

头孢噻呋人工牛血清抗原的合成 与原子力显微镜鉴定

张冲, 王建华*, 王从周

(重庆大学 生物工程学院, 重庆 400044)

摘要: 采用 N-羟基琥珀酰亚胺与双环己基碳酰二亚酰胺联用的方法将兽药头孢噻呋与牛血清白蛋白偶联, 得到头孢噻呋人工牛血清抗原。通过十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)、电喷雾质谱(ESI-MS)证实头孢噻呋人工牛血清抗原合成成功, 计算得到头孢噻呋与牛血清蛋白的结合比约为 8, 并首次尝试将原子力显微镜(AFM)应用于头孢噻呋人工牛血清抗原的表征。

关键词: 头孢噻呋; 人工抗原; 原子力显微镜

中图分类号: O766.1; S852.43 文献标识码: A 文章编号: 1004-4957(2011)09-1013-05

doi: 10.3969/j.issn.1004-4957.2011.09.011

Synthesis of Ceftiofur Artificial Bovine Serum Albumin Antigen and Its Identification by Atomic Force Microscope

ZHANG Chong, WANG Jian-hua*, WANG Cong-zhou

(Bioengineering College of Chongqing University, Chongqing 400044, China)

Abstract: The ceftiofur artificial antigen was synthesized by conjugating ceftiofur to BSA with n-hydroxysuccinimide and N, N-dicyclohexyl carbodiimide. The synthesis product was characterized by the traditional sodium lauryl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis(SDS-PAGE) and electrospray ionization mass spectrometric(ESI-MS) method. The result showed that the ceftiofur artificial bovine serum albumin antigen was successfully prepared and the binary complex ratio of ceftiofur to BSA was about 8. Herein, atomic force microscope(AFM) was firstly used to characterize the ceftiofur artificial antigen.

Key words: ceftiofur; artificial antigen; atomic force microscope(AFM)

头孢噻呋(Ceftiofur, CEF)是首个动物用头孢类抗生素,主要用于治疗牛、羊、猪、禽等动物的细菌性疾病,在兽医临床上的应用非常广泛,因此其食品中的残留问题也日益受到关注。目前检测头孢噻呋残留的常用方法有紫外分光光度法、高效液相色谱法等^[1],但这些方法或操作复杂,或分析成本较高、耗时长。免疫分析是以抗原与抗体特异性结合为基础的分析技术,具有选择性强、灵敏度高、操作简单、适于大量样品快速筛选和检测的特点,是较理想的兽药残留分析检测手段。目前几乎所有重要的兽药都已建立或尝试建立免疫测定方法^[2]。稳定的、具有良好免疫原性的头孢噻呋人工抗原的合成是应用免疫分析检测头孢噻呋残留的前提和重要步骤。

人工抗原的合成主要包括半抗原的设计、载体选择和半抗原与载体的偶联等步骤^[3]。其表征方法主要有紫外光谱、聚丙烯酰胺凝胶电泳、基质辅助激光解析飞行时间质谱等。相对于以上传统方法,原子力显微镜(AFM)由于具有较高的分辨率(横向分辨率达0.5~1 nm,纵向分辨率达0.1~0.2 nm)和二维、三维成像能力,可在分子水平上研究样品的物理化学特性,并能够在近生理环境以及原位液态环境下实时观测样品^[4]。本文采用原子力显微镜对人工抗原微观层面进行了研究。通过 N-羟基琥珀酰亚胺与双环己基碳酰二亚酰胺联用的方法将兽药 CEF 与牛血清白蛋白(BSA)偶联,得到 CEF-BSA 抗原;根据 ESI-MS 谱获得 BSA 与 CEF-BSA 的分子量以及 CEF 与 BSA 的结合比;并采用 AFM 进一步考察了 BSA 与 CEF-BSA 的形貌图、三维立体图和均方根糙度。研究结果表明,AFM 图可更加直观和全

