

# 分泌抗黄曲霉毒素M1抗体的大鼠-小鼠淋巴细胞 杂交瘤细胞株的建立及其特性的研究

季永镛 林国妹 叶敏

(中国科学院上海细胞生物学研究所, 上海)

通过大鼠、小鼠对 AFM1-BSA 抗体应答的比较, 选用应答强的大鼠脾细胞作为亲本细胞, 与小鼠骨髓瘤P3X63-Ag8.653系细胞融合制作杂交瘤。经HAT培养液选择和RIA的筛选, 克隆化, 最终获得生长良好、稳定分泌抗AFM1抗体的5株大鼠-小鼠淋巴细胞杂交瘤细胞株。以ELISA、竞争结合的RIA进一步证明获得的5个单抗是针对AFM1, 并与其衍生物AFB1有明显的交叉反应。5个单抗亲和力的平衡常数 $K$ 为 $10^9-10^{11}$  1/M, 这表明这些单抗具有组建检测AF试剂盒的潜在实用价值。

**关键词** 黄曲霉毒素, 单克隆抗体

黄曲霉毒素(AF)较广泛地存在于受真菌污染的粮食和饲料中, 不仅对人畜有强烈的急性毒性, 而且具有明显的致癌作用, 尤其是肝癌<sup>[1-3]</sup>。历年来, 世界卫生组织、世界粮农组织等机构多次公布食品中AF的最高允许含量, 并逐次下降<sup>[4]</sup>。因此, 监测粮食和饲料中AF含量有重要意义。

80年代初, 建立了检测AF的放射免疫法(RIA)和酶联免疫法(ELISA)<sup>[5,6]</sup>。这两种方法在灵敏度、特异性和简便等都优于薄层层析和高压液相色谱检测法。但目前用于RIA和ELISA的抗AF抗体多为多克隆抗体, 其特异性和灵敏度等有所逊色。单克隆抗体的应用可以弥补多克隆抗体的不足<sup>[7]</sup>。为此, 建立了分泌抗黄曲霉毒素M1(AFM1)抗体的大鼠-小鼠淋巴细胞杂交瘤细胞株, 研究了它们分泌的抗体的特性, 为组建检测AF的试剂盒打下基础。

## 材 料 和 方 法

### (一) 动物及其免疫

1. 动物: 成年Wistar大鼠, 雄性, 体重约200g; 成年BALB/c小鼠, 雄性, 体重约20g。

2. 动物的免疫: 首次免疫是以半抗原AFM1与载体牛血清白蛋白(BSA)偶联的复合物——AFM1-BSA + Freund's佐剂, 足掌、皮下多点注射。以后每隔3周至1个月, 以AFM1-BSA + 不完全 Freund's佐剂追加免疫一次。在融合前3或4天腹腔注射AFM1-BSA加强免疫一次。免疫大鼠的AFM1-BSA的量每次为50  $\mu$ g/只; 免疫小鼠的量每次为20  $\mu$ g/只。

本文于1991年3月31日收到。

许河生同志参加<sup>125</sup>I标记AFM1-BSA的工作; 上海市粮食局科学研究所李丽芳和黎燕斌同志热忱帮助并提供样品, 特此致谢。

## (二) 抗AFM1抗体的检测

1. 免疫双向扩散<sup>[8]</sup>: 用1%琼脂糖板, 以AFM1-BSA和BSA为抗原, 检测AFM1-BSA免疫血清中的抗体。同时以BSA中和免疫血清中的抗BSA抗体(抗载体抗体), 再作同样的检测, 以验证抗血清中AFM1抗体的存在。

2. RIA: 引用的RIA方式系本实验室设计, 可特异地检测抗半抗原AFM1抗体<sup>[9]</sup>。以AFM1-BSA-<sup>125</sup>I为标记抗原, 通过10—15%新生小牛血清抑制抗BSA抗体与标记抗原的结合, 如此可以求得抗AFM1抗体与标记抗原的结合率(B/T), 以表示抗AFM1抗体的效价。

在进一步鉴定单抗抗AFM1特异性时, 待测样品与标记抗原混合前, 先与结合竞争物——非标记的半抗原AFM1或AFB1混和, 于37℃放置2h, 然后作RIA检测, 求得B/T值。

