●临床研究

阿米卡星单抗的制备及其荧光免疫层析检测法的建立

王建超　李忠鹏　徐健　陈颖　陈楠　林彬　范炜斌

【摘要】 **目的**　建立一种简易、灵敏、便捷、特异性高的阿米卡星血药浓度荧光免疫层析检测法。 **方法**　通过戊二醛法偶联载体蛋白制备得到阿米卡星完全抗原。通过杂交瘤方法制备阿米卡星的单克隆抗体，以竞争法原理建立阿米卡星血药浓度荧光免疫层析检测法。基于以上检测原理建立阿米卡星的标准曲线以实现定量检测阿米卡星血药浓度，并对该检测法进行方法学评价，包括灵敏度、线性范围、精密度、回收率、特异性、试纸条稳定性和样本临床比对。 **结果**　通过优化体系，本研究建立的检测法半数抑制浓度为1.27 μg/mL，线性范围为0.5~10.0 μg/mL，检出限为0.22 μg/mL，精密度均＜8.5%，回收率为97.9%~100.3%。与5种阿米卡星结构相似以及联合用药相关的药物无明显交叉反应。采用荧光免疫层析法和质谱法分别检测83份阿米卡星临床样本，发现2种方法相关性较好，r=0.985。 **结论**　本试验成功建立了一种操作简单、快速、特异性强、灵敏度高的阿米卡星荧光免疫层析检测方法，为临床血药浓度监测的应用奠定了基础。

【关键词】 阿米卡星；抗原；单克隆抗体；荧光免疫层析法

Preparation of Amikacin monoclonal antibody and establishment of its fluorescent immunochromatographic assay

Wang Jianchao, Li Zhongpeng, Xu Jian, Chen Ying, Chen Nan, Lin Bin, Fan Weibin

First-author's address: Department of Pharmacy, Changxing County People's Hospital, Key Laboratory of Intelligent Pharmacy and Individualized Therapy of Huzhou, Huzhou 313100, China

Corresponding author: Fan Weibin, E-mail: weibinfan@hotmail.com

【Abstract】 **Objective**　To establish a rapid, simple, sensitive and highly-specific fluorescent immunochromatographic assay for the detection of blood amikacin concentration. **Methods**　Amikacin complete antigen was prepared by cross-linking carrier protein with the glutaraldehyde method. Anti-amikacin monoclonal antibodies were obtained via hybridoma-cell fusion technique. A fluorescent immunochromatographic detection system for blood amikacin concentration based on competitive principle was constructed, and the standard curve of amikacin was established based on the above detection principle for quantitative analysis of blood amikacin concentration. The detection method was evaluated using methodological indicators, including the sensitivity, linear range, precision, recovery rate, specificity, test-strip stability and clinical-sample comparison. **Results**　After system optimization, the half-maximal inhibitory concentration of the assay in this study was 1.27 μg/mL. Its linear range was 0.5-10.0 μg/mL and the limit of detection was 0.22 μg/mL. The precision was below 8.5% and the recovery rate ranged from 97.9% to 100.3%. No obvious cross-reaction was observed against five structurally-similar and commonly-combined drugs. Eighty-three clinical samples were detected by the fluorescent immunochromatographic assay and mass-spectrometry method, and the correlation of the two approaches was favourable, with r=0.985. **Conclusion**　This research successfully develops an easy-operated and rapid fluorescent immunochromatographic assay with outstanding sensitivity and specificity, which lays a foundation for the application of blood drug concentration monitoring.

【Key words】 Amikacin; Complete antigen; Monoclonal antibody; Fluorescent immunochromatographic assay

DOI：10.12056/j.issn.1006-2785.2026.48.16.2025-2230

基金项目：浙江省药学会医院药学专项科研资助项目（2021ZYY48）

作者单位：313100　长兴县人民医院药剂科、湖州市智能药学与个体化治疗重点实验室（王建超、林彬、范炜斌）；浙江准策生物技术有限公司（李忠鹏、徐健、陈颖）；郑州人民医院药学部（陈楠）

