

# 玉米赤霉烯酮单克隆抗体的制备及间接竞争 ELISA 检测方法的建立

王元凯<sup>1</sup> 王君<sup>1</sup> 王雨晨<sup>1</sup> 陈志飞<sup>2\*</sup> 严亚贤<sup>1</sup> 郝倩雯<sup>1</sup> 李树清<sup>2</sup> 于翠<sup>2</sup> 杨翠云<sup>2</sup> 孙建和<sup>1\*</sup>

(1. 上海交通大学 农业与生物学院 上海市兽医生物技术重点实验室 上海 200240)

(2. 上海出入境检验检疫局 上海 200135)

**摘要:** 玉米赤霉烯酮具有较强的生物毒性, 检测谷物中的玉米赤霉烯酮在食品和饲料安全中具有重要的作用。将玉米赤霉烯酮与牛血清白蛋白的偶联物免疫 BALB/c 小鼠制备单克隆抗体, 并建立基于单克隆抗体的酶联免疫法作为检测玉米赤霉烯酮的方法。结果共筛选到 4 株抗玉米赤霉烯酮单克隆抗体, 3 株抗体亚类为 IgG1, 1 株为 IgG2b。选择其中的一株杂交瘤细胞 2C9 制备小鼠腹水, 纯化后测定了抗体效价为 1/40 000。以此单抗建立的间接竞争 ELISA 方法, 其半数抑制率 (IC<sub>50</sub>) 为 1.90 ng/mL, 检测限 (IC<sub>10</sub>) 为 0.051 ng/mL, 检测区间 (IC<sub>20</sub>–IC<sub>80</sub>) 为 0.115–13.900 ng/mL; 且对玉米赤霉烯酮有很好的特异性。回收率检测在样品含 1.46–93.80 μg/kg 时回收率为 96.5%–113.0%。本实验建立的检测方法可用于多种谷物及饲料样本中玉米赤霉烯酮的检测。

**关键词:** 玉米赤霉烯酮, 单克隆抗体, 酶联免疫法, 回收率

## Preparation of anti-zearalenone monoclonal antibodies and development of an indirect competitive ELISA for zearalenone

WANG Yuan-Kai<sup>1</sup> WANG Jun<sup>1</sup> WANG Yu-Chen<sup>1</sup> CHEN Zhi-Fei<sup>2\*</sup> YAN Ya-Xian<sup>1</sup>  
Hao Qian-Wen<sup>1</sup> LI Shu-Qing<sup>2</sup> YU Cui<sup>2</sup> YANG Cui-Yun<sup>2</sup> SUN Jian-He<sup>1\*</sup>

(1. Key Laboratory of Veterinary Biotechnology, School of Agriculture and Biology, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China)

(2. Shanghai Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Shanghai 200135, China)

**Abstract:** Zearalenone (ZEN) is a high toxic mycotoxin. How to detect ZEN from food and feed is important and challenging. Monoclonal antibody was prepared by means of immunization in mice with conjugates of ZEN and bovine serum albumin (BSA), and enzyme-linked immunosorbent assay for ZEN based on monoclonal antibodies was developed. Four hybridoma cell strains secreting anti-zearalenone

基金项目: 国家 863 计划项目(No. 2007AA10Z424); 上海出入境检验检疫局课题(No. HK022-2009)

\* 通讯作者: 陈志飞: Tel: 86-21-68544571; ✉: chenzzf@shcaiq.gov.cn

孙建和: Tel: 86-21-34206926; ✉: sunjhe@sjtu.edu.cn

收稿日期: 2011-06-03; 接受日期: 2011-09-16

monoclonal antibodies were cloned. The subclasses of the monoclonal antibody were characterized as Ig G1 for three and Ig G2b for one. One of the cell strains 2C9 was used to prepare ascites for its high bioactivity. The titer of purified ascites was 1/40 000. The indirect-competitive ELISA was developed with good specificity for ZEN, the half maximal inhibitory concentration (IC<sub>50</sub>) is 1.90 ng/mL, the detection limit is 0.051 ng/mL, and the detection range is 0.115–13.9 ng/mL. The recovery rate could get to 96.5%–113% while the sample containing ZEN 1.46–93.8 µg/kg. The method for detection was developed, which could be applied to detect ZEN from a variety of grain and feed samples.

