

文章编号: 1000- 0615(2005)04- 0534- 06

渔药恩诺沙星完全抗原合成方法及效果的研究

刘春娥, 林 洪, 曹立民, 江 洁
(中国海洋大学水生生物制品安全性实验室, 山东 青岛 266003)

摘要: 采用牛血清白蛋白(BSA)和鸡血清白蛋白(OVA)为免疫用载体蛋白,匙孔血蓝蛋白(KLH)为包被抗原用蛋白,采用不同的方法合成完全抗原,对 BALB/C 小鼠进行免疫,并通过紫外光谱特征、抗血清检测等手段对完全抗原的合成效果进行了分析。实验表明蛋白-恩诺沙星偶联物的紫外光谱特征可以较为准确、简便地提示完全抗原的合成效果,并能够与抗血清的酶联免疫吸附试验(ELISA)分析结果吻合。用乙二胺(EDA)对载体蛋白进行处理,可以明显提高完全抗原的合成效果;而偶联方法对于不同载体蛋白的影响也存在差异,OVA 采用活化酯法效果较好,而 BSA 采用碳二亚胺法得到的血清效价较高。

关键词: 恩诺沙星;酶联免疫吸附试验;完全抗原

中图分类号: S948 文献标识码: A

Studies on synthesis and characteristics of complete antigens of Enrofloxacin

LIU Chun-e, LIN Hong, CAO Li-min, JIANG jie
(Seafood Safety Laboratory, Ocean University of China, Qingdao 266003, China)

Abstract: Fluoroquinolones (FQs) are one of the commonest antibiotic groups that have been used for the treatment of bacterial infection. Enrofloxacin (EF) belongs to this group and has been increasingly used in veterinary medicine. A simple and reliable analytical method for this drug is required. The current determination by high performance liquid chromatography (HPLC) is sensitive but labor-intensive. Immunoassay methods have been successfully developed to rapidly screen EF residues. The synthesis and characteristics of complete antigens of EF were experimented. The results of this study indicated that the antibodies against EF may be used as the basis for an immunoassay to rapidly screen samples for the presence of FQs in tissues or body fluids. EF is a small molecule ($MW < 1000$) that must be conjugated to a carrier to elicit an immune response. Proteins are commonly used carriers, such as bovine serum albumin (BSA), ovalbumin (OVA), keyhole limpet hemocyanin (KLH) and Albumin Human (HSA). Using the free carboxylic acid on EF, it could be linked to protein carriers through the amide linkage. BSA and OVA were used as protein carriers to synthesize EF complete antigens respectively by both carbodiimide method and active ester method, which were then immunized to BALB/C rats. KLH was coupled to EF by carbodiimide method, the conjugation was used as coating antigen. The effects of coupling between haptens and carriers were investigated by UV spectrum, anti-serum, etc. The UV spectrum showed that the major absorbances of EF were in 208 nm, 271 nm and 334 nm, while protein had its major absorbances at 229 nm and 278 nm; the EF-protein conjugates had a significant peak at 330-335 nm which were the main characteristic of EF but could not be seen in protein, so it could be concluded that the linkage between EF and protein were successfully set up. An indirect enzyme linked immunosorbant assay (ELISA) was used to determine the titers of the antiserum, the titers of all the resultant polyclonal antibodies could reach 1:50000. In ELISA procedure, the optimal dilution of coating antigen was determined by the checkerboard test and the optimum condition selected was coating antigen concentration in $10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ and secondary antibody diluted 1:10000. The hapten-protein ratio was calculated by formula at the range of 1-6. It used to believe that the amount of haptens coupled to the protein should be as much as possible. But in theory, the carrier protein linked even to one hapten may be enough to produce specific antibody, and in fact many researchers have proved that in some cases overabundance of the haptens with the carrier cannot result in desired responses, because it may prevent the protein from being present at the surface of immunoglobulins on B cells, and then

收稿日期: 2004-06-30

资助项目: 国家自然科学基金资助(30400336); 山东省科技攻关项目资助(031070120)

作者简介: 刘春娥(1980-), 女, 山东烟台人, 硕士研究生, 主要从事水产品安全研究。Tel: 0532-2031550, E-mail: lchune@tom.com

