

牛奶过敏原 β -乳球蛋白的单克隆抗体制备 及其双抗体夹心法的建立

陈献雄, 邬玉兰, 吉琼梅, 杨平常, 刘志刚*

(深圳大学过敏反应与免疫学研究所, 深圳 518060)

摘要: **目的** 制备与鉴定牛奶主要过敏原 β -乳球蛋白(β -LG)的单克隆抗体, 并建立双抗体夹心检测法。 **方法** 以 β -LG 为抗原免疫 BALB/c 小鼠, 融合免疫鼠脾细胞和小鼠骨髓瘤 NS-1。半固体培养基法结合有限稀释法筛选稳定分泌抗体的杂交瘤细胞株。杂交瘤细胞株诱导小鼠腹水, 采用蛋白 A 亲和层析法获得纯化抗体。利用 Ig 类与亚类鉴定试剂盒鉴定该单克隆抗体的 Ig 亚型。间接 ELISA 方法和 Western Blot 鉴定抗体效价和特异性以及与其他过敏原的交叉反应性。建立双单克隆抗体夹心法, 检测 β -LG。 **结果** 共获得抗 β -LG 细胞株 6 株, 分别命名为 1H8, 4A7, 4C3, 1F9, 1G5, 3D11, 效价均高于 20 万。经抗体亚型鉴定, 6 株抗体均为 IgG1 型。Western Blot 的结果表明 6 株抗体能识别 β -LG。在特异性检测实验中, 6 株抗体与其他种类食物过敏原无交叉反应, 而 1G5 和 3D11 与牛奶酪蛋白过敏原有交叉反应性。通过建立双单克隆抗体夹心 ELISA 法, 发现牛奶 β -LG 蛋白的检出下限为: 15.625 ng/mL, 标准曲线在 15.625~250 ng/mL 范围内线性良好。 **结论** 获得高效价抗体 6 株, 建立了高效、高特异性的牛奶过敏原 β -LG 的检测方法, 为食品中牛奶过敏原的检测提供了依据。

关键词: 牛奶 β -lactoglobulin 蛋白; 单克隆抗体; 特性鉴定; 过敏原检测

Preparation of monoclonal antibodies and establishment of a sandwich-ELISA system against allergen β -lactoglobulin from milk

CHEN Xian-Xiong, WU Yu-Lan, JI Qiong-Mei, YANG Ping-Chang, LIU Zhi-Gang*

(Institute of Allergy and Immunology, Shenzhen University, Shenzhen 518060, China)

ABSTRACT: Objective To prepare and characterize monoclonal antibodies against allergen β -lactoglobulin (β -LG) in milk and establish a method for the detection of milk allergens by sandwich-ELISA. **Methods** BALB/c mice were immunized with β -LG-the main allergen from milk. The fusion cell strain secreting antibodies stably was screened by using hybridoma and limit dilution technique. The cells used to induce ascites in mice and monoclonal antibodies were purified by affinity chromatography on immobilized protein A. The sub-

基金项目: 国家自然科学基金项目(81271950)、广东省工程技术研究开发中心项目(2013158925)、广东省对外科技合作项目(2013B051000088)、深圳市科技计划国际科技合作项目(GJHZ20130408174112021)、深圳市科技计划基础研究项目(JCYJ20140418095735604)

Fund: Supported by the National Natural Science Foundation of China (81271950), Guangdong Engineering Technology Research Center Project (2013158925), Guangdong Province Science and Technology Cooperation Project (2013B051000088), Shenzhen Scientific Technology Project International Cooperative Project (GJHZ20130408174112021) and Shenzhen Science and Technology Plan Basic Research Project (JCYJ20140418095735604)

