

呋喃唑酮代谢物抗体的制备与筛查

杨悦熙¹, 李敏¹, 李文美², 何小维¹

(1. 华南理工大学轻工与食品学院, 广东广州 510640) (2. 广州万孚生物技术有限公司, 广东广州 510530)

摘要: 利用呋喃唑酮的4种代谢物合成免疫原以及包被原, 用4种免疫原各免疫两只新西兰大白兔, 得到8份抗血清, 再纯化抗血清。采用间接ELISA方法, 筛选出OD值明显高于阴性样本的血清用于以后的实验, 同时对抗体的效价进行测定。实验检测结果表明, 当用包被原A和包被原B包被酶标板时, 7号和8号抗血清对该包被抗原有很好的亲和性, 呋喃唑酮代谢物衍生物对抗体有很好的抑制。通过效价检测, 7号和8号抗血清均具有高效价、高特异性的特点, 其中8号抗血清的效价更高, 亲和力更强。再通过进一步对两种包被原和两份抗血清进行筛查, 选择B包被原和8号兔子的抗体清用于ELISA法的建立。

关键词: 呋喃唑酮代谢物; 抗体; 间接ELISA

文章篇号: 1673-9078(2013)2-362-366

The preparation and screening of antibody of Furazolidone Metabolite

YANG Yue-xi¹, LI Min¹, LI Wen-mei², HE Xiao-wei¹

(1. College of Light Industry and Food Sciences, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

(2. Wondfo Biotech Co., Ltd, Guangzhou 510530, China)

Abstract: Using of 4 Furazolidone Metabolite Residues, immunogen and coating antigen were synthesized. Then, 4 immunogen were used to immunize 2 New Zealand rabbits. 8 antisera were obtained and purified. Using indirect ELISA method, the OD value which was higher than that of negative samples of serum were filtered out and used in subsequent experiments, and then antibody titer were determined. The results implied when coating antigen A and B coated microtiter plates. No.7 and No.8 antisera had a good affinity on the coating antigen. The derivatives of Furazolidone Metabolite had a good effect on antibody inhibition. Through the determination of antibody titer, No.7 and No.8 antisera both had high titer and high specificity features, of which NO.8 antiserum provided higher antibody titer and higher affinity. Through further screening of 2 coating antigen and 2 antisera, coating antigen B and No.8 antiserum were chosen for ELISA method.

Key words: furazolidone metabolite; antibody; indirect ELISA

呋喃唑酮属于硝基呋喃类抗菌药, 因其效高价廉, 广泛应用在家畜、家禽、水产类的痢疾、肠炎、球虫病和火鸡黑头病的预防和治疗^[1]。呋喃唑酮在动物体内可代谢为3-氨基-2-恶唑烷酮(AOZ)^[2-4], AOZ对人体有毒副作用^[5-7]。由于它严重的危害性, 导致世界各国普遍禁止使用。目前对于呋喃唑酮代谢物检测的方法主要为HPLC^[8]、LC-MS和LC-MS/MS, 但一次只能分析一个样品、需昂贵仪器, 并且不能进行现场在线检测或跟踪监测。

运用免疫学和生物工程技术所建立的酶联免疫吸附测定技术, 具有特异性强、灵敏度高、成本低、效率高、仪器化程度低、检测容量大等特点, 适用于大批量样本中的检测, 是作为一种重要的补充技术,

收稿日期: 2012-08-21

作者简介: 杨悦熙(1989-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 食品安全检测
通讯作者: 何小维(1952-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 功能碳水化合物材料理论与技术

在现场监控, 简单基础实验室的检测, 甚至大型实验室的初步筛选上有广泛的应用前景^[9]。本文主要研究了呋喃唑酮代谢物的抗体的制备与筛查, 为ELISA法的建立奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 原料

NPAOZ标准品, 德国Sigma公司; 弗氏完全佐剂, 德国Sigma公司; 弗氏不完全佐剂, 德国Sigma公司; 磷酸二氢钠, 广州化学试剂厂; 磷酸氢二钠, 广州化学试剂厂; 氯化钠, 广州化学试剂厂; 硫酸铵, 广州化学试剂厂; Tween 20, 浙江龙游县化工试剂厂; 过氧化氢, 广州化学试剂厂; 四甲基联苯胺(TMB), 捷倍斯生物技术有限公司; 辣根过氧化物酶标记的羊抗兔IgG, 捷倍斯生物技术有限公司; 其他试剂均为分析纯试剂, 购于广州化学试剂厂。

