

沙拉沙星完全抗原的合成及多克隆抗血清制备

刘儒彪^{1,2}, 胡晓飞², 孙亚宁², 王方雨², 蔡齐超², 邓瑞广², 张改平^{2,3*}, 刘 玺^{1*}

(1. 河南科技学院 食品学院, 河南 新乡 453003; 2. 河南省农业科学院 河南省动物免疫学重点实验室, 河南 郑州 450002;
3. 河南农业大学 牧医工程学院, 河南 郑州 450002)

摘要: 为了制备沙拉沙星(SARA)多克隆抗血清, 采用碳二亚胺(EDC)法将 SARA 分别与牛血清白蛋白(BSA)、卵清白蛋白(OVA) 偶联, 制备了免疫原 SARA-BSA、包被原 SARA-OVA。经 SDS-PAGE 电泳与紫外扫描初步判定偶联成功, 然后用免疫原 SARA-BSA 分别按 20、50 μg /只的剂量免疫 BALB/c 小鼠, 共免疫 3 次, 每次间隔 3 周, 于最后 1 次免疫 10 d 后断尾采血, 制备多克隆抗血清。采用间接 ELISA 方法测定多克隆抗血清效价, 间接竞争 ELISA 方法测定其敏感性和特异性。结果显示, 制备多克隆抗血清效价均达 1 : 10 000 以上, IC_{50} 为 623.5 ng/mL, 且与其他药物交叉反应率低, 具有较好的特异性。

关键词: 沙拉沙星; 人工抗原; ELISA; 多抗血清

中图分类号: S859.84 文献标志码: A 文章编号: 1004-3268(2014)05-0167-05

Synthesis of Complete Antigen and Preparation of Polyclonal Antiserum against Sarafloxacin

LIU Ru-biao^{1,2}, HU Xiao-fei², SUN Ya-ning², WANG Fang-yu², CAI Qi-chao²,
DENG Rui-guang², ZHANG Gai-ping^{2,3*}, LIU Xi^{1*}

(1. College of Food Science and Technology, Henan Institute of Science and Technology, Xinxing 453003, China;
2. Henan Provincial Key Laboratory of Animal Immunology, Henan Academy of Agricultural Sciences,
Zhengzhou 450002, China; 3. Animal Husbandry and Veterinary College, Henan Agricultural University,
Zhengzhou 450002, China)

Abstract: To prepare high sensibility and specificity polyclonal antiserum against Sarafloxacin (SARA), SARA was linked to the carrier proteins BSA and OVA with EDC method to prepare the immunogen SARA-BSA and the coating antigen SARA-OVA. UV scanning spectrum and SDS-PAGE preliminarily proved that SARA was coupled successfully to the carrier protein. The specific polyclonal antisera with higher titer were obtained by immunizing BALB/c mice with SARA-BSA of 20 μg , 50 μg each mouse respectively, with the titer of 1 : 10 000 and the inhibition titer of 623.5 ng/mL. These results indicated that SARA was successfully linked to the carrier proteins. This study laid the foundation for further gain monoclonal anti-SARA and its immunological assay.

Key words: Sarafloxacin; artificial antigen; ELISA; polyclonal antiserum

收稿日期: 2014-01-08

基金项目: 国家科技支撑计划项目(2011BAK10B01); 河南省重大科技专项项目(121100110800); 河南省高校科技创新团队支持计划项目(13IRTSTHN006); 公益行业(农业)科研专项(201203040)

作者简介: 刘儒彪(1987-), 男, 河南商丘人, 在读硕士研究生, 研究方向: 食品安全检测。E-mail: 458407666@qq.com

* 通讯作者: 张改平(1960-), 男, 河南内黄人, 研究员, 中国工程院院士, 博士生导师, 主要从事动物免疫学及动物病毒分子致病机制和食品快速检测技术研究。E-mail: zhanggaiping2003@163.com

