

酚酞单克隆抗体的制备

谭攀¹, 吴鑫¹, 蔡杜曼², 胡金梅^{2*}

(1. 深圳市三方圆生物科技股份有限公司, 深圳 518109; 2. 广东环境保护工程职业学院, 佛山 528216)

摘要: **目的** 建立免疫学快速检测减肥类保健食品中非法添加的酚酞, 制备酚酞单克隆抗体并进行评价。**方法** 利用碳二亚胺(carbodiimide, EDC)法合成免疫原和包被原, 用免疫原免疫 Balb/C 小鼠, 取小鼠脾脏与 SP2/0 鼠骨髓瘤细胞融合。采用竞争结合双阳性两步筛选法, 筛选出能分泌特异性抗体的杂交瘤细胞, 利用有限稀释亚克隆方法得到单株细胞; 采用体内诱生法制备腹水型单克隆抗体。利用辛酸-饱和硫酸铵法对腹水型抗体进行纯化, 利用酶联免疫吸附法鉴定纯化后的抗体。**结果** 成功合成了酚酞-BSA 免疫原和酚酞-OVA 包被原, 筛选获得酚酞杂交瘤细胞株 FT/BSA/2019, 单克隆抗体的效价 1×10^5 。**结论** 本研究初步建立了特异性高的酚酞单克隆抗体的制备方法。**关键词:** 酚酞; 单克隆抗体; 酶联免疫吸附法

Preparation of monoclonal antibody of phenolphthalein illegally added in health products

TAN Pan¹, WU Xin¹, CAI Du-Man², HU Jin-Mei^{2*}

(1. Sanfangyuan Biological Technology Co., Ltd., Shenzhen 518109, China; 2. College of Guangdong Polytechnic of Environmental Protection Engineering, Foshan 528216, China)

ABSTRACT: Objective To establish immunological rapid detection of illegally added phenolphthalein in dietetic health foods, and to prepare and evaluate phenolphthalein monoclonal antibodies. **Methods** The immunogen and coating antigen were synthesized using a carbodiimide (EDC) method. Balb/C mice were immunized with the synthetic immunogen, and the mouse spleen was fused with SP2/0 mouse myeloma cells. The hybridoma cells capable of secreting specific antibodies were screened by adopting a competition and double-positive two-step screening method, individual cell line was obtained by using a limited dilution subcloning method, and the ascites-type monoclonal antibody was prepared by adopting an *in-vivo* induction assay. The ascites-type antibody was purified by caprylic acid-saturated sulfuric acid method, and the purified antibody was identified by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). **Results** Phenolphthalein -BSA immunogen and phenolphthalein-OVA encapsulant were successfully synthesized, FT/BSA/2019 of phenolphthalein hybrid tumor cell line was screened, and the titer of monoclonal antibody was 1×10^5 . **Conclusion** This paper establish the preparation method of the specific high-specificity phenolphthalein monoclonal antibody.

KEY WORDS: phenolphthalein; monoclonal antibody; enzyme-linked immunosorbent assay

基金项目: 2019 年广东大学生科技创新培育项目(PDJH2019b0805)、广东高校省级重点平台和重大科研项目(2017GGXJK041)

Fund: Supported by Scientific and Technological Innovation Cultivation Project of Guangdong College Students in 2019 (PDJH2019b0805), and Provincial Key Platforms and Major Scientific Research Projects in Guangdong Colleges (2017GGXJK041)

*通讯作者: 胡金梅, 博士, 高级工程师, 主要研究方向为食品营养与安全。E-mail: 172323992@qq.com

*Corresponding author: HU Jin-Mei, Ph.D, Senior Engineer, College of Guangdong Polytechnic of Environmental Protection Engineering, Foshan 528216, China. E-mail: 172323992@qq.com

1 引言

酚酞是一种化学制品,可医用为刺激性泻药,适用于慢性便秘;但长期服用酚酞会导致营养物质的丢失,引起贫血、水电解质失衡、体重过低、抵抗力下降及营养不良等并发症^[1]。已有从减肥类中成药及保健食品检出酚酞、脱氢表雄甾酮等非法添加物的报道^[2-4]。目前,减肥类保健食品非法添加化学药物的检测方法主要有红外光谱法、拉曼光谱法、核磁共振氢谱法、质谱法、液相色谱法、液相色谱-质谱联用法、气相色谱-质谱联用法等^[5-9]。这些检测方法存在仪器成本高、对检测人员要求高等限制因素。也有研究者开发了相关的化学显色法和薄层色谱法^[10,11]。由于保健食品本身化学成分复杂,显色法和薄层色谱法受样品基底、环境温度等影响较大,假阳性率较高。因此,开发一种快速、高效灵敏、低成本的检测方法对保健食品、中药等非法添加酚酞的筛查具有重要意义。免疫分析法具有检测速度快、灵敏度高、操作简单等优势。其中单克隆抗体因其具有专一的特异性,性质稳定,制备后容易稳定获取等优点,在快速免疫检测得到广泛应用^[12-14]。但目前还鲜见有酚酞单克隆抗体制备的报道。

