



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104725392 A

(43) 申请公布日 2015. 06. 24

(21) 申请号 201310721973. X

G07K 14/77(2006. 01)

(22) 申请日 2013. 12. 24

G07K 16/12(2006. 01)

(71) 申请人 中国农业大学

G01N 33/53(2006. 01)

地址 100193 北京市海淀区圆明园西路 2 号

(72) 发明人 沈建忠 江海洋 王战辉 温凯
丁双阳 张素霞 史为民 曹兴元
夏曦 李建成

(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

(51) Int. Cl.

C07D 493/04(2006. 01)

C07K 14/765(2006. 01)

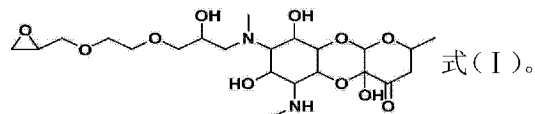
权利要求书1页 说明书5页 附图1页

(54) 发明名称

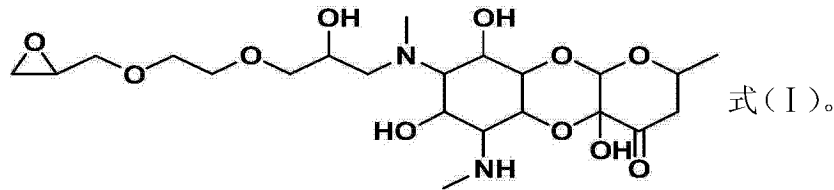
半抗原 SPE-EDE 及其相应的人工抗原与应用

(57) 摘要

本发明公开了一种半抗原 SPE-EDE 及其相应的人工抗原与应用。本发明保护式(I)所示化合物。本发明还保护一种制备式(I)所示化合物的方法,包括如下步骤:使盐酸大观霉素与乙二醇二环氧甘油醚反应,生成式(I)所示化合物。本发明还保护所述式(I)所示化合物与载体蛋白的偶联物(人工抗原)。本发明还保护以上任一所述偶联物为免疫原得到的抗体。本发明还保护一种试剂盒,包括所述偶联物和所述抗体。本发明还保护以上任一所述偶联物、所述抗体或所述试剂盒在检测大观霉素或大观霉素衍生物(如盐酸大观霉素)中的应用。本发明对于检测大观霉素及其衍生物具有重大的实用价值,操作简单、成本低廉、可以满足检测限的需要。



1. 式(I)所示化合物；



2. 一种制备式(I)所示化合物的方法,包括如下步骤:使盐酸大观霉素与乙二醇二环氧甘油醚反应,生成式(I)所示化合物。

3. 如权利要求2所述的方法,其特征在于:盐酸大观霉素与乙二醇二环氧甘油醚的质量配比为37.5:20。

4. 如权利要求2或3所述的方法,其特征在于:所述反应的条件为:4℃、15min。

5. 如权利要求2所述的方法,其特征在于:所述方法如下:将37.5mg盐酸大观霉素溶于5mL 3g/100ml NaHCO₃水溶液,冰浴条件下边搅拌边加入0.5mL乙二醇二环氧甘油醚-二甲基甲酰胺溶液,然后4℃搅拌15min,得到式(I)所示化合物;所述乙二醇二环氧甘油醚-二甲基甲酰胺溶液的制备方法为:将20mg乙二醇二环氧甘油醚溶于0.5mL二甲基甲酰胺,得到0.5mL乙二醇二环氧甘油醚-二甲基甲酰胺。

