

庆大霉素人工抗原及多克隆抗体的制备与鉴定

许耀心¹, 龚云飞¹, 陈宗伦², 奚茜¹, 戴明雁¹, 吴莹莹¹, 刘啊敏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: 为研究建立庆大霉素的免疫分析技术, 合成庆大霉素人工抗原: 采用碳二亚胺法将庆大霉素 (gentamicin, GM) 偶联到牛血清白蛋白 (BSA) 和鸡卵清蛋白 (OVA) 上, 分别合成免疫原 GM-BSA 和包被原 GM-OVA。通过紫外扫描和 SDS-PAGE 垂直电泳鉴定证明人工抗原偶联成功。以 GM-BSA 为免疫原, 采用新的动物免疫方案免疫新西兰大白兔, 获得抗庆大霉素抗血清。在本次免疫新方案中, 在动物的生命周期内获得了多于普通免疫的血清量, 在多抗血清的制备上是一次抗体工程上的尝试。通过间接酶联免疫对抗血清效价和灵敏度进行跟踪检测, 结果表明抗血清效价在九免后稳定在 1:20000 左右, IC₅₀ 则稳定在 3 ng/mL 左右。并在八免血清基础上建立了 GM 间接竞争 ELISA 法。结果表明, 庆大霉素浓度在 0.3~243 ng/mL, 方法的线性回归方程为 $y = -0.1009 \ln x + 0.6093$ 和 $R^2 = 0.9845$, 方法的检测灵敏度 IC₅₀ = 2.954 ng/mL, 最低检测限 IC₁₀ = 0.056 ng/mL。该研究结果为多抗血清制备在量上的突破提供了思路, 同时为研制庆大霉素试剂盒提供了良好的基础。

关键词: 庆大霉素; 人工抗原; 碳二亚胺法; 多克隆抗体

文章编号: 1673-9078(2014)6-152-157

Preparation and Identification of Gentamicin and Its Polyclonal Antibody

XU Yao-xin¹, GONG Yun-fei¹, CHEN Zong-lun², XI Xi¹, DAI Ming-yan¹, WU Ying-ying¹, LIU A-ming¹, ZHANG Ming-zhou¹

(1. College of Life Science, China Jiliang University, Zhejiang Provincial Key Laboratory of Bio-metrology, Inspection and Quarantine, Hangzhou 310018, China) (2. Hangzhou DNA Sci-tech Co., Ltd, Hangzhou 310013, China)

Abstract: To develop immunoassay for gentamicin, the artificial antigen and polyclonal antibody were prepared in this study. Identified through ultraviolet spectrum (UV) and SDS-PAGE, the immunogen (GM-BSA) and coating antigen (gm-ova) of gentamicin were synthesized by the method of carbodiimide successfully. GM-BSA was used to immune New Zealand white rabbits, and the antiserum was obtained. In this study, we utilize a native method to immune animal and obtained serum volume much more than conventional method's. One indirect competitive ELISA method has been developed to detect the titer and sensitivity of the antiserum. The results show that the titer of antiserum was continuously improving and the IC₅₀ was nearly 3ng/mL. On this basis, With an concentration range from 0.3 to 243 ng/mL, the IC₅₀ is 2.954 ng/mL, and the IC₁₀ is 0.056 ng/mL. The results of this study provide a basis for the breakthrough of serum volume, and also is a good start for the development of gentamicin ELISA kit.

Key words: gentamicin; artificial antigen; carbodiimide; polyclonal antibody

庆大霉素 (gentamicin, GM) 是由小单孢菌属 (*Micromonospora purpurea*) 发酵产生的一组结构相近的多组分氨基糖苷类抗生素, 它们在结构上是由脱氧链霉胺 (purposamine)、紫素胺和 3-甲基-3-去氧-4-甲基戊糖胺缩合成的苷^[1]。庆大霉素对革兰氏阳性和

收稿日期: 2014-01-24

基金项目: 浙江省重点科技创新团队 (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: 许耀心 (1991-), 女, 本科在读, 研究方向: 食品安全快速检测技术

通讯作者: 张明洲 (1970-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 食品安全快速检测技术

阴性菌有极好的抑制作用, 因此广泛应用于医药和兽药领域。然而, 庆大霉素对人类具有明显的毒害作用, 对脑神经、听觉以及肾脏的损害严重^[2-3]。因此对动物源性食品中庆大霉素的残留量的限制与检测是非常必要的。针对庆大霉素在食品和疫苗中的残留, 许多国家和机构都规定了明确的最大残留量 (MRLs)。中国庆大霉素在牛和猪的脂肪和肌肉里以及鸡和火鸡的可食组织中的最高残留量为 100 μg/kg, 在牛奶中为 200 μg/kg, 在牛和猪的肝脏和肾脏中分别为 2 mg/kg 和 5 mg/kg^[4], 疫苗中庆大霉素残留量应不高于 50 ng/剂^[5]; JECFA (The Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives) 推荐使用的庆大霉素在动物性食品

