

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



## [12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200810162588.5

[51] Int. Cl.

C07K 14/795 (2006.01)

C07K 14/765 (2006.01)

C07K 14/77 (2006.01)

C07K 16/00 (2006.01)

C07K 16/44 (2006.01)

C07K 16/06 (2006.01)

[43] 公开日 2009年5月13日

[11] 公开号 CN 101429241A

[51] Int. Cl. (续)

C12N 9/00 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

G01N 33/577 (2006.01)

[22] 申请日 2008.12.4

[21] 申请号 200810162588.5

[71] 申请人 浙江大学

地址 310027 浙江省杭州市浙大路 38 号

[72] 发明人 吴建祥

[74] 专利代理机构 杭州求是专利事务所有限公司

代理人 张法高

权利要求书 2 页 说明书 10 页

[54] 发明名称

青霉素与载体蛋白偶联产物和  $\beta$ -内酰胺类青霉素抗体制备的方法及用途

[57] 摘要

本发明提供一种青霉素与载体蛋白偶联产物、 $\beta$ -内酰胺类青霉素抗体制备的方法及用途。用本发明偶联的青霉素人工抗原免疫动物制备可用于食品中  $\beta$ -内酰胺类青霉素检测的抗体；免疫的 BALB/C 小鼠脾细胞与 SP2/O 鼠骨髓瘤细胞融合，用与载体蛋白偶联的  $\beta$ -内酰胺类抗生素作为包被抗原筛选阳性杂交瘤细胞、经细胞克隆获得能稳定传代并分泌抗  $\beta$ -内酰胺类抗生素抗体的杂交瘤细胞，并制备腹水单抗。利用制备的抗体建立了对  $\beta$ -内酰胺类抗生素具有高度特异性、灵敏性和精确性的直接竞争 ELISA 方法及免疫胶体金试纸条。本发明提供的青霉素与载体蛋白偶联产物及  $\beta$ -内酰胺类抗生素抗体的制备方法，可为快速检测食品中  $\beta$ -内酰胺类抗生素残留服务。

1. 一种青霉素与载体蛋白偶联产物的制备方法, 其特征在于包括如下步骤:
  - a) 将20-200mg青霉素钠盐、5-100mgN-羟基丁二酰亚胺和20-200mg碳化二亚胺加到1-10毫升超纯水中, 在冰浴中搅拌10-50分钟;
  - b) 上述溶液中边搅拌边逐滴加入含10-100mg 载体蛋白的超纯水1-10毫升, 加毕在4-30℃搅拌反应3-20小时, 合成青霉素-载体蛋白偶联产物;
  - c) 青霉素-载体蛋白偶联产物放入透析袋中, 用0.01M pH7.2的磷酸盐缓冲液在4℃透析1-3天;
  - d) 透析后的青霉素-载体蛋白偶联产物进行紫外扫描, 分析鉴定偶联产物及浓度测定, 分装后于-20℃冰箱保存备用。
2. 根据权利要求1所述一种青霉素与载体蛋白偶联产物的制备方法, 其特征在于所述的载体蛋白为匙孔血蓝蛋白、人血清白蛋白、牛血清白蛋白、牛丙种球蛋白、酶或卵清蛋白。
3. 一种如权利要求1所述方法制备的青霉素与载体蛋白偶联产物的用途, 其特征在于所述的青霉素-载体蛋白偶联产物可免疫动物制备 $\beta$ -内酰胺类抗生素抗体及作为人工抗原应用于食品中 $\beta$ -内酰胺类抗生素检测的免疫学方法。
4. 一种抗 $\beta$ -内酰胺类抗生素单抗的制备方法, 其特征在于包括如下步骤:
  - 1) 青霉素-载体蛋白偶联产物作为免疫原免疫 BALB/C 小鼠;
  - 2) 取免疫鼠的脾细胞与 SP2/0 鼠骨髓瘤细胞在 50% 聚乙二醇融合剂下融合, HAT 筛选培养基筛选杂交瘤细胞, 用间接 ELISA 方法筛选分泌抗 $\beta$ -内酰胺类抗生素抗体的细胞;
  - 3) 采用有限稀释法进行细胞克隆, 经间接 ELISA 筛选阳性克隆, 获得能稳定传代并分泌抗 $\beta$ -内酰胺类抗生素特异性单克隆抗体的杂交瘤细胞株, 杂交瘤细胞注射入 BALB/C 小鼠腹腔制备单抗腹水;
  - 4) 采用直接竞争 ELISA 方法测定抗 $\beta$ -内酰胺类抗生素单抗与 $\beta$ -内酰胺类抗生素、卡那霉素、庆大霉素、四环素、氯霉素的交叉反应率, 选择仅与 $\beta$ -内酰胺类抗生素有特异性免疫反应, 且检测灵敏度达到 0.5-3 ng/mL 的单抗, 可用于畜产品中 $\beta$ -内酰胺类抗生素残留的检测。
5. 根据权利要求4所述的一种抗 $\beta$ -内酰胺类抗生素单抗的制备方法, 其特征在于所述的免疫原是根据权利要求书1方法偶联的青霉素-载体蛋白偶联产物。
6. 根据权利要求4所述的一种抗 $\beta$ -内酰胺类抗生素单抗的制备方法, 其特征在于所述的免疫原的载体蛋白为匙孔血蓝蛋白、人血清白蛋白、牛血清白蛋白、

