

孔雀石绿单克隆抗体制备和酶联免疫检测方法的建立

王 宇¹ 杨金易² 徐振林² 戚 平¹ 沈玉栋^{*2}

¹(广州市食品检验所, 广州 510410) ²(华南农业大学食品学院, 广州 510640)

摘 要 针对孔雀石绿三苯环特征结构,设计合成 1 种高质量半抗原。通过偶联载体蛋白、动物免疫和细胞融合,制备出一株高质量的单克隆抗体 MG-DA4-C7,亚类为 IgG1,轻链为 κ 型。通过对包被原浓度、抗体浓度、二抗浓度的优化,建立了孔雀石绿间接竞争酶联免疫分析方法。方法半抑制浓度(IC_{50})为 0.96 $\mu\text{g/L}$,线性检测范围($IC_{20} \sim C_{80}$)为 0.1 ~ 8.1 $\mu\text{g/L}$, $LOD(IC_{10})$ 为 0.05 $\mu\text{g/L}$,回归方程 $y = -0.3274\lg x + 0.4698$ ($R^2 = 0.9891$)。本方法特异性高,与代谢物隐孔雀石绿交叉反应小于 0.1%,与结晶紫、灿绿交交叉反应率分别为 18.1% 和 26.5%;实际样品添加回收率为 87.3% ~ 107.3%。本方法测定结果经 HPLC-MS/MS 方法确证,二者相关系数达 0.999。本方法可用于鱼类等水产品中孔雀石绿残留的实际检测。

关键词 孔雀石绿; 半抗原; 单克隆抗体; 抗原识别; 酶联免疫分析

1 引 言

孔雀石绿(Malachite green, MG, 图 1)是三苯甲烷类工业染料,从 1933 年起作为杀菌剂、防腐剂被广泛用于预防与治疗水产动物养殖中的水霉病、鳃霉病和小瓜虫病等^[1,2]。但是,孔雀石绿及其代谢物隐性孔雀石绿具有潜在“三致”作用,可能对人类健康与环境造成危害^[3~6]。因此,美国、加拿大、欧盟等国家都禁止在水产养殖中使用孔雀石绿,我国于 2002 年将孔雀石绿列入《食品动物禁用的兽药及其化合物清单中》^[7,8]。然而,由于孔雀石绿杀菌、防腐效果好,且价格低廉,致使一些生产者受利益驱动在水产品养殖、运输及贮存中违规使用情况依然存在^[9,10]。因此,研究孔雀石绿快速检测方法显得尤为重要^[11]。

目前,检测孔雀石绿的方法主要有高效液相色谱法(HPLC)^[12,13]、拉曼光谱法^[14]、液/质联用分析法(LC-MS)^[15,16]和免疫学方法等^[17~22]。仪器分析方法多数需要昂贵的检测仪器,检测成本高,对操作人员技术要求高,难以满足基层量大面广的现场快速筛查需求;有些仪器方法为增强信号需要将 LMG 氧化为 MG 再测定 MG 含量^[14]。免疫分析方法具有灵敏度好、特异性高、操作简便、检测成本低、适合现场筛选等特点^[20],已成为食品、药品等领域快速检测技术的重要组成部分。近年来,关于孔雀石绿抗体制备和免疫检测方法建立的研究报道主要是通过羧基化^[17,18,21]、氨基化^[19]衍生合成半抗原,并制备孔雀石绿抗体,但该方法重复性较差,本课题组多次重复均无法制备出孔雀石绿的抗体。另外, Yang 等^[17]制备出孔雀石绿多克隆抗体,虽然检测限达 0.05 $\mu\text{g/L}$,但鉴于多克隆抗体存在制备周期长、批间重复性差等不足,不利于批量生产和应用; Oplatowska 等^[18]通过制备孔雀石绿单克隆抗体建立了免疫检测方法,但检测灵敏度不理想(检测限为 0.27 $\mu\text{g/L}$)。因此,本研究在前期研究基础^[23,24]上,采用羧乙氧基手臂半抗原新策略,开展了孔雀石绿单克隆抗体稳定制备及高灵敏度间接竞争酶联免疫检测方法(icELISA)研究,方法检测限可达 0.05 $\mu\text{g/L}$,经 HPLC-MS/MS 方法比对验证,本方法检测准确、稳定,整体性能优于现有文献报道,可以满足孔雀石绿的实际检测需求。

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

U-3010A 紫外-可见分光光度计(日本 Hitachi 公司); Multiskan-MK3 多功能酶标仪和 Wellwash-MK2 洗板机(美国 Thermo 公司); API3000 液相色谱三重四极杆质谱仪(美国 Perkin-Elmer 公司);

2016-03-11 收稿; 2016-06-06 接受

本文系国家自然科学基金(No. 31371769),广东省科技计划项目(Nos. 2014A020219008, 2013B040402006, 2016A040403077),广东省自然科学基金项目(Nos. 2013030013338, 2014A030306026)项目资助。