为了建立一种快速、特异性高的酚酞免疫检测方法,本研究通过设计酚酞半抗原,然后与载体蛋白偶联制备免疫原,进而免疫 BALB/c 小鼠,取鼠脾细胞与 SP2/0 鼠骨髓瘤细胞融合,经筛选和克隆,制备酚酞单克隆抗体并进行初步评价,以期为进一步研制减肥类保健食品中酚酞快速检测免疫试剂盒提供依据。

2 材料与方法

2.1 仪器

TDL-40B 低速多管架自动平衡离心机(上海安亭科学仪器有限公司); Multiskan-FC 酶标仪(赛默飞世尔科技有限公司); PW-960.PLUS 全自动洗板机(深圳汇松科技发展有限公司); WH-2 微型旋涡混合仪(上海沪西分析仪器厂); DHP-9052 电热恒温培养箱(上海一恒科技有限公司); HF-151UVCO2 培养箱(力康生物医疗科技有限公司); S100F+XSZ-D 倒置显微镜[尼康仪器(上海)有限公司]; SW-CJ-LFD 超净工作台(苏州净化设备有限公司); UV-1900PC 紫外可见分光光度计(上海美析仪器有限公司)。

2.2 材料与试剂

酚酞(阿拉丁试剂有限公司); 牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)、卵清蛋白(ovalbumin, OVA)、弗式完全佐剂、弗式不完全佐剂、PRMI 1640 培养基、聚乙烯二醇 1500 (PEG 分子量为 1500)、50×HAT[次黄嘌呤(H-hypoxanthine), 甲氨喋呤(A-aminopterin), 胸腺嘧啶核苷(T—thymidine)]培养基添加剂、50×HT[次黄嘌呤

(H-hypoxanthine), 胸腺嘧啶核苷(T—thymidine)]培养基添加(Sigma 公司); 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐 [1-(3-dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimide, EDC] (广东和为化工有限公司); 胎牛血清(杭州四季青生物工程有限公司); 青链霉素溶液、4-(2-羟乙基)-1-哌嗪乙磺酸 [4-(2-hydroxyethyl) piperazine-1-ethanesulfonic acid, HEPES]、谷氨酰胺(上海生工生物工程股份有限公司); 巯基乙醇、丙酮酸钠(广州威佳科技有限公司); N, N-二甲基甲酰胺(N, N-Dimethylformamide, DMF)、乙酸乙酯(广东光华科技股份有限公司); 丁二胺、蔗糖、碳酸氢钠、一水葡萄糖、碳酸钠、氯化钠、十二水合磷酸氢二钠、磷酸二氢钾、浓硫酸、柠檬酸(上海麦克林生化科技有限公司); 蛋白浓度测定试剂盒(bicinchoninic acid, BCA)(上海瑞齐生物科技有限公司); SP2/0 细胞(江苏宝莱生物科技有限公司)。SPF 级的 Balb/C 雌性小鼠, 6~8 周龄, 体质量约 20 g/只[实验动物许可证号: SCXK-(粤)2018-0002, 广东省医学实验动物中心]。

2.3 实验方法

2.3.1 抗原的合成

酚酞半抗原的合成参考文献方法^[15], 并加以改进。称取 0.944 g 酚酞, 0.6 mL 丁二胺溶于 10 mL DMF 中, 升温至 100 °C 反应过夜, 点板中控反应完毕后, 减压浓缩旋干溶剂 DMF 和过量的丁二胺, 浓缩物加 20 mL 乙酸乙酯溶解后, 用 0.1 mol/L 的盐酸水溶液中和没有除去的丁二胺, 分液, 乙酸乙酯层用水洗涤三次后用无水硫酸钠干燥, 减压浓缩旋干乙酸乙酯, 得到半抗原。合成反应方程如图 1 所示。

