

26) 189-192

### 眼镜蛇毒细胞毒素的生物素-抗生物素蛋白-酶联免疫吸附检测

郭慕平, 王晴川, 刘广芬 (福建医学院蛇毒研究室, 福州 350004, 中国) 782.740.3

**Biotin-avidin-ELISA for cytotoxin purified from cobra venom**

GUO Mu-Ping, WANG Qing-Chuan, LIU Guang-Fen (Laboratory of Snake Venom Research, Fujian Medical College, Fuzhou 350004, China)

**ABSTRACT** A technique combining the biotin-avidin amplifying system with sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (B-A-ELISA) was developed for the microassay of the cytotoxin from *Naja naja atra* venom. The horse-peroxidase was used as the marker and polystyrene micro-hemagglutination plates as solid carrier. The sensitivity was  $0.5 \text{ ng} \cdot \text{ml}^{-1}$ . The assay range was 1.25-320  $\text{ngml}^{-1}$  with coefficient of variation of 4.9% (intragroup) and 8.1% (intergroups), respectively.

**KEY WORDS** cobra venoms; cytotoxins; biotin; avidin; enzyme-linked immunosorbent assay

**提要** 用夹心酶联免疫吸附检测技术, 以辣根过氧化物酶为标记酶, 结合生物素-抗生物素蛋白放大系统, 以聚苯乙烯微量反应板为固相载体, 建立一种眼镜蛇毒细胞毒素的微量检测方法: 生物素抗生物素蛋白-酶联免疫吸附测定, 灵敏度  $0.5 \text{ ng} \cdot \text{ml}^{-1}$ , 工作范围 1-320  $\text{ng} \cdot \text{ml}^{-1}$ , 组内和组间变异系数分别为 4.9% 和 8.1%。

**关键词** 眼镜蛇毒液类; 细胞毒素; 生物素; 抗生物素蛋白; 酶连接免疫吸附测定

眼镜蛇毒的细胞毒素(cytotoxin, CTX)亦称心脏毒素, 是一类对心脏具有毒性又有抗癌活性的组分, 我们从中华眼镜蛇毒中纯化一种 CTX, 经体内和体外实验, 均证明对多种肿瘤细胞有很强的杀伤作用(待发表), 为研究其药物动力学, 我们应用夹心酶联免疫吸附检测技术<sup>(1)</sup>, 以辣根过氧化物酶为标记酶, 结合生

物素(biotin)抗生物素蛋白(avidin)放大系统, 以聚苯乙烯微量反应板为固相载体, 建立了一种高灵敏度的眼镜蛇毒细胞毒素的生物素-抗生物素蛋白-酶联免疫吸附检测方法(B-A-ELISA)。本文报告方法的建立和检测效果。

#### MATERIALS AND METHODS

中华眼镜蛇(*Naja naja atra*)蛇毒, 产地广西。SP-Sephadex C-50, SP-Sephadex C-25, CNBr 活化 Sepharose 4B 均购自 Pharmacia 公司, 酯化生物素, 辣根过氧化物酶标记抗生物素蛋白(Av-HRP), 精制抗眼镜蛇毒血清, 均为上海生物制品研究所产品。邻苯二胺(OPD)及其它试剂为国产品 AR, 55 孔聚苯乙烯微量反应板, GXM-201 型酶标光度计, 四川分析仪器厂产品。

**CTX 的分离纯化和生物活性测定** 用 SP-Sephadex C-50 柱层析分离粗毒, 分离所得细胞毒组分再经 SP-Sephadex C-25 柱层所纯化<sup>(2)</sup>。用双向免疫扩散和 SDS-PAGE 法鉴定其纯度, 用离体大鼠心脏标本<sup>(3)</sup>测定其对心脏的毒性, 作为细胞毒指标。

**CTX 特异性抗体(F(ab)<sub>2</sub>)的纯化** CTX 溶于偶联缓冲液( $\text{NaHCO}_3$   $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , containing  $\text{NaCl}$   $0.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , pH 8.3)再与 CNBr-Sepharose 4B 混合制备 CTX-Sepharose 4B 亲和层析柱, 用 pH 分步洗脱法<sup>(4)</sup>, 从精制抗眼镜蛇毒血清中纯化 CTX 特异性抗体, 比较纯化抗体和精制抗眼镜蛇毒血清对注射 CTX 小鼠的保护作用, 测定纯化抗体的特异性中和能力<sup>(5)</sup>。

**生物素化抗体制备** 把酯化生物素溶于二甲基甲酰胺, 浓度为  $34.1 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ , 纯化

Received 1991 Jan 22

Accepted 1991 Dec 4

的 CTX 特异性抗体于 4℃ 对碳酸氢钠溶液  $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , pH 9.0 透析过夜, 浓度调为  $10 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ , 二者按酯化生物素与免疫球蛋白自由氨基酸分子比例为 1:1 混合, 于 22℃ 下反应 2 h, 透析备用<sup>(6)</sup>.

