

(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102336831 A

(43) 申请公布日 2012. 02. 01

(21) 申请号 201010237964. X

(22) 申请日 2010. 07. 27

(71) 申请人 天津科技大学

地址 300000 天津市经济技术开发区十三大街 29 号天津科技大学食品工程与生物技术学院

(72) 发明人 王硕 张燕 王俊平 王莉

(51) Int. Cl.

C07K 14/795 (2006. 01)

C07K 16/44 (2006. 01)

C07K 16/06 (2006. 01)

C07D 487/04 (2006. 01)

G01N 33/535 (2006. 01)

权利要求书 2 页 说明书 5 页

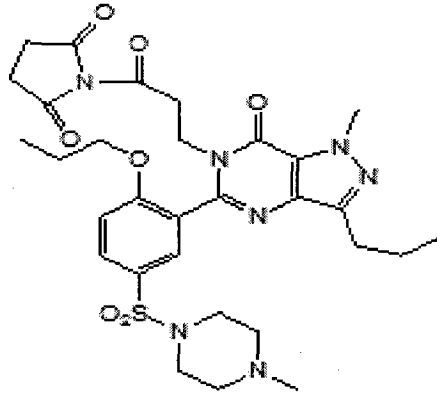
(54) 发明名称

一种抗西地那非的特异性抗体

(57) 摘要

西地那非人工抗原和抗体的制备方法, 涉及一种最大程度保留西地那非结构的人工半抗原、抗原和抗体的制备方法, 通过化学合成方法制得的西地那非半抗原与载体 KLH 蛋白相连接合成人工抗原, 抗体是人工抗原经动物免疫、取血, 分出抗血清, 纯化制得。本发明是通过设计合成具有西地那非结构的半抗原和人工抗原, 突出了此分子特异性抗原决定簇又克服了化学合成的困难, 并采用免疫动物诱导产生亲和性很高的抗体; 与其他同类方法相比, 具有特异、灵敏、准确、快速、方便、廉价等特点, 所设计、合成的半抗原为制备特异性良好的抗体奠定了基础。

1. 西地那非的人工抗原和抗体其特征在于使用分子式为



的半抗原与 KLH 蛋白连接合成人工抗原,与辣根过氧化物酶连接合成酶标抗原,其中人工抗原再经过免疫新西兰大白兔,取血,分离出抗血清纯化制得抗体;

2. 权利要求 1 所述的西地那非人工抗原的制备方法,其特征在于是用下述步骤制得:

1) 将 47.5mg 西地那非加入到 1.5mL 含 60% 氢氧化钠的 N,N-二甲基甲酰胺的悬浮液中并用氮气保护,室温搅拌 1h 后,滴加含 19mg 溴乙酸乙酯的 N,N-二甲基甲酰胺 0.8mL,室温搅拌 15min 后,60°C 油浴中继续搅拌 16h,减压整除 N,N-二甲基甲酰胺,残余物中加入 1mL 水,用二氯甲烷提取产物,合并提取液,水洗涤后,分出有机层,无水硫酸镁干燥,滤除干燥剂,滤液减压浓缩后,残余物柱层析分离,得到取代乙酸甲酯接臂产物;

2) 将上述取代乙酸甲酯样品溶于 1mL 四氢呋喃,室温搅拌下加入氢氧化锂水溶液,室温搅拌 5-6h,直至薄层板中样品斑点完全消失,减压旋蒸掉四氢呋喃后,二氯甲烷先提取杂质,用 5mol/L 的盐酸调溶液 pH 2-3 后,用二氯甲烷提取制得的取代乙酸,合并提取液,水洗后无水硫酸镁干燥即可得到西地那非半抗原;

