

展青霉素特异性抗体的制备及其免疫学检测方法的探析

金妙坚

杭州源抗生物技术有限公司 浙江杭州 310000

【摘要】青霉素作为一种毒性真菌代谢产物，广泛存在于霉变水果及相关制品中，严重威胁食品安全和人类健康。本研究聚焦于青霉素特异性抗体的制备以及免疫学检测方法的探索。通过合理设计半抗原与载体蛋白的偶联策略，成功制备免疫原并免疫动物获得抗血清，随后经多步分离纯化获得高特异性抗体。在免疫学检测方法方面，详细研究了间接酶联免疫吸附测定法（ELISA）和免疫层析法的关键参数与条件，优化后建立的方法展现出良好的灵敏度、特异性和稳定性，为青霉素的快速、准确检测提供了有效的技术手段，对保障食品安全具有重要意义。

【关键词】青霉素；异性抗体；制备；免疫学检测方法；探析

【中图分类号】Q51

Preparation of specific penicillin antibodies and immunological detection methods

Jin MiaoJian

Hangzhou Yuan Antibiotic Technology Co., LTD., Hangzhou, Zhejiang Province 310000

【Abstract】 Penicillin, as a toxic fungal metabolite, is widely found in moldy fruits and related products, posing a serious threat to food safety and human health. This study focuses on the preparation of penicillin-specific antibodies and the exploration of immunological detection methods. By rationally designing coupling strategies between haptens and carrier proteins, we successfully prepared an immunogen and immunized animals to obtain antiserum. Subsequently, high-specificity antibodies were obtained through multiple steps of purification. In terms of immunological detection methods, we conducted detailed studies on the key parameters and conditions of indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and immunochromatography. After optimization, the established methods demonstrated excellent sensitivity, specificity, and stability, providing effective technical means for rapid and accurate detection of penicillin, which is of great significance for ensuring food safety.

【Key words】 penicillin; heterologous antibody; preparation; immunological detection method; analysis

展青霉素（Patulin, PAT）是由很多真菌（青霉属、曲霉属、丝衣霉属）产生的有毒次级代谢产物，它具有广谱抗菌性，但在对人和动物产生多方面的毒性作用，如神经毒、免疫毒、致畸性、致癌性等。食品安全要求必须加强食品中有毒物质的监控，为了快速、准确、有效地对食品中展青霉素残留进行检测，开发出高特异、高灵敏度、方便快捷的快速检测技术尤为关键。而免疫学快速检测技术因方法简单易行、检测时间短、敏感性高、价格低廉等特点在食品安全检测中得到广泛应用，这些免疫学快速检测方法的关键是制备特异的、高效价的单克隆抗体和多克隆抗体。因此，青霉素抗原特异性抗体的研究和青霉素特异性免疫学方法研究有着理论意义和实践意义，可以对食品中青霉素的检测起可靠的支撑作用，保障消费者饮食安全[1]。

1 展青霉素特异性抗体的制备

1.1 半抗原设计与合成

青霉素本身是一个小分子物质，分子量较小，本身无免疫原性，需与载体蛋白偶联形成全抗原后才能诱发动物产生免疫应答。设计半抗原是制备特异抗体的第一步，需保留青

霉素的分子特征结构并设计连接臂，从而与载体蛋白偶联。

1.1.1 结构分析与连接臂选择

通过对展青霉素的化学结构进行研究，找出展青霉素的重要免疫决定簇。选取适于连接臂的长和化学性质的连接臂，即 AHA。连接臂的长和柔顺性能够影响半抗原与载体蛋白间的偶联效应和抗体特异性与亲和力，而 6-氨基己酸有中等长度且柔顺性良好，它可在不改变青霉素分子构型和免疫原性的基础上为偶联提供相应的间隔。

1.1.2 合成步骤

通过化学合成反应，将展青霉素偶联到 6-氨基己酸上。将展青霉素溶于适当溶剂，如二氯甲烷。加入一定量的 N，N'-二环己基碳二亚胺（DCC）和 N-羟基琥珀酰亚胺（NHS），低温反应一段时间，使展青霉素分子上的羧基被活化，形成活泼的酯键。加入 6-氨基己酸，常温反应几小时后，经柱层析等方法对反应产物进行分离纯化即可获得青霉素-6-氨基己酸半抗原。

