

酸性橙 II 半抗原及人工抗原的合成与鉴定

王 剑^{1,2}, 王 萌², 周兆祥², 陈 琛¹, 张小莺^{1,2*}

(1. 陕西理工学院生物科学与工程学院, 汉中 723001; 2. 西北农林科技大学动医学院, 杨凌 712100)

摘 要: **目的** 建立酸性橙 II 半抗原及人工抗原的合成及鉴定方法。 **方法** 将重氮化后的 2-氨基-5-磺基苯甲酸与 2-萘酚经偶氮反应合成带羧基基团酸性橙 II, 通过碳二亚胺法将其与载体蛋白(BSA)偶联制备酸性橙 II 人工抗原。采用核磁共振碳谱和氢谱对合成的酸性橙 II 半抗原进行结构分析, 并用紫外光谱扫描法和蛋白质电泳法鉴定酸性橙 II 人工抗原并计算偶联比。 **结果** 通过偶氮反应及碳二亚胺法最终得到纯化后的酸性橙 II 半抗原约 47 mg, 核磁结果显示成功合成酸性橙 II 半抗原。经 SDS-PAGE、N-PAGE 和紫外光谱扫描结果均显示酸性橙 II 人工抗原蛋白分子质量大于 BSA, 所带负电荷大于 BSA, 且合成后的酸性橙 II 人工抗原具有吸收峰叠加效应, 均表明酸性橙 II 人工抗原合成成功, 偶联比为 20.9:1。 **结论** 此方法能够成功合成酸性橙 II 半抗原和人工抗原, 为进一步制备特异性酸性橙 II 抗体和建立酸性橙 II 的免疫检测方法奠定基础。

关键词: 酸性橙 II; 半抗原; 人工抗原

Synthesis and identification of acid orange II hapten and artificial antigen

WANG Jian^{1,2}, WANG Meng², ZHOU Zhao-Xiang², CHEN Chen¹, ZHANG Xiao-Ying^{1,2*}

(1. College of Biological Science and Engineering, Shaanxi University of Technology, Hanzhong 723001, China;
2. College of Veterinary Medicine, Northwest A&F University, Yangling 712100, China)

ABSTRACT: Objective To explore a method for the synthesis and identification of acid orange II hapten and artificial antigen. **Methods** Acid orange II hapten was synthesized by the reaction between 2-amino-5-sulfo-benzoic acid and 2-naphthol, then acid orange II artificial antigen was prepared by active ester method. Acid orange II hapten was identified by mass spectrometry and acid orange II artificial antigen was identified by UV spectrophotometric, SDS-PAGE as well as N-PAGE. **Results** The structure of acid orange II hapten was consistent with the predictive structure by mass spectral analysis. By the methods of SDS-PAGE and N-PAGE, the molecule weight and negatively charged electrons of acid orange II artificial antigen were greater than BSA. Acid orange II artificial antigen showed the superposition phenomenon by Ultraviolet spectrum. According to the UV, acid orange II hapten and BSA coupling ratio was 20.9:1. **Conclusion** This method can be applied for acid orange II hapten and artificial antigen synthesis and provide technical basis for the preparation of acid orange II specificity antibodies and development of acid orange II immune detection.

KEY WORDS: acid orange II; hapten; artificial antigen

基金项目: 国家外国专家局高端外国专家项目(GDW20146100228)、陕西省国际科技合作基地建设项目(2015SD0018)

Fund: Supported by the High-end Foreign Experts Recruitment Program (GDW20146100228) and the Key Construction Program of International Cooperation Base in S&T, Shaanxi Province (2015SD0018)

*通讯作者: 张小莺, 博士, 教授, 博士生导师, 主要研究方向为药学研究。E-mail: zhang.xy@nwsuaf.edu.cn

*Corresponding author: ZHANG Xiao-Ying, Ph.D., Professor, College of Veterinary Medicine, Northwest A&F University Xinong Rd.22, Yangling 712100, China. E-mail: zhang.xy@nwsuaf.edu.cn

