

基于混合抗体的酶联免疫分析方法同时检测孔雀石绿和隐孔雀石绿

谢焕龙, 王宇, 徐振林, 杨金易, 肖治理, 王弘, 雷红涛, 孙远明, 沈玉栋

(华南农业大学食品学院, 广东省食品质量安全重点实验室, 广东广州 510642)

摘要: 孔雀石绿是“三致”物质, 常被非法使用于渔业生产。水产品 and 环境中常以孔雀石绿和隐孔雀石绿两种形式同时存在, 均具有强致癌性。但由于二者结构差异较大, 现有的单克隆抗体只能分别检测样品中单一药物的残留量, 难以客观地反映出孔雀石绿和隐孔雀石绿的总残留量。目前同时检测两种结构的免疫分析方法鲜有报道, 本文分别制备了针对孔雀石绿和隐孔雀石绿的高特异性单克隆抗体, 通过研究混合抗体模式建立了可以同时检测两种物质的酶联免疫分析方法, 该方法对孔雀石绿和隐孔雀石绿混合物的半抑制浓度 (50% inhibiting concentration, IC_{50}) 为 3.27 ng/mL, 检测线 LOD (IC_{10}) 为 0.24 ng/mL, 线性范围为 0.62~17.25 ng/mL。本方法的建立对保障水产品安全具有重要意义, 也为混合抗体法同时检测两种或多种残留药物提供了方法借鉴。

关键词: 孔雀石绿; 隐孔雀石绿; 单克隆抗体; 混合抗体

文章篇号: 1673-9078(2015)12-325-330

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2015.12.049

Simultaneous Detection of Malachite Green and Leucomalachite Green Based on Hybrid Antibody ELISA Analysis Method

XIE Huan-long, WANG Yu, XU Zhen-lin, YANG Jin-yi, XIAO Zhi-li, WANG Hong, LEI Hong-tao, SUN Yuan-ming, SHEN Yu-dong

(College of Food Science, Guangdong Provincial Key Laboratory of Food Quality and Safety, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract: Malachite green (MG) is a carcinogenic, teratogenic, and mutagenic chemical that is often illegally used in fishery production. The chemical residues mainly exist in two forms, as MG and its metabolite leucomalachite green (LMG), both of which have severe carcinogenicity, in aquatic products and the environment. Due to the significant structural differences of these two compounds, existing monoclonal antibodies are only able to detect one drug residue in a sample, and cannot accurately reflect the total amount of MG and LMG residues. To date, immunoassay methods for simultaneous detection of MG and LMG residues have rarely been reported owing to the structural differences between the two. Highly specific monoclonal antibodies of MG and LMG were prepared separately, while the indirect competitive enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the simultaneous detection of MG and LMG was developed based on the hybrid antibody model. The half maximal inhibitory concentration (IC_{50}) value of the established method on MG and LMG was 3.27 ng/mL, while the limit of detection (LOD) was 0.24 ng/mL and the linear range was 0.62~17.25 ng/mL. Thus, the establishment of the indirect competitive ELISA (icELISA) method is of great significance for ensuring the safety of aquatic food, in addition to providing a reference method to detect two or more residual chemicals simultaneously by the hybrid antibody assay.

Key words: malachite green; leucomalachite green; monoclonal antibody; hybrid antibody

收稿日期: 2015-03-16

基金项目: 国家自然科学基金 (31371769); 广东省科技计划项目 (2012A020100002, 2013B040402006); 国家星火计划项目 (2012GA780001); 广州市科技计划项目 (2013J4100053)

作者简介: 谢焕龙 (1987-), 男, 硕士研究生, 研究方向: 食品质量安全免疫分析技术相关方向

通讯作者: 沈玉栋 (1977-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 食品质量安全快速检测, 生物分析与传感相关方向

孔雀石绿 (malachite green, MG, 图 1a) 属于三苯甲烷类有机化合物, 过去常被用于制陶业、纺织业、皮革业、食品颜色剂和细胞化学染色剂。近来常有报道其被非法用于治疗水生动物水霉病、腮霉病以及寄生虫病^[1], 也用作消毒剂, 以延长鱼类在长途贩运中的存活时间^[2]。但是, 孔雀石绿潜在的致癌、致畸、致突变对人类健康与环境造成严重危害^[3], 孔雀石绿在生物体内会代谢成为隐孔雀石绿