**BA-ELISA 操作步骤** 用 CTX 特异性抗体包被 55 孔微量反应板, 于 4℃ 放置 8 h, 洗涤 4 次, 加待测样本, 37℃ 下温育 2 h, 洗涤 4 次, 加生物素化抗体, 37℃ 下温育 20 min, 洗涤 4 次, 加 Av-HRP, 22℃ 下温育 20 min, 洗涤 4 次, 加底物 (OPD-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), 37℃ 下避光显色 30 min, 加入 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>  $2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  终止反应, 加样量均为 0.1 ml/孔. 测  $A_{492 \text{ nm}}$ , 建立标准曲线并分析其敏感性、特异性和精密度.

## RESULTS

**CTX 的分离纯化和生物活性** 眼镜蛇毒经 SP-Sephadex C-50 柱层析, 分离为 14 个组分, 见 Fig 1, 组分 XIII, XIV 能使离体灌流心脏挛缩而停搏, 为细胞毒素, 其中组分 XIV 经 SP-Sephadex C-25 柱层析纯化, 用 SDS-PAGE 和双向免疫琼脂扩散检测, 呈现单一沉淀带, 用离体大鼠灌流心脏检测, 具有很强的细胞毒作用.

**CTX 特异性抗体的纯化** 吸附在亲和层析柱上的 CTX 特异性抗体, 经乙酸缓冲液 ( $0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , pH 5.5) 和甲酸 ( $0.53 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , pH 2.05) 分步洗脱后, 得到 2 个蛋白峰, 见 Fig 2. 甲酸 ( $0.53 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , pH 2.05) 洗脱的蛋白峰与 CTX 亲和力高, 量多, 与眼镜蛇毒进行双向免疫琼脂扩散试验, 只出现单一沉淀线. 抗体活性测定结果表明, 1 mg 精制抗眼镜蛇毒血清可中和 0.3 LD<sub>50</sub> CTX, 1 mg 纯化抗体可中和 10 LD<sub>50</sub> 的 CTX, 以精制抗眼镜蛇毒血清的特异中和效价为 1.0, 则纯化抗体的相对效价为 33.5.

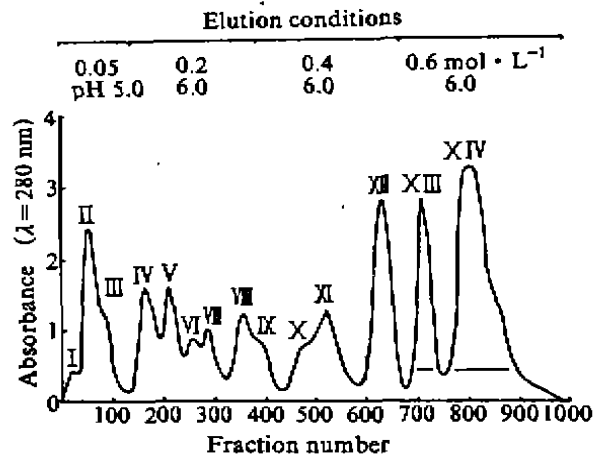


Fig 1. SP-Sephadex C-50 column chromatography of *Naja naja atra* venom. Cobra venom 4 g was dissolved in 28 ml of NH<sub>4</sub>Ac buffer ( $0.05 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , pH 5.0) and applied to a column (3.5 × 70 cm) of SP-Sephadex C-50. The column was eluted with a step gradient of NH<sub>4</sub>Ac buffer. The horizontal bars indicate the presence of cytotoxins.

**最适条件** 包被抗体稀释度为 1:1600, 生物素化抗体稀释度为 1:800, Av-HRP 稀释度为 1:1000, 为最适反应浓度 (Fig 3), (Tab 1).

**标准曲线** 用上述最适条件制备 CTX 标准曲线, 量-效反应在  $1.25\text{--}320 \text{ ng} \cdot \text{ml}^{-1}$  范围内呈直线关系, 见 Fig 4.

**敏感性** 用 PBS ( $0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , pH 7.2) 稀释的正常兔血浆 10 倍稀释液, 配制 CTX 的浓度系列, 用上述制备标准曲线条件, 按 BA-ELISA 流程测定, 绘制剂量反应曲线, 结果表明, 当样品中 CTX 浓度达  $0.5 \text{ ng} \cdot \text{ml}^{-1}$  时, 即出现有意义的  $A_{492 \text{ nm}}$  值.

**特异性** 分别采用牛血清白蛋白和眼镜蛇毒神经毒素 3, 30, 300  $\text{ng} \cdot \text{ml}^{-1}$  取代了 CTX, 在同样条件下用 B-A-ELISA 测定, 均不出现有意义的结果. 见 Tab 2.