* E-mail: syd_tyx@163.com

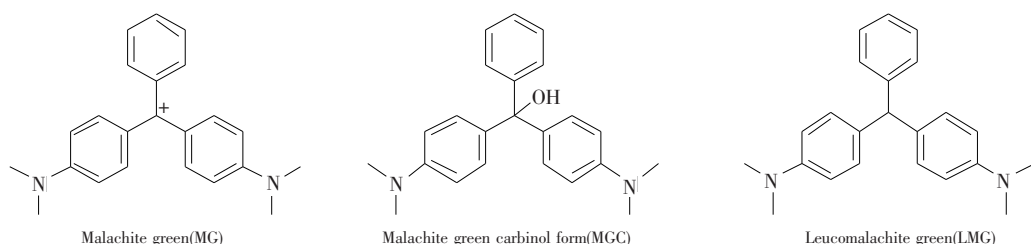


图 1 孔雀石绿及其结构类似物结构式

Fig. 1 The chemical structures of MG and its structural analogues

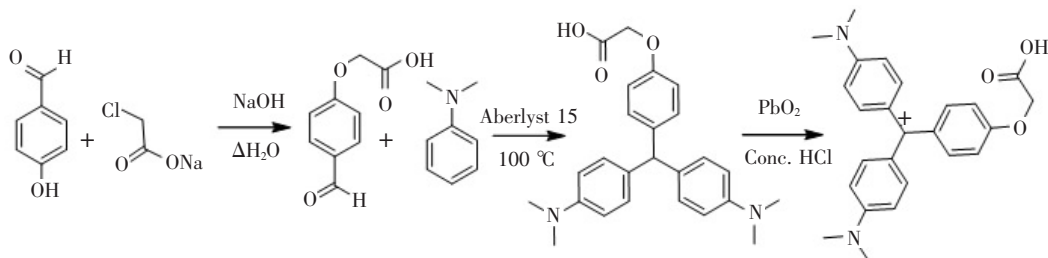
DRX-400/600 核磁共振仪(德国 Burkcr 公司)。

N,N-二甲基苯胺(AR, 中国亭新化工试剂厂); 羧基苯甲醛、羟基苯甲醛、氯乙酸钠、孔雀石绿、孔雀绿(98%, Alfa Aesar 公司); 隐孔雀石绿(91%, 上海安谱科学仪器有限公司); 氘代孔雀石绿(D5-MG, >99.0%, Dr. Ehrenstorfer 公司); 铁粉(>95%, AR 级, 天津市科密欧化学试剂开发中心); 卵清蛋白(98%)、弗氏完全佐剂与不完全佐剂(99%)、*N*-羟基琥珀酰亚胺(99%)、二环己基碳二亚胺(98.6%)和牛血清蛋白(98%)(Sigma 公司); HRP 标记羊抗鼠 IgG 抗体(武汉博士德生物工程有限公司); BCA(Bicinchoninic acid)蛋白浓度测定试剂盒(北京博奥森生物技术有限公司); 小鼠单克隆抗体亚类鉴定试剂盒(Sigma 公司); 包被液(pH 9.6、0.1 mol/L 碳酸盐缓冲液)、洗涤液(含 0.05% 吐温-20、pH 7.4 的 0.01 mol/L 磷酸盐缓冲液)、封闭液(5% 的脱脂奶粉磷酸盐溶液)、稀释液为磷酸盐缓冲液(0.2 g/L KH_2PO_4 , 2.9 g/L $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 0.2 g/L KCl, 8.5 g/L NaCl, 0.05% Tween-20); 其它试剂均为国产分析纯或色谱纯, 鱼、虾等样品购于广州本地超市。

SPF 级 Balb/c 雌性小鼠、普通级雌性昆明鼠均购自广东省医学动物实验中心(广东佛山), 鼠骨髓瘤细胞 SP2/0(来自中山医科大学, 本实验室保藏)。

2.2 实验方法

2.2.1 孔雀石绿半抗原的合成、纯化和鉴定 参考 Burgstahler 等^[25]方法, 合成半抗原 MGH: 于烧瓶中加入 6.1 g 羟基苯甲醛, 10 mL 5mol/L NaOH 溶液, 5.8 g 氯乙酸钠和 40 mL 蒸馏水, 60℃ 下加热搅拌反应 2~3 h。反应结束后用浓 HCl 调 pH=2 左右, NaHCO_3 调碱, 二氯甲烷萃取; 水相用浓 HCl 调至沉淀析出, 抽干得中间产物 1。参考文献[26]方法, 取 *N,N*-二甲基苯胺 2.50 g 于烧瓶中, 加入 5.0 g Aberlyst 15 Resin, 搅拌下加等摩尔当量的中间产物 1, 氮气回流加热搅拌过夜。反应完成后, 加入 1.0 mol/L 的 NaHCO_3 溶液, 乙酸乙酯萃取、饱和 NaCl 洗涤、无水硫酸钠除水, 减压旋蒸得中间产物 2。称取 5g 中间产物于圆底烧瓶中, 加 10 mL 蒸馏水, 加 5g PbO_2 , 滴加 1 mL 浓盐酸, 室温搅拌反应过夜后产物用甲醇洗脱, 硅藻土柱层析纯化, 硅胶柱层析纯化得孔雀石绿半抗原 MGH, 合成路线见下式:



半抗原纯化后采用 ESI/APCI-MS 或 ^1H -NMR 鉴定。

2.2.2 人工抗原的合成和鉴定 采用活泼酯法^[27]将半抗原 MGH 与载体蛋白 BSA 和 OVA 分别偶联, 合成系列不同偶联比人工抗原, 采用 Bicinchoninic acid(BCA)法^[28]测定蛋白或偶联物浓度, 采用紫外光谱法^[29]对偶联产物进行鉴定。

2.2.3 单克隆抗体的制备和鉴定 参照文献[30]的方法对 Balb/c 雌鼠进行动物免疫, 采用间接 ELISA 和间接竞争 ELISA 方法对免疫血清进行效价和特异性鉴定; 参照文献[31]的方法进行小鼠脾细