3) 称取 423.2mg 西地那非半抗原和 126.7mg N-羟基琥珀酰亚胺 (NHS) 溶于 20mL 无水四氢呋喃 (THF) 中,冰浴下搅拌 0.5h,加入溶有 227.0mg N,N-二环己基碳二亚胺 (DCC) 的 5mL THF 溶液,冰浴下继续搅拌 1h,自然升至室温,搅拌过夜,旋蒸得到产物,将产物溶于 1mL N,N-二甲基甲酰胺 (DMF) 溶液中,将此溶液在冰浴中逐滴加入浓度为 5mg mL⁻¹ 的 2mL KLH 溶液中,搅拌,室温下反应 5h,再精确称取 4.7mg EDC 加入反应液中,搅拌,4°C 反应过夜,然后将反应液在 4°C、pH 7.4 的磷酸盐缓冲溶液中透析三天,即可得到人工抗原;

3. 权利要求 1 所述的西地那非酶标抗原的制备方法,其特征在于是用下述步骤制得:

分别精确称权利要求 2 所得西地那非半抗原 16.975mg 溶于 1mL N,N-二甲基甲酰胺溶液中,将此溶液在冰浴中逐滴加入 2mL 浓度为 5mg/mL 的 HRP 溶液中,搅拌,室温下反应 5h,4°C 反应过夜,然后将反应液在 4°C、pH 7.4 的磷酸盐缓冲溶液中透析三天即可得到西地那非的酶标抗原;

4. 权利要求 1 所述的西地那非抗体的制备方法,其特征在于是用下述步骤制得:

免疫动物选用雌性新西兰大白兔,免疫方法采用皮下和肌肉注射法,初免后进行四次加强免疫,加强免疫分别于初次免疫后 2 周、4 周和 6 周后免疫三次,此后间隔一个月进行第五次免疫,免疫后 9 天由兔子的耳缘静脉取血,进行效价检测,具体做法是:

初次免疫:取 1mg 按照权利要求 2 所述方法合成的人工抗原溶于 0.9% 的 NaCl 溶液和弗氏完全佐剂等体积所配制的溶液中,进行动物免疫,

加强免疫 :用 0.5mg 上述人工抗原溶于 0.9%的 NaCl 溶液和弗氏不完全佐剂等体积所配制的溶液,进行动物免疫,

抗体纯化 :定时监测动物抗体效价,当抗体对一定的包被抗原达到适宜效价时,采集血液,并离心获得抗血清,使用 G-Sepharose 蛋白亲和层析柱对抗血清进行纯化,获得抗西地那非的特异性抗体。

一种抗西地那非的特异性抗体

技术领域

[0001] 本发明涉及选择一种最大可能包含西地那非原有结构的化合物作为西地那非半抗原,并将半抗原制成抗原、进而产生抗体;以及此类半抗原、抗原的合成与抗体制备方法。本发明属于生物技术领域。

背景技术

[0002] 随着全球经济一体化和食品贸易国际化,食品安全已成为一个世界性的挑战和全球重要的公共卫生问题。随着人们生活水平的提高,人们越来越关注自己的健康,功能食品也日益受到人们的青睐。但是近些年来功能食品中违法添加药品问题十分突出,“补肾、壮阳”类功能食品中违法添加西地那非,不仅给患者造成了极大的危害,也带来了经济上的损失,已严重影响到我国人民对于食品的消费信心以及我国食品在国际市场上的竞争力。因此,加快对食品安全快速检测技术的研究开发,构建食品质量与安全保障体系,对加速我国食品流通领域现代化、提高食品在全球市场的竞争力,具有重要的现实意义和深远的战略意义。

