

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200610043205.3

[51] Int. Cl.

C07K 14/435 (2006.01)

C07C 237/26 (2006.01)

C07K 16/00 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

[43] 公开日 2006年11月15日

[11] 公开号 CN 1861631A

[22] 申请日 2006.3.14

[21] 申请号 200610043205.3

[71] 申请人 山东大学

地址 250100 山东省济南市历下区山大南路
27号

[72] 发明人 郝日沫 张玉兰 卢圣欣

[74] 专利代理机构 济南圣达专利商标事务所

代理人 郑华清

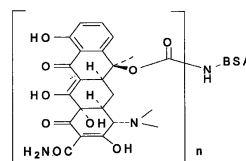
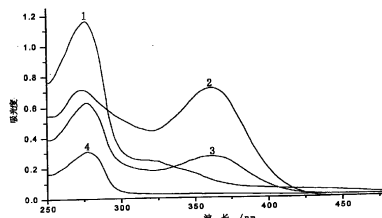
权利要求书 2 页 说明书 6 页 附图 1 页

[54] 发明名称

四环素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)的四环素的偶联物，由四环素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四环素的分子数，所述 n 为整数 1~15；BSA 为牛血清蛋白，分子量范围是 6.6KDa~6.9KDa。本发明还公开了所述的偶联物的制备方法，即将四环素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。本发明的四环素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 1ppb。本发明具有方法简便，快速，特异，准确的特点，为制备四环素的酶联免疫检测试剂盒提供了基础。

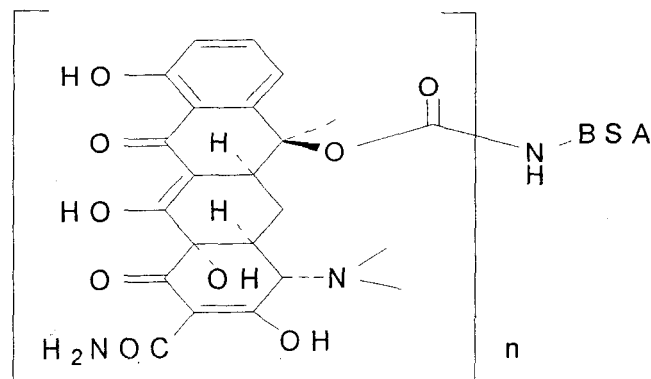


(I)

1. 一种四环素的偶联物，由四环素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所述的四环素的偶联物，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所述的四环素的偶联物，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四环素的分子数，所述n为整数1~15，BSA为牛血清蛋白（Bovine Serum Albumin），分子量范围是6.6KDa~6.9 KDa；

上述偶联物显示出如下物化特征：

- (1) 外观：淡黄色粉末固体；
- (2) 紫外吸收光谱：276nm, 320nm。

4. 如权利要求3所述的四环素的偶联物，其特征是：所述n为整数1~10，牛血清蛋白分子量范围是6.7~6.8 KDa。

5. 权利要求1~4中任一项所述的四环素的偶联物的制备方法，其特征是：将四环素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所述四环素的偶联物的制备方法，由如下步骤完成：

(1) 溶液A的制备：将四环素与1,1'-羰基二咪唑（CDI）按摩尔比为1：1~1：3的比例溶在无水丙酮中，通入氮气，在氮气保护下，37℃±1℃避光反应3±1小时，反应生成四环素与1,1'-羰基二咪唑的活性中间体，备用；同时，以四环素与牛血清蛋白的摩尔数比为20：1~35：1的量，称取牛血清蛋白备用；

(2) 溶液B的制备：将上述反应后的溶液A中的丙酮旋转蒸干，加入pH=8.5±0.5，浓度为0.5M的硼砂缓冲溶液溶解生成的四环素与1,1'-羰基二咪唑的活性中间体，然

后再加入上述牛血清蛋白，使牛血清蛋白的终浓度为 10.0 ± 5 mg/ml，在氮气保护下， $25^\circ\text{C} \pm 5^\circ\text{C}$ 避光反应30~48小时，得溶液B；

(3) 用pH为7.30-7.50，浓度为0.01M-0.02M的磷酸缓冲液在 $0-4^\circ\text{C}$ 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，得到淡黄色的四环素的偶联物。

