

基于单克隆抗体的食品中 乳酸链球菌素酶联免疫方法

张世伟*, 冯荣虎, 王士峰, 赖心田, 杨国武

(深圳市计量质量检测研究院, 深圳 518102)

摘要: 建立了乳酸链球菌素的酶联免疫检测方法。以乳酸链球菌素 A 偶联牛血清白蛋白作为抗原制备了单克隆抗体, 该抗体能等同识别乳酸链球菌素 A 和 Z, 对其他多肽类抗生素无交叉反应。所建立的乳酸链球菌素检测方法 IC_{50} 为 $0.49 \mu\text{g/mL}$, 线性范围为 $0.05 \mu\text{g/mL} \sim 5.4 \mu\text{g/mL}$ ($y = -0.12 \ln(x) + 0.385, R^2 = 0.98$)。该方法适用于热加工样品的检测, 前处理简单, 整个检测过程仅需 60min, 为乳酸链球菌素速测提供了有力的技术手段。

关键词: 乳酸链球菌素; 单克隆抗体; 酶联免疫分析; 定量

中图分类号: TS202.3/TS207.3 文献标识码: A 文章编号: 1006-2513 (2017) 08-0166-04

Enzyme linked immunosorbent assay for quantitative detection of Nisin based on monoclonal antibody food

ZHANG Shi-wei*, FENG Rong-hu, WANG Shi-feng, LAI Xin-tian, YANG Guo-wu

(Shenzhen Academy of Metrology and Quality Inspection, Shenzhen 518102)

Abstract: An enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for quantitative detection of nisin was established. Nisin A coupled with bovine serum albumin (BSA) was used as antigen to prepare monoclonal antibody. The antibody could combine with Nisin A and Nisin Z equally and did not combine with other polypeptide antibiotics. The assay exhibited dynamic linear range for detection of Nisin from $0.05 \mu\text{g/mL}$ to $5.4 \mu\text{g/mL}$ ($y = -0.12 \ln(x) + 0.385, R^2 = 0.98$), IC_{50} was 0.49 ng/mL . The assay method could be applied in heat-processed products. The detection time for each sample was 60 min.

Key words: Nisin; monoclonal antibody; enzyme linked immunosorbent assay; quantification

乳酸链球菌素 (Nisin) 是从乳酸链球菌发酵产物中提制的一种多肽抗菌素类物质, 是一种世界公认的安全的天然生物性食品防腐剂和抗菌剂。早在 1928 年, Rogers 和 Whittier 就发现乳酸链球菌的代谢产物能够抑制部分革兰氏阳性菌的生长^[1-2]。1944 年 Mattick 和 Hirsch 发现血清学 N 群中的一些乳酸链球菌能产生蛋白类抑菌物质, 命名为 N inhibitory Substance 即 N 群抑菌物质, 简称为 Nisin^[3]。其由 34 个氨基酸组成, 根据构型不同可分为 A、B、C、D、E 和 Z 型。天然的 Nisin 主要以 Nisin A 和 Nisin Z 形式存在^[4]。由于 Nisin 被食用后在消化道中很快被蛋白水解酶

消化成氨基酸, 因而不会改变肠道内的正常菌群, 不会引起抗药性问题, 亦不会与其他抗生素出现交叉抗性, 是目前国际公认的一种理想的安全、无毒副作用的生物防腐剂, 已被广泛应用于乳制品、肉制品、罐装食品、植物蛋白制品、酿造酒、酒精制品、果汁饮料、袋装食品、焙烤食品和方便食品等食品的防腐保鲜^[5]。

我国于 1990 年开始批准使用乳酸链球菌素, 并在 GB 2760-2010《食品添加剂使用卫生标准》中规定乳酸链球菌素作为食品防腐剂的最大允许使用量, 然而并未发布乳酸链球菌素的检测方法标准, 使得这一指标一直是监管的盲区。高彩红

