

杨伟群, 管月清. 氯霉素人工多克隆抗体的制备、纯化与特性分析[J]. 江苏农业学报, 2015, 31(1): 192-196.

doi:10.3969/j.issn.1000-4440.2015.01.030

氯霉素人工多克隆抗体的制备、纯化与特性分析

杨伟群, 管月清

(台州职业技术学院生物与化学工程学院, 浙江 台州 318000)

摘要: 通过合成氯霉素完全抗原, 制备氯霉素的多克隆人工抗体, 建立氯霉素(CAP)的免疫学检测方法。采用重氮法合成氯霉素完全抗原, 以氯霉素牛血清白蛋白(CAP-BSA)免疫大耳白家兔, 用ELISA方法进行鉴定和特性分析。结果显示, 该抗血清与链霉素、青霉素、四环素等常见抗生素的交叉反应率均小于2.1%, IC_{50} 为13.65 ng/ml, 检测限达到1.01 μ g/L。获得了选择性好、特异性较高的氯霉素特异抗体, 可用于氯霉素的快速定量检测。

关键词: 氯霉素; 多克隆抗体; 酶联免疫吸附法

中图分类号: S851.4*3

文献标识码: A

文章编号: 1000-4440(2015)01-0192-05

Preparation, purification and characterization of polyclonal antibody against chloramphenicol

YANG Wei-qun, GUAN Yue-qing

(School of Biological & Chemical Engineering, Taizhou Vocational & Technical College, Taizhou 318000, China)

Abstract: Chloramphenicol (CAP) is an inexpensive and effective broad-spectrum antibiotic that has been used in veterinary practice to treat septicaemia, pulmonary, urinary and digestive infections. However, two types of CAP-induced toxicity in humans have been identified, due to its side effects in humans, especially fatal bone marrow depression and aplastic anemia. The use of CAP for treatment of food-producing animals is prohibited in many countries including China. The detection limit of the analytical methods is crucial and decisive to control CAP residues at trace levels. Therefore, it is necessary to develop sensitive methods for determining CAP residues in animal tissues. But traditional detecting methods such as gas chromatography (GC), liquid chromatography (LC), GC-mass spectrometry (MS) or LC-MS-MS been described in recent years are time consuming and require extensive clean-up steps, sophisticated equipment and well-trained personnel. Thus, there is a pressing need for the development of a rapid, sensitive and economic alternative screening method to detect the CAP residues. In this study, diazotization reaction were performed to synthesize the immunogen and coating antigen of chloramphenicol. White rabbits were immunized with BSA-CAP-HS, and the characteristics of polyclonal antibody (pAb) was identified by indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). ELISA results showed that the cross-reactivities of the anti-serum with streptomycin, penicillin, tetracycline, were less than 2.1%, and the hemi-inhibitory concentration (IC_{50}) was 13.65 ng/ml. Recovery test revealed that the detection limit for CAP was 1.01 ng/ml. The polyclonal antibody achieved in this study can be used for the sensitive and quantitative analysis of chloramphenicol.

Key words: chloramphenicol; polyclonal antibody; enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

收稿日期: 2014-10-15

基金项目: 浙江省科技计划项目(2013C37045)

作者简介: 杨伟群(1973-), 女, 江西九江人, 高级实验师, 主要研究方向为环境分析化学。(E-mail) yangwq112@sina.com

氯霉素(Chloramphenicol, CAP)是一种广谱抗生素, 因其效高价廉, 曾广泛应用于预防和治疗动物疾病, 在水产养殖业也曾被大量使用^[1]。

但研究结果证实,氯霉素对机体有很大的毒副作用^[2],会引起动物体内正常菌群失调,同时可能引起机体的再生障碍性贫血和粒细胞缺乏症等疾病。欧美发达国家对氯霉素残留限量标准都有严格规定^[2],中国农业部在2002年公布的《食品动物禁用的兽药及其他化合物清单》也规定氯霉素被禁止用于食品动物^[3]。因此,建立氯霉素残留的ELISA快速定量检测方法,对于畜产品的安全控制具有重要意义。