*通讯作者: 刘志刚, 教授, 博士, 主要研究方向为免疫学和变态反应学。E-mail: lzg@szu.edu.cn

*Corresponding author: LIU Zhi-Gang, Professor, Institute of Allergy and Immunology, School of Medicine, Shenzhen University, 3688 Nanhai Ave., Shenzhen 518060, China. E-mail: lzg@szu.edu.cn

class of Ig, speciality, titers and cross-reactivity of the antibodies were detected with indirect enzymelinked immunosorbent assay (ELISA) and western blot. β -LG in milk with these antibodies was detected by sandwich-ELISA. **Results** Six hybridoma cell lines secreting McAbs against antigenic epitope of β -LG from milk were obtained, which were denominated as 1H8, 4A7, 4C3, 1F9, 1G5, and 3D11. The titers of 6 monoclonal antibodies were higher than 1:200000 ($P/N > 2.1$). The 6 McAbs belonged to IgG1 subtype. Results of western blot and ELISA indicated that all antibodies could bind to β -LG specifically, and had no cross-reaction with other familiar foods, but 1G5 and 3D11 had cross-reactivity with casein allergen from milk. The standard curve was linear with β -LG concentration from 15.625~250 ng/mL and the detection limit was 15.625 ng/mL. **Conclusion** These 6 monoclonal antibodies against of β -LG from milk are prepared successfully, and a sandwich-ELISA system is set up to detect the presence of milk allergens, which will facilitate establishing detection method of milk allergen.

KEY WORDS: β -lactoglobulin protein from milk; monoclonal antibody; characterization; allergen test

1 引言

牛奶营养丰富,含多种人体必需的氨基酸与矿物质,同时也是世界粮农组织认定的导致人类过敏的八大类食物之一^[1]。对于婴幼儿来说,牛奶是除了母乳外,其较早接触的外源性食物蛋白。据流行病学研究显示,牛奶过敏在儿童中的发生率高达 7.5%,是 3 岁以下儿童最主要的过敏类型^[2]。牛奶过敏极大地影响了婴幼儿与儿童的健康,可以引起婴幼儿腹泻、皮疹、缺铁性贫血、发育不良,严重时甚至可以引起喉头水肿和过敏性休克^[3]。导致牛奶过敏的蛋白质主要有酪蛋白、 β -乳球蛋白(β -LG)、 α -乳白蛋白等,其中 β -LG 蛋白被认为是其中重要的致敏蛋白质之一^[4]。据报道,约 82% 的牛奶过敏病人都对 β -LG 蛋白过敏^[5]。可见,研发过敏原检测试剂,检测出引发症状的过敏原十分必要,既可确保婴幼儿与儿童免受食物过敏的伤害,也可以防止因过度治疗或者是不必要的饮食控制,而导致的营养不良而影响生长发育。因此,本研究以牛奶 β -LG 为免疫原,制备单克隆抗体,建立抗 β -乳球蛋白双单克隆抗体夹心 ELISA 法的检测系统,为食品中牛奶过敏原的检测提供了实验依据,也为研究牛奶中过敏原量降低的程度奠定了基础。

2 材料与方法

2.1 材料

2.1.1 实验材料

雌性 4 周龄 BALB/c 小鼠购自广东省医学实验动物中心。小鼠骨髓瘤细胞 NS-1 与牛奶粗抗原由深圳

大学医学院过敏反应与免疫学研究所保存。

2.1.2 主要试剂

β -lactoglobulin (L3908)、福氏完全佐剂和不完全佐剂、Ig 类与亚类二抗、PEG SOLUTION、DMSO 均购于 Sigma 公司;羊抗小鼠 IgG-HRP 购于 SouthernBiotech 公司; NHS-Biotin 购于 Thermo 公司; DMEM、HAT、青链霉素、胎牛血清购于 Gibco 公司; 3,3'-二氨基联苯胺(DAB)购于 invitrogen 公司; PVDF 膜购于 Bio rad 公司; 预染 protein marker 购于 Fermentas 公司; 牛血清白蛋白(BSA)购于 BBI 公司。

