

Tạo kháng thể thổ kháng chuyên biệt chloramphenicol

• **Nguyễn Đức Thịnh**

Viện Y tế Công cộng TP. HCM – Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQG–HCM

• **Nguyễn Thị Nguyệt Thu**

• **Dương Ngọc Diễm**

Viện Pasteur TP.HCM

• **Chu Phạm Ngọc Sơn**

Trung tâm Sắc ký Hải đăng

• **Trần Linh Thuớc**

Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQG–HCM

(Bài nhận ngày 20 tháng 05 năm 2016, nhận đăng ngày 21 tháng 11 năm 2016)

TÓM TẮT

Chloramphenicol (CAP) là một kháng sinh phổ rộng có độc tính cao, ảnh hưởng xấu đến sức khỏe con người nên cần được kiểm soát chặt chẽ trong thực phẩm. Chúng tôi quan tâm đến việc phát triển một phương pháp chiết tách hiệu quả CAP từ thực phẩm dựa trên nguyên tắc miễn dịch sử dụng kháng thể kháng chuyên biệt CAP để kết hợp với phương pháp sắc ký lỏng ghép khối phổ LC/MS/MS nhằm phục vụ việc phân tích xác định tồn dư CAP trong thực phẩm đạt yêu cầu của các tiêu chuẩn quốc tế. Trong bài báo này, chúng tôi báo cáo kết quả thực nghiệm tạo kháng thể thổ kháng chuyên biệt CAP. Kháng nguyên cộng hợp giữa CAP và protein mang, bovine serum albumin, BSA (kháng nguyên CAP-BSA), đã được tổng hợp thành công từ chloramphenicol succinate và BSA với hiệu suất cộng hợp BSA lớn hơn 70 % và sự hiện diện của CAP trong kháng nguyên cộng hợp được kiểm chứng bằng phương pháp ELISA.

Từ khóa: chloramphenicol, an toàn thực phẩm, kháng thể, sắc ký ái lực miễn dịch

MỞ ĐẦU

Chloramphenicol (CAP) là một kháng sinh phổ rộng, được cơ thể hấp thu tốt sau khi uống, tiêm và được đào thải chậm [1]. CAP gây nên những ảnh hưởng xấu đến sức khỏe trên người, được xác định là có liên quan tới bệnh suy tủy xương, thiếu máu không tái tạo hay tác nhân gây

Kháng nguyên CAP-BSA đã gây đáp ứng miễn dịch tốt ở thổ tạo kháng thể kháng BSA từ lần tiêm kháng nguyên đầu tiên và cảm ứng sự hình thành kháng thể kháng CAP trong huyết thanh thô tăng dần từ lần tiêm kháng nguyên thứ ba trở đi, đạt cao nhất sau lần tiêm kháng nguyên thứ năm. Kháng thể kháng CAP được tinh chế từ kháng huyết thanh thô bằng hai bước: i) Loại bỏ albumin cùng các protein không là kháng thể bằng ammonium sulfate 35–37 % bão hòa; ii) Loại bỏ kháng thể kháng BSA bằng cột sắc ký ái lực chuyên biệt Sepharose-BSA. Khả năng tương tác và gắn chuyên biệt CAP hiện diện trong dung dịch mẫu chứa CAP của kháng thể kháng CAP tinh chế đã được chứng minh bằng cột sắc ký miễn dịch Sepharose-Kháng thể kháng CAP được tạo thành bằng cách cộng hợp kháng thể kháng CAP tinh chế với Sepharose.

ung thư trên người [3, 8]. Trong chăn nuôi, CAP được sử dụng để điều trị và phòng ngừa các bệnh nhiễm trùng do vi khuẩn ở vật nuôi, nên có thể còn tồn dư trong các sản phẩm chăn nuôi, gây ảnh hưởng đến sức khỏe người tiêu dùng [4].

Hiện nay để đánh giá dư lượng chloramphenicol trong thực phẩm, hai phương pháp thường được sử dụng là phương pháp sàng lọc (screening) và phương pháp xác nhận (confirmation). Phương pháp sàng lọc thường để thực hiện trên lượng mẫu lớn, giá thành rẻ, dễ triển khai nhưng có độ tin cậy không cao [5]. Phương pháp xác nhận là phương pháp có độ tin cậy cao và là phương pháp tiêu chuẩn của các cơ quan kiểm soát thực phẩm trong cũng như ngoài nước. Trong phương pháp xác nhận, việc xử lý mẫu đóng một vai trò rất quan trọng. Các kỹ thuật xử lý mẫu của phương pháp xác nhận hiện nay đều được xây dựng trên kỹ thuật chiết lỏng-lỏng hay tách chiết pha rắn. Tách chiết pha rắn có ưu điểm hơn tách chiết lỏng-lỏng là dễ thao tác hơn và cho kết quả có độ lặp lại cũng như độ thu hồi tốt hơn. Pha rắn thường sử dụng tách chiết CAP là cột C_{18} . Bất lợi của cột tách chiết C_{18} là độ chuyên biệt thấp do tính chất tương tác không chuyên biệt, nên chỉ cho kết quả tốt trên số nền mẫu như cá, tôm, thịt, sữa. Đối với các mẫu có chứa nhiều tạp chất như thức ăn gia súc hay chứa hàm lượng đường cao như mật ong, việc xử lý mẫu cột C_{18} không loại được triệt để các tạp chất trong mẫu, gây khó khăn cho quá trình phân tích bằng sắc ký khối phổ tiếp theo.

