

文章编号: 1674-7054(2019)01-0089-05

β -葡萄糖苷酶抗体的制备及比较分析

余厚美 张振文

(中国热带农业科学院 热带作物品种资源研究所/国家薯类加工技术研发分中心/
农业部木薯种质资源保护与利用重点实验室 海南 儋州 571737)

摘要: β -葡萄糖苷酶是一种广泛存在于自然界的水解酶,其含量高低直接关系到水解产物的量。木薯含有大量的生氰糖苷,是 β -葡萄糖苷酶的底物之一,被水解后将产生有毒的氰化物,给食品安全带来隐患。为保障食品安全,给木薯及其制品的氰化物含量提供快速检测技术。本研究以A、B、C 3种来源的 β -葡萄糖苷酶为抗原免疫Balb/C小鼠,并制备单克隆抗体和做出初步评价。结果表明,A抗原免疫的小鼠融合后获得5株杂交瘤细胞株,效价均达到 10^5 以上,抗体亚型均为IgG1型,但单克隆抗体与B抗原、C抗原、KLH、BSA均无交叉反应。说明不同来源的 β -葡萄糖苷酶免疫小鼠得到的抗体均为特异性抗体。

关键词: β -葡萄糖苷酶; 抗体; 抗体制备

中图分类号: Q-331 **文献标志码:** A **DOI:** 10.15886/j.cnki.rdsxb.2019.01.015

β -葡萄糖苷酶(β -Glucosidase, EC3.2.1.21)是一种水解酶,也叫 β -D-葡萄糖苷水解酶、龙胆二糖酶^[1],能够水解结合于末端非还原性的 β -D-葡萄糖苷键,同时释放出 β -D-葡萄糖和相应的配基^[2]。相对分子质量一般在 $40 \times 10^3 \sim 250 \times 10^3$ 之间。1837年,LIEBIG和WOHLER首次在苦杏仁中发现 β -葡萄糖苷酶,其广泛存在于许多古细菌、细菌、真菌、酵母、曲霉、昆虫、动物和植物中^[3-5]。不同来源的 β -葡萄糖苷酶的相对分子质量差异较大,这是由其结构和组成的不同导致的。由于参与生物体的糖代谢, β -葡萄糖苷酶对维持生物体的正常生理功能有着重要作用^[2],已经在哺乳动物的疾病防治和人类的癌症治疗方面广泛开展了应用研究^[2,6];此外, β -葡萄糖苷酶还能将果、蔬、茶中的风味前体物质水解为具有浓郁天然风味的香气物质,协助纤维素酶降解纤维素等功能^[1-2,7-8]。在饲料工业、生物合成和生物燃料等领域, β -葡萄糖苷酶同样有巨大的应用价值^[4,9]。目前, β -葡萄糖苷酶的检测技术主要是酶活法,主要测试方法有分光光度法、荧光法、电化法和比色法^[8]和以京尼平苷为底物检测酶活的一种新方法^[10]。分光光度法容易受到干扰,灵敏度低;荧光法灵敏度高,但是操作复杂,重复性差^[11]。比色法虽然灵敏度不如以京尼平苷为底物的方法高,但是总体来说,简单、快速、重复性好^[8,11]。酶联免疫法(ELISA)是免疫学领域应用最广泛的技术之一,是将免疫学技术与现代测试手段相结合而建立的一种超微量检测技术。ELISA的优点是检测成本低、可大批量检测、专一性强、灵敏度高、安全性好,可进行定性或者定量检测,不需要昂贵的仪器,操作简单,容易推广普及,尤其适合样本量大、检测种类多的现场和基层检测^[12-14]。免疫学分析技术主要利用抗原抗体的特异性结合,已广泛应用于生命科学的各个研究领域。近年来免疫学分析技术以其抗原抗体反应的高度专一性和特异性,在人类临床诊断、食品安全等领域广泛应用^[15]。

