

# 环丙沙星人工抗原的合成及鉴定

郝贵增<sup>1</sup>, 龙淼<sup>2</sup>

(1. 安阳工学院生物与食品工程学院, 河南 安阳 45500) (2. 吉林大学畜牧兽医学院, 吉林 长春 130062)

**摘要:** 通过化学方法制备了环丙沙星的免疫抗原和包被抗原; 分别采用碳二亚胺(EDC)法和氯甲酸乙丁酯法把环丙沙星与 BSA 进行了偶联制备了人工免疫抗原 CIP-BSA, EDC 法制备了包被抗原 CIP-OVA, 经 PAGE、紫外分光光度法测定了人工合成抗原的偶联比, EDC 法和氯甲酸乙丁酯法制得的 CIP-BSA 两分子结合比率分别为 4:1 和 11:1, CIP-OVA 中两分子结合比率为 12:1。这为环丙沙星单克隆抗体的制备奠定了基础。

**关键词:** 环丙沙星; 人工抗原; 碳二亚胺法; 氯甲酸乙丁酯法

中图分类号: R392.11; 文献标识码: A; 文章编号: 1673-9078(2008)07-0658-04

## Synthesis and Identification of Ciprofloxacin Artificial Antigen

HAO Gui-zeng<sup>1</sup>, LONG Miao<sup>2</sup>

(1. School of Biotechnology and Food Engineering, Anyang Institute of Technology, Anyang 455000, China)

(2. College of Animal science and Veterinary Medicine, Jilin University, Changchun 130062, China)

**Abstract:** The Ciprofloxacin (CIP) was conjugated directly to bovine serum albumin(BSA) by carbodiimide (EDC) method and isobutyl chloroformate method, giving the immunizing antigen. And the coating antigen, CIP-OVA, was synthesized by EDC method. The conjugated CIP-BSA and CIP-OVA were analyzed by non-denaturing gel electrophoresis and UV spectrophotometry. Results showed that the molecule conjugate ratio of CIP to BSA by EDC method and isobutyl chloroformate method were 4:1 and 11:1, respectively. The molecule conjugate ratio of CIP to OVA was 12:1. The successful synthesis of Ciprofloxacin artificial antigens provided references for establishment of immunoassay of Ciprofloxacin.

**Key words:** ciprofloxacin; artificial antigen; carbodiimide method; isobutyl chloroformate method

当前, 各个国家都很重视食品中兽药残留检测, 因为兽药残留在食品中会严重危害到人类身体健康、会引起食物中毒、抗菌药物失效等严重后果。各个国家纷纷建立起兽药残留检测最高限量标准, 如日本的“肯定列表制度”、欧盟的食品安全标准中的一些规定。我国是对日和欧盟食品输出的贸易大国, 但是由于兽药残留的问题严重地影响了对其贸易。因此, 建立高效、快捷、准确的食品中兽药残留方法具有重要意义。

环丙沙星(Ciprofloxacin)是一种新型长效氟喹诺酮类(FQs)抗菌药物, 又叫丙氟哌酸, 悉复欣, 环丙氟哌酸。其结构见图 1。

该药物具有抗菌谱广、抗菌作用强、临床效果好、口服易吸收、不良反应弱等特点, 所以在人医和畜牧养殖业中有广泛的应用<sup>[1,2]</sup>。随着 FQs 在食品动物中的广泛应用, 其残留问题已不能忽视<sup>[3]</sup>。许多国家都已对其使用作了休药期和最高残留限量标准。我国在参

收稿日期: 2008-03-15

作者简介: 郝贵增(1964-)。男, 硕士, 副教授, 研究方向: 食品卫生检验和兽医临床工作

考 JECFA 及美国(CFR)和 EC 有关标准的基础上, 制定了恩诺沙星、环丙沙星在动物性食品中的最高残留限量(MRLs)(2002)肉中为 100 μg/kg, 产蛋鸡禁用。

