

文章编号:1673-1689(2011)06-0884-03

三聚氰胺单克隆抗体的制备及其免疫学特性鉴定

钮伟民¹, 何恩奇¹, 戴维杰¹, 赵春城², 刘文卫¹, 杨婷婷²

(1. 无锡市疾病预防控制中心, 江苏 无锡 214023, 2. 江苏省苏微生物研究所, 江苏 无锡 214036)

摘要: 采用牛血清白蛋白偶联的三聚氰胺(melamine-BSA)完全抗原免疫 BALB/C 小鼠, 应用杂交瘤技术制备抗三聚氰胺的特异性单克隆抗体。所得单克隆抗体效价可达 5.0×10^5 , 且抗体的亚类类型为 IgG₁, 抗体的亲和常数为 3.21×10^9 L/mol。与三聚氰酸、三聚氰酸二酰胺、三聚氰酸一酰胺的交叉反应率分别为 30%、93% 和 46%。说明该单抗可用于三聚氰胺类物质的检测, 为研制高质量的三聚氰胺 ELISA 试剂盒和胶体金试纸条奠定了基础。

关键词: 三聚氰胺; 单克隆抗体; 鉴定; 免疫学检测

中图分类号: Q 813

文献标识码: A

Preparation and Immunological Characterization of Monoclonal Antibody Against Melamine

NIU Wei-min¹, HE En-qi¹, DAI Wei-jie¹, ZHAO Chun-cheng²,
LIU Wen-wei¹, YANG Ting-ting²

(1. Wuxi Center for Disease Control and Prevention, Wuxi 214023, China; 2 Jiangsu suwei Institute of Microbiology CO. LTD, Wuxi 214036, China)

Abstract: In this study, mice BALB/C were immunized by melamine-BSA and anti-melamine monoclonal antibody (McAb) was prepared by using hybridoma technique. The ELISA titers of ascite was exceeded 50,000. Subtype of the McAb was IgG₁ and the affinity constant was 3.21×10^9 L/mol. The cross-reactivity with Cyanuric acid, cyanurodiamide and ammelide was 30%, 93% and 46% respectively. The monoclonal antibody can be used for fast determination of melamine substances.

Key words: melamine, monoclonal antibody, characterization, immunological detection

三聚氰胺(melamine), 又称 2,4,6-三氨基-1,3,5-三嗪、蜜胺、三聚氰酰胺。分子式 $C_3N_6H_6$, 相对分子质量 126.12。三聚氰胺显弱碱性, 能够与各种酸反应生成三聚氰胺盐。在强酸或强碱液中, 三聚氰胺发生水解, 氨基逐步被羟基取代, 生成三聚氰酸二酰胺、三聚氰酸一酰胺和三聚氰酸。三聚氰胺是一种三嗪类含氮杂环有机化合物, 重要的氮杂环

有机化工原料, 主要用于生产三聚氰胺-甲醛树脂和塑料, 同时还广泛用于涂料、塑料、黏合剂、造纸等工业生产中^[1]。自从在宠物食品、饲料、牛奶等中发现三聚氰胺以来, 迫切需要一种快速的检测方法, 从而能准确的检测食品及饲料中的三聚氰胺。目前, 检测三聚氰胺的主要方法是液相色谱、气相色谱以及质谱联用技术等^[3-7], 但对仪器及实验室

收稿日期: 2010-05-26

基金项目: 无锡市卫生系统科研基金项目(XM0906)。

作者简介: 钮伟民(1954—), 男, 无锡人, 主任技师, 主要从事卫生理化检验工作。Email: wxcdcnwm@126.com

要求较高,样品处理和操作也相对要求较高。本研究采用前期设计合成的三聚氰胺完全抗原(melamine-BSA)免疫 BALB/C 小鼠,应用杂交瘤技术建立分泌抗三聚氰胺单克隆抗体的杂交瘤细胞株,体内诱生腹水制备单抗,为三聚氰胺免疫学检测方法的建立奠定基础。

