

企鹅珍珠贝镉金属硫蛋白的分离纯化及其多克隆抗体的制备

吴晓萍¹, 廖爱琳¹, 章超桦^{1*}, 廖艳², 卢虹玉¹, 杨捷²

(1. 广东海洋大学食品科技学院, 广东 湛江 524025;

2. 广东海洋大学现代生化中心, 广东 湛江 524088)

摘要: 镉—金属硫蛋白(Cd-MT)是水生环境中重金属镉污染的重要生物标志物,对该蛋白的研究不仅有利于Cd-MT免疫学检测方法的建立,也为水生环境重金属污染监测技术的开发提供理论依据。采用不同浓度CdCl₂(0~0.8 mg/L)胁迫诱导企鹅珍珠贝合成Cd-MT,通过组织捣碎、冷冻离心、热处理、Sephadex G-50凝胶柱层析等方法从企鹅珍珠贝全脏器中纯化得到Cd-MT。紫外吸收显示,在CdCl₂浓度为0.8 mg/L时,MT粗提液中的Cd-MT特征吸收最大,表明贝体内的Cd-MT含量随着CdCl₂胁迫浓度的增大而增加。SDS-PAGE显示纯化后的Cd-MT及其二聚体分子量约为9 ku和18 ku。采用戊二醛法将获得的Cd-MT与牛血清白蛋白(BSA)偶联后免疫家兔,制备了兔抗企鹅珍珠贝Cd-MT多克隆抗血清。通过间接ELISA法检测其抗血清效价为1:12 800。经饱和硫酸铵法和DEAE-Sephadex A50亲和层析纯化得到分子量约为35 ku的高纯度免疫球蛋白G(IgG)。ELISA免疫鉴定显示,该IgG不仅能识别企鹅珍珠贝的Cd-MT,还与马氏珠母贝的Cd-MT有明显的免疫交叉反应。

关键词: 企鹅珍珠贝; 镉金属硫蛋白; 多克隆抗体

中图分类号: S 917; Q 955

文献标志码: A

随着工业的发展,大量的重金属以多种方式进入海洋,由此造成水环境中的重金属含量不断增加。重金属镉是主要的海洋污染物之一,由于水生生物对镉的富集能力极强,水中的镉通过食物链富集后可在其体内达到相当高的浓度^[1-3]。贝类是滤食性的底栖生物,它生活在沉积物与水体的界面,体内的重金属和一些化学物质的含量,与周围水生环境污染程度密切相关,能够真实反映环境的污染状况,因而成为重要的海洋污染监测生物^[4]。

金属硫蛋白(metallothioneins, MTs)是一类广泛存在于生物体内的低分子量、富含金属和半胱氨酸,能被金属或其他因素诱导生成的金属结合蛋白^[5],它参与生物机体微量元素的储存、运输和代谢、重金属的解毒等生理活动^[6]。由于金属和MT结合,使得MT具有特征光谱,如Cd-MT特征吸收峰为254 nm, Zn-MT为220 nm, Cu-

MT为270 nm^[7]。MT很容易被Cd、Zn、Cu等重金属诱导合成,研究表明水生生物体内MT含量与水生环境中的重金属含量成正相关,能够间接反应环境的重金属污染情况,因而,MT可作为水生环境重金属污染的生物标志物^[8],在环境保护领域内被大量地研究,常用的检测方法包括血红蛋白亲和层析法、银饱和法、银染法和ELISA检测法等^[9],其中ELISA检测法因其操作简单快速而受到众多研究者的青睐。

目前对MTs的研究主要集中在哺乳动物和植物上,对于海洋动物如贝类的研究相对较少。作为一个贝类生产和消费大国,在如今海洋环境污染日益严重的情况下,研究简单快速的贝类重金属检测方法具有十分重要的意义。企鹅珍珠贝(*Pteria penguin*)分布于热带、亚热带海区,属于大型海产珍珠贝类,具有生长速度快,对环境适应能力强,成活率高等特点^[10],常年吊养在海面与

收稿日期:2011-03-08 修回日期:2011-04-27

资助项目:现代农业产业技术体系(CARS-48-07B);广东省科技厅农业攻关项目(2010B020313005);广东海洋大学自然科学基金(2010)

通讯作者:章超桦, Tel:0759-2383063, E-mail: zhangch@gdou.edu.cn

沉积物之间,其组织中的 MT 含量可以作为一种监测水体重金属暴露的生物标志物。本研究以企鹅珍珠贝为研究对象,旨在从贝全脏器中分离提纯 Cd-MT,制备兔抗企鹅珍珠贝 Cd-MT 多克隆抗体,同时对多克隆抗体的相关性质进行了试验验证,为下一步建立企鹅珍珠贝 Cd-MT 间接 ELISA 检测方法以及开发贝类 Cd-MT 检测试剂盒提供技术和理论支持。

