



四环素人工抗原的制备与鉴定

王 硕, 房 立, 于 姣, 李晓龙

(食品营养与安全教育部重点实验室, 天津科技大学食品工程与生物技术学院, 天津 300457)

摘要: 根据四环素的化学结构特点, 四环素与对氨基苯甲酸通过重氮法合成半抗原. 经过酸化, 乙酸乙酯萃取提纯, 半抗原通过质谱鉴定. 通过活化酯法, 半抗原分别与 BSA 和 OVA 连接制备人工免疫原和包被原, 抗血清的效价分别为 1 : 70 000 和 1 : 32 000, 为制备四环素人工抗原提供一种更为有效的途径, 进而建立酶联免疫快速检测方法, 为最终实现四环素检测试剂盒的研发奠定基础.

关键词: 四环素; 酸化; 活化酯; 抗原合成

中图分类号: Q503

文献标志码: A

文章编号: 1672-6510(2010)03-0001-01

Hapten Synthesis and Identification of Tetracycline

WANG Shuo, FANG Li, YU Jiao, LI Xiao-long

(Key Laboratory of Food Nutrition and Safety, Ministry of Education, College of Food Engineering and Biotechnology, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China)

Abstract: A new synthesis way of hapten for tetracycline base on the formation of its diazo derivatives with acidification, extraction by ethyl acetate. Then, happen TC was covalently attached through its carboxylic acid moiety to the carrier protein (BSA, OVA) by means of the active ester method for preparing immungens and coating antigen, the titer of serum were 1 : 70 000 and 1 : 32 000, respectively. The purpose of this artificial is to provide an effective way to preparate haptens for tetracycline. This study laid a well foundation for the control for the control of tetracycline by ELISA method.

Keywords: tetracycline; acidification; active ester; hapten synthesis

四环素 (tetracycline, TC), 具有四环素类抗生素的基本母核氢化骈四苯, 化学结构如图 1 所示.

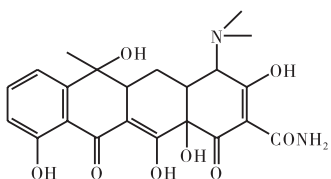


图 1 四环素的化学结构

Fig.1 Chemical structure of tetracycline

四环素类的抗生素是由链霉菌产生的一类广谱抗生素, 此种药物常作为兽药添加到动物饲料中, 使用剂量过大、用药时间过长等原因都会造成其在动物性食品中的残留, 进而成为潜在的食品安全隐患^[1].

欧盟的第 675/92 号令 (出台于 1992 年 3 月 18 日) 规定: 肌肉及牛奶中四环素类化合物的总量不得超过 100 ng/mg 和 100 ng/mL; 肾脏、肝脏及鸡蛋中分别不得超过 600、300、200 ng/mg^[2]. 日本肯定列表制度 (2006 年 5 月 29 日实施) 规定: 奶和鸡蛋中四环素类化合物的总量分别不得超过 100 ng/mL 和 400 ng/mg.

目前, 对该类抗生素的检测方法有高效液相色谱法^[3]、毛细管电泳法^[4]、液相色谱-质谱联用技术^[4]等. 仪器方法结果精确, 但耗时较长, 且需要专业的从业人员, 成本较高. 而免疫检测技术, 尤其是近几年发展的酶联免疫 (ELISA) 技术, 具有灵敏度高、效率高、操作简便、适于批量检测、成本低及便于基层推广等优点^[5], 此方法的关键是获得高质量的抗体, 而抗原的合成则显得尤为重要.

收稿日期: 2009-12-15; 修回日期: 2010-03-03

基金项目: 国家“十一五”科技支撑计划项目 (2009BADB9B03)

作者简介: 王 硕 (1969—), 男, 天津人, 教授, 博士, s.wang@tust.edu.cn.