不同组织 MRLs 范围为 100~5000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ^[6]；欧盟规定的动物性食品中庆大霉素 MRLs 范围是 100~1000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ，牛奶中的 MRLs 为 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ，肌肉、脂肪中的 MRLs 为 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ^[7]。

目前，庆大霉素的检测方法主要有微生物法^[8]、仪器分析法和免疫分析法。仪器分析法主要有高效液相色谱法 (HPLC)^[9]、质谱法 (MS)^[10]、气相色谱法 (GC)^[11]和液相色谱-串联质谱法 (LC-MS/MS)^[12]等。微生物法实验周期较长；仪器分析法结果精确，但样品前处理过程繁琐，对技术人员要求高，检测设备也非常昂贵，因此检测成本高，尤其不适合大批量样品的筛选。免疫测定作为一种快速、特异和灵敏度较高的检测技术正逐步被应用于小分子药物残留的检测^[13]，样品前处理简单，操作方便，亦适于现场检测。2003 年 Loomnas 等^[14]人首次采用新霉素作为半抗原合成人工抗原，制备的多抗可同时检测脱氧链霉素类的多种药物，在奶样中对庆大霉素的半数抑制浓度为 9 ng/mL；2004 年 Vaelrie Guadin 等^[15]验证了用 ELISA 试剂盒检测牛奶中庆大霉素残留量结果的准确性高，重复性好。

庆大霉素酶联免疫检测试剂盒的研制，关键是制备出特异性强、效价高的针对庆大霉素的抗体。而庆大霉素的分子量为 477.6，是小分子半抗原，不具有免疫原性，必须与大分子载体蛋白交联，才能刺激动物产生特异性免疫应答。本研究通过对庆大霉素半抗原的研究分析，设计人工抗原合成方案，用获得的免疫原去刺激新西兰大白兔，产生了能与庆大霉素特异性结合的多克隆抗体，并对此多克隆抗体进行了初步评价，为庆大霉素 ELISA 试剂盒的研制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 原料

1.1.1 主要试剂

庆大霉素，新霉素，链霉素，妥布霉素，卡那霉素，环丙沙星，恩诺沙星，磺胺二甲嘧啶，氯霉素，购自中国兽医药品监察所；牛血清白蛋白 (BSA)、鸡卵清蛋白 (OVA)、弗氏完全佐剂 (FCA) 和弗氏不完全佐剂 (FIA)，均购自 Sigma (中国) 公司；聚苯乙烯酶标板，购于上海 Corning；酶标二抗 (羊抗兔 IgG-HRP)，显色剂 (四甲基联苯胺溶液，H2O2 底物溶液)，购于北京天根生物技术有限公司；透析袋、丙烯酰胺、甘氨酸、三乙胺和偶联剂 1-乙基-3-(3-二甲氨基)碳二亚胺盐酸盐 (EDAC) 等，均购自上海生工生物技术有限公司。

新西兰大白兔，由浙江省杭州师范大学提供并负责饲养。

1.1.2 主要溶液

ELISA 使用液：(1) 磷酸盐缓冲溶液 (PBS)，0.01 mol/L，pH 7.4：0.27 g KH_2PO_4 ，1.42 g Na_2HPO_4 ，8 g NaCl，0.2 g KCl，定容 1 L；(2) 包被液 (CBS)，0.05 mol/L，pH 9.6：1.7 g Na_2CO_3 ，2.8 g NaHCO_3 ，定容于 1000 mL 超纯水中，4 $^\circ\text{C}$ 冰箱保存；(3) 封闭液：含 5% BSA 的 PBS；(4) 显色剂：为 TMB 的磷酸-柠檬酸缓冲液；(5) 终止液：2 mol/L 的 H_2SO_4 ；(6) 洗涤液 (PBST)：0.05% 吐温-20 的 PBS；

SDS-PEAG 用液：(1) 10% 过硫酸铵：1 g 过硫酸铵溶解于 1 mL 水中，新鲜配置；(2) 30% 丙烯酰胺溶液：29 g 丙烯酰胺，1 g N，N'-亚甲双丙烯酰胺，定容 100 mL；(3) 1.5 mol/L Tris-HCl (pH 8.8)；(4) 1.0 mol/L Tris-HCl (pH 6.8) (5) 2 \times SDS 凝胶上样缓冲液：100 mmol/L Tris-HCl (pH 6.8)，200 mmol/L DTT 现用现加，4% SDS，0.2% 溴酚蓝，20% 甘油；(6) 染色液：甲醇 90 mL，水 90 mL，冰乙酸 10 mL，0.25 g 考马斯亮蓝 R250；(7) 脱色液：甲醇 180 mL，水 180 mL，冰乙酸 20 mL。

