

# 抗玉米赤霉烯酮单抗独特型抗体制备与鉴定

余涛<sup>1</sup>, 李大刚<sup>2</sup>, 邓宁<sup>1</sup>, 向军俭<sup>1</sup>, 宋其芳<sup>1</sup>, 贾彦琼<sup>1</sup>, 王宏<sup>1,\*</sup>

(1.暨南大学生命科学技术学院, 广东 广州 510632; 2.广东省农业科学院畜牧研究所, 广东 广州 510640)

**摘要:** 目的: 研制抗玉米赤霉烯酮(zearalenone, ZEN)单抗独特型抗体并鉴定其特性, 为建立ZEN无毒检测方法提供理论依据。方法: 在研制抗ZEN单抗的基础上, 将IgG与KLH偶联作为免疫原, 免疫BALB/c小鼠, 制备抗ZEN单抗独特型抗体; 同时将经Protein G纯化的单抗用胃蛋白酶酶切获取Fab片段, 作为检测原, 并采用间接ELISA和间接竞争ELISA对抗独特型抗体特性进行鉴定。结果: 所研制的抗独特型抗体能够与ZEN竞争结合ZEN单抗, 与ZEN之间存在“内影像”关系。结论: 成功研制抗ZEN单抗独特型抗体, 可以替代ZEN标准品应用于ELISA检测。

**关键词:** 玉米赤霉烯酮; 抗独特型抗体; Fab片段; 内影像

## Preparation and Identification of Anti-Zearalenone Monoclonal Antibody

YU Tao<sup>1</sup>, LI Da-gang<sup>2</sup>, DENG Ning<sup>1</sup>, XIANG Jun-jian<sup>1</sup>, SONG Qi-fang<sup>1</sup>, JIA Yan-qiong<sup>1</sup>, WANG Hong<sup>1,\*</sup>

(1. College of Life Science and Technology, Jinan University, Guangzhou 510632, China;

2. Institute of Animal Science, Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Guangzhou 510640, China)

**Abstract:** Objective: To prepare and identify anti-zearalenone (ZEN) monoclonal antibody, and provide a theoretical reference for the non-toxic detection of ZEN. Methods: During the preparation of anti-ZEN monoclonal antibody, the antigen was prepared by conjugation between IgG and KLH and the BALB/c mice were subjected to the immunization by obtained antigen to prepare anti-ZEN monoclonal antibody. The identification of this monoclonal antibody was conducted by ELISA coupled with Fab fragment as coating antigen. Results: The obtained anti-ZEN monoclonal antibody was identified as the “inner image” with ZEN toxin. Conclusion: Anti-ZEN monoclonal antibody is successfully prepared and can be used to replace ZEN toxin standard in ELISA.

**Key words:** zearalenone; anti-idiotypic antibody; Fab fragment; inner image

中图分类号: R392.11

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630(2013)03-0184-04

玉米赤霉烯酮是由禾谷镰刀菌和黄色镰刀菌等真菌产生的有毒次级代谢产物, 广泛存在于大量谷物, 如玉米、大麦、燕麦、小麦、水稻和高粱等<sup>[1]</sup>。尽管ZEN的毒性较低, 但是对哺乳动物的影响超过雌性激素, 研究表明<sup>[2]</sup>ZEN及其代谢物可以引起猪、牛、家禽的雌激素过多症, 以及生殖系统紊乱等症状。此外ZEN具有细胞毒性, 并且在体内外表现出潜在的遗传毒性<sup>[3]</sup>, 同样对人类也会产生诸如此类的毒害。因此欧盟及许多国家制定了谷物及饲料中ZEN最大限量标准<sup>[4-5]</sup>。

