



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102079786 A

(43) 申请公布日 2011.06.01

(21) 申请号 201010556432.2

赵素君 文豪

(22) 申请日 2010.11.24

(51) Int. Cl.

(71) 申请人 叶健强

C07K 16/18 (2006.01)

地址 610066 四川省成都市锦江区牛沙路 7 号

G01N 33/53 (2006.01)

申请人 严玉宝

谢晶

余华

廖党金

胡娟

李江凌

陈世界

曹冶

周岷江

李红

崔鹏博

赵素君

文豪

(72) 发明人 叶健强 严玉宝 谢晶 余华

廖党金 胡娟 李江凌 陈世界

曹冶 周岷江 李红 崔鹏博

权利要求书 1 页 说明书 5 页

(54) 发明名称

一种恩拉霉素完全抗原的合成方法

(57) 摘要

一种恩拉霉素完全抗原的合成方法,属于有机化学及免疫化学技术领域。本发明以恩拉霉素为半抗原,用戊二醛法将其与载体蛋白 BSA 偶联,用分光光度法测定偶联物的偶联比。本发明成功合成了恩拉霉素的人工抗原,合成步骤简洁,有效,完全用于酶免疫分析,为相关的酶免疫分析的检测快速、操作简便、降低成本提供技术基础。

1. 恩拉霉素完全人工抗原的合成：

配制 A 液：称取 71.64g 磷酸氢二钠 ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)，用重蒸水配制成 1000mL 溶液，浓度为 0.2mol/L，置于 4℃ 下保存备用；

配制 B 液：称取 31.21g 磷酸二氢钠 (NaH_2PO_4)，用重蒸水配成 1000mL 溶液，浓度为 0.2mol/L，置于 4℃ 下保存备用；

配制 C 液：取 A 液 72.0mL、B 液 28.0mL 于 250mL 三角瓶中，配成 pH7.2 的磷酸盐缓冲溶液 (PBS)，置于 4℃ 下保存备用；

配制 D 液：用移液管吸取 0.25mL 戊二醛液体，将其配成 100mL 溶液，得 0.25% 的戊二醛溶液，置于 4℃ 下保存；

配制 E 液：配制含碳酸钠 (Na_2CO_3) 10g/L 及乙二胺四乙酸二钠 (EDTA) 1mol/L 的碱性 EDTA 溶液，置于 4℃ 下保存，以备处理透析袋；

称取恩拉霉素 20mg 盛于 100mL 锥形瓶中，称取牛血清蛋白 BSA 20mg 于 5 号试管中。向试管中加入 C 溶液约 3mL，待牛血清蛋白 BSA 完全溶解后转移到有恩拉霉素的锥形瓶中，再用 C 溶液洗涤试管，将牛血清蛋白 BSA 完全移入锥形瓶，共用 C 溶液 10mL。待恩拉霉素基本溶解后，向锥形瓶中加入 1,4- 二氧六环 10mL，混匀。将磁力搅拌器放入反应器后把锥形瓶放在一个含少量水的大烧杯中，再将烧瓶置于 25℃ 水浴，开启搅拌器，约 5min 后，保持搅拌状态，向反应器内逐滴加入 D 溶液 5mL，滴加完毕后仍保持搅拌状态，反应 4h，即得恩拉霉素完全抗原混合液；

透析袋前处理：取 20cm 的透析袋，将其置于 E 溶液中，于沸水中煮沸 30min，稍冷后用蒸馏水冲洗 3min 将其洗净，另取 100cm 长的棉线一根，用其一端将透析袋的一端扎紧，保证不会漏液，保存在 4℃ 去离子水中备用；

透析：将恩拉霉素完全抗原混合液由漏斗口转移至透析袋内，且将透析袋封口，悬于盛有适量蒸馏水的大烧杯中，在 4℃ 冰箱内开始透析，透析 72h，每天换水 2 次，最后使用冷冻干燥法将透析袋中的液体制成粉末，即得到恩拉霉素完全抗原：恩拉霉素 - 牛血清白蛋白；

2. 恩拉霉素完全人工抗原的鉴定：恩拉霉素完全人工抗原采用分光光度法鉴定其偶联结果，利用牛血清蛋白标准液得到标准曲线，从曲线上比对得到抗原溶液的蛋白浓度，计算摩尔吸光系数数 ϵ ，再测定恩拉霉素完全人工抗原的偶联比。