常用氯霉素残留检测方法主要有仪器分析法、免疫化学法和微生物法^[4-6]。仪器分析法中气相色谱法和液相色谱法具有精密度较高、结果可靠等优点^[7-8],但存在前处理过程复杂,耗时长,仪器操作较为繁琐等缺点,不适合用于大规模的样品分析检验。免疫化学法具有操作简便、费用低廉、适用于对大量样品进行筛检的特点^[9-10],其中高特异性抗体的制备,是提高免疫检测方法灵敏度的基础。本研究拟采用重氮化法制备出氯霉素完全抗原,获得氯霉素高特异性多克隆抗体,为建立氯霉素胶体金试纸或ELISA试剂盒等现场快速检测奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 试验材料

试验动物:清洁级雄性大耳白兔6只(体质量为2.5~3.0kg)购自试验动物中心;免疫原:氯霉素-BSA、氯霉素-OVA(均为实验室制备)^[10-11];弗氏完全佐剂与弗氏不完全佐剂均购自Sigma公司;HiTrap™ Protein G亲和层析纯化柱(5ml)购自GE Healthcare(美国);酶标仪(型号:Thermo MK3);低速离心机(型号:LD5-2A)。

1.2 完全抗原制备与动物免疫

1.2.1 完全抗原的合成 以琥珀氯霉素作为半抗原,利用重氮化法将半抗原与载体蛋白质进行偶联^[11-12]。具体方法为:称取0.20mmol氯霉素半抗原完全溶于0.4ml无水乙醇中,用0.5mol/L HCl调节pH至1.0,加入0.45mmol的锌粉于85℃反应35min。离心取上清液,并用1.0mol/L盐酸调节pH至1.0,于4℃边搅拌边缓慢滴加NaNO₂溶液(0.1mol/L)至淀粉碘化钾试纸变灰蓝。然后选用氢氧化钠溶液(1.0mol/L)将反应液pH调至8.0,于4℃避光条件下反应2h,离心取上清液即氯霉素重氮盐溶液。取适量

BSA或OVA溶解于2ml 0.02mol/L的PBS中,滴加NaOH保持溶液pH为7.0。偶联物离心去除沉淀后于4℃避光搅拌12h,用0.01mol/L pH7.4的PBS充分透析。

1.2.2 免疫原乳化处理^[12] 于灭菌生理盐水中准确配置2mg/ml CAP-BSA免疫原溶液,吸取2ml免疫原溶液放入Eppendorf管中并加入等量弗氏佐剂。采用一次性注射器缓慢反复均匀抽吸,使抗原充分乳化。

1.2.3 动物免疫 剪去背毛,酒精消毒后进行背部皮下5点注射,每点注射约0.2ml,每只兔总注射量为1ml。首次免疫1个月后,进行第2次加强免疫,此后每隔2周加强免疫1次,每次免疫前耳缘静脉取血ELISA法测定血清效价。当效价满足要求,即可在第3~5d进行采血。

1.3 氯霉素多克隆抗体纯化^[8]

利用HiTrap™ Protein G亲和层析纯化柱进行抗血清纯化,方法为:按每管收集1ml样品添加60~200μl 1mol/L的Tris-HCl溶液(pH为9.0),添加到样品收集管中备用,用10倍柱床体积的上样缓冲液(20mmol/L磷酸盐缓冲液,pH为7.0)洗涤纯化柱后,用注射器上样,上样完毕后用5~10倍柱床体积的上样缓冲液洗涤,然后用3倍柱床体积的洗脱液(0.1mol/L Gly-HCl, pH为2.7)洗脱,收集样品进行SDS-PAGE鉴定,PBS 4℃透析脱盐48h。