(leucomalachite green, LMG, 图 1b), 其危害程度比孔雀石绿更大^[4]。美国、日本和中国等国家都将孔雀石绿列为水产品中不得检出药物。

鉴于孔雀石绿及其代谢产物的严重危害性, 建立能够快速同时检测水产品中 MG 和 LMG 残留量的方法具有重大意义。有报道^[5]用 2,3-二氯-5,6-二氰基-1,4-苯醌将 LMG 氧化成 MG, 再用拉曼光谱法测定 MG 的含量, 以达到同时检测 MG 和 LMG 含量的目的, 该方法可用于大量样品的快速筛选, 但样品前处理复杂。Muammer 等^[6]建立了鱼肉中三苯甲烷类药物同时检测的 LC-MS/MS 法, 该方法检测成本高、费时且需要专业的操作人员。免疫分析方法成本低、耗时少、操作简单, 适合大规模样品的同时检测。尽管 MG 和 LMG 分子式非常接近, 但分子模拟显示这两种结构空间上存在很大差异(图 2a), 叠合性差。因此, 目前制备一种可以同时识别 MG 和 LMG 的抗体鲜有报道^[7-8]。ZHANG 等^[9]用化学发光酶联免疫法检测出海鲜中 MG 的含量, 但这不能代表食品中 MG 和 LMG 的总残留量。本研究者分析 LMG 和 MG 空间结构差异的基础上, 分别针对 LMG 和 MG 设计半抗原, 制备单克隆抗体, 最后摸索混合抗体的模式, 建立同时检测 LMG 和 MG 的酶联免疫分析方法, 实现了 LMG 和 MG 的同时检测, 相关研究为首次报道。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

N,N-二甲基苯胺(AR, 中国亭新化工试剂厂); 3-羟苯基甲醛和孔雀石绿(98%, Alfa Aesar 公司); 隐孔雀石绿(91%, 上海安谱科学仪器有限公司); 卵清蛋白(98%)、弗氏完全佐剂与不完全佐剂(99%)、N-羟基琥珀酰亚胺(99%)、二环己基碳二亚胺(98.6%)和牛血清蛋白(98%)(Sigma 公司); HRP 标记的羊抗鼠 IgG 抗体(武汉博士德生物工程有限公司)。

台式高速冷冻离心机 5417R(德国 EPPENDORF 公司); SA-IIA 生物安全工作台(苏州净化设备厂); LRH-150A 型生化培养箱(广东省医疗器械厂); ZF-20D 暗箱式紫外分析仪(郑州长城科工贸有限公司); Multiskan MK3 酶标仪和 Wellwash MK2 洗板机(美国 Thermo 公司); ZHJH-1112 超净工作台(上海智城分析仪器制造有限公司); TC-2323CO₂ 培养箱(SHELDON 公司)。

1.2 试验方法

1.2.1 孔雀石绿和隐孔雀石绿半抗原的合成及

纯化

参考 Pashkovskii 等^[10]人的合成方法, 得到中间体 4-甲酰苯氧基乙酸。取 2.5 g N,N-二甲苯胺于 50 mL 三口烧瓶中, 加入 20 mL 蒸馏水和 5.0 g Amberlyst 15 Resin, 边搅拌边加入 2.0 g 中间体, 氮气保护下回流过夜。冷却, 滴加饱和 NaHCO₃ 溶液, 待气泡消失, 用乙酸乙酯萃取。有机相用饱和 NaCl 溶液洗涤, 无水 Na₂SO₄ 干燥, 减压蒸除溶剂得目标粗产物, 硅胶柱层析法纯化得到隐孔雀石绿半抗原 LMG-H(图 1(c))。

称取 2.5 g 隐孔雀石绿半抗原于圆底烧瓶中, 加入 5 mL 蒸馏水, 再加入 2.5 g PbO₂, 然后滴加 0.5 mL 浓盐酸, 室温下反应过夜。反应产物用甲醇洗脱, 再用硅胶柱层析法纯化得到孔雀石绿半抗原 MG-H(图 1(d))。

1.2.2 人工抗原的合成及鉴定

采用活泼酯法^[11]将 LMG-H 和 MG-H 分别与 BSA 和 OVA 偶联, 制备隐孔雀石绿和孔雀石绿的人工抗原和包被抗原, 经透析及紫外扫描鉴定, 以 1 mg/mL 的浓度分装, -20 °C 保存备用。

