

# 动物组织中氟苯尼考残留的半定量快速检测胶体金试纸条的研制 ——氟苯尼考抗原的合成与鉴定

孙素玲, 徐园芳 (安徽科技学院动物科学学院, 安徽凤阳 233100)

**摘要** [目的] 为动物组织中氟苯尼考残留快速检测试纸条的制备奠定基础。[方法] 采用琥珀酸酐法制备氟苯尼考人工半抗原, 用活波酯法将氟苯尼考人工半抗原与牛血清蛋白进行偶联制备氟苯尼考人工抗原。紫外光谱法和光谱分析法对氟苯尼考人工抗原 FFC-HS-BSA 进行鉴定。[结果] 与 BSA 和 FFC 相比, FFC-HS-BSA 的最大吸收峰发生了变化, 曲线形状也发生了改变, FFC-HS 与 BSA 的偶联比为 18.9:1。[结论] FFC-HS-BSA 人工抗原的合成是成功的, 其偶联比在最适范围内。

**关键词** 氟苯尼考; 人工抗原; 琥珀酸酐法; 活波酯法; 偶联比

**中图分类号** S859.84 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2014)23-07757-02

## Development Colloidal Gold Test Strip of Rapid Semi-quantitative Detection of Florfenicol Residues in Animal Tissues—Synthesis and Identification of Florfenicol Antigen

SUN Su-ling et al (College of Animal Sciences, Anhui Science and Technology University, Fengyang, Anhui 233100)

**Abstract** [Objective] To lay the foundation for the preparation of animal tissues florfenicol residue test strip for rapid detection. [Method] Florfenicol antigen was synthesized by using the succinic anhydride method. Florfenicol synthesized antigen were prepared with the active ester method florfenicol artificial hapten conjugated to bovine serum proteins. Florfenicol synthesized antigen were identified by UV spectroscopy and spectroscopic analysis. [Result] FFC-HS-BSA compares with BSA and FFC, the maximum absorption peak of the FFC-HS-BSA changed. The shape of the curve of FFC-HS-BSA also changed. FFC-HS and BSA coupling ratio is 18.9:1. [Conclusion] Synthesis of FFC-HS-BSA artificial antigen was successful, the coupling ratio was within its optimum range.

**Key words** Florfenicol; Synthesized antigen; Succinic anhydride method; Active ester method; Coupling ratio

氟苯尼考是酰胺醇类第 3 代动物专用抗菌药, 具有广谱、高效、吸收好、体内分布广、无致再生障碍性贫血作用等特点, 作为氯霉素的替代药物被广泛用于治疗畜禽的细菌性疾病<sup>[1]</sup>, 还用作猪的饲料添加剂来预防和治疗猪的细菌性疾病<sup>[2]</sup>。研究表明, 氟苯尼考具有胚胎毒性和耐药性, 在畜禽生产上的大量应用也导致其在畜禽产品中残留, 危害公众健康。欧盟、日本等国均制定了动物食品中氟苯尼考的最大残留量标准, 我国农业部 235 号公告也对其残留限量做出了严格规定。

目前, 检测动物性食品中氟苯尼考残留的检测方法主要是色谱分析法<sup>[3-4]</sup>和免疫分析方法(如酶联免疫吸附试验(ELISA)和 ELISA 试剂盒等)<sup>[5]</sup>。色谱分析法具有准确、敏感的优点, 但也具有检测需要时间长、样品前处理比较复杂、操作烦琐、需要特殊的仪器、成本高等缺点。免疫分析法具有简便、灵敏度高、特异性好等优点。动物组织中氟苯尼考残留的半定量快速检测胶体金试纸条制备是属于免疫分析方法, 建立氟苯尼考残留免疫分析方法最关键的一步是氟苯尼考人工抗原的合成。笔者对氟苯尼考人工抗原进行合成与鉴定, 为氟苯尼考抗体的制备及动物组织中氟苯尼考残留快速检测试纸条的制备奠定基础。