1.1.3 主要仪器

酶标仪 (Genios)、紫外分光光度计 (Shimadzu UV-2501pc)、垂直电泳仪 (Bio-rad)、恒温培养箱、超纯水系统 (Millipore)、全自动灭菌锅、凝胶成像分析系统 (GeneGenius)、磁力搅拌器等。

1.2 方法

1.2.1 GM 人工抗原的合成

本实验采用碳二亚胺 (EDC) 法，参考文献方法^[16-17]并改进，将 GM 分别与 BSA 偶联成人工免疫原，与 OVA 偶联成包被原。称量庆大霉素 20 mg 充分溶解于 0.75 mL 双蒸水中；称量 EDC 31 mg 充分溶解于 1.5 mL 双蒸水中，将两者混合，4 $^\circ\text{C}$ 下搅拌反应 1 h，记为 A 液。称量 BSA、OVA 各 12 mg，分别溶解于 0.75 mL 的双蒸水，记为 B 液。将 A 液缓慢地滴加入 B 液，避光，4 $^\circ\text{C}$ 下搅拌反应 7 h。待上述反应完成后，将反应液转移至透析袋中，用纯水 4 $^\circ\text{C}$ 下透析三天，每天换液二次。

1.2.2 GM 的人工抗原的鉴定

1.2.2.1 紫外扫描法

采用紫外光谱扫描法对 GM-BSA 人工抗原和 GM-OVA 包被原的峰产物进行长波段扫描，并计算偶联物中半抗原与载体蛋白的结合比。

1.2.2.2 聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 鉴定

采用 5% 浓缩胶和 10% 分离胶进行 SDS-PAGE 电泳, 对 GM 人工抗原进行鉴定。

1.2.3 动物免疫

将合成好的 GM-BSA 用无菌生理盐水稀释到 2 mg/mL, 加入等体积佐剂 (第一次免疫用弗氏完全佐剂, 加强免疫均用弗氏不完全佐剂)。完全乳化后, 采用背部皮下、各部位皮下、腿部肌肉和耳缘静脉多种注射方式, 免疫 3 只体重为 2.5~3 kg 的健康新西兰大白兔。第四次加强免疫后一周, 耳缘静脉采血, 血样 37 °C 静置 2 h, 离心, 吸取上层析出的血清, 一般免疫 7~8 次。在本研究中, 尝试了一种新的免疫方式, 即在七兔血清效价和半抑制浓度稳定后, 不采取冲击免疫取全血, 而是继续加强免疫, 每隔两周取血 5 mL (经离心后可得抗血清 3 mL 左右), 然后继续加强免疫。如此延长动物的免疫期, 每隔两周取血一次, 一年后终止免疫取全血, 所获得的抗血清将多于普通免疫方案获得的抗血清量。

1.2.4 间接 ELISA 法测定血清中的抗体效价

1.2.4.1 十五次免疫效价变化趋势

对免疫的三只新西兰大白兔 (分别标记为 GM-1、GM-2、GM-3) 免疫的各阶段效价变化进行测定, 以 GM-OVA 作为包被原, 用 CBS 稀释至一定倍数, 在 96 孔板上每孔加 100 μ L, 37 °C 孵育 2 h。以 PBST 洗板 1 次。再用封闭液封闭, 每孔加 150 μ L, 37 °C 孵育 2 h。抗血清用酶稀 III 稀释至一定倍数, 37 °C 孵育 1 h, 洗板 3 次。每孔加入 100 μ L 酶标二抗 (1:8000), 37 °C 孵育 30 min, 洗板 3 次。每孔加入 TMB 显色液 100 μ L, 37 °C 孵育显色 15 min 后, 每孔加 2 mol/L 硫酸 100 μ L 终止反应, 测定 A_{450} 值。以同一稀释倍数下抗血清与阴性血清 A_{450} 差值大于 0.8 时血清的最大稀释度定为抗体效价。对每次免疫后取得的血清进行效价测定, 目前测定到第十五次免疫, 将每次抗血清的效价进行统计列表, 制成曲线图, 观察效价变化趋势。

1.2.4.2 GM-2 和 GM-3 效价比较

以 GM-OVA 稀释 5000 作为包被原, 在 96 孔板上每孔加 100 μ L, 37 °C 孵育 2 h。以 PBST 洗板 1 次。再用封闭液封闭, 每孔加 150 μ L, 37 °C 孵育 2 h。抗血清稀释倍数分别为 2000 倍、4000 倍、8000 倍、12000 倍、16000 倍、20000 倍、24000 倍、28000 倍, 37 °C 孵育 1 h, 洗板 3 次。每孔加入 100 μ L 酶标二抗 (1:8000), 37 °C 孵育 30 min, 洗板 3 次。每孔加入 TMB 显色液 100 μ L, 37 °C 孵育显色 15 min 后, 每孔加 2 mol/L 硫酸 100 μ L 终止反应, 测定 A_{450}

