

# 磺胺间甲氧嘧啶全抗原的制备研究

张改平<sup>1\*</sup>, 职爱民<sup>2</sup>, 瞿明仁<sup>2</sup>, 王自良<sup>3</sup>, 王选年<sup>1</sup>, 李青梅<sup>1</sup>,  
邢广旭<sup>1</sup>, 杨继飞<sup>1</sup>, 柴书军<sup>1</sup>, 刘庆堂<sup>1</sup>, 石团员<sup>4</sup>, 宋志超<sup>5</sup>

(1. 河南省农业科学院生物技术研究所, 河南 郑州 450002; 2. 江西农业大学动物科技学院, 江西 南昌 330045;  
3. 河南科技学院动物科学学院, 河南 新乡 453003; 4. 河南农业大学, 河南 郑州 450002;  
5. 河南省兽药监察所, 河南 郑州 450011)

**摘要:** 采用重氮化法, 将半抗原磺胺间甲氧嘧啶(SMM)与载体牛血清白蛋白(BSA)和卵清白蛋白(OVA)偶联, 制得磺胺间甲氧嘧啶全抗原 SMM-BSA 和 SMM-OVA。通过其紫外扫描光谱、SDS-PAGE 凝胶电泳试验, 表明半抗原和载体成功偶联, 免疫动物以后可以产生满意效价。这为进一步制备抗 SMM 抗体提供了良好的免疫原。

**关键词:** 磺胺间甲氧嘧啶; 全抗原; 紫外扫描; 免疫; 鉴定

中图分类号: S852.4<sup>+</sup>3 文献标识码: A 文章编号: 1004-3268(2006)03-0096-05

## Study on Preparation of Complete Antigen of Sulfamonomethoxine

ZHANG Gai-ping<sup>1\*</sup>, ZHI Ai-min<sup>2</sup>, QU Ming-ren<sup>2</sup>, WANG Zi-liang<sup>3</sup>, WANG Xuan-nian<sup>1</sup>,  
LI Qing-mei<sup>1</sup>, XING Guang-xu<sup>1</sup>, YANG Ji-fei<sup>1</sup>, CHAI Shu-jun<sup>1</sup>,  
LIU Qing-tang<sup>1</sup>, SHI Tuan-yuan<sup>4</sup>, SONG Zhi-chao<sup>5</sup>

(1. Institute of Biology and Technique Sciences Henan Academy of Agricultural Sciences Zhengzhou 450002, China;  
2. College of Animal Sciences, Jiangxi Agricultural University, Nanchang 330045, China; 3. College of Animal Science  
Henan Institute of Science and Technology, Xinxiang 453003, China; 4. Henan Agricultural University, Zhengzhou  
450002, China; 5. Henan Institute of Veterinary Drug Control, Zhengzhou 450002, China)

**Abstract:** Semiantigen sulfamonomethoxine (SMM) was coupled with carrier protein bovine serum albumin (BSA) and ovalbumin to prepare complete antigen SMM-BSA and SMM-OVA by the method of diazotization. UV scanning spectrum, SDS-PAGE and animal immunity all indicated that the complete antigens both SMM-BSA and SMM-OVA were successfully produced. The present research supplied an excellent immune antigen for further preparation of antibody to SMM.

**Key words:** Sulfamethoxydiazine; Complete antigen; UV scanning spectrum; Immunity; Identify

磺胺间甲氧嘧啶(SMM)作为一种长效的磺胺类药, 由于其具有较强的抗菌作用, 常被用作饲料添加剂而广泛添加到畜禽饲料当中, 但会引起人体的过敏反应<sup>[1]</sup>, 并可能具有一定程度的致癌性<sup>[2]</sup>。磺胺间甲氧嘧啶的不合理使用, 其残留对食品安全特别是动物源性食品安全、环境安全和人类身体健康具有潜在危害性。因此, 磺胺间甲氧嘧啶的残留

问题倍受关注。根据农业部无公害食品行动计划和动物源性食品药物残留监控计划的有关部署, 从 2005 年起, 农业部将把畜产品中磺胺类药物的残留情况作为继盐酸克伦特罗之后的又一个重点予以监控。为此, 将相应地增加检测数量和畜产品的检测种类, 同时对检测出的阳性样品将全部进行跟踪处理<sup>[3]</sup>。目前检测磺胺类药物残留的理化方法有高

