

文章编号:1673-1689(2011)06-0962-05

基于单克隆抗体的三聚氰胺 ELISA 检测方法的建立

王黎丽, 陈芳芳, 吴超, 余为一*

(安徽农业大学 安徽省人兽共患病重点实验室, 安徽 合肥 230036)

摘要: 建立三聚氰胺直接和间接竞争 ELISA 检测方法。三聚氰胺(melamine)-BSA 免疫 BALB/c 小鼠, 通过融合小鼠脾细胞与 SP2/0 细胞, 制备分泌 MEL 单克隆抗体(monoclonal antibody)的细胞株; 体内诱生腹水制备 MEL-mAb。用高碘酸钠法制备 MEL-OVA-HRP 偶联物并对其活性进行鉴定。分别用 MEL-OVA 和制备的 MEL-mAb 包被, 用三聚氰胺标准液作为抑制物, 做直接和间接竞争 ELISA, 并对两种 ELISA 方法在灵敏度、线性检测范围、检测时间进行比较。筛选出 4 株可以稳定分泌特异性抗体的杂交瘤细胞株。其中的 C4 株腹水效价达到 $1:10^4$, 亲和力常数(Ka)为 2.92×10^8 L/mol。三聚氰胺间接竞争 ELISA 和直接竞争 ELISA 检测法的 IC_{50} 分别为 $3.12 \mu\text{g/L}$ 和 $56.88 \mu\text{g/L}$, 线性检测范围分别为 $0.05 \sim 10 \mu\text{g/L}$ 和 $0.1 \sim 1000 \mu\text{g/L}$ 。两种竞争 ELISA 方法都能应用于三聚氰胺的快速检测, 但间接竞争 ELISA 比直接竞争 ELISA 更加灵敏。

关键词: 三聚氰胺; 单克隆抗体; 间接竞争 ELISA; 直接竞争 ELISA

中图分类号: Q 813

文献标识码: A

Establishment of ELISA Methods for Detecting Melamine Based on Monoclonal Antibodies

WANG Li-li, CHEN Fang-fang, WU Chao, YU Wei-yi*

(Key Laboratory of Zoonoses of Anhui Province, Anhui Agricultural University, Hefei 230036, China)

Abstract: The objective of this study is to establish direct and indirect competitive enzyme-linked immunoassay for detection of melamine. For this, BALB/c mice were immunized with MEL-BSA, after a fusion of mouse spleen cells with SP2/0 cells, the hybridoma cells secreting monoclonal antibody against MEL were generated. MEL-mAb was produced by ascites in mice. Melamine was conjugated with HRP, and the conjugates activity was identified. MEL-OVA and MEL mAb were coated in wells respectively, standard melamine were used as inhibitors, direct and indirect competitive ELISA were compared in sensitivity, work range and testing time. Four hybridism cell strains were obtained, which could stably secrete mAbs against melamine. One of them, C4 strain, had a titers of $1:10^4$ at least in ascites by indirect ELISA and a high affinity constant (Ka) with 2.92×10^8 L/mol. IC_{50} of direct and indirect competitive ELISA methods were $3.12 \mu\text{g/L}$ and $56.88 \mu\text{g/L}$ respectively, and their work ranges were $0.1 \sim 1000 \mu\text{g/L}$ and $0.05 \sim 10 \mu\text{g/L}$, respectively. Both direct and indirect competitive ELISA methods can be used for the detection of melamine, while the latter is more sensitive and suitable for further research.

收稿日期: 2010-12-02

* 通信作者: 余为一(1952-), 男, 上海人, 农学博士, 教授, 博士研究生导师, 主要从事免疫学研究。Email: yuweiyi@sohu.com。

Key words: melamine, monoclonal antibody, direct competitive ELISA, indirect competitive ELISA

三聚氰胺^[1]简称三胺,化学名 1,3,5-三嗪-2,4,6-三氮,分子式为 $C_3N_6H_6$,相对分子质量为 126.12,是一种低毒无味的纯白色单斜棱晶体,广泛应用于涂料、建材、造纸、皮革、纺织等行业中。由于三聚氰胺的含氮量高达 66%,是蛋白质平均含氮量的 4 倍,而常用的凯氏定氮法测定样品中的蛋白质含量时却不能区分这种非蛋白氮,因此被不法商贩利用添加在饲料和食品中以提高食品和饲料中粗蛋白质检测数值。动物实验表明^[2],三聚氰胺对于哺乳动物属于微毒、低毒类化学物质,长期饲喂可能造成生殖、泌尿系统的损害,膀胱、肾部出现结石,并可进一步诱发膀胱癌。

