



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101812128 A

(43) 申请公布日 2010.08.25

(21) 申请号 200910237951.X

C07K 14/77(2006.01)

(22) 申请日 2009.11.26

C07K 14/795(2006.01)

C07K 1/10(2006.01)

(71) 申请人 北京维德维康生物技术有限公司

C07K 16/44(2006.01)

地址 100085 北京市海淀区上地开拓路5号
中关村生物医药园B区421室

G01N 33/577(2006.01)

G01N 33/53(2006.01)

(72) 发明人 江海洋 王战辉 吴小平 徐飞
史为民 米铁军 李娜 王亚辉
张静

(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 任风华

(51) Int. Cl.

C07K 14/765(2006.01)

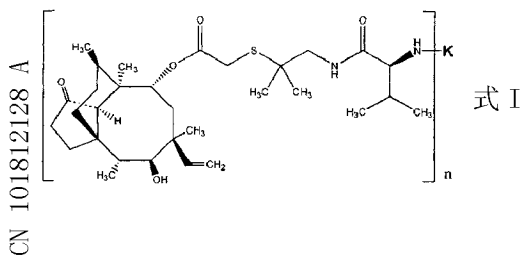
权利要求书 1 页 说明书 5 页 附图 1 页

(54) 发明名称

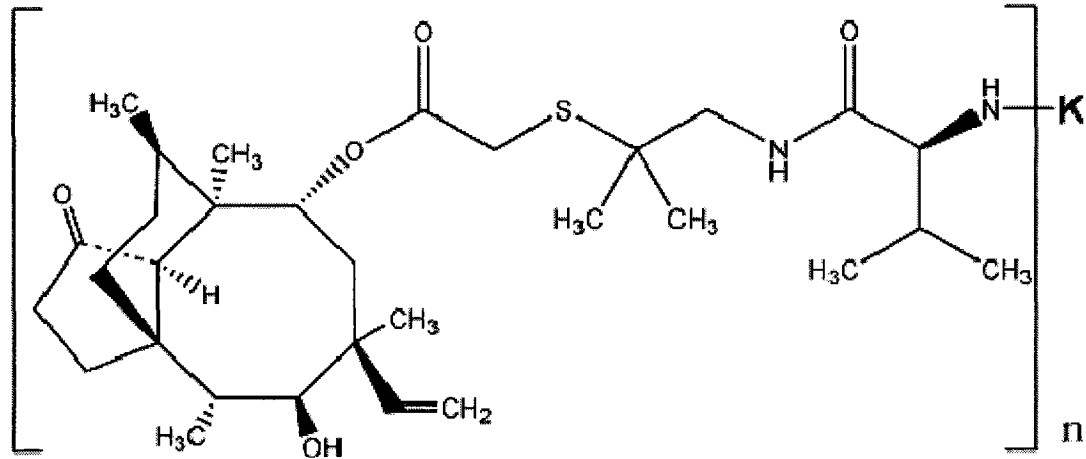
沃尼妙林人工抗原及其制备方法与应用

(57) 摘要

本发明公开了一种沃尼妙林人工抗原及其制备方法与应用。本发明提供的沃尼妙林人工抗原为式 I 所示化合物;式 I 中, n 为 1-25 的自然数;K 表示载体蛋白。用本发明的人工抗原免疫新西兰大白兔,可以得到对沃尼妙林有特异反应的抗体。经 ELISA 实验鉴定,获得的抗血清效价达到 1 : 102400。本发明为沃尼妙林的酶联免疫检测方法中所用检测试剂的开发以及制备沃尼妙林的酶联免疫检测试剂盒提供了广阔的应用和发展空间。应用本发明的人工抗原得到的抗体进行沃尼妙林的检测,具有简便、特异、准确的特点,可以用于动物源性食品中沃尼妙林的快速、高效筛选,为快速检测沃尼妙林奠定了技术基础。



