

大豆主要过敏原 Gly m Bd 30K 蛋白单克隆抗体的制备与应用

邹菊, 刘志刚

(深圳大学 医学院 过敏反应与免疫学研究所, 广东 深圳 518060)

摘要: 利用大豆主要过敏原 Gly m Bd 30K 蛋白抗原表位蛋白为免疫原免疫 BALB/c 小鼠, 取免疫小鼠脾细胞与小鼠骨髓瘤 NS-1 细胞融合。采用半固体培养基法和有限稀释法相结合的方法快速筛选获得稳定分泌的特异性杂交瘤细胞, 用杂交瘤细胞株诱生小鼠腹水, 应用蛋白 A 亲和层析法进行抗体纯化。采用 Ig 类与亚类鉴定试剂盒鉴定该单克隆抗体的 Ig 亚型; 通过间接 ELISA、Western Blotting 鉴定该单克隆抗体的特性和交叉性。利用双单抗夹心 ELISA 法检测大豆过敏原。结果表明: 获得 6 株可稳定分泌鼠抗大豆主要过敏原 Gly m Bd 30K 蛋白的单克隆抗体, 分别命名为 1C10, 1D12, 2D1, 4B4, 5F9, 6B12, 其 Ig 亚型除 1D12 和 4B4 为 IgG2a 外, 其余均为 IgG1, 且 6 株单抗效价均在 10^{-5} 以上。ELISA 和 Western Blotting 分析表明该 6 株单抗均能特异性识别大豆主要过敏原 Gly m Bd 30K 蛋白, 并且建立双单抗夹心 ELISA 的方法可以准确检测出大豆过敏原的存在。鼠抗大豆主要过敏原 Gly m Bd 30K 蛋白抗原表位区蛋白的单克隆抗体的成功制备, 以及双单抗夹心 ELISA 检测系统的建立, 为大豆主要过敏原蛋白的检测奠定了基础, 也可以为食品中大豆过敏原的检出提供依据。

关键词: 大豆主要过敏原 Gly m Bd 30K 蛋白; 单克隆抗体; 特性鉴定; 双抗体夹心法

中图分类号: S565.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-9841(2011)05-0723-04

Preparation and Application of Monoclonal Antibodies against Allergen Gly m Bd 30K

ZOU Ju, LIU Zhi-gang

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

Abstract: To prepare monoclonal antibodies against allergen soybean, BALB/c mice were immunized with antigenic epitope of Gly m Bd 30K protein from soybean, and the splenocytes of the immunized mice were fused with NS-1 myeloma cells by hybridoma technique. The McAbs were purified using affinity chromatography on immobilized protein A and identified by their specificity, subtype, titers and cross-reactivity with ELISA and Western blotting. With the method of sandwich-ELISA to detect soybean allergen protein trace in food products. Six hybridoma cell lines secreting McAbs against antigenic epitope of Gly m Bd 30K protein from soybean were obtained, which were denominated as 1C10, 1D12, 2D1, 4B4, 5F9, 6B12. The six McAbs all recognized recombinant antigenic epitope of Gly m Bd 30K protein from soybean. A sandwich-ELISA system was set up to detect the presence of soybean allergens. These six monoclonal antibodies against antigenic epitope of Gly m Bd 30K protein from soybean were prepared successfully, which would facilitate establishing detection method of soybean allergen.

