

抗微囊藻毒素单克隆抗体的研制

李楠 计融 韩春卉 江涛 吴岩
(中国疾病预防控制中心营养与食品安全所,北京 100021)

摘要:为研制抗微囊藻毒素(Microcystins,简称 MC)的特异性单克隆抗体,用 MC- KLH 偶联物免疫 6~8 周龄雌性 BalB/c 小鼠,取脾细胞与小鼠骨髓瘤细胞 Sp2/0 融合,经过 3~4 次亚克隆建立稳定分泌抗 MC 的杂交瘤细胞株。将杂交瘤细胞注入 BalB/c 小鼠腹腔,生产出抗 MC 的单克隆抗体。得到了抗微囊藻毒素单克隆抗体细胞株,命名为 G5,抗体亚类为 IgG2a,亲和力常数 2.9×10^{-11} mol/L,分子量 150 kD,加标回收率在 81.5%~125.0%之间,与其他结构类似物的交叉反应率 <1%。筛选出的抗微囊藻毒素单克隆抗体具有较好的特异性。
关键词:海藻毒素类;酶联免疫吸附测定;抗体;单克隆

Preparation of Monoclonal Antibody Against Microcystins

LI Nan, JI Rong, HAN Chun-hui, JIANG Tao, WU Yan
(National Institute for Nutrition and Food Safety, Chinese CDC, Beijing 100021, China)

Abstract: For development of monoclonal antibodies against Microcystin, a hybridoma cell line steadily secreting monoclonal antibodies against Microcystin, coded G5, was obtained by fusing murine Sp2/0 cells with spleen cells from mice immunized with MC-KLH conjugate and subcloning for 3 to 4 cycles. The ascites containing monoclonal antibodies against MC was gained via inoculation of the hybridoma cells into the abdominal cavity of BalB/c mice. The antibody subclass is IgG2a, affinity constant is 2.9×10^{-11} mol/L, molecular weight is 150 kD, recovery is 81.5%~125.0%, cross-reaction <1%. The monoclonal antibodies thus prepared are highly sensitive and specific against microcystin.
Key word: Lyngbya Toxins; Enzyme-Linked Immunosorbent Assay; Antibodies, Monoclonal

微囊藻毒素(Microcystins,简称 MC)是水体中蓝藻爆发性繁殖产生的二级毒性代谢物。MC 为肝毒素,能在贻贝和扇贝的消化腺内积累并沿食物链进入到鱼、鸟、哺乳动物和人等高级营养生物体内,引起中毒甚至死亡。MC 是一个结构相似的环七肽家族,已知有 60 余种异构体,其中存在最普遍也是含量较多的是 MC-LR,MC-RR,MC-YR(L、R、Y 分别代表 Leu(亮氨酸)、Arg(精氨酸)和 Tyr(酪氨酸))。鉴于其危害性,我国现行的生活饮用水水质卫生规范^[1]、2001 年卫生部卫法监发[2001]161 号文件附件^[2]和地表水环境质量标准[GB 3838—2002]^[3]都有微囊藻毒素的检测项目,世界卫生组织(WHO)在《饮用水卫生基准》中制定了微囊藻毒素的指标为 1 μg/L。

本研究中所使用的毒素标准品为 MC-LR,其分子式为 C₄₉H₇₄N₁₀O₁₂,分子量为 995.2,^[4]分子结构见图 1。该毒素性质稳定,具有水溶性和耐热性,易溶于水、甲醇或丙酮,不挥发。目前对微囊藻毒素的检测方法主要有生物分析、化学分析和免疫分析技

术。我们在单克隆抗体基础上建立了 ELISA 检测方法,该法具有简单、快速、灵敏度高、特异性高和可同时检测大量样品等多项优点,有着很好的前景,尤其适用于基层检测部门大量筛选样品。

