

文章编号: 1004 - 7271(2002)04 - 0362 - 05

# 诺氟沙星与牛血清白蛋白及卵清蛋白结合物的合成

周大勇, 戚晓玉, 陈舜胜, 周培根

(上海水产大学食品学院, 上海 200090)

**摘要:**采用碳二亚胺法制备诺氟沙星与牛血清白蛋白(BSA)的结合物,作为诺氟沙星酶联免疫用的免疫原。经紫外光谱法测定,每分子牛血清白蛋白连接的诺氟沙星分子数为 16.1 个。分别用碳二亚胺法和混合酞酐法制备诺氟沙星与卵清蛋白(OA)的结合物,作为诺氟沙星酶联免疫测定用的包被抗原。经紫外光谱法测定,每分子卵清蛋白连接的诺氟沙星分子数分别为 5.8 和 1.9 个。

**关键词:**诺氟沙星;牛血清白蛋白;卵清蛋白;酶联免疫吸附测定

**中图分类号:**R967      **文献标识码:**A

## The synthesis of norfloxacin-bovine serum albumin and norfloxacin-ovalbumin conjugates

ZHOU Da-yong, QI Xiao-yu, CHEN Shun-sheng, ZHOU Pei-gen

(College of Food Science, Shanghai Fisheries University, Shanghai 200090, China)

**Abstract:**The antigenic conjugate of norfloxacin and bovine serum albumin (BSA) was prepared by carbodiimide method. 16.1 norfloxacin residues were linked to a molecule of the BSA in the conjugate by method of UV spectrum. The conjugates of norfloxacin-ovalbumin (OA) used for coating antigen were synthesized by carbodiimide method and mixed anhydride method, respectively. The number of norfloxacin residues per molecule of the conjugates was 5.8 and 1.9.

**Key words:** norfloxacin; bovine serum albumin (BSA); ovalbumin (OA); ELISA

诺氟沙星(norfloxacin, NFLX)是氟喹诺酮类抗菌素,具有广谱性和强烈的抑菌作用,目前已广泛应用于临床,以及畜牧和养殖业。然而,它在食品中的残留以及引起病原菌的耐药性问题已受到人们的关注和重视。

测定诺氟沙星在食品中残留的方法大多采用高效液相色谱法<sup>[1,2]</sup>。但是,该法对测定样品的前处理不仅复杂,而且重复性较差,加之仪器昂贵而难以普及。一种利用免疫学原理发展起来的酶联免疫吸附测定法(ELISA)具有专一性强、操作简便、以及可适用于大规模检测等优点,已被广泛应用于农药、激素及其它化学残留物的检测<sup>[3-5]</sup>,但未见有诺氟沙星酶联免疫吸附测定法的报道。为了建立检测诺氟沙星残留量的酶联免疫吸附测定法,必须将不具有免疫原性的诺氟沙星分子共价连接到生物大分子上形成具有免疫原性的全抗原。通过化学方法合成具有免疫原性的诺氟沙星与牛血清白蛋白(BSA)的结合物,以及诺氟沙星与卵清蛋白(OA)的结合物用作于 ELISA 的包被抗原。

收稿日期: 2002-06-20

作者简介: 周大勇(1976-),男,江苏宜兴人,上海水产大学 2000 级硕士研究生,专业方向为水产食品学。E-mail: dyzhou@shfu.edu.cn

## 1 材料与方法

### 1.1 仪器与试剂

#### 1.1.1 试剂

诺氟沙星(NFLX),牛血清白蛋白(BSA,MW:68000),卵清蛋白(OA,MW:45000)乙基[3-(二甲氨基)丙基]碳二亚胺盐酸(EDC·HCl),三硝基苯磺酸(TNBS)均为 Sigma 公司产品;二甲基甲酰胺(DMF)、二环乙基碳二亚胺(DCC)均为 Amersco 产品;三丁胺,氯甲酸异丁酯(BASF 产品),羟基琥珀酰亚胺(NHS),二氧杂环己烷均为分析纯;Sephadex-G75(Pharmacia 产品)。磷酸缓冲生理盐水(PBS)含有 0.14mol/L NaCl 的 10mmol/L 磷酸缓冲液(pH7.4)。