1.2.3 隐孔雀石绿和孔雀石绿单克隆抗体的制备

取 8 周龄 Balb/c 雌鼠 3 只/组, 参考余宇燕等^[12]人的免疫方法免疫小鼠。加强免疫三次后, 小鼠尾部取血, 离心取上清, -20 °C 保存。采用方阵滴定法优化包被抗原浓度和抗血清工作浓度, 选择吸光值为 1.0 左右时的抗原浓度和抗体稀释度作为工作浓度。参照 Kane^[13]的方法, 实验采用 SP2/0 为融合骨髓瘤细胞。经过筛选、克隆得到能够稳定分泌抗体的杂交瘤细胞株 LMG-DA4-C7 和 MG-DC4-A6, 并制备腹水。腹水用正辛酸-硫酸铵法纯化, 所得抗体 4 °C 下保存备用。

1.2.4 混合抗体免疫检测技术研究

1.2.4.1 包被抗原的选择及效价测定

采用方阵滴定法以隐孔雀石绿单克隆抗体(Leucomalachite green monoclonal antibody, LMG-McAb)和孔雀石绿单克隆抗体(Malachite green monoclonal antibody, MG-McAb)分别对所制备的两种人工抗原做效价测定, 选择基于两种抗体都有亲和力且亲和力相近的抗原做固相包被抗原。

1.2.4.2 最佳 ELISA 检测条件的优化

在选择好固相包被抗原的基础上, 对包被抗原浓度、抗体浓度、抗体配比进行 ELISA 优化, 通过配制一系列浓度的 LMG 和 MG 标准溶液(0、0.3、1.0、3.0、9.0、27.0、81.0、243.0 ng/mL)及这两种标准溶液等比例混合的标准品进行 icELISA 试验。选择分别

对两种药物检测灵敏度相同或接近的条件进行 icELISA 方法的建立。

1.2.4.3 混合抗体 icELISA 检测标准曲线建立

在上述优化的 ELISA 条件下, 通过 MG 和 LMG 系列浓度混合标准溶液 (0、0.3、1.0、3.0、9.0、27.0、81.0、243.0 ng/mL), 在每个 MG 和 LMG 混合溶液浓度点, 以各不同比例 MG 和 LMG 混合溶液进行平行试验, 并进行四参数函数拟合, 绘制 MG 和 LMG 混合检测 icELISA 标准曲线。

1.2.5 数据分析

每组实验做四个平行, 实验数据用平均值 (\bar{x}) 表示, 采用 Origin 9.0 软件四参数对数函数对平均值进行曲线拟合, 并计算标准偏差。对实验数据进行分析, 该分析方法真实可靠。

2 结果与讨论

2.1 孔雀石绿和隐孔雀石绿单克隆抗体的制备及鉴定

孔雀石绿和隐孔雀石绿都是三苯甲烷类有机物, 分子式只相差一个氢原子, 电子云密度都集中于中心碳原子周围, 属于以碳原子为中心的扇叶片结构。本研究根据 MG 和 LMG 的结构特征, 在中心碳原子苯环的对位上引入含两个碳的羧乙氧基手臂作为半抗原, 分别为 MG-H (图 1c) 和 LMG-H (图 1d)。

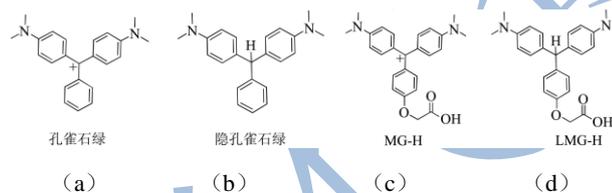


图1 MG 和 LMG 及其半抗原的结构

Fig.1 Chemical structures of MG, LMG, MG-H, and LMG-H

通过计算机模拟获得 MG 和 LMG 的三维空间结构, 发现二者差异很大 (图 2a), MG 三个芳香环所成二面角小, 整体较平; 而 LMG 三个芳香环所成二面角较大, 立体结构明显。因此, 目前现有报道的隐孔雀石绿单克隆抗体和孔雀石绿单克隆抗体只能识别自身原药, 几乎不能交叉识别^[7-8]。为了实现 MG 和 LMG 的同时检测, 必须分别制备单克隆抗体。经分子模拟, MG (图 2b) 和 LMG (图 2c) 与相应的半抗原骨架结构具有很好的叠合性, 手臂的引入没有改变原药骨架空间结构, 说明两种半抗原的设计很好地保留了原药真实结构。

