

高特异性抗桔霉素单克隆抗体的制备及鉴定*

李泳宁¹⁾ 汪媛媛²⁾ 郑允权¹⁾ 郭养浩^{1, 2)**}

(¹⁾ 福州大学化学化工学院, 福州 350002; (²⁾ 福建省医疗器械与医药技术重点实验室, 福州 350002)

摘要 以 1, 4- 丁二醇二缩水甘油醚(双环氧试剂)为偶联剂, 合成桔霉素 - 蛋白偶联抗原 CIT-BSA, 将偶联抗原免疫 BALB/C 小鼠, 取脾细胞与小鼠骨髓瘤细胞 SP2/0 进行融合, 应用有限稀释法进行筛选, 经过克隆化后筛选到一株稳定分泌抗桔霉素抗体的杂交瘤细胞株 H2-F8. 该单克隆抗体经过初步鉴定, 抗体类型为 IgM 类, 抗体的相对亲和力为 4.17×10^8 L/mol, 单抗与黄曲霉毒素 B1、赭曲霉毒素 A、脱氧雪腐镰刀菌烯醇和玉米赤霉烯酮等毒素的交叉反应率均低于 0.1%, 与红曲色素中的橙色素和红色素的交叉反应率均低于 0.01%. 在此基础上建立了间接竞争 ELISA 检测方法, 线性范围为 0.05~1.0 $\mu\text{g/L}$, IC_{50} 值为 0.3 $\mu\text{g/L}$. 结果为快速检测桔霉素的酶联免疫检测方法的建立和检测试剂盒的研制提供技术依据.

关键词 1, 4- 丁二醇二缩水甘油醚, 桔霉素, 单克隆抗体
学科分类号 R446.6, R392.12, Q513

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2010.00026

桔霉素(Citrinin, CIT)是由青霉菌属和曲霉菌属的某些菌株产生的真菌毒素^[1], 分子式为 $\text{C}_{13}\text{H}_{14}\text{O}_5$, 相对分子质量为 250.2, 是小分子半抗原物质. 近年来的调查发现: 在许多农产品如玉米、大米、苹果、梨和果汁等食品和农产品中都有可能检测到桔霉素^[2], 由于桔霉素具有严重的致畸、致癌和诱发基因突变等作用, 人和动物食用含桔霉素的食物后会造成肝肾损伤^[3], 因此桔霉素引起的污染问题越来越受到人们的关注.

桔霉素的分析检测方法主要有酶联免疫吸附法(ELISA)^[4]、薄层层析法(TLC)^[5]和高效液相色谱法(HPLC)^[6]等. 酶联免疫检测法具有特异性强、灵敏度高、检测时间短等特点, 被广泛应用于各种霉菌毒素的检测, 开发精确、灵敏、快速的桔霉素检测方法是国内外很多研究人员努力的方向. 目前国内外对桔霉素单克隆抗体制备的研究报道较少, 仅有刘荣等^[7]仁采用甲醛加成法合成的桔霉素偶联抗原免疫小鼠并制备了单克隆抗体, 其单克隆抗体经鉴定为 IgG2a 型, IC_{50} 为 200 $\mu\text{g/L}$.

本工作在采用 1, 4- 丁二醇二缩水甘油醚(双环氧试剂)为偶联剂成功制备桔霉素 - 蛋白偶联抗原, 获得高特异性多克隆抗体的基础上^[8], 进一步采用

杂交瘤细胞技术建立了抗桔霉素单克隆抗体的杂交瘤细胞株, 并对单克隆抗体进行了初步鉴定, 建立了桔霉素的 ELISA 检测方法. 该方法具有快速、灵敏和高特异性等优点, 适用于大量样品的筛选, 为进一步开发具有我国自主知识产权的快速检测试剂盒奠定了基础.

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试剂. 桔霉素(Citrinin, CIT), 福氏佐剂购自 Sigma 公司; 牛血清白蛋白(BSA)为 Solarbio 公司产品; 卵清蛋白(OVA)为 Worthington 公司产品; 四甲基联苯胺(TMB)为 TIANGEN 公司产品; HRP 标记羊抗鼠 IgG 购自 Thermo 公司; G-25 凝胶为 Solarbio 公司产品; 1, 4- 丁二醇二缩水甘油醚(1, 4-butanediol diglycidyl ether)为 Alfa Aesar 公司产品;

* 福建省医疗器械与医药技术重点实验室开放基金资助项目(09003).