Để tăng tính chuyên biệt của pha rắn đối với CAP trong tách chiết pha rắn ứng dụng cho các mẫu thực phẩm phức tạp, cột polymer in dấu phân tử (MIP) chuyên biệt đối với CAP đã được phát triển và thương mại hóa trên thế giới, nhưng có giá thành cao [9]. Việc phát triển một cột sắc ký ái lực miễn dịch cho CAP cũng là một giải pháp nhiều triển vọng giúp tăng hiệu quả của bước tách chiết chuyên biệt CAP từ mẫu. Tuy nhiên cho đến nay phương pháp này chưa được nghiên cứu ứng dụng cho việc phân tích dư lượng CAP trong mẫu thực phẩm. Chúng tôi quan tâm đến việc phát triển một phương pháp chiết tách hiệu quả CAP từ các mẫu thực phẩm phức tạp dựa trên nguyên tắc miễn dịch sử dụng kháng thể kháng chuyên biệt CAP để kết hợp với phương pháp sắc ký lỏng ghép khối phổ

LC/MS/MS nhằm phục vụ việc phân tích xác định tồn dư CAP trong thực phẩm đạt yêu cầu của các tiêu chuẩn quốc tế. Trong bài báo này, chúng tôi báo cáo kết quả thực nghiệm tạo kháng thể thô kháng chuyên biệt CAP.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Vật liệu, hóa chất

Các vật liệu, hóa chất chuẩn: chloramphenicol (Supelco-442513), chloramphenicol succinate (Sigma-C3787), bovine serum albumin BSA (Sigma-A7906), 2-*N*-morpholinoethanesulfonic acid (Sigma-M3671), 1-ethyl-3-[3-dimethylaminopropyl] carbodiimide hydrochloride (Pierce-22980), Tá chất Freund toàn phần (Sigma-F5881), tá chất Freund không toàn phần (Sigma-F5506), huyết thanh thô kháng chloramphenicol (Abcam-Ab35658), huyết thanh dê kháng thô gắn men horseradish peroxidase (HRP) (Abcam-Ab97051), 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (Sigma-5525), SeaKem HE agarose (lonza-50020) và các hóa chất tinh khiết phòng thí nghiệm khác.

Cộng hợp chloramphenicol-OVA (sử dụng làm kháng nguyên CAP trong phương pháp ELISA gián tiếp), gel sắc ký ái lực Sepharose gắn BSA do chúng tôi tự tổng hợp và chế tạo.

Phương pháp

Chế tạo và kiểm tra kháng nguyên cộng hợp chloramphenicol-BSA (CAP-BSA)

Cho tuần tự 1 mL dung dịch BSA 10 mg/mL và 2,5 mL dung dịch chloramphenicol succinate 4 mg/mL (cả hai đều được pha trong dung dịch đệm 0,1 M 2-*N*-morpholinoethanesulfonic acid, MES, pH 4,5–5,0) vào lọ phản ứng. Bổ sung 0,5 mL dung dịch 1-ethyl-3-[3-dimethylaminopropyl] carbodiimide hydrochloride 10 mg/mL. Khuấy từ 2 giờ ở nhiệt độ phòng. Loại bỏ lượng chloramphenicol succinate dư bằng cột sắc ký loại muối Hi Trap và bảo quản dung dịch cộng hợp qua cột ở 4 °C [2, 5, 7].

Sự hiện diện và hàm lượng của CAP trong cộng hợp CAP-BSA được xác định bằng phương pháp ELISA. Hiệu quả cộng hợp BSA với chloramphenicol succinate được xác định thông qua định lượng lượng BSA trong cộng hợp thu nhận được bằng phương pháp Bradford.

