

文章编号:1673-1689(2009)03-0371-06

特布他林人工抗原的合成和抗体的制备

孙海新¹, 凌红丽¹, 张玉兰², 曹照真², 高亚东¹, 郝日沫^{*2}

(1. 青岛康地恩实业有限公司, 山东 青岛 266111; 2. 山东大学 化学与化工学院, 山东 济南 250100)

摘要: 特布他林是一种在食品中禁用的 β -兴奋剂类药物, 为建立针对 β -兴奋剂的残留快速检测方法, 作者研究了特布他林免疫原的合成和抗体的制备方法。采用1, 4-丁二醇缩水甘油醚(BDE)、对氨基苯甲酸(ABA)将特布他林(TER)分别与cBSA、cOVA偶联, 合成了特布他林免疫原和包被抗原, 并对其进行了紫外分析。用特布他林免疫原TER-cBSA免疫新西兰大白兔, 获得了多克隆抗体, 采用间接ELISA法检测抗体的性质, 所得抗体效价达到51 200, IC₅₀值为9.25 ng/mL, 证明了特布他林人工抗原偶联成功, 所制备的特布他林抗体具有很高的灵敏度。

关键词: 特布他林; ELISA; 偶联; 抗原; 抗体

中图分类号: S 859. 84

文献标识码: A

Synthesis of Terbutalin Artificial Antigen and Preparation of Anti-Terbutalin Antibody

SUN Hai-xin¹, LING Hong-li¹, ZHANG Yu-lan², CAO Zhao-zhen²,
GAO Ya-dong¹, XI Ri-mo^{*2}

(1. Qingdao Contient Group, Qingdao 266111, China; 2. School of Chemistry and Chemical Engineering, Shandong University, Jinan 250100, China)

Abstract: In this study, the immunogen of terbutalin was synthesized using 1, 4-butanediol diglycidyl (BDE) as linking reagents to connect hapten terbutalin with carrier protein bovine serum albumin (cBSA). The coating antigen was synthesized by using 4-aminobenzoic acid (ABA) as linker to connect terbutalin with ovalbumin (cOVA). The BSA conjugate was used to immunize New Zealand rabbits and polyclonal antibodies against terbutalin were obtained. The titer of antibodies were determined to be 51 200 by indirect ELISA and the antibodies show high sensitivity in the heterologous assay using TER-cOVA as a coating antigen, with an IC₅₀ value of 9.25 ng/mL toward terbutalin. The results indicated that the artificially synthesized antigen has perfect immunogenicity and the antibody obtained has excellent quality.

Key words: Terbutalin, ELISA, conjugation, antigen, antibody

收稿日期: 2008-08-20

基金项目: 国家自然科学基金项目(20675048); 国家 863 计划项目(07AA10Z435; 2007AA06A407); 青岛市科技计划项目(06-3-2-4-nsh)。

作者简介: 孙海新(1978-), 男, 山东东平人, 工程师, 农学硕士, 主要从事动物源性食品的食品安全方面的研究。
Email: hisense_sun@sina.com。

* 通讯作者: 郝日沫(1962-), 男, 内蒙古锡林浩特人, 理学博士, 教授, 硕士生导师, 主要从事食品中残留药物的免疫检测试剂盒的研制和开发方面的研究。E-mail: xirimo2000@yahoo.com。

特布他林是 β 兴奋剂家族的一员,分子结构见图1,曾被用于治疗支气管哮喘,畜牧养殖业回来提高肥育猪的生产性能、改善饲料利用效率、提高猪的瘦肉率^[1-2]。近年来,使用 β 兴奋剂类药物所引起的安全隐患受到人们的日益重视^[3-4],我国及许多其他国家纷纷将该类药物列为禁用药物。然而,在经济利益驱动下,我国的养殖领域仍存在该类药物的非法使用现象,随着我国对外经贸交流的不断加深,迫切需要建立科学、规范的药残监控体系。目前对于 β 兴奋剂类药残检测主要依靠气-质联用(GC-MS)^[1,3,5-6]、高效液相色谱(HPLC)^[3,6-7]以及液-质联用(LC-MS)^[3,8-9]等仪器法,这些方法固然能够达到准确测定的目的,但是昂贵的仪器设备以及对操作者的专业要求限制了仪器法的推广应用。

