链霉素人工抗原及多克隆抗体的制备与鉴定

奚 茜[1]，李沐洁[1]，龚云飞[1]，陈宗伦[2]，方结红[1]，王唯芬[1]，张明洲[1,*]
(1.中国计量学院生命科学学院，浙江省生物计量与检验检疫技术重点实验室，浙江 杭州 310018；
2.杭州迪恩科技有限公司，浙江 杭州 310013)

摘 要：通过研究链霉素(SM)人工抗原的合成和多克隆抗体的制备，建立链霉素残留的免疫分析方法。以氧-缩甲基羟胺肟化链霉素的醛基，引入羧基，再用碳二亚胺法将半抗原与蛋白质载体连接，合成免疫原SM-cBSA。用戊二醛法合成包被原SM-OVA。用紫外扫描、SDS-PAGE分析偶联情况，计算得链霉素与cBSA、OVA的分子偶联比分别为7.6:1与17.7:1。经动物免疫获得效价为1:40000的链霉素多克隆抗体，采用间接竞争ELISA测定IC_{50}为3.32ng/mL，与双氢链霉素的交叉反应率为105.21%，与同类的其他药物均无交叉反应。

关键词：链霉素；人工抗原；多克隆抗体；间接ELISA法

Preparation and Identification of Streptomycin Artificial Antigen and Its Polyclonal Antibody

XI Xi[1]，LI Mu-jie[1]，GONG Yun-fei[1]，CHEN Zong-lun[2]，FANG Jie-hong[1]，WANG Wei-fen[1]，ZHANG Ming-zhou[1,*]
(1. Zhejiang Provincial Key Laboratory of Biometrology, Inspection and Quarantine, College of Life Science, China Jiliang University, Hangzhou 310018, China；2. Hangzhou DNA Scitech Co. Ltd., Hangzhou 310013, China)

Abstract：In order to develop an immunoassay for treptomycin (SM) residues, the synthesis of antigen and preparation of polyclonal antibody for SM were explored. In this study, immunogen SM-cBSA was synthesized by EDC after inserting carboxy group by *O*-carboxymethyl-hydroxylamine. Coating antigen SM-OVA was synthesized by glutaraldehyde. Both SM-cBSA and SM-OVA were identified with UV-visible spectroscopy and SDS-PAGE to reveal the successful coupling with a molar coupling ratio of 7.6:1 and 17.7:1, respectively. During animal immunization, the antibody titer and IC_{50} were detected by indirect ELISA and measured by competitive ELISA to be 1:40000 and 3.32 ng/mL, respectively. Meanwhile, the cross-reactivity of streptomycin polyclonal antibody with dihydrostreptomycin was 105.21%.

Key words：streptomycin；artificial antigen；polyclonal antibody；indirect ELISA
中图分类号：S859.84 文献标志码：A 文章编号：1002-6630(2013)05-0181-05

链霉素(strepomycin，SM)是一种氨基糖胺类抗生素，具有性质稳定、抗菌谱广、生产工艺简单、疗效好，尤其对结核分枝杆菌有强大抗菌作用，被广泛的应用于动物疾病的治疗和预防上。但链霉素具有严重的耳毒性和肾毒性，它在动物性食品中的残留已引起国内外的普遍关注[1-2]。澳大利亚、加拿大、德国、英国、美国、日本等国家和我国港台地区均开展了链霉素药物残留检测研究工作，并制定了相应的检测方法及残留限量[3]。2002年农业部公告235号《动物性食品中兽药最高残留限量》规定链霉素/双氢链霉素残留限量值：牛奶200ng/mL，肌肉组织、肝脏600ng/mL，肾脏1000ng/mL[4]。

目前，链霉素常用检测方法主要为高效液相色谱法(HPLC)[5-6]、色谱质谱串联(LC-MS)[7-10]和酶联免疫吸附分析法[11-13]。仪器分析法准确度高，但试样的预处理及测定操作繁琐，而且链霉素分子中没有紫外发光团和荧光团，在分析中需将它转变为具有紫外发光团或荧光的衍生物才能进行分析[14]。这些方法费用高，耗时耗力，不适于大量样品的快速分析。免疫学分析法具有灵敏、快速、特异、简便等优点，近年来在兽药、农药残留检测领域已被广泛应用。SM是小分子物质，没有免疫原性，需要先偶联到大分子载体，才能免疫动物，产生抗体。国内外也有一些链霉素人工抗原合成及抗体制备的报道，但本实验所获得的抗体特异性、效价具有较好的优势[15-18]。本实验利用SM上不同的化学基团，采用两种方法将SM偶联到载体蛋白cBSA和OVA上，为抗体的生产和链霉素残留的免疫学检测提供参考。