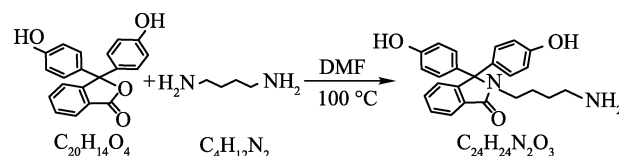


图 1 酚酞半抗原合成路线

Fig.1 Synthetic route of phenolphthalein hapten

采用碳二亚胺法制备酚酞完全抗原,将改造成功的酚酞半抗原(butylamino phenolphthalein, PT)分别与载体蛋白 BSA 和 OVA 偶联,得酚酞-BSA 完全抗原(BSA coupling compound with PT, PT-BSA)和酚酞-OVA 完全抗原(OVA coupling compound with PT, PT-OVA)。采用紫外分光光谱法扫描 230~360 nm 吸收曲线。

2.3.2 小鼠免疫及效价测定

将制备的免疫抗原 PT-BSA 与弗氏完全佐剂等量混合,完全乳化后,腹部皮下注射 6~8 周龄 Balb/c 雌性小鼠,剂量为含酚酞-BSA 100 μg/只,以后每隔 2 周以相同剂量 PT-BSA 抗原与弗氏不完全佐剂混合乳化后进行皮下多点注射,共免疫 4 次,二次免疫后进行老鼠尾静脉采血,分离血清,以 PT-OVA 抗原包被酶标板,用间接 ELISA 方法

检测分析血清抗体效价。选取免疫效价检测值最高的小鼠, 于细胞融合前 3 d 进行冲击免疫 1 次, 3 d 后取冲击免疫过的小鼠脾脏细胞进行细胞融合。

2.3.3 细胞融合及筛选

无菌取脾细胞与骨髓瘤细胞(SP2/0)按数量 5:1 的比例于 50 mL 离心管中轻轻混匀, 900 r/min 离心 5 min, 弃上清, 重新加入不完全 RPMI-1640 培养基重悬, 再次离心弃去上清液, 倒扣在滤纸上除去管壁液体, 于离心管架上反复震荡混匀置于 37 °C 水浴中。将预热的 1 mL PEG 加入离心管中, 边加边轻轻搅拌, 在 1 min 内加完。静置 1 min 后, 加入 10 mL 37 °C 预热的 RPMI-1640 培养基, 先慢后快, 37 °C 静置 10 min, 900 r/min 离心 7 min, 弃去上清, 用 5 mL HAT 培养基轻轻重悬细胞混匀沉淀, 将细胞悬液用 HAT 培养基稀释至 60 mL, 混合均匀, 加入到已含有饲养层细胞的 96 孔细胞培养板中, 每孔 100 μ L, 置于 5% CO₂ 37 °C 培养箱中恒温培养。

融合后第 7 d 观察细胞的生长状况, 用 HAT 培养基半换液一次, 10 d 后再用 HT 培养基置换 HAT 培养基, 待细胞贴壁并长满孔底 1/3 时, 吸取上清液, 用间接 ELISA 竞争法检测($OD_{450\text{ nm}}$), 以酚酞-OVA 为包被抗原, 以 $P/N \geq 2.1$ 作为阳性判断标准。对检测为阳性的细胞进行扩大培养。同时采用有限稀释法进行克隆化培养, 选择克隆数少、 OD 值高的阳性孔, 将其再次克隆。克隆 3 次至所有细胞孔阳性率检测为 100% 时, 扩大培养并冻存。

2.3.4 单克隆抗体腹水的制备与纯化

腹水的制备选取周龄 7~8 周的 Balb/C 小鼠 10 只, 腹部注射 0.5 mL/只降植烷。一周后, 将扩大培养的 2×10^6 个细胞注入小鼠腹腔内, 7~15 d 后小鼠腹部膨大行动不便时, 用 10 mL 注射器插入小鼠腹部抽取腹水。将收集的腹水 1000 r/min 离心 5 min, 取中间层上清。然后使用高速冷冻离心机 10000 r/min 离心 5 min, 吸取上清备用。采用间接竞争 ELISA 法检测腹水。

