

文章编号: 1004-7271(2004)03-0279-04

·研究简报·

氯霉素人工免疫原的合成与鉴定

Synthesis and identification of immunogen chloramphenicol

熊清明, 杨先乐, 王民权

(上海水产大学生命科学与技术学院, 上海 200090)

XIONG Qing-ming, YANG Xian-le, WANG Min-quan

(College of Aqua-life Science and Technology, Shanghai Fisheries University, Shanghai 200090, China)

关键词: 氯霉素; 琥珀酸酐法; 人工免疫原

Key words: chloramphenicol; mixed anhydride reaction; immunogen

中图分类号: S942.5 文献标识码: A

氯霉素(chloramphenicol, CAP)在水产养殖中的应用导致了越来越严重的残留过量问题。业已证实, CAP 用于人的治疗有严重毒副作用^[1], CAP 在水产品中的残留, 会给人类的健康造成严重威胁。因此, 目前世界上许多国家都限制甚至禁止 CAP 用于食用水产品的生产, 并规定了最高残留限量标准^[2]。为保障人民身体健康, 提高我国出口水产品的国际信誉, 必须建立用于水产品 CAP 残留检测的有效方法。

免疫学检测方法因其灵敏度高、特异性强、快速、经济等优点, 非常适合 CAP 残留的筛选检测^[3]。酶联免疫方法用于 CAP 检测, 国外研究进展很快^[4-6], 我国尚处于起步阶段^[2, 7, 8], 因此目前我国 CAP 残留检测不得不使用进口的免疫检测试剂盒。为改变我国水产品 CAP 残留检测方面的被动局面, 自主开发研制 CAP 残留检测试剂盒已成当务之急。本试验通过混合酸酐法合成 CAP 人工免疫原, 制备多抗血清, 旨在为今后的免疫检测方法的建立奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试剂

CAP, sigma 分装, 购于北京鼎国生物技术公司; 牛血清蛋白组分五(BSA, Fraction V), Roche 分装; 卵清白蛋白(OVA), Sigma 分装; 弗氏佐剂, Sigma 公司; 吡啶, 乙酸乙酯, N-N-二甲基甲酰胺(DMF)均为分析纯; 氯甲酸异丁酯, 琥珀酸酐, 三丁胺, 化学纯。

1.2 CAP 免疫原的人工合成

参照文献[9, 10]并作改进。

1.2.1 氯霉素半琥珀酸酐(CAP-HS)的制备

称取 0.4952g CAP 和 1.5548g 琥珀酸酐(SA)于圆底烧瓶中, 加入 5mL 无水吡啶(加 KOH 干燥过夜, 减压蒸馏, 收集 114~116℃馏分), 60℃, 冷凝回流 24h。待 SA 完全溶解, 溶液呈橙红色, 加水终止反应, 负压蒸去吡啶, 得到呈红色的固体物质, 加入 30mL 乙酸乙酯溶解, 7mL 0.1mol/L HCl 振荡, 分离酸

层。再用蒸馏水洗3次,以除去混在乙酸乙酯中的HCl。加过量无水 Na_2SO_4 干燥24h,过滤除去 Na_2SO_4 ,80℃水浴加热,蒸除乙酸乙酯,得粉末状固体CAP-HS。

1.2.2 CAP-HS与BSA的偶连

将CAP-HS溶于DMF,4℃预冷10min,加入三丁胺200 μL ,混合,再加入氯甲酸异丁酯200 μL ,4℃磁力搅拌30min,得甲液。称取502.7mg的BSA溶于23mL的50%DMF,加入1mol/L NaOH,冰浴调pH为8.0,得乙液。将上述的甲液慢慢加入乙液中,并且冰浴搅拌,调节pH,维持在8.0~9.0。将混合液置于4℃,磁力搅拌反应4h。将粗品装于透析袋,置于4℃的冰箱中,用0.9%生理盐水透析,8h换水一次,连续透析18次。分装冻干,-20℃保存备用。同法合成CAP-HS-OVA作为检测用包被抗原。

