

重金属离子的免疫检测研究进展

Advances in Heavy Metal Ions Immunoassay

刘功良¹, 王菊芳¹, 李志勇², 梁世中^{1*}

LIU Gong-Liang¹, WANG Ju-Fang¹, LI Zhi-Yong² and LIANG Shi-Zhong^{1*}

1 华南理工大学生物科学与工程学院, 广州 510640

2 广东检验检疫技术中心, 广州 510623

1 College of Bioscience and Bioengineering, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China

2 The center of analysis and quarantine in Guangdong, Guangzhou 510623, China

摘 要 农畜产品中残留的重金属离子已对人类安全构成严重威胁, 急需快速、高效的重金属残留检测方法。重金属离子免疫检测是一种新型的检测方法, 与传统检测方法相比, 具有省时、省力、费用低廉、便于携带、易于操作等优点。除了化学螯合剂之外, 植物螯合肽和金属硫蛋白也可用来制备重金属免疫原。重金属离子的免疫检测可分为多克隆抗体免疫检测和单克隆抗体免疫检测, 前者包括荧光偏振免疫检测, 后者包括间接竞争性 ELISA、一步法竞争性免疫检测和 KinExA 免疫检测。作为一种辅助方法, 胶体金快速免疫层析法可初步检测样品中的重金属离子浓度。

关键词 重金属离子, 多克隆抗体, 单克隆抗体, 免疫检测

中图分类号 Q81 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2006)06-0877-05

Abstract Heavy metal leftover on farm and stock products has become a big threat to human. It is necessary to develop some fast and efficient detection methods. Heavy metal immunoassays are new methods for detection of heavy metal ions. Compared to the traditional chemical methods, immunoassays are not only fast, cheap, simple, but also reasonably portable, highly sensitive and selective. It can be used as preliminary screening for rapid determination of heavy metal ions. Except chemical chelators, phytochelatin and metallothionein can also be used for preparing immunogen, both of them can chelate heavy metal ions to carrier protein. There are two prototype assays: polyclonal antibody immunoassay and monoclonal antibody immunoassay. The former includes fluorescence polarization immunoassay; the latter includes indirectly competitive ELISA, one-step competitive immunoassay and KinExA immunoassay. Among these assays, indirectly competitive ELISA which was used for determining heavy metal ions in the early days was easy to be interfered and showed false positive. Fluorescence polarization immunoassay which used polyclonal antibody for determining heavy metal ions was simple and cheap. KinExA instrument could be functioned as an immunosensor for environmental samples. One-step immunoassay which avoided to the addition of second antibody and chromogenic substrate was simple and sensitive. Colloidal gold enhanced immunochromatography assay is a semi-quantitation for determining heavy metal ions. As an adjunctive way for chemical methods, it has the potential application in rapid determination of heavy metal ions.

Key words heavy metal ions, polyclonal antibody, monoclonal antibody, immunoassay

Received: June 26, 2006; Accepted: July 19, 2006.

This work was supported by the grants from Guangdong planning technology programme (No. 2003C20409) and AQSIQ technology programme (No. 2004IK062).

* Corresponding author. Tel: 86-20-87114881; Fax: 86-20-87114881; E-mail: fesliang@scut.edu.cn

广东省科技计划项目(No. 2003C20409)及国家质检总局科技项目(No. 2004IK062).

重金属是有毒的、持久的环境污染物质,在农畜等产品中都有不同程度的残留。随着工业化进程的加快,重金属通过食物链的生物放大作用进入人体,在人体内长期积累,对人类健康构成严重威胁^[1]。传统的重金属检测方法多采用化学仪器检测,例如原子吸收光谱分析(atomic absorption spectroscopy, AAS)、电感耦合等离子体发射光谱(inductively coupled plasma atomic emission spectroscopy, ICP-AES)等,这些方法需要对大量的样品预处理,并且检测过程必须在集中大型分析仪器的室内进行,无法用于现场检测,具有费用高、处理量有限、检测时间长等缺陷,难以适应环境及市场产品的现场抽查、生产企业自查及产品进出口快速通关的要求^[2]。免疫学检测技术具有检测速度快、费用低廉、仪器简单易携、灵敏度高和选择性强等优点,可用于现场检验。20世纪90年代初期,国外已经建立了多种针对有机污染物的免疫检测方法,并且尝试将这些方法用于重金属离子的分析检测,迄今为止,免疫检测技术已经成功用于水中的镉(Cd²⁺)^[3]、汞(Hg²⁺)^[4]、铜(Cu²⁺)^[5]、铅(Pb²⁺)^[6]和铀(U⁶⁺)^[7]等的检测。本文综述了重金属免疫原的制备方法与重金属离子免疫检测模式及各自的研究进展。

