

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



# [12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200910039021.3

[51] Int. Cl.

*C07J 13/00 (2006.01)*  
*C07K 14/765 (2006.01)*  
*C07K 14/77 (2006.01)*  
*C07K 14/795 (2006.01)*  
*C07K 14/42 (2006.01)*  
*C07K 14/435 (2006.01)*

[43] 公开日 2009年9月23日

[11] 公开号 CN 101538307A

[51] Int. Cl. (续)

*C07K 16/44 (2006.01)*  
*C12N 15/06 (2006.01)*  
*C12P 21/08 (2006.01)*  
*G01N 33/53 (2006.01)*  
*G01N 33/02 (2006.01)*

[22] 申请日 2009.4.27

[21] 申请号 200910039021.3

[71] 申请人 华南农业大学

地址 510642 广东省广州市天河区五山路 483 号

[72] 发明人 雷红涛 孙远明 石敏 沈玉栋  
杨金易 王弘 徐晓艳

[74] 专利代理机构 广州市华学知识产权代理有限公司

代理人 裘晖 杨晓松

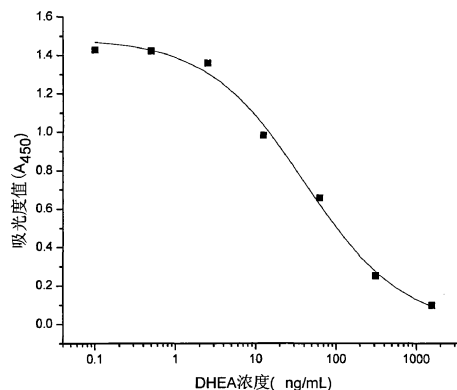
权利要求书 3 页 说明书 11 页 附图 1 页

[54] 发明名称

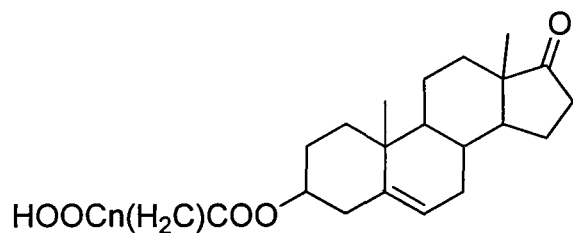
去氢表雄酮半抗原、人工抗原和抗体及其制备方法和应用

[57] 摘要

本发明公开了一种去氢表雄酮半抗原及其相应的人工抗原和抗体，同时本发明也公开了所述去氢表雄酮半抗原、人工抗原和抗体的制备方法和应用。本发明以去氢表雄酮为原料，与酸酐反应生成含羧基的去氢表雄酮半抗原；然后通过活泼脂法或者混合酸酐法将去氢表雄酮半抗原与蛋白质偶联制备去氢表雄酮人工抗原。将去氢表雄酮人工抗原免疫动物后产生对去氢表雄酮高特异性抗体。再将去氢表雄酮抗体与辣根过氧化物结合，得到辣根过氧化物标记的去氢表雄酮抗体。应用所述辣根过氧化物标记的去氢表雄酮抗体和去氢表雄酮人工抗原免疫检测方法可用于去氢表雄酮现场快速检测，对实现保健食品安全的快速检测具有重要现实意义。

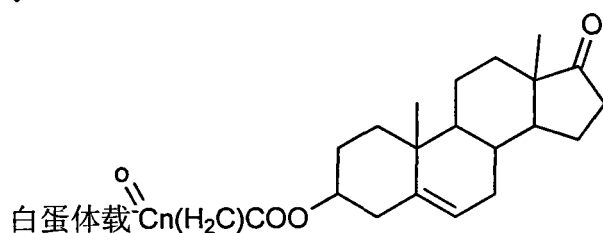


1、一种去氢表雄酮半抗原，其特征在于分子结构式为：



$n$  为 2~4 的自然数。

2、一种去氢表雄酮人工抗原，是由权利要求 1 所述的去氢表雄酮人工半抗原与载体蛋白结合而成，其特征在于：所述去氢表雄酮人工抗原分子结构式为：



$n$  为 2~4 的自然数；所述的载体蛋白为牛血清白蛋白、血蓝蛋白、伴刀豆球蛋白、甲状腺球蛋白或卵清蛋白的一种。

3、一种去氢表雄酮抗体，是能与权利要求 2 所述的去氢表雄酮人工抗原发生特异性免疫反应的免疫球蛋白。

4、根据权利要求 3 所述的去氢表雄酮抗体，其特征在于：所述的去氢表雄酮抗体为辣根过氧化物标记的去氢表雄酮抗体。

5、权利要求 1 所述去氢表雄酮半抗原的制备方法，其特征在于包括以下步骤：

(1) 去氢表雄酮与酸酐按摩尔比 1:1~:18 混合，加入无水吡啶至溶解，同时加入与去氢表雄酮摩尔比为 1:5~:115 的 1,4-二甲氨基吡啶作为催化剂，室温反应过夜；