本文采用重氮化法,经过酸化后用乙酸乙酯进行萃取提纯,并将产物进行活化酯反应,其目的在于能够得到质量更高的四环素人工抗原。

1 材料与方方法

1.1 药品、试剂与仪器

牛血清白蛋白(BSA), Merck 公司;四环素(纯度 $\geq 99\%$), Fluka 公司;卵清蛋白、弗式完全与不完全佐剂、*N*-羟基琥珀酰亚胺(NHS)、*N,N*-二甲基甲酰胺(DMF)、*N,N*-二环己基碳二亚胺(DCC)、四氢呋喃(THF), Sigma 公司;对氨基苯甲酸,天津化学试剂一厂;亚硝酸钠(NaNO_2)、乙酸乙酯,天津双船化学试剂厂. 96 孔酶标板,丹麦 Nunc 公司;微孔板清洗机, BIO-RAD;酶标仪,芬兰 Labsystems dragon 公司;

Mill-Q 超纯水系统,美国 Millipore 公司;高效液相色谱-质谱联用仪,美国菲尼根公司;旋转蒸发仪,香港 Buchi 公司。

1.2 溶液

磷酸盐缓冲液(0.01 mol/L PBS, pH 7.4)、碳酸盐缓冲液(0.05 mol/L, pH 9.6)、洗涤液(0.01 mol/L PBST, pH 7.4)、封闭液(含有 0.5%脱脂奶粉的 PBS 缓冲溶液)、3,3,5,5-四甲基联苯胺(TMB)底物液(TMB-过氧化氢脲溶液)、终止液(2.5 mol/L H_2SO_4)、硼砂缓冲液(0.05 mol/L, pH 8.5, 含 0.15 mol/L 的 NaCl)、磷酸氢二钾溶液(50 mmol/L K_2HPO_4 , pH 9.3)、6 mol/L HCl。

