

单增李斯特菌单克隆抗体的研制及特性分析

齐颖颖¹, 吴萌², 王怡雯¹, 刘慧¹, 谢远红¹, 张红星^{*1}

(1. 北京农学院 食品科学与工程学院, 北京 102206; 2. 河北省生物研究所, 河北 石家庄 050081)

摘要: 运用辐照法和热灭菌法自制单增李斯特菌的免疫原、检测原, 运用尾静脉免疫方法免疫 BALB/c 小鼠, 运用杂交瘤技术进行细胞融合, 制备得到抗单增李斯特菌的单克隆抗体, 并对其免疫学特性分析。结果表明, 成功筛选 4 株能稳定分泌抗单增李斯特菌的单克隆杂交瘤细胞株, 腹水抗体效价为 1:102 400~1:409 600, 免疫球蛋白亚型为 IgG1、Ig2a、Ig2b, 亲和力常数在 $1 \times 10^7 \sim 1 \times 10^{10}$ L/mol; 经测定分析出最佳配对抗体; 并与绵羊李斯特菌、英诺克李斯特菌及大肠杆菌、沙门氏菌、枯草杆菌、金黄色葡萄球菌、链球菌等菌属无明显交叉反应; 进行双抗体夹心 ELISA 方法对模拟单增李斯特菌污染肉样检测其灵敏度达 1×10^3 CFU/mL。获得高效价、特异性强、灵敏度高的单克隆抗体, 为食品中致病菌单增李斯特菌残留的免疫学检测方法奠定了基础。

关键词: 单增李斯特菌; 杂交瘤; 单克隆抗体

中图分类号: F 407.82 文献标志码: A 文章编号: 1673—1689(2016)02—0151—05

Preparation and Characterization of Monoclonal Antibodies Against *Listeria monocytogenes*

QI Yingying¹, WU Meng², WANG Yiwen¹, LIU Hui¹, XIE Yuanhong¹, ZHANG Hongxing^{*1}

(1. Faculty of Food Science and Engineering, Beijing University of Agriculture, Beijing 102206, China; 2. Biology Institute of Hebei Academy of Sciences, Shijiazhuang 050081, China)

Abstract: In order to explore the specific monoclonal antibodies against *Listeria monocytogenes* for the immunological detection, irradiation life-style and thermal extinguishing method were used to produce *Listeria monocytogenes* antibodies as the antigen, four hybridomas stably secreting McAbs to *Listeria monocytogenes* were developed. The results showed that four hybridomas were successfully established, and the indirect ELISA titers of the ascites were $1:10^4 \sim 1:4 \times 10^4$. Their immune globulin subtypes were IgG1, Ig2a, Ig2b. Therefore, *Listeria monocytogenes* could be detected by a two-antibody-sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (das-ELISA) formed by McAbs. The affinity constants (K_{affi}) were from 1×10^7 L/mol to 1×10^{10} L/mol, which had no cross-reaction between the other compounds. The sensitivity of LM McAbs in the detection of antigen was as low as 1×10^3 CFU/mL. The high-titer, sensitive and specific anti-LM monoclonal antibodies were produced in this study, which makes it possible to develop immunoassay for detection of LM residues.

Keywords: *Listeria monocytogenes*, hybridomas, monoclonal antibody

收稿日期: 2014-07-04

基金项目: 国家 863 科技计划项目(SS2012AA101606-5; 2012BAD28B02-01); 北京市长城学者培养计划项目(CIT&TCD20140315)。

* 通信作者: 张红星(1970—), 男, 黑龙江哈尔滨人, 工学博士, 教授, 硕士研究生导师, 主要从事食品安全检测方面的研究。

E-mail: hxzhang511@163.com

民以食为天,食品安全关系到人类的生存和健康。随着经济全球化和食品贸易的日益扩大,危及人类健康、生命安全的重大食品安全事件屡屡发生,我国食品安全问题成为人们关注的热点。危害食品安全物质^[1]包括环境污染、化学性危害(抗生素、激素等)、微生物危害(生物毒素、致病菌等)。其中致病菌近几年来给食品安全带来很大的威胁,主要的致病菌包括沙门氏菌、志贺氏菌、单增李斯特菌等等。