值。平行试验两组, 计算标准差, 绘制曲线图, 同一吸光值下抗血清稀释倍数高者效价较高。

1.2.5 GM 抗体与人工抗原最适工作浓度的确定

以 GM-OVA 作为包被原, 用 CBS 稀释至 1:2500、1:5000、1:10000, 在 96 孔板上每孔加 100 μ L, 37 °C 孵育 2 h。以 PBST 洗板 1 次。再用封闭液封闭, 每孔加 150 μ L, 37 °C 孵育 2 h。抗血清稀释倍数分别为 5000 倍, 10000 倍, 20000 倍, 24000 倍, 37 °C 孵育 1 h, 洗板 3 次。每孔加入 100 μ L 酶标二抗 (1:8000), 37 °C 孵育 30 min, 洗板 3 次。每孔加入 TMB 显色液 100 μ L, 37 °C 孵育显色 15 min 后, 每孔加 2 mol/L 硫酸 100 μ L 终止反应, 测定 A_{450} 值。选取吸光值在 1.2~2.0 之间, 且包被原稀释倍数与抗血清稀释倍数相近的抗原抗体稀释倍数为最适工作浓度。

1.2.6 间接竞争 ELISA 法测定血清中的抗体灵敏度

1.2.6.1 十五次免疫半抑制浓度变化趋势

以 GM-OVA 稀释 2000 倍作为包被原, 在 96 孔板上每孔加 100 μ L, 37 °C 孵育 2 h, 洗板 1 次。再用封闭液封闭, 每孔加 150 μ L, 37 °C 孵育 2 h。抗血清稀释倍数为 4000 倍, GM 标准品稀释为 7 个质量浓度, 分别为 0.3 ng/mL、1.0 ng/mL、3 ng/mL、9 ng/mL、27 ng/mL、81 ng/mL、243 ng/mL, 设置对照孔质量浓度为 0 μ g/mL, 每孔分别加入不同质量浓度的 GM 和抗血清各 100 μ L, 37 °C 孵育 1 h, 洗板 3 次。每孔加入 50 μ L HRP-羊抗兔酶标二抗 (1:8000), 37 °C 孵育 1 h, 洗板 3 次。每孔加入 TMB 显色液 100 μ L, 37 °C 孵育显色 15 min 后, 每孔加 2 mol/L 硫酸 100 μ L 终止反应, 测定 A_{450} 值, 制作标准曲线, 计算半抑制率 IC_{50} , 统计十五次免疫的 IC_{50} , 绘制趋势图。

1.2.6.2 最佳工作浓度下标准曲线绘制

以 GM-OVA 作为包被原, 用 CBS 稀释至 1:5000, 在 96 孔板上每孔加 100 μ L, 37 °C 孵育 2 h, 洗板 1 次。再用封闭液封闭, 每孔加 150 μ L, 37 °C 孵育 2 h。抗血清稀释倍数为 10000 倍, GM 标准品稀释为 7 个质量浓度, 分别为 0.3 ng/mL、1.0 ng/mL、3 ng/mL、9 ng/mL、27 ng/mL、81 ng/mL、243 ng/mL, 设置对照孔质量浓度为 0 μ g/mL, 每孔分别加入不同质量浓度的 GM 和抗血清各 100 μ L, 37 °C 孵育 1 h, 洗板 3 次。每孔加入 50 μ L HRP-羊抗兔酶标二抗 (1:8000), 37 °C 孵育 1 h, 洗板 3 次。每孔加入 TMB 显色液 100 μ L, 37 °C 孵育显色 15 min 后, 每孔加 2 mol/L 硫酸 100 μ L 终止反应, 测定 A_{450} 值, 用 EXCEL 绘制标准曲线, 得到线性方程, 计算半抑制

率 IC_{50} (半抑制率为 50% 时 GM 的质量浓度, 抑制率 $=I = (B_0 - B) / B_0 \times 100\%$), 并以 B/B_0 达到 90% 时的庆大霉素质量浓度为本研究的最低检测极限 (LOD), 即 IC_{10} 。

1.2.7 抗体特异性评价^[18]