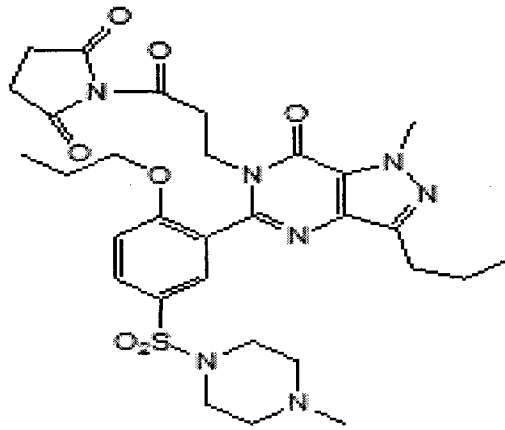
[0003] 非法添加在功能食品中的西地那非具有较大的副作用,对人体造成较大危害。由于西地那非在功能食品中的添加剂量都很微量,仪器方法检测具有很多限制和缺陷,因此建立一种经济、可靠、特异、敏感、快速有效的方法具有重要意义。本课题根据西地那非结构制备出西地那非半抗原,进行免疫试验后得到高特异性的西地那非抗体,经过试验条件的优化,样品前处理方法的研究,建立了一种样品前处理简单、准确度高的西地那非酶联免疫检测方法,为今后西地那非试剂盒的开发研制奠定了基础。

发明内容

[0004] 本发明设计合成了小分子目标分析物半抗原,并与载体蛋白质偶联,制备有效人工抗原,免疫动物制备对小分子分析物特异性抗体,利用抗原抗体的特异性免疫学反应和易被检测识别的标记物的放大作用,从而定性定量的检测样本中超微量小分子目标物,可用于样本测定。该技术研究的关键是半抗原的分子设计、合成和全抗原及抗体的制备。

[0005] 本发明为达到以上目的所设计的技术方案是合成分子结构式如下图所示西地那非半抗原

[0006]



[0007] ,然后将半抗原与载体蛋白联接合成人工抗原,免疫动物,获得抗体。

[0008] (1) 西地那非 (47.5mg, 0.1mmol) 加入到 60% 氢化钠 (5.2mg, 0.13mmol, 分散在矿物油中) 在 N,N-二甲基甲酰胺 (1.5mL) 的悬浮液中 (氮气保护)。室温搅拌 1h 后,滴加溴乙酸乙酯 (19mg, 0.11mmol) 的 N,N-二甲基甲酰胺 (0.8mL) 溶液。室温搅拌 15min 后,60°C 油浴中继续搅拌 16h。减压整除 N,N-二甲基甲酰胺,残余物中加入 1mL 水后,用二氯甲烷提取产物。合并提取液,水洗涤后,分出有机层,无水硫酸镁干燥。滤除干燥剂,滤液减压浓缩后,残余物柱层析分离得较纯产物。

[0009] (2) 将上述取代乙酸甲酯样品溶于 1mL 四氢呋喃,室温搅拌下加入氢氧化锂水溶液,室温搅拌 5-6h,直至薄层板中样品斑点完全消失。减压旋蒸掉四氢呋喃后,二氯甲烷先提取杂质。用 5mol/L 的盐酸调溶液 pH 2-3 后,用二氯甲烷提取制得的取代乙酸。合并提取液,水洗后无水硫酸镁干燥。

[0010] (3) 人工抗原的合成:称取 423.2mg 西地那非半抗原和 126.7mg N-羟基琥珀酰亚胺 (NHS) 溶于 20mL 无水四氢呋喃 (THF) 中,冰浴下搅拌 0.5h。加入溶有 227.0mg N,N-二环己基碳二亚胺 (DCC) 的 5mL THF 溶液。冰浴下继续搅拌 1h,自然升至室温,搅拌过夜。旋蒸得到产物,将产物溶于 1mL N,N-二甲基甲酰胺 (DMF) 溶液中。将此溶液在冰浴中逐滴加入 2mL 浓度为 5mg/mL 的蛋白 KLH 溶液中 (10mg KLH 溶于 2mL 130mmol/L 碳酸氢钠缓冲液中, pH 8.1),搅拌,室温下反应 5h;再精确称取 4.7mg EDC 加入反应液中,搅拌,4°C 反应过夜,然后将反应液在 4°C、pH 7.4 的磷酸盐缓冲溶液 (PBS) 中透析三天,然后精确量取蛋白质偶联物溶液的体积,测定浓度加入叠氮钠,分装,-20°C 保存。

