

甲氧苄氨嘧啶人工抗原的合成及鉴定

职爱民, 刘庆堂, 邢广旭, 杨继飞, 张改平*

(河南省农业科学院 农业部动物免疫学重点开放实验室, 河南省动物免疫学重点实验室, 河南 郑州 450002)

摘要: 用重氮化方法将甲氧苄氨嘧啶(TMP)偶联于载体蛋白 BSA 和 OVA 上, 合成了免疫抗原 BSA-TMP 和包被抗原 OVA-TMP, 并用紫外扫描、SDS-PAGE 和动物免疫试验进行了鉴定。结果表明, 半抗原 TMP 和载体蛋白偶联成功。人工抗原 BSA-TMP 的成功合成, 为 TMP 单克隆抗体制备及其快速检测试剂的研制奠定了基础。

关键词: 甲氧苄氨嘧啶; 人工抗原; 合成; 鉴定

中图分类号: S859.84 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-3268(2010)03-0096-04

Synthesis and Characterization of Trimethoprim Artificial Immunogen

ZHI Ai-min, LIU Qing-tang, XING Guang-xu, YANG Ji-fei, ZHANG Gai-ping*

(Key Laboratory for Animal Immunology of the Ministry of Agriculture, Henan Provincial Key Laboratory of Animal Immunology, Henan Academy of Agricultural Sciences, Zhengzhou 450002, China)

Abstract: Artificial immunogen BSA-TMP and OVA-TMP were synthesized using diazotization by linking carrier proteins BSA and OVA to TMP. The immunogen BSA-TMP was identified by ultraviolet scanning, SDS-PAGE and animal immunization experiment. The results showed that the hapten TMP was successfully linked to carrier proteins. Artificial immunogen BSA-TMP laid a solid foundation for further research of the monoclonal antibodies and rapid test kits against TMP.

Key words: Trimethoprim; Artificial antigen; Synthesis; Identification

甲氧苄氨嘧啶(trimethoprim, TMP)为化学合成抗菌剂, 抗菌范围和磺胺药相近。与磺胺药联合使用时, 其疗效可增强几倍到几十倍, 因此被广泛地用于畜禽疾病的治疗和预防。TMP 通过对叶酸代谢的干扰而抑制细菌的生长, 其副作用很大, 可产生过敏反应^[1,2]、肝脏毒性^[3]和遗传毒性^[4], 且可能有致癌性。TMP 在规模化畜禽生产中的不合理使用, 会带来一定环境威胁^[5]。我国农业部 2002 年发布的《动物性食品中兽药最高残留量》中规定, 动物性食品中 TMP 的最大残留量(MRL)为 50 μg/L^[6]。为防止 TMP 超标的畜产品进入市场, 必须建立一种简便、快速、灵敏、准确的检测方法对 TMP 残留进行有效地

监测。目前检测 TMP 残留的理化方法主要包括高效液相色谱法(HPLC)^[7]、高效液相色谱—电喷雾串联质谱法(HPLC/ESI-MS/MS)^[8]、液相色谱—质谱法(HPLC-MS)^[9]等。尽管这些方法有很高的灵敏度和准确性, 但存在需要昂贵的仪器、样品前处理复杂、繁琐费时、不能现场操作等缺陷, 限制了其应用。免疫学分析方法由于具有灵敏、快速、特异、简便等优点, 近年来在兽药、农药残留检测领域已被广泛应用^[10-13]。本试验以半抗原 TMP 与载体蛋白偶联, 制备 BSA-TMP 人工抗原, 旨在为进一步建立 TMP 残留 ELISA 检测试剂盒及其胶体金免疫层析技术的应用奠定基础。

收稿日期: 2009-09-14

基金项目: “十一五”国家科技支撑计划(2006BAK02A21)