**Keywords:** Zearalenone, Monoclonal antibody, Enzyme-linked immunosorbent assay, Recovery rate

随着食品安全意识的普遍提高,真菌毒素在谷物及以谷物为原料的产品中的存在和其毒性作用被广泛认识,已成为食品乃至动物饲料中重点监测的有毒有害物质。真菌毒素是一些真菌(主要为曲霉属、青霉属及镰孢属)在生长过程中产生的易引起人和动物病理变化和生理变化的次级代谢产物。其中玉米赤霉烯酮毒素(Zearalenone, ZEN)是镰刀菌(*Fusarium roseum*)的次级代谢产物,其毒性主要表现在生殖毒性<sup>[1]</sup>、DNA 损伤毒性<sup>[2]</sup>和免疫抑制毒性<sup>[3]</sup>。研究者对世界多个国家和地区的检测发现<sup>[4]</sup>,很多国家的谷物和动物饲料都不同程度地受到 ZEN 的污染并已导致对人和家畜的毒害。我国《GB 13078.2-2006 饲料卫生标准 饲料中赭曲霉毒素 A 和玉米赤霉烯酮的允许量》要求,配合饲料、玉米中的 ZEN 含量应≤500 µg/kg。根据 2011 年最新出台的《GB 2761-2011 食品中真菌毒素限量》要求,谷物及其制品中,ZEN 含量应低于 60 µg/kg<sup>[5]</sup>。

检测玉米赤霉烯酮方法主要有色谱法和免疫学方法。色谱法如气相色谱-质谱联用法(Gas chromatography-mass spectrometry, GC/MS)<sup>[6]</sup>和高效液相色谱法(High-performance liquid chromatography, HPLC)<sup>[7]</sup>等,具有检测灵敏、可靠的特点,但是需要昂贵仪器,对操作人员要求较高。免疫学方法具有简便、灵敏、快捷、成本低、适合大批量检测等特点,尤其适合我国很多生产企业单位的自检。目前国内外对利用酶联免疫吸附测定法(Enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)检测 ZEN 有较多研究<sup>[8-16]</sup>,并取得了一定成果。但是与进口试剂盒相比,国内的检测试剂盒存在检测范围较窄,灵敏度

不高的缺点。因此目前 ZEN 的免疫学检测试剂盒大多来自进口,国内有关 ZEN 的单抗制备、试剂盒的开发还相对落后。本文通过研制 ZEN 单克隆抗体,并以为之基础建立了 ELISA 检测方法,为检测 ZEN 的试剂国产化提供了充足的单抗来源和研究基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 主要试剂:**玉米赤霉烯酮(ZEN)、O-羧甲基羟胺(CMO)、N、N'-二环己碳二亚胺(DCC)、N-羟基琥珀酸亚胺(NHS)、二甲基甲酰胺(DMF)、50% PEG1500、玉米赤霉烯酮单克隆抗体购自 Sigma;牛血清白蛋白(BSA)、卵白蛋白(OVA)、脱脂奶粉均购自上海生工;无水四氢呋喃、甲醇、乙酸乙酯、吡啶、苯购自上海国药;辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠二抗购自优宁维;HAT、HT、胎牛血清购自 GIBCO;DMEM 培养基购自 Hyclone;抗体亚类检测试剂盒购自 Hycult 公司;HRP 标记羊抗鼠 IgG 购自 PTGlab 公司;RIDASCREEN<sup>®</sup> 玉米赤霉烯酮检测试剂盒购自 R-Biopharm 公司;小麦和玉米阴性样本由上海出入境检验检疫局提供,经过 HPLC 测定为 ZEN 阴性;实验所需缓冲液自行配制。

**1.1.2 主要器材:**酶联检测仪购自 Bio-Rad 公司;CO<sub>2</sub> 恒温培养箱购自 Precision 公司;96 孔 ELISA 酶标板、96 孔及 24 孔细胞培养板购自 Corning 公司;Protein G 亲和层析预装柱购自 GE 公司;AKTA explorer 纯化系统购自 Amersham Biosciences 公司。

**1.1.3 实验动物:**6 周龄、8 周龄 BALB/c 雌性小鼠,购自中科院上海动物所;SP2/0 细胞由本实验室保存。

## 1.2 单克隆抗体的制备

**1.2.1 玉米赤霉烯酮完全抗原偶联物的制备与鉴定:**方法参照文献[17]并改进。首先合成玉米赤霉烯酮-6-羧甲氧肟: 1 mg 玉米赤霉烯酮溶于 1.2 mL 吡啶中, 加入 2 mg O-羧甲基羟胺, 室温搅拌反应 24 h。真空干燥后, 溶于 4 mL 蒸馏水, 调节 pH 至 8.0, 分 3 次分别加入 1 mL 苯, 未反应的玉米赤霉烯酮通过苯除去, 保留水相。水相调 pH 至 3.0, 出现沉淀, 用 10 mL 乙酸乙酯分 4 次抽提, 保留脂相, 用无水硫酸钠滤过后吹干。

