

文章编号: 1673-1689(2011)02-0316-05

# 强力霉素人工抗原的合成与抗体制备

甘金华<sup>1</sup>, 邓薇<sup>1</sup>, 李进平<sup>2</sup>, 艾晓辉<sup>1</sup>

(1. 中国水产科学研究院 长江水产研究所, 湖北荆州 434000; 2. 武汉纺织大学 环境与城建学院, 湖北武汉 430073)

**摘要:** 采用改进的碳二亚胺两步法将强力霉素半抗原与载体蛋白 BSA 连接制备强力霉素-牛血清白蛋白 (BSA-DC) 人工免疫抗原, 并用同样方法将强力霉素与载体蛋白 OVA 连接制备人强力霉素-卵清白蛋白 (OVA-DC) 人工包被抗原。经紫外扫描分析和动物免疫试验证实: 强力霉素人工抗原合成成功, 强力霉素与 BSA 的结合比为 3: 1, 经动物免疫试验所得抗血清效价为  $2.048 \times 10^6$ , 完全能够满足强力霉素残留的 ELISA 检测要求。

**关键词:** 强力霉素; 人工抗原; 抗体; 合成; 制备

中图分类号: S 816 17

文献标识码: A

## Artificial Antigen Synthesis and Antibody Preparation of Doxycycline

GAN Jir hua<sup>1</sup>, DENG Wei<sup>1</sup>, LI Jir ping<sup>2</sup>, AI Xiao hui<sup>1</sup>

(1. Yangtze River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Jingzhou 434000, China; 2. Environment and Urban Construction, Wuhan Textile University, Wuhan 430073, China)

**Abstract:** In this study, the improved two-step carbodiimide method was used to connect doxycycline hapten with carrier protein BSA, and doxycycline with the carrier protein OVA to prepare the artificial antigen of doxycycline (BSA-DC) and coating antigen (OVA-DC), respectively. UV scanning analysis and animal immune tests confirm the success in preparation of artificial antigen, and the combination ratio of doxycycline and BSA is 3: 1 by calculating. At the same time, the results showed that high titers of  $2.048 \times 10^6$  anti-DC serum were produced by BSA-DC immunized rabbit. It provided a necessary condition for ELISA detecting doxycycline residues.

**Key words:** doxycycline, artificial antigen, antibody, synthesis, preparation

强力霉素 (doxycycline, DC) 是半合成的四环素类抗菌药, 为快速抑菌剂, 其结构式见图 1。强力霉素的抑菌机制主要是抑制微生物蛋白质的合成,

它可以特异性地与细菌核糖体的 30 亚基结合, 进而阻止了携带有氨基酸的 tRNA 与 mRNA-核糖体化合物的结合, 从而阻止肽链延伸和细菌蛋白质合

收稿日期: 2010-04-30

基金项目: 农业部公益性行业专项项目(200803013)。

作者简介: 甘金华(1979-), 女, 湖北安陆人, 理学硕士, 助理研究员, 主要从事鱼类药理、病理学及药物残留检测方面的研究。Email: rabbit\_gjh@sina.com

成<sup>[1]</sup>。其次四环素类还可引起细胞膜通透性改变,使胞内的核苷酸和其他重要成分外漏,从而抑制 DNA 复制<sup>[2]</sup>。与天然四环素类药物如金霉素(aureomycin, AM)、土霉素(oxytetracycline, OT)及四环素(tetracycline, TC)相比,强力霉素具有抗菌活性和组织穿透力更强、体内分布广、生物利用度高、半衰期较长等优点,现已广泛应用于水产养殖中多种感染性疾病的预防和治疗或是用作促生长剂<sup>[3]</sup>。其不良反应有:1) 如果长期使用该药物会引起动物消化机能障碍的发生。长期大量口服或静脉给予大剂量该药物时会损害肝脏,引起肝脂量增高及细小脂肪变性,因药物沉积于肝细胞线粒体,干扰脂蛋白的合成和甘油三酯的输出,引起肝脏的脂肪变性甚至是脂肪肝<sup>[4]</sup>;2) 强力霉素会影响骨骼的生长,沉积于婴幼儿的牙组织又能透过胎盘。同时与金属形成的络合物被机体吸收后会导致骨骼障碍,生长停滞,可引起人牙齿黄染、龋齿等<sup>[5]</sup>;3) 长期大量使用强力霉素还可能引起肠内合成维生素 B 族和维生素 K 的细菌受到抑制,从而引起维生素 B<sub>2</sub> 及 K 的缺乏,因而可引起舌炎、口角炎等维生素缺乏症<sup>[6]</sup>。同时,强力霉素残留期长,可通过食物链和生物浓缩效应等途径污染肉制品和水产品,这给食品安全带来了风险。为了控制强力霉素在动物性食品中的残留,欧盟、日本和美国等都制定了动物组织中的最高残留限量为 100 g/kg(以鲜重计),我国农业部也明确规定四环素类药物在动物组织中的最高残留限量为 100 g/kg(以鲜重计)。