通信作者：范炜斌，E-mail：weibinfan@hotmail.com

浙江医学杂志社官方网站网址：www.zjyxzzs.com

阿米卡星属于氨基糖苷类抗生素，通过结合细菌核糖体抑制蛋白质合成，对革兰阴性菌具有较强的抗菌活性及抗生素后效应，已广泛应用于临床[1-5]。然而，阿米卡星治疗窗较窄，个体差异大，血药浓度过高可诱发肾毒性与耳毒性[6-8]。因此，建立方便、快捷、准确的血药浓度检测方法，对指导临床合理用药、保证用药安全具有重要意义[9-10]。目前，高效液相色谱法和液质联用法是检测阿米卡星血药浓度的主要方法，虽特异性强、灵敏度高，但仪器昂贵，操作复杂，难以在基层医院常规开展[11-12]。荧光免疫层析法无须样本前处理，操作简便、检测快速、成本低廉，可实现床旁检测，为临床提供便捷可靠的检测途径[13]。小分子半抗原抗体性能及抗原结构是免疫层析检测的关键[14]。本研究拟通过自主设计阿米卡星完全抗原制备技术，采用杂交瘤技术获取高亲和力、高灵敏度、高特异性的阿米卡星单克隆抗体，进而建立一种简易、灵敏、便捷、特异性高的阿米卡星血药浓度荧光免疫层析检测法，现报道如下。

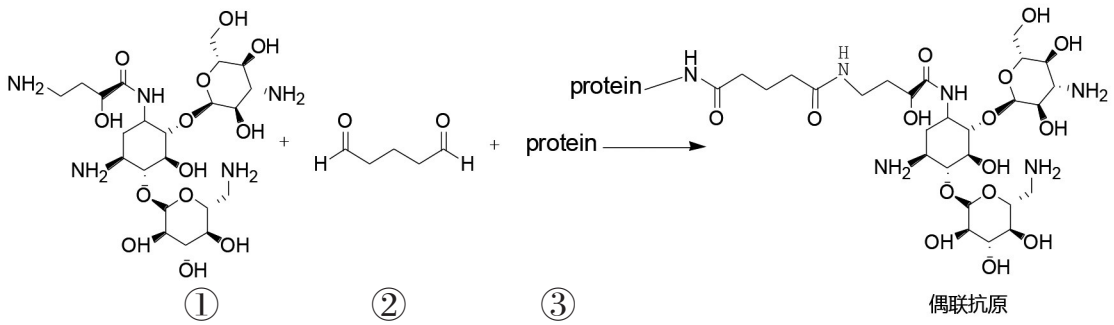
1 材料和方法

1.1 主要材料、试剂和仪器 阿米卡星粉剂购自中国食品药品检定研究院，规格：150 mg/瓶，批号：130623-202302；BALB/c小鼠购自常州卡文斯实验动物有限公司；弗氏佐剂、50倍次黄嘌呤-氨基蝶呤-胸苷（hypoxanthine-aminopterin-thymidine，HAT）培养基浓缩添加剂、50倍次黄嘌呤-胸腺嘧啶核苷培养基浓缩添加剂、聚乙二醇1500均购自美国Sigma公司，规格：10 mL/瓶、50 mL/瓶、50 mL/瓶、4 mL/瓶，批号：F5881、H0262、H0137、10783641001；50%戊二醛购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司，规格：500 mL/瓶，批号：G105906；辣根过氧化物酶标记山羊抗小鼠免疫球蛋白（immunoglobulin，Ig）G购自生工生物工程（上海）股份有限公司，规格：1 mL/支，批号：BA1051；羊抗兔IgG抗体购自杭州启泰生物技术有限公司，规格：1 mL/支，批号：GR106；SP2/0细胞购自美国典型培养物保藏中心；二喹啉甲酸蛋白浓度试剂盒（规格：500次/盒）和酶联免疫吸附试验（enzyme-linked immunosorbent assay，ELISA）试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司，批号：P0010、EK387/2-32；CF® 647荧光染料购自武汉艾美捷科技有限公司，规格：1 mg/支，批号：BTM-00041；干式荧光免疫分析仪购自浙江准策生物技术有限公司，型号：ZC-S100。本研究实验场地设于无锡福阳生物科技有限公司，经该公司福利伦理委员会审查通过（批准文号：CXRM-J015）。

