

西地那非多克隆抗体的制备及特异性分析

熊波, 吴胜泽, 苏焕斌, 张燕, 刘辉*

(广东产品质量监督检验研究院, 顺德 528300)

摘要: **目的** 为了研究开发一种具有高灵敏度、高特异性的西地那非(sildenafil, SD)多克隆抗体。**方法** 本文通过人工合成西地那非半抗原(SDH)和西地那非抗原(SDH-BSA), 然后经免疫兔子, 制备了SD多克隆抗体, 并对制得的抗体的特异性进行了分析。**结果** 免疫后产生了SD多克隆抗体, 抗体的效价为 3.8×10^5 , 线性检测范围为0.02~3.8 ng/mL, 抗体除与瓦地那非具有较高的交叉反应率外, 与红地那非、他地那非等结构类似物交叉反应率均较低。**结论** 采用本方法制备的SD多克隆抗体具有较高的特异性和灵敏度, 可用于SD快速检测试剂盒的开发。

关键词: 西地那非; 多克隆抗体; 酶联免疫

Preparation and specificity analysis of sildenafil polyclonal antibody

XIONG Bo, WU Sheng-Ze, SU Huan-Bin, ZHANG Yan, LIU Hui*

(Guangdong Provincial Product Quality Supervision and Inspection Institute, Shunde 528300, China)

ABSTRACT: Objective To prepare high sensitivity and specificity polyclonal antibody against sildenafil (SD). **Methods** Sildenafil hapten (SDH) and Sildenafil antigen (SDH-BSA) were prepared by artificial methods. Then, through immunized rabbits the SD polyclonal antibody was prepared. **Results** After immunity, the polyclonal antibody against SD was generated. The titer of the antibody was 3.8×10^5 . The linear detection of the polyclonal antibody was ranged from 0.02 ng/mL to 3.8 ng/mL. The polyclonal antibody had a high cross reaction rate to vardenafil, but had a low response rate to hongdenafil and calais. **Conclusion** SD polyclonal antibody had a high specificity and sensitivity, and it could be applied to the development of SD rapid detection kit.

KEY WORDS: sildenafil; polyclonal antibody; ELISA

1 引言

西地那非(sildenafil, SD)是美国FDA1998年批准用于治疗性功能障碍(erectile dysfunction, ED)的药物, 能够通过竞争性抑制5型磷酸二酯酶, 阻断cGMP分解为GMP, 导致自然产生的cGMP不断积

聚, 促进海绵体动脉平滑肌舒张, 促使阴茎勃起, 从而达到治疗ED的功效^[1-3]。但是研究表明它对人体也有较大副作用, 会导致人体面部潮红、头晕、头痛、鼻塞和视觉异常等症状^[4], 因此这类药物必须在医生指导下使用。然而一些保健品生产厂家, 为了增强或夸大产品壮阳功效, 在产品中违法添加西地那非, 以

基金项目: 广东省科技计划项目(2013B090600059)

Fund: Supported by Guangdong Province Science and Technology Plan Project (2013B090600059)

*通讯作者: 刘辉, 工程师, 主要研究方向为食品安全与营养。E-mail: lh403@163.com

*Corresponding author: LIU Hui, Engineer, Guangdong Provincial Product Quality Supervision and Inspection Institute, Shunde 528300, China. E-mail: lh403@163.com

欺骗消费者,这严重地危害了广大消费者的身心健康,也不利于我国保健品行业的发展。目前已报道的关于SD的检测方法很多,其中包括薄层色谱法、液相色谱法、液相色谱-质谱联用法等方法^[5-7],然而这些检测方法成本昂贵、前处理复杂、灵敏度也较低,因此研究开发一种简便快捷、灵敏度高的SD检测方法具有极其重要的意义。

