

陈一兵, 王雯蕾, 张评浒. 金黄色葡萄球菌肠毒素 B 单克隆抗体制备及免疫酶检测方法的构建 [J]. 畜牧与兽医, 2025, 57 (5): 84-87.

CHEN Y B, WANG W L, ZHANG P H. The development of monoclonal antibodies for staphylococcal enterotoxin B and establishment of immuno-enzymatic method for its detection [J]. Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2025, 57 (5): 84-87.

金黄色葡萄球菌肠毒素 B 单克隆抗体制备及免疫酶检测方法的构建

陈一兵¹, 王雯蕾², 张评浒^{1,2*}

(1. 扬州大学动物实验中心, 江苏 扬州 225009;

2. 扬州大学医学院转化医学研究院, 江苏 扬州 225009)

摘要: 旨在建立一种免疫酶测定方法, 用于定量检测金黄色葡萄球菌肠毒素 B。以金黄色葡萄球菌重组肠毒素 B 免疫 BALB/c 小鼠, 制备鼠源单抗; 筛选针对该毒素的配对单抗, 构建双抗体夹心 ELISA 检测体系, 在保证检测特异性基础上增加生物素/链霉亲和素放大系统, 进一步提升敏感度。通过杂交瘤技术共获得 6 株针对重组 B 毒素的单抗克隆, 其中由 0085 (捕获抗体) 和 0020 (检测抗体) 构建的双抗体夹心 ELISA 检测体系表现出良好的特异性, 与肠毒素 A、C、D、E 均无交叉, 对肠毒素 B 的检测敏感度可达 0.625 ng/mL。增加生物素/链霉亲和素放大系统后敏感度可提升至 0.156 ng/mL。本研究构建的检测方法具有高特异性及高敏感性, 具有较强的应用前景。

关键词: 金黄色葡萄球菌肠毒素 B; 单克隆抗体; 双抗体夹心 ELISA

中图分类号: S852.6 文献标志码: A 文章编号: 0529-5130(2025)05-0084-04

The development of monoclonal antibodies for staphylococcal enterotoxin B and establishment of immuno-enzymatic method for its detection

CHEN Yibing¹, WANG Wenlei², ZHANG Pinghu^{1,2*}

(1. College of Veterinary Medicine, Yangzhou University, Yangzhou, 225009, China;

2. Institute of Translational Medicine, Medical College, Yangzhou University, Yangzhou, 225009, China)

Abstract: This study was to establish an immuno-enzymatic platform for staphylococcal enterotoxin B detection. Recombinant staphylococcal enterotoxin B (reSEB) was used to immunize mice for monoclonal antibodies development, and two antibody clones were screened to set up an immuno-enzymatic method. Based on its higher specificity, the system was further integrated with biotin/streptavidin to improve its sensitivity. Six antibody clones were obtained and clones 0085 and 0020 were screened to establish a double antibody sandwich ELISA system. This system had a good specificity for SEB, with no cross-binding to SEA, SEC, SED, and SEE. Furthermore, the sensitivity has enhanced from 0.625 to 0.156 ng/mL after biotin/streptavidin modification. The assay system established in this study had higher sensitivity and specificity, and might be used for SEB detection in practice.

Keywords: staphylococcal enterotoxin B; monoclonal antibody; double antibody sandwich ELISA

金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 简称金葡菌, 是严重威胁人类健康的条件致病菌, 主要引起医院内感染和食品不当加工导致的食物中毒。在该菌众多的致病因子中, 金葡菌肠毒素 (staphylococcal enterotoxin, SE) 所导致的病理过程最为严重, 因此成为金葡菌感染后检测的重要靶标分子和疫苗研发中的候选分子^[1]。作为一种超级抗原 (super antigen,

