

抗赭曲霉毒素 A 单克隆杂交瘤细胞系的建立及特性

江 涛 王环宇 高秀芬 王玉平 宫慧之 田 静 李凤琴 计 融
(中国疾控中心营养与食品安全所,北京 100021)

摘 要:为快速检测食物中的赭曲霉毒素 A,建立了抗 Ochratoxin A 的单克隆杂交瘤细胞株。用 OA-匙孔噻血蓝素(OA-KLH)偶联物免疫 8~10 周龄雌性 Balb/c 小鼠后,取脾细胞与小鼠骨髓瘤细胞系 Sp2/0 融合,经过 3~4 次亚克隆建立了 3 个稳定分泌抗赭曲霉毒素 A 抗体的杂交瘤细胞株,分别命名为 10G7、10G10 和 5G11。将上述 3 株杂交瘤细胞分别注入 Balb/c 小鼠腹腔,获得含抗赭曲霉毒素 A 单克隆抗体的腹水。将腹水用饱和硫酸铵法纯化,得到 10G7、10G10 和 5G11 单克隆抗体。其中 10G10、5G11 单克隆抗体的 Ig 亚类为 IgG1,10G7 单克隆抗体的 Ig 亚类为 IgG_{2a}。抗体腹水的稀释度为 $1.6.4 \times 10^6 \sim 1.1.3 \times 10^8$,参考工作浓度为 $1.1.0 \times 10^6 \sim 1.3.2 \times 10^7$ 。纯化后 10G7 抗体的 IgG 含量为 16.4 g/L,亲和常数为 9×10^{-8} mol/L。10G7 抗体与其它结构类似物无交叉反应,具有较高的特异性。

关键词:赭曲霉毒素 A; 杂交瘤细胞; 单克隆抗体

Development of hybridoma cell lines excreting monoclonal antibodies against Ochratoxin A

Jiang Tao, et al.

(National Institute for Nutrition and Food Safety, China CDC, Beijing 100021)

Abstract: Three hybridoma cell lines excreting monoclonal antibodies against Ochratoxin A, coded 10G7, 10G10 and 5G11, respectively, were obtained by fusing murine Sp2/0 cells with spleen cells from Balb/c mice immunized with OA-KLH conjugate and subcloning for 3 to 4 cycles. The ascites containing monoclonal antibodies against Ochratoxin A was gained via inoculation of the hybridoma cell into abdominal cavity of Balb/c mice. Monoclonal antibodies produced by the hybridoma cells were tested for subtypes and designated as IgG1 for both 10G10 and 5G11, and IgG_{2a} for 10G7, respectively. The titers of antibodies in ascites ranged from $1.6.4 \times 10^6$ to $1.1.3 \times 10^8$ and the working concentration between $1.1.0 \times 10^6$ and $1.3.2 \times 10^7$. IgG concentration in purified ascites yielded by hybridoma cell with the code number of 10G7 reached to 16.4 g/L and its affinity constant was 9×10^{-8} mol/L. The monoclonal antibodies obtained in the present study was of relatively high specificity to ochratoxin A, owing to the results of no cross reactions between the monoclonal antibodies against Ochratoxin A with the analogues of Ochratoxin A were found.

Key Words: Ochratoxins A; hybridoma; monoclonal antibodies

赭曲霉毒素(Ochratoxins)是曲霉属和青霉属产生的一组结构类似、主要危及人和动物肾脏的有毒代谢产物,有 A、B、C、D 4 种化合物,其中毒性最大、与人类健康关系最密切、对农作物污染最严重、分布最广泛的是赭曲霉毒素 A(Ochratoxin A,OA),它是一种对肝脏和肾脏毒性强力,并有致畸、致突变和致癌作用的真菌毒素。赭曲霉毒素 A 主要污染粮食作物中的小麦、玉米等农产品。由于 OA 的危害,世界卫生

组织/粮农组织联合专家委员会对 OA 相关肾病的流行病学、遗传毒性和对动物的肾毒性资料进行了深入研究,在其第 44 届会议上提出了 100 ng/kg BW 的每周容许摄入量(provisional tolerable weekly intake, PTWI),食品添加剂和污染物的法典委员会也在第 31 次会议上建议粮食及其制品中 OA 最高容许量为 5 或 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$,并且有逐步降低其限量标准的趋势。^[1]

