验首先通过活化丙烯酸后直接与载体蛋白偶联得到人工抗原1，经几次免疫之后均未产生特异性识别丙烯酰胺的抗体，推测其原因是偶联点与小分子的特征结构相距较近，不利于特征结构的暴露，使免疫系统对特征结构的识别难度加大。

4.3 由于免疫系统具有对载体远端的结构识别能力最强的特性，当偶联点远离待测物的特征结构部分和官能团时，载体蛋白质对小分子特征结构的屏蔽作用最小^[6]。因此尝试在待测物与载体蛋白之间引入连接臂，通过间隔臂使丙烯酰胺的官能团及特征结构远离载体蛋白，从而有利于高选择性和高亲合性抗体的产生。但是经几次免疫之后仍未得到高亲合性丙烯酰胺抗体。由此可知在载体蛋白与待测物间引入间隔臂的方法并未能产生高亲和性的丙烯酰胺抗体。

4.4 丙烯酰胺是一个三碳原子的线性小分子，化学结构极其简单，基于以上尝试，可知获得针对丙烯酰胺具有高特异性的抗体十分困难，因而考虑对丙烯酰胺进行衍生，增加活性基团从而获得高特异性的抗体。据文献报道^[7]，半抗原结构中有芳香环形成的抗原具有较强的免疫原性，可使机体产生较强的免疫应答，平均成功率大约为1/3，而未含有芳香环的半抗原成功率仅占1/11。因为丙烯酰胺很容易与亲和基团结合，且巯基与氨基的反应活性较高，因而选择对巯基苯甲酸作为衍生物与丙烯酰胺进行反应得到半抗原3。免疫新西兰大白兔后产生了针对半抗原3的高特异性抗体。第四次免疫后，此抗体对丙烯酰胺及对巯基苯甲酸(3-MBA)没有识别，但针对半抗原3(1 μg/mL)的抑制率可达80.7%。实际检测丙烯酰胺时，虽然需要先将丙烯酰胺与对巯基苯甲酸衍生，但二者的结合很容易且结合比很高，能够满足免疫分析前处理简单的要求。因而为利用免疫手段实际检测食品中的丙烯酰胺含量奠定了良好的基础。

5 结论

本实验合成了三种丙烯酰胺人工抗原，通过动物免疫得到了针对三种抗原的高效价抗体。使用丙烯酰胺与对巯基苯甲酸衍生的方法获得的抗体对衍生物(对丙烯酰胺基苯甲酸)表现了很高的特异性，而对丙烯酰胺及对巯基苯甲酸(3-MBA)均无识别。该法以对巯基苯甲酸为衍生剂，经简单过滤、减压蒸馏，即可得到纯度很高的衍生物，为建立快速检测食品中丙烯酰胺残留的免疫分析方法奠定了基础，更为食品安全监管提供了技术支撑。

参考文献

- [1] 张根义.热加工食品中丙烯酰胺的形成机理和风险分析[J].无锡轻工业学报,2003,22(4):91-99
- [2] 杨文友.食品中丙烯酰胺的特性及危害[J].试验与研究,2002,11:22-26
- [3] 林流丹,黄才欢,欧仕益.食品中丙烯酰胺形成机理的研究进展[J].现代食品科技,2006,22(1):168-170
- [4] Wenzel T, Beatriz M, Anklam E. Analytical methods for the determination of acrylamide in the food products: a review [J]. Food Additives and Contaminants, 2003, 20(10): 885-902
- [5] 黎其万,潘灿平.农药残留免疫分析方法及其应用研究进展[J].西南农业学报,2004,17(2):248-252
- [6] 陈林,吴青,潘科,等.农药分子半抗原合成的研究进展[J].现代农药,2005,4(3):10-14
- [7] Thomas N R. Hapten design for the generation of catalytic

antigens [J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 1994,

47(2-3): 345-372

现代食品科技