



## 论文

# 一种用青霉素 G 合成的用于重金属离子免疫检测的人工半抗原青霉烯酸硫醇铜盐的合成与表征

徐武<sup>①</sup>, 谢鹏<sup>①</sup>, 樊柳荫<sup>①</sup>, 曹成喜<sup>①\*</sup>, 奚涛<sup>②</sup>, 周培<sup>②\*</sup><sup>①</sup> 上海交通大学生命科学技术学院, 微生物代谢国家重点实验室, 上海 200240;<sup>②</sup> 上海交通大学农业与生物学院, 上海 200240

\* 联系人, E-mail: cxcao@sjtu.edu.cn; peizhou@sjtu.edu.cn

收稿日期: 2011-03-17; 接受日期: 2011-07-01

国家自然科学基金(批准号: 30821005)和国家高技术研究发展计划(批准号: 2007AA10Z401)资助项目

**摘要** 利用青霉素衍生物合成了一种新型的铜离子半抗原青霉烯酸硫醇铜盐(CMPA). 通过动物免疫实验发现: (1) 新合成的 CMPA 抗原具有很好的稳定性并且对免疫动物无毒害作用, 在实验中也未发生动物中毒现象; (2) 免疫抗原(CMPA-BSA)能够刺激实验动物免疫系统产生效价高达 150000 的特异性抗体; (3) 抗血清中抗体对抗原 OVA-GSH-CuCl 的亲性和性高于 OVA-GSH, 表明抗体对铜离子具有特异亲和力. 上述结果提示, 已成功合成了针对铜离子的半抗原 CMPA 及相关全抗原 CMPA-BSA, 在环境及食品样品方面的铜离子免疫检测方面取得了明显的进步.

**关键词**  
免疫检测  
铜离子  
半抗原  
环境  
食品样品

重金属是一类有毒且能长期存在的污染物, 其以不同水平存在于环境及各种类型的工农业产品中<sup>[1]</sup>. 不同于有机污染物能够完全降解成相关的无害产物, 金属离子仅能通过有限的几种化学和生物自律过程进行转化<sup>[2]</sup>. 更为严重的是, 自然界中的重金属可以通过生物富集作用进入人体并且在机体内长期存在, 这对人类的健康是一个严重的威胁<sup>[3]</sup>. 铜元素是生命活动中某些生物化学反应过程中必需酶类的必要组成成分, 但是和其他重金属元素一样, 在高浓度条件下铜元素也是有毒的<sup>[4,5]</sup>. 所有的这些因素都使得铜离子对环境和人类健康形成了潜在的威胁. 因此, 有必要对环境中的铜和其他重金属离子进行检测和鉴定.

传统的重金属检测技术是仪器分析法, 如原子吸收光谱法(AAS)、电感耦合等离子光谱法(ICP-AES

和 ICP-MS)及电位测定法等. 虽然这些方法能精确检测样品中的重金属含量, 但是它们都需要昂贵的实验设备和集中于相应的实验区域进行检测, 同时样品处理时间也较慢. 而且, 仪器分析法通常无法提供关于金属氧化状态的信息.

在这种情况下, 以抗原-抗体反应的亲和性和特异性为基础的免疫检测技术为金属离子检测提供了一种新的思路. 与传统的仪器检测方法相比, 免疫检测技术具有明显的优势, 如省时、费用低廉、易操作、便于携带及可用于现场检测等, 同时免疫测定技术也具有很好的灵敏度和选择性. 免疫检测最早可追溯到 20 世纪 50 年代, 当时 Yalow 和 Berson<sup>[6]</sup>提出了关于定量免疫学方法发展的研究报告, 根据此法可以从体液中测定皮克级的胰岛素含量. 在随后的时间里, 免疫测定技术在生物、医药、农业和环境科学

领域得到了广泛地应用<sup>[7,8]</sup>. 在重金属离子分析领域, 免疫检测技术也经历了一个漫长的发展过程<sup>[9-14]</sup>. 20世纪80年代, Meares 等人<sup>[15-18]</sup>与 Mukkala 等人<sup>[19]</sup>首次提出了可用于医学诊断放射显影分析的一系列金属-络合物-抗体复合物的合成方法. Blake 等人通过 BALB/c 小鼠的相关抗原免疫实验对针对重金属的单克隆抗体的合成方法进行了系统性的研究, 另外他们还进行了用于金属检测的抗体传感器和相关重金属免疫分析方法构建方面的研究. 目前, 已发表了关于铅、镉、汞、铀和钷的免疫分析技术的报道<sup>[20-26]</sup>.

针对重金属离子的免疫检测方法的构建过程包括: 重金属离子半抗原的设计和合成, 合成重金属离子全抗原, 动物免疫实验, 抗血清检测, 免疫分析方法优化, 从血清中获得多克隆抗体, 筛选出针对金属离子特异的单克隆抗体, 将单克隆抗体应用于对重金属离子的免疫检测. 在所有步骤中, 半抗原的设计最为关键, 相关研究表明, 合适的半抗原设计决定了最终免疫检测中抗体的特异性和选择性<sup>[27]</sup>. 传统的半抗原设计方法是将金属离子共价连接到络合物分子(EDTA, DTPA)上. 这种模式的缺点是, 最终由金属络合物与载体蛋白复合物诱导产生的多克隆抗体大多数识别笼形的金属-络合物复合体, 而非特定的金属离子本身<sup>[25,28]</sup>. Wylie 等人<sup>[14]</sup>提出了一种新的半