腹水的纯化取 1 mL 腹水, 加入 2 mL 乙酸缓冲液, 逐滴加入 33 μ L 正辛酸, 边加边混匀, 4 °C 静置 2 h。然后 12000 r/min 离心 30 min, 留上清, 弃沉淀。加入上清量 1/10 叠氮化钠, 再加入总量 0.277 g/mL 的硫酸铵, 混匀溶解, 放置 4 °C, 静置 2 h。然后 12,000 r/min 离心 30 min, 去除上清液, 加入 0.01 mol/L 的 PBS 重悬, 在 4 °C 条件下用 0.01 mol/L 的 PBS 透析 3 d, 每 8 h 换液 1 次。

2.3.5 单克隆抗体的浓度与效价

BCA 法检测抗体浓度参考试剂盒说明, 将标准品或样品和 BCA 工作液加入到 96 空板中, 37 °C 放置 30 min, 测定溶液在 562 nm 处的吸光度值, 计算待测蛋白的浓度。

抗体的效价: 将酚酞包被原分别稀释为 1、0.1、0.01、0.001 μ g/mL 浓度, 分别包被在聚苯乙烯酶标板上, 包被量为 100 μ L/孔, 采用间接竞争 ELISA 法检测其效价。

3 结果与分析

3.1 完全抗原的合成

制备的完全抗原 PT-BSA 和 PT-OVA 采用紫外分光光度计检测, 扫描结果如图 2 所示。其中图 2a, BSA 在 278 nm 处有吸收峰; PT 在 271 nm 处有吸收峰; 而 PT-BSA 在 280 nm 处有吸收峰。图 2b 中, OVA 在 278 nm 处有吸收峰, PT 在 271 nm 处有吸收峰; 而 PT-OVA 在 275 nm 处有吸收峰。偶联后产物最大吸收峰的位置和强度均发生了一定的变化。推测酚酞和载体蛋白 BSA、OVA 均发生偶联。

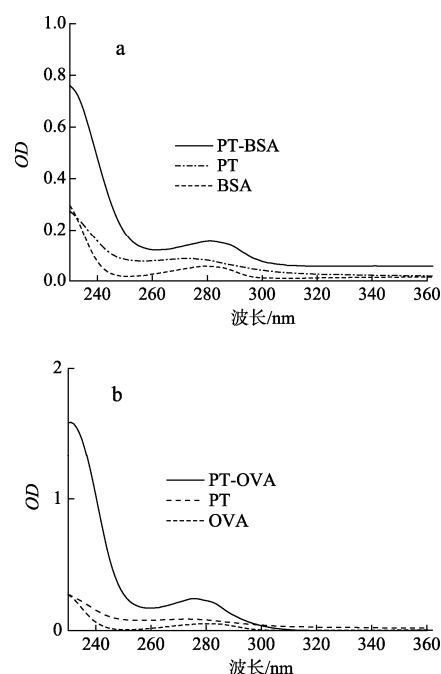


图 2 酚酞免疫抗原和包被抗原的紫外扫描光谱

Fig.2 UV scanning spectra of phenolphthalein immune antigens and coated antigens

3.2 小鼠免疫及效价

稀释酚酞的阳性血清及阴性血清, 采用方阵法确定酚酞蛋白的最佳包被浓度和阳性血清的最佳稀释倍数(即效价), 以 OD_{450} 为 1.0 左右时所对应的包被原浓度以及血清稀释倍数为最佳工作浓度。经过 4 次免疫后, 免疫小鼠多抗血清效价测定结果如表 1 所示, 检测结果得出免疫小鼠血清效价 1:40000, 免疫尾血清效价达到 1:80000。满足可用于细胞融合要求的小鼠多抗血清效价应大于 10000 倍。因此, 经酚酞-完全抗原免疫的小鼠多抗血清效价均符合要求, 可用于下一步融合。

3.3 单克隆细胞株的融合与筛选

细胞融合一周后, 在显微镜下可以观察到融合成功的细胞呈葡萄串状分布, 细胞饱满呈透亮状。细胞融合第 10 d 给细胞更换 HT 培养液后, 能看到较多细胞集落。融

合第 13 d, 将 HT 培养液换成 20%血清完全 1640 培养基, 继续培养。融合细胞集落长到孔底 1/3~1/2, 且细胞培养液经数次换液, 细胞培养液颜色变黄时(3~4 d)吸取杂交瘤细胞培养上清, 使用 ELISA 方法检测。选择阳性值最高的杂交瘤细胞株, 经有限稀释法 4 次亚克隆培养。所有克隆细胞集落克隆孔检测为阳性时, 得到能稳定分泌单克隆抗体的杂交瘤细胞株, 命名为 FT-BSA/2019。如表 2 所示, 经有限稀释法 4 次亚克隆后建立了分泌有效抗体的细胞株, 抑制率为 81.9%。