sAg), SE 是目前已知的人淋巴细胞最强的刺激剂和最有力的细胞因子诱生剂, 其在抗肿瘤方面的应用前景广阔, 已经成为治疗恶性肿瘤的临床生物制剂^[2]。SE 可分为多种血清型, 包括 A、B、C、D、E、G、I 等, 其中以 SEB 最为重要, 这是因为金葡菌的 SEB 产毒量往往较高 (100~200 mg/L)^[3], 且中毒剂量低, 其对小鼠半数致死量 (LD₅₀) 只有 0.023~5 μg/kg^[4]。SEB 是一种可溶性蛋白质, 耐热, 经 100℃煮沸 30 min 不被破坏, 也不受胰蛋白酶的影响, 误食被肠毒素污染的食物会引起急性胃肠炎^[5]。另外, 美国疾控中心已把 SEB 列为 II 生物战剂, 在气溶胶形式下吸入 30 ng, 人就会出现中毒症状, 丧

收稿日期: 2024-05-20; 修回日期: 2025-03-11

基金项目: 扬州大学高端创新人才计划 (20180508)

第一作者: 陈一兵, 男, 博士, 高级兽医师

* 通信作者: 张评浒, 教授, 研究方向为临床检验医学, E-mail:

zhangpinghu@163.com。

失战斗能力^[6]。因此对包括 SEB 在内的 SE 的精准检测至关重要。本研究以重组 SEB 为免疫原,通过传统杂交瘤技术制备其单克隆抗体,并在此基础上建立了金葡菌 SEB 的双抗体夹心 ELISA 检测方法。

1 材料与方法

1.1 主要材料

表达重组 SEB (reSEB) 质粒 pET-28a (+) -SEB、大肠杆菌 BL21 (DE3),由本实验室构建保存;骨髓瘤细胞系 SP2/0 由本实验室构建保存;镍亲和层析柱、Protein G 亲和层析柱购自 GE Healthcare 公司;BALB/c 小鼠由扬州大学比较医学中心提供;天然金葡菌肠毒素 A、B、C2、C3、D、E 购自南京妙迪生物科技有限公司;辣根过氧化物酶 (HRP) 购自济南泰天和生物科技有限公司;活化生物素、(TMB+H₂O₂) 底物购自 Thermo Fisher 公司;HRP 标记山羊抗小鼠 IgG 购自北京中杉生物;HRP 标记链霉亲和素 (SA-HRP) 购自生工生物工程(上海)股份有限公司。

1.2 reSEB 的表达和纯化

将 reSEB 质粒 pET-28a (+) -SEB 转化至大肠杆菌 BL21 (DE3)。挑取单菌落,接种 LB 培养基,加入终浓度 50 μg/mL 的卡那霉素,37 °C、200 r/min 摇床振荡培养过夜。次日,过夜培养物按 1:100 转接大瓶 LB 培养基,摇床振荡培养 3~4 h 至 OD_{600nm} 大约为 1.0,加入终浓度为 0.5 mmol/L 的 IPTG,30 °C、200 r/min 诱导过夜。培养物沉淀经超声波粉碎、离心,上清液使用 AKTA explorer 纯化仪进行镍亲和层析纯化,用含有 500 mmol/L 咪唑的磷酸盐缓冲液洗脱目的蛋白,并透析至 PBS 中备用。

1.3 SEB 单克隆抗体的制备

将纯化的 reSEB 先后与弗氏完全(或不完整)佐剂混合乳化后,皮下免疫 BALB/c 小鼠,两次免疫间隔 2 周,共免疫 3 次。摘除小鼠脾脏取脾细胞,并与 SP2/0 细胞融合。用间接 ELISA 法筛选阳性克隆,并进行亚克隆操作 2~3 次。稳定杂交瘤细胞株接种小鼠腹腔,2 周后收集腹水,经适当处理后用 Protein G 亲和层析柱纯化、定量,并透析到 PBS 中,测浓度,-20 °C 冻存备用。