(2) 反应结束后加入 5~15 ml 的饱和盐水中，继续混匀 5~20 分钟；水不溶性有机溶剂进行萃取，取水层，重复萃取至少 3 次；

(3) 冷却水层，再用盐酸酸化水层，使其 pH 2~4，过滤，收集沉淀；

(4) 饱和盐水洗涤沉淀至中性，干燥，得到去氢表雄酮半抗原。

6、根据权利要求 5 所述去氢表雄酮半抗原的制备方法，其特征在于：所述的酸酐为丁二酸酐、戊二酸酐或己二酸酐的一种；所述饱和盐水为饱

和氯化钠溶液或饱和碳酸钠溶液；所述水不溶性有机溶剂为乙酸乙酯、三氯甲烷、二氯甲烷或石油醚。

7、权利要求 2 所述去氢表雄酮人工抗原的制备方法为活泼脂法或混合酸酐法，其特征在于：

所述活泼酯方法包括以下步骤：

(1) 将 30~50 $\mu$ mol 的去氢表雄酮半抗原溶解于 1~2 ml 二甲基亚砜；

(2) 在步骤 (1) 的溶液中分别加入与去氢表雄酮等摩尔的 N, N-二环己基碳二亚胺和 N-羟基琥珀酸亚胺，室温避光反应过夜；

(3) 0~4 $^{\circ}$ C 离心，取上清液，将上清液缓慢加入到 4~6 ml 0.1mol/L pH9.0~9.5 碳酸钠-碳酸氢钠缓冲液中，然后在 4 $^{\circ}$ C 下反应过夜；所述的碳酸盐缓冲液含有载体蛋白，其中载体蛋白的浓度为 10~20 mg/ml；

(4) 步骤 (3) 的溶液反应完成后，将其装入透析袋，再用生理盐水透析，得到去氢表雄酮人工抗原；

所述活泼脂法步骤 (3) 中的载体蛋白为为牛血清白蛋白、血蓝蛋白、伴刀豆球蛋白、甲状腺球蛋白或卵清蛋白的一种；

所述的混合酸酐法包括以下步骤：

(1) 将 100~200 $\mu$ mol 去氢表雄酮半抗原溶于 2~4 ml 二甲基甲酰胺中，再加入 60~90  $\mu$ l 正三丁胺，冰浴；

(2) 接着，缓慢滴加 0.1~0.2 mmol 氯甲酸异丁酯到步骤 (1) 的溶液中，0~4 $^{\circ}$ C 反应 0.5~1 小时，得到甲液；将 60~80mg 载体蛋白溶于 4~6 ml 1mol/L pH 9.0~9.6 碳酸钠-碳酸氢钠缓冲液中，得到乙液；将甲液缓慢滴加到乙液中，4 $^{\circ}$ C 反应过夜；

(3) 步骤 (2) 的溶液反应完成后，将其装入透析袋，再用生理盐水透析，得到去氢表雄酮人工抗原；

所述混合酸酐法步骤 (2) 中的载体蛋白为为牛血清白蛋白、血蓝蛋白、伴刀豆球蛋白、甲状腺球蛋白或卵清蛋白的一种。

8、权利要求 4 所述去氢表雄酮抗体的制备方法，其特征在于：

(1) 实验选用健康的雄性小鼠或雄性兔作为实验对象，免疫剂量基础免疫为 0.25~1 mg/kg，使用抗原与弗氏完全佐剂乳化免疫，加强免疫为 0.5~1 mg/kg，使用抗原与弗氏不完全佐剂乳化免疫。雄性兔子采用背部皮下多点注射，雄性小鼠采用腹腔注射，基础免疫 15~20 天后进行加强免疫，每隔 15 天加强免疫一次，第 4 次加强免疫后 8~10 天内，耳缘静

脉采血，测定效价和特异性，待其血清效价和特异性合格后，兔子采用心脏采血，分离出抗血清；或用小鼠脾细胞进行细胞融合，获得杂交瘤细胞，进而获得单克隆抗体；

(2) 采用辛酸-硫酸铵法或采用蛋白 A 亲和层析法，得到兔抗血清或是小鼠腹水中的免疫球蛋白 G；所述的免疫球蛋白 G 是去氢表雄酮抗体；

(3) 辣根过氧化物标记的去氢表雄酮抗体的制备方法为过碘酸盐氧化法，纯化方法同步骤 (2) 所述纯化方法。

9、权利要求3或4所述的去氢表雄酮抗体的应用，其特征在于：所述去氢表雄酮抗体应用于去氢表雄酮含量的免疫检测。

10、根据权利要求9所述去氢表雄酮抗体的应用，其特征在于：所述的去氢表雄酮抗体应用于减肥类保健食品中去氢表雄酮含量的免疫检测。

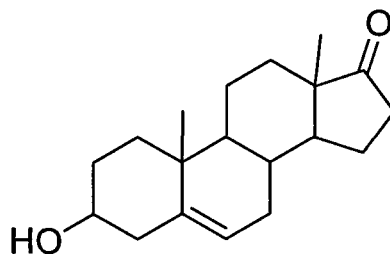
# 去氢表雄酮半抗原、人工抗原和抗体及其制备方法和应用

## 技术领域

本发明涉及一种去氢表雄酮半抗原及其相应的人工抗原和抗体，还涉及上述去氢表雄酮半抗原及其相应的人工抗原和抗体的制备方法和应用。

## 背景技术

去氢表雄酮（dehydroepiandrosterone, DHEA）化学名为 3 $\beta$ -羟基雄甾-5 烯-17 酮，分子量为 288.4，CAS 号为 53-43-0，其结构式为：



去氢表雄酮是人体肾上腺与性腺分泌的一种 C19 类固醇素，具有雄性激素作用，可提高体内的睾酮水平，是睾丸激素与雌激素的前体物质。研究发现其可以阻止内脏脂肪的积累，增加肌肉胰岛素的抵抗力。经常使用 DHEA 可能会改变脂肪酶的活性和  $\beta 3$  受体激动剂的密度，而  $\beta 3$  受体为 G 蛋白偶联的跨膜受体，兴奋后能激动腺苷酸环化酶（AC），使依赖 cAMP 的脂肪酶活化，UCP 表达增加，对胰岛素的敏感性增加。这些作用可以使体重减轻，糖尿病症状改善。同时，由于 DHEA 具有拟甲状腺作用，因此具有抑制食物和脂肪的摄入，同时可以增加能量消耗，刺激脂肪氧化，从而起到一定的减肥作用，对肥胖者有一定的功效。