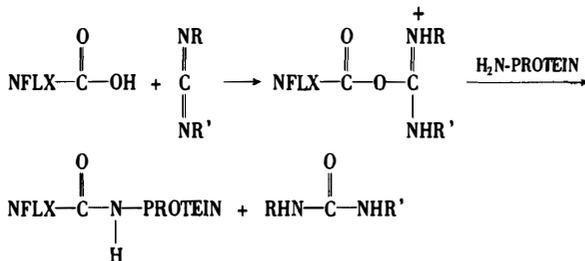
#### 1.1.2 仪器

紫外分光光度计(UV-2102PC;Unico);高速离心机(SPRVALL RC5C PLUS)

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 诺氟沙星与牛血清白蛋白(BSA)的共价偶联

采用碳二亚胺法<sup>[6,7]</sup>,并略作改进,反应历程如下:



称取诺氟沙星 14.1mg、羟基琥珀酰亚胺 20.3mg、乙基[3-(二甲氨基)丙基]碳二亚胺盐酸盐 50.8mg (或二环乙基碳二亚胺 54.6mg)溶于 8.0mL 二甲基甲酰胺(DMF)中,搅拌过夜,得到诺氟沙星反应液。

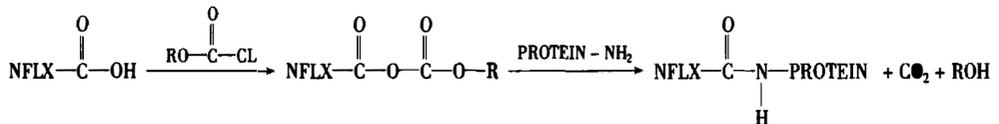
称取牛血清白蛋白(BSA)50.0mL PBS(0.01mol/L, pH7.4)中,然后将上述反应液滴加到此 BSA 溶液,在 4℃下搅拌过夜后,对 PBS 透析 2~3d,离心(20 000g)30min,取上清液,真空冷冻干燥。

将干燥后的样品溶解于少量体积 PBS 中,经凝胶层析(Sephadex-G75,50X1.4cm)纯化,以 PBS(0.01 mol/L, pH7.4)洗脱,收集对应蛋白质峰洗脱液,经真空冷冻干燥后测定蛋白质含量,于 -20℃保存备用。

#### 1.2.2 诺氟沙星与卵清蛋白(OA)的共价偶联

(1) 碳二亚胺法: 在 1.2.1 中除了以 70mgOA 代替 50mgBSA 外,其余步骤均相同。

(2) 混合酸酐法<sup>[8]</sup>并略作改进。反应历程如下:



称取诺氟沙星 10.0mg 溶于 15mL 二氧杂环己烷中,加入 7.5μL 三丁胺,在低温下加入 4μL 氯甲酸异丁酯,反应 30min。

称取卵清蛋白(OA)70.0mg 溶解于 50mL 水中,用 0.1mol/L NaOH 溶液调 pH 至 8.5,将上述反应液滴加到蛋白质溶液中,在充分搅拌下反应 2h,透析,经凝胶柱层析纯化(条件向前)后,真空冷冻干燥得到的蛋白质样品,测定蛋白质含量,于 -20℃下保存备用。

### 1.3 蛋白质含量测定

蛋白质含量测定按 Lowry 法<sup>[9]</sup>进行,以 BSA 作为标准蛋白。

## 1.4 诺氟沙星与载体蛋白连接的测定

### 1.4.1 紫外光谱法

参照 Erlanger 等<sup>[10]</sup>的方法进行。

### 1.4.2 三硝基苯磺酸法(TNBS 法)

按 Habeeb<sup>[11]</sup>进行,但 TNP——蛋白质溶液的测定波长由文献中的 335nm 改为 420nm。

## 2 结果

### 2.1 诺氟沙星与 BSA 及 OA 结合物的定性鉴定

诺氟沙星与 RSA 以及与 OA 两种结合物、BSA、OA 和游离的诺氟沙星的紫外吸收光谱如图 1、2 所示。从图中可以看出,诺氟沙星在波长 273nm 处有最大吸收峰,在波长 323nm 和 335nm 处也有较强的吸收。BSA 和 OA 在波长 280nm 处有最大吸收峰,而在 300nm 以上几乎没有紫外吸收。

