

食品中残留盐酸克伦特罗免疫原的合成与鉴定

胥传来, 王武康, 贺铁明
(江南大学食品学院, 江苏 无锡 214036)

摘要: 盐酸克伦特罗是一种只具有免疫反应性不具有免疫原性的小分子半抗原。本文采用重氮化法将其与牛血清白蛋白交联, 用紫外扫描和 SDS 变性凝胶电泳方法检验。并用合成的 CL_BSA 免疫小鼠, 经 ELISA 检验, 小鼠产生了针对 CL 的抗体, 表明合成的 CL_BSA 复合物具有免疫原性, 为盐酸克伦特罗单克隆抗体的制备及其检测试剂盒的研制奠定了基础。

关键词: 盐酸克伦特罗; 重氮化法; 交联

Synthesis and Identification of ImmunogenClenbuterol Residues in Foods

XU Chuan-lai, WANG Wu-kang, HE Tie-ming
(School of Food Science and Technology, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China)

Abstract: Clenbuterol is a small molecular hapten that has immunoreactivity but hasn't immunogenicity. It is coupled with bovine serum albumin by diazotization in this article. And the Clenbuterol_BSA conjugate is identified by ultraviolet scan, SDS-PAGE and indirect inhibited ELISA. The results demonstrated that the Clenbuterol_BSA conjugate has immunogenicity which is good for next monoclonal antibody preparation and the research of ELISA kit.

Key words: Clenbuterol; diazotization; conjugate

中图分类号 S859.7

文献标识码 B

文章编号 1002-6630(2004)12-0169-04

盐酸克伦特罗 (Clenbuterol, CL), 异名克喘素, 氨哮素, 俗名“瘦肉精”, 化学名为 α -[(叔丁胺基)甲基]-4-氨基-3,5-二氯苯甲醇盐酸盐。临床上用于防治哮喘和支气管痉挛, 在动物日粮中添加这类物质, 可有效地改变动物胴体构成, 提高瘦肉率^[1]。但 CL 在肌肉特别是内脏中会有高浓度的残留, 对人与动物的肝、肾及神经系统有一定的毒副作用^[1~3]。欧美各国早已禁止将 CL 作为饲料添加剂使用^[2,3]。我国农业部亦于 1997 年发文明令禁止, 至今每年都要开展各种打击非法生产、销售、使用盐酸克伦特罗的专项治理活动, 下达残留监控计划。特别是 2001 年, 农业部、卫生部、国家经贸委、国家工商总局、国家质量监督检验检疫总局等部门都单独或联合开展严打活动, 但收效并不理想, CL 引起食物中毒的报道仍屡见报端。就在今年的三月份, 各大网站均报道了佛山市顺德区杏坛镇 200 多人因食用含有“瘦肉精”的猪肉导致食物中毒的新闻。

CL 屡禁不止的原因之一就是目前的检测方法高效液相色谱-质谱联用法 (HPLC-MS) 和气相色谱-质谱联

用法 (GC-MS) 不能适应市场监督需要快速、简便、价廉的要求^[4]。若想彻底禁止 CL 的非法使用, 就必须加快快速检验方法的研究。酶联免疫吸附检测法 (Enzyme-linked Immunosorbent assay, ELISA) 是一种快速检测方法。不仅仪器化程度低, 而且灵敏度高, 特异性强, 样品前处理简单, 非常适合大量样品的检测, 便于现场监控^[5,6]。德、美等国都已将 ELISA 用于 CL 残留检测中, 并早有 ELISA 商品化试剂盒问世, 大大加强和方便了动物性食品中 CL 残留的检测。目前我国使用的试剂盒主要是从国外进口, 但这些试剂盒的价格昂贵, 不可能推广使用。因此, 开发我国自主知识产权的 ELISA 试剂盒便为当务之急。