表 1 免疫小鼠多抗血清的效价
Table 1 Titer of polyclonal antiserum in immunized mice

小鼠	空白对照	1:10000	1:20000	1:40000	1:80000
1#	0.063	2.898	2.402	2.085	1.691
2#	0.059	2.908	2.495	2.052	1.813
3#	0.064	2.912	2.498	2.062	1.896

表 2 单克隆杂交瘤细胞上清的抑制率(%)
Table 2 Detection data of monoclonal hybridoma cell culture supernatant (%)

标准品 (mg/kg)	一次亚克隆	二次亚克隆	三次亚克隆	四次亚克隆
5	37.5	48.3	52.7	62.4
10	59.2	72.2	73.4	81.9

3.4 单克隆腹水的纯化及效价

间接竞争 ELISA 法测定腹水效价及抑制率, 由表 3 可知, 腹水的效价达到 $1:10^5$, 且 3 批腹水的批间差小于 3%, 证明该细胞产生的腹水含有目的抗体, 并且抗体的稳定性良好。

表 3 单克隆抗体腹水的效价
Table 3 Titer of monoclonal antibody ascities

腹水批次	1:10 ³	1:10 ⁴	1:10 ⁵	1:10 ⁶
PT-BSA-180927	3.776	2.577	2.155	1.52
PT-BSA-180928	3.842	2.658	2.086	1.53
PT-BSA-180930	3.643	2.545	2.142	1.56

3.5 间接竞争 ELISA 法测定结果

由 BCA 方法检测抗体蛋白质浓度为 6.5 mg/mL。间接竞争 ELISA 法测定其抗体效价, 如下表 4 可知, 抗体的效价为 1×10^5 , 初步达到了单克隆抗体的制备要求。后续还可以对抗体的纯化工艺、分类、纯度、亲和力、灵敏度和特异性等开展研究。

表 4 单克隆抗体的效价
Table 4 Titer of monoclonal antibody

抗体	抗体效价			
	10 ³	10 ⁴	10 ⁵	10 ⁶
酚酞抗体	2.822	2.588	2.185	1.582
空白对照	0.125	0.071	0.074	0.062

4 结 论

本研究通过将酚酞分子氨基化改性后与载体蛋白 BSA 和 OVA 偶联, 经紫外分光光度法检测, 成功制备了免疫原酚酞-BSA 和包被原酚酞-OVA。通过杂交瘤技术对细胞株的筛选, 获得 1 株酚酞杂交瘤细胞株 FT-BSA/2019。将其进行抗体腹水的制备与纯化, 腹水效价达到 1×10^5 , 三批腹水的效价及抑制率批间差小于 3%; 采用间接竞争 ELISA 法测定单克隆抗体的效价达到 1×10^5 , 说明制备的单克隆抗体特异性和稳定性良好。本研究为下一步研制减肥类保健食品中酚酞快速检测免疫试剂盒提供了实验依据。

参考文献

[1] 侯晓芳, 施迎娣, 王嗣岑. 中药及保健品中非法添加物的分析技术研究进展[J]. 中国药科大学学报, 2019, 50(1): 33-40.
Hou XF, Shi YD, Wang SC. Progress in the analysis of adulterated additives in traditional Chinese medicines and health care products [J]. J China Pharm Univ, 2019, 50(1): 33-40.

[2] 黄诺嘉, 杨文红, 黄奕滨. 减肥类中成药、保健食品、食品中非法添加酚酞-西布曲明等化学成分的快筛检测方法研究[J]. 食品与药品, 2011, 13(3): 114-117.
Huang NJ, Yang WH, Huang YB. Study on quick screening test for chemicals such as phenolphthalein and sibutramine hydrochloride illegally mixed into anti-obesity chinese patent medicine, healthcare food and foodstuff [J]. Food Drug, 2011, 13(3): 114-117.

[3] Li X, Chen X, Wu X, *et al.* Rapid detection of adulteration of dehydroepiandrosterone in slimming products by competitive indirect enzyme-linked immunosorbent assay and lateral flow immune chromatography [J]. Food Agric Immunol, 2019, 30(1): 123-139.

[4] Yun J, Choi J, Jo CH, *et al.* Detection of synthetic anti-obesity drugs, designer analogues and weight-loss ingredients as adulterants in slimming foods from 2015 to 2017 [J]. J Chromatogr Sep Technol, 2018, 9(396): 2.

