

文章编号: 1673 1689(2011)01-0156-05

三聚氰胺单克隆抗体的制备及鉴定

李康¹, 桑丽雅², 卜令杰², 陈育旺¹

(1. 杭州市质量技术监督检测院, 浙江 杭州 310022; 2. 杭州南开日新生物技术有限公司, 浙江 杭州 310022)

摘要: 为建立三聚氰胺免疫分析方法, 采用戊二醛法合成免疫抗原 MEL-BSA 和包被抗原 MEL-OVA, 全抗原经紫外吸收法检测证实偶联成功且偶联比约为 16: 1。用 MEL-BSA 免疫 BALB/c 小鼠, 用常规单克隆制备技术筛选获得 1 株稳定分泌抗三聚氰胺单克隆抗体的细胞株 6E3。腹水经纯化后, 研究了抗体效价、竞争抑制能力及与结构类似物的交叉反应率, 其中抗体效价为 1: 64 000, 检测线性范围为 0.1~3.2 mg/L, IC_{50} 为 1.01 mg/L, 与三聚氰酸、三聚氰酸一酰胺及三聚氰酸二酰胺的交叉反应率均小于 0.1%, 该方法有望用于三聚氰胺免疫检测试剂的研制开发。

关键词: 三聚氰胺; 单克隆抗体; 半抗原

中图分类号: R 392.12

文献标识码: A

Production and Identification of Monoclonal Antibodies to Melamine

LI Kang¹, SANG Liya², BO Lingjie², CHEN Yurwang¹

(1. Hangzhou Institute of Calibration and Testing for Quality and Technical Supervision, Hangzhou 310022, China; 2. Hangzhou Nankai Biotech Co., Ltd., Hangzhou 310022, China)

Abstract: In order to establish the immunoassay method of melamine (MEL), two artificial antigens (MEL-BSA, MEL-OVA) were prepared by glutaraldehyde crosslinking method, which were identified by UV absorbency spectrum. MEL-BSA was used as immuneogen to produce a cell strain (6E3) secreting monoclonal antibody against melamine from BALB/c. After purification, its titers of ascetic fluids were 64000 by indirect ELISA. The lineal range and half-inhibitory concentration (IC_{50}) of the monoclonal antibody were from 0.1 to 3.2 mg/L and 1.01 mg/L. The percentages of cross activity to cyanuric acid, Ammelid and Ammeline were all less than 0.1%. Results indicated that the monoclonal antibody against melamine would be useful in the development of melamine residue ELISA test kit or colloid gold-immunochromatography assay strip.

Key words: melamine, monoclonal antibodies, hapten

三聚氰胺 (Melamine) 简称三胺, 别名蜜胺、氰 尿酰胺, 分子式: $C_3N_6H_6$, 相对分子质量: 126.12,

收稿日期: 2010-04-13

基金项目: 杭州市社会发展科研攻关项目 (20091133B16)。

作者简介: 李康 (1976-), 浙江杭州人, 高级工程师, 主要从事食品质量安全检测技术研究。Email: lik@hzzjy.net

© 1994-2011 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. <http://www.cnki.net>

是一种重要的氮杂环有机化工原料。在工业上,三聚氰胺最初被用来制造密胺塑料,后又逐步拓展到胶黏剂、减水剂、交联剂、阻燃剂、印染及造纸助剂等多种领域。2008 年,我国乳品行业爆发了三鹿奶粉三聚氰胺污染事件,随后整个乳品行业陷入了信用危机之中。据调查,由于三聚氰胺含氮量高达 66.6%,折合成粗蛋白含量为 416.27%,掺入少量就可以迅速提高蛋白质含量,因此在利益驱使下,三聚氰胺常被添加入乳品及饲料原料中,以增加蛋白质表现检测含量。

20 世纪 50 年代就有研究报道,长期服用三聚氰胺的动物可能导致结石。2007 年美国宠物食品污染事件的初步调查结果认为,掺杂了三聚氰胺的小麦蛋白粉是宠物食品导致中毒的原因,确认了三聚氰胺具有低毒性^[1]。有研究报道,小鼠急性死亡的剂量为 5 000 mg/kg,喂食后 9 h 内即可死亡。三聚氰胺在机体内的代谢属于不活泼代谢或惰性代谢,即它在机体内不会迅速发生任何类型的代谢变化,长期喂食可以引起尿结石甚至肾衰竭^[2]。