收稿日期：2011-12-17
基金项目：浙江省重点科技创新团队项目(2010R50028)；浙江省科技成果转化项目(2011E61018)；浙江省重大科技专项重点项目(2012C12013-3)
作者简介：奚茜(1986—)，女，硕士研究生，研究方向为食品安全快速检测技术。E-mail：jinhuijunxixi@163.com
*通信作者：张明洲(1970—)，男，教授，博士，研究方向为食品安全快速检测技术。E-mail：zmzcjlu@cjlu.edu.cn

1 材料与方法

1.1 试剂

链霉素(SM)、庆大霉素、卡那霉素、盐霉素、氨苄青霉素、磺胺嘧啶、磺胺二甲氧嘧啶、磺胺间甲氧嘧啶(纯度均≥99.0%)、牛血清白蛋白(BSA)、卵清白蛋白(OVA)、辣根过氧化物酶(HRP)、四甲基联苯胺(TMB) 美国Sigma公司；羊抗兔酶标二抗(goat anti rabbit-HRP) 北京博奥森生物技术有限公司；实验用水均为超纯水。其他化学试剂均为分析纯，购自上海生物工程技术有限公司。

洗液(PBST)为PBS含0.05%吐温-20；包被液(CBS)为0.1mol/L pH9.6的碳酸盐缓冲液；阻断ELISA的封闭液、稀释液为5%猪血清的PBST；终止液为2mol/L硫酸；pH9.6碳酸盐缓冲液(CBS)：1.7g Na_2CO_3，2.8g $NaHCO_3$定容于1000mL超纯水中，4℃冰箱保存；0.1mol/L MES缓冲液：101.6g溶于500mL超纯水中，调pH值至7.0。

1.2 仪器与设备

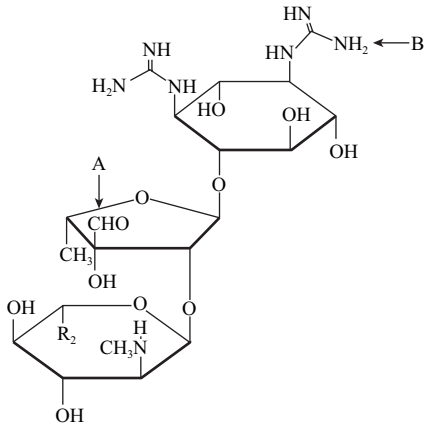
UV-2501PC紫外-可见分光光谱仪 日本Shimadzu公司；超纯水系统 美国Millipore公司；垂直电泳系统 美国Bio-Rad公司；酶标仪、凝胶成像分析系统、全自动蛋白层析系统、高速冷冻离心机、全自动灭菌锅 美国Thermo公司。

1.3 实验动物

新西兰雄性大白兔，兔龄2～3月，体质量约2kg。由杭州师范大学动物房提供。

1.4 方法

1.4.1 人工抗原的制备



A. 碳二亚胺法；B. 戊二醛法。

图1 链霉素化学结构及反应基团

Fig.1 Structure and reaction site of streptomycin

1.4.1.1 碳二亚胺(EDC)法

参照范国英等[18]的方法，对链霉素上带的醛基，用*O*-羧甲基羟胺进行肟化处理引入羧基，然后采用EDC法合成免疫原，并作如下改进：

1)阳离子牛血清白蛋白(cBSA)制备：将18mg(300μmol)乙二胺(EDA)慢慢滴入冰冷的20mL(0.01mol/L，pH7.4)PBS中，0～4℃搅拌，向改溶液中加入浓盐酸，调pH值至7.4；称取1g BSA(15μmol)和56mg(300μmol)EDA的溶液中，室温反应2h。反应后，反应液用玻沙漏斗抽滤，取上清液透析以除去多余的EDA。用PBS(0.01mol/L，pH7.4)0～4℃透析5d，每12h换透析液一次。将透析后的溶液冻干，得到白色絮状固体，－20℃保存备用。

