

抗大田软海绵酸单抗独特型抗体的制备及鉴定

林超, 王东旭, 任洪林, 柳增善, 周玉, 李岩松, 闫东明, 王里奇, 卢士英*
(人兽共患病研究教育部重点实验室, 吉林大学人兽共患病研究所, 吉林大学畜牧兽医学院, 吉林 长春 130062)

摘要: 目的: 研制大田软海绵酸(okadaic acid, OA)单抗的独特型抗体并鉴定其模拟抗原特性, 为建立无毒检测提供借鉴。方法: 利用小鼠腹水法大量制备抗OA单抗, 经辛酸饱和和硫酸铵法纯化后用胃蛋白酶酶切制备F(ab')₂片段, 免疫日本大耳白兔, 取其血清, 琼脂扩散法检测血清抗体与抗OA单抗反应活性, ELISA方法鉴定血清抗体与抗OA单抗反应活性及与OA竞争活性。结果: 该抗独特型抗体与抗OA单抗呈阳性反应, 且可抑制抗OA单抗与固相抗原OA-OVA的结合。结论: 制备的抗OA单抗的独特型抗体与OA抗原存在内影像的关系, 可替代毒素用于检测。

关键词: 大田软海绵酸; F(ab')₂片段; 抗独特型抗体; 内影像

Preparation and Identification of Anti-idiotypic Antibody against Anti-okadaic Acid Monoclonal Antibody

LIN Chao, WANG Dong-xu, REN Hong-lin, LIU Zeng-shan, ZHOU Yu, LI Yan-song,
YAN Dong-ming, WANG Li-qi, LU Shi-ying*

(Key Laboratory of Zoonosis Research, Ministry of Education, Institute of Zoonosis, College of Animal Science and Veterinary Medicine, Jilin University, Changchun 130062, China)

Abstract: Objective: In order to develop a toxin-free detection method for okadaic acid (OA) from the shellfish, an anti-idiotypic antibody against anti-OA toxin monoclonal antibody (McAb) was prepared and identified. Methods: F(ab')₂ fragment from anti-OA McAb that was massively produced by the mouse ascites method and purified by caprylic acid and saturated ammonium sulfate was prepared by pepsin cleavage. Japanese big-ear white rabbits were immunized with the F(ab')₂ fragment and then their sera were taken for determination of reactivity between serum antibodies and anti-OA McAb by agar gel diffusion test, indirect ELISA and indirect competitive ELISA. Results: The anti-idiotypic antibody had positive reaction with anti-OA McAb and competitively inhibited the binding of anti-OA McAb with detection antigen (OA-OVA). Conclusion: The prepared anti-idiotypic antibody against anti-OA monoclonal antibody has inner image of OA antigen and can be used to replace OA toxin standard in ELISA.

Key words: okadaic acid (OA); F(ab')₂ fragment; anti-idiotypic antibody; inner image

中图分类号: R155.32

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2011)11-0110-04

大田软海绵酸(OA)是一种重要的小分子聚醚类海洋毒素, 是腹泻性贝类毒素的主要成分^[1]。该毒素是海洋藻类的代谢产物, 在贝类、鱼类和其他动物的滤食或摄食过程中, 海水中产生OA的藻类作为食物转移到其的胃或食道中, 经胃和肠消化、吸收并导致OA在贝体内的积累。被人类摄食后, 易引起腹泻性中毒, 其症状包括腹泻、寒颤、恶心、呕吐等。虽然目前未见致死报道, 但已证实OA是蛋白磷酸酶PP1和PP2A的烈性抑制剂, 具有强烈的促肿瘤和致癌作用。同时OA

耐热性较强, 对于一般性的加热烹调处理毒素仍较稳定^[2-3]。因此为了保障食用者的健康安全, 建立OA毒素的检测方法是必不可少的。本课题组近年来一直从事部分海洋毒素检测方法的研究, 在研究中发现已建立的方法中仍然存在各自无法弥补的缺点或不足, 最关键的是方法中都使用了毒素标准品, 而海洋毒素标准品难于制备, 价格极其昂贵。检测中使用毒素标准品对实验操作人员存在安全隐患, 如果管理不当, 会造成生物毒素的实验室泄漏事件, 对环境及公众的健康造成潜在

收稿日期: 2010-08-26

基金项目: 国家自然科学基金项目(31071539; 30671762); 国家质检总局科技计划项目(2008IK003);

吉林大学农学部博士科研启动基金项目(4305050102C8)

