

# 小麦 GLB1 蛋白单克隆抗体的制备及鉴定<sup>\*</sup>

孔令超<sup>1,2</sup>, 杨成彬<sup>3</sup>, 詹政科<sup>1</sup>, 刘志强<sup>1</sup>, 刘立忠<sup>3</sup>, 刘志刚<sup>1</sup>, 朱清仙<sup>4</sup>

(1. 深圳大学医学院过敏反应与免疫学研究所, 广东 深圳 518060;

2. 南昌大学研究生院医学部 2011 级, 江西 南昌 330006;

3. 深圳大学医学院血液循环教研室, 广东 深圳 518060;

4. 南昌大学医学院组胚教研室, 江西 南昌 330006)

**摘要:** 以小麦主要过敏原 G1b-1 蛋白为免疫原免疫 BALB/c 小鼠, 取免疫小鼠脾细胞与小鼠骨髓瘤 NS-1 细胞融合。采用细胞融合和有限稀释法相结合的方法快速筛选获得稳定分泌的特异性杂交瘤细胞株, 用杂交瘤细胞株诱生小鼠腹水并用蛋白 A 亲和层析法纯化抗体后检测。采用间接 ELISA 法鉴定该单克隆抗体的 IgG 亚型; 通过间接 ELISA 鉴定该单克隆抗体的特性和交叉性。利用双单抗夹心 ELISA 法检测单抗的抗原表位特异性。结果表明: 共获得 4 株可稳定分泌小鼠抗小麦主要过敏原 G1b-1 蛋白的单克隆抗体, 分别命名为 1C4、4H5、1A9、4F5, 经检测其 Ig 亚型均为 IgG1, 且 4 株单抗效价均在  $10^{-9}$  以上。ELISA 结果分析表明该 4 株单抗均能特异性识别小麦主要过敏原 G1b-1 蛋白且和其他常见食物无交叉反应性。将 4 株单抗两两配对进行 ELISA 实验, 结果发现 1C4 与 4H5 可能有不同的抗原表位, 以此建立的双抗夹心 ELISA 系统可以检测小麦 G1b1-G3 蛋白。实验成功制备了鼠抗小麦主要过敏原 G1b-1 蛋白抗原的单克隆抗体, 并且建立了双单抗夹心 ELISA 检测系统, 为小麦主要过敏原蛋白的检测奠定了基础。

**关键词:** 小麦 G1b-1 蛋白; 单克隆抗体; 免疫学鉴定

中图分类号: Q78 文献标志码: A 文章编号: 0529-6579(2014)02-0114-07

## Preparation and Application of Monoclonal Antibodies Against Allergen G1b-1

KONG Lingchao<sup>1,2</sup>, YANG Chengbin<sup>3</sup>, ZHAN Zhengke<sup>1</sup>, LIU Zhiqiang<sup>1</sup>,  
LIU Lizhong<sup>3</sup>, LIU Zhigang<sup>1</sup>, ZHU Qingxian<sup>4</sup>

(1. Institute of Allergy and Immunology, Shenzhen University, Shenzhen 518060, China;

2. 2011 Grade of Department Medical of Graduate School, Nanchang University, Nanchang 330006, China;

3. Department of Pathophysiology, Medical School, Shenzhen University, Shenzhen 518060, China;

4. Department of Histology and Embryology, Medical School, Nanchang University, Nanchang 330006, China)

**Abstract:** BALB/c mice were immunized with G1b-1 protein, the main allergen from wheat. The splenocytes of the immunized mice were fused with NS-1 myeloma cells. Cell fusion and limited dilution assay were used to screen hybridoma with stable secretion character and mice ascites were induced by the selected hybridoma. Monoclonal antibodies (McABs) were purified using affinity chromatography and further tested by their specificity, subtype, titers and cross-reactivity. The antigen epitope specificity of the McABs was examined by ELISA method. Four cell lines secreting McABs against wheat G1b-1 protein were obtained, named 1C4, 4H5, 1A9 and 4F5, respectively. The four McABs belong to IgG1

\* 收稿日期: 2013-07-23

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81271950, 81300292); 广东省高等学校国际暨港澳台科技合作创新平台资助项目(2012ghz0009); 深圳市科技计划基础研究重点资助项目(JC201005250073A)

作者简介: 孔令超(1989生), 男; 研究方向: 临床疾病与机体免疫; 通信作者: 刘志刚; E-mail: lzg195910@126.com

subtype and their titer was above  $9^{-10}$ . Moreover, all the four McABs specially recognized wheat G1b-1 protein and had no cross-reaction with other familiar foods. In order to establish a double-antibody sandwich ELISA system to detect wheat G1b1 proteins, we paired off the four monoclonal antibodies for ELISA assay and found 1C4 and 4h5 might have different epitopes. Four mice anti-wheat G1b-1 protein McABs were prepared successfully and a double-antibody sandwich ELISA method was set up in this work, which may facilitate other wheat allergen protein detection.