Key words: Antigenic epitope of Gly m Bd 30K protein from soybean; Monoclonal antibody; Characterization; Allergen test

大豆是人类主要的植物蛋白来源之一, 然而大豆蛋白属于目前公认的八大类食物过敏原之一^[1]。1934 年 Duke 等^[2] 提出大豆蛋白会引起人类的过敏反应, 而 1983 ~ 1986 年期间, 我国有 184 例由于食物过敏而引起的变态反应性疾病, 其中大豆过敏患者占 25.5%^[3]。

大豆过敏原可引发过敏体质人群的 I 型过敏反应, 主要临床症状有口周红斑、唇肿、口腔疼痛、舌咽肿、恶心和呕吐等, 严重的甚至会引起过敏性

休克威胁生命安全^[4]。目前国内外对过敏性疾病尚无根治的方法。对食物过敏原过敏的患者避免食入含有相应蛋白的食物是目前最有效的预防方法之一。国际上很多国家已经把大豆作为主要食物过敏原成分进行标注并对部分进口食品进行大豆过敏原检测, 而中国对食物过敏原的研究和关注与国外存在较大差距^[5]。因此, 加强对中国食品过敏现状的研究, 开发一种实用、灵敏、特异的大豆过敏原蛋白成分检测试剂势在必行。国内食品过敏原成

收稿日期: 2011-05-09

基金项目: 广东省科技重点专项资助项目(2003A3080502); 深圳市科技计划资助项目(200929)。

第一作者简介: 邹菊(1982-), 女, 硕士, 研究方向为食物过敏原单克隆抗体的研制及相应检测方法的开发。Email: juliana_zou11@126.com。

通讯作者: 刘志刚(1959-), 男, 教授, 博士生导师, 主要从事过敏反应方面的研究。E-mail: lzg@szu.edu.cn。

分检测尚处在起步阶段,陈家杰等^[6]利用双多抗夹心 ELISA 法检测大豆过敏原灵敏度低,特异性差。

Ogawa 等^[7]用免疫印迹技术,提出大豆蛋白中的 3 种主要过敏原为 Gly m Bd 28K, Gly m Bd 30K 和 Gly m Bd 60K。Ogawa 等^[8-10]的研究表明,超过 65% 的对大豆敏感的病人仅对 Gly m Bd 30K 蛋白过敏,因此 Gly m Bd 30K 蛋白被视为大豆蛋白中一个重要的免疫显性过敏原。Gly m Bd 30K 也称为 P34,是半胱氨酸蛋白酶的木瓜蛋白酶超家族的一个边缘成员。邬玉兰等^[11]的研究显示 Gly m Bd 30K 的全蛋白不表达,天然纯化技术难,从而难以得到 Gly m Bd 30K。林苏霞等^[12]通过构建大豆过敏原 Gly m Bd 30K 的主要抗原表位,得到了具有免疫学活性的高表达大豆抗原表位蛋白。

该研究通过采用杂交瘤技术制备鼠抗大豆主要过敏原 Gly m Bd 30K 蛋白抗原表位蛋白的单克隆抗体,并建立了检测食品中大豆过敏原的双单抗夹心 ELISA 检测系统,为食品中大豆过敏原成分的标注提供依据。

1 材料与方 法

1.1 试验材料

1.1.1 供试材料 BALB/c 健康小鼠,5 周龄雌鼠,购自广东省医学实验动物中心;小鼠骨髓瘤细胞 NS-1 由汕头大学医学院炎症学与变态反应学实验室赠与;大豆主要过敏原 Gly m Bd 30K 蛋白抗原表位蛋白由实验室克隆表达。

1.1.2 试剂与仪器 福氏完全(不完全)佐剂、羊抗小鼠 IgG-HRP、Ig 类与亚类鉴定试剂盒、PEG SOLUTION 购于 Sigma 公司;DMEM 高糖培养基、HAT、HT、青链霉素、胎牛血清购于 Gibco 公司;链酶亲和素-HRP 购于 KPL 公司;NHS-Biotin 购于 Pierce 公司;Hybridoma Selection Medium Medium D (Selection & Cloning) 购于 ClonaCell-HY 公司;蛋白 Marker 购于美国 Fermentas 公司;HiTrap protein A、硝酸纤维素膜购于美国 Amersham 公司;其它试剂为国产分析纯。酶标分析仪购于深圳雷杜生命科学股份有限公司。蛋白质电泳转移仪购于 Bio-Rad 公司。