收稿日期: 2011-04-11; 修回日期: 2011-06-21

基金项目: 国家科技支撑计划资助项目(2007BAD51B05)

* 通讯作者: 王建华, 教授, 研究方向: 药物合成与生物医学工程研究, Tel: 023-65102507, E-mail: wjh@cqu.edu.cn

面地展现人工抗原的表面特性。

1 实验部分

1.1 材料与仪器

头孢噻唑(98%, 齐鲁制药); 牛血清白蛋白(BSA)、环己基碳酰二亚酰胺(DCC)、1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)-碳化二亚胺盐酸盐(EDC)、N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)、16-巯基棕榈酸(MHA)均为 Sigma Aldrich Chemical 产品; 考马斯亮蓝 R-250(Sigma 公司); 磷酸盐缓冲液(PBS, Merck 公司): 140 mmol/L NaCl, 3 mmol/L KCl, pH 7.4; 乙醇(优级纯, Merck); 超纯水(电阻率为 18.2 MΩ, Millipore 纯化水系统); 其他试剂均为国产分析纯。

35 mm 透析袋(截留分子量 14 000, 百灵威化学技术有限公司), KQ-50DB 型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司), GS-800 Calibrated Densitometer 扫描仪(上海百维生物有限公司), DYCZ-28A型电泳槽、电泳仪(北京六一仪器设备厂), Flexi-Dry 型冷冻干燥机(美国 FTS 公司), 串联质谱用 Finnigan LCQ^{DECA}型质谱仪(美国 Finnigan 公司), 原子力显微镜(本原 CSPM 5000 型 SPM); 1.6 μm 扫描器; 商用 Si₃N₄ 探针(共振频率约为 250 kHz)。

1.2 头孢噻唑人工牛血清抗原(CEF-BSA)的合成

准确称取头孢噻唑 31.5 mg、NHS 16.9 mg、DCC 45.0 mg, 依次加入 3 mL 二氯甲烷中, 充氮气保护, 搅拌, 室温下反应 8 h, 反应结束后氮气吹干, 以 5 mL PBS 洗涤得溶液 A; 称取 BSA 50 mg, 溶于 5 mL PBS, 得溶液 B。4 °C 搅拌条件下向溶液 B 中每 20 min 滴加 1 mL 溶液 A, 反应 5 h, 反应液转入透析袋, 0~4 °C 下超声处理 30 min, 于 PBS(pH 7.4) 中透析 3 d, 每 24 h 更换 1 次透析液并进行超声处理。透析结束后将反应液转出, -20 °C 冷冻, 冻干得到 CEF-BSA, 4 °C 保存备用。反应式如图 1。

