

抗玉米赤霉烯酮单克隆杂交瘤细胞系的建立及单抗生产

王玉平¹ 计融¹ 江涛¹ 韩春卉¹ 宫慧之² 高秀芬¹

(1. 中国疾病预防控制中心营养与食品安全所, 北京 100021; 2. 中国医科大学, 辽宁 沈阳 110001)

摘要:为快速检测食品中的玉米赤霉烯酮(Zearalenone 以下简称 ZEN),建立了抗 ZEN 的单克隆杂交瘤细胞株。用 ZEN-BSA 偶联物免疫 8~10 周龄雌性 BalB/c 小鼠后,取脾细胞与小鼠骨髓瘤细胞 Sp2/0 融合,经过 4~5 次亚克隆建立了稳定分泌抗 ZEN 抗体的杂交瘤细胞株,分别命名为 Z2A4、Z8D6。将上述 2 种杂交瘤细胞分别注入 BalB/c 小鼠腹腔,获得含抗 ZEN 单克隆抗体的腹水。将腹水用饱和硫酸铵盐析法纯化,得到 Z2A4、Z8D6 单克隆抗体。经鉴定,其亚类为 IgG,抗体腹水效价 Z2A4 和 Z8D6 分别为 1.6×10^6 和 3.2×10^6 ;分子量均为 150 040 (150kD);参考工作浓度分别为 1 40 000 和 1 100 000;纯化后抗体 IgG 含量分别为 34 和 39 mg/ml;抗体与其它霉菌毒素无交叉反应(交叉反应率 < 1%),具有较高特异性;抗体亲和力常数 Z2A4 和 Z8D6 分别为 5.52×10^8 和 4.68×10^9 mol/L。

关键词:玉米赤霉烯酮;杂交瘤;细胞系;抗体,单克隆

Development of hybridoma cell lines excreting monoclonal antibodies against zearalenone

WANG Yu-ping, JI Rong, JIANG Tao, HAN Chun-hui, GONG Hui-zhi, GAO Xiu-fen

(National Institute for Nutrition and Food Safety, Chinese CDC, Beijing 100021, China)

Abstract: Two hybridoma cell lines excreting monoclonal antibodies against Zearalenone (ZEN), coded Z2A4 and Z8D6, respectively, were obtained by fusing murine Sp2/0 cells with spleen cells from 8~10-week-old BalB/c mice immunized with ZEN-BSA conjugate and subcloning for 4 to 5 cycles. The ascites containing monoclonal antibodies against ZEN was gained via inoculation of the hybridoma cells into the abdominal cavity of BalB/c mice. The monoclonal antibodies produced by the hybridoma cells were tested for subtypes and designated as IgG for ZEN. The titer of antibodies in ascites was 1.6×10^6 for Z2A4 and 3.2×10^6 for Z8D6, the MW was both 150 040 (150 kD) and the working concentration was 1 40 000 and 1 100 000. IgG concentration in purified ascites yielded by hybridoma cells of Z2A4 and Z8D6 reached 34 and 39 mg/ml respectively, and had high specificity to ZEN because there was no cross reaction between the monoclonal antibodies against ZEN and other mycotoxins. Affinity constants of Z2A4 and Z8D6 were 5.52×10^8 and 4.68×10^9 mol/L respectively.

Key word: Zearalenone; Hybridoma; Cell Line; Antibodies, Monoclonal

玉米赤霉烯酮(Zearalenone,简称 ZEN)也称 F-2 雌性发情激素,是由禾谷镰刀菌和黄色镰刀菌等产生的次级代谢产物,具有很强的雌性激素作用,可引起大鼠、小鼠、家禽及猪等动物的雌激素过多症和严重的生殖道症状和不孕症,还具有免疫毒性、基因毒性等,对肿瘤的发生也有一定影响,有报道 ZEN 对人也有雌激素作用^[1]。ZEN 主要污染玉米、大麦、