2)EDC法偶联：称取145.7mg(含SM分子0.2mmol)硫酸链霉素和25.5mg(0.2mmol)羧甲基羟胺分别溶于500μL超纯水中，混匀后，用1mol/L碳酸钠缓冲液调pH值为8.0左右，室温磁力搅拌24h；将混合物置真空干燥箱，45℃干燥后用500μL MES缓冲液复溶，称取EDC 20.7mg(0.2mmol)溶于200μL 20%乙醇中，同时称取50mg cBSA溶于1mL MES缓冲液中，将这3种溶液混匀后，室温磁力搅拌24h。收集反应物，在4℃条件下用PBS(pH7.4)透析，透析后的反应液进一步用葡聚糖凝胶Sephadex G-25纯化，制得人工抗原SM-cBSA，冻干－20℃保存备用。合成路线见图2。同法合成SM-EDC-OVA。

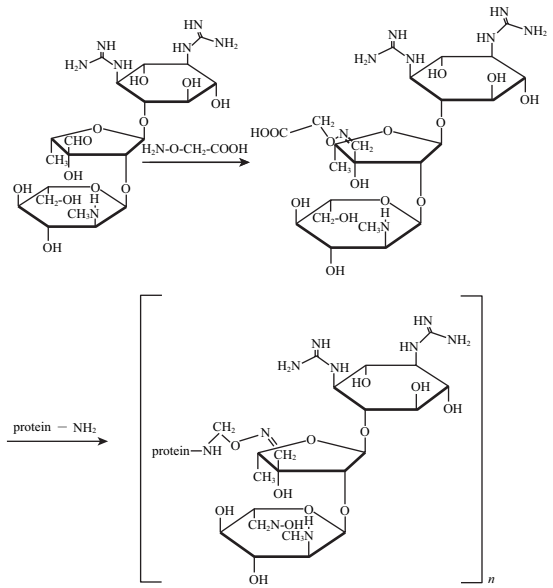


图2 EDC法合成路线

Fig.2 Synthetic pathway of EDC method

1.4.1.2 戊二醛(GA)法

参照Deborah等[19]的方法，用戊二醛法偶联，并作如下改进。具体步骤：

1)称取硫酸链霉素73mg(含SM 0.1mmol)溶于500μL PBS 缓冲液中，加入2500μL 1%的GA溶液，混匀，室温磁力搅拌6h，该反应液为A液；2)称取40mg OVA溶于0.05mol/L，pH9.6的CBS 2mL中，缓慢滴入A液中，pH值

保持在9.0左右，室温缓慢磁力搅拌4h；3)透析，制得人工抗原SM-OVA，冻干－20℃保存备用。合成路线见图3。同法合成SM-GA-cBSA。

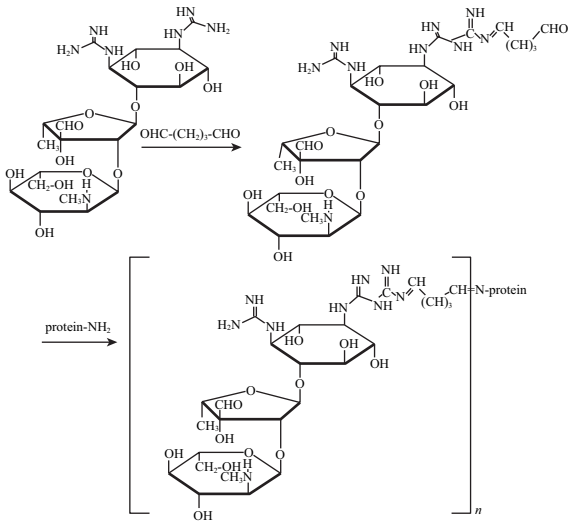


图3 GA法合成路线

Fig.3 Synthetic pathway of GA method

1.4.2 人工抗原的鉴定

1.4.2.1 紫外光谱扫描鉴定

采用紫外光谱扫描法对链霉素人工抗原进行鉴定，并测定偶联物中半抗原与载体蛋白的结合比，即偶联比。偶联比按式(1)估算。

$$偶联比=\frac{(A_{偶联物}-A_{蛋白质})\times\rho_{半抗原}\times M_{蛋白质}}{A_{半抗原}\times M_{半抗原}\times\rho_{蛋白质}} \quad (1)$$