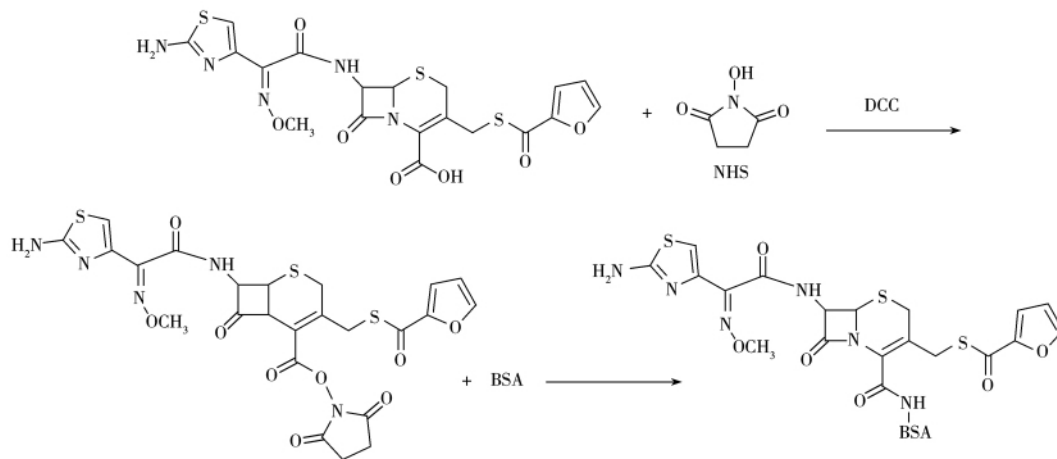


图 1 CEF-BSA 的合成步骤

Fig. 1 Steps in preparation of CEF-BSA

1.3 头孢噻唑人工牛血清抗原的鉴定

1.3.1 CEF-BSA 的聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)鉴定 采用含量为 5%~15% 的线性梯度胶, 各取 BSA 和 CEF-BSA 8 μg 分别与等量缓冲溶液混合均匀后上样。基层胶电压 80 V, 待指示剂移至分离胶后, 将电压升至 120 V, 制剂室接近下端后关闭电源。20% 的三氯乙酸固定 0.5 h, 考马斯亮蓝 R-250 染色 2 h 以上。用乙酸-乙醇-水(1:2:7)脱色, 期间换液数次, 直至背景干净。用 GS-800 Calibrated Densitometer 扫描成像, Quantity One 软件进行条带分析和图像处理。

1.3.2 人工抗原的原子力显微镜鉴定 AFM 成像在 PBS 缓冲液环境下进行, 工作模式为轻敲模式, 扫描范围设置为 1 μm × 1 μm, 扫描频率为 2.0 Hz。AFM 测试所得图像用 AFM 自带图像分析软件 Imager 4.60 分析。

经处理的空白金片(空白金片的前处理参照文献[5])浸入 Piranha 溶液(体积比 3:1 的 H₂SO₄-H₂O₂) 30 min 以除去表面的有机物。清洗后的金片在 1 mL 的 MHA 乙醇溶液中浸泡 24 h, 自组装形成

有序的 MHA 单分子膜, 依次用无水乙醇、超纯水冲洗后于高纯氮气流中吹干。MHA 膜的羧基在 2 g/L NHS 和 2 g/L EDC 的 PBS 溶液中活化 1 h 后成酯。控制温度在 4 °C, 活化后的 MHA 膜分别在 10 mg/L 的牛血清白蛋白和 CEF-BSA 的 PBS 溶液中反应 12 h。最后, 将分别形成的 BSA 和 CEF-BSA 单分子层保存在 4 °C 下并尽快测试^[6]。

1.3.3 人工抗原结合比的电喷雾质谱测定 质谱条件: 电喷雾(ESI)离子源, 采用正离子扫描方式, 毛细管电压 4 500 V, 干燥气(N₂)流速 4.0 L/min, 雾化气(N₂)流速 5.0 L/min, 干燥气温度 180 °C, 质量扫描范围 m/z 50~3 000, 进样方式为蠕动泵直接进样, 流速 5 μ L/min。

分别取 BSA、人工抗原适量, 均采用甲醇-超纯水(体积比 1:1)溶解。

2 结果与讨论

2.1 头孢噻呋人工牛血清抗原的合成产率

冻干后, 得 CEF-BSA 47.2 mg。计算得到产物与反应物(81.5 mg)的质量比为 57.9%, 该产率与其他人工抗原的产率相近^[7-8]。这是因为反应投样量少, 经多次操作处理后损失较大, 故产率较低。

2.2 CEF-BSA 与 BSA 的 SDS-PAGE 电泳图

CEF-BSA 及 BSA 的 SDS-PAGE 结果如图 2 所示, CEF-BSA 电泳带迁移率明显低于其载体 BSA 的迁移率, 说明 CEF-BSA 的分子量大于 BSA 的分子量, 证明偶联成功。由于反应不能绝对均衡, 每分子 BSA 结合的头孢噻呋分子数有波动, 这也解释了 CEF-BSA 电泳条带拖尾的现象。由图 2 可读出 CEF-BSA 分子量约 70 ku, BSA 的分子量不易估计, 但样品的标示分子量为 66 ku, 可估算 BSA 与头孢噻呋的结合比约为 8。