刘 玺(1959-), 男, 河南商丘人, 教授, 硕士生导师, 主要从事食品安全检测与农产品加工研究。
E-mail: lxliuxi@163.com

沙拉沙星(SARA)是新型的动物专用药,于1995 年在美国上市,是美国第一个被批准用于动物性食品的氟喹诺酮类药物^[1]。该药属于广谱抗菌剂,由于其具有良好的杀菌效果且价格低廉而被广泛使用^[2-4]。

目前,SARA 已被批准用于对大肠杆菌等病菌的防治^[5-6],但是氟喹诺酮类药在动物源食品中残留可能会加速人类病原体对抗生素的耐药性。国内规定 SARA 的最高残留量为 $80 \mu\text{g}/\text{kg}$ ^[7]。目前,检测氟喹诺酮类药物的常规方法包括荧光分光光度法、高效液相色谱等^[8-14]。以上检测方法的精确度和灵敏度都很高,但这些检测方法需要的设备比较昂贵,且样品前期处理较为繁琐,只能限于实验室内检测,不能满足现场快速监测食品中残留的需要,故需建立一种能快速准确检测 SARA 残留且成本较低的检测方法。酶联免疫吸附法(ELISA)是一种具有简便易操作、检测快、灵敏度和准确度高、能实现现场检测等特点的检测方法,且其成本较低,能够弥补大型仪器所带来的不足。近年来随着 ELISA 的不断发展,ELISA 在农药和兽药快速检测方面已经得到广泛应用^[15-16]。

建立 SARA 的 ELISA 检测方法需要制备 SARA 的单克隆抗体,而 SARA 是小分子物质,属于半抗原,有反应原性,无免疫原性,需要与大分子物质相结合,人工合成免疫原,才能获得免疫原性,然后通过免疫小鼠获得小鼠多抗血清,进而制备 SARA 单克隆抗体,建立 ELISA 检测方法。本研究根据 ELISA 在检测方面的特点和优点,通过人工合成免疫原 SARA-BSA,免疫小鼠而获得高亲和特异性多抗血清,为制备 SARA 单克隆抗体和建立 SARA ELISA 检测方法奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 试剂 Sarafloxacin 标准品购自 Fluka 公司;弗氏不完全佐剂(FIA)、牛血清白蛋白(BSA)、碳二亚胺(EDC)、N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)、弗氏完全佐剂(FCA)、鸡卵清蛋白(OVA)、3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB)均购自 Sigma 公司;羊抗鼠酶标二抗(GAM-IgG-HRP)购自上海蓝基生物科技有限公司;N,N-二甲基甲酰胺(DMF)购自国药集团化学试剂有限公司;重蒸去离子水(ddH₂O)由河南省动物免疫学重点实验室自制。

1.1.2 溶液 0.01 mol/L pH 值为 7.4 的磷酸盐缓冲液(PBS)、0.05 mol/L pH 值为 9.6 的碳酸盐缓冲液(CBS)、含 0.05% Tween-20 的 PBS 溶液(PBST)、终止液(2 mol/L H₂SO₄)、5%猪血清、磷酸-柠檬酸缓冲液均由河南省动物免疫学重点实验室配制。

1.1.3 仪器 NanoDrop 1000 购自 Nanodrop 公司,iMark 酶标仪购自美国 Bio-Rad 公司,AE260 电子天平购自德国 METTLER 公司,凝胶成像分析系统购自 Syngene 公司,multifuge 台式冷冻离心机购自德国 Thermo scientific 公司,IS128 标准型 pH 计购自上海仪迈仪器科技公司,DYY-4C 电泳仪购自北京六一公司。

1.1.4 供试动物 SPF 级 8 周龄雌性 BALB/c 小鼠购自郑州大学实验动物中心,由河南省动物免疫学重点实验室饲养。

1.2 试验方法

1.2.1 人工抗原的制备 参照 Jiang 等^[17]的方法并加以改进,其合成路线见图 1。称取 2.5 mg SARA 溶解于 1 mL DMF 中,加入 5 mg N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)和 10 mg 碳二亚胺(EDC),室温避光搅拌 4 h;称取 10 mg BSA 溶于 2 mL PBS 缓冲液中,将活化后的 SARA 溶液逐滴加入到 BSA 溶液中,室温避光搅拌 6 h。反应完成后,产物在 4 ℃、PBS 溶液中透析 72 h,每 8 h 换透析液一次。将透析液 5 000 r/min 离心 6 min,上清液即为免疫原 SARA-BSA,分装,-20 ℃保存备用。并用同法制得包被原 SARA-OVA。