胞与 SP 2/0 瘤细胞的细胞融合与筛选;采用小鼠腹腔诱导腹水制备单克隆抗体^[32],以饱和硫酸铵沉淀法纯化单克隆抗体蛋白^[33];采用间接 ELISA 鉴定抗体亚类,按 Sigma 公司鼠单克隆抗体分类试剂盒说明书操作;采用间接 ELISA 测定亲和常数(K_a)。

2.2.4 icELISA 方法的建立 根据文献^[37]所述操作步骤,棋盘滴定法确定最佳抗体稀释倍数及包被原浓度;通过单因素实验,优化包被抗原种类、浓度和二抗浓度的最佳条件。以 MG 浓度的常用对数值为横坐标,以 B/B_0 为纵坐标(其中, B_0 为不加药物时的吸光值 $A_{450\text{ nm}}$, B 为药物浓度为 x 时的 $A_{450\text{ nm}}$), B/B_0 为 0.5 所对应的浓度即为 IC_{50} 值。以 A_{max}/IC_{50} 的比值作为评价各影响因素的标准,比值越大,则代表灵敏度越高^[34]。选取最佳的反应条件,使用 Origin 9.0 软件,按照四参数对数拟合绘制标准曲线。

2.2.5 添加回收率的测定 孔雀石绿标准品稀释成不同浓度的标准溶液;鱼肉样品:新鲜鱼(去皮剔骨)、虾(虾去头脱壳),将肉剁碎成肉末,于 -20°C 冷冻保存,待用。阴性样品测定:称取 2 g 鱼、虾肉于 15 mL 离心管中,加入 1.2 mL、1 mol/L 的对甲苯磺酸溶液,加入 2.8 mL 蒸馏水或标准品稀释液。剧烈振荡 5 min, 4000 r/min 离心 10 min, 取上清,重复上述操作,合并两次上清,加入 1 mL 正己烷,震荡 1 min, 3000 r/min 离心 5 min, 取下层溶液进行 icELISA 检测;添加回收率测定:实验前称取鱼、虾肉样品,添加浓度分别为 0, 1, 3, 5 $\mu\text{g/kg}$ 的 MG, 震荡均匀,避光放置于 4°C 冰箱过夜,前处理方法同阴性样品测定方法所述。

2.2.6 HPLC-MS/MS 方法验证 采用内标法,在测定样品中加入 10 $\mu\text{g/kg}$ 的氘代 MG 标准液做内标,样品前处理方法同 2.2.5 节。使用 HPLC-MS/MS 进行方法比对,色谱条件如下:色谱柱为 Agilent Zorbax Eclipse Plus C_{18} (150 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm);流动相由乙腈(A)和 5 mol/L 乙酸铵(B)组成,梯度洗脱参数为:0 min:70% A, 30% B; 3~14 min:95% A, 5% B;流速:0.5 mL/min;柱温: 25°C ;进样量:20 μL 。质谱条件:电喷雾离子源(ESI)正离子扫描,采用多反应监测(MRM)模式;电喷雾电压 5500 V,辅助气压力 70 psi,雾化气压力 60 psi,气帘气压力 20 psi,离子源温度 350°C ;孔雀石绿:定性离子对(m/z)329.2/208.2、331.2/315.2,定量离子对(m/z)329.2/208.2,去簇电压 60V,碰撞气能量 48 eV,碰撞室出口电压为 15V;氘代孔雀石绿内标:定性离子对(m/z)334.2/318.3、334.2/213.2,定量离子对(m/z)334.2/318.3,去簇电压 65V,碰撞气能量 51eV,碰撞室出口电压 13V。

3 结果与讨论

3.1 孔雀石绿半抗原的设计与合成

小分子化合物抗体制备关键在于合理结构半抗原的设计合成,通常引入 3~6 个碳原子长度的空间间隔臂有利于目标结构“暴露”于载体表面,易被机体免疫系统识别,增加产生特异性抗体的可能性^[35,36]。本研究基于孔雀石绿三苯环结构,在前期半抗原制备和抗体特异性反应研究结果基础上^[24,37],设计合成基于羧乙氧基手臂的高质量孔雀石绿半抗原,经质谱与核磁技术分析,半抗原 MGH 合成成功(图 2)。MS (APCI positive) m/z : 403.1 $[\text{M}]^+$ 。 ^1H NMR (600 MHz, CDCl_3 , TMS): δ 7.36 (d, $J=8.7$ Hz, 4H), 7.27 (d, $J=10.2$ Hz, 2H), 7.12 (d, $J=8.3$ Hz, 2H), 6.88 (d, $J=8.6$ Hz, 4H), 4.76 (s, 2H), 3.31 (s, 12H)。

3.2 人工抗原的合成与鉴定

一般来说,不同偶联比的抗原对抗体特性有一定影响,有研究认为每 100 kDa 载体蛋白上连接 10~30 个半抗原分子较有利于抗体产生^[38]。同时,不同偶联比的包被抗原也对抗体的竞争识别灵敏度产生影响。因此,本实验通过控制半抗原和载体蛋白偶联时的不同投料摩尔比,合成系列不同偶联比的人工抗原 A1~A6(表 1)。以 BSA 载体基人工抗原 A1 和 OVA 载体基人工抗原 A4 为例,UV-Vis 光谱图显示,抗原同时具备了 MG 和载体蛋白的吸收特征,表明人工抗原合成成功(图 3)。同时,参照 Fedenko^[29]的方法测定了抗原偶联比在 7:1~34:1 之间(表 1)。