1 引言

酸性橙 II, 又名酸性金黄 II 或酸性艳橙 GR, 是重要的精细化工产品, 广泛用于印染、皮革、纸张等染色^[1,2]。研究证实酸性橙 II 对生殖具有致畸作用, 并伴有中等的致癌性, 不允许作为食品添加剂使用^[3]。由于酸性橙 II 色泽鲜艳, 着色稳定和价廉, 在食品生产与加工中出现违规添加酸性橙 II 的现象, 对消费者的健康造成严重危害^[4]。2011 年, 国家卫生部明确规定将酸性橙 II 等合成色素列为非食用物质和易滥用的食品添加剂名单, 禁止在食品中添加。因此, 建立一套快速、准确检测食品中酸性橙 II 的方法具有重要意义。

目前, 食品中非食品添加剂的残留检测方法主要有高效液相色谱法^[4]、荧光光谱法^[5]以及高效液相色谱-质谱/质谱法^[6]等, 准确性高, 但这些方法需昂贵的仪器设备及专业操作人员, 且样品前处理过程繁琐复杂, 很难满足大批量样品快速检测的要求。免疫分析法具有简便、快速、灵敏度高和成本低廉、便于现场检测和高度特异性等特点^[7], 其关键是制备具有免疫原性的抗原。本研究针对酸性橙 II 不具有免疫原性的特点, 建立酸性橙 II 人工抗原的合成方法并对其进行鉴定, 为酸性橙 II 在食品安全中的检测奠定基础。

2 材料与方法

2.1 实验材料

微量移液器(德国 Eppendorf 公司); 磁力搅拌器(上海梅颖浦仪器仪表制造有限公司); 多用真空泵(北京莱伯泰科仪器有限公司); 紫外可见分光光度计(德国耶拿分析仪器股份公司); 核磁共振仪(Bruker

AVANC EIII 500 MHz); 高速冷冻离心机(美国 Thermo Scientific 公司); 电子天平(日本岛津)。

2-氨基-5-磺基苯甲酸(96%)和 2-萘酚(99%)购自西亚试剂; 牛血清白蛋白(BSA, 99%)购自科邦生物; N-羟基丁酰亚胺(NHS)、N,N-二环己基碳二亚胺(DCC)购自阿拉丁; KI 淀粉试纸和 pH 试纸购自上海三爱思试剂有限公司; 二甲亚砜(DMSO)购自国药集团化学试剂有限公司; 亚硝酸钠、碳酸氢钠、二氯甲烷、浓盐酸、N,N-二甲基甲酰胺(DMF)和甲醇均为分析纯, 购自成都市科隆化工试剂厂。

2.2 实验方法

2.2.1 酸性橙 II 半抗原的合成

将 100 mg 2-氨基-5-磺基苯甲酸溶解于 1 mL DMSO 后, 加入 4 mL HCl (0.5 mol/L) 溶液后, 逐滴加入 NaNO₂ (0.1 mol/L), 直到使淀粉 KI 试纸变成蓝色为止, 冷却至 4℃, 得到溶液 A, 备用; 将 67 mg 2-萘酚溶解于 1 mL DMSO 后, 加入 2 mL Na₂CO₃ (1 mol/L) 溶液, 冷却至 4℃, 得到溶液 B, 备用; 将溶液 A 加入到溶液 B 中, 4℃ 搅拌 2 h, 得到红色沉淀物; 最后, 用盐酸调节溶液 pH 至 3.0, 继续 4℃ 搅拌 30 min, 抽滤, 得到红色残余物, 37℃ 烘干, 合成路线见图 1。

2.2.2 酸性橙 II 半抗原的纯化

采用重结晶的方法纯化粗样品, 将 140 mg 粗样品溶解于甲醇。待完全溶解后室温静置 3~4 d, 可析出红色沉淀物, 滤纸过滤, 石油醚冲洗 2~3 次, 50℃ 烘干, 得红色沉淀(酸性橙 II 半抗原, 见图 2)约 47 mg。