1.2.2 人工抗原的紫外扫描鉴定 用 PBS 配置相同浓度的 SARA、BSA、OVA、SARA-BSA、SARA-OVA 的标准溶液,分别进行紫外扫描得到特征吸收峰,初步判定偶联结果,根据杨利国等^[18]所述方法及公式计算蛋白质量浓度及偶联比。

$$\text{蛋白质量浓度}(\text{mg/mL}) = 1.45 \times \text{OD}_{280} - 0.74 \times \text{OD}_{260};$$

偶联比 = $\epsilon(\text{结合物}) - \epsilon(\text{载体}) / \epsilon(\text{半抗原})$, ϵ 为摩尔消光系数。

1.2.3 SDS-PAGE 电泳鉴定 参照文献^[19]的方法进行,上层胶为 5% 浓缩胶,下层胶为 12% 分离胶。初始电压为 60 V,30 min 后电压调整为 90 V。上样量为 20 μL /孔,蛋白质含量为 3 μg ;考马斯亮蓝染色 3~4 h,脱色 7~10 h,每 2 h 换 1 次脱色液。脱色完成后拍照分析,根据 BSA 和偶联物 SARA-BSA 条带偏移程度可初步鉴定偶联结果。

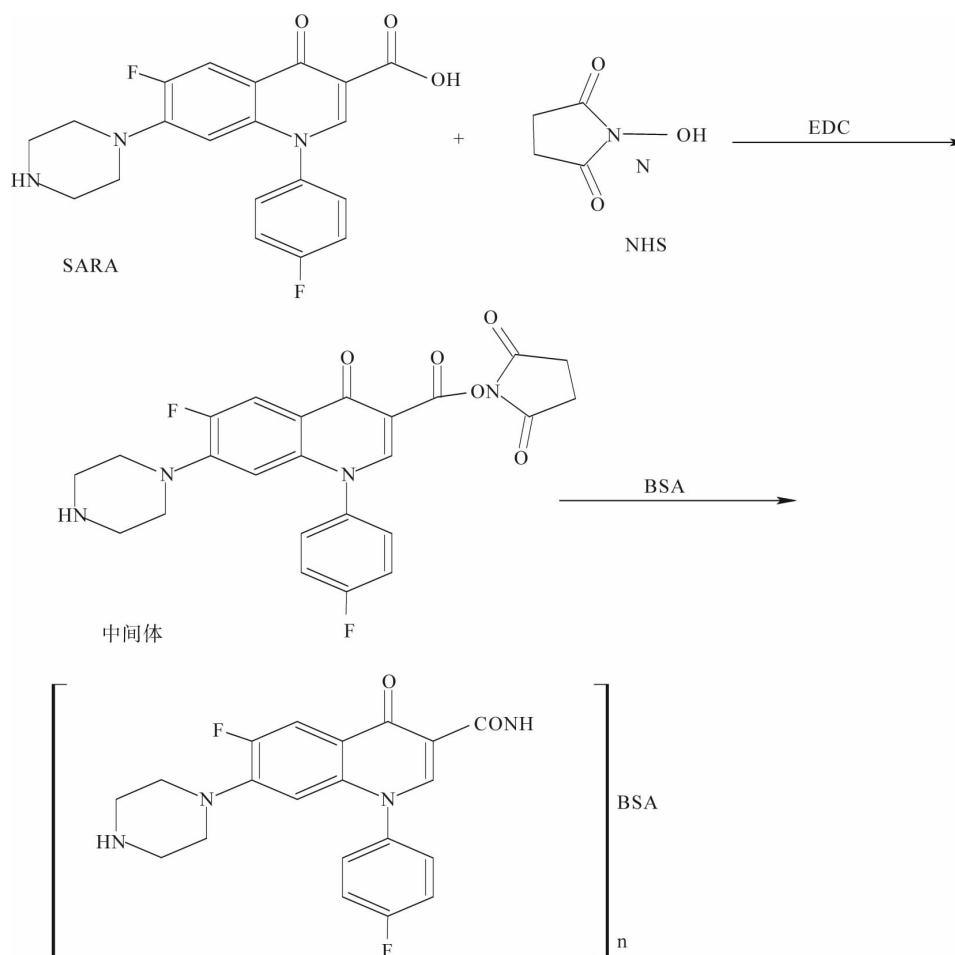


图 1 SARA-BSA 完全抗原合成路线

1.2.4 SARA 多抗血清制备 取 SPF 级小鼠 6 只,分为 2 组。免疫剂量为:第 1 组 20 μg /只,分别免疫 1、2、3 号小鼠;第 2 组 50 μg /只,分别免疫 4、5、6 号小鼠。首免用无菌 PBS 稀释 SARA-BSA 与 FCA 混合乳化,2 免和 3 免用无菌 PBS 稀释 SARA-BSA 与 FIA 混合乳化。免疫方法采用背部皮下多点免疫,免疫间隔时间为 3 周。小鼠 3 免 10 d 后断尾采血,用 PBS 按 1:100 稀释,5 000 r/min 离心 5 min,上清即为多抗血清。

1.2.5 小鼠多抗血清(pAb)的鉴定 用 CBS 液稀释包被原 SARA-OVA 至 3 $\mu\text{g}/\text{mL}$,50 $\mu\text{L}/\text{孔}$ 包被,放入 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温箱温育 2 h,洗板,用含 