收稿日期: 2017-03-03

*通讯作者

作者简介: 张世伟 (1985-), 男, 高级工程师, 本科, 研究方向为食品检测。E-mail: zsw_8506@163.com。

曾经报道了乳酸链球菌素的高效液相色谱法^[6]。该方法稳定、特异性较好,但是设备和人员要求较高。酶联免疫方法作为一种快速,高通量,低成本初筛方法,被广泛应用于农药、兽药、非法添加物、食品添加剂的定量分析,成为色谱、质谱等确证方法的有效补充^[7-10]。Suarez和孟茹分别报道了基于乳酸链球菌素多克隆抗体的双抗夹心ELISA法和直接竞争ELISA法^[11-12]。本研究通过制备乳酸链球菌素单克隆抗体,保障了ELISA方法的特异性,并进一步缩短检测时间。

1 材料与amp;方法

1.1 试剂

乳酸链球菌素A(Nisin A)、乳酸链球菌素Z(Nisin Z)(HANDRAY公司)、二甲基亚砜(DMSO)、四甲基联苯胺(TMB)、福氏完全佐剂及福氏不完全佐剂、辣根过氧化物酶(Sigma公司)。其余试剂为国产分析纯。BALB/c小鼠A购自广东医学实验动物中心;ELISA反应检测用试液配制见参考文献[13]。

1.2 仪器

酶标仪为iMARK(BIORAD公司),以及高速离心机、精密电子天平等常规仪。

1.3 方法

1.3.1 乳酸链球菌素蛋白偶联物的制备

取10mL 5mg/mL蛋白(OVA或BSA)溶液,加入0.01mL甲醛反应2h,再加入0.01g氰基硼氢化钠反应2h后透析24h,加入10mg Nisin A反应12h后透析48h。

1.3.2 乳酸链球菌素单克隆抗体制备

用PBS稀释Nisin A或Nisin A-BSA至质量浓度2mg/mL,和等体积免疫佐剂Quickantibody等体积混匀,小鼠大腿肌肉免疫100μg/只,第21天等剂量加强免疫,第35天后尾部采血检测,测量血清多抗效价。单克隆抗体制备冷泉港实验手册所述方法^[14]。采用辛酸硫酸铵纯化抗体^[15]。

1.3.3 酶标抗体的制备

使用本课题组先前报道的方法制备辣根过氧化物酶标记抗体^[16]。将0.3mg纯化的抗体溶解与0.1mol/L pH9.5的碳酸盐缓冲液中。加入0.1mL 10mg/mL的活化醛基的辣根过氧化物酶溶液后

4℃反应过夜。加入30 μL 0.2mol/L的赖氨酸终止反应,透析纯化后备用。

1.3.4 ELISA方法

用棋盘滴定法确定包被抗原和一抗、样品稀释倍数。其他ELISA条件:96微孔板每孔用100 μL适当浓度Nisin A或Nisin A-OVA包被,4℃孵育过夜,次日弃上清,用200 μL含有质量分数2% BSA的PBST溶液37℃封闭2h,弃上清用PBST洗涤5遍拍干后,微孔板可密封4℃保存或立即使用。

间接竞争ELISA:取封闭好的微孔板室温平衡30min,先加入50 μL标液或检测样本稀释液,再加入50 μL适合浓度酶标抗体稀释液,37℃反应30min,加入TMB显色液,避光37℃反应10 min后,加入50 μL终止液终止反应,酶标仪450 nm检测吸光度值。

1.3.5 ELISA检测抗体特异性

使用竞争ELISA方法测试抗体和等其他常见多肽类抗生素的交叉反应。

1.3.6 样品前处理

固体样品分别按以下方法前处理:

(1)PBS提取法。称取1g肉制品,使用8mL 0.01M PBS涡旋提取10min后定容至10mL。10000g离心2min,取上清直接待测;(2)酸提取法。称取1g肉制品,使用4mL 0.1M盐酸涡旋提取10min,1M氢氧化钠调节提取液pH至6.0~8.0,0.01M PBS定容至10mL。10000g离心2min,取上清直接待测。

液体样品分别按以下方法前处理:(1)直接检测法。使用1M氢氧化钠调节样品pH至6.0~8.0。10000g离心2min,取上清直接待测。(2)PBS稀释法。使用1M氢氧化钠调节样品pH至6.0~8.0,0.01M PBS 1:1稀释,10000g离心2min,取上清待测。

