

甲硝唑半抗原及全抗原合成与鉴定

雷红涛¹, 沈玉栋¹, 刘文字², 邱志超¹, 杨 瑾¹, 孙远明¹

(1 广东省高等学校食品质量安全重点实验室, 华南农业大学 食品质量安全研究所, 广东 广州 510642; 2 华南农业大学 兽医学院, 广东 广州 510642)

摘要:在微波加热条件下,将甲硝唑与琥珀酸酐反应,合成半抗原甲硝唑半琥珀酸酯,氢核磁共振、电喷雾质谱、红外光谱方法的鉴定结果表明,目标半抗原合成成功;通过活泼酯法将半抗原与载体蛋白偶联制备甲硝唑全抗原,紫外光谱法鉴定结果表明,全抗原合成成功。

关键词:甲硝唑; 半抗原; 全抗原; 鉴定

中图分类号:S859

文献标识码:A

文章编号:1001-411X(2007)03-0101-04

Synthesis and Identification of the Hapten and Complete Antigen of Metronidazole

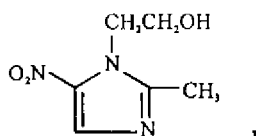
LEI Hong-tao¹, SHEN Yu-dong¹, LIU Wen-zi², QIU Zhi-chao¹, YANG Jin¹, SUN Yuan-ming¹

(1 The Higher Education Key Lab of Guangdong Province - Food Quality and Safety Laboratory; Institute of Food Quality and Safety, South China Agric. Univ., Guangzhou 510642, China;
2 College of Veterinary Medicine, South China Agric. Univ., Guangzhou 510642, China)

Abstract: The hapten metronidazole monosuccinate was synthesized by reacting metronidazole and succinic anhydride under microwave heating. Identification using ¹H nuclear magnetic resonance, electrospray ionization mass and infrared spectrum showed the hapten was successfully synthesized. Then active ester method was used to produce complete antigen of metronidazole, which was confirmed by analysis using ultraviolet spectrum.

Key words: metronidazole; hapten; complete antigen; identification

动物性食品安全与人民身体健康和经济贸易密切相关,药物残留是威胁动物性食品安全的重要因素。甲硝唑(metronidazole, MNZ)又称甲硝咪唑、灭滴灵,化学名为1-(2-羟乙基)-2-甲基-5-硝基咪唑,化学结构为:



其在动物生产上主要用于治疗鸡、火鸡组织滴虫病、牛毛滴虫病,还与其他抗生素联合用于治疗厌氧菌感染^[1]。研究表明,甲硝唑对细菌有诱变作用,对实

验动物具有致癌性^[2],其残留对环境、生物以及人类健康造成的影响也日益引起人们关注^[3]。甲硝唑残留检测目前主要依靠薄层色谱^[4]、色质联用^[5-6]等理化分析方法,虽然结果准确,但检测设备昂贵,需专业操作人员,并且样品前处理繁琐,很难满足批量样品快速检测的要求。免疫分析技术作为一种简单、快速、灵敏、特异、成本低廉的筛选检测方法,近年来在兽药残留分析领域应用越来越多,目前已有多种兽药免疫分析试剂盒问世。本文建立了一种鲜见文献报道的甲硝唑半抗原及全抗原合成方法,该法原料易得,操作简单。以期为进一步制备甲硝唑抗体奠定基础。

收稿日期:2006-10-12

作者简介:雷红涛(1973—),男,副教授,博士;通讯作者:孙远明(1956—),男,教授,博士,E-mail:ymsun@scau.edu.cn

基金项目:国家自然科学基金(20377016);广东省自然科学基金(032240);粤港关键领域重点突破项目(2006A25005002)

3 讨论

目前,有关 PCV2 疫苗研制的报道较少. PCV2 在 PK-15 细胞上可以增殖,但增殖滴度不高,毒价测定须借助免疫过氧化物酶单层试验(IPMA),因此使用全病毒来制备灭活疫苗,操作繁琐,成本高. 基于此,利用基因工程方法获得的疫苗(DNA 疫苗、亚单位疫苗及病毒活载体疫苗)将成为防控该病的重要方向. 目前已有 PCV2 DNA 疫苗、亚单位疫苗和嵌合病毒疫苗的研究报道^[1-3],这些疫苗虽对 PCV2 有较好的免疫效果,但由于 DNA 疫苗的安全隐患、亚单位疫苗的高成本以及嵌合病毒疫苗的低增殖滴度限制了这些疫苗的广泛应用,因此病毒活载体疫苗研究具有重要的现实意义. 笔者在前期研究中,以伪狂犬病毒为载体构建了表达 PCV2 ORF2 蛋白的重组病毒^[8],该研究是对 PCV2 活载体疫苗的一种成功尝试.