This work was supported by the Grant from National Science and Technology Program Funds of Ministry of Science and Technology, China. (2001BA804A20)

基金项目:国家“十五”科技攻关项目(2001BA804A20)。

作者简介:江 涛 男 硕士

到目前为止,全世界已有 11 个国家制定了食品(1~50 $\mu\text{g}/\text{kg}$)和动物饲料(100~1000 $\mu\text{g}/\text{kg}$)中 OA 的限量标准,这些国家主要集中在欧洲。我国尚无粮食中 OA 的限量标准。由于 OA 主要污染小麦、玉米等农产品,而我国人民的饮食习惯也主要是以小麦、玉米等粮食产品为主,因此我国急需制定粮农产品中 OA 的限量标准,保护我国人民的身体健康。制定 OA 的国家标准首先需要对我国小麦、玉米等谷物产品中 OA 的污染水平进行调查,而我国目前检测 OA 的国家标准方法是薄层色谱法,该方法用目测半定量,已不适应检测大量样品的实际需要,并且该方法需要大量接触 OA 标准品,不利于保护操作者的健康。为此我们建立了免疫学检测方法,即建立在单克隆抗体基础上的 ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) 检测法。该方法具有简单、快速、高灵敏度、高特异性和可同时检测大量样品等多项优点,有着广泛的应用前景,尤其适用于基层检验部门大面积筛选样品之需。同时,我们在该项研究的基础上形成具有我国知识产权的商品试剂盒并申报我国的国家标准检测方法。

真菌毒素的免疫检测方法主要包括两个方面,即特异性抗体的制备和检测方法(如:ELISA)的建立。本研究运用 B 淋巴细胞杂交瘤技术,制备出抗赭曲霉毒素 A 特异性的单克隆抗体。

1 材料与方 法

1.1 材料

CO_2 培养箱(美国 Queue 公司)、洁净工作台(北京半导体设备一厂)、生物倒置显微镜(日本奥林巴斯光学株式会社)、酶标分析仪(SUNRISE)、电子分析天平(瑞士 Mettler 公司)、低温高速离心机(德国 Hermle 公司)、普通离心机(北京医用离心机厂)、电泳仪(BIO-RAD)、微量可调移液器(Gilson、Fisher)、细胞培养板(96 孔,美国 Costar 公司;24 孔,美国 Gbco 公司)、酶标板(96 孔,美国 Corning 公司)、玻璃及塑料制品等。

赭曲霉毒素 A (Ochratoxin A)、脱氧雪腐镰刀菌烯醇(DON)、玉米赤霉烯酮(ZEN)、展青霉素、伏马菌素 B1、T-2 毒素、牛血清白蛋白(BSA)、匙孔嘁血蓝素(KLH)、抗体亚类测定试剂盒(IgM, IgG, IgA, IgD, IgG₁, IgG_{2a}, IgG_{2b}, IgG₃)均购自美国 Sigma 公司;RP-MII640 培养基、HAT 选择性培养基、HEPES、福氏佐剂(完全、不完全)、二甲基亚砷(DMF)、吐温 20(Tween 20)、聚乙二醇(PEG, MW 5000)、青链霉素,均购自 Gbco 公司;辣根过氧化物酶羊抗鼠 IgG(北京中山试剂公司)、30% H_2O_2 (优级纯,北京化工

厂);二甲基甲酰胺、过碘酸钠、辛酸、硼氢化钠、无水乙醇、乙醚、柠檬酸、磷酸氢二钠、磷酸二氢钠、磷酸二氢钾、氯化钾、氯化钠、氢氧化铵、硫酸铵、氢氧化钠、无水碳酸钠、碳酸氢钠、乙酸钠等均为分析纯以上,购自北京化学试剂商店。

溶液系统

ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) 使用液包被液 0.05 mol/L 碳酸盐缓冲液, pH 9.6。