盐酸克伦特罗酶联免疫检测试剂盒的研制, 首先就是要制备出特异性强、效价高、针对 CL 的单克隆抗体。而 CL 的分子量仅为 313, 不具有免疫原性, 必须与大分子载体蛋白交联, 才能刺激动物产生特异性免疫应答。本研究采用重氮化法, 将 CL 与载体蛋白 (BSA) 偶联, 合成了 CL 完全抗原, 为 CL 单克隆的抗体的制

收稿日期: 2004-02-03

基金项目: 国家科技“十五”攻关食品安全重大专项 (2001BA804A18-05)

作者简介: 胥传来 (1965-), 男, 副教授, 博士, 研究方向为食品安全关键技术。

备及ELISA 试剂盒的研制奠定了基础。

1 材料与与方法

1.1 仪器与试剂

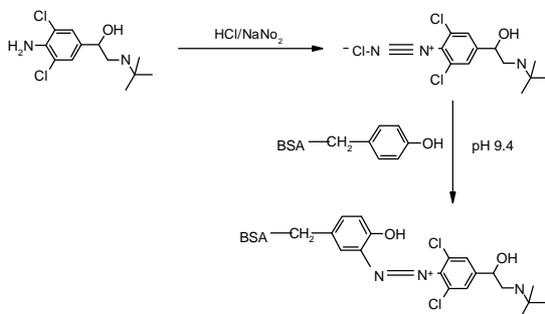
试剂: Clenbuterol (CL) 美国Sigma; 牛血清白蛋白(BSA)上海伯奥; 鸡蛋白蛋白(OVA)批号 030602 电泳纯; FREUND'S 不完全和完全佐剂 美国Sigma。以上试剂除特殊说明均为分析纯。

仪器: AB104-N 型电子分析天平 上海Metller Toledo 集团; PHS-3TC 精密酸度计 上海天达仪器有限公司; 石英自动双重纯水蒸馏器 江苏金坛市荣华仪器制造有限公司; 79.3 型磁力恒温搅拌器; U-3000 紫外扫描仪 日本岛津; 722 型可见分光光度计; ZD-9556 水平摇床 太仓科教器材厂; Multiska Mks 酶标仪 Thermo Labsystems; 可调式移液器一套 Thermo Labsystems。实验动物: Balb/c 小白鼠 中科院上海实验动物中心。

1.2 实验方法

1.2.1 重氮化法制备 CL_BSA 偶联蛋白质

盐酸克伦特罗为半抗原物质, 单独作用时不具有免疫原性或免疫原性较弱, 仅能与相应的抗体发生特异性反应, 而不能刺激机体产生抗体, 必须将这类半抗原连接到高分子载体上形成抗原之后, 才能刺激机体产生抗体, 其合成路线如下:



(1) CL 偶氮化: 取CL500mg, 加入8ml 1mol/L 预冷的盐酸中, 在冰浴中搅拌, 慢慢滴加1mol/L 的亚硝酸钠溶液。其间用碘化钾淀粉试纸检验, 直至试纸变为深紫色, 停止, 继续搅拌30min。

(2) CL 与 BSA 交联: 准确称取3g BSA 溶于pH9.5, 0.1mol/L 的碳酸盐缓冲液中。将偶氮后的CL 慢慢滴入BSA 溶液中, 用1mol/L 氢氧化钠调节pH, 使pH 维持在9.0~9.5 之间。滴加结束后, 在暗处继续搅拌3h。

(3) 透析: 反应结束后, 在4℃ 冰箱中用PBS (0.01mol/L, pH7.2~7.4) 连续透析2d, 多次换液, 最后冷冻干燥保存。

同法合成CL_OVA。

1.2.2 CL_BSA 免疫原的鉴定

1.2.2.1 紫外扫描方法 先用生理盐水精确配制CL与BSA 标准溶液, 然后称取一定量的CL_BSA 溶于生理盐水中, 用Bradford 法测定蛋白质浓度, 根据此浓度调整CL_BSA 溶液中蛋白质的浓度与BSA 一致。用UV3000 紫外扫描仪测得CL 与BSA 的最大吸收波长, 并取得各自最大吸收波长处的吸光值, 然后在它俩各自的最大波长下测CL_BSA 的吸光值。代入参考文献[7]介绍的公式, 计算出CL_BSA 的偶联率。