采用碳二亚胺法合成 BSA-ZEN 偶联物: 玉米赤霉烯酮-6-羧甲氧肟溶于 0.4 mL 无水四氢呋喃中, 再加入 6 mg DCC 和 3 mg NHS, 30 °C 振摇 60 min, 4 000 r/min 离心 20 min, 保留上清液, 真空干燥后用二甲基甲酰胺溶解残留物。将上述溶液缓慢加入含 20 mg BSA 的碳酸氢钠(0.13 mol/L)缓冲液中, 摇动 30 min。9 000 r/min 离心 20 min, 去除沉淀, 上清液在 0.01 mol/L PBS 溶液中透析 3 d。OVA-ZEN 的偶联与 BSA-ZEN 的偶联方法相同。

偶联后的 BSA-ZEN 与 OVA-ZEN 分别作为包被抗原进行间接 ELISA, 并包被 BSA、OVA 作为阴性对照, 以 PBS 为空白对照, 鉴定偶联效果。以 BSA-ZEN 为例, 间接 ELISA 具体步骤为: 将最适工作浓度的 BSA-ZEN 包被于 ELISA 孔中, 每孔 100  $\mu$ L, 37 °C 孵育 4 h。之后用 PBST 洗涤 3 遍, 5% 脱脂奶粉封闭 2 h 后, 用 PBST 洗涤 3 遍, 加入购买的最适工作浓度玉米赤霉烯酮单克隆抗体, 孵育 1 h, PBST 洗涤后加入辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠二抗, 孵育 1 h 后 PBST 洗涤, 加入 TMB 显色 6 min, 终止显色后使用酶标仪记录结果。

**1.2.2 杂交瘤细胞的筛选与腹水的制备:**用 BSA-ZEN 偶联物免疫 6 周龄雌性 BALB/c 小鼠 5 次后, 取具有较好免疫反应的小鼠脾细胞与小鼠骨髓瘤细胞 Sp2/0 融合, 经过 3 次筛选和亚克隆后, 获得稳定分泌抗 ZEN 的杂交瘤细胞株。选择稳定分泌特异性抗体的杂交瘤细胞株注射 8 周龄 BALB/c 小鼠腹腔, 制备抗 ZEN 单克隆抗体的腹水。收集的腹水经辛酸硫酸铵法初步纯化后, 再经 Protein G 层析方法纯化。

## 1.3 单克隆抗体相关特性的测定

**1.3.1 单克隆抗体效价的测定:**采用间接 ELISA 法测定不同细胞株分泌抗体的效价。具体步骤为: OVA-ZEN 以最适工作浓度包被, 将不同稀释浓度的腹水作为一抗加入, 选择显色为阳性的最大稀释度为此细胞株的效价。

**1.3.2 单克隆抗体灵敏度的测定:**抗体灵敏度及单克隆抗体对 ZEN 的抑制率, 通过间接竞争 ELISA 中加入不同浓度的竞争抗原, 作出标准曲线, 通过比较 IC<sub>50</sub> (半数抑制率) 确定抗体灵敏度高低。IC<sub>50</sub> 越低, 则抗体灵敏度越高。

**1.3.3 单克隆抗体亚型的鉴定:**使用 Hycult 公司的抗体亚型检测试剂盒对单克隆抗体的亚型进行鉴定。

## 1.4 检测 ZEN 的间接竞争 ELISA 方法的建立

**1.4.1 标准曲线绘制:**通过方阵滴定法测定包被抗原和自行制备的单抗的最适工作浓度, 然后通过加入不同浓度的竞争抗原, 绘制针对 ZEN 的间接竞争标准曲线, 并计算出 IC<sub>50</sub>、检测区间和最低检出量。

以测定结果最佳抗体稀释度的两倍作为间接竞争 ELISA 中的抗体浓度, 竞争 ZEN 浓度分别为 50.00、10.00、5.00、1.00、0.10、0.01、0.00 ng/mL, 制作标准抑制曲线。以竞争抗原 ZEN 浓度对数值为横坐标, 以竞争抗原浓度为 0 的 OD 值为  $B_0$ 。各相应竞争抗原浓度的 OD 值为  $B$ , 以空白对照(以 PBS 作为反应液的孔)吸光值为  $b$ , 以抑制率(抑制率=1-[( $B-b$ )/( $B_0-b$ )] $\times$ 100%)为纵坐标, 绘制竞争标准曲线, 通过 Microcal Origin 6.0 软件计算回归曲线的方程和相关系数。