洗涤液 PBS-T, 含 0.05% Tween20 的 0.05 mol/L PBS(体积分数)。

底物缓冲液 0.1 mol/L 柠檬酸加 0.2 mol/L 磷酸氢二钠, pH 5.0

底物溶液 10 mg TMB 加入 1 mL 二甲基甲酰胺, 冷冻保藏。用时取此溶液 75 μL , 加 10 mL 底物缓冲液和 10 μL H_2O_2 。

终止液 2 mol/L H_2SO_4 。

抗体稀释液 含 0.1% (体积质量) BSA 的 0.05 mol/L PBS。

细胞系与实验动物

小鼠骨髓瘤细胞系 Sp2/0 由本室传代, 并经 8-氮杂鸟嘌呤处理。

Balb/c 小鼠购自军事医学科学院实验动物研究所动物繁育场。

1.2 方法

1.2.1 人工抗原的制备 OA 与载体蛋白 KLH、BSA 的连接按 Chu 等^[2]的方法进行, 其接合物的摩尔比率用 BCA 蛋白测定试剂盒及紫外光谱吸收法进行测定。^[3]

1.2.2 免疫动物 采用小剂量长周期的免疫方案。对 6~8 周龄的雌性 Balb/c 小鼠(体重 18~20 g), 首次免疫用 100 μg OA-KLH 与等量完全福氏佐剂混匀, 腹腔注射。2 周后, 再用 50 μg OA-KLH 与等量不完全福氏佐剂混匀后, 腹腔注射。此后每隔两周用 50 μg OA-KLH 与等量不完全福氏佐剂混匀, 腹腔注射。8 周后脾内免疫 50 μg OA-KLH 作为加强免疫, 3 d 后取脾融合。

1.2.3 细胞融合 免疫小鼠脾细胞与骨髓瘤细胞(Sp2/0)以 10:1 混合, 用 50% 聚乙二醇(PEG, MW5000)作融合剂。融合细胞悬于含 20% 小牛血清的 HAT 选择培养基内, 分种于加有 Balb/c 小鼠腹腔渗出细胞作滋养层的 96 孔细胞培养板中, 置 5% CO_2 、37 $^{\circ}\text{C}$ 孵箱中培养, 当镜检杂交瘤克隆生长达 1/3~1/2 视野时, 取上清液进行筛选。

1.2.4 杂交瘤筛选及抗体检测 以 OA-BSA 为包被抗原, 用间接非竞争 ELISA 法筛选分泌抗 OA 抗体的细胞孔, 用毒素间接竞争抑制性 ELISA 法确证。

以免疫小鼠的血清为阳性对照,以 Sp2/0 细胞培养的上清液为空白对照,以细胞培养板中未长出克隆的细胞培养上清液为阴性对照,阳性细胞孔的判定标准为 $(A_{\text{试验}} - A_{\text{空白}})/(A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}}) \geq 2.1$ 。

1.2.5 杂交瘤细胞的克隆化 采用培养瓶内准确计数稀释法,^[4]将阳性克隆细胞吹匀,取 10 μL 置培养瓶内,倒置显微镜下准确计数细胞个数,将培养瓶内细胞稀释到 100 个/mL,再从培养瓶中取 1 mL 稀释至 10 mL,接种于加有 Balb/c 小鼠腹腔渗出细胞作滋养层的 96 孔细胞培养板中,置 5% CO_2 、37 $^{\circ}\text{C}$ 孵箱中培养,当镜检杂交瘤克隆生长达 1/3 ~ 1/2 视野时,取上清液进行检测,直至所有细胞生长孔的培养上清液均呈阳性为止。当连续 3 次 100% 阳性时,即可将杂交瘤细胞冻存于液氮罐中。

1.2.6 单克隆抗体的生产 采用动物体内诱生单克隆抗体的方法。吹打培养的杂交瘤细胞,1000 r/min 离心 10 min,弃上清液,用生理盐水将杂交瘤细胞悬浮混匀,并将细胞数调至 $2 \times 10^6/\text{mL}$,每只 Balb/c 小鼠腹腔注射 0.5 mL 杂交瘤细胞,并同时于对侧腹腔注射 0.5 mL 降植烷和不完全福氏佐剂混合物(1:1 混和),10 ~ 14 d 后收集腹水。

1.2.7 单克隆抗体的纯化 采用饱和硫酸铵法对腹水进行纯化。^[5]