抗原设计思路: 将汞离子共价连接到还原性谷胱甘肽的巯基上形成汞离子半抗原, 然后再将这种汞离子半抗原通过酰胺键连接到载体血蓝蛋白(KLH)上. 实验表明, 经抗原 KLH-GSH-HgCl 诱导产生的抗体能够特异性识别汞离子. 本文通过咪唑的催化作用, 将一种青霉素不稳定中间产物转化成了稳定的青霉烯酸硫醇汞盐(MMPA)和青霉烯酸硫醇铜盐(CMPA)<sup>[29,30]</sup>. 在结构上, MMPA 和 CMPA 没有青霉素结构中的 $\beta$ -内酰胺环, 取而代之的是其独特的恶唑酮环结构(图1). 恶唑酮环在 325 nm 紫外吸收光谱处具有特征性的紫外吸收峰, 利用该原理对合成的半抗原青霉烯酸硫醇铜盐(CMPA)进行检测.

本文利用青霉素的降解反应原理合成了新型的铜离子半抗原 CMPA, 并将半抗原 CMPA 作为一种有效的双功能偶联剂连接铜离子和载体蛋白(BSA 或 OVA), 最终诱导免疫动物产生高效价的血清抗体. 以下是有关抗原合成、鉴定、动物免疫和血清中抗体效价检测的内容.

## 1 材料与方法

### 1.1 药品与试剂

牛血清白蛋白购自上海丽珠东风生物技术公司

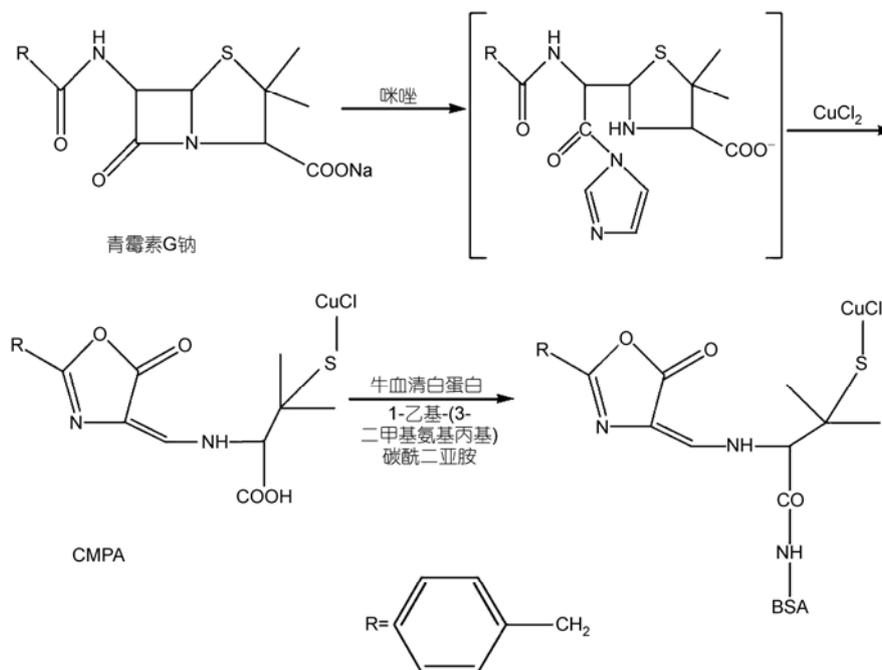


图1 半抗原 CMPA 和全抗原 CMPA-BSA 的合成过程

(上海, 中国). 还原型谷胱甘肽(GSH)、咪唑、 $\text{CuCl}_2$ 、抗坏血酸和 30%的过氧化氢购自上海化学试剂公司(上海, 中国). 1-乙基-(3-二甲氨基丙基)碳酰二亚胺盐酸盐购自 Bio Basic 公司. 青霉素 G(1650 units/mg)、卵清白蛋白(OVA)、福氏完全佐剂、福氏不完全佐剂购自 Sigma-Aldrich 公司, 吐温 20, TMB, 羊抗兔 IgG-HRP 购自上海神航化学试剂公司(上海, 中国). 新西兰白兔购自上海 SLK 实验动物公司(上海, 中国). 所用试剂皆为其最高纯度级.

## 1.2 仪器

实验用仪器: Bruker EQUINOX 55 傅立叶变换红外光谱仪, Thermo Fisher Iris Advantage 1000 电感耦合等离子发射光谱仪, Thermo Electron Evolution 300 紫外可见分光光度计, 科华 KHB ST-360 酶标仪, Mettler Toledo Delta 320 pH 计.

## 1.3 缓冲溶液

磷酸缓冲液(PBS), 50 mmol/L, pH 7.4; 碳酸盐缓冲液, 50 mmol/L, pH 9.6; 磷酸吐温缓冲液(PBST); DMSO, 10%(体积比); 4% $\text{NaHCO}_3$ ; HRP 基质溶液: (1) TMB, 10 mg/mL, 溶剂为 0.6%DMSO; (2) pH 7.4 的柠檬酸缓冲液; (3) 30% $\text{H}_2\text{O}_2$ ; (4) 2 mol/L  $\text{H}_2\text{SO}_4$ .

