

氨苄青霉素单克隆抗体及其与青霉素类抗生素交叉反应性

李青梅,刘庆堂,王寅彪,柴书军,王自良,郭军庆,职爱民,孟红丽,张改平

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

摘要:以戊二醛法将氨苄青霉素(Ampicillin, Amp)偶联于牛血清白蛋白(BSA)和卵清白蛋白(OVA),合成免疫抗原BSA-Amp和检测抗原OVA-Amp,并进行了鉴定;用BSA-Amp免疫BALB/c小鼠,应用杂交瘤技术建立了4株分泌抗Amp单克隆抗体的杂交瘤细胞株。ELISA和竞争ELISA结果显示,单克隆抗体1G7、2A11、2D10和3F6的腹水抗体效价分别为 $1:2.56 \times 10^7$ 、 $1:1.28 \times 10^7$ 、 $1:5.12 \times 10^6$ 和 $1:5.12 \times 10^6$,Amp的半数抑制浓度(IC_{50})分别为10.22, 3.58, 4.03, 4.95 ng/mL。Amp单克隆抗体与羧苄青霉素(1G7、2A11、2D10和3F6)、青霉素G(1G7和3F6)、阿莫西林(1G7)等青霉素类抗生素存在显著的交叉反应,而与双氯霉素和邻氯霉素未见明显交叉反应。

关键词:氨苄青霉素;单克隆抗体;交叉反应

中图分类号:Q78 文献标识码:A 文章编号:1000-7091(2011)03-0060-04

Anti-ampicillin Monoclonal Antibodies and Their Cross-reactivity to Penicillin Antibiotics

LI Qing-mei, LIU Qing-tang, WANG Yin-biao, CHAI Shu-jun, WANG Zi-liang,
GUO Jun-qing, ZHI Ai-min, MENG Hong-li, ZHANG Gai-ping

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

Abstract: Ampicillin (Amp) was coupled to carrier proteins of bovine serum albumin (BSA) and ovalbumin (OVA) to synthesize immunogen BSA-Amp and detection antigen OVA-Amp. Four hybridoma cell lines secreting monoclonal antibodies (mAbs) specific for Amp were established by immunizing BALB/c mice with BSA-Amp using hybridoma technology. The antibody titers of mAb ascites (1G7, 2A11, 2D10 and 3F6) were determined as $1:2.56 \times 10^7$, $1:1.28 \times 10^7$, $1:5.12 \times 10^6$ and $1:5.12 \times 10^6$ in ELISA, and their half maximal inhibitory concentration (IC_{50}) of Amp were 10.22, 3.58, 4.03, 4.95 ng/mL in the inhibitive ELISA, respectively. The Amp mAbs showed significant cross-reactivity to the penicillin antibiotics of carbenicillin (1G7, 2A11, 2D10 and 3F6), penicillin G (1G7 and 3F6), and amoxicillin (1G7), whereas no obvious cross-reactivity to dicloxacillin or cloxacillin was found.

Key words: Ampicillin; Monoclonal antibody; Cross-reactivity

氨苄青霉素(Ampicillin, 简称Amp)是一种β-内酰胺类广谱半合成抗生素,其核心基团为闭合噻唑环、β-内酰胺环,分子式为 $C_{16}H_{25}N_3O_7S$,分子量403.45^[1]。Amp的抗菌谱比青霉素G广,对革兰氏阴性菌和革兰氏阳性菌均有作用,因其高效、低毒,且价格低廉、使用方便而成为畜禽养殖中最常用的

抗生素类药物之一;同时,该药物的不合理使用也使其在动物源性食品中的残留现象较为严重,容易造成过敏反应和产生耐药菌株等,对环境和人们身体健康产生潜在的威胁^[2]。为此,多个国家或国际组织均对Amp的应用制定了最高残留限量(Maximum residue limit, MRL),欧盟规定牛奶和动物组织中

收稿日期:2010-07-15

基金项目:“十一五”国家科技支撑计划(2006BAK02A21)

作者简介:李青梅(1972-),女,河南郑州人,副研究员,硕士,主要从事单克隆抗体生产与鉴定研究。

通讯作者:张改平(1960-),男,河南内黄人,研究员,博士后,中国工程院院士,主要从事动物分子免疫学研究。

Amp 的 MRL 分别为 $4 \mu\text{g}/\text{kg}$ 和 $50 \mu\text{g}/\text{kg}$ ^[3]; 我国农业部规定 Amp 在可食组织中的 MRL 为 $50 \mu\text{g}/\text{kg}$, 牛奶中的 MRL 为 $10 \mu\text{g}/\text{kg}$ ^[4]。目前对 Amp 残留的检测主要采用传统的微生物学法^[5]、高效液相色谱法(HPLC)^[6-8]和薄层色谱法^[9]等, HPLC 虽然灵敏、高效, 但需要特殊的检测仪器, 难以在临床检测中推广应用。免疫学检测具有特异、灵敏、简便、快速及低成本等优点, 已成为兽药和农药等小分子药物残留筛查的主要发展方向。

