(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 104277107 A
(43)申请公布日 2015.01.14

(21)申请号 201410535384.7

(22)申请日 2014.10.11

(71)申请人 中国农业大学
地址 100193 北京市海淀区圆明园西路 2 号

(72)发明人 王战辉 沈建忠 史为民 张素霞
江海洋 温凯 张会艳 盛雅洁

(74)专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司 11245
代理人 关畅 陈晓庆

(51)Int.Cl.
C07K 16/02(2006.01)
C07K 1/30(2006.01)
G01N 33/53(2006.01)

权利要求书1页 说明书7页 附图2页

(54)发明名称

一种沃尼妙林卵黄抗体的制备方法

(57)摘要

本发明公开了一种沃尼妙林卵黄抗体的制备方法。本发明公开一种制备沃尼妙林卵黄抗体的方法,包括如下步骤:通过碳二亚胺将盐酸沃尼妙林与载体蛋白进行偶联,得到免疫原;用免疫原免疫蛋鸡,得到免疫蛋鸡的鸡卵;提取鸡卵卵黄中的沃尼妙林卵黄抗体。利用本发明公开的方法制备沃尼妙林抗体具有制备过程简单、经济,产量高等独特优点,在兽药残留检测中具有良好的应用前景。

CN 104277107 A

1. 一种制备沃尼妙林卵黄抗体的方法，包括如下步骤：通过碳二亚胺将盐酸沃尼妙林与载体蛋白进行偶联，得到免疫原；用免疫原免疫蛋鸡，得到免疫蛋鸡的鸡卵；提取鸡卵卵黄中的沃尼妙林卵黄抗体。

2. 根据权利要求 1 所述的方法，其特征在于：所述载体蛋白为牛血清白蛋白。

3. 根据权利要求 1 或 2 所述的方法，其特征在于：所述用免疫原免疫蛋鸡的方法如下：将所述免疫原用等体积的弗氏完全佐剂乳化后首次免疫蛋鸡，再将首次免疫中所用的免疫原剂量减半，并用等体积的弗氏不完全佐剂乳化后对首次免疫的蛋鸡进行加强免疫。

4. 根据权利要求 1-3 任一所述的方法，其特征在于：所述免疫的方式为背部多点免疫。

5. 根据权利要求 1-4 任一所述的方法，其特征在于：所述免疫原用 PBS 溶液溶解；

所述 PBS 溶液的浓度具体为 0.01mol/L。

6. 根据权利要求 1-5 任一所述的方法，其特征在于：所述首次免疫的所述免疫原的剂量为 300-400ug；

所述加强免疫的次数为 7-8 次，具体为 7 次。

7. 根据权利要求 1-6 任一所述的方法，其特征在于：所述提取鸡卵卵黄中的沃尼妙林卵黄抗体的方法为饱和硫酸铵沉淀法，步骤如下：

1) 将免疫蛋鸡的鸡卵中的卵黄与纯水混匀，调节 pH 至 5.0-5.2，放置，得溶液 1；

2) 将溶液 1 离心，收集上清，加入 pH 7.2-7.4 的饱和 $(NH_4)_2SO_4$ 水溶液，使饱和 $(NH_4)_2SO_4$ 水溶液的体积占总体积的 30-40%，放置，得溶液 2；

3) 将溶液 2 离心，取沉淀即得。

8. 根据权利要求 1-7 任一所述的方法，其特征在于：所述卵黄和所述纯水的体积比为 1:5-6，具体为 1:6；

所述放置的条件为 4℃ -10℃放置 12-20h，具体为 4℃放置 12-20h；

所述饱和 $(NH_4)_2SO_4$ 水溶液占总体积的体积百分含量为 40%。

9. 由权利要求 1-8 任一所述的方法制备得到的沃尼妙林抗体。

10. 权利要求 9 所述的沃尼妙林抗体在制备具有结合沃尼妙林的活性的产品中的应用；

或，

权利要求 9 所述的沃尼妙林抗体在制备检测沃尼妙林的产品中的应用。

一种沃尼妙林卵黄抗体的制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种沃尼妙林抗体的制备方法;特别涉及一种沃尼妙林卵黄抗体的制备方法,属于抗体制备领域。