## 1.4 半抗原 CMPA 和全抗原的合成

先前研究报道关于 CMPA 的合成方法<sup>[29,30]</sup>, 其合成步骤简述如下: 步骤一, 将 40 mg 的青霉素 G 和 0.7 g 的咪唑溶解在 10 mL 超纯水中, 完全溶解后缓慢滴加 1 mol/L 的 HCl 将溶液的 pH 调至 6.8, 在室温状态下匀速搅拌 10 min; 步骤二, 逐滴加入 10 mg/mL 的  $\text{CuCl}_2$  溶液; 步骤三, 将上述溶液 65°C 水浴 1 h; 步骤四, 待水浴结束后, 加入 1.0 mol/L 的 HCl 酸化反应后溶液, 生成如图 2(C)中的灰白色絮状沉

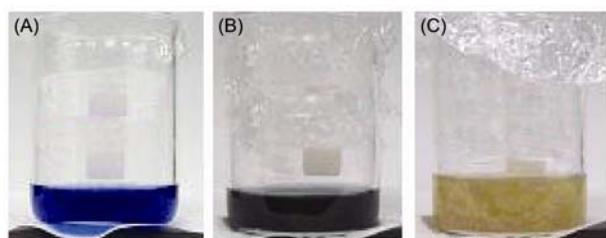


图 2 CMPA 合成反应的相关混合溶液

(A) 65°C 水浴前; (B) 65°C 水浴后; (C) 经 1 mol/L HCl 酸化后, 其灰白色沉淀即 CMPA

淀; 步骤五, 用 1.0 mol/L 的 HCl 洗涤沉淀 3 次, 然后再用双蒸水洗涤沉淀 2 次除去未反应的青霉素 G 和  $\text{CuCl}_2$ .

半抗原 CMPA 通过 EDC.HCl 的催化作用连接到载体蛋白 BSA 或 OVA 上, 即通过 CMPA 结构式中的酰胺键与载体蛋白结合. 为了获得理想的 CMPA 和 BSA 偶联比, 需要进行某些因素(如反应时间、CMPA 和 BSA 摩尔比)的优化验证, 使用紫外可见分光光度法检测 CMPA 和载体蛋白 BSA 的连接, 电感耦合等离子发射光谱法(ICP-AES)测定 CMPA 和 BSA 的摩尔比. 包被抗原 CMPA-OVA 的合成与鉴定方法与免疫抗原 CMPA-BSA 类似.

为了研究抗血清中抗体对于铜离子的特异性, 根据先前研究方法<sup>[14]</sup>合成了两种包被抗原 OVA-GSH 和 OVA-GSH-CuCl, 使用电感耦合等离子发射光谱法(ICP-AES)来测定抗原 OVA-GSH-CuCl 的偶联比.

## 1.5 兔子与小鼠免疫实验

4 只新西兰白兔被免疫注射铜离子抗原 CMPA-BSA(偶联比为 25:1), 基础免疫的注射方法是 1 mg 的 CMPA-BSA 与等体积的福氏完全佐剂混合后进行免疫动物的皮下多点注射. 2 周后, 使用经福氏不完全佐剂乳化后的 CMPA-BSA 进行第 2 次加强免疫注射. 后续的时间里进行第 3 和 4 次免疫注射. 在第 3 次免疫的 7 天后对兔子取血, 进行相关的抗血清检测.

BALB/c 小鼠的免疫程序也采用上述方法进行. 对小鼠的免疫实验参照 Lerner 等人<sup>[11]</sup>与 Wylie 等人<sup>[14]</sup>的实验程序进行.

免疫检测中使用的抗血清采用离心法获得, 在血清中加入硫柳汞作为防腐剂, -20°C 保存备用<sup>[31]</sup>.

## 1.6 血清抗体效价检测

由每只免疫兔子和小鼠获得的抗血清的检测采用间接非竞争 ELISA 法, 以阴性抗血清作为对照. 具体过程: 用 5  $\mu\text{g/mL}$  的包被抗原 CMPA-OVA 将 96 孔板进行包被, 加入碳酸盐缓冲液, 37°C 水浴 3 h; 将经过 PBST 洗涤后的平板用 1% OVA 进行封闭, 37°C 水浴 1 h 后, 再次用 PBST 洗涤平板; 将经 10 mmol/L pH 7.4 PBS 梯度稀释(1/4000, 1/50000, 1/100000, 1/150000)后的含 1% OVA 的血清加入平板, 37°C 水浴 2 h 后, 用 PBST 洗涤平板; 加入经辣根过氧化物酶

(HRP)标记的羊抗兔 IgG 抗体, 37°C 水浴 1 h; PBST 洗涤后, 平板中每孔加入 100  $\mu$ L 的底物缓冲液; 经 15 min 孵育后, 加入 2 mol/L  $H_2SO_4$  终止反应, 在 450 nm 下使用上海科华 KHB ST-360 酶标仪读取吸光度 (A). 阳性值的标准是待测血清的 A 高于阴性对照血清 2.1 倍.

### 1.7 抗体对于半抗原 CMPA 和铜离子的特异性测定

抗体对于半抗原 CMPA 的亲合性通过间接非竞争性 ELISA 进行测定. 具体方法: 将 96 孔板用每孔 5  $\mu$ g/mL 的包被抗原 CMPA-OVA 100  $\mu$ L 进行包被. 经过 3 h 水浴后, 将平板用 1%OVA 进行封闭. 同时对对照板采用溶解在碳酸盐缓冲液中的 1%OVA 进行包被. 随后, 每孔加入 100  $\mu$ L 含有 1%OVA 的抗血清 (1:1000 稀释). 剩下的操作步骤与血清中抗体效价的检测类似.

抗体对于铜离子的特异性亲和力检测通过比较抗体对包被抗原 OVA-GSH 和 OVA-GSH-CuCl 的差异进行. 实验程序如下: 将包被抗原 OVA-GSH 和 OVA-GSH-CuCl 固定到平板上, 经 1 h 37°C 水浴后, 1%OVA 封闭平板. 然后每孔加入 100  $\mu$ L 500 倍稀释的抗血清. 其余的操作步骤与血清中抗体效价的检测方法相同.