单核细胞增生李斯特菌^[2] (*Listeria monocytogenes*, LM)简称单增李斯特菌,为革兰氏阳性菌,需氧或兼性厌氧。LM 是李斯特菌属中重要的人畜共患的食源性致病菌,被列为居沙门氏菌之后第二位主要的食源性致死病菌。单增李斯特菌中毒严重的可以引起血液和脑组织感染,被 LM 感染后死亡率可达 30%,新生婴幼儿和免疫力低下的人群中死亡率高达 70%,常见病症包括脑膜炎、脑脊髓炎以及孕妇流产等^[3]。单增李斯特菌在 2~42 °C 下生存,能在冰箱内生存较长时间,生存环境可塑性大,其在酸性、碱性条件下和高盐浓度时也能存活并生长,适应范围很大,带菌较高的食品有乳制品、肉类等。单增李斯特菌不易被冻融,能耐受较高的渗透压,在土壤、地表水、污水、废水、植物中均有该菌存在,所以动物很容易食入该菌,30%以上的肉制品均被该菌污染,约占 85%~90%的病例是由于被该菌污染而引起^[4]。

目前检测单增李斯特菌有传统分离鉴定方法、分子生物检测法、免疫法^[5]。其中传统的分离鉴定方法操作过程耗费大量的时间和劳动力,分子检测法的程序复杂、检测仪器昂贵、检测费用高。而免疫法应用抗原抗体的特异性识别作用,再通过酶催化底物的显色反应,将结果显示出来,具有快速、简便、灵敏度高、结果准确、简便等优点,适于大批量快速检测的需要,成为目前致病菌检测的主流技术,而基于该技术的快速检测产品占有绝大部分市场。

1 材料与方法

1.1 试验动物

BALB/c 小鼠:由北京实验动物中心提供。

1.2 主要试剂和仪器

单增李斯特菌 *Listeria monocytogenes* ATCC 54003、*Listeria monocytogenes* ATCC 54001, 绵羊李

斯特菌 *Listeria ivanuii* ATCC 19119, 英诺克李斯特菌 *Listeria innocua* ATCC 33091, 大肠杆菌 *E. coli* O157 CMCC 44828, 沙门氏菌 *Salmonella typhimurium* ATCC13311, 枯草杆菌 *Bacillus subtilis* BD366, 金黄色葡萄球菌 *Staphylococcus aureus* CMCC26003 及链球菌 *Streptococcus thermophilus* G1 等标准株:作者所在实验室保存。

小鼠 SP2/0 骨髓瘤细胞、单增李斯特菌免疫原和检测原:北京农学院食品科学与工程学院保存和制备。

李斯特菌培养基(国标 GB 4789. 30-2010):北京陆桥技术有限责任公司。HAT 培养基、HT 培养基、PEG4000、完全佐剂和不完全佐剂以及小鼠单克隆抗体亚型鉴定试剂盒:Sigma 公司;DMEM 培养基、细胞培养板:GIBCO 公司;HRP 标记山羊抗小鼠 IgG:北京华美生科生物技术有限公司。其他试剂均为分析纯。

1.3 动物免疫

选取 8 只 6 周雌性 BALB /c 小鼠,初次基础免疫采用尾静脉注射^[6]30 μg 自制免疫原;二次基础免疫采用尾静脉 20 μg 自制免疫原。免疫间隔为 2 周。内眦取血并分离血清,间接 ELISA 检测小鼠血清抗体效价。选取最佳免疫小鼠,于融合前 3 天脾脏免疫注射免疫原 20 μg 加强免疫。

1.4 杂交瘤细胞株的建立

取对数生长期的小鼠 SP2/0 骨髓瘤细胞与免疫脾细胞,按常规方法 50% PEG 进行细胞融合。检测培养上清液抗体效价,选择强阳性的细胞,从而进行数次有限稀释亚克隆筛选培养,直至 100%阳性。制备出稳定的分泌高特异性、高效价、高亲和力和抗体的杂交瘤细胞株,置于液氮中^[7]。