1 材料与方法

1.1 实验材料 以 β -葡萄糖苷酶为抗原,该抗原分别购自北京索莱宝公司、上海源叶生物公司、上海麦克

收稿日期: 2018-08-22

修回日期: 2018-10-10

基金项目: 海南省重点研发专项对外合作项目(ZDYF2017157)和现代农业产业技术体系(CARS-12)专项资金
共同资助

作者简介: 余厚美(1984-),女,硕士,助理研究员,研究方向: 抗体制备与快速检测方法的研究, E-mail: yuhoumei@sina.com

通信作者: 张振文(1975-),男,博士,副研究员,研究方向: 采后处理与加工利用, E-mail: scuta96@163.com

林公司(表1); DMEM 不完全培养基购自北京索莱宝公司; HAT、HT、DMSO、小鼠抗体亚型鉴定试剂盒、钥孔血蓝蛋白(keyhole limpet hemocyanin, KLH)、牛血清白蛋白(Bovine Serum Albumin, BSA)为 Sigma 公司产品; QuickAntibody-mouse 5w 佐剂、clone easy 培养基购自北京博奥龙免疫技术有限公司; 弗氏佐剂、HRP-羊抗鼠、PEG 融合剂、TMB 底物液、封闭液和抗体稀释液购自海南亿康生物科技有限公司; 胎牛血清、小牛血清购自兰州民海生物公司; Tween-20、磷酸二氢钠、磷酸氢二钠、氯化钠、碳酸氢钠、碳酸钠、氯化钾和甘油等化学试剂购自国药集团化学试剂有限公司; Bahl/C 小鼠购自汕头大学医学中心; SP2/0 保存于中国热带农业科学院热带作物品种资源研究所国家薯类加工技术研发分中心实验室。

表1 不同厂家的抗原信息

Tab. 1 Antigen information from different manufacturers

抗原编号 Code	抗原名称 Antigen	生产单位 Manufacturer	抗原来源 Source	货号及规格 Spec
A	β -葡萄糖苷酶 β -glucosidase	北京索莱宝 Beijing Solarbio	杏仁 Almond	G8830-400mg
B	β -葡萄糖苷酶 β -glucosidase	上海源叶生物 Shanghai Yunyue	杏仁 Almond	S10047-400U
C	β -葡萄糖苷酶 β -glucosidase	上海麦克林 Shanghai Macklin	杏仁 Almond	G824159-50mg

1.2 动物免疫 将不同厂商生产的 β -葡萄糖苷酶分别编号为 A、B、C, 按每鼠 50 μ g 的剂量与 QuickAntibody-mouse 5w 佐剂等剂量混匀, 后腿肌肉注射免疫 4 只小鼠, 第 21 天按同样方式再免疫 1 次, 第 35 天断尾采血, 全血 37 $^{\circ}$ C 放置 2 h 后 4 $^{\circ}$ C 放置 12 h, 4 $^{\circ}$ C 10 000 $r \cdot \min^{-1}$ 离心 15 min, 收集血清, 每只小鼠血清都用 A、B、C 3 种蛋白作为包被原, ELISA 间接法检测血清效价。

1.3 单克隆抗体的制备 取 50 g 免疫原用生理盐水定容到 500 μ L, 腹腔冲击免疫抗体效价高的小鼠, 冲击免疫后 72 h 左右摘眼球取全血分离血清保存, 备用。将小鼠在体积分数为 75% 的酒精中浸泡 10 min, 无菌条件下取出小鼠脾脏并分离脾细胞, 与 SP2/0 细胞在 PEG 作用下融合, HAT 筛选培养, 培养 7~10 d, 以免疫原为包被原, 用上述间接 ELISA 检测细胞上清, 阳性细胞用有限稀释法克隆直至阳性单克隆率为 100%, 小鼠体内诱生腹水法制备抗体, 将阳性杂交瘤细胞于液氮中长期保存^[13]。

1.4 腹水纯化 参考欧文军等方法^[15]并加以改进, 将新采集的腹水于 4 $^{\circ}$ C、10 000 $r \cdot \min^{-1}$ 离心 15 min, 去沉淀, 用 0.05 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、pH 7.0 的 PBS 5 倍稀释, 在冰浴条件下等体积逐滴加入饱和硫酸铵溶液, 冰浴搅拌 30 min 后 4 $^{\circ}$ C 静置 12 h, 4 $^{\circ}$ C、10 000 $r \cdot \min^{-1}$ 离心 15 min, 弃上清, 沉淀用与腹水等体积的 0.02 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、pH 7.2 的 PBS 溶解, 冰浴条件下再逐滴加入总 PBS 体积半量的饱和硫酸铵溶液使之达到 33% 饱和度, 连续搅拌 30 min 后 4 $^{\circ}$ C、10 000 $r \cdot \min^{-1}$ 离心 15 min, 弃上清, 沉淀用 0.02 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、pH 7.2 的 PBS 透析 72 h 后分装, -20 $^{\circ}$ C 冻存。每个抗体纯化前后各取 10 μ L, 用 SDS-PAGE 对抗体进行电泳, 考马斯亮蓝染色检测纯化效果。

