



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103172728 A

(43) 申请公布日 2013.06.26

(21) 申请号 201110440578.5

(22) 申请日 2011.12.26

(71) 申请人 中国人民解放军军事医学科学院卫
生学环境医学研究所

地址 300050 天津市和平区大理道一号

(72) 发明人 宁保安 柳明 彭媛 连璐
高志贤 孙思明 白家磊 张亦红

(51) Int. Cl.

C07K 14/765 (2006.01)

C07K 16/44 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

权利要求书1页 说明书3页 附图2页

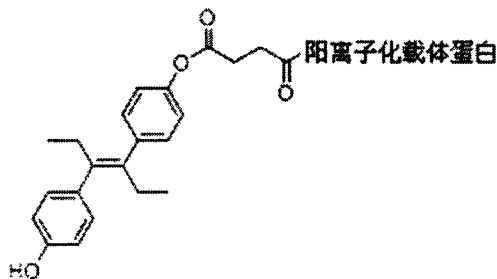
(54) 发明名称

己烯雌酚阳离子化完全抗原制备方法及其用途

(57) 摘要

本发明公开了一种己烯雌酚阳离子化完全抗原的制备方法及其用途,属于生物化工技术领域,本发明合成了阳离子化的载体蛋白,利用EDC法与羧基化的己烯雌酚偶联,经质谱鉴定及SDS-PAGE分析成功合成了阳离子化的己烯雌酚人工完全抗原,制备方法简单有效,成本低廉,相对于天然载体蛋白,阳离子化的完全抗原作为免疫原时,被免疫的小鼠机体能产生更高水平的免疫应答,合成的人工完全抗原可以应用于制备特异识别己烯雌酚的高效抗体与研制快速检测己烯雌酚的免疫速测试剂盒。

1. 一种己烯雌酚阳离子完全抗原,具有式 I 结构:



2. 式 I 结构的一种己烯雌酚阳离子化完全抗原的制备方法,由如下步骤组成:

(1) 阳离子化载体蛋白的合成及鉴定在冰浴条件下,将 670 μ L 乙二胺 (EDA) 滴加到 670 μ L 乙烷磺酸偶联缓冲液 (MES),用 4M HCl 调 pH 值至 4.75 左右,此为 A 液;先后将载体蛋白的 MES 溶液 (50mg 溶解于 500mL)、EDC 的 MES 溶液 (30mg 溶解于 500 μ L) 滴加至冰浴中的 A 液中;室温磁力搅拌反应 2h,加入醋酸 (约 400 μ L) 终止;去离子水透析 72h,冻干备用;

(2) 己烯雌酚阳离子完全抗原的合成采用 EDC 法,具体操作步骤如下:称取己烯雌酚半琥珀酸酯 10.0mg、EDC 7.8mg、NHS 3.7mg,溶于 2mL N,N-二甲基甲酰胺 (DMF) 中,室温震荡搅拌反应 8h,此为 A 液;按阳离子蛋白:小分子=1:40 投料比准确称取阳离子化蛋白溶于 2mL PBS 中,此为 B 液,将 A 液用 2mL PBS 稀释后,在震荡器上将 A 液逐滴加至 B 液,4 $^{\circ}$ C 缓慢搅拌过夜,将反应液在 PBS (0.01mol/L、pH 7.4) 中透析 3 天。

己烯雌酚阳离子化完全抗原制备方法及其用途

技术领域

[0001] 本发明涉及一种己烯雌酚阳离子化完全抗原制备方法,属于生物化工技术领域,用于制备特异识别化学兽药己烯雌酚的高效抗体与研制可以快速检测己烯雌酚残留的免疫速测试剂盒。

背景技术

[0002] 己烯雌酚 (Diethylstilbestrol, DES),又名乙烯雌酚、乙蔗酚,化学名为 1,2-双(4-羟苯基)-1,2-二乙基乙烯,1938年由 Dodds 在英国伦敦合成,DES 是一种具有酚羟基结构的人工合成的非甾体雌性激素,为无色结晶或白色结晶性粉末,几乎无臭无味,几乎不溶于水,溶于乙醇、氯仿、乙醚、脂肪油、稀氢氧化钠等,熔点 169 ~ 172℃。