2.3 电喷雾质谱的测定结果

BSA 与 CEF-BSA 的电喷雾质谱图均为一系列多电荷峰(见图 3), 软件转化后得两者的分子量分别为 66 431 和 70 471。已知头孢噻呋的分子量为 524, 与 BSA 偶联后连接部位为 507, 则 BSA 与头孢噻呋的结合比为 8 ($70\ 471 \sim 66\ 431/507 \approx 8$)。所得 CEF-BSA 符合杨利国等^[9]推荐的最佳结合比范围(5~20), 具有较好的免疫原性, 适于经动物获得相应的单克隆抗体, 建立兽药头孢噻呋免疫分析程序。

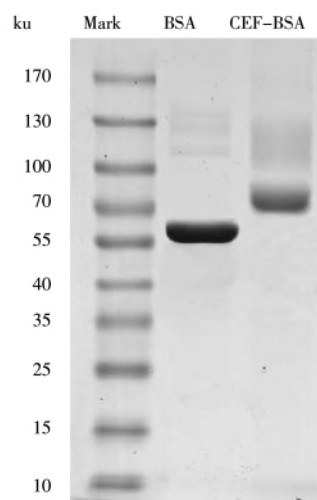


图 2 CEF-BSA 及 BSA 的 SDS-PAGE 电泳图

Fig. 2 SDS-PAGE electrophoresis of BSA and CEF-BSA

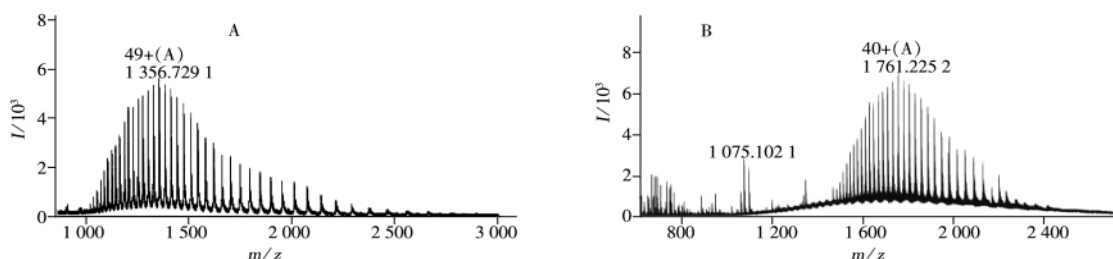


图 3 BSA (A) 和 CEF-BSA 的多电荷质谱图(B)

Fig. 3 Multiply charged ESI-MS chromatograms of BSA (A) and CEF-BSA (B)

2.4 BSA 及 CEF-BSA 的二维形貌图、三维立体图及均方根糙度(Sq)、高度分析

在轻敲模式下, 悬臂以与其共振频率相近的频率振动, 探针间歇地击打样品表面, 对样品进行成像扫描。当探针靠近样品时, 其顶端的原子与样品表面原子间的作用力使悬臂的共振频率发生改变, 共振频率改变的信号经转化后, 由 AFM 自带图像分析软件分析得出 BSA 和 CEF-BSA 的均方根糙度(Sq)分别为 1.87 nm 和 1.46 nm。

分别对 BSA 和 CEF-BSA 样品进行 AFM 扫描, 获得两者的二维形貌图和三维图(见图 4~5), 其图像尺寸为 1 000.00 nm × 1 000.00 nm。