目前用于分析谷类粮食、饲料及食品中ZEN含量的方法主要有薄层色谱(TLC)<sup>[6]</sup>、高效液相色谱(HPLC)<sup>[7]</sup>、酶联免疫吸附实验(ELISA)<sup>[8-9]</sup>等。ELISA法已被AOAC批准为玉米、小麦、饲料中ZEN的快速筛选方法<sup>[10]</sup>。免疫学测定法特点是特异性强、灵敏度高, 并且可以现场筛选大量样品。然而由于ZEN免疫学测定法涉及到使用毒素标准品, 包括游离物和偶联物, 可能对研制者和使用者带来毒

害。近来, 许多科研机构都在研制半抗原的替代品, 如利用噬菌体库筛选多肽模拟ZEN<sup>[11]</sup>; 应用抗独特型抗体(anti-idiotypic antibody, Aid)模拟皮质醇等<sup>[12-13]</sup>。抗独特型抗体是针对抗体独特型产生的抗体<sup>[14]</sup>, 根据独特型的不同, 分为几种类型, 其中能够结合抗原抗体结合部位的Aid称之为Ab2 β, Jerne称之为抗原的“内影像”, 可以模拟抗原的三维结构。本研究是在已制备抗ZEN单抗(Ab1)的基础上, 用IgG-KLH偶联物免疫BALB/c小鼠, 制备抗ZEN单抗独特型抗体(多抗), 并研究抗独特型抗体与ZEN之间的“内影像”关系, 为抗ZEN单抗独特型抗体替代ZEN标准品用于ELISA检测提供理论依据。

## 1 材料与与方法

### 1.1 材料与试剂

ZEN毒素标准品、HRP标记的链霉亲和素、HRP标

收稿日期: 2011-11-15

基金项目: “十一五”国家科技支撑计划项目(2008BAK42B05); 天河区科技计划项目(108ZH044); 暨南大学创新基金项目(11610312)

作者简介: 余涛(1984—), 男, 硕士研究生, 研究方向为食品安全检测。E-mail: yutao840809@163.com

\*通信作者: 王宏(1976—), 女, 副教授, 博士, 研究方向为分子免疫学与抗体工程。E-mail: wanghonghjlj@yahoo.com.cn

记的羊抗鼠IgG(Fc特异性)二抗 美国Sigma公司; HRP标记的羊抗鼠IgG(Fab特异性)二抗 美国Santa公司; 固定化胃蛋白酶、生物素标记试剂盒、匙孔血蓝蛋白(KLH)、BCA™ protein试剂盒 美国Thermo公司; 细胞培养基RPMI-1640、小牛血清 Gibico公司; Protein G亲和层析柱 美国GE公司; Quickadjuvant佐剂 北京优尼康生物科技有限公司; 其他试剂均为国产分析纯。

## 1.2 动物及细胞系

3只BALB/c小鼠(6~8周龄, 雌性) 南方医科大学实验动物中心; 抗ZEN单抗1G4杂交瘤细胞株、IgG2b亚类 本实验室保存。

## 1.3 仪器与设备

Multiskan MK3 酶标仪、细胞培养箱 美国Thermo公司; Eppendorf centrifuge 5417R离心机 德国Eppendorf 公司; PowerPac HCTM 电泳仪 美国Bio-Rad公司; TS-2 型脱色摇床 海门市麒麟医用仪器厂; 超净工作台 苏州净化设备厂; 倒置显微镜 日本Olympus公司。

## 1.4 方法

### 1.4.1 抗ZEN单抗腹水制备及抗体纯化

复苏冻存的抗ZEN单抗的杂交瘤细胞并扩大培养, 每只BALB/c小鼠提前注射0.5mL弗氏不完全佐剂, 1周后每只小鼠腹腔内接种 $1 \times 10^6$ 个杂交瘤细胞, 7~10d后抽取腹水。先采用饱和硫酸铵法粗纯腹水, 再用Protein G亲和层析柱进行纯化, SDS-PAGE鉴定单抗纯化效果。