开发灵敏、准确、快速的针对三聚氰胺的免疫检测技术及其产品是对现有仪器检测方法高效液相色谱法、气相色谱-质谱联用法和液相色谱-质谱/质谱法等^[3-5]的一个重要补充。本研究在利用合成的三聚氰胺人工抗原和自制辣根过氧化物酶标记抗原,通过细胞融合技术制备出 MEL 单克隆抗体,初步建立并比较了检测三聚氰胺的直接竞争 ELISA 和间接竞争 ELISA 检测方法,为试剂盒研制打下基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试剂 三聚氰胺标准品购自国药集团化学试剂有限公司;人工抗原 MEL-BSA 和 MEL-OVA 由南京金斯特公司合成;辣根酶标记山羊抗小鼠 IgG,购自中杉金桥生物公司;牛血清白蛋白(BSA)、鸡卵清蛋白(OVA)、弗氏完全(不完全)佐剂为 Sigma 公司产品;RPMI Medium 1640 细胞培养基为 invitrogen 公司产品;DMEM 高糖培养基、胎牛血清为 GIBCOL 公司产品;GENMED 聚乙二醇细胞融合试剂盒购自上海杰美基因医药科技有限公司;其余试剂均为分析纯。

1.1.2 细胞和小鼠 SP2/0 骨髓瘤细胞由本实验室保存;雌性 8 周龄 BALB/c 小鼠购于安徽医科大学实验动物中心。

1.1.3 实验仪器 超净工作台:苏州净化设备厂生产;CO₂ 恒温培养箱:ShellLab 产品;倒置显微镜:Olympus IX51 重庆光学仪器厂产品;高速冷冻离心机:德国 Eppendorf 公司产品;酶标仪:MK3 型

Thermo Fisher Scientific 产品;96 孔酶标板、96 孔细胞培养板:美国 constra 公司生产。

1.2 方法

1.2.1 单抗的制备和鉴定 用人工抗原 MEL-BSA 免疫 BALB/c 小鼠,经 4 次免疫后,检测血清抗体效价达到约为 $1:10^5$,取免疫鼠的脾淋巴细胞与 SP2/0 细胞融合,以 MEL-OVA 为包被抗原用间接 ELISA 方法筛选,检测为阳性的杂交瘤细胞经有限稀释法进行亚克隆,将最后筛选出的阳性杂交瘤细胞扩大培养、冻存并制备腹水。对收集的小鼠腹水用 PEG6000 沉淀法进行初步提纯。

采用间接 ELISA 测定腹水效价。参照 McAb 亚型鉴定试剂盒操作说明进行 McAb 亚型鉴定。亲和力鉴定参照 BATTY^[6]所述方法测定亲和常数(K_a)。以 MEL mAb 与 MEL-OVA 和载体蛋白 BSA、OVA 的间接 ELISA 反应对 MEL mAb 做特异性分析。

1.2.2 MEL 标准溶液的配制 准确称取 2 mg MEL 溶于 2 mL 甲醇溶液中,配制成 1 mg/mL 母液,然后用体积分数 20% 甲醇溶液稀释母液得到质量浓度分别为 10、1、0.1 $\mu\text{g/mL}$ 的 MEL 溶液(现配现用)。

1.2.3 间接竞争 ELISA 方法的建立 将 MEL-OVA 用碳酸盐缓冲液(pH 9.6)分别稀释至 10、5、2.5、1.25、0.625 $\mu\text{g/mL}$,4 $^{\circ}\text{C}$ 包被过夜,100 μL /孔;弃去包被液每孔加入 100 μL 含 5 g/dL 甘氨酸的 PBS 37 $^{\circ}\text{C}$ 封闭 1 h, PBST 洗涤 3 次;分别加入 40、20、10、5、2.5 $\mu\text{g/mL}$ MEL mAb 100 μL ,进行方阵滴定,确定 MEL-OVA 和 MEL mAb 的工作浓度。在确定抗原和抗体最佳工作浓度的基础上,采用间接 ELISA 对封闭液(0.1 mol/L NH_4Cl , 5 g/dL 甘氨酸, 3 g/dL OVA, 1 g/dL 明胶、PBST)、封闭时间(37 $^{\circ}\text{C}$ 30 min、1、2 h 和不封闭)、二抗作用体积比(1:2 000、1:4 000、1:8 000、1:16 000)、二抗(37 $^{\circ}\text{C}$ 30 min、1、2 h)和底物作用时间分别为 5、10、15、20、30 min 反应条件进行优化,具体步骤同上,以阳性值与阴性值的比例(P/N)最高为优化的条件。