中国“三鹿事件”后,欧盟、澳大利亚和新西兰、加拿大等国家对食品中三聚氰胺采取了相应的控制措施^[3]。2008 年 10 月,我国卫生部等联合公告:三聚氰胺在乳与乳制品中的临时管理限量值分别为婴幼儿配方乳粉中 1 mg/kg,液态奶(包括原料乳)、奶粉、其他配方乳粉中 2.5 mg/kg,含乳质量分数 15% 以上的其他食品中 2.5 mg/kg。

因此,研究和开发对三聚氰胺的有效分析方法对于食品安全检测具有十分重要的意义。作者用戊二醛法制备三聚氰胺免疫抗原,用杂交瘤技术制备抗三聚氰胺单克隆抗体,为进一步研制开发三聚氰胺免疫胶体金快速检测试剂提供一定的依据。

1 材料与方 法

1.1 材料

三聚氰胺(MEL)、羊抗鼠 IgG-HRP、聚乙二醇 2000、弗氏完全佐剂、弗氏不完全佐剂、HT 培养基、HAT 培养基,美国 Sigma 公司产品;牛血清白蛋白(BSA)、卵清蛋白(OVA):上海西宝生物科技有限公司产品;96 孔细胞板为丹麦 Nunc 公司产品;96 孔酶标板为德国 greiner 公司产品;SP2/0 小鼠骨髓瘤细胞:浙江大学生物技术研究所有保存及提供;BALB/c 小鼠,购自中国科学院上海实验动物中心。其他化学试剂均为分析纯。

Avanti J26XP 高速冷冻离心机:美国 Beckman 公司产品;WJ-II 型 CO₂ 细胞培养箱:上海跃

进医疗器械厂产品;680 型酶标仪:美国 BIO-RAD 公司产品;UV-2802 紫外连续扫描分光光度计:美国 UNICO 公司产品;78HW-1 恒温磁力搅拌器:杭州仪表电机有限公司产品。

1.2 三聚氰胺免疫抗原的制备和鉴定

1.2.1 抗原的制备 根据三聚氰胺分子结构采用戊二醛法将三聚氰胺半抗原与载体蛋白 BSA 和 OVA 偶联分别作为免疫抗原和包被抗原。

称取 40 mg 三聚氰胺于 25 mL 烧杯中,用 5 mL 醋酸钠缓冲液(pH 6.0)溶解。称取 100 mg BSA/OVA 于 25 mL 烧杯中,用 5 mL 醋酸钠缓冲液(pH 6.0)溶解。将上述两种溶液混匀后,边搅拌边加入 40 μ L 质量分数 25% 戊二醛溶液,搅拌反应 2 h。收集上述反应液后,用 0.01 mol/L, pH 7.4 的 PBS 缓冲液透析 3 d,期间每 6~8 h 换液 1 次,每次用量 2 L。收集透析物并小量分装,于 -20 $^{\circ}$ C 冻存备用。

1.2.2 抗原的鉴定 将合成的 MEL-BSA 和 MEL-OVA 全抗原稀释成 100 μ g/mL(蛋白质质量浓度),测定 200~350 nm 波长范围内的紫外吸收。比较三聚氰胺半抗原、载体蛋白和偶联物的紫外光谱图,判断偶联是否成功。参照杨利国介绍的计算方法^[4]测算偶联比,即三聚氰胺与载体蛋白的摩尔比,其计算公式如下:

$$\frac{C_{MEL}}{C_{载体蛋白}} = \frac{(A_{MEL-载体蛋白, am} \times K_{载体蛋白, bm} - A_{MEL-载体蛋白, bm} \times K_{载体蛋白, am})}{(A_{MEL-载体蛋白, bm} \times K_{MEL, am} - A_{MEL-载体蛋白, am} \times K_{MEL, bm})}$$

式中, $C_{MEL}/C_{载体蛋白}$ 为偶联物中 MEL 和载体蛋白(BSA 或 OVA)这两种物质的摩尔浓度比;

$A_{MEL-载体蛋白, am}$ 为偶联物(MEL-载体蛋白)在 MEL 最大吸收峰波长处(am)的吸光值;

$A_{MEL-载体蛋白, bm}$ 为偶联物(MEL-载体蛋白)在载体蛋白最大吸收峰波长处(bm)的吸光值;

$$K_{载体蛋白, am} = A_{载体蛋白, am} / C_{载体蛋白}; K_{载体蛋白, bm} = A_{载体蛋白, bm} / C_{载体蛋白}; K_{MEL, am} = A_{MEL, am} / C_{MEL}; K_{MEL, bm} = A_{MEL, bm} / C_{MEL}。$$