[0011] (4) 抗体的制备及纯化

[0012] 免疫动物选择日本大耳白兔 2 只,月龄 3 个月,体重 1.5 公斤左右,分别编号为 1 号、2 号。免疫采取皮下和肌肉注射法共同进行。

[0013] 免疫程序:初次免疫:为提高抗原的免疫性,采用由弗氏完全佐剂乳化的免疫原,剂量为 1mg,溶于 1mL 0.9% 的 NaCl,再与 1mL 的弗氏完全佐剂混合进行乳化。加强免疫:初次免疫后第 14 天和 28 天进行加强免疫,剂量为 0.5mg,溶于 1mL 0.9% 的 NaCl,再与 1mL 的弗氏不完全佐剂混合进行乳化。以后每隔 28 天加强免疫一次,共免疫 6 次。从第 2 次加强免疫开始,每次免疫 10 天后对动物试采血进行血清效价测定和亲和力测定。末次免疫后采用股动脉采血法对动物采全血,经离心处理后收集全部血清,采取免疫亲和层析法进行抗体纯化,所得抗体添加 0.1% (W/V) 的叠氮钠后于 4°C 储存备用。

[0014] 血清效价检测方法的步骤:

[0015] 1) 将制备好的西地那非包被原溶于 pH 9.6 Na₂CO₃-NaHCO₃ 的缓冲液中, 将西地那非包被原稀释为 1.0 μg/100 μL 作为包被液, 96 孔微孔板每孔各加入 100 μL, 室温放置过夜或者 37°C 恒温温育 2 ~ 3 小时, 用 PBST 即磷酸盐缓冲液 0.05% (V/V), Tween20 洗液洗涤三次;

[0016] 2) 每孔加入 200 μL 1% KLH/PBS 封闭液, 封闭 1 小时, 用洗液洗涤四次;

[0017] 3) 将各种稀释倍数的西地那非抗血清加入到各自的微孔中, 要三孔平行加样, 震荡混匀 5 ~ 10min, 室温反应 1 ~ 2 小时;

[0018] 4) 用洗液洗微孔板 3 ~ 4 次, 将孔内液体甩掉, 用吸水纸扣干, 向每微孔加 100 升羊抗兔酶标二抗, 37°C 反应 30 分钟;

[0019] 5) 用洗液洗微孔板 3 ~ 4 次, 将孔内液体甩掉, 用吸水纸扣干, 加入底物 A 和底物 B 的混合液, 该底物 A 和底物 B 的混合液的配比为 14.6 : 0.45, 室温下反应 0.5 小时;

[0020] 6) 向各微孔中加入终止液以终止反应, 用酶标仪读取吸光度值, 根据吸光值为 1 时的血清稀释度为效价, 绘制从免疫 24 天到第 120 天的西地那非抗体效价曲线。

[0021] 本发明的优点和积极效果是:

[0022] 1. 本发明最大程度地保留了西地那非的化学结构, 为国内外首创的新化合物, 用此半抗原制备的免疫抗原去免疫动物最大可能保留了原来西地那非的分子结构, 这为获得对西地那非有高度特异性的抗体提供了保证。

[0023] 2. 本发明, 具有特异、灵敏、准确、快速、廉价等特点, 所设计、合成的半抗原为制备特异性良好的抗体奠定了基础。

[0024] 3. 经试验验证, 上述半抗原, 其合成方法简单, 且所用主要原料如西地那非, 四氢呋喃价格低廉、容易获得, 在一般化学试剂公司均可购得。

[0025] 4. 本发明经试验验证上述半抗原, 其合成方法简便, 合成效率高, 反应步骤少, 提高了反应的可控性; 另外, 合成产物的提取、纯化方法简便, 易于推广普及。