收稿日期: 2005-12-15

基金项目: “十五”国家重大科技专项“食品安全关键技术综合示范”(2001BA804A30-08)

作者简介: 张改平(1960-), 男, 河南内黄人, 研究员 博士生导师, 博士, 主要从事动物免疫学与生物技术研究。为通讯作者。

效液相色谱法(HPLC)、薄层色谱法(TLC)和气相色谱法(GC)等<sup>[4~7]</sup>,这些方法虽然灵敏、准确,但检测时间长、耗资大、对人员素质要求高,不适合用来对大批样品测定。酶联免疫吸附法(ELISA)作为一种快速、特异和灵敏度较高的免疫测定技术,正逐步应用于磺胺类药物残留的检测<sup>[8]</sup>。磺胺间甲氧嘧啶分子量 280.23Da,为小分子化合物,仅有抗原性而没有免疫原性,属半抗原,需要和蛋白质分子结合后形成复合物才具有免疫原性。本研究以牛血清白蛋白(BSA)和卵清白蛋白为载体,重氮化法合成全抗原和 SMM-OVA,为进一步建立 ELISA 等免疫分析法检测 SMM 残留奠定基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 试剂、仪器及实验动物

磺胺间甲氧嘧啶(SMM),SIGMA 公司(美国);牛血清白蛋白(BSA)、卵清白蛋白(OVA),SIGMA 公司(美国);亚硝酸钠等其他试剂均为国产分析纯试剂。

550 型酶标仪,美国 Bio-Rad 公司;DU-600 紫外可见分光光度计、高速冷冻离心机,德国 BKMAN 公司;JM-250 电泳仪,大连捷迈科贸有限公司;DZY-6090 真空干燥机,上海恒河有限公司;SZ-93 自动双重水蒸馏器,90-3 定时恒温双向磁力搅拌器,上海亚荣生化仪器厂;AE260 电子天平,德国 METTLER 公司;HI9321 精密酸度计,美国 HANNA 公司;凝胶成像系统。

实验动物为 8 周龄 SPF 级 BALB/c 小鼠,购自郑州大学医学院动物实验中心,并由河南省动物免疫学重点实验室饲养。

### 1.2 全抗原的制备

参照 Fleeker 和 Lovett 的重氮化法<sup>[9]</sup>并加以改进。称 SMM (0.143 mmol)40 mg 置于 10ml 螺口瓶中。加入 NaNO<sub>2</sub> 45.2 mg,再加入 5 ml 0.1 mol/L NaOH 溶解。置 4℃预冷 20 min,加入 1 mol/L HCl 至 pH 为 1 以下。4℃搅拌反应 6h,此为 A 液;BSA 20 mg 用 PBS 3 ml 充分溶解后,置于 4℃预冷 30 min 以上,此为 B 液。将 B 液在搅拌下缓慢加入 A 溶液中,冰浴下调 pH 8.5 左右,4℃过夜。在 4℃下将合成产物对 1 000 ml PBS(pH 7.2)透析,每天更换透析液一次,透析 7 d,以除去未反应的小分子物质亚硝酸钠、SMM 等。收集透析物,一半冻存,一半 4℃备用。

SMM-OVA 的制备方法同 SMM-BSA。

### 1.3 全抗原的鉴定

1.3.1 SDS-PAGE 凝胶电泳鉴定 参照郭尧君<sup>[10]</sup>介绍的方法配制各种电泳溶液,积层胶浓度 5%,分离胶浓度 12%,积层胶电压 98V,分离胶电压 48V,上样量为 20 μl,考马斯亮蓝染色 3~4 h,置脱色液中脱色过夜。

1.3.2 紫外扫描鉴定 用 PBS 精确配制 SMM 与 BSA 标准溶液(可加少量 NaOH 溶液助溶),然后称取一定量的 SMM-BSA 溶于生理盐水中,用紫外吸收法测定蛋白质浓度,根据此浓度调整 SMM-BSA 溶液中蛋白质的浓度与 BSA 一致。用 DU-600 紫外扫描仪测得 SMM 与 BSA 的紫外吸收曲线。

