

抗黄曲霉毒素 B₁ 单克隆抗体的制备及特性

路 戈 刘宝顺 刘春霞

(北京市营养源研究所 北京 100054)

王德斌 曹明华

(中国医学科学院肿瘤研究所 北京 100021)

摘 要 用杂交瘤技术制备了 5 株产生抗黄曲霉毒素 B₁ 单克隆抗体的杂交瘤细胞株。对其其中之一 AFB₁-2H8 进行了较系统的研究。AFB₁-2H8 属 IgG₃。纯化腹水抗体效价约 5×10^6 。ELISA 检测标准毒素的线性范围为 0.5~50ng/ml。最低检出量为 0.01ng/ml。该单抗与参试的其它黄曲霉代谢物的交叉反应系数为 0~0.21, 该抗体有较大的应用价值。

关键词 黄曲霉毒素 B₁, 单克隆抗体, 酶联免疫吸附测定法

黄曲霉毒素 (Aflatoxin) 是常见霉菌黄曲霉 (*Aspergillus flavus*) 和寄生曲霉 (*A. parasiticus*) 的次级代谢产物, 是一组有毒性的物质。其中黄曲霉毒素 B₁ (AFB₁) 毒性最强, 并发现是自然界存在的最严重的化学致癌物之一。因此, 它在所有真菌毒素中对人类以及家畜家禽的危害最大, 调查表明, 在世界范围内, 粮食、油料、饲料作物及制品中 AFB₁ 的污染都十分普遍。为此, 联合国有关组织 (如 WHO、FAO、UNEP 等) 已多次组织调查并提出控制标准⁽¹⁾。我国对 AFB₁ 的污染和控制也非常重视, 组织专门人员对肝癌高发区的江苏、广西等省连续多年进行流行病学调查和监测⁽²⁾, 并在 1982 年颁布了粮油和发酵食品中的 AFB₁ 含量的允许量标准⁽³⁾。

检测 AFB₁ 的传统方法, 主要有薄层层析法, 色谱 (气相、液相) 法和色谱-质谱联合测定法等^(4~7)。这些方法, 有的因方法本身限制, 精确度低, 灵敏度差; 有的样品前处理过程复杂费时; 有的需要价格昂贵的仪器, 检测成本高, 难以推广应用, 影响了对粮、油食品中 AFB₁ 污染的有效监测。

酶联免疫吸附测定法 (ELISA) 是在免疫学和细胞工程学基础上发展的一种微量检测技术, 特别适合于对 AFB₁ 污染监测控制中大量样品的处理。美国朱繁生等人在 70 年代中后期制备出抗 AFB₁ 的单克隆抗体, 通过 ELISA 方法检测食品中的 AFB₁ 含量^(6~10)。90 年代以来, 国内亦有一些单位相继开展了这方面的研究。

本文采用淋巴细胞杂交瘤技术, 建立了产生抗 AFB₁ 单克隆抗体的杂交瘤细胞系。并对该杂交瘤细胞系分泌的抗 AFB₁ 单克隆抗体的各项性能指标进行了研究。已建立的 AFB₁ ELISA 方法完全能够满足 AFB₁ 监测控制的有关国家标准。

1 材料和方法

1.1 试剂

人工抗原: 黄曲霉毒素 B₁-牛血清白蛋白复合物 (10~25mol/mol BSA), 黄曲霉毒素 B₁、B₂、G₁、G₂、M₁ (美国 Sigma 公司), 弗氏完全佐剂与弗氏不完全佐剂, L-谷氨酰胺, 牛白蛋白第五部分, 聚乙二醇-1000, 2, 6, 10, 14-四甲基十五烷 (Pristane), 邻苯二胺, 二甲基亚砷, Tris, Hepes pH 缓冲剂, 免疫球蛋白分型试剂盒 (美国 Gibco 公司), 辣根过氧化氢酶标免疫抗 BALB/c 鼠 IgG (北京生物制品所产品), 小鼠 IgG 和羊抗小鼠 IgG (华美公司, 军事医学科学院产品), 其它常规化学试剂均为优级纯、分析纯试剂。

1.2 免疫动物

8 周龄 BALB/c 雄性小鼠 (购自卫生部药检所动物繁育场) 用人工抗原 AFB₁-BSA 行二次免疫; 每只小鼠基础免疫剂量为 100 μ g, 腹腔注射; 24d 后加强免疫, 剂量为每只小鼠 100 μ g, 尾静脉注射, 4d 后取脾融合。

