

孔雀石绿多克隆抗体的制备与筛选

孙晶玮, 胡章立

(深圳大学生命科学学院, 海洋生物资源与生态环境重点实验室, 广东深圳 518060)

摘要: 设计并成功合成了三种孔雀石绿半抗原, 所有半抗原均采用活化酯法分别与血匙兰蛋白(KLH)偶联制备成免疫抗原, 与卵清蛋白(OVA)偶联制备成包被抗原。利用所制备的三种免疫原免疫新西兰大耳白兔都获得了高效价的抗孔雀石绿抗体, 并将每一种抗体都与三种包被抗原进行组合配对, 通过间接竞争酶联免疫吸附检测(ELISA)方法筛选出最佳的抗体-包被抗原组合, 筛选出的抗体采用 Sepharose FF-ProteinA 亲和层析柱纯化, 采用间接 ELISA 法测定效价及鉴定特异性。经测定筛选出的抗体效价达到 1:12000, IC₅₀ 值为 0.65 ng/mL, 交叉反应表明该抗体有较好的特异性, 与结构类似物结晶紫的交叉反应率为 18.73%, 与隐性孔雀石绿及隐性结晶紫的交叉反应率低于 10%。本研究为建立快速检测食品中孔雀石绿残留的免疫分析方法奠定了基础。

关键词: 孔雀石绿; 半抗原; 多克隆抗体; 酶联免疫吸附检测

文章编号: 1673-9078(2013)11-2712-2716

Preparation and Selection of Polyclonal Antibodies against Malachite Green

SUN Jing-wei, HU Zhang-li

(Shenzhen Key Laboratory of Living Marine Resources and Ecological Environment, College of Life Science, Shenzhen University, Shenzhen 518060, China)

Abstract: Three haptens for malachite green were designed and synthesized. Then the haptens were separately coupled to keyhole limpet hemocyanin (KLH) as immunogens and coupled to ovalbumin (OVA) as coating proteins by using active ester method. New Zealand white rabbits were immunized with the three immunogens, and all produced high titer antisera antibodies against malachite green. All the antibodies and the coating proteins were screened and then the optimal antibody-coated antigen combination was obtained. The selected polyclonal antiserum was purified by Sepharose FF-Proteins A affinity chromatography. The titer and characteristic were determined by indirect ELISA. The results showed that the antibody titer and IC₅₀ reached 1:12000, and 0.65 ng/mL, respectively. And the antibody had good specificity. The cross-reactivity was less than 10% for leucomalachite green and leucocrystal violet but the antibody exhibited significant cross reactivity with crystal violet (18.73%). The study provided basis for rapid detecting malachite green residues in food by immune analysis.

Key words: malachite green; haptens; polyclonal antibodies; enzyme-linked immunosorbent assay

孔雀石绿是一种三苯甲烷类染料, 极易溶解于水, 水溶液呈蓝绿色, 具有抗菌杀虫作用, 曾被广泛应用于水产养殖中^[1], 也有人在水产品运输途中及存放过程使用其作为消毒剂来延长水产品的存活时间。随着对孔雀石绿研究的深入, 发现其具有高毒性、高残留和致癌、致畸、致突变作用^[2-4], 鉴于此, 国内外对其残留量制定了严格标准, 欧盟委员会 2004 年规定孔雀石绿和无色孔雀石绿总量的检出限 2

μg/kg, 日本于 2006 年实施的《肯定列表制度》, 其中规定孔雀石绿不得检出。由于孔雀石绿价格低廉, 对于预防和治疗水产品的水霉病和鳃霉病等效果明显^[5], 不少养殖户仍在违规使用, 因此开展食品中孔雀石绿的残留监控具有十分重要的意义。

目前国内外已报道的检测孔雀石绿残留的方法主要是高效液相色谱法及液质联用^[6-8], 这些方法虽然灵敏、准确, 但也存在着样品前处理过程复杂、不适合大批量样品筛选的缺陷。目前, 较为先进的兽药残留检测法是酶联免疫吸附分析(ELISA), 因为它具有快速、简便、灵敏度高、特异性强等优点, 近年已在国内外被广泛应用^[9]。目前虽然已有孔雀石绿半抗原制备的报道, 但多是在非取代苯环邻位或对位上引入一个甲酰基^[9-10]或氨基^[11], 未有其它取代基团半抗原的

