

文章编号: 1004 - 7271(2008)05 - 0585 - 06

## 环丙沙星偶联物的制备及其产物的鉴定

黄宣运, 胡 鲲, 方 伟, 金 怡, 杨先乐

(上海海洋大学农业部渔业动植物病原库, 上海 200090)

**摘 要:**采用碳二亚胺法, 制备了环丙沙星-小牛血清蛋白偶联物, 评价了 pH、环丙沙星和碳二亚胺浓度对偶联结合比率的影响。同时采用红外光谱、紫外光谱、聚丙烯酰胺凝胶电泳和质谱方法对偶联产物的基团、分子量等特征进行分析鉴定。正交试验结果表明, pH 对环丙沙星-小牛血清蛋白的偶联结合比率具有显著性差异, 碳二亚胺和环丙沙星浓度差异性不显著。在 pH 5.0, 碳二亚胺和环丙沙星浓度分别为 60 mg/mL 和 5 mg/mL 的条件下, 环丙沙星-小牛血清蛋白偶联结合比率为 30:1。该方法条件下的偶联反应成功。结论: 该方法可用于环丙沙星-小牛血清蛋白的偶联, 且简便易行。

**关键词:**环丙沙星; 碳二亚胺法; 偶联; 鉴定

**中图分类号:**S 948      **文献标识码:**A

## Preparation of ciprofloxacin-carrier protein conjugation and identification of its products

HUANG Xuan-yun, HU Kun, FANG Wei, JIN Yi, YANG Xian-le  
(Aquatic Pathogen Collection Center of Ministry of Agriculture, Shanghai Ocean University, Shanghai 200090, China)

**Abstract:** The conjugation of Ciprofloxacin-bovine serum albumin (BSA) is prepared via carbodiimide method, whereby the effect of pH, concentration of CIP and EDC to the coupling conjugation ratio is then assessed. Features of the conjugation, such as base group, molecular weight are then identified by infrared spectrometry, ultraviolet spectrometry, polyacrylamide gel electrophoresis and mass spectroscopy. The result of Orthogonal Test shows that pH is significant to the coupling conjugation ratio of CIP and BSA molecules while concentrations of carbodiimide and ciprofloxacin are not. The coupling conjugation ratio of BSA will be 30:1 under conditions that the pH is 5.0, and concentration of carbodiimide and ciprofloxacin is respectively 60 mg/mL and 5 mg/mL under which conditions the coupling reaction works successfully. This method is easily applicable to conjugate CIP and BSA.

**Key words:** ciprofloxacin; carbodiimide method; coupling conjugate; identification

环丙沙星(ciprofloxacin, CIP)<sup>[1]</sup> 又称环丙氟哌酸, 属于第三代氟喹诺酮(fluoroquinolones, FQs)类药物, 其通过作用于细菌 DNA 螺旋酶, 而具有广泛的抗菌谱和极强的抗菌活性。目前 CIP 广泛地应用于

收稿日期: 2008-01-23

基金项目: 国家十一五科技支撑计划项目(2006BAD03B04); 上海市科技兴农重点攻关项目(6660106477); 上海市重点学科建设项目(Y1101)

作者简介: 黄宣运(1984 - ), 男, 福建永安人, 硕士研究生, 专业方向为水产动物免疫。E-mail: 0311115@stmail.shou.edu.cn

通讯作者: 杨先乐, E-mail: xlyang@shou.edu.cn

人医和畜牧业生产中。由于 CIP 在水产品中的残留不仅直接威胁了公共卫生安全和生物安全、污染了自然环境,还严重影响了我国主要水产品的对外出口贸易<sup>[2]</sup>。目前 CIP 已被列为禁用渔药<sup>[3]</sup>。利用免疫学方法作为初筛方法检测水产品中的药物残留,具有灵敏、快速、特异和简便等一系列优点<sup>[1,4-5]</sup>,有十分广泛的应用前景和实用价值。CIP 等小分子药物化合物作为半抗原,只有反应原性而无免疫原性。只有将其与大分子偶联后成为完全抗原,才能刺激机体产生相应的抗体<sup>[1,5-9]</sup>。将小分子药物与大分子载体(如蛋白质等)偶联是制备药物抗血清的关键。在一定的范围内,偶联结合比率越高,产生的抗体效价越高。为了获得效价高、特异性强的抗体,必需选择合适的半抗原偶联方法,既要获得较高的偶联结合比率,又要选择恰当的偶联结合位点(远离半抗原的特征结构和官能团),获得特异性的空间构象。

