

庆大霉素酶联免疫检测法研究

马 伟, 汪宝欢, 李 娟, 胥传来*

(江南大学食品学院, 江苏 无锡 214122)

摘 要: 本实验采用戊二醛方法合成庆大霉素的免疫原, 利用凝胶电泳对免疫原进行鉴定。使用该免疫原免疫兔子, 得到抗血清测出效价高于 512000, 对抗血清进行纯化测出检测限达 0.1ng/ml, 建立庆大霉素的免疫检测方法。

关键词: 庆大霉素, 抗体, 免疫检测

Development of Enzyme-linked Immunoassay for Detection of Gentamicin

MA Wei, WANG Bao-huan, LI Juan, XU Chuan-lai*

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

Abstract: An immunogen, gentamicin-bovine serum albumin (BSA), was prepared by glutaraldehyde coupling method, and was identified by SDS-PAGE. New Zealand white rabbit was immunized with this immunogen three times. After immunization the antiserum with the titer of higher than 512000 was obtained. After purified by salting-out with ammonium sulfate, the obtained anti-gentamicin antibody was used to develop an indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for detection of gentamicin, with the detection limit of 0.1 ng/ml.

Key words: gentamicin; antibody; immunoassay

中图分类号: R155.5

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2009)10-0242-03

庆大霉素又名艮他霉素, 正泰霉素等, 是由小单孢菌(*Micromonospora purpurea*)产生的一种多成分抗生素, 作用特点是对变形杆菌、绿脓杆菌和耐青霉素金黄色葡萄球菌都具抑制作用。庆大霉素生产实践中应用较多。主要用于上述敏感菌的感染如呼吸道感染、败血症、肠道感染、肺炎、软组织感染、胆道感染等。毒副作用主要为耳毒性及肾毒性, 故庆大霉素的超量添加, 不安停药期规定添加等。非法使用会给食品安全带来严重的影响^[1]。因此需要快速、简便的检测方法。

免疫检测方法因其有简单, 低廉, 灵敏等特点而成为一种非常有优势的方法, 为食品安全提供有力的保障。本实验用戊二醛方法耦联庆大霉素与牛血清蛋白(BSA)作为免疫原, 免疫新西兰大白兔, 拟提取抗血清并纯化, 以期建立庆大霉素酶联免疫检测方法。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

硫酸庆大霉素 北京拜尔迪生物技术有限公司; 牛血清白蛋白、卵清白蛋白 上海伯奥生物科技有限公司;

司; 戊二醛 国药集团化学试剂有限公司; 水溶性碳二亚胺盐酸盐(EDCHCl) 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; 聚苯乙烯酶标板 上海吉泰生物科技有限公司; 其他常用试剂均为分析纯。

1.2 仪器与设备

凝胶电泳仪 Thermo 公司; 电子天平 AB104-N 上海梅特勒-托利多公司; 酶标仪、可调移液器 Thermo Labsystems 公司; 电热恒温鼓风干燥箱 上海跃进医疗器械厂; SZ-97 自动三重纯水蒸馏器 上海亚荣生化仪器厂; 磁力搅拌器 德国 IKA 公司; 台式离心机 上海安亭科学仪器厂。

1.3 方法

1.3.1 免疫原的合成与鉴定

称取 40mg 庆大霉素溶于 5ml PBS 溶液(0.01mol/L, pH7.4), 充分溶解后, 逐滴加入 1% 戊二醛 1ml, 室温搅拌反应 20min, 然后称取约 25mg BSA 溶于 4ml 上述 PBS 溶液后逐滴加入上述庆大霉素与戊二醛反应液, 室温搅拌反应 20min, 加入 20mg 硼氢化钠, 后置 4℃ 孵育 3h, 透析。

收稿日期: 2008-10-30

作者简介: 马伟(1984-), 男, 硕士研究生, 研究方向为食品安全。E-mail: mawei209@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