1.5 抗体效价和特异性检测 采用棋盘法测定抗体效价, 即抗原用 pH 9.6 0.05 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的碳酸盐缓冲液稀释, 按照 100 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、200 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、500 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、1 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、2 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、5 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的浓度梯度包被于酶标板, 每孔 100 μ L, 37 $^{\circ}$ C 包被 2 h, PBST 洗涤 1 次, 每孔用 120 μ L 含 5% 小牛血清的 PBST, 37 $^{\circ}$ C 封闭 1.5 h, 每孔加 100 μ L 梯度稀释的抗体, 37 $^{\circ}$ C 反应 30 min, PBST 洗涤 4~5 次, 每孔加 100 μ L 酶标羊抗鼠二抗, 37 $^{\circ}$ C 反应 30 min, PBST 洗涤 4~5 次, TMB 底物液 37 $^{\circ}$ C 显色反应 15 min, 0.5 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ H_2SO_4 终止反应后, 酶标仪 450 nm 波长处检测每孔的吸光度值。选择阳性孔 OD 值大于阴性 OD 值的 2.1 倍的抗体最高稀释倍数为抗体的效价。然后分别在酶标板上包被 1 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ A β -葡萄糖苷酶、B β -葡萄糖苷酶、C β -葡萄糖苷酶、KLH、BSA, 采用 ELISA 方法检测抗体的特异性。

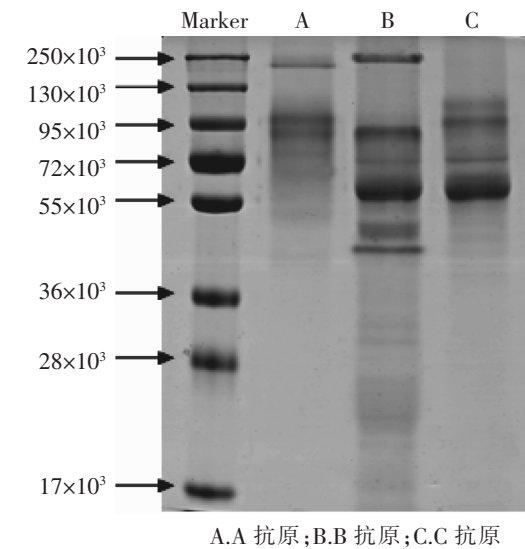
1.6 抗体亚型鉴定 用小鼠抗体亚型鉴定试剂盒检测单抗的亚型。

1.7 电泳鉴定 3 种 β -葡萄糖苷酶抗原 分别取 20 μg ABC 3 种抗原, 用 SDS-PAGE 对抗原进行电泳, 考马斯亮蓝染色。

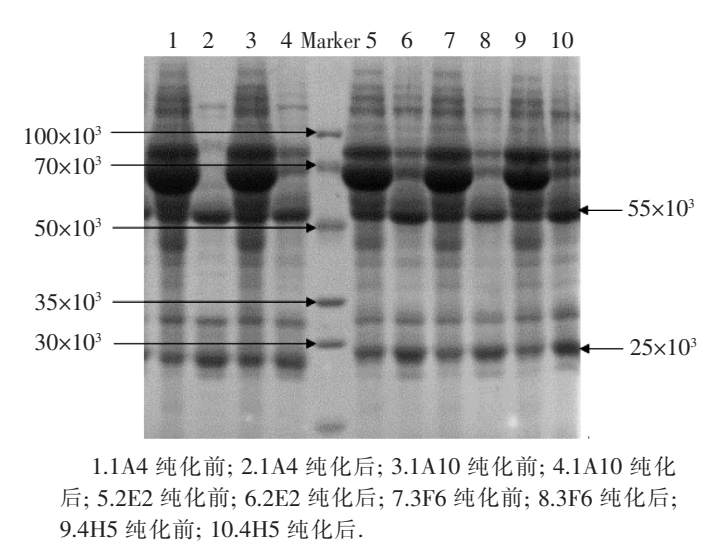
2 结果与分析

2.1 抗原 SDS-PAGE 鉴定 抗原相对分子质量大小对免疫结果至关重要。本研究将 3 种抗原进行 SDS-PAGE 电泳鉴定, 结果见图 1。由图 1 可见, 3 种抗原电泳条带差异明显。A、B 抗原在 250×10^3 附近有条带

