



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104530220 A

(43) 申请公布日 2015. 04. 22

(21) 申请号 201410742420. 7

(22) 申请日 2014. 12. 05

(71) 申请人 中国人民解放军总后勤部卫生部药品仪器检验所

地址 100071 北京市丰台区丰台西路 17 号

(72) 发明人 张癸荣 魏彪

(74) 专利代理机构 北京恒都律师事务所 11395
代理人 李向东

(51) Int. Cl.

C07K 14/765(2006. 01)

C07K 16/18(2006. 01)

G01N 33/53(2006. 01)

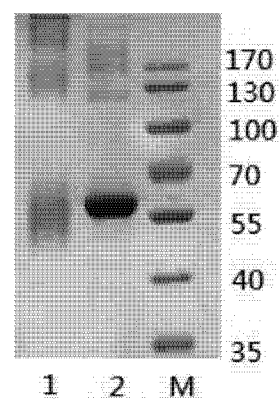
权利要求书1页 说明书7页 附图3页

(54) 发明名称

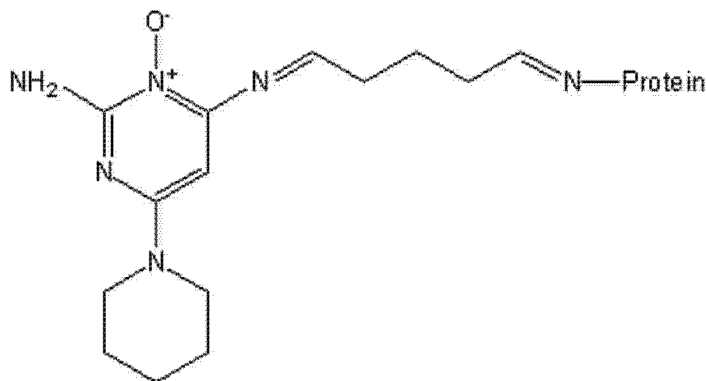
米诺地尔人工抗原、其多克隆抗体及其制备方法和应用

(57) 摘要

本发明提供一种具有良好免疫原性的米诺地尔人工抗原、其多克隆抗体及其制备方法和应用。通过米诺地尔半抗原设计、连接臂引入、载体引入、合成、纯化等步骤制备出具有免疫原性的人工抗原,再经免疫动物等步骤制备出多克隆抗体并评估其效价。本发明提供的米诺地尔人工抗原及其多克隆抗体可用于米诺地尔的免疫检测,满足低成本、快捷、操作简便的检测要求;解决当前没有高灵敏度、高特异性的米诺地尔及其盐和衍生物的检测方法的问题。



1. 一种米诺地尔人工抗原,其特征在于,其结构式为:



2. 根据权利要求1所述的一种米诺地尔人工抗原的制备方法,其特征在于,包括如下步骤:

(1) 取米诺地尔 (Minoxidil),溶于甲醇中,再加水稀释,即得溶液 I ;

(2) 取蛋白载体,溶于 pH 值为 7.2-7.4 的缓冲溶液中,即得溶液 II ;

(3) 取 25% 的戊二醛 (GA),加水稀释 40 ~ 50 倍,即得溶液 III ;

(4) 量取溶液 I、溶液 II、溶液 III,其中溶液 I 和溶液 III 的摩尔浓度比为 50 ~ 100:1,将溶液 I 和溶液 III 混合均匀,混合后溶液逐滴加入到溶液 II 中,溶液 I 和溶液 III 的混合液与溶液 II 的体积比为 1 ~ 2:5,搅拌 8-12 小时;

(5) 将步骤 (4) 所得混合溶液装入透析袋中,对水透析 4-5 天,每天更换 2-3 次透析液,收集透析外液,即得米诺地尔人工抗原。

3. 根据权利要求2所述的一种米诺地尔人工抗原的制备方法,其特征在于,所述蛋白载体为牛血清白蛋白 (BSA)。

4. 根据权利要求2所述的一种米诺地尔人工抗原的制备方法,其特征在于,所述溶液 I 和溶液 III 的摩尔浓度比为 80:1。

5. 根据权利要求1所述的一种米诺地尔人工抗原的多克隆抗体,其特征在于,所述米诺地尔人工抗原的多克隆抗体是能与所述米诺地尔人工抗原发生特异性免疫反应的免疫球蛋白。

6. 根据权利要求5所述的一种米诺地尔人工抗原多克隆抗体的制备方法,其特征在于,包括如下步骤:

(1) 将制备好的米诺地尔人工抗原作为免疫原,对小鼠进行注射;

(2) 第一次免疫注射后,每隔 2 周注射一次,即加强免疫;

(3) 从第二次加强免疫起,每次加强免疫后的第 7-10 天,剪尾采血,免疫注射 4-6 次;