根据确定的反应条件建立三聚氰胺间接竞争 ELISA 方法。具体步骤:用碳酸盐缓冲液(pH 9.6)将 MEL-OVA 稀释至 2.5 $\mu\text{g/mL}$ 4 $^{\circ}\text{C}$ 包被过夜,

100 μL /孔;弃去包被液每孔加入 100 μL 含 5 g/dL 甘氨酸的 PBS 37 $^{\circ}\text{C}$ 封闭 1 h, PBST 洗涤 3 次;同时加入 50 μL 用体积分数 20% 甲醇水稀释的 MEL 标准溶液(10、5、1、0.5、0.1、0.05 ng/mL)和 50 μL 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 MELmAb, 37 $^{\circ}\text{C}$ 共同孵育 1 h, PBST 洗涤 3 次;每孔加 100 μL OPD 底物液显色, 避光反应 15 min;每孔加入 2 mol/L H_2SO_4 100 μL 以终止反应;用酶标仪在 492 nm 波长下测各孔吸光值, 计算抑制率($B/B_0 \times 100\%$, B 为加 MEL 时的 OD 值, B_0 为不加 MEL 时的 OD 值), 并绘制抑制曲线, 计算 IC_{50} 和最低检测限。由测定 10 个 0 ng/mL 标准液 OD 值的平均值减去 2 倍标准差所得值对应浓度最低检测限。

1.2.4 三聚氰胺酶标抗原的制备 参照 Micheli L 等^[7]所述方法进行, 将 HRP 和 MEL-OVA 偶联成酶标抗原。步骤: 称取 HRP 3 mg 溶于 pH 5.6 0.2 mol/L 醋酸盐缓冲液 1.0 mL 中;加入新鲜配制的 0.5 mL 0.1 mol/L NaIO_4 溶液混匀 4 $^{\circ}\text{C}$ 静置 30 min;加 0.5 mL 0.16 mol/L 乙二醇(0.05 mol/L pH 9.5 的醋酸盐缓冲液配制), 室温静置 30 min;将活化的酶溶液与 0.5 mL 3 mg/mL 三聚氰胺-OVA 溶液(PBS 溶解)混合均匀后转入透析袋中, 用 0.05 mol/L pH 值 9.5 的醋酸盐缓冲液透析过夜;取出透析液后加入 0.1 mL 5 mg/mL NaBH_4 溶液, 混匀后 4 $^{\circ}\text{C}$ 放置 3 h;混合液用 0.01 mol/L pH 7.4 PBS 4 $^{\circ}\text{C}$ 透析过夜后 3 000 r/min 离心 30 min, 除去沉淀物, 上清液即为酶标记抗原。

1.2.5 酶标抗原免疫活性测定 用 0.05 mol/L, pH 9.5 的醋酸盐缓冲液将 MELmAb 稀释至 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 包被酶标板, 100 μL /孔, 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜;弃去包被液每孔加入 100 μL 含 1 g/dL BSA 的 PBS 37 $^{\circ}\text{C}$ 封闭 1 h, PBST(含体积分数 0.05% Tween 20)洗涤 3 次;加入倍比稀释的 MEL-OVA-HRP 100 μL /孔(以相同浓度的 HRP 溶液做阴性对照, PBS 溶液做空白对照, 100 μL /孔)37 $^{\circ}\text{C}$ 温育 1 h, PBST 洗涤 3 次;然后每孔加 100 μL OPD 底物液显色, 避光反应 15 min;每孔加入 2 mol/L H_2SO_4 100 μL 以终止反应;用酶标仪在 492 nm 波长下测各孔吸光值。

1.2.6 直接竞争 ELISA 方法的建立 将 MELmAb 用醋酸盐缓冲液(pH 9.6)分别稀释至 10、5、2.5、1.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 100 μL /孔, 4 $^{\circ}\text{C}$ 包被过夜;弃去包被液每孔加入 100 μL 含 1 g/dL OVA 的 PBS 37 $^{\circ}\text{C}$ 封闭 1 h, PBST 洗涤 3 次;分别加入 1:50、1:100、1:200(V:V)稀释的 MEL-OVA-HRP 100 μL , 进行方阵滴定, 确定 MELmAb 和