1.2 主要仪器设备

Mtiskan Mk3 酶标仪, 美国 Thermo 公司; MK3 洗板机, 美国 Thermo 公司; CP224S 精密电子天平, 德国 Satorious 公司; WH-2 微型旋涡混合仪, 上海沪西分析仪器厂; TGL20M 台式高速冷冻离心机, 长沙英泰仪器有限公司; GL-3250C 磁力搅拌器, 海门麒麟贝尔医用仪器厂; 0~10 μL 、10~100 μL 、100~1000 μL 单通道连续可调移液枪, 美国 Thermo 公司; 50~200 μL 八通道连续可调移液枪, 美国 Thermo 公司。

1.3 溶液系统

包被缓冲液 (0.05 mol/L, pH=9.6 的碳酸盐缓冲液); 2 PBS (0.01 mol/L, pH=7.4 的磷酸盐缓冲液); 洗涤缓冲液 (0.05%, pH=7.4 PBST); 显色液 A (0.1 mol/L、pH5.0 的磷酸盐-柠檬酸缓冲液, 0.045% 过氧化氢), 显色液 B (0.1 mol/L、pH=5.0 的磷酸盐-柠檬酸缓冲液, 0.04% 的 TMB); 终止液 (2 mol/L, H_2SO_4 溶液); 硫酸铵或饱和硫酸铵溶液; NPAOZ 标准液的配制: 用甲醇配制 1 mg/mL 的标准品储备液。用 PBS

溶液进行系列浓度稀释, 配制成浓度为 0 ng/mL、0.25 ng/mL、0.5 ng/mL、1 ng/mL、2 ng/mL、10 ng/mL 的标准溶液。

1.4 实验方法

1.4.1 抗血清的制备

实验动物为每种免疫原选用 2 月龄、体重为 1.5~2 kg 的健康实验级雌性新西兰大白兔, 采用皮下和肌肉注射法进行免疫^[10-11], 1 只作为阴性对照组, 剩余为实验组 (编号为 1 号~8 号), 连续观察 3 d, 确定身体状况正常后进行免疫。将 1 mg 免疫原溶于 0.5 mL 生理盐水和 0.5 mL 弗氏佐剂的混合溶液中, 混成乳浊液。再进行抗原乳化^[12]: 将乳浊液混合物在旋涡混合器上充分震荡混合至 W/O 状态 (将一滴乳剂滴入水中, 飘在水面不扩散)。本研究采用通过 AOZ 合成的免疫原 I、II、III 和 IV 同时免疫 8 只新西兰大白兔, 具体免疫程序见表 1。

表 1 兔子免疫程序

Table 1 The immunization scheme of rabbits

免疫时间	时间/d	免疫物质	免疫剂量	免疫方法
一次免疫	0	免疫原+完全弗氏佐剂	1 mL/只	颈背部皮下多点注射
二次免疫	21	免疫原+不完全弗氏佐剂	1 mL/只	颈背部皮下多点注射
三次免疫	35	免疫原+不完全弗氏佐剂	1 mL/只	颈背部皮下多点注射
四次免疫	49	免疫原+不完全弗氏佐剂	1 mL/只	颈背部皮下多点注射
心脏采血	56	-	-	-

1.4.2 抗血清的分离与保存

离心管在室温下静置 4 h, 待血液凝固后, 冰箱 4 $^{\circ}\text{C}$ 中过夜, 使血块收缩, 血清自然析出。抗体存在于血液的血清部分, 血清一旦析出后, 应立即将血清与血细胞分离, 否则细胞将溶解而释放出其他杂蛋白, 污染抗体并将抗体水解, 降低其效价。将血清吸出后, 4500 r/min 离心 20 min, 消除一些杂蛋白及红细胞碎片, 提取上清液, 即抗血清。与前面吸出的血清混在一起。加入 0.02% 硫柳汞钠盐, 分装, -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用^[13-14]。

1.4.3 抗血清的纯化^[15]