3. ELISA: 采用间接法<sup>[10]</sup>。以AFM1-BSA、BSA和卵白蛋白(OVA)分别作为抗原, 包被ELISA检测板。以与辣根过氧化物酶(HRP)偶联的兔抗大鼠IgG抗体为第二抗体。底物是3', 3, 5', 5'-四甲基联苯胺(TMB) + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub><sup>[11]</sup>。

## (三) 淋巴细胞杂交瘤的制作和克隆化

杂交瘤的亲本是AFM1-BSA高度免疫的Wistar大鼠的脾细胞和小鼠骨髓瘤P3X63-Ag8.653系细胞。按常规的聚乙二醇(PEG4000)方法进行细胞融合, 在HAT培养液中选择得到杂交瘤细胞。以RIA检测杂交瘤培养上清液中的抗AFM1抗体进行筛选, 并用有限稀释法对分泌抗AFM1抗体的杂交瘤细胞进行克隆化, 以得到分泌抗AFM1抗体的淋巴细胞杂交瘤的单克隆细胞株。

## (四) 抗AFM1单抗亲和力的测定<sup>[12]</sup>

以不同量的AFM1-BSA-<sup>125</sup>I与等量的杂交瘤培养上清液反应, 当反应平衡时, 可以测得游离的AFM1-BSA-<sup>125</sup>I和被上清液中抗体结合的AFM1-BSA-<sup>125</sup>I的比放射性。根据单位质量的AFM1-BSA-<sup>125</sup>I的比放射性, 可以换算得到游离抗原的克分子浓度(c)和结合抗原的克分子浓度(b)。以1/b为纵坐标, 1/c为横坐标作图(如图1)。根据图1可以求得平衡常数K。K值的大小表示了抗体亲和力的大小。

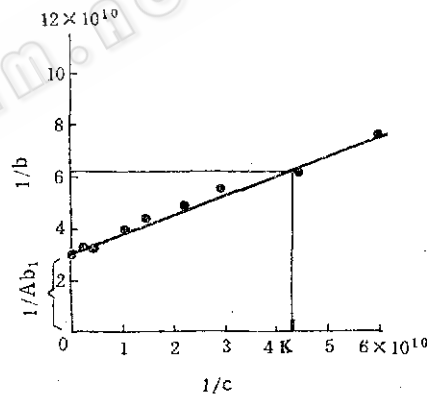


图1 抗体亲和力的测定

Fig.1 Determination of antibody affinity

## 结 果

### (一) 大鼠、小鼠对AFM1-BSA的抗体应答

图2是多次免疫的3\*、4\*、5\*大鼠血清与AFM1-BSA和BSA之间的免疫双向扩散, 左侧是未经BSA中和的大鼠血清, 它们与AFM1-BSA和BSA之间均有抗原-抗体复合物的沉淀线出现, 说明大鼠对AFM1-BSA发生了抗体应答; 右侧是以

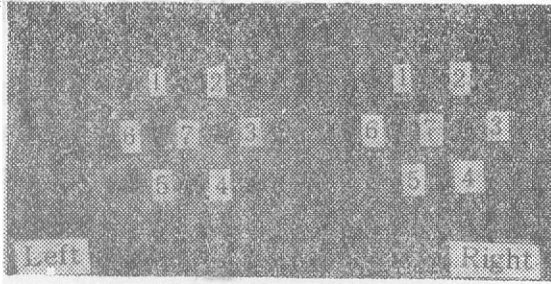


图2 免疫双扩散法测定AFM1 McAbs  
Fig.2 Detection of AFM1 McAbs by immuno-double diffusion  
2, 4, 6: BSA; 7: AFM1-BSA; 1:3\* rat serum; 3: 5\* rat serum 5: 4\* rat serum  
Left: unblocked sera; Right: BSA blocked sera

1mg/ml BSA中和的大鼠血清，其中4\*大鼠血清与AFM1-BSA之间出现了沉淀线，但与BSA之间无沉淀线出现，说明4\*大鼠已被诱发了较强的抗AFM1抗体应答。但是，BALB/c小鼠虽经多次免疫，用免疫双向扩散检测其血清抗体，均没有得到阳性结果。以RIA检测抗血清中的抗体，若以结合率约为对照组(背景)的3倍左右为阳性，大鼠血清的抗体效价为256000(表1)，小鼠的为5000(表2)。结果不仅说明在大鼠和小鼠中均诱发了抗AFM1的抗体，而且大鼠的应答远强于小鼠的应答。因此，选用了免疫大鼠脾细胞为制作杂交