采用间接竞争 ELISA 的方法, 以梯度稀释的链霉素等氨基糖苷类物质及其他结构类似物作为竞争反应物, 绘制标准曲线, 并计算其反应的 IC_{50} , 计算公式如下:

$$\text{交叉反应率}(\%) = IC_{50}(\text{GM}) / IC_{50}(\text{竞争物}) \times 100$$

2 结果与讨论

2.1 紫外扫描结果

紫外扫描结果如图 1, GM (0.6 mg/mL)、BSA (0.625 mg/mL) 的特征峰分别出现在 245.0 nm 和 279.0 nm, 而偶联物 GM-BSA (3 mg/mL) 的特征峰为 277 nm, 与 GM、BSA 紫外吸收特征具有明显差异, 说明 GM 成功地偶联到载体蛋白上。同理可得, GM-OVA 合成成功, 扫描图如图 2。经计算 GM 和 BSA、OVA 的偶联比分别为 5.7:1 和 16.9:1。

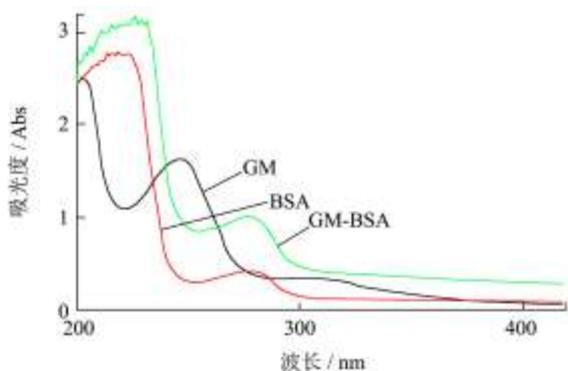


图 1 GM 人工抗原紫外扫描谱图

Fig.1 UV spectra of GM, BSA and GM-BSA

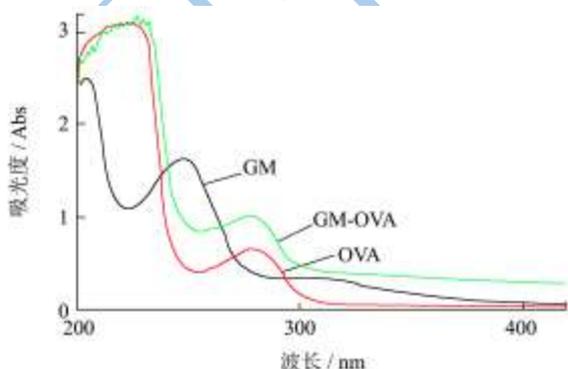


图 2 GM 人工抗原紫外扫描谱图

Fig.2 UV spectra of the artificial antigens of GM, OVA and GM-OVA

2.2 聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)鉴定

从图 3 可知, GM-BSA 条带相对 BSA 条带出现滞后现象, 说明其相对分子量较 BSA 变大, 由此推断 GM 与 BSA 成功交联; 从图 4 可知, GM-OVA 相对 OVA 滞后, 说明其相对分子量较大, 由此推断 GM 与 OVA 成功交联, 但颜色较浅, 说明浓度较低。从电泳图还可看到, 出现了大分子量(大于 116.2 kDa)的条带, 说明载体蛋白发生了自偶联现象。

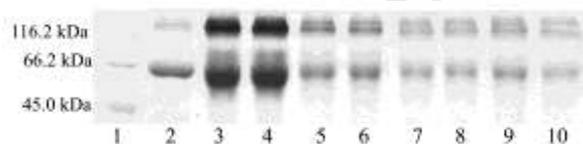


图 3 GM 人工抗原 SDS-PAGE 电泳图

Fig.3 SDS-PAGE electrophoresis of GM-BSA

注: 1: Marker; 2: BSA; 3~4: GM-BSA 原液; 5~6: GM-BSA 稀释两倍; 7~8: GM-BSA 稀释四倍; 9~10: GM-BSA 稀释五倍。

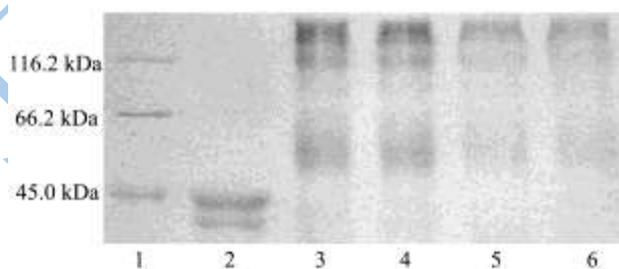


图 4 GM 人工抗原 SDS-PAGE 电泳图

Fig.4 SDS-PAGE electrophoresis of GM-OVA

注: 1: Marker; 2: OVA; 3~4: GM-OVA 原液; 5~6: GM-OVA 稀释两倍。

2.3 间接 ELISA 法测定血清中的抗体效价

本研究中, 每只新西兰大白兔每次采血获得抗血清 3 mL/次, 预计最终可获得有效抗血清接近 100 mL (目前已获得 45 mL), 远多于普通免疫方案获得的抗血清量 25~35 mL。