### 1.4.2 抗ZEN单抗Fab片段制备及鉴定

不同类或亚类抗体的片段化需要选择不同的蛋白酶, 对于IgG2b亚类的抗体需要用固定化胃蛋白酶进行酶切, 此亚类抗体对胃蛋白酶非常敏感, 而且酶切产物为Fab/c<sup>[15]</sup>。首先摸索最佳酶切时间, 分别设定酶切时间为1、2、3、4h, 37℃条件下进行酶切, 具体步骤参考Pierce固定化胃蛋白酶说明书。选择最佳酶切时间后进行大量的酶切IgG抗体(1~10mg), 酶切产物经Protein G亲和层析柱纯化并浓缩后, 分装保存于-20℃, 同时采用凝胶电泳和ELISA法对单抗Fab片段活性进行鉴定。

### 1.4.3 免疫原抗ZEN单抗-血蓝蛋白(KLH)偶联物的制备

抗ZEN单抗为鼠源性抗体, 如果用单抗直接免疫BALB/c小鼠, 免疫原性很弱, 需要将抗ZEN单抗进行修饰。参考Toshifumi等<sup>[13]</sup>, 通过化学偶联剂EDC IgG与KLH偶联, 将25.6mg EDC加入4mg/mL IgG溶液(PBS, 500μL)中, 室温搅拌反应30min, 然后加入2mg/mL的KLH溶液(PBS, 1mL), 4℃反应过夜, 反应产物用PBS透析2d, 即获得免疫原IgG-KLH偶, 分装并保存于-20℃备用。

### 1.4.4 动物免疫

使用Quickadjuvant高效免乳化佐剂进行免疫, 此佐剂的特点是免疫剂量少、免疫周期短, 并且可以保持免

疫原活性。以免疫原IgG-KLH偶联物免疫3只BALB/c小鼠, 免疫剂量为每只小鼠50μg, 等体积免疫原与佐剂(各50μL)快速混匀后, 小腿肌肉注射, 免疫周期为3周, 共免疫3次。

### 1.4.5 血清分离及纯化

第3次免疫后2周, 摘眼球取血, 37℃放置1h, 然后4℃过夜, 3000r/min离心10min, 收集上清即为血清。采用辛酸-硫酸铵进行纯化, BCA试剂盒测定纯化抗体质量浓度。

### 1.4.6 抗ZEN单抗生物素标记

由于本研究中制备的抗独特型抗体为鼠源性多抗, 为了方便研究抗独特型抗体与ZEN之间内影像关系, 需要将抗ZEN单抗进行生物素标记, 建立生物素-链霉亲和素检测系统。标记过程参考Pierce 生物素标记试剂盒说明书, 将3.5mg Ab1溶于1mL 0.01mol/L PBS(pH7.2)中, 然后加入51μL 20mmol/L NHS-LC-Biotin溶液, 室温反应1h, 用Zeba脱盐离心柱对反应产物进行脱盐, 即获得Biotin-ZEN单抗。

### 1.4.7 抗ZEN单抗独特型抗体鉴定

采用间接ELISA测定抗独特型抗体效价, 将检测原Fab用包被缓冲液稀释至0.5μg/mL, 加入96孔酶标板, 每孔100μL, 37℃孵育3h; 300μL磷酸盐-吐温溶液(PBST)洗板3次; 加入200μL 5%脱脂乳粉, 37℃封闭1h; 300μL PBST洗板3次; 加入100μL倍比稀释的抗血清, 37℃孵育1h; 300μL PBST洗板3次; 加入100μL 1:10000稀释的HRP标记的羊抗鼠IgG(Fc特异性)二抗, 37℃孵育40min; 300μL PBST洗板5次; 加入100μL TMB底物, 避光显色10min; 加入50μL 2mol/L硫酸终止反应, 酶标仪测定OD<sub>450nm</sub>值, 当其在1.0左右时, 抗血清稀释倍数就是其效价。

间接竞争ELISA测定抗独特型抗体灵敏度, 操作过程类似于间接ELISA, 不同处为同时加入50μL不同浓度的ZEN竞争物和50μL 2倍于抗独特型抗体效价的抗血清。

