

对氯甲基苯甲酸链接的莱克多巴胺人工抗原的合成与鉴定

陈 臣¹, 罗顺菁^{1*}, 刘成梅¹, 邹常春², 汪志宇¹, 王文飞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.南昌大学资产管理处, 江西 南昌 330031)

摘 要: 采用对氯甲基苯甲酸(CBA)为链接臂, 用混合酸酐法将莱克多巴胺(RAC)与牛血清白蛋白(BSA)偶联制备人工抗原(RAC-CBA-BSA), 通过紫外、红外、电泳鉴定抗原合成成功; 再以卵清蛋白(OVA)为载体蛋白合成包被抗原(RAC-CBA-OVA), 测定其与抗体的亲和力和抑制率。间接竞争ELISA结果以对CBA为链接臂合成的包被抗原对应的抗体滴度为7047.3、IC₅₀为17.05ng/mL, 结果表明, CBA可以用于RAC人工抗原的合成, 使用RAC-CBA-OVA作为包被抗原可以提高ELISA检测灵敏度。

关键词: 莱克多巴胺; 对氯甲基苯甲酸; ELISA灵敏度; 人工抗原

Synthesis and Characterization of Ractopamine Antigen Linked by 4-Methylbenzoic Acid

CHEN Chen¹, LUO Shun-jing^{1*}, LIU Cheng-mei¹, ZOU Chang-chun², WANG Zhi-yu¹, WANG Wen-fei¹

(1. State Key Laboratory of Food Science and Technology, Nanchang University, Nanchang 330047, China;

2. Asset Management Department, Nanchang University, Nanchang 330031, China)

Abstract: The mixed anhydride method was used to prepare artificial antigen through the conjugation between ractopamine (RAC) and bovine serum albumin (BSA) in the presence of 4-chloromethyl benzoic acid (CBA). The prepared artificial antigen was identified by IR, UV and SDS-PAGE. RAC-CBA was also conjugated with OVA to form a coating antigen. The affinity and inhibitory activity of the coating antigen were measured. This study suggests that CBA can be used to prepare artificial RAC antigens. Meanwhile, CBA conjugated with RAC to form coating agent improves the sensitivity of ELISA.

Key words: ractopamine; 4-chloromethyl benzoic acid; ELISA sensitivity; artificial antigens

中图分类号: S859.84

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630(2013)01-0180-05

莱克多巴胺(RAC)具有营养重分配, 降低胴体脂肪, 提高瘦肉率, 同时使动物增重的作用^[1-2]。但是人类过量食用(超过1.25μg/(kg·d))含有该残留的畜产品会引发食物中毒, 表现为恶心、呕吐、心悸、头疼、目眩等^[3-4], 对患有高血压、青光眼、糖尿病等疾病的患者则可能危及生命。RAC在中国被禁止使用于饲料添加, 是中国食品安全委员会当前发布的第一批82种“禁止在饲料、动物饮用水和畜禽水产养殖过程中使用的药物和物质”之一。在体育比赛中, RAC可以增强运动员、动物(如马)肌肉, 提高运动成绩, 国际奥委会已将其列为禁用药物。

目前对于RAC的检测方法主要有气质联用(GC-MS)^[5-6]、高效液相色谱(HPLC)^[7]以及液质联用(LC-MS)^[8-9]等方法, 这些方法准确、科学, 但对操作者的专业要求较,

仪器昂贵, 且维护费用较高, 不利于推广应用。酶联免疫吸附检测法(ELISA)是一种基于抗原抗体反应和酶化学反应的快速检测方法, 灵敏度高、特异性强、样品前处理简单, 不需要昂贵的仪器设备, 对操作人员的专业要求相对较低, 非常适于现场监控和大批量筛选。

RAC人工抗原是研制酶联免疫吸附检测试剂的首要基础, 对于提高RAC检测的灵敏度及准确性, 有重要的影响。异源性ELISA检测中, 由于抗体对包被抗原的识别减弱, 使得待测物能与抗体结合机会增加, 与包被抗原充分竞争, 从而能检测较低浓度的待测物, 提高检测灵敏度。且免疫半抗原与包被半抗原的差异性越大, 检测灵敏度越高^[10]。半抗原的结构对ELISA检测灵敏度的影响, 从高到低依次为连接位点、链接臂结构、链接臂