1.2.2.2 SDS聚丙烯酰胺凝胶电泳法 参照参考文献[8]的方法, 配制各种溶液, 浓缩胶浓度为4%, 分离胶浓度为14%, 电泳电压为200V, 考马斯亮蓝染色。

1.2.2.3 小鼠免疫 以CL_BSA 免疫8周龄Balb/c小鼠6只, 3只小鼠作对照。免疫剂量50μg/只。首次免疫以弗氏完全佐剂乳化抗原, 100μl/只, 三只皮下分点注射, 三只腹腔注射。初次免疫间隔3周, 以后每隔10d 用不完全佐剂乳化, 加强免疫4次。第四次免疫一周后, 每只小鼠尾静脉采血20μl, 分离血清, 等量添加甘油, -20℃ 保存^[9]。

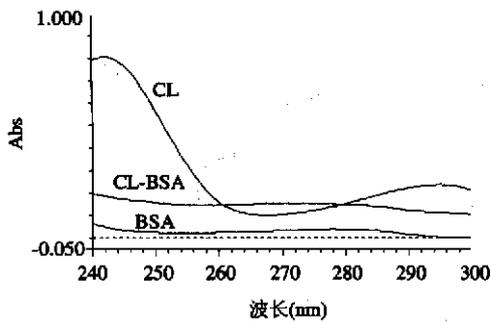
1.2.2.4 间接抑制ELISA法 用CL_OVA 包被酶标板(Corning USA), 100μl/孔, 4℃ 冰箱中过夜; 用2% 的OVA 溶液封闭, 150μl/孔, 37℃ 孵育2h。每孔先加30μl 不同浓度的CL 标准溶液, 随后加入稀释的阳性抗血清或稀释的阴性抗血清70μl/孔。用30μl PBS 加70μl PBS 做空白对照, 30μl PBS 加70μl 阳性抗血清或阴性抗血清做标准, 37℃ 下孵育30min。然后, 加羊抗鼠酶标二抗(Sigma, USA), 100μl/孔, 仍于37℃ 下孵育30min。随后加100μl/孔底物液3,3', 5,5' - 四甲基联苯胺(TMB), 15min 后显色, 最后用100μl/孔2mol/L H₂SO₄ 终止反应后测OD₄₅₀。以上每一步加样后, 都经过多次振荡后洗涤。

2 结果与讨论

2.1 紫外扫描图分析

从图1和表1可见, BSA 的最大吸收波长(279nm)处的吸光度为0.0381, 此时CL_BSA 的吸光度为0.1501, CL 的吸光度为0.2502。尽管CL_BSA 溶液中蛋白质的浓度与BSA 溶液相同, CL_BSA 的吸光度却明显比BSA 的高, 由图可知CL_BSA 的吸收光谱分别具有BSA 和CL 的吸收特征, 并且由于在蛋白质结构上偶联了一定量的CL 分子, 导致了蛋白质特征峰的偏移, 说明了偶联结合实验成功。

各溶液在2种波长下的吸光值如下表所示, 代入参考文献[7]中的公式, 即可计算得CL_BSA 的偶联率为17.5。与参考文献[11, 12]提到的最佳偶联率一致。



Sample: 25nm 处从上往下 BS60, CL_BSA, CL60 样品
Comment: 5月9日生理盐水溶解

图1 CL、BSA及CL_BSA的紫外扫描图

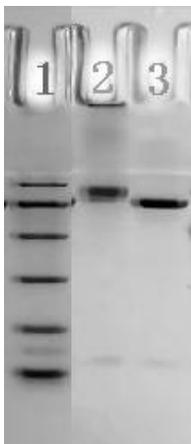
Fig.1 Ultraviolet spectrum of CL、BSA and CL_BSA