Phương pháp ELISA gián tiếp kiểm tra hiệu quả cộng hợp

Thêm vào mỗi giếng của đĩa ELISA 100 μ L dung dịch cộng hợp CAP-BSA được pha loãng 1/10, 1/100, 1/1000 và 1/10.000 trong đệm carbonate pH 9,6. Ủ đĩa ELISA ở nhiệt độ phòng qua đêm. Rửa đĩa ELISA 02 lần bằng dung dịch 0,05 % Tween 20. Khóa giếng bằng cách bổ sung vào mỗi giếng 200 μ L dung dịch gelatin cá 1 %; ủ ở 37 °C trong 2 giờ. Rửa đĩa ELISA 02 lần bằng dung dịch 0,05 % Tween 20. Bổ sung vào mỗi giếng 100 μ L kháng huyết thanh thỏ kháng CAP (Abcam) được pha loãng 1/2000 bằng dung dịch PBS chứa 1% BSA; ủ ở 37 °C trong 2 giờ. Rửa đĩa ELISA 02 lần bằng dung dịch 0,05 % Tween 20 như trên. Bổ sung vào mỗi giếng 100 μ L kháng thể dê kháng thỏ gắn HRP (Abcam) pha loãng 1/2000 bằng dung dịch PBS chứa 1% BSA; ủ ở 37 °C trong 1 giờ. Rửa đĩa ELISA 02 lần bằng dung dịch 0,05 % Tween 20; bổ sung vào mỗi giếng 100 μ L dung dịch cơ chất TMB; để ở nhiệt độ phòng 10 phút; dừng phản ứng ELISA bằng cách bổ sung vào mỗi giếng 100 μ L dung dịch 10 % H₂SO₄. Đọc mật độ quang bằng máy đọc ELISA tại OD_{450nm}.

Chế tạo kháng thể thỏ kháng CAP

Thử thí nghiệm được gây miễn dịch bằng các mũi tiêm cách nhau 1 tháng. Mũi tiêm đầu tiên chứa 300 μ g CAP-BSA và tá chất Freund toàn phần. Kỹ thuật khuếch tán kép trên thạch với kháng nguyên kiểm tra là BSA được sử dụng để đánh giá mức độ đáp ứng miễn dịch ở thỏ sau mũi tiêm đầu tiên. Các mũi tiêm tiếp theo chứa 150 μ g CAP-BSA và tá chất Freund không toàn phần và kỹ thuật ELISA gián tiếp được sử dụng để đánh giá đáp ứng miễn dịch (mức độ hiện diện của kháng

thể kháng CAP trong kháng huyết thanh thỏ) sau các mũi tiêm tiếp theo [6, 7].

Phương pháp ELISA gián tiếp đánh giá đáp ứng miễn dịch ở thỏ

Thêm vào các giếng ELISA 100 μ L kháng nguyên chloramphenicol-OVA pha trong đệm carbonate pH 9,6 với nồng độ 5 μ g/mL; ủ phiên ELISA qua đêm ở nhiệt độ phòng; rửa đĩa ELISA bằng dung dịch 0,05 % Tween 20. Bổ sung vào các giếng 200 μ L dung dịch gelatin cá 1 %; ủ 2 giờ ở 37 °C; Rửa đĩa ELISA 02 lần bằng dung dịch 0,05 % Tween 20. Bổ sung vào mỗi giếng 100 μ L kháng huyết thanh thỏ (được gây miễn dịch bằng cộng hợp CAP-BSA) được pha loãng 1/100, 1/1000, 1/10.000, 1/100.000 bằng dung dịch đệm PBS chứa 1 % BSA hoặc bổ sung huyết thanh thỏ đối chứng (không gây đáp ứng miễn dịch). Các bước tiếp theo như thêm kháng thể dê kháng thỏ gắn HRP và cơ chất được tiến hành tương tự như kỹ thuật ELISA dùng kiểm tra hiệu quả cộng hợp ở trên [7].

Thu nhận kháng huyết thanh và tinh chế kháng thể kháng CAP

Theo dõi sự tăng của lượng kháng thể kháng CAP trong huyết thanh thỏ bằng phương pháp ELISA. Khi lượng kháng thể đạt tối đa, tiến hành thu toàn bộ máu của thỏ để thu nhận kháng huyết thanh và tinh chế kháng thể thỏ kháng CAP. Kháng huyết thanh thỏ thô được pha loãng theo tỷ lệ 1:3 bằng nước, khuấy đều ở 4 °C và bổ sung từ từ dung dịch ammonium sulfate bão hòa để đạt 35– 37 % độ bão hòa. Tiếp tục khuấy hỗn hợp dung dịch trong 30 phút; để yên qua đêm. Ly tâm hỗn hợp 6000 vòng/phút, ở 4 °C trong 15 phút. Loại bỏ dịch nổi, thu nhận tủa kháng thể. Huyền phù hóa tủa kháng thể bằng 20 mL dung dịch đệm PBS và chuyển vào túi thẩm tích. Tiến hành thẩm tích tủa kháng thể bằng dung dịch đệm PBS cho đến khi sạch hoàn toàn muối ammonium sulfate. Dung dịch kháng thể thu được là hỗn hợp của kháng thể kháng BSA, kháng thể kháng CAP. Tiến hành loại bỏ kháng thể kháng BSA bằng cột sắc ký ái lực