5%猪血清的 PBST 液封闭,220 $\mu\text{L}/\text{孔}$,放入 37 $^{\circ}\text{C}$ 温育 1 h,洗板,晾干密封后于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱避光保存备用^[20]。

1.2.5.1 pAb 效价的测定 用 5%的猪血清 PBST 铺底,每孔 50 μL ,第 1 孔加 50 μL 1:100 多抗血清,依次往下加入成倍稀释后的血清,设置阴性对照(NC),放入 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温箱孵育 15 min,PBST 洗板;加 GAM-IgG-HRP (用 5%猪血清 PBST 液 1:1 000 倍稀释),每孔 50 μL ,37 $^{\circ}\text{C}$ 温育 30 min,洗

板;每孔加 50 μL TMB 显色液,显色 5 min;每孔加 50 μL 2 mol/L H_2SO_4 终止反应,iMark 酶标仪读 OD_{450} 值。结果判断:待测孔 $\text{OD}_{450} \geq 0.2$,且待测孔 OD_{450} 与 NC OD_{450} 的比值 ≥ 2.1 时,即判为阳性^[21]。

1.2.5.2 pAb 敏感性鉴定 采用间接竞争 ELISA 法测定敏感性。用包被好的 SARA-OVA 板,加入不同质量浓度的 SARA 标准品和 OD_{450} 为 1.0 左右的小鼠血清 50 μL 作为抑制剂,同时设阴性对照和阳性对照,放入 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温箱孵育 15 min,洗板 4~6 次。后续操作同 1.5.1。计算抑制率(B/B_0),(B_0 为 SARA 标准品质量浓度为 0 时的吸光值, B 为 SARA 标准品在不同质量浓度时的吸光值)^[22]。以 B/B_0 值作为纵坐标,以 SARA 质量浓度的对数值作为横坐标,在半对数坐标轴上绘制抗 SARA 的 pAb 对 SARA 的抑制曲线,根据曲线趋势推导回归方程,计算抗 SARA 的 pAb 对 SARA 的 50%抑制浓度(IC_{50}),并以 IC_{50} 判断其敏感度。