具体实施方式

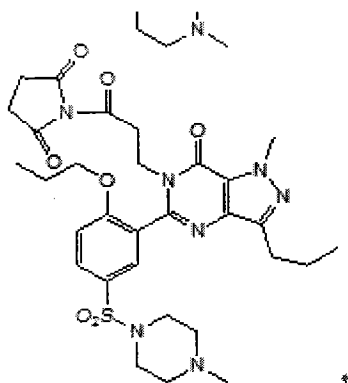
[0026] 下面结合附图, 对本发明实施例做进一步说明; 下述实施例是说明性的, 不是限定性的, 不能以下述实施例来限定本发明的保护范围。

[0027] 实施例 1:

[0028] 1. 半抗原的合成

[0029] 本发明选择西地那非的半抗原, 分子结构式为:

[0030]



[0031] 具体制备方法是：西地那非 (47.5mg, 0.1mmol) 加入到 60% 氢化钠 (5.2mg, 0.13mmol, 分散在矿物油中) 在 N,N-二甲基甲酰胺 (1.5mL) 的悬浮液中 (氮气保护)。室温搅拌 1h 后, 滴加溴乙酸乙酯 (19mg, 0.11mmol) 的 N,N-二甲基甲酰胺 (0.8mL) 溶液。室温搅拌 15min 后, 60℃ 油浴中继续搅拌 16h。减压整除 N,N-二甲基甲酰胺, 残余物中加入 1mL 水后, 用二氯甲烷提取产物。合并提取液, 水洗涤后, 分出有机层, 无水硫酸镁干燥。滤除干燥剂, 滤液减压浓缩后, 残余物柱层析分离得较纯产物。

[0032] 2. 水解

[0033] 将上述取代乙酸甲酯样品溶于 1mL 四氢呋喃, 室温搅拌下加入氢氧化锂水溶液, 室温搅拌 5-6h, 直至薄层板中样品斑点完全消失。减压旋蒸掉四氢呋喃后, 二氯甲烷先提取杂质。用 5mol/L 的盐酸调溶液 pH 2-3 后, 用二氯甲烷提取制得的取代乙酸。合并提取液, 水洗后无水硫酸镁干燥, 即为西地那非半抗原。

[0034] 3、人工抗原的合成

[0035] 称取 423.2mg 西地那非半抗原和 126.7mg N-羟基琥珀酰亚胺 (NHS) 溶于 20mL 无水四氢呋喃 (THF) 中, 冰浴下搅拌 0.5h。加入溶有 227.0mg N,N-二环己基碳二亚胺 (DCC) 的 5mL THF 溶液。冰浴下继续搅拌 1h, 自然升至室温, 搅拌过夜。旋蒸得到产物, 将产物溶于 1mL N,N-二甲基甲酰胺 (DMF) 溶液中。将此溶液在冰浴中逐滴加入 2mL 浓度为 5mg/mL 的蛋白 KLH 溶液中 (10mg KLH 溶于 2mL 130mmol/L 碳酸氢钠缓冲液中, pH 8.1), 搅拌, 室温下反应 5h; 再精确称取 4.7mg EDC 加入反应液中, 搅拌, 4℃ 反应过夜, 然后将反应液在 4℃、pH 7.4 的磷酸盐缓冲溶液 (PBS) 中透析三天, 然后精确量取蛋白质偶联物溶液的体积, 测定浓度加入叠氮钠, 分装, -20℃ 保存。

[0036] 4、包被抗原的合成

[0037] 实验所得的西地那非半抗原与 OVA 结合制成包被抗原, 用于包被酶标板。其具体做法同人工抗原的合成。

[0038] 5、抗体的制备及纯化：

[0039] 免疫动物选择日本大耳白兔 2 只, 月龄 3 个月, 体重 1.5 公斤左右, 饲养于标准试验动物房中, 连续观察 4 天, 确定身体状况正常后进行免疫。免疫采取皮下和肌肉注射法共同进行。

