

抗吗啡单克隆抗体的制备及其胶体金交联物的初步应用

谢 鑫¹, 金伯泉¹, 朱 勇¹, 刘雪松¹, 王文学¹, 李笑松², 吴汉源²

(¹第四军医大学基础部免疫学教研室, 陕西 西安 710032; ²陕西省公安厅刑警总队, 陕西 西安 710016)

Preparation of monoclonal antibodies against morphine and preliminary application of its colloidal gold conjugates

XIE Xin¹, JIN Boquan¹, ZHU Yong¹, LIU Xuesong¹, WANG Weixue¹, LI Xiaosong², WU Hanyuan²

¹Department of Immunology, Fourth Military Medical University, Xi'an 710032; ²Criminal Police General Division of Public Security Office, Xi'an 710016, China

Abstract

AIM: To prepare monoclonal antibodies (mAbs) against morphine. **METHODS:** Morphine was crosslinked to rabbit serum albumin or bovine serum albumin, respectively and the BALB/c mice were immunized with the crosslinker. The mAbs against morphine were obtained by hybridoma technique. The urine samples were detected with the paper chromatography based on crosslinked of the purified mAb with colloidal gold. **RESULTS:** Three mAbs against morphine were obtained and the sensitivity detected by paper chromatography reached to 200 µg/L. **CONCLUSION:** The successful preparation of the mAb and its colloid gold conjugates may be useful for field check.

Keywords: drug abuse; monoclonal antibody; colloidal gold

摘要

目的: 制备吗啡特异性单克隆抗体(mAb)。方法: 将吗啡分子与兔血清白蛋白或牛血清白蛋白交联, 免疫BALB/c小鼠并检测免疫效价后, 应用淋巴细胞杂交瘤技术制备抗吗啡mAb。将纯化mAb与胶体金颗粒交联后利用纸层析技术进行标本检测。**结果:** 成功地制备了3株抗吗啡mAb, 利用其中1株抗体制备的胶体金试纸条, 检测样品灵敏度达200 µg/L。**结论:** 吗啡mAb胶体金试纸条研制成功将为毒品的现场检测打下基础。

关键词: 毒品滥用; 单克隆抗体; 胶体金

中图分类号: R392.11 文献标识码: B

近年来, 毒品滥用已经成为一种严重危害社会的犯罪现

收稿日期: 2002 - 03 - 27; 修回日期: 2003 - 03 - 15

基金项目: 陕西省科技研究发展基金部分资助(No. 97K14-G7)

作者简介: 谢 鑫(1974-), 男, 河南驻马店人, 博士生。

Tel. (029) 3374528, Email: immu-jin@fmmu.edu.cn

通讯作者: 金伯泉。

象。其中, 鸦片、吗啡和海洛因及其衍生物为主要的毒品类型, 他们的主要代谢终产物均为吗啡^[1]。对于毒品的检测, 目前常用的方法有色谱法^[2]和免疫学方法^[3]。尽管色谱法能够精确定量, 但由于其通常需要贵重仪器, 且难以开展现场检测, 因此应用范围受限; 而后者具有携带方便、耗时短及成本低廉等优点, 因此已成为目前常用的毒品滥用现场检测的手段。本研究中, 我们利用细胞融合技术制备了抗吗啡特异性单克隆抗体(mAb), 并研制其胶体金颗粒的交联物。

1 材料和方法

1.1 材料 四周龄雌性BALB/c小鼠和7wk龄雌性纯种新西兰大白兔, 均由本校动物实验中心提供。同品系来源骨髓瘤细胞系Sp2/0由本室常规冻存。吗啡盐酸盐购自中国药品生物制品检定所。牛血清白蛋白(BSA)、福氏完全和不完全佐剂、HAT和HT均购自Sigma公司。兔血清白蛋白(RSA)自制。免疫球蛋白亚类鉴定试剂盒购自Pierce公司。氯金酸为上海化学试剂厂产品。ÛKTA FPLC及蛋白G亲和层析柱, 均为Pharmacia Biotech产品。PE支撑硝酸纤维素膜及玻璃纤维纸均购自Whatman公司。检测的样本(尿液)由西安市戒毒所提供。

1.2 方法

1.2.1 吗啡白蛋白交联物的制备及检测 首先将吗啡与琥珀酸酐在无水吡啶中反应, 生成吗啡半琥珀酸酯(MHS), 然后用氯甲酰异丁酯为缩合剂, 将MHS与RSA或与BSA结合, 得到RSA-MHS及BSA-MHS交联物^[4]。以交联物常规免疫免并检测其免疫效价。

1.2.2 抗吗啡mAb的制备 mAb的制备为本室常规技术^[5], 取RSA-MHS(3.6 g/L)30 µL稀释于生理盐水中共0.25 mL, 加等量福氏完全佐剂研磨均匀后, 皮下多点注射。21 d后, 再取100 µg RSA-MHS加福氏不完全佐剂研磨均匀后皮下注射。分别于42 d和56 d后, 取100 µg RSA-MHS腹腔注射加强免疫。45 d后, 取免疫小鼠静脉血进行效价测定。60 d后常规融合, 包被BSA-MHS(5 g/L)以间接ELISA方法进行筛选, 取阳性孔以有限稀释法进行克隆化。扩大培养后常规制备腹水。

1.2.3 抗吗啡mAb的鉴定 取制备的腹水进行抗体鉴定。效价测定: 采用间接ELISA法。Ig亚类的鉴定: 按照试剂盒说明书进行。特异性鉴定: 利用吗啡分子进行阻断实验。按照分子摩尔比计算抗体与游离吗啡分子的结合效价, 以20 µg/L的吗啡分别与10⁴和10⁵稀释的mAb室温作用10 min, 间接ELISA法检测。实验中以TNF-与其特异性mAb以及未阻断抗体作为对照。