1.2 方法

1.2.1 阿米卡星完全抗原制备 采用戊二醛法偶联载体蛋白制备阿米卡星完全抗原。称取50 mg阿米卡星，溶于5 mL超纯水，配制为10 mg/mL阿米卡星溶液，加入8.5 mg/mL卵清蛋白（ovalbumin，OVA）或牛血清白蛋白（bovine serum albumin，BSA），再逐滴加入50 μL 50%戊二醛溶液，涡旋混匀后，置于磁力搅拌器上持续搅拌，在室温避光下反应8 h。反应产物采用磷酸盐缓冲液（phosphate buffer solution，PBS）透析4次，收集透析液，采用二喹啉甲酸蛋白浓度试剂盒分别测定阿米卡星-BSA抗原和阿米卡星-OVA抗原的浓度。偶联产物结构式见图1，采用紫外分光光度法鉴定偶联抗原的偶联效果。

1.2.2 阿米卡星单克隆抗体制备 将上述制备的阿米卡星免疫原稀释至0.2 mg/mL，取500 μL免疫原溶液与等体积弗氏佐剂充分混合并完全乳化，对BALB/c小鼠进行免疫。采用经典免疫程序完成4次免疫后，经腹腔注射约100 μg免疫原进行加强免疫；加强免疫5 d后摘取小鼠脾脏用于细胞融合。将小鼠脾细胞与SP2/0细胞进行细胞融合，采用HAT培养基筛选和ELISA法鉴定阳性杂交瘤细胞。选取6~7周龄BALB/c小鼠，每只腹腔注射0.5 mL石蜡油，7 d后腹腔注射0.5 mL含1×



注：protein代表牛血清白蛋白或卵清蛋白。

图1 阿米卡星完全抗原制备技术路线

10^6阳性杂交瘤细胞的细胞悬液。观察小鼠健康状态与腹腔腹水情况，约8 d后采集小鼠腹水。采用Protein G亲和层析法纯化单克隆抗体。通过荧光免疫层析检测法完成抗体特异性筛选。采用间接竞争ELISA法检测纯化抗体对阿米卡星的抑制效果。以1 μg/mL阿米卡星-OVA抗原包被酶标板，封闭后加入系列浓度阿米卡星标准品（0.01~100 ng/mL）与腹水抗体（1∶8 000）的混合液，37 ℃竞争孵育1 h；后续同间接ELISA操作测定450 nm波长下的光密度（optical density，OD_{450}）。抑制率计算公式：抑制率（%）=(OD_0-OD_x)/OD_0 × 100%，其中OD_0为不加阿米卡星时的光密度，OD_x为加入阿米卡星标准品后的光密度。采用四参数logistic模型拟合抑制曲线，计算半数抑制浓度（half-maximal inhibitory concentration，IC_{50}），选择IC_{50}较低、亲和力较好的抗体用于后续荧光免疫层析检测试剂盒的开发。

1.2.3 阿米卡星荧光免疫层析检测法的建立

1.2.3.1 检测卡制备 采用PBS将阿米卡星-OVA抗原与兔IgG分别稀释至适当浓度（0.5~1.5 mg/mL）。在18~28 ℃条件下，将稀释后的阿米卡星-OVA抗原与兔IgG均匀喷涂于硝酸纤维素膜，置于鼓风干燥箱干燥24 h以上，充分干燥后密封保存，制成检测卡备用。

1.2.3.2 检测液制备 参照CF® 647荧光染料说明书分别对阿米卡星单克隆抗体、羊抗兔IgG抗体进行荧光标记，采用含BSA的PBS，将两种标记抗体稀释配制为检测液，2~8 ℃避光保存备用。

1.2.3.3 检测试剂盒标准曲线建立 将阿米卡星标准液与阴性血浆混合，配制成浓度为0、0.5、1.0、2.0、4.0、8.0、12.0 μg/mL的阿米卡星系列浓度标准液。采用PBS对各浓度阿米卡星标准液进行80倍稀释，取稀释后标准液与检测液按1∶1充分混匀，取100 μL混合液加入检测卡加样孔，层析15 min后置于干式荧光免疫分析仪读取检测线（test，T线）和质控线（control，C线）的荧光信号值，T/C值为纵坐标，阿米卡星标准液浓度为横坐标，采用四参数logistic模型拟合，建立标准曲线，并将标准曲线录入集成电路卡，内置于检测器。