**1.4.2 单克隆抗体特异性的测定:**选择伏马毒素 B1、呕吐毒素、黄曲霉毒素 B1 作为竞争抗原, 与纯化后的单克隆抗体进行间接竞争 ELISA 检测, 测定单克隆抗体针对玉米赤霉烯酮的特异性。

## 1.5 加标样品检测

根据检测范围确定加标浓度, 在不含玉米赤霉烯酮的小麦和玉米样品(0.3 g)中分别加入一定量的 ZEN, 使其玉米赤霉烯酮含量分别为 1.46、2.93、5.86、11.70、23.40、46.90、93.75、188.00  $\mu$ g/kg。

加入 3 mL 70% 甲醇-PBS 溶液, 剧烈震荡 15 min, 静置 30 min。上清液通过快速定性滤纸过滤, 稀释 5 倍后, 取 50  $\mu$ L 进行检测, 进行回收率测定。每个加标水平做 3 个重复。

回收率(Recovery, %)的计算方法为:

$$\text{Recovery (\%)} = \left( \frac{\text{实测ZEN测量}}{\text{已知ZEN含量}} \right) \times 100。$$

## 1.6 与试剂盒的比较

为了测试本实验建立的方法与市售试剂盒的相关性, 在不含玉米赤霉烯酮的小麦和玉米样品(0.3 g)中分别加入一定量的 ZEN 进行定量检测。根据回收率较好的样本中 ZEN 的含量范围, 设计了 3 个以 4 倍梯度递减的添加浓度, 加标样品玉米赤霉烯酮含量分别为 13.67、54.69、218.75  $\mu$ g/kg, 萃取方法与前述一致。所有样本采用 RIDASCREEN<sup>®</sup> 玉米赤霉烯酮检测试剂盒以及本实验建立的检测方法进行同步检测, 每个检测样本均为 3 个平行重复, 比较检测结果。

## 2 结果

### 2.1 ZEN 完全抗原偶联物的鉴定

ZEN 为小分子半抗原, 不能直接包被在 ELISA 板中, 因此将偶联完成的 BSA-ZEN 与 OVA-ZEN 包被 ELISA 板孔中, 同时用 BSA、OVA 作阴性对照, PBS 作空白对照。购买的抗玉米赤霉烯酮单克隆抗体作为一抗加入后, 包被孔中结合有 ZEN 时才显色为阳性。实验结果显示两种偶联抗原检测得到的吸光值超过阴性对照的 2.1 倍, 可认为偶联成功。间接 ELISA 结果如图 1 所示。

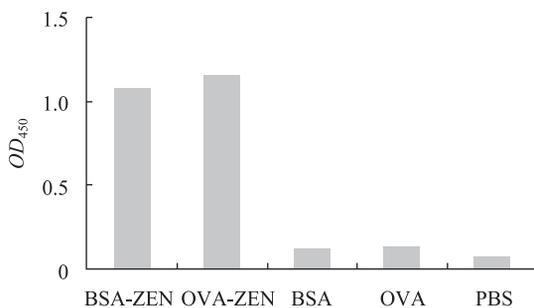


图 1 间接 ELISA 测定偶联物

Fig. 1 Conjugates determined by indirect ELISA

### 2.2 小鼠免疫

经过 5 次免疫, 采血后分析每只小鼠的血清效价和 ZEN 对其的抑制率。由图 2 可以看出当对不同小鼠的血清都稀释为 1/10 000, 竞争抗原 ZEN 为 500 ng/mL 时, 小鼠 3、4 具有较好的 ELISA 效价和抑制效果, 因此选择小鼠 3、4 进行细胞融合。

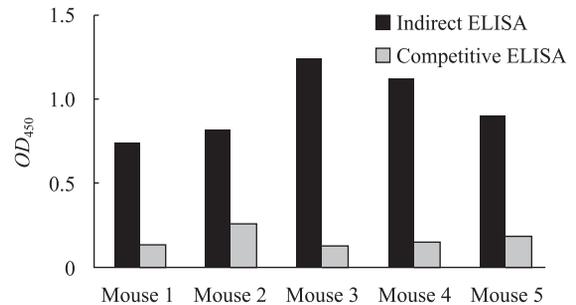


图 2 间接 ELISA、间接竞争 ELISA 检测小鼠血清

Fig. 2 Serum antibody titres of mouse determined by indirect ELISA and indirect competitive ELISA

### 2.3 杂交瘤细胞株的筛选

细胞融合后第 10 天开始, 在 96 细胞培养板中可见融合细胞团增长至孔的 1/4-1/3, 此时开始计算融合率, 检测杂交瘤细胞株的阳性率。通过计算, 小鼠 3 和小鼠 4 的融合率分别为 70%、90%。小鼠 3 和小鼠 4 的杂交瘤细胞株阳性率分别为 52%、95%。通过 3 次筛选, 获得 4 株生长旺盛、分泌抗体效价较高, 对 ZEN 抑制率好的杂交瘤细胞株, 分别为 1C4、2C9、1E4、1H12。其中 1H12 来源于小鼠 3, 其余均来自于小鼠 4。

