

MRSA-PBP2a 单克隆抗体乳胶凝集检测法的建立

徐霞, 陈思聪, 唐晓华

(广州医学院检验系, 广东 广州 510182)

摘要: 【目的】应用抗 PBP2a 单克隆抗体,以化学交联法致敏羧化聚苯乙烯乳胶,建立快速检测 MRSA-PBP2a 的乳胶凝集法。【方法】以辛酸-硫酸铵法纯化 PBP2a 单克隆抗体,将纯化后单克隆抗体和羧化乳胶经碳化二亚胺(EDC)共价偶联,并对偶联条件(偶联抗体浓度、乳胶浓度、偶联时间和偶联缓冲液)进行探索和优化,建立检测 PBP2a 的乳胶凝集法。【结果】140 mg/L 的抗体浓度与 15 g/L 的羧化聚苯乙烯乳胶,在 pH 5.8 缓冲液中偶联 8 h 后有较好的凝集效果和偶联效率,所建立的乳胶凝集法敏感性和特异性良好。【结论】初步建立了检测 PBP2a 的胶乳凝集法,为研制 MRSA 快速鉴定试剂盒奠定了良好的基础。

中图分类号: R378.1 文献标识码: A 文章编号: 1672-3554(2008)05-0611-04

Establishment of a Latex Agglutination Test Using Anti-PBP2a Monoclonal Antibody for Detection of MRSA-PBP2a

XU Xia, CHEN Si-cong, TANG Xiao-hua

(Department of Medical Laboratory Science, Guangzhou Medical College, Guangzhou 510182, China)

Abstract: 【Objective】 To develop a simple and rapid latex agglutination test (LAT) for the detection of MRSA-PBP2a, which is based on Carboxyl-polystyrene latex sensitized with anti-PBP2a monoclonal antibody (mAb) by chemical cross-linking method. 【Methods】 The purification of mAb from ascites fluids was performed by caprylic acid/ammonium sulfate precipitation (CA-AS), the purified mAb was covalently coupled to carboxylate latex by the carbodiimide method, then the coupling conditions such as coupling antibody concentration, the coupling time, the latex concentration and the coupling buffer were studied to optimize the latex agglutination test (LAT) for the detection of MRSA-PBP2a. 【Results】 The best agglutination and the highest coupling efficiency was reached when the antibody concentration was 140 mg/L and the latex concentration was 1.5 g/L with the reaction time of 8 hours and the buffer of pH=5.8. The sensitivity and specificity of the LAT in detecting the PBP2a were high. 【Conclusion】 A LAT for detection of PBP2a was successfully established, which lays the foundation for the preparation of a LAT kit.

Key words: PBP2a; latex agglutination test; chemical cross-linking method

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2008, 29(5): 611-615; 628]

耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(methicillin resistant staphylococcus aureus, MRSA)是全球性引起医院内感染最重要的耐药致病菌之一^[1,2],对常用的包括甲氧西林在内的多种抗生素广泛耐药,其主要耐药机制是由于染色体 mecA 基因^[3]编码产生了对 β -内酰胺类抗生素低亲和力的青霉素结合蛋白 2a (penicillin binding protein 2a, PBP2a)所致,由于其所致感染病情复杂、治疗棘手、死亡率

高,因此建立快速、准确地诊断 MRSA 感染的方法成为各国学者关注与研究的热点。Nakatomi 和 Sugiyama^[4]于 1998 年报道一种快速检测 MRSA 的乳胶凝集试验(Latex agglutination test, LAT),其原理是抗 PBP2a 单克隆抗体致敏的乳胶颗粒与 MRSA 的膜蛋白提取物作用,如产生肉眼可见的凝集颗粒,证实有 PBP2a 存在,以此判断该菌为 MRSA。目前该方法国外已有试剂盒出售^[5],但尚

收稿日期: 2008-02-22

基金项目: 广州市医药卫生科技项目(2005-YB-135); 广州医学院项目(03-K-32)