1 材料与方 法

1.1 材 料

实验材料 企鹅珍珠贝、马氏珠母贝购于广东省徐闻县芳华珍珠养殖场,贝龄 2.5 龄;家兔,购于广东医学院动物中心。

试剂 弗氏完全佐剂,弗氏不完全佐剂,三(羟甲基)氨基甲烷(Tris)购自北京鼎国生物技术有限公司;牛血清白蛋白(BSA)、3,3',5,5'-四甲基联苯胺盐酸盐(TMB·2HCl)购自广州市齐云生物技术有限公司;辣根过氧化物酶标记羊抗兔 IgG 购自北京博奥森生物技术有限公司;其他化学试剂均为国产分析纯。

仪器 可拆 96 孔酶标板(丹麦 NUNC 公司);MK3 多功能酶标仪(美国 Thermo 公司);ALPHA1-2 LD 冷冻干燥机(德国 Christ 公司);U-3310 型紫外分光光度计、Z-5000 原子吸收光谱和 CR-22G 型高速冷冻离心机(均为日本日立公司)。

1.2 方 法

企鹅珍珠贝 Cd-MT 的诱导及分离纯化 将企鹅珍珠贝分成 4 组吊养在广东湛江徐闻岸华珍珠养殖场,对 3 组企鹅珍珠贝分别注射浓度为 0.8、0.6、0.4 mg/L 的 CdCl₂,连续注射 7 d。第 4 组作为对照组,不注射,吊养在同一海域。注射结束后继续吊养一周。

取出企鹅珍珠贝全脏器,清洗,剪碎,加入两倍体积经 4 °C 预冷的 0.01 mol/L pH 8.6 的 Tris-HCl 缓冲液匀浆,4 °C 静置过夜。取匀浆液于 4 °C,10 000 r/min 离心 20 min,取上清液在 80 °C 的水浴中热处理 5 min,冷却,同上条件离心,弃沉淀,上清即为 MT 粗提液。粗提液上 Sephadex G-50 柱(2.6 cm×80 cm),用 0.01 mol/L pH 8.6 的 Tris 缓冲液以 1 mL/min 的流速洗脱,每管收集 8 mL,在 200~300 nm 波长范围对各管层析液进行

紫外扫描并用石墨炉原子吸收测定每管镉浓度。收集 A_{254nm} 大于 3 倍 A_{280nm} 且镉浓度高的层析液作为 Cd-MT 提取液,冻干,-20 °C 保存。将纯化好的 Cd-MT 用分离胶为 15%,浓缩胶为 5% 的聚丙烯酰胺不连续凝胶电泳(SDS-PAGE)鉴定纯度^[11]。

Cd-MT 的偶联 用戊二醛法偶联 Cd-MT 和 BSA。取 3 mg 提纯的 Cd-MT、6 mg BSA,用 2 mL PBS 溶解(0.1 mol/L,pH 7.0),在振荡下逐滴加入 1 mL 1% 的戊二醛,室温下持续振荡 2 h,4 °C 冰箱放置过夜。用 PBS(0.01 mol/L,pH 7.4)透析除去未交联的戊二醛。采用紫外扫描和 SDS-PAGE 鉴定偶联效果。

兔抗企鹅珍珠贝 Cd-MT 多克隆抗血清的制备和纯化 选用两只 2~2.5 kg 的雄性家兔作为诱导动物。将 Cd-MT-BSA 用生理盐水稀释到适当浓度。第一次基础免疫用浓度为 400 μg/mL Cd-MT-BSA 和等体积弗氏完全佐剂混匀,对家兔大腿内侧和背部多点皮下注射,每点约 0.1 mL,每只家兔共注射 1 mL。每隔 10 天加强免疫,用 Cd-MT-BSA 与等体积弗氏不完全佐剂混匀,注射浓度每次递增 20 μg/mL。第 4 次注射 7 d 后耳静脉采血,测抗血清效价。当抗体效价达 10 000 以上后,对家兔进行心脏取血,全血室温静置 1 h 后,4 °C 静置过夜使血清充分析出,然后于 4 000 r/min 离心 10 min,取上清,-20 °C 保存备用。

按文献[12]的间接非竞争 ELISA 法测定免疫期间抗血清效价。将阴性对照 OD₄₅₀ 值记为 N,阳性 OD₄₅₀ 记为 P,计算阳性结果(P)与阴性结果(N)的比值,当 P/N > 2 且 P - N > 0.2 时判为阳性,取判定结果为阳性时抗血清的最大稀释倍数为抗血清效价。

