

隐孔雀石绿半抗原与全抗原设计、合成及鉴定

沈玉栋, 王 宇, 孙远明, 雷红涛, 王 弘, 肖治理

(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)

摘 要: 从偶联位点、偶联活性基团的性质及半抗原的合成与偶联方法分析, 设计了系列不同结构的半抗原和人工抗原及其合成方法。以 N,N-二甲基苯胺、苯甲醛衍生物为原料, Amberlyst 15 树脂为催化剂, 在温和条件下合成出 3 种隐孔雀石绿半抗原; 进一步采用活泼酯和重氮化法分别将获得的半抗原与牛血清白蛋白(BSA)偶联, 形成相应全抗原。半抗原和全抗原分别经减压硅胶柱色谱及透析纯化后, 采用质谱、核磁共振及紫外扫描光谱等分析手段进行了鉴定, 结果表明半抗原及免疫全抗原均合成成功, 满足了进一步免疫、筛选高质量抗体和建立检测方法的需要。同时, 采用分子模拟手段对抗原表面半抗原决定簇的前线分子轨道分布情况进行了仿真模拟分析, 讨论了前线轨道的分布可能对抗体特性造成的影响, 为进一步的半抗原构效关系研究提供理论支持。

关键词: 孔雀石绿; 半抗原; 全抗原; 合成; 鉴定

Design, Synthesis and Identification of Leucomalachite Green Haptens and Complete Antigens

SHEN Yu-dong, WANG Yu, SUN Yuan-ming, LEI Hong-tao, WANG Hong, XIAO Zhi-li

(Food Quality and Safety Key Laboratory of University of Guangdong Province, Institute of Food Quality and Safety, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract: Several complete antigens were prepared to produce the antibodies for leucomalachite green. Three haptens (4-MGC, 3-MGN and 4-MGN) with different active groups and linker substitution patterns were synthesized facilely with N, N-dimethylaniline and benzaldehyde derivatives as raw materials. The 4-MGC, 3-MGN and 4-MGN were conjugated to bovine serum albumin (BSA) with active ester and diazotization method respectively to form three complete antigens. The ratios of 4-MGC, 3-MGN, and 4-MGN to BSA are proved as 40:1, 15:1 and 13:1 respectively by UV spectra analysis and trinitrobenzenesulfonic acid (TNBS) method. Frontier molecular orbital (FMO) distribution of conjugate mimics was analyzed successfully by molecular modeling. The research lays a foundation for further discovering the structure-activity relations (SAR) of small molecule haptens and developing antibody and immunoassay method.

Key words: malachite green; hapten; complete antigen; synthesis; identification

中图分类号: S859; O625.6

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2008)07-0263-04

孔雀石绿(malachite green, MG)属三苯甲烷类染料, 曾广泛用于预防和治疗各类水产动物的水霉病、鳃霉病和小瓜虫病等^[1]。近年来研究表明, 孔雀石绿在生物体内主要以代谢物隐孔雀石绿(leucomalachite green, LMG)形式存在, 对人体有致畸、致癌和致突变的危险性^[2-4]。

目前, 欧盟及美国等均已禁止孔雀石绿用作渔药。我国也于 2002 年 5 月将孔雀石绿列入《食品动物禁用的兽药及其化合物清单》(农业部公告 193 号)。然而, 受价格低廉及水霉病防治效果较好等利益驱使, 孔雀石绿

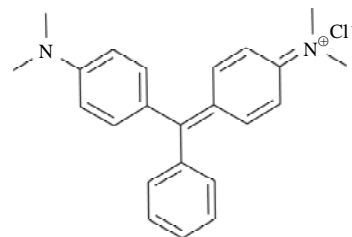


图 1 孔雀石绿结构
Fig.1 Structure of MG

收稿日期: 2007-08-12

基金项目: 广东省自然科学基金项目(06300421); 粤港关键领域重点突破项目(2006A25005002);

华南农业大学校长基金项目(5100-k06133)