收稿日期: 2011-10-07

基金项目: 江西省科技支撑计划项目(2010BNA09500)

作者简介: 陈臣(1982—), 男, 硕士, 研究方向为营养与食品卫生。E-mail: jordan0297@vip.sina.com

*通信作者: 罗顺菁(1969—), 女, 副教授, 硕士, 研究方向为食品安全。E-mail: luoshunjing@yahoo.com.cn

长度。目前针对连接位点、链接臂结构、链接臂长度对RAC ELISA检测灵敏度的影响的研究未见报道。

本实验是针对链接臂结构对ELISA检测灵敏度影响进行研究。链接臂的选择首先必须考虑其结构有利于进行蛋白质与RAC的偶联反应；其次根据Wright等^[11]提出的理论，链接臂越长，产生高特异性抗体的可能性越低，因此链接臂的长度必须合适；最后要求合成抗原纯化方便。对氯甲基苯甲酸(CBA)易溶于无机相，在半抗原合成中，未参加反应的CBA遇水便可析出，方便除去，而未反应的RAC也可以在随后的透析中被除去，抗原纯化方便。本实验使用对CBA作为链接臂，通过混合酸酐法制备人工抗原，探索对CBA作为链接臂制备RAC人工抗原的方法及条件，并对其进行初步鉴定。再与以戊二酸酐为链接臂制备的包被抗原(RAC-SA-OVA)比较不同半抗原对ELISA检测灵敏度的影响。

1 材料与方 法

1.1 材料、试剂与仪器

RAC(生物纯) 武汉华美公司；CBA(分析纯) 强中化工有限公司；牛血清白蛋白(BSA)、卵清蛋白(OVA) 美国Sigma公司；*N,N*-二甲基酰胺(DMF)、1,4-二氧六环、三正丁胺、氯甲酸异丁酯、无水乙醇等试剂均为分析纯。

320-S pH计 梅特勒-托利多仪器有限公司；各种规格的移液枪 芬兰雷勃公司；磁力搅拌器 德国IKA公司；WH-3漩涡混匀仪 上海沪西分析仪器厂有限公司；SHZ-82气浴恒温振荡器 荣华仪器设备有限公司；DU640紫外-可见分光光度计 美国Beckmen公司；蛋白质电泳仪 美国Bio-Rad公司；MK3酶标仪、NICOLIT5700红外光谱仪 美国热电公司；可拆酶标板 美国康宁公司；冷冻干燥机 美国Labconco公司。

1.2 方 法

1.2.1 RAC人工抗原的合成

称取34mg RAC溶于4mL DMF-1,4-二氧六环(体积比1:1)溶液中，加入20.5mg CBA，磁力搅拌室温下反应过夜，加入10 μ L三正丁胺，冰浴反应10min，取出反应物至室温，加入7 μ L氯甲酸异丁酯，室温下反应2h；称取130mg BSA、45mg OVA分别溶解于10mL DMF-PBS-蒸馏水(体积比1:1:2)中；分别取5mL BSA、OVA溶液，0 $^{\circ}$ C冰浴备用，各取600 μ L RAC-CBA溶液以每1滴/50s的速率分别滴加至BSA、OVA溶液中，期间用0.1mol/L NaOH溶液调整pH8.0左右，冰浴反应4h，反应液1000r/min离心10min，取上清4 $^{\circ}$ C透析3d。冷冻干燥至粉末备用。

1.2.2 全抗原的鉴定

1.2.2.1 全抗原红外光谱扫描

分别称取干燥的RAC-BSA全抗原2mg和KBr 200mg放入玛瑙钵中，在红外灯的照射下将混合物研磨均匀后，装入压片模具中，在8t压力下压制10min，压制厚度为1mm的透明KBr压片，同样方法制备BSA和RAC的KBr压片后，用红外光谱仪进行扫描，得到红外光谱图。

1.2.2.2 全抗原紫外光谱扫描及偶联比的计算

将RAC、BSA、OVA和两种全抗原RAC-BSA、RAC-OVA用PBS稀释成一定浓度的溶液，然后用DU460紫外扫描仪在波长200~400nm处进行紫外扫描，得到紫外吸光图谱。根据公式(1)进一步计算出两种全抗原的浓度比，即偶联比(c_1/c_2)^[12]。

$$c_1/c_2 = \frac{(OD_{274nm} \times OD'_{278nm} - OD_{274nm}^B \times OD_{278nm}) \times c'_1}{(OD_{278nm} \times OD'_{274nm} - OD_{278nm}^B \times OD_{274nm}) \times c'_2} \quad (1)$$