为了获得高效、特异性强的完全抗原,本文将 CIP 半抗原与蛋白质进行了偶联改造,对偶联条件进行了优化,评价了影响偶联效率的因素。同时采用红外光谱(IR)、紫外光谱(UV)、十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)和质谱(MASS)等手段对制备的偶联物进行了鉴定,为进一步建立免疫学方法检测 CIP 在水产品中的残留奠定了技术基础。

## 1 材料与方 法

### 1.1 仪器和试剂

UNICAN 紫外分光光度计;Magna-IR<sup>TM</sup> spectrometer 750 型红外光谱仪;Agilent 1100 hp LCQ DECA 型质谱仪;Bio-Rad powerpac300 型电泳仪;UVP ca91786 型凝胶成像系统;SAVANT Novalyphe-NL150 型冷冻干燥机;Eppendorf centrifuge 5417R 型离心机。

CIP,含量 $\geq 98.5\%$ ,购自浙江国邦药业有限公司;牛血清蛋白(bovine serum album,简称 BSA)购于华美生物公司;乙基碳二亚胺(1-Ethyl-3-carbodiimide methiodide,简称 EDC),纯度 $\geq 99.3\%$ ,购自上海延长生化科技发展有限公司;其它化学试剂购于上海国药有限公司。

磷酸缓冲液(PBS):8 g NaCl、0.2 g KCl、1.44 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 和 0.24 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>,用蒸馏水定容至 1 L。

流动相 A 为 0.1% 甲酸水溶液;流动相 B 为 0.1% 甲酸乙腈溶液。

### 1.2 偶联条件的优化

#### 1.2.1 偶联方法

采取碳二亚胺(carbodiimide)法<sup>[5]</sup>。将 BSA 溶解在 PBS 中,分别加入 DEC 和 CIP,在适当的 pH 下,室温中反应 2 h,装入透析袋中,PBS 中透析 2 d,每天换液 1 次。偶联物冷冻干燥后,-20℃保存备用。此偶联物记作 CIP-BSA。合成途径见图 1。

#### 1.2.2 偶联比的测定

采用紫外分光光度法估测偶联物的偶联结合比<sup>[9]</sup>。将透析后的 CIP-BSA 稀释到一定浓度,250~400 nm 进行紫外扫描。以 CIP-BSA 的特征峰 280 nm,建立 CIP 和 BSA 的吸收值-浓度标准曲线,鉴定 CIP-BSA 中 CIP 的浓度。计算公式:

$$\text{结合比} = \frac{(\text{CIP 浓度}/\text{CIP 分子量})}{(\text{BSA 浓度}/\text{BSA 分子量})}$$

其中 CIP 质量浓度为 mg/mL,BSA 质量浓度为 mg/mL。

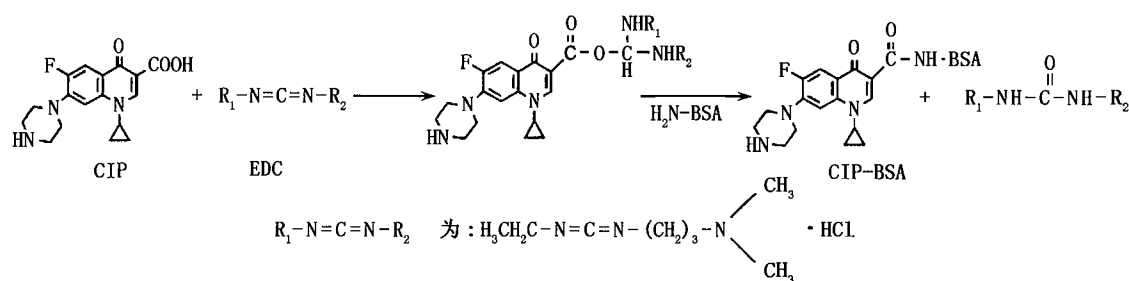


图 1 CIP-BSA 合成路线图

Fig. 1 The conjugates of CIP-BSA

### 1.2.3 偶联条件的正交试验

确定 pH、EDC 质量和 CIP 质量为 3 个影响因素,每个因素选取 4 个水平进行正交试验<sup>[10]</sup>来确定最佳偶联条件。进行  $L_{16}(4^3)$  正交试验,正交试验的因素水平见表 1。以各实验组 CIP 与 BSA 的偶联比为评价参数。通过方差分析<sup>[11]</sup>评价影响偶联结合比率(CIP 与蛋白质分子的结合比例)的条件,并根据最佳偶联条件制备 CIP-BSA 偶联物。