MEL-OVA-HRP 的工作浓度。

根据确定的反应条件建立三聚氰胺直接竞争 ELISA 方法。具体步骤: 用醋酸盐缓冲液将 MELmAb 稀释至 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 4 $^{\circ}\text{C}$ 包被过夜, 每孔加入 100 μL 1 g/dL OVA 37 $^{\circ}\text{C}$ 封闭 1 h, PBST 洗涤 3 次;同时加入 50 μL MEL 标准溶液(1 000、100、10、1、0.1 ng/mL)和 50 μL 1:50 稀释的酶标抗原 MEL-OVA-HRP 37 $^{\circ}\text{C}$ 共同孵育 1 h, PBST 洗涤 3 次;每孔加 100 μL OPD 底物液显色, 避光反应 15 min;每孔加入 2 mol/L H_2SO_4 100 μL 以终止反应;用酶标仪在 492 nm 波长下测各孔吸光值, 计算抑制率($B/B_0 \times 100\%$, B 为加 MEL 时的 OD 值, B_0 为不加 MEL 时的 OD 值), 并绘制抑制曲线, 计算 IC_{50} 和最低检测限, 最低检测限计算方法同上。

2 结果

2.1 单抗的制备与鉴定

以 MEL-OVA 为筛选抗原包被在酶标板上, 通过间接 ELISA 筛选, 获得 4 株能够稳定分泌抗 MELmAb 的阳性细胞株, 命名为 A85, B11, C4 和 B6(见表 1)。其中 C4 株的效价较高因此对其性能进行进一步的研究。

表 1 MEL mAb 的效价

Tab. 1 Titlers of MEL mAb

株系	细胞上清效价	腹水效价	对照
A85	1:32	1:8 000	0.084
B11	1:16	1:4 000	0.092
C4	1:256	1:8 000	0.109
B6	1:32	1:4 000	0.079

C4 抗体经 PEG6000 沉淀法提纯后间接 ELISA 法检测腹水效价在 $1:10^4$ 以上;属于 IgM 亚类;亲和常数为 $2.92 \times 10^8 \text{ L/mol}$, 依据抗体亲和力理论可知, 本试验中筛选出的 C4 株抗体的亲和力较高;对单抗的特异性分析显示 C4 与载体蛋白 BSA、OVA 均没有反应而特异性针对 MEL 半抗原(见表 2)。

表 2 MEL mAb 的特异性分析

Tab. 2 Specificity analysis of MEL mAb

	阳性	阴性
BSA	0.050	0.051
OVA	0.112	0.097
MEL-BSA	1.374	0.073
MEL-OVA	0.940	0.104

2.2 酶标抗原酶活性测定和直接竞争 ELISA 方法的建立

酶标抗原 HRP-OVA-MEL 鉴定结果见图 1。HRP-OVA-MEL 孔的 OD_{492nm} 为 1.548, 而相同浓度的 HRP 和空白对照孔的 OD_{492nm} 值分别为 0.370 和 0.058。这一结果表明酶标抗原 MEL-OVA-HRP 可以和 MEL 抗体发生特异性结合, 并保持了 HRP 的催化活性。

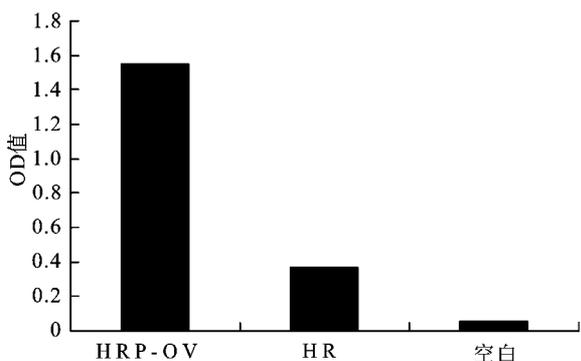


图 1 酶标抗原活性鉴定

Fig. 1 Activity of marking antigen enzyme

2.3 直接竞争 ELISA 检测方法的建立

对于直接竞争 ELISA 检测方法, 确立的 MELmAb 和 OVA-MEL 工作浓度分别为 5 μg/mL 和 1:50。根据建立的直接竞争 ELISA 检测方法, 以三聚氰胺标准溶液的质量浓度的对数值为横坐标结合率为纵坐标绘制的标准曲线见图 2, 回归方程为 $y = -11.432x + 70.072$, $R^2 = 0.9948$, IC₅₀ 为 56.88 μg/L, 检测限为 0.12 μg/L。