6. 权利要求1所述化合物与载体蛋白的偶联物,或,权利要求2至5中任一所述方法制备得到的化合物与载体蛋白的偶联物。

7. 权利要求6所述偶联物在制备免疫原中的应用;所述免疫原的用途为制备与大观霉素或大观霉素衍生物结合的抗体。

8. 以权利要求6所述偶联物为免疫原得到的抗体。

9. 一种试剂盒,包括权利要求6所述偶联物。

10. 权利要求6所述偶联物、权利要求8所述抗体或权利要求9所述试剂盒在检测大观霉素或大观霉素衍生物中的应用。

半抗原 SPE-EDE 及其相应的人工抗原与应用

技术领域

[0001] 本发明涉及一种半抗原 SPE-EDE 及其相应的人工抗原与应用。

背景技术

[0002] 大观霉素(spectinomycin, SPE)是由壮观链霉菌产生的一种氨基糖苷类广谱抗生素。该药物能有效地治疗和预防由链球菌、大肠杆菌、沙门氏菌及支原体引起的多种畜禽疾病,尤其对大肠杆菌及支原体引起的混合感染具有良好的治疗效果,并能作为饲料添加剂有效促进动物生长,因而被广泛应用于畜牧业生产中。

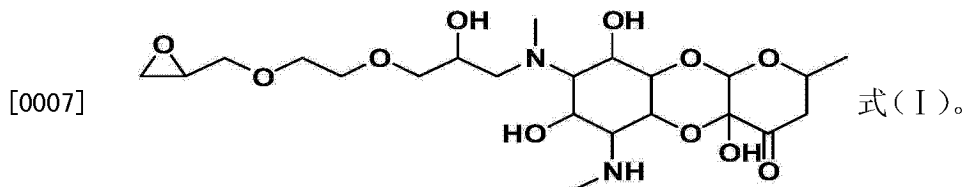
[0003] 由于大观霉素对体会造成潜在的危害,特别是肾脏毒性和耳毒性,因而国内外对动物性食品中大观霉素的残留都明确了其最大残留限量。欧盟 2002 年颁布了关于大观霉素在所有食品动物的肌肉、脂肪、肝、肾中的最大残留限量分别为 300、500、1000 和 1500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。中国农业部于 2003 年也颁布了关于大观霉素在动物组织中的最大残留限量,在肌肉、脂肪、肝、肾中最大残留限量分别为 500、2000、2000 和 5000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

[0004] 传统的检测大观霉素方法有气相色谱法、高效液相色谱法、液相色谱-质谱联用法、微生物法等,但都需要昂贵的仪器,检测成本高,不能满足进行现场快速检测的需要。

发明内容

[0005] 本发明的目的是提供一种半抗原 SPE-EDE 及其相应的人工抗原与应用。

[0006] 本发明保护式(I)所示化合物;



[0008] 本发明还保护一种制备式(I)所示化合物的方法,包括如下步骤:使盐酸大观霉素与乙二醇二环氧甘油醚反应,生成式(I)所示化合物。

[0009] 所述方法中,盐酸大观霉素与乙二醇二环氧甘油醚的质量配比具体可为 37.5 : 20。

[0010] 所述方法中,所述反应的条件具体可为:4 $^{\circ}\text{C}$ 、15min。

[0011] 所述方法具体如下:将 37.5mg 盐酸大观霉素溶于 5mL 3g/100ml NaHCO_3 水溶液,冰浴条件下边搅拌边加入 0.5mL 乙二醇二环氧甘油醚-二甲基甲酰胺溶液,然后 4 $^{\circ}\text{C}$ 搅拌 15min,得到式(I)所示化合物;所述乙二醇二环氧甘油醚-二甲基甲酰胺溶液的制备方法为:将 20mg 乙二醇二环氧甘油醚溶于 0.5mL 二甲基甲酰胺,得到 0.5mL 乙二醇二环氧甘油醚-二甲基甲酰胺。

[0012] 所述方法具体如下:将 37.5mg 盐酸大观霉素溶于 5mL 3g/100ml NaHCO_3 水溶液,冰浴条件下边搅拌边加入 0.5mL 所述乙二醇二环氧甘油醚-二甲基甲酰胺溶液,然后 4 $^{\circ}\text{C}$ 搅拌 15min,得到含有式(I)所示化合物的溶液。