**Key words:** antigenic epitope of Glb-1 protein from wheat; monoclonal antibodies; allergen test

I型糖尿病(T1D)又称胰岛素依赖型糖尿病(Insulin-dependent Diabetes Mellitus, IDDM),是一种器官特异性自身免疫疾病,该类病人由于机体胰岛素绝对缺乏而需终身依赖外源胰岛素来维持机体血糖的平衡。I型糖尿病主要发生在青少年,占糖尿病患者的5%~10%<sup>[1-2]</sup>。过去50年中全球I型糖尿病发病率增长了2~4倍,0-14岁儿童发病率每年以3%的速率增长<sup>[3-6]</sup>。I型糖尿病患者不仅有多尿、多食、多饮、消瘦等糖尿病的典型症状,还会继发出现糖尿病酮症酸中毒,晚期还因微血管病变导致视网膜病变及肾功能损害。由此可见I型糖尿病严重危害患者的健康和生活质量,同时也给患者、家庭、社会造成巨大的经济负担。I型糖尿病是由T淋巴细胞介导,通过对胰岛的浸润、引发胰岛炎症,破坏及降低胰岛 $\beta$ 细胞分泌胰岛素的能力,导致胰岛素绝对缺乏<sup>[7]</sup>。绝大多数I型糖尿病是在易感基因的基础上,由一个或多个环境因素诱导引起。

研究发现食物是与I型糖尿病发病最为密切的环境因素<sup>[1]</sup>。对糖尿病易感大鼠(BB大鼠)的研究揭示,食物可诱导糖尿病的发生和发展<sup>[8-11]</sup>。有研究证明小麦麸质是最强的致糖尿病的食物因素<sup>[12-15]</sup>。以小麦为主食的NOD小鼠的糖尿病的发病率明显高于饲养不含小麦麸质的对照组小鼠<sup>[16-17]</sup>,越来越多的研究提示小麦蛋白在人的I型糖尿病发生和病理过程中起重要作用<sup>[18-19]</sup>。最近的研究进一步表明小麦麸质所含的Glb1在其致糖尿病的发生中起到了重要的作用。Scott实验室利用易感BB大鼠IgG抗体从小麦cDNA表达文库中筛选出小麦储藏蛋白(Glb1)<sup>[20]</sup>。抗Glb1抗体不出现在非糖尿病人的血清,但对小麦敏感的I型糖尿病患者血清检测出高滴度的抗Glb1抗体<sup>[21]</sup>,提示小麦Glb1蛋白与I型糖尿病的发生发展密切相关。然而小麦Glb1蛋白介导的免疫反应及其在I型糖尿病发病中的作用机理尚不清楚。因此研制小麦Glb1蛋白对I型糖尿病的发生发展研究有重要意义。小麦储藏蛋白(Glb1)是一种球

蛋白,在小麦胚乳和小麦麸质蛋白中含量丰富,研究显示糖尿病大鼠Glb1的抗体浓度明显高于非糖尿病对照组,且与胰腺的炎症和破坏程度密切相关。Glb1不仅在小麦喂养的BB大鼠具有高抗原性,而且在I型糖尿病病人体内也具有高抗原性<sup>[22]</sup>。临床资料显示对小麦高度敏感的I型糖尿病患者表现过强的针对Glb1的免疫反应<sup>[21]</sup>。现有研究表明Glb1与胰岛 $\beta$ 细胞损害密切相关,因此研究Glb1介导的免疫反应及其对胰岛 $\beta$ 细胞和胰岛素分泌影响的机理,对于揭示I型糖尿病的病因和发病机理,为更有效的预防和治疗I型糖尿病的提供理论依据。单克隆抗体因为其特异性强,灵敏度高且可以进行抗原表位分析的生物学特性在该研究中能发挥重要作用。本实验以小麦Glb1-G3蛋白为免疫原,利用细胞融合技术,建立了稳定分泌抗Glb-1特异性单克隆抗体的细胞株。并对得到的这些单克隆抗体的生物学特性进行鉴定。抗Glb-1单克隆抗体的成功研制,对进一步探讨Glb-1的生物学功能,阐明Glb-1与I型糖尿病的致病机制提供了有力的实验工具。现将制备该单克隆抗体的过程报道如下。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 实验动物及细胞株 5周龄雌性BALB/c小鼠,购自广东省医学实验动物中心;小鼠骨髓瘤细胞NS-1由汕头大学医学院炎症学与变态反应学实验室赠与;小麦Glb1-G3蛋白由美国GenScript The Biology CRO公司合成。

1.1.2 试剂 DMEM高糖培养基、8-氮鸟嘌呤(8-AG)、HAT、HT、双抗、胎牛血清(FBS)购于Gibco公司;福氏完全佐剂、福氏不完全佐剂、羊抗小鼠IgG-HRP、Ig类与亚类鉴定试剂盒、PEG SOLUTION购于Sigma公司;链酶亲和素-HRP购于KPL公司;蛋白Marker购于美国Fermentas公司。

1.1.3 抗原信息 小麦Glb1-G3抗原是选取小麦

Glb1 蛋白序列第 595 至 612 位多肽人工合成, 序列构成为: CEGFVAGPEQSQSREQEER, 相对分子质量 2 464.55。动物免疫用抗原为偶联了 Key-hole Limpet Hemocyanin (KLH) 小麦 GLB1 - G3 多肽。均由美国 GenScript The Biology CRO 公司合成。

