

文章编号: 1004-2490(2021)01-0104-08

亚甲基蓝多克隆抗体的制备与鉴定

黄宣运^{1,2,3,4}, 杨光昕^{1,2}, 史永富^{1,2}, 黄冬梅^{1,2}, 叶洪丽^{1,2}, 蔡友琼^{1,2}

(1. 中国水产科学研究院东海水产研究所, 上海 200090; 2. 农业农村部水产品质量安全风险评估实验室 (上海), 上海 200090; 3. 上海海洋大学, 农业农村部鱼类营养与环境生态研究中心, 上海 201306; 4. 上海海洋大学, 水产科学国家级实验教学示范中心, 上海 201306)

摘 要: 为建立检测水产品中亚甲基蓝及其代谢物残留的酶联免疫吸附检测方法 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA), 以亚甲基蓝代谢物天青 C (azure C) 为亚甲基蓝的半抗原, 采用戊二醛法, 将 azure C 上的氨基与蛋白上的羧基进行偶联, 制备免疫原 azure C-BSA 和包被原 azure C-OVA。利用紫外扫描 (UV) 和基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱 (MALDI-TOF-MS) 对免疫原和包被原进行鉴定。以 azure C-BSA 为免疫原, 按 $0.2 \text{ mg} \cdot \text{只}^{-1}$ 的剂量免疫 BALB/c 小鼠, 对获得的多克隆抗体的效价、灵敏度和特异性进行测定。实验结果表明: 制备的人工抗原 azure C-BSA 和 azure C-OVA 偶联成功, 偶联比约为 31:1 和 52:1。经过 ELISA 测定, 多克隆抗体效价均在 16 000 以上, 其中 2 号小鼠抗体效价最高, 半数抑制浓度 (IC_{50}) 为 $43.9 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$, 该抗体与亚甲基蓝代谢物天青 A、天青 B 和天青 C 存在交叉反应, 交叉反应率分别为 127.6%、84.7% 和 138.1%, 与其他常见染料不存在交叉反应, 说明该抗体特异性良好。实验成功合成亚甲基蓝人工抗原并获得免疫学特性良好的鼠源多抗血清, 为后期单克隆抗体的制备及开发免疫学快速检测方法奠定了基础。

关键词: 亚甲基蓝; 半抗原; 偶联物; 多克隆抗体

中图分类号: TS 207.3 **文献标志码:** A

亚甲基蓝 (methylene blue, MB) 是一种吩噻嗪类化合物^[1], 最早被用于工业染色和治疗细菌性疟疾。近年来, 亚甲基蓝被用于替代禁用药物孔雀石绿^[2]防治水产动物养殖过程中的水霉病^[3]。与孔雀石绿相比, 亚甲基蓝毒性较低, 但依然存在副作用^[4-5]。目前, 欧盟规定禁止亚甲基蓝用于动物食品生产过程, 日本规定动物食品中亚甲基蓝最高残留限量为 $10 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ^[6]。因此, 建立一种简单、快捷的检测亚甲基蓝的方法显得十分必要。

现有检测动物源性食品中亚甲基蓝残留的方法主要有仪器法和免疫学分析法, 仪器法主要

包括紫外分光光度法^[7-8]、液相色谱法^[9]、液相色谱串联质谱法^[10]等。与仪器法相比, 免疫学分析法具有灵敏、快速、简单等优点, 更适合用于水产品药物残留的初步筛查^[11-13]。目前, 基于免疫学原理开发的快速检测方法主要针对氟喹诺酮类^[14-15]、孔雀石绿^[16]等指标, 对于亚甲基蓝尚未有相关研究报道。

本研究以亚甲基蓝代谢物天青 C (azure C) 作为亚甲基蓝的半抗原, 采用戊二醛法合成亚甲基蓝人工抗原, 并制备和鉴定了亚甲基蓝鼠源多克隆抗体, 以期为进一步制备亚甲基蓝单克隆抗体及开发快速检测试剂盒提供参考。

收稿日期: 2020-07-22

基金项目: 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金 (中国水产科学研究院东海水产研究所) 项目 (2015M05); 国家农产品质量安全风险评估重大专项 (GJFP201600901)

