

酸性红 73 多克隆抗体的制备及其应用

常向彩¹ 杨晓农^{*1} 宋定州¹ 刘倩¹ 于学辉¹ 程江² 黄伟¹

¹(西南民族大学生命科学与技术学院 成都 610041) ²(四川省兽药监察所 成都 610041)

摘 要 在酸性红 73 分子的羟基上引入一个带有羧基的“间隔臂”,采用 *N*-羟基琥珀亚胺活性酯法将酸性红 73 分别与牛血清白蛋白(BSA)、卵清蛋白(OA)偶联,合成免疫原和包被原,经免疫新西兰白兔获得多克隆抗体,所得抗体最大效价可达 2.56×10^5 ,建立了酸性红 73 的间接竞争 ELISA 检测方法。本方法的半数抑制浓度(IC_{50})为 181.2 $\mu\text{g/L}$,检出限(LOD)为 7.9 $\mu\text{g/L}$ 。交叉反应实验表明,除苏丹红 3 号(1.13%)外,抗 AR73 抗体与其它竞争物均无交叉反应。在虾仁中的空白添加回收率为 63.5%~90.7%,RSD<6.8%。说明本方法可用于虾仁中酸性红 73 的残留检测。

关键词 酸性红 73; 酸性大红 GR; 多克隆抗体; 活性酯法

1 引 言

酸性红 73(Acid red 73, AR73),俗称酸性大红 GR,是一种化学合成的偶氮盐类染料,主要用于羊毛、丝织物及纸张、皮革的染色,还可用于塑料、电化铝、水泥的着色和染发产品之中。AR73 以致癌物质——对氨基偶氮苯为中间体,有中等毒性,强致癌性。2011 年欧洲委员会已将 AR73 列为禁用染发剂原料^[1]。AR73 能与人血清蛋白(HSA)、DNA 结合,与其竞争具有重要生理功能的生物分子^[2,3]。另外,AR73 分子结构上有两个磺酸基,有报道称含硫染料具有遗传毒性^[4]。AR73 工业废水分解的有毒物质会危害到水生生物及动植物,因此,德国将其污染水的等级列为 3 级(WGK Germany 3)。目前,已建立了多种处理废水中 AR73 的方法^[5~8]。由于 AR73 染色效果好、不易褪色,有被非法添加于虾、肉等食品的蒸煮过程中的案例^[9],从而造成 AR73 的残留。关于虾仁中 AR73 染料的反向高效液相色谱法已有报道^[10],但尚未有 AR73 免疫学检测技术的相关报道。本研究通过分析 AR73 的化学结构,设计并合成了 AR73 的完全抗原,建立了 AR73 染料的 ELISA 快速检测技术,对保障食品安全具有重要意义。

2 实验部分

2.1 仪器、试剂与实验动物

酶联免疫检测仪、通用型电泳仪 164-5070 及凝胶成像系统(美国 BIO-RAD 公司);高速冷冻离心机(德国 Eppendorf 公司);DU-800 紫外/可见光分光光度计(美国 Beckman Coulter 公司);超纯水仪(法国 Millipore 公司);90-2 型恒温磁力搅拌器(上海青浦沪西仪器厂);恒温培养箱(上海齐欣科学仪器公司);96 孔可拆酶标板(美国 Costar 公司)。

酸性红 73 标准品(日本 TCI 公司);牛血清白蛋白(BSA, J&K 公司);卵清白蛋白(OA)、弗氏佐剂,明胶、邻苯二胺(Sigma 公司);辣根过氧化物酶标记羊抗兔 IgG(HRP-IgG,上海生工生物公司);其它试剂均为 AR 或 GR 购于成都科龙化工试剂厂。

