

# 3种抗糖皮质激素抗体的制备、纯化与鉴定

边爱, 刘丽强, 袁媛, 胡拥明, 陈伟, 彭池方, 胥传来\*

(江南大学食品学院, 江苏 无锡 214122)

**摘要:** 采用活性酯法合成地塞米松(DEX)、倍他米松(BET)、双氟米松(FLM)3种免疫原和包被原, 用免疫原分别免疫2只新西兰大白兔, 5次免疫后进行采血获得抗血清。用盐析与DEAE-纤维素离子交换联用的方法纯化抗血清, 再用间接酶联免疫法测定抗血清的效价, 其中较好的抗血清效价分别高达345600、614400、307200, 具有较好的亲和性, 可以满足抗原抗体反应的动力学要求。

**关键词:** 糖皮质激素; 抗体; 制备; 纯化; 鉴定

## Preparation, Purification and Certification of Antibody to Corticosteroids

BIAN Ai, LIU Li-qiang, YUAN Yuan, HU Yong-ming, CHEN Wei, PENG Chi-fang, XU Chuan-lai\*

(School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

**Abstract:** Three immunogens and coating-antigens were prepared by conjugating derived dexamethasone, betamethasone and flumethasone with bovine serum albumin, ovalbumin respectively. Each immunogen was applied to immunize two New Zealand rabbits to obtain anti-serums. After five immunization, the antiserum was collected from the blood, and purified by salt fraction combined with DEAE. The indirect ELISA was adopted to determine the efficiency of the purified antiserum. Among all the antiserum samples, the better efficiency of the antiserum could be as high as 345600, 614400 and 307200 respectively, which had sufficient affinity to meet the requirements of antigen-antibody reaction kinetics.

**Key words:** gentamycin; antibody; preparation; purification; identification

中图分类号: R446.61

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2009)23-0266-04

酶联免疫检测方法中抗体是不可或缺的基本试剂, 获得高亲和力的抗体是酶联免疫检测的关键。抗体的优劣直接影响ELISA方法的灵敏度、特异性等<sup>[1-9]</sup>。合成类糖皮质激素属于畜产品常用的药物, 它常被用于治疗家畜的炎症反应、免疫性疾病、牛的酮病等, 但由于能增加家畜的饲料摄入量从而达到增重的目的, 抗糖皮质激素目前普遍被非法滥用。本实验以地塞米松(DEX)、倍他米松(BET)、双氟米松(FLM)为研究对象, 制备相应的人工抗原, 免疫新西兰大白兔, 通过白兔的机体反应产生对应的抗体, 然后通过间接ELISA方法对获得的血清进行纯化, 并测定其效价。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

弗氏完全佐剂和不完全佐剂 Sigma公司; 辣根过氧化物酶标记的羊抗兔IgG(HRP-IgG) 康成生物工程公

司; 四甲基联苯胺(TMB) 华美生物工程公司; Tween-20 浙江龙游县化工试剂厂; DEAE纤维素 北京拜尔迪生物公司。

### 1.2 仪器与设备

Multiskan Mks酶标仪、可调试移液器 Thermo Labsystems公司; DHG-9070A型电热恒温鼓风干燥箱 上海精宏实验设备有限公司; H.S.G电热恒温水浴锅 上海仪表集团供销公司; WH-2微型旋涡混合仪 上海沪西分析仪器厂; TGL-40B台式低速离心机 上海安亭科学仪器厂; ZD-9556水平摇床 太仓科教器材厂; Costar96孔8×12可拆酶标板 上海吉泰生物科技有限公司; HY-4型调速多用振荡器 江苏省金坛市荣华仪器制造有限公司。

### 1.3 方法

#### 1.3.1 半抗原的制备

称取0.32g DEX和0.24g丁二酸酐于50ml SA圆底烧

收稿日期: 2009-07-08

作者简介: 边爱(1983—), 女, 硕士研究生, 研究方向为动物源食品残留物检测。E-mail: bianwenai3348@126.com

\*通讯作者: 胥传来(1965—), 男, 教授, 博士, 研究方向为食品安全。E-mail: xcl@jiangnan.edu.cn

瓶中, 加入 5ml 无水吡啶, 混合物在 60℃ 下加热搅拌 6h, 将反应物转入含 10% HCl(V/V)的冰水(4℃)中, 有白色沉淀析出, 离心出去吡啶及过量的 SA, 去离子水洗涤数次, 离心, 干燥箱干燥后保存<sup>[10]</sup>。同法制备 BET 和 FLM 的半抗原。