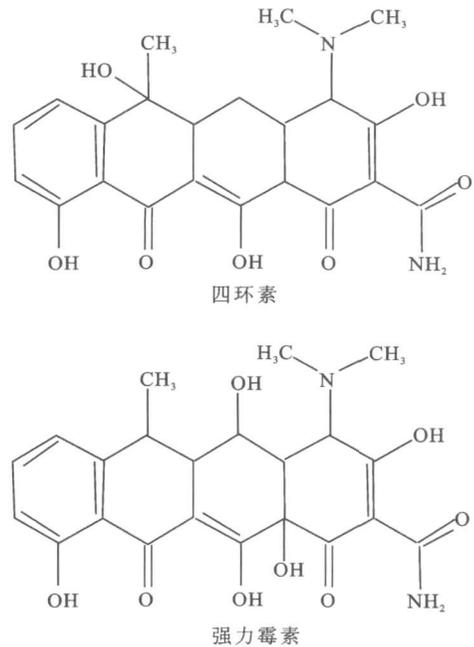
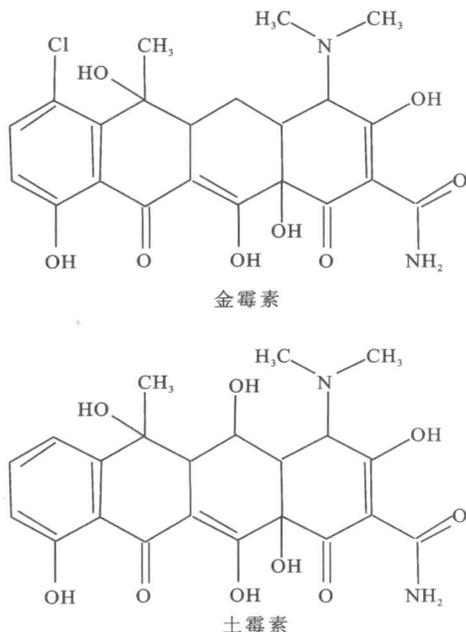


图 1 四环素类药物结构式

Fig. 1 Structure of tetracyclines

目前对强力霉素的残留分析多采用微生物法、色谱法及色谱-质谱联用法等<sup>[7-9]</sup>。但这些方法耗时,而且测试费用高,前处理步骤繁杂,不能满足快速检测的要求。酶联免疫吸附测定法(ELISA)具有快速、准确、高通量的特点,可以极大地提高检测效率,节约检测成本,现已被广泛应用于食品安全快速检测中。

之前有关于四环素类抗生素人工抗原的合成主要是合成四环素、金霉素、土霉素的全人工抗原,而没有针对强力霉素的全人工抗原,而强力霉素是半合成的四环素类抗生素,具有不同于天然四环素类抗生素的性质。强力霉素是四环素类抗生素中亲脂性最强的一种抗生素,且吸收不受食物的影响,药物大部经胆汁排入肠道又可再吸收,经肾小管时也可再吸收,因此其在生物体内的血浆半衰期也最长,为 16~20 h,可维持有效血药浓度 24 h 以上。同时,关于强力霉素的试剂盒德国 bio pharm 已经开发出来了,但由于其价格昂贵,而且没有任何的文献资料报道该试剂盒的研制方法。为填补国内外相关研究的空白,作者合成了强力霉素人工抗原,为强力霉素 ELISA 检测方法的建立奠定了基础。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