一种恩拉霉素完全抗原的合成方法

技术领域

[0001] 一种恩拉霉素完全抗原的合成方法,本发明属于有机化学及免疫化学技术领域,本发明合成的恩拉霉素完全抗原用于制备特异性识别化学兽药恩拉霉素的抗体和研制高效快速检测恩拉霉素微含量的免疫速测试剂盒。

背景技术

[0002] 抗生素发明以来,不仅在人类疾病的治疗和预防方面效果显著,同时在畜牧业饲料添加剂方面也发挥着巨大的作用。抗生素对动物的促生长作用是在 20 世纪 40 年代后期由 Stocktadt 等人发现,以后相继发现四环素类、大环内酯类、 β -内酰胺类等抗生素加入饲料中,都有促进生长、增重、增产、提高饲料报酬作用。1950 年美国 FDA 正式批准允许在饲料中添加抗生素。抗生素对于畜禽的生长和提高生产性能的作用是肯定的,而且很稳定,许多国家的畜禽业都长期应用抗生素添加剂。实践证明,合理地使用抗生素添加剂能促进畜禽生长,提高饲料转化率。同时也有报告显示,不允许在饲料中添加抗生素或其他抗菌促生长剂的国家,会造成畜牧业生产成本增加,盈利减少,也有可能引发诸如生态环境及国家之间的贸易战等问题。但为了避免由于抗生素的滥用引起耐药菌株大量繁殖或使药物在畜产品中的残留量增大,对畜禽生长及人体健康造成直接危害,应用畜禽专用的抗生素饲料添加剂已迫在眉睫。只有对其进行全面的认识并合理的应用,提高其应用水平,才能充分发挥其有利作用又能避免对人类健康造成危害。

[0003] 恩拉霉素,英文名称:Enramycin;中文名又称:恩来霉素、恩霉素、安来霉素、持久霉素,其主要成分是恩拉霉素 A: $C_{107}H_{138}N_{26}O_{31}C_{12}$ $R = CH_3$ 和恩拉霉素 B: $C_{108}H_{140}N_{26}O_{31}C_{12}$ $R = C_2H_5OH$ 。本品是由日本武田药品研究所于 1966 年由土壤中分离出来的放线菌 (*Streptomyces fungicidius* NO. B5477) 经发酵产生的一种由不饱和脂肪酸和上二种氨基酸结合而成的多肽类 (Polypeptide) 抗生素,并因其强大的杀菌作用而被称之为 Enduracidin。该药品于 1973 年正式在日本获得批准为抗生素饲料添加剂,应用至今;于 1993 年该药在中国登记注册,并开始应用,由于该药品具有不被肠道降解吸收可保持原有抗菌活性,临床试验时与现有抗生素或抗菌药间无交叉耐药性等优点,现今应用已经相当广泛,尤其是在鸡和猪的饲养中,应用形式主要为预混剂 (4%~8%),2007 年使用量已达上千吨。

[0004] 作为饲料添加剂恩拉霉素有如下优点:

[0005] 1. 临床应用研究方面,与其他抗生素添加剂相比,用量少的情况下饲料系数更低,生长速度更快,并能改善畜牧业的商品性能。

[0006] 2. 药效学研究方面,恩拉霉素对主要的革兰氏阳性菌都具有强大的杀菌作用。恩拉霉素对乙肝病毒 (HBV) 抗原有较强的抑制作用,对乙肝 e 抗原 (HBeAg) 也有较好的抑制效果。因此对 HBVDNA 及抗原都有较好的抑制作用。恩拉霉素与临床上现有的抗生素或抗菌药之间不存在交叉耐药性。敏感菌几乎不对恩拉霉素产生耐药性,在实验条件下,耐药性的产生也非常缓慢,即使出现,耐药性也不稳定,而且极易丢失。