7. 如权利要求6所述的四环素的偶联物的制备方法，其特征是：步骤(1)所述四环素与1,1'-羰基二咪唑(CDI)的摩尔比为1:2。

8. 如权利要求6所述的四环素的偶联物的制备方法，其特征是：步骤(1)所述四环素与牛血清蛋白的摩尔数比为30:1。

9. 如权利要求6所述的四环素的偶联物的制备方法，其特征是：步骤(3)所述磷酸缓冲液的pH为7.40，浓度为0.01 M。

10. 权利要求1~4中任一项所述的四环素的偶联物作为免疫原在制备四环素特异反应抗体中的应用。

四环素的偶联物及其制备方法与应用

技术领域

本发明涉及一种抗生素类的偶联物及其制备方法与应用，尤其涉及一种四环素（tetracycline）的偶联物及其制备方法与应用。属抗生素药免疫检测领域。

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

1,1'-羰基二咪唑(1,1'-carbonyldiimidazole, 简称CDI)：Fluka公司产品

四环素：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

四环素类抗生素包括金霉素、多西环素、美他环素、土霉素和四环素等。四环素类抗生素为广谱抗生素，对革兰氏阳性和阴性细菌、立克次氏体等均有抑菌作用。其作用机理主要是和30S核糖体亚基的末端结合，从而干扰细菌蛋白质的合成。由于其口服吸收好、优良的抗菌性、稳定的药性和低廉的价格，在畜禽生产中四环素类抗生素被广泛用作药物添加剂，用于防治肠道感染和促生长，但过量使用不可避免使母体代谢产物等相关抗生素残留于动物的肌肉、蛋、奶、脏器、组织中，进而通过食物链影响人体健康。四环素类药物的毒性反应主要表现在对胃、肠、肝脏的损害，以及牙齿的染色，还会造成过敏反应、二重感染、致畸胎作用。颜军等报道土霉素可导致肝脏肿大、黄疸、脂肪肝等。四环素可造成妊娠期妇女严重肝损伤，甚至死亡。

在我国四环素类抗生素尤其是四环素是使用最多的药物添加剂，其在动物性食品中的残留量往往超过规定限量，对人类健康造成很大危害。随着四环素类药物研究的不断深入，特别是四环素作为保鲜剂、防腐剂等新用途的开发利用，对动物性食品中四环素残留量的分析越来越重要；再者，自从加入WTO以后，我国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规范的法律和规范。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。

在四环素类抗生素药物残留的检测中，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，四环素类抗生素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物免疫系统产生抗体的免疫原（又称之为完全抗原）。经检索，现在世界上尚未有关于四环素的免疫原的合成及抗体制备的报道，而且目前国内检测四环素药物残留的ELISA试剂盒大都购于国外，保存期限短，价格高，远不能满足检测需要，因此研究四环素的免疫原的合成及抗体制备就显得十分必要。

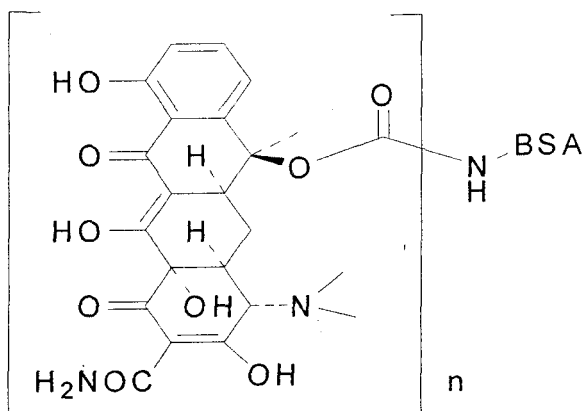
发明内容

针对上述现有技术的不足，本发明要解决的问题是：提供一种能引发动物免疫系统产生针对四环素有特异反应的抗体的免疫原，即四环素（tetracycline）的偶联物及其制备方法。同时，本发明还提供了所述的四环素的偶联物作为免疫原在制备四环素特异反应抗体中的应用。

本发明的四环素的偶联物，由四环素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。

本发明所述的四环素的偶联物，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四环素的分子数，所述n为整数1~15，BSA为牛血清蛋白（Bovine Serum Albumin），分子量范围是6.6KDa~6.9 KDa；