收稿日期: 2013-07-15

基金项目: 深圳市科技计划项目(JSA200904011804A); 国家自然科学基金资助项目(31301481)

作者简介: 孙晶玮(1979-), 女, 博士, 博士后, 研究方向为食品安全检测

通讯作者: 胡章立(1964-), 教授, 博导, 研究方向为生态环境

报道。

本试验设计合成了三种不同长度间隔臂的孔雀石绿半抗原，并采用活化酯法偶联蛋白制备人工抗原，经动物实验表明合成的三种人工抗原均能促使免疫动物产生针对孔雀石绿的抗体，并对所得的三种抗体进行筛选，为建立快速的孔雀石绿残留免疫分析方法奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

匙孔血蓝蛋白 (KLH)、牛血清白蛋白 (BSA)、卵清蛋白 (OVA)、弗氏完全佐剂、弗氏不完全佐剂、N-羟基琥珀酰亚胺 (NHS)、1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺 (EDC) 等其他试剂均购于 sigma 公司；孔雀石绿标准品购于 Dr.Ehrenstorfer 公司。

1.2 仪器与设备

AV-300 核磁共振仪购自德国 Bruker 公司；96 孔酶标板购自丹麦 Nunc 公司；酶标仪购自美国 Molecular Devices 公司；快速蛋白层析仪购自美国 Amersham Biosciences 公司。

1.3 酶联免疫测定(ELISA)用溶液

磷酸盐缓冲液 (PBS, 0.01 mol/L, pH 7.4)、碳酸盐缓冲液 (CB, 0.05 mol/L, pH 9.6)、洗涤液 (PBST, 0.01 mol/L, pH 7.4, PBS-0.5 mol/L 吐温 20)、封闭液 (1% BSA-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)。

1.4 方法

1.4.1 半抗原 H₁ 的合成

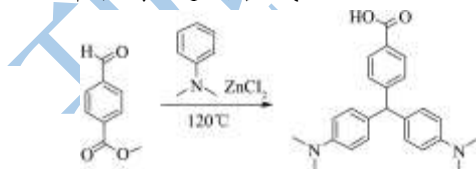


图 1 半抗原 H₁ 的合成路线

Fig.1 The synthetic route for haptens H₁

准确称取 1.8 g 对-甲酰基苯甲酸甲酯和 3.7 g 氯化锌于 50 mL 烧瓶中，然后加入 5.3 g N,N-二甲基苯胺，加热到 120 °C，搅拌反应 4 h，乙酸乙酯萃取，硅胶柱层析纯化 (乙酸乙酯:正己烷 = 1:2) 得到目标化合物 4 [双(4-二甲氨基)苯基]甲基苯甲酸，产率 10%。