gắn BSA. Quá trình loại bỏ này được thực hiện bằng cách cho dung dịch kháng thể thu được sau thẩm tích qua cột sắc ký ái lực Sepharose-BSA. Thu phần dịch qua cột và nạp trở lại lên cột; lặp lại 5 lần. Thu phần dịch qua cột chứa kháng thể kháng CAP. Dung ly kháng thể kháng BSA gắn trên cột sắc ký bằng dung dịch đệm Tris HCl 10 mM, NaCl 0,5 M; pH 7,5 cho đến khi dịch rửa không còn protein ($OD_{280}=0$). Độ tinh sạch của kháng thể kháng CAP được kiểm tra bằng kỹ thuật điện di SDS-PAGE, hiệu quả loại bỏ kháng thể kháng BSA được xác định bằng kỹ thuật khuếch tán kép trên thạch.

Kiểm tra khả năng gắn CAP trong dung dịch mẫu của kháng thể kháng CAP đã điều chế

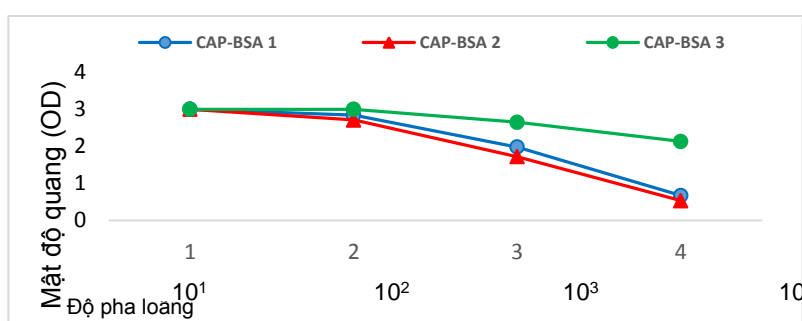
Kháng thể kháng CAP đã tinh chế được sử dụng để tạo cột sắc ký ái lực Sepharose-Kháng thể kháng CAP (cột Sepharose-IgG_{CAP}) như sau: cộng hợp 5 mg kháng thể thô sau tinh chế với 1 mL gel Sepharose-CNBr; nhồi vào mỗi cột sắc ký 0,1 mL gel. Cột Sepharose-IgG_{CAP} này được dùng để kiểm tra khả năng gắn CAP bằng cách cho 1 mL dung dịch chứa 10 ng CAP chuẩn đi qua cột với tốc độ dòng 1 mL/phút. Rửa cột bằng 20 mL dung dịch PBS, tiếp theo là 20 mL nước. Sau đó hút chân không nhẹ cho cột khô hoàn toàn. Dung ly chloramphenicol ra khỏi cột bằng 02 lần mỗi lần bằng 0,5 mL methanol. Lọc dịch bằng lọc 0,45 μ m. Sự hiện diện của CAP trong phân đoạn dung ly được phân tích bằng phương pháp LC MS/MS trên

hệ thống sắc ký lỏng ghép khối phổ Shimadzu UFLC_{XR} kết nối với khối phổ Applied Biosystem API 5500 và phần mềm Analyst phiên bản 1.5.1.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Tạo kháng nguyên cộng hợp CAP-BSA

Chúng tôi tiến hành tổng hợp kháng nguyên cộng hợp CAP-BSA 3 lần, thu nhận được 3 sản phẩm là CAP-BSA 1, CAP-BSA 2 và CAP-BSA 3. Kết quả xác định sự hiện diện của CAP trong cộng hợp CAP-BSA bằng phương pháp ELISA gián tiếp sử dụng kháng thể thô kháng CAP (Hình 1) cho thấy cả ba sản phẩm đều cho OD tương đương nhau ở độ pha loãng 10^1 . Tuy nhiên ở các độ pha loãng cao hơn (10^2 , 10^3 , 10^4) thì OD thu được là khác nhau: CAP-BSA 3 cho OD cao nhất, tiếp theo là CAP-BSA 1 và CAP-BSA 2. Kết quả này cho phép xác nhận có sự hiện diện của CAP trong cả 3 sản phẩm cộng hợp, trong số này hàm lượng CAP trong một đơn vị trọng lượng của cộng hợp là cao nhất ở trường hợp CAP-BSA 3. Kết quả định lượng BSA trong cộng hợp CAP-BSA (Bảng 1) cho thấy phương pháp chế tạo cộng hợp của chúng tôi cho phép gắn 74,1 % – 84,0 % lượng BSA với chloramphenicol succinate. Các kết quả trên Hình 1 và Bảng 1 cho thấy chúng tôi đã chế tạo được thành công cộng hợp CAP-BSA và cộng hợp CAP-BSA 3 được chọn là kháng nguyên để gây đáp ứng miễn dịch ở thỏ nhằm thu nhận kháng thể thô kháng CAP.