2.2 实验方法

2.2.1 杂交瘤细胞的制备

用牛奶 β -LG 蛋白作为抗原免疫 6 周龄的雌性 BALB/c 小鼠 3 只,免疫总剂量为 30 μ g/只,2 周后皮下分点注射等量福氏不完全佐剂乳化的抗原,剂量不变,3 周后进行第 3 次常规免疫,间隔至少 1 个月,在融合前的第 3 d 尾静脉最后一次注射抗原,剂量为 15 μ g/只,进行加强免疫一次。将收集的免疫小鼠脾细胞和 NS-1 细胞以约 1:5 的比例在 50% PEG 作用下按常规方法融合。融合后的细胞沉淀用 2.5 mL 完全培养液轻悬,加入 22.5 mL 半固体培养基 Medium D 混匀后倒入直径 3.5 cm 的平皿中,每个平皿约 2 mL,37 $^{\circ}$ C,5% CO₂ 培养。一周后肉眼可见平皿的培养基表面有白色斑点,显微镜下即为细胞克隆团。无菌条件下将平皿中分散的、单个的细胞团吸起放入 96 孔板培养液中,继续培养。96 孔板中细胞长满后间接 ELISA 法进行检测,阳性孔用有限稀释法进行亚克隆。

2.2.2 单克隆抗体的获得

扩大培养建株的杂交瘤细胞, 取 8 周龄的 BALB/c 小鼠, 腹腔注射液体石蜡 0.5 mL/只, 7 d 后腹腔注射杂交瘤细胞 $5 \times 10^5 \sim 5 \times 10^6$ /只, 7~10 d 后抽取小鼠腹水。腹水参照 HiTrap protein A 亲和层析说明书进行纯化, 获得单克隆抗体。

2.2.3 单克隆抗体的亚类鉴定

采用间接 ELISA 法, 以 IgG1、IgG2a、IgE、IgA、IgM 为二抗, 进行单克隆抗体亚类的测定。

2.2.4 单克隆抗体的效价测定

通过间接 ELISA 法, 包被牛奶粗抗原与 β -LG 抗原 100 ng/孔, 分别以 1:100 与 1:200 梯度稀释奶 β -LG 单克隆抗体, 以免疫前小鼠血清作为阴性对照, 二抗为 HRP 羊抗小鼠 IgG, 稀释比例为 1:10000。450 nm 测定吸光值, 测定孔读数与阴性对照值之比大于 2.1 为阳性。

2.2.5 抗牛奶 β -LG 单克隆抗体结合活性鉴定

采用 Western Blot 法, 将牛奶 β -LG 蛋白进行 12% SDS-PAGE 电泳, 然后转移至 PVDF 膜上, 牛奶 β -LG 单抗孵育 1~2 h, HRP 羊抗小鼠 IgG 孵育 1~2 h, 用 ECL 试剂盒显色, 拍照后记录。

2.2.6 单克隆抗体的交叉反应性鉴定

采用间接 ELISA 法, 包被 8 大类食物过敏原粗蛋白: 牛奶、花生、鱼、虾、榛子、鸡蛋、大豆、麦与牛奶酪蛋白, 将牛奶 β -LG 单抗为一抗, 以免疫前小鼠血清作为阴性对照, 用 HRP 标记的羊抗鼠 IgG 的抗体为二抗, 用 TMB 试剂显色。A_{450 nm} 读取吸光值, 并记录数据。

2.2.7 双单克隆抗体夹心 ELISA 法的建立

以单克隆抗体 1H8 作为双抗夹心 ELISA 的包被抗体, 生物素标记的 4C7 单抗作为捕获抗体, 用牛奶过敏原 β -LG 蛋白系列稀释后测定该方法的检出限与最佳标准曲线。

3 结果与分析

3.1 抗牛奶 β -LG 蛋白杂交瘤细胞株的建立

取 β -LG 蛋白免疫后的小鼠脾脏进行细胞融合, 经多次筛选, 亚克隆获得的单克隆株经冻存复苏后阳性维持不变。最终获得稳定的 6 株抗 β -LG 蛋白单克隆细胞株, 命名为: 1H8、4A7、4C3、1F9、1G5、3D11。