[0013] 本发明还保护所述式(I)所示化合物与载体蛋白的偶联物(人工抗原)。所述载体蛋白具体可为牛血清白蛋白或鸡卵清白蛋白。

[0014] 本发明还保护以上任一所述方法制备得到的化合物与载体蛋白的偶联物(人工抗原)。所述载体蛋白具体可为牛血清白蛋白或鸡卵清白蛋白。

[0015] 所述偶联物的制备方法具体如下：

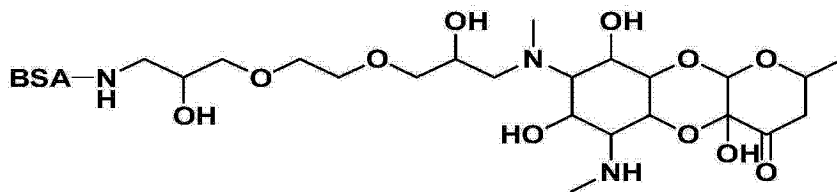
[0016] (1) 将 50mg 载体蛋白溶于 5mL 0.1mol/L Na_2CO_3 水溶液；

[0017] (2) 将所述含有式(I)所示化合物的溶液加入步骤(1)得到的溶液中，室温搅拌 16h；

[0018] (3) 取步骤(2)得到的溶液，在 PBS 缓冲液 (pH7.4、0.01mol/L) 中 4℃ 透析，得到偶联物溶液。

[0019] 以牛血清白蛋白为例，偶联物的结构式如下：

[0020]



[0021] 本发明还保护以上任一所述偶联物在制备免疫原中的应用；所述免疫原的用途为制备与大观霉素或大观霉素衍生物结合的抗体。

[0022] 本发明还保护以上任一所述偶联物为免疫原得到的抗体。

[0023] 本发明还保护一种试剂盒，包括以上任一所述偶联物。所述试剂盒还包括以上任一所述偶联物为免疫原得到的抗体。所述试剂盒具体包括(a)和(b)：(a)式(I)所示化合物与鸡卵清白蛋白的偶联物或以上任一所述方法制备得到的化合物与鸡卵清白蛋白的偶联物；(b)式(I)所示化合物与牛血清白蛋白的偶联物为免疫原得到的抗体或以上任一所述方法制备得到的化合物与牛血清白蛋白的偶联物为免疫原得到的抗体。

[0024] 本发明还保护以上任一所述偶联物、所述抗体或所述试剂盒在检测大观霉素或大观霉素衍生物(如盐酸大观霉素)中的应用。

[0025] 一般小分子化合物(分子质量 < 5000Da)不具有免疫原型，不能直接刺激动物产生抗体，只有与大分子的载体蛋白偶联形成完全抗原才具有免疫原性，才能刺激动物产生抗体。大观霉素分子质量只有 368.8Da，因此必须与大分子的载体蛋白进行偶联才能用于动物免疫。在小分子抗体制备中，用于连接半抗原分子与载体蛋白的间隔臂具有十分重要的作用。采用本发明提供的免疫原免疫动物，可以得到高效价、高灵敏度的抗体，表明免疫原的设计是非常成功的。

[0026] 应用本发明提供的人工抗原和抗体检测大观霉素或大观霉素衍生物，具有灵敏度高、检测快速、仪器要求简单、成本低等优点，尤其适于现场监控和大量样本的筛选，对大观霉素在动物性食品中的残留检测具有重要的现实意义。

附图说明

[0027] 图 1 为 SPE-EDE-BSA 的合成路线图。

[0028] 图 2 为实施例 5 中的标准曲线。

具体实施方式

[0029] 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。以下实施例中的定量试验,均设置三次重复实验,结果取平均值。下述实施例中的搅拌,均为采用磁力搅拌器搅拌(采用上海青浦沪西仪器厂的 90-3 型磁力搅拌器)。

[0030] 盐酸大观霉素(SPE):阿拉丁试剂公司。乙二醇二环氧甘油醚(EDE):Alfa Aesar 公司。牛血清白蛋白(BSA)、鸡卵清白蛋白(OVA)、弗氏完全佐剂、弗氏不完全佐剂均购自 Sigma 公司。二甲基甲酰胺(DMF):Sigma 公司,货号 D4551。MK3 型酶标仪;Thermo 公司。新西兰大白兔:北京市实验动物中心。