1.4 基于双抗体夹心 ELISA 检测体系中抗体配对的选择

在 ELISA 平台上对获得的单抗进行彼此配对,以期获得捕获和检测抗体。将单抗蛋白分别与 HRP 偶联(按照活化 HRP 产品说明书操作)作为酶标抗体。将未标记的单抗蛋白分别包被 96 孔酶标板(1 μg/mL),经洗涤后用 5% 的脱脂牛奶 4 °C 封闭。向酶

标板中加入 reSEB (浓度为 100 ng/mL,100 μL/孔),37 °C 孵育 1 h,用 PBST (在 PBS 中加入终浓度为 0.05% 的 Tween-20) 洗涤 5 次。向酶标板中加入 100 μL/孔的酶标抗体(1:1 000 稀释),37 °C 孵育 0.5 h,用 PBST 洗涤 5 次后,加入 100 μL/孔 TMB + H₂O₂ 底物,室温孵育 5 min,加入 50 μL/孔终止液,于 450 nm 处测定 OD 值。

1.5 双抗体夹心 ELISA 检测体系特异性和敏感性鉴定

对于获得的抗体配对,利用购置的天然金葡菌肠毒素(A、B、C2、C3、D、E)测试该抗体配对的检测特异性,操作方法同上。测试配对抗体的检测敏感性(天然 SEB 从 5 ng/mL 开始进行倍比稀释),操作方法同上。

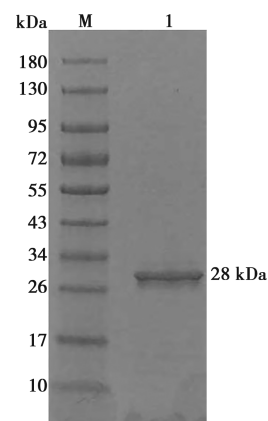
1.6 生物素/链霉亲和素系统对本检测体系敏感性的提升

首先将检测抗体进行生物素化(按照活化生物素产品说明书操作)。天然 SEB 倍比稀释后(从 5 ng/mL 开始),加入酶标板(包被有捕获抗体),100 μL/孔,37 °C 孵育 1 h,用 PBST 洗涤 5 次。加入 100 μL/孔生物素化检测抗体(1:1 000 稀释),37 °C 孵育 0.5 h,用 PBST 洗涤 5 次后,加入 100 μL/孔的 SA-HRP(1:1 000 稀释)37 °C 孵育 0.5 h,用 PBST 洗涤 5 次后加入 100 μL/孔 TMB + H₂O₂ 底物,室温孵育 5 min,加入 50 μL/孔终止液,于 450 nm 处测定 OD 值。

2 结果与分析

2.1 reSEB 的表达

reSEB 以可溶形式表达,存在于细胞破碎后的上清液中。使用镍亲和层析纯化并透析至 PBS 中,SDS-PAGE 结果显示获得了高纯度的 reSEB,相对分子质量(Mr)约为 28 kDa,与理论值相符(图 1)。



M. 蛋白 Marker; 1. reSEB 蛋白。

图 1 SDS-PAGE 检测纯化的 reSEB 蛋白

2.2 应用双抗体夹心 ELISA 选择最佳抗体配对

应用传统的鼠源杂交瘤技术,并经过多次亚克隆操作,本次融合最终共获得 6 个单抗克隆,分别命名

为 0020、0081、0082、0083、0084、0085。在 ELISA 平台上,经过彼此配对获得了 0085 作为捕获抗体、0020 作为检测抗体的最佳配对(0085/0020)(表 1)。

表 1 双抗体夹心 ELISA 检测体系抗体配对选择 ($OD_{450\text{ nm}}$ 值)

捕获抗体	检测抗体					
	0020-HRP	0081-HRP	0082-HRP	0083-HRP	0084-HRP	0085-HRP
0020	0.064	0.050	0.049	0.047	0.048	0.214
0081	0.068	0.054	0.054	0.049	0.049	0.057
0082	0.061	0.052	0.049	0.050	0.048	0.068
0083	0.046	0.056	0.053	0.056	0.054	0.052
0084	0.064	0.397	0.098	0.729	0.088	0.265
0085	2.701	0.041	0.320	1.134	0.062	0.076