2.2.3 酸性橙 II 半抗原的鉴定

纯化所得的酸性橙 II 半抗原采用核磁共振仪 (13C-NMR, 1H-NMR) 鉴定其分子结构, 确定酸性橙 II 半抗原是否合成成功。

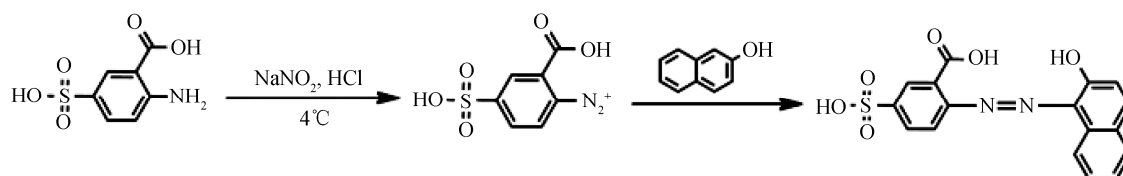


图 1 酸性橙 II 半抗原合成路线

Fig. 1 Synthetic route of acid orange II haptens



图2 酸性橙 II 半抗原

Fig. 2 Synthetic acid orange II haptens

2.2.4 酸性橙 II 人工抗原的合成

称取 5.2 mg 酸性橙 II 半抗原、3.22 mg NHS、7.448 mg DCC 溶于 2 mL DMF, 室温搅拌约 10 h, 将混合液 2000 r/min 离心 5 min。将上清与 2 mL BSA(13.8 mg)溶液混合, 4 °C 搅拌过夜。PBS 缓冲液透析, 每 12 h 换液, 透析 3 d 后收集, -20 °C 保存, 合成路线见图 3。

2.2.5 酸性橙 II 人工抗原的鉴定

采用变性(SDS-PAGE)和非变性(N-PAGE)蛋白电泳鉴定酸性橙 II 人工抗原^[8], 并通过紫外光谱法鉴定酸性橙 II 人工抗原和计算偶联比。用 PBS 缓冲液将载体蛋白、酸性橙 II 半抗原和酸性橙 II 人工抗原分别稀释浓度为 0.25、0.0125、0.25 mg/mL, 在 200~400 nm 紫外波长下分别扫描全波长。根据波长 320nm 处的吸光度计算半抗原与载体蛋白的偶联比^[9,10], 公式如下:

$$\text{偶联比} = \frac{(A_{\text{偶联物}} - A_{\text{载体蛋白}}) * \rho_{\text{半抗原}} * M_{\text{蛋白质}}}{A_{\text{半抗原}} * M_{\text{半抗原}} * \rho_{\text{载体蛋白}}}$$

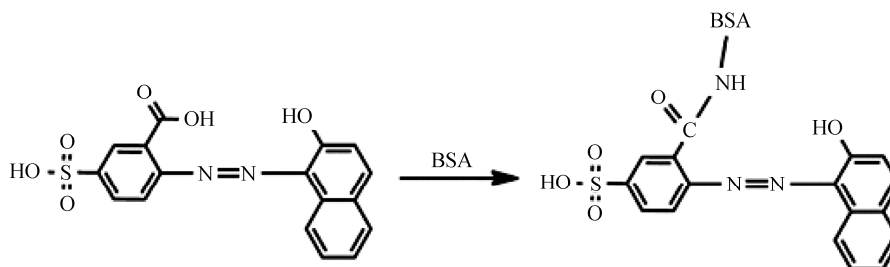


图3 酸性橙 II 人工抗原的合成路线

Fig. 3 Synthetic route of acid orange artificial antigens

式中: A 为吸光度; M 为相对分子质量; ρ 为质量浓度 (mg/mL)。

3 结果与分析

3.1 酸性橙 II 半抗原的结构鉴定

经 ¹³C 和 ¹H 核磁图谱(图 4、图 5)结果分析: C 谱中 180.14(6×10^{-6})为—COOH 基团, 且图谱结果显示酸性橙 II 半抗原结构中 C 和 H 数目与预期结构一致。因而, 可判定成功合成带有羧基基团的酸性橙 II 半抗原。

3.2 酸性橙 II 抗原的鉴定

3.2.1 酸性橙 II 抗原蛋白电泳检测鉴定结果

SDS-PAGE 电泳鉴定结果显示: 由于酸性橙 II 人工抗原的分子量较 BSA 大, 从而致使酸性橙 II 人工抗原的迁移速率较 BSA 慢, 图 6B 显示酸性橙 II 人工抗原条带相比 BSA 条带有明显的拖带现象, 说明 BSA 成功偶联酸性橙 II 半抗原。N-PAGE 电泳鉴定结果显示: BSA 的蛋白条带迁移速率较酸性橙 II 人工抗原快, 说明酸性橙 II 人工抗原电离后所带负电荷数比 BSA 大(图 6A)。结合 SDS-PAGE 和 N-PAGE 结果说明酸性橙 II 人工抗原偶联成功。