本试验以 Amp 人工抗原免疫小鼠, 利用杂交瘤细胞技术生产鉴定了高亲和力的抗 Amp 单克隆抗体, 并测定其与 β -内酰胺类抗生素的交叉反应谱, 以期为 Amp 免疫检测提供关键检测试剂。

1 材料和方法

1.1 生化试剂

Amp 和羧苄青霉素(Carbenicillin)为 Amresco 公司产品, 阿莫西林(Amoxicyllin)为 Sigma-Aldrich 公司产品, 青霉素 G(Penicillin G)、双氯青霉素(Dicloxacillin)和邻氯青霉素(Cloxacillin)为 Dr. Ehrenstorfer 公司产品; 牛血清白蛋白(BSA)和卵清白蛋白(OVA)为 PIERCE 公司产品; 弗氏完全佐剂(Freund's Complete Adjuvant, FCA)、弗氏不完全佐剂(Freund's Incomplete Adjuvant, FIA)、RPMI-1640、HAT、HT 和 PEG-1500 均为 GIBCO 公司产品; 新生牛血清购自杭州四季青生物工程材料有限公司; 辣根过氧化物酶(HRP)标记羊抗鼠 IgG 抗体(HRP-G α mIgG)购自华美生物工程有限公司; 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine(TMB)和单克隆抗体 Ig 亚型鉴定试剂盒均购自 Sigma-Aldrich 公司。

1.2 试验动物和细胞

清洁级 6 周龄 BALB/c 小鼠购自郑州大学医学院实验动物中心。小鼠浆细胞瘤细胞株 NS0 由英国国家动物健康研究院惠赠。

1.3 人工抗原的合成与鉴定

1.3.1 人工抗原的合成 以戊二醛法合成 Amp 人工抗原^[10]。称取 10 mg BSA 或 OVA 溶于 1.6 mL 0.01 mol/L PBS (pH7.2), 充分溶解; 称 8.4 mg Amp 加到 BSA/OVA 溶液中, 充分溶解; 取 20 μL 25% 戊二醛逐滴添加到混合液中, 室温搅拌反应 4 h; 将反应液加入透析袋中对 PBS 溶液 4℃ 透析 3 d, 每天换液 3~4 次, 获得 BSA-Amp 免疫抗原和 OVA-Amp 检测抗原, 分别用于小鼠免疫和抗体检测。

1.3.2 人工抗原的鉴定 以 ND-1000 微量分光光度计在波长 200~400 nm 对 Amp 人工抗原进行紫

外扫描, 以 10% SDS-PAGE 对 Amp 人工抗原进行电泳分析。

1.4 小鼠免疫

用 BSA-Amp 免疫抗原免疫 6 周龄雌性 BALB/c 小鼠 3 只, 首次免疫以 FCA 乳化 BSA-Amp, 皮下多点注射, 剂量为 $50 \mu\text{g}/\text{只}$; 每次加强免疫间隔 3~4 周, 以 FIA 乳化 BSA-Amp, 皮下或腹腔注射, $50 \mu\text{g}/\text{只}$ 共免 3 次; 最后 1 次加强免疫 14 d 后断尾采血, 用 OVA-Amp 检测抗原以间接 ELISA 检测血清抗体效价, 并以竞争 ELISA 测定 Amp 的抑制效果。细胞融合前 3 d, 尾静脉注射 BSA-Amp 进行超强免疫, 用于细胞融合。

1.5 杂交瘤细胞株的建立

1.5.1 细胞融合 按常规方法进行细胞融合。将免疫小鼠脾细胞与 NS0 浆细胞瘤细胞在 PEG1500 作用下融合, 用 HAT 培养基选择培养融合细胞, 置 37℃、5% CO_2 培养箱培养。

1.5.2 杂交瘤细胞的筛选与克隆 细胞融合 7~10 d 后, 取杂交瘤细胞培养上清, 用检测抗原 OVA-Amp 以间接 ELISA 和竞争 ELISA 进行阳性孔筛选, 选择强阳性、抑制率高、细胞生长旺盛的杂交瘤细胞以有限稀释法连续克隆 3 次, 建立稳定分泌抗 Amp 单克隆抗体的杂交瘤细胞株。

