

西马特罗人工抗原的合成及鼠源多克隆抗血清的制备

职爱民,刘庆堂,李青梅,杨苏珍,胡晓飞,柴书军,邓瑞广,张改平

(河南省农业科学院 农业部动物免疫学重点实验室 河南省动物免疫学重点实验室,
河南 郑州 450002)

摘要:拟合成并鉴定西马特罗(Cimaterol,CIM)人工抗原,通过动物免疫生产亲和力高、特异性好的鼠源CIM多克隆抗血清。通过重氮化方法将西马特罗偶联于载体蛋白BSA和OVA上,分别合成免疫抗原BSA-CIM和包被抗原OVA-CIM,并采用紫外分光光度法和SDS-PAGE进行了鉴定。结果表明,半抗原CIM和载体蛋白偶联成功。动物免疫试验结果显示,6只小鼠效价均达 1×10^{-3} 以上,且4号小鼠多抗血清抗CIM的 IC_{50} 为86.9 ng/mL,表明成功获得了高效价、特异性好、亲和力高的鼠源抗CIM多抗血清。

关键词:西马特罗;人工抗原;合成;多抗血清

中图分类号:S852.2 文献标识码:A 文章编号:1000-7091(2010)04-0097-05

Synthesis of Cimaterol Artificial Antigen and Development of Its Polyclonal Antiserum

ZHI Ai-min, LIU Qing-tang, LI Qing-mei, YANG Su-zhen, HU Xiao-fei,
CHAI Shu-jun, DENG Rui-guang, ZHANG Gai-ping

(Key Laboratory of Animal Immunology of the Ministry of Agriculture, Henan Provincial Key Laboratory of Animal Immunology, Henan Academy of Agricultural Sciences, Zhengzhou 450002, China)

Abstract: The goal of this study was to synthesize artificial antigen of cimaterol and obtain its mice polyclonal antiserum. Artificial antigen BSA-CIM and OVA-CIM were synthesized using diazotization by linking carrier proteins BSA and OVA to CIM. The antigen BSA-CIM and OVA-CIM was identified by ultraviolet scanning, SDS-PAGE. The results showed that the hapten CIM was successfully linked to carrier proteins. The animal immunization results showed that six BALB/c mice indirect ELISA titer against CIM were above 1×10^{-3} and the IC_{50} of No. 4 mice was 86.9 ng/mL and the high-titer sensitivity CIM polyclonal antiserum has been generated. The artificial antigen of CIM and its mice polyclonal antiserum laid a foundation base for product the monoclonal antibodies and rapid test reagent against CIM.

Key words: Cimaterol; Artificial antigen; Synthesis; Polyclonal antiserum

西马特罗(Cimaterol,CIM)又名喜马特罗,塞曼特罗,属于苯乙胺类药物的一种,是一种强效 β_2 -受体激动剂。CIM在医学和兽医临床上主要用于扩张气管和增加肺通气量,可以用于哮喘、阻塞性肺炎、平滑肌痉挛和休克等症。研究显示,饲喂CIM可以增加肥育猪的饲料报酬并增加瘦肉率^[1,2],对牛、鸡、鸭和绵羊等动物都有一定作用^[3-9],故CIM常被作为饲料添加剂非法用于动物源性食品生产中。

长期使用可能造成CIM在可食动物组织内蓄积性残留,常引起心悸、肌肉震颤、疼痛、神经症状、头晕头痛、恶心呕吐、发热寒战等临床症状,特别对心脏病、糖尿病和高血压等病人危害更大。鉴于CIM的明显危害,我国禁止CIM在畜禽生产中应用,并规定在所有的动物可食组织中不得检出^[10]。色谱技术为检测CIM的经典技术,目前已建立的检测方法主要有高压液相色谱法(HPLC)^[11,12],薄层层析法

收稿日期:2010-07-14

基金项目:“十一五”国家科技支撑计划(2006BAK02A21)