1.2 试验方法

1.2.1 动物免疫及杂交瘤细胞株的建立 取 0.5 mL 0.5 g · L⁻¹ 的大豆主要过敏原 Gly m Bd 30K 蛋白与等体积的福氏完全佐剂充分乳化后皮下多点

注射于 4 只 BALB/c 小鼠。每间隔 27 d 改用福氏不完全佐剂加强免疫 1 次。第 2 次加强免疫后 7 d 取尾血测效价。取其中免疫效果最好的小鼠融合前 3 d 经尾静脉注射同等剂量的抗原 PBS 溶液再加强免疫 1 次。分别收集 NS-1 细胞和免疫小鼠脾细胞以约 1:10 的比例在 PEG 作用下按常规方法融合。融合后的细胞用 2.5 mL 完全培养液轻悬加入 22.5 mL Medium D 混匀后倒入直径 3.5 cm 的平皿中,37℃,5% CO₂ 培养。7 d 后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。细胞上清用间接 ELISA 法进行检测,阳性孔用有限稀释法进行亚克隆。

1.2.2 腹水制备与纯化 注射 0.5 mL 液体石蜡至 BALB/c 小鼠腹腔。7 d 后注射 1 mL 5 × 10⁶ 的浓度杂交瘤细胞。5 ~ 7 d 后,收集腹水。室温 2 000 r · min⁻¹ 离心 5 min 吸取上清。参照 HiTrap protein A 亲和层析说明书进行腹水的抗体纯化。

1.2.3 抗体亚型的鉴定 严格按 Ig 类与亚类鉴定试剂盒说明书进行间接 ELISA 检测。

1.2.4 单克隆抗体的效价测定 将 Gly m Bd 30K 蛋白 100 ng · 孔⁻¹ 包被,单抗梯度稀释,用免疫前小鼠血清做平行阴性对照试验,通过间接 ELISA 法测定其 A_{450nm} 值,以与大豆主要过敏原 Gly m Bd 30K 蛋白靶抗原发生反应的单克隆抗体的最大稀释度为其效价,P/N ≥ 2.1 为阳性。

1.2.5 Western blot 鉴定 先将 Gly m Bd 30K 蛋白进行 12% SDS-PAGE 电泳后点电转移至硝酸纤维素膜上(300 mA,50 min)。加含有 2% BSA 的 TBST 4℃ 封闭过夜后,分别加入制备的单克隆抗体室温孵育 1 h,以免疫前鼠血清作为阴性对照,多抗为阳性对照;用 HRP 标记的羊抗鼠 IgG 的抗体为二抗,室温孵育 1 h,用 DAB 试剂显色。

1.2.6 与其它食物过敏原的交叉性检测 采用间接 ELISA 法,将大豆蛋白与小麦、榛子、花生、鸡蛋、虾、鱼、牛奶 7 种食物过敏原蛋白包被在酶标板上,将此 6 株单抗作为一抗,以免疫前鼠血清作为阴性对照,以免疫后小鼠血清(多抗)作为阳性对照,用 HRP 标记的羊抗鼠 IgG 的抗体为二抗,用 TMB 试剂显色后于波长 450 nm 读取 A 值。

1.2.7 双单抗夹心 ELISA 法检测大豆 Gly m Bd 30K 蛋白 利用相加 ELISA 法对 6 种单抗进行两两配对试验。对不同抗原表位的单抗进行生物素标记。用未标记生物素的单抗进行包被,抗原与生物

素标记的单抗孵育后进行 ELISA 检测,确定包被抗体与标记抗体的种类及稀释度。用建立起来的双抗体夹心 ELISA 系统检测大豆过敏原。

2 结果与分析

2.1 杂交瘤细胞株的建立

挑选出 570 个独立分散的克隆团进行培养,2 d 后用间接 ELISA 法检测培养上清。抗体阳性检出率为 91% (518/570),选择其中较高读数的 15 株进行扩大培养。反复筛选及克隆化后最终获得 6 株稳定分泌抗 Gly 的抗体的单克隆细胞株,分别命名为 1C10,1D12,2D1,4B4,5F9 和 6B12。