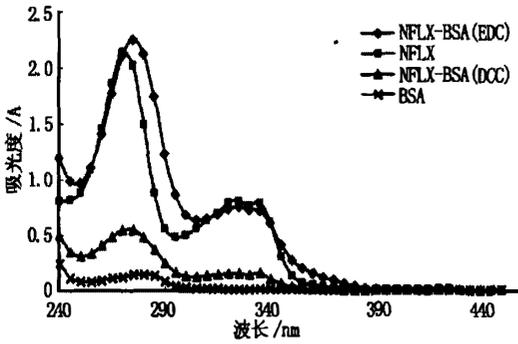


图 1 BSA、NFLX 及其结合物在 PBS (0.01mol/L, pH 7.4) 中的紫外光谱

Fig.1 The UV spectra of BSA, NFLX and its conjugates in PBS(0.01mol/L, pH 7.4)

- 注:1. NFLX-BSA(EDC):用水溶性碳二亚胺(EDC)制备的诺氟沙星与 BSA 的结合物(蛋白质浓度:0.22mg/mL)  
2. NFLX:诺氟沙星(0.0186mg/mL,  $5.82 \times 10^{-2}$ mmol/L)  
3. NFLX-BSA(DCC):用脂溶性碳二亚胺(DCC)制备的诺氟沙星与 BSA 的结合物(蛋白质浓度:0.22mg/mL)  
4. BSA(0.22mg/mL)

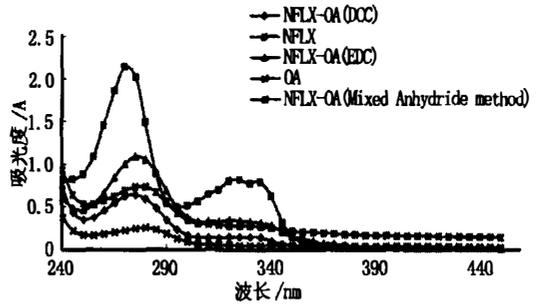


图 2 OA、NFLX 及其结合物在 PBS (0.01mol/L, pH 7.4) 中的紫外光谱

Fig.2 The UV spectra of OA, NFLX and its conjugates in PBS(0.01mol/L, pH 7.4)

- 注:1. NFLX:诺氟沙星(0.0186mg/mL,  $5.82 \times 10^{-2}$ mmol/L)  
2. NFLX-OA(EDC):用水溶性碳二亚胺(EDC)制备的诺氟沙星与 OA 的结合物(蛋白质浓度:0.17mg/mL)  
3. NFLX-OA(DCC):用脂溶性碳二亚胺(DCC)制备的诺氟沙星与 OA 的结合物(蛋白质浓度:0.21mg/mL)  
4. NFLX-OA (Mixed Anhydride Method):用混合酞酐法制备的诺氟沙星与 BSA 的结合物(蛋白质浓度:0.45mg/mL)  
5. ●A(0.21mg/mL)

然而,可以看到两种结合物的紫外吸收光谱与诺氟沙星、BSA 和 OA 的吸收光谱有明显的不同。结合物的最大吸收峰波长在 276nm,并且在 323~335nm 间具有明显的紫外吸收,这与诺氟沙星在此波长范围表现出的吸收特征一致。这一结果说明两种结合物上均偶联上了诺氟沙星。

### 2.2 诺氟沙星与 BSA 及 OA 连接数目的测定

#### 2.2.1 紫外光谱法的测定结果

诺氟沙星与 BSA 及 OA 的连接数目可根据结合物与 BSA 或 OA 在波长 323nm 处的紫外吸收的差值,按下列公式进行计算。诺氟沙星在 PBS 中的摩尔消光系数为  $\epsilon_{323\text{nm}} = 14\ 100\ \text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ 。计算结果见表 1。

$$\text{诺氟沙星连接数} = \frac{\text{OD}_{323\text{conjugate}} - \text{OD}_{323\text{protein}}}{\text{诺氟沙星摩尔消光系数}(\epsilon_{323\text{nm}})} / \text{蛋白质浓度}(\text{mol/L})$$

### 2.2.2 TNBS 法的测定结果

以 BSA 作工作曲线,按每分子 BSA 有 60 个游离氨基计,游离氨基在波长 420nm 的摩尔消光系数为  $\epsilon_{420\text{nm}} = 1260 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ 。