牛丙种球蛋白、酶或卵清蛋白。

7.一种如权利要求4所述方法制备的抗 $\beta$ -内酰胺类抗生素单抗的用途,其特征在于,所述 $\beta$ -内酰胺类抗生素单抗用于检测食品中青霉素类抗生素残留的免疫学方法。

8.根据权利要求7所述的一种 $\beta$ -内酰胺类抗生素单抗的用途,其特征在于所述的用于检测食品中 $\beta$ -内酰胺类抗生素残留的免疫学方法为竞争ELISA或免疫检测试纸条。

9.一种用权利要求1所述方法制备的偶联产物免疫鼠、兔子、羊、驴、牛或禽制备抗 $\beta$ -内酰胺类抗生素多抗的制备方法,其特征在于包括如下步骤:

1) 初次免疫采用0.1-5mg偶联产物抗原与等体积弗氏完全佐剂充分乳化后皮下或皮内或肌肉小量、多点注射免疫;

2) 每间隙2-4周,用弗氏不完全佐剂与偶联产物抗原充分乳化后皮下或皮内或肌肉小量、多点注射,进行2-5加强免疫;

3) 末免不加佐剂,加倍剂量肌肉注射免疫,末免后7-10天后采血,离心分离血清;

4) 用蛋白A/G亲和柱纯化IgG,纯化的IgG冻干冰箱保存。

## 青霉素与载体蛋白偶联产物和 $\beta$ -内酰胺类青霉素抗体制备的方法及用途技术领域

本发明属于免疫化学生物技术领域，尤其是涉及一种青霉素与载体蛋白偶联产物和 $\beta$ -内酰胺类青霉素抗体制备的方法及用途。

### 背景技术

青霉素是一类重要的 $\beta$ -内酰胺类抗生素，它们可由发酵液提取或半合成而制得，各种 $\beta$ -内酰胺类抗生素的作用机制均相似，内酰胺类抗生素与细胞膜上的 $\beta$ -内酰胺类抗生素结合蛋白(PBP)结合而阻碍细菌细胞壁粘肽的合成，使之不能交联而造成细胞壁的缺损，致使细菌细胞破裂而死亡。这一过程发生在细菌细胞的繁殖期，因此本类药物为繁殖期杀菌药。

$\beta$ -内酰胺类抗生素通过抑制细菌转肽酶的活性、干扰细胞壁肽聚糖的合成，从而起到抗菌作用。在兽医临床上主要通过注射途径用于治疗因感染革兰氏阳性菌引起的疾病，如奶牛乳腺炎、子宫内膜炎、葡萄球菌病、链球菌病等的治疗。肌肉注射后被吸收的 $\beta$ -内酰胺类抗生素可以随血液分布到全身，也能通过乳血屏障进入乳腺。因此，无论是肌肉注射还是乳腺内注射，均可导致牛奶中的残留，威胁消费者健康，并进一步影响乳制品的发酵加工。

随着时代的发展和各种新药的出现，耐药性菌株也接踵而至（即包括药物选择压力的结果，也包括细菌自身的进化）。欧洲动物卫生联盟对欧盟和瑞士抗生素使用统计数据表明，仅1997年用于人类健康的抗生素达5460吨，用于动物健康的抗生素达3465吨，用于动物生长促进剂的抗生素达1575吨，并有逐年增加的趋势。抗生素的副作用以及耐药菌株的出现严重威胁着人类的健康，而且临床亚治疗水平的抗生素更容易促使抗性基因的转移。残留在动物性食品中的抗生素被人们食用后，除了加速人体内耐药菌株的进化之外，抗生素本身的副作用往往威胁人类尤其是孕妇和婴儿的健康，而这一点恰恰是人类认识的盲点，很容易被忽视。

引起青霉素类抗生素过敏反应的成分不是其本身，而是其降解产物青霉噻唑酸和青霉烯酸。青霉噻唑酸还可以形成聚合物，并与多肽或蛋白质结合形成青霉噻唑酸蛋白，而使其抗原性增强。它的过敏休克反应一般与给药途径和剂量无明显关系，多发生用药后20分钟内，有时呈闪电式发生，可在数秒或数分钟内出现症状。使用大剂量青霉素类抗生素可干扰凝血机制而造成出血，偶然因大量青霉素类抗生素进入中枢神经而引起中毒，可产生抽搐、神经根炎、大