将半抗原与蛋白偶联, 免疫动物并制备单克隆

抗体, 分别获得了 MG 和 LMG 单克隆抗体 DC4-A6 和 DA4-C7。LMG-McAb 的效价为 4×10^4 , IC_{50} 为 2.25 ng/mL, 与 MG 的 CR 为 0.04%; MG-McAb 的效价为 5×10^4 , IC_{50} 为 4.05 ng/mL, 与 LMG 的 CR 为 0.7%。MG-McAb 对 LMG 的低交叉反应率和 LMG-McAb 对 MG 的低交叉反应率证实了上述分子模拟结果: MG 和 LMG 在空间结构上有很大的差异。

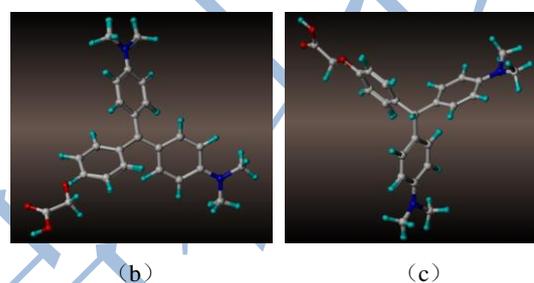
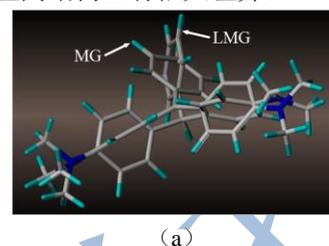


图2 (a) MG 和 LMG 叠加图, (b) MG 与 MG-H 叠加图, (c) LMG 与 LMG-H 叠加图

Fig.2 (a) Overlay plot of MG and LMG, (b) Overlay plot of MG and MG-H, and (c) Overlay plot of LMG and LMG-H

2.2 混合抗体条件优化

混合抗体免疫分析法是一种有效的多残留总量分析方法^[14], 其原理为: 固相包被抗原和残留药物分别竞争抗体, 酶标二抗对两种抗体具有相同的识别能力, 底物颜色的深浅与药物残留量相关。该方法除了一抗为混合抗体外, 其原理与步骤和 icELISA 相同。本研究对混合抗体法实现 LMG 和 MG 的同时检测进行初步探究。

2.2.1 最佳包被抗原的选择

研究曾尝试采用 MG-H-OVA 和 LMG-H-OVA 混合包被模式, 但 MG-H-OVA 对 LMG 和 MG 两种抗体的亲和力差异太大, 造成竞争反应不均一, 灵敏度差异大, 不利于方法建立与优化。因此, 选择了在优化条件下与两种抗体具有近似亲和力 (效价) 的 LMG-H-OVA 为包被抗原 (图 3), 来调控体系具备近似的药物竞争反应能力, 从而保证所建立方法的准确性。同时, 初步选择混合抗体对 LMG、MG 灵敏度相近的抗体配比条件对 LMG-H-OVA 包被浓度进行优化, 结果显示, 当包被浓度为 0.25 $\mu\text{g/mL}$ 时, LMG-H-OVA 与 MG-McAb、LMG-McAb 的亲有效价

具备较好一致性(图3)。因而,将其作为最佳包被条件,进一步优化MG-McAb与LMG-McAb抗体配比。

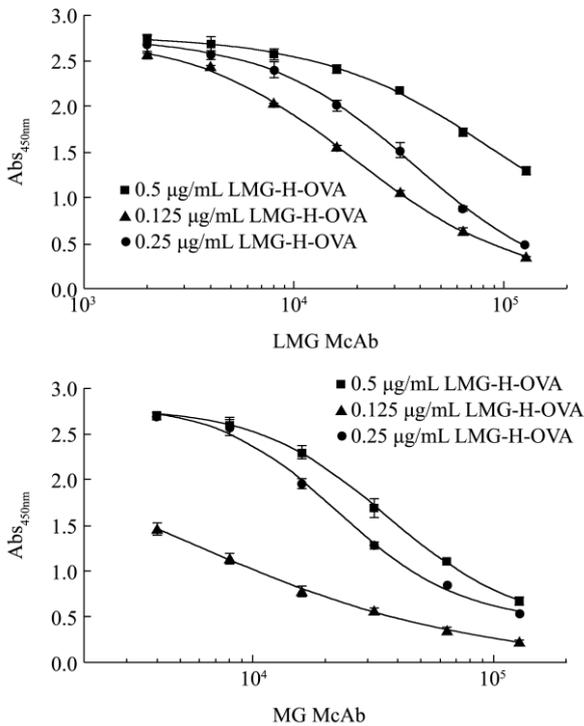


图3 icELISA 检测两种抗体的效价 (n=4)