式中： OD_{274nm} 为全抗原在RAC最大吸收波长处的光密度； OD'_{278nm} 为BSA在其最大吸收波长处的光密度； OD_{274nm}^B 为BSA在RAC最大吸收波长处的光密度； OD_{278nm} 为全抗原在BSA最大吸收波长处的光密度； OD'_{274nm} 为RAC在其最大吸收波长处的光密度； OD_{278nm}^B 为RAC在BSA最大吸收波长处的吸光度； c'_1 为RAC标准物的浓度； c'_2 为BSA标准物的浓度。

1.2.2.3 全抗原SDS-PAGE电泳

用蒸馏水分别稀释RAC、BSA、OVA和两种全抗原RAC-BSA、RAC-OVA，煮沸5min再冰浴5min，1000r/min离心5min，取上清。5%浓缩胶、16%分离胶，电极缓冲液为250mmol/L Tris-HCl(pH8.3)，甘氨酸0.1% SDS。起始恒定电流2.1mA/cm浓缩样品，溴酚蓝进入分离胶后，将电流调制3.0mA/cm，电压为60V，直至溴酚蓝条带距封底胶约0.5cm时停止电泳，用0.025g/mL的考马斯亮蓝(R-250)染色，用25%的甲醇和10%的冰乙酸制成脱色液脱色至背景清晰。用凝胶成像仪得到电泳图^[13]。

1.2.3 动物免疫

采用以戊二酸酐为链接臂制备的RAC-SA-BSA免疫原免疫小鼠制备抗血清。具体方法为：初免将人工抗原与弗氏完全佐剂1:1混合，采用皮下多点注射，免疫5周龄的雌性Balb/c小鼠；二免、三免、四免使用弗氏不完全佐剂替换弗氏完全佐剂与抗原1:1混合，同样方法免疫Balb/c小鼠。四免后断尾取血并用ELISA法检测。

1.2.4 不同包被抗原对抗体亲和力的影响

用间接ELISA法对比两种包被抗原与抗体的亲和力。具体如下：RAC-SA-OVA、RAC-CBA-OVA稀释至5 μ g/mL包被酶标板，每孔100 μ L，4 $^{\circ}$ C静置过夜后用1% PBST洗涤；加入380 μ L 3%脱脂牛奶封闭酶标板，37 $^{\circ}$ C温育1h后洗涤；加入100 μ L梯度稀释的抗体，抗体稀释度为1:800~1:51200倍比稀释，37 $^{\circ}$ C温育1h后洗涤；加入

100 μ L酶标羊抗小鼠IgG, 37 $^{\circ}$ C温育1h后洗涤; 加入100 μ L TMB显色液, 37 $^{\circ}$ C温育15min; 加入50 μ L 2mol/L的H₂SO₄溶液终止显色, 用酶标仪检测其在波长450nm处OD值为阳性值。抗体滴度OD值为1.0时的抗体稀释度。

1.2.5 不同包被抗原对ELISA检测灵敏度的影响

用间接竞争ELISA法检测不同包被抗原对ELISA检测灵敏度的影响。将1.2.4节中加梯度稀释抗体一步改为加入50 μ L质量浓度为0、4、10、20、40、100、140、200ng/mL RAC标准品及50 μ L最佳工作质量浓度的RAC单抗, 其余步骤相同, 计算抑制率(IR)。半数抑制率IC₅₀为抑制率达到50%时的竞争品质量浓度。