### 2.4 单克隆抗体相关特性的研究

**2.4.1 单克隆抗体效价的测定:** 经间接 ELISA 测定 4 株不同杂交瘤细胞株分泌的单克隆抗体的效价, 1C4、2C9、1E4、1H12 的效价分别为: 1/8 000、1/40 000、1/40 000、1/20 000。

**2.4.2 单克隆抗体灵敏度测定:** 经间接竞争 ELISA 测定, 4 株不同杂交瘤细胞分泌的单克隆抗体的相关灵敏度及检测相关参数如表 1 所示。通过比较, 2C9 的相关特性较好。

**2.4.3 单克隆抗体亚类鉴定:** 如图 3 所示单抗斑点 ELISA 的检查结果, 1C4、2C9、1E4 的亚类均为 IgG1a, 轻链为  $\kappa$  类; 1H12 亚类为 IgG2b, 轻链为  $\kappa$  类。

表 1 4 株不同杂交瘤细胞分泌的单克隆抗体检测相关参数

Table 1 Parameters of 4 monoclonal antibodies from different hybridoma cell lines

	IC50 (ng/mL)	检测限 The limit of detection (ng/mL)	检测区间 Detection range (ng/mL)
1C4	4.98	0.314	0.618-36.2
2C9	1.90	0.051	0.115-13.9
1E4	4.83	0.446	0.807-28.3
1H12	5.88	0.078	0.180-27.4

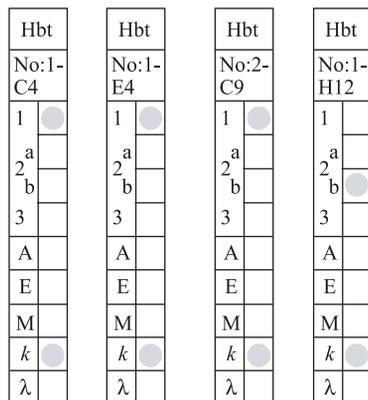


图 3 单克隆抗体亚类测定

Fig. 3 Subclass of monoclonal antibodies

**2.4.4 SDS-PAGE 鉴定 Protein G 亲和层析柱纯化后抗体:** 选择 2C9 作为最佳杂交瘤细胞株, SDS-PAGE 检测结果显示纯化的 2C9 单抗有两条条带, 一条是分子量约为 25 kD 的轻链, 一条是分子量约为 50 kD 的重链(图 4)。

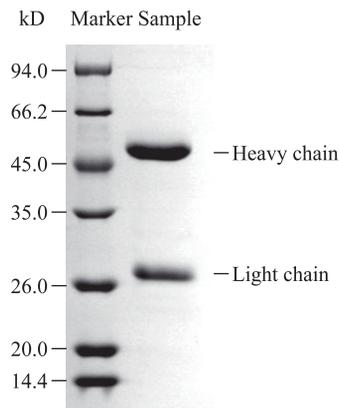


图 4 单克隆抗体 SDS-PAGE 电泳图谱

Fig. 4 The analysis of monoclonal antibody by SDS-PAGE

## 2.5 检测 ZEN 的间接竞争 ELISA 方法的建立

**2.5.1 包被抗原与单克隆抗体最佳工作浓度的测定:** 通过方阵滴定, 确定包被抗原 OVA-ZEN 最佳工作浓度为 0.25 μg/mL, 单克隆抗体最佳工作浓度为 1/40 000。

**2.5.2 标准竞争抑制曲线的绘制:** 用标准毒素溶液浓度分别为 50.00、10.00、5.00、1.00、0.10、0.01、0.00 ng/mL 作为竞争抗原, 制作标准抑制曲线(图 5), 每个浓度做 3 个平行孔, 重复 3 次, 曲线稳定。经 Microcal Origin 6.0 分析, 检测限 IC10 为 0.051 ng/mL, 检测范围 IC20-IC80 为 0.115-13.9 ng/mL, 半数抑制率 IC50 为 1.90 ng/mL。