背景技术

[0002] 沃尼妙林(Valnemulin,VAL)为新一代截短侧耳类(Pleuromutilin)半合成抗生素,具有安全性较高、抗菌谱广、抗菌活性强、耐药性低等特点而受到广泛关注,目前该药主要用于畜禽支原体及肠道螺旋体感染的预防与治疗。但是由于应用比较广泛,其在动物组织内的残留现象较为严重,可能会引起一些不良反应,此外,沃尼妙林还可以与聚醚类药物作用导致动物中毒。因此,欧洲医药评价局(EMEA)规定,沃尼妙林在猪组织中的最大残留限量(MRL):肌肉,50μg/kg;肝脏,500μg/kg;肾脏,100μg/kg。

[0003] 卵黄抗体(Egg yolk antibody)是从免疫禽蛋卵黄中提取的特异性抗体,为禽类所特有,其化学性质稳定,生产制备过程简单、经济,产量高,适合大规模生产。制备卵黄抗体时无需对动物进行采血,便于采集,不会对动物造成损伤,符合现代动物保护要求。但是目前卵黄抗体在兽药残留检测领域应用较少,并且未见沃尼妙林卵黄抗体制备的报道。

发明内容

[0004] 本发明的目的是提供一种沃尼妙林卵黄抗体的制备方法。

[0005] 本发明提供一种制备沃尼妙林卵黄抗体的方法,包括如下步骤:通过碳二亚胺将盐酸沃尼妙林与载体蛋白进行偶联,得到免疫原;用免疫原免疫蛋鸡,得到免疫蛋鸡的鸡卵;提取鸡卵卵黄中的沃尼妙林卵黄抗体。

[0006] 上述方法中,所述载体蛋白为牛血清白蛋白。

[0007] 上述任一所述的方法中,所述用免疫原免疫蛋鸡的方法如下:将所述免疫原用等体积的弗氏完全佐剂乳化后首次免疫蛋鸡,再将首次免疫中所用的免疫原剂量减半,并用等体积的弗氏不完全佐剂乳化后对首次免疫的蛋鸡进行加强免疫。

[0008] 上述任一所述的方法中,所述免疫的方式为背部多点免疫。

[0009] 上述任一所述的方法中,所述免疫原用 PBS 溶液溶解;

[0010] 所述 PBS 溶液的浓度具体为 0.01mol/L。

[0011] 上述任一所述的方法中,所述首次免疫的所述免疫原的剂量为 300-400ug;

[0012] 所述加强免疫的次数为 7-8 次,具体为 7 次;

[0013] 所述加强免疫具体为在首次免疫后第 15 天、29 天、43 天、55 天、79 天、91 天以及 121 天各进行一次加强免疫。

[0014] 上述任一所述的方法中,所述提取鸡卵卵黄中的沃尼妙林卵黄抗体的方法为饱和硫酸铵沉淀法,步骤如下:

[0015] 1)将免疫蛋鸡的鸡卵中的卵黄与纯水混匀,调节 pH 至 5.0-5.2,放置,得溶液 1;

