

论著

抗黄曲霉毒素 B₁ 单抗独特型抗体的制备

江 涛 柳 桢 李 楠 李燕俊 高秀芬 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 研制黄曲霉毒素 B₁ 标准品的替代品并应用于酶联免疫吸附试验(ELISA)。方法 在研制了抗黄曲霉毒素 B₁ 单抗的基础上,将抗体用无花果蛋白酶进行酶切,制备出抗黄曲霉毒素 B₁ 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,制备出抗黄曲霉毒素 B₁ 单抗独特型抗体,并对该独特型抗体进行鉴定。结果 该独特型抗体是 Ab₂β 型,与黄曲霉毒素 B₁ 存在内影像关系。结论 该抗体可以替代黄曲霉毒素 B₁ 标准品应用于 ELISA 检测。
关键词:黄曲霉毒素 B₁;抗体;抗独特型;酶联免疫吸附测定

Preparation of Polyclonal Anti-Idiotypic Antibody Against Anti-Aflatoxin B₁ Monoclonal Antibody

JIANG Tao, LIU Zhen, LI Nan, LI Yan-jun, GAO Xiu-fen, JI Rong
(National Institute for Nutrition and Food Safety, Chinese CDC, Beijing 100021, China)

Abstract: **Objective** To prepare a substitute for aflatoxin B₁ standard and to apply it for enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). **Method** The polyclonal anti-idiotypic antibody against anti-aflatoxin B₁ monoclonal antibody was prepared by immunizing Japanese flap-eared rabbits with F(ab')₂ fragment of anti-aflatoxin B₁ monoclonal antibody. **Results** The polyclonal anti-idiotypic antibody was identified as a Ab₂β subclass and as an “inner image” with aflatoxin B₁. The polyclonal anti-idiotypic antibody can be used as a substitute for aflatoxin B₁ standard in ELISA.
Key words: Aflatoxin B₁; Antibodies; Anti-Idiotypic; Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

黄曲霉毒素(aflatoxin)是由寄生曲霉(*Aspergillus parasiticus*)和产毒的黄曲霉(*A. flavus*)污染粮油及其制品、饲料所产生的一系列有毒代谢产物。其中以黄曲霉毒素 B₁ (aflatoxin B₁, AFB₁) 的毒性最强、污染最为严重,是自然界存在的最严重的化学致癌物之一^[1]。世界上几乎所有的国家和地区都规定了食品及饲料中 AFB₁ 的最大允许限量并作为强制性标准进行检测和控制。检测粮油食品中黄曲霉毒素 B₁ 的污染状况,必须依赖于黄曲霉毒素 B₁ 标准品。我国目前所使用的黄曲霉毒素 B₁ 标准品主要依赖于进口。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。2002 年,澳大利亚集团(包括美国、英国等发达国家)制定了《生化敏感物项出口控制指导原则》,对一些军民两用的化学品、生物剂及相关设备和技术实行出口许可证制度。现集团控制清单中共包括 19 种毒素,其中,黄曲霉毒素在控制清单之列^[10]。因此,我国不可能从上述属于澳大利亚集团的成员国进口黄曲霉毒素,黄曲霉毒

素标准品的紧缺已经成为检测和研究 AFB₁ 的瓶颈。因此寻找 AFB₁ 标准品的替代品已成为检测和评价食品中 AFB₁ 污染水平及对人群危害的关键技术。本研究根据 JERNE 的免疫网络学说^[5],参考了 MICHIO H 的研究方法^[2],利用抗独特型抗体 β 亚型在空间构象上与抗原存在“内影像”关系,可以在一定程度上替代抗原的原理,在已有的抗黄曲霉毒素 B₁ 单抗的基础上研制出抗黄曲霉毒素 B₁ 单抗独特型抗体,并对该抗独特型抗体的特性进行研究。

1 材料和方法

1.1 材料和试剂

黄曲霉毒素 B₁、B₂、G₁、G₂ 和黄曲霉毒素 M₁ (美国 Sigma 公司)、无花果蛋白酶(美国 Sigma 公司)、SephacrylTM S-200 分子筛凝胶(美国 Amersham 公司)、黄曲霉毒素 B₁-牛血清白蛋白和钥孔血蓝素 KLH(美国 Sigma 公司)、完全弗氏佐剂(CFA)和不完全弗氏佐剂(IFA)(美国 Sigma 公司)、辣根过氧化物酶(美国 Sigma 公司)、25 %戊二醛(美国 Sigma 公司)、甘氨酸(美国 Amresco 公司)、正辛酸(美国 Sigma 公司)、硫酸铵(北京化学试剂公司)、羊抗鼠