1.6 单克隆抗体的制备

以体内诱生腹水法制备抗 Amp 单克隆抗体。扩大培养克隆化杂交瘤细胞, 以 $2 \times 10^6 \sim 5 \times 10^6$ 细胞腹腔注射经降植烷或液体石蜡致敏的 8 周龄 BALB/c 小鼠, 10~15 d 后抽取小鼠腹水, 以间接 ELISA 和竞争 ELISA 测定腹水的抗体效价和 Amp 抑制价。

1.7 单克隆抗体 Ig 亚型测定

用小鼠 Ig 亚型鉴定试剂盒测定单克隆抗体的 Ig 轻、重链亚型, 操作按试剂盒说明进行。

1.8 间接 ELISA

用 OVA-Amp 检测抗原以间接 ELISA 测定 Amp 抗体及其效价。以 $1 \mu\text{g}/\text{mL}$ OVA-Amp 检测抗原 4℃ 过夜包被 96 孔酶标板, 5% 脱脂奶 37℃ 封闭 1 h, 分别加入倍比稀释待检抗体(小鼠血清、细胞培养上清或小鼠腹水) 37℃ 作用 30 min, 用 1:1 000 稀释 HRP-G μ mIgG 作为第二抗体 37℃ 作用 30 min, 每步反应均以含 0.05% Tween 20 的 PBS (PBST) 充分洗涤, 加 TMB 显色底物室温避光显色 5 min, 加 2 mol/L H_2SO_4 终止显色反应, 用 Bio-Rad 550 型酶标仪测定 450 nm 吸光值(A_{450})。待检孔 A_{450} /阴性孔 A_{450} (S/N) > 2.5 判为阳性, 以阳性孔的稀释倍数为待检样品的抗体效价。

1.9 竞争 ELISA

以竞争 ELISA 测定 Amp 单克隆抗体的敏感性与交叉反应性^[11,13]。分别将 1 000 ng/mL 起倍比稀释的 Amp、羧苄青霉素、青霉素 G、阿莫西林、双氯西林和邻氯西林与等体积适当质量浓度的 Amp 单克隆抗体混合 37℃ 充分作用 1 h 后,分别加入 OVA-Amp 包被酶标孔 37℃ 反应 30 min,以 HRP-G α mIgG 为第二抗体检测单克隆抗体的结合,TMB 显色后,测定 A₄₅₀ 值。根据抑制率 = $(B_{\max} - B_i) / (B_{\max} - B_{\min}) \times 100\%$,其中 B_{max} 为 0 标准质量浓度 A₄₅₀,B_i 为不同质量浓度 A₄₅₀,B_{min} 为空白对照 A₄₅₀,计算不同质量浓度抗生素抑制率,利用 GraphPad Prism 5.01 软件绘制抑制曲线,求得各种抗生素的半数抑制浓度(IC₅₀);根据交叉反应率 = $(\text{Amp IC}_{50} / \text{其他抗生素 IC}_{50}) \times 100\%$,计算 Amp 单克隆抗体与其他青霉素类药物的交叉反应性。

2 结果与分析

2.1 Amp 人工抗原的鉴定

以紫外扫描和 SDS-PAGE 电泳对 BSA-Amp 和 OVA-Amp 合成抗原进行分析鉴定。BSA 和 OVA 的特征峰在 280 nm,Amp 的最大吸收峰在 226 nm,Amp 与 BSA/OVA 偶联后,二者吸收峰叠加,蛋白吸收峰偏移至 265 nm(图 1),SDS-PAGE 电泳可见 BSA-Amp 和 OVA-Amp 偶联蛋白泳动速度均明显慢于 BSA/OVA 载体蛋白,表明 Amp 成功偶联于 BSA 和 OVA 载体蛋白。

表 1 Amp 单克隆抗体的免疫学特性

Tab. 1 Immunological characteristic of Anti-Amp mAbs

单抗 mAbs	ELISA 效价 ELISA titers		抗体亚型 Ig subtypes	
	细胞上清 Supernatant	腹水 Ascites	重链 Heavy chain	轻链 Light chain
1G7	1:2 560	1:2.56 × 10 ⁷	IgG2a	κ
2A11	1:2 560	1:1.28 × 10 ⁷	IgG2a	κ
2D10	1:1 280	1:5.12 × 10 ⁶	IgG1	κ
3F6	1:1 280	1:5.12 × 10 ⁶	IgG2b	κ