1.2.4 阿米卡星荧光免疫层析法检测的方法学评价

1.2.4.1 灵敏度和线性范围 参照定量检测体外诊断试剂分析性能评估注册审查指导原则[15]，取0 μg/mL标准溶液加入测试卡样本孔，按照1.2.3.3项下方法开展检测，根据标准曲线计算得到20组测定值；计算20次测定结果的均值（$\bar{x}$）和标准差（s），以$\bar{x}-2s$计算结果作为试剂盒检出限。重新测定标准曲线上各个浓度点，每个浓度测定3次，分别计算各浓度样本T/C值的均值（$\bar{x}$）、标准偏差（standard deviation，*SD*）及相对标准偏差（relative standard deviation，*RSD*），将*RSD*值＜15%对应的最高、最低浓度作为试剂盒线性范围的上、下限。

1.2.4.2 精密度 采用已建立的阿米卡星荧光免疫层析检测体系，分别对浓度为2 μg/mL、8 μg/mL的阿米卡星标准液进行检测，每个浓度重复测定10次，计算高、低浓度阿米卡星的精密度。精密度以*RSD*表示，计算公式：

$$RSD=SD/\bar{x}\times 100\%$$

其中，$\bar{x}$为10次测定T/C值的算术平均值，*SD*为标准偏差。分别计算高、低浓度样本的*RSD*，以*RSD*＜15%为合格。

1.2.4.3 回收率 将阿米卡星标准液稀释至70、35 μg/mL，另取阴性血浆作为空白对照（0 μg/mL）。各取10 μL与100 μL低浓度阿米卡星阳性样本混匀（标准液添加体积占总体积比例＜10%），每个加标水平重复测定5次，分别计算回收率（*R*）。计算公式：

$$R=\frac{C_x-C_0}{C_{理论}}\times 100\%$$

其中，C_x为加标后实测总浓度，C_0为低浓度阳性样本的初始浓度（由空白对照组测定获得），$C_{理论}$为理论加标浓度。回收率评价依据《实验室质量控制规范食品理化检测》（GB/T 27404-2008）执行。

1.2.4.4 特异性实验 分别配制哌拉西林、头孢哌酮、美罗培南、左氧氟沙星、伏立康唑与阿米卡星等临床常用联用药物的标准液，浓度设置为各自临床最高血药浓度，将各药物标准液分别稀释80倍后进行检测，每组重复测定3次，将各特异性样本检测所得T/C均值代入标准曲线，计算得到对应的浓度，以评价阿米卡星荧光免疫层析检测法对上述结构类似物及联合用药的交叉反应情况。若计算浓度低于方法检出限（0.22 μg/mL），则认为无交叉反应，表明该检测法特异性良好。

1.2.4.5 试纸条稳定性 稳定实验可用于评价试纸条的长期保存性能。将同一批次制备的阿米卡星荧光免疫层析试纸条分为两组，分别装入含干燥剂的铝箔袋密封保存，一组置于50 ℃烘箱中保存28 d，进行加速老化实验；另一组置于室温条件下常规保存作为对照。分别在第0、7、14、28 d取样检测，采用样品稀释液进行上样测定，每个时间点设置3次重复，记录T线、C线信号值，通过计算T/C值偏差，综合评估试纸条稳定性[16-17]。