作者简介: 职爱民(1976-), 男, 河南新乡人, 副研究员, 博士, 主要从事动物营养与免疫研究。E-mail: aiminzhi@126.com

*通讯作者: 张改平(1960-), 男, 河南内黄人, 研究员, 博士, 博士生导师, 主要从事动物免疫学和兽药残留研究。

1 材料和方法

1.1 试剂

TMP 为 Sigma 产品, 纯度 $\geq 99.0\%$; BSA、OVA、弗氏完全佐剂 (FCA) 和弗氏不完全佐剂 (FIA) 为 Pierce 产品; 四甲基联苯胺 (TMB) 购自上海五联化工厂; 羊抗鼠酶标二抗 (GaM IgG-HRP) 购自华美生物工程有限公司; 其他试剂市售所得, 均为 AR 级。洗液 (PBST) 为含体积分数 0.05% 的 Tween-20 的 PBS; 包被液 (CBS) 为 0.1 mol/L pH 9.6 的碳酸盐缓冲液; 间接 ELISA 和阻断 ELISA 封闭液、稀释液均为含体积分数 5% 猪血清的 PBST; 显色液为 TMB 的醋酸-柠檬酸缓冲液; 终止液为 2 mol/L 的硫酸溶液。

1.2 仪器

AE260 电子天平, 德国 METTLER 公司生产; HI9321 酸度计, 美国 HANNA 公司产品; DU-600 核酸蛋白分析仪, 德国 BECKMAN 公司产品; 550 型酶标仪, 美国 Bio-Rad 公司产品; 3K-18 高速冷冻离心机, 德国 SIGMA 公司生产; 凝胶成像系统及分析软件, Syngene 公司产品; JM-250 电泳仪, 大连捷迈科贸有限公司; SZ-93 自动双重纯水蒸馏器和 93-3 定时恒温双向磁力搅拌器, 上海亚荣生化仪器厂生产。

1.3 试验动物

6 周龄 SPF 级雌性 BALB/c 小鼠, 购自郑州大学医学院实验动物中心, 农业部动物免疫学重点开放实验室饲养。

1.4 人工抗原的合成

BSA-TMP 完全抗原的合成方法如下: 称取 5.5 mg 的 TMP 置于 10 mL 螺口瓶中, 用 2 mL 0.5 mol/L 的 HCl 溶解。冰浴冷却后, 避光边搅拌边逐滴加入灭菌双蒸水溶解已预冷的 1 mol/L NaNO_2 溶液适量 (淀粉碘化钾试纸呈蓝黑色为宜), 4°C 反应 6 h , 得重氮化 TMP。称取 10 mg BSA 溶于 1 mL PBS (pH = 7.2), 预冷后边搅拌边逐滴加入重氮化 TMP, 用 1 mol/L NaOH 调 pH 至 8.5 左右, 4°C 反应过夜。反应产物在 4°C 搅拌下用 PBS 透析 3 d , 每天换液 3 次, 透析后得到纯化的 BSA-TMP。合成路线见图 1。同法制得包被抗原 TMP-OVA。

1.5 人工抗原的鉴定

1.5.1 紫外扫描鉴定 (UV) 用 PBS 配制 TMP 和 BSA 标准溶液, 取 BSA-TMP 溶液, 用紫外吸收法测定其蛋白质的浓度和特征峰, 调节 BSA-TMP 溶液的蛋白质浓度与 BSA 标准溶液一致, 在波长 220

$\sim 400\text{ nm}$ 范围内进行紫外扫描, 根据峰的变化判断偶联效果^[8]。

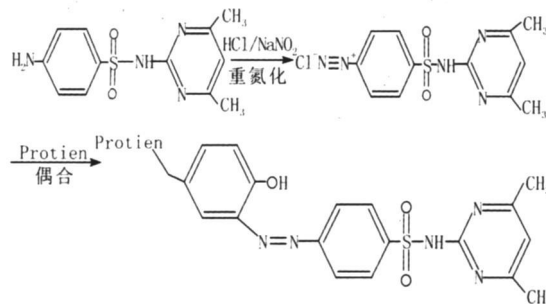


图 1 重氮化法合成 BSA-TMP 路线

1.5.2 SDS-PAGE 凝胶电泳鉴定 参考文献[14]介绍的方法配制各种电泳溶液, 浓缩胶为 5% , 分离胶质量体积分数为 12% , 浓缩胶电压 60 V , 分离胶电压 80 V , 上样量为 $20\mu\text{L}$, 考马斯亮蓝染色 $3\sim 4\text{ h}$ 后, 置脱色液中过夜脱色。根据条带分子量的大小变化判断偶联效果。