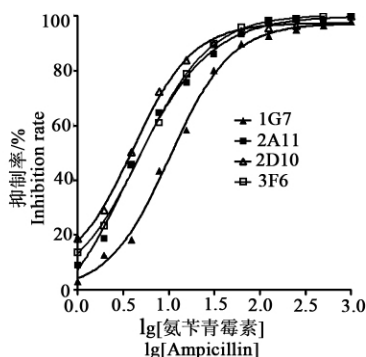


图 2 Amp 单克隆抗体的抑制曲线

Fig. 2 Inhibitive curve of Amp mAbs

2.2 杂交瘤细胞株的建立

细胞融合后 8 d 用 OVA-Amp 检测抗原对细胞培养上清进行间接 ELISA 检测,筛选抗体阳性杂瘤细胞 21 孔,经连续 3 次亚克隆后,以竞争 ELISA 测定其 IC₅₀,获得 4 株杂交瘤,分别命名为 1G7、2A11、2D10 和 3F6,经多次传代、冻存及复苏,杂交瘤细胞稳定分泌抗 Amp 单克隆抗体。

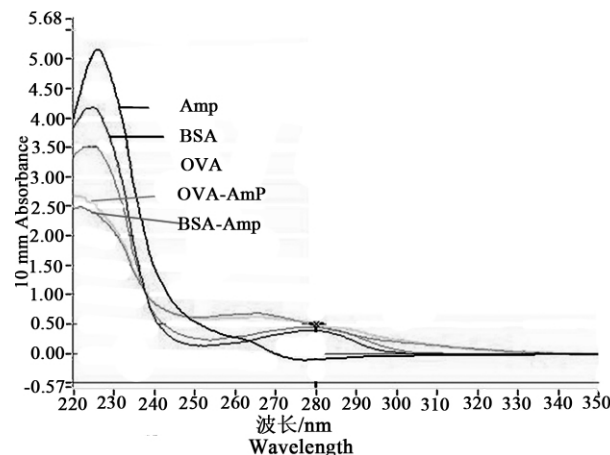


图 1 Amp 人工抗原的紫外扫描光谱

Fig. 1 UV scanning spectrum of Amp conjugates

2.3 单克隆抗体的免疫学特性

以 Ig 亚型试剂盒测定 4 株 Amp 单克隆抗体的 Ig 重、轻链亚型,以 ELISA 测定细胞培养上清和腹水的抗体效价。由表 1 可知,Amp 单克隆抗体细胞上清和腹水的 ELISA 效价分别在 1:1 280 和 10⁻⁶ 以上,其 Ig 轻链均为 κ ,重链分别为 IgG2a、IG1 或 IgG2b。

2.4 单克隆抗体的敏感性

采用竞争 ELISA 测定不同质量浓度 Amp 对单克隆抗体的抑制率,以 Amp 质量浓度对数值为横坐标,抑制率为纵坐标,利用 GraphPad Prism 5.01 软件绘制 4 株单克隆抗体(1G7、2A11、2D10 和 3F6)的 Amp 抑制曲线($R^2 = 0.9966$ 、 0.9962 、 0.9977 和 0.9986),求得 Amp 的 IC₅₀ 分别为 10.22、4.03、4.95 ng/mL(图 2)。

2.5 单克隆抗体的交叉反应性

以竞争 ELISA 测定不同青霉素类抗生素对 Amp 单克隆抗体的抑制率,根据其 IC₅₀ 值计算 Amp 单克隆抗体与 β -内酰胺类抗生素的交叉反应性。

由表 2 可知,4 株 Amp 单克隆抗体均对羧苄青霉素呈现显著的交叉反应(2A11 较弱),与青霉素 G 存在较弱的交叉反应,而对双氯青霉素和邻氯青霉素未见明显交叉反应。此外,单克隆抗体 1G7 对阿莫西林有强的交叉反应,而 2A11 与其他青霉素类抗生素均未见明显交叉反应。

表 2 Amp 单克隆抗体的交叉反应性

Tab. 2 The cross-reactivities of Amp mAb

抗生素 Antibiotics	IC ₅₀ /(ng/mL)				交叉反应性/% Cross-reactivity1G7			
	1G7	2A11	2D10	3F6	1G7	2A11	2D10	3F6
氨苄青霉素 Ampicillin	10.21	3.58	4.03	4.95	100.00	100.00	100.00	100.00
羧苄青霉素 Carbenicillin	11.39	15.81	3.03	4.16	89.64	22.64	133.00	118.99
青霉素 G Penicillin G	41.48	102.10	41.51	23.85	24.61	3.51	9.71	20.75
阿莫西林 Amoxilin	14.13	>1 000	91.68	83.26	72.26	<0.36	4.40	5.95
双氯青霉素 Dicloxacillin	>1 000	620.80	995.80	>1 000	<1.02	0.58	0.40	0.50
邻氯青霉素 Cloxacillin	>1 000	>1 000	>1 000	>1 000	<1.02	<0.36	<0.40	<0.50