式中：A为吸光度；M为相对分子质量；ρ为质量浓度/(mg/mL)。

1.4.2.2 聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)鉴定

采用5%浓缩胶，10%分离胶做SDS-PAGE。按照Bio-Rad SDS-PAGE凝胶电泳系统说明书提示制胶。

1.4.3 动物免疫

免疫前饲养一周，耳缘静脉采血，制备阴性血清。首次免疫，将0.5mL人工抗原(2mg/mL以载体蛋白计算)与等量的弗氏完全佐剂混合并充分乳化皮下分10个注射点免疫新西兰白兔。以后每隔14d用0.5mL人工抗原(1mg/mL以载体蛋白计算)与等量的弗氏不完全佐剂混合，加强免疫一次，每次加强免疫后一周，耳缘静脉取血，监测效价。当效价达到一定水平，用0.5mL人工抗原(1mg/mL以载体蛋白计算)与等量的生理盐水混合，冲击免疫，1周后心脏采血。

1.4.4 抗血清的效价测定和特异性分析

1.4.4.1 抗血清效价测定

抗体的效价是指能产生反应的抗体的最大稀释度，常以OD_{450nm}值在0.8～1.5之间的抗体稀释倍数作为抗体的效价。包被原稀释到0.1mg/L，抗血清1:1000～1:128000稀释，羊抗兔HRP 1:8000稀释，采用常规间接ELISA方法测定抗血清效价。

1.4.4.2 抗体亲合性与检测灵敏度分析

以SM-OVA最佳工作质量浓度包被96孔板封闭后，加入SM系列标准工作溶液(40.5、13.5、4.5、1.5、0.5、0ng/mL)，100μL/孔，然后加入最佳稀释度下的抗血清100μL，羊抗兔HRP 1:8000稀释，间接竞争ELISA方法检测抗体亲和性。以结合率为纵坐标，以对应的各标准品质量浓度的对数为横坐标，绘制SM半对数标准曲线，并分别求出抑制反应50%(IC_{50})和10%(IC_{10})所需的标准品质量浓度，以IC_{50}衡量抗体对SM的亲和性，以IC_{10}衡量SM的ELISA间接竞争法的检测灵敏度。结合率与抑制率分别按式(2)、(3)计算。

$$结合率/\%=\frac{标准(或样品)的吸光度}{零标准的吸光度}\times 100 \quad (2)$$

$$抑制率/\%=(1-结合率/\%)\times 100 \quad (3)$$

1.4.4.3 抗体交叉反应与检测特异性分析

用上面确定的最适工作浓度和优化后的分析条件，采用竞争ELISA法测定抗体与硫酸链霉素、双氢链霉素、庆大霉素、卡那霉素、硫酸新霉素、磺胺二甲嘧啶、磺胺甲氧基嘧啶配制成系列药物浓度，作竞争抑制实验，求出各自的IC_{50}，计算出交叉反应率，交叉反应率越小，抗体的特异性越好。交叉反应率按式(4)计算。

$$交叉反应率/\%=\frac{SM\ IC_{50}}{其他药物IC_{50}}\times 100 \quad (4)$$

2 结果与分析

2.1 人工抗原的鉴定

由于EDC法中与OVA偶联的产物，以及戊二醛法中与cBSA偶联的产物，出现了较多沉淀，不能较为精确的判断蛋白质的含量，也不便于鉴定，因此，最终选择EDC法中与cBSA偶联，作为免疫原，戊二醛法中与OVA偶联，作为包被原。

2.1.1 紫外扫描结果

由图4可知，SM、cBSA与OVA的特征波长分别为265、278、279nm，而SM与cBSA、OVA的偶联物(免疫原与包被抗原)的最大吸收峰发生了左移，合成的免疫原与包被抗原(SM-cBSA与SM-OVA)的特征波长分别为277.5、272nm，初步说明SM与cBSA、OVA成功偶联。经计算，SM与cBSA、OVA的偶联比分别为7.6:1、17.7:1。

