

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*  
50(10):1406–1411; 4 October 2010  
ISSN 0001–6209; CN 11–1995/Q  
<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>

## 应用 HTS-ELISA 筛选方法制备抗黄曲霉毒素 M1 单抗

裴世春<sup>1</sup>, 何娜<sup>2</sup>, 张立军<sup>3</sup>, 陆梅生<sup>4</sup>

(<sup>1</sup> 齐齐哈尔大学食品与生物工程学院, 齐齐哈尔 161006)

(<sup>2</sup> 黑龙江八一农垦大学食品学院, 大庆 163319)

(<sup>3</sup> 大庆麦伯康生物技术有限公司, 大庆 163316)

(<sup>4</sup> 上海麦柏星生物科技有限公司, 上海 201203)

**摘要:**【目的】确立基于高通量酶联免疫(HTS-ELISA)筛选方法制备高亲和力抗黄曲霉毒素 M1 单克隆抗体的方法体系。【方法】采用 AFM1-BSA (Aflatoxin M1-bovine serum albumin) 免疫 Balb/C 小鼠, 利用 HTS-ELISA 方法筛选分泌抗黄曲霉毒素 M1 单抗的杂交瘤细胞株, 并分析抗体的特性。【结果】筛选到 14 株具有分泌高活性抗黄曲霉毒素 M1 单克隆抗体的杂交瘤细胞株, 纯化的最佳抗体的亲和力为  $5.5 \times 10^{-10}$  mol/L。与黄曲霉毒素 M1 及其结构类似物黄曲霉毒素 M2、B1、B2、G1、G2 以及其他物质脱氧雪腐镰刀菌烯醇和 BSA 的交叉反应率分别为 100%、4.5%、21.5%、1.0%、16.6%、1.0%、0%、0%。间接竞争 ELISA 检测最低检测限可达 0.01  $\mu\text{g/L}$ , 线性范围为 0.1–10  $\mu\text{g/L}$ , 竞争性抑制抗体反应 50% 的抑制浓度  $\text{IC}_{50}$  为 0.82  $\mu\text{g/L}$ , 添加 0.25–5  $\mu\text{g/L}$  黄曲霉毒素的牛奶间接竞争 ELISA 检测回收率在 60.3%–152.8% 之间。【结论】HTS-ELISA 方法可以制备具有高亲和力的抗黄曲霉毒素 M1 单克隆抗体, 可为黄曲霉毒素 M1 免疫检测体系的建立提供优质抗体材料。

**关键词:** 黄曲霉毒素 M1; 高通量酶联免疫法; 单克隆抗体

**中图分类号:** R446.61    **文献标识码:** A    **文章编号:** 0001-6209 (2010)10-1406-06

黄曲霉毒素 M1 (Aflatoxin M1, AFM1) 是一种痕量存在于乳制品中的致癌物质<sup>[1]</sup>, 由于 AFM1 在乳制品的加工过程中难以去除, 因此世界各国大多采用高灵敏的检测方法监控乳制品中 AFM1 的污染度, 并制定严格的法定残留限量来预防黄曲霉毒素 M1 的危害, 其中基于抗体的免疫亲和柱-HPLC、纳米胶体金试纸条、ELISA 等是常用的检测方法<sup>[2–6]</sup>, 而这些方法的准确性和灵敏度是取决于所采用的抗 AFM1 单抗的品质, 但是国内目前还未见有完全可以替代国外先进的抗 AFM1 单克隆抗体相关产品, 其原因之一是由于国内在筛选分泌高亲和力抗 AFM1 抗体的杂交瘤细胞株相关技术领域一直存在

一些瓶颈问题未能有所突破, 特别是在应用高通量酶联免疫分析法筛选杂交瘤细胞株的领域缺乏实验研究资料, 制约了高活性抗 AFM1 单克隆抗体的完全国产化。

目前高通量 ELISA 筛选方法 (High-Throughput Screening ELISA, HTS-ELISA) 已经被世界各大医药公司广泛应用于高纯度、高活性单克隆抗体的大批量筛选。HTS-ELISA 方法以其规模大、速度快的优势, 远比经典的融合杂交瘤细胞筛选的方法提高单克隆抗体的开发效率, 但是国内在抗 AFM1 单克隆抗体筛选研究中还未见有 HTS-ELISA 的应用报告。

