

孔雀石绿单克隆抗体的制备及直接竞争 ELISA 方法的建立

李晓丽¹, 陈雪岚², 刘春梅³, 熊勇华^{1,*}

(1.南昌大学 食品科学与技术国家重点实验室, 江西 南昌 330047; 2.江西师范大学生命科学学院, 江西 南昌 330022; 3.无锡中德伯尔生物技术有限公司, 江苏 无锡 214174)

摘要: 通过合成羧基化孔雀石绿, 采用活泼酯法制备孔雀石绿免疫抗原 CMG-BSA、检测抗原 CMG-OVA。采用 CMG-BSA 免疫 BALB/c 小鼠, 经融合、筛选和克隆化获得了一株稳定的抗孔雀石绿单克隆抗体, 并建立了检测孔雀石绿的直接竞争 ELISA 方法。ELISA 方法的最佳操作参数: 孔雀石绿抗体稀释倍数 1:16000(1mg/ml), 酶标抗原(CMG-HRP)使用质量浓度 0.2 μg/ml。该方法具有良好的灵敏度和特异性, IC₅₀ 值 0.3ng/ml, 最低检测灵敏度达到 0.05ng/ml, 标准曲线方程为 $y = -20.888x + 81.423 (R^2 = 0.9813)$ 。

关键词: 孔雀石绿; 单克隆抗体; 直接竞争 ELISA

Preparation of Monoclonal Antibody of Malachite Green and Establishment of Direct Competitive ELISA

LI Xiao-li¹, CHEN Xue-lan², LIU Chun-mei³, XIONG Yong-hua^{1,*}

(1. State Key Laboratory of Food Science and Technology, Nanchang University, Nanchang 330047, China; 2. College of Life Science, Jiangxi Normal University, Nanchang 330022, China; 3. Wuxi Zodolabs Biotech Co. Ltd., Wuxi 214174, China)

Abstract: Carboxyl-malachite green (CMG) was synthesized and immunogen was prepared by coupling CMG with carrier protein BSA through an ester activation method. BALB/c mice were subjected to injection of CMG-BSA and a hybridoma cell line secreting monoclonal antibody against MG was constructed after fusion, screening and cloning experiments. A direct competitive ELISA for detection MG was established with 0.2 μg/ml CMG-HRP and 1:16000 of antibody dilution ratio. This method exhibited high sensitivity and excellent specificity for detecting MG. The standard regression equation of this method was $y = -20.888x + 81.423 (R^2 = 0.9813)$ with a detection limit for MG at the level of 0.05 ng/ml and IC₅₀ was 0.3 ng/ml.

Key words: malachite green; monoclonal antibody; direct competitive ELISA

中图分类号: R392.11; R446.61

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2009)24-0283-04

孔雀石绿(malachite green, MG)又名碱性绿、盐基块绿、孔雀绿, 属三苯甲烷类染料, 曾被广泛用于预防和治疗各类水产动物的水霉病、鳃霉病和小瓜虫病等^[1]。但孔雀石绿及其代谢产物无色孔雀石绿在水产品体内会产生高残留, 人食用后易引起致癌、致畸和致突变等副作用^[2]。欧盟、美国以及部分东亚国家均已禁止将孔雀石绿用作渔类的抗真菌药物, 我国于 2002 年 5 月也将孔雀石绿列入《食品动物禁用的兽药及其化合物清单》中^[3]。但由于孔雀石绿价格低廉、防治鱼病效果好, 使用者存在着巨大的利益驱动; 同时由于孔雀石绿目前无

灵敏、便利的检测手段, 因此, 实际上孔雀石绿在水产养殖、水产品运输及贮存过程中仍被广泛滥用。

目前, 孔雀石绿的检测方法主要有液/质联用分析法(LC-MS)、高效液相色谱法(HPLC)和免疫学方法等^[4-6]。LC-MS 和 HPLC 法具有准确、重复性好、适用于定量检测等优点, 是检测孔雀石绿的最终确认方法, 但由于其成本高, 操作繁琐, 设备昂贵及操作人员需专业培训, 实验周期长等原因, 难以满足基层进行现场快速筛查的要求。国外已有高灵敏、商品化的孔雀石绿 ELISA 检测试剂盒出售, 如美国 Bio Scientific 公司和

