

膝沟藻毒素 GTX1-4 单克隆抗体的制备与鉴定

黄柏强, 张卓, 江天久

(暨南大学, 赤潮与海洋生物学研究中心, 水体富营养化与赤潮防治广东省高校重点实验室, 广东 广州 510632)

摘要: 研究膝沟藻毒素 GTX1-4 单克隆抗体的制备方法。利用甲醛法合成 GTX1-4 人工抗原, 通过小鼠免疫和单克隆抗体技术制备 GTX1-4 单克隆抗体。结果显示, 合成了免疫抗原 GTX1-4-BSA 和检测抗原 GTX1-4-KLH, 其偶联比分别为 10.7 : 1 与 22.4 : 1。筛选出 3 株能稳定分泌 GTX1-4 单克隆抗体的杂交瘤细胞 1-A4, 5-E11 和 5-A11。5-E11、1-A4 诱生腹水单克隆抗体的亚型分别为 IgG1 和 IgG2a, 效价均达到 64000; 5-A11 诱生腹水单克隆抗体的亚型为 IgG1, 效价达到 128000。5-A11 诱生腹水单克隆抗体的灵敏度为 6.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 特异性较强。本实验成功合成了 GTX1-4 人工抗原, 并获得了能够稳定分泌 GTX1-4 单克隆抗体的杂交瘤细胞株。

关键词: 麻痹性贝类毒素; 膝沟藻毒素; 完全抗原; GTX1-4 单克隆抗体

中图分类号: X171.5 文献标识码: A 文章编号: 1007-6336(2021)03-0457-05

Preparation and identification of monoclonal antibody against Gonyautoxins GTX1-4

HUANG Bai-qiang, ZHANG Zhuo, JIANG Tian-jiu

(Key Laboratory of Eutrophication and Red Tide Prevention of Guangdong Higher Education Institutes, Research Center of Harmful Algae and Marine Biology, Jinan University, Guangzhou 510632, China)

Abstract: The goal of this study was to develop a method for preparation of monoclonal antibody against Gonyautoxins GTX1-4. GTX1-4 artificial antigen was synthesized by formaldehyde method, and GTX1-4 monoclonal antibody was prepared by mouse immunity and monoclonal antibody technology. The results showed that the conjugated ratios of immunizing antigen GTX1-4-BSA and detected antigen GTX1-4-KLH were 10.7 : 1 and 22.4 : 1, respectively. Three hybridomas cell lines, 1-A4, 5-A11 and 5-E11, which could stably secrete GTX1-4 monoclonal antibody were screened. The subtypes of monoclonal antibodies in ascites induced by 5-E11 and 1-A4 were IgG1 and IgG2a, and the titers of them were up to 64000. The subtype of monoclonal antibody in ascites induced by 5-A11 was IgG1, and its titer could be 128000. The sensitivity of monoclonal antibody in ascites induced by 5-A11 was 6.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$, and this antibody has a strong specificity. In the study, consequently, GTX1-4 artificial antigen was successfully synthesized, and the hybridomas cell lines which could stably secrete GTX1-4 monoclonal antibody was obtained.

Key words: paralytic shellfish poison toxins; gonyautoxins; complete antigen; GTX1-4 monoclonal antibody

部分有害藻华(harmful algal blooms, HABs) 使海产品染毒, 人类因误食有毒的海产品而频发
可产生多种毒素, 这类毒素可通过食物链的传递 中毒事件^[1]。麻痹性贝类毒素(paralytic shellfish

收稿日期: 2020-02-28, 修订日期: 2020-03-29

基金项目: 科技部科技基础资源调查专项项目(2018FY100201); 国家重点研发计划项目(2019YFC1407900); 国家自然科学基金面上项目(41276091); 海洋公益性行业科研专项项目(201305010)