小便失禁，甚至瘫痪等“青霉素类抗生素脑病”。因此不要随意加大剂量。但食品中青霉素类抗生素残留所引起的常见过敏反应包括皮肤出现红斑以及胃肠道紊乱引起的腹泻、恶心和呕吐等。然而，包括青霉素类抗生素在内的多种抗生素的最主要危害还是细菌在亚治疗抗生素剂量下产生的耐药性，而且抗性基因可以在细菌之间进行传播和转移，包括从非致病性微生物传给病原微生物，直接导致后者对正常剂量的药物治疗不再产生反应。如果含有抗性基因的病原菌污染了食物，将增加传染性食物中毒的风险，而且治疗剂量的抗生素对此将不再有效。

关于药物残留的控制既需要完善的检验方法和标准，又需要健全的监控体系。目前国际上对抗生素类药物残留的检测主要有仪器分析法（包括 HPLC 和 GC-MS）和微生物学法（主要用于抗生素残留的检测）等。仪器分析法既要求仪器设备具有相当高的精度，也要求技术人员具有较好的分析操作技能，其昂贵的价格和缓慢的软件更新速度以及操作上的烦琐限制了其在一般实验室中的应用。但由于检测的灵敏度可以达到 ng 级水平（ppb 级），在一些大型实验室仍将其作为残留检测的参考标准使用。

ELISA 法操作上的简便、快速和达到 ng 级水平的灵敏度等优点，目前备受有关部门的青睐，而 ELISA 法的第一步就需要特异性的高效价抗体。一些国外厂商已经研制出了部分药物残留的 ELISA 检测试剂盒，但价格昂贵。所以研制国产化的药物残留检测试剂盒对推动我国动物性产品的出口、保证国人的健康等方面具有重要意义。

FAO/WHO 食品添加剂联合专家委员会第 36 次、第 50 次会议对  $\beta$ -内酰胺类抗生素药物的毒理学评估如下：动物性食品中抗微生物药物（包括  $\beta$ -内酰胺类抗生素）的残留对于消费这些食品的消费者都可以产生危险，特别是在低浓度下就能产生的毒副作用的药物以及对于敏感个体产生过敏反应的药物必须引起高度重视。因此，委员会将过敏反应作为  $\beta$ -内酰胺类抗生素残留安全评估的决定因素，并推荐  $\beta$ -内酰胺类抗生素的 ADI 应低于  $30\mu\text{g}$ 。FAO/WHO 食品添加剂联合专家委员会对 Benzylpenicillin（ $\beta$ -内酰胺类抗生素 G、苄  $\beta$ -内酰胺类抗生素）MRL 建议标准：所有动物：肌肉 50ppb，肝 50ppb，肾 50bbp，乳  $4\mu\text{g/L}$ 。欧盟  $\beta$ -内酰胺类抗生素 MRL 标准：所有能加工成食品的动物：肌肉、肝、肾、脂肪为 50bbp；乳为 4bbp。关于  $\beta$ -内酰胺类抗生素残留的检测目前已从最初的微生物生长抑制试验，发展到比较灵敏的仪器分析法（HPLC、GC-MS）。

$\beta$ -内酰胺类抗生素在畜牧业中的滥用导致动物体内药物的滞留或蓄积，并以

残留的方式进入人体及生态系统。它对人体及环境的危害主要是慢性、远期和累积性的。抗生素耐药菌株的存在将严重威胁着人类的健康，而且临床亚治疗水平的抗生素更容易促使抗性基因的转移，比如对动物进行低水平  $\beta$ -内酰胺类抗生素治疗，其粪肠菌群由对  $\beta$ -内酰胺类抗生素敏感逐渐变成抗  $\beta$ -内酰胺类抗生素最后发展成对其它药物也产生抗性。在长期的生活中，恰恰是人类和动物肠道的正常菌群成了耐药基因的储存库，并不断的将耐药基因转移给致病菌，并在人和动物中交叉传播，尤其是释放到环境中耐药菌的危害更为严重，可造成耐药基因的迅速转移。随着人们生活水平以及对滥用抗生素危害性认识的提高，人们非常重视食品中抗生素的残留，喜欢食用无抗生素残留的畜产品和水产品。