1.5 单克隆抗体的制备及抗体的特性分析

将抗单增李斯特菌杂交瘤细胞克隆及扩大培养接种于提前石蜡油致敏的雌性 BALB/c 小鼠腹腔^[8],诱生腹水产生抗单增李斯特菌单克隆抗体。7~10 d 后收集 3~9 mL 腹水进行抗体的 ProteinG 纯化^[9],采用 SDS-PAGE 法检测抗体纯度^[10],并用凝胶成像系统进行分析^[11];采用紫外吸收法测定抗体浓度。

采用间接 ELISA 法进行抗体效价测定;采用 sigma 公司抗体亚型检测试剂盒鉴定抗体亚型。采用非竞争酶免疫试验对单克隆抗体的亲和力和常数进行测定,采用高碘酸钠的方法进行抗体标酶。

1.6 ELISA 相加试验及最佳配对

以单增李斯特菌自制检测原包被酶标板,分别加入一株 McAb 腹水温育后,再加入另一株 McAbs 腹水,温育后加入酶标记山羊抗小鼠 IgG 抗体,以四甲基联苯胺(TMB)为底物显色,终止反应后测得 OD 值。McAbs 最佳配对的选择,按方阵交叉匹配法进行。分别以各种 McAbs 包被酶标板,以单增李斯特菌为中心抗原,和每种 HRP 标记的 McAb 逐一进行交叉匹配试验^[12]。

1.7 抗体特异性^[13]与敏感性检测

用 0.01 mol/L pH 9.6 碳酸盐缓冲液将单克隆抗体稀释至 5 μg/mL 包被酶标板,4 ℃过夜;用 PBS/T20 洗板 3 次,每次 3 min;用含 10 %小牛血清的 PBS/T20 封闭,37 ℃孵育 1 h,洗板;模拟污染肉样 37℃孵育 45 min,洗板;加入另一单克隆抗体 HRP 酶标抗体 37 ℃孵育 30 min,洗板;加入 TMB 显色液,37 ℃避光反应 15 min 后加入终止液;读取波长 450 nm 的 OD 值^[14]。

2 结果与分析

2.1 抗单增李斯特菌杂交瘤细胞株的建立

进行细胞融合,每次用 6 块 96 孔板,平均每孔有 1~2 株融合细胞生长,融合率为 100 %。经过对阳性孔数次亚克隆,共获得 4 株稳定分泌抗单增李斯特菌的杂交瘤细胞株。分别命名为:1B10、3A12、4G11、5F6。

2.2 抗体的制备及纯化

将得到的 4 株杂交瘤细胞分别注射到成年 BALB/c 小鼠腹腔内诱发腹水,每只获取 3~9 mL 腹水。经间接 ELISA 检测,4 株腹水效价均在 100 000 以上。经蛋白质纯化,蛋白质质量浓度为 18.8~35.4 mg/mL,凝胶成像分析纯度达 88%~95%见表 1。用 Sigma 公司的抗体亚型试剂盒鉴定,结果 1B10 为 IgG2a,4G11 为 IgG2b,3A12 和 5F6 为 IgG1,见图 1。

表 1 LM mAb 的效价及纯化后纯度和蛋白质质量浓度

Table 1 Ascites titer and purity and purified protein content of anti-LM mAb

杂交瘤细胞株	腹水效价	抗体纯度	蛋白质质量浓度/(mg/mL)
1B10	1:20.48×10 ⁴	88%	18.8
3A12	1:40.96×10 ⁴	95%	35.4
4G11	1:20.48×10 ⁴	90%	26.9
5F6	1:10.24×10 ⁴	91%	28.8

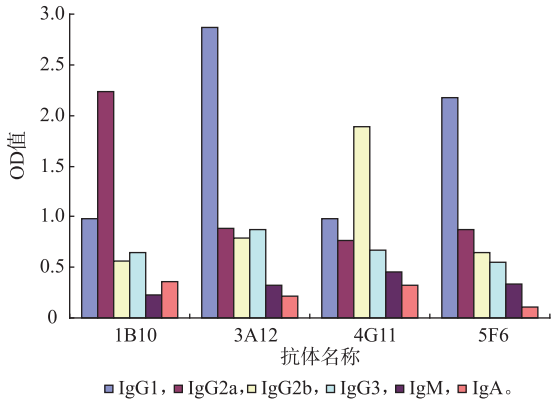


图 1 单克隆抗体亚型鉴定

Fig. 1 Assay of monoclonal antibody subtype

2.3 单克隆抗体识别抗原表位特性分析

为了测定单抗识别抗原表位的特性,先以棋盘法测定酶标记山羊抗小鼠 IgG 的饱和度,并测定抗原与 McAbs 的饱和浓度。在本试验系统中,酶标记山羊抗小鼠 IgG 为 1:5 000 倍稀释,各株单抗腹水根据所测饱和浓度分别作 1:500~1:2 000 倍稀释。结果以相加指数 AI(addictivity index)大小来判定。

