

抗T—2毒素单克隆抗体的制备及特性

卫生部食品卫生监督检验所 阳传和 罗雪云

摘要: T—2毒素和GlgG联接物免疫的BALB/c小鼠脾细胞和BALB/c小鼠骨髓瘤细胞NS—1融合, 获得一个产生抗T—2毒素单克隆抗体(单抗), 称其为1D7。1D7的Ig亚类为IgG₁, 其相对亲和常数为 2.59×10^9 L/M, 终滴度为1:200万, 检测纯毒素的线性范围为10~800ng/ml, 最小检出量为4ng/ml。在9种单端孢霉烯族化合物中, 只与乙酰T—2毒素有36%的交叉反应。

单端孢霉烯族化合物(Trichothecenes)是某些农作物病原真菌的代谢产物。镰刀菌(*Fusarium* sp)可引致麦类、玉米等作物患赤霉病, 赤霉病谷物中含有大量的该类毒素。其中, 对人畜危害最大的主要有T—2毒素等^[1]。该毒素是体内蛋白质合成的抑制剂^[2]。人畜误食带病的谷物后, 可引起呕吐、腹泻、发烧等急性中毒症状, 严重时损伤造血组织, 造成人畜伤亡^[3]。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^[4]。因此, 需建立一种特异性强、灵敏度高、简单快速、适于检测大量样品的方法。以便加强对谷物的卫生监督管理, 预防食物中毒的发生。

T—2毒素常用的化学检测法是薄层层析法、气相色谱法等^[5]。薄层层析法因方法本身的限制, 精确度低、敏感性差。气相色谱法则因需价格昂贵的精密仪器, 提取过程复杂且费时间, 难以推广应用。而免疫测定方法, 精确度高、敏感性强, 设备要求简单。目前, 欧美一些国家已开展这方面的研究^[6, 7], 而国内尚无报道。本文应用B淋巴细胞杂交瘤技术制备了具有特异性强的抗T—2毒素单克隆抗体。

1 材料与方法

1.1 试剂: T—2

乙酰T—2 (AcetylT—2)、

T—2 三醇(T—2 triol)、
T—2 四醇(T—2 tetraol)、
脱氧雪腐镰刀菌烯醇 (Deoxynival, DON)、
二醋酸藁草镰刀菌烯醇 (Diacetoxyscitrpenol, DAS)、
牛血清白蛋白(BSA)
2,6,10,14,一甲基15烷(Prisfane)
以上均为sigma公司产品;
疣孢霉素(verrucarol), Makor 化学公司;
镰刀菌酮—X(Fusarenon—x)、
新茄病镰刀菌素(Neosolaniol)和光纯药工业株式会社;
羊免疫球蛋白(GlgG)、华美生物公司; 羊抗鼠IgG, 北京生物制品研究所;
聚乙二醇(PEG, MW20000), 上海化学试剂采购供应站。

1.2 实验动物: BALB/C雄性小鼠, 6~8周龄, 北京医科大学实验动物部提供。

1.3 人工抗原制备: 半抗原T—2与载体蛋白GlgG(以及BSA)的联接按chu等^[8]的方法进行, 结合物用紫外分光光度计进行扫描鉴定。

1.4 免疫方法: 用T—2—GlgG联接物作为免疫原, 均采用尾静脉注射。第一次免疫, 剂量为400ug/只, 同时注射200ug/只

的羊抗鼠IgG。于第15天和第30天,进行第二次,第三次免疫,剂量均为200ug/只。第三次免疫后3天,测得的小鼠血清抗体效价为1:1000,取脾细胞,做融合试验。

1.5 细胞融合:

免疫小鼠脾细胞与骨髓瘤细胞NS-1的融合,按Gendloff等报道的方法^[7]进行。

1.6 杂交瘤筛选及抗体检测:

杂交瘤筛选用竞争性ELISA间接法进行。用T-2-BSA(8ug/ml)作为检测抗原包被聚苯乙烯板(每孔100ul),4℃过夜,洗涤后,加入培养上清液50ul,同时加入T-2半抗原(10ug/ml,50ul,37℃孵育1.5h,洗涤后加羊抗鼠IgG与辣根过氧化物酶结合物(100ul)37℃2h,洗涤后加底物溶液(OPD-H₂O₂),同等条件孵育30min后,用2MH₂SO₄终止反应,于492nm处检测OD值。

培养上清液及腹水中抗体滴度的检测,用非竞争性ELISA间接法进行。与竞争性ELISA间接法不同在于,加培养上清液(100ul)时,不加T-2半抗原。

1.7 单克隆抗体腹水制备:

于BALB/C小鼠腹腔注射0.3ml Pristane,经7~14天,再注入杂交瘤细胞3~5×10⁶个,8~10天后取腹水,离心沉淀取上清液。

1.8 抗体特性鉴定:

抗体Ig亚类的鉴定,用免疫双扩散法。

抗体的亲和常数测定,按Friguet^[8]报道的方法。

抗体与各种毒素的反应性检测,按上述的竞争性ELISA间接法进行。所采用的毒素半抗原: T-2、乙酰T-2、T-2三醇、T-2四醇、疣孢霉素、镰刀菌酮-X、新茄病镰刀菌素、脱氧雪腐镰刀菌烯醇、二醋酸蕨草镰刀菌烯醇。

2 结 果

2.1 杂交瘤的产生和抗体效价

细胞融合后,45%的孔长出杂交瘤细胞,其中8个孔杂交瘤分泌抗体。经筛选后,一个杂交瘤稳定分泌特异性抗T-2单克隆抗体,命名为1D7细胞株,其分泌的抗体称为1D7。1D7细胞三次再克隆,于第二次再克隆时,100%孔细胞分泌抗体。

1D7细胞培养上清液经PEG(MW 20000)浓缩10倍后,非竞争性ELISA间接法测其抗体滴度可达1:2560。

BALB/C小鼠腹水中的抗体滴度曲线见图1。其效价可达1:200万。

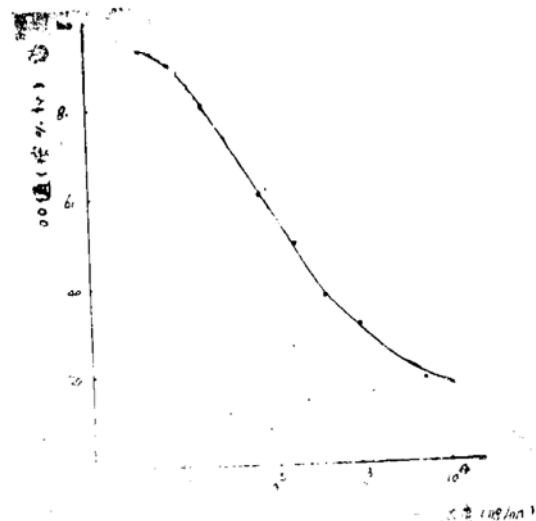


图1 T-2抗体腹水的稀释曲线

腹水经饱和硫酸铵盐析纯化后,经紫外分光光度计测其260nm和280nm处的OD值,得出纯化腹水中的蛋白浓度为13.1mg/ml。

2.2 抗体的Ig亚类和相对亲和力及特异性:

1D7抗体免疫双扩散结果,出现的沉淀线为IgG₁;

用Friguet法测得的抗体的相对亲和常数为2.59×10⁹L/M,

特异性检测: T-2等9种单端孢霉烯族化合物(分子结构及其支链基团见图2),

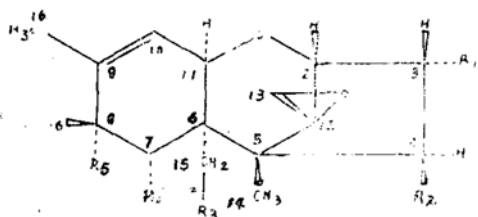


图 2 供试的9种单端孢霉烯族化合物的分子结构及其交链基团

通过竞争性ELISA间接法测定结果表明, 只与乙酰T-2有交叉抑制反应, 与供试的其他毒素无交叉反应, 见表1。

表1 ID7抗体与9种单端孢霉烯族化合物的特异性

毒 素	50%抑制 (ug/ml)	最低检出量 (ug/ml)	交叉反应
T-2	0.018	0.004	1
乙酰T-2	0.050	0.010	0.36
T-2三醇	ND	ND	N
T-2四醇	ND	ND	N
新茄病镰刀菌素	ND	ND	N
二醋酸蔗草镰刀菌烯醇	ND	ND	N
疣孢霉素	ND	ND	N
镰刀菌酮-X	ND	ND	N
脱氧雪腐镰刀菌烯醇	ND	ND	N

ND: 未检出(>50.00ug/ml)

N: 无交叉反应。

从图3 T-2毒素的抑制曲线中可以看出, T-2毒素的最低检出量为4 ng/ml,

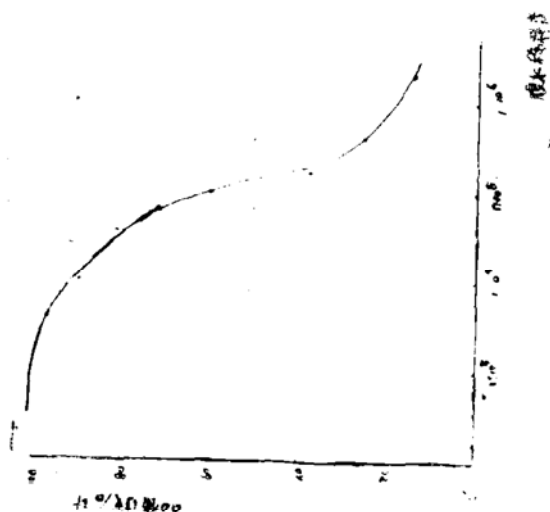


图 3 T-2毒素的标准抑制曲线

检测的线性回归方程为:

$$T = -30.03482 \log x + 118.7196 \quad (R = -0.985)$$

3 讨论

T-2毒素与载体蛋白的结合物, 具有免疫毒性作用^[7], 因此, T-2毒素单克隆抗体的研制需要大剂量的抗原刺激和长时间的免疫过程^[7]。我们运用Finkelman等报道的方法^[9]加以改进, 用羊免疫球蛋白作为半抗原免疫时的载体, 取得了令人满意的结果。在短程方案免疫BALB/C小鼠后, 获得了高效价的单克隆抗体。该抗体只与乙酰T-2有交叉反应(36%), 说明具有较强的特异性。其相对亲和常数和T-2毒素的最低检出量均优于Hunter等^[10]及 Gendlof等^[7]的报道。

从交叉反应的情况看, 单端孢霉烯族化合物8位上的 α -异戊酰氧基和4位、15位上的乙酰氧基的同时存在, 是抗T-2抗体反应所必需。

应用本文报道的1D7单克隆抗体, 通过竞争性ELISA间接法, 检测T-2毒素, 最低检出量达4ng/ml, 其灵敏度明显高于薄层层析法^[10]和气相色谱法^[11](最低检出量分别为200ng/ml和20ng/ml), 显见, 在食品卫生领域内, 该单抗具有较大应用潜力。

致谢: 曾蒙中国医学科学院肿瘤研究所王德斌副教授指导, 在此致谢。

参 考 文 献

- [1] Snyder AP. Qualitative, quantitative and technological aspects of the trichothecene mycotoxins. J. Food Prot. 1986; 49: 544
- [2] Cannon M, et al. Prevention by ribosome-bound nascent polyphenylalanine chains of the functional interaction of T-2 toxin with its receptor site. Biochem. J. 1976; 156: 289
- [3] Lutsky I, et al. The role of T-2 toxin in experimental alimentary toxin aleukia, a toxicity

- study in cats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 1978; 43:111
- [4] 荣康泰, 等. T-2毒系的放射免疫测定, 中国药理学与毒理学杂志, 1987, 1(3), 195
- [5] Chin FS, et al.. Production of antibody against T-2 toxin. *Appl. Environ. Microbiol.* 1979; 37: 104
- [6] Hunter KW, et al.. Preparation and characterization of monoclonal antibodies to the trichothene mycotoxin T-2. *Appl. Environ. Microbiol.* 1985; 49: 168
- [7] Gendloff EH, et al.. Production of a monoclonal antibody to T-2 toxin with strong cross-reactivity to T-2 metabolites. *Phytopathology* 1987; 77: 57
- [8] Friguet B, et al.. Measurements of the true affinity constant in solution of antigen-antibody complexes by enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Immunol. Methods* 1985; 77: 305
- [9] Finkelman FD, et al.. Polyclonal activation of the murine immune system by an antibody to IgD. I. Increase in cell size and DNA synthesis. *J. Immunol.* 1982; 129: 629
- [10] 罗雪云, 等. 食品(小麦和玉米)中T-2毒素的薄层层析法. 卫生研究 1985; 14(3), 31
- [11] Rosen RT, et al.. Quantification and confirmation of four *Fusarium* mycotoxins in corn by gas chromatography-mass spectrometry-selected ion monitoring. *J. Chromatogr.* 1984; 283: 223

毒 素	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆
T-2	-OH	-OAC	-OAC	-H	-OISV	-H
乙酰T-2	-OAC	-OAC	-OAC	-H	-OISV	-H
T-2三醇	-OH	-OH	-OH	-H	-OISV	-H
T-2四醇	-OH	-OH	-OH	-H	-OH	-H
新茄病镰刀菌素	-OH	-OAC	-OAC	-H	-OH	-H
二醋酸蔗草镰刀菌烯醇	-OH	-OAC	-OAC	-H	-H	-H
抗胞霉素	-H	-OH	-H	-OH	-H	-H
镰刀菌酮-Y	-OH	-OAC	-OH	-OH	=O	
脱氧雪腐镰刀菌烯醇	-OH	-H	-OH	-OH	=O	

-OAC: 乙酰氧基($-\text{OCOCH}_3$)

-OISV: 异戊酰氧基($-\text{OCOCH}_2\text{CHCH}_3\text{CH}_3$)

本 刊 启 示

根据本刊实际情况, 决定暂不向作者收取稿件处理费及发表费,

特此告示

《中国食品卫生》杂志社