1.3.3 动物免疫 以偶联复合物 SMM-BSA 为免疫原,选择 SPF 级 8 周龄 BALB/c 小鼠 5 只进行免疫。首免, SMM-BSA PBS 溶液与等体积的 FCA 混合成乳剂,背部皮下多点注射,剂量为每只 0.2 ml(蛋白含量 50 μg);每隔 2 周以同剂量 SMM-BSA PBS 溶液与等体积的 FIA 混合成乳剂,加强免疫 1 次。第 3 次加强免疫后 10d,尾静脉采血检测血清抗体水平。间接 ELISA 检测抗体的产生情况。具体操作步骤是:用重氮化法偶联的 SMM-OVA 为包被抗原(2 μg/ml)包板,50 μl/孔,37℃,2h,洗板;用 5%猪血清(含 OVA 5 mg/ml)封闭,200 μl/孔,37℃1 h,洗板;第 1 孔先加入 1:50 多抗血清 50 μl,倍比至第 7 孔,第 8 孔留作空白,37℃,20 min,洗板;加入羊抗鼠酶标二抗(1:1 000)50 μl/孔,37℃0.5 h,洗板;加入 TMB 底物溶液 80 μl,显色 5 min,记录结果;加入 50 μl/孔终止液终止反应后读 OD<sub>450</sub>。

## 2 结果与分析

### 2.1 反应机理及反应途径

磺胺类药物的分子基本结构是由氨基磺胺的 N1 端连接 1 个 R 基团(图 1),多具有芳香伯氨基,一般为白色或黄色结晶粉末,无臭,基本无味。一般相当稳定,但长时间暴露于日光下会变成黄色,应避免光保存。微溶于水,易溶于乙醇、丙酮等有机溶剂,但几乎不溶于乙醚和氯仿。含有伯氨基和磺酰氨基而呈酸碱两性。SMM 的结构见图 2。

重氮化法是利用其 N<sub>4</sub> 位上的氨基与连接剂反应后偶联到蛋白质分子上的。含芳香胺的化合物,可以和亚硝酸反应生成重氮盐,重氮盐正离子可以作为亲电试剂与活泼的芳香化合物进行芳香亲电取

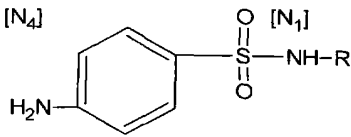


图 1 磺胺类药物基本结构

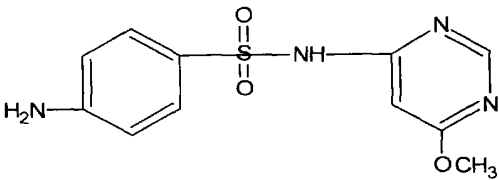


图 2 磺胺间甲氧嘧啶分子结构

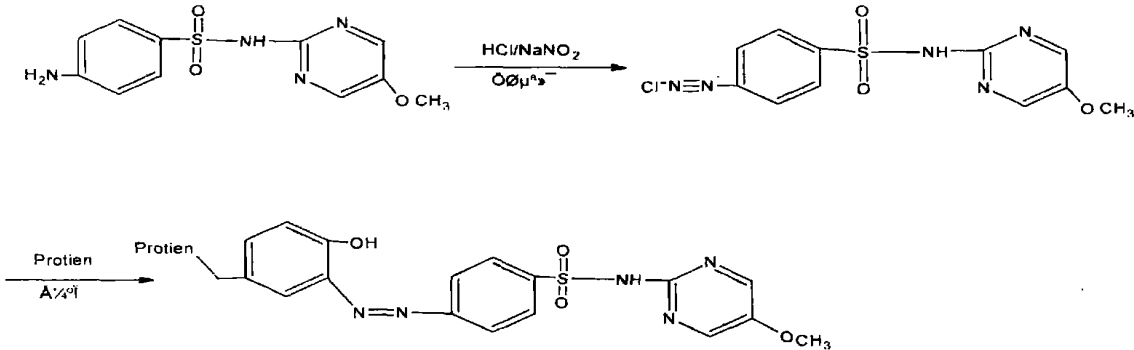
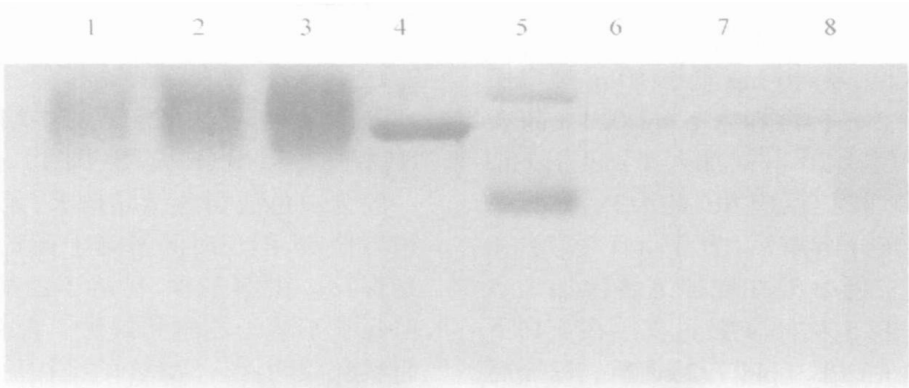


