

抗阿莫西林多克隆抗体的制备

魏东 徐彤 赵月平 黄智鸿 李秀娟 (河北北方学院, 河北张家口 075000)

摘要 [目的] 为研究阿莫西林残留的免疫学检测方法奠定基础。[方法] 采用N-羟基琥珀酰亚胺活性酯(NHS)法将阿莫西林分别与牛血清白蛋白(BSA)、卵清蛋白(OVA)偶联,制备免疫抗原AMX-BSA和检测抗原AMX-OVA,用AMX-BSA免疫成年兔以获得高效价的多克隆抗体。[结果] 免疫抗原AMX-BSA紫外光谱具有药物和蛋白的叠加特征,其最大吸收峰在276 nm处,说明载体蛋白BSA与AMX成功偶联,可用于动物免疫。检测抗原AMX-OVA最大吸收峰在275 nm处,说明载体蛋白OVA与AMX成功偶联,可用作检测抗原进行包被。间接ELISA检测结果表明,2只兔抗血清效价较高,均达1:32 000以上,说明有特异性抗体产生。[结论] 该研究成功制备了抗阿莫西林多克隆抗体,也进一步证明药物偶联成功。

关键词 阿莫西林; 动物免疫; 多克隆抗体

中图分类号 S852.4⁺3 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2008)09-03692-02

Preparation of Polyclonal Antibody against Amoxicillin

WEI Dong et al (Hebei North University, Zhangjiakou, Hebei 075000)

Abstract [Objective] The research aimed to lay the foundation for studying the immunological method for detecting the residue of amoxicillin. [Method] Amoxicillin were coupled with bovine serum albumin (BSA) and ovalbumin (OVA) by using N-hydroxysuccinimide activated ester method to prepare the immune antigen AMX-BSA and detection antigen AMX-OVA. The adult rabbits were immunized with AMX-BSA to obtain the polyclonal antibody with high titer. [Result] The ultraviolet spectrum of immune antigen AMX-BSA had the stacking characteristics of medication and protein and its maximum absorption peak was 276 nm, which indicated that vector protein BSA was successfully coupled with AMX and it could be used in animal immunization. The maximum absorption peak of detection antigen AMX-OVA was 275 nm, indicating vector protein OVA was successfully coupled with AMX and it could be taken as detection antigen for coating. The results of indirect ELISA detection showed that the antiserum titers of 2 rabbits were higher and both reached over 1:32 000, which indicated that the specific antibody was produced. [Conclusion] In this research, the polyclonal antibody against amoxicillin was successfully prepared, which further proved that the drugs were successfully coupled.

Key words Amoxicillin; Animal immunization; Polyclonal antibody

阿莫西林(Amoxicillin, AMX), 化学名为羟氨苄青霉素, 属青霉素类-内酰胺抗生素, 其体外抗菌谱等同于氨苄青霉素, 但体内效果则增强2~3倍, 可广泛用于治疗各种动物的尿道、呼吸道等的敏感菌感染。随着该药的大量使用, 其在动物源食品中的残留问题引起广泛关注。笔者采用N-羟基琥珀酰亚胺活性酯(NHS)法将AMX分别与牛血清白蛋白(BSA)、卵清蛋白(OVA)偶联制备免疫抗原AMX-BSA和检测抗原AMX-OVA, 用免疫抗原免疫成年兔, 获得高效价的多克隆抗体, 旨在为研究阿莫西林残留的免疫学检测方法奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 材料 试验动物。成年新西兰兔2只, 由河北北方学院实验牧场提供。试剂。阿莫西林购自中国兽医药品监察所, 牛血清白蛋白(BSA)、卵清蛋白(OVA)、乙基碳二亚胺盐酸(EDC.HCl)及邻苯二胺均购自Sigma公司, 二甲基甲酰胺(DMF)购自Genview公司, N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)购自Cxbio Biotechnology公司, 1%明胶、羊抗兔IgG辣根过氧化物酶(IgG HRP)、弗氏完全佐剂、弗氏不完全佐剂均购自鼎国公司。ELISA试验所用溶液为实验室自配, 其他试剂均为分析纯。仪器。96孔可拆酶标板购自丹麦NUNC公司, 紫外可见分光光度计756PC型, 高速离心机D78532 SPRVALL RC5C PLUS, 磁力搅拌器CJ-781C型、酶标仪ELX800型为美国Bio-TEK产品。