作者简介: 沈玉栋(1977-), 男, 讲师, 博士, 主要研究方向为食品安全。E-mail: shenyudong@scau.edu.cn

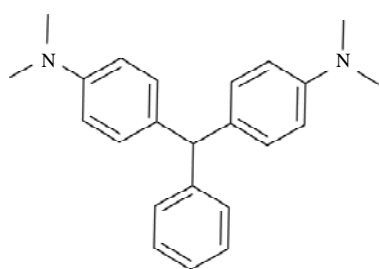


图2 隐孔雀石绿结构
Fig.2 Structure of LMG

非法滥用现象依然严重,由此造成对人体的潜在危害不容忽视。

孔雀石绿及隐孔雀石绿残留检测主要是气相色谱法和高效液相色谱法,设备昂贵,操作繁琐,不适用于现场快速检测^[5]。免疫分析方法近年来在环境、食品安全监测领域逐渐广泛应用的一种快速、高通量、低成本的检测技术,已逐渐成为国际上有毒有害残留物快速筛选检测的主要方法之一。目前,市售免疫检测 ELISA 试剂盒均直接以孔雀石绿为检测对象,而生物体内残留主要以隐孔雀石绿代谢物形式存在,检测过程需要经过复杂繁琐的氧化步骤,操作难度大,稳定性差。因此,发展隐孔雀石绿免疫检测方法,具有重要的意义。本研究旨在合成系列隐孔雀石绿半抗原及全抗原,并进行分子模拟分析,为进一步筛选高质量抗体,阐明半抗原构效关系以及建立隐孔雀石绿免疫检测方法奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

4-羧基苯甲醛 Alfa Aesar 公司; N, N- 二环己基碳二亚胺(DCC)、N-羧基琥珀酰亚胺(NHS)、Amberlyst 15 树脂 ACROS 公司; 牛血清白蛋白(BSA, 65kD)、2, 4,6- 三硝基苯磺酸(TNBS) Sigma 公司; 其他试剂均为市售分析纯。

JB-3 型定时恒温磁力搅拌器 上海雷磁仪器厂; U-3010 紫外可见分光光度计 日本日立公司; DRX-400 核磁共振仪 德国 Bruker 公司; LCQEDCA 液质联用仪 美国 Finnigan 公司。

1.2 隐孔雀石绿半抗原合成(图3)

半抗原 4-MGC 的合成: 取 N, N- 二甲基苯胺 2.50g (0.02mol), 4-羧基苯甲醛 1.50g (0.01mol), 苯 30ml 以及催化量 Amberlyst 15 resin 于 50ml 两口烧瓶中, 氮气保护, 回流搅拌过夜, 减压蒸去溶剂, 粗产物硅胶柱层析纯化得到目标半抗原 4-(双(4-二甲氨基)苯基)甲基)苯甲酸(4-MGC)白色固体。