[0016] 2)将溶液 1 离心,收集上清,加入 pH7.2-7.4 的饱和 $(NH_4)_2SO_4$ 水溶液,使饱和

$(NH_4)_2SO_4$ 水溶液的体积占总体积的 30-40％，放置，得溶液 2；

[0017] 3) 将溶液 2 离心，取沉淀即得。

[0018] 上述任一所述的方法中，所述卵黄和所述纯水的体积比为 1:5-6，具体为 1:6；

[0019] 所述放置的条件为 4℃ -10℃放置 12-20h，具体为 4℃放置 12-20h；

[0020] 所述饱和 $(NH_4)_2SO_4$ 水溶液占总体积的体积百分含量为 40％；

[0021] 所述调节 pH 至 5.0-5.2 所用的试剂为盐酸。

[0022] 由上述任一所述的方法制备得到的沃尼妙林抗体也属于本发明的保护范围。

[0023] 上述沃尼妙林抗体在制备具有结合沃尼妙林的活性的产品中的应用也属于本发明的保护范围；

[0024] 或，

[0025] 上述沃尼妙林抗体在制备检测沃尼妙林的产品中的应用也属于本发明的保护范围。

[0026] 本发明的有益效果在于，利用本发明提供的方法制备的沃尼妙林抗体产量高，在整个试验周期（43 周）内收集卵黄抗体的量大约为 20g。在免疫后前 10 周，抗体效价上升速度较快，然后慢慢趋向稳定，抗体效价可在一个较高的水平维持 15 周以上，并且抗体的最高效价达 $1:2^{18}$。抗体灵敏度较高，随着免疫的进行，各抗体灵敏度不断提高，所制标准曲线的 IC_{50} 逐渐下降，并且最低可降至 21.77ng/mL。抗体特异性良好，除与泰妙菌素存在 383.9％的交叉反应率外，与其它结构相似的抗生素类药物均不存在显著的交叉反应。

[0027] 利用本发明提供的方法制备沃尼妙林抗体具有制备过程简单、经济，产量高等独特优点，在兽药残留检测中具有良好的应用前景。

附图说明

[0028] 图 1 为沃尼妙林免疫原结构图。

[0029] 图 2 为沃尼妙林卵黄抗体效价变化趋势图。

[0030] 图 3 为沃尼妙林卵黄抗体灵敏度变化趋势图。

具体实施方式

[0031] 下述实施例中所使用的实验方法如无特殊说明，均为常规方法。

[0032] 下述实施例中所用的材料、试剂等，如无特殊说明，均可从商业途径得到。

[0033] 盐酸沃尼妙林标准品购自欧洲药典委员会 BP907-F67029，产品目录号为 Y0000584。

[0034] 泰妙菌素标准品购自欧洲药典委员会 BP907-F67029。

[0035] 红霉素和阿维菌素标准品均购自梯希爱（上海）化成工业发展有限公司。

[0036] 替米考星和泰乐菌素标准品均购自中国兽药监察所。

[0037] 弗氏完全佐剂、弗氏不完全佐剂均购自 Sigma 公司，产品目录号分别为 F-5881 和 F-5506。

[0038] 蛋鸡购自北京市西苑农贸市场

[0039] Proclin 300 生物防腐剂购自 sigma 公司

[0040] 0.05M 的碳酸盐缓冲液（pH9.6）的组成成分及含量为：

[0041] Na_2CO_3 1.59g

[0042] $NaHCO_3$ 2.93g

[0043] 纯水 1000mL。

[0044] PBST 缓冲液 (pH7.2) 的组成成分及含量为：

[0045]

$Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ 3.12g

$NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ 1.76 g

Tween-20 500μL

蒸馏水 1000mL。

[0046] 封闭液的组成成分及含量为：

[0047]

小牛血清 50 mL

蔗糖 50 g

酪蛋白 2.5 g

$Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ 5.8 g

$NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ 0.593 g

Proclin 300 300 μL

纯水 950 mL。

[0048] 抗体稀释液的组成成分及含量为：

[0049]

NaCl 16 g

$NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ 0.6 g

无水 Na_2HPO_4 1.072 g

KCl 0.4 g

[0050]

Proclin 300 300 μL

聚乙二醇辛基苯基醚 (Triton) 500 μL

纯水 1000 mL。

[0051] 酶标二抗稀释液的组成成分及含量为：

[0052]

小牛血清	50 mL
NaCl	16g
$NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$	0.6 g
无水 Na_2HPO_4	1.072 g
KCl	0.4 g
Proclin 300	200 μL

