

现代化工

浅析氯霉素全抗原的合成及其卵黄抗体的分离纯化

金妙坚

杭州源抗生物技术有限公司

DOI:10.12238/jpm.v6i6.8114

[摘要] 氯霉素作为一种广谱抗生素，曾在畜禽养殖等领域广泛应用，但因其严重的毒副作用，对其残留检测十分关键。本研究聚焦于氯霉素全抗原的合成以及卵黄抗体的分离纯化。通过合理选择合成方法成功制备氯霉素全抗原，利用化学偶联技术将氯霉素半抗原与载体蛋白连接。在卵黄抗体分离纯化阶段，对比多种经典方法并优化条件，获得高纯度、高活性的卵黄抗体。研究结果为氯霉素残留免疫检测技术的发展提供关键技术支持，有助于提升食品安全检测水平，保障消费者健康。

[关键词] 氯霉素全抗原；合成；卵黄抗体；分离纯化

[中图分类号] R914

The synthesis of chloramphenicol total antigen and the isolation and purification of yolk antibody were analyzed

Jin Miaojian

Hangzhou Yuan Antibiotic Technology Co., LTD.

[Abstract] Chloramphenicol, as a broad-spectrum antibiotic, was widely used in livestock and poultry farming. However, due to its severe toxic side effects, the detection of its residues is crucial. This study focuses on the synthesis of chloramphenicol whole antigen and the isolation and purification of yolk antibodies. By selecting appropriate synthesis methods, chloramphenicol whole antigen was successfully prepared, and chemical coupling techniques were employed to link the chloramphenicol hapten with carrier proteins. During the isolation and purification of yolk antibodies, various classic methods were compared and optimized conditions were refined to obtain high-purity, highly active yolk antibodies. The research results provide key technical support for the development of chloramphenicol residue immunoassay technology, which helps enhance food safety testing levels and protect consumer health.

[Key words] chloramphenicol total antigen; synthesis; soft yellow antibody; separation and passivation

氯霉素（Chloramphenicol, CAP）是由委内瑞拉链霉菌产生或化学合成的一种广谱抗生素，可抑制革兰阳性菌和阴性菌，曾广泛用于畜禽、水产业等动物疾病的防治，提高养殖的产量，但氯霉素有强的骨髓抑制造成再生障碍性贫血的毒副作用，严重的会引发灰婴症，严重威胁到人类健康。因此，欧盟、美国食品药品监督管理局（Food and Drug Administration FDA）和我国等许多国家和地区的许多国家标准都明令禁止氯霉素在食品动物养殖中使用，制定出极低量值的限量标准。

由于氯霉素在日常食品中多有残留，为了对氯霉素的残留进行有效的监控，需要研发高灵敏度、高特异性的检测方法。其中，免疫检测方法如酶联免疫吸附试验（ELISA）、免疫层析快速检测试纸等以其简单、快速、成本低、灵敏度高优点成为食品中氯霉素残留检测的重要选择，免疫检测方法中关键环节在于获得高纯度抗体。由于鸡卵黄抗体（IgY）具有易于

合成、提取简便、稳定性高等特点，可作为氯霉素检测抗体的重要来源。卵黄抗体的制备步骤主要包括合成具有高免疫原性能力的全抗原，免疫母鸡使其生产产生特异性抗体，最后进行分离纯化得到高纯度的卵黄抗体，因此进一步探究氯霉素全抗原的合成及其卵黄抗体的分离纯化具有重要的理论和实用意义，不仅能够促进氯霉素残留的检测技术的发展，还有力地保证了食品安全及消费者的健康[1]。

1 氯霉素全抗原的合成

1.1 合成原理

氯霉素本身为一个较小分子量的物质，分子量小，无免疫原性，属于半抗原，若想使其刺激机体发生免疫反应，就必须将其偶联到具有免疫原性的大分子载体蛋白上，形成全抗原。常用于载体蛋白有牛血清白蛋白（BSA）、卵清蛋白（OVA）。本研究采用的是碳化二亚胺法（EDC法）合成氯霉素全抗原。

其机理在于 EDC（carbonyldiimidazole，1-ethyl-3-(3-dimethylamino-propanol)）作为缩合剂在酸性条件下与半抗原上的羧基反应，形成一个活泼的中间产物，该中间物可与载体蛋白的氨基发生亲核取代反应，从而将半抗原与载体蛋白之间以其价键连接起来，形成含有免疫原性的全抗原。

