

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.
G01N 33/531 (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01)



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200710014993.8

[43] 公开日 2007年11月28日

[11] 公开号 CN 101078725A

[22] 申请日 2007.6.28

[21] 申请号 200710014993.8

[71] 申请人 山东大学

地址 250100 山东省济南市历城区山大南路
27号

[72] 发明人 郝日沫 张玉兰 卢圣欣 刘 围
赵承彪

[74] 专利代理机构 济南金迪知识产权代理有限公司
代理人 许德山

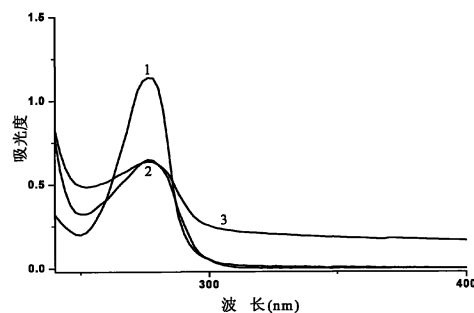
权利要求书2页 说明书6页 附图1页

[54] 发明名称

特布他林的偶联物及其制备方法与应用

[57] 摘要

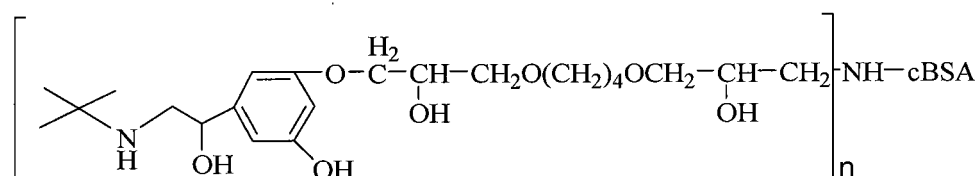
本发明公开了一种通式(I)的特布他林的偶联物,由特布他林半抗原与产生免疫原性的载体物质牛血清蛋白或卵清蛋白偶联构成。其中n为与一个牛血清蛋白分子结合的特布他林的分子数,所述n为整数1~15;cBSA为活化的牛血清蛋白,分子量范围是66KDa~69KDa。本发明还公开了所述的偶联物的制备方法,即将特布他林与产生免疫原性的载体物质连接起来,结合为具有诱发动动物免疫系统产生抗体的偶联物。本发明的特布他林的偶联物通过免疫新西兰大白兔,制备了效价达1:50,000以上的抗血清,其最低检测限为0.3ppb,IC₅₀为9.25ppb。本发明具有方法简便,快速,特异,准确的特点,为制备特布他林的酶联免疫检测试剂盒提供了基础。



1. 一种特布他林的偶联物，由特布他林半抗原与产生免疫原性的载体物质牛血清蛋白或卵清蛋白偶联构成。

2. 如权利要求1所述的特布他林的偶联物，其中所述产生免疫原性的载体物质是牛血清蛋白。

3. 如权利要求2所述的特布他林的偶联物，其结构通式如（I）



（I）

其中：n：为与一个牛血清蛋白分子结合的特布他林的分子数，所述n为整数 1~15，cBSA为活化牛血清蛋白（Cationized Bovine Serum Albumin），分子量范围是66 KDa~69 KDa；

上述偶联物显示出如下物化特征：

（1）外观：白色粉末固体；

（2）紫外吸收光谱：276 nm。

4. 如权利要求3所述特布他林的偶联物，其特征是：所述n为整数 1~10，活化牛血清蛋白分子量范围是 67 KDa~68 KDa 。

5. 权利要求1~4中任一项所述的特布他林的偶联物的制备方法，其特征是：将特布他林与产生免疫原性的载体物质连接起来，结合为具有诱发动动物免疫系统产生抗体的偶联物，并保持该偶联物的生物活性不变。

6. 如权利要求5所述特布他林的偶联物的制备方法，由如下步骤完成：

1) 溶液A的制备：将活化的牛血清蛋白溶在 pH =10.5±0.6、浓度为50 mM 碳酸盐缓冲液中，同时按牛血清蛋白与1, 4-丁二醚摩尔比为 1 : 90~150 的比例量取1, 4-丁二醚也加入该溶液中，室温反应 22±2 小时，得无色澄清溶液A，备用；