1.3 三聚氰胺单克隆抗体的制备和纯化

1.3.1 免疫程序 将合成的 MEL-BSA 抗原作为免疫抗原,通过常规免疫法免疫 BALB/c 小鼠。首次免疫以弗氏完全佐剂乳化抗原,皮下分点注射,免疫剂量为 75 μ g/只。以后每隔 2~3 周加强免疫 1 次,改用 MEL-BSA 抗原加不完全佐剂腹腔注射,剂量为 85 μ g/只,加强免疫共 4 次。细胞融合前 3 天,进行 1 次强化免疫,免疫剂量加倍。

1.3.2 细胞融合 取强化免疫后小鼠脾脏细胞与

Sp2/0 小鼠骨髓瘤细胞在 50% PEG2000 作用下按 8:1 的比例进行融合。将融合后的细胞悬液加到含饲养细胞的 96 孔细胞培养板上,在 37℃、体积分数 5% CO₂ 的细胞培养箱中培养 3~5 d 后,用 HAT 培养基再换液 1 次,第 10 天换成 HT 培养基培养。

1.3.3 阳性杂交瘤细胞筛选及克隆化 细胞融合 7 d 后,以 MEL-OVA 包被酶标板,采用间接 ELISA 法对融合细胞分泌的抗体进行特异性筛选。对筛选为阳性的孔用有限稀释法进行克隆化扩大培养,得到一株稳定分泌抗三聚氰胺抗体的杂交瘤细胞株 6E3,用于腹水制备和液氮保存。

1.3.4 单克隆抗体的腹水制备和纯化 采用小鼠体内诱生腹水的方式生产三聚氰胺单克隆抗体。取 3 月龄雌性 BALB/c 小鼠腹腔注射液体石蜡,0.5 mL/只,7~10 d 后腹腔注射杂交瘤细胞 1×10⁶/只,8 d 后抽取小鼠腹水。

收集腹水后,参照文献[5]对腹水用正辛酸-饱和硫酸铵法进行纯化。

1.4 三聚氰胺单克隆抗体的初步鉴定

1.4.1 效价测定 将研究制备的结合抗原 MEL-OVA 用 0.05 mol/L pH 9.6 碳酸盐缓冲液稀释到 8 μg/mL 包被酶标板,100 μL/孔,置 4℃过夜。倒尽包被液,用 PBST 液洗板 3 次,250 μL/孔,每次 3 min。用体积分数 2% 脱脂牛奶 200 μL/孔,37℃封闭 30 min 后,洗板 3 次。将纯化后的小鼠腹水倍比稀释,以同样稀释度的阴性血清为对照,按间接 ELISA 操作程序^[6]进行测定。以待测孔的 OD 值大于或等于阴性对照孔的 2.1 倍者判为阳性,以判为阳性的最高稀释倍数为效价判定终点稀释度。

1.4.2 半抑制率试验 将 0、4、20、100、500、2500 ng/mL 的三聚氰胺标准品溶液各 20 μL,分别与 80 μL 三聚氰胺单抗混合,反应 10 min 后加入已包被 MEL-OVA 抗原的酶标板,按竞争 ELISA 程序测定各孔 A_{450 nm} 值。以三聚氰胺标准品浓度的对数值为横坐标,以 B/B₀(%) (B 代表添加三聚氰胺标准品孔的 A_{450 nm} 值, B₀ 代表不添加三聚氰胺标准品孔的 A_{450 nm} 值) 为纵坐标作三聚氰胺的竞争性抑制曲线,计算 B/B₀=50% 时,横坐标上三聚氰胺标准品的质量浓度,即 IC₅₀ 值。

1.4.3 特异性分析 三聚氰胺单抗的特异性通过抗体与三聚氰胺结构类似物的交叉反应率试验来分析。选用三聚氰酸、三聚氰酸一酰胺和三聚氰酸二酰胺为竞争物,对三聚氰胺单克隆抗体采用竞争法 ELISA 进行交叉性分析。