[0040] 初次免疫：称取剂量为 1mg, 溶于 1mL 0.9% 的 NaCl, 再与 1mL 的弗氏完全佐剂混合进行乳化, 乳化液用于免疫。

[0041] 加强免疫：初次免疫后第 14 天和 28 天进行加强免疫, 称取 0.5mg, 溶于 1mL 0.9% 的 NaCl, 再与 1mL 的弗氏不完全佐剂混合进行乳化, 乳化液进行免疫。从第四次免疫开始每隔 28 天加强免疫一次, 共免疫 6 次。从第 2 次加强免疫开始, 每次免疫 10 天后对动物试采血进行血清效价测定。末次免疫后采用股动脉采血法对动物采全血, 经离心处理后收集全部血清, 采取 proteinA-SepharoseCL-4B 免疫亲和层析柱进行抗体纯化, 所得抗体添加 0.1% (W/V) 的叠氮钠后于 4℃ 储存备用。

[0042] 6、血清效价检测方法的步骤：

[0043] 包被：将制备好的西地那非包被原溶于 pH 9.6 Na₂CO₃-NaHCO₃ 的缓冲液中, 将西地那非包被原稀释为 1.0 μg/100 μL 作为包被液, 96 孔微孔板每孔各加入 100 μL, 室温放置过夜或者 37℃ 恒温温育 2~3 小时, 用 PBST 即磷酸盐缓冲液 0.05% (V/V), Tween20 洗液

洗涤三次；

[0044] 封闭：每孔加入 200 μ L 1%牛血清蛋白 (BSA)/PBS 封闭液，封闭 1 小时，用洗液洗涤四次；

[0045] 加样：将各种稀释倍数的西地那非抗血清加入到各自的微孔中，要三孔平行加样，震荡混匀 5 ~ 10min，室温反应 1 ~ 2 小时；

[0046] 加酶标二抗：用洗液洗微孔板 3 ~ 4 次，将孔内液体甩掉，用吸水纸扣干，向每微孔加 100 微升羊抗兔酶标二抗，37 $^{\circ}$ C 反应 30 分钟；

[0047] 加底物：用洗液洗微孔板 3 ~ 4 次，将孔内液体甩掉，用吸水纸扣干，显色底物使用四甲基联苯胺 (TMB)。每孔加入 150 微升四甲基联苯胺 - 双氧水溶液 (5mg 四甲基联苯胺溶于 1ml 底物缓冲液)，室温下反应 0.5 小时；

[0048] 终止：向各微孔中加入终止液以终止反应，用酶标仪读取吸光度值，根据吸光值为 1 时的血清稀释度为效价。

专利名称(译)	一种抗西地那非的特异性抗体		
公开(公告)号	CN102336831A	公开(公告)日	2012-02-01
申请号	CN201010237964.X	申请日	2010-07-27
[标]申请(专利权)人(译)	天津科技大学		
申请(专利权)人(译)	天津科技大学		
当前申请(专利权)人(译)	天津科技大学		
[标]发明人	王硕 张燕 王俊平 王莉		
发明人	王硕 张燕 王俊平 王莉		
IPC分类号	C07K14/795 C07K16/44 C07K16/06 C07D487/04 G01N33/535		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

西地那非人工抗原和抗体的制备方法，涉及一种最大程度保留西地那非结构的人工半抗原、抗原和抗体的制备方法，通过化学合成方法制得的西地那非半抗原与载体KLH蛋白相连接合成人工抗原，抗体是人工抗原经动物免疫、取血，分出抗血清，纯化制得。本发明是通过设计合成具有西地那非结构的半抗原和人工抗原，突出了此分子特异性抗原决定簇又克服了化学合成的困难，并采用免疫动物诱导产生亲和性很高的抗体；与其他同类方法相比，具有特异、灵敏、准确、快速、方便、廉价等特点，所设计、合成的半抗原为制备特异性良好的抗体奠定了基础。