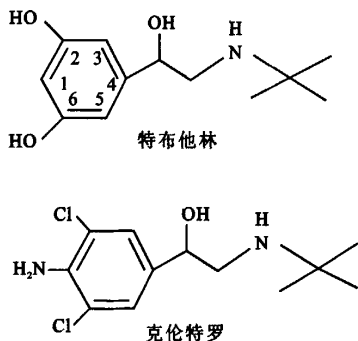


图1 特布他林与克伦特罗的分子结构

Fig.1 Molecular structure of terbutalin and clenbuterol

酶联免疫吸附检测法(ELISA)作为一种基于抗原抗体反应和酶化学反应的快速检测技术,不需要复杂且昂贵的仪器设备,特异灵敏,样品前处理简单,不需要专业的操作者,非常适合样品的大批量检测。目前,关于 β 兴奋剂药物的相关研究多集中在克伦特罗、莱克多巴胺等药物上^[10-11],而关于特布他林的ELISA相关研究少有报道。基于此,作者合成了特布他林的人工抗原并对其进行了鉴定,并在此基础上,制备了高质量的抗体,建立了检测特布他林残留的ELISA方法。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

特布他林标准品:购于中国兽药监察所;牛血清白蛋白 BSA、卵清蛋白 OVA、水溶性碳二亚胺(EDC)、1,4-丁二醇缩水甘油醚(BDE)、4-氨基苯甲(ABA)及福氏佐剂:Sigma 公司产品;邻苯二胺(OPD):购于北京欣经科生物技术有限公司;羊抗

兔酶标抗体 IgG-HRP:由北京军事医学科学院提供;其他试剂为国产化学纯。

1.2 仪器设备

UV-4100 紫外可见分光光度计:Hitachi 公司制造;KHB ST-360 酶标仪:上海智华医学精密仪器有限公司制造;PD-1C 冷冻干燥机:北京博医康实验仪器有限公司制造;RE-5203A 旋转蒸发仪:上海亚荣生化仪器厂制造;JB-2 型恒温磁力搅拌器:上海雷磁新经仪器有限公司制造。

1.3 试验动物

雄性新西兰大白兔,体重 1.5~2.0 kg,购于山东省农业科学院实验动物中心,以常规方法进行饲养管理。

1.4 试验方法

1.4.1 BSA 和 OVA 的活化 将 BSA 和 OVA 分别通过乙二胺活化成为 cBSA 和 cOVA,从而使 BSA 和 OVA 上的羧基官能团转变为氨基官能团,以有利于半抗原与载体的偶联,具体步骤参照文献^[12-13]。

1.4.2 特布他林免疫原和包被原的合成 采用 BDE 为联结物将 TER 与 cBSA 偶联得到免疫原 TER-BDE-cBSA,采用 ABA 为联结物将 TER 与 cOVA 偶联得到包被抗原 TER-ABA-cOVA,具体步骤参照文献^[12-13]并略作改进,具体化学反应过程分别见图 2~3 所示,用紫外扫描法对偶联物进行鉴定。

1.4.3 动物免疫 以新西兰大白兔为免疫动物,免疫前进行耳缘静脉采血并分离血清,置于-20℃保存,留作阴性血清。将适量特布他林的 cBSA 偶联物溶液与等量福氏佐剂乳化均匀混合(首次免疫使用完全佐剂,以后免疫使用不完全佐剂),采用皮下多点注射,于五免后 10 d 心脏采血,分离血清,置于-20℃保存。

1.4.4 抗体效价检测 采用间接 ELISA 方法测定抗体的效价,将阳性血清与阴性血清按照同比稀释后依次加入酶标二抗、底物、终止液、OD_{492nm}测定,具体操作步骤参照文献^[12-13],以 S/N 值>2 所对应的抗血清最大稀释倍数定为抗血清的效价,其中 S 为阳性抗血清的 OD 值, N 为阴性抗血清的 OD 值。

1.4.5 抗体特异性检测 采用双向倍比稀释法筛选包被抗原和抗体的最佳工作浓度,再以包被抗原的工作浓度重新进行度盘,封闭,采用间接竞争 ELISA 方法加入抗体、竞争药物并依次加入酶标二抗、底物、显色液,测定 OD_{492nm},具体操作参照文献^[12-13]。