1.4.2 孔雀石绿半抗原 H₂ 和半抗原 H₃ 的合成

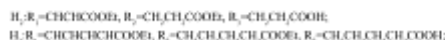


图 2 半抗原 H₂ 和 H₃ 的合成路线

Fig.2 The synthetic routes for haptens H₂ and H₃

准确称取 10 g 对-羟基苯甲酸溶于二氯甲烷中，0 °C 加入 7.8 mL 溴化苄及 9.3 mL 三乙胺，室温搅拌反应 1~2 d，0 °C 加入饱和氯化铵淬灭反应，二氯甲烷萃取，浓缩，硅胶柱纯化得到化合物 2；将 4.1 g 该产物溶于二氯甲烷中，0 °C 加入 7.9 g 三氯异氰尿酸、2.86 g NaHCO₃ 及 2,2,6,6-四甲基哌啶氧化物，反应 5 min，硅胶柱纯化，洗脱液浓缩得到化合物 3；称取 4.08 g 该产物溶于二氯甲烷中，加入 9.1 g 三苯基磷乙酯的 Wittig 试剂，常温搅拌，TLC 监测，浓缩，硅胶柱纯化得到化合物 4；将 5.27 g 化合物 4 溶于无水甲醇中，加入两药勺钯碳，氢气保护，常温搅拌反应 4 h，TLC 监测，加入少量乙酸乙酯，硅胶柱纯化，浓缩得化合物 5；将 3.8 g 化合物 5 溶于无水四氢呋喃，0 °C 加入 3.37 mL 氯甲酸异丁酯及 4.8 mL 三乙胺，搅拌反应 1 h，加入 3.25 g 硼氢化钠，继续搅拌反应 3 h，0 °C 加入 0.1 M HCl 淬灭反应，浓缩，乙酸乙酯萃取，浓缩，硅胶柱纯化得到化合物 6；将 1.4 g 该化合物溶于二氯甲烷中，0 °C 加入 3.1 g 三氯异氰尿酸、1.1 g NaHCO₃ 及 2,2,6,6-四甲基哌啶氧化物，反应 5 min 后迅速过硅胶柱，得到化合物 7；称取 1.22 g 氯化锌和 0.6 g 化合物 7 于 50 mL 烧杯中，加入 3 mL N,N-二甲基苯胺，加热到 120 °C，搅拌反应 1 d，TLC 监测，乙酸乙酯萃取，硅胶柱纯化 (甲醇:二氯甲烷= 1:10) 得到半抗原 2，产率 25%。

用类似的方法合成半抗原 3，产率为 25%。

1.4.3 孔雀石绿人工抗原的合成

分别将三种半抗原采用活化酯法^[12]与载体蛋白 KLH 或 OVA 偶联，制备人工免疫原和人工包被原。具体方法如下：称取 0.5 mmol 半抗原，0.625 mmol NHS 溶于 3 mL 无水四氢呋喃，在 N₂ 保护下，逐滴加入溶于 0.625 mmol DCC 的 4 mL 无水四氢呋喃溶液，边滴边搅拌，室温下搅拌反应 4 h，得到目标产物。称取 10 mg 载体蛋白溶于 2 mL pH 9.3 的 KH₂PO₄ 中，另取上述半抗原酯化物溶解于 0.1 mL DMF 中，冰浴下逐滴加到蛋白溶液中，边滴边摇匀，4 °C 反应过夜，将

反应液装入透析袋中, 在 4 °C 条件下 0.01 mol/L PBS (pH 7.4) 溶液透析 3 d, 加入 10% 叠氮钠-20 °C 保存。

1.4.4 动物免疫

免疫选择六只雌性新西兰大白兔(每种免疫原免疫两只), 体重约 1.5 kg, 按照常规免疫程序免疫 6 次。准确称取 0.2 mL 人工抗原(5 mg/mL) 溶于 0.3 mL 0.9% 的 NaCl 溶液, 与等量的弗氏完全佐剂乳化, 采用腋下多点注射进行初次免疫, 加强免疫用不完全佐剂, 免疫剂量减半, 分别于初次免疫后 2 周、4 周、8 周、12 周、16 周共加强免疫五次, 分别于第三、四、五、六次免疫完后 7~10 d, 由兔子的耳缘静脉取血, 进行效价检测。当效价达到较高平台期时采用心脏取血法取全血。用 Sepharose FF-Protein A 纯化抗血清, 所得抗体 PBS 4 °C 透析 3 d 后备用。

1.4.5 抗体效价及特异性的测定

包被原用 CB 稀释后包被在酶标板上, 包被量为 1 μg/well, 室温孵育过夜; PBST 洗涤三次, 加入 200 μL/well 封闭液, 室温下封闭 1h; PBST 洗板三次后, 加入 100 μL/well PBS 梯度稀释的抗血清, 或标准品与抗血清稀释液各 50 μL/well, 室温孵育 1h; 洗板四次后, 加入 100 μL/well 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/well 新鲜配制的底物液进行显色反应, 20 min 后加入 50 μL/well 终止液; 测定每孔吸光度值(450 nm 为测定波长), 选择吸光度值在 0.7~1.2 范围内的抗血清稀释倍数, 即为抗血清效价, 由抑制率得出抗体的特异性。

1.4.6 抗体的筛选

以三种包被原和所制得的三种抗体为研究对象进行正交试验, 包被原浓度设为 1 μg/well, 分别将各抗体稀释至最适浓度, 测定孔雀石绿标准品浓度为 10 ng/ml 时的抑制率。