1.2.5.3 pAb 特异性鉴定 以诺氟沙星、司帕沙星、环丙沙星、甲硝唑、土霉素、金霉素、新霉素、四环素作为竞争物,用间接竞争 ELISA 法测定多抗血清

对各竞争物的 IC_{50} , 并以 SARA 的 IC_{50} 与上述药物的 IC_{50} 的百分比作为其交叉反应率。

2 结果与分析

2.1 紫外扫描鉴定结果

从图 2 可以看出, 在波长 220~350 nm, BSA 在 278 nm 处有吸收峰, SARA 在 225 nm 和 272 nm 处有吸收峰。SARA-BSA 偶联后的紫外吸收峰与 BSA、SARA 相比都发生了一定的位移, 偶联后产物在 285 nm 处出现最大吸收峰, 初步鉴定偶联成功, 经计算 SARA-BSA 的偶联比为 7.5 : 1。

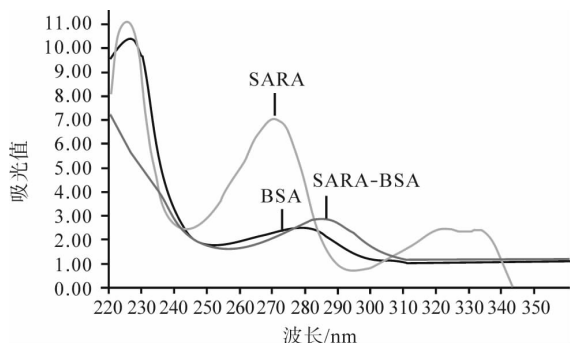


图 2 BSA、SARA、SARA-BSA 紫外扫描图谱

2.2 SDS-PAGE 凝胶电泳鉴定结果

在 SDS-PAGE 凝胶电泳中, 蛋白分子迁移量的大小与其分子量成反比。SARA-BSA 比 BSA 的分子量大 385.36, 从图 3 可以看出 SARA-BSA 的迁移量比 BSA 的略小, 与预期的结果相符合, 进一步鉴定表明偶联成功。

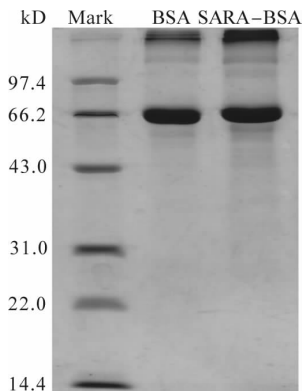


图 3 人工抗原及其载体的 SDS-PAGE 鉴定

2.3 SARA pAb 的鉴定结果

2.3.1 间接 ELISA 效价测定结果 由图 4 可知, 免疫的 6 只小鼠效价均达到了 1 : 10 000, 其中 2 号小鼠的血清效价最高, 达到 1 : 25 600, 证明注射的免疫原获得了良好的免疫效果, 且高、低剂量组小鼠效价无明显差异。

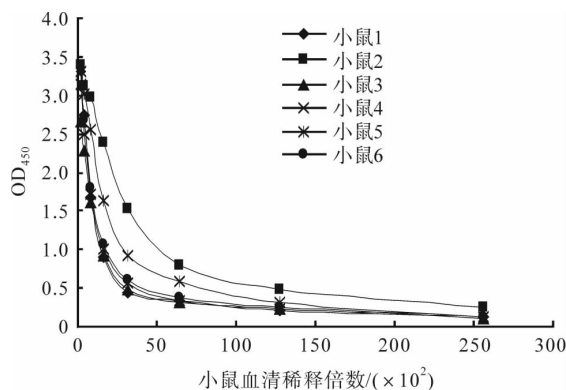


图 4 抗 SARA 的 pAb 效价

2.3.2 pAb 敏感性鉴定结果 从图 5 可知, 2 号小鼠抑制率的线性回归方程为 $Y = -0.42661X + 0.9675$, R^2 为 0.9937, IC_{50} 为 623.5 ng/mL, 说明 2 号鼠的 pAb 对 SARA 的敏感性较好。