纯水 950 mL。

[0053] 3,3',5,5'-四甲基联苯胺溶液的组成成分及含量为：

[0054]

TMB	96.15 mg
乙二醇	38.46 mg
质量分数为 30%的过氧化氢	961μL
$Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$	35.4 g
柠檬酸	8.97g

纯水 1000 mL。

[0055] 实施例 1、沃尼妙林卵黄抗体的制备

[0056] 一、沃尼妙林抗原合成

[0057] 将 100mg 载体蛋白牛血清白蛋白 (BSA)、50mg 盐酸沃尼妙林溶于 2mL 0.01M(pH7.4) 的 PBS 缓冲液中，得到溶液Ⅰ；称取 100mg 碳二亚胺 (EDC)，溶于 1mL 纯水中，得到溶液Ⅱ；将溶液Ⅱ加入到溶液Ⅰ中，20-25℃搅拌反应 2-3h，得到目标产物 VAL-BSA，将其在室温 (20-25℃) 条件下 0.01mol/L PBS 溶液中透析 3-4 天，-20℃保存。

[0058] 二、用沃尼妙林免疫原免疫蛋鸡

[0059] 用免疫原 VAL-BSA 免疫蛋鸡。

[0060] 首次免疫时将 VAL-BSA(用 0.01mol/L PBS 溶液溶解) 用等体积的弗氏完全佐剂乳化后对蛋鸡进行背部多点免疫，VAL-BSA 的免疫剂量为 300-400μg。之后第 15 天、29 天、43 天、55 天、79 天、91 天以及 121 天各进行一次加强免疫，加强免疫时将免疫原 VAL-BSA(用 0.01mol/L PBS 溶液溶解) 与等体积的弗氏不完全佐剂乳化后进行，免疫原 VAL-BSA 的免疫剂量为为首次免疫剂量的一半。

[0061] (在免疫的过程中做效价以及活性的监控，七八次免疫的效果较好。在加强免疫时，免疫间隔时间会越来越长，以保证免疫效果和利用度。)

[0062] 三、沃尼妙林卵黄抗体的提取

[0063] 沃尼妙林卵黄抗体的提取采用水稀释法进行，方法如下：

[0064] (一) 分离卵黄和卵清，将 10mL 首次免疫后收集的不同时间点 (大约每三天收集一次) 的鸡卵卵黄与 60mL 纯水充分混匀 (卵黄与纯水的体积比范围为 1:5-6 均可)，滴加 1M 盐酸水溶液调 pH 至 5.0-5.2，在 4℃冰箱 (4℃ -10℃均可) 过夜放置 12-20 小时；

[0065] (二) 10000rpm 离心 30min(9500-10500rpm 离心 25-30min 均可)，收集上清，加入

pH7.2-7.4 的 2/3 上清体积的饱和 $(NH_4)_2SO_4$ 水溶液，使饱和 $(NH_4)_2SO_4$ 水溶液的体积占溶液总体积的 30-40%（具体为 40%），4℃冰箱（4℃ -10℃均可）过夜放置 12-20 小时；

[0066]　（三）5000rpm 离心 20min（4500-5000rpm 离心 20-30min 均可），弃上清，沉淀用 5mL 0.01mol/L 的 PBS 溶解，-20℃冰箱保存。

[0067]　实施例 2、沃尼妙林卵黄抗体的鉴定

[0068]　一、抗体产量的测定

[0069]　沃尼妙林卵黄抗体浓度通过 NaNoDrop 分光光度计进行检测，结果显示沃尼妙林卵黄抗体平均浓度在 15-18mg/mL 左右，即从每个卵黄中大约能够收集 1g 卵黄抗体，从首次免疫后开始到试验结束的整个试验周期（43 周）内收集卵黄抗体的量大约为 20g。