抗血清纯化本实验采用盐析法, 抗血清 1 mL, 加入等量生理盐水, 摇匀后, 慢慢加入 2 mL 饱和硫酸铵溶液, 边加边摇匀, 充分混合后置 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱内 40 min。取出离心, 5000 r/min, 20 min。弃去上清液, 加入 2 mL 生理盐水, 溶解沉淀物后, 加入饱和硫酸铵 1 mL, 使硫酸铵的饱和度达 33%, 边加边摇匀, 置 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱内 40 min。取出后离心, 以 33% 饱和度的硫酸铵溶液洗涤沉淀。弃去上清液, 加少量生理盐水溶解沉淀物, 使其达到原血清量的 1/4 左右, 装入透析袋

中。以 0.01 mol/L pH=7.4 磷酸盐缓冲液, 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中透析 3 d, 每天换液数次, 每次 2000 mL。得到提纯 IgG(Ab)。

1.4.4 血清的筛选

采用间接 ELISA 方法, 筛选出 OD 值明显高于阴性样本的血清用于实验。采用与免疫原同样的方法合成的包被抗原, 载体蛋白质为 cBSA。将合成好的包被原 (A、B、C、D), 用包被缓冲液稀释 1:4000, 稀释后包被酶标板, 100 μL /孔, 于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱过夜。次日取出酶标板回至室温, 洗板机洗涤 3 次后, 在吸水纸上将酶标板拍干, 以下洗涤方法相同; 充分洗涤后, 用封闭缓冲液封闭酶标板, 120 μL /孔, 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 温育箱内温育 1 h 后洗涤, 拍干; 加入抗血清: 将血清稀释 1:5000, 100 μL /孔, 37 $^{\circ}\text{C}$ 温育 30 min 后洗涤、拍干; 加入酶标二抗: 每孔加入 100 μL , 1:5000 稀释的 HRP-GAR-IgG, 37 $^{\circ}\text{C}$ 温育 30 min 后洗涤、拍干; 显色: 每孔加入 100 μL 显色液, 暗处 37 $^{\circ}\text{C}$ 温育 15 min; 终止反应: 取出酶标板, 每孔加入 50 μL 终止液 (2 mol/L 的硫酸); 读数: 在终止 15 min 后, 用酶标仪上 450 nm 波长处测定各孔吸光值。

1.4.5 抗体效价的测定

将合成好的包被原 (A、B), 用包被缓冲液稀释, 稀释后包被 96 孔酶标板, 100 μL /孔, 于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱过夜。次日取出酶标板回至室温, 洗板机洗涤 3 次后, 在吸水纸上将酶标板拍干, 以下洗涤方法相同; 充分洗涤后, 用封闭缓冲液封闭酶标板, 120 μL /孔, 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 温育箱内温育 1 h 后洗涤, 拍干; 将血清作系列梯度稀释, 100 μL /孔, 37 $^{\circ}\text{C}$ 温育 30 min 后洗涤、拍干; 每孔加入 100 μL , 1:3000 稀释的 HRP-GAR-IgG, 37 $^{\circ}\text{C}$ 温育 30 min 后洗涤、拍干; 每孔加入 100 μL 显色液, 暗处 37 $^{\circ}\text{C}$ 温育 15 min; 终止反应: 取出酶标板, 每孔加入 50 μL 终止液 (2 mol/L 的硫酸); 在终止 15 min 后, 用酶标仪上 450 nm 波长处测定各孔吸光值^[16]。