3 讨论

青霉素类抗生素是化学分子结构中含有四元β-内酰胺环的一类抗生素,其母核由氢化噻唑环与β-内酰胺环稠合形成 6-氨基青霉烷酸(6-APA)等,不同种类青霉素具有不同的侧链基团:青霉素 G 的侧链基团为苯乙酰氨基,Amp 为 2-氨基苯乙酰氨基,阿莫西林为 2-氨基对羟基苯乙酰氨基,羧苄青霉素为 2-羧基苯乙酰氨基,而邻氯霉素和双氯霉素为氯代苯甲异噻唑。

本研究制备的高亲和力 Amp 单克隆抗体与羧苄青霉素(1G7、2A11、2D10 和 3F6)、青霉素 G(1G7 和 3F6)、阿莫西林(1G7)等青霉素类抗生素存在显著的交叉反应,而与双氯霉素和邻氯霉素未见明显交叉反应,提示上述 4 株 Amp 单克隆抗体不识别青霉素类母核 6-氨基青霉烷酸,其识别位点位于抗生素的侧链基团。单克隆抗体 1G7 均识别青霉素 G、阿莫西林和羧苄青霉素,表明其识别青霉素侧链的苯乙酰氨基相关基团,而 2A11、2D10 和 3F6 与羧苄青霉素呈现明显交叉反应,可能识别青霉素侧链的苯羟基或苯羧基相关基团。所获得的 3 株 Amp 单克隆抗体(2A11、2D10 和 3F6)对 Amp 具有高度敏感性,其 Amp 半数抑制质量浓度为 3~5 ng/mL,能够满足我国动物源食品中 Amp 的 MRL 限量检测要求,为 ELISA 和免疫试纸等 Amp 免疫检测方法提供了关键的检测试剂。

参考文献:

[1] http://www.chemicalbook.com/ProductChemicalPropertiesCB2247346_EN.htm.
[2] Dewdney J M, Maes L, Raynaud J P, et al. Risk assessment of antibiotic residues of beta-lactams and macrolides in food products with regard to their immuno-allergic potential[J]. Food Chem Toxicol, 1991, 29(7): 477-483.

[3] Council Regulation (EEC) No. 2377/90 of 26 June 1990. Laying down a community procedure for the establishment of maximum residue limits of veterinary medicinal products in foodstuffs of animal origin[S]. Off J Eur Commun, 1990, L 224: 34-35.
[4] 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(续)[J]. 中国兽药杂志, 2003, 37(3): 5-11.
[5] Linage B, Gonzalo C, Carriedo J A, et al. Performance of blue-yellow screening test for antimicrobial detection in ovine milk[J]. J Dairy Sci, 2007, 90(12): 5374.
[6] 农业部畜牧兽医局. 农业部发布动物性食品中兽药残留检测方法[J]. 中国兽药杂志, 2003, 37(3): 2.
[7] Luo W, Ang C Y W, Thompson Jr H C. Rapid method for the determination of ampicillin residues in animal muscle tissues by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection[J]. J Chromatogr B Biomed Sci Appl, 1997, 694(2): 401-407.
[8] Anderson K L, Moats W A, Rushing J E, et al. Ampicillin and amoxicillin residue detection in milk, using microbial receptor assay (Charm II) and liquid chromatography methods, after extra-label administration of the drugs to lactating cows[J]. Am J Vet Res, 1996, 57(1): 73-78.
[9] Tajick M A, Shohreh B. Detection of antibiotics residue in chicken meat using TLC[J]. Inter J Poult Sci, 2006, 5(7): 611-612.
[10] Cliquet P, Cox E, Van Dorpe C, et al. Generation of class-selective monoclonal antibodies against the penicillin group[J]. J Agric Food Chem, 2001, 49(7): 3349-3355.
[11] Heddy Zola. 单克隆抗体技术手册[M]. 周宗安, 方元, 房德兴 等译. 南京: 南京大学出版社, 1991: 31-77.
[12] 詹爱军, 王新卫, 陈枝楠, 等. 抗 H9N2 AIV HA 单克隆抗体的制备及其在胶体金层析检测中的初步应用[J]. 河南农业科学, 2008(9): 123-126.
[13] 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.