将上述中获得的兔抗企鹅珍珠贝 Cd-MT 多克隆抗血清分别用 50%、33%、33% 的饱和硫酸铵法提纯 3 次,沉淀用尽量少的生理盐水溶解,再用 PBS(0.01 mol/L,pH 7.4)透析 2~3 次脱盐。参照文献[13]将饱和硫酸铵所得粗提抗体经 DEAE-Sephadex A50 亲和层析柱(1.0 cm×30 cm)纯化,以 SDS-PAGE 鉴定纯化免疫球蛋白 G(immunoglobulin G,IgG)。

多克隆抗体特异性检测 采用间接非竞争 ELISA 法^[12] 鉴定兔抗企鹅珍珠贝 Cd-MT

IgG 的特异性。用浓度为 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 IgG 分别与包被浓度为 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 BSA、企鹅珍珠贝 Cd-MT、马氏珠母贝 (*Pinctada martensi*) Cd-MT (与企鹅珍珠贝 Cd-MT 的提取纯化方法相同) 进行交叉反应鉴定抗体的特异性。每个样品做 3 个平行,统计其平均值(\bar{X})和方差(SD),数据用 $\bar{X} \pm \text{SD}$ 表示。当 $P/N > 2$ 且 $P - N > 0.2$ 时判为阳性。

2 结果与分析

2.1 企鹅珍珠贝 Cd-MT 的诱导及分离纯化

企鹅珍珠贝 Cd-MT 的纯化 将企鹅珍珠贝 MT 粗提液经 Sephadex G-50 凝胶过滤柱层析分离,在 20~30 和 45~70 管处形成两个蛋白洗脱峰(图 1)。经紫外扫描,第一个蛋白洗脱峰在 254 nm 和 280 nm 处均有较强吸收值,同时镉浓度也较大。根据 MT 在 280 nm 处无酪氨酸和色氨酸等芳香族氨基酸的特征吸收,推测第一个洗脱峰不是 MT 洗脱峰。第二个蛋白洗脱峰中 58~63 管的 $A_{254\text{nm}}$ 大于三倍 $A_{280\text{nm}}$ 且镉浓度大,收集其作为 Cd-MT 提取液。

企鹅珍珠贝 Cd-MT 的诱导 不同剂量 CdCl_2 对企鹅珍珠贝 Cd-MT 的诱导效果见图 2。随着 CdCl_2 胁迫浓度的增高,Cd-MT 提取液在 Cd-MT 特征吸收 254 nm 处吸收值也增大, CdCl_2 诱导浓度为 0.8 mg/mL 的企鹅珍珠贝 Cd-MT 提取液在 254 nm 处的吸光度达 1.78,是对照组的两倍多。结果表明 CdCl_2 可以诱导企鹅珍珠贝体内合成 Cd-MT,在 CdCl_2 的诱导浓度范围内,贝体内的 Cd-MT 含量随着 Cd^{2+} 诱导浓度的增大而增加。这与在牡蛎 (*Crassostrea gigas*)^[14]、贻贝 (*Mytilus glloprovincialis*)^[15-16] 和华溪蟹 (*Sinopotamon henanense*)^[17-19] 中的研究结果基本一致,进一步表明环境中的金属离子会通过其体表吸附和透过体表吸收在贝体内大量的积累^[20],从而诱导体内大量合成 MT,因而贝体内的 Cd-MT 含量与环境中的重金属浓度有着显著的相关性,可以反映其水生环境中的镉的污染程度。

Cd-MT Sephadex G-50 柱层析纯化的电泳分析 将纯化好的 Cd-MT 提取液冷冻浓缩,用 SDS-PAGE 鉴定其纯度。企鹅珍珠贝 Cd-MT 在电泳图中呈现两条明显的条带(图 4 中的 4

和 5 泳道),经计算对应的分子量分别为 9 ku 和 18 ku。依据 MT 的分子量一般 $< 10 \text{ ku}$ ^[21] 且在溶液状态极易聚合^[22],推测企鹅珍珠贝 Cd-MT 的分子量为 9 ku,18 ku 的条带为 Cd-MT 二聚体。这与 LEMOINE 等^[23]用 CdCl_2 诱导紫贻贝 (*Mytilus edulis*),产生 MT (10 ku) 和 MT (20 ku) 两种蛋白同形体的结果类似。上述结果表明本实验制备的 Cd-MT 纯度满足抗体制备的要求^[24]。

