

单克隆抗体在食品科学中的应用及其前景

王正祥

诸葛健

(扬州医学院微生物学与免疫教研室)

(无锡轻工业学院发酵工程系)

抗原抗体相互间特异结合为我们提供了一系列十分敏感且专一的免疫学分析方法。随着免疫学的迅速发展和单克隆抗体(Mab)的普及应用以及免疫学技术与其它先进技术的有机结合。现在,若干科学领域的科学工作者已逐渐将这类方法作为一极有价值的分析和研究工具用于各自的科学研究和生产实践中。免疫学方法起源于医学界,目前仍主要用于医学界,但其使用现已渗透到若干其它学科中,其中包括食品科学中的若干领域。

本文在简介免疫学中的基本概念和原理及常用的免疫学分析方法之后,侧重介绍Mab在食品科学中的应用及其前景。

1 免疫学中的基本概念及原理

免疫学中首先出现的两个基本概念便是抗原(Ag)和抗体(ab)。抗原是一能够刺激机体的免疫系统发生免疫应答,产生抗体或致敏淋巴细胞,并能在体内或体外与相应的抗体或致敏淋巴细胞发生特异性结合的物质。由此得出抗原具有二重性质:一是刺激机体的免疫系统使之发生免疫应答的免疫原性;二是在体内或体外与相应的免疫应答产物发生特异性结合的反应性。作为抗原物质应具备的特点是异物性、高分子量和分子结构的复杂性。因此,在食品中所研究的若干大分子(包括蛋白质、酶、多糖、核酸等)都是良好的抗原,因而一些小分子物质(如激素、真菌毒素)可以通过与大分子的载体(如牛血清白蛋白,BSA)相结合成完全抗原。如此,食品科学中遇到的几乎一切物质都可直接或间接地作为抗原。抗体则是抗原引起的免疫应答的产物之一,可与引发的抗原发生特异性结合。它是一类糖蛋白,人血清中的抗体有IgG₁₋₄,IgM,IgD,IgE和IgA,在应用于免疫分析方法中的Mab主要为IgG和IgM。抗体单体由两条相同的重链和相同的轻链排列成对称的“Y”形分子。IgG为单体结构,IgM簇则是由5个单体组成的聚合体。

决定抗原分子与相应抗体发生反应之特异性为抗原分子表面具有特殊立体构象的有免疫活性的化学基团——抗原决定基(或决定簇)。一个抗原分子可以有若干不同的抗原决定簇——包括顺序决定簇和空间决定簇。因此在制备抗体时,如用常规方法制备免疫血清(抗体),则这种血清实际是针对多种抗原决定簇的不同的抗体混合物;而用杂交瘤技术获得的Mab是仅针对于抗原分子上的某一特定的抗原决定簇,因而具有较好的均一性和较高的专一性。

抗原抗体特异性结合后发生肉眼可见的凝集成沉淀反应是若干免疫学技术的基础。当抗

体在一定的电解质、pH和温度等条件下与相应的适量抗原(至少带有两个相同的抗原决定簇结合时可形成大而密的网络状复合物。一抗体分子单体识别两个抗原分子上的抗原决定簇各一个,余下的抗原决定簇可与另一抗体上的抗原识别位点起反应,后者又可以另一识别位点与另一抗原的决定簇结合。如果抗原为颗粒性的(如细胞),则抗原抗体之间特异性结合反应以凝集形式表现出来;如果抗原为可溶性的(如蛋白质),则以沉淀表现出来。如果抗原分子上仅有一个与抗体相对应的抗原决定簇,则仅能发生由一个抗体单体与两个抗原分子结合形成可溶性复合物。遇到这种情况,我们可以对抗原或抗体进行加工,如将抗体结合到绵羊红细胞(SRBC)或胶乳颗粒上。

1.1 单克隆抗体的优点

单克隆抗体较之常规血清具有以下优点:

上面已经提到 Mab 仅针对抗原分子表面的单个抗原决定簇,因此其以全或无的方式与抗原决定簇反应;而用常规方法制备的免疫血清是针对多个抗原决定簇的,因此测定抗原分子上的微细差异仅能依靠 Mab。