1.3 CAP免疫原的鉴定

1.3.1 CAP-HS-BSA的紫外扫描图谱

将CAP、BSA、CAP-BSA适当稀释,以PBS为空白对照,用紫外分光光度计在200~400nm分别测定其OD,绘制紫外吸收光谱图,并根据公式:偶连结合比 $= (\epsilon_{\text{CAP-HS-BSA}} - \epsilon_{\text{BSA}}) / \epsilon_{\text{CAP}}$,式中 ϵ 为CAP、CAP-HS-BSA和BSA三者278nm处的摩尔吸光系数^[9]。

1.3.2 CAP-HS-BSA红外光谱分析

将合成好的免疫原CAP-HS-BSA作红外光谱检测。

1.4 CAP抗血清的制备

选体重2.5kg左右的健康新西兰兔,用CAP-HS-BSA进行免疫。将CAP-BSA用PBS溶解,配成2mg/mL溶液,与等体积弗氏完全佐剂充分乳化,皮内多点注射,每只1mL。3周后加强免疫,改用不完全佐剂,皮下注射,以后每隔2周加强免疫一次。每次加强免疫后7d,耳静脉采血,双向琼扩试验测定抗血清效价,待效价达1:16,扑杀兔子,分离血清,-20℃冻存备用。

2 结果

2.1 CAP免疫原的紫外扫描分析

CAP、BSA及偶联物CAP-HS-BSA的紫外吸收光谱图如图1所示。CAP在波长275nm处有最大吸收峰,BSA在波长280nm处有最大吸收峰,CAP-HS-BSA最高吸收峰出现前移,在270nm附近出现一扁平较宽吸收峰,符合CAP和BSA吸收峰叠加特征。CAP-HS-OVA也出现相同变化特征。计算CAP-HS-BSA中CAP的结合比为4。

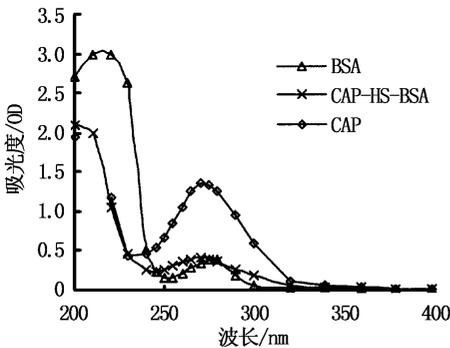


图1 CAP、BSA和结合物CAP-HS-BSA的紫外吸收光谱

Fig.1 UV spectrum of CAP, BSA and CAP-HS-BSA

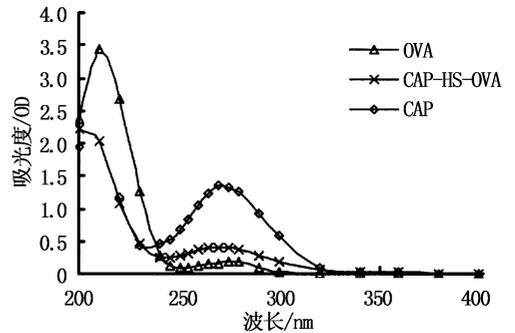


图2 CAP、OVA和结合物CAP-HS-OVA的紫外吸收光谱

Fig.2 UV spectrum of CAP, OVA and CAP-HS-OVA

2.2 CAP免疫原的红外光谱分析

红外光谱测定CAP-HS-BSA结果见图3。在图中,出现芳香对位硝基的特征峰1531.95、1349.73,并

且都为较强峰,表明 CAP 分子苯环上的对位硝基在改造反应中保留并存在,同时在 1735.74 处附近出现酯键特征峰,符合 CAP 与琥珀酸酐生成琥珀酯的特征。该红外图谱提示,CAP 分子结构已正确改造并成功偶联到载体分子 BSA 上。