### 1.4.8 替代标准曲线建立

间接ELISA测定Biotin-ZEN单抗的效价, 包被缓冲液将检测原ZEN-BSA稀释至0.5μg/mL, 加入96孔酶标板, 每孔100μL, 37℃孵育3h; 300μL PBST洗板3次; 加入200μL 5%脱脂乳粉, 37℃封闭1h; 300μL PBST洗板3次; 加入倍比稀释的Biotin-ZEN单抗, 每孔100μL, 37℃孵育1h; 300μL PBST洗板3次; 加入100μL 1:800稀释的HRP标记的链霉亲和素, 37℃孵育40min; 300μL PBST洗板5次; 加入100μL TMB底物, 避光显色10min; 加入50μL 2mol/L硫酸终止反应, 酶标仪测定OD<sub>450nm</sub>值, OD<sub>450nm</sub>值在1.0左右时的抗体稀释倍数为Biotin-ZEN单抗的效价。

采用间接竞争ELISA研究ZEN与替代物抗独特型抗体之间的相关性, 首先建立ZEN毒素或抗独特型抗体竞争抑制曲线, 过程如上所述, 不同之处为同时加入50μL系列质量浓度(0.5~160ng/mL)的ZEN标准品或系列质量浓度(0.098~6.250μg/mL)的抗独特型抗体和50μL 2倍于

效价的Biotin-ZEN单抗。根据统计学绘制在相同抑制率条件下, ZEN质量浓度( $\mu\text{g/mL}$ )与抗独特型抗体质量浓度( $\text{ng/mL}$ )间的相关性曲线。

## 2 结果与分析

### 2.1 抗ZEN单抗纯化效果鉴定

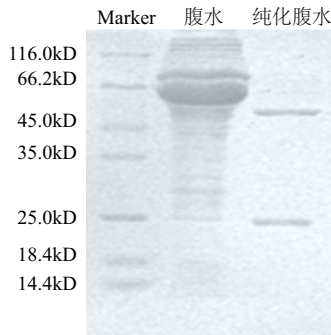
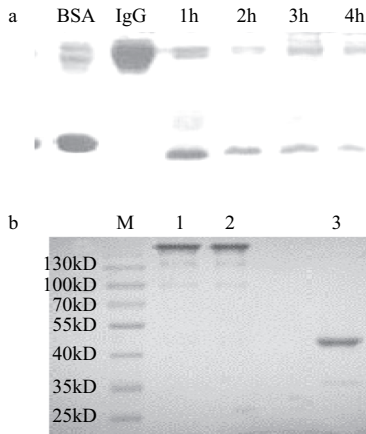


图1 腹水及纯化腹水的SDS-PAGE图  
Fig.1 SDS-PAGE of ascites and purified ascites

采用12%分离胶的SDS-PAGE鉴定抗ZEN单抗纯度, 结果如图1所示, 纯化后的单抗只有2条带, 分别是50kD处的重链和25kD的轻链, 表明抗体纯度很高。

### 2.2 抗ZEN单抗Fab片段特性鉴定



BSA. 牛血清白蛋白对照; M. 蛋白质  
Marker; 1, 2. 均为IgG; 3. Fab抗体片段。

图2 非变性PAGE研究酶切时间对IgG片段化的影响(a)和非还原SDS-PAGE鉴定Fab抗体片段(b)

Fig.2 Effect of digestion time on pepsin digestion of IgG assessed by native-PAGE and the identification of Fab fragment by non-reduced SDS-PAGE

抗ZEN单抗酶切产物进行非变性凝胶电泳, 结果如图2a所示, 酶切1h获得的片段化抗体最多, 随着酶切时间的增加, 片段化抗体逐渐减少, 因此选择酶切时间为1h。酶切产物经Protein G层析柱纯化, 非还原性SDS-PAGE鉴定纯化后产物, 图2b显示酶切片段分子质量为50kD, 与抗体片段Fab大小吻合。

