

受体分析结合酶联免疫检测 牛乳中的头孢噻呋残留

李铁柱¹, 孙永海¹, 郝伟东^{1,2}

(1. 吉林大学生物与农业工程学院, 长春 130022; 2. 东北电力大学经济管理学院, 吉林 132012)

摘要 利用源于肺炎链球菌的青霉素结合蛋白 PBP 2x 对 β -内酰胺类抗生素具有高度亲和力的性质, 提出了一种受体分析结合酶联免疫快速检测牛乳中头孢噻呋残留的新方法. 在样品中残留的 β -内酰胺类抗生素只有头孢噻呋的前提下, 该法可作为定量筛选方法. 对牛乳中头孢噻呋的检测极限可达到欧盟规定最大残留量的 1/5, 并且不需要烦琐的样品预处理. 给出了头孢噻呋残留检测的标准曲线, 可用于快速定量分析.

关键词 牛乳; 头孢噻呋; 受体分析; 酶联免疫分析

中图分类号 O657 **文献标识码** A **文章编号** 0251-0790(2008)03-0473-04

β -内酰胺类抗生素由于其广谱廉价, 在奶牛养殖业中常被用于医治奶牛的乳腺炎, 且被频繁地超剂量使用, 由此导致了牛奶中含有高浓度的残留物^[1]. 虽然 β -内酰胺类抗生素本身对机体没有很强的毒性, 但会使一些个体产生十分剧烈的过敏反应. 如果长期摄入含有其残留的牛奶会使人体肠道内的正常菌群受到抑制, 导致致病菌及条件致病菌的大量繁殖, 从而引起全身或局部的感染^[2]. 另外, 在乳品加工过程中, 原料乳中 β -内酰胺类残留物严重干扰发酵乳制品的生产, 从而影响干酪、黄油及发酵乳的起酵和后期风味的形成^[3].

在兽医临床中应用较为广泛的 β -内酰胺类抗生素是美国普强公司于 20 世纪 80 年代开发成功的兽医专用的第三代头孢菌素——头孢噻呋 (Ceftiofur), 其分子式为 $C_{19}H_{17}N_5O_7S_3$, 化学名为 {6R-[6 α , 7 β (z)]}7-[[(α -氨基-4-噻唑基)(甲氧亚氨基)乙酰]氨基]-3-[(2-咪唑基)硫代]甲基]-8-氧代-5-硫杂-1-氮杂双环[4.2.0]辛-2-烯-2-羧酸. 2001 年, 该药成为全球 30 种主要兽药产品中销售增长最快的药品^[4]. 目前, 许多国家对牛奶中的头孢残留的管理十分严格, 欧盟规定的头孢噻呋在牛奶中的残留限量为 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ^[5]. 我国对乳制品中的头孢噻呋残留也日益重视, 并将头孢噻呋残留列为强制性必测项目^[6]. 常用的 β -内酰胺残留检测筛选方法大体可分为微生物生长抑制法和受体吸附法两种. 微生物生长抑制法具有操作简便及低成本的优势, 但也存在不能定量检测、特异性差和易假阳性等缺点, 不能完全满足残留检测的需要^[7,8]. 受体吸附法是一种可以定量检测、专一性强、灵敏度及自动化程度高的检测方法, 但在我国起步较晚, 实际应用主要依赖进口试剂盒^[9].

本文建立了受体分析结合酶标记法检测牛奶中头孢噻呋残留的新方法. 利用与青霉素类抗生素具有高度亲和力的源于肺炎链球菌的青霉素结合蛋白 PBP 2x^[10] 为受体, 包被于微孔板, 加入待测乳样, 使其中所含头孢噻呋与 PBP 2x 的青霉素于结合位点结合, 从而使小分子半抗原头孢噻呋生成完全抗原; 然后加入头孢噻呋抗体与之结合, 进而应用辣根过氧化氢酶标记的羊抗鼠 IgG (二抗) 检测此抗原抗体复合物.

