

王娅丹,杨雅梅,强敏,等. 达氟沙星完全抗原的制备与鉴定[J]. 江苏农业科学,2016,44(10):354-356.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.10.103

# 达氟沙星完全抗原的制备与鉴定

王娅丹<sup>1</sup>, 杨雅梅<sup>1</sup>, 强敏<sup>2</sup>, 朱新生<sup>2</sup>, 王云<sup>1</sup>

(1. 江苏大学食品与生物工程学院, 江苏镇江 212013; 2. 江苏省镇江市产品质量监督检验中心, 江苏镇江 212132)

**摘要:**通过 *N*-羟基琥珀酰亚胺 (NHS) 法, 将半抗原达氟沙星 (danofloxacin, DAN) 与载体蛋白牛血清白蛋白 (BSA) 偶联, 制备完全抗原 DAN-BSA。对所制备的完全抗原通过 FT-IR 光谱、紫外光谱和 SDS-PAGE 进行分析确证, 并通过测定免疫血清的效价和 IC<sub>50</sub> 对其免疫原性进行检测。结果表明, DAN-BSA 的 FT-IR 光谱较 BSA 和 DAN 均有变化; 紫外光谱扫描中, DAN-BSA 的最大吸收波长较 BSA 和 DAN 有所偏移; SDS-PAGE 电泳中 DAN-BSA 的条带较 BSA 条带上移, 说明 DAN-BSA 的分子量大于 BSA; 免疫原性检测中, 血清的效价达到 256 000, IC<sub>50</sub> 值为 28.84 μg/L, 说明所制备的完全抗原具有免疫原性。综上可知, 完全抗原 DAN-BSA 成功合成, 可以用来免疫动物制备抗体, 这为后续免疫学检测方法的建立奠定了良好的基础。

**关键词:**达氟沙星; 完全抗原; *N*-羟基琥珀酰亚胺法; 免疫原性

**中图分类号:** Q812 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2016)10-0354-03

达氟沙星 (danofloxacin, 简称 DAN) 是一种氟喹诺酮类抗菌药物 (图 1), 具有抗菌谱广、杀菌作用强、与其他抗菌药物无交叉耐药性等优点, 因而被广泛用于动物疫病的预防和治疗<sup>[1]</sup>; 但是, 达氟沙星会在动物组织中累积, 通过食物链进入人体, 进而威胁人体健康。已有研究表明达氟沙星会损伤人体器官, 使人体免疫力下降, 并且具有潜在的致癌性<sup>[2]</sup>。FAO/WHO 食品添加剂联合专家委员会 (JCEFA)、欧盟及我国都制定了达氟沙星在肉制品中严格的残留限量。由于达氟沙星在畜牧业中的加量使用和滥用现象普遍存在, 因而需要建立一种针对达氟沙星的快速筛查技术。

目前, 农兽药残留检测以仪器分析法为主, 如高效液相色谱法、气相色谱-质谱法、高效液相色谱-质谱法、毛细管电

泳法、高效薄层色谱法等<sup>[3-5]</sup>。仪器分析方法检测准确, 但是样品前处理复杂, 仪器设备价格昂贵, 需要专业的实验室和操作人员, 这些缺点限制了仪器分析法在大规模快速筛查中的应用。免疫学检测是基于抗原和抗体的特异性结合反应建立起来的一种快速分析方法, 具有快速、简便、特异性高等优点, 适合大量样品的快速筛查和现场检测<sup>[6]</sup>。免疫学检测方法主要包括酶联免疫法 (ELISA)、胶体金试纸条、免疫亲和柱等方法<sup>[7]</sup>。

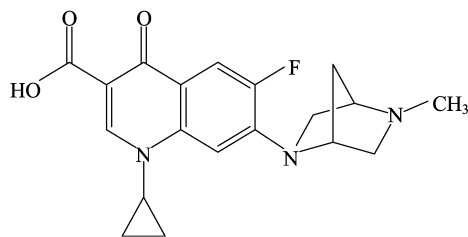


图1 达氟沙星结构式

免疫学检测的关键是获得对应的抗体。达氟沙星属于小分子化合物, 本身不具有免疫原性, 必须先和载体蛋白偶联获得完全抗原, 再进行动物免疫制备抗体。本试验通过 NHS 法合成了达氟沙星的完全抗原, 免疫动物制备获得了相应的多