通讯作者: 曹立民, Tel: 0532-2032389, E-mail: caolimin@ouc.edu.cn

interfere with the immune reaction. The results showed that the UV spectrum of protein-EF could coincide with the results of enzyme immunoassay of antisera, so it could be used to indicate the characteristics of the complete antigens simply. During the reaction, amino group on the protein can also be linked with the carboxyl group on itself. To reduce the self-coupling, we added excess ethylenediamine (EDA) first to block the proteins and it could be seen that the characters of the modified proteins did not change from its UV spectrum. Now no relative reports about modified protein could be obtained in China. Also it was found that coupling effects could be obviously improved after the carrier proteins were treated with EDA. But to various carrier proteins, the coupling effects were greatly influenced by different coupling methods. It was better to use active ester method than carbodiimide method when carrier protein was OVA. But when BSA was used as carrier protein, the coupling effects of the carbodiimide method were better.

Key words: Enrofloxacin; enzyme linked immunosorbant assay(ELISA); complete antigen

氟喹诺酮类(Fluoroquinolones, FQs)为一族人工合成的抗生素,目前被广泛用于动物和人类的多种感染性疾病的治疗,恩诺沙星(Enrofloxacin, EF)即为其中常用的一种。随着FQs在水产养殖中的广泛应用,其残留问题已经成为目前水产品安全问题的典型性表现形式之一,并引起国内外广泛的关注,如欧盟规定水产品中最高残留限量(MIR)在 $100\sim 300\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ (恩诺沙星与环丙沙星总量),我国的MIR范围与欧盟相同(仅在不同动物的不同部位略有差异)^[1]。

目前对氟喹诺酮类药物残留的检测方法主要有微生物法、免疫分析法、色谱法及色谱-质谱联用等。HPLC法是已报道用于FQs残留检测最常用的检测方法,但由于前处理较复杂,所需仪器较昂贵,尤其不能适用于大量样品的快速检测。微生物法检测限常高于FQs的MIR,不够灵敏。LC-MS因所用仪器要求高、价格昂贵,仅用于残留确证。免疫分析法灵敏度高,特异性强,可适用于大量样品的快速筛选及某一样品的确证,因而被认为是一种较有前途的药残快速检测方法^[2]。

氟喹诺酮类药物的免疫分析研究目前尚处于起步阶段^[3],近期已有国外学者制备了沙拉沙星等药物的单克隆抗体,并采用ELISA方法检测动物组织中相应药物的残留,检测限可达到 $2\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$,但与其它FQs组分之间存在不同程度的交叉反应^[4]。由于此类药物属半抗原,因此完全抗原的合成效果直接影响抗体的性能,而如何根据具体的检测要求,有效地设计优化完全抗原的合成过程,以及如何对合成效果进行简便准确的判断和鉴定,目前尚未见有报道。

本文描述了渔药恩诺沙星完全抗原的合成过程以及鉴定方法,就其中主要因素的影响进行了探讨,并对其抗体的性质进行了初步研究,从而为进一步发展水产品中该类药物残留的免疫分析方法提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料和仪器

恩诺沙星标准品(EF),含量99%,中国兽医药品监察所; NHS(N-羟基琥珀酰胺), Sigma公司; EDC(1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺), Sigma公司; DCC(1,3-二环己基碳二亚胺), Sigma公司; 福氏完全佐剂(CFA), Sigma公司; 福氏不完全佐剂(IFA), Sigma公司; 匙孔血蓝蛋白(KLH), Sigma公司; 牛血清白蛋白(BSA), 上海实生细胞生物技术有限公司; 人血清白蛋白(HSA), 北京经科宏大生物公司; 鸡血清白蛋白(OVA), 北京经科宏大生物公司; 辣根酶标记山羊抗小鼠IgG, 北京中山生物技术有限公司; N,N'-二甲基甲酰胺(DMF), 上海五联化工厂; TMB(3,3',5,5'-四甲基对二氨基联苯二盐酸化物), Amresco; 其它试剂均为分析纯。