小麦、燕麦等作物,世界各地均有报道^[2]。目前已有 9 个国家制定了食品中 ZEN 的限量标准^[3]。我国是以粮谷类为主食的国家,也是粮食生产和贸易大国。美国是粮食出口大国,我国的小麦进口大部分来自美国,据报道,美国粮食中 ZEN 的污染远远高于我国的粮食^[1],目前我国尚未制定检测食品中 ZEN 的国家标准方法及限量标准,故污染 ZEN 的进口粮食

基金项目:国家“十五”科技攻关项目(2001BA804A20)

作者简介:王玉平 女 硕士生 中国 CDC 与河北医科大学联合培养

通讯作者:计融 男 研究员

This work was supported by the Grant from National Science and Technology Program Funds of Ministry of Science and Technology, China. (2001BA804A20)

有可能进入我国,对我国消费者的健康造成潜在危害,因此迫切需要建立测定 ZEN 的国标方法并制定其限量标准。为此本方法生产了抗 ZEN 单克隆抗体并建立了在单克隆抗体基础上的 ELISA 检测方法。该方法具有快速、简便、高灵敏度、高特异性等优点,尤其适用于大量样品的筛选和普查。

1 材料与amp;方法

1.1 材料

仪器 CO₂ 培养箱(美国 Queue 公司)、洁净工作台(北京半导体设备一厂)、生物倒置显微镜(日本欧林巴斯株式会社)、酶标分析仪(SUNRISE)、电子分析天平(瑞士 Mettler 公司)、低温高速离心机(德国 Hermle 公司)、普通离心机(北京医用离心机厂)、(BIO-RAD)微量可调移液器(Gilson、Fisher)、细胞培养板(96孔,美国 Costar 公司)、酶标板(96孔,美国 Corning 公司)、玻璃及塑料器皿等。

试剂 ZEN 毒素、抗体亚类测定试剂盒均购自美国 Sigma 公司;RPMI 1640 培养基、HAT 选择性培养基、N-2-羟乙基哌嗪-N-2-烷磺酸(HEPES)、福氏佐剂(完全、不完全)、二甲基亚砜(DMSO)、吐温 20(Tween20)、聚乙二醇(PEG,MW5000)、青霉素、链霉素,均购自 Gibco 公司;辣根过氧化物酶羊抗鼠 IgG(北京中山试剂公司)、30% H₂O₂ (保证试剂,北京化工厂);辛酸、无水乙醇、乙醚、柠檬酸、磷酸氢二钠、磷酸二氢钠、磷酸二氢钾、氯化钾、氯化钠、氢氧化铵、硫酸铵、氢氧化钠、无水碳酸钠、碳酸氢钠、乙酸钠等均为分析纯以上,购自北京化学试剂公司。人工抗原 ZEN-BSA 购自 Sigma 公司。

ELISA 使用液

包被液 0.05 mol/L 碳酸盐缓冲液, pH 9.6;洗涤液 PBS-T,含 0.05% Tween 20 的 0.05 mol/L PBS (体积分数);底物缓冲液 0.1 mol/L 柠檬酸加 0.2 mol/L 磷酸氢二钠, pH 5.0;底物溶液 10 mg TMB 加入 1 ml 二甲基甲酰胺,冷藏。用时取此溶液 75 μl,加 10 ml 底物缓冲液和 10 μl H₂O₂;终止液 2 mol/L H₂SO₄;抗体稀释液 含 0.1% (体积质量) BSA 的 0.05 mol/L PBS。

细胞系与实验动物

小鼠骨髓瘤细胞系 Sp2/0 由本室传代,并经 8-AG(8-氮杂鸟嘌呤)处理。

BalB/c 小鼠购自军事医学科学院实验动物研究所动物繁育场。

1.2 方法

1.2.1 小鼠免疫 采用小剂量长周期的免疫方案。对 6~8 周龄的雌性 BalB/c 小鼠(体重 18~20g),首

次免疫用 200 μg ZEN-BSA 与等量完全福氏佐剂混匀,腹腔注射。2 周后,再用 200 μg ZEN-BSA 与等量不完全福氏佐剂混匀,腹腔注射。此后每隔 2 周用 200 μg ZEN-BSA 与等量不完全福氏佐剂混匀,腹腔注射。8 周后脾内免疫 100 μg ZEN-BSA 作为加强免疫,3 d 后取脾融合。