1.2.4.6 样本临床比对实验 收集83例阿米卡星用药患者的血浆临床样本，委托苏州海科医药技术有限公司采用液相色谱-串联质谱法进行质谱检测。同时采用

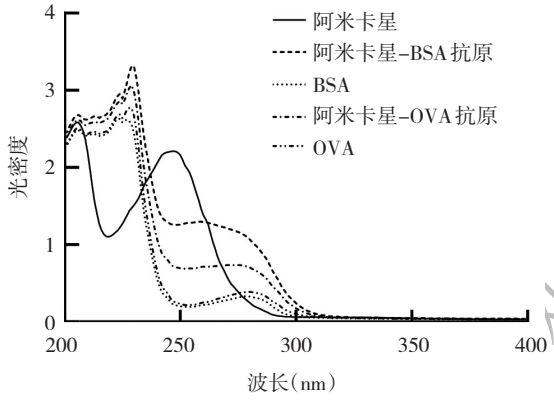
浙江医学杂志官方网站网址：www.zjyxzz.com

本研究建立的荧光免疫层析法对上述样本同步检测。

1.3 统计学处理 采用MedCalc22.019软件。根据《体外诊断试剂临床试验技术指导原则》(2021年第72号)开展数据分析。采用Pearson相关分析荧光免疫层析法与质谱法检测阿米卡星血药浓度结果的线性相关关系;运用Deming回归拟合两种检测方法的回归方程。采用Bland-Altman分析法评价两组检测结果的一致性,并绘制散点图。

2 结果

2.1 阿米卡星完全抗原的制备 对制备所得阿米卡星-OVA抗原、阿米卡星-BSA抗原分别进行紫外全波长扫描,扫描结果见图2。与阿米卡星标准液、载体蛋白比较,两种偶联产物的紫外扫描波峰位置发生偏移,证明阿米卡星人工完全抗原偶联制备成功。



注:BSA为牛血清白蛋白;OVA为卵清蛋白。

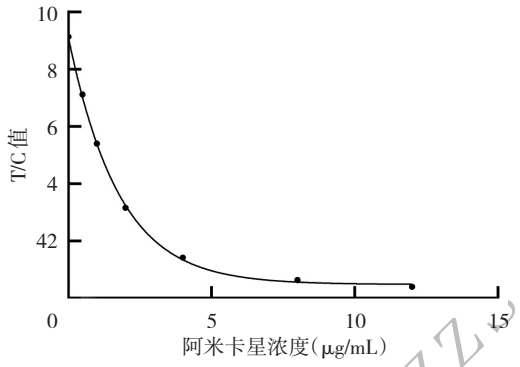
图2 阿米卡星人工完全抗原紫外全波长扫描图谱

2.2 阿米卡星单克隆抗体亲和性、灵敏度测定 细胞融合完成后,经HAT筛选和ELISA法鉴定,成功获得2株可特异性分泌针对阿米卡星单克隆抗体的杂交瘤细胞。1号抗体在1∶8 000稀释时的IC_{50}为5.99 ng/mL,2号抗体在相同稀释倍数时的IC_{50}为6.28 ng/mL。鉴于荧光免疫层析法对阿米卡星的检测要求为微克级别,无需过高亲和力抗体,综合判定选择2号抗体用于后续试剂盒开发。

2.3 阿米卡星荧光免疫层析检测法标准曲线 将配制好的阿米卡星标准液进行检测,每个浓度重复3次,测得T/C值,采用四参数logistic模型拟合,标准曲线见图3。回归方程:$y=(A-D)/[1+(x/C)^B]+D$,式中y为T/C值,x为阿米卡星血浆浓度(μg/mL)。回归参数:A=9.12,B=1.41,C=1.27,D=0,R^2=0.99,拟合度良好,IC_{50}=1.27 μg/mL。

2.4 方法学评价

2.4.1 灵敏度和线性范围 对0 μg/mL空白样品重复检测20次,按$\bar{x}-2s$计算得检出限为0.22 μg/mL。重新测定标准曲线上各浓度点,各浓度*RSD*均<15%,线性范围为0.5~10.0 μg/mL。



注:T/C值为检测线/质控线荧光信号值比值。

图3 阿米卡星荧光免疫层析检测标准曲线

2.4.2 精密度 高、低浓度(2、8 μg/mL)阿米卡星样本的*RSD*均<8.5%,精密度良好。

2.4.3 回收率 回收率为97.9%~100.3%,符合标准要求。

2.4.4 特异性 各特异性样本检测浓度均低于0.22 μg/mL,表明本检测体系特异性良好。

2.4.5 试纸条稳定性 在加速稳定性试验中,将同批次免疫层析试纸条分别置于室温条件和50 ℃恒温烘箱中保存,于第0、7、14、28天采用2 μg/mL和8 μg/mL的样本进行检测,记录T/C比值。各时间点T/C比值与第0天相比偏差均小于10%,提示该试纸条在50 ℃加速条件下至少可稳定28 d,具有良好的稳定性,可满足商品化运输与保存的实际需求。