实验动物: BALB/C小鼠, female, 6~8周龄, 购于山东大学医学院动物房。

UV-2102C分光光度计, UNICO上海公司。MuLiskan MK3酶标仪, 芬兰 Labsystems公司

1.2 方法

载体蛋白的封闭 参照文献[5], 将200μL 乙二胺(EDA)(10%), 23.6mg 载体蛋白, 25.6mg EDC依次溶于1mL 磷酸盐缓冲液(PBS)($0.01\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, pH7.0)中, 恒温振荡培养箱振荡过夜(20°C , $110\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$), PBS完全透析后备用。

制备免疫抗原 碳二亚胺法^[6]合成程序为: 取15mg EF, 5.2mg NHS, 9.3mg EDC溶于250μL DMF中, 室温振荡1.5h; $3000\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心30s, 取上清50μL加入2mL含5mg载体蛋白的PBS溶液(预先溶有33%的DMF), 恒温振荡过夜($110\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$, 4°C); 然后将反应物装入透析带中, 先用含33%DMF的PBS溶液透析, 逐步减少DMF的量直至完全用PBS, 透析完全后冻干, -

80℃保存。活化酯法^[7]合成程序为:取3 mg EF, 10 mg NHS, 10 mg DDC 加入1.5 mL 溶有6 mg 载体蛋白的PBS的溶液(溶有33% DMF)中,在室温下振荡过夜,然后将反应物用PBS透析后,冻干, -80℃保存备用。

制备包被抗原 以KLH为载体蛋白,依照载体蛋白封闭的方法先对其进行封闭,采用碳二亚胺法合成KLH-EF偶联物,操作同上。

人工抗原的鉴定 分别将蛋白、EF以及透

析后的偶联物稀释到一定浓度,于200~400 nm 进行紫外扫描。

偶联比的测定 采用紫外分光光度法,利用蛋白质在278 nm 和EF在334 nm 的标准曲线(图1和图2),分别测定偶联物中EF和蛋白浓度。半抗原与蛋白质分子的结合比计算公式为^[8]:

$$\text{结合比} = \frac{\text{EF 浓度} / \text{EF 分子量}}{\text{蛋白浓度} / \text{蛋白分子量}}$$

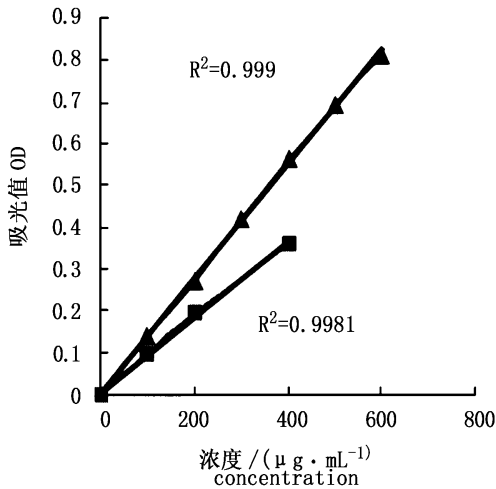


图1 蛋白质标准曲线

Fig. 1 The standard curve of protein

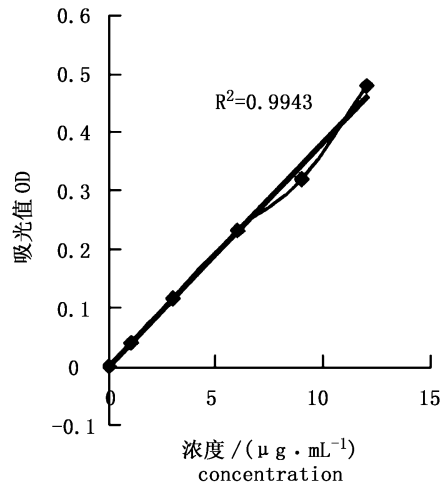


图2 EF标准曲线

Fig. 2 The standard curve of Enrofloxacin

动物免疫 选取6~8周龄的BALB/C小鼠,进行免疫试验。免疫前采血作为阴性血清。将300 μg 完全抗原(以蛋白浓度计)与0.05 mL 生理盐水和0.05 mL CFA 混合后进行腹腔注射,14 d后第二次免疫,剂量与方法同第一次,CFA换成IFA,7 d后采血测效价。35 d进行第三次免疫后7 d摘眼球取血,离心取上清液, -20℃贮存备用。