免疫原的鉴定用凝胶电泳法(SDS-PAGE), 分离胶 10%、压缩胶 5%、电压 100V、电流 20mA、电泳时间 1.5h; 固定液为 12.5% 的三氯乙酸溶液, 固定 30min; 含 0.1% 考马斯亮蓝 G250 的固定液染色 1h。超低分子量标准蛋白分子量分别为: 兔肌球蛋白 200000D、钙调蛋白 130000D、兔磷酸化酶 B97400D、牛血清蛋白 66200D、兔肌动蛋白 43000D。

1.3.2 包被原的合成^[2]

称取 30mg 庆大霉素和 20mg 卵清白蛋白溶于 PBS 溶液(0.01mol/L, pH7.4)搅拌均匀, 称 75mg EDC·HCl 加入到上述混合液中, 搅拌反应 4h, 透析。

1.3.3 动物免疫及血清提取纯化

1.3.3.1 免疫动物及采血

免疫 2 只两月龄、体重 1.5~2kg 的健康新西兰大白兔, 免疫前一周耳源静脉采血作阴性对照。初次免疫用等量福氏完全佐剂乳化后于兔子背部多点注射, 1mg 免疫原/只。加强免疫用福氏不完全佐剂乳化, 于肌肉注射, 两周加强免疫一次, 剂量与初次免疫相同。第三次免疫开始后每次免疫第 10d 耳缘静脉采血^[3]。

1.3.3.2 抗血清处理及纯化

采取的抗血清先室温静置 3h 左右, 待血液凝固后, 置冰箱 4℃ 中过夜, 3000r/min 离心 15min, 取上清。

抗血清的纯化用饱和硫酸铵盐析法, 取抗血清 1ml, 加入 1ml 生理盐水, 摇匀后, 缓慢加入饱和硫酸铵溶液 2ml, 逐滴加入并摇匀, 充分混匀后, 静置 4℃ 冰箱内 1h。取出离心, 5000r/min 离心 20min。弃上清, 加入生理盐水 2ml, 溶解沉淀物后, 加入 1ml 饱和硫酸铵, 逐滴加入并摇匀, 混匀后, 置 4℃ 冰箱内 40h。取出后离心, 重复第二次沉淀一次, 用生理盐水溶解沉淀物, 装入透析袋中。以 0.01mol/L pH7.4 磷酸盐缓冲液, 4℃ 冰箱中透析 3d, 即得纯化抗体^[4]。

1.3.4 庆大霉素间接 ELISA 方法

影响 ELISA 的因素很多, 每一个参数的改变都会引起结果的不用, 一般比较重要的参数有包板方式、竞争时间、溶液系统的 pH 值等, 本实验操作步骤如下^[5]。

包板: 包被原 1:5000 稀释加到酶标板中, 每孔 100 μl, 将酶标板置 4℃ 包被过夜, 次日取出酶标板放至室温, 每孔注入 200 μl 洗涤液, 摇床上振荡 3min, 用力甩掉洗涤液, 在吸水纸上拍干。重复上述洗涤 2 次。以下洗涤方法相同。

封闭: 用 0.1% 明胶封闭, 每孔 200 μl, 放入 37℃ 温箱中 2h, 洗涤, 拍干。

加抗体: 将 50 μl 标准品溶液加到各孔中, 再加入 50 μl 的 1:16000 稀释的纯化后抗体, 37℃ 温箱中孵育 45min, 洗涤, 拍干。

加酶: 加入 1:4000 稀释的辣根过氧化物酶标记的羊抗兔二抗, 每孔 100 μl, 37℃ 温箱中孵育 1h, 洗涤, 拍干。

显色: 每孔依次加显色液 100 μl(TMB 与底物液比例为 1:5), 37℃ 暗处反应 15min 后加终止液, 每孔 100 μl。用酶标仪测定光密度值 OD_{450nm}。

1.3.5 绘制标准曲线

以无庆大霉素抑制时的 OD 值为 B₀ 值, 不同浓度庆大霉素抑制时的 OD 值为 B 值, 以抑制率 B/B₀ 为纵坐标, 以不同庆大霉素浓度的对数为横坐标, 绘制标准曲线。

