

# 抗氯霉素单克隆抗体杂交瘤细胞株的筛选及金标试纸检测方法的建立

王自良<sup>1,2</sup>, 王建华<sup>1</sup>, 杨艳艳<sup>3</sup>, 杨继飞<sup>3</sup>, 张海棠<sup>2</sup>, 范国英<sup>1</sup>, 张改平<sup>3</sup>

(1 西北农林科技大学 动物科技学院, 陕西 杨凌 712100;

2 河南科技学院 动物科学学院, 河南 新乡 453003;

3 河南省动物免疫学重点实验室, 河南 郑州 450002)

**[摘要]** 以BSA-CAP-HS免疫Balb/C小鼠,用细胞融合技术筛选抗氯霉素单克隆抗体(CAP mAb)杂交瘤细胞,体内诱生腹水法制备CAP mAb,并鉴定其免疫学特性;依据胶体金免疫层析试验(GICA)原理,以CAP mAb为金标抗体,研制CAP残留快速检测金标试纸(CAP-Strip),并对其性能进行测定。结果表明,筛选出了3株杂交瘤细胞,其中最好的4F9-B2株间接ELISA效价细胞培养上清为1:1 280,腹水为1:640 000,亲和常数( $K_d$ )为 $1.84 \times 10^{10}$  L/mol,对CAP的半数抑制浓度( $IC_{50}$ )为0.88  $\mu$ g/L,与氯霉素琥珀酸钠的交叉反应(CR%)为150%,与其他酰胺醇类和抗菌素类药物无交叉反应;CAP-Strip的标准曲线呈典型的S型,符合4参数logit拟合曲线,目测检测限为0.5  $\mu$ g/L;其敏感性与竞争ELISA试剂盒相当,符合率为100%;可见CAP-Strip具有快速、敏感、特异、简便等特点,适合于CAP残留的快速检测,具有较高的推广应用价值。

**[关键词]** 氯霉素;细胞融合;单克隆抗体;胶体金免疫层析试验;快速检测试纸

**[中图分类号]** S859.84

**[文献标识码]** A

**[文章编号]** 1671-9387(2006)05-0006-07

氯霉素(Chloramphenicol, CAP)具有引发再生障碍性贫血及粒细胞缺乏症、灰婴综合症等毒性作用,其在动物性食品中的残留严重危害着人的健康,因此我国和世界上多数国家禁止将CAP用于食品动物<sup>[1]</sup>。CAP残留金标试纸检测方法以其灵敏、特异、快速、简便等优点替代了理化检验和ELISA方法<sup>[2]</sup>,德国R-Biopharm公司、美国Euro-Diagnostica公司已开发出相关产品,国内虽然也有类似报道,但由于其灵敏度较低,而不能满足实际检测工作的需要。为此,本研究应用细胞融合技术,在建立抗氯霉素单克隆抗体(CAP mAb)杂交瘤细胞株的基础上,根据胶体金免疫层析试验(GICA)原理,成功地研制出了CAP残留快速检测金标试纸(CAP-Strip),并对其性能进行了测定,现将研究结果报道如下。

## 1 材料与方 法

### 1.1 动物、细胞、试剂与耗材

SPF级Balb/C小鼠购自郑州大学医学院;小

鼠骨髓瘤细胞株NS0由英国国家动物健康研究院惠赠;CAP,纯度 $\geq 99.0\%$ ,Sigma公司产品;弗氏佐剂CFA、IFA, Pierce公司产品;细胞培养基RPMI-1640、HAT、HT和PEG-4000为Gibco公司产品;氯金酸( $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ),柠檬酸三钠( $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ),上海化学试剂公司生产;人工免疫原BSA-CAP-HS、包被原OVA-CAP-HS(混合酸酐法)、OVA-CAP(重氮化法)、兔抗鼠IgG(RaMIgG)、兔抗鼠酶标二抗(RaMIgG-HRP)和酶标半抗原(HRP-CAP)为本课题组制备;其他试剂均为市售所得,AR级。AE<sub>90</sub>硝酸纤维素膜(NC膜)、支持板、吸水纸、玻璃棉和胶膜均为德国S&S公司产品。1 mg/mL的CAP甲醇母液用0.01 mol/L pH 7.4的磷酸盐缓冲液(PBS)稀释,配制CAP标准品。