间接ELISA测定抗体的效价 方阵滴定法确定包被抗原的浓度、酶标二抗的稀释度及底物浓度。

ELISA操作程序:用碳酸盐缓冲液(pH 9.6, 0.1 mol·L⁻¹)将包被抗原稀释到一定浓度加到96孔酶标板上,每孔100 μL, 37℃水浴温育1.5 h;用PBS(内含0.1%吐温-20)洗涤3次,每次3~4 min,弃去洗涤液,在吸水纸上将酶标板敲干;用0.1% BSA(OVA)封闭,每空200 μL, 37℃水浴1.5 h,洗涤3次后敲干;将一定浓度的抗血清加到板

孔中,每空100 μL, 37℃水浴1.5 h,洗涤3次后敲干;加入羊抗鼠酶标二抗,每空100 μL, 37℃水浴1.5 h,洗涤3次后敲干;加入TMB底物溶液(0.1 mg·mL⁻¹),每空100 μL, 37℃避光水浴15 min;每空加入50 μL、2 mol·L⁻¹的硫酸溶液终止反应;吸光值测定。

2 结果

2.1 蛋白、半抗原以及人工抗原的紫外图谱特征

从图3可看出,恩诺沙星在271 nm 和334 nm 处均有吸收,而蛋白的吸收峰主要集中在229 nm 和278 nm,而在334 nm 没有吸收。从图4可看出,经过EDA 封闭和未经EDA 封闭蛋白的紫外图谱没有明显的变化。从图5、图6可看出,蛋白-EF偶联物除在220 nm、278 nm 存在两处明显的吸收峰外,在330~335 nm 还普遍存在一个吸收峰,但是不同偶联物的峰值存在明显差异。

2.2 不同完全抗原免疫效果的比较 利用间接 ELISA 测定抗血清效价, 方阵滴定

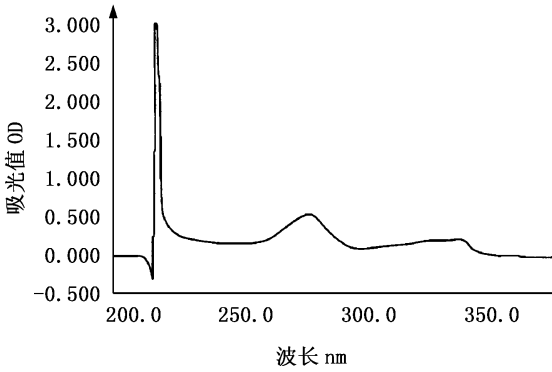


图3 EF紫外扫描图谱

Fig.3 UV scanning spectrum of Enrofloxacin

法确定包被抗原浓度为 $10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 酶标二抗稀释为 15000, 底物浓度为 $0.2 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