** 通讯联系人.

Tel/Fax: 0591-83720772, E-mail: yongningli@163.com

收稿日期: 2010-04-12, 接受日期: 2010-08-10

黄曲霉毒素 B₁(aflatoxin B₁, AFB₁)、赭曲霉毒素 A (ochratoxin A, OTA)、脱氧雪腐镰刀菌烯醇 (deoxynivalenol, DON)、玉米赤霉烯酮(zearalenone, ZEA)为 Sigma 公司产品; 红曲色素中的红色素和橙色素由福州大学化学化工学院制备. 其他试剂均为分析纯.

1.1.2 实验动物. BALB /C 小鼠(8~12 周龄, 雌性)由福建医科大学实验动物室提供.

1.1.3 细胞. SP2/0 细胞, 福州大学化学化工学院保存.

1.2 方法

1.2.1 桔霉素 - 蛋白偶联抗原的制备方法.

采用双交联法制备 CIT-BSA 偶联抗原. 具体步骤为: 0.5 mg CIT 溶于 0.5 ml 0.6 mol/L NaOH 中, 加入 0.5 ml 2 g/L 硼氢化钠, 再加入 0.5 μl 1, 4-丁二醇二缩水甘油醚进行活化, 25℃ 振摇 4 h, 加入适量的 Na₂CO₃ 使其浓度为 0.3 mol/L, 加入 5 mg BSA, 37℃ 偶联反应 24 h, 反应结束, 加入过量的甘氨酸, 进行封闭. 将反应产物溶液过 G-25 层析柱进行纯化, 用 0.01 mol/L PBS (pH 7.4) 洗脱液洗脱, 收集的第一个洗脱峰即为目标产物 CIT-BSA. 同法制得 CIT-OVA 抗原. 抗原冻干保存.

1.2.2 动物免疫. 选 6 只 8~12 周龄 BALB/C 小鼠, 腹腔注射 CIT-BSA 偶联抗原 0.5 ml/ 只·次(按 CIT 量计为 1.63 μg/ 只·次), 首次免疫将免疫抗原与等量福氏完全佐剂(CFA)混合, 进行腹腔注射. 此后, 每隔 2 周加强免疫一次, 将免疫抗原与等量福氏不完全佐剂(IFA)混合, 免疫方法同首免. 共免疫 4 次.

1.2.3 杂交瘤细胞株的建立. 取免疫鼠的脾细胞, 按 5: 1~10: 1 比例与 SP2/0 骨髓瘤细胞融合, 以 50% PEG 作融合剂. 细胞重悬浮于 HAT 培养液中, 接种于 5 块含有饲养细胞的 96 孔培养板中, 培养 7~10 天. 用间接非竞争 ELISA 对细胞培养上清液中的抗体进行检测. 采用有限稀释法对阳性的杂交瘤细胞进行克隆化, 培养 7~10 天, 出现肉眼可见的克隆即可检测抗体, 对阳性杂交瘤细胞再进行克隆化, 直至 100%的克隆分泌特异性抗体为止. 同时, 将阳性克隆扩大培养, 并冻存.

1.2.4 单克隆抗体的生产及纯化. 采用动物体内生产单抗的方法. 每只 BALB/C 小鼠腹腔注射灭菌液体石蜡 0.5 ml, 7~14 天后可供腹腔注射杂交瘤细胞. 每只小鼠腹腔注射 1×10⁶ 个杂交瘤细胞.

7~10 天后观察小鼠腹水产生情况, 如腹部明显膨大, 即可抽取腹水. 腹水采集后离心除去油脂和沉淀, 即得到小鼠腹水单克隆抗体, 测定其抗体效价后分装并置-20℃ 下冻存. 腹水采用 PEG 法进行单克隆抗体的纯化.

1.2.5 单克隆抗体特性鉴定.

a. 杂交瘤细胞的染色体分析: 采用秋水仙素对细胞株的核型进行了分析, 杂交瘤细胞经 Giemsa 染色后, 在显微镜下观察染色体的形态及数目.

b. 效价测定: 间接 ELISA 进行单克隆抗体效价测定.

c. 抗体的分子质量鉴定: 采用 SDS-PAGE 进行测定.

d. 单抗浓度测定: 紫外分光法测定单抗在 280 nm 和 260 nm 处的吸光度值 A_{280} 和 A_{260} .