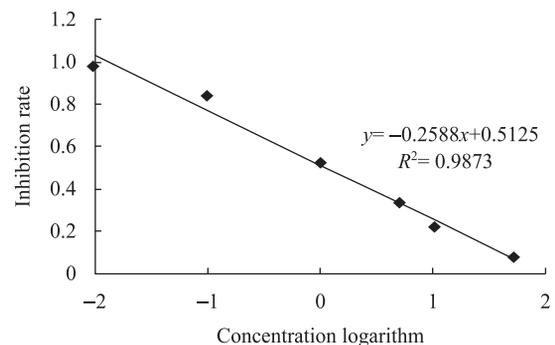


图 5 玉米赤霉烯酮标准抑制曲线

Fig. 5 Standard inhibition curve of zearalenone

**2.5.3 单克隆抗体特异性测定:** 通过间接竞争法, 检测了 2C9 抗体与伏马毒素 B1、呕吐毒素、黄曲霉毒素 B1 的交叉反应性。结果表明该单克隆抗体与参试的其他毒素交叉反应均很低, 针对玉米赤霉烯酮具有较高的特异性。

## 2.6 样品检测与回收率测定

在样品中添加不同浓度的 ZEN, 加标回收结果见表 2。加标样品中 ZEN 浓度在 1.46-93.80 μg/kg 范围内时, 回收率较好。该方法相对标准偏差低于 10%, 稳定性较好。

## 2.7 与试剂盒的比较

本实验建立的 ELISA 方法与 RIDASCREEN® 玉米赤霉烯酮检测试剂盒同时定量检测不同浓度的玉米加标样品, 结果见表 3。当样本分别含有 13.67、54.69 μg/kg 两个浓度时, 两种检测方法无显著差别, 均能比较精确的检测出所添加的毒素含量。但当样本含量超过检测区间时, 两种检测方法均不能精确定量。

表 2 玉米与小麦加标回收率测定  
Table 2 Recovery rates of ZEN in corn and wheat

检测样品 Detection samples	ZEN 浓度 ZEN concentration ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )		回收率 $\pm$ 平均标准偏差 Recovery $\pm$ average standard deviation (%)	变异系数 Coefficient of variation (%)
	加入浓度 Added concentration	检测浓度 Founded concentration		
	玉米 Corn	188.00		
	93.80	106.00	113.0 $\pm$ 18.60	16.50
	46.90	46.50	99.2 $\pm$ 22.40	22.60
	23.40	23.00	98.5 $\pm$ 27.80	28.20
	11.70	11.10	95.0 $\pm$ 13.90	14.60
	5.86	6.27	107.0 $\pm$ 15.70	14.70
	2.93	3.08	105.0 $\pm$ 7.30	6.95
	1.46	1.41	96.5 $\pm$ 8.40	8.70
小麦 Wheat	188.00	273.00	145.0 $\pm$ 7.80	5.38
	93.80	122.00	130.0 $\pm$ 30.10	23.20
	46.90	51.60	110.0 $\pm$ 29.10	26.50
	23.40	23.60	101.0 $\pm$ 22.80	22.60
	11.70	11.50	98.0 $\pm$ 11.30	11.50
	5.86	5.71	97.5 $\pm$ 6.10	6.26
	2.93	3.05	104.0 $\pm$ 8.10	7.79
	1.46	1.43	98.2 $\pm$ 3.20	3.26

表 3 两种方法检测玉米赤霉烯酮加标样品  
Table 3 ZEN in addition samples determined by two different methods

加标浓度 Standard concentration ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	本实验建立的 ELISA 方法 Established ELISA in this research ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	RIDASCREEN <sup>®</sup> 玉米赤霉烯酮检测试剂盒 RIDASCREEN <sup>®</sup> ZEN detection kit ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )
13.67	13.12	12.33
54.69	56.54	57.62
218.75	327.45	193.91

### 3 讨论

酶联免疫吸附测定法是一种准确、可靠、快速、特异、成本低的检测方法,适合于大批样品的快速筛选和检测,特别适合于基层检测机构大批量筛选样品,在我国具有广泛的应用前景。而目前国产检测实际盒亟待解决的问题是检测的特异性、敏感性以及检测方法的稳定性。本实验的目的之一就是试图筛选高特异性、高效价的分泌单克隆抗体的杂交瘤细胞株,然后在此基础上建立敏感特异的检测方法,以便于为食品安全提供可靠的技术支撑。

在单抗筛选中,持续保持细胞的培养条件(如培养箱温度、CO<sub>2</sub>浓度、培养基、血清等)的稳定至关

重要。同时,为了确保筛选到的杂交瘤细胞分泌的抗体对玉米赤霉烯酮有较高的特异性,在筛选细胞时,除了利用间接 ELISA 方法检测细胞上清,还需要利用间接竞争 ELISA 方法。因为免疫原及 ELISA 中的包被原都是蛋白质与玉米赤霉烯酮的偶联物,所以通过间接 ELISA 检测得到的阳性杂交瘤细胞株所分泌的抗体并不一定针对玉米赤霉烯酮(本实验中,间接 ELISA 确定的阳性杂交瘤细胞只有约 1/10 对玉米赤霉烯酮有较好的特异性)。以玉米赤霉烯酮作为竞争抗原,测定抗体与其的结合性,从而确保最后筛选到的杂交瘤细胞所分泌的单克隆抗体对玉米赤霉烯酮有较高的特异性。