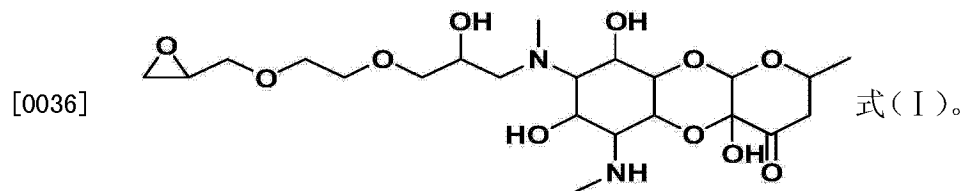
[0031] 实施例 1、免疫原和包被原的制备

[0032] SPE-EDE-BSA 的合成路线示意图见图 1。

[0033] 一、半抗原的制备

[0034] 将 37.5mg 盐酸大观霉素溶于 5mL 3g/100ml NaHCO_3 水溶液,冰浴条件下边搅拌边逐滴加入 0.5mL EDE-DMF 溶液(20mg EDE 溶于 0.5mL DMF,得到 0.5mL EDE-DMF 溶液),然后 4℃ 搅拌 15min,得到半抗原溶液(半抗原即为 SPE-EDE)。

[0035] 半抗原如式(I)所示。



[0037] 二、免疫原的制备

[0038] 1、将 50mg BSA 溶于 5mL 0.1mol/L Na_2CO_3 水溶液。

[0039] 2、将步骤一得到的半抗原溶液边搅拌边逐滴加入步骤 1 得到的 BSA 溶液中,然后室温搅拌 16h。

[0040] 3、取步骤 2 得到的溶液,装入透析袋,在 PBS 缓冲液(pH7.4、0.01mol/L)中 4℃ 透析(共 3 天,每天换液 2 次),然后收集透析袋中的溶液,即为免疫原溶液(免疫原即为 SPE-EDE-BSA),-20℃ 保存备用。

[0041] 三、包被原的制备

[0042] 用 OVA 代替 BSA,其它同步骤二,得到包被原溶液(包被原即为 SPE-EDE-OVA)。

[0043] 实施例 2、多克隆抗体的制备

[0044] 将实施例 1 制备的免疫原溶液用灭菌生理盐水稀释成 2mg/mL 的溶液(以蛋白量计),加入等体积的弗氏完全佐剂进行乳化,得到首次免疫制剂。将实施例 1 制备的免疫原溶液用灭菌生理盐水稀释成 2mg/mL 的溶液(以蛋白量计),加入等体积的弗氏不完全佐剂进行乳化,得到加强免疫制剂。

[0045] 取 4 月龄的雌性新西兰大白兔:采用颈背部多点皮内注射的方式进行首次免疫,首次免疫制剂的剂量为 1mg/ 每只大白兔(以蛋白量计);分别于首次免疫 2 周后、4 周后、6 周后、8 周后和 10 周后各加强免疫一次,采用颈背部多点皮下注射的方式,加强免疫制剂的

单次剂量为 1mg/ 每只大白兔(以蛋白量计);最后一次加强免疫 10 天后,心脏采血,分离血清(抗体),-20℃保存备用。

[0046] 实施例 3、最佳包被浓度和最佳抗体工作浓度的确定

[0047] 采用方阵法。采用碳酸盐缓冲液(pH9.5、0.05mol/L)将实施例 1 制备的包被原溶液进行 1 : 1000 ~ 1 : 50000 倍(体积比)梯度稀释。采用 PBS 缓冲液(pH7.4、0.01mol/L)将实施例 2 制备的血清(抗体)进行 1 : 1000 ~ 1 : 100000 倍(体积比)梯度稀释。采用间接 ELISA 法测定最佳抗原包被浓度及最佳抗体工作浓度。以 OD_{490nm} 值接近 1.5 时对应的抗原包被浓度和抗体使用浓度为最佳抗原包被浓度和最佳抗体工作浓度。