## 1.2 方法

1.2.1 杂交瘤细胞株的建立 取 0.5 mg/mL 的小麦 Glb1 - G3 蛋白 0.5 mL 与等体积的福氏完全佐剂充分乳化后皮下多点注射于 5 只 BALB/c 小鼠, 每只 200  $\mu$ L。每间隔 3 周改用福氏不完全佐剂加强免疫 1 次, 剂量同前。第 2 次加强免疫后 1 周取尾血测效价。取其中免疫效果最好的小鼠融合前 3 d 经尾静脉注射含 50  $\mu$ g 小麦 Glb1 - G3 蛋白的 PBS 溶液 200  $\mu$ L 再加强免疫 1 次。小鼠骨髓瘤细胞 NS - 1 于融合前两周复苏培养于含有 8 - 氮鸟嘌呤的  $w = 10\%$  FBS 高糖 DMEM 培养基中, 融合前一天更换为普通培养基。细胞融合时, 分别收集免疫小鼠脾细胞和 NS - 1 细胞, 不完全培养基洗涤 3 次后, 调整脾细胞数与 NS - 1 细胞数之比约为 1:5,  $w = 50\%$  PEG1500 作用 1 ~ 2 min 后, 加入含有 HAT 的完全培养基稀释, 接种于 96 孔培养板, 37  $^{\circ}$ C,  $\varphi = 5\%$  CO<sub>2</sub> 培养。约 2 周后, 用间接 ELISA 法筛选阳性生长的细胞克隆孔, 并更换为含有 HT 的完全培养基, 1 周后更换为完全培养基, 有限稀释法进行克隆及亚克隆。

1.2.2 单克隆抗体的制备及纯化 注射 0.5 mL 液体石蜡至 BALB/c 小鼠腹腔。2 周后注射 1 mL  $1 \times 10^6$  的杂交瘤细胞。5 ~ 7 d 后, 收集腹水。室温 3 000 r  $\cdot$  min<sup>-1</sup> 离心 5 min 吸取上清。参照 HiTrap protein A 亲和层析说明书进行腹水的抗体纯化。

1.2.3 单克隆抗体效价分析 使用间接 ELISA 方法对各株单克隆抗体腹水效价进行分析。用浓度为 1 mg/mL 的小麦 Glb1 - G3 蛋白 100  $\mu$ L/孔包被, 4  $^{\circ}$ C 过夜, 洗板 3 次,  $w = 3\%$  BSA 封闭 37  $^{\circ}$ C 2 h, 小鼠腹水以 1:1 000、1:2 000、1:4 000、1:8 000、1:16 000、1:32 000、1:64 000、1:128 000、1:256 000、1:512 000、1:1 024 000、1:2 048 000 梯度稀释后 100  $\mu$ L/孔 37  $^{\circ}$ C 孵育 1 h, 阴性小鼠血清为阴性对照, 阳性小鼠血清为阳性对照, 洗板 5 次, 加入羊抗小鼠 IgG-HRP 作为二抗 37  $^{\circ}$ C 孵育 1 h, 洗板 3 次, TMB 显色, 终止后酶标仪测  $A_{450\text{nm}}$  值。

1.2.4 单克隆抗体亲和力测定 采用间接 ELISA 法, 分别以 1:1、1:2、1:4 的小麦 Glb1 - G3 蛋白抗原 (质量浓度 1、0.5、0.25 mg/mL) 包被酶标板, 封闭后, 依次加入倍比稀释的 4 株单克隆抗体

及羊抗小鼠 IgG-HRP, 加 TMB 显色后, 测定  $A_{450\text{nm}}$  值。以每一株单克隆抗体的浓度为横坐标, 以其相应的  $A_{450\text{nm}}$  值为纵坐标, 分别绘出包被不同抗原浓度的 3 条反应曲线。以各曲线上部趋于平坦的  $A$  值作为 100%, 查出  $A_{450\text{nm}}$  值为 50% 点对应的单克隆抗体的浓度  $[Ab]_t$ , 这样每份被检样品在包被抗原浓度分别为 1:1、1:2、1:4 时可得  $[Ab]_t$ 、 $[Ab']_t$ 、 $[Ab'']_t$  3 个值, 然后按下列公式计算  $K$  值, 当包被抗原浓度为 1:2 时,  $K = 1/2 (2 [Ab']_t - [Ab]_t)$  和  $K = 1/2 (2 [Ab'']_t - [Ab']_t)$  计算, 当包被抗原浓度为 1:4 时,  $K = 3/2 (2 [Ab'']_t - [Ab]_t)$ 。这样每株单克隆抗体可以得到 3 个  $K$  值, 取 3 个  $K$  值的平均值即为亲和常数, 以  $K_a$  表示

1.2.5 单克隆抗体亚型测定 间接 ELISA 方法, 以标记辣根过氧化物酶的 IgG, IgG1, IgG2a, IgE 为二抗测定抗体亚型。

1.2.6 八大类食物过敏原交叉反应性检测 将小麦 Glb1 - G3 蛋白及小麦、大豆、榛子、花生、鸡蛋、虾、鱼、牛奶 8 种食物过敏原包被在酶标板上, 分别以 4 株单抗为一抗, 羊抗小鼠 IgG-HRP 为二抗, 免疫前小鼠血清为阴性对照, 免疫后小鼠血清为阳性对照, 进行间接 ELISA 检测, 显色后  $A_{450\text{nm}}$  值。