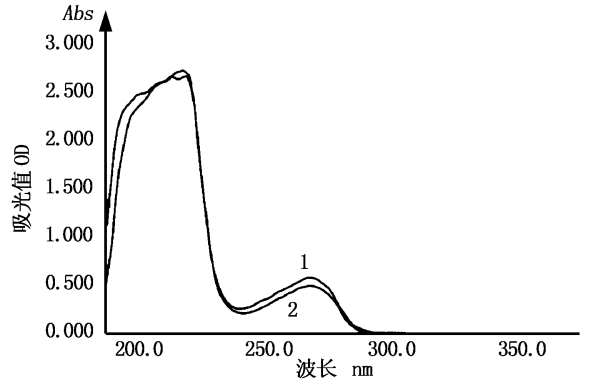


图4 载体蛋白和经 EDA 处理后载体蛋白的紫外扫描图

Fig.4 UV spectrum of BSA and EDA-BSA
1: BSA; 2: EDA-BSA

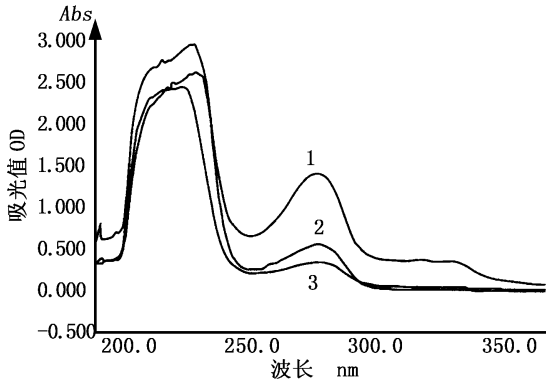


图5 以 BSA 为载体的不同完全抗原的紫外扫描图谱

Fig.5 UV scanning spectrum of various complete antigens based on BSA

1: 封闭后经碳二亚胺法处理; 2: 活化酯法处理 3: 未封闭处理
1: carbodiimide method after EDA treatment; 2: active ester method after EDA treatment; 3: carbodiimide method only

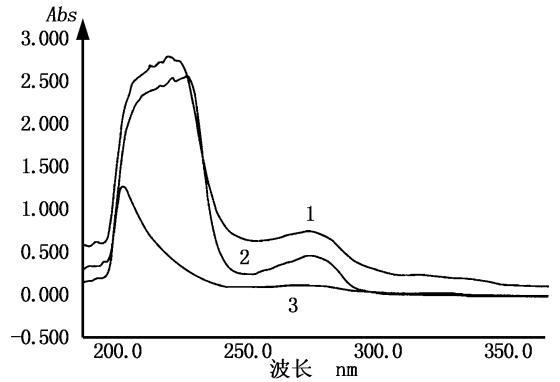


图6 以 OVA 为载体的不同完全抗原的紫外扫描图谱

Fig.6 UV scanning spectrum of various complete antigens based on OVA

1: 封闭后经碳二亚胺法处理; 2: 活化酯法处理 3: 未封闭处理
1: carbodiimide method after EDA treatment; 2: active ester method after EDA treatment; 3: carbodiimide method only

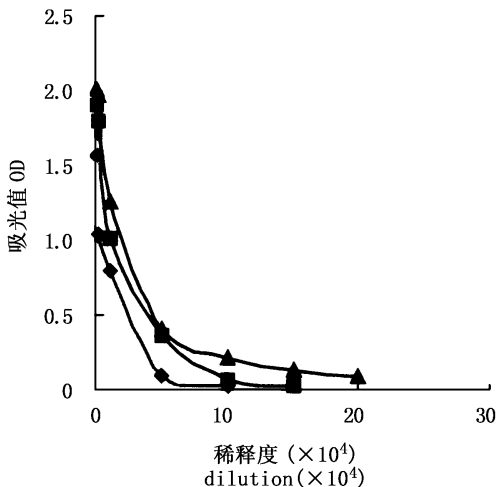


图7 OVA 为载体蛋白所制备抗血清的效价

Fig.7 The titer of anti-serums against immunogens using OVA as the carrier protein

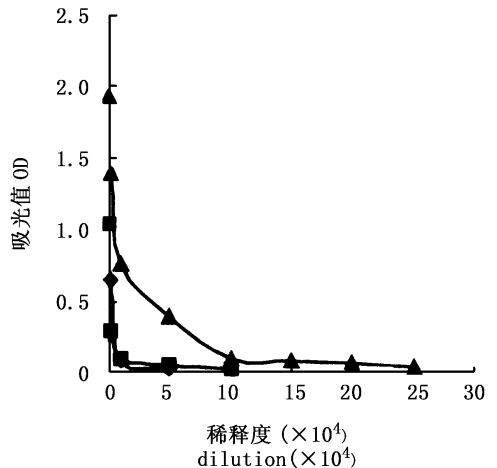


图8 BSA 为载体蛋白制备血清的效价

Fig.8 The titer of anti-serums against immunogens using BSA as the carrier protein

从图 7、图 8 可以看出, 所得到的抗血清效价均达到 50 000 以上, 这表明完全抗原的合成是成功的。但是, 合成方法对于抗原免疫效果存在较为明显的影响, 如载体蛋白经 EDA 封闭处理后得到的抗血清效价均高于未处理样品。此外, 同样经过 EDA 处理后, OVA 采用活化酯法得到的抗血清的效价要高于碳二亚胺法, 而 BSA 则用碳二亚胺法的效果较好。同时值得注意的是, 抗血清的效价与其相应完全抗原的紫外光谱特征存在较为明显的对应关系, 凡是 334 nm 吸收值较高、偶联比较高的完全抗原, 其免疫小鼠所得抗血清的效价也处于较高水平。