### 1.2 细胞融合备用小鼠的选择

用BSA-CAP-HS免疫6周龄雌性Balb/C小鼠5只,免疫剂量为50  $\mu$ g/只(按BSA-CAP-HS中

**[收稿日期]** 2006-02-16

**[基金项目]** 国家“863”计划项目(2001AA249030)

**[作者简介]** 王自良(1966—),男,河南叶县人,副教授,在读博士,主要从事兽药残留检测技术研究。E-mail: WangZL\_2008@Yahoo.com.cn

**[通讯作者]** 张改平(1960—),男,河南内黄人,研究员,博士生导师,主要从事细胞与分子免疫学研究。

BSA 的量计算),配成 0.2 mL 溶液于背部皮下分点注射。首免用无菌 PBS 稀释 BSA-CAP-HS,与等量 CFA 混合乳化;加强免疫用无菌 PBS 稀释 BSA-CAP-HS,与等量 IFA 混合乳化。共免 5 次,每次间隔 4 周,最后 1 次免疫后第 10 天断尾采血分离血清,间接 ELISA 检测抗 BSA-CAP-HS 抗体效价,阻断 ELISA 检测抗 BSA-CAP-HS 抗体抑制效价,操作程序参照 Van 等<sup>[3]</sup>的方法进行。选择抗 BSA-CAP-HS 抗体效价 $<1:1\ 600$ ,且抑制效价最低的小鼠作为细胞融合备用小鼠。

### 1.3 细胞融合与杂交瘤细胞株的筛选

1.3.1 细胞融合 融合前 2 d 用 RPMI-1640 传代培养 NS0 细胞,前 1 d 用 HAT 培养滋养细胞。对选择出的细胞融合备用小鼠进行超免,每只小鼠超免剂量按 BSA-CAP-HS 中 BSA 的量计算,尾静脉与腹腔各注射 50  $\mu\text{g}$ ,体积均为 100  $\mu\text{L}$ 。超免后第 4 天,摘除眼球采血,分离阳性血清,脱颈致死小鼠,无菌取脾脏制备脾细胞,在 PEG-4000 作用下与 NS0 细胞融合,将融合后的细胞悬液加到已铺有滋养细胞层的 96 孔细胞培养板中,HAT 培养。

1.3.2 杂交瘤细胞株的筛选 融合细胞共培养 14 d,分别于第 4、7 和 10 天用 HAT 换液,第 14 天起用 RPMI-1640 培养并用间接 ELISA 和阻断 ELISA 进行阳性杂交瘤细胞筛选,选择阳性强、抑制率高、细胞生长旺盛孔的细胞,用有限稀释法进行克隆,而后扩大培养、冻存并进行鉴定。

### 1.4 CAP mAb 的制备及其免疫学特性鉴定

1.4.1 CAP mAb 的制备 采用体内诱生腹水法<sup>[4]</sup>进行。

1.4.2 CAP mAb 的免疫学特性鉴定 (1)效价。用间接 ELISA 法测定。(2)亲和力。参照 Batty 等<sup>[5]</sup>

的方法测定亲和常数( $K_a$ )。(3)特异性。以 CAP 及其他酰胺醇类和抗菌类药物作为抑制物,用阻断 ELISA 测定各抑制物的半数抑制浓度( $IC_{50}$ ),以 CAP mAb 对 CAP 的  $IC_{50}$  与其对各抑制物  $IC_{50}$  的百分比作为其交叉反应率。