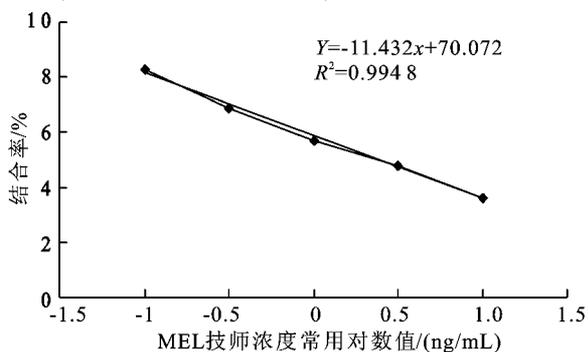


图 2 DC-ELISA 抑制曲线

Fig. 2 Inhibitory curve of DC-ELISA

2.4 间接竞争 ELISA 检测方法的建立

对间接竞争 ELISA 检测方法的条件进行了优化, 优化后的条件分别为 OVA-MEL 和 MELmAb 的工作浓度分别为 2.5 μg/mL 和 20 μg/mL; 5 g/dL 甘氨酸封闭 1 h; 二抗 1:4000 温育 1 h; 底物作用 20 min。根据建立的间接竞争 ELISA 检测方法, 以三聚氰胺标准溶液的质量浓度的对数值和结合率分别为横坐标和纵坐标, 绘制的标准曲线见图

3, 回归方程为 $y = -25.093x + 62.409$, $R^2 = 0.9877$, IC₅₀ 为 3.12 μg/L, 检测限为 0.079 μg/L。

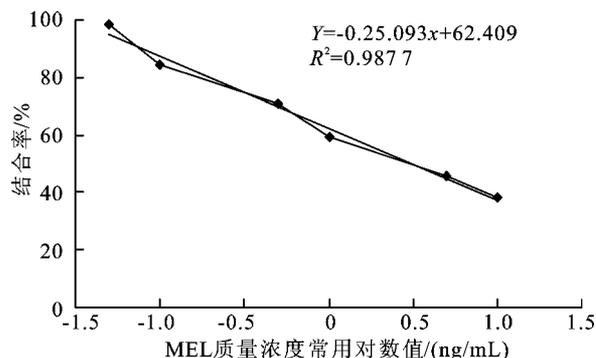


图 3 IC-ELISA 抑制曲线

Fig. 3 Inhibitory curve of IC-ELISA

2.5 直接和间接竞争 ELISA 检测方法的比较

两种 ELISA 检测方法比较的结果(见表 3)看, 直接竞争 ELISA 方法的灵敏度比间接竞争 ELISA 方法的低, 但所花费的时间和费用要少于间接竞争 ELISA 法。

表 3 三聚氰胺直接竞争和间接竞争 ELISA 法的比较

Tab. 3 Comparison of DC-ELISA assay and IC-ELISA for Melamine

检测法	IC ₅₀ / (μg/L)	检测限 / (μg/L)	检测范围 / (μg/L)	检测时间/h	二抗应用
直接竞争 ELISA	56.88	0.12	0.1~1 000	2.5	无
间接竞争 ELISA	3.12	0.079	0.05~10	3.5	有

3 讨论

合成酶标抗原通常有将 MEL 与 HRP 直接偶联和先合成的 MEL-OVA 再偶联上 HRP 两种方法, 但笔者发现相同浓度的合成的 HRP-MEL 与 MEL 抗体不能发生特异性结合, 分析原因有以下几点: 首先三聚氰胺的分子量较小, 含有的可反应基团较少, 使偶联上的可能性大大降低, 其次三聚氰胺难溶于水, 而偶联反应一般是在水相中进行, 即使将三聚氰胺溶于体积分数 20% 的甲醇溶液, 也可能对偶联反应产生影响, 最后三聚氰胺的结构简单, 与酶偶联上后由于没有一点的间隔臂可能会影响三聚氰胺与抗体的特异性识别。

目前用高效液相色谱法、气相色谱-质谱联用法和液相色谱-质谱/质谱法三种方法检测三聚氰胺的检出限分别为 2、0.05 和 0.01 mg/kg, 与这些方法相比, 本试验所建立的检测方法的灵敏度较低。但由于 ELISA 方法对仪器、样品纯度和技术人员的要求不高, 适合于大批量样本的检测, 目前市售的