$$IR\% = \left(1 - \frac{OD}{OD_0}\right) \times 100 \quad (2)$$

式中: OD为加入竞争品孔的OD值; OD₀为竞争品质量浓度为0孔的OD值。

2 结果与分析

2.1 全抗原红外光谱扫描结果

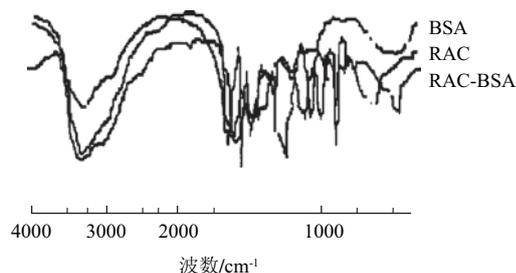


图1 RAC、BSA和RAC-BSA红外扫描光谱图
Fig.1 IR spectra of RAC, BSA and RAC-BSA

如图1所示, 对比BSA和RAC-BSA人工抗原的红外光谱图在3500~2600cm⁻¹和1900~1500cm⁻¹区域出现了类似的吸收峰, 且明显呈现蛋白质吸收特点: 3297cm⁻¹处的氨基N—H吸收峰、1666cm⁻¹和1549cm⁻¹的两个酰胺谱带^[4]等, 判断应该是BSA中氨基酸产生的特征峰; 同时, 对照RAC和RAC-BSA人工抗原的红外光谱图发现它们在830cm⁻¹附近有类似的吸收出现, 且BSA的红外光谱图不具备这个特点; 另外在RAC-BSA全抗原的红外光谱图中还能找到1000~1280cm⁻¹处出现的由于RAC与BSA偶联而产生的C—N伸缩振动吸收峰。综上所述, 可以得出结论在RAC-BSA的KBr压片中含有RAC和BSA, 且RAC-BSA人工抗原偶联成功。

2.2 全抗原紫外光谱扫描结果

如图2所示, RAC和BSA的最大吸收峰分别在波长为274nm和278nm处; 而RAC-BSA全抗原的最大吸收峰在波长为276nm处, 与BSA比较, 波峰左移, 证明人工抗原偶联成功。同样, RAC和OVA人工抗原的紫外光谱图中

看到相同情况, RAC-OVA全抗原的最大吸收与OVA比较同样向左偏移, 证明RAC-OVA人工抗原也偶联成功。

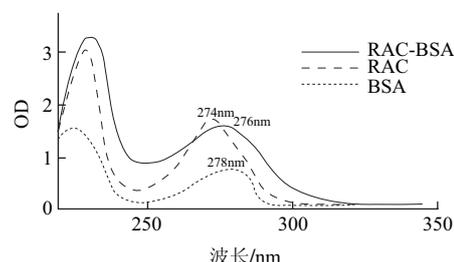


图2 RAC、BSA和RAC-BSA紫外扫描光谱图
Fig.2 UV spectra of RAC, BSA and RAC-BSA

2.3 偶联比的计算结果

RAC-BSA全抗原偶联比为17.6:1; RAC-OVA全抗原的偶联比为4.4:1。

2.4 全抗原SDS聚丙烯酰胺凝胶电泳结果

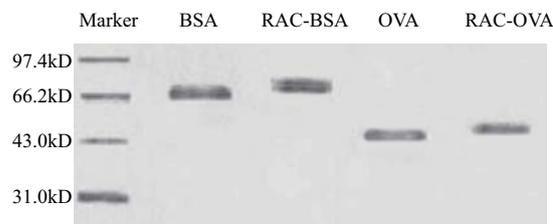


图3 人工抗原SDS-PAGE图
Fig.3 Identification of artificial antigens by SDS-PAGE

如图3所示, RAC-BSA全抗原的泳动速度小于BSA, 可见RAC-BSA全抗原的分子质量大于BSA, 由此可以证明RAC与BSA已经偶联成功, 同时, RAC-BSA全抗原的条带在其相应位置出现了一定程度的弥散现象, 这是因为每一个BSA分子和RAC小分子偶联的数目并不完全相同。使用紫外凝胶成像系统分析软件分析后, 得出BSA的分子质量约66.2kD, RAC-BSA全抗原的分子质量大约为73.5kD, 全抗原中RAC与BSA的偶联比约为18.9:1, 与紫外扫描结果基本一致。OVA的结果为4.5:1, 与紫外扫描结果基本相符。

2.5 抗体效价检测结果

在包被抗原浓度等其他ELISA条件相同时, 改变包被抗原种类, 则其在波长450nm处的OD值反映了不同包被抗原对抗体的亲和力, OD值越高, 亲和力越高。图4为两种包被抗原间接竞争ELISA法中对应的抗体稀释曲线。相同抗体稀释度下, RAC-SA-OVA的OD值略高于RAC-CBA-OVA, 由图计算二者的抗体滴度分别为17325.6和7047.3。由于与免疫半抗原具有不同的链接臂, 降低了人工抗体对链接臂部分的识别, 因此RAC-CBA-OVA对抗体的亲和力略小于RAC-SA-OVA^[15]。