半抗原 3-MGN 和 4-MGN 合成: 取 N, N- 二甲基苯胺 2.50g (0.02mol), 3-硝基苯甲醛(或 4-硝基苯甲醛)1.53g

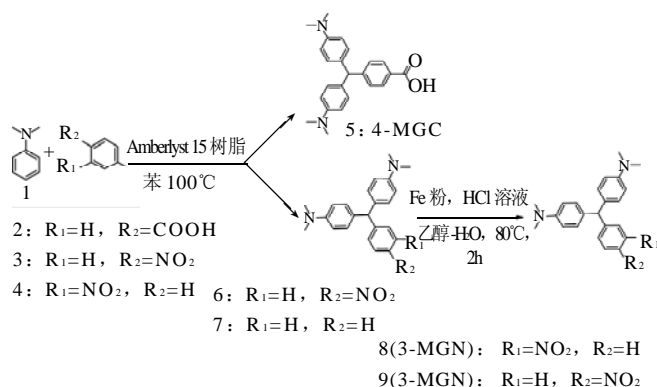


图3 半抗原 4-MGC、3-MGN 和 4-MGN 的合成

Fig.3 Synthesis of haptens 4-MGC, 3-MGN and 4-MGN

(0.01mol), 苯 30ml 以及催化量 Amberlyst 15 树脂于 50ml 两口烧瓶中, 氮气保护, 回流搅拌过夜, 减压蒸去溶剂, 得粗产物 6(或 7)。然后, 在含有粗产物的反应烧瓶中加入 95% 的乙醇 10ml, 搅拌溶解后分别加入铁粉 4.00g(0.07mol), 蒸馏水 20ml, 浓盐酸 1ml。80℃回流搅拌 2h 停止反应, 过滤除去铁粉等沉淀, 减压蒸去溶剂。反应粗产物经硅胶柱层析纯化得到浅黄色固体目标半抗原 3-(双(4-二甲氨基)苯基)甲基)苯胺(3-MGN)[或 4-(双(4-二甲氨基)苯基)甲基)苯胺(4-MGN)]。

1.3 隐孔雀石绿全抗原合成

1.3.1 全抗原 A 的制备

免疫原 4-MGC-BSA(抗原 A)制备: 称取 0.0375g 半抗原 4-MGC 和 N-羧基琥珀酰亚胺(NHS)0.014g 溶于 1.0ml N, N- 二甲基甲酰胺(DMF)中。将 0.025g N, N- 二环己基碳二亚胺(DCC)溶于 1.0ml DMF 中, 磁力搅拌下逐滴加入, 室温搅拌 3.5h 得 A 液。然后在搅拌状态下将 A 液逐滴加入到 BSA 溶液中, 4℃冰箱搅拌反应过夜。4℃下用 9% 的生理盐水透析 3d, 每 4h 换一次透析液。紫外扫描透析液无小分子吸收峰时将产物在无菌条件下通 0.2 μm 的滤膜, 得免疫抗原 A, 分装后, -20℃保存。

1.3.2 全抗原 B 和 C 的制备

免疫原 3-MGN-BSA(抗原 B)和 4-MGN-BSA(抗原 C)的制备: 称取 0.0345g 半抗原 3-MGN(或 4-MGN)于 10ml 称量皿中, 加入 1ml 1.0mol/L 的盐酸溶液, 随后称取 0.0138g NaNO₂ 加入称量皿中, 冰浴搅拌 30min。得到淡黄色液体 A。搅拌状态下将 A 液逐滴加入到 BSA 溶液中, 4℃反应过夜。4℃下用 9% 的生理盐水透析 3d, 每 4h 换一次透析液。紫外扫描透析液无小分子吸收峰时可将产物在无菌条件下通 0.2 μm 的滤膜, 得免疫抗原 B(或 C), 分装于安培瓶中, -20℃保存。

1.4 全抗原鉴定及偶联比测定

参照文献[6]~[8]方法进行。

2 结果与分析

2.1 半抗原的结构鉴定

对半抗原 4-MGC、3-MGN 和 4-MGN 进行了质谱(MS)与核磁共振(NMR)分析, 结果表明 3 个半抗原合成成功。其波谱数据及结构归属如下。

半抗原 4-MGC: ESI-MS m/z : 375($M+H$)⁺; ESI-MS² m/z : 360($M-CH_3+H$)⁺。¹H-NMR(400MHz, d₆-Acetone, TMS): δ 2.90(s, 12H, CH₃), 5.44(s, 1H, CH), 6.69(d, $J=8.7$ Hz, 4H, ArH), 6.96(d, $J=8.7$ Hz, 4H, ArH), 7.26(d, $J=8.2$ Hz, 2H, ArH), 7.95(d, $J=8.2$ Hz, 2H, ArH)。

半抗原 3-MGN: ESI-MS m/z : 346($M+H$)⁺。¹H-NMR(400MHz, d₆-Acetone, TMS): δ 2.88(s, 12H, CH₃), 4.49(s, br, 2H, NH₂), 5.19(s, 1H, CH), 6.35(d, $J=7.6$ Hz, 1H, ArH), 6.43(s, 1H, ArH), 6.47(d, $J=7.90$ Hz, 1H, ArH), 6.66(d, $J=8.7$ Hz, 4H, ArH), 6.91~6.96(m, 5H, ArH)。