基金项目:“十五”国家科技重大专项(2001BA804A46)
作者简介:江 涛 男 副研究员
通讯作者:计 融 男 研究员

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)。

抗黄曲霉毒素 B₁ 单抗、抗赭曲霉毒素 A(OA) 单抗、抗 T-2 毒素(T-2)单抗、抗河豚毒素(TTX)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 3 只,均为 1~1.5 kg,购自北京富豪动物养殖中心[SCXK(京)2000-0019];6~8 周龄雌性未经产 BALB/c 小鼠 3 只,购自军事医学科学院动物中心。

1.4 方法

1.4.1 抗 AFB₁ 单克隆抗体 F(ab')₂ 片段的制备及鉴定

抗 AFB₁ 单克隆抗体 F(ab')₂ 片段的制备 用辛酸-饱和硫酸铵两步沉淀法纯化抗 AFB₁ 单克隆抗体^[3],将纯化好的单抗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)分离酶切片段,最终得到抗 AFB₁ 单克隆抗体 F(ab')₂ 片段。采用 AKTA UNICOM5.0 分析软件对分子筛凝胶分离出的色谱峰进行分析,通过对比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来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 AFB₁ 单克隆抗体 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^[4]。F(ab')₂ 片段活性的鉴定采用间接竞争 ELISA 法进行。以 0.062 5 μg/ml AFB₁-BSA 包被酶标板,采用间接竞争 ELISA 方法。分别选择抗 AFB₁ 单克隆抗体和抗 AFB₁ 单克隆抗体的酶切片段 F(ab')₂ 片段作为反应抗体,用不同稀释浓度 0.00、0.01、0.02、0.05、0.10、0.20、0.50、1.00、2.00、5.00、10.00 ng/ml 的 AFB₁ 毒素标准品作为反应抗原,采用羊抗鼠 IgG Fab-HRP 为第二抗体,绘制竞争抑制曲线。

1.4.2 动物免疫

取 1 ml 含抗 AFB₁ 单抗 F(ab')₂ 片段的溶液(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 含 F(ab')₂ 片段的溶液(浓度为 0.5 mg/ml)加等体积不完全弗氏佐剂乳

化后,皮下多点注射进行加强免疫。此后,每隔 2 周重复免疫一次,即按照第二次的免疫方法进行。每次免疫前抽约 0.5 ml 耳缘静脉血,分离血清检测免疫效果。采用纯化后的 AFB₁ 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 天后颈动脉取血,收集兔血清。

1.4.3 血清的分离、纯化

将收集的兔血置 4℃凝固约 1 h 至血块收缩,收集析出的血清,剩余血块全部倾入离心管,在常温下 2 500 g 离心 30 min,取上清与前面的血清混合,采用辛酸-饱和硫酸铵两步沉淀法纯化血清。分装成 1 ml/管,于 -20℃保存。

1.4.4 抗 AFB₁ 单独特型抗体的鉴定

1.4.4.1 抗 AFB₁ 单独特型抗体亚型的鉴定 将兔血清(含有抗 AFB₁ 单独特型抗体)用 0.85%生理盐水稀释成 1 mg/ml,首次免疫用 200 μl 兔血清(相当于 200 μg 抗 AFB₁ 单独特型抗体)加等体积的完全弗氏佐剂充分乳化后,右侧腹腔免疫 BALB/c 小鼠,2 周后用 100 μl 的兔血清(相当于 100 μg 抗 AFB₁ 单独特型抗体)加等体积的不完全弗氏佐剂充分乳化后加强免疫,此后,每隔 2 周按第二次免疫法重复加强免疫 1 次。免疫 4 次后取静脉血,3 000 r/min 离心,取上清进行检测。以 0.5 μg/ml 的 AFB₁-BSA 为包被抗原,检测血清中抗体的滴度。

1.4.4.2 抗 AFB₁ 单独特型抗体特异性的鉴定

将抗 AFB₁ 单独特型抗体分别与本室制备的其他单克隆抗体(抗黄曲霉毒素 B₁ 单抗、抗赭曲霉毒素 A 单抗、抗 T-2 毒素单抗、抗河豚毒素单抗)进行交叉反应,测定抗 AFB₁ 单独特型抗体与其他单克隆抗体的交叉反应率。