3.2.2 酸性橙 II 人工抗原紫外扫描鉴定结果

酸性橙 II 半抗原与 BSA 均具有各自的紫外吸收特征, 依据紫外吸光度的加和性致使酸性橙 II 人工抗原兼具有二者的紫外吸收特征。紫外扫描酸性橙 II 人工抗原紫外全波长扫描结果见图 7, 酸性橙 II 人工抗原的吸收峰表现出了酸性橙 II 半抗原和 BSA 吸收峰的叠加现象, 说明载体蛋白 BSA 上成功偶联酸性橙 II 半抗原, 成功合成酸性橙 II 人工抗原。

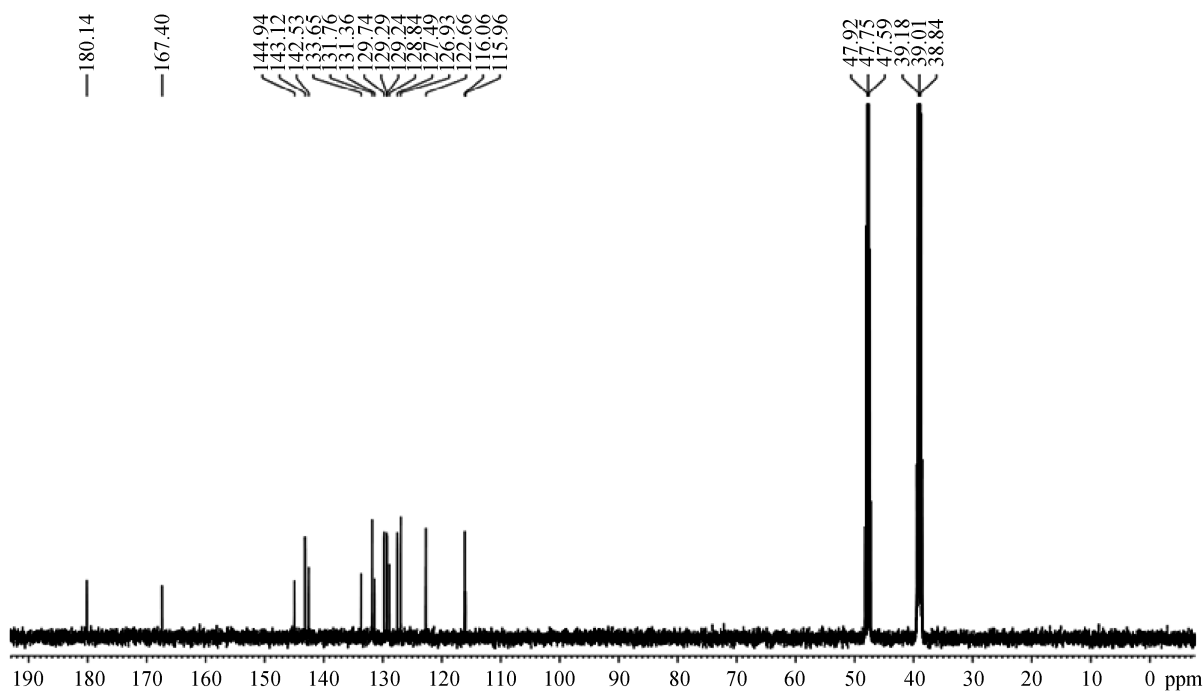


图 4 酸性橙 II 半抗原 C 谱

Fig. 4 ^{13}C NMR of acid orange II haptens

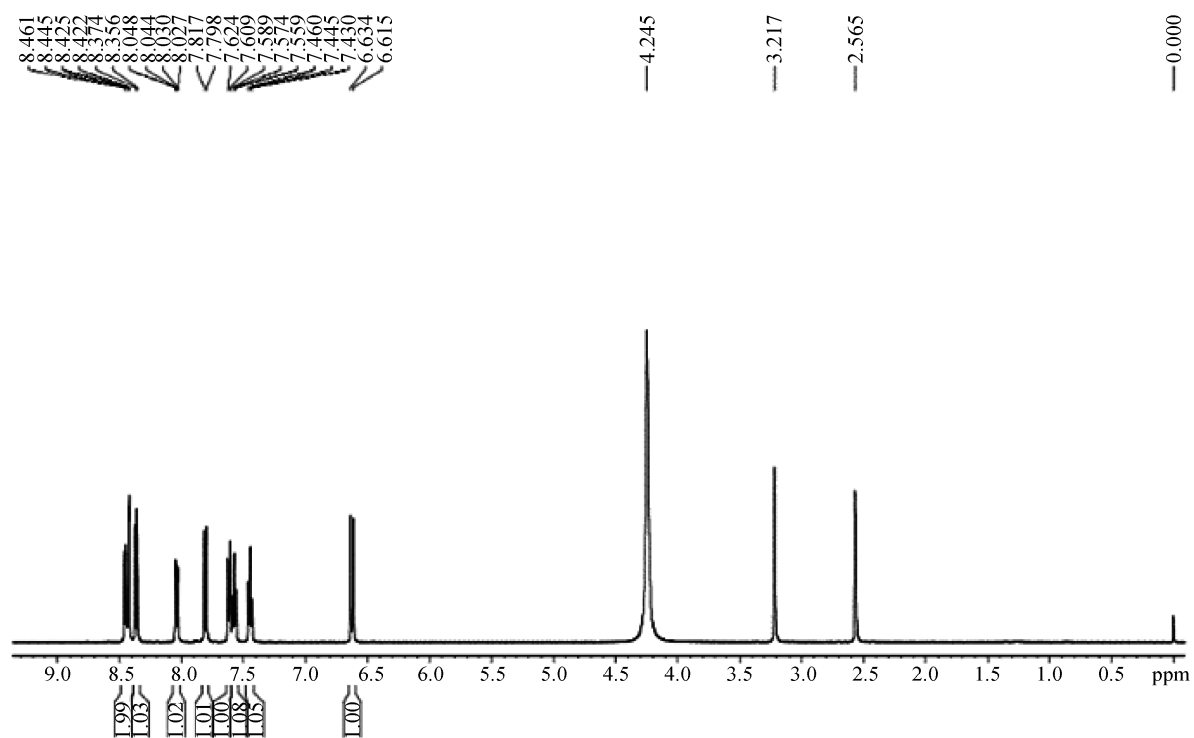


图 5 酸性橙 II 半抗原 H 谱

Fig. 5 ^1H NMR of acid orange II haptens