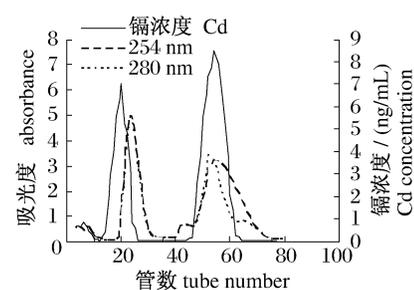


图 1 MT 粗提液 Sephadex G-50 柱层析图
Fig. 1 Chromatography of MT coarse extracting liquid on Sephadex G-50 gel filtration column

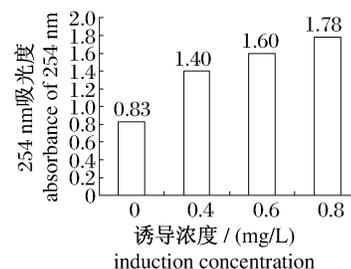


图 2 Cd-MT 的诱导效果
Fig. 2 The induction effect of Cd-MT

2.2 Cd-MT 的偶联

用戊二醛法偶联 Cd-MT 和 BSA 得到偶联物 (Cd-MT-BSA)。紫外扫描(图 3)显示 Cd-MT 在 254 nm 处有 Cd-MT 特征吸收,在 206 nm 处形成肽键吸收峰。Cd-MT-BSA 在 254 nm 处的特征吸收值有所降低,但保留了 206 nm 的吸收峰。BSA 在 254 nm 几乎不产生吸收,并且在紫外扫描范围内未形成吸收峰。

SDS-PAGE 图(图 4)显示 Cd-MT-BSA 有两个条带,经计算分子量分别为 105 ku、71 ku,推测为 Cd-MT 单体、二聚体与 BSA 的偶联物。实验结果表明此次偶联成功,具有引起免疫应答的能力^[24]。

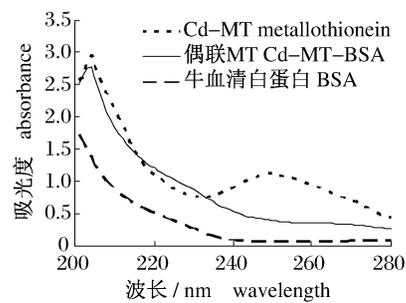


图3 紫外吸收光谱

Cd-MT 浓度:34.8 ng/mL; Cd-MT-BSA 浓度:8.4 μ g/mL;
BSA 浓度:50 μ g/mL。

Fig. 3 UV absorbance spectrum

concentration of Cd-MT:34.8 ng/mL; concentration of Cd-MT-BSA:8.4 μ g/mL; concentration of BSA:50 μ g/mL.

2.3 兔抗企鹅珍珠贝 Cd-MT 抗血清的制备及纯化
利用制备的 Cd-MT-BSA 为抗原免疫家兔,获得了高滴度抗血清。采用 ELISA 方法检测免

疫期间抗血清效价。当第 11 次加强免疫后 2 号家兔的抗血清效价达到 1:12 800(表 1)。

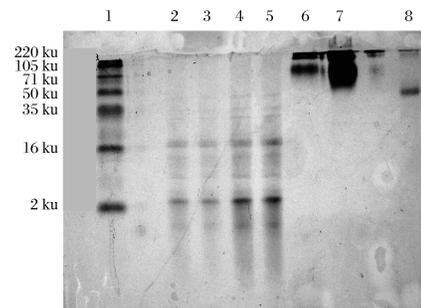


图4 Cd-MT 与 Cd-MT-BSA 的 SDS-PAGE 分析

1. 标准蛋白; 2~3. 马氏珠母贝 Cd-MT; 4~5. 企鹅珍珠贝 Cd-MT; 6. 马氏珠母贝 Cd-MT-BSA; 7. 企鹅珍珠贝 Cd-MT-BSA; 8. BSA。

Fig. 4 SDS-PAGE analysis of Cd-MT and Cd-MT-BSA

1. protein marker; 2-3. Cd-MT of *Pinctada martensi*; 4-5. Cd-MT of *Pteria penguin*; 6. Cd-MT-BSA of *P. martensi*; 7. Cd-MT-BSA of *P. penguin*; 8. BSA.