Hình 1. Kết quả xác nhận sự hiện diện và xác định hàm lượng tương đối của CAP trong các sản phẩm cộng hợp CAP-BSA bằng kỹ thuật ELISA

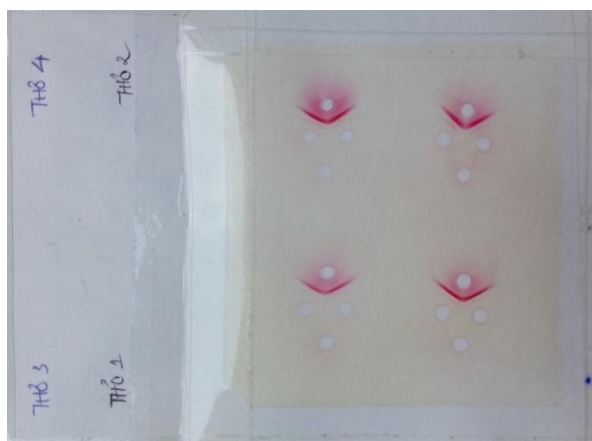
Bảng 1. Hiệu suất cộng hợp BSA với CAP

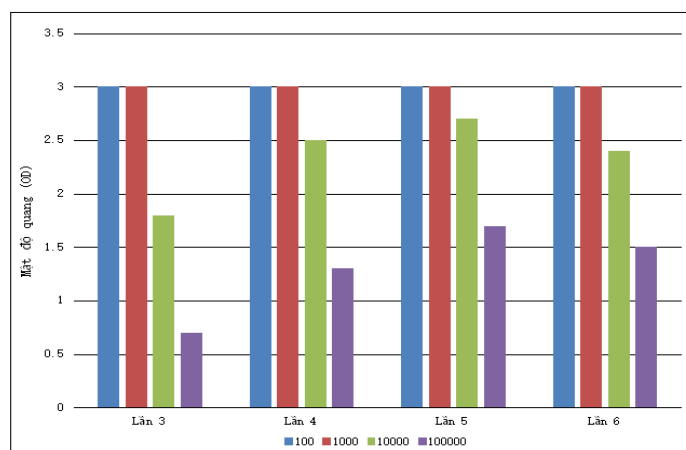
Sản phẩm	Lượng BSA sử dụng (mg)	Dung tích cộng hợp sau tinh chế (mL)	Hàm lượng BSA (mg/mL)	Tổng lượng BSA trong cộng hợp (mg)	Hiệu suất cộng hợp BSA (%)
CAP-BSA 1	10	2,2	3,8	8,36	83,6
CAP-BSA 2	10	1,9	3,9	7,41	74,1
CAP-BSA 3	10	2,1	4,0	8,40	84,0

Thu nhận kháng huyết thanh thô

Đáp ứng miễn dịch ở thỏ đối với kháng nguyên cộng hợp CAP-BSA 3 được kiểm tra bằng sự hiện diện trong huyết thanh của thỏ kháng thể kháng BSA (sau khi tiêm kháng nguyên lần thứ nhất và lần thứ hai) và kháng thể kháng CAP (sau lần tiêm kháng nguyên thứ ba). Kết quả kiểm tra sự hiện diện của kháng thể kháng BSA trong huyết thanh thỏ ở lần lấy máu đầu tiên và lần thứ hai bằng kỹ thuật khuếch tán kép trên thạch (Hình 2) cho thấy huyết thanh từ 04 con thỏ được gây miễn dịch đều cho phản ứng dương tính với kháng nguyên BSA, chứng tỏ huyết thanh thỏ có chứa kháng thể kháng BSA.

Sau mũi tiêm kháng nguyên lần thứ 3, huyết thanh được thu nhận để kiểm tra sự hiện diện của kháng thể kháng CAP bằng kỹ thuật ELISA gián tiếp. Kết quả cho thấy huyết thanh sau lần tiêm kháng nguyên thứ ba từ 04 thỏ đều cho phản ứng ELISA dương tính. Hình 3 trình bày kết quả ELISA xác định sự hiện diện của kháng thể kháng CAP trong huyết thanh thỏ ở các độ pha loãng $10^2 - 10^5$ sau các lần tiêm kháng nguyên thứ 3, 4, 5 và 6. Kết quả cho thấy nồng độ kháng thể trong kháng huyết thanh thỏ tăng dần, đạt cực đại sau mũi tiêm thứ 5 và bắt đầu giảm sau lần tiêm thứ 6. Do vậy, chúng tôi quyết định thu lấy máu của thỏ sau lần tiêm thứ 6 để thu nhận kháng huyết thanh sử dụng để tinh chế kháng thể kháng CAP.

