



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 105820033 A

(43)申请公布日 2016.08.03

(21)申请号 201610247793.6

(51)Int.Cl.

(22)申请日 2016.04.20

C07C 27/02(2006.01)

C07C 59/68(2006.01)

(71)申请人 哈尔滨市兽药饲料监察所

C07C 67/31(2006.01)

地址 150028 黑龙江省哈尔滨市松北区文
汇路225号

C07C 69/712(2006.01)

C07K 14/765(2006.01)

申请人 北京维德维康生物技术有限公司
谷实农牧集团股份有限公司

C07K 14/77(2006.01)

C07K 16/44(2006.01)

(72)发明人 霍峰 林晓莉 董艳峰 秦誉

G01N 33/68(2006.01)

覃丹凤 贾良曦 李宁 彭玮

G01N 33/53(2006.01)

于静泉 张巍 张治成 梅岩松

张磊 刘中成 梁代华

(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 王春霞

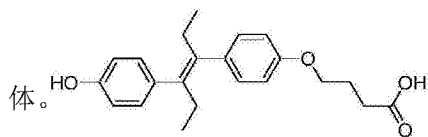
权利要求书2页 说明书6页 附图3页

(54)发明名称

一种己烯雌酚人工抗原及其制备的抗体

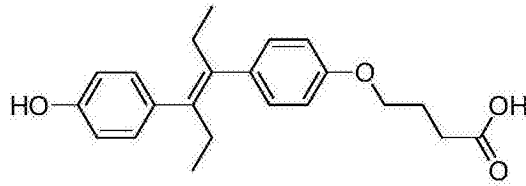
(57)摘要

本发明公开了一种己烯雌酚人工抗原及其制备的抗体。己烯雌酚半抗原,其结构式如式I所示。既保留了DES分子原有的立体结构,又有利于特异性抗体的产生。己烯雌酚人工抗原,它为式I所示化合物与载体蛋白的偶联物。本发明还提供了以该己烯雌酚人工抗原为免疫原制备得到的抗体,及一种检测己烯雌酚的试剂盒,它包括己烯雌酚半抗原和/或己烯雌酚人工抗原和/或抗



式 I

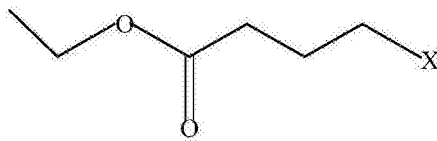
1. 式I所示化合物;



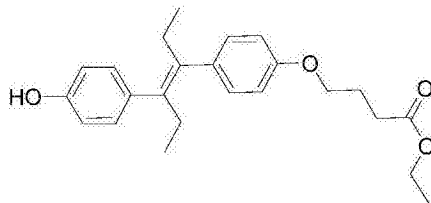
式 I。

2. 权利要求1所述化合物的制备方法,包括如下步骤:

(1) 己烯雌酚与式 II 所示化合物经取代反应,得到式 III 所示化合物;式 II 中,X为氯、溴或碘;



式 II;



式 III;

(2) 式 III 所示化合物经水解反应,得到式 I 所示化合物。

3. 根据权利要求2所述的制备方法,其特征在于:步骤(1)中,所述乙烯雌酚与所述4-溴丁酸乙酯的摩尔比为1:(1~1.2);和/或,

所述取代反应在碱的条件下进行,所述碱与所述己烯雌酚的摩尔比为1:(1~1.2);所述碱具体为氢氧化钠、氢氧化钾和氢氧化锂中的任一种;和/或,

所述取代反应在有机溶剂中进行,所述有机溶剂为二甲基甲酰胺或二甲基亚砷;和/或,

所述取代反应的温度为35~40℃,时间为1~2小时。

4. 根据权利要求2或3所述的制备方法,其特征在于:步骤(2)中,所述水解反应在碱的条件下进行;所述式 II 所示化合物与所述碱的摩尔比为1:(3~4);所述碱具体为氢氧化锂、氢氧化钠和氢氧化钾中的任一种;和/或,