1.1.3 半抗原鉴定

采用核磁（NMR）、质谱（MS）等分析技术进行半抗原结构鉴定。通过 NMR 谱图可测定半抗原中各原子的化学位移和耦合常数，测定连接臂是否连至展青霉素分子上和是否为正确的半抗原结构；质谱分析可准确测定半抗原的分子

量,从而最终确定出合成产物的结构与纯度[2]。

1.2 全抗原制备

1.2.1 偶联方法

展青霉素半抗原以碳化二亚胺法(EDC法)与牛血清白蛋白偶联。碳化二亚胺(EDC)是半抗原载体偶联中最常用的一种偶联剂。EDC为酸性化合物,当其与半抗原上的羧基反应,形成活泼中间体,能和载体蛋白上的氨基发生亲核取代反应生成半抗原载体蛋白共价连接的全抗原。具体方法为:展青霉素半抗原用二甲亚砜(DMSO)溶解,加入适量的N-羧基琥珀酰亚胺(NHS)和碳化二亚胺(EDC),低温避光搅拌反应一段时间使其活化,再缓慢将活化的半抗原溶液滴加到牛血清白蛋白的磷酸盐缓冲液(PBS, pH7.4)中,在室温下搅拌反应数小时即可。

1.2.2 全抗原鉴定

使用紫外分光法和 SDS-PAGE 电泳鉴定全抗原。利用紫外分光分析比较半抗原、载体蛋白及全抗原在 280nm 处的吸光度峰变化,初步判定半抗原能否偶联到载体蛋白上。利用 SDS-PAGE 电泳观测全抗原分子量的变化及纯度情况。全抗原在凝胶上的移动位置对比载体蛋白发生明显改变且经过考马斯亮蓝染色后,在凝胶上出现清晰的条带,则进一步证明半抗原是否能够偶联到载体蛋白上,全抗原也有很好的纯度和完整性。

1.3 动物免疫与抗体效价测定

1.3.1 动物选择与免疫程序

选用健康 Balb/c 小鼠作为免疫动物,免疫程序采取多次免疫方法,具体做法为:展青霉素-BSA 全抗原:弗氏完全佐剂=1:1,搅拌乳化后多点腹部皮下注射,每只小鼠注射 100 μ g 抗原剂量,2 周后首免后第 1 次加强免疫,全抗原:弗氏不完全佐剂=1:1,搅拌乳化后多点腹部皮下注射,抗原量 50 μ g,每 1 周加强免疫 3~4 次。

1.3.2 抗体效价测定

在每次加强免疫后的 7~10 天,采集小鼠的尾静脉血,分离血清,采用间接 ELISA 法测定抗体效价。将展青霉素-BSA 全抗原包被在酶标板上,加入不同稀释度的小鼠血清,孵育后洗涤,再加入酶标记的羊抗鼠 IgG 抗体,最后加入底物显色。在酶标仪上测定 450 nm 波长处的吸光度值,以吸光度值大于阴性对照 2.1 倍的血清最高稀释度作为抗体效价。当抗体效价达到满意水平(如 1:10000 以上)时,进行小鼠的心脏采血,收集抗血清[3]。

1.4 抗体的分离与纯化

粗提方法:根据硫酸铵法提纯抗血清(硫酸铵法)。往抗血清中慢慢滴加硫酸铵晶体,搅拌的同时滴加硫酸铵晶体,直至饱和度到达 50%时,抗体与其它蛋白一起沉淀出来,留在溶液中的物质主要是杂质,再搅拌一段时间后,以一定速度离心,取沉淀,以一定体积的 PBS 溶解沉淀,再透析去除硫酸铵,即可获得初步纯化好的抗体溶液。

2 免疫学检测方法的探索

2.1 间接酶联免疫吸附测定法(ELISA)