(4) 从采集的血液中分离获得抗血清。

7. 根据权利要求5所述的一种米诺地尔人工抗原多克隆抗体的应用,其特征在于,所述多克隆抗体用于米诺地尔及其盐和衍生物的免疫检测。

米诺地尔人工抗原、其多克隆抗体及其制备方法和应用

技术领域

[0001] 本发明属于基因工程领域,具体涉及一种米诺地尔人工抗原、其多克隆抗体及其制备方法和应用。

背景技术

[0002] 米诺地尔是一种治疗高血压的血管扩张药,局部长期使用时可刺激毛发增生。1988 年美国 FDA 批准米诺地尔可外用治疗男性雄激素性脱发。虽然米诺地尔只是局部外用,但存在头皮轻度皮炎、眩晕、刺激性过敏、面部和四肢多毛症等不良反应,使用不慎可能会灼伤和刺激眼部。日用洗发护发类化妆品不允许添加该药物,《化妆品卫生规范》(2007) 明令禁止在化妆品中添加米诺地尔。但一些生产商为使洗发护发类化妆品达到一定功效,牟取利润,违规添加米诺地尔。因此,有必要对洗发护发类化妆品中是否含有米诺地尔及其盐和衍生物进行检测。

[0003] 近年来,食品中农药、兽药残留、保健品和化妆品中的非法添加剂的检测方法已成为研究热点,其中,以小分子为待测物的免疫分析技术发展迅速。免疫分析是以抗原与抗体的特异性结合反应为基础的新型分析技术。相对于传统检测方法,它具有简便、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。此外,免疫分析技术对药品鉴定、药物代谢研究、药材中农药和重金属残留的检验、解毒及环境监测等也具有重要意义。

[0004] 免疫分析几乎适用于所有生物活性物质的检测,其基本原理是以待测物合成人工抗原,经动物获取相应的单克隆抗体,然后建立和优化免疫分析程序进行检测。有效的人工抗原的合成是保证免疫分析的前提和关键,其合成途径一般为:先根据待测分子的结构设计合成具有活性基团的半抗原,然后依据免疫学原理选择适当的载体,最后用适当的方式将半抗原与载体相互耦联,形成载体-半抗原结合物,纯化后即得到人工抗原。

[0005] 最近几年,对于人工抗原的合成国内外已有较多报道,Tuomola 等用一个分子量很小的化合物(分子量为 131.2)3-甲基吡啶的羰基与适当较长的连接臂连接,合成 9 个半抗原,通过进一步筛选实验得到特异性单克隆抗体。

[0006] 虽然人工抗原的合成方法有了很大的发展,但是所得到人工抗原的免疫原性差异较大,部分人工抗原不能完全满足免疫分析的要求。由于免疫应答具有其复杂性,对于一个具体的待测物,其人工抗原的合成要根据自身结构特征具体分析对待,需要设计、组合出多套方案,如从不同位置引入不同性质的基团、不同长度的间隔臂,将半抗原与多种载体相结合,通过改变投料比例获得不同结合比的人工抗原等等。通过免疫活性测试,优化筛选制备方案。因此,人工抗原合成研究不单纯是化学合成问题,亦涉及免疫学原理,如何根据免疫学原理合成具有较高免疫原性的人工抗原是该领域的重要研究方向。

[0007] 目前国内仍未有明确关于洗发护发类化妆品中米诺地尔及其盐和衍生物的检测方法标准。有文献报道用紫外分光光度计和高效液相色谱法测定米诺地尔洗剂和血浆中的米诺地尔,但这两种方法灵敏度差、不具有特异性。

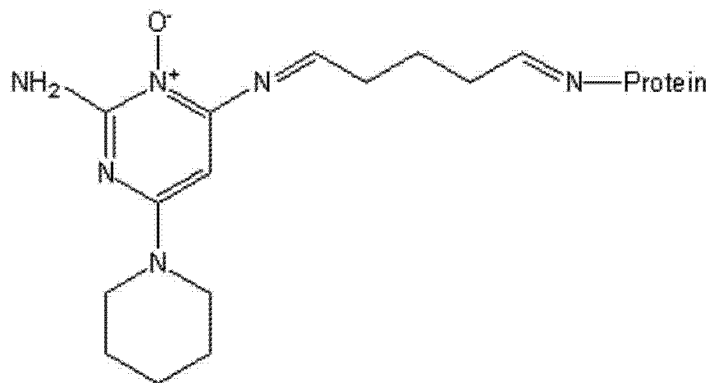
发明内容

[0008] 针对现有技术的不足,本发明的目的在于提供一种具有良好免疫原性的米诺地尔人工抗原、其多克隆抗体及其制备方法和应用。解决当前没有高灵敏度、高特异性的米诺地尔及其盐和衍生物的检测方法的问题。