[0070]　二、抗体效价的测定

[0071]　采用实施例 1 中步骤一的方法制备包被原 VAL-OVA，其中仅将卵清蛋白代替牛血清白蛋白。

[0072]　间接 ELISA 测定沃尼妙林卵黄抗体效价，方法如下：

[0073]　（一）包被：用 0.05M 的碳酸盐缓冲液（pH9.6）将包被原 VAL-OVA 稀释成 0.6μg/mL，在 96 孔透明酶标板中每孔加入 100μL，37℃温箱孵育 2h，用 PBST 缓冲液（pH7.2）洗板 3 次。

[0074]　（二）封闭：加入 150μL/ 孔的封闭液，37℃温箱孵育 1h，弃封闭液，PBST 缓冲液（pH7.2）洗涤 3 次，拍干。

[0075]　（三）加待测抗体：各列孔加入 1:500 稀释开始的用抗体稀释液二倍倍比稀释的实施例 1 收集的各时间点的沃尼妙林卵黄抗体，每孔 100μL，37℃温箱反应 30min，PBST 缓冲液（pH7.2）洗涤 3 次，拍干。

[0076]　同时设置未经免疫的蛋鸡所产鸡蛋提取的卵黄抗体作为阴性对照。

[0077]　（四）加酶标二抗：加入用酶标二抗稀释液按照体积比 1:5000 稀释的 HRP 标记兔抗鸡 IgY 抗体（购自 Jackson Immunosearch 公司），每孔 100μL，37℃温箱反应 30min，PBST 缓冲液（pH7.2）洗涤 3 次，拍干。

[0078]　（五）显色：将辣根过氧化物酶底物 3,3'，5,5' - 四甲基联苯胺溶液和质量分数为 30%的过氧化氢按照 1:1 的体积比混合，100μL/ 孔加样，室温显色 10min。

[0079]　（六）终止：每孔加入 50μL 2mol/L 的浓硫酸。

[0080]　（七）读数：以 OD_{450} 以及 OD_{630} 双波长测定各孔 OD 值，计算得到样本 OD（测定 OD_{450nm}- 测定 OD_{630nm}），以与阴性对照孔 OD 值（测定 OD_{450nm}- 测定 OD_{630nm}）的比值（P/N）大于 2.1 为限的沃尼妙林卵黄抗体的最大稀释倍数为其 ELISA 效价。

[0081]　检测结果如图 2 所示。

[0082]　图 2 表明，在首次免疫后前 10 周，沃尼妙林卵黄抗体效价上升速度较快，然后慢慢趋向稳定，抗体效价可在一个较高的水平维持 15 周以上，并且抗体的最高效价达 1 :2^{18}。

[0083]　三、卵黄抗体灵敏度的测定

[0084]　采用间接竞争 ELISA 测定免疫后不同时期各沃尼妙林卵黄抗体的灵敏度，具体操作步骤如下所示：

[0085]　（一）包被：用 0.05M 的碳酸盐缓冲液（pH9.6）将包被原 VAL-OVA 稀释成 0.6μg/mL，在 96 孔透明酶标板中每孔加入 100μL，37℃温箱孵育 2h，用 PBST 缓冲液（pH7.2）洗板

3 次。

[0086] （二）封闭：加入 150μL/ 孔的封闭液，37℃温箱孵育 1h，弃封闭液，PBST 缓冲液（pH7.2）洗涤 3 次，拍干。

[0087] （三）加入标准品和抗体：在各列孔中依次加入 50μL 浓度分别为 0、0.01、0.1、1、10、100 和 1000ng/mL 的盐酸沃尼妙林标准品，每个浓度三个平行；然后在各孔中加入 50μL 实施例 1 收集的各时间点的沃尼妙林卵黄抗体，37℃温箱反应 30min，PBST 缓冲液（pH7.2）洗涤 3 次，拍干。

[0088] 其中盐酸沃尼妙林标准品和沃尼妙林卵黄抗体竞争性结合包被原 VAL-OVA。

[0089] （四）加酶标二抗：加入用酶标二抗稀释液按照体积比 1:5000 稀释的 HRP 标记兔抗鸡 IgY 抗体（购自 Jackson Immunosearch 公司），每孔 100μL，37℃温箱反应 30min，PBST 缓冲液（pH7.2）洗涤 3 次，拍干。