1 重金属免疫原及其特异性单克隆抗体的制备

重金属离子免疫检测的关键在于重金属特异性单克隆抗体的制备,重金属特异性单克隆抗体制备的关键又在于重金属免疫原。由于重金属离子带有电荷,能与动物体内生物分子发生强烈的不可逆的反应,导致动物中毒,因此,可利用特异性的双功能螯合剂螯合重金属离子,形成能被动物免疫系统识别金属-螯合剂的复合物,但这些重金属-螯合剂复合物是分子量低于1kD的半抗原,免疫原性低,不足以引起免疫反应,还需将之与载体蛋白偶联,才能形成完整的免疫原。

制备重金属免疫原的关键在于双功能螯合剂的筛选,双功能螯合剂应具有两个作用,除了能特异性螯合重金属离子之外,还能与载体蛋白偶联,形成免疫原。制备重金属特异性单克隆抗体常用的双功能螯合剂主要是乙二胺四乙酸(ethylenediamine tetraacetic acid, EDTA)或二乙烯三胺五乙酸(diethylene-triaminepentaacetic acid, DTPA)的衍生物^[8,9],包括异硫氰酸苯基-EDTA、异硫氰酸苯基-DTPA、反式-环己基-DTPA等。此外, Wylie等人利用

还原型谷胱甘肽作为双功能螯合剂螯合Hg(II),并与钥孔血蓝素(keyhole limpet hemocyanin, KLH)偶联形成免疫原,制备Hg(II)的特异性单克隆抗体^[10]。Blake等人利用5-异硫氰酸苯基-1,10-菲啉-2,9-二羧酸(DCP)螯合UO₂²⁺,通过与KLH偶联,制备了UO₂²⁺特异性的单克隆抗体^[11]。除了双功能螯合剂之外,植物螯合肽(phytochelatin, PC)^[12]和金属硫蛋白(metallothionein, MT)^[13]也能与重金属离子配位形成低毒或无毒络合物,与载体蛋白偶联后,可以形成完整的免疫原。

在成功制备重金属抗原之后,可以通过小鼠免疫、细胞融和、杂交瘤筛选、抗体纯化等步骤制备重金属特异性单克隆抗体。

2 重金属离子的免疫检测模式

目前,重金属离子的免疫检测都是采用抗原抑制检测的方法,按照使用抗体的种类,可分为多克隆抗体免疫检测和单克隆抗体免疫检测。多克隆抗体免疫检测包括荧光偏振免疫检测(fluorescence polarization immunoassay, FPIA);单克隆抗体免疫检测包括间接竞争性酶联免疫吸附检测(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)、一步法免疫检测和KinExA免疫检测等。

2.1 多克隆抗体免疫检测

2.1.1 荧光偏振免疫检测:FPIA的原理是样品中的金属离子与过量螯合剂形成金属-螯合剂复合物后,与固定浓度的金属-螯合剂-荧光复合物竞争检测多克隆抗体上的结合位点,然后进入荧光偏振分析仪进行分析,通过与标准曲线对照得出金属离子的浓度^[14]。该方法利用多克隆抗体检测样品中重金属离子的含量,无需制备重金属特异性单克隆抗体,成本较低。