诺氟沙星与 BSA 连接数 = 60 - NFLX-BSA 结合物游离氨基数。

诺氟沙星与 OA 连接数 = 20 - NFLX-OA 结合物游离氨基数。

诺氟沙星连接数测定结果见表 1。

表 1 载体蛋白质的诺氟沙星连接数目

Tab.1 The number of norfloxacin residues conjugated to protein carriers

化合物	O. D <sub>323</sub>	诺氟沙星连接数	
		紫外扫描法	TNBS 法
NFLX	0.822		
BSA 0.22mg/mL	0.024		
OA 0.21mg/mL	0.044		
OA 0.45mg/mL	0.198		
NFLX-BSA(EDC)	0.761	16.1	26.4
NFLX-BSA(DCC)	0.164	3.1	
NFLX-OA(EDC)	0.340	5.8	7.8
NFLX-OA(DCC)	0.144	1.6	
NFLX-OA(混合酸酐法)	0.462	1.9	

## 3 讨论

### 3.1 诺氟沙星与 BSA 及 OA 偶联部位的选择

通常分子量低于 1000 的物质是不具有免疫原性的,需要与载体蛋白偶联形成结合物后方能具有免疫原性。诺氟沙星分子较小,分子量为 319.3(图 3)。它必须与载体蛋白偶联,才能成为全抗原。氟喹诺酮类抗菌素在化学结构上具有某些共同点,即在喹啉环的 6-位碳原子上引入一个氟原子,在 7-位碳原子上连接一个亲水的哌嗪基。这些基团的引入增强了沙星类抗菌素的抗菌活性,拓宽了抗菌谱。这是由于氟原子增强了对革兰氏阳性(Gram<sup>+</sup>)菌的抗菌性,而哌嗪基因增强了对假单胞菌的抗菌性<sup>[12]</sup>。可以认为,哌嗪基和氟原子是诺氟沙星抗菌的活性基团。然而,氟喹诺酮类抗菌素在结构上也有区别,主要是在 1-位氮原子连接的基团不同,例如环丙沙星连接的基团是环丙基,其抗菌活性优于诺氟沙星。从诺氟沙星分子结构来看,至少有 3 个基团可供为偶联的部位,即哌嗪环上的亚氨基、3-位碳原子的羧基和 4-位碳原子的羰基。考虑到哌嗪环是抗菌活性基团,以及羧基较易与蛋白质的氨基形成肽键,因此选择诺氟沙星的羧基作为与载体蛋白的偶联基团。

在建立 ELISA 时,一般使用的载体蛋白有 BSA、人血清蛋白(HAS)与血蓝蛋白(KLH)等,其中以使用 BSA 最为常见。这是因为它具有大量的反应基团,如氨基、羧基等,并且能在水相或某些有机溶剂的混合物中充分溶解,使偶联反应可在较高浓度的反应物存在条件下进行。除此以外,它的价格较低廉,易为大多数实验室购用。据文献报道,每分子 BSA 有 60 个游离氨基,每分子 OA 有 20 个游离氨基<sup>[13]</sup>,可以和诺氟沙星的羧基反应形成肽键。

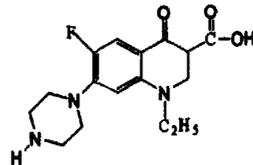


图 3 诺氟沙星的分子结构

Fig.3 The molecular structure of norfloxacin

### 3.2 水溶性碳二亚胺与脂溶性二亚胺的偶联效果比较

在表1中可以看到,分别采用水溶性碳二亚胺(EDC)和脂溶性碳二亚胺(DCC)合成的诺氟沙星与BSA以及与OA的两种结合物中的诺氟沙星分子数目有较大的差别。根据紫外光谱法的计算结果,用水溶性碳二亚胺(EDC)合成的两种结合物中每个蛋白质分子上连接的诺氟沙星分子数分别为16.1和5.8个,而用脂溶性碳二亚胺(DCC)合成的两种结合物中的诺氟沙星分子数分别为3.1和1.6个。这一结果说明,水溶性碳二亚胺偶联诺氟沙星的效果明显优于脂溶性碳二亚胺。造成这种差别的原因可能是由于本实验中使用DMF作为反应溶剂。DMF是极性很强的有机溶剂,在这种反应溶剂中,EDC与诺氟沙星的反应可能要比DCC与诺氟沙星的反应更为充分,所以偶联的效果要好。

