

莱克多巴胺抗体的制备与评价

王凤侠, 张艳, 何金兴, 王玮, 徐蓓, 王忠斌, 王硕

(天津科技大学食品工程与生物技术学院, 天津市食品营养与安全重点实验室, 天津 300457)

摘要: 本文以 RAC-linker-BSA 为免疫抗原获得了莱克多巴胺的多克隆抗体, 用混合酸酐法合成包被抗原, 建立了莱克多巴胺的间接竞争酶联免疫检测方法 (ELISA), 对抗体性质进行了评价。结果表明, 制备出的莱克多巴胺抗体具有较高的灵敏度, IC_{50} 为 0.9 ng/mL, 检出限 (IC_{15}) 为 0.1 ng/mL, 低于同类文献的报道结果; 除了与多巴酚丁胺的交叉反应为 7.5% 外, 与克伦特罗、沙丁胺醇、特步他林、异丙肾上腺素和异奎胍均无交叉现象, 说明抗体特异性较高; 此外, 抗体具有很好的稳定性, 可在 4 °C 冰箱中储存半年以上。为建立酶联免疫快速检测方法, 实现对莱克多巴胺的有效监控奠定了良好的基础。

关键词: 莱克多巴胺; ELISA; 抗体

中图分类号: Q503; 文献标识码: A; 文章编号: 1673-9078(2007)09-0001-04

Production and Evaluation of a Antibody Against Ractopamine

WANG Feng-xia, ZHANG Yan, HE Jin-xing, WANG Wei, XU Bei, WANG Zhong-bin, WANG Shuo

(Tianjin Key Laboratory of Food Nutrition and Safety, College of Food Engineering and Biotechnology, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300457, China)

Abstract: An indirect competitive enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) procedure was established to detect ractopamine employing a polyclonal antibody generated from RAC-linker-BSA and a coating antigen synthesized by method of mixed acid anhydride. The antibody against ractopamine showed high sensitivity with an IC_{50} of 0.9 ng/mL and the detection limit (IC_{15}) was 0.1 ng/mL, which was lower than the data reported in literatures. The antibody with high specificity showed no cross-reactivity with clenbuterol, salbutamol, isoproterenol, terbutaline and isoxsuprine, while had the cross-reactivity of 7.5% with dobutamine. In addition, it was stable enough to be stored at 4 °C for half a year. This study laid a well foundation for the control of ractopamine by ELISA method.

Key words: ractopamine; ELISA; antibody

莱克多巴胺 (Ractopamine, 缩写 RAC), 化学名称为 N-[2-(4-羟基苯基)-2-羟基乙基]-1-甲基-3-(4-羟基苯基)丙氨^[1], 化学结构如图 1 所示, 其商品名为舒喘灵, 与克伦特罗 (瘦肉精) 一样, 是苯乙醇胺类 β_2 -受体激动剂 (兴奋剂)。它是由美国 Elanco Animal Health 公司 (Eli Lilly & Co 的分公司) 开发成功, 并被美国 FDA 于 2000 年 7 月批准生产应用于养猪业^[2-4]。20 世纪 80 年代的一系列动物试验表明, 莱克多巴胺具有营养“再分配效应 (repartitioning effects)”, 可以调控动物体营养代谢路径, 显著增加酮体瘦肉率, 提高饲料利用率^[5-7]。也正是由于此特性使其在“瘦肉精”克伦特罗被国际禁止使用之后很快成为瘦肉精的替代品被广泛用动物的饲养中。近年来, 受经济利益的驱使, 莱克多巴胺在实际使用过程中的用量往往高

于法定用量, 从而导致了严重的残留超标现象, 引发了多起人类食用中毒事件, 严重威胁人类健康和世界的经济发展。因此, 目前国内外对其在动物源性食品中残留有严格规定, 因此迫切需要快速有效的莱克多巴胺检测方法。

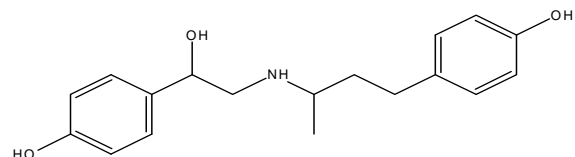


图 1 莱克多巴胺的化学结构

目前, 关于莱克多巴胺的检测方法主要有仪器检测和免疫检测两种。其中, 仪器检测主要有高效液相色谱联用法 (HPLC-MS)^[8,9] 和气相色谱-质谱联用法 (GC-MS)^[10]。此法检测结果准确, 但是需要专门仪器和专业人员, 成本较高, 耗时, 而免疫检测法, 尤其是酶联免疫吸附检测法 (ELISA) 作为筛选检测, 具有灵敏度高, 样品前处理简单, 操作方便, 适于现