作者简介: 林超(1985—), 女, 硕士研究生, 研究方向为兽医公共卫生。E-mail: sara851109@hotmail.com

*通信作者: 卢士英(1973—), 女, 副教授, 博士, 研究方向为兽医公共卫生。E-mail: lushiyang1129@163.com

危害。解决这一问题的关键就是在方法中避免使用毒素标准品。因此,寻找一种可以替代 OA 毒素标准品的技术已经成为建立免疫学检测方法的关键。

根据 Jerne 的免疫网络学说^[4],抗独特型抗体在空间构象上与抗原存在“内影像”关系,获得的 Ab2 β 独特型抗体有望作为毒素的替代品用于免疫学检测,从而实现海洋贝毒素的无毒低价检测。基于这种考虑,本课题在已获得抗 OA 毒素单抗的基础上进一步研制抗 OA 毒素单抗的独特型抗体,并对该抗体的活性进行鉴定,为实现 OA 的无毒检测提供指导。

1 材料与方 法

1.1 材料与试剂

OA 杂交瘤细胞株为本课题组制备并冻存。

OA 标准品 瑞士 ALEXIS[®] Biochemicals 产品;卵清白蛋白(OVA)、*N*-羟丁二酰亚胺(*N*-hydroxysuccinimide)、*N,N*-二环乙烷碳(*N,N*-dicyclohexylcarbodiimide)、*N,N*-二甲基甲酰胺(*N,N*-dimethylformamide, DMF)、胃蛋白酶、邻苯二胺(OPD)、福氏完全佐剂、福氏不完全佐剂 美国 Sigma 公司;辣根过氧化物酶标记的羊抗小鼠 IgG 北京中山试剂公司;辣根过氧化物酶羊抗兔 IgG 北京欣经科生物技术公司;其他所用试剂均为国产分析纯。

1.2 实验动物

8 周龄雌性未经产 Balb/c 小鼠,健康雄性日本大耳白兔,均购自于长春生物制品所。

1.3 方 法

1.3.1 单抗制备及纯化

将分泌抗 OA 单抗的冻存杂交瘤细胞株复苏并扩大培养,无菌注射石蜡致敏的 Balb/c 小鼠,每只小鼠腹腔注射 2×10^6 个杂交瘤细胞,7~10d 后,当小鼠腹部膨胀且行动迟缓时抽取腹水,用辛酸-饱和硫酸铵沉淀法^[5]初步纯化腹水。

1.3.2 F(ab')₂ 片段的制备及纯化

取 1.5mL 纯化后的抗 OA 单抗,用 0.1mol/L 的 HCl 调 pH 值为 3.0~3.5,加入 1.5×10^{-4} g 胃蛋白酶混匀,31℃ 水浴 4h,用 0.4mol/L NaOH 溶液调 pH 值为 5.2~5.5,57℃ 水浴 30min 后超滤离心去除 FC 片段,得到 F(ab')₂ 片段。利用 12% 非还原型 SDS-PAGE 电泳^[6]分析 F(ab')₂ 片段的分子质量,利用间接竞争 ELISA 鉴定^[7]F(ab')₂ 片段的活性。

1.3.3 动物免疫^[8]

取 F(ab')₂ 片段 1mL 与等量福氏完全佐剂混合,振荡器振荡乳化完全后,皮下背部多点注射日本大耳白兔,剂量为 1mL/只。7d 后,取纯化后 F(ab')₂ 片段 1mL

与等量福氏不完全佐剂混合,振荡器振荡乳化完全,注射方法同上。10d 后,取纯化后 F(ab')₂ 片段 1.2mL,加强免疫一次。耳缘静脉取血,ELISA 跟踪检测血清效价。3d 后,心脏取血处死。

1.3.4 血清的分离、收集以及纯化

将血液倾斜置 37℃ 恒温箱 2h,然后取出放于 4℃ 过夜使血块收缩,3000r/min 离心 10min,取上清液即血清抗体。辛酸-饱和硫酸铵法^[5]初步纯化血清后,用考马斯亮蓝法^[9]测定 OD_{595nm},计算血清中抗体质量浓度,用 12% 非还原型 SDS-PAGE 鉴定纯化结果。

1.3.5 抗 OA 单抗独特型抗体活性的鉴定

琼脂糖免疫扩散实验^[10]:将 1.5% 琼脂糖加热融化,待冷却后均匀的倒在小培养皿上,打梅花型 6 孔,中心孔加入兔血清 10 μ L,周围孔分别加入不同稀释倍数的抗 OA 单抗。37℃ 孵育 12~48h 进行扩散反应。