Fig.3 Titers of MG McAb and LMG McAb by icELISA (n = 4)

2.2.2 最佳抗体浓度配比优化

在0.25 µg/mL LMG-H-OVA包被条件下,对两种抗体的混合浓度配比进行试验优化,以进一步优化两种药物在同种抗原上对两种抗体具备高度一致的竞争抑制反应。实验结果显示,LMG-McAb与MG-McAb在40 K相同稀释倍数下进行等比例混合,可以达到相近的灵敏度,IC₅₀也较为接近(图4a)。而进一步减小抗体浓度至50 K倍等比例混合时,针对MG和LMG的检测灵敏度进一步提高,而且混合抗体对两种药物的竞争抑制效应及灵敏度达到良好一致性(图4b)。但是,当抗体稀释倍数进一步降低为60 K时(图4c),MG的灵敏度提高而LMG的灵敏度降低,可能是在同等固相包被条件下,LMG-McAb与MG-McAb对固相包被抗原的竞争反应存在一定差异造成,当LMG-McAb浓度过低导致MG-McAb与固相抗原的亲合力占据主导,影响LMG的灵敏度。因此,试验选择抗体浓度配比为50 K稀释倍数下的等比例混合进行下一步研究。

2.2.3 混合抗体检测标准曲线建立

将MG-McAb和LMG-McAb稀释50k倍等比混合,以0.25 µg/mL的LMG-H-OVA为包被抗原,检测MG和LMG系列比例和浓度标准溶液,浓度设置为0、0.3、1.0、3.0、9.0、27.0、81.0、243.0 ng/mL,每个

浓度点的药物比例MG/LMG设置为1/0、2/1、4/1、1/4、1/2、0/1作为6组平行实验,绘制混合检测icELISA标准曲线(图5-a)。

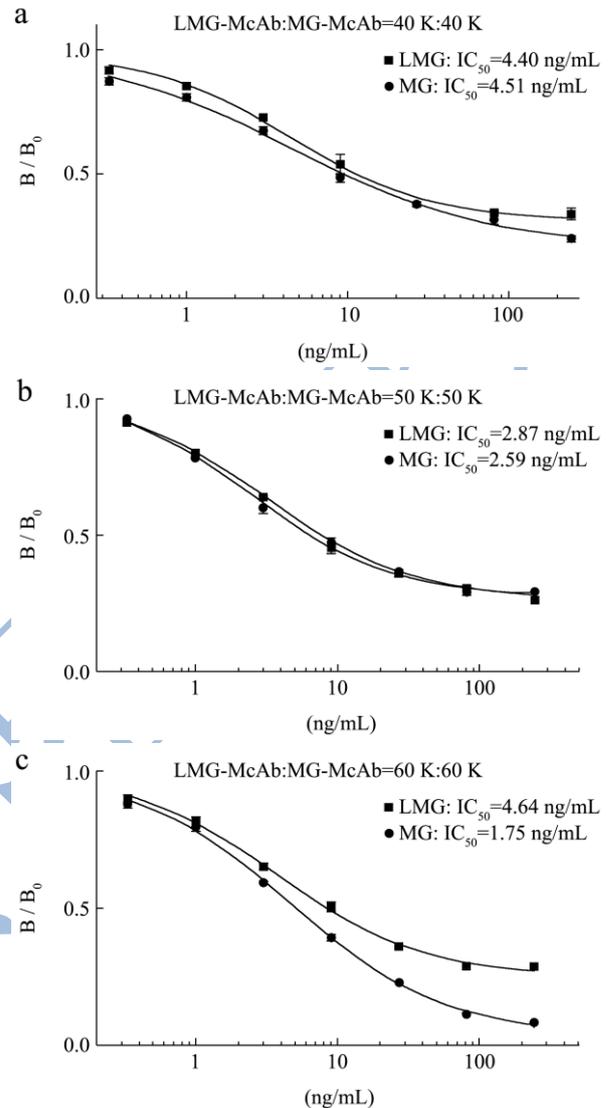


图4 混合抗体浓度优化 icELISA 曲线 (n=4)