1. 式 I 所示化合物；



式 I；

式 I 中，n 为 1-25 的自然数；

K 表示载体蛋白。

2. 根据权利要求 1 所述的化合物，其特征在于：所述 K 为牛血清白蛋白、人血清白蛋白、兰素蛋白或卵清白蛋白，优选牛血清白蛋白；所述 n 为 18。

3. 权利要求 1 所述化合物的制备方法，包括如下步骤：

1) 将沃尼妙林、载体蛋白共溶于 PBS 中，得到溶液 I；将碳二亚胺溶于水中，得到溶液 II；所述沃尼妙林、所述载体蛋白、所述碳二亚胺的质量比为 (10-100) : (20-200) : (20-200)；

2) 将溶液 II 和溶液 I 混合，15-25℃ 反应 1-3 小时，得到式 I 所示化合物。

4. 根据权利要求 3 所述的方法，其特征在于：所述方法包括如下步骤：

1) 将 50mg 沃尼妙林、100mg 载体蛋白共溶于 2ml 0.01M pH7.4 的 PBS 中，得到溶液 I；将 100mg 碳二亚胺溶于 1ml 水中，得到溶液 II；

2) 将溶液 II 和溶液 I 混合，20℃ 反应 2 小时，得到式 I 所示化合物。

5. 根据权利要求 3 或 4 所述的方法，其特征在于：所述 K 为牛血清白蛋白、人血清白蛋白、兰素蛋白或卵清白蛋白，优选牛血清白蛋白；所述 n 为 18。

6. 根据权利要求 3 至 5 中任一所述的方法，其特征在于：所述方法还包括将步骤 2) 得到的式 I 所示化合物进行透析的步骤；所述透析的条件为：4℃ -20℃、用 PBS 透析 48-96 小时，优选为 4℃、用 0.01M pH7.4 的 PBS 透析 72 小时。

7. 根据权利要求 6 所述的方法，其特征在于：所述方法还包括将透析后的式 I 所示化合物进行离心取上清的步骤；所述离心的条件为 4℃、5000-8000rpm 离心 20-30 分钟，优选为 4℃、5000rpm 离心 30 分钟。