2 结果与讨论

2.1 抗血清的筛选

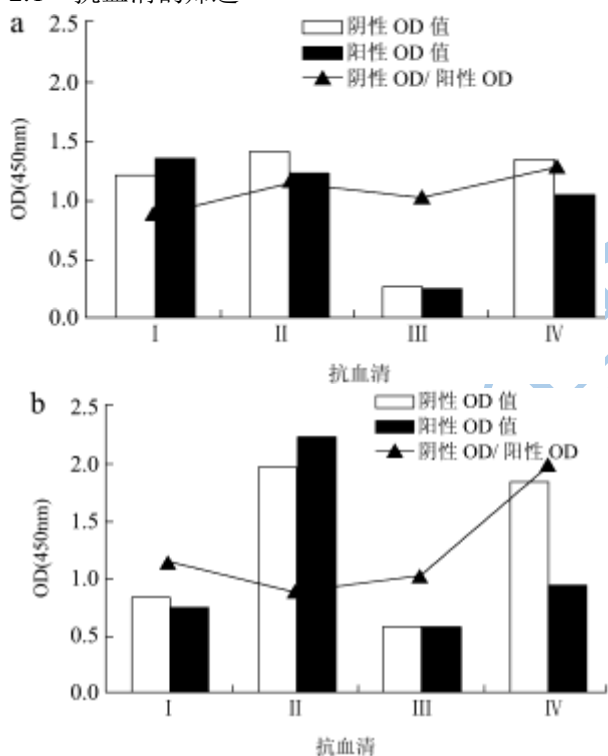


图 1 包被原 A 与抗体的配对结果

Fig.1 Matching results between coating antigen A and antibodies

注: a, b 为平行实验

实验检测结果表明, 当用包被原 A 和包被原 B 包被酶标板时, 免疫原 IV 得到的抗血清检测中, 0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 标准品的 OD 值较大, 在加入抑制浓度标准品时, 咪

喃唑酮代谢物衍生物与抗体产生了竞争性结合反应, 这表明 7 号和 8 号抗血清对该包被抗原有很好的亲和性, 咪喃唑酮代谢物衍生物对抗体有很好的抑制。而其他配对抗体几乎没有抑制, 原因可能是在这三种免疫原的合成过程中免疫原上的半抗原残基受到载体蛋白的影响, 与游离的半抗原结构比较有所不同。因此完全抗原所诱导产生的抗体特异性存在较大差异, 针对载体蛋白或其他非特征结构的抗体无法识别游离的半抗原。因此, 选用包被原 A 和包被原 B, 免疫原 IV 得到的 7 号和 8 号抗血清检测做进一步的研究。

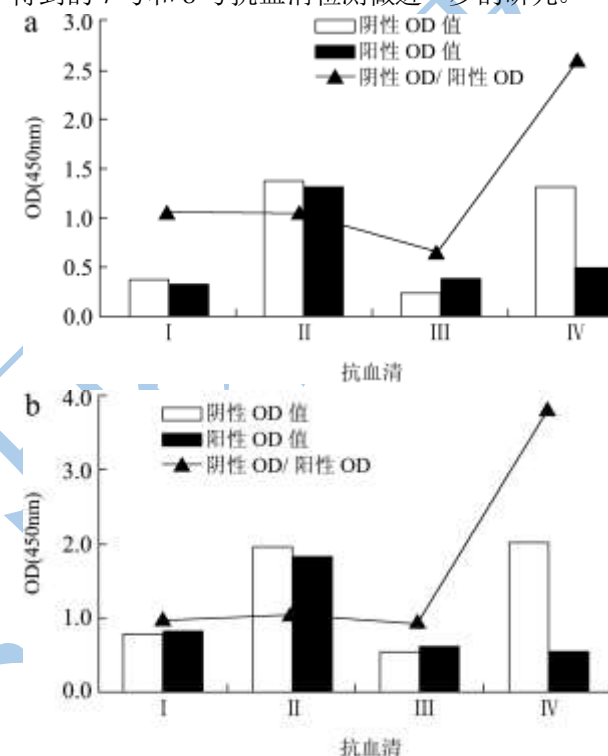


图 2 包被原 B 与抗体的配对结果

Fig.2 Matching results between coating antigen B and antibodies

注: a, b 为平行实验

2.2 抗体的效价

以阳性血清的 A450 \geq 阴性对照的 2.1 倍并且 A450 大于 0.1 作为抗血清的效价。由测定结果可知 7 号和 8 号兔子抗血清效价分别为 40500 和 121500, 结果表明免疫原 IV 得到的抗血清能识别咪喃唑酮代谢物结构, 但不同机体对同一免疫原的免疫应答反应存在差异。7 号和 8 号抗血清均具有高效价、高特异性的特点, 其中 8 号抗血清的效价更高, 亲和力更强, 但是效价不是一个标准化的指标, 随评定的标准, 测定条件变化而差异很大。因此, 只能作为一个筛选抗血清的指标。