Johnson等人利用FPIA构建了检测Cd(II)-螯合物的标准曲线^[15],对待测样品中存在过量的无金属氨基丁烷的衍生物或其与Cu(II), Zn(II), Hg(II)的螯合物而言,该标准曲线同样有效。对Cd(II)-螯合物而言,检测范围为0~100 nmol/L,检测下限在1.0 nmol/L以下。交叉反应很低,足以构建检测浓度为0~100 nmol/L的Cd(II)-螯合物的标准曲线。

Johnson等人利用FPIA测定了Pb(II)的浓度^[16]。该方法利用针对Pb(II)-EDTA螯合物的多克隆抗体来检测土壤、固体废物渗滤液、空气尘埃、饮用水中的Pb(II)。试验结果表明,土壤样品的检

测结果与 AAS 的检测结果的相关系数(r)高达 0.96,固体废物渗滤液的检测结果与 ICP-AES 的检测结果相关系数(r)高达 0.93。这些样品的检测限可达 1 ppb,15 种非目标金属所造成的交叉反应均低于 0.5%。

2.2 单克隆抗体免疫检测

2.2.1 间接竞争性 ELISA 免疫检测

重金属间接竞争 ELISA 免疫检测法的原理是样品中的重金属离子与过量螯合剂形成可溶性的重金属-螯合剂复合物,将其与已经包被在酶标板上的重金属-螯合剂-蛋白质复合物竞争单克隆抗体的抗原结合位点,添加酶标二抗和底物显色,与标准曲线对照,即可得出样品中的重金属离子浓度。该方法是重金属免疫检测技术发展过程中最初使用的方法,与其他免疫检测方法相比,该方法易受干扰,造成检测结果的假阳性。

Khosraviani 等人利用竞争性 ELISA 法测定了环境水样中 $\text{Cd}(\text{II})$ 的含量^[17]。研究表明,环境水样中常见的 $\text{Ca}(\text{II})$ 、 $\text{Na}(\text{I})$ 和 $\text{K}(\text{I})$ 对 $\text{Cd}(\text{II})$ 的检测没有任何干扰;当水样中 $\text{Fe}(\text{III})$ 、 $\text{Mg}(\text{II})$ 和 $\text{Pb}(\text{II})$ 离子浓度超过 1 mmol/L 时,该方法可以测定 7 ~ 500 ppb 的 $\text{Cd}(\text{II})$;当 $\text{Zr}(\text{II})$ 和 $\text{Ni}(\text{II})$ 低于 100 $\mu\text{mol/L}$ 时,对检测的影响最小;当 $\text{Ir}(\text{III})$ 和 $\text{Mn}(\text{II})$ 的浓度低于 100 $\mu\text{mol/L}$ 时,使得检测对 $\text{Ir}(\text{III})$ 和 $\text{Mn}(\text{II})$ 造成的干扰不敏感;而当 $\text{Hg}(\text{II})$ 浓度超过 1 $\mu\text{mol/L}$ 时候会影响检测结果,造成假阳性。

啟田勤等人利用竞争性 ELISA 检测了 18.8 ppb ~ 2.8 ppm 的 $\text{Cd}(\text{II})$ ^[18]。研究表明,在检测 $\text{Cd}(\text{II})$ 的过程中,无金属的 EDTA 及其与 Ca 、 Cu 、 Fe 、 Hg 、 Mg 、 Ni 、 Pb 、 Zn 的复合物与抗体的交叉反应均低于 0.73%。

2.2.2 一步法免疫检测

在间接 ELISA 免疫检测的基础上,Darwish 等人研究了利用一步法竞争性免疫检测(直接竞争 ELISA 法)测定重金属离子的浓度。其原理是把重金属离子特异性的单抗包被在酶标板内,样品中的金属离子先与过量螯合剂混合形成重金属离子-螯合剂复合物,并与已知浓度的重金属离子-螯合剂-酶复合物混合,二者在包被有抗体的微孔中竞争单克隆抗体的抗原结合位点,加底物显色,与标准曲线对照得出重金属离子浓度。该方法避免了添加二抗和显色底物,成本较低,并且检测的特异性好,灵敏度高,检测下限在 1 ppb 以下。