8. 权利要求 1 或 2 所述的化合物在制备沃尼妙林抗体中的应用。

9. 以权利要求 1 或 2 所述的化合物为免疫原制备得到的单克隆抗体。

10. 权利要求 1 或 2 所述化合物或权利要求 9 所述抗体在检测沃尼妙林中的应用。

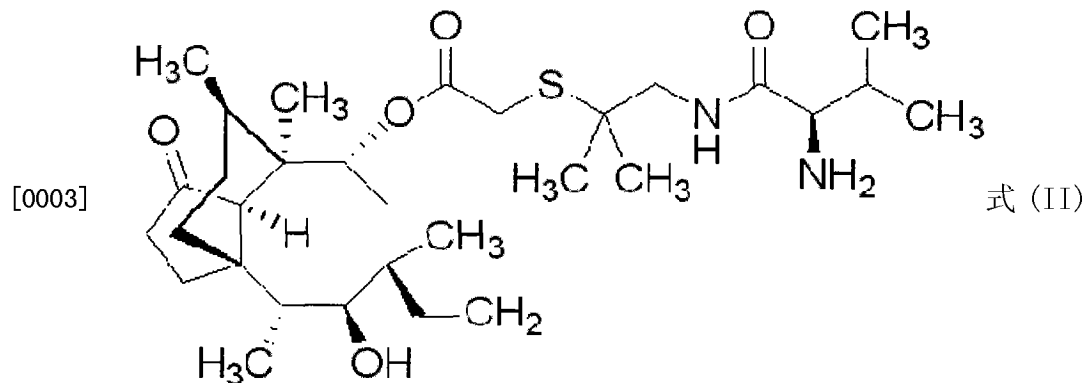
沃尼妙林人工抗原及其制备方法与应用

技术领域

[0001] 本发明涉及一种沃尼妙林人工抗原及其制备方法与应用。

背景技术

[0002] 沃尼妙林 (Valnemulin) 是新一代截短侧耳素 (pleurom. tilin) 类半合成抗生素, 属二萜烯类, 是泰妙菌素的同类药物。现已上市的沃尼妙林原料药为盐酸沃尼妙林, 化学名为 { [2 ~ ((R) - 2 - 氨基 - 3 - 甲基丁酰氨基) - 1,1 - 二甲基乙基] 巯基 } 乙酸 (3as, 4R, 5S, 6S, 8R, 9R, 9aR, 10R) - 八氢 - 5,8 - 二羟基 - 4,6,9,10 - 四甲基 - 6 ~ 乙烯基 - 3a,9 - 丙烷 - 3aH - 环戊环辛烯 - 1 (4H) - 酮 - 8 - 酯盐酸盐, 分子式 $C_{31}H_{53}ClN_2O_5S$, 相对分子量 601.30, 化学结构式见式 (II)。盐酸沃尼妙林为白色或淡黄色非结晶性粉末, 有吸湿性; 在水、无水乙醇中易溶, 在叔丁基甲醚中几乎不溶; 比旋度为 $+15.5^{\circ} \sim +18.0^{\circ}$; 熔点 $174 \sim 177^{\circ}C$; pH 值为 3.0 ~ 6.0。



[0004] 沃尼妙林的作用机理是与病原微生物核糖体上的 50s 亚基结合, 抑制其蛋白质的合成。Poulsen 等研究发现, 沃尼妙林可与病原微生物核糖体 23sRNA 的 v 区结合, 阻止转肽酶在 tRNA 的 CCA 一末端的准确定位, 从而抑制病原微生物蛋白质的合成, 致使其死亡。

[0005] 1984 年, 瑞士 Sandoz 公司 Bemer 等利用截短侧耳素率先合成成功。1999 年, 瑞士 Norvatis 公司将其做成预混剂, 商品名 Econor, 现已在多个国家上市, 主要用于防治畜禽支原体及肠道螺旋体感染。由于沃尼妙林具有安全、高效、低毒、不易产生耐药性等特点, 目前许多国家已广泛使用。虽然, 沃尼妙林以其治疗效果好、消除快、残留低、不易产生耐药性、毒副作用小、对环境无污染等特点, 得到了世界各国越来越多的关注。但动物实验表明其也可引起一些不良反应, 此外沃尼妙林可与聚醚离子载体类药物, 如莫能菌素、盐霉素、拉沙里菌素、马杜霉素等相互作用, 导致动物出现严重的中毒症状, 甚至死亡。因此其对人体的健康具有潜在的危害。虽然有研究报道沃尼妙林与其他药物相比不易产生耐药性, 但其临床应用时间不长, 并不能证明其在长期使用后的结果。目前, EMEA 规定了沃尼妙林在猪体内的最大残留限量 (MRLs): 肝脏, $500 \mu g/kg$; 肾脏, $100 \mu g/kg$; 肌肉, $50 \mu g/kg$ 。

[0006] 目前对沃尼妙林还没有一种公开发表, 稳定可靠的残留检测方法, 可能是由于沃尼妙林的最大吸收在近紫外区, 而近紫外区各种杂质的干扰又比较大, 这无疑增大了其残留检测的难度, 因此, 建立一种稳定可靠的残留检测方法就成了当前亟待解决的问题。免疫