本文旨在通过免疫学试验,制备具有高特异性、高灵敏度的SD多克隆抗体,以便为进一步的SD快速检测试剂盒的开发奠定基础。

2 材料与方法

2.1 材料与试剂

新西兰大白兔2只,雌性,体重3 kg以上,购自广东省实验动物中心; Freund氏完全佐剂与不完全佐剂、N,N-二甲基甲酰胺(DMF)、N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)、二环己基碳二亚胺(DCC)、牛血清蛋白(BSA)、卵清蛋白(OVA)、3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB)均购自Sigma公司;西地那非、瓦地那非、他地那非、红地那非标准品均购自Alfa Aesar公司;其他化学试剂均为分析纯。

2.2 仪器与设备

HP1100液质联用仪(美国,Agilent); Multiskan MK3酶标仪(美国,Thermo公司); Wellwash MK2洗板机(美国,Thermo公司)。

2.3 实验方法

2.3.1 SD半抗原的合成

称取4.75 g西地那非(4.75 g, 10 mmol),加入到30 mL DMF溶液中,然后再加入520 mg 60%氢氧化钠。室温下磁力搅拌1 h后,滴加2.34 g溴乙酸叔丁酯,搅拌15 min后,于60 °C油浴中继续搅拌16 h,然后用油泵减压蒸除DMF,残余物中加入20 mL水后,用二氯甲烷进行萃取产物。合并提取液,水洗涤后,分出有机层,无水硫酸钠干燥。滤除干燥剂,滤液经减压浓缩后,残余物用硅胶柱层析分离得纯的中间体。将上述获得的乙酸叔丁酯样品溶于6 mL二氯甲烷中,室温搅拌下加入3 mL三氟乙酸(TFA),室温搅拌2 h, TLC监控直至薄层板中样品斑点完全消失,减压旋蒸掉溶剂后,即为最终产物SDH,如图1所示。

2.3.2 人工抗原制备与鉴定

采用活泼酯法^[8]制备免疫抗原SDH-BSA,包被抗原SDH-OVA。称取半抗原0.1 mmol溶于0.5 mL DMF中,搅拌加入0.2 mmol DCC和0.2 mmol NHS,让其在室温下反应过夜后,离心(4000 r/min, 5 min),取上清液,缓慢加入到溶有适量的BSA或OVA(半抗原与BSA或OVA的摩尔比大约为60:1)pH为9.6的碳酸缓冲溶液中,然后在磁力搅拌下反应4 h,待反应完成后,装入透析袋,先用蒸馏水透析2次,然后用0.8%生理盐水透析,透析完毕后分装保存于-20 °C的冰箱中。

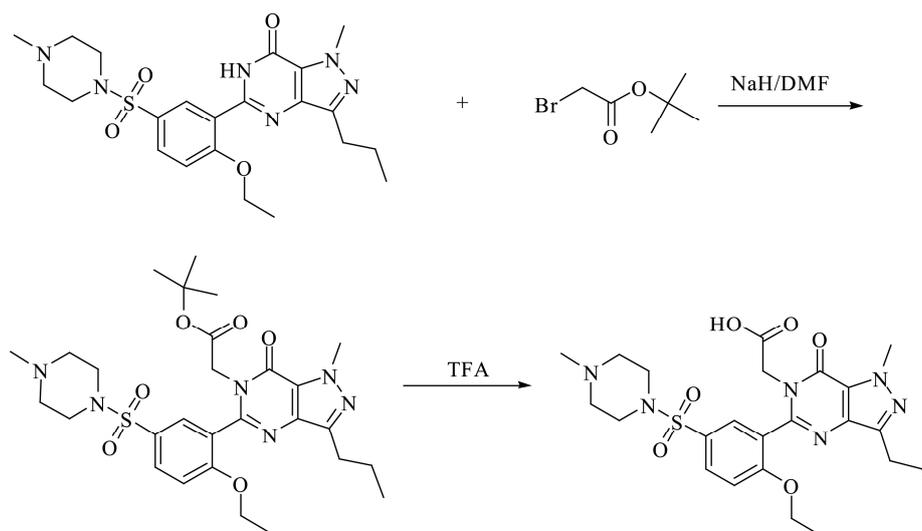


图1 半抗原SDH的合成

Fig. 1 The synthesis of SDH hapten

在波长 200~400 nm 区间, 对各人工抗原的紫外吸收光谱进行测定, 鉴定半抗原与载体蛋白(BSA 或 OVA)是否偶联成功^[9]。

2.3.3 多克隆抗体的制备^[10]