1.2 合成步骤

1.2.1 半抗原的活化

准确称取一定质量的氯霉素半抗原，加入一定量二甲亚砜（DMSO）配制成一定质量分数的溶液，再依次加入适当质量的 N-羟基琥珀酰亚胺（NHS）、碳化二亚胺（EDC），在一定温度下避光搅拌反应一段时间，将半抗原羧基活化生成酯键活性酯。其中 NHS 起与 EDC 反应生成活性更高的中间体，以促使后续载体蛋白反应进行。

1.2.2 载体蛋白的准备

称取适量的牛血清白蛋白（BSA），溶解于磷酸盐缓冲液（PBS，pH 7.4）中，得到一定浓度的 BSA 溶液。PBS 缓冲液能够维持溶液的 pH 值稳定，为后续反应提供适宜的环境[2]。

1.2.3 偶联反应

取活化半抗原溶液缓慢滴入到 BSA 溶液中，将反应液于一定温度下，恒温搅拌反应数小时后，反应液中的活化半抗原经过活泼的酯键与 BSA 上氨基发生反应形成稳定的酰胺键，完成氯霉素与 BSA 的偶联得到氯霉素-BSA 全抗原。

1.2.4 透析纯化

反应完成后，将反应液装入透析袋内，在大量 PBS 中进行透析，透析反应液中的小分子如半抗原、EDC、NHS 等随缓冲液中的液体会透过透析袋进入缓冲液中，大分子全抗原则留在透析袋中，间隔一定时间更换透析液，透析一定时间后将反应液中的小分子杂质清除干净，获取纯净的氯霉素-BSA 全抗原。

1.3 合成产物鉴定

1.3.1 紫外光谱分析

分别取适量的氯霉素半抗原、BSA 以及合成的氯霉素-BSA 全抗原，用 PBS 缓冲液稀释至合适浓度，在紫外分光光度计上进行扫描，扫描波长范围一般为 200 - 400 nm。由于氯霉素半抗原和 BSA 在特定波长处有各自特征吸收峰，通过比较三者的紫外吸收光谱，可以初步判断半抗原是否成功偶联到载体蛋白上。若合成的全抗原在氯霉素半抗原和 BSA 的特征吸收峰处均有吸收，且吸收强度和峰形发生变化，则表明偶联反应可能成功[3]。

1.3.2 SDS - PAGE 电泳分析

将 BSA、氯霉素半抗原、合成的氯霉素-BSA 全抗原配制成合适浓度的十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶（SDS-PAGE），电泳过程中，蛋白质和抗原将根据分子量大小被电泳分离。BSA 为对照，其电泳迁移已知。合成的氯霉素-BSA 全抗原如在凝胶中的迁移位置与 BSA 的有显著改变，在考马斯亮蓝染色下有一条清晰的条带，更进一步表明半抗原与载体蛋白偶联，合成的氯霉素-BSA 全抗原有较好的纯度与完整性。

2 卵黄抗体的分离纯化

2.1 分离纯化原理

鸡卵黄中免疫球蛋白 Y（IgY）含量丰富，分离纯化 IgY 主要基于 IgY 和其他卵黄成分在物理、化学性质上的差异。除了 IgY 之外，卵黄中主要的成分还包括油分、脂蛋白、磷脂等。基于 IgY 与硫酸铵等某些盐溶液之间溶解度的差异，IgY 与一些吸附剂所形成的特定的吸附特性，可以通过稀释卵黄而将 IgY 从低离子强度的溶液中溶解释放出来，同时油脂等杂质会留在有机相中；也可以用不同的硫酸铵溶液来稀释卵黄中 IgY，当改变硫酸铵的饱和度时，IgY 在不同饱和度的硫酸铵溶液中的溶解性不同，会沉降至卵黄底端，从而与杂质分离；另外，利用 IgY 与蛋白 A、蛋白 G 等配体的结合特性，实现其与复杂卵黄混合物中其他成分的分离，有着更高的纯度和特异性。

2.2 分离纯化方法

2.2.1 水稀释法

将新鲜鸡蛋用 75%酒精擦拭外表面消毒后，打开鸡蛋，将卵黄缓慢地移入离心管内，按一定比例将去离子水加入卵黄，充分搅拌，使卵黄变稀，然后以一定转速离心，此时卵黄内的油脂等物质会漂浮在液面上，IgY 则溶解于下层水相，收集下层水相，即可获得初步分离的 IgY 溶液。此方法操作简单、成本低，但获得的 IgY 纯度较低，有较多杂蛋白及其他杂质，需要进一步进行纯化。