表 1 免疫大鼠血清系列稀释样品抗AFM1滴度比较  
Table 1 Comparison of anti-AFM1 titers in serial dilution of serum from different immunized rats

No. of rats	Binding rate (%)									
	500*	1000	2000	4000	8000	16000	32000	64000	128000	256000
1	76.4	73.4	70.4	66.1	61.1	54.0	44.0	33.4	21.0	13.1
2	73.3	72.8	65.0	64.8	61.8	54.8	47.1	37.3	25.9	28.0
3	76.7	74.9	70.1	65.4	61.3	50.6	47.9	37.5	27.6	16.9
4	69.0	65.0	62.7	58.5	54.8	53.1	46.0	37.6	28.0	22.4
5	74.0	70.4	63.4	60.2	57.5	45.9	36.3	29.9	19.9	14.3
Control	4.9									

10% BSA in PBS

\* Reciprocal of antiserum dilution

表 2 放射免疫法测定以AFM1-BSA免疫小鼠血清的AFM1抗体

Table 2 Radioimmunoassay of antibodies against AFM1 in sera from mice immunized with aflatoxin M1-BSA

No. of mouse	Binding rate (%)			
	50*	500	5000	50000
1	32.2	24.7	22.5	16.5
2	32.9	27.2	22.0	13.3
3	29.1	24.5	17.8	9.4
4	30.1	24.8	19.9	13.1
5	37.8	24.1	18.2	18.3
Control	7.2			

\* Reciprocal of antiserum dilution

瘤的淋巴细胞亲本。

### (二) 分泌抗AFM1抗体的大鼠-小鼠淋巴细胞杂交瘤的制作及其克隆化

表3和表4是大鼠-小鼠杂交瘤制作和克隆化的实验数据。按Poisson分布原则：连续三次克隆中，克隆率均小于66%和抗体阳性率为100%者，即为单克隆细胞株。从最初选择的13个孔的杂交瘤培养物，经克隆化，最终获得了5个具有抗AFM1抗体分泌功能的细胞株，命名为1C6、1E6、2E4、3E2和4E1。其余的8个孔的培养物在克隆化过程中丧失了抗体的分泌功能。

### (三) 分泌抗AFM1抗体的大鼠-小鼠淋巴细胞杂交瘤株及其单抗的特性

1. 抗AFM1单抗的特性：筛选杂交瘤的RIA的研究业已表明能特异地检测抗AFM1抗体，但为了进一步证明所获得杂

表 3 小鼠骨髓瘤细胞和以AFM1-BSA免疫的大鼠脾细胞的融合

Table 3 Results of cell fusion between spleen cells from a rat immunized with AFM1-BSA and mouse myeloma cells (Line P3X63-Ag8.653)

Ratio of spleen cells to myeloma cells	Number of total wells	number of myeloma cells per well	Fusion rate(%)	Ab positive rate(%)
6:1	376	$2 \times 10^4$	29.8	24.1

表 4 分泌抗AFM1抗体的大鼠-小鼠杂交瘤株的克隆

Table 4 Cloning results of rat-mouse hybridomas secreting antibodies against aflatoxin M1

Clone	1st cloning		2nd cloning		3rd cloning		4th cloning	
	Cloning rate(%)	Ab positive rate(%)	Cloning rate(%)	Ab positive rate(%)	Cloning rate(%)	Ab positive rate(%)	Cloning rate(%)	Ab positive rate(%)
1B3	66.7	78.1	38.8	0				
4B1	100.0	0						
4B10	69.1	0						
1C6	51.2	100.0	46.4	100.0	42.3	100.0		
2C6	25.0	0						
2C7	25.5	0						
1D4	11.7	0						
4D4	56.3	0						
1E6	85.7	88.9	26.2	100.0	58.3	100.0	18.5	100.0
2E4	39.3	100.0	35.7	100.0	59.5	100.0		
3E2	100.0	100.0	39.3	100.0	43.5	100.0	43.5	100.0
4E1	24.4	100.0	34.5	100.0	31.0	100.0		
4F10	100.0							