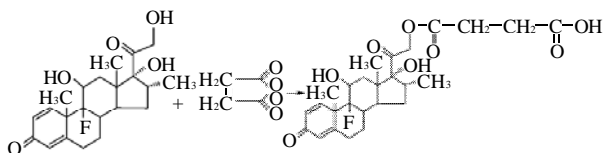


图1 DEX 半抗原合成路线图

Fig.1 Schematic diagram of production of antibody to DEX

### 1.3.2 免疫原的制备(活性酯法)

取半抗原 44.31mg, NHS 10.35mg, DCC 20.4mg 溶解于 1.8ml 的二氧六环中, 室温下搅拌过夜, 离心后弃沉淀, 清液为活性酯中间体, 为 A 液; 将 120.6mg 的 BSA 溶解于 9ml 的 PBS(0.1mol/L, pH8.0)中, 为 B 液; 将 A 液逐滴滴入 B 液中, 溶液维持在 4℃, 所有的 A 液加入后, 继续搅拌 1h 恢复至室温; 透析: 透析袋前处理: 取 10cm 的透析袋, 于沸水中煮沸 10min, 再用 60℃ 的去离子水冲洗 3min, 保存在 4℃ 去离子水中备用。将上述反应液转移到透析带中, 用水透析 3d, 每天换水两次; 离心后取上清液, 4℃ 冷藏待用。

在上述步骤中, 将 BSA 换成 OVA, 即可得到相应的包被抗原<sup>[11]</sup>。

### 1.3.3 抗血清的制备

#### 1.3.3.1 油包水抗原乳化剂的制备

佐剂有助于促进免疫反应, 也能起到保护不稳定抗原的作用, 使抗原在体内的吸收期延长, 这就可减少加强注射的次数, 在弗氏不完全佐剂中加入杀死的分枝杆菌或卡介苗就制成弗氏完全佐剂, 分枝杆菌能增强局部淋巴结的反应, 扩大免疫原性, 从而促进了最终高亲和力抗体的形成, 故首次可以用完全佐剂, 以后几次选用不完全佐剂。

方法: 用弗氏完全佐剂或弗氏不完全佐剂 1.5ml 混合 1.5ml 的 2mg/ml 的免疫原, 用注射器混合, 将混合好的乳化剂滴入盛有冷水的烧杯中, 若一滴乳化剂状态完整的停留在水面上, 而不扩散, 表明形成稳定的油包水抗原乳化剂。

#### 1.3.3.2 免疫新西兰大白兔<sup>[12-14]</sup>

取 2 月龄的健康雄性新西兰大白兔 6 只, 免疫前观察一周, 编号并分别采血制备阴性血清, 其中 DEX 抗原免疫的兔子编号为 1 和 7, BET 抗原免疫的兔子编号为 2 和 13, FLM 抗原免疫的兔子编号为 10 和 11, 先将新西兰大白兔背部的毛小心剪去, 然后取 600μl 制备好

的油包水抗原乳化剂, 用微量注射器多位点进行皮下注射, 一只动物背部两侧注射总数约为 14~16 点, 使抗原能缓慢扩散, 每隔 2 周免疫一次, 观察注射点是否红肿, 如果糜烂可用紫药水收干。在免疫 3~4 次后, 从兔子的耳缘静脉抽血约 1ml, 离心 10min 后, 得血清可进行效价鉴定, 共进行 4 次免疫(表 1), 在末次免疫 5d 后采用心脏采血法取血<sup>[15]</sup>。

表1 兔子免疫程序

Table 1 Immunoassay procedure of rabbit

免疫次数	免疫物质	免疫剂量	免疫方法
一次免疫	免疫原 + 完全弗氏佐剂	1ml/ 只	颈背部皮下多点注射
二次免疫	免疫原 + 不完全弗氏佐剂	1ml/ 只	肌肉注射
三次免疫	免疫原 + 不完全弗氏佐剂	1ml/ 只	肌肉注射
四次免疫	免疫原 + 不完全弗氏佐剂	1ml/ 只	肌肉注射
五次免疫	免疫原	1ml/ 只	肌肉注射

#### 1.3.3.3 抗血清的分离与保存

塑料离心管倾斜 50℃ 于室温下静置 4h, 待血液凝固后, 冰箱 4℃ 中过夜, 血清自然析出。将血清吸出后, 3000r/min 离心 15min, 取上清液, 与前面吸出的血清混在一起。加入 0.01% 硫柳汞钠和 50% 甘油, 分装, 于 -20℃ 保存备用。