2.2 抗体亚型的鉴定

由图 1 可知,1D12 和 4B4 为 IgG2a 亚型,其余株均为 IgG1 类免疫球蛋白。

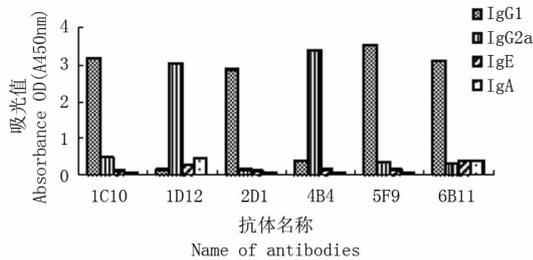


图 1 六株单抗 Ig 亚型鉴定

Fig. 1 Ig class and subclass of six McAbs

2.3 抗体效价的测定

由图 2 可知,除 2D1 和 5F9 效价约为 10^{-5} 外,其余抗体效价均在 10^{-7} 以上。

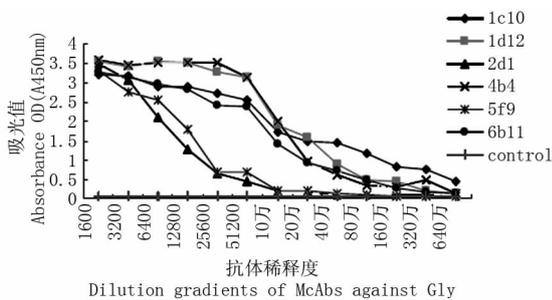


图 2 抗体效价

Fig. 2 Detection of the potency of McAbs against soybean allergen

2.4 Western blot 鉴定

Western Blot 分析表明,6 株单抗均能特异性与大豆主要过敏原 Gly m Bd 30K 蛋白结合反应 (图

3)。从而鉴定出此 6 株抗体均具有抗大豆主要过敏原 Gly m Bd 30K 蛋白的活性。

2.5 与其它过敏原的交叉性检测

将抗体按 1:3 000 稀释后,6 株单抗均能特异性的识别大豆蛋白,而与其它食物过敏原没有交叉反应(图 4)。

2.6 双单抗夹心 ELISA 法检测食品中的大豆过敏原

通过相加 ELISA 法发现 1D12 和 4B4 可能为不同的抗原表位。棋盘法测定发现单抗 1D12 以 1:4 000 稀释包被,生物素标记的 4B4 以 1:15 000 稀释效果较好。大豆总蛋白提取液倍比稀释,阴性对照孔用 PBS 代替,以测定孔与阴性孔 OD 值之比大于 2.1 为阳性判断标准,测定该方法的检出范围,结果如图 5 所示。该方法测出的大豆过敏原的检出限为 $4 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$,标准曲线在 $4 \sim 125 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的范围内线性良好。