### 发明内容

本发明的目的是提供一种青霉素与载体蛋白偶联产物和  $\beta$ -内酰胺类青霉素抗体制备的方法及用途。

青霉素与载体蛋白偶联产物的制备方法包括如下步骤：

- a) 将20-200mg青霉素钠盐、5-100mgN-羟基丁二酰亚胺和20-200mg碳化二亚胺加到1-10毫升超纯水中，在冰浴中搅拌10-50分钟；
- b) 上述溶液中边搅拌边逐滴加入含10-100mg 载体蛋白的超纯水1-10毫升，加毕在4-30℃搅拌反应3-20小时，合成青霉素-载体蛋白偶联产物；
- c) 青霉素-载体蛋白偶联产物放入透析袋中，用0.01M pH7.2的磷酸盐缓冲液在4℃透析1-3天；
- d) 透析后的青霉素-载体蛋白偶联产物进行紫外扫描，分析鉴定偶联产物及浓度测定，分装后于-20℃冰箱保存备用。

所述的载体蛋白为匙孔血蓝蛋白、人血清白蛋白、牛血清白蛋白、牛丙种球蛋白、酶或卵清蛋白。

所述的青霉素-载体蛋白偶联产物可免疫动物制备 $\beta$ -内酰胺类抗生素抗体及作为人工抗原应用于食品中 $\beta$ -内酰胺类抗生素检测的免疫学方法。

抗  $\beta$ -内酰胺类抗生素单抗的制备方法包括如下步骤：

- 1) 青霉素-载体蛋白偶联产物作为免疫原免疫 BALB/C 小鼠；
- 2) 取免疫鼠的脾细胞与 SP2/0 鼠骨髓瘤细胞在 50 %聚乙二醇融合剂下融合，HAT 筛选培养基筛选杂交瘤细胞，用间接 ELISA 方法筛选分泌抗  $\beta$ -内酰胺类抗生素抗体的细胞；
- 3) 采用有限稀释法进行细胞克隆，经间接 ELISA 筛选阳性克隆，获得能稳

定传代并分泌抗  $\beta$ -内酰胺类抗生素特异性单克隆抗体的杂交瘤细胞株；杂交瘤细胞注射入 BALB/C 小鼠腹腔制备单抗腹水；

4) 采用直接竞争 ELISA 方法测定抗  $\beta$ -内酰胺类抗生素单抗与  $\beta$ -内酰胺类抗生素、卡那霉素、庆大霉素、四环素、氯霉素的交叉反应率，选择仅与  $\beta$ -内酰胺类抗生素有特异性免疫反应，且检测灵敏度达到 0.5-3 ng/mL 的单抗，可用于畜产品中  $\beta$ -内酰胺类抗生素残留的检测。

所述的免疫原是根据权利要求书 1 方法偶联的青霉素-载体蛋白偶联产物。

所述的免疫原的载体蛋白为匙孔血蓝蛋白、人血清白蛋白、牛血清白蛋白、牛丙种球蛋白、酶或卵清蛋白。

抗  $\beta$ -内酰胺类抗生素单抗用于检测食品中青霉素类抗生素残留的免疫学方法。所述的用于检测食品中  $\beta$ -内酰胺类抗生素残留的免疫学方法为竞争 ELISA 或免疫检测试纸条。

青霉素-载体蛋白偶联产物免疫鼠、兔子、羊、驴、牛或禽制备抗  $\beta$ -内酰胺类抗生素多抗的制备方法包括如下步骤：

1) 初次免疫采用 0.1-5mg 偶联产物抗原与等体积弗氏完全佐剂充分乳化后皮下或皮内或肌肉小量、多点注射免疫；

2) 每间隙 2-4 周，用弗氏不完全佐剂与偶联产物抗原充分乳化后皮下或皮内或肌肉小量、多点注射，进行 2-5 加强免疫；

3) 末免不加佐剂，加倍剂量肌肉注射免疫，末免后 7-10 天后采血，离心分离血清；

4) 用蛋白 A/G 亲和柱纯化 IgG，纯化的 IgG 冻干冰箱保存。

本发明的优点是：1) 本发明提供一种能制备检测食品中  $\beta$ -内酰胺类抗生素残留的抗体的青霉素免疫原偶联方法，其操作简单方便；2) 提供了一种能获得检测  $\beta$ -内酰胺类抗生素残留的抗体的制备方法，其方法简单有效；3) 利用本发明所制备的抗体，可有效地用于畜产品中  $\beta$ -内酰胺类抗生素残留的检测。目前  $\beta$ -内酰胺类抗生素残留的检测主要有仪器分析和免疫分析两种方法，其中仪器分析法主要用高效液相色谱法(HPLC)、气相色谱 (GC)，由于其存在仪器昂贵、操作烦琐、费时费力、费用高、不能大规模现场检测等问题，也要求技术人员具有一定的操作和分析技能，因而不能很好推广应用。酶联免疫吸附分析(ELISA) 具有简便、快捷、能大规模检测、灵敏和成本低廉及现场检测的优点，尤其适合在生产和流通过程中对畜产品及水产品中  $\beta$ -内酰胺类抗生素等抗生素残留进行检测。胶体金免疫层析试纸条应用广泛，已有多种可检测人、动物、植物病原、