## 2 结果与讨论

### 2.1 半抗原 CMPA 的鉴定

在结构上, 半抗原 CMPA 不同于青霉素 G 中的  $\beta$ -内酰胺环结构, 其含有特殊的恶唑酮环, 结果使得在 325 nm 处 CMPA 具有特征性的紫外吸收峰. 图 3 是 CMPA 和青霉素 G 的紫外光谱对比图, 从中可以明显看出 CMPA 在 325 nm 处的特征性吸收, 这也揭示了半抗原 CMPA 被成功合成. 此外, 对全抗原 CMPA-BSA 和包被抗原 CMPA-OVA 的紫外光谱分析也进一步证明了 CMPA 结构中恶唑酮环的存在(图 3).

另外, 红外分析技术也被用于进一步对半抗原 CMPA 的鉴定. 图 4 是 CMPA 和青霉素 G 的红外光谱图.

在 CMPA 的红外光谱中,  $\beta$ -内酰胺环的 1774  $cm^{-1}$  特征吸收峰消失了, 这说明在 CMPA 的合成过程中,  $\beta$ -内酰胺环被完全降解. 1665 和 2540  $cm^{-1}$  的

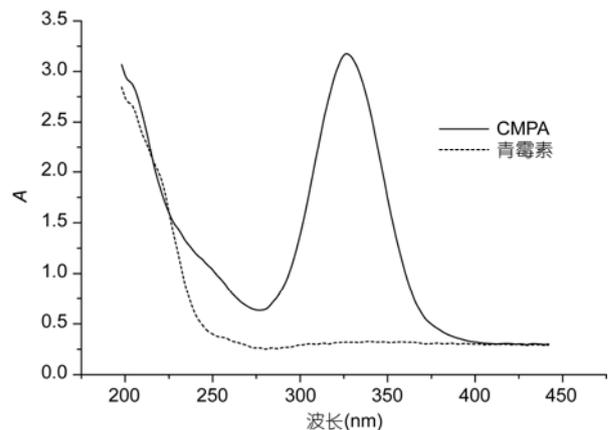


图 3 青霉素 G 和半抗原 CMPA 的紫外光谱对比图

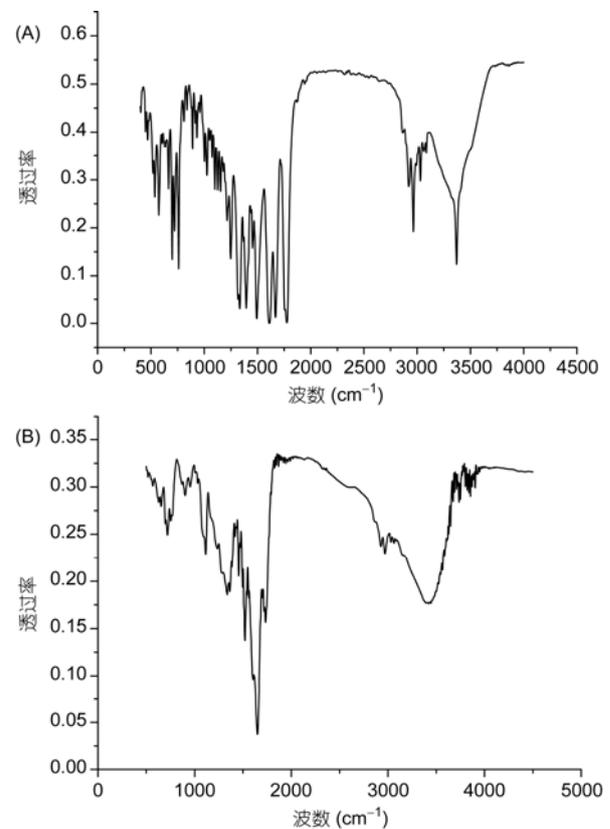


图 4 青霉素 G(A)和 CMPA(B)的红外光谱图

外吸收证明了  $-C-C-CO(\alpha, \beta$  不饱和酮)和  $-SH(-S-Cu)$  结构的存在. 而且, 其他非特征性的红外谱线皆存在于 CMPA 和青霉素 G 的结构中, 如 700, 750(苯环上的单取代基)和 2927  $cm^{-1}[-C(CH_3)_2]$ . 这些结果充分证明本实验中半抗原 CMPA 被成功合成.

## 2.2 抗原 CMPA-BSA 和 CMPA-OVA 的鉴定

为了准备动物免疫实验和 ELISA 实验, 合成了免疫抗原 CMPA-BSA 和包被抗原 CMPA-OVA, 紫外可见分光光度法被用于鉴定半抗原 CMPA 和载体蛋白(BSA 或 OVA)之间的连接. 如图 5 所示, 在 CMPA-BSA 和 CMPA-OVA 的紫外可见吸收光谱都存在 325 nm 的最大紫外吸收峰, 这就证明了 CMPA-BSA 和 CMPA-OVA 的成功合成.

