

论著

抗 T-2 毒素单抗独特型抗体的制备及应用研究

江涛 郑佳 李楠 吴岩 计融

(中国疾病预防控制中心营养与食品安全所,北京 100021)

摘要:目的 研制 T-2 毒素标准品的替代品并应用于酶联免疫吸附试验(ELISA)。方法 在研制了抗 T-2 毒素单抗的基础上,将抗体用无花果蛋白酶进行酶切,制备抗 T-2 毒素单抗 F(ab')₂ 片段,并以 F(ab')₂ 片段作为免疫原免疫日本大耳白兔,研制出抗 T-2 毒素单抗独特型抗体。结果 所研制的抗独特型抗体经过鉴定,是 Ab₂ 型,与 T-2 毒素存在内影像关系。结论 该抗体可以替代 T-2 毒素标准品应用于 ELISA 检测。

关键词:T-2 毒素;抗体;抗独特型;酶联免疫吸附试验

Study of Polyclonal Anti-Idiotypic Antibody Against Anti-T2 Toxin Monoclonal Antibody

JIANG Tao, ZHENG Jia, LI Nan, WU Yan, JI Rong

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

Abstract: **Objective** To explore a substitute for standard T2 toxin and apply it to enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). **Method** The polyclonal anti-idiotypic antibody against anti-T2 toxin monoclonal antibody was prepared by immunizing the Japanese flap-eared rabbit with anti-T2 toxin monoclonal antibody's F(ab')₂. **Results** The obtained polyclonal anti-idiotypic antibody against anti-T2 toxin monoclonal antibody was identified as Ab₂ subclass. **Conclusion** The obtained polyclonal anti-idiotypic antibody was the "inner image" with T2 toxin and can be used to replace T2 toxin standard in ELISA.

Key word: T-2 Toxin; Antibody, Anti-Idiotypic; Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

单端孢霉烯族化合物是某些农作物致病真菌的代谢产物,是粮食和动物饲料中污染最为严重的天然毒素之一,其中镰刀菌属(*Fusarium*)导致麦类、玉米等作物的赤霉病,病谷中含有大量的该类毒素,T-2 毒素在这类毒素中对人畜危害最大。该毒素是体内蛋白质合成的抑制剂,人畜误食病谷后,可引起呕吐、腹泻、发热等急性中毒症状,严重时损伤造血组织,造成死亡。^[1]此外,T-2 毒素还与我国某些地区食管癌、克山病和大骨节病的高发病率有着密切的关系^[2]。因此有必要开展对该毒素的调查研究。但是自从“9.11”事件后,各国政府均加强了对毒素标准品的控制,尤其是 T-2 毒素属于生物战剂类毒素,很难再从国外购得。毒素标准品的紧缺已经成为检测和研究 T-2 毒素的瓶颈。寻找 T-2 毒素标准品的替代品技术已成为检测食品中 T-2 毒素污染水平及评价 T-2 毒素对人群的危害的关键技术。

本研究根据 Jerne 的免疫网络学说,利用抗独特型抗体 2 亚型在空间构象上与抗原存在“内影像”关系,在已有的抗 T-2 毒素单抗的基础上研制出抗

T-2 毒素单抗独特型抗体,并对抗独特型抗体的特性进行研究^[3]。

1 材料和方法

1.1 主要材料和试剂 T-2 毒素标准品、赭曲霉毒素 A(OA)标准品、玉米赤霉烯酮(ZEN)标准品、黄曲霉毒素 B₁(AFB₁)标准品、无花果蛋白酶、SephacrylTM S-200 分子筛凝胶、黄曲霉毒素 B₁—牛血清白蛋白、钥孔血蓝素 KLH、完全弗氏佐剂和不完全弗氏佐剂、辣根过氧化物酶、25%戊二醛、正辛酸均购自美国 Sigma 公司;甘氨酸 美国 Amresco 公司。硫酸铵 北京化学试剂公司,羊抗鼠 IgG-辣根过氧化物酶 北京中山试剂公司,羊抗兔 IgG-辣根过氧化物酶 北京欣经科生物技术公司,可拆分酶标板 96 孔,美国 Gbico 公司。

抗 T-2 毒素单抗、抗赭曲霉毒素(OA)单抗、抗玉米赤霉烯酮(ZEN)单抗、抗黄曲霉毒素 B₁(AFB₁)单抗均由本室制备。

1.2 仪器 低温高速离心机 德国 HermLe 公司, SUNRISE 酶标分析仪 瑞士 Tecan 公司,AKTA 快速蛋白液相色谱系统 FPLC 美国 Amersham 公司。