本试验在前期成功构建重组病毒 TK⁻/gG⁻/ORF2⁺ 的基础上,对重组病毒在细胞上的增殖特性、遗传稳定性、安全性、免疫原性及保护力进行了研究,结果表明重组病毒的增殖滴度与亲本株相当,遗传稳定性良好,对小鼠安全,可诱导小鼠产生针对 PRV 和 PCV2 的特异性免疫应答,并且对致死剂量 PRV Ea 株强毒的攻击具有很好的免疫保护效果. 本研究未用 PCV2 强毒对免疫小鼠进行攻击,主要是由于小鼠不是 PCV2 感染的模型动物. 在对小鼠进行相关研究的基础上,我们将进一步开展重组病毒对猪的安全性、免疫原性及保护力试验.

为了提高重组病毒的免疫效果,后续研究将对重组病毒进行相应改造,如采用更强的启动子以增加 ORF2 蛋白表达量、加入分子佐剂以提高疫苗免疫效果等,同时对免疫程序进行优化,以期研制出一种安全、有效的基因工程疫苗用于 PRV 和 PCV2 的防控.

参考文献:

- [1] BLANCHARD P, MAHE D, CARIOLET R, et al. Protection of swine against post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) by porcine circovirus type 2 (PCV2) proteins[J]. *Vaccine*, 2003, 21: 4565-4575.
- [2] FENAUX M, OPRIESSING T, HALBUR P G, et al. Immunogenicity and pathogenicity of chimeric infectious DNA clones of pathogenic porcine circovirus type 2 (PCV2) and nonpathogenic PCV1 in weanling pigs[J]. *J Virol*, 2003, 77: 11232-11243.
- [3] KAMSTRUP S, BARFOED A M, FRIMANN T H, et al. Immunization against PCV2 structural protein by DNA vaccination of mice[J]. *Vaccine*, 2004, 22: 1358-1361.
- [4] MULDER W A, PRIEM J, GLAZENBURG K L, et al. Virulence and pathogenesis of non-virulent and virulent strains of pseudorabies virus expressing envelope glycoprotein E1 of hog cholera virus[J]. *J Gen Virol*, 1994, 75 (1): 117-124.
- [5] IDEKINGE H V, WIND N D, WENSVOORT G, et al. Comparison of the protective efficacy of recombinant pseudorabies viruses against pseudorabies and classical swine fever in pigs, influence of different promoters on gene expression and on protection[J]. *Vaccine*, 1996, 14 (1): 6-12.
- [6] JU Chun-mei, FAN Hui-ying, TAN Ya-di, et al. Immunogenicity of a recombinant pseudorabies virus expressing ORF1-ORF2 fusion protein of porcine circovirus type 2[J]. *Vet Microbiol*, 2005, 109: 179-190.
- [7] 陈焕春, 周复春, 方六荣, 等. 伪狂犬病病毒鄂 A 株 TK⁻/gG⁻/LacZ⁺ 突变株的构建[J]. *病毒学报*, 2001, 17: 69-74.
- [8] 琚春梅, 陈焕春, 郝鑫, 等. 表达猪 2 型圆环病毒 ORF2 基因的重组伪狂犬病病毒的构建及鉴定[J]. *中国农业科学*, 2006, 39(8): 1716-1722.
- [9] 琚春梅, 陈焕春, 刘正飞, 等. 应用在大肠杆菌中表达的猪 2 型圆环病毒 ORF2 蛋白建立一种 ELISA 诊断方法[J]. *畜牧兽医学报*, 2004, 35(6): 689-693.

【责任编辑 柴 焰】

2.4 重组病毒 TK⁻/gG⁻/ORF2⁺ 对小鼠的免疫原性

2.4.1 免疫小鼠血清中伪狂犬病毒中和抗体水平

重组病毒和亲本株病毒免疫组在首免后3周均产生了PRV中和抗体,且二者之间差异不显著;在第4周加强免疫后,各组的抗体水平都得到显著的提高,首免后6周及8周与首免后3周相比,差异极显著($P<0.01$),在首免后6周及8周,重组病毒TK⁻/gG⁻/ORF2⁺诱导产生的PRV中和抗体水平分别为1:45.25和1:40.32,与亲本株病毒TK⁻/gG⁻/LacZ⁺同期诱导产生的PRV中和抗体水平基本相当(1:45.25和1:45.26),经*t*检验,差异不显著($P>0.05$).对照组无论首次免疫还是加强免疫都检测不到PRV中和抗体(表2).该结果表明重组病毒和亲本株病毒都能在小鼠体内得到有效的增殖,并诱导产生一定的中和抗体,在加强免疫后,中和抗体水平显著升高,且在首免后第6周左右抗体水平达到高峰.