1.5 数据分析

以间接竞争 ELISA 法, 得到不同孔雀石绿浓度的吸光度值, 根据吸光度值计算抑制率, 抑制率计算公式如下:

$$IC/\% = \left[1 - \frac{A_{\text{样品}} - A_{\text{空白}}}{A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}}} \right] \times 100 \quad (1)$$

注: IC/%-孔雀石绿对抗原抗体结合反应的抑制率; A_{对照}-不含孔雀石绿的平均吸光度值; A_{样品}-含有孔雀石绿标准液或样液的平均吸光度值; A_{空白}-不加酶标及孔雀石绿标准液的平均吸光度值。

以孔雀石绿浓度对数值及相应抑制率绘制标准曲线。X 轴为孔雀石绿浓度对数, Y 轴为抑制率, 标准曲线是典型的 S 型。

方法的特异性测定用抗体与其结构类似物的交叉反应程度进行评价, 以抑制抗体最大结合率的 50% 所需目标分析物的浓度 IC₅₀(孔雀石绿) 与所需各种结构类似化合物的浓度 IC₅₀(其它兽药) 之比的百分数表示, 交叉反应越小则证明方法的特异性越高。交叉反应率的公式如下:

$$\text{交叉反应率}/\% = IC_{50(\text{孔雀石绿})} / IC_{50(\text{其他兽药})} \times 100 \quad (2)$$

2 结果与分析

2.1 孔雀石绿半抗原的设计合成

小分子物质本身不具有免疫原性, 必须与载体蛋白偶联合成人工抗原, 因而制备针对小分子物质的抗体的关键是半抗原的设计合成。适合的半抗原应尽可能的保留待测物的结构特征^[3]。从孔雀石绿的结构分析, 电子云密度较高的二甲氨基取代的两个苯环系统可能是产生特异性抗体的决定性特征结构区。因此, 半抗原设计中必须要保留这部分特征结构, 而在远离该药物特征结构区的非取代苯环的对位上衍生化与载体蛋白偶联的间隔臂。目前虽然已有孔雀石绿抗体制备的报道^[9-11], 但多是在非取代苯环邻位或对位上引入一个甲酸基或氨基。本研究在总结前人成果基础上的, 设计合成孔雀石绿半抗原时, 在非取代苯环的对位引入吸电子性质的羧基, 同时设计了长短不一的直链间隔臂, 其中半抗原 H₂ 和 H₃ 的结构及合成方法未见报道。

2.2 孔雀石绿半抗原的表征

对设计合成的三个半抗原进行了核磁共振分析, 结果表明三个半抗原合成成功, 其表征数据及相应谱图如下:

半抗原 H₁: ¹H-NMR (300 MHz, d₆-CDCl₃) δ: 2.87 (s, 4H, COCH₂CH₂CO), 2.92 (s, 12H, CH₃), 5.46 (s, 1H, CH), 6.68 (d, 4H, ArH), 6.96 (d, 4H, ArH), 7.30 (d, 2H, ArH), 8.04 (d, 2H, ArH)。

半抗原 H₂: ¹H-NMR (500 MHz, d₆-CDCl₃) δ: 2.81 (s, 4H, COCH₂CH₂CO), 2.90 (t, 2H, CH₂), 2.93 (s, 12H, CH₃), 3.05 (t, 2H, CH₂), 5.36 (s, 1H, CH), 6.68 (d, 4H, ArH), 7.01 (d, 4H, ArH), 7.12 (q, 4H, ArH)。

半抗原 H₃: ¹H-NMR (500 MHz, d₆-CDCl₃) δ: 2.624 (s, 4H, COCH₂CH₂CO), 2.80 (s, 4H, CH₂), 2.88 (s, 12H, CH₃), 2.93 (t, 2H, CH₂), 5.34 (s, 1H, CH), 6.67 (d, 4H, ArH), 6.99 (d, 4H, ArH),

