DOI:10.12441/spyswjs.20240125003 [文章编号] 1673-1689(2024)07-0067-10

基于 Expi 293F 细胞的玉米赤霉烯酮重组全长抗体表达的研究

王何瑶[1,2] 梁 赟[1,2] 钟于红[1,2] 郭原臻[1,2] 黄斌辉[1,2] 何庆华[2,3*]

(1. 南昌大学食品学院,江西 南昌 330000; 2. 南昌大学食品科学与资源挖掘全国重点实验室,江西 南昌 330000; 3. 南昌大学中德联合研究院,江西 南昌 330000)

摘要:免疫分析技术在食品安全快速检测领域发挥着重要作用,其中抗体是免疫分析的核心元件。然而,目前食品安全领域所使用的抗体主要基于多克隆抗体或通过杂交瘤细胞体内培养而获得的单克隆抗体,不仅涉及动物福利及病毒污染问题,还可能面临非靶向抗体污染和细胞抗体基因丢失等挑战。以食品中常见的真菌毒素玉米赤霉烯酮(zearalenone,ZEN)为研究对象,基于作者所在实验室自制的抗 ZEN 单克隆杂交瘤细胞株(Z14),采用亚型特异性引物分别扩增抗 ZEN 抗体的重、轻链全长基因序列,构建了 ZEN 重组全长抗体的表达载体,并使用 PEI 介导实现了 ZEN 重组全长抗体在 Expi 293F 细胞内的瞬时转染表达。间接竞争酶联免疫吸附检测(indirect competitive enzyme-linked immunosorbent assay,IC-ELISA)结果显示,基于重组全长抗体建立的 ZEN 抑制标准曲线,其半数抑制质量浓度(IC_{50})为 2.43 ng/mL,线性范围(IC_{20}~IC_{80})的质量浓度为 0.66~8.88 ng/mL,亲和常数 K_a 为 3.87×10^{10} L/moL,性能均优于传统腹水制备的 ZEN 单克隆抗体,为未来采用体外细胞培养技术大规模生产抗 ZEN 的重组全长抗体奠定了基础。

关键词:玉米赤霉烯酮;重组抗体;真核表达

Study on Expression of Recombinant Full-Length Antibodies Against Zearalenone Based on Expi 293F Cells

WANG Heyao[1,2] *LIANG Yun*[1,2] *ZHONG Yuhong*[1,2] *GUO Yuanzhen*[1,2] *HUANG Binhui*[1,2] *HE Qinghua*[2,3*]

(1. College of Food Science & Technology, Nanchang University, Nanchang 330000, China; 2. State Key Laboratory of Food Science and Resources, Nanchang University, Nanchang 330000, China; 3. Sino German Joint Research Institute, Nanchang University, Nanchang 330000, China)

Abstract: Immunoassay technology plays an important role in the field of rapid detection of food safety, with antibodies being the core component of immunoassay. However, the current detection of antibodies used in foods is mainly based on polyclonal antibodies or monoclonal antibodies obtained in large quantities through the *in vivo* cultivation of hybridoma cells, which not only face animal welfare and viral contamination, but also face problems, such as non-targeted antibody contamination and loss of cellular antibody genes. This study focused on the common fungal toxin zearalenone (ZEN) in foods. Based on the self-made anti-ZEN monoclonal hybridoma cell line (Z14) in our laboratory, sub-type specific primers were used to amplify the full-length gene sequences of

基金项目:江西省“双千计划”人才培养项目(JXSQ2023201029);江西省自然科学基金重点项目(20232ACB205027)。

通信作者:何庆华(1980—),男,博士,研究员,博士研究生导师,主要从事工程抗体构建及其应用研究。E-mail:heqinghua@ncu.edu.cn

收稿日期:2024-01-25 **改回日期:**2024-03-09

the heavy and light chains of the anti-ZEN antibody. The expression vector of the ZEN recombinant full-length antibody was constructed and the PEI mediated transient transfection expression of the ZEN recombinant full-length antibody in Expi 293F cells was achieved. The results of the indirect competitive enzyme-linked immunosorbent assay (IC-ELISA) showed that the half inhibitory mass concentration (IC_{50}) of the ZEN inhibition standard curve established was based on recombinant full-length antibodies, which was 2.43 ng/mL. Moreover, the mass concentration in the linear range (IC_{20}~IC_{80}) was 0.66~8.88 ng/mL, while the affinity constant (K_a) was 3.87×10^{10} L/mol. The performance of the ZEN monoclonal antibodies prepared from ascites was superior to that of traditional ascites, providing a basis for a large-scale production of recombinant full-length antibodies against ZEN based on *in vitro* cell culture in the later stage.

Keywords: zearalenone; recombinant antibodies; eukaryotic expression

真菌毒素污染是影响中国粮食质量安全的重要因素之一[1]。玉米赤霉烯酮是污染玉米、小麦、高粱等重要农作物[2]的一种常见真菌毒素,国际癌症研究机构(International Agency for Research on Cancer,IARC)已将其归类为3B类致癌物[3],因此对粮食及其制品中的ZEN进行快速、准确、灵敏的检测显得尤为重要[4]。

免疫分析方法在食品安全检测领域中的广泛应用得益于其独特的优势,如节约成本、操作简单、反应快速、检测灵敏等。抗体是免疫分析的核心元件,其性能的优劣对免疫分析至关重要[5]。目前,食品安全领域应用的抗体以多克隆抗体和单克隆抗体为主[6]。然而,有报道指出,免疫动物血清中的多克隆抗体只有0.5%~5.0%与预期靶标结合[7],这可能导致高背景信号或免疫学方法中的交叉反应性。