1.3 单克隆抗体的鉴定

抗体的免疫球蛋白类别及亚类鉴定采用抗体亚类测定试剂盒。抗体 IgG 含量采用 BCA 蛋白测定试剂盒进行测定。抗体分子量采用 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)法。^[6]

抗体滴度测定以 OA-BSA 为包被抗原,从 1 10000 倍开始将抗体进行倍比稀释,以 Sp2/0 细胞培养上清液为阴性对照,用间接非竞争 ELISA 方法测定抗体滴度,以 $(A_{\text{试验}} - A_{\text{空白}})/(A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}}) \geq 2.1$ 的最大稀释倍数为滴定终点。抗体亲和力的测定采用间接非竞争性 ELISA 法,即测定抗体的亲和常数。^[7]抗体的特异性和抗体的灵敏度用间接竞争抑制性 ELISA 法进行测定,参试毒素为脱氧雪腐镰刀菌烯醇(DON)、玉米赤霉烯酮(ZEN)、展青霉素、伏马菌素 B1、T-2 毒素和载体蛋白 BSA。

2 结果

2.1 人工抗原的制备 通过紫外光谱吸收法证明半抗原 OA 与载体蛋白 KLH、BSA 已经连接成功,其摩尔比为 8.5 和 9.7。

2.2 单克隆抗体的制备 用 OA-KLH 免疫 Balb/c 小鼠获得了较好的免疫应答。细胞融合后,经间接非竞争 ELISA 筛选,并用间接竞争 ELISA 确证,从中选择出对 OA 毒素有强抑制而阳性对照孔较强的细胞株,经 3 ~ 4 次亚克隆,建立了稳定分泌抗 OA 毒素单克隆抗体的杂交瘤细胞株,分别命名为 10G7、10GI0 和 5GI1。半年内对获得的细胞株进行多次冻融,其分泌抗体的能力和稳定性均无改变。

2.3 单克隆抗体特性的鉴定

2.3.1 抗体的亚类、分子量、杂交瘤细胞产生的腹水稀释度、亲和常数等见表 1。

表 1 单克隆抗体特性

杂交瘤细胞系	抗体亚类	分子量 kD	IgG 含量 g/L	腹水稀释度	参考工作稀释度	亲合常数 ml/L
10G7	IgG _{2a}	150	16.4	1 1.3 $\times 10^8$	1 1.6 $\times 10^7$	9.0 $\times 10^{-8}$
10GI0	IgG1	150	-	1 6.4 $\times 10^6$	1 1.0 $\times 10^6$	6.4 $\times 10^{-8}$
5GI1	IgG1	-	-	-	-	-

注:“-”:为未做此项试验。

2.3.2 用间接竞争性 ELISA 法测得 OA 单克隆抗体与脱氧雪腐镰刀菌烯醇(DON)、玉米赤霉烯酮(ZEN)、展青霉素、伏马菌素 B1、T-2 毒素和载体蛋白 BSA 的交叉反应率,见表 2。

表 2 OA 单克隆抗体与其它类似物的交叉反应率 %

杂交瘤细胞系	DON	ZEN	展青霉素	伏马菌素 B1	T-2 毒素	BSA
10G7	<1	<1	<1	<1	<1	<1
10GI0	<1	<1	-	-	<1	<1
5GI1	-	-	-	-	-	<1

注:“-”:为未做此项试验。

2.3.3 用间接竞争性 ELISA 法测得 10G7 单克隆抗体与 OA 毒素的竞争抑制曲线,见图 1。

由图 1 可见,曲线的线性范围在 1 ~ 1000 ng/mL 之间,50% 的抑制浓度为 200 ng/mL。通过 STATA 统计软件作回归分析,得到回归方程: $y = 0.9645 - 0.217 \log x$ 。

3 讨论

OA 是一种强力的肝脏和肾脏毒,并是有致畸、致突变和致癌作用的真菌毒素。国内外的资料均提示 OA 污染广泛,因而有必要建立敏感性好、特异性强、简便快速的免疫检测方法。