- [0007] 3. 药物残留研究方面,恩拉霉素内服极不易被吸收,药物主要通过粪便排出体外。
- [0008] 4. 毒理学研究方面,恩拉霉素毒性很低;急性毒性实验表明,恩拉霉素在口服、皮下或肌肉注射给药时实际无毒。
- [0009] 5. 恩拉霉素的盐酸盐对热、光照和潮湿有极好的稳定性。恩拉霉素在饲料中具有很高的稳定性,在室温条件下长期储藏很少降解,在制成颗粒料过程中也非常稳定,与饲料混合后在室温下长期储藏效价下降甚微。恩拉霉素在肠道内不被降解,能够保持原有的抗菌活性。
- [0010] 随着人们生活水平的提高以及对滥用抗生素的防范意识的提高,逐渐关注日益广泛应用的恩拉霉素在残留量方面的危害,尤其对动物源性食品中的残留量,为此各国均在进出口贸易中对其添加剂的成分和含量均有严格限定。
- [0011] 目前,酶联免疫法(ELISA)基于抗原抗体反应和酶化学反应,具有灵敏、快速、简便、特异性好、样品需求少,对昂贵仪器以及专业操作人员的依赖程度较低等优点,非常适于现场监控和样品的批量检测,而且酶联免疫法的操作过程所需试剂大部分为无机化学试剂,且用量较少,因此该法环境友好型检测方法。但现在国内外尚未有理想的针对恩拉霉素残留免疫检测方法的报道,仅日本厚生省对该项残留物质有畜、水产性食品有常规检测技术报道。为了弥补这一空白,有必要设计和制备以恩拉霉素自身为半抗原(仅具有免疫反应性而不具有免疫原性的小分子化合物)与载体蛋白偶联形成恩拉霉素既具有免疫原性又具有免疫反应性的完全抗原,在此基础上才能建立相关的酶联免疫检测方法。

发明内容

[0012] 本发明的目的是提供了一种恩拉霉素完全抗原的合成方法,将该完全抗原用于动物体恩拉霉素残留量及免疫检测上,具有检测快速、操作简便、成本低的优点。

[0013] 本发明的技术方案:一种恩拉霉素完全抗原的合成方法,以恩拉霉素为半抗原,用戊二醛法将其与牛血清蛋白(BSA)或卵清蛋白(OVA)偶联,用分光光度法测定偶联物的偶联比;步骤为:

[0014] (1) 恩拉霉素完全人工抗原的合成:

[0015] 配制A液:称取71.64g磷酸氢二钠($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$),用重蒸水配制成1000mL溶液,浓度为0.2mol/L,置于4℃下保存备用;

[0016] 配制B液:称取31.21g磷酸二氢钠(NaH_2PO_4),用重蒸水配成1000mL溶液,浓度为0.2mol/L,置于4℃下保存备用;

[0017] 配制C液:取A液72.0mL、B液28.0mL于250mL三角瓶中,配成pH7.2的磷酸盐缓冲溶液(PBS),置于4℃下保存备用;

[0018] 配制D液:用移液管吸取0.25mL戊二醛液体,将其配成100mL溶液,得0.25%的戊二醛溶液,置于4℃下保存;

[0019] 配制E液:配制含碳酸钠(Na_2CO_3)10g/L及乙二胺四乙酸二钠(EDTA)1mol/L的碱性EDTA溶液,置于4℃下保存,以备处理透析袋;

[0020] 称取恩拉霉素20mg盛于100mL锥形瓶中,称取牛血清蛋白BSA20mg于5号试管中。向试管中加入C溶液约3mL,待牛血清蛋白BSA完全溶解后转移到有恩拉霉素的锥形瓶中,再用C溶液洗涤试管,将牛血清蛋白BSA完全移入锥形瓶,共用C溶液10mL。待恩拉霉素基

本溶解后,向锥形瓶中加入 1,4- 二氧六环 10mL,混匀。将磁力搅拌器放入反应器后把锥形瓶放在一个含少量水的大烧杯中,再将烧瓶置于 25℃ 水浴,开启搅拌器,约 5min 后,保持搅拌状态,向反应器内逐滴加入 D 溶液 5mL,滴加完毕后仍保持搅拌状态,反应 4h,即得恩拉霉素完全抗原混合液;

[0021] 透析袋前处理:取 20cm 的透析袋,将其置于 E 溶液中,于沸水中煮沸 30min,稍冷后用蒸馏水冲洗 3min 将其洗净,另取 100cm 长的棉线一根,用其一端将透析袋的一端扎紧,保证不会漏液,保存在 4℃ 去离子水中备用;

[0022] 透析:将恩拉霉素完全抗原混合液由漏斗口转移至透析袋内,且将透析袋封口,悬于盛有适量蒸馏水的大烧杯中,在 4℃ 冰箱内开始透析,透析 72h,每天换水 2 次,最后使用冷冻干燥法将透析袋中的液体制成粉末,即得到恩拉霉素完全抗原:恩拉霉素-牛血清白蛋白;

[0023] (2) 恩拉霉素完全抗原的鉴定:恩拉霉素完全抗原采用分光光度法鉴定其偶联结果,利用牛血清蛋白标准液得到标准曲线,从曲线上比对得到抗原溶液的蛋白浓度,计算摩尔吸光系数 ϵ ,再测定恩拉霉素完全抗原的偶联比。