### 1 材料与方法

#### 1.1 材料

**1.1.1 主要试剂。** 氟苯尼考, 纯度 $\geq 99.0\%$ , 购自武汉三汇医药化工有限公司; 牛血清白蛋白(BSA), 含量 $\geq 98\%$ , 购自

上海源聚生物科技有限公司; 琥珀酸酐, AR 级, 含量 $\geq 99\%$ , 购自陕西省渭南市惠丰化学工业有限责任公司; N,N-二甲基甲酰胺(DMF), AR 级, 购自天津市大茂化学试剂厂; N-羧基琥珀酰亚胺(NHS, 含量 $\geq 99\%$ ), AR 级, 购自上海金穗生物科技有限公司。

**1.1.2 主要仪器。** YP600 型电子天平, 购自上海精密科学仪器有限公司; BCD-502F 型冰箱, 购自青岛海尔冰箱股份有限公司; TLD80-2B 型离心机, 购自上海安亭科学仪器厂; 752 型紫外分光光度计, 购自南京麒麟分析仪器有限公司; JB-1A 搅拌机(雷磁), 购自上海梦汉实业有限公司。

#### 1.2 方法

##### 1.2.1 氟苯尼考人工抗原的制备。

**1.2.1.1 氟苯尼考-半琥珀酸酯(FFC-HS)的制备**<sup>[6]</sup>。参照文献[6]方法, 氟苯尼考(FFC) 6.0 g、琥珀酸酐 4.5 g 搅拌溶于 45 ml 无水吡啶中, 60 °C 回流反应 24 h, 旋转蒸发器中蒸去吡啶, 用 60 ml 乙酸乙酯复溶蒸干物, 转至 250 ml 分液漏斗中, 待溶液分层后, 用 0.5 mol/L HCl 40 ml 洗涤 3 次, 三蒸水 40 ml 洗涤 3 次, 得到橙红色溶液。减压浓缩上述溶液, 避光真空干燥 48 h 后得到粉红色单酯粗品 FFC-HS。

**1.2.1.2 FFC-HS 与 BSA 的偶联(活泼酯法)**<sup>[7]</sup>。参照文献[7]的方法, 用 4 ml 的 N,N-二甲基甲酰胺溶解 500 mg 的半抗原, 再加入 270 mg N-羧基琥珀酰亚胺和 460 mg N,N-二环己基碳酰亚胺, 室温避光搅拌 24 h。将反应液 2 000 r/min 离心 10 min, 弃去沉淀, 上清液即为制备的氟苯尼考活化中间产物。将氟苯尼考活化中间产物在搅拌下逐滴加到含 100 mg BSA 的 16 ml PBS 中, 搅拌 1 h 后转至 4 °C 下搅拌 48 h。4 °C 搅拌下, 用 pH7.4 的 0.01 mol/L PBS 透析, 每 8 h 换液 1 次, 透析 2 d。2 000 r/min 离心 10 min, 取上清液得到 FFC-

基金项目 安徽科技学院自然科学研究项目(ZRC201425)。

作者简介 孙素玲(1958-), 女, 安徽砀山人, 教授, 从事兽药残留检测的研究。

收稿日期 2014-06-27

HS-BSA 人工抗原。小量分装,  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  下保存。

### 1.2.2 氟苯尼考人工抗原的鉴定。

**1.2.2.1** FFC-HS-BSA 溶液的蛋白浓度测定(双缩尿法)<sup>[8]</sup>。根据文献[8]的方法,将透析好的 FFC-HS-BSA 适当稀释后,测定在 260 和 280 nm 波长处的吸光度值,按照以下公式计算蛋白浓度:蛋白浓度(mg/ml) =  $1.45OD_{280\text{ nm}} - 0.74OD_{260\text{ nm}}$ 。