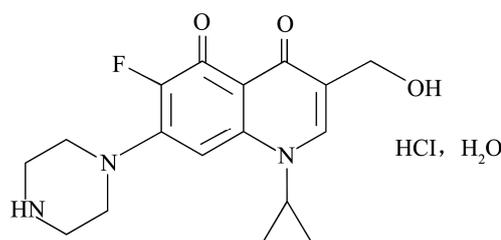


图 1 环丙沙星的结构

Fig.1 Structure of Ciprofloxacin

目前环丙沙星的残留检测分析方法主要有微生物检测法(MIA)、高效液相法(HPLC)、液-质联机法(LC-MS)、毛细管电泳法等<sup>[4-5]</sup>。上述方法都需要复杂的样品前处理、分析费时且需要专门的仪器设备而不易推广。ELISA 法灵敏度高, 特异性比微生物法强, 单克隆抗体的特异性高, 可适用于大量样品的快速筛选及某一样品的确证。ELISA 法的核心是单克隆

抗体, 环丙沙星是小分子抗原, 没有免疫原性。本研究分别采用碳二亚胺法(EDC)<sup>[6]</sup>和氯甲酸乙丁酯法(混合酸酐法)<sup>[7]</sup>, 将环丙沙星与载体蛋白偶联, 制备了环丙沙星的完全抗原, 为动物性食品中环丙沙星残留检测用 ELISA 试剂盒研制奠定了基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 试剂及设备

牛血清白蛋白(BSA)、卵清白蛋白(OVA)、碳化二亚胺(EDC)、N-羟基琥珀酰亚胺(NHS) Sigma 产品。盐酸环丙沙星(CIP)标准品, 含量 99.8%, 批号 H010203, 中国兽医药品监察所。二甲基甲酰胺(DMF)和氯甲酸乙丁酯, 化学纯, 德国进口; 三乙胺, 化学纯, 国产。BECKMAN DU-640 核酸蛋白分析仪, USA; 自动凝胶成像仪, EEC。

### 1.2 环丙沙星人工免疫原的合成

#### 1.2.1 碳二亚胺法合成环丙沙星人工免疫原

采用碳二亚胺法合成环丙沙星人工免疫原 CIP-BSA 的原理见图 2。将 10 mg CIP 溶于 3 mL DMF 中, 同时加入 NHS 20 mg, EDC 70 mg, 放入磁力搅拌器转子, 遮光室温搅拌孵育 24 h (溶液 1); 30 mg

BSA 溶于 2 mL 0.01 M pH 7.4 PBS 中 (溶液 2)。再将孵育后的溶液 1 逐滴加入溶液 2 中, 边加边搅拌, 于室温搅拌反应 6 h。反应混合物移入处理好的透析袋中, 用 0.01 M pH 7.4 PBS 透析 6 d, 期间换液 18 次, 以移走游离的 CIP 等小分子物质。

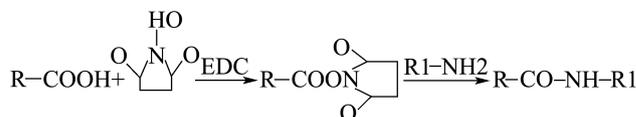


图 2 CIP 与载体蛋白的偶联方式

Fig.2 Coupling of CIP and carrier protein

#### 1.2.2 氯甲酸乙丁酯法合成环丙沙星人工免疫原

采用氯甲酸乙丁酯法(又称混合酸酐法)合成环丙沙星人工免疫原 CIP-BSA 的原理见图 3。将 19.4 mg CIP 溶于 3 mL DMF 中, 同时加入三乙胺 10 μL, 氯甲酸乙丁酯 20 μL, 放入磁力搅拌器转子, 遮光室温搅拌孵育 24 h (溶液 1); 70 mg BSA 溶于 3 mL 0.01 M pH 7.4 PBS 中 (溶液 2)。再将孵育后的溶液 1 逐滴加入溶液 2 中, 边加边搅拌, 于室温搅拌反应 6 h。反应混合物移入处理过的透析袋中, 用 0.01 M pH 7.4 PBS 透析 6 d, 期间换液 18 次, 以移走游离的 CIP 等小分子物质。