收稿日期: 2009-08-21

作者简介: 李晓丽(1986—), 女, 硕士研究生, 研究方向为食品安全。E-mail: 250042463@163.com

* 通讯作者: 熊勇华(1970—), 男, 研究员, 博士, 研究方向为食品安全。E-mail: yhxiongchen@163.com

Beacon 公司产品, 其检测下限达到 0.5ng/ml, 回收率 80%~95%, 样本提取只需 2h, 但总体价格昂贵, 导致单次检测成本居高不下。而国内有关免疫学检测方法的报道, 大部分 IC₅₀ 值在 1~10ng/ml 之间, 样本回收率低, 耗时长, 与国外产品有一定距离^[6]。本实验通过合成羧基化修饰的孔雀石绿制备免疫原, 免疫小鼠筛选获得一株性状稳定的抗孔雀石绿单克隆抗体, 并建立直接竞争 ELISA 方法。

1 材料与方法

1.1 材料、试剂与仪器

有色孔雀石绿(MG)、无色孔雀石绿(LMG)、结晶紫(CV)、隐色结晶紫(LCV) 国药集团化学试剂有限公司上海分公司。

福氏完全佐剂、福氏不完全佐剂、辣根过氧化物酶(HRP)、碳二亚胺(EDC)、*N*-羟基琥珀酰亚胺(NHS)、驴抗鼠二抗、牛血清白蛋白(BSA)、卵清蛋白(OVA) Sigma 公司; 96 孔酶标板 Costar 公司。

MK3 酶标仪 Labsystems 公司; Ultrospec-5300pro 紫外-可见分光光度计 安玛西亚公司。

1.2 实验动物

BALB/c 小鼠(6 周龄, 雄性) 扬州大学实验动物中心。

1.3 方法

1.3.1 羧基化孔雀石绿(CMG)的合成以及鉴定

参考 Yang 等^[7]方法合成羧基化孔雀石绿(CMG)。具体工艺如下: 在氮气保护下, 4-甲酰基苯甲酸, *N,N*-二甲基苯胺和无水 ZnCl₂ 在无水乙醇中加热回流 24h。调节 pH5.0, 过滤后真空干燥得到淡绿色无色孔雀石绿(CLMG)。三氯甲烷溶解 CLMG, 加入四氯对苯醌、冰醋酸 25℃ 搅拌反应 1.5h, 反应产物经等体积三氯甲烷-四氯甲烷洗涤两次, 真空干燥可获得 CMG 粉末, 产物进一步进行红外吸收光谱、核磁共振氢谱、核磁共振碳谱、质谱方法进行分子结构的鉴定。

1.3.2 孔雀石绿免疫原的制备以及鉴定

将 2mg CMG 溶于 1ml 20% 的 *N,N*-二甲基甲酰胺溶液(DMF), 边磁力搅拌边加入 2mg/ml EDC 33μl 和 2mg/ml NHS 20μl, 调 pH4.5~5.0, 反应 20min 后, 迅速加入 7.5mg BSA, 调 pH7.0, 室温反应 3h, 期间调整 pH7.0 两次。将偶联产物装入透析袋, 0.01mol/L pH6.0 的 PBS 透析 3d 后, -20℃ 冷冻保存^[7]。单抗筛选抗原 CMG-OVA 的制备方法同上。免疫原用紫外分光光度计扫描监控偶联比, 根据如下公式计算偶联率^[8]。

1.3.3 动物免疫与单克隆抗体的制备

1.3.3.1 动物免疫以及单克隆细胞株的筛选

选用 6 周龄的雌性 BALB/c 小鼠(4 只)作为免疫动物,

CMG 免疫抗原(CMG-BSA)与等量弗氏完全佐剂乳化后采用皮下多点注射(100μg/只)。间隔 3 周加强免疫, CMG-BSA 与等量弗氏不完全佐剂乳化后多点皮下注射(100μg/只), 加强免疫 3 次。最后一次加强免疫后第 10 天断尾采血, 分离血清, 以 CMG-OVA 为检测抗原测定小鼠血清抗体效价。选择效价最好的小鼠进行脾内冲击免疫(CMG-BSA, 50μg/只)。免疫鼠脾细胞与骨髓瘤细胞 SP2/0 按细胞个数 5:1 混合, 聚乙二醇 4000 为融合剂, 间接竞争 ELISA 法(CMG-OVA 为检测抗原)筛选阳性克隆孔, 有限稀释法克隆 3 次至阳性率达到 100%, 液氮冻存杂交瘤细胞株。