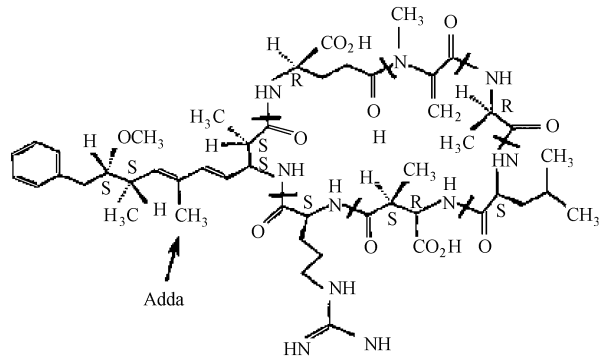


图 1 MC-LR 分子结构图

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 仪器 二氧化碳培养箱(Thermo 公司)、洁净工作台(北京半导体设备一厂)、生物倒置显微镜(日本欧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

基金项目:
作者简介:作者简介:李楠 女 实习研究员
通讯作者:计融 男 研究员

医用离心机厂)、电泳仪(BIO - RAD)、微量可调移液器(Gilson)、细胞培养板(24孔、96孔,美国Corning公司)、酶标板(96孔,美国Costar公司)、紫外可见分光光度计(biospace)。

1.1.2 试剂 微囊藻毒素(MC - LR)、玉米赤霉烯酮(ZEN)、赭曲霉毒素A(OA)、河豚毒素(TTX)、T-2毒素、牛血清白蛋白(BSA)、抗体亚类测定试剂盒(IgM, IgG, IgA, IgD, IgG₁, IgG_{2a}, IgG₃)均购自美国Sigma公司;MC - KLH、MC - BSA由江苏微生物所提供;RPMI 1640完全培养基、HAT选择性培养基、HEPES、福氏佐剂(完全、不完全)、二甲基亚砜、吐温20(Tween 20)、聚乙二醇(PEG, MW5000)、青链霉素均购自Gibco公司。辣根过氧化物酶(HRP)标记羊抗鼠IgG(北京中山试剂公司)、小牛血清(杭州四季青)、30% H₂O₂(保证试剂,北京化工厂)。四甲基联苯胺(TMB)、二甲基甲酰胺(DMF)、辛酸、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,均购自北京化学试剂商店。

1.1.3 溶液系统 ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay)使用液体 包被液:0.05 mol/L碳酸盐缓冲液,pH 9.6;洗涤液:PBS - T,含0.05% Tween 20的0.05 mol/L PBS;底物缓冲液:0.1 mol/L柠檬酸+0.2 mol/L磷酸氢二钠,pH 5.0;底物溶液:10 mg TMB + 1 ml DMF 冷藏保存,使用时取此溶液75 μ l,加入10 ml底物缓冲液和10 μ l H₂O₂。

1.1.4 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小鼠购自北京维通利华实验动物技术有限公司,许可证号SC/K(京)2002 - 0003。

1.2 方法

1.2.1 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 μ g MC - KLH与等量完全福氏佐剂混匀,腹腔注射。3周后,再用100 μ g MC - KLH与等量不完全福氏佐剂混匀,腹腔注射。此后每隔两周用100 μ g MC - KLH与等量不完全福氏佐剂混匀,腹腔注射。8周后脾内免疫100 μ g MC - KLH作为加强免疫,3 d后取脾融合。

1.2.2 细胞融合 免疫小鼠脾细胞与骨髓瘤细胞(Sp2/0)以5:1混合,用50%聚乙二醇(PEG)作融合剂将两种细胞融合。融合细胞悬于含20%小牛血清的2% HAT选择性培养基内,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%CO₂、37℃培养箱中培养,当镜检杂交瘤克隆

生长达1/3~1/4视野时,取上清液筛选。

1.2.3 杂交瘤筛选及克隆 以MC - BSA为包被抗原,用间接非竞争ELISA法筛选分泌抗MC抗体的细胞孔,再用毒素间接竞争抑制性ELISA法确证。以免疫小鼠血清为阳性对照,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液上清为阴性对照,阳性细胞孔的判定标准为(测定孔A值 - 空白值)/(阴性对照A值 - 空白值) \geq 2.1。经ELISA检测后,从中选择出对MC毒素有强抑制性而阳性对照孔较强的细胞株,进行亚克隆。