但是从 DHEA 的安全性考虑，如果 DHEA 过多摄入会造成许多并发症，如痤疮，女性容易获得男性第二性征以及减少女性体内 HDL-C，使胰岛素的敏感性和葡萄糖的忍受性受损。此外，饮用过量的 DHEA 会引起心血管疾病，肝脏损害（主要包括肝脏肿大，肝脏器系数增大等）及某些性激素相关的肿瘤发病增加等。1996 年 11 月，去氢表雄酮被国际奥委会医学委员会列入禁用药物名单。近年来，去氢表雄酮和其他内源性类固醇激素的滥用已成为一个严重的问题。含 DHEA 的保健食品已出现在国内外市场上。

对保健食品中 DHEA 残留的检测目前主要采用高效液相色谱法 (HPLC)。然而应用 HPLC 时其方法的灵敏度受样品的净化、浓缩等步骤的影响很大,测定方法复杂、繁琐,检测通量小,检测成本昂贵,不能实现大批量样品的快速检测分析。因此,有必要研制更加简单快捷方便的检测方法。

免疫检测方法,是目前食品安全快速检测的重要方法之一,检测成本很低,使用简单,适合大量样品的筛选检测,已经在食品安全监管中发挥了重要作用。目前,尚未有保健食品中去氢表雄酮的免疫学检测方法。

### 发明内容

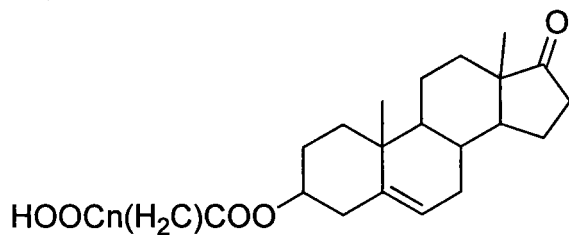
本发明的首要目的在于克服现有技术的缺点与不足,提供一种去氢表雄酮半抗原及其相应的人工抗原和抗体。

本发明的另一目的在于提供所述去氢表雄酮半抗原及其相应的人工抗原和抗体的制备方法。

本发明的再一目的在于提供所述去氢表雄酮半抗原及其相应的人工抗原和抗体的应用。

本发明的目的通过以下技术方案实现:

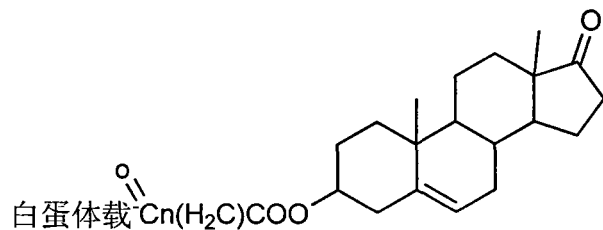
一种去氢表雄酮半抗原的分子结构式为:



n 为 2~4 的自然数。

所述的 n 优选为 3。

一种去氢表雄酮人工抗原的分子结构式为:



n 为 2~4 的自然数。

所述的 n 优选为 3。

所述的载体蛋白为 BSA (牛血清白蛋白)、KLH (血蓝蛋白)、CONA

(伴刀豆球蛋白)、THY (甲状腺球蛋白) 或 OVA (卵清蛋白)。

一种去氢表雄酮抗体为能与去氢表雄酮人工抗原发生特异性免疫反应的免疫球蛋白。

所述去氢表雄酮抗体优选为辣根过氧化物标记的去氢表雄酮抗体。

所述去氢表雄酮半抗原的制备方法, 包括以下步骤:

(1) 去氢表雄酮与酸酐按摩尔比 1:1~1:8 混合, 加入无水吡啶至溶解, 同时加入与去氢表雄酮摩尔比为 1:5~1:15 的 DMAP (1,4-二甲氨基吡啶) 作为催化剂, 室温反应过夜;

(2) 反应结束后加入 5~15 ml 的饱和盐水中, 继续混匀 5~20 分钟; 水不溶性有机溶剂进行萃取, 取水层, 重复萃取至少 3 次;

(3) 冷却水层, 再用盐酸酸化水层, 使其 pH 2~4, 过滤, 收集沉淀;

(4) 饱和盐水洗涤沉淀至中性, 干燥, 得到去氢表雄酮半抗原。

所述的酸酐为丁二酸酐、戊二酸酐或己二酸酐的一种。

所述饱和盐水为饱和氯化钠溶液或饱和碳酸钠溶液。

所述水不溶性有机溶剂为乙酸乙酯、三氯甲烷、二氯甲烷或石油醚。

所述去氢表雄酮人工抗原的制备方法为活泼脂法或混合酸酐法。

所述活泼酯方法包括以下步骤:

(1) 将 30~50 $\mu$ mol 的去氢表雄酮半抗原溶解于 1~2 ml 二甲基亚砜 (DMSO);

(2) 在步骤 (1) 的溶液中分别加入与去氢表雄酮等摩尔的 DCC (N,N-二环己基碳二亚胺) 和 NHS (N-羟基琥珀酸亚胺), 室温避光反应过夜;

(3) 0~4 $^{\circ}$ C 离心, 取上清液, 将上清液缓慢加入到 4~6 ml 0.1mol/L pH9.0~9.5 碳酸钠-碳酸氢钠缓冲液中, 然后在 4 $^{\circ}$ C 下反应过夜; 所述的碳酸盐缓冲液含有载体蛋白, 其中载体蛋白的浓度为 10~20 mg/ml;

(4) 步骤 (3) 的溶液反应完成后, 将其装入透析袋, 再用生理盐水透析, 得到去氢表雄酮人工抗原。

所述活泼脂法步骤 (3) 中的载体蛋白为 BSA、OVA、KLH、CONA 或 THY。

所述的混合酸酐法包括以下步骤:

(1) 将 100~200 $\mu$ mol 去氢表雄酮半抗原溶于 2~4 ml 二甲基甲酰胺 (DMF) 中, 再加入 60~90  $\mu$ l 正三丁胺, 冰浴;

(2) 接着, 缓慢滴加 0.1~0.2mmol 氯甲酸异丁酯到步骤 (1) 的溶液

中，0~4℃反应0.5~1小时，得到甲液；将60~80mg载体蛋白溶于4~6 ml 1mol/L pH 9.0~9.6 碳酸钠-碳酸氢钠缓冲液中，得到乙液；将甲液缓慢滴加到乙液中，4℃反应过夜；

(3) 步骤(2)的溶液反应完成后，将其装入透析袋，再用生理盐水透析，得到去氢表雄酮人工抗原。

所述混合酸酐法步骤(2)中的载体蛋白为BSA、KLH、CONA、THY或OVA。

所述去氢表雄酮抗体的制备方法，具体步骤如下：

(1) 实验选用健康的雄性小鼠或雄性兔作为实验对象，免疫剂量基础免疫为0.25~1 mg/kg，使用抗原与弗氏完全佐剂乳化免疫，加强免疫为0.5~1 mg/kg，使用抗原与弗氏不完全佐剂乳化免疫。雄性兔子采用背部皮下多点注射，雄性小鼠采用腹腔注射，基础免疫15~20天后进行加强免疫，每隔15天加强免疫一次，第4次加强免疫后8~10天内，耳缘静脉采血，测定效价和特异性，待其血清效价和特异性合格后，兔子采用心脏采血，分离出抗血清；或用小鼠脾细胞进行细胞融合，获得杂交瘤细胞，进而获得单克隆抗体（刘秀梵，《单克隆抗体在农业上的应用》）；

(2) 采用辛酸-硫酸铵法或采用蛋白A亲和层析法，得到兔抗血清或是小鼠腹水中的免疫球蛋白G；所述的免疫球蛋白G是去氢表雄酮抗体。

所述去氢表雄酮抗体的制备方法步骤(1)中的雄性小鼠优选为雄性Balb/c小鼠，雄性兔优选为雄性新西兰兔。

所述的去氢表雄酮抗体特异性、效价、亲和力高。

所述辣根过氧化物标记的去氢表雄酮抗体的制备方法为过碘酸盐氧化法，纯化方法同所述去氢表雄酮抗体的制备方法步骤(2)。

所述的去氢表雄酮抗体应用于去氢表雄酮含量的免疫检测。

所述的去氢表雄酮特抗体应用于食品中去氢表雄酮含量的免疫检测，特别是应用于减肥类保健食品中去氢表雄酮含量的免疫检测。

所述的免疫检测为酶联免疫吸附剂测定（即ELISA）。

本发明的原理：由于去氢表雄酮是小分子物质（分子量小于1000），本身不具有免疫原性，必须与大分子载体偶联制备人工抗原，才能诱导特异性抗体的产生。由于去氢表雄酮本身并不具有活性基团，不能与大分子载体偶联，因此需要对去氢表雄酮分子进行改造，引入活性基团（-COOH、-NH<sub>2</sub>、-OH等），合成去氢表雄酮半抗原。本发明以去氢表雄酮为原料，

与酸酐反应生成含羧基的去氢表雄酮半抗原；然后通过活泼脂法或者混合酸酐法将去氢表雄酮半抗原与蛋白质偶联制备去氢表雄酮人工抗原。将去氢表雄酮人工抗原免疫动物后产生对去氢表雄酮高特异性抗体。再将去氢表雄酮抗体与辣根过氧化物结合，得到辣根过氧化物标记的去氢表雄酮抗体。

本发明相对于现有技术具有如下的优点及效果：

(1) 本发明制备的去氢表雄酮半抗原，其纯化方法与国外已有技术相比，更为简单快速，使用萃取的方法取代了原来的柱层析方法；

(2) 本发明制备的去氢表雄酮抗体的亲合力高，可以在 90 分钟内实现检测；

(3) 应用本发明制备的去氢表雄酮人工抗原和抗体的免疫检测分析方法，与仪器方法相比较，其检测成本低，其成本只是仪器检测的 1/10 左右；

(4) 应用本发明制备的去氢表雄酮人工抗原和抗体的免疫检测分析方法灵敏度高、特异性强，其检测线性检测范围为 5.7~279.3 ng/ml，最低检测限为 1.5 ng/ml；

(5) 应用本发明制备的去氢表雄酮半抗原及其相应的人工抗原和抗体的免疫检测分析方法能够同时检测大批量的样品，速度较快，方便操作，因此本发明制备的去氢表雄酮半抗原及其相应的人工抗原和抗体适用于去氢表雄酮含量的现场监控的痕量分析。