提高ELISA检测的灵敏度是优化ELISA检测方法的重要手段。图5所示为间接竞争ELISA的抑制曲线, 在相

同抑制率下, RAC-CBA-OVA组的竞争品质量浓度低于RAC-SA-OVA组。同时, 半数抑制率 IC_{50} 为判断ELISA灵敏度的重要参数, 包被RAC-CBA-OVA的ELISA检测的 IC_{50} 为17.05ng/mL低于包被RAC-SA-OVA的20.90ng/mL。由于CBA-OVA在ELISA检测过程中与抗体结合力下降, 使得抗体与RAC作用几率增加, 检测的抑制率被提高, 因此使用RAC-CBA-OVA做ELISA检测包被抗原对检测提高灵敏度有所帮助^[16]。

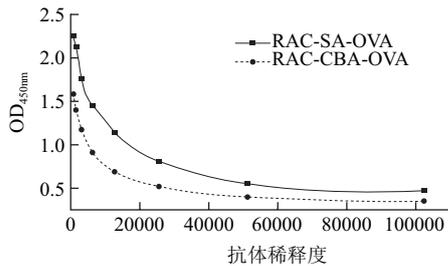


图4 两种包被抗原间接竞争ELISA的抗体稀释曲线图

Fig.4 Antibody dilution curves obtained using two different coating antigens

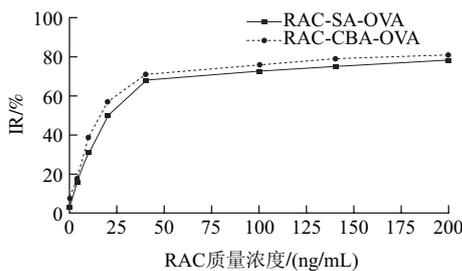


图5 两种包被抗原间接竞争ELISA的抑制曲线

Fig.5 ELISA inhibition curves obtained using different coating antigens

3 讨论

食品中残留的农药、抗生素及其他人为添加的有害成分的分子质量普遍小于1kD, 这些小分子物都属于半抗原, 即虽然具有抗原性, 但不具备免疫原性, 这是因为根据小分子半抗原与大分子载体偶联, 即人工抗原^[17]。小分子物质的免疫分析研究的关键在于合成出高质量的人工抗原。BSA和OVA由于具有稳定的理化性质、良好的溶解性以及具有较多容易修饰的官能团, 而被普遍认为是比较合适的人工抗原载体蛋白, 同时, 人工抗原合成之后, 对其进行相应的鉴定是十分必要的, 本实验中对人工抗原的鉴定主要目的在于判断抗原是否偶联成功、偶联率的计算以及人工抗原的纯度鉴定。通过红外吸收光谱法、紫外吸收光谱法、SDS-PAGE凝胶电泳对合成的人工抗原进行综合鉴定, 表明对CBA作为链接臂的RAC人工抗原合成成功。同时, 以对CBA为间接臂合成的RAC-

BSA人工抗原其偶联比与常用的以戊二酸酐连接的人工抗原偶联比接近, 且符合Schneider等^[18]提出的有关人工免疫原最适宜偶联比应在10:1~20:1之间的要求, 故可用于全抗原的合成。

根据有关包被抗原对ELISA检测灵敏度影响的相关报道^[19], 以对CBA为链接臂合成的RAC-OVA的偶联比也较为适宜。同时, 由于CBA和戊二酸酐在合成人工抗原时结合位点相同, 而其结构和长度并不相同, 两者对比, 能直观地反映人工抗原链接臂在ELISA检测灵敏度中的影响。Kim等^[10]的报道中提到, 改变包被抗原链接臂能在一定程度上减少链接臂对ELISA检测灵敏度的干扰, 实验结果表明, 在以RAC-SA-BSA为免疫原的体系中, 包被抗原RAC-CBA-OVA的亲合力低于RAC-SA-OVA, 却拥有更高的灵敏度, 这是由于包被抗原与免疫抗原所采用的链接臂不同, 减少了对抗体中链接臂部分识别的干扰, 故对提高ELISA检测灵敏性有积极作用。

参考文献:

- [1] SHELVER W L, SIMINTH D J, BERRY E S. Production and characterization of a monoclonal antibody against the β -adrenergic agonist ractopamine[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2000, 48: 4020-4026.
- [2] GABIOLA C, CALONGE M A G, PORTILLO M P, et al. Validation of a method for the determination of salbutamol in animal urine by gas chromatography-mass spectrometry and its application to treated lamb samples[J]. J Microcolumn Separations, 1996, 8: 361-364.
- [3] VANOOSTHUYZE K E I, ARTS C J M, PETEGHEM C H V. Development of a fast and simple method for determination of β -agonists in urine by extraction on empore membranes and detection by a test strip immunoassay[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1997, 45: 3129-3137.
- [4] SHELVER W L, SMITH D J. Determination of ractopamine in cattle and sheep urine samples using an optical biosensor analysis: comparative study with HPLC and ELISA[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2003, 51: 3751-3721.
- [5] SHEN S H, OYANG J, BAEYENS W R G, et al. Determination of β -agonists by ion chromatography with direct conductivity detection[J]. J Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2005, 38: 166-172.
- [6] REGUEIRO J A G, PEREZ B, CASADMONT G. Determination of clenbuterol and salbutamol in urine by capillary gas chromatography with capillary columns of 100 μ m[J]. J Chromatogr A, 1993, 655: 73-76.
- [7] POLETTINIA A, MONTAGNA M, HOGENDOORN E A, et al. Applicability of coupled-column liquid chromatography to the analysis of β -agonists in urine by direct sample injection 1. Development of a single-residue reversed-phase liquid chromatography-UV method for clenbuterol and selection of chromatographic conditions suitable for multi-residue analysis[J]. J Chromatogr A, 1995, 695: 19-31.
- [8] JOSEFSSON M, SABANOVIC A. Sample preparation on polymeric solid phase extraction sorbents for liquid chromatographic-tandem mass spectrometric analysis of human whole blood: a study on a number of beta-agonists and beta-antagonists[J]. J Chromatogr A, 2006, 1120: 1-12.

- [9] SPYRIDAKI M H, VONAPARTI P K A, VALAVIANI P, et al. Doping control analysis in human urine by liquid chromatography-electrospray ionization ion trap mass spectrometry for the Olympic Games Athens 2004: determination of corticosteroids and quantification of ephedrine, salbutamol and morphine[J]. *Anal Chim Acta*, 2006, 573: 242-249.
- [10] KIM Y J, CHO Y A, LEE H S, et al. Investigation of the effect of hapten heterology on immunoassay sensitivity and development of an enzyme-linked immunosorbent assay for the organophosphorus insecticide fenthion[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2003, 494(1/2): 29-40.
- [11] WRIGHT A, TAO M H, KABAT E A, et al. Antibody variable region glycosylation: position effects on antigen binding and carbohydrate structure[J]. *EMBO J*, 1991, 10(10): 2717-2723.
- [12] TIJSSEN P. Practice and theory of enzyme immunoassays[M]. New York: Elsevier Amsterdam, 1985: 27.
- [13] SAMBROOK J, RUSSELL D W. Molecular cloning: a laboratory manual[M]. 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2002.
- [14] 陈奎治, 彭亦如, 林伟, 等. 光谱分析法研究八羧酸酐菁铝配合物与牛血清白蛋白的结合作用[J]. *光谱学与光谱分析*, 2007, 27(9): 84.
- [15] ZHANG Q, WANG L, AHN K C, et al. Hapten heterology for a specific and sensitive indirect enzyme-linked immunosorbent assay for organophosphorus insecticide fenthion[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2007, 596(2): 303-311.
- [16] BUTLER J E. Enzyme-linked immunosorbent assay[J]. *Journal of Immunoassay*, 2000, 21(2): 165-209.
- [17] LANDSTEINER K. The specificity of serological reactions[M]. Boston: Harvard University Press, 1945: 78-86.
- [18] SCHNEIDER P, HAMMOCK B D. Influence of the ELISA format and the hapten-enzyme conjugate on the sensitivity of an immunoassay for *S*-triazine herbicides using monoclonal antibodies[J]. *Agric Food Chem*, 1992, 40(3): 525-530.
- [19] 罗舜菁, 钟寒燕, 刘成梅, 等. 氯霉素免疫抗原及包被抗原的制备[J]. *食品科学*, 2010, 31(10): 91-94.