将三聚氰胺标准品及其结构类似物三聚氰酸、三聚氰酸一酰胺及三聚氰酸二酰胺标准品做梯度稀释,分别与包被抗原 MEL-OVA 做间接竞争 ELISA,计算 IC₅₀ 值。由各结构类似物的 IC₅₀ 与三聚氰胺的 IC₅₀ 之比计算交叉反应率,计算公式如下:

$$\text{交叉反应率}(\%) = \frac{\text{IC}_{50}}{\text{IC}_{50}} \times 100\%$$

式中, IC₅₀ 为三聚氰胺单抗对三聚氰胺的半抑制质量浓度; IC'₅₀ 为三聚氰胺单抗对三聚氰胺结构类似物三聚氰酸、三聚氰酸一酰胺及三聚氰酸二酰胺的半抑制质量浓度。

2 结果

2.1 抗原的偶联比率

三聚氰胺半抗原、载体蛋白 BSA 和人工抗原 MEL-BSA 的紫外扫描图谱见图 1。

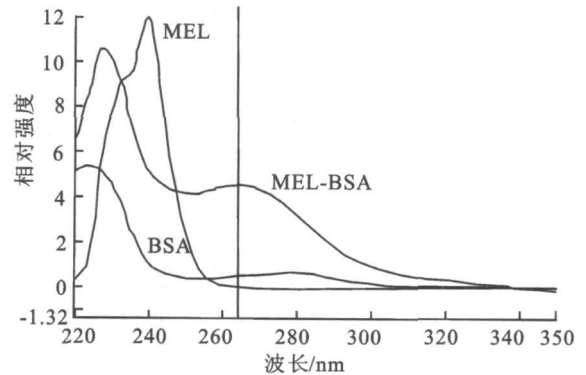


图1 MEL、BSA 和 MEL-BSA 的紫外扫描图谱

Fig. 1 UV absorbency spectrum of MEL, BSA and MEL-BSA

由图 1 可见,偶联前三聚氰胺溶液的特征吸收波峰接近 240 nm, BSA 的特征吸收波峰接近 278 nm,偶联后 MEL-BSA 的特征吸收波峰发生了明显偏移,根据吸光度加合性原理,证明三聚氰胺和载体蛋白已偶联成功。根据 1.2.2 中计算公式计算得到 MEL 与 BSA 的偶联比率为 16:1。

2.2 单克隆抗体的效价

纯化后的小鼠腹水效价测定值见图 2。

由图 2 可见,细胞株 6E3 分泌的抗三聚氰胺单克隆抗体的效价为 1:64 000。

2.3 单克隆抗体的 IC₅₀ 值

利用间接竞争 ELISA 法进行亲合性测定,结果表明 6E3 细胞株分泌的三聚氰胺抗体质量浓度在 0.1~3.2 mg/L 范围内抑制率与质量浓度呈线性关系,见图 3。线性回归方程为 $y = -41.663 \lg x + 50.117$, $R^2 = 0.9935$,抑制浓度 IC₅₀ = 1.01 mg/L。