2) 溶液B的制备：按特布他林与1, 4-丁二醚的摩尔比为 2 : 1-1 : 1 的比例称取特布他林溶在pH =10.5±0.6、浓度为50 mM 碳酸盐缓冲液中，然后把配好的特布他林溶液滴加到通入氮气的A溶液中，室温反应 22±2 小时，得无色澄清溶液B；

3) 用pH为 7.30-7.50，浓度为 0.01 M-0.02 M 的磷酸缓冲液在 0-4℃ 下，搅拌透析溶液B 70~80 小时，然后改用蒸馏水透析 20~30 小时，每 6 小时更换一次透析液；

4) 冻干透析后的溶液，得到白色的特布他林的偶联物。

-
7. 如权利要求6所述的特布他林的偶联物的制备方法,其特征是:步骤 1) 所述牛血清蛋白与1, 4-丁二醚的摩尔比为1 : 99。
 8. 如权利要求6所述的特布他林的偶联物的制备方法,其特征是:步骤 2) 所述特布他林与1, 4-丁二醚的摩尔数比为 1.5 : 1。
 9. 如权利要求6所述的特布他林的偶联物的制备方法,其特征是:步骤 3) 所述磷酸溶液的pH为 7.4, 浓度为 0.01 M。
 10. 权利要求1~4中任一项所述的特布他林的偶联物作为免疫原在制备特布他林特异反应抗体中的应用。

特布他林的偶联物及其制备方法与应用

技术领域

本发明涉及一种 β -兴奋剂类的偶联物及其制备方法与应用，尤其涉及一种特布他林(terbutaline)的偶联物及其制备方法与应用。属 β -兴奋剂免疫检测领域。

背景技术

本发明涉及的下列名称适用于整个说明书和权利要求书：

牛血清蛋白(Bovine Serum Albumin,简称BSA)：Sigma公司产品

卵清蛋白(简称OVA)：Sigma公司产品

磷酸缓冲液(Phosphate Buffered Saline,简称PBS)(0.01 M, pH =7.40)

透析膜：bioshorp公司产品

硫酸特布他林：中国药品生物制品检定所

1,4-丁二醚(1,4-Butanediol diglycidyl ether,简称BDE)：Sigma公司产品

羟基琥珀酰亚胺(简称NHS)：Sigma公司产品

乙基[3-(二甲氨基)丙基]碳二亚胺(简称EDC)：Sigma公司产品

对氨基苯甲酸(4-aminobenzoic acid)：Fluka公司产品

β -兴奋剂是一类化学合成的苯乙醇胺类衍生物，20世纪80年代至今，人工合成的 β -兴奋剂主要有克伦特罗(clenbuterol)、卡布特罗(carbuterol)、莱克多巴胺(ractopamine)、沙丁胺醇(salbutamol)、特布他林(terbutaline)等十余种。 β -兴奋剂作用机理和肾上腺素、去甲肾上腺素相同，可影响营养物质在动物体内的流向和重新分配，有效促进肌肉组织生长，降低胴体脂肪含量，提高瘦肉率和增加瘦肉产量，因而曾在欧美广泛使用。但另一方面， β -兴奋剂具有类似肾上腺素的化学结构，能与细胞表面的 β -受体结合而产生明显的生理作用，如心悸、头疼、目眩、恶心、呕吐、战栗、神经过敏、血管扩张、心率加快等，而且这类化合物具有口服活性，如果违法超量使用就会对人与动物的肝肾等内脏器官产生一定的毒副作用。1992年，西班牙发生40多人食用含 β_2 -兴奋剂的畜产品中毒事件；1997年，香港发生进食大陆供港猪的内脏引起人中毒事件；2006年9月上海发生盐酸克伦特罗中毒事件。现在欧美各国均禁止其在畜牧生产上的应用，美国规定只能用于科研，我国农业部也正式发文严禁作为添加剂使用。但是由于经济利益的驱使，在畜牧生产中违法使用现象较为普遍，致使药物在动物体内残留量过高，难以达到发达国家的标准，畜禽产品出口屡遭绿色壁垒，使贸易受阻，给整个产业造成很大的经济损失。为了应对药物残留给整个产业发展和食品安全保障所带来的挑战，我国政府和相关部门，已加大了对药物添加剂的检测力度，修订和颁布了更为严格的法律和法规。对畜产品生产过程进行监控和执法，一是制定最高残留限