Fig.4 icELISA curves of the optimal concentration of the hybrid antibody

注: a-混合抗体稀释40000倍的icELISA曲线, b-混合抗体稀释50000倍的icELISA曲线, c-混合抗体稀释60000倍的icELISA曲线。

拟合结果显示:该方法对MG和LMG混合物检测的IC₅₀分别为3.27 ng/mL,检测线LOD(IC₁₀)为0.24 ng/mL,线性检测范围为0.62~17.25 ng/mL。同时,取S曲线直线段数据进行线性拟合,给出线性回归方程 $y = -0.32015 \log x + 0.74983$ ($R^2 = 0.99249$)(图5a),可用于同一体系中MG和LMG的检测。另外,混合抗体法分别针对MG和LMG的检测灵敏度IC₅₀为2.77 ng/mL和2.43 ng/mL,检测限LOD(IC₁₀)为0.23 ng/mL和0.17 ng/mL,线性范围为0.57~13.47 ng/mL

和 0.45~12.97 ng/mL (图 5b)。

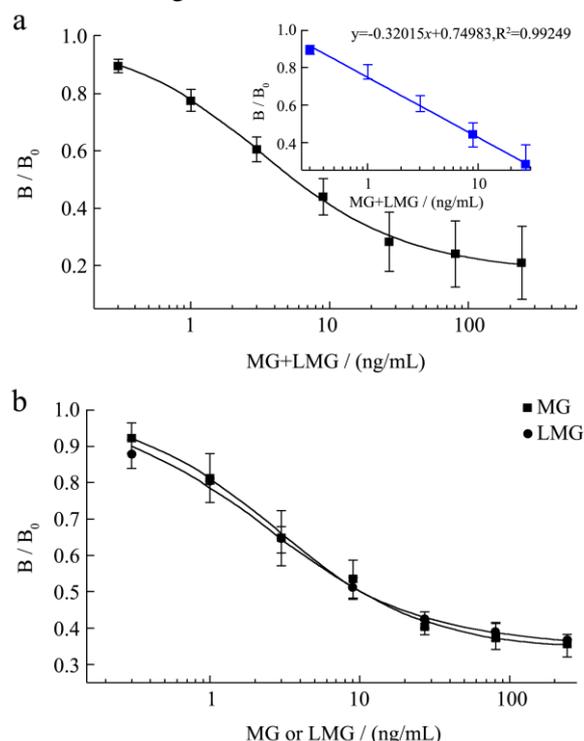


图 5 混合抗体对 MG+LMG 的 icELISA 曲线 (n=6)

Fig.5 icELISA curves of the hybrid antibody on MG and LMG

2.3 交叉反应率

表 1 与类似结构药物的交叉反应率

Table 1 Cross-reactivity of chemicals with a similar structure

交叉反应物	结构式	IC ₅₀ (ng/mL)	CR/%
LMG		2.4	100
MG		2.8	85.7
LCV		42.2	5.7
CV		1701.3	0.1
MGC		1278	0.2
PA		>10000	<0.1

MB		>10000	<0.1
LBG		>10000	<0.1
BG		>10000	<0.1
N,N-二甲基 苯胺		>10000	<0.1
N,N-二乙基 苯胺		>10000	<0.1
苯甲醚		>10000	<0.1

选取 LMG 和 MG 结构类似物及次级结构片段为对象, 考察方法特异性, 结果显示: 其它三苯甲烷类似物和次级结构无明显交叉反应(表 1), 说明该方法可用于 LMG 和 MG 特异性同时检测。

3 结论

基于多残留检测的需求, 实验在制备高特异性单克隆抗体的基础上对混合抗体免疫检测技术进行初步探索, 初步建立了孔雀石绿和隐孔雀石绿残留的特异性同时检测 ELISA 方法, 可用于常规定性或半定量分析, 为开发多残留检测试剂盒和胶体金免疫层析纸条提供参考。