1.2.7 双抗夹心 ELISA 法检测小麦 Glb1 - G3 蛋白 利用 ELISA 方法对四种单抗进行两两配对实验。将 4 种单抗包被酶标板, 加入梯度稀释的小麦 Glb1 - G3 蛋白作为抗原 37  $^{\circ}$ C 孵育 1 h, 洗板 5 次, 分别加入用生物素标记的 4 种单抗两两配对, 37  $^{\circ}$ C 孵育 1 h, 洗板 3 次, 加入链酶亲和素 - HRP, TMB 显色, 终止后酶标仪测  $A_{450\text{nm}}$  值。确定包被抗体与标记抗体的种类及稀释度。用建立起来的双抗夹心 ELISA 系统检测小麦 Glb1 - G3 蛋白。

## 2 实验结果

### 2.1 杂交瘤细胞株的建立

细胞融合率为 96.2% (452/470), 抗体阳性检出率为 87.4% (411/470), 选择其中较高读数的 10 株进行克隆和亚克隆, 最终获得 4 株分泌抗小麦 Glb1 - G3 蛋白单克隆抗体的杂交瘤细胞株, 分别命名为: 1C4、4H5、1A9、4F5。

### 2.2 单克隆抗体的制备及纯化

将收集好的各单抗腹水参照 HiTrap protein A 亲和层析说明书进行纯化。纯化后的抗体经过  $w = 12\%$  SDS-PAGE 分析, 可见清晰地 2 条蛋白条带,

位于 55 000 附近处的为抗体重链，位于 26 000 附近的为轻链（图 1）。

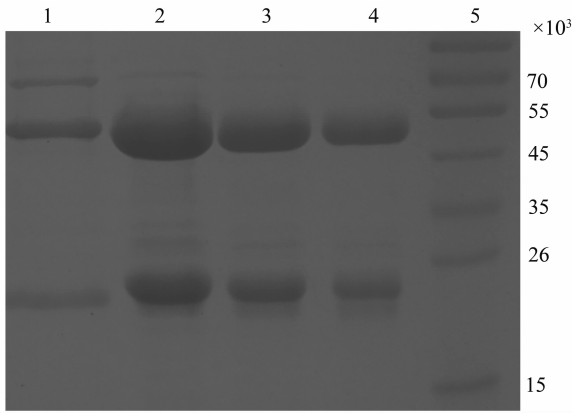


图 1 小麦 Glb1 - G3 蛋白单克隆抗体纯度鉴定

Fig.1 Identification of the purity of McAbs against Glb1 - G3

1: 1C4; 2: 4H5; 3: 4F5; 4: 1A9; 5: Protein Marker

### 2.3 单克隆抗体效价分析

将取得的小鼠腹水按一系列梯度稀释，用间接 ELISA 法测定单抗的效价，4 株抗体效价均超过 200 万（图 2）。

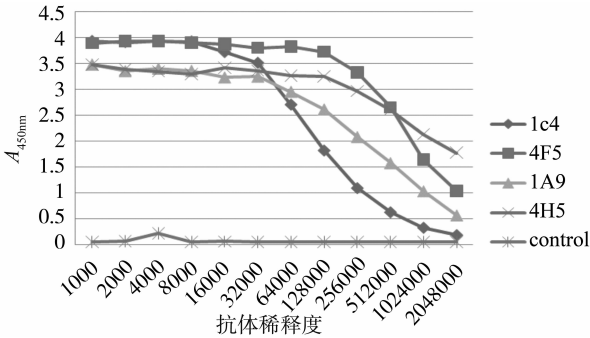
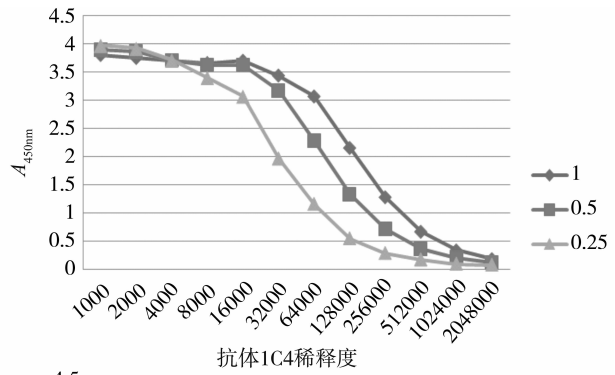


图 2 单克隆抗体效价

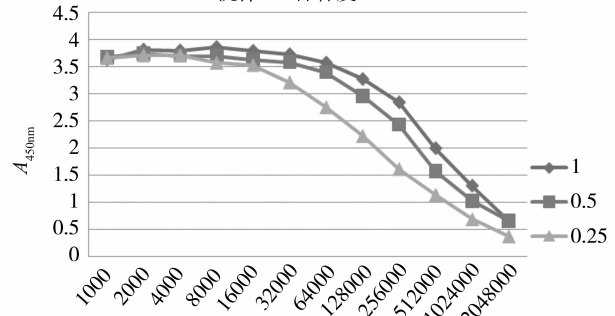
Fig.2 Detection of the potency of McAbs against Glb1 - G3 allergen

