

# 新霉素单克隆抗体的制备及其免疫学特性鉴定

刘宣兵<sup>1,2</sup>, 滕 蔓<sup>1</sup>, 张改平<sup>1</sup>, 杨艳艳<sup>1</sup>, 邓瑞广<sup>1</sup>, 侯玉泽<sup>2</sup>, 杨继飞<sup>1</sup>

(1. 河南省农业科学院 河南省动物免疫学重点实验室, 河南 郑州 450002; 2. 河南科技大学 食品与生物工程学院, 河南 洛阳 471003)

**摘要:**用碳二亚胺(EDC)法将新霉素(NEO)偶联于载体蛋白 BSA 和 OVA, 合成免疫原 BSA-NEO 和包被原 OVA-NEO, 用红外扫描(IR)、SDS-PAGE 进行鉴定; 用 BSA-NEO 免疫 BALB/c 小鼠, 间接 ELISA 和阻断 ELISA 选择细胞融合备用鼠; 应用杂交瘤技术建立分泌 NEOmAb 细胞株, 用体内诱生腹水法制备 NEOmAb; 对 NEOmAb 的效价、亲和性、敏感性和特异性等免疫学特性进行鉴定。结果表明, 成功制备了 BSA-NEO 人工抗原; 筛选出 1E9、4E8、1G1 共 3 株敏感特异的杂交瘤细胞, 间接 ELISA 效价细胞培养上清分别为  $1.256 \times 10^3$ 、 $1.128 \times 10^3$ 、 $1.512 \times 10^3$ , 腹水效价分别为  $1.512 \times 10^5$ 、 $1.256 \times 10^5$ 、 $1.102 \times 10^6$ , 1G1 亲和常数( $K_a$ )为  $3.75 \times 10^{10}$  (L/mol); 1G1 株对 NEO 的  $IC_{50}$  为 2.57 ng/mL, NEO mAb 对庆大霉素、链霉素、土霉素、环丙沙星、二氟沙星等无交叉反应。试验获得了抗 NEO 高价、敏感、特异的 mAb, 可用于 NEO 残留检测的免疫学试验。

**关键词:**新霉素; 单克隆抗体; 免疫学特性

**中图分类号:**S859.84 **文献标识码:**A **文章编号:**1000-7091(2009)04-0080-04

## Preparation and Immunological Properties of Neomycin Monoclonal Antibody

LIU Xuan-bing<sup>1,2</sup>, TENG Man<sup>1</sup>, ZHANG Gai-ping<sup>1</sup>, YANG Yan-yan<sup>1</sup>,  
DENG Rui-guang<sup>1</sup>, HOU Yu-ze<sup>2</sup>, YANG Ji-fei<sup>1</sup>

(1. Henan Key Laboratory for Animal Immunology, Henan Academy of Agricultural Sciences, Zhengzhou 450002, China; 2. Food and Bioengineering College, Henan University of Science and Technology, Luoyang 471003, China)

**Abstract:** Neomycin was conjugated to carrier protein BSA and OVA by the method of EDC to form the immunizing antigen BSA-NEO and the coating antigen OVA-NEO. IR and SDS-PAGE were used to identify the NEO artificial antigen. Balb/c mice were immunized with BSA-NEO. The titre of polyclonal antibody was detected by indirect ELISA and blocking ELISA. The hybridoma lines that secrete NEO mAb were established with monoclonal antibody hybridoma technology. The immunological traits such as titer, affinity, sensitivity and specificity of the mAb were characterized. The results showed that NEO artificial antigen was synthesized successfully. Three hybridoma cell lines of 1E9, 4E8 and 1G1 were screened for specificity to NEO. The indirect ELISA titer of the mAb were  $1.256 \times 10^3$ ,  $1.128 \times 10^3$  and  $1.512 \times 10^3$  in supernatant, and  $1.512 \times 10^5$ ,  $1.256 \times 10^5$  and  $1.102 \times 10^6$  in ascites. The affinity constant ( $K_a$ ) of 1G1 was about  $3.75 \times 10^{10}$  (L/mol). The mAb of 1G1 showed good sensitivity with an  $IC_{50}$  of 2.57 ng/mL to NEO. No cross-reactivity to other compounds was detected, such as Gentamicin, Streptomycin, Oxytetracycline, Ciprofloxacin, Difloxacin, etc. The NEOmAb with high-titer, sensitivity and specificity had been generated, and could be used to establish the immunoassay of NEO residues in feed and animal food.