### 1.5 CAP-Strip 的研制及其性能测定

1.5.1 CAP-Strip 的制备 (1)胶体金的制备。采用柠檬酸钠还原法<sup>[6]</sup>。(2)金标抗体的制备。取 8 孔酶标板,每孔 25  $\mu\text{L}$  ddw 铺底,第 1 孔加入 25  $\mu\text{L}$  CAP mAb 倍比稀释;每孔加入 25  $\mu\text{L}$  pH 8.2 的胶体金溶液,室温反应 10 min 后,加入 100 g/L NaCl 溶液 100  $\mu\text{L}$ ,室温反应 10 min,观察显色情况,以含 CAP mAb 量最低的红色孔为标记浓度;按标记浓度取所需量的胶体金和 CAP mAb 混合,室温温育 20 min,10 000 r/min 离心 30 min,弃上清,沉淀物用 0.02 mol/L  $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$  溶液(含 100 g/L BSA)稀释,10 000 r/min 离心 30 min,沉淀物用 0.02 mol/L  $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$  溶液(含 10 g/L BSA,0.5 g/L 叠氮钠)稀释,4  $^{\circ}\text{C}$  保存备用。(3)金标抗体玻璃棉的制备。裁取 20 mm $\times$ 4 mm 的玻璃棉,将金标抗体用 X-only 单向喷点仪均匀喷洒于玻璃棉上,37  $^{\circ}\text{C}$  干燥 1 h,密封,4  $^{\circ}\text{C}$  保存备用。(4)NC 膜的制备。将浓度为 1 mg/mL 的 BSA-CAP-HS 放于 X-only 单向喷点仪贮存池 A,浓度为 1 mg/mL 的 RaM IgG 放于贮存池 B,开机后将 BSA-CAP-HS 和 RaM IgG 分别点射于膜中央,形成间距 0.5 cm 的检测线(T 线)和质控线(C 线),自然干燥,密封,4  $^{\circ}\text{C}$  保存备用。(5)试纸的组装。将支持板、NC 膜、金标抗体玻璃棉、吸水纸及胶膜按一定工艺组装到一起,用 CM4000 切割机切割,密封,4  $^{\circ}\text{C}$  保存备用。检测试纸的结构如图 1 所示。

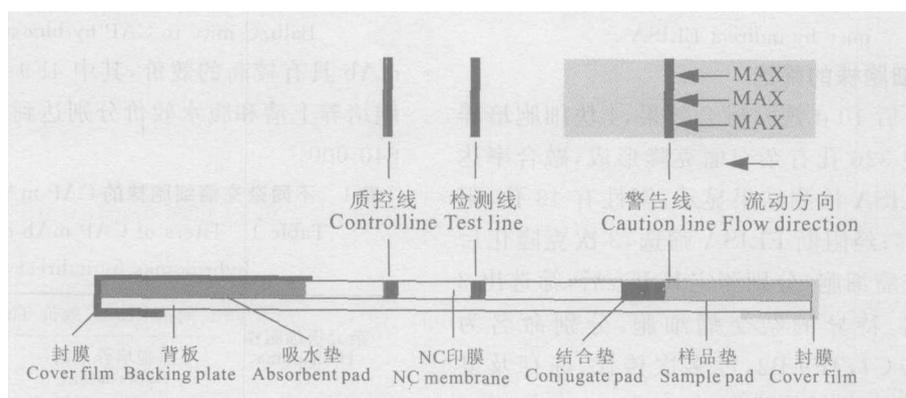


图 1 检测试纸组装示意图

Fig. 1 Schematic diagram of CAP-Strip showing its components

1.5.2 检测方法的建立 将质量浓度分别为 0, 0.01, 0.03, 0.09, 0.27, 0.81, 2.43  $\mu\text{g/L}$  的 CAP 标准品加到 CAP-Strip 样品垫上, 静置反应 10 min, 用 BioDot-TSR 3000 读条仪读取 T 线扫描面积光密度的相对光密度值(ROD), 以不同浓度标准品 ROD 与空白标准品 ROD 的百分比 ( $\eta = \frac{\text{ROD}_{(\text{标准品})}}{\text{ROD}_{(\text{空白标准品})}} \times 100\%$ ) 为纵坐标, 以不同标准品浓

度的常用对数值为横坐标, 在半对数坐标纸上绘制标准曲线, 推导回归方程, 进行回归分析。根据试验结果并参照 Joon 等<sup>[7]</sup>的方法, 取  $\eta = 50\%$  为目测敏感度, 即 CAP-Strip 的检测限。实际检测时, 将样品加到 CAP-Strip 样本垫上, 室温反应 10 min, 观察显色结果。判定标准为, 阴性: T 线、C 线均显示红色; 阳性: T 线不显示红色, C 线显示红色; 检测失败, T 线、C 线均不显示红色。

1.5.3 CAP-Strip 的性能测定 (1) 敏感性。用 CAP-Strip 测定质量浓度分别为 0, 0.25, 0.5, 1.0, 2.0, 4.0, 8.0, 16.0, 100, 1 000  $\mu\text{g/L}$  的 CAP 标准