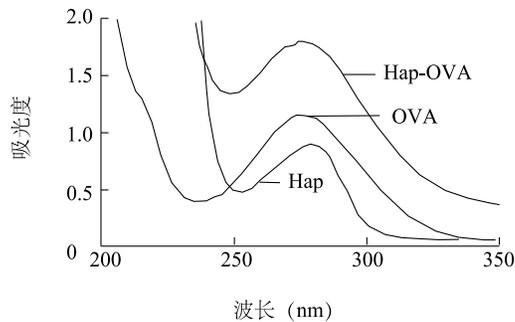
1.4 抗血清特异性鉴定

1.4.1 抗血清效价测定 应用间接ELISA方法测定纯化后抗血清的效价。以氯霉素-OVA为包被原,每孔2μg(100μl),冰箱4℃包被过夜,3% OVA封闭后,加入系列稀释的抗血清,37℃孵育2h后洗涤,加入羊抗兔IgG(1:3000稀释),孵育1h后洗涤,加入底物显色液每孔90μl,37℃温箱暗处放置10min,2mol/L的浓硫酸终止反应,于450nm处检测吸光度值,以阳性OD值:阴性OD值>3的最高稀释倍数定为抗血清效价。

1.4.2 抗血清竞争活性分析 应用间接竞争ELISA方法测定纯化后抗血清的竞争结合活性。以氯霉素-OVA为包被原,每孔2μg(100μl),冰箱4℃包被过夜,3% OVA封闭后,加入抗血清(1:5000稀释)和系列稀释的游离氯霉素抗原,37℃孵育2h后洗涤,加入羊抗兔IgG(1:3000稀释),孵育1h后洗涤,加入底物显色液每孔90μl,37℃温

箱暗处放置 10 min, 2 mol/L 的浓硫酸终止反应, 于 450 nm 处检测吸光度值, 根据抑制率 (抑制率 = 系列稀释的氯霉素 A_{450} / 氯霉素为 0 的 A_{450}) 对氯霉素浓度绘制竞争结合曲线图计算 IC_{50} 。

1.4.3 抗血清特异性分析 应用间接竞争 ELISA 方法测定纯化后抗血清的特异性。方法同竞争活性分析, 不同的是以氯霉素结构功能类似物 (包括链霉素、青霉素和四环素) 代替氯霉素作为竞争结合物, 计算 IC_{50} , 根据公式: 交叉反应率 (CR) = 待测物的 IC_{50} / 交叉反应物的 IC_{50} × 100%, 计算交叉反应率, 评价抗血清的特异性^[8]。



2 结果

2.1 完全抗原鉴定

采用紫外吸收法鉴定完全抗原, 结果如图 1 所示, 从图 1 可以看出半抗原 (Hap)、载体蛋白 (BSA、HAS、OVA) 和完全抗原 (Hap-OVA、Hap-BSA) 的紫外吸收曲线存在很大不同, 完全抗原的吸收峰出现明显飘移, 其消光系数均大于半抗原及载体蛋白, 间接说明 CAP-BSA 偶联成功。根据朗伯-比尔定律计算出其结合比依次为: CAP : OVA = 1.5 : 1.0, CAP : BSA = 7 : 1。

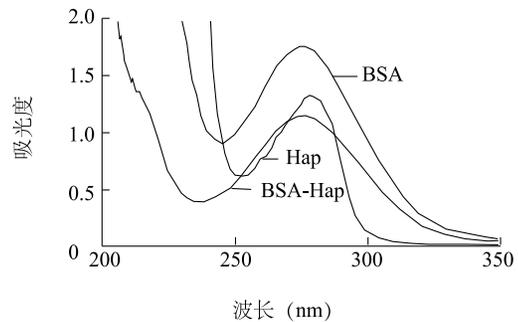
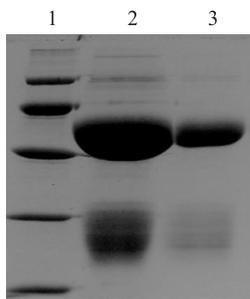