将抗 AFB₁ 单独特型抗体分别与黄曲霉毒素 B₂、黄曲霉毒素 G₁、黄曲霉毒素 G₂ 和黄曲霉毒素 M₁ 等进行交叉反应,测定抗 AFB₁ 单独特型抗体与黄曲霉毒素的交叉反应率。

1.4.5 抗 AFB₁ 单独特型抗体的应用

以 AFB₁-BSA 作为包被抗原(包被量为 0.062 5 μg/ml),采用间接竞争 ELISA 法,以抗 AFB₁ 单克隆抗体反应抗体,分别与 AFB₁ 毒素标准品或制备所得的兔血清(含有抗 AFB₁ 单独特型抗体)反应,观察制备出的兔血清和抗 AFB₁ 单抗的竞争曲线,并且与 AFB₁ 毒素标准品和抗 AFB₁ 单抗的竞争曲线进行比较,找出兔血清与 AFB₁ 毒素标准品的对应关系。

样品的提取:样品经粉碎后使其 90%通过 250

~500 μm 网筛。称取 5 g 加到 100 ml 具塞三角烧瓶中,加入 0.5 g 氯化钠及 25 ml 甲醇水溶液(70 :30, 体积比),剧烈震荡 30 min 后过滤。滤液用纯水稀释 10 倍进行检测。

2 结果

2.1 抗黄曲霉毒素 B₁ 单抗片段 F(ab')₂ 的特性

2.1.1 F(ab')₂ 片段的色谱图

图 1 为鼠 IgG F(ab')₂ 标准片段的凝胶过滤色谱图,图 2 为抗 AFB₁ 单抗酶切片段的凝胶过滤色谱图。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,说明两种物质的分子量大小相同,可以认为图 2 中峰 1 为所需要的 F(ab')₂ 片段,见图 1、图 2。

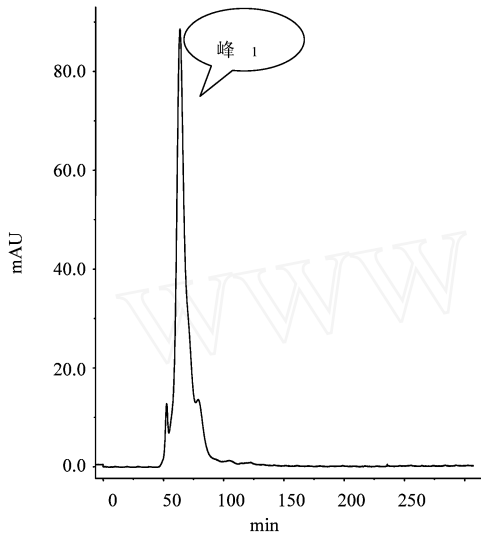


图 1 F(ab')₂ 标准片段的凝胶过滤色谱图

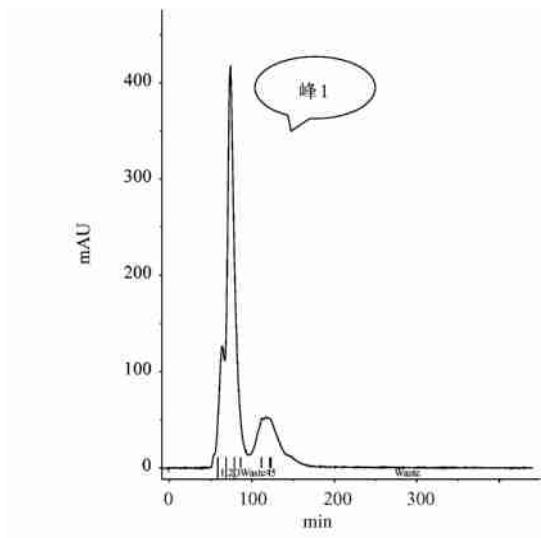


图 2 AFB₁ 抗体酶切片段的凝胶过滤色谱图

2.1.2 F(ab')₂ 片段的分子量

根据非还原电泳鉴定抗 AFB₁ 单抗及抗体的酶

切片段 F(ab')₂ 的相对分子量。实验结果表明,在非还原电泳条件下,纯化抗体 IgG 相对分子量约为 150 KD,酶切片段 F(ab')₂ 的相对分子量约为 105 KD。