[0003] 己烯雌酚在兽医临床上主要用于发情不明显动物的催情,还可用于治疗子宫炎、胎衣不下、排出死胎等。DES 曾作为促生长剂而广泛应用于畜禽生产中,这是由于其在促进动物蛋白质的合成代谢、减少脂肪和提高动物日增重等方面效果明显。国际癌症研究机构 (IARC) 研究发现,DES 是一种致癌物质,会对人体健康产生严重危害,甚至可诱发人体产生癌变。与致癌性关系最密切的是女性阴道和子宫颈透明细胞腺癌 (CCA),这种病过去只发生在中老年妇女中,但到 20 世纪 70 年代以后 CCA 的发病率在年轻女性中有所增加。Herbst 等的调查结果中发现年龄和出生年份是影响患透明细胞腺癌风险的主要因素,而 Kinch 等的研究中也发现大多数病患都与其母亲在妊娠早期服用过 DES 有关。此外,DES 还会导致乳腺癌和子宫内膜癌等,现在大多数女孩月经初潮明显提前也与 DES 有关。

[0004] 己烯雌酚作为一种饲料添加剂,能够在动物源性食品(肝脏、肌肉、蛋、奶)中残留,并通过食物链危害人体健康,因此世界各国开始关注 DES 残留控制。早在 1981 年,欧盟理事会在 81/602 号指令中制订的第一批欧盟禁用兽药清单中就包括了己烯雌酚。美国也颁布禁令,将己烯雌酚列为禁止在食品动物中使用的兽药。我国在 1999 年制定的《中华人民共和国动物及动物源食品残留监控计划》中规定在动物性食品中不得检出己烯雌酚,2002 年又发布了《食品动物禁用的兽药及其它化合物清单》,禁止己烯雌酚及其盐、酯制剂以任何用途用于所有食品动物。然而,由于巨大经济利益的驱使,养殖户违禁添加己烯雌酚的情况依然存在,严重影响我国水产品、畜产品在国际上的声誉,造成重大经济损失的同时也给人们的健康带来隐患。因此,为了确保我国畜牧水产品出口贸易的畅通和动物食品的安全,建立针对己烯雌酚的快速、灵敏的检测技术成为当务之急。

发明内容

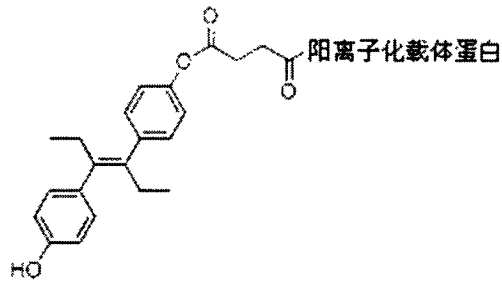
[0005] 本发明的第一个目的提供一种己烯雌酚阳离子化完全抗原。

[0006] 本发明的第二个目的提供一种己烯雌酚阳离子化完全抗原的制备方法。

[0007] 本发明的技术方案概述如下:

[0008] 一种己烯雌酚阳离子化完全抗原,具有式 I 结构:

[0009]



(I)

[0010] 式 I 结构的一种己烯雌酚阳离子化完全抗原的制备方法,由如下步骤组成:

[0011] 1. 阳离子化载体蛋白的合成及鉴定在冰浴条件下,将 670 μ L 乙二胺 (EDA) 滴加到 670 μ L 乙烷磺酸偶联缓冲液 (MES),用 4M HCl 调 pH 值至 4.75 左右,此为 A 液;先后将载体蛋白的 MES 溶液 (50mg 溶解于 500ml)、EDC 的 MES 溶液 (30mg 溶解于 500 μ L) 滴加至冰浴中的 A 液中;室温磁力搅拌反应 2h,加入醋酸 (约 400 μ L) 终止;去离子水透析 72h,冻干备用。