出现,但是出现位置不同,C 抗原在该区域没有条带出现;3 个抗原在 95×10^3 附近都有条带出现,但是出现位置几乎不重复,B 抗原在 95×10^3 附近只有 1 条带,A、C 抗原均有 2 条带;B、C 抗原在 $55 \times 10^3 \sim 72 \times 10^3$ 间有 1 个比较粗的蛋白条带出现。在所有蛋白里面,B 抗原条带最多。



A.A 抗原;B.B 抗原;C.C 抗原
图 1 抗原 SDS-PAGE 的鉴定
Fig.1 Identification of Antigen by SDS-PAGE



1.1A4 纯化前; 2.1A4 纯化后; 3.1A10 纯化前; 4.1A10 纯化后; 5.2E2 纯化前; 6.2E2 纯化后; 7.3F6 纯化前; 8.3F6 纯化后; 9.4H5 纯化前; 10.4H5 纯化后.
图 2 SDS-PAGE 检测抗体纯化情况
Fig. 2 Detection of antibody purified using SDS-PAGE

表 2 小鼠血清效价检测
Tab. 2 Serum titer of mice

小鼠编号 Mouse code	包被原 A Coating antigen A	包被原 B Coating antigen B	包被原 C Coating antigen C
1#	2.0×10^4	—	—
2#	3.0×10^4	—	—
3#	1.0×10^4	—	—
4#	1.5×10^4	—	—
5#	—	2.6×10^6	—
6#	—	5.1×10^5	—
7#	—	5.4×10^6	—
8#	—	1.5×10^5	—
9#	—	—	3.0×10^5
10#	—	—	1.5×10^6
11#	—	—	2.0×10^6
12#	—	—	4.5×10^6

2.2 小鼠血清效价检测 用免疫前的小鼠血清作为阴性对照,抗原包被 $5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$,12 只小鼠血清分别梯度稀释,得到的血清效价见表 2。A 免疫原免疫的小鼠只对 A 抗原显色,对 B、C 抗原不显色,B 和 C 免疫的小鼠也出现和 A 抗原免疫的小鼠一样的情况,即只对本身免疫原显色,对其余抗原均不显色。挑选 A 抗原效价高的 2#小鼠进行细胞融合。

2.3 抗体纯化前后效价测定和 SDS-PAGE 对比 融合共铺板 8 块 96 孔板,融合细胞孔阳性率为 1%,融合后的杂交瘤细胞经过 3 次的有限稀释克隆,得到 5 株阳性单克隆细胞。5 株阳性单克隆细胞体外诱导法制备的腹水的效价均达到 10^5 及以上,结果见表 3。纯化前后进行 SDS-PAGE 分析,结果见图 2,纯化后的抗体条带主要集中在 25×10^3 和 55×10^3 附近,纯化后杂质明显少于纯化前,效价有所下降,但是变化不大,说明抗体纯化保留了抗体的有效成分,成功去除了杂质,达到了纯化的目的。

2.4 抗体纯化后亚型测定和特异性测定 将所有纯化的抗体加入事先包被好的 β -葡萄糖苷酶 A 抗原、B 抗原、C 抗原、KLH、BSA 板孔检测抗体的特异性,结果(表 4)表明,所有抗体均与 B 抗原、C 抗原、

KLH、BSA 无交叉反应,说明抗体均为 A 抗原特异性抗体。通过抗原抗体特异性结合把抗体固定在酶标板上,加亚型抗体测定的单克隆抗体亚型均为 IgG₁ 型。

表 3 腹水纯化前后效价检测

Tab. 3 Ascites titer before and after purified

细胞株编号 Cell line code	纯化前 Before purified	纯化后 After purified
1A4	8.0×10^6	5.0×10^6
1A10	1.5×10^6	1.0×10^6
2E2	1.8×10^6	1.3×10^6
3F6	2.0×10^6	1.5×10^6
4H5	1.5×10^6	8.0×10^5

表 4 纯化后抗体特异性和抗体亚型测定

Tab. 4 Ascites titer and subtypes testing after purified

细胞株编号 Cell line code	A 抗原 Antigen A	B 抗原 Antigen B	C 抗原 Antigen C	KLH	BSA	抗体亚型 Subtype
1A4	5.0×10^6	—	—	—	—	IgG1
1A10	1.0×10^6	—	—	—	—	IgG1
2E2	1.3×10^6	—	—	—	—	IgG1
3F6	1.5×10^6	—	—	—	—	IgG1
4H5	8.0×10^5	—	—	—	—	IgG1