品, 每个浓度设 6 个重复, 根据试验结果判断其敏感性。(2) 重复性。取不同批次的 6 批 CAP-Strip, 分别在 6 d 对 CAP 质量浓度为 0.1, 0.5, 1.0, 2.0  $\mu\text{g/L}$  的牛奶样、猪尿样、猪肉样进行检测, 每个浓度设 6 个重复, 检验其重复性。(3) 符合试验。用 CAP-Strip、竞争 ELISA 试剂盒对质量浓度为 0, 0.5, 1.0  $\mu\text{g/L}$  的牛奶样、猪尿样、猪肉样进行检测, 每个浓度设 6 个重复, 测定其符合率。(4) 保存期检验: 将不同批次的 CAP-Strip 分别于普通冰箱(2~8  $^{\circ}\text{C}$ ) 保存 12 个月、室温干燥保存 6 个月, 研究不同保存条件及时间对检测结果的影响, 确定其保存期。

## 2 结果与分析

### 2.1 细胞融合备用小鼠的选择

由图 2 和图 3 可知, 免疫的 5 只小鼠血清抗体效价均达到了  $10^{-3}$ , 说明获得了较好的免疫效果; 其中 3 号小鼠效价最高且抑制效果最好, 因此选 3 号小鼠为细胞融合备用鼠。

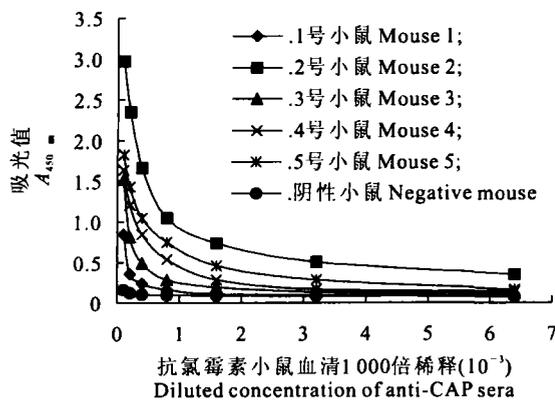


图 2 小鼠多抗血清的间接 ELISA 效价  
Fig. 2 Titers of anti-sera of Balb/C mice by indirect ELISA

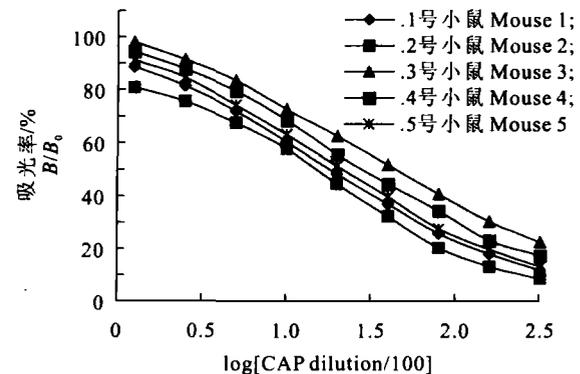


图 3 小鼠多抗血清的阻断 ELISA 抑制效价  
Fig. 3 Inhibitive titers of anti-sera of Balb/C mice to CAP by blocking ELISA

### 2.2 杂交瘤细胞株的筛选

细胞融合后 10 d 观察融合效果, 4 块细胞培养板的 384 孔中 326 孔有杂交瘤克隆形成, 融合率达 85%; 间接 ELISA 检测结果显示, 阳性有 48 孔, 阳性率为 14.7%; 经阻断 ELISA 筛选, 3 次克隆化后获得 8 株杂交瘤细胞, 分别测定其  $\text{IC}_{50}$  后, 筛选出 3 株高价、敏感、特异的杂交瘤细胞, 分别命名为 1A10-E6, 2B5-C7, 4F9-B2, 经多次传代、冻存及复苏, 杂交瘤细胞分泌抗体稳定。

### 2.3 CAP mAb 的免疫学特性鉴定

2.3.1 效价 由表 1 可知, 杂交瘤细胞分泌的

mAb 具有较高的效价, 其中 4F9-B2 株效价最高, 细胞培养上清和腹水效价分别达到了 1:1 280 和 1:640 000。

表 1 不同杂交瘤细胞株的 CAP mAb 间接 ELISA 效价  
Table 1 Titers of CAP mAb of the different hybridomas by indirect ELISA

杂交瘤细胞株 Hybridoma	间接 ELISA 效价 Titer by indirect ELISA	
	细胞培养上清 Supernatant	腹水 Ascites
1A10-E6	1:640	1:160 000
2B5-C7	1:320	1:80 000
4F9-B2	1:1 280	1:640 000