[5] 朱晓雯, 郭芯岐. 高效液相色谱法测定减肥类保健食品中酚酞含量的不确定度评定[J]. 食品安全质量检测学报, 2018, 9(15): 3954-3957.
Zhu XW, Guo XQ. Uncertainty evaluation in determination of phenolphthalein added in weight-reducing health products by high performance liquid chromatography [J]. J Food Saf Qual, 2018, 9(15): 3954-3957.

[6] 黄艳萍, 袁萍, 黄勇红. 减肥保健品中西布曲明的近红外光谱法快速测定[J]. 海峡药学, 2015, 27(11): 42-44.
Huang YP, Yuan P, Huang YH. Analysis of sibutramine in weight-loss healthy food by NIR combined with wavelet transform and artificial neural network [J]. Strait Pharm J, 2015, 27(11): 42-44.

- [7] Hachem R, Assemet G, Martins N, *et al.* Proton NMR for detection, identification and quantification of adulterants in 160 herbal food supplements marketed for weight loss [J]. *J Pharm Biomed*, 2016, (124): 34–47.
- [8] 甘勇强, 纪南, 田萍, 等. 拉曼光谱快速检测减肥保健品中非法添加酚酞的研究[J]. *中国药师*, 2014, 17 (10): 1675–1677.
- Gan YQ, Ji N, Tian P, *et al.* A fast determination method for phenolphthalein illegally added into diet health products by raman spectroscopy [J]. *China Pharm*, 2014, 17(10): 1675–1677.
- [9] Kim JY, Park HJ, Kim JW, *et al.* Development and validation of UPLC and LC–MS/MS methods for the simultaneous determination of anti-obesity drugs in foods and dietary supplements [J]. *Arch Pharm Res*, 2016, 39(1): 103–114.
- [10] 许凤, 李莉, 张宏莲, 等. 薄层色谱扫描法对减肥保健食品中酚酞的定性定量分析[J]. *药物分析杂志*, 2014, 34(9): 1634–1640.
- Xu F, Li L, Zhang HL, *et al.* Identification and determination of phenolphthalein added into the anti-obesity product and healthcare food by TLCs [J]. *China J Pharm Anal*, 2014, 34(9): 1634–1640.
- [11] 姚世平, 刘光中, 姚洪涛, 等. 减肥类保健食品化学添加成分酚酞检测卡的研制[J]. *中国医学装备*, 2016, 13(8): 11–17.
- Yao SP, Liu GZ, Yao HT, *et al.* The development of chemical ingredients of phenolphthalein test card in health weight-reducing food [J]. *China Med Equip*, 2016, 13(8): 11–17.
- [12] Senyuva HZ, Jones IB, Sykes M, *et al.* A critical review of the specifications and performance of antibody and DNA-based methods for detection and quantification of allergens in foods [J]. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess*, 2019, 36(4): 507–547.
- [13] 孔君, 刘箐, 韩跃武, 等. 单克隆抗体制备技术的最新进展及应用前景[J]. *免疫学杂志*, 2011, 27(2): 170–173.
- Kong J, Liu Q, Han YW, *et al.* The advances and application prospects of monoclonal antibody preparation technology [J]. *Immunol J*, 2011, 27(2): 170–173.
- [14] 姚静静, 胡晓飞, 韩俊岭, 等. 黄曲霉毒素 B₁ 单克隆抗体的制备及基于该抗体的黄曲霉毒素 B₁ 免疫学检测方法的建立[J]. *动物营养学报*, 2019, 31(3): 1405–1414.
- Yao JJ, Hu XF, Han JL, *et al.* Establishment of immunologic detection method for aflatoxin B₁ based on preparation of aflatoxin B₁ monoclonal antibody [J]. *Chin J Anim Nutr*, 2019, 31(3): 1405–1414.
- [15] 卢宇靖, 蔡森源, 郭晓路, 等. 酚酞半抗原、人工抗原及其制备方法: 中国 201710096284.2[P]. 2017.
- Lu YJ, Cai SY, Guo XL, *et al.* Phenolphthalein haptens, artificial antigens and their preparation methods: China 201710096284.2 [P]. 2017.

(责任编辑: 王 欣)

作者简介



谭 攀, 工程师, 主要研究方向为食品安全快速检测技术。

E-mail: 445831146@qq.com



胡金梅, 博士, 高级工程师, 主要研究方向为食品营养与安全检测技术。

E-mail: 172323992@qq.com