与多克隆抗体相比,单克隆抗体因其特异性强、灵敏度高和性能稳定[8]等优点在食品安全快速检测领域广泛应用。然而,目前食品安全快速检测领域所使用的单克隆抗体主要是通过体内杂交瘤细胞繁殖的方式获得,即利用杂交瘤细胞注射动物腹腔,从而产生体腔积液(腹水),虽然具有制备快速、成本低等优势,但也存在众多局限性。首先,面临着动物福利、病毒污染等问题,欧盟动物实验替代品参考实验室(EURL ECVAM)在2020年发布关于非动物源性抗体的新建议,指出不应再使用动物来开发和生产用于研究、监管、诊断和治疗应用的抗体[9];其次,基于传统杂交瘤方式制备的单克隆抗体存在非靶向抗体的可能性[7]。有报道指出许多商业单克隆抗体并非只存在单一的抗体链,会与多个靶标发生反应[10]。杂交瘤细胞系会随着传代次数的增加发生细胞死亡或丢失抗体基因的可能[11]。因此,在获得杂交瘤细胞的基础上,进行抗体基因测序,并基于哺乳动物细胞开展全长抗体的重组表达,是目前有效避免上述缺陷的主要抗体制备方式,并已在抗体药物、体外诊断领域得到了规模化应用。然而,目前在食品安全快速检测领域的应用较少。

作者以食品污染中常见的真菌毒素ZEN为研究对象,基于作者所在实验室自制的抗ZEN单克隆杂交瘤细胞株(Z14),采用亚型特异性引物分别扩增抗ZEN抗体的重、轻链全长基因序列,构建重组全长抗体的表达载体,使用PEI介导ZEN重组全长抗体的重/轻链质粒转染Expi293F细胞,对影响转染效率和抗体表达的因素进行优化,选取优化的条件制备抗ZEN重组全长抗体,并对其性能进行了鉴定,为未来采用体外细胞培养技术大规模生产抗ZEN的重组全长抗体奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

ZEN单克隆抗体杂交瘤细胞株(Z14)、ZEN-BSA检测抗原、pCDNA3.4载体:均来源于作者所在实验室。

Hifair III cDNA第一链合成试剂盒:上海翌圣生物科技有限公司;pMD™18-T Vector Cloning Kit试剂盒:宝日医生物技术(北京)有限公司;转染试剂PEI:南京禾鸣英固生物科技有限公司;Expi 293F细胞株、Opti-MEM I型减血清培养基:美国Thermo Fisher Scientific公司;OPM-293 CD05培养基:上海奥浦迈生物科技股份有限公司;Protein G亲和层析柱:上海生工生物工程股份有限公司。

引物:上海生工生物工程股份有限公司合成,见表1。

表1 用于扩增重/轻链全长基因序列和构建表达载体的引物

Table 1 Primers for amplifying full-length gene sequences of heavy/light chains and constructing expression vectors

引物名称	正向引物DNA序列（5′-3′）	反向引物DNA序列（5′-3′）	用途
ZEN-L	F1:GGGGATATCCACCATGGAGACAGACACACTCCTGCTAT F2:GGGGATATCCACCATGGATTTTCAAGTGCAGATTTTCAG F3:GGGGATATCCACCATGGAGWCACAKWCTCAGGTCTTTRTA F4:GGGGATATCCACCATGKCCCCWRCTCAGYTYCTKG F5:GGGGATATCCACCATGAAGTTGCCTGTTAGGCTGTTG	R1:GCCGCGGCCTGCAAAGACTCACTTTATTGA	扩增ZEN抗体轻链全长基因
ZEN-H	F6:GGGGATATCCACCATGGRATGSAGCTGKGTMATSCTCTT F7:GGGGATATCCACCATGRACTTCGGGYTGAGCTKGGTTTT F8:GGGGATATCCACCATGGCTGTCTTGGGGCTGCTCTTCT	R2:GCCGCGGCCTGCAAAGACTCACTTTATTGA	扩增ZEN抗体重链全长基因
pCDNA3.4 ZEN-H	F9:CGTGCATAGCGGATCCGACGTGAAGCTCGTGGAGT	R3:GGTTCGATCCTCTAGACTAGAGATTCCGTTTACCAGGAGAGTGG	构建ZEN重链表达载体（下划线依次代表载体和片段的同源序列）
pCDNA3.4 ZEN-L	F10:CGGGATCCGATGTTTTGATGACCCAAACTCCACTC	R4:GCTCTAGAACACTCATTCCTGTTGAAGCTCTTGAC	构建ZEN重链表达载体（下划线依次代表*Bam*H I、*Xba* I的酶切位点）

注：R为A/G；Y为C/T；M为A/C；K为G/T；S为C/G；W为A/T。

1.2 仪器与设备

TGL-185M型高速冷冻离心机：湖南平科科学仪器有限公司；Gentier 32R型PCR仪：西安天隆科技有限公司；MB-580型酶标分析仪：深圳市汇松科技发展有限公司；EVOS FL系列倒置荧光显微镜、ZCZY-AN型二氧化碳振荡培养箱：上海知楚仪器有限公司。

1.3 试验方法

试验流程见图1。

1.3.1 抗体的重、轻链基因扩增 复苏ZEN杂交瘤细胞（Z14），取细胞上清液进行抗体亚型鉴定，当ZEN杂交瘤细胞（Z14）的细胞数目约为3×10^6 CFU/mL时，参照Chomczynski等[12]的方法提取细胞总RNA，通过Hifair III cDNA第一链合成试剂盒反转录合成cDNA。使用亚型特异性的简并引物并参考李蓉芳等[13]的方法扩增抗体的重、轻链全长基因，用1.5 g/dL的琼脂糖凝胶电泳鉴定扩增的产物并进行胶回收，将回收产物克隆至pMD18-T载体，转化涂布后挑取转化子进行测序，并对测序正确的单菌落进行培养，最后提取质粒。

1.3.2 抗体的重、轻链表达载体的构建 分别构建ZEN抗体的重链和轻链两种表达载体，用于后续共转染得到ZEN重组全长抗体。

重链表达载体是采用无缝克隆方法将重链的全长基因克隆至pCDNA3.4表达载体上：首先设计带有同源序列的引物（见表1）扩增ZEN单抗的重链基因并割胶回收；其次使用*Bam*H I和*Xba* I快切酶对pCDNA3.4载体进行双酶切使其线性化并割胶回收；最后通过MonClone Single Assembly Cloning Mix试剂盒将重链全长基因插入到pCDNA3.4载体中。

轻链表达载体是通过酶切连接法将轻链的全长基因克隆至pCDNA3.4表达载体上：首先设计带有酶切位点的引物（见表1）扩增抗体的轻链全长基因并割胶回收；其次使用*Bam*H I和*Xba* I快切酶对pCDNA3.4载体进行双酶切使其线性化并割胶回收；最后使用T4 DNA连接酶将轻链的全长基因插入到pCDNA3.4载体中。