收稿日期: 2007-06-15

基金项目: 国家十一五科技支撑计划 (2006BAD05A06)

作者简介: 王凤侠 (1981-), 女, 硕士研究生, 主要从事食品安全检测研究

通讯作者: 王硕, 男, 教授

场检测。

本试验采用 linker 法偶联免疫抗原 RAC-BSA, 通过特定免疫程序进行动物免疫, 获得具有高灵敏度、特异性的抗莱克多巴胺抗体, 从而为建立灵敏度高的莱克多巴胺酶联免疫检测方法, 以及快速检测试剂盒的研制奠定物质基础。

1 材料与方 法

1.1 材料与仪器

牛血清白蛋白 (BSA) 购于 Merck 公司; 盐酸莱克多巴胺 (纯度>99%, 比利时) 购于上海安普公司; 鸡蛋清白蛋白 (OA) 等其他试剂均购于 Sigma 公司; 96 孔酶标板购于丹麦 Nunc 公司; 微孔板清洗机购于 BIO-RAD; 酶标仪购于 Multiskan 芬兰 Labsystems dragon 公司; Mill-Q 超纯水系统。

1.2 溶液

磷酸盐缓冲液 (PBS, 0.01 mol/L, pH 7.4)、碳酸盐缓冲液 (0.05 mol/L, pH 9.6)、洗涤液 (PBST, 0.01 mol/L, pH 7.4, PBS-0.5 mL/L 吐温 20)、封闭液 (含 0.5% 脱脂奶粉的 PBS 溶液)、3,3',5,5'-四甲基联苯胺 (TMB) 底物液 (TMB-过氧化氢脲溶液)、终止液 (2.5 mol/L H₂SO₄ 溶液)。

1.3 试验方法

1.3.1 免疫抗原的制备^[11]

10 mg 的 BSA 溶于 0.5 mL 双蒸水中, 用 1.0 mol/L 的氢氧化钠溶液调节 pH 值到 10.8, 加入 22 μL/L 的 butane-1,4-diol diglycidyl ether 溶液 50 μL, 在氮气保护下, 室温搅拌反应 22 h。

17 mg (50 μmol) RAC-HCl 加入到 0.5 mL 0.5 mol/L 的氢氧化钠溶液中, 加入 50 μL 二甲基甲酰胺助溶。然后在冰浴中将此溶液缓慢加入到活化的 BSA 溶液中, 氮气保护下室温搅拌反应 22 h。

反应产物于 4 °C 冰箱中用 PBS 透析 3 d, 所得偶联物 RAC-BSA 中加入 0.1% 叠氮钠, -20 °C 储存备用。

1.3.2 包被抗原的制备^[12]

17 mg (50 μmol) of RAC-HCl 和 5 mg (50 μmol) 琥珀酸酐溶于无水吡啶中, 室温搅拌 24 h 后用氮气吹干, 产物溶于 2 mL DMF:1,4-二氧六环 (1:1), 加入 13 μL (约 0.05 mmol) 三丁胺, 冰浴中搅拌 10 min 后加入 7.2 μL (0.05 mmol) 氯甲酸异丁酯, 室温反应 1 h, 然后缓慢加入 10 mg OA (预先溶于 2.5 mL 0.1 mol/L 磷酸盐缓冲液, 4 °C 预冷), 30 min 内加完, 室温搅拌反应 24 h。反应产物于 4 °C 冰箱中用 PBS 透析 3 d, 所得偶联物 RAC-OA 中加入 0.1% 叠氮钠, -20 °C 储存

备用。

1.3.3 动物免疫

两只体重约 2 kg 日本大耳白兔, 观察饲养一周后, 取 2 mg (以蛋白量计) 免疫原, 加入生理盐水至 2 mL, 与等量的弗氏完全佐剂充分混合乳化, 采取皮内多点注射和肌肉注射进行初次免疫。加强免疫用不完全佐剂, 免疫原量减半, 前三次每隔两周免疫一次, 第三次后每隔一个月免疫一次。从第三次免疫开始, 于每次加强免疫后 10 d 进行耳缘静脉取血, 并进行血清效价以及灵敏度测定, 六次免疫结束后 10 d 进行腹部动脉采全血。离心分离获得抗血清加入 0.1% 叠氮钠于 -20 °C 储存备用。