2.3 双抗体夹心 ELISA 检测体系特异性和敏感性

特异性测试结果表明(图 2),在天然金葡菌肠毒素(A、B、C2、C3、D、E)浓度为 100 ng/mL 条件下,由 0085/0020 组成的 ELISA 体系可有效地检测 SEB,与 SEA、SEC2、SEC3、SED、SEE 均无交叉反应。在敏感度检测中,5%脱脂奶粉/PBS 作为阴性对照(NC),临界值设定为阴性对照平均值(0.047 25)的 2.1 倍,即 0.099。该 ELISA 体系的检测敏感性可达 0.625 ng/mL(表 2)。

为了进一步提高其检测敏感性,在上述检测体系的基础上增加生物素/链霉亲和素放大系统。由表 3 可见,临界值设定为阴性对照平均值(0.064)的 2.1 倍,即 0.134 4。由 0085/0020 组成的 ELISA 体系的检测敏感性可从 0.625 ng/mL(表 2)进一步提升至 0.156 ng/mL,提升 4 倍。

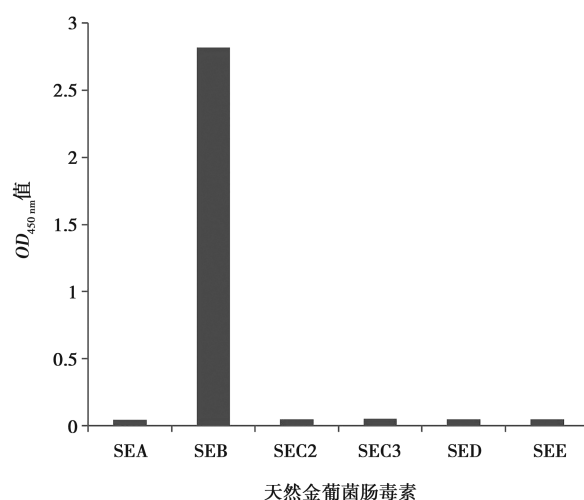


图 2 双抗体夹心 ELISA 的检测特异性

表 2 双抗体夹心 ELISA 检测体系的敏感性 ($OD_{450\text{ nm}}$ 值)

批次	SEB 浓度/ (ng · mL ⁻¹)						NC1	NC2
	5.000	2.500	1.250	0.625	0.313	0.156		
第 1 次	0.936	0.506	0.267	0.145	0.084	0.058	0.044	0.046
第 2 次	1.031	0.517	0.281	0.152	0.079	0.060	0.048	0.051

表 3 生物素/链霉亲和素放大系统对双抗体夹心 ELISA 体系检测敏感度的优化 ($OD_{450\text{ nm}}$ 值)

批次	SEB 浓度/ (ng · mL ⁻¹)							NC1	NC2
	5.000	2.500	1.250	0.625	0.313	0.156	0.078		
第 1 次	3.216	3.023	2.255	0.916	0.343	0.172	0.108	0.062	0.062
第 2 次	3.191	2.961	2.342	1.082	0.377	0.195	0.094	0.067	0.065

3 讨论

由于肠毒素在金葡菌致病过程中的重要作用,建

立一种快速、可靠的检测金葡菌肠毒素的方法对诊断感染及指导治疗具有重要意义。尽管毒素基因检测是一种有效工具,但由于毒素基因的表达受环境因素的

影响,其基因的存在与是否表达往往并不一致^[7],而基于抗原/抗体特异性结合的免疫学方法检测的则是肠毒素抗原本身,具有临床实际意义。本研究即是利用免疫酶检测平台,对金葡菌肠毒素中重要一员SEB进行精准检测。