2.1.1 条件优化

优化间接 ELISA 方法中包被抗原的浓度、抗体稀释度、孵育时间和温度、封闭液类型与浓度等条件。方阵滴定法确定抗原包被浓度以及抗体稀释度。将不同浓度的展青霉素-BSA 全抗原分别包被于酶标板中,加入不同稀释度的展青霉素纯抗体,测吸光度值以确定能够获得最佳信号-噪声比的抗原包被浓度和抗体稀释度。优化孵育时间和温度,研究不同孵育时间(37℃孵育 30min、60min 和 90min)以及不同孵育温度(37℃和 25℃)对检测的影响,选择灵敏度和特异性较好的孵育条件。研究不同封闭液(5%脱脂奶粉和 1%BSA 等)和不同浓度封闭液(5%、10%、20%等)的封闭条件,分析不同封闭条件下对非特异性吸附的影响,选择合适的封闭条件以降低背景。

2.1.2 标准曲线绘制

以 PBS 溶液将展青霉素标准品制成质量浓度分别为 0.1ng/mL、0.5ng/mL、1ng/mL、5ng/mL、10ng/mL、50ng/mL 等的标准溶液;依据优化的间接 ELISA 方法进行检测,以展青霉素浓度的以 lg 浓度为横坐标,吸光度值为纵坐标绘制工作曲线,利用四参数逻辑回归拟合工作曲线,得到标准曲线方程式,样品中展青霉素含量的计算。

2.1.3 灵敏度、特异性和稳定性评估

灵敏度通过计算半数抑制浓度(IC50)进行评定,IC50 值越小说明检测方法的灵敏度越好,特异性通过检测与展青霉素结构类似的化合物(如棒曲霉素、赭曲霉毒素等)的交叉反应率进行评定,交叉反应率越低说明检测方法的特异性越好,稳定性通过检测同一样品多次及检测同一样品在不同检测时刻次数来观察检测结果的重复性和一致性进行评定。

2.2 免疫层析法

2.2.1 试纸条制备

免疫层析试纸条主要由样品垫、结合垫、硝酸纤维素膜(NC膜)、吸水垫和底板组成。在结合垫上喷涂用胶体金标记的展青霉素特异性抗体,在 NC 膜上分别包被展青霉素-BSA 全抗原(检测线, T 线)和羊抗鼠 IgG 抗体(控制线, C 线)。将各部件按照一定顺序组装在底板上,切割成一定宽度的试纸条。

2.2.2 条件优化

优化免疫层析法各步骤的条件,包括胶体金标记抗体浓度、金标抗体的喷涂量、抗原、抗体的包被浓度、反应时间等。通过实验确定使试纸条检测灵敏度和特异性达到最佳的各参数的最佳条件。例如优化胶体金标记抗体浓度,分析不同标记抗体浓度对检测信号强度及灵敏度的效应,调整金标抗体的喷涂量和抗体、抗原的包被浓度,达到清晰的检测线和控制线,优化反应时间,确定可获得检测结果快速且有效的最佳反应时间。

2.2.3 检测性能评估

利用免疫层析试纸条进行检测结果分析评价,包括灵敏度、特异性、稳定性及检测限。灵敏度的评价方法为观察不同浓度的展青霉素标准品在试纸上形成检测线后有无明显

颜色变化,能检测到使试纸条检测线颜色可见的最低展青霉素浓度。特异性的评价方法为检测与展青霉素结构相似的化合物,观察试纸条上是否产生假阳性结果。试纸条的稳定性评价方法是将试纸条在常温及 4℃等环境下放置一段时间后检测评价。检测限的评价方法为在重复实验多批次测定低浓度的展青霉素标准品后,确定检测展青霉素可以得到的最小量。

3 讨论

3.1 抗体制备方法的影响

在青霉素特异抗体的制备过程中,半抗原的结构和合成、全抗原的制备以及动物的免疫程序等都会对面源青霉素抗血清的质量和水平起到一定的影响,而恰当的半抗原设计能够保证所留下的青霉素的免疫决定簇是关键基团,同时要合适数目的连接臂便于合成的半抗原和载体蛋白偶联效果好和特异性。本文选用了 6-氨基己酸作为连接臂成功合成了具有免疫原性的半抗原,而在全抗原的制备中采用碳化二亚胺方法将半抗原有效偶联至载体蛋白,但是在偶联过程中对反应条件有较高要求,优化后的偶联工艺能够有效提高所制备全抗原的纯度和免疫原性从而诱导小鼠分泌出了高效价的抗体。此外,动物免疫程序,包括免疫次数、免疫剂量及佐剂的选用等也能够对提高抗体的效价和亲和力起到至关重要的作用。适当的多次免疫并进行合理的剂量增加有助于使小鼠充分激发其免疫应答,同时生成高特异性和高亲和力的抗体。