所述碱以碱的水溶液的形式添加,所述碱的水溶液的摩尔浓度为1~1.2mol/L;和/或,所述水解反应的温度为35~40℃,时间为1~2小时。

5. 权利要求1所述化合物与载体蛋白的偶联物。

6. 根据权利要求5所述的偶联物,其特征在于:所述载体蛋白为牛血清白蛋白或鸡卵清白蛋白。

7. 权利要求5或6所述的偶联物在制备己烯雌酚抗体中的应用。

8. 以权利要求5或6所述的偶联物为免疫原制备得到的抗体。

9. 一种检测己烯雌酚的试剂盒,它包括权利要求1所述的化合物和/或权利要求5或6所

述的偶联物和/或权利要求8所述的抗体。

一种己烯雌酚人工抗原及其制备的抗体

技术领域

[0001] 本发明涉及一种己烯雌酚人工抗原及其制备的抗体。

背景技术

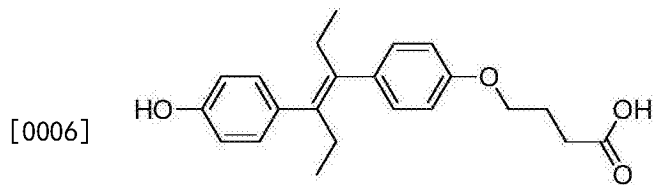
[0002] 己烯雌酚(diethylstilbestrol, DES)是一种人工合成的雌激素,具有促进动物生长、增加蛋白质沉积、提高饲料转化率和减少脂肪沉积的作用,因此曾作为生长促进剂广泛用于畜禽养殖中。但DES可导致机体代谢紊乱和发育异常,国际癌症研究机构(IARC)研究还发现DES是一种致癌物,能够在动物源性食品如肉、蛋、奶中残留,并通过食物链危害人体健康。因此欧盟等国规定禁止在食品动物养殖中使用DES,我国农业部2002年先后发布了176号和193号公告,明确规定了禁止在所有食用动物饲养中使用己烯雌酚以促生产或其它用途。

[0003] 目前,国内外已建立了多种检测DES残留的理化检测方法,主要包括高效液相色谱法(HPLC),液质联用法(LC-MS),但仪器方法样品前处理过程复杂,检测时间长,仪器设备昂贵,且需专业人员操作,严重限制了这种方法的推广和应用。酶联免疫吸附法(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)具有特异性强、简便、快速、成本低等优点,目前已广泛应用于食品安全检测领域。而基于酶联免疫吸附法的快速检测试剂盒,更适合企业进行现场监测,方便实用,易于推广,是目前食品安全检测领域中最具有发展前景和产业化的检测手段。

发明内容

[0004] 本发明的目的是提供一种己烯雌酚人工抗原及其制备的抗体,本发明在DES分子结构中的一个酚羟基的位置引入羧基制得己烯雌酚半抗原,再与蛋白质交联形成偶联物制得己烯雌酚全抗原,既保留了DES分子原有的立体结构,又有利于特异性抗体的产生。

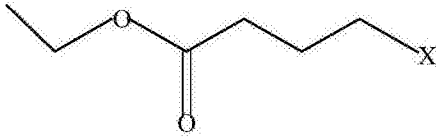
[0005] 本发明提供的己烯雌酚半抗原,其结构式如下:



式 I。

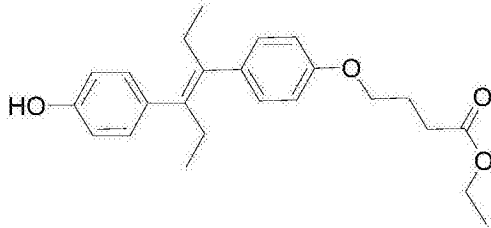
[0007] 上述己烯雌酚半抗原(式I所示化合物)的制备方法,包括如下步骤:

[0008] (1)己烯雌酚与式II所示化合物经取代反应(Williamson成醚反应),得到式III所示化合物(己烯雌酚丁酸乙酯中间体);式II中,X为氯、溴或碘;



式II;

[0009]



式III;

[0010] (2)式III所示化合物(己烯雌酚丁酸乙酯中间体)经水解反应,得到式I所示化合物。

[0011] 上述的制备方法中,步骤(1)中,所述乙烯雌酚与所述4-溴丁酸乙酯的摩尔比为1:(1~1.2),具体为1:1;和/或,

[0012] 所述取代反应在碱的条件下进行,所述碱与所述己烯雌酚的摩尔比可为1:(1~1.2),具体为1:1;所述碱可为氢氧化钠、氢氧化钾和氢氧化锂中的任一种;

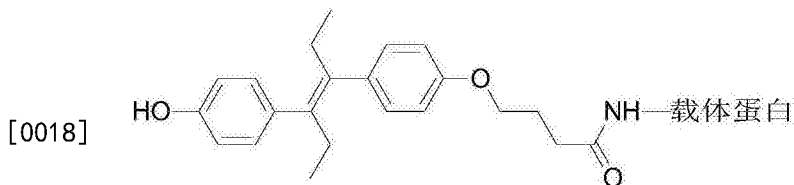
[0013] 所述取代反应在有机溶剂中进行,所述有机溶剂可为二甲基甲酰胺(DMF)或二甲基亚砜(DMSO);和/或,