半抗原 4-MGN: APCI-MS m/z : 346($M+H$)⁺; APCI-MS² m/z : 331($M-CH_3+H$)⁺。¹H-NMR(400MHz, d₆-Acetone, TMS): δ 2.88(s, 12H, CH₃), 4.45(s, br, 2H, NH₂), 5.19(s, 1H, CH), 6.57(d, $J=8.4$ Hz, 2H, ArH), 6.66(d, $J=8.8$ Hz, 4H, ArH), 6.8(d, $J=8.3$ Hz, 2H, ArH), 6.90(d, $J=8.6$ Hz, 4H, ArH)。

2.2 全抗原鉴定

载体蛋白 BSA 在 280nm 波长处有强吸收, 孔雀石绿半抗原在该波长吸收较弱, 最大吸收位置与载体蛋白不重叠。隐孔雀石绿半抗原、完全抗原、载体蛋白的紫外光谱扫描结果(图 4~6)显示, 完全抗原在 280nm 波长附近均表现出肩峰, 整体波形与相应载体蛋白有较大差异, 明显呈现出相应半抗原吸收峰叠加的特征, 从而说明 3 种完全抗原 A~C 均合成成功^[8]。同时, 参照文献[6]方法从紫外光谱扫描结果进一步分析了完全抗原 A~C 的偶联比分别为 40:1、15:1 和 13:1。另外, 采用三硝基苯磺酸(TNBS)法^[7]测定了完全抗原 A 的半抗原偶