[0048] 包被原(SPE-EDE-OVA)的最佳包被浓度为 0.3 μg/mL (以蛋白量计),抗体最佳工作浓度为 1 : 1500。

[0049] 实施例 4、抗体效价的确定(间接 ELISA 法)

[0050] 1、采用实施例 1 制备的包被原溶液(采用 pH9.5、0.05mol/L 的碳酸盐缓冲液调整蛋白浓度)包被酶标板,100 μL/孔;包被浓度为 0.3 μg/mL (以蛋白量计),然后 4℃ 孵育 16 小时。

[0051] 2、封闭并洗板。

[0052] 3、每孔加入 100 μL 实施例 2 制备的血清的梯度稀释液(采用 pH7.4、0.01mol/L 的 PBS 缓冲液进行梯度稀释),室温孵育 2h,洗板。

[0053] 4、每孔加入 100 μL 辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG,室温孵育 2h,洗板。

[0054] 5、加入 TMB 显色液,避光显色 15min。

[0055] 6、每孔加入 100 μL 2mol/L 硫酸中止反应;读 OD₄₅₀ 值。

[0056] 步骤 3 中,采用将未经任何免疫的 4 月龄的雌性新西兰大白兔的血清作为实施例 2 制备的血清的阴性对照。步骤 3 中,采用 pH7.4、0.01mol/L 的 PBS 缓冲液作为血清稀释液的空白对照。

[0057] 每个稀释度设置三个复孔,结果取平均值。

[0058] 空白对照设置 3 个复孔,结果取平均值。

[0059] 以 $P/N \geq 2.1$, $P - N \geq 0.2$ 作为阳性血清的判断标准。其中 $P/N = (\text{标本 OD}_{490\text{nm}} \text{值} - \text{空白对照 OD}_{490\text{nm}} \text{值}) / (\text{阴性对照 OD}_{490\text{nm}} \text{值} - \text{空白对照 OD}_{490\text{nm}} \text{值})$; $P - N = \text{标本 OD}_{490\text{nm}} \text{值} - \text{阴性对照 OD}_{490\text{nm}} \text{值}$ 。

[0060] 结果见表 1。SPE-EDE-BSA 免疫得到的血清(多克隆抗体)的效价为 1 : 5000。

[0061] 表 1 血清(多克隆抗体)的效价检测结果

[0062]

OD _{490nm} 值	稀释倍数
1.065	1 : 2500
0.624	1 : 5000
0.313	1 : 10000
0.136	1 : 20000

0.093	1 : 40000
0.056	1 : 80000
0.061	1 : 160000
0.059	1 : 320000

[0063] 实施例 5、抗体标准曲线的建立(间接竞争 ELISA 法)

[0064] 1、采用实施例 1 制备的包被原溶液(采用 pH9.5、0.05mol/L 的碳酸盐缓冲液调整蛋白浓度)包被酶标板,100 μ L/孔;包被浓度为 0.3 μ g/mL(以蛋白量计),然后 4 $^{\circ}$ C 孵育 16 小时。

[0065] 2、封闭并洗板。

[0066] 3、每孔加入 50 μ L 盐酸大观霉素溶液(由盐酸大观霉素和 pH7.4、0.01mol/L 的 PBS 缓冲液组成;盐酸大观霉素的浓度分别为 0.1、0.3、0.9、2.7 和 8.1ng/mL;将只加入 pH7.4、0.01mol/L 的 PBS 缓冲液的孔作为对照孔);每个浓度设置 3 个复孔。

[0067] 4、每孔加入 50 μ L 实施例 2 制备的血清的 1500 倍稀释液(采用 pH7.4、0.01mol/L 的 PBS 缓冲液进行稀释),室温孵育 2h,洗板。

[0068] 4、每孔加入 100 μ L 辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG,室温孵育 2h,洗板。