图 1 完全抗原 Hap-OVA、Hap-BSA 的紫外鉴定图

Fig.1 The UV spectrum of complete antigen Hap-OVA and Hap-BSA

2.2 抗血清纯化

如图 2 所示, 抗血清纯化前有明显的电泳杂带, 说明除氯霉素抗体外还有其他杂蛋白, 而经过亲和层析纯化柱 (HiTrap™ Protein G) 进行蛋白纯化处理后, 其电泳杂带则明显减少。显示杂蛋白被基本去除, 所得抗体纯度较高, 可以应用于下一步试验。



1: 低分子量蛋白标准; 2: 纯化前抗血清; 3: 纯化后抗体。

图 2 氯霉素抗体纯化 SDS-PAGE 电泳结果

Fig.2 The identification of polyanitbody by SDS-PAGE

2.3 抗体效价间接 ELISA 测定

用 Hap-BSA 偶联物免疫家兔, 背部皮下多点注

射。从第 1 次加强免疫开始, 每次免疫 1 周后在前耳缘静脉取血 1.5 ml 分离血清, 采用间接 ELISA^[13] 测定抗血清效价。当效价达到 1 : 10 000 以上时, 按照间接竞争 ELISA 法测定其竞争性, 从而得到所制人工抗体的检测灵敏度和抗体特异性。ELISA 测试结果如图 3 所示, 在第 4 次加强免疫后血清效价迅速上升, 第 5 次、第 6 次加强免疫后, 血清效价维持在 1 : 8.0×10^5 到 1 : 1.0×10^6 水平, 具有该效价的血清可以用于下一步的检测试验。

3.4 抗血清竞争 ELISA 检测氯霉素

氯霉素-OVA 稀释 2 000 倍后包被酶标板, 采用 0.1% OVA 封闭。用 10% 甲醇溶解氯霉素, 进行 10 倍梯度稀释为 1 000 mg/ml 至 1 ng/ml 溶液, 加样完毕后再加入 10 000 倍稀释的抗血清, 37 °C 孵育 1.5 h, 甩去酶标孔中液体, PBS 洗涤 3 次, 加入 HRP 标记的山羊抗兔二抗孵育 45 min, PBS 洗涤 4 次后, 加入 100 μ l 的 TMB 底物液, 避光显色 5 ~ 7 min 后加入 2 mol/L 硫酸终止液后于 450 nm 处测定吸光度值, 以氯霉素浓度的对数为横坐标, 抑制率为纵坐标

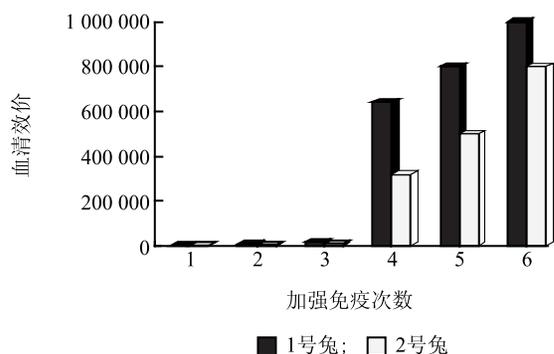


图3 6次免疫的血清效价的变化

Fig.3 Variation of serum titers after six immunizations

绘制标准曲线,其结果如图4所示。线性回归方程:
 $y = 43.44 \lg C + 0.6899$, $R^2 = 0.9865$, 由此计算 $IC_{50} = 13.65 \text{ ng/ml}$, 最低检测限 1.01 ng/ml , 检测范围为 $1.26 \sim 113.75 \text{ ng/ml}$ 。

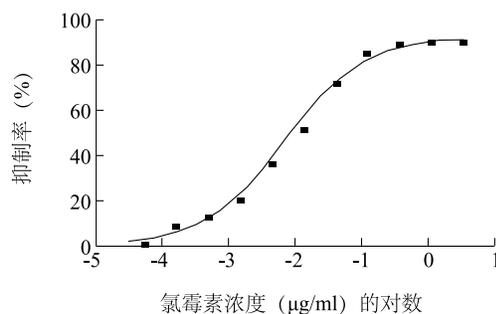


图4 ELISA法测定氯霉素的竞争结合曲线

Fig.4 Competitive binding curves of CAP by ELISA

3.5 氯霉素抗血清的特异性分析

加入结构功能类似物链霉素、青霉素和四环素作为交叉反应物,按照公式计算交叉反应率(表1),氯霉素抗血清与其他类似物无明显交叉反应,特异性好。

表1 氯霉素抗血清与其结构类似物的交叉反应率

Table 1 The cross reaction of chloramphenicol antiserum with its structural analogs