1.3 实验方法

1.3.1 四环素完全抗原的合成

四环素完全抗原合成路线如图 2 所示。

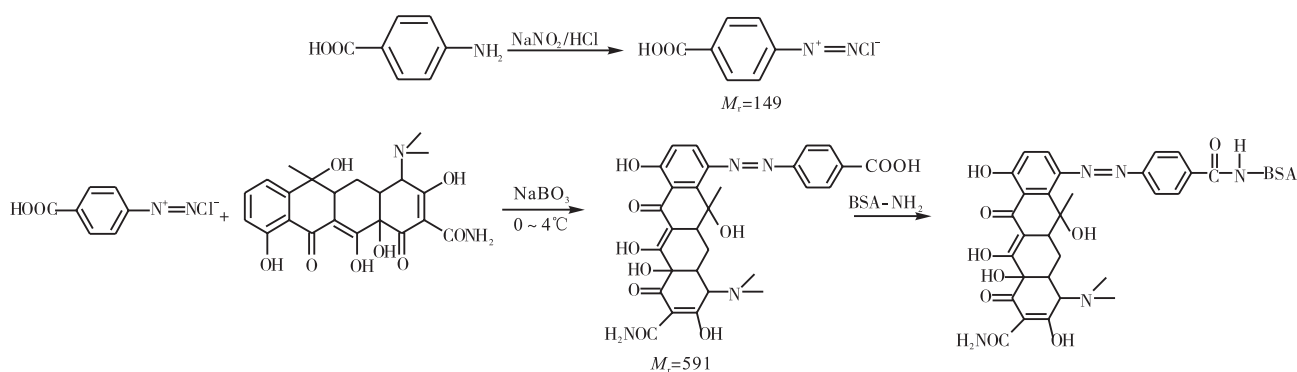


图 2 四环素完全抗原合成路线图

Fig.2 Synthesis route of tetracycline artificial antigen

(1) 四环素半抗原的合成

重氮化法合成半抗原^[6]:称取 60 mg (438 μmol) 对氨基苯甲酸溶于 7 mL 0.2 mol/L HCl, $0\sim 4^\circ\text{C}$, 然后称取 36 mg (522 μmol) 的 NaNO_2 溶于 1 mL 的蒸馏水中, 将 NaNO_2 溶液逐滴加入对氨基苯甲酸溶液中, 避光搅拌反应 1 h. 称取 81 mg (182 μmol) 四环素溶于 30 mL 0.05 mol/L 硼砂缓冲液 (pH 8.5, 含 0.15 mol/L 的 NaCl) 中, $0\sim 4^\circ\text{C}$, 将上述溶液 5 mL 逐滴加入到该溶液中, 避光反应 2 h, 得深红色溶液. 用 6 mol/L HCl 将深红色溶液酸化, 产生沉淀, 离心, 弃去上清液, 用双蒸水洗 3 遍, 直至 pH 为 6. 在沉淀中加入乙酸乙酯会出现分层现象, 取出乙酸乙酯层, 减压下除去溶剂, 得到四环素半抗原 (81 mg, 74%) 并通过 ESI-MS 鉴定。

活化酯的制备: 5 mg (11 μmol) 四环素半抗原和 1.5 mg (13 μmol) NHS 溶于 THF, 迅速滴入 2.5 mg (12 μmol) DCC, 在 N_2 保护下室温搅拌反应过夜, 将

反应后的溶液旋蒸, 收集产物, 取少量进行 HPLC-MS 鉴定。

(2) 免疫抗原的制备

称取活化酯 5 mg (4 μmol) 溶于 50 μL DMF 中 (溶液 I), 称取牛血清白蛋白 (BSA) 10 mg (0.15 μmol) 溶于 2 mL 磷酸氢二钾溶液 (50 mmol/L K_2HPO_4 , pH 9.3) 溶液中 (溶液 II), 取适量溶液 I 缓慢加入到溶液 II 中, 在冰浴中混合, 置于 4°C 冰箱内用 PBS 透析 3 d, 所得偶联物 TC-BSA 中加入 0.1%叠氮钠, -20°C 储存备用. 包被抗合成原方法同上。

1.3.2 动物免疫

2 只体重 1.5 kg 大耳白兔, 观察饲养 1 周后, 取 2 mg (以蛋白量计) 免疫原, 加入生理盐水至 2 mL, 与等体积的弗氏完全佐剂混合乳化, 初次免疫采取皮内多点注射与肌肉注射, 加强免疫采用不完全佐剂, 免疫原量减半, 前 3 次每隔 2 周免疫 1 次, 第 3 次后每隔 28 d 免疫 1 次, 在每次加强免疫后的 8~10 d 进行

耳缘取血, 对血清效价测定。

1.3.3 抗血清效价测定

在酶标板上每孔包被 100 μL 经稀释的包被原 1 μg , 室温孵育 3 h; 用洗涤液洗板 3 次后, 酶标板每孔加入封闭液 200 μL , 室温下封闭 1 h; 洗板 3 次后, 每孔分别加入梯度稀释的抗血清以及 PBS 各 100 μL , 室温反应 1 h; 洗板 4 次后, 加入用 PBS 稀释 500 倍的 1:20 酶标二抗, 室温反应 30 min; 洗板 5 次后, 加入 150 μL 底物液显色 20 min 后加入 50 μL 的终止液终止显色; 用酶标仪测定吸光度, 吸收波长为 450 nm 和 650 nm。

2 结果与分析

2.1 四环素完全抗原的合成

2.1.1 氨基苯甲酸重氮化后的 HPLC-MS 鉴定

氨基苯甲酸重氮化后的质谱图见图 3。氨基苯甲酸相对分子质量是 137.14, 图谱中相对分子质量 149.06 是氨基苯甲酸重氮化后的阳离子峰, 计算出其阳离子相对分子质量(M_r)为 149, 与实际 M_r 相符, 说明反应第一步合成成功。