1.2 方 法

1.2.1 AMX-BSA和AMX-OVA的制备。采用NHS法^[1], 将20.0 ng AMX、10.0 ng NHS、12.5 ng EDC充分溶解于1 ml

DMF中, 于室温下避光搅拌24 h, 得AMX反应液。称取BSA 50.0 ng, 使之充分溶解在3 ml PBS(pH 7.4)中, 将AMX反应液逐滴加入BSA溶液中, 于室温下搅拌3 h, 然后用PBS透析3 d, 每天换液2次, 以除去未反应的小分子物质。以3 000 r/min离心30 min, 收集上清, 即为制备的免疫抗原AMX-BSA, 分装, -20℃保存。以50.0 ng OVA代替BSA, 其余操作均同上, 制备检测抗原AMX-OVA。

1.2.2 免疫抗原AMX-BSA与检测抗原AMX-OVA的紫外扫描光谱鉴定。在200~400 nm紫外光区, 分别对AMX、BSA、OVA的PBS溶液和2种偶联物进行扫描。操作参照文献[2], 根据文献[3]计算半抗原与载体蛋白的偶联比。

1.2.3 动物免疫试验。兔耳缘静脉抽血, 取血清, 作为阴性对照。背部皮下多点注射进行免疫。免疫抗原AMX-BSA用量1 ng/只(以载体蛋白含量计算), 14 d/次, 共免疫5次。首次免疫使用等量弗氏完全佐剂乳化抗原, 以后均使用等量弗氏不完全佐剂乳化抗原, 第5次直接使用免疫抗原1 ng/只。从第3次免疫开始, 每次免疫后7 d耳静脉取血, 间接ELISA方法测定AMX抗血清效价。第5次免疫后7 d心脏穿刺采血, 室温静置1 h, 4℃下放置过夜, 3 000 r/min离心10 min, 收集上清, 经硫酸铵盐析法纯化^[4], 分装, -20℃保存。

2 结果与分析

2.1 抗原合成的鉴定 在200~400 nm紫外光区, 分别对AMX、BSA、OVA、AMX-BSA、AMX-OVA的PBS溶液进行扫描(图1、2)。由图1可知, AMX的PBS溶液的最大吸收峰在273 nm处, BSA的PBS溶液最大吸收峰在278 nm处, 而免疫抗原AMX-BSA与它们中任何一方的光谱都不同, 其紫外光谱明显具有药物和蛋白叠加的特征, 最大吸收峰在276 nm处。这说明在BSA载体蛋白上连接上了目的物小分子AMX, 证明偶联成功, 可用作动物免疫。同理, 由图2可知, 检测抗原