1.3.3.2 单克隆抗体的制备

取 BALB/c 小鼠腹腔注射 0.5ml 降植烷, 10d 后腹腔接种杂交瘤细胞, 每只小鼠按 1.0×10^6 个细胞数注入。待小鼠腹部明显膨大, 16 号针头采集腹水。腹水采用辛酸硫酸铵法纯化, 具体步骤如下: 腹水 9000r/min, 4℃ 离心 10min, 去除试管中的漂浮物, 再经 0.45μm 滤膜过滤去除杂质。上清液加入两倍体积的 0.06mol/L pH 5.0 醋酸钠缓冲液。按每毫升稀释腹水加 11μl 辛酸, 于 30min 内搅拌下逐滴加入辛酸, 4℃ 静置 2h。10000r/min、4℃ 离心 30min, 弃沉淀; 上清液加入 1/10 体积的 0.1mol/L PBS, 用 1mol/L NaOH 调 pH7.4; 在 4℃ 条件下加入饱和硫酸铵至 45% 饱和度, 静置过夜; 9000r/min、4℃ 离心 1h, 弃上清液; 沉淀溶于适量 0.01mol/L pH7.4 PBS, 4℃ 透析过夜, 10000r/min 离心 30min, 除去不溶性沉淀, 测定蛋白质含量, 加入等体积甘油 -20℃ 冻存备用。

1.3.4 MG 直接竞争 ELISA 方法的建立

直接竞争 ELISA 基本操作步骤如下: 将羊抗鼠二抗 0.01mol/L PBS 稀释至一定浓度, 37℃ 包被酶标板 1h (100μl/孔)。PBST 洗涤后, 采用 5% BSA 37℃ 封闭酶标板 1h(400μl/孔)。PBST 洗涤后, 用 0.01mol/L PBS 将 MG-Ab 稀释至一定倍数, 100μl/孔加入酶标板, 37℃ 反应 1h。PBST 洗涤后, 将 MG 标准品稀释成系列浓度, CMG-HRP 抗原稀释成一定倍数, 各孔中加入 50μl 标准品溶液或待检样品后, 加入 50μl/孔 CMG-HRP 溶液, 混匀, 37℃ 反应 30min。PBST 洗涤三次后, 每孔加入 100μl 显色液, 37℃ 避光反应 15min, 加入终止液, 50μl/孔。酶标仪在 450nm 波长处测定各孔的吸光度, 判定结果。

1.3.4.1 ELISA 方法的灵敏度以及 IC₅₀ 值的确定

由方阵滴定确定 MG 单抗及 CMG-HRP 的最佳工作浓度。在最佳工作浓度下, 将 MG 标准品配成 4.05、3、1.35、0.45、0.15、0.05、0ng/ml 系列质量浓度做直接竞争 ELISA 检测。

1.3.4.2 与结构类似物间的交叉反应

选择最优条件进行直接竞争 ELISA 检测, 测定与羧基化孔雀石绿、无色孔雀石绿、结晶紫、隐色结晶紫的交叉反应率, 确定本方法的特异性。

$$\text{交叉反应率}(\%) = \frac{\text{MG IC}_{50}}{\text{交叉物 IC}_{50}} \times 100$$

2 结果与分析

2.1 羧基化孔雀石绿(CMG)的鉴定

合成的 CMG 固体经红外吸收光谱、核磁共振氢谱、核磁共振碳谱、质谱 4 种方法确证合成的化学物质为羧基化孔雀石绿。

2.2 羧基化孔雀石绿(CMG)免疫原的鉴定

取出透析后的 CMG-BSA 作紫外分光光谱扫描。偶联产物在 350nm 波长附近形成一特定的吸收峰, 扫描结果见图 1 所示。BSA 在 280nm 波长处有特征性吸收峰, CMG 在 320nm 波长处有特征性吸收峰, 而偶联物吸收峰发生漂移, 350nm 处为偶联基团所特有的吸收峰, 由图 1 可知, CMG 与 BSA 发生偶联反应, 偶联率为 11.76:1。

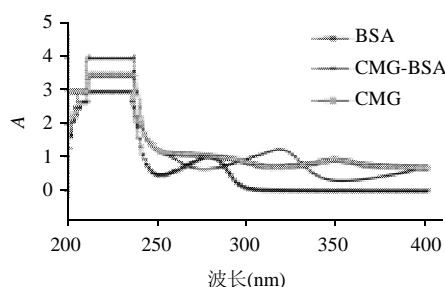


图1 CMG-BSA 紫外-可见光谱扫描图
Fig.1 UV-visible spectrum of CMG-BSA

2.3 单克隆抗体的制备以及抗体纯化

4 只小鼠经过三次免疫后, 经断尾采血测效价, 其中一只小鼠效价达到 512000 以上, 取该小鼠进行脾内冲击免疫。取脾细胞与骨髓瘤细胞进行融合, 融合率约为 70%, 取细胞上清进行检测, 共获得 6 个阳性克隆, 其中 1 个阳性克隆孔细胞为单克隆且上清检测对 MG 具有