1 材料和方法

1.1 主要仪器与试剂

CO₂ 培养箱 2440/2-2:美国 SHELLAB 产品;恒温培养箱 MIR-153:日本 SANYO 产品;酶标仪 MK3:芬兰 Labsystems Dragon Wellscan 产品;倒置显微镜 DIAPHOT300:日本 Nikon 产品;水平式离心机 TDL-4B:上海安亭科学仪器厂产品;超净工作台 SW-CJ-1:上海锦屏仪器仪表有限公司产品;三聚氰胺完全抗原(Mel-BSA 和 Mel-OVA)为本研究室合成,三聚氰胺标准品:Sigma 公司产品;弗氏完全、不完全佐剂:Sigma 公司产品;四甲基联苯胺(TMB)、HRP 标记的羊抗鼠 IgG:北京博奥森有限公司产品;经传代并经 8-氮杂鸟嘌呤处理的小鼠骨髓瘤细胞系 Sp2/0、BALB/C 小鼠:中国科学院上海实验动物中心提供;鼠单克隆抗体亚类检测试剂盒、DMEM 培养基、HAT、HT 培养基、PEG1500 均为 Sigma 公司产品。

1.2 方法

1.2.1 动物免疫与细胞融合 三聚氰胺-牛血清白蛋白(melamine-BSA)偶联抗原用生理盐水配成 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 抗原溶液,与等体积完全福氏佐剂混匀,充分乳化,供首次免疫用,加强免疫时用等量的不完全福氏佐剂代替完全福氏佐剂。首次免疫采用小鼠腹腔内直接注射,免疫剂量为 50 $\mu\text{g}/\text{只}$ 小鼠,以后每隔 2 周加强免疫一次,加强免疫采用尾静脉注射,免疫剂量 10 $\mu\text{g}/\text{只}$,最后一次免疫采用脾内注射,经 ELISA 法测定抗体效价明显升高达,可用于细胞融合,4 d 后取脾融合,将分离的免疫小鼠脾细胞与处于对数生长期的骨髓瘤细胞 SP-2/0 以 10:1 比例混合,离心,去除上清液,在 50~90 S 内将 1 mL 50 g/L 聚乙二醇(分子量为 1 500)加至细胞中,充分混匀,使其融合,1 min 后加入 20 mL DMEM 培养液,终止融合,水浴静止 10 min 后离心,去除上清;将融合细胞用含体积分数 20% 小牛血清的 HAT 选择性培养基悬浮后,以最后浓度为 1×10^4 饲养细胞/0.1 mL 接种于以小鼠腹腔巨噬细胞作饲养层的 96 孔培养板中,于 5% CO₂, 37℃ 条件下培养,8 d 后,每培养孔更换 2/3 HT 培养液。10~

20 d 后,开始对镜检有杂交瘤克隆生长的培养孔,取上清液进行筛选,对检测结果呈阳性的细胞立即用有限稀释法进行克隆。

1.2.2 杂交瘤的筛选与克隆 杂交瘤筛选采用固相抗原间接非竞争 ELISA 法进行。以三聚氰胺-卵清蛋白(melamine-OVA)为包被抗原,以免疫小鼠的血清为阳性对照,以 SP-2/0 骨髓瘤细胞培养的上清液为阴性对照。阳性细胞孔的判定标准为 $(A_{\text{试验}} - A_{\text{空白}})/(A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}}) > 2$;对分泌阳性抗体的细胞进行克隆。采用有限稀释法,将阳性克隆细胞吹匀,取一微滴至培养瓶内,倒置显微镜下准确计数细胞个数,稀释为 70 个/mL,再取 1 mL 稀释 20 倍,接种入 96 孔培养板中进行亚克隆。直至所有细胞孔的培养上清均呈阳性为止。

1.2.3 单克隆抗体的制备与纯化 采用动物体内诱生腹水制备单克隆抗体(McAb)。对 10~13 周龄 BALB/C 小鼠腹腔注射液体石蜡 0.3 mL/只~0.5 mL/只,8~10 d 后,腹腔注射培养至对数期的杂交瘤细胞, 5×10^5 细胞/只,5 d 后注意观察,收集腹水,离心去除沉淀,采用饱和硫酸铵盐析法纯化抗体,加甘油于 -20℃ 保存。