作者简介: 黄宣运 (1984—), 男, 助理研究员, 研究方向: 水产品质量安全与风险评估。E-mail: hxyseven@163.com

通信作者: 蔡友琼, 研究员。E-mail: caiyouqiong@163.com

1 材料与方 法

1.1 材料和试剂

亚甲基蓝,含量 $\geq 98.9\%$,购自 USP 美国药典标准品公司;天青 A,含量 $\geq 99.0\%$,购自山东西亚化学工业有限公司;天青 B,含量 $\geq 95.1\%$,购自北京正翔科技有限公司;天青 C,含量 $\geq 90\%$,购自 Sigma 公司;牛血清白蛋白 (bovine serum album, BSA)、鸡卵血清白蛋白 (ovalbumin, OVA)、辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠 IgG (酶标二抗)、96 孔酶标板、50% 戊二醛 (GA),购自生工生物工程 (上海) 公司;弗氏完全、不完全佐剂,购自 Sigma 公司;BALB/c 小鼠购自上海吉辉实验动物饲养有限公司,许可证号为:SCXK (沪) 2017-0012。本实验动物饲养于华东师范大学闵行校区实验动物中心,许可证号为:SYXK (沪) 2015-0011。

本实验所用其他生物试剂纯度均大于 98%,化学试剂均为分析纯及以上纯度。

Multifuge X3R 离心机 (赛默飞世尔 (上海) 仪器公司), U4100 紫外分光光度计 (株式会社日立制作所, 日本), Multiskan MK3 酶标仪 (赛默飞世尔 (上海) 仪器公司)。

1.2 亚甲基蓝人工抗原的合成

参考滕海英等^[17]的方法,对人工抗原进行合成。称取 3.5 mg 天青 C 溶解于 2 mL 磷酸盐缓冲溶液 (PBS 0.01 mol · L⁻¹, pH 7.2) 中,加入 50 μ L 50% 戊二醛 (GA) 反应 1 h。在室温磁力搅拌下,逐滴加入 0.85 mL 20 mol · L⁻¹ 的 BSA 溶液,再加入 1.1 mL PBS 缓冲液,反应 24 h。将溶液转移至处理好的透析袋中,并以 PBS 溶液为透析液在 4 $^{\circ}$ C 透析 3 d,每天更换透析液 3 ~ 4 次。透析后即 为亚甲基蓝人工抗原 (azure C-BSA), 4 $^{\circ}$ C 保持备用,其合成路线见图 1。azure C-VOA 的制备方法与 azure C-BSA 一致,将 OVA 替换 BSA 即可。

1.3 亚甲基蓝人工抗原的鉴定

1.3.1 紫外扫描鉴定

用 PBS 将 BSA、OVA、天青 C 和人工抗原稀释至适当浓度后,用紫外-可见分光光度计对其进行表征。

1.3.2 基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱 (MADLI-TOF MS) 鉴定

人工抗原委托生工生物工程 (上海) 股份有限公司进行鉴定。具体方法如下:取 1 μ L 样品点至样品靶上,自然干燥后,再取 CHCA 基质溶液点至对应靶位上并自然干燥,用相同方法在样品靶位相邻位置点标准品。在正离子模式下选择线性方法对样品测试分子量。通过比较偶联蛋白、半抗原及人工抗原的分子量,计算偶联比。

1.4 多克隆抗体制备

挑选 4 只健康的 6 周龄的 BALB/c 小鼠,暂养 1 周后,免疫前眼眶取血作为阴性血清。取 2 mg · mL⁻¹ 免疫原 (azure C-BSA) 与弗氏完全佐剂等量混合,腹腔注射小鼠,免疫剂量为 0.2 mg。首次免疫后 2 周,免疫原与弗氏不完全佐剂混合乳化,腹腔注射。以后免疫不加佐剂,分别 在第 3 周、第 4 周、第 5 周各免疫一次,采用尾部静脉注射免疫。最后一次免疫后,摘眼球取血,离心分离血清后冻存备用。

1.5 多克隆抗体的鉴定

1.5.1 抗体效价测定

采用间接酶联免疫吸附检测方法 (ELISA) 检测抗体效价。将包被原稀释 400 倍后加入酶标板中,每孔 100 μ L, 37 $^{\circ}$ C 包被 1 h。弃去废液, PBST (0.5% Tween-20) 洗板 3 次 (以下简称洗板), 拍干。每孔加入 200 μ L 的 PBS (5% 的牛奶) 封闭过夜,洗板,拍干,每孔加入 100 μ L 倍比稀释抗体,同时设置空白和阴性对照, 37 $^{\circ}$ C, 1 h。洗板,拍干后加入羊抗鼠酶标二抗 (1:2 000 稀释) 37 $^{\circ}$ C, 0.5 h,洗板,拍干。每孔添加新配置的 TMB 显色液 100 μ L, 37 $^{\circ}$ C, 10 min,加入 2M H₂SO₄