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

肺炎链球菌 D39 由中山大学医学院吴忠道教授惠赠, pGEX-6P-1 由吉林大学生命科学学院金英花

收稿日期: 2007-10-10.

基金项目: 吉林省科技厅科技发展计划项目(批准号: 20050536)资助.

联系人简介: 孙永海, 男, 博士, 教授, 博士生导师, 主要从事农产品无损检测研究. E-mail: sunyh@jlu.edu.cn

教授惠赠, 头孢噻唑单克隆抗体由国家兽药安全评价中心冯才茂博士惠赠. 其余质粒及菌种均为本室保存. 各种限制性内切酶及连接酶购自大连宝生物工程公司. Taq 酶、dNTP、IPTG(异丙基- β -D-硫代半乳糖苷)及辣根过氧化物酶标记羊抗小鼠 IgG 购自鼎国生物工程公司. PCR 引物由鼎国生物工程公司合成并经 PAGE 纯化. Glutathione-Sepharose 4B 亲和柱和 Sephacryl S100 购自 Pharmacia 公司. 头孢噻唑、四环素、DNA 及蛋白质分子量标准及四甲基联苯胺(TMB)均购自 Sigma 公司. 其它试剂为分析纯.

Multiskan Ascent V1. 24 酶标仪(芬兰雷勃公司)采用 450nm 波长测量, 每次测量前摇振 15 s.

1.2 表达质粒的构建

各种基因工程基本操作均参考文献[11]方法进行. 50 μ L PCR 扩增体系包括: 5 μ L 10 \times Taq plus DNA 聚合酶缓冲液, 1 μ L dNTP(10 μ mol/L), 0.5 μ L 5'端引物(10 μ mol/L), 0.5 μ L 3'端引物(10 μ mol/L), 0.5 μ L Taq DNA 聚合酶(4 U/ μ L), 2 μ L 模板 cDNA, 加水补充总体积至 50 μ L. PCR 反应条件: 94 $^{\circ}$ C 变性 1 min, 60 $^{\circ}$ C 退火 45 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 45 s, 30 个循环后于 72 $^{\circ}$ C 保温 10 min. PCR 反应产物以冻融法回收. 先将 PCR 产物克隆进 pGEM-T 载体, 并插入含有纠错 DNA 序列, 然后再进一步克隆进 pGEX-6P-1. DNA 序列由上海生工生物工程技术有限公司测定.

1.3 青霉素结合蛋白的表达与纯化

对 Cacciatore 等^[12]报道的 PBP 2x 重组融合蛋白表达纯化方法进行了部分改进, 具体方法如下: 原核表达载体质粒 pGEX-tet-PBP2x 转化大肠杆菌 BL 21, 挑取已转化了的单菌落, 接种于 YTY 培养基(16 g 胰蛋白胨, 10 g 酵母膏, 5 g NaCl 和 15 mg/L 四环素)中, 于 37 $^{\circ}$ C 以 220 r/min 的速度振荡培养过夜, 将过夜培养物转接于 100 mL YTY 培养液中, 于 37 $^{\circ}$ C 剧烈振荡培养 1~2 h, 加入 IPTG 诱导 4~6 h, 于 4 $^{\circ}$ C 以 6000 r/min 的速度离心 15 min 收获菌体. 菌体重悬于 PBS(10 mL/g)湿菌体, 置于冰浴中, 温和超声破碎细胞. 加入 Triton X-100 至终浓度达 1%, 于室温缓慢搅拌 30 min, 于 4 $^{\circ}$ C 以 12000 r/min 的速度离心 15 min, 收集上清液. 过 10 倍体积 PBS 和 10 倍体积含 1% Triton X-100 的 PBS 平衡好的 Glutathione-Sepharose 4B 亲和柱, 以 20 倍柱体积的 PBS 洗去杂蛋白, 在亲和柱中加入凝血酶, 于 25 $^{\circ}$ C 反应 12~16 h, 收集酶切反应液, 上样于经过 10 mmol/L NH_4HCO_3 预平衡的 Sephacryl S 100 层析柱(2.6 cm \times 80 cm), 以 10 mmol/L NH_4HCO_3 洗脱, 收集洗脱峰, 浓缩, 将纯化后的 PBP 2x 储存在 -20 $^{\circ}$ C 含体积分数为 10% 的甘油溶液中.