Darwish 等人采用一步竞争性免疫检测法对环境水样中的 $\text{Cd}(\text{II})$ 进行检测^[19]。该检测对 $\text{Cd}(\text{II})$ 的灵敏度很高,检测下限可达 0.3 ppb,水中常见的

$\text{Ca}(\text{II})$ 、 $\text{Mg}(\text{II})$ 和 $\text{Fe}(\text{III})$ 对检测结果并无干扰。将检测结果与 AAS 检测的结果进行比较,免疫检测的精确度令人满意,分析多批样品时,批内分析精确度的变异系数为 3.6% ~ 10.9%,批间分析精确度的变异系数为 4.81% ~ 10.21%。

接着,Darwish 等人采用一步竞争性免疫检测法对人血清中的 $\text{Cd}(\text{II})$ 进行检测^[20]。当检测 $\text{Cd}(\text{II})$ 的浓度范围为 0.24 ~ 100 ppb 时,检测结果的变异系数 $\leq 10\%$ 。将检测结果与 AAS 检测的结果进行比较,两者密切相关,相关系数达 0.984,并且检测的特异性很高,人血清中常见的 Cu 、 Zn 、 Mg 、 Hg 、 Ca 、 Ni 、 Fe 和 Pb 等离子对检测的结果影响不大。

2.2.3 KinExA 免疫检测

在间接 ELISA 的基础上,Blake 等人开发了 KinExA 免疫检测法^[21]。KinExA 是一种计算机控制的流式荧光计,由毛细管流/观察单元组成并配有多微孔筛,把蛋白质-螯合剂-金属复合物固定在硬质的小珠上面,然后利用微孔筛将其放入观测单元内,将抗体、可溶性金属-螯合剂复合物、抗体-抗原复合物三者的混和的溶液快速流经小珠,部分带有空白抗原结合位点的抗体分子固定在小珠上,结合了可溶性金属-螯合物的抗体、可溶性金属-螯合物都被冲洗掉,添加荧光标记的二抗,检测结合在小珠上的抗体分子,通过对照标准曲线,即可得出重金属离子的浓度。KinExA 免疫检测的灵敏度比间接 ELISA 微板法高 10 ~ 1000 倍,目前,应用 KinExA 仪器对重金属离子进行检测只是在实验室中进行,Blake 等人正与 Sapidyn 仪器公司和 KinExA 制造商进行合作使这种仪器小型化并能应用于现场检测。

Blake 等人利用 KinExA 法对 UO_2^{2+} 进行了检测^[22]。当 UO_2^{2+} 的浓度在 0.24 ~ 1.2 ppb,检测的结果线性相关系数较高。

Yu Haini 等人利用 KinExATM 3000 建立了一个自动的免疫传感器,并对 $\text{U}(\text{VI})$ 进行检测^[23]。该传感器能对 $\text{U}(\text{VI})$ 的检测范围可达 1.4 ~ 24 ppb,检测的变异系数为 3.5% ~ 5.9%,为环境和诊所样品中 $\text{U}(\text{VI})$ 提供了快速、廉价的检测。

2.3 免疫胶体金快速诊断

胶体金快速免疫层析法(Colloidal Gold Enhanced Immunochromatography assay, CGEIA)属于单克隆抗体免疫检测的一种,能定性或者半定量检测重金属离子,其原理是以微孔滤膜为载体,包被特异性单克隆抗体,加入待检标本之后,经滤膜的毛细管作用或渗透作用使标本中的抗原与膜上包被的单抗结合,再

用胶体金结合物标记而达到检测目的^[24]。

在对农畜产品的现场抽查及进出口快速通关检测中,可以利用 CGEIA 对产品中的重金属离子含量进行初测。根据试纸条上面的颜色深浅程度判断重金属离子含量是否超标,若超标或者是接近超标,则可选择化学方法精确测定重金属离子含量。利用免疫胶体金快速诊断来初测农畜产品中的重金属离子含量,可以节省时间,大大加快检测进程,提高现场抽查和快速通关检测的效率。目前,国内外对这方面的研究还属于空白。