[0009] 为实现上述目的,本发明所采用的技术方案是:

[0010] 一种米诺地尔人工抗原,其结构式为:

[0011]



[0012] 一种米诺地尔人工抗原的制备方法,包括如下步骤:

[0013] (1) 取米诺地尔 (Minoxidil),溶于甲醇中,再加水稀释,即得溶液 I ;

[0014] (2) 取蛋白载体,溶于 pH 值为 7.2-7.4 的缓冲溶液中,即得溶液 II ;

[0015] (3) 取 25% 的戊二醛 (GA),加水稀释 40 ~ 50 倍,即得溶液 III ;

[0016] (4) 量取溶液 I、溶液 II、溶液 III,其中溶液 I 和溶液 III 的摩尔浓度比为 50 ~ 100:1,将溶液 I 和溶液 III 混合均匀,混合后溶液逐滴加入到溶液 II 中,溶液 I 和溶液 III 的混合液与溶液 II 的体积比为 1 ~ 2:5,搅拌 8-12 小时;

[0017] (5) 将 (4) 中搅拌后的混合溶液装入透析袋中,对水透析 4-5 天,每天更换 2-3 次透析液,收集透析外液,即得米诺地尔人工抗原;

[0018] 优选地,所述蛋白载体为牛血清白蛋白 (BSA);

[0019] 优选地,所述溶液 I 和溶液 III 的摩尔浓度比为 80:1;

[0020] 一种米诺地尔人工抗原的多克隆抗体,是能与所述米诺地尔人工抗原发生特异性免疫反应的免疫球蛋白;

[0021] 一种米诺地尔人工抗原多克隆抗体的制备方法,包括如下步骤:

[0022] (2) 将制备好的米诺地尔人工抗原作为免疫原,对小鼠进行注射;

[0023] (2) 第一次免疫注射后,每隔 2 周注射一次,即加强免疫;

[0024] (3) 从第二次加强免疫起,每次加强免疫后的第 7-10 天,剪尾采血,免疫注射 4-6 次;

[0025] (4) 从采集的血液中分离获得抗血清;

[0026] 一种米诺地尔人工抗原多克隆抗体的应用,所述多克隆抗体用于米诺地尔及其盐和衍生物的免疫检测。

[0027] 本发明通过米诺地尔半抗原设计、连接臂引入、载体引入、合成、纯化等步骤制备出具有免疫原性的人工抗原,从中找出最合适的偶联物和连接臂。再通过制备出的人工抗

原经免疫动物等步骤制备出多克隆抗体并评估其效价。本发明提供的米诺地尔人工抗原具有良好的免疫原性、结构稳定、合成重现性好；本发明还提供这种米诺地尔人工抗原的制备方法，并进一步提供所述米诺地尔抗原的多克隆抗体及其制备方法；本发明提供的米诺地尔人工抗原及其多克隆抗体可用于制备高亲和力的米诺地尔单克隆抗体；本发明提供的米诺地尔人工抗原及其多克隆抗体可用于米诺地尔的免疫检测，满足低成本、快捷、操作简便的检测要求；为进一步的免疫检测研发奠定基础。

附图说明

[0028] 图 1：本发明米诺地尔人工抗原、其多克隆抗体的制备流程图；

[0029] 图 2：本发明鉴定米诺地尔人工抗原的紫外分光光谱图；

[0030] 图 3：本发明鉴定米诺地尔人工抗原的 SDS-PAGE 电泳图。

具体实施方式

[0031] 以下结合附图对本发明的技术方案作进一步描述。

[0032] 下述实施例中所述实验方法，如无特殊说明，均为常规方法；所述试剂和生物材料，如无特殊说明，均可从商业渠道获得。

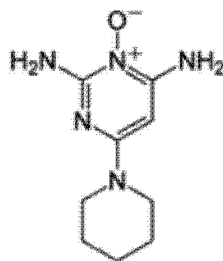
[0033] 本发明具体实施方式如下：

[0034] 1、米诺地尔人工抗原的制备

[0035] (1) 米诺地尔半抗原

[0036] 结构式为：

[0037]



[0038] (2) 连接臂的选择

[0039] 戊二醛法，双功能试剂戊二醛的两个醛基分别与半抗原和蛋白质上的氨基形成 schiff 键 ($-N=C-$)，在半抗原和蛋白质间引入一个 5 碳桥。这一反应条件温和，可在 $4 \sim 40^{\circ}\text{C}$ 及 $\text{pH}6.0 \sim 8.0$ 内进行，操作简便，应用广泛。戊二醛受到光照、温度和碱性的影响，可能发生自我聚合，减弱其交联作用，因此最好使用新鲜的戊二醛。