7.06 (d, 4H, ArH)。

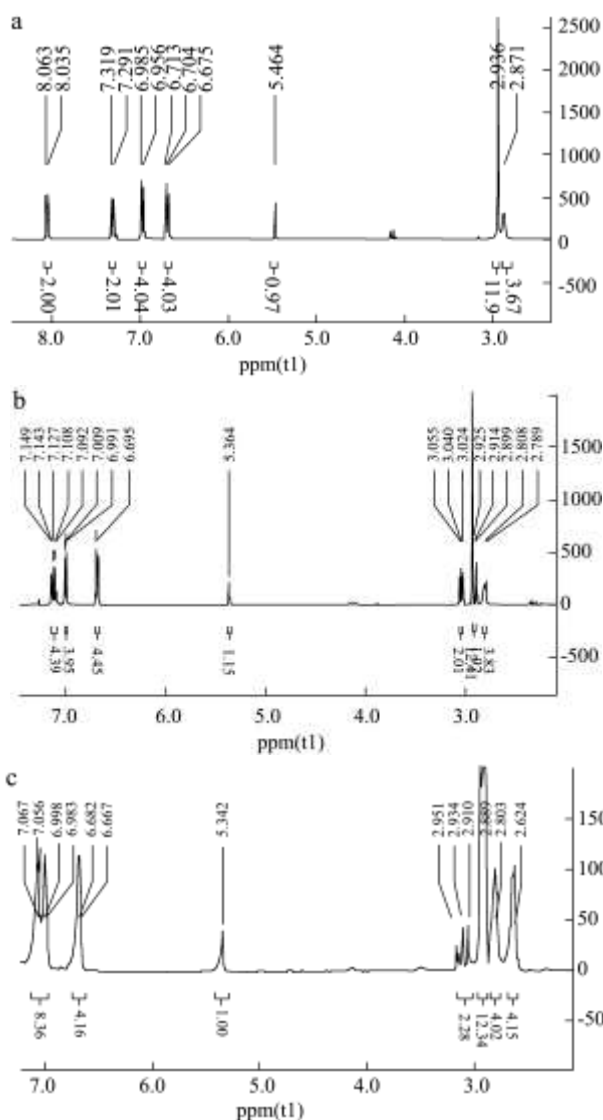


图3 半抗原活化酯的核磁谱图

Fig.3 The NMR spectra for the active ester of hapten H₁, H₂ and H₃

注：a-半抗原1活化酯，b-半抗原2活化酯，c-半抗原3活化酯。

2.3 抗血清效价的测定

由图4可知免疫所制得的抗血清在第5次免疫后达到平台期，所获得的三种抗血清效价均在40000以上，证明抗血清中确实含有抗孔雀石绿的抗体，且本试验所用包被原与免疫原具有不同载体，这就消除了抗血清中抗KLH抗体对试验可能造成的假阳性结果，从而更真实地反应出抗血清中存在抗孔雀石绿抗体。试验结果表明抗孔雀石绿抗体已成功制备。

2.4 抗体的筛选

从表1中可以看出，采用H₁抗体所建立的ELISA对

同等浓度待测物的抑制率较其它两种抗体高，这可能是因为半抗原H₁的分子结构更类似于孔雀石绿，H₁抗体对孔雀石绿分子的识别能力较高。同时采用H₁抗体与H₃-OVA包被原组合所建立的ELISA，对同等浓度待测物的抑制率明显高于其他组合，这可能是因为H₃半抗原的空间结构与孔雀石绿相差相对较大，因而在H₃-OVA与低浓度孔雀石绿竞争抗体时能得到较好的灵敏度。因此最终选择H₁抗体与H₃-OVA进行后续试验研究。

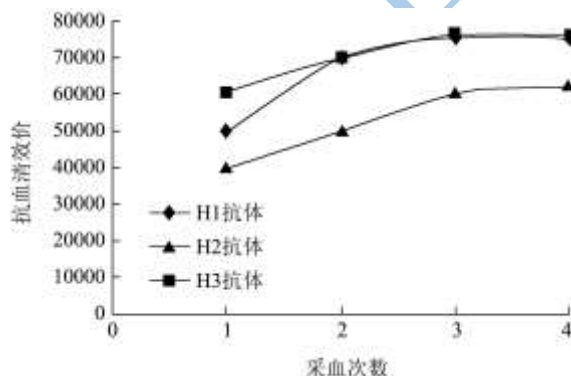


图4 三种抗血清效价

Fig.4 Titer of the antiserum

表1 抗体亲和性 (n=3)

Table 1 The affinity of antiserum (n=3)