量的标准，二是改进残留分析方法和技术，发展快速、准确和高灵敏度的检测手段。

在 β -兴奋剂药物残留的检测中，常用的方法有仪器法如高效液相色谱法、气相色谱法、液相-质谱联用法等。这些方法准确、稳定、可靠，可以作为标准方法。但仪器法价格昂贵，费时较长，且造成有机溶剂污染，需要大型仪器设备，需要专门的技术人员，所以难于用于现场操作。酶联免疫法（ELISA）具有灵敏、快速、特异性好、样品量少，不需要专门人员操作等优点，这使得ELISA法成为一种理想的、可用于常规扫描的检测方法。但是酶联免疫检测法需要高质量的抗体， β -兴奋剂都是小分子有机化合物，不具有免疫原性，称之为半抗原。所以必须把这些化合物转变成能引发动动物免疫系统产生抗体的免疫原（又称之为完全抗原）。克伦特罗是作为促生长剂最常使用的一种药物，但随着对盐酸克伦特罗检测力度的加大，非法使用者开始使用其它代替品，由于特布他林与盐酸克伦特罗的促生长作用相似，特布他林成为继盐酸克伦特罗之后的主要的代替品之一，国内外对特布他林的研究还比较少，因此研究特布他林的免疫原的合成及抗体制备就显得十分必要。

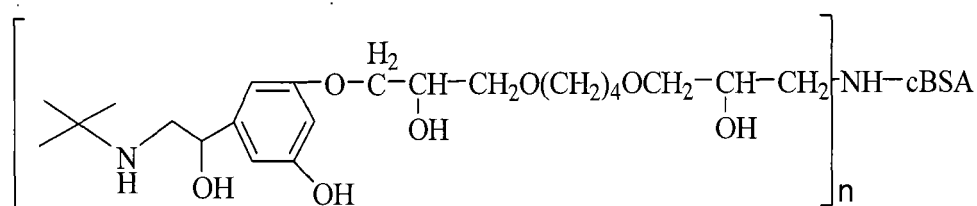
发明内容

针对上述现有技术的不足，本发明要解决的问题是：提供一种能引发动动物免疫系统产生针对特布他林有特异反应的抗体的免疫原，即特布他林（terbutaline）的偶联物及其制备方法。同时，本发明还提供了所述的特布他林的偶联物作为免疫原在制备特布他林特异反应抗体中的应用。

本发明所述特布他林的偶联物，由特布他林半抗原与产生免疫原性的载体物质牛血清蛋白或卵清蛋白偶联构成。

其中：上述产生免疫原性的载体物质优选是牛血清蛋白。

本发明所述的特布他林的偶联物，其结构通式如（I）



（I）

其中：n：为与一个牛血清蛋白分子结合的特布他林的分子数，所述n为整数1~15，cBSA为活化牛血清蛋白（Cationized Bovine Serum Albumin），分子量范围是66 KDa~69 KDa；

上述偶联物显示出如下物化特征：

- （1）外观：白色粉末固体；
- （2）紫外吸收光谱：276 nm。

在上述的特布他林的偶联物中，所述n优选为整数1~10，活化牛血清蛋白（cBSA）分子量范围优选是67 KDa~68 KDa。

上述的特布他林的偶联物的制备方法是：将特布他林与产生免疫原的载体物质连接起来，结合为具有诱发动动物免疫系统产生抗体的偶联物，并保持该偶联物的生物活性不变。

上述的特布他林的偶联物的制备方法，具体由如下步骤完成：

1) 溶液A的制备：将活化的牛血清蛋白溶在 $\text{pH} = 10.5 \pm 0.6$ 、浓度为 50 mM 碳酸盐缓冲液中，同时按牛血清蛋白与 1, 4-丁二醚摩尔比为 1 : 90~150 的比例量取 1, 4-丁二醚也加入该溶液中，室温反应 22 ± 2 小时，得无色澄清溶液A，备用；