表 1  $L_{16}(4^3)$  因素与水平Tab. 1 The factors and levels of  $L_{16}(4^3)$ 

水平	pH	EDC 浓度(mg/mL)	CIP 浓度(mg/mL)
1	5	10	1
2	6	20	2
3	7.4	40	4
4	8	60	5

### 1.4 偶联物的鉴定

#### 1.4.1 IR 鉴定

将样品冷冻干燥后,取 0.2 mg 样品,加入干燥 KBr 200 mg。置于玛瑙乳钵中,在红外线照射下研磨,混匀,装压片模具,15 t/inch 下 10 min,制得厚度为 1 mm 的透明样品晶片,上机测试。

#### 1.4.2 UV 鉴定

用 PBS 配制 BSA 和 CIP 的标准溶液,将一定量的环丙沙星偶联物溶于 PBS 中,用 PBS 调零。在波长 250 nm 到 400 nm 之间,对标准品和样品进行紫外扫描,参照 1.2.2 方法计算偶联比率。

#### 1.4.3 SDS-PAGE 鉴定

采用常规 SDS-PAGE 方法<sup>[12]</sup>。

#### 1.4.4 MASS 鉴定

样品溶于甲醇,取 10  $\mu$ L 进样。色谱条件:梯度洗脱为 0~5 min 流动相 A: 流动相 B = 95:5; 5~17 min 流动相 A: 流动相 B 从 95:5 匀速变至 5:95; 17~20 min 流动相 A: 流动相 B 从 5:95 匀速变至 95:5; 20~30 min 流动相 A: 流动相 B = 95:5。流速 0.2 mL/min, 温度 25  $^{\circ}$ C, 色谱柱: Agilent Zorbax 300SB-C18 柱(2.1  $\times$  150 mm)。

## 2 结果

### 2.1 偶联条件的优化

CIP-BSA  $L_{16}(4^3)$  正交试验设计如表 2。根据极差分析可知:在 3 个试验因素中 pH 对 CIP-BSA 偶联效率的影响最大,CIP 浓度影响次之,EDC 浓度影响最小。 $F$  测验结果如表 3, pH、EDC 和 CIP 的量的  $F$  值分别为 7.66、2.13 和 3.46,其中 pH 具有显著性差异,EDC 和 CIP 的浓度均无显著性差异。根据  $K$  值,选定 CIP 与 BSA 偶联的优化条件为:pH 5.0,EDC 浓度为 60 mg/mL 和 CIP 浓度为 5 mg/mL。依据此偶联条件,制备 CIP-BSA 偶联物,得到偶联物其偶联结合比率为 30:1。

表2  $L_{16}(4^3)$  正交设计  
Tab. 2 The orthogonal design of  $L_{16}(4^3)$

实验组	列号			偶联结合比率
	pH	EDC	CIP	
1	1	1	1	6.64
2	1	2	2	9.28
3	1	3	3	15.85
4	1	4	4	21.21
5	2	1	2	6.13
6	2	2	3	7.89
7	2	3	4	9.55
8	2	4	1	5.62
9	3	1	3	6.35
10	3	2	4	7.31
11	3	3	1	5.78
12	3	4	2	6.01
13	4	1	4	4.89
14	4	2	1	4.29
15	4	3	2	5.69
16	4	4	3	7.29
$K_1$	52.98	24.01	22.34	$T = 129.78$
$K_2$	29.19	28.77	27.11	$T^2 = 16842.36$
$K_3$	25.44	36.86	37.37	$C = T^2/16 = 1052.648$
$K_4$	22.16	40.13	42.96	
极差(R)	30.82	16.12	20.62	
$K_1^2 + K_2^2 + K_3^2 + K_4^2$	4797.87	4373.72	4475.99	

注:  $K_1$  为水平 1 实验组的偶联比率之和;  $K_2$ 、 $K_3$ 、 $K_4$  类推

表3  $L_{16}(4^3)$  的  $F$  测验  
Tab. 3  $F$  test of  $L_{16}(4^3)$

方差来源	平方和	自由度	均方	$F$ 值
pH	146.82	3	48.94	7.66 *
EDC	40.78	3	13.59	2.13
CIP	66.35	3	22.11	3.46
误差	38.34	6	6.39	
总和	292.29	15		