作者简介: 徐霞(1962-)女,汉族,江苏连云港人,硕士,教授,主任技师,从事免疫学诊断研究, E-mail: xuxia503@126.com

不具有自主知识产权的国产试剂盒问世。本研究利用自行制备的针对 PBP2a 的单克隆抗体,以化学交联法致敏羧化聚苯乙烯乳胶,对致敏条件进行探索和优化选择,建立了检测 PBP2a 的乳胶凝集法,旨在为进一步制备 MRSA 快速鉴定试剂盒奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 材 料

pET-his-PBP2a 转肽酶区表达质粒由本室构建,Ni-NTA 金属螯合亲和层析柱为 Novagen 公司产品。100 g/L 羧化聚苯乙烯乳胶为上海科欣生物公司产品;水溶性碳化二亚胺(EDC)购自 Sigma 公司,-20 °C 保存。其余试剂为分析纯。高速冷冻离心机为 EPPENDORF 公司产品;7170 全自动生化分析仪为日立公司产品。

1.2 方 法

1.2.1 重组 PBP2a 转肽酶区蛋白制备 取含 pET-his-PBP2a 转肽酶区表达质粒的 E.coli BL21(DE3) plysS 于含氨卞青霉素(100 mg/L) LB 培养液中 37 °C 250 × g 振荡至 $A_{600nm}=0.6$,加 IPTG(终浓度为 0.6 mmol/L)于 37 °C 继续振荡培养 5 h,离心收集菌体,8 mol/L 的尿素变性后,过 Ni-NTA 金属螯合亲和层析柱,以 SDS-PAGE 鉴定重组蛋白相对分子量(M_r)及纯度,并采取逐步降低尿素浓度梯度复性法复性,离心取上清,PEG(20000)浓缩后备用^[6]。

1.2.2 抗 PBP2a 单克隆抗体的制备 以重组 PBP2a 转肽酶区蛋白为抗原,免疫 BALB/c 小鼠,取免疫小鼠的脾细胞和 NS-1 骨髓瘤细胞在 PEG(4000)作用下进行细胞融合,筛选和 4 次克隆化,获得 2 株特异性好、亲和力高、可稳定分泌抗 PBP2a mAb 的杂交瘤细胞。取其中 1 株杂交瘤细胞(1×10^6)接种于已注射降植烷的 BALB/c 小鼠腹腔中制备腹水,采用正辛酸-饱和硫酸铵法纯化腹水中抗 PBP2a 单克隆抗体。取 0.5 mL 小鼠腹水用 VBS 缓冲液稀释至 2 mL,混匀后加入 30 mg SiO_2 ,置于室温中搅动 30 min,4 °C 14 000 × g 离心 15 min。取上清加入 8 mL 醋酸缓冲液,在缓慢搅拌过程中,室温下逐滴滴加正辛酸 33 μ L,使其终浓度为 3.3%,4 °C,14 000 × g 离心 15 min;取上清用 0.01 mol/L NaOH 调 pH 至 7.0;再加入 PBS (0.01 mol/L,pH7.4)6 mL 以及 45%硫酸铵溶液

6 mL,4 °C,14 000 × g 离心 15 min;弃上清,取沉淀加入适量 PBS,装于透析袋内,对 50 倍体积的 PBS(0.01 mol/L,pH 7.4)4 °C,透析 24 ~ 48 h,中途换液数次。将透析物进行蛋白量的测定,并于 4 °C 保存^[7]。