3 展望

重金属是一类移动性差、难以降解并具有潜在危害的重要土壤污染物,具有隐蔽性、长期性和不可逆的特点,不但会严重影响农畜产品的产量与品质,更重要的是它可通过食物链的生物放大作用进入人体,威胁人体健康^[25],其毒理作用表现在:造成生殖障碍,影响胎儿正常发育;威胁儿童和成人身体健康,能够导致各种“公害病”和癌症等,最终降低了人的身体素质,阻碍了人类社会的可持续发展。研究表明,重金属对人类的危害是多方面、多层次的^[26]。因此,快速而又准确地检测样品中的重金属离子至关重要。

传统的重金属检测方法多采用化学仪器检测,如利用 AAS、ICP-AES 或电化学方法等,检测仪器昂贵,样品要经过湿法消解或微波消解,逐个测定单种重金属浓度,测量精度虽可达到 mg/kg 或更高,但检测步骤繁琐,检测成本高,需耗时 2d 左右,难以适应环境及市场产品的现场抽查及产品进出口快速通关的要求,而重金属的免疫检测正好可以弥补这些缺陷,具有检测速度快,灵敏度高,选择性强,操作简单等优点。它是一种辅助的检测方法,并非用来取代传统的检测方法。它可以用于重金属污染样品的现场检测和批量样品的快速扫描检测,对待检测的样品进行初筛,能减少检测费用,并且能提现场检测的效率和质量。重金属离子的免疫检测仍有许多待改进的地方。例如筛选或合成特异性好的新型螯合剂用来螯合重金属离子用来制备重金属半抗原,利用 PC 和 MT^[27]与重金属离子配位形成络合物用以制备免疫原,制备特异性高的单克隆抗体用于检测,开发新型的简易传感器用于现场检测等。近年来,重组单克隆抗体的建构技术、基因工程抗体和蛋白质工程技术为重金属特异性单克隆抗体的制备提供了新的机遇,为重金属离子的免疫学检测提供了广阔

的前景。

REFERENCES(参考文献)

- [1] Lu YT(陆贻通), Shen GQ(沈国靖), Hua YF(华银锋). Advances on the technique of rapid determination of heavy metals by enzyme inhibition in the contaminated environment. *Journal of Safety and Environment* (安全与环境学报), 2005, **5**(2): 68-71
- [2] Wang JF(王菊芳), Li ZY(李志勇). Rapid determination of heavy metal residue. *Biotechnology* (生物技术), 2006, **16**(2): 95-97
- [3] Chakrabarti P, Hatcher FM, Blake II RC *et al.* Enzyme immunoassay to determine heavy metals using antibodies to specific metal-EDTA complexes: optimization and validation of an immunoassay for soluble indium. *Analytical Chemistry*, 1994, **217**: 70-75
- [4] Westhoff CM, Lopez O, Goebel P *et al.* Unusual amino acid usage in the variable regions of mercury-binding antibodies. *PROTEINS: Structure, Function, and Genetics*, 1997, **37**: 429-440
- [5] Jones RM, Yu Haini, Delehanty JB *et al.* Monoclonal antibodies that recognize minimal differences in the Three-dimensional structures of metal-chelate complexes. *Bioconjugate Chem*, 2002, **13**: 408-415
- [6] Khosraviani M, Blake II, Pavlov AR *et al.* Binding properties of a monoclonal antibody directed toward Lead-chelate complexes. *Bioconjugate Chem*, 2000, **11**: 267-277
- [7] Blake II RC, Pavlov AR, Khosraviani M *et al.* Novel monoclonal antibodies with specificity for chelated uranium(VI): Isolation and binding properties. *Bioconjugate Chem*, 2004, **15**: 1125-1136
- [8] Delehanty JB, Jones RM, Bishop TC *et al.* Identification of important residues in metal-chelate recognition by monoclonal antibodies. *Biochemistry*, 2003, **42**: 14173-14183
- [9] Blake II RC, Delehanty JB, Khosraviani M. Allosteric binding properties of a monoclonal antibody and its fab fragment. *Biochemistry*, 2003, **42**: 497-508
- [10] Wylie DE, Di Lu, Carlson LD *et al.* Monoclonal antibodies specific for mercuric ions (hybridomas/metals). *Immunology*, 1992, **89**(5): 4104-4108
- [11] Blake DA, Pavlov AR, Yu Haini *et al.* Antibodies and antibody-based assays for hexavalent uranium. *Analytica Chimica Acta*, 2001, **444**: 3-11
- [12] Quan XQ(全先庆), Zhang HT(张洪涛), Dan I(单雷) *et al.* Advances in plant metallothionein and its heavy metal detoxification mechanisms. *Hereditas* (遗传), 2006, **28**(3): 375-382
- [13] Wu FB(邬飞波), Zhang GP(张国平). Phytochelatin and its function in heavy metal tolerance of higher plants. *Chinese Journal of Applied Ecology* (应用生态学报), 2003, **14**(4): 632-636
- [14] Johnson DK. Fluorescence polarization immunoassays for metal ions. *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening*, 2003, **6**: 245-255
- [15] Johnson DK. A fluorescence polarization immunoassay for cadmium (II). *Analytica Chimica Acta*, 1999, **399**: 161-172