可以无限量的获得理化特性和免疫生物学特性明确的匀质 Mab,便于研究方法和结果的统一和标准化。

可更好地适用于以抗原抗体识别为基础的免疫学技术之其它分析技术,这些方法包括免疫荧光试验,酶联免疫吸附试验等;而用常规血清则不易或无法达到这一点。

相对投资等费用较低,并可根据不同用途制备不同的 Mab。如用于一般分析检测,则可选择出亲和力强的 Mab;如用在纯化抗原的亲合色谱中,则制成中等强度亲和力的 Mab。

2 方法

2.1 Mab 的制备

Mab 制备的原理和方法基本与 Kohler 和 Milstein^[1]方法相同。首先将抗原免疫小鼠(通常为 BALB/c 纯系小鼠),取其脾细胞(B细胞)与粘液瘤细胞(通常为 sp2/0)在 PEG 存在下进行融合,然后选择出能够连续分泌抗体的杂交瘤细胞,将这一细胞注入小鼠腹腔中,便可从小鼠腹水制备大量理化及免疫学性质完全一致的 Mab。这种杂交瘤细胞可在液氮中长期保存。

2.2 酶联免疫吸附试验(ELISA)和放射免疫试验(RIA)

在 ELISA 和 RIA 中,标记上酶或放射性同位素的 Mab 用于检测相应的抗原,同样,亦可将酶或放射性同位素标记抗原。除了标记物的天然性质外,两种方法的原理十分相似。当然就这种方法而言又有若干种,而且新的方法又在不断涌现。这里仅介绍最为常用的 ELISA 技术。最为常用的 ELISA 技术之一是双抗夹心技术。首先将 Mab 吸附于固相表面如聚苯乙烯板的孔内壁;洗涤后加入待检样本(抗原),洗涤,加入酶标 Mab;洗涤,加入酶催化底物。根据光密度判断结果,光密度值与样品中抗原的量成正比(图 1)。

值得一提的是由 Guesdon 等^[2]于 1979 年介绍的生物素亲和素系统——酶联免疫吸附试验。此方法具有比 ELISA 更为迅速和敏感之特点。在此方法中, Mab 不直接用酶标记,取而代之的是 Mab 和酶用低分子量的生物素标记。从鸡蛋白来的亲和素和由 *Streptomyces avidinii* 分泌的链亲和素都具有四个结合生物素的结合部位。因此可将亲和素或链亲和素作