1.3.7 方法的添加回收

取空白肉制品样品(火腿肠)用Nisin A添加至终浓度5 μg/g、30 μg/g、200 μg/g。取空白果汁(鲜橙汁)用Nisin A添加至终浓度10 μg/mL、60 μg/mL、400 μg/mL。用本研究建立的方法测定,计算添加回收率。

1.3.8 模拟热加工

将乳酸链球菌素加入鲜橙汁中,终浓度为

100 μg/mL, 模拟果汁杀菌工艺, 100°C 加热 0 min、15 min、20 min、25 min 和 30 min。使用本研究建立的 ELISA 检测方法检测其乳酸链球菌素含量。

2 结果与讨论

2.1 免疫原和包被原的确定

由于 Nisin A 的分子量为 3510 Da, 而其活性分别以二聚体和四聚体形式出现, 其二聚体和四聚体的分子量分别为 7000 Da 和 14 000 Da^[13-14], 介于小分子和大分子之间, 因此本研究采用 Nisin A 和 Nisin A 偶联的 BSA 分别免疫。包被原的配对对于 ELISA 方法的灵敏度也非常重要, 适当的异源包被能有效提高方法的灵敏度^[17]。Nisin A 属于较复杂的多肽, 可能对酶标板具有一定的物理吸附作用, 因此本研究采用 Nisin A 和 Nisin A 偶联的 OVA 分别作为包被原。不同免疫原免疫小鼠获得的血清, 用不同包被原进行 ELISA 检测的结果如表 1 所示。直接用 Nisin A 免疫小鼠所获得血清的效价较差, 不利于后续细胞融合制备单克隆抗体。从灵敏度上来看, 这四种组合中, 两种同源包被组合灵敏度均较差, 其中 Nisin A-BSA /Nisin A-OVA 这种免疫原 / 包被原组合灵敏度最差, 其原因在于产生了较多的手臂抗体, 同源包被无法对臂抗体进行有效的屏蔽。两种异源组合灵敏度相近, 因此结合效价考虑, 选用 Nisin A-BSA 作为免疫原的小鼠进行下一步的单克隆抗体制备。

表 1 不同免疫原和包被原的 ELISA 结果

Table 1 ELISA result used various antigens and coating antigens

免疫原 / 包被源	效价	IC ₅₀ (μg/mL)
Nisin A /Nisin A-OVA	80000	2.2
Nisin A/Nisin A	16000	36
Nisin A-BSA /Nisin A-OVA	1280000	960
Nisin A-BSA /Nisin A	320000	1.3

2.2 ELISA 方法的建立

基于 Nisin A-BSA 为免疫原所获得的单克隆抗体和 Nisin A 为包被原, 所建立的 ELISA 方法 IC₅₀ 为 0.49 μg/mL。标准曲线见图 1, 线性范

围为 0.05 μg/mL ~ 5.4 μg/mL, 线性回归方程为 $y = -0.12 \ln(x) + 0.385$, $R^2 = 0.98$ 。使用所建立的 ELISA 方法检测其他多肽类抗生素, 结果如表 2 所示, 该方法能等同识别 Nisin A 和 Nisin Z。Nisin A 和 Nisin Z 差别在于第 27 位的氨基酸, Nisin A 是组氨酸, 而 Nisin Z 是天门冬酰, 目前商品化的作为食品添加剂的乳酸链球菌素均为这两种构型^[18]。因此, 目前食品中作为添加剂添加的乳酸链球菌素均能被本方法检出, 而其他的多肽类抗生素不会影响本方法。