表1 标准溶液最大吸收波长下,各溶液的吸光值

Table 1 Absorbency at the Max wavelength of 2 standard solution

样品	m.w.	浓度 ($\mu\text{g/ml}$)	A_{279}	A_{295}	最大吸收 波长(nm)
CL	313.6	60	0.2502	0.4910	295
BSA	68000	60	0.0381	0.0042	279
CL_BSA		60	0.1501	0.1127	274

2.2 SDS-PAGE 电泳图分析



1. 低分子量标准蛋白; 2. CL_BSA ; 3. BSA

图2 SDS-PAGE 电泳图

Fig.2 SDS-PAGE Electrophoresis

从电泳图的2、3条带可以看出, CL_BSA 条带滞后于交联的载体蛋白质BSA的条带, 也比BSA条带稍宽, 说明CL_BSA比BSA分子量有所增加, 即说明CL分子应该与BSA分子结合了。

又反应过程中, 偶氮后的CL滴入BSA溶液中, 颜色立刻变黄, 最后成为亮黄色, 透析和冷冻干燥过程中, 颜色亦不退减。从反应的颜色变化, 也暗示偶氮后的CL已经与BSA交联^{[6][11]}。

以上紫外扫描图和电泳图的分析结果还只能说明CL分子已经与BSA分子交联, 但CL_BSA的免疫原性如何, 是否能够刺激小鼠产生针对CL的抗体, 还需更有力的证据, 即动物免疫试验。

2.3 动物免疫试验结果

2.3.1 间接抑制ELISA检测结果分析

从间接抑制ELISA实验结果可以看到, 阴性血清0标准的吸光度与空白值相差不大, 并且往阴性血清中加入25ng/ml CL标准液, 吸光度相对于0标准几乎没有变化说明阴性血清中不存在针对CL的抗体。而1:5000与1:6000稀释的阳性抗血清的0标准吸光度都是空白值的几倍, 于1:5000稀释的阳性血清中仅加入1ng/ml CL标准液, 吸光度就有明显下降(7.6%), 加入25ng/ml CL标准液, 下降幅度则高达34.28%, 这都说明免疫小鼠产生了针对CL的抗体, 也最终说明了CL_BSA免疫原的合成。

表2 间接抑制ELISA吸光值

Table 2 Absorbency of indirect inhibited ELISA

小鼠抗血清	吸光度(A)					
	空白对照	0ng/ml	1ng/ml	5ng/ml	10ng/ml	25ng/ml
1:5000阳性血清	0.147	0.951	0.879	0.813	0.769	0.625
1:6000阳性血清	0.138	0.674	0.660	0.609	0.552	0.481
1:200阴性血清	0.142	0.175			0.173	0.180

3 结论

小分子半抗原与大分子载体交联, 合成完全抗原, 首先由Landsteiner创立。半抗原偶联到载体上的数目, 常会影响到抗体的滴度。但是最佳的交联数目, 到目前为止, 还没有定论, 一般认为在8~25之间比较合适^[13]。本研究, 借控制CL和BSA的摩尔比和反应时间, 经紫外扫描计算得到的交联比为17.5。

交联物CL_BSA的紫外扫描图、SDS-PAGE图均与载体蛋白BSA有比较明显的区别, 这都预示CL分子已与BSA分子偶合。间接抑制ELISA方法则最终说明CL_BSA具有较好的免疫原性, 能够刺激小鼠产生针对CL的抗体, 为下一步的单克隆抗体的制备和ELISA试剂盒奠定了基础。

参考文献:

[1] 林海丹, 江庆娣, 伍绍登. 饲料中盐酸克伦特罗含量的检测[J]. 饲料工业, 2000, 21(1): 25-26.
[2] Andrzej Posyniak, Jan Zmudzki, Jolanta Niedzielska. Screening procedures for clenbuterol residue determination in bovine urine and liver matrices using enzyme-linked immunosorbent assay and liquid chromatography[J]. Analytica Chimica Acta, 2003, 483: 61-67.