癌症抗原、激素、药物与农药残留的试纸条，该方法具有如下优点：操作简单、方便、快速，几乎人人都会使用；不需任何设备；结果准确可靠、特异性强、灵敏度高；低成本高效益；保存方便等。因此免疫层析试纸条目前已成为多种物质免疫学检测的发展方向之一。本专利应偶联的人工抗原制备抗  $\beta$ -内酰胺类抗生素抗体，以该多抗为核心开发  $\beta$ -内酰胺类抗生素残留检测试剂盒及胶体金免疫层析试纸条，为我国动物源食品中  $\beta$ -内酰胺类抗生素残留的快速检测服务。

### 具体实施方式

本发明提供了青霉素与载体蛋白偶联产物和  $\beta$ -内酰胺类青霉素抗体制备的方法及用途。用制备的免疫原制备  $\beta$ -内酰胺类抗生素的特异性强、灵敏度高、稳定性好、能大量生产的单克隆抗体和多抗，并用这些抗体建立了检测食品中  $\beta$ -内酰胺类抗生素残留具有高度特异性、灵敏性和正确性的快速诊断方法—竞争ELISA 及免疫层析试纸条，可有效地用于畜产品中  $\beta$ -内酰胺类抗生素残留的检测，为我国的食品安全服务。

#### 1.一种青霉素与牛血清白蛋白（BSA）偶联产物的制备方法的步骤：

a) 将20 mg青霉素钠盐、5 mgN-羟基丁二酰亚胺和20 mg碳化二亚胺加到1毫升超纯水中，在冰浴中搅拌10-50分钟；

b) 上述溶液中边搅拌边逐滴加入含10mg BSA的超纯水1毫升，加毕在4-30℃搅拌反应3-20小时，合成青霉素-BSA偶联产物；

c) 青霉素-BSA偶联产物放入透析袋中，用0.01M pH7.2的磷酸盐缓冲液在4℃透析1-3天；

e) 透析后的青霉素-BSA偶联产物、青霉素胺、BSA溶液进行紫外扫描，分析鉴定偶联产物及浓度测定，分析发现偶联产物的紫外扫描图形与BSA、青霉素的扫描图形明显不同，说明青霉素已与BSA偶联成功，偶联产物分装后于-20℃冰箱保存，用于免疫动物制备抗体及作为青霉素人工抗原应用于食品中 $\beta$ -内酰胺类抗生素检测的免疫学方法。

#### 2.一种青霉素与牛血清白蛋白（BSA）偶联产物的制备方法的步骤：

a) 将200mg青霉素钠盐、100mgN-羟基丁二酰亚胺和200mg碳化二亚胺加到10毫升超纯水中，在冰浴中搅拌10-50分钟；

b) 上述溶液中边搅拌边逐滴加入含100mg BSA的超纯水10毫升，加毕在4-30℃搅拌反应3-20小时，合成青霉素-BSA偶联产物；

c) 青霉素-BSA偶联产物放入透析袋中，用0.01M pH7.2的磷酸盐缓冲液在4℃透析1-3天；

e) 透析后的青霉素-BSA偶联产物、青霉素胺、BSA溶液进行紫外扫描, 分析鉴定偶联产物及浓度测定, 分析发现偶联产物的紫外扫描图形与BSA、青霉素的扫描图形明显不同, 说明青霉素已与BSA偶联成功, 偶联产物分装后于-20℃冰箱保存, 用于免疫动物制备抗体及作为青霉素人工抗原应用于食品中β-内酰胺类抗生素检测的免疫学方法。

### 3.β-内酰胺类抗生素单克隆抗体的制备方法

#### 1) 免疫动物

青霉素-BSA 偶联产物免疫四周龄体重 18-20 g BALB/C 雌性小鼠: 取 1 mg/ml 青霉素-BSA 偶联产物 0.5-0.7 ml 与等体积福氏完全佐剂混合, 充分乳化后, 经背腹部皮下多点注射 0.2-0.3ml/只, 间隔 3-4 周, 取与一免等量抗原和等体积的福氏不完全佐剂充分乳化后, 进行腹腔注射加强免疫 (0.2-0.3ml/只), 共进行 3-5 次加强免疫, 不加佐剂的末免用加倍剂量的抗原进行腹腔注射, 3 天后取脾细胞进行融合。

#### 2) 细胞融合

取上述免疫小鼠脾细胞与小鼠骨髓瘤细胞 (SP2/0) 按 5-10: 1 的比例, 在无血清的 RPMI-1640 (Gibco) 培养基中混匀, 1500 rpm 离心 5 min, 去除培养基, 用 50 % PEG(聚乙二醇, Sigma)作为融合剂, 在 37℃下水浴下加入 0.5-0.7ml, 使其融合 2 min, 用无血清的 RPMI-1640 培养基终止融合后 1500 rpm 离心 5 min, 沉淀用 HAT 筛选培养基 (Sigma) 悬浮, 分装到 96 孔含有饲养细胞的细胞板中, 37℃, 5 % CO<sub>2</sub> 的细胞培养器皿中培养。