1.5.3 多抗血清 (pAb) 的制备及鉴定

1.5.3.1 pAb 的制备 取 $0.22\mu\text{m}$ 滤膜无菌过滤 PBS 溶解 BSA-TMP 至 500 mg/L , 与等量 FCA 混合, 手持式匀浆器充分乳化后免疫 6 周龄 BALB/c 小鼠 3 只, 免疫剂量为每只 0.2 mL , 免疫方式为背部皮下 6 点注射。首免 3 周后加强免疫, 用无菌 PBS 溶解 BSA-TMP, 与等量 FIA 混合乳化, 共免 4 次, 每次间隔 3 周, 免疫剂量同首次免疫。每隔 2 周加强免疫 1 次, 3 次免疫后 16 d 断尾采血分离血清, -20°C 保存备用。

1.5.3.2 pAb 效价测定 采用间接 ELISA 方法测定 pAb 效价, 基本程序参照 Tijssen 的方法^[15] 并加以改进。TMP-OVA 包被, 包被浓度 1 mg/L , 包被量 $100\mu\text{L/孔}$, 37°C 温育 2 h , PBST 洗板 6 次; 体积分数 5% 猪血清封闭液 $200\mu\text{L/孔}$, 37°C 温育 1 h , 洗 6 次; 加 pAb, $50\mu\text{L/孔}$, 用封闭液倍比稀释, 设阴性对照 (NC) 和空白对照 (BC), 37°C 温育 15 min , 洗 6 次; 加 GaM IgG-HRP, $1:1000$ 用封闭液稀释, $50\mu\text{L/孔}$, 37°C 温育 30 min , 洗 6 次; 加酶底物 TMB 显色 $50\mu\text{L/孔}$, 室温反应 10 min ; 加入 $50\mu\text{L/孔}$ 2 mol/L H_2SO_4 终止反应, 读 OD_{450} 值; 结果判断: 以待测孔 OD_{450} 值 $\geq \text{NC OD}_{450}$ 值的 2.1 倍 ($P/N \geq 2.1$) 判为阳性。

2 结果与分析

2.1 UV 鉴定结果

利用 U-3000 紫外扫描仪进行扫描, 结果表明,

BSA 的最大吸收峰在 278 nm, TMP 的最大吸收峰在 266 nm, BSA 与 TMP 偶联后, 在 233~280 nm 处紫外吸收峰发生上移(图 2), 表明偶联成功。

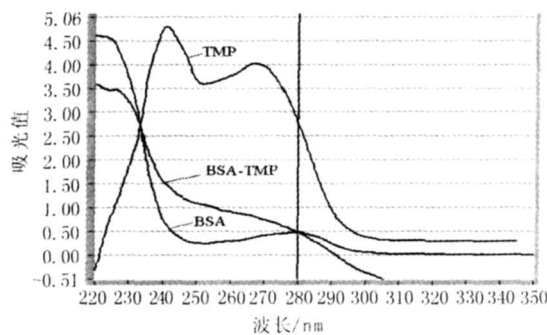
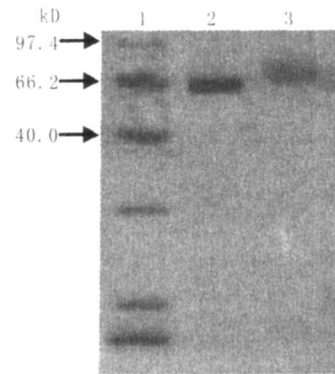