**Key words:** Neomycin; Monoclonal antibody; Immunological traits

新霉素(Neomycin, NEO)属于氨基糖甙类抗生素, 由新霉胺和新霉二糖胺结合而成<sup>[1]</sup>。它的抗菌

谱广, 对革兰氏阴性菌、革兰氏阳性菌、结核杆菌、抗酸菌等均有良好的抑制作用。随着新霉素在国内外

收稿日期: 2008-12-01

基金项目: “十一五”国家科技支撑计划(2006BAK02A21)

作者简介: 刘宣兵(1982-), 男, 山东诸城人, 硕士, 主要从事兽药残留检测与食品安全研究。

通讯作者: 张改平(1960-), 男, 河南内黄人, 研究员, 博士生导师, 主要从事动物免疫学研究。

养殖业中被越来越广泛地应用,其在动物性食品中的残留问题也日益突出,并对人和动物存在潜在的耳毒性和肾毒性<sup>[2]</sup>,给人类健康造成了很大威胁。目前,NEO 残留检测方法主要有微生物法、高效液相色谱法和免疫学测定法<sup>[3]</sup>。其中,免疫学分析方法由于具有灵敏、快速、特异、简便等优点,近年来国内外在兽药、农药残留检测领域已被广泛应用<sup>[4]</sup>。本研究应用新霉素的人工合成抗原免疫 BALB/c 小鼠,通过细胞融合技术建立分泌抗新霉素单克隆抗体的杂交瘤细胞株,制备出高效价、敏感、特异的新霉素单克隆抗体,旨在为 NEO 残留免疫学检测方法的建立奠定基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

新霉素、庆大霉素、链霉素、土霉素、环丙沙星、二氟沙星,中国兽医药品监察所产品;沙丁胺醇、磺胺嘧啶、磺胺甲噁唑, Sigma 公司产品;BSA、OVA、水溶性碳化二亚胺(EDC),Pierce 公司产品;佐剂 FCA、FIA,细胞培养基 RPMI-1640,选择培养基 HAT、HT, PEG-1500, Gibco 公司产品;新生牛血清,羊抗鼠酶标二抗(GaMIgG-HRP),华美生物工程有限公司。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 人工抗原的合成与鉴定

1.2.1.1 人工抗原的合成 NEO 和载体蛋白的连接,参照文献[5]的方法进行。

1.2.1.2 人工抗原的鉴定 红外鉴定:取样品 2 mg,加入干燥 KBr 约 220 mg,置于玛瑙乳钵中,在红外灯照射下研磨、混匀,装入压片模具,8 t 压力下 10 min,制得厚度 1 mm 的透明 KBr 样品片,上机测试。

SDS-PAGE 鉴定:参照文献[6]介绍的方法配制各种电泳溶液,浓缩胶浓度为 5%,分离胶浓度为 10%,浓缩胶电压 70 V,分离胶电压 85 V,上样量为 20  $\mu$ L,考马斯亮蓝染色 5~6 h 后,置脱色液中脱色过夜。

#### 1.2.2 小鼠多抗血清(pAb)效价测定

1.2.2.1 小鼠免疫 用 BSA-NEO 免疫 6 周龄雌性 BALB/c 小鼠 3 只,免疫剂量为 50  $\mu$ g/只,背部皮下分点注射。共免 3 次,每次间隔 28 d,最后 1 次免疫后 20 d 断尾采血,分离血清,检测筛选融合备用鼠;超强免疫,用无菌 PBS 溶解 BSA-NEO,腹腔注射 50  $\mu$ g/只。