3 讨 论

抗原抗体反应是免疫应答的基础^[16],抗体是免疫分析技术的核心试剂^[18]。机体产生抗体的强度,受到动物物种、年龄、体质状况、免疫部位、抗原结构、抗原性质、抗原剂量、佐剂、免疫途径、间隔时间等因素的影响^[18]。本研究使用的小鼠年龄、注射方式、注射剂量、免疫部位等完全一样的情况下,所用的 3 个 β -葡萄糖苷酶均标注来自于杏仁,分别免疫后的抗体只对相应原免疫原显色,对其不同来源免疫源都不显色。即 A 免疫的小鼠所得血清,只对 A 抗原显色,对 B、C 抗原均不显色;B 免疫原和 C 免疫原免疫动物检测结果 A 相同,都只对免疫原显色,对其余抗原均不显色。首先验证是不是抗原活性原因引起的差异,所以要求厂商分别做质控,但是反馈质控活性正常;又分别购买同一生产厂商其他货号的产品,检测所得的结果和免疫原相似,即同一厂商的不同货号 and 批次的蛋白均对从该厂商采购的 β -葡萄糖苷酶为免疫原免疫的鼠产生的抗体显色,对其余抗体不显色,即 A 免疫的小鼠所得血清,只对 A 厂商来源的抗原显色,对 B、C 抗原均不显色,只是不同批次和货号间效价有差异;B 和 C 免疫后也得到相同的结果。本研究中 3 个不同来源抗原经电泳分析表明其相对分子质量差别较大,A 和 B、C 抗原条带几乎没有重叠,所以产生的抗体间无交叉反应,B、C 抗原在 $55 \times 10^3 \sim 72 \times 10^3$ 间有 2 个相似的条带,但是 B、C 抗原免疫动物后,抗体检测结果表明抗原间仍然没有交叉反应。可见,不同来源的抗原均产生了特异性抗体。 β -葡萄糖苷酶免疫小鼠产生抗体差异如此大,可能是跟 β -葡萄糖苷酶的蛋白结构差异有关,因为不同来源(即使是同一菌属的不同菌株或者同一植物组织)的 β -葡萄糖苷酶的相对分子质量差异 $40 \times 10^3 \sim 250 \times 10^3$ 的范围^[2],而且有单亚基、多亚基的区别,其结构差异就有可能大相径庭^[19]。

不同的结构有不同的空间构象,抗体的产生是抗原刺激机体产生的免疫反应,不同构象的抗原免疫,肯定得到不同的抗体,这也是不同厂商来源的 β -葡萄糖苷酶差异巨大的原因之一。此外,有研究表明,不同来源(化学合成、不同克隆表达产物、自然感染表达等)的同一生物分子的抗原存在差异,抗原中单个氨基酸替代突变所致抗原性的序贯漂移和抗原不稳定等因素都对抗原抗体的结合产生很大的影响^[20]。甚至在仅有一个氨基酸差异或仅为几个小分子 DNP 的情况下,也会出现与抗体结合的情况,使之能逃避宿主的免疫应答,抗体效价相差巨大的情况出现^[16-21]。为此,避免因抗原来源不同导致产生特异性抗体,开展同一来源的抗体制备是解决出现特异性抗体的关键,也是今后研究的重点。

参考文献:

- [1] 王昊宇. β -葡萄糖苷酶的研究及应用[J]. 中国高新区, 2018(14): 215.