作者简介: 黄柏强(1995-), 男, 广东廉江人, 硕士研究生, 研究方向为海洋污染与海产品食用安全, E-mail: 1131077018@qq.com

通讯作者: 江天久, 研究员, E-mail: tjiangtj@jnu.edu.cn

poison toxins, PSTs)主要是由海洋微藻亚历山大藻属 (*Alexandrium spp*) 和膝沟藻属 (*Gonyaulax spp*) 等产生的一类毒性极强的神经阻断性毒素, 具有分布范围广、危害作用大的特点^[2]。PSTs 通过生物富集作用积累在双壳贝类和甲壳类等海洋动物体内, 人类摄食富含 PSTs 的水产品后会引发麻痹性中毒反应 (paralytic shellfish poisoning, PSP)^[3]。中毒的症状取决于中毒的严重程度。轻度中毒会导致嘴唇麻痹或轻微刺痛, 其后慢慢扩散至脸部、颈部、手指等部位, 还能引起头晕、恶心等症状; 重症为肌肉麻痹, 呼吸困难, 甚至可能因为呼吸障碍而导致死亡^[4]。PSTs 是一类四氢嘌呤环基类水溶性化合物, 目前已发现其至少有 24 种同系化合物, 依据其 R4 基团的结构, 将其分为氨基甲酸酯类毒素 [石房蛤毒素 STX、膝沟藻毒素 1~4 (GTX1-4) 和新石房蛤毒素 NeoSTX]、N-磺酰氨基甲酰基类毒素、脱氨基甲酰基类等 4 类。我国沿海中毒贝类的主要毒素成分是 GTX1-4^[5-6], 近年来已造成多起群体性中毒事件^[7-8]。为保护消费者的健康安全, 我国制定的海产品 PSTs 的限量标准为 800 μg STX-eq/kg (GTX1-4 的毒性因子分别为 1、0.4、0.6 和 0.7)。开发简便易行的 PSTs 检测技术, 加强 PSTs 监测和管理是减轻其危害的有效途径之一。

PSTs 的主要检测方法有小鼠生物法、高效液相色谱法、液相色谱-串联质谱法以及酶联免疫吸附测定法等^[9]。酶联免疫吸附测定法具有价廉、简便和高效的特点, 适于现场样品的快速检测, 但目前市售的 PSTs 试剂盒是以 STX 抗体为基础研制的^[10], 该抗体的特异性强, 不能用于所有 PSTs 的检测, 不适合我国贝类的筛查和监控。本文通过载体蛋白交联的方法合成 GTX1-4 完全抗原, 再通过小鼠免疫和单克隆技术制备 GTX1-4 单克隆抗体, 以期开发适合我国贝类 PSTs 快速检测的免疫试剂盒或试纸条提供物质基础。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

制备用 GTX1-4 来自本课题组取自微小亚历山大藻的提取物, 该提取物经多次纯化分离

后, 纯度达 90.22%, 分析用 GTX1-4 标准品购自加拿大国家海洋研究所 (GTX1 浓度为 24.85 $\mu\text{g}/\text{mL}$, GTX2 浓度为 45.15 $\mu\text{g}/\text{mL}$, GTX3 浓度为 17.16 $\mu\text{g}/\text{mL}$, GTX4 浓度为 8.10 $\mu\text{g}/\text{mL}$)。

1.2 实验动物

Balb/c 系 6~8 周龄健康的雌性小鼠, 购自南方医科大学动物实验中心。

1.3 人工抗原的制备与鉴定

参照 Kawatsu 等^[11]制备 GTX1-4 人工抗原, 即利用牛血清蛋白 (bovine albumin, BSA) 和血蓝蛋白 (keyhole limpet hemocyanin, KLH) 作为载体蛋白分别合成 GTX1-4 免疫抗原和检测抗原。取 125 μL GTX1-4 毒素原液 (GTX1~GTX4 浓度分别为 0.79 mg/mL、0.865 mg/mL、0.295 mg/mL 和 0.129 mg/mL, 总浓度为 2.06 mg/mL) 在避光条件下加入 20 μL 0.1 mol/L 醋酸溶液, 随后加入 60 μL 0.1 mol/L 的醋酸钠溶液, 调节 pH 为 5.6。接着加入 40% 甲醛溶液, 调整甲醛终浓度为 1%, 避光于 24 $^{\circ}\text{C}$ 下震荡 80 h, 调整 pH 为 7.2。上述溶液同时配制两份, 分别加入 160 μL 浓度为 14.4 mg/mL 的 BSA 和 KLH, 室温避光反应 80 h 后对其进行超滤, 最后离心 (5000 r/min, 10 min), 获得人工抗原合成样品。采用全波段紫外扫描法对合成的人工抗原进行鉴定。