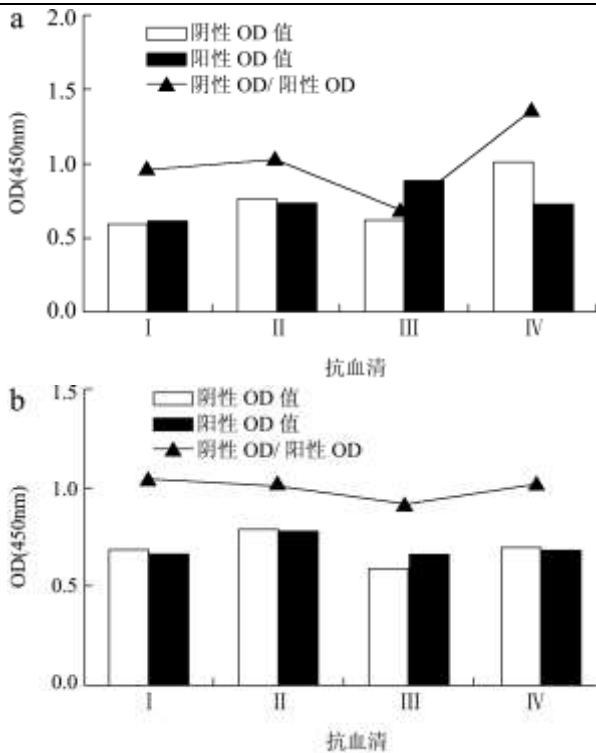


图3 包被原 C 与抗体的配对结果

Fig.3 Matching results between coating antigen C and antibodies

注: a, b 为平行实验

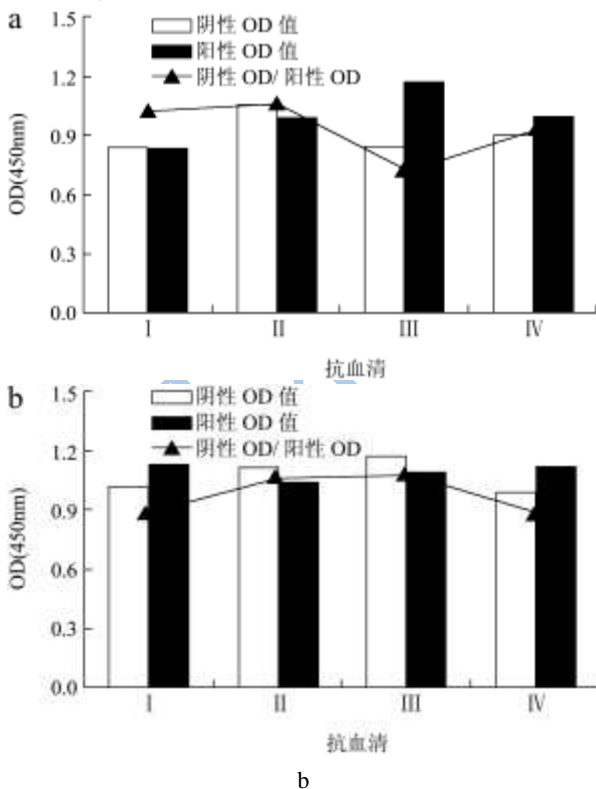


图4 包被原 D 与抗体的配对结果

Fig.4 Matching results between coating antigen D and antibodies

注: a, b 为平行实验

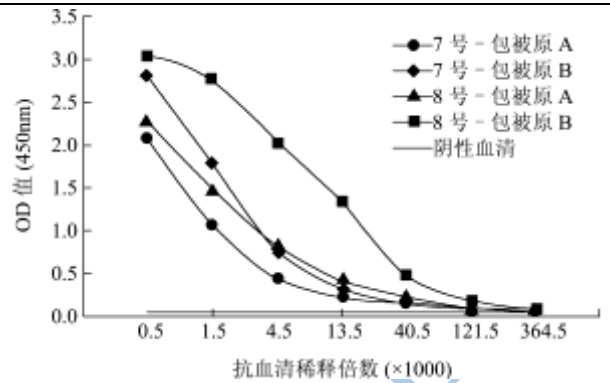


图5 抗体的效价曲线

Fig.5 Titer curve of antibodies

表2 包被原 A

Table 2 The effect of coating antigen A

HRP	Ag2K			
	Ab	标准浓度/($\mu\text{g}/\text{kg}$)	7号兔子	8号兔子
4K	8K	0	1.403	1.483
		10	0.585	0.309
	2W	0	0.838	0.851
		10	0.327	0.171
HRP 1W	4K	0	0.381	0.395
		10	0.168	0.094
		10	0.639	0.705
		10	0.293	0.152