因此, 本研究采用 AFM1-BSA 为免疫抗原, 在

**基金项目:** 黑龙江省教育厅项目 (1151hz025); 国家自然科学基金 (30771799)

**作者简介:** 裴世春 (1966–), 男 (朝鲜族), 吉林省通化市人, 教授, 博士, 从事食品中真菌毒素的检测研究。E-mail: peisc2002cn@yahoo.com.cn

**收稿日期:** 2010-04-01; **修回日期:** 2010-05-11

包被有 AFM1-BSA 和全抗原偶联物 BSA 的配套数十块 96 孔板中进行高通量对比筛选融合杂交瘤细胞集落,根据各包被板对应孔之间的阴、阳性和 96 孔板间对应孔间的阳性孔顺序叠加现象筛选出分泌高特异性和高亲和力的抗 AFM1 抗体的融合杂交瘤细胞克隆,并利用细胞集落显微操作技术挑出融合杂交瘤细胞,经再次 ELISA 确认后进行杂交瘤细胞的亚克隆,并确立分泌抗 AFM1 抗体的杂交瘤细胞株系的 HTS-ELISA 方法体系,旨在为食品安全快速检测用抗体的高效开发提供试验参考。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 细胞和小鼠:**SP2/0 骨髓瘤细胞由上海麦伯星生物科技有限公司惠赠,Balb/C 小鼠购自中国农科院哈尔滨兽医研究所,雌性。

**1.1.2 主要试剂:**Aflatoxin M1-bovine serum albumin conjugate (AFM1-BSA), Aflatoxin M1, Aflatoxin B1, Aflatoxin B2, Aflatoxin M2, Aflatoxin G1, Aflatoxin G2, Deoxynivalenol, CFA (complete Freund's adjuvant), IFA (Freund's incomplete adjuvant), goat anti-mouse IgG/Fc-HRP conjugate, Tween-20, DMSO, PEG, BSA, OPD, Trypan Blue, Hepes, Protein A (SPA) 亲和柱等购自 Sigma 公司;MD6 无血清哺乳细胞培养基购自上海麦伯星生物科技有限公司,DMEM 培养基购自 Invitrogen 公司;优级胎牛血清 (FBS) 购自中国医学院生物医学工程研究所灏洋生物制品科技有限责任公司;其他分析和有机试剂均为优级以上。

**1.1.3 试验仪器与设备:**96 孔洗板机 (美国 Skan Wahser400), 96 孔加样机 (Costar Transtar-96), 全自动加样机 (Genetix QFill3), 微孔板分液器 (Biotex, Ufill), HL-恒流泵 (上海), Stirred ultrafiltration cells (美国 Millipore), CO<sub>2</sub> 培养箱 (美国 SIM E191IR), 37℃ 恒温培养箱 (美国 Stat Fax-2100), 倒置显微镜 (日本 Olympus), 超净工作台 (美国 Purifier Logic A2), 微量紫外分光光度计 (GE Nano-Drop), 精密分析天平 (瑞士 Metter), 细胞离心机 (德国 Eppendorf), 灭菌器 (TMQ. C5090, 山东新华), 细胞培养板、细胞瓶、冻存管 (Costar) 等。

### 1.2 Balb/C 小鼠的免疫程序和方法

5 周龄 Balb/C 小鼠共 3 只,免疫前饲养适应一周,取 0.5 g/L 的 Aflatoxin M1-BSA 溶液 150 μL 与 150 μL CFA 混合后对小鼠皮下和腹腔注射免疫每

只小鼠 100 μL, 14 d 后将佐剂换成 IFA 后同样方法每隔 14 d 免疫 2 次,合计 3 免之后,间接 ELISA 测血清效价。融合前 3 d,采用不加任何佐剂,加强免疫一次,3 d 后取小鼠脾脏细胞进行融合。

### 1.3 杂交瘤的制备及筛选

将培养好的 SP2/0 细胞与制备好的脾细胞计数,并按 1:5 的比例融合,采用 50% 1 mL PEG (分子量 3800) 在 60 s 内加完,作用 30 s。依据计数的脾细胞,按每孔一定量的脾细胞用 1% HAT 培养液稀释后利用全自动加样机转移至 96 孔细胞培养板中,5% CO<sub>2</sub> 37℃ 封闭培养 12 d。12 d 后利用 Transtar-96 从每孔取上清液 40 μL/孔分别添加到预先准备好的与细胞培养板相对应的并包被有 AFM1-BSA 和 BSA 的各 96 孔板中,进行 HTS-ELISA 对比筛选出抗体阳性杂交瘤细胞孔。选择在 AFM1-BSA 板中显强阳性而对照孔为阴性的细胞集落孔,采用单集落显微操作法挑取杂交瘤细胞集落转移至新的 96 孔板中培养,经再次 ELISA 确认后,选择阳性孔的杂交瘤细胞集落置换选择性培养基为 MD6 无血清培养基,然后进行杂交瘤细胞的亚克隆。亚克隆 7-10 d 后扩大培养,冻存杂交瘤细胞。