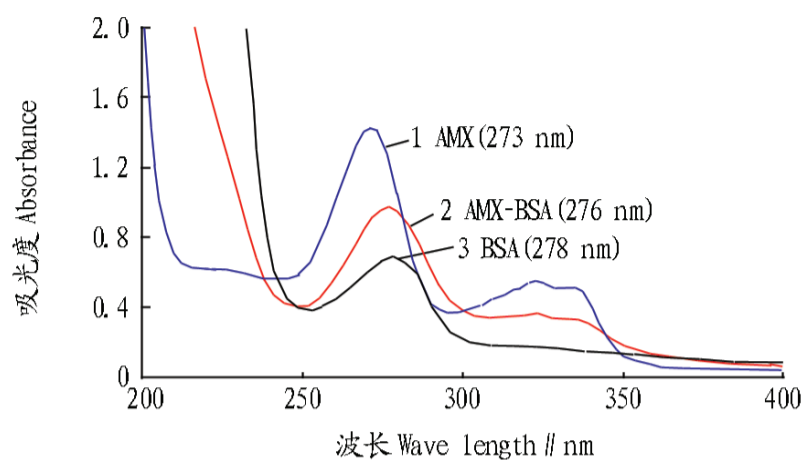
基金项目 河北省张家口市科技局课题(0701046C)。

作者简介 魏东(1971-), 男, 河北张家口人, 硕士, 助理研究员, 从事兽药残留检测研究。

收稿日期 2007-12-15

AMX-OVA 最大吸收峰在275 nm处,与AMX和OVA任何一方的光谱都不同,同样说明在OVA载体蛋白上连接上了目的物小分子AMX,证明偶联成功,可用做检测抗原进行包被。

根据半抗原与载体蛋白的偶联比公式计算结果为:免疫抗原AMX-BSA的偶联比为23:1,检测抗原AMX-OVA的偶联比为8:1,可进一步证明完全抗原偶联成功。

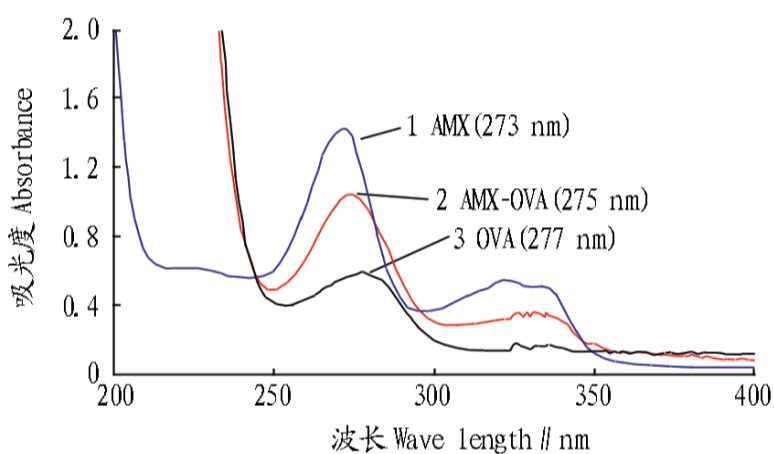


注:1为AMX的PBS溶液(18.6 μg/ml),2为AMX-BSA的PBS溶液(220 μg/ml),3为BSA的PBS溶液(220 μg/ml)。

Note:1 means PBS solution of AMX (18.6 μg/ml), 2 means PBS solution of AMX-BSA (220 μg/ml), 3 means PBS solution of BSA (220 μg/ml).

图1 免疫抗原AMX-BSA的紫外扫描光谱

Fig.1 UV scanning spectrum of immune antigen AMX-BSA



注:1为AMX的PBS溶液(18.6 μg/ml),2为AMX-OVA的PBS溶液(220 μg/ml),3为OVA的PBS溶液(220 μg/ml)。

Note:1 means PBS solution of AMX (18.6 μg/ml), 2 means PBS solution of AMX-OVA (220 μg/ml), 3 means PBS solution of OVA (220 μg/ml).