蛋白质含量按下列公式计算: 蛋白质含量(g/L)= $1.45 \times A_{280} - 0.74 \times A_{260}$.

e. 抗体的类型鉴定: 采用单抗分型试剂盒进行测定.

1.2.6 抗体亲和力的测定 采用 ELISA 间接法测定抗体的亲和力常数, 详见参考文献[9].

1.2.7 抗体特异性鉴定. 用 10%甲醇将不同浓度黄曲霉毒素 B₁、赭曲霉毒素 A、脱氧雪腐镰刀菌烯醇、玉米赤霉烯酮和本实验室制备的红曲色素稀释成梯度浓度的标准品, 进行间接竞争 ELISA 测试, 得到 IC_{50} , 然后计算出交叉反应率, 交叉反应率(CR)=桔霉素 IC_{50} / 桔霉素结构类似物 IC_{50} ×100%.

2 结果与讨论

2.1 偶联抗原的对小鼠的免疫效果

将合成抗原免疫 BALB/C 小鼠, 经过 4 次免疫, 获得抗桔霉素多克隆抗体. 经间接 ELISA 检测, 效价达到 1.1×10^5 , 同时采用间接竞争 ELISA 测定多克隆抗体的特异性, CIT 的 IC_{50} 为 100 μg/L, 因此可进一步用于制备单克隆抗体.

2.2 杂交瘤细胞株的建立

2.2.1 融合结果. 细胞融合后, 用 ELISA 法进行抗体筛选, 共融合 5 块培养板 480 孔, 杂交瘤细胞生长孔数为 390 孔, 结果细胞融合率为 81.25%, 间接 ELISA 检测阳性率为 12.8%. 选择阳性较强的单克隆细胞孔内的杂交瘤细胞进行克隆化, 经 4 次克隆, 得到 1 株稳定分泌抗桔霉素的杂交瘤细胞株, 命名为 H2-F8. 将上述细胞进行扩大培养、冻

存并制备腹水。

2.2.2 杂交瘤细胞的染色体分析。用秋水仙素对细胞株的核型进行了分析，杂交瘤细胞经 Giemsa 染色后，在显微镜下观察染色体的形态及数目，见

图 1c，染色体数目约为 105~110；正常小鼠脾细胞的染色体数目为 40，见图 1b；小鼠骨髓瘤细胞 SP2/0 染色体数目为 62~68，见图 1a。由此证明杂交瘤细胞确为两亲本细胞融合后的杂交体。



Fig. 1 Chromosomes of myeloma SP2/0, spleen cells, and hybridoma cells

(a), (b), (c) Corresponding to SP2/0, spleen cells, hybridoma cells H2-F8. (a) Chromosome number of SP2/0: $2n=62\sim68$. (b) Chromosome number of spleen cells: $2n=40$. (c) Chromosome number of hybridoma cells: $2n=105\sim110$.

2.3 抗桔霉素单克隆抗体的鉴定

2.3.1 抗桔霉素单克隆抗体的类型鉴定。采用单抗分型试剂盒进行测定，结果表明 H2-F8 细胞株分泌的单克隆抗体为 IgM 类。刘仁荣等^[7]采用甲醛加成法合成桔霉素偶联抗原免疫小鼠并制备了单克隆抗体，其单克隆抗体经鉴定为 IgG2a 型。

2.3.2 腹水抗体效价的测定。采用间接非竞争 ELISA 测定其效价，结果表明，纯化前腹水单抗的效价为 $1:3.46\times10^5$ ，采用 PEG 纯化后单抗的效价为 $1:2.70\times10^5$ ，在纯化过程中单抗效价损失了 22.0%。

2.3.3 单抗纯度及分子质量鉴定。将纯化前的腹水单抗和纯化后的单抗产物进行 SDS-PAGE 分析

(图 2)。由图 2 分析可得，在未纯化的腹水中除了明显的单抗条带外还含有较多的杂蛋白；经 PEG 沉淀纯化后，单抗纯度明显提高。本工作所得的 IgM 型抗桔霉素单克隆抗体的重链约 65 ku，轻链约 25 ku。经紫外扫描，根据 260 nm 和 280 nm 紫外吸收值，算得的蛋白质含量为 2.59 g/L。