3 只健康成年新西兰大白兔 购自四川大学华西医学院实验动物中心。

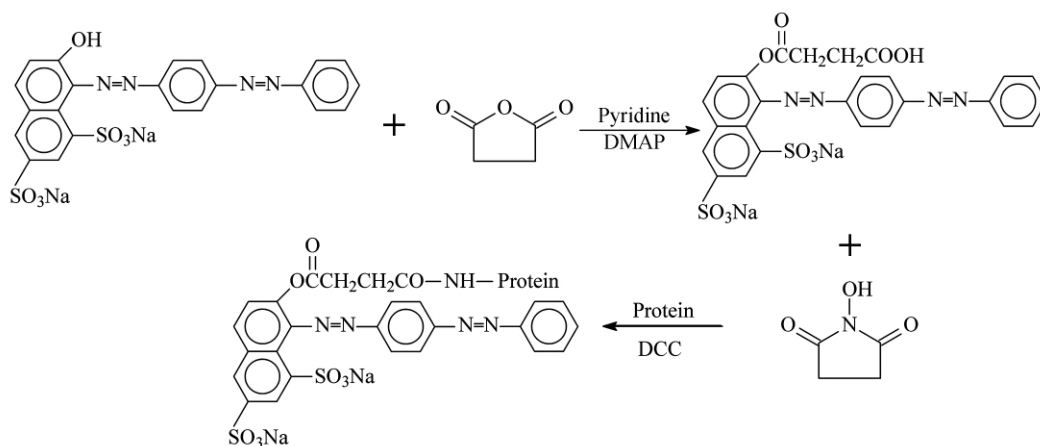
2.2 实验方法

2.2.1 人工抗原的合成与鉴定 将 AR73 与琥珀酸酐反应,在 AR73 分子上引入一个带羧基的“间隔臂”,与 *N*-羟基琥珀亚胺(NHS)、*N,N*-二环己基碳二亚胺(DCC)反应,生成活泼的酸酐中间体,羧基被活化,与蛋白质的氨基反应生成酰胺键,从而与蛋白载体偶联,其合成路线如图解 1 所示(Protein 为载

2012-02-13 收稿;2012-05-26 接受

本文系西南民族大学研究生创新型科研重点项目(No. CX2011SZ16)和西南民族大学研究生学位点建设项目(No. 2011XWD-S0906)资助

* E-mail: yangxn058@yahoo.com.cn



图解 1 AR73 的偶联过程

Scheme 1 Synthetic process of acid red 73 (AR73) conjugates

体蛋白 BSA 或 OA)。

(1) 称取 1.2 g AR73 加入 10 mL 吡啶, 完全溶解后, 加入 1.6 g 琥珀酸酐和 20 mg 4-二甲氨基吡啶 (DMAP), 在 80 °C 水浴搅拌 3 h; 冷却至室温, 调至 pH 3~4, 在 4 °C 静置过夜; 以冰异戊醇重结晶 3 次, 抽滤, 真空干燥, 即得粗制酸性红 73-半琥珀酸酯 (AR73-HS), 回收率为 38.6%。(2) 称取 56 mg AR73-HS, 溶于 1 mL 二甲基甲酰胺 (DMF) 中, 加入 20 mg NHS 和 40 mg DCC, 在室温下搅拌活化过夜; 取上清液缓慢滴加于 3 mL 含有 65 mg BSA 的 PBS 缓冲液中, 在 4 °C 低速搅拌过夜。(3) 将反应液装入处理后的透析袋中, 在 4 °C 用生理盐水搅拌透析 5 d, 换液 10 次, 即得酸性红 73-半琥珀酸酯-牛血清白蛋白 (AR73-HS-BSA), 用作免疫原, -20 °C 冻存。将 BSA 换成 OA, 以同种方法即得酸性红 73-半琥珀酸酯-卵清蛋白 (AR73-HS-OA), 用作包被原。包被原和免疫原分别通过紫外光谱与 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) [11] 进行鉴定。

2.2.2 多克隆抗体的制备 选取 3 只健康纯种新西兰大白兔, 免疫前采血作阴性对照。在兔皮内多点注射, 免疫剂量为 1 mg/只, 以皮下多点注射方式加强免疫 4 次。抗血清以饱和硫酸铵法纯化, 粗提 IgG 组分。