1.4 小鼠免疫及免疫效果评价

取 3 只 6~8 周龄雌性 BALB/c 系小鼠, 用 GTX1-4-BSA 进行免疫。首次免疫采用注射器双推法将弗式完全佐剂与完全抗原等体积混合乳化, 对小鼠进行多点皮下注射, 每隔 2 周免疫 1 次, 首次之后的免疫采用弗式不完全佐剂与完全抗原等体积混合进行免疫。第 4 次免疫方法是腹腔注射 2 倍皮下免疫剂量的 GTX1-4-BSA。第 4 次免疫后 1 周, 采用断尾采血的方式检测血清中多抗效价。

通过间接 ELISA 检测血清效价。检测抗原 GTX1-4-KLH 的包被浓度为 1.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$; 以不同稀释倍数的小鼠血清作为第一抗体, 第二抗体为 HRP 标记的羊抗小鼠抗体; 阴性对照为未免疫的小鼠, 数量为 1 只; 空白对照为注入生理盐水的小鼠 3 只。当免疫小鼠血清与未免疫小鼠血清在 OD450 的比值 ≥ 2.1 时的小鼠血清最高

稀释倍数即为小鼠血清中抗 GTX1-4 抗体的效价。每个样品设 3 个复孔。

1.5 细胞融合与抗 GTX1-4 阳性细胞株筛选

对免疫小鼠进行摘眼球放血, 脱颈处死, 取脾脏制备免疫脾细胞。将 SP2/0 骨髓瘤细胞与脾细胞按数量比 1 : 5 混合后加入 PEG4000 诱导细胞融合, 利用有限稀释法克隆筛选出能够稳定分泌抗 GTX1-4 的单克隆抗体的杂交瘤细胞株。

1.6 腹水型单克隆抗体生产与纯化

采用 BALB/c 系小鼠作为实验对象, 先注射 500 μ L 弗式不完全佐剂到小鼠腹腔内, 10 d 后再注射 500 μ L 阳性杂交瘤细胞 (1.0×10^6 cell/mL); 10 d 后抽取小鼠腹水, 利用辛酸-硫酸锌沉淀法初步纯化后转入 protein G 柱中进行层析纯化。

1.7 腹水型单克隆抗体的鉴定

利用 BCA 试剂盒测定腹水单克隆抗体的浓度; 按照说明书使用抗体亚型测定试剂盒对腹水型单克隆抗体进行鉴定; 利用间接 ELISA 与竞争 ELISA 测定腹水抗体效价与特异性。每个试样设 3 个平行。

2 结果与讨论

2.1 紫外光谱法鉴定人工合成抗原

从紫外扫描分析图谱中可看出, 半抗原 (GTX1-4) 与人工抗原 (GTX1-4-BSA 和 GTX1-4-KLH) 以及载体蛋白 (BSA 和 KLH) 的吸收峰位置互不重叠 (图 1), 因此, 初步判定实验成功偶联制备了完全抗原。根据王静^[12] 等研究小分子偶联比计算公式所得人工抗原 GTX1-4-BSA 与 GTX1-4-KLH 的分子偶联比分别为 10.7 : 1 与 22.4 : 1。

2.2 小鼠的血清效价测定

当血清效价高于 10000 时, 可以进行细胞融合。四免检测结果如图 2 所示, 3 只小鼠的抗体效价均达标, 其中 #2 号和 #3 号小鼠血清效价达到 51200; #1 号小鼠血清效价较低 (25600)。

2.3 细胞融合及单克隆细胞株筛选

通过 3 次有限稀释法克隆, 最终筛选出 3 株阳性率为 100% 的能稳定分泌抗 GTX1-4 单克隆抗体的杂交瘤细胞株 1-A4、5-A11、5-E11 (表 1)。