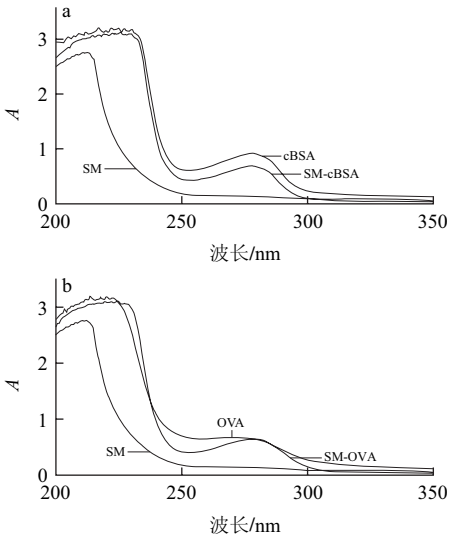


图 4 SM人工抗原紫外扫描谱图

Fig.4 UV scanning of SM artificial antigen

2.1.2 SDS-PAGE电泳结果

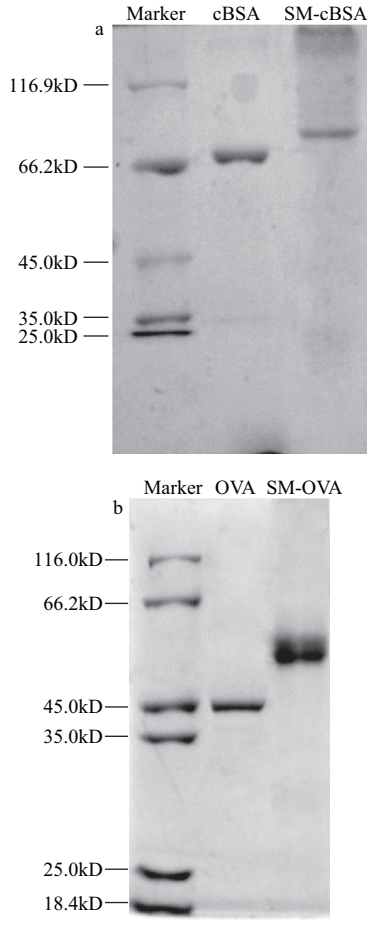


图 5 SM人工抗原SDS-PAGE电泳

Fig.5 SDS-PAGE of SM artificial antigen

由图5可知，SM-cBSA相对cBSA滞后，说明其分子质量有一定增加，同时cBSA相对Marker的BSA条带之后，说明BSA经过活化而分子质量增加；SM-OVA相对滞后很多，由此初步推断SM与cBSA、OVA偶联成功，这一结果与紫外扫描计算获得的结合比相符。另外，在靠近电泳起点(分子质量大)附近，也存在一些条带，可以判断，蛋白质载体之间存在自交联的现象，因此存在分子质量特别大的物质。

2.2 抗体免疫学特性鉴定

2.2.1 效价测定

免疫前耳缘静脉采血1.0mL，作为阴性对照血清。按免疫方案进行免疫，第4次免疫后一周耳缘静脉采血1.0mL，4℃过夜，5000r/min离心10min制备血清，测定抗链霉素血清的效价，结果图6所示，效价可达到1:40000。

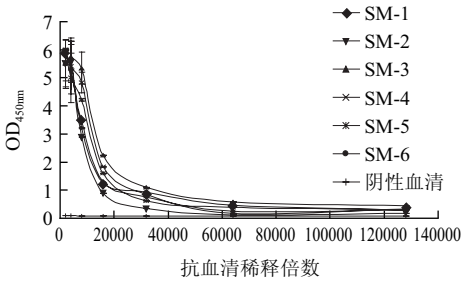


图 6 SM抗体效价测定(*n*=6)

Fig.6 Titer determination of SM antigen(*n*=6)

2.2.2 标准曲线线性范围及检测灵敏度

选择效价较高的SM-3号抗血清，用非间接竞争ELISA法确定抗原抗体最佳工作质量浓度为：包被原0.1mg/L，血清稀释倍数为20000倍。用所确定的抗原抗体最佳工作质量浓度进行间接竞争ELISA法。以结合率为纵坐标、SM质量浓度的对数为横坐标，SM系列标准品质量浓度40.5、13.5、4.5、1.5、0.5、0ng/mL的标准曲线呈较典型的S型，表明在0.5～40.5ng/mL质量浓度范围内，结合率与质量浓度呈线性关系，线性回归方程为$y=-0.4177x+1.1355$($R^2=0.9766$)。通过抑制率计算确定：50%抑制率IC_{50}=3.32ng/mL，方法的检测灵敏度IC_{10}=0.36ng/mL。