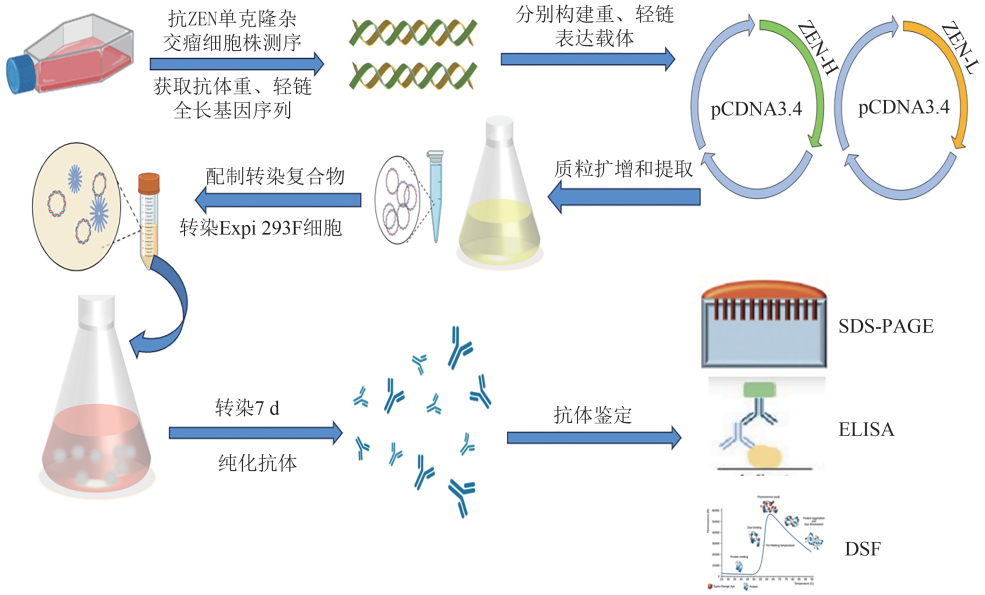


图 1　ZEN 重组全长抗体的构建及瞬时转染表达流程示意图

Fig. 1　Schematic diagram of the construction and transient transfection expression process of ZEN recombinant full-length antibody

将构建的 2 种表达载体分别转化至 DH5a 感受态细胞并涂布，12 h 后挑取单菌落，进行菌落 PCR 验证并送样测序。

1.3.3　ZEN 重组全长抗体的瞬时转染表达及鉴定

将构建的 ZEN 重链和轻链质粒以质量比 2∶3 共转染至 Expi 293F 细胞，并基于三因素三水平的正交设计（见表 2）探究转染时的细胞密度、PEI 质量浓度以及质粒的质量浓度对瞬时转染表达重组全长抗体产量的影响，具体转染方法参考李蓉芳等[13]的研究。利用间接 ELISA 法对转染后的细胞上清液进行检测，鉴定是否有 ZEN 重组全长抗体表达，此过程连续监测 7 d。

根据 ELISA 结果选取效果好的转染条件进行 30 mL 培养体系的瞬时转染表达：细胞复苏、培养及传代方法参考 Fang 等[14]的研究，瞬时转染的具体操作同 1.3.1，当细胞存活率下降至体积分数约为 60% 时，离心收集细胞上清液。经孔径为 0.22 μm 的滤膜过滤后，使用 Protein G 亲和层析纯化柱对滤过液进行纯化，纯化得到的抗体分别采用十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳（SDS-PAGE）、酶联免疫吸附测定（ELISA）、差示扫描荧光法（DSF）等方法进行纯度、活性及热稳定性的检测[15-16]。

（1）表达产物纯化及 SDS-PAGE 验证：向 3 mL 柱体积的层析亲和柱中加入 1 mL 的 Protein G 填料，将离心后的细胞上清液加入亲和柱中，以富集分离目的抗体。接着加入 1 mL 平衡缓冲液洗涤 8 次，以去除杂蛋白质。然后加入 1 mL 的洗脱缓冲液，重复洗脱 8 次，并收集洗脱液。纯化产物用 12.5 g/dL 的 SDS-PAGE 验证相对分子质量大小。为维持抗体的稳定性，使用 PBS 缓冲溶液（0.01 mol/L，pH 7.4）对纯化产物透析 72 h。

表 2　瞬时转染表达条件的正交设计表

Table 2　Orthogonal design table for transient transfection expression conditions

转染条件	细胞密度/（×10^6 CFU/mL）	PEI 质量浓度/（μg/mL）	质粒质量浓度/（μg/mL）
1	0.5	1	1
2	0.5	3	4
3	0.5	6	2
4	2	1	4
5	2	3	2
6	2	6	1
7	3	1	2
8	3	3	1
9	3	6	4

（2）ELISA 法测定抗体亲和性包被抗原：分别向 96 孔板中加入 100 μL 质量浓度为 1 μg/mL 的 ZEN、脱氧雪腐镰刀菌烯醇（DON）、伏马菌素 B_1（FB_1）、二甲四氯（MCPA）抗原，37 ℃孵育 2 h，然后用 PBST（含有体积分数 0.05% 吐温-20 的 PBS

溶液）洗涤3次。每孔加入300 μL含有5 g/dL脱脂奶粉的PBS缓冲液，37 ℃封闭1.5 h，结束后再用PBST洗涤3次并干燥。加一抗：分别取100 μL纯化的重组抗体、腹水制备的抗体、50 μL纯化的重组抗体和腹水制备的抗体与50 μL不同质量浓度的毒素标准品混合，将混合液在37 ℃下孵育30 min，然后用PBST洗涤3次。加二抗：向孔中加入100 μL辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠二抗，孵育条件和洗涤步骤同上一步。显色读数：向每个样品孔中加入100 μL的3，3’，5，5’-四甲基联苯胺溶液，7 min后加入50 μL浓度为2 mol/L的H_2SO_4溶液终止反应，在450 nm下测定吸光度（OD_{450}）。添加体积分数为5 %乙醇的PBS溶液到对照孔，其OD_{450}为B_0，添加ZEN标准品的OD_{450}为B。以毒素质量浓度为横坐标，B/B_0为纵坐标，用GraphPad Prism 9制图软件通过非线性拟合得到标准曲线，并确定B/B_0为50%时所对应的真菌毒素的质量浓度，即半抑制质量浓度（IC_{50}）。此外，通过对比相同质量浓度下的ZEN、DON、FB_1、MCPA、毒素对抗体与抗原结合的抑制效果，验证抗体的特异性。