$$AI = \left[\frac{2 \times A_{1+2}}{A_1 + A_2} - 1 \right] \times 100\%$$

其中 A_1 、 A_2 分别是单独使用一株 McAb 所测定的 OD 值, A_{1+2} 为两株 McAb 所测定的 OD 值。若两株 McAbs 识别抗原的同一表位, A_{1+2} 应等于 A_1 和 A_2 的均值,AI 应等于零;若两株 McAb 识别不同的表位, A_{1+2} 应等于 A_1 和 A_2 的总和,AI 则等于 100%。在实际测定中,一般以 AI 值小于 50%判定为识别相同的表位,以 AI 值大于 50%判定为识别不同的表位。表 2 表明,只有 1B10 与 4G11 和 3A12 与 5F6 这两对 McAb 互交相加后,AI 值均小于 50%(最高 AI 值只有 15.29%),则两对抗体所结合的表位是相同或距离很近,没有互补或相加的特性。而其余两对 McAb 互交相加后,计算得出的 AI 值大于 50%(最高 AI 值为 95.12%),具有相加性,它们识别抗原上不同的表位且表位的距离很远,即认为是识别抗原上不同构象表位的。

2.4 最佳配对的选择及抗体灵敏度检测

据相加试验的结果,判定 1B10 与 3A12,1B10 与 5F6,4G11 与 3A12,4G11 与 5F5 互为配对抗体。并将 4 株抗体分别标 HRP 酶为 1B10-HRP,3A12-HRP,4G11-HRP 和 5F5-HRP。进行棋盘筛选试验,取每一株抗体分别包被酶标板,与不同浓度模拟污

表 2 4 株 McAb 腹水相加试验的 OD 值及 AI 值

Table 2 Titer of the combined test value and AI by indirect ELISA

McAb	1B10		3A12		4G11		5F6	
	OD 值	AI/%	OD 值	AI/%	OD 值	AI/%	OD 值	AI/%
1B10	0.38	—	0.80	95.12	0.46	13.58	0.64	62.03
3A12	0.78	90.24	0.44	—	0.67	54.02	0.49	15.29
4G11	0.45	11.11	0.66	51.72	0.43	—	0.67	59.52
5F6	0.62	56.96	0.48	12.94	0.68	61.90	0.41	—

染 LM 肉样 ($10^7, 10^6, 10^5, 10^4, 10^3, 100, 50, 10$ CFU/mg) 反应后, 加入各自其配对细胞株的标酶(HRP) 抗体, 其标酶抗体的初始质量浓度为 $2.5 \mu\text{g/mL}$, 按 $2n$ ($n=0, 1, 2, \dots$) 倍比稀释加入, 运用双抗体夹心 ELISA 进行灵敏度检测。经试验证明 1B10 与 3A12 为最佳配对抗体, 检测 LM 的灵敏度是最高的, 当 1B10 作为包被抗体, 3A12 作为酶标抗体其质量浓度为 $0.625 \mu\text{g/mL}$ 时检测 LM 的灵敏度可达 100 CFU/mg , 见图 2。

抗原分子上的表位是由线性的氨基酸残基或者非连续序列折叠形成的紧密的三维结构, 它们在抗原的表面是局部表面结构, 1B10 能与 3A12-HRP 配对检测到 LM, 表明该抗原分子表面这两个表位之间的距离较远。采用两株单抗夹心 ELISA 完成对 LM 的检测, 这样既提高检测灵敏度又能增强特异性, 这是因为单抗是由单个杂交瘤克隆分泌的抗体组成的, 具有均质性和很高的亲和力, 并且在抗原检测上具有高度一致的特性。