1.2.2.2 小鼠抗血清效价、敏感性测定 间接 ELISA 测定 pAb 的效价,阻断 ELISA 测定其对 NEO 的抑制。

#### 1.2.3 杂交瘤细胞株的建立

1.2.3.1 细胞融合 用 RPMI-1640 完全培养液培养 NSO 骨髓瘤细胞,于融合前 2 d 传代培养;融合前 1 d 制备小鼠饲养细胞;小鼠超强免疫后 4 d,脱颈致死小鼠,无菌取脾脏制备脾细胞,在 50% PEG-1500 作用下与 NSO 细胞融合;将融合后的细胞悬液加到 96 孔细胞培养板中,用 HAT 培养基置于 37  $^{\circ}$ C,5%  $\text{CO}_2$  培养箱培养。

1.2.3.2 融合细胞的培养及阳性杂交瘤的筛选与克隆 融合细胞于第 8 天用 HT 培养液半量换液;用间接 ELISA 和阻断 ELISA 进行阳性孔筛选,选择强阳性、抑制率高、细胞生长旺盛的孔进行有限稀释克隆化,而后扩大培养、冻存、鉴定和建株。

1.2.3.3 mAb 生产 体内诱生腹水法生产 mAb<sup>[7]</sup>。将建株后的细胞扩大培养,待细胞数量达到  $1 \times 10^6$  个/mL,收集并测定 ELISA 效价;将 8 周龄 BALB/c 小鼠腹腔注入灭菌液体石蜡 0.5 mL/只,15 d 后注入克隆化阳性细胞  $3 \times 10^6 \sim 6 \times 10^6$  个/只,16 d 后抽取腹水,用饱和硫酸铵盐析法纯化 mAb,DU-600 核蛋白分析仪测定 mAb 含量。

#### 1.2.4 mAb 免疫学特性鉴定

1.2.4.1 效价测定 间接 ELISA 测定 mAb 效价。

1.2.4.2 杂交瘤核型鉴定 采用秋水仙素阻断法<sup>[8]</sup>进行核型分析。将杂交瘤细胞传代培养 48 h,加入秋水仙素后继续培养 6 h,离心及低渗处理,3 次固定后制片,10% Gemsa 染色,去离子水洗脱,油镜下观察,计数分析。

1.2.4.3 同种型及亚类鉴定 采用间接 ELISA 检测方法,按鉴定试剂盒说明进行操作。

1.2.4.4 亲和性鉴定 参照 Batty<sup>[9]</sup>所述方法测定亲和常数( $K_a$ )。

1.2.4.5 敏感性鉴定 用阻断 ELISA 测定 1 GI mAb 对不同浓度 NEO 的抑制率,以吸光率  $B/B_0$  为纵坐标,以不同浓度 NEO 的对数值为横坐标,绘制标准抑制曲线,进行相关回归分析,计算 1 GI mAb 对 NEO 的  $\text{IC}_{50}$ 。

1.2.4.6 特异性鉴定 NEO 及其同系物等作为抑制剂,用阻断 ELISA 测定各抑制物的  $\text{IC}_{50}$ ,以 mAb 对 NEO 的  $\text{IC}_{50}$  与各抑制物的  $\text{IC}_{50}$  之比的百分数为其交叉反应率(CR%)。

## 2 结果与分析

### 2.1 人工抗原鉴定结果

由图 1 可知,将 BSA-NEO 的红外扫描光谱与 BSA 的相比较,它们在  $2500 \sim 3200 \text{ cm}^{-1}$  和  $1500 \sim$

1 660  $\text{cm}^{-1}$  区域具有相似的吸收,这是 BSA 中氨基酸产生的特征峰,说明合成的 BSA-NEO 中含有 BSA;BSA-NEO 谱带中在 1 082  $\text{cm}^{-1}$  处出现一个 BSA 所没有的吸收峰,而该吸收峰在 NEO 中则很强,这说明半抗原 NEO 分子已经偶联在 BSA 上,从而引进了 NEO 的吸收峰。SDS-PAGE 鉴定结果见图 2。由图 2 可见,BSA-NEO 偶联物有明显的拖尾现象,证明 NEO 与 BSA 已成功偶联。