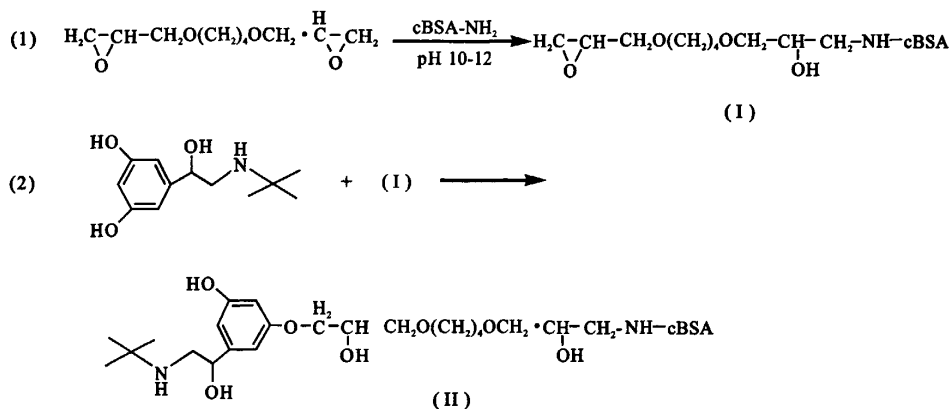


图2 TER-BDE-cBSA. 特布他林免疫原的合成

Fig. 2 Synthetic procedure for immunogen of TER-BDE-cBSA

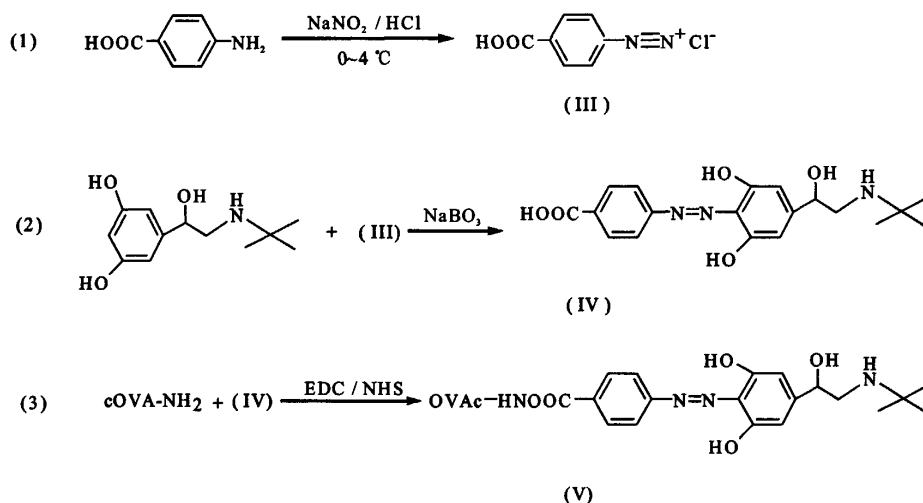


图3 TER-ABA-cOVA. 特布他林包被抗原的合成

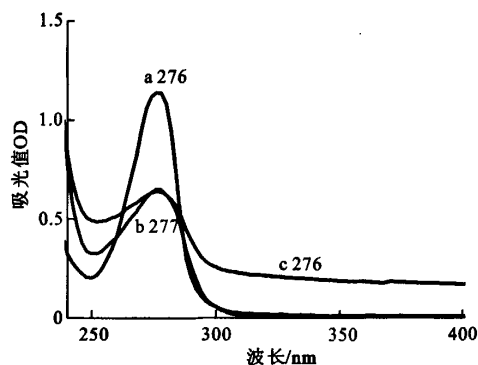
Fig. 3 Synthetic procedure for coating antigen of TER- ABA-cOVA

1.4.6 数据处理 采用 Microcal(TM)Origin 6.0 软件对所得试验数据进行分析。

2 结果与分析

2.1 紫外扫描分析结果

对 TER、cBSA 和偶联物 TER-cBSA 进行紫外扫描,所得结果见图4。由图4可知,TER 和 cBSA 的特征波长分别在 276 nm 和 277 nm 处,但偶联物 TER-cBSA 在 277 处也有一个吸收峰,这表明虽然 BDE 作为 TER 和载体蛋白的连接臂将二者连接成 TER-cOVA 偶联物,但是偶联物中并没有增加可在紫外区产生明显吸收峰的结构,因此从紫外扫描结果上很难判断偶联是否成功,需要通过抗体的特异性检测加以证明。