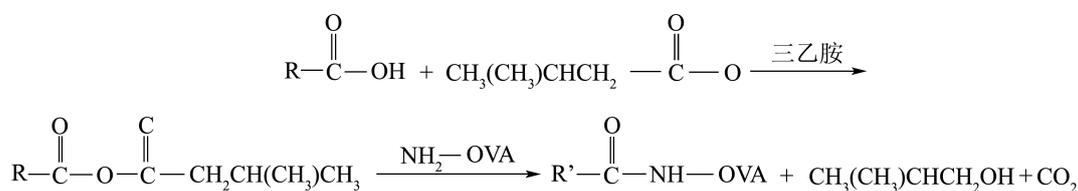


图 3 CIP-BSA 氯甲酸乙丁酯法偶联方式

Fig.3 Coupling of CIP and BSA by isobutyl chloroformate

### 1.3 环丙沙星包被原的合成

方法同 1.2.1。CIP 为 20 mg, 3 mL DMF, NHS 20 mg, EDC 70 mg, OVA 70 mg, PBS 4 mL。偶联产物称为 CIP-OVA。

### 1.4 环丙沙星人工抗原的鉴定及分子结合比的测定

#### 1.4.1 聚丙烯酰胺非变性凝胶电泳分析

分离胶浓度为 10%。被分析样品 5 μL 与等量上样缓冲液混合均匀后上样。积层胶电压 80 V, 待指示剂移到分离胶后, 将电压升至 120 V, 指示剂接近下端后关闭电源。20%三氯乙酸固定半小时, 考马斯亮蓝 R-250 染色 2 h 以上。乙酸-乙醇脱色, 直至背景脱净, 期间换液数次。

#### 1.4.2 紫外分光光度法测定环丙沙星人工抗原分子结合比

参照文献[8]计算环丙沙星人工抗原分子结合比。采用 PBS 调零, 同时设环丙沙星、BSA、OVA 对照。

## 2 结果

### 2.1 聚丙烯酰胺非变性凝胶电泳分析

CIP 与载体蛋白偶联的效果将直接影响免疫效果和 ELISA 检测结果, 所以必须对偶联产物进行偶联效果分析和分子结合比测定。利用聚丙烯酰胺非变性凝胶电泳可对偶联产物进行偶联效果分析, 通过紫外分光光度法可测定 CIP 与载体蛋白之间的分子结合比, 上述方法简便实用, 可对多种偶联物进行定性和定量分析。

EDC 法和氯甲酸乙丁酯法制得的 CIP-BSA 的非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳分析结果见图 4。CIP-OVA 的非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳分析结果见图 4。从图中可以看出, 偶联物的电泳条带均与载体蛋白不同, 证实偶联成功。

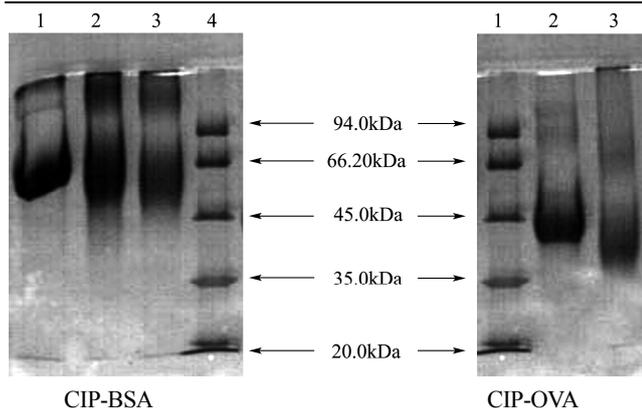


图4 CIP-BSA 和 CIP-OVA 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳

Fig.4 Non-denaturing gel electrophoretogram of CIP-BSA and CIP-OVA

### 2.2 紫外分光光度法测定

将各溶液稀释至 200 μg/mL (偶联产物以蛋白计), 经紫外扫描得各溶液的紫外吸收光谱, BSA、CIP、CIP-BSA 和 OVA、CIP-OVA 的紫外吸收光谱均有明显差异。各溶液最大吸收峰所对应的波长及最大吸光度值见表 1。经计算估测出, EDC 法和氯甲酸乙丁酯法制得的 CIP-BSA 两分子结合比率分别为 4:1 和 11:1, CIP-OVA 中两分子结合比率为 12:1。