### 1.4 单克隆抗体的纯化

在 MD6 哺乳细胞无血清培养基中采用逐步提高杂交瘤细胞培养密度的方法进行扩大培养后将杂交瘤细胞转移至 1.0 L-2.0 L 旋转瓶中,连续培养至细胞全部死亡后取出培养液离心收集上清,上清液和 pH8.0 的蛋白-A 结合缓冲液以 1:1 (v/v) 比例混合后利用蛋白 A 亲和层析柱、HL-2 恒流泵及分管收集仪纯化单克隆抗体。洗脱的抗体溶液利用美国 Amicon 公司的搅拌式超滤装置系统 (Stirred Ultrafiltration cells) 进行 PBS 缓冲液即时膜透析和抗体蛋白的浓缩,浓缩抗体用微量紫外分光光度计 (Nano-Drop) 定量后分装待用。

### 1.5 单克隆抗体的鉴定

**1.5.1 抗原和抗体结合的亲和力测定:**利用非竞争性酶免疫法测定抗体亲和力。将包被原 AFM1-BSA 按 1、0.5、0.25 mg/L 包被酶标板,100 μL/孔,4℃ 过夜;1.5% 的 BSA 封闭后,将单抗从 1 mg/L 开始梯度稀释后进行间接非竞争 ELISA 检测。以抗体浓度的对数值为横座标,以其对应的吸光度为纵座标,在一个座标系内作出 3 条 S 形曲线。设定 S 曲线的顶部平行部分为 OD<sub>max</sub>。在曲线中分别找出 3 条曲线各自 50% OD<sub>max</sub> 对应的抗体浓度。将 3 个浓度两两一组,根据下列公式计算单抗的亲合常

数<sup>[3]</sup>。

$$K_{\text{aff}} = (n - 1)/2(n[Ab']t - [Ab]t)$$

注: $n$  为每组中两个包被浓度的倍数; $[Ab']t$  和  $[Ab]t$  分别为每组中两个 50%  $OD_{\text{max}}$  对应的抗体浓度 (mol/L); 单抗的分子量按标准小鼠 IgG 分子量 150 kDa 计算。

**1.5.2 抗体特异性测定:**以最佳 AFM1-BSA 浓度包被酶标板,分别取同浓度的 AFM1、AFM2、AFB1、AFB2、AFG1、AFG2、DON 和 BSA 等 7 种毒素标准液和对照蛋白液进行 10 倍梯度稀释后每孔加 50  $\mu\text{L}$ ,并加入最佳浓度的单抗每孔 50  $\mu\text{L}$ ,每种毒素做 2 个平行组,同时设不加毒素的的对照孔,测定各孔  $OD_{450}$  值,2 个平行组取平均值。各对照组  $OD_{450}$  值用  $B_0$  表示,加毒素各孔  $OD_{450}$  值用  $B$  表示。 $B/B_0(\%)$  为对应浓度的毒素对抗 AFM1 单抗的抑制率。

以各毒素浓度的对数值为横坐标,以  $B/B_0(\%)$  为纵坐标,得出以上各毒素的竞争抑制曲线,求出回归方程,然后计算出 50% 抑制率时所对应的竞争物浓度即  $IC_{50}$  值。根据以下公式,计算 AFM1 与其他几种毒素的交叉反应率:

$$\text{交叉反应率}(\text{CR}\%) = IC_{50\text{AFM1}}/IC_{50\text{毒素}} \times 100\%$$

## 2 结果

### 2.1 细胞融合及筛选

取小鼠脾脏细胞计数结果为  $8.47 \times 10^7$ ,与骨髓瘤细胞融合后,利用添加 1% HAT 和 10% FBS 的 1200 mL MD6 哺乳细胞无血清培养基稀释融合细胞后 280  $\mu\text{L}$ /孔均分到 45 块 96 孔平底细胞培养板中,在 5%  $\text{CO}_2$  和 37℃ 的培养箱中封闭培养 12 d。12 d 后利用 Transtar-96 移液器在无菌净化操作台内分别取上清液 40  $\mu\text{L}$ /孔分别转移到预先准备好的与细胞培养板相对应的并包被有 AFM1-BSA 和 BSA 的各 45 块 ELISA 板中,转移过程中按 96 孔板标号顺序从 1 号板顺序一直添加到 45 号板,在室温反应 10 min 后利用高通量加样机、洗板机进行间接 ELISA 分析。其结果如表 1 所示。