2.1.3 抗 AFB₁ 毒素单抗 F(ab')₂ 片段与 AFB₁ 毒素标准品的竞争抑制曲线

AFB₁ 毒素标准品对抗体片段 F(ab')₂ 抑制率为 20 % 的浓度为 0.15 ng/ml,抑制率为 50 % 的浓度为 0.52 ng/ml;AFB₁ 毒素标准品对抗 AFB₁ 单抗抑制率为 20 % 的浓度为 0.20 ng/ml,抑制率为 50 % 的浓度为 0.59 ng/ml。由图 3 与图 4 比较可知,AFB₁ 毒素标准品对完整的抗 AFB₁ 抗体及抗体片段的抑制率在 20 %、50 % 和 80 % 的水平上浓度基本相同,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,制备抗独特型抗体。

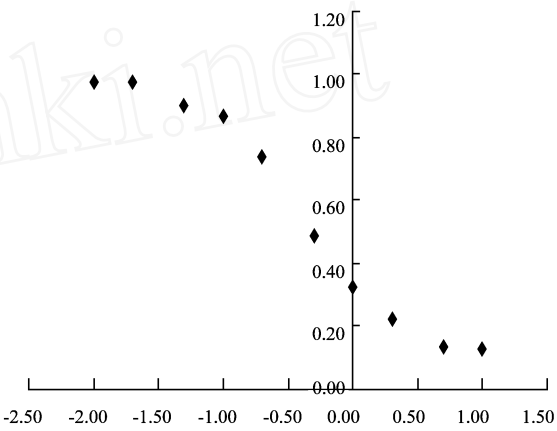
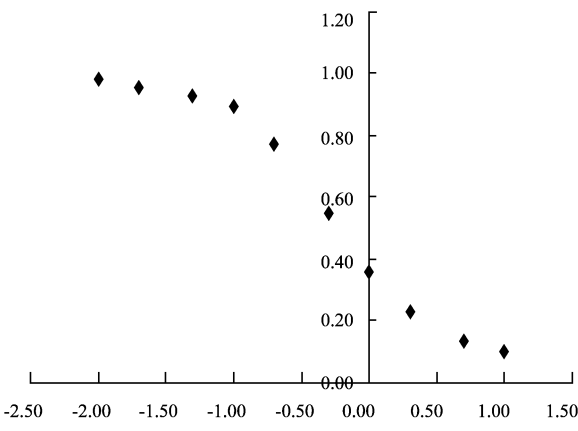


图 3 F(ab')₂ 片段对 AFB₁ 竞争抑制标准曲线



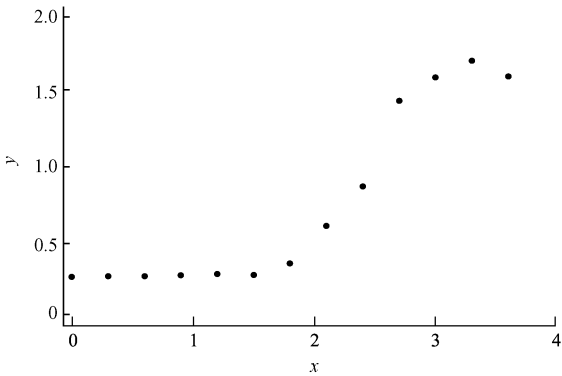
注:图 3 图 4 中的纵轴为吸光度比值,横轴为 AFB₁ 毒素浓度的对数值。

图 4 完整单抗对 AFB₁ 竞争抑制标准曲线

2.2 抗 AFB₁ 单抗独特型抗体的特性

以 AFB₁-BSA 为包被抗原,用抗 AFB₁ 单抗独特

型抗体免疫小鼠后所收集到的小鼠血清为反应抗体,得到包被抗原 - 反应抗体之间的关系曲线。用所制备的抗 AFB₁ 独特型抗体免疫 BALB/c 小鼠,经过初次免疫及加强免疫 4 次后,在小鼠体内产生的抗体可以结合由 AFB₁-BSA 包被的 ELISA 板,并且在一定范围内存在剂量反应关系,可以认为本研究所研制的抗独特型抗体的亚类为 $\alpha\beta$ 型,见图 5。