选取体重在 3 kg 以上的雌性新西兰大白兔, 初次免疫时用 0.5mg 免疫原与 2 mL 生理盐水和 2 mL 弗氏完全佐剂混合后采用背部多点注射。间隔 3 周, 取免疫原与弗氏不完全佐剂乳化, 加强免疫。以后免疫每隔两周进行免疫。取耳缘静脉血, 采用 ELISA 方法测定抗血清效价。待效价稳定后, 再加强免疫一次。最后一次免疫后 10 d 心脏采血, 离心(4000 r/min, 5 min)保留血清, 存放于-20 °C 冰箱中。

2.3.4 抗体特异性分析

选择瓦地那非、他地那非、红地那非三种与 SD 结构和功能相同的类似物进行抑制试验, 考察了制备的 SD 多克隆抗体的特异性。

3 结果与分析

3.1 SD 半抗原的鉴定

将合成的中间体和终产物进行液相-质谱联用仪(LC-MS)分析, 结果如图 2、3 所示, 从图中可知该化合物中间体的分子离子峰为 589.2 [M+H]⁺, 半抗原

SDH 的分子离子峰为 533.4[M+H]⁺, 与该化合物的目标分子量相符。

3.2 SD 抗原的制备及鉴定

图 4 为 SDH、BSA、OVA、SDH-BSA、SDH-OVA 的紫外光谱图, 从图中可以看出, SDH-BSA 波峰稍偏移至 276~277 nm, OD 明显增大, 波谷偏移至 245 nm, OD 明显增大, 300~320 nm 仍有吸收; SDH-OVA 波峰稍偏移至 276~277 nm, OD 稍增大, 波谷偏移至 248 nm, OD 变化不大, 与 SDH、BSA、OVA 的图谱都有所不同, 其具有 SDH 和 BSA、OVA 叠加的特点, 说明反应产物是不同于载体蛋白和半抗原的物质, 是载体蛋白和半抗原的复合物, 由此可说明 SDH 与载体蛋白交联成功。

3.3 抗体效价的测定及其标准曲线的绘制

抗体的效价采用 icELISA 测定, 分别以不同浓度的包被抗原包被酶标板, 将纯化好的多克隆抗体倍比稀释, 抗体效价为抗体 A_{450nm}~1.0 左右时的抗体的稀释倍数^[11]。采用棋盘法优化包被抗原浓度和抗血清工作浓度, 选择吸光值(OD)为 1.0 左右时的抗原浓度和抗体稀释度作为工作浓度。经测定, 当包被浓度为 0.25 μg/mL 时, 抗体的效价为 3.8×10⁵。