### 2.4 单克隆抗体亲和力测定

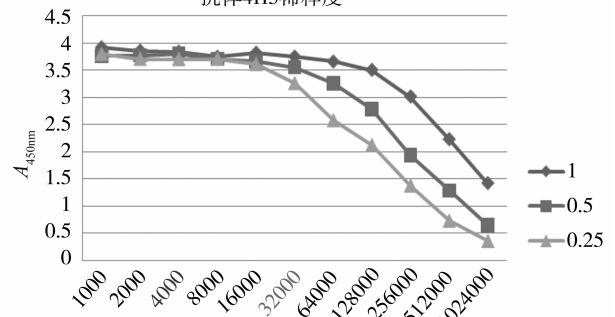
分别以 1:1、1:2、1:4 的小麦 Glb1 - G3 蛋白抗原（质量浓度 1、0.5、0.25 mg/mL）包被酶标板，间接 ELISA 方法测定封闭后，依次加入倍比稀释的 4 株单克隆抗体及羊抗小鼠 IgG-HRP，加 TMB 显色后，测定 A<sub>450nm</sub> 值。以每一株单克隆抗体的浓度为横坐标，以其相应的 A<sub>450nm</sub> 值为纵坐标，分别绘出包被不同抗原浓度的 3 条反应曲线（图 3 - 6）。以抗体 1C4 为例，小麦 Glb1 - G3 蛋白抗原包被质量浓度为 1、0.5、0.25 mg/mL 时各曲线上部趋于平坦的 A<sub>450nm</sub> 值作为 100% 分别为 3.802、



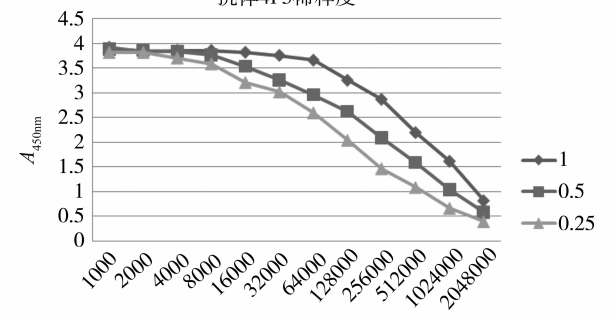
抗体1C4稀释度



抗体4H5稀释度



抗体4F5稀释度



抗体1A9稀释度

图 3 单克隆抗体的亲和力检测

Fig.3 Aviclicity of the monoclonal antibodies

3.88、3.92，则查出 50% A<sub>450nm</sub> 值 1.901、1.94、1.96 对应的单抗浓度分别是 [Ab] <sub>t</sub> = 2.83 × 10<sup>-11</sup> mol/L、[Ab'] <sub>t</sub> = 1.96 × 10<sup>-10</sup> mol/L、[Ab'' ] <sub>t</sub> = 4.55 × 10<sup>-10</sup> mol/L 三个值，然后按下列公式计算 K 值，当包被抗原浓度为 1:2 时，K = 1/2 (2 [Ab'] <sub>t</sub> - [Ab] <sub>t</sub>) = 1.37 × 10<sup>9</sup> L/mol 和 K = 1/2 (2 [Ab'' ] <sub>t</sub> - [Ab'] <sub>t</sub>) = 7.00 × 10<sup>8</sup> L/mol 计算<sup>[23]</sup>，当包被抗原浓度为 1:4 时，K = 3/2 (2

$[Ab'' ]_t - [Ab ]_t) = 1.71 \times 10^9 \text{ L/mol}$ 。3 个  $K$  值的平均值即为单抗 1C4 亲和力常数  $K_a = 1.26 \times 10^9 \text{ L/mol}$ 。同理, 4H5、4F5、1A9 的亲和力常数分别为:  $7.24 \times 10^9$ ,  $4.79 \times 10^9$ ,  $4.59 \times 10^9 \text{ L/mol}$ 。

## 2.5 单克隆抗体亚型测定

用间接 ELISA 方法, 以各单克隆抗体为一抗, 标记辣根过氧化物酶的 IgG, IgG1, IgG2a, IgE 为二抗测定抗体亚型。检测结果 4 株单抗皆为 IgG1 亚型。

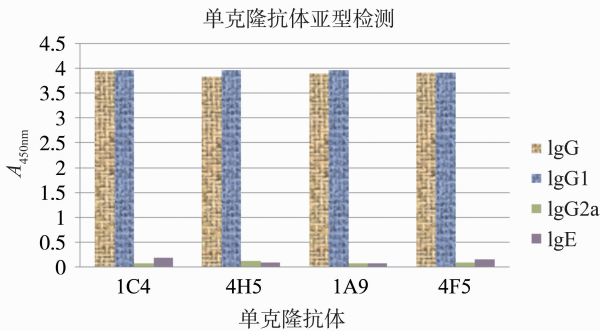


图 4 单克隆抗体的亚型检测

Fig. 4 Subtypes of the monoclonal antibodies

## 2.6 八大类食物过敏原交叉反应性检测

将小麦 Glb1 - G3 蛋白及小麦、大豆、榛子、花生、鸡蛋、虾、鱼、牛奶 8 种食物过敏原包被酶标板, 分别以 4 株单抗为一抗进行间接 ELISA 检测, 结果显示: 所制备的 1C4、4H5、1A9、4F5 4 株单克隆抗体与小麦 Glb1 - G3 蛋白有很好的反应能力, 与大豆、榛子、花生、鸡蛋、虾、鱼、牛奶 7 种食物过敏原无交叉反应, 4H5、4F5 与小麦粗提蛋白可反应, 1C4、1A9 与小麦粗提蛋白反应能力较弱, 可能与粗提蛋白中相关抗原含量低或者抗原结构有关。