2.2.3 间接竞争 ELISA 方法的建立及样品提取 采用方阵滴定法确定包被原和免疫原的最佳工作浓度, 以此建立对 AR73 的间接竞争 ELISA 检测方法 [12]; 将 AR73 分别换成同等系列浓度的苏丹红 3 号、番红花红、苯酚红、刚果红、碱性品红进行检测。将无竞争物时的 OD 值作为 B_0 值, 各浓度抑制时的 OD 值作为 B 值, 以 B/B_0 为纵坐标, 各竞争物浓度的对数 ($\lg C$) 为横坐标, 绘制竞争抑制曲线。将产生 50% 和 20% 抑制时的竞争物浓度定义为本方法对竞争物的半数抑制浓度 (IC_{50}) 和检出限 (LOD), 交叉反应率 (CR) 按 AR73 IC_{50} 与竞争物 IC_{50} 的百分比计算。

2.2.4 样品的制备提取 选用已知未添加 AR73 染料的虾仁作为空白样品, 添加 AR73 染料的标准品 (添加浓度为 10, 30 和 100 ng/g), 用乙醇-氨水-水 (7:3:1, V/V) 的混合液提取 [10], 并进行空白样品的标准添加回收实验, 评价本方法的准确性。

3 结果与讨论

3.1 酸性红 73 的半抗原与偶联物

AR73 是小分子物质 (分子量为 556.48), 只有反应原性, 没有免疫原性。本实验通过对 AR73 结构上的羟基进行修饰, 得到酸性红 73 的半抗原, 以改进的活性酯法 [13~15] 与载体蛋白偶联制备成完全抗原。偶联物在 274 和 512 nm 处含有 AR73 (500 nm) 与蛋白载体 (270 nm) 的特征峰 (图 1), 这不仅证明抗原与载体蛋白偶联成功, 也可间接表明成功合成 AR73-HS。SDS-PAGE 结果显示, 偶联物的条带比较粗, 且滞后于载体蛋白 (图 2), 由此可以大致判定本方法具有较好的偶联效果。此外, 在偶联、净化和透析过程中, 半抗原的红色始终存在, 也说明半抗原与蛋白偶联成功。免疫原和包被原的浓度分别为 5.

28 和 4.67 g/L ,偶联比分别为 12: 1 和 13: 1^[16]。

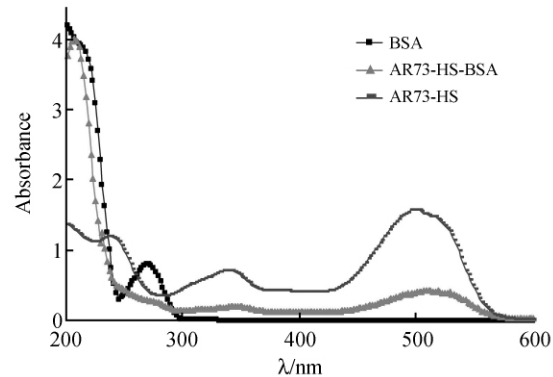


图 1 BSA ,AR73-HS-BSA ,AR73-HS 的紫外扫描图
Fig.1 UV-scanning of BSA ,AR73-hemisuccinate(HS) – BSA and AR73-HS

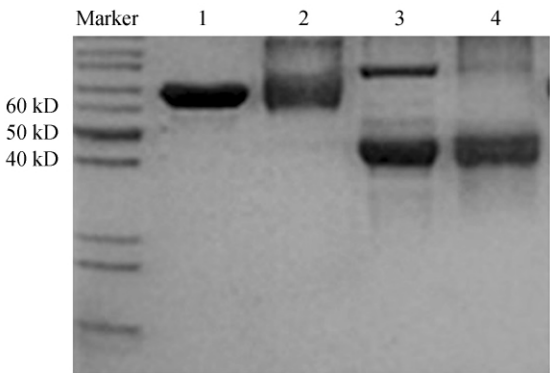


图 2 蛋白载体与偶联物的 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳图
Fig.2 SDS polyacrylamide gel electrophoresis map for protein carrier and conjugates
1. BSA; 2. AR73-HS-BSA; 3. Ovalbumin (OA) ; 4. AR73-HS-OA.