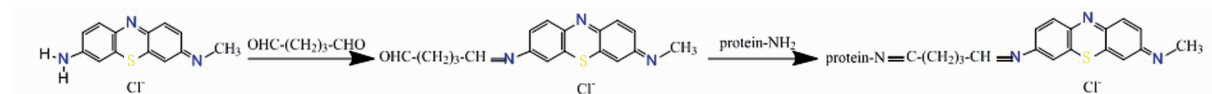


图 1 亚甲基蓝人工抗原合成路线

Fig.1 Synthetic route of MB artificial antigen

50 μL 终止反应,用酶标仪在 450 nm 读数。以上清液吸光度为阴性值吸光度 2 倍(即 $P/N \geq 2.0$)判断为阳性。

1.5.2 抗体灵敏度测定

利用方阵法,以 OD_{450} 为 1.0 时,作为抗原抗体最佳反应浓度,配置不同浓度 MB 标准品,用间接竞争 ELISA 测不同浓度 MB 条件下的 OD_{450} ,采用四参数 Logistic 拟合标准曲线,公式为 $y = A_2 + (A_1 - A_2) / [1 + (X/X_0)^P]$,其中 A_1 为最大吸光度对应的浓度, A_2 为最小吸光度对应的浓度, X_0 为半数抑制浓度(IC_{50})对应的 MB 浓度, P 为斜率。

1.5.3 抗体特异性测定

以亚甲基蓝代谢物天青 A、天青 B、天青 C、孔雀石绿和结晶紫等作为竞争物,用间接竞争 ELISA 测定多抗对各竞争物的半数抑制浓度(IC_{50})。交叉反应率(cross reactivity, CR)为 MB 的 IC_{50} 与各竞争物的 IC_{50} 的百分比。

2 结果与讨论

2.1 半抗原的选择

亚甲基蓝是一个小分子化合物,其分子量只有 319.9 Da,必须连接大分子物质,如 BSA、OVA 和钥孔血蓝蛋白(KLH)等才能够刺激机体产生抗体^[18]。如图 2 所示,MB 没有直接与蛋白质连接的功能基团(羧基和氨基),除了对 MB 进行化学改造接入连接功能基团外,利用结构类似物替代目标物作为半抗原,是一种最为简便的策略^[19]。对于亚甲基蓝而言,其代谢物天青 A 或

天青 C 不仅结构与其类似,而且有连接蛋白质的氨基基团,在本研究中选取天青 C 作为半抗原。

2.2 亚甲基蓝人工抗原的鉴定

2.2.1 紫外扫描鉴定

紫外扫描是鉴定人工抗原是否偶联成功最简单有效的方法^[20]。在 250 ~ 400 nm 波长条件下,对天青 C、BSA、OVA 和人工抗原进行扫描,结果如图 3 所示,天青 C、BSA、OVA、azure C-BSA 和 azure C-OVA 的最大吸收峰分别为 292 nm、278 nm、279 nm、260 nm 和 266 nm,与 BSA 和 OVA 相比较,人工抗原的最大吸收峰发生了蓝移,证明亚甲基蓝人工抗原制备成功。

2.2.2 MADLI-TOF MS 鉴定

利用 MADLI-TOF MS 对 BSA、OVA、azure C-BSA、azure C-OVA 的分子量进行鉴定,结果如图 4 所示,BSA 的分子量为 66 330.2 Da,azure C-BSA 分子量为 74 134.2 Da。BSA 上连接 1 个天青 C 分子,分子量增加为 249.7 ($M_{r, \text{azure C}} - M_{r, \text{H}_2\text{O}} = 277.7 - 18 = 249.7$),因此 azure C-BSA 的偶联比约为 31:1,同理 azure C-OVA 的偶联比约为 52:1。

2.3 多克隆抗体鉴定

2.3.1 抗体效价测定

最后一次免疫后,用 ELISA 测定血清效价,以阳性血清的 $\text{OD}_{450} \geq$ 阴性对照的 2 倍作为血清的效价判断依据。从表 1 可以看出,4 只小鼠均产生了抗体,效价均在 1.6×10^4 以上,其中 2 号小鼠效价最高,选取该抗体进行后续竞争实验。