2) 溶液B的制备：按特布他林与 1, 4-丁二醚的摩尔比为 2 : 1-1 : 1 的比例称取特布他林溶在 $\text{pH} = 10.5 \pm 0.6$ 、浓度为 50 mM 碳酸盐缓冲液中，然后把配好的特布他林溶液滴加到通入氮气的A溶液中，室温反应 22 ± 2 小时，得无色澄清溶液B。

3) 用 pH 为 7.30-7.50，浓度为 0.01 M-0.02 M 的磷酸缓冲液在 0-4°C 下，搅拌透析溶液B 70~80 小时，然后改用蒸馏水透析 20~30 小时，每 6 小时更换一次透析液；

4) 冻干透析后的溶液，得到白色的特布他林的偶联物。

在上述的特布他林的偶联物的制备方法中：步骤 1) 所述牛血清蛋白与 1, 4-丁二醚的摩尔比优选为 1 : 99。

在上述的特布他林的偶联物的制备方法中：步骤 2) 所述特布他林与 1, 4-丁二醚的摩尔数比优选为 1.5 : 1。

在上述的特布他林的偶联物的制备方法中：步骤 3) 所述磷酸溶液的 pH 优选为 7.4，浓度优选为 0.01 M。

本发明所述的特布他林的偶联物作为免疫原在制备特布他林特异反应抗体中的应用。

利用本发明的技术方案可以成功地把半抗原特布他林与载体蛋白特别是牛血清蛋白偶联起来，从而合成了能够在动物体内引发免疫反应，产生抗体的完全免疫原——特布他林的偶联物。

利用本发明所述的特布他林的偶联物作为免疫原免疫新西兰大白兔，成功地获得了对半抗原特布他林有特异反应的抗体。经酶联免疫检测实验鉴定，利用本发明所述的特布他林的偶联物作为免疫原制备的特布他林特异反应抗体，其抗血清效价达到 1 : 50,000 以上，其最低检测限为 0.3 ppb， IC_{50} 为 9.25 ppb。

上述的特布他林的偶联物以及高效价的特布他林特异反应抗体的制备成功，为制备特布他林的酶联免疫检测试剂盒提供了基础。在实际应用中，把所述制备的特布他林特异反应抗体镀在微孔盘内，就可以用来检验动物源食品中特布他林的残留。由于本发明所述方法具有简易，快速，特异，准确的特点，所以可以用于食品检验检疫中的初步扫描检测之用。这样不但可以节省大量的检验时间，还可以用于现场操作，从而弥补了仪器法费时较长，需要大型仪器设备支持，需要专门的技术人员操作，难于用于现场的不足。所以，半抗原特布他林与载体蛋白特别是牛血清蛋白偶联物的合成及抗血清的成功制备为这种快速检验法奠定了基础。

附图说明

图 1 紫外吸收光谱图：

其中：1：硫酸特布他林 2：cBSA 3：特布他林的偶联物

具体实施方式

实施例1

(1) 溶液A的制备：称取 50 mg cBSA ($0.735 \mu\text{mol}$) 溶在 3 mL 50 mM 碳酸盐 (pH =10.7) 缓冲液中，然后向溶液中加入 13.8 μL ($72.9 \mu\text{mol}$) 的1, 4-丁二醚 (BDE)，室温反应 20 小时，得无色澄清溶液A, 备用；

(2) 溶液B的制备：称取 30 mg ($109.4 \mu\text{mol}$) 硫酸特布他林溶在 1.5 mL 50 mM 碳酸盐 (pH =10.7) 缓冲液中，把溶液A通入氮气，随后将硫酸特布他林溶液逐滴加入A溶液中，室温反应 20 小时，得无色澄清溶液B。