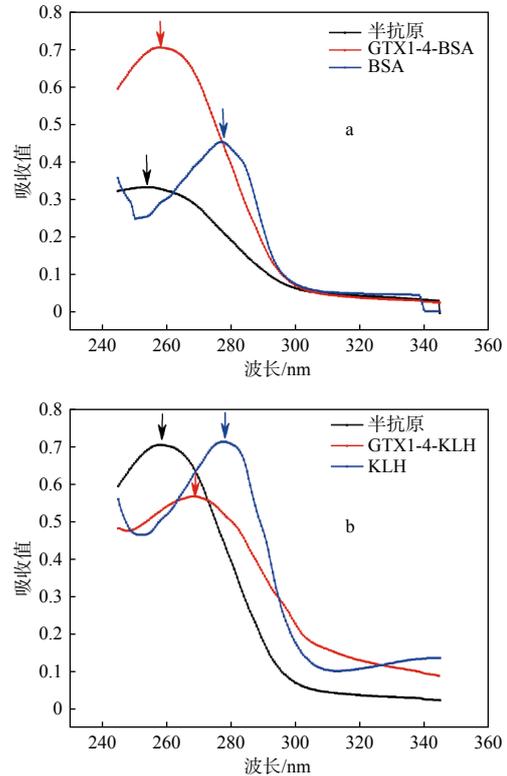


图 1 GTX1-4-BSA 与 GTX1-4-KLH 紫外光谱扫描鉴定
Fig. 1 The UV spectral scanning identification of GTX1-4-BSA and GTX1-4-KLH

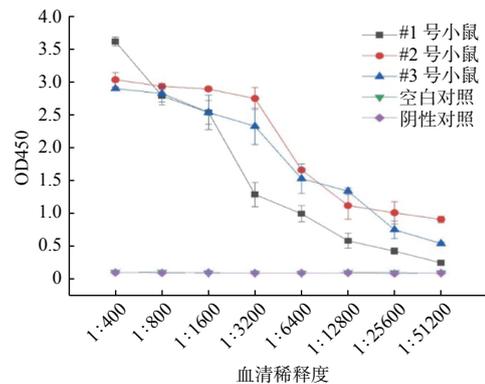


图 2 第四次免疫小鼠血清效价测定

Fig. 2 The detection of serum titer of the 4th immune mice

表 1 GTX1-4 杂交瘤细胞株的筛选

Tab.1 The screening of GTX1-4 hybridoma cell lines

克隆孔	阳性率/(%)		
	第一次	第二次	第三次
1-A4	36.40	79.10	100
4-D9	12.50	7.20	0
5-A11	37.50	93.70	100
5-E11	41.60	69.70	100

2.4 腹水单克隆抗体效价鉴定

采用间接 ELISA 法对 3 株阳性细胞株的诱生腹水进行效价测定,结果如图 3。1-A4 和 5-E11 的腹水单克隆抗体效价均可达到 64000, 5-A11 细胞株诱生腹水单克隆抗体,效价达到 128000 以上。经过蛋白的纯化后 1-A4、5-A11 以及 5-E11 的 GTX1-4 单克隆抗体蛋白含量浓度分别为 6.14 mg/mL、8.41 mg/mL 和 10.26 mg/mL。

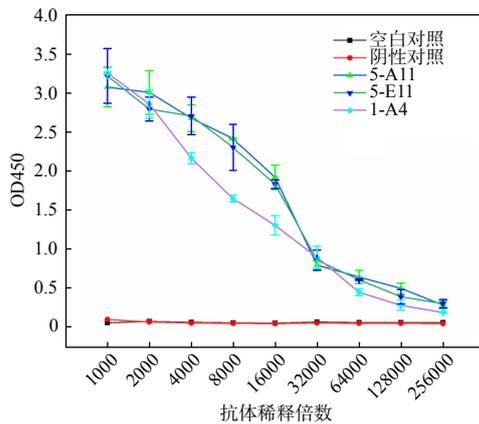


图 3 腹水单克隆抗体效价检测

Fig. 3 The detection of monoclonal antibody titer in ascites

2.5 腹水单克隆抗体亚型鉴定结果

细胞株 5-A11 与 5-E11 所产腹水单克隆抗体的亚型为免疫球蛋白 G1(IgG1); 1-A4 所产腹水单克隆抗体的亚型为免疫球蛋白 G2a(IgG2a)。3 株细胞所产腹水单克隆抗体轻链均为 Kappa 型。

2.6 GTX1-4 单克隆抗体特异性的鉴定

5-A11 细胞株腹水单抗对于 GTX1-4 的 IC_{50} 为 $6.25 \mu\text{g/mL}$, 检测限(抑制率为 20% 时毒素浓度)为 $1.56 \mu\text{g/mL}$ (图 4)。该抗体对于 dcGTX2,3、GTX5、STX 的 IC_{50} 分别为 $22 \mu\text{g/mL}$ 、 $27 \mu\text{g/mL}$ 、 $32 \mu\text{g/mL}$, 交叉反应率分别为 28.1%、23%、19%, 但与其他藻类毒素都无交叉反应(表 2)。