[0069] 5、加入 TMB 显色液,避光显色 15min。

[0070] 6、每孔加入 100 μ L 2mol / L 硫酸中止反应;读 OD₄₅₀ 值。

[0071] 步骤 3 中,盐酸大观霉素溶液每个浓度设置 3 个复孔,对照孔设置 3 个复孔。

[0072] 以盐酸大观霉素浓度为横坐标,以 $\ln[B/(B_0-B)]$ 为纵坐标建立标准曲线,B 为加入盐酸大观霉素溶液后得到 OD_{490nm} 值,B₀ 为加入 PBS 缓冲液后得到的 OD_{490nm} 值。

[0073] 标准曲线见图 2。

[0074] 线性回归方程为 $y = -0.6664x + 0.8376$, 其中 $r = 0.9985$ 。根据标准曲线的回归方程得出 SPE 抑制中浓度(IC₅₀)为 3.5ng/mL。

[0075] 结果表明,本发明提供的人工抗原可以制备出高效价、高灵敏度的抗体。

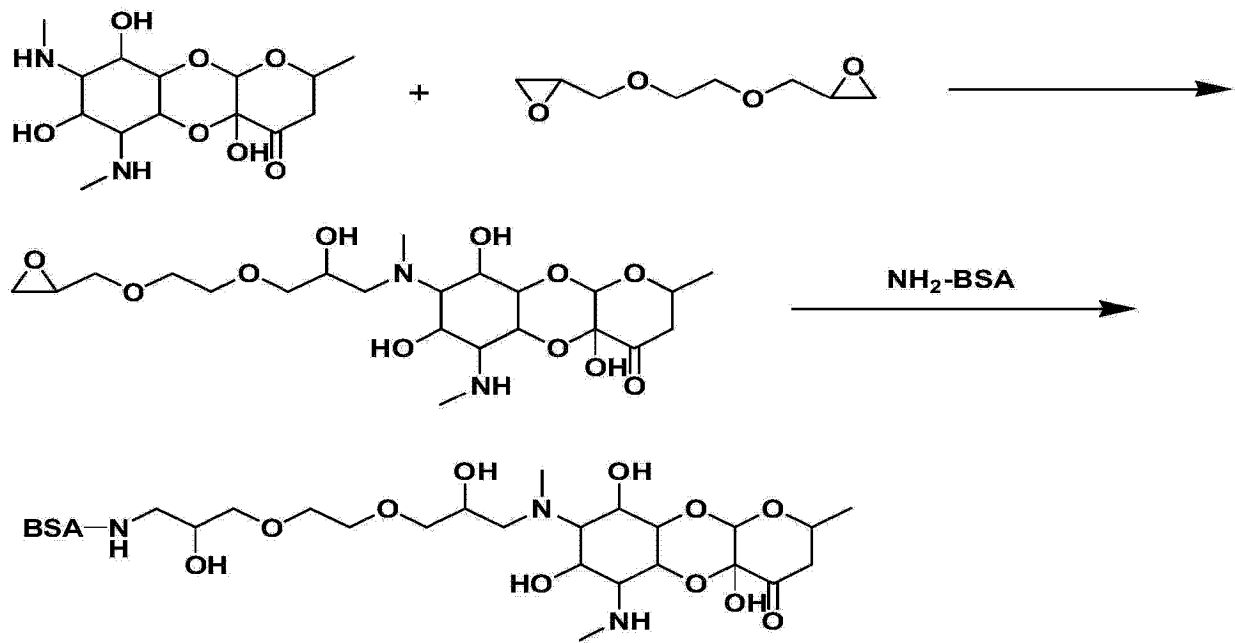


图 1

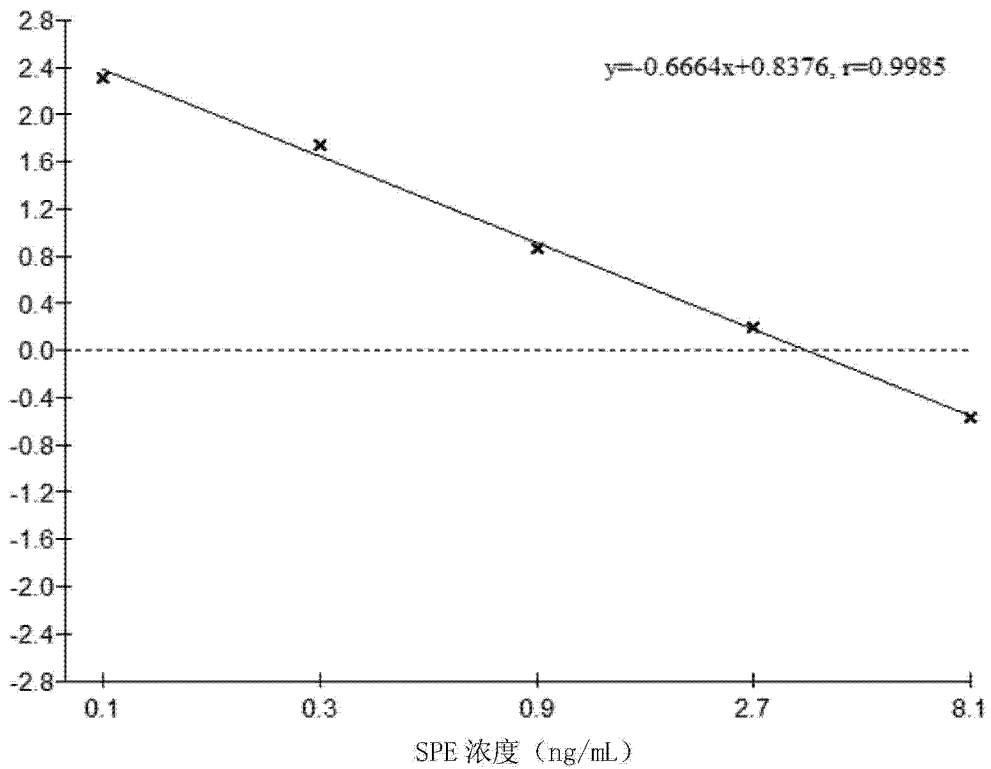


图 2

专利名称(译)	半抗原SPE-EDE及其相应的人工抗原与应用		
公开(公告)号	CN104725392A	公开(公告)日	2015-06-24
申请号	CN201310721973.X	申请日	2013-12-24
[标]申请(专利权)人(译)	中国农业大学		