1.2.4 吗啡胶体金交联物的制备及鉴定 以柠檬酸三钠为还原剂, 按照文献^[6]制备胶体金颗粒, 并以电镜检测。将腹

水以饱和硫酸铵沉淀过夜后,做 G 蛋白 FPLC 亲和层析。采用光电比色法,确定 mAb 与胶体金颗粒结合的最稳定量后,将纯化 mAb 与胶体金颗粒交联,并以超速离心法纯化。

1.2.5 尿样吗啡的快速检测 将 BSA-吗啡交联物及兔抗小鼠 IgG 抗体分别划线于硝酸纤维素膜上,作为样品检验区和质控区。将纯化后的胶体金颗粒附着于玻璃纤维滤纸上,并固定于硝酸纤维素膜的下端,测试样品。

2 结果

2.1 吗啡交联物的制备及检测 通过薄层法、熔点法及紫外分光光度法,证明吗啡与琥珀酸酐反应产物为吗啡半琥珀酸酯(MHS),反应的靶点是吗啡的醇羟基。将 MHS 与 BSA 或 RSA 物通过柱层析后用紫外分光光度法测得每个蛋白分子结合的啡分子数为 (8.0 ± 0.5) 个。兔抗交联物免疫血清的效价为 10^4 左右。

2.2 抗吗啡 mAb 的制备及特性鉴定 常规免疫小鼠后,取脾细胞与 Sp2/0 细胞融合,融合率为 98%。融合后 12 d,取上清做间接 ELISA 检测到 3 株阳性较强的细胞克隆。经过两次有限稀释扩大培养后,得到 3 株阳性克隆,分别命名为 3G10、1E10 和 6A3。腹水做对比稀释后,以间接 ELISA 检测 3 株 mAb 的效价分别为 1.1×10^6 、 1.32×10^6 和 1.16×10^6 。测得 mAb 1E10 为 IgG1 型, 链。与对照组相比较, 10^4 稀释的 3 株 mAb 均可被游离吗啡完全阻断。

2.3 抗吗啡 mAb 胶体金颗粒的制备 电镜结果显示,自制胶体金颗粒均匀,直径约为 15 nm(图 1)。测定 mAb 交联的最稳定量为 35 mg/L。



图 1 直径为 15 nm 的胶体金颗粒电镜照片

Fig 1 Electron micrograph of colloidal gold with diameter of 15 nm ($\times 60\,000$)

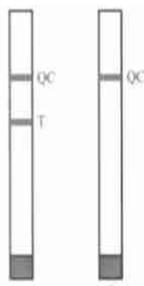


图 2 抗吗啡 mAb 胶体金交联物纸条的检测原理

Fig 2 Principle of detection by crosslinker of anti-morphine mAb and colloidal gold

QC: Quality control; T: Test region.

2.4 试制条检测结果 利用自制阳性样品和戒毒所提供阳性样品测定试制条敏感度为 200 $\mu\text{g/L}$ 。

3 讨论

免疫学方法检测小分子物质已经成为目前常用的手段。首先必须制备抗原特异性的 mAb 或者多抗。由于 mAb 的特异性使得其在应用中有着其他方法无法比拟的优点。毒品小分子为半抗原,与分子量较大的蛋白偶联后可以作为免疫原,从而制备抗体。胶体金标记试制条主要利用的原理为竞争结合。原理如图 2: 质控区(C)为兔抗小鼠的多克隆抗体,主要用于监测抗体是否失效;测试区(T)为兔血清白蛋白吗啡交联物。当样品带动试纸下端的胶体金颗粒向上迁徙时则阳性样品中抗体被特异性阻断,不能够与 T 区抗原结合,显示为两条带,而阴性样品则为一带。美国食品及药物管理局(FDA)将试制条检测的阳性指标定为 300 $\mu\text{g/L}$ ^[7],我们可以通过改善胶体金浓度以期达到此标准。

据统计,截止 1995 年底,我国登记在册的吸毒人员约有 52 万人,近年更是增长迅速。公安机关所破获的毒品案件中,80%以上与吗啡类毒品(包括鸦片、海洛因、吗啡等)有关。吗啡胶体金试制条的研制成功将会使现场检测更加简便。同时,由于本产品公安、医疗、招工和征兵等领域都有着广泛的应用前景,最终将会取得良好的经济效益及社会效益。

参考文献:

- [1] Kintz P, Bundeli P, Brre nneisen R, *et al.* Dose-concentration relationships in hair from subjects in a controlled heroin maintenance program[J]. *J Anal Toxicol*, 1998, 22(3): 231-236.
- [2] Logan BK, Oliver JS, Smith H. The measurement and interpretation of morphine in blood[J]. *Forensic Sci Int*, 1987, 35(2-3): 189-195.
- [3] Gasel JA, Bradbury WM, Venn RF. Properties of murine anti-morphine antibodies[J]. *Mol Immunol*, 1983, 20(12): 1419-1422.
- [4] Wainer BH, Fitch FW, Rothburg RM, *et al.* Morphine-3-succinyl-bovine serum albumin: an immunogenic hapten-protein conjugate[J]. *Science*, 1972, 176(39): 1143-1145.
- [5] 许晓光,朱 勇,刘雪松,等. 抗人 CD100 单克隆抗体的制备与初步鉴定[J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2003, 19(1): 80-82.
- [6] Johne B, Hansen K, Mork E. Colloidal gold conjugated monoclonal antibodies, studied in the BIAcore biosensor and in the Nycocard immunoassay format [J]. *J Immunol Methods*, 1995, 183(1): 167-174.
- [7] Nightingale SL. From the food and drug administration[J]. *JAMA*, 1991, 266(13): 1751.