2.3.2 亲和力 由图4可知,1A10-E6,2B5-C7和4F9-B2的 $K_a$ 分别为 $2.14 \times 10^8$ , $1.68 \times 10^9$ 和 $1.84 \times 10^{10}$  L/mol。依据James等<sup>[8]</sup>的 $K_a$ 为 $10^7 \sim 10^{12}$  L/mol时抗体亲和力高的结论可知,本试验筛选出3种杂交瘤细胞所分泌的CAP mAb亲和力均较高,其中以4F9-B2株最高。

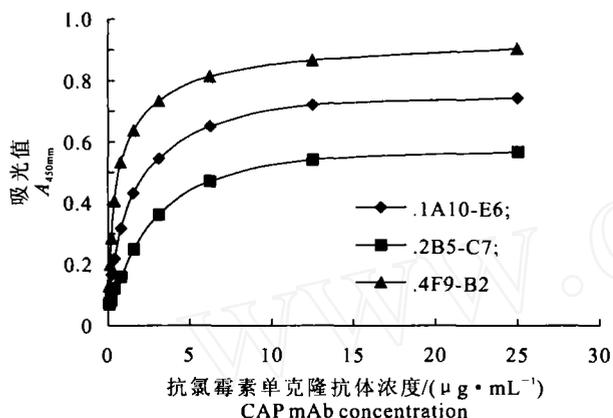


图4 CAP mAb的亲和常数( $K_a$ )测定曲线  
Fig.4 Association constant ( $K_a$ ) curve of CAP mAb

2.3.3 特异性 由表2可知,CAP mAb对CAP的 $IC_{50}$ 为 $0.88 \mu\text{g/L}$ ,说明本研究制备出的CAP mAb与CAP可特异性结合;与氯霉素琥珀酸钠具

有很强的交叉反应,这是因为氯霉素琥珀酸钠与人工免疫原BSA-CAP-HS中的半抗原氯霉素琥珀单酯(CAP-HS)的化学结构非常接近,存在着共同的B细胞表位,故易被CAP mAb识别并与之结合;与其他酰胺醇类和抗生素无交叉反应。

表2 CAP mAb与CAP类似化合物的交叉反应

Table 2 Percent cross-reactivity of CAP mAb with CAP analogous compounds

抑制物 Inhibitor	$IC_{50}/(\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1})$	交叉反应率/% Cross-reactivity
氯霉素 CAP	0.88	100
氯霉素琥珀酸钠 CAP succinate sodium	0.69	150
甲磺霉素 Thiamphenicol	$>3.2 \times 10^5$	$<0.01$
氟甲磺霉素 Florfenicol	$>3.2 \times 10^5$	$<0.01$
青霉素G钾盐 Penicillin G-K salt	$>3.2 \times 10^5$	$<0.01$
链霉素 Streptomycin	$>3.2 \times 10^5$	$<0.01$
四环素 Tetracycline	$>3.2 \times 10^5$	$<0.01$
土霉素 Oxytetracycline	$>3.2 \times 10^5$	$<0.01$
磺胺二甲嘧啶 Sulphadimidine	$>3.2 \times 10^5$	$<0.01$
诺氟沙星 Norfloxacin	$>3.2 \times 10^5$	$<0.01$

2.4 检测方法的建立

BioDot-TSR3000 读条仪对不同CAP标准品的机读结果见图5。

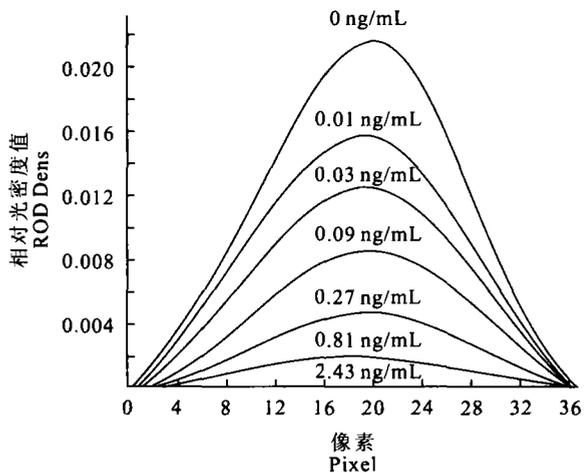


图5 CAP标准品机读相对光密度曲线图  
Fig.5 Relative optical density (ROD) curves of CAP standard samples by BioDot-TSR3000