[0090] （五）显色：将辣根过氧化物酶底物 3,3’,5,5’- 四甲基联苯胺溶液和质量分数为 30％的过氧化氢按照 1:1 的体积比混合，100μL/ 孔，室温显色 10min。

[0091] （六）终止：每孔加入 50μL 2mol/L 的浓硫酸。

[0092] （七）读数：以 OD_{450} 以及 OD_{630} 双波长测定各孔 OD 值，以盐酸沃尼妙林标准品浓度为横坐标，以 OD 值（测定 OD_{450nm}- 测定 OD_{630nm}）为纵坐标，利用 Origin8.0 的四参数方程进行拟合，建立标准曲线获得 IC_{50}。

[0093] 以 IC_{50} 为纵坐标，以首次免疫后的周数为横坐标建立曲线，如图 3 所示。

[0094] 图 3 表明，随着免疫的进行，各沃尼妙林卵黄抗体灵敏度不断提高，所制标准曲线的 IC_{50} 逐渐下降，、并且最低可降至 21.77ng/mL。

[0095] 四、卵黄抗体特异性的检测

[0096] 沃尼妙林卵黄抗体特异性的测定则是分别绘制盐酸沃尼妙林以及其他结构相似截短侧耳类药物（泰妙菌素、泰乐菌素）和大环内酯类药物（替米考星、红霉素、阿维菌素）的标准曲线（方法同步骤三，仅将标准品替换为上述各药物），获得 IC_{50}，根据公式：交叉反应率＝ $IC_{50(\text{盐酸沃尼妙林})}/IC_{50(\text{结构相似的药物})}\times 100\%$ 获得交叉反应率。

[0097] 交叉反应率结果如表 1 所示。

[0098] 表 1 交叉反应率测定结果

[0099]

药物名称	IC_{50}(ng/mL)	交叉反应率（%）
盐酸沃尼妙林	21.77	100
泰妙菌素	5.67	383.9
泰乐菌素	>500	<0.1
替米考星	>500	<0.1
红霉素	>500	<0.1
阿维菌素	>500	<0.1

[0100] 表 1 表明,沃尼妙林卵黄抗体与泰妙菌素存在 383.9%的交叉反应率,与其它结构相似的抗生素类药物均不存在显著的交叉反应率,表明此卵黄抗体存在较强的特异性。

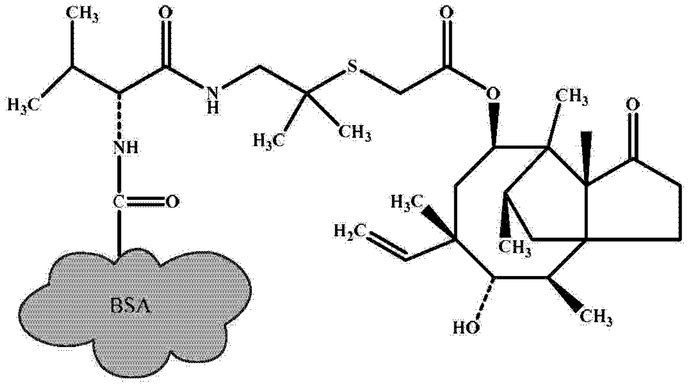
CH3
O
O
H3C
N
H
S
O
CH3
O
NH
H3C
CH3
C=O
H3C
H2C
CH3
BSA
HO
CH3