#### 附图说明

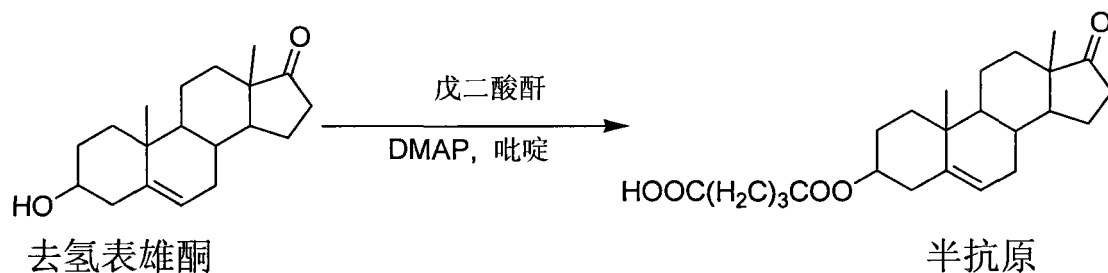
图 1 为去氢表雄酮标准曲线。

#### 具体实施方式

下面结合实施例及附图对本发明作进一步详细的描述，但本发明的实施方式不限于此。

##### 实施例 1

(1) 去氢表雄酮半抗原 (n=3) 的制备，如下反应式所示：



将 250 mg (0.827 mmol) DHEA, 511 mg (4.48 mmol) 戊二酸酐与 11 mg (90  $\mu\text{mol}$ ) 的 DMAP 溶于 1 ml 的无水吡啶中, 在室温下搅拌反应 23 小时。反应结束后加入 10 ml 饱和碳酸钠溶液, 继续搅拌 10 分钟; 然后使用乙酸乙酯萃取, 取水层, 重复萃取 3 次; 冷却水层, 并用 2 mol/L 的盐酸酸化水层, 使其 pH 为 3, 过滤, 收集沉淀; 使用饱和碳酸钠溶液洗涤沉淀至中性, 然后真空干燥沉淀, 得到去氢表雄酮半抗原。

(2) 去氢表雄酮人工抗原的制备, 采用活泼酯法制备免疫抗原, 混合酸酐法制备包被抗原:

免疫抗原的制备: 将 50  $\mu\text{mol}$  的去氢表雄酮半抗原溶解于 1.5 ml 的 DMSO 中, 然后在该溶液里加入 50  $\mu\text{mol}$  DCC 和 50  $\mu\text{mol}$  NHS, 室温避光反应过夜, 4 $^{\circ}\text{C}$  离心弃沉淀, 留上清液; 将上清液其缓慢加入到 6 ml 0.1 mol/L pH9.5 的含有载体蛋白 BSA 的  $\text{Na}_2\text{CO}_3\text{-NaHCO}_3$  缓冲液中, 其中 BSA 的浓度为 15 mg/ml。混合物在 4 $^{\circ}\text{C}$  下反应过夜。待反应完成后, 装入孔径为 8~14kD 的透析袋, 然后用质量百分比 0.9% 的生理盐水透析 3 天, 得到去氢表雄酮人工抗原 (DHEA-BSA)。

包被抗原的制备: 将 100  $\mu\text{mol}$  去氢表雄酮半抗原溶于 2ml 无水 DMF 中, 加入 60  $\mu\text{l}$  正三丁胺, 冰浴下缓慢滴加 0.15 mmol 氯甲酸异丁酯, 4 $^{\circ}\text{C}$  搅拌反应 1 小时, 得到甲液; 将 80mg OVA 溶于 4ml 1mol/L pH9.6 的  $\text{Na}_2\text{CO}_3\text{-NaHCO}_3$  缓冲液中, 得到乙液; 将甲液缓慢滴加到乙液中, 4 $^{\circ}\text{C}$  磁力搅拌反应过夜, 待反应完成后, 装入孔径为 8~14kD 的透析袋, 然后用质量百分比 0.9% 的生理盐水透析 3 天, 得到去氢表雄酮人工抗原 (DHEA-OVA)。

按照分光光度法测定去氢表雄酮半抗原、载体蛋白以及去氢表雄酮人工抗原的最大吸收值, 计算去氢表雄酮人工抗原的偶联比。扫描波长为 200~400nm, 计算得到: 去氢表雄酮半抗原与 BSA 的偶联比为 14.1:1, 去氢表雄酮半抗原与 OVA 的偶联比为 8.2:1。

(3) 兔去氢表雄酮抗体的制备

实验选用 2~3 月、体重 2~2.5 kg 健康雄性的新西兰兔作为实验对象，同时免疫两只兔子，基础免疫剂量为 0.5mg/kg，使用 DHEA-BSA 抗原与弗氏完全佐剂乳化免疫；加强免疫剂量为 1 mg/kg，使用 DHEA-BSA 抗原与弗氏不完全佐剂乳化免疫。采用背部皮下多点注射，基础免疫 20 天后进行加强免疫，每隔 15 天加强免疫一次，第 4 次免疫后 8~10 天内，耳缘静脉采血，测定效价，待其血清效价稳定不再增长后，兔子采用心脏采血，分离出抗血清。得到的抗血清的效价为 1/320000。

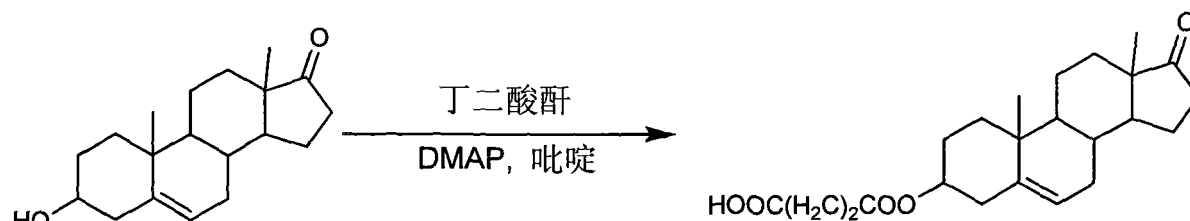
抗血清采用辛酸-硫酸铵盐析法纯化：在抗血清内加入同抗血清等体积的 pH4.0、60 mmol/L 醋酸盐缓冲液，并用 0.1 mol/L NaOH 调 pH 至 4.5。在振荡下滴加正辛酸(33  $\mu$ l/ml)，室温搅拌 30 分钟，4  $^{\circ}$ C 静置 1 小时，然后在 4  $^{\circ}$ C 10000rpm 离心 30 分钟。弃沉淀，取上清液，用定性滤纸过滤，加入 0.1 mol/L PBS，用 1 mol/L NaOH 调 pH 至 7.4，在 4  $^{\circ}$ C 条件下预冷 15 分钟。每毫升混合液加入 0.277 g 硫酸铵，搅拌 30 分钟后在 4  $^{\circ}$ C 冰箱内静置 2~3 小时，10000 rpm 离心 30 分钟，弃上清。沉淀用少量 0.01 mol/L PBS 溶解，并于 4 $^{\circ}$ C 下在 pH7.4 0.01 mol/L PBS 中透析，每天换液 3~5 次，得到纯化的兔去氢表雄酮抗体。