1.2.4 抗三聚氰胺单克隆抗体的鉴定

1)效价测定:按照常规间接 ELISA 法测定抗体的效价。

2)抑制曲线绘制:以对照 0 $\mu\text{g}/\text{L}$ 三聚氰胺标准品的吸光度值为 A_0 ,不同浓度三聚氰胺标准品(5、25、50、100、200、400 $\mu\text{g}/\text{L}$)对应的吸光值为 A ,采用 Logit-Log 法绘制三聚氰胺抑制率曲线。

3)特异性测定:采用间接 ELISA 方阵滴定法确定抗原抗体的工作浓度,然后在工作浓度下采用间接竞争 ELISA 法对三聚氰胺、三聚氰酸、三聚氰酸二酰胺、三聚氰酸一酰胺等作出抑制率曲线,以抑制率达到 50% 时所对应的浓度为各自的半数抑制浓度 IC_{50} ,然后计算交叉反应率

$$\text{产交叉反应率} = \frac{\text{三聚氰胺的 } \text{IC}_{50}}{\text{三聚氰胺结构类似物的 } \text{IC}_{50}} \times 100\%$$

4)亲和力测定:采用间接 ELISA 法测定单克隆抗体与包板抗原间的亲和常数 $K(\text{L}/\text{mol})$ 。(5)亚类鉴定:采用 sigma 公司的鼠单克隆抗体亚类检测试剂盒,按说明书操作。

2 结果与分析

2.1 杂交瘤细胞的筛选及克隆

用 melamine-OVA 作为包被抗原进行间接 ELISA 法筛选阳性孔,最终选出 1 株分泌阳性抗体

的杂交瘤细胞。对已建立杂交瘤细胞株进行观察,在传代后 5~7 d 内均能持续地增殖。经 5 个月以上体外传代和多次冻存复苏后,细胞株均能良好生长,并能稳定分泌抗体。经扩大培养后,用于腹水制备。

2.2 抗三聚氰胺单克隆抗体的特性

2.2.1 抗体效价及灵敏度测定 本实验选择了 6 只健康 BALB/C 小鼠,进行动物体内诱生制备单克隆抗体,每只小鼠可获得 20~35 mL 腹水。采用饱和硫酸铵法^[7]纯化腹水,间接 ELISA 法分别测定抗体的效价,若以阳性血清的 $A_{450} \geq$ 阴性对照的 2.1 倍作为抗血清的效价,由测定结果可知,所得抗体效价可达 5.0×10^5 。

2.2.2 抑制曲线绘制 抑制曲线如图 1 所示,根据回归方程计算三聚氰胺半数抑制率 IC_{50} 为 61.6 $\mu\text{g/L}$ 。最低检出限(10%抑制率对应的质量浓度 c)为 10.5 $\mu\text{g/L}$ 。

2.2.3 特异性测定 采用间接 ELISA 方阵滴定法确定抗原抗体的工作浓度,然后在工作浓度下采用间接竞争 ELISA 法对三聚氰胺、三聚氰酸、三聚氰酸二酰胺、三聚氰酸一酰胺等作出抑制率曲线,并在曲线上找出以上各类物质的半数抑制浓度 IC_{50} ,然后计算出三聚氰胺结构类似物的交叉反应率。结果表明,抗三聚氰胺单克隆抗体与三聚氰酸、三聚氰酸二酰胺、三聚氰酸一酰胺的交叉反应率分别为 30%、93%和 46%。说明该单抗可用于三聚氰胺类物质的检测。

参考文献(References):