2.2.3 交叉反应与检测特异性

表 1 间接竞争法测链霉素多抗与同类药物的交叉反应

Table 1 Cross-reactivity of SM pAb with SM analogous compounds by indirect competitive ELISA

化合物名称	IC_{50}/(ng/mL)	交叉反应率/%
硫酸链霉素	3.32	100
双氢链霉素	3.86	105.21
庆大霉素	＞10^4	＜0.01
卡那霉素	＞10^4	＜0.01
硫酸新霉素	＞10^4	＜0.01
氨苄青霉素	＞10^4	＜0.01
妥布霉素	＞10^4	＜0.01
磺胺二甲嘧啶	＞10^4	＜0.01
磺胺甲氧基嘧啶	＞10^4	＜0.01

由表1可知，SM抗体对硫酸链霉素及其类似物双氢链霉素的交叉反应率分别可达到100%及105.21%，而与其他抗生素如庆大霉素、卡那霉素、硫酸新霉素的交叉反应率均小于0.01%。因此，以本研究获得的SM抗体建立的ELISA检测方法对链霉素及双氢链霉素具有很好的特异性，其他抗生素对SM检测的干扰较小。

3 讨 论

链霉素是小分子物质(分子摩尔质量为581.574g/mol)，本身没有免疫原性，需先与蛋白质等大分子物质偶联制备人工抗原才能刺激机体产生抗体。因此，将SM与载体蛋白偶联制备人工抗原是产生高效价、高特异性抗体的关键。由于SM的分子结构中具有化学性质相对活泼的胺基，因此对其分子进行改造的重点放在对胺基的改造上，利用戊二醛法衍生出与OVA缩合的活性胺基而合成SM-OVA；SM分子也有醛基，可以通过氧-羧甲基羟胺进行肟化处理引入羧基，然后用EDC合成免疫原SM-cBSA。通过紫外扫描、SDS-PAGE电泳，初步证明了戊二醛法和碳二亚胺法所得的人工抗原合成成功。

合成人工抗原的蛋白质载体有BSA、OVA、钥孔戚血蓝素(KLH)、人血清白蛋白(HSA)、结核杆菌毒素蛋白(TT)。其中BSA最为常用，因其物理化学性质稳定、不易变变性、廉价易得，赖氨酸含量高，自由氨基多，在不同的pH值和离子强度条件下均有较大的溶解度，在含有有机溶剂(如吡啶、*N*,*N*-二甲基甲酰胺)情况下均可和半抗原进行偶联，且在偶联后仍可保持溶解状态[20]。阳离子牛血清白蛋白(cBSA)，也称氨基化牛血清白蛋白(aminalyted bovine serum albumin，aBSA)通过过量的乙二胺修饰天然BSA制备而成，基本上用带正电的伯胺封闭了所有带负电的羧基基团。其效果是高度带正电的蛋白质(pI＞11)具有明显增强的免疫原性。此外，伯胺数量的增加还可为小分子的半抗原的载体蛋白偶联提供更多的活性氨基，提高半抗原与BSA载体蛋白交联的分子比例。阳离子牛血清白蛋白(cBSA)在水相缓冲液中极易溶解，并且含有56个赖氨酸残基和大量的、可与戊二醛和其他交联试剂定向地交联的伯胺基团，在抗体生产的抗原制备中充当即用型和具有高度免疫原性的载体蛋白[21]。

采用不同载体蛋白可减少抗体对包被原的特异性结合，提高分析的特异性和灵敏度。因此，本实验分别采用碳二亚胺法和戊二醛法，选择抵抗力强、溶解性好、价廉易得且亲源关系较远、交叉反应程度较低的BSA和OVA作为载体蛋白偶联合成SM的免疫原和包被原。与已有的方法[15-19]相比，本实验用与cBSA交联的SM-cBSA作为免疫原，获得了高特异性的SM多克隆抗体，其IC_{50}可达到3.32ng/mL，具有明显的优势，为SM单克隆抗体制备和SM快速检测试剂盒的研制提供参考。

参考文献：

[1] 于船, 王万钦. 中国兽药知识大全[M]. 成都: 四川科学技术出版社, 1997: 736-737.

[2] BISHOP Y. The veterinary formulary[M]. 6th ed. London: Pharmaceutical Press, 2005: 165-170.