结构类似物名称	交叉反应物的结构	交叉反应率 (%)
氯霉素		100.00
链霉素		0.78
青霉素		2.10
四环素		<0.10

3 结论

本研究以琥珀氯霉素作为半抗原,利用重氮化法将半抗原与载体蛋白质进行偶联,经紫外分光光度法鉴定,成功制备了完全抗原 Hap-BSA 和 Hap-OVA。以 Hap-BSA 为免疫原多次免疫家兔后,经 ELISA 法测定,抗体效价可稳定维持在 $1:8.0 \times 10^5$ 到 $1:1.0 \times 10^6$ 之间,获得了氯霉素高滴度抗体,以 Protein G 亲和层析纯化柱纯化氯霉素抗血清,SDS-PAGE 分析结果表明获得了抗血清纯化制品,该抗血清与氯霉素结构功能类似物青霉素、四环素和链霉素均无明显交叉反应,其检出限达到 1.01 ng/ml 。本研究成功获得了灵敏度高、特异性好的氯霉素抗血清,为建立动物性食品中氯霉素残留快速免疫检测方法奠定了基础。

参考文献:

- [1] 陆 辉,左伟勇,王 健,等. 抗氯霉素单链抗体基因扩增与序列测定[J]. 江苏农业科学,2013,41(10):28-30.
- [2] SHAKILA R, JEYA, VYLA, et al. An improved microbial assay for the detection of chloramphenicol residues in shrimp tissues[J]. Innovative Food Science & Emerging Technologies, 2007, 8(4): 515-518.
- [3] 何方洋,冯月君,吴 鹏,等. 氯霉素化学发光酶联免疫检测方法的建立[J]. 中国兽药杂志,2012,46(3):25.
- [4] SN0215-1993 出口禽肉中氯霉素残留量检验方法[S].
- [5] 李俊锁,邱月明,王 超. 兽药残留分析[M]. 上海:上海科学技术出版社,2002:20.
- [6] 王自良,赵 坤,张改平. 氯霉素的毒性及其在动物性食品中的残留与检测[J]. 河南科技学院学报:自然科学版,2005,33(2):101.
- [7] 陈朝方,罗玉玮,郑 帆,等. 气相色谱/负化学源质谱法测定蜂蜜中氯霉素的残留量[J]. 理化检验(化学分册),2004,40(10):570-573.
- [8] 欧阳立群,吴富忠. 水产品中氯霉素残留量的高效液相色谱测定方法[J]. 中国卫生检验杂志,2005,15(2):178.
- [9] 黄雅丽,程敬丽,桂文君,等. 氯霉素多克隆抗体的制备及免疫活性研究[J]. 浙江大学学报:农业与生命科学版,2006,32(2):180.
- [10] GAUDIN VALERIE, CADIEU NATHALIE, MARIS PIERRE. Inter-laboratory studies for the evaluation of ELISA kits for the detection of chloramphenicol residues in milk and muscle[J]. Food and Agricultural Immunology, 2003, 15(3-4):143-157.
- [11] E WATANABE, EUN H, BABA K, et al. Synthesis of haptens for development of antibodies to alkylphenols and evaluation and optimization of a selected antibody for ELISA development[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2005, 53(19):7395-7403.
- [12] 杨小姣. 胶体金免疫层析快速检测氯霉素技术研究[D]. 陕西:西北农林科技大学,2007.
- [13] 陈翠翠,刘建青,吕志强,等. 雌二醇完全抗原及多克隆抗体的制备[J]. 解放军预防医学杂志,2012,30(5):317.

(责任编辑:陈海霞)