作者简介:职爱民(1976-),男,河南新乡人,副研究员,博士,主要从事动物营养与免疫研究。

通讯作者:张改平(1960-),男,河南内黄人,研究员,博士,博士生导师,中国工程院院士,主要从事动物免疫学和兽药残留研究。

(TLC)^[35]、液相色谱-质谱联用法(LC-MS)^[13,14]、超高效液相色谱/串联质谱分析方法(UPLC-MS/MS)^[15]、气相色谱-质谱联用法(GC-MS)^[16]、高效毛细管区带电泳法(CZE)^[17,18]等。这些方法灵敏、准确,但样品处理繁琐费时,成本高,而且需要有经过专门训练的专业人员来操作复杂的仪器设备,无法应用于现场检测,因此限制了其广泛应用。免疫分析技术具有敏感、特异、快速且一次能检测大量样品的特点,检测精度可达 ng/g 级,代表着小分子药物快速筛查的发展方向^[19-23]。免疫分析技术具有敏感性高、特异性强、检出范围广、样品处理简单、回收率高和成本低等特点。同时,CIM 为小分子,本身无免疫原性,需和载体蛋白偶联后用于抗体的生产。鉴此,本研究合成了 CIM 人工抗原并生产其鼠源的抗血清,旨在为 CIM 单抗的生产以及免疫学快速检测方法的建立奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 试剂 CIM 为 Sigma 产品,纯度 $\geq 98.0\%$; BSA 和 OVA,弗氏完全佐剂(FCA)和弗氏不完全佐剂(FIA)为 Pierce 产品;四甲基联苯胺(TMB)购自上海五联化工厂;羊抗鼠酶标二抗(GaMIgG-HRP)购自华美生物工程有限公司;其他试剂市售所得,均为 AR 级。CIM 标准液,稀盐酸定容后以 0.01 mol/L pH 7.4 的磷酸盐缓冲液(PBS)为稀释液,根据需要配制;洗液(PBST)为含 0.05% (体积分数)的 Tween-20 的 PBS;包被液(CBS)为 0.1 mol/L pH9.6 的碳酸盐缓冲液;间接 ELISA 和阻断 ELISA

封闭液、稀释液均为含体积分数 5% 猪血清的 PBST;显色液为 TMB 的醋酸-柠檬酸缓冲液;终止液为 2 mol/L 的硫酸溶液。

1.1.2 仪器 550 型酶标仪,美国 Bio-Rad 公司产品;3K-48 高速冷冻离心机,德国 SIGMA 公司生产;凝胶成像系统及分析软件, Syngene 公司产品;JM-250 电泳仪,大连捷迈科贸有限公司;AE260 电子天平,德国 METTLER 公司生产;HI9321 酸度计,美国 HANNA 公司产品;DU-600 核酸蛋白分析仪,德国 BECKMAN 公司产品;手持式匀浆器,德国 IKA 公司产品;SZ-93 自动双重纯水蒸馏器和 93-3 定时恒温双向磁力搅拌器,上海亚荣生化仪器厂生产。

1.1.3 试验动物 6 周龄 SPF 级雌性 BALB/c 小鼠,购自郑州大学医学院实验动物中心,农业部动物免疫学重点开放实验室饲养。

1.2 方法

1.2.1 人工抗原的合成 采用重氮化法合成 BSA-CIM 完全抗原,具体方法如下:称取 3.5 mg 的 CIM 置于 10 mL 螺口瓶中,用 1 mL 0.1 mol/L HCl 溶解。冰浴冷却后,避光边搅拌边逐滴加入灭菌双蒸水溶解已预冷的 1 mol/L NaNO₂ 溶液适量(淀粉碘化钾试纸呈蓝黑色为宜) 4℃ 条件下反应 6 h,得重氮化 CIM。称取 10 mg BSA 溶于 1 mL PBS (pH = 7.4),预冷后边搅拌边逐滴加入重氮化 CIM,用 1 mol/L NaOH 调 pH 至 8.5 左右 4℃ 过夜反应。反应产物在 4℃ 搅拌下用 PBS 透析 3 d,每天换液 3 次,透析后得到纯化的 BSA-CIM。合成路线见图 1。同法制得包被抗原 CIM-OVA。