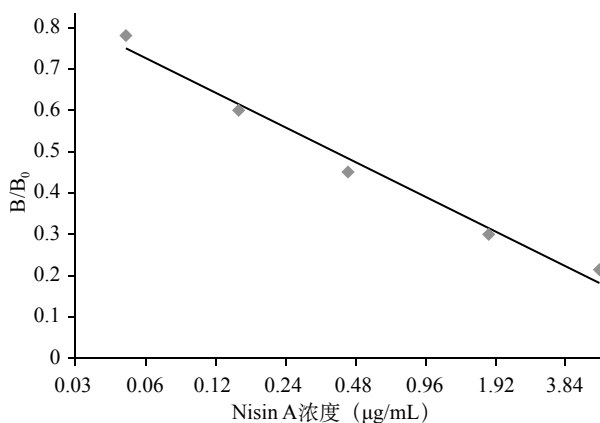


图 1 乳酸链球菌素的 ELISA 竞争曲线

Fig. 1 Representative detection standard curves for nisin in competitive ELISA

2.3 前处理方法选择

前处理方法是免疫分析方法的重要组成部分, 由于抗原抗体反应的最适 pH 一般在 6.0 ~ 8.0 之间, 因此常使用中性的 PBS 缓冲液作为样品提取液。然而, 由表 3 可看出, 中性的 PBS 提取固体样品中的乳酸链球菌素很难达到理想的回收率。其原因在于, 乳酸链球菌素在中性和碱性溶液中溶解性较差, 并且含有大量疏水性的氨基酸, 容易和固体样品中的脂肪、蛋白形成疏水性结合, 因此必须采用酸提取。而在液体样品中, 乳酸链球菌素已处于溶解态, 是否需要稀释取决于抗体对基质的抗干扰能力。表 3 结果表面, 本研究所制备的单克隆抗体基质干扰小, 直接提取法和稀释法相比无明显区别, 因此液体样品可直接进行 ELISA 分析。基于该前处理方法, 以样品稀释倍数乘以标准曲线线性范围最小值计算定量限, 该方法检测固体样品和液体样品的最低定量限分别为 0.5 μg/g 和 0.05 μg/mL。

表2 与各多肽类抗生素的交叉反应率
Table 2 Cross-reactivity of antibody with various polypeptide antibiotics

反应物	IC ₅₀ / (μg/mL)	交叉 反应率 /%	反应物	IC ₅₀ / (μg/mL)	交叉 反应率 /%
Nisin A	0.49	-	Nisin Z	0.49	100%
多黏菌素 B	> 50	< 1.0	多黏菌素 E	> 50	< 1.0
平阳霉素	> 50	< 1.0	万古霉素	> 50	< 1.0
环孢菌素 A	> 50	< 1.0	缬氨霉素	> 50	< 1.0

表3 方法的添加回收率
Table 3 Results of recovery of this method

固体样品前 处理方法	添加量 (μg/g)	回收率 (%)	液体样品前 处理方法	添加量 (μg/mL)	回收率 (%)
	5	42%		10	92%
PBS 提取法	30	23%	直接法	60	95%
	200	15.2%		400	90%
	5	84%		10	95%
酸提取法	30	87%	PBS 稀释法	60	92%
	200	80%		400	91%

2.4 热加工对检测结果的影响

乳酸链球菌素 (Nisin) 具有良好的热稳定性, 特别在酸性溶液中热稳定性更强, 因此常用于酸性食品的防腐中。如溶于 pH=6.5 的脱脂牛奶中, 经 85℃ 巴氏灭菌 15min 后, 活性仅损失 15%, 当溶于 pH=3 的稀盐酸中, 经 121℃ 15min 高压灭菌仍保持 100% 的活性。本研究模拟果汁的杀菌条件, 考察样品经过加热后对检测结果的影响。图 2 所示, 样品经过 100℃ 30min 加热后, 虽然能观察到一定程度的水解, 但其回收率仍然能达到 80% 以上, 说明本方法可以用于检测热加工样品。