1.4 标准样品的制备

将头孢噻唑溶于 PBS 缓冲溶液中配置成质量浓度为 100 μ g/mL 的标准溶液, 向已知无抗奶中加入此溶液, 调配含一定浓度的头孢噻唑标准样品, 将标准样品置于摇床充分混匀 15 min.

1.5 受体吸附分析步骤

在 4 $^{\circ}$ C 下, 将一定量青霉素结合蛋白 PBP 2x 固定在微孔板表面(加盖)过夜. 用 0.01 mol/L PBS 缓冲溶液(1.47 g/L Na_2HPO_4 , 0.43 g/L KH_2PO_4 和 6.79 g/L NaCl, pH = 7.2)冲洗后, 继续使用质量分数为 2% 的酪蛋白溶液封闭以避免非特异性吸附. 然后用 PBS 缓冲溶液洗涤 3 次, 加入 100 μ L 脱脂后的待测样品(做 3 个平行样), 恒温培养 30 min. 如果样品中含有头孢噻唑残留, 头孢噻唑将被青霉素结合蛋白 PBP 2x 吸附. 用清洗溶液(8.55 g/L NaCl 和 0.25 mL/L Tween 20)及 PBS 缓冲溶液清洗 2 次, 加入 100 μ L 头孢噻唑单克隆抗体, 恒温培养 30 min. 使用清洗溶液和 PBS 缓冲溶液冲洗后, 加入 100 μ L 辣根过氧化物酶标记羊抗小鼠 IgG(1:1500)培养 30 min, 以特异性吸附于头孢噻唑单克隆抗体. 使用清洗溶液和 PBS 缓冲溶液冲洗微孔板之后, 加入 100 μ L 酶底物溶液. 反应 10 min 后加入 100 μ L 1 mol/L HCl 以终止酶反应. 反应过程中, 样品含有的头孢噻唑残留越多, PBP 2x 与头孢噻唑复合物的生成量越大, 则复合物所能吸附的头孢噻唑抗体越多, 进而酶标二抗的吸附量相应地也会多些, 最终导致酶解液的吸光度变大, 即样品中的头孢噻唑浓度与微孔中酶解液的吸光度成正比.

2 结果与讨论

2.1 分析条件的优化

2.1.1 青霉素结合蛋白包被浓度的选择 样品中的头孢噻唑残留量为 100 μ g/kg, 在头孢噻唑抗体质

量浓度为 4000 ng/mL 条件下,进行了青霉素结合蛋白包被浓度单因素试验,结果如图 1. 可见,当青霉素结合蛋白包被质量浓度低于 5 $\mu\text{g/mL}$ 时,在 450 nm 所测得的吸光值随包被浓度的增加而增加,可见酶标板仍有部分位点未被青霉素结合蛋白包被;当青霉素结合蛋白包被浓度高于 5 $\mu\text{g/mL}$ 时,在 450 nm 所测得的吸光值随包被浓度的增加而减小,说明蛋白之间的相互作用使包被于酶标板的蛋白量减少. 因此确定最佳青霉素结合蛋白包被质量浓度为 5 $\mu\text{g/mL}$.