1.2.3 PBP2a 乳胶凝集法的建立 ①致敏方案^[8]:取 0.4 mL 的羧化聚苯乙烯乳胶放入离心管中,加入 1 mL 碳酸缓冲液(0.1 mol/L,pH 9.6)14 000 × g 离心 10 min,倾去上清液,反复洗 3 遍,再加入 1 mL PBS 溶液 14 000 × g 离心 10 min,倾去上清液,反复洗 3 遍,接着加入水溶性碳化二亚胺(EDC) 0.5 mL 和 PBS 0.5 mL,室温下搅动 30 min,再用硼酸缓冲液(0.01 mol/L,pH 8.0)14 000 × g 离心 10 min,倾去上清液,反复洗 3 遍。再加入 1 mL 硼酸缓冲液制成胶乳悬液,再加入提纯的抗 PBP2a 单克隆抗体 0.1 mL,室温下于摇床上摇动适当时间。最后加入终止剂甘氨酸溶液(0.1 mol/L) 50 μ L,搅动 30 min,14 000 × g 离心 15 min,收集上清液进行蛋白量测定。最后将已致敏胶乳试剂悬浮于贮存液(0.01 mol/L,pH 7.4 的 PBS 溶液,5%甘油,0.01% BSA,0.1%叠氮钠)中 4 °C 保存。②致敏乳胶试剂与重组蛋白 PBP2a 的反应:用移液器吸取 25 ~ 30 μ L 抗 PBP2a 单克隆抗体致敏的乳胶试剂滴于黑色卡片上,然后吸取等量的重组蛋白 PBP2a 与卡片上的乳胶试剂混合,并用枪头搅拌均匀,轻轻摇动卡片,使其充分结合,5 ~ 10 min 后判定结果。同时用生理盐水设为阴性对照。③结果判定:“++++”表示:全部胶乳凝集,颗粒聚于液滴边缘,液体完全透明;“+++”表示:大部分胶乳凝集,颗粒明显,液体稍混浊;“++”表示:约 50%胶乳凝集,但颗粒较细,液体较混浊;“+”表示:有少许凝集,液体呈混浊;液滴呈原有的均匀乳状而不凝集则为“-”。④抗体偶联效率的测定^[9]:抗体偶联效率通过反应前后溶液中的蛋白量变化求得:偶联效率(%) = (PBP2a 单克隆抗体的初始加入量 - 剩余上清液中的 PBP2a 单克隆抗体蛋白量) / PBP2a 单克隆抗体的初始加入量 × 100%。蛋白量经 7170 全自动生化分析仪测定。⑤最佳偶联时间的选择:在抗体浓度(140 mg/L)和 PBS 缓冲液 pH 为 5.8 的条件下,分别用 10 g/L、15 g/L、25 g/L、50 g/L 的羧化乳胶,分别在反应后 2 h、4 h、6 h、8 h、10 h、12 h 观察凝集效果和测定抗体偶联效率,选择最佳偶联时间。⑥最佳偶联缓冲液 pH 值

的选择: 采用了 3 个不同 pH 值的 PBS 溶液分别是: 5.8(偏酸性)、6.8(中性)、8.0(偏碱性)用于致敏乳胶试剂。通过凝集效果的观察, 选择最佳偶联缓冲液的 pH 值。⑦最佳偶联羧化聚苯乙烯乳胶浓度的选择: 将提纯的 PBP2a 单克隆抗体分别偶联 5 个不同浓度的羧化聚苯乙烯乳胶, 通过凝集效果的观察和抗体偶联效率的测定, 选择最佳偶联羧化聚苯乙烯乳胶浓度。⑧最佳偶联 PBP2a 单克隆抗体蛋白量的选择: 分别用 3 个不同浓度的 PBP2a 单克隆抗体偶联一定浓度的羧化聚苯乙烯乳胶, 通过凝集效果的观察和抗体偶联效率的测定, 选择最佳偶联 PBP2a 单克隆抗体蛋白量。

1.2.4 致敏乳胶试剂质量的鉴定 ①自凝性: 用等量 PBS、硼酸缓冲液、生理盐水分别代替待检样品, 观察致敏胶乳的会否自凝。②敏感性: 将重组蛋白 PBP2a 进行一系列浓度的倍比稀释, 分别用致敏好的乳胶诊断试剂检测, 观察其凝集程度。③特异性: 将致敏好的乳胶试剂分别与重组 PBP2a 转肽酶区蛋白、BSA、MRSA、铜绿假单胞菌、大肠杆菌、表皮葡萄球菌进行检测, 观察其特异性(MRSA 临床分离株经自动药敏仪器、进口乳胶凝集鉴定试剂盒及 mecA 基因 PCR 检测法鉴定证实为甲氧西林耐药的金黄色葡萄球菌)^[10]。④可重复性: 在上述致敏条件确定的基础上制备 3 批 PBP2a 胶乳试剂, 每批 5 个, 在每批胶乳试剂中随机抽取 3 个对重组蛋白 PBP2a 进行检测, 观察重复性。