上述偶联物显示出如下物化特征：

- (1) 外观：淡黄色粉末固体；
- (2) 紫外吸收光谱：276nm, 320nm。

在上述的四环素的偶联物中,所述n优选为整数1~10,BSA分子量范围优选是6.7~6.8 KDa。

上述的四环素的偶联物的制备方法是:将四环素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。

上述的四环素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:将四环素与1,1'-羰基二咪唑(CDI)按摩尔比为1:1~1:3的比例溶在无水丙酮中,通入氮气,在氮气保护下,37°C±1°C避光反应3±1小时,反应生成四环素与1,1'-羰基二咪唑的活性中间体,备用;同时,以四环素与牛血清蛋白的摩尔数比为20:1-35:1的量,称取牛血清蛋白备用;

(2) 溶液B的制备:将上述反应后的溶液A中的丙酮旋转蒸干,加入pH=8.5±0.5,浓度为0.5M的硼砂缓冲溶液溶解生成的四环素与1,1'-羰基二咪唑的活性中间体,然后再加入上述牛血清蛋白,使牛血清蛋白的终浓度为10.0±5 mg/ml,在氮气保护下,25°C±5°C避光反应30~48小时,得溶液B;

(3) 用pH为7.30-7.50,浓度为0.01M-0.02M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,得到淡黄色的四环素的偶联物。

在上述的四环素的偶联物的制备方法中:步骤(1)所述四环素与1,1'-羰基二咪唑(CDI)的摩尔比优选为1:2。

在上述的四环素的偶联物的制备方法中:步骤(1)所述四环素与牛血清蛋白的摩尔数比优选为30:1。

在上述的四环素的偶联物的制备方法中:步骤(3)所述磷酸缓冲液的pH优选为7.40,浓度优选为0.01 M。

本发明所述的四环素的偶联物作为免疫原在制备四环素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四环素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——四环素的偶联物。

利用本发明所述的四环素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四环素有特异反应的抗体。经酶联免疫检测实验鉴定,利用本发明所述的四环素的偶联物作为免疫原制备的四环素特异反应抗体,其抗血清效价达到1:50,000以上,其最低检测限为1ppb。

上述的四环素的偶联物以及高效价的四环素特异反应抗体的制备成功,为制备四环素的酶联免疫检测试剂盒提供了基础。在实际应用中,把所述制备的四环素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四环素的残留。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,半抗原四环素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：1：四环素的偶联物 2：四环素 3：四环素与BSA的机械混合 4：BSA

具体实施方式

实施例1

(1) 溶液A的制备：称取40mg四环素溶在8ml无水丙酮中，通入氮气，然后迅速加入29mg的1,1'-羰基二咪唑，在氮气保护下37℃避光反应3小时，反应生成四环素与1,1'-羰基二咪唑(CDI)的活性中间体，备用；同时，称取200mg牛血清蛋白(分子量为6.8Kda)备用；

(2) 溶液B的制备：将上述反应后的A溶液中的丙酮旋转蒸干，加入15ml pH=8.5，浓度为0.5M的硼砂缓冲溶液溶解生成的四环素与1,1'-羰基二咪唑的活性中间体，然后再加入上述牛血清蛋白，使牛血清蛋白的终浓度为13mg/ml，在氮气保护下，30℃避光反应48小时；用pH为7.40，浓度为0.01M的磷酸缓冲液0-4℃搅拌透析溶液B 72小时，然后改用蒸馏水透析24小时，每六小时更换一次透析液；

(3) 冻干透析好的溶液，得到淡黄色的四环素的偶联物，通过紫外吸收光谱确定产物的吸收峰位于276nm, 320nm。

实施例2

(1) 溶液A的制备：称取40mg四环素溶在8ml无水丙酮中，通入氮气，然后迅速加入16mg的1,1'-羰基二咪唑，在氮气保护下37℃避光反应2小时，反应生成四环素与1,1'-羰基二咪唑(CDI)的活性中间体，备用；同时，称取240mg牛血清蛋白(分子量为6.7Kda)备用；

(2) 溶液B的制备：将上述反应后的A溶液中的丙酮旋转蒸干，加入20ml pH=9.0，浓度为0.5M的硼砂缓冲溶液溶解生成的四环素与1,1'-羰基二咪唑的活性中间体，然后再加入上述牛血清蛋白，使牛血清蛋白的终浓度为12mg/ml，在氮气保护下，25℃避光反应36小时；用pH为7.30，浓度为0.01M的磷酸缓冲液0-4℃搅拌透析溶液B 70小时，然后改用蒸馏水透析20小时，每六小时更换一次透析液；