收稿日期: 2016-03-07

基金项目: 国家科技支撑计划 (编号: 2015BAK45B01); 江苏省镇江市农业科技支撑计划 (编号: NY2014024); 江苏省普通高校研究生科研实践计划 (编号: SJLX\_0483)。

作者简介: 王娅丹 (1990—), 女, 河南平顶山人, 硕士, 主要从事食品安全研究。E-mail: w\_yadan@163.com。

通信作者: 王云, 博士, 教授, 从事食品生物技术研究。E-mail: wangy1974@ujs.edu.cn。

[17] 房兴堂, 闫莉, 石延玲, 等. 孵化期间乌骨鸡种蛋水分和钙变化及胚胎生长的研究[J]. 中国家禽, 2002, 24(11): 10-12.

[18] 张鸥, 潘周雄, 杨正德. 绿壳种蛋孵化期间钙磷含量的变化[J]. 山地农业生物学报, 2014, 33(3): 60-63.

[19] 王凤春. 鸡钙、磷需要量的分析[J]. 养殖技术顾问, 2014(2): 56-56.

[20] 孟君, 赵耀元. 火焰原子光谱法测定饲料和不同种类鸡蛋中的微量元素[J]. 粮食与饲料工业, 2014(4): 54-56.

[21] 祁艳霞, 张爱提, 张爱静, 等. 饲料中添加硫酸亚铁对鹌鹑体内和蛋中铁沉积量的影响[J]. 河南农业科学, 2011, 40(7): 144-146.

[22] Finney L, Vogt S, Fukai T, et al. Copper and angiogenesis:

unravelling a relationship key to cancer progression[J]. Clinical and Experimental Pharmacology & Physiology, 2009, 36(1): 88-94.

[23] Linder M C, Goode C A. Biochemistry of copper[M]. New York: Springer-Verlag, 1991.

[24] 江国永, 潘勇, 高冬余, 等. 血红素铁对鸡蛋铁沉积及蛋品质的影响[J]. 中国家禽, 2011, 33(2): 19-21.

[25] Parkin G. Zinc-Zinc bonds: a new frontier[J]. Science, 2005, 36(2): 1117-1118.

[26] 张楠. 添加锌、锰、铜、铁对蛋鸡生产性能、养分代谢及部分血浆指标的长期影响[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2006.

[27] 程妮. 蛋鸡铜、铁、锌、锰添加效应研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2005.

抗,为达氟沙星的免疫学快速检测奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 试剂

达氟沙星,购自上海圣克鲁斯生物技术公司;*N*-羟基琥珀酰亚胺(NHS)、1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)碳化二亚胺盐酸盐(EDAC)、二甲基甲酰胺(DMF)、牛血清白蛋白(BSA)、卵清蛋白(OVA)、弗氏佐剂均购自 Sigma 公司;HRP-山羊抗兔 IgG 购自上海生工生物工程公司;其他所涉及的试剂均为国产分析纯,购自上海国药集团化学试剂有限公司。

### 1.2 试验动物

新西兰纯系大白兔,雄性,体质量 1.5~2 kg,购自江苏大学动物中心。

### 1.3 DAN 完全抗原的制备

采用 *N*-羟基琥珀酰亚胺法(NHS 法)制备完全抗原<sup>[8]</sup>。称取 20 mg DAN、12.5 mg EDAC、10 mg NHS,充分溶解于 1 mL DMF 中,并将其滴加到含有 25 mg BSA 的 PBS (0.01 mmol/L, pH 值 7.4) 溶液中,室温搅拌 3 h;将上述反应好的溶液装入透析袋中,对 PBS 溶液 4℃ 条件下透析 3 d 后,4 000 r/min 离心 20 min,收集上清液,冷冻干燥后,分装保存。用 OVA 代替 BSA,制备包被原(DAN-OVA)。