[0014] 所述取代反应的温度可为35~40℃,具体可为35℃;时间可为1~2小时,具体可为1小时。

[0015] 上述的制备方法,步骤(2)中,所述水解反应(酯的水解)在碱的条件下进行,所述碱可为氢氧化锂、氢氧化钠和氢氧化钾中的任一种;所述式II所示化合物与所述碱的摩尔比可为1:(3~4),具体可为1:3;所述碱以碱的水溶液的形式添加,所述碱的水溶液的摩尔浓度可为1~1.2mol/L,具体可为1mol/L;和/或,

[0016] 所述水解反应的温度可为35~40℃,具体可为35℃,时间可为1~2小时,具体可为1小时。

[0017] 本发明提供的己烯雌酚人工抗原,它为上述己烯雌酚半抗原(式I所示化合物)与载体蛋白的偶联物。所述偶联物的结构式如式IV所示:



[0018]

式IV。

[0019] 上述的偶联物中,所述载体蛋白可为牛血清白蛋白(BSA)或鸡卵清白蛋白(OVA)。

[0020] 上述的偶联物中,己烯雌酚半抗原(式I所示化合物)与载体蛋白的偶联比(摩尔比)可为(3~10):1,具体可为5.65:1或3.61:1。该己烯雌酚人工抗原可以作为免疫原也可以作为包被原。将该己烯雌酚人工抗原免疫动物,可获得高特异性的多克隆抗体,方法简

便、易行。

[0021] 本发明还提供了上述的偶联物在制备己烯雌酚抗体中的应用。

[0022] 上述的应用中,所述抗体可为单克隆抗体或多克隆抗体。

[0023] 本发明提供的抗体,它为以上述任一项所述的偶联物为免疫原制备得到的抗体。

[0024] 本发明还提供了一种试剂盒,它包括己烯雌酚半抗原(式I所示化合物)和/或己烯雌酚人工抗原(偶联物)和/或所述的抗体。

[0025] 己烯雌酚是小分子物质,不具备免疫原性,只有反应原性,无法直接诱导机体产生特异性抗体,因此需要与大分子共价结合后才能使动物免疫系统识别,产生相应的抗体,本发明利用4-溴丁酸乙酯与DES进行反应,在酚羟基的位置引入羧基,再与蛋白质交联形成DES-BSA偶联物,与文献报道方法相比,既保留了DES分子原有的立体结构,又有利于特异性抗体的产生。经质谱扫描鉴定,免疫产生高滴度抗体证实,得到了具有免疫原性和特异反应性的人工抗原。

附图说明

[0026] 图1为己烯雌酚半抗原的合成线路图。

[0027] 图2为己烯雌酚半抗原的HPLC-MS图谱。

[0028] 图3为牛血清蛋白BSA和免疫原DES-BBAE-BSA的MALDI-TOF图谱,其中图3(a)为牛血清蛋白的MALDI-TOF图谱,3(b)为免疫原DES-BBAE-BSA的MALDI-TOF图谱。

[0029] 图4为实施例5中间接ELISA法测定所得血清的 $1C_{50}$ 的曲线图。

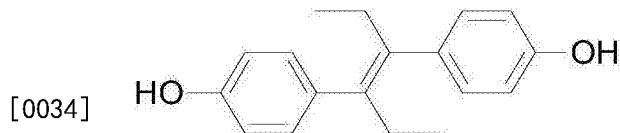
具体实施方式

[0030] 下述实施例中所使用的实验方法如无特殊说明,均为常规方法。

[0031] 下述实施例中所用的材料、试剂等,如无特殊说明,均可从商业途径得到。

[0032] 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。

[0033] 己烯雌酚原料药购于大连美仑生物技术有限公司,其结构式如式V所示:



式V。

[0035] 牛血清白蛋白(BSA)、鸡卵清白蛋白(OVA)、1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDC)、N-羟基丁二酰亚胺(NHS)、4-溴丁酸乙酯、弗氏完全佐剂、弗氏不完全佐剂均购自Sigma公司;其他试剂为国产分析纯。新西兰大白兔:北京市实验动物中心。

[0036] 实施例1、制备己烯雌酚半抗原

[0037] 一、制备过程

[0038] 按照图1所示合成线路图进行制备,具体步骤如下:

[0039] (1)将536mg己烯雌酚原料药溶于5mLDMF,搅拌15min后于室温加入68.57mg70%的氢氧化钠,磁力搅拌反应1小时。然后滴加390mg 4-溴丁酸乙酯磁力搅拌反应1小时,将反应液滴加到45ml冰水中析出类白色固体,过滤,滤饼用10ml水洗,收集滤饼45℃鼓风干燥4小时,

得到己烯雌酚丁酸乙酯中间体。

[0040] (2)在圆底烧瓶中加入500mg己烯雌酚丁酸乙酯中间体和10ml THF,25℃磁力搅拌20min后滴加3.5ml 1M氢氧化锂水溶液,磁力搅拌3小时后40℃减压浓缩,残留物中加入20ml水,用盐酸调节pH至5.5--6.0,析出类白色固体,过滤,滤饼用10ml水洗,收集滤饼45℃鼓风干燥5小时得到己烯雌酚丁酸半抗原,简称DES-BBAE。

[0041] 二、表征

[0042] 半抗原DES-BBAE经HPLC-MS鉴定,结果见图2。DES-BBAE的分子量理论应为354,此次鉴定试验采用的是负离子模式,由此可知353.5对应的峰对应的峰即为半抗原DES-BBAE,说明半抗原DES-BBAE合成成功。

[0043] 实施例2、制备己烯雌酚人工抗原

[0044] 一、己烯雌酚免疫原

[0045] 1、己烯雌酚免疫原的制备过程

[0046] 按照如下步骤制备免疫原(DES-BBAE-BSA):

[0047] (1)将15.86mg实施例1中制备得到的己烯雌酚半抗原用1.5mL DMF溶解,200rpm搅拌10min,加入21.5mg EDC,溶解后再加入13mg NHS,室温搅拌(500rpm)活化2h。

[0048] (2)称取50mg牛血清白蛋白溶于3.5mL 0.1M碳酸氢钠溶液中,200rpm搅拌10min,使其充分溶解,将步骤1反应液在反应盒中冰浴(<4℃)搅拌(1000rpm)中逐滴加入(1mL/min),搅拌(500rpm)反应24h。

[0049] (3)将反应产物装入干净透析袋,在1L 0.01M PBS(pH7.2)透析液中4℃搅拌(100rpm)透析3天,每天换液3次,将透析产物5000rpm离心6min,1.5mL/管分装,得到己烯雌酚免疫原,简称DES-BBAE-BSA,-20℃保存备用。

[0050] 2、己烯雌酚免疫原的表征

[0051] 采用MALDI-TOF技术,对合成的抗原进行鉴定,牛血清蛋白BSA质谱峰质荷比为66538.973,人工抗原DES-BBAE-BSA的质谱峰质荷比分别为68539.643,见图3,说明半抗原DES-BBAE成功结合了BSA,经计算其结合比为5.65:1。

[0052] 二、己烯雌酚包被原

[0053] 1、己烯雌酚包被原的制备过程

[0054] (1)将15.86mg实施例1中制备得到的己烯雌酚半抗原用1.5mL DMF溶解,200rpm搅拌10min,加入21.5mg EDC,溶解后再加入13mg NHS,室温搅拌(500rpm)活化2h。

[0055] (2)称取33.6mg鸡卵清白蛋白溶于3.5mL 0.1M碳酸氢钠溶液中,200rpm搅拌10min,使其充分溶解,将步骤1反应液在反应盒中冰浴(<4℃)搅拌(1000rpm)中逐滴加入(1mL/min),搅拌(500rpm)反应24h。

[0056] (3)将反应产物装入干净透析袋,在1L 0.01M PBS(pH7.2)透析液中4℃搅拌(100rpm)透析3天,每天换液3次,将透析产物5000rpm离心6min,1.5mL/管分装,得到己烯雌酚包被原,简称DES-BBAE-OVA,-20℃保存备用。

[0057] 2、表征

[0058] 采用TNBS法测定结合比,己烯雌酚包被原DES-BBAE-OVA的结合比3.61:1。

[0059] 实施例3、多克隆抗体的制备

[0060] 以实施例2制备得到的DES-BBAE-BSA作为免疫原,免疫3-4月龄新西兰大白兔。首

次免疫,将制备好的免疫原与等体积的弗氏完全佐剂进行乳化,于腋下、颈背部皮下多点注射。加强免疫,将弗氏完全佐剂换成弗氏不完全佐剂,免疫剂量和免疫方法同上。每次免疫间隔为3周。从第四次免疫起,每次免疫的第七天于耳缘静脉采血,用间接竞争ELISA法检测抗体效价和 IC_{50} 。待抗体性能参数达到要求后,心脏采血,离心分离多抗血清(抗体)。