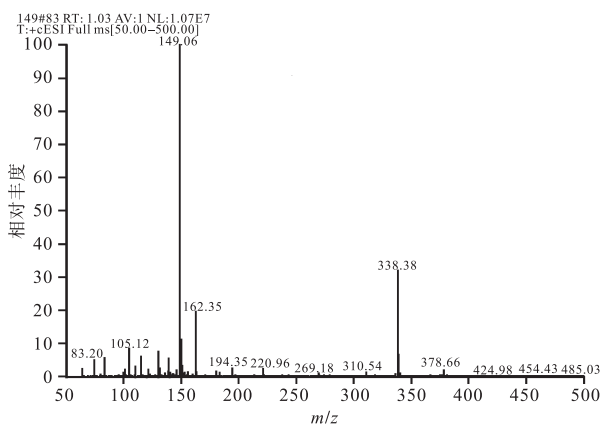


图 3 重氮化后阳离子质谱图

Fig.3 Mass spectrum of the diazotization products

2.1.2 反应中间产物酸化前后 HPLC-MS 检测结果

质谱图 4 和图 5 分别显示的是反应中间产物酸化前后的阴离子峰, 其中相对分子质量 591.13 为其阴离子峰, 计算其 M_r 为 591, 与实际 M_r 相符, 可以看出酸化前后, 杂峰减少, 说明反应中间产物的纯度相对较高。由此判断, 中间产物合成成功。

在制备中间产物的过程中, 在质谱图上会出现 589、590、591 等一簇阴离子峰, 有可能是中间产物的同位素峰; 也可能是因为四环素中间产物的基团上至少有一个活泼的氢离子随着反应的进行而不同程度地从基团上脱落所致, 但其并不会影响活化酯反应位