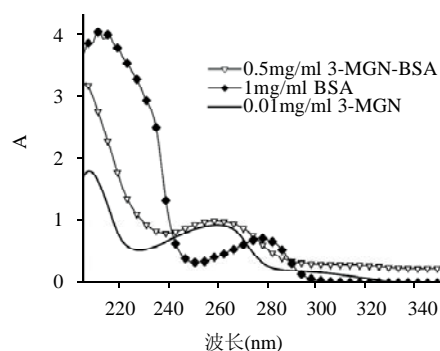


图5 抗原 C 紫外图谱

Fig.5 UV spectogram of antigen C

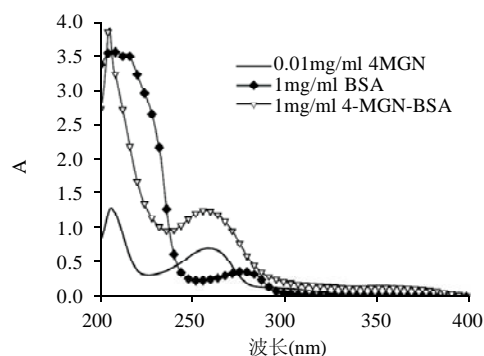


图6 抗原 E 紫外图谱

Fig.6 UV spectogram of antigen E

联比为 39:1, 与紫外光谱法结果一致, 佐证了紫外光谱法的准确性。

2.3 理论计算

根据分子轨道理论, 前线分子轨道(frontier molecular orbital, FMO)及其附近的分子轨道对生物活性影响最大

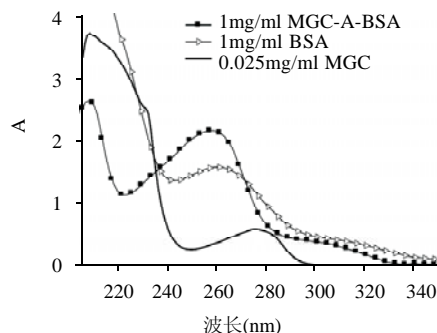


图4 抗原 A 紫外图谱

Fig.4 UV spectogram of antigen A

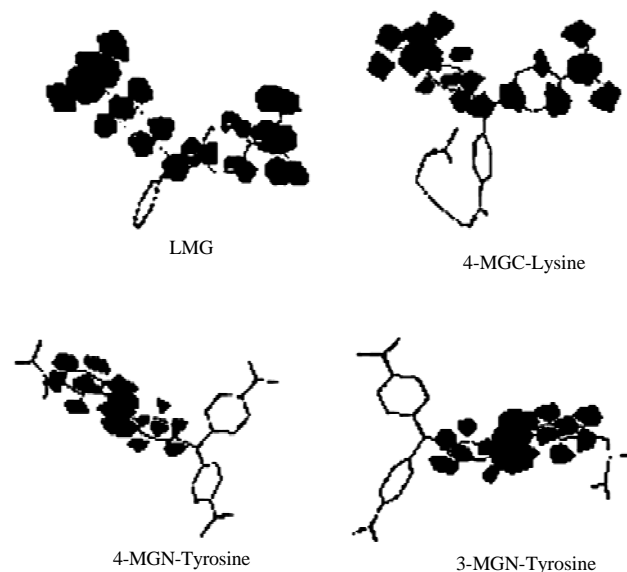


图7 半抗原-载体蛋白偶联模拟物 FMO 分布图

Fig.7 FMO distribution of conjugate mimics

[13-14]。为了考察抗原表面半抗原决定簇微观电子结构对抗体特性影响的规律,研究阐明半抗原的构效关系(structure-activity relationship, SAR),本研究采用 Chem Office 软件包对抗原表面半抗原决定簇模拟物 FMO 分布进行了 Hückel 轨道模拟计算。

羧基衍生的 4-MGC 半抗原一般偶联于载体蛋白表面的赖氨酸氨基残基上,因此,抽取赖氨酸片断与半抗原组成半抗原决定簇模拟物 4-MGC-Lysine 进行仿真模拟计算;氨基重氮化法一般偶联在酪氨酸的酚羟基邻位,因此抽取酪氨酸片断与半抗原组成半抗原决定簇模拟物 4-MGN-Tyrosine 和 3-MGN-Tyrosine 进行仿真模拟计算。

计算结果显示(图 7),半抗原 4-MGC 偶联载体后,FMO 轨道分布与药物 LMG 相比变化不大,而半抗原 4-MGN 和 3-MGN 偶联载体后,其 FMO 分布从二甲氨基取代的苯环区完全转移到了偶联位点区,电子结构发生了较大变化。

3 讨论

3.1 半抗原设计

免疫分析方法研究中,制备高质量抗体是关键,而抗体质量的优劣很大程度上取决于半抗原的结构(宏观立体结构与微观电子结构)是否合理。因此,设计合理的半抗原结构及选择合适的偶联蛋白方式非常重要。文献研究经验表明:制备高特异性抗体所需半抗原及人工抗原应能最大限度的保持药物分子的特征结构。从隐孔雀石绿的结构分析,电子云密度较高的二甲氨基取代的两个苯环系统可能是产生特异性抗体的决定性特征结构区。因此,半抗原设计中采取了远离该药物特征结构区衍生化偶联手臂的策略。同时,为了研究半抗原的构效关系,考察不同衍生化方法及偶联位点对抗体特性的影响,分别在非取代苯环的邻对位引入吸电子性质的羧基和偶联蛋白后扩大共轭体系的氨基活性基团。进一步的模拟计算结果表明:羧基衍生的半抗原偶联蛋白后保持了药物分子的微观特征电子结构(FMO 分布与药物分子一致),可能跟有利于高特异性抗体的产生;氨基衍生的半抗原偶联蛋白后,较大程度改变了药物分子特征电子结构(FMO 分布发生较大变化),可能对产生高特异性抗体产生较大负面影响,深入的理论计算及半抗原构效关系分析有待进一步研究。

3.2 半抗原合成及鉴定

隐孔雀石绿合成通常采用盐酸催化方法进行^[9],该方法在反应过程中发生较多氧化交联副反应,反应产物后处理比较繁琐。本研究尝试采用 Amberlyst 15 树脂催化反应新策略^[10]合成隐孔雀石绿半抗原,该方法条件温和,操作简单,大大减弱了氧化交联副反应的发生,反应产物经简单的蒸馏、重结晶或减压硅胶柱层析,即可方便的得到高纯产物。所有半抗原产物结构及纯度均经过充分的波谱分析鉴定确证。