### 1.4 完全抗原 DAN-BSA 的 FT-IR 光谱扫描鉴定

取 1 mg 冻干的完全抗原 DAN-BSA、BSA 和 DAN 分别与 KBr 研磨压片,进行 FT-IR 扫描分析。

### 1.5 完全抗原 DAN-BSA 的紫外光谱扫描鉴定

在 200~400 nm 波长范围内分别对完全抗原 DAN-BSA、载体蛋白 BSA 和达氟沙星进行紫外扫描分析,以 PBS 溶液为空白对照。

### 1.6 完全抗原 DAN-BSA 的 SDS-PAGE 电泳鉴定

SDS-PAGE 电泳鉴定参照文献<sup>[9]</sup>进行,浓缩胶和分离胶浓度分别为 5% 和 12%。

### 1.7 完全抗原 DAN-BSA 的免疫原性鉴定

1.7.1 动物免疫 完全抗原用生理盐水配成 1 g/L 的溶液。首次免疫 0.4 mg/只,用弗氏完全佐剂将完全抗原乳化后,采用背部皮下多点注射方式;加强免疫使用不完全佐剂进行抗原乳化。三免后第 7 天,耳缘静脉取血,测定其效价和 IC<sub>50</sub> 值。

1.7.2 免疫血清效价的测定 采用间接 ELISA 法测定血清的效价,具体步骤如下:用 DAN-OVA 作为包被原,100 μL/孔,4℃ 包被过夜,PBST 洗板 3 次;用含有 0.2% 明胶的 PBS 溶液作为封闭液,200 μL/孔,37℃ 封闭 2 h,PBST 洗板 3 次;用含有质量浓度 0.1% 明胶的 PBST 溶液作为抗体稀释液,将免疫血清在稀释 2 000 倍的基础上做 2 倍倍比稀释,100 μL/孔,37℃ 温育 1 h;将 HRP-山羊抗兔 IgG 稀释 3 000 倍作为酶标二抗,100 μL/孔,37℃ 温育 1 h;加入 TMB 显色液,100 μL/孔,37℃ 温育 15 min;加入终止液,50 μL/孔,终止反应后,用酶标仪测定 450 nm 下的吸光度(*D*<sub>450 nm</sub>)。

1.7.3 免疫血清 IC<sub>50</sub> 值的测定 采用间接竞争 ELISA 法测定免疫血清的 IC<sub>50</sub> 值。将酶标板包被封闭后,每孔加入 50 μL 不同浓度的达氟沙星标准品溶液,再加入 50 μL 合适稀释倍

数的免疫血清,其他步骤同效价测定。

## 2 结果与分析

### 2.1 完全抗原 DAN-BSA 的红外图谱

如图 2 所示,在 1 700~1 600 cm<sup>-1</sup> 处三者的吸收峰强度有很大不同,这是因为羧基极性很强,在 1 850~1 600 cm<sup>-1</sup> 之间会出现非常强的吸收峰。达氟沙星有羧基,此处的吸收峰强度最大,完全抗原此处吸收峰强度变弱,说明达氟沙星和载体蛋白发生酰胺反应。达氟沙星相对分子质量远远小于载体蛋白 BSA,其结构信息容易被掩埋在载体蛋白的结构信息中<sup>[10]</sup>,但图谱显示两者的指纹区(1 300~670 cm<sup>-1</sup>)差别很大,指纹区对分子结构的微小变化表现很敏感,这里通过羧基吸收峰和指纹区的差别初步判定 DAN 和 BSA 发生反应合成完全抗原 DAN-BSA。