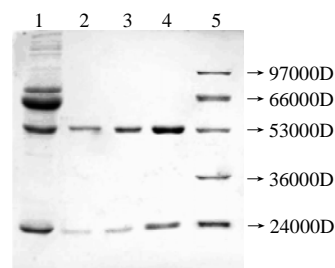
间接 ELISA 实验:将 F(ab')₂ 片段适当稀释包被 96 孔酶标板,将系列稀释(200、400、800、1600、3200、6400、12800、25600、51200、102400 倍)的 1.3.4 节制备的兔免疫血清作为反应抗体,同样系列稀释的正常兔血清作为对照组,辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG 作为二抗,OPD/H₂O₂ 底物显色后用酶标仪测定 OD_{492nm} 值。

间接竞争 ELISA 检测:采用活泼酯法制备完全偶联抗原 OA-OVA^[11]作为检测原,通过 1% 琼脂糖电泳和 12% 非还原型 SDS-PAGE 鉴定偶联结果。以 1 μ g/mL OA-OVA 包被 96 孔酶标板,抗 OA 单抗为反应抗体(5×10^4 倍稀释),1.3.4 节所制的兔免疫血清经系列稀释(400、800、1600、3200、6400、12800、25600、51200 倍)作为竞争物,辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠 IgG 作为二抗,OPD/H₂O₂ 底物显色后用酶标仪测定 OD_{492nm} 值。

2 结果与分析

2.1 单克隆抗体纯化结果

粗腹水及被纯化腹水经 12% 还原型 SDS-PAGE 分析(图 1)显示,纯化后的腹水有明显的 2 条带,分别为轻链和重链。未纯化的样品杂蛋白带较多,说明腹水经纯化后,绝大部分杂蛋白被除去。

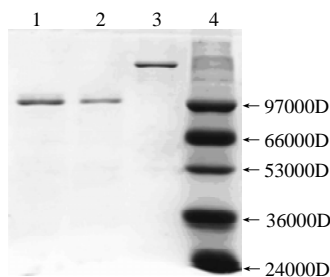


1.粗腹水(1 μ L); 2~4.纯化腹水分别为 1、2、3 μ L; 5.蛋白 Marker。

图 1 腹水 12% 还原型 SDS-PAGE 图

Fig.1 12% SDS-PAGE of crude and purified mouse ascites

2.2 F(ab')₂ 片段分子质量和活性



1、2. F(ab')₂ 分别为 3、2 μL; 3. 纯化腹水(2 μL); 4. 蛋白 Marker。

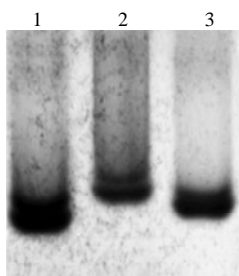
图2 抗体经胃蛋白酶消化 12% 非还原型 SDS-PAGE 图

Fig.2 12% SDS-PAGE of antibody after pepsin cleavage

根据非还原型 SDS-PAGE 电泳图鉴定抗 OA 的单克隆抗体及酶切后 F(ab')₂ 的分子质量。由图 2 可知, 在非还原型垂直电泳条件下, 纯化后的抗 OA 的单克隆抗体的分子质量约为 160kD, 酶切片段 F(ab')₂ 的分子质量约为 105kD。由间接竞争 ELISA 检测结果可知 OA 标准品与 F(ab')₂ 片段对完整 OA 单抗的抑制率基本相同, 说明抗体在经过酶切后, 保持了完整的抗原结合位点, 可以用来作为免疫原制备抗 OA 单抗的独特型抗体。

2.3 完全偶联抗原的鉴定结果

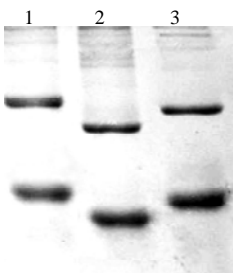
偶联物经 1% TAE 琼脂糖凝胶电泳和还原型 SDS-PAGE 电泳分析, 结果分别见图 3、4。载体蛋白 OVA 和处理的 OVA 其电泳轨迹未有明显变化, 但偶联抗原与小分子偶联使分子质量变大, 与对照样品和载体蛋白相比迁移速度减慢。