表 1 中阳性孔编号 (Positive Well) 规则为板数-板的行号-板的列号,其中板数为 1 至 45 块板,板的行号为 A 至 H,板的列号为 1 至 12;拖孔数 (Trailing count) 是指某一块板出现阳性孔的下一组对应板出现阳性孔的板数;阳性孔细胞集落数 (Cell colonies in each well) 是指每一个初筛的阳性融合杂交瘤细胞孔中细胞集落的个数。

在确定阳性孔后利用单集落显微操作技术将每

一个阳性孔中的细胞集落共计 24 个集落分别转移到新的 96 孔细胞培养板中培养,3 d 后取部分上清液再次作 ELISA 确认,结果确定了 14 个阳性融合杂交瘤细胞孔,对每一孔杂交瘤细胞进行亚克隆后转移至 24 孔扩大培养并冻存。

表 1 HTS-ELISA 对比筛选融合杂交瘤细胞孔

Tabal 1 The Screening HTS-ELISA results of the hybridoma fusion plate wells

Positive well	AFM1 coated $OD_{450}$	Trailing count	Cell colonies In each well	BSA coated $OD_{450}$
1F1	0.695	3	2	0.012
2A2	0.564	3	2	0.010
7A7	0.515	5	1	0.008
8G7	0.543	5	3	0.010
8H1	0.502	2	1	0.009
18A7	0.525	3	3	0.011
18F11	0.504	5	1	0.008
18G11	0.548	5	1	0.011
22D8	0.451	2	3	0.016
23G1	0.514	2	2	0.012
27D8	0.537	4	2	0.009
28B12	0.542	2	1	0.004
28E2	0.527	5	1	0.013
33B4	0.559	5	1	0.008

### 2.2 单克隆抗体的鉴定

**2.2.1 抗体亲和力的测定:**将筛选的最佳阳性融合细胞株系大量培养后,收集上清液利用 SPA 亲和柱进行纯化,利用 Amicon 搅拌式超滤装置在分子量 3 万的超滤膜上进行对洗脱缓冲液与 PBS 交换透析和抗体浓缩,浓缩的抗体蛋白液经微量紫外分光光度计 (Nano-Drop) 定量后,利用非竞争性酶免疫法测定抗体亲和力。所得结果见图 1,在图 1 中分别找出 3 条曲线的 50%  $OD_{\text{max}}$  所对应的抗体浓度换算成摩尔浓度则分别是  $1.12 \times 10^{-11}$  mol/L、 $1.26 \times$

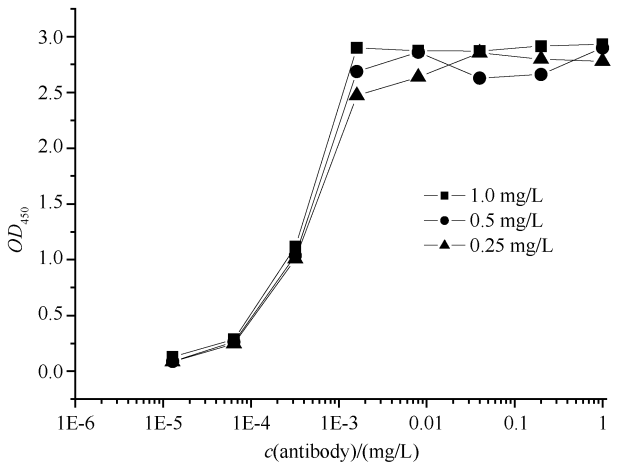


图 1 抗 AFM1 单克隆抗体亲和力

Fig. 1 The affinity of anti-AFM1 mAb.