参考文献

- [1] A Eli, O F Briyai, J F N Abowei. A review of some fungi infection in African fish saprolegniasis, dermal mycoses; branchiomyces infections, systemic mycoses and dermatocystidium [J]. Asian Journal of Medical Science, 2011, 3(5): 198-205
- [2] 孙满义, 杨贤庆, 岑剑伟, 等. 水产品中孔雀石绿的研究进展 [J]. 食品工业科技, 2009, 30(2): 312-315
SUN Man-yi, YANG Xian-qing, CEN Jian-wei, et al. Research progress of malachite green in fishery [J]. Science and Technology of Food Industry, 2009, 30(2): 312-315
- [3] 徐向荣, 郝青, 彭加喜, 等. 水产品中残留孔雀石绿研究进展 [J]. 热带海洋学报, 2013, 32(4): 97-106
XU Xiang-rong, HAO Qing, PENG Jia-xi, et al. Recent studies on residual malachite green in aquatic products [J]. Journal of Tropical Oceanography, 2013, 32(4): 97-106
- [4] Stammati A, Nebbia C, Angelis I D, et al. Effects of

- malachite green (MG) and its major metabolite, leucomalachite green (LMG), in two human cell lines [J]. *Toxicology in Vitro*, 2005, 19: 853-858
- [5] Zhang Yuan-yuan, Yu Wan-song, Pei Lu, et al. Rapid analysis of malachite green and leucomalachite green in fish muscles with surface-enhanced resonance Raman scattering [J]. *Food Chemistry*, 2015, 169: 80-84
- [6] Muammer K, Elmas O. O, Oznur K. A rapid and simple method for simultaneous determination of triphenylmethane dye residues in rainbow trouts by liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Journal of Chromatography A*, 2014, 1349: 37-43
- [7] 赵春城,刘一军,徐帮兴,等.抗无色孔雀石绿抗体的制备及鉴定[J].*中国卫生检验杂志*,2009,19(1):39-41
ZHAO Chun-cheng, LIU Yi-jun, XU Bang-xing. et al. Preparation and identification of anti-leucomalachite green antibodies [J]. *Chinese Journal of Health Laboratory Technology*, 2009, 19(1): 39-41
- [8] 李晓丽,陈雪岚,刘春梅,等.孔雀石绿单克隆抗体的制备及直接竞争 ELISA 方法的建立[J].*食品科学*,2009,32(24): 283-286
LI Xiao-li, CHEN Xue-lan, LIU Chun-mei, et al. Preparation of Monoclonal Antibody of Malachite Green and Establishment of Direct Competitive ELISA [J]. *Food Science*, 2009, 32(24): 283-286
- [9] Zhang Yan, Yang Jin-yi, Lei Hong-tao, et al. Development of chemiluminescent enzyme immunoassay for the determination of malachite green in seafood [J]. *Food and Agricultural Immunology*, 2015, 26(2): 204-217
- [10] Pashkovskii F S, Shchukina E M, Gribovskii M G, et al. Heterocyclic analogs of prostaglandins: IV. Synthesis of 3,7-interphenylene 3,10(11)-dioxo-13-azaprostanoids and 9-oxa-7-azaprostanoids based on tetronic acid and aromatic aldehydes [J]. *Russian Journal of Organic Chemistry*, 2008, 44(5): 657-670
- [11] Inan M, Aryasomayajula D, Sinha J, et al. Enhancement of protein secretion in *Pichia pastoris* by overexpression of protein disulfide isomerase [J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2006, 93(4): 771-778
- [12] 余宇燕,陈莉,卢玲,等.动物性食品中诺氟沙星残留的荧光免疫分析方法研究[J].*现代食品科技*,2012,28 (7):856-858
YU Yu-yan, CHEN Li, LU Ling, et al. Development of Fluorescence Immunoassay for Norfloxacin Residue in Animal Derived Food [J]. *Modern Food Science and Technology*, 2012, 28(7): 856-858
- [13] 甄玉萍,裴世春,高建伟.基于 HTS-ELISA 的单克隆抗体分泌杂交瘤细胞筛选技术进展[J].*食品安全质量检测报*, 2014, 5(7):1960-1964
ZHEN Yu-ping, PEI Shi-chun, GAO Jian-wei. Progress of monoclonal antibody secretion hybridoma cell rapid screening technology based on HTS-ELISA [J]. *Journal of Food Safety and Quality*, 2014, 5(7): 1960-1964
- [14] 吴雅欣.有机磷农药多残留 ELISA 方法探讨[D].北京:中国农业科学院,2009
WU Ya-xin. Preliminary study on enzyme-linked immunosorbent assay for multi-residue detection of organic phosphorus pesticides [D]. Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2009