3.2 抗体亚型的鉴定

经单克隆抗体亚类鉴定试剂盒鉴定, 牛奶 6 株抗 β -LG 蛋白单克隆抗体均为 IgG1 类免疫球蛋白, 实验均重复 3 次(图 1)。

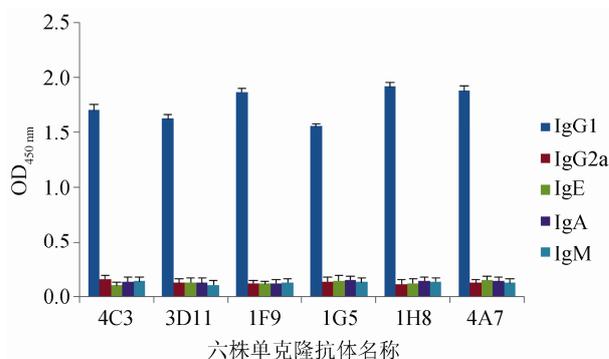


图 1 六株抗体亚型鉴定

Fig. 1 Ig class and subclass of 6 McAbs

3.3 六株抗体效价测定

包被牛奶 β -LG 蛋白, 采用间接 ELISA 法测定 6 株单抗的效价。结果显示 6 株抗体效价均在 20 万以上, 且稀释比例 1:200000 时, OD 值仍维持在 1.2 以上(图 2)。检测 6 株抗体与牛奶粗抗原结合能力, 发现 6 株抗体效价在 10 万以上(图 3)。以上实验结果均重复 3 次。