由图5可知,不同浓度CAP标准品的显色结果不同,所对应的相对光密度值也不相同,即随浓度增加显色逐渐减弱,相对光密度值逐渐减小。其中以0 ng/mL时的显色最深,相对光密度值最大;2.43 ng/mL时显色最浅,相对光密度值最小。根据不同

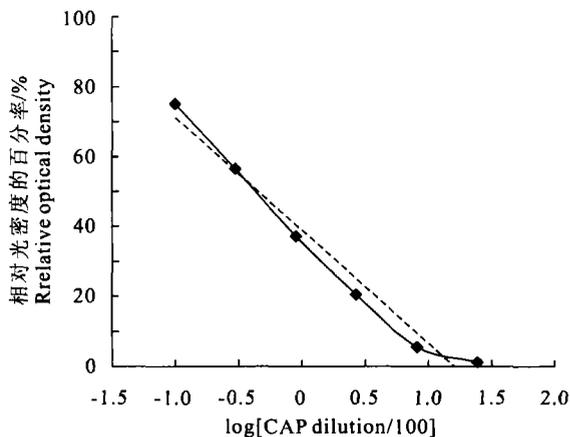


图6 检测试纸的标准曲线  
Fig.6 Calibration curve of CAP-Strip

浓度CAP的显色结果及对应的相对光密度值,绘制出CAP-Strip的标准曲线见图6。由图6可知,CAP-Strip的标准曲线呈典型的S型,符合4参数logit曲线,回归方程为 $y = -32.289x + 38.92$ ,相关系数为 $R^2 = 0.9736$ 。 $\eta = 50\%$ 时,曲线方程对应的

CAP 浓度为 0.45  $\mu\text{g}/\text{L}$ , 即目测灵敏度为 0.45  $\mu\text{g}/\text{L}$ 。考虑到实际检测工作的需要和用户操作方面的误差, 可将其目测检测限确定为 0.5  $\mu\text{g}/\text{L}$ 。

## 2.5 CAP-Strip 的性能测定结果

2.5.1 敏感性 由表 3 可知, CAP-Strip 的目测检测限为 0.5  $\mu\text{g}/\text{L}$ 。

表 3 检测试纸敏感度试验 ( $n=6$ )

Table 3 Sensitivity of CAP-Strip ( $n=6$ )

CAP 浓度/ $(\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1})$ Amount of CAP	0	0.25	0.5	1.0	2.0	4.0	8.0	16.0	100	1000
结果 Results	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+

2.5.2 重复性 由表 4 可知, 不同批次的 6 批 CAP-Strip 对牛奶、猪尿、猪肉的检测结果完全一

致, 证明不同批次生产的 CAP-Strip 检测结果稳定可靠, 具有良好的重复性。

表 4 不同批次检测试纸重复性试验 ( $n=6$ )

Table 4 Repeatability of CAP-Strip in different batches ( $n=6$ )

批次 Batches	CAP 质量浓度/ $(\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1})$ CAP concentration											
	牛奶 Milk				猪尿 Swine urine				猪肉 Pork			
	0.1	0.5	1.0	2.0	0.1	0.5	1.0	2.0	0.1	0.5	1.0	2.0
050815	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+
050818	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+
050820	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+
050824	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+
050828	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+
050903	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+

2.5.3 符合试验 由表 5 可知, CAP-Strip 与 ELISA 试剂盒的敏感性相当, 结果完全一致, 符合

率为 100%。

表 5 检测试纸与 ELISA 试剂盒检出试验结果的比较

Table 5 Results of parallel test of CAP-Strip and ELISA-kit

材料	CAP 质量浓度/ $(\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1})$ CAP concentration	检测方法 Tested method			
		ELISA 试剂盒法 ELISA kit			试纸条 Strip
		OD <sub>150</sub>	检测浓度/ $(\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1})$ Tested concentration	检测结果 Result	
牛奶 Milk	0	0.834	0	-	-
	0.5	0.631	8.2	+	+
	1.0	0.484	16.1	+	+
猪尿 Swine urine	0	0.841	0	-	-
	0.5	0.584	8.8	+	+
	1.0	0.403	17.5	+	+
猪肉 Pork	0	0.836	0	-	-
	0.5	0.652	6.8	+	+
	1.0	0.511	14.2	+	+