表 1 加强免疫期间抗血清效价

Tab. 1 Titers of antiserum of different durations of strengthening immunization

组号 group number	第 6 次 6th	第 7 次 7th	第 8 次 8th	第 9 次 9th	第 10 次 10th	第 11 次 11th
1	1:200	1:400	1:800	1:1 600	1:3 200	1:6 400
2	1:400	1:800	1:1 600	1:3 200	1:6 400	1:12 800

用硫酸铵盐析和 DEAE-Sephadex A50 亲和层析柱纯化抗血清,以 PBS(0.01 mol/L, pH 7.4)洗脱,收集 7~10 管($A_{260nm} : A_{280nm}$ 值小于 0.6)的洗脱液为纯化的 IgG(图 5)。纯化抗体的 SDS-PAGE 分析结果(图 6 的 5 和 6 泳道)表明,经纯化得到分子量为 35 ku 的高纯度 IgG。

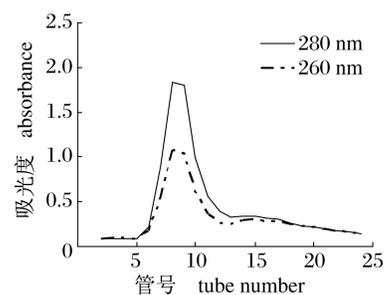


图5 兔抗企鹅珍珠贝 Cd-MT 抗体 DEAE-Sephadex A50 柱层析图
Fig. 5 Chromatography of rabbit anti-*Pteria penguin* Cd-MT antibody on DEAE-Sephadex A50

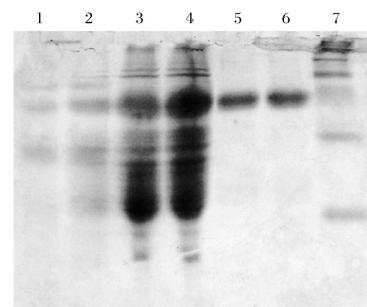


图6 抗血清蛋白 SDS-PAGE 分析

1~2. 抗血清; 3~4. 饱和硫酸铵粗提抗体; 5~6. 纯化 IgG; 7. 蛋白质 Marker。

Fig. 6 SDS-PAGE analysis of antiserum protein

1-2. antiserum; 3-4. globulin obtained by saturation ammonium sulfate; 5-6. purified IgG; 7. protein marker.

2.4 Cd-MT 多克隆抗体特异性

采用纯化的兔抗企鹅珍珠贝 Cd-MT 多克隆抗体检测不同贝类之间的免疫交叉性。结果显示(表 2),抗体能特异性识别企鹅珍珠贝 Cd-MT,并与马氏珠母贝 Cd-MT 有较强的免疫交叉反应,而与 BSA 无交叉反应。马氏珠母贝、企鹅珍珠贝

Cd-MT 的 SDS-PAGE 分析(图 4)也表明它们具有相同的分子量。实验结果提示,马氏珠母贝与企鹅珍珠贝虽然不同目,但同属于珍珠贝科,其 Cd-MT 具有相同的免疫原性。

表 2 间接 ELISA 法检测多克隆抗体的特异性
Tab. 2 The result of indirect ELISA cross reaction

	企鹅珍珠贝 Cd-MT Cd-MT of <i>P. penguin</i>	马氏珠母贝 Cd-MT Cd-MT of <i>P. martensi</i>	牛血清 白蛋白 BSA
P	0.979 ± 0.022	0.846 ± 0.039	0.247 ± 0.032
N	0.177 ± 0.026	0.197 ± 0.057	0.203 ± 0.051
P/N	5.531	4.294	1.245
P-N	0.802	0.649	0.044
判断 decision	+	+	-

3 讨论

3.1 企鹅珍珠贝 Cd-MT 多克隆抗体的制备

目前用免疫学方法检测动物金属硫蛋白的研究较多,多数是从哺乳动物体内提取 MT 作为抗原,经免疫家兔或大鼠制备多克隆抗体,再用于检测哺乳动物、水生动植物等体内的 MT 含量,而用从贝类中提取 MT,制备抗体的研究还鲜有报道。

MARGARITA 等^[25]用戊二醛将鼠肝 MT₁ 和 MT₂ 混合物与溶解酵素偶联后作为抗原免疫新西兰雄兔,得到效价达 1:10 000 的多克隆抗血清。金慧英等^[26]通过 CdCl₂ 诱导大鼠肝组织产生 Cd-MT,用戊二醛将 Cd-MT 分子间聚合,并用 1~2 mg 的剂量诱导家兔,两个多月后获得效价达 1:32 的抗血清。王廷璞等^[27]用 CdCl₂ 诱导黄瓜产生 Cd-MT,并用 BSA 与 MT 分子偶联以及 MT 分子间偶联相结合的方法免疫家兔,仅一个多月就获得了 1:16 的高效价兔抗黄瓜 Cd-MT 多克隆抗血清。由于 MT 是小分子蛋白,其免疫原性弱,上述研究都通过将 MT 与蛋白质类载体偶联的方式,增强其免疫原性。此外,获得高效价的多克隆抗血清与免疫剂量、免疫方式和免疫时间间隔等因素都有很大的关系。本研究通过 CdCl₂ 诱导企鹅珍珠贝产生 Cd-MT,经提取纯化得到了 Cd-MT 单体(9 ku)和其二聚体(18 ku),采用戊二醛法将提纯 Cd-MT 与 BSA 偶联,获得 Cd-MT 单体、二聚体与 BSA 的偶联物的混合物,并以此免疫家兔,获得兔抗企鹅珍珠贝 Cd-MT 多克隆抗体。本实验抗体的诱导周期较长,可能是初次注射剂