注:图中的纵轴为吸光度比值,横轴为抗体浓度的对数值。

图 5 抗黄曲霉毒素 B₁ 单抗独特型多克隆抗体 Ab₂ β 亚类鉴定

将抗 AFB₁ 单抗独特型抗体分别与本室研制的其他单克隆抗体(抗 T-2 毒素单抗、抗 TTX 毒素单抗、抗赭曲霉毒素 A 单抗等)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。

抗 AFB₁ 单抗独特型抗体与黄曲霉毒素 B₂、黄曲霉毒素 G₁、黄曲霉毒素 G₂ 和黄曲霉毒素 M₁ 的交叉反应率也均小于 1%。

2.3 抗 AFB₁ 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 AFB₁ 单抗独特型抗体或 AFB₁ 毒素标准品与抗 AFB₁ 单克隆抗体进行竞争抑制反应,相同吸光度比值下 AFB₁ 毒素标准品浓度与抗 AFB₁ 单抗独特型抗体浓度的对应关系用 STATA 软件回归分析,算出 AFB₁ 毒素标准品与抗 AFB₁ 单抗独特型抗体的浓度对应关系。黄曲霉毒素 B₁ 抗独特型抗体与黄曲霉毒素 B₁ 标准品对应关系回归方程 $y = 0.13x - 0.17$ ($R^2 = 0.97$),其中 x 为抗 AFB₁ 单抗独特型抗体的浓度($\mu\text{g/ml}$), y 为 AFB₁ 毒素标准品浓度(ng/ml)。以抗 AFB₁ 为反应抗体,以抗 AFB₁ 独特型抗体为反应抗原,校正曲线为 $y = -0.43x + 0.90$ ($R^2 = 0.98$),校正曲线的线性范围 1.5~100 $\mu\text{g/ml}$ (相当黄曲霉毒素 B₁ 0.03~10 ng/ml)。

分别向不含 AFB₁ 毒素的玉米样品中加入一定

量的 AFB₁ 毒素标准品,使样品浓度分别达到 5 ng/g 和 60 ng/g ,对样品中的 AFB₁ 毒素进行提取回收,用抗独特型抗体替代 AFB₁ 毒素标准品绘制标准曲线进行检测,将检测结果根据抗独特型抗体浓度与 AFB₁ 毒素标准品浓度之间的换算关系计算,推出相当于 AFB₁ 毒素标准品的量,并计算其回收率。其结果见表 1。

表 1 AFB₁ 两个水平加标回收率试验结果 (%)

样品编号	5 ng/g 加标回收率	60 ng/g 加标回收率
1	102.27	97.82
2	80.56	91.65
3	92.58	88.81
4	95.36	82.26
5	108.32	86.05
平均回收率	95.82	89.32
RSD	10.96	6.59

3 讨论

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]。他把免疫系统看成是一个 V-功能区(V 域)的网,出发点就是 Ig 分子的双重性,即游离的 Ig 分子有两种相反的部位:其中一个部位能与抗原表位结合,称作结合部位或补位;另一个部位能被其它 Ig 分子及 T、B 细胞上的补位所识别,称作独特型决定位或独特位。按照这一免疫网络理论,机体对外来抗原的免疫应答将触发一个复杂的连锁反应。在外界抗原的刺激下,机体产生 Ab₁ (idiot-type),Ab₁ 又刺激 Ab₂ (anti-idiotype) 的产生,Ab₂ 再刺激 Ab₃ (anti-anti-idiotype) 的产生……,如此等等,在体内构成了复杂的 Id 与 anti-Id 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,Ab₁ 上不同的独特型决定位可刺激产生不同类型的 Ab₂,主要分为 4 种类型,分别为 Ab₂ α 、Ab₂ β 、Ab₂ γ 、Ab₂ ϵ ^[6]。PAN Y 等人认为只有 Ab₂ β 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 Ab₁ 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^[7]。SHOENFELD 等证实,在多数自身免疫动物模型中,自身抗体的抗独特型升高导致抗独特型的产生,从而导致起始的自身抗原不断产生^[8,9]。

制备抗独特型抗体免疫原是至关重要的。完整的抗 AFB₁ 抗体分子或抗 AFB₁ 抗体的酶切片段均可以作为免疫原。但是如果用完整的抗 AFB₁ 抗体分子作为免疫原免疫日本大耳白兔,由于其 FC 段