#### 3) 杂交瘤细胞、阳性孔的筛选及其克隆

细胞在培养器皿中培养 5 天后, 用 HAT 筛选培养基换液一次, 第 10 天用 HT 培养基换液, 等到融合细胞覆盖孔底 5%-50%时, 用青霉素偶联卵清蛋白作为包被抗原进行间接 ELISA 方法筛选阳性孔, 共获 258 多个对 β-内酰胺类抗生素有反应的阳性孔, 阳性率为 5 %。选择 5 个呈强阳性反应的细胞孔, 进行有限稀释法克隆, 获得 5G2 株能分泌抗 β-内酰胺类抗生素的特异性抗体的杂交瘤细胞株。经 6 个月以上体外传代和多次冻存复苏后, 细胞株均能良好生长, 并稳定分泌抗体。经扩大培养后, 用于腹水制备和液氮保存。

#### 4) 单克隆抗体腹水制备及纯化

取 8 周龄左右 BALB/C 小鼠, 腹腔注射 0.3-0.5 ml 降植烷 (Sigma), 7-10 天后腹腔注入  $5-10 \times 10^5$  个杂交瘤细胞, 注射后 7-10 天可见小鼠腹部明显膨大, 采取腹水, 3000-5000 rpm 离心 3-5 min, 收集上清液, 即为单克隆抗体腹水。取

1 倍体积腹水加 2 倍体积 0.06 M pH 4.8 醋酸缓冲液稀释,加辛酸(30 ul/ml 腹水),室温下边加边搅拌,4℃澄清 1 小时,12000 rpm 离心 20 min,收集上清,再用 50%饱和硫酸铵沉淀免疫球蛋白,4℃放置 2 小时,3000-5000 rpm 离心 20 min,沉淀用 2 倍体积的 PBS 溶液溶解,在 4℃流动透析 24 小时后即获纯化的腹水抗体,-70℃保存。

#### 5) 单克隆抗体的亚类鉴定和腹水效价测定

将纯化的单抗腹水与 Sigma 公司的标准抗 BALB/C 小鼠 IgG、IgG<sub>1</sub>、IgG<sub>2a</sub>、IgG<sub>2b</sub>、IgG<sub>3</sub>、IgM 抗体,作双向琼脂扩散试验,结果为,5G2 的抗体类型及亚类为 IgG<sub>1</sub>,单克隆抗体的轻链为 κ 链。用常规间接 ELISA 方法检测单抗腹水效价,结果为上述腹水效价均在 10<sup>-6</sup>以上。

#### 4. 检测 β-内酰胺类抗生素残留的直接竞争 ELISA 方法的建立

##### 1) 青霉素-辣根过氧化物酶 (HRP) 偶联产物的制备:

a) 将40mg青霉素钠盐、13mgN-羟基丁二酰亚胺和53mg碳化二亚胺加到2毫升超纯水中,在冰浴中搅拌10-50分钟;

b) 上述溶液中边搅拌边逐滴加入含20mg HRP的超纯水2毫升,加毕在4-30℃搅拌反应3-20小时,合成青霉素-HRP偶联产物;

c) 青霉素-辣根过氧化物酶 (HRP) 偶联产物放入透析袋中,用pH7.2的磷酸盐缓冲液 (PBS) 在4℃透析1-3天;

d) 透析后的青霉素-HRP偶联产物、青霉素、HRP溶液进行紫外扫描,鉴定偶联产物,分析发现偶联产物的紫外扫描图形与青霉素、HRP的扫描图形明显不同,说明青霉素已与HRP偶联成功,偶联产物分装后于-20℃冰箱保存,用于检测β-内酰胺类抗生素的直接竞争ELISA方法。

##### 2) 直接竞争 ELISA 方法条件优化:

用方阵试验法对抗体和酶标半抗原的进行一系列浓度的稀释,确定直接竞争 ELISA 法抗体和酶标半抗原的最适工作浓度。OD<sub>450</sub> 值约为 1.0,抗体抗原用量较少的浓度组合,即为抗体-抗原的最佳工作浓度。首先,将单抗用 PBS (0.01 M, pH 7.4) 稀释成一系列浓度,分别依次加入 96 孔酶标板 (100μL/well), 37 °C 下温育 2 h, PBST 洗涤 3 次; 用含 2.0% 脱脂奶的 PBS 封闭, 每孔 300 μL, 37 °C 温育 0.5 h, 后用 PBST 洗涤 3 次; 加入预先以 PBS 稀释成不同浓度的酶标半抗原, 在微量震荡器上混匀, 37 °C 下温育 1 h, PBST 洗涤 3 次; 加入底物溶液 (100 μL/well), 37 °C 温育 15 min, 加入终止液 (50 μL/well), 用酶标仪测定各孔的 OD<sub>450</sub> 值。