明显的阻断作用。有限稀释法进行 3 次亚克隆, 整板上清检测, 阳性率达到 100%。以该细胞株进行腹水制备, 采用辛酸硫酸铵法纯化抗体, 每毫升腹水可获得 3.3mg 抗体。

2.4 直接竞争 ELISA 方法的建立

2.4.1 直接竞争 ELISA 方法的灵敏度以及 IC₅₀

方阵滴定条件: MG 抗体质量浓度 1mg/ml, 分别稀释 8000、12000、14000、16000 倍使用。CMG-HRP 使用质量浓度为 0.4、0.2、0.1、0.05 μg/ml。结果如表 1 所示, MG 单克隆抗体(1mg/ml)最佳稀释倍数为 1:16000, CMG-HRP 最佳工作质量浓度为 0.2 μg/ml。以 MG 质量浓度梯度溶液(4.05、3、1.35、0.45、0.15、0.05、0ng/ml)进行直接竞争 ELISA。结果以 MG 溶液质量浓度对数值为横坐标(x)、抑制率(B/B₀, 即样品吸光度与阴性吸光度之比)为纵坐标(y), 绘制标准曲线, 如图 2 所示, 标准曲线方程为 $y = -20.888x + 81.423 (R^2 = 0.9813)$ 。从曲线中可知, 该方法 IC₅₀ 值为 0.3ng/ml, 最低检测灵敏度为 0.05ng/ml(以 B/B₀ 为 85% 时的样品浓度, 确定为方法最低检测灵敏度)。

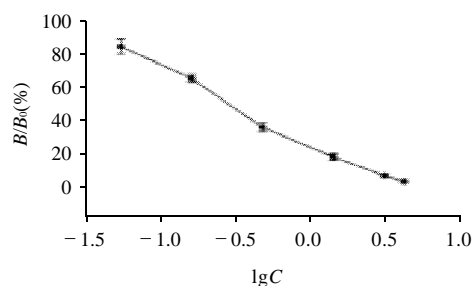


图2 MG 直接竞争 ELISA 标准曲线
Fig.2 Standard curve of direct competitive ELISA for MG detection

2.4.2 特异性实验

表 3 为该方法其他孔雀石绿结构类似物的交叉反应结果。从表中可知, 本方法中抗体与结晶紫具有较大的交叉反应, 达到了 100%, 而与无色孔雀石绿以及隐色结晶紫基本无交叉反应, 因此本研究建立的方法也可用于结晶紫的检测和监控, 而对于水体以及水产品中总孔雀石绿的监控(包括无色孔雀石绿), 则需要通过氧化的方法将无色孔雀石绿转化成有色孔雀石绿后进一步检测。

表1 MG 抗体与 CMG-HRP 方阵滴定结果
Table 1 Titration results of MG antibody and CMG-HRP matrix

| 稀释 倍数 | 0.4 μg/ml | | | | | 0.2 μg/ml | | | | | 0.1 μg/ml | | | | | 0.05 μg/ml | | | | |
|----------|-----------|-------|-------|-------|-------|-----------|-------|-------|-------|------|-----------|-------|-------|-------|------|------------|-------|-------|-------|------|
| | 标准 | 变异系 | | 标准 | 变异系 | 标准 | 变异系 | | 标准 | 变异系 | 标准 | 变异系 | | 标准 | 变异系 | 标准 | 变异系 | | 标准 | 变异系 |
| | 方差 | 数(%) | 方差 | 数(%) | 数(%) | 方差 | 数(%) | 数(%) | 方差 | 数(%) | 方差 | 数(%) | 数(%) | 方差 | 数(%) | 方差 | 数(%) | 数(%) | 方差 | 数(%) |
| 8000 | 3.262 | 3.189 | 3.207 | 0.038 | 1.18 | 2.923 | 2.68 | 2.889 | 0.132 | 4.66 | 2.176 | 2.254 | 2.197 | 0.040 | 1.81 | 1.262 | 1.381 | 1.231 | 0.079 | 6.13 |
| 12000 | 2.027 | 1.737 | 1.932 | 0.148 | 7.83 | 1.891 | 1.518 | 1.602 | 0.196 | 11.7 | 1.286 | 1.233 | 1.169 | 0.056 | 4.8 | 0.777 | 0.918 | 0.823 | 0.072 | 8.57 |
| 14000 | 1.654 | 1.437 | 1.744 | 0.158 | 9.80 | 1.469 | 1.008 | 1.231 | 0.231 | 18.7 | 0.878 | 1.077 | 1.045 | 0.107 | 10.7 | 0.568 | 0.49 | 0.548 | 0.041 | 7.69 |
| 16000 | 1.066 | 1.177 | 1.167 | 0.061 | 0.054 | 1.025 | 1.01 | 1.045 | 0.018 | 1.76 | 0.68 | 0.486 | 0.6 | 0.097 | 16.5 | 0.361 | 0.418 | 0.397 | 0.029 | 7.34 |