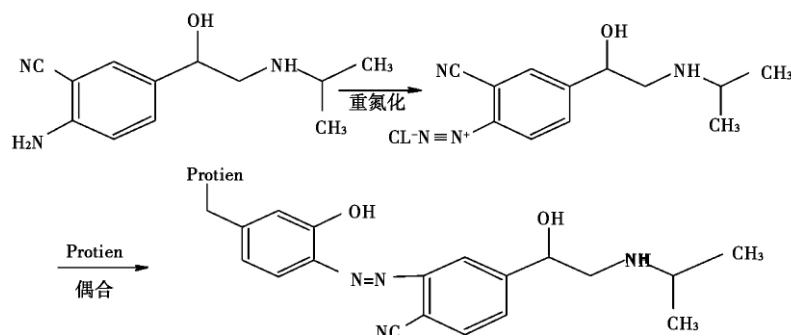


图 1 重氮化法合成 BSA-CIM 路线

Fig. 1 Synthesis scheme of BSA-CIM by diazotization

1.2.2 人工抗原的鉴定

1.2.2.1 紫外扫描鉴定 用 PBS 配制 CIM 和 BSA 标准溶液,取 BSA-CIM 溶液,用紫外吸收法测定其蛋白质的浓度和特征峰,调节 BSA-CIM 溶液的蛋白质浓度与 BSA 标准溶液一致,在波长 220 ~ 360 nm 范围内进行紫外扫描,根据吸收峰的变化判断偶联

是否成功。

1.2.2.2 CIMS-PAGE 凝胶电泳鉴定 参照文献[24]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 12%,浓缩胶电压 60 V,分离胶电压 80 V,上样量为 20 μ L,考马斯亮蓝染色 3 ~ 4 h 后,置脱色液中过夜脱色。根据条带分子量的大小

变化判断偶联效果。

1.2.3 多抗血清的制备及鉴定

1.2.3.1 多抗血清制备 取 0.22 μm 滤膜无菌过滤 PBS 溶解 BSA-CIM 至 500 μg/mL ,与等量 FCA 混合 ,手持式匀浆器充分乳化后免疫 6 周龄 BALB/c 小鼠 3 只 ,免疫剂量为每只 0.2 mL ,免疫方式为背部皮下 6 点注射。首免 21 d 后加强免疫 ,用无菌 PBS 溶解 BSA-CIM ,与等量 FIA 混合乳化 ,共免 4 次 ,每次间隔 21 d ,免疫剂量同首次免疫。每隔 14 d 加强免疫 1 次 ,3 次免疫后 16 d 断尾采血分离血清 , -20℃ 保存备用。

1.2.3.2 多抗血清效价测定 采用间接 ELISA 方法测定多抗血清效价 ,基本程序参照文献报道的方法^[25] 并加以改进: CIM-OVA 包被 ,包被浓度 1 μg/mL ,包被量 100 μL/孔 ,37℃ 温育 2 h ,PBST 洗板 6 次 ;5% 猪血清封闭 200 μL/孔 ,37℃ 温育 1 h ,洗 6 次 ;加多抗血清 50 μL/孔 ,用封闭液倍比稀释 ,设阴性对照 (NC) 和空白对照 (BC) ,37℃ 温育 15 min ,洗 6 次 ;加 GaMIgG-HRP ,1:1 000 用封闭液稀释 ,50 μL/孔 ,37℃ 温育 30 min ,洗 6 次 ;加酶底物 TMB 显色 50 μL/孔 ,室温反应 10 min ;加入 50 μL/孔 2 mol/L H₂SO₄ 终止反应 ,读 OD₄₅₀ 值 ;结果判断 :以待测孔 OD₄₅₀ 值 ≥ NC OD₄₅₀ 值的 2.1 倍 (P/N ≥ 2.1) ,判为阳性。

1.2.3.2 多抗血清抑制价测定 采用阻断 ELISA 鉴定效价最高的小鼠多抗血清抑制价 ,即对不同浓度 CIM 的抑制率。以吸光率 (B/B₀) (B 是 CIM 不同标准浓度的 OD₄₅₀ 值 ,B₀ 是 CIM 0 标准浓度的 OD₄₅₀ 值) 为纵坐标 ,以不同浓度 CIM 以 10 为底的对数值为横坐标 ,绘制标准抑制曲线 ,进行相关回归分析 ,计算多抗血清对 CIM 的 IC₅₀。

