



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104059119 A

(43) 申请公布日 2014. 09. 24

(21) 申请号 201410253502. 5

C07K 14/795(2006. 01)

(22) 申请日 2014. 06. 10

C07K 14/765(2006. 01)

(71) 申请人 高海岗

C07K 14/77(2006. 01)

地址 215128 江苏省苏州市东吴北路西塘北巷 5 号苏州市动物卫生监督所

C07K 16/44(2006. 01)

G01N 33/53(2006. 01)

(72) 发明人 高海岗 陆建荣 顾菲菲 张月峰 马光焰 施妮莎 许国平

(74) 专利代理机构 苏州慧通知识产权代理事务所(普通合伙) 32239

代理人 安纪平

(51) Int. Cl.

C07J 1/00(2006. 01)

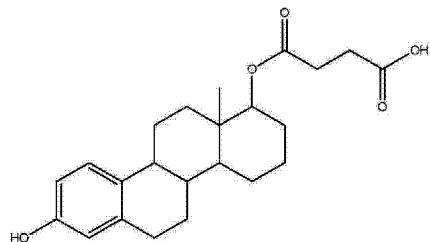
权利要求书1页 说明书6页 附图1页

(54) 发明名称

雌二醇半抗原、抗原、抗体及其制备方法与应用

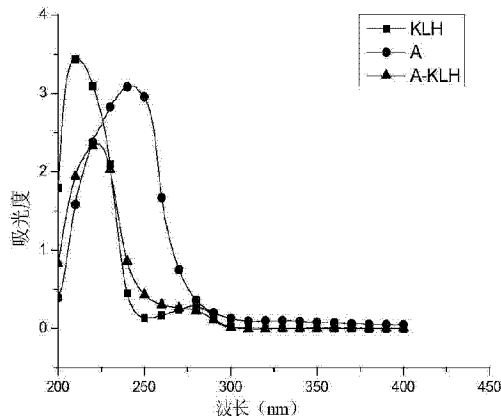
(57) 摘要

本发明一种雌二醇半抗原,雌二醇半抗原具有如下结构式:

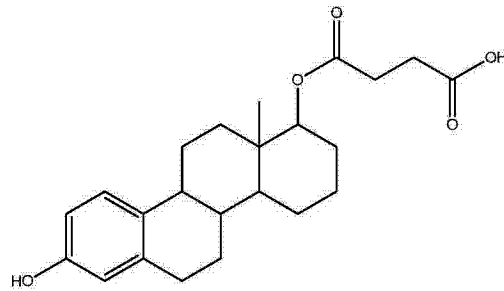


以及抗原、抗

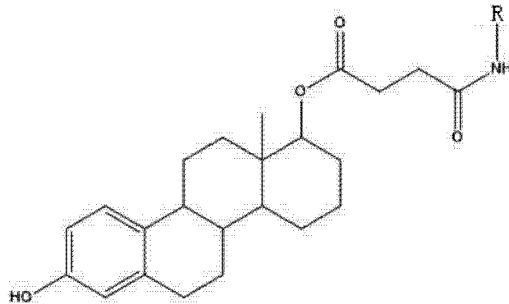
体及其制备方法和应用,现有的雌二醇检测技术以仪器法居多,而仪器法操作繁复,前处理复杂,成本高;本发明提供了雌二醇半抗原、抗原及其制备方法与应用;通过延长雌二醇特征基团的手臂制备半抗原,进而制备抗原,免疫动物获得特异性抗体;该抗体可以特异性识别雌二醇;延长半抗原的特征基团手臂长度,增大了与载体蛋白的距离,减小空间位阻,有利于刺激动物免疫应答产生特异性更强、灵敏度更高的抗体;本发明提供的雌二醇特异抗体对雌二醇的抑制率高达 91%。



1. 一种雌二醇半抗原,其特征在于,所述雌二醇半抗原具有如下结构式:



2. 一种雌二醇抗原,其特征在于,所述雌二醇抗原具有如下结构式:



式中:R 为载体蛋白。

3. 根据权利要求 2 所述的雌二醇抗原,其特征在于,所述载体蛋白为匙孔血蓝蛋白、牛血清蛋白或卵清蛋白。

4. 权利要求 1 所述的雌二醇半抗原的制备方法,其特征在于,所述制备方法操作步骤为:将雌二醇与戊二酸酐在催化剂的作用下反应得到产物,通过乙醚萃取纯化上述产物,得到所述雌二醇半抗原。