#### 1.1.1 试剂及溶液 强力霉素标准品(DC)、牛血

清白蛋白(BSA)、卵清蛋白(OVA)、弗式不完全佐剂、弗式完全佐剂(Sigma进口分装),水溶性碳二亚胺(EDC)、N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)、N,N-二甲基甲酰胺(DMF)、显色剂(四甲基联苯胺溶液、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>底物溶液)、酶标二抗(羊抗兔IgG)(华美生物工程公司)、终止液(2 mol/L H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)、磷酸盐缓冲液(PBS, pH 7.4)、洗涤液(PBST)、碳酸盐缓冲液(CB, pH 9.6, 0.05 mol/L)、聚苯乙烯酶标板(丹麦 NUNC 公司)。

**1.1.2 仪器** 漩涡混合仪; 303AS 电热恒温箱: 上海仪器制造厂制造; 电子天平: 感量 0.000 01 g, Sartorius 公司; Ns-6 紫外可见分光光度计; 高速冷冻离心机: HITACHI 公司制造; MK3 型酶标仪: Thermo Labsystem 公司制造。

**1.1.3 动物** 2.0 kg 以上的雄性新西兰实验用白兔, 由湖北省实验动物研究中心提供。

## 1.2 方法

**1.2.1 强力霉素完全抗原的合成** 强力霉素完全抗原的合成采用碳二亚胺法并略有改进, 其合成步骤如下: 精确称取 7 mg N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)、12.3 mg 水溶性碳二亚胺(EDC)、165 mg BSA 共溶于 5 mL、0.1 mol/L PBS(pH 7.4) 溶液中, 4 °C 下搅拌反应过夜, 5 000 r/min 离心 10 min, 上清液为 A 液。精确称取 10 mg DC 溶于 0.5 mL N,N-二甲基甲酰胺(DMF)中, 待完全溶解后边搅拌边用移液器逐滴加入到 A 液中, 避光反应 4 h, 5 000 r/min 离心 10 min, 取上清液, 以 PBS(pH 7.4) 溶液作透析液于 1 000 mL 烧杯中, 置 4 °C 透析 3 d, 每天更换 3 次 PBS, 除去未反应的 DMF、EDC、NHS、DC 小分子物质。经紫外图谱鉴定并测定蛋白质质量浓度, 将 DC-BSA 抗原分装成 2 mL/份, 于 -20 °C 保存。

## 1.2.2 强力霉素完全抗原的鉴定

1) 紫外扫描: 先用 PBS 精确配制适宜浓度的强力霉素半抗原与蛋白质标准溶液, 然后量取一定量的 DC-BSA 和 DC-OVA 贮备液, 稀释适宜倍数后, 用紫外分光光度计测出各物质的最大吸收波长, 然后按照式(1)~(3)计算出 DC-BSA 的结合比。

$$N = \frac{\epsilon_{\text{偶联物}} - \epsilon_{\text{载体蛋白}}}{\epsilon_{\text{半抗原}}} \quad (1)$$

式中,  $\epsilon_{\text{偶联物}}$ 、 $\epsilon_{\text{载体蛋白}}$ 、 $\epsilon_{\text{半抗原}}$  分别为偶联物、载体蛋白、半抗原在某一波长下的摩尔吸光系数,  $N$  为每摩尔载体蛋白上所偶联的半抗原的摩尔数。

$$\text{蛋白质质量浓度 (mg/mL)} = 1.45A_{280} - 0.74A_{260} \quad (2)$$

式中,  $A_{280}$ 、 $A_{260}$  分别为该蛋白质溶液在 280、260 nm 下的吸光度值。

$$A = \epsilon_{\text{克分子消光系数}} d \quad (3)$$

式中,  $A$  是该物质在最大波长处的吸光度值,  $c$  是该物质的浓度(mol/L),  $l$  是比色杯的直径(cm),  $\epsilon_{\text{克分子消光系数}}$  是该物质的克分子消光系数[ $l$ /(mol·cm)]。

2) 动物免疫试验: 选择体重 2 kg 左右的雄性新西兰兔 10 只作为免疫动物, 随机分为两组, 一个为实验组, 一个为对照组。实验组剂量分别设定为 1、2 mg/kg, 每个剂量免疫 4 只兔子, 剩余 2 只兔子作为对照组处理。将制备的完全抗原用 1 g/dL 盐水溶解, 与等体积的完全弗氏佐剂充分乳化, 使抗原终浓度为 2 mg/mL 和 4 mg/mL, 于兔子背部皮下注射, 每只 1 mL。2 周后, 用不完全弗氏佐剂乳化的同浓度完全抗原在足掌皮下注射, 每只注射 1 mL, 以后每 10 天加强免疫 1 次。从第三次免疫后, 10 d 内采血测试效价, 直到抗体效价不再升高, 及时采血。