3.2 抗体效价及工作浓度的确定

采用间接竞争 ELISA 法筛选抗体血清的效价 ,在 OD_{492 nm} /OD_{630 nm} 处进行双波长扫描^[17 ,18]。结果表明 3 只兔子抗体血清的效价均在 1.28 × 10⁵ 以上;在同等条件下 2 号兔的血清效价可高达 2.56 × 10⁵ ,故选其进行后续实验。包被原和抗体最佳稀释倍数分别为 3.2 × 10⁴ 和 8.0 × 10³。

3.3 间接竞争 ELISA 方法的特异性检测

根据 2.2.3 节方法建立的竞争抑制曲线见图 3。B/B₀ 与 lgC 之间的线性方程为 B/B₀ = -21.369lgC + 97.312 ,R² = 0.9822。本方法对 AR73 的 IC₅₀ 为 181.2 μg/L; 检出限为 7.9 μg/L。

抗体对其它竞争物 IC₅₀ 的计算方法与 AR73 一致。经计算 抗 AR73 抗体与刚果红、苯酚红、番红花红、碱性品红几乎不存在交叉反应 ,但与苏丹红 3 号的交叉反应率为 1.13% (表 1)。这是由于 AR73 的化学结构与苏丹红 3 号极为相似所造成的。尽管如此 ,实验结果仍能够说明抗 AR73 抗体具有较好的特异性 ,而且也可作为食品中 AR73 与苏丹红类染料的多残留检测提供了参考。

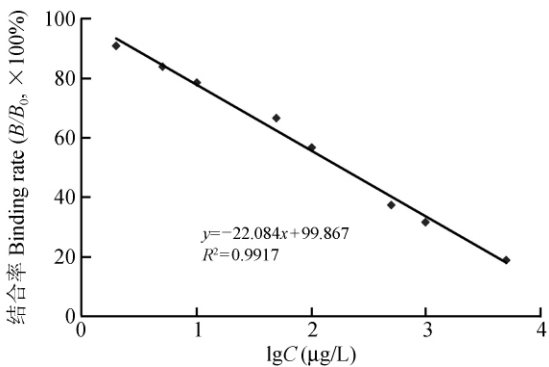


图 3 AR73 对抗 AR73 抗体的抑制曲线
Fig.3 Inhibition curve of antibody for AR73

表 1 抗血清与几种抑制物的交叉反应率
Table 1 Cross-reactivity of anti-serum with some competitors

	酸性红 73 Acid red 73	苏丹红 3 号 Sudan red 3	刚果红 Congo red	苯酚红 Phenol red	番红花红 Safranine	碱性品红 Basic fuchsin
IC ₅₀	181.2	1.59 × 10 ⁴	4.58 × 10 ⁵	—	—	—
交叉反应率 Ratio of cross-reaction (%)	100	1.13	0.03	—	—	—
检出限 LOD (μg/L)	7.9	—	—	—	—	—

—: 未检出 (Not determined) 。

3.4 样品的 ELISA 检测

分别按 10 ,30 和 100 ng/g 的浓度在空白虾仁中添加 AR73 染料 ,用本方法进行检测。结果表明 (表 2) 3个添加水平的样品回收率为 63.5% ~90.7% ,RSD <6.8% ,说明本方法准确度高 ,重复性好 ,可

实现虾仁中 AR73 染料的快速筛选。

本方法不需要昂贵的仪器和复杂的样品提取过程,具有廉价、灵敏、快速等优点,也为下一步将要进行的抗酸性红 73 单克隆抗体的制备、研制快速检测酸性红 73 的免疫试剂盒奠定了基础。

表 2 AR73 在空白虾仁中的添加回收率

Table 2 Recoveries of AR73 from blank shrimps

添加值 Added (ng/g)	测定值 Found (ng/g , n = 6)	Recovery (% , n = 6)	RSD (% n = 6)
10	6.34	63.5	6.8
30	23.1	77.1	5.0
100	90.7	90.7	3.3