(3) 用pH为7.40，浓度为 0.01 M 的磷酸缓冲液在 0—4℃ 下，搅拌透析溶液B 70~80 小时，然后改用蒸馏水透析 20~30 小时，每 6 小时更换一次透析液；

(4) 冻干透析好的溶液，得到白色的特布他林的偶联物。

通过紫外吸收光谱确定产物的吸收峰位于 276 nm。

实施例2

(1) 溶液A的制备：称取 50 mg cBSA ($0.735 \mu\text{mol}$) 溶在 3 mL 50 mM 碳酸盐 (pH =11.1) 缓冲液中，然后向溶液中加入 16.7 μL ($88.2 \mu\text{mol}$) 的BDE，室温反应 22 小时，得无色澄清溶液A, 备用；

(2) 溶液B的制备：称取 25 mg ($91.2 \mu\text{mol}$) 硫酸特布他林溶在 1.0 mL 50 mM 碳酸盐 (pH =11.1) 缓冲液中，把溶液A通入氮气，随后将硫酸特布他林溶液逐滴加入A溶液中，室温反应 24 小时，得无色澄清溶液B。

(3) 用pH为 7.50，浓度为 0.01M 的磷酸缓冲液在 0—4℃ 下，搅拌透析溶液B 70~80小时，然后改用蒸馏水透析 20~30 小时，每 6 小时更换一次透析液；

(4) 冻干透析好的溶液，得到白色的特布他林的偶联物，通过紫外吸收光谱确定产物的吸收峰位于 276 nm。

实施例3

(1) 溶液A的制备：称取 60 mg cBSA ($0.882 \mu\text{mol}$) 溶在 4 mL 50 mM 碳酸盐 (pH =10.9) 缓冲液中，然后向溶液中加入 25.0 μL ($132.3 \mu\text{mol}$) 的BDE，室温反应 24 小时，得无色澄清溶液A, 备用；

(2) 溶液B的制备：称取 40 mg ($146 \mu\text{mol}$) 硫酸特布他林溶在 3 mL 50 mM 碳酸盐 (pH =10.9) 缓冲液中，把溶液A通入氮气，随后将硫酸特布他林溶液逐滴加入A溶液中，室温反应 24 小时，得无色澄清溶液B。

(3) 用pH为 7.30，浓度为 0.02 M 的磷酸缓冲液在 0—4℃ 下，搅拌透析溶液B 70~80 小时，然后改用蒸馏水透析 20~30 小时，每 6 小时更换一次透析液；

(4) 冻干透析好的溶液，得到白色的特布他林的偶联物，通过紫外吸收光谱确定产物的吸收峰位于 276 nm。

实施例4

抗体的制备纯化及检测

1. 抗体的制备

选择上述实施例1所制备的特布他林的偶联物作为免疫原进行动物免疫实验以制备

抗体。

取1 mg/mL 的特布他林的偶联物的溶液1mL，加入等体积的弗氏完全佐剂，充分乳化后，经皮下多点注射给四只体重 2 kg 的雄性健康新西兰大白兔，1 mL/只，15 天后以同量抗原与弗氏不完全佐剂充分乳化后进行二免，二免以后，每隔 15 天加强免疫一次，抗原量减半，共免疫 5 次。最后一次免疫 7 天后，心脏采血，室温静置 1 小时，0-4℃ 过夜，13000 转/分离心 15 分钟，收集血清，-20℃ 保存，备用。

2. 抗体的纯化

搅拌状态下向上述制备的抗血清中加入饱和硫酸铵至硫酸铵溶液的终浓度为体积百分比是 50%，0-4℃ 放置过夜，有沉淀物析出；以 13000 转/分离心 15 分钟，弃上清液，向沉淀物中加入 0.01 M、pH 7.4 的PBS至沉淀溶解，然后加入饱和硫酸铵溶液至硫酸铵溶液的终浓度为体积百分比是 33%，0-4℃ 放置过夜，有沉淀物析出；以 13000 转/分离心 15 分钟，弃上清液，向沉淀物中加入 0.01 M、pH 7.4 的PBS至沉淀溶解。将上述纯化物用 0.01 M、pH 7.4 的PBS，0-4℃ 透析，换透析液 3 次，然后加入质量体积百分比为 0.02% 的叠氮化钠，-20℃ 保存，备用。

