

大田软海绵酸人工抗原的合成及其多克隆抗体的制备

王丽, 桑亚新, 周群标, 王向红*

(河北农业大学食品科技学院, 河北省农产品加工工程技术研究中心, 河北保定 071001)

摘要: 采用活化酯法将大田软海绵酸(OA)与匙孔血蓝蛋白(KLH)偶联制备免疫抗原(OA-KLH),用还原聚丙烯酰胺凝胶电泳法和红外光谱法对人工抗原的偶联效果进行分析,通过免疫兔子制备抗体,所得抗血清经Protein A凝胶层析柱纯化处理后,用紫外全波长扫描和间接竞争ELISA法验证纯化效果。结果表明,免疫抗原偶联成功并获得了高亲和力的多克隆抗血清,抗血清纯化后浓度为2.16 mg/mL,间接竞争ELISA测定其滴度为12 800、 IC_{15} 为3.41 ng/mL,为建立快速、经济的检测方法打下了基础。

关键词: 大田软海绵酸; 人工抗原; 红外表征; 抗体纯化

中图分类号: Q 785; S 917

文献标志码: A

近年来全球近岸海域赤潮频发,其危害面积、强度及发生频率均呈上升趋势^[1-3],赤潮导致大量产腹泻性贝类毒素(diarrhetic shellfish poisoning, DSP)的藻类增殖,如利玛原甲藻(*Prorocentrum lima*)^[4]。贝类通过滤食毒藻而积累DSP,但自身对其毒素有一定耐受能力,并能够通过代谢作用排出体外而不受毒害^[5-6],人食用污染贝类后会引起食物中毒,症状以腹泻、呕吐为主,还会对体内多种脏器造成毒害作用,甚至致癌。

大田软海绵酸(okadaic acid, OA)是DSP中的一类酸性脂溶性生物毒素,它是蛋白磷脂酶(PP1和PP2A)的烈性抑制剂,使体内蛋白质过磷酸化,从而可能导致细胞分裂和基因表达异常现象^[7],对哺乳类细胞具有诱发癌变和促进凋亡的双重功效^[8-9]。此外,OA有很强的稳定性,对一般加工处理,如冷冻、取内脏、臭氧化及热处理无明显影响^[10]。有研究称电离辐射对DSP的降解有一定的效果,但尚不能确定剂量和方式对降解程度的影响^[11]。因此,建立健全DSP快速检测方法成为关乎公众健康和水产行业发展的迫切需要。为此,本试验基于免疫学快速检测方法的原理,采用多克隆抗体技术制备灵敏度高、特异性强的抗体,为快速检测方法的建立打下基础。

1 材料与方法

1.1 试剂

大田软海绵酸(OA)、匙孔血蓝蛋白(KLH)、卵清白蛋白(OVA)、福氏完全佐剂(FCA)、福氏不完全佐剂(FICA)、N-羟丁二酰亚胺(NHS)、N,N-二环乙烷碳二亚胺(DCC)、N,N-二甲基甲酰胺(DMF)、3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB)、过氧化氢脲、十二烷基硫酸钠(SDS)均购于美国Sigma公司;超滤离心管(美国Millipore);蛋白A琼脂糖凝胶(Protein A Sepharose CL-4B)、辣根过氧化物酶标记羊抗兔IgG(北京热景生物技术有限公司)。其它试剂均为分析纯。

1.2 仪器

电子感量分析天平(北京赛多利斯仪器系统有限公司);冷冻离心机(上海安亭科学仪器厂);紫外可见分光光度计(上海尤尼柯仪器有限公司);冷冻干燥机(北京博医康实验仪器有限公司);凝胶成像系统(德国Binta公司);傅立叶变换红外光谱仪(美国Bio-rad公司);垂直电泳仪(北京六一仪器厂);酶标仪、洗板机(美国Thermo公司);96孔酶标板(美国Costar公司);单道、八道微量可调移液枪(上海大龙医疗设备有限公司)。

收稿日期:2010-12-16 修回日期:2011-05-13

资助项目:国家海洋局公益性行业科研专项(200805046)