[0040] (3) 载体的选择

[0041] 常用来合成人工抗原的载体蛋白质是匙孔血蓝蛋白 (keyhole limpet hemocyanin, KLH)、牛血清白蛋白 (bovine serum albumin, BSA)、卵清蛋白 (ovaalbumin, OVA)、牛甲状腺球蛋白 (bovine thyroglobulin, BTG)、人血清蛋白 (human serum albumin, HAS)、伴球蛋白 (conalbumin)、鸡免疫球蛋白 (chicken immunoglobulin, CGG) 及人工合成的多聚赖氨酸 (Poly-L-Lysine, PLL) 等中的一种或多种。载体蛋白选择原则上是不能对小分子半抗原造成任何影响，不能掩盖半抗原分子的抗原决定簇。载

体蛋白与半抗原的连接效果受到许多因素的影响，比如载体蛋白自身的浓度、偶联剂的有效浓度、半抗原的理化性质、半抗原量与载体蛋白量的比例、缓冲溶液的离子强度及 pH 值等。大多数连接反应应在温和的条件下进行。本发明中优选 BSA 和 OVA，二者皆具有较多的活性连接位点，易溶，价格低廉，进一步优选 BSA 来作为合成人工免疫抗原的载体。

[0042] (4) 合成

[0043] 配制溶液 I、溶液 II、溶液 III。

[0044] 溶液 I :取米诺地尔 (Minoxidil) 半抗原,溶于甲醇中,再加水稀释,即得溶液 I ;

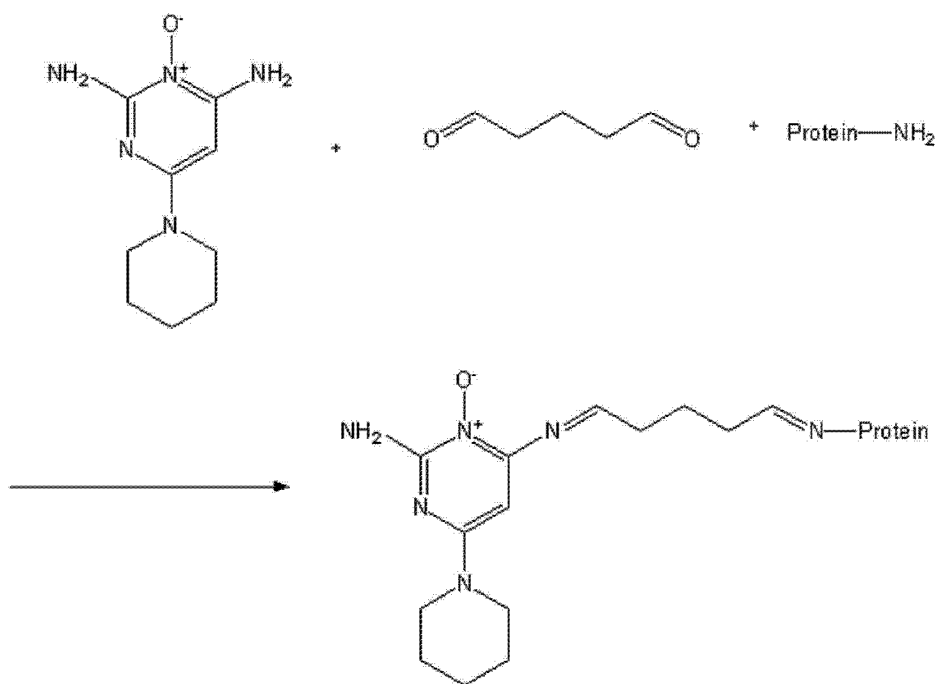
[0045] 溶液 II :取蛋白载体,优选牛血清白蛋白 (BSA),溶于 pH 值为 7.2 ~ 7.4 的缓冲溶液中,优选磷酸盐缓冲溶液 (PBS),即得溶液 II ;

[0046] 溶液Ⅲ:取戊二醛 (GA), 优选浓度为 25% 的戊二醛, 加水稀释 40 ~ 50 倍, 即得溶液Ⅲ。

[0047] 量取溶液 I、溶液 II、溶液 III, 其中溶液 I 和溶液 III 的摩尔浓度比为 50 ~ 100:1, 将溶液 I 和溶液 III 混合均匀, 混合后溶液逐滴加入到溶液 II 中, 溶液 I 和溶液 III 的混合液与溶液 II 的体积比为 1 ~ 2:5, 搅拌 8-12 小时。

[0048] 米诺地尔人工抗原合成的化学方程式为：

[0049]