(3) 冻干透析好的溶液，得到淡黄色的四环素的偶联物，通过紫外吸收光谱确定产物的吸收峰位于276nm, 320nm。

实施例3

(1) 溶液A的制备：称取20mg四环素溶在5ml无水丙酮中，通入氮气，然后迅速加入10mg的1,1'-羰基二咪唑，在氮气保护下37℃避光反应4小时，反应生成四环素与1,1'-羰基二咪唑(CDI)的活性中间体，备用；同时，称取155mg牛血清蛋白(分子量为6.9Kda)备用；

(2) 溶液B的制备：将上述反应后的A溶液中的丙酮旋转蒸干，加入15ml pH=8.0，浓度为0.5M的硼砂缓冲溶液溶解生成的四环素与1,1'-羰基二咪唑的活性中间体，然后再加入上述牛血清蛋白，使牛血清蛋白的终浓度为10mg/ml，在氮气保护下，20℃避光反应40小时；用pH为7.50，浓度为0.02M的磷酸缓冲液0-4℃搅拌透析溶液B 75小时，然后改用蒸馏水透析30小时，每六小时更换一次透析液；

(3) 冻干透析好的溶液，得到淡黄色的四环素的偶联物，通过紫外吸收光谱确定产物的吸收峰位于276nm, 320nm。

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所制备的四环素的偶联物作为免疫原进行动物免疫实验以制备抗体。

取1mg/ml的四环素的偶联物的溶液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2kg的雄性健康新西兰大白兔，1ml/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0.01M、pH7.4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0.01M、pH7.4的PBS至沉淀溶解。将上述纯化物用0.01M、pH7.4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/孔的四环素与卵清蛋白的偶联物（10 μg/ml）包被，0-4℃放置过夜，然后用PBST（1000ml pH7.4、浓度0.01M的PBS+体积百分比是0.05% Tween20）洗板四次；用250 μl/孔封闭液（1000ml 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100ul/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 100ul，室温放置1小时，洗板；加入底物邻苯二胺显色，室温放置10min，再加入2MHC1终止。酶标仪A492nm检测。

经测定：本发明所述四环素的偶联物抗体效价达1：51200。

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：上述P为代测血清在某一稀释倍数测定的吸光度值，上述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，加抗体的同时加入四环素溶液（从200ppm-0.1ppb），与包被抗原竞争结合有限的抗体，四环素药的浓度越高，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，未加四环素药的吸光度值）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1ppb。

实施例5

制备上述酶联免疫检测中所用四环素与卵清蛋白的偶联物:

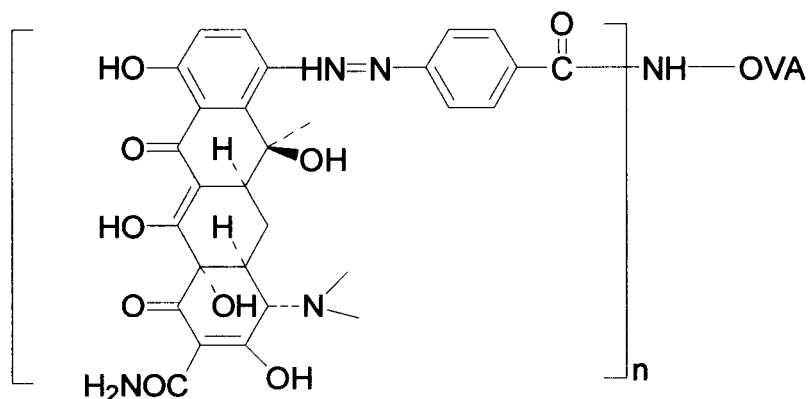
(1) 溶液A的制备: 称取12mg的亚硝酸钠溶在0.35ml的蒸馏水中, 然后称取20mg对氨基苯甲酸溶入2.2ml 0.2M的盐酸中, 冰浴搅拌, 将亚硝酸钠溶液逐滴加入到对氨基苯甲酸溶液中, 避光反应1小时, 得到无色的对氨基苯甲酸活性中间体, 备用;