1.3 实验动物 健康雄性日本大耳白兔,为 1~1.5 kg,购自北京富豪动物养殖中心 SCXK(京)2000

作者简介:江涛 男 副研究员
通讯作者:计融 男 研究员

- 0019;6~8 周龄雌性未经产 BalB/c 小鼠 3 只,购自军事医学科学院。

1.4 方法

1.4.1 抗 T-2 毒素单抗 F(ab')₂ 片段的制备及鉴定

抗 T-2 毒素单抗 F(ab')₂ 片段的制备 用辛酸-饱和硫酸铵两步沉淀法^[4]纯化抗 T-2 毒素单抗,将纯化好的单抗原用无花果蛋白酶酶切,采用分子筛凝胶过滤法经快速蛋白纯化仪(FPLC)分离纯化酶切片段,得到抗 T-2 毒素单抗 F(ab')₂ 片段。采用 AKTA UNICOM 5.0 分析软件对分子筛凝胶分离出的色谱峰进行分析,通过对抗体酶切片段的凝胶过滤色谱图和鼠 IgG F(ab')₂ 标准片段的凝胶过滤色谱图的出峰时间判定是否是要回收的产物并收集相对应的 F(ab')₂ 酶切片段。

抗 T-2 毒素单抗 F(ab')₂ 片段的鉴定 F(ab')₂ 片段分子量的鉴定采用非还原 SDS-PAGE 进行。F(ab')₂ 片段活性的鉴定采用间接竞争 ELISA 法进行。以 0.5 μg/ml T-2-BSA 包被酶标板,采用间接竞争 ELISA 方法。分别选择抗 T-2 毒素单抗和相应的 F(ab')₂ 片段作为反应抗体,用不同稀释度(0、1、2、5、10、20、50、100、200、500、1 000 ng/ml)的 T-2 毒素标准品作为反应抗原,采用羊抗鼠 IgG Fab-HRP 二抗显色,绘制竞争抑制曲线。

1.4.2 动物免疫 取 1 ml F(ab')₂ 片段(浓度为 1 mg/ml),加等体积的完全弗氏佐剂充分乳化后,分别于日本大耳白兔背部皮下多点注射免疫。首次免疫后间隔 3 周再以 1 ml F(ab')₂ 片段(浓度为 0.5 mg/ml)加等体积不完全弗氏佐剂乳化后,注入皮下多点加强免疫。而后,每隔 2 周重复免疫 1 次。每次免疫前抽少许耳缘静脉血,分离血清检测免疫效果。采用纯化后的 T-2 抗体包被酶标板检测免疫血清滴度,待免疫血清滴度达到 1 10 000 后,以 250 μg F(ab')₂ 片段加强免疫。3 d 后颈动脉放血,收集兔血清。

1.4.3 血清的分离、纯化、保存 将收集到的兔血清置 4℃ 凝固约 1 h 使血块收缩,将析出血清收集,剩余血块全部倾入离心管,在常温下 2 500 ×g 离心血块 30 min,取上清与前面的血清混合,将血清采用辛酸-饱和硫酸铵两步沉淀法纯化。分装成 1 ml/管, -20℃ 保存。

1.4.4 抗 T-2 毒素单抗独特型抗体的鉴定

抗 T-2 毒素单抗独特型抗体亚型的鉴定 将兔血清用 0.85% 生理盐水稀释成 1 mg/ml,首次

200 μg(200 μl)加等体积的完全弗氏佐剂(CFA)充分乳化后,右侧腹腔免疫 BalB/c 小鼠,2 周后用 0.5 mg/ml 的兔血清 100 μg(200 μl)加等体积的不完全弗氏佐剂(IFA)充分乳化后加强免疫,而后,每隔 2 周按第二次免疫法重复加强免疫。免疫 3 次后取小鼠内眦静脉血,以 0.5 μg/ml 的 T-2 毒素和牛血清白蛋白连接物(T-2-BSA)为包被抗原,检测抗体滴度。

抗 T-2 毒素单抗独特型抗体特异性的鉴定 将抗 T-2 毒素单抗独特型抗体分别与本室制备的其它单克隆抗体进行交叉反应,测定该独特型抗体与其它单克隆抗体的交叉反应率。

1.4.5 抗 T-2 毒素单抗独特型抗体的应用 以 T-2-BSA 作为包被抗原(包被量为 0.5 μg/ml),采用间接竞争 ELISA 法检测抗 T-2 毒素单抗分别与 T-2 毒素标准品或制备所得的兔血清(含有抗 T-2 毒素独特型抗体)反应,观察所研制的兔血清(含有抗 T-2 毒素独特型抗体)和抗 T-2 毒素单抗的竞争曲线,并且与 T-2 毒素标准品和 T-2 毒素单抗的竞争曲线进行比较,找出兔血清(含有抗 T-2 毒素独特型抗体)与 T-2 毒素标准品的对应关系,同时采集一些小麦样品,加入一定量的 T-2 毒素,用抗独特型抗体替代 T-2 毒素标准品,检测加标试样的回收率。