表3 交叉反应实验结果
Table 3 Experimental results of cross reaction

| 结构类似物 | IC ₅₀ (ng/ml) | 交叉反应率(%) |
|---------|--------------------------|----------|
| 羧基化孔雀石绿 | 0.3 | 100 |
| 孔雀石绿 | 0.3 | 100 |
| 无色孔雀石绿 | > 100 | < 0.01 |
| 结晶紫 | 0.3 | 100 |
| 隐色结晶紫 | > 100 | < 0.01 |

3 讨论

MG 是小分子物质, 没有免疫原性, 必须与载体蛋白偶联后才可制备免疫抗原。而 MG 分子本身没有可与载体蛋白结合的可供活化的功能基团, 因此无法直接制备 MG 人工抗原。本研究通过化学法合成羧基化的 MG, 利用活泼酯的方法活化 CMG 分子上羧基, 并进一步与载体蛋白氨基反应获得免疫原。

羧基化孔雀石绿在碱性条件极易变成无色孔雀石绿, 因此在制备免疫原以及酶标抗原时, 偶联溶液以及透析液的 pH 值应严格控制在 7.0 以内, 以免制备的免疫抗原或酶标抗原的免疫效果或与抗孔雀石绿抗体的识别能力下降。

小分子化合物合成的全抗原一般要求小分子与载体蛋白的最适偶联率在 1:10~1:25 之间, 可有效地刺激机体产生免疫应答^[9]。本研究中制备的免疫原偶联率为 11.76:1, 以此为抗原免疫小鼠, 小鼠获得了良好的免疫应答(效价高达 512000)。

竞争 ELISA 方法可分为直接法和间接法两种。间接法一般需要两步反应, 因此操作时间相对较长; 而直接竞争 ELISA 方法不需要添加酶标二抗等步骤, 操作程序简单, 与间接法比较可缩短检测时间 30~60min; 同时本实验抗体包被过程采用了二抗包板, 抗体与二抗反

应。该步骤可保证抗体的 Fab 片段完全暴露, 因此有效地提高了检测方法的灵敏度, 结果显示本实验方法的最低检测灵敏度可达到 0.05ng/ml, IC₅₀ 值为 0.3ng/ml, 均高于目前市场上常规流通的孔雀石绿试剂盒检测灵敏度。

参考文献:

- [1] BERGWERFF A A, KUIPER R V, SCHERPENISSE P. Persistence of residues of malachite green in juvenile eels (*Anguilla anguilla*)[J]. Aquaculture, 2004, 233(1/4): 55-63.
- [2] SRIVASTAVA S, SINHA R, ROY D. Toxicological effects of malachite green[J]. Aquatic Toxicology, 2004, 66(3): 319-329.
- [3] RUSHING L G, HANSEN E B Jr. Confirmation of malachite green, gentian violet and their leuco analogs in catfish and trout tissue by high-performance liquid chromatography utilizing electrochemistry with ultraviolet-visible diode array detection and fluorescence detection[J]. Chromatography B, 1997, 700(1/2): 223-231.
- [4] LUIS V, CECILIA D, ANDONIA L Z, et al. Determination of the sum of malachite green and leucomalachite green in salmon muscle by liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization-mass spectrometry[J]. Journal of Chromatography A, 2005, 1067(1/2): 101-105.
- [5] LONG C Y, MAI Z B, YANG Y F, et al. Determination of multi-residue for malachite green, gentian violet and their metabolites in aquatic products by high-performance liquid chromatography coupled with molecularly imprinted solid-phase extraction[J]. Journal of Chromatography A, 2009, 1216(12): 2275-2281.
- [6] 龚鹏飞, 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.
- [7] YANG M C, FANG J M, KUO T F, et al. Production of antibodies for selective detection of malachite green and the related triphenylmethane dyes in fish and fishpond water[J]. Agricultural and Food Chemistry, 2007, 55(22): 8851-8856.
- [8] 杨利国, 胡少昶, 魏平华, 等. 酶联免疫测定技术[M]. 南京: 南京大学出版社, 1998: 95-96.
- [9] 吴定, 张羽航, 姚汝华. 乳中磺胺甲基嘧啶残留酶联免疫测定[J]. 食品科学, 1998, 19(6): 42-45.