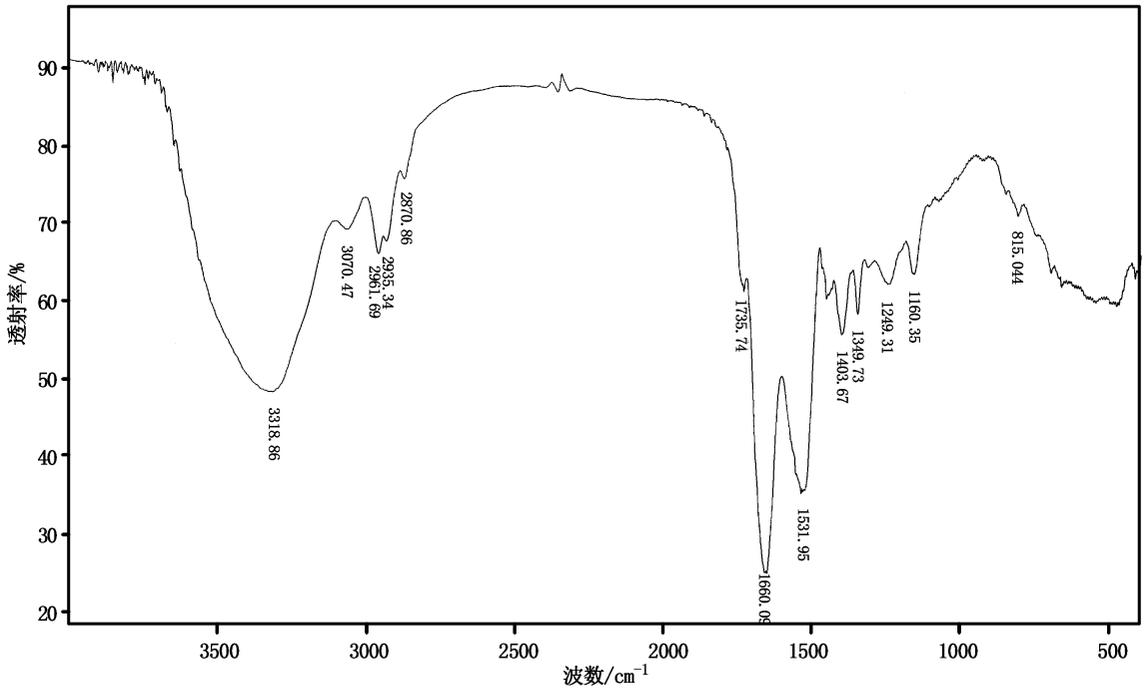


图 3 CAP-HS-BSA 的红外光谱测定

Fig.3 The IR spectrum of CAP-HS-BSA

2.3 抗血清的鉴定

用 CAP-HS-BSA 免疫家兔 4 次,双向琼脂扩散试验检测抗血清效价为 1:16。抗血清与免疫原 CAP-HS-BSA、BSA、包被抗原 CAP-HS-OVA 均有明显沉淀线产生,与 OVA 无沉淀线产生。结果表明所制备抗血清中含有 CAP 抗体和 BSA 抗体,但与 OVA 无交叉反应。

3 讨论

CAP 化学名称为 D(-)-苏阿型-1-对硝基苯基-2-二氯乙酰胺基-1,3-丙二醇,分子量 323.1,无免疫原性,必须和蛋白质载体偶联才能够成为全抗原。CAP 分子结构中无现成氨基或羧基,必须先将 CAP 分子结构进行改造,然后与载体蛋白的-NH₂ 或-COOH 连接。1966 年,Hamburger^[11]首次制备了 CAP 抗体。现在已证实 CAP 的二氯乙酰胺醇和硝基苯结构可作为抗原决定簇^[12]。因此,CAP 分子改造一般有两种途径,一是通过琥珀酸酐法得到琥珀 CAP,然后与蛋白质的-NH₂ 偶联,另一方法则通过重氮化法改造 CAP 苯环上的-NO₂,然后与蛋白质的-COOH 连。本文通过琥珀酸酐法将 CAP 分子的二氯乙酰胺醇中的-OH 改造得到-COOH,并成功与蛋白质载体 BSA 和 OVA 偶联,制备了免疫原和检测用包被抗原,为以后建立免疫学检测方法奠定基础。