亚克隆采用培养瓶内准确计数法^[5]。将阳性克隆细胞吹下,置于提前放好RPMI 1640完全培养液的培养瓶中,取出10 μ l置计数板上,在倒置显微镜下准确计数细胞个数,根据计数结果,取大约100个细胞置于10 ml培养液中(培养液置于高压灭菌过的平皿中),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%CO₂、37℃培养箱中培养。如此经4~5次亚克隆,建立了稳定分泌抗微囊藻毒素单克隆抗体的杂交瘤细胞株,将细胞从96孔培养板转入培养瓶扩大培养,并传代,达到一定数量后即可冻存于液氮罐(10⁶个细胞/冻存管),或用来免疫小鼠生产腹水。

1.2.4 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,用生理盐水将杂交瘤细胞混匀,并将细胞数调至2 \times 10⁶/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石蜡油和不完全福氏佐剂混合物,10~14 d后收集腹水。

1.2.5 单克隆抗体纯化 采用饱和硫酸铵法对腹水进行纯化^[6]。对文献报道方法略有改进。取腹水70 ml,加70 ml PBS(即稀释1倍),加2倍体积(即280 ml)的0.06 mol/L pH 4.0的醋酸缓冲液,逐滴加入正辛酸2.31 ml(原腹水量的3.3%),边搅边逐滴加入,加完后用1 mol/L NaOH将pH值调节为4.5,室温搅拌30 min,然后10000 r/min,15 min,离心15 min。将上清液过滤,装入透析袋中,于0.01 mol/L pH 7.2的PBS中4℃透析过夜(间隔4 h换一次透析液)。终止透析后,按25.8 g/100 ml加硫酸铵粉末105.78 g(共410 ml),边加边搅拌溶解,用氨水调pH到7.4,搅拌30 min,放4℃2~4 h。10000 r/min,4℃离心15 min。沉淀用30 ml PBS溶解(PBS用量为总量的1/2~1/3),加24.5 ml饱和硫酸铵(终浓度为45%)洗1~2次,10000 r/min,4℃离心15 min。再用PBS溶解沉淀,放入透析袋,用0.01 mol/L pH

7.2的 PBS 透析。透析结束后将上清分装冻存备用。

1.2.6 抗体特性鉴定 抗体的免疫球蛋白类别及亚类鉴定采用抗体亚类鉴定试剂盒。抗体纯度和分子量测定采用 SDS- 聚丙烯酰胺凝胶电泳法(SDS- PAGE)^[7]。抗体 IgG 含量用 ELISA 方法测定。抗体滴度测定以 MC- KLH 为包被抗原,抗体从 1 1 000 倍起倍比稀释,以 Sp2/0 细胞培养上清为阴性对照,用间接非竞争 ELISA 方法测定抗体滴度,以(A 试验- A 空白)/(A 对照- A 空白) 2.1 的最大稀释倍数为滴定终点。抗体亲和力常数用间接竞争抑制性 ELISA 法测定。抗体的特异性和灵敏度用间接竞争抑制性 ELISA 法测定。抗体特异性试验,参试毒素为玉米赤霉烯酮(ZEN)、赭曲霉毒素 A(OA)、河豚毒素(TTX)、T- 2 毒素和载体蛋白 BSA。

1.2.7 样品回收率试验 取北京市龙潭湖湖水进行样品加标回收率试验,分别加标 100 ng/ml,50 ng/ml,20 ng/ml,每个加标浓度做 5 个重复,计算回收率。

2 结果

2.1 单克隆抗体的制备 用 MC- KLH 免疫的 BalB/c 小鼠获得了较好的免疫应答。细胞融合后经 ELISA 方法确证,选择出了对 MC 毒素有强抑制且阳性对照孔较强的细胞株,经 3~4 次亚克隆后建立了稳定分泌 MC 毒素单克隆抗体的杂交瘤细胞株,命名为 G5。