2.4.2 免疫小鼠血清中PCV2 ORF2蛋白的抗体水平 用PCV2 ELISA方法检测不同时期采集的小鼠血清中的ORF2蛋白抗体,结果显示,重组病毒免疫组在首免后3周,ORF2蛋白抗体仍为阴性;在首免后6周,重组病毒免疫小鼠发生抗体阳转($D_{630\text{ nm}}>0.383$ 为阳性);在首免后8周,ORF2蛋白的抗体得到进一步提高,而亲本株及PBS对照组在免疫后不同时间ORF2蛋白抗体均为阴性(表3).

2.5 重组病毒 TK⁻/gG⁻/ORF2⁺ 免疫小鼠对 PRV Ea 株强毒的攻毒保护效果

免疫PBS的空白对照组小鼠在攻毒后72h出现典型的伪狂犬病发病症状,表现为兴奋性增高,病毒注射部位搔痒,发病动物在12h内死亡,而重组病毒TK⁻/gG⁻/ORF2⁺及其亲本株TK⁻/gG⁻/LacZ⁺免疫组小鼠未发生任何死亡,并且在观察的2周内均表现正常,表明重组病毒与亲本株相比,对伪狂犬病毒具有同样的免疫保护效果(表4).

表2 疫苗免疫后不同时间小鼠体内的PRV中和抗体水平(log₂)¹⁾

Tab.2 Neutralization antibody titers against PRV in mice at different time after vaccination

组别 group	首免后时间 time after first vaccination			
	0周 week 0	3周 week 3	6周 week 6	8周 week 8
TK ⁻ /gG ⁻ /ORF2 ⁺	-	1.33 ± 0.52	5.50 ± 0.84 ^{**}	5.33 ± 0.82 ^{**}
TK ⁻ /gG ⁻ /LacZ ⁺	-	1.00 ± 0.00	5.50 ± 1.22 ^{**}	5.50 ± 1.64 ^{**}
PBS	-	-	-	-

1)“-”示PRV中和抗体为阴性; ** 示同行数据与首免后3周结果相比差异极显著($P<0.01$,*t*-检验)

表3 疫苗免疫后不同时间小鼠体内的ORF2蛋白抗体水平($D_{630\text{ nm}}$)

Tab.3 Antibody titers against ORF2 protein in mice at different time after vaccination

组别 group	首免后时间 time after first vaccination			
	0周 week 0	3周 week 3	6周 week 6	8周 week 8
TK ⁻ /gG ⁻ /ORF2 ⁺	0.216 ± 0.056	0.302 ± 0.063	0.395 ± 0.096	0.543 ± 0.059
TK ⁻ /gG ⁻ /LacZ ⁺	0.144 ± 0.045	0.137 ± 0.057	0.231 ± 0.071	0.281 ± 0.067
PBS	0.135 ± 0.066	0.138 ± 0.049	0.268 ± 0.080	0.244 ± 0.051

表4 疫苗免疫小鼠对致死剂量PRV攻击的保护效果

Tab.4 Protective efficacy of vaccines in mice after challenge with lethal PRV

组别 group	免疫动物数 vaccinated animals	死亡动物数 dead animals	平均死亡时间 average of dead time/h	保护率 pretection rate/%
TK ⁻ /gG ⁻ /ORF2 ⁺	6	0	不死亡	100
TK ⁻ /gG ⁻ /LacZ ⁺	6	0	不死亡	100
PBS	6	6	80 ± 2	0

病毒在增殖的同时可稳定表达外源基因,从而提供对伪狂犬病毒和其他相应传染病的抵抗力.迄今为止,已有多种致病微生物的保护性抗原基因在该病毒中获得稳定表达^[4-6].本研究在前期成功构建重组病毒 TK⁻/gG⁻/ORF2⁺ 的基础上,对病毒的增殖特性、遗传稳定性、安全性、免疫原性及对免疫小鼠的保护力进行测定,为重组病毒疫苗的应用奠定一定的基础.

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 病毒 伪狂犬病毒(PRV)Ea株由华中农业大学动物病毒室分离、保存;伪狂犬病毒 TK⁻/gG⁻/LacZ⁺ 突变株(以下简称亲本株)由华中农业大学动物病毒室周复春博士构建^[7];表达猪2型圆环病毒 ORF2 蛋白的重组伪狂犬病毒 TK⁻/gG⁻/ORF2⁺ (以下简称重组病毒)由笔者构建^[8].

1.1.2 细胞 IBRS-2 细胞、Marc-145 细胞由华中农业大学动物病毒室保存;鸡胚成纤维细胞(CEF)由华中农业大学动物病毒室制备.

1.1.3 试验动物 6~8 周龄的雌性 Balb/c 小鼠购自湖北省医学科学院实验动物中心.

1.1.4 试剂 DMEM 购自 GIBCO BRL 公司;新生牛血清(NCS)购自杭州四季青材料有限公司.