2.7 讨论

麻痹性贝类毒素 GTX1-4 属于小分子化合物, 分子质量约为 396 Da, 免疫原性较弱, 本实验通过化学合成的手段, 即蛋白连接技术, 经载体蛋白交联合成人工抗原, 进而免疫动物得到相应抗体或单克隆抗体。最常用的载体蛋白有血蓝蛋白(KLH)、牛血清白蛋白(BSA)、卵清蛋白(ovalbumin, OVA)和牛甲状腺球蛋白(thyro-

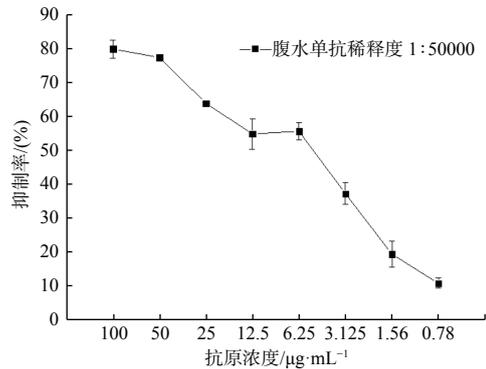


图 4 GTX1-4 腹水单克隆抗体抑制率 IC_{50} 的检测

Fig. 4 The detection of the IC_{50} of GTX1-4 Monoclonal antibodies in ascites

表 2 5-A11 细胞株腹水单抗的特异性反应

Tab.2 The specificity of monoclonal antibody in ascites induced by 5-A11 cells

毒素成分	$IC_{50}/\mu\text{g mL}^{-1}$	交叉反应率
GTX1-4	6.25	100%
dcGTX2,3	22	28.1%
GTX5	27	23%
STX	32	19%
neoSTX	>1000	<0.01
dcSTX	>1000	<0.01
C1,2	>1000	<0.01
DA	>1000	<0.01
OA	>1000	<0.01
CTX	>1000	<0.01

注: 交叉反应率=(GTX1-4的 IC_{50} /竞争物的 IC_{50}) \times 100%

globulin, THY)^[12]。本实验采用性质稳定、价廉易得、偶联性高的 KLH 和 BSA 作为载体蛋白。人工抗原合成的结果可直接影响宿主产生抗体的质量, 研究表明, 偶联比为 3~35:1 的人工抗原具有良好的免疫原性^[13]。本实验利用紫外扫描法获得 GTX1-4 与 BSA 以及 KLH 的偶联比分别为 10.7:1 和 22.3:1, 表明本实验合成的抗原免疫原性较好。细胞融合是单克隆抗体制备过程中的关键步骤, 通常采用 PEG 作为助融剂。PEG 的分子量、作用时间以及作用温度与细胞的融合效果成正比, 但对细胞的毒性作用也会随之增大。经过对细胞融合条件的反复摸索, 最终确定 PEG 分子量为 4000, 融合时间控制在 60 s 以内, 温度在 37 °C ~ 40 °C, 采用此条件进行细胞

融合可使融合率达到 89%。通过将融合后的杂交瘤细胞多次传代培养以及亚克隆后, 筛选出了 3 株能够持续产生高效抗体的单克隆细胞株, 其中, 5-A11 细胞株诱生腹水单克隆抗体效价达到 128000 以上。建立 GTX1-4 间接竞争 ELISA 法, 得到 GTX1-4 的 IC_{50} 为 6.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 检测限为 1.56 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 检测范围为 1.56 ~ 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 与罗辉武等^[14]建立的 GTX2,3 的间接竞争 ELISA 法相比, 灵敏度、检测限和检测范围都更具优势。本研究制备的 GTX1-4 单克隆抗体对 dcGTX2,3、GTX5、STX 的交叉反应率分别为 28.1%、23%、19%, 但与其他藻类毒素都无交叉反应, 表明该抗体特异性较强, 并且由此抗体建立的间接竞争 ELISA 法可同时应用于 dcGTX2,3、GTX5、STX 的检测。本实验结果显示, 单克隆抗体的检测灵敏度为 6.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 尚未能达到国家食品安全标准所要求的最低检测限, 因而还需要对 GTX1-4 完全抗原和单克隆抗体的制备方法做进一步的优化。