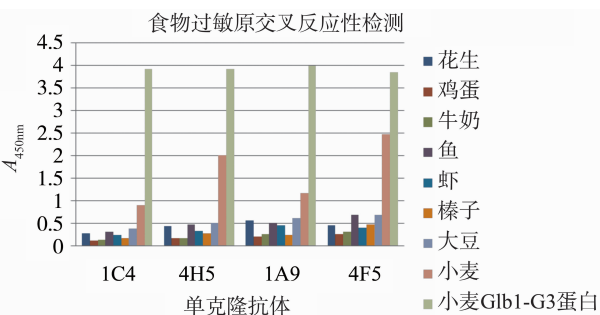


图 5 单克隆抗体与常见食物过敏原的交叉反应

Fig. 5 Cross-reaction of the monoclonal antibodies with familiar food allergen

## 2.7 双抗夹心 ELISA 法检测小麦 Glb1 - G3 蛋白

利用 ELISA 方法对四种单抗进行两两配对实验, 发现 1C4 与 4H5 可能为不同的抗原表位。棋盘法测定单抗 1C4 以 1:8 000 稀释度包被, 生物素标记的 4H5 以 1:32 000 稀释度反应效果较好。小麦 Glb1 - G3 蛋白做倍比稀释, 阴性对照孔用 PBS 代替抗原, 以测定孔与阴性孔  $A_{450\text{nm}}$  值之比大于 2.1 为阳性来检测该方法对抗原的检出范围。该方法对小麦 Glb1 - G3 蛋白的检出限为 3.75 ng/mL, 标准曲线在 3.75 ~ 120 ng/mL 范围内线性良好。

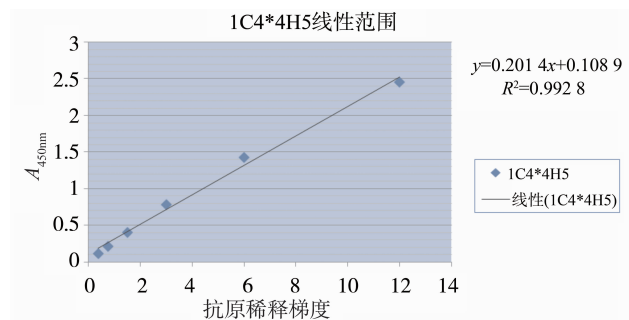


图 6 单克隆抗体对小麦蛋白 Glb1 - G3 的检测

Fig. 6 Detection of the wheat protein Glb1 - G3 with the monoclonal antibodies

## 3 讨论

小麦经过长期的发展, 已经成为世界上分布最广、面积最大、总产量第二、贸易额最多、营养价值最高的粮食作物之一。全世界有 43 个国家, 有 35% ~ 40% 的人口以小麦为主要粮食。小麦子粒含有丰富的淀粉、较多的蛋白质、少量的脂肪, 还有多种矿物质元素和维生素 B, 是一种营养丰富、经济价值较高的商品粮。据联合国粮农组织 2004 年统计, 全世界小麦收获面积 32.36 亿亩 (1 亩约为 667  $\text{m}^2$ ), 单产 193.8 kg/亩, 总产 6.27 亿 t, 单产较高的国家主要集中在西欧。但是于此同时, 小麦也是 FAO 1995 年所报道的八大类常见过敏食物<sup>[24]</sup>。糖尿病 (Diabetes Mellitus) 是一组与胰岛素产生和作用异常相关、以血糖增高为特征的慢性疾病, 该病及其并发症具有危害大、治愈难、费用高等特点, 已成为严重威胁人类健康的社会问题。糖尿病的发病原因众多, 从营养学角度来说, 进食个体不耐受的食物以及紊乱的饮食结构是糖尿病发病的一个重要因素<sup>[25]</sup>。小麦及其相关产品在日常饮食中的广泛摄入, 使小麦成为主要的食物蛋白来源, 但同时也成为主要的食物过敏原。小麦过敏可

以诱发哮喘、鼻炎、接触性荨麻疹、乳糜泻肠炎等症状<sup>[26]</sup>。小麦储藏蛋白作为小麦的主要过敏原,本研究是根据小麦储藏蛋白在小麦过敏中的重要作用利用杂交瘤技术制备抗 Glb - 1 特异性单克隆抗体,并鉴定其生物学特性,为研究 Glb - 1 与 I 型糖尿病的关系提供了研究基础。