过小(0.2 mg),在第 6 次注射后抗血清效价仍较低,于是后期把注射浓度增加到 0.5 mg/mL,并在以后的加强免疫过程中每次增加 0.1 mg 的注射剂量,增大注射剂量后的一个多月获得效价为 1:12 800 的抗血清。

3.2 企鹅珍珠贝 Cd-MT 多克隆抗体的纯化

抗体有 IgM、IgG、IgA 等,其中 IgG 是存在于血液、淋巴、腹腔及脑脊液中的主要免疫球蛋白,高亲和力和 IgG 的存在是再次体液免疫应答的一个标志^[24]。多克隆免疫血清中抗体外的其他血清成分可能会对试验结果产生假阳性或增大交叉反应的影响,因而要对抗血清中的 IgG 进行纯化。一般采用沉淀法对抗体进行粗提,再通过凝胶过滤、离子交换层析和亲和层析对 IgG 进一步纯化。ANASRI 等^[28]将蛋白 A 交联到 Sepharose 凝胶上,制备了蛋白 A Sepharose 亲和层析柱,并采用此层析柱从兔血清中提纯了 IgG。邢小红等^[29]用制备的大肠杆菌全菌蛋白通过非特异性去除法纯化了兔抗 hBit(人大肠杆菌中表达的人 Bit 蛋白)抗体,Western-blotting 分析结果表明,非特异性去除法纯化后的抗血清的印迹结果中非特异的显色条带明显减少。钱垂文等^[30]采用辛酸-硫酸铵沉淀进行粗纯,以及 DEAE 离子交换层析精纯的方法提纯了兔抗 SARS 冠状病毒的 IgG,SDS-PAGE 结果表明纯化后的 IgG 相对纯度达到 90% 以上。本研究根据血清中 IgG 属于中性蛋白(等电点 pI 为 6.85~7.50),在 pH 7.2~7.4 的环境中不被 DEAE-Sephadex A50 吸附而其他的酸性蛋白均被吸附的原理^[13],通过 DEAE-Sephadex A50 柱层析获得了较纯的 IgG。在抗血清的制备过程中,若操作不当会使出现溶血现象,致使抗血清的采集失败,本研究通过饱和硫酸铵和 DEAE-Sephadex A50 柱层析相结合的纯化方式从溶血血清中提纯了 IgG,经 ELISA 测定,所提纯的 IgG 和正常抗血清中提纯的 IgG 具有相同的效价,这为抗血清制备过程中出现溶血问题提供了一种解决方法。

3.3 企鹅珍珠贝 Cd-MT 多克隆抗体的特异性

MARGARITA 等^[25]所制备的鼠肝 MT 抗血清与猪肝 MT 和人血清 MT 都具有较好的交叉反应,其中人血清 MT 的添加回收率达到 89%,表明哺乳动物的 MT 都具有相似的初级结构和抗原决定簇。王廷璞等^[27]的研究表明镉-金属硫蛋

白在免疫反应上有高度保守性,其所制备的兔抗黄瓜 Cd-MT 多克隆抗体与百合 Cd-MT、牛蛙 Cd-MT 均有完全交叉反应。KATSUYKI 等^[31]发现鼠 MT₂的 NH₂末端乙酰化的 7 个氨基酸巯基与哺乳动物中的 MT₁和 MT₂相同,用鼠 MT₂制备的抗血清建立的 ELISA 可用于检测人和其他哺乳动物体内的 MT₁和 MT₂的总浓度。汪宁等^[32]制备的鼠抗鲢过敏原小清蛋白能特异地检测 4 种鱼(鲤、鲢、鲫、黄鳍鲷)中的小清蛋白。企鹅珍珠贝和马氏珠母贝是同属于珍珠贝科不同属的两种贝类,本研究制备的兔抗企鹅珍珠贝 Cd-MT 多克隆抗体与马氏珠母贝 Cd-MT 具有较好的免疫交叉反应,且这两种贝 Cd-MT 也具有相同的分子量(图 4),提示这两种贝类体内的 Cd-MT 可能具有相同的免疫原性,可用抗企鹅珍珠贝 Cd-MT 多克隆抗体检测马氏珠母贝体内的 Cd-MT 含量,进一步证明 Cd-MT 在免疫反应上有高度保守性。