3) 抗体质量评价: 分离所得血清, 并用 DC-OVA 做包被原。取上清液作倍比稀释, 用间接 ELISA 法测定抗血清的效价, 以抗血清的稀释倍数表示。如果待检血清与已知阴性血清的比值( $P/N$ )  $\geq 2$ , 而且待检血清的 OD 值  $\geq 0.2$ , 则判定为阳性, 否则判定为阴性。剩余血清分装后冷冻保存备用。

强力霉素为四环素类抗生素, 因此为了评价抗血清的特异性, 选择四环素类抗生素金霉素、土霉素、四环素做交叉反应实验, 用间接竞争 ELISA 测定判断是否有特异性抗体产生。同时, 还选择了氨基糖苷类的庆大霉素、大环内酯类的螺旋霉素、青霉素类的青霉素、磺胺类的磺胺二甲嘧啶、喹诺酮类的环丙沙星和  $\beta$  内酰胺类的青霉素进行间接竞争 ELISA 反应, 并用式(4)式计算交叉反应率。

$$\text{交叉反应率}(\%) = \frac{\text{强力霉素 IC}_{50}}{\text{其他化合物 IC}_{50}} \times 100\% \quad (4)$$

## 2 实验结果

### 2.1 强力霉素与 BSA 和 OVA 偶联物的紫外光谱分析

图 2 为半抗原、载体蛋白及其偶联物的紫外光谱图。由图 2 可知: 在 PBS 中, 牛血清蛋白 BSA 和卵清蛋白 OVA 在 278 nm 处呈现最大特征吸收波长, 且它们在 300~400 nm 无吸收, DC 在 346.7 nm 处呈现最大特征吸收波长; 较 BSA 和 DC 而言, 与偶联物的紫外吸收波形图相比, 位置发现了明显

的改变, DC-BSA 偶联物波峰大致在 375 nm 左右, 波宽相对变宽。因此, 综合分析可得出 DC 通过连接臂与蛋白质偶联成功。通过测定不同波长下的吸光度值, 由特定公式计算出 DC 与蛋白质的偶联比为 3: 1。同理, 通过紫外分光光度计测定, 结果也证明包被原偶联成功。

实验所得的人工抗原必须进行纯化, 以除去未反应的半抗原小分子、盐类及其他小分子杂质。人工抗原的纯化对其自身鉴定及产生高质量的抗体都具有十分重要的意义。作者采用透析法对合成的人工抗原进行了纯化, 最终的透析液经紫外扫描判断纯化较为彻底。

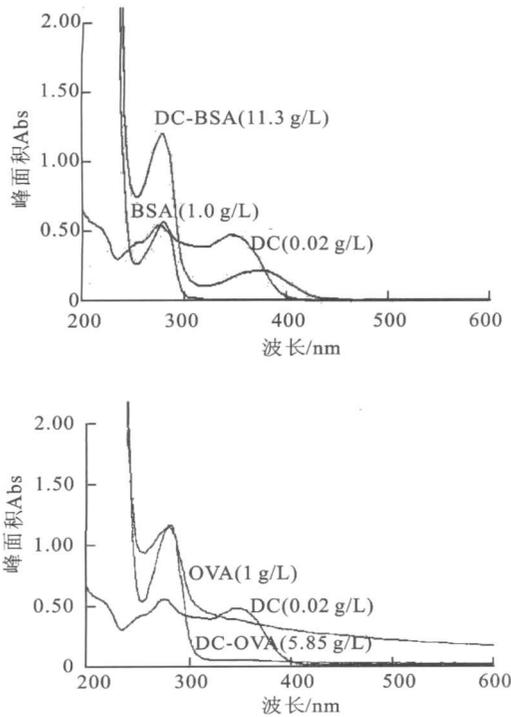


图 2 半抗原、载体蛋白及其偶联物的紫外光谱图  
Fig. 2 UV spectra of hapten, BSA and its conjugates

### 2.2 动物免疫试验结果及抗体质量评价

DC-BSA 免疫的新西兰实验用白兔, 经 3 次加强免疫后, 利用 DC-OVA 做包被原, 采用间接 ELISA 检测, 结果表明: 剂量为 2 mg/kg 的实验组的免疫试验结果较好, 且该组的 4 只白兔均有特异性抗体产生; 采用不同质量浓度的强力霉素作竞争抑制物, 间接竞争 ELISA 试验证实强力霉素可特异性地阻断上述反应的发生, 证实抗血清中含有针对强力霉素的特异性抗体。上述结果结合紫外扫描试验证明强力霉素免疫原的成功合成, 同时也证明了包被原的顺利合成。