2.2 抗体特性鉴定 杂交瘤细胞系:G5,抗体亚类: IgG_a,IgG 含量(g/L):5,腹水稀释度:1 25.6 万,参考工作浓度:1 25.6 万,亲和力常数(mol/L):2.9 × 10⁻¹¹,分子量(kD):150。抗体与其他结构类似物的交叉反应率<1%,抗体具有较强的特异性。

2.3 竞争抑制曲线 用间接竞争性 ELISA 法测得单克隆抗体与 MC 毒素的竞争抑制曲线,见图 2。

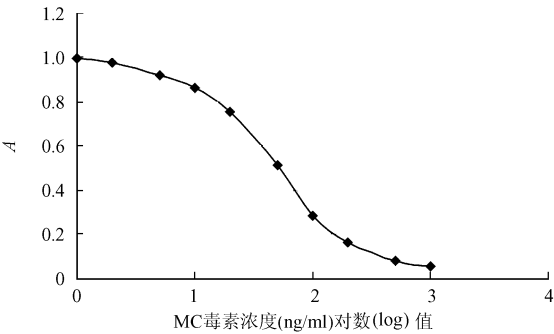


图2 单克隆抗体与 MC 毒素竞争抑制曲线

由图 2 可见,曲线的线性范围是 10~200 ng/ml,线性方程是 $y = 1.4564 - 0.5656x$,对毒素的 50%抑制浓度为 49 ng/ml。

2.4 样品回收率试验 取北京市龙潭湖湖水进行样品加标回收率试验,分别加标 100、50、20 ng/ml,回收率结果见表 1。

| 表 1 湖水样品回收率测定 (n=5) (%) | | | |
|-------------------------|-----------------|---------------|---------------|
| 湖水样品编号 | 100 ng/ml 加标回收率 | 50 ng/g 加标回收率 | 20 ng/g 加标回收率 |
| 1 | 90.0 | 90.8 | 123.5 |
| 2 | 81.5 | 98.2 | 125.0 |
| 3 | 89.3 | 102.4 | 110.5 |
| 4 | 97.0 | 102.4 | 118.0 |
| 5 | 82.5 | 98.0 | 119.0 |
| 平均值 | 88.06 | 98.36 | 119.20 |
| RSD (%) | 7.16 | 4.82 | 4.77 |

回收率在 81.5%~125.0%之间,相对标准偏差<15%。

在目前的监测方法中,小鼠生物分析法应用较为广泛,但其灵敏度低且无法鉴定毒素种类。化学分析方法中高效液相色谱法应用较多,可定性定量测定,但所需仪器价格昂贵,难普及,且单位时间内检测的样品数量有限,不适宜大量样品的筛检。本研究在制备了抗微囊藻毒素单克隆抗体的基础上研制了 ELISA 试剂盒,特异性、灵敏度均较高,可定性、定量测定微囊藻毒素,适合于大量样品的筛检,具有较好的发展前景。

参考文献

[1] 中华人民共和国卫生部. 卫法监发[2001]161号. 生活饮用水卫生规范附件 1:生活饮用水水质卫生规范[S].

[2] GB 3838—2002. 地表水环境质量标准[S].

[3] 王朝晖,许忠能,胡韧,等. 地表水中微囊藻毒素的危害与控制(综述)[J]. 暨南大学学报(自然科学版),2004, 25(1):110-114.

[4] 金丽娜,徐小清. 微囊藻毒素对鱼类毒性影响的研究进展[J]. 水生生物学报,2003,27(6):644-647.

[5] 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.

[6] 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.

[7] J 萨姆布鲁克,EF 弗里奇,T 曼尼阿蒂斯. 分子克隆实验指南[M],第 2 版. 北京:科学技术出版社,1996,880-887.

[收稿日期:2006-09-10]