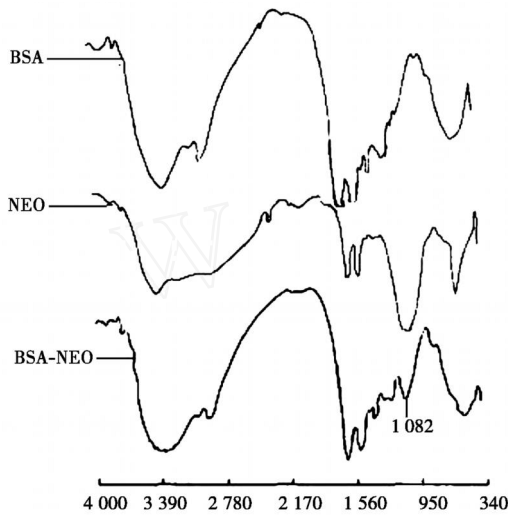


图 1 BSA、NEO 和 BSA-NEO 的红外扫描光谱  
Fig. 1 The IR spectra of BSA, NEO and BSA-NEO

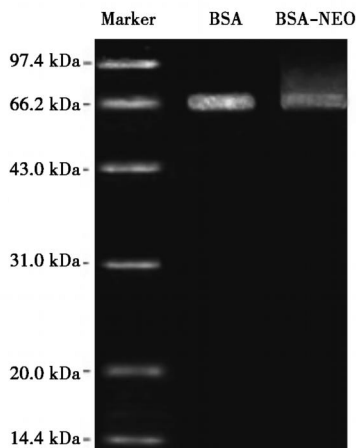


图 2 BSA-NEO 偶联的 SDS-PAGE 鉴定

Fig. 2 Identification of BSA-NEO conjugation by SDS-PAGE

## 2.2 小鼠血清效价敏感性测定结果

间接 ELISA 测定结果见图 3,  $\text{IC}_{50}$  结果见图 4。图 3 可知,免疫的 3 只小鼠血清抗体效价均达到了  $10^{-4}$ , 获得了较好的免疫效果,其中 3 号鼠血清效价较高且  $\text{IC}_{50}$  最低,选作细胞融合用。

## 2.3 杂交瘤细胞株的生长情况

细胞融合后 10 d 观察融合效果,4 块细胞培养板 384 孔中有杂交瘤克隆形成的 208 孔,融合率为 54%;间接 ELISA 检测,阳性 15 孔,阳性率为 7.2%;

3 次亚克隆后获得 10 株杂交瘤,分别测定其  $\text{IC}_{50}$ ,筛选出 3 株杂交瘤,分别命名为 1E9、4E8、1G1,经多次传代、冻存及复苏,杂交瘤细胞分泌抗体稳定。