2.3.4 单克隆抗体亲和力的测定。本实验对筛选到的 IgM 类抗 CIT 单抗的亲和力进行了测定。以抗体稀释梯度为横坐标，对应的 A 值为纵坐标，根据 ELISA 测定曲线图，计算出该单克隆抗体 50%饱和 A_{450} 值时对应的抗体浓度，其倒数即为抗体的相对亲和力，本单抗测的相对亲和力为 4.17×10^8 L/mol。

2.3.5 抗桔霉素单克隆抗体的特异性。桔霉素的结构类似物主要有 OTA、ZEA、AFB1、DON 等真菌毒素以及红曲中的红曲色素如橙色素 (rubropunctatine)、红色素 (rubropunctamine) 等，其结构见图 3。用 10% 甲醇将 AFB1、OTA、DON、ZEN、rubropunctatine、rubropunctamine 的标准品溶液稀释成梯度浓度的标准品，与包被抗原 CIT-OVA 做间接竞争 ELISA 测试，实验结果表明，桔霉素单抗与 OTA、ZEA、AFB1 和 DON 的交叉反应率均小于 0.1%。本工作还首次报道了桔霉素单抗与本实验制备的红曲色素的交叉反应，单抗与红曲色素中的橙色素和红色素的交叉反应率均低于 0.01%。

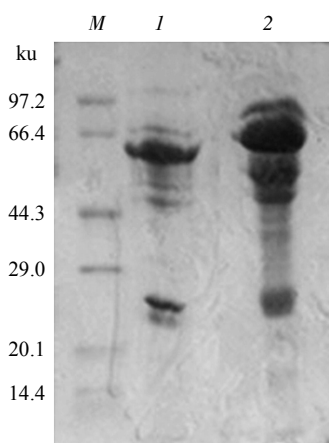


Fig. 2 SDS-PAGE electrophoresis of monoclonal antibody before and after purification

M: Marker of protein (ku); 1: McAb after purification; 2: The ascites.

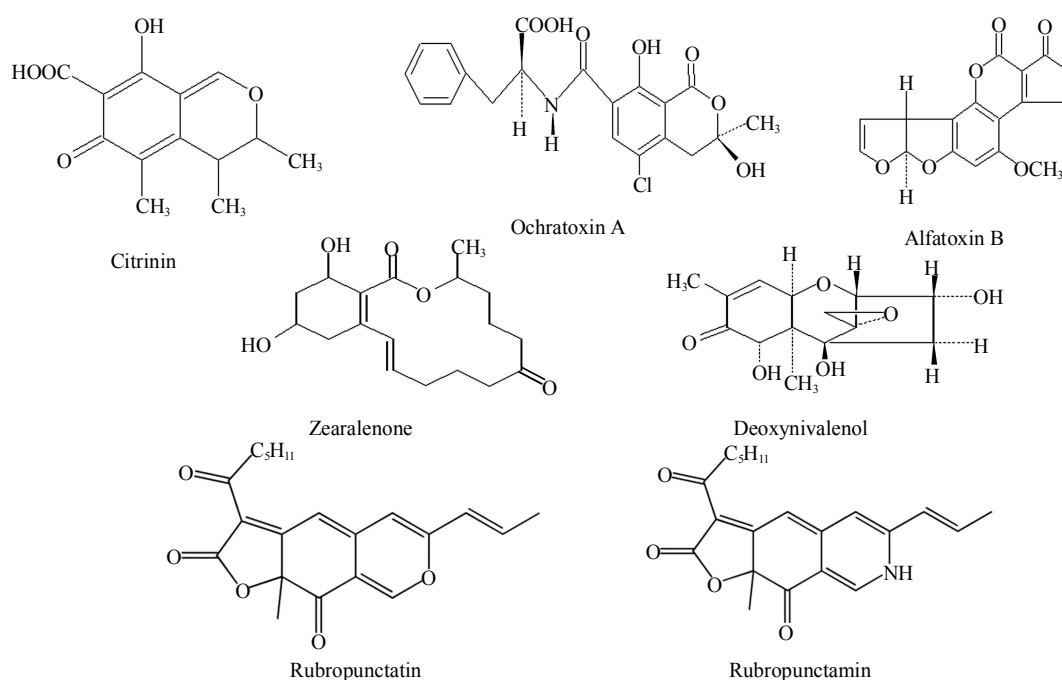


Fig. 3 The structure of analogue to CIT

Table 1 Cross reactivity of McAb against CIT

Analogue to CIT	$IC_{50}(\mu\text{g/L})$	CR(%)
AFB ₁	566	0.05
OTA	600	0.05
DON	>100 000	<0.001
ZEA	>100 000	<0.001
Rubropunctatine	78 000	<0.001
Rubropunctamine	4 800	0.006