3.2 免疫学检测方法的优势与局限

免疫学检测方法是青霉素检测常用的检测方法,间接 ELISA 和免疫层析法是两种常用的方法,间接 ELISA 可实现定量检测,灵敏度高、特异性好等优点。通过条件优化可获得较低的检测下限、较好的线性范围,因而可用于实验室中的样品展青霉素含量的准确测定。该方法操作比较繁琐,需要使用仪器设备(如酶标仪)、检测时间比较长(一般数小时),不能适用于现场快速检测。免疫层析法检测时间相对

较短(一般 5-15min 即可得出结果)、操作简单、不需要专业的仪器设备等,可用于现场的快速筛查。但灵敏度不高,一般只能通过定性、半定量的检测方法,对于展青霉素含量低的样品检测,受限较大。实际应用中可依据检测需求及场合选择适当的方法或者两种方法结合使用,对青霉素进行全面、准确检测。

3.3 研究的不足与展望

本研究对青霉素特异性抗体的制备及免疫学检测方法进行了初步探索,仍有不尽如人意之处,如抗体制备方面制备出了特异性强、亲和力高的青霉素特异性抗体,但对抗体的结构与功能之间的研究还不多,未来可进一步开展相应的工作来提高抗体的性能;如免疫学检测方法方面对免疫学方法(间接 ELISA 与免疫层析法)的检测方法进行了优化,提高了方法的灵敏度、特异性等。但检测方法的灵敏度(尤其是免疫层析法)有待进一步优化,此外还可结合最新的标记技术以及信号放大技术来改善这些缺点,如量子点标记法、纳米金催化放大法等,从而来提升检测方法的性能等,同时还可以结合微流控技术、生物传感器技术等来实现检测方法的便捷性、灵敏性、高通量等,从而为食品安全的检测提供强有力的支持。

4 结语

本试验成功制备了青霉素特异性抗体并探索和优化了间接酶联免疫吸附测定法和免疫层析法这两种免疫学方法。合理设计了半抗原与载体蛋白的偶联策略,获得了一种良好的免疫原性全抗原,免疫小鼠后经分离纯化制得了高特异性和高亲和力抗体,在免疫学检测方法上间接 ELISA 优化后和免疫层析法能够表现出较好的敏感性、特异性和稳定性,为青霉素进行快速、准确的检测提供了有效的检测技术。不足之处也是研究中存在的不足和尚待深入探讨的地方,未来应针对抗体性能和检测方法的进一步优化,使青霉素检测技术不断发展,为食品安全控制提供更大的贡献。

参考文献

- [1]李博强,陈勇,邢孟阳,田世平.食品中展青霉素的产生机制及污染防控策略[J].食品科学技术学报,2023,41(04):16-25.
- [2]袁敏煊,吴泓靓,游丹阳,郑俊豪,梁效贵,彭文文,傅小香.青霉素免疫学检测方法研究进展[J].食品安全质量检测学报,2023,14(03):207-214.
- [3]邓健康,吴瞳,扈婧,王青华,张迪,赵娟娟,吴荣荣.食品中展青霉素的前处理及检测方法研究进展[J].食品研究与开发,2021,42(21):184-191.
- [4]曾硕,马骏,申岱林,等.低温等离子体对展青霉素脱毒研究进展[J].现代食品,2024,30(14):101-103.DOI:10.16736/j.cnki.cn41-1434/ts.2024.14.032.
- [5]李江,郑香峰,杨振泉.食品中展青霉素的预防与减除技术研究进展[J].食品安全质量检测学报,2024,15(11):151-158.DOI:10.19812/j.cnki.jfsq11-5956/ts.20240110001.

作者简介:金妙坚(1981—),女,汉族,浙江丽水人,本科学历,中级工程师,主要研究方向为生物化工。