图 3 重氮化法反应途径

出现明显的拖尾,说明偶联成功; 6, 7, 8 道条带隐约可见,但不很明显,原因是因为 OVA 的溶解度不好。按计算量上样,实际上样量小于计算量,造成带比较弱,但也可以隐约看到有拖尾现象,说明偶联成功(图 4)。

2.2.2 紫外扫描鉴定 从图 5 可见,BSA 的最大吸收峰在 279 nm 左右,此时 SMM-BSA 的吸光度大于 BSA 的吸光度。尽管 SMM-BSA 溶液中蛋白质的浓度与 BSA 溶液相同,SMM-BSA 的吸光度却明显比 BSA 的高,说明 SMM 与 BSA 已经结合,



1.SMM-BSA 1 $\mu$ g; 2.SMM-BSA 2 $\mu$ g; 3.SMM-BSA 3 $\mu$ g; 4.BSA 3 $\mu$ g  
5.OVA 3 $\mu$ g; 6.SMM-OVA 1 $\mu$ g; 7.SMM-OVA 2 $\mu$ g; 8.SMM-OVA 3 $\mu$ g

图 4 SDS-PAGE 鉴定 SMM-BSA 和 SMM-OVA 的偶联

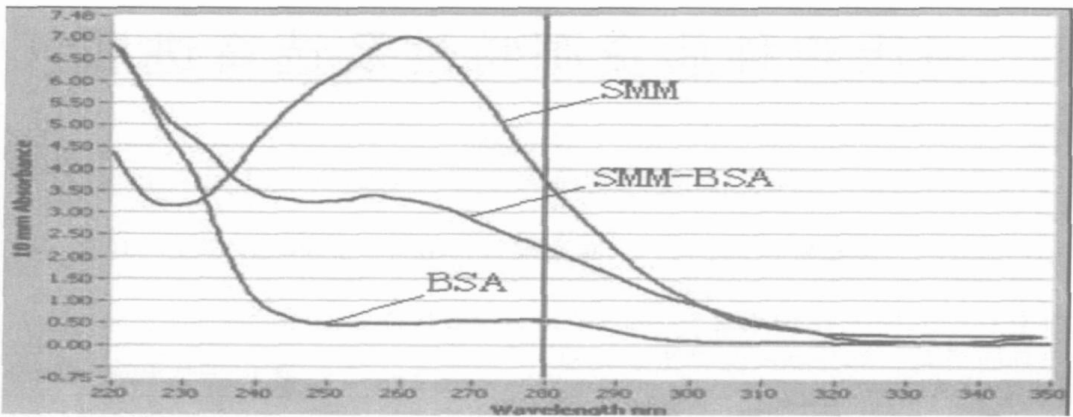


图 5 SMM-BSA、BSA 和 SMM 的紫外扫描图谱

导致 SMM-BSA 吸光度增加。示, 经过 3 次免疫, 可以激发产生特异的磺胺间甲氧嘧啶抗体, OD 值见表 1。

2.2.3 动物免疫试验鉴定 间接 ELISA 结果显

表 1 间接 ELISA 光密度吸收值

鼠号	稀释倍数							空白
	1:100	1:200	1:400	1:800	1:1600	1:3200	1:6400	
小鼠 1	2.352	2.036	1.752	1.351	0.985	0.654	0.364	0.055
小鼠 2	2.366	2.098	1.850	1.253	0.896	0.520	0.325	0.075
小鼠 3	2.182	1.985	1.690	1.056	0.562	0.388	0.163	0.068
小鼠 4	2.235	2.059	1.765	1.362	0.972	0.511	0.321	0.057
小鼠 5	1.023	0.850	0.654	0.521	0.300	0.122	0.073	0.069

3 讨论

小分子半抗原没有免疫原性, 必须和大分子载体连接起来才具有免疫原性。SMM 是典型的半抗原, 需要和相应的载体蛋白连接才可以用于制备 SMM 的抗体。根据其分子结构, 试验可以选择 N<sub>1</sub> 端连接蛋白, 制备簇特异的抗体; 也可以选择 N<sub>4</sub> 端连接载体蛋白, 制备单个药物的特异性抗体<sup>[1]</sup>。本次试验选择了 N<sub>4</sub> 端连接蛋白, 制备了 SMM 免疫原, 可用于 SMM 特异性抗体的制备。并采用 SDS-PAGE 电泳、紫外扫描进行鉴定, 鉴定结果显示已经成功偶联。半抗原偶联到载体上的数目常被认为会影响抗体的产生情况, 但是现在并没有定论。Roe 认为半抗原和载体的连接比在 3~25 时都可以获得满意的免疫学检测效果<sup>[12]</sup>; 而 Erlanger 认为在 8~25 之间都是比较合适的<sup>[13]</sup>; 也有报道认为, 要获得尽可能多的连接率<sup>[14]</sup>。本次试验的目的是制备抗体, 是否能产生相应的抗体才是判断免疫原是否成功合成的关键, 所以进行了动物免疫试验。结果表明, 合成的完全抗原可以激发机体产生针对目