图2 BSA、TMP 和 BSA-TMP 的紫外扫描光谱

2.2 SDS-PAGE 鉴定结果

SDS-PAGE 电泳结果表明, BSA 的泳动速度大于 BSA-TMP(图 3), 说明 BSA-TMP 的分子量大于 BSA, 证明 TMP 与 BSA 已成功偶联。



1. 蛋白质 Marker; 2. BSA; 3. BSA-TMP

图3 BSA-TMP 偶联物的 SDS-PAGE 鉴定图谱

2.3 间接 ELISA 测定 pAb 效价结果

间接 ELISA 检测结果表明, 免疫的 3 只小鼠血清抗体效价均达到了 10^{-3} (表 1), 说明 BSA-TMP 获得了较好的免疫效果, 其中 2 号小鼠最高血清效价为 $1:1.28 \times 10^4$ 。

表 1 三免后 10 d 小鼠血清效价

小鼠序号	抗血清稀释倍数							阴性对照	空白对照
	200	400	800	1 600	3 200	6 400	12 800		
1	2.934	1.913	1.328	0.998	0.786	0.245	0.110	0.083	0.067
2	2.823	2.132	1.764	1.021	0.678	0.321	0.223	0.085	0.071
3	2.102	1.576	1.118	0.897	0.456	0.189	0.098	0.076	0.073

3 讨论

TMP 分子量只有 290.32 Da, 为半抗原, 本身没有免疫原性, 不会激发动物免疫系统产生特异抗体, 需要和载体蛋白连接起来构成人工免疫原才可以用于制备抗 TMP 抗体的疫苗。对于带有氨基的半抗原与载体蛋白的偶联一般采用重氮化法、戊二醛法和 EDC 法, 在前期工作中, 笔者也利用 GA 法和 EDC 法制备了相应的免疫原和包被抗原, 但其免疫效果较差, 难以产生高效价的抗体。本试验结果进一步证实了重氮化法适用于芳香胺而 GA 法适合于脂肪胺的报道^[19]。一定长度的间隔臂的介入, 有助于半抗原结构的暴露, 有利于特异性抗体的产生, 间隔臂过长可形成新的抗原表位, 易被细胞识别而产生桥抗体, 间隔臂过短则载体蛋白的空间位阻会影响细胞对半抗原的识别, 不产生特异性抗体^[17]。本试验以 -N=N- 作间隔臂, 长度适宜, 既产生了针对 TMP 的特异性抗体, 又避免了桥抗体的出现。本试验成功合成了 TMP 人工抗原, 免疫 BALB/c

小鼠制备出高效价的 pAb, 为抗 TMP 单克隆抗体 (mAb) 的研制和 TMP 免疫学分析方法的建立奠定了基础。

参考文献:

- [1] Alonso M D, Marcos C, Davila I, *et al.* Hypersensitivity to trimethoprim[J]. *Allergy*, 1992, 47(4): 340-342.
- [2] Choi M J, Fernandez P C, Patnaik A, *et al.* Trimethoprim-Induced hyperkalemia in a patient with AIDS [J]. *N Engl J Med*, 1993, 328(10): 703-706.
- [3] Lai W G, Zahid N, Uetrecht J P. Metabolism of trimethoprim to a reactive iminoquinone methide by activated human neutrophils and hepatic microsomes[J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 1999, 291(1): 292-299.
- [4] Ono T, Sekiya T, Takahashi Y, *et al.* The genotoxicity of diaveridine and trimethoprim [J]. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 1997, 3(4): 297-306.
- [5] Campagnolo E R, Johnson K R, Karpati A, *et al.* Antimicrobial residues in animal waste and water resources proximal to large-scale swine and poultry feeding operations[J]. *The Science of the Total Environment*,