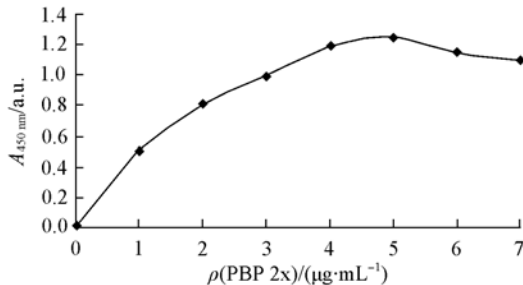


Fig. 1 Concentration of PBP 2x single factor analysis

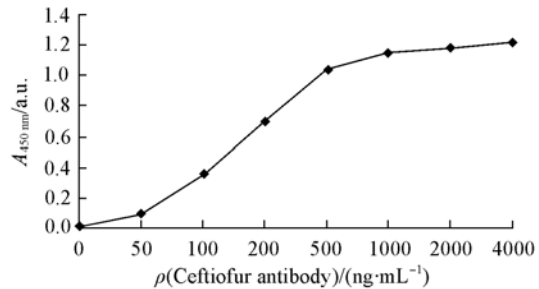


Fig. 2 Concentration of ceftiofur antibody single factor analysis

2.1.2 头孢噻呋单克隆抗体浓度的选择 样品中的头孢噻呋残留量为 100 $\mu\text{g/kg}$, 在青霉素结合蛋白包被浓度为 5 $\mu\text{g/mL}$ 条件下,进行头孢噻呋单克隆抗体浓度单因素试验,结果如图 2. 可见,当抗体质量浓度低于 1000 ng/mL 时,在 450 nm 所测得的吸光值随抗体浓度的增加而增加,且幅度较大,而当抗体质量浓度高于 1000 ng/mL 时,在 450 nm 所测得的吸光值随抗体浓度增加幅度逐渐变缓. 这是因为,当抗原的量一定时,其所能结合的抗体量也一定;当抗体浓度超过一定值时,再增加抗体的浓度,测定值不会有显著的增加,所以确定最佳抗体质量浓度为 1000 ng/mL.

2.2 牛奶中头孢噻呋的测定

2.2.1 标准曲线的建立及灵敏度 在最优化条件下做牛奶中头孢噻呋浓度与 450 nm 吸光度值关系的标准曲线,并计算各个数据的标准偏差(图 3). 当头孢噻呋浓度在 100 ~ 400 $\mu\text{g/kg}$ 范围内时,二者成线性关系,线性回归方程为 $y = 0.0035x + 0.0136$ ($R = 0.99$). 在此浓度范围内,可对头孢噻呋进行定量分析;超出此浓度范围并能检出,则可进行定性或半定量分析.

定义 $\text{LOD} = 3\delta/D$ (其中 δ 为空白时的相对标准偏差, D 为线性方程的斜率),因此法测定头孢噻呋残留的检出限为 20 $\mu\text{g/kg}$.

2.2.2 精密度及回收率 为测定批内误差,测定了 3 个不同浓度的标准样品 ($n = 6$); 为测定批间误差,连续 3 d 对不同批次的 3 个不同浓度的标准样品分别进行了测定 ($n = 18$), 结果列于表 1. 表 2 为 3 个不同浓度的标准样品的测定回收率 ($n = 6$). 测定结果表明,此方法具有很好的精密度及回收率,适合于定量分析牛乳中的头孢噻呋残留.

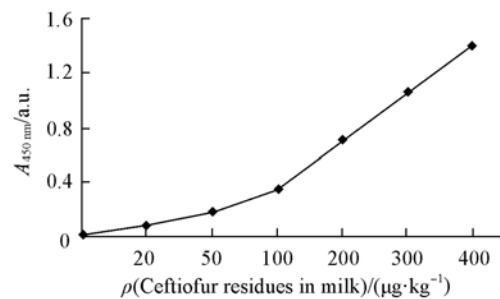


Fig. 3 Standard curve ceftiofur residues in milk

Table 1 Precision of ceftiofur residues determination by the assay

Concentration/ $(\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1})$	Coefficient of variation (%)	
	Intra-assay	Inter-assay
200	7.1	10.2
150	6.2	11.2
100	5.7	12.3

Table 2 Recovery data for ceftiofur residues analysis determined at three concentration levels

Concentration/ $(\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1})$	Mean recovery (%)	Coefficient of variation (%)
200	102.3	9.3
150	98.5	5.2
100	97.6	11.4