2 结 果

2.1 抗 PBP2a 单克隆抗体的制备

鼠源性 PBP2a 单克隆抗体经 7170 全自动生化分析仪测定蛋白量为 140 mg/L。

2.2 偶联时间对致敏效果的影响

在抗体浓度(140 mg/L)和 PBS 缓冲液 pH 为 5.8 的条件下, 偶联时间对抗体和羧化乳胶偶联效率的影响如图 1 所示。结果表明偶联时间为 8 h 时偶联效率及凝集程度最佳。

2.3 偶联缓冲液 pH 值对凝集效果的影响

试验中采用了 3 个不同 pH 值的 PBS 溶液与 EDC 交联剂反应, 用于致敏乳胶试剂, 分别是: 5.8(偏酸性), 6.8(中性), 8.0(偏碱性)。当致敏乳胶的 PBS 溶液的最佳 pH 值为 5.8 时凝集程度最佳, 且致敏后乳胶不发生自凝。

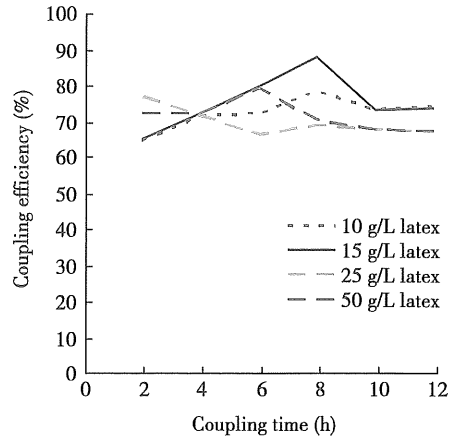


图 1 不同乳胶浓度条件下偶联时间对偶联效率的影响
Fig.1 The effects of coupling time on coupling efficiency under different concentration of latex

2.4 最佳偶联羧化聚苯乙烯乳胶浓度的选择

根据前面述及的致敏方案, 在 8 h 的偶联时间条件下, 使用 pH 为 5.8 的 PBS 缓冲液, 将 5 个不同浓度的乳胶分别与提纯的 PBP2a 单克隆抗体进行偶联, 结果如表 1 所示。经试验证明, 乳胶浓度为 15 g/L 时偶联效率最高, 凝集效果最佳。

表 1 最佳偶联羧化聚苯乙烯乳胶浓度的选择
Table 1 Selection of the optimum coupling carboxyl-polystyrene latex concentration

Latex concentration(g/L)	Coupling antibody concentration(mg/L)	Coupling efficiency	Agglutination degree
5	17	12%	-
10	68	49%	++
15	120	86%	+++
25	113	81%	+++
50	85	61%	+/-

2.5 最佳偶联 PBP2a 单克隆抗体蛋白量的选择

根据前面述及的致敏方案, 在 8 h 的偶联时间条件下, 使用 pH 为 5.8 的 PBS 缓冲液, 3 个不同浓度的 PBP2a 单克隆抗体分别与 15 g/L 的乳胶进行偶联, 结果如表 2 所示。经试验证明, PBP2a 单克隆抗体浓度为 140 mg/L 时偶联效率最高, 凝集效果最佳。

2.6 胶乳凝集抗原质量的鉴定

2.6.1 敏感性试验 如表 3 所示。结果表明, 乳胶试剂敏感性可达 0.01 mg/L。

2.6.2 自凝性 致敏乳胶与重组 PBP2a 转肽酶区蛋白凝集呈阳性(+++), 与等量 PBS、硼酸缓冲液、

表 2 最佳偶联 PBP2a 单克隆抗体蛋白量的选择
Table 2 Selection of the optimum coupling antibody concentration

Antibody concentration(g/L)	Coupling antibody concentration(mg/L)	Coupling efficiency	Agglutination degree
140	120	86%	+++
55	35	64%	+
31	9	32%	-

表 3 敏感性试验
Table 3 The sensitivity test

Recombinant PBP2a ¹⁾	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64
+++	+	+	+	+/-	-	-