抗体特异性的检测：将纯化的兔去氢表雄酮抗体与与去氢表雄酮相似的抗原混合，测两者之间的结合率。纯化的兔去氢表雄酮抗体与雄烯二酮、甲基睾丸酮、孕酮、皮质醇、雌二醇或 L-甲状腺素钠的结合率分别为 10.0%、0.04%、0.52%、0.06%、0.01%和小于 0.01%，可知制备得到的兔去氢表雄酮抗体的特异性较好。

(4)辣根过氧化物标记的去氢表雄酮抗体的制备，具体步骤为：称 5 mg HRP 溶解于 1 ml 蒸馏水中，加入 0.2 ml 新配制的 0.1 mol/L 过碘酸钠，室温下避光搅拌 20 min。反应完后装入透析袋，用 0.001 mol/L pH 4.4 醋酸盐缓冲液在 4  $^{\circ}$ C 透析过夜。加 20  $\mu$ l 0.2 mol/L 碳酸缓冲液，然后立即加入 1 mL 含有 10 mg 纯化抗体的 0.01 ml/L pH9.0-9.5 的  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ - $\text{NaHCO}_3$  缓冲液。室温避光反应 2 小时。加入 100  $\mu$ l 4 mg/mL 硼氢化钠，4  $^{\circ}$ C 冰箱反应 2 小时；然后按上述辛酸-硫酸铵盐析法纯化方法进行纯化。

## 实施例 2

(1) 去氢表雄酮半抗原 (n=2) 的制备，如下反应式所示：



将 250 mg (0.827 mmol) DHAE, 120mg (0.827 mmol) 丁二酸酐与 20 mg (165  $\mu\text{mol}$ ) 的 DMAP 溶于 2 ml 的无水吡啶中, 在室温下搅拌反应 23 小时。反应结束后加入 5ml 的饱和氯化钠溶液中, 继续搅拌 20min; 二氯甲烷萃取, 取水层, 重复萃取 3 次; 冷却水层, 并用 2 mol/L 的盐酸酸化水层, 使其 pH 为 2, 过滤, 收集沉淀; 使用饱和氯化钠溶液洗涤沉淀至中性, 然后干燥沉淀, 得到去氢表雄酮半抗原。

(2) 去氢表雄酮人工抗原的制备, 采用活泼酯法制备免疫抗原, 混合酸酐法制备包被抗原:

免疫抗原的制备: 将 30  $\mu\text{mol}$  的去氢表雄酮半抗原溶解于 1 ml 的 DMSO 中, 然后在该溶液里加入 30  $\mu\text{mol}$  DCC 和 30  $\mu\text{mol}$  NHS, 室温避光反应过夜, 4 $^{\circ}\text{C}$  离心弃沉淀, 留上清液; 将上清液其缓慢加入到 4 ml 0.1mol/L pH9.0 的含有载体蛋白 BSA 的  $\text{Na}_2\text{CO}_3\text{-NaHCO}_3$  缓冲液中, 其中 BSA 的浓度为 10 mg/ml。混合物在 4 $^{\circ}\text{C}$  下反应过夜。待反应完成后, 装入孔径为 8-14kD 的透析袋, 然后用质量百分比 0.9% 的生理盐水透析 3 天, 得到去氢表雄酮人工抗原 (DHEA-BSA)。

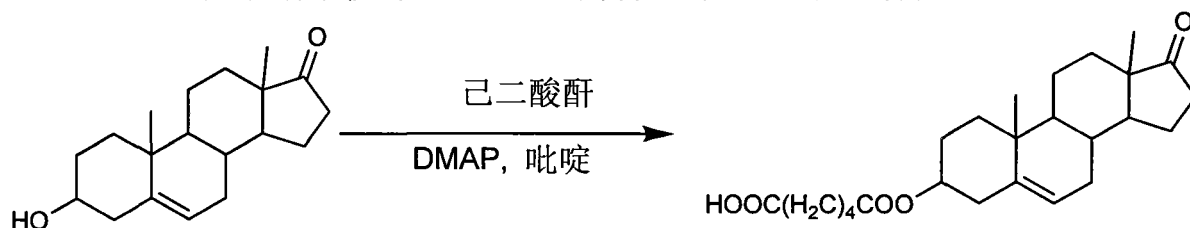
包被抗原的制备: 将 150 $\mu\text{mol}$  去氢表雄酮半抗原溶于 3 ml 无水 DMF 中, 加入 80  $\mu\text{l}$  正三丁胺, 冰浴下缓慢滴加 0.1 mmol 氯甲酸异丁酯, 4 $^{\circ}\text{C}$  搅拌反应 0.5 小时, 得到甲液; 将 60 mg KLH 溶于 5 ml 1mol/L pH 9.0 的  $\text{Na}_2\text{CO}_3\text{-NaHCO}_3$  缓冲液中, 得到乙液; 将甲液缓慢滴加到乙液中, 4 $^{\circ}\text{C}$  磁力搅拌反应过夜, 待反应完成后, 装入孔径为 8~14kD 的透析袋, 然后用质量百分比 0.9% 的生理盐水透析 3 天, 得到去氢表雄酮人工抗原 (DHEA-KLH)。