1.3.6 交叉反应测定

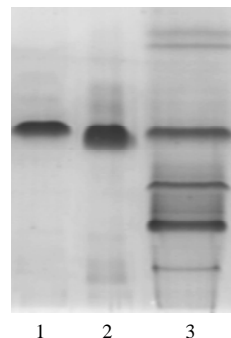
交叉反应测定时, 包板是用所测药物对应的包被原, 封闭后加入系列稀释的所测药物标准品。其他步骤同庆大霉素间接酶联免疫步骤。并用以下公式计算交叉反应率:

$$\text{交叉反应率 CR(\%)} = \frac{\text{庆大霉素 IC}_{50} \times 100}{\text{结构类似物的 IC}_{50}}$$

2 结果与分析

2.1 免疫原的鉴定

将 BSA、免疫原、低分子量标准蛋白 marker 进行 SDS-PAGE 电泳, 用 5% 的压缩胶, 10% 的分离胶。由图 1 看出免疫原的电泳迁移率比 BSA 要小, 而在 SDS-PAGE 中, 样品的迁移率仅与其分子量大小相关, 而与其他条件无关, 故可以看出免疫原的分子量大于 BSA, 利用凝胶成像软件对标准蛋白做出标准曲线(图 2), 利用免疫原及 BSA 的迁移率的大小代入标准曲线, 得到免疫原的分子量比 BSA 增加 4216, 考虑到连接臂的引入, 利用公式 $r = (M_{p1} - M_{p2}) / (M_{g1} + M_{g2})$ [r 为偶联比; M_{p1} 为免疫原的分子量; M_{p2} 为载体蛋白的分子量; M_{g1} 为庆大霉素分子量; M_{g2} 为(间隔臂)戊二醛的分子量] 算出偶联比为 7.74, 说明免疫原的合成是成功的, 完全适合免疫。



1. BSA; 2. 免疫原; 3. 标准蛋白

图 1 免疫原电泳图

Fig.1 SDS-PAGE pattern of gentamicin-BSA

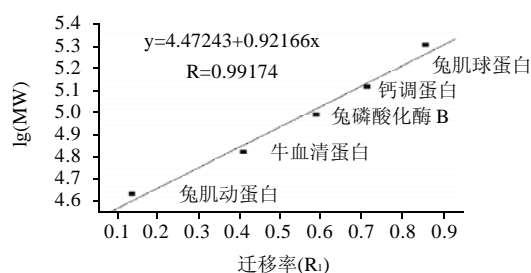
图2 标准蛋白 lg(MW)-R_f 图

Fig.2 Standard curve of low molecular weight protein marker

2.2 血清的效价

当阳性血清的 $OD_{450nm} \geq$ 阴性对照孔的 2.1 倍并且 OD_{450nm} 大于 0.2 时, 此时血清的稀释倍数即为血清的效价。本实验五次免疫反应得到的抗血清的效价达到 512000。从而说明了所得抗体的高亲和性。

2.3 庆大霉素标准曲线

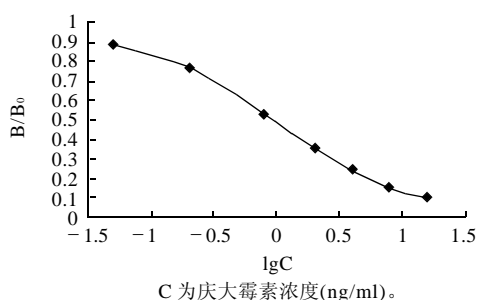


图3 庆大霉素标准曲线

Fig.3 Standard curve of gentamicin

图3是优化后的庆大霉素标准曲线, 该曲线可以得到的庆大霉素的检测限是 0.1ng/ml, IC_{50} 是 0.95ng/ml, 充分说明了所获得抗体的灵敏性。

2.4 交叉反应

本实验考察了该抗体与其他药物的交叉反应率, 以庆大霉素的交叉反应率为 100%, 新霉素、卡那霉素、链霉素的交叉反应均小于 0.1%, 从而说明了本实验所得到的庆大霉素抗体的特异性。