3.3 不同偶联比抗原对抗血清识别性能的影响

免疫抗原的半抗原偶联比及载体蛋白,通常会对诱导动物机体产生的抗体识别性能产生影响。为

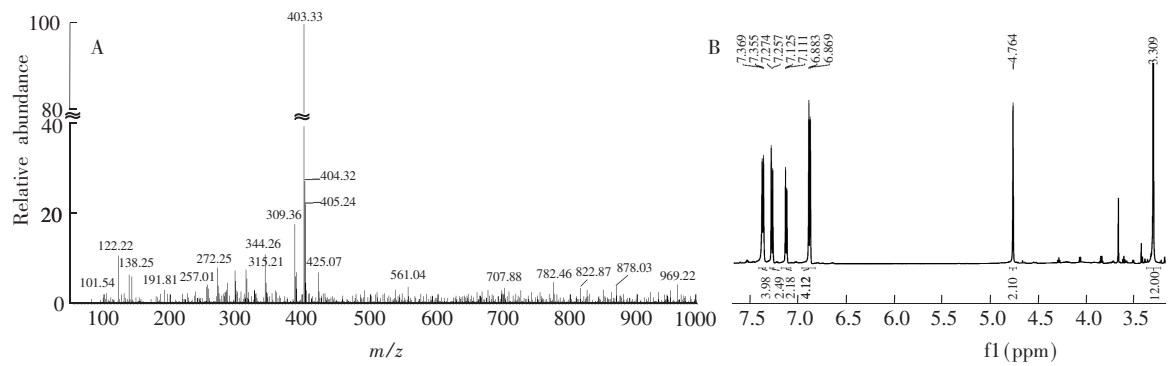


图 2 半抗原 MGH 的离子质谱图 (A) 和核磁氢谱图 (B)

Fig. 2 Mass spectrum (A) and ¹H-NMR spectrum (B) of hapten MGH

表 1 紫外可见吸收光谱法测定人工抗原偶联比结果

Table 1 The coupling ratio of artificial antigen determined by UV-vis absorption spectroscopy

抗原 Antigen	半抗原 Hapten	载体蛋白 Carrier protein	投料摩尔比 Molar ratio	半抗原浓度/半抗原分子量 Hapten concentration/ Hapten molecular weight (μg/mL)/Da	抗原蛋白浓度/蛋白分子量 Antigen concentration/ Protein molecular weight (mg/mL)/Da	偶联比 Coupling ratio
A1	MGH	牛血清白蛋白 BSA	100 : 1	0.024/374	0.13/68000	34 : 1
A2			50 : 1	0.063/443	0.37/68000	26 : 1
A3			20 : 1	0.038/403	0.56/68000	12 : 1
A4		卵清蛋白 OVA	50 : 1	0.052/403	0.34/45000	17 : 1
A5			20 : 1	0.037/403	0.33/45000	13 : 1
A6			10 : 1	0.041/403	0.64/45000	7 : 1

此,实验分别选择了 BSA 和 OVA 两种载体蛋白,采用高、低两种偶联比抗原(A1, A3, A4, A6)免疫动物,对不同偶联比人工抗原免疫的 12 只小鼠采取尾部取血,4000 r/min 离心取血清,采用 icELISA 考察了抗血清的亲力和特异性。同时,考虑到抗原偶联比对抗体竞争识别灵敏度产生影响,实验考察了 BSA 和 OVA 两种载体蛋白的 6 种不同偶联比包被抗原条件下抗血清的识别性能(图 4,图 5)。结果表明:以 BSA 为载体的高偶联比(34:1)抗原 A1 免疫获得的抗血清效价(图 4a)显著优于低偶联比抗原 A3 免疫获得的抗血清效价(图 4b),且低偶联比抗原 A3 的抗血清对 MG 无特异性识别(图 4b);以 OVA 为载体的不同偶联比抗原(A4、A6)免疫获得的抗血清效价整体高于 BSA 载体基抗原的血清(OVA: 32000 ~ 64000,BSA:1000 ~ 32000),且基于不同偶联比免疫抗原 A4(图 5a)和 A6(图 5b)获得的抗血清对 MG 均有特异性识别(图 5),其中抗原 A4 的抗血清(图 5a)对 MG 的识别性能最佳,灵敏度 IC₅₀ 为 2.34 μg/mL,抗血清效价达 1:64000。因此,选择抗原 A4 免疫小鼠进行单克隆抗体的制备。

3.4 单克隆抗体的制备与鉴定

参考文献[29]方法进行细胞融合与筛选。培养 10 天后,显微镜观察细胞融合率达 35.6%,杂交瘤细胞克隆长至目镜可视面积的 1/4 ~ 1/3 时,对有杂交瘤细胞的上清液用 icELISA 检测,检测结果有 2 孔呈阳性,阳性率为 4%,且用 icELISA 进行检测,均可被 MG 抑制。选择 A_{450 nm} 值高、对 MG 抑制好的阳性细胞孔进行亚克隆,获得一株稳定分泌抗 MG 抗体的细胞株(命名为 MG-DA4-C7),抗体亚型为 IgM、轻链为 κ 型,抗体亲和力常数(K_a)为 7.19×10⁹ L/mol。