参考文献:

- [1] 李磊,袁骐,平先隐,等. 东海沿岸海域牡蛎体内的重金属含量及其污染评价[J]. 海洋通报,2010,29(6):678-684.
- [2] 马元庆,张秀珍,孙玉增,等. 栉孔扇贝对重金属的富集效应研究[J]. 水产学报,2010,34(10):1572-1576.
- [3] 李学鹏,段青源,励建荣. 我国贝类产品中重金属镉的危害及污染分析[J]. 食品科学,2010,31(17):457-461.
- [4] 翁焕新. 重金属在牡蛎(*Crassostrea virginica*)中的生物积累及其影响因素的研究[J]. 环境科学学报,1996,16(1):51-58.
- [5] DZIEQIEL P, JELEŃ M, MUSZCZYŃSKA B, et al. Role of metallothionein expression in non-small cell lung carcinomas [J]. Roczniki Akademii Medycznej Białymstoku, 2004, 49 (Suppl): 43-45.
- [6] CARSTEN S, DETMAR B. Transient peaks in zinc and metallothionein levels during differentiation of 3T3L1 cells [J]. Archives of Biochemistry and Biophysics, 1999, 364(1):91-98.
- [7] 张艳,杨传平. 金属硫蛋白的研究进展[J]. 分子植物育种,2006,4,(S1):73-78.
- [8] OLIVIER P, YVES C, BERNADETTE P, et al. Long-term trends in accumulated metals (Cd, Cu and Zn) and metallothionein in bivalves from lakes within a smelter-impacted region [J]. Science of the Total Environment, 2006, 369:403-418.
- [9] 李婧. 金属硫蛋白检测方法的研究进展[J]. 现代检验医学杂志,2004,19(3):64-65.
- [10] 梁飞龙,邓陈茂,符绍,等. 企鹅珍珠贝游离珠培养技术的初步研究[J]. 海洋通报,2008,27(2):91-94.
- [11] 黎燕,冯健男,张纪岩. 分子免疫学实验指南[M]. 北京:化学工业出版社,2008:5-7.
- [12] 李少南,谢显传,谭亚军,等. 麦穗鱼脑 AChE 间接非竞争 ELISA 定量分析法的建立[J]. 农药学报,2003,5(3):71-75.
- [13] 吴力专. Zn-金属硫蛋白间接竞争型 ELISA 的建立与应用[D]. 长沙:湖南农业大学,2004.
- [14] YONG K C, PIL G J, CHEOL Y C. Cadmium affects the expression of heat shock protein 90 and metallothionein mRNA in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* [J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part C, 2008, 147(3):286-292.
- [15] BEBIANNO M J, LANGSTON W J. Cadmium induction of metallothionein synthesis in *Mytilus galloprovincialis* [J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part C, 1992, 103(1):79-85.
- [16] IVANKOVIC D, PAVICIC J, ERK M, et al. Evaluation of the *Mytilus galloprovincialis* Lam. digestive gland metallothionein as a biomarker in a long-term field study: seasonal and spatial variability [J]. Marine Pollution Bulletin, 2005, 50(11):1303-1313.
- [17] 马文丽,王兰,何永古,等. 镉诱导华溪蟹不同组织金属硫蛋白表达及镉蓄积的研究[J]. 环境科学学报,2008,28(6):1192-1197.
- [18] WANG L, YAN B, LIU N, et al. Effects of cadmium on glutathione synthesis in the hepatopancreas of freshwater crab, *Sinopotamon yangtsekiense* [J]. Chemosphere, 2008, 74(1):51-56.
- [19] MA W L, WANG L, HE Y J, et al. Tissue-specific cadmium and metallothionein levels in freshwater crab *Sinopotamon henanense* during acute exposure to waterborne cadmium [J]. Environmental Toxicology, 2008, 23(3):393-400.
- [20] 励建荣,李学鹏,王丽,等. 贝类对重金属的吸收转运与积累规律研究[J]. 水产科学,2007(1):51-55.
- [21] GRUMIAUX F, BULET P, SALZET M, et al. Isolation and structural characterization of hepatic metallothionein from the roach (*Rutilus rutilus* L.) [J]. Fish Physiology and Biochemistry, 1998, 19:279-286.