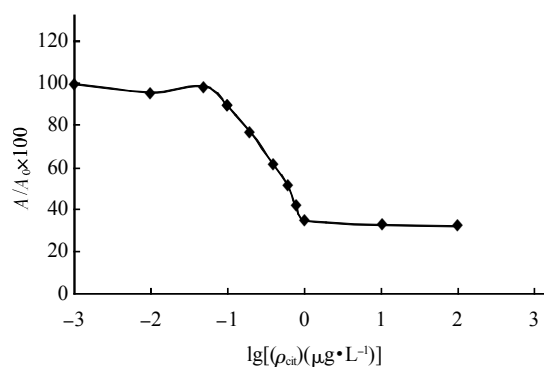


Fig. 4 The competitive inhibition curve of McAb against CIT

2.4 间接竞争 ELISA 的标准曲线

以吸光度比值 A/A_0 为纵坐标(A 为添加 CIT 的吸光度, A_0 为不添加 CIT 的吸光度), CIT 添加浓度的对数值为横坐标, 单抗与 CIT 的间接竞争曲线示于图 4. 在 CIT 浓度为 $0.05 \sim 1.0 \mu\text{g/L}$ 时该曲线有较好的线性关系, 在此范围内建立间接竞争 ELISA 的标准曲线, 其标准方程为: $y = -49.062x + 38.989$, 其中: $R^2 = 0.9816$. 当抑制率为 50% 时, IC_{50} 值为 $0.3 \mu\text{g/L}$.

2.5 单抗与多抗的比较

多克隆抗体(PcAb)由于成分混杂, 存在与其他结构类似物之间的交叉反应性. 单克隆抗体(McAb)则具有特异性强、均一性好、与免疫原其他成分无交叉反应、只有一个识别位点且亲和力高等特点. 应用该单抗还可以对抗原物质做出多抗无法进行的精细分析和测试, 且能用体内或体外方法

无限量生产, 比多抗易于提纯.

从表 2 可以看出, 本工作筛选到的 IgM 类抗 CIT 单抗的特异性好、亲和力高, 以抗 CIT 单抗建立的 ELISA 检测方法的检测范围比多抗低了 2 个

数量级, 且其 IC_{50} 也明显优于多抗; 同时筛选的 IgM 类单抗 IC_{50} 比刘仁荣筛选的 IgG2a 类单抗的 IC_{50} 更低, 可以更灵敏地对含有微量桔霉素的样品进行检测.

Table 2 Comparison of indirect competitive ELISA standard curve

	PcAb against CIT	McAb against CIT	McAb against CIT ^[7]
Dynamic range($\mu\text{g/L}$)	10~250	0.05~1.0	20~1 000
Detection limit($\mu\text{g/L}$)	10	0.05	10
$IC_{50}(\mu\text{g/L})$	100	0.3	200

3 结 论

本工作采用双环氧试剂(1, 4- 丁二醇二缩水甘油醚)将桔霉素 C8 位置的—OH 与蛋白质的—NH₂ 进行偶联, 化学反应条件温和, 该偶联抗原具有良好的免疫原性, 同时产生针对桔霉素的抗体. 在此基础上, 进一步采用杂交瘤细胞技术建立了抗桔霉素单克隆抗体的杂交瘤细胞株 H2-F8, 并对单克隆抗体进行了初步鉴定, 建立了桔霉素的 ELISA 检测方法. 本工作筛选到的 IgM 类抗 CIT 单抗的特异性好、亲和力高, 其 IC_{50} 比刘仁荣等筛选到的 IgG2a 类单抗的 IC_{50} 更低. 本工作为桔霉素 ELISA 快速检测技术的建立以及检测试剂盒的研制提供了依据.