[3] 吕青, 朱咏梅, 刘勇, 等. 食品中链霉素检测方法研究进展[J]. 安徽农业科学, 2009, 37(17): 7850-7851.

[4] 李俊锁, 邱月明. 兽药残留分析[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2002.

[5] 陈晓红, 刘小莉, 董明盛, 等. 高效液相色谱法测定蜂产品中链霉素残留量[J]. 食品科学, 2004, 25(1): 155-158.

[6] VINAS P, BALSALOBRE N, HERNANDEZ-CORDOBA M. Liquid chromatography on an amide stationary phase with post-column derivatization and fluorimetric detection for the determination of streptomycin and dihydrostreptomycin in foods[J]. Talanta, 2007, 72(2): 808-812.

[7] HOLZGRABE U, NAP C J, KUNZ N, et al. Identification and control of impurities in streptomycin sulfate by high-performance liquid chromatography coupled with mass detection and corona charged-aerosol detection[J]. J Pharm Biomed Anal, 2011, 56(2): 271-279.

[8] 刘晓茂, 张进杰, 张守军, 等. 双柱固相萃取净化-液相色谱-串联质谱法测定牛奶和奶粉中链霉素和双氢链霉素残留量[J]. 分析试验室, 2010, 29(10): 40-44.

[9] GRANJA R H, NINO A M, ZUCCHETTI R A, et al. Determination of streptomycin residues in honey by liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. Anal Chim Acta, 2009, 627(1/2): 64-67.

[10] 何强, 孔祥虹, 赵洁, 等. 奶粉中链霉素与双氢链霉素的残留量的超高效液相色谱-串联质谱法测定[J]. 分析测试学报, 2010, 29(7): 691-694.

[11] WU Jianxiang, ZHANG Shaoen, ZHOU Xueping. Monoclonal antibody-based ELISA and colloidal gold-based immunochromatographic assay for streptomycin residue detection in milk and swine urine[J]. Zhejiang Univ-Sci B (Biomed & Biotechnol), 2010, 11(1): 52-60.

[12] ABUKNEHA R A, LUK C. Enzyme immunoassays for the analysis of streptomycin in milk, serum and water: development and assessment of a polyclonal antiserum and assay procedures using novel streptomycin derivatives[J]. Analyst, 2005, 130: 964-970.

[13] WATANABE H, SATAKE A, KIDO Y, et al. Monoclonal-based enzyme-linked immunosorbent assay and immunochromatographic rapid assay for dihydrostreptomycin in milk[J]. Analytica Chimica Acta, 2002, 472: 45-53.

[14] EDDER P, COMINOLI A, CORVI C. Determination of streptomycin residues in food by solid-phase extraction and liquid chromatography with post-column derivatization and fluorometric detection[J]. Journal of Chromatography A, 1999, 830(2): 345-351.

[15] STRASSER A, DIETRICH R, USLEBER E, et al. Immunochemical rapid test for multiresidue analysis of antimicrobial drugs in milk using monoclonal antibodies and hapten-glucose oxidase conjugates[J]. Analytica Chimica Acta, 2004, 495: 11-19.

[16] 张桂贤. 链霉素人工抗原的合成及其多克隆抗体的制备[J]. 山东畜牧兽医, 2010(3): 9-11.

[17] WATANABE H, SATAKE A, KIDO Y, et al. Monoclonal-based enzyme-linked immunosorbent assay and immunochromatographic rapid assay for dihydrostreptomycin in milk[J]. Analytica Chimica Acta, 2002, 472: 45-53.

[18] 范国英, 王顺岗, 王子良, 等. 链霉素人工抗原的制备与鉴定[J]. 西北农业学报, 2009, 18(2): 45-50.

[19] DEBORAH E D, STANLEY E K. Competitive direct enzymelinked immunosorbent screening assay for the detection of sulfamethazine contam ination of animal feeds[J]. J Assoc Off Anal Chem, 1991, 74(5): 784-789.

[20] 焦奎, 张书圣. 酶联免疫分析技术与应用[M]. 北京: 化学工业出版社, 2004.

[21] APPLE R J, DOMEN P L, MUCKERHEIDE A, et al. Cationization of protein antigens. Ⅳ. Increased antigen uptake by antigen-presenting cells[J]. J Immunol, 1987, 140: 3290-3295.