交瘤株细胞分泌的抗体的特异性, 进一步鉴定以AFM1-BSA、BSA和OVA为抗原, 分别包被ELISA检测板来检测5个瘤

株的单抗。ELISA的结果(表5)表明5个单抗只与AFM1-BSA反应, 而与载体蛋白BSA以及无关蛋白OVA均无反应。这说明5个单抗都是针对AFM1的。同样, 以半抗原AFM1作为结合竞争物, 与AFM1-BSA- $^{125}\text{I}$ 作竞争结合试验, 结果(图3)表明AFM1有效地抑制5个单抗与AFM1-BSA- $^{125}\text{I}$ 的结合, 抑制程度与AFM1的量有关, 进一步证明了这些单抗的特异性。

2. 抗AFM1单抗与AFM1的衍生物AFB1的交叉反应: 以AFM1-BSA和AFB1-BSA作抗原的ELISA(表6)和以AFB1为结合竞争物的RIA(图3), 结果均表明5个单抗与AFB1呈阳性反应, 说明抗AFM1单抗与AFB1有交叉反应。

3. 抗AFM1单抗的效价和亲和力: 以AFM1-BSA- $^{125}\text{I}$ 为抗原, 测定5株

表 5 用ELISA鉴定抗AFM1的单克隆抗体的特性  
Table 5 Identification of the specificity of monoclonal antibodies against AFM1 by ELISA

Clone	OD <sub>450nm</sub>		
	AFM1-BSA*	BSA*	OVA*
1C6	1.965 (0.179)**	0.150 (0.008)	0.156 (0.009)
1E6	1.228 (0.086)	0.136 (0.006)	0.144 (0.010)
2E4	1.226 (0.069)	0.144 (0.007)	0.156 (0.007)
3E2	1.108 (0.071)	0.143 (0.010)	0.144 (0.008)
4E1	0.954 (0.151)	0.143 (0.005)	0.150 (0.009)
Control	0.177 (0.011)	0.155 (0.005)	0.162 (0.009)

\* Antigens coated on plate (0.5 $\mu\text{g}$ /well).

\*\*SD

表 6 抗AFM1的单克隆抗体与AFM1-BSA和AFB1-BSA反应的比较

Table 6 Comparison of the reactivity of AFM1 McAbs with AFM1-BSA and AFB1-BSA

Clones	OD <sub>450nm</sub>	
	AFM1-BSA	AFB1-BSA
1C6	1.549(0.026)*	1.510(0.128)
1E6	1.618(0.069)	1.424(0.339)
2E4	0.531(0.006)	0.529(0.016)
3E2	1.176(0.004)	1.193(0.005)
4E1	1.251(0.004)	1.146(0.074)
Control	0.218(0.019)	0.215(0.016)

\*SD

杂交瘤细胞株上清液中抗体效价(表7), 5个单抗的效价为4000—8000之间。用RIA测定单抗的亲合力(表8), 它们的反应平衡常数为 $10^9$ — $10^{11}$ l/M之间。

4. 杂交瘤株的生长及其稳定性: 从细胞增殖的生长曲线(图4)来看, 5个杂交瘤株细胞在传代后5—7天内均能持续地增殖。在完成克隆化后, 连续培养3个月, 细胞仍能稳定地分泌抗体(表9)。冻存3个月复苏后, 杂交瘤株细胞仍保持着抗体分泌功能(表10)。

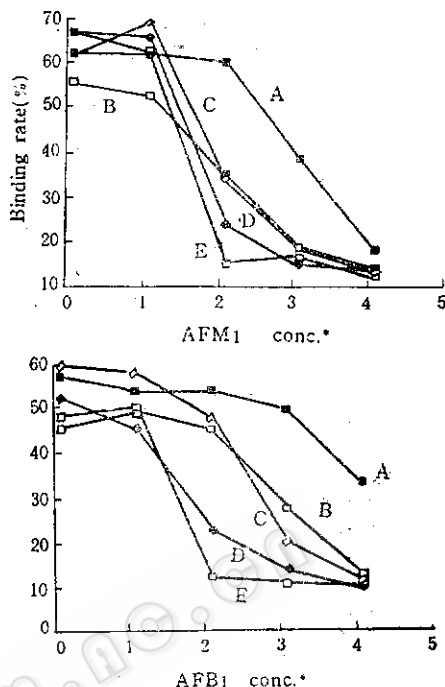


图3 竞争性结合法鉴定McAbs的特性

Fig.3 Competitive binding assay for identification of McAbs specificity

\* 0. 0ng/ml; 1. 1.5ng/ml; 2. 15ng/ml; 3. 150ng/ml; 4. 1500ng/ml  
A. 4E1; B. 2E4; C. 3E2; D. 1E6; E. 1C6