2.5.4 保存期 在保存期内, CAP-Strip 的外观、准确性、敏感性、特异性等均未发生变化, 与新制备 CAP-Strip 的测试结果完全相同。该结果表明, CAP-Strip 的有效期为 2~8  $^{\circ}\text{C}$  保存 12 个月以上, 室温干燥保存 6 个月以上。

细胞培养上清的效价; 二是能够排除存在的桥抗体; 三是能够确定 mAb 的特异性。为此, 本研究同时采用间接 ELISA 和阻断 ELISA 筛选阳性杂交瘤, 参照 Stenven 等<sup>[9]</sup>的混合酸酐法以偶联的 OVA-CAP-HS 作为包被原, 用间接 ELISA 法测定细胞培养上清的效价; 参照吴媛媛等<sup>[10]</sup>的重氮化法以偶联的 OVA-CAP 作为包被原, 用间接 ELISA 法排除存在的桥抗体, 用阻断 ELISA 法确定阳性杂交瘤细胞对 CAP 的识别能力, 从而筛选出了效价高、无桥抗体、特异性强的 3 株杂交瘤细胞。

## 3 讨论

### 3.1 关于抗 CAP 杂交瘤细胞的筛选方法

成功筛选高质量的杂交瘤细胞需要建立可靠的筛选体系, 对该体系的要求有三: 一是能够准确测定

### 3.2 关于 CAP mAb 的免疫学特性

高价、敏感、特异的 mAb 是建立免疫学分析方法的关键,本研究用混合酸酐法成功制备出了分子结合比为 1:15.6 的免疫原 BSA-CAP-HS,5 次免疫 Balb/C 小鼠后用细胞融合技术筛选出 3 株杂交瘤细胞,选择其中最好的 4F9-B2 株制备 CAP mAb。经鉴定,CAP mAb 间接 ELISA 效价细胞上清为 1:1280,腹水为 1:640000,  $K_d$  为  $1.84 \times 10^{10}$  L/mol,  $IC_{50}$  为 0.88  $\mu$ g/L,与氯霉素琥珀酸钠的交叉反应率为 150%,与其他酰胺醇类和抗菌素药物无交叉反应。该结果表明,本试验成功制备出了高价、敏感、特异性强的 CAP mAb。

### 3.3 关于 CAP-Strip 的质量性能

敏感性是由抗体与其对应抗原反应的亲和力大小所决定的。本研究制备的 CAP mAb 的  $K_d$  为  $10^7$

$\sim 10^{12}$  L/mol,为高亲和力抗体,设计组装的检测试纸的目测灵敏度为 0.45  $\mu$ g/L,实际检测限为 0.5  $\mu$ g/mL。准确性是由 CAP-Strip 标准曲线标准点的设置所决定的,根据金标试纸采用的反对数曲线拟合成直线进行线性定量的原理,本研究将不同浓度 CAP 相对光密度值的百分率与 CAP 浓度的对数值设置在同一条曲线上体现其线性,结果表明,线性范围为 0~2.43  $\mu$ g/L。通过与 ELISA 试剂盒的符合试验证实,本试验所设标准点合理,检测结果准确,与 ELISA 试剂盒的符合率为 100%。特异性是由抗体的特异性所决定的,本研究通过交叉反应试验鉴定 CAP mAb 的特异性,经反复试验证实,本研究所制备的 CAP-Strip 灵敏度高、准确性好、特异性强,可用于 CAP 的残留检测。