[0024] 偶联比测定:是估算偶联物中被偶联的两种分子的比率(偶联比率)的方法,虽然测定方法种类很多,但都是依据检测偶联物中被偶联的两种分子含量(或相对含量)的原理建立起来的。分光光度法是利用物质对光的吸收与其浓度呈比例关系的原理分别测定被偶联的两种分子浓度。在大分子与小分子偶联物中,两种分子均有各自不同的紫外扫描光谱,并表现出光谱图迭加的性质。

[0025] 摩尔吸光系数 ϵ :用 pH = 7.2 的 PBS 溶液配制恩拉霉素系列标准浓度,通过紫外扫描可知恩拉霉素的吸收波长为 278nm,在 278nm 处测吸光值,每个浓度做平行样并计算摩尔吸光系数 ϵ 。

[0026] 偶联物蛋白浓度测定:配制系列标准浓度的牛血清蛋白溶液,采用考马斯亮蓝测定法,将每个浓度做平行样,在 595nm 处测吸光值,绘制蛋白浓度与吸光值的关系曲线。将抗原溶液按一定比例稀释,在 595nm 处测定抗原溶液的吸光值,从曲线上得到抗原溶液的相应的蛋白浓度。

[0027] 偶联比测定:用 pH = 7.2 的 PBS 溶液配制标准浓度的牛血清蛋白溶液,将偶联产物完全抗原用 pH = 7.2 的 PBS 溶液稀释至标准浓度,在 278nm 处测吸光值,以 pH = 7.2 的 PBS 溶液为空白,测出牛血清蛋白溶液的吸光值为 A₁,偶联产物的吸光值为 A₂,则偶联比率 r 为:
$$r = [(A_1 - A_2) / \epsilon] / (C / 67000)$$

[0028] 其中 ϵ 为摩尔吸光系数 ($L \cdot \text{mol}^{-1}$),67000 为牛血清蛋白的分子量,C 为牛血清蛋白浓度 ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)。

[0029] 本发明的有益效果:本发明成功合成了恩拉霉素的人工抗原,合成步骤简洁,有效,可完全用于免疫分析当中,为以后人们的研究提供了方便的途径,可以满足国内对其研究的需要。

具体实施方式

[0030] 实施例 1

[0031] (1) 恩拉霉素完全抗原的制备

[0032] 配制 A 液 :称取 71.64g 磷酸氢二钠 ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$),用重蒸水配制成 1000mL 溶液,浓度为 0.2mol/L,置于 4℃ 下保存备用 ;

[0033] 配制 B 液 :称取 31.21g 磷酸二氢钠 (NaH_2PO_4),用重蒸水配成 1000mL 溶液,浓度为 0.2mol/L,置于 4℃ 下保存备用 ;

[0034] 配制 C 液 :取 A 液 72.0mL、B 液 28.0mL 于 250mL 三角瓶中,配成 pH7.2 的磷酸盐缓冲溶液 (PBS),置于 4℃ 下保存备用 ;

[0035] 配制 D 液 :用移液管吸取 0.25mL 戊二醛液体,将其配成 100mL 溶液,得 0.25% 的戊二醛溶液,置于 4℃ 下保存 ;

[0036] 配制 E 液 :配制含碳酸钠 (Na_2CO_3) 10g/L 及乙二胺四乙酸二钠 (EDTA) 1mol/L 的碱性 EDTA 溶液,置于 4℃ 下保存,以备处理透析袋 ;

[0037] 称取恩拉霉素 20mg 盛于 100mL 锥形瓶中,称取牛血清蛋白 (BSA) 20mg 于 5 号试管中。向试管中加入 C 溶液约 3mL,待牛血清蛋白 (BSA) 完全溶解后转移到有恩拉霉素的锥形瓶中,再用 C 溶液洗涤试管,将牛血清蛋白 (BSA) 完全移入锥形瓶,共用 C 溶液 10mL。待恩拉霉素基本溶解后,向锥形瓶中加入 1,4- 二氧六环 10mL,混匀。将磁力搅拌器放入反应器后把锥形瓶放在一个含少量水的大烧杯中,再将烧瓶置于 25℃ 水浴,开启搅拌器,约 5min 后,保持搅拌状态,向反应器内逐滴加入 D 溶液 5mL,滴加完毕后仍保持搅拌状态,反应 4h,即得恩拉霉素完全抗原混合液 ;

[0038] 透析袋前处理 :取 20cm 的透析袋,将其置于 E 溶液中,于沸水中煮沸 30min,稍冷后用蒸馏水冲洗 3min 将其洗净,另取 100cm 长的棉线一根,用其一端将透析袋的一端扎紧,保证不会漏液,保存在 4℃ 去离子水中备用 ;