#### 1.3.4 抗血清的纯化

盐析: 取抗血清 100ml, 加入等量生理盐水, 摇匀后, 缓慢加入饱和硫酸铵溶液 200ml, 边加边摇匀, 充分混合后置 4℃ 冰箱内半小时以上。取出后 5000r/min 离心 20min。弃去上清液, 加入生理盐水 100ml, 溶解沉淀物后, 加入 50ml 饱和硫酸铵, 使硫酸铵的饱和度达 33%, 边加边摇匀, 充分混匀, 置 4℃ 冰箱内 40min。取出后离心, 以 33% 饱和度的硫酸铵溶液洗涤沉淀两次。

脱盐: 将离心后的上清液弃去, 用少量生理盐水将沉淀物溶解, 使其达到原血清量的 1/4 左右, 装入透析袋中。以 0.0175mol/L pH7.4 磷酸盐缓冲液, 4℃ 冰箱中透析 3d, 每天换液数次, 每次 2000ml。此时为粗提的 IgG。

DEAE-纤维素离子交换纯化: 取湿重 5g 的 DEAE-纤维素, 将 2ml 初提的 IgG 与之混合均匀, 4℃ 条件下放置 2h(每隔 20min 搅拌一次)后, 4000r/min 离心 15min, 取上清液, 即为纯化的抗体<sup>[16]</sup>。

#### 1.3.5 抗血清的鉴定

采用间接 ELISA 方法, 方阵滴定法确定包被抗原和抗体的最适工作浓度, 在最佳工作浓度下测定抗 DEX (BET、FLM) 抗体血清的效价及其亲和常数, HRP 标记的羊抗兔 IgG 选用推荐浓度 1:3000。

将合成好的包被原,用包被缓冲液作系列稀释后包被 96 孔酶标板,100  $\mu$ l/孔,于 4℃ 冰箱过夜。次日取出酶标板回至室温,每孔注入 200  $\mu$ l PBST 溶液,摇床上振荡 3min,用力甩掉洗涤液,在吸水纸上拍干,继续洗涤 3 次。以下洗涤方法相同。

充分洗涤后,用封闭缓冲液封闭酶标板,200  $\mu$ l/孔,于 37℃ 温育箱内温育 2h 后取出烘干待用;将阳性血清系列稀释系列梯度,对应加入到酶标板 7 行,第 8 行加入阴性血清,100  $\mu$ l/孔,37℃ 孵育 30min 后洗涤、拍干;每孔加入 100  $\mu$ l,1:3000 稀释的 HRP 标记的羊抗兔 IgG,37℃ 孵育 30min 后洗涤、拍干;每孔加入 100  $\mu$ l 显色液(TMB 与底物液比例为 1:5),暗处 37℃ 反应 30min,取出后每孔加入 100  $\mu$ l 终止液(2mol/L 的硫酸),用酶标仪测定吸光度( $A_{450nm}$ )。

阳性血清的  $A_{450nm}$  值在 1.5 左右,同时与阴性血清的  $A_{450nm}$  差距最大的抗原包被浓度、抗体稀释度为最佳工作浓度。

阳性血清的  $A_{450nm} \geq$  阴性对照孔的 2.1 倍并且  $A_{450nm}$  大于 0.1,此时血清的稀释倍数即为血清的效价。

## 2 结果与分析

### 2.1 抗 DEX 抗体的效价

将纯化后的 2 只兔子的抗血清分别做间接 ELISA 实验:将 DEX-OVA 做包被原,用包被缓冲液系列稀释成 1:800、1:2400、1:7200、1:21600,抗 DEX 的血清系列稀释成 1:600、1:1800、1:3600、1:7200、1:14400、1:28800、1:57600 和 1:115200、1:345600、1:1036800,对应加入到酶标板的前 9 行,第 10 行加入阴性血清,11 行加入抗体稀释液做空白实验。确定包被抗原和抗体工作浓度,同时测定抗 DEX 抗体效价,结果见表 2。