对比图4中BSA与CEF-BSA的二维形貌图可见,图4A中凸起的颗粒较完整,排列较疏松,图4B中凸起的颗粒大多数仅部分结构暴露于表面,排列相对紧密。产生这一现象的原因可能是:BSA在MHA单分子表层形成均匀的单分子层^[10],并均匀地自组装于MHA膜表面,蛋白质分子间的空隙较大。而偶联多个头孢噻唑分子后,蛋白质分子间的侧向空隙变小(即偶联上的头孢噻唑分子填补了BSA分子之间的间隙),空间相对拥挤,因此相对图4A,图4B颗粒暴露部分更小且排列更紧密。同时,偶联上的头孢噻唑分子增加了BSA分子侧向的相互吸引,这也导致后者形貌图排列紧密,而且由于偶联上的头孢噻唑分子填补了BSA分子之间的间隙,使得后者在表面形貌上相对平坦,沟壑较浅,其均方根粗糙度降低。

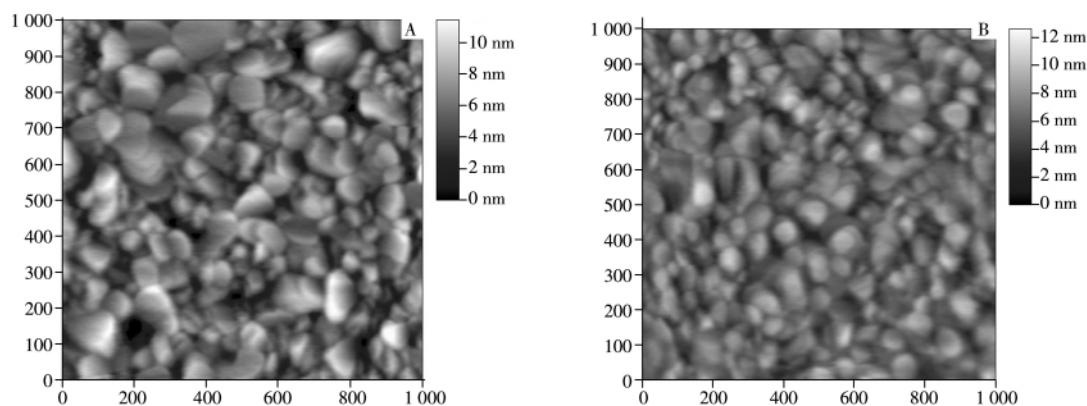


图4 BSA(A)和CEF-BSA(B)的二维形貌图
Fig.4 2D features of BSA(A) and CEF-BSA(B)

从BSA和CEF-BSA的三维立体图(图5)中可观察到,两者人工抗原单分子层的最高高度(包含MHA的高度)分别为11.40 nm和12.59 nm,差异明显。研究表明在保持两种样品制备、测试条件相同的情况下,头孢噻唑分子与BSA的偶联会增加单分子层的三维高度,进一步佐证了CEF与BSA偶联成功。

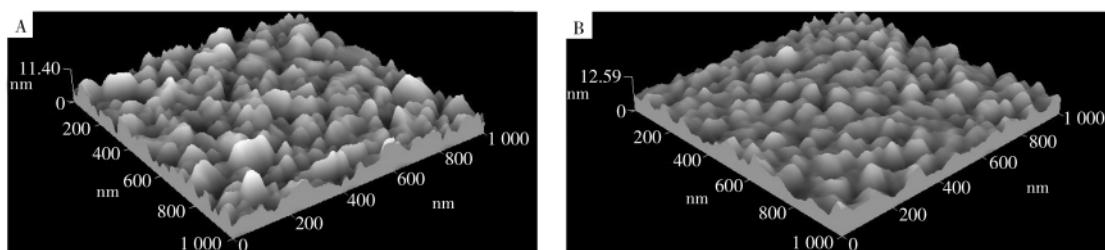


图5 BSA(A)和CEF-BSA(B)的三维立体图
Fig.5 3D features of BSA(A) and CEF-BSA(B)

3 结论

在近生理条件下采用N-羧基琥珀酰亚胺与双环己基碳酰二亚酰胺联用的方法将兽药头孢噻唑与牛血清白蛋白偶联,并通过SDS-PAGE和ESI-MS证实头孢噻唑人工牛血清抗原合成成功,计算得头孢噻唑与BSA的结合比为8。AFM观测显示CEF-BSA单分子层较BSA单分子层排列紧密,分子层层高更高且具有较小的均方根粗糙度。两者在形态上有较大差异,因此AFM可为人工抗原的表征提供一个新的选择。