3.3 全抗原制备及鉴定

分别采用活性酯和重氮化法制备了载体蛋白表面不同半抗原取向的全抗原 A 以及 B 和 C。全抗原的鉴定和

偶联比的测定主要采用了紫外扫描光谱法 TNBS 法^[6-7]。紫外扫描光谱法用于两种组分的吸收光谱不重叠时,进行光谱扫描,推算结合比,可以初步判定全抗原是否合成成功。TNBS 法用来测定载体蛋白含有的游离氨基残基,因偶联后载体蛋白氨基减少,从而推算出两者的结合比,该方法只适用于偶联方法消耗载体蛋白氨基残基的抗原,如完全抗原 A 偶联比的测定。重氮法偶联载体蛋白主要偶联位点在酪氨酸苯环的酚羟基邻位,不消耗氨基残基,因此重氮化法所得抗原 B 和 C 的偶联比不能用 TNBS 法测定。TNBS 法和紫外光谱法测定抗原 A 偶联比结果的一致性佐证了紫外光谱法测定隐孔雀石绿全抗原偶联比的准确性。

4 结论

4.1 设计了 3 种不同结构的 LMG 半抗原,提出了一条 LMG 半抗原高效合成的新策略,并采用质谱、核磁共振等波谱分析手段对合成得到的 3 种半抗原进行成功鉴定。

4.2 通过活泼酯法与重氮化法成功地制备了全抗原 A、B 和 C,并对其进行了紫外扫描光谱鉴定。同时,结合 TNBS 法进一步对抗原偶联比进行了准确分析,为进一步的抗体制备奠定基础。

4.3 通过分子模拟手段成功计算并分析了全抗原表面半抗原决定簇的前线轨道分布特点,为进一步从微观角度进行半抗原构效关系研究提供理论支持。

参考文献:

- [1] AIDERMAN D J. Malachite green: review[J]. Journal of Fish Disease, 1985(8): 289-298.
- [2] SRIVASTAVA S, SINHA R, ROY D. Toxicological effects of malachite green[J]. Aquatic Toxicology, 2004, 66:319-329.
- [3] RAO K V K. Inhibition of DNA synthesis in primary rat hepatocyte cultures by malachite green:a new liver tumor promoter[J]. Toxicology Letters, 1995, 81:107-113.
- [4] CULP S J, BELAND F A, HEFLICH R H, et al. Mutagenicity and carcinogenicity in relation to DNA adduct formation in rats fed leucomalachite green[J]. Mutation Research, 2002, 506/507:55-63.
- [5] 丁涛,徐锦忠,吴斌,等.测定鳙鱼中孔雀石绿、隐性孔雀石绿残留量[J].现代科学仪器,2006(1): 27-29.
- [6] 杨少国,胡少昶,魏华平.酶免疫检测技术[M].南京:南京大学出版社,1998.
- [7] SASHIDHAR R B, CAPOOR A K, RAMANA D. Quantitation of -amino group using amino acids as reference standards by trinitrobenzene sulfonic acid. A simple spectrophotometric method for the estimation of hapten to carrier protein ratio[J]. Journal Immunological Methods, 1994, 167:121-127.
- [8] 陈新建.免疫学技术在植物科学中的应用[M].北京:中国农业大学出版社,1998.
- [9] BONGSUP P C, TIANLE Y, LONNIE R B, et al. Synthesis and characterization of N-demethylated metabolites of malachite green and leucomalachite green [J]. Chemical Research Toxicology, 2003, 16:285-294.
- [10] SHEN Y D, WU H Q, AN L K, et al. Unexpected synthesis of 2,2'-(1-(4-methoxyphenoxy) propane-2, 2-diyl) bis (5-methoxy-3-methylbenzofuran)[J]. Chinese Chemical Letters, 2005, 16:1581-1583.
- [11] 姜凯龄,杨定乔,郭维,等.邻氨基苯甲醛的合成方法[J].合成化学,2005, 13: 520-521.
- [12] BAVIN P M G. Adamantane [Tricyclo[3.3.1.1.3,7] decane][J]. Organic syntheses,1973,1(5):30.
- [13] FUKUI K. Molecular orbitals in chemistry, physics and biology[M]. New York: Academic Press,1964.
- [14] CHEN C Y, LI L M. Theoretical and computational developments[J]. International Journal of Quantum Chemistry, 1983, 23: 1597-1599.