[0039] 透析 :将恩拉霉素完全抗原混合液由漏斗口转移至透析袋内,且将透析袋封口,悬于盛有适量蒸馏水的大烧杯中,在 4℃ 冰箱内开始透析,透析 72h,每天换水 2 次,最后使用冷冻干燥法将透析袋中的液体制成粉末,即得到恩拉霉素完全抗原 :恩拉霉素 - 牛血清白蛋白 ;

[0040] (2) 恩拉霉素完全抗原的鉴定 :恩拉霉素完全抗原采用分光光度法鉴定其偶联结果,利用牛血清蛋白标准液得到标准曲线,从曲线上比对得到抗原溶液的蛋白浓度,计算摩尔吸光系数 ϵ ,再测定恩拉霉素完全抗原的偶联比。

[0041] 偶联比测定 :是估算偶联物中被偶联的两种分子的比率 (偶联比率) 的方法,虽然测定方法种类很多,但都是依据检测偶联物中被偶联的两种分子含量 (或相对含量) 的原理建立起来的。分光光度法是利用物质对光的吸收与其浓度呈比例关系的原理分别测定被偶联的两种分子浓度,在大分子与小分子偶联物中,两种分子均有各自不同的紫外扫描光谱,并表现出光谱图迭加的性质。

[0042] 摩尔吸光系数 ϵ :用 pH = 7.2 的 PBS 溶液配制恩拉霉素系列标准浓度,通过紫外扫描可知恩拉霉素的吸收波长为 278nm,在 278nm 处测吸光值,每个浓度做平行样并计算摩尔吸光系数 ϵ 。

[0043] 偶联物蛋白浓度测定 :配制系列标准浓度的牛血清蛋白溶液,采用考马斯亮蓝测定法,将每个浓度做平行样,在 595nm 处测吸光值,绘制蛋白浓度与吸光值的关系曲线。将抗原溶液按一定比例稀释,在 595nm 处测定抗原溶液的吸光值,从曲线上得到抗原溶液的相应的蛋白浓度。

[0044] 偶联比测定:用 pH = 7.2 的 PBS 溶液配制标准浓度的牛血清蛋白溶液,将偶联产物完全抗原用 pH = 7.2 的 PBS 溶液稀释至标准浓度,在 278nm 处测吸光值,以 pH = 7.2 的 PBS 溶液为空白,测出牛血清蛋白溶液的吸光值为 A₁,偶联产物的吸光值为 A₂,则偶联比率 r 为: $r = [(A_1 - A_2) / \epsilon] / (C / 67000)$ 。

[0045] 其中 ϵ 为摩尔吸光系数 ($L \cdot \text{mol}^{-1}$),67000 为牛血清蛋白的分子量,C 为牛血清蛋白浓度 ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)。

专利名称(译)	一种恩拉霉素完全抗原的合成方法		
公开(公告)号	CN102079786A	公开(公告)日	2011-06-01
申请号	CN201010556432.2	申请日	2010-11-24
[标]申请(专利权)人(译)	严玉宝 谢晶 余华 胡娟 李江凌 陈世界 李红 赵素君 文豪		
申请(专利权)人(译)	严玉宝 谢晶 余华 胡娟 李江凌 陈世界 李红 赵素君 文豪		
当前申请(专利权)人(译)	严玉宝 谢晶 余华 胡娟 李江凌 陈世界 李红 赵素君 文豪		
[标]发明人	叶健强 严玉宝 谢晶 余华 廖党金 胡娟 李江凌 陈世界 曹冶 周岷江 李红 崔鹏博 赵素君 文豪		
发明人	叶健强 严玉宝 谢晶 余华		

廖党金
胡娟
李江凌
陈世界
曹冶
周岷江
李红
崔鹏博
赵素君
文豪

IPC分类号 C07K16/18 G01N33/53

CPC分类号 Y02P20/149

外部链接 [Espacenet](#) [SIPO](#)

摘要(译)

一种恩拉霉素完全抗原的合成方法，属于有机化学及免疫化学技术领域。本发明以恩拉霉素为半抗原，用戊二醛法将其与载体蛋白BSA偶联，用分光光度法测定偶联物的偶联比。本发明成功合成了恩拉霉素的人工抗原，合成步骤简洁，有效，完全用于酶免疫分析，为相关的酶免疫分析的检测快速、操作简便、降低成本提供技术基础。