1.2 方法

1.2.1 重组病毒 TK⁻/gG⁻/ORF2⁺ 及亲本株 TK⁻/gG⁻/LacZ⁺ 在不同细胞上的增殖滴度测定 将重组病毒 TK⁻/gG⁻/ORF2⁺ 及亲本株 TK⁻/gG⁻/LacZ⁺ 分别以相同剂量同步接种 IBRS-2 细胞、Marc-145 细胞及 CEF,24 h 后收毒,并用 IBRS-2 细胞测定各自的半数组织细胞感染量(TCID₅₀),比较不同细胞对2种病毒的敏感性 & 2 种病毒的 TCID₅₀ 结果有无差异.

1.2.2 重组病毒 TK⁻/gG⁻/ORF2⁺ 的遗传稳定性研究 将重组病毒 TK⁻/gG⁻/ORF2⁺ 在 IBRS-2 细胞上连续传 15 代,并结合 PCR 方法检测外源基因在重组病毒中的存在情况.

1.2.3 重组病毒 TK⁻/gG⁻/ORF2⁺ 对小鼠的安全

性试验 将重组病毒 TK⁻/gG⁻/ORF2⁺、亲本株 TK⁻/gG⁻/LacZ⁺ 及 PRV Ea 株分别以 10⁷TCID₅₀ 接种 Balb/c 小鼠,每组 6 只,观察 2 周,以评价重组病毒对小鼠的安全性.

1.2.4 重组病毒 TK⁻/gG⁻/ORF2⁺ 对小鼠的免疫原性试验 将重组病毒 TK⁻/gG⁻/ORF2⁺ 及亲本株 TK⁻/gG⁻/LacZ⁺ 分别以 10⁵TCID₅₀ 免疫 Balb/c 小鼠,每组 6 只,4 周后加强免疫 1 次,同时设 PBS 对照组,并于免疫前及免疫后 3、6、8 周分别采血,分离血清,以检测血清中的 PRV 中和抗体水平和 PCV2 ORF2 蛋白的 ELISA 抗体水平^[6,9].

1.2.5 重组病毒 TK⁻/gG⁻/ORF2⁺ 免疫小鼠的攻毒保护试验 在首免后 56 d,用 10⁶TCID₅₀ 的 PRV Ea 株强毒(LD₅₀ = 10⁴TCID₅₀)对免疫小鼠进行攻毒,每隔 12 h 观察小鼠的发病、死亡情况,共观察 2 周.

2 结果与分析

2.1 重组病毒 TK⁻/gG⁻/ORF2⁺ 及亲本株 TK⁻/gG⁻/LacZ⁺ 在不同细胞上的增殖滴度

重组病毒 TK⁻/gG⁻/ORF2⁺ 及亲本株 TK⁻/gG⁻/LacZ⁺ 感染 IBRS-2 细胞、Marc-145 细胞及 CEF 的 TCID₅₀ 见表 1. 从表 1 可以看出,不同细胞对重组病毒及亲本株的敏感程度由强到弱依次为 IBRS-2 细胞、Marc-145 细胞、CEF,并且重组病毒及亲本株在同一细胞上的增殖滴度基本相当,表明 PCV2 ORF2 基因的插入不影响伪狂犬病毒在细胞上的增殖.

2.2 重组病毒 TK⁻/gG⁻/ORF2⁺ 的遗传稳定性

在重组病毒 TK⁻/gG⁻/ORF2⁺ 接种细胞中,每代都可检测到 PCV2 ORF2 基因,表明外源基因已稳定插入到伪狂犬病病毒的基因组中去,连续传 15 代未发生外源基因的丢失.

2.3 重组病毒 TK⁻/gG⁻/ORF2⁺ 对小鼠的安全性

试验结果表明,重组病毒 TK⁻/gG⁻/ORF2⁺ 及其亲本株 TK⁻/gG⁻/LacZ⁺ 接种的小鼠在 2 周内均表现正常,而接种 PRV Ea 株的小鼠全部死亡,由此可见重组病毒 TK⁻/gG⁻/ORF2⁺ 与其亲本株相比,毒力未见增强,并且以 100 倍的免疫剂量接种小鼠时,对小鼠是安全的.

表 1 重组伪狂犬病毒及亲本株在不同细胞上的增殖滴度

Tab. 1 The propagated titer of the recombinant pseudorabies virus and parent virus in different cells mL⁻¹

毒株 strain	IBRS-2 细胞 IBRS-2 cell	Marc-145 细胞 Marc-145 cell	鸡胚成纤维细胞 CEF
TK ⁻ /gG ⁻ /ORF2 ⁺	10 ^{4.1}	10 ^{7.6}	10 ^{6.5}
TK ⁻ /gG ⁻ /LacZ ⁺	10 ^{4.3}	10 ^{7.3}	10 ^{6.6}