包被原	抗体		
	H ₁ 抗体 10 ng/mL 的 抑制率/%	H ₂ 抗体 10 ng/mL 的 抑制率/%	H ₃ 抗体 10 ng/mL 的 抑制率/%
H1-OVA	65.24±4.61	59.27±4.01	65.37±3.61
H2-OVA	67.72±5.33	60.53±3.52	62.05±4.14
H3-OVA	74.34±6.15	65.07±4.24	62.30±2.94

2.5 筛选出抗体效价的测定

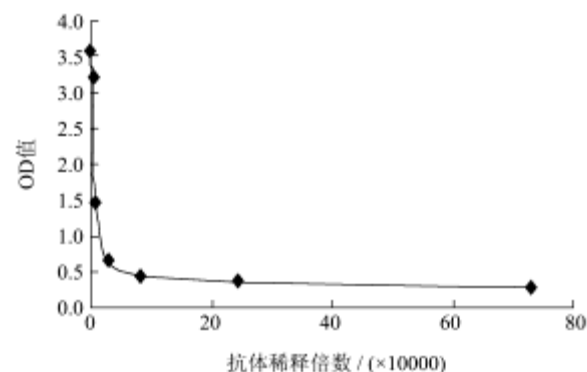


图5 筛选出的抗体效价

Fig.5 Titer of the selected antibody

选择H₃-OVA作为最佳包被抗原，用H₁-KLH免疫得到的兔血清做间接ELISA实验。由测定结果（图5）可知抗孔雀石绿抗体的效价最高为1:12000，结果表明抗体可能识别了包被抗原上孔雀石绿的部分结构，因

而异源抗原抗体组合较同源抗原抗体组合(图1)的效价低。

2.6 间接竞争ELISA标准曲线

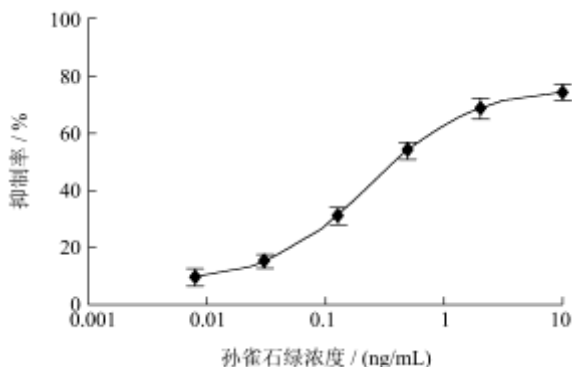


图6 H₁抗体对孔雀石绿的抑制率曲线

Fig.6 Inhibitory ratio curve of the H₁ antibody against malachite green

抑制率为50%时所对应的药物浓度即为IC₅₀(半抑制率),用来衡量抗体的灵敏度。图6孔雀石绿间接竞争ELISA方法的标准曲线,呈典型的S曲线。由图可知,标准曲线的IC₅₀平均为0.65 ng/mL,结果低于同类文献的相关报道,如2007年龚鹏飞^[13]报道的IC₅₀为18.5 μg/L。说明本试验所制得的抗孔雀石绿抗体具有较高的灵敏度。

2.7 抗体的特异性

为了衡量所得抗体的特异性,研究了所制备抗体对与孔雀石绿结构相似的其它三苯甲烷类物质之间的亲和性。

表2 抗体交叉反应试验结果(n=3)

Table 2 The cross reactivity of the antibody against malachite green

药物	IC ₅₀ (ng/mL)	交叉反应率 CR/%
孔雀石绿	0.65±0.08	100
隐孔雀石绿	6.88±0.65	9.45
结晶紫	3.47±0.31	18.73
隐性结晶紫	8.92±0.82	7.29

由表2结果可知,此抗体与结晶紫表现出18.73%的交叉反应,与其它两种类似物的交叉反应率均小于10%,表明此抗体表现出较好的特异性。

3 结论

本试验成功合成了三种孔雀石绿半抗原,通过活化酯法制备出三种人工抗原,经过动物免疫制得了针对三种抗原的高效价抗体,通过三种抗原及所得的三种抗体的正交试验表明以H₃-OVA为包被原,H₁抗体