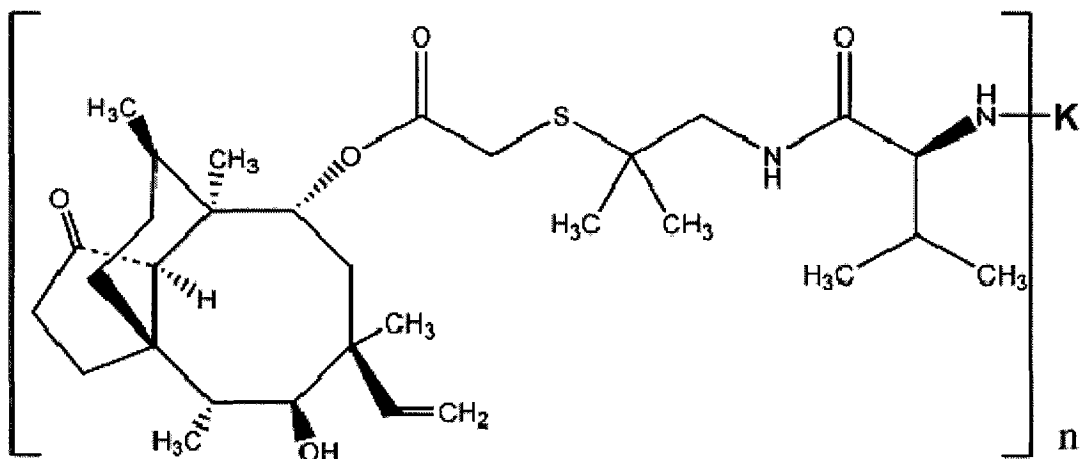
化学分析由于其原理为抗原抗体之间的特异性结合,刚好可避开上述困难,因而具有独特的优势。同时免疫分析还具有操作简便快速、成本低、灵敏度较高、分析样本量大的优点。影响免疫化学分析质量的根本因素是抗体的特异性与亲和性,这些性质又决定于免疫抗原分子的结构,因此免疫抗原的分子设计与合成就是产生特异性抗体和建立小分子兽药残留快速检测技术的最基础和最关键的步骤。

发明内容

[0007] 本发明的目的是提供一种沃尼妙林人工抗原及其制备方法与应用。

[0008] 本发明提供沃尼妙林人工抗原为式 I 所示化合物;

[0009]



[0010] 式 I;

[0011] 式 I 中, n 为 1-25 的自然数;

[0012] K 表示载体蛋白。

[0013] 所述化合物中,所述 K 具体可为牛血清白蛋白、人血清白蛋白、兰素蛋白或卵清白蛋白等,优选牛血清白蛋白。

[0014] 所述化合物中,所述 n 具体可为 18。

[0015] 本发明还保护式 I 所示化合物的制备方法,包括如下步骤:

[0016] 1) 将沃尼妙林、载体蛋白共溶于 PBS 中,得到溶液 I;将碳二亚胺 (EDC) 溶于水中,得到溶液 II;所述沃尼妙林、所述载体蛋白、所述碳二亚胺的质量比为 (10-100) : (20-200) : (20-200);

[0017] 2) 将溶液 II 和溶液 I 混合,15-25°C 反应 1-3 小时,得到式 I 所示化合物。

[0018] 具体来说,所述方法包括如下步骤:

[0019] 1) 将 50mg 沃尼妙林、100mg 载体蛋白共溶于 2ml 0.01M pH7.4 的 PBS 中,得到溶液 I;将 100mg 碳二亚胺溶于 1ml 水中,得到溶液 II;

[0020] 2) 将溶液 II 和溶液 I 混合,20°C 反应 2 小时,得到式 I 所示化合物。

[0021] 所述方法中,所述 K 具体可为牛血清白蛋白、人血清白蛋白、兰素蛋白或卵清白蛋白等,优选牛血清白蛋白。

[0022] 所述方法中,所述 n 具体可为 18。

[0023] 所述方法还包括将步骤 2) 得到的式 I 所示化合物进行透析的步骤;所述透析的条

件为：4℃ -20℃、用 PBS 透析 48-96 小时，优选为 4℃、用 0.01M pH7.4 的 PBS 透析 72 小时。

[0024] 所述方法还包括将透析后的所述化合物进行离心取上清的步骤；所述离心的条件为：4℃、5000-8000rpm、20-30 分钟，优选为 4℃、5000rpm、30 分钟。