1.2.2 细胞融合 免疫小鼠脾细胞与骨髓瘤细胞(Sp2/0)以 10:1 混合,用 50% 聚乙二醇(PEG)作融合剂。融合细胞悬于含 20% 小牛血清的 1% HAT 选择性培养基内,分种于加有 BalB/c 小鼠腹腔渗出细胞作滋养层的 96 孔细胞培养板中,置 5% CO₂、37 孵箱中培养,当镜检杂交瘤克隆生长达 1/3~1/4 视野时,取上清液筛选。

1.2.3 杂交瘤筛选及抗体检测 以 ZEN-BSA 为包被抗原,用间接 ELISA 法筛选分泌抗 ZEN 抗体的细胞孔,用毒素间接竞争抑制性 ELISA 法确证。以免疫小鼠血清为阳性对照,以 Sp2/0 细胞培养的上清液为空白对照,以细胞培养板中未长出克隆的细胞培养液上清为阴性对照,阳性细胞孔的判定标准为(测定孔 A 值 - 空白值)/(阴性对照 A 值 - 空白值) > 2.1。

1.2.4 杂交瘤细胞的克隆化 采用有限稀释法,将阳性克隆细胞吹下,置于提前放好 RPMI 1640 完全培养液的培养瓶中,取出 10 μl 置计数板上,在倒置显微镜下准确计数细胞个数,根据计数结果,取大约 100 个细胞置于 10 ml 培养液中(培养液置于灭菌的平皿中),接种于加有 BalB/c 小鼠腹腔渗出细胞作滋养层的 96 孔细胞培养板中,置 5% CO₂、37 孵箱中培养,当镜检杂交瘤克隆生长达 1/3~1/4 视野时,即可将杂交瘤细胞株冻存于液氮罐中。

1.2.5 单克隆抗体的生产 采用动物体内诱生单克隆抗体的方法。吹打培养的杂交瘤细胞,1 000 r/min 离心 10 min,弃上清,用生理盐水将杂交瘤细胞混匀,并将细胞数调至 2 × 10⁶/ml,每只 BalB/c 小鼠腹腔注射 0.5 ml 杂交瘤细胞,并同时于对侧腹腔注射 0.5 ml 石蜡油和不完全福氏佐剂混合,10~14 d 后收集腹水。

1.2.6 单克隆抗体纯化 采用饱和硫酸铵盐析法对腹水进行纯化^[4]。

1.2.7 单克隆抗体特性鉴定 抗体的免疫球蛋白类别及亚类鉴定采用抗体亚类鉴定试剂盒。抗体 IgG 含量采用 BCA 蛋白测定试剂盒进行测定。抗体滴度测定以 ZEN-BSA 为包被抗原,从 1 10 000 倍开始将抗体进行倍比稀释,以 Sp2/0 细胞培养上清为阴性对照,用间接非竞争 ELISA 方法测定抗体滴度,以(测定孔 A 值 - 空白值)/(阴性对照 A 值 - 空

白值) 2.1 的最大稀释倍数为滴定终点。抗体的特异性和抗体的灵敏度用间接竞争抑制性 ELISA 法进行测定,参试毒素为脱氧雪腐镰刀菌烯醇(DON)、赭曲霉毒素 A(OA)、伏马菌素 B1、T-2 毒素和载体蛋白 BSA。抗体分子量用 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)测定,具体方法参阅文献^[5]。