申请(专利权)人(译)	中国农业大学		
当前申请(专利权)人(译)	中国农业大学		
[标]发明人	沈建忠 江海洋 王战辉 温凯 丁双阳 张素霞 史为民 曹兴元 夏曦 李建成		
发明人	沈建忠 江海洋 王战辉 温凯 丁双阳 张素霞 史为民 曹兴元 夏曦 李建成		
IPC分类号	C07D493/04 C07K14/765 C07K14/77 C07K16/12 G01N33/53		
CPC分类号	C07D493/04 C07K14/765 C07K14/77 C07K16/12 C07K16/1232 C07K16/1235		
代理人(译)	关畅		
其他公开文献	CN104725392B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种半抗原SPE-EDE及其相应的人工抗原与应用。本发明保护式(1)所示化合物。本发明还保护一种制备式(1)所示化合物的方法,包括如下步骤:使盐酸大观霉素与乙二醇二环氧甘油醚反应,生成式(1)所示化合物。本发明还保护所述式(1)所示化合物与载体蛋白的偶联物(人工抗原)。本发明还保护以以上任一所述偶联物为免疫原得到的抗体。本发明还保护一种试剂盒,包括所述偶联物和所述抗体。本发明还保护以上任一所述偶联物、所述抗体或所述试剂盒在检测大观霉素或大观霉素衍生物(如盐酸大观霉素)中的应用。本发明对于检测大观霉素及其衍生物具有重大的实用价值,操作简单、成本低廉、可以满足检测限的需要。式(1)。