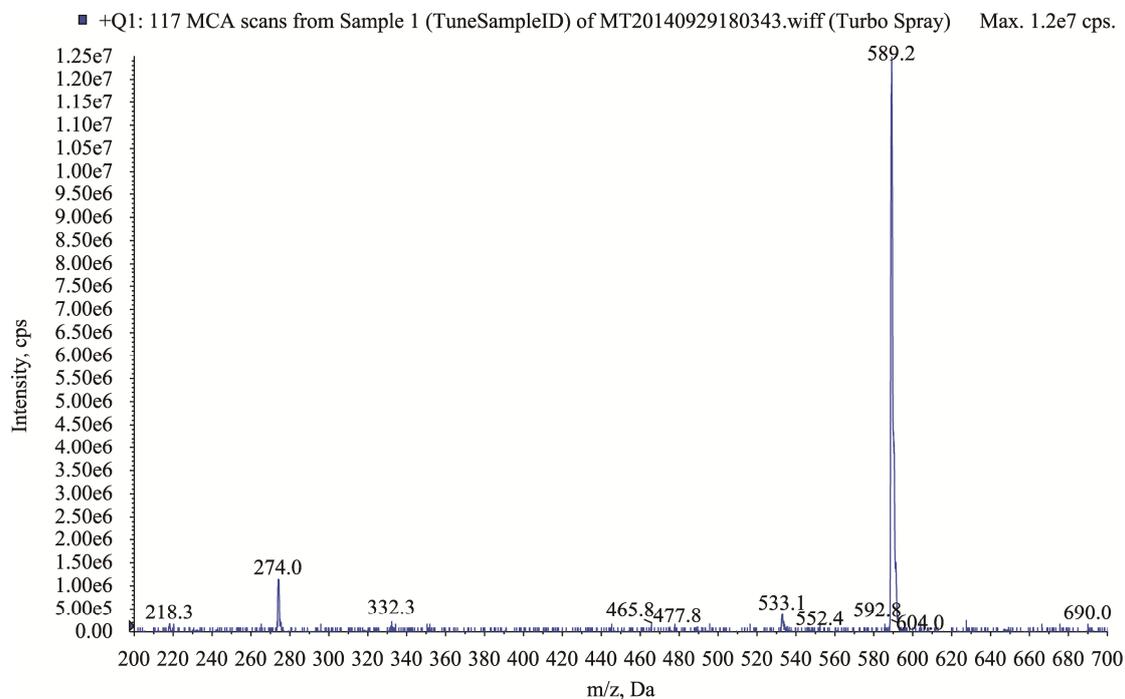


图 2 半抗原 SDH 中间体的质谱图

Fig. 2 The mass spectrogram of SDH intermediate

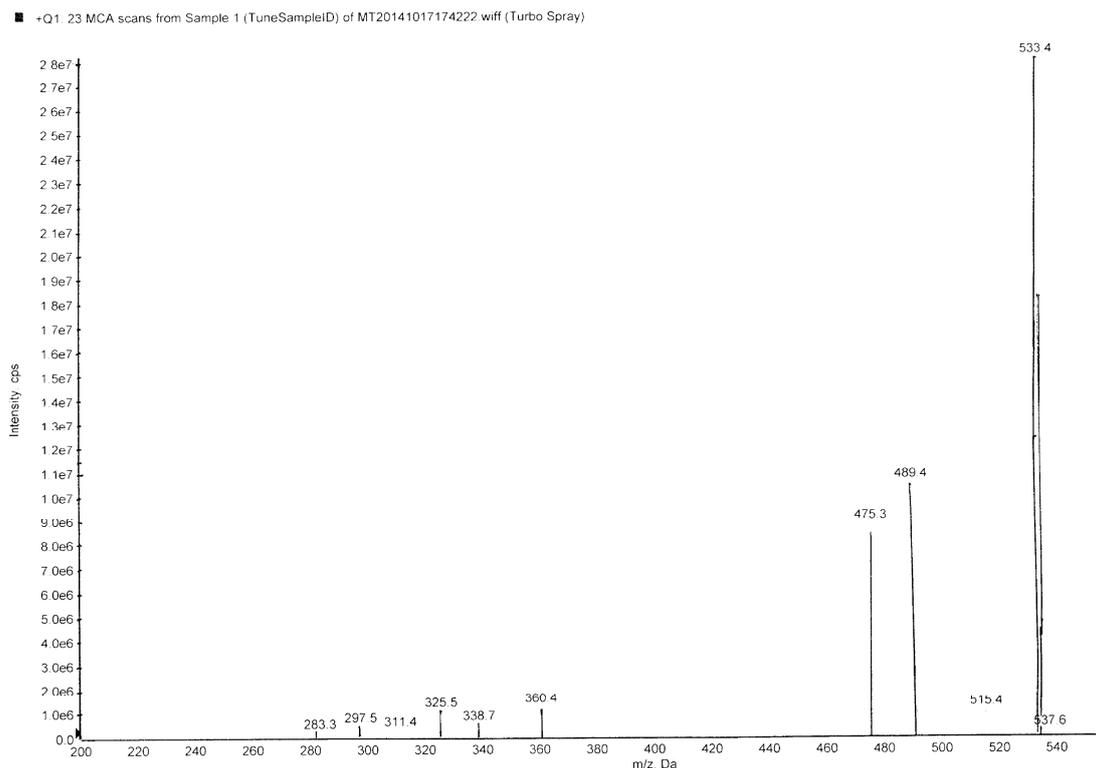


图 3 半抗原 SDH 的质谱图
Fig. 3 The mass spectrogram of SDH hapten

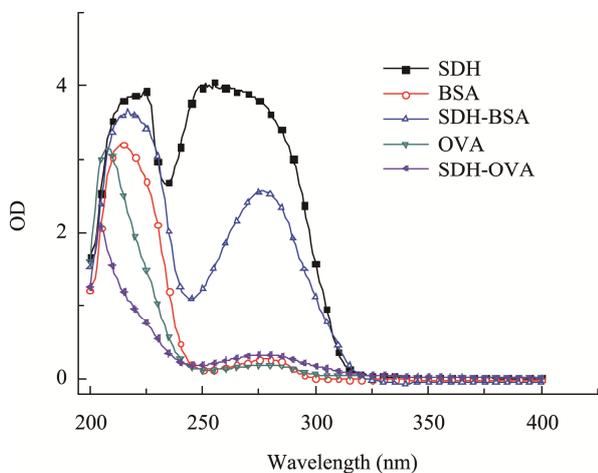


图 4 SDH 人工抗原紫外扫描谱图
Fig. 4 UV spectrum of SDH artificial antigens and haptens

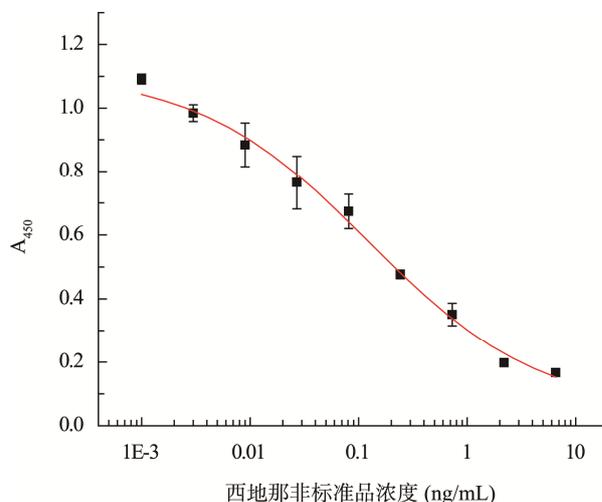


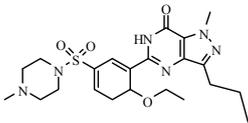
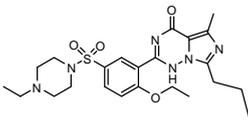
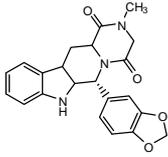
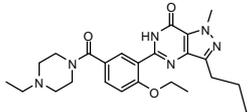
图 5 西地那非的间接 ELISA 标准曲线
Fig. 5 The icELISA standard curve of SD

根据上述实验做药物竞争实验, 采用 Originlab 7.5 的四参数拟合模块对间接竞争 ELISA 反应曲线进行 S 拟合, 以 SDH-OVA 为包被原, 建立间接 ELISA 标准曲线如图 5 所示, 计算得曲线的 IC_{50} 为 0.16 ng/mL, 线性检测范围($IC_{20} \sim IC_{80}$)为 0.02~3.8 ng/mL。