### 3) 抗体亲和性及检测灵敏度

在优化的条件下，在预先包被好单抗的酶标板上，加入系列浓度的青霉素钠盐标样，每浓度3孔重复，设不加青霉素钠盐对照和溶剂空白对照，50  $\mu\text{L}/\text{well}$ ，再加入0.22 $\mu\text{g}/\text{ml}$  酶标半抗原50  $\mu\text{L}$ ，震荡1 min后37  $^{\circ}\text{C}$ 下温育1 h，PBST洗涤 4次；加入TMB底物溶液（100  $\mu\text{L}/\text{well}$ ），37  $^{\circ}\text{C}$ 温育15 min，加入2M硫酸终止液（50  $\mu\text{L}/\text{well}$ ），用酶标仪测定各孔的OD<sub>450</sub>值。以抑制率与青霉素钠盐浓度的半对数绘制标准曲线。抑制率I计算公式如下：

$$I\% = \frac{(\text{OD}_{\text{max}} - \text{OD}_{\text{min}}) - (\text{OD}_x - \text{OD}_{\text{min}})}{(\text{OD}_{\text{max}} - \text{OD}_{\text{min}})} \times 100$$

式中：OD<sub>max</sub>-不加抗生素的吸光值；OD<sub>x</sub>-抗生素浓度为x时的吸光值；OD<sub>min</sub>-空白对照孔的吸光值。

以抑制率达到50%的抗生素浓度（IC<sub>50</sub>）来表示抗体对青霉素钠盐的亲合性，以IC<sub>10</sub>作为ELISA方法的检测灵敏度。在优化的ELISA分析条件下，对青霉素钠盐建立标准曲线，以考察其在最优化的反应体系中的检测灵敏度。根据竞争ELISA反应标准曲线计算得IC<sub>50</sub>为11.58 ng/ml，IC<sub>10</sub>为0.3 ng/ml。

### 4) $\beta$ -内酰胺类抗生素单抗的特异性

在优化的条件下，将 $\beta$ -内酰胺类抗生素标准品（青霉素钠盐、安苄青霉素、羧苄青霉素等）、卡那霉素、、庆大霉素、四环素、氯霉素、作系列稀释，分别与单抗进行直接竞争ELISA，制作标准曲线，并在曲线上找出抑制率50%的浓度，以及上述几种物质50%抑制率的浓度，然后计算出各类抗生素的交叉反应率。交叉反应率CR计算方法为CR% = 青霉素IC<sub>50</sub>/其它抗生素IC<sub>50</sub> × 100。结果表明，5G2单抗与青霉素G、安苄青霉素、羧苄青霉素 $\beta$ -内酰胺类抗生素的交叉反应率分别为100%、91%、78%，与卡那霉素、庆大霉素、四环素、氯霉素的交叉反应率均小于0.1%。说明制备的单抗的特异性很高，仅对 $\beta$ -内酰胺类抗生素有特异性反应。

### 5. 抗 $\beta$ -内酰胺类抗生素多抗的制备

用青霉素与载体蛋白偶联产物免疫鼠、兔子、羊、驴、牛、禽等动物制备多抗。初次免疫采用偶联产物人工抗原（0.1-5mg）与等体积弗氏完全佐剂（complete freund's adjvant, CFA）充分乳化，然后皮下或皮内或肌肉小量、多点注射；间隙2-4周后，再用弗氏不完全佐剂（incomplete freund's adjvant, IFA）与抗原充分乳化，然后皮下或皮内或肌肉小量、多点注射进行加强免疫；间隙2-4周，进行2-5加强免疫；末免不加佐剂，直接肌肉注射，末免后7-10天后采

血。每次免疫后 4-8 采少量血，进行 ELISA 效价的测定，效价满意后大量采血，离心分离血清。用蛋白 A/G 亲和柱纯化 IgG，纯化的 IgG 用于食品中  $\beta$ -内酰胺类抗生素检测的免疫学方法。

## 6. 免疫层析试纸条的制备

胶体金的制备及单抗的金标记：

胶体金颗粒制备 在100 ml去离子水中加入1%柠檬酸三钠1 ml，煮沸后迅速加入1%氯金酸1 ml，继续煮沸15 min，冷却后，4 °C下保存备用。通常情况下，制备好的胶体金颗粒的大小平均为30 nm。