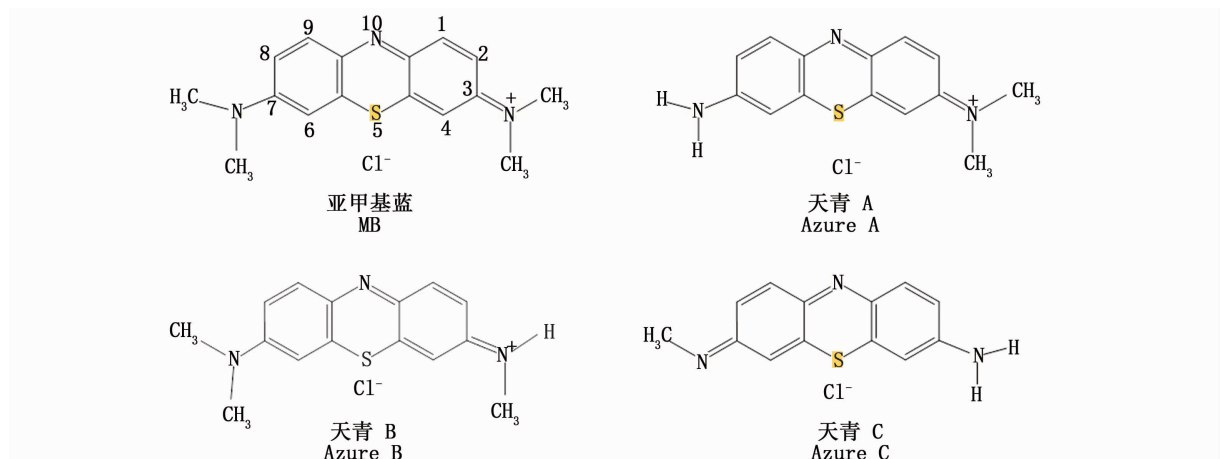


图 2 不同化合物的分子结构示意图

Fig. 2 Molecular structure formula of different compounds

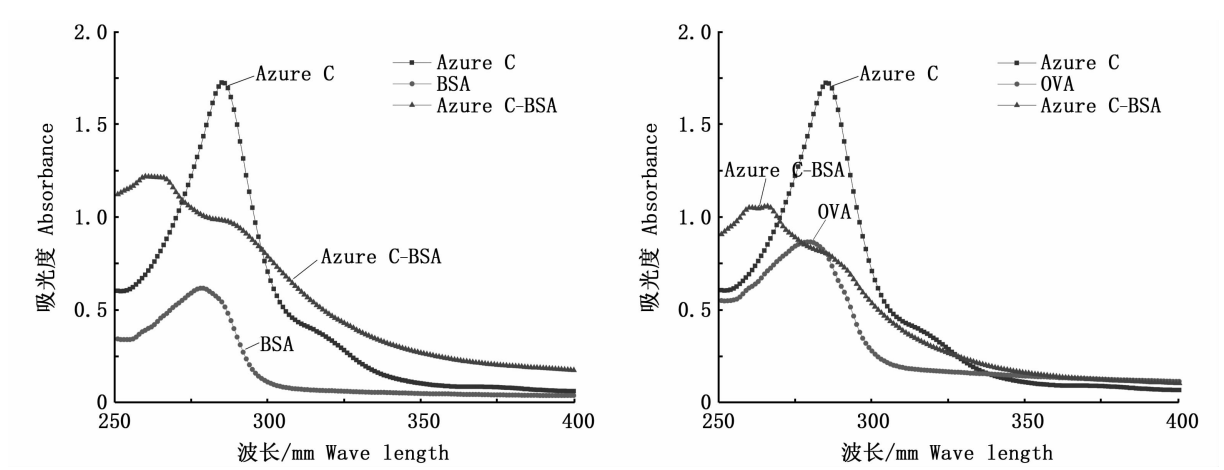


图 3 人工抗原紫外扫描图谱

Fig.3 UV scanning spectrum of artificial antigen

注:azure C:天青 C;BSA:牛血清白蛋白;OVA:鸡卵血清白蛋白; azure C-BSA 和 azure C-OVA:亚甲基蓝人工抗原
Note: azure C: azure C; BSA: bovine serum album; OVA: ovalbumin; azure C-BSA and azure C-OVA: MB artificial antigen