表 7 抗AFM1单克隆抗体的滴定度

Table 7 Titers of monoclonal antibodies against AFM1

Clones	Binding rate(%)**						
	5***	50	500	1000	2000	4000	8000
1C6	71.9 (2.4)*	71.2 (1.5)	64.9 (0.8)	54.8 (2.1)	42.9 (3.0)	34.5 (0.6)	30.1 (1.5)
1E6	66.9 (0.1)	58.3 (2.5)	51.6 (3.9)	43.8 (0.8)	38.4 (4.7)	30.5 (0.8)	25.3 (2.8)
2E4	62.2 (2.3)	59.3 (2.7)	54.1 (0.8)	48.5 (2.5)	43.8 (0.6)	34.9	31.7 (2.7)
3E2	68.5 (0.7)	67.0 (1.5)	56.6 (0.3)	51.4 (0.8)	43.7 (5.8)	34.9 (3.5)	29.6 (3.5)
4E1	74.7 (2.3)	66.7 (2.8)	55.8 (3.3)	43.5 (6.1)	33.3 (2.4)	27.7 (0.6)	23.0 (0.5)
Control	11.7 (0.4)						

\*SD

\*\*AFM1-BSA-<sup>125</sup>I used as Ag in RIA

\*\*\*Reciprocal of sample dilution

表 8 抗AFM1抗体McAbs的亲和力  
Table 8 Affinity of AFM1 McAbs

Clones	K(I/M)
1C6	$8.94 \times 10^9$
1E6	$1.07 \times 10^{11}$
2E4	$6.67 \times 10^{11}$
3E2	$5.45 \times 10^{10}$
4E1	$1.06 \times 10^{10}$

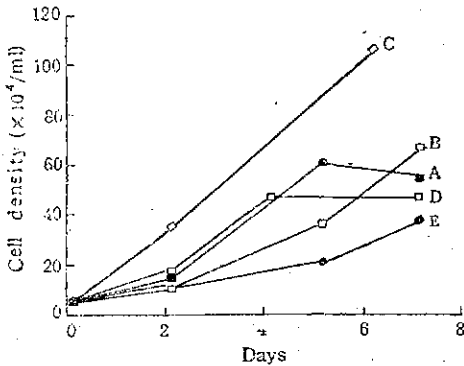


图 4 大鼠-小鼠杂交瘤细胞株的生长图谱  
Fig.4 Growth pattern of rat-mouse hybridomas

A. 4E1; B. 2E4; C. 3E2; D. 1E6; E. 1C6

表 9 大鼠-小鼠杂交瘤细胞克隆分泌功能的稳定性  
Table 9 Stability of the secreting function of rat-mouse hybridoma clones

Clones	Culture days of established clone	Binding rate*(%)
1C6	87	66.5(1.9)**
1E2	75	64.1(1.4)
2E4	87	58.7(0.8)
3E2	82	66.6(1.5)
4E1	87	61.2(0.1)
Control		14.6(1.1)

\* AFM1-BSA-<sup>125</sup>I used as antigen in RIA  
\*\*SD

表10 杂交瘤细胞培养物经冷藏后上清液中抗体的测定  
Table 10 Detection of AFM1 McAb in supernatant from hybridoma cultures after frozen storage

Clones	Binding rate* (%)
1C6	66.3(4.5)**
1E6	61.8(5.9)
2E4	76.3(1.0)
3E2	65.6(0.1)
4E1	73.0(12.0)
Control	11.0(1.4)

\* AFM1-BSA-<sup>125</sup>I used as antigen in RIA  
\*\*SD

## 讨 论

制作分泌特异抗体的淋巴细胞杂交瘤株，融合亲本淋巴细胞中含有特异抗体生成细胞的多寡与成功的机率有密切的关系。大鼠对 AFM1-BSA 的抗体应答远高于小鼠的应答(见表 1 和表 2)，故选用了大鼠作为淋巴细胞的供者。实验结果表明大鼠脾细胞为亲本的杂交瘤；抗体的阳性率高达24.1%(见表 3)。