的抗原高亲和力的特异性抗体, 充分证明该合成是有效的, 为下一步单克隆抗体的制备以及免疫学快速检测方法的建立, 打下了坚实的基础。

参考文献:

[ 1 ] Huber W G. Allergenicity of antibacterial drug residues [ A ]. Rico A G. Drug residues in animals[ M ]. New York: Academic Press 1986. 33—50.

[ 2 ] Littlefield N A, Sheldon W G, Allen R. Chronic toxicity/ carcinogenicity studies of sulphamethazine in Fisher 344/ N rats: two-generation exposure[ J ]. Food Chem Toxicol 1990, 28: 157—167.

[ 3 ] 中国兽药信息网[ OL ]. [http://www. ivdc. gov. cn/](http://www.ivdc.gov.cn/) , 2004—11—05

[ 4 ] Garden S W, Sporns P. Development and evaluation of an enzyme immunoassay for sulfamerazine in milk[ J ]. J Agric Food Chem, 1994, 42: 1379—1391.

[ 5 ] 农业部畜牧兽医局. 动物源食品中磺胺类药物残留的检测方法[ J ]. 中国兽药杂志, 2002, 36(6): 12—13.

[ 6 ] Aerts M M L, Hogenboom A C, Brinkman U A. Analytical strategies for the screening of veterinary drugs and their residues in edible products [ J ]. J Chromatog B, 1995, 667: 1—40.

# 卢氏鸡种质资源特性及选育进展

吉进卿

(河南省畜牧局, 河南 郑州 450011)

中图分类号: S831      文献标识码: A      文章编号: 1004-3268(2006)03-0100-02

卢氏鸡是河南省三大地方良种鸡之一, 因主产区在河南省卢氏县而得名。部分鸡产绿壳蛋是其显著特性, 在国内外片羽非乌骨鸡中是罕见的。当地四面环山, 平均海拔 800 m, 交通不便, 自然隔离良好, 客观上使卢氏鸡成为原始地方鸡种的天然闭锁群。20 世纪 80 年代被列入《河南省地方优良畜禽品种志》和《中国畜禽良种志》, 2001 年被列入河南省畜禽品种资源保护名录。该品种种质资源特异性高, 自然状态下约有 0.9% 的个体产绿壳蛋, 且所产的绿壳蛋蛋清浓, 蛋黄呈橘红色, 经检测具有“三高一低”(高锌、高碘、高硒, 低胆固醇)特点, 被誉为“鸡蛋中的人参”, 因而极具开发利用价值。