通讯作者:王向红,E-mail:wangxianghong@hebau.edu.cn

两只健康雄性日本大耳白实验兔(10周龄)购自保定养兔基地,体质量2 kg左右,观察一周,确定身体状况正常。

1.3 缓冲溶液系统

包被缓冲液:0.2 mol/L pH 9.6 碳酸盐缓冲液;稀释缓冲液:0.01 mol/L pH 7.4 PBS 溶液;洗涤缓冲液:0.01 mol/L PBST;TMB 底物溶液;终止液:1.2 mol/L H₂SO₄ 溶液;结合缓冲液:0.02 mol/L pH 7.0 碳酸盐缓冲液;洗脱缓冲液:0.1 mol/L pH 2.7 甘氨酸盐酸缓冲液;中和缓冲液:1 mol/L pH 9.0 Tris-HCl 缓冲液。

1.4 活化酯法制备 OA 免疫原和包被原

OA 是一种多环聚醚类亲脂性生物毒素,不溶于水,为保证偶联反应的顺利进行,用 DMF 作为反应体系溶剂。在 DCC 的脱水缩合作用下,OA 分子中的羧基与 NHS 中的羟基反应生成活化酯衍生物。将衍生混合液滴加到载体蛋白溶液中,活化酯与蛋白的氨基反应生成更稳定的酰胺键偶合物,从而完成免疫原(OA-KLH)与包被原(OA-OVA)的合成。

合成步骤参考 MATSUURA 等^[12]的方法,并稍作修改:3 mg OA、0.466 mg NHS、0.855 mg DCC 溶于 200 μL DMF 中混匀,室温孵育 3 h,其中 120 μL 反应液缓慢滴加到 10 mg KLH(溶于 2 mL 0.1 mol/L NaHCO₃),冰块上晃动保持低温反应 2 h 以上,4 ℃ 反应过夜。另外 80 μL 反应液加入 10 mg OVA(溶于 2 mL 0.1 mol/L NaHCO₃),操作

步骤同上。未反应的小分子物质及副产物通过超滤离心法去除。所得偶联物溶液分别冻干,-20 ℃ 保存。

1.5 免疫原偶联效果的分析

偶联抗原 SDS-PAGE 电泳分析 分离胶中丙烯酰胺含量为 10%,积层胶中为 5%。将均为 10 mg/mL 的 KLH、OA-KLH、OVA、OA-OVA 各 10 μL 与等量上样缓冲液混匀,沸水浴 5 min 后点样。积层胶电压为 80 V,待指示剂移到分离胶后,将电压升至 120 V,指示剂移出凝胶后关闭电源。室温下考马斯亮蓝 R-250 染色过夜,25% 乙醇/8% 乙酸脱色至背景透明,UVP 凝胶自动成像系统拍照。

红外光谱扫描 取少量冻干的免疫原加入预先烘干的溴化钾中,研磨均匀后压片,进行 400~5 000 cm⁻¹ 红外光谱扫描。

1.6 OA 多抗的制备

称取人工免疫原(OA-KLH)溶于生理盐水中,加入等量佐剂乳化至滴入水中不扩散即乳化充分,采用颈背部六点皮下,大腿肌肉两点注射方法免疫兔子,如表 1,第 3~6 次加强免疫完成后 10 d,于兔子耳缘取血,采用间接 ELISA 法测定其滴度,并考察特异性。于第 6 次加强免疫后 10 d 进行心脏取全血,37 ℃ 放置 1 h 后放入 4 ℃ 冰箱凝血过夜,将血清 10 000 r/min 离心 10 min,加叠氮钠(1/1 000)后 -20 ℃ 冷冻保存。

表 1 免疫程序

Tab. 1 The procedure of immunization

免疫次数 times of immunization	免疫剂量/只 immune dosage per rabbit	时间间隔/d time interval
首次免疫 the first booster immunization	1 mg 免疫原 + 1 mL 生理盐水 + 1 mL FICA	—
第二次加强免疫 the second booster immunization	0.5 mg 免疫原 + 1 mL 生理盐水 + 1 mL FICA	14
第三次加强免疫 the third booster immunization	0.5 mg 免疫原 + 1 mL 生理盐水 + 1 mL FICA	14
第四次加强免疫 the forth booster immunization	0.7 mg 免疫原 + 1 mL 生理盐水 + 1 mL FICA	14
第五次加强免疫 the fifth booster immunization	0.8 mg 免疫原 + 1 mL 生理盐水 + 1 mL FICA	14
第六次加强免疫 the sixth booster immunization	1 mg 免疫原 + 1 mL 生理盐水 + 1 mL FICA	14