1.OVA; 2.OA-OVA; 3.处理 OVA。

图3 OA-OVA 1% 琼脂糖凝胶电泳图

Fig.3 1% Agarose gel electrophoresis of OA-OVA



1.OA-OVA; 2.OVA; 3.处理 OVA。

图4 OA-OVA 12% 还原型 SDS-PAGE 图

Fig.4 12% SDS-PAGE of OA-OVA

2.4 抗 OA 单抗独特型抗体的活性鉴定结果

纯化后兔血清经紫外分光光度计测定抗体的质量浓度为 6.43mg/mL。通过琼脂糖免疫扩散反应(图 5)可以清晰地看到, 抗原抗体结合所形成的白色条带, 随着抗 OA 单抗质量浓度的降低, 白色条带逐渐变淡, 而未经免疫的兔血清(对照组)不与抗 OA 单抗结合, 因此制备的兔血清具有与抗 OA 单抗结合的特性。经间接 ELISA 检测兔血清效价约为 2×10^5 。



Ab-Id. 抗独特型抗体; 0. 阴性对照孔; 1、1/2、1/4、1/8、1/16. 分别为抗 OA 单克隆抗体稀释了 1 倍、2 倍、4 倍、8 倍、16 倍。

图5 单抗与独特型抗体反应的琼脂糖免疫扩散图

Fig.5 Agarose gel diffusion testing of the reaction between McAb and Ab-Id

由图 6 可见, 免疫后的兔血清与 F(ab')₂ 片段结合呈阳性反应, 并且随着兔血清质量浓度的减小, OD_{492nm} 值递减, 而正常兔血清对照组的 OD_{492nm} 值均很低, 无此现象。说明所制备的血清抗体是特异针对 F(ab')₂ 片段产生的独特型抗体。

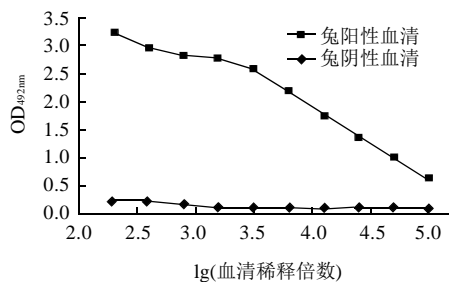


图6 兔血清与 F(ab')₂ 片段的结合

Fig.6 Identification of specific binding between rabbit serum and F(ab')₂ fragment

兔血清抗体作为竞争物与固相 OA 抗原竞争抗 OA 单抗的 ELISA 检测结果如图 7 所示。兔血清浓度越高, OD_{492nm} 值越小, 说明兔阳性血清中存在抗独特型抗体成分, 可与 OA 抗原竞争抗体, 使与固相抗原结合的抗体减少, 因此 OD_{492nm} 值相应减小。竞争线性相关系数 R^2 接近 1, 说明该兔血清与固相 OA 抗原存在显著的线性竞争关系。因此, 所制备的兔血清抗体含有抗原内影

像的独特型抗体 Ab2 β ，可以作为 OA 的替代品用于相关检测方法的建立。

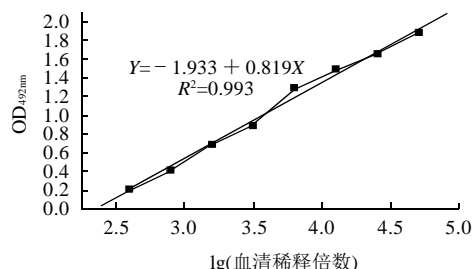


图7 兔血清与 OA 抗原的竞争关系

Fig.7 Competitive relationship between rabbit serum and OA antigen

3 讨论

本世纪 50 年代，科学家就证明了抗体本身携带着抗原决定簇，存在于抗体上的抗原决定簇称为抗独特型抗原，而把能与独特型抗原结合的抗体称为抗独特型抗体。1974 年，Jerne 提出了著名的免疫网络学说^[4]，根据这一学说，机体在外界抗原的刺激下，首先产生 Ab1，Ab1 上的独特型决定簇又刺激机体产生 Ab2，Ab2 上的独特型决定簇再刺激机体产生 Ab3……，如此等等^[4]，在体内构成了复杂的抗体独特型与抗独特型抗体的网络。抗独特型抗体作为抗原的模拟物，模拟外来抗原竞争抗体的结合位点，因而被称为抗原的“内影像”，可以被用作抗原的替代物应用于免疫学检测，具有很好的应用前景，国内外已有关于抗独特型抗体替代抗原用于检测的研究报道，如 T-2 毒素、黄曲霉毒素 B₁ 等无毒检测方法已建立^[12-13]。Shestowsky 等^[14]早在 20 世纪 90 年代初利用这一原理制备了抗 OA 单抗的抗独特型抗体，并建立了相应的 ELISA 方法。但国内有关贝毒的无毒检测仍处于空白。