## 2.4 杂交瘤核型鉴定结果

NSO 染色体数目为 61~69 条,小鼠脾细胞染色体数目为 40 条,本试验获得的杂交瘤染色体数目为 92~101 条,平均 97.8 条。

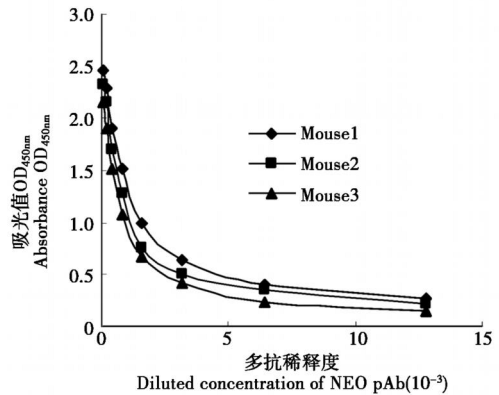


图 3 小鼠血清效价

Fig. 3 Titer curve of BALB/c mice antisera

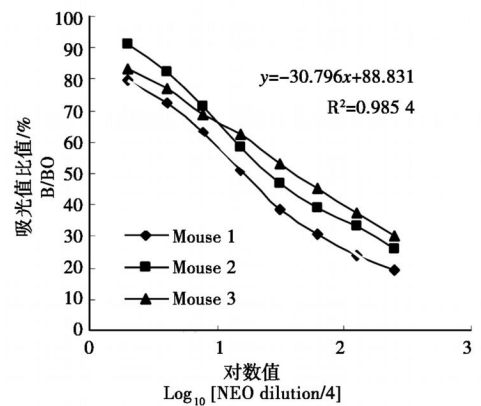


图 4 pAb 对 NEO 的阻断 ELISA 抑制曲线

Fig. 4 The inhibitive curve for pAb to NEO by blocking ELISA

## 2.5 mAb 免疫学特性鉴定结果

2.5.1 同种型及亚类鉴定结果 用 Pierce 公司的小鼠 mAb 同种型间接 ELISA 检测试剂盒鉴定,1E9、4E8、1G1 同种型分别为  $\text{IgG}_{2a}$ 、 $\text{IgG}_{2a}$ 、 $\text{IgG}_1$ 、 $\text{IgG}_1$ 。

2.5.2 效价测定结果 由表 1 可知,杂交瘤分泌的抗 NEO mAb 具有较高的效价,其中 1G1 株效价最高,细胞培养上清和腹水效价分别达到了  $1.5.12 \times 10^3$  和  $1.1.02 \times 10^6$ 。

2.5.3 亲和力鉴定结果 图 5 可知,1G1 所分泌的 mAb 与抗原结合达到饱和的 50% 所需 mAb 的浓度分别为 0.980、0.491  $\mu\text{g/mL}$ 。依据 James 等<sup>[10]</sup>的结论,亲和常数为  $10^7 \sim 10^{12} \text{ L/mol}$  抗体亲和力高,本试验制备的 mAb 亲和常数为  $3.75 \times 10^{10} \text{ L/mol}$ ,适合于 ELISA 方法检测。

表 1 NEO mAb 的间接 ELISA 效价

Tab.1 The indirect ELISA titer of NEO mAb		
单克隆抗体 mAb	上清 Supernatant	腹水 Astices
1E9	1 2.56 ×10 <sup>3</sup>	1 5.12 ×10 <sup>5</sup>
4E8	1 1.28 ×10 <sup>3</sup>	1 2.56 ×10 <sup>5</sup>
1G1	1 5.12 ×10 <sup>3</sup>	1 1.02 ×10 <sup>6</sup>

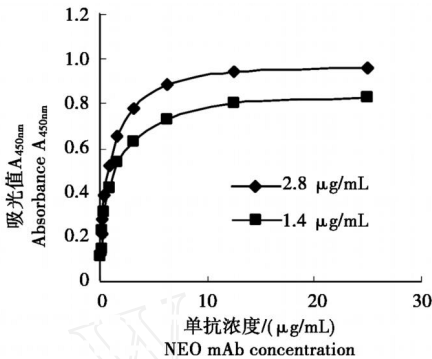


图 5 NEO mAb 的亲合常数测定曲线

Fig.5 The association constant(ka) curve of NEO mAb

2.5.4 敏感性鉴定结果 1G1 mAb 标准抑制曲线的线性回归方程为  $y = -36.881x + 65.092$ , 根据回归方程计算出 1G1 mAb 对 NEO 的  $IC_{50}$  为 2.57 ng/mL (图 6)。