采用间接ELISA和间接竞争ELISA鉴定Fab片段活性, 结果如表1所示, Fab片段的比效价比抗ZEN单抗低, 但灵敏度较完整抗体提高了3倍, 表明制备的Fab片段活性较好, 可以作为检测原, 用于检测抗ZEN单抗独特型抗体。

表1 抗ZEN单抗与抗体片段Fab特性对比

Table 1 Characteristic comparison of anti-ZEN monoclonal antibody and Fab fragment

类型	相对分子质量/kD	效价	蛋白质质量浓度/(mg/mL)	IC <sub>50</sub> /(ng/mL)	比效价/(Titre/mg)
ZEN单抗	150	1:100000	8.0	10.0	1.25 × 10 <sup>4</sup>
ZEN Fab	50	1:3200	0.9	3.0	0.35 × 10 <sup>4</sup>

### 2.3 抗ZEN单抗独特型抗体特性鉴定

表2 间接ELISA测定抗血清效价

Table 2 Indirect ELISA determination of antiserum titer

编号	抗血清稀释倍数						
	1:200	1:400	1:800	1:1600	1:3200	1:6400	1:12800
1号小鼠	1.71	1.83	1.46	1.21	0.96	0.71	0.53
2号小鼠	1.38	1.43	1.17	0.94	0.57	0.48	0.23
3号小鼠	1.34	1.27	0.81	0.68	0.38	0.30	0.21

间接ELISA测定三免后抗血清效价, 从表2可知, 1、2、3号鼠的抗血清效价分别为1:3200、1:1600、1:400。同时采用间接竞争ELISA测定3只小鼠抗血清灵敏度(图3), 其中1号鼠的灵敏度最高, 竞争物ZEN的IC<sub>50</sub>值为33.8ng/mL, 检出限(IC<sub>10</sub>)为0.06ng/mL, 因此选择纯化1号鼠抗血清, 共获得0.3mL纯化抗体, BCA试剂盒测得纯化抗体的质量浓度为10mg/mL。

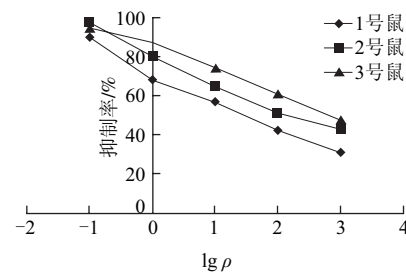


图3 间接竞争ELISA检测抗血清对ZEN的抑制曲线

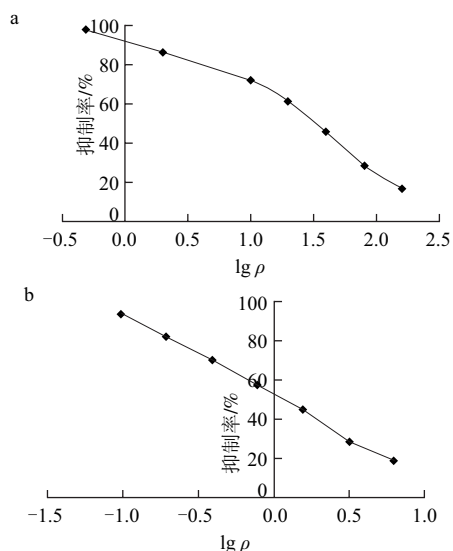
Fig.3 Inhibitory curve of antiserum against ZEN determined by indirect competitive ELISA

### 2.4 抗ZEN单抗独特型抗体与ZEN间“内影像”关系

首先间接ELISA测定Biotin-ZEN单抗的工作浓度为1:40000, 以Biotin-ZEN单抗为反应抗体, 分别以不同质量浓度的ZEN毒素或抗ZEN单抗独特型抗体为竞争物, 建立竞争抑制曲线。由图4可知, 抗独特型抗体能否替代ZEN实现无毒检测, 必须分析抗ZEN单抗独特型抗体与ZEN之间的相关度, 根据抑制率在20%~80%间, 在相同抑制率条件下, ZEN质量浓度与