5. 根据权利要求 2 所述的雌二醇抗原的制备方法,其特征在于:所述制备方法包括如下步骤:

- 1) 制备雌二醇半抗原的 N,N- 二甲基甲酰胺溶液;
- 2) 在上述溶液中加入 N,N- 二环己基碳酰亚胺和 N- 羟基琥珀酰亚胺;
- 3) 搅拌,静置;
- 4) 离心后得上清液;
- 5) 将所述上清液加入载体蛋白的磷酸盐缓冲液中;
- 6) 反应后离心,取上清液,用生理盐水透析,得到目标产物。

6. 根据权利要求 5 所述的雌二醇抗原的制备方法,其特征在于:所述载体蛋白为匙孔血蓝蛋白、牛血清蛋白或卵清蛋白。

7. 一种雌二醇抗体,其特征在于,所述抗体通过将所述抗原与免疫佐剂乳化后刺激动物机体免疫应答获得。

8. 将权利要求 1 所述的雌二醇半抗原用于检测食品中的雌二醇。
9. 将权利要求 2 或 3 所述的雌二醇抗原用于检测食品中的雌二醇。
10. 将权利要求 7 所述的雌二醇抗体用于检测食品中的雌二醇。

雌二醇半抗原、抗原、抗体及其制备方法与应用

技术领域

[0001] 本发明涉及半抗原、抗原和抗体的制备方法,尤其涉及雌二醇半抗原、抗原、抗体及其制备方法与应用。

背景技术

[0002] 雌二醇 (17 β -Estradiol) 是天然雌激素的重要成分,因其可以明显促进动物生长及提高畜禽瘦肉比,而被应用于畜禽业生产中,雌二醇在动物体内的半衰期比较长,可以在畜禽肝脏肌肉和肾脏中蓄积,通过食物链进入人体,对人体正常的内分泌系统产生干扰,引起儿童性早熟及男性儿童乳腺发育呈女性化等问题。许多国家已经规定了雌二醇及其衍生物的最高残留限量,例如:美国农业部食品安全检验署 1991 年公布,在家禽的可食用部分雌二醇棕榈酸的最高残留限量为 0.002mg/kg;韩国兽药残留限量规定牛肉中苯甲酸雌二醇最高限量是 0.00012mg/kg;2010 年我国农业部第 235 号公告规定,雌二醇允许作治疗用,但不得在动物性食品中检出。因此,食品中雌二醇检测不容忽视。

[0003] 目前国内外检测雌二醇的常用方法主要集中在仪器方法如高效液相色谱-质谱联用等方法,这些方法样品预处理要求高、步骤复杂、操作需专业人员、检测费用高、所依赖仪器昂贵复杂、费时费力,很难适应多种不同场合的快速检测需要,在应用上不能广泛推广。

[0004] 基于抗原-抗体特异性结合的免疫分析法具有样品前处理简便、操作简单、快速、灵敏、高通量等特点,被誉为是 21 世纪最具竞争和挑战的快速检测技术,在食品安全领域具有广阔的应用前景。但是,对于免疫分析法而言,抗体是决定整个方法性能的重要基础,而抗体的效果很大程度上取决于引起相应动物发生免疫反应的抗原结构。由于雌二醇属于甾体化合物,极可能存在载体决定簇竞争性干扰、免疫耐受性及内分泌系统的干扰,制备其抗体常常较困难。

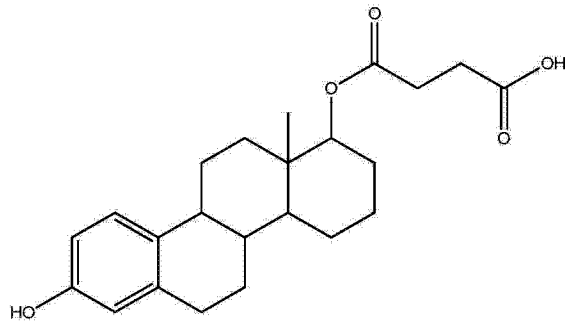
[0005] 有鉴于上述现有的雌二醇半抗原、抗原、抗体及其制备方法存在的缺陷,本发明人基于从事此类产品设计制造多年丰富的实务经验及专业知识,并配合学理的运用,积极加以研究创新,以期创设一种新型雌二醇半抗原、抗原、抗体及其制备方法与应用,使其更具有实用性。经过不断的研究、设计,并经反复试作样品及改进后,终于创设出确具实用价值的本发明。