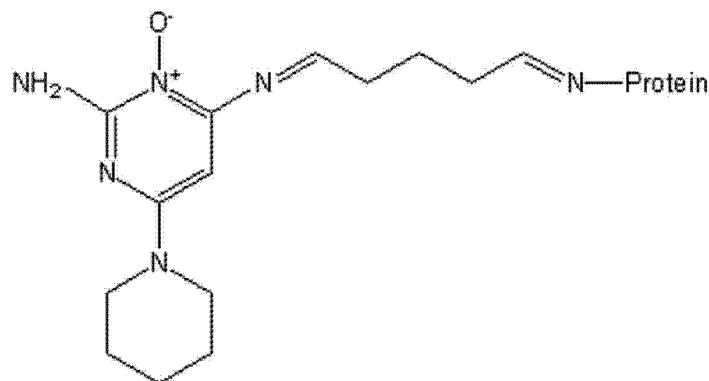
[0050] (5) 纯化

[0051] 将(4)中搅拌后的混合溶液装入透析袋中,对水透析4-5天,每天更换2-3次透析液,对透析外液监测至透析完全,收集透析外液,即得米诺地尔人工抗原(Minoxidil-GA-BSA)。

[0052] (6) 米诺地尔人工抗原鉴定

[0053] 得到米诺地尔人工抗原的结构式为：

[0054]



[0055] 通过紫外光谱和 SDS-PAGE 凝胶电泳,判定是否偶联成功。

[0056] 2、米诺地尔多克隆抗体的制备

[0057] 利用制备好的抗原对 BALB/C 小鼠进行免疫注射,制备相应的多克隆抗体。优选 5 周龄的 BALB/C 健康雌性小鼠,设一组阴性对照,首次免疫前剪尾采血,获得阴性血清。首次免疫之后每隔 2 周免疫一次称为加强免疫。从第二次加强免疫起,每次加强免疫后的第 7-10 天,剪尾采血,免疫注射 4-6 次,从采集的血液中分离获得抗血清,鉴定其抗血清的效价和敏感性。间接 ELISA 法测定多克隆抗体 (pAb) 效价。

[0058] 实施例 1

[0059] 如图 1 所示,称取米诺地尔 (Minoxidil) 半抗原 10mg,溶于 0.3mL 甲醇,加入 0.6mL 蒸馏水,即得溶液 I;称取 5mg 牛血清白蛋白 (BSA) 溶于 0.35mL 0.01mol/L pH 7.2 磷酸盐缓冲溶液 (PBS) 中,即得溶液 II;量取 100 μ L 25% 戊二醛 (GA),加蒸馏水至 5mL,即得溶液 III。在室温磁力搅拌下,将溶液 I 和溶液 III 逐滴加入溶液 II 中,搅拌 8h 后,装入透析袋中,对水透析 4d,每天更换 2-3 次透析液,对透析外液监测至透析完全,收集透析外液,即得米诺地尔人工抗原 (Minoxidil-GA-BSA)。

[0060] 图 2 所示为通过紫外分光光谱图对得到的米诺地尔人工抗原进行鉴定的结果,证明人工抗原偶联成功。其中,图 2a 是米诺地尔人工抗原紫外分光光谱图,图 2b 是 BSA 紫外分光光谱图,图 2c 是米诺地尔半抗原紫外分光光谱图。

[0061] 图 3 所示为通过 SDS-PAGE 电泳对得到的米诺地尔人工抗原进行鉴定的结果,1 条带为米诺地尔人工抗原条,2 条带为 BSA,M 条带为 marker,从电泳条带里可以看出有新物质生成即证明人工抗原偶联成功。

[0062] 实施例 2

[0063] 如图 1 所示,将制备好的米诺地尔人工抗原对 BALB/C 小鼠进行免疫注射,制备相应的多克隆抗体。注射方式采用背部皮下多点注射或腹腔注射。优选 5 周龄的 BALB/C 健康雌性小鼠,设一组阴性对照,首次免疫前剪尾采血,获得阴性血清。进行初次免疫,注射免疫原,免疫佐剂优选弗氏完全佐剂,具体为 300 μ L 人工抗原、200 μ L PBS 和 500 μ L 弗氏完全佐剂;初次免疫两周后进行二次免疫,注射免疫原,具体为 250 μ L 人工抗原、250 μ L PBS 和 500 μ L 弗氏不完全佐剂,二次免疫 7-10 天后剪尾采血;二次免疫两周后进行三次免疫,注射免疫原,具体为 250 μ L 人工抗原、250 μ L PBS 和 500 μ L 弗氏不完全佐剂,三次免疫 7-10 天后剪尾采血;三次免疫两周后进行四次免疫,注射免疫原,具体为 250 μ L 人工抗原、250 μ L PBS 和 500 μ L 弗氏不完全佐剂,四次免疫 7-10 天后剪尾采血。

[0064] 从采集的血液中分离抗血清。每份采集的血液样本取 10 μ L,溶于 990 μ L PBS 中,

3000r/min 离心 10min, 取上清为多克隆抗体 (pAb), 分装于 1.5ml 离心管中, -20°C 冻存备用。

[0065] 间接 ELISA 法测定多克隆抗体效价:

[0066] (1) 包被: 取 96 孔聚苯乙烯酶标板, 用抗原包被缓冲液 (CBS) 稀释 Minoxidil-GA-BSA, 使其工作浓度为 $2\mu\text{g/ml}$, 充分混匀后, 加入酶标板中, $50\mu\text{L/孔}$, 37°C 孵育 2h, PBST 洗板 5 次;

[0067] (2) 封闭: 加 5% 脱脂奶粉, $200\mu\text{L/孔}$, 37°C 封闭 2h, 洗板 5 次, 拍干;

[0068] (3) 加 pAb: 用 PBS 铺底, $50\mu\text{L/孔}$, 向第一孔加入 pAb $50\mu\text{L}$, 混匀, 倍比稀释至倒数第三孔; 向倒数第二孔加入阴性血清 $50\mu\text{L}$, 设为阴性对照 (NC); 最后一孔加 PBS $50\mu\text{L}$ 设为空白对照 (BC), 37°C 孵育 30min, 洗板 5 次;

[0069] (4) 加酶标二抗: 取羊抗鼠 IgG-HRP, 用 PBS 作 1:1000 稀释, 混匀后, 加入到酶标板中, $50\mu\text{L/孔}$, 37°C 孵育 30min, 洗板 5 次;

[0070] (5) 显色: TMB 显色液的 A 液、B 液以 1:1 (V/V) 等量充分混匀, 加入到酶标板中, $50\mu\text{L/孔}$, 室温显色 10min;

[0071] (6) 终止: 加终止液 $50\mu\text{L/孔}$, 终止反应;

[0072] (7) 读数: 反应终止后, 立即用酶标仪测各孔 OD₄₅₀ 值;

[0073] (8) 结果判定: 计算样品孔 OD₄₅₀ 值 (P) 与阴性对照孔 OD₄₅₀ 值 (NC) 的比值, 样品孔 $\text{OD}_{450} \geq \text{NCOD}_{450} \times 2.1$ (即 $P/N \geq 2.1$) 且样品孔 OD₄₅₀ 大于 0.1 时, 判定为阳性。所对应的抗体最大稀释倍数即为该抗体的效价。

[0074] 如下表所示, 本实施例中取 4 免后的米诺地尔 pAb 分别倍比稀释至 1:3200、1:6400、1:12800 进行鉴定, 测定结果显示本发明米诺地尔多克隆抗体效价为 1:12800。

[0075]

鼠号	不同稀释倍数 OD ₄₅₀ 值				
	1:3200	1:6400	1:12800	空白	阴性
1	1.411	0.770	0.404	0.090	0.150
2	1.320	0.612	0.370	0.088	0.160

[0076] 实施例 3

[0077] 米诺地尔人工抗原及其制备方法, 其中溶液 I 与溶液 III 的摩尔浓度比为 50:1, 溶液 II 中 25% 戊二醛为 $80\mu\text{L}$, 将溶液 I 和溶液 III 逐滴加入溶液 II 中, 搅拌时间为 8h, 其他均与实施例 1 相同。

[0078] 实施例 4

[0079] 米诺地尔人工抗原及其制备方法, 其中溶液 I 与溶液 III 的摩尔浓度比为 80:1, 溶液 II 中 25% 戊二醛为 $100\mu\text{L}$, 将溶液 I 和溶液 III 逐滴加入溶液 II 中, 搅拌时间为 10h, 其他均与实施例 1 相同。

[0080] 实施例 5

[0081] 米诺地尔人工抗原及其制备方法, 其中溶液 I 与溶液 III 的摩尔浓度比为 100:1, 溶液 II 中 25% 戊二醛为 $120\mu\text{L}$, 将溶液 I 和溶液 III 逐滴加入溶液 II 中, 搅拌时间为 12h, 其他均与实施例 1 相同。

[0082] 在以上的描述中阐述了很多具体细节以便于充分理解本发明。但是以上描述仅是本发明的较佳实施例而已, 本发明能够以很多不同于在此描述的其它方式来实施, 因此本

发明不受上面公开的具体实施的限制。同时任何熟悉本领域技术人员在不脱离本发明技术方案范围情况下,都可利用上述揭示的方法和技术内容对本发明技术方案做出许多可能的变动和修饰,或修改为等同变化的等效实施例。凡是未脱离本发明技术方案的内容,依据本发明的技术实质对以上实施例所做的任何简单修改、等同变化及修饰,均仍属于本发明技术方案保护的范围内。