注: 平方和 =  $(K_1^2 + K_2^2 + K_3^2 + K_4^2)/4 - C$ ;  $F_{0.05(3,6)} = 4.757$ ;  $F_{0.01(3,6)} = 9.780$ ; \* 为显著性差异

## 2.2 偶联物的鉴定

### 2.2.1 IR 鉴定

CIP、BSA 和 CIP-BSA 的 IR 扫描图如图 2。将 CIP-BSA 的 IR 与 BSA 的 IR 相比较,发现在  $3\ 300 \sim 3\ 500\ \text{cm}^{-1}$  和  $1\ 550\ \text{cm}^{-1}$  附近出现 N-H 的伸缩振动和弯曲振动峰,表明制备的偶联物中有 BSA 存在。再将 CIP-BSA 的 IR 与 CIP 的 IR 相比较,发现在  $2\ 500\ \text{cm}^{-1}$  处出现与氮相邻的亚甲基、次甲基的碳氢伸缩振动峰,而牛血清蛋白 IR 谱图中无此特征峰,同时在  $1\ 650\ \text{cm}^{-1}$  处也出现羧酸盐的振动特征峰,这表明制备的偶联物中有 CIP 的存在。据此可以证明 CIP 与 BSA 偶联成功。

### 2.2.2 UV 鉴定

CIP、BSA 和 CIP-BSA UV 扫描图如图 3。BSA 的最大吸收峰在 280 nm, CIP 的最大吸收峰在 270 nm, CIP-BSA 的最大吸收峰在 275 nm。由此可以推断 CIP 与 BSA 偶联成功,且 CIP 与 BSA 的偶联比率约为 30:1。

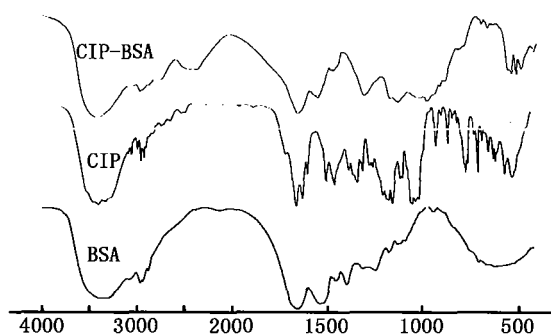


图2 CIP, BSA and CIP-BSA 红外扫描光谱  
Fig. 2 Infrared spectrum of CIP, BSA and CIP-BSA

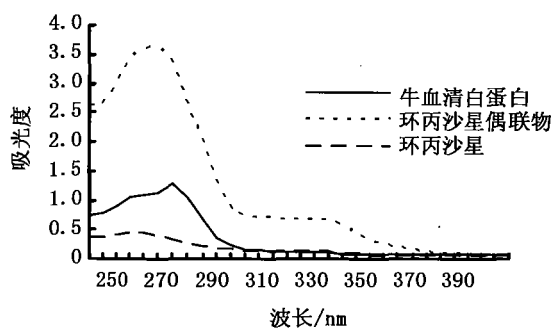


图3 CIP, BSA and CIP-BSA 紫外扫描光谱  
Fig. 3 ultraviolet spectrum of CIP, BSA and CIP-BSA

### 2.2.3 SDS-PAGE 鉴定

SDS-PAGE 鉴定结果见图 4, BSA 样品迁移距离大于 CIP-BSA 偶联物样品迁移的距离, 说明 CIP-BSA 偶联物的分子量大于 BSA, 从而证明 CIP 与 BSA 已经成功偶联; 利用紫外凝胶成像系统分析软件分析得出, BSA 分子量为  $6.62 \times 10^4$ , CIP-BSA 的分子量约为  $7.71 \times 10^4$ , CIP 与 BSA 的偶联比率约为 33:1。

### 2.2.4 MASS 鉴定

BSA 质谱图如图 5-a, BSA 的分子量测定为  $6.64 \times 10^4$ , CIP-BSA 偶联物质谱图如图 5-b, 其中可观察到分子量为 78 228 的高分子化合物。对比 BSA 的分子量<sup>[13]</sup>和 CIP 分子量<sup>[1]</sup>, 可以推断偶联成功, 偶联比率约为 36:1, 与上述鉴定结果基本相符。