References

- 1 European Commission , *List of 179 Substances Banned for use in Hair Dye Products* , http://ec.europa.eu/consumers/sectors/cosmetics/files/doc/179_banned_substances_en.pdf **2010**
- 2 Guo Y M , Yue Q Y , Gao B Y. *Environ. Toxicol. Phar* , **2010** , 30(1) : 45 - 51
- 3 Guo Y M , Yue Q Y , Gao B Y. *Int. J. Biol. Macromol.* , **2011** , 49(1) : 55 - 61
- 4 Dawkar V V , Jadhav U U , Jadhav M U , Kagalkar A N , Govindwar S P. *Word J. Microb. Biot.* , **2010** , 26 (5) : 909 - 916
- 5 Fu F L , Xiong Y , Xie B P , Chen R M. *Chemosphere* , **2007** , 66 (1) : 1 - 7
- 6 Jin R F , Zhou J T , Zhang A L , Wang J. *Word J. Microb. Biot.* , **2008** , 24 (1) : 23 - 29
- 7 Fu F L , Wang Q , Tang B. *J Hazard Mater* , **2010** , 174 (1-3) : 17 - 22
- 8 Zhao L J , Zhou J T , Jia Y J , Chen J F. *J. Hazard Mater* , **2010** , 181 (1-3) : 602 - 608
- 9 Food Safety Commission of Feng County(丰县食品安全委员会) [EB/OL] : <http://www.chinafx.gov.cn/gov/Article.asp?id=345&classid=90&articleid=26309> , 2008
- 10 NING Shang-Yong , GAO Jie , XU Zhi-Qiang , HE Guo-Liang , CUI Xi-Yong , LV Yan-Ni. *Chin. J. Anal. Lab.* , **2008** , 27 (4) : 72 - 75
宁尚勇,高洁,许志强,何国亮,崔西永,吕燕妮. 分析试验室, **2008** , 27(4) : 73 - 75
- 11 Schägger H. *Net. Protoc* , **2006** , 1 (1) : 16 - 22
- 12 Chang X C , Hu X Z , Li Y Q , Shang Y J , Liu Y Z , Gao F , Wang J P. *Food Control* , **2011** , 22 (11) : 1770 - 1775
- 13 SONG Juan , WANG Rong-Mei , WANG Yue-Qiu , TANG Yu-Rong , DENG An-Ping. *Chinese J. Anal. Chem.* , **2010** , 38 (8) : 1211 - 1218
宋娟,王榕妹,王悦秋,唐雨榕,邓安平. 分析化学, **2010** , 38 (8) : 1211 - 1218
- 14 ZHANG Cun-Zheng , YANG Chun-Long , LIU Xian-Jin , CHEN Min , YU Jie. *Chinese J. Anal. Chem.* , **2011** , 39(2) : 225 - 230
张存政,杨春龙,刘贤进,陈敏,俞杰. 分析化学, **2011** , 39(2) : 225 - 230
- 15 Fan Q J , Wang X H , Zhou Q B , Wang L , Zhao Y. *Front. Agric. China* , **2010** , 4(2) : 188 - 194
- 16 ZHANG Qing-Hua , Gao Jian-Zhong , YANG Xian-Le. *Immunological Journal* , **2008** , 24 (6) : 703 - 706
张庆华,高建忠,熊清明,杨先乐. 免疫学杂志, **2008** , 24 (6) : 703 - 706
- 17 Dietemann J , Berthoux P , Gay-Montchamp J P , Batie M , Berthoux F. *Nephrol Dial Transpl* , **2001** , 16(11) : 2246 - 2249
- 18 ZHAO Hong. *China Medical Herald* , **2010** , 7(11) : 52 - 53
赵鸿. 中国医药导报, **2010** , 7(11) : 52 - 53

Preparation and Application of Acid Red 73 Polyclonal Antibody

CHANG Xiang-Cai¹ , YANG Xiao-Nong^{*1} , SONG Ding-Zhou¹ , LIU Qian¹ ,
YU Xue-Hui¹ , CHENG Jiang² , HUANG Wei¹