2 结果与分析

2.1 人工抗原的鉴定结果

2.1.1 UV 鉴定结果 利用 U-3000 紫外扫描仪在 220 ~ 360 nm 波长范围进行扫描 ,结果表明 BSA 的最大吸收峰在 278 nm ,CIM 的最大吸收峰在 247 nm。

BAS 与 CIM 偶联后 ,在 240 ~ 255 nm 处紫外吸收峰发生上移 ,320 nm 附近出现吸收峰 (图 2) ,表明偶联成功。

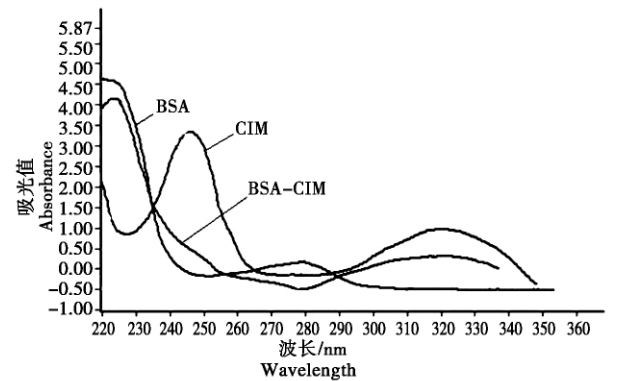
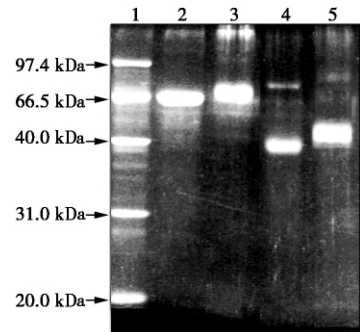


图 2 BSA、CIM 和 BSA-CIM 的紫外扫描光谱
Fig.2 UV scanning spectrum of BSA ,CIM and CIM-BSA

2.1.2 SDS-PAGE 鉴定结果 SDS-PAGE 电泳结果表明 ,BSA 和 OVA 的泳动速度分别大于 BSA-CIM 和 OVA-CIM (图 3) ,说明 BSA-CIM 和 OVA-CIM 的分子量分别大于 BSA 和 OVA ,证明 CIM 已分别与 BSA 和 OVA 成功偶联。



1. Marker; 2. BSA; 3. BSA-CIM; 4. OVA; 5. OVA-CIM.
图 3 BSA-CIM 偶联物的 SDS-PAGE 鉴定
Fig.3 Identification of BSA-CIM and OVA-CIM conjugation by SDS-PAGE

2.2 间接 ELISA 测定多抗血清效价结果

间接 ELISA 检测结果表明免疫的 6 只小鼠血清抗体效价均达到了 1×10^{-3} 以上 (表 1) ,说明 BSA-CIM 获得了较好的免疫效果 ,其中 4 和 5 号小鼠最高血清效价为 $1:1.28 \times 10^4$ 。表明成功获得了高效价的 CIM 抗血清。

表 1 小鼠四免后 10 d 间接 ELISA 测小鼠血清效价

Tab.1 Titer of BALB/c mice anti-sera detected by indirect ELISA

序号 Serial number	抗血清稀释倍数 Diluted multiple of antiserum							阴性对照 Negative	空白对照 Blank
	200	400	800	1 600	3 200	6 400	12 800		
1	1.734	1.236	1.012	0.976	0.356	0.211	0.094	0.079	0.069
2	1.623	1.124	1.004	0.876	0.412	0.209	0.097	0.076	0.065
3	1.156	0.938	0.678	0.345	0.178	0.110	0.093	0.082	0.071
4	2.711	2.102	1.653	1.182	0.876	0.345	0.221	0.083	0.067
5	2.546	2.024	1.561	1.119	0.814	0.324	0.209	0.085	0.071
6	2.108	1.976	1.235	0.997	0.678	0.283	0.132	0.076	0.073

2.3 多抗血清抑制价测定结果

由图 4 可知,4 号小鼠多抗血清标准抑制曲线的线性回归方程为 $y = -25.826x + 100.08$, 回归系数 $R^2 = 0.98$, 根据回归方程计算多抗血清对 CIM 的 IC_{50} 为 86.9 ng/mL, 表明本试验所获 CIM 抗血清对 CIM 具有较高的敏感性。