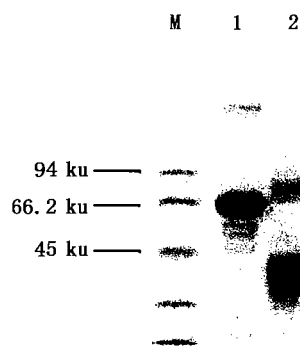


图4 SDS-PAGE 鉴定 CIP-BSA  
Fig. 4 electropherogram of SDS-PAGE for CIP-BSA  
M. Mark; 1. BS 标准; 2. CIP-BSA 偶联物

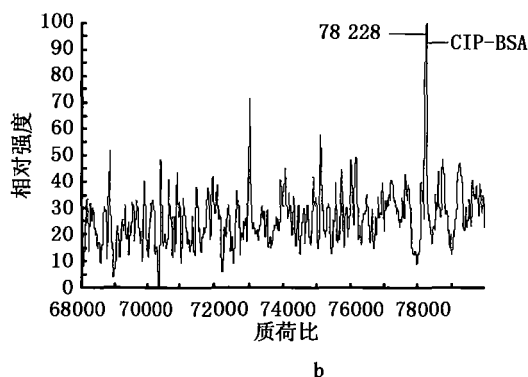
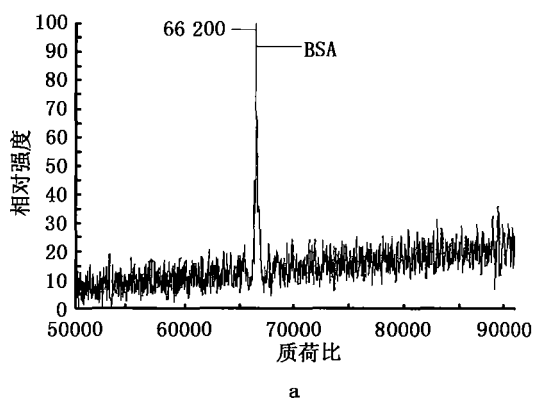


图5 CIP-BSA 质谱图  
Fig. 5 Mass-spectrogram of CIP-BSA

## 3 讨论

### 3.1 CIP-BSA 偶联物的制备

小分子半抗原(通常分子量小于 5000)通常需要经过与大分子物质(如载体蛋白质)偶联改造后才能具有免疫特性<sup>[1, 5, 8, 14]</sup>。大分子载体的选择和偶联方法的选择影响着偶联产物, 并对随后制备抗体的特异性、亲和性和不均一性<sup>[14]</sup>具有关键性的影响。

本实验中采用的碳二亚胺法主要是碳二亚胺可以使环丙沙星上的羧基首先被活化,生成不稳定的亲电中间体,然后再与牛蛋白血清发生缩合反应,将 CIP 连接到 BSA 上。

碳二亚胺法制备 CIP-BSA 的优化实验结果表明 pH 对偶联反应的影响最大,具有显著性差异。其余原因可解释为:EDC 属于水溶性碳化二亚胺,在偶联的过程中其亲电性中心碳原子与羧基中的氧原子反应生成对  $H^+$  极其敏感、且不稳定的类酸酐中间体。李俊锁等<sup>[1]</sup>认为:偶联反应的外界环境(如 pH)、半抗原参与偶联反应的摩尔浓度是影响偶联比率的重要因素;在形成-CONH-的抗原中 pH 通过调节非质子化氨基的比率来直接影响偶联比率。这也为本实验结论提供了佐证。

不同于其它半抗原,CIP 分子同时具有氨基和羧基,其既可以与 BSA 中赖氨酸的  $\epsilon$ -氨基,又可同 BSA 中天冬氨酸的  $\beta$ -羧基、谷氨酸的  $\gamma$ -羧基形成的稳定肽键。因此,同样作为双分子反应的底物,CIP 浓度对 CIP-BSA 偶联结合比率的影响高于 EDC 的影响。