2.2.2 硫酸铵沉淀法

将以上水稀释制备后的 IgY 液缓慢加入固体硫酸铵中，并在搅拌的条件下使硫酸铵饱和度不断增加（一般在 33%~50% 这个范围内，IgY 才会逐渐开始沉淀析出，其他杂质蛋白仍溶解在溶液中），继续搅拌一段时间后，以适当转速离心，取沉淀（即初步纯化的 IgY），用适量的 PBS 缓冲液溶解沉淀，再透析去除硫酸铵，得到较纯的 IgY 溶液。硫酸铵沉淀法可除去大量的杂蛋白，进一步提高 IgY 纯度，但还有一些蛋白质杂质与 IgY 性质相类似。

2.2.3 亲和层析法

选用适合的亲和层析介质如偶联蛋白 A 或蛋白 G 的琼脂糖凝胶。将上述经过硫酸铵沉淀法粗纯后的 IgY 溶液上样于亲和层析柱中，IgY 会特异性结合于蛋白 A 或蛋白 G 上，其余杂质不吸附，直接流出层析柱，然后用适当的洗脱液洗脱，洗脱下被吸附在层析介质上的 IgY，收集洗脱液，即可获得高纯度 IgY。亲和层析法可特异分离 IgY，获得高活性高纯度抗体，但其成本较高，操作过程复杂，需层析设备等。

2.3 纯化效果鉴定

2.3.1 蛋白质含量测定

使用经典的 Lowry 法或 BCA 法测定纯化前后的 IgY 溶液的蛋白质含量。将牛血清白蛋白（BSA）作为已知浓度的标准品，制作标准曲线。将待测 IgY 溶液适当稀释，加入对应的试剂，再在特定波长测定吸光值，依据标准曲线计算出 IgY 溶液的蛋白质含量。通过纯化前后蛋白质含量变化判断分离纯化对 IgY 的回收率。

2.3.2 纯度鉴定

以 SDS-PAGE 法电泳纯化产物纯度检测。与合成产物纯度的 SDS-PAGE 电泳相同,进行纯化产物电泳,将 IgY 用考马斯亮蓝染色。如果在凝胶上出现一条清晰而明显的条带,且出现在 IgY 的理论分子量附近,就认为 IgY 纯度较高;如果有多个条带出现,则表明有杂蛋白被混杂了,说明要再次优化分离纯化条件。

2.3.3 抗体活性测定

纯化后 IgY 的抗体活性采用间接 ELISA 法测量,包被氯霉素-BSA 全抗原到酶标板内,加入不同倍数稀释的纯化 IgY 溶液孵育,洗板,加酶标记二抗,加入底物显色,检测在指定波长下的吸光度数值,绘制抗体倍数与吸光度之间的关系曲线,测得抗体效价。抗体倍数越高、抗体活性越大、分离纯化作用越好。

3 讨论

3.1 合成与纯化方法的优势与局限

碳化二亚胺法在氯霉素全抗原合成的工艺方面具有温和条件、操作方便、偶联反应效率较高等优点,在反应过程中,碳化二亚胺能够在较温和的酸性条件下进行,避免了酸性破坏蛋白质和半抗原结构而丧失其免疫原性的缺点,有利于全抗原的保存。而该方法在合成过程中存在副反应发生较多等缺点,致使偶联过程中产生一定的副反应,引起某些载体蛋白交联或半抗原连接不均匀,从而影响全抗原的质量、免疫原性等。在后期的工艺研究过程中,可改变反应条件,如适当改变 EDC、NHS 与半抗原的比例等,控制反应温度、时间等工艺参数,以减少副反应的发生,提高全抗原质量。

水稀释法和硫酸铵沉淀法操作简便,成本低,适用于规模化粗提卵黄抗体,但纯化效果不明显,抗体纯度低,影响其后免疫的检测灵敏性与特异性;亲和层析法纯化得到纯度高的抗体,但成本高、技术和设备的要求也高,不适用于一些不具备条件的资源实验室或生产单位。在实际工作中,可以根据实际情况、需求,采用不同的分离纯化方法,或者几种方法复合使用,最终达到一个较好的分离纯化效果;如先水稀释法和硫酸铵沉淀法粗提去杂,继而亲和层析精细提纯,即降低了成本又保证了其抗体纯度。