1) the concentration of recombinant PBP2a was 0.04 mg/L

生理盐水分均呈阴性反应(-)。

2.6.3 特异性 结果表明,致敏乳胶试剂能够与纯化的 PBP2a 转肽区蛋白、MRSA 菌体蛋白提取液发生明显的凝集反应,而与 BSA、铜绿假单胞菌裂解液、大肠杆菌裂解液、表皮葡萄球菌的裂解液不发生凝集,其特异性良好。

2.6.4 可重复性 可重复性试验结果见表 4 所示。

表 4 可重复性试验
Table 4 The replicate test

Batch	Reagent 1	Reagent 2	Reagent 3
1	+++	+++	+
2	++	++	+
3	++	+	++

3 讨论

乳胶凝集试验是一种快速、操作简便的免疫学诊断方法,在临床快速诊断领域有着广阔的应用前景^[11]。化学交联法是乳胶致敏技术中最重要和最常用的方法之一。该法是利用化学胶乳表面的羧基、羟基或酰胺基团通过化学交联剂与抗原(或抗体)上的氨基基团进行共价连接,即在化学乳胶的功能基团上通过化学交联剂接一个手臂,这样既可减轻空间构型对抗原抗体反应的阻碍,还可降低对致敏抗原(或抗体)的纯度要求。此法致敏的乳胶在特异性、稳定性和敏感性上相对普通的物理吸附法来说有一定程度的提高,因此在

近些年得到了较为广泛的应用^[12]。

我们在自行制备了 PBP2a 转肽酶区蛋白及其单克隆抗体的基础上,进行了 PBP2a 乳胶凝集检测法的建立。在试验中对抗体浓度、乳胶浓度、偶联时间、偶联关键缓冲液 PBS 的 pH 值等因素进行了探索和优化。发现乳胶凝集效果与下述因素有关:偶联过程中蛋白的加入量、偶联时间和乳胶的浓度。结果表明,140 mg/L 的抗体浓度与 15 g/L 以及 25 g/L 的乳胶浓度均有较好的凝集效果,偶联效率也较高,随着加入抗体浓度的下降,致敏效果减弱,偶联效率下降。考虑成本因素,确定最佳致敏的抗体浓度为 140 mg/L,乳胶浓度为 15 g/L。浓度为 5 g/L 的乳胶与抗体偶联的乳胶试剂与抗原蛋白不能发生凝集效果,说明乳胶浓度过低,蛋白的吸附量降低,乳胶试剂的敏感性降低,偶联不易实现。随着时间的增加,偶联效率不断增加,在偶联时间 8 h 左右,偶联效率最高,8 h 后,偶联效率趋于下降。因此,8 h 为最佳的偶联时间。对 3 种不同 pH 值的 PBS 溶液的比较中,当 pH 值达到中性(pH 6.8)及碱性(pH 8.0)时,乳胶试剂无法和 PBP2a 抗原发生凝集。因此确定 pH=5.8 的偏酸性的 PBS 缓冲液为最佳的偶联缓冲液。这是因为碳化二亚胺(EDC)活化羧基基团的反应需在酸性条件下(pH<7)进行^[13],但是免疫球蛋白分子在酸性太强的条件下易丧失活性,因此选择 5.8 的 pH 值对抗体致敏是必要的。另外,EDC 是一种性质非常活跃的试剂,在储藏和使用中应避免高温、潮湿。

上述条件优化后对致敏乳胶试剂进行了质量鉴定,所制备的致敏乳胶试剂在 PBS、硼酸缓冲液、生理盐水中均不出现自凝,不仅能与重组 PBP2a 转肽酶区蛋白呈现良好的凝集反应(敏感性达 0.01 mg/L),而且与临床分离的 MRSA 菌株也呈现良好的凝集反应,并与 BSA、铜绿假单胞菌裂解液、大肠杆菌裂解液、表皮葡萄球菌裂解液不呈现凝集反应,表明所建立的 PBP2a 乳胶凝集检测法具有良好的特异性和敏感性,为进一步大批量的临床验证奠定了基础。重复性试验结果显示本试验有待进一步提高其稳定性,其原因可能在于一些试剂加入量的误差,以及批间重复实验中的操作误差。乳胶试剂的保存液和保存时间也有待进一步摸索。