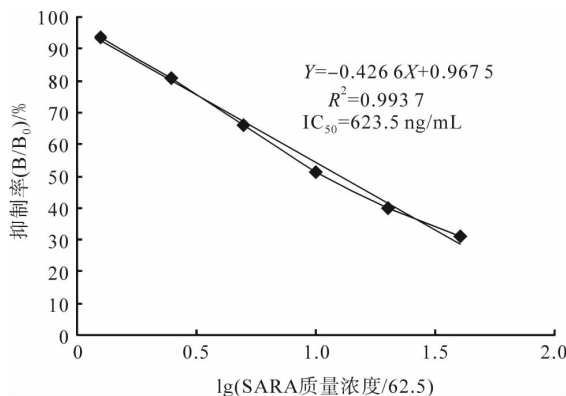


图 5 pAb 对 SARA 的阻断 ELISA 抑制曲线

2.3.3 pAb 特异性鉴定结果 由表 4 可知, 小鼠多抗血清与其他药物交叉反应率低, 具有很好的特异性。

表 4 pAb 与其他竞争药物的交叉反应

化合物	IC_{50} /(ng/mL)	交叉反应率/%
诺氟沙星	$>1.5 \times 10^4$	<4.0
司帕沙星	$>1.5 \times 10^5$	<0.4
环丙沙星	$>1.5 \times 10^5$	<0.4
甲硝唑	$>1.5 \times 10^5$	<0.4
土霉素	$>1.5 \times 10^5$	<0.4
四环素	$>1.5 \times 10^5$	<0.4
金霉素	$>1.5 \times 10^5$	<0.4
新霉素	$>1.5 \times 10^5$	<0.4

3 结论与讨论

3.1 人工抗原的合成与鉴定

SARA 为小分子物质, 属于半抗原, 只有与大分子物质(如蛋白质等)结合后, 才能刺激小鼠体内

T 细胞产生抗体特异性免疫应答。本试验利用 SARA 所带羧基,选用 EDC,与 BSA 和 OVA 上的氨基进行脱水缩合反应,分别制备了 SARA 的免疫原 SARA-BSA 与包被原 SARA-OVA。此外,本试验还采用了 DCC 法制备免疫原和包被原,经紫外扫描和 SDS-PAGE 凝胶电泳鉴定,与采用 EDC 法制备的免疫原和包被原相比较,采用 EDC 法效果较好,且偶联率较高。初步分析认为,在 DCC 偶联过程中,需要经过离心除去反应所产生的副产物二氧环己脲;而采用 EDC 法偶联无需经过离心,减少了试验操作带来的误差。试验采用 EDC 法制备的免疫原免疫小鼠后,成功获得了高效、特异的多克隆抗体。

3.2 免疫剂量的选择

本试验采用 2 种免疫剂量分别免疫 2 组小鼠,第 1 组每只免疫 20 μg ,第 2 组每只免疫 50 μg 。从效价结果来看,免疫剂量的大小对小鼠产生抗体无明显影响。

3.3 展望

穆国冬^[23]在 2007 年已制备了 SARA 单抗,但是其单抗与其他喹诺酮类药物交叉反应率较高。本试验制备了高效、特异的 SARA 多抗,与其他药物交叉反应率较低,为下一步制备特异性好、敏感性高且交叉反应率低的 SARA 单抗提供了材料,也为建立 SARA 免疫学检测方法及研制 SARA 检测试剂盒奠定了基础。

参考文献:

- [1] 李艳华,闫清波,孙丁岩,等. 兽用喹诺酮类抗菌剂沙拉沙星的研究概况[J]. 黑龙江畜牧兽医,2001(9):29-31.
- [2] Mc Conville M L, Dijkstra J W, Stamm J M, *et al.* Effects of sarafloxacin hydrochloride on human enteric bacteria under simulated human gut conditions [J]. *Veterinary Quarterly*, 1995, 17(1):1-5.
- [3] 王玉华,赫荣帆,康国平,等. 盐酸沙拉沙星胶囊对家蚕细菌性败血病的防治研究[J]. 蚕业科学,2010,36(6):977-983.
- [4] Bernt M, Egil M, Elisabeth R, *et al.* *In vitro* antimicrobial activity of sarafloxacin against clinical isolates of bacteria pathogenic to fish[J]. *Journal of Aquatic Animal Health*, 1991, 3(4):235-241.
- [5] 曾振灵,陈杖榴,冯淇辉,等. 沙拉沙星对实验性感染猪链球菌病及大肠杆菌病的药效学[J]. 中国兽医学报,2000,20(1):70-73.
- [6] Chansiripornchai N, Sasipreeyajan J. Efficacy of sarafloxacin in broilers after experimental infection with *Escherichia coli* [J]. *Veterinary Research Communications*, 2002, 26(4):255-262.
- [7] 农业部. 中华人民共和国农业部第 235 号公告动物性食品中兽药最高残留限量 [EB/OL]. [2013-11-08]. http://jckspaqj.aqsiq.gov.cn/dwyxspjy/gnxbz/200610/t20061027_9809.htm.
- [8] 李达焱,石新林. 紫外分光光度法测定沙拉沙星可溶性粉的含量[J]. 中国兽药杂志,2003,37(8):30-31.
- [9] 刘媛,谢孟峡,丁岚,等. 高效液相色谱同时测定鸡蛋中 4 种氟喹诺酮类药物残留[J]. 分析化学,2004(3):352-355.
- [10] Maxwell R J, Cohen E, Donoghue D J. Determination of sarafloxacin residues in fortified and incurred eggs using on-line microdialysis and HPLC/programmable fluorescence detection[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1999, 47(4):1563-1567.
- [11] Schilling J B, Cepa S P, Menacherry S D, *et al.* Liquid chromatography combined with tandem mass spectrometry for the confirmation of sarafloxacin in catfish tissue [J]. *Analytical Chemistry*, 1996, 68(11):1905-1909.
- [12] 董琳琳,刘艳华,汪霞,等. 反相高效液相色谱法同时测定 4 种氟喹诺酮类药物在鸡可食性组织中的残留[J]. 色谱,2005,23(3):285-288.
- [13] Roudaut B. High-performance liquid chromatographic method with fluorescence detection for the screening and quantification of oxolinic acid, flumequine and sarafloxacin in fish[J]. *Journal of Chromatography B*, 2002, 780(2):481-485.
- [14] 傅丽,王晓玉,龙运前. 胶束增敏荧光法测定盐酸沙拉沙星[J]. 分析试验室,2008,27(12):92-94.
- [15] 张泽英,高小龙. 动物性食品中兽药残留酶联免疫分析研究进展[J]. 武汉生物工程学院学报,2007,3(2):115-118.
- [16] 徐飞,任康,丁双阳. 免疫分析技术在动物性食品兽药残留检测中的应用[J]. 兽医导刊,2009(6):59-60.
- [17] Jiang J Q, Zhang H T, Liu J W, *et al.* Development and optimization of an indirect competitive ELISA for detection of norfloxacin residue in chicken liver[J]. *Procedia Environmental Sciences*, 2011, 8:128-133.
- [18] 杨利国,胡少昶,魏平华. 酶免疫检测技术[M]. 南京:南京大学出版社,1998:273-280.
- [19] 郭尧君. 蛋白质电泳实验技术[M]. 北京:科学出版社,2001:456-460.
- [20] Hermanson G T. Bioconjugate techniques [M]. San Diego: Academic Press, 1996.
- [21] Tijssen P. Practice and theory of enzyme immunoassays[M]. Amsterdam: Elsevier Science, 1985.
- [22] 王耀,胡晓飞,裴亚峰,等. 伏马菌素 B1 人工抗原的合成及鼠源多克隆抗血清的制备[J]. 核农学报,2012, 26(1):113-117.
- [23] 穆国冬. 盐酸沙拉沙星单克隆抗体的制备及其在 ELISA 中的应用[D]. 吉林:吉林大学,2007.