- 2002, 299(1-3): 89-95.
- [6] 农业部畜牧兽医局. 农业部发布动物性食品中兽药最高残留限量[J]. 中国兽药杂志, 2003, 37(4): 15-20.
- [7] Pereira A V, Cass Q B. High-performance liquid chromatography method for the simultaneous determination of sulfamethoxazole and trimethoprim in bovine milk using an on-line clean-up column[J]. Journal of Chromatography B, 2005, 826(1-2): 139-146.
- [8] Renew J E, Huang C H. Simultaneous determination of fluoroquinolones, sulfonamides, and trimethoprim antibiotics in wastewater using tandem solid phase extraction and liquid chromatography-electrospray mass spectrometry [J]. Journal of Chromatography A, 2004, 1042(1/2): 113-121.
- [9] Croubels S, Wassink P, De Backer P. Simultaneous determination of sulfadiazine and trimethoprim in animal feed by liquid chromatography with UV and tandem mass spectrometric detection[J]. Analytica Chimica Acta, 2002, 473(1/2): 183-194.
- [10] Zhang G, Wang X, Zhi A, *et al.* Development of a lateral flow immunoassay strip for screening of sulfamonomethoxine residues[J]. J Food Additives & Contaminants: Part A, 2008, 25(4): 413-423.
- [11] Zhang G P, Wang X N, Yang J F, *et al.* Development of an immunochromatographic lateral flow test strip for detection of [beta] -adrenergic agonist clenbuterol residues[J]. Journal of Immunological Methods, 2006, 312(1/2): 27-33.
- [12] 王翀, 魏松红, 李兴海, 等. 甲拌磷人工抗原的合成及多克隆抗体制备[J]. 河南农业科学, 2009(3): 56-59.
- [13] 刘庆堂, 职爱民, 张改平, 等. 磺胺二甲基嘧啶人工抗原的合成及鉴定[J]. 河南农业科学, 2008(2): 91-94.
- [14] Sambrook J, Fritsch E, Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual[M]. NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- [15] Tijssen P. Practice and theory of enzyme immunoassay[M]. Amsterdam: Elsevier, 1985.
- [16] 李林生. 戊二醛与蛋白质反应的特点[J]. 中国皮革, 1997(5): 12-14.
- [17] Wie S L, Hammock B D. Comparison of coating and immunizing antigen structure on the sensitivity and specificity of immunoassays for benzoylphenyl urea insecticides[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1984, 32(6): 1294-1301.
- (上接第 95 页)
- [5] 崔保安, 陈红英, 张素梅, 等. 猪 α 干扰素在大肠杆菌中的表达及抗病毒活性检测[J]. 西北农林科技大学学报, 2008, 36(4): 41-46.
- [6] Tian Kegong, Yu Xiuling, Zhao Tiezhu, *et al.* Emergence of fatal PRRSV variants; unpar-alleled outbreaks of atypical PRRS in China and molecular dissection of the unique hallmark[J]. J PLoS ONE, 2007, 2: 1-10.
- [7] 孙鏊国, 马云, 胡方建. 猪用干扰素对繁殖障碍与呼吸道综合征的疗效观察[J]. 中国畜牧兽医, 2007, 34(6): 96-97.
- [8] 陈雪梅, 薛清华, 祝荣格, 等. 猪 I 型与 II 型干扰素的克隆、表达及抗病毒活性比较[J]. 生物工程学报, 2009, 25(6): 806-812.
- [9] 田晓辉, 王爱萍, 乔松林, 等. 猪繁殖与呼吸障碍综合征病毒 ORF5 基因的克隆与表达[J]. 河南农业科学, 2009(2): 102-106.
- [10] 刘玉华, 陈光明. 猪繁殖障碍性疾病的病因及防控[J]. 现代农业科技, 2007(24): 165-166.
- [11] 韩素珍, 梁风, 许从义, 等. 猪繁殖与呼吸综合征的流行特点及防治措施[J]. 现代农业科技, 2006(6): 166.