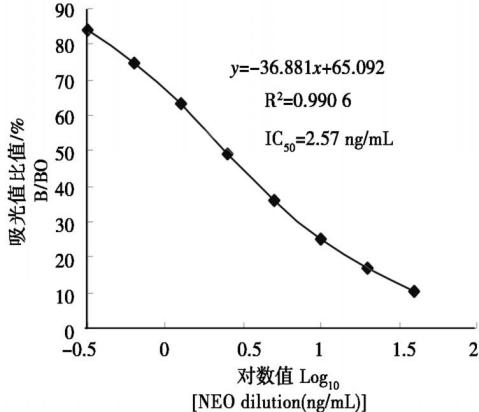


图 6 阻断 ELISA 检测 NEO  $IC_{50}$

Fig.6  $IC_{50}$  inhibitive curve of NEO mAb by blocking ELISA

表 2 NEO mAb 与其他化合物的交叉反应

Tab.2 The cross reactivity of NEO mAb with other compounds		
化合物 Compounds	半数抑制浓度 / (ng/mL) $IC_{50}$	交叉反应性/ % Cross-reactivity
新霉素 Neomycin (NEO)	2.57	100
庆大霉素 Gentamicin (GM)	> 10 <sup>4</sup>	<0.1
链霉素 Streptomycin (STM)	> 10 <sup>4</sup>	<0.1
土霉素 Oxytetracycline (OTC)	> 10 <sup>4</sup>	<0.1
环丙沙星 Ciprofloxacin (CIP)	> 10 <sup>4</sup>	<0.1
二氟沙星 Difloxacin (DIF)	> 10 <sup>4</sup>	<0.1
沙丁胺醇 Salbutamol (SAL)	> 10 <sup>4</sup>	<0.1
磺胺嘧啶 Sulfadiazine (SD)	> 10 <sup>4</sup>	<0.1
磺胺甲恶唑 Sulfamethoxazole (SMZ)	> 10 <sup>4</sup>	<0.1

2.5.5 交叉反应试验结果 由表 2 可知 ,NEO 的

$IC_{50}$  为 2.57 ng/mL ,说明 NEO 对其 mAb 结合反应的特异性很强 ,对庆大霉素、链霉素、土霉素、环丙沙星、二氟沙星等无交叉反应。

3 讨论

单克隆抗体的制备多采用动物体内诱生法。在接种杂交瘤细胞的前 10 d ,给小鼠注射灭菌液体石蜡、降植烷或者弗氏不完全佐剂 ,其原理是液体石蜡等腹水刺激剂能有效抑制小鼠巨噬细胞和淋巴细胞的免疫功能 ,使小鼠能更好的接纳腹腔中具有恶性生长特性的杂交瘤。在这种环境中 ,杂交瘤将逐步增殖 ,并分泌抗体于腹水中。本试验采用高压液体石蜡预处理小鼠 ,15 d 后注射杂交瘤 ,16 d 后收集腹水 ,获得较好的效果<sup>[11]</sup>。

本试验成功合成了 NEO 人工抗原 ,经 4 次免疫 BALB/c 小鼠后获得了高效价的 pAb ,通过杂交瘤技术获得了 3 株高亲和力和高特异性的杂交瘤细胞 ,经多次传代、冻存与复苏 ,杂交瘤分泌抗体稳定 ,经鉴定 ,制备出的 NEOmAb 高价、敏感、特异 ,可以用于 NEO 残留检测的免疫学试验。

参考文献：

[1] 安登魁,张正行,盛龙生. 药物分析[M]. 济南:济南出版社,1994:1606 - 1607.

[2] Stolker A A M,Brinkman UATH. Analytical strategies for residue analysis of veterinary drugs and growth-promoting-agents in food-producing animals:areview[J ].Journal of Chromatography A ,2005 ,1067 :15 - 33.

[3] 赵银丽,滕 蔓,邓瑞广,等. 恩诺沙星单克隆抗体杂交瘤细胞株的建立及其免疫学特性[J ]. 河南农业科学 ,2008(10) :121 - 124.

[4] Sherma J. Current status of pesticide residue analysis[J ].J AOAC Int ,1997 ,80(4) :283 - 287.

[5] 洪孝庄. 蛋白质连接技术[M]. 北京:中国医药科技出版社,1993:34 - 36.

[6] 郭尧君. 蛋白质电泳实验技术[M]. 北京:科学出版社,2001.

[7] 王自良,张改平,杨艳艳,等. 氯霉素单克隆抗体免疫金标快速检测试纸的研制及性能测定[J ]. 华北农学报 ,2006 ,21(5) :127 - 131.

[8] 章静波. 细胞生物实用方法和技术[M]. 北京:北京医科大学中国协和医科大学联合出版社,1995:151 - 152.

[9] Batty J D,Beatty B G,Wlanos W G. Measurement of monoclonal antibody affinity by noncompetitive enzyme immunoassay[J ]. Journal of Immunology Methods ,1987 (100) :173 - 179.

[10] James W G. Monoclonal antibodies:principles and practice [M]. Academic press ,Inc Ltd ,1983:142 - 147.

[11] 王选年,杨艳艳,李青梅,等. 盐酸克伦特罗单克隆抗体的制备及其特性[J ]. 河南农业科学 ,2002(6) :30 - 33.