抗血清效价测定结果见图 3。经多次测定, 抗

血清效价为  $2.048 \times 10^6$ , 效价较高。

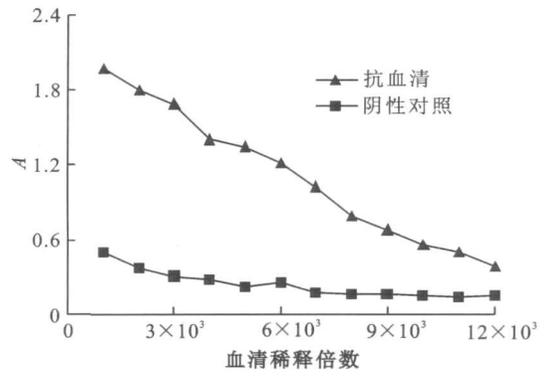


图 3 DC 抗体效价图

Fig. 3 Antibody effectiveness curve of DC

由图 4 可知, 在 50% 抑制时, 可知金霉素、土霉素、四环素、强力霉素的  $IC_{50}$  分别为 8 000 13、3 897. 72、2 000 00、189. 94  $\mu\text{g/L}$ 。强力霉素与金霉素、土霉素、四环素的交叉反应率分别为 2. 37%、4. 87%、9. 50%。同时结果还表明室温下螺旋霉素、磺胺二甲嘧啶、环丙沙星、庆大霉素、青霉素质量浓度达 10 000  $\mu\text{g/L}$  时仍无抑制作用, 因此可以认定上述药品对此抗体不产生交叉反应。

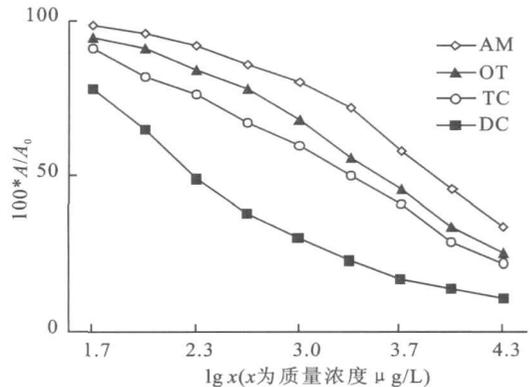


图 4 4 种药物竞争抑制曲线

Fig. 4 Competitive inhibition curve of four drugs

### 3 结 语

强力霉素是一种小分子半抗原, 本身并不具备免疫原性, 必须将其与载体蛋白质相偶联生成人工抗原才具有免疫原性。而牛血清白蛋白 (BSA) 因其具有物理化学性质稳定、自由氨基多, 在不同的 pH 值和离子强度下均有较大的溶解度, 在含有有机溶剂 (如 N, N-二甲基甲酰胺) 情况下可和半抗原进行偶联, 且在偶联后仍保持可溶状态<sup>[10]</sup>, 因而仍然是目前用得最多的一种载体蛋白质。由于强力霉素不太稳定, 容易差向异构化, 所以其羟基、酮基不能

用来做活性基团与蛋白质偶联<sup>[11-12]</sup>。因此作者针对强力霉素自身具有的酰胺键采用碳二亚胺法合成强力霉素人工抗原。纯化后的强力霉素全人工抗原紫外图谱显示,其与载体蛋白BSA的紫外图谱相比,形状上发生了明显的改变,强力霉素偶联物在375 nm处有典型吸收,这与烱晶晶<sup>[11]</sup>报道的四环素与BSA合成的四环素全人工抗原的紫外图谱、安清聪<sup>[13]</sup>报道的土霉素与BSA合成的土霉素全人工抗原的紫外图谱都不同,而这正好说明了强力霉素抗体特异性高与全人工抗原的合成关系密切。