能否获得具有模拟抗原特性的抗独特型抗体，免疫原为关键所在。本实验采用胃蛋白酶消化抗 OA 单抗，得到 F(ab')₂ 片段和 FC 片段的混合物，经超滤离心去除 FC 片段，得到 F(ab')₂ 片段免疫日本大耳白兔。完整的 OA 抗体分子也可以刺激机体产生抗体，但是由于抗体分子中的 FC 片段的免疫原性更强，免疫后所产生的抗体多为针对 FC 片段的抗体，而针对抗体独特位产生的抗体较少，不能完全的暴露抗体的独特型表位^[15]，因此，选用酶切后的纯 F(ab')₂ 片段作为免疫原可以获得更好的免疫效果。获得的兔血清抗体经琼脂扩散和间接 ELISA、竞争 ELISA 鉴定具有与初始抗原竞争结和抗

OA 单抗的特点，说明该兔血清抗体是特异针对抗 OA 单抗独特型表位产生的，且含有抗原内影像的 Ab2 β ，可模拟 OA 毒素抗原，为进一步探索 OA 毒素无毒检测的免疫学方法奠定了基础。相信经过深入研究，利用抗独特型抗体与 OA 毒素标准品之间的对应关系，可以实现抗独特型抗体替代 OA 毒素标准品进行免疫学检测，克服 OA 毒素价格昂贵、购买困难等客观因素对于检测造成的阻碍，给 OA 毒素的检测提出了新的思路。

参考文献：

- [1] HUMBERTO J D, BEATRIZ P, DARANAS A H, et al. Dinoflagellate polyether within the yessotoxin, pectenotoxin and okadaic acid toxin groups: characterization, analysis and human health implications[J]. *Toxicon*, 2010, 56(2): 191-217.
- [2] CORDIER S, MONFORT C, MIOSEC L, et al. Ecological analysis of digestive cancer mortality related to contamination by diarrhetic shellfish poisoning toxins along the coasts of France[J]. *Environ Res*, 2002, 84 (2): 145-150.
- [3] ALEXANDER J, AUDUNSSON G A, BENFORD D, et al. Marine biotoxins in shellfish-okadaic acid and analogues-scientific opinion of the panel on contaminants in the food chain[J]. *EFSA Journal*, 2008, 589: 1-62.
- [4] JERNE N K. Towards a network theory of the immune system[J]. *Ann Immunol*, 1974, 125C(1/2): 373-389.
- [5] 于光, 卢士英, 李岩松, 等. 抗大田软海绵酸单克隆抗体的制备、纯化及其特性研究[J]. *中国兽医学报*, 2006, 26(6): 639-641.
- [6] NAOTO O, TAKENORI Y, MASAHIRO W, et al. Identification of TMEM45B as a protein clearly showing thermal aggregation in SDS-PAGE gels and dissection of its amino acid sequence responsible for this aggregation[J]. *Protein Expression and Purification*, 2009, 77(1): 118-123.
- [7] CATIA I C, ISABELLA F D, JALINE A C C, et al. Establishment and validation of an ELISA for the quantitation of HBsAg in recombinant hepatitis B vaccines[J]. *Journal of Virological Methods*, 2011, 26(2): 32-37.
- [8] 郑佳. T-2 毒素抗独特型多抗的制备及无毒 ELISA 定量检测试剂盒的初步研制[D]. 河南: 郑州大学, 2006.
- [9] 王文华, 杨志和, 臧文生, 等. 螺旋霉素中蛋白含量的测定方法 (Bradford 法) 及验证[J]. *广州化工*, 2010, 38(4): 137-138.
- [10] 黎燕, 冯健男, 张纪岩. 分子免疫学实验指南[M]. 北京: 化学工业出版社, 2008: 13-14.
- [11] 卢士英, 周玉, 任洪林, 等. 海洋毒素大田软海绵酸完全抗原的制备与分析[J]. *海洋科学*, 2009, 33(2): 46-49.
- [12] 江涛, 郑佳, 李楠, 等. 抗 T-2 毒素单抗独特型抗体的制备及应用研究[J]. *中国食品卫生杂志*, 2007, 19(3): 234-237.
- [13] 柳植. 黄曲霉毒素 B-1 免疫检测标准品替代研究[D]. 河南: 郑州大学, 2006.
- [14] SHESTOWSKY W S, QUILLIAM M A, SIKORSKA H M. An idiotype-anti-idiotype competitive immunoassay for quantitation of okadaic acid [J]. *Toxicon*, 1992, 30(11): 1441-1448.
- [15] GAULTON G N, SHARPE A H, CHANG D W, et al. Syngeneic monoclonal internal image anti-idiotypes as prophylactic vaccines [J]. *Immunology*, 1986, 137(9): 2930-2936.