1.3.4 抗血清效价测定

在酶标板上包被 100 μL 稀释好的包被抗原 (1 μg/well), 室温孵育过夜; 然后用 PBST 洗板三次, 向每孔加入 200 μL 的封闭液, 室温下封闭 1 h; PBST 洗板三次后, 逐个向每孔加入 100 μL 梯度稀释的抗血清, 室温孵育 1 h; 洗板四次后, 每孔加入 100 μL 的酶标二抗 (用 PBS 稀释 10000 倍), 室温孵育 30 min; 洗板五次后, 加入 150 μL 新鲜配制的底物液进行显色反应, 20 min 后加入 50 μL 的终止液终止显色; 用酶标仪测定吸光度值, 采取双波长测定每孔吸收值 (450 nm 为测定波长, 650 nm 为参考波长)。

1.3.5 抗体纯化和浓度测定

以 Protein A-Sepharose 4B 作为亲和层析介质纯化抗血清, 纯化后的抗体调节 pH 至中性, 用 PBS 透析 3 d 后加入 0.1% 叠氮钠, 4 °C 冰箱中储存备用。

纯化后的抗体用 PBS 稀释 20 倍后, 在 280 nm 测定吸光度值, 以 PBS 为空白对照。

$$\text{抗体浓度} = \frac{A_0 - A_1}{1.35} \times 20$$

其中: A_0 - 抗体蛋白在 280 nm 的吸光度值

A_1 - 空白对照的吸光度值

1.3.6 标准曲线的绘制

将莱克多巴胺标准溶液稀释为 100 ng/mL、25 ng/mL、6.25 ng/mL、1.56 ng/mL、0.39 ng/mL、0.098 ng/mL 6 个浓度梯度, 采用间接竞争 ELISA 法进行测定, 除了在加入 100 μL 抗体的同时加入 100 μL 不同浓度的莱克多巴胺标准溶液外, 其余步骤同抗血清效价的测定, 根据吸光度值 (OD 值) 计算抑制率。

抑制率 (%) = $[1 - (A_{\text{样品}} - A_{\text{空白}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}})] \times 100$

其中: A 是吸光度值 = $A_{450\text{nm}} - A_{650\text{nm}}$

以莱克多巴胺的浓度取对数后为横坐标, 抑制率

为纵坐标, 绘制出莱克多巴胺的标准曲线, 应为典型的 S 形曲线。

1.3.7 抗体特异性测定

采用间接竞争的方法, 分别采用梯度稀释的莱克多巴胺、克伦特罗、沙丁胺醇、特步他林、异丙肾上腺素、多巴酚丁胺和异奎胍同时进行标准曲线的绘制, 计算各竞争物的 IC_{50} , 比较抗体对它们的亲和性。用下式计算各竞争物与抗 RAC 抗体的交叉反应性。

$$\text{交叉反应性}(\%) = IC_{50}(\text{RAC}) / IC_{50}(\text{竞争物}) \times 100$$

1.3.8 抗体稳定性测定

将抗体分别于 4 °C、室温和 37 °C 储存, 在储存 1 d、3 d、5 d、7 d 和 30 d 后, 采用间接竞争 ELISA, 分别同时测定 IC_{50} 值并加以比较。

2 结果与讨论

2.1 RAC 抗体的制备

对于小分子物质, 抗体制备的关键是免疫原的合成, 免疫原合成的好坏直接影响抗体的特异性和灵敏度, 同时由于动物的个体差异的存在, 导致所产生的免疫应答强弱不一, 同样也决定抗体的效果。

2.1.1 免疫抗原的制备

可以诱导动物体产生免疫应答获得抗体的物质必须同时具备 T 细胞表位和 B 细胞表位, 为完全抗原, 而 RAC 为小分子物质, 结构简单, 不同时具有这两种表位, 为半抗原不能直接刺激机体产生免疫应答, 必须将其连接到大分子蛋白质载体上成为完全抗原, 借助载体蛋白的 T 细胞表位间接诱导 B 细胞激活, 从而产生针对半抗原分子的特异性抗体。如果将半抗原与载体蛋白直接偶联, 由于空间位阻效应, 半抗原的结构难以暴露, 很难产生针对半抗原表位的特异性抗体。因此通常会在小分子和载体蛋白分子之间引入连接臂, 减小空间位阻, 将半抗原的抗原决定簇暴露出来, 从而诱导动物产生特异性抗体。连接臂的长短对抗体的特异性也有不同的影响, 常用的连接臂为 6~8 个碳的链状结构。