3.4 SD 多克隆抗体特异性分析

利用 icELISA 程序, 在已经优化好的 icELISA 条件下, 选择了三种与 SD 结构和功能相同的类似物, 考察了抗体的特异性。依次做 SD 药物的类似物竞争

表1 SD与结构类似物或功能类似物的交叉反应率结果 ($n=3$)
Table 1 Cross reactivity of polyclonal antibody with analogous compound of SD ($n=3$)

药物名称	结构式	IC ₅₀ (ng/mL)	交叉反应率
西地那非		0.16	100
瓦地那非		0.22	72.7
他地那非		3550.44	<0.01
红地那非		1392.62	<0.01

抑制曲线, 求出各自抑制率为 50%时的标准品质量浓度, 然后再换算成摩尔浓度后用公式计算出每种结构类似物与抗体的交叉反应率^[12]。

$$CR(\%) = \frac{100 \times IC_{50}(SD)}{IC_{50}(\text{cross-reactant})}$$

在几种 cGMP PDE-5 抑制剂对 PcAb-SDH-BSA 抗体的交叉反应曲线中, 发现与瓦地那非有高的交叉反应(72.7%), 而与他地那非和红地那非的交叉反应几乎没有交叉反应(<0.01%)。这主要是由于瓦地那非除了杂环上的原子排布与 SD 有差异外, 其他结构都与 SD 非常相似, 导致 SD 抗体口袋腔能识别瓦地那非, 而他地那非和红地那非的结构与 SD 存在较大差异, 抗体不能识别, 因此交叉反应率较低。

4 讨论

在食品安全的免疫分析中, 人工抗原的合成是抗体制备和免疫分析方法建立中最关键的步骤^[13]。小分子药物在与载体蛋白连接的部位很容易受到屏蔽, 从而导致产生的抗体丧失对屏蔽基团的特异性^[14]。因此在人工抗原合成的过程中确定半抗原是否受蛋白的屏蔽作用非常重要, 解决这一问题的关键就是联入间隔臂^[15]。本文根据 SD 的结构特点, 在 SD 嘧啶环上的亚氨基上引入含有两个碳的手臂, 再与

载体蛋白偶联制备 SD 抗原, 然后经免疫兔子制得了 SD 多克隆抗体。经特异性分析, 发现制备的多克隆抗体与他地那非和红地那非的交叉反应率均小于 0.01%, 而与瓦地那非的交叉反应率为 72.7%, 具有良好的特异性, 可用于 SD 快速检测试剂盒的开发。

参考文献

- [1] Behr-Roussel D, Oudot A, Caisey S, *et al.* Daily treatment with sildenafil reverses endothelial dysfunction and oxidative stress in an animal model of insulin resistance [J]. *European urology*, 2008, 53(6): 1272–1281.
- [2] Fleshner N, Harvey M, Adomat H, *et al.* Evidence for contamination of herbal erectile dysfunction products with phosphodiesterase type-5 inhibitors [J]. *Urology*, 2005, 174(2): 636.
- [3] 王健, 任骏, 王振纲. 西地那非的作用机制[J]. *中国医学科学院学报*, 1999, 21(6): 493–496.
Wang J, Ren J, Wang ZG. Mode of Action of Sildenafil [J] *Acta Acad Med Sinicae*, 1999, 21(6): 493–496.
- [4] McCulley TJ, Luu JK, Marmor MF, *et al.* Effects of sildenafil citrate (Viagra) on choroidal congestion [J]. *Ophthalmologica*, 2002, 216 (6): 455–458.
- [5] 庞小雄, 吕华冲. 中成药及中药保健品中添加西地那非的快速检测方法[J]. *中国医院药学杂志*, 2008, 28(8): 673–674.
Pang XX, Lv HC. Fast detection method of sildenafil in Chinese patent drug and traditional Chinese medicine health care products