根据软件分析 Glb - 1 蛋白的结构,选择性的选取了两段亲水、暴露、无转角且抗原性强的肽段表达分别命名为 G1、G2。经免疫和细胞融合后证实 G1、G2 免疫 BALB/C 小鼠后 ELISA 检测杂交瘤细胞抗体检出阳性率较低。而用于免疫小鼠的 Glb - 1 G3 肽段是根据文献报道将 2 段与糖尿病相关的短肽人工合成表达, G3 序列构成为: CEG-FVAGPEQQSREQEQR, 相对分子质量 2 464. 55, 实验结果 G3 免疫后的 BALB/C 小鼠脾细胞与 NS - 1 细胞融合后检测融合率和抗体阳性率均较理想。本实验利用细胞融合技术制备了小鼠抗 Glb - 1 的杂交瘤细胞,细胞融合率较高且用 Glb - 1 G3 包被 ELISA 检测出的抗阳性检出率理想。经过对 ELISA

A 值读数较高的 10 株进行克隆和亚克隆,最终获得 4 株稳定分泌抗小麦 Glb1 - G3 蛋白单克隆抗体的杂交瘤细胞株,分别命名为: 1C4、4H5、1A9、4F5。通过向小鼠注射这 4 株杂交瘤细胞后收集腹水通过亲和层析进行纯化。将小鼠腹水梯度稀释后用间接 ELISA 法测定单抗的效价, 4 株抗体效价均超过 200 万。且经检测后 4 株单抗皆为 IgG1 亚型。4 株单抗为一抗分别与八大类食物进行交叉反应性检测结果表明该 4 株单抗均能特异性识别小麦 Glb - 1 蛋白且与其他主要食物均无交叉反应,特异性强。双抗夹心 ELISA 法检测小麦 Glb1 - G3 蛋白实验发现 1C4 与 4H5 可能为不同的抗原表位,可以准确检测 Glb - 1 蛋白,可以制备小麦过敏原检测试剂盒,具有实际应用价值。

综上所述,本研究已获得鼠抗小麦 Glb - 1 单克隆抗体,为研究小麦过敏与临床疾病的关系和小麦主要过敏原蛋白的检测了研究工具和研究依据,同时也为小麦 Glb - 1 蛋白的结构和生物学功能研究奠定了基础。

#### 参考文献:

[1] LEFEBVRE D E, POWELL K L, STROM A, et al. Dietary proteins as environmental modifiers of type 1 diabetes mellitus[J]. *Annu Rev Nutr*, 2006, 26: 175 - 202.

[2] PATRICK C, WANG G S, LEFEBVRE D E, et al. Promotion of autoimmune diabetes by cereal diet in the pres-

ence or absence of microbes associated with gut immune activation, regulatory imbalance, and altered cathelicidin antimicrobial peptide[J]. *Diabetes*, 2013, 62(6): 2036 - 2047.

- [3] ONKAMO P, VAANANEN S, KARVONEN M, et al. Worldwide increase in incidence of type 1 diabetes—the analysis of the data on published incidence trends[J]. *Diabetologia*, 1999; 42: 1395 - 1403.
- [4] GALE E A. The rise of childhood type 1 diabetes in the twentieth century[J]. *Diabetes*, 2002, 51: 3335 - 3361.
- [5] GILLESPIE K M, BAIN S C, BARNETT A H, et al. The rising incidence of childhood type 1 diabetes and reduced contribution of highrisk HLA haplotypes[J]. *Lancet*, 2004, 364: 1645 - 1647.
- [6] LIESE A D, MA X, MAAHS D M, et al. Physical activity, sedentary behaviors, physical fitness, and their relation to health outcomes in youth with type 1 and type 2 diabetes: A review of the epidemiologic literature [J]. *Journal of Sport and Health Science*, 2013, 2(1): 21 - 38.
- [7] 许曼音, 陆广华, 陈名道. 糖尿病学[M]. 2 版. 上海: 上海科学技术出版社, 2010: 87 - 92.
- [8] ELLIOTT R B, MARTIN J M. Dietary protein: a trigger of insulin-dependent diabetes in the BB rat? [J]. *Diabetologia*, 1984, 26: 297 - 299.
- [9] ISSA-CHERGUI B, GUTTMANN R D, SEEMAYER T A, et al. The effect of diet on the spontaneous insulin dependent diabetic syndrome in the rat[J]. *Diabetes Res*, 1988, 9: 81 - 86.
- [10] VISSER J, BRUGMAN S, KLATTER F, et al. Short-term dietary adjustment with a hydrolyzed casein-based diet postpones diabetes development in the diabetes-prone BB rat[J]. *Metabolism-Clinical and Experimental*, 2003, 52(3): 333 - 337.
- [11] MAURANO F, ROSSI M, TRONCONE R. Gut involvement in NOD mouse diabetes[J]. *Immunology Endocrine & Metabolic Agents in Medicinal Chemistry*, 2007, 7(3): 211 - 217.
- [12] GRAHAM S, COURTOIS P, MALAISSE W J, et al. Enteropathy precedes type 1 diabetes in the BB rat[J]. *Gut*, 2004, 53: 1437 - 1444.
- [13] VAARALA O, ATKINSON M A, NEU J. The “perfect storm” for type 1 diabetes—the complex interplay between intestinal microbiota, gut permeability, and mucosal immunity[J]. *Diabetes*, 2008, 57(10): 2555 - 2562.
- [14] MACFARLANE A J, BURGHARDT K M, KELLY J, et al. A type 1 diabetes-related protein from wheat (*Triticum aestivum*) cDNA clone of a wheat storage globulin, glb1, linked to islet damage[J]. *The Journal of Biologi-*