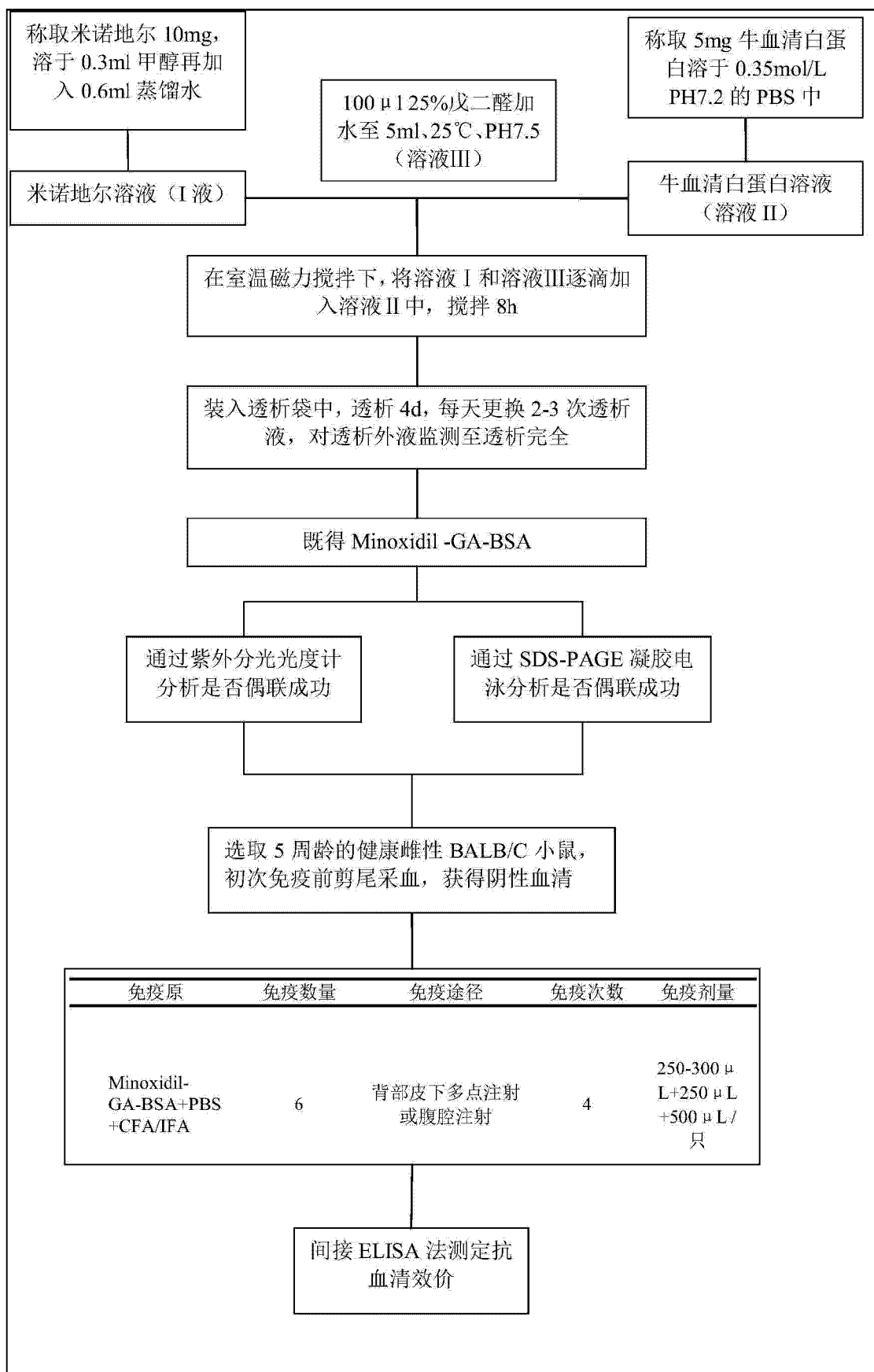


图 1

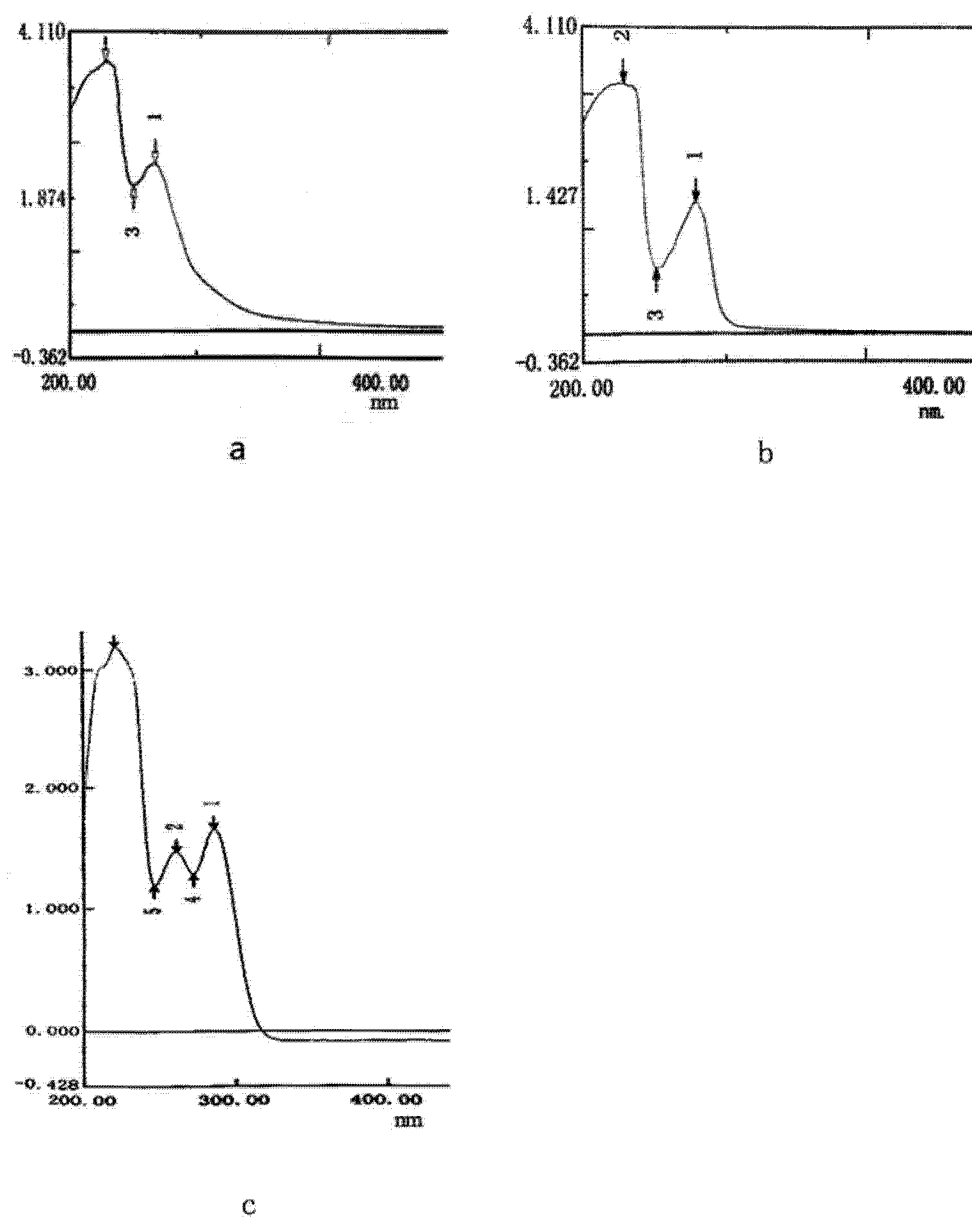


图 2

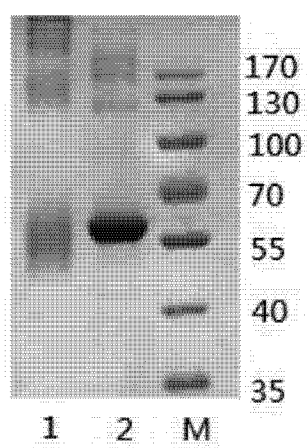


图 3

专利名称(译)	米诺地尔人工抗原、其多克隆抗体及其制备方法和应用		
公开(公告)号	CN104530220A	公开(公告)日	2015-04-22
申请号	CN201410742420.7	申请日	2014-12-05
[标]申请(专利权)人(译)	中国人民解放军总后勤部卫生部药品仪器检验所		
申请(专利权)人(译)	中国人民解放军总后勤部卫生部药品仪器检验所		
当前申请(专利权)人(译)	中国人民解放军总后勤部卫生部药品仪器检验所		
[标]发明人	张癸荣 魏彪		
发明人	张癸荣 魏彪		
IPC分类号	C07K14/765 C07K16/18 G01N33/53		
CPC分类号	C07K19/00 C07K14/765 C07K16/06 G01N33/94		
代理人(译)	李向东		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供一种具有良好免疫原性的米诺地尔人工抗原、其多克隆抗体及其制备方法和应用。通过米诺地尔半抗原设计、连接臂引入、载体引入、合成、纯化等步骤制备出具有免疫原性的人工抗原，再经免疫动物等步骤制备出多克隆抗体并评估其效价。本发明提供的米诺地尔人工抗原及其多克隆抗体可用于米诺地尔的免疫检测，满足低成本、快捷、操作简便的检测要求；解决当前没有高灵敏度、高特异性的米诺地尔及其盐和衍生物的检测方法的问题。