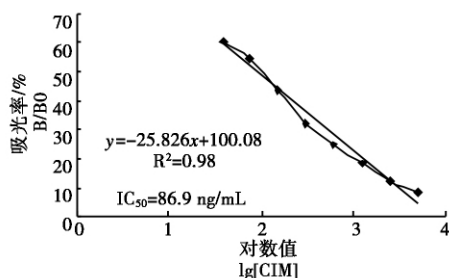


图 4 阻断 ELISA 检测 4 号小鼠 CIM IC_{50}

Fig. 4 IC_{50} inhibitive curve of mice 4 CIM polyclonal antiserum by competitive ELISA

3 讨论

CIM 分子量只有 219.28 kDa, 为半抗原, 本身没有免疫原性, 不会激发动物免疫系统产生抗体, 需要和载体蛋白连接起来合成人工免疫原, 才具备制备抗 CIM 抗体的免疫原性。对于带有氨基的半抗原与载体蛋白的偶联一般采用重氮化法、戊二醛和 EDC 法, 有研究证实, 重氮化法适用于芳香胺而 GA 法适合于脂肪胺的报道^[26], 影响人工抗原免疫原性的主要因素包括载体蛋白的性质、半抗原的分子空间结构、间隔臂的长度和分子结合比等。

由于 BSA 理化性质稳定, 不易变性, 价廉易得, 分子内含自由氨基和羧基多, 在较大 pH 值范围和不同离子强度下均能保持较大的溶解度, 更有利于偶联反应的进行, 故本试验选用 BSA 作为免疫原的蛋白载体。

一定长度的间隔臂的介入, 有助于半抗原结构的暴露, 有利于特异性抗体的产生, 间隔臂过长可形成新的抗原表位, 易被细胞识别而产生“桥抗体”, 间隔臂过短则载体蛋白的空间位阻将影响细胞对半抗原的识别, 不易产生特异性抗体^[27]。以 -N=N- 作间隔臂, 长度适宜, 既可产生针对目标抗原的特异性抗体, 又避免了桥抗体的出现。故本试验选用氮化法偶联 CIM 与载体蛋白 BSA 和 OVA 分别制备人工抗原和包被原, 经紫外分光光度法和 SDS-PAGE 检测鉴定人工抗原偶联的效果良好。

动物免疫试验结果显示, 其 3 只小鼠效价均达 1×10^{-3} 以上, 且多抗血清对 CIM 的 IC_{50} 为 86.9 ng/mL, 成功的获得了高效价、特异性较好的鼠源抗 CIM 多抗血清。本试验在国内首次报道了 CIM 人

工抗原的合成, 免疫 BALB/c 小鼠并制备出抗 CIM 的高效价的多抗血清, 为进一步抗 CIM 单克隆抗体的研制和 CIM 免疫学分析方法的建立奠定了基础。

参考文献:

- [1] Jones R W, Easter R A, McKeith F K, *et al.* Effect of the beta-adrenergic agonist cimaterol (CL 263,780) on the growth and carcass characteristics of finishing swine [J]. *J Anim Sci*, 1985, 61(4): 905-913.
- [2] Hill M A, Dalrymple R H. Evaluation of feet and skeletons of limbs from pigs treated with a repartitioning agent, cimaterol [J]. *Can J Vet Res*, 1987, 51(2): 217-223.
- [3] Kim Y S, Lee Y B, Dalrymple R H. Effect of the repartitioning agent cimaterol on growth, carcass and skeletal muscle characteristics in lambs [J]. *J Anim Sci*, 1987, 65(5): 1392-1399.
- [4] Sainz R D, Wolff J E. Effects of the beta-agonist, cimaterol, on growth, body composition and energy expenditure in rats [J]. *Br J Nutr*, 1988, 60(1): 85-90.
- [5] Merkley J W, Cartwright A L. Adipose tissue deposition and cellularity in cimaterol-treated female broilers [J]. *Poult Sci*, 1989, 68(6): 762-770.
- [6] Gwartney B L, Calkins C R, Jones S J. The effect of cimaterol and its withdrawal on carcass composition and meat tenderness of broiler chickens [J]. *J Anim Sci*, 1991, 69(4): 1551-1558.
- [7] Fiems L O, Boucque C V, Cottyn B G. Effect of duration of a beta-agonist treatment on growth, feed intake and carcass characteristics in finishing bulls [J]. *Arch Tierernahr*, 1993, 45(2): 101-109.
- [8] 金邦荃, 周蔚, 陈剑慧, 等. 塞曼特罗 (cimaterol) 对肉鸭生长后期肌肉增长和体脂代谢的影响 [J]. *江苏农业学报*, 1998, 14(2): 118-122.
- [9] Schiavone A, Tarantola M, Perona G, *et al.* Effect of dietary clenbuterol and cimaterol on muscle composition, beta-adrenergic and androgen receptor concentrations in broiler chickens [J]. *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)*, 2004, 88(3-4): 94-100.
- [10] 农业部畜牧兽医局. 农业部发布动物性食品中兽药最高残留限量 [J]. *中国兽药杂志*, 2003, 37(4): 15-20.
- [11] Degroot J M, Wyhowski de Bukanski B, De Groof J, *et al.* Cimaterol and clenbuterol residue analysis by HPLC-HPTLC in liver [J]. *Z Lebensm Unters Forsch*, 1991, 192(5): 430-432.
- [12] Courtheyn D, Desaeve C, Verhe R. High-performance liquid chromatographic determination of clenbuterol and cimaterol using post-column derivatization [J]. *J Chromatogr*, 1991, 564(2): 537-549.