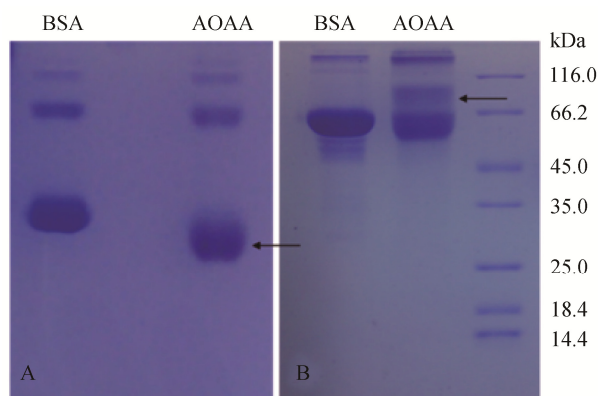


图6 酸性橙 II 人工抗原鉴定(AOAA)

Fig. 6 Protein electrophoresis of the acid orange II artificial antigen(AOAA) and BSA

A: N-PAGE 蛋白电泳; B: SDS-PAGE 蛋白电泳

A: N-PAGE Protein electrophoresis; B: SDS-PAGE Protein electrophoresis

通过紫外图谱分析: 320 nm 处可明显看出酸性橙 II 半抗原和人工抗原的紫外吸收峰特征; 287 nm 处为 BSA 的紫外吸收峰。根据 320 nm 处的紫外吸光度计算酸性橙 II 半抗原与 BSA 偶联比(BSA、酸性橙 II 半抗原和人工抗原的吸收紫外值分别为: 0.0257、0.2403、0.586)为 20.9:1。