**Hình 2.** Phản ứng khuếch tán kép trên thạch giữa BSA và huyết thanh thỏ

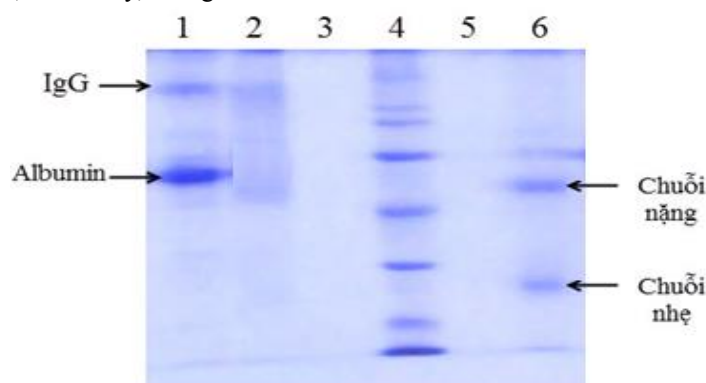


Hình 3. Kết quả kiểm tra sự hiện diện của kháng thể kháng CAP trong huyết thanh thô sau các lần tiêm kháng nguyên CAP-BSA 3 bằng phương pháp ELISA gián tiếp

Tinh chế kháng thể kháng CAP

Kháng huyết thanh thô thu được là hỗn hợp của kháng thể kháng BSA, kháng thể kháng CAP và các protein tạp khác, đặc biệt là albumin. Để thu nhận được kháng thể kháng chuyên biệt CAP, trước tiên chúng tôi tiến hành loại bỏ albumin và các protein không là kháng thể bằng cách tủa với dung dịch ammonium sulfate 35–37 % bão hòa, sau đó loại bỏ kháng thể kháng BSA từ hỗn hợp kháng thể bằng cột sắc ký ái lực chuyên biệt Sepharose-BSA. Kết quả phân tích bằng điện di SDS-PAGE (Hình 4) cho thấy, trong điều kiện

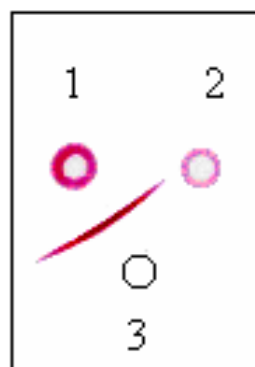
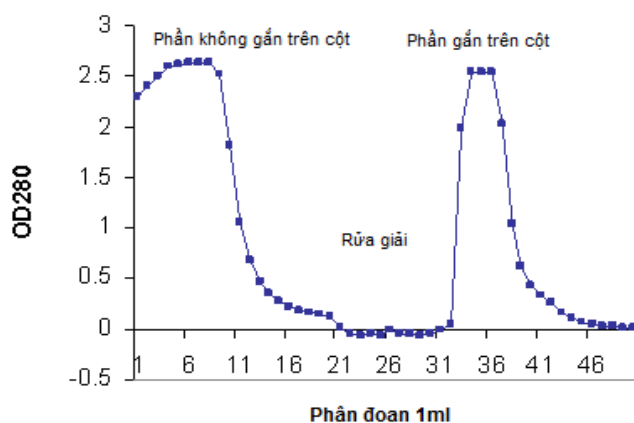
không được xử lý bằng DTT, kháng huyết thanh ban đầu chỉ chứa 2 vạch protein chính là kháng thể và albumin (Giếng 1); sau khi được tủa phân đoạn bằng ammonium sulfate 35– 37 % bão hòa, chế phẩm chỉ còn một vạch chính là kháng thể (Giếng 2). Khi được xử lý bằng DTT, chế phẩm kháng thể được tách thành 2 vạch protein tương ứng với chuỗi nặng (50 kDa) và chuỗi nhẹ (25 kDa) của kháng thể (Giếng 6). Như vậy, phương pháp tủa bằng ammonium sulfate 35– 37 % bão hòa đã loại bỏ hầu hết albumin và các protein tạp khác khỏi chế phẩm kháng thể.