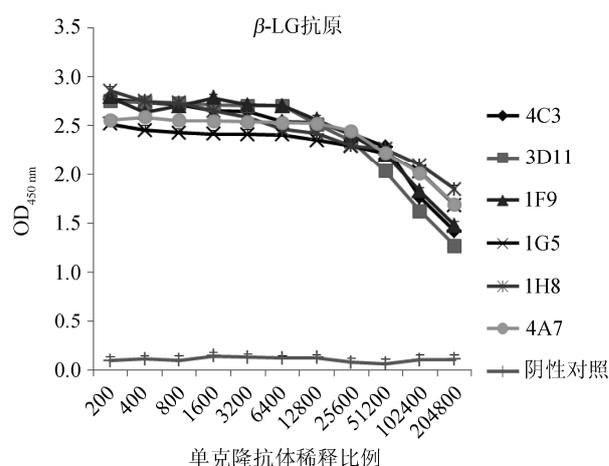


图 2 抗体效价测定

Fig. 2 Detection of the potency of McAbs against β -lactoglobulin allergen

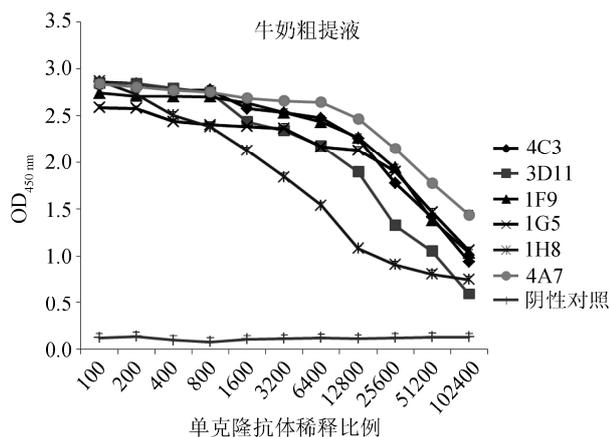


图 3 抗体效价测定

Fig. 3 Detection of the potency of McAbs against β -lactoglobulin allergen

3.4 Western Blot 鉴定

结果表明 6 株抗牛奶单克隆抗体均能与 β -LG 蛋白反应, 与 ELISA 法测定的单克隆抗体效价结果基本一致(见图 4)。

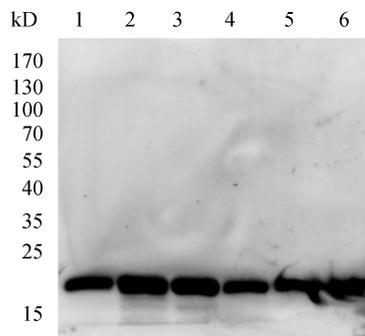
图 4 抗 β -lactoglobulin 单克隆抗体的免疫印迹鉴定

Fig. 4 Western-blotting analysis of McAbs against β -lactoglobulin allergen

样品顺序: Marker; 1. 1H8; 2. 4A7; 3. 4C3; 4. 1F9; 5. 1G5; 6. 3D11

3.5 单克隆抗体的交叉反应性检测

采用间接 ELISA 法测定单克隆抗体的特异性, 发现 6 株抗牛奶 β -LG 单克隆抗体与花生、鱼、虾、榛子、鸡蛋、大豆、麦等 7 大类食物均无交叉反应, 但是 3D11 与 1G5 抗体与牛奶酪蛋白具有交叉反应(图 5)。

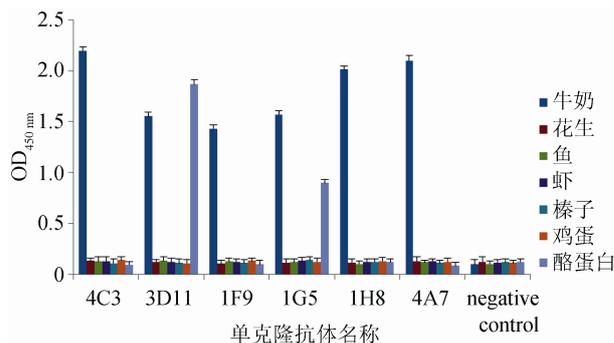
图 5 抗 β -LG 单克隆抗体的交叉性研究

Fig. 5 The cross-reactivity of McAbs against β -lactoglobulin allergen

3.6 双单克隆抗体夹心 ELISA 法的建立

通过棋盘滴定法摸索包被抗体和捕获抗体的最佳稀释倍数, 结果表明 1H8 抗体包被和标记生物素 4C3 抗体的最佳稀释倍数分别为 1:2000 和 1:1000。以牛奶 β -LG 蛋白系列稀释, 测出的牛奶 β -LG 蛋白的检出低限为: 15.625 ng/mL, 标准曲线在 15.625~250 ng/mL 范围内线性良好(图 6)。

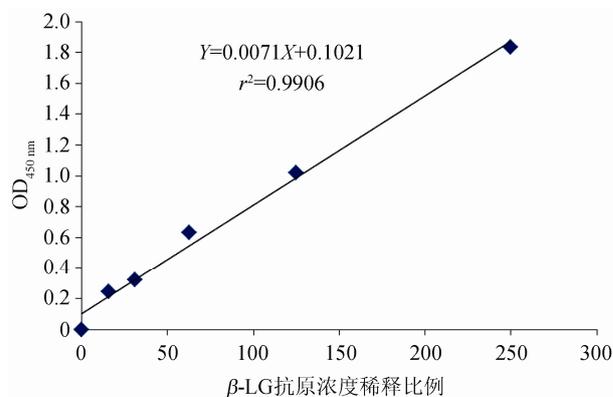
图 6 双抗夹心 ELISA 法检测 β -lactoglobulin 过敏原标准曲线

Fig. 6 The curve of sandwich ELISA for detection of β -lactoglobulin allergen protein

4 结论与讨论

食物过敏是临床上常见病、多发病, 被世界卫生组织列为 21 世纪重点防治三大疾病之一, 近几十年食物过敏的发病率趋势不断上升, 甚至有报道称其

受累人群已达世界人口总数的四分之一^[6-7]。牛奶是八大类食物过敏原之一, 在婴幼儿与儿童中发病率较高, 严重影响了他们的身体健康^[2]。因此, 诊断和防治食物过敏具有重要意义。过敏性疾病防治原则是避免接触过敏原^[8], 而防治手段的前提是尽早确诊食物过敏的类型, 那么食物检测试剂的研发十分必要。