因为 CMPA 结构式中存在-S-CuCl 结构(图 1), 所以也可以利用电感耦合等离子发射光谱法(ICP-AES)来检测 CMPA 的合成和 CMPA 与载体蛋白 BSA, OVA 之间的偶联比. 由表 1 和 2 可见, 即使抗原 CMPA-BSA, CMPA-OVA 经过 PBS 透析纯化过程处理后, 铜离子仍存在于抗原分子中, 这表明 CMPA

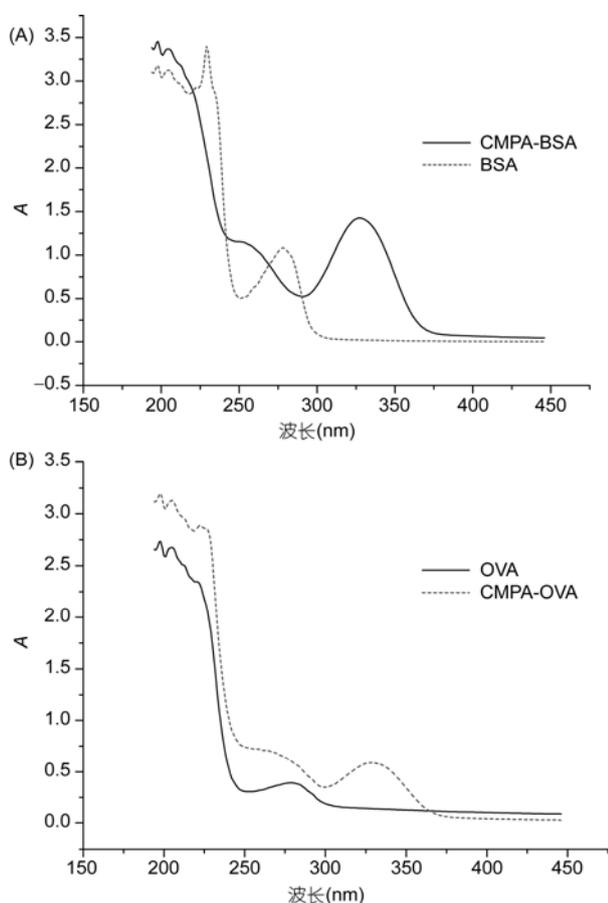


图 5 免疫抗原 CMPA-BSA(A)和包被抗原 CMPA-OVA(B)紫外光谱图

0.10 mg/mL CMPA-BSA, CMPA-OVA, BSA 和 OVA 溶液, 在 190~450 nm 波长下经 Thermo Electron Evolution 300 紫外可见分光光度计全波长扫描

表 1 合成条件对抗原 CMPA-BSA 偶联比的影响<sup>a)</sup>

反应时间(h)	偶联比	
	M=10:1	M=100:1
2	4:1	7:1
6	6:1	11:1
12	6:1	20:1
14	6:1	24:1

a) M 示反应前 CMPA 和 BSA 的摩尔比

表 2 合成条件对抗原 CMPA-OVA 偶联比的影响<sup>a)</sup>

反应时间(h)	偶联比	
	M=10:1	M=100:1
2	4:1	3:1
6	4:1	5:1
12	4:1	5:1
14	4:1	5:1

a) M 示反应前 CMPA 和 BSA 的摩尔比

具有很好的稳定性. 另一方面, 在抗原 CMPA-BSA 的合成过程中也观察到一个明显现象: 如将 CMPA 和 BSA 的反应摩尔比 M 设定为 10:1, 反应 6 h 后, CMPA-BSA 的偶联比稳定为 6:1, 进一步延长反应时间不会增加抗原 CMPA-BSA 的偶联比. 但若将 CMPA 和 BSA 的反应摩尔比 M 设定为 100:1 时, 反应 2 h 后, CMPA-BSA 的偶联比为 7:1; 反应 14 h 后, CMPA-BSA 的偶联比为 24:1. 以上结果表明, 反应条件会明显影响 CMPA-BSA 的偶联比, 同样的现象也出现在 CMPA-OVA 的合成过程中(表 2).

## 2.3 血清效价检测

在血清效价检测中, 阳性结果的判断标准是待测血清的 A 高于阴性对照血清 2.1 倍. 由图 6 可见, 血清中的抗体具有很高的效价, 即使在稀释 150000 倍的情况下. 在 4 只实验兔子中, 相比其他 3 只兔子, 2 号兔子血清效价最高, 因此多采用 2 号兔子血清进行后续实验.

## 2.4 抗体对半抗原 CMPA 的亲合力检测

通过间接非竞争性 ELISA 测定兔血清中抗体对半抗原 CMPA 的亲合力. 由图 7 可见, 与 1%OVA 包被的对照孔相比, 抗体对 CMPA 具有更强的亲合力.