T-2 毒素试样的提取方法 取 5 g 粉碎的试样与 25 ml 70% 甲醇溶液混合,强力振荡 3 min,用快速定性滤纸过滤,取 1 ml 处理后的试样,用 5 ml 蒸馏水稀释,取 50 μl 稀释液进行分析。

2 结果

2.1 抗 T-2 毒素单克隆抗体 F(ab')₂ 片段的特性

F(ab')₂ 片段的色谱图 F(ab')₂ 片段的色谱图见图 1、图 2。图 1 为鼠 IgG F(ab')₂ 标准片段的凝胶过滤色谱图,图 2 为抗 T-2 毒素抗体酶切片段的凝胶色谱图。图中横坐标为保留时间,纵坐标为吸光度值。图 1、2 中,峰 1 的出峰时间均约为 95 min,说明是同一种物质,可以认为图 2 中峰 1 为所需要的 F(ab')₂ 片段。

F(ab')₂ 片段的分子量 根据非还原电泳鉴定抗 T-2 毒素单克隆抗体及抗体的酶切片段 F(ab')₂ 的相对分子量,见图 3。由图 3 可见,在非还原电泳条件下,纯化抗体 IgG 相对分子量约为 160 KD,酶切片段 F(ab')₂ 的相对分子量约为 105 KD。

2.1.3 抗 T-2 毒素单抗 F(ab')₂ 片段与 T-2 毒素标准品的竞争抑制关系 抗 T-2 毒素单抗 F(ab')₂ 片段与 T-2 毒素标准品的竞争抑制关系见图 4、图

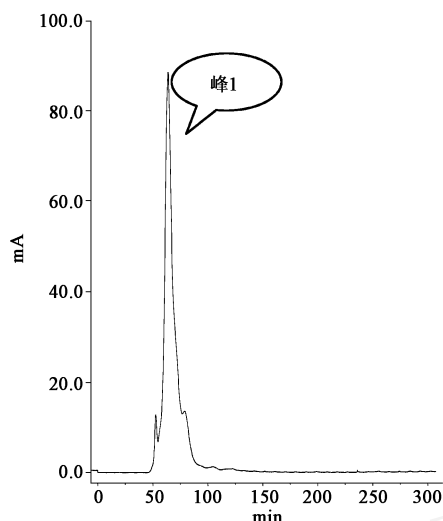


图1 F(ab')₂ 标准片段的凝胶过滤色谱图

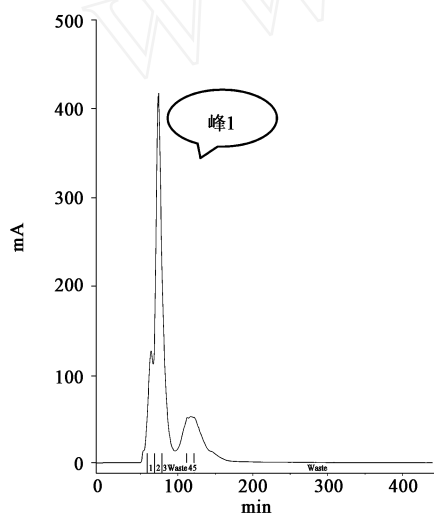
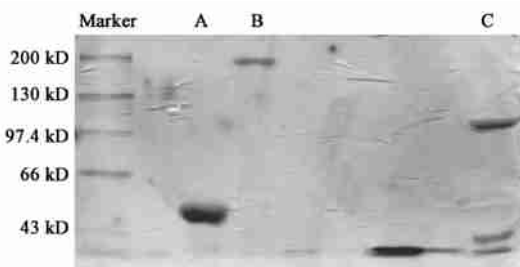