本实验室一直致力于食物过敏原的研究^[9,10], 在 2009 年, 本实验室克隆了牛奶 β -LG 蛋白基因并构建了其原核表达载体^[11], 且利用牛奶多克隆抗体, 建立了牛奶双多克隆抗体夹心 ELISA 法^[12]。但是采用多克隆抗体具有一定的缺点, 易引起交叉反应, 导致检测结果呈假阳性。而单克隆抗体高特异性、高均一性、生物活性单一、来源容易等优势, 能够大量提供标准化抗体, 使抗原抗体反应结果便于质量控制, 利于检测的标准化和规范化, 而且提高了 ELISA 方法的特异性和选择性^[13]。

此次实验以牛奶主要过敏原 β -LG 为抗原免疫小鼠, 用半固体培养与有限稀释相结合的杂交瘤技术, 成功筛选出 6 株稳定分泌抗 β -LG 的单克隆抗体的胞株, 分别命名为 1H8、4A7、4C3、1F9、1G5、3D11。采用半固体培养与有限稀释相结合的方法, 既可以缩短筛选单克隆抗体的时间, 又可以避免传统的直接铺 96 孔板培养过程中因未及时亚克隆而导致的抗体株的丢失。目前, 单克隆抗体的纯化方法有很多, 如辛酸-硫酸铵法、离子交换层析、亲和层析、疏水层析、凝胶过滤法及高压液相层析法等。本实验采用 HiTrap protein A 蛋白层析柱纯化 β -LG 单克隆抗体, 纯化效果较好。纯化后单克隆抗体经 ELISA 测定, 6 株抗体亚型均为 IgG1, 所有抗体效价均高于 20 万以上, 同时发现 6 株抗体与牛奶粗抗原结合能力较强, 效价也在 10 万以上。高效价与高灵敏度抗体对开发检测试剂具有有利的优势, 可以减少抗体的用量, 利于检测试剂生产工艺的放大。经 Western Blot 鉴定, 6 株抗体均与牛奶粗抗原具有较好的结合活性, 这为食品中牛奶抗原的检测奠定了基础。通过与其他食物过敏原的交叉反应性测定, 显示 6 株抗牛奶 β -LG 单克隆抗体与花生、鱼、虾、榛子、鸡蛋、大豆、麦等 7 大类食物均无交叉反应, 但是 3D11 和 1G5 抗体与牛奶酪蛋白具有交叉反应, 其他 4 株抗体特异性较高, 可以避免多克隆抗体产生的与其他食物过敏原的交叉反应, 适用于检测 β -LG 蛋白等免疫学方法的建立。

双抗体夹心 ELISA 法是一种最常用的免疫分析方法, 已经在食品安全等领域中被广泛使用^[14], 本实验成功建立抗牛奶 β -LG 双单克隆抗体夹心 ELISA 法, 测出的牛奶 β -LG 蛋白的检出低限为: 15.625 ng/mL, 标准曲线在 15.625~250 ng/mL 范围内线性良好。之前实验室建立的牛奶双多克隆抗体夹心 ELISA 法检测限为 25~1000 ng/mL^[12], 而国内学者建立的 β -乳球蛋白的双多克隆抗体夹心 ELISA 法与间接竞争 ELISA 法的检测限分别为 47~1500 ng/mL 和 60~1920 ng/mL^[15]。相比之下, 此次实验建立的抗牛奶 β -LG 双抗体夹心 ELISA 法灵敏度更高, 由于实验使用的是双单克隆抗体, 特异性也稍强。上述实验结果为食品中 β -乳球蛋白含量的检测奠定了一定的基础, 也为低敏性乳制品的开发提供了一定的实验依据和技术手段。