参考文献:

- [1] Jiang W, Fang X M, Tang Y F, Pang G F, Tao N P. *J. Instrum. Anal.* (姜维, 方晓明, 唐毅锋, 庞国芳, 陶宁萍. 分析测试学报), **2008**, 27(2): 178-180.
- [2] Gong X J. *Xinjiang Xu Mu Ye* (宫秀杰. 新疆畜牧业), **2008**, 6: 54-61.
- [3] Wang J H, Zhang C. *Chin. J. Appl. Chem.* (王建华, 张冲. 应用化学), **2011**, 28(4): 367-375.
- [4] Humphris A D L, Miles M J, Hobbs J K. *Appl. Phys. Lett.*, **2005**, 86(3): 34-36.

- [5] Lü Z J, Wang J H, Deng L H. *Nanoscale Res. Lett.*, **2009**, 4: 1403 – 1408.
- [6] Lü Z J, Wang J H, Deng L H. *Nanoscale Res. Lett.*, **2010**, 5: 1032 – 1038.
- [7] Shan S J, Tanaka H Y, Shoyama Y H. *Anal. Chem.*, **2001**, 73: 5784 – 5790.
- [8] Sakai T, Shinahara K, Torimaru A, Tanaka H, Shoyama Y, Matsumoto K. *Anal. Sci.*, **2004**, (20): 279 – 283.
- [9] Yang L G, Hu S C, Wei P H, Guo A Z. *Enzyme immunoassay*. Nanjing: Nanjing University Press (杨利国, 胡少昶, 魏平华, 郭爱珍. 酶免疫测定技术. 南京: 南京大学出版社), **1998**: 280.
- [10] Lü Z J, Chen G P, Wang J H. *J. Biomed. Eng.* (吕正检, 陈国平, 王建华. 生物医学工程学杂志), **2010**, 27 (3): 692 – 695.

《理化检验 – 化学分册》2012 年征订启事

《理化检验 – 化学分册》杂志创刊于 1963 年, 是由上海材料研究所与机械工程学会理化检验分会联合主办的技术类刊物, 主要报道材料的化学分析与仪器分析专业领域中的新方法、新技术、新设备以及国内外的研究方向。“面向生产、注重实用、反映动向、兼顾普及”是刊物的编辑方针, 旨在最大程度地满足不同层次读者的需要。涉及的领域为机械、冶金、石油化工、环境科学、生命科学等。主要栏目有“试验与研究”、“工作简报”、“知识与经验介绍”、“综述”、“专题讲座”、“读者园地”、“动态与信息”等。

《理化检验 – 化学分册》为国内理化检验行业权威刊物, 中国期刊方阵中双效期刊。已被列为全国中文核心期刊、中国科技论文统计用期刊、美国“CA 千种表”中我国化学化工类核心期刊、中国学术期刊(光盘版)和中国期刊网全文数据库及美国工程信息公司 Ei Page One 数据库收录期刊。

本刊为月刊, 大 16 开本, 每月 18 日出版, 由邮局征订向国内外公开发行, 邮发代号: 4 – 182, 每册定价: 15.00 元, 全年 12 期共 180.00 元。

本刊已于 2006 年 12 月开通网上远程投稿系统, 欢迎大家登录 www.mat-test.com 进行网上投稿。

欲订阅本刊的单位与个人, 请尽快到当地邮政局(所)办理订阅手续, 切勿贻误。

本刊地址: 上海市邯郸路 99 号, 邮编: 200437, 电话: 021 – 65556775 – 263, 021 – 55882970, 传真: 021 – 65544911, E-mail: hx@mat-test.com 或 mppnc@81890.net。