2.5 荧光免疫层析法与质谱法检测阿米卡星临床样本结果 Deming回归分析结果显示,两种方法检测阿米卡星血药浓度的回归方程为y=0.223+1.008x,其中斜率为1.008(95%*CI*:0.936~1.080),截距为0.223(95%*CI*:-0.024~0.470),对纳入统计的数据进行分析,*r*=0.985,表明阿米卡星荧光免疫层析法检测结果与质谱法的检测结果相关性较好,见图4。Bland-Altman一致性评价,97.6%(81/83)的样本在95%一致性界限的范围内,表明两种方法一致性较好,见图5。

3 讨论

本研究建立了一种快速准确检测阿米卡星药物浓度的方法。与传统检测技术相比,该方法建立的荧光免疫层析卡在处理样本时具有明显优势:样本前处理过程简单、操作便捷、成本较低,检测灵敏度高以及特异性较好,IC_{50}为1.27 μg/mL,线性范围为0.5~10.0 μg/mL,检出

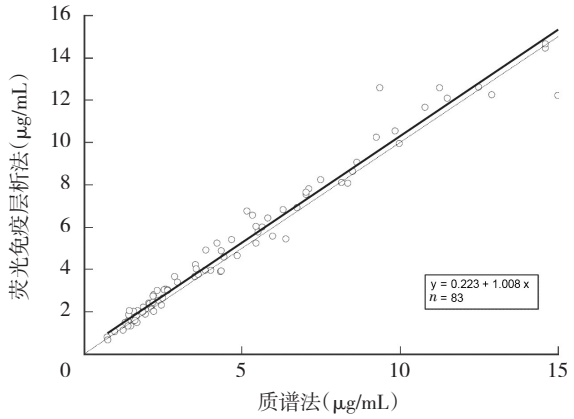


图4 荧光免疫层析法与质谱法检测阿米卡星血药浓度的Deming回归图

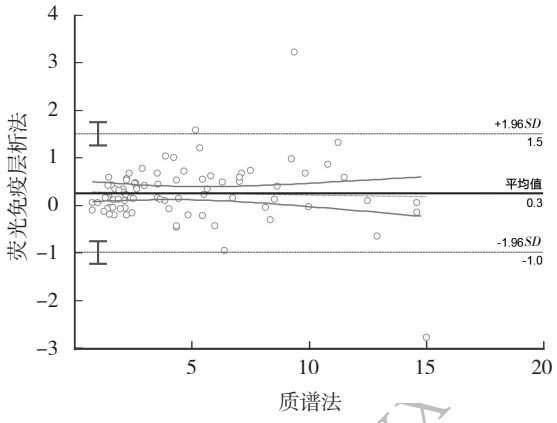


图5 荧光免疫层析法与质谱法检测阿米卡星血药浓度的Bland-Altman一致性图

限为0.22 μg/mL，精密度均＜8.5%，回收率为97.9%~100.3%。与5种阿米卡星结构类似物和联合用药相关药物无交叉反应。能满足现场大量样本同时检测，大大缩短了单个样本的检测时间，满足了对阿米卡星临床检测时效性和准确性的需求，具有广泛的临床应用前景。

4 参考文献

[1] 刘海燕, 殷瑜. 氨基糖苷类抗生素作用机制研究进展[J]. 中国抗生素杂志, 2019, 44(11):1283-1287. DOI:10.13461/j.cnki.cja.006834.

[2] 何勇预, 黄志军, 邹晓彤. 阿米卡星联合哌拉西林他唑巴坦治疗EICU铜绿假单胞菌肺炎的临床效果[J]. 临床合理用药, 2023, 16(17):67-70. DOI:10.15887/j.cnki.13-1389/r.2023.17.019.

[3] 周晨霞, 陶赟, 张碧波, 等. 阿米卡星辅助头孢哌酮纳舒巴坦纳治疗CRAB医院获得性肺炎的临床观察[J]. 山东医药, 2021, 61(25):89-91. DOI:10.3969/j.issn.1002-266X.2021.25.024.