3 结 论

提出了受体分析结合酶联免疫快速检测牛乳中头孢噻呋残留的新方法,并通过单因素试验进一步

优化得到青霉素结合蛋白最佳包被浓度为 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 最佳头孢噻呋单克隆抗体质量浓度为 1000 ng/mL . 更进一步地建立了标准曲线, 实验结果表明, 此方法专一性强, 灵敏度高, 自动化程度高, 同时具有很好的稳定性和重现性, 对于头孢噻呋检测极限可达 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 批内误差低于 10%, 批间误差在 10.2% ~ 12.3% 之间, 在 3 个浓度水平所做回收率在 97.6% ~ 102.3% 之间. 作为一种快速筛选方法, 完全可以满足乳品工业对牛乳中头孢噻呋残留检测的要求.

德国凯泽斯劳滕大学 Regine Hakenbeck 教授及 Patrick Maurer 博士在 PBP 2x 重组融合蛋白提取和纯化方面给予了指导和帮助, 在此表示感谢.

参 考 文 献

- [1] Boatto G. , Cerri R. , Pau A. , *et al.* . Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis[J] , 1998 , **17**(4/5) : 733—738
- [2] Dewdney J. M. , Maes L. , Raynaud J. P. , *et al.* . Food and Chemical Toxicology[J] , 1991 , **29**(7) : 477—483
- [3] Grunwald L. , Petz M. . Analytica Chimica Acta[J] , 2003 , **483**(1/2) : 73—79
- [4] GUO Teng(郭腾) , WU Lian-Yong(吴连勇) , ZHANG Jia-Xiang(张家祥) . Animal Husbandry & Veterinary Medicine[J] , 2003 , **35**(16) : 38—41
- [5] Molina M. P. , Althaus R. L. , Molina A. , *et al.* . International Dairy Journal[J] , 2003 , **13** : 821—826
- [6] YAO Yan-Xia(姚艳霞) , ZHANG Xiao-Fen(张晓芬) . Shanxi Agriculture(山西农业)[J] , 2006 , (20) : 42—43
- [7] Nouws J. , van Egmond H. , Smulders I. , *et al.* . International Dairy Journal[J] , 1999 , **9**(2) : 85—90
- [8] Aureli P. , Ferrini A. M. , Mannoni V. . Food Control[J] , 1996 , **7**(3) : 165—168
- [9] Gustavsson E. , Bjurling P. , Sternesjo A. . Analytica Chimica Acta[J] , 2002 , **468**(1) : 153—159
- [10] Jamin M. , Hakenbeck M. , Frère J. M. . FEBS Letters[J] , 1993 , **331**(1/2) : 101—104
- [11] Sambrook J. , Fritsch E. F. , Maniatis T. . Molecular Cloning: a Laboratory Manual, 2nd Ed. [M] , New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989
- [12] Cacciatore G. , Petz M. , Rachid S. , *et al.* . Analytica Chimica Acta[J] , 2004 , **520**(1/2) : 105—115

Determination of Ceftiofur Residues in Milk by Receptor-based Microplate with Elisa Assay

LI Tie-Zhu¹ , SUN Yong-Hai^{1*} , XI Wei-Dong^{1,2}

(1. College of Biological and Agricultural Engineering, Jilin University, Changchun 130022, China;

2. College of Economics and Management, Northeast Dianli University, Jilin 132012, China)

Abstract The penicillin-binding protein PBP 2x from *Streptococcus pneumoniae* was utilized to develop a novel microplate assay for the determination of ceftiofur with intact β -lactam structure in milk. The assay was developed as screening test with the option for a quantitative assay for ceftiofur residues. Ceftiofur could be detected at levels corresponding to 1/5 EU maximum residue limit(MRL) in milk without lengthy and elaborate sample pre-treatment. Matrix calibration curves are presented, which show that quantitative analyses are possible.

Keywords Milk; Ceftiofur; Receptor binding assay; Enzyme-linked immunosorbent assay

(Ed. : A, G)