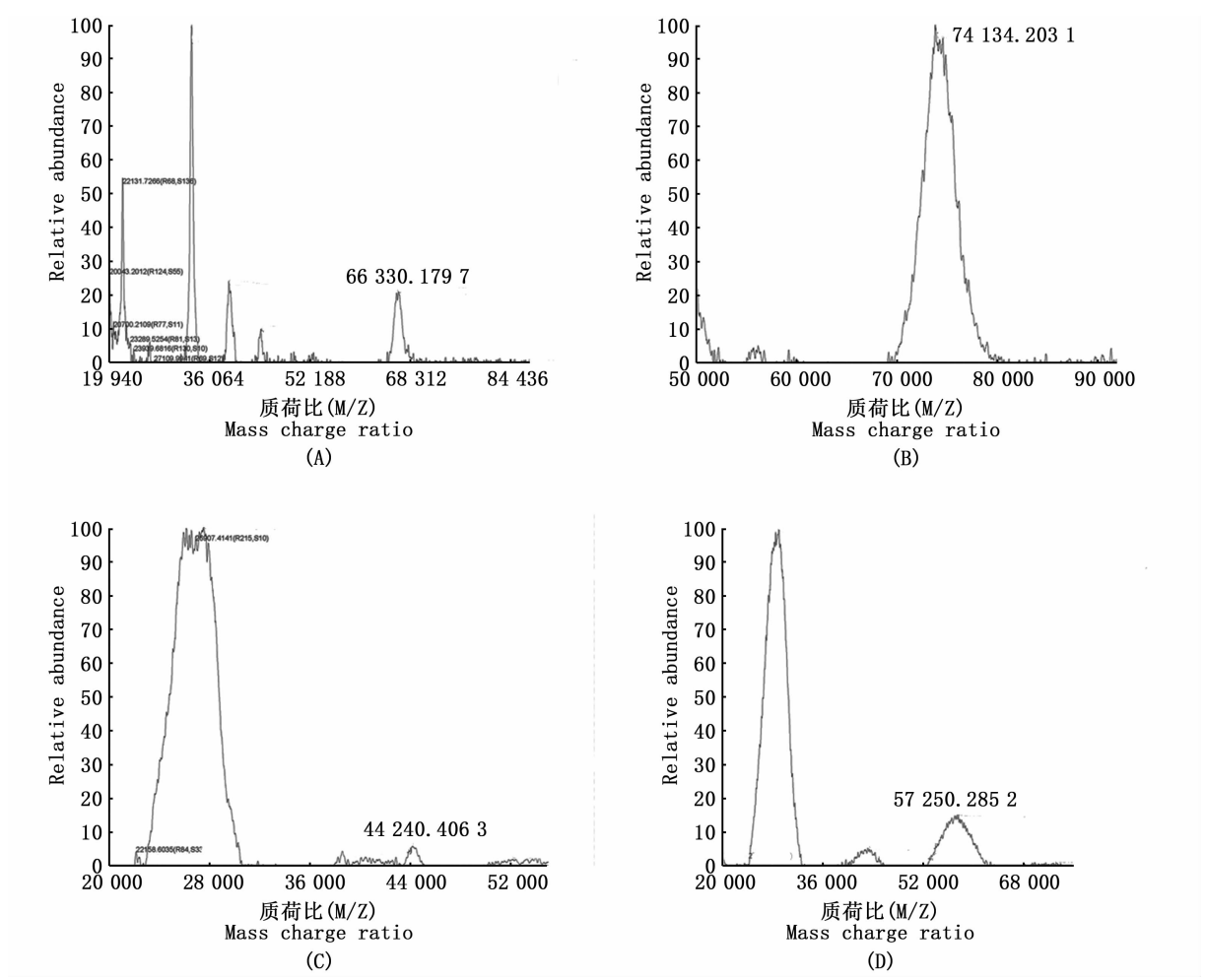


图 4 BSA(A)、azure C-BSA(B)、OVA(C) 和 azure C-OVA(D) 质谱图

Fig.4 MALDI-TOF MS spectrogram of BSA(A) , azure C-BSA(B) , OVA(C) and azure C-OVA(D)