所得抗血清的特异性是能否用于 ELISA 检测的关键。本文选择不同的载体,同时制备了 CAP-HS-OVA 作包被抗原,目的是为了消除抗血清中针对载体蛋白的非特异性抗体,从本文对抗血清的琼脂扩散实验鉴定结果来看,用 CAP-HS-BSA 免疫家兔得到的抗血清与载体 OVA 无交叉反应,以后的 ELISA 也进一步证实这一点(另文发表)。该结果表明,所得抗血清能用于 CAP 的免疫学检测。

本校生命科学与技术学院 1999 级生物科学专业杨慧强和沈颜斐同学参与本实验中部分工作,谨此致谢。

参考文献:

- [1] Meyer L, Polak B C P, Shut D. *et al.* Blood dyscrasias attributed to chloramphenicol. A review of 641 published and unpublished cases[M]. Postgrad Med. 1974 50 :123 - 126.
- [2] 王桂枝,石德时,毕丁仁,等. 素免疫原的合成与鉴定[J]. 中国兽医学报,1998,18(2):163 - 167.
- [3] 刘智宏. 酶标免疫测定法(EIA)在检测动物性食品中氯霉素残留的应用[J]. 中国兽药杂志,1995 29(2):47 - 48.
- [4] Allen E H. Review of chromatographic methods for chloramphenicol residues in milk, eggs, and tissues from food-producing animals[J]. J Assoc Off Anal Chem,1985 25(5) 990 - 999.
- [5] Arnold D, Somogyi A. Trace analysis of chloramphenicol residues in eggs, milk and meat: comparison of gas chromatography and radioimmunoassay [J]. J Assoc Off Anal Chem,1985 68(5) 984 - 990.
- [6] Water C V D, Haagsma N. Sensitive streptavidin-biotin enzyme-linked immunosorbent assay for rapid screening of chloramphenicol residues in swine muscle tissue[J]. J Assoc Off Anal Chem,1990 73(4) 534 - 540.
- [7] 黄世乐,陈祖义,成冰. 氯霉素抗体的制备与特性[J]. 核农学通报,1991,12(6) 291 - 293.
- [8] 石德时,王桂枝,毕丁仁,等. 氯霉素抗体的制备[J]. 华中农业大学学报,2001 20(5) 465 - 465.
- [9] Erlanger B F, Borek E, Beiser S M, *et al.* Steroid-protein conjugates 1. Preparation and characterization of bovine serum albumin in with testosterone and with cortison[J]. J Biol Chem, 1957 228 713 - 727.
- [10] Stenven R H, Andrew G B, Imelda M T, *et al.* Detection of ivermectin residues in bovine liver using an enzyme immunoassay[J]. Analyst,1998, 123(2) 355 - 358.
- [11] Hamburger R N. Chloramphenicol-specific antibody[J]. Science,1966,152 203 - 205.
- [12] 李俊锁. 兽药残留分析[M]. 北京: 科学出版社, 2002. 408 - 409.

欢迎订阅 2005 年《渔业现代化》

《渔业现代化》杂志创刊于 1973 年,由中国水产科学研究院渔业机械仪器研究所和中国渔船渔机行业协会主办。本刊全面报道水产养殖新技术、新成果,介绍各类渔业机械及其应用是本刊的特色。本刊文章注重技术性、新颖性和实用性,经常阅读有助于开阔视野,提高技术水平,增强致富本领。欢迎水产养殖与技术推广、大中专水产院校、科研单位及渔业企业等单位或个人订阅。

主要栏目:海淡水养殖、苗种培育、病害防治、渔业水体净化、饲料与营养、工厂化养鱼、深水网箱、渔业机械、水产品加工与保鲜、渔船与捕捞,以及国内外最新渔业信息集粹等。

本刊为双月刊,大 16 开本,明年起正文从 48 页增至 56 页,定价不变,每期仍为 4 元,全年 24 元。全国各地邮局均可订阅,也可直接汇款到编辑部邮购。

编辑部地址:上海市赤峰路 63 号,邮编 200092,电话(021)65018533;E-mail:fm@fmiri.com