$10^{-11}$  mol/L、 $1.35 \times 10^{-11}$  mol/L,根据公式  $K_{\text{aff}} = (n - 1)/2(n[Ab']t - [Ab]t)$  共求出 3 个  $K_{\text{aff}}$  值分别是  $4.0 \times 10^{-10}$  mol/L、 $3.0 \times 10^{-10}$  mol/L、 $9.0 \times 10^{-10}$  mol/L,取其平均值即为单抗的亲 constants 为  $5.5 \times 10^{-10}$  mol/L。

**2.2.2 抗体检测范围及特异性测定:**经过 96 孔酶标板棋盘滴定法确定最佳 AFM1 抗原包被浓度为 0.2 mg/L,竞争结合抗体浓度 0.01 mg/L,将此固定抗体浓度的抗体分别和以起始浓度为 1000  $\mu\text{g/L}$  的 AFM1 标准毒素的 10 倍梯度稀释液混合并加 50  $\mu\text{L}$ /孔,设 2 个平行组,进行间接竞争 ELISA,测  $OD_{450}$  后取平均值。

以 AFM1 标毒浓度为横坐标,以  $B/B_0$  (%) 为纵坐标,利用 Origin 7 Server 软件做标准曲线并进行拟合分析,见图 2。如图 2 所示,拟合分析后将间接竞争 ELISA 结果在 Origin 7 Server 上进行计算,可得  $IC_{50\text{AFM1}}$  为 0.82  $\mu\text{g/L}$ 。由于毒素浓度在 0.01  $\mu\text{g/L}$  和 0.1  $\mu\text{g/L}$  之间的  $OD$  值差异显著,因此可以认为研制的抗体灵敏度可达 0.01  $\mu\text{g/L}$ 。经计算可知与  $OD$  值线性关系最佳的范围是 0.1 – 10  $\mu\text{g/L}$  之间,因此基于此抗体的竞争性 ELISA 检测范围可确认在 0.1 – 10  $\mu\text{g/L}$  之间最为可靠。

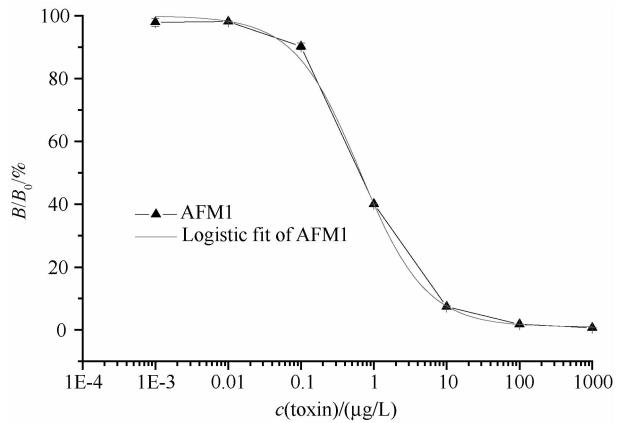


图 2 AFM1 检测 ELISA 标准曲线

Fig.2 The Standard curve of Aflatoxin M1 by indirect competitive ELISA.

利用同样的方法分别制备 1000  $\mu\text{g/L}$  浓度的 AFM1、AFM2、AFB1、AFB2、AFG1、AFG2、DON 和 BSA 并 10 倍梯度稀释后在包被有 AFM1-BSA 的酶标板上与抗 AFM1 单克隆抗体进行间接竞争结合各毒素的 ELISA,利用 Origin 7 Server 软件进行拟合分析,其结果见图 3。

由图 3 可知,本文所制备的抗体与 AFM1、AFM2、AFB1、AFB2、AFG1、AFG2、DON 和 BSA 交叉反应率分别是 100%、4.5%、21.5%、1.0%、

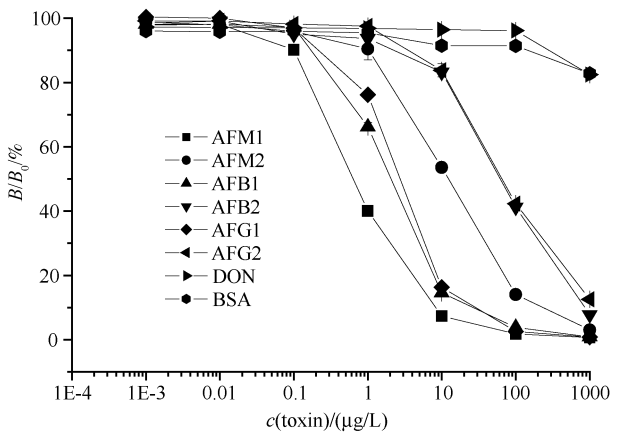


图 3 毒素对 AFM1 单抗抑制率曲线

Fig.3 The different toxins inhibitory of anti-AFM1 mAb.