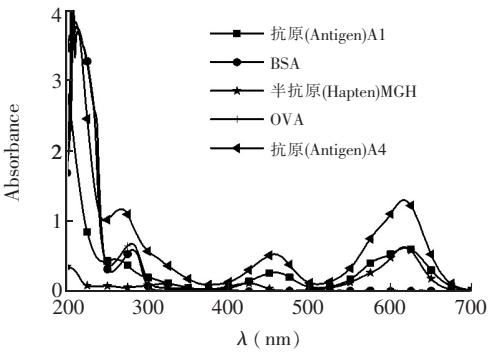


图 3 孔雀石绿人工抗原紫外-可见吸收光谱图

Fig. 3 UV-vis spectra of artificial antigen of MG

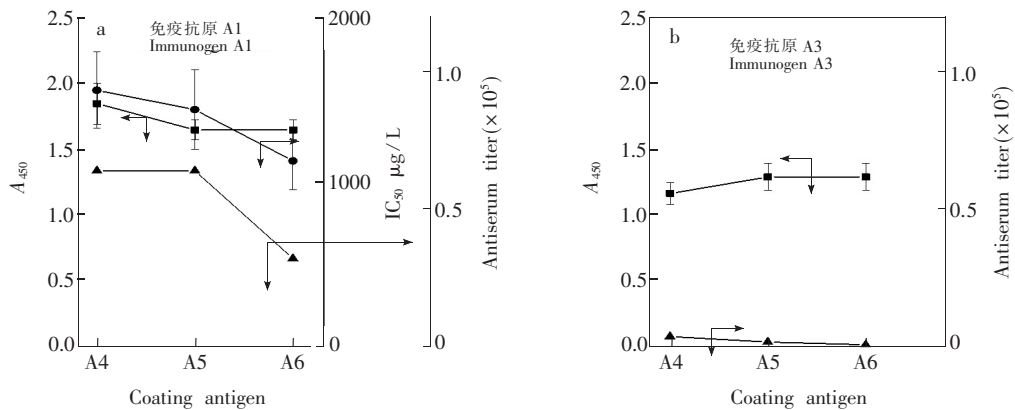


图 4 不同偶联比 BSA 载体基免疫原对抗血清的影响
Fig. 4 Effect on antiserum of BSA carrier-based immunogen with different coupling ratios

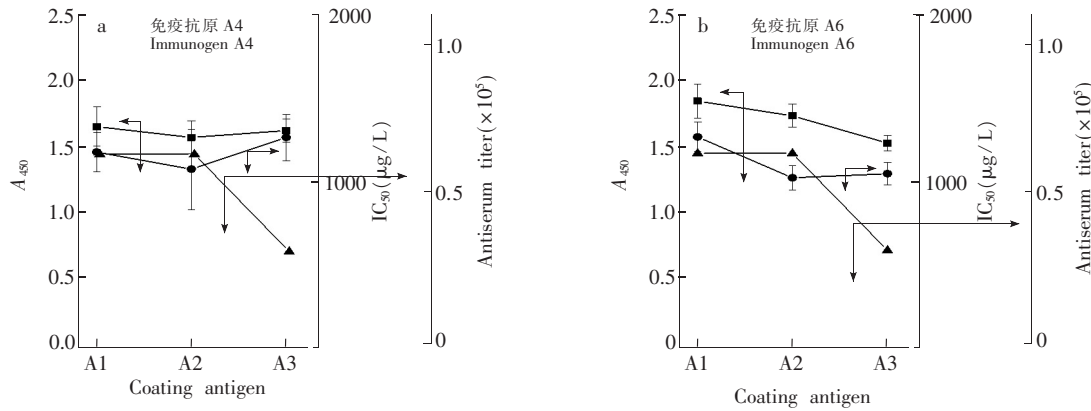


图 5 不同偶联比 OVA 载体基免疫原对抗血清的影响
Fig. 5 Effect on antiserum of OVA carrier-based immunogen with different coupling ratios

3.5 MG 单克隆抗体 icELISA 方法的建立

基于前期半抗原制备和抗体特异性反应研究结果^[24,36],以 A_{max}/IC_{50} 值为判断标准^[35],对包被原浓度、抗体稀释倍数、二抗稀释倍数、缓冲溶液 pH 值进行优化。确定最佳工作条件如下:包被抗原为 A5,包被浓度为 $0.5\text{ }\mu\text{g/mL}$,抗体稀释倍数为 50000 倍 ($2.68\times 10^{-5}\text{ mg/mL}$),二抗稀释倍数为 6000 倍 ($1.67\times 10^{-4}\text{ mg/mL}$),缓冲体系为 0.05% Tween-20、pH=6.4 的 PBST 溶液。

根据上述优化条件,实验建立了孔雀石绿酶联免疫检测方法的标准曲线(图 6),方法半抑制浓度 (IC_{50})为 $0.96\text{ }\mu\text{g/L}$,检测范围 ($IC_{20}\sim IC_{80}$)为 $0.1\sim 8.1\text{ }\mu\text{g/L}$,LOD (IC_{10}) = $0.05\text{ }\mu\text{g/L}$,线性回归方程为 $y=-0.3274\lg x+0.4698(R^2=0.9891)$ 。

3.6 方法特异性分析

以交叉反应率(Cross-reactivity, CR)评价 icELISA 方法的特异性,CR 越高,特异性越差^[35]。计算公式如下:

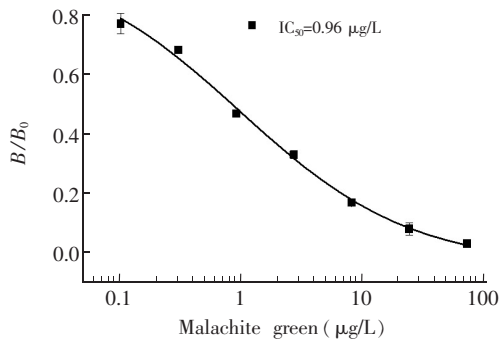


图 6 icELISA 法检测孔雀石绿标准曲线($n=3$)
Fig. 6 Standard curve for detection of malachite green by icELISA ($n=3$)

$$CR(\%) = \frac{IC_{50}}{IC_{50(竞争物)}} \times 100。$$

选择与孔雀石绿结构相似的三苯甲烷类药物以及一些次级结构药物进行方法特异性评价,结果如表 2 所示,基于孔雀石绿单克隆抗体建立的 icELISA 方法特异性较好,与结晶紫、灿烂绿交叉反应率分别为 18.1% 和 26.5%,与隐孔雀石绿、隐性结晶紫交叉反应率分别为 0.035% 和 0.04%,与其它次级结构无交叉反应。

表 2 基于单克隆抗体建立的 ic-ELISA 方法对 MG 及其结构类似物的交叉反应率
Table 2 Cross-reactivity of monoclonal antibody against MG and its analogs by the icELISA

交叉反应物 Competitive compound	结构式 Chemical structure	半抑制浓度 IC ₅₀ (μg/L)	交叉反应率 Cross-reactivity (%)
孔雀石绿 Malachite green, MG		0.96	100
隐性孔雀石绿 Leuco-malachite green, LMG		2730	0.035
隐性结晶紫 Leuco-crystal violet, LCV		2407	0.04
结晶紫 Crystal violet, CV		5.29	18.1
孔雀石绿 carbinol malachite green carbinol, MGc		16.24	5.91
副品红 Pararosaniline, PA		4431	2.17
亚甲基蓝 Methylene blue, MB		138.58	6.92
隐性灿烂绿 Leuco-brilliant green, LBG		>10000	<0.01
灿烂绿 Brilliant green, BG		3.62	26.5
N,N-二甲基苯胺 N,N-Dimethylaniline		>10000	<0.01
N,N-二乙基苯胺 N,N-Diethylaniline		>10000	<0.01
苯甲醚 Anisole		>10000	<0.01
甲苯 Methylbenzene		>10000	<0.01

3.7 添加回收实验

实验选用所购鱼虾样品,先用 HPLC-MS/MS 法准确测定空白样品中 MG 的含量,在此基础上添加已知浓度的 MG,采用 icELISA 进行检测,扣除空白样品 MG 含量后计算添加 MG 的回收率。结果表明方法平均添加回收率为 87.3% ~ 107.3% 之间。通过 HPLC-MS/MS 对方法的准确度进行评价,由表 3 中数据可知:所建立的 icELISA 方法对实际样品检测结果与 HPLC-MS/MS 检测结果,两者相关系数达 0.999,表明所建立的 icELISA 方法能够准确筛选出阳性样品,满足现有实际检测需求。

表 3 icELISA 法和 HPLC-MS/MS 法测定样品添加回收结果比对 ($n=3$)
Table 3 Recoveries of fish sample fortified with MG by icELISA and HPLC-MS/MS method ($n=3$)

样品 Sample	添加浓度 Added ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	icELISA			HPLC-MS/MS		
		测量浓度 Measured value ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	回收率 Recovery (%)	相对标准偏差 RSD (%)	测量浓度 Measured value ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	回收率 Recovery (%)	相对标准偏差 RSD (%)
多宝鱼 Turbot	0.0	0	—	—	0	—	—
	0.5	0.51±0.03	101.9	5.0	0.49±0.02	98.1	4.1
	1.0	0.94±0.06	93.6	2.6	0.96±0.05	95.6	5.2
	3.0	3.07±0.12	102.2	3.9	2.88±0.07	96.0	2.4
鲈鱼 Weever	0.0	0	—	—	0	—	—
	0.5	0.44±0.02	87.3	4.1	0.46±0.03	92.0	6.5
	1.0	0.96±0.07	96.2	7.0	0.93±0.04	93.1	4.3
	3.0	2.98±0.07	99.3	2.3	2.91±0.07	97.2	2.4
桂花鱼 Mandarin fish	0.0	0	—	—	0	—	—
	0.5	0.46±0.02	91.4	3.2	0.47±0.03	94.0	6.4
	1.0	0.94±0.06	93.6	2.6	0.97±0.05	96.7	5.2
	3.0	3.07±0.12	102.2	3.9	2.95±0.08	98.3	2.7
虾 Shrimp	0.0	0	—	—	0	—	—
	0.5	0.47±0.04	94.3	8.1	0.48±0.03	96.0	6.2
	1.0	1.07±0.06	107.3	5.8	0.97±0.05	97.1	5.7
	3.0	2.94±0.07	98.1	2.5	2.96±0.07	98.7	2.4
平均值 Average			97.3			96.1	

3.8 精密度实验

按本实验建立的方法,制备 icELISA 法检测 MG 试剂盒。采用 3 个批次的试剂盒分别测定 0.5, 1.0 和 3.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 浓度添加空白鲈鱼样品,每个浓度样品做 3 个重复,计算样品添加回收率和批内相对标准偏差,统计 3 个批次试剂盒的批间相对标准偏差。表 4 数据表明,试剂盒批(板)内相对标准偏差 <10%,批(板)间相对标准偏差 <5%,完全可以满足实际样品中 MG 残留的快速检测需求。