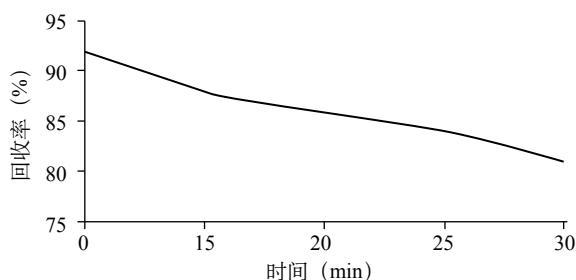


图2 不同加热时间的乳酸链球菌素 ELISA 检测的回收率

Fig. 2 Comparison of heat-treated nisin by ELISA

3 总结

本研究通过制备乳酸链球菌素单克隆抗体, 建立了乳酸链球菌素酶联免疫检测方法。该方法可等同识别目前最常用的两种乳酸链球菌素——Nisin A 和 Nisin Z, 并且和其他多肽类抗生素无交叉反应。该方法灵敏度好, 前处理简单, 可用于热加工食品中乳酸链球菌素的检测, 为开发乳酸链球菌素酶免疫试剂盒的打下了良好的基础。

参考文献:

- [1] Rogers L A. The inhibiting effect of streptococcus on *Lactobacillus bulgaricus*[J]. Journal of Bacteriology, 1928 (16) : 321-325.
- [2] Rogers L A, whiter E O. Limiting Factors in the lactic fermentation[J]. Journal of Bacteriology, 1928(16) :211-229.
- [3] Mattick A T R, Hirsch A. A Powerful inhibitory Substance produced by group N Streptococci[J]. Nature (London), 1944 (154) : 551.
- [4] 李勃, 马喻, 肖明. 乳酸链球菌素产业的发展现状及前景展望 [J]. 食品与发酵工业, 2011, 37 (6) : 152-155.
- [5] 黄现青, 张建威, 高晓平, 等. 乳酸链球菌素检测及其在肉品中的应用 [J]. 肉类工业, 2011 (3) : 38-40.
- [6] 高彩红, 宋杰, 崔倩, 等. 高效液相色谱法检测食品中防腐剂——乳酸链球菌素 [J]. 农业科技与装备, 2011 (5) : 26-28.
- [7] 张世伟, 赖心田, 王士峰, 等. 基于免疫分析的杏仁蛋白饮料中杏仁蛋白质定量方法研究 [J]. 河南农业科学, 2016, 45 (4) : 145-149.
- [8] GARCIA T. Detection of goat's milk in ewe's milk by indirect ELISA [J]. Food and Agricultural Immunology, 1994, 6: 113-118.
- [9] ANGUIA G, MART R, GARC A T, et al. Indirect ELISA for detection of cows' milk in ewes' and goats' milks using a monoclonal antibody against bovine β-Casein [J]. Journal of Dairy Research, 1995, 62: 655-659.
- [10] 薛海燕, 胡围围, 宋宏新, 等. 羊乳中掺入牛乳的间接 ELISA 定量检测 [J]. 食品科学, 2010, 31 (24) : 370-373.
- [11] Su á rez A M, Rodr í guez J M, Hern á ndez P E, et al. Generation of polyclonal antibodies against nisin: immunization strategies and immunoassay development [J]. Applied & Environmental Microbiology, 1996, 62 (6) : 2117-2121.
- [12] 孟茹, 赵贵明, 贾瑜, 等. 酶联免疫法检测食品中乳酸链球菌素 [J]. 食品与生物技术学报, 2013, 32 (5) : 509-515.
- [13] 韩丹, 于梦, 吴梅, 等. 酶联免疫吸附分析法测定食品中的苏丹红 I 号 [J]. 分析化学, 2007, 35 (8) : 1168-1170.
- [14] HARLOW E, LANE D. Antibodies : A Laboratory Manual [M]. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1988: 139-242.
- [15] WENGATZ I, STOUTAMIRE D, GEE S J, et al. Development of an enzymelinked immunosorbent assay for the detection of the pyrethroid insecticide fenprothrin [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1998, 46, 2211-2221.
- [16] 张世伟, 赖心田, 洪晓明, 等. 双抗夹心酶联免疫分析法检测食品中鸡蛋过敏原 [J]. 安徽农业科学, 2012, 40 (32) : 15894-15895.
- [17] 宋娟, 王榕妹, 王悦秋, 等. 半抗原的设计、修饰及人工抗原的制备 [J]. 分析化学, 2010, 38 (8) : 1211-1218.
- [18] 浮吟梅, 吕亚西. 生物防腐剂的应用和发展动向 [J]. 中国食品添加剂, 2004 (3) : 51-53.