由于 GM-1 在四免后异常死亡, 故只统计 GM-2 与 GM-3 血清效价。两只兔血清效价和半抑制浓度跟踪结果如图 5 所示。从三免到八免, 抗血清效价逐渐升高, 由 1:2000 到 1:20000; 从九免后, 血清效价保持在 1:20000 左右。与此同时, 对两只兔子的血清半抑制率进行测试, 趋势变化如图 6 所示, 在免疫期间内, 半抑制浓度在逐渐降低, 即灵敏度逐渐升高, GM-3 和 GM-2 的半抑制浓度分别在八免后和九免后稳定在 3 ng/mL 左右。

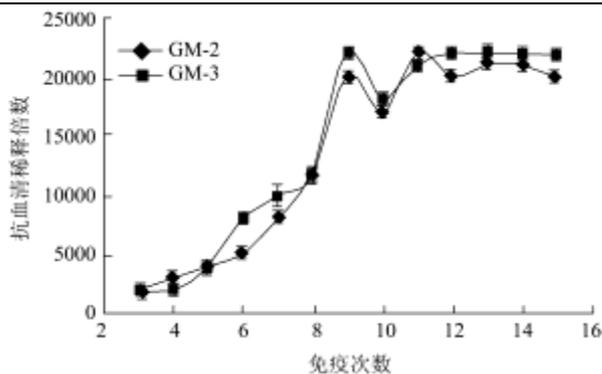


图5 免疫期间血清效价变化

Fig.5 Variation of dilute degree during the immunity period

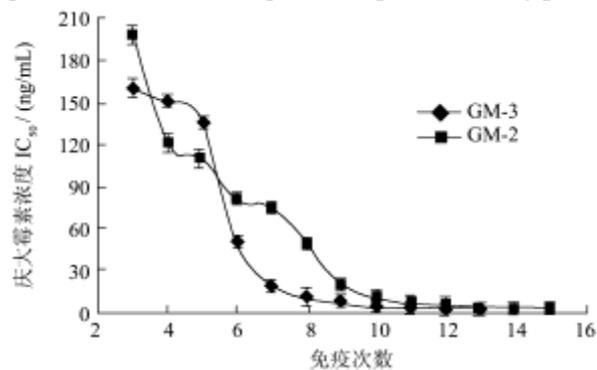


图6 免疫期间抗血清 IC₅₀变化

Fig.6 Variation of IC₅₀ during the immunity period

利用棋盘法测定出GM-3的抗血清纯化抗体效价最高(1:22000),因此选定GM-3抗血清做进一步的研究。

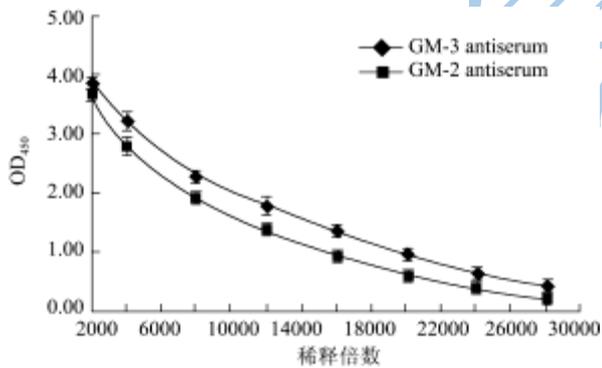


图7 抗GM多克隆抗体效价

Fig.7 The titer of anti-gentamicin polyclonal antibodies

2.4 GM抗体与人工抗原最适工作浓度的确定

棋盘法试验结果表明,包被原稀释5000倍,抗体稀释10000倍时为建立间接ELISA的最佳工作稀释倍数,具体结果如表1所示。

2.5 间接竞争ELISA法测定血清中的抗体灵敏度

表1 GM-3抗体和人工抗原最佳工作浓度的确定

Table 1 The optimum concentration of antibody and artificial antigens

包被原	GM-3 anti-gentamicin pAb (mean±SD)			
	1:5000	1:10000	1:20000	1:24000
GM-OVA				
1:1250	4.13±0.05	3.03±0.02	2.20±0.01	0.99±0.04
1:2500	4.00±0.05	2.56±0.00	1.62±0.01	0.70±0.02
1:5000	2.89±0.04	1.73±0.02	1.06±0.00	0.47±0.02
1:10000	2.12±0.06	1.20±0.02	0.64±0.01	0.41±0.03

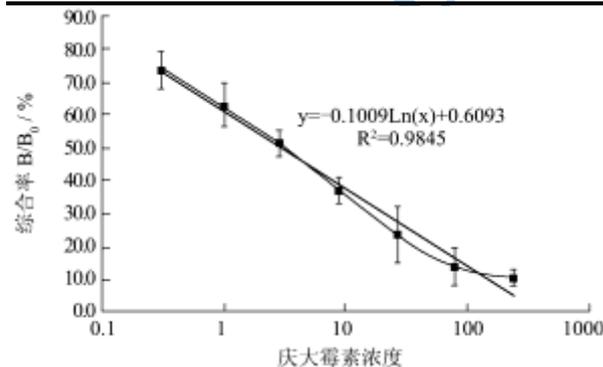


图8 GM标准曲线 (n=6)