表 1 各溶液的最大吸光度值

Table 1 Maximum absorbance of the antigen-containing solutions

溶液	A <sub>277.5</sub>	A <sub>278.5</sub>	A <sub>281</sub>	最大吸收波长
BSA 标准液	0.1781	-	0.1678	277.5
EDC 法制得的 CIP-BSA	0.3767	-	1.2069	278.5
混合酸酐法制得的 CIP-BSA	0.8046	-	0.8028	286.5
CIP	1.1193	1.1301	1.2069	281
OVA	-	0.2133	0.2088	278.5
CIP-OVA	0.8593	-	0.9099	283

## 3 讨论

### 3.1 CIP 人工抗原的合成

CIP 是小分子物质, 本身没有免疫原性, 必须与载体蛋白结合才能刺激机体发生免疫应答, 产生特异性抗体。EDC 法和氯甲酸乙丁酯法原理均是在缩合剂的作用下, 把小分子物质的羧基活化, 生成不稳定的中间体, 再与载体蛋白上游离的氨基发生缩合反应, 把半抗原连接到载体蛋白上。

半抗原与载体的连接具有双分子反应的特点, 因此一般需要搅拌和高浓度的反应物, 以增加半抗原与

载体结合的机会。为防止发生蛋白质变性和沉淀, 影响反应产率和载体的免疫原性, 结合反应通常在水介质中进行。本试验采用的是 DMF, 但是 CIP 在 DMF 中的溶解性较差, 超声也不能完全溶解, 这就影响了 CIP 与载体蛋白的结合。之所以采用 DMF, 只是载体蛋白在此溶剂中不易变性和产生沉淀, 具体采用哪种溶剂适合 CIP, 有待进一步研究。

本试验分别采用碳二亚胺 (EDC) 法和氯甲酸乙丁酯法把环丙沙星与 BSA 进行了偶联制备了人工免疫抗原 CIP-BSA, 同邹明等<sup>[9]</sup>利用 EDC 法和混合酸酐法分别制备了二氟沙星的免疫抗原和包被抗原不同之处在于, 可以通过动物免疫检验两种偶联方法中哪种偶联方法的产物可以更好的诱导功能性目的抗体的产生。

### 3.2 CIP 人工抗原的鉴定

CIP 与载体蛋白的偶联效果将直接影响免疫效果和 ELISA 效果, 本试验利用聚丙烯酰胺非变性凝胶电泳对偶联产物进行了偶联效果分析, 利用紫外分光光度法测定了 CIP 与载体蛋白之间的分子结合比。对半抗原与载体蛋白偶联效果分析的方法有很多种, 本试验采用的 PAGE 和紫外分光光度法简便实用, 可对多种偶联物进行定性和定量分析。

小分子与载体蛋白的偶联比率并非越多越好, 而是要有一定的范围。一般认为, 半抗原结合比过高或过低均影响抗体的生成, 以 5~15 为宜。本实验中 EDC 法和氯甲酸乙丁酯法制得的 CIP-BSA 两分子结合比率分别为 4:1 和 11:1, CIP-OVA 中两分子结合比率为 12:1, 实验证明免疫效果和包被效果均好。

半抗原结合比的大小对诱导抗体的产生并无决定性的影响。每分子蛋白质只连接一个半抗原也可以产生特异性抗体, 并且低结合比可能有助于提高抗体的选择性和亲和力<sup>[10-11]</sup>。

而蔡勤仁研究表明<sup>[12]</sup>, 半抗原结合比高也产生了很好的效果, 因此, 对于抗原结合比应该多大为好, 应视不同药物而定, 没有统一的标准。此外, 由于目前对半抗原与载体蛋白结合比的测定还没有一个标准的方法, 不同的学者采用的方法也不尽相同, 因此结合比报道只是提供比较粗略的分析, 而非绝对意义上的结合比。

## 参考文献

[1] 杨履端. 兽用喹诺酮类抗菌药介绍[J]. 贵州畜牧兽医, 2000, 24(6):9-11

(下转第 673 页)