本实验制备的抗玉米赤霉烯酮单克隆抗体 2C9

具有灵敏度高、特异性好的特点。通过 2C9 建立的间接竞争 ELISA 方法与近期国内相关报道的比较, 在最低检测限(0.051 ng/mL)以及检测加标样品时, 回收率较好的最低限(1.46  $\mu\text{g}/\text{kg}$ )方面, 优于刘涛等<sup>[13]</sup>、唐宁<sup>[14]</sup>的报道, 回收率检测(96.5%–113.0%)比张晓等<sup>[10]</sup>、刘涛等<sup>[13]</sup>、唐宁<sup>[14]</sup>报道有较大优势。张东升等报道其检测区间为 1–20  $\mu\text{g}/\text{L}$ <sup>[11]</sup>, 即定量测定时, 需要将待检样本做一定稀释, 使得样品液中的玉米赤霉烯酮最好在 1–20  $\mu\text{g}/\text{L}$  之间才能精确定量。本研究所获得的单克隆抗体建立的检测方法的检测区间为 0.115–13.900 ng/mL, 即为 0.115–13.900  $\mu\text{g}/\text{L}$ 。检测区间的宽度计算公式为  $\log(13.900) - \log(0.115) = 2.08$ , 大于 1–20  $\mu\text{g}/\text{L}$  检测区间的宽度 [ $\log(20) - \log(1) = 1.30$ ]。在定量检测中, 较宽的检测区间, 具有更好的适用性, 可满足含有不同浓度的玉米赤霉烯酮的样品的定量检测。

在特异性检测方面, 与玉米赤霉烯酮抗原最为相似的是  $\alpha$ -玉米赤霉烯醇、 $\beta$ -玉米赤霉烯醇, 它们通常是玉米赤霉烯酮的代谢产物, 多在腐烂、潮湿的环境中出现, 在谷物中  $\alpha$ -玉米赤霉烯醇、 $\beta$ -玉米赤霉烯醇的总量较玉米赤霉烯酮低很多, 目前在谷物中还没有相应的检测标准和限量。因此在实际检测中, 玉米赤霉烯醇的存在对于玉米赤霉烯酮的检测无较大影响, 而且即使有交叉也是体现玉米赤霉烯酮及其衍生物的总量, 所以本实验没有与这两种物质进行特异性检测。本实验中选择的特异性比较的抗原均为谷物中危害较大、污染率较高的真菌毒素, 抗原结构上有一定的相似, 测定它们之间的交叉反应是为了今后进行多种真菌毒素检测时, 能最大限度的消除它们相互之间的干扰, 以获得对每一种真菌毒素的精确定量。

特异性单克隆抗体的获得对今后开发检测玉米赤霉烯酮试剂盒提供了前提条件, 单克隆抗体将来亦可应用在其他以免疫学为基础的检测方法上, 如 ELISA 检测方法<sup>[18]</sup>、胶体金试纸条检测方法、免疫伏安法、等离子体共振检测方法等, 并可与其他相关真菌毒素抗体配合, 建立多重液相芯片检测法、固相芯片检测法等。通过建立多种检测方法提高检

测灵敏度、缩短样品处理时间、降低某一种检测方法的错误率, 对检测结果进行综合评估, 根据检测需要选择相应检测方法, 以达到高灵敏度、高通量、多样品多重待测物质同时定性定量检测的目的。