发明内容

[0006] 本发明的主要目的在于,克服现有的雌二醇半抗原、抗原及抗体制备方法存在的缺陷,而提供一种新型雌二醇半抗原、抗原、抗体及其制备方法,提高抗体效价和灵敏度,并且可重复性高,从而更加适于实用,且具有产业上的利用价值。

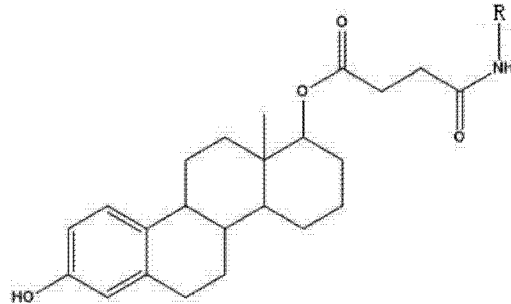
[0007] 本发明的目的及解决其技术问题是采用以下技术方案来实现的。依据本发明提出的一种雌二醇半抗原,所述雌二醇半抗原具有如下结构式:

[0008]



[0009] 一种雌二醇抗原,所述雌二醇抗原具有如下结构式:

[0010]



[0011] 式中:R 为载体蛋白。

[0012] 前述的雌二醇抗原,所述载体蛋白为匙孔血蓝蛋白、牛血清蛋白或卵清蛋白。

[0013] 前述的雌二醇半抗原的制备方法,所述制备方法操作步骤为:将雌二醇与戊二酸酐在催化剂的作用下反应得到产物,通过乙醚萃取纯化上述产物,得到所述雌二醇半抗原。

[0014] 前述的雌二醇抗原的制备方法,所述制备方法包括如下步骤:

[0015] 1) 制备雌二醇半抗原的 N,N- 二甲基甲酰胺 (DMF) 溶液;

[0016] 2) 在上述溶液中加入 N,N- 二环己基碳酰亚胺 (DCC) 和 N- 羟基琥珀酰亚胺 (NHS);

[0017] 3) 搅拌,静置;

[0018] 4) 离心后得上清液;

[0019] 5) 将所述上清液加入载体蛋白的磷酸盐缓冲液 (PBS) 中;

[0020] 6) 反应后离心,取上清液,用生理盐水透析,得到目标产物。

[0021] 前述的雌二醇抗原的制备方法,所述载体蛋白为匙孔血蓝蛋白、牛血清蛋白或卵清蛋白。

[0022] 一种雌二醇抗体,所述抗体通过将所述抗原与免疫佐剂乳化后刺激动物机体免疫应答获得。

[0023] 将前述的雌二醇半抗原作为检测食品中的雌二醇的用途。

[0024] 将前述的雌二醇抗原作为检测食品中的雌二醇的用途。

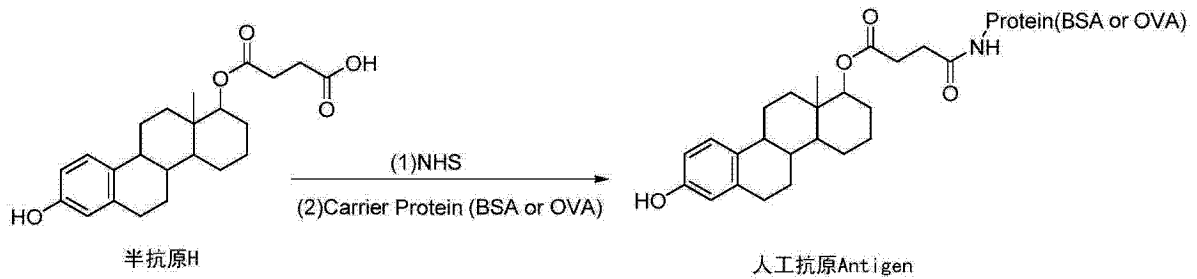
[0025] 将前述的雌二醇抗体作为检测食品中的雌二醇的用途。

[0026] 借由上述技术方案,本发明雌二醇半抗原、抗原、抗体及其制备方法与应用至少具有下列优点:

[0027] 现有的雌二醇检测技术以仪器法居多,而仪器法操作繁复,前处理复杂,成本高;本发明提供了雌二醇半抗原、抗原及其制备方法与应用;通过延长雌二醇特征基团的手臂

离心管中。冻存于 -20°C 冰箱中, 供免疫用。反应如下式:

[0039]



[0040] 对载体蛋白, 半抗原及其相应的抗原进行紫外扫描测定 ($200 \sim 400\text{nm}$), 发现抗原同时具备半抗原和载体蛋白的特征吸收峰, 如图 1 所示。

[0041] 抗体的制备及鉴定

[0042] 用合成的抗原分别免疫两只 2-2.5kg 雌性新西兰大白兔, 实验前取阴性血清作为对照。首次免疫取 1mg/mL 抗原 1mL 与等量弗氏完全佐剂充分乳化, 皮下多点注射; 三周后取 1mg/mL 抗原 1mL 与等量弗氏不完全佐剂充分乳化, 免疫方式同上; 随后每隔两周加强免疫一次, 当效价不再上升时, 采用耳缘静脉加强免疫; 1 周后心脏采血, 室温静置 $0.5 \sim 1\text{h}$, 于 4°C 冰箱过夜后吸取上层析出的血清, 10000r/min 离心 10min , 取上清即得兔抗血清, -20°C 保存备用。抗血清采用硫酸铵沉淀法纯化得到多克隆抗体, 透析后冷冻干燥成粉末, 于 -20°C 下保存备用。

[0043] 间接竞争 ELISA 测定抗体阳性滴度以 2.1 倍于阴性血清的测定值为准, 结果表明以雌二醇对应的抗血清 (Ab-H) 效价为 $1:128000$ 。

[0044] 抗体的特异性

[0045] 依据如上效果, 使用酶联免疫分析 (ELISA) 测定抗血清的抑制率; 使用磷酸盐吐温缓冲液 (PBST, 100mmol/L , $\text{pH}7.4$) 作为所有样品的稀释液; 使用 H-OVA 作为包被原; 将 $50 \mu\text{L}$ 浓度为 $1 \mu\text{g/mL}$ 的雌二醇或雌二醇类似物标准品和 $50 \mu\text{L}$ 适当稀释倍数的雌二醇多特异性抗体加入 96 孔酶标板中, 竞争反应后通过酶标分析仪测定吸光值 (OD)。抑制率公式如下:

[0046]

$$\text{抑制率} (\%) = \frac{\text{OD}_{\text{效价}} - \text{OD}_{\text{抑制}}}{\text{OD}_{\text{效价}}} \times 100\%$$

[0047] 结果如表 1, 可知雌二醇多特异性抗体对雌二醇抑制率极高, 且与其他雌二醇类似物无交叉, 因此该方法可以用于检测食品中的雌二醇。

[0048] 表 1 抗体对雌二醇及其类似物的抑制率

[0049]

标准品	抑制率 (%)
雌二醇	91.00
雌酮	0.12

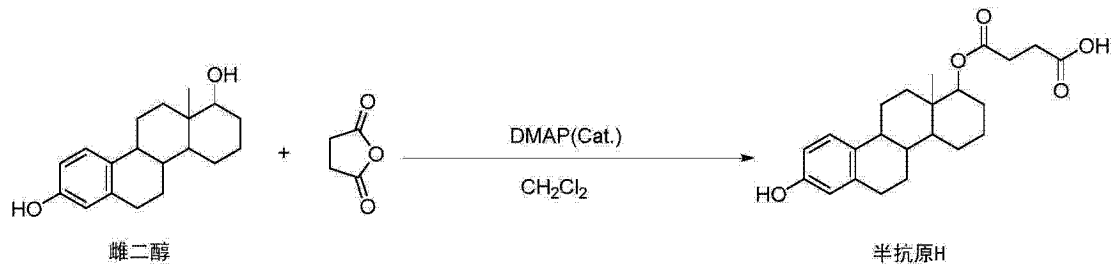
去清表雌酮	0.04
炔雌酮	0.05
黄体酮	0.02
氢化可的松	0.08
己烷雌酚	0.11
己烯雌酚	0.26
双烯雌酚	0.14