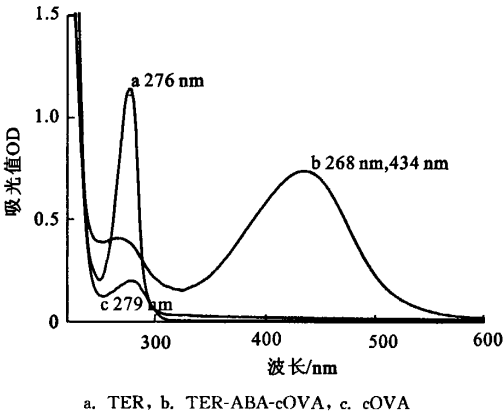


a. TER, b. cBSA, c. TER-BDE-cBSA

图4 TER-BDE-cBSA 紫外扫描光谱图

Fig. 4 UV absorbance of immunogen TER-BDE-cBSA

对 TER、cOVA 和偶联物 TER-cOVA 进行紫外分析结果见 5。由图 5 可知,TER 和 cOVA 的特征波长分别在 276 nm 和 279 nm 处,偶联物 TER-cOVA 在 268 nm 及 434 nm 处各有一个吸收峰,这是由于采用 ABA 的方法将 TER 和 cOVA 偶联后,由于偶联物中引入了苯环而产生红移,在紫外区高于 300 nm 处产生的紫外吸收峰,所以紫外光谱的结果表明,包被抗原 TER-cOVA 偶联获得成功。



a. TER, b. TER-ABA-cOVA, c. cOVA

图 5 TER-ABA-cOVA 紫外扫描光谱图

Fig 5 UV absorbance of coating antigen TER-ABA-cOVA

2.2 抗体效价测定结果

对阳性及阴性血清进行 OD_{492nm} 检测结果见表 1。可以看出,用合成的免疫原对 4 只实验兔进行免疫所得阳性血清与阴性血清,经 800X、1 600X、3 200X……102 400X 后,阳性血清的 OD_{492nm} 随着稀释倍数的增大而逐渐减小,而阴性血清的 OD_{492nm} 随着稀释倍数的增大变化幅度不大,S/N>2 所对应的最大稀释倍数为 1:51 200,即机体经 5 次免疫后抗体效价达到 51 200,表明合成的免疫原具有较好的免疫原性,能够诱导机体的免疫系统产生较强的免疫应答。

2.3 抗体的特异性测定结果

以 TER 作为竞争药物分子,用 TER-ABA-cOVA 作为包被抗原进行竞争 ELISA 检测所得抑制曲线见图 6。由图 6 可知,TER 作为竞争者(质量浓度范围 0.001 ng/mL 到 10⁴ ng/mL),能够与 TER 包被抗原竞争性地结合特布他林抗体,抑制了 TER 抗体与 TER 包被抗原的结合,其抑制率与 TER 浓度之间呈明显的线性关系,对 TER 抗体的 IC₅₀ 为 9.25 ng/mL。表明抗体具有良好的特异性,能够与药物产生特异性识别,也证明抗原的合成是成功的,能够激发动物产生高质量的特异性抗体。

表 1 抗体的 OD_{492 nm} 检测结果

Tab.1 OD_{492nm} result of antibody

稀释 倍数	1 [#] 兔		2 [#] 兔		3 [#] 兔		4 [#] 兔	
	阳性血清	阴性血清	阳性血清	阴性血清	阳性血清	阴性血清	阳性血清	阴性血清
800	1.276	0.065	1.260	0.061	1.419	0.069	1.386	0.057
1 600	1.070	0.055	1.031	0.052	1.312	0.070	1.323	0.054
3 200	0.803	0.063	0.818	0.055	1.123	0.071	1.121	0.058
6 400	0.565	0.070	0.566	0.056	0.894	0.081	0.819	0.061
12 800	0.322	0.065	0.345	0.048	0.605	0.065	0.537	0.053
25 600	0.134	0.056	0.192	0.048	0.387	0.055	0.255	0.054
51 200	0.111	0.055	0.126	0.051	0.127	0.051	0.128	0.058
102 400	0.071	0.054	0.069	0.052	0.071	0.052	0.055	0.051
PBS	0.048	0.056	0.042	0.051	0.051	0.053	0.056	0.049