不同水解度酪蛋白酶解产物对小鼠脾 淋巴细胞增殖调节活性的比较

毛学英¹, 南庆贤², 李莹辉³, 宋锦平³, 钟萍³

(1. 北京大学环境工程系 水沙科学教育部重点实验室, 北京 100871; 2. 中国农业大学食品科学与营养工程学院, 北京 100083; 3. 航天医学工程研究所, 北京 100094)

摘要: 以小鼠的脾淋巴细胞作为供试细胞和效应细胞, 采用MTS法、ELISA法分别测定了不同水解度酪蛋白酶解产物(A、B和C样的水解度分别为9.74%、18.54%和24.02%)对小鼠脾淋巴细胞增殖活性、白细胞介素-2(IL-2)生成量的影响, 结果显示B样和C样对小鼠脾淋巴细胞增殖和IL-2生成有促进作用, 而A样抑制小鼠脾淋巴细胞增殖和IL-2生成。

关键词: 酪蛋白; 酶解产物; 水解度; 免疫调节活性

Study on Effects of Casein Hydrolysates of Different DH on Mouse Spleen Cells Lymphoproliferation Activity and IL-2 Release

MAO Xue-ying¹, NAN Qing-xian², LI Ying-hui³, SONG Jin-ping³, ZHONG Ping³
(1. Department of Environmental Engineering, Peking University, Beijing 100871, China
2. College of Food Science and Nutritional Engineering, CAU, Beijing 100094, China
3. Institute of Space Medico-Engineering, Beijing 100094, China)

Abstract: This research studied the effect of casein hydrolysates of different DH (the DH of A, B, and C were 9.74%, 18.54%, and 24.02% respectively) on the lymphoproliferation activity and IL-2 release of mouse spleen cells. The results showed that sample B and C could promote lymphoproliferation activity and IL-2 release, while sample A had inhibitory effect on both.

收稿日期: 2003-12-19

作者简介: 毛学英(1970-), 女, 博士, 研究方向为乳品科学及蛋白质加工利用。

- [3] The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products Veterinary Medicines and information Technology unit. Committee for veterinary medicinal products Clenbuterol Hydrochloride summary report (1). EMEA/MRL/030/95-FINAL <http://www.emea.eu.int/pdfs/vet/mrls/003095en.pdf>
- [4] 刘国艳, 柴春彦. 动物性产品中盐酸克伦特罗(瘦肉精)检测方法研究进展[J]. 动物科学与动物医学, 2002, 19(4): 32-34.
- [5] 李俊锁, 钱传范. 兽药残留免疫分析及其进展[J]. 中国兽医学报, 1998, 18(4): 411-415.
- [6] 何方洋, 邱阳生, 杨根海, 等. 克伦特罗单克隆抗体的制备与鉴定[J]. 中国兽医科技, 2002, 31(6): 30-32.
- [7] 杨利国, 胡少昶, 魏平华, 等. 酶免疫测定技术[M]. 南京: 南京大学出版社, 1998.
- [8] 郭尧君. 蛋白质电泳实验技术[M]. 北京: 科学出版社, 2001.
- [9] 孙敬方. 动物实验方法学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2002.
- [10] 刘辉. 临床免疫学和免疫检验实验指导[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2002.
- [11] 黄永科, 刘清, 周光宏. 用2种偶联率率偶联蛋白质制备猪抗克伦特罗血清的比较[J]. 中国兽医科技, 2001, 31(2): 26-27.
- [12] 陈继明, 龚晓明, 陆承, 等. 免疫源蛋白与自身蛋白作为载体制备抗克伦特罗血清[J]. 南京农业大学学报, 1998, 21(3): 84-88.
- [13] Bernard F. erlanger. The preparation of antigenic haptencarrier conjugate: a survey methods in enzymology[M]. New York: Academic Press, 1980. 70.