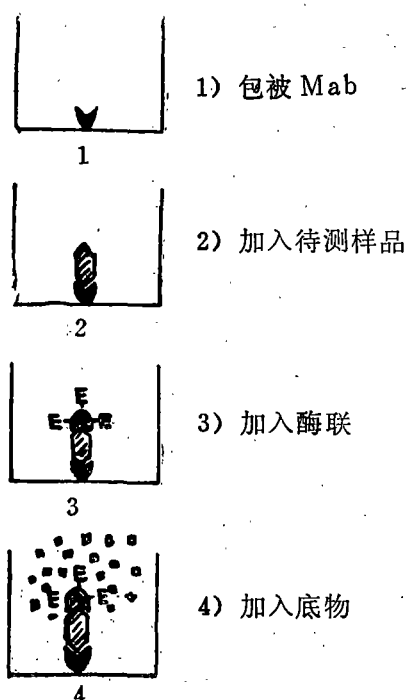


图1 ELISA操作程序

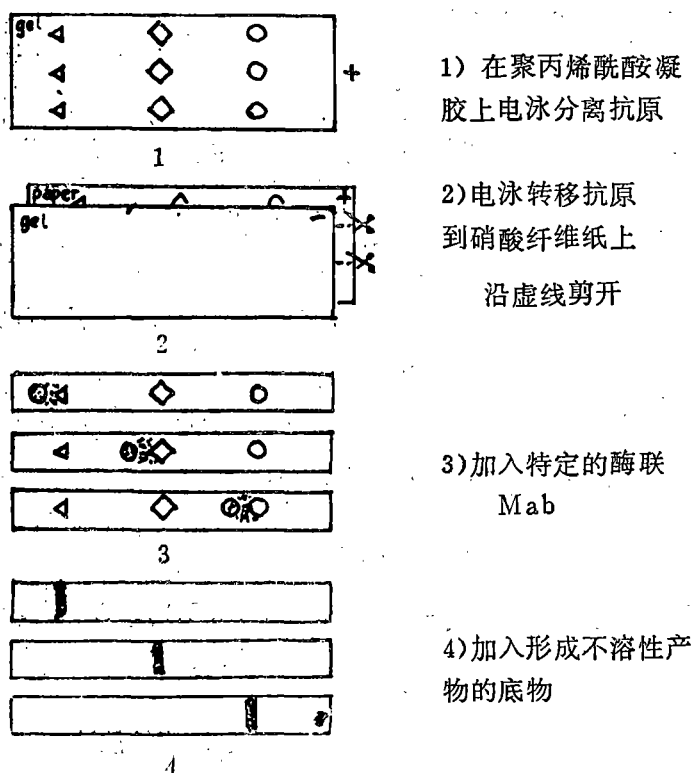


图2 免疫吸印方法操作程序

为生物素标记的 Mab 和 酶之间的桥梁。由于可将若干生物素分子粘接到每一抗体和酶分子上, 因此可获得标记酶对 Mab 分子的高比值率。有时根据用亲和素还是链亲和素作为桥分子而将此方法分别称为 BRAB-ELISA^[2] 和 EBStraLISA^[3]。此方法的实际操作过程与 ELISA 相似, 其操作顺序是包被未标记 Mab→抗原样本→生物素标记 Mab→亲和素、链亲和素→生物素标记的酶→底物。

2.3 免疫荧光技术(IF)

在免疫荧光技术中, 抗原通过标记有荧光分子如 FITC 和 Mab 来定位。在食品的组化研究和抗原物质分布研究中很重要。首先将抗原固定于组织中, 然后加入标记 Mab 让其与固定化抗原反应。多余的抗体用洗涤去除。最后在荧光显微镜下通过抗体分子上荧光素的激发来观察抗原的存在、分布及排列等情况。值得注意的是酶标 Mab 及胶体金标记 Mab 也已广泛用于定位固定于组织中的抗原。

2.4 免疫吸印技术

免疫吸印技术^[4]为蛋白质混合物的电泳分离与由 ELISA, RIA 和免疫荧光技术衍生的方法进行抗原鉴定的结合(图 2)。首先将非标记蛋白质异质混合物通过聚丙烯酰胺凝胶电泳分离, 然后用一横向的电场将凝胶上已分离的蛋白质吸印到一张能牢牢结合蛋白质的硝基纤维素膜上, 用酶标 Mab 探测膜上抗原, 洗涤后加入底物, 或者先加上未标记 Mab, 然后加入标记酶的抗 Mab 的抗体, 再加底物。这里标记抗体亦可用荧光素标记的或放射性同位素标记的 Mab。

2.5 免疫沉淀技术

免疫沉淀技术^[5]最初用于从总核糖体制备物分离合成特定蛋白质的核糖体。各种不同的方法都是基于仍结合于核糖体上初生肽相应 Mab 直接认识和结合的能力。然后通过加入纯化抗原和额外 Mab 以允许大的不溶性复合物的形成或通过加入第二抗体来沉淀可溶性 Mab 初生肽—核糖体复合物。另外, 用金黄色葡萄球菌蛋白 A 具有结合多种类型的 Ig 的位点, 因此可用于选择性去除免疫复合物。失活的经甲醛固定的金黄色葡萄球菌细胞可直接用作吸附剂, 吸附有 Mab—初生肽—核糖体的细胞可很容易通过离心收集。另外, 用偶联于 Sepharose 的蛋白 A 的亲合色谱柱来分离免疫复合物。

从分离的 mRNA 在体内或体外转译合成的蛋白质或多肽亦可通过相似的方法从蛋白质混合物中选择分离。多肽与特定 Mab 反应, 所得到的沉淀物或是通过蔗糖梯度离心直接收集或是加入第二抗体, 亦可用蛋白 A(图 3)。