（3）DSF验证重组全长抗体和腹水制备的抗体的热稳定性：利用差示扫描量热法对重组全长抗体和腹水制备的抗体稳定性进行鉴定。具体步骤为：利用1×PBS（0.01 mol/L，pH 7.4）将蛋白质荧光染料稀释至体积比为1∶12.5，备用，置于4 ℃保存；将ZEN重组全长抗体和腹水制备的抗体稀释为1 mg/mL；将19 μL蛋白质溶液、1 μL蛋白质荧光染料置于PCR管中（荧光染料终浓度体积比为1∶250）。离心后，将PCR管置于qPCR仪中进行检测，检测条件设置如下：试验类型选择溶解曲线，采用连续模式，温度扫描范围为25~95 ℃，升温速率为0.5 ℃/min，25 ℃平衡4 min，在升温过程中采集数据，报告基团选择HEX，反应体积为20 μL。

2 结果与分析

2.1 ZEN单抗的重、轻链基因测序及表达载体的构建

对于真核生物样品，完整的总RNA经过变性凝胶电泳的鉴定，通常会产生清晰的28S和18S rRNA条带，两条带的亮度比约为2∶1，并且可以观察到5S rRNA条带[17]。作者使用Trizol法提取的总RNA电泳结果见图2（a），显示出清晰的28S、18S和5S共3条带，表明提取的RNA质量合格，可用于后续试验。

免疫球蛋白具有多样性，但骨架区高度保守，所以可以通过设计简并引物来扩增其全长基因。在设计引物时，PCR扩增时的正向引物设计在前导序列，反向引物可以设计在恒定区[18]。简并引物具有特殊性，以反转录得到的第一链cDNA为模板，最终结果显示，ZEN重链的全长基因序列的扩增引物为正向引物ZEN-HF7和反向引物ZEN-HR2，轻链的全长基因序列扩增引物为正向引物ZEN-LF5和反向引物ZEN-LR1，扩增得到的片段大小均符合预期结果，见图2（b）。

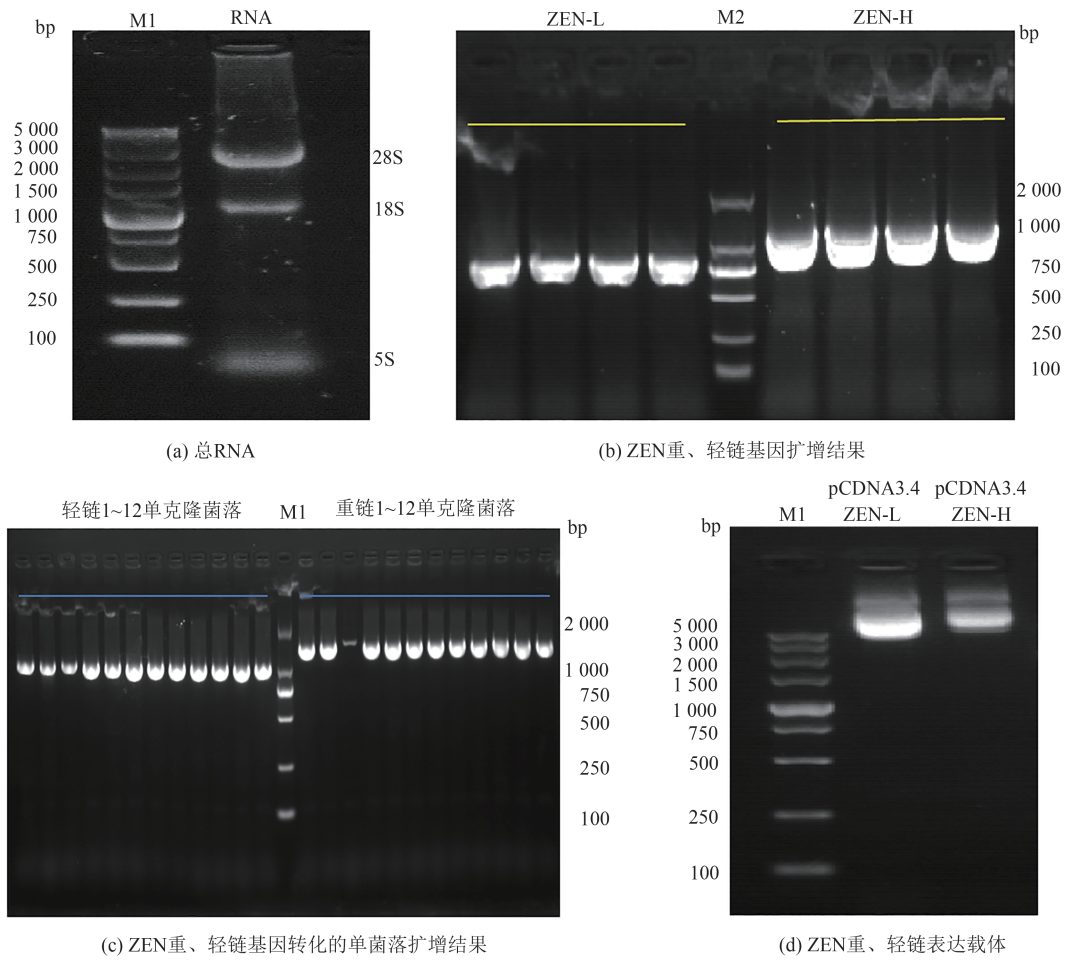
从ZEN的重、轻链的转化平板上各挑取12个转化子进行菌落PCR扩增，验证转化产物的阳性率，根据PCR结果统计，重链阳性克隆率为91.6%、轻链阳性克隆率为100%，见图2（c）。