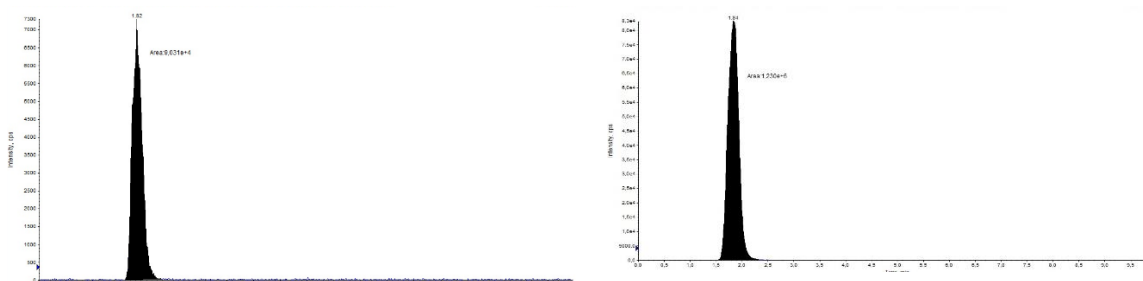
Hình 4. Kết quả phân tích độ sạch của chế phẩm kháng thể sau khi được xử lý với dung dịch ammonium sulfate 35-37 % bão hòa bằng điện di SDS-PAGE. 1, Kháng huyết thanh ban đầu, DTT (-); 2, Kháng thể sau khi tủa bằng ammonium sulfate, DTT (-); 3, Không chứa mẫu; 4, Thang khối lượng phân tử (myosin 200 kDa, β -galactosidase 116 kDa, phosphorylase b 97 kDa, serum albumin 66 kDa, ovalbumin 45 kDa, carbonic anhydrase 31 kDa, soybean trypsin inhibitor 21 kDa, lysozyme 14,4 kDa, aprotinin 6,5 kDa); 5, Không chứa mẫu; 6, Kháng thể sau khi tủa bằng ammonium sulfate, DTT (+)

Kháng thể kháng BSA được loại khỏi hỗn hợp kháng thể bằng cột sắc ký ái lực miễn dịch chuyên biệt BSA. Hình 5A cho thấy biểu đồ sắc ký gồm hai phần chính: i) Các phân đoạn chứa kháng thể kháng CAP không gắn vào cột Sepharose-BSA (phân đoạn 1-21) và ii) Các phân đoạn chứa kháng thể kháng BSA gắn chuyên biệt vào cột Sepharose-BSA, được dung ly khỏi cột sau bước rửa (phân đoạn 31-46). Hiệu quả loại bỏ kháng thể kháng BSA ra khỏi hỗn hợp kháng thể được kiểm chứng

bằng phản ứng khuếch tán kép trên thạch (Hình 5B): phân đoạn không gắn vào cột (chứa kháng thể kháng CAP) không còn chứa kháng thể kháng BSA nên cho phản ứng âm tính khuếch tán kép trên thạch, so với kết quả dương tính của mẫu trước khi nạp vào cột. Kết quả trên Hình 5 cho thấy đã loại được kháng thể kháng BSA ra khỏi kháng thể kháng CAP bằng cột sắc ký ái lực miễn dịch chuyên biệt BSA.



Hình 5. A, Sắc ký đồ của quá trình loại bỏ kháng thể kháng BSA khỏi hỗn hợp kháng thể bằng cột sắc ký ái lực Sepharose-BSA. B, Kiểm tra hiệu quả loại kháng thể kháng BSA bằng phản ứng khuếch tán kép trên thạch; 1, Mẫu kháng thể trước khi nạp vào cột sắc ký; 2, Phân đoạn kháng thể không gắn vào cột sắc ký; 3, Kháng nguyên BSA.



Hình 6. A, Dung dịch chứa chuẩn CAP, $t_R=1,82$ phút; B, Dung dịch dung ly từ cột Sepharose-IgG_{CAP}, $t_R=1,84$ phút.

Kiểm chứng khả năng gắn CAP trong dung dịch mẫu của kháng thể thu được

Kháng thể kháng CAP tinh chế được sử dụng để gắn cộng hóa trị lên gel Sepharose và tạo cột sắc ký ái lực gắn chuyên biệt CAP, cột Sepharose-IgG_{CAP}. Cột Sepharose-IgG_{CAP} này được sử dụng để đánh giá khả năng gắn CAP trong dung dịch

mẫu chứa CAP của kháng thể thu được. Cho dung dịch mẫu chứa 10 ng CAP đi qua cột Sepharose-IgG_{CAP} (0,1 mL gel). Sự hiện diện của CAP trong dung dịch dung ly thu từ cột sắc ký được xác định bằng phương pháp LC MS/MS. Sắc ký đồ của dung dịch mẫu chứa CAP xuất hiện một peak duy nhất ở thời gian lưu $t_R = 1,82$ phút (Hình 6A);

tương tự, sắc ký đồ của dung dịch dung ly từ cột sắc ký xuất hiện một peak duy nhất ở thời gian lưu $t_R=1,84$ phút (Hình 6B) hầu như trùng với chuẩn CAP. Như vậy, có thể kết luận rằng kháng thể kháng CAP gắn trên cột Sepharose-IgG_{CAP} có khả năng gắn CAP trong dung dịch mẫu.