表 2 兔抗 DEX 血清效价的测定  
Table 2 Determination of the rabbit's DEX antiserum titre

血清稀释倍数	包被原稀释倍数							
	1 号兔				7 号兔			
	800	2400	7200	21600	800	2400	7200	21600
600	2.877	2.792	2.796	2.709	2.743	2.789	2.629	2.586
1800	2.682	2.627	2.572	2.472	2.674	2.609	2.523	2.441
3600	2.762	2.592	2.501	2.508	2.608	2.644	2.465	2.373
7200	2.698	2.560	2.411	2.316	2.577	2.541	2.347	2.221
14400	2.610	2.418	2.315	2.274	2.512	2.397	2.224	1.906
28800	2.338	2.182	2.143	2.068	2.402	2.207	1.96	1.661
115200	1.521	1.314	1.245	1.052	1.666	1.342	1.189	0.801
345600	0.577	0.552	0.526	0.434	0.825	0.71	0.489	0.351
1036800	0.307	0.236	0.260	0.193	0.351	0.277	0.197	0.167
N2000	0.182	0.146	0.142	0.136	0.257	0.205	0.194	0.179
空白	0.167	0.117	0.084	0.071	0.081	0.09	0.087	0.088

由表 2 可知,1 号、7 号兔子的抗血清效价分别为

345600、115200,1 号兔子的效价高于 7 号。

### 2.2 抗 BET 抗体的效价

将纯化后的 2 只兔子的抗血清分别做间接 ELISA 实验:将 BET-OVA 做包被原,用包被缓冲液系列稀释成 1:400、1:1600、1:3200、1:6400、1:25600、1:102400,抗 BET 的血清系列稀释成 1:2400、1:9600、1:38400、1:153600、1:307200、1:614400 和 1:2457600,对应加入到酶标板的前 7 行,第 8 行加入阴性血清。确定包被抗原和抗体工作浓度,同时测定抗 BET 抗体效价,结果见表 3。

表 3 兔抗 BET 血清效价的测定  
Table 3 Determination of the rabbit's anti-BET serum titre

血清稀释倍数	包被原稀释倍数											
	2 号兔						13 号兔					
	400	1600	3200	6400	25600	102400	400	1600	3200	6400	25600	102400
2400	2.686	2.686	2.576	2.589	2.425	1.884	2.57	2.564	2.576	2.453	2.238	1.234
9600	2.646	2.596	2.515	2.452	2.067	0.833	2.424	2.415	2.312	2.032	1.519	0.503
38400	2.486	2.239	2.182	1.588	0.743	0.219	1.562	1.743	1.513	1.156	0.553	0.192
153600	1.989	1.748	1.467	0.901	0.307	0.116	0.89	0.752	0.526	0.41	0.196	0.098
307200	1.611	1.359	0.924	0.551	0.192	0.09	0.494	0.436	0.34	0.262	0.129	0.081
614400	1.054	0.802	0.547	0.326	0.133	0.071	0.298	0.251	0.192	0.159	0.091	0.066
2457600	0.368	0.275	0.198	0.14	0.078	0.061	0.136	0.122	0.1	0.08	0.064	0.062
N2000	0.314	0.221	0.123	0.088	0.071	0.068	0.09	0.082	0.078	0.075	0.072	0.068

由表 3 可知,2 号、13 号兔子的抗血清效价分别为 614400、307200,2 号兔子的效价高于 13 号。

### 2.3 抗 FLM 抗体的效价

将纯化后的 2 只兔子的抗血清分别做间接 ELISA 实验:将 FLM-OVA 做包被原,用包被缓冲液系列稀释成 1:400、1:1600、1:3200、1:6400、1:25600、1:102400,抗 FLM 的血清系列稀释成 1:2400、1:9600、1:38400、1:153600、1:307200、1:614400 和 1:2457600,对应加入到酶标板的前 7 行,第 8 行加入阴性血清。确定包被抗原和抗体工作浓度,同时测定抗 FLM 抗体效价,结果见表 4。

表 4 FLM 兔抗血清效价的测定  
Table 4 Determination of the rabbit anti-FLM serum titre

血清稀释倍数	包被原稀释倍数											
	10 号兔						11 号兔					
	400	1600	3200	6400	25600	102400	400	1600	3200	6400	25600	102400
2400	2.627	2.508	2.33	1.833	0.786	0.304	2.73	2.693	2.577	2.544	2.106	1.2
9600	2.152	1.839	1.191	0.703	0.235	0.116	2.501	2.479	2.289	1.798	0.985	0.525
38400	1.039	0.587	0.386	0.218	0.104	0.074	2.047	1.636	1.176	0.782	0.319	0.194
153600	0.348	0.237	0.15	0.105	0.073	0.064	0.809	0.596	0.388	0.239	0.129	0.092
307200	0.233	0.162	0.102	0.079	0.064	0.06	0.387	0.288	0.175	0.12	0.082	0.07
614400	0.146	0.125	0.086	0.074	0.063	0.059	0.248	0.189	0.14	0.102	0.07	0.065
2457600	0.119	0.091	0.074	0.068	0.061	0.06	0.121	0.108	0.086	0.073	0.065	0.062
N2000	0.101	0.096	0.086	0.082	0.073	0.075	0.112	0.108	0.083	0.074	0.069	0.07