1.7 抗血清亲和力(affinity)的鉴定

酶标板每孔加入 100 μL OA-OVA(10 μg/mL),4 ℃ 包被过夜,洗板后用 1% BSA 封闭液常温下孵育 1 h,洗板,加入倍比稀释的标品 OA(1 000、200、40、8、1.6、0.32 μg/L)与滴度浓度的抗血清,常温竞争反应 1 h,洗板后每空加入 100 μL 1:5 000 倍稀释的辣根过氧化酶标记的羊抗兔稀释液,常温孵育 0.5 h,洗板,加入 TMB 底物混合

液,15 min 后终止反应,用酶标仪在 450 nm 下测定吸光值。根据所测吸光值计算抑制率(inhibition),以标品浓度对数值为 X 轴,其相应抑制率为 Y 轴绘制抑制曲线。抑制率计算公式如下:

$$\text{抑制率}(I)\% = [1 - (A_{\text{样品}} - A_{\text{空白}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}})] \times 100$$

1.8 抗体纯化及浓度的测定

本实验采用饱和硫酸铵盐析法^[13-14]结合

Protein A Sepharose CL-4B 凝胶柱层析法提取纯化血清中的 IgG,柱层析过程中,上样后进行淋洗和洗脱,收集层析液 1.5 mL/管,测定其在 280 nm 处的吸光值,收集洗脱峰中吸光值 UV > 0.2 的蛋白层析液,经 PBS 透析后加入 1/1 000 的 NaN_3 备用。

采用紫外分光法测定提纯抗体中蛋白的含量,记录在 260 nm 和 280 nm 处的吸光值 A_{260} 、 A_{280} 。IgG 蛋白含量计算公式:蛋白量 (mg/mL) = $(1.45 \times A_{260} - 0.74 \times A_{280}) \times$ 稀释倍数

1.9 抗体纯化效果的检测

紫外分光光度计法 将未纯化的血清用 PBS 适当稀释后与纯化后的血清在 280 nm 处进行紫外光谱扫描,以 PBS 缓冲液做对照,检测纯化效果。

间接竞争法测定抗血清纯化前后的特异性 分别用纯化前后的抗体进行间接 ELISA 竞争反应,绘制抑制曲线,比较其最低检测限的变化。

2 结果

2.1 偶联抗原 SDS-PAGE 电泳结果分析

从图 1 中 1、2 条带可以看出, KLH-OA 条带略滞后于载体蛋白 KLH 条带,而由 3、4 条带可知, OVA-OA 条带略滞后于 OVA 条带。蛋白电泳中各蛋白组分的迁移率主要取决于分子的大小和形状以

及所带电荷多少,蛋白加入 SDS-PAGE 电泳系统后,蛋白分子带相同量电荷,其迁移率主要取决于分子量大小,因此可推断载体蛋白的分子量发生了一些变化,有部分 OA 偶联到了载体蛋白分子上。

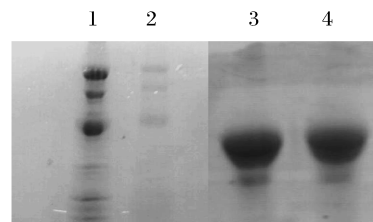


图 1 载体蛋白与抗原的 SDS-PAGE 电泳图

Fig. 1 SDS-PAGE of carrier proteins and conjugates

1. KLH; 2. KLH-OA; 3. OVA; 4. OVA-OA.

2.2 红外光谱法鉴定人工抗原 (OA-KLH)

蛋白 KLH 红外图谱中(图 2), 3 422、1 655 cm^{-1} 为羧基的特征吸收带,而在人工抗原 (KLH-OA) 的红外光谱图中, 1 661 cm^{-1} 处是 $-\text{CONH}-$ 中 $\text{C}=\text{O}$ 伸缩振动特征吸收峰, 3 431 cm^{-1} 处是 $-\text{NH}$ 伸缩振动吸收峰。1 074 和 1 162 cm^{-1} 处的谱带分别是 OA 分子中的 $-\text{C}-\text{O}-\text{C}-$ 的对称与反对称伸缩振动, 702、862、836 cm^{-1} 处的谱带很可能是 OA 分子中 $\text{C}=\text{C}$ 的不同顺反结构的吸收峰。由此可以推断出 OA 与载体蛋白 KLH 偶联成人工抗原 (KLH-OA) 成功完成。