[0025] 沃尼妙林可先溶解于 PBS 溶液中，再加几滴 DMF 促溶。具体可以采取逐滴加入的方式。所述反应过程中也可以进行搅拌。

[0026] 所述的化合物可应用于制备沃尼妙林抗体，如单克隆抗体。

[0027] 用所述的化合物为免疫原制备得到的单克隆抗体也属于本发明的保护范围。

[0028] 所述化合物或所述抗体可应用于检测沃尼妙林。

[0029] 本发明以 EDC 与载体蛋白的羧基反应，生成载体蛋白的活性酯中间产物，然后与含伯氨基的沃尼妙林发生反应，从而使载体蛋白与沃尼妙林以酰胺键相连，得到人工抗原。将人工抗原免疫动物后产生了针对沃尼妙林的特异性抗体。实验结果表明，用本发明的抗原免疫动物得到的抗血清的效价可达 1 : 102400，最低检测限为 0.05ng/mL，半抑制浓度为 0.4ng/mL，产生的抗体的特异性高、灵敏度高、准确度高。本发明的抗原和 / 或抗体，可用于建立竞争酶联免疫吸附分析技术，从而用于快速检测食品中的沃尼妙林残留，较常规色谱法比，具有成本低廉、操作简单、样品前处理简便、方便快捷的特点，还减少由于采用 HPLC、GC 检测而使用的甲醇、乙腈等有机溶剂对环境的污染，适合于大规模检测。本发明的制备方法的产率高。因此，本发明的抗原及抗体及检测方法具有广阔的应用前景。

附图说明

[0030] 图 1 为沃尼妙林人工抗原的紫外光谱图。

具体实施方式

[0031] 以下的实施例便于更好地理解本发明，但并不限定本发明。下述实施例中的实验方法，如无特殊说明，均为常规方法。下述实施例中所用的试验材料，如无特殊说明，均为自常规生化试剂商店购买得到的。

[0032] 实施例 1、沃尼妙林人工抗原的制备和鉴定

[0033] 沃尼妙林：购自 Sigma Aldrich 公司；产品目录号：32971。

[0034] 一、沃尼妙林人工抗原的制备

[0035] 将 50mg 沃尼妙林 (Valnemulin)、100mg 载体蛋白 (牛血清蛋白 BSA) 共溶于 2ml 0.01M pH7.4 的 PBS 中，得到溶液 I；称取碳二亚胺 (EDC) 100mg，溶于 1ml 水中，得到溶液 II；将溶液 II 加入到溶液 I 中，在 20℃ 的条件下，反应 2 小时，得到反应产物 (沃尼妙林人工抗原)。将反应产物进行透析，透析的条件为：4℃、用 0.01M pH7.4 的 PBS 透析 72 小时。透析后将化合物于 4℃、5000-8000rpm 离心 30 分钟，取上清 (沃尼妙林人工抗原)，分装于安培瓶中，-20℃ 保存。

[0036] 二、沃尼妙林人工抗原的鉴定

[0037] 将步骤一保存的上清 (沃尼妙林人工抗原) 用 0.01M pH7.4 的 PBS 稀释，然后进行紫外 (200-400nm) 光谱扫描，以 1mg/mL 的 BSA 作为对照。紫外 (200-400nm) 光谱扫描结果见图 1，沃尼妙林人工抗原的紫外图谱与 BSA 相比发生了明显变化，说明沃尼妙林半抗原与载体蛋白 BSA 成功偶联。沃尼妙林人工抗原 (Valnemulin-BSA) 为式 I 所示化合物，沃尼

妙林和 BSA 的偶联比为 18 : 1。

[0038] 实施例 2、抗血清的制备和特异性鉴定

[0039] 沃尼妙林标准品:购自 Sigma Aldrich 公司;产品目录号:32971。

[0040] 新西兰大白兔:购自北京实验动物研究中心。

[0041] HRP-羊抗兔 IgG:购自上海锐聪科技发展有限公司;产品目录号:KT117。

[0042] 一、沃尼妙林抗血清的制备

[0043] 新西兰大白兔 100 只,随机分成实验组和对照组(每组 50 只);实验组以步骤二制备的沃尼妙林人工抗原进行免疫,对照组以牛血清蛋白(BSA)进行免疫;每只兔子每次免疫 1mg/mL(以 BSA 量计),每两周免疫一次,共免疫 7 次;分别在第三次免疫之后 7 天,第四次免疫之后 7 天,第五次免疫之后 7 天,第六次免疫之后 7 天,第七次免疫之后 7 天,每组取 10 只兔子耳缘静脉采血。

[0044] 二、沃尼妙林抗血清的效价测定

[0045] 分别将步骤一采得的血样制备血清,进行间接竞争 ELISA 分析(每孔均设三个复孔),具体步骤如下:

[0046] 1、包被:用包被缓冲液将 Valnemulin-OVA(制备方法同 Valnemulin-BSA,用 OVA 代替 BSA) 倍比稀释为系列浓度(1000-100000),每一浓度包被一行,100 μ L/孔,4 $^{\circ}$ C 过夜;

[0047] 2、洗涤与封闭:倾去孔内液体,用洗涤液洗涤 3 次,每次 3 分钟;每孔加入 150 μ L 封闭液,37 $^{\circ}$ C 恒温封闭 1h,然后洗涤 3 次,每次 3 分钟;

[0048] 3、加样:将 50 μ L 倍比稀释的兔血清(1000-100000,)与 50 μ L 沃尼妙林标准液(1 μ g/ml) 加到酶标板上 37 $^{\circ}$ C 反应 1 小时,倾去孔内液体,用洗涤液洗涤 3 次;然后每孔加入 100 μ L HRP-羊抗兔 IgG,37 $^{\circ}$ C 反应 1 小时,倾去孔内液体,用洗涤液洗涤 3 次;

[0049] 4、显色测定:每孔加入 TMB 溶液 100 μ L,37 $^{\circ}$ C 显色 20min,然后每孔加入 50 μ L 2mol L⁻¹H₂SO₄ 以终止反应,最后用酶标仪测定各孔的 OD_{450nm} 值。

[0050] ELISA 分析中:空白对照孔中用 PBS 代替兔血清,作为空白对照;零标准孔中用 PBS 代替沃尼妙林标准液,作为阴性对照。

[0051] 实验组:沃尼妙林人工抗原第 6 次免疫之后获得了特异性抗体,效价高达 1 : 102400,其配对包被抗原稀释倍数为 5000 倍;与阴性对照(未加沃尼妙林标准品)相比,加入沃尼妙林标准品后,吸光值呈明显的递减梯度,说明获得的兔血清能够特异性地识别沃尼妙林。

[0052] 对照组:BSA 免疫组采集的 7 次免疫血清,测定中均无显色,说明实验组产生的抗体是特异性针对沃尼妙林药物的。

[0053] 结果表明,用沃尼妙林人工抗原免疫兔子,可以获得高效价的抗体,且免疫后得到的兔血清能够特异性地识别沃尼妙林。

[0054] 三、沃尼妙林抗血清的最低检测限和半抑制浓度测定

[0055] 分别将步骤一采得的血样制备血清,进行如下实验:

[0056] 1、包被:用包被缓冲液将 Valnemulin-OVA(制备方法同 Valnemulin-BSA,用 OVA 代替 BSA) 稀释 5000 倍,100 μ L/孔,4 $^{\circ}$ C 过夜;

[0057] 2、洗涤与封闭:倾去孔内液体,用洗涤液洗涤 3 次,每次 3 分钟;每孔加入 150 μ L 封闭液,37 $^{\circ}$ C 恒温封闭 1h,然后洗涤 3 次,每次 3 分钟;

[0058] 3、加样：将 50 μ L 的兔血清（102400 倍稀释）与 50 μ L 沃尼妙林系列标准液（0、0.05、0.25、1.25、6.25、50.0、250.0ng/mL）加到酶标板上 37 $^{\circ}$ C 反应 1 小时，倾去孔内液体，用洗涤液洗涤 3 次；然后每孔加入 100 μ L HRP-羊抗兔 IgG，37 $^{\circ}$ C 反应 1 小时，倾去孔内液体，用洗涤液洗涤 3 次；

[0059] 4、显色测定：每孔加入 TMB 溶液 100 μ L，37 $^{\circ}$ C 显色 20min，然后每孔加入 50 μ L 2mol L⁻¹H₂SO₄ 以终止反应，最后用酶标仪测定各孔的 OD_{450nm} 值。