OA 是一种小分子物质,其分子量为 403.8,是典型的半抗原,在免疫反应中只具有反应原性而不具有免疫原性,因此为了制备其相应抗体,必须将此

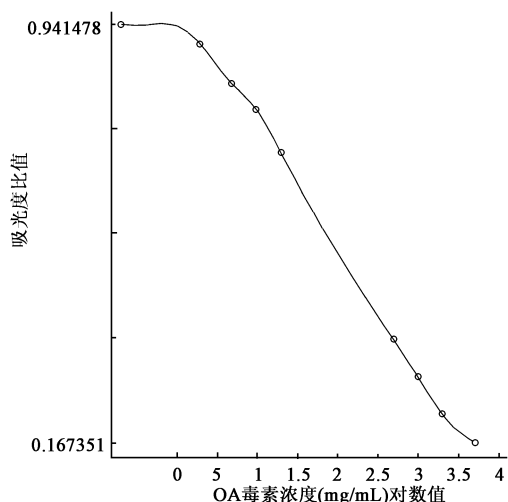


图1 抗体与OA毒素竞争抑制曲线

物质连接在某种特定大分子蛋白载体上。本研究采用碳二亚胺法将OA分别与KLH、BSA连接,作为免疫原和包被抗原,取得了满意的效果,经过3~4次亚克隆后,得到了理想的分泌特异性抗体的杂交瘤细胞株。

在经典的单克隆抗体制备中,细胞克隆化技术多采用有限稀释法,需要进行系列稀释,操作繁琐,对细胞计数的要求也较高,工作量大,需要的克隆次数较多。在本实验中采用了培养瓶内准确计数细胞稀释法,提高了实验效率,减少了克隆次数,在较短的时间里,得到了分泌目标单克隆抗体的细胞株。

传统的腹水法生产单克隆抗体,需要在腹腔注射杂交瘤细胞株一周以前先用降植烷处理小鼠,灭活腹腔巨噬细胞,以增加腹水含量。本研究在腹腔注射杂交瘤细胞株的同时,在对侧腹腔注射降植烷

和福氏不完全佐剂的混合液,效果良好,腹水滴度与传统的腹水法生产单克隆抗体的滴度相同,腹水量多于传统的腹水生产法,并简化了实验步骤。

通过上述研究,我们制备的单克隆抗体对OA有较高的特异性,检测灵敏度可达到 $2\mu\text{g}/\text{kg}$,明显优于传统的国标检测方法-薄层色谱法($10\mu\text{g}/\text{kg}$),且方法简便,易于操作,有广泛的应用前景,尤其适用于大量样品的筛选和普查。同时,我们也在该项研究的基础上形成具有我国自主知识产权的商品试剂盒并准备申报我国的国家标准检测方法。

参考文献:

- [1] 李凤琴,计融. 赭曲霉毒素A与人类健康关系研究进展[J]. 卫生研究. 2003,32(2):172-175
- [2] Chu F S, Chang F C C, Hinsdill R D, et al. Production of Antibody Against Ochratoxin A [J]. Appl Environ Microbiol. 1976,31:831.
- [3] Candlish A G, Candlish, William H, et al. Determination of Ochratoxin A by monoclonal antibody based enzyme immunoassay[J]. J Assoc Off Anal Chem, 1988,71:961.
- [4] 马世兴. 准确快速的细胞克隆化试验研究[J]. 单克隆抗体通讯. 1993,9(2):70-72.
- [5] 徐志凯. 实用单克隆抗体技术[M]. 西安:陕西科学技术出版社,1991.
- [6] J 萨姆布鲁克, E F 弗里奇, T 曼尼阿蒂斯, 著. 分子克隆实验指南[M]. 第2版. 北京:科学出版社,1996,880-887.
- [7] 万文徽. 单克隆抗体亲和常数的测定[J]. 单克隆抗体通讯. 1993,9(2):72-75.

[收稿日期:2003-10-20]

中图分类号:R15;R379 文献标识码:A 文章编号:1004-8456(2004)01-0014-04

新食品添加剂 Actilight

Actilight 的双歧原能刺激肠道菌落,在碳水化合物和类脂化合物的新陈代谢中参与某些维生素的合成(B族维生素和维生素K),并参与肠道食物的调节。欧洲、日本和美国的一些食品厂家使用 Actilight 作为生产奶、酸奶、糖、鲜奶酪、果酱、香肠、火腿、饼干、药茶、谷物食品的添加剂。