### 3.2 CIP-BSA 偶联物的鉴定

常用偶联物鉴定方法包括紫外分光光度<sup>[1,7,15-16]</sup>、红外光谱<sup>[1,6]</sup>、电泳(如 SDS-PAGE)<sup>[6,9,16]</sup>、同位素标记<sup>[1,16]</sup>、质谱<sup>[9,18]</sup>等方法。其中,紫外分光光度法根据游离半抗原、载体蛋白和偶联物中发色团的紫外吸收确定偶联反应是否成功,还可以依据摩尔吸光系数定量计算出偶联结合比率;红外光谱法从特征性官能团的角度来判断偶联反应是否成功,适合于 CIP、BSA 这类红外特征吸收峰差异明显的偶联反应;SDS-PAGE 作为直接比较分子量的手段,广泛地应用与偶联物的鉴定中,但由于受到检测灵敏度等因素的限制,SDS-PAGE 适合于鉴定偶联结合比率比较大的偶联反应;同位素标记虽然灵敏度高,但成本高、操作繁琐,作为鉴定偶联物的手段应用不多;MASS 鉴定作为一种最为直观的检测方法,通过测定偶联物分子量和特征性的 PMF,能对偶联反应进行准确的定性和定量分析,具有快速、灵敏、准确等优点,是近年来应用于偶联物鉴定的新型的鉴定方法之一。此外,在国外毛细管电泳(capillary electrophoresis,简称 CE)<sup>[20]</sup>也作为一种新型的检测手段逐步替代传统检测方法应用到偶联物的鉴定中。

#### 参考文献:

- [1] 李俊锁,邱月明,王超. 兽药残留分析[M]. 上海:上海科学技术出版社,2002:258-261.
- [2] 胡鲲,杨先乐,唐俊,等. 绒螯蟹中3种氟喹诺酮类药物残留检测的前处理方法研究[J]. 华中农业大学学报,2007,26(5):670-675.
- [3] 中国水产科学院珠江水产研究所. NY5071-2002 无公害食品鱼用药物使用准则[S]//中华人民共和国农业部. 北京:中国标准出版社,2002.
- [4] 胡鲲,杨先乐,张菊. 酶联免疫法检测中华鳖肌肉中己烯雌酚[J]. 上海水产大学学报,2002,11(3):199-202.
- [5] 冯仁青,郭振泉,宓捷波. 现代抗体技术及其应用[M]. 北京:北京大学出版社,2006:47-50.
- [6] 谷峰,薛飞群,张丽芳. 克仑特罗偶联物的鉴定[J]. 中国兽医杂志,2004,38(3):22-25.
- [7] 晁博,薛飞群. 小分子半抗原制备技术的研究进展[J]. 中国兽医科学,2006,36(9):757-762.
- [8] Singh K V, Jasdeep K, Grish C, et al. Synthesis and Characterization of Hapten-protein Conjugates for Antibody Production against Small Molecules[J]. Bioconjugate Chem, 2004, 15(1): 168-173.
- [9] 胥传来,刘剑波,彭池方,等. 氯霉素-BSA 和氯霉素-OVA 偶联物的制备与鉴定[J]. 细胞与分子免疫学杂志,2005,21(6):789-792.
- [10] 方开泰,马长兴. 正交与均匀试验设计[M]. 北京:科学出版社,2001,175-183.
- [11] 杜荣骞. 生物统计[M]. 北京:高等教育出版社,2003,104-110.
- [12] 郭尧君. 蛋白质电泳实验技术[M]. 北京:科学出版社,1992,132-136.
- [13] Hirayama K, Akashi S, Furuya M, et al. Rapid confirmation and revision of the primary structure of bovine serum albumin by ESIMS and FRIT-FAB LC/MS[J]. Biochem Biophys Res Commun, 1990,173:639.
- [14] Sashidhar R B, Capoor A K, Ramana D. Quantitation of epsilon-amino group using amino acids as reference standards by trinitrobenzene sulfonic acid. A simple spectrophotometric method for the estimation of hapten to carrier protein ratio[J]. J Immunol Methods, 1994, 167:121-127.
- [15] 熊清明,杨先乐,王民权. 氯霉素人工免疫原的合成与鉴定[J]. 上海水产大学学报,2004,13(3):279-282.
- [16] 吴瑜,胡昌勤,金少鸿. 半抗原免疫分析研究进展[J]. 药物分析杂志,2007,27(5):771-776.
- [17] 王静萍,杜黎明. 环丙沙星在 BTR 缓冲液中的紫外光谱性质研究与应用[J]. 化学研究,2002,13(1):34-35.
- [18] 朱国念,吴银良,程敬丽. 克百威人工抗原的合成与鉴定[J]. 浙江大学学报(农业与生命科学版),2002,38(1):47-53.
- [19] Samir Safi, Zouhair Asfari, Agnès Hagège. Characterization of protein conjugates using capillary electrophoresis[J]. J Chromatography A, 1173(1):159-164.