**1.2.2.2** 紫外光谱法鉴定 FFC-HS-BSA 人工抗原的合成。氟苯尼考在紫外区能产生明显的吸收光谱。用 PBS 将 BSA、透析好的 FFC-HS-BSA 均配成 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  质量浓度,用甲醇溶解 FFC 配成 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  质量浓度。FFC 用甲醇作参比,其余均用稀释液 PBS 作参比,在 200~400 nm 紫外光区对 FFC-HS-BSA 溶液、BSA 溶液和 FFC 溶液进行光谱扫描,通过数据和图谱的对比可证明偶联成功与否。

**1.2.2.3** FFC-HS-BSA 人工抗原结合比的测定(光谱分析法)<sup>[9]</sup>。根据上述用紫外分光光度计测定出的 FFC 的最大吸收波长,在 FFC 最大吸收波长下测定 FFC-HS-BSA 和 BSA 的吸光度值,按照以下公式计算 FFC-HS-BSA 人工抗原结合比:

$$\begin{aligned} \text{结合比} &= \frac{\sum \text{偶联物} - \sum \text{蛋白质}}{\sum \text{半抗原}} \\ &= \frac{(A_{\text{偶联物}} - A_{\text{蛋白质}}) \times C_{\text{半抗原}} \times M_{\text{蛋白质}}}{A_{\text{半抗原}} \times M_{\text{半抗原}} \times C_{\text{蛋白质}}} \end{aligned}$$

式中,  $A$  为吸光度;  $M$  为相对分子质量;  $C$  为质量浓度/(mg/ml)。

## 2 结果与分析

### 2.1 氟苯尼考人工抗原的鉴定

**2.1.1** FFC-HS-BSA 溶液的蛋白浓度。经双缩尿法测定的 FFC-HS-BSA 中蛋白质质量浓度为 3.30 mg/ml。

**2.1.2** 紫外光谱法鉴定 FFC-HS-BSA 人工抗原的合成。从图 1 可以看出, FFC 在 233 nm 波长处有最大吸收峰, BSA 在 214 nm 波长处有最大吸收峰, FFC-HS-BSA 在 229 nm 波长处有最大吸收峰。FFC-HS-BSA 与 BSA 和 FFC 相比,不但最大吸收峰发生了变化,曲线形状也发生了改变,表明 FFC-HS-BSA 人工抗原的合成是成功的。

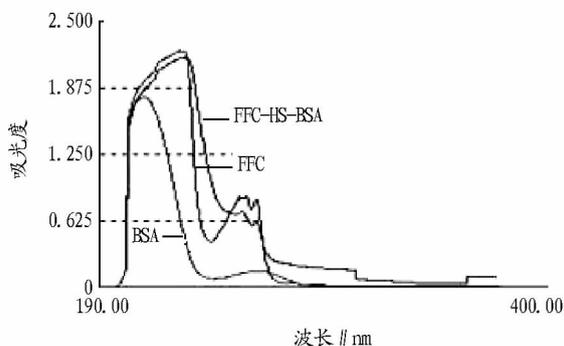


图1 FFC、BSA 和 FFC-HS-BSA 的紫外扫描图谱

**2.1.3** FFC-HS-BSA 人工抗原结合比。根据紫外扫描图, FFC 的最大吸收波长为 233.0 nm, 在 233.0 nm 波长处测定

的 FFC-HS-BSA 与 BSA 的吸光度分别为 1.077 和 0.44, 计算出的 BSA 与半抗原的结合比为 18.9:1。

## 3 讨论

人工抗原的合成在兽药残留的免疫分析方法中是最关键的环节,人工抗原的质量直接决定着抗体的效价和特异性<sup>[9]</sup>。FFC 是半抗原,本身并不具备免疫原性,必须和载体蛋白偶联才能成为完全抗原。FFC 分子结构中没有与载体蛋白连接的功能性基团氨基( $-\text{NH}_2$ )和羧基( $-\text{COOH}$ ),必须先对 FFC 分子结构进行改造成具有氨基或者羧基。笔者利用 FFC 分子结构上所带的羟基( $-\text{OH}$ ),用琥珀酸酐作“间隔臂”,将其改造成具有羧基( $-\text{COOH}$ )的活性半抗原 FFC-HS。为了防止载体蛋白之间的交叉反应,笔者选用 BSA 作为载体蛋白,用活泼酯法将 FFC-HS 的羧基与载体蛋白 BSA 上的氨基相联,合成含 CO-NH 键的 FFC-HS-BSA 人工抗原。