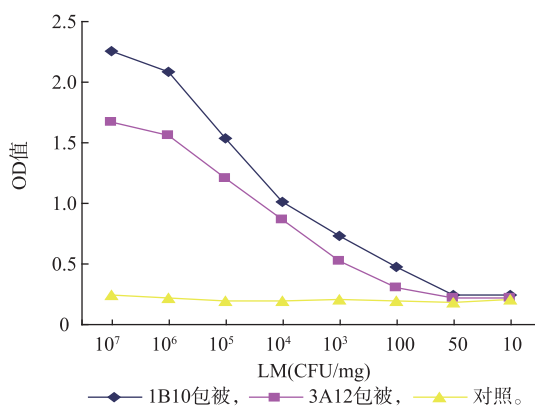


图 2 1B10 和 3A12 配对结果

Fig. 2 Result of antibody pairs for ELISA

2.5 双抗夹心 ELISA 检测特异性

以最佳配对的抗体以及最佳浓度来进行双抗体夹心 ELISA 检测特异性, 其分别与两株单增李斯特菌和绵羊李斯特菌、英诺克李斯特菌、大肠杆菌、

沙门氏菌、枯草杆菌、金黄色葡萄球菌及链球菌等菌株进行特异性检测, 见图 3。结果表明, 两个单克隆抗体夹心检测的特异性很好, 与两株单增李斯特菌有明显反应, 但与绵羊李斯特菌、英诺克李斯特菌、大肠杆菌、沙门氏菌、枯草杆菌、金黄色葡萄球菌及链球菌和空白对照没有明显交叉反应。

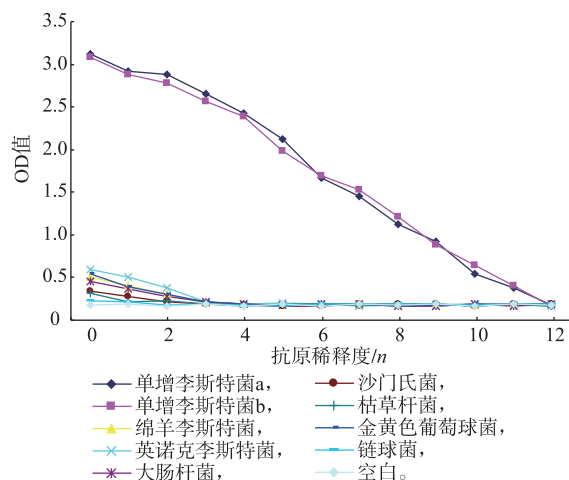
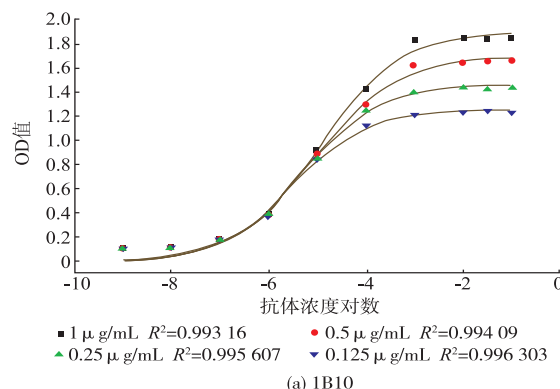


图 3 双抗体夹心 ELISA 特异性测定

Fig. 3 Assay of specificity by sandwich ELISA

2.6 亲和力测定

对 4 株单克隆抗体进行了亲和力测定, 结果见图 4。4 株抗体的亲和力为 $1 \times 10^7 \sim 1 \times 10^{10} \text{ L/mol}$, 其中, 1B10 的亲和力是 $1 \times 10^{10} \text{ L/mol}$, 3A12 的亲和力是 $1 \times 10^{10} \text{ L/mol}$ 。