3 结 语

兽药、抗生素等物质属于小分子物质,只有抗原性,不具有免疫原性,必须将其与载体偶联以形成完全抗原,才能制备抗体。因此,制备高质量的

免疫原是对制备抗体,从而对小分子物质进行免疫分析的关键。之所以选择牛血清白蛋白(BSA)作为偶联载体,是因为 BSA 的理化性质稳定,水溶性及在混溶剂中的溶解性较好,而且具有众多可修饰的官能团,其合成的免疫原一般具有较强的免疫原性,而且,将 BSA 活化成为 cBSA,使得 BSA 上的羧基官能团转化成氨基官能团,更有利于与半抗原分子

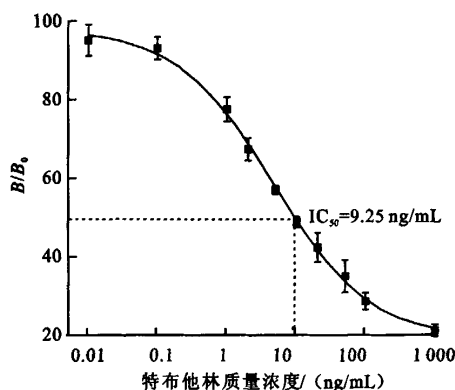


图6 特布他林对抗特布他林抗体的抑制率曲线
(TER-ABA-OVA为包被抗原)

Fig. 6 Representative inhibition curve for anti-terbutalin antibody using terbutalin as the competitor

上官能团的化学偶联,而且提高了偶联效率,降低了载体蛋白质发生自身偶联的可能性^[14]。将载体与小分子物质偶联是一个有机合成过程,目前常用的偶联方法有重氮化法、戊二醛法、碳二亚胺法等等,具体选择何种方法,取决于对于小分子物质的结构及官能团分析。

为了得到效价高、特异性强的抗体,最好使重要的抗原决定簇尽可能地暴露于偶联物的外部,从

而使得抗体对暴露于外部的半抗原部分具有较好的识别能力^[15-16]。因此,作者利用BDE长链特性,使其一端与cBSA相联,另一端与半抗原分子相联,既保持了偶联物的免疫原性,又提高了获得高特异性抗体的成功率。另外,对偶联复合物进行鉴定是必要的,可根据实际情况采用紫外吸收法、红外光谱法、核磁共振法^[17]、质谱法^[18-19]、同位素示踪法^[20]等等。在包括有蛋白质大分子的免疫原的鉴别中,紫外光谱被证明很有效果。但是,由于半抗原分子与载体蛋白质反应的复杂性,仅仅依靠以上技术手段评价偶联效果的好坏是有一定局限的。偶联效果的好坏,最终还要由免疫结果来验证。

制备全抗原的目的是为了得到具有特异性的优良抗体,因此,对所制备抗体进行特异性检测是十分必要的,由特布他林分子对特布他林抗体的抑制曲线可以看出,特布他林与抗体发生了竞争性结合,抑制了抗体与包被抗原的结合,其抑制程度与特布他林的质量浓度呈明显的正相关,表明动物机体对合成的全抗原产生了理想的免疫应答,产生了针对半抗原特布他林的特异性抗体。本研究所制备的抗体效价及特异性结果表明,通过BDE方法合成TER-cBSA是可行的,能够得到理想的抗体,这些工作为建立TER的药残检测体系奠定了基础。

参考文献(References):