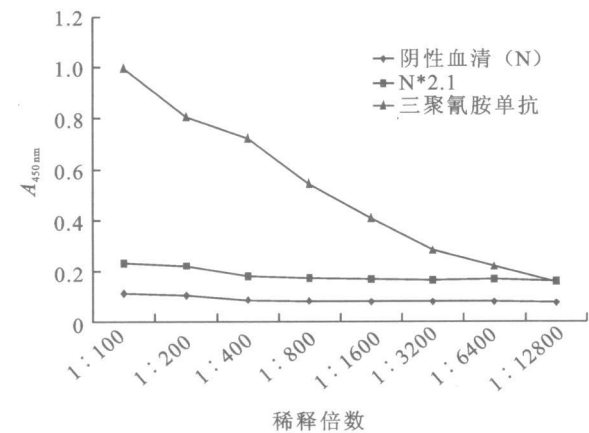


图 2 三聚氰胺单克隆抗体效价图

Fig. 2 Analysis of monoclonal antibody titer against melamine

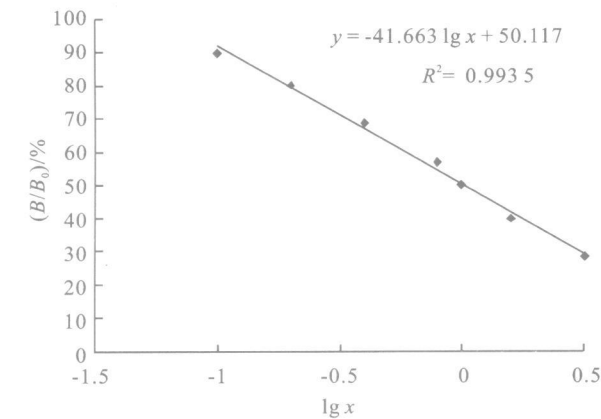


图 3 三聚氰胺的竞争抑制曲线

Fig. 3 Standard inhibition curve by indirect ELISA for MEL

2 4 单克隆抗体的特异性

三聚氰胺抗体与结构类似物的交叉反应结果见表 1。可见,三聚氰胺单克隆抗体与结构类似物三聚氰酸、三聚氰酸一酰胺及三聚氰酸二酰胺的交叉反应率< 0. 1%。

表 1 三聚氰胺单克隆抗体与结构类似物的交叉反应性

Tab. 1 Cross reactivity of MEL monoclonal antibody with related structural analogue

化合物	IC ₅₀ /(mg/ L)	CR/ %
三聚氰胺	1. 01	100
三聚氰酸	> 1000	< 0. 1
三聚氰酸一酰胺	> 1000	< 0. 1
三聚氰酸二酰胺	> 1000	< 0. 1

3 讨 论

3 1 三聚氰胺抗原合成方法的选择

完全抗原物质结构必须同时具备 T 细胞表位和

B 细胞表位。三聚氰胺属于小分子物质, 不具备免疫原性, 必须与其他大分子物质(如 BSA、OVA 等蛋白质大分子) 偶联后, 借助大分子物质的 T 细胞表位刺激机体, 使机体产生抗体特异性免疫应答。

分析三聚氰胺分子结构特征, 由于其本身的分子结构简单, 相对分子质量小, 因此必须给其连接上一定长度的臂, 增加其特征结构暴露程度, 然后再与蛋白偶联使机体产生针对三聚氰胺的免疫反应。此外, 由于三聚氰胺分子含氮杂环上连有 3 个 NH₂, 理论上可以采用偶联剂戊二醛、EDC 等将 NH₂ 与载体蛋白的 COOH 偶联。除此之外, 还可以先将三聚氰胺进行衍生反应(加臂处理), 反应物如对羧基苯甲醛、对氨基苯甲酸乙酯等, 衍生后根据结构特征再与载体蛋白进行偶联。

若直接用碳二亚胺法进行偶联, 由于三聚氰胺相对分子质量小、结构长度短, 以此免疫得到的抗体容易对三聚氰胺无特异性或特异性差。用戊二醛作为偶联剂可以为三聚氰胺增加一个 4 碳侧链, 增加其得到特异性抗体的可能性, 但戊二醛受光照、温度和 pH 等因素影响容易发生自身聚合, 因此使用时要特别注意以上条件及反应浓度。用衍生物对三聚氰胺衍生化后, 可以增强三聚氰胺免疫原性, 得到的抗体效价较高, 但机体容易对衍生物自身结构或衍生后两者共有结构产生免疫反应, 因此, 筛选特异性好的三聚氰胺抗体的难度较大。

综上所述, 作者选用戊二醛法进行三聚氰胺抗原合成。选用戊二醛法的优点在于该法得到高特异性抗体的几率大, 操作简单、成本较低, 该法存在的缺点包括免疫得到的抗体效价较低, 且结合抗原稳定性相对较差。

3 2 偶联比测定方法选择

当前, 将小分子半抗原与蛋白载体偶联后进行偶联比率测定的方法主要包括紫外吸收法、同位素示踪法、SDS——聚丙烯酰胺凝胶电泳法等。

紫外吸收法是抗原偶联比率测定最常用的方法。但紫外吸收法鉴定抗原偶联的准确性受半抗原和载体两种物质特征波长的影响, 若两种物质的特征波长相近, 则准确性差。实验半抗原三聚氰胺和载体 BSA/OVA 的特征波长相差较大, 因此其偶联比具有较好的参考价值。

同位素示踪法则利用同位素或某些特殊物质标记被偶联分子中的一种特定原子, 通过检测偶联前后标记物的变化情况估算偶联物中被偶联分子的比率。该法操作较繁, 还会遇到放射性同位素污染和防护等问题, 因此, 该法使用范围受限, 作者未

采用。

凝胶电泳估算偶联物相对分子质量法^[7]通过凝胶电泳分析偶联物的相对分子质量从而推算偶联比率,该法对仪器设备要求低,但要求偶联物的纯度很高。作者研究制备的结合抗原只采用了透析法分离了三聚氰胺、戊二醛等小分子物质,其他大分子杂物如 BSA 等未经其他方式纯化,故选用此方法推算的偶联比可信度不高。