3. 抗体的酶联免疫检测

(1) 效价测定：方法采用常规的间接酶联免疫吸附检测法：

在 96 孔的酶标板上，用 100 μL/孔的特布他林与卵清蛋白的偶联物（2.5 μg/mL）包被，0-4℃ 放置过夜，然后用PBST（1000 mL pH 7.4、浓度 0.01 M 的PBS+体积百分比是 0.05%Tween20）洗板四次；用 250 μL/孔封闭液（1000 mL PBST+质量体积百分比是 1% 卵清蛋白）封闭，室温放置 3 小时，洗板；在洗去封闭液后，加 100 μL/孔的抗血清，室温放置 2 小时，洗板；在洗去抗血清以后，每孔加入 1:1000 的辣根过氧化物酶标记的羊抗兔IgG 100 μL，室温放置 1 小时，洗板；加入底物邻苯二胺显色，室温放置 10 min，再加入 2M HCl终止。酶标仪A492nm检测。

经测定：本发明所述特布他林的偶联物抗体效价达 1:51,200。

效价的判定以P/N大于 2:1 的血清最高稀释倍数为该抗体的酶联免疫检测效价。

其中：P为代测血清在某一稀释倍数测定的吸光度值，N为阴性对照在相应稀释倍数测定的吸光度值。

(2) 特异性测定：

测定步骤与效价测定类似，在上述最佳的包被抗原与抗体浓度条件下，加抗体的同时加入特布他林溶液（从 0.2 ppb-2000 ppb），与包被抗原竞争结合有限的抗体，特布他林药的浓度越高，抗体与包被抗原就结合得越少，从而显色越浅，吸光度值越低。再与空白对照（只加抗体，未加特布他林药的吸光度值）相比较，以确定抗体特异性。

通过测定抗体特异性较好，其最低检测限可达到 0.3 ppb，IC₅₀为 9.25 ppb。

实施例5

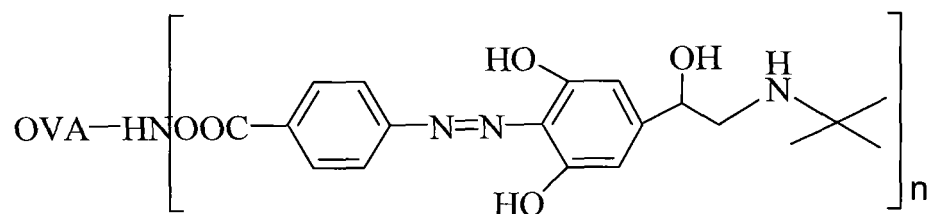
(1) 溶液A的制备：称取 31.3 mg (0.723 μmol) OVA溶在 3 mL 50 mM 碳酸盐 (pH =11.08) 缓冲液中，然后向溶液中加入 11.04 μL (58.32 μmol) 的BDE，室温反应 24 小时，得无色澄清溶液A，备用；

(2) 溶液B的制备：称取 24 mg (87.49 μmol) 硫酸特布他林溶在 1 mL 50 mM 碳酸盐 (pH =11.08) 缓冲液中，把溶液A通入氮气，随后将硫酸特布他林溶液逐滴加入A

溶液中，室温反应 20 小时，得无色澄清溶液B。

(3) 用pH为 7.4，浓度为 0.01 M 的磷酸缓冲液在 0—4℃ 下，搅拌透析溶液B 70~80小时，然后改用蒸馏水透析 20~30 小时，每 6 小时更换一次透析液；