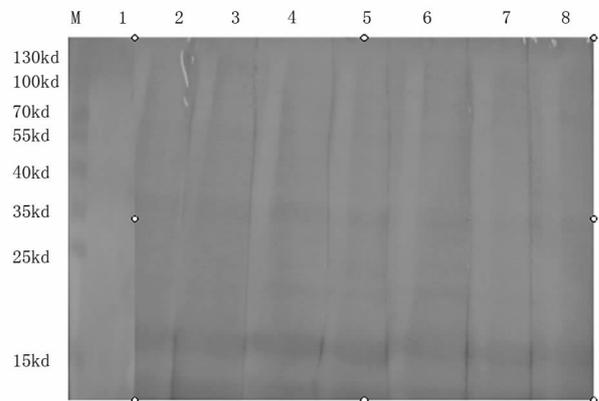


图 3 抗 Gly m Bd 30K 单克隆抗体的免疫印迹鉴定

Fig. 3 Western-blotting analysis of McAbs against soybean allergen

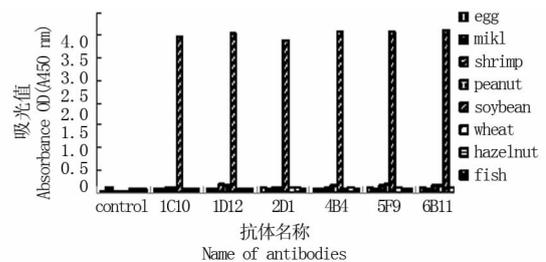


图 4 抗大豆单克隆抗体的交叉性研究

Fig. 4 Study about cross-reactivity of McAbs against soybean allergen

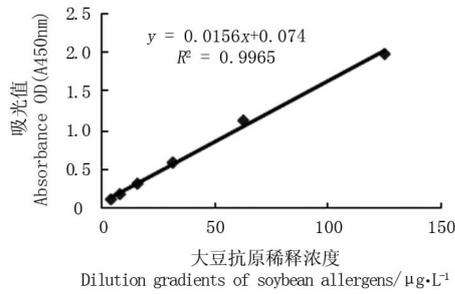


图5 双单克隆抗体 ELISA 法检测大豆过敏原标准曲线

Fig.5 Study curve of sandwich ELISA for detection of soybean allergen

3 讨论

大豆主要过敏原 Gly m Bd 30K 蛋白是大豆中最主要的过敏原之一。目前国内对大豆过敏原单克隆抗体的相关研究报道比较少,游金明等^[13]利用大豆 β -conglycinin 半抗原制备了致仔猪过敏性的大豆过敏原单克隆抗体,但是对人类大豆过敏原单克隆抗体的制备国内还鲜有报道。制备出高效价、高灵敏度的特异性抗体对于研究大豆过敏性疾病及食物过敏原检测等均有重要意义。该研究用大豆主要过敏原 Gly m Bd 30K 抗原表位蛋白为免疫原,采用半固体培养基与有限稀释相结合的杂交瘤技术^[14],成功筛选出 6 株稳定分泌抗大豆主要过敏原 Gly m Bd 30K 蛋白单克隆抗体的细胞株。通过间接 ELISA 鉴定,单抗 2D1 和 5F9 的效价在 10^{-5} 左右,单抗 1C10, 1D12, 4B4, 6D11 效价均在 10^{-7} 以上;Western Blotting 分析显示此 6 株单抗均可用于蛋白印迹检测;并且此 6 株单抗与其它主要食物过敏原均无交叉反应,特异性强。该抗体的制备为大豆 Gly m Bd 30K 蛋白定量检测方法的建立提供了免疫学工具。利用双单克隆抗体 ELISA 体系研制开发大豆过敏原检测试剂盒将具有良好的应用前景。

研究筛选到的单克隆抗体 1D12 和 4B4 属于 IgG2a 亚型,其余 4 株均为 IgG1 亚型,有报道不同亚型的 IgG 在 IgG 介导的食物过敏反应病人血清中含量会有变化^[15],该研究制备的大豆单克隆抗体与食物过敏性疾病的临床意义有待进一步研究。

参考文献

[1] Metcalfe D. The nature and mechanisms of food allergies and related diseases[J]. Food Technology, 1992, 5(5):136-140.
 [2] Duke W W. Soybean as a possible important source of allergy[J]. Journal of Allergy, 1934, 5:300-302.
 [3] 李钢,丁淑霞,左容,等. 食物过敏引起变态反应疾病 184 例临床分析[J]. 佳木斯医学院学报, 1989, 12(3):269. (Li G, Ding S X, Zuo R, et al. Food allergies cause allergic disease clinical analysis of 184 cases[J]. Jiamusi Medical College, 1989, 12(3):269.)