1.3 细胞融合

免疫小鼠脾细胞与骨髓瘤细胞 Sp-2/0 以 10:1 混合。用 50% 分子量为 1000 聚乙二醇作融合剂, 融合细胞用含 20% 小牛血清的 HAT 选择性培养基悬浮后, 接种于以小鼠腹腔巨噬细胞作饲养层的 96 孔培养板中, 于 5% CO₂, 37 $^{\circ}$ C 条件下培养, 7d 后, 每培养孔更换 2/3 HT 培养液。9d 后, 开始对镜检有杂交瘤克隆生长的培养孔, 取上清液进行筛选, 对检测结果呈阳性的细胞立即用有限稀释法进行克隆化。

1.4 腹水抗体纯化

用硫酸铵盐析法纯化腹水抗体^[1]。

1.5 杂交瘤筛选及抗体检测

杂交瘤筛选用固相抗原间接竞争性 ELISA 法进行: 包被抗原 AFB₁-BSA 的浓度为 15 μ g/ml, 每孔加量 120 μ l; 每孔所含抗体抗原反应物由 80 μ l 培养上清液 + 2 μ l 经紫外分光光度计标定浓度的 AFB₁ (10 μ g/ml) 组成; 检测对照孔中的抗原部分则用 20 μ l 毒素稀释液 (20% MeOH-PBS) 代替; 酶底物用邻苯二胺 (OPD); 其它按标准方法进行。

1.6 抗体的特性

1.6.1 抗体滴度: 用固相抗原间接非竞争性 ELISA 测定, 测试条件为: 包被抗原为 AFB₁-BSA, 浓度 15 μ g/ml, 每孔加量 150 μ l; 抗体从 100 倍开始对倍稀释, 每孔加量 130 μ l; 抗体稀释液为 0.1% BSA-PBS; 阴性对照孔用 Sp-2/0 骨髓瘤细胞培养上清液; 封闭液为 1% BSA-PBS, 每孔加量 250 μ l; 酶底物用 OPD; 酶标板购自美国 Linbro 公司。其它按标准方法进行。

1.6.2 检测标准毒素灵敏度: 先用棋盘滴定法筛选出包被抗原浓度和抗体工作稀释度的优化组合, 以此为测试条件, 用固相抗原间接竞争性 ELISA 法作出 AFB₁ 的标准抑制曲线, 并对结果进行数理统计分析。其中 ELISA 测试条件为: 包被抗原 AFB₁-BSA 的浓度为 5 μ g/ml, 每孔加量 150 μ l; 抗体工作稀释度为 1:25600; 抗体稀释液为 0.1% BSA-PBS; 抗体抗原反应液为每孔 65 μ l 抗体 + 65 μ l 相应浓度 AFB₁; 封闭液为 1% BSA-PBS,

每孔加量 250 μ l; 酶底物为 OPD; 阴性对照用 Sp-2/0 骨髓瘤细胞培养上清液; 酶标板用美国 Linbro 板。其它按标准方法进行。

1.6.3 抗体的特异性: 用固相抗原间接竞争性 ELISA 法测定, 参试毒素为 AFB₁、AFB₂、AFB_{2a}、AFG₁、AFM₁; 其它测试条件同 1.6.2, 其中 AFB_{2a} 测试结果为美国威斯康星大学食品研究所朱繁生教授提供。

1.6.4 抗体亚类分析: 用免疫双扩散法进行^[11]。

1.6.5 抗体的亲和力: Friguet 法^[12]。对应小鼠 IgG 标准曲线滴定出抗体 IgG 含量, 再对应抗体滴度曲线求出平衡态下, 抗体使抗原达到半饱和时的游离抗体克分子浓度 [Ab], 代入下式求出抗体的亲和常数 K_a (L/mol):

$$K_a = \frac{1}{[Ab]}$$

1.7 样品中 AFB₁ 提取与纯化

参照 GB 5009 22-85 提供的方法进行^[5]。

2 结果和讨论

2.1 细胞融合与杂交瘤细胞的筛选

细胞融合后, 约 57.6% 的孔中长出杂交瘤克隆, 其中抗体检测阳性率约为 88.0%。从中选择对抗原有强抑制作用的孔, 经多次亚克隆, 建立了 5 个稳定分泌抗 AFB₁ 单克隆抗体的杂交瘤细胞株, 详见表 1。

表 1 杂交瘤细胞株克隆化结果
Table 1 The results of hybridoma cell lines cloning

Cell lines	Positive ratio of the cloning/%			
	I	II	III	IV
2A6	93.3	100.0	100.0	
3E6	100.0	100.0	100.0	
2H8	88.9	100.0	93.1	100.0
2B6	94.1	100.0		
2C12	100.0	100.0		