2 结果

2.1 单克隆抗体制备

用 ZEN-BSA 免疫 BalB/c 小鼠获得了较好的免

疫应答。细胞融合后,经间接非竞争 ELISA 筛选,并用间接竞争 ELISA 确证,从中选择出对 ZEN 毒素有强抑制性而阳性对照孔较强的细胞株,经 4~5 次亚克隆,建立了稳定分泌抗 ZEN 毒素单克隆抗体的杂交瘤细胞株,分别命名为 Z2A4、Z8D6。半年内对获得的细胞株进行多次冻融,其分泌抗体的能力和稳定性均无改变。

2.2 单克隆抗体特性的鉴定

2.2.1 抗体的亚类、杂交瘤细胞产生的腹水稀释度等见表 1。

表 1 玉米赤霉烯酮单克隆抗体的特性

杂交瘤细胞系	抗体亚类	IgG 含量(mg/ml)	腹水稀释度	参考工作浓度	亲和力常数(mol/L)	分子量
Z2A4	IgG ₁	34	1 1.6 × 10 ⁶	1 40 000	5.52 × 10 ⁸	150 kD
Z8D6	IgG ₁	39	1 3.2 × 10 ⁶	1 100 000	4.68 × 10 ⁹	150 kD

由于无法得到 ZEN 的 4 种衍生物,即和 zearalenol 及和 -zearalanol,故无法进行抗体与此 4 种毒素的交叉反应,经与其它参试霉菌毒素(DON、OA 等)间接竞争抑制性 ELISA 测定,ZEN 抗体与这些霉菌毒素的交叉反应率均小于 1%,说明此抗体具有较高的特异性。图 1 为 SDS-PAGE 测定纯化后抗体分子量结果。



图 1 SDS-PAGE 测定纯化后抗体的分子量

2.2.2 用间接竞争 ELISA 法测得 Z2A4、Z8D6 单克隆抗体与 ZEN 毒素的竞争抑制曲线,见图 2、图 3。

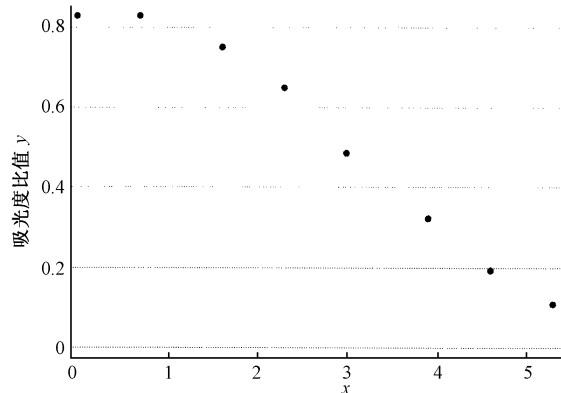


图 2 Z8D6 校正抑制曲线

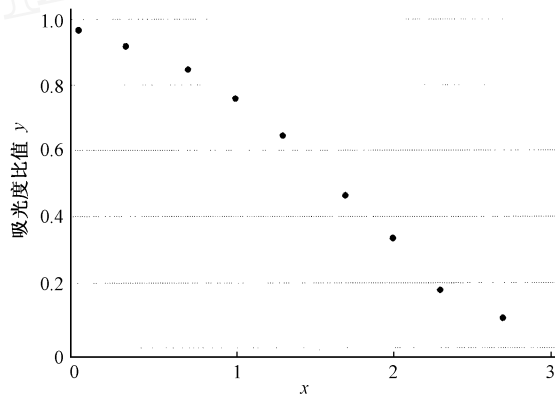


图 3 Z2A4 校正抑制曲线

通过 STATA 统计软件作回归分析,得 Z2A4 回归方程 $y = 1.168327 - 0.4219616x$ ($R^2 = 0.9934$)。线性范围在 5 ~ 200 ng/ml,50% 的抑制浓度为 50 ng/ml,最低检出浓度为 5 ng/ml。