为检测抗体时对目标孔雀石绿的抑制率最高。试验结果表明已制得高质量抗孔雀石绿抗体,从而为建立简便、快速、灵敏的检测食品中孔雀石绿残留的免疫分析方法奠定了基础。

参考文献

- [1] 李宁.孔雀石绿对健康的影响[J].国外医学卫生学分册,2005,32(5):262-264
Li Ning. Effect of Malachite Green on Health [J]. Foreign Medical Sciences (Section Hygiene), 2005, 32(5):262-264
- [2] White CR, Davies SJ, Henry TB. Malachite Green Toxicity and Effects on Reproductive Success in Zebrafish Danio Rerio [J]. Zebrafish, 2012, 9(3), 135-139
- [3] Culp SJ, Beland FA, Heflich RH, et al. Mutagenicity and Carcinogenicity in Relation DNA Adduct Formation in Rats Fed Leucomalachite Green [J]. Mutation Research, 2002, 506-507: 55-63
- [4] Khodabakhshi A, Amin MM. Determination of Malachite Green in Trout Tissue and Effluent Water from Fish Farm [J]. International Journal of Environmental Health Engineering, 2012, 1(1): 51-56
- [5] 翟毓秀,张翠,宁劲松,等.水产品中的孔雀石绿残留及其研究概况[J].海洋水产研究,2007,28(1):101-108
Zhai Yu-xiu, Zhang Cui, Ning Jin-song, et al. Survey of Malachite Green Residue in Aquatic Product [J]. Marine Fisheries Research, 2007, 28(1): 101-108
- [6] 刘少彬,王耀,邹滩力,等.水产品中孔雀石绿测定方法的改进[J].现代食品科技,2010,3:314-330
Liu Shao-bin, Wang Yao, Zou Wei-li, et al. Improved Method for Determination of Malachite Green in Aquatic Product [J]. Modern Food Science and Technology, 2010, 3: 314-330
- [7] Chen G, Miao S. HPLC Determination and MS Confirmation of Malachite Green, Gentian violet, and their Leucometabolite Residues in Channel Catfish Muscle [J]. Agric. Food Chem., 2010, 58(12): 7109-7114
- [8] Hashimoto JC, Paxchoal JA, Queiroz SC, et al. A Simple Method for the Determination of Malachite Green and Leucomalachite Green Residues in Fish by a Modified QuEChERS Extraction and LCMSMS [J]. AOAC Int, 2012, 95(3): 913-922
- [9] 沈玉栋,王宇,孙远明,等.隐孔雀石绿半抗原与全抗原设计、合成及鉴定 [J].食品科学,2008,29(7):263-266
Shen Yu-dong, Wang Yu, Sun Yuan-ming, et al. Design, Synthesis and Identification of Leucomalachite Green Hapten and Complete Antigens [J]. Food Science, 2008, 29(7):

- 263-266
- [10] Xu HY, Chen XL, Guo L, et al. Monoclonal Antibody Based Enzyme Linked Immunosorbent Assay for Detection of Total Malachite Green and Crystal Violet Residues in Fishery Products [J]. *International Journal of Environment Analytical Chemistry*, 2013, 93(7): 959-969
- [11] 赵春城,徐子寅,刘一军,等.免疫分析方法检测无色孔雀石绿研究 I 人工抗原的合成[J].*中国食品卫生杂志*,2009, 21(1):23-27
- Zhao Chun-cheng, Xu Zi-ran, Liu Yi-jun, et al. Study on Leucomalachite Green Determinated by Immunoassay I Preparation of Immun-Antigen of Leucomalachite Green [J]. *Chinese Journal of Food Hygiene*, 2009, 21(1): 23-27
- [12] Moreno MJ, Abad A, Montoya A. Production of Monoclonal Antibodies to the N-Methylcarbamate Pesticide Propoxur. [J] *Agric. Food Chem.*, 2001, 49: 72-78
- [13] 龚朋飞,王权,陈永军.孔雀石绿单克隆抗体的制备及其鉴定 [J].*中国兽医科学*,2007,37(4):359-362
- Gong Peng-fei, Wang Quan, Chen Yong-jun. Preparation and Identification of Monoclonal Antibody against Malachite Green [J]. *Veterinary Science in China*, 2007, 37(4): 359-362