按照分光光度法测定去氢表雄酮半抗原、载体蛋白以及去氢表雄酮人工抗原的最大吸收值, 计算去氢表雄酮人工抗原的偶联比。扫描波长为 200~400nm, 计算得到: 去氢表雄酮半抗原与 BSA 的偶联比为 17.5:1, 去氢表雄酮半抗原与 KLH 的偶联比为 10.3:1。

(3) 兔去氢表雄酮抗体的制备: 按照实施例 1 步骤 (3) 进行兔抗体的制备。

### 实施例 3

(1) 去氢表雄酮半抗原 ( $n=4$ ) 的制备, 如下反应式所示:



将 250 mg (0.827 mmol) DHAЕ, 680 mg (6.62 mmol) 己二酸酐与 6.7 mg (55  $\mu\text{mol}$ ) 的 DMAP 溶于 1ml 的无水吡啶中, 在室温下搅拌反应 23 小时。反应结束后加入 15 ml 的饱和碳酸钠中, 继续搅拌 5min; 石油醚萃取, 取水层, 重复萃取 3 次; 冷却水层, 并用 2 mol/L 的盐酸酸化水层, 使其 pH 为 4, 过滤, 收集沉淀; 使用饱和盐水洗涤沉淀至中性, 然后干燥沉淀, 得到去氢表雄酮半抗原。

(2) 去氢表雄酮人工抗原的制备, 采用活泼酯法制备免疫抗原, 混合酸酐法制备包被抗原:

免疫抗原的制备: 将 40  $\mu\text{mol}$  的去氢表雄酮半抗原溶解于 1.2 ml 的 DMSO 中, 然后在该溶液里加入 40  $\mu\text{mol}$  DCC 和 40  $\mu\text{mol}$  NHS, 室温避光反应过夜, 4 $^{\circ}\text{C}$  离心弃沉淀, 留上清液; 将上清液其缓慢加入到 5 ml 0.1mol/L pH9.3 的含有载体蛋白 OVA 的  $\text{Na}_2\text{CO}_3\text{-NaHCO}_3$  缓冲液中, 其中 OVA 的浓度为 20 mg/ml。混合物在 4 $^{\circ}\text{C}$  下反应过夜。待反应完成后, 装入孔径为 8~14kD 的透析袋, 然后用质量百分比 0.9% 的生理盐水透析 3 天, 得到去氢表雄酮人工抗原 (DHEA-OVA)。

包被抗原的制备: 将 200 $\mu\text{mol}$  去氢表雄酮半抗原溶于 4 ml 无水 DMF 中, 加入 90  $\mu\text{l}$  正三丁胺, 冰浴下缓慢滴加 0.2 mmol 氯甲酸异丁酯, 4 $^{\circ}\text{C}$  搅拌反应 1 小时, 得到甲液; 将 80 mg THY 溶于 6 ml 1mol/L pH9.5 的  $\text{Na}_2\text{CO}_3\text{-NaHCO}_3$  缓冲液中, 得到乙液; 将甲液缓慢滴加到乙液中, 4 $^{\circ}\text{C}$  磁力搅拌反应过夜, 待反应完成后, 装入孔径为 8~14kD 的透析袋, 然后用质量百分比 0.9% 的生理盐水透析 3 天, 得到透析好去氢表雄酮人工抗原 (DHEA-THY)。

按照分光光度法测定去氢表雄酮半抗原、载体蛋白以及去氢表雄酮人工抗原的最大吸收值, 计算去氢表雄酮人工抗原的偶联比。扫描波长为 200~400nm, 计算得到: 去氢表雄酮半抗原与 OVA 的偶联比为 15.2:1, 去

氢表雄酮半抗原与 THY 的偶联比为 8.6:1。

(3) 兔去氢表雄酮抗体的制备：按照实施例 1 步骤 (3) 进行兔抗体的制备。

#### 实施例 4

使用实施例 1 制备得到的 DHEA-VOA 和辣根过氧化物标记的去氢表雄酮抗体进行免疫检测。

(1) 包被：在 96 孔酶标板上每孔加入 100 $\mu$ l 含有 DHEA-VOA 包被抗原的包被液，4 $^{\circ}$ C 过夜；包被液中 DHEA-VOA 包被抗原的浓度为 100ng/ml；

(2) 封闭：取出包被好的酶标板，使用 PBST（磷酸盐吐温 20 缓冲溶液）洗板两次，每孔加入 120  $\mu$ l 脱脂牛奶封闭液，与 37 $^{\circ}$ C 温箱中温育 3 小时后将脱脂牛奶封闭液甩干，置烘箱 1 小时；

(3) 加样：在封闭好的酶标板中每孔加入经系列稀释制备的去氢表雄酮标准液 50 $\mu$ l，浓度梯度（单位为 ng/ml）为 0、1、5、25、125、625、3125、10000，再加入抗体稀释液稀释 2500 倍的辣根过氧化物标记的去氢表雄酮抗体 50  $\mu$ l，在室温下反应 30 分钟，使用 PBST 洗液洗板 6 次；

(4) 显色：每孔加入底物 TMB-过氧化氢溶液 100  $\mu$ l，即 150 $\mu$ l 的 0.1mol/L 的 TMB 与 2 $\mu$ l 30%的过氧化氢溶液混合，使用 10ml 底物缓冲液稀释；，室温显色 10 分钟后用 50  $\mu$ l 10% 的 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 终止反应。在酶标仪上 450 nm 波长下测吸光值。根据百分吸光度值与去氢表雄酮浓度之间的半对数关系按照四参数拟合得到标准曲线，如图 1 所示：