[4] Dean D M, Hugh A S, Ronald A S. Food allergy: adverse reactions to foods and food additives (Second Edition) [M]. Massachusetts: Blackwell Publishing, 1997:253-267.
 [5] 周淑红. 国外关于食品过敏标签的现状与启示[J]. 世界农业, 2007(6):67-68. (Zhou S H. The apocalypse and status on food allergy labels in abroad[J]. World Agriculture, 2007(6):67-68.)
 [6] 陈家杰,朱海,叶卫翔,等. 双抗体夹心 ELISA 法测定食物中大豆过敏原蛋白成分[J]. 食品研究与开发, 2009, 30(5):105-109. (Chen J J, Zhu H, Ye W X, et al. Detection of soybean allergen protein trace in food products by sandwich-antibody enzyme linked immunosorbent assay [J]. Food Research and Development, 2009, 30(5):105-109.)
 [7] Ogawa T, Bando N, Tsuji H, et al. Investigation of the IgE binding proteins in soybeans by immunoblotting with the sera of the soybean sensitive patients with atopic dermatitis[J]. Journal of Nutritional Science and Vitaminology, 1991, 37(6):555-565.
 [8] Kalinski A J, Melroy D L, Dwivedi R S, et al. A soybean vacuolar protein(P34) related to thiol proteases which is synthesized as a glycoprotein precursor during seed maturation[J]. Journal of Biological Chemistry, 1992, 267(17):12068-12076.
 [9] Kalinski A J, Weisemann J, Matthews B F, et al. Molecular cloning of a protein associated with soybean oil bodies which is homologous to thiol proteases of the papain family [J]. Journal of Biological Chemistry, 1990, 265(23):13843-13848.
 [10] Ogawa T, Tsuji H, Kitamura K, et al. Identification of the soybean allergenic protein, Gly m Bd 30 K, with the soybean seed 34-kDa oil-body-associated protein[J]. Bioscience, Biotechnology and Biochemistry, 1993, 57(6):1030-1033.
 [11] 郭玉兰, 刘志刚. 大豆主要过敏原 Glym Bd 30K 基因的克隆及其原核表达载体的构建[J]. 大豆科学, 2009, 28(1):11-15. (Wu Y L, Liu Z G. Cloning and prokaryotic expression vector construction of Gly m Bd 30K gene from soybean (*Glycine max*) [J]. Soybean Science, 2009, 28(1):11-15.)
 [12] 林苏霞, 王晓梅, 刘志刚, 等. 大豆主要过敏原 Glym Bd 30K 的抗原表位区基因的克隆表达、纯化及免疫原性鉴定[J]. 大豆科学, 2010, 29(2):186-190. (Lin S X, Wang X M, Liu Z G, et al. Cloning and expression of the antigenic epitope of Gly m Bd 30K protein from soybean and purification and identification of expressed product[J]. Soybean Science, 2010, 29(2):186-190.)
 [13] 游金明, 王自蕊, 谯仕彦, 等. 致仔猪过敏性大豆抗原蛋白 β conglycinin 单克隆抗体的制备与鉴定[J]. 中国畜牧杂志, 2008, 44(17):462-49. (You J M, Wang Z R, Qiao S Y, et al. Preparation and characterization of monoclonal antibodies against soybean β -conglycinin, a hypersensitive allergen to piglets[J]. Chinese Journal of Animal Science, 2008, 44(17):46-49.)
 [14] 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 Z G. Preparation and potential application of monoclonal antibodies against allergen ovomucoid [J]. Immunological Journal, 2011, 27(3):185-188.)
 [15] 陈嵘, 廖家, 林映萍, 等. 结节性痒疹患者血清中食物不耐受 sIgG、IgG 亚型和 TNF- α 水平测定[J]. 广东医学院学报, 2008, 26(6):597-598. (Chen R Y, Liao J, Lin Y P, et al. Serum levels of food intolerance-specific IgG, IgG subtypes and TNF- α in prurigo nodularis[J]. Journal of Guangdong Medical College, 2008, 26(6):597-598.)