[0060] 用 20%抑制浓度作为最低检测限，测定结果为 0.05ng/mL，半抑制浓度为 0.4ng/mL。

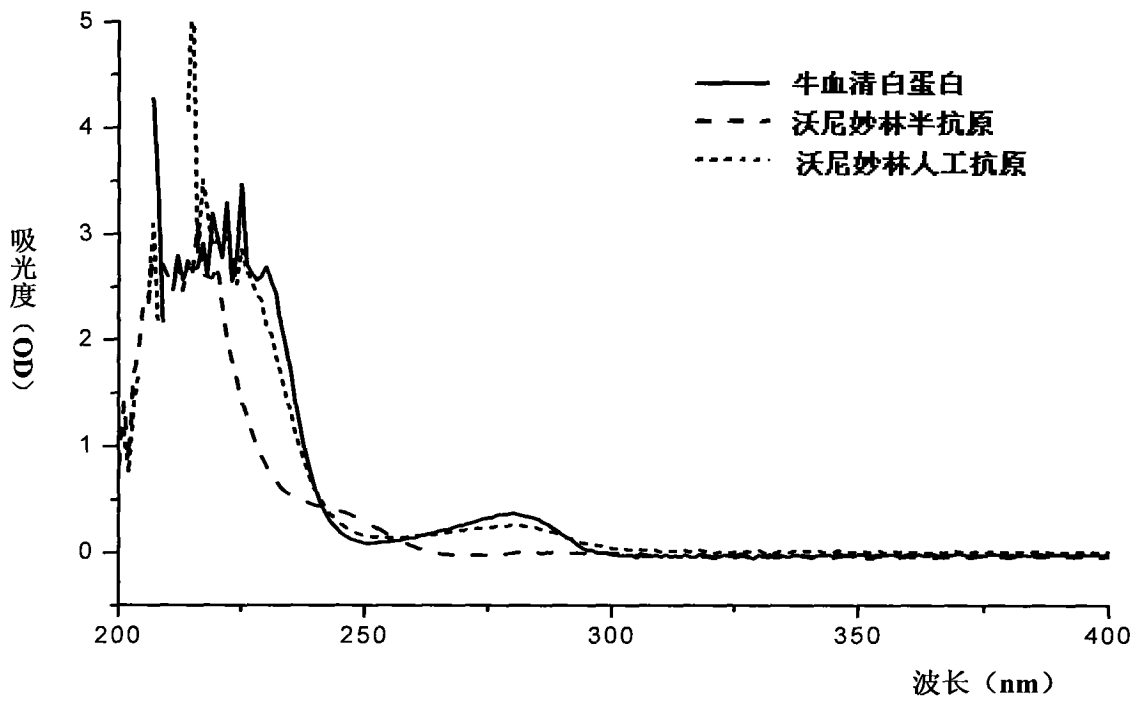


图 1

专利名称(译)	沃尼妙林人工抗原及其制备方法与应用		
公开(公告)号	CN101812128A	公开(公告)日	2010-08-25
申请号	CN200910237951.X	申请日	2009-11-26
[标]申请(专利权)人(译)	北京维德维康生物技术有限公司		
申请(专利权)人(译)	北京维德维康生物技术有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	北京维德维康生物技术有限公司		
[标]发明人	江海洋 王战辉 吴小平 徐飞 史为民 米铁军 李娜 王亚辉 张静		
发明人	江海洋 王战辉 吴小平 徐飞 史为民 米铁军 李娜 王亚辉 张静		
IPC分类号	C07K14/765 C07K14/77 C07K14/795 C07K1/10 C07K16/44 G01N33/577 G01N33/53		
代理人(译)	关畅		
其他公开文献	CN101812128B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种沃尼妙林人工抗原及其制备方法与应用。本发明提供的沃尼妙林人工抗原为式I所示化合物；式I中，n为1-25的自然数；K表示载体蛋白。用本发明的人工抗原免疫新西兰大白兔，可以得到对沃尼妙林有特异反应的抗体。经ELISA实验鉴定，获得的抗血清效价达到1:102400。本发明为沃尼妙林的酶联免疫检测方法中所用检测试剂的开发以及制备沃尼妙林的酶联免疫检测试剂盒提供了广阔的应用和发展空间。应用本发明的人工抗原得到的抗体进行沃尼妙林的检测，具有简便、特异、准确的特点，可以用于动物源性食品中沃尼妙林的快速、高效筛选，为快速检测沃尼妙林奠定了技术基础。