表 4 icELISA 试剂盒检测鲈鱼样品中 MG 的精密度 ($n=3$)
Table 4 Detection precision of malachite green spiked to weever sample by icELISA kit ($n=3$)

样品 Sample	浓度 Added ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	批次 Batch	测定值 Measured ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	回收率 Recovery (%)	相对标准偏差 RSD (%)	
					批内 Intra-batch	批间 Inter-batch
鲈鱼 Weever	0.5	1	0.44±0.02	87.3	4.1	3.4
		2	0.46±0.03	92.4	6.5	
		3	0.43±0.04	86.0	9.3	
	1.0	1	0.96±0.07	96.2	7.3	2.6
		2	0.93±0.06	93.2	6.4	
		3	0.98±0.06	98.1	6.1	
	3.0	1	2.98±0.07	99.3	2.3	1.0
		2	2.92±0.11	97.5	3.8	
		3	2.95±0.12	98.4	4.1	

References

- 1 Alderman D J. *J. Fish Dis.*, **1985**, 8(3): 289–298
- 2 Alderman D J, Clifton-Hadley R S. *J. Fish Dis.*, **1993**, 16(4): 297–311
- 3 Culp S J, Beland F A. *J. Am. Coll. Toxicol.*, **1996**, 15(3): 219–238
- 4 Fessard V, Godard T, Huet S, Mourot A, Poul J M. *J. Appl. Toxicol.*, **1999**, 19(6): 421–430
- 5 Culp S J, Beland F A, Heflich R H, Benson R W, Blankenship L P, Webb P J, Trotter R W, Shelton S D, Greenlees K J, Manjanatha M G. *Mutat. Res.*, **2002**, 506–507: 55–63
- 6 Mittelstaedt R A, Mei N, Webb P J, Shaddock J G, Dobrovolsky V N, McGarrity L J, Morris S M, Chen T, Beland F A, Greenlees K J, Heflich R H. *Mutat. Res.*, **2004**, 561(1–2): 127–138
- 7 Commission Decision 2004/25/EC, *Off. J. Eur. Commun. L6*, **2004**: 38–39
- 8 *Ministry of Agriculture Bulletin No. 193*, 2002
《食品动物禁用的兽药及其化合物清单》，中华人民共和国农业部公告 193 号，2002
- 9 ZENG Yu-Mei, LU Jia-Ming, DONG Xin. *Chin. J. Food Hyg.*, **2015**, 27(1): 79–81
曾玉梅, 卢嘉明, 董欣. 中国食品卫生杂志, **2015**, 27(1): 79–81
- 10 Veterinary Residues Committee's Annual Report on surveillance for Veterinary Residues in Food in UK for 2001 to 2010. Available from <http://www.vmd.defra.gov.uk/vrc/Reports/annual.htm>
- 11 Chu Y L, Chimeddulam D, Sheen L Y, Wu K Y. *Food Chem. Toxicol.*, **2013**, 62: 770–776
- 12 Xie J, Peng T, Chen D D, Zhang Q J, Wang G M, Wang X, Guo Q, Jiang F, Chen D, Deng J. *J. Chromatogr. B*, **2013**, 913–914: 123–128
- 13 HU Jiang-Tao, YU Ling-Yun, YU Gang, SHUAI Pei-Qiang, ZHANG Ying, WU Meng-Ru, ZHANG Qin. *China Measurement & Test*, **2016**, 42(4): 49–64
胡江涛, 俞凌云, 于刚, 帅培强, 张莹, 吴孟茹, 张琴. 中国测试, **2016**, 42(4): 49–64
- 14 Zhang Y Y, Yu W S, Pei L, Lai K Q, Rasco B, Huang Y Q. *Food Chem.*, **2015**, 169: 80–84
- 15 Schneider M J, Andersen W C. *J. AOAC Int.*, **2015**, 98(3): 658–670
- 16 ZHOU Yan, ZHAO Yong-Gang, ZHANG Bei-Bei, ZHANG Yong, CHEN Guo-Song. *Chinese J. Anal. Chem.*, **2014**, 42(3): 367–374
周岩, 赵永刚, 张蓓蓓, 章勇, 陈国松. 分析化学, **2014**, 42(3): 367–374
- 17 Yang M C, Fang J M, Kuo T F. *J. Agri. Food Chem.*, **2007**, 55(22): 8851–8856
- 18 Oplatowska M, Connolly L, Stevenson P, Stead S, Elliott C T. *Anal. Chim. Acta*, **2011**, 698(1–2): 51–60
- 19 Xing W W, He L, Yang H, Sun C J, Li D W, Yang X M, Li Y, Deng A P. *J. Sci Food Agri.*, **2009**, 89: 2165–2173
- 20 Lequin R M. *Clin. Chem.*, **2005**, 51(12): 2415–2418
- 21 LI Xiao-Li, CHEN Xue-Lan, LIU Chun-Mei, XIONG Yong-Hua. *Food Sci.*, **2009**, 30(24): 283–286
李晓丽, 陈雪岚, 刘春梅, 熊勇华. 食品科学, **2009**, 30(24): 283–286
- 22 LI Zhao-Hui, JIANG Pan-Pan, HE Ji-Guo. *Food Sci.*, **2009**, 30(13): 223–226
李招慧, 姜盼盼, 何计国. 食品科学, **2009**, 30(13): 223–226
- 23 Shen Y D, Deng X F, Xu Z L, Wang Y, Lei H T, Wang H, Yang J Y, Xiao Z L, Sun Y M. *Anal. Chim. Acta*, **2011**, 707(1–2): 148–154
- 24 XIE Huan-Long, WANG Yu, XU Zhen-Lin, YANG Jin-Yi, XIAO Zhi-Li, WANG Hong, LEI Hong-Tao, SUN Yuan-Ming, SHEN Yu-Dong. *Mod. Food Sci. Technol.*, **2015**, 31(12): 325–330
谢焕龙, 王宇, 徐振林, 杨金易, 肖治理, 王弘, 雷红涛, 孙远明, 沈玉栋. 现代食品科技, **2015**, 31(12): 325–330
- 25 Burgstahler A W, Worden L R. *Coumarone. Org. Synth. Coll.*, **1973**, 5: 251; **1966**, 46: 28
- 26 Cho B P, Yang T L, Blankenship L R, Moody J D, Churchwell M, Beland F A, Culp S J. *Chem. Res. Toxicol.*, **2003**, 16: 285–294
- 27 Langone J J, Vunakis H V. *Methods Enzymol.*, **1982**, 84: 628–640
- 28 Brenner A J, Harris E D. *Anal. Biochem.*, **1995**, 226(1): 80–84
- 29 Fedenko V S. *Chem. Nat. Compd.*, **1989**, 25(5): 590–592