16.6%、1.0%、0%、0%。本文制备的抗 AFM1 抗体对 AFB1 和 AFG1 的交叉反应率分别为 21.5% 和 16.6%,而对其它结构类似物或结构不同物质的交叉反应率小于 5%,考虑到黄曲霉毒素基本结构中 AFM1、AFB1、AFG1 的二呋喃环中  $C_{15}$  与  $C_{16}$  之间均为  $C_{15} = C_{16}$ ,而 AFM2、AFB2、AFG2 的二呋喃环中  $C_{15}$  与  $C_{16}$  之间为  $C_{15} - C_{16}$ ,加上 AFM1、AFM2 二呋喃环中的均有一 OH 基,而 AFG2 无一 OH 基等结构特点可推断,本研究制备的抗 AFM1 单克隆抗体主要特异性结合部位为黄曲霉毒素的二呋喃环部分,其中  $C_{15} = C_{16}$  和 —OH 为主要与抗体特异性的结合部位。由于黄曲霉毒素是结构非常相似的一类化合物,从本实验的结果分析可知,制备一种完全与所有黄曲霉毒素结构类似物无任何交叉反应性的单克隆抗体是极为困难的,因此,在实际筛选抗体的过程中需要根据目标毒素的检测目的和分布情况选择具有不同交叉反应特性的单克隆抗体。

**2.2.3 AFM1 牛奶中添加回收试验:**为了评估对 AFM1 检测的准确性,将 AFM1 标毒添加到离心处理的鲜牛奶样品中,通过稀释使其浓度分别为 5、2.5、1.25、0.50、0.25  $\mu\text{g/L}$ ,经间接竞争 ELISA 测定结果见表 2,由表 2 中的回收率分析结果可知,牛奶中 AFM1 污染度在大于 0.25  $\mu\text{g/L}$  和小于 5  $\mu\text{g/L}$  的污染度范围内的间接竞争 ELISA 检测的可靠性在 60.3% – 152.8% 之间,由此可认为利用本文制备的抗体构建的 AFM1 间接竞争 ELISA 分析体系在对一定 AFM1 污染度范围的鲜牛奶进行简单离心处理后进行测定的方法是可行的,但对于污染度小于 0.5  $\mu\text{g/L}$  和大于 5  $\mu\text{g/L}$  的鲜奶,在测定过程中可能会存在较大的误差,考虑到我国鲜奶中 AFM1 残留限量标准为 0.5  $\mu\text{g/L}$ ,因此本文制备的抗体以及

ELISA 检测方法可以用于大量牛奶样品中阳性样品的初期筛查研究,可以减少直接应用精密仪器进行大量样品检测时的工作量。

表 2 竞争 ELISA 检测 AFM1 牛奶中添加回收率  
Table 2 Recovery of AFM1 from artificially contaminated milk samples as detection with competitive ELISA

No.	Conc of AFM1 used for spiking samples/( $\mu\text{g/L}$ )	Detection conc of AFM1 <sup>a</sup> /( $\mu\text{g/L}$ )	Recoveries of AFM1 in spiked samples <sup>b</sup> /%
1	5.00	3.01 $\pm$ 0.04	60.3 $\pm$ 0.73
2	2.50	0.93 $\pm$ 0.01	77.3 $\pm$ 0.46
3	1.25	1.18 $\pm$ 0.07	94.3 $\pm$ 5.97
4	0.50	0.58 $\pm$ 0.04	115.0 $\pm$ 7.07
5	0.25	0.38 $\pm$ 0.04	152.8 $\pm$ 16.97

<sup>a</sup>: Each sample was spiked with a known concentration of AFM1 and assayed. Data represent the mean of three replications  $\pm$  SD; <sup>b</sup>: Determined by the following formula: detected AFM1 ( $\mu\text{g/L}$ ) divided by the concentration of AFM1 used for spiking and multiplied by 100. Values are means  $\pm$  SD.