由表4可知,10号、11号兔子的抗血清效价分别为38400、307200,11号兔子的效价优于10号。

### 3 结 论

采用DEX-BSA、BET-BSA、FLM-BSA同时免疫6只兔子,5次免疫后进行采血获得抗血清。用饱和硫酸铵盐析与DEAE-纤维素离子交换联用的方法进行纯化,再用间接酶联免疫法测定纯化后抗血清的效价。DEX抗血清效价分别为345600、115200;BET抗血清效价分别为614400、307200;FLM抗血清效价分别为38400、307200,具有较好的亲和性,可以满足抗原抗体反应的动力学要求。

#### 参考文献:

- [1] STOLKER A A M, BRINKMAN U A T. Analytical strategies for residue analysis of veterinary drugs and growth-promoting agents in food producing animals: a review[J]. *Journal of Chromatography A*, 2005, 1067: 15-53.
- [2] LO E S, HUTTINOT G, FEIN M, et al. Direct radioimmunoassay procedure for plasma dexamethasone with a sensitivity at the pocogram level[J]. *J Pharm Sci*, 1989, 8: 1040-1044.
- [3] SHIBATA T, HASEGAWA R, MOCHIDA K, et al. Studies on the enzyme immunoassay of dexamethasone[J]. 1983, 103(10): 1054-1059.
- [4] ROBERTS C J, JACKSON L S. Development of an ELISA using a universal method of enzyme-labeling drug-specific antibodies.I: Detection of dexamethasone in equine urine[J]. *Journal of Immunological Methods*, 1995, 181: 157-166.
- [5] MEYER H, DURSCH H D. Dexamethasone: an enzyme immunoassay for residue analysis and pharmacokinetics[J]. *Arch Lebensmittelhyg*, 1996, 47: 22-24.
- [6] HIDALGO O H, LOPEZ M J, CARAZO E A, et al. Determination of dexamethasone in urine by gas chromatography with negative chemical ionization mass spectrometry[J]. *Journal of Chromatography B*, 2003, 788: 137-146.
- [7] IQBAL Z, MIDGELY J M, WATSON D G. The quantification of endogenous steroids in bovine aqueous humour and vitreous humour using isotope dilution GC-NCI-MS[J]. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2001, 24: 535-543.
- [8] RIVERO-MARABE J J, MAYNAR-MARINO J I. Determination of natural corticosteroids in urine samples from sportsmen[J]. *Journal of Chromatography B*, 2001, 761: 77-84.
- [9] ANTIGNAC J, BIZEC B L, MONTEAU F, et al. Validation of analytical methods based on mass spectrometric detection according to the "2002/657/EC" European decision: guideline and application[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2003, 483: 325-334.
- [10] HICHENS M, HOGANS A F. Radioimmunoassay for dexamethasone in plasma[J]. *Clin Chem*, 1974, 20(2): 266-271.
- [11] NISHIGUCHI Y, KOBAYASHI Y. Enzyme immunoassay for serum dexamethasone using 4-(carboxymethylthio) dexamethasone as a new hapten[J]. *Steroids*, 1992, 57: 178-181.
- [12] HAUWE O V D, DUMOULIN F, ELLIOTT C, et al. Detection of synthetic glucocorticoid residues in cattle tissue and hair samples after a single dose administration using LC-MS/MS[J]. *Journal of Chromatography B*, 2005, 817: 215-223.
- [13] TOUBER M E, van ENGELEN M C, GEORGAKOPOULOS C, et al. Multi-detection of corticosteroids in sports doping and veterinary control using high-resolution liquid chromatography/time-of-flight mass spectrometry[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2007, 586: 137-146.
- [14] ANTIGNAC J P, LE BIZEC B, MONTEAU F, et al. Multi-residue extraction -purification procedure for corticosteroids in biological samples for efficient control of their misuse in livestock production[J]. *J Chromatogr*, 2001, 757: 11-19.
- [15] 董志伟,王琰. 抗体工程[M]. 北京: 北京医科大学出版社, 2002.
- [16] 沈关心,周汝麟. 现代免疫学实验技术[M]. 武汉: 湖北科学技术出版社, 2002.