[0050] 实施例 2

[0051] 半抗原的制备方法

[0052] 将 10mmol 雌二醇溶于二氯甲烷溶液中滴加到含 5mmol 戊二酸酐的二氯甲烷溶液中, 加入 1mmol 催化剂 4-二甲氨基吡啶, 进行催化反应, 37°C 下避光搅拌 1h。反应结束, 40°C 真空旋干反应溶剂, 加入 5mL 水溶解未反应的雌二醇和戊二酸酐, 用 5mL 乙醚萃取反应产物后, 旋干乙醚, 得到白色固体, 即为雌二醇半抗原, 产率为 86%, 反应式如下:

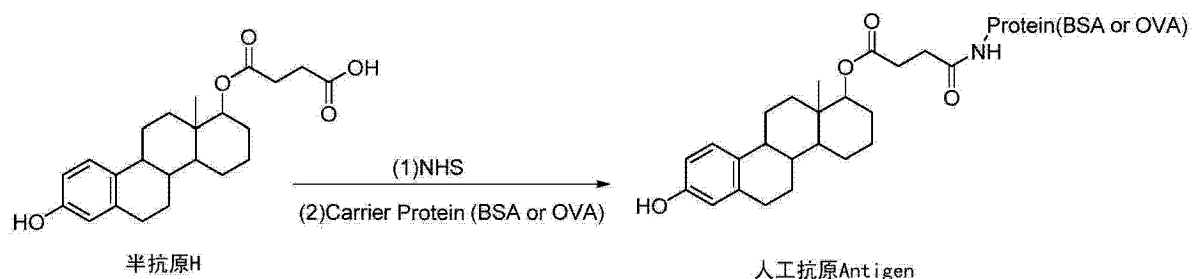
[0053]



[0054] 抗原的制备方法

[0055] 活泼酯法: 取上述制备的半抗原 0.1mmol 溶于 0.5mL DMF 中, 搅拌加入 0.2mmol DCC 和 0.2mmol NHS, 4°C 下磁力搅拌反应, 静置 12 小时过夜, 离心后上清液为 A 液。称取 OVA 0.02g, 0-4°C 下缓慢溶于 2mL 浓度为 0.1mol/L 的 PBS 缓冲溶液中 (pH 8.0), 搅拌溶解制备 B 液。磁力搅拌下, A 液逐渐滴入 B 液中, 4°C 下反应 12h。离心后, 取上清液, 4°C 下用生理盐水透析 3 天, 每天更换 4 次透析液。得到的抗原 H-OVA 以 1mg/mL 的浓度分装于 0.5mL 离心管中。冻存于 -20°C 冰箱中, 供免疫用。反应如下式:

[0056]



[0057] 对载体蛋白,半抗原及其相应的抗原进行紫外扫描测定(200 ~ 400nm),发现抗原同时具备半抗原和载体蛋白的特征吸收峰,如图 2 所示。

[0058] 抗体的制备及鉴定

[0059] 用合成的抗原分别免疫两只 2-2.5kg 雌性新西兰大白兔,实验前取阴性血清作为对照。首次免疫取 1mg/mL 抗原 1mL 与等量弗氏完全佐剂充分乳化,皮下多点注射;三周后取 1mg/mL 抗原 1mL 与等量弗氏不完全佐剂充分乳化,免疫方式同上;随后每隔两周加强免疫一次,当效价不再上升时,采用耳缘静脉加强免疫;1 周后心脏采血,室温静置 0.5 ~ 1h,于 4℃ 冰箱过夜后吸取上层析出的血清,10000r/min 离心 10min,取上清即得兔抗血清,-20℃ 保存备用。抗血清采用硫酸铵沉淀法纯化得到多克隆抗体,透析后冷冻干燥成粉末,于 -20℃ 下保存备用。

[0060] 间接竞争 ELISA 测定抗体阳性滴度以 2.1 倍于阴性血清的测定值为准,结果表明以雌二醇对应的抗血清 (Ab-H) 效价为 1:128000。

[0061] 抗体的特异性

[0062] 依据如上效果,使用酶联免疫分析 (ELISA) 测定抗血清的抑制率;使用磷酸盐吐温缓冲液 (PBST, 100mmol/L, pH7.4) 作为所有样品的稀释液;使用 H-OVA 作为包被原;将 50 μL 浓度为 1 μg/mL 的雌二醇或雌二醇类似物标准品和 50 μL 适当稀释倍数的雌二醇多特异性抗体加入 96 孔酶标板中,竞争反应后通过酶标分析仪测定吸光值 (OD)。抑制率公式如下:

[0063]

$$\text{抑制率 (\%)} = \frac{\text{OD}_{\text{效价}} - \text{OD}_{\text{抑制}}}{\text{OD}_{\text{效价}}} \times 100 \%$$

[0064] 通过表 1 可知,雌二醇多特异性抗体对雌二醇抑制率极高,且与其他雌二醇类似物无交叉,因此该方法可以用于检测食品中的雌二醇。

[0065] 以上所述,仅是本发明的较佳实施例而已,并非对本发明作任何形式上的限制,虽然本发明已以较佳实施例揭露如上,然而并非用以限定本发明,任何熟悉本专业的技术人员,在不脱离本发明技术方案范围内,当可利用上述揭示的技术内容做出些许更动或修饰为等同变化的等效实施例,但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作的任何简单修改、等同变化与修饰,均仍属于本发明技术方案的范围。

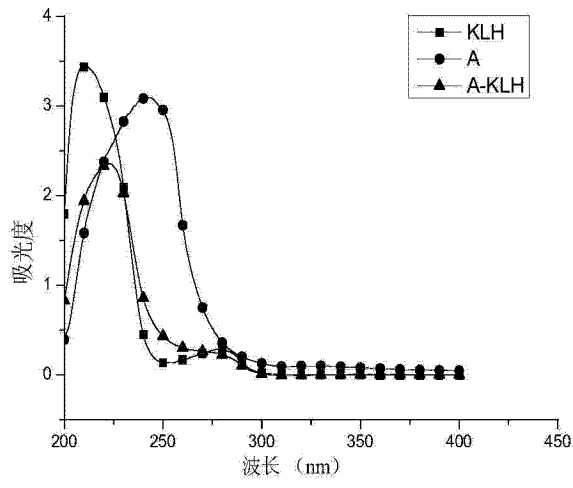


图 1

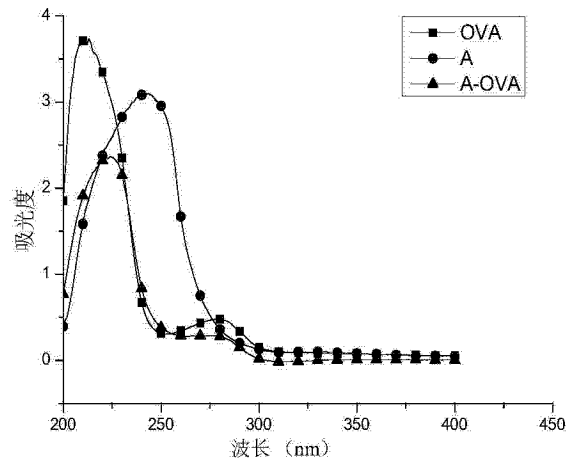


图 2

专利名称(译)	雌二醇半抗原、抗原、抗体及其制备方法与应用		
公开(公告)号	CN104059119A	公开(公告)日	2014-09-24
申请号	CN201410253502.5	申请日	2014-06-10
[标]发明人	高海岗 陆建荣 顾菲菲 张月峰 马光焰 施妮莎 许国平		
发明人	高海岗 陆建荣 顾菲菲 张月峰 马光焰 施妮莎 许国平		
IPC分类号	C07J1/00 C07K14/795 C07K14/765 C07K14/77 C07K16/44 G01N33/53		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明一种雌二醇半抗原，雌二醇半抗原具有如下结构式：以及抗原、抗体及其制备方法和应用，现有的雌二醇检测技术以仪器法居多，而仪器法操作繁复，前处理复杂，成本高；本发明提供了雌二醇半抗原、抗原及其制备方法与应用；通过延长雌二醇特征基团的手臂制备半抗原，进而制备抗原，免疫动物获得特异性抗体；该抗体可以特异性识别雌二醇；延长半抗原的特征基团手臂长度，增大了与载体蛋白的距离，减小空间位阻，有利于刺激动物免疫应答产生特异性更强、灵敏度更高的抗体；本发明提供的雌二醇特异抗体对雌二醇的抑制率高达91%。