PSTs 的主要检测方法有小鼠生物法 (mouse bioassay, MBA)、化学仪器分析法以及酶联免疫吸附测定法 (enzyme linked immunosorbent assay, ELISA) 等^[9]。其中, MBA 是目前世界上公认的检测 PSTs 的标准方法, 然而, MBA 在分析期间会产生大量的动物废物, 存在伦理争议。化学仪器分析法目前应用最广泛的是液相色谱-串联质谱 (LC-MS/MS) 联用技术, LC-MS/MS 法与高效液相色谱 (HPLC) 法相比, 具有更好的定性定量优势, 但是, 仪器造价以及维护成本昂贵限制了化学仪器分析法的使用场景。ELISA 法具有价廉、简便和高效的特点, 适于现场样品的快速检测, 其不足之处在于目前只研发出少量贝类毒素的 ELISA 试剂盒或试剂条。市售的 PSTs 试剂盒以 STX 抗体为基础研制^[10], 不适合 GTX1-4 的快检分析。迄今为止, 国内鲜有关于 GTX1-4 免疫学检测方法的研究报道, 罗辉武等^[14]、梁玉波等^[15] 等对 GTX2-3 进行了免疫学方面的部分研究, 而 GTX1-4 关于这方面的研究基本处于空白状态。基于我国沿海染毒贝类的主要毒素成分是 GTX1-4^[5-6], 研制一种价廉、简便、高效、灵敏度高、检出限低的 GTX1-4 快速检测方法,

对我国海产品监测体系的建立具有极为重要的意义。本实验获得的单克隆抗体为 GTX1-4 的 ELISA 检测试剂盒或胶体金试剂条的研制奠定了一定的基础, 在实际贝类样品的快速检测中具有良好的应用价值。

3 结 论

(1) 本研究利用甲醛法成功合成了具有良好免疫原性的免疫抗原 GTX1-4-BSA 和检测抗原 GTX1-4-KLH。

(2) 小鼠经 GTX1-4-BSA 4 次注射免疫后, 其血清效价高达 25600 以上, 为杂交瘤细胞的制备提供物质基础。

(3) 通过 3 次有限稀释法克隆, 成功筛选出了 3 株能够持续产生高效抗体的单克隆细胞株 1-A4、5-E11 和 5-A11, 其中, 5-A11 诱生的腹水单克隆抗体效价最高。

(4) 本研究获得了效价高、灵敏度良好、特异性较强的 GTX1-4 腹水单抗, 为 GTX1-4 的快速检测技术的开发奠定了一定的基础。

参考文献:

- [1] AMARO A M, FUENTES M S, OGALDE S R, et al. Identification and characterization of potentially algal-lytic marine bacteria strongly associated with the toxic dinoflagellate *Alexandrium catenella*[J]. Journal of Eukaryotic Microbiology, 2005, 52(3): 191-200.
- [2] POMATI F, MANAROLLA G, ROSSI O, et al. The purine degradation pathway: possible role in paralytic shellfish toxin metabolism in the cyanobacterium *Planktothrix* sp. FP1[J]. Environment International, 2001, 27(6): 463-470.
- [3] LLEWELLYN L E. Saxitoxin, a toxic marine natural product that targets a multitude of receptors[J]. Natural Product Reports, 2006, 23(2): 200-222.
- [4] CUSICK K D, SAYLER G S. An overview on the marine neurotoxin, saxitoxin: genetics, molecular targets, methods of detection and ecological functions[J]. Marine Drugs, 2013, 11(4): 991-1018.
- [5] 韩 华, 周 春, 于光磊, 等. 大窑湾海域虾夷扇贝体内麻痹性贝毒的周年变化[J]. 海洋环境科学, 2012, 31(3): 436-438.
- [6] 刘仁沿, 刘 磊, 梁玉波, 等. 我国近海有毒微藻及其毒素的分布危害和风险评估[J]. 海洋环境科学, 2016, 35(5): 787-800.
- [7] 林祥田, 庞中全, 张 雨, 等. 一起贝类膝沟藻毒素中毒调查分析[J]. 中国食品卫生杂志, 2009, 21(3): 265-267.

(下转第 484 页)