- [13] Fesser A C ,Dickson L C ,MacNeil J D ,*et al.* Determination of beta-agonists in liver and retina by liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. J AOAC Int , 2005 ,88(1) : 61 - 69.
- [14] Van Vyncht G ,Preece S ,Gaspar P ,*et al.* Gas and liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry for the multiresidue analysis of beta-agonists in biological matrices [J]. J Chromatogr A ,1996 ,750(1 - 2) : 43 - 49.
- [15] Sun L ,Zhang L ,Zhu Y ,*et al.* Simultaneous determination of nine beta-agonist residues in animal derived foods by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Se Pu 2008 ,26(6) : 709 - 713.
- [16] Wu P ,Chen H ,Wang Q ,*et al.* Multi-residue analysis of 10 beta2-agonists in animal tissues using gas chromatography-mass spectrometry [J]. Se Pu 2008 ,26(1) : 39 - 42.
- [17] Duan J ,Chen H ,Chen Y ,*et al.* Simultaneous determination of cimaterol clenbuterol and salbutamol in feeds by capillary zone electrophoresis [J]. Se Pu 2005 ,23(3) : 261 - 263.
- [18] 段建平 ,陈红青 ,陈颖 ,等. 高效毛细管电泳法同时测定西马特罗、盐酸克伦特罗、沙丁胺醇[J]. 广西师范大学学报: 自然科学版 2003 ,1(21) : 250 - 251.
- [19] 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.
- [20] 王选年 ,杨艳艳 ,邢广旭 ,等. 盐酸克伦特罗单抗快速检测试剂盒的研制[J]. 中国兽医学报 2004 ,24(1) : 75 - 78.
- [21] 刘宣兵 ,张改平 ,王斌 ,等. 磺胺甲噁唑残留检测阻断 ELISA 试剂盒的研制[J]. 华北农学报 ,2009 ,24(2) : 214 - 217.
- [22] 张改平 ,职爱民 ,邓瑞广 ,等. 兽药残留的免疫学快速检测技术概述[J]. 河南农业科学 ,2009(9) : 193 - 196.
- [23] 范国英 ,王建华 ,王自良 ,等. 链霉素残留快速检测阻断 ELISA 试剂盒的研制及其性能测定[J]. 中国兽医杂志 2008 ,44(1) : 82 - 84.
- [24] Sambrook J ,Fritsch E ,Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual [M]. NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press ,1989.
- [25] Tijssen P. Practice and theory of enzyme immunoassay [M]. Amsterdam: Elsevier ,1985.
- [26] 李林生. 戊二醛与蛋白质反应的特点[J]. 中国皮革 , 1997(5) : 12 - 14.
- [27] Wie S I ,Hammock B D. Comparison of coating and immunizing antigen structure on the sensitivity and specificity of immunoassays for benzoylphenyl urea insecticides[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry , 1984 ,32(6) : 1294 - 1301.