3.2 对免疫检测技术的影响

高纯度和高活性的全抗原和卵黄抗体是免疫检测技术准确灵敏检测氯霉素残留的关键,而合成的全抗原免疫原性越强,刺激母鸡产生的抗体效价越高,特异性较好;而分离纯化的高纯度的卵黄抗体可减少非特异性反应,提高免疫检测的灵敏度、准确度;在 ELISA 检测中,高纯度的抗体可降低背景信号,使检测结果更加准确清晰可靠;在免疫层析试纸条中高活性的抗体可保证试纸条对氯霉素进行快速、准确识别,检测灵敏度和稳定性;因此,进一步优化氯霉素全抗原合成的方法和卵黄抗体的分离纯化技术,对提高免疫检测技术用于氯霉素残留检测的性能,实现对食品中氯霉素残留的快速、准确的筛查和定量检测、保障食品安全具有重要意义。

3.3 研究的不足与展望

本研究对氯霉素全抗原的合成和卵黄抗体的分离纯化做了初步探索,但也存在不少局限性。其中在全抗原合成方面,虽经紫外分光光度计和 SDS-PAGE 电泳鉴定了合成产物,但对于半抗原与载体蛋白的偶联比例、偶联位点等仍缺乏深入讨论。这些信息对全抗原的免疫原性机制的探讨以及进一步优化全抗原合成方法意义重大。在卵黄抗体分离纯化方面,只对几种经典的分离纯化方法进行了比较研究,对一些新型的分离方法,如膜分离技术、双水相萃取技术等未做考察,这些方法可能有更高的分离率、更好的纯化度,值得我们在今后工作加以深入开展。

未来,在生物技术的推动下,各种合成方法及分离纯化方法将进一步被开发利用。进一步开展基于基因工程技术的全抗原合成方法研究,利用构建融合蛋白的方式,定量控制半抗原与载体蛋白连接,优化全抗原质量及免疫性能;结合多种分离方法优势,开发出分离效率更高、成本更低的分离纯化工艺是发展方向;深入研究卵黄抗体的构效关系,为卵黄抗体性能的优化、免疫法检测技术灵敏度、特异性提高提供更好的理论支持,为未来氯霉素残留检测向更高水平方向发展提供良好的理论基础。

4 结语

该研究合成的氯霉素全抗原经过一系列方法分离纯化卵黄抗体,经过鉴定后得出结论:利用碳化二亚胺合成有免疫能力的氯霉素全抗原,并通过水稀释法、硫酸铵沉淀法及亲和层析法联用对卵黄抗体进行富集,获得高活性、高纯度的抗体。该结果为完善和优化氯霉素残留免疫检测技术提供指导,从而为食品安全提供强大的技术保证,有利于人民群众的身体健康。但是还存在着不足与需要进一步完善之处,在以后的研究中尽量对研究方法进行进一步优化和完善,引入新的方法去完善该技术,从而促进该技术的进步与发展。

【参考文献】

[1]黄向月,吴锦波,岑鑫,李铸,雍军,苏元君,余忠华.复合卵黄抗体与中药制剂联合治疗犊牛腹泻的临床效果评估[J].畜禽业,2025,36(01):1-6.

[2]丁乔棋,李丽,范文韬,吕亚楠,胡建华,闫丽萍,宋素泉.基于新型量子点荧光微球的氯霉素免疫层析试纸条的制备和应用[J].分析化学,2017,45(11):1686-1693.

[3]潘嘉慧,田峻,赵亮亮,沈国权,朱海云.氯霉素抗原的制备及其在免疫胶体金快速检测中的应用[J].广东化工,2015,42(01):39-40.

[4]李佳仪,栗慧,张岩蔚,等.氯霉素人工抗原的合成及其抗体的制备[J].黑龙江畜牧兽医,2018,(19):203-205.

[5]潘嘉慧,田峻,赵亮亮,等.氯霉素抗原的制备及其在免疫胶体金快速检测中的应用[J].广东化工,2015,42(01):39-40.

作者简介:金妙坚,男,1981.12,汉族,本科,籍贯浙江丽水,中级工程师,研究方向:生物化工。