(2) 溶液B的制备: 称取27mg四环素溶在10ml冰冷的硼砂缓冲溶液中 (pH=9.0, 含0.15M的氯化钠), 冰浴搅拌, 将上述的A溶液1.5ml逐滴加入到该溶液中, 避光反应2小时, 得到深红色的四环素活性中间体, 备用。

(3) 四环素与卵清蛋白的偶联物的制备: 在B溶液中加入 H_3BO_3 晶体调其pH至7.4, 然后加入86mg的卵清蛋白 (分子量为4.3Kda), 再加入120mg乙基[3-(二甲氨基)丙基]碳二亚胺, 36mg羟基琥珀酰亚胺, 室温搅拌3小时, 得深红色溶液。

用pH7.4、浓度0.01M的PBS缓冲液0-4°C条件下, 搅拌透析步骤(3)制得的溶液72小时, 然后改用蒸馏水透析30小时, 每6小时更换一次透析液。

将透析液3000转/分离心30分钟。冻干上清液, 得到深红色固体, 即为四环素与卵清蛋白的偶联物; 其紫外吸收为277nm, 410nm, 524nm, 其结构图如下:



其中: 上述 n: 为与一个卵清蛋白分子结合的四环素的分子数, 所述 n 为整数 1~15。

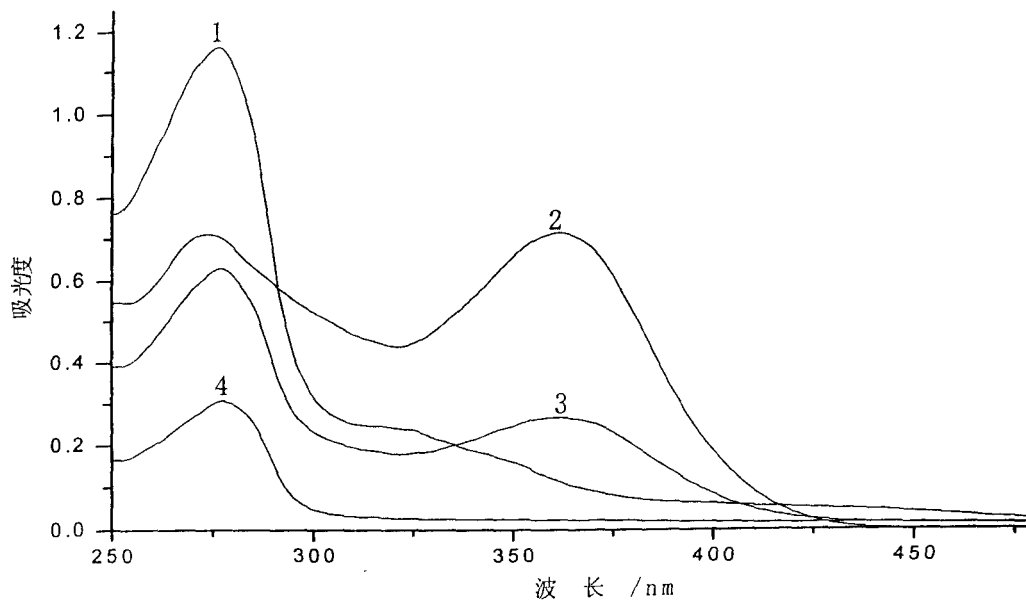


图 1

专利名称(译)	四环素的偶联物及其制备方法与应用		
公开(公告)号	CN1861631A	公开(公告)日	2006-11-15
申请号	CN200610043205.3	申请日	2006-03-14
[标]申请(专利权)人(译)	山东大学		
申请(专利权)人(译)	山东大学		
[标]发明人	郗日沫 张玉兰 卢圣欣		
发明人	郗日沫 张玉兰 卢圣欣		
IPC分类号	C07K14/435 C07C237/26 C07K16/00 G01N33/53		
代理人(译)	郑华清		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种通式(I)的四环素的偶联物，由四环素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四环素的分子数，所述n为整数1~15；BSA为牛血清蛋白，分子量范围是6.6KDa~6.9KDa。本发明还公开了所述的偶联物的制备方法，即将四环素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。本发明的四环素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1ppb。本发明具有方法简便，快速，特异，准确的特点，为制备四环素的酶联免疫检测试剂盒提供了基础。