莱克多巴胺分子结构的两端均为苯环结构, 且各带有一个酚羟基, 可以直接与连接臂偶联。为了获得针对莱克多巴胺的特异性抗体, 选择 butane-1,4-diol diglycidyl ether 为连接臂 (linker), 使其随机的与两个酚羟基中的一个偶联, 制备免疫原, 进一步通过特定免疫程序以获得针对莱克多巴胺的特异性抗体。

2.1.2 抗血清的筛选

抗血清的效价, 即试验过程中所需的适宜的抗血清稀释倍数。采用间接方法进行测定, 选择吸光度值

在 1.0 左右时的抗血清稀释度为此抗血清的效价。

受动物个体差异的影响, 同一人工抗原免疫动物所得抗血清效果可能不尽相同, 通过对几次所采血清进行效价和特异性 (IC_{50} 值, 即达到 50% 抑制率时的莱克多巴胺标准溶液浓度) 测定, 比较获得效果最佳的进行采全血。

表 1 免疫过程中所采血清的效价和特异性比较

采血次数	效价		特异性/ IC_{50} (ng/mL)	
	RAC-BSA1	RAC-BSA2	RAC-BSA1	RAC-BSA2
1	2000	1000	6.2	5.1
2	4000	2000	5.1	3.2
3	4000	3000	3.2	2.1
4	4000	3000	2.0	1.2

由表 1 可以看出两只兔子免疫后均产生了针对莱克多巴胺具有特异性的抗体, 随着免疫时间的增加, 效价在升到一定程度后就不再提高, 而特异性一直呈现增强的趋势; 1 号兔子血清的效价较 2 号高, 但其特异性并没有 2 号强, 这说明抗血清效价与其特异性效果并非总是一致的, 而对于建立特异性的酶联免疫吸附试验来说, 特异性是一个更加重要的因素。因此, 本试验选择 2 号兔子的第四次血清进行后续研究。

2.2 抗体的评价

效果较好的 2 号兔子采全血后离心, 所得的抗血清采用免疫亲和柱层析的方法进行纯化, 去除了杂蛋白等其他杂质后, 获得了高浓度的抗体, 其浓度值为 4.35 mg/mL。

2.2.1 标准曲线的建立

如图 2 所示, 为莱克多巴胺间接竞争 ELISA 方法的标准曲线, 是典型的 S 形曲线。由图可以看出, 标准曲线的 IC_{50} 值为 0.9 ng/mL, 检出限 (IC_{15} 值, 即抑制率为 15% 时的莱克多巴胺标准溶液浓度) 为 0.1 ng/mL, 结果明显低于同类文献的相关报道, 如 2005 年于洪侠报道的 IC_{50} 为 10 ng/mL^[12]。说明本试验所得抗莱克多巴胺抗体具有很高的检测灵敏度。

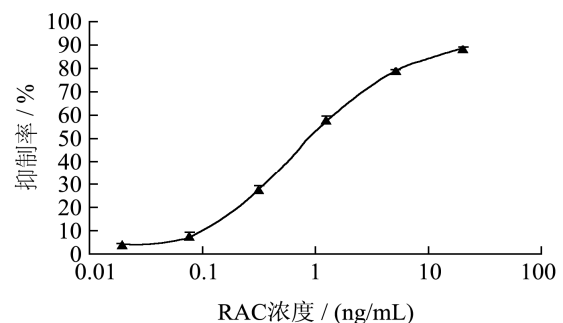


图 2 莱克多巴胺标准曲线

注: 为直观地表示浓度与抑制率的关系, 本图中曲线取值

为 RAC 浓度的对数值, 横坐标的标注仍为浓度的原始值。

2.2 抗体的特异性

特异性即抗体与结构类似化合物的交叉反应程度, 交叉反应越小, 抗体特异性越高, 反之, 交叉反应越大, 抗体特异性越差。为了衡量所得抗体的特异性, 研究了所制备抗体对与莱克多巴胺结构相似的其他 β -兴奋剂之间的亲和性。