(a) 1B10

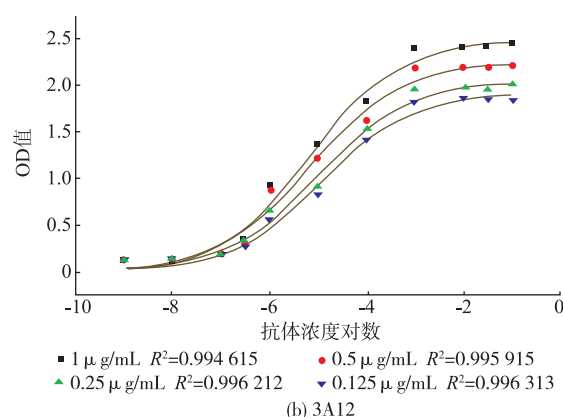


图4 亲和力测定

Fig. 4 Association constant(Kaffi) curve of LM mAb

3 结语

作者制备和选定的 1B10 和 3A12 两株单克隆抗体效价高,抗单增李斯特菌特异性强,通过双抗体夹心 ELISA 法可以实现对单增李斯特菌的免疫学检测。这种检测方法具有过程简单、灵敏度高和分析速度快等优点,可作为对大量样品的快速初筛选分析,再将疑似阳性样品使用确证分析法进行确证,这样可以降低大批量样品的成本并提高分析效率。

参考文献:

- [1] 刘秀梅. 中国食品工业与科技蓝皮书[M]. 北京:中国食品学报出版社,2003:44-48.
- [2] 李郁,魏建忠,王桂军. 产单核李斯特菌的研究进展[J]. 中国卫生检验杂志,2005,15(8):1018-1020.
LI Yu,WEI Jianzhong,WANG Guijun. Research progress in production of mononuclear Lester bacteria [J]. **Chinese Journal of Health Laboratory Technology**,2005,15(8):1018-1020.(in Chinese)
- [3] 沈晓盛,郑国兴,李庆,等. 食品中单核细胞增生李斯特菌的危害及其检测[J]. 食品与发酵工业,2004,30(8):87-91.
SHEN Xiaosheng,ZHENG Guoxing,LI Qing,et al. Hazard and detections of *Listeria monocytogenes* in food[J]. **Food and Fermentation Industries**,2004,30(8):87-91.(in Chinese)
- [4] 李干红,丁晓雯. 李斯特菌及其快速检测[J]. 广州食品工业科技,2002,18(3):67-69.
LI Ganhong,DING Xiaowen. *Listaria* and its rapid detections [J]. **Guangzhou Food Science and Technology**,2002,18(3):67-69.(in Chinese)
- [5] 梁锐萍,黄素珍,胡慧强. 单核细胞增生性李斯特氏菌及其检验[J]. 动物科学与动物医学,2004,21(11):47-49.
LIANG Ruiping,HUANG Suzhen,HU Huiqiang. *Listeria monocytogenes* and its detections [J]. **Animal Science & Veterinary Medicine**,2004,21(11):47-49.(in Chinese)
- [6] 徐怀德. 食品杀菌新技术[M]. 上海:科学技术文献出版社,2005.
- [7] 裘法祖,武忠弼,吴在德,等. 现代免疫学实验技术[M]. 武汉:湖北科学技术出版社,2002:23-25.
- [8] 金伯泉. 细胞和分子免疫学实验技术[M]. 西安:第四军医大学出版社,2002:9-17.
- [9] 董志伟,王琰. 抗体工程(第2版)[M]. 北京:北京医科大学出版社,2002:218-225,280-282.
- [10] Mckinney M M,Parkins A. A simple,nonchromatographic procedure to purify immunoglobulins from serum and ascites[J]. **Immunol Methods**,1987,96(2):271.
- [11] 奥斯伯 F,等著. 新编分子生物学实验指导[M]. 王海林,等译. 北京:科学出版社,1998:333-338.
- [12] 刘苏燕,董邦全,李恩善. 分析不同单克隆抗体识别的表位特异性的三种 ELISA 方法比较 [J]. 上海免疫学杂志,1991,11(2):108-109,112.
LIU Suyan,DONG Bangquan,LI Enshan. Comparison of three ELISA methods for analysis of epitopes specificity using different monoclonal antibodies[J]. **Shanghai Journal of Immunology**,1991,11(2):108-109,112.(in Chinese)
- [13] Chii Yuh Kuo,Kuang Wei Chen,Joseph Fu,et al. Generation of monoclonal antibodies to prostatic acid phosphatase isoenzyme 2 and application in solid-phase enzyme immunoassay[J]. **Biotechnology and Applied Biochemistry**,1989,11:8995.
- [14] 哈洛 E.苏思 D. 抗体技术实验指南[M]. 沈关心,龚非力,译. 北京:科学出版社,2002:19.