### [参考文献]

- [1] 王自良,赵坤,张改平. 氯霉素的毒性及其在动物性食品中的残留[J]. 河南科技学院学报,2005,33(2):101-105.
- [2] Dykman L A, Sumaroka M V, Staroverov S A, et al. Immunogenic properties of the colloidal gold[J]. J Izv Akad Nauk Ser Biol, 2004, 1: 86-91.
- [3] Van de Water C, Haagsma N. Sensitive streptavidin-biotin enzyme-linked immunosorbent assay for rapid screening of chloramphenicol residues in swine muscle tissue[J]. J Assoc Off Anal Chem, 1990, 73(4): 534-40.
- [4] 朱立平,陈学清. 免疫学常用实验方法[M]. 北京:人民军医出版社,2000:356-357.
- [5] Batty J D, Beatty B G, Wlanos W G. Measurement of monoclonal antibody affinity by non-competitive enzyme immunoassay[J]. J Immunol Methods, 1987, 103(2): 173-179.
- [6] Putalun W, Morinaga O, Tanaka H, et al. Development of a one-step immunochromatographic strip test for the detection of sennosides A and B[J]. Phytochem Anal, 2004, 15(2): 112-116.
- [7] Joon Tam Y, Mohd Lila M A, Bahaman A R. Development of solid-based paper strips for rapid diagnosis of Pseudorabies infection[J]. Trop Biomed, 2004, 21(2): 121-134.
- [8] James W G. Monoclonal antibodies: principles and practice[M]. New York: Academic Press, 1983: 142-147.
- [9] Stenven R H, Andrew G B, Imelda M T, et al. Detection of ivermectin residues in bovine liver using an enzyme immunoassay[J]. Analyst, 1998, 123(2): 355-358.
- [10] 吴媛媛,包永明,梁兴超,等. 氯霉素全抗原的合成与鉴定[J]. 化学通报, 2005, 68(6): 458-463.

## Filtration of hybridoma lines of monoclonal antibody and development of colloidal gold-labeled strip for rapid detection of chloramphenicol

WANG Zi-liang<sup>1,2</sup>, WANG Jian-hua<sup>1</sup>, YANG Yan-yan<sup>3</sup>, YANG Ji-fei<sup>3</sup>,  
ZHANG Hai-tang<sup>2</sup>, FAN Guo-ying<sup>2</sup>, ZHANG Gai-ping<sup>3</sup>

(1) College of Animal Science and Technology, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China;

(2) College of Animal Science, Henan Institute of Science and Technology, Xinxiang, He'nan 453003, China;

(3) He'nan Provincial Key Laboratory for Animal Immunology, Zhengzhou, He'nan 450002, China)

**Abstract:** Balb/C mice were immunized with BSA-CAP-HS and hybridoma lines that secrete monoclon-

al antibody against chloramphenicol (CAP mAb) were filtered with cell fusion and the immunological traits of CAP mAb were characterized. Based on the principle of gold immunochromatography assay (GICA), a strip for detection CAP (CAP-Strip) was developed with CAP mAb and its traits were tested. The results showed that three hybridoma lines were filtered and the best one was 4F9-B2, which secrete CAP mAb with indirect ELISA titers of 1 : 1 280 in supernatant and 1 : 640 000 in ascites. CAP mAb has a high affinity constant ( $K_d$ ) with  $1.84 \times 10^{10}$  L/mol, a good sensitivity with an  $IC_{50}$  of 0.88  $\mu$ g/L to CAP, 150% cross-reactivity to CAP succinate sodium and little or no cross-reactivity to other compounds. The calibration curve of CAP-Strip was typical sigmoid curve fitted to the four parameter logistic. Its detection limit was 0.5  $\mu$ g/L and its sensitivity was as same as that of competitive ELISA-Kit and its coincidence rate was 100% compared with ELISA-Kit. The CAP-Strip possessed rapidity, sensitivity, specificity and briefness and was proved to be used in the rapid test of CAP residues in animal food.

**Key words:** chloramphenicol; cell fusion; monoclonal antibody; gold immunochromatography assay; rapid test strip

(上接第 5 页)

Abstract ID:1671-9387(2006)05-0001-EA

## Development of indirect ELISA for detecting PCV2 antibody

YANG Zeng-qi, ZHU Wei-guo, WANG Xu-rong, ZHANG Yong

(College of Animal Science, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

**Abstract:** In order to express ORF2 gene of porcine circovirus type 2 (PCV-2), a pair of primers was designed according to the sequence of PCV2. The ORF2 gene was amplified by using the primers having *Hind* III and *Kpn* I site by PCR, and then the gene was subcloned into prokaryotic expressing vector pBAD/g III. So the recombinant plasmid named pBAD/g III-ORF2 was constructed. After that, pBAD/g III-ORF2 was transformed into *Escherichia coli* TOP10 and induced by L-Arabinose. The results of SDS-PAGE and Western-blot indicated that the ORF2 gene was expressed and the recombinant fusion protein was about 28 ku with purity over 85%. By using the fusion protein, a kind of ELISA method can be built for detecting PCV2 antibody.

**Key words:** porcine circovirus type 2; ORF2 gene; expression in *E. coli*; ELISA; detecting