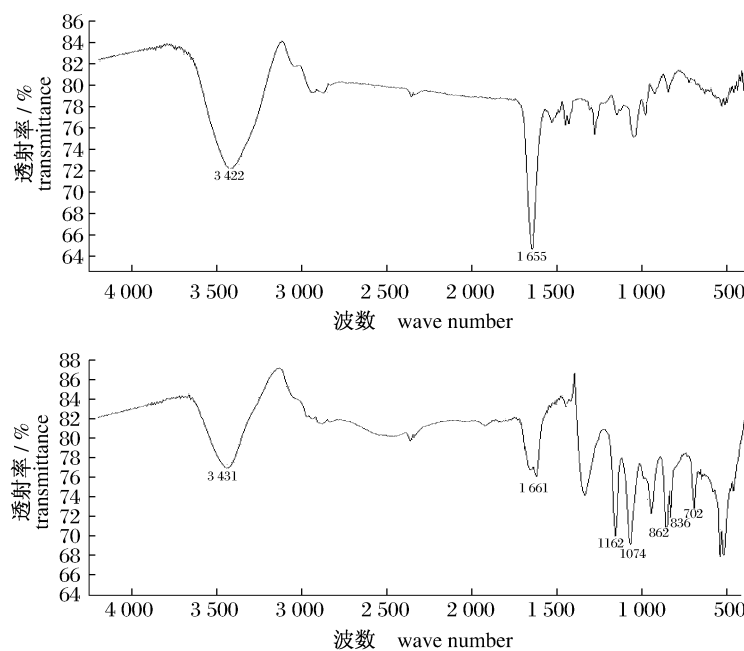


图 2 KLH 及 KLH-OA 的红外光谱图 (由上至下)

Fig. 2 IR spectrum of KLH, KLH-OA

2.3 抗血清鉴定

抗血清滴度的变化 从间接 ELISA 测定加强免疫后采血血清实验结果可以看出,血清滴度随免疫次数的增加呈明显上升趋势,从第一次采血是滴度为 800 到取全血后滴度达到 12 800,由此说明此免疫程序能获得较高滴度的抗体。

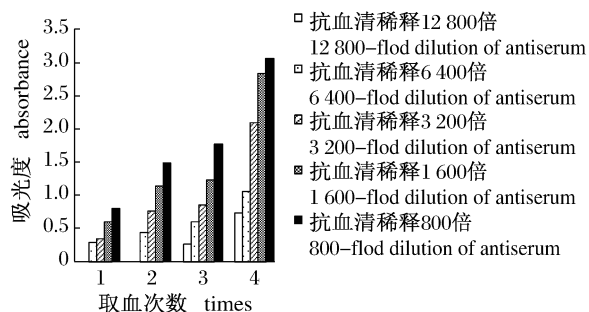


图3 抗血清滴度变化

Fig. 3 The change of titer of the antiserum of rabbit anti-OA after each booster immunization

抗血清亲和力的变化 由3次从兔耳缘静脉采血后测定的间接竞争曲线(图4)可以看出,随着免疫次数的增多,同一浓度 OA 的抑制率呈增大趋势,而其 IC_{50} (抑制率为 50% 时的标准品浓度)由 125.56 ng/mL 下降到 15.45 ng/mL,说明此免疫程序能明显增强抗血清对 OA 的亲合力。

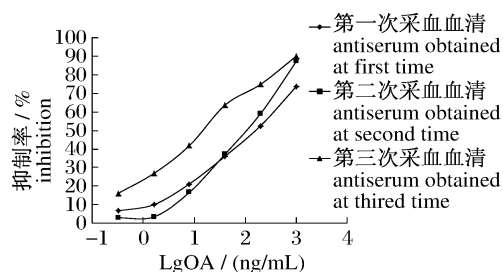


图4 抗血清亲和性的变化

Fig. 4 The change of affinity of the antiserum

2.4 抗体纯化效果

抗血清纯化 抗血清经饱和硫酸铵沉淀纯化后得到免疫球蛋白粗提物,过凝胶柱再次纯化,免疫球蛋白 IgG 与蛋白 A 在结合缓冲液淋洗条件下结合,杂蛋白及其它杂质淋洗出去形成第一个蛋白吸收峰,随后加入 pH 为 2.7 的洗脱缓冲液使免疫球蛋白 IgG 洗脱下来,收集即得到浓度为 2.16 mg/mL 的纯化抗体。