此外, 小鼠血清中抗体对 CMPA 亲和力的结果如

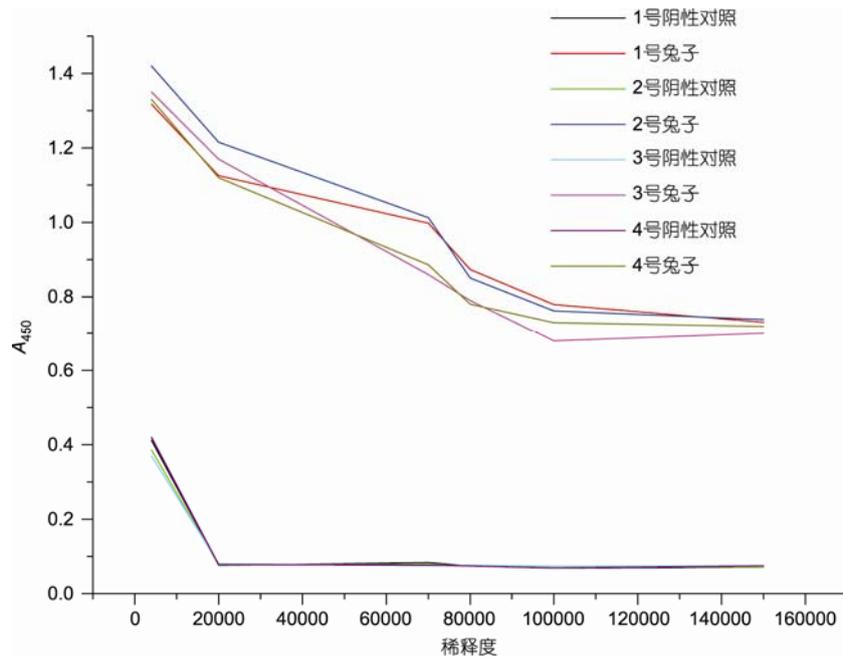


图6 最终加强免疫后兔血清效价检测图

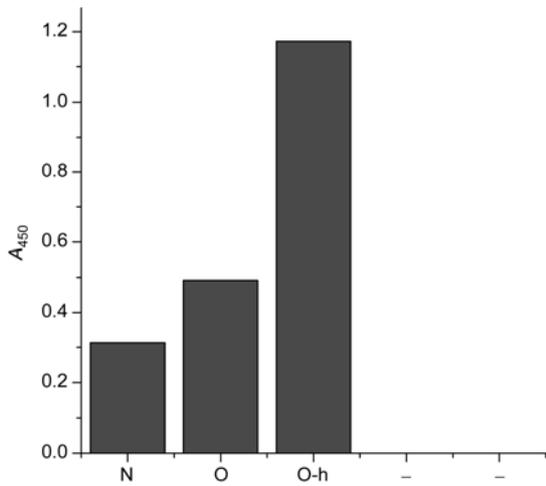


图7 兔血清中抗体对半抗原 CMPA 的亲和力检测

N: 阴性对照血清; O: 空白免疫血清, 检测孔经 1%OVA 包被, 为实验对照组; O-h: 免疫血清, 检测孔经 OVA-CMPA 包被. 在 ELISA 检测前, 免疫血清经 1000 倍稀释. 空白孔(O)经 1%OVA 包被, 检测孔(O-h)经 CMPA-OVA 包被

表 3 所示, 5 只小鼠血清中抗体皆对对照包被抗原具有很低的亲和性; 与其他血清相比, 4 和 5 号小鼠血清中抗体对目标抗原 CMPA-OVA 具有更高的亲和力.

上述结果表明, 本实验新合成的半抗原 CMPA 具有很高的免疫原性, 能够刺激免疫动物产生高效价的抗体.

表 3 小鼠免疫血清对抗原 CMPA 的亲和力检测

小鼠编号	封闭试剂	抗体效价	
		CMPA-BSA <sup>a)</sup>	BSA <sup>a)</sup>
1	BSA	<1000	<1000
2	BSA	<1000	<1000
3	BSA	<1000	<1000
4	BSA	1000	<1000
5	BSA	2000	<1000
对照血清	BSA	<1000	<1000

a) 检测孔抗原的包被浓度为 10 μg/mL

### 2.5 抗体对铜离子的特异性亲和力

同时, 进一步检测了抗体对铜离子的亲和力. 为了能圆满达成这一目标, 根据前人的研究<sup>[14,32]</sup>合成了两种包被抗原, OVA-GSH 和 OVA-GSH-CuCl. 经 ICP-AES 测定 OVA-GSH-CuCl 的偶联比为 1:5. 如图 8 所示, 2 号兔血清中抗体对包被抗原 OVA-GSH-CuCl 具有很好的亲和性, 其 A 为 0.771, 高于对照包被抗原 OVA-GSH(A 为 0.692), 与此同时, 阴性空白对照血清的 A 为 0.332. 抗体对 OVA-GSH-CuCl 和 OVA-GSH 的不同亲和力表明, 血清中抗体对铜离子具有特异性的亲和力, 详细的数据如表 4 所示. 以上结果表明, 由抗原 CMPA-BSA 诱导产生的抗体对铜离子具有特

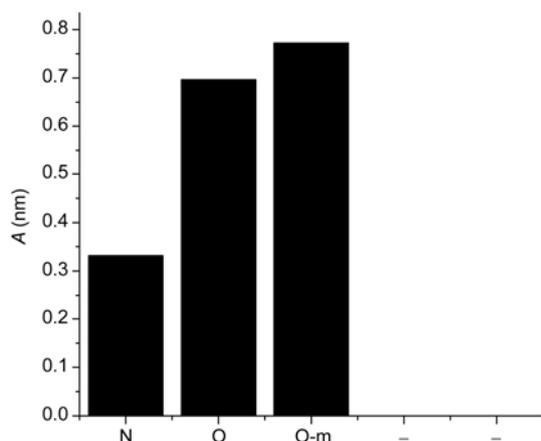


图8 2号兔血清中抗体对铜离子的亲和性检测

N: 阴性空白对照血清; O: 对照组, 检测孔经抗原 OVA-GSH 包被;  
O-m: 检测组, 检测孔经目标抗原 OVA-GSH-CuCl 包被

表4 血清中抗体对包被抗原 OVA-GSH 和 OVA-GSH-CuCl 的亲和力比较

兔子编号	OVA-GSH	OVA-GSH-CuCl	相对偏差 <sup>a)</sup>
1	0.657±0.035	0.689±0.042	4.80
2	0.692±0.032	0.771±0.034	11.40
3	0.626±0.028	0.639±0.026	2.07
4	0.682±0.039	0.724±0.046	6.15

a) 相对偏差计算公式:  $[(A_{450} \text{ of OVA-GSH-CuCl} - A_{450} \text{ of OVA-GSH}) / (A_{450} \text{ of OVA-GSH})] \times 100\%$ . 其中数据为 3 次检测值的平均值