- 30 WANG Yu, SHEN Yu-Dong, XU Zhen-Lin, LEI Hong-Tao, WANG Hong, SUN Yuan-Ming. *Chinese J. Anal. Chem.*, **2010**, 38(3): 313–317
王 宇, 沈玉栋, 徐振林, 雷红涛, 王 弘, 孙远明. 分析化学, **2010**, 38(3): 313–317
- 31 Köhler G, Milstein C. *Nature*, **1975**, 256: 495–497
- 32 Gosling J P. *Immunoassays A Practical Approach*. America: Oxford University Press, **2000**: 41
- 33 Wengatz I, Stoutamire D, Gee S J, Hammock B D. *J. Agri. Food Chem.*, **1998**, 46(6): 2211–2221
- 34 Liang C Z, Jin R Y, Gui W J, Zhu G N. *Environ. Sci. Technol.*, **2007**, 41(19): 6783–6788
- 35 Kim Y J, Cho Y A, Lee H S. *Anal. Chim. Acta*, **2003**, 475(1-2): 85–96
- 36 CHENG Jian-Xin, CHEN Mei-Ying, ZHAO Hui-Jie. *Immunology Technique in PlantScience*. Beijing: China Agricultural University Press, **1998**: 45
陈新建, 陈梅英, 赵会杰. 免疫学技术在植物科学中的应用, 北京: 中国农业大学出版社, **1998**: 45
- 37 SHEN Yu-Dong, WANG Yu, SUN Yuan-Ming, LEI Hong-Tao, WANG Hong, XIAO Zhi-Li. *Food Sci.*, **2008**, 29(7): 263–266
沈玉栋, 王 宇, 孙远明, 雷红涛, 王 弘, 肖治理. 食品科学, **2008**, 29(7): 263–266
- 38 Hennion M C, Barcelo D. *Anal. Chim. Acta*, **1998**, 362(1): 33–34

Synthesis of Novel Hapten and Development of Monoclonal Antibody-based Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Malachite Green in Fish Samples

WANG Yu¹, YANG Jin-Yi², XU Zhen-Lin², QI Ping¹, SHEN Yu-Dong^{*2}

¹(Guangdong Provincial Key Laboratory of Food Quality and Safety,
South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

²(Guangzhou Institute for Food Control, Guangzhou 510410, China)

Abstract To produce specific antibodies against malachite green (MG), one special hapten was synthesized and characterized, and conjugated to carrier protein as immunogen. The immunogen showed excellent reactogenicity and immunogenicity. One specific monoclonal antibody (mAb, named MG-DA4-C7) with high sensitivity and specificity for MG in indirect competitive enzyme-linked immunoassay (icELISA) was screened. The isotype was IgG1 and the light chain was κ type. After optimization of ELISA conditions, the proposed icELISA showed a 50% inhibition value (IC_{50}) of 0.96 $\mu\text{g/L}$, a linear range (IC_{20} – IC_{80}) of 0.1–8.1 $\mu\text{g/L}$ and a limit of detection (LOD, IC_{10}) of 0.05 $\mu\text{g/L}$ for determination of MG. The assay showed cross-reactivity of 18.1%, 26.5% with crystal violet and brilliant green, respectively, and negligible cross-reactivity with other metabolites of MG ($<0.1\%$). The average recoveries of MG from spiked fish samples were from 87.3% to 107.3%. Good correlation ($R^2=0.999$) was obtained between the results of icELISA and those of liquid chromatography-tandem mass spectrometry analysis. The proposed icELISA is suitable for the determination of MG in fish samples in a simple and sensitive manner.

Keywords Malachite green; Hapten; Monoclonal antibody; Antigenic-determinant; Enzyme-linked immunoassay

(Received 11 May 2016; accepted 6 July 2016)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 31371769) and the Natural Science Foundation of Guangdong Province, China (Nos. 2013030013338, 2014A030306026)