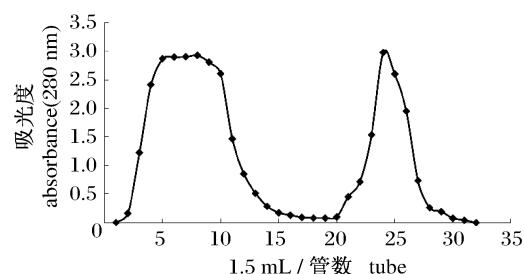


图5 Protein A Sepharose CL-4B 凝胶柱层析柱对抗血清纯化的色谱图

Fig. 5 Chromatography of antiserum on Protein A Sepharose CL-4B gel column

紫外扫描鉴定纯化效果 多克隆抗血清在未经纯化前含大量干扰抗原抗体特异性结合的杂质,如脂类物质、血红蛋白、维生素、无机物等。由图6显示,未纯化血清光谱扫描图中在 416 nm 处有明显胆固醇特征吸收峰^[15]和 415 nm 处血红蛋白特征吸收峰^[16],而血清纯化后干扰物质的吸收峰消失且在 280 nm 有明显蛋白吸收峰,由此说明血清纯化所得免疫球蛋白较单一。

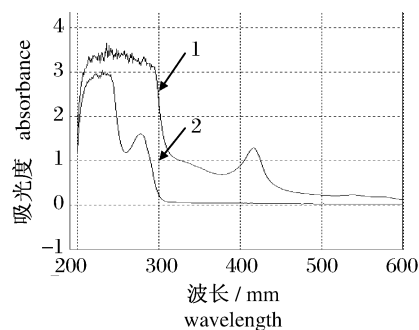


图6 抗血清纯化前后的全波长紫外扫描图

1. 未经纯化的血清; 2. 纯化后的血清。

Fig. 6 Ultraviolet spectrum of antiserum before and after being purified

1. unpurified antiserum; 2. purified antiserum.

间接竞争 ELISA 鉴定纯化效果 抗血清经纯化后亲合力未受明显影响,且对低浓度 OA 的抑制率有所提高,检测限 IC_{15} 降低,多克隆抗体纯化对抗原抗体特异性反应有增强作用(图7)。

3 讨论

目前,世界各国加大水产品安全监管力度,纷纷制定了 DSP 的限量标准,其中美国食品药品监督管理局(FDA)为 20 $\mu\text{g}/100\text{g}$ 可食部分,欧盟 EU 的限量标准为 16 $\mu\text{g}/100\text{g}$ 可食部分^[17]。

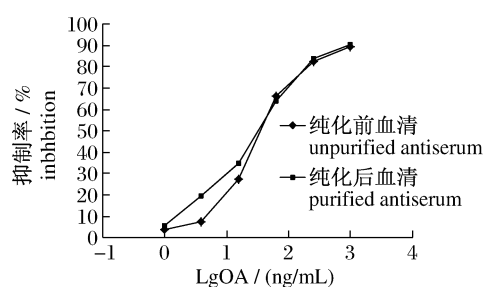


图7 抗血清纯化前后亲和力变化
Fig.7 The affinity of the antiserum before and after being purified

在我国,由国家质量监督检验检疫总局规定 DSP 限量标准为 $60 \mu\text{g}/100 \text{g}$ 可食部分,而农业部规定 DSP 不得检出。近年来随着科学技术水平的不断提高,已形成多种较成熟的检测方法,小鼠生物学法为最常用方法,其次色谱学检测技术也日新月异,如液相荧光检测、液质联用技术等。免疫学检测法因其特异性、实用性而逐步成为研究重点,在国外以高灵敏度单克隆抗体为基础的生物传感器迅速诞生,其灵敏度最低可达 $0.03 \text{ ng}/\text{mL}$ ^[18],在我国对 OA 的抗体研究尚处于起步阶段,卢士英等^[19]建立了 OA 直接和间接竞争 ELISA 方法,最低检出限分别为 $0.6 \text{ ng}/\text{mL}$ 和 $0.18 \text{ ng}/\text{mL}$ 。刘仁岩等^[20]建立的间接竞争 ELISA 方法,其检出限为 $0.175 \text{ ng}/\text{mL}$ 。而多克隆抗体较单克隆抗体制备简单,血清获得量大,储存方便,因此选择制备多克隆抗体进行研究。