- [J]. *Chin J Hosp Pharm*, 2008, 28(8): 673-674.
- [6] 鲁杰, 杨大进, 方从容. 高效液相色谱法测定保健食品中枸橼酸西地那非[J]. *中国卫生工程学*, 2007, 6(3): 162-164.
Lu J, Yang DJ, Fang CR. Determination of sildenafil citrate in health food by high-performance liquid chromatography [J]. *Chin J Public Health Eng*, 2007, 6(3): 162-164.
- [7] 张翠英, 李振国, 徐金玲, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法测定中成药中非法添加枸橼酸西地那非的研究[J]. *中成药*, 2007, 29(9): 1315-1318.
Zhang CY, Li ZG, Xu JL, *et al.* Determination of sildenafil citrate illegally mixed into traditional Chinese medicinal preparation by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Chin Tradit Patent Med*, 2007, 29(9): 1315-1318.
- [8] Cho YA, Seok JA, Lee HS, *et al.* Synthesis of haptens of organophosphorus pesticides and development of immunoassays for fenitrothion [J]. *Anal Chim Acta*, 2004, 522(2): 215-222.
- [9] Singh K V, Kaur J, Varshney G C, *et al.* Synthesis and characterization of hapten-protein conjugates for antibody production against small molecules[J]. *Bioconjugate Chem*, 2004, 15(1): 168-173.
- [10] 谢桂勉, 孙远明, 徐振林, 等. 硫代磷酸二乙酯类农药半抗原设计及抗体识别特性[J]. *高等化学学报*, 2009, 30(11): 2193-2198.
Xie GM, Sun YM, Xu ZL, *et al.* Design of Generic Haptens for O, O-Diethyl phosphorothioate pesticides and recognition properties of antibodies [J]. *Chem J Chin Univ*, 2009, 30(11): 2193-2198.
- [11] Abad A, Moreno MJ, Montoya A. Development of monoclonal antibody-based immunoassays to the N-methylcarbamate pesticide Carbofuran [J]. *J Agric Food Chem*, 1999, 47: 2475-2485.
- [12] 曹欢, 蔡芳, 王秀宇, 等. 玉米赤霉烯酮半抗原及全抗原的合成与鉴定[J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2011, 27(9): 975-978.
Cao H, Ji Fang, Wang XY, *et al.* Synthesis and identification of the hapten and complete antigens for Zearalenone [J]. *Chin J Cell Mol Immunol*, 2011, 27(9): 975-978.
- [13] 胡颖. 沙丁胺醇单克隆抗体的制备及其间接 ELISA 检测方法的建立[D]. 扬州: 扬州大学, 2010.
Hu Y. Preparation of Monoclonal Antibodies Against Salbutamol and the Establishment of an Indirect ELISA Method for Detection[D]. Yangzhou: Yangzhou University, 2010.
- [14] 宋娟, 王榕妹, 王悦秋. 半抗原的设计、修饰及人工抗原的制备[J]. *分析化学*, 2010, 38(8): 1211-1218.
Song J, Wang RM, Wang YQ. Hapten design, modification and preparation of artificial antigens [J]. *Chin J Analytical Chem*, 2010, 38(8): 1211-1218.
- [15] 施海燕, 王鸣华. 半抗原的间隔臂长度对免疫识别的影响[J]. *农药学报*, 2008, 10(2): 172-177.
Shi HY, Wang MH. Effect of Hapten Space Arm Length on immune recognition [J]. *Chin J Pestic Sci*, 2008, 10(2): 172-177.

(责任编辑: 白洪健)

作者简介



熊波, 硕士, 主要研究方向为食品安全质量。

E-mail: xiongbo19892006@126.com



刘辉, 博士, 食品质量工程师, 主要研究方向为食品安全与营养。

E-mail: lh403@163.com