2.6 间接血凝试验(PHA)

间接血凝试验中的反向间接血凝试验(RPHA)是目前应用较广的检测可溶性抗原的方法之一, 其具有灵敏、快速、容易操作和无需昂贵仪器等优点, 而且经改用磺化红细胞以后, 重复性较好。

在 RPHA 中, 首先将 Mab 直接结合于经甲醛—丙酮醛双醛化 SRBC 或“O”型人红细胞上, 然后加入样本, 经过抗体致敏。红细胞与相应抗原作用发生红细胞凝集现象, 经肉眼直接判断结果。

除上述介绍的常用方法之外, 尚有玻片凝集试验, 环状沉淀试验、琼脂扩散试验以及用于抗原高纯或超纯制备的亲合色谱技术等。

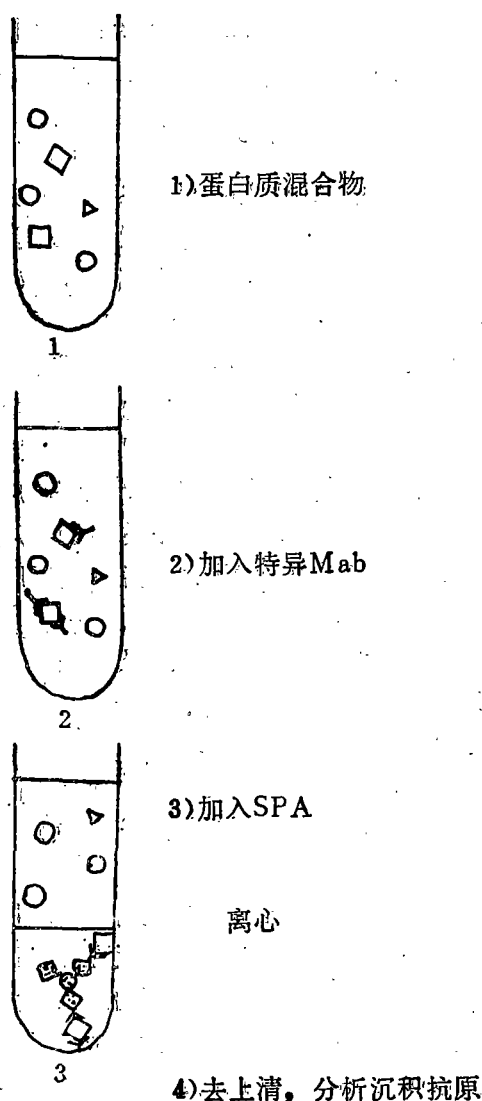


图3 免疫沉淀方法操作程序

3 应用范例

3.1 优良大麦品系的选育和鉴定

大麦在酿制乙醇饮料中具有极其主要的地位, 其质量的高低直接影响产品的质量。由于大麦的第一限制性氨基酸为赖氨酸, 因此选育高赖氨酸含量的大麦以增加其营养价值具有极大的意义。SP—II^[6]为在Hiproly大麦品系中发现的一种白蛋白, 其赖氨酸含量为11.5%, 并发现SP—II具有抑制糜蛋白酶活性作用(故又称为CI—2)^[7]。与CI—8相似的一种白蛋白CI—1^[8]亦具有抑制糜蛋白酶活性之作用。由于这两者的结构十分相似, 用常规血清不易区分, 而用杂交瘤技术制备其Mab, 可很好地解决这一问题。现在, CI—2的免疫荧光检测方法, 放射免疫扩散检测方法以及ELISA已建立并已用于育种程序中^[9,10]。

用CI—2 Mab沉淀核糖体—mRNA—CI—2复合物来提取编码CI—2的mRNA, 用于

CDNA。将此合成的 CDNA 组装到一定载体中来转化细胞,改良大麦品系的工作正在深入^[10]。

3.2 食品营养及质量控制

有害微生物污染食品是食品工作者和食品科学工作者解决的重要问题之一。用有关病原微生物及腐败微生物的特异性Mab建立的ELISA和IF等方法具有迅速、敏感、经济和准确地确定何种有害微生物污染之优点,因而具有广泛的应用前景。针对于沙门氏菌属 A~F 群之特殊性Mab 国内全部建株,初步用于肉样及其制品已取得满意的结果。