图2 检测抗原AMX-OVA的紫外扫描光谱

Fig.2 UV scanning spectrum of immune antigen AMX-OVA

2.2 AMX抗血清效价的测定 间接ELISA检测2只兔的抗血清效价结果表明,2只兔抗血清效价较高,均达1:32 000以上,说明有特异性抗体产生,证明抗阿莫西林多克隆抗体制备成功,也进一步证明药物偶联成功。

3 讨论

3.1 偶联物的鉴定 偶联物的鉴定一般分为紫外扫描光谱鉴定和免疫学鉴定。在紫外扫描光谱鉴定中,BSA、OVA和AMX在PBS溶液中的最大吸收峰分别在278 nm、277 nm和273 nm处。由于在偶联过程中分子组成及空间构型发生了一定的变化,偶联物AMX-BSA和AMX-OVA的特征性最大吸收峰分别出现在276 nm和275 nm处。因此,通过紫外光谱可证明偶联成功。同时,通过偶联比的计算,也可证明偶联的成功。偶联物的结合比大小将直接影响抗体的质量,据有关资料报道^[5],偶联结合比<20具有较好的免疫性。国外著名试剂公司提供的一些免疫抗原的结合比一般为8~12:1^[6]。该试验中制备完全抗原的结合比达到了常规要求。免疫学鉴定中,该试验免疫的2只兔子产生的抗体效价均达1:32 000以上,说明产生了针对AMX的抗体,抗AMX多克隆抗体制备的成功,进一步证明了药物偶联成功。

3.2 抗血清效价的判定 以P/N 2.1且P/N>0.2的血清最高稀释倍数为该抗体的ELISA检测效价。其中P为待测血清在某一稀释倍数测定的OD值;N为阴性对照血清在相应稀释倍数时测定的OD值。若1.5<P/N<2.1为可疑,P/N 1.5为阴性。ELISA效价是相对效价,与包被浓度和反应条件相关,最终应以用于ELISA检测时的工作浓度为准。

参考文献

- [1] TUJSEN P. Practice and Theory of Enzyme Immunoassay [M]. Amsterdam: Elsevier, 1985: 83-85.
- [2] 陈新建, 陈梅英. 免疫学技术在植物学中的应用 [M]. 北京: 中国农业出版社, 1998: 54-58.
- [3] 于洪侠, 杨曙明. 莱克多巴胺人工抗原的合成与鉴定 [J]. 中国兽医科技, 2005, 35(12): 1000-1003.
- [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: 74-75.
- [5] RINEHART KL, NAMKOSH M, CHO B W. Structure and biosynthesis of toxins from blue green algae (cyanobacteria) [J]. J Appl Phycol, 1994, 6: 159-176.
- [6] 赵晓联, 孙蔚榕, 孙秀兰, 等. 藻毒素免疫抗原的制备及鉴定 [J]. 卫生研究, 2005, 35(6): 726-729.

- 37 -

(上接第3684页)

- [13] OKU H, YAMAGUCHI H, SUGIYAMA T, et al. Retinal toxicity of nitric oxide released by administration of a nitric oxide donor in the albino rabbit [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1997, 38(12): 2540-2544.
- [14] SENLAUB F, COURTOIS Y, GOUREAU. Inducible nitric oxide synthase mediates the change from retinal to vitreal neovascularization in ischemic retinopathy [J]. Clin Invest, 2001, 107: 717-725.
- [15] 刘晓强, 丁正平. 大鼠视网膜急性光损伤后一氧化氮合酶阳性神经元的改变 [J]. 中华眼底病杂志, 2000, 16(3): 209-210.
- [16] VARMA S D, CHAND D, SHARMA Y R, et al. Oxidative stress on lens and cataract formation: role of light and oxygen [J]. Curr Eye Res, 1984, 3(1): 35

- [17] SUA W, TOCH. Nitric oxide and hydroxyl radical-induced retinal lipid peroxidation in vitro [J]. Clin Exp Otol, 2002, 85(6): 378-382.
- [18] HALLI WEL B, GULFERRIDGE J. Free radicals in biology and medicine [M]. Oxford: Clarendon Press Oxford, 1995.
- [19] CHENE. Inhibition of cytochrome oxidase and blue-light damage in rat retina [J]. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol, 1993, 231(7): 416-423.
- [20] 张广栋, 刘学政, 张鹏, 等. 大鼠视网膜光损伤MDA含量和形态学改变及SOD的治疗作用 [J]. 锦州医学院学报, 2006, 27(2): 16-18.
- [21] 戴天元, 沈长春, 冯森, 等. 光诱渔船集鱼灯的光照度分布及其适渔性能分析 [J]. 福建水产, 2007, 112(1): 27-31.