异性的亲和力。

表 5 列出了小鼠血清中抗体对铜离子特异性亲和力的相关数据。在 ELISA 实验前, 抗血清首先用 BSA 进行中和处理。实验中, 测定了小鼠血清对 CMPA-BSA, BSA, Cu-GSH-OVA 和 GSH-OVA 的亲性和。由表 5 可见, 4 和 5 号小鼠血清中抗体对半抗原 CMPA 具有更高的亲和力。但在实验中没有观察到小鼠血清抗体对抗原 OVA-GSH-CuCl 和 OVA-GSH 的明显亲和力差异。

表5 小鼠免疫血清对抗原 CMPA-BSA 的亲性和检测

小鼠编号	封闭试剂	抗体效价			
		CMPA-BSA	BSA	Cu-GSH-OVA	GSH-OVA
1	BSA	<1000	<1000	<1000	<1000
2	BSA	<1000	<1000	<1000	<1000
3	BSA	<1000	<1000	<1000	<1000
4	BSA	1000	<1000	1000	1000
5	BSA	2000	<1000	1000	1000
对照血清	BSA	<1000	<1000	<1000	<1000

由兔血清和小鼠血清免疫检测实验结果可见, 动物免疫血清中抗体对铜离子有较弱的亲和力。形成这种较弱的抗体与铜离子之间亲和力的原因可能由以下几点: 首先, 在 CMPA 分子结构中有 3 个主要的抗原决定簇: 恶唑酮环、苯环和 -S-CuCl 基团。较前两个基团, -S-CuCl 对动物免疫系统的影响力要小得多; 其次, 因为恶唑酮环和苯环在 CMPA 结构中具有很大的体积, 目标抗原决定簇 -S-CuCl 被前两个基团掩盖, 没有充分地暴露在动物免疫系统中的机会; 最后, 半抗原 CMPA 和载体蛋白 BSA 之间的连接臂为 S-C-C-CO-(图 1), 没有足够的长度使半抗原 CMPA 在动物免疫系统中得到充分的暴露机会, 这同时也增强了其他基团对抗原决定簇 -S-CuCl 的空间遮蔽效应<sup>[14,27]</sup>。

为了解决上述问题, 制定了两套方案: 第一, 通过单克隆抗体筛选机制, 可以获得针对铜离子有高度特异性的单克隆抗体, 但是该过程通常会耗费很长时间, 且需要昂贵的仪器和试剂; 第二, 可以在抗体免疫检测之前安排一步样品前处理过程。本实验室已经成功合成了两种金属离子半抗原: 针对铜离子的 CMPA 和针对汞离子的 MMPA<sup>[28]</sup>。但是这两种针对铜离子和汞离子的半抗原合成体系并不适合其他的重金属离子, 如 Pb(II), Cr(III), Co(II), Cr(III), Pb(III) 和 Ni(II)。此外, 通过一步简单的样品前处理过程除去汞离子后, 就可以使用针对半抗原 CMPA 的抗体来测定环境和食品样品中的铜离子。相信这种方法将会开辟一条新的重金属离子检测途径。

### 3 结论

本文结合前人相关研究成果<sup>[29,30,32,33]</sup>, 成功使用青霉素衍生物合成了一种新型的铜离子半抗原 CMPA。结果表明: (1) CMPA 在体内和体外条件下都

具有很好的稳定性, 对实验动物也很安全, 在整个免疫实验期间没有动物中毒现象发生; (2) 抗原 **CMPA-BSA** 能够诱导动物免疫系统产生高效价的抗体, 其抗体滴度最高可达 150000; (3) 血清中的抗体对抗原 **OVA-GSH-CuCl** 的亲合性高于 **OVA-GSH**. 这表明血清中存在针对铜离子的特异性抗体. 另外, 在实验中还发现, **CMPA** 和 **BSA** 之间的偶联比对于最终

的免疫结果也会产生显著影响, 这一现象与先前的研究结论——抗原分子中的高偶联比可以增强免疫反应的强度和特异性相一致<sup>[29,34]</sup>.

上述结果提示, 新合成的抗原 **CMPA-BSA** 对于环境和食品样品中的铜离子检测具有重要意义. 同时, 这种新型的铜离子半抗原合成方法也为传统的免疫测定技术中的半抗原设计开辟了一条新的思路.