(4) 冻干透析好的溶液，得到白色的特布他林的偶联物，通过紫外吸收光谱确定产物的吸收峰位于276 nm，其结构图如下：



其中：上述 n 为与一个卵清蛋白分子结合的特布他林的分子数，所述 n 为整数 1~15。

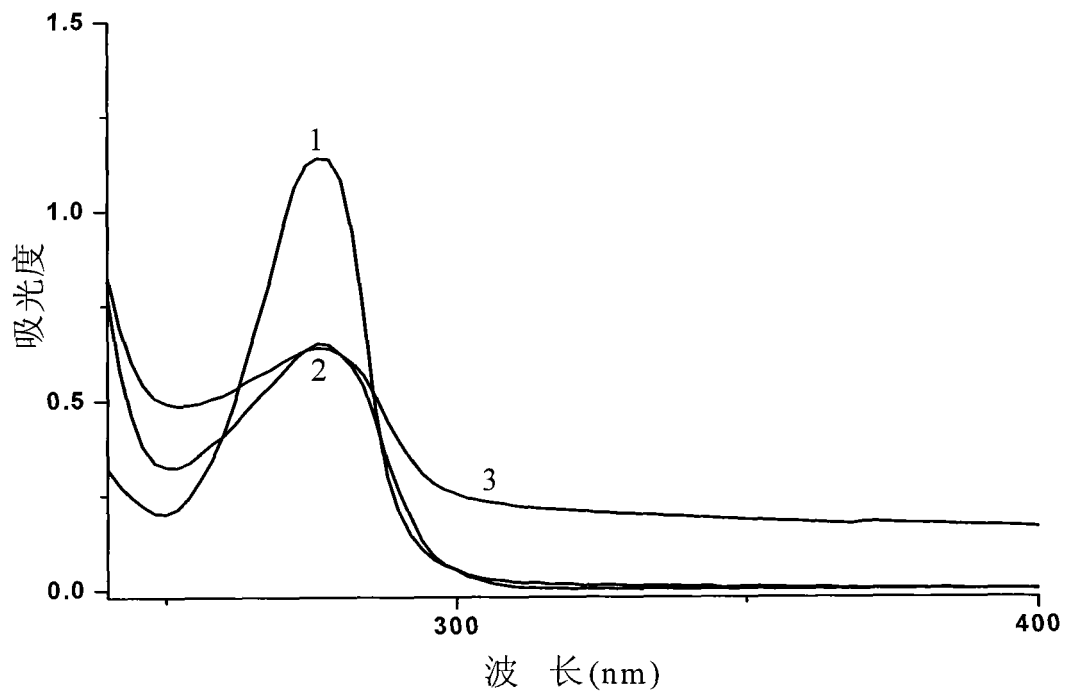


图 1

专利名称(译)	特布他林的偶联物及其制备方法与应用		
公开(公告)号	CN101078725A	公开(公告)日	2007-11-28
申请号	CN200710014993.8	申请日	2007-06-28
[标]申请(专利权)人(译)	山东大学		
申请(专利权)人(译)	山东大学		
当前申请(专利权)人(译)	山东大学		
[标]发明人	郗日沫 张玉兰 卢圣欣 刘围 赵承彪		
发明人	郗日沫 张玉兰 卢圣欣 刘围 赵承彪		
IPC分类号	G01N33/531 G01N33/53		
代理人(译)	许德山		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种通式(I)的特布他林的偶联物，由特布他林半抗原与产生免疫原性的载体物质牛血清蛋白或卵清蛋白偶联构成。其中n为与一个牛血清蛋白分子结合的特布他林的分子数，所述n为整数1~15；cBSA为活化的牛血清蛋白，分子量范围是66KDa~69KDa。本发明还公开了所述的偶联物的制备方法，即将特布他林与产生免疫原性的载体物质连接起来，结合为具有诱发动物免疫系统产生抗体的偶联物。本发明的特布他林的偶联物通过免疫新西兰大白兔，制备了效价达1:50,000以上的抗血清，其最低检测限为0.3ppb，IC50为9.25ppb。本发明具有方法简便，快速，特异，准确的特点，为制备特布他林的酶联免疫检测试剂盒提供了基础。