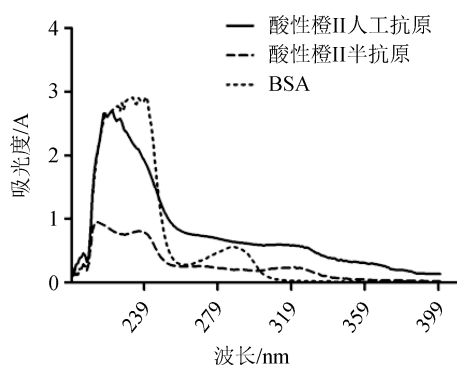


图7 酸性橙 II 人工抗原紫外扫描

Fig. 7 UV spectrum of BSA, acid orange II haptens and artificial antigens

4 讨论

目前, 免疫分析法已被应用于食品安全检测^[11], 其关键步骤是人工抗原的合成。合成具有免疫原性的人工抗原中, 半抗原化合物必须具有或衍生出能与

载体蛋白进行交联反应的功能基团(氨基、羧基、羟基、重氮盐等)。本研究采用两种合成前体分子(带有羧基)合成直接带有羧基基团的酸性橙 II 半抗原, 经核磁共振检验分析酸性橙 II 半抗原合成成功。

评价合成人工抗原的分析检测方法有紫外光谱法、红外光谱法、核磁共振法、蛋白电泳、标记抗原示踪法、免疫鉴定等^[12,13]。紫外光谱法是鉴定人工抗原最常见的方法, 其依据人工抗原的紫外光谱特征(具有半抗原与载体蛋白紫外光谱的叠加性)判断人工抗原是否偶联成功。SDS-PAGE 电泳法依据蛋白质分子量的大小差异判断人工抗原是否偶联成功。如果偶联成功, 人工抗原的分子量较载体蛋白增大, 从而致使人工抗原的电泳条带迁移速度变慢; N-PAGE 电泳法依据蛋白质所带的静电荷差异判断人工抗原是否偶联成功, 相同极性, 静电荷数大的迁移距离大。本实验采用紫外光谱法及蛋白电泳法鉴定半抗原与载体蛋白的连接, 二者结果一致, 说明人工抗原合成成功。

为了获得较好的免疫效果, 除鉴定半抗原与载体蛋白的连接, 还需确定半抗原与载体蛋白是否有适宜的偶联比^[13,14]。一般认为, 偶联比在 3:1~45:1 之间时具有较强的免疫原性, 能够较好地刺激免疫动物的免疫系统产生特异性抗体^[14]。本试验通过紫外吸收法测得人工抗原中半抗原与载体蛋白的偶联比为 20.9:1, 处于适宜的范围^[15]。结论表明: 此方法成功合成酸性橙 II 人工抗原, 为进一步制备特异性酸性橙 II 抗体和建立非食品添加剂酸性橙 II 的免疫检测方法奠定了基础。

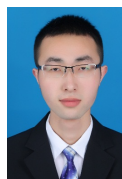
参考文献

- [1] 向仲朝, 龚光隆. 食品中酸性橙 II 测定方法的研究及污染调查[J]. 现代预防医学, 2003, 30(2): 172-173.
Xiang ZC, Gong GL. Study on quantitative analysis and contamination of acid orange II in food [J]. Mod Prev Med, 2003, 30(2): 172-173.
- [2] 欧阳光, 陈志良, 吴立新. 中国化工产品大全(中卷)[M]. 北京: 化学工业出版社, 1994.
Ou YG, Chen ZL, Wu LX. Encyclopedia of Chinese chemical products (volume) [M]. Beijing: Chemical Industry Press, 1994.
- [3] 卢士英, 邹明强. 食品中常见的非食用色素的危害与检测[J]. 中国仪器仪表, 2009, (8): 45-50.
Lu SY, Zou MQ. The hazards of frequent inedible colorants used