## 参考文献

- 1 Blake A, Jones M, Darwish A, et al. Antibody-based sensors for heavy metal ions. *Biosens Bioelectron*, 2001, 16: 799–809
- 2 Devi M, Lu D, Carlson D, et al. Inhibition of acetylcholinesterase activity in the central nervous system of the red swamp crayfish, *Procambarus clarkia*, by mercury, cadmium, and lead. *Bull Environ Contam Toxicol*, 1995, 55: 746–750
- 3 Ireland P. Heavy Metal Sources—Uptake and Distribution. In: Dillon H K, Ho M H, eds. *Biological Monitoring of Heavy Metals*. New York: Wiley, 1991. 263
- 4 Avitsin P, Zhavoronkov A, Rish A, et al. *Human Microelementoses*. Moscow: Meditsina, 1991
- 5 Gismers J, Hueso D, Procopio R, et al. Ion-selective carbon paste electrode based on tetraethyl thiuram disulfide for copper and mercury. *Anal Chim Acta*, 2004, 524: 347–353
- 6 Yalow R S, Berson S A. Immunoassay of endogenous plasma insulin in man. *J Clin Invest*, 1960, 39: 1157–1175
- 7 Blake A, Blake II C, Khosraviani M, et al. Immunoassays for metal ions. *Anal Chim Acta*, 1998, 376: 13–19
- 8 Allen B, Sittonen H, Thompson C, et al. Methods for the determination of arsenic, cadmium, copper, lead, and tin in sucrose, corn syrups, and high-fructose corn syrups by inductively coupled plasma atomic emission spectrometry. *J Agric Food Chem*, 1997, 45: 162–165
- 9 Blake A, Dawson N, Chakravarti P, et al. *Environmental Immunochemical Methods: Perspectives and Applications*. Washington D.C.: American Chemistry Society, 1996. 10
- 10 Blake A, Chakrabarti P, Hatcher M, et al. Metal binding properties of a monoclonal antibody directed toward metal-chelate complex. *J Biol Chem*, 1996, 271: 27677–27685
- 11 Lerner A, Benkovic J, Schultz G, et al. At the crossroads of chemistry and immunology catalytic antibodies. *Science*, 1991, 252: 659–667
- 12 Love A, Villafranca E, Aust M, et al. How the anti-(metal chelate) antibody **CHA255** is specific for the metal ion of its antigen: X-ray structures for two Fab'/hapten complexes with different metals in the chelate. *Biochem*, 1993, 32: 10950–10959
- 13 Wylie E, Carlson D, Carlson R, et al. Detection of mercuric ions in water by ELISA with a mercury specific antibody. *Anal Biochem*, 1991, 194: 381–387
- 14 Wylie E, Lu D, Carlson D, et al. Immunology, monoclonal antibodies specific for mercuric ions. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, 89: 4104–4108
- 15 Meares F, Mccall J, Reardan T, et al. Conjugation of antibodies with bifunctional chelating agents: isothiocyanate and bromoacetamide reagents, methods of analysis, and subsequent addition of metal ions. *Anal Biochem*, 1984, 142: 68–78
- 16 Meares F. Chelating agents for the binding of metal ions to antibodies. *Int J Rad Appl Instru B*, 1986, 13: 311
- 17 Moi K, Meares F, Denardo J, et al. Copper chelates as probes of biological systems: stable copper complexes with a macrocyclic bifunctional chelating agent. *Anal Biochem*, 1985, 148: 249–253
- 18 Reardan T, Meares F, Frincke M, et al. Antibodies against metal chelates. *Nature*, 1985, 316: 265–268
- 19 Mukkala M, Mikola H, Hemmil I, et al. The synthesis and use of activated N-benzyl derivatives of diethylenetriaminetetraacetic acids: alternative reagents for labeling of antibodies with metal ions. *Anal Biochem*, 1989, 176: 319–325
- 20 Blake A, Jones M, Yu N, et al. Antibody-based sensors for heavy metal ions. *Biosens Bioelectron*, 2001, 16: 799–809
- 21 Blake C, Delehanty B, Blake A, et al. Allosteric binding properties of a monoclonal antibody and its Fab fragment. *Biochem*, 2003, 42: 497–508
- 22 Chakrabarti P, Hatcher M, Blake A, et al. Enzyme immunoassay to determine heavy metals using antibodies to specific metal EDTA complexes: optimization and validation of an immunoassay for soluble indium. *Anal Biochem*, 1994, 217: 70–75
- 23 Delehanty B, Jones M, Blake A, et al. Identification of important residues in metal-chelate recognition by monoclonal anti-bodies. *Biochem*, 2003, 42: 14173–14183

- 24 Khosraviani M, Pavlov R, Blake A, et al. Detection of heavy metals by immunoassay: optimization and validation of a rapid, portable assay for ionic cadmium. *Environ Sci Technol*, 1998, 32: 137–142
- 25 Khosraviani M, Blake C, Blake A, et al. Binding properties of a monoclonal antibody directed toward lead chelate complexes. *Bioconjugate Chem*, 2000, 11: 267–277
- 26 Blake A, Pavlov R, Blake C, et al. Antibodies and antibody-based assays for hexavalent uranium. *Anal Chim Acta*, 2001, 444: 3–11
- 27 Maro P, Gee S, Hammock D. Immunochemical techniques for environmental analysis II. Antibody production and immunoassay development. *Tren Anal Chem*, 1995, 14: 415–418
- 28 Xie P, Xu W, Cao C X, et al. Mercuric mercaptide of penicillenic acid, a novel hapten for relevant immunoassay, synthesized from penicillin. *J Immun Meth*, 2010, 353: 1–7
- 29 Smith G, Grey E, Patel J, et al. The spectrophotometric determination of ampicillin. *Analyst*, 1967, 92: 247–252
- 30 Bundgaard K. A new spectrophotometric method for the determination of Penicillins. *J Pharm*, 1972, 24: 790–794
- 31 He H, Liu Y, Sun C, et al. Preparation of anti-cadium-EDTA complex polyclonal antibody and its application for dertermination of cadmium in aqueous solution. *Anal Lett*, 2009, 42: 409–442
- 32 de Weck A L, Eisen H N. Some immunochemical properties of penicillenic acid: an antigenic determinant derived from penicillin. *J Exp Med*, 1960, 112: 1227–1247
- 33 Carpenter H, Turner A, Vigeneaud V, et al. Benzylpenicillenic acid as an intermediate in the synthesis of benzylpenicillin (penicillin acid). *J Biol Chem*, 1948: 893–905
- 34 Singh V, Kaur J, Suri R, et al. Synthesis and characterization of papten-protein conjugates for antibody production against small molecules. *Bioconjugate Chem*, 2004, 15: 168–173