从表 1 可见, 各细胞株经两次亚克隆以后, 阳性率已达到 100%。2H8 第 3 次克隆化时有反复 (疑为假阴性), 所以进行了 4 次亚克隆。

2.2 抗体特性

2.2.1 抗体滴度: 杂交瘤细胞株的培养上清液经超滤浓缩 6.5 倍后 (IgG 阻留率为 97%) 测其抗体滴度为 1:25600; 腹水经纯化后的抗体滴度约为 1:5 \times 10⁶, 其滴度曲线见图 1。

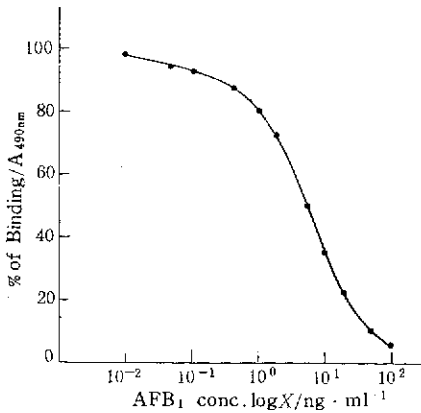
2.2.2 检测标准毒素灵敏度: 从图 2 可见, 抗体检测灵敏度为 0.01ng/ml。

表 2 AFB₁ 标准抑制曲线的数理统计分析结果

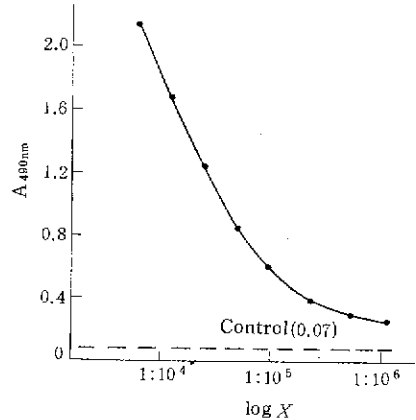
Table 2 The results of statistical analysis for the standard inhibition curve of AFB₁

Linear range	Linear regression equation	Correlation coefficient	Minimal detectable conc. of AFB ₁
0.5~50.0ng/ml	$Y = 78.7028 - 41.2961 \lg x$	$r = -0.9942$	0.01ng/ml

Results are average of triplicate analysis.

图1 抗AFB₁单克隆抗体的滴度曲线Fig. 1 Titer curve for the purified McAb (AFB₁-2H8) to AFB₁

X: The times of dilution of the purified McAb (AFB₁-2H8)

图2 AFB₁的标准抑制曲线(ELISA)Fig. 2 Standard inhibition curve by indirect ELISA for AFB₁

Results are average of triplicate analysis

2.2.3 抗体的特异性: 6种黄曲霉毒素通过固相抗原间接竞争性ELISA法测定结果表明, AFB₁-2H8对AFB₂与AFG₁有弱的交叉反应, 与供试的其它毒素无交叉反应, 见表3。(注: 威斯康星大学食品研究所提供的抗体特异性检测结果表明, 该单抗仅对AFB₂有弱的交叉反应, 而其它毒素均无交叉反应)。

表3 AFB₁-2H8与6种黄曲霉毒素的特异性分析Table 3 Specificities analysis for the McAb (AFB₁-2H8) to six aflatoxins determined in the indirect ELISA

Aflatoxins	50% Neutralization conc. of toxin / $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$	Minimal detectable conc. of toxin / $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$	Cross-react
AFB ₁	0.009	0.00001	1.00
AFB ₂	0.105	0.0025	0.08
AFB _{2a}		>0.10	N
AFG ₁	0.042	0.00001	0.21
AFG ₂	0.219	0.04	0.04
AFM ₁	0.251	0.0001	0.03

N. no cross-reactivity.

2.2.4 抗体亚类分析: 免疫双扩散形成的沉淀线表明, AFB₁-2H8的亚类为IgG₃。

2.2.5 抗体的亲和力K_a: 用Friguet法测得抗体的亲和力K_a≈7.57×10⁹L/mol。

2.3 加标准毒素回收实验

于正常样品中, 分别加入稀释成不同浓度的AFB₁标准毒素。经提取后, 用间接竞争性ELISA法测定, 对照标准抑制曲线, 用数值插入法计算的回收结果见表4。

表 4 样品中 AFB₁ 加标回收结果Table 4 ELISA recovery of AFB₁ from artificially contaminated samples

Samples	Mean recovery ratio (X±SD)%					
	1	2	5	10	20	50
	(added ng/ml)					
Corn	105.0±23.6	95.6±15.9	110.3±16.1	98.1±5.4	83.8±1.7	99.1±24.1
Wheat	84.8±12.9	87.1±11.2	87.8±6.7	97.1±2.7	97.5±2.6	104.0±5.0
Rice	93.3±12.8	110.0±7.8	95.8±6.9	88.5±7.8	102.9±7.9	83.0±11.3
Peanut	91.5±5.2	105.1±8.3	106.7±3.5	101.9±15.1	100.3±8.1	90.7±6.8
Plant oil	96.1±14.5	95.5±5.9	101.7±7.5	86.8±3.5	106.9±5.6	102.2±6.7

Means±SD of 6 estimations with each assayed in 3 wells on a microtiter plate.