### 3 讨论

AFM1 是乳制品中普遍存在的真菌毒素,因此国际上主要是利用抗 AFM1 单克隆抗体结合各种色谱分析技术针对乳制品中 AFM1 的污染度进行着广泛的调查研究<sup>[7-11]</sup>,目的在于为 AFM1 的摄入量风险评估、法定残留限量的制定等方面提供最基础性的数据,而我国相对来讲更多的是针对抗 AFM1 单克隆抗体的制备和检测体系的建立以及抗 AFM1 单链抗体的活性等方面研究较为普遍<sup>[2-4]</sup>,目的是为了单克隆抗体的国产化,但是从已发表的国内抗 AFM1 抗体制备研究论文来看,由于全自动加样器、Transtar-96 等设备应用所限,大多采用较为传统的方法筛选杂交瘤细胞株和制备单克隆抗体,即细胞融合后初期在 5 块 96 孔板中进行培养后筛选阳性孔,按脾脏细胞数平均  $10^8$  左右来计算,传统方法会造成每孔中的融合细胞数量过于密集或融合率低,筛选的最高活性阳性孔也可能是由于多个中等活性分泌抗 AFM1 抗体融合细胞密集生长所致,往往造成最终筛选的杂交瘤细胞株系并非最佳细胞株系,而本研究所采用的 96 孔培养板高通量筛选方法由于是在 45 块板上进行筛选,大大提高了分泌抗 AFM1 抗体的高活性杂交瘤细胞株的筛选概率,同时结合单集落显微操作技术对挑选的每一个融合细胞株进行再次 ELISA 确认,进一步降低了丢失高活性融合细胞的可能性。

由于黄曲霉毒素 M1 标准品价格昂贵,自制全抗原需要合成检测抗原、免疫抗原等多种抗原物质,而且黄曲霉毒素 M1 毒性很强,在合成全抗原过程

中对试验者的危害性较大,本研究结合对比筛选的方法,利用 Sigma 产品 Aflatoxin M1-bovine serum albumin conjugate 为免疫抗原,以 BSA 包被为对照,利用高通量筛选 ELISA,通过反复筛选获得了稳定分泌抗 AFM1 单抗的杂交瘤细胞株系,其中最佳细胞株分泌的抗 AFM1 的单抗亲和力达到  $10^{-10}$  mol/L 到  $10^{-11}$  mol/L 之间,灵敏度可以测到 0.01  $\mu\text{g/L}$  的 AFM1,与 AFM1 结构类似的黄曲霉毒素 B1、G1 的交叉反应率分别是 21.5%、16.6%,与其他结构类似物交叉反应性低于 5%,而与 AFM1 结构有差异的脱氧雪腐镰刀菌烯醇以及作为免疫抗原偶联物的 BSA 没有交叉反应性,本方法制备的抗体与江涛<sup>[3]</sup>等研制的单克隆抗体的亲和力  $2.8 \times 10^{-11}$  mol/L 相比略显低一些,但对黄曲霉毒素 M1 的检测灵敏度和线性检测范围却有显著提高,特别是本方法制备的抗体在 0.01  $\mu\text{g/L}$  和 10  $\mu\text{g/L}$  的大范围内具有良好的线性关系,这也证明了本方法制备的抗体具有良好的活性,非常适合于基于抗体的免疫检测分析体系的建立,虽然本方法制备的抗体与 AFB1、AFG1 具有一定的交叉反应性,但是考虑到 AFM1 主要污染乳制品,而乳制品中其他 AFM1 结构类似物含量极少,因此在本抗体在乳制品中的应用方面不会有影响,同时本方法对于一些毒性大、价格昂贵、难以合成全抗原的小分子危害物检测用抗体的开发方法方面也具有良好的参考价值。

本研究在抗 AFM1 高活性单克隆抗体的制备方面采用了蛋白 A 亲和柱直接从细胞培养上清液进行抗体的亲和纯化,相对于小鼠腹水法,其制备抗体稳定性好、无杂蛋白掺入,减少了因小鼠个体差异造成的抗体产量的不稳定性,本文报告的方法非常适合于高活性单克隆抗体的产业化生产,可为后期 AFM1 检测用试剂盒、免疫亲和柱、荧光免疫偏振检测、胶体金试纸条等的开发提供稳定性状良好的优质国产化抗体材料。

**致谢** 抗体亲和力测定由北京华安麦科生物技术有限公司协助测定,在此一并表示感谢。

### 参考文献

[ 1 ] Thirumala DK, Mayo MA. Development and Application of an indirect Competitive Enzyme-linked Immunoassay for Aflatoxin M1 in Milk and Milk-Based Confectionery. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2002, 50: 933-937.