本实验在前人对多克隆抗体制备研究的基础上,采用活泼酯法成功合成了免疫原(OA-KLH)和包被原(OA-OVA),并经变性聚丙烯酰胺凝胶电泳法和红外光谱法对其偶联效果进行了分析,为人工抗原的验证提供了理论支持。同时,对动物进行阶梯递进式免疫,即每次加强免疫时适当加大免疫原用量,此免疫方式所得抗血清具有较高滴度和高亲和力。多克隆抗体经 Protein A 凝胶层析柱纯化后,采用紫外全波长扫描方法直观证实了抗血清的纯化效果,而经间接竞争 ELISA 法的进一步证实,清除干扰抗原抗体特异性反应的杂蛋白对抗体的灵敏度具有一定的增强效果,其 IC_{50} 可达 $3.41 \text{ ng}/\text{mL}$ 。因此,高亲和力抗体的获得为 ELISA 方法的建立及快速检测产品的开发奠定了物质基础。

参考文献:

- [1] FLEMING L E, KIRKPATRICK B, BACKER L C, et al. Review of Florida red tide and human health effects[J]. *Harmful Algae*, 2011, 10(2): 224-233.
- [2] 张丽旭,赵敏,蒋晓山. 中国赤潮发生频率的变化趋势及其多发年份的 R/S 预测[J]. *海洋通报*, 2010, 29(1): 72-77.
- [3] 陈舜,佟蒙蒙,江天久,等. 赤潮灾害对水产养殖业损失的分级评估[J]. *水产学报*, 2009, 33(4): 610-616.
- [4] 李丽璇,汤敬谦,杨维东,等. 海洋底栖甲藻—利玛原甲藻(*Prorocentrum lima*)产毒特征的研究[J]. *生态毒理学报*, 2009, 4(5): 745-750.
- [5] 商兴芳,杨维东,刘洁生,等. 腹泻性贝毒在翡翠贻贝中的积累、排出及其对 HSP70 表达的影响[J]. *暨南大学学报*, 2009, 30(5): 571-575.
- [6] 张剑军. DSP 在贝体中的积累及其对 P-糖蛋白基因表达的影响[D]. 广州:暨南大学, 2009.
- [7] SOUID M G, MOUKHA S, MOBIO T A, et al. The cytotoxicity and genotoxicity of okadaic acid are cell-line dependent [J]. *Toxicol*, 2008, 51(8): 1338-1344.
- [8] 陈洋,颜天,于仁成,等. OA 对人肝细胞 HL-7702 和肝癌细胞 Bel-7402 增殖的影响和对细胞凋亡的诱导作用研究[J]. *中山大学学报:医学科学版*, 2008, 47(5): 86-92.
- [9] 邢鸣鸾,楼建林,徐立红. 大田软海绵酸对 FL 细胞 DNA 的损伤及凋亡相关蛋白表达的影响[J]. *水生生物学报*, 2007, 31(5): 661-665.
- [10] REBOREDA A, LAGO J, CHAPELA M J, et al. Decrease of marine toxin content in bivalves by industrial processes[J]. *Toxicol*, 2010, 55(2-3): 235-243.
- [11] 位正鹏,步营,于玲,等. 电离辐射对腹泻性贝毒和麻痹性贝毒降解的研究[J]. *水产科技情报*, 2010, 37(3): 139-143.
- [12] MATSUURA S, KITA H, TAKAGAKI Y. Specificity of mouse monoclonal anti-okadaic antibodies to okadaic acid and its analogs among diarrhetic shellfish toxins [J]. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 1994, 58(8): 1471-1475.
- [13] 张和平,岳喜庆,冯巧萍,等. 饱和硫酸铵法提取血清中 IgG 最佳条件的研究[J]. *中国乳品工业*, 2006, 34(1): 4-8.
- [14] 胡晓苗,余为一,张丹俊. 犬血清 IgG 的纯化、抗体制备及其鉴定[J]. *安徽农业科学*, 2008, 36(21): 8940-9078.
- [15] 朱卫华,赵志敏,郭昕,等. 基于血清紫外-可见吸