- cal Chemistry, 2003, 278: 54 – 63.
- [15] SCOTT F W, SARWAR G, CLOUTIER H E. Diabetogenicity of various protein sources in the diet of the diabetes-prone BB rat [J]. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 1989, 246: 277 – 285.
- [16] COLEMAN D L, KUZAVA J E, LEITER E H. Effect of diet on incidence of diabetes in nonobese diabetic mice [J]. *Diabetes*, 1990, 39: 432 – 436.
- [17] ANTVORSKOV J C, FUNDOVA P, BUSCHARD K, et al. Dietary gluten alters the balance of pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines in T cells of BALB/c mice [J]. *Immunology*, 2013, 138(1): 23 – 33.
- [18] ZIEGLER A G, SCHMID S, HUBER D, et al. Early infant feeding and risk of developing type 1 diabetes-associated autoantibodies [J]. *JAMA*, 2003, 290: 1721 – 1728.
- [19] NORRIS J M, BARRIGA K, KLINGENSMITH G, et al. Timing of initial cereal exposure in infancy and risk of islet autoimmunity [J]. *JAMA*, 2003, 290: 1713 – 1720.
- [20] SCOTT F W, MONGEAU R, KARDISH M, et al. Diet can prevent diabetes in the BB rat [J]. *Diabetes*, 1985, 34(10): 1059 – 1062.
- [21] MOJIBIAN M, CHAKIR H, MACFARLANE A J, et al. Immune reactivity to a Glb 1 homologue in a highly wheat-sensitive patient with type 1 diabetes and celiac disease [J]. *Diabetes Care*, 2006, 29(5): 1108 – 1110.
- [22] SIMPSON M, MOJIBIAN M, BARRIGA K, et al. An exploration of GLO-3A antibody levels in children at increased risk for type 1 diabetes mellitus [J]. *Pediatric Diabetes*, 2009, 10(8): 563 – 572.
- [23] 柳忠辉. 医学免疫学实验技术 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2008: 22 – 23.
- [24] Food and Agriculture Organization of the United Nations Report of the FAO technical consultation on food allergies [C]. Rome, Italy: Food and Agriculture Organization of the United Nations, 1995.
- [25] 钱荣立. 饮食紊乱与糖尿病 [J]. *中国糖尿病杂志*, 2012, 20(1): 5 – 6.
- [26] JOHANSSON S, HOURIHANE J, BOUSQUET J, et al. A revised nomenclature for allergy: An EAACI position statement from the EAACI nomenclature task force [J]. *Allergy*, 2001, 56(9): 813 – 824.

(上接第 113 页)

- [14] LIU L, DUAN J A, TANG Y, et al. Taoren – Honghua herb pair and its main components promoting blood circulation through influencing on hemorheology, plasma coagulation and platelet aggregation [J]. *J Ethnopharmacol*, 2012, 139(2): 381 – 387.
- [15] 曹明山, 张道华. 血液流变学检查的临床应用及注意事项 [J]. *临床医药实践*, 2003, 12(6): 474.
- [16] 李凤兰, 程虎英, 刘莹. 血液流变学标本采集的注意事项 [J]. *全科护理*, 2009, 7(2): 328.
- [17] 苏薇薇. 岭南特色中药指纹图谱质量控制关键技术研究 [M]. 广州: 广东科技出版社, 2012: 327 – 340.
- [18] SONG Q, SHEPPERD M. Predicting software project effort: A grey relational analysis based method [J]. *Expert Systems with Applications*, 2011, 38(6): 7302 – 7316.
- [19] KUO Y, YANG T, HUANG G W. The use of grey relational analysis in solving multiple attribute decision-making problems [J]. *Computers & Industrial Engineering*, 2008, 55(1): 80 – 93.
- [20] 刘新华. 因子分析中数据正向化处理的必要性及其软件实现 [J]. *重庆工学院学报: 自然科学版*, 2009, 23(9): 152 – 155.
- [21] HENNEKENS C H, BURING J E. Aspirin in the primary prevention of cardiovascular disease [J]. *Cardiology Clinics*, 1994, 12(3): 443 – 450.
- [22] MAREE A O, CURTIN R J, DOOLEY M, et al. Platelet response to low-dose enteric-coated aspirin in patients with stable cardiovascular disease [J]. *Journal of the American College of Cardiology*, 2005, 46(7): 1258 – 1263.
- [23] JIANG S M, FU Y, CHEN Y P, et al. Study on protective effects of traditional Chinese medical complex prescription on myocardial ischemia/reperfusion injury after coronary artery ligation in rats [J]. *Chinese Journal of Integrated Traditional and Western Medicine in Intensive and Critical Care*, 2005, 12(6): 347 – 351.
- [24] WEN Z, YAO W, XIE L, et al. Influence of neuraminidase on the characteristics of microrheology of red blood cells [J]. *Clinical Hemorheology and Microcirculation*, 2000, 23(1): 51 – 57.
- [25] BAJAJ S P, JOIST J H. *Seminars in thrombosis and hemostasis* [M]. New York: Stratton Intercontinental Medical Book Corporation, 1974 – 1999: 407 – 418.
- [26] GACHET C, CAZENAVE J. ADP induced blood platelet activation: a review [J]. *Nouvelle Revue Francaise Dhématologie*, 1991, 33(5): 347.