由于有机磷化合物作为杀虫剂在农业和畜牧业中广泛使用,有机磷对环境和食品的污染已成为世界性公害,而用于有机磷的检测方法多半是费时、费工和不标准。最近, P. Schmitt等^[11]用竞争抑制性酶免疫试验(CIEIA)来定性和定量检测甲基磷酸-氨苯基-1, 22- 三甲基丙基双酯(MATP),取得较好的结果,检测最低浓度为 10^{-10} mol/L。由于MATP 分子量很小,为一半抗原,因此作者将MATP 与 BSA偶联制成完全抗原,然后用此制备免疫血清用于 CIEIA 中。但此方法的标准化仍存在问题,因为用的是常规血清,而且此血清的制备十分烦琐。如使用 Mab 代替常规血清原可克服上述问题。其它有机磷的检测亦可采用相似的方法进行。

免疫学检测方法在食品毒理学中的应用已相当普遍,在不少方法中使用抗体为 Mab,这里就不再枚举其应用了。

3.3 细胞和酶的固定化

细胞和酶的固定方法很多,主要有物理吸附、包埋和化学键合。最新发展起来的抗体固定化酶和细胞方法^[12]为细胞和酶的固定化开辟了一条新路。用此方法还可对酶进行共固定化。

首先用杂交瘤技术制备针对所要固定的酶之特异性 Mab,然后将Mab 固定于基质上,加入相应的酶,通过抗体抗原(酶)间特异性结合反应可将酶固定上。如果将几种酶的特异性 Mab 同时固定于同一基质上,则通过抗体抗原的结合可进行多酶的共固定化。另外,用四交瘤技术可选择出具有两个不同特异性结合部位的 Mab,这样,一个Mab 单体,可结合上两种酶。细胞的固定化亦可运用此方法进行。

除上述的应用之外,免疫学技术还广泛用于食品的组化研究中。通过杂交瘤技术选择出亲和力适中的 Mab 制成亲和色谱可广泛用于各种大分子物质的纯化和制备,而且此方法对于一些有生物活性的大分子来说更为有用。

结 论

免疫学方法是极为有用的分析技术,加之有了 Mab 代替常规血清,使其使用更为广泛和深入。其在食品科学中的应用必将引起食品科学分析手段的重大变革。

一般而言,常规血清所能适应的免疫学方法, Mab 都可代替之,而在一些免疫学方法中 Mab 更具优越性。

所具有抗原性的和可通过一定方法转化为具有抗原性的物质都可用免疫学方法加以检测及分离提纯。

杂交瘤技术和Mab 的产生历史只有10多年,其自身的发展和不断完善是必要的。

以抗原抗体间特异性结合为基础的分析和应用新方法将不断涌现。

参 考 文 献

- [1] Kohler G, Milstein C. *Nature*.1975, **256**: 495
- [2] Guesdon J—L et al. *J Histochem Cytochem*.1979, **27**: 1131
- [3] Vaag P. *Eur. Brew. Congr.* 1985, **20**: 547
- [4] Towbin H et al.*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*.1979, **76**: 4350
- [5] Palmiter R D et al. *J.Biol.chem.* 1972, **247**: 3296
- [6] Jonassen I. *Carlsberg Res. Commun.* 1980, **45**: 47
- [7] Jonassen I, Svendsen I. *Carlsberg Res. Commun.* 1982, **47**: 199
- [8] Boisen S et al. *Physiol. Plant.* 1981, **52**: 167
- [9] Rasmussen u *Carlsberg Res.Commun.*1985, **50**: 83
- [10] Vaag P, Munck L. *Cereal Chem.* 1987, **64**(2): 59
- [11] Schmidt P et al. *Bioscience*.1988, **43**(3/4): 167
- [12] de Alwis W U et al. *Anal.Chem.* 1987, **59**: 2688