### 3.3 碳二亚胺法和混合酸酐法偶联效果比较

从表1中也可看到,用混合酸酐法合成的诺氟沙星与OA的结合物中诺氟沙星的连接数为1.9个,这与脂溶性碳二亚胺(DCC)的偶联效果(诺氟沙星连接数为1.6个)没有显著的差异。然而用水溶性碳二亚胺(EDC)进行诺氟沙星与OA偶联,其效果(诺氟沙星连接数为5.8个)明显优于前面的两种偶联方法。

### 3.4 两种测定诺氟沙星连接数方法的比较

据文献报道<sup>[14]</sup>,用紫外光谱法测定的半抗原与载体蛋白的连接数目一般要比它的实际值低。用紫外光谱法测定诺氟沙星的连接数目是在假定诺氟沙星在波长323nm的摩尔消光系数和诺氟沙星-蛋白质结合物在同一波长的摩尔消光系数相同的前提下计算得出的。但在图1、2中显示,结合物的吸收峰的波长已向长波方向漂移,这就使得诺氟沙星在原吸收峰波长处的吸光度测定值变小,这是造成结果比实际值偏低的主要原因。

同样,用TNBS法测定诺氟沙星连接数的准确性也受很多因素的影响。首先,蛋白质分子自身具有游离的羧基和氨基,在反应中蛋白质分子之间也会发生交联。其次,在诺氟沙星与载体蛋白偶联过程中,除了它与赖氨酸的 $\epsilon\text{-NH}_3^+$ 共价结合外,也有可能和载体蛋白分子的其它基团结合。因此,用TNBS法测定诺氟沙星的连接数目可能会比它的实际数值偏高。

### 参考文献:

- [1] Griggs D J, Wise R. A simple isocratic high-pressure liquid chromatographic assay of quinolones in serum[J]. J Antimicrob Chemother, 1989, 24(3):437-445.
- [2] Davis J D, Aarons L, Houston J B. Simultaneous assay of fluoroquinolones and theophylline in plasma by high-performance liquid chromatography[J]. J Chromatogr, 1993, 621(1):105-109.
- [3] Chen T, Dwyre-Gymax C, Hadfield S T, et al. Development of an enzyme-linked immunosorbent assay for a broad spectrum triazole fungicide: hexaconazole[J]. J Agric Food Chem, 1996, 44:1352-1356.
- [4] Singh P, Ram B P, Sharkov N. Enzyme immunoassay for screening of sulfamethazine in swine[J]. J Agric Food Chem, 1989, 37:109-114.
- [5] Schneider P, Hammock B D. Influence of the ELISA format and the hapten-enzyme conjugate on the sensitivity of an immunoassay for s-triazine herbicides using monoclonal antibodies[J]. J Agric Food Chem, 1992, 40:525-530.
- [6] Sheehan J C, Gess G P. A new method of forming peptide bonds[J]. J AM Chem Soc, 1955, 77:1067-1068.
- [7] Goodfriend T L, Levine L, Fasman G D. Antibodies to bradykinin and angiotensin: a use of carbodiimides in immunology[J]. Science, 1964, 144:1344-1346.
- [8] Vauhan J R, Osato R L. The preparation of peptides using mixed carbonic-carboxylic acid anhydrides[J]. J AM Chem Soc, 1952, 74:676-678.
- [9] Lowry O H, Rosebrough N j, Farr A. L, et al. Protein measurement with the folin phenol reagent[J]. J Biol Chem, 1951, 193:265-275.
- [10] Erlager B F, Borek F, Beiser S M, et al. Steroid-protein conjugates[J]. J Biol Chem, 1959, 234:1091-1094.
- [11] Habeeb A F S A. Determination of free amino groups in proteins by trinitrobenzenesulfonic acid[J]. Anal Biochem, 1966, 14:328-336.
- [12] Wolfson J S, Hooper D C. Mode of action of the quinolone antimicrobial agents: review of recent information[J]. Rev Infect Dis, 1989, 2:378-424.
- [13] Felix Hourwitz. The Chemistry and Function of Protein [M]. New York: Academic Press Inc, 1963. 190.