2.3.2 抗体灵敏度

经方阵实验优化筛选, MB 间接竞争 ELISA 测定最佳工作条件为包被原稀释 400 倍, 包被酶标板; 抗体稀释 2 000 倍; 酶标二抗稀释 2 000 倍, 反应时间为 0.5 h。按上述实验条件测定抗体的灵敏度, 利用 Origin 16.0 对测定结果进行四参数拟合, 得到曲线方程为 $y = 0.27 + 0.76/[1 + (x/43.9)^{1.67}]$ (图 5), IC_{50} 值为 $43.9\text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

2.3.3 抗体特异性

通过优化的间接竞争 ELISA 法测定了 9 种物质与抗体的交叉反应。结果显示 (表 2): 抗体与目标物结构非常接近的天青 A、天青 B 和天青 C 均有交叉反应, 交叉反应率 (CR) 分别为 127.6%、84.7% 和 138.1%。而与水产品中常见的其他药物几乎不存在交叉反应 ($CR < 0.01\%$)。由此说明, 该抗体不仅可以高特异性地识别目标物 (亚甲基蓝), 而且能够识别与其结构相似的代

谢物 (天青 A、天青 B 和天青 C), 这为下一步开发亚甲基蓝及其代谢物快速检测试剂盒奠定了基础。

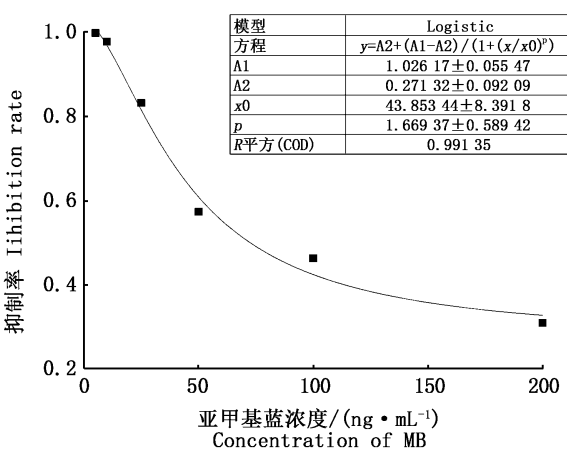


图 5 亚甲基蓝间接竞争 ELISA 方法标准曲线

Fig. 5 Standard ELISA inhibition curve of MB

表 1 多克隆抗体效价测定

Tab. 1 Titers of polyclone antibody

多抗稀释倍数 Dilution multiple of antibody	1 号小鼠 NO. 1 mice	2 号小鼠 NO. 2 mice	3 号小鼠 NO. 3 mice	4 号小鼠 NO. 4 mice
1 000	2. 169	2. 232	1. 882	1. 951
2 000	1. 611	1. 821	1. 519	1. 578
4 000	1. 062	1. 168	1. 095	1. 073
8 000	0. 622	0. 712	0. 568	0. 528
16 000	0. 392	0. 592	0. 332	0. 283
32 000	0. 182	0. 282	0. 151	0. 205
64 000	0. 153	0. 158	0. 112	0. 139
阴性对照 Negative control	0. 103	0. 121	0. 115	0. 112
空白对照 Blank control	0. 084	0. 085	0. 090	0. 073

表 2 多克隆抗体与类似物的交叉反应率

Tab. 2 Cross-reactivity of related analogues of polyclone antibody

竞争物 Competitor	$IC_{50}/(\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1})$	交叉反应率/% Cross reaction rate
亚甲基蓝 Methylene blue	43. 9	100
天青 A Azure A	34. 4	127. 6
天青 B Azure B	51. 8	84. 7
天青 C Azure C	31. 8	138. 1
孔雀石绿 Malachite green	$>1\ 000$	<0.01
无色孔雀石绿 Leuco malachite green	$>1\ 000$	<0.01
亮绿 Bright green	$>1\ 000$	<0.01
隐性亮绿 Leuco bright green	$>1\ 000$	<0.01
结晶紫 Crystal violet	$>1\ 000$	<0.01
隐性结晶紫 Leuco crystal violet	$>1\ 000$	<0.01

3 小结

本实验以亚甲基蓝代谢物天青 C 作为亚甲基蓝半抗原,成功合成了亚甲基蓝人工抗原,免疫小鼠后,获得的多克隆抗体效价均在 16 000 以上,其中 2 号小鼠的多抗血清灵敏度最高,IC₅₀为 43.9 ng · mL⁻¹,与天青 A、天青 B 和天青 C 均有交叉反应,与水产品中常见其他药物几乎不存在交叉反应,说明该抗体特异性良好,为下一步制备亚甲基蓝单克隆抗体及开发免疫学快速检测方法奠定了基础。