- [2] 潘利华, 罗建平. β -葡萄糖苷酶的研究及应用进展[J]. 食品科学 2006(12): 803-807.
- [3] 何旭, 李建冲, 李婷婷, 等. 低浓度尿素提高橡胶籽 β -葡萄糖苷酶活性和稳定性的影响[J]. 海南大学学报(自然科学版) 2018, 36(3): 248-254.
- [4] 曹慧方, 李新新, 张玥琦, 等. 来源于脂环酸芽孢杆菌的 GH1 家族 β -葡萄糖苷酶的葡萄糖耐受性分子改造[J]. 中国农业科技导报 2018, 20(5): 26-33.
- [5] ERWIN STRAHSBURGER, ANA MARIA LOPEZ DE LACEY, LLARIA MAROTTI, et al. In vivo assay to identify bacteria with β -glucosidase activity[J]. Electronic Journal of Biotechnology, 2017, 30: 83-87.
- [6] 连彦军, 陈道达, 郑勇斌, 等. 抗 CEA 单抗- β -葡萄糖苷酶偶联物的制备及体外激活苦杏仁甙靶向杀伤 LoVo 细胞的实验研究[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志 2004(4): 239-243.
- [7] 周俊, 夏秀东, 李亚辉, 等. 产 β -D-葡萄糖苷酶乳酸菌的筛选、鉴定及系统发育分析[J]. 食品工业科技 2018, 39(12): 119-123, 131.
- [8] 李华, 高丽. β -葡萄糖苷酶活性测定方法的研究进展[J]. 食品与生物技术学报 2007(2): 107-114.
- [9] 韦策. β -葡萄糖苷酶的固定化及应用研究[D]. 南京: 南京林业大学 2012.
- [10] 梁华正, 刘富梁, 彭玲西, 等. 京尼平苷为底物测定 β -葡萄糖苷酶活力的方法[J]. 食品科学 2006(4): 182-185.
- [11] 陈守文, 陈九武, 赵山. 利用黑曲霉 β -葡萄糖苷酶改善葡萄酒的风味[J]. 中国酿造 1999(3): 17-19.
- [12] 李晓婷, 王纪华, 朱大洲, 等. 果蔬农药残留快速检测方法研究进展[J]. 农业工程学报 2011, 27(S2): 363-370.
- [13] 余厚美. 饲料中硝基咪唑类药物检测的胶体金试纸条研制[D]. 北京: 北京农学院 2015.
- [14] 杨利国, 胡少昶, 魏平华, 等. 酶免疫测定技术[M]. 南京: 南京大学出版社, 1998: 132, 143-157.
- [15] 欧文军, 余厚美, 安飞飞, 等. 木薯钙调蛋白的原核表达及其单克隆抗体的制备[J]. 西北农业学报 2017, 26(9): 1317-1323.
- [16] 宋世军, 张旋. 小分子抗原免疫途径和结合数量对抗体效价的影响[J]. 国际检验医学杂志 2011, 32(10): 1069-1070+1072.
- [17] 张奇. 倍硫磷和速灭威半抗原分子设计及其免疫效果研究[D]. 南京: 南京农业大学 2007.
- [18] 田浩泉. 更换抗原注射途径对抗体产生的影响[J]. 青岛医学院学报 1959(1): 3-6.
- [19] 袁晓华. β -葡萄糖苷酶产生菌的筛选、培养条件优化及 β -葡萄糖苷酶应用研究[D]. 济南: 山东大学 2009.
- [20] 李时君, 张春燕, 李佩珊, 等. G145R rHBsAg 抗原衰减对抗体亲和层析的影响[J]. 生物技术 2008(5): 51-54.
- [21] 朱云娟. 缺乏 12 氨基酸重复序列的恶性疟原虫裂殖子表面蛋白 MSP2 FC27 型抗原对抗体识别的差异[J]. 国外医学(寄生虫病分册) 1997(3): 122-123.

Preparation and Comparative Analysis of β -glucosidase Antibodies

YU Houmei, ZHANG Zhenwen

(Tropical Crops Genetic Resources Institute, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences/National R&D Centre for Potato Processing/ Ministry of Agriculture and Rural Affairs Key Laboratory for Conservation and Utilization of Cassava Germplasm Resources, Danzhou, Hainan 571737)

Abstract: β -glucosidase is a hydrolase which exists widely in nature, and its content is directly related to the amount of hydrolysate. Cassava contains a large number of cyanogenic glycosides which are one of the substrates of β -glucosidase and will produce a poisonous substance, cyanide after hydrolyzed by β -glucosidase, bringing hidden dangers to the food safety. For food safety, an attempt was made to provide a rapid detection technique for cyanide content of cassava and its products. The Balb/C mice were immunized with β -glucosidase from A, B and C sources as antigens, and their monoclonal antibodies were prepared and evaluated. The results showed that the antibodies obtained from the mice immunized with the three sources (A, B and C) of β -glucosidase did not cross-react with each other. Five hybridoma cell lines were obtained from the spleen of the mice immunized with Antigen A, and the titer of antibodies was above 10^5 . All the subtypes were IgG1, but all the monoclonal antibodies had no cross-reaction with the Antigens B and C, KLH and BSA. It was concluded that the antibodies obtained from the mice immunized with different sources of β -glucosidase were specific.

Keywords: β -glucosidase; antibody; antibody preparation

(责任编辑: 叶 静)