2.3 载体蛋白以及合成方法对于完全抗原合成效果的影响

由图 5、图 6 可以看出, 经封闭处理的偶联物在 334 nm 处的吸收均比未经处理的要高。从图 5 还可以看出载体蛋白为 BSA 时, 封闭后由碳二亚胺法制备的偶联物在 334 nm 处的吸收要高于活化酯法, 从图 6 也可以看出 OVA 封闭后由活化酯法制备的偶联物在 334 nm 处的吸收高于碳二亚胺法, 偶联比的计算和比较也反映了同一趋势。

表 1 不同方法所合成抗原的偶联比

Tab. 1 Conjugation ratio of coupled antigens

载体蛋白 carrier proteins	EDA 封闭 ¹ EDA treat ¹		EDA 封闭 ² EDA treat ²		未经 EDA 封闭 ¹ EDA untreat ¹	
	OVA	BSA	OVA	BSA	OVA	BSA
	偶联比 ratio					
	4	4	6	2	2	1

注: 1: 采用碳二亚胺法; 2: 采用活化酯法

Notes: 1: carbodiimide method; 2: active ester method

3 讨论

3.1 EF 完全抗原合成效果的评价

特异性抗体的出现及其性能, 是对完全抗原的合成效果最为准确的检验。考虑到时间因素, 采用物理及化学方法在免疫动物之前判断、分析完全抗原的性能并在此基础上进行合成环节的优化, 是较为合理的研究路线。目前分析半抗原-载体蛋白的偶联结果可以采用红外光谱、紫外光谱、电泳以及激光解析飞行质谱等手段, 其中紫外光谱因操作较为简便、定性分析准确度较高而被广泛采用, 但前提条件是半抗原应具有与载体迥然不同的吸收峰, 从而使偶联物兼具两者的图谱特征。恩诺沙星在 271 nm 和 334 nm 存在较为明显的吸收, 其中 271 nm 为主吸收峰, 但是与蛋白

278 nm 的吸收峰非常接近而难以作为判断依据。实验结果表明, EF-蛋白偶联物在 334 nm 的吸收特征与偶联效果存在较好的对应关系, 当偶联物中 EF 比例较高时, 其在 334 nm 的吸收峰比较明显, 而随着样品浓度降低或者偶联物中 EF 比例减小, 吸收值会逐渐降低。因此对于 EF 完全抗原的合成, 334 nm 处的吸收特点可以作为一个较为准确和简明的指证, 用来评价偶联成功与否以及偶联程度的高低。

相对于定性分析, 偶联比的计算及其对于评价完全抗原合成效果的意义, 要显得复杂许多。过去一般认为, 接到蛋白质分子上的半抗原数目要尽可能多。但理论上讲, 每个载体分子连接上一个半抗原分子就足以产生抗体, 以往核糖核酸酶、胰岛素及寡聚赖氨酸的单价二硝基苯酚 (DNP) 衍生物等研究均证明, 过多的半抗原有时并不能得到预期的结果, 反而可能导致载体上覆盖的半抗原分子过多而不利于载体与淋巴细胞表面结合, 甚至不能引发免疫反应, 李俊锁等^[9]进一步认为以血清蛋白为载体, 偶联比一般应以 10 左右为宜, 而且低偶联比往往有助于提高抗体的选择性和亲和力。实际上在不同的具体条件和要求下, 适宜的偶联比可能是不同的。本实验所获得完全抗原的偶联比的范围均在 10 以下, 而且其数值大小与完全抗原紫外扫描图谱在 334 nm 吸光值、以及抗血清的效价具有较好的吻合关系。这提示我们, 这一范围的偶联比可以在一定程度上预示恩诺沙星抗体的实际性质。

值得注意的是通过偶联公式得出的偶联比是利用蛋白 278 nm 处的吸光值, 而这一吸光值与 EF 在 271 nm 的吸收接近, 因此偶联比只能在一定的程度上反映连接的情况, 偶联比的精确计算可以通过飞行质谱等其它手段测定。