[4] Ruiz-Ramos J, Villarreal E, Gordón M, et al. Implication of haemodiafiltration flow rate on amikacin pharmacokinetic parameters in critically ill patients[J]. Blood Purification, 2018, 45(1-3):88-94. DOI:10.1159/000478969.

[5] 张翔云, 焦伟杰, 王腾飞, 等. 雾化阿米卡星辅助治疗多重耐药革兰阴性菌肺炎疗效与安全性的Meta分析[J]. 中国抗生素杂志, 2024, 49(6):678-685. DOI:10.13461/j.cnki.cja.007703.

[6] 俞洁, 孙逸凡, 周涵璐, 等. 氨基糖苷类药物耳毒性研究进展[J]. 毒理学杂志, 2023, 37(4):365-369. DOI:10.16421/j.cnki.1002-3127.2023.04.006.

[7] 柯英, 涂杰霞. 硫酸阿米卡星注射液肾毒性研究[J]. 中国现代医药杂志, 2022, 24(1):97-99. DOI:10.3969/j.issn.1672-9463.2022.01.026.

[8] 闫成, 苏彦雷, 刘倩. 1例阿米卡星致急性肾功能衰竭患者死亡的原因分析[J]. 抗感染药学, 2021, 18(6):889-891. DOI:10.13493/j.issn.1672-7878.2021.06-033.

[9] 崔玉娟, 屠春林, 楚亚萍, 等. 应用阿米卡星时不同剂量溶媒对老年患者血药浓度及肾功能的影响[J]. 广西医学, 2020, 42(21):2846-2850. DOI:10.11675/j.issn.0253-4304.2020.21.22.

[10] 张亮, 侯文洁, 周秋云, 等. HPLC-UV法检测人血浆中阿米卡星的浓度[J]. 中南药学, 2015, 13(10):1048-1050. DOI:10.7539/j.issn.1672-2981.2015.10.009.

[11] Hammett-Stabler CA, Johns T. Laboratory guidelines for monitoring of antimicrobial drugs[J]. Clinical Chemistry, 1998, 44(5):1129-1140. DOI:10.1093/clinchem/44.5.1129.

[12] 徐兰, 汪凤华, 任琦, 等. HPLC法测定人血清中阿米卡星的浓度及临床应用[J]. 药品评价, 2020, 17(21):9-12. DOI:10.3969/j.issn.1672-2809.2020.21.004.

[13] 吴萌, 魏治静. 人血清淀粉样蛋白A荧光免疫层析检测试剂盒的研制[J]. 现代医药卫生, 2020, 36(14):2170-2173. DOI:10.3969/j.issn.1009-5519.2020.14.012.

[14] Hu Y, Lu X, Shen L, et al. Difunctional magnetic nanoparticles employed in immunochromatographic assay for rapid and quantitative detection of carcinoembryonic antigen[J]. Int J Mol Sci, 2023, 24(16):12562. DOI:10.3390/ijms241612562.

[15] 国家药品监督管理局医疗器械技术审评中心. 国家药监局器审中心关于发布定量检测体外诊断试剂分析性能评估注册审查指导原则的通告(2022年第32号)[EB/OL]. (2022-08-26)[2025-10-25]. https://www.cmde.org.cn//xwdt/shpgzgg/gztg/20220826134939123.html.

[16] 宋妍灵, 翟璐, 李因来, 等. 基于Eu3+荧光微球的丁香酚时间分辨荧光免疫层析技术的建立[J]. 农业生物技术学报, 2024, 32(9):2190-2202. DOI:10.3969/j.issn.1674-7968.2024.09.021.

[17] 肖蕴祺, 汪劲能, 邱良祝, 等. 应用时间分辨荧光免疫层析法快速定量检测玉米及其副产物中的伏马毒素[J]. 中国饲料, 2025, 3:116-122. DOI:10.15906/j.cnki.cn11-2975/s.2024030028-04.

（收稿日期：2025-11-25）

（本文编辑：聂超颖）

浙江医学杂志官网站网址：www.zjyx.com