[0061] 实施例4、抗体纯化

[0062] 以protein A-Sepharose 4B作为亲和层析介质,采用免疫亲和层析法对多抗血清进行纯化。用5倍柱体积的结合缓冲液(3.0mol/L的NaCl,100mmol/L柠檬酸/磷酸盐缓冲液,pH9.0)冲洗柱子,流速为5ml/min,用磷酸缓冲液稀释多抗血清后上柱,流速为0.5ml/min,继续添加结合缓冲液,当280nm的吸光值回到基线时,加洗脱缓冲液(100mM柠檬酸/磷酸盐缓冲液,pH3.0),流速0.5ml/min,迅速用1M Tris中和抗体,将抗体装入透析袋,4℃条件下PBS溶液透析,测定浓度,4℃保存。

[0063] 实施例5、抗体效价、 IC_{50} 的确定

[0064] (1)采用间接ELISA法测定实施例4所得血清的抗体效价,具体步骤如下:

[0065] 1)包被:96孔酶标板每孔加入100 μ L浓度为2 μ g/mL的“己烯雌酚-OVA”溶液(用包被缓冲液进行稀释),4℃包被过夜,用PBST洗涤3次。

[0066] 包被缓冲液:pH9.6、0.05mol/L的碳酸钠-碳酸氢钠缓冲液(溶剂为水,溶质及其浓度如下:Na₂CO₃ 1.59g/L和NaHCO₃ 2.93g/L)。

[0067] 2)封闭:每孔加入150 μ L/孔的封闭液,在37℃孵育2h,弃封闭液,PBST洗涤3次,拍干。置于4℃冰箱保存备用。

[0068] 封闭液:含有0.5%(体积百分含量)小牛血清、3%(3g/100ml)酪蛋白的磷酸盐缓冲液,pH7.4。

[0069] 3)竞争反应:每孔加入100 μ L实施例4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),37℃孵育30min,洗板4次,拍干。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4制备的血清的阴性对照。采用pH7.4、0.01mol/L的PBS缓冲液作为血清稀释液的空白对照。

[0070] 4)加酶标二抗:HRP标羊抗兔IgG抗体(Jackson ImmunoResearch公司,货号111-035-003),100 μ L/孔,37℃孵育30min,PBST洗涤4次,拍干。

[0071] 5)显色:四甲基联苯胺(TMB)-双氧水溶液100 μ L/孔,室温显色15min。

[0072] 6)终止:加入终止液(2M H₂SO₄)50 μ L/孔。

[0073] 7)读数:以450nm单波长测定各孔OD值,以与阴性对照孔(以PBS代替待测样品的对照)OD值的比值(P/N)大于2.1为限,作为判断为血清效价的临界点。其中 $P/N = (\text{标本}OD_{450nm} \text{值} - \text{空白对照}OD_{450nm} \text{值}) / (\text{阴性对照}OD_{450nm} \text{值} - \text{空白对照}OD_{450nm} \text{值})$ 。

[0074] ELISA结果判定方法:抗体效价以 $P/N > 2.1$ 的血清最大稀释倍数表示。

[0075] 结果表明血清中的抗体效价为1:10000。

[0076] (2)采用间接ELISA法测定所得血清的 IC_{50} ,具体步骤如下:

[0077] 1)包被:96孔酶标板每孔加入100 μ L浓度为2 μ g/mL的“己烯雌酚-OVA”溶液(用包被缓冲液进行稀释),4℃包被过夜,用PBST洗涤3次。

[0078] 包被缓冲液:pH9.6、0.05mol/L的碳酸钠-碳酸氢钠缓冲液(溶剂为水,溶质及其浓度如下:Na₂CO₃ 1.59g/L和NaHCO₃ 2.93g/L)。

[0079] 2)封闭:每孔加入150 μ L/孔的封闭液,在37 $^{\circ}$ C孵育2h,弃封闭液,PBST洗涤3次,拍干。置于4 $^{\circ}$ C冰箱保存备用。

[0080] 封闭液:含有0.5%(体积百分含量)小牛血清、3%(3g/100ml)酪蛋白的磷酸盐缓冲液,pH7.4。

[0081] 3)竞争反应:阳性孔中先后加入己烯雌酚标准品溶液和己烯雌酚抗体各50 μ l,以10mM PBS代替己烯雌酚标准品溶液作为阴性对照孔。37 $^{\circ}$ C孵育30min,洗板4次,拍干。

[0082] 4)加酶标二抗:HRP标羊抗兔IgG抗体(Jackson ImmunoResearch公司,货号111-035-003),100 μ l/孔,37 $^{\circ}$ C孵育30min,PBST洗涤4次,拍干。