AFB₁ 对人和动物有严重危害, 是各国对粮食、饲料重点监控的对象。GB 2761-81 中规定食品所含 AFB₁ 的限制标准分别为: 花生、玉米<20ng/g, 大米<10ng/g, 其它粮食制品<5ng/g。婴儿食品不得检出^[3]。为此, 抗 AFB₁ 的单克隆抗体应具有较高的灵敏度, 以保证相应的 ELISA 检测法对微量 AFB₁ 有正确稳定的检出率。上述研究表明, AFB₁-2H8 检测灵敏度可达 0.01ng/ml。而且该单克隆抗体对纯毒素的竞争抑制标准曲线的线性区段 (0.5~50ng/ml) 恰好与国家食品中 AFB₁ 含量的限制标准范围相重叠。从图 2 可见, 在此段, 抗体抗原反应液的吸光率从 90% 降至 10%。这种明显的色度变化, 便于基层检测部门通过目测判定结果进行半定量分析。

建立 AFB₁ 的 ELISA 方法, 除具有经济、简便、灵敏, 适合处理批量样品等免疫检测法的一般特点外, 由于检测过程中不必使用标准毒素, 还可使有关人员免受毒害, 易于普遍推广, 因此具有很强的实用价值和广泛的应用前景。

参 考 文 献

- [1] FAO. Manuals of Food Quality Control 10 Training in Mycotoxins Analysis, Rome. 1990, pp. 75~78.
- [2] 孟昭赫主编. 食品卫生检验方法注解-微生物学部分, 北京: 人民卫生出版社, 1990, pp. 420~442.
- [3] 中华人民共和国卫生部. 中国国家标准, 北京: 中国标准出版社, 1990, GB 2761-81.
- [4] Trucksess M W, Stoloff L, Pons W A *et al.* J ASSOC off Anal Chem, 1977, 60 (4): 795-804.
- [5] 中华人民共和国卫生部. 中国国家标准, 北京: 中国标准出版社, 1990, GB5009pp. 22~85.
- [6] 上野芳夫, 川村理. 化学と生物, 1989, 27 (5): 312~327.
- [7] 居乃璇. 黄曲霉毒素, 北京: 轻工出版社, 1980.
- [8] Chu F S, Ueno I. Appl Environ Microbiol, 1977, 33 (5): 1125~1128.
- [9] Candish A A G, Stimson W H, Smith J E. Lettres in Appl Microbiol, 1985, 1: 57~61.
- [10] Chu F S, Fan Titan S L, Zhang G S *et al.* J Assoc off Anal Chem. 1987, 70 (5): 854~857.
- [11] 杨景山主编. 医学细胞化学与细胞生物技术, 北京: 北京医科大学, 中国协和医科大学联合出版社, 1990.
- [12] Friguert B. J Immunol Methods, 1985, 77: 305~319.

Preparation and Characterization of Monoclonal Antibodies to Aflatoxin B₁

Lu Ge Liu Baoshun Liu Chunxia

(Beijing research Institute for Nutritional Resources, Beijing 100054)

Wang Debin Cao Minghua

(Cancer Institute, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100021)

Abstract Five hybridoma cell lines producing monoclonal antibodies (McAb) against aflatoxin B₁ (AFB₁) were established after fusion of mouse myeloma cells (Sp-2/0-Ag-14) with spleen cells isolated from male BALB/c mice immunized with AFB₁-BSA conjugate. Among them, a McAb which was designated AFB₁-2H8 was of the subtype IgG₃ and the ascitic fluid of it gave suitably high dilution titres ($1 : 5 \times 10^6$). The sensitivity of a competitive enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using AFB₁-2H8 for AFB₁ was demonstrated that the linear range was 0.5~50ng/ml and the minimum detectable concentration of AFB₁ was 0.01ng/ml. The specificity of the McAb was determined and it was shown no cross-reaction significantly with any of the metabolites tested. So the McAb and the ELISA described may prove of use in the detection of AFB₁ foods and feeds.

Key words Aflatoxin B₁, monoclonal antibody, enzyme-linked immunosorbent assay