[0012] 2. 己烯雌酚阳离子化完全抗原的合成采用 EDC 法,具体操作步骤如下:称取己烯雌酚半琥珀酸酯 10.0mg、EDC 7.8mg、NHS 3.7mg,溶于 2mL N,N-二甲基甲酰胺 (DMF) 中,室温振荡搅拌反应 8h,此为 A 液;按阳离子化蛋白:小分子=1:40 投料比准确称取阳离子化蛋白溶于 2mL PBS 中,此为 B 液,将 A 液用 2mL PBS 稀释后,在振荡器上将 A 液逐滴加至 B 液,4 $^{\circ}$ C 缓慢搅拌过夜,将反应液在 PBS (0.01mol/L、pH 7.4) 中透析 3 天。

[0013] 本发明的有益效果:相对于天然载体蛋白,阳离子化的完全抗原作为免疫原时,被免疫的小鼠机体能产生更高水平的免疫应答,这是因为阳离子化的载体蛋白的正电性使得完全抗原更容易与带负电性的抗原递呈细胞结合,从而提高了抗原提呈效率,而且由于增加伯胺数量而提供了更大量的使用典型交联方法可被交联的抗原分子,因此也增加了 DES-HS 与载体蛋白偶联的几率,从而提高了针对 DES 抗体产生的几率。

附图说明

[0014] 图 1 阳离子化 BSA (cBSA) 合成路线示意图

[0015] 图 2 BSA 与 cBSA 的紫外吸收图谱

[0016] 图 3 己烯雌酚阳离子化完全抗原的 SDS-PAGE 电泳,1:BSA,2:DES-HS-BSA,3:DES-HS-cBSA,4:cBSA

[0017] 图 4 DES-cBSA 的质谱鉴定图,其中上图为 cBSA,下图为 DES-cBSA

[0018] 其中上图为 cBSA 的质谱图,所测质荷比为 66666.21;下图为 DES-cBSA 的质谱图,其质荷比为 70853.03,相较于 BSA 的峰其分子量增大了 4185.82。因其偶联的半抗原的分子量约为 367,故其偶联上的半抗原约为 11.4 个,即偶联比 cBSA/DES = 1/11.4。基于以上质谱结果可以确证己烯雌酚阳离子化完全抗原偶联成功。图 5 DES-BSA 与 DES-cBSA 作为免疫原产生的抗体效价图,相比较而言,小鼠对 DES-cBSA 的免疫应答水平要显著高于 DES-BSA。

具体实施方式

[0019] 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剂与材料,如无特殊说明,均可从常规试剂公司购买得到。

[0020] 本发明的技术方案:一种己烯雌酚阳离子化完全抗原的制备方法:

[0021] 实施例 1 cBSA 的制备和鉴定

[0022] 在冰浴条件下,将 670 μ L 乙二胺 (EDA) 滴加到 670 μ L 乙烷磺酸偶联缓冲液 (MES),用 4M HCl 调 pH 值至 4.75 左右,此为 A 液;先后将 BSA 的 MES 溶液 (50mg 溶解于 500mL)、EDC 的 MES 溶液 (30mg 溶解于 500 μ L) 滴加至冰浴中的 A 液中;室温磁力搅拌反应 2h,加入醋酸 (约 400 μ L) 终止;去离子水透析 72h,冻干备用。合成路线如图 1 所示,通过紫外分光光度计对其进行鉴定,与 BSA 相比,cBSA 的最大吸收峰发生了蓝移 (图 2)。

[0023] 实施例 2 己烯雌酚阳离子化完全抗原的制备与鉴定

[0024] 采用 EDC 法,准确称取己烯雌酚半琥珀酸酯 (本实验室制备) 10.0mg、EDC 7.8mg、NHS 3.7mg,溶于 2mL N,N-二甲基甲酰胺 (DMF) 中,室温避光震荡反应 8h,此为 A 液;准确称取 cBSA 46.2mg,溶解于 3mL PBS (pH = 7.4) 中,此为 B 液;剧烈震荡下将 A 液缓慢滴加至 B 液,4 $^{\circ}$ C 震荡反应过夜;反应完成后,将反应液用 PBS 于 4 $^{\circ}$ C 透析 72h,每 4-6h 换液一次,以相同方法制备 DES-HS-BSA 作为对照。采用 SDS-PAGE 电泳从分子量的角度对其进行鉴定,可以看到 cBSA-DES 条带明显滞后 BSA (图 3),采用质谱法鉴定并估算小分子与载体蛋白的偶联比 (图 4)。