[0083] 5)显色:四甲基联苯胺(TMB)-双氧水溶液100 μ l/孔,室温显色15min。

[0084] 6)终止:加入终止液(2M H_2SO_4)50 μ l/孔。

[0085] 7)读数:以450nm单波长测定各孔OD值,即 OD_{450nm} 。以己烯雌酚浓度为横坐标,以B/ B_0 为纵坐标建立曲线。B为加入己烯雌酚溶液后得到 OD_{450nm} 值, B_0 为加入PBS缓冲液后得到的 OD_{450nm} 值。曲线见图4。 $1C_{50}$ 为0.025ng/mL。

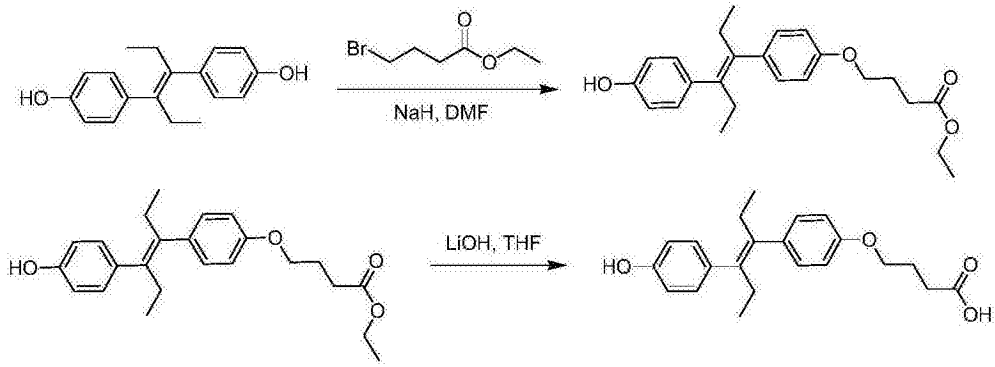


图1

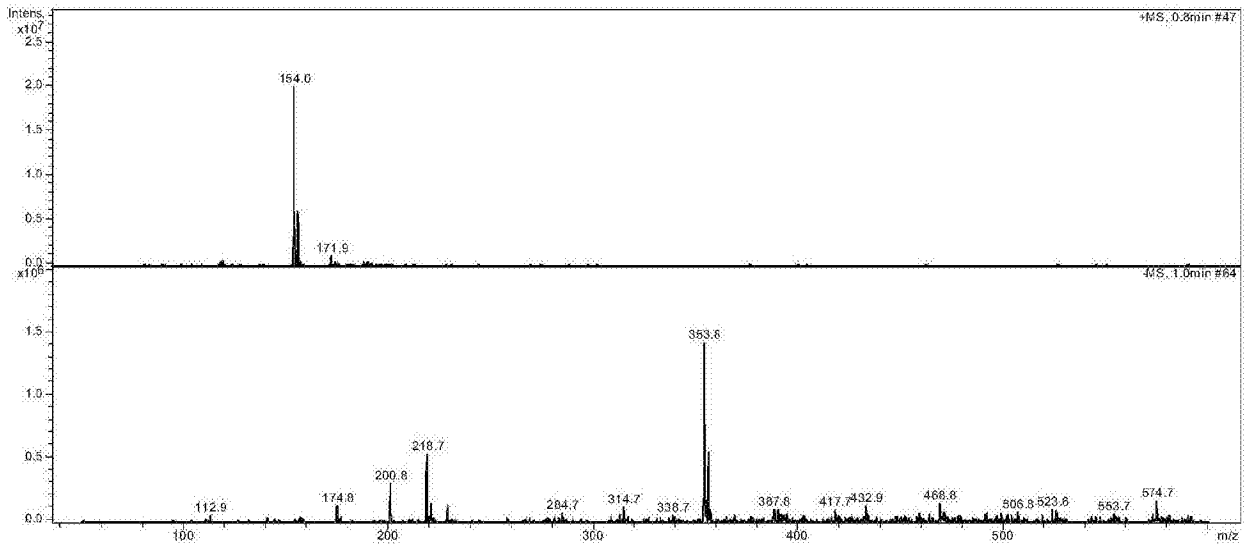
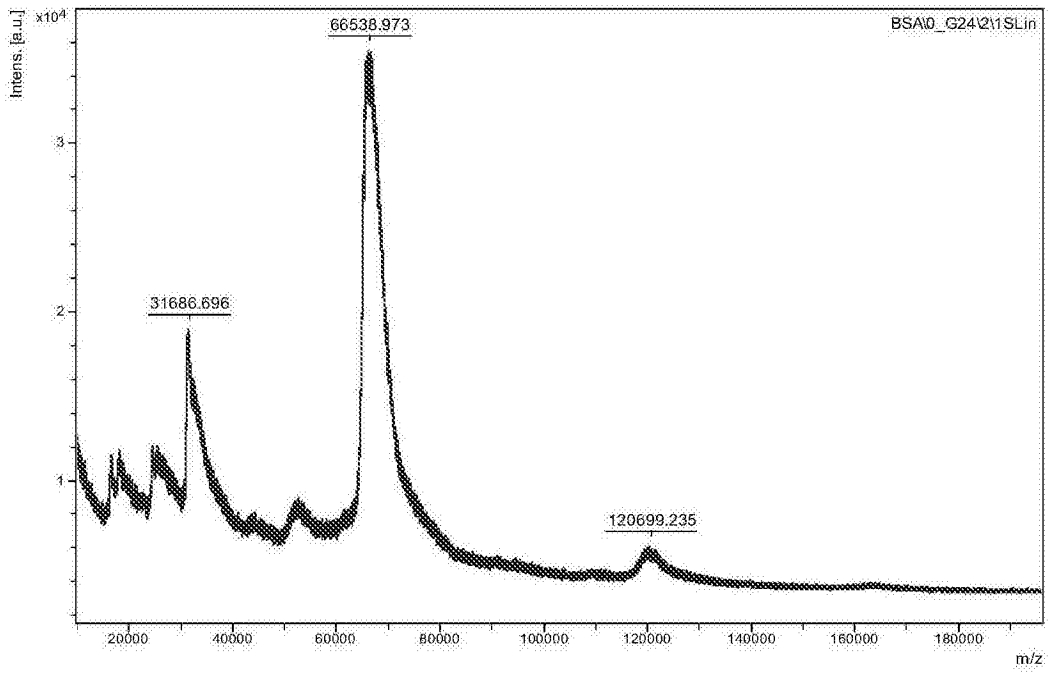
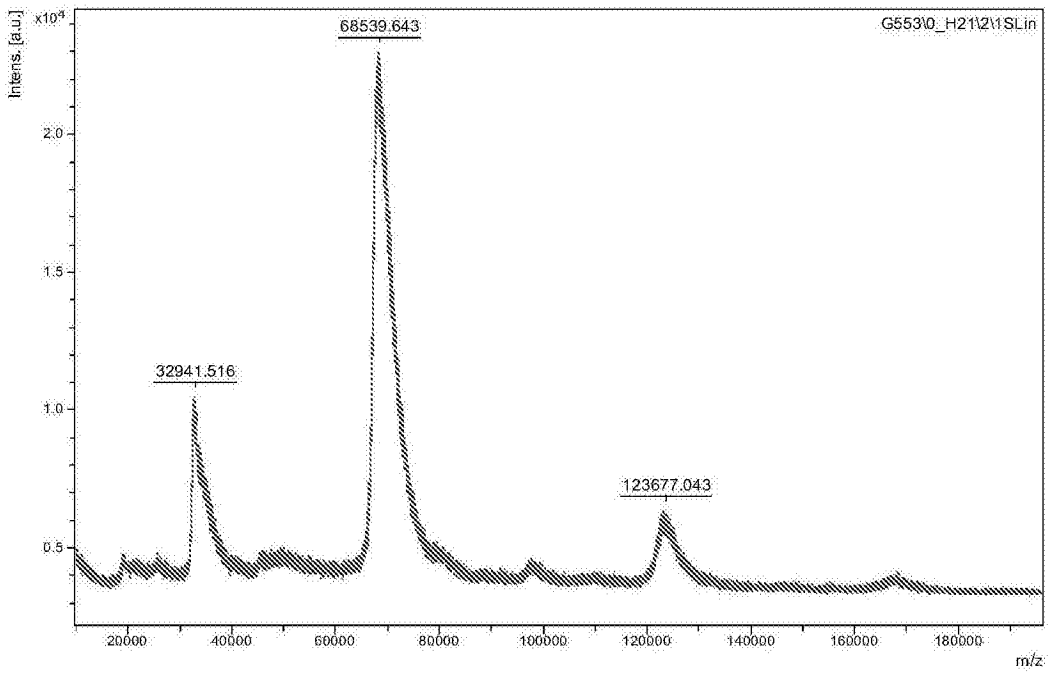


图2



(a)



(b)