单抗的金标记：

取已制备好的胶体金溶液100 ml，用0.1 mol/L碳酸钾溶液调pH 到8.0。边搅拌边加入单抗2.2 mg，搅拌15 min，再逐滴加入2.5 ml 25 mg/ml聚乙二醇20000 (PEG 20000)，搅拌20 min。20 000 r/min离心20 min，弃上清液，加入10 ml pH 7.4 PBS缓冲液(含0.4 mg/ml PEG)清洗2 次。将沉淀用5ml 含2% BSA 的PBS 缓冲液(pH 7.4)溶解，用0.22 $\mu$ m 无菌过滤器过滤后，4 °C保存备用。

免疫层析试纸条的组装：

用点膜机把适当浓度的青霉素-BSA抗原及羊抗鼠IgG 喷在NC 膜上，分别作为检测线(T)和控制线(C)，在37 °C烘箱干燥8 h。以同样方法，将制备好的金标记 $\beta$ -内酰胺类抗生素单抗包被在胶体金结合垫上。将样品垫、胶体金结合垫、硝酸纤维素膜及吸水垫依次粘贴在底板上，从而组成一个连续的微滤体系。将贴好的板切割成4 mm 宽的条，装入模板中制成检测试剂板，避光、密闭、常温保存备用。

用滴管吸取待检样品溶液，滴加3滴(约100ul)于上述试剂板的加样孔中，加样后开始计时；结果应在3-5分钟内读取，其他时间判读无效；读取结果时，检测试剂应图3右侧所示摆放方式置于观察者正面。根据观察区的T、C线的颜色比对来确定结果，T线显色比C线深或者相等时，结果判定为阴性。当T线颜色显色比C线浅时，检测结果为阳性。

将青霉素标准品配置成不同浓度的分析试样溶液：0、1、3、5、7、10、15、20、30、40、50、60、70、80、90、100 ng/ml，用检测试纸条进行测定，每个试样做3 个重复，5 min 后观察结果，检测结果表明，当样品中青霉素钠盐残留药物的含量达到或超过1.1g/ml，由于大多数单克隆抗体被样品中的青霉素残留竞争结合，T线的包被抗原结合到的青霉素单克隆抗体就很少或者没有，T线的显色明显比C线浅或不显色，结果为阳性；当样品中青霉素残留的含量低于

0.80ng/ml时，T 线呈色与C 线一致或比C线浅，结果为阴性；无论是阳性还是阴性结果，胶体金-青霉素单抗结合物总能与C线处的羊抗鼠IgG结合，形成一条紫红色的条带。如果，C线不显色，无论是T线有无，这时的结果均无效。

检测试剂板的稳定性试验：

用同一批次不同检测试剂板检测同一样品，及用不同批次检测试剂板测定同一样品，其质控线、检测线的显色时间及颜色深浅和最终结果判读基本相同。将相同批次的试剂板置于37℃、室温、4℃密闭保存3个月，每2周各检测阳性和阴性奶样各20份，结果显示随着时间和温度的变化，检测结果未发生大的变化。根据37℃下一天相当于1周估算，本试剂板可以在室温下保存12个月。

专利名称(译)	青霉素与载体蛋白偶联产物和β - 内酰胺类青霉素抗体制备的方法及用途		
公开(公告)号	<a href="#">CN101429241A</a>	公开(公告)日	2009-05-13
申请号	CN200810162588.5	申请日	2008-12-04
[标]申请(专利权)人(译)	浙江大学		
申请(专利权)人(译)	浙江大学		
当前申请(专利权)人(译)	浙江大学		
[标]发明人	吴建祥		
发明人	吴建祥		
IPC分类号	C07K14/795 C07K14/765 C07K14/77 C07K16/00 C07K16/44 C07K16/06 C12N9/00 G01N33/53 G01N33/577		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明提供一种青霉素与载体蛋白偶联产物、β - 内酰胺类青霉素抗体制备的方法及用途。用本发明偶联的青霉素人工抗原免疫动物制备可用于食品中β - 内酰胺类青霉素检测的抗体；免疫的BALB/C小鼠脾细胞与SP2/0鼠骨髓瘤细胞融合，用与载体蛋白偶联的β - 内酰胺类抗生素作为包被抗原筛选阳性杂交瘤细胞、经细胞克隆获得能稳定传代并分泌抗β - 内酰胺类抗生素抗体的杂交瘤细胞，并制备腹水单抗。利用制备的抗体建立了对β - 内酰胺类抗生素具有高度特异性、灵敏性和精确性的直接竞争ELISA方法及免疫胶体金试纸条。本发明提供的青霉素与载体蛋白偶联产物及β - 内酰胺类抗生素抗体的制备方法，可为快速检测食品中β - 内酰胺类抗生素残留服务。

$$I\% = \frac{(OD_{max} - OD_{min}) - (OD_x - OD_{min})}{(OD_{max} - OD_{min})} \times 100$$