论著

液相色谱 - 电喷雾串联质谱法定量葱蒜类植物中
Se - 甲基 - 硒半胱氨酸的最佳提取条件研究

毛德倩¹ 张 明² 林少彬² 杨文婕¹

(1. 中国疾病预防控制中心营养与食品安全所,北京 100021;

2. 中国疾病预防控制中心环境与健康相关产品安全所,北京 100021)

摘 要:目的 研究适于液相色谱-电喷雾串联质谱法(LC-MS/MS)定量测定富硒葱蒜类植物中 Se-甲基-硒半胱氨酸(MSeC)的提取液的最佳制备条件。方法 用4种提取剂(纯水、甲醇、丙酮和乙酸乙酯)、2种提取方法(超声提取和沸水提取)、不同水提取温度(70、80、90和100 °C)和时间(45、60、75和90 min)对富硒大蒜中的MSeC的最佳提取条件依次筛选研究,获得满足最大量测得MSeC的样品制备方法。按照选择条件提取洋葱、韭葱和大葱加标粉制剂,并采用LC-MS/MS测定MSeC含量,计算加标回收率。结果 4种提取剂的超声提取对比分析发现,纯水提取蒜粉中MSeC的量最大,沸水浴加热比单独超声处理能够提高蒜粉中MSeC的提取率。水加热提取温度和时间二因素正交设计优选实验证实,蒜粉中MSeC最佳提取制备条件为100 °C提取90 min,该提取条件处理其他葱蒜类粉制剂的MSeC加标回收率在91%~108%之间。结论 沸水提取90 min适用于LC-MS/MS在线定量分析葱蒜类植物中MSeC的待测液的制备。

关键词:Se-甲基-硒半胱氨酸;葱属;色谱法;高压液相;串联质谱法

的免疫原性较强,而抗体独特位的免疫原性较弱,所以产生的主要是针对抗 AFB₁ 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 AFB₁ 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点,能够获得较好的免疫效果。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点保持良好,能够保证该片段作为免疫原时的免疫效果。

本研究通过抗黄曲霉毒素 B₁ 单克隆抗体 F(ab)₂ 片段免疫日本大耳白兔,制备出了能够模拟黄曲霉毒素 B₁ 内影像的抗黄曲霉毒素 B₁ 单抗独特型抗体,可作为黄曲霉毒素 B₁ 的替代物,为进一步研究和开发具有我国自主知识产权的无毒检测试剂盒积累了重要资料。

参考文献

[1] PAKNEJAD M, JAVAD RASAEI M, MOHAMMADNEJAD J, et al. Development and characterization of enzyme-linked immunosorbent assay for aflatoxin B₁ measurement in urine sample using penicillinase

as label[J]. J Toxicol Sci, 2008,33(5):565-573.

[2] MICHIO H, MOTOWO M, YOSHIKO M, et al. Development of syngeneic monoclonal anti-idiotypic antibodies to mouse monoclonal anti-asialoglycoprotein receptor antibody[J]. Acta Med, 2002,56(3):135-139.

[3] 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.

[4] 黄培堂. 分子克隆实验指南[M]. 北京:科学出版社,2002.

[5] JERNE NK. The generative grammar of the immune system[J]. Science, 1985,229:1057-1059.

[6] BONA C, MORAN A. Idiotype vaccines[J]. Ann Inst Pasteur Immunol, 1985,136C(3):299-312.

[7] PAN Y, YUHASZ SC, AMZEL LM. Anti-idiotypic antibodies: biological function and structural studies[J]. FASEB J, 1995,9(1):43-49.

[8] SHOENFELD Y, RAUOVA L, GLBURD B, et al. Efficacy of IVIG affinity-purified anti-double-stranded DNA anti-idiotypic antibodies in the treatment of an experimental murine model of systemic lupus erythematosus[J]. Int Immunol, 2002,14(11):1303-1311.

[9] SHOENFELD Y. The idiotypic network in autoimmunity: antibodies that bind antibodies[J]. Nat Med, 2004,10(1):17-18.

[10] Australia Group. List of Biological Agents for Export Control, 2002 [R/OL]. [2008-07-28]. <http://www.australiagroup.net/>.

[收稿日期:2009-03-10]

中图分类号:R15;Q949.32 文献标识码:A 文章编号:1004-8456(2009)05-0385-05

基金项目:国家自然科学基金项目(30471454)

作者简介:毛德倩 男 助理研究员

通讯作者:杨文婕 女 研究员