## 参 考 文 献

- [1] Collins TFX, Sprando RL, Black TN, et al. Effects of zearalenone on in utero development in rats[J]. Food and Chemical Toxicology, 2006, 44(9): 1455–1465.
- [2] Quanes Z, Ayed-Boussema I, Baati T, et al. Zearalenone induces chromosome aberrations in mouse bone marrow: preventive effect of 17 $\beta$ -estradiol, progesterone and Vitamin E[J]. Mutation Research-Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, 2005, 565(2): 139–149.
- [3] Vlata Z, Porichis F, Tzanakakis G, et al. A study of zearalenone cytotoxicity on human peripheral blood mononuclear cells[J]. Toxicology Letters, 2006, 165(3): 274–281.
- [4] Placinta CM, D'Mello JPF, Macdonald AMC. A review of worldwide contamination of cereal grains and animal feed with *Fusarium* mycotoxins[J]. Animal Feed Science and Technology, 1999, 78(1/2): 21–37.
- [5] GB 2761-2011, 食品中真菌毒素限量[S].
- [6] Marques MAS, Lima LA, Bizarri CHB, et al. Development and validation of a screening method for DES, zearanol, and  $\beta$ -zearalanol in bovine urine by HRGC-MS and evaluation of robustness for routine survey of the Brazilian herd[J]. Journal of Analytical Toxicology, 1998, 22(5): 367–373.
- [7] 朱孟丽, 彭聪, 洪振涛. 高效液相色谱法对饲料中玉米赤霉烯酮的测定[J]. 饲料工业, 2007, 28(1): 37–38.
- [8] Gallo G, Lo Bianco M, Bognanni R, et al. Mycotoxins in durum wheat grain: hygienic-health quality of sicilian production[J]. Journal of Food Science, 2008, 73(4): 42–47.
- [9] 路戈, 刘春霞, 计融. 玉米赤霉烯酮单克隆抗体酶联免疫测定方法的建立及初步应用[J]. 真菌学报, 1996, 15(4): 292–296.
- [10] 张晓, 张晴晴, 程罗根, 等. 动物饲料中玉米赤霉烯酮 ELISA 检测方法的建立[J]. 江苏农业学报, 2007, 23(4): 351–355.
- [11] 张东升, 王虎, 蔡建荣, 等. 玉米副产物中玉米赤霉烯酮的 ELISA 测定[J]. 饲料工业, 2008, 29(1): 38–40.
- [12] 王玉平, 计融, 江涛, 等. 玉米赤霉烯酮 ELISA 定量检测试剂盒研制[J]. 卫生研究, 2006, 35(2): 221–224.

- [13] 刘涛, 王向红, 常戡, 等. 直接竞争酶联免疫法检测大麦中玉米赤霉烯酮[J]. 食品与机械, 2008, 24(2): 97-99.
- [14] 唐宁. 玉米赤霉烯酮单抗的制备及初步应用[D]. 扬州: 扬州大学硕士毕业论文, 2009.
- [15] 蔡建荣, 吴杰, 赵春城. 间接竞争 ELISA 法检测玉米中 ZEN 的提取方法研究[J]. 饲料工业, 2008, 29(21): 41-42.
- [16] 王雄, 荣钊, 蒙海超, 等. 抗玉米赤霉烯酮单克隆抗体的制备及 ELISA 检测试剂盒的研制[J]. 饲料研究, 2010(11): 39-42.
- [17] Liu MT, Ram BP, Hart LP, et al. Indirect enzyme-linked immunosorbent assay for the mycotoxin zearalenone[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1985, 50(2): 332-336.
- [18] 王雨晨, 王君, 王元凯, 等. 伏马毒素 B1 单克隆抗体的制备及间接竞争 ELISA 方法的建立[J]. 上海交通大学学报: 农业科学版, 2011, 29(2): 69-74.

## 编辑部公告

### 关于《微生物学通报》专题刊申请的通知

当前, 随着生物技术的飞速发展, 微生物学涵盖的领域越来越广, 交叉学科的研究也越来越受到关注。除了已有的微生物学、病毒学、基因工程、细胞工程、酶工程、发酵工程之外, 基因组学、代谢工程、纳米科学、生物炼制、生物质能等也逐步成为微生物学研究的热门领域。为了更加系统、集中地反映各个领域的研究成果, 以及该领域学科的热点难点问题, 充分发挥《微生物学通报》的学科引领和导向作用, 促进学科发展, 为某个领域的科研人员提供一个交流的平台, 《微生物学通报》编委会决定自 2008 年起, 每年出版一定数量的专题刊。专题刊将系统地反映微生物学相关领域或新学科生长点的最新进展, 及时介绍国内外微生物相关前沿领域的突破性成果, 以及面向国家和社会发展需要并具有重大应用前景的研究成果。真诚欢迎本领域各学科的学术带头人, 申请并组织专题刊。申请得到编委会批准后, 申请人将被邀请担任本专题刊的特邀编辑, 负责组织稿件、确定审稿专家, 并撰写专题刊序言。

根据专刊工作计划, 现将有关事项通知如下:

1. 专刊申请的有关规定附在通知的下面, 请申请者仔细阅读;
2. 提交形式: 请到我刊主页(<http://journals.im.ac.cn/wwxtbcn>)的“下载专区”下载专题刊申请表; 填写好之后, 以 E-mail 附件的形式发送到编辑部信箱: [tongbao@im.ac.cn](mailto:tongbao@im.ac.cn), 请在邮件主题中注明: “专题刊申请”字样;
3. 申请者如有疑问, 请咨询编辑部, 联系方式: Tel: 010-64807511; E-mail: [tongbao@im.ac.cn](mailto:tongbao@im.ac.cn)