参考文献

- [1] FAO technical consultation on food allergens [Z]. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations, 1995.
- [2] Prioult G Pecquet S, Fliss I. Allergenicity of acidic peptides from bovine b-lactoglobulin is reduced by hydrolysis with bifidobacteriumlactis NCC362 enzymes [J]. *Int Dairy J*, 2005, (15): 439-448.
- [3] Bahna SL, Gandhi MD. Milk hypersensitivity I Pathogenesis and symptomatology [J]. *Ann Allergy*, 1983, 50(4): 218-223.
- [4] Massimo N, Carolina B, Giovanna M, *et al.* Cow's milk allergens identification by two-dimensional immunoblotting and mass spectrometry [J]. *Mol Nutr Food Res*, 2004, 48(5): 363-369.
- [5] Makoto Hattori, Ken-ichi Numamoto, Kazuo Kobayashi, *et al.* Functional changes in β -lactoglobulin by conjugation with cationic saccharides [J]. *J Agric Food Chem*, 2000, 48(6): 2050-2056.
- [6] Gerez IFA, Shek LPC, Chng HH, *et al.* Diagnostic tests for food allergy [J]. *Singapore Med J*, 2010, 51(1): 4-9.
- [7] Arslan LG. Gastrointestinal food hypersensitivity: symptoms, diagnosis and provocation tests [J]. *Turk J Gastroenterol*, 2007, 18(1): 5-13.
- [8] Linda Monaci, Virginie Tregoeat, Arjon J. van Hengel, *et al.* Milk allergens, their characteristics and their detection in food: A review [J]. *Eur Food Res Technol*, 2006, 223: 149-179.
- [9] 赵郭存, 张强, 杨波. 榛子主要过敏原 Cor h 1 单克隆抗体识别抗原表位区域的确定 [J]. *食品安全质量检测学报*, 2012, 3(4): 264-269.
- [10] Zhao GC, Zhang Q, Yang B, *et al.* Identification of hazelnut an-

- tigenic epitope regions recognized by anti-Cor h 1 monoclonal antibodies [J]. *J Food Saf Qual*, 2012, 3(4): 264–269.
- [10] 邹菊, 张强, 刘志刚. 抗鸡蛋卵类黏蛋白单克隆抗体的制备与鉴定[J]. *免疫学杂志*, 2011, 27(3): 185–188.
- Zou J, Zhang Q, LIU ZG. Preparation and identification of monoclonal antibodies against allergen ovomucoid [J]. *Immunol J*, 2011, 27(3):185–188.
- [11] 邹玉兰, 刘志刚, 陈小文. 奶牛主要过敏原 β -乳球蛋白基因的克隆及其原核表达载体的构建[J]. *热带医学杂志*, 2009, 9(9): 998–1001.
- Wu YL, Liu ZG, Chen XW. Cloning and sequence analysis of the major allergen β -lactoglobulin in dairy cow(*Bos taurus*) [J]. *J Trop Med*, 2009, 9(9): 998–1001.
- [12] 詹政科, 刘萍, 吉坤美, 等. 双抗体夹心 ELISA 法测定食物中牛奶过敏原蛋白成分[J]. *中国乳品工业*, 2009, 37(5): 44–47.
- Zhan ZK, Liu P, Ji KM, *et al.* Detection of milk allergen protein trace in food products by sandwich-antibody enzyme linked immunosorbent assay [J]. *China Dairy Ind*, 2009, 37(5): 44–47.
- [13] Andrzej Posyniak, Jan Zmudzki, Jolanta Niedzielska. Evaluation of sample preparation for control of chloramphenicol residues in porcine tissues by enzyme-linked immunosorbent assay and liquid chromatography [J]. *J Anal Chem*, 2003, (5): 307–311.
- [14] Wen HW, Wlodzimierz BW, Thomas RD, *et al.* Peanut allergy, peanut allergens, and methods for the detection of peanut contamination in food products [J]. *Comp Rev Food Sci Food Saf*, 2007, 6(2): 47–58.
- [15] 赵金龙. β -乳球蛋白两种酶联免疫检测方法的建立和比较[D]. 天津: 天津科技大学, 2010.
- Zhao JL. Two enzyme-linked immunoassay methods for the β -lactoglobulin detection [D]. Tianjin: Tianjin Science and Technology University, 2010.

(责任编辑: 杨翠娜)

作者简介



陈献雄, 硕士, 高级实验师, 主要研究方向为我国常见吸入性过敏原标准化研究。
E-mail: gzcxx@126.com



刘志刚, 教授, 博士, 主要研究方向为免疫学和变态反应学。
E-mail: lzg@szu.edu.cn