抗独特型抗体间浓度对应关系, 绘制替代标准曲线及对应的线性回归方程(图5), 线性回归方程为 $y=37.22x-13.144(R^2=0.99)$ ,  $y$ 为ZEN质量浓度( $\text{ng/mL}$ );  $x$ 为抗独特型抗体质量浓度( $\mu\text{g/mL}$ ), 相关系数 $R^2$ 达到0.99, 表明抗ZEN单抗独特型抗体与ZEN毒素间相关度很高, 可以称为ZEN的“内影像”, 因此可以用抗ZEN单抗独特型抗体替代ZEN毒素用于无毒检测。



a. ZEN的标准曲线,  $IC_{50}$ 值为25.13 $\text{ng/mL}$ ;  
b. Aid的标准曲线,  $IC_{50}$ 值为1.12 $\mu\text{g/mL}$ 。

图4 ZEN(a)及Aid(b)的标准抑制曲线

Fig.4 Standard curves of ZEN and anti-ZEN antibody

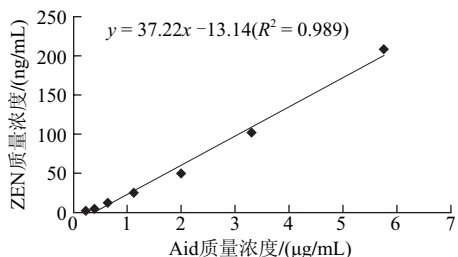


图5 抗ZEN单抗独特型抗体与ZEN标准品之间的相关性

Fig.5 Correlation between anti-ZEN antibody and ZEN standard

### 3 讨论与结论

在目前的免疫技术中, 抗独特性抗体的研制是一种可行的免疫原替代技术, 国内外已经报道了很多关于抗独特性抗体替代小分子半抗原应用于检测的报道, 如背景中提到的制备皮质醇的抗独特型抗体并建立非竞争ELISA, 国内的制备T-2毒素、大田海绵酸、黄曲霉毒素等抗独特型抗体, 用于建立无毒检测方法<sup>[16-18]</sup>。

在制备抗独特型抗体过程中, 受到很多因素的影响, 尤其是制备Ab2  $\beta$ , 例如免疫动物的选择, 免疫原的修饰, 佐剂的选择等<sup>[19]</sup>。本研究选择免疫的是小鼠,

这样理论上产生的抗体应该都是抗独特型抗体, 但因免疫原性很弱, 产生能够结合抗原抗体结合部位的抗体很少, 需要对免疫原即抗体进行修饰, 将单抗与载体蛋白KLH偶联, 可以极大地增强单抗的免疫原性<sup>[20]</sup>。此外, 利用高效免疫佐剂Quickadjuvant替代常规使用的弗氏佐剂进行免疫, 该类佐剂的特点是不破坏抗原天然构像, 尤其是抗原抗体结合部位, 能够最大程度的保持免疫原的活性, 产生更多的Ab2  $\beta$ 。

本研究经过多次免疫, 成功研制出抗ZEN单抗独特型抗体(鼠多抗), 而且抗独特性抗体与毒素ZEN间相关度很高,  $R^2$ 值达到0.99, 因此可以作为ZEN标准品的替代品应用于ELISA检测, 为实现ZEN毒素的无毒检测方法的建立奠定基础。