3 讨论

目前检测 ZEN 方法有 TLC 法和 LC 法等^[6],TLC 法用目测半定量,灵敏度不高,也不适于大量样品筛选和普查,且该方法需大量接触 ZEN 标准品,浪费毒素并对操作者健康不利;LC 法虽然灵敏度较高,结果稳定,但所需仪器设备昂贵,也不适于大量样品的筛选。ELISA 检测法是大家比较公认的快速准确的方法^[1],AOAC 于 1997 年将 ELISA 检测方法正式作为法定方法公布,该方法可检测玉米、小麦和猪饲料中 800 ng/g 的 ZEN^[7]。2003 年欧盟对其 9 个成员国国家粮食中 ZEN 污染物情况调查时,法国和德国检测玉米样品使用了 ELISA 法,欧盟评价这种方法是可行的^[8]。

本法生产的单克隆抗体具有较高的特异度,在

此基础上建立的 ELISA 检测方法,最低检出浓度为 5 ng/mL,灵敏度要高于 AOAC ELISA 法(800 ng/g)^[7],且方法简单,易于操作,可同时检测大量样品,尤其适用于基层检测机构大面积筛选样品之需,有广泛的应用前景,该方法拟申报国家标准检测方法。

参考文献

- [1] European Commission. Opinion of the scientific committee on food on *fusarium* toxins . Part2 : zearalenone (ZEN) [DB/OL]. europa.eu.int/comm/food/fs/sc/scf/out65_en.pdf. 2002-06-22.
- [2] Safety evaluation of certain food additives: zearalenone[Z]. WHO Food Additives Series 44. Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, 53rd Report. World Health Organization, Geneva, 2000. www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v44jec14.htm
- [3] Rudolf Krska. Mycotoxins of growing interest zearalenone,

- third joint FAO/WHO/UNEP international conference on mycotoxins[Z]. Tuis, Tunisia, 1999-03-03-06.
- [4] 徐志凯. 实用单克隆技术[M]. 西安:陕西科学技术出版社,1992.
- [5] 沈关心,周如林. 现代免疫学实验技术[M]. 武汉:湖北科学技术出版社,1998,398-400.
- [6] 罗雪云,刘宏道,周桂莲,等. 食品卫生微生物检验标准手册[M]. 北京:中国标准出版社,1995,368-375.
- [7] AOAC. Zearalenone in corn, wheat, and feed, enzyme-linked immunosorbent (Agri-Screen) method[Z]. AOAC official method of analysis (1995) 994. 01, Revision March 1998.
- [8] Collection of occurrence data of *fusarium* toxins in food and assessment of dietary intake by the population of EU Member States[R]. Report of experts participating in Task 3. 2. 10. 9. Zearalenone, April 2003. www.mold-survivor.com/fusariumtoxins.htm

[收稿日期:2004-09-21]

中图分类号:R15;Q949.32;Q813.2 文献标识码:A 文章编号:1004-8456(2005)01-0013-04

卫生部文件

卫监督发[2004]310号

卫生部关于食品分装加工 及分装食品监督管理有关问题的批复

福建省卫生厅:

你厅《关于食品分装加工及分装食品监督管理有关问题的请示》(闽卫法监[2004]154号)收悉。经研究,批复如下:

一、根据《食品卫生法》第五十四条规定,食品生产经营指一切从事食品的生产(不包括种植业和养殖业)、采集、收购、加工、贮存、运输、陈列、供应、销售等活动。以大包装食品为原料直接通过分装加工方式生产定型包装食品的企业属于食品生产经营企业,应当依据《食品卫生法》第二十七条的规定办理卫生许可证,其生产贮存条件应符合《食品企业通用卫生规范》(GB14881-94)及相关卫生规范的要求。

二、以单纯性分装或添加少量其他成分后分装的定型包装食品的生产日期按分装日期标注;产品保质期应按被分装食品的原保质期标注,若添加成分的保质期比被分装食品的保质期短,则产品保质期按添加成分的原保质期标注。

此复。

中华人民共和国卫生部
二〇〇四年九月十四日