图2 抗体酶切片段的凝胶过滤色谱图

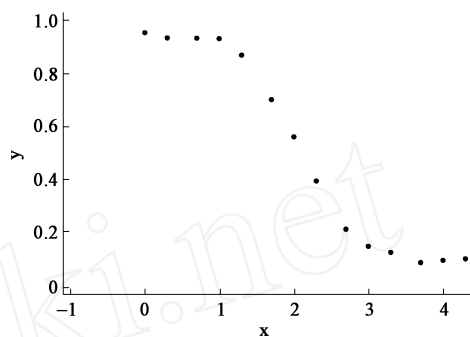


: 小鼠 IgG F(ab)₂ 标准, B: 纯化抗 T-2 单抗, C: F(ab)₂ 酶切片。

图3 纯化抗 T-2 毒素单抗及其酶切片段的非还原电泳图

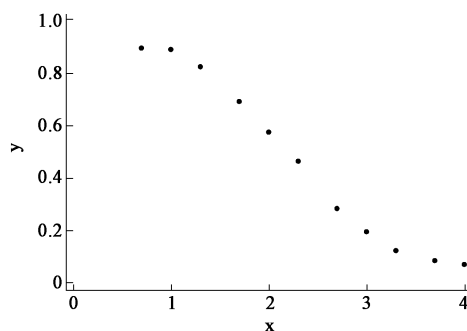
5. T-2 毒素标准品对抗体片段 20% 的抑制率为 31 ng/ml, 50% 的抑制率为 126 ng/ml, 80% 的抑制率为 525 ng/ml, T-2 毒素标准品对抗 T-2 单抗 20% 的抑制率为 26 ng/ml, 50% 的抑制率为 151 ng/ml, 80% 的抑制率为 607 ng/ml。由竞争结果可知, T-2 毒素标准品对完整的抗 T-2 抗体及抗体片段的抑制率基本相同, 说明抗体在经过酶切后, 抗体片段很

好地保留了抗体的抗原结合位点及抗体活性, 能够用所制备的抗体片段免疫日本大耳白兔, 研制抗独特型抗体。



x: T-2 毒素浓度的对数值, y: 吸光度比值。

图4 T-2 毒素对抑制单克隆抗体 F(ab)₂ 片段的竞争抑制曲线



x: T-2 毒素浓度的对数值, y: 吸光度比值。

图5 T-2 毒素抑制对单克隆抗体的竞争抑制曲线

2.2 抗 T-2 毒素单抗独特型抗体的特性 抗 T-2 毒素亚类的鉴定见图 6。由图 6 可以看出, 用所制备的抗 T-2 独特型抗体免疫 BalB/c 小鼠, 经过初次免疫及加强免疫后, 可以在小鼠体内产生针对 T-2 毒素的抗体, 因此可以认为本研究所研制的抗独特型抗体的亚类为 2 型。

将抗 T-2 单抗独特型抗体分别与本室研制的其他单克隆抗体进行交叉反应, 交叉反应率均小于 1%, 说明该独特型抗体具有较好的特异性。

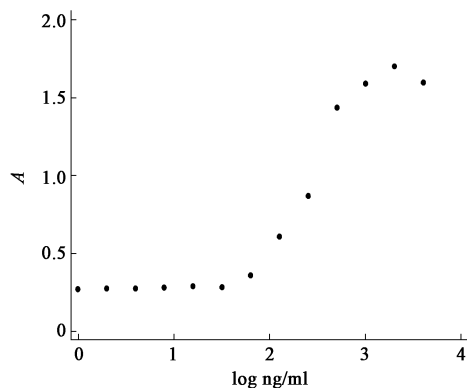


图6 Ab₂ 亚类鉴定小鼠血清稀释度曲线

2.3 抗 T-2 毒素单抗独特型抗体的应用 在相同的反应条件下,分别用所研制的抗 T-2 毒素单抗独特型抗体和 T-2 毒素标准品与抗 T-2 毒素单克隆抗体进行竞争抑制反应,将相同吸光度值下 T-2 毒素标准品浓度与抗 T-2 毒素独特型抗体浓度的对应关系进行 STATA 回归分析,算出 T-2 毒素标准品与抗 T-2 毒素单抗独特型抗体的对应关系,回归方程为 $y = 1.66x - 4.71 (R^2 = 0.99)$ 。其中 x 为抗 T-2 单抗独特型抗体的浓度(ng/ml), y 为 T-2 毒素标准品浓度(ng/ml)。

分别向不含 T-2 毒素的小麦试样中加入一定量的 T-2 毒素标准品,使最终浓度分别达到 100.00 ng/g 和 200.00 ng/g 的浓度,对试样中的 T-2 毒素进行提取回收,用抗独特型抗体替代 T-2 毒素标准品进行检测,将检测结果根据抗独特型抗体与 T-2 毒素标准品之间的换算关系,推出相当于 T-2 毒素标准品的量,并计算其回收率。其结果见表 1。