表1 交叉反应率的测定

Table 1 Cross-reactivity of obtained anti-gentamicin antibody with other antibiotics

药物	庆大霉素	卡那霉素	链霉素	新霉素
交叉反应率(%)	100	<0.1	<0.1	<0.1

3 讨论

一般待测物有可供耦联用的功能基团时, 可以直接进行耦联, 庆大霉素药物有多个氨基, 可以选用不同的方法进行耦联。本实验设计戊二醛法耦联庆大霉素与

BSA, 做免疫原, 引入了间隔臂, 以期产生较好的免疫应答, 结果得到了特异性、灵敏性的抗体。说明了药物与载体蛋白耦联后能最大程度的能突出药物的特征结构, 特别是立体结构。有助于加强生物机体的免疫系统对载体远端的抗原决定簇的识别, 有助于产生好的抗体。所以在免疫原的设计中, 有间隔臂的免疫原合成方法应是首选方法^[6-9]。

本实验用 SDS-PAGE 电泳方法鉴定免疫原, 利用凝胶成像系统计算分子量从而算出耦联比, 方法直观可靠, 比通常的紫外法鉴定准确, 为耦联特别是没有紫外吸收的药物耦联提供了一种可靠的方法。后面抗体制备的成功也说明了这种鉴定免疫原方法的可靠性。

在抗体生产中, 免疫动物一般可产生分别针对载体蛋白、间隔臂以及半抗原三种抗体。本实验中采用两种不同的耦联方法耦联免疫原和包被原, 免疫原中药物与载体蛋白的结合基团是氨基、有五碳长的间隔臂, 包被原中药物与载体蛋白的结合基团是羧基、无间隔臂, 使包被原和免疫原存在结构差异。从本实验测定的灵敏性、特异性结果说明了免疫原包被原异源性的重要性。

因此在免疫原设计中, 既要考虑突出药物分子中的抗原决定簇, 又要注重免疫原、包被原异源性。尽量在免疫原、包被原的合成中, 药物与载体蛋白的结合位点、间隔臂长度或半抗原结构上存在的差异, 以期提高多克隆抗体间接竞争 ELISA 的检测灵敏度、特异性。

参考文献:

- [1] 徐立松, 徐秋琴. 药理学[M]. 杭州: 浙江科学技术出版社, 2004.
- [2] HASSNOOT W, STOUTEN P, CAZEMIER G, et al. Immunochemical detection of aminoglycosides in milk and kidney[J]. The Analyst, 1999, 124: 302-305.
- [3] CHEN Y Q, SHANG Y H, LI X M, et al. Development of an enzyme-linked immunoassay for the detection of gentamicin in swine tissues[J]. Food Chemistry, 2008, 108: 304-309.
- [4] 杨利国, 胡少昶, 魏平华, 等. 酶免疫测定技术[M]. 南京: 南京大学出版社, 1998.
- [5] 李金明. 临床酶免疫测定技术[M]. 北京: 人民军医出版社, 2005.
- [6] CHEN Y Q, SHANG Y H, WU X P, et al. Enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of neomycin in milk: effect of hant heterogeneity on assay sensitivity[J]. J Food and Agricultural Immunology, 2007, 18(2): 117-128.
- [7] LOOMANS E E M G, van WILTENBURG J, KOETS M, et al. Neamias immunogen for the development of a generic ELISA detecting gentamicin, kanamycin, and neomycin in milk[J]. J Agric Food Chem, 2003, 51: 587-593.
- [8] STRASSER A, USLEBER E, SCHNEIDER E, et al. Improved enzyme immunoassay for group-specific determination of penicillins in milk[J]. J Food and Agricultural Immunology, 2003, 15 (2): 135-143.
- [9] CLIQUET P, COX E, van DORPE, et al. Generation of class-selective monoclonal antibodies against the penicillin group[J]. J Agric Food Chem, 2001, 49: 3349-3355.