3.2 合成方法对于 EF 完全抗原合成效果的影响

恩诺沙星分子式为 $C_{19}H_{22}FN_3O_3$ (图 9), 分子量 359.40, 属于半抗原, 需与大分子物质 (如蛋白质等) 结合后才具有免疫原性。EF 分子中含有羧基, 活化羧基的方法主要有: 混合酸酐法 (mixed acid anhydride)、碳二亚胺法 (EDC) 和活化酯法 (active ester method)。碳二亚胺是一类很强的脱水剂, 能使 EF 上的羧基与载体蛋白上的氨基形成酰胺键, 但这种缩合反应没有选择性, 易形成蛋白分子间的自身聚合, 产生非均一性产物, 因此

本实验采用的是改进的碳二亚胺法,即在反应体系中加入一定量的 NHS,以减少非均一性产物;活化酯法是利用 EF 上的羧基在 DDC 的作用下,与 NHS 反应,生成活泼酯衍生物,后者与载体蛋白上的氨基反应,形成以酰胺键连接的偶合物。从实验结果可以看出针对不同的蛋白,2 种方法的效果是不一样的:BSA 采用碳二亚胺法较好,OVA 采用活化酯法较好。可能的原因是活化酯法中用的 DCC 是脂溶性的,OVA 在其中的溶解性好于 BSA;同样 EDC 为水溶性,BSA 在其中的溶解性较好。

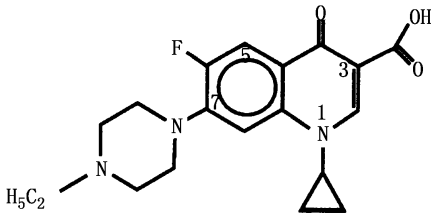


图 9 EF 结构式

Fig. 9 The structure of Enrofloxacin

由于在反应过程中蛋白分子间也可能发生聚合,为了减少蛋白的自身反应,将蛋白先用过量的乙二胺处理,封闭其上的羧基,再与 EF 进行偶联,目前国内尚无这一方面的报道。有报道对载

体蛋白 OVA 进行 EDA 封闭时采用 37.5% 的 DMF,但在重复这一方法时出现大量絮状沉淀,因此本实验降低其用量为 33%,效果较好。从实验结果可以看出,不管对于何种蛋白,经 EDA 处理过的均比未经处理的结果要好。

参考文献:

- [1] 邓国东, 杨桂香, 陈杖榴. 氟喹诺酮类药物在动物性食品中的残留检测研究进展[J]. 中国兽药杂志, 2000, 34(3): 53-58.
- [2] 蔡勤仁, 曾振灵, 杨桂香. 兽药残留免疫检测技术应用进展[J]. 动物医学进展, 2002, 23(2): 25-28.
- [3] Hammer P, Heeschen W. Antibody-captured immunoassay for the detection of enrofloxacin in raw milk[J]. *Milchwissenschaft Milk Science International*, 1995, 50:513-514.
- [4] Kamps Holtzapple C, Buckley S, Stanker L. Production and characterization of monoclonal antibodies against sarafloxacin and cross-reactivity studies of related[J]. *J Agric Food Chem*, 1997, 45, 1984-1990.
- [5] Kamps Holtzapple C, Carlin R J, C Sheffield, *et al.* Analysis of haptens-carrier protein conjugates by nondenaturing gel electrophoresis[J]. *J Immunological Methods*, 1993, 164: 245-253.
- [6] 洪孝庄, 孙曼霁. 蛋白质连接技术[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 1993. 3-4.
- [7] 周新民, 陈连颐, 王捍东, 等. SMD 残留检测的 ELISA 方法的建立和初步应用[J]. *畜牧与兽医*, 2003, 35(10): 8-11.
- [8] 刘凤权, 许金刚, 王金生. 定量测定甲胺磷残留的间接竞争 ELISA 的建立和初步应用[J]. *农业生物技术学报*, 1998, 6(2): 140-146.
- [9] 李俊锁, 钱传范. 兽药残留免疫分析及其进展[J]. *中国兽医学报*, 1998, 18(4): 411-415.