Fig.8 GM standard curve

经检测,GM对2只免疫大白兔的抗血清均具有能特异性结合。以GM-3抗体与人工抗原的最佳工作浓度建立间接竞争ELISA法,对照孔的A₄₅₀值为B₀,浓度对应的A₄₅₀值为B,以GM浓度的对数为横坐标,结合率(B/B₀)为纵坐标,标准曲线如图8所示。在0.3~243 ng/mL范围内,线性方程为y = -0.1009lnx + 0.6093和R²=0.9845,半抑制率IC₅₀=2.954 ng/mL, IC₁₀=0.056 ng/mL。

2.6 抗体的特异性

表2 GM与其他氨基糖苷类的交叉反应

Table 2 Cross reaction of GM with other aminoglycosides

化合物	IC ₅₀ /(ng/mL)	CR/%
庆大霉素	2.954	100
链霉素	>10 ⁹	<0.001
新霉素	>10 ⁹	<0.001
妥布霉素	>10 ⁹	<0.001
卡那霉素	>10 ⁹	<0.001
氯霉素	>10 ⁹	<0.001
恩诺沙星	>10 ⁹	<0.001
环丙沙星	>10 ⁹	<0.001
磺胺二甲嘧啶	>10 ⁹	<0.001

特异性即抗体与结构类似化合物的交叉反应程度,交叉反应越小,抗体特异性越高;反之,交叉反应越大,抗体特异性越差。结果见表2,此抗体特异性

良好,与链霉素等氨基糖苷类物质及其他抗生素均无交叉反应。

3 结论

3.1 本研究通过碳二亚胺法建立庆大霉素与大分子蛋白的偶联,主要是利用大分子蛋白上的羧基基团和庆大霉素分子上的氨基基团都与EDAC上的反应基团发生反应,从而使得庆大霉素偶联到大蛋白上,通过研究证明此方法的合成效果较好,所得目标产物较多。从理论上讲,任何含有羧基或氨基的半抗原都可以利用EDAC和载体蛋白偶联。在本研究中,碳二亚胺法也使载体蛋白发生了自偶联现象,使得终产物中出现了副产物,所幸从动物免疫效果看,未明显影响有效抗血清的获得。但还是建议,若反应中有大量副产物出现,免疫原最好经过分子筛技术纯化后再用作免疫。

3.2 在制备了有效的抗原抗体的基础上,初步建立了间接竞争ELISA法,在0.3~243 ng/mL范围内,半抑制率 IC_{50} 为2.954 ng/mL,比王丹^[19]报道的10.2 ng/mL(多克隆抗体)要低,同样低于潘宪云等^[20]报道的用单抗制备的试剂盒的7.37 ng/mL。

3.3 在本研究中,采用了一种新式免疫方案。在常规免疫方案中,兔血清效价稳定后,便进行冲击取全血,大多在7~10次免疫,可得抗血清的量以兔子的个体特点而定,常常在25~35 mL,周期为4~5个月。而采用本免疫方案后,以一年周期算,可获得有效抗血清达100 mL。这对于多抗制备技术中,抗体不能像单抗技术或基因工程抗体技术一样源源不断获取的缺点,是一次工程应用上的尝试。

3.4 本研究在动物免疫技术上的新尝试为多抗原抗体的制备提供了新方法,庆大霉素人工抗原和多抗血清的成功开发为庆大霉素ELISA试剂盒的研制奠定了基础。

参考文献

- [1] 刘英,王立萍.庆大霉素组分和有关物质对效价的影响[J].中国抗生素杂志,2012,37(2):127-131
LIU Ying, WANG Li-ping. The effect of the component and the related impurities of gentamicin to the content of microbial potency [J]. Chinese Journal of Antibiotics, 2012, 37(2): 127-131
- [2] Riviere J E, Spoo J W. Aminoglycoside antibiotics [M]. Veterinary pharmacology and therapeutics, 2001, 7: 797-819
- [3] Walker E M, Fazekas M A, Bowen W R. Nephrotoxic and ototoxic agents [J]. Clinics in laboratory medicine, 1990, 10(2): 323-354