- [16] Johnson DK , Combs SM , Parsen JD *et al.* Lead analysis by Anti-chelate fluorescence polarization immunoassay. *Environ Sci Technol* , 2002 , **36** : 1042 – 1047
- [17] Khosraviani M , Pavlov AR , Flowers GC *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
- [18] Tawarada K , Sasaki , Ohmura N *et al.* Preparation of anti-cadmium-EDTA complex monoclonal antibody and its binding specificity. *The Japan Society for Analytical Chemistry* , 2003 , **52** (8) : 583 – 587
- [19] Darwish IA , Blake DA. One-step competitive immunoassay for cadmium ions : development and validation for environmental water samples. *Analytical Chemistry* , 2001 , **73** : 1889 – 1895
- [20] Darwish IA , Blake DA. Development and Validation of a One-Step Immunoassay for Determination of Cadmium in Human Serum. *Analytical Chemistry* , 2002 , **74** : 52 – 58
- [21] Blake DA , Jones RM , Blake II RC. Antibody-based sensors for heavy metal ions. *Biosensors & Bioelectronics* , 2001 , **16** : 799 – 809
- [22] Blake DA , Pavlov AR , Yu Haini *et al.* Antibodies and antibody-based assays for hexavalent uranium. *Analytical Chemistry* , 2001 , **444** : 3 – 11
- [23] Yu Haini , Jones RM , Blake DA. An immunosensor for autonomous in-line detection of heavy metals : validation. *International Journal of Environmental & Analytical Chemistry* , 2005 , **15** : 12 – 13
- [24] Chen FM(陈凤梅) , Li J(李娟) , Qu YJ(曲原君) *et al.* Application and research progress of the immune colloidal gold technique. *Chinese Journal of Veterinary Drug* (中国兽药杂志) , 2004 , **38** (8) : 33 – 35
- [25] Lang ML(郎明林) , Zhang YX(张玉秀) , Chai TY(柴团耀) . Advances in the research of genetic engineering of heavy metal resistance and accumulation in plants. *Chinese Journal of Biotechnology* (生物工程学报) , 2004 , **20** (2) : 157 – 164
- [26] Sun ZH(孙兆海) , Zheng CR(郑春荣) , Zhou DM(周东美) *et al.* Effects of soil Pb pollution on growth of *Brassica chinensis* and *Ipomoea aquatica* and urease activities. *Rural Eco-environment* (农村生态环境) , 2005 , **21** (1) : 38 – 43
- [27] Deng X(邓旭) , Li QB(李清彪) , Lu YH(卢英华) *et al.* Uptake of nickel from industrial wastewater by genetically engineered *Escherichia coli* JM109. *Chinese Journal of Biotechnology* (生物工程学报) , 2003 , **19** (3) : 343 – 348