点的活性。所以, 这一簇阴离子峰都可以被认为是目的产物峰。

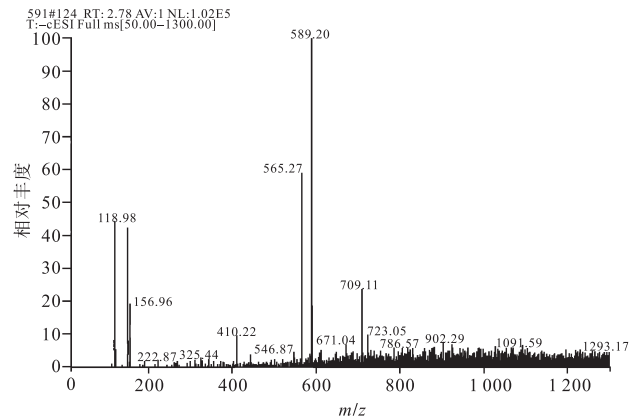


图 4 酸化前阴离子质谱图

Fig.4 Mass spectrum of products before the acidification

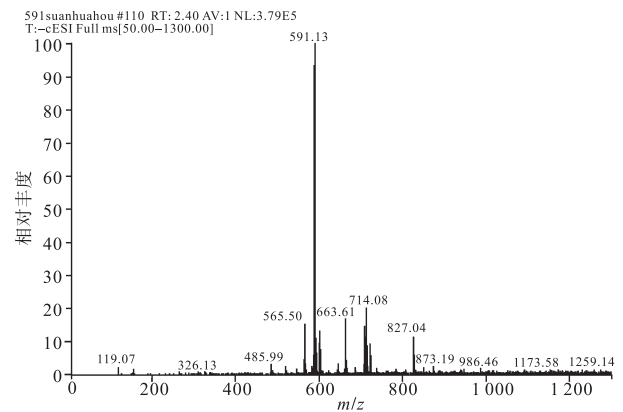


图 5 酸化后阴离子质谱图

Fig.5 Mass spectrum of the products after the acidification

2.1.3 活化酯产物的 HPLC-MS 的分析

活化酯阴离子质谱图见图 6。

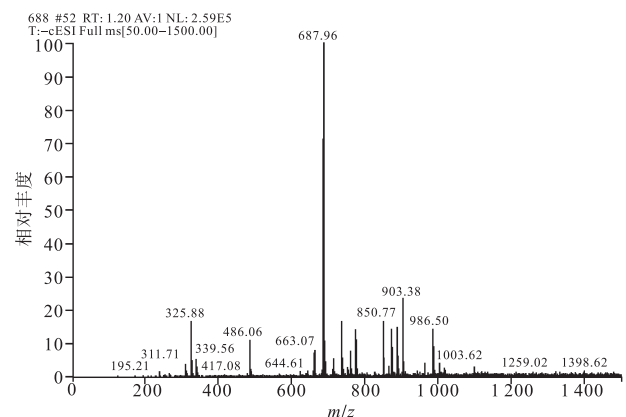


图 6 活化酯阴离子质谱图

Fig.6 Mass spectrum of the activated ester

图 6 显示的相对分子质量 687.96 为其活化酯产物的阴离子峰, 计算得其 M_r 为 688, 与实际 M_r 相符,

由此判断,四环素半抗原合成成功,并且产物杂质峰较少,可以看出产物的纯度较高.

2.2 四环素特异性抗体效价的测定

四环素特异性抗体效价测定结果见表 1. 由于吸光度(A_{450})在 0.7 ~ 1.2 之间时,酶标仪读数较为准确,

因此两只兔子抗血清的效价大约为 1 : 70 000 和 1 : 32 000,此效价值较为乐观,说明用此方法合成的免疫抗原制备四环素多克隆抗体比较理想,并且由于酸化萃取后进行的活化酯修饰,使半抗原的活性增强,抗原决定簇能够充分暴露,更容易产生抗体.

表 1 四环素特异性抗体效价测定结果
Tab.1 Result titer of tetracycline antibody

抗血清稀释比例	A_{450}						空白
	TC-BSA1 ($n=3$)		TC-BSA2 ($n=3$)				
1 : 1 000	3.693	3.724	3.801	3.386	3.364	3.408	0.040
1 : 2 000	3.258	3.405	3.162	3.074	3.089	3.032	0.045
1 : 4 000	3.325	3.308	3.329	3.245	3.242	2.243	0.042
1 : 8 000	3.312	3.309	3.331	3.227	3.223	3.213	0.041
1 : 16 000	3.245	3.247	3.258	1.727	1.721	1.728	0.046
1 : 32 000	2.685	2.600	2.588	0.901	0.891	0.882	0.051
1 : 64 000	1.407	1.414	1.434	0.449	0.446	0.443	0.044
1 : 128 000	0.504	0.503	0.493	0.142	0.146	0.141	0.043

3 结 论

本文在对四环素重氮化的基础上,进一步进行酸化,从质谱图的结果可以看出,酸化有纯化反应产物的作用,并用乙酸乙酯进行萃取再提纯,减少在活化酯反应中的杂质;在联接 BSA、OVA 等大蛋白之前,进行活化酯反应,对于增强反应基团的活性,提高与蛋白的偶联比有很大的作用,免疫效价明显增高,为制备质量较高的免疫抗原和包被抗原奠定了良好的基础.

参考文献:

[1] 武香玉,刘志国,韩增飞,等. 四环素与金霉素完全抗原的制备研究[J]. 武汉工业学院学报,2007,26(4) :48-52.

[2] 沮晶晶,屈凌波,孙武勇. 四环素人工抗原的合成与鉴定[J]. 郑州大学学报:理学版,2007,39(4) :170-173.
 [3] 刘丽,蔡志斌,张英. 高效液相色谱法测定水产品中土霉素、四环素、金霉素[J]. 中国卫生检验杂志,2007,17(8) :1405-1406.
 [4] 杜红鸽,郭芙蓉,陈蕾. 四环素类药物残留分析方法研究进展[J]. 河南畜牧兽医:综合版,2008,29(6) :13.
 [5] 黄秀清. 浅谈莱克多巴胺的检测方法与监控措施[J]. 福建农业科技,2005(4) :49-50.
 [6] ZHANG Yuan,LU Sheng-xin,LIU Wei,et al. Preparation of anti-tetracycline antibodies and development of an indirect heterologous competitive enzyme-linked immunosorbent assay to detect residues of tetracycline in milk[J]. Agricultural and Food Chemistry,2007,55(2) :211-218.