## 1 品种特性调查

卢氏鸡属小型蛋肉兼用品种, 体形紧凑, 匀称, 羽毛、翅紧贴。头小清秀, 眼大而圆, 颈细长, 腿脚长。性活泼, 机敏, 易受惊, 善飞。毛色杂, 母鸡以麻色为多, 占 52%, 其次为白色和黑色。公鸡以红黑色为主, 占 80%, 其次为白色及黄色。冠形以单冠为主, 占 82%。喙以青色为主, 其次为黄、粉色。趾多为青色。据对 27 只成年公鸡、205 只成年母鸡测

定, 其各项指标见表 1。

表 1 卢氏鸡的体重与体尺

项目	成年公鸡	成年母鸡
体重(kg)	1.70	1.11
体斜长(cm)	20.77	18.04
胸深(cm)	9.92	8.55
胸宽(cm)	8.03	6.89
胸骨长(cm)	11.22	9.56
骨盆宽(cm)	9.41	7.94
趾长(cm)	10.09	8.59

母鸡开产日龄 170 d, 公鸡开啼日龄 88 d。母鸡就巢性强, 散养条件下年产蛋 110~150 枚, 蛋重 46.75 g, 蛋形指数为 1.32。蛋黄结构致密, 呈橘红色, 比重大于其他鸡种。蛋壳致密, 颜色基本分为红褐色和绿色, 前者占 96.4%, 其他占 3.6%。

对笼养蛋鸡使用一般配合饲料所产绿壳蛋进行分析, 鸡蛋的各项指标分别为: 含水量 62.5%, 低于普通鸡蛋; 粗蛋白质 11.9%, 粗脂肪 8.5%, 铜 0.67 mg/kg, 锌 14.46 mg/kg, 铁 18.43 mg/kg, 锰 0.87 mg/kg; 维生素 A  $7.44 \times 10^3$  IU/kg, 维生素 E 299

收稿日期: 2005-11-23

作者简介: 吉进卿(1963-), 男, 河南南乐人, 高级畜牧师, 主要从事动物品种选育与改良工作。

[ 7 ] 林海丹. 动物源性食品中磺胺类药物残留的固相萃取—高效液相色谱法测定[ J ]. 分析测试学报, 2003, 22 (1): 94—96.

[ 8 ] Muldoon M T, Holtzapple C K, Deshpande S S, *et al.* Development of a monoclonal antibody-based ELISA for the analysis of sulfadimethoxine. I Development and characterization of monoclonal antibodies and molecular modeling studies of antibody recognition[ J ]. J Agric Food Chem, 2000, 48: 537—544.

[ 9 ] Fleeker J R, Lovett L J. Enzyme immunoassay for screening sulfamethazine residues in swine blood[ J ]. J Assoc Off Anal Chem, 1985, 68: 172—174.

[ 10 ] 郭尧君. 蛋白质电泳实验技术[ M ]. 北京: 科学出版社, 2001.

[ 11 ] 李俊钺, 邱月明, 王超. 兽药残留分析[ M ]. 上海: 上海科学技术出版社, 2002. 251—252.

[ 12 ] Roe R M. Enzyme-linked immunosorbent assay of small molecular weight toxicants[ A ]. Hodgson E, Roc R M, Motoyama N. Pesticides and the future: toxicological studies of risks and benefits[ M ]. Raleigh N C: North Carolina State University, 1991. 273—287.

[ 13 ] Erlanger B P. The preparation of antigenic hapten-carrier conjugates: a survey[ J ]. Methods Enzymol, 1980, 70: 85—104.

[ 14 ] 李君瓔, 黄樵让. 免疫生物学概论[ M ]. 北京: 高等教育出版社, 1992. 55—78.