表3 包被原 B

Table 3 The effect of coating antigen B

Ag	HRP 1K		
	Ab	标准浓度/($\mu\text{g}/\text{kg}$)	OD 值
Ag500	7号兔子	0	2.626
	-1K	10	1.641
	8号兔子	0	2.539
	-1K	10	0.646
Ag2K	7号兔子	0	1.264
	-1K	10	0.418
	8号兔子	0	1.244
	-1K	10	0.282

2.3 酶联免疫检测用抗原抗体确定

在抗原与抗体的配对实验中,包被原 A 和包被原 B 与 7 号和 8 号抗血清均有比较明显的抑制效果,通过进一步对两种包被原和两份抗血清进行筛查,选择最优包被原和抗体用于 ELISA 法的建立。由测定结果可知两份抗血清在包被原 A 包被酶标板时,Oppb 标准品的 OD 值偏低,7 号抗血清在包被原 B 包被酶标板时的抑制浓度的 OD 值达不到要求,抑制率仅为 37.5%,而 8 号抗血清抑制率为 74.6%。8 号兔子的抗血清在 B 包被原包被酶标板时,Oppb 标准品的 OD 值

和抑制浓度的 OD 值都符合农业部的备案,因此以它们作为 ELISA 用抗体和包被原。

3 结论

3.1 本研究采用免疫原 I、II、III 和 IV 同时免疫 8 只新西兰大白兔,免疫量 1 mg/只,四次免疫后进行采血获得抗血清,用饱和硫酸铵盐析法对获得抗血清进行纯化后对抗原抗体配对,初步选择适宜的包被原(A 和 B)和抗血清(7 号和 8 号)。

3.2 用间接酶联免疫法测定 7 号和 8 号抗血清的效价分别为 40500 和 121500。但是效价随评定的标准,测定的条件变化而差异很大,它不是一个标准化的指标。因此,只能作为一个筛选抗血清的指标。

3.3 ELISA 法检测小分子抗原需要充分考虑其抑制效果,进一步实验,选用 B 包被原和 8 号抗体分别作为 ELISA 检测用的包被原和抗体。

参考文献

- [1] 陈笑梅,鲍晓霞.HPLC 法测定鳗鱼、猪肉和对虾中的痢特灵残留[J].分析测试学报,1994,13(3):78-80
- [2] 郭桢,连瑾,吴淑君.动物源性食品中呋喃唑酮及代谢物的检测[J].广东农业科学,2005(5):57-59.
- [3] 侯为道,傅小鲁,张立实.动物性食品中兽药残留的监测与控制[J].中国公共卫生,2003,19(2):241-244.
- [4] 佟恒敏,李艳华,韩建春.我国动物性食品中兽药残留的现状 & 危害[J].龙江畜牧兽医,2003(11):61-621
- [5] 柳其芳.食品中呋喃唑酮的 ELISA 检测法[J].职业与健康,2006,22:1142-1144
- [6] 宋凯.高效液相色谱法同步测定饲料及兽药中 4 中硝基呋喃类药物[J].粮食与饲料工业,2010,3:1142-1144
- [7] 郭桢.动物源性食品中呋喃唑酮及其代谢物的检测[J].广东农业科学,2005,5:1142-1144
- [8] 郝征红,张炳文,邓立刚,赵平娟.高效液相色谱法测定水产品中呋喃唑酮残留量的分析研究[J].现代食品科技,2006,22(1):119-120
- [9] 李敏,何小维.间接竞争 ELISA 法检测呋喃唑酮代谢物[J].现代食品科技,2012,28(4):476-479
- [10] Bradford M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding [J]. Analytical Biochemistry, 1976, 72: 248-254
- [11] 施新猷.医学动物实验方法[M].北京:人民卫生出版社,1980
- [12] 王钦富.免疫学及免疫学检验实验技术[M].北京:中国医药科技出版社,1995:148
- [13] 李国华,陆曙梅.免疫检验技术[M].北京:人民卫生出版社,2002
- [14] 卢锦汉,章以浩.医学生物制品学[M].北京:人民卫生出版社,1995
- [15] 董志伟,王琰.抗体工程[M].北京:北京医科大学出版社,2002
- [16] Akerstrom B, Brodin T, Reis K, et al. Protein G: a powerful tool for binding and detection of monoclonal and polyclonal antibodies [J]. Journal of Immunology, 1995, 135: 2589-2592