三聚氰胺 ELISA 检测的试剂盒的检测范围在 20~500 ng/mL,最低检测限甚至可以达到 10 ng/mL,而在已有的报道中,邢淑婕^[8]、何方洋^[9]等只制备了三聚氰胺多克隆抗体和单克隆抗体,蔡家利等^[10]不但制备了三聚氰胺单抗,并且用 HRP 酶标记此单抗建立了直接竞争 ELISA 方法其 IC₅₀ 为 4.15 μg/mL,与上述研究相比,本试验建立的直接竞争 ELISA 检测方法灵敏度不如市售的三聚氰胺检测试剂盒。目前国家规定婴儿配方食品中三聚氰胺的限量值为 1 mg/kg,其他食品和饲料中的限量值

为 2.5 mg/kg,本试验建立的直接和间接竞争 ELISA 检测方法均能达到此检测水平。

在现有的试验条件下,间接法比直接法检测三聚氰胺的灵敏度稍高,这可能是由于间接法使用二抗的信号放大作用,其稀释倍数较高且产生背景值低,而直接法中自制的酶标抗原稀释倍数低,可能对抑制效果有影响。鉴于建立的 ELISA 方法具有良好的灵敏性,本研究将继续优化反应条件,从精确度、准确度、特异性和稳定性方面进行质量控制以期发挥更好的检测效果。

参考文献(References):

- [1] 北京化学试剂公司编. 化学试剂目录手册[M]. 北京:北京工业大学出版社,1993.
- [2] 邹移海, 张薇, 郭学军, 等. 三聚氰胺泌尿系结石及其动物模型研究进展[J]. 实验动物与比较医学, 2010, 30(4): 308—312.
ZOU Yi-hai, ZHANG Wei, GUO Xue-jun, et al. Progress in research of animal models with melamine urolithiasis[J]. *Laboratory Animal and Comparative Medicine*, 2010, 30(4): 308—312. (in Chinese)
- [3] 林影, 叶茂, 韩双艳, 等. 免疫分析研究进展[J]. 食品与生物技术学报, 2007, 4: 117—120.
LIN Ying, YE Mao, HAN Shuang-yan, et al. The progress on the research of immunoassay[J]. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 2007, 4: 117—120. (in Chinese)
- [4] Hanwen Sun, Lixin Wang, et al. SPE then RP-LC for simultaneous analysis of cyromazine and its metabolite melamine in liquid milk and egg[J]. *Chromatographia*, 2009, 70(12): 1685—1689.
- [5] 张曦, 金芬, 钱永忠, 等. 食品及饲料中三聚氰胺的研究进展[J]. 食品工业科技, 2009, 30(7): 337—342.
ZHANG Xi, JIN Fen, QIAN Yong-zhong, et al. Review on advance of melamine in foods and animal feeds[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2009, 30(7): 337—342. (in Chinese)
- [6] Batty JD, Beatty BG, Wlanos WG. Measurement of monoclonal antibody affinity by noncompetitive enzyme immunoassay [J]. *Journal of Immunology Methods*, 1987, 100: 173—179.
- [7] Micheli L, Di Stefano S, Moscone D, et al. Production of antibodies and development of highly sensitive formats of enzyme immunoassay for saxitoxin analysis[J]. *Analy Bioanaly Chem*, 2002, 373(8): 678—684.
- [8] 邢淑婕, 刘开华. 牛奶中三聚氰胺的 ELISA 检测研究[J]. 中国食品添加剂, 2009, 05: 187—191.
XING Shu-jie, LIU Kai-hua. Analysis of Melamine in milk by ELISA[J]. *China Food Additives*, 2009, 05: 187—191. (in Chinese)
- [9] 何方洋, 万宇平, 罗晓琴, 等. 三聚氰胺单克隆抗体的制备与鉴定[J]. 吉林畜牧兽医, 2010, 3(31): 7—9.
HE Fang-yang, WAN Yu-ping, LUO Xiao-qin, et al. Preparation and identification of monoclonal antibodies against melamine[J]. *Jilin Animal Husbandry and Veterinary Medicine*, 2010, 3(3): 7—9. (in Chinese)
- [10] 蔡家利, 陈昕, 徐社会. 三聚氰胺单克隆抗体的制备及鉴定[J]. 重庆理工大学学报: 自然科学, 2010, 24(4): 30—34.
CAI Jia-li, CHEN Xin, XU She-hui, et al. Development and characterization of hybridoma cell line H2C6 secreting monoclonal antibody against melamine[J]. *Journal of Chongqing University of Technology: Natural Science*, 2010, 24(4): 30—34. (in Chinese)