将测序得到的ZEN抗体的重、轻链基因序列经IMGT进行分析，结果显示这些序列均为完整的V-（D）-J可变区序列，所有序列均未出现早期终止密码子，且序列比对结果发现ZEN抗体重链与NCBI中登录号为OP966768.1的IgG1型小鼠重链基因相似比为96.56%，ZEN抗体轻链与NCBI中登录号为X87231.1的Igκ型小鼠轻链基因的相似比为99.13%。由基因序列翻译得到的各氨基酸序列，采用kabat标准通过abYsis划分重、轻链的高变区（CDR），其轻链的CDR1、CDR2和CDR3分别编码11、3、9个氨基酸；重链分别编码8、8、12个氨基酸。

构建的ZEN抗体重链和轻链全长基因的表达载体分别标记为pCDNA3.4 ZEN-H和pCDNA3.4 ZEN-L，对测序正确的菌株进行质粒提取，质粒的琼脂糖凝胶结果与预期相符，pCDNA3.4 ZEN-H条带大小约7 300 bp和pCDNA3.4 ZEN-L条带大小约6 700 bp，见图2（d）。

2.2 ZEN重组全长抗体的瞬时转染表达及鉴定

ZEN抗体的重、轻链表达载体的质粒按照正交设计的条件共转染至Expi 293F细胞，连续7 d取样并进行pH和细胞密度的测定，见图3（a）和3（b）。转染初期，细胞培养基的养分和培养空间完全满足细胞的生长繁殖需求，随着转染时间的延长，细胞数目增多及代谢废物



(a) 总RNA　(b) ZEN重、轻链基因扩增结果

(c) ZEN重、轻链基因转化的单菌落扩增结果　(d) ZEN重、轻链表达载体

M1—DL 5 000 DNA marker；M2—DL 2 000 DNA marker.

图2　总RNA及抗体重、轻链全长基因及表达载体的鉴定

Fig. 2　Identification of total RNA，antibody weight，light chain full-length genes，and expression vectors

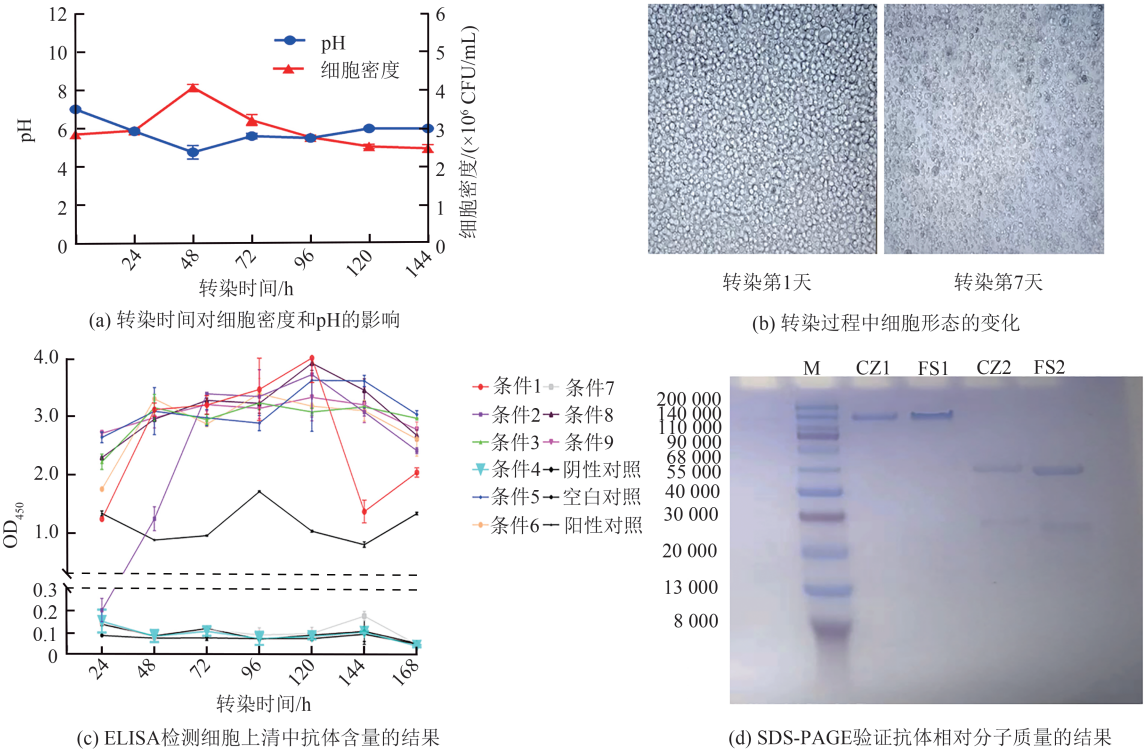
的产生导致培养基的pH降低，当细胞数目增长至一定程度后，部分细胞开始凋亡。结果显示pH与细胞密度随着转染时间的推移呈现负相关的关系，即pH随着转染时间的延长呈现先降低后上升并趋于稳定，而细胞密度呈现先上升后降低最后也趋于稳定。

采用间接ELISA检测上清液中重组全长抗体的含量，结果显示细胞密度、PEI和质粒的投入比对重组全长抗体的表达有一定影响，见图3(c)。转染条件4和7的ELISA结果显示，这2种条件均不适合重组全长抗体的瞬时转染表达，两者PEI和质粒的质量比分别为1∶4和1∶2，转染试剂PEI通过静电作用与质粒DNA结合，形成多元化无规律的复合物，两者的比例会影响PEI和质粒DNA形成不同粒径的复合物，其大小会影响质粒进入细胞的成功率。另外，根据ELISA结果可看出，细胞上清液中抗体含量也随着转染时间的延长呈现先上升后降低的趋势。

根据ELISA结果，初步选定了转染条件3、8、9进行30 mL体系的瞬时转染表达。转染后纯化的SDS-PAGE电泳结果显示，3种条件均可正确表达相对分子质量约为150 000的条带，且转染条件9表达的抗体量最高。将其抗体与腹水制备的抗体同时进行SDS-PAGE凝胶验证，见图3(d)，结果表明其条带大小与腹水制备的条带大小相同，证明ZEN重组全长抗体表达成功。通过BCA试剂盒测定，在30 mL转染体系中利用转染条件3、8、9转染的重组全长抗体的质量分别为0.18、0.20、1.16 mg。