FFC 与载体蛋白的偶联效果如何将直接影响 FFC-HS-BSA 人工抗原的免疫效果,笔者利用紫外扫描法和 FFC-HS 与载体蛋白之间的结合比测定对 FFC-HS-BSA 偶联效果进行分析。紫外扫描法结果表明 FFC-HS-BSA 与 BSA 和 FFC 相比,不仅最大吸收峰发生了变化,而且曲线形状也发生了改变,表明人工抗原 FFC-HS-BSA 的合成是成功的。人工抗原的特异性还与其载体蛋白上连接的半抗原数目有关。通常每个载体蛋白上含有 8~25 个半抗原时能取得较好的免疫效果<sup>[9-11]</sup>。笔者测定了 FFC-HS-BSA 人工抗原结合比,计算出 BSA 与 FFC-HS 的结合比为 18.9:1,属于最适结合比范围之内,从理论上来看应该得到效价较高的抗体。笔者采用低速离心和透析来提高 FFC-HS-BSA 人工抗原的纯度,离心除去变性的载体蛋白,用 PBS 对 FFC-HS-BSA 透析 2 d, 除去了未反应的氟苯尼考、琥珀酸酐等小分子,保证了 FFC-HS-BSA 人工抗原的纯度。

## 参考文献

- [1] 李孝文,章洪敏,宋文超,等. 氟苯尼考研究进展及其在猪场使用建议[J]. 用药指南,2012(8):52-56.
- [2] 邱银生,吴佳. 兽用光谱抗菌药氟甲砜霉素[J]. 中国兽药杂志,1996,30(2):47-48.
- [3] 孙丰云,张素霞,沈建忠,等. 虾肉中氯霉素甲砜霉素氟苯尼考及氟苯尼考胺残留气相色谱-微电子捕获检测法[J]. 中国兽医杂志,2006,42(10):66-67.
- [4] 魏海涛,方秋华,曾振玲,等. 高效液相色谱法测定猪血浆中氟苯尼考含量[J]. 广东畜牧兽医科技,2010,35(3):31-33.
- [5] 冯才茂,贾瑜,马孝斌,等. 氟苯尼考残留的酶联免疫检测方法的研究[J]. 北京工商大学学报:自然科学版,2012,30(4):50-53.
- [6] 骆鹏杰,张素霞,梁春来,等. 氟苯尼考人工抗原的合成与鉴定[J]. 中国兽医杂志,2009,45(9):87-89.
- [7] 赵朋玲,郑海涛,姜盼盼,等. 两种方法制备氟苯尼考人工抗原及其鉴定[J]. 食品科学,2010,31(15):225-230.
- [8] 陈钧辉,陶力,李俊,等. 生物化学实验[M]. 北京:科学出版社,2003:197-199.
- [9] 孙法良,刁有祥,刘悦竹,等. 氟苯尼考人工抗原的合成与鉴定[J]. 福建农业学报,2009,24(1):24-28.
- [10] 荣康泰,徐勤惠,李根令,等. 半抗原与载体的最佳分子结合比[J]. 中国生物化学与分子生物学报,1985,1(2):27-31.
- [11] LI Q X, ZHAO M S, GEE S L, et al. Development of enzyme-linked immunosorbent assays for 4-nitrophenol and substituted 4-nitrophenols[J]. J Agric Food Chem, 1991, 39: 1685-1692.