参 考 文 献

- [1] Blanc P J, Loret M, Goma G. Production of citrinin by various species of *Monascus*. *Biotechnology Letters*, 1995, **17**(3): 291
- [2] Bao J X, Xiao Q J, Li J G, *et al.* Review on the qualitative and quantitative analysis of the mycotoxin citrinin. *Food control*, 2006, **17**: 271-285.
- [3] Vrabcheva T, Usleber E, Dietrich R, *et al.* Cooccurrence of ochratoxin A and citrinin in cereals from Bulgarian villages with a history of Balkan endemic nephropathy. *J Agricultural and Food Chemistry*, 2000, **48**: 2483-2488
- [4] Kononenko G P, Burkin A A. Immunoenzyme method for the determination of citrinin. *Zhurnal Analiticheskoi Khimii*, 2007, **62**(7): 769-774
- [5] 胡晓清, 陈福生, 邢淑婕等. 红曲中桔霉素的薄层层析分析. *食品科学*, 2003, **24**(5): 126-129
- [6] Hu X Q, Chen F S, Xing S J, *et al.* Food Science, 2003, **24**(5): 126-129
- [7] Franco C M, Fente C A, Vazquez B, *et al.* Simple and sensitive high-performance liquid chromatography-fluorescence method for the determination of citrinin application to the analysis of fungal culture and cheese extracts. *J Chromatography A*, 1996, **723**: 69-75
- [8] 刘仁荣, 余 宙, 何庆华, 等. 抗桔青霉素单克隆抗体的研制与鉴定. *卫生研究*, 2007, **36**(2): 190-193
- [9] Liu R R, Yu Z, He Q H, *et al.* *J Hygiene Research*, 2009, **36**(2): 190-193
- [10] 汪媛媛, 李泳宁, 郭养浩. 双交联法制备桔霉素-蛋白偶联抗原及抗体. *生物化学与生物物理进展*, 2010, **37**(3): 337-341
- [11] Wang Y Y, Li Y N, Guo Y H. *Prog Biochem Biophys*, 2010, **37**(3): 337-341
- [12] 万文徽, 董志伟. 单克隆抗体亲和常数的测定. *单克隆抗体通讯*, 1993, **9**(2): 72-75
- [13] Wan W H, Dong Z W. *Chin J Cell Mol Immunol*, 1993, **9**(2): 72-75

Preparation and Characterization of The High Specificity Monoclonal Antibodies Against Citrinin*

LI Yong-Ning¹⁾, WANG Yuan-Yuan²⁾, ZHENG Yun-Quan²⁾, GUO Yang-Hao^{1, 2)**}

¹⁾ College of Chemistry & Chemical Engineering, Fuzhou University, Fuzhou 350002, China;

²⁾ Fujian Key Laboratory of Medical Devices and Pharmaceutical Technology, Fuzhou 350002, China)

Abstract To prepare citrinin(CIT)-protein antigen, CIT was conjugated with bovine serum albumin (BSA) by 1, 4-butanediol diglycidyl ether. The spleen from the BALB/C mice immunized with CIT-BSA conjugate was used to fuse with the murine SP2/0. By subcloning, a hybridoma cell lines excreting monoclonal antibodies(McAb) against CIT was obtained and named H2-F8. The monoclonal antibodies obtained from hybridoma H2-F8 was of IgM subclass. The affinity constant of the McAb to CIT was 4.17×10^8 L/mol and the IC_{50} value was 0.3 $\mu\text{g/L}$. Its linear range of the assay was between 0.05 $\mu\text{g/L}$ and 1.0 $\mu\text{g/L}$. The cross-reactivity rates were less than 0.1% of other toxins such as ochratoxin A, aflatoxin B1, deoxynivalenol, zearalenone and were less than 0.01% of rubropunctatine and rubropunctamine. This work would be helpful for establishing the technology and developing the kit to determine CIT-contaminated samples by ELISA.

Key words 1, 4-butanediol diglycidyl ether, citrinin, monoclonal antibodies

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2010.00026

*This work was supported by a grant from Fund of Fujian Key Laboratory of Medical Devices and Pharmaceutical Technology (09003).

**Corresponding author.

Tel/Fax: 86-591-83720772, E-mail: yongningli@163.com

Received: April 12, 2010 Accepted: August 10, 2010