[0025] 实施例 3 己烯雌酚阳离子化完全抗原的动物免疫

[0026] 选取雌性 6-7 周 SPF 级 Balb/C 小鼠 12 只,随机分为两组,分别用 DES-BSA 和 DES-cBSA 免疫。首次免疫将免疫原与等量的弗氏完全佐剂混匀乳化,腹腔单点注射,免疫剂量为 120 μ g/只,此后每隔 10 天用免疫原与等量弗氏不完全佐剂混匀乳化进行加强免疫,免疫剂量逐次递增。间接 ELISA 法测定血清中抗体效价 (图 5)。

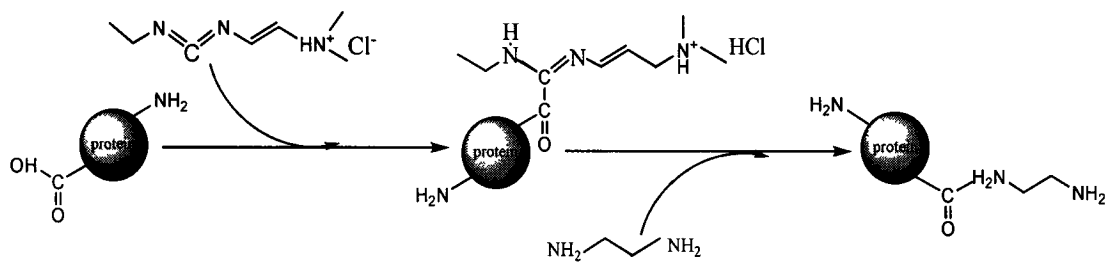


图 1

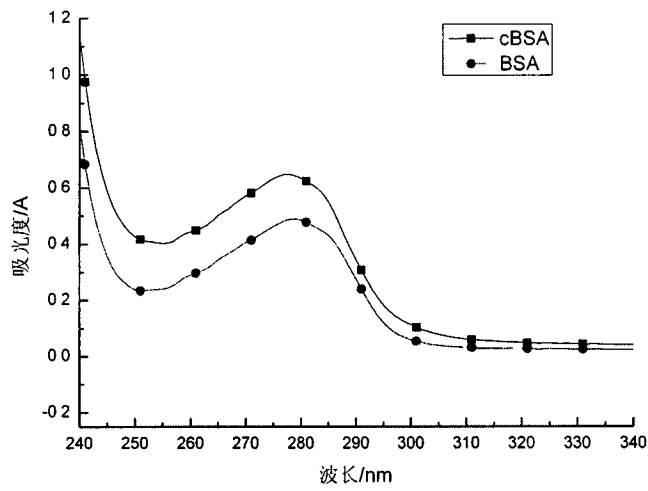


图 2



图 3

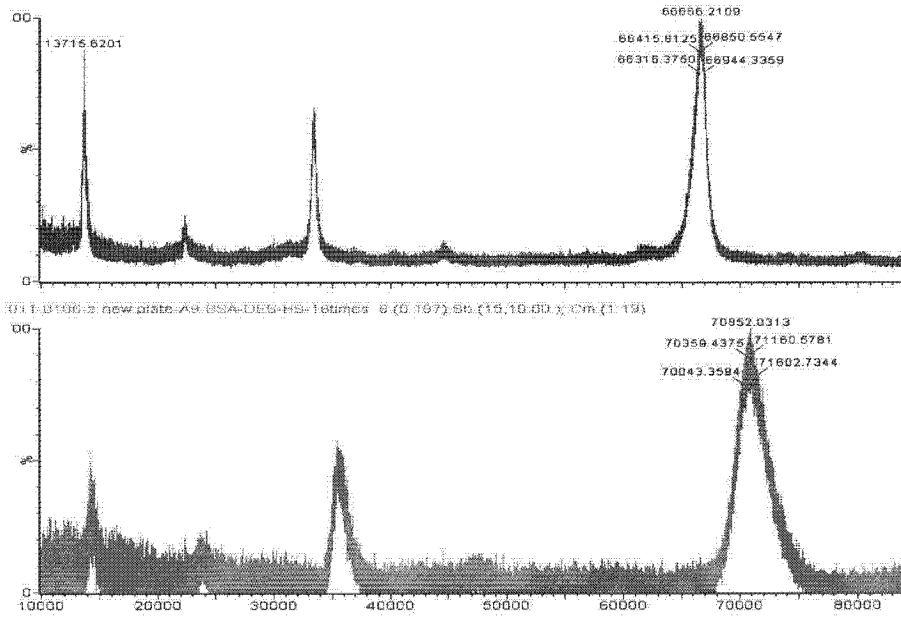


图 4

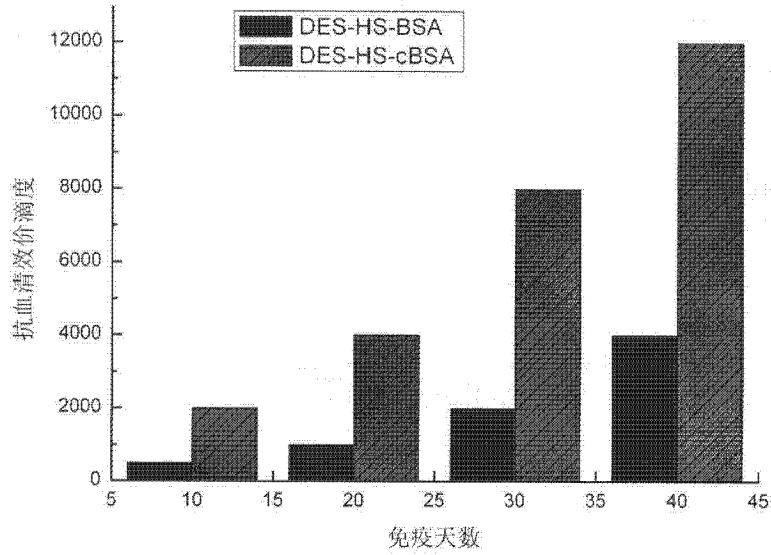
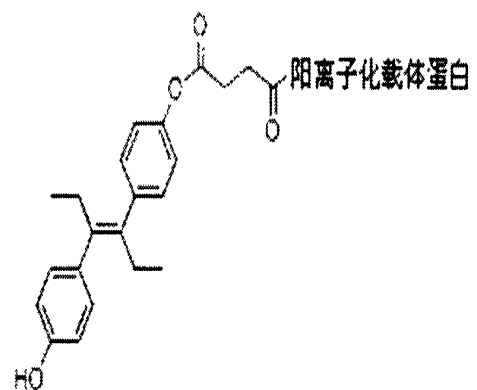


图 5

专利名称(译)	己烯雌酚阳离子化完全抗原制备方法及其用途		
公开(公告)号	CN103172728A	公开(公告)日	2013-06-26
申请号	CN201110440578.5	申请日	2011-12-26
[标]申请(专利权)人(译)	中国人民解放军军事医学科学院卫生学环境医学研究所		
申请(专利权)人(译)	中国人民解放军军事医学科学院卫生学环境医学研究所		
[标]发明人	宁保安 柳明 彭媛 连璐 高志贤 孙思明 白家磊 张亦红		
发明人	宁保安 柳明 彭媛 连璐 高志贤 孙思明 白家磊 张亦红		
IPC分类号	C07K14/765 C07K16/44 G01N33/53		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种己烯雌酚阳离子化完全抗原的制备方法及其用途，属于生物化工技术领域，本发明合成了阳离子化的载体蛋白，利用EDC法与羧基化的己烯雌酚偶联，经质谱鉴定及SDS-PAGE分析成功合成了阳离子化的己烯雌酚人工完全抗原，制备方法简单有效，成本低廉，相对于天然载体蛋白，阳离子化的完全抗原作为免疫原时，被免疫的小鼠机体能产生更高水平的免疫应答，合成的人工完全抗原可以应用于制备特异识别己烯雌酚的高效抗体与研制快速检测己烯雌酚的免疫速测试剂盒。



(I)