### 参考文献:

- [1] HART L P, BRASELTON W E, STEBBINS T C. Production of zearalenone and deoxynivalenol in commercial sweet corn[J]. Plant Dis, 1982, 66: 1133-1135.
- [2] 肖志军. 猪玉米赤霉烯酮与繁殖障碍[J]. 中国畜牧收益, 2005, 32(2): 45-46.
- [3] BOUSSEMA AYED I, OUANES Z, BACHA H, et al. Toxicities induced in cultured cells exposed to zearalenone: apoptosis or mutagenesis[J]. Journal of Biochemical and Molecular Toxicology, 2007, 21: 136-144.
- [4] Commission regulation (EC) no 856/2005 of 6 June 2005 amending regulation (EC) no 466/2001 as regards *Fusarium* toxins[S]. Off J Eur Union L 143/7.
- [5] Food and Agriculture Organization of the United Nations. Worldwide regulations for mycotoxins in food and feeds in 2003[S]. FAO Food and Nutrition Paper, 2004: 81.
- [6] GENDLOFF E H, PESTKA J J, SWANSON S P, et al. Detection of T-2 toxin in *Fusarium* sporotrichioides-infected corn by enzyme-linked immunosorbent assay[J]. Microbiol, 1984, 47: 1161-1163.
- [7] THOUVENOT D R, MORFIN R F. Quantitation of zearalenone by gas-liquid chromatography on capillary glass columns[J]. Journal of Chromatogr, 1979, 170: 165-173.
- [8] BURKIN A A, KONOENKO G P, SOBOLEVA N A, et al. Preparation of conjugated antigens based on zearalenone carboxymethylxime and their use in enzyme immunoassay[J]. Applied Biochemistry and Microbiology, 2000, 36: 282-288.
- [9] 王景琳, 李忠润, 张志东, 等. 玉米赤霉烯酮免疫检测技术研究[J]. 中国兽医科技, 1991, 21(2): 3-6.
- [10] BENNETT G A, NELSEN T C, MILLER B M. Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of zearalenone in maize, wheat, and pig feed: collaborative study[J]. Journal of AOAC International, 1994, 77: 1500-1509.
- [11] HE Qinghua, XU Yang, HUANG Yunhong. Phage-displayed peptides that mimic zearalenone and its application in immunoassay[J]. Food Chemistry, 2011, 126: 1312-1315.
- [12] KOBAYASHI N, OIWA H, KUBOTA K, et al. Monoclonal antibodies generated against an affinity-labeled immune complex of an antibody acid metabolite antibody: an approach to noncompetitive hapten immunoassays based on anti-idiotypic or anti-metatype antibodies[J]. Journal of Immunological Methods, 2000, 245: 95-108.
- [13] TOSHIFUMI N, TAKAYUKI K, PI S, et al. An enzyme-linked immunometric assay for cortisol based on anti-idiotypic reactions[J]. Analytica Chimica Acta, 2009, 638: 94-100.
- [14] JERNE N K. The generative grammar of the immune system[J]. Science, 1985, 229: 1057-1059.
- [15] PARHAM P. On the fragmentation of monoclonal IgG1, IgG2a, and IgG2b from BALB/c mice[J]. The Journal of Immunology, 1983, 131(6): 2895-2902.
- [16] 江涛, 郑佳, 李楠, 等. 抗T-2毒素单抗独特型抗体的制备及应用研究[J]. 中国食品卫生杂志, 2007, 19(3): 234-237.
- [17] 林超, 王东旭, 任洪林, 等. 抗大田软海绵酸单抗独特型抗体的制备及鉴定[J]. 食品科学, 2011, 32(11): 110-113.
- [18] 江涛, 柳桢, 李楠, 等. 抗黄曲霉毒素B<sub>1</sub>单抗独特型抗体的制备[J]. 中国食品卫生杂志, 2009, 21(5): 385-389.
- [19] MARUYAMA H, SPERLAGH M, ZALOUK J, et al. Immunization procedures for anti-idiotypic antibody induction in mice and rats[J]. Journal of Immunological Methods, 2002, 264(1/2): 121-133.
- [20] HARRIS J R, MARK L J. Keyhole limpet hemocyanin (KLH): a biochemical review[J]. Micron, 1999, 30: 597-623.