- 收光谱的胆固醇含量研究[J]. 光谱学与光谱分析, 2009, 29(4): 1004-1007.
- [16] 沈星灿, 刘新艳, 梁宏, 等. 牛血红蛋白与银纳米粒子相互作用的光谱研究[J]. 化学学报, 2006, 64(6): 469-474.
- [17] 赵晓芳, 计融. 国内外腹泻性贝类毒素管理控制措施的对比分析[J]. 中国热带医学, 2006, 6(2): 350-354.
- [18] CAMPAS M, IGLESIA P D L, BERRE M L, *et al.* Enzymatic recycling-based amperometric immunosensor for the ultrasensitive detection of okadaic acid in shellfish[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2008, 24(4): 716-722.
- [19] 卢士英, 周玉, 李岩松, 等. 大田软海绵酸单克隆抗体 ELISA 检测方法的建立[J]. 中国兽医学报, 2007, 27(3): 336-339.
- [20] 刘仁沿, 陈冰君, 梁玉波, 等. 腹泻性贝毒软海绵酸单克隆抗体的制备和酶联免疫检测方法的建立[J]. 卫生研究, 2008, 37(4): 443-445.

· 会议信息 ·

“十一五”渔业科技成果展示与交流活动

中华人民共和国农业部与福建省人民政府将于2011年9月15-18日共同主办海峡(福州)渔业周。作为渔业周活动的主要内容之一,农业部渔业局决定与福州市人民政府和福建省海洋与渔业厅共同举办“中国渔业科技创新成果展示与交流活动”。

此项活动旨在全国范围内集中宣传、展示“十一五”水产科技工作成就,推广“十一五”水产科技成果,全面提升产业素质,促进渔业又好又快发展。请各有关单位积极报名参展、参会。

一、活动主题

“创新渔业科技,推动产业转型”。

二、活动主要内容

- (一) 举办水产科技创新成果展示。
- (二) 编辑出版《科技创新与发展成就》图册。
- (三) 举办渔业科技创新与产业发展讲座。

三、活动组织

主办单位: 中华人民共和国农业部, 福建省人民政府

承办单位: 中华人民共和国农业部渔业局, 中国水产学会, 福建省海洋与渔业厅, 福州市人民政府

协办单位: 中国水产科学研究院, 全国水产技术推广总站

四、时间、地点

时间: 2011年9月15-18日

地点: 中国·福州海峡国际会展中心(福建省福州市仓山区城门镇 086-591-88039800)

五、参展参会范围:

各省(区、市)渔业主管部门。从事渔业行业研究工作的相关科研院所和大专院校。有关渔业企业,包括水产养殖、加工及设备制造企业,渔业饲料及渔药企业。港澳台水产相关企业。国外水产相关企业。

活动秘书处: 杨清源 邹强军

联系电话: 010-59199610

2011年7月5日

Synthesis of artificial antigen and preparation of polyclonal antibody against okadaic acid

WANG Li, SANG Ya-xin, ZHOU Qun-biao, WANG Xiang-hong*

(*Hebei Research Center of Primary Products Processing Technology, College of Food Science & Technology, Agricultural University of Hebei, Baoding 071001, China*)

Abstract: Okadaic acid (OA) is one kind of lipophilic marine biotoxins, and main pathogenic factor of diarrheic shellfish poisoning (DSP). In this paper, the artificial antigen was made by coupling hapten of OA with keyhole limpet hemocyanin (KLH) using active ester method, and the artificial antigen was tested by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and IR spectrum. After being obtained from rabbits, the antiserum was purified by Chromatography on Protein A Sepharose CL-4B gel column, and the purification efficiency was verified by ultraviolet scanning and ciELISA. The results showed the artificial antigen was prepared successfully and lots of interfering substances were removed. After being purified, the concentration of antiserum was 2.16 mg/mL, it had high titer (12 800) and sensitivity (the value of IC_{15} was 3.41 ng/mL), which was tested by ciELISA. The success of obtaining polyclonal antibody against OA with high titer and affinity provides the solid foundation which is practical and theoretical for developing rapid and economical detections.

Key words: okadaic acid (OA); antigen synthesis; IR characterization; antibody purification

Corresponding author: WANG Xiang-hong. E-mail: wangxianghong@hebau.edu.cn