除上述几种方法外,近年来,偶联比率测定出现了一种新方法-紫外光谱和基质辅助激光解吸电离-飞行时间质谱法(matrix assisted laser desorption/ionization time of light mass spectrometry, MALDI-TOF MS)。与常规方法相比,该方法具有准确率高、重复性好、样品消耗量少等优点,是较理想的方法。但该方法耗资大,需要配备昂贵的质谱仪器。当前,运用此方法测定人工抗原偶联比已有不少报道,如陈立本^[8]、徐金森^[9-10]等。相信随着

科技发展,未来会有更多抗原偶联比测定新技术开发出来。

4 结 语

由于三聚氰胺奶粉污染事件的发生,使得对其检测方法的探讨和研究受到广泛关注。作者用戊二醛法合成免疫抗原 MEL-BSA 和包被抗原 MEL-OVA,用 MEL-BSA 免疫 BALB/c 小鼠,免疫脾细胞与 Sp2/0 小鼠骨髓瘤细胞融合后经间接竞争 ELISA 检测筛选,获得 1 株稳定分泌抗三聚氰胺单克隆抗体的细胞株 6E3。6E3 细胞株分泌的抗体的效价为 1: 64 000,检测线性范围为 0.1~3.2 mg/L, IC₅₀ 为 1.01 mg/L,与三聚氰胺、三聚氰胺一酰胺及三聚氰胺二酰胺的 CR(%) 均小于 0.1%。结果表明,作者制备的三聚氰胺单抗各项技术指标较优,有望用于三聚氰胺快速免疫检测试剂的研制开发。

参考文献(References):

- [1] Cianciolo R E, Bischoff K, Ebel J G, et al. Clinicopathologic, histologic, and toxicologic findings in 70 cats inadvertently exposed to pet food contaminated with melamine and cyanuric acid[J]. **Am Vet Med Assoc**, 2008, 233(5): 729- 737.
- [2] Baynes R E, Smith G, Mason S E, et al. Pharmacokinetics of melamine in pigs following intravenous administration[J]. **Food and Chemical Toxicology**, 2008, 56: 4340- 4347.
- [3] 余永新,柳江英,吕晓玲,等. 三聚氰胺的毒性及其危害[J]. 食品与药品,2009, 11(3): 71- 74.
SE Yong xin, LIU Jiang yin, LV Xiao lin, et al. Toxicity of melamine[J]. **Food and Drug**, 2009, 11(3): 71- 74. (in Chinese)
- [4] 杨利国,胡少旭,魏平华,等. 酶免疫学测定技术[M]. 南京: 南京大学出版社,1998: 279- 281.
- [5] 冯仁青,郭振泉,寇捷波等. 现代抗体技术及其应用[M]. 北京: 北京大学出版社,2006: 108- 109.
- [6] [北京医学院微生物学教研组. 实验免疫学[M]. 北京: 人民卫生出版社,1980: 275- 281.
- [7] 张龙翔 张庭芳 李令媛. 生化实验方法和技术[M]. 北京: 高等教育出版社,1981: 112- 132.
- [8] 陈立本,金涌,韩博. 抗生素人工抗原偶联比测定的新方法: MALDI-TOF MS [A]. 中国畜牧兽医学学会 2008 年学术年会暨第六届全国畜牧兽医青年科技工作者学术研讨会论文集[C], 2008.
- [9] 徐金森,邵幼岩,林纪昀,等. 药用植物活性成分为人工抗原的质量鉴定方法研究[J]. 新疆大学学报(自然科学版), 2007, 24: 121- 124.
XU Jing shen, SAO Your yan, LIN Ji yun, CAI Bi shuang, et al. Studies on the method for appraisal of artificial antigen quality with bioactive constituents[J]. **Journal of Xinjiang University(Natural Science Edition)**, 2007, 24: 121- 124. (in Chinese)
- [10] 徐金森. MALDI-TOF MS 法测定芍药苷-人血清白蛋白复合物的半抗原数[J]. 厦门大学学报(自然科学版), 2006, 45: 54- 56.
XU Jing shen. Counting the half antigen number of Paeoniflorin-human serum albumin(HSA) compound with MALDI-TOF-MS methods[J]. **Journal of Xiamen University(Natural Science Edition)**, 2006, 45: 54- 56. (in Chinese)