- [ 2 ] 李燕俊.乳与乳制品中黄曲霉毒素 M1 的检测方法. 中国食品卫生杂志( *Chinese Journal of Food Hygiene* ), 1998,10 ( 2 ):31-34.
- [ 3 ] 江涛,俞琼,李敏.抗黄曲霉毒素 M1 抗体制备及检测方法建立. 中国公共卫生( *Chinese Journal of Public Health* ),2007,23:43-45.
- [ 4 ] 潘葳,庞广昌.抗黄曲霉毒素 M1 单克隆抗体细胞株的筛选. 食品科技( *Journal of Food Science and Technology* ),2005,5:6-9.
- [ 5 ] Lee JE, Kwak BM, Jeon TH. Occurrence of aflatoxin M1 in raw milk in South Korea using an immunoaffinity column and liquid chromatography. *Food Control*, 2009, 20:136-138.
- [ 6 ] Hu YY, Zheng P, Zhang ZX. Determination of aflatoxins in high-pigment content samples by matrix solid-phase dispersion and high-performance liquid chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2006, 54: 4126-4130.
- [ 7 ] Sadeghi N, Oveisi MR, Jannat B. Incidence of aflatoxin M1 in human breast milk in Tehran, Iran. *Food Control*, 2009, 20:75-78.
- [ 8 ] Hussain I, Anwar J, Munawar MA, Variation of levels of aflatoxin M1 in raw milk from different localities in the central areas of Punjab, Pakistan. *Food Control*, 2008, 19: 1126-1129.
- [ 9 ] Rastogi S, Dwivedi PD, Das M. Detection of aflatoxin M1contamination in milk and infant mlik products from Indian markets by ELISA. *Food Control*, 2004, 15, 287-290.
- [10] Sassahara M, Pontes ND, Yanaka EK. Aflatoxin occurrence in foodstuff supplied to dairy cattle and aflatoxin M1 in raw milk in the North of Parana  state. *Food and Chemical Toxicology*, 2005,43(6), 981-984.
- [11] Tajkarimi M, Aliabadi SF, Ahdavi H. Aflatoxin M1 contamination in winter and summer milk in 14 states in Iran. *Food Control*, 2008,19, 1033-1036.

# Using HTS-ELISA method to make anti-aflatoxin M1 monoclonal antibody

Shichun Pei<sup>1\*</sup>, Na He<sup>2</sup>, Lijun Zhang<sup>3</sup>, Mason Lu<sup>4</sup>

(<sup>1</sup> Food and Biological Engineering College, Qiqihar University, Qiqihar 161006, China)

(<sup>2</sup> Food Science College, HLJ August First Land Reclamation University, Daqing 163319, China)

(<sup>3</sup> MabCom. Inc., Daqing 163316, China)

(<sup>4</sup> MabStar. Inc., Shanghai 201203, China)

**Abstract:** [ **objective** ] To prepare high-affinity anti-aflatoxin M1 monoclonal antibodies by High Throughput Screening ELISA (HTS-ELISA) [ **Methods** ] Balb/C mice were immunized by aflatoxin M1-bovine serum albumin conjugate, and screen secret anti-aflatoxin M1 monoclonal antibody hybridoma by HTS-ELISA. The antibody was characterized. [ **Results** ] Fourteen hybridoma cell lines which could secret high activity anti-aflatoxin M1 monoclonal antibodies were obtained. The affinity of the purified monoclonal antibody was  $5.5 \times 10^{-10}$  mol/L. The cross-reactivity of the monoclonal antibody clone against aflatoxin M1, aflatoxin M2, aflatoxin B1, aflatoxin B2, aflatoxin G1, aflatoxin G2, deoxynivalenol and BSA was 100% , 4.5% , 21.5% , 1.0% , 16.6% , 1.0% , 0% , 0% , respectively. The sensitivity of the anti-AFM1 monoclonal antibody binding to aflatoxin M1 was 0.01  $\mu\text{g/L}$  and the linear range for developed indirect competitive ELISA was 0.1 – 10  $\mu\text{g/L}$  aflatoxin M1. The binding inhibition IC50 of the anti-aflatoxin M1 monoclonal antibody was 0.82  $\mu\text{g/L}$ . Assays of milk samples mixed with AFM1 ranging in concentration from 0.25 to 5.0  $\mu\text{g/L}$  gave mean indirect competitive ELISA recovery of 60.3% – 152.8% . [ **Conclusion** ] HTS-ELISA can be used for the preparation of the high-affinity anti-aflatoxin M1 monoclonal antibodies. The anti-aflatoxin M1 monoclonal antibody could be provided as the high quality material in the system of aflatoxin M1 immune detection.

**Keywords:** Aflatoxin M1; HTS-ELISA; monoclonal antibody

( 本文责编:张晓丽 )

Supported by the Department of Education item of Heilongjiang Province (1151hz025) and the National Natural Science Foundation of China (30771799)

\* Corresponding author. Fax: +86-452-2738361; E-mail: peisc2002cn@yahoo.com.cn

Received: 1 April 2010/Revised: 11 May 2010