对纯化后的人工抗原进行鉴定,一方面是定性判断半抗原与载体是否偶联成功,另一方面是定量测定半抗原与蛋白质的结合比。强力霉素与载体

蛋白BSA的偶联比为3:1,之前报道的土霉素与BSA的偶联比为16.7:1,四环素与BSA的偶联比为4:1。一般认为,结合比过高或者过低均影响抗体的生成,而本实验中抗血清效价达到了 $2.048 \times 10^6$ ,如此高的效价和较高的特异性正说明了低结合比是有助于提高抗体的选择性和亲和力的。

四环素类抗生素人工抗原的合成方法有重氮化法、碳二亚胺法、戊二醛法等<sup>[14]</sup>,而作者所述的这种改进的碳二亚胺两步法不仅简单、快捷、结合比低,而且所得抗体效价较高,特异性也较好。综上所述,作者研制的这种低结合比全人工抗原及由此产生的较高特异性、较高效价的抗体为强力霉素残留ELISA检测方法的研究奠定了了的基础。

## 参考文献(References):

- [1] 陈杖榴. 兽医药理学[M]. 北京: 中国农业出版社, 2001.
- [2] Maria L Valencik, John A McDonald. Codon optimization markedly improves doxycycline regulated gene expression in the mouse heart[J]. **Transgenic Research**, 2001, 10(3): 269-275.
- [3] Sean F Lynn. Tetracycline and doxycycline applications[J]. **Primary Care Update for OB/GYNs**, 1996, 3(6): 224-227.
- [4] Dario A Gutierrez, Michael J Puglisi, Alyssa H Hasty. Impact of increased adipose tissue mass on inflammation, insulin resistance, and dyslipidemia[J]. **Current Diabetes Reports**, 2009, 9(1): 26-32.
- [5] M Pytlík, J Folwarczna, W Janiec. Effects of doxycycline on mechanical properties of bones in rats with ovariectomy induced osteopenia[J]. **Calcified Tissue International**, 2004, 75(3): 225-230.
- [6] 杨芟, 宋金春, 蔡鸿生. 四环素类抗生素不良反应[J]. 医药导报, 1994(1): 39-40.  
YANG Ji, SONG Jir chun, CAI Hong sheng. Adverse reactions caused by tetracyclines[J]. **Herald of Medicine**, 1994(1): 39-40. (in Chinese)
- [7] Korsrud G O, Boison J O. Bacterial inhibition test used to screen for antimicrobial veterinary drug residues in slaughtered animals[J]. **J AOAC**, 1998, 81(1): 21-24.
- [8] Böcker R, Estler C J, Weber A. Metabolism of doxycycline[J]. **The Lancet**, 1982, 320(8303): 1155-1155.
- [9] R Böcker. Analysis and quantitation of a metabolite of doxycycline in mice, rats, and humans by high performance liquid chromatography[J]. **Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications**, 1983, 312: 255-262.
- [10] 陈建新. 免疫学技术在植物科学中的应用[M]. 北京: 中国农业大学出版社, 1998.
- [11] 烱晶晶, 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.  
ZU Jing jing, QU Ling bo, SUN Wu yong. Synthesis and identification of tetracycline artificial antigen[J]. **J of Zhengzhou Univ: Nat Sci Ed**, 2007, 39(4): 170-173. (in Chinese)
- [12] 张泽英, 袁宗辉. 兽药人工抗原合成的研究进展[J]. 中国兽药杂志, 2006, 40(5): 44-47.  
ZHANG Ze ying, YUAN Zong hui. Research progress on synthesis of artificial antigens for veterinary drugs[J]. **Chinese Journal of Veterinary Drug**, 2006, 40(5): 44-47. (in Chinese)
- [13] 安清聪, 张曦, 陈克麟. 动物组织中四环素类抗生素残留的ELISA检测研究—土霉素抗体的制备[J]. 畜牧与兽医, 2004, 36(9): 8-10.  
AN Qing cong, ZHANG Xi, CHEN Ke ling. Detection of tetracyclines residue in animal tissues by ELISA: preparation of anti-OTC antibodies[J]. **Animal Husbandry & Veterinary Medicine**, 2004, 36(9): 8-10. (in Chinese)
- [14] 李俊锁, 邱月明, 王超. 兽药残留分析[M]. 上海: 上海科技出版社, 2002: 163-169.