大鼠-小鼠杂交瘤是一种异种杂交瘤，它的稳定性是个问题。从克隆化的结果看(见表 4)，克隆的成功率为5/13，抗体转阴大多发生在第一次克隆后。对已建立的杂交瘤株的观察，在长达 3 个月的体外连续扩增传代过程中，未见上清液中抗体效价下降(见表 9)；冻存 3 个月复苏后的杂交瘤细胞保持着抗体分泌功能(见表10)。此外，杂交瘤细胞能良好地在体外增殖(见图 4)。因此，可以认为建立的 5 株大鼠-小鼠淋巴细胞杂交瘤株是十分稳定的。

以半抗原-载体作为免疫原诱发的抗体可能有三大类，分别针对半抗原、载体和半抗原载体偶联时可能形成的新的抗原决定簇，因此有必要以不同的检测方法来证实建立的杂交瘤株细胞分泌抗体的特异性。从ELISA的结果(见表 6)和竞争结合的RIA的结果(见图 3)，均证实 5 个单抗都针对半抗原 AFM1，达到了预定的目的。同时，5 个单抗与AFM1的衍生物——AFB1有明显的交叉反应，这与前人的报道一致<sup>[13]</sup>。AFB1是黄曲霉菌产生毒素中的主要成份，单抗的这一特点有利于作AF的检测。

5 个杂交瘤株细胞培养上清液的抗体效价为4000—8000(见表 7)，它们亲和力和

平衡常数 $K$ 为 $10^8$ — $10^{11}l/M$ 。一般认为 $K$ 大于 $10^8l/M$ , 则该抗体有实用意义。

因此, 本文获得的单抗及其特性的研究, 为组建检测AF的试剂盒创造了条件。

### 参 考 文 献

- [1] Sargeant, K. et al.; *Nature*, 192:1096—1097, 1961.
- [2] Nesbitt, B. F. et al.; *Nature*, 195:1060—1063, 1962.
- [3] 汤钊猷主编, 原发性肝癌, 上海科技出版社, 1981.
- [4] 屠乃斌: 黄曲霉毒素, 轻工业出版社, 1980.
- [5] Pestka, J. J. et al.; *Applied and Environmental Microbiology*, 40:1027—1031, 1980.
- [6] Pestka, J. J. et al.; *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 64:294—301, 1981.
- [7] 孙宗棠等, 中华肿瘤杂志, 5:401—405, 1983.
- [8] Ouchterlong, O. and Nilsson, L. A.; In "Handbook of Experimental Immunology" Ed. weir, D. M., pp. 19.1—19.44, 1978.
- [9] 季永镛等: 中国免疫学杂志, 7:290—293, 1991.
- [10] 叶 敏和季永镛: 上海免疫学杂志, 1(3): 1—5, 1981.
- [11] 郭莉莉等: 中华微生物学和免疫学杂志, 6: 9—11, 1986.
- [12] Hudson, L. and Hay, F.; *Practical Immunology*, pp. 98—105, 1980.
- [13] Harder, W. O. and Chu, F. S.; *Experientia*, 35:1104—1107, 1979.

## Establishment of Rat-mouse Lymphocyte Hybridoma Clones Secreting Anti-aflatoxin M1 Antibodies and the Properties of the Secreted Antibodies

Ji Yongyong Lin Guomei Ye Ming

(Shanghai Institute of Cell Biology, Academia Sinica, Shanghai)

Through the comparison of antibody responses to AFM1-BSA between rats and mice, rat spleen cells were chosen as a partner to fuse with mouse myeloma cell line P3X63-Ag8.653 cells to construct hybridoma. The radioimmunoassay for the detection of specific anti-AFM1 antibodies designed in our lab was used to screen hybridoma cells. Five clones of hybridomas secreting anti-AFM1 antibodies were obtained, named as clone 1C6, 1E6, 2E4, 3E2 and 4E1. Their specificity against AFM1 was further characterized with other antibody assays different from that used in screening. The results showed that in addition to their specificity for AFM1 the five monoclonal antibodies all cross-reacted with AFB1 significantly. The equilibrium constant  $K$  of antibody affinity of the five clones was  $10^8$ — $10^{11}l/M$ . It indicated the potentiality of their application to produce aflatoxin immunodetection kit.

### Key words

Aflatoxin; monoclonal antibody