其中所述百分吸光度值的计算式为：

$$\text{百分吸光度值(\%)} = (B/B_0) \times 100$$

B 为标准溶液的平均吸光值，B<sub>0</sub> 为 0 浓度标准溶液的平均吸光度值。实施例 1 制备得到的 DHEA-VOA 和辣根过氧化物标记的去氢表雄酮抗体对去氢表雄酮线性检测范围为 5.7-279.3 ng/mL，最低检测限为 1.5 ng/ml。其方法的批内平均变异系数为 10.32%，其批间平均变异系数为 14.5%。

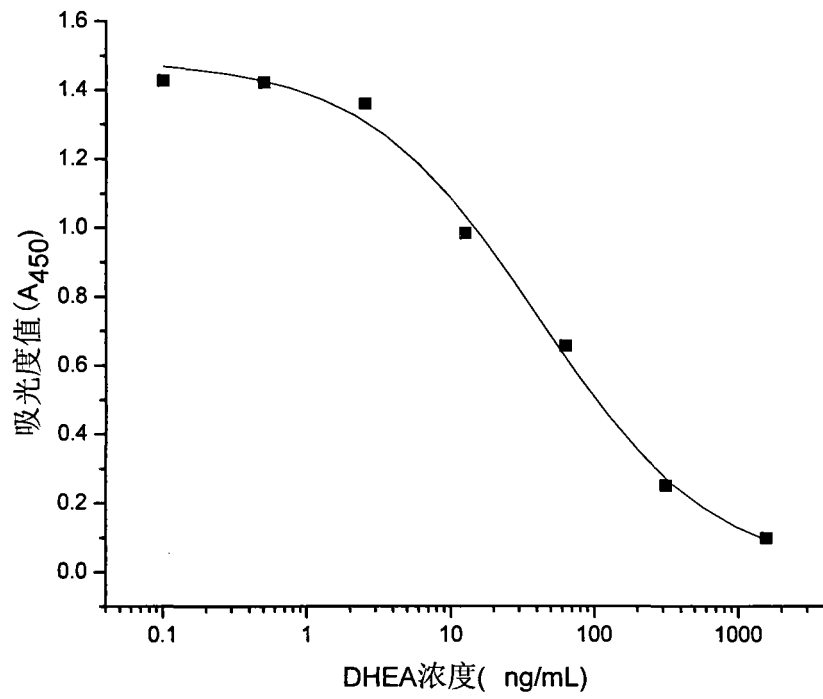
表 1 ELISA 的基本参数

抗原浓度	抗体倍数	检测时间	检测温度	线性范围	检测限
100ng/ml	2500 倍	90 min	37 $^{\circ}$ C	5.7-279.3ng/ml	1.5 ng/ml

### 实施例 6:

将减肥茶样品使用研钵磨碎后,称取 1g 置于三角瓶中。使用甲醇:水=8:2 作为提取液,在超声波上超声 20min。超声提取后使用离心方法将上清液与沉淀分离。上清液经旋转蒸干后,使用 20%的甲醇溶解,再使用二氯甲烷萃取,将目标物萃取至二氯甲烷层,蒸干二氯甲烷层,使用 10%甲醇溶解并定容至 10ml,使用实施例 1 制备得到的 DHEA-OVA 和辣根过氧化物标记的去氢表雄酮抗体进行免疫学方法检测,得到方法的平均回收率为 81.59%,平均变异系数为 12.59%。由于方法的准确度是使用加标回收率来评价的,回收率在 80%~120%之间,表明该方法准确,可以进行实际应用;变异系数表示方法的重复性,一般  $CV < 15\%$  时,表明方法的重复性好。可见应用本发明所制备的去氢表雄酮人工抗原及其抗体的免疫学检测方法准确,重复性好。

上述实施例为本发明较佳的实施方式,但本发明的实施方式并不受上述实施例的限制,其他的任何未背离本发明的精神实质与原理下所作的改变、修饰、替代、组合、简化,均应为等效的置换方式,都包含在本发明的保护范围之内。



专利名称(译)	去氢表雄酮半抗原、人工抗原和抗体及其制备方法和应用		
公开(公告)号	<a href="#">CN101538307A</a>	公开(公告)日	2009-09-23
申请号	CN200910039021.3	申请日	2009-04-27
[标]申请(专利权)人(译)	华南农业大学		
申请(专利权)人(译)	华南农业大学		
当前申请(专利权)人(译)	华南农业大学		
[标]发明人	雷红涛 孙远明 石敏 沈玉栋 杨金易 王弘 徐晓艳		
发明人	雷红涛 孙远明 石敏 沈玉栋 杨金易 王弘 徐晓艳		
IPC分类号	C07J13/00 C07K14/765 C07K14/77 C07K14/795 C07K14/42 C07K14/435 C07K16/44 C12N15/06 C12P21/08 G01N33/53 G01N33/02		
代理人(译)	杨晓松		
其他公开文献	CN101538307B		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明公开了一种去氢表雄酮半抗原及其相应的人工抗原和抗体，同时本发明也公开了所述去氢表雄酮半抗原、人工抗原和抗体的制备方法和应用。本发明以去氢表雄酮为原料，与酸酐反应生成含羧基的去氢表雄酮半抗原；然后通过活泼脂法或者混合酸酐法将去氢表雄酮半抗原与蛋白质偶联制备去氢表雄酮人工抗原。将去氢表雄酮人工抗原免疫动物后产生对去氢表雄酮高特异性抗体。再将去氢表雄酮抗体与辣根过氧化物结合，得到辣根过氧化物标记的去氢表雄酮抗体。应用所述辣根过氧化物标记的去氢表雄酮抗体和去氢表雄酮人工抗原免疫检测方法可用于去氢表雄酮现场快速检测，对实现保健食品安全的快速检测具有重要现实意义。