图3

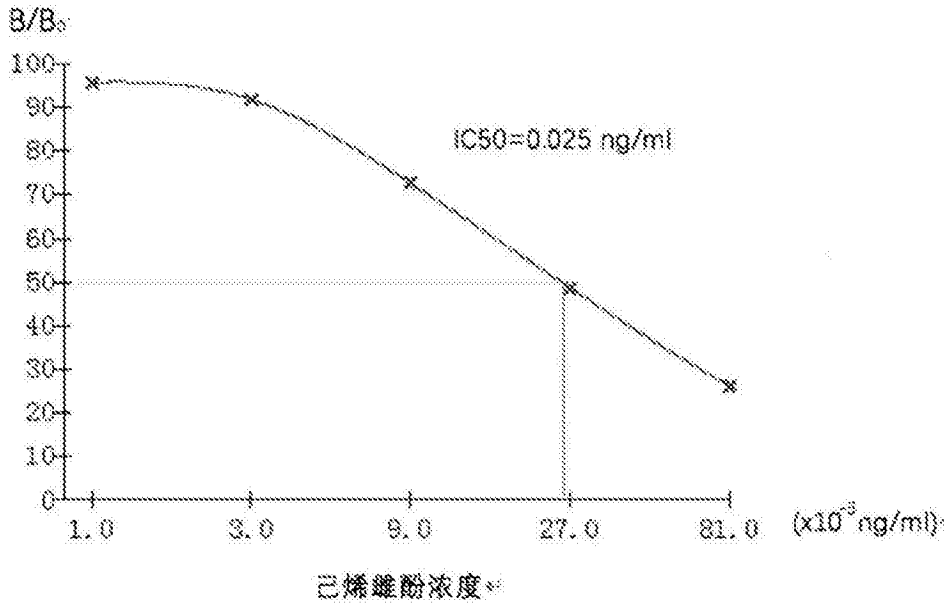


图4

专利名称(译)	一种己烯雌酚人工抗原及其制备的抗体		
公开(公告)号	CN105820033A	公开(公告)日	2016-08-03
申请号	CN201610247793.6	申请日	2016-04-20
[标]申请(专利权)人(译)	哈尔滨市兽药饲料监察所 北京维德维康生物技术有限公司 谷实农牧集团股份有限公司		
申请(专利权)人(译)	哈尔滨市兽药饲料监察所 北京维德维康生物技术有限公司 谷实农牧集团股份有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	哈尔滨市兽药饲料监察所 北京维德维康生物技术有限公司 谷实农牧集团股份有限公司		
[标]发明人	霍峰 林晓莉 董艳峰 秦誉 覃丹凤 贾良曦 李宁 彭玮 于静泉 张巍 张治成 梅岩松 张磊 刘中成 梁代华		
发明人	霍峰 林晓莉 董艳峰 秦誉 覃丹凤 贾良曦 李宁 彭玮 于静泉 张巍 张治成 梅岩松 张磊 刘中成 梁代华		
IPC分类号	C07C27/02 C07C59/68 C07C67/31 C07C69/712 C07K14/765 C07K14/77 C07K16/44 G01N33/68 G01N33/53		
CPC分类号	C07C51/09 C07C59/68 C07C67/31 C07K14/765 C07K14/77 C07K16/44 G01N33/53 G01N33/6854 C07C69/712		

代理人(译)

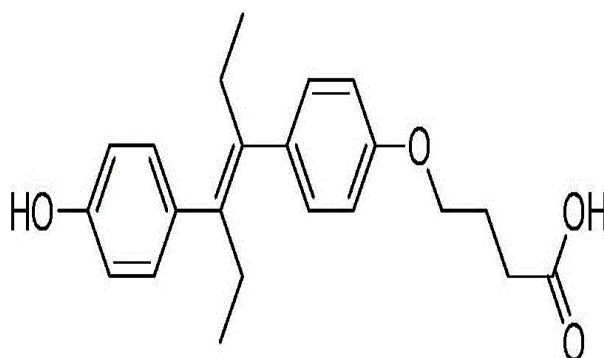
关畅
王春霞

外部链接

[Espacenet](#) [SIPO](#)

摘要(译)

本发明公开了一种己烯雌酚人工抗原及其制备的抗体。己烯雌酚半抗原，其结构式如式I所示。既保留了DES分子原有的立体结构，又有利于特异性抗体的产生。己烯雌酚人工抗原，它为式I所示化合物与载体蛋白的偶联物。本发明还提供了以该己烯雌酚人工抗原为免疫原制备得到的抗体，及一种检测己烯雌酚的试剂盒，它包括己烯雌酚半抗原和/或己烯雌酚人工抗原和/或抗体。



式I。