- in foods and their detection methods [J]. *China Instrum*, 2009, (8): 45–50.
- [4] 徐琴, 刘琳, 傅余强, 等. 高效液相色谱法测定食品中的酸性橙 II [J]. *食品科学*, 2010, 31(8): 219–221.
Xu Q, Liu L, Fu YQ, *et al.* Determination of acid orange II in foods by HPLC [J]. *Food Sci*, 2010, 31(8): 219–221.
- [5] 刘周忆, 朱拓, 顾恩东, 等. 荧光光谱检测的酸性橙 II 的研究 [J]. *光学学报*, 2008, 28(6): 1106–1110.
Liu ZY, Zhu T, Gu ED, *et al.* Acid orange II detection by fluorescence spectra [J]. *Acta Optica Sin*, 2008, 28(6): 1106–1110.
- [6] 吴海智, 周丛, 袁列江, 等. 高效液相色谱 - 质谱/质谱法测定食品中的酸性橙 II 与酸性金黄 [J]. *分析测试学报*, 2014, 33(12): 1387–1392.
Wu HZ, Zhou C, Yuan LJ, *et al.* Determination of acid orange II and metanil yellow in food by HPLC-MS/MS [J]. *J Instrum Anal*, 2014, 33(12): 1387–1392.
- [7] 李丽华, 徐振林, 孙远明, 等. 3-氨基-2-噁唑烷酮半抗原、人工抗原的合成及鉴定 [J]. *食品工业科技*, 2012, 33(2): 49–51.
Li LH, Xu ZL, Sun YM, *et al.* Synthesis and characterization of AOZ hapten and artificial antigens [J]. *Sci Technol Food Ind*, 2012, 33(2): 49–51.
- [8] 杨润亚, 祁志军, 吴文君. 苦皮藤素 V 人工抗原的合成与鉴定 [J]. *西北农林科技大学学报(自然科学版)*, 2004, 32(6): 64–68.
Yang RY, Qi ZJ, Wu WJ. Synthesis and characterization of artificial antigen of Celangulin V [J]. *J Northwest A F Univ (Nat Sci Ed)*, 2004, 32(6): 64–68.
- [9] 林伊莱, 张小燕, 施祖灏, 等. 三聚氰胺半抗原及完全抗原的合成与鉴定 [J]. *中国家禽*, 2013, 35(9): 34–35.
Lin YL, Zhang XY, Shi ZH, *et al.* Synthesis and identification of hapten and complete antigens for melamine [J]. *China Poult*, 2013, 35(9): 34–35.
- [10] 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): 225–229.
Zhao PL, Zheng HT, Jiang PP, *et al.* Preparation of haptens by two different methods for immunoassay determination of florfenicol and their identification [J]. *Food Sci*, 2010, 31(15): 225–229.
- [11] 李兴霞, 王国霞, 潘家荣, 等. 免疫分析新方法在食品安全检测中的应用 [J]. *生物技术通报*, 2006, (1): 42–45.
Li XX, Wang GX, Pan JR. Application of new immunoassay methods in food safety [J]. *Biotechnol Bulletin*, 2006, (1): 42–45.
- [12] 张小燕, 施祖灏, 陆俊贤, 等. 三聚氰胺抗原合成及其多克隆抗体的制备 [J]. *中国动物检疫*, 2013, 30(1): 53–56.
Zhang XY, Shi ZH, Lu JX, *et al.* Synthesis of melamine antigen and preparation of its polyclonal antibodies [J]. *China Animal Health Insp*, 2013, 30(1): 53–56.
- [13] 赵津子, 郑礼, 谢文艳, 等. 药物残留免疫分析研究进展 [J]. *中国药学杂志*, 2011, 46(2): 85–88.
Zhao JZ, Zheng L, Xie WY, *et al.* Study on immune analysis of drug residues [J]. *Chin Pharm J*, 2011, 46(2): 85–88.
- [14] 谢晶, 叶健强, 余华, 等. 动物性食品中兽药人工抗原合成的研究 [J]. *畜牧兽医杂志*, 2011, 30(1): 28–30.
Xie J, Ye JQ, Yu H, *et al.* Study on the synthesis of artificial antigen of veterinary drugs in animal food [J]. *J Anim Sci Veter Med*, 2011, 30(1): 28–30.
- [15] 张梅, 张继瑜, 李剑勇. 兽药人工抗原合成的研究进展 [J]. *中兽医医药杂志*, 2006, 25(1): 63–65.
Zhang M, Zhang JY, Li JY. Study on synthesis artificial antigen of veterinary medicine [J]. *J TCVM*, 2006, 25(1): 63–65.

(责任编辑: 杨翠娜)

作者简介



王 剑, 硕士研究生, 主要研究方向为生物化学。

E-mail: m_lina510@163.com



张小莺, 博士, 教授, 博士生导师, 主要研究方向为药学研究。

E-mail: zhang.xy@nwsuaf.edu.cn