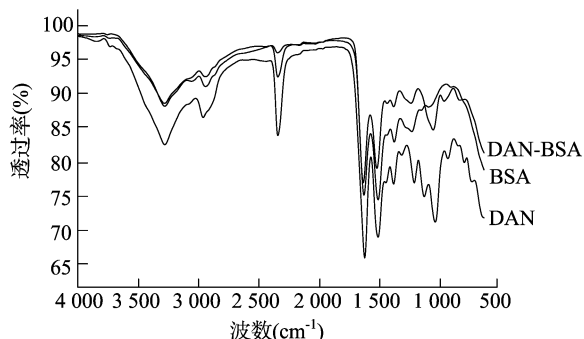


图2 完全抗原的红外图谱

### 2.2 完全抗原 DAN-BSA 的紫外图谱

图 3 的紫外扫描图谱表明,载体蛋白 BSA 在 277 nm 处有特征吸收峰,DAN 在 274 nm 和 326 nm 处有 2 个特征吸收峰,完全抗原 DAN-BSA 在 276 nm 和 325 nm 处有 2 个特征吸收峰。紫外吸收具有加合性,完全抗原 DAN-BSA 的紫外图谱保留了 BSA 在 277 nm 处的紫外特征吸收峰,也有 DAN 在 326 nm 处的特征吸收峰,但又有所迁移,说明 BSA 和 DAN 发生反应,另外透析过程中未反应的半抗原 DAN 已经除去,完全抗原在 326 nm 处仍有半抗原 DAN 的特征吸收峰并有所迁移,充分说明完全抗原的成功合成。

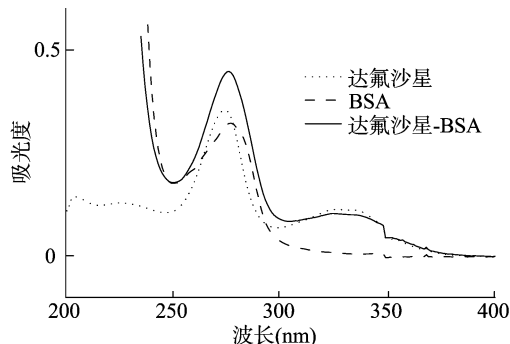


图3 完全抗原的紫外图谱

### 2.3 完全抗原 DAN-BSA 的 SDS-PAGE 鉴定

凝胶电泳分析中样品的迁移率只与分子质量有关,图 4 显示偶联后产物 DAN-BSA 的相对分子质量大于 BSA,并且条带清晰,纯度比较高,进一步说明完全抗原偶联成功。

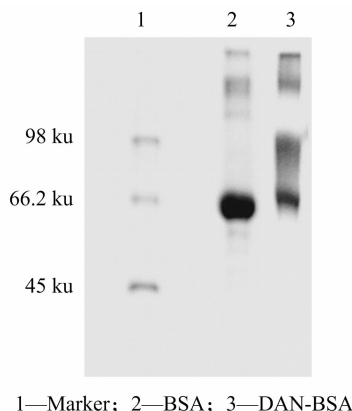


图4 完全抗原 DAN-BSA 的 SDS-PAGE 电泳图

## 2.4 完全抗原的免疫原性鉴定

2.4.1 免疫血清的效价 免疫血清的效价是指将免疫血清做倍比稀释后与对应的配体相作用,出现反应的最大稀释倍数,一般以阳性血清与阴性血清比值大于 2.1 倍时的稀释倍数作为血清的效价。由图 5 可以看出,随着稀释倍数的增加,阴性血清的  $D$  值无显著变化,阳性血清的  $D$  值随着稀释倍数的增加而降低,ELISA 测定的免疫血清的效价达到 256 000。

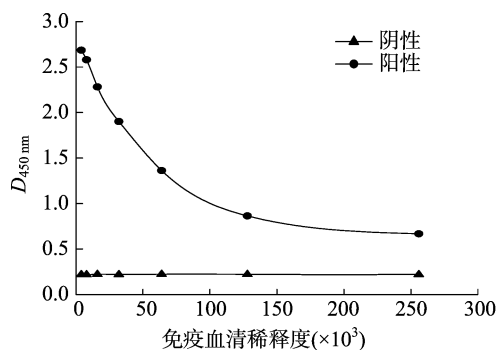


图5 免疫血清的效价曲线

2.4.2 免疫血清的  $IC_{50}$  值 免疫血清的间接竞争 ELISA 曲线如图 6 所示,根据拟合结果,得出 3 次免疫后免疫血清的  $IC_{50}$  值为 28.84  $\mu\text{g/L}$ ,最低检测限  $IC_{15}$  值为 0.18  $\mu\text{g/L}$ 。所制备的完全抗原 DAN-BSA 具有免疫原性,可以制备针对 DAN 的特异性抗体。免疫血清的抑制性可以通过加强免疫和抗体纯化进一步提高。