- [1] Yadollah Yamini, Curt T Reimiann, Alireza Vatanara et al. Extraction and preconcentration of salbutamol and terbutaline from aqueous samples using hollow fiber supported liquid membrane containing anionic carrier [J]. *Journal of Chromatography A*, 2006, 1124: 57-67.
- [2] Weilin L Shelper, David J Smith, Eugene S Berry. Production and characterization of a monoclonal antibody against the β -adrenergic agonist ractopamine[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2000, 48: 4020-4026.
- [3] Yantu Zhang, Zhujun Zhang, Yonghua Sun, et al. Development of an analytical method for the determination of β -2-Agonist residues in animal tissues by high-performance liquid chromatography with on-line electrogenerated $[\text{Cu}(\text{HIO}_6)_2]^{5-}$ -luminol chemiluminescence detection[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2007, 55: 4949-4956.
- [4] Vanoosthuyze K E I, Arts C J M, Peteghem C H V. Development of a fast and simple method for determination of β -agonists in urine by extraction on empore membranes and detection by a test strip immunoassay[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1997, 45: 3129-3137.
- [5] Regueiro J A G, Pérez B, Casademont G. Determination of clenbuterol and salbutamol in urine by capillary gas chromatography with capillary columns of 100 μm [J]. *J Chromatogr A*, 1993, 655: 73-76.
- [6] Shen S H, Ouyang J, Baeyens W R G, et al. Determination of β -agonists by ion chromatography with direct conductivity detection[J]. *J Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2005, 38: 166-172.
- [7] Poletti A, Montagna M, Hogendoorn E A, et al. Applicability of coupled-column liquid chromatography to the analysis of β -agonists in urine by direct sample injection 1. Development of a single-residue reversed-phase liquid chromatography-UV method for clenbuterol and selection of chromatographic conditions suitable for multi-residue analysis[J]. *J Chromatogr A*, 1995, 695: 19-31.

- [8] Spyridaki M H, Vonaparti P K A, Valavani P, et al. Doping control analysis in human urine by liquid chromatography-electrospray ionization ion trap mass spectrometry for the Olympic Games Athens 2004: Determination of corticosteroids and quantification of ephedrine, salbutamol and morphine [J]. *Anal Chim Acta*, 2006, 573:242–249.
- [9] Josefsson M, Sabanovic A. Sample preparation on polymeric solid phase extraction sorbents for liquid chromatographic-tandem mass spectrometric analysis of human whole blood—A study on a number of beta-agonists and beta-antagonists[J]. *J Chromatogr A*, 2006, 1120:1–12.
- [10] Yamamoto I, Iwata K. Enzyme immunoassay for clenbuterol, an β -adrenergic stimulant [J]. *J Immunoassay*, 1982, 3, 155–171.
- [11] Weilin L, Shelper, David J, Smith. Determination of ractopamine in cattle and sheep urine samples using an optical biosensor analysis; comparative study with HPLC and eLISA[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2003, 51, 3715–3721.
- [12] Wei Liu, Chengbiao Zhao, Yulan Zhang, et al. Preparation of polyclonal antibodies to a derivative of 1-aminohydantion (AHD) and development of an indirect competitive ELISA for the detection of nitrofurantoin residue in water[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2007, 55:6829–6834.
- [13] Shengxin Lu, Yulan Zhang, Jingting Liu, et al. Preparation of anti-pefloxacin antibody and development of an indirect competitive enzyme-linked immunosorbent assay for detection of pefloxacin residue in chicken liver[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2006, 54(19):6995–7000.
- [14] Watanabe H, Satake A, Kido Y, et al. Monoclonal-based enzyme-linked immunosorbent assay and immunochromatographic assay for enrofloxacin in biological matrices[J]. *Analyst*, 2002, 127:98–103.
- [15] Kim H J, Liu S Z, Keum Y S, et al. Development of an enzyme-linked immunosorbent assay for the insecticide thiamethoxam[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2003, 51:1823–1830.
- [16] Wang S, Allan R D, Skerritt J H, et al. Development of a class-specific competitive ELISA for the benzoylphenylurea insecticides[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1998, 46:3330–3338.
- [17] Lommen A, Hassnoot W, Weseman J M. Nuclear magnetic resonance controlled method for coupling of fenoterol to carrier and enzyme[J]. *Food and Agriculture Immunology*, 1995, 7:123–129.
- [18] Adamczyk M, Gebler J C, Mattingly P G. Characterization of protein hapten conjugates. Electrospray mass spectrometry of bovine serum albumin hapten conjugates[J]. *Bioconjugate Chemistry*, 1996, 7:475–481.
- [19] Sighn K V, Kaur J, Grish C, et al. Synthesis and characterization of hapten-protein conjugation for antibody production against small molecules[J]. *Bioconjugate Chemistry*, 2004, 15:168–173.
- [20] Shelper W L, Smith D J. Development of an immunoassay for the β -agonist ractopamine[J]. *J Immunoassay*, 2000, 21:1–23.

(责任编辑:李春丽)