表 2 RAC 与结构类似物的交叉反应

化合物	IC50/(ng/mL)	CR/%
莱克多巴胺	0.5	100
多巴酚丁胺	6.7	7.5
异丙肾上腺素	>10000	<0.01
沙丁胺醇	>10000	<0.01
克伦特罗	>10000	<0.01
特步他林	>10000	<0.01
异奎胍	>10000	<0.01

由表 2 结果可以看出, 此抗体除了与多巴酚丁胺表现出 7.5% 的交叉反应外, 与其他物质均无交叉现象。因为在这几种物质中, 多巴酚丁胺的结构与莱克多巴胺的结构最相近, 都是双苯烷基胺化合物, 具有类似的免疫活性基团。

2.2.3 抗体的稳定性

抗体的稳定性即抗体对外界条件变化的抵抗程度, 主要是温度变化的影响。因为在酶联免疫检测的实际应用过程中, 温度条件是个易变量, 如果抗体的灵敏度受温度影响较大, 则很难保证检测的准确性。因此, 抗体的稳定性也是衡量抗体优劣的标准之一。

试验结果表明, 抗体在一个月的储存期内, 4℃、室温和 37℃ 三个温度下存放的抗体灵敏度都没有下降的趋势; 而且, 在实验过程中, 纯化后的抗体一直储存在 4℃ 冰箱中为期半年以上, 灵敏度也没有明显改变, 这说明此抗体受温度影响不大, 具有很好的稳定性。

3 结论

酶联免疫检测方法作为一种筛选方法, 其检测的灵敏度是至关重要的。由本试验结果可以看出, 此次完全抗原的合成是成功的, 获得了特异性和灵敏度均很高的抗莱克多巴胺的抗体, 而且抗体受温度的影响较小, 具有很高的稳定性, 在 4℃ 冰箱中至少可以保存半年以上, 这些对于研制一种具有高灵敏度的莱克

多巴胺检测试剂盒具有重要意义。

参考文献

- [1] 陈建新, 陈杖榴. 电喷雾质谱鉴定合成 Ractopamine 的副反应产物[J]. 质谱学报, 2003, 24: 11-12
- [2] 张雨梅, 殷俊. 莱克多巴胺单克隆抗体的研制[J]. 扬州大学学报, 2004, 25: 22-24
- [3] M.P. Turberg; T.D. Macy; Lewis. Determination of ractopamine hydrochloride in swine and turkey tissues by liquid chromatography with coulometric detection[J]. Journal of AOAC International, 1995, 78(6):1394-1402.
- [4] FDA (Food and Drug Administration). New animal drugs for use in animal feeds: Ractopamine hydrochloride. Federal register: May 6, 2004 (Volume 69, Number 88)
- [5] Yang Y.T., Mcelligott M.A. Multiple action of β_2 -adrenergic agonist on skeletal muscle and adipose tissue[J]. Biochem J, 1989, 261:1-10.
- [6] Werner T.L., Muscle protein metabolism in finishing pigs fed ractopamine[J]. J. Anim Sci, 1989, 67:2255-2262
- [7] Mitchell, A.D., Solomon, M.B., Steel, N.C. Response of low and high select lines of pigs to the feeding of the beta-adrenergic agonist ractopamine (phenethanolamine)[J]. J. Anim. Sci., 1990, 68:3226.
- [8] J.P. Antignac, P. Marchand, B.L. Bizec, et al. Identification of ractopamine residues in tissue and urine samples at ultra-trace level using liquid chromatography-positive electrospray tandem mass spectrometry[J]. Journal of Chromatography B, 2002, 774: 59-66
- [9] Monal L. Churchwell, C. Lee Holder, Davia Little, Steve Preece, David J. Smith, Daniel R. Doerge. Liquid chromatography/electrospray tandem mass spectrometric analysis of incurred ractopamine residues in livestock tissues. Rapid Commun[J]. Mass Spectrom, 2002, 16, 1261-1265
- [10] J.P. Wang, X.W. Zhang, J.Z. Shen. Development of Immunoaffinity Sample-Purification for GC-MS Analysis of ractopamine in Swine Tissue[J]. Chromatographia, 2006, 64, 613-617
- [11] 许文涛, 黄昆仑. 莱克多巴胺抗原合成鉴定及其抗体的制备纯化[J]. 食品科学, 2005, 26: 29-33
- [12] 于洪侠, 杨曙明. 莱克多巴胺人工抗原的合成与鉴定[J]. 中国兽医科技, 2005, 35: 1000-1003