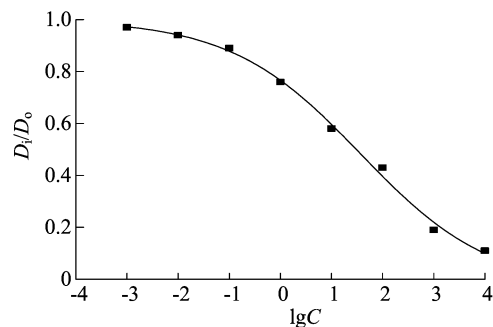


图6 免疫血清的  $IC_{50}$  值

## 3 结论

本试验以 BSA、OVA 作为载体蛋白,采用 NHS 法,将 DAN 进行活化,生成中间产物,再与载体蛋白通过酰胺反应生成完全抗原,这样可以防止载体蛋白对半抗原的包埋,使抗原决定簇完全外露,增加所产生抗体的特异性。

完全抗原的鉴定中,FT-IR 图谱、紫外图谱和 SDS-PAGE 这 3 种方法检测表明偶联成功。虽然物理及化学方法的检验是必要的,但只有特异抗体的出现才是对完全抗原及其合成步骤的最好检验<sup>[11]</sup>,本试验所获免疫血清效价高、具有抑制性,可以通过加强免疫及纯化进一步提高。

综合完全抗原的鉴定,DAN-BSA 偶联成功并且具有良好的免疫原性,可以用来免疫动物进行 DAN 抗体的制备,为后续 ELISA 检测、免疫亲和柱和胶体金试纸条等免疫学检测产品的制备奠定良好的基础。

## 参考文献:

- [1] 刘芳萍,李昌文,佟恒敏. 兽用氟喹诺酮类抗菌剂单诺沙星的研究进展[J]. 黑龙江畜牧兽医,2002(5):50-51.
- [2] 杜付彬,谭建华. 动物性食品中氟喹诺酮类药物残留检测研究进展[J]. 动物医学进展,2006,27(12):39-43.
- [3] Zeng Z L, Dong A G, Yang G X, et al. Simultaneous determination of nine fluoroquinolones in egg white and egg yolk by liquid chromatography with fluorescence detection[J]. Journal of Chromatography B, 2005, 821(2):202-209.
- [4] Toussaint B, Chedin M, Bordin G, et al. Determination of (fluoro) quinolone antibiotic residues in pig kidney using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. I. Laboratory-validated method[J]. Journal of Chromatography A, 2005, 1088(1/2):32-39.
- [5] van Vyncht G, Janosi A, Bordin G, et al. Multiresidue determination of (fluoro) quinolone antibiotics in swine kidney using liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. Journal of Chromatography A, 2002, 952(1/2):121-129.
- [6] Turner N W, Subrahmanyam S, Piletsky S A. Analytical methods for determination of mycotoxins: a review[J]. Analytica Chimica Acta, 2009, 632(2):168-180.
- [7] Köppen R, Koch M, Siegel D, et al. Determination of mycotoxins in foods: current state of analytical methods and limitations[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2010, 86(6):1595-1612.
- [8] Hiroo W, Atsuko S, Yasumasa K, et al. Monoclonal-based enzyme-linked immunosorbent assay and immunochromatographic assay for enrofloxacin in biological matrices[J]. Analyst, 2002, 127(1):98-103.
- [9] 陆建. 蛋白质纯化技术及应用[M]. 北京:化学工业出版社, 2005:183.
- [10] 李伟岭,岳永波,李金明,等. 沃尼妙林人工抗原的合成与鉴定[J]. 中国兽医杂志,2012,48(2):78-80.
- [11] 罗芳琴,金邦荃,侯翔,等. 环丙氧嗪人工抗原的合成与鉴定[J]. 江苏农业科学,2009(4):343-345.