- [1] 邵静君,温家琪,徐世文. 三聚氰胺毒理学研究进展[J]. 现代畜牧兽医, 2007, 12: 52—54.
SHAO Jing-jun, WEN Jia-qi, XU Shi-wen. Updated information on toxicology of melamine[J]. *Modern Journal of Animal Husbandry and Veterinary Medicine*, 2007, 12: 52-54. (in Chinese)
- [2] 洗燕萍,郭新东,罗海英,等. 气相色谱-质谱法测定奶粉中三聚氰胺及同系物[J]. 食品与发酵工业, 2009, 35(7): 143—145.
XIAN Yan-ping, GUO Xin-dong, LUO Hai-ying, et al. Simultaneous detection of melamine and its analogues in milk powder by GC-MS[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2009, 35(7): 143—145. (in Chinese)
- [3] Jonathan J L, Gregory E M, Kevin J M. GC-MS screen for the presence of melamine, ammeline, ammelide, and cyanuric Acid[J]. *Laboratory Information Bulletin*, 2008, 24: 4417—4423.
- [4] 唐涛,李双花,刘翻,等. 鸡蛋中三聚氰胺的液相色谱快速测定[J]. 色谱, 2009, 27(4): 513—515.
TANG Tao, LI Shuang-hua, LIU Fan, et al. Rapid determination of melamine in eggs by high performance liquid chromatography[J]. *Chinese Journal of Chromatography*, 2009, 27(4): 513—515. (in Chinese)
- [5] 王浩,刘艳琴,曹红,等. 固相萃取与高效液相色谱联用测定宠物食品中三聚氰胺[J]. 分析化学, 2008, 36(2): 273—277.
WANG Hao, LIU Yan-qin, CAO hong, et al. Determination of melamine in pet food by solid phase extraction(SPE)-high performance liquid chromatography method[J]. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 2008, 36(2): 273—277. (in Chinese)
- [6] Wendy C A, Sherri B T, Christine M K, et al. Determination of Melamine Residues in Catfish Tissue by Triple Quadrupole LC-MS-MS with HILIC Chromatography [J]. *Laboratory Information Bulletin*, 2007, 23: 4390—4396.
- [7] 王廷华,李官成, Xin-Fu Zhou. 抗体理论与技术[M]. 北京: 科学出版社, 2005: 315.
- [8] Juan I A, Mohamed M A, Ronald D P, et al. Production of monoclonal antibodies to the mycotoxins fumonisins B₁, B₂, B₃[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1992, 40, 531—534.

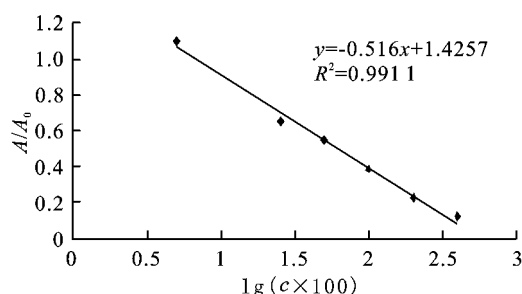


图1 三聚氰胺抑制率曲线

Fig. 1 The inhibition curve of Melamine

2.2.4 亲和力测定 抗体的亲和力也是表示抗体特性的一个重要指标。抗体的亲和力表征抗体与抗原表位结合的强度,常用亲和常数表示。许多资料显示,亲和常数介于 $10^5 \sim 10^{12}$ L/mol 的抗体在免疫化学分析中都得到较好的使用效果^[8]。本实验所得单克隆抗体的亲和常数为 3.21×10^9 L/mol。

2.2.5 亚类鉴定 应用鼠单克隆抗体亚类检测试剂盒,对抗三聚氰胺单克隆抗体的细胞上清进行检测,结果表明抗体亚类为 IgG₁。

3 结 语

实验中 ECD 法合成成功的三聚氰胺作为完全抗原,用其免疫 BALB/C 小鼠,并应用杂交瘤技术制备了抗三聚氰胺的特异性单克隆抗体。发现该抗三聚氰胺单克隆抗体对其类似物——三聚氰酸、三聚氰酸二酰胺、三聚氰酸一酰胺的交叉反应率均较高,这对三聚氰胺的检测更加有效,可进一步用于食品及饲料中三聚氰胺类物质的免疫学检测产品的开发。