如何在保证检测特异性的前提下,进一步提高检测敏感性是本研究面临的两大挑战。目前国内广泛使用的金葡菌肠毒素检测试剂多来自德国拜发公司,但该产品存在严重交叉反应(A/E、E/A、B/C、C/B)。良好的检测特异性基础在于配对单抗的特异性,本研究以reSEB为免疫原,通过杂交瘤技术制备鼠源单克隆抗体。为了保证检测特异性,在进行抗体配对时使用了天然而非重组肠毒素,最终从6株单抗中成功获得了0085/0020这一抗体配对,该配对抗体只与SEB反应,而与其他毒素无交叉反应。

双抗体夹心ELISA体系一般使用HRP作为指示物,当与底物一起孵育时,HRP即可催化产生有色产物,从而实现定性或定量检测。虽然通过对荧光或发光衍生物的检测可进一步提高检测敏感度^[8],但是该类检测严重依赖高端设备。本研究使用较为普通的TMB底物产生有色衍生物,检出限可以达到0.625 ng/mL。为了进一步提升检测敏感度,在原检测体系基础上增加了生物素/链霉亲和素放大系统,其敏感度可达0.156 ng/mL,提升4倍,不仅高于以往国内外公开报道的0.078~10 μg/mL的检测限^[9],而且略高于近期报道的同类试剂的检出限,因而可实现大多数检测的实际需求^[3-10]。需要指出的是,本研究过程中由于缺少现场样本,没有进行实地检测,是其不足,有待后续进一步验证。

参考文献:

- [1] CLEGG J, SOLDAINI E, MCLOUGHLIN R M, et al. *Staphylococcus aureus* vaccine research and development: the past, present and future, including novel therapeutic strategies [J]. *Front Immunol*, 2021, 12: 705360.
- [2] SHIVAE A, SEDIGHI M, IMANI FOOLADI A A. Staphylococcal enterotoxins as good candidates for cancer immunotherapy: a systematic review [J]. *Ann Ig*, 2020, 32 (6): 648-663.
- [3] 龙军, 陈清, 俞守义. 双抗体夹心ELISA法检测葡萄球菌B型肠毒素 [J]. *中国公共卫生*, 2005, 21 (2): 154-155.
- [4] BUONPANE R A, CHURCHILL H R, MOZ A B, et al. Neutralization of staphylococcal enterotoxin B by soluble, high-affinity receptor antagonists [J]. *Nat Med*, 2007, 13 (6): 725-729.
- [5] 李小兵, 谢光洪, 周昌芳, 等. 相思子毒素-a双抗体夹心ELISA法的建立和初步应用 [J]. *中国兽医学报*, 2008, 28 (8): 962-964.
- [6] VARSHNEY A K, WANG X, AGUILAR J L, et al. Isotype switching increases efficacy of antibody protection against staphylococcal enterotoxin B-induced lethal shock and *Staphylococcus aureus* sepsis in mice [J]. *mBio*, 2014, 5 (3): e01007-14.
- [7] 国康琳, 余佳佳, 刘瑛, 等. 分离自非血液无菌体液的金黄色葡萄球菌耐药性和分子特征分析 [J]. *中国感染与化疗杂志*, 2024, 24 (1): 36-42.
- [8] 陈立杰, 刘振世, 董邦权, 等. 酶联免疫发光法检测金葡菌肠毒素(SE)B和SEC1方法的建立 [J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2006, 22 (5): 668-669.
- [9] 李红云, 姚咏明, 施志国, 等. 双单抗夹心ELISA方法检测血浆及组织中金黄色葡萄球菌肠毒素B [J]. *中华医院感染学杂志*, 2002, 12 (9): 655-657.
- [10] 周刘忠, 胡乃静, 张丁木, 等. 利用特异性抗体建立金黄色葡萄球菌肠毒素B快速检测方法 [J]. *生物技术通讯*, 2020, 31 (6): 720-726.