- [22] 侯廷军,安钰,茹炳根,等. 三种金属硫蛋白动力学稳定性的理论研究[J]. 物理化学学报, 2000, 16(3):41-46.
- [23] LEMOINE S, BIGOT Y, SELLOS D, *et al.* Metallothionein isoforms in *Mytilus edulis* (Mollusca, Bivalvia): Complementary DNA characterization and quantification of expression in different organs after exposure to cadmium, zinc, and copper [J]. *Marine Biotechnology*, 2000 (2): 195-203.
- [24] 王廷华,李官成. 抗体理论与技术[M]. 北京:科学出版社,2009.
- [25] MARGARITA A, CHOUDOMIR N, MILENA K, *et al.* New competitive enzyme-linked immunosorbent assay for determination of metallothionein in tissue and sera [J]. *Talanta*, 1998 (46):325-333.
- [26] 金慧英,魏尧梅,胡惠民,等. 镉—金属硫蛋白的抗体制备及酶联免疫吸附法测定[J]. 中国公共卫生, 1998, 14(2):103-104.
- [27] 王延璞,安建平,邹亚丽,等. 镉诱导黄瓜金属硫蛋白抗体的制备及纯化[J]. 生态学杂志, 2008, 27(9):1592-1595.
- [28] ANSARI A A, CHANG T S. Immunochemical studies to purify rabbit and chicken immunoglobulin G antibody by protein A-Sepharose chromatography [J]. *American Journal of Veterinary Research*, 1998, 44(5):901-906.
- [29] 邢小红,吴元明,黄高昇. 兔抗人 Bit 1 抗血清的制备及其纯化[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2004, 20(6):764-765.
- [30] 钱垂文,王一飞,陆家海,等. 兔抗 SARS 冠状病毒 IgG 的纯化及鉴定[J]. 暨南大学学报:医学版, 2005, 26(4):535-537.
- [31] KATSUYUKI N, TSUKASA K, MIHOKO K, *et al.* Development of an enzyme-linked immunosorbent assay for metallothionein- I and- II in plasma of humans and experimental animals [J]. *Clinica Chimica Acta*, 2010(411):758-761.
- [32] 汪宁,蔡秋凤,刘光明,等. 鲢骨骼肌过敏原小清蛋白的分离纯化及多克隆抗体制备与应用[J]. 水产学报, 2010, 34(1):41-46.

Purification and polyclonal antibody preparation of Cd-MT from *Pteria penguin*

WU Xiao-ping¹, LIAO Ai-lin¹, ZHANG Chao-hua^{1*}, LIAO Yan², LU Hong-yu, YANG Jie²

(1. College of Food Science and Technology, Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524025, China;

2. Modern Bio-Chemical Laboratory Center, Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524088, China)

Abstract: Heavy metals in three wastes are discharged into water by a variety of means with the industry development such as mine, smelting and electroplating, which lead to pollution of aquatic environments and threaten human health and biological survival seriously. Cadmium (Cd) is one of the main marine pollutants. As Cd can accumulate in different tissues of shellfish through food chains, which threaten the quality and safety of shellfish foods, it is extremely necessary to research and monitor conditions of shellfish contamination with Cd. Cadmium-metallothioneins (Cd-MTs) are important biomarker used for indicating cadmium pollution in aquatic environment. The research on these Cd-MTs not only is propitious to establish Cd-MT immunoassay method, but also provides the theoretical basis for technology development in monitoring heavy metal pollution. Cd-MT was induced to synthesize by injecting different concentrations of CdCl₂ (0–0.8 mg/L) in *Pteria penguin* and was isolated and purified from whole tissues of *P. penguin* by tissue homogenization, freezing centrifugation, heat treatment and Sephadex G-50 gel column chromatography. The characteristic absorption of Cd-MT in crude extract by ultraviolet spectrophotometry was the strongest at 0.8 mg/L Cd²⁺. The results showed that the content of Cd-MT in *P. penguin* increased with concentration of Cd²⁺. The results from SDS-PAGE assay showed that molecular weight of purified Cd-MT and its dimer were 9 ku and 18 ku respectively. Then Cd-MT was coupled to bovine serum albumin (BSA) with glutaraldehyde and polyclonal antiserum by immunizing rabbits with Cd-MT-BSA was prepared. The titer of antiserum was measured by indirect ELISA assay and reached 1:12 800. IgG (molecular weight is about 35 ku) in the antiserum was obtained by methods including saturated ammonium persulfate precipitation and DEAE-Sephadex A50 column chromatography. ELISA assay showed that the IgG from antiserum could react to Cd-MT of *P. martensi* as well as Cd-MT of *P. penguin*. The study will lay a foundation for establishing an indirect ELISA method of Cd-MT in shellfish and meanwhile, afford technological and theoretical support for exploitation of Cd-MT test kit used in shellfish.

Key words: *Pteria penguin*; Cd-MT; polyclonal antibodies

Corresponding author: ZHANG Chao-hua. E-mail: zhangch@gdou.edu.cn