参考文献:

- [1] PAKAVATHKUMAR P, SHARMA G, KAUSHAL V, *et al.* Methylene blue inhibits caspases by oxidation of the catalytic cysteine[J]. Scientific Reports, 2015. Doi:10.1038/srep.13730.
- [2] 王 群, 宋 恽, 马 兵. 水产品中孔雀石绿的风险评估(一)[J]. 中国渔业质量与标准, 2011, 1(2):38-43.
WANG Q, SONG Y, MA B. Risk assessment of malachite green in aquatic products (I) [J]. Chinese Fishery Quality and Standards, 2011, 1(2): 38-43.
- [3] LV X M, YANG X L, XIE X Y, *et al.* Comparative transcriptome analysis of *Anguilla japonica* livers following exposure to methylene blue [J]. Aquaculture Research, 2018, 49(3):1232-1241.
- [4] AKAZAWA M, WU Y, LIU W. Allergy-like reactions to methylene blue following laparoscopic chromopertubation: A systematic review of the literature[J]. European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology, 2019(238): 58-62.
- [5] PROGRAM N T. Toxicology and carcinogenesis studies of methylene blue trihydrate (Cas No. 7220-79-3) in F344/N rats and B6C3F1 mice (gavage studies) [J]. National Toxicology Program Technology Representative Service, 2008(540):1-224.
- [6] XU J, DIA L, WU B, *et al.* Determination of methylene blue residues in aquatic products by liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Journal of Separation Science, 2009, 32(23):4193-4199.
- [7] RAZMARA R S, DANESHFAR A, SAHRAI R. Determination of methylene blue and sunset yellow in wastewater and food samples using salting-out assisted liquid-liquid extraction [J]. Journal of Industrial and Engineering Chemistry, 2011, 17(3): 533-536.
- [8] AHMADI R, KAZEMI G, RAMEZANI A M, *et al.* Shaker-assisted liquid-liquid microextraction of methylene blue using deep eutectic solvent followed by back-extraction and spectrophotometric determination [J]. Microchemical Journal, 2019, 145:501-507.
- [9] KASUGA Y, HISHIDA M, TANAHASHI N. Simultaneous determination of malachite green and methylene blue in cultured fishes by high performance liquid chromatography [J]. Food Hygiene and Safety Science (Shokuhin Eiseigaku Zasshi), 1991, 32(3):137-141.
- [10] KIM S, HA D, KOO T. Simultaneous quantification of methylene blue and its major metabolite, azure B, in plasma by LC-MS/MS and its application for a pharmacokinetic study [J]. Biomedical Chromatography, 2014, 28(4):518-524.
- [11] HU K, HUANG X Y, JIANG Y S, *et al.* Monoclonal antibody based enzyme-linked immunosorbent assay for the specific detection of ciprofloxacin and enrofloxacin residues in fishery products [J]. Aquaculture, 2010, 310(1-2):8-12.
- [12] WU L, LI G H, XU X, *et al.* Application of nano-ELISA in food analysis: Recent advances and challenges [J]. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 2019(113):140-156.
- [13] WANG C, LI X M, PENG T, *et al.* Latex bead and colloidal gold applied in a multiplex immunochromatographic assay for high-throughput detection of three classes of antibiotic residues in milk[J]. Food Control, 2017(77):1-7.
- [14] HU S, HUANG Z, WANG C, *et al.* Using hapten cross-reactivity to screen heterologous competitive antigens for improving the sensitivity of ELISA[J]. Food Chemistry, 2019. Doi:10.1016/j.foodchem.209.125379.
- [15] 李树莹, 唐云飞, 盛建武, 等. 恩诺沙星完全抗原的合成及间接竞争 Elisa 方法的建立[J]. 环境科学学报, 2017, 37(8):2904-2910.
LI S Y, TANG Y F, SHENG J W, *et al.* Preparation of complete antigen and development of an indirect competitive ELISA for the detection of enrofloxacin in water samples [J]. Acta Scientiae Circumstantiae,