Để xác nhận khả năng gắn CAP này của cột Sepharose-IgG_{CAP} là do tương tác đặc hiệu của kháng thể IgG_{CAP} với CAP mà không phải là do sự hấp phụ không đặc hiệu của pha rắn, chúng tôi cũng đã tiến hành nạp dung dịch chứa 10 ng CAP vào cột sắc ký ái lực Sepharose-BSA và tiến hành sắc ký với điều kiện tương tự như trên. Kết quả phân tích bằng LC MS/MS cho thấy dung dịch

dung ly từ cột không chứa CAP. Kết quả này cho thấy khả năng lưu lại của CAP trên cột sắc ký ái lực Sepharose-IgG_{CAP} là do tương tác đặc hiệu của kháng thể IgG_{CAP} trên cột sắc ký với kháng nguyên là CAP.

KẾT LUẬN

Chúng tôi đã tạo thành công kháng thể thỏ kháng chloramphenicol bằng cách gây miễn dịch thỏ với cộng hợp BSA-CAP. Kháng thể được tinh chế và chứng minh khả năng gắn chuyên biệt bởi chloramphenicol bằng kỹ thuật sắc ký ái lực miễn dịch và có tiềm năng ứng dụng trong việc kiểm tra dư lượng kháng sinh trong thực phẩm.

Preparation of anti-chloramphenicol rabbit antibody

- **Nguyen Duc Thinh**

Institute of Hygiene and Public Health – University of Science, VNU-HCM

- **Nguyen Thi Nguyet Thu**

- **Duong Ngoc Diem**

Pasteur Institute of Ho Chi Minh City

- **Chu Pham Ngoc Son**

Sac Ky Hai Dang Scientific Services Joint Stock Company

- **Tran Linh Thuoc**

University of Science, VNU-HCM

ABSTRACT

Chloramphenicol (CAP) is a broad-spectrum antibiotic of high toxicity on human therefore it is being strictly controlled in food. We are interested in the development of a method of effective extraction of CAP in food based on the immunological principle using specific anti-CAP antibody combining with LC/MS/MS for the analysis of the residual CAP in food meeting the international standard. In this article, we reported experimental results on the preparation of anti-CAP rabbit antibody. Conjugative antigen between

CAP and the carrier protein, bovine serum albumin, BSA (CAP-BSA) was successfully synthesized from chloramphenicol succinate and BSA with a BSA conjugating efficiency of more than 70 %, and the presence of CAP in the conjugative antigen was confirmed by ELISA method. The CAP-BSA antigen could cause good immune response in rabbit by the first antigen injection and induce the increasing production of anti-CAP antibody in rabbit serum from the third antigen injection which reached maximal value

after the fifth injection. Anti-CAP antibody was purified from rabbit anti-serum in two steps: i) Removing of albumin and other non antibody proteins by 35–37 % saturated ammonium sulphate; ii) Elimination of anti-BSA antibody by the Sepharose-BSA specific affinity chromatography column. The ability of the purified

anti-CAP antibody to interact and bind with CAP molecules in CAP-spiked sample was proved using a Sepharose-Anti-CAP antibody chromatography column which was made by conjugating the purified anti-CAP antibody with Sepharose beads.

Keywords: chloramphenicol, food safety, antibody, immunoaffinity chromatography

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. FAO/WHO (Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Health Organization), Toxicological evaluation of certain veterinary drug residues in food. Chloramphenicol. WHO Food Additives Series, 33 (1995).
- [2]. E. Hemaprabha, Chemical crosslinking of proteins: Review, *The Journal of Pharmaceutical and Scientific Innovation*, 1, 1, 22–26 (2012).
- [3]. IARC (International Agency for Research on Cancer), Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans, 50 (1990).
- [4]. J.C. Hanekamp, G. Frapporti, K. Olieman, Chloramphenicol, food safety and precautionary thinking in Europe, *Environmental Liability*, 11, 209–221 (2003).
- [5]. J.V. Samsonova, M.D. Fedorova, I.P. Andreeva, M.Y. Rubtsova, Al.M. Egorov, Characterization of anti-chloramphenicol antibodies by enzyme-linked immunosorbent assay, *Analytical Letters*, 43, 133–141 (2010).
- [6]. J.O. Wesongah, A.N. Guantai, Potential Animal Sources of antibodies for the development of a chloramphenicol enzyme linked immunosorbent assay, *African Journal of Pharmacology and Therapeutics*, 1, 2, 41–45 (2012).
- [7]. M. Pattarawarapan, S. Nangola, C. Tayapiwatana, Establishment of competitive ELISA for detection of chloramphenicol, *Chiang Mai J. Sci.*, 33, 1, 85–94 (2006).
- [8]. P. Shukla, F.W. Bansode, R.K. Singh, Chloramphenicol toxicity: A review, *Journal of Medicine and Medical Sciences*, 2, 13, 1313–1316, (2011).
- [9]. Supelcom, Supe MIP Solid Phase Extraction, (2009).