图 1

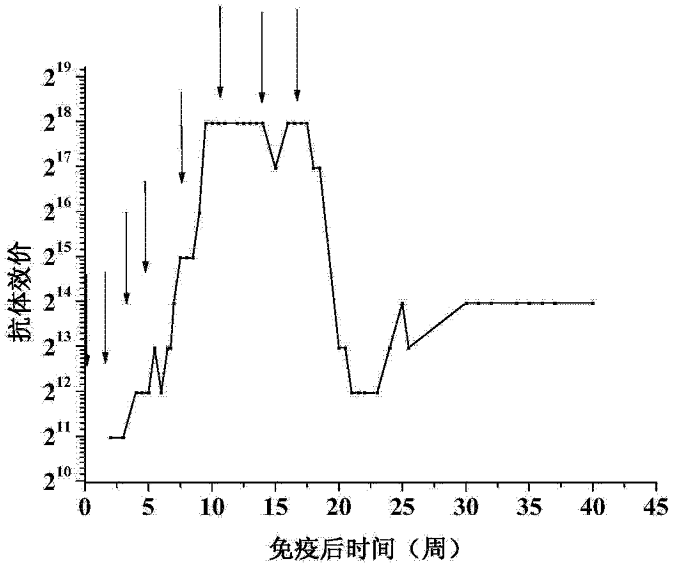
抗体效价
免疫后时间（周）
0
5
10
15
20
25
30
35
40
45

图 2

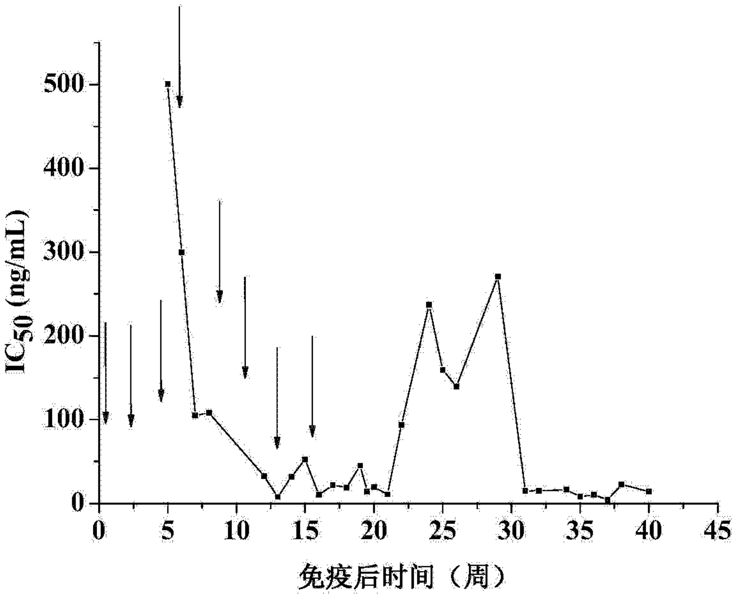

图 3

patsnap

专利名称(译)	一种沃尼妙林卵黄抗体的制备方法		
公开(公告)号	CN104277107A	公开(公告)日	2015-01-14
申请号	CN201410535384.7	申请日	2014-10-11
[标]申请(专利权)人(译)	中国农业大学		
申请(专利权)人(译)	中国农业大学		
当前申请(专利权)人(译)	中国农业大学		
[标]发明人	王战辉 沈建忠 史为民 张素霞 江海洋 温凯 张会艳 盛雅洁		
发明人	王战辉 沈建忠 史为民 张素霞 江海洋 温凯 张会艳 盛雅洁		
IPC分类号	C07K16/02 C07K1/30 G01N33/53		
代理人(译)	关畅 陈晓庆		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种沃尼妙林卵黄抗体的制备方法。本发明公开一种制备沃尼妙林卵黄抗体的方法，包括如下步骤：通过碳二亚胺将盐酸沃尼妙林与载体蛋白进行偶联，得到免疫原；用免疫原免疫蛋鸡，得到免疫蛋鸡的鸡卵；提取鸡卵卵黄中的沃尼妙林卵黄抗体。利用本发明公开的方法制备沃尼妙林抗体具有制备过程简单、经济，产量高等独特优点，在兽药残留检测中具有良好的应用前景。

$Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$	3.12g
$NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$	1.76 g
Tween-20	500μL

蒸馏水 1000mL。