- 2017,37(8):2904-2910.
- [16] 孙晶玮, 胡章立. 孔雀石绿多克隆抗体的制备与筛选[J]. 现代食品科技, 2013,29(11): 2712-2716.
- SUN J W, HU Z L. Preparation and selection of polyclonal antibodies against malachite green [J]. Modern Food Science and Technology, 2013, 29 (11):2712-2716.
- [17] 滕海英, 余宇燕, 卢 玲, 等. 戊二醛法合成石杉碱甲人工抗原及其鉴定[J]. 福建中医药大学学报, 2012,22(6):41-44.
- TENG H Y, YU Y Y, LU L, *et al.* Synthesis of huperzine a artificial antigens by glutaraldehyde and its identification[J]. Journal of Fujian University of Traditional Chinese Medicine, 2012, 22 (6): 41-44.
- [18] 刘媛媛, 陈奇娜, 潘学春, 等. 多环芳烃菲和茚萘半抗原的制备及量化计算[J]. 化学试剂, 2017, 39(11):1205-1208.
- LIU Y Y, CHEN Q N, PAN X C, *et al.* Preparation and quantum chemical calculation of polycyclic aromatic hydrocarbons naphthalene and fluoranthene [J]. Chemical Reagent, 2017, 39 (11): 1205-1208.
- [19] 徐振林, 沈玉栋, 王 弘, 等. 有机磷农药半抗原设计及多特异性抗体识别机制研究[J]. 中国科学:化学, 2015,45(2):168-176.
- XU Z L, SHEN Y D, WANG H, *et al.* Design of generic haptens for O, O-diethyl phosphorothioate pesticides and study of broad-specificity antibody recognition[J]. Scientia Sinica Chimica, 2015, 45 (2):168-176.
- [20] 李潇潇, 丁书茂, 杨 旭, 等. 噻唑酰胺人工抗原的合成及酶联免疫吸附分析方法的建立[J]. 分析化学, 2018,46(1):27-32.
- LI X X, DING S M, YANG X, *et al.* Synthesis of thifluzamide artificial antigens and establishment of enzyme linked immunosorbent assay detection method [J]. Chinese Journal of Analytical Chemistry, 2018, 46(1):27-32.

Preparation and identification of methylene blue polyclonal antibody

HUANG Xuanyun^{1,2,3,4}, YANG Guangxin^{1,2}, SHI Yongfu^{1,2},

HUANG Dongmei^{1,2}, YE Hongli^{1,2}, CAI Youqiong^{1,2}

(1. *East China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Shanghai 20090, China*;
2. *Laboratory of Quality & Safety Risk Assessment for Aquatic Products (Shanghai), Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Shanghai 200090, China*; 3. *Centre for Research on Environmental Ecology and Fish Nutrition, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China*; 4. *National Demonstration Center for Experimental Fisheries Science Education, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China*)

Abstract: Methylene blue and its metabolites (azure A, azure B and azure C) residues in fishery products were dangerous for human health and it still remains a big challenge in China. However, there are few available assays to detect specifically methylene blue and its metabolites residues in fishery products. In order to establish an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) method for the detection of methylene blue and its metabolites residues in fishery products, methylene blue metabolite azure C with similar structure as methylene blue was selected as the hapten of methylene blue. The amino group on azure C was coupled with the carboxyl group on protein by glutaraldehyde method to prepare the immunogen azure C-BSA and coating antigen azure C-OVA. Immunogen and coating antigen were identified by ultraviolet scanning (UV) and matrix-assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS). BALB/c mice were immunized with azure C-BSA as immunogen at a dose of 0.2 mg for one mouse, and then the titer, sensitivity and specificity of the obtained polyclonal antibody were detected. Results showed that the artificial antigen of azure C-BSA and azure C-OVA was synthesized successfully, with the coupling ratio of the prepared artificial antigen azure C-BSA and azure C-OVA was about 31:1 and 52:1, respectively. The titer of polyclonal antibody obtained from mouse was above 16 000, and the NO.2 mice had the highest antibody titer with the half inhibitory concentration (IC_{50}) of $43.9 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$. The antibody cross reacted with the methylene blue metabolites azure A, azure B and azure C, and the cross reaction rates were 127.6%, 84.7% and 138.1%, respectively. There was no cross reaction with other common dyes, indicating that the antibody was of good specificity. This experiment successfully synthesized methylene blue artificial antigen and obtained mouse-derived polyantiserum with good immunological properties, which laid the foundation for the preparation of monoclonal antibody and the development of rapid immunological detection method.

Keywords: methylene blue; hapten; conjugation; polyclonal antibody