表 1 T-2 毒素 2 个水平 5 个重复的加标回收率试验结果

| 试样编号 | 100.00 ng/g 加标回收率 (%) | 200.00 ng/g 加标回收率 (%) |
|-----------|-----------------------|-----------------------|
| 1 | 108.75 | 95.04 |
| 2 | 114.82 | 96.54 |
| 3 | 114.82 | 70.39 |
| 4 | 91.09 | 90.77 |
| 5 | 87.47 | 79.28 |
| 平均回收率 | 103.39 | 86.40 |
| 相对标准差 (%) | 11.22 | 13.18 |

应用抗独特型抗体替代 T-2 毒素标准品,采用 ELISA 方法对采集到的 10 份小麦样品进行检测,结果未检出阳性样品。

3 讨论

3.1 抗独特型抗体的理论基础 1974 年,Jerne 在 Burnet 的细胞克隆选择学说的基础上提出了著名的免疫网络学说^[5]。根据这一学说,机体在外界抗原的刺激下,首先产生抗体 1,抗体 1 上的独特型决定位又刺激机体产生抗体 2,抗体 2 上的独特型决定位再刺激机体产生抗体 3……,如此等等,在体内构成了复杂的抗体独特型与抗独特型抗体的网络。机体的免疫应答就是通过这个网络进行调节来维持其稳定状态的。根据 Bona 的看法^[6],抗体 1 上不同的独特型决定位可刺激机体产生不同类型的抗体 2,分别为抗体 2、抗体 2、抗体 2、抗体 2。其中只有 Ab₂ 这一类抗独特型抗体由于在三维结构上与抗原表位类似,因而能模拟外来抗原竞争抗体 1 的结合位点,因而被称为抗原的内影像,可以被用作外

界抗原的替代物。

3.2 关于酶切片段 生产抗独特型抗体免疫原至关重要。完整的抗 T-2 毒素抗体分子或抗 T-2 毒素抗体的酶切片段均可以作为免疫原。但是如果用完整的抗 T-2 毒素抗体分子作为免疫原去免疫日本大耳白兔,由于其 Fc 段的免疫原性较强,而抗体独特位的免疫原性较弱,所以主要产生的是针对抗 T-2 毒素抗体 Fc 段的抗体,而针对抗体独特位产生的抗体较少,因此本研究采用抗 T-2 毒素抗体的酶切片段作为免疫原,一方面可以去掉抗体 Fc 段的免疫原性,另一方面还可以充分暴露抗体的独特位,能够获得较好的免疫效果^[7]。在制备抗体的酶切片段时,采用凝胶过滤色谱法进行分离纯化。该方法反应条件温和,对抗体的活性及抗体的独特位保持良好,能够保证该片段作为免疫原时的免疫效果。

3.3 关于 T-2 毒素标准品替代技术 在免疫学检测中,应用抗独特型抗体替代 T-2 毒素标准品可以在一定程度上缓解由于 T-2 毒素标准品的缺乏而形成的检测瓶颈。抗独特型抗体与 T-2 毒素标准品之间有明确的换算关系,应用抗独特型抗体不能够改变免疫学检测方法本身的检测限和灵敏度,而仅仅是将 T-2 毒素标准品换成抗独特型抗体,其检测结果是根据抗独特型抗体的使用量通过换算关系推出相当于 T-2 毒素标准品的含量。

参考文献

- [1] MINERVINI F, FORNELLI F, LUCIVERO G, et al. T-2 toxin immunotoxicity on human B and T lymphoid cell lines[J]. Toxicology, 2005, 210(1): 81-91.
- [2] 吕旌乔,王丽娟. T-2 毒素与大骨节病[J]. 中国地方病防治杂志, 2000, 15(1): 35-38.
- [3] CHANH T C, RAPPOCCIOLO G, HEWETSON J F. Monoclonal anti-idiotypic induces protection against the cytotoxicity of the trichothecene mycotoxin T-2[J]. The Journal of Immunology, 1990, 144(12): 4721-4728.
- [4] 江涛,宫慧之,李凤琴,等. 抗伏马菌素 B₁ 单克隆抗体的制备及试剂盒的研制[J]. 卫生研究, 2006, 35(2): 209-212.
- [5] 沈关心,周汝麟. 现代免疫学实验技术[M]. 武汉:湖北科学技术出版社, 1998: 32-33.
- [6] ZIVANCEVIC-SIMONOVIC S, STOJANOVIC M, INIC-KANADA A, et al. A high dose of an idiotype generates high levels of Ab₂s[J]. In Vivo, 2006, 20(5): 621-627.
- [7] ANTALIKOVA J, SIMON M, JANKOVICOVA J, et al. Monoclonal antibody to the light chain of bovine immunoglobulin[J]. Hybridoma, 2006, 25(5): 309-312.

[收稿日期: 2006-12-16]