¹(College of Life Science and Technology , Southwest University for Nationalities , Chengdu 610041 , China)

²(Sichuan Province Institute of Veterinary Drug Control , Chengdu 610041 , China)

Abstract Connecting the hydroxyl of acid red 73 (AR73) molecule with a " spacer arm " containing a carboxyl as hapten , and the hapten was conjugated to bovine serum albumin (BSA) or ovalbumin (OA) by

using N-hydroxysuccinimide active ester method as immunogen and coating antigen respectively , the polyclonal antibody titer was 2.56×10^5 through immunization of New zealand white rabbits , then an indirect ELISA procedure for the determination of acid red 73 was established. The half of inhibition concentration (IC_{50}) was 181.2 $\mu\text{g/L}$, the limit of detection for acid red 73 was 7.9 $\mu\text{g/L}$, and the cross-reactivity study showed that the polyclonal antiserum was highly specific to AR73 , and no cross-reactivity was detected between the obtained polyclonal antiserum and the other competitors except to Sudan red III (1.13%) . The recoveries from the standards fortified blank samples were in the range of 63.5% – 90.7% with RSD lower than 6.8% . The developed method can be used to determine the acid red 73 residue in shrimps , and can help to prepare the monoclonal antibody and develop the rapid test kits for acid red 73.

Keywords Acid Red 73; Acid Red GR; Polyclonal antibody; Active ester method

(Received 13 February 2012; accepted 26 May 2012)

《分析测试学报》2013 年征订启事

国内刊号: CN 44-1318/TH

国际标准刊号: ISSN 1004-4957

国际刊名化代码 CODEN: FCEXES

邮发代号: 46-104

国外代号: BM 6013

广告经营许可证: 440000100186

《分析测试学报》是由中国广州分析测试中心、中国分析测试协会共同主办的全国性学术刊物,中文核心期刊。刊登质谱学、光谱学、色谱学、波谱学、电化学、电子显微学等方面的分析测试新理论、新方法、新技术的研究成果,介绍新仪器装置及在生物、医药、化学化工、商检、食品检验等方面实用性强的实验技术。适合科研院所、高等院校、检测机构、医药、卫生以及厂矿企业分析测试工作和管理人员阅读。

经过多年的发展,本刊已成为国内知名的化学类核心期刊。2010 年,影响因子在全国化学类刊物排名中列第 5 名,被引频次每年递增约 30% 稿源丰富,基金论文比超过 70%。近几年,本刊刊发的论文被 CA(美国化学文摘)收录率达 94% 2006 年引文频次在 CA 千种表中国部分中列第 38 名,并被国际上其它知名的数据库如日本科技文献速报、俄罗斯文摘、英国分析文摘(AA)、《质谱公报》等收录。在《中文核心期刊要目总览》2008 年版的化学类期刊列第 10 位;进入由全国 8000 种期刊遴选出的 500 种科技期刊组成的“中国科技期刊精品数据库”;中国学术期刊综合评价数据库(CA-JCED)统计刊源;中国科技论文统计源期刊(中国科技核心期刊);《中国科学引文数据库》来源期刊;中国期刊全文数据库(CJFD)收录期刊;《中国核心期刊(遴选)数据库》收录;《中国学术期刊(光盘版)》全文收录期刊;《中国期刊网》全文收录期刊;《中国学术期刊文摘(中、英文版)》收录为源期刊等。

本刊为月刊,国内外公开发行。大 16 开,单价:12.00 元/册,全年 144 元。请在全国各地邮局订阅。未在邮局订到者可直接向本编辑部补订。补订办法:请从邮局汇款至广州市先烈中路 100 号《分析测试学报》编辑部,邮编:510070,写明订户单位、详细地址、收刊人姓名、邮编及补订份数(全年或某期),电话:(020) 87684776 或 37656606, <http://www.fxcxb.com/> (可在线投稿) E-mail: fxcxb@china.com。