- [4] 农业部发布动物性食品中兽药最高残留限量[J].中国兽药杂志,2003,02:7-9
The Ministry of agriculture animal food maximum residue limits [J]. Chinese Journal of Veterinary Drug, 2003, 02: 7-9
- [5] 国家药典委员会.中华人民共和国药典(2010版:三部)[S].北京:中国医药科技出版社,2010:138-140
Chinese Pharmacopoeia Commission. Chinese Pharmacopoeia (2010 Edition: three) [S]. Beijing: Chinese Medicine Science Press. 2010: 138-140.
- [6] Posyniak A, Zmudzki J, Niedzielska J. Sample preparation for residue determination of gentamicin and neomycin by liquid chromatography [J]. Journal of Chromatography A, 2001, 914(1): 59-66
- [7] The European Agency for the Evaluation of Medical Products (EMA). Regulation No.EMA/MRL/886/03-FINAL [Z]. London, 2003
- [8] Montero A, Athaus R L, Molina A, et al. Detection of antimicrobial agents by a specific microbiological method (Eclipse100®) for ewe milk [J]. Small Ruminant Research, 2004, 57(2): 229-237
- [9] BS ISO 14183-2006, Animal feeding stuffs-determination of monensin, narasin and salinomycin contents-liquid chromatographic method using post-column derivatization [S]. England, 2006
- [10] Heller D N, Peggins J O, Nochetto C B, et al. LC/MS/MS measurement of gentamicin in bovine plasma, urine, milk, and biopsy samples taken from kidneys of standing animals [J]. Journal of Chromatography B, 2005, 821(1): 22-30
- [11] Löffler D, Temes T A. Analytical method for the determination of the aminoglycoside gentamicin in hospital wastewater via liquid chromatography-electrospray-tandem mass spectrometry [J]. Journal of Chromatography A, 2003, 1000(1): 583-588
- [12] 洗燕萍,罗海英,杜志峰,等.液相色谱-串联质谱法同时测定玉米粉中6种真菌毒素[J].现代食品科技,2009,11:1355-1357
XIAN Yan-ping, LUO Hai-ying, DU Zhi-feng, et al. Simultaneous determination of six kinds of mycotoxins in corn powder by LC-MS/MS [J]. Modern Food Science and Technology, 2009, 11: 1355-1357
- [13] 范国英,王建华,王自良,等.链霉素残留快速检测阻断ELISA试剂盒的研制及其性能测定[J].中国兽医杂志, 2008, 44(1): 82-84
FAN Guo-ying, WANG Jian-hua, WANG Zi-liang, et al. Study on rapidly determination of residue streptomycin by competitive ELISA-kit [J]. Chinese Journal of Veterinary Medicine, 2008, 44(1): 82-84

- [14] Elma E. M, Gloomans, Jim Van Wiltenburg, et al. Neamin as immunogen for the development of a generic ELISA detecting gentamicin, kanamycin, and neomycin in milk [J]. *Agric Food Chem.* 2003, 51: 587-593
- [15] Valerie Gaudin, Nathalie Cadieu, Paeal Sanders. Results of a European proficiency test for the detection of streptomycin/dihydrostreptomycin, gentamicin and neomycin in milk by ELISA and biosensor methods [J]. *Analytica Chimica Acta*, 2005, 529: 273-283
- [16] 刘宣兵,张改平,侯玉泽等.庆大霉素人工抗原的合成与鉴定 [J].*黑龙江畜牧兽医*,2008,(12):64-65
LIU Xuan-bing, ZHANG Gai-ping, HOU Yu-ze, et al. Synthesis and identification of the antigen for gentamicin [J]. *Hei long jiang Animal Science and Veterinary Medicine* 2008, (12): 64-65
- [17] Galvidis I A, Burkin M A. Monoclonal antibody-based enzyme-linked immunosorbent assay for the aminoglycoside antibiotic kanamycin in foodstuffs [J]. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2010, 36(6): 722-729
- [18] 王凤侠,张艳,何金兴等.莱克多巴胺抗体的制备与评价[J].*现代食品科技*,2007,09:1-4
WANG Feng-xia, ZHANG Yan, HE Jing-xing, et al. Production and evaluation of a antibody against ractopamine [J]. *Modern Food Science and Technology*, 2007, 09: 1-4
- [19] 王丹.建立同时检测三种真菌毒素膜免疫芯片方法的研究与抗庆大霉素多克隆抗体的制备[D].南昌大学,2010
WANG Dan. Study on establishing simultaneous detection for three kinds of mycotoxin by membrane immune-chip and preparation of anti-GM polyclonal antibodies [D]. Nanchang University, 2010
- [20] 潘宪云,席仲兴,彭林峰等.庆大霉素单克隆抗体的制备及试剂盒的配制[J].*微生物学免疫学进展*,2013,1:42-48
PAN Xian-yun, XI Zhong-xing, PENG Lin-feng, et al. Preparation of monoclonal antibody and establishment of detection method by ELISA for gentamicin [J]. *Progress in Microbiology and Immunology*, 2013, 1: 42-48