**精密度** 如前所述配制 CTX 浓度系列, 每种浓度平行测定 4 个样本, 以观察组内变

Tab 1. Absorbance at 492 nm in biotin-avidin-ELISA.  $n=4$ ,  $\bar{x} \pm s$ .

Dilutions of avidin-horseradish peroxidase	Rabbit plasma	Dilutions of biotinylated antibody				
		1:100	1:200	1:400	1:800	1:1600
1:250	Positive	1.43 ± 0.05	1.23 ± 0.09	1.09 ± 0.09	0.98 ± 0.02	0.88 ± 0.05
	Normal	0.48 ± 0.02	0.39 ± 0.01	0.33 ± 0.02	0.29 ± 0.01	0.25 ± 0.02
	Ratio	3.0	3.1	3.3	3.6	3.5
1:500	Positive	1.33 ± 0.09	1.11 ± 0.06	1.01 ± 0.03	0.95 ± 0.02	0.72 ± 0.01
	Normal	0.40 ± 0.02	0.34 ± 0.01	0.30 ± 0.01	0.24 ± 0.01	0.25 ± 0.13
	Ratio	3.3	3.2	3.4	3.9	2.9
1:1000	Positive	1.13 ± 0.1	1.03 ± 0.05	0.95 ± 0.02	0.86 ± 0.02	0.55 ± 0.01
	Normal	0.32 ± 0.02	0.28 ± 0.01	0.21 ± 0.02	0.09 ± 0.01	0.06 ± 0.01
	Ratio	3.5	3.6	4.5	9.9	8.6
1:2000	Positive	0.67 ± 0.01	0.61 ± 0.01	0.55 ± 0.01	0.49 ± 0.02	0.29 ± 0.01
	Normal	0.18 ± 0.01	0.13 ± 0.01	0.09 ± 0.01	0.05 ± 0.01	0.04 ± 0.01
	Ratio	3.7	4.6	6.0	8.7	6.7

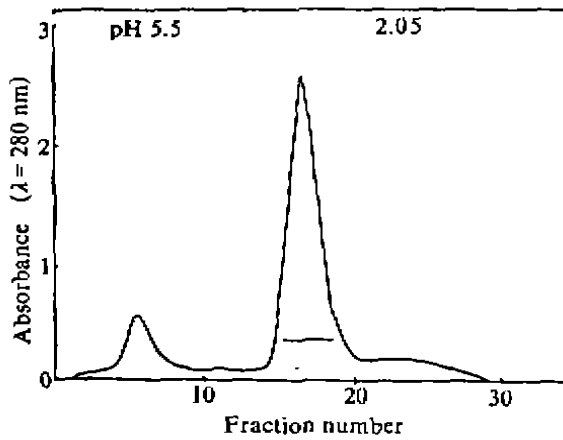


Fig 2. Purification of specific cytotoxin antibody by affinity chromatography from antiserum of cobra venom on Sepharose-CTX column. Antiserum was circulated through Sepharose-CTX column for 10 h, and eluted with 30 ml of  $\text{NaHCO}_3$  buffer ( $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , pH 8.3, containing  $\text{NaCl} 0.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ). Elution was carried out stepwise with the following buffers: acetate buffer ( $0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , containing  $\text{NaCl} 0.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , pH 5.5) and formic acid ( $0.53 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , containing  $\text{NaCl} 0.15 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , pH 2.05). Fractions of 4 ml were collected at a rate of  $20 \text{ ml} \cdot \text{h}^{-1}$ . The horizontal bar indicates the presence of purified specific cytotoxin antibody.

异, 另在同样条件下每天测定 1 次, 以观察组间变异, 结果组内变异系数为 4.9%, 组间变

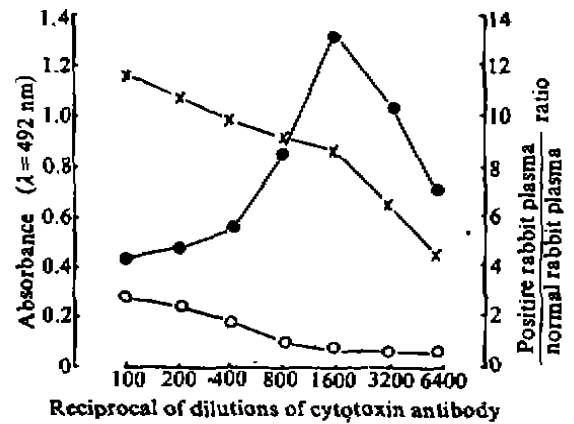


Fig 3. Coating concentrations of cytotoxin antibody in the biotin-avidin-ELISA. (○) control plasma; (●) plasma containing cytotoxin  $0.3 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ ; (×) positive rabbit plasma / normal rabbit plasma ratio. Optimal coating concentration was  $2.4 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ .

Tab 2.  $A_{492}$  value in biotin-avidin-ELISA for cytotoxin from *Naja naja atra* venom.  $n=4$ ,  $\bar{x} \pm s$  ( $A_{492}$  of control plasma = 0.06).

$\text{ng} \cdot \text{ml}^{-1}$	Bovine serum albumin	Neurotoxin	Cytotoxin
300	$0.06 \pm 0.01$	$0.07 \pm 0.02$	$0.87 \pm 0.03$
30	$0.06 \pm 0.01$	$0.07 \pm 0.01$	$0.59 \pm 0.02$
3	$0.06 \pm 0.01$	$0.06 \pm 0.02$	$0.25 \pm 0.01$

异系数为 8.1%。

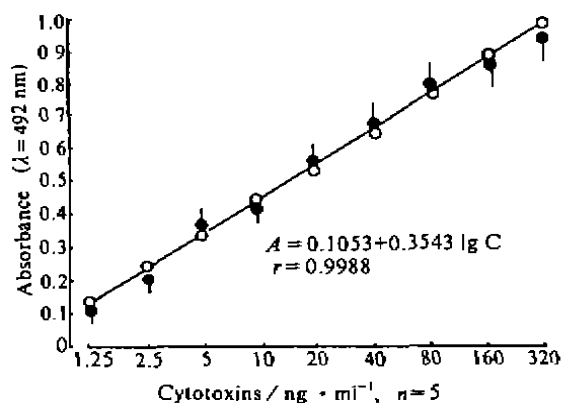


Fig 4. Cytotoxin from *Naja naja atra* venom in biotin-avidin-ELISA. Coating: specific antibody of cytotoxin ( $2.4 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ ). Conjugate: biotinylated antibody 1:800, avidin-horseradish peroxidase 1:1000. Substrate: *O*-phenylenediamine- $\text{H}_2\text{O}_2$ . (●) Observed; (○) Calculated.  $\bar{x} \pm s$ .

#### DISCUSSION

生物素-抗生物素蛋白系统(BAS)与酶联免疫方法相结合,具有敏感性高、特异性强等优点,但由于实验中涉及反应物多,其敏感性、特异性、精确性受多种因素影响。能否消除实验中的非特异性显色,是方法成败的关键因素。实验过程中的非特异性显色,主要来源于抗生物素蛋白及生物素化抗体对固相的非特异性吸附,特别是抗生物素蛋白对反应板的非特异性吸附<sup>(7)</sup>。我们采用高 pH 值、高离子强度的酶标抗生物素蛋白稀释液有效地抑制了抗生物素蛋白对反应板的非特异性吸附。采用 10%兔血浆的生物素化抗体稀释液,既有效地抑制了生物素化抗体的非特异性吸附,又避免了高离子浓度对抗原抗体结合反应的影响。上述措施有效地控制了非特异性显色。非特

异性的下降,不但表明检测系统的特异性达到较高水平,而且由于阳性对照与阴性对照光吸收度比值的升高,使系统检测灵敏度显著提高。

本法除可作为蛇毒药物动力学研究的检测手段外,对于蛇伤诊断、法医学鉴定,也均有实用意义。

#### REFERENCES

- 1 Yolken RH, Leister FJ, Whitcomb LS, Santosham M. Enzyme immunoassays for the detection of bacterial antigens utilizing biotin-labeled antibody and peroxidase biotin-avidin complex. *J Immunol Methods* 1983; **56**: 319-27.
- 2 Du YC, Shen JH, Wang KZ, Wu WY, Wu CR, Gu BX. Membrane toxins from Chinese cobra (*Naja naja atra*) venom: cytolysis and synthesis of fragments. In: Shen ZW, editor. *Nucleic acids and proteins*. Beijing: Science Press, 1980: 163-8.
- 3 The staff of the Department of Pharmacology, University of Edinburgh. *Pharmacological experiments on isolated preparations*. 2nd ed. Edinburgh: Churchill Livingstone, 1970: 112-9.
- 4 Yang CC, Lin MF, Chang CC. Purification of anticobratoin antibody by affinity chromatography. *Toxicon* 1977; **15**: 51-62.
- 5 Sun X, Gong CL, He QW, Pan SY. Purifications of anti-cobra neurotoxin antibody and anti-cobra cardiotoxin antibody by affinity chromatography. *Zool Res* 1981; **2** (4 Suppl): 75-81.
- 6 Guesdon JL, Ternynck T, Avrameas S. The use of avidin-biotin interaction in immunoenzymatic techniques. *J Histochem Cytochem* 1979; **27**: 1131-9.
- 7 Zhang ZL, Fang L, She TY. Investigation of factors affecting the performance of ABC-ELISA. *J Xi'an Med Univ* 1987; **8**: 360-3.