2.3　ZEN重组全长抗体的性能鉴定

2.3.1　间接ELISA测定特异性和灵敏度　通过间接ELISA法检测ZEN重组全长抗体和腹水制备的抗体的结合特异性，分别使用质量浓度为1 μg/



(a) 转染时间对细胞密度和pH的影响

(b) 转染过程中细胞形态的变化

(c) ELISA检测细胞上清中抗体含量的结果

(d) SDS-PAGE验证抗体相对分子质量的结果

CZ1、FS1 和 CZ2、FS2 分别为非还原型和还原型电泳缓冲液处理的 ZEN 重组全长抗体和 ZEN 腹水制备的抗体。

图 3　瞬时转染培养时间对 Expi 293F 细胞的影响

Fig. 3　Effect of transient transfection culture time on Expi 293F cell

mL 的 4 种检测抗原进行包被，将抗体的质量浓度也设置为 1 μg/mL。ELISA 结果表明，ZEN 重组全长抗体和腹水制备的抗体均可与 ZEN-BSA 检测抗原结合，而与其他检测抗原的结合能力（OD_{450}）均低于 0.2，这表明它们具有较好的特异性，见图 4（a）。

为验证作者制备的 ZEN 重组全长抗体的检测灵敏度，采用间接竞争 ELISA 法对抗体进行检测并绘制标准曲线，见图 4（b）。结果表明，ZEN 腹水制备的抗体对 ZEN 的半数抑制质量浓度（IC_{50}）为 3.76 ng/mL，IC_{20}~IC_{80} 线性范围为 1.03~13.67 ng/mL，ZEN 重组全长抗体对 ZEN 的半数抑制质量浓度（IC_{50}）为 2.43 ng/mL，IC_{20}~IC_{80} 线性范围为 0.66~8.88 ng/mL，ZEN 重组全长抗体的检测灵敏度较好。

2.3.2　间接 ELISA 饱和浓度法测定亲和常数　以 ZEN-BSA（质量浓度为 1 μg/mL）作为包被原，加入梯度稀释的 ZEN 重组全长抗体、腹水制备的抗体作为一抗，以 ZEN 抗体的浓度为横坐标，OD_{450} 为纵坐标，通过 GraphPad 非线性拟合得出 IC_{50}，以 IC_{50} 倒数计算亲和常数，试验结果见图 4（c）。全长重组抗体的 K_a 值为 3.87×10^{10} L/moL，ZEN 腹水制备的抗体的 K_a 值为 5.51×10^{9} L/moL，表明重组全长抗体的亲和力有所提高。

2.3.3　DSF 测定热稳定性　取 PBS 将蛋白质荧光染料稀释成体积比为 1∶12.5，将 ZEN 重组全长抗体和腹水制备的抗体稀释为质量浓度 1 mg/mL。将 19 μL 的抗体溶液与 1 μL 的蛋白荧光染料混合后置于 PCR 管（荧光染料终浓度体积比为 1∶250），利用 RT-PCR 仪器进行测定。

DSF 结果见图 4（d），显示 ZEN 重组全长抗体和腹水制备的抗体均可检测出完整的 IgG1 单抗的 3 个变性温度 T_{m1}、T_{m2}、T_{m3}，其依次对应 CH2、抗原结合段和 CH3 结构域的变性温度。ZEN 重组全长抗体和腹水制备的抗体 T_{m1}、T_{m2}、T_{m3} 分别为 48.3、67.4、78.0 ℃和 45.4、68.8、79.9 ℃。T_m 表征的是分子的结构稳定性，即分子本身的稳定性，DSF 的结果表明 ZEN 重组全长抗体的稳定性基本一致，再次表明重组全长抗体与抗体性能一致。T_m 的值越高，代表使单抗变性的温度越高，也表明蛋白质的结构越稳定[19]。

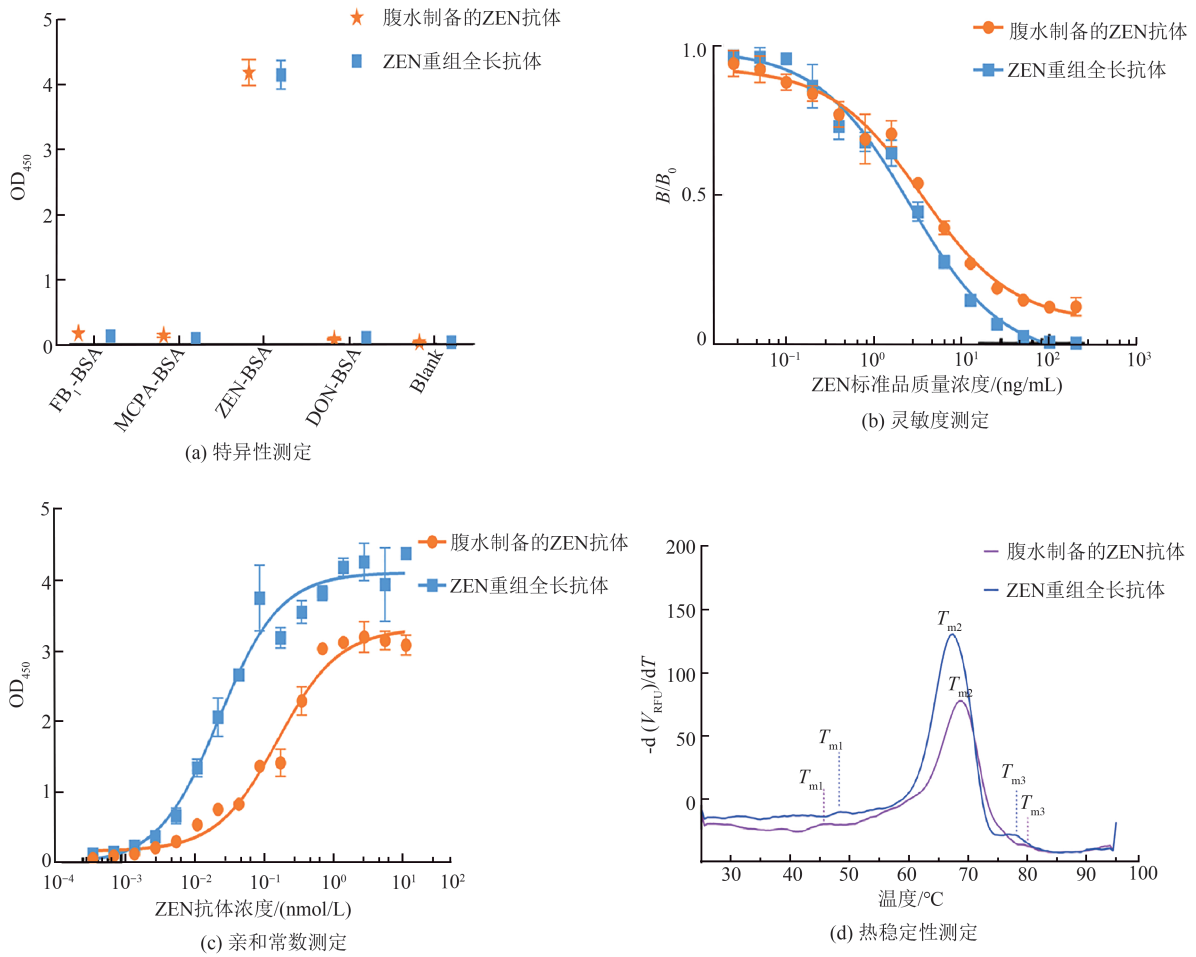


图 4　ZEN 重组全长抗体的性能鉴定

Fig. 4　Performance identification of ZEN recombinant full-length antibody

3　结 论

获得免疫球蛋白的基因序列信息是制备重组抗体的先决条件，因此，获取正确的杂交瘤细胞单克隆抗体基因序列对于构建重组抗体表达载体及其稳定表达尤为重要。Babrak 等[20]以抗体可变区之外的编码前导区、恒定区和铰链区序列的区域作为 PCR 引物选择的基础，设计简并引物扩增杂交瘤细胞的抗体可变区序列。吴挺[21]使用简并引物成功扩增出抗 GP73 的单克隆抗体可变区序列。作者采取简并引物法，根据小鼠抗体的重、轻链前导序列和恒定区 CH3—CHS 区域的序列分别设计 5′端和 3′端的简并引物，利用简并引物 PCR 法成功扩增出抗体的全长编码基因序列。

重组全长抗体的表达主要通过哺乳类动物细胞，为了使抗体基因在真核细胞中获得高水平的表达，构建的表达载体应具备 3 个主要特征[22]：(1)独立于基因组整合位点的表达水平；(2)与整合的靶基因拷贝数相关的表达水平；(3)随着时间的推移保持表达效率。目前构建重组全长抗体表达载体常用的方法有酶切连接法[23]、无缝克隆[24]等，作者获得 ZEN 抗体的重、轻链基因后，基于无缝克隆和酶切连接法分别构建 ZEN 单抗的重、轻链表达载体。

抗体的重、轻链基因表达载体的构建对于抗体的表达也有影响，孙秀兰等[25]将抗 DON 抗体重链和轻链的编码基因分别构建到两个独立的载体，采用共转染方式成功表达抗 DON 重组全长抗体；刘鹏琰等[26]将重、轻链质粒和转染试剂按照一定的比例混匀，转染 HEK 293(F)获得抗噬虫嗪全长重组抗体；Schlatter 等[27]在 CHO 细胞中以不同重链和轻链基因比例瞬时表达抗 cB72.3 重组抗体。作者参考以上方法，选择重链和轻链质粒比为 2∶3，通过调整转染时的细胞密度、PEI 和质粒投

入比等关键因素成功获得ZEN重组全长抗体。转染步骤中的孵育体积比会间接影响细胞状态,从而影响细胞所处的培养环境和营养物质浓度,最终影响细胞转染效率[28]。作者参考陈中元[28]的方法确定孵育体积比为1∶10,最终确定ZEN重组抗体在30 mL细胞培养体系中的最佳表达条件为细胞浓度为3×10^6 CFU/mL,PEI质量浓度为6 μg/mL,质粒质量浓度为4 μg/mL。利用SDS-PAGE、ELISA、DSF等方法验证了ZEN重组全长抗体及其腹水制备的抗体性能具有一致性。与Wang等[29]的结果相同,全长重组抗体具有良好的生物活性,在构建体和功能上基本与天然抗体相似。

综上,作者成功表达了与腹水制备的抗体性能一致的ZEN重组全长抗体。目前,ZEN重组抗体仅通过瞬时转染的方式表达,可以短时间获取小批量目的蛋白[30],后续研究可通过添加筛选标记来筛选稳定转染[19]表达ZEN重组全长抗体的细胞系,也可使用CHO细胞系[31]进行重组全长抗体的表达,以便于重组抗体的大批量生产。

参考文献

[1] LOGRIECO A, BATTILANI P, LEGGIERI M C, et al. Perspectives on global mycotoxin issues and management from the MycoKey maize working group[J]. Plant Disease, 2021, 105(3): 525-537.

[2] KĘPIŃSKA P J, BIEL W. Mycotoxins—prevention, detection, impact on animal health[J]. Processes, 2021, 9(11): 2035.

[3] LUO Y, LIU X J, LI J L. Updating techniques on controlling mycotoxins-a review[J]. Food Control, 2018, 89: 123-132.

[4] YANG Z D, XUE K S, SUN X L, et al. Multi-Toxic endpoints of the foodborne mycotoxins in nematode caenorhabditis elegans[J]. Toxins, 2015, 7(12): 5224-5235.

[5] CUI X, LU J, WEI J C, et al. Single-chain variable fragment-based immunoassay for bioactive natural products[J]. Phytochemistry Reviews, 2023: 1-21.

[6] FENG P. Rapid methods for the selection of *Salmonella* in foods[J]. Journal of Food and Drug Analysis, 2020, 1: 119-131.

[7] PELTOMAA R, BARDERAS R, BENITO-PEÑA E, et al. Recombinant antibodies and their use for food immunoanalysis[J]. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2022, 414(1): 193-217.

[8] 王云云,石广革,孙嘉笛,等.玉米赤霉烯酮和脱氧雪腐镰刀菌烯醇双特异性抗体的制备及检测方法构建[J].食品与生物技术学报,2023,42(11): 1-10.
WANG Y Y,SHI G G,SUN J D,et al.Preparation of bispecific antibodies against zearalenone and deoxynivalenol and construction of detection methods[J]. Journal of Food Science and Biotechnology, 2023,42(11): 1-10.(in Chinese)

[9] FILIPE V, BARROSO J, HALDER M, et al. EURL ECVAM recommendation on non-animal-derived antibodies[J].Geobiology, 2020, 301(85): 1-74.

[10] BRADBURY A R M, TRINKLEIN N D, THIE H, et al. When monoclonal antibodies are not monospecific: hybridomas frequently express additional functional variable regions[J]. mAbs, 2018, 10(4): 539-546.

[11] BRADBURY A R M, PLÜCKTHUN A. Reproducibility: standardize antibodies used in research[J]. Nature, 2015, 518: 27-29.

[12] CHOMCZYŃSKI P A, SACCHI N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction[J]. Analytical biochemistry, 1987, 162(1): 156-159.

[13] 李蓉芳,吴箫,王何瑶,等.赭曲霉毒素A单克隆抗体的体外制备及其重组抗体的构建研究[J].食品安全质量检测学报,2023,14(6): 118-126.
LI R F, WU X, WANG H Y, et al. Preparation of ochratoxin A monoclonal antibody *in vitro* and construction of recombinant antibody[J]. Journal of Food Safety and Quality,2023,14(6): 118-126.(in Chinese)

[14] FANG X T, SEHLIN D, LANNFELT L, et al. Efficient and inexpensive transient expression of multispecific multivalent antibodies in Expi293 cells[J]. Biological Procedures Online, 2017, 19(1): 11.

[15] JIA J, PAN J, XU H, et al. Urine protein quantification in stacking gel by SDS-PAGE[J]. Electrophoresis, 2019, 40 (4): 487-490.

[16] JOSHI S, MAHARANA C, RATHORE A S. An application of nano differential scanning fluorimetry for higher order structure assessment between mAb originator and biosimilars: trastuzumab and rituximab as case studies[J]. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2020, 186: 113270.

[17] 马迎春,王曙光,詹卉,等.四种类型竹种竹叶总RNA提取方法的比较研究[J].核农学报, 2024, 38(2): 256-264.
MA Y C,WANG S G,ZHAN H,et al. Comparative study on total RNA extraction methods of four types of bamboo leaves[J]. Journal of Nuclear Agricultural Sciences, 2024, 38(2): 256-264.(in Chinese)

[18] 董志伟, 王琰. 抗体工程, 第二版[M]. 北京: 北京医科大学出版社, 2002.

[19] 郭莎,贾哲,贺鹏飞,等.纳米级差示扫描荧光法在阿达木单抗热分析中的应用[J].药物分析杂志,2023,43(1):

153-161.
GUO S,JIA Z,HE P F,et al. Application of nano-differential scanning fluorescence inthermal analysis of adalimumab[J]. Chinese Journal of Pharmaceutical Analysis, 2023, 43(1): 153-161.(in Chinese)

[20] BAbRAK L, MCGARVEY J A, STANKER L H, et al. Identification and verification of hybridoma-derived monoclonal antibody variable region sequences using recombinant DNA technology and mass spectrometry[J]. Molecular Immunology, 2017, 90: 287-294.

[21] 吴挺 . 小鼠抗人 GP73 单克隆抗体的制备与鉴定[D]. 扬州:扬州大学, 2022.

[22] BLAAS L, MUSTEANU M, EFERL R, et al. Bacterial artificial chromosomes improve recombinant protein production in mammalian cells[J]. BMC Biotechnology, 2009, 9(1): 3-8.

[23] CHANG Y, CHEN Y, JIAO S, et al. A novel full-length IgG recombinant antibody highly specific to clothianidin and its application in immunochromatographic assay[J]. Biosensors, 2022, 12(4): 233-245.

[24] LIU Y, JIAO S, CHANG Y, et al. High-affinity recombinant full-length antibody-based immunochromatographic strip assay for rapid and reliable detection of pyraclostrobin residues in food samples[J]. Food and Agricultural Immunology, 2020, 31(1): 985-1003.

[25] 孙秀兰, 王云云, 孙嘉笛,等 . 真核表达脱氧雪腐镰刀菌烯醇全长抗体的制备方法以及用途, CN116063477A [P/OL]. 2023-05-05.

[26] 刘鹏琰,郭源昊,焦沙沙,等 . 抗噻虫嗪重组全长抗体的制备与特异性识别机制研究[J]. 农药学学报, 2021, 23(2): 296-307.
LIU P Y, GUO Y H, JIAO S S, et al. Develoment of anti-thiamethoxam full-length recombinant antibody and investigation of the specific recognition mechanism[J]. Chinese Journal of Pesticide Science, 2021, 23(2): 296-307. (in Chinese)

[27] SCHLATTER S, STANSFIELD S H, DINNIS D M, et al. On the optimal ratio of heavy to light chain genes for efficient recombinant antibody production by CHO cells[J]. Biotechnology Progress, 2005, 21(1): 122-133.

[28] 陈中元 . HEK293 细胞悬浮培养扩增腺相关病毒的培养基开发与过程优化[D]. 上海:华东理工大学, 2021.

[29] WANG Z Y, ZHU J W, LU H L. Antibody glycosylation: impact on antibody drug characteristics and quality control[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2020, 104(5): 1905-1914.

[30] 赵志文,张铮,吴颖 . 哺乳动物细胞中重组蛋白瞬时表达技术(TGE)的研究进展[J]. 现代生物医学进展,2014,14(3): 593-596.
ZHAO Z W, ZHANG Z, WU Y. Advance in recombinant proteins production by transient gene expression in mammalian cells[J]. Progress in Modern Biomedicine, 2014,14(3):593-596.(in Chinese)

[31] LI J D, MENZEL C, MEIER D